



Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Σχολή Θετικών Επιστημών
Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βοτανικής

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μελέτη γονιδίων των οποίων τα προϊόντα αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη SBP (Selenium binding protein 1) του *Arabidopsis thaliana*»

ΕΙΡΗΝΗ- ΦΩΤΕΙΝΗ ΔΕΡΒΙΣΗ

Βιολόγος

Επιβλέπων: Ανδρέας Ρούσσης,

Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Φυσιολογίας Φυτών



Η διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε με υποτροφία του ΙΚΥ η οποία χρηματοδοτήθηκε από την Πράξη «ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ» από πόρους του ΕΠ «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», 2014-2020.

ΑΘΗΝΑ, 2021

«Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του ΕΚΠΑ δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα» (ν. 5343/1932, άρθρο 202).

«Το κείμενο της Διδακτορικής Διατριβής δεν αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.»

Μέλη της Τριμελούς Επιτροπής:

Ανδρέας Ρούσσης, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Φυσιολογίας Φυτών, ΕΚΠΑ (Επιβλέπων)

Κοσμάς Χαραλαμπίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας Ανάπτυξης Φυτών, ΕΚΠΑ

Κώστας Θάνος, Ομότιμος Καθηγητής Φυσιολογίας Φυτών, ΕΚΠΑ

Μέλη της Επταμελούς Επιτροπής:

Ανδρέας Ρούσσης, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Φυσιολογίας Φυτών, ΕΚΠΑ (Επιβλέπων)

Κοσμάς Χαραλαμπίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας Ανάπτυξης Φυτών, ΕΚΠΑ

Κώστας Θάνος, Ομότιμος Καθηγητής Φυσιολογίας Φυτών, ΕΚΠΑ

Σοφία Ριζοπούλου, Καθηγήτρια Φυσιολογίας Φυτών, ΕΚΠΑ

Βασίλειος Κουβέλης, Επίκουρος Καθηγητής Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, ΕΚΠΑ

Εμμανουήλ Φλεμετάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας Φυτών και Μικροοργανισμών, ΓΠΑ

Κωνσταντίνος Βλαχονάσιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Φυσιολογίας Φυτών, ΑΠΘ

Υπάρχει ένα σημείο όπου η υψηλή επιστήμη υπερβαίνει το τεχνολογικό επίπεδο και εισέρχεται στο ποιητικό.

Τομ Ρόμπινς, «Το Άρωμα του Ονείρου»

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε στον Τομέα Βοτανικής στο Τμήμα Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Τον κο Ανδρέα Ρούσση, Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Φυσιολογίας Φυτών, του Τομέα Βοτανικής, του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ, για την εμπιστοσύνη, την υπομονή και τη στήριξη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια, τις συμβουλές, εργαστηριακές αλλά και ζωής, που ήταν και θα είναι καθοριστικές.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, τον κο Κώστα Θάνο, Ομότιμο Καθηγητή Φυσιολογίας Φυτών και τον κο Κοσμά Χαραλαμπίδη, Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας Ανάπτυξης Φυτών του ΕΚΠΑ, οι οποίοι με τις συμβουλές και την καθοδήγησή τους με βοήθησαν να εξελιχθώ και να βελτιωθώ.

Ακόμα, το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών για την χορήγηση υποτροφίας εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής, χάρη στην οποία πραγματοποιήθηκε και ολοκληρώθηκε η μελέτη αυτή.

Επιπλέον, δε θα πρέπει να παραλείψω τον κο Βασίλειο Κουβέλη, Επίκουρο Καθηγητή Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, για την πολύτιμη βοήθεια του και την μετάδοση των γνώσεων του στις φυλογενετικές αναλύσεις.

Τους ερευνητές που με βοήθησαν στη συνεστιακή μικροσκοπία στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυτικών Επιστημών «Δημόκριτος» και στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Μιχάλης Ζαχαριάδης και Δέσποινα Μπερή, αντίστοιχα, καθώς επίσης και τα μέλη του εργαστηρίου του Αναπληρωτή Καθηγητή Εμμανουήλ Φλεμετάκη του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και ιδιαίτερα την Κατερίνα Κωλέττη για την φιλοξενία και την χρήση του εργαστηριακού τους εξοπλισμού.

Ακόμα, την Δρ Βαρβάρα Ποδιά, πιστή θαμώνας και συνεργάτης στο εργαστήριο, αλλά και όλα τα υπόλοιπα μέλη, Ορφέας, Μυρσίνη, Φίλιππος, Αμαλία, Βάσω που πέρασαν από αυτό, για την δημιουργία ενός ευχάριστου και φιλικού κλίματος.

Επίσης, όλα τα μέλη του Εργαστηρίου της Μικροβιολογίας, για την απλόχερη βοήθεια που έχουν προσφέρει και προσφέρουν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συνοδοιπόρους αυτών των τεσσάρων ετών, Γωγώ Παπαδάκη και Ανδρέα Μπερτσάτο, αλλά και όλους τους φίλους που στάθηκαν δίπλα μου, τους γονείς μου, Αναστασία και Γιώργο και τον αδερφό μου, Γιάννη που με ανέχονται και με στηρίζουν.

Περίληψη

Οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν σελήνιο (SBPs) είναι πρωτεΐνες με πολύ υψηλή συντήρηση και παρούσες σε όλα τα βασίλεια της ζωής. Στον άνθρωπο, οι μελέτες είναι πολυάριθμες και η σημασία τους στη διαδικασία ανάπτυξης κακοηθειών είναι ήδη γνωστή. Στους φυτικούς οργανισμούς έχει φανεί η συμμετοχή της SBP1 στην αντιμετώπιση βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων. Προηγούμενες μελέτες έχουν αποκαλύψει την πιθανή ικανότητα της SBP1 να αλληλεπιδρά με δεκατέσσερις στο σύνολό τους πρωτεΐνες που σχετίζονται με την μεταφορά πρωτεϊνών μέσω κυστιδίων, την μεμβρανική σύνθεση και τον οξειδωτικό έλεγχο του κυττάρου, υποδεικνύοντας την συμμετοχή της σε ένα νέο πρωτεϊνικό δίκτυο που σχετίζεται με την οξειδωτική καταπόνηση. Σκοπός της συγκεκριμένης διατριβής ήταν η επιβεβαίωση της ύπαρξης του πρωτεϊνικού δικτύου της SBP1 μέσω της μελέτης των πιθανών αλληλεπιδρώσεων πρωτεϊνών και της διερεύνησης των αλληλεπιδράσεών τους με αυτή. Έτσι, μελετήθηκαν λεπτομερώς δυο πρωτεΐνες που σχετίζονται με την μεταφορά πρωτεϊνών μέσω κυστιδίων (RD19c) και με την μεμβρανική σύνθεση (DALL3), ενώ μελετήθηκαν και άλλες τρεις πρωτεΐνες (GRXS14, GRXS16, SAH7) ως προς την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με την SBP1. Η φωσφολιπάση και η πρωτεάση μελετήθηκαν ως προς την ιστοειδική τους έκφραση, όπου η πρώτη εντοπίστηκε στον αγωγό ιστό της ρίζας, στα υδατόδια, στα καταφρακτικά κύτταρα και στο αγγειακό σύστημα των κοτυληδόνων και των πρώτων φύλλων, στο αγωγό σύστημα των ανθήρων, των πετάλων και των κερατίων και στο στίγμα, ενώ η δεύτερη στα καταφρακτικά κύτταρα, στα υδατόδια των κοτυληδόνων και των πρώτων φύλλων, στις τρίχες των πρώτων φύλλων, στον αγωγό ιστό της ρίζας και των πλάγιων ριζών, των πρώτων φύλλων και των κοτυληδόνων, των πετάλων και των ανθήρων καθώς και στη βάση των κερατίων και στους γυρεόκοκκους. Με αυτό τον τρόπο δείχτηκε ότι τα μεταγγραφα της DALL3 και της RD19c επάγονται στους ίδιους ιστούς με αυτούς της SBP1, όπως είναι το στίγμα, τα καταφρακτικά κύτταρα και η ρίζα. Επιπλέον, με την μελέτη του υποκυτταρικού τους εντοπισμού ανιχνεύθηκαν η φωσφολιπάση στα πλαστίδια που περιβάλλουν τον αγωγό ιστό και σε αυτά της ακραίας περιοχής της ρίζας, στις πλάγιες ρίζες και στους χλωροπλάστες των καταφρακτικών κυττάρων. Αντίστοιχα, η πρωτεάση εντοπίστηκε στην ακραία περιοχή της κεντρικής ρίζας και των πλάγιων ριζών αλλά και στις τρίχες των πρώτων φύλλων. Ως προς τα επίπεδα έκφρασης, εκτός από αυτές τις πρωτεΐνες, μελετήθηκε και το αλλεργιογόνο SAH7. Παρατηρήθηκε μια συνεχή έκφραση και για τις τρεις πρωτεΐνες με την φωσφολιπάση να έχει μέγιστο στον ιστό της ρίζας αρτιβλάστων 10 ημερών και στα άνθη και ελάχιστο στα αρτίβλαστα 10 ημερών και στα φύλλα ροζέτας. Η πρωτεάση παρουσίασε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στη ρίζα χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά και χαμηλότερα στα άνθη και στα φύλλα ροζέτας, ενώ η SAH7 είχε μέγιστο στις κοτυληδόνες και στο βλαστό αρτιβλάστων 10 ημερών και ελάχιστο στα φύλλα ροζέτας. Επιπρόσθετα, μελετήθηκαν και ως προς την επαγωγή τους στην παρουσία σεληνώδους, σεληνικού και καδμίου, όπου και οι τρεις παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα παρουσία σεληνώδους, υποδεικνύοντας την συμμετοχή τους στον μηχανισμό απόκρισης τουλάχιστον αυτής της μορφής σεληνίου. Ο αρχικός έλεγχος των αλληλεπιδράσεων πραγματοποιήθηκε στο σύστημα ζύμης δύο υβριδίων, όπου αποκαλύφθηκε η αλληλεπίδραση και των τεσσάρων πρωτεϊνών που ελέγχθηκαν με την SBP1. Στο ίδιο σύστημα δείχθηκε ότι τα πρώτα 175 αμινοξικά κατάλοιπα της SBP1 είναι απαραίτητα για την αλληλεπίδρασή της με την DALL3 και την RD19c, ενώ τα πρώτα 105 για την αλληλεπίδρασή της με την γλουταρεδοξίνη 14 και το αλλεργιογόνο SAH7. Τέλος, εντοπίστηκε η πρωτεάση RD19c σε κυστίδια, η φωσφολιπάση DALL3 σε δομές που εφάπτονται στους χλωροπλάστες και στα πλαστίδια

της ρίζας, τις γλουταρεδοξίνες GRXS14 και GRXS16 στους χλωροπλάστες, το αλλεργιογόνο SAH7 στο ενδοπλασματικό δίκτυο και την SBP1 στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα. Παρά τον διαφορετικό τους υποκυτταρικό εντοπισμό αποκαλύφθηκε ότι οι αλληλεπιδράσεις πραγματοποιούνται *in planta*. Η SBP1 αλληλεπιδρά με την DALL3 σε δομές που εφάπτονται στους χλωροπλάστες, με την RD19c στο κυτταρόπλασμα, την GRXS14 στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα, ενώ με την GRXS16 μόνο στο κυτταρόπλασμα και τέλος με το SAH7 στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η SBP1 έχει βρεθεί ότι συμμετέχει στις διαδικασίες αποτοξίνωσης του φυτού από την οξειδωτική καταπόνηση και από στην παρούσα διατριβή επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη του νέου πρωτεϊνικού δικτύου της SBP1, στο οποίο έχει κυρίαρχο ρόλο και σχετίζεται με την απόκριση του φυτού στην οξειδωτική καταπόνηση.

Abstract

Selenium binding proteins (SBPs) are highly conserved and have representatives in all life kingdoms. In humans, many studies have demonstrated SBP1 importance in cancer development. In plants, SBP1 participates in biotic and abiotic stress responses. Previous studies have revealed its ability to interact with 14 proteins related to protein trafficking, membrane synthesis and redox control, indicating its participation in a novel protein network linked to oxidative stress. The aim of this thesis was to confirm the existence of the SBP1 network by studying the interacting proteins in the model plant *Arabidopsis thaliana*. Thus, two proteins related to protein trafficking (RD19c) and membrane synthesis (DALL3) were studied, while GRXS14, GRXS16 and SAH7 were additionally investigated for their ability to interact with SBP1. The phospholipase DALL3 and the protease RD19c were initially studied for tissue-specific expression, with the first one expressed in the root cylinder, hydathodes, guard cells, vasculature of cotyledons, first emerging leaves, sepals, siliques and anthers and in the stigma, while RD19c was expressed in guard cells, hydathodes, leaf trichomes, vasculature tissues of roots, lateral roots, first emerging leaves, cotyledons, sepals, anthers as well as in the silique base and in pollen. In these analyses it was shown that the transcripts of DALL3 and RD19c are expressed in the same tissues with those of SBP1, such as guard cells, stigma and root. Moreover, in subcellular analysis the phospholipase DALL3 was detected in the chloroplasts of the guard cells, in plastids of the root apex and the central root and in the lateral root primordia. Similarly, the protease localized in the root apex of the central and lateral roots and leaf trichomes. The relative expression levels were studied also in the allergen SAH7. The expression levels of these proteins were constitutive, with the highest expression in 10-day-old roots and flowers for DALL3 and minimum in 10-days-old seedlings and rosette leaves. The protease exhibited its highest expression levels in roots with no statistical significance difference and the lowest expression was in flowers and rosette leaves, while SAH7 was upregulated in cotyledons and shoots and downregulated in rosette leaves. Furthermore, the respective genes were studied for their induction in the presence of selenite, selenate and cadmium, and were highly expressed after selenite treatment, indicating their participation in the response mechanism related at least to this chemical compound. The initial investigation of protein-protein interactions was accomplished in yeast two-hybrid assay, which revealed the interaction of the four proteins with SBP1. In the same system, it was showed that the first 175 amino acids of SBP1 are crucial for its interaction with the DALL3 and RD19c, whereas the 105 with the GRXS14 and SAH7. Finally, the protease RD19c was detected in vesicles, the phospholipase DALL3 in speckle-like structures attached to chloroplasts and in root plastids, the glutaredoxins GRXS14 and GRXS16 in chloroplasts, the allergen SAH7 in the endoplasmic reticulum and the SBP1 in cytoplasm and nucleus. Despite their different subcellular localization we revealed that these interactions can take place *in planta*. SBP1 interacts with the DALL3 in speckle-like structures attached to the chloroplasts and in root plastids, with the RD19c in cytoplasm, GRXS14 in the cytoplasm and nucleus, GRXS16 only in cytoplasm and lastly SAH7 in the endoplasmic reticulum. SBP1 is known for its participation in plant detoxification procedures against oxidative stress and our study confirms the existence of a novel protein network, where SBP1 exhibits the main role and is related to plant responses against oxidative stress.

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	9
1. Εισαγωγή	16
1.1 Το σελήνιο (Selenium, Se).....	17
1.1.1 Μεταφορά σεληνίου και ο μεταβολισμός του	19
1.2 Το κάδμιο (Cadmium, Cd)	21
1.2.1 Μεταφορά καδμίου, τοξικότητα και αποκρίσεις	21
1.3 Οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν σελήνιο (Selenium binding proteins, SBPs).....	24
1.3.1 Δομή της SBP1.....	24
1.3.2 Η SBP1 στον άνθρωπο	25
1.3.3 Η SBP1 στα φυτά.....	27
1.3.4 Οι SBPs στο <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
1.4 Οι φωσφολιπάσες.....	31
1.4.1 Οι φωσφολιπάσες A1	31
1.4.2 Δομή των φωσφολιπασών.....	33
1.4.3 Η φωσφολιπάση PLA1-ly2 (DAD1-LIKE LIPASE 3, DALL3, AT2G30550)	33
1.5 Οι πρωτεάσες.....	34
1.5.1 Πρωτεάσες κυστεΐνης όμοιες με παπαΐνη (Papain-Like Cysteine Proteases, PLCP)	35
1.5.2 Δομή υπο-οικογένειας πρωτεασών όμοιες με RD19A	35
1.5.3 Γονίδιο απόκρισης στην αφυδάτωση (Response to dehydration 19C (RD19c, AT4G16190)	36
1.6 Οι γλουταρεδοξίνες (GRXs).....	37
1.6.1 Δομή γλουταρεδοξινών	40
1.6.2 Οι γλουταρεδοξίνες στον άνθρωπο.....	40
1.6.3 Οι γλουταρεδοξίνες στα φυτά	41
1.6.4 Οι γλουταρεδοξίνες <i>AtGRXS14</i> (CXIP1, AT3G54900) και <i>AtGRXS16</i> (CXIP2, AT2G38270) .	42
1.7 Η οικογένεια των αλλεργιογόνων της γύρης Ole e 1	43
1.7.1 Δομή της αυτοτελούς δομικής περιοχής Ole.....	44
1.7.2 Το αλλεργιογόνο SAH7 (AT4G08685)	44

2.	Υλικά και Μέθοδοι.....	45
2.1	Καλλιέργειες <i>Escherichia coli</i> και <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	46
2.2	Αποθήκευση <i>Escherichia coli</i> και <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (stock -80°C).....	48
2.3	Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	48
2.4	Πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	49
2.5	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια <i>Escherichia coli</i> , Miniprep (Birnboim and Doly, 1979).....	50
2.6	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια <i>Escherichia coli</i> με τη χρήση NucleoSpin ^R Plasmid DNA purification (Macherey-Nagel).....	51
2.7	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια <i>Escherichia coli</i> με τη χρήση NucleoBond ^R Xtra Midi - Plasmid DNA purification (Macherey-Nagel).....	52
2.8	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	53
2.9	Απομόνωση RNA (DNA-free RNA isolation –Vegetative tissues).....	53
2.10	Απομόνωση DNA από ζώνη πήκτης αγαρόζης και καθαρισμό PCR (PCR clean Up, Gel Extraction, Macherey-Nagel)	55
2.11	Αντίδραση λιγάσης (Ligation)	56
2.12	Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i>	57
2.13	Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	57
2.14	Μετασηματισμός του φυτού <i>Arabidopsis thaliana</i> με τη μεσολάβηση του βακτηρίου <i>Agrobacterium</i>	58
2.15	Clone JET PCR Cloning KIT (Thermo Scientific).....	59
2.16	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction- PCR)	60
2.17	Colony PCR	63
2.18	Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription, RT -PCR, SMARTTM MMLV RT, Clontech) .	64
2.19	Ποσοτική PCR (qPCR, KAPABIOSYSTEMS)	66
2.20	Φύτεμα σπερμάτων <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 σε τρυβλία με MS ½	67
2.21	Χρώσεις.....	68
2.21.1	Χρώση GUS (Gus staining).....	68
2.21.2	Χρώση με φθορίζουσες χρώσεις	68

2.22	Ποσοτικοποίηση της ενεργότητας του GUS μέσω φθορισμομετρίας.....	69
2.23	Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford	70
2.24	Απομόνωση πρωτοπλαστών και μετασχηματισμό τους	70
2.25	Σύστημα ζύμης δύο υβριδίων (Yeast – Two Hybrid, Y2H, Clontech).....	73
2.26	Μικροσκοπία	75
2.27	Κατασκευή μοντέλων τριτοταγούς δομής.....	76
2.27.3	Κατασκευή μοντέλου τριτοταγούς δομής της AtDALL3	76
2.27.4	Κατασκευή μοντέλου τριτοταγούς δομής της AtSBP1	77
2.28	Ανάλυση Μοριακής αγκυροβόλησης (Molecular Docking Analysis).....	77
2.29	Κατασκευή φυλογενετικών δένδρων	78
2.29.5	Κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου της οικογένειας DAD1.....	78
2.29.6	Κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου της υποοικογένειας RD19A	79
2.30	Αναστολή έκφρασης γονιδίου με παρεμβολή RNA (RNA-induced, RNAi)	80
2.31	Πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης	81
2.31.7	Ο πλασμιδιακός φορέας pJET1.2/ blunt cloning vector	82
2.31.8	Διαδικοί φορείς (Binary vectors)	83
2.31.9	Οι πλασμιδιακοί φορείς για το σύστημα ζύμης δύο υβριδίων pGADT7 και pGBKT7 (Clontech) 84	
2.31.10	Οι πλασμιδιακοί φορείς για τον μετασχηματισμό πρωτοπλαστών	86
2.31.11	Ο πλασμιδιακός φορέας pHANNIBAL για την αποσιώπηση γονιδίου	88
2.32	Θρεπτικά	88
2.33	Διαλύματα.....	89
2.33.12	Διαλύματα Ηλεκτροφόρησης	89
2.33.13	Διαλύματα πέψεων με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών	89
2.33.14	Διαλύματα για απομόνωση πλασμιδίου από <i>Escherichia coli</i> και <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	90
2.33.15	Διαλύματα για απομόνωση RNA	90
2.33.16	Διαλύματα για μετασχηματισμό φυτών με τη μεσολάβηση του <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	90

2.33.17	Διαλύματα για την χρώση Gus.....	91
2.33.18	Διαλύματα για απομόνωση πρωτοπλαστών και μετασχηματισμό.....	91
2.33.19	Διαλύματα φθορισμομετρίας.....	92
2.34	Εκκινητές.....	93
3.	Αποτελέσματα.....	96
3.1	Η Φωσφολιπάση <i>AtDALL3</i>	97
3.1.1	Τα χαρακτηριστικά της αλληλουχίας της <i>AtDALL3</i> και μοντέλο της τρισδιάστατης δομής της	97
3.1.2	Ιστοειδική μελέτη της έκφρασης του γονιδίου <i>AtDALL3</i>	99
3.1.3	Ποσοτική έκφραση της <i>AtDALL3</i> κατά την ανάπτυξη και την αβιοτική καταπόνηση.....	101
3.1.4	Ενεργότητα υποκινητή της <i>AtDALL3</i> κατά την αβιοτική καταπόνηση.....	105
3.1.5	Υποκυτταρικός εντοπισμός της <i>AtDALL3</i>	107
3.1.6	Ανάλυση των αλληλεπιδράσεων της <i>AtDALL3</i> με την <i>AtSBP1</i> σε σύστημα ζύμης δύο υβριδίων.....	108
3.1.7	Υποκυτταρικός εντοπισμός των <i>AtSBPs</i> και <i>AtDALL3</i> και η <i>in planta</i> μελέτη αλληλεπίδρασης τους.....	110
3.1.8	Φυλογενετική ανάλυση της <i>AtDALL3</i>	113
3.2	Η Πρωτεάση όμοια με παπαΐνη <i>AtRD19c</i>	115
3.2.1	Ιστοειδική μελέτη της έκφρασης του γονιδίου <i>AtRD19c</i>	115
3.2.2	Ποσοτική έκφραση της <i>AtRD19c</i> κατά την ανάπτυξη και την αβιοτική καταπόνηση.....	118
3.2.3	Ενεργότητα του υποκινητή της <i>AtRD19c</i> κατά την αβιοτική καταπόνηση.....	119
3.2.4	Υποκυτταρικός εντοπισμός της <i>AtRD19c</i>	120
3.2.5	Ανάλυση των αλληλεπιδράσεων της <i>AtRD19c</i> με την <i>AtSBP1</i> σε σύστημα ζύμης δύο υβριδίων.....	122
3.2.6	Υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεάσης <i>AtRD19c</i> και <i>in planta</i> αλληλεπίδραση με την <i>AtSBP1</i> σε σύστημα πρωτοπλαστών.....	124
3.2.7	Φυλογενετική ανάλυση της υπο-οικογένειας όμοιων με την <i>RD19A</i>	126
3.3	Οι γλουταρεδοξίνες.....	128
3.3.1	Ανάλυση των αλληλεπιδράσεων της <i>AtGRXS14</i> με την <i>AtSBP1</i> σε σύστημα ζύμης δύο υβριδίων.....	128

3.3.2	Ανάλυση Μοριακής Αγκυροβόλησης (Molecular Docking Analysis) για την αλληλεπίδραση AtGRXS14 με AtSBP1	129
3.3.3	Υποκυτταρικός εντοπισμός των AtGRXS14 και AtGRXS16 και η <i>in planta</i> μελέτη αλληλεπίδρασης τους με την AtSBP1.....	130
3.4	Το αλλεργιογόνο AtSAH7.....	132
3.4.1	Ποσοτική έκφραση της AtSAH7 κατά την ανάπτυξη και την αβιοτική καταπόνηση	132
3.4.2	Ανάλυση των αλληλεπιδράσεων της AtSAH7 με την AtSBP1 σε σύστημα ζύμης δύο υβριδίων	133
3.4.3	Υποκυτταρικός εντοπισμός του αλλεργιογόνου AtSAH7 και η <i>in planta</i> μελέτη της αλληλεπίδρασης του με την AtSBP1	134
4.	Συζήτηση.....	137
4.1	Η φωσφολυτάση AtDALL3.....	138
4.1.1	Χαρακτηριστικά αλληλουχίας και τριτοταγούς δομής της AtDALL3	138
4.1.2	Φυλογενετική ανάλυση	138
4.1.3	Γονιδιακή έκφραση.....	139
4.1.4	Ενεργότητα υποκινητή της AtDALL3.....	141
4.1.5	Υποκυτταρικός εντοπισμός.....	142
4.1.6	Ανάλυση αλληλεπιδράσεων	142
4.2	Η πρωτεάση AtRD19c	143
4.2.1	Ιστοειδική έκφραση	143
4.2.2	Φυλογενετική ανάλυση	144
4.2.3	Γονιδιακή έκφραση.....	145
4.2.4	Υποκυτταρικός εντοπισμός.....	145
4.2.5	Ανάλυση αλληλεπίδρασης.....	145
4.3	Γλουταρεδοξίνες	146
4.3.1	Μελέτη αλληλεπίδρασης AtGRXS14 με AtSBP1	146
4.3.2	Υποκυτταρικός εντοπισμός και <i>in planta</i> αλληλεπιδράσεις της AtRD19c	146
4.4	Το αλλεργιογόνο AtSAH7.....	147
4.4.1	Γονιδιακή έκφραση.....	147

4.4.2 Υποκυτταρικός εντοπισμός και <i>in planta</i> αλληλεπιδράσεις της AtSAH7	148
4.5 Συμπεράσματα.....	148
4.6 Μελλοντικοί στόχοι	150
Βιβλιογραφία	151
Παράρτημα I	176
Παράρτημα II	183
Παράρτημα III	200
Βιογραφικό σημείωμα.....	202
Δημοσιεύσεις.....	207

1. Εισαγωγή

Η παρούσα διδακτορική διατριβή έχει θέμα την μελέτη γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων αλληλεπιδρούν με την Πρωτεΐνη που Δεσμεύει Σελήνιο 1 (Selenium-binding Protein 1, SBP1). Όπως σηματοδοτεί και η ονομασία της, πρόκειται για μια πρωτεΐνη που δεσμεύει σελήνιο, ενώ μελέτες έχουν δείξει ότι δεσμεύει και κάδμιο. Για την καλύτερη κατανόηση της πιθανής δράσης αυτών των πρωτεϊνών είναι σημαντικό να γίνει ανάλυση της δράσης των χημικών στοιχείων σεληνίου και του καδμίου καθώς και του τρόπου πρόσληψης αυτών από τα φυτά και στη συνέχεια θα αναλυθούν περαιτέρω οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν σελήνιο, αλλά και οι πρωτεΐνες που μελετήθηκαν ως πιθανές αλληλεπιδρώσες με αυτήν, οι οποίες ανήκουν στις φωσφολιπάσες, πρωτεάσες, γλουταρεδοξίνες και αλλεργιογόνα.

1.1 Το σελήνιο (Selenium, Se)

Το σελήνιο (Selenium, Se) ανήκει στα αμέταλλα, στην ομάδα 16 του περιοδικού πίνακα, μαζί με το θείο (Sulfur, S), γεγονός που τα καθιστά ικανά να έχουν και παρόμοιες χημικές ιδιότητες (Εικόνα 1.1.1.1). Μπορεί να σχηματίζει ομοιοπολικούς δεσμούς με τον άνθρακα και εντοπίζεται σε ενώσεις όπως η σεληνοκυστεΐνη (SeCys) και η σεληνομεθειονίνη (SeMet) και επομένως και σε σεληνοπρωτεΐνες. Οι σεληνοπρωτεΐνες έχουν βρεθεί σε όλους τους οργανισμούς αλλά απουσιάζουν από τους μύκητες και τα χερσαία φυτά (White, 2018). Η πλειοψηφία αυτών των πρωτεϊνών είναι ένζυμα που εμπλέκονται σε οξειδοαναγωγικές δραστηριότητες και χρησιμοποιούν SeCys αντί Cys ως καταλυτικό κατάλοιπο του ενεργού κέντρου, προσδίδοντας πλεονεκτικές βιοχημικές ιδιότητες (π.χ. μειώνοντας pKa). Όσον αφορά τους

Group	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	1 H																	2 He
2	3 Li	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne
3	11 Na	12 Mg											13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
4	19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr
5	37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe
6	55 Cs	56 Ba	57 La *	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
7	87 Fr	88 Ra	89 Ac *	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Ds	111 Rg	112 Cn	113 Nh	114 Fl	115 Mc	116 Lv	117 Ts	118 Og
				* 58 Ce	* 59 Pr	* 60 Nd	* 61 Pm	* 62 Sm	* 63 Eu	* 64 Gd	* 65 Tb	* 66 Dy	* 67 Ho	* 68 Er	* 69 Tm	* 70 Yb	* 71 Lu	
				* 90 Th	* 91 Pa	* 92 U	* 93 Np	* 94 Pu	* 95 Am	* 96 Cm	* 97 Bk	* 98 Cf	* 99 Es	* 100 Fm	* 101 Md	* 102 No	* 103 Lr	

Εικόνα 1.1.1: Περιοδικός Πίνακας. Με μαύρο πλαίσιο σημειώνεται το σελήνιο, ενώ με μπλε το κάδμιο.

φυτικούς οργανισμούς δεν έχει αποκλειστεί η παραγωγή σεληνοπρωτεϊνών μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων σε αμινοξικά κατάλοιπα για την δημιουργία καταλοίπων σεληνοκουστεϊνης (Pilon-Smits & Quinn, 2010).

Το σελήνιο δε διαθέτει ισοκατανεμημένη εξάπλωση στο περιβάλλον και η φυτοδιαθεσιμότητα του συχνά είναι χαμηλή. Επομένως, δε θα μπορούσε να αποτελέσει απαραίτητο στοιχείο για την ανάπτυξη των χερσαίων φυτών. Αν και δεν είναι απαραίτητο στοιχείο, υπάρχουν δεδομένα που καταδεικνύουν τη θετική επίδραση που μπορεί να έχει στην ανάπτυξη και στην επιβίωση των φυτών σε συγκεκριμένες συνθήκες. Έχει αναφερθεί μάλιστα ότι οι χαμηλές δόσεις Se προστατεύουν τα φυτά από αβιοτικές καταπονήσεις, όπως είναι ο παγετός, η ξηρασία και η καταπόνηση από μέταλλα (Gupta & Gupta, 2017). Αντίθετα όμως, σε υψηλές συγκεντρώσεις η συσσώρευση Se είναι τοξική.

Τα φυτά μπορούν να ομαδοποιηθούν στους υπερσυσσωρευτές, στους δευτερεύοντες συσσωρευτές ή δείκτες και στους μη-συσσωρευτές, ανάλογα με την ικανότητά τους να συσσωρεύουν Se στα κύτταρά τους. Οι υπερσυσσωρευτές συγκεντρώνουν την υψηλότερη ποσότητα Se στα κύτταρά τους, πάνω από 1000mg Se/Kg ξηρού βάρους (ΞΒ) και ευδοκίμουν σε περιοχές πλούσιες σε Se. Φέρουν μεθυλιωμένες μορφές SeCys και SeMet, παρέχοντας στα φυτά ανοχή στο σελήνιο, και μπορούν να το απομακρύνουν ως αέριο διμεθυλοδισεληνίδιο (DMDS_e). Οι δευτερεύοντες συσσωρευτές συγκεντρώνουν Se και δεν παρουσιάζουν συμπτώματα τοξικότητας μέχρι 100-1000 mgSe/Kg ΞΒ. Οι μη-συσσωρευτές μπορούν να συσσωρεύσουν Se λιγότερο από 100 mg Se/Kg ΞΒ, δεν μπορούν να επιβιώσουν σε εδάφη πλούσια σε σελήνιο και μπορούν να το απομακρύνουν ως αέριο διμεθυλοσεληνίδιο (DMSe). Τέλος, όταν οι μη-συσσωρευτές εμπλουτίζονται με Se αυτό γρήγορα απομονώνεται στα κενοτόπια στα κύτταρα του μεσόφυλλου των φύλλων (Gupta & Gupta, 2017; White, 2018).

Ο κυρίαρχος λόγος τοξικότητας που προκαλείται από το σελήνιο είναι η λανθασμένη ενσωμάτωση SeCys και SeMet σε πρωτεΐνες, διαταράσσοντας την λειτουργία τους. Επιπλέον, η συγκέντρωση αυτών των πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε τοξικότητα, ενώ φυτά υπερσυσσωρευτές μπορούν να μειώνουν τη συγκέντρωση αυτών οδηγώντας τις για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα (Kolbert *et al.*, 2016; Van Hoewyk, 2018). Ο Van Hoewyk, μάλιστα, πρότεινε τη συμμετοχή του ενδοπλασματικού δικτύου που υποβοηθά την αποικοδόμηση, (Endoplasmic Reticulum—Assisted Degradation, ERAD) στην απομάκρυνση αυτών των άτυπων σεληνοπρωτεϊνών και έτσι, οδηγεί στην ανοχή σεληνίου (Van Hoewyk, 2018). Επιπρόσθετο λόγο τοξικότητας αποτελεί η παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) επάγοντας οξειδωτική καταπόνηση (Pilon-Smits & Quinn, 2010; Tamaoki & Maruyama-Nakashita, 2017), αλλά και η παραγωγή ενεργών ριζών αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS) οδηγώντας αντίστοιχα σε νιτροδωτική

καταπόνηση (Kolbert *et al.*, 2016; Lehotai *et al.*, 2016). Η διαταραχή των επιπέδων ROS και RNS επηρεάζουν τον μεταβολισμό και καταστρέφουν κυτταρικές δομές (Kolbert *et al.*, 2016).

Τέλος, το σελήνιο επηρεάζει και την παραγωγή φυτοορμονών, όπως είναι το ιασμονικό οξύ, το αιθυλένιο, η αυξίνη και οι κυτοκινίνες, προκαλώντας σηματοδοτήσεις αβιοτικής καταπόνησης, οδηγώντας στην αντοχή των φυτών παρουσία σεληνίου (Tamaoki *et al.*, 2008) και επηρεάζοντας τον μεταβολισμό και την ανάπτυξη (Lehotai *et al.*, 2016; Malheiros *et al.*, 2019).

1.1.1 Μεταφορά σεληνίου και ο μεταβολισμός του

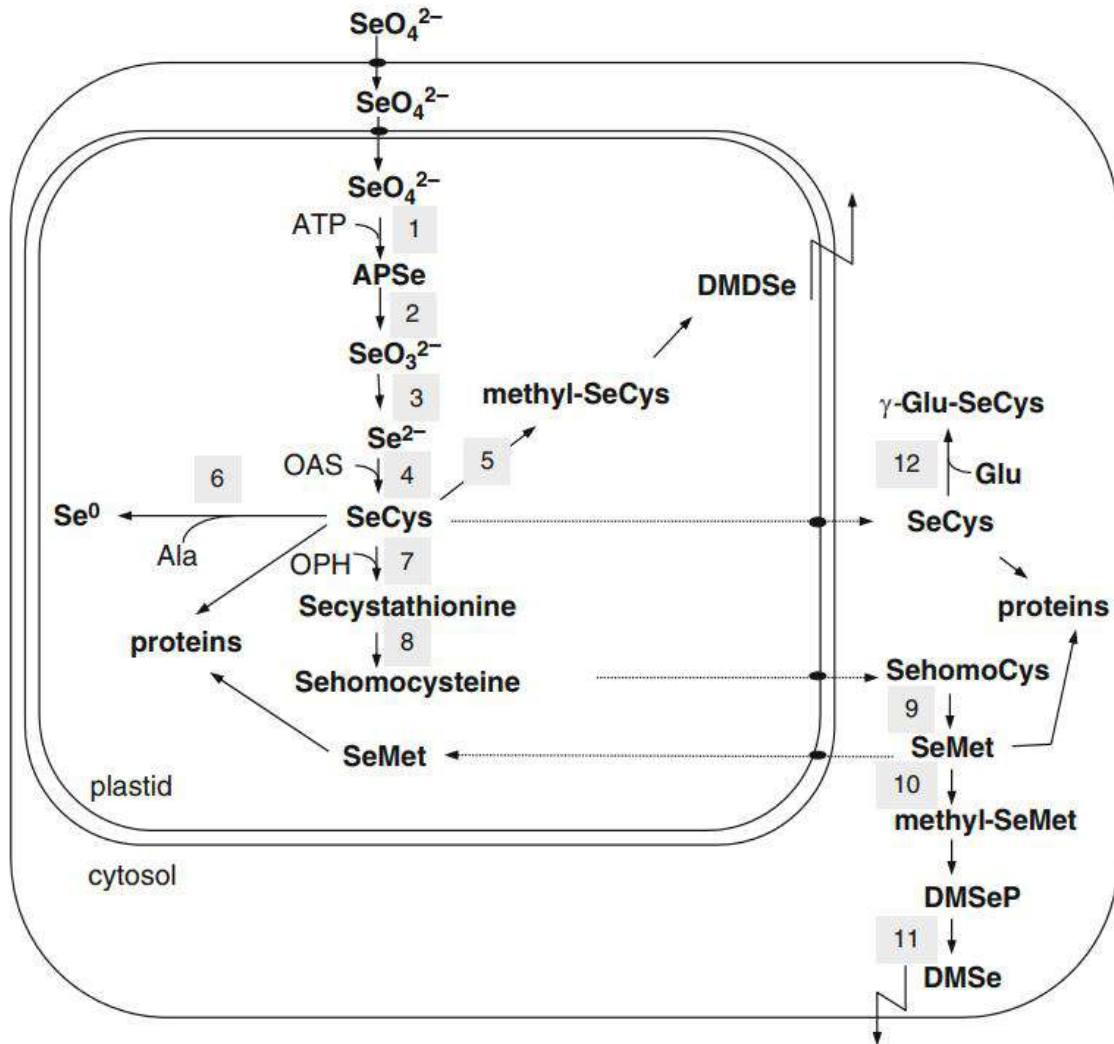
Το σελήνιο προσλαμβάνεται από τα κύτταρα της ρίζας με τη μορφή σεληνώδους (selenite, SeO_3^{2-} , HSeO_3^- , H_2SeO_3), σεληνικού (selenate, SeO_4^{2-}) και οργανοσεληνικών ενώσεων, όπως είναι η SeCys και η SeMet. Η εισροή σεληνικού στα ριζικά κύτταρα πραγματοποιείται από υψηλής συγγένειας συµμεταφορείς H^+ /Θείου, οµόλογων των AtSULTR1;1 και AtSULTR1;2 του πρότυπου φυτού *Arabidopsis thaliana*. Το σεληνώδες από την άλλη, προσλαμβάνεται από την ρίζα με την μορφή HSeO_3^- από μέλη μεταφορέων φωσφόρου της οικογένειας Pht1 και με τη μορφή H_2SeO_3 μέσω υδατοπορινών, όπως ο μεταφορέας Os-NIP2;1 του ρυζιού. Τέλος, η πρόσληψη SeCys και SeMet επιτυγχάνεται από τους μεταφορείς που καταλύουν την είσοδο Cys και Met, αντίστοιχα (Pilon-Smits & Quinn, 2010; Pilon-Smits, 2017).

Μετά την πρόσληψη του σεληνίου από τη ρίζα, το σεληνικό μετακινείται συμπλαστικά μέχρι τον κεντρικό κύλινδρο μέσω του οποίου μεταφέρεται στο βλαστό, ενώ το σεληνώδες μετατρέπεται σε οργανοσεληνικές ενώσεις, και συνήθως παραμένει στην ρίζα. Αν και η επικρατέστερη μορφή σεληνίου είναι αυτή του σεληνικού στο ξύλωμα, έχουν παρατηρηθεί και μικρές ποσότητες SeMet και SeOMet (Pilon-Smits & Quinn, 2010; Pilon-Smits, 2017).

Έπειτα από την μεταφορά του σεληνικού στον βλαστό, αυτό θεωρείται ότι εισέρχεται στα κύτταρα των φύλλων μέσω μεταφορέων θείου SULTR για την αφομοίωση του. Στα περισσότερα φυτά, το σεληνικό απομονώνεται σε κυστίδια των κυττάρων του αγωγού συστήματος και του μεσόφυλλου. Επιπλέον, το σελήνιο εύκολα αναδιανέμεται στο φλοιώμα με τη μορφή σεληνικού ή οργανοσεληνικών ενώσεων (SeMet, SeMSeCys). Στις διαδικασίες αυτές φαίνεται να συµμετέχουν είτε μεταφορείς θείου, είτε μεταφορείς αμινοξέων (Pilon-Smits & Quinn, 2010; Pilon-Smits, 2017).

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, λόγω της ομοιότητας του Se με το S, το πρώτο ανταγωνίζεται το δεύτερο και ακολουθεί τα μεταβολικά μονοπάτια του θείου για την αφομοίωση του. Έτσι λοιπόν, το σεληνικό μετατρέπεται σε σεληνώδες στους χλωροπλάστες των φύλλων με την διαδοχική δράση δύο ενζύμων. Η ATP σουλφουρυλάση (ATP Sulfurylase, APS) ενώνει το σεληνικό με ATP, σχηματίζοντας φωσφοσεληνική αδενοσίνη, η οποία στη συνέχεια ανάγεται σε σεληνώδες από την δράση της αναγωγής της φωσφοθειικής αδενοσίνης (Adenosine Phosphosulfate Reductase, APR). Ισοένζυμα των APS και APR εντοπίζονται και στο κυτοσόλιο εκτός από τους χλωροπλάστες, αλλά το μεγαλύτερο ποσοστό της αναγωγής του σεληνικού πραγματοποιείται στους χλωροπλάστες. Η περαιτέρω αναγωγή του σεληνώδους σε σεληνίδιο λαμβάνει μέρος αποκλειστικά στους χλωροπλάστες. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι σημαντικό ρόλο στην αναγωγή του σεληνώδους έχει και η μη ενζυματική αναγωγή με την ανηγμένη μορφή

γλουταθειόνης (GSH). Το σεληνίδιο ακολούθως μπορεί να μετατραπεί σε SeCys με τη δράση της συνθάσης της κυστεΐνης, η οποία φαίνεται ότι εκτός από τους χλωροπλάστες εντοπίζεται στο κυτοσόλιο και στα μιτοχόνδρια. Η SeCys μπορεί να μετατραπεί σε άλλες οργανοσεληνικές ενώσεις όπως είναι η SeMet, Methyl-SeCys, DMDSe και Se(0), διαδικασίες που μοιράζονται στους χλωροπλάστες και στο κυτοσόλιο (Van Hoewyk *et al.*, 2008; Pilon-Smits & Quinn, 2010; White, 2018). Έτσι, οι χλωροπλάστες φαίνεται να



Εικόνα 1.1.1.1: Σχηματική απεικόνιση του μεταβολισμού του Se στα φυτά. APSe (adenosine phosphoselenate) – Φωσφοσεληνική αδενοσίνη, SAT (serine acetyl transferase) – Ακετυλομεταφοράση σερίνης, OAS (O-acetylserine) – O-ακετυλοσερίνη, OPH (O-phosphohomoserine) – O-φωσφομοσερίνη, SeCys (selenocysteine) – Σεληνοκυστεΐνη, SeMet (selenomethionine) – Σεληνομεθειονίνη, DMSeP (dimethylselenopropionate) – Διμέθυλο-σεληνο-προπιονικό, DMSe (dimethylselenide) - Διμέθυλο-σεληνίδιο, DMDSe (dimethyldiselenide) – Διμέθυλο-δι-σεληνίδιο. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε ένζυμα. (1) ATP σουλφουρυλάση (ATP Sulfurylase), (2) Φωσφοθειϊκή αναγωγίαση αδενοσίνης (Adenosine phosphosulfate reductase), (3) Αναγωγίαση του θειώδους ή της γλουταθειόνης (Sulfite reductase ή glutathione reductase), (4) Θειολο-λυάση της O-ακετυλοσερίνης (OAS thiol lyase), (5) Μεθυλοτρανσφεράση της σεληνοκυστεΐνης (SeCys methyltransferase), (6) Λύαση της σεληνοκυστεΐνης (SeCys lyase), (7) Κυσταθιονίνη-γ-συνθάση (cystathionine-γ-synthase), (8) Κυσταθιονίνη-β-λυάση (cystathionine-β-lyase), (9) Συνθάση της μεθειονίνης (methionine synthase), (10) Μεθυλοτρανσφεράση της μεθειονίνης (methionine methyltransferase), (11) Λύαση της DMSP (DMSP Lyase), (12) Συνθετάση της γ-γλουταμιλοκυστεΐνης (γ-glutamylcysteine synthetase) (Pilon-Smits & Quinn, 2010).

έχουν σημαντικό ρόλο όσον αφορά την αφομοίωση του Se και την μετατροπή του σε λιγότερο τοξικές μορφές. Η παραπάνω διαδικασία μεταβολισμού σεληνίου παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.1.1.1.

Η λανθασμένη ενσωμάτωση των SeCys και SeMet στις πρωτεΐνες οδηγεί σε αποδιοργάνωση της δομής και της λειτουργίας των πρωτεϊνών, προκαλώντας τοξικότητα. Η SeMet μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον σχηματισμό σεληνοπρωτεϊνών ή να μεθυλιωθεί σχηματίζοντας Me-SeMet. Οι μορφές Me-SeCys και Me-SeMet μπορούν να εξατμιστούν στην ατμόσφαιρα ως μη τοξικές μορφές διμεθυλοσεληνιδίου (DMSe) στους μη-υπερσυσσωρευτές ή διμεθυλοδισεληνιδίου (DMDS) στους υπερσυσσωρευτές (Pilon-Smits & Quinn, 2010; Gupta & Gupta, 2017). Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει η πρωτεΐνη *crNifS*, η οποία είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό συμπλόκων Fe-S στους χλωροπλάστες και φαίνεται να διαθέτει και δράση λύασης της σεληνοκυστεΐνης απελευθερώνοντας αλανίνη και στοιχειακό σελήνιο, γεγονός που αποτρέπει την τοξικότητα σεληνίου σε φυτά που μεγαλώνουν σε υψηλές συγκεντρώσεις σεληνικού (Van Hoewyk *et al.*, 2008).

1.2 Το κάδμιο (Cadmium, Cd)

Το κάδμιο (Cadmium, Cd) ανήκει στα μέταλλα, στην ομάδα 12 του Περιοδικού Πίνακα (Εικόνα 1.1.1) και κατατάσσεται στα στοιχεία μετάπτωσης, δηλαδή τα άτομα του διαθέτουν ηλεκτρόνια σθένους σε περισσότερες από μια ενεργειακές στιβάδες. Πρόκειται για βαρέο μέταλλο με τοξικές επιπτώσεις για τους περισσότερους οργανισμούς ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Andresen & Küpper, 2013), με εξαίρεση το θαλάσσιο διάτομο *Thalassiosira weissflogii* για το οποίο είναι απαραίτητο μικροθρεπτικό στοιχείο (Lane & Morel, 2000; Andresen & Küpper, 2013).

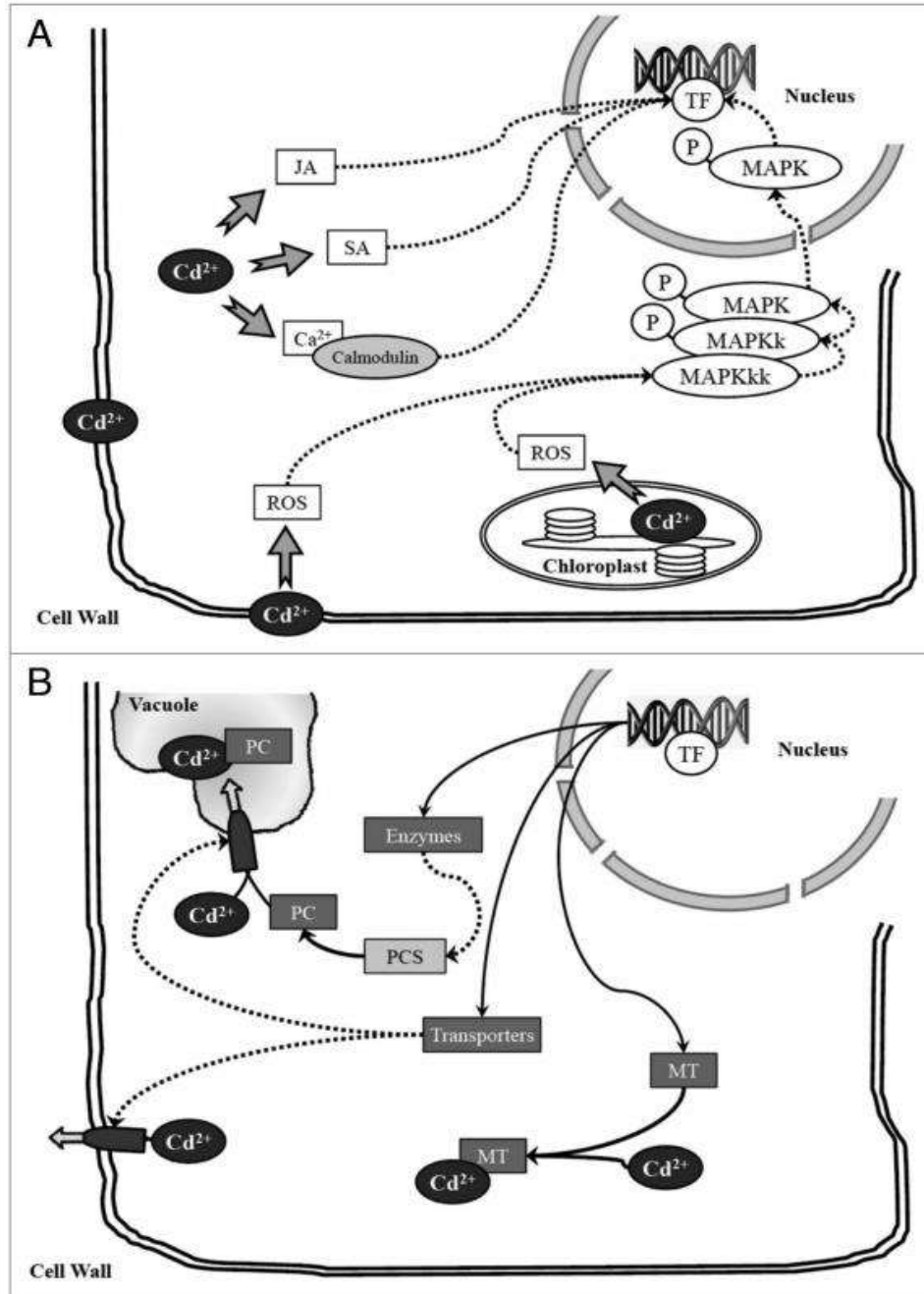
Το κάδμιο, όπως και άλλα βαρέα μέταλλα αποτελούν σημαντικούς περιβαλλοντικούς ρύπους και η διαθεσιμότητά τους στο έδαφος εξαρτάται είτε από φυσικές διαδικασίες λιθογένεσης και πεδογένεσης, είτε από ανθρωπογενείς παράγοντες, όπως είναι οι εξορύξεις, η καύση ορυκτών καυσίμων, η απόθεση αστικών αποβλήτων, η απορροή εδάφους, οι μεταλλουργικές βιομηχανίες, η ναυσιπλοΐα, η εφαρμογή φωσφορικών λιπασμάτων, η διαχείριση αστικών απορριμμάτων και η επεξεργασία λυμάτων (Hasan *et al.*, 2009; Andresen & Küpper, 2013).

Τα βαρέα μέταλλα αποτελούν σημαντικό περιβαλλοντικό πρόβλημα για την μόλυνση του εδάφους και των υδάτων. Το Cd θεωρείται ένα από τα πιο φυτοτοξικά βαρέα μέταλλα, λόγω της υψηλής διαλυτότητας που έχει στο νερό. Το γεγονός αυτό επιτρέπει στο κάδμιο την εύκολη και άμεση πρόσληψη του από τα φυτά, αποτελώντας τη βασική είσοδο του στη τροφική αλυσίδα, προκαλώντας έτσι και σοβαρά προβλήματα υγείας και στον άνθρωπο (Buchet *et al.*, 1990; Clemens, 2006; DalCorso *et al.*, 2010). Ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, η πρόσληψη του και η μεταφορά του στο υπόλοιπο φυτό και στα αναπαραγωγικά όργανα έχει αρνητική επίδραση όσον αφορά την πρόσληψη θρεπτικών, την ομοίωση, την αύξηση και την ανάπτυξη (DalCorso *et al.*, 2010).

1.2.1 Μεταφορά καδμίου, τοξικότητα και αποκρίσεις

Η τοξικότητα που προκαλείται από το κάδμιο οφείλεται κυρίως στην ιδιότητά του να αντιδρά με άτομα θείου (S) και αζώτου (N) των αμινοξικών αλληλουχιών (Clemens, 2001). Επιπλέον, μπορεί να αντικαταστήσει άλλα μεταλλικά ιόντα των ενεργών κέντρων των ενζύμων, καταστρέφοντας την καταλυτική

τους δράση. Η συσσώρευση Cd οδηγεί στην εμπλοκή φυσιολογικών διαδικασιών, όπως είναι η φωτοσύνθεση, η αναπνοή, η πρόσληψη, η μεταφορά και αφομοίωση θρεπτικών στοιχείων και η πρόσληψη νερού (Εικόνα 1.2.1.1) (He *et al.*, 2017). Επίσης, η καταπόνηση από κάδμιο τροποποιεί την έκφραση πρωτεϊνών,



Εικόνα 1.2.1.1: Σχηματική απεικόνιση των μονοπατιών μεταγωγής σήματος που σχετίζονται με την απόκριση στο κάδμιο. (Α) Η είσοδος Cd επάγει ROS, που είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση του καταρράκτη κινασών MAPK. Μαζί με την ενεργοποίηση του συστήματος Ca-καλμοδουλίνης και τις ορμόνες που σχετίζονται με καταπονήσεις, ρυθμίζουν μεταγραφικούς παράγοντες στον πυρήνα. (Β) Με τη σειρά τους, οι μεταγραφικοί παράγοντες επάγουν την έκφραση γονιδίων υπεύθυνων για την αποτοξίνωση από Cd. JA (Jasmonic acid - Ιασμονικό οξύ), SA (Salicylic acid - Σαλικυλικό οξύ), ROS (Reactive oxygen species - Ενεργές ρίζες οξυγόνου), MAPK (mitogen-activated protein kinases - κινάσες ενεργοποιούμενες από μιτογόνα), TF (Transcription factor - Μεταγραφικός παράγοντας), PC (Phytochelatin - Φυτοχηλατίνες), PCS (Phytochelatin synthase - Συνθετάση φυτοχηλατινών), MT (Metallothionein - Μεταλλοθειονεΐνη) (DaCorso *et al.*, 2010)

επάγοντας ή αναστέλλοντας ένζυμα, ενισχύοντας την συσσώρευση ROS και την υπεροξειδωση λιπιδίων, με αποτέλεσμα να διαταράσσεται ο μεταβολισμός (He *et al.*, 2017).

Το κάδμιο που βρίσκεται στο έδαφος μπορεί να εισέρθει στα κύτταρα της ρίζας μέσω μεταφορέων μετάλλων απαραίτητων για την κυτταρική λειτουργία, με τα οποία διαθέτουν παρόμοια χημική συγγένεια (Clemens, 2006; Andresen & Kürper, 2013), ενώ φαίνεται και πιθανή η συμμετοχή και των καναλιών ασβεστίου (Perfus-Barbeoch *et al.*, 2002; Andresen & Kürper, 2013). Τα κατιόντα Zn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} και Si^{2+} ανταγωνίζονται το Cd στις θέσεις εισροής, ενώ η απορρόφηση του μπορεί να περιοριστεί από την παρουσία των ανταγωνιστικών ιόντων (Degryse *et al.*, 2004; He *et al.*, 2017). Επιπλέον, τα οξειδία σιδήρου, αλουμινίου και μαγγανίου μπορούν να προσροφήσουν Cd στην επιφάνεια τους, μειώνοντας την διαθεσιμότητα του (Hettiarachchi & Pierzynski, 2002; He *et al.*, 2017). Αντίθετα, η παρουσία Cd στο θρεπτικό διάλυμα επηρεάζει την θρεπτική κατάσταση των φύλλων και της ρίζας, αποτρέποντας την πρόσληψη άλλων μετάλλων στα εναέρια μέρη του φυτού και επηρεάζοντας την παραγωγή φυτοχλατινών (Sandali *et al.*, 2001; He *et al.*, 2017). Το Cd αλληλεπιδρά με τον μεταβολισμό και τον τρόπο πρόσληψης άλλων μετάλλων, όπως είναι το ασβέστιο (Calcium, Ca), ο ψευδάργυρος (Zinc, Zn), το πυρίτιο (Silicon, Si), ο σίδηρος (Iron, Fe) και άλλα. Η εμπλοκή του Cd στα μονοπάτια του Ca έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή των διαδικασιών σηματοδότησης και το κλείσιμο των στομάτων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η συνύπαρξη του καδμίου με πυρίτιο, καθώς το δεύτερο προκαλεί αλλαγές στην πλαστικότητα της ρίζας (He *et al.*, 2017). Η εναπόθεση Si στο κυτταρικό τοίχωμα τα ενισχύει σχηματίζοντας έναν πιο ανθεκτικό φυσικό φραγμό για την πρόσληψη Cd. Επιπλέον, φαίνεται ότι το Cd μπορεί να σχηματίζει σύμπλοκα στα κυτταρικά τοιχώματα αποτρέποντας τη μεταφορά του από τη ρίζα στο βλαστό (He *et al.*, 2017), καθώς το κυτταρικό τοίχωμα είναι αρνητικά φορτισμένο, καθιστώντας το ικανό να δεσμεύει και να κατακρατεί βαρέα μέταλλα (DalCorso *et al.*, 2010; He *et al.*, 2017). Η εναπόθεση Si στα κυτταρικά τοιχώματα της ενδοδερμίδας συμβάλλει επίσης, στην παρεμπόδιση της μεταφοράς του καδμίου, ενώ στο κυτταρόπλασμα το Si μπορεί να σχηματίσει πυριτικά άλατα αποτρέποντας και την συμπλαστική μεταφορά του (He *et al.*, 2017).

Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελεί την πρωταρχική θέση αναγνώρισης εξωτερικών ερεθισμάτων και ενεργοποίησης αντίστοιχων κυτταρικών σηματοδοτήσεων. Τα βαρέα μέταλλα και το κάδμιο έχουν εντοπιστεί στο κυτταρικό τοίχωμα σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από ότι στο κυτοσόλιο, επάγοντας μονοπάτια μεταγωγής σήματος για την τροποποίηση της έκφρασης γονιδίων. Τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται περιλαμβάνουν αυτό με τις κινάσες ενεργοποιούμενες από μιτογόνα (mitogen-activated protein kinases, MAPK) (Jonak *et al.*, 2004), το σύστημα δευτερογενούς σηματοδότησης ιόντων ασβεστίου-καλμοδουλίνης (Arazi *et al.*, 2000), το σύστημα γλουταθειόνης (GSH/GSSG) (Romero-Puertas *et al.*, 2007), συσσώρευση ROS (Mithöfer *et al.*, 2004; Romero-Puertas *et al.*, 2007), ενώ αλλαγές προκαλούνται και στη σύνθεση ορμονών, όπως είναι το ιασμονικό οξύ, το αιθυλένιο και το σαλικυλικό οξύ (Εικόνα 1.2.1.1) (Maksymiec, 2007).

Μια από τις στρατηγικές που χρησιμοποιούν οι φυτικοί οργανισμοί για να αντιμετωπίσουν την τοξικότητα από κάδμιο είναι η απομάκρυνση του από το κύτταρο μέσω μεταφορέων και καναλιών ή η απομόνωσή του στα κενοτόπια (DalCorso *et al.*, 2010). Επιπλέον, το κάδμιο μπορεί να δημιουργήσει χηλικές ενώσεις με συνδέτες που περιέχουν θειόλη, όπως είναι η γλουταθειόνη και τα παράγωγα φυτοχλατινών (Cobbett, 2000), ώστε να επιτραπεί η μεταφορά αυτών των συμπλόκων στα κενοτόπια ή στον

αποπλάστη μέσω μεμβρανικών αντλιών εξαρτώμενες από ATP (Wolf *et al.*, 1996). Τέλος, η καταπόνηση από βαρέα μέταλλα μπορεί να επάγει την έκφραση μεταλλοθειονεϊνών (Metallothionein, MT), μικρού μοριακού βάρους πεπτίδια που είναι πλούσια σε κυστεΐνες και μπορούν να δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα (Cobbett & Goldsbrough, 2002; DalCorso *et al.*, 2010).

Η παρουσία του καδμίου επιφέρει σοβαρά προβλήματα στον μεταβολισμό και στην ανάπτυξη των φυτών. Αρχικά, επηρεάζει αρνητικά τον μεταβολισμό του αζώτου, αναστέλλοντας την πρόσληψή του, αλλά και μειώνοντας την δράση των ενζύμων που συμμετέχουν στο μονοπάτι αφομοίωσης του (Chang *et al.*, 2013; He *et al.*, 2017), ενώ έχει παρατηρηθεί και αύξηση της παραγωγής NO (He *et al.*, 2017). Εκτός από την πρόσληψη του αζώτου διαταράσσεται και η πρόσληψη και μετακίνηση του νερού, προκαλώντας στα φυτά υδατική καταπόνηση μέσω της μείωσης της αγωγιμότητας των στομάτων, του ρυθμού διαπνοής και της σχετικής περιεκτικότητας νερού των φύλλων (Domínguez *et al.*, 2011; He *et al.*, 2017). Επιπλέον, διαταράσσεται και η διαδικασία φωτοσύνθεσης, καθώς μειώνεται η σύνθεση των χλωροφυλλών και η σταθερή δέσμευσή τους με τις πρωτεΐνες των φωτοσυνθετικών μηχανών (Kürper *et al.*, 2007). Τέλος, το κάδμιο οδηγεί σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, ενώ έχει παρατηρηθεί και γενοτοξικότητα (Andresen & Kürper, 2013; He *et al.*, 2017).

1.3 Οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν σελήνιο (Selenium binding proteins, SBPs).

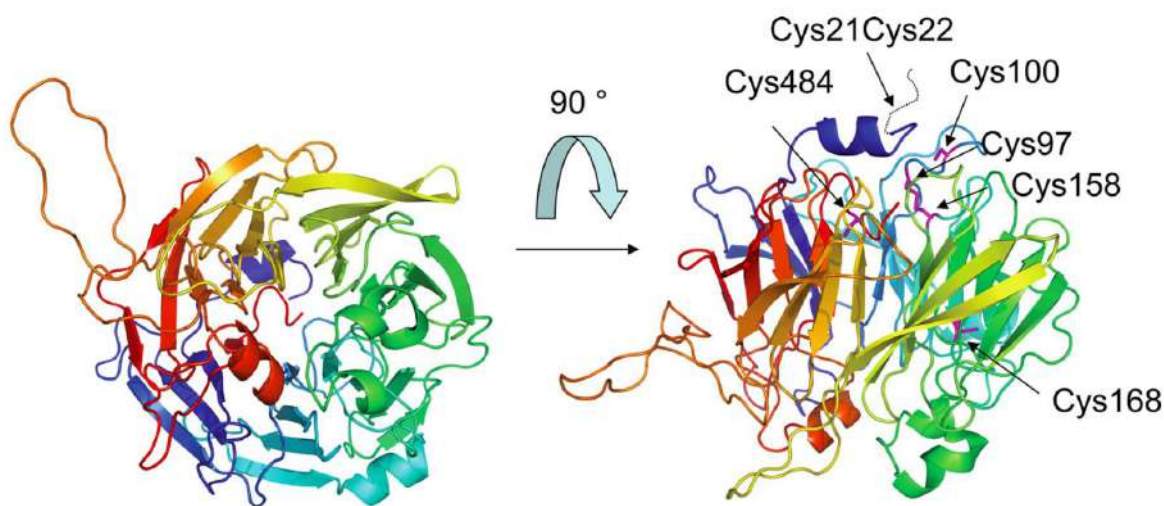
Η πρωτεΐνη που δεσμεύει σελήνιο 1 (Selenium-binding protein 1, SBP1, SELENBP1, hSP56) απομονώθηκε πρώτη φορά το 1989 (Bansal *et al.*, 1989) στο ήπαρ ποντικού σε μια προσπάθεια να εντοπισθούν πρωτεΐνες που δεσμεύουν σελήνιο, ενώ η αλληλουχία της προσδιορίστηκε το 1997 (Chang *et al.*, 1997). Η πρωτεΐνη αποτελείται από 472 αμινοξέα και είναι πολύ υψηλά συντηρημένη σε όλο το φάσμα των οργανισμών (Flemetakis *et al.*, 2002; Agalou *et al.*, 2006). Επιπλέον, οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν σελήνιο δεν ανήκουν στις τυπικές σεληνοπρωτεΐνες, καθώς το σελήνιο προσδένεται σε αυτές (Schild *et al.*, 2014; Elhodaky & Diamond, 2018), αντί να ενσωματώνεται μέσω τροποποιημένων αμινοξέων σεληνοκυστεΐνης και σεληνομεθειονίνης. Για την κατανόηση αυτών των πρωτεϊνών μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε πληθώρα ζωικών οργανισμών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, αλλά και σε φυτικούς οργανισμούς και βακτήρια, όπου φαίνεται, παρά τις διαφορές τους, ότι οι πρωτεΐνες αυτές έχουν κάποιο ρόλο στις διαδικασίες αποτοξίνωσης.

Πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν ότι η οξειδάση της μεθανοθειόλης εξαρτώμενη από τον χαλκό (Cu) με ευρεία διασπορά στη βιόσφαιρα, που έχει ρόλο κλειδί στον κύκλο του θείου, ανήκει στην οικογένεια SBP (Eyice *et al.*, 2018). Επιπλέον, δράση οξειδάση της μεθανοθειόλης αποκαλύφθηκε ότι έχει και η ομόλογη SBP του ανθρώπου (Pol *et al.*, 2018).

1.3.1 Δομή της SBP1

Η SBP που έχει προσδιοριστεί κρυσταλλογραφικά με τη μέθοδο ακτίνων-Χ είναι αυτή του αρχαιοβακτηρίου *Sulfolobus tokodaii* (2ECE). Η δομή της SBP1 αποτελείται από α-έλικες και β-κλώνους. Οι κλώνοι σχηματίζουν μια προπέλα με επτά λεπίδες, η οποία περιβάλλεται από α-έλικες (Schild *et al.*, 2014). Επιπλέον, προσδιόρισαν τα αμινοξικά κατάλοιπα κυστεΐνης που συμμετέχουν στην πρόσδεση του σεληνίου. Στην AtSBP1, τα κατάλοιπα αυτά είναι γειτονικά και είναι τα Cys21 και Cys22 (Εικόνα 1.3.1.1) (Schild *et al.*, 2014), ενώ το μοτίβο CSSC φαίνεται να εμπλέκεται στη δέσμευση καδμίου. Αντίθετα, στον

άνθρωπο η SBP1 δε φέρει τα γειτονικά κατάλοιπα κυστεΐνης, αλλά το μοτίβο Cys5-X2-Cys8 έχει προταθεί για την πρόσδεση σεληνίου (Schild *et al.*, 2014). Επιπρόσθετα, τα κατάλοιπα κυστεΐνης Cys97 και Cys158 σχηματίζουν μια δισουλφιδική γέφυρα (Schild *et al.*, 2014). Βιοχημικές και βιοφυσικές αναλύσεις έδειξαν ότι η SBP1 διαθέτει πολλαπλά μοτίβα πρόσδεσης μετάλλων αλλά και ότι έχει χηλικές ιδιότητες (Schild *et al.*, 2014). Ο Schild και οι συνεργάτες αποκάλυψαν ότι η AtSBP1 ανάγει το σελήνιο από την οξειδωτική κατάσταση IV στην οξειδωτική κατάσταση II (Schild *et al.*, 2014). Τέλος, υποθέτουν ότι η AtSBP1, ανάγοντας το σεληνικό αποτρέπει την αναγωγή του από την γλουταθειόνη (GSH) και άρα και την πρόσδεση του σεληνίου στην μεθειονίνη και στην κυστεΐνη με αποτέλεσμα την αποφυγή της τοξικότητας που



Εικόνα 1.3.1.1: Σχηματική απεικόνιση της τριτοταγούς δομής της SBP1 του φυτού *Arabidopsis thaliana* βάσει της δομής του *Sulfolobus tokodaii* (PDB, 2ECE). Το σύνολο των αμινοξικών καταλοίπων κυστεΐνης είναι σημειωμένα. Τα Cys²¹ και Cys²², βρέθηκαν ότι συμμετέχουν στην πρόσδεση σεληνίου και ανήκουν στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, ενώ τα Cys⁹⁷ και Cys¹⁵⁸ συμμετέχουν στο σχηματισμό δισουλφιδικής γέφυρας (Schild *et al.*, 2014).

προκαλεί (Schild *et al.*, 2014).

1.3.2 Η SBP1 στον άνθρωπο

Η SBP1 στον άνθρωπο εμπλέκεται σε πληθώρα φυσιολογικών κυτταρικών λειτουργιών και έχει φανεί ότι η απουσία της ή και τα μειωμένα ακόμα επίπεδα έκφρασης της οδηγούν σε πολλών τύπων κακοήθειες (Miyaguchi, 2004; Scortegagna *et al.*, 2009; Jerome-Morais *et al.*, 2012; Yang & Diamond, 2013; Wang *et al.*, 2015, 2020; Elhodaky & Diamond, 2018), όπως είναι στον καρκίνο του προστάτη (Yang & Sytkowski, 1998; Jeong *et al.*, 2009; Ansong *et al.*, 2015; Elhodaky *et al.*, 2019), του πνεύμονα (Chen *et al.*, 2004), των ωοθηκών (Huang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010; Yu-Rice *et al.*, 2017), του θυρεοειδή (Nikiforova *et al.*, 2003a), του ήπατος (Raucci *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2018) και του παχέος εντέρου (Kim *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Pohl *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014). Έχει δειχθεί ότι η SBP1 μπορεί να καταστέλλει όγκους (Yang & Diamond, 2013; Ansong *et al.*, 2015) αλλά και ότι μπορεί να έχει αντικαρκινική δράση (Ying *et al.*, 2015). Επίσης, η SBP έχει συσχετιστεί με τη σχιζοφρένεια (Glatt *et al.*, 2005; Kanazawa *et al.*, 2009; Amar *et al.*, 2010; Udawela *et al.*, 2015; Chau *et al.*, 2018) και έχει προταθεί και ως βιοδείκτης για ψυχιατρικές διαταραχές (Kanazawa *et al.*, 2008).

Στον άνθρωπο εντοπίζονται δύο πρωτεΐνες που δεσμεύουν σεληνίο, η SBP1 και η ηπατική πρωτεΐνη που δεσμεύει σεληνίο (AP-56, SBP2). Η SBP1 εκφράζεται σε αφθονία σε πληθώρα ιστών συμπεριλαμβανομένου του ήπατος, των πνευμόνων, του προστάτη και του παγκρέατος, ενώ με πιο μειωμένα επίπεδα εντοπίζεται στον σπλήνα, στην καρδιά και στις ωοθήκες (Chang *et al.*, 1997; Elhodaky & Diamond, 2018). Η ηπατική πρωτεΐνη που δεσμεύει σεληνίο (AP-56), διαφέρει από την SBP1 σε μόλις 14 αμινοξικά κατάλοιπα και κωδικοποιείται από διαφορετικό γονίδιο, ενώ μελέτες έχουν δείξει την εμπλοκή της στην αποτοξίνωση της ακεταμινοφαίνης στο ήπαρ (Lanfear *et al.*, 1993).

Η πρωτεΐνη που δεσμεύει σεληνίο έχει εντοπιστεί στο κυτταρόπλασμα (Bansal *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 2004; Glatt *et al.*, 2005; Ansong *et al.*, 2015) και στον πυρήνα (Chen *et al.*, 2004; Ansong *et al.*, 2015), ενώ μικρό ποσοστό της έχει βρεθεί να δεσμεύεται παροδικά στις μεμβράνες της δεξαμενής Golgi και του ενδοπλασματικού δικτύου (Porat *et al.*, 2000). Η SBP1 έχειδειχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές θεμελιώδεις φυσιολογικές λειτουργίες, όπως είναι η αποικοδόμηση πρωτεϊνών (Jeong *et al.*, 2009), η μετακίνηση πρωτεϊνών μέσω κυστιδίων μεταξύ των δεξαμενών Golgi (intra-Golgi) (Porat *et al.*, 2000), η κυτταρική διαφοροποίηση (Wang *et al.*, 2014), η κυτταρική κινητικότητα (Miyaguchi, 2004), η οξειδοαναγωγική ρύθμιση (Wang *et al.*, 2015) και ο μεταβολισμός των μορίων που περιέχουν θείο (Pol *et al.*, 2018).

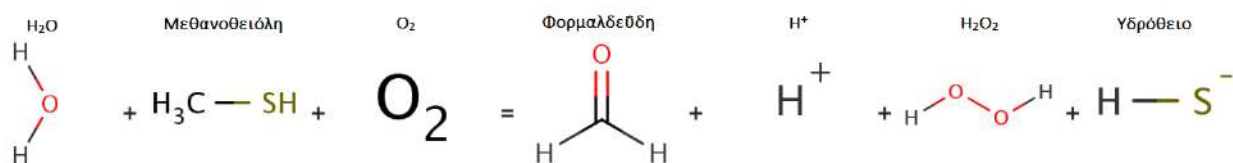
Η SBP1 αλληλεπιδρά με το ένζυμο 1 απο-ουβικιτίνωσης που αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη von Hippel-Lindau (pVHL), VDU1 (Jeong *et al.*, 2009), μια πρωτεΐνη που συμμετέχει στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών στο πρωτεάσωμα. Συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι η αλληλεπίδραση αυτή είναι εφικτή μόνο όταν η SBP1 έχει προσδέσει σεληνίο (Jeong *et al.*, 2009). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η SBP1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα μονοπάτια αποικοδόμησης και αποτοξίνωσης στα οποία μεσολαβεί η ουβικιτίνωση και η απο-ουβικιτίνωση (Jeong *et al.*, 2009).

Επιπρόσθετα, η SBP1 εμπλέκεται στα τελευταία στάδια της μεταφοράς πρωτεϊνών μέσω κυστιδίων της δεξαμενής Golgi, ρυθμίζοντας κυρίως τα στάδια συλλογής και σύντηξης αυτών (Porat *et al.*, 2000).

Τελευταίες μελέτες σε μεθυλοτρόπα βακτήρια έδειξαν ότι η οξειδάση της μεθανοθειόλης ανήκει στην οικογένεια των SBP (Eyice *et al.*, 2018) και ενώ αντίστοιχη δραστηριότητα στον άνθρωπο δεν είχε αποκαλυφθεί, έπειτα από αυτή την παρατήρηση βρέθηκε ότι η SBP1 διαθέτει την ενεργότητα οξειδάσης (Pol *et al.*, 2018; Philipp *et al.*, 2021). Συγκεκριμένα, σε ινοβλάστες ασθενών που πάσχουν από στοματική κακοσμία (extraoral halitosis) παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα της SBP1 και μη ανιχνεύσιμη ενζυματική δράση οξειδάσης, ενώ τα επίπεδα μεθανοθειόλης και άλλων παράγωγων θείου ήταν αυξημένα (Pol *et al.*, 2018). Επιπλέον, βρέθηκε ότι την ίδια δράση διαθέτει και στα ώριμα κύτταρα του εντέρου συμβάλλοντας στην μείωση των επιπέδων μεθανοθειόλης που παράγονται από το μικροβίωμα του εντέρου (Philipp *et al.*, 2021).

Συγκεκριμένα, οι οξειδάσες μεθανοθειόλης μετατρέπουν τη μεθανοθειόλη σε H₂O₂, φορμαλδεΰδη και υδρόθειο (H₂S) (Εικόνα 1.3.2.1), με το υδρόθειο να αποτελεί ένα μοριακό σηματοδότη με ξεχωριστές λειτουργίες σε διαφορετικές κυτταρικές συγκεντρώσεις (Barr & Calvert, 2014; Kohl *et al.*, 2019). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις αυξάνει την κατανάλωση οξυγόνου μέσω ενεργοποίησης της μεταφοράς η-

λεκτρονίων στα μιτοχόνδρια, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι τοξικό, καθώς μπλοκάρει τα αναπνευστικά σύμπλοκα των μιτοχονδρίων (Szabo *et al.*, 2014). Έτσι, το υδρόθειο έχει προταθεί για θεραπευτικός στόχος σε πολλές ασθένειες (Módos *et al.*, 2014). Με βάση τα προηγούμενα μπορεί να γίνει η υπόθεση ότι η συμμετοχή της SBP1 στις προαναφερθείσες ασθένειες οφείλεται στην επίδρασή της στα επίπεδα υδρόθειου αλλά και των υπόλοιπων προϊόντων της αντίδρασης ως οξειδάση της μεθανοθειόλης (Elhodaky & Diamond, 2018).



Εικόνα 1.3.2.1: Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης που καταλύει η SBP1 ως οξειδάση της μεθανοθειόλης (Uniprot,Q13228).

Τέλος, το ορθόλογο της SBP1 στο νηματώδη *Caenorhabditis elegans* φάνηκε να μειώνει το προσδόκιμο ζωής αλλά και την ανοχή στην οξειδωτική καταπόνηση, ενώ οδήγησε στην καλύτερη επιβίωση του νηματώδη παρουσία τοξικών επιπέδων σεληνίου (Köhnlein *et al.*, 2020).

1.3.3 Η SBP1 στα φυτά

Η SBP1 έχει μελετηθεί σε διάφορους φυτικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου του πρότυπου οργανισμού *Arabidopsis thaliana* (Agalou *et al.*, 2005, 2006; Schild *et al.*, 2014; Valassakis *et al.*, 2018, 2019), το ρύζι (Sawada *et al.*, 2003, 2004), το φυτό *Lotus japonicus* (Flemetakis *et al.*, 2002), στο κακάο (Martins Alves *et al.*, 2019) και πρόσφατα στο σιτάρι (Luo *et al.*, 2020), ενώ η έκφρασή της έχει συνδεθεί με αντοχή σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Επιπρόσθετες μελέτες με μικροσυστοιχίες δείχνουν ότι η SBP1 μπορεί να θεωρηθεί ως ένα γονίδιο γενικής απόκρισης στις καταπονήσεις (Desikan *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2002; Liu & Baird, 2003; Nikiforova *et al.*, 2003b; Zhu-Salzman *et al.*, 2004; Valassakis *et al.*, 2018).

Στο ρύζι, η υπερέκφραση του ομόλογού της *OsSBP* οδηγεί τα φυτά σε ανθεκτικότητα έναντι των ασθενειών που προκαλούνται από τον μύκητα *Pyricularia grisea* και από το βακτήριο *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (Sawada *et al.*, 2003, 2004). Επίσης, τα επίπεδα έκφρασης της *OsSBP* αυξάνονται σε απόκριση στο ιασμονικό οξύ και σαλικυλικό οξύ, ορμόνες που σχετίζονται με καταπονήσεις, ενώ μεταβολές παρατηρήθηκαν παρουσία αποκοπτικού οξέος και του φυτοφαρμάκου παρακουάτ, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) (Sawada *et al.*, 2003).

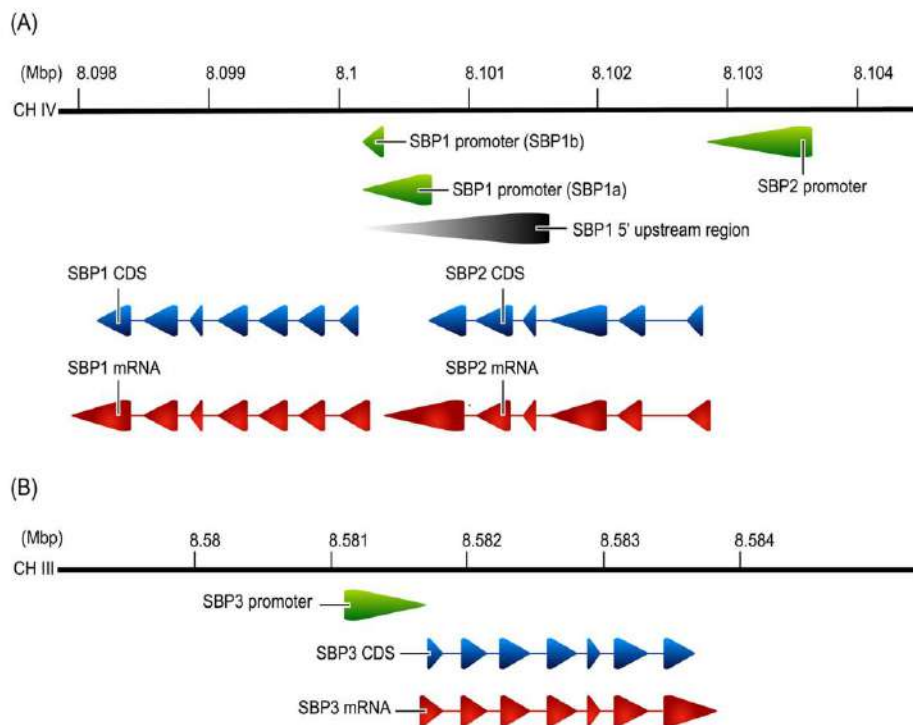
Στο ψυχανθές *Lotus japonicus* φαίνεται να συμμετέχει σε πληθώρα φυσιολογικών λειτουργιών, καθώς εκφράζεται συνεχώς στο φλοιό της ρίζας, στα κεράτια και στα έμβρυα, αλλά φαίνεται να συμμετέχει και στο σχηματισμό και στη λειτουργία των φυματίων κατά τη συμβιωτική σχέση, μέσω κυστιδίων του Golgi ή και του ενδοπλασματικού δικτύου για τη σύνθεση των μεμβρανών (Flemetakis *et al.*, 2002). Τα επίπεδα της *LjSBP* παρατηρήθηκαν αυξημένα στα νεαρά φυμάτια αλλά και σε άλλους ιστούς με υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις, οδηγώντας στην υπόθεση ότι η *LjSBP* είναι απαραίτητη και κατά την οργανογένεση (Flemetakis *et al.*, 2002).

Επίσης, η SBP στο *Theobroma cacao* (*TcSBP*) αποκαλύφθηκε πρόσφατα ότι είναι μια θερμοσταθερή πρωτεΐνη, ικανή να δεσμεύει σεληνικό και έχει προταθεί ότι εμπλέκεται στα τελευταία στάδια της ασθένειας που οφείλεται στον βασιδιομύκητα *Moniliophthora perniciosa*, ο οποίος προκαλεί σοβαρές καταστροφές στην παραγωγή κακάο (*Martins Alves et al., 2019*). Έτσι, η *TcSBP* θεωρείται κατάλληλη υποψήφια για βιοτεχνολογικές εφαρμογές, με σκοπό την προστασία των καλλιεργειών κακάο από βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (*Martins Alves et al., 2019*).

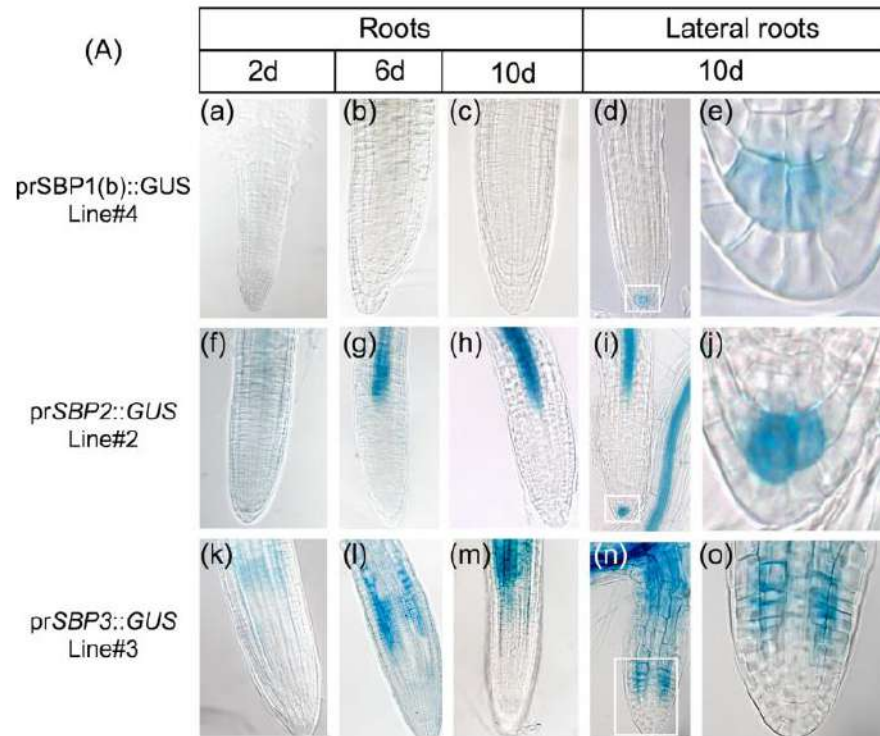
Τέλος, στο σιτάρι (*Triticum aestivum* L.) η ομόλογη της *AtSBP1*, *TaSBP-A* φάνηκε ότι εμπλέκεται στην ανοχή έναντι του καδμίου μέσω συσσώρευσης ελεύθερων ιόντων Cd^{2+} και αποτοξίνωσης του (*Luo et al., 2020*). Επιπλέον, οι Luo και συνεργάτες, έδειξαν ότι πρόκειται για μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, που παρουσιάζει υψηλά επίπεδα έκφρασης στη ρίζα, ενώ η παρουσία καδμίου επάγει την έκφρασή της. Επιπρόσθετες *in vitro* αναλύσεις συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες ότι το μοτίβο CXXC δεσμεύει Cd και παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση του φυτού από αυτό (*Luo et al., 2020*).

1.3.4 Οι SBPs στο *Arabidopsis thaliana*

Στο γονιδίωμα του φυτού *Arabidopsis thaliana* εντοπίζονται 3 γονίδια SBP (SBP1 (AT4G14030), SBP2 (AT4G14040), SBP3 (AT3G23800)) (*Flemetakis et al., 2002; Agalou et al., 2005*). Μελέτες έχουν δείξει ότι η *AtSBP1* οδηγεί σε ανοχή της τοξικότητας του σεληνίου (*Agalou et al., 2005; Schild et al., 2014; Valassakis et al., 2018*) και του καδμίου (*Sarry et al., 2006; Dutilleul et al., 2008; Schild et al., 2014*), ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι η *AtSBP1* συμμετέχει σε ένα άγνωστο μέχρι στιγμής μηχανισμό αποτοξίνωσης των φυτών από τα μέταλλα (*Dutilleul et al., 2008*). Επιπλέον, φαίνεται ότι και οι τρεις *AtSBP* (SBP1-3) πιθανόν λειτουργούν ως αισθητήρες του οξειδοαναγωγικού περιεχομένου των κυττάρων (*Valassakis et*

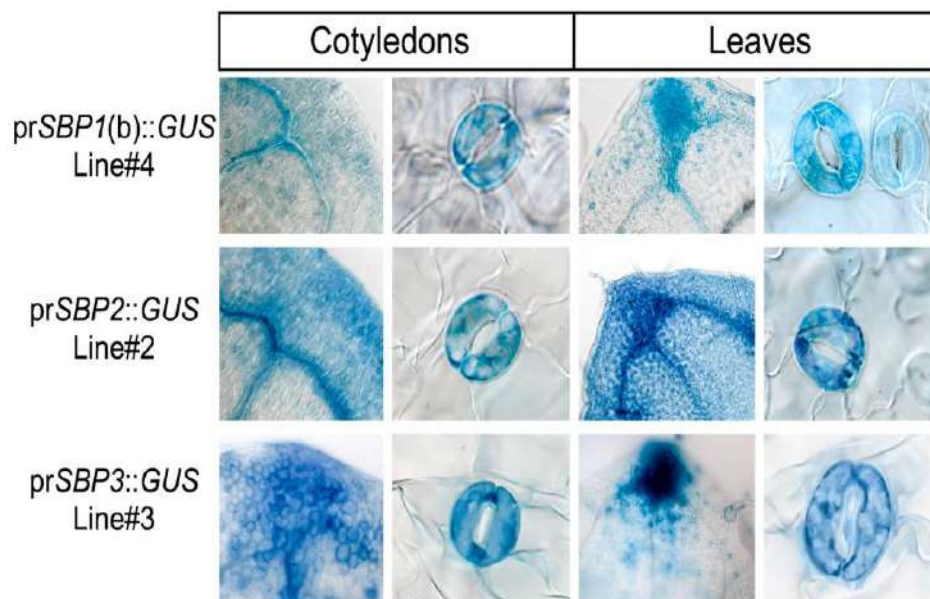


Εικόνα 1.3.4.1: Σχηματική απεικόνιση της οργάνωσης των γονιδίων των Πρωτεϊνών που Δεσμεύουν Σελήνιο (SBPs) στα χρωμοσώματά IV και III (*Valassakis et al., 2018*).



Εικόνα 1.3.4.3: Ανάλυση της ενεργότητας των υποκινητών των *AtSBP1-3* σε ρίζα και πλάγια ρίζα μετασηματισμένων φυτών με το γονίδιο αναφοράς β-γλουκουρονιδάσης (GUS) υπό τον έλεγχο των ενδογενών υποκινητών τους, αντίστοιχα. Μελετήθηκαν αρτίβλαστα 2 (2d), 6 (6d) και 10 ημερών (10d) (Valassakis *et al.*, 2018).

al., 2018). Επιπρόσθετα, υπάρχουν ισχυρά δεδομένα ότι η έκφραση της *AtSBP1* σχετίζεται με τις απαιτήσεις του κυττάρου σε θείο και γλουταθειόνη (Hugounieux *et al.*, 2009). *In vitro* δοκιμές έχουν δείξει ότι η SBP1 συμμετέχει σε ένα νέο πρωτεϊνικό δίκτυο, το οποίο αποτελείται τουλάχιστον από την SBP1, την αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης (GAPDH) και την αλδολάση της 1,6-διφωσφορικής



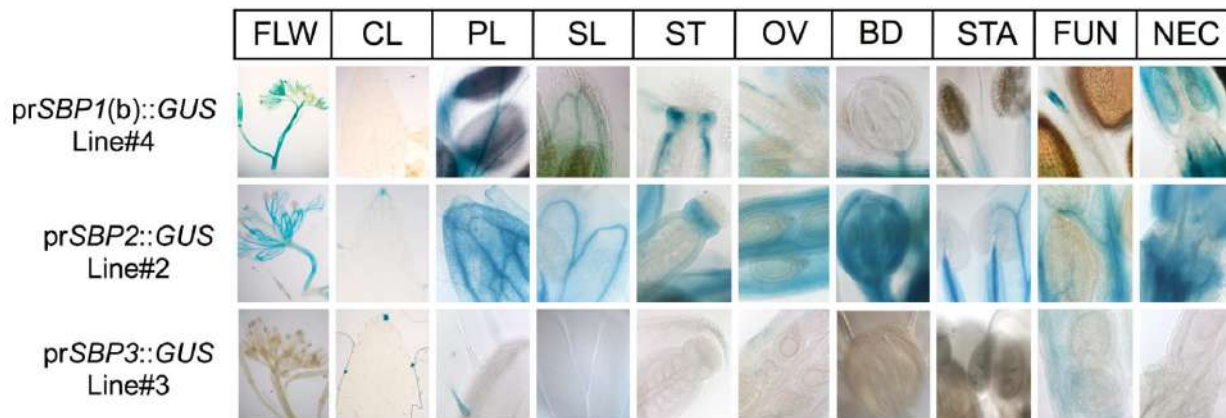
Εικόνα 1.3.4.2: Ανάλυση της ενεργότητας των υποκινητών των *AtSBP1-3* σε κοτυληδόνες και φύλλα με-τασηματισμένων φυτών με το γονίδιο αναφοράς β-γλουκουρονιδάσης (GUS) υπό τον έλεγχο των ενδογενών υποκινητών τους, αντίστοιχα (Valassakis *et al.*, 2018).

φρουκτόζης (FBA), αλλά φαίνεται να έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά και με άλλες 13 πρωτεΐνες που σχετίζονται με την μεταφορά πρωτεϊνών μέσω κυστιδίων, την σύνθεση μεμβρανών και με τον οξειδοαναγωγικό έλεγχο του κυττάρου (Agalou *et al.*, 2006).

Η *AtSBP1* και *AtSBP2* βρίσκονται ως ένα σύμπλεγμα (cluster) στο χρωμόσωμα IV, ενώ η *AtSBP3* στο χρωμόσωμα III (Εικόμα 1.3.4.1). Όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης των *AtSBPs*, έχει δειχθεί ότι οι *AtSBP1* και *AtSBP2* παρουσιάζουν μια συνεχή έκφραση, με την *AtSBP1* να έχει μέγιστη έκφραση σε αρτίβλαστα 3 ημερών, ενώ η *AtSBP2* σε αρτίβλαστα 10 ημερών. Αντίθετα, η *AtSBP3* εκφράζεται μόνο σε χαμηλά επίπεδα σε αρτίβλαστα 3 ημερών και ακόμα χαμηλότερα στη ρίζα αρτιβλάστων 10 ημερών (Valassakis *et al.*, 2018).

Μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και στους υποκινητές των *AtSBPs* (Valassakis *et al.*, 2018). Οι περιοχές ανοδικά των σημείων έναρξης της μεταγραφής που λειτουργούν ως υποκινητές είναι 182bp για την *AtSBP1*, 816bp για την *AtSBP2* και 590bp για την *AtSBP3*. Στον ιστό της ρίζας, η *AtSBP1* επάγεται στον κεντρικό αγωγό κύλινδρο αρτιβλάστων 10 ημερών, ενώ η *AtSBP2* στον αγωγό κύλινδρο επεκτείνοντας την έκφραση της μέχρι και την μεριστωματική περιοχή, όπως και η *AtSBP3*. Στις πλάγιες ρίζες εκφράζονται και οι τρεις *AtSBPs* με την *AtSBP3* να διατηρεί το ίδιο πρότυπο, ενώ οι *AtSBP1* και *AtSBP2* εντοπίζονται στα αρχικά κύτταρα καλύπτρας (Valassakis *et al.*, 2018)(Εικόνα 1.3.4.3).

Στις κοτυληδόνες και στα φύλλα και οι τρεις *AtSBPs* εκφράζονται στο αγγειακό σύστημα, στα κύτταρα του μεσόφυλλου, στα καταφρακτικά κύτταρα των στομάτων και στα υδατόδια (Εικόνα 1.3.4.2). Στα άνθη και στα κεράτια, η *AtSBP3* επάγεται μόνο στα υδατόδια το πετάλων, ενώ οι *AtSBP1* και *AtSBP2* εκφράζονται και στο αγωγό σύστημα αυτών των οργάνων (Εικόνα 1.3.4.4) (Valassakis *et al.*, 2018).

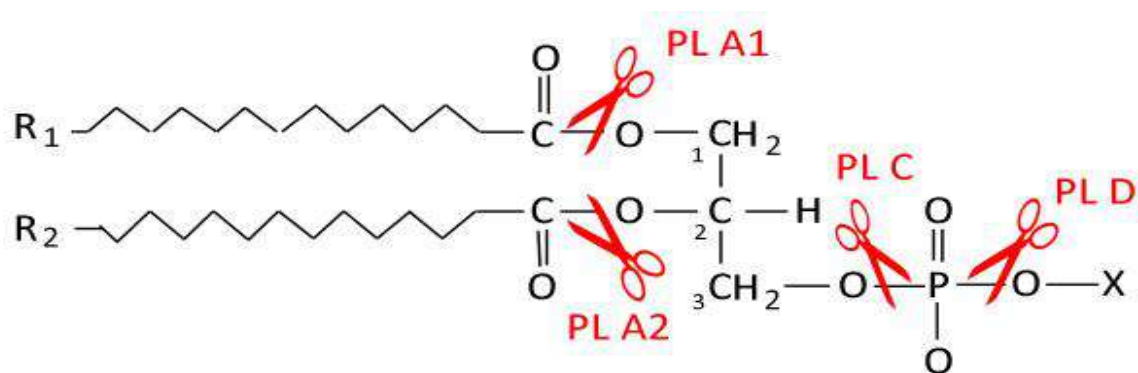


Εικόνα 1.3.4.4: Ανάλυση της ενεργότητας των υποκινητών των *AtSBP1-3* σε άνθη και κεράτια μετασηματισμένων φυτών με το γονίδιο αναφοράς β-γλουκουρονιδάσης (*GUS*) υπό τον έλεγχο των ενδογενών υποκινητών τους, αντίστοιχα. FLW: άνθη (flowers), CL: φύλλα βλαστού (cauline leaves), PL: πέταλα (petals), SL: σέπαλα (sepals), ST: στίγμα (stigma), OV: ωοθήκες (ovaries), BD: κλειστά άνθη (flower bud), STA: στήμονες (Stamens), FUN: ομφαλικός ιμάντας (funiculus), NEC: βάση κερατίων (nectaries) (Valassakis *et al.*, 2018).

1.4 Οι φωσφολιπάσες

Οι φωσφολιπάσες είναι μια κατηγορία ενζύμων που υδρολύουν φωσφολιπίδια. Τα φωσφολιπίδια αποτελούν τη βασική δομή των βιομεμβρανών, λειτουργούν ως σημαντική πηγή σηματοδοτικών μηνυμάτων και καταλαμβάνουν σημαντικές θέσεις στον μεταβολισμό λιπιδίων. Οι φωσφολιπάσες, δεν επηρεάζουν μόνο τη δομή και τη ρευστότητα των κυτταρικών δομών, αλλά ρυθμίζουν και κυτταρικές λειτουργίες (Wang, 2001), καθώς συμμετέχουν σε ποικίλες φυσιολογικές διαδικασίες στα φυτά, όπως είναι η ομοιόσταση της μεμβράνης, η βιοσύνθεση και ο μεταβολισμός λιπιδίων, οι αποκρίσεις σε καταπονήσεις και η σηματοδότηση του κυττάρου (Ryu, 2004; Chen *et al.*, 2011). Οι διαδικασίες αυτές μπορούν να επάγονται άμεσα ή έμμεσα μέσω της δράσης των προϊόντων της υδρόλυσης των φωσφολιπιδίων, όπως είναι τα λυσοφωσφολιπίδια, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA), η διακυλογλυκερόλη (DAG), το φωσφατυδικό οξύ (PA), η φωσφορική χολίνη (choline phosphate) (Chen *et al.*, 2011).

Στα φυτά έχουν βρεθεί τριών ειδών φωσφολιπάσες: οι φωσφολιπάσες A (PLA), οι φωσφολιπάσες C (PLC) και οι φωσφολιπάσες D (PLD). Οι φωσφολιπάσες B (PLB) δεν έχουν παρατηρηθεί στα φυτά. Οι φωσφολιπάσες A διαιρούνται σε τρεις υποκατηγορίες PLA1, PLA2 και φωσφολιπάσες όμοιες με πατατίνες (ratatin-like PLA, PAT-PLA). Οι PLA1, PLA2 υδρολύουν ακυλικές ομάδες στις θέσεις sn-1 και sn-2, αντίστοιχα και οι PAT-PLA παρουσιάζουν δραστηριότητα και στις δύο θέσεις. Οι φωσφολιπάσες C καταλύουν την υδρόλυση της φωσφορικής ομάδας ελευθερώνοντας διακυλογλυκερόλη (DAG), ενώ οι φωσφολιπάσες D υδρολύουν το τερματικό φωσφοδιεστερικό δεσμό ελευθερώνοντας φωσφατυδικό οξύ (PA). Οι θέσεις υδρόλυσης των φωσφολιπασών παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.4.1 (Chen *et al.*, 2011).



Εικόνα 1.3.4: Σχηματική απεικόνιση των θέσεων υδρόλυσης των φωσφολιπασών PLA1, PLA2, PLC, PLD. (Εικόνα από διαδίκτυο, <https://fr.wikipedia.org/wiki/Phospholipase>).

1.4.1 Οι φωσφολιπάσες A1

Οι φυτικές PLAs συμμετέχουν στο μεταβολισμό και στη βιοσύνθεση λιπιδίων, στην ομοιόσταση της μεμβράνης, στην απορρόφηση θρεπτικών στοιχείων, καθώς και στο σχηματισμό βιοενεργών μορίων που συμμετέχουν στη σηματοδότηση του κυττάρου (Ryu, 2004; Chen *et al.*, 2011). Επιπλέον, τα μόρια που παράγονται από την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων λειτουργούν ως δευτερογενή σηματοδοτικά σιγνάλα για τη μεσολάβηση της κυτταρικής επιμήκυνσης, τον βαρυτροπισμό, την διάνοιξη των ανθέων, τη βιοσύνθεση ιασημονικού οξέος και την άμυνα (Ryu, 2004). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή η κατηγορία ενζύμων έχει σημαντικές εφαρμογές στη βιοτεχνολογία και στη βιομηχανία, όπως για παράδειγμα

στη κομποστοποίηση φυτικών ελαίων, των γαλακτοκομικών, στην επεξεργασία κρόκων αυγού και στην παραγωγή βιοκαυσίμων (De Maria *et al.*, 2007; Mansfeld, 2009).

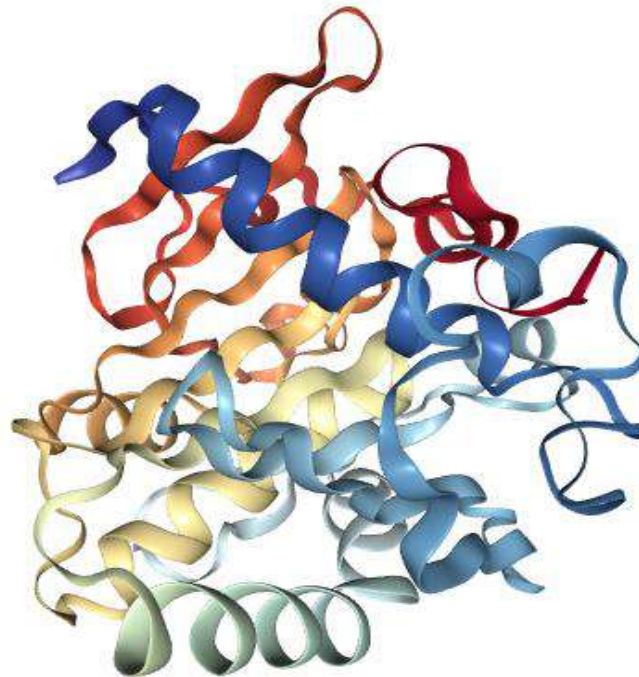
Ειδικότερα, οι PLA1 υδρολύουν φωσφολιπίδια και παράγουν 2-άκυλο-λυσωφωσφολιπίδια και λιπαρά οξέα (Richmond & Smith, 2011) και εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών λειτουργιών, που περιλαμβάνει την βιοσύνθεση ιασμονικού οξέος (Ishiguro *et al.*, 2001; Hyun *et al.*, 2008), την σηματοδότηση άμυνας που επάγεται από UV ακτινοβολία (Lo, 2004), την ανάπτυξη του κυττάρου και των ιστών (Seo *et al.*, 2007), την έναρξη της γήρανσης (Hong *et al.*, 2000), τη συσσώρευση αποθηκευτικών λιπιδίων (Hong *et al.*, 2000; Noiriél *et al.*, 2004) και τον βαρυτροπισμό (Kato *et al.*, 2002). Όλες οι φυτικές PLA1 πρωτεΐνες περιλαμβάνουν το μοτίβο Gly-x-Ser-x-Gly (GX SXG) και μια καταλυτική τριάδα με τα αμινοξικά κατάλοιπα Ser, Asp και His, ενώ έχουν μοριακό βάρος 45-50kDa (Ishiguro *et al.*, 2001; Matsui *et al.*, 2004; Matos & Pham-Thi, 2009; Seo *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011). Αυτή η κατηγορία των φωσφολιπασών μπορεί να διαιρεθεί περαιτέρω σε πέντε ομάδες: I, II, III, LCAT-PLA1 και PA-PLA1 (Ryu, 2004; Chen *et al.*, 2011), όμως ως φωσφολιπάσες A1 αναφέρονται πλέον οι τάξεις I, II και III (Chen *et al.*, 2011).

Στο γονιδίωμα του φυτού *Arabidopsis* έχουν αναγνωριστεί 12 ισομορφές της οικογένειας PLA1 (Ryu, 2004), με μία από αυτές να είναι και η πρωτεΐνη DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE 1 (DAD1, At2g44810) και οι υπόλοιπες 11 ομόλογές της. Αυτές οι πρωτεΐνες μπορούν να διαιρεθούν περαιτέρω σε τρεις τάξεις (I, II, III), όπως ήδη αναφέρθηκε, με βάση την παρουσία μεταφορικού σήματος στο N-άκρο, τις ομοιότητες στην αμινοξική αλληλουχία της καταλυτικής περιοχής και την εξειδίκευση σε υπόστρωμα (Ishiguro *et al.*, 2001; Ryu, 2004; Seo *et al.*, 2009). Η τάξη I περιλαμβάνει επτά φωσφολιπάσες που έχει δειχθεί ότι εντοπίζονται στους χλωροπλάστες και συμμετέχουν στην βιοσύνθεση του ιασμονικού οξέος (Seo *et al.*, 2009). Η τάξη II αποτελείται από τέσσερις φωσφολιπάσες, οι οποίες έχουν προβλεφθεί ότι εντοπίζονται στο κυτοσόλιο (Ishiguro *et al.*, 2001; Ryu, 2004; Seo *et al.*, 2009), ενώ η τάξη III, περιλαμβάνει μια μιτοχονδριακή πρωτεΐνη, η οποία σχετίζεται με τη βιωσιμότητα των σπερμάτων (Seo *et al.*, 2011).

Το ιασμονικό οξύ αποτελεί ένα σηματοδοτικό μόριο που ενεργοποιεί τη φυτική άμυνα έναντι εντόμων (Farmer *et al.*, 2003; Howe & Jander, 2008) και παθογόνων (Farmer *et al.*, 2003; Andersson *et al.*, 2006; Wasternack, 2007; Avanci *et al.*, 2010) αλλά ρυθμίζει και την αύξηση του φυτού και την ανάπτυξη των ανθέρων και των γυρεόκοκκων (Avanci *et al.*, 2010). Επιπλέον, οδηγεί στην επαγωγή γονιδίων που συμμετέχουν σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις, συμπεριλαμβανομένου και του τραυματισμού (Creelman & Mullet, 1995; Seo *et al.*, 2001; Wasternack, 2007; Koo & Howe, 2009). Οι βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις οδηγούν σε μεγάλη αύξηση των επιπέδων του ιασμονικού (Mueller, 1997; León & Sánchez-Serrano, 1999; Wasternack, 2007; Ghasemi Pirbalouti *et al.*, 2014), το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τον επαναπρογραμματισμό της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στην αύξηση της ρίζας και στην ανάπτυξη των ανθέρων, στη γήρανση, στο σχηματισμό δευτερογενών μεταβολιτών αλλά και ποικίλων μεταβολικών μονοπατιών (Sasaki-Sekimoto *et al.*, 2005; Koo & Howe, 2009; Pauwels *et al.*, 2009). Η βιοσύνθεση του ιασμονικού οξέος λαμβάνει χώρα σε δύο κυτταρικά οργανίδια, στα πλαστίδια και στα υπερξεισώματα. Η βιοσύνθεση ξεκινά στα πλαστίδια από το α-λινολενικό οξύ, το οποίο παράγεται από την υδρόλυση φωσφολιπιδίων των πλαστιδιακών μεμβρανών από τις φωσφολιπάσες A1 και συγκεκριμένα της τάξης I (Mueller, 1997; Ishiguro *et al.*, 2001; Wasternack, 2007; Avanci *et al.*, 2010; Ghasemi Pirbalouti *et al.*, 2014).

1.4.2 Δομή των φωσφολιπασών

Οι φωσφολιπάσες A1 διαθέτουν το χαρακτηριστικό δίπλωμα υδρολάσης α/β (α/β hydrolase) (Li-Beisson *et al.*, 2013) και το ενεργό κέντρο των λιπασών αποτελείται από μια σερίνη (νουκλεόφιλο κατάλοιπο), μια ασπαραγίνη (όξινο κατάλοιπο) και μια ιστιδίνη. Επίσης, χαρακτηρίζεται από μια συντηρημένη περιοχή GX SXG, που περιλαμβάνει το κατάλοιπο της σερίνης της καταλυτικής τριάδας (Ishiguro *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2009). Αναλυτικότερα, το δίπλωμα α/β συντίθεται από μία κεντρική, παράλληλη β -πτυχωτή επιφάνεια που αποτελείται από 8 β -κλώνους, με μόνο τον δεύτερο αντιπαράλληλο (Εικόνα 1.4.2.1). Ένα ακόμα χαρακτηριστικό είναι η παρουσία δισουλφιδικών γεφυρών, που προσδίδουν σταθερότητα στο ένζυμο και συχνά είναι σημαντικές για την καταλυτική ενεργότητα. Το τετραεδρικό ενδιάμεσο που σχηματίζεται κατά τον καταλυτικό μηχανισμό σταθεροποιείται από υδρογονικούς δεσμούς με δύο αμινοξέα να σχηματίζουν μια δομή που ονομάζεται οξυανική σπή (oxyanion hole). Αυτά τα αμινοξέα σταθεροποιούν το ενδιάμεσο, μέσω υδρογονικών δεσμών μεταξύ των πρωτονίων του αμινικού σκελετού και του οξυγόνου της καρβονυλικής ομάδας του υποστρώματος (Pleiss *et al.*, 2000; Casas-Godoy *et al.*, 2012).



Εικόνα 1.4.2.1: Τρισδιάστατη δομή της λιπάσης τριάκυλογλυκεριδίων του μύκητα *Rhizomucor miehei* με τη μέθοδο ακτίνων-X (Brady *et al.*, 1990).

1.4.3 Η φωσφολιπάση PLA1-Iy2 (DAD1-LIKE LIPASE 3, DALL3, AT2G30550)

Η φωσφολιπάση PLA1-Iy2 ή διαφορετικά DAD1-LIKE LIPASE 3 (DALL3, AT2G30550) είναι μέλος της τάξης I της DAD1 οικογένειας και συμμετέχει στη βιοσύνθεση του ιασμονικού οξέος, καθώς το μεταλλάγμα αποσιώπησης της οδηγεί στην μείωση των επιπέδων του ιασμονικού κατά το μισό (Rudus *et*

al., 2014). Ο τραυματισμός των φυτών είναι γνωστό ότι οδηγεί στην παραγωγή υψηλών επιπέδων ιασμονικού και έχει δειχθεί ότι η συγκεκριμένη φωσφολιπάση επάγεται έπειτα από τον τραυματισμό φύλλων, αν και εκφράζεται και σε μη επεξεργασμένα φύλλα (Hyun *et al.*, 2008; Ellinger & Kubigsteltig, 2010; Rudus *et al.*, 2014). Άλλες πειραματικές εργασίες, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν βιοσυνθετικές μορφές ιασμονικού οξέος και μεταλλάγματα αποκρίσεων του ιασμονικού, αποκάλυψαν ότι η επαγωγή της *AtDALL3* κατά τον τραυματισμό ρυθμίζεται με τρόπο ανεξάρτητο των COI1 υποδοχέων και του ιασμονικού οξέος (Rudus *et al.*, 2014).

Επιπρόσθετα, στο γονιδίωμα και συγκεκριμένα στο χρωμόσωμα II εντοπίζονται δύο ισομορφές που παράγονται από εναλλακτικό μάτισμα, με τη μια να κωδικοποιεί την λειτουργική πρωτεΐνη (AT2G30550.2) (Seo *et al.*, 2009). Οι Seo και συνεργάτες έδειξαν επίσης, ότι η *AtDALL3* έχει ισχυρή δράση PLA1 και μπορεί να υδρολύσει φωσφατιδυλοχολίνη (phosphatidylcholine, PC), μονογαλακτοσυλο-διακυλογλυκερόλη (monogalactosyldiacylglycerol, MGDM), διγλυκόσυλο-διακυλογλυκερόλη (diglycosyl diacylglycerols, DGDG) και τριακυλογλυκερόλη (triacylglycerol, TAG) (Seo *et al.*, 2009). Τέλος, αναλύσεις με μικροσυστοιχίες έχουν δείξει ότι η έκφραση της *AtDALL3* αυξάνεται έπειτα από βιοτική και αβιοτική καταπόνηση (Ellinger & Kubigsteltig, 2010) και ίσως να συμμετέχει στην άμυνα του φυτού μέσω των υποδοχέων που σχετίζονται με μοτίβα παθογόνων (Pathogen-associated Motif Patterns, PAMPs) (Sato *et al.*, 2007).

1.5 Οι πρωτεάσες

Οι πρωτεάσες είναι μια ομάδα υδρολυτικών ενζύμων με ευρεία εξάπλωση στη φύση, παρούσες στους μικροοργανισμούς, στα ζώα και στα φυτά και υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς πρωτεϊνών. Ένας βασικός διαχωρισμός των ενζύμων αυτών είναι σε εξωπεπτιδάσες και ενδοπεπτιδάσες, με τις πρώτες να δρουν στα άμινο- και καρβόξυ- τελικά άκρα και οι δεύτερες στο εσωτερικό των αλληλουχιών των υποστρωμάτων τους. Οι πρωτεάσες είναι μια ομάδα πρωτεϊνών που περιλαμβάνει πολλές οικογένειες και είναι γνωστό ότι έχουν καθοριστικό ρυθμιστικό ρόλο σε πολλαπλές βιολογικές λειτουργίες (van der Hoorn, 2008). Με βάση τη βάση δεδομένων πεπτιδασών [MEROPS](#), οι πρωτεάσες διαιρούνται σε 56 ομάδες (clans) και 272 οικογένειες (families) (Rawlings, 2020). Επιπλέον, τα ένζυμα αυτά μπορούν να διαιρεθούν σύμφωνα με τον καταλυτικό τους μηχανισμό σε πεπτιδάσες σερίνης, θρεονίνης, κυστεΐνης, ασπαρτικού και μεταλλοπεπτιδάσες (van der Hoorn *et al.*, 2004; Mazorra-Manzano *et al.*, 2018).

Στον άνθρωπο, οι πρωτεάσες παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλαπλές θεμελιώδεις βιολογικές λειτουργίες. Αρχικά, θεωρούνταν πρωτεολυτικά ένζυμα με μη-εξειδικευμένη λειτουργία στον καταβολισμό, όμως φάνηκε ότι διαθέτουν υψηλή εξειδίκευση υποστρωμάτων και επηρεάζουν τις κυτταρικές λειτουργίες, την επιβίωση και τον θάνατο του κυττάρου (López-Otín & Overall, 2002; Turk, 2006; López-Otín & Matrisian, 2007). Οι πρωτεάσες μέσω της υδρόλυσης των πρωτεϊνών συμμετέχουν στον έλεγχο της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου, τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου και τον κυτταρικό θάνατο, την αντιγραφή του DNA, τον σχηματισμό ιστών, την πήξη του αίματος, την επούλωση πληγών και την απόκριση του ανοσοποιητικού (López-Otín & Overall, 2002; Turk, 2006). Οι πρωτεάσες, όπως φαίνεται είναι ένζυμα ζωτικής σημασίας και έχει δειχθεί ότι εμπλέκονται σε ασθένειες. Έχουν βρεθεί πρωτεάσες οι οποίες καταστέλλουν όγκους (López-Otín & Matrisian, 2007) και άλλες που τους εξελίσσουν (Rakashanda *et al.*, 2012). Επίσης, πρωτεάσες έχουν συσχετιστεί και με νευροεκφυλιστικές ασθένειες, επισημαίνοντας την ανάγκη για στοχοποίηση τους (Siklos *et al.*, 2015). Τέλος, παρασιτικοί οργανισμοί παράγουν πρωτεάσες,

οι οποίες καθορίζουν τον κύκλο ζωής τους και την παθογένεια τους (McKerrow *et al.*, 2006; Verma *et al.*, 2016). Έτσι, οι πρωτεάσες μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως φαρμακολογικοί στόχοι για την αντιμετώπιση ασθενειών (Turk, 2006; Rakashanda *et al.*, 2012; Siklos *et al.*, 2015; Verma *et al.*, 2016).

Οι φυτικές πρωτεάσες, όπως ήδη αναφέρθηκε παίζουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο, γεγονός που αντανακλάται και στο ότι συνήθως τα μεταλλάγματα καταστολής τους οδηγούν σε μη βιώσιμους φαινοτύπους. Οι λειτουργίες που συντελούν είναι ποικίλες και εξαρτώνται αυστηρά από την έκφραση τους στον χρόνο και στον χώρο (van der Hoorn, 2008). Τα ένζυμα αυτά λοιπόν, εντοπίζονται σε διαφορετικές υποκυτταρικές θέσεις βάσει της λειτουργίας τους. Έτσι, υπάρχουν εκκρινόμενες πρωτεάσες, πρωτεάσες που εντοπίζονται σε κυστίδια, σε χλωροπλάστες, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο κυτταρόπλασμα ή πυρήνα (van der Hoorn, 2008). Επιπλέον, υπάρχουν πρωτεάσες που δε δρουν μέσω των υποστρωμάτων τους (Rcr3) ή δρουν καταλύοντας μη πρωτεολυτικές διαδικασίες (SNG1/2) (van der Hoorn, 2008). Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρήση τους στην παραγωγή βιοενεργών πεπτιδίων στη βιομηχανία τροφίμων, στην έρευνα και στη φαρμακοβιομηχανία (Mazorra-Manzano *et al.*, 2018).

1.5.1 Πρωτεάσες κυστεΐνης όμοιες με παπαΐνη (Papain-Like Cysteine Proteases, PLCP)

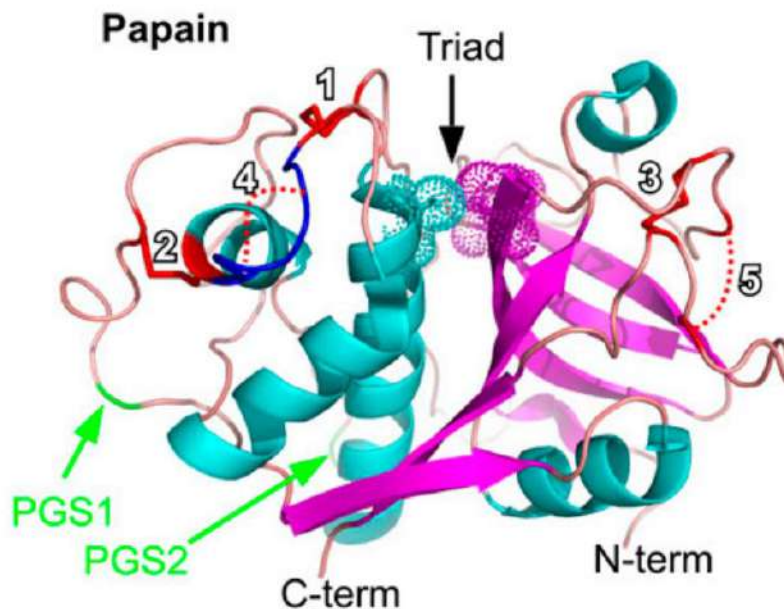
Οι Πρωτεάσες κυστεΐνης όμοιες με παπαΐνη (Papain-Like Cysteine Proteases, PLCPs) έχουν εντοπιστεί σε ιούς (Rawlings *et al.*, 1992; Ziebuhr *et al.*, 2001), βακτήρια (Kantyka *et al.*, 2011), ζύμες (Enenkel & Wolf, 1993), πρωτόζωα, φυτά και ζώα (Rawlings *et al.*, 2010; Novinec & Lenarčič, 2013; Liu *et al.*, 2018). Οι πρωτεΐνες αυτές παράγονται ως ανενεργές πρόδρομες με ένα πεπτίδιο σινάλο για έκκριση και με μια αυτο-αναστελλόμενη πρόδρομη περιοχή (prodomain) για την αποφυγή μη επιθυμητής αποικοδόμησης πρωτεϊνών (Coulombe *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2018). Οι PLCPs είναι σφαιρικές πρωτεΐνες και το καταλυτικό τους κέντρο αποτελείται από την καταλυτική τριάδα Κυστεΐνης - Ιστιδίνης - Ασπαραγίνης (Cys-His-Asn) (Richau *et al.*, 2012).

Οι πρωτεάσες κυστεΐνης όμοιες με παπαΐνη ανήκουν σε μια πολυγονιδιακή οικογένεια, η οποία διαιρείται σε 9 υπο-οικογένειες, βάσει δομικών χαρακτηριστικών (Martinez & Diaz, 2008; Richau *et al.*, 2012; Zou *et al.*, 2017). Στα ζώα, οι PLCPs είναι πρωτεάσες στα λυσοσώματα, οι οποίες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών εντός των αυτο-λυσοσωμάτων (autolysosomes) (Kroemer & Jäätelä, 2005; Man & Kanneganti, 2016). Οι φυτικές PLCPs έχει δειχθεί ότι συμμετέχουν στην φύτρωση των σπερμάτων (Zhang & Jones, 1995; Grudkowska & Zagdańska, 2004; Richau *et al.*, 2012; Prabuca *et al.*, 2013; Diaz-Mendoza *et al.*, 2016), στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Zhao *et al.*, 2000; Cai *et al.*, 2018; Buono *et al.*, 2019; Han *et al.*, 2019), στη γήρανση των φύλλων (Lohman *et al.*, 1994; Gepstein *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2004; Guo & Gan, 2014), μεσολαβούν στις αποκρίσεις έναντι αβιοτικών καταπονήσεων (Liu *et al.*, 2018) και γενικότερα έχουν σημαντικό ρόλο στην φυτική ανοσία (Shindo & Van Der Hoorn, 2008; Misas-Villamil *et al.*, 2016).

1.5.2 Δομή υπο-οικογένειας πρωτεασών όμοιες με RD19A

Οι PLCPs στο φυτό *Arabidopsis thaliana* χωρίζονται σε εννέα υπο-οικογένειες με βάση δομικές ομοιότητες και λειτουργικά μοτίβα. Οι υπο-οικογένειες παίρνουν το όνομα τους από έναν αντιπρόσωπό τους. Έτσι, αναφέρονται ως πρωτεάσες όμοιες με RD21A, CEP1, XCP2, XBCP3, THI1, SG12, RD19A, AALP και CTB3 (Richau *et al.*, 2012). Για την μοντελοποίηση των δομών, οι Richau και συνεργάτες (Richau *et al.*,

2012) χρησιμοποίησαν τη δομή της παπαΐνης ([1PPP](#), Kim *et al.*, 1992). Οι PLCPs αποτελούνται από δύο αυτοτελείς δομικές περιοχές, μια επικράτεια α-έλικας (αριστερά, Εικόνα 1.5.2.1) και μια β-πτυχωτής επιφάνειας (δεξιά, Εικόνα 1.5.2.1), σχηματίζοντας τη σχισμή, όπου εντοπίζεται η καταλυτική τριάδα (Triad, Εικόνα 1.5.2.1) που δεσμεύεται το υπόστρωμα. Σχεδόν όλες οι πρωτεάσες κυστεΐνης όμοιες με παπαΐνη περιέχουν τρία ζεύγη καταλοίπων κυστεΐνης με πολύ υψηλή συντήρηση, τα οποία δημιουργούν τις δι-σουλφιδικές γέφυρες 1, 2 και 3 που φαίνονται στην Εικόνα 1.5.2.1 (Richau *et al.*, 2012). Η υποοικογένεια πρωτεασών όμοιες με την RD19A, στην οποία ανήκει η RD19C, φέρει δύο επιπλέον ζευγάρια συντηρημένων καταλοίπων κυστεΐνης, όπου πιθανόν δημιουργούν τις δισουλφιδικές γέφυρες 4 και 5 που σταθεροποιούν την επικράτεια της α-έλικας και της β-πτυχωτής επιφάνειας, αντίστοιχα (Εικόνα 1.5.2.1) (Richau *et al.*, 2012). Επιπλέον, υπάρχουν περιοχές με θέσεις υποθετικών N-γλυκοζυλιώσεων (PGS) στην περιοχή των α-ελίκων, με την PGS2 της Εικόνας 1.5.2.1 να εντοπίζεται στην υπό μελέτη υποοικογένεια (Richau *et al.*, 2012).



Εικόνα 1.5.2.1: Σχηματική απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής των πρωτεασών όμοιες με παπαΐνη. Οι αριθμοί 1-5 αφορούν τις δισουλφιδικές γέφυρες που σχηματίζονται μεταξύ συντηρημένων καταλοίπων κυστεΐνης. Η περιοχή της καταλυτικής τριάδας (Triad) βρίσκεται ανάμεσα στις επικράτειες της α-έλικας και της β-πτυχωτής επιφάνειας. Οι θέσεις N-γλυκοζυλίωσης αναγράφονται ως PGS (Richau *et al.*, 2012).

1.5.3 Γονίδιο απόκρισης στην αφυδάτωση (Response to dehydration 19C (RD19c, AT4G16190))

Οι έρευνες που αφορούν την πρωτεάση RD19c (AT4G16190) είναι κυρίως πρωτεομικές και μεταγραφομικές αναλύσεις καθώς και αναλύσεις με μικροσυστοιχίες. Αρχικά, αναφέρθηκε ως μια πρωτεΐνη που επάγεται ως απόκριση στο ψύχος (Seki *et al.*, 2001) και στην ξηρασία (Seki *et al.*, 2001; Bray, 2002). Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η απουσία θείου επηρεάζει με θετικό τρόπο την έκφραση του γονιδίου της RD19c (Hirai *et al.*, 2003; Nikiforova *et al.*, 2003b; Hirai & Saito, 2004), όπως και η απουσία φωσφόρου (Hammond *et al.*, 2003) και αζώτου (Peng *et al.*, 2007). Επιπλέον, φαίνεται να επάγεται κατά

την γήρανση (Gepstein *et al.*, 2003), αλλά και με την παρουσία του ζιζανιοκτόνου ατραζίνη (Ramel *et al.*, 2007). Τέλος, οι αναλύσεις με μικροσυστοιχίες έδειξαν ότι αυτή η πρωτεάση κυστεΐνης ρυθμίζεται από βρασσινοστεροειδή ενώ την επηρεάζει αρνητικά η αυξίνη (Goda *et al.*, 2004).

Οι πρωτεομικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι είναι μια πρωτεάση που εντοπίζεται σε κυστίδια (Carter *et al.*, 2004; Endler *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2013), ενώ ο υποκυτταρικός εντοπισμός της σε φύλλα καπνού (*N. benthamiana*) απέδειξε τον εντοπισμό της σε λυτικά κυστίδια, καθώς φάνηκε να συσχετίζεται με την αλευρίνη (Bernoux *et al.*, 2008), μία πρωτεάση θειόλης, για την οποία έχει αποδειχθεί ο κυστιδιακός της εντοπισμός (Ahmed *et al.*, 2000; Flückiger *et al.*, 2003).

Τέλος, πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν ότι το ένζυμο επεξεργασίας κυστιδίων (Vacuolar processing enzyme, VPE) είναι απαραίτητο για την ωρίμανση και την ενεργοποίηση των πρωτεασών κυστεΐνης όμοιες με παπαΐνη AtCEP1, AtRD19A και AtRD19C, κατά την ανάπτυξη του άνθους στο φυτό *Arabidopsis thaliana* (Cheng *et al.*, 2020). Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι το ένζυμο VPE συμμετέχει στην αρχική ενεργοποίηση ενζύμων, τα οποία αποικοδομούν την κυστιδιακή μεμβράνη και ενεργοποιούν τον πρωτεολυτικό καταρράκτη που οδηγεί στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Cheng *et al.*, 2020). Ειδικότερα, φάνηκε ότι η βVPE είναι απαραίτητη για την ωρίμανση της RD19C, καθώς σε μεταλλάγματα αποσιώπησης *bnpe* δεν ανιχνεύθηκε ώριμη AtRD19C (Cheng *et al.*, 2020). Επομένως, η AtRD19C μπορεί να συμμετέχει στην ανάπτυξη των ανθέων έπειτα από την ενεργοποίηση της από την βVPE μέσω μεσο-λάβησης προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.

1.6 Οι γλουταρεδοξίνες (GRXs)

Οι γλουταρεδοξίνες (GRXs) είναι θερμοανθεκτικές και χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνες (10-16 kDa) και λειτουργούν ως οξειδοαναγωγάσες εξαρτώμενες από την γλουταθειόνη ή την αναγωγή της θειορεδοξίνης (GSH ή TR-dependent) (Rouhier *et al.*, 2008; Couturier *et al.*, 2009; Meyer *et al.*, 2009; Kalinina *et al.*, 2014). Ειδικότερα, θεωρείται πως λειτουργούν ως σαρωτές των ενεργών ριζών οξειγόνου (ROS) και ως ρυθμιστές της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης του κυττάρου (Wu *et al.*, 2017). Πρόκειται για συντηρημένες πρωτεΐνες παρούσες στους περισσότερους ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς οργανισμούς με εξαίρεση κάποια είδη βακτηρίων και αρχαίων (Alves *et al.*, 2009; Kalinina *et al.*, 2014). Οι γλουταρεδοξίνες χαρακτηρίστηκαν πρώτη φορά σε μεταλλάγματα *Escherichia coli*, στα οποία απουσίαζε η θειορεδοξίνη (Holmgren & Åslund, 1995) και φάνηκε ότι σε σύγκριση με τη θειορεδοξίνη οι γλουταρεδοξίνες είναι πιο ευέλικτες όσον αφορά την επιλογή του υποστρώματος και τον μηχανισμό της αντίδρασης (Lillig *et al.*, 2008).

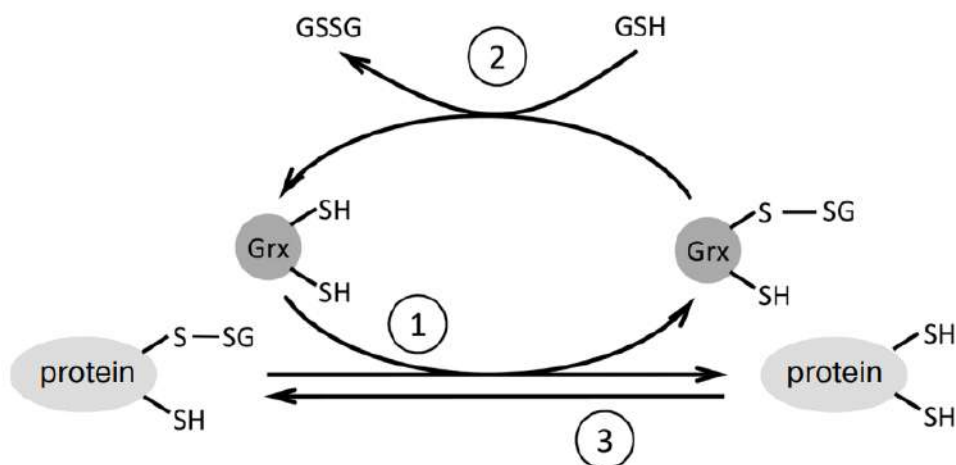
Αρχικά, οι γλουταρεδοξίνες χαρακτηρίστηκαν ως σημαντικά ένζυμα που συμμετέχουν στην αναγωγή δισουλφιδίων και στην απο-γλουταθειονυλίωση (Kalinina *et al.*, 2014). Αργότερα, αποκαλύφθηκε ο ρόλος τους ως πρωτεΐνες μεταφορείς για συμπλέγματα σιδήρου-θείου [Fe-S], χρησιμοποιώντας γλουταθειόνη για τη δέσμευση. Η δέσμευση αυτή μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό διμερών ή τετραμερών (Rouhier, 2010; Kalinina *et al.*, 2014). Η οξειδωμένη μορφή των γλουταρεδοξινών που προκύπτει έπειτα από την δράση τους ανάγεται από την γλουταθειόνη (GSH). Όμως, υπάρχουν γλουταρεδοξίνες, οι οποίες ανάγονται από αναγωγάσες θειορεδοξίνης εξαρτώμενες από την φερρεδοξίνη ή το NADPH.

Με βάση τη δομή τους ανήκουν στην υπεροικογένεια των θειορεδοξινών και μαζί με τις θειορεδοξίνες έχουν σημαντικό ρόλο στις κυτταρικές λειτουργίες που εξαρτώνται από την οξειδοαναγωγή. Η

αλληλουχία του ενεργού κέντρου εντοπίζεται στην αμινοτελική περιοχή της γλουταρεδοξίνης, ενώ η συντηρημένη περιοχή δέσμευσης της γλουταθειόνης βρίσκεται στο καρβοξυτελικό τμήμα του μορίου (Kalinina *et al.*, 2014).

Οι γλουταρεδοξίνες με βάση την φυλογένεση, τις αλληλουχίες και τη δομή τους χωρίζονται σε δύο βασικές ομάδες, τις διθειολικές και μονοθειολικές GRXs. Οι διθειολικές γλουταρεδοξίνες (dithiol Grxs) περιέχουν στην περιοχή του ενεργού κέντρου την συντηρημένη αλληλουχία Cys-X-X-Cys, ενώ οι μονοθειολικές (monothiol Grxs) την αλληλουχία Cys-X-X-Ser. Οι δεύτερες μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω στις γλουταρεδοξίνες με μια επικράτεια Grx (single-domain monothiol Grxs) και σε αυτές με πολλές επικράτειες Grxs (multi-domain monothiol Grxs), οι οποίες περιέχουν στο αμινοτελικό άκρο μια επικράτεια όμοια με Trx και στο καρβοξυτελικό άκρο μια με τρεις μονοθειολικές επικράτειες Grxs, που αναφέρονται και ως PICOT ομόλογη επικράτεια (Lillig *et al.*, 2008). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι όλες οι διθειολικές Grxs φαίνεται να καταλύουν αντιδράσεις με μονοθειολικό μηχανισμό, αλλά όχι όλες με διθειολικό, ενώ οι περισσότερες μονοθειολικές Grxs υστερούν ενεργότητας έναντι των γνωστών μηχανισμών (Lillig *et al.*, 2008). Επίσης, οι διθειολικές Grxs και οι μονοθειολικές με μία επικράτεια Grx είναι παρούσες σε όλο το φάσμα των οργανισμών, ενώ αυτές με πολλές επικράτειες Grx εντοπίζονται μόνο στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Στα βακτήρια, ζύμες και θηλαστικά, ο αριθμός των γλουταρεδοξινών είναι μικρός και η ταξινόμησή τους ως μόνο- και δι-θειολικές επαρκεί. Στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς όμως, εντοπίζεται ένας μεγάλος αριθμός γλουταρεδοξινών και έτσι ταξινομούνται σε έξι τάξεις με βάση την ομολογία τους στην αμινοξική τους αλληλουχία (Couturier *et al.*, 2009; Rouhier, 2010; Kalinina *et al.*, 2014).

Οι γλουταρεδοξίνες μπορούν να χρησιμοποιούν δύο καταλυτικούς μηχανισμούς: τον μονοθειολικό και τον διθειολικό. Ο μονοθειολικός μηχανισμός είναι χαρακτηριστικός για την αντίδραση απο-γλουταθειονυλίωσης πρωτεϊνών. Σε αυτή την περίπτωση, μόνο το πρώτο κατάλοιπο κυστεΐνης του ενεργού κέντρου Cys_A συμμετέχει στην κατάλυση, μέσω της νουκλεοφιλικής του επίθεσης στο υπόστρωμα (Kalinina *et al.*, 2014). Το υπόστρωμα απελευθερώνεται με τον σχηματισμό ενός ενδιάμεσου προϊόντος



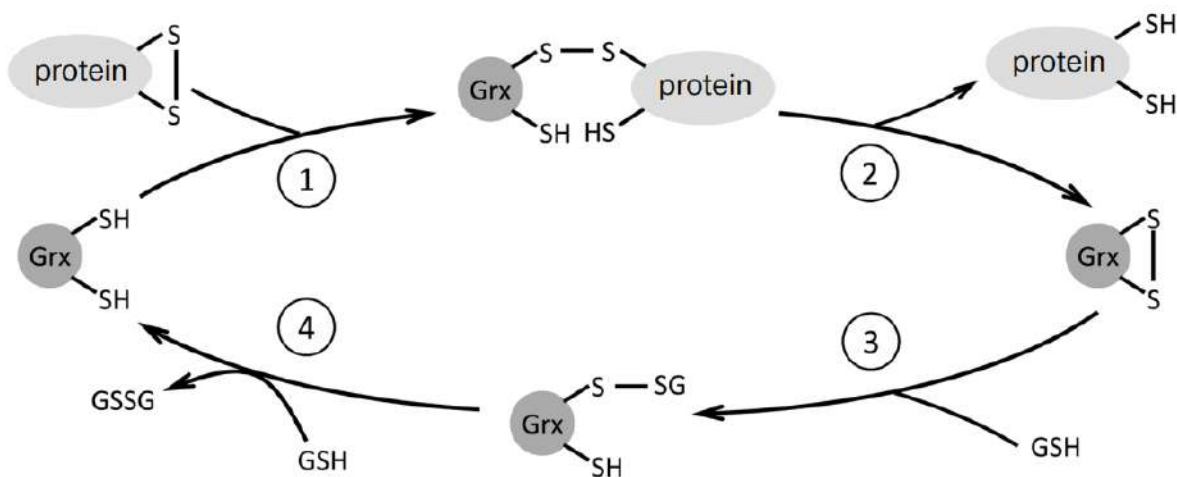
Εικόνα 1.6.1: Σχηματική απεικόνιση του μονοθειολικού μηχανισμού δράσης των γλουταρεδοξινών. Οι γλουταρεδοξίνες καταλύουν την απο-γλουταθειονυλίωση των πρωτεϊνών με αυτόν τον μηχανισμό μέσω του σχηματισμού ενός μεικτού δισουλφιδικού δεσμού με Grx (1), η οποία αναγεννάται από την γλουταθειόνη GSH (2). Σε συνθήκες με μειωμένο λόγο GSH/GSSG, η Grx μπορεί και καταλύει S-γλουταθειονυλίωση (3) (Kalinina *et al.*, 2014).

Grx-SSG (Εικόνα 1.6.1). Στη συνέχεια, η γλουταρεδοξίνη αναγεννάται από την γλουταθειόνη παράγοντας Grx(SH)₂ και GSSG. Όπως ήδη αναφέρθηκε, αυτός ο μηχανισμός δράσης χρησιμοποιείται και από τις μονοθειολικές και τις διθειολικές Grxs (Lillig *et al.*, 2008; Kalinina *et al.*, 2014).

Στον διθειολικό μηχανισμό, εκτός από το πρώτο κατάλοιπο κυστεΐνης του ενεργού κέντρου, απαιτείται και ένα επιπλέον, το οποίο μπορεί να είναι είτε το δεύτερο κατάλοιπο του ενεργού κέντρου Cys_B, είτε κάποιο απομακρυσμένο από την ενεργή περιοχή Cys_C. Στην περίπτωση της απο-γλουταθειονυλίωσης το ενδιάμεσο προϊόν Grx-SSG μετρέπεται σε Grx(S₂), έπειτα από τη δράση της γλουταθειόνης. Αυτός ο δισουλφιδικός δεσμός ανάγεται με την χρήση δύο μορίων γλουταθειόνης ή από την αναγωγή της γλουταθειόνης. Στην περίπτωση που το υπόστρωμα της γλουταρεδοξίνης χρειάζεται την αναγωγή κάποιου δισουλφιδικού δεσμού, το κατάλοιπο Cys_A της Grx σχηματίζει έναν παροδικό δισουλφιδικό δεσμό με μία κυστεΐνη του υποστρώματος. Στη συνέχεια, το ανηγμένο υπόστρωμα απελευθερώνεται, καθώς σχηματίζεται δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ των Cys_A και Cys_B ή Cys_C της Grx. Τελικά, ο δισουλφιδικός δεσμός Grx(S₂) ανάγεται με την χρήση δύο μορίων γλουταθειόνης ή από την αναγωγή της γλουταθειόνης (Εικόνα 1.6.2). Μέχρι στιγμής έχειδειχθεί ότι όλες οι διθειολικές Grxs έχουν την ικανότητα να δρουν με τον μονοθειολικό μηχανισμό αλλά όχι όλες με τον διθειολικό, ενώ όλες όσες δρουν με τον διθειολικό μπορούν και με τον μονοθειολικό (Lillig *et al.*, 2008; Kalinina *et al.*, 2014). Η κατανόηση των Grxs περιπλέκεται καθώς και οι μονοθειολικές μπορούν να δράσουν με παρόμοιο τρόπο χρησιμοποιώντας ένα επιπλέον κατάλοιπο κυστεΐνης (Couturier *et al.*, 2009).

Η GSSG που παράγεται με την δράση της αναγωγής της γλουταθειόνης και την κατανάλωση NADPH αναγεννά την γλουταθειόνη (Lillig *et al.*, 2008; Kalinina *et al.*, 2014). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ο λόγος GSH/GSSG αποτελεί σημαντικό δείκτη της κατάστασης του κυττάρου και η διατήρησή του στο βέλτιστο είναι απαραίτητο για τη βιωσιμότητα του κυττάρου (Kalinina *et al.*, 2014).

Οι πρωτεΐνες αυτές χρησιμοποιούν την αναγωγική δύναμη της γλουταθειόνης για την διατήρηση και ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου και των σηματοδοτικών μονοπατιών που



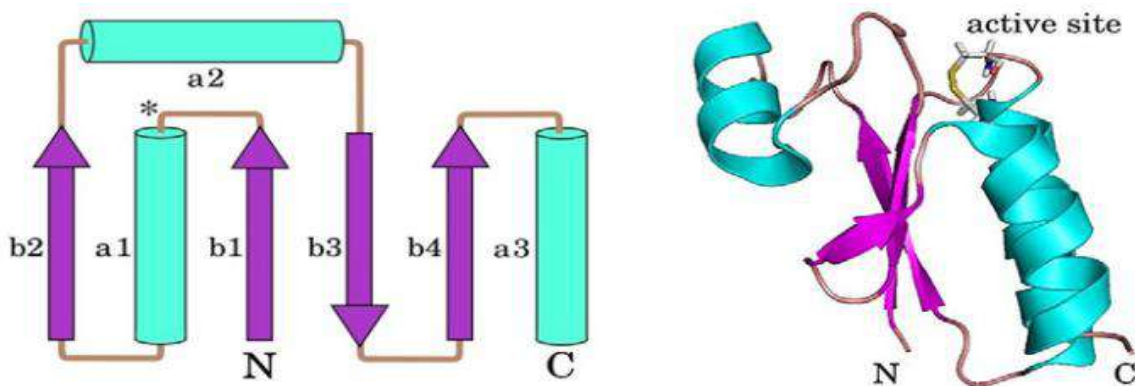
Εικόνα 1.6.2: Σχηματική απεικόνιση του διθειολικού μηχανισμού δράσης των γλουταρεδοξινών. Οι γλουταρεδοξίνες με αυτόν τον μηχανισμό ανάγουν δισουλφιδικούς δεσμούς πρωτεϊνών μέσω σχηματισμού ενδιάμεσων συμπλόκων μεταξύ Grx και υποστρώματος (1,2). Η οξειδωμένη Grx ανάγεται από δύο μόρια GSH (3,4) (Kalinina *et al.*, 2014).

εξαρτώνται από αυτή. Ειδικότερα, οι Grx παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της σηματοδότησης του κυττάρου, μέσω της αλληλεπίδρασης με ρυθμιστικές κινάσες που ελέγχουν τις αποκρίσεις σε καταπονήσεις, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση (Kalinina *et al.*, 2014).

1.6.1 Δομή γλουταρεδοξινών

Οι γλουταρεδοξίνες ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών με την χαρακτηριστική αναδίπλωση θειορεδοξινών (Trx fold). Οι βακτηριακές γλουταρεδοξίνες εμφανίζουν την πιο βασική δομή της οικογένειας, καθώς αναπαριστούν μια υπο-δομή ή μια επικράτεια των άλλων μελών της οικογένειας. Έτσι λοιπόν, αποτελείται από τέσσερις β-κλώνους που περικλείονται από τρεις α-έλικες. Επιπλέον, όλες οι οξειδοαναγωγάσες της οικογένειας των θειορεδοξινών μοιράζονται ένα όμοιο μοτίβο στο ενεργό κέντρο τους Cys-X-X-Cys ή Cys-X-X-Ser το οποίο εντοπίζεται στη θηλιά που ενώνει τον β1-κλώνο με την α1 έλικα και ένα κατάλοιπο *cis*-Pro (Εικόνα 1.6.1.1).

Οι Grxs καθορίζονται από την ικανότητά τους να δεσμεύουν και να χρησιμοποιούν γλουταθειόνη (GSH) ως υπόστρωμα. Δίπλα από τα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου, εντοπίζονται δύο επιπλέον συντηρημένες περιοχές: τα κατάλοιπα πριν την *cis*-Pro (TVP) και τα κατάλοιπα που ακολουθούν το Grx- χαρακτηριστικό GG-μοτίβο, GgxdD. Επιπλέον, δύο επιπλέον θετικά φορτισμένα κατάλοιπα στο αμινοτελικό άκρο του ενεργού κέντρου και του μοτίβου TVP συμμετέχουν στη στοίχιση της γλουταθειόνης με το υπόστρωμα (Lillig *et al.*, 2008).



Εικόνα 1.6.1.1: Σχηματική απεικόνιση της δομής των γλουταρεδοξινών. Οι βακτηριακές γλουταρεδοξίνες παρουσιάζουν την πιο βασική αναπαράσταση του διπλώματος της οικογένειας των θειορεδοξινών (PDB: 1EGO) (Lillig *et al.*, 2008).

1.6.2 Οι γλουταρεδοξίνες στον άνθρωπο

Στα θηλαστικά έχουν βρεθεί τέσσερις γλουταρεδοξίνες (Grx1, Grx2, Grx3/PICOT, Grx5). Οι Grx1 και Grx2 έχουν εντοπιστεί στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα και στα μιτοχόνδρια, ενώ η Grx3/PICOT εντοπίζεται μόνο στο κυτταρόπλασμα και η Grx5 μόνο στα μιτοχόνδρια (Kalinina *et al.*, 2014). Ο λόγος GSH/GSSG, όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι ύψιστης σημασίας για την «αντίληψη» της οξειδωτικής κατάστασης του κυττάρου και άρα για τον τρόπο δράσης των γλουταρεδοξινών (Kalinina *et al.*, 2014).

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι γλουταρεδοξίνες συμμετέχουν στην ομοιόσταση του σιδήρου. Η απορρύθμιση του σιδήρου συνδέεται με την παθοφυσιολογία σοβαρών ασθενειών, όπως είναι η ασθένεια Αλτσχάιμερ και Πάρκινσον αλλά και η αιμοχρωμάτωση. Η απουσία της Grx3 και Grx4 έχει δείχθει ότι οδηγεί στη συνεχόμενη έκφραση γονιδίων που ρυθμίζουν τον σίδηρο, ενώ επιπλέον προκαλούν την υπερπαραγωγή κυττάρων G1 και επιβραδύνουν την ανάπτυξη. Επιπλέον, τα κύτταρα στα οποία απουσιάζουν οι Grx3 και Grx4 έχουν μεγάλη ευαισθησία στην οξειδωτική καταπόνηση που προκαλείται από το υπεροξειδίο. Τέλος, η Grx2 φάνηκε ότι συμμετέχει στο σχηματισμό συμπλέγματος σιδήρου-θείου [Fe-S] (Lillig *et al.*, 2008; Kalinina *et al.*, 2014).

Όπως έχει δείχθει μέχρι στιγμής οι Grxs συμμετέχουν σε διαδικασίες σημαντικές για την βιωσιμότητα του κυττάρου και έτσι εμπλέκονται σε φυσιολογικές διεργασίες αλλά και σε συνθήκες που σχετίζονται με ασθένειες, όπως είναι η άμυνα του ανοσοποιητικού, η υπερτροφία της καρδιάς (Jeong *et al.*, 2008), ο νευροεκφυλισμός (Akterin *et al.*, 2006), η ανάπτυξη καρκίνου (Nakamura *et al.*, 2000; Welss *et al.*, 2003) και η μετάσταση του (Lillig *et al.*, 2008).

1.6.3 Οι γλουταρεδοξίνες στα φυτά

Ο αριθμός γλουταρεδοξινών στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς είναι μεγαλύτερος από ότι στα θηλαστικά, τα βακτήρια και τις ζύμες και έτσι μπορούν και ταξινομούνται περαιτέρω σε έξι τάξεις με βάση τις ομοιότητες τους στην περιοχή του ενεργού κέντρου και την περιοχή δέσμευσης με την γλουταθειόνη (Couturier *et al.*, 2009). Οι τάξεις V και VI, εντοπίζονται αποκλειστικά στα κυανοβακτήρια και περιέχουν πρωτεΐνες που στο ενεργό τους κέντρο φέρουν το μοτίβο CPWG και CPWC/S, αντίστοιχα. Έτσι, οι γλουταρεδοξίνες των χερσαίων φυτών ταξινομούνται σε τέσσερις τάξεις. Η τάξη I περιλαμβάνει πρωτεΐνες με το μοτίβο CxxC/S στο ενεργό κέντρο, εκτός από το μοτίβο CGFS που χαρακτηρίζει την τάξη II. Οι δύο αυτές τάξεις είναι κοινές για όλους τους οργανισμούς. Η τάξη III, εντοπίζεται αποκλειστικά στα φυτά και αποτελείται από πρωτεΐνες που έχουν στο ενεργό τους κέντρο την ιδιαίτερη αλληλουχία CCxx, με πιο συνηθισμένα τα CCxS και CCxC. Τέλος, η τάξη IV, είναι χαρακτηριστική των ευκαρυωτικών οργανισμών και αποτελείται από τρεις επικράτειες, την αμινοτελική που ακολουθείται από δυο επιπλέον επικράτειες με άγνωστη λειτουργία (Couturier *et al.*, 2009).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι Grxs συμμετέχουν στον έλεγχο των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) και χαρακτηρίζονται ως ρυθμιστές του οξειδοαναγωγικού περιεχομένου του κυττάρου. Πρόσφατες μελέτες αποκαλύπτουν ότι οι γλουταρεδοξίνες εμπλέκονται σε πληθώρα λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένων της ρύθμισης της μεταγραφής σε αποκρίσεις άμυνας του φυτού, της ανάπτυξη των ανθέων, τις αποκρίσεις της οξειδωτικής καταπόνησης, της σηματοδότησης, της ορμονικής ρύθμισης, της ομοιόσταση σιδήρου και της προσαρμογής στις περιβαλλοντικές συνθήκες (Wu *et al.*, 2017).

Βασικό χαρακτηριστικό των αποκρίσεων των φυτών έναντι καταπονήσεων αποτελεί η παραγωγή των ενεργών ριζών οξυγόνου, οι οποίες τροποποιούν την κυτταρική οξειδωτική ομοιόσταση και οδηγούν σε οξειδωτική καταπόνηση (Li, 2014). Έτσι, έχουν αναπτυχθεί συστήματα ανίχνευσης των ROS αλλά και απόκρισης τους στις καταπονήσεις που προκαλούν. Ένα από αυτά τα συστήματα αποτελούν και οι Grxs.

Μελέτες έχουν ταυτοποιήσει γλουταρεδοξίνες που οδηγούν σε ανθεκτικότητα σε υψηλές αλλά και σε χαμηλές θερμοκρασίες (Wu *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2015), όπως είναι η AtGRXS17, όπου η απουσία

της οδηγεί σε υπερευαίσθησία σε θερμική καταπόνηση. Επίσης, δείχθηκε ότι έπειτα από θερμοκρασιακές μεταβολές η AtGRXS17 μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, επάγοντας την έκφραση γονιδίων για την προσαρμογή στις αντίστοιχες συνθήκες (Wu *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2015). Επιπλέον, άλλες Grxs έχουν βρεθεί ότι σχετίζονται με την ανοχή στην ξηρασία και στην ώσμωση (Guo *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2013), άλλες με ανοχή στην παρουσία αρσενικού (Sundaram *et al.*, 2008, 2009; Ströher *et al.*, 2016) και άλλες στη φωτοτοξικότητα (Laporte *et al.*, 2012).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι γλουταρεδοξίνες έχουν την ικανότητα να δεσμεύσουν σύμπλοκα σιδήρου-θείου (Fe-S) και συμμετέχουν στην ομοιόσταση του σιδήρου. Στα φυτά, τα σύμπλοκα Fe-S είναι πολύ σημαντικά για την φωτοσύνθεση, τον μεταβολισμό και την αναπνοή ως μεταφορείς ηλεκτρονίων (Balk & Schaedler, 2014), ενώ μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προσθετικές ομάδες σε πρωτεΐνες με ρυθμιστικό ρόλο σε κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι οι αποκρίσεις σε οξειδωτική καταπόνηση και η σταθερότητα του γονιδιώματος (Balk & Pilon, 2011).

Οι γλουταρεδοξίνες έχουν αναγνωριστεί ως κρίσιμοι ρυθμιστές της ανάπτυξης των μεριστωμάτων, καθώς ελέγχουν τη κατάσταση των ROS σε αυτά τα κύτταρα και ρυθμίζουν την σηματοδότηση της αυξίνης και τον κυτταρικό κύκλο τους (Eckardt, 2010; Dietz, 2014). Έτσι, οι γλουταρεδοξίνες ROXY1 και ROXY2 είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των ανθέων (Xing & Zachgo, 2008). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην σηματοδότηση που αφορά την απόκριση απουσία αζώτου (Ohkubo *et al.*, 2017; Jung *et al.*, 2018; Noctor *et al.*, 2018).

Τέλος, οι γλουταρεδοξίνες ρυθμίζουν την ανταλλαγή μηνυμάτων (crosstalk) μεταξύ σαλικυλικού οξέος και ιασμονικού οξέος, επομένως και λειτουργίες που αφορούν αυτές τις ορμόνες, όπως είναι η ανθεκτικότητα σε μολύνσεις (Li, 2014; Caarls *et al.*, 2015).

1.6.4 Οι γλουταρεδοξίνες AtGRXS14 (CXIP1, AT3G54900) και AtGRXS16 (CXIP2, AT2G38270)

Οι γλουταρεδοξίνες CXIP1 και CXIP2 ονομάστηκαν έτσι από την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με μεταφορείς ασβεστίου CAX (CAX- Interacting Protein) (Cheng & Hirschi, 2003). Οι AtGRXS14 και AtGRXS16 ανήκουν στην τάξη II των γλουταρεδοξινών, που τις χαρακτηρίζει το μοτίβο CGFS στο ενεργό τους κέντρο (Rey *et al.*, 2017) και υποκυτταρικά εντοπίζονται στους χλωροπλάστες/πλαστίδια (Cheng *et al.*, 2006; Bandyopadhyay *et al.*, 2008; Couturier *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013). Επιπλέον, φαίνεται ότι και στις δύο, το καρβοξυτελικό τους άκρο έχει υψηλή ομολογία με τις πρωτεΐνες PICOT (Cheng & Hirschi, 2003; Cheng *et al.*, 2006).

Τα ιόντα Ca²⁺ είναι σημαντικά για τις διαδικασίες μεταγωγής σήματος και γίνεται αυστηρός έλεγχος των επιπέδων τους στο κυτταρόπλασμα με μεταφορείς Ca²⁺. Τέτοιοι μεταφορείς είναι και οι CAX (Cation exchanger) με τους CAX1, CAX2, CAX4 να εντοπίζονται στο χυμοτόπιο. Ο CAX1 έχει στο αμινοτελικό του άκρο με περιοχή που λειτουργεί ως αυτο-αναστολέας. Στην περιοχή αυτή δεσμεύεται η AtCXIP1 και τον ενεργοποιεί. Επίσης, οι CXIP1 και CXIP2 ενεργοποιούν πιο αδύναμα τον CAX4 και καθόλου τον CAX2, ενώ η AtCXIP2 δεν έχει κάποια επίδραση στον CAX1. Έτσι, οι AtGRXS14 και AtGRXS16 μπορούν και συμμετέχουν στην ρύθμιση των αντιμεταφορέων H⁺/Ca²⁺ CAX1 και CAX4, αντίστοιχα (Cheng & Hirschi, 2003).

Πρωτεΐνες που περιέχουν κέντρα Fe-S είναι απαραίτητα για ένα μεγάλο αριθμό βιοχημικών αντιδράσεων και σημαντικών διαδικασιών, όπως είναι η φωτοσύνθεση, η αναπνοή, η αφομοίωση αζώτου και θείου, η σύνθεση ριβοσωμάτων και η επιδιόρθωση του DNA (Bandyopadhyay *et al.*, 2008; Rouhier, 2010). Επομένως, είναι σημαντική η δημιουργία και η παρουσία συμπλεγμάτων Fe-S. Η βιοσύνθεση τους αρχίζει στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες (Bandyopadhyay *et al.*, 2008) και οι γλουταρεδοξίνες AtGRXS14 και AtGRXS16 φαίνεται να συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία (Bandyopadhyay *et al.*, 2008). Έτσι, αυτές οι GRXs πιθανότατα μπορούν και λειτουργούν ως καλούπια για την συγκέντρωση χλωροπλαστιδιακών συμπλόκων Fe-S ή ακόμα να συσσωρεύουν αυτά τα σύμπλοκα και να τα μεταφέρουν σε άλλες πρωτεΐνες δέκτες Fe-S (π.χ. φερρεδοξίνη) συμμετέχοντας έτσι στην ομοιόσταση του σιδήρου (Bandyopadhyay *et al.*, 2008; Rouhier, 2010; Couturier *et al.*, 2011).

Όσον αφορά την AtGRXS14 έχει δειχθεί ότι έχει κρίσιμο ρόλο στην ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των χλωροπλάστων, καθώς στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, η απουσία της οδηγεί στην οξείδωση πρωτεϊνών στους χλωροπλάστες και στην ευαισθησία των αρτιβλάστων σε εξωγενή οξειδωτικά (Cheng *et al.*, 2006). Επίσης, έχει προταθεί ότι η AtGRXS14 προστατεύει τις πρωτεΐνες από οξειδωτικές βλάβες, μέσω της διαμόρφωσης της ομοιόστασης του σιδήρου, ώστε να ελέγχονται οι ενεργές ρίζες οξυγόνου που παράγονται από την παρουσία του εντός των χλωροπλάστων (Cheng *et al.*, 2006). Έτσι, παίζει σημαντικό ρόλο σε συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης, υψηλών θερμοκρασιών και έκθεσης σε αρσενικό (Cheng *et al.*, 2006; Sundaram *et al.*, 2008, 2009; Ströher *et al.*, 2016; Rey *et al.*, 2017) αλλά και στη διατήρηση της περιεχόμενης χλωροφύλλης (Rey *et al.*, 2017).

Τέλος, η AtGRXS16, φάνηκε ότι στο φυτό της ντομάτας, παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης της γλουταθειόνης και στη ρύθμιση της ενεργότητας της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST). Επιπλέον, δρα καθοδικά των ROS που παράγονται στον αποπλάστη από την δράση βρασσινοστεροειδών και συμμετέχει στον μεταβολισμό του φυτοφαρμάκου chlorothalonil μέσω της διαμεσολάβησης οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης (Hou *et al.*, 2018).

1.7 Η οικογένεια των αλλεργιογόνων της γύρης Ole e 1

Η πρωτεΐνη Ole e 1 πρωτοανακαλύφθηκε ως ένα αλλεργιογόνο που απομονώθηκε από την γύρη της ελιάς (*Olea europaea* L.) (Lauzurica *et al.*, 1988) και ονοματίστηκε βάσει της ονοματολογίας της Διεθνούς Ένωσης Ανοσολογικών Εταιριών (International Union of Immunological Societies, IUIS) (King *et al.*, 1994). Θεωρείται το κυρίαρχο αλλεργιογόνο, που προκαλεί υπερευαισθησία στη γύρη της ελιάς σε ποσοστό πάνω από το 70% των ασθενών (Rodríguez *et al.*, 2002) και πρόκειται για μία όξινη πρωτεΐνη με πολλές γλυκοζυλιωμένες μορφές (Batanero *et al.*, 1994), όπως και με μικροτερογένειες σε πολλές θέσεις της αμινοξικής της αλληλουχίας (Villalba *et al.*, 1993, 1994).

Με σκοπό τον ανοσοκυτταροχημικό εντοπισμό της Ole e 1 χρησιμοποιήθηκε η Μικροσκοπία Ηλεκτρονικής Διεύλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM) κατά την ανάπτυξη της γύρης (Martín-Orozco *et al.*, 1994; Rodríguez-García *et al.*, 1995a; b). Οι μελέτες αυτές έχουν δείξει ότι στους κόκκους γύρης της ελιάς, αυτή η αλλεργιογόνος πρωτεΐνη εντοπίζεται στις δεξαμενές του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου, ΑΕΔ (Rough Endoplasmatic reticulum, RER) (Martín-Orozco *et al.*, 1994; Rodríguez-García *et al.*, 1995a; b; Alché *et al.*, 1999). Έχει αναφερθεί, ότι το σύστημα του ΑΕΔ υφίσταται διακριτές αλλαγές στη δομή του κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των κόκκων της γύρης (Rodríguez-García & Fernández,

1990; Alché *et al.*, 1999). Οι δεξαμενές του ΑΕΔ προοδευτικά μετατρέπονται σε άφθονους θύλακες και σάκους με πυκνό ηλεκτρονιακό περιεχόμενο, διασκορπισμένα σε όλο το κυτταρόπλασμα των ώριμων κόκκων γύρης (Rodríguez-García & Fernández, 1990; Alché *et al.*, 1999, 2004). Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι η Ole e I συντίθεται στο ΑΕΔ και αποθηκεύεται στο σύστημα αυτό (Alché *et al.*, 1999, 2004). Επιπρόσθετα, έχειδειχθεί ότι και άλλα αλλεργιογόνα της οικογένειας των Oleaceae παρουσιάζουν ίδιο εντοπισμό (Martín-Orozco *et al.*, 1994; Fernández *et al.*, 1996).

Με βάση ομοιότητες που έχουν άλλα αλλεργιογόνα με την πρωτεΐνη Ole e I δημιουργείται μια οικογένεια πρωτεϊνών που περιέχουν την επικράτεια Ole e I και είναι παρούσα σε πολλούς φυτικούς οργανισμούς (Jiménez-López *et al.*, 2011). Αυτές οι πρωτεΐνες περιέχουν την επικράτεια Ole e I, η οποία χαρακτηρίζεται από την συντηρημένη αμινοξική αλληλουχία E/Q/T-G-X-V-Y-C-D-T/N/P-C-R (Villalba *et al.*, 1993; Jiang *et al.*, 2005; Jiménez-López *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2014). Η οικογένεια των αλλεργιογόνων Ole e I διαιρείται σε 109 υπο-οικογένειες βάσει ομοιοτήτων στις αμινοξικές αλληλουχίες και σε δομικές ομοιότητες (Jiménez-López *et al.*, 2011).

Τέλος, μελέτες στο ρύζι αποκαλύπτουν πως η δράση των αλλεργιογόνων, συμπεριλαμβανομένου και αυτών της οικογένειας Ole e I, πιθανόν να μην περιορίζεται μόνο στην αναπαραγωγική φάση του φυτού αλλά να παίζουν ρόλο και στην βλαστική ανάπτυξη (Jiang *et al.*, 2005).

1.7.1 Δομή της αυτοτελούς δομικής περιοχής Ole

Η αυτοτελής δομική περιοχή Ole αποτελείται από έξι συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης, τα οποία πιθανότατα σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς, καθώς δεν έχουν εντοπιστεί ελεύθερες ομάδες θείου στην ολόκληρη μορφή της πρωτεΐνης (Villalba *et al.*, 1993; Jiménez-López *et al.*, 2011). Η πρωτεΐνη Ole e I της ελιάς παρουσιάζει υψηλό βαθμό μικροετερογένειας, που κυρίως συγκεντρώνεται στο τρίτο μόριο που βρίσκεται κοντά στο αμινοτελικό άκρο (Jiménez-López *et al.*, 2011). Το χαρακτηριστικό μοτίβο της Ole e I επικράτειας είναι η αμινοξική αλληλουχία, που ήδη έχει αναφερθεί, E/Q/T-G-X-V-Y-C-D-T/N/P-C-R (Sigrist *et al.*, 2010; Jiménez-López *et al.*, 2011). Υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία ανάμεσα στις πρωτεΐνες που μοιράζονται την αυτοτελή δομική περιοχή Ole, με αποτέλεσμα η οικογένεια Ole e I να περιλαμβάνει πρωτεΐνες πλούσιες σε προλίνη (proline-rich proteins), πρωτεΐνες που κωδικοποιούν για επικράτειες όμοιες με εξτενσίνες (proteins encoding extensin-like domains), φωσφογλυκερικές μούτάσες (phosphoglycerate mutase), γλυκοπρωτεΐνες πλούσιες σε τυροσίνη και υδρόξυ-προλίνη (tyrosine-rich hydroxyproline-rich glycoprotein) και γλυκοπρωτεΐνες πλούσιες σε υδρόξυ-προλίνη (hydroxyproline-rich glycoprotein) (Jiménez-López *et al.*, 2011).

1.7.2 Το αλλεργιογόνο SAH7 (AT4G08685)

Το αλλεργιογόνο SAH7 (AT4G08685) δεν έχει μελετηθεί και έτσι δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες για αυτό. Ανήκει στην οικογένεια των Ole e I αλλεργιογόνων και εξτενσινών. Η συστηματική και φυλογενετική ανάλυση της οικογένειας των πρωτεϊνών της γύρης Ole e I, την συμπεριλαμβάνει στην ομάδα Ole e I₄₈, την πιο εκτενή οικογένεια με 63 μέλη, που κωδικοποιούν για διαφορετικές πρωτεΐνες της γύρης ομόλογων της πρωτεΐνης C13 (αλλεργιογόνο του καλαμποκιού) (Jiménez-López *et al.*, 2011). Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι τα μόρια mRNA της SAH7 μπορούν να μεταφέρονται από κύτταρο σε κύτταρο (Thieme *et al.*, 2015). Τέλος, βιοπληροφορικές αναλύσεις δείχνουν ότι φέρει ένα πεπτίδιο μεταφοράς για εξωκυττάρια στόχευση.

2. Υλικά και Μέθοδοι

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζονται οι μεθοδολογίες, οι πειραματικές διαδικασίες καθώς και τα υλικά και θρεπτικά που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διατριβή.

2.1 Καλλιέργειες *Escherichia coli* και *Agrobacterium tumefaciens*

Η οργανισμική ποικιλότητα στην Γη αντικατοπτρίζεται μέσα από την πληθώρα των διαφορετικών ειδών στην εντυπωσιακή ποικιλομορφία σωματικών σχεδίων. Παρά την πολυπλοκότητα που χαρακτηρίζει την πλειονότητα των οργανισμών, υπάρχουν κάποιοι που διακρίνονται για την «απλότητα» των δομών και των λειτουργιών. Έτσι, για την προσέγγιση ερευνητικών προβλημάτων, οι ερευνητές έχουν εστιάσει την προσοχή τους στον μικρό αριθμό «απλούστερων» και «προσιτών» οργανισμών. Οι πιο σημαντικοί από αυτούς είναι το βακτήριο *Escherichia coli*, και οι φάγοι του, βακτηριοφάγοι T και λ, η μαγιά *Saccharomyces cerevisiae*, το αγριόχορτο *Arabidopsis thaliana*, ο νηματώδης σκώληκας *Caenorhabditis elegans*, η μύγα των φρούτων *Drosophila melanogaster* και ο ποντικός *Mus musculus*.

Κάθε πρότυπος οργανισμός διαθέτει κάποια συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, που τον καθιστούν ειδικό για την προσέγγιση διαφορετικών επιστημονικών μελετών. Για παράδειγμα, ο σακχαρομύκητας διαθέτει ένα ιδανικό σύστημα σύζευξης, γεγονός που το καθιέρωσε ως πρότυπο οργανισμό για τη διασαφήνιση ερωτημάτων που αφορούν το ευκαρυωτικό κύτταρο.

Παρά τα ειδικά χαρακτηριστικά τους, οι πρότυποι οργανισμοί διαθέτουν κάποια κοινά πλεονεκτήματα. Το βασικότερο πλεονέκτημά τους είναι η διαθεσιμότητα ισχυρών εργαλείων κλασικής και μοριακής γενετικής, που επιτρέπουν τη διαχείριση και μελέτη του οργανισμού. Το γεγονός ότι ένα μόνο είδος ήταν εφικτό να αξιοποιείται από μια πληθώρα ερευνητών, ήταν καταλύτης για την πρόοδο της βιολογικής επιστήμης, καθώς κατέστη δυνατή η διακίνηση ιδεών, μεθόδων, πειραματικών εργαλείων και στελεχών.

Στη συγκεκριμένη διατριβή χρησιμοποιήθηκαν στελέχη βακτηρίων *E. coli* (OmniMax, DH5a) για την διευκόλυνση κατασκευής των επιθυμητών πλασμιδιακών κατασκευών και τον έλεγχο τους, τα οποία αναπτύχθηκαν τόσο σε υγρά όσο και στερεά θρεπτικά μέσα.

Ένα ακόμα βακτήριο που χρησιμοποιήθηκε για τον μετασηματισμό των φυτών *Arabidopsis thaliana* ήταν το *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101). Το συγκεκριμένο βακτήριο ανήκει στην οικογένεια Rhizobiaceae και είναι ένα κατά Gram αρνητικό βακτήριο, το οποίο προκαλεί την ασθένεια του κορωνωτού κάλλου και μπορεί να μολύνει σχεδόν όλα τα δικοτυλήδονα φυτά (Cleene, 1985).

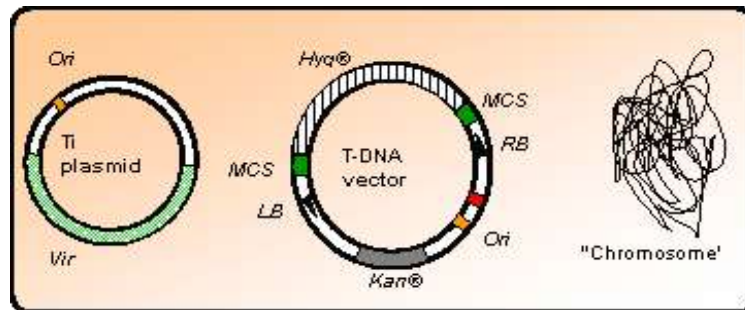
Η παθογενετικότητα του αγρίου τύπου *A. tumefaciens* οφείλεται στην ύπαρξη ενός μεγάλου πλασμιδίου, που ονομάζεται Ti-πλασμίδιο. Γενετικές αναλύσεις έδειξαν ότι δυο περιοχές αυτού του πλασμιδίου, Vir και T-DNA περιοχές, είναι υπεύθυνες για την ικανότητά του να μολύνει φυτικά κύτταρα. Η Vir περιοχή περιέχει έναν αριθμό γονιδίων, τα οποία όταν εκφραστούν μεταφέρουν και ενσωματώνουν ένα αντίγραφο DNA της T-DNA περιοχής στο γονιδίωμα του φυτού. Η T-DNA περιοχή του Ti-πλασμιδίου περιέχει γονίδια υπεύθυνα για τη σύνθεση ή την τροποποίηση βασικών φυτικών αυξητικών παραγόντων, όπως αυξίνες και κυτοκίνινες. Η ρυθμιστική έκφραση αυτών των γονιδίων τροποποιεί την κανονική διαφοροποίηση των φυτικών κυττάρων οδηγώντας σε νεοπλασία. Επίσης, η T-DNA περιοχή περιέχει γονίδια

για την έκφραση αμινοξέων και σπινών, τα οποία αναγνωρίζονται και καταβολίζονται αποκλειστικά από το βακτήριο (Zupan *et al.*, 2000; Gelvin, 2003).

Η μεταφορά του T-DNA εξαρτάται από δύο συνοριακές ακολουθίες (LB, left border και RB, right border) που βρίσκονται στα δύο άκρα του T-DNA. Πρόκειται για δύο όμοιες αλληλουχίες που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες ακολουθίες των 24bp, οι οποίες αναγνωρίζονται από Vir πρωτεΐνες (Zupan *et al.*, 2000; Gelvin, 2003).

Πέρα από την επαγωγή του κάλλου όμως, το Ti- πλασμίδιο έχει κάποια χαρακτηριστικά που το καθιστούν ιδανικό για τον μετασχηματισμό των φυτών. Η T-DNA περιοχή μεταξύ του LB και RB συνοριακού μπορεί να απαλειφθεί χωρίς να επηρεαστεί η ανάπτυξη του βακτηρίου, και επιπλέον, αν η περιοχή Vir παραμείνει ανέπαφη, τα βακτηριακά κύτταρα διατηρούν τη μολυσματικότητα τους. Επιπρόσθετα, οι πρωτεΐνες Vir μπορούν και επάγουν τα γονίδια της T-DNA περιοχής ακόμη και σε *trans* κατάσταση, δηλαδή σε περίπτωση που τα συνοριακά με τη T-DNA περιοχή βρίσκονται σε διαφορετικό πλασμίδιο εντός του βακτηρίου και όχι στο Ti. Όλα αυτά τα δεδομένα οδήγησαν τους ερευνητές στην ανάπτυξη τροποποιημένων βακτηριακών στελεχών, τα οποία φέρουν πλασμίδιο Ti απαλλαγμένο από την ενδογενή T-DNA περιοχή, διατηρώντας όμως την Vir. Ταυτόχρονα, έχουν κατασκευαστεί ειδικοί δυαδικοί φορείς (binary vectors), στους οποίους είναι δυνατός ο ανασυνδυασμός τους εντός δύο συνοριακών LB και RB (Εικόνα 2.1.1). Η εισαγωγή του δυαδικού φορέα στο *Agrobacterium* επιτρέπει τον μετασχηματισμό των φυτών με την επιθυμητή ένθεση (Hoekema *et al.*, 1983; Gelvin, 2003).

Το σύστημα του *Agrobacterium* αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για τη μοριακή γενετική, καθώς επιτρέπει την μεταφορά γενετικού υλικού στα δικοτυλήδονα. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά το φυτό *Arabidopsis*, η μεθοδολογία μετασχηματισμού του περιλαμβάνει την εμφάνιση ανώριμων ανθικών στελεχών σε καλλιέργεια αγροβακτηρίου που φέρει το κατάλληλο ανασυνδυασμένο μόριο (Bent, 2006).



Εικόνα 2.1.1: Σχηματική απεικόνιση του *Agrobacterium tumefaciens* με τα πλασμίδια και το χρωμοσωμικό DNA. Αριστερά: το τροποποιημένο Ti πλασμίδιο, που φέρει τα γονίδια Vir και την περιοχή έναρξης αντιγραφής (ori). Δεξιά: δυαδικός φορέας με την ori, την περιοχή πολλαπλών θέσεων ενδονουκλεασών (MCS), τα συνοριακά LB, RB, και τα γονίδια ανθεκτικότητας (Εικόνα από διαδίκτυο).

Για τις υγρές καλλιέργειες εμβολιάστηκαν με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα από stock -80°C ή από μοναδική αποικία τρυβλίου ή με 8μl προηγούμενης υγρής καλλιέργειας, σε 8ml LB που είχαν προστεθεί τα κατάλληλα αντιβιοτικά και επώαστηκαν στη κατάλληλη θερμοκρασία υπό ανάδευση.

Για τις στερεές καλλιέργειες τα βακτηριακά κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία LB-άγαρ 1,4% με κατάλληλα αντιβιοτικά επιλογής με τη μέθοδο διασποράς και επώαστηκαν ανεστραμμένα σε κλίβανο, σε κατάλληλη θερμοκρασία

Συγκεκριμένα, οι συνθήκες για το κάθε βακτήριο παρατίθενται στον Πίνακα 2.1.1.

Πίνακας 2.1.1: Συνθήκες ανάπτυξης βακτηρίων.

Βακτήρια	T (°C)	Χρόνος (h)	Αντιβιοτικά
<i>Escherichia coli</i>	37	12-18	Ανάλογα με το πλασμίδιο που φέρει
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	28	~36	Ανάλογα με το πλασμίδιο που φέρει, Ριφαμπικίνη ₁₀ , Γενταμικίνη ₃₀

Ανάλογα με το γονίδιο ανθεκτικότητας που φέρει κάθε πλασμίδιο, το αντιβιοτικό επιλογής αλλάζει. Η παρουσία των αντιβιοτικών είναι σημαντική για δύο κυρίως λόγους. Ο ένας αφορά την παρεμπόδιση ανάπτυξης βακτηρίων μη ανασυνδυασμένων και ο άλλος είναι ότι απουσία αντιβιοτικού, τα κύτταρα τείνουν να αποβάλλουν το πλασμίδιο που φέρουν, καθώς δεν τους είναι αναγκαίο.

2.2 Αποθήκευση *Escherichia coli* και *Agrobacterium tumefaciens* (stock -80°C)

Τα βακτηριακά κύτταρα των στελεχών που επρόκειτο να αποθηκευτούν είναι απαραίτητο να προέρχονται από φρέσκια καλλιέργεια. Από την καλλιέργεια αυτή, 900 μl μεταφέρονται σε αποστειρωμένο μικροσωληνάριο χωρητικότητας 1.5ml στο οποίο προστίθενται 300μl αποστειρωμένης γλυκερόλης 60%. Ακολουθεί ανάδευση και αποθήκευση σε υπερκαταψύκτη -80°C.

2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

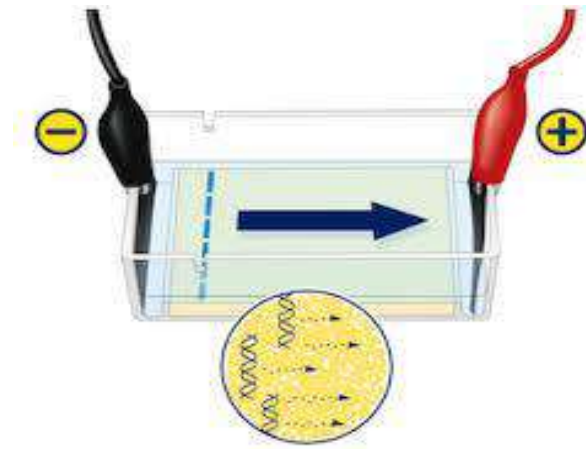
Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται για την ανάλυση νουκλεϊκών οξέων και βασίζεται στον διαχωρισμό φορτισμένων μορίων κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος, που είναι η αγαρόζη, στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο λόγω των φωσφορικών ομάδων του φωσφορικού σκελετού του και για αυτό κινείται προς την κάθοδο (θετικό πόλο). Τα φορτισμένα υποστρώματα κινούνται και διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους. Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να διαχωριστούν μόρια από 500bp έως 25kb.

Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που προέρχεται από φύκη και στα πήκτωμα της σχηματίζει ευμεγέθεις πόρους κατάλληλους για το διαχωρισμό DNA και RNA. Ανάλογα με τα μεγέθη των τμημάτων DNA που θέλουμε να διαχωρίσουμε χρησιμοποιούνται διαφορετικές συγκεντρώσεις αγαρόζης. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε κυρίως η συγκέντρωση 0,8% με διακριτική ικανότητα 500bp με 12kb.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε:

- Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας μιας PCR ή Colony PCR.
- Για τον έλεγχο απομόνωσης πλασμιδιακών φορέων.

- Για τον έλεγχο δοκιμαστικών πέψων.
- Για την απομόνωση τμήματος DNA που προέρχεται είτε από πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, είτε από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (DNA Gel Extraction, Macherey-Nagel).



Εικόνα 2.3.1: Διάταξη ηλεκτροφορητικής συσκευής. Τα μόρια του DNA κατευθύνονται στον θετικό πόλο. Όσο μικρότερο είναι ένα τμήμα DNA τόσο πιο γρήγορα μεταναστεύει στο πήκτωμα (Εικόνα από διαδίκτυο).

- Για τον έλεγχο της ποιότητας και ποσότητας RNA.

Τα δείγματα που αφορούν έλεγχο ηλεκτροφορούνται για 30-45min σε ένταση περίπου 100V, ενώ στη περίπτωση απομόνωση ζώνης DNA από πήκτωμα αγαρόζης, το δείγμα ηλεκτροφορείται περίπου για 2h σε ένταση 75V. Για την παρακολούθηση του μετώπου των δειγμάτων προστίθεται χρωστική (OrangeG). Όσον αφορά ηλεκτροφορήσεις RNA τα δείγματα ηλεκτροφορούνται για 5-10min σε ένταση 130V, ενώ χρησιμοποιείται ειδική χρωστική (RNA loading dye). Στη συνέχεια, το πήκτωμα αγαρόζης εμβαπτίζεται σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου για 10-15min και έπειτα παρατηρούνται οι ζώνες παρουσία ακτινοβολίας UV. Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων και να φθορίζει υπό την επίδραση ακτινοβολίας UV.

Η χρήση των χρωστικών βοηθά την προσθήκη του δείγματος στη κατάλληλη θέση («πηγαδάκι»), καθώς και την παρακολούθηση του μετώπου του δείγματος κατά τη μετανάστευση στο πήκτωμα.

2.4 Πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα, τα οποία αναγνωρίζουν συγκεκριμένες δίκλωνες παλίνδρομες αλληλουχίες, συνήθως 4-8 ζεύγη βάσεων και υδρολύουν των φωσφοδιεστερικό δεσμό σε συγκεκριμένο σημείο. Τα άκρα που μπορούν να σχηματιστούν είναι κολλώδη και «τυφλά». Τα ένζυμα αυτά απομονώνονται από βακτήρια στα οποία λαμβάνουν προστατευτικό ρόλο από την εισβολή ξένου-DNA.

Στην παρούσα εργασία οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο μετασηματισμένων κυττάρων, ώστε να εξακριβωθεί ποια κύτταρα φέρουν την επιθυμητή ένθεση. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν για την εισαγωγή των ενθεμάτων στους κατάλληλους φορείς. Να σημειωθεί πως για να εισαχθούν οι επιθυμητές αλληλουχίες στους φορείς κλωνοποίησης, κατά των σχεδιασμό εκκινητών

προστέθηκαν και τροποποιήθηκαν βάσεις, ώστε να σχηματιστούν αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από ενδονουκλεάσες.

Για να μπορέσουν να δράσουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, χρειάζονται το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα με τα απαραίτητα άλατα. Σε περιπτώσεις διπλής πέψης εντοπίζεται το ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο δρουν και τα δύο ένζυμα, διαφορετικά απαιτείται να πραγματοποιηθεί η πρώτη πέψη και έπειτα από τον καθαρισμό του δείγματος (Clean up ή Gel Extraction) να ακολουθήσει η δεύτερη.

Ο χρόνος επώασης συνήθως είναι 1h και 30min στους 37°C, με εξαίρεση τα ένζυμα P1-PspI και I-SceI. Το ένζυμο P1-PspI απαιτεί για τη δράση του 65°C, ενώ το I-SceI αν και δρα στους 37°C, ο χρόνος επώασης μειώνεται στα 45 min και ακολουθεί υποχρεωτικά απενεργοποίηση του ενζύμου στους 65°C για 20 min. Τέλος, ο όγκος των ενζύμων δε πρέπει να ξεπερνά το 10% του τελικού όγκου της αντίδρασης, καθώς η γλυκερόλη και το EDTA που περιέχονται στο ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης του ενζύμου μπορούν να δράσουν ανασταλτικά.

Πίνακας 2.4.1: Αντιδραστήρια για πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Αντιδραστήρια	C _{αρχική}	C _{τελική}	V ₂₀	V ₅₀
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x		1x	2μl	5μl
Πλασμίδιο		0.5 - 3μg	*	*
Ένζυμο 1	20U/μl	1U	0.4μl	1μl
Ένζυμο 2	20U/μl	1U	0.4μl	1μl
ddH ₂ O			Μέχρι 20μl	Μέχρι 50μl

2.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια *Escherichia coli*, Miniprep (Birnboim and Doly, 1979)

Η μέθοδος της αλκαλικής λύσης αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου που περιγράφηκε από τους Birnboim και Doly, 1979 και χρησιμοποιήθηκε στις περιπτώσεις ελέγχου των πιθανών ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, με την ακόλουθη πραγματοποίηση δοκιμαστικών πέψεων. Βήματα:

1. Σχηματισμός κυτταρικού ιζήματος σε μικροσωληνάριο (1,5ml) από 3ml φρέσκιας υγρής καλλιέργειας με φυγοκέντριση 30s με πλήρης ταχύτητα και ακολουθεί ολική απομάκρυνση υπερκειμένου. Σημαντικό σε αυτό το βήμα είναι η πλήρης απομάκρυνση υπερκειμένου, καθώς τα αντιβιοτικά μπορούν να καταστείλουν τη δράση ενζύμων σε επόμενα βήματα.
2. Προσθήκη 150μl διαλύματος P1 και πλήρη επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος. Στο στάδιο αυτό γίνεται δέσμευση των δισθενών ιόντων με τη δράση του EDTA. Τα δισθενή ιόντα δεσμεύονται από την κυτταρική μεμβράνη με σκοπό την αποσταθεροποίηση της και από ένζυμα, όπως η DNAάση, που λειτουργούν ως συμπαραγόντες.

3. Προσθήκη 200μl διαλύματος P2 και ήπια ανακίνηση 6-10 φορές. Το διάλυμα αυτό περιέχει SDS το οποίο διαταράσσει τη δομή των φωσφολιπιδίων και προκαλεί οπές στο κυτταρικό τοίχωμα. Η αύξηση του pH λόγω του NaOH προκαλεί την μετουσίωση των πρωτεϊνών και την αποδιάταξη του DNA διασπώντας τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων.
4. Προσθήκη 350μl διαλύματος P3 (4°C) και ήπια ανακίνηση 6-10 φορές, επώαση 5min στον πάγο, και φυγοκέντριση για 15min με πλήρη ταχύτητα σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (4°C). Στο στάδιο αυτό γίνεται επαναφορά του pH και επομένως, επαναδιάταξη του κυκλικού πλασμιδιακού DNA, που είναι πιο εύκολη του χρωμοσωμικού. Το πλασμίδιο παραμένει στη διαλυτή φάση, ενώ οι πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό σχηματίζουν αδιάλυτο ίζημα.
5. Μεταφορά του καθαρού υπερκείμενου σε καινούριο μικροσωληνάριο (1,5ml) και προσθήκη 350μl ισοπροπανόλης, έντονη ανάδευση, επώαση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου (RT), φυγοκέντριση για 5min με πλήρη ταχύτητα και ολική απομάκρυνση υπερκείμενου. Με τη δράση της ισοπροπανόλης το DNA κατακρημνίζεται.
6. Προσθήκη 350μl EtOH_{75%} και φυγοκέντριση για 5min με πλήρη ταχύτητα και ολική απομάκρυνση υπερκείμενου, για καθαρισμό του ιζήματος.
7. Ξήρανση του πλασμιδιακού ιζήματος για 15min στον απαγωγό ή 10min στον κλίβανο 70°C με ανοιχτό καπάκι και επαναιώρηση του σε 40-80μl.
8. Προσθήκη 2μl RNAse A (10mg/ml) (-20°C), ανακίνηση και επώαση για 10min στους 37°C.

2.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια *Escherichia coli* με τη χρήση NucleoSpin^R Plasmid DNA purification (Macherey-Nagel)

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη μέθοδο της αλκαλικής λύσης και της επερχόμενης δέσμευσης του DNA στη μεμβράνη της στήλης του NucleoSpin^R Plasmid/Plasmid (NoLid), με τη χρήση του κατάλληλου διαλύματος. Με τη χρήση αυτού του πρωτοκόλλου, επιτυγχάνεται απομόνωση πλασμιδίου σε πολύ πιο καθαρή μορφή από ότι με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης, χωρίς υπολείμματα πρωτεϊνών και RNA.

1. Σχηματισμός κυτταρικού ιζήματος σε μικροσωληνάριο (1,5ml) από 3ml φρέσκιας υγρής καλλιέργειας με φυγοκέντριση 30s σε 11000g και πλήρη απομάκρυνση υπερκείμενου.
2. Προσθήκη 250μl διαλύματος A1 (4°C) και πλήρη επαναιώρηση.
3. Προσθήκη 250μl διαλύματος A2 (περιέχει SDS) και ήπια ανακίνηση 6-8 φορές. Επώαση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου για λύση κυττάρων. Σε αυτό το βήμα επιτυγχάνεται η απελευθέρωση του DNA από το κύτταρο.
4. Προσθήκη 300μl διαλύματος A3 και ήπια ανακίνηση 6-8 φορές, μέχρι τον αποχρωματισμό του διαλύματος. Με αυτό το διάλυμα επέρχεται η εξουδετέρωση του διαλύματος και η δημιουργία κατάλληλων συνθηκών για την πρόσδεση του DNA στη μεμβράνη της στήλης.

5. φυγοκέντριση για 5min σε 11000g. Αν το υπερκείμενο δεν είναι καθαρό επαναλαμβάνεται η φυγοκέντριση. Με τη φυγοκέντριση αυτή πρωτεΐνες, γενωμικό DNA και κυτταρικά θραύσματα καθιζάνουν.
6. Τοποθέτηση της στήλης στη κολώνα συλλογής. Προσθήκη του καθαρού υπερκειμένου στη στήλη (μέγιστο 750μl), φυγοκέντριση για 1 min σε 11000g και απόρριψη αυτού που έχει περάσει στη κολώνα συλλογής.
7. Προσθήκη 600μl διαλύματος A4 και φυγοκέντριση για 1min σε 11000g και απόρριψη αυτού που έχει περάσει στη κολώνα συλλογής. Το συγκεκριμένο διάλυμα περιέχει αιθανόλη, η οποία απομακρύνει άλατα, μεταβολίτες και άλλα διαλυτά μακρομοριακά κυτταρικά συστατικά.
8. φυγοκέντριση 2min σε 11000g για την πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης και απόρριψη της κολώνας συλλογής.
9. Τοποθέτηση της στήλης σε καινούριο μικροσωληνάριο (1,5ml).
10. Προσθήκη στο κέντρο της στήλης 25μl διαλύματος AE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5). Επώαση 1min σε θερμοκρασία δωματίου. φυγοκέντριση 1min σε 11000g. Σε αυτό το βήμα το πλασμίδιο εκλούεται από την μεμβράνη της στήλης κάτω από χαμηλή ιονική ισχύ.
11. Επανάληψη του βήματος 10.

2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια *Escherichia coli* με τη χρήση NucleoBond^R Xtra Midi - Plasmid DNA purification (Macherey-Nagel)

1. Επίστρωση της επιθυμητής καλλιέργειας σε τρυβλίο LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής και επώαση στους 37°C για περίπου 16h. Εμβολιασμό μονής αποικίας σε 3ml θρεπτικό LB με το αντιβιοτικό επιλογής και επώαση στους 37°C με ανακίνηση 300rpm για 8h.
2. Εμβολιασμό μιας καλλιέργειας μεγαλύτερου όγκου (100ml) αραιώνοντας την προηγούμενη 1/1000 και προσθέτοντας το κατάλληλο αντιβιοτικό. Επώαση στους 37°C με ανακίνηση 300rpm για 12-16h.
3. Μέτρηση OD₆₀₀ βάση του οποίου γίνεται ο προσδιορισμός του όγκου της που χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί [$V \text{ (ml)} = 400 / OD_{600}$]. φυγοκέντριση για 15min σε 4.500-6000g σε ψυχόμενη φυγόκεντρο.
4. Προσθήκη 8ml διαλύματος επαναιώρησης RES (με RNase A) και επαναιώρηση.
5. Προσθήκη 8ml διαλύματος λύσης LYS. Ήπια ανακίνηση 5 φορές και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5min.
6. Διάβρεξη του φίλτρου της στήλης με 12ml διαλύματος εξισορρόπησης EQU.
7. Προσθήκη 8ml διαλύματος εξουδετέρωσης NEU και ήπια ανακίνηση 10-15 φορές.
8. Μεταφορά του καθαρού διαλύματος στο φίλτρο της στήλης και το αφήνουμε να διατρέξει τη στήλη.
9. Διάβρεξη του φίλτρου με 5ml διαλύματος εξισορρόπησης EQU.

10. Αφαίρεση του φίλτρου.
11. Προσθήκη 8ml διαλύματος πλύσης WASH.
12. Προσθήκη 5ml διαλύματος έκλουσης ELU εφόσον τοποθετηθεί σωληνάριο φυγόκεντρο (15ml).
13. Προσθήκη 3,5ml ισοπροπανόλη και πολύ καλή ανάμειξη. Επώαση 2min σε θερμοκρασία δωματίου. Φυγοκέντριση για 30min σε 15000g σε ψυχόμενη φυγόκεντρο και αφαίρεση υπερκείμενου.
14. Προσθήκη 2ml αιθανόλης_{70%} και φυγοκέντριση 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Στέγνωμα του πλασμιδιακού ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου.
15. Επαναιώρηση σε 100μl ddH₂O (ανάλογα το ίζημα).

2.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια *Agrobacterium tumefaciens*

Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή της αλκαλικής λύσης, με κάποιες τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, τα βήματα είναι:

1. Σχηματισμός κυτταρικού ιζήματος σε μικροσωληνάριο (1,5ml) από 1,5ml φρέσκιας υγρής καλλιέργειας με φυγοκέντριση 2min 14,5rpm και πλήρη απομάκρυνση υπερκείμενου.
2. Επαναιώρηση κυττάρων σε 100μl διάλυμα P1 (*E.coli*)
3. Προσθήκη 10μl λυσοζύμης (40mg/ml), ανάδευση 20s, 15min επώαση στους 37°C. Η λυσοζύμη διασπά το κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου.
4. Προσθήκη 200μl διαλύματος P2 (*E.coli*), ανάδευση 20s και προσθήκη 50μl φαινόλης (pH 8,0) και έντονη ανάδευση 1min.
5. Προσθήκη 200μl διαλύματος AgroP3 (4°C), ανάδευση και φυγοκέντριση για 5min με πλήρη ταχύτητα σε ψυχόμενη φυγόκεντρο.
6. Τοποθέτηση υπερκείμενου σε καινούριο μικροσωληνάριο (1,5ml) και προσθήκη σε αναλογία 2:1 παγωμένης αιθανόλης_{100%}: δείγμα, ανάδευση, 10min στον πάγο, φυγοκέντριση 10min με πλήρη ταχύτητα και ολική απομάκρυνση υπερκείμενου. Στο στάδιο αυτό γίνεται κατακρήμνιση του DNA.
7. Προσθήκη 350μl αιθανόλης_{75%}, φυγοκέντριση 5min με πλήρη ταχύτητα και ολική απομάκρυνση υπερκείμενου.
8. Στέγνωμα του πλασμιδιακού ιζήματος με 15min στον απαγωγό με ανοιχτά καπάκια και επαναιώρηση σε 40-80μl ddH₂O (ανάλογα το ίζημα).

2.9 Απομόνωση RNA (DNA-free RNA isolation –Vegetative tissues)

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του RNA αποτελεί τροποποίηση της Ευρεσιτεχνίας των Ηνωμένων Εθνών 5973137 και έχει προσαρμοστεί για την RT-qPCR. Χρησιμοποιήθηκε

ιστός από *Arabidopsis thaliana* βάρους περίπου 100mg. Η μέθοδος αυτή είναι γρήγορη, φθηνή, αποδοτική - καθώς απομονώνεται μεγάλη ποσότητα RNA - τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται δε περιέχουν τοξικούς οργανικούς διαλύτες και είναι σταθερά σε θερμοκρασία δωματίου (Oñate-Sánchez & Vicente-Carbajosa, 2008).

Χρησιμοποιείται ένα ανιονικό απορρυπαντικό (SDS) και ένας χηλικός παράγοντας (EDTA) σε χαμηλό pH για τη διαλυτοποίηση του κυτταρικού περιεχομένου και την αδρανοποίηση των RNAσων. Το βήμα αυτό ακολουθεί ο καθαρισμός του RNA χρησιμοποιώντας υψηλές συγκεντρώσεις, αντιδραστήρια με άλατα σε χαμηλό pH για τη μείωση σημαντικής μόλυνσης DNA και πρωτεϊνών και τη κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη. Τα δείγματα δεν είναι πλήρως καθαρά, αλλά μπορεί να λάβει μέρος η αντίδραση με τη χρήση DNAσης (Oñate-Sánchez & Vicente-Carbajosa, 2008).

A. Προετοιμασία δειγμάτων:

Πάγωμα των ιστών σε υγρό άζωτο και κονιορτοποίηση του ιστού σε αυτό με τη βοήθεια εμβόλου.

B. Πρωτόκολλο 1:

1. Προσθήκη 300μl διαλύματος κυτταρικής λύσης Soll και ομογενοποίηση με ανακινητήρα (vortex), 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Προσθήκη 100μl διαλύματος Protein-DNA prep Solll και ανάδευση σε ανακινητήρα 2s.
3. Στον πάγο για 15min.
4. φυγοκέντριση 10min με πλήρη ταχύτητα σε ψυχόμενη φυγόκεντρο.
5. Μεταφορά υπερκειμένου σε καινούριο μικροσωληνάριο (1,5ml) μέχρι το υπερκείμενο να είναι πλήρως καθαρό.
6. Μεταφορά υπερκειμένου σε καινούριο μικροσωληνάριο (1.5ml). Προσθήκη 300μl Ισοπροπανόλης και έντονη ανάδευση.
7. φυγοκέντριση για 4min με πλήρη ταχύτητα και ολική απομάκρυνση υπερκειμένου.
8. Ξέπλυμα του ιζήματος με αιθανόλη_{70%} (~300μl, φυγοκέντριση 4min σε πλήρη ταχύτητα και ολική απομάκρυνση υπερκειμένου).
9. Στέγνωμα του ιζήματος και επαναιώρηση σε 25μl παγωμένου ddH₂O
10. Ηλεκτροφόρηση (2,5μl δείγματος, 1μl χρωστικής, 6,5μl ddH₂O).

C. Αντίδραση με DNAάση (NEB):

Πίνακας 2.9.1: Αντίδραση DNaseI (Biolabs)

Αντιδραστήρια	C _{τελική}	V ₁₀₀
DNaseI Biolabs Buffer (10x)	1x	10μl
RNA	<10μg	(23μl)

DnaseI Biolabs (2U/μl)	2U	1μl
ddH ₂ O	-	Μέχρι 100μl
Επώαση στους 37°C για 10min		
0.5M EDTA	5mM	1μl
Επώαση στους 75°C για 10min		

D. Πρωτόκολλο 1 (Συνέχεια):

1. Προσθήκη 50μl CH₃COONH₄ και 400μl Αιθανόλης_{100%}, καλή ανάδευση.
2. φυγοκέντριση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο 20min με πλήρη ταχύτητα.
3. Ξέπλυμα του ιζήματος με αιθανόλη_{70%} (~300μl, φυγοκέντριση 10min με πλήρη ταχύτητα σε ψυχόμενη φυγόκεντρο και απομάκρυνση υπερκείμενου).
4. Στέγνωμα του ιζήματος και επαναιώρηση σε 20μl ddH₂O.
5. Ηλεκτροφόρηση 2μl δείγματος.

2.10 Απομόνωση DNA από ζώνη πήκτης αγαρόζης και καθαρισμό PCR (PCR clean Up, Gel Extraction, Macherey-Nagel)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για των καθαρισμό τμημάτων DNA από ενζυμικές αντιδράσεις αλλά και από πήκτωμα αγαρόζης. Συγκεκριμένα, απομακρύνονται νουκλεοτίδια, εκκινητές, ένζυμα, χρωστικές, άλατα κ.α. Στο δείγμα προστίθεται διάλυμα δέσμευσης, και στη περίπτωση της απομόνωσης από πήκτωμα αγαρόζης γίνεται επώαση για τη διαλυτοποίηση του πηκτώματος. Παρουσία του χαστροπικού άλατος, που περιέχεται στο διάλυμα δέσμευσης, το DNA δεσμεύεται στη μεμβράνη του NucleoSpin[®] Gel και της στήλης PCR Clean-up. Άλλα στοιχεία απομακρύνονται με ξέπλυμα της μεμβράνης με αιθανόλη. Τέλος, το καθαρό DNA εκλούεται κάτω από συνθήκες χαμηλών αλάτων και ελαφρώς αλκαλικού περιβάλλοντος. Στη περίπτωση του PCR Clean-up το πρωτόκολλο τροποποιείται ξεκινώντας από το βήμα 2 χωρίς την επώαση.

1. Τοποθέτηση του πηκτώματος αγαρόζης εφόσον έχει επωαστεί στο αιθίδιο στη UV και αποκοπή της επιθυμητής ζώνης με καθαρό ξυραφάκι και μεταφορά της σε καινούριο μικροσωληνάριο. Ζύγισμα σε ζυγό ακριβείας.
2. Προσθήκη NT1 σε αναλογία 2NT1:1 δείγματος και επώαση στους 50°C για 10min με ανακίνηση κάθε 2-3min μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη.
3. Τοποθέτηση της στήλης σε σωληνάριο συλλογής (collection tube), προσθήκη της ποσότητας στη στήλη (μέγιστο 700μl) και φυγοκέντριση 30s σε 11000g. Απόρριψη αυτού που έχει περάσει στο σωληνάριο συλλογής και επανάληψη αν χρειάζεται.

4. Προσθήκη 700μl NT3, φυγοκέντριση 30s σε 11000g και απόρριψη αυτού που έχει περάσει στο σωληνάριο συλλογής.
5. φυγοκέντριση 1min σε 11000g και απόρριψη του σωληναρίου συλλογής, τοποθέτηση της στήλης σε καινούριο μικροσωληνάριο (1,5ml) και επώαση για 5min στους 70°C με ανοιχτά καπάκια για ολική απομάκρυνση αιθανόλης (που περιέχεται στο NT3).
6. Προσθήκη 30μl NE (5mM Tris/HCl, pH 8.5) (σε δύο βήματα) στο κέντρο της στήλης, επώαση για 1min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντριση για 1min σε 11000g.

*Για τμήματα πάνω από 1000bp ή αχνές ζώνες το NE προθερμάνθηκε στους 70°C, και η επώαση έγινε για 5min στους 70°C.

2.11 Αντίδραση λιγάσης (Ligation)

Στον ανασυνδυασμό μορίων τα τμήματα DNA που χρησιμοποιούνται έχουν παραχθεί με πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Η πλειοψηφία των ενζύμων αυτών αναγνωρίζουν μια αλληλουχία και δημιουργούν κολλώδη άκρα, δηλαδή τα τμήματα που προκύπτουν διαθέτουν μονόκλινα τμήματα. Διαφορετικά τμήματα DNA που έχουν προκύψει από τη δράση της ίδιας ενδονουκλεάσης, διαθέτουν συμπληρωματικά μεταξύ τους άκρα επομένως, μπορούν να συνδεθούν μέσω συμπληρωματικότητας. Το ζευγάρι αυτό σταθεροποιείται με τη δράση DNA λιγάσης που σχηματίζει φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Έτσι, το πλασμίδιο με τα επιθυμητά ενθέματα ανασυνδυάζονται.

Τα ένζυμο λιγάσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από την εταιρεία Takara και New England Biolabs. Ο τελικός όγκος πλασμιδιακού φορέα, ενθέματος και ddH₂O είναι 8.5μl. Οι αντιδράσεις επάζονται στους 16°C για ένα βράδυ (overnight).

Πίνακας 2.11.1: Αντιδραστήρια για την αντίδραση λιγάσης T4 (Takara).

Αντιδραστήρια	C _{τελική}	V ₁₀
Ligase T4 Buffer Takara (10x)	1x	1μl
Ligase T4 Takara (350U/μl)	175U	0.5μl
Πλασμιδιακός φορέας	25 fmol	*
Ενθεση	2.5-250 fmol	*
ddH ₂ O	N/A	-

Πίνακας 2.11.2: Αντιδραστήρια για την αντίδραση λιγάσης T4 (New England Biolabs).

Αντιδραστήρια	C _{τελική}	V ₁₀
T4 DNA Ligase Buffer (10x)	1x	1μl
T4 DNA Ligase (20 U/μl)	10 U	0.5μl
Πλασμιδιακός φορέας	50ng (0.020pmol)	*

Ενθεςη	37.5ng (0.060pmol)	*
ddH ₂ O	-	-

2.12 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli*

Η διαδικασία εισαγωγής ξένου DNA σε ένα οργανισμό - ξενιστή ονομάζεται μετασχηματισμός (transformation) και με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται ο *in vivo* πολλαπλασιασμός του ανασυνδυασμένου μορίου.

1. Δεκτικά κύτταρα *E. coli* (Omnimax ή DH5α) μεταφέρθηκαν από τους -80°C στον πάγο για να ξεπαγώσουν.
2. Προσθήκη του δείγματος της αντίδρασης της λιγάσης (ligase mix) όλο (ή 1/2, 50-500ng πλασμιδιακού DNA) και αφήνεται για 15min στον πάγο.
3. Επώαση 45s στους 42°C.
4. Προσθήκη 1ml LB χωρίς αντιβιοτικά προθερμασμένο στους 37°C και επώαση στους 37°C για 1h υπό ανάδευση.
5. Επίστρωση 100μl σε τρυβλίο με κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής. Το υπόλοιπο φυγοκεντρείται για 2min σε 3000 rpm.
6. Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναίωση (~100μl LB). Από αυτό 60μl επιστρώνονται σε δεύτερο τρυβλίο και το υπόλοιπο σε τρίτο τρυβλίο.
7. Επώαση στους 37°C.

*στην περίπτωση των δειγμάτων μαρτύρων μετά το βήμα 6 η ποσότητα των κυττάρων προστίθεται στο τρυβλίο με τα πρώτα 100μl.

2.13 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens*

1. Ξεπάγωμα κυττάρων *Agrobacterium* GV3101 στον πάγο.
2. Προσθήκη 1μg πλασμιδιακού DNA και πάγωμα των κυττάρων γρήγορα στο υγρό άζωτο.
3. Επώαση στους 37°C για 5min.
4. Προσθήκη 1ml YEP (χωρίς αντιβιοτικά) και επώαση για 2-4 ώρες στους 28-30°C(shake)
5. Φυγοκέντριση 30s σε 11000g.
6. Απομάκρυνση και επαναίωση σε 100μl YEP και επίστρωση σε YEP με κατάλληλα αντιβιοτικά.
7. Επώαση των τρυβλίων στους 28-30°C για περίπου 36h.

* Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ριφαμπικίνη 10mg/ml, γενταμικίνη 30mg/ml, και η επιλογή για τον πλασμιδιακό φορέα.

2.14 Μετασχηματισμός του φυτού *Arabidopsis thaliana* με τη μεσολάβηση του βακτηρίου *Agrobacterium*

Το δικοτυλήδονο αγγειόσπερμο *Arabidopsis thaliana* (2.14.1) είναι ένα ζιζάνιο της οικογένειας Brassicaceae. Οι οικότυποι που χρησιμοποιούνται είναι οι Landsberg erecta (Ler), Columbia (Col), Wasilewskija (Ws). Ο οικότυπος που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα εργασία είναι ο Columbia. Το είδος αυτό αποτελεί πρότυπο οργανισμό καθώς διαθέτει χαρακτηριστικά που διευκολύνουν μοριακές πειραματικές προσεγγίσεις (Meinke *et al.*, 1998). Αυτά τα χαρακτηριστικά είναι: Το μικρό γονιδίωμα, το οποίο περιέχει 125 εκατομμύρια ζεύγη βάσεων. Αν και αποτελείται από περίπου 25.500 γονίδια, πολλά από αυτά επαναλαμβάνονται, με αποτέλεσμα ο αριθμός των μοναδικών γονιδίων στην *Arabidopsis* να είναι περίπου 15.000. Επίσης, η νουκλεοτιδική αλληλουχία ολοκληρώθηκε το Δεκέμβριο του 2000 (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), με αποτέλεσμα τη δυνατότητα διαφορετικής προσέγγισης ερωτημάτων.

1. Ο διπλοειδισμός, καθώς τα περισσότερα φυτικά είδη εμφανίζουν πολυπλοειδία που δυσκολεύουν την μελέτη υποτελών χαρακτηριστικών.
2. Το μικρό του μέγεθος καθώς φτάνει τα 30-40 cm ύψος, οπότε μπορεί να καλλιεργηθεί σε ελεγχόμενους θαλάμους.
3. Ο μικρός κύκλος ζωής, 8-10 εβδομάδες, και έτσι γίνεται εφικτό η ανάπτυξη μέχρι και 6 γενεών σε ένα χρόνο.
4. Η παρουσία ερμαφρόδιτων ανθέων, τα οποία υπό κανονικές συνθήκες αυτογονιμοποιούνται, και έτσι μπορούν εύκολα να διατηρήσουν ομόζυγες σειρές, χωρίς να αποκλείεται η τεχνητή γονιμοποίηση (σταυρογονιμοποίηση).
5. Ο εύκολος και γρήγορος μετασχηματισμός του με τη χρήση του *Agrobacterium tumefaciens*.

Η εύκολη μεταλλαγμένη σπερμάτων με την επίδραση ακτίνων-X ή χημικών παραγόντων, όπως το αιθυλο-μεθανο-σουλφονικό (EMS). Ο μετασχηματισμός του φυτού *A. thaliana* αποτελεί μια απλή διαδικασία και με υψηλή επιτυχία (Bent, 2006). Το φυτό *Arabidopsis thaliana* και κάποια άλλα μέλη της οικογένειας Brassicaceae είναι μοναδικά καθώς επιτρέπουν την εξωγενή εισαγωγή βακτηρίων *Agrobacterium* να εποικίσουν το εσωτερικό των ωοθηκών, όπου τα αρχέγονα κύτταρα των θηλυκών γαμετόφυτων μετασχηματίζονται (Bent, 2006).

Ανθισμένα φυτά (4-8 εβδομάδων) απλά εμβαιπίζονται στο κατάλληλο βακτηριακό στέλεχος *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) και στη συνέχεια συλλέγονται τα σπέρματα αυτών των T₀ φυτών, στα οποία γίνεται επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών T₁ με φύτεμα σε κατάλληλο αντιβιοτικό. Κάθε φυτό αποτελεί μια σειρά.

1. Εμβολιασμός GV3101 (-80°C) σε 8ml YEB και προσθήκη των κατάλληλων αντιβιοτικών, επώαση για 36h στους 30°C και ανάδευση 150rpm.
2. Εμβολιασμός 3ml (ανάλογα τη καλλιέργεια) της καλλιέργειας αυτής σε 300ml YEB χωρίς αντιβιοτικά, που βρίσκεται σε κωνική των 500ml και επώαση στους 30°C για ένα βράδυ (overnight).

- Μέτρηση της απορρόφησης της καλλιέργειας στα 600nm. Πρέπει να είναι πάνω από 1. Τότε αφήνεται στον πάγο για 15min.



Εικόνα 2.14.1: Το φυτό *Arabidopsis thaliana* (από διαδικτυο).

- Σχηματισμός κυτταρικού ιζήματος με φυγοκέντριση στα 4000rpm για 15min και αφήνονται για λίγο στον πάγο.

- Προσθήκη 1ml I.M. (Infiltration Media) σε κάθε μπουκάλι φυγόκεντρου και επαναίωση του κυτταρικού ιζήματος. Ένωση των τεσσάρων σε ένα μπουκάλι.

- Μέτρηση της απορρόφησης στα 600nm που πρέπει να ρυθμιστεί μεταξύ 0,5-0,9 με προσθήκη I.M. Μέτρηση OD₆₀₀ με αραιώση 1:100 ή 1:1000 (δηλαδή 2ml I.M. +20μl κύτταρα ή 2ml I.M. +2μl κύτταρα αντίστοιχα). Μεγαλύτερη τιμή στην απορρόφηση μπορεί να οδηγήσει σε τοξικότητα.

- Προσθήκη 350ml I.M. σε κωνική των 500ml και προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας κυττάρων (ώστε η απορρόφηση να είναι μεταξύ 0,5-0,9), Silwett-L77 (C_i=200μl/L) και BAP (C_i=0,01mg/ml). Καλό ανακάτεμα.

[Silwett-L77: επιφανειοδραστική ουσία, βοηθά στη συγκράτηση του διαλύματος στο φυτό,

για την ενίσχυση της άνθισης και κυτταρικής διαίρεσης]

BAP (6-Benzylaminopurine): συνθετική κυτοκίνη,

- Κόψιμο των κερατίων (silique) που έχουν αναπτυχθεί. Τοποθέτηση του διαλύματος σε ποτήρι ζέσεως των 250ml. Εμβάπτιση του φυτού για 1min (x2). Με σύριγγα προσθέτουμε το διάλυμα σε σημεία κοντά στη ροζέτα που δεν έχει φτάσει από την εμβάπτιση (x2).

- Κάλυψη των φυτών για <24h.

2.15 Clone JET PCR Cloning KIT (Thermo Scientific)

Ο πλασμιδιακός φορέας pJET1.2 μπορεί να δεχθεί τμήματα από 6bp μέχρι και 10kb, καθώς επίσης και τμήματα με τυφλά άκρα ή και με κολλώδη. Η πολυμεράση που χρησιμοποιήσαμε LongAmpTaq DNA Polymerase εισάγει στο 3'-άκρο του προϊόντος dA. Έτσι, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο κλωνοποίησης κολλώδη άκρων (Sticky-End Cloning Protocol).

- Στήσιμο της αντίδρασης δημιουργίας τυφλών άκρων στον πάγο (Blunting Reaction).

Πίνακας 2.15.1: Αντιδραστήρια και στοιχεία για την αντίδραση 'τυφλοποίησης' του πρωτόκολλου κλωνοποίησης του pJET1.2

Αντιδραστήρια	V ₂₀ (μl)
2x Reaction Buffer	10
Προϊόν PCR	1 (0.15 pmol ends)

ddH ₂ O	6
DNA Blunting Enzyme	1

2. Επώαση στους 70°C για 5min. Έπειτα στον πάγο.
3. Στήσιμο της αντίδρασης λιγάσης στον πάγο. Προσθήκη των παρακάτω στο μείγμα της αντίδρασης δημιουργίας τυφλών άκρων (blunting reaction).

Πίνακας 2.15.2: Αντιδραστήρια και στοιχεία για την αντίδραση λιγάσης του πρωτόκολλου κλωνοποίησης του pJET1.2.

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)
pJET1.2/blunt Cloning Vector (50ng/μl)	1 (0.05 pmol ends)
T4 DNA Ligase	1

4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5min

*Για τμήματα πάνω από 3kb η επώαση μπορεί να παραταθεί για 30min(παραπάνω μπορεί να μειώσει την αποδοτικότητα της κλωνοποίησης).

5. Χρησιμοποίηση του μείγματος αυτού απευθείας για μετασχηματισμό βακτηρίων *E. coli*.

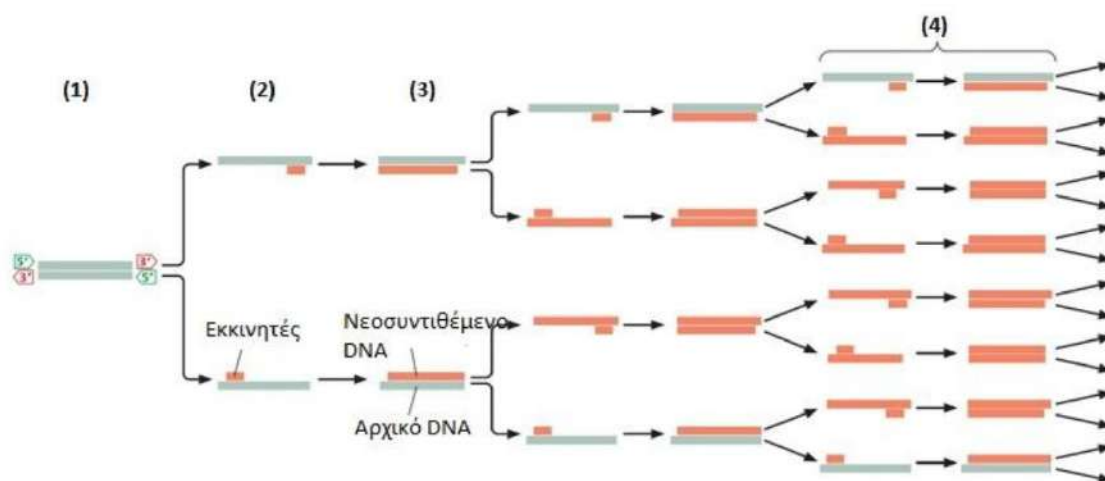
Η κλωνοποίηση στον φορέα pJET1.2 πραγματοποιείται για την διευκόλυνση του επακόλουθου ανασυνδυασμού. Τα ένζυμα για να δράσουν απαιτούν τη παρουσία ενός αριθμού βάσεων ώστε να γίνει η αναγνώριση της αλληλουχίας που κόβουν. Ο αριθμός των βάσεων εξαρτάται από το ένζυμο. Στο γραμμικό μόριο των τμημάτων που έχουν προκύψει από PCR μπορεί να παρουσιαστεί δυσκολία στην δράση των περιοριστικών ενδονουκλεασών, ενώ στη περίπτωση του pJET1.2, η πέψη γίνεται πιο αποτελεσματική. Έτσι, τα επιθυμητά τμήματα απομονώνονται με πέψη από τον pJET1.2 με την χρήση των κατάλληλων περιοριστικών ενδονουκλεασών.

2.16 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction- PCR)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) ανακαλύφθηκε το 1983 από τον Kary Mullis, για την οποία του απονεμήθηκε και το Νόμπελ Χημείας το 1993. Η PCR αποτελεί μια δυναμική μεθοδολογία για την ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων DNA *in vitro*, με τη χρησιμοποίηση διαδοχικών μεταβολών θερμοκρασιών. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης απαιτούνται το εκμαγείο, ένα ζευγάρι εκκινητών, μείγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων, η DNA πολυμεράση και ρυθμιστικό διάλυμα, που περιέχει στοιχεία για την βελτιστοποίηση της αντίδρασης.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε αυτόματους θερμικούς κυκλοποιητές, που μεταβαίνουν αυτόματα στις καθορισμένες θερμοκρασίες που απαιτούνται σε κάθε κύκλο. Οι συνθήκες κάθε κύκλου ποικίλουν ανάλογα με τις απαιτήσεις της πολυμεράσης, τη συγκέντρωση των αλάτων, την αλληλουχία των εκκινητών. Σε γενικότερο πλαίσιο, όμως, κάθε κύκλος περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Αποδιάταξη: αυξάνεται η θερμοκρασία, ώστε οι αλυσίδες του DNA εκμαγείου να αποδιαταχθούν και να μπορέσουν να υβριδοποιηθούν με τους εκκινητές.
2. Υβριδοποίηση (annealing): Θερμοκρασία τήξης (melting temperature, T_m) των εκκινητών, στην οποία οι εκκινητές προσδένονται στο DNA εκμαγείο.
3. Επιμήκυνση (elongation): Η βέλτιστη θερμοκρασία για την δράση της DNA πολυμεράσης, κατά την οποία γίνεται σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας, χρησιμοποιώντας τα δεοξυριβονουκλεοτίδια του διαλύματος. Ο χρόνος επώασης σε αυτό το στάδιο εξαρτάται από το μήκος του τμήματος που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε.



Εικόνα 2.16.1: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερισμού (PCR) (1) Το DNA θερμαίνεται μεταξύ 90°-100°C για τον διαχωρισμό των δύο κλώνων. (2) Το DNA ψύχεται μεταξύ 30°-60°C για να επιτραπεί η υβριδοποίηση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες. (3) Το διάλυμα θερμαίνεται μεταξύ 60°-70°C για να δράσει η DNA πολυμεράση συνθέτοντας δύο νέες συμπληρωματικές αλληλουχίες. (4) Ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται. Σε κάθε επαναλαμβανόμενο κύκλο η ποσότητα DNA διπλασιάζεται. (Εικόνα από διαδίκτυο)

Για την ενίσχυση των επιθυμητών αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο LongAmpTaqDNA Polymerase (NEB) (Πίνακας 2.16.1, Πίνακας 2.16.2) καθώς και η KAPA HiFi HotStart Polymerase (Roche) (Πίνακας 2.16.3, Πίνακας 2.16.4). Η χρήση των παραπάνω πολυμερασών έγινε για την ενίσχυση αλληλουχιών, τα οποία προορίζονταν για την κλωνοποίησή τους σε πλασμιδιακούς φορείς, καθώς είναι ένζυμα που αντιγράφουν με πολύ υψηλή πιστότητα.

Πίνακας 2.16.1: Αντιδραστήρια και στοιχεία της PCR με τη χρήση της πολυμεράσης LongAmpTaqDNA Polymerase (NEB).

Αντιδραστήρια	Στελική	V ₅₀ (μl)
5x LongAmp Taq Reaction Buffer	1x	10
10mM dNTPs	300μM	1.5
10μM εκκινητή (Forward)	0.4 (0.05-1μM)	2
10μM εκκινητή (Reverse)	0.4 (0.05-1μM)	2

Μήτρα DNA	< 1000ng	*
LongAmpTaq DNA Pol	5U/50μl	2
ddH ₂ O	-	Μέχρι 50μ

Πίνακας 2.16.2: Βήματα και απαιτούμενες συνθήκες κάθε σταδίου για την αντίδραση πολυμερισμού με τη χρήση της LongAmp-Taq DNA Polymerase (NEB).

Στάδιο		Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (s)
Αρχική αποδιάταξη		94	30
30-35 κύκλοι	Αποδιάταξη	94	10-30
	Υβριδοποίηση	45-65	15-60
Επιμήκυνση	Επιμήκυνση	65	50s/kb
		65	10
		25	∞

Πίνακας 2.16.3: Αντιδραστήρια και στοιχεία της PCR με τη χρήση της πολυμεράσης KAPA HiFi HotStart Polymerase (Roche).

Αντιδραστήρια	C _{τελική}	V ₂₅ (μl)
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	1x	12.5
10μM εκκινητή (Forward)	0.3μM	0.75
10μM εκκινητή (Reverse)	0.3μM	0.75
Μήτρα DNA	*	*
ddH ₂ O	-	Μέχρι 25μl

Πίνακας 2.16.4: Βήματα και απαιτούμενες συνθήκες κάθε σταδίου για την αντίδραση πολυμερισμού με τη χρήση της KAPA HiFi HotStart Polymerase (Roche).

Στάδιο		Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη		95	3min
15-35 κύκλοι	Αποδιάταξη	98	20s
	Υβριδοποίηση	60-75	15s
Επιμήκυνση	Επιμήκυνση	72	15-60s/kb
		72	1min/kb
		25	∞

2.17 Colony PCR

Αυτή η μέθοδος έχει σχεδιαστεί για την γρήγορη ανίχνευση πλασμιδιακού ενθέματος απευθείας σε αποικίες *E. coli*. Το πλασμίδιο θα πρέπει να είναι πολλαπλών αντιγράφων (high copy). Αν και η παρουσία του ανασυνδυασμένου βακτηρίου μπορεί να γίνει και με την μέθοδο μπλε/λευκών αποικιών, η τεχνική της PCR colony μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του μεγέθους της ένθεσης καθώς επίσης και την κατεύθυνση στον πλασμιδιακό φορέα. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε Taq πολυμεράση της εταιρίας Invitrogen και Phusion. Έτσι, τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στους Πίνακες 2.17.1 και 2.17.3, ενώ τα στάδια στους Πίνακες 2.17.2 και 2.17.4.

Πίνακας 2.17.1: Αντιδραστήρια της colony PCR με τη χρήση Taq πολυμεράσης (Invitrogen)

Αντιδραστήρια	C _{τελική}	V ₅₀ (μl)
10x PCR Buffer	1x	10
50mM MgCl ₂	1.5mM	1.5
10mM dNTPs	0.5mM	1
10μM εκκινητή (Forward)	0.5μM	2.5
10μM εκκινητή (Reverse)	0.5μM	2.5
Taq DNA Pol	1-2.5U/50μl	0.15
ddH ₂ O	-	Μέχρι 50μl

Πίνακας 2.17.2: Βήματα και απαιτούμενες συνθήκες κάθε σταδίου για την αντίδραση πολυμερισμού με τη χρήση της Taq πολυμεράσης (Invitrogen).

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95	5min
30-35 κύκλοι	Αποδιάταξη	1min
	Υβριδοποίηση	T _m
Επιμήκυνση	Επιμήκυνση	1min/1000b
		72
	25	∞

Πίνακας 2.17.3: Αντιδραστήρια της colony PCR με τη χρήση Phusion πολυμεράσης (Εργαστήριο Χατζηνικολάου).

Αντιδραστήρια	C _{τελική}	V ₅₀ (μl)
5x GC Buffer	1x	10
10mM dNTPs	0.2mM	1

10μM εκκινητή (Forward)	0.5μM	2.5
10μM εκκινητή (Reverse)	0.5μM	2.5
Phusion		0.5
ddH ₂ O	-	Μέχρι 50μl

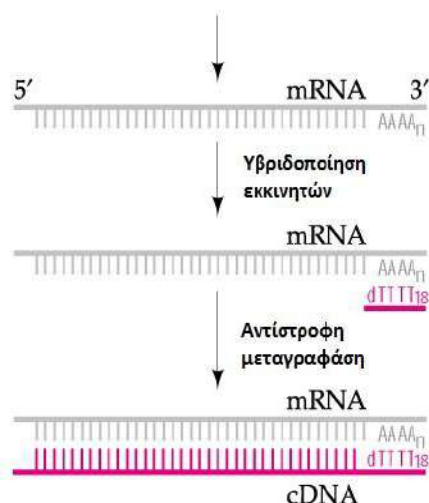
Πίνακας 2.17.4: Βήματα και απαιτούμενες συνθήκες κάθε σταδίου για την αντίδραση πολυμερισμού με τη χρήση της Phusion πολυμεράσης.

Στάδιο		Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη		95	5min
30-35 κύκλοι	Αποδιάταξη	95	1min
	Υβριδοποίηση	Tm	35s
Επιμήκυνση	Επιμήκυνση	72	1min/1000b
		72	5min
		25	∞

2.18 Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription, RT -PCR, SMARTTM MMLV RT, Clontech)

Η μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφής είναι η *in vitro* μετατροπή των μονόκλωνων RNA σε συμπληρωματικές μονόκλωνες αλυσίδες DNA (complementary DNA, cDNA). Η μετατροπή αυτή γίνεται με τη χρήση των κατάλληλων ενζύμων, των αντίστροφων μεταγραφασών. Τα ένζυμα αυτά απομονώνονται από ρετροϊούς, οι οποίοι τα χρησιμοποιούν για την μετατροπή του γενωμικού RNA του σε δίκλωνο cDNA, το οποίο ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή. Συνήθως, το ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης περιέχει δύο καταλυτικές περιοχές, την εξαρτώμενη από RNA ενεργότητα πολυμερισμού του DNA και την ενεργότητα ριβονουκλεάσης.

Απομονώνοντας ολικό RNA από τα μελετώμενα δείγματα, επιτυγχάνεται η απομόνωση τόσο ώριμων όσο και ανώριμων μορίων RNA. Καθώς, ο σκοπός των πειραμάτων είναι ο καθορισμός της έκφρασης γονιδίου, τα μόρια RNA που χρειάζονται είναι τα ώριμα mRNA. Τα ώριμα mRNA, φέρουν πολύ-A ουρές στο 3'-άκρο τους, χαρακτηριστικό που χρησιμοποιείται για την απομόνωσή του. Συγκεκριμένα, στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης χρησιμοποιούνται ως εκκινητές μόρια με τη συνεχή ακολουθία βάσεων θυμίνης (-TTTTT, Ολίγο-dT). Οι εκκινητές αυτοί υβριδοποιούνται με την πολύ-A ουρά των ώριμων mRNAs του κυττάρου. Στη συνέχεια, με τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης και με μήτρα



Εικόνα 2.18.1: Διαγραμματική απεικόνιση της σύνθεσης cDNA από απομονωμένο RNA, από το οποίο χρησιμοποιούνται ως μήτρα της αντίστροφης μεταγραφάσης τα ώριμα μόρια mRNA, τα οποία διαθέτουν την πολύ-A ουρά. Για την επιλογή αυτών των μορίων γίνεται χρήση εκκινητών που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες βάσεις θυμίνης (ολιγο -dT18). Μετά την υβριδοποίηση των εκκινητών με τις αλληλουχίες στόχους ακολουθεί η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής για τη σύνθεση cDNA (Εικόνα από διαδίκτυο).

το RNA, πραγματοποιείται η σύνθεση και η επέκταση του συμπληρωματικού DNA (cDNA) (Εικόνα 2.18.1). Με τη διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται η αντιστοίχιση της γονιδιακής έκφρασης, η οποία αντικατοπτρίζεται από το σύνολο των mRNAs, σε ένα σύνολο μονόκλωνων μορίων DNA (cDNA).

Το ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης που χρησιμοποιήθηκε απομονώθηκε από τον ιό λευχαιμίας των ποντικών (Moloney Murine Leukemia Virus, MMLV). Το ένζυμο αυτό παρουσιάζει πολύ χαμηλή ενεργότητα RNAάσης και είναι κατάλληλο για την σύνθεση cDNA.

Πίνακας 2.18.1: Συστατικά, στοιχεία και πορεία της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής.

Αντιδραστήρια	C_{τελική}	V₂₀
Δείγμα RNA	5ng-5μg	*
OligodT ₁₈	2.5μM	5μl
ddH ₂ O	-	(~11.5μl)
Επώαση στους 70°C για 3min και απευθείας στον πάγο.		
5x First Strand Buffer	1x	4μl
dNTPs (10mM)	1mM	2μl
DTT (100mM)	10mM	2μl
SMART MMLV RT	10 U/μl	0.5μl
Επώαση στους 42°C για 60min		

Επώαση στους 70°C για 15min

* Η επώαση του RNA στους 70°C είναι για την αποδιάταξη δευτεροταγών δομών του RNA καθώς και την υβριδοποίηση του με τους εκκινητές.

2.19 Ποσοτική PCR (qPCR, KAPABIOSYSTEMS)

Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης γονιδίων που μας αφορούν. Η κλασική PCR παρέχει ποιοτικό έλεγχο παρουσίας ή μη ενός γονιδίου, ενώ με αυτή την μέθοδο μπορούμε να έχουμε ποσοτικό έλεγχο. Ο έλεγχος του πολλαπλασιασμού του DNA σε κάθε κύκλο πραγματοποιείται με την χρήση ειδικών φθορίζοντων χρωστικών και ανιχνευτών.

Οι αντιδράσεις αυτές λαμβάνουν χώρα σε ειδικούς θερμοκυκλοποιητές, οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να ανιχνεύουν φθορισμό.

Στη παρούσα εργασία η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε ήταν η SYBR Green I.

Πίνακας 2.19.1: Αντιδραστήρια και στοιχεία της ποσοτικής PCR με KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Kit για τον θερμοκυκλοποιητή *StepOnePlus™*.

Αντιδραστήρια	C _{τελική}	V ₁₀
ddH ₂ O	N/A	Μέχρι 10μl
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix1x (2x)		5μl
F-Εκκινητής (10μM)	200nM	0.2μl
R-Εκκινητής (10μM)	200nM	0.2μl
Μήτρα DNA	<20ng	

Πίνακας 2.19.2: Βήματα και απαιτούμενες συνθήκες κάθε σταδίου για την αντίδραση πολυμερισμού για τον θερμοκυκλοποιητή *StepOnePlus™*

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95	3min	
40 κύκλοι	Αποδιάταξη	95	3s
	Υβριδοποίηση	60	30s
	Επιμήκυνση	72	20s
Επιμήκυνση	72	5min	
	25	∞	

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη μέθοδο ΔΔCt.

2.20 Φύτεμα σπερμάτων *Arabidopsis thaliana* Col-0 σε τρυβλία με MS ½

Το φύτεμα σπερμάτων σε τρυβλία με MS_{1/2} χρησιμοποιείται για την επιλογή των μετασηματισμένων φυτών, την ανάπτυξη φυτών που πρόκειται να υποστούν χρώση GUS (GUS staining) ή για συλλογή ιστού που προορίζεται για απομόνωση RNA. Σε κάθε περίπτωση οι εκάστοτε συνθήκες διαφοροποιούνται.

Αρχικά, η επιλογή μετασηματισμένων φυτών γίνεται σε θρεπτικό μέσο στο οποίο έχουν προστεθεί τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Συγκεκριμένα, τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται είναι:

- ✓ Σεφοταξίμη (Cefotaxime, C_T=100μg/ml), η οποία στοχεύει ένζυμο που αφορούν τη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου *Agrobacterium* με αποτέλεσμα τη θανάτωσή τους.

και

- ✓ Υγρομυκίνη Β (Hygromycin B, C_T=15-30μg/ml). Παρουσία του συγκεκριμένου γονιδίου ανθεκτικότητας τα σπέρματα εφόσον επιστρωθούν αφήνονται σε φως για 6h και στη συνέχεια στο σκοτάδι για 5-7d. Μετά τη πάροδο των ημερών αφήνονται και πάλι στο φως για 2-3d και έπειτα μεταφυτεύονται σε χώμα αυτά που έχουν αναπτύξει ψηλό υποκοτύλιο. Το κάθε ένα από αυτά αποτελεί μια σειρά (lines)

ή

- ✓ Καναμυκίνη (Kanamycin, C_T=40μg/ml). Για την επιλογή μετασηματισμένων φυτών με τη χρήση αυτού του αντιβιοτικού, τα σπέρματα αφήνονται σε φως για 7d και έπειτα μεταφυτεύονται αυτά που έχουν αναπτύξει πράσινες κοτυληδόνες.

Στη περίπτωση που τα φυτά προορίζονται για απομόνωση RNA ή για χρώση GUS, η χρήση των αντιβιοτικών δε συνίσταται. Στο RNA μπορούν να δράσουν ως στρεσογόνοι παράγοντες στα φυτά αγγρίου τύπου, ενώ στη χρώση GUS, μπορεί να επηρεάσουν το πρότυπο.

Το φύτεμα, ειδικά στις περιπτώσεις RNA, πρέπει να γίνεται προσεκτικά και σε αποστειρωμένες συνθήκες, καθώς μπορεί να υπάρξει μόλυνση, μη επιθυμητή, ακόμα και από μύκητες, και για αυτό το φύτεμα λαμβάνει χώρα στο θάλαμο νηματικής ροής (laminar).

Τα βήματα όμως, για το φύτεμα παραμένουν ίδια:

1. Άρση ληθάργου των σπερμάτων (Imbibition). Αυτό πραγματοποιείται με προσθήκη μερικών σπερμάτων σε μικροσωληνάριο (1,5ml) ή σωλήνα φυγοκέντρου (15ml), την προσθήκη dH₂O και την επακόλουθη ανακίνηση ώστε να διαβραχούν όλα τα σπέρματα και αφήνονται στο ψυγείο για 3-5μέρες.

Στο θάλαμο νηματικής ροής (laminar) γίνεται η αποστείρωση των σπερμάτων:

2. Αφαίρεση dH₂O και προσθήκη αιθανόλης_{75%}, ανακίνηση για 2min.
3. Αφαίρεση αιθανόλης και προσθήκη χλωρίνης_{25%}, ανακίνηση για 4min.
4. Αφαίρεση χλωρίνης_{25%} και προσθήκη αποστειρωμένου dH₂O, ανακίνηση για 2min (x4).

5. Επίστρωση σε MS_{1/2} με κατάλληλα αντιβιοτικά, αν χρειάζεται.

Επίσης, τα σπέρματα που προορίζονται για χρώση GUS και για συλλογή ιστού 3 ημερών επιστρώνονται σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, σε θρεπτικό που έχει προστεθεί 0.8% Plant Agar και αφήνονται να αναπτυχθούν στο θάλαμο σε οριζόντιο επίπεδο. Ενώ, αυτά που προορίζονται για συλλογή των υπόλοιπων ιστών διατάχθηκαν σε ευθεία γραμμή σε τρυβλία με 1% Plant Agar και τοποθετήθηκαν κάθετα.

2.21 Χρώσεις

2.21.1 Χρώση GUS (Gus staining)

Η χρώση GUS των ιστών γίνεται με σκοπό την μελέτη της επαγωγής των μελετώμενων υποκινητών. Συγκεκριμένα, το ένζυμο β-γλουκουρονιδάση βρίσκεται σε μεταγραφική σύντηξη με τον εκάστοτε υποκινητή. Όταν προστεθεί το υπόστρωμα 5-βρώμο-4-χλώρο-3-ινδολυλο-βήτα-D-γλουκουρονικό οξύ (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid, X-GlucA) σε διάλυμα που φέρει τους φυτικούς ιστούς, αυτό διασπάτε όπου επάγεται ο υποκινητής και άρα και το γονίδιο β-γλουκουρονιδάση, με αποτέλεσμα να διασπάται το υπόστρωμα και να χρωματίζει με μπλε χρώμα τους ιστούς στους οποίους επάγεται ο υποκινητής.

1. Τοποθέτηση ιστών ή φυτών σε μικροσωληνάρια (1,5ml) περίπου 20 φυτά ή σε σωλήνες φυγοκέντρου και προστίθεται παγωμένη ακετόνη_{90%} για 20-30 min με ανακίνηση κάθε 5-10min. (x2)
2. Αφαίρεση ακετόνης_{90%} και προσθήκη παγωμένου διαλύματος RGS για 5-10min (x2).
3. Αφαίρεση διαλύματος RGS και προσθήκη διαλύματος Gus staining.
4. Επώαση 37°C για ένα βράδυ.
5. Αφαίρεση του διαλύματος GUS staining και προσθήκη διαδοχικών αραιώσεων αιθανόλης (20%, 35%, 50%, 70%, 90%, 100%) με επώαση 30min για τη κάθε μια.
6. Προσθήκη 90% αιθανόλη και 70% και αποθήκευση στους 4°C ή για επακόλουθη επώαση με chloral hydrate προσθήκη 90% αιθανόλη και έπειτα hydrate/glycerol/dH₂O (8g/1ml/2ml). Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου (RT).

2.21.2 Χρώση με φθορίζουσες χρώσεις

Για την παρατήρηση φυτών που εκφράζουν φθορίζουσες πρωτεΐνες και τη διερεύνηση του υποκυτταρικού τους εντοπισμού, χρησιμοποιήθηκαν φθορίζουσες χρωστικές.

Χρώση με Βρωμιούχο Ιώδιο

Το βρωμιούχο ιώδιο είναι μια ένωση η οποία δεσμεύεται στο DNA, με αποτέλεσμα να σημαίνει τους πυρήνες νεκρών κυττάρων. Στα υγιή κύτταρα όμως η χρωστική παραμένει στη μεμβράνη, προσδίδοντας κόκκινο φθορίζον χρώμα στο περίγραμμα των κυττάρων της ρίζας. Η διαδικασία περιγράφεται από το εργαστήριο του καθηγητή Βιολογίας Philip N. Benfey (<https://sites.duke.edu/benfey/protocols/>) του Πανεπιστημίου Duke (ΗΠΑ).

1. Εμβάπτιση αρτιβλάστων ή κομμένων ριζών σε διάλυμα βρωμιούχου ιωδίου 10μg/ml για περίπου 30s - 60s.
2. Ξέπλυμα των ιστών σε dH₂O και παρατήρηση των φυτών σε φθορίζον μικροσκόπιο.

Χρώση με SynaptoRed C2 (FM4-64) (Biotium)

Η φθορίζουσα χρωστική SynaptoRed C2, γνωστή και ως FM4-64 είναι μια αμφιφιλική χρωστική, σημαντική για την παρατήρηση του μονοπατιού της ενδοκύττωσης. Έπειτα από την εφαρμογή στα φυτά, απευθείας η χρωστική σημαίνει την πλασματική μεμβράνη και στη συνέχεια ενσωματώνεται ακολουθώντας τη διαδικασία εσωτερικοποίησης εξαρτώμενη από το ενδομεμβρανικό σύστημα. Με τη πάροδο του χρόνου η χρωστική διανέμεται σε όλο το δίκτυο κυστιδίων, από την πλασματική μεμβράνη μέχρι το χυμοτόπιο, συμπεριλαμβανομένου και των συστατικών των μονοπατιών έκκρισης. Η χρωστική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την χρώση ριζών αρτιβλάστων αλλά και πρωτοπλαστών. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι αυτό που περιγράφεται από τους Rigal και συνεργάτες (Rigal *et al.*, 2015).

2.22 Ποσοτικοποίηση της ενεργότητας του GUS μέσω φθορισμομετρίας

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ενζυμική δράση του γονιδίου αναφοράς GUS. Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του γονιδίου αναφοράς και άρα της επαγωγής του υποκινητή που το ελέγχει χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα το 4-μεθυλουμπελλιφαιρολ-β-D γαλακτοπυρανοζίδιο (4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide, MUG) στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα μελέτης.

Πρωτεϊνικό εκχύλισμα:

1. Ομογενοποίηση περίπου 100mg ιστού σε μικροσωληνάριο (1,5ml) με τη χρήση έμβολου σε υγρό άζωτο.
2. Προσθήκη 100μl διαλύματος εκχύλισης.
3. Φυγοκέντρωση 5min σε 15000rpm.

Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μπορεί να αποθηκευτεί στους -70°C χωρίς να χαθεί η ενζυμική ενεργότητα για μεγάλο χρονικό διάστημα, ή στους 4°C με απώλεια της ενεργότητας. Καλό είναι να αποφεύγεται η αποθήκευση στους -20°C.

Προετοιμασία φθορισμομετρίας:

1. Επώαση 0,5ml υποπολλαπλάσιων (aliquots) διαλύματος δοκιμής στους 37°C για την προθέρμανσή του.
2. Προσθήκη 50μl εκχυλίσματος σε 0,5ml προθερμασμένου διαλύματος δοκιμής. Ανάδευση σε ανακινητήρα. Επώαση στους 37°C.
3. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, 30min για υψηλή ενεργότητα, ή 1h για χαμηλή ενεργότητα, μεταφέρονται 100μl δείγματος σε προσημειωμένα μικροσωληνάριο (1,5ml) που περιέχουν 0,9ml διαλύματος τερματισμού. Χρειάζονται 3-4 χρονικά διαστήματα.

Οι χρόνοι δειγματοληψίας ήταν 5min, 10min, 20min, 30min, 60min, 90min, 120min, 180min, 240min και στη συνέχεια για κάθε δείγμα επιλέχθηκαν τα χρονικά διαστήματα για τα οποία η καμπύλη παραμένει ευθύγραμμη.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων απαιτείται η κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς γνωστής συγκέντρωσης (nM) με ένταση φθορισμού. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται γνωστές συγκεντρώσεις 4-μεθυλουμπελιφαιρόνης (4-methylumbelliferone, 4-MU) 1nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM, 2000nM στις οποίες μετρήθηκε ο φθορισμός.

2.23 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι οι πρωτεΐνες σε υδατικά διαλύματα αντιδρούν με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 σε όξινο περιβάλλον και δίνουν κυανό χρώμα που έχει μέγιστο απορρόφησης στα 595nm. Η χρωστική αυτή προσδένεται στα αρωματικά αμινοξέα και κυρίως στην αργινίνη.

1. Προσθέτουμε 5μl δείγματος σε 1ml διαλύματος εργασίας Bradford.
2. Πολύ καλή ανάδευση σε ανακινητήρα.
3. Επώαση 30min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Μέτρηση απορρόφησης στα 595nm.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των άγνωστων δειγμάτων απαραίτητη είναι η κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς γνωστών πρωτεϊνικών συγκεντρώσεων. Αυτό πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ποσότητες αλβουμίνης γνωστών συγκεντρώσεων 0,5mg/ml , 1mg/ml, 2mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml. Ακολουθώντας την διαδικασία που αναφέρθηκε γίνεται εφικτό να κατασκευαστεί καμπύλη αναφοράς γνωστών συγκεντρώσεων – απορρόφησης. Μέσω αυτή της καμπύλης μπορούν να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις των άγνωστων δειγμάτων, εφόσον οι απορροφήσεις τους βρίσκονται εντός αυτού του ευθύγραμμου τμήματος.

2.24 Απομόνωση πρωτοπλαστών και μετασχηματισμό τους

Ι. Απομόνωση πρωτοπλαστών

Από μεσόφυλλο (Wu *et al.*, 2009)

1. Κόβουμε φύλλα ροζέτας από φυτά 3-4 βδομάδων. Κολλάμε τα φύλλα με την πάνω επιδερμίδα σε χαρτοταινία και στη συνέχεια κολλάμε τη ταινία Magic Tape στην κάτω επιδερμίδα, ώστε τραβώντας την ταινία να αφαιρείται η κάτω επιδερμίδα (“Tape Arabidopsis Sandwich”).
2. Τα φύλλα χωρίς επιδερμίδα τοποθετούνται σε τρυβλία με 10ml φρέσκου ενζυμικού διαλύματος (Enzymatic Solution-Enz Sol M).
3. Επώαση στο θάλαμο με φως και ανακίνηση 40rpm για 1h.

4. Μεταφορά του εκχυλίσματος σε σωλήνα φυγόκεντρου (50 ml), φυγοκέντριση 4min στα 100g (4°C).
5. Προσεκτική αφαίρεση υπερκείμενου και προσθήκη 10ml διαλύματος W5 (4°C), επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος, φυγοκέντριση 4min στα 100g (x3).
6. Επώαση 30min στον πάγο.
7. Καταμέτρηση πρωτοπλαστών, φυγοκέντριση 1min στα 100g, και επαναιώρηση στον κατάλληλο όγκο διαλύματος MMg ώστε η τελική συγκέντρωση πρωτοπλαστών να είναι $2-5 \times 10^5$ πρωτοπλάστες/ml.

Από ρίζα (Bargmann & Birnbaum, 2010)

1. Κόβουμε ρίζες από αρτίβλαστα 7-10 ημερών.
2. Οι ρίζες τοποθετούνται σε σωλήνες φυγόκεντρου (50ml ή 15ml) με το ενζυμικό διάλυμα (Enzymatic Solution-Enz Sol R). 10ml ενζυματικού διαλύματος χρειάζονται για 1500 αρτίβλαστα.
3. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1h στο σκοτάδι και ανακίνηση σε 75rpm.
4. Φιλτράρισμα του διαλύματος με ύφασμα blutex ως φίλτρο (55μm).
5. Φυγοκέντριση 10min στα 500g.
6. Προσεκτική αφαίρεση υπερκείμενου και προσθήκη 10ml διαλύματος W5 (4°C), επαναιώρηση του ιζήματος, φυγοκέντριση 10min στα 500g (x3).
7. Επώαση 30min στον πάγο.
8. Καταμέτρηση πρωτοπλαστών, φυγοκέντριση 1min στα 100g, και επαναιώρηση στον κατάλληλο όγκο διαλύματος MMg ώστε η τελική συγκέντρωση πρωτοπλαστών να είναι $2-5 \times 10^5$ πρωτοπλάστες/ml.

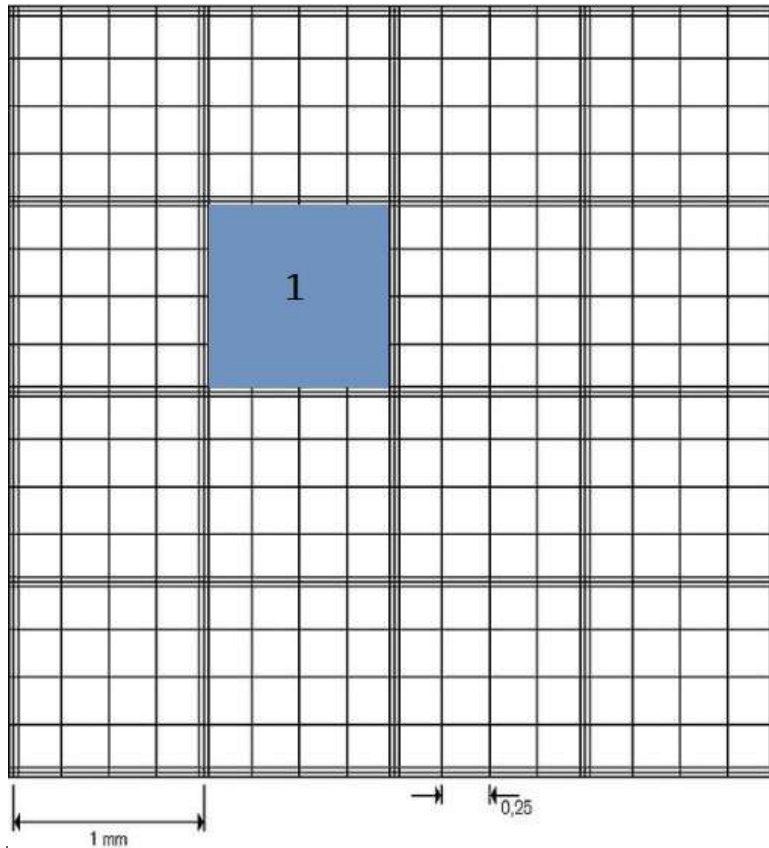
II. **Καταμέτρηση πρωτοπλαστών**

Μετράμε κύτταρα σε τετράγωνα 1, όπως της εικόνας 2.24.1 και υπολογίζουμε τη συγκέντρωση των κυττάρων, σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{Συγκέντρωση κυττάρων} = \frac{\text{Σύνολο κυττάρων από τετράγωνα (1)} \times 10.000}{\text{Αριθμός τετραγώνων}}$$

Στη συνέχεια, πολλαπλασιάζουμε τη συγκέντρωση κυττάρων με τον συνολικό όγκο του διαλύματος W5, στο οποίο έχουν επαναιωρηθεί οι πρωτοπλάστες, ώστε να υπολογίσουμε το σύνολο των πρωτοπλαστών. Τέλος, για να υπολογίσουμε τον όγκο του διαλύματος MMg, χρησιμοποιούμε την εξίσωση:

$$V_{MMg} = \frac{\text{Σύνολο πρωτοπλαστών}}{\text{Τελική συγκέντρωση}}$$



Εικόνα 2.24.1: Πλάκα Fuchs-Rosenthal. Το τετράγωνο 1 έχει: Εμβαδόν = $1\text{mm} \times 1\text{mm} = 1\text{mm}^2$, Όγκο = $1\text{mm}^2 \times 0,1\text{mm} = 0,1\text{mm}^3 = 1 \times 10^{-4} \text{ ml}$

III. Μετασηματισμός πρωτοπλαστών

1. Προσθήκη σε μικροσωληνάριο (2ml) 30μg πλασμιδιακού DNA (20-40μg) και στη συνέχεια προσθήκη 200μl πρωτοπλάστες (2×10^4 - 1×10^5 πρωτοπλάστες/ml) σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Προσθήκη 200μl διαλύματος PEG, ανάμειξη και επώαση 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Προσθήκη 1ml διαλύματος W5, ανάμειξη, φυγοκέντριση 2min στα 100g και αφαίρεση υπερκευμένου (x2).
4. Επαναιώρηση σε 1ml διαλύματος W5.
5. Τοποθέτηση τους σε πλάκα με 12 ή 8 θέσεις που καλύφθηκαν με 1% BSA (για 3h στους 37°C . Επώαση για 16h στο θάλαμο φυτών.

2.25 Σύστημα ζύμης δύο υβριδίων (Yeast – Two Hybrid, Y2H, Clontech)

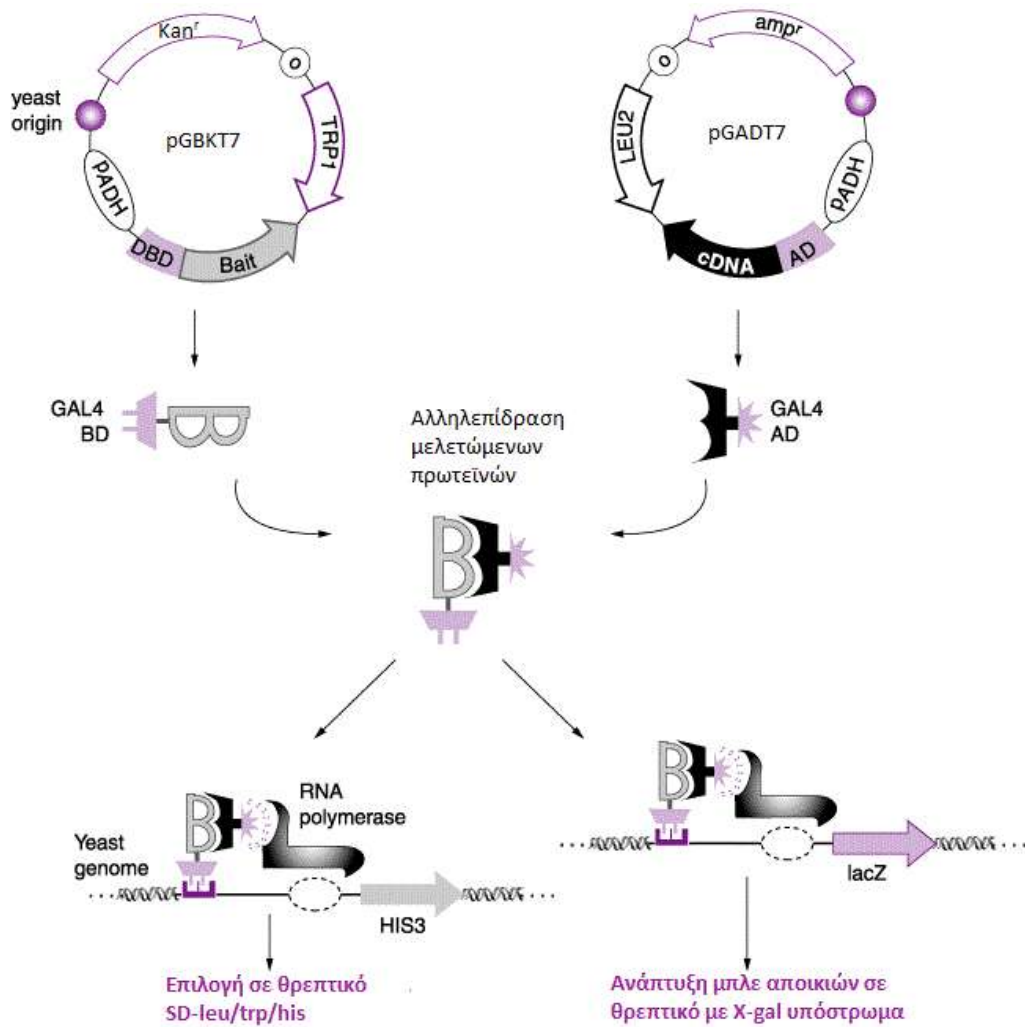
Το σύστημα δύο υβριδίων στη ζύμη χρησιμοποιείται στη μοριακή βιολογία για την μελέτη αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών *in vivo*. Το σύστημα αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εύρεση αλληλεπιδράσεων μιας γνωστής πρωτεΐνης με έλεγχο των πρωτεϊνών σε μια βιβλιοθήκη, είτε για τον έλεγχο αλληλεπίδρασης δυο γνωστών πρωτεϊνών. Επίσης, η μέθοδος αυτή είναι ευαίσθητη, καθώς επιτρέπει την μελέτη ακόμα και ασθενών αλλά και παροδικών αλληλεπιδράσεων.

Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός, ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούνται από δύο μέρη, την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (Binding Domain, BD) και την περιοχή ενεργοποίησης της αντιγραφής (Activating Domain, AD). Οι δύο αυτές περιοχές χωρίζονται κατάλληλα σε δύο διαφορετικούς πλασμιδιακούς φορείς δίνοντας την δυνατότητα για μεταγραφική σύντηξη με μελετώμενες πρωτεΐνες. Αν οι δύο αυτές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν θα πλησιάσουν η μία την άλλη, παρασύροντας και τις περιοχές του μεταγραφικού παράγοντα, αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση του γονιδίου αναφοράς.

Στο σύστημα αυτό χρησιμοποιούνται δύο πλασμιδιακοί φορείς. Ο ένας φορέας φέρει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του ενεργοποιητή της μεταγραφής και ο δεύτερος την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής του γονιδίου αναφοράς με βάση το οποίο γίνεται ο έλεγχος της αλληλεπίδρασης. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς της Clontech pGBKT7, που φέρει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA και ο pGADT7, που φέρει τη περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής. Ο πλασμιδιακός φορέας pGBKT7 φέρει γονίδιο βιοσύνθεσης του αμινοξέος τρυπτοφάνη, ενώ ο πλασμιδιακός φορέας pGADT7 φέρει το γονίδιο βιοσύνθεσης της λευκίνης. Έτσι, η επιλογή των αποικιών που έχουν δεχτεί και τους δύο πλασμιδιακούς φορείς μπορεί να γίνει σε τρυβλία με θρεπτικό από το οποίο απουσιάζουν τα αμινοξέα τρυπτοφάνη και λευκίνη.

Ο έλεγχος της αλληλεπίδρασης στο στέλεχος SG335 μπορεί να γίνει με τη χρήση HIS3, MEL1(ή lacZ) και ADE2 υπό τον έλεγχο του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 στις ανοδικές αλληλουχίες ενεργοποίησης (UASs, upstream activating sequences) και στα κουτιά TATA. Συγκεκριμένα, αν υπάρχει αλληλεπίδραση των μελετώμενων πρωτεϊνών τα κύτταρα της ζύμης αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο, από το οποίο απουσιάζουν τα αμινοξέα τρυπτοφάνη, λευκίνη και ιστιδίνη. Επιπλέον, αν προστεθεί στο θρεπτικό το υπόστρωμα (X-α-Gal) της α-γαλακτοσιδάσης (MEL1) ή β-γαλακτοσιδάσης (lacZ), τότε η αλληλεπίδραση μπορεί να ελεγχθεί από την εμφάνιση μπλε/άσπρων αποικιών. Ένας επιπλέον έλεγχος που γίνεται, είναι η ανάπτυξη των αποικιών σε θρεπτικό μέσο απουσίας τεσσάρων αμινοξέων τρυπτοφάνη, λευκίνη, ιστιδίνη και αδενίνη. Η απουσία αδενίνης, προσδίδει μια ροζ απόχρωση στην αποικία, που βοηθά να εξασφαλιστεί ότι η παρατηρούμενη αλληλεπίδραση δεν οφείλεται σε κάποια τυχαία μεταλλαγή. Τέλος, χρησιμοποιείται ο παράγοντας 3-AT, ο οποίος είναι ένας κατασταλτικός παράγοντας και με διαφορετικές συγκεντρώσεις γίνεται έλεγχος της έντασης της αλληλεπίδρασης.

Εκτός από το στέλεχος SG335, χρησιμοποιήθηκε και το στέλεχος Y2HGold με την ίδια λογική. Το συγκεκριμένο στέλεχος απαιτεί μεγαλύτερη συγκέντρωση αδενίνης 120mg/L. Ενώ, η αλληλεπίδραση μελετάται απουσία και των τεσσάρων αμινοξέων τρυπτοφάνη, λευκίνη, ιστιδίνη και αδενίνη.



Εικόνα 2.25.1: Σχηματική απεικόνιση του συστήματος δύο υβριδίων στη ζύμη. Όταν οι δύο μελετώμενες πρωτεΐνες, που βρίσκονται σε μεταφραστική σύντηξη με τις δύο διαφορετικές περιοχές του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 (AD και BD), αλληλεπιδρούν, τότε και οι περιοχές του μεταγραφικού παράγοντα έρχονται κοντά, επάγοντας την έκφραση ενός γονιδίου αναφοράς (HIS3 ή lacZ).

Σε κάθε μέθοδο γίνεται χρήση των κατάλληλων μαρτύρων. Στο σύστημα δύο υβριδίων χρησιμοποιήθηκαν οι μάρτυρες της Clontech. Ως θετικός μάρτυρας (Positive control) χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pGBKT7-53 και pGADT7-T, στους οποίους έχει γίνει μεταγραφική σύντηξη δύο πρωτεϊνών οι οποίες αλληλεπιδρούν στο σύστημα ζύμης (p53 και SV40 T- αντιγόνο, αντίστοιχα). Ως αρνητικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pGBKT7-Lam και pGADT7-T. Ο πρώτος, φέρει σε μεταγραφική σύντηξη το γονίδιο ανθρώπινης λαμίνης C καθώς δεν αλληλεπιδρά με τις περισσότερες πρωτεΐνες, ούτε σχηματίζει συμπλέγματα.

1. Εμβολιασμός σε 1ml YPDA μερικών μονήρων αποικιών από το στέλεχος της ζύμης SG335 (ή Y2H Gold) που ήταν επιστρωμένο σε θρεπτικό YPDA. Καλό ανακάτεμα σε ανακινήτηρα για τυχόν συσσωματώματα.

2. Μεταφορά των κυττάρων σε 50ml YPDA που περιέχονται σε κωνική των 100ml και επώαση για 16-18h στους 30°C με ανακίνηση (210rpm) μέχρι η οπτική απορρόφηση στα 600nm να ξεπεράσει το 1,5 ($OD_{600} > 1,5$).
3. Μεταφορά της καλλιέργειας σε 300ml καλλιέργειας YPDA που βρίσκονται σε κωνική των 500ml ώστε η οπτική απορρόφηση να φτάσει $OD_{600} = 0,2-0,3$. Γίνεται επώαση στους 30°C με ανακίνηση 250rpm για 3h μέχρι η οπτική απορρόφηση να φτάσει $OD_{600} = 0,5 \pm 0,1$.
4. φυγοκέντριση 5min σε 1000g (RT) με τη χρήση μπουκάλια φυγοκέντρου (50ml) που βρίσκονταν στον πάγο.
5. Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναίωση σε 1,5ml 1x TE/LiAc.
6. Σε αποστειρωμένα μικροσωληνάρια (1,5ml) προστίθεται 0,1μg από κάθε πλασμίδιο (AD, BD vector) και 0,1mg carrier DNA και καλή ανάμιξη.
7. Σε κάθε μικροσωληνάριο (1,5ml) προστίθενται 100μl από δεκτικά κύτταρα ζύμης και αναδύεται σε ανακινητήρα.
8. Προσθήκη 600μl PEG/TE/LiAc σε κάθε μικροσωληνάριο και ανάδευση σε ανακινητήρα για 10s.
9. Επώαση στους 30°C για 30min με ανακίνηση 200rpm.
10. Προσθήκη 70μl DMSO, ήπια ανακίνηση, 15min στους 42°C και επώαση στον πάγο για 2-3 min.
11. Σύντομη φυγοκέντριση για 5s σε 14rpm και πλήρη απομάκρυνση υπερκειμένου, επαναίωση σε 500μl 1xTE
12. Επίστρωση σε τρυβλία με θρεπτικό SD-leu/trp. Επώαση στους 30°C για 2-4d.
13. Στη συνέχεια, γίνεται επιλογή οχτώ μονήρων αποικιών από κάθε μελετώμενη αλληλεπίδραση και επιστρώνεται σε θρεπτικό SD-leu/trp, επανάληψη 2-3 φορές
14. Τελικά γίνεται επιλογή μονήρων αποικιών και εμβολιάζεται σε υγρό θρεπτικό SD-leu/trp και επωάζεται στους 30°C για 2-4d με ανακίνηση (210rpm).
15. Σε κάθε αποικία μετρείται η οπτική απορρόφηση, η οποία θα πρέπει να είναι $OD_{650} \sim 1$. Στη συνέχεια, γίνεται καταγραφή των αραιώσεων που χρειάζεται να γίνουν ώστε να επιτευχθεί $OD_{600} = 0,8-0,9$ και έπειτα η αναγωγή τους σε τελικό όγκο 100μl. Από αυτά χρησιμοποιούνται 5μl και επιστρώνονται ως κηλίδες σε τρυβλία με τα θρεπτικά: SD-leu/trp, SD-leu/trp/his, SD-leu/trp/his/ade, SD-leu/trp/his 0,5mM 3-AT.

2.26 Μικροσκοπία

Για την παρατήρηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss AxioPlan (Zeiss, Oberkochen, Germany), το οποίο διαθέτει διαφορική αντίθεση παρεμβολών (Differential Interference Contrast, DIC) και μια ψηφιακή κάμερα AxioCam MRC5 (Zeiss). Επιπλέον, για την παρατήρηση ανθέων και κερατίων χρησιμοποιήθηκε το στερεοσκόπιο Zeiss Stemi 2000-C εφοδιασμένο με κάμερα Jenoptik Progres3 (Jenoptik, Jena, Germany)

Επιπρόσθετα, έγινε χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Πόρων “Δημόκριτος” και στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο. Στην πρώτη περίπτωση, τα δείγματα σε πολυφωτονικό συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP8 MP (Weltzer, Germany) εξοπλισμένο με laser Αργού (σειρές διέγερσης στα 485, 476, 488, 496 και 514 nm) και laser IR MaiTai DeepSee Ti:Sapphire (Spectra-Physics, Santa Clara, CA, USA) για πολυφωτονικές εφαρμογές. Οι εικόνες ανακτήθηκαν με φασματικό ανιχνευτή του μικροσκοπίου χρησιμοποιώντας κατάλληλα εύρη εκπομπής κυμάτων (emission). Για την ανίχνευση της EYFP η κορυφή διέγερσης κεντραρίστηκε στα 488 nm και η εκπομπή ήταν 550-550 nm, ενώ για την χρωστική PI η διέγερση ήταν στα 591 nm και η εκπομπή στα 590-700 nm. Στην δεύτερη περίπτωση, η παρατήρηση έγινε με ανεστραμμένο πολυφωτονικό μικροσκόπιο (Leica TCS SP8 X, Wetzlar, Germany) εξοπλισμένο με laser UV και laser Λευκού Φωτός (White Light Laser, WLL). Για την ανίχνευση της EYFP και του αυτοφθορισμού της χλωροφύλλης, τα κέντρα διέγερσης κεντραρίστηκαν στα 488 nm και 470 nm, αντίστοιχα, ενώ τα φάσματα εκπομπής προσαρμόστηκαν στα 500-550 nm για την EYFP και στα 680-700 nm για την χλωροφύλλη από ανιχνευτές HyD και PMT. Οι τομές, και στις δύο περιπτώσεις, αναλύθηκαν με το λογισμικό Application Suite X (LAS X) (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Germany) χρησιμοποιώντας τις ίδιες παραμέτρους για όλα τα δείγματα.

2.27 Κατασκευή μοντέλων τριτοταγούς δομής

Η πρόβλεψη των τριτοταγών δομών (3D) παράχθηκαν χρησιμοποιώντας τον server I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement), έναν διαδικτυακό server, ο οποίος έχει σχεδιαστεί για την αυτοματοποιημένη πρόβλεψη πρωτεϊνικής δομής και λειτουργίας ([I-TASSER](#)) (Roy *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015). Για την ανάλυση δε τροποποιήθηκαν οι παράμετροι του λογισμικού. Τα μοντέλα των δομών κατασκευάστηκαν από προσομοιώσεις πολλαπλής στοίχισης ύφανσης (multiple threading alignment) και επαναλαμβανόμενης δομικής συγκρότησης (iterative structural assembly). Η σύγκριση των παραγόμενων μοντέλων με άλλες γνωστές δομές παρέχει πληροφορίες για την λειτουργία των μελετώμενων πρωτεϊνών (Yang *et al.*, 2013). Τα μοντέλα αυτά στη συνέχεια υποβλήθηκαν στη διαδικασία ελαχιστοποίησης της ενέργειας μέσω του λογισμικού GROMACS v. 2016.3 (Abraham *et al.*, 2015) και το πεδίο δυνάμεων AMBER ff99SB-ILDN (Lindorff-Larsen *et al.*, 2010), με σκοπό τη αφαίρεση των συγκρούσεων μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων. Οι αναπαραστάσεις των δομών παράχθηκαν με το πρόγραμμα PyMol Molecular Visualization System (<https://pymol.org>).

2.27.3 Κατασκευή μοντέλου τριτοταγούς δομής της AtDALL3

Η τριτοταγής δομή της DALL3 του φυτού *Arabidopsis thaliana* δεν έχει προσδιοριστεί πειραματικά και έτσι κατασκευάστηκε ένα θεωρητικό μοντέλο με τον server I-TASSER. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα η αλληλουχία της AtDALL3 (UniProt: [Q3EBR6](#)), χωρίς το σηματοδοτικό πεπτίδιο μεταφοράς (1-43 αμινοξέα). Η εκτίμηση της ποιότητας του προβλεπόμενου μοντέλου από το I-TASSER πραγματοποιήθηκε υπολογίζοντας της τιμές C-score, TM-score (template modeling score) και RMSD (root mean square difference). Η αξιολόγηση με C-score είναι έμπιστη και παίρνει τιμές από - 5 μέχρι +2. Μια υψηλή τιμή υποδεικνύει ένα υψηλής αξιοπιστίας μοντέλο. Το Tm-score είναι μια κλίμακα υπολογισμού της δομικής ομοιότητας μεταξύ δύο πρωτεϊνών με διαφορετικές τριτοταγείς δομές. Μια τιμή πάνω από +0.5 υποδεικνύει ότι η τοπολογία του προβλεπόμενου μοντέλου είναι σωστή, ενώ μια τιμή κάτω από +

0.17 δείχνει την τυχαία ομοιότητα. Σε αυτή την περίπτωση, οι τιμές του C-score, TM-score και RMSD σε συσχέτιση με το C-score για το προβλεπόμενο μοντέλο είναι -1.16 , 0.57 ± 0.15 και $9.9 \pm 4.4 \text{ \AA}$, αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές υποδεικνύουν ότι το μοντέλο πρόβλεψης της δομής της AtDALL3 είναι αξιόπιστο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση και υπόδειξη των δομικών χαρακτηριστικών της. Το μοντέλο στη συνέχεια, υποβλήθηκε σε διαδικασία ελαχιστοποίησης της ενέργειας χρησιμοποιώντας GROMACS με σκοπό να βελτιωθεί η γεωμετρία του και να αφαιρεθούν οι συγκρούσεις μεταξύ των πλάγιων αλυσίδων.

2.27.4 Κατασκευή μοντέλου τριτοταγούς δομής της AtSBP1

Για την AtSBP1 κατασκευάστηκε ένα θεωρητικό μοντέλο της τριτοταγούς δομής της με την χρήση του server I-TASSER. Με σκοπό να εκτιμηθεί η ποιότητα του προβλεπόμενου μοντέλου, η τιμή C-score υπολογίστηκε. Η τιμή C-score είναι αξιόπιστη και παίρνει τιμές από -5 μέχρι $+2$. Η υψηλή τιμή C-score υποδεικνύει υψηλή εγκυρότητα του μοντέλου. Το προβλεπόμενο μοντέλο αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας και τις τιμές TM-score (Template Modeling-score) και RMSD (Root Mean-Square Difference). Η τιμή TM-score αντίστοιχη σε μια κλίμακα υπολογισμού της δομικής ομοιότητας δύο πρωτεϊνών με διαφορετικές τριτοταγείς δομές. Για την τιμή TM-score αποτελέσματα πάνω από $+0.5$ υποδεικνύουν ότι η τοπολογία του προβλεπόμενου μοντέλου είναι σωστή, ενώ αποτελέσματα κάτω από $+0.17$ υποδεικνύουν τυχαία ομοιότητα. Στην περίπτωση μας, οι τιμές C-score, TM-score και RMSD του μοντέλου της AtSBP1 είναι 0.02 , 0.71 ± 0.12 και $7.3 \pm 4.2 \text{ \AA}$, αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές δείχνουν ότι το μοντέλο είναι αξιόπιστο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην επακόλουθη ανάλυση αγκυροβόλησης, με εξαίρεση τα 23 πρώτα αμινοξικά κατάλοιπα της αμινοξικής περιοχής, καθώς δεν υπάρχει διαθέσιμη μήτρα που να τα περιέχει.

2.28 Ανάλυση Μοριακής αγκυροβόλησης (Molecular Docking Analysis)

Για την πρόβλεψη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών AtGRX14 – AtSBP1 χρησιμοποιήθηκε ο server HADDOCK2.2 (Dominguez *et al.*, 2003; van Zundert *et al.*, 2016), στον οποίο επιλέχθηκε ο αλγόριθμος CPORT (de Vries & Bonvin, 2011). Η καθοδηγούμενη πειραματική ανάλυση αγκυροβόλησης μας παρείχε λύση, η οποία παρουσίασε τιμή HADDOCK -136.4 , με τιμές ενέργειας (Kcal/mole) να έχουν υπολογιστεί ως εξής: α) ενέργεια van der Waals: -36.2 , β) ηλεκτροστατική ενέργεια: -375.2 , γ) ενέργεια αποδιαλυτοποίησης: -48.5 , δ) ενέργεια παραβίασης περιορισμών (restraints violation energy): 233.7 και ε) η ολική θαμμένη επιφάνεια (BSA): 1667.5 \AA^2 . Πρέπει να σημειωθεί ότι η ενέργεια παράβασης περιορισμού έχει υψηλή τιμή, καθώς ένας μεγάλος αριθμός καταλοίπων που θεωρήθηκαν ενεργά από τον αλγόριθμο CPORT δεν συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση αγκυροβόλησης. Τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση μεταξύ AtSBP1 και AtGRX14 υπολογίστηκαν από το λογισμικό PISA (Krissinel & Henrick, 2007).

2.29 Κατασκευή φυλογενετικών δένδρων

2.29.5 Κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου της οικογένειας DAD1

Για την κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου των Φωσφολιπασών, συλλέχθηκαν Φωσφολιπάσες A1, μέλη της οικογένειας λιπασών όμοιες με την DAD1, από 15 τάξεις των Αγγειόσπερμων, από την κλάση Bryopsida, την Lycorodiopsida και από ένα μονοκύτταρο φωτοσυνθετικό οργανισμό το φύκος *Chlamydomonas reinhardtii*, φτάνοντας στο σύνολο των 146 πρωτεϊνών. Αυτές οι πρωτεΐνες συλλέχθηκαν με την διαδικασία της αναζήτησης τοπικής στοίχισης (BLAST) σε βάσεις δεδομένων. Πρώτα, χρησιμοποιήθηκε η αμινοξική αλληλουχία της AtDALL3 (Phospholipase A1-Igamma2, Q3EBR6.2) και στη συνέχεια, κάθε μέλος της οικογένειας DAD1 [(Phospholipase A1-Ialpha1 (Q9MA46.1), Phospholipase A1-Ialpha2 (Q9SIN9.1), Phospholipase A1-Ibeta1 (DAD1, Q948R1.1), Phospholipase A1-Ibeta2 (O23522.2), Phospholipase A1-Igamma1 (Q941F1.2), Phospholipase A1-Igamma3 (Q9C8J6), Phospholipase A1-IIalpha (Q9LNC2.1), Phospholipase A1-IIbeta (O82274.2), Phospholipase A1-IIgamma (O49523.1), Phospholipase A1-IIdelta (Q9SJI7.1), DAD1-like acylhydrolase (Q9C8G6)] για την αναζήτηση όμοιων αλληλουχιών μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας NCBI BLASTp και ως βάσεις αναζήτησης τις Reference proteins (refseq_protein) ή non-redundant protein sequences (nr). Για κάθε πρωτεΐνη πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αναζητήσεις τοπικών στοιχίσεων για κάθε οργανισμό. Το ελάχιστο ποσοστό αμινοξικής ομοιότητας (identity) ήταν 42% με 55% θετικά και E-value 5e-126, ώστε να μπορούν να συμπεριληφθούν στην ανάλυση. Η λιπάση τριακυλογλυκερόλης του μύκητα *Rhizomucor mieher* χρησιμοποιήθηκε για ρίζα (outgroup) του δένδρου, καθώς είναι γνωστό ότι η αλληλουχία της περιέχει τα συντηρημένα χαρακτηριστικά (καταλυτική τριάδα και μοτίβο GX SXG) που χαρακτηρίζουν τις λιπάσες και η πρωτεϊνική δομή έχει αναλυθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X (Brady *et al.*, 1990; Ishiguro *et al.*, 2001). Οι αντιπρόσωποι από τα Αγγειόσπερμα συλλέχθηκαν σαρώνοντας όλες τις φυτικές ομάδες βασιζόμενοι στο σύστημα ταξινόμησης APG IV με μεγαλύτερη προσοχή στην ομάδα rosids. Από την ομάδα Basal Angiosperms επιλέχθηκε *Amborella trichopoda* και την ομάδα Monocots, *Asparagus officinalis*, *Oryza sativa* και *Zea mays*. Από τον κλάδο των ευδικοτυλήδων συλλέχθηκαν από τις τάξεις Fabales, Malpighiales, Fagales, Rosales, Myrtales, Sapindales, Brassicales, Malvales, Caryophyllales, Solanales, Asterales, and Proteales. Επιπλέον, η *Physcomitrella patens* επιλέχθηκε ως μέλος των Βρυόφυτων, ενώ η *Selaginella moellendorffi* των Lycopods.

Όλες οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες στοιχίστηκαν με το πρόγραμμα Clustal Omega (EMBL-EBI). Η στοίχιση μεταφέρθηκε στο πρόγραμμα PAUP 4.0 beta Win (Sworfford, 2002), με σκοπό την κατασκευή δένδρων Neighbor Joining και Maximum Parsimony. Για την κατασκευή Μπαϊεσιανού δένδρου, χρειάστηκε να βρεθεί το καλύτερο μοντέλο (WAG + I + G + F) χρησιμοποιώντας το PartitionFinder2 (Guindon *et al.*, 2010; Lanfear *et al.*, 2012, 2016). Το πρόγραμμα MrBayes v3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012) χρησιμοποιήθηκε για να τρέξει τέσσερις ανεξάρτητες MCMCMC αναζητήσεις με διαφορετικά τυχαία σημεία εκκίνησης και για 1,000,000 γενιές παίρνοντας δείγμα κάθε 5,000 γενιές. Η σύγκλιση υπολογίστηκε με τον δείκτη PSRF (Potential Scale Reduction Factor) (Gelman & Rubin, 1992) καθώς προσεγγίζει την τιμή 1, καθώς επίσης ελέγχοντας τα μέσω διαγραμμάτων τιμών των πιθανοτήτων με των αριθμό των γενεών

των διαφορετικών “τρεξιμάτων”. Βασιζόμενοι σε αυτή την ανάλυση, ορίστηκε το 25% για burn-in (“κάψιμο”), δηλαδή απορρίπτεται το 25% και δε συνεχίζει σε ανάλυση. Οι κόμβοι των κλάδων των τριών δένδρων συγκρίθηκαν με την χρήση του προγράμματος TreeGraph 2 (2.14.0-771 beta) (Stöver & Müller, 2010). Τέλος, η αξιοπιστία των κόμβων αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας 1000 και 100 bootstrap επαναλήψεις για το NJ και MP, αντίστοιχα και των πιθανοτήτων από την ανάλυση BI. Το δένδρο BI παρουσιάστηκε και επεξεργάστηκε με το πρόγραμμα FigTreev1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

2.29.6 Κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου της υποοικογένειας RD19A

Για την κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου της υποοικογένειας RD19A συλλέχθηκαν 123 πρωτεϊνικές αλληλουχίες, από 25 τάξεις των Αγγειόσπερμων, από την κλάση Bryopsida, την κλάση Lycorodiopsida, από το ηπατικό βρύο (Marchantiopsida) *Marchantia polymorpha* και από το νηματώδες φύκος *Klebsormidium nitens*. Αυτές οι πρωτεΐνες συλλέχθηκαν με την διαδικασία της αναζήτησης τοπικής στοίχισης (BLAST) σε βάσεις δεδομένων. Το κάθε μέλος της υποοικογένειας της AtRD19A [AtRD19A (P43296), AtRD19B (P43295), AtRD19C (Q9SUL1), AtRD19D (Q8VYSO)] χρησιμοποιήθηκε για την αναζήτηση όμοιων αλληλουχιών μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας NCBI BLASTp και ως βάσεις αναζήτησης τις Reference proteins (refseq_protein) ή non-redundant protein sequences (nr). Για κάθε πρωτεΐνη πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αναζητήσεις τοπικών στοιχίσεων για κάθε οργανισμό. Το ελάχιστο ποσοστό αμινοξικής ομοιότητας (identity) ήταν 55% με 72% θετικά και E-value $2e^{-134}$, ώστε να μπορούν να συμπεριληφθούν στην ανάλυση.

Οι αντιπρόσωποι από τα Αγγειόσπερμα συλλέχθηκαν σαρώνοντας όλες τις φυτικές ομάδες βασιζόμενοι στο σύστημα ταξινόμησης APG IV. Από την ομάδα Basal Angiosperms επιλέχθηκε η *Amborella trichopoda* και *Nymphaea colorata* και από την ομάδα Monocots, *Musa acuminata subsp. Malaccensis*, *Colocasia esculenta*, *Elaeis guineensis*, *Asparagus officinalis*, *Dendrobium catenatum*, *Carex littledalei*, *Ananas comosus*, *Oryza sativa* και *Zea mays*. Από τον κλάδο των ευδικοτυλήδων συλλέχθηκαν αλληλουχίες από τις τάξεις Fabales, Malpighiales, Fagales, Cornales, Cucurbitales, Ericales, Gentianales, Oxalidales, Ranunculales, Rosales, Myrtales, Sapindales, Brassicales, Malvales, Caryophyllales, Solanales, Asterales και Proteales. Επιπλέον, από την ομάδα των Magnoliids επιλέχθηκε το φυτό *Cinnamomum micranthum f. kanehirae*. Η *Physcomitrella patens* επιλέχθηκε ως μέλος των Βρυόφυτων, η *Selaginella moellendorffi* ως μέλος των Lycorods και η *Marchantia polymorpha* ως ηπατικό βρύο. Τέλος, η πρωτεάση του φύκου *Klebsormidium nitens* χρησιμοποιήθηκε ως ρίζα (outgroup) του δένδρου, ως ένας οργανισμός πρόγονος των χερσαίων φυτών.

Η αρχική σάρωση των αλληλουχιών των πρωτεασών όμοιων με την RD19A με τους φυτικούς οργανισμούς, έδωσε τεράστιο αριθμό δεδομένων, λόγω της υψηλής ομοιότητας και με άλλες πρωτεάσες όμοιες με παπαΐνες. Για την μείωση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν οι πληροφορίες που αναφέρονται στη δημοσίευση των Richau και συνεργατών (Richau *et al.*, 2012), ως προς την δομή και τα χαρακτηριστικά των αλληλουχιών της RD19A οικογένειας. Συγκεκριμένα αφαιρέθηκαν οι αλληλουχίες που δεν περιείχαν την συντηρημένη καταλυτική τριάδα Κυστεΐνης (Cys), Ιστιδίνης (His), Ασπαραγίνης (Asn). Επιπρόσθετο χαρακτηριστικό της οικογένειας αποτελεί το συντηρημένο μοτίβο VXNF{S/T} και οι παρουσιά

τεσσάρων επιπρόσθετων συντηρημένων καταλοίπων κυστεΐνης που σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς, δηλαδή, οι πρωτεάσες αυτές διαθέτουν 5 ζεύγη κυστεϊνών για την δημιουργία 5 δισουλφιδικών γεφυρών. Επομένως, όσες αλληλουχίες δε διέθεταν τα παραπάνω συντηρημένα χαρακτηριστικά αφαιρέθηκαν από την ανάλυση.

Οι 123 αλληλουχίες που συλλέχθηκαν στοιχήθηκαν με το διαδικτυακό εργαλείο MAFFT version 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Η στοιχισή αυτή χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την κατασκευή Μπαϊεσιανού δένδρου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα PartitionFinder 2 για την εύρεση του καλύτερου μοντέλου (LG + G + I) (Guindon *et al.*, 2010; Lanfear *et al.*, 2012, 2016). Το πρόγραμμα MrBayes v3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012) χρησιμοποιήθηκε για να τρέξει τέσσερις ανεξάρτητες MCMCMC αναζητήσεις με διαφορετικά τυχαία σημεία εκκίνησης και για 1,000,000 γενιές παίρνοντας δείγμα κάθε 5,000 γενιές. Οι υπόλοιπες παράμετροι και διαδικασίες ήταν ίδιες με αυτές που αναφέρθηκαν και για την κατασκευή του φυλογενετικού της οικογένειας DAD1, ενώ η παρουσίασή του έγινε με τη χρήση του διαδικτυακού εργαλείου iTOL (Letunic & Bork, 2019).

2.30 Αναστολή έκφρασης γονιδίου με παρεμβολή RNA (RNA-induced, RNAi)

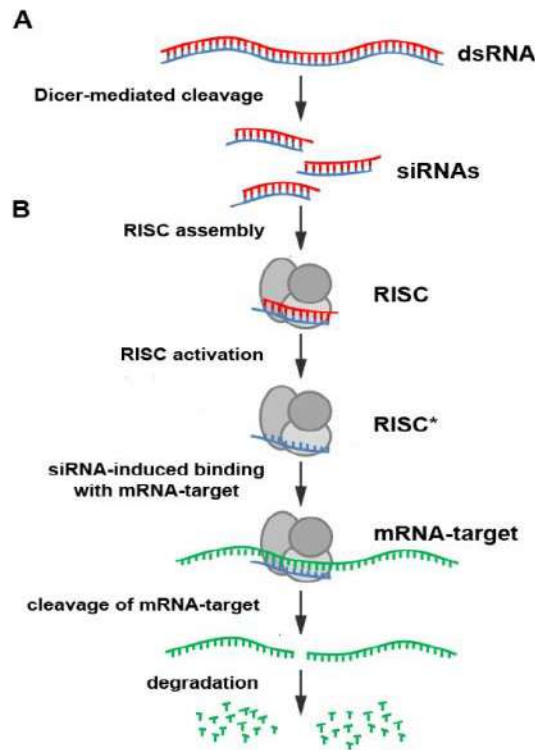
Η παρεμβολή RNA με βραχεία μόρια RNA είναι ένας μηχανισμός του κυττάρου που χρησιμοποιεί για την ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων. Η ρύθμιση της έκφρασης ενός γονιδίου μπορεί να λαμβάνει χώρα είτε αναστέλλοντας την μετάφραση του είτε αποικοδομώντας το mRNA του είτε αποσιωπώντας μεταγραφικά τον υποκινητή που το ελέγχει.

Ο μηχανισμός αυτός του κυττάρου παίζει σπουδαίο ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης των οργανισμών, συμπεριλαμβανομένου και του φυτού *Arabidopsis thaliana*, αλλά αποτελεί και αμυντικός μηχανισμός έναντι ιών. Πλέον, ο μηχανισμός αυτός χρησιμοποιείται ως εργαλείο για τη στοχευμένη αναστολή έκφρασης μελετώμενων γονιδίων.

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αναγνώριση δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA) από το κύτταρο. Τα τεχνητά και μη dsRNA μέσω του ενζύμου Dicer πέπτονται σε μικρότερα siRNA μεγέθους 21-23 νουκλεοτιδίων. Κάθε μόριο συνδέεται με τις απαραίτητες πρωτεΐνες παράγοντας το σύμπλοκο κατασίγασης RISC (RNA-induced Silencing Complex). Το ώριμο RISC αποτελείται από ένα μονόκλωνο siRNA και τις απαραίτητες πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένου και μιας πρωτεΐνης Αργοναύτης-Slicer με δράση νουκλεάσης (Εικόνα 2.30.1).

Το σύστημα αυτό πρώτη φορά αναφέρθηκε το 1986 από τους Ecker και Davis σε φυτικά κύτταρα, όπου παρατήρησαν ότι το συμπληρωματικό RNA (antisense RNA) μπορεί να αναστείλει την έκφραση γονιδίου (Ecker & Davis, 1986). Αρχικά, πολλές μελέτες πραγματοποιήθηκαν στους φυτικούς οργανισμούς, όπου φάνηκε η επίδρασή παρεμβαλλόμενων RNA στην φυτική άμυνα (Kumagai *et al.*, 1995; Covey *et al.*, 1997). Στη συνέχεια, εδραιώθηκε και σε άλλους οργανισμούς όπως ο νηματώδης *C. elegans*. Οι μελέτες στο νηματώδη οδήγησαν τους Andrew Z. Fire και Craig C. Mello στην ανακάλυψη ότι το σύστημα RNAi μπορεί και οδηγεί στην αποσιώπηση της έκφρασης ενός γονιδίου έπειτα από χορήγηση dsRNA (Fire *et al.*, 1998), γεγονός που τους οδήγησε στη βράβειυσή τους με Nobel Φυσιολογίας και Ιατρικής το 2006.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την δημιουργία μόνιμων μετασηματισμένων φυτών με αποσιώπηση για την πρωτεάση RD19c. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκε να ενισχυθεί με περιοχή 355bp, ειδική για την RD19c που δε παρουσιάζει ομοιότητα με κάποια άλλη πρωτεΐνη. Αυτή λοιπόν συντήχθηκε με 5→3 και 3→5 κατεύθυνση στις MCS1 και MCS2 του πλασμιδιακού φορέα pHANNIBAL, αντίστοιχα, ο οποίος φέρει όλα τα απαραίτητα στοιχεία για τη διαδικασία της αποσιώπησης. Έπειτα, η κασέτα απο-



Εικόνα 2.30.1: Ο μηχανισμός δράσης του RNAi συστήματος. Δίκλινα μόρια RNA (dsRNA) πέπτονται σε μικρότερα siRNAs από τη πρωτεΐνη Dicer. Τα μόρια αυτά δεσμεύονται στο σύμπλοκο RISC. Το ενεργό RISC σύμπλοκο αναγνωρίζει τα μόρια mRNA στόχους και τα πέπτει. (<http://davisgen564s14.weebly.com/rna-interference.html>).

σιώπησης κλωνοποιήθηκε στον δυαδικό φορέα pCambia-1301, εφόσον αφαιρέθηκε το γονίδιο αναφοράς GUS.

2.31 Πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης

Η βασική αρχή της μοριακής κλωνοποίησης συνίσταται στην ένθεση ενός τμήματος DNA (insert) που μας ενδιαφέρει σε ένα άλλο μόριο DNA, το οποίο ονομάζεται φορέας κλωνοποίησης (cloning vector) και έχει την ιδιότητα να αντιγράφεται μέσα σε ένα κύτταρο-ξενιστή. Από την αντιγραφή του ανασυνδυασμένου DNA εντός του κυττάρου-ξενιστή προκύπτουν πολλαπλά αντίγραφα του, συνιστώντας ένα κλώνο μορίων, δηλαδή επιτυγχάνεται η δημιουργία μιας μεγάλης ποσότητας του DNA που μας ενδιαφέρει.

Ανάλογα με το μέγεθος της ένθεσης και το πειραματικό σκοπό επιλέγεται ο κατάλληλος φορέας κλωνοποίησης. Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια ως φορείς. Τα πλασμίδια είναι κυκλικά δίκλινα μόρια DNA, που έχουν την ιδιότητα να αντιγράφονται ανεξάρτητα του χρωμοσωμικού DNA, που περιέχεται στο κύτταρο-ξενιστή, λόγω της παρουσίας μιας θέσης έναρξης της αντιγραφής

(origin of replication, ori). Επιπλέον, τα πλασμίδια φέρουν γονίδιο ανθεκτικότητας έναντι κάποιου αντιβιοτικού, γεγονός που διευκολύνει την επιλογή των μετασηματισμένων κυττάρων που έχουν λάβει τον συγκεκριμένο πλασμιδιακό φορέα. Τέλος, περιέχουν μια τουλάχιστον περιοχή πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (Multiple Cloning Site, MCS), η οποία αποτελείται από μοναδικές θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενδονουκλεασών, για τη διευκόλυνση των ανασυνδυασμών. Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

Πίνακας 2.31.1: Συνοπτική αναφορά των πλασμιδιακών φορέων που χρησιμοποιήθηκαν.

Πλασμιδιακός φορέας	Εικόνα από Παράρτημα I
pJET1.2/blunt	Εικόνα 1
pCambia1301	Εικόνα 2
pGBKT7	Εικόνα 7
pGADT7	Εικόνα 6
pSAT1-cCFP-N	Εικόνα 9
pSAT4-nCerulean-N	Εικόνα 10
pSAT4-nCerulean-C	Εικόνα 11
pSAT6-EYFP-N1	Εικόνα 8
pPZP-RCS2-ntpII	Εικόνα 3
pGPTV-HPT	Εικόνα 4
pHANNIBAL	Εικόνα 12
ER-YFP (CD3-957)	Εικόνα 5

2.31.7 Ο πλασμιδιακός φορέας pJET1.2/ blunt cloning vector

Ο pJET1.2/blunt αποτελεί ένα γραμμικό φορέα κλωνοποίησης 2974bp, ο οποίος επιτρέπει την ένθεση τμημάτων από 6bp μέχρι 10kb. Περιέχει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (ApR). Επίσης, το 5' άκρο του φορέα περιέχει φωσφορικές ομάδες, με αποτέλεσμα να μην κυκλοποιείται (Εικόνα 10). Η κυκλοποίηση έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση ενός θνησιγόνου γονιδίου, το οποίο μετά τον μετασηματισμό δεν επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό του. Έτσι, μόνο οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι που περιέχουν την ένθεση θα εμφανιστούν ως μονήρη αποικίες. Οι ενθέσεις μπορεί να έχουν κολλώδη άκρα ή τυφλά, με τη διαφορά ότι σε αυτές με κολλώδη άκρα προηγείται μια αντίδραση για την δημιουργία τυφλών άκρων (blunting reaction). Στη συγκεκριμένη εργασία τα τμήματα που κλωνοποιήθηκαν, ενισχύθηκαν με την πολυμεράση LongAmpTaq, η οποία προσθέτει στο 3' άκρο του προϊόντος -dA και για αυτό προηγήθηκε η αντίδραση δημιουργίας κολλώδων άκρων (blunting reaction), της αντίδρασης της λιγάσης.

2.31.8 Δυαδικοί φορείς (Binary vectors)

Για τον μετασχηματισμό των φυτών *Arabidopsis thaliana* χρησιμοποιείται τροποποιημένο το σύστημα του Ti πλασμιδίου του *Agrobacterium tumefaciens*. Συγκεκριμένα, χωρίζεται σε ένα ζευγάρι πλασμιδίων, τον δυαδικό φορέα (binary plasmid) και τον βοηθό φορέα (helper plasmid). Ο δυαδικός φορέας περιέχει την T-DNA περιοχή, δηλαδή αυτή που μεταφέρεται στο γονιδίωμα του φυτού, ενώ στο πλασμίδιο βοηθό βρίσκονται τα γονίδια *vir*, τα οποία χρειάζονται για την μεταφορά του T-DNA. Έτσι, λοιπόν, διαθέτουν τα συνοριακά RB και LB, στοιχεία που συμβάλουν στο μετασχηματισμό φυτών, τα οποία αναφέρονται πιο αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2.1.

- pCambia-1301

Ο πλασμιδιακός φορέας pCambia-1301 αποτελείται από 11.850bp και είναι κατάλληλος για τον μετασχηματισμό φυτών με τη μεσολάβηση *Agrobacterium*. Η περιοχή εντός των συνοριακών, φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη (HygR) για την επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών, την περιοχή MCS και το γονίδιο αναφοράς β-γλουκουρονιδάση (GUS). Το γονίδιο αναφοράς GUS μέσω μεταγραφικής σύντηξης, χρησιμοποιείται για την ιστοειδική έκφραση του υπό μελέτη υποκινητή. Τέλος, ο φορέας pCambia-1301 εμφανίζει γονίδιο ανθεκτικότητας στη καναμυκίνη (KanR) για την επιλογή μετασχηματισμένων βακτηρίων.

Σε αυτόν τον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποιήθηκαν σε μεταγραφική σύντηξη με το γονίδιο β-γλουκουρονιδάση τα θραύσματα υποκινητών που μελετήθηκαν. Οι θέσεις κλωνοποίησης αναγράφονται στον πίνακα 2.31.8 Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία κατασκευής υπερέκφρασης RD19c, λόγω προβλημάτων που υπήρξαν με τον φορέα pGPTV-HPT. Αναλυτικότερα, το προϊόν που ενισχύθηκε με τους εκκινητές F-RD19c-SmaI και R-RD19c-SmaI κλωνοποιήθηκε αρχικά στον πλασμιδιακό φορέα pSAT4-nCerulean. Στη συνέχεια, εντοπίστηκε αποικία που είχε κλωνοποιηθεί με κατεύθυνση 3'-5' και ακολούθησε η κλωνοποίηση του με BamHI/EcoRV στις θέσεις BglII/PmlI του pCambia1301. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή της κασέτας iRD19c από τις θέσεις PstI/StuI του pHANNIBAL/iRD19c στις θέσεις PstI/PmlI του pCambia1301.

Πίνακας 2.31.8.1: Πλασμιδιακές κατασκευές με τις θέσεις κλωνοποίησης τους.

Κατασκευή	5' άκρο	3' άκρο
pCambia1301/PRDALL3	EcoRI	NcoI
pCambia1301/PRDALL3-DEL1	EcoRI	NcoI
pCambia1301/PRDALL3-DEL2	EcoRI	NcoI
pCambia1301/PRDALL3-DEL3	EcoRI	NcoI
pCambia1301/PRDALL3-DEL4	EcoRI	NcoI
pCambia1301/PRDALL3-DEL5	EcoRI	NcoI
pCambia1301/PRRD19c	EcoRI	NcoI

pCambia1301/PRRD19c-DEL1	EcoRI	NcoI
pCambia1301/PRRD19c-DEL2	EcoRI	NcoI
pCambia1301/PRRD19c-DEL3	EcoRI	NcoI
pCambia1301/35S::RD19c	BamHI/BglII (insert/vector)	EcoRV/PmlI (insert/vector)
pCambia1301/iRD19c	PstI	StuI/PmlI (insert/vector)

- pPZP-RCS2-nptII (CD3-1061)

Ο πλασμιδιακός φορέας pPZP-RCS2-nptII (CD3-1061) αποτελείται από 8.890bp και χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή επιθυμητών κασέτων μελέτης, από τον πλασμιδιακό φορέα pSAT6-EYFP, που φέρουν το γονίδιο μελέτης σε μεταφραστική σύντηξη με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη EYFP υπό τον έλεγχο ισχυρού υποκινητή (π.χ. 35::RD19c-EYFP, 35S::DALL3-EYFP). Ο συγκεκριμένος φορέας διαθέτει γονίδιο επιλογής για τα φυτά καναμυκίνη (KanR), ενώ για τα βακτήρια σπεκτινομυκίνη (SmR). Οι κασέτες 35::RD19c-EYFP, 35S::DALL3-EYFP και mCherry-VIRD2NLS κλωνοποιήθηκαν στη θέση PI-PspI.

- pGPTV-HPT

Για την δημιουργία σειρών υπερέκφρασης των γονιδίων μελέτης χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pGPTV-HPT, από τον οποίο έχει αφαιρεθεί το γονίδιο αναφοράς β-γλουκουρονιδάση και είναι περίπου 13.000bp. Διαθέτει γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη (KanR) για τα βακτήρια και στην υγρομυκίνη (HygR) για επιλογή στα φυτά. Για την φωσφολιπάση DALL3 επιλέχθηκε η αποικία pJET1.2/3'-DALL3-5' και από εκεί κλωνοποιήθηκε αρχικά στον φορέα pSAT4/nCerulean στις θέσεις XbaI/EcoRI και από εκεί στον pGPTV-HPT στις θέσεις XbaI/SacI.

- CD3-957 (ER-YK)

Τέλος, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας CD3-957 (ER-YK), ο οποίος φέρει κατάλληλη κασέτα για την στόχευση του ενδοπλασματικού δικτύου, για την δημιουργία μόνιμα ματεσηματισμένων φυτών. Επίσης, η κασέτα αυτή κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pSAT4-nCerulean-N για να χρησιμοποιηθεί στον μετασηματισμό πρωτοπλαστών.

2.31.9 Οι πλασμιδιακοί φορείς για το σύστημα ζύμης δύο υβριδίων pGADT7 και pGBKT7 (Clontech)

Οι pGADT7 και pGBKT7 είναι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιούνται για το μετασηματισμό κυττάρων ζύμης με σκοπό την μελέτη αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών. Έτσι, έχουν σχεδιαστεί για την έκφραση πρωτεϊνών ενδιαφέροντος συντηγμένες με διαφορετικές περιοχές του μεταγραφικού παράγοντα GAL4. Η μεταγραφή αυτών των κατασκευών βρίσκονται υπό τον έλεγχο ενός μόνιμα ενεργού υποκινητή ADH1 (P_{ADH1}) και τερματίζεται από το σινιάλο λήξης μεταγραφής του ADH1 (T_{ADH1}). Επιπροσθέτως, εμπειρεύονται και άλλα στοιχεία που βοηθούν για περαιτέρω *in vitro* μελέτες.

Πίνακας 2.31.9.1: Πλασμιδιακές κατασκευές με τις θέσεις κλωνοποίησης τους.

Κατασκευή	5'-άκρο	3'-άκρο
-----------	---------	---------

pGADT7/AtSBP1	NdeI	BamHI
pGADT7/AtSBP2	NdeI	BamHI
pGADT7/AtSBP3	NdeI	BamHI
pGADT7/AtSBP1DEL1	NdeI	BamHI
pGADT7/AtSBP1DEL2	NdeI	BamHI
pGADT7/AtSBP1DEL3	NdeI	BamHI
pGADT7/AtSBP1DEL4	NdeI	BamHI
pGADT7/AtSBP1DEL5	NdeI	BamHI
pGADT7/AtSBP1DEL6	NdeI	BamHI
pGADT7/AtSBP1DEL7	NdeI	BamHI
pGADT7/AtSBP1DEL8	NdeI	BamHI
pGADT7/AtGRX14	NdeI	XhoI
pGADT7/AtDALL3	NdeI	EcoRI
pGADT7/RD19c	NdeI	BamHI
pGADT7/SAH7	NdeI	BamHI
pGBKT7/AtGRX14	NdeI	XhoI
pGBKT7/AtDALL3	NdeI	EcoRI
pGBKT7/RD19c	NdeI	BamHI
pGBKT7/SAH7	NdeI	BamHI
pGBKT7/AtSBP1DEL2	NdeI	BamHI
pGBKT7/AtSBP1DEL3	NdeI	BamHI
pGBKT7/AtSBP1DEL8	NdeI	BamHI

Ο pGADT7 φέρει την επικράτεια ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 (GAL4 AD, 768aa-881aa) μαζί με το πεπτίδιο πυρηνικού εντοπισμού SV40 (SV40 NLS) για την στόχευση της πρωτεΐνης στον πυρήνα της ζύμης. Στην συνέχεια, ακολουθεί η περιοχή πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (MCS). Επιπλέον, ο φορέας φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (AmpR) για επιλογή στα βακτήρια και το γονίδιο βιοσύνθεσης της λευκίνης (LEU2) για επιλογή στη ζύμη.

Ο pGBKT7 διαθέτει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 (GAL4 DNA-BD). Αυτή την περιοχή ακολουθεί η περιοχή πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (MCS) του φορέα.

Τέλος, στον φορέα περιέχεται το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη (KanR) για επιλογή στα βακτήρια και το γονίδιο βιοσύνθεσης τρυπτοφάνης (Trp) για επιλογή στη ζύμη.

2.31.10 Οι πλασμιδιακοί φορείς για τον μετασχηματισμό πρωτοπλαστών

Για τον υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pSAT6-EYFP-N1 (pE3225). Ο υποκυτταρικός εντοπισμός των αλληλεπιδράσεων μελετήθηκε με τη μέθοδο της συμπληρωματικότητας του διμοριακού φθορισμού (Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC). Στη μέθοδο αυτή μια φθορίζουσα πρωτεΐνη χωρίζεται σε δύο θραύσματα, καθένα από αυτά συντήκεται μεταφραστικά με τις μελετώμενες για αλληλεπίδραση πρωτεΐνες. Αν οι μελετώμενες πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν τότε παρατηρείται φθορισμός. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pSAT1-cCFP-N (pE3449) και pSAT4-nCerulean-N (pE3309) (Lee *et al.*, 2008).

- pSAT6-EYFP-N1 (pE3225)

Ο πλασμιδιακός φορέας pSAT6-EYFP-N (pE3225) φέρει την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green Fluorescent Protein, EYFP) σε ακολουθία με την περιοχή των πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (MCS) και υπό τον έλεγχο ενός ισχυρού υποκινητή (35S). Τέλος, φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (AmpR). Οι θέσεις κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο αναγράφονται στον πίνακα .

Πίνακας 2.31.10.1: Πλασμιδιακές κατασκευές με τις θέσεις κλωνοποίησης τους.

Κατασκευή	5'-άκρο	3'-άκρο
pSAT6-AtDALL3-EYFP-N1	EcoRI	Sall
pSAT6-AtRD19c-EYFP-N1	HindIII	BamHI
pSAT6-AtSAH7-EYFP-N1	EcoRI	BamHI
pSAT6-AtSBP1-EYFP-N1	EcoRI	XmaI
pSAT6-AtSBP2-EYFP-N1	EcoRI	XmaI
pSAT6-AtSBP3-EYFP-N1	EcoRI	XmaI
pSAT6-AtGRX14-EYFP-N1	HindIII	BamHI
pSAT6-AtGRX16-EYFP-N1	EcoRI	BamHI

- pSAT1-cCFP-N (CD3-1069, pE3449)

Ο πλασμιδιακός φορέας pSAT1-cCFP-N (pE3449) φέρει τη καρβοξυτελική περιοχή της κυανής φθορίζουσας πρωτεΐνης (Cyan Fluorescent Protein, CFP) cCFP σε ακολουθία με την περιοχή των πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (MCS) και υπό τον έλεγχο ενός ισχυρού υποκινητή (35S). Τέλος, φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (AmpR).

- pSAT4-nCerulean-N (CD3-1091, pE3309)

Ο πλασμιδιακός φορέας pSAT4-nCerulean-N (pE3309) φέρει την περιοχή των πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (MCS), την οποία ακολουθεί η αμινοτελική περιοχή της κυανής φθορίζουσας πρωτεΐνης Cerulean (nCerulean) και βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενός ισχυρού υποκινητή (35S). Τέλος, φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (AmpR).

- pSAT4-nCerulean-C (CD3-1090, pE3416)

Ο πλασμιδιακός φορέας pSAT4-nCerulean-N (pE3309) φέρει την αμινοτελική περιοχή της κυανής φθορίζουσας πρωτεΐνης Cerulean (nCerulean) σε ακολουθία με την περιοχή των πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (MCS) και υπό τον έλεγχο ενός ισχυρού υποκινητή (35S). Τέλος, φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (AmpR).

Πίνακας 2.31.10.2: Πλασμιδιακές κατασκευές με τις θέσεις κλωνοποίησης τους.

Κατασκευή	5'-άκρο	3'-άκρο
pSAT4-AtDALL3-nCerulean-N	EcoRI	Sall
pSAT4-AtRD19c-nCerulean-N	HindIII	BamHI
pSAT4-nCerulean-AtRD19c-C	Sall	BamHI
pSAT4-AtSAH7-nCerulean-N	EcoRI	BamHI
pSAT4-AtGRXS14-nCerulean-N	HindIII	BamHI
pSAT4-AtGRXS16-nCerulean-N	EcoRI	BamHI
pSAT1-AtSBP1-cCFP-N	EcoRI	XmaI
pSAT1-AtSBP2-cCFP-N	EcoRI	XmaI
pSAT1-AtSBP3-cCFP-N	EcoRI	XmaI

- pSAT6-mCherry-VIRD2NLS (CD3-1106, pE3170)

Ο πλασμιδιακός φορέας pSAT6-mCherry-VIRD2NLS (CD3-1106) φέρει την κατάλληλη κασέτα για τον πυρηνικό εντοπισμό. Η κασέτα αυτή κλωνοποιήθηκε στον δυαδικό πλασμιδιακό φορέα pPZP-RCS2-nptII (CD3-1061) στις θέσεις PI-PspI για να παραχθούν μόνιμα μετασηματισμένες σειρές φυτών με πυρηνικό εντοπισμό.

- pSAT4-ER-YFP

Για την κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα pSAT4-ER-YFP χρησιμοποιήθηκε η κασέτα 35S::ER-YFP του δυαδικού φορέα CD3-957 με τα άκρα AgeI/EcoRI και κλωνοποιήθηκε στις θέσεις AgeI/ApoI του πλασμιδιακού φορέα pSAT4-nCerulean-N.

2.31.11 Ο πλασμιδιακός φορέας ρHANNIBAL για την αποσιώπηση γονιδίου

Ο πλασμιδιακός φορέας ρHANNIBAL είναι κατάλληλος για την τεχνητή κατασκευή dsRNA μορίων για την στοχευμένη αναστολή έκφρασης του γονιδίου μελέτης. Ο φορέας έχει μέγεθος 5824bp και φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (AmpR) ενώ φέρει δύο περιοχές πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (MCS1 και MCS2) που μεταξύ τους παρεμβάλλεται το εσώνιο PDK (PDK intron) και η έκφρασή του ελέγχεται από έναν ισχυρό υποκινητή (CaMV 35S). Το εσώνιο PDK είναι απαραίτητο για την κατάλληλη ωρίμανση του μορίου και την δημιουργία μορίων dsRNA με δομή φουρκέτας, για τους φυτικούς οργανισμούς. Η ένθεση εισάγεται στη θέση MSC1 με κατεύθυνση 5' → 3' ενώ στη θέση MSC2 με 3' → 5', ώστε να μπορεί να δημιουργηθεί η δομή φουρκέτας. Τέλος, η επιθυμητή ένθεση μπορεί να είναι από 15bp μέχρι και 500bp. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ένθεση περίπου 350bp της περιοχής της πρωτεύουσας με την μικρότερη ομολογία. Συγκεκριμένα, στην MCS1 κλωνοποιήθηκε με XhoI/KpnI, ενώ στην MCS2 με BamHI/ClaI. Στη συνέχεια, η κασέτα iRD19c κλωνοποιήθηκε με PstI/StuI στις θέσεις PstI/PmlI του δυαδικού φορέα ρCambia1301 για τον μόνιμο μετασχηματισμό φυτών.

2.32 Θρεπτικά

Πίνακας 2.32.1: Πίνακας των θρεπτικών που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια και την ανάπτυξη των *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Arabidopsis thaliana*.

LB – <i>Escherichia coli</i>	YEB - <i>Agrobacterium tumefaciens</i> MS _{1/2} – <i>Arabidopsis thaliana</i>	
1% NaCl	0.5%NaCl	0.22% MS (Duchefa)
1% Tryptone	1% Tryprone	0.05% MES (Duchefa)
0.5% Yeast Extract	1% Yeast extract	1x Vitamins B5
1.4% Agar-agar	1.4% Agar-agar	PH 5.7 (KOH)
		0.8 – 1.2% Plant Agar

Πίνακας 2.32.2: Πίνακας θρεπτικών που χρησιμοποιήθηκαν για τον *Saccharomyces cerevisiae* στο σύστημα ζύμης δύο υβριδίων.

YPDA	SD-leu/trp (100ml)	SD-leu/trp/his (100ml)	SD-leu/trp/his/ade (100ml)
2% Peptone	0.65g YNB w/o aa with Ammonium Sulfate	0.65g YNB w/o aa with Ammonium Sulfate	0.65g YNB w/o aa with Ammonium Sulfate
1% Tryptone	2% D-glucose monohydrate	2% D-glucose monohydrate	2% D-glucose monohydrate
2% D-Glucose	1x Dropout SO - leu/trp	1x Dropout SO - leu/trp/his	60mg Dropout - leu/trp/his/ade
120µg/ml Adenine Hemi-sulfate	pH 5.8 (NaOH)	pH 5.8 (NaOH)	pH 5.8 (NaOH)

2g Bacto Agar

2g Bacto Agar

2g Bacto Agar

2g Bacto Agar

2.33 Διαλύματα

2.33.12 Διαλύματα Ηλεκτροφόρησης

Πίνακας 2.33.12.1: Πίνακας διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στις ηλεκτροφορήσεις.

20 x SB (500ml)	1 x SB	Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)	Βρωμιούχο αιθίδιο για ηλεκτροφόρηση
4g NaOH	50ml 20 x SB	100 mg/ml	100μl Αιθίδιο _{10mg/ml}
22.5g Boric Acid	950ml dH ₂ O	10ml 1 x SB	100ml 1 x SB

2.33.13 Διαλύματα πέψων με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών

Πίνακας 2.33.13.1: Διαλύματα πέψης Biolabs.

CutSmart [®] Buffer (1x)	NEB 1.1	NEB 2.1 (1x)	NEB 3.1 (1x)
50mM Potassium Acetate	MM Bis-Tris-Propane-HCl	50mM NaCl	100mM NaCl
20mM Tris-acetate	10mM MgCl ₂	10mM Tris-HCl	50mM Tris-HCl
10mM Magnesium Acetate	100μg/ml BSA	10mM MgCl ₂	10mM MgCl ₂
100μg/ml BSA	pH 7 @ 25°C	100μg/ml BSA	100μg/ml BSA
pH 7.9 @25°C		pH 7.9 @25°C	pH 7.9 @25°C

Πίνακας 2.33.13.2: Διάλυμα για πέψεις Invitrogen, Roche.

TA (10x)	React [®] 2 Buffer (Invitrogen)	React [®] 6 Buffer (Invitrogen)	SuRE/Cut A (Roche)
330mM Tris-acetate (pH 7.5)	50mM Tris-Hcl (pH 8.0)	50mM Tris-HCl (pH 7.4)	33mM Tris Acetate
660 mM potassium acetate	10mM MgCl ₂	6mM MgCl ₂	10mM Mg-acetate
100 mM magnesium acetate	50mM NaCl	50mM KCl	66mM K-acetate
5 mM dithiothreitol (DTT)		50mM NaCl	0.5mM dithiothreitol (DTT)

2.33.14 Διαλύματα για απομόνωση πλασμιδίου από *Escherichia coli* και *Agrobacterium tumefaciens*

Πίνακας 2.33.14.1: Διαλύματα για την απομόνωση πλασμιδίου από *Escherichia coli* και *Agrobacterium tumefaciens*.

Διάλυμα Επαναιώρησης P1	Διάλυμα λύσης P2	Διάλυμα εξουδετέρωσης P3
25mM Tris-HCl	1% SDS	2.8M Potassium Acetate (KoAc)
10mM EDTA	200mM NaOH	PH 5.1 (Glacial Acetic Acid)
(50mM Glucose)		

2.33.15 Διαλύματα για απομόνωση RNA

Πίνακας 2.33.15.1: Διαλύματα για την απομόνωση RNA.

Διάλυμα λύσης κυττάρων S0II	Διάλυμα κατακρήμνισης Πρωτεϊνών-DNA S0III
2% SDS	4M NaCl
68mM Sodium Citrate	16mM Sodium Citrate
132mM Citric Acid	32mM Citric Acid
1mM EDTA	

2.33.16 Διαλύματα για μετασχηματισμό φυτών με τη μεσολάβηση του *Agrobacterium tumefaciens*

Πίνακας 2.33.16.1: Διάλυμα εμφύπτισης *Arabidopsis thaliana*.

Infiltration Media (I.M)

0.22% MS (Duchefa)

0.05% MES (Duchefa)

5% Sucrose

1x Vitamins B5

pH 5.7 (KOH)

200μl/L Silwett-L77

0.1mg/ml BAP

2.33.17 Διαλύματα για την χρώση Gus

Πίνακας 2.33.17.1: Διαλύματα για την Χρώση GUS.

Gus Staining Buffer	Rinse Staining Buffer	100mM NaPO ₄ pH 7.2
50mM NaPO ₄	50mM NaPO ₄	28mM NaH ₂ PO ₄
0.2% Triton-X	0.2% Triton-X	72mM Na ₂ HPO ₄
1mM Potassium Ferrocyanide	1mM Potassium Ferrocyanide	
1mM Potassium Ferricyanide	1mM Potassium Ferricyanide	
ddH ₂ O	dH ₂ O	

2.33.18 Διαλύματα για απομόνωση πρωτοπλαστών και μετασχηματισμό

Πίνακας 2.33.18.1: Πίνακας διαλυμάτων για απομόνωση πρωτοπλαστών από μεσόφυλλο.

Ενζυμικό διάλυμα	Διάλυμα W5
1% Cellulase	154mM NaCl
0.25% Macerozyme	5mM KCl
0.4M Mannitol	5mM Glucose
20mM KCl	Αποστείρωση. Έπειτα προσθήκη:
20mM MES pH 5.7	125mM CaCl ₂
10min @ 55°C	2mM MES pH 5.7
Το αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα:	
0.1% BSA	
10mM CaCl ₂	

Πίνακας 2.33.18.2: Διαλύματα απομόνωσης πρωτοπλαστών από ρίζα.

Ενζυμικό διάλυμα	Διάλυμα W5
1.25% Cellulase	154mM NaCl
0.3% Macerozyme	5mM KCl
0.4M Mannitol	Αποστείρωση. Έπειτα προσθήκη:
20mM KCl	125mM CaCl ₂

20mM MES 5mM MES pH 5.7

pH 5.7 (1M Tris/HCl pH 7.5)

*

10min @ 55°C

Το αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα:

10mM CaCl₂

0.1% BSA

5mM β-mercaptoethanol

*Στην περίπτωση που δεν έχει ρυθμιστεί το pH του MES, το διάλυμα W5 για πρωτοπλάστες ρίζας ρυθμίζεται με KOH για pH 5.7.

Πίνακας 2.33.18.3: Διαλύματα για τον μετασχηματισμό πρωτοπλαστών ρίζας και μεσόφυλλου.

Διάλυμα MMg	Διάλυμα PEG
0.4M Mannitol	40% PEG ₄₀₀₀
15mM MgCl ₂	0.2M Mannitol
4mM MES pH 5.7	0.1M CaCl ₂

Τα επιμέρους διαλύματα 1M Mannitol, 100mM MgCl₂, 100mM KCl αποστειρώνονται και αποθηκεύονται. Τα διαλύματα 1.25M CaCl₂ και 100mM MES pH 5.7 φιλτράρονται.

2.33.19 Διαλύματα φθορισμομετρίας

Πίνακας 2.33.19.1: Διαλύματα για φθορισμομετρίας.

Διάλυμα εκχύλισης	Διάλυμα Δοκιμής	Διάλυμα τερματισμού
50mM NaPO ₄ pH 7.0	50mM NaPO ₄ pH 7.0	0.2M Na ₂ CO ₃
10mM DTT ή β-mercaptoethanol	10mM DTT ή β-mercaptoethanol	
0.1% Sodium Lauryl Sarcosine	0.1% Sodium Lauryl Sarcosine	
0.1% Triton-X 100	0.1% Triton-X 100	
	1mM 4-methylumbelliferyl-b-D-glucuronide (4-MUG)	

2.34 Εκκινητές

Πίνακας 2.34.1: Εκκινητές για την ενίσχυση ελλειμμάτων του υποκινητή της *AtDALL3*.

Όνομασία	Αλληλουχία
prPLA1-F1	CGCGAATTCACTTGAGTTTTCTTGAACCATATGC
prPLA1-F2	GCTAAAGAATTCGGTACATCCGCACATGT
prPLA1-F3	CTCCTATCGAATTCTTACTTTCTCTTGTGTGC
prPLA1-F4	GAAAAATTGAATTCGCAACCTCCTAGCTAAGTGAC
prPLA1-F5	GGATCCATGAATTCTGATCTGTACCAGATTGC
prPLA1-F6	GTTGAGGAATTC AATTCTCTTGTCACTTACCGG
prPLA1-R	GCCGCCATGGTTGAGAAGCTTCAAAGC

Πίνακας 2.34.2: Εκκινητές για την ενίσχυση της κωδικής περιοχής *AtDALL3* για κλωνοποίηση στους πλασμιδιακούς φορείς pGBKT7 και pSAT4-nCerulean-N.

Όνομασία	Αλληλουχία
PLA1-NdeI-F	GCTTCTCACATATGGCGGCTATTCCITCC
PLA1-EcoRI-R	GCGTGAATTCTTAACAAGGATGATCAAGACGG
pSAT-DALL3-EcoRI-F	GATCTCAGAGGAGGAATTCATATGGCGGC
pSAT-DALL3-XmaI-R	CCCCGGGAACCTTTGACAAGGATG

Πίνακας 2.34.3: Εκκινητές για την ενίσχυση των ελλειμμάτων του υποκινητή της πρωτεΐνης *AtRD19c*.

Όνομασία	Αλληλουχία
prPRD19c-F1	CGCGAATTCAC- TAATTTACCCTCAAGTTTTATTATTAAGG
prPRD19c-F2	CCGAATTCATTGATGCTGTAGCAG- TCTCTCACATTAAG
prPRD19c-F3	CCGAATTC AATTCGGCAATCGTTCTAGATATGGTTTC
prPRD19c-F4	GAGAATTCAGAAACAACAAGCAACGTGTCACTT
prPRD19c-R	GGAAGAAGAAGACCACACGATCCATGG

Πίνακας 2.34.4: Εκκινητές για την ενίσχυση της κωδικής περιοχής της *AtRD19c* για την κλωνοποίηση στους πλασμιδιακούς φορείς pGBKT7, pSAT4-nCerulean-N, pHANNIBAL και pGPTV-HPT.

Όνομασία	Αλληλουχία
RD19c-pSAT-F-HindIII	CGAAGCTTCATGGATCGTGTGGTCTTCTTCTCC
RD19c-pSAT-F-SalI	GGTGTGGTCGACATGGATCGTGTGGTCTTCTTC
RD19c-pSAT-R-BamHI	GCGGATCCACTTGGGTGAGGTATGAACAGCAGCAAC
RD19c-BK-F	CCGCATATGGATCGTGTGGTCTTCTTCTTCTCC
F-RD19c-SmaI	GGAGGACCCGGGATGGATCGTGTGG
R-RD19c-SmaI	GATCCCGGGCCACTTGGGTGAGGTATG
F-BamHI-XhoI-iRD19C	AAAGGATCCTCGAGGTCTTCTTCTCCTCATC
R-ClaI-KpnI-iRD19C	TTTTAATCGATGGTACCCCTCGGCGTTTCAG

Πίνακας 2.34.5: Εκκινητές για την ενίσχυση της κωδικής περιοχής της *AtSAH7* για την κλωνοποίηση στους πλασμιδιακούς φορείς pGBKT7 και pSAT4-nCerulean-N.

Όνομασία	Αλληλουχία
SAH7-F-RI	GAATTCATGTCTAAAGCAGTTCTATTGGTCGC
SAH7-R	CGTCCTCGGTTTCTTGGTATAG
SAH7-F-NN	CGCGGCCGCATATGTCTAAAGCAGTTCTATTGGTCGCTC
SAH7-R-BS	TACTAGTGGGGGGATCCCGTCTCGGTTTCTTGGTATAGC

Πίνακας 2.34.6: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων *AtRD19c*, *AtSBP1*, *AtSBP2*, *AtSBP3*, *AtSAH7*, *AtUBQ10* και *AtPP2A*.

Όνομασία	Αλληλουχία
DALL3-RLT-F	CGTGATATCGCGATTGCGTGG
DALL3-RLT-R	GTCGCCGTGTTCTTCCACTAAC
RD19c-RLT-F	TCGATTGGCGTGAACAAGGA
RD19c-RLT-R	GCTGCTCACTGAGGCTAACA
SAH7-RLT-F	TCTCCGGTGCAGTGGTTAGA
SAH7-RLT-R	ATGACCAGGGGACACATTGG
RT-SBP1-F	CCGACTGGTCTCTTACCTTTG
RT-SBP1-R	CATCTTACTCCCTTTTTTATTCAACTC

RT-SBP2-F	TTGCATATTTATCAATGGCCT
RT-SBP2-R	GAGTAAGAACAACCTTAATTGTCT
RT-SBP3-F	GGCCGCGTTTACCAAAGGATTTG
RT-SBP3-R	CTGTTCCGATTTCCATAGAAATCCTTGATT
RLT-UBQ10-F	AGAAGTTCAATGTTTCGTTTCATGTAA
RLT-UBQ10-R	GAACGGAAACATAGTAGAACACTTATTCA
RLT-PP2A-F	TGATCCAGATGACCGATGCG
RLT-PP2A-R	GAGTGGTTTCGGGTTCTCGACT

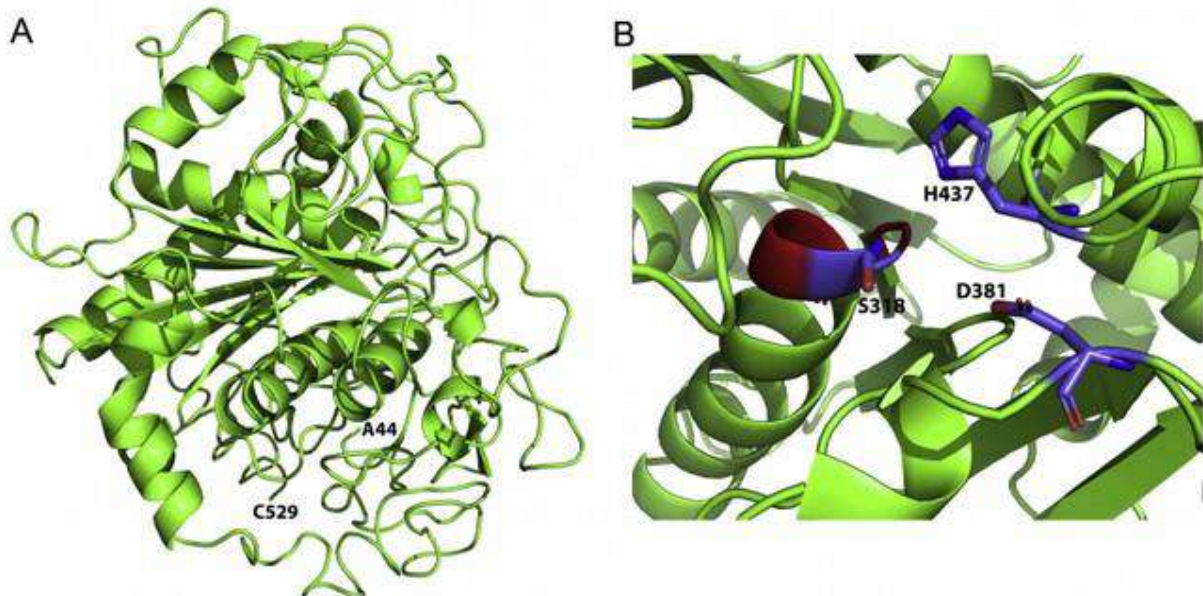
3. Αποτελέσματα

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν τα γονίδια τα προϊόντα των οποίων πιθανόν να αλληλεπιδρούν με την *AtSBP1*. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν διεξοδικά η φωσφολιπάση A1, *AtDALL3* και η πρωτεάση όμοια με Παπαΐνη, *AtRD19c*, καθώς επίσης μελετήθηκαν οι *in planta* αλληλεπιδράσεις της *AtSBP1* με τις γλουταρεδοξίνες *AtGRXS14*, *AtGRXS16* και το αλλεργιογόνο *AtSAH7*. Στο κεφάλαιο αυτό παρατίθενται τα πειραματικά αποτελέσματα για κάθε πρωτεΐνη που μελετήθηκε ξεχωριστά.

3.1 Η Φωσφολιπάση *AtDALL3*

3.1.1 Τα χαρακτηριστικά της αλληλουχίας της *AtDALL3* και μοντέλο της τρισδιάστατης δομής της

Η φωσφολιπάση *AtDALL3* (Q3EBR6, At2g30550) εντοπίζεται στο δεύτερο χρωμόσωμα και κωδικοποιεί μια χλωροπλαστιδιακή πρωτεΐνη με 529 αμινοξικά κατάλοιπα (Εικόνα 3.1.1.2, A). Περιλαμβάνει μια πολύ συντηρημένη περιοχή GXSXG, που εντοπίζεται ανάμεσα στα αμινοξικά κατάλοιπα 316-320 και μια χαρακτηριστική καταλυτική τριάδα που αποτελείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα σερίνης (aa318), ασπαρτικού οξέος (aa381) και ιστιδίνης (aa437) (Εικόνα 3.1.1.2, B).



Εικόνα 3.1.1.1: Μοντέλο της τρισδιάστατης δομής της *AtDALL3*. (A) Μοντέλο κορδέλα αναπαράστασης της δομής της *AtDALL3* (πράσινο χρώμα). Η δομή της *AtDALL3* αποτελείται από μια κεντρική β-πτυχωτή επιφάνεια που περικλείεται από α-έλικες. (B) Η καταλυτική τριάδα, η οποία είναι συντηρημένη στις λιπάσες, εντοπίζεται και στην *AtDALL3* και σχηματίζεται από τα αμινοξικά κατάλοιπα Ser318, Asp381 και H437. Τα καταλυτικά αμινοξέα αναπαριστώνται με ράβδους. Η συντηρημένη αλληλουχία G-X-S-X-G (κατάλοιπα 316-320) που περιλαμβάνει το καταλυτικό κατάλοιπο σερίνης χρωματίζεται με κόκκινο χρώμα. Απεικόνιση με το λογισμικό PyMOL (Νικόλαος Παπανδρέου, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής).

(A)

```

      10      20      30      40      50      60
AtDALL3 1 MAAIPSHNNLLTINHKNSITGSSSLNTNFSEINFPAKFRVATRALSRTESSLSAVISRLERRERERQGL
      80      90      100     110     120     130
AtDALL3 71 LIEEAEGAGELWMTAEDIRRRDKKTEEERLRDTRWRIQGEDDWAGLMDPMDPILRSELIRYGEMAOQAC
      150     160     170     180     190     200
AtDALL3 141 DAFDFDPASKYCGTSRFTRLEFFDSLGMIDSGYEVARYLYATSNINLPNFFSKSRWSKVWSKNANWNGYV
      220     230     240     250     260     270
AtDALL3 211 AVSDDETSRRNLGRDIAIAWRGTVTKLEWIADLKDYLPVTENKIRCPDPAVKVESGFLDLYTDKDTTC
      290     300     310     320     330     340
AtDALL3 281 KFARFSAREQILTEVKRLVEEHGDDDDSDLSITVTGHSLSGALAILSAYDIAEMRLNRSKKGKVIPTVL
      360     370     380     390     400     410
AtDALL3 351 TYGGPRVGNVRFRRERMEELGVKVMRVNVHGVVFKSPGLFLNESRPHALMKIAEGLPWCYSHVGEELALD
      430     440     450     460     470     480
AtDALL3 421 HQNSPFLKPSVDVSTAHNLEAMLHLLDGYHGKGERFVLSSGRDHALVNKASDFLKEHLQIPFFWRQDANK
      500     510     520
AtDALL3 491 GMVRNSEGRWIQAERLRFEDHHSPDIHHHLSQLRLDHP

```

(B)

<i>AtDAD1</i>	(292)	GHS LG (54)	D (65)	H (29)
<i>AtDALL3</i>	(315)	GHS LG (60)	D (55)	H (92)
<i>AtPLA1-IIdelta</i>	(235)	GHS LG (56)	D (38)	H (76)
<i>AtPLA1-III</i>	(325)	GHS LG (55)	D (54)	H (88)
<i>R.miehei</i>	(235)	GHS LG (56)	D (53)	H (12)
<i>C.reinhardtii</i>	(321)	GHS LG (72)	D (93)	H (64)

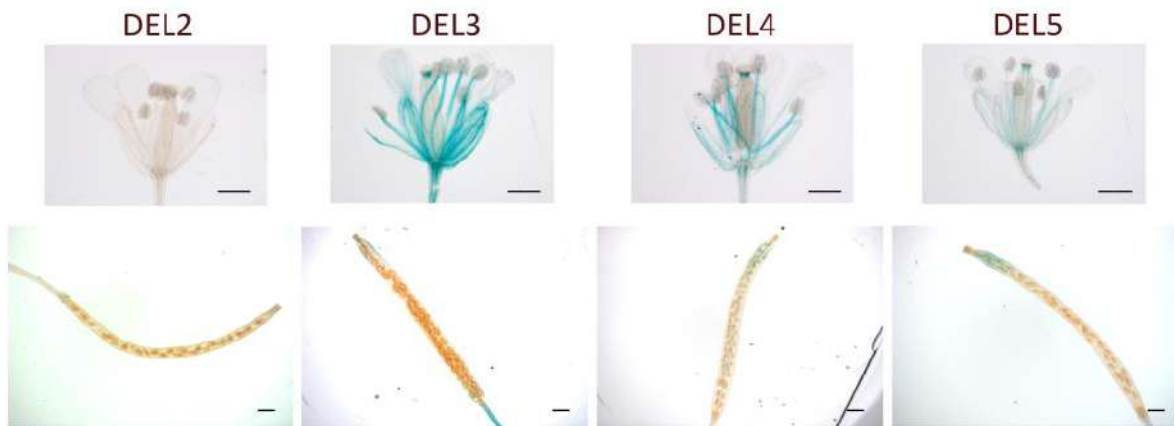
Εικόνα 3.1.1.2: Η αμινοξική αλληλουχία της *AtDALL3* και η πολλαπλή στοίχιση της περιοχής του ενεργού κέντρου από μέλη της οικογένειας DAD1. (A) Η γραμμική αλληλουχία της *AtDALL3*. Η περιοχή σε πλαίσιο προσδιορίζει το πεπτίδιο-σινιάλο χλωροπλαστιδιακής στόχευσης. Τα σκιασμένα αμινοξικά κατάλοιπα αποτελούν το συντηρημένο μοτίβο GX SXG (γκρι) και την καταλυτική τριάδα (μαύρο), η οποία αποτελείται από τα κατάλοιπα σερίνης (S), ασπαρτικού οξέος (D) και ιστιδίνης (H). (B) Αμινοξική στοίχιση της καταλυτικής περιοχής της *AtDALL3* και των ομόλογων της στους οργανισμούς *Chlamydomonas reinhardtii*, *Rhizomucor miehei* και *Arabidopsis thaliana* (*AtDAD1*, *AtPLA1-IIdelta*, *AtPLA1-III*). Οι αριθμοί στις παρενθέσεις υποδεικνύουν τον αριθμό των αμινοξέων που μεσολαβούν. Τα κατάλοιπα χρωματίστηκαν βάσει της ταυτοσημότητας τους, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα JalView 2.10.5.

Η τριτοταγής δομή της DALL3 του φυτού *Arabidopsis thaliana* δεν έχει προσδιοριστεί πειραματικά και έτσι κατασκευάστηκε ένα θεωρητικό μοντέλο. Η παρατήρηση της δομής δείχνει ότι αποτελείται από μια κεντρική αντιπαράλληλη β-πτυχωτή επιφάνεια, με τον δεύτερο β-κλώνο αντιπαράλληλο, που περικλείεται από α-έλικες (Εικόνα 3.1.1.1, A). Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η *AtDALL3* ανήκει στην τάξη των α/β πρωτεϊνών, υιοθετώντας την αναδίπλωση των αλφα/βήτα υδρολασών, η οποία χαρακτηρίζει τις λιπάσες (Casas-Godoy *et al.*, 2012). Αυτό το συμπέρασμα ενισχύεται από τα αποτελέσματά μας, όταν το μοντέλο σαρώθηκε έναντι των ταξινομημένων αυτοτελών δομικών περιοχών της βάσης CATH (Dawson *et al.*, 2017), μια δημόσια προσβάσιμη διαδικτυακή πηγή ταξινόμησης των δομικών αυτοτελών δομικών περιοχών, των προσδιορισμένων πειραματικά τριτοταγών δομών, που βρίσκονται κατατεθειμένες στην βάση Protein Data Bank (PDB) (Berman *et al.*, 2000). Η ομοιότητα των αυτοτελών δομικών περιοχών της CATH με αυτή της δομής που υποβλήθηκε, υπολογίστηκε με βάση το Πρόγραμμα Στοίχισης Δομικής Αλληλουχίας (Sequential Structure Alignment Program, SSAP) (Orengo & Taylor, 1996). Γενικά, οι τιμές SSAP πάνω από 80 σχετίζονται με πολύ όμοιες δομές. Όλες οι δομές (κωδικοί PDB: 2YIJ,

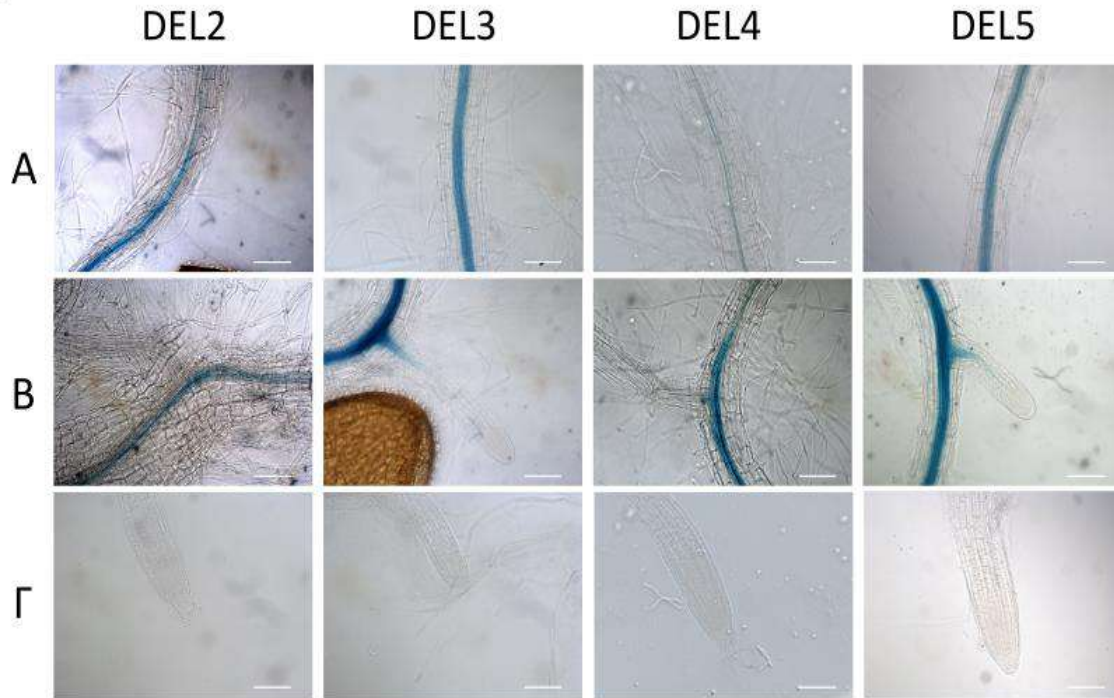
3TGL και 1UWC) που ταιριάζουν βέλτιστα στο μοντέλο της AtDALL3 (με τιμές SSAP > 80) είναι ταξινομημένες ως αβ πρωτεΐνες σε επίπεδο Τάξης (Class), που σχηματίζουν ένα Sandwich τριών επιπέδων (aba) σε επίπεδο αρχιτεκτονικής (Architecture). Εκτός από την τιμή SSAP, η τιμή RMSD μεταξύ του μοντέλου που κατασκευάστηκε και αυτού που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα (κωδικός PDB 2YIJ) είναι 0.8 Å, δείχνοντας την υψηλή ομοιότητα μεταξύ των δύο δομών. Επιπλέον, μια επιπλέον αναζήτηση στη βάση δεδομένων SCOPe (Fox *et al.*, 2014), αντίστοιχη των καταχωρίσεων της PDB, επιβεβαιώνει επίσης την ομαδοποίηση της με τις πρωτεΐνες της τάξης α/β που χαρακτηρίζονται από το δίπλωμα υδρολάσης α/β, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση μας ότι η AtDALL3 υιοθετεί την συγκεκριμένη αναδίπλωση. Όσον αφορά τα καταλυτικά κατάλοιπα, το συντηρημένο μοτίβο ανάμεσα στα αμινοξέα 316-320, που χαρακτηρίζεται από την αλληλουχία GX SXG και την καταλυτική τριάδα, που αποτελείται από τα αμινοξέα σερίνης (aa318), ασπαρτικού οξέος (aa381) και ιστιδίνης (aa437), βρίσκονται σε εγγύτητα στο προτεινόμενο μοντέλο, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο να εκτελέσει τον καταλυτικό της ρόλο (Εικόνα 3.1.1.1, B).

3.1.2 Ιστοειδική μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *AtDALL3*

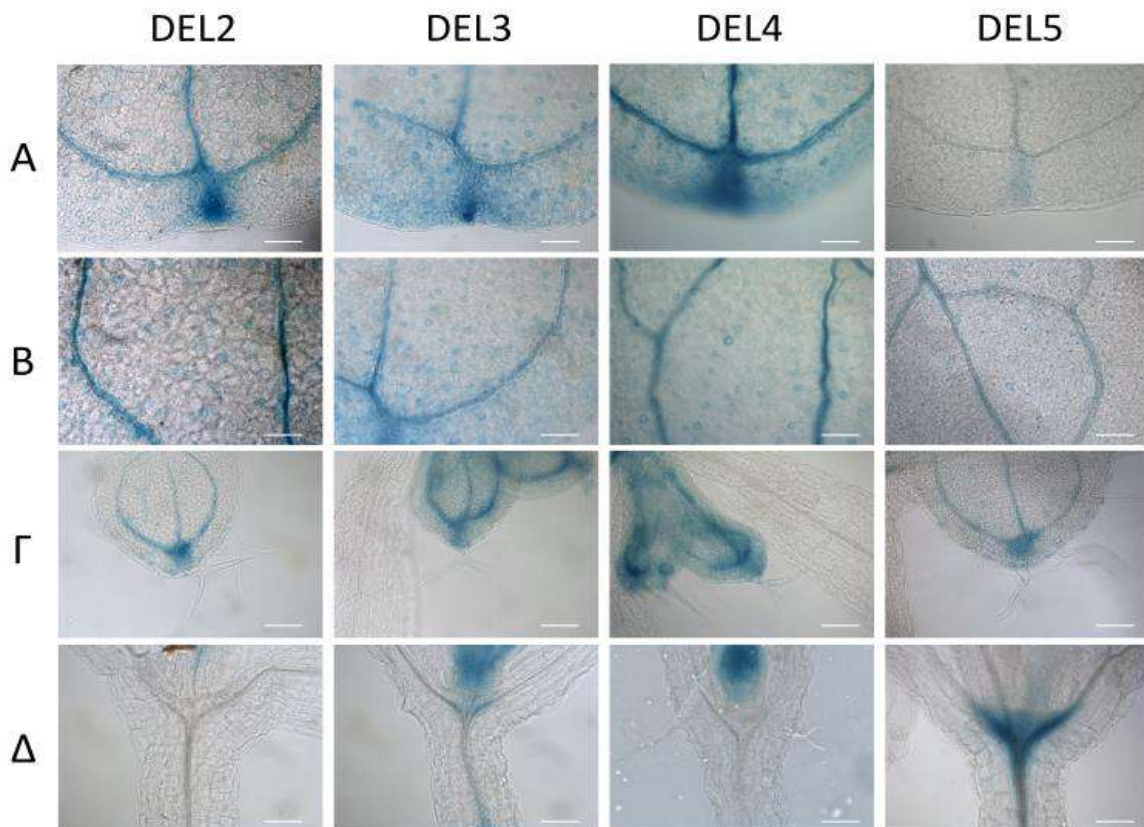
Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε ανάλυση της ιστοειδικής έκφρασης του γονιδίου της φωσφολιπάσης *DAD1-like lipase 3 (DALL3)*. Η έκφραση ενός γονιδίου εξαρτάται από ρυθμιστικά στοιχεία που φέρει η αλληλουχία του υποκινητή, στα οποία προσδένονται μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι ρυθμίζουν την έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου. Για την εύρεση των ρυθμιστικών στοιχείων του υποκινητή επιλέχθηκε μια περιοχή ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής (-3100bp) και στη συνέχεια δημιουργήθηκαν 5 διαδοχικές απαλοιφές του 5'-άκρου αυτής: PR-DALL3-DEL1 (2810bp), PR-DALL3-DEL2 (2414bp), PR-DALL3-DEL3 (1556bp), PR-DALL3-DEL4 (1261bp), PR-DALL3-DEL5 (628bp). Οι αλληλουχίες αυτές συντήχθηκαν μεταγραφικά με το γονίδιο αναφοράς β-γλυκουρονιδάσης (β-glucuronidase, GUS) στον δυαδικό πλασμιδιακό φορέα pCambia1301 (Παράρτημα Ι, Εικόνα 2). Με τις κατασκευές αυτές παράχθηκαν διαγονιδιακά φυτά, έπειτα από μετασχηματισμό φυτών *Arabidopsis thaliana* αγρίου τύπου με την μεσολάβηση *Agrobacterium tumefaciens* που περιείχαν την αντίστοιχη πλασμιδιακή κατασκευή.



Εικόνα 3.1.2.1: Ιστοειδική έκφραση των διαδοχικών ελλειμμάτων του υποκινητή της *AtDALL3* (DEL2, DEL3, DEL4, DEL5) σε άνθη (πάνω) και κεράτια (κάτω).



Εικόνα 3.1.2.2: Ιστοειδική έκφραση των διαδοχικών ελλειμμάτων του υποκινητή της *AtDALL3* (DEL2, DEL3, DEL4, DEL5) στην ρίζα (Α), τις πλάγιες ρίζες (Β) και το ακρόριζο (Γ).



Εικόνα 3.1.2.3: Ιστοειδική έκφραση των διαδοχικών ελλειμμάτων του υποκινητή της *AtDALL3* (DEL2, DEL3, DEL4, DEL5) στις κοτυληδόνες (Α-Β), τα φύλλα (Γ) και το υποκοτύλιο (Δ).

τα σπέρματα αποτελώντας την γενετική δεξαμενή (pool) με μετασηματισμένα και μη σπέρματα. Η επιλογή των μετασηματισμένων φυτών πραγματοποιείται σε τρυβλία παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών, στην περίπτωση του πλασμιδιακού φορέα pCambia1301, Υγρομυκίνη (30 µg/ml).

Τα φυτά της T₂ γενιάς παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο AxioPlan, έπειτα από χρώση GUS, ως προς το πρότυπο έκφρασης τους σε αρτίβλαστα 10 ημερών και σε άνθη και κεράτια από φυτά 3 εβδομάδων.

Οι αλληλουχίες με μήκος 3100bp (PR-DALL3) και 2810bp (PR-DALL3-DEL1) δε παρουσίασαν καμία χρώση, ενώ τα υπόλοιπα θραύσματα δεν είχαν έντονες διαφορές στο πρότυπο έκφρασης. Συγκεκριμένα, στα φύλλα και τις κοτυληδόνες παρατηρείται επαγωγή στο αγγειακό αγωγό σύστημα αυτών, στα υδατόδια και στα στόματα (Εικόνα 3.1.2.3). Στη ρίζα, η έκφραση εντοπίζεται στην περιοχή του αγωγού κυλίνδρου, διακόπτεται όμως πριν την περιοχή του ακρόριζου. Παρόμοιο πρότυπο εμφανίζεται και στις πλαγιές ρίζες (Εικόνα 3.1.2.2). Στα άνθη, παρατηρείται επίσης έκφραση στις περιοχές του αγγειακού συστήματος των πετάλων, των στύλων των ανθίρων και του ύπερου (Εικόνα 3.1.2.1). Τέλος, στο αγγειακό σύστημα των κερατίων εμφανίζεται χρώση (Εικόνα 3.1.2.1).

Καθώς το πρότυπο έκφρασης μεταξύ των ελλειμμάτων που μελετήθηκαν δεν παρουσιάζει έντονες διαφορές, μπορεί να θεωρηθεί ότι το μικρότερο έλλειμμα έχει την ικανότητα να δρα ως λειτουργικός υποκινητής του γονιδίου της *AtDALL3*.

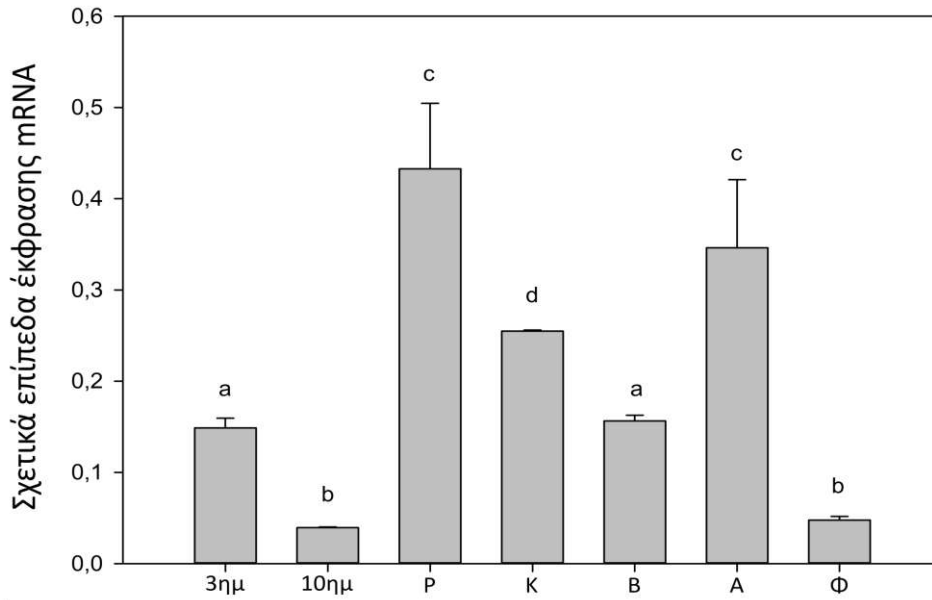
3.1.3 Ποσοτική έκφραση της *AtDALL3* κατά την ανάπτυξη και την αβιοτική καταπόνηση

Για την μελέτη των επιπέδων έκφρασης της *AtDALL3* συλλέχθηκαν ιστοί 3 ημερών, 10 ημερών ολόκληρα αρτίβλαστα, ρίζα, κοτυληδόνες και βλαστοί, 4 εβδομάδων φύλλα ροζέτας και άνθη. Στη συνέχεια, απομονώθηκε RNA από αυτούς τους ιστούς και ακολούθησε η σύνθεση cDNA. Τα cDNA χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης τους με qPCR. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο δδCt και σχεδιάστηκε αντίστοιχο ιστόγραμμα.

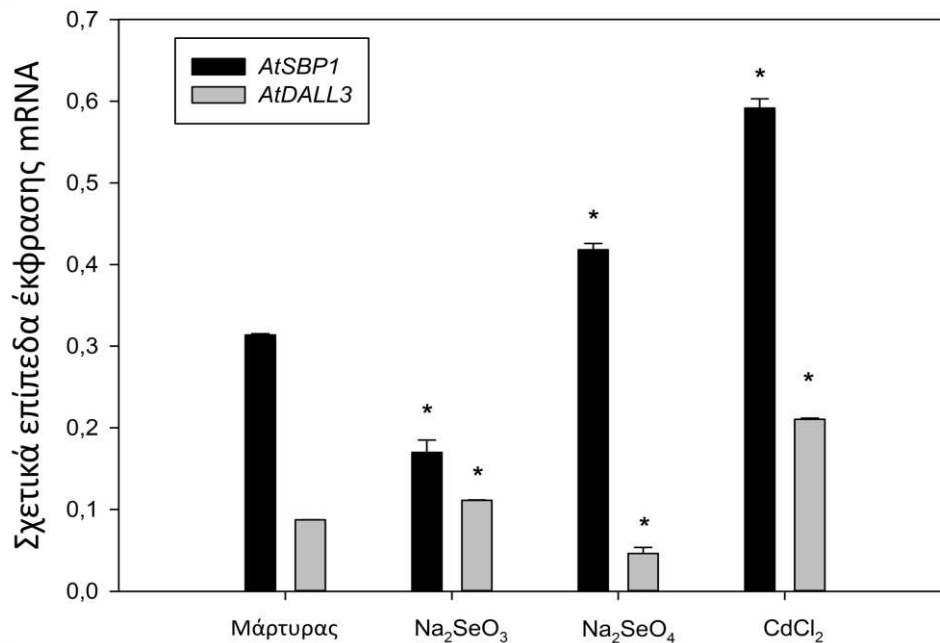
Τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν στις ρίζες αρτιβλάστων 10 ημερών και στα άνθη, ενώ εμφανίζει μια συνεχή έκφραση και στους υπόλοιπους ιστούς. Επιπλέον, σημειώθηκε κατακόρυφη πτώση της έκφρασης στα αρτίβλαστα 10 ημερών σε σχέση με αυτή των αρτιβλάστων 3 ημερών (Εικόνα 3.1.3.1).

Όσον αφορά την καταπόνηση από χημικές ενώσεις, εκτός από την *AtDALL3* μελετήθηκαν και τα επίπεδα έκφρασης της *AtSBP1*. Τα επίπεδα έκφρασης μελετήθηκαν σε ιστούς ρίζας έπειτα από επίδραση με 150µM Na₂SeO₃, 150µM Na₂SeO₄ και 150µM CdCl₂. Παρατηρούμε λοιπόν, ότι τα επίπεδα έκφρασης της *AtDALL3* αυξάνονται έπειτα από Na₂SeO₃, ενώ μειώνονται παρουσία Na₂SeO₄. Αντίθετα, η *AtSBP1* παρουσιάζει μείωση παρουσία Na₂SeO₃ και αύξηση έπειτα από κατεργασία με Na₂SeO₄, ενώ και τα δύο γονίδια παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική επαγωγή της έκφρασής τους παρουσία CdCl₂ (Εικόνα 3.1.3.2). Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση του τραυματισμού στα επίπεδα έκφρασης των μελών της οικογένειας των *AtSBP* και της *AtDALL3*. Στην επίδραση του τραυματισμού συλλέχθηκαν 10 ζεύγη φύλλων από φυτά 21 ημερών, που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας, ενώ άλλα 10 ζεύγη τραυματίστηκαν με λαβίδα και έπειτα από 80min συλλέχθηκαν (Rudus *et al.*, 2014). Έπειτα από ανάλυση των αποτελεσμάτων

παρατηρήθηκε διπλασιασμός της έκφρασης της *AtDALL3* και κατακόρυφη μείωση των επιπέδων των *AtSBP1*, *AtSBP2*, *AtSBP3* (Εικόνα 3.1.3.4).

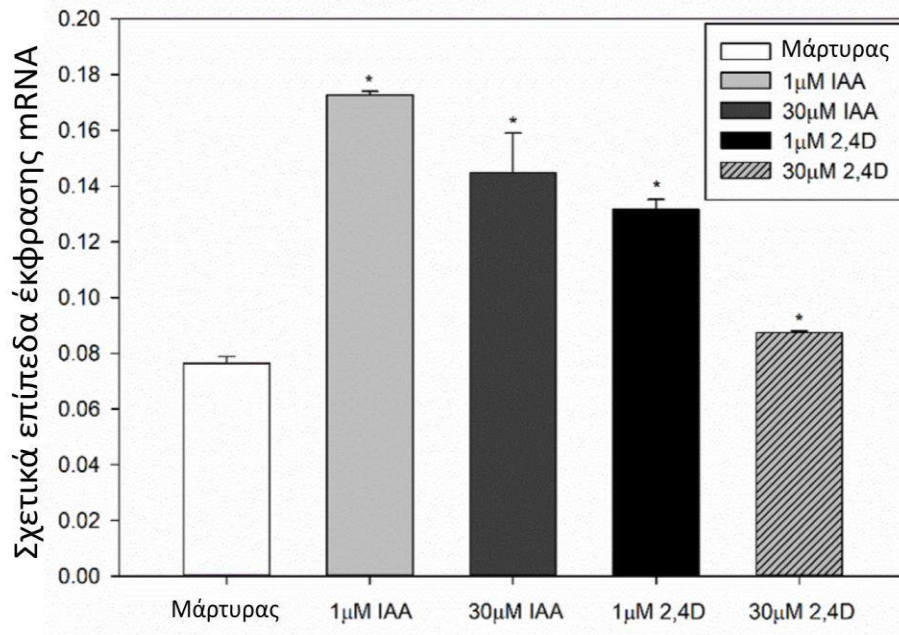


Εικόνα 3.1.3.1: Ιστόγραμμα σχετικής έκφρασης mRNA της *AtDALL3* στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια και ιστούς. 3ημ: 3 ημερών, 10ημ: 10 ημερών, P: ρίζα από 10 ημερών αρτίβλαστα, K: κοτυληδόνες από 10 ημερών αρτίβλαστα, B: βλαστός από 10 ημερών αρτίβλαστα, Φ: φύλλα ροζέτας και A: άνθη. Τα γράμματα a,b,c,d υποδηλώνουν την στατιστική σημαντικότητα των μεταβολών μεταξύ των μελετώμενων ιστών. Οι μπάρες προσδιορίζουν την τυπική απόκλιση (SD).

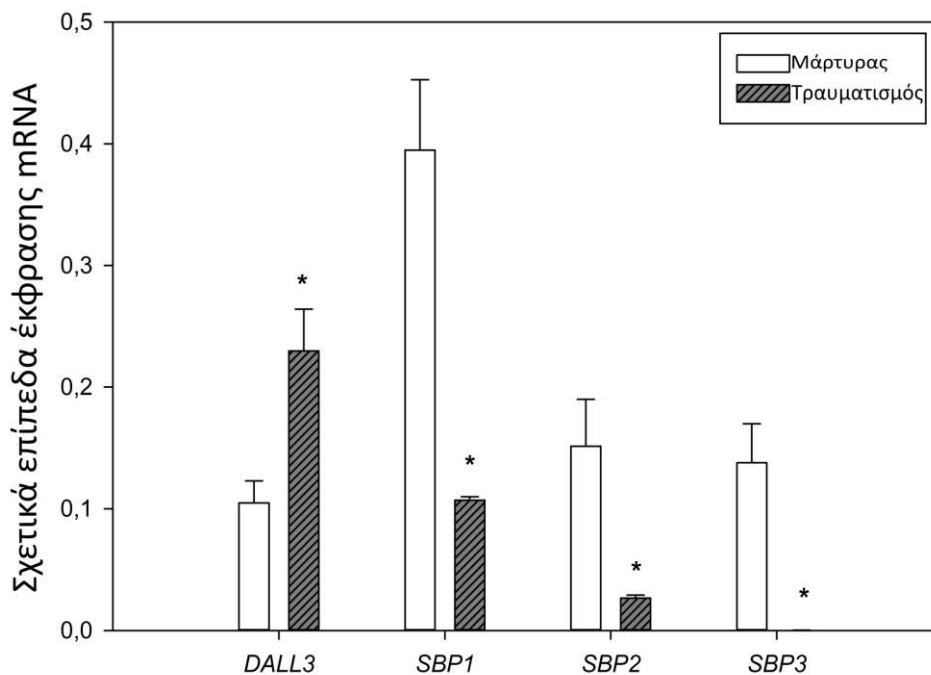


Εικόνα 3.1.3.2: Ιστόγραμμα σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA της *AtDALL3* έπειτα από επίδραση με σεληνώδες νάτριο (Na₂SeO₃), σεληνικό νάτριο (Na₂SeO₄) και χλωριούχο κάδμιο (CdCl₂). Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν την στατιστική σημαντικότητα των μεταβολών των κατεργασιών σε σχέση με τον μάρτυρα. Οι μπάρες προσδιορίζουν την τυπική απόκλιση (SD).

Επιπρόσθετα, φάνηκε ότι η αυξίνη έχει θετική επίδραση στα επίπεδα έκφρασης της *AtSBP1*, επομένως πρόκειται για ένα γονίδιο που σχετίζεται με την αυξίνη (Εικόνα 3.1.3.3). Ο τραυματισμός πρό-

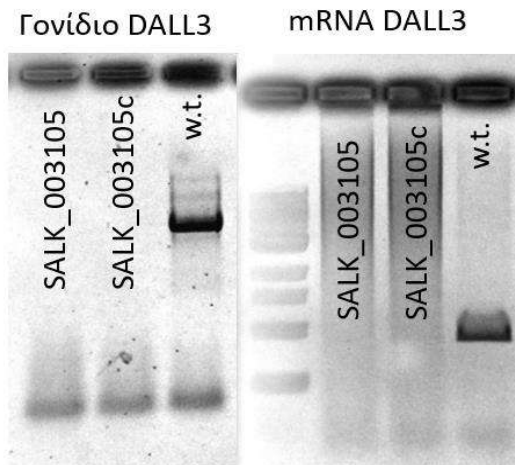


Εικόνα 3.1.3.3: Ιστογράμμο σχετικών επιπέδων έκφρασης της *AtSBP1* έπειτα από επίδραση με 1μM και 30 μM Ινδολο-3-οξικό οξύ (IAA) και της συνθετικής ορμόνης 2,4-διχλωρο-φαινοκυ-οξικό οξύ (2,4D). Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τη στατιστικά σημαντική μεταβολή ανάμεσα στην κατεργασία και στον μάρτυρα. Οι μπάρες προσδιορίζουν την τυπική απόκλιση (SD).



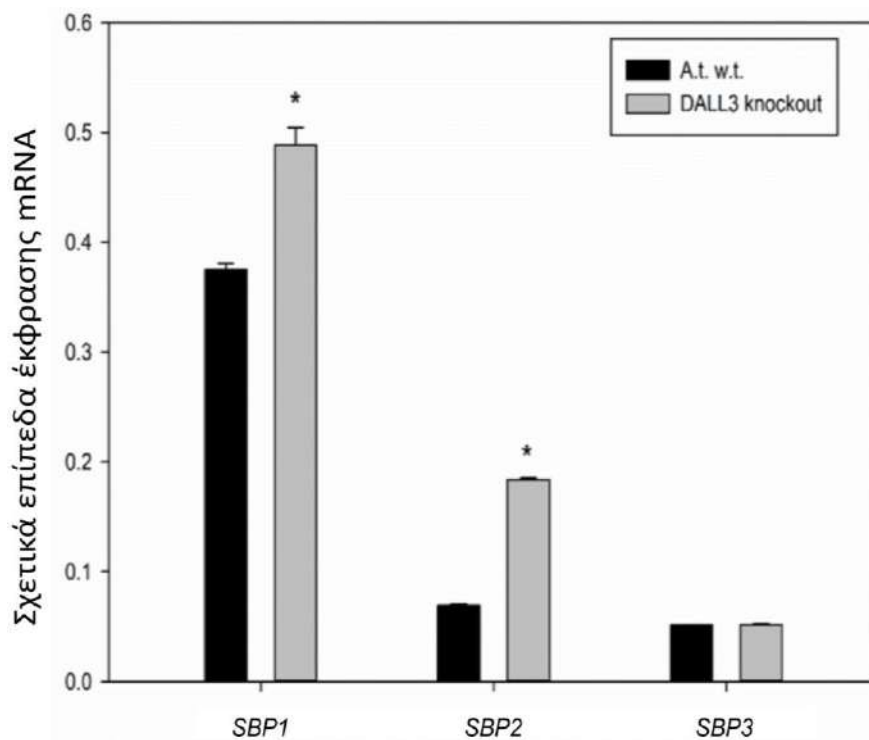
Εικόνα 3.1.3.4: Ιστογράμμο σχετικών επιπέδων έκφρασης των *AtDALL3*, *AtSBP1*, *AtSBP2*, *AtSBP3* έπειτα από μηχανικό τραυματισμό. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τη στατιστικά σημαντική μεταβολή ανάμεσα στην κατεργασία και στον μάρτυρα. Οι μπάρες προσδιορίζουν την τυπική απόκλιση (SD).

κείται για αβιοτική καταπόνηση και έχει δειχθεί ότι κατά την αβιοτική καταπόνηση, γονίδια που σχετίζονται με την αυξίνη παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης (Cheong *et al.*, 2002; Swindell, 2006). Το γεγονός αυτό δικαιολογεί την μείωση των επιπέδων έκφρασης της *AtSBP1* έπειτα από τον τραυματισμό (Εικόνα 3.1.3.4).



Εικόνα 3.1.3.5: Ηλεκτροφορήσεις για τον έλεγχο της παρουσίας του γονιδίου *AtDALL3* και της έκφρασής της σε επίπεδο mRNA σε μεταλλάγματα καταστολής της.

Τέλος, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των Πρωτεϊνών που δεσμεύουν σελήνιο σε μέταλλα καταστολής της *AtDALL3* (*dall3*). Τα μεταλλάγματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι από το Κέντρο Βιολογικών Πόρων *Arabidopsis* (*Arabidopsis* Biological Resource Center, ABRC) με κωδικούς



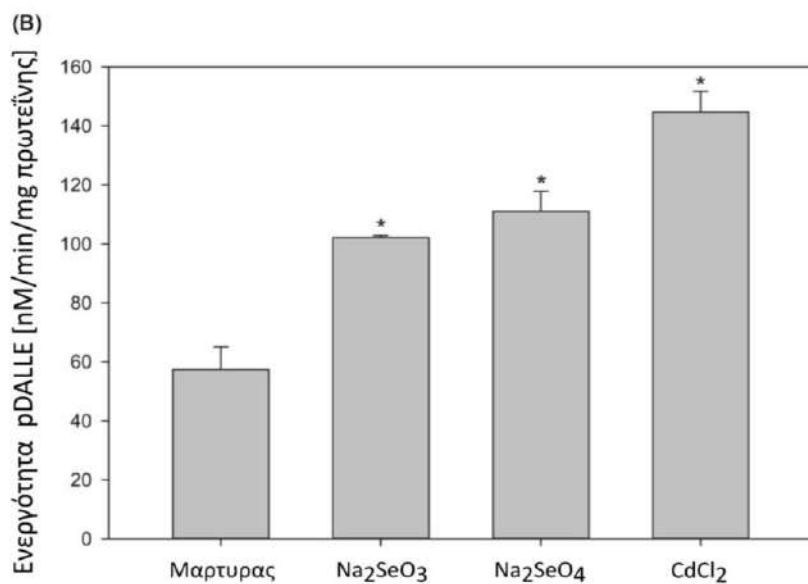
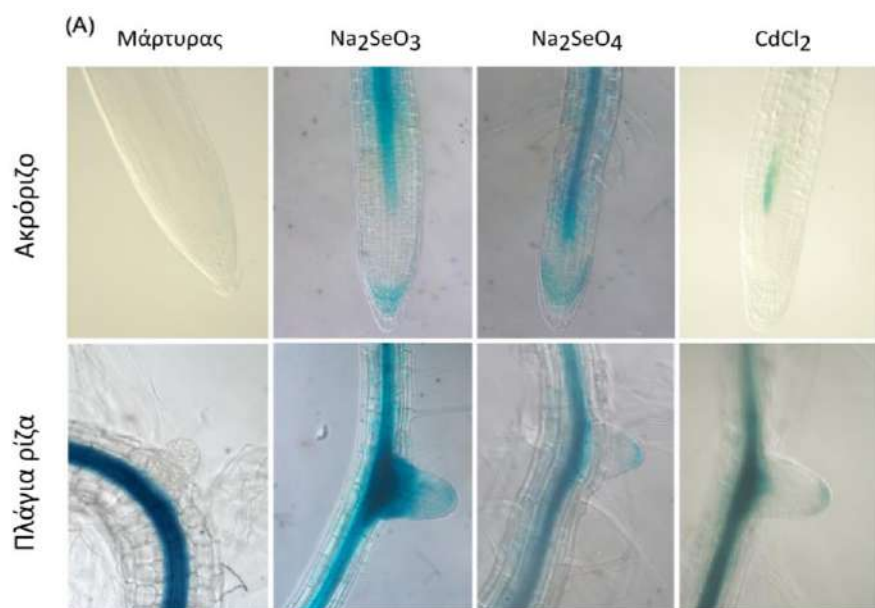
Εικόνα 3.1.3.6: Ιστόγραμμα σχετικών επιπέδων έκφρασης των *AtSBP1*, *AtSBP2*, *AtSBP3* σε αρτίβλαστα με αποσιώπηση της *AtDALL3*. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τη στατιστικά σημαντική μεταβολή. Οι μπάρες προσδιορίζουν την τυπική απόκλιση (SD).

SALK_003105, SALK_003105C, τα οποία έχουν προκύψει με ένθεση T-DNA. Τα μεταλλάγματα ελέγχθηκαν για την ένθεση T-DNA και για την απουσία της έκφρασης της *AtDALL3* (Εικόνα 3.1.3.5). Στην συγκεκριμένη περίπτωση, η έκφραση μελετήθηκε σε φύλλα ροζέτας. Τα επίπεδα έκφρασης των *AtSBP1* και *AtSBP2* αυξάνονται σε σχέση με αυτά του αγρίου τύπου, ενώ τα επίπεδα της *AtSBP3* δε παρουσιάζουν κάποια μεταβολή (εικόνα 3.1.3.6).

3.1.4 Ενεργότητα υποκινητή της *AtDALL3* κατά την αβιοτική καταπόνηση

Για την μελέτη της ενεργότητας του υποκινητή κατά την αβιοτική καταπόνηση χρησιμοποιήθηκαν τα διαγονιδιακά φυτά που φέρουν την κατασκευή *pDALL3-DEL5::GUS*. Το γονίδιο αναφοράς β-γλουκουρονιδάση μπορεί να αποικοδομεί το υπόστρωμα 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολο-β-D-γλουκουρονικό (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide) σε ολόκληρα αρτίβλαστα ή φυτικά όργανα, απελευθερώνοντας μπλε χρώμα, υποδεικνύοντας την ιστοειδική έκφραση του γονιδίου μελέτης. Επιπλέον, το ίδιο γονίδιο μπορεί και αποικοδομεί το υπόστρωμα 4-μεθυλουμπελιφαιρολ-β-D γαλακτοπυρανοζίδιο (4-methylumbelliferyl-b-D-glucuronide, MUG) σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα απελευθερώνοντας φθοροφόρο προϊόν κατάλληλο για την ποσοτικοποίηση της ενεργότητας του υποκινητή.

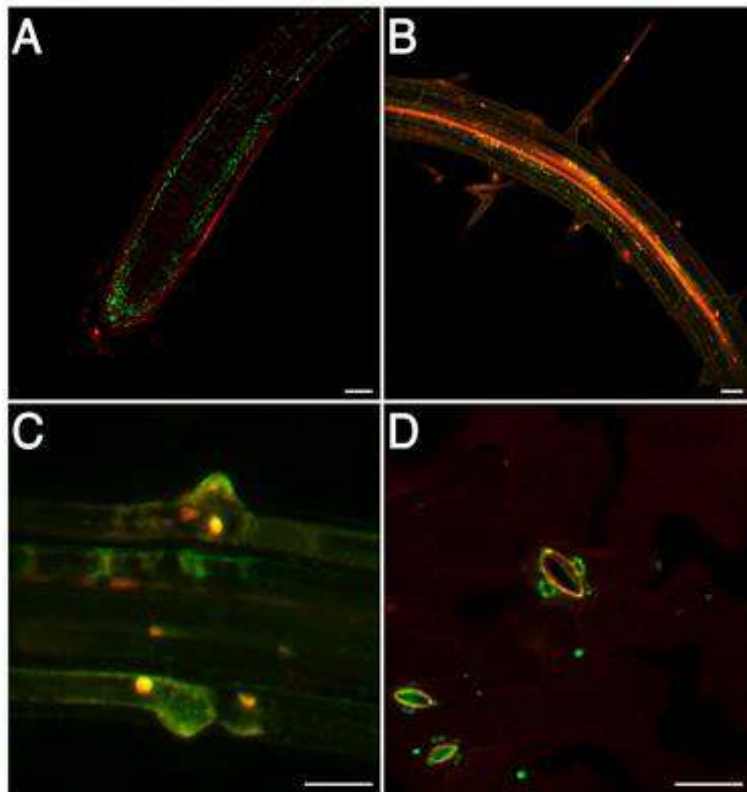
Οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σε ολόκληρα αρτίβλαστα και στα αντίστοιχα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα τους, έπειτα από επίδραση με 150μM Na_2SeO_3 , 150μM Na_2SeO_4 και 150μM CdCl_2 . Παρατηρήθηκε, επαγωγή της ενεργότητας του υποκινητή και στις τρεις περιπτώσεις, με μέγιστη αυτή της παρουσίας καδμίου, ενώ παρατηρήθηκε αλλαγή στο πρότυπο έκφρασης στην περιοχή του ακρόριζου και των πλάγιων ριζών παρουσία των μορφών σεληνίου, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.1.4.1.



Εικόνα 3.1.4.1: Επίδραση της αβιοτικής καταπόνησης στον υποκινητή της *AtDALL3*. (A) Ιστοειδική ανάλυση του υποκινητή *pDALL3-DEL5* παρουσία χημικών στοιχείων σεληνίου και καδμίου στην περιοχή του ακρόριζου και των πλάγιων ριζών. (B) Η ενεργότητα του υποκινητή προσδιορίστηκε σε φυσιολογικές συνθήκες και έπειτα από την επίδραση μορφών σεληνίου και καδμίου. Η φθορισμομετρία πραγματοποιήθηκε σε τριπλέτες και υπολογίστηκε η μέση τιμή. Οι μπάρες προσδιορίζουν την τυπική απόκλιση (SD). Η στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) προσδιορίζεται με αστερίσκο. Η ενεργότητα παρουσιάζεται με nM-4-MU που παράγονται ανά mg πρωτεΐνης ανά λεπτό. Οι μπάρες προσδιορίζουν την τυπική απόκλιση (SD).

3.1.5 Υποκυτταρικός εντοπισμός της *AtDALL3*

Για την μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού παράχθηκαν μόνιμα μετασηματισμένα φυτά που φέρουν το γονίδιο της φωσφολιπάσης *AtDALL3* σε μεταφραστική σύντηξη με το γονίδιο EYFP υπό τον έλεγχο ενός ισχυρού υποκινητή (2x35S). Για το προσδιορισμό της κυτταρικής έκφρασης της φωσφολιπάσης, ακολούθησε χρώση με ιωδιούχου προπιδίου (propidium iodide, PI) σε αρτίβλαστα 10 ημερών, όπως περιγράφεται από το εργαστήριο του Philip N. Benfey (<https://sites.duke.edu/benfey/protocols/>). Συγκεκριμένα, τα φυτά πρώτα εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα ιωδιούχου προπιδίου 10 μg/ml και στη συνέχεια σε ddH₂O. Τα φυτά παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος», με χειριστή τον Μιχάλη Ζαχαριάδη. Φθορίζον σήμα ανιχνεύθηκε στα πλαστίδια της περιοχής του ακρόριζου, στα πλαστίδια της κεντρικής ρίζας και στο κυτταρόπλασμα της ακραίας περιοχής της πλάγιας ρίζας. Τέλος, ανιχνεύθηκε στους χλωροπλάστες των καταφρακτικών κυττάρων των στομάτων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.1.5.1.

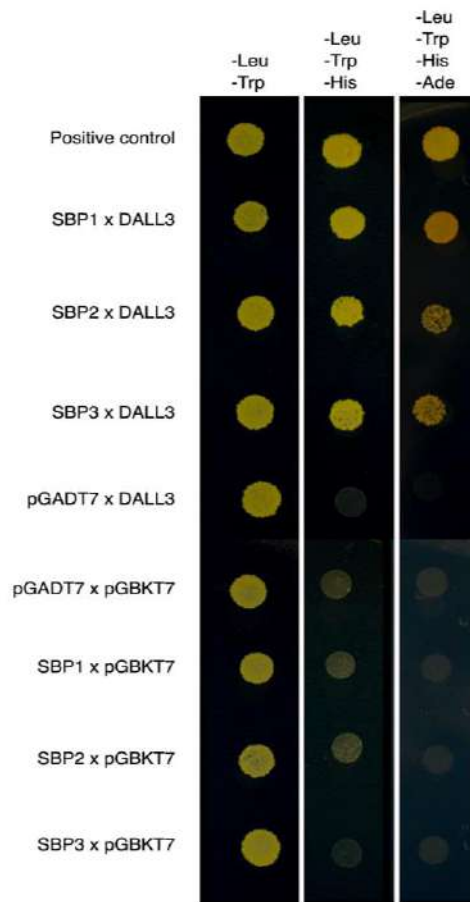


Εικόνα 3.1.5.1: Υποκυτταρικός εντοπισμός της *AtDALL3* σε αρτίβλαστα 10 ημερών των χιμαιρικών *AtDALL3::EYFP* μόνιμα μετασηματισμένων φυτών. Η παρατήρηση έγινε με συνεστιακό μικροσκόπιο και παρατηρήθηκε σήμα σε: (A) πλαστίδια του ακρόριζου, (B) στα πλαστίδια της κεντρικής ρίζας, (C) στο κυτταρόπλασμα των πλάγιων ριζών και (D) στους χλωροπλάστες των καταφρακτικών κυττάρων των στομάτων. Μπάρα 34μm. (Μιχάλης Ζαχαριάδης, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος»)

3.1.6 Ανάλυση των αλληλεπιδράσεων της *AtDALL3* με την *AtSBP1* σε σύστημα ζύμης δύο υβριδίων

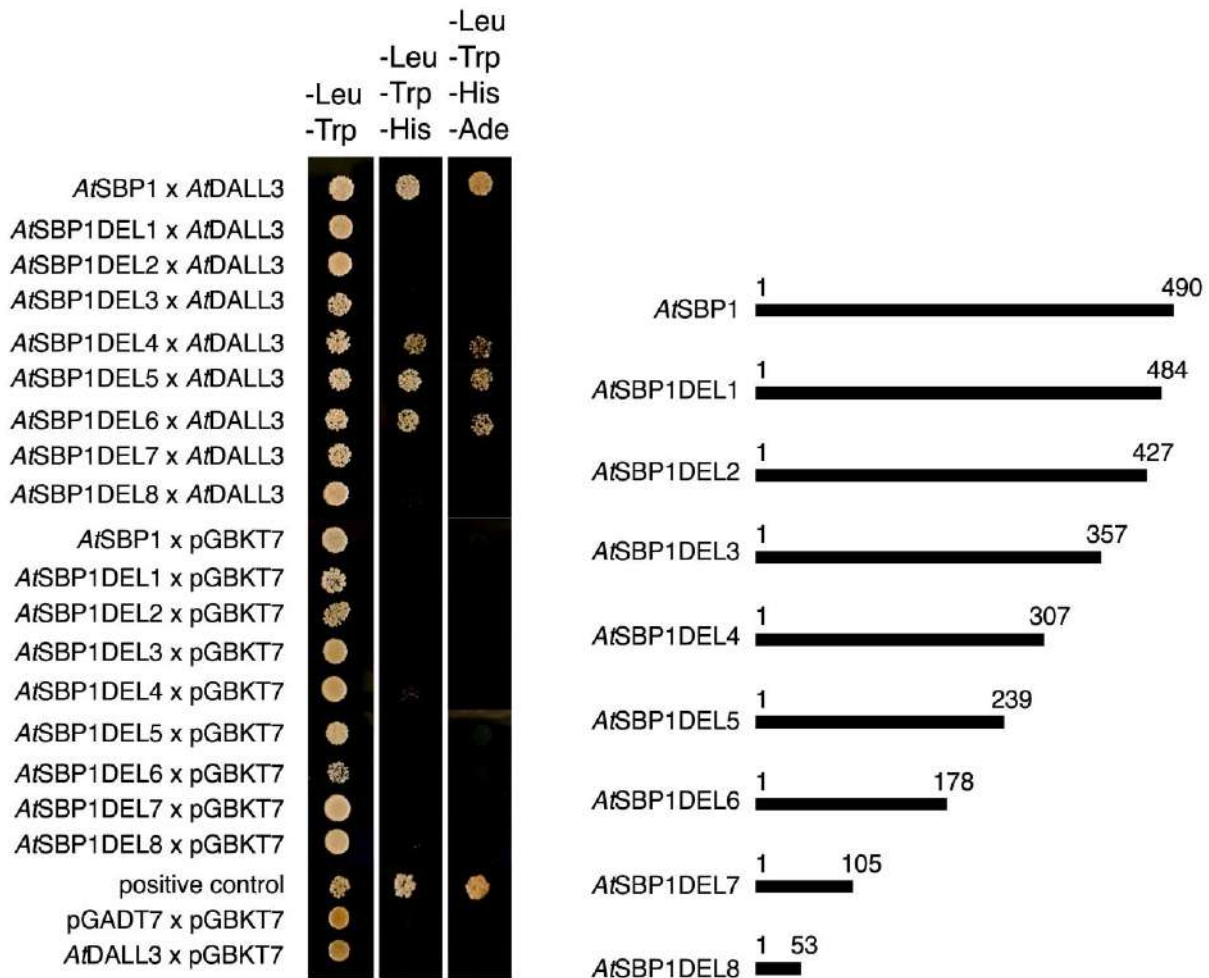
Για την εξακρίβωση της αλληλεπίδρασης της *AtDALL3* με την *AtSBP1* χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ζύμης δύο υβριδίων (Yeast two-hybrid, Y2H). Τα αντίστοιχα γονίδια ενισχύθηκαν από cDNA ρίζας και κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακούς φορείς κατάλληλους για την μελέτη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Επιπλέον, ενισχύθηκαν και κλωνοποιήθηκαν οι *AtSBP2* και *AtSBP3*, για να μελετηθούν λόγω της υψηλής ομολογίας που παρουσιάζουν με την *AtSBP1*.

Οι *AtSBPs* κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pGADT7, ενώ η *AtDALL3* στον πλασμιδιακό φορέα pGBKT7. Αυτή η μελέτη αποκάλυψε ότι η *AtDALL3* έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά ισχυρά με την *AtSBP1* αλλά και με τις *AtSBP2*, *AtSBP3*. Για την αποφυγή ψευδών θετικών αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν όλοι οι απαραίτητοι συνδυασμοί με κενούς πλασμιδιακούς φορείς ως αρνητικοί μάρτυρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.1.6.1.



Εικόνα 3.1.6.1: Ανάλυση αλληλεπιδράσεων της *AtDALL3* με τις *AtSBP1*, *AtSBP2*, *AtSBP3* στο σύστημα ζύμης δύο υβριδίων. Κατάλληλοι συνδυασμοί χρησιμοποιήθηκαν για την εξακρίβωση ψευδώς θετικού σφάλματος καθώς και ο συνδυασμός pGADT7-T x pGBKT7-p53 ως θετικός μάρτυρας.

Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια προσδιορισμού της περιοχής της *AtSBP1* που ευθύνεται για την αλληλεπίδρασή της με την *AtDALL3*. Για τον σκοπό αυτό παράχθηκαν 8 διαδοχικά ελλείμματα του καρβοξυτελικού άκρου της, καθένα από τα οποία ελέγχθηκε για την ικανότητα του να αλληλεπιδρά με την *AtDALL3*.

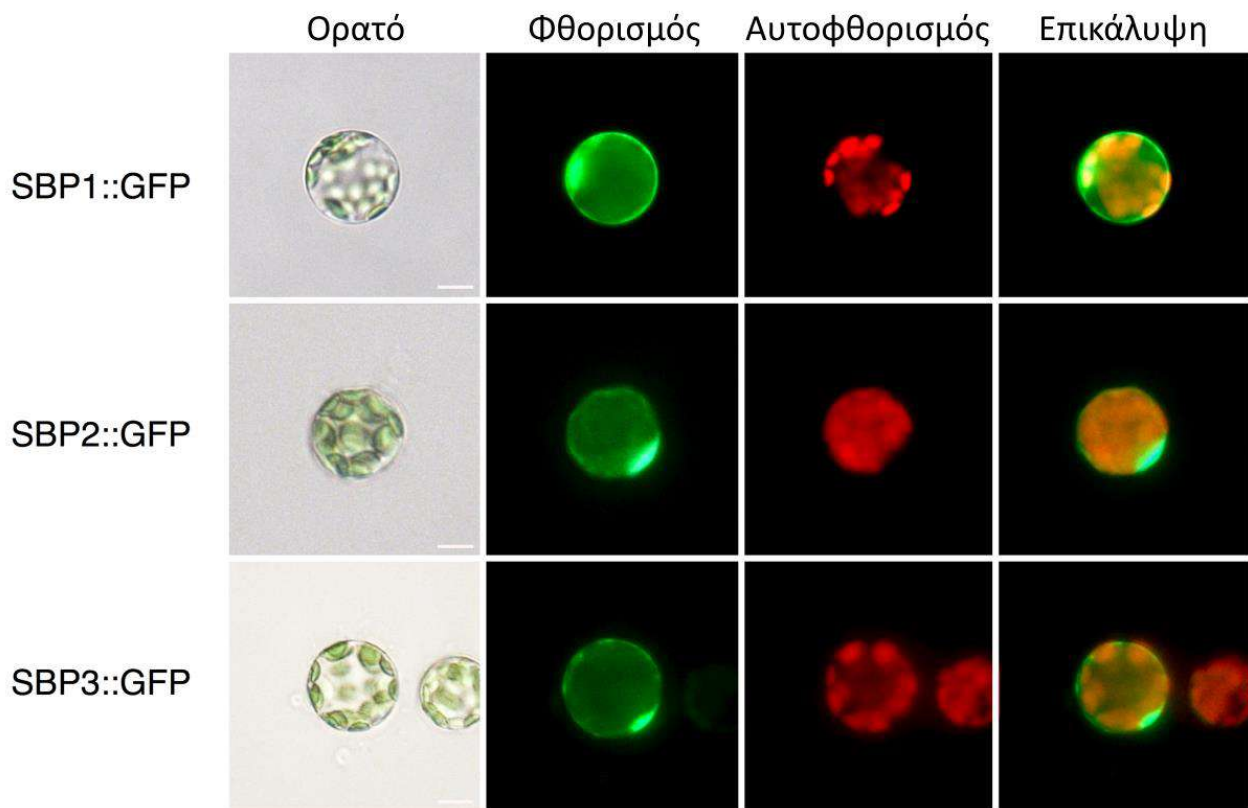


Εικόνα 3.1.6.2: Η φυσική ικανότητα της *AtDALL3* να αλληλεπιδρά με την *AtSBP1*, όπως φάνηκε από την μελέτη με τα ελλείμματα της *AtSBP1*. Δεξιά σχηματική απεικόνιση των διαδοχικών ελλειμμάτων της *AtSBP1*. Αντίστοιχα, χρησιμοποιήθηκαν όλοι οι απαραίτητοι συνδυασμοί για την αποφυγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων καθώς και θετικός μάρτυρας (pGADT7-T x pGBKT7-p53).

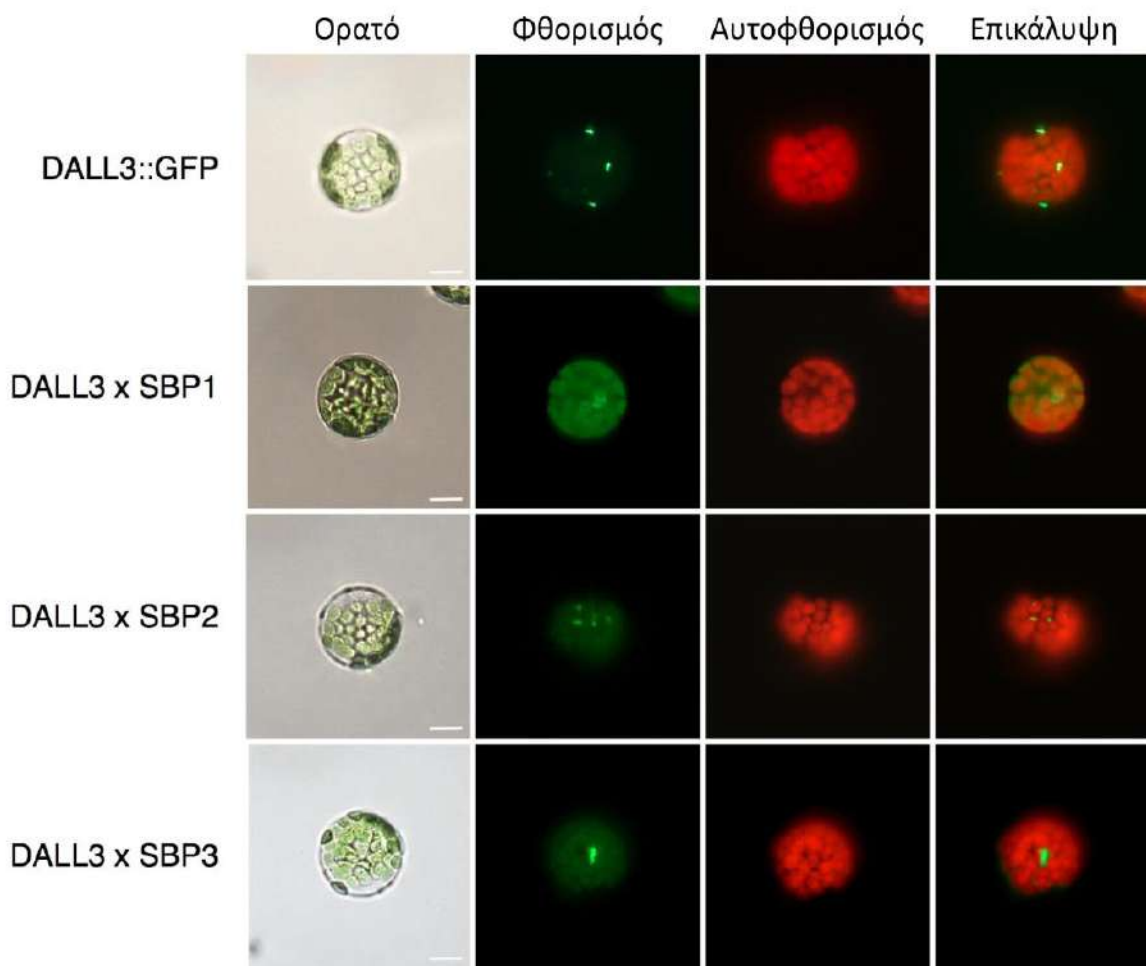
Η παραπάνω ανάλυση έδειξε ότι τα πρώτα 178 αμινοξέα της *AtSBP1* είναι απαραίτητα για την πλήρη και ισχυρή αλληλεπίδραση με την *AtDALL3*, ενώ η περιοχή 357-490 όταν αποκοπεί, εμποδίζει την σωστή αλληλεπίδραση (Εικόνα 3.1.6.2). Το γεγονός ότι τα ελλείμματα *AtSBP1*DEL2 και *AtSBP1*DEL3 δεν αλληλεπιδρούν με την *AtSBP1*, ενώ περιέχουν τις περιοχές αλληλεπίδρασης, πιστεύουμε ότι οφείλεται σε διαφορετικές τριτοταγείς διαμορφώσεις που λαμβάνουν λόγω των ελλειμμάτων, που εμποδίζουν την αλληλεπίδραση.

3.1.7 Υποκυτταρικός εντοπισμός των *AtSBPs* και *AtDALL3* και η *in planta* μελέτη αλληλεπίδρασης τους

Η *AtDALL3* εκφράστηκε σε μεταφραστική σύντηξη με την *YFP* σε πρωτοπλάστες που απομονώθηκαν από φύλλα ροζέτας. Σε αυτό το σύστημα η *AtDALL3* εντοπίζεται σε σφαιρικές δομές που εφάπτονται στους χλωροπλάστες (Εικόνα 3.1.7.2). Για τον υποκυτταρικό εντοπισμό των *AtSBPs*, απομονώθηκαν πρωτοπλάστες από μόνιμα μετασχηματισμένα φυτά *AtSBPs* που βρίσκονται σε μεταφραστική σύντηξη με την φθορίζουσα πρωτεΐνη *YFP* (Valassakis *et al.*, 2018). Έτσι, στο σύστημα πρωτοπλαστών από μεσόφυλλο, φάνηκε ότι οι *AtSBPs* εντοπίζονται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 3.1.7.1).

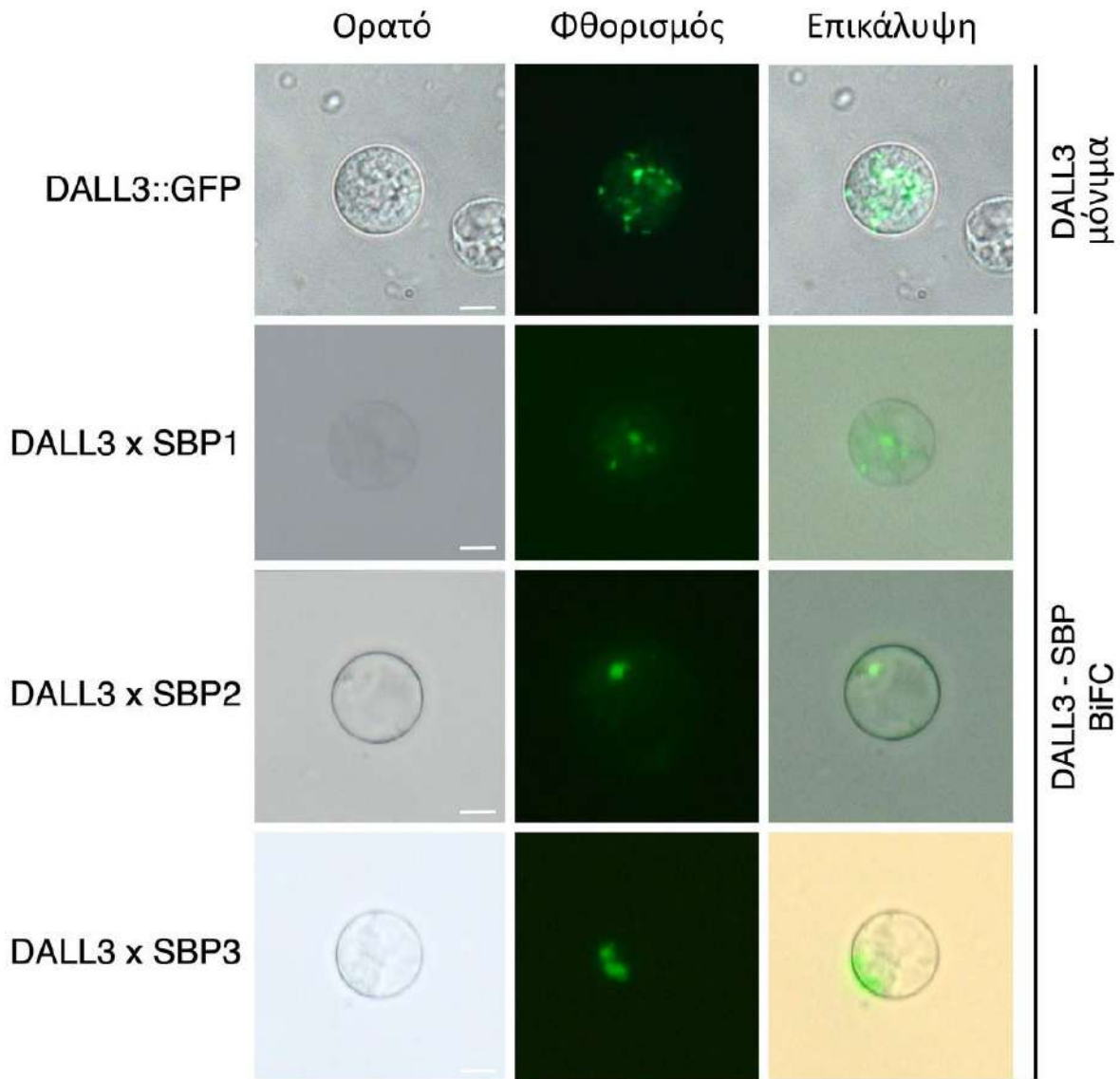


Εικόνα 3.1.7.1: Υποκυτταρικός εντοπισμός των *AtSBP1*, *AtSBP2* και *AtSBP3* σε πρωτοπλάστες μεσόφυλλου από μόνιμα μετασχηματισμένα φυτά των *AtSBPs* σε μεταφραστική σύντηξη με την φθορίζουσα πρωτεΐνη *YFP*. Οι τρεις πρωτεΐνες εντοπίζονται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα (Μπάρα 25μm).



Εικόνα 3.1.7.2: Παροδική έκφραση των *AtDALL3* και αναλύσεις με την μέθοδο της συμπληρωματικότητας διμοριακού φθορισμού (Bimolecular Fluorescent Complementation, BiFC) σε πρωτοπλάστες από μεσόφυλλο του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Η *AtDALL3* συντήχθηκε με την EYFP και nCerulean για τον σχηματισμό χιμαιρικών κατασκευών, ενώ οι *AtSBPs* με την cCFP. Η *AtDALL3* αλληλεπιδρά *in planta* με τις *AtSBPs* σε δομές όμοιες με σφαιρίδια (speckle-like) που βρίσκονται στην επιφάνεια χλωροπλαστών, όπου εντοπίζεται και η *AtDALL3* (Μπάρα 25μm).

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης της *AtDALL3* με τις *AtSBPs* πραγματοποιήθηκε με τη τεχνική της συμπληρωματικότητας του διμοριακού φθορισμού (Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC) σε σύστημα πρωτοπλαστών *Arabidopsis thaliana*, ως ένα *in planta* σύστημα (Citovsky *et al.*, 2006; Kerppola, 2008). Για τον μετασχηματισμό των πρωτοπλαστών χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο ζεύγος πλασμιδιακών φορέων pSAT (Lee *et al.*, 2008). Συγκεκριμένα, η *AtDALL3* συντήχθηκε μεταφραστικά με την nCerulean στον πλασμιδιακό φορέα pSAT4-nCerulean-N (CD3-1091, pE3309), ενώ οι *AtSBP1*, *AtSBP2* και *AtSBP3* με την cCFP, στον πλασμιδιακό φορέα pSAT1-cCFP-N (CD3-1069, pE3449). Στο σύστημα πρωτοπλαστών μεσόφυλλου, οι αλληλεπιδράσεις των *AtSBPs* με την *AtDALL3* εντοπίζονται σε σφαιρικές δομές που εφάπτονται στους χλωροπλάστες, όμοιες με το πρότυπο της *AtDALL3::EYFP* (Εικόνα 3.1.7.2).



Εικόνα 3.1.7.3: Αναλύσεις με την μέθοδο της συμπληρωματικότητας διμοριακού φθορισμού (Bimolecular Fluorescent Complementation, BiFC) σε πρωτοπλάστες από ρίζα. Οι πρωτοπλάστες απομονώθηκαν από ρίζες 10 ημερών φυτών *Arabidopsis thaliana* και μετασηματίστηκαν με τα μελετώμενα ζεύγη AtDALL3 και AtSBPs. Το ίδιο πλαστιδιακό πρότυπο παρατηρήθηκε και στις τρεις περιπτώσεις και της έκφρασης της AtDALL3 (Μπάρα 15μm).

Επιπρόσθετα, οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις μελετήθηκαν και σε σύστημα πρωτοπλαστών που απομονώθηκαν από ρίζες αρτιβλάστων 10 ημερών από το φυτό *Arabidopsis thaliana*. Για τον εντοπισμό της AtDALL3 απομονώθηκαν πρωτοπλάστες ρίζας από μόνιμα μετασηματισμένα φυτά 35S::DALL3::EYFP, ενώ για τις αλληλεπιδράσεις της με τις AtSBPs από αγρίου τύπου, οι οποίοι στη συνέχεια μετασηματίστηκαν παροδικά με τις αντίστοιχες πλασμιδιακές κατασκευές, όπως στην περίπτωση των πρωτοπλαστών από μεσόφυλλο. Τόσο η έκφραση της AtDALL3, όσο και οι αλληλεπιδράσεις της με τις AtSBPs εντοπίστηκαν στα πλαστίδια (Εικόνα 3.1.7.3).

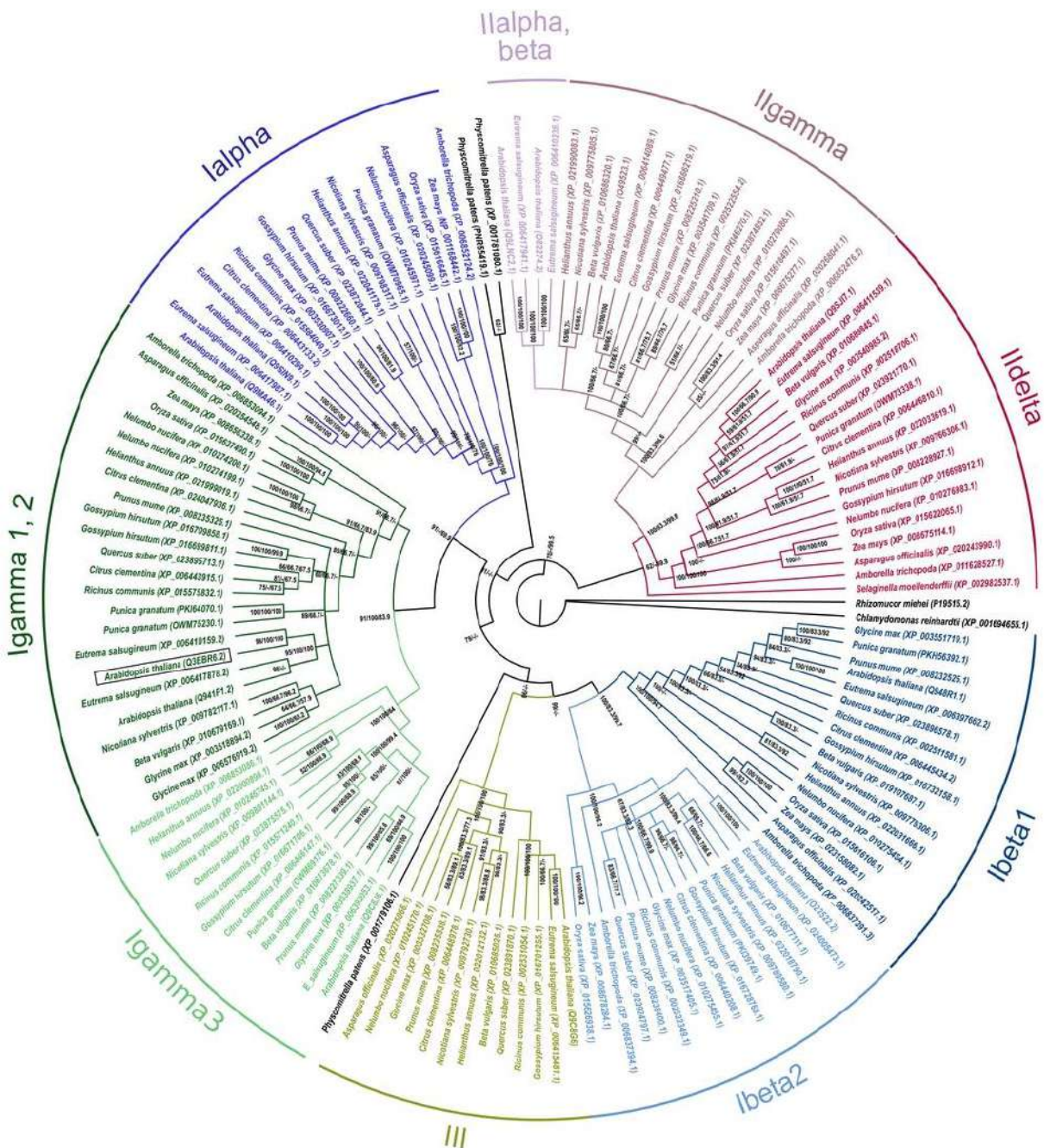
3.1.8 Φυλογενετική ανάλυση της AtDALL3

Η κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου των Φωσφολιπασών στηρίχθηκε στη συλλογή Φωσφολιπασών A1. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα μέλη της οικογένειας λιπασών όμοιες με την DAD1, από 15 τάξεις των Αγγειόσπερμων, από την κλάση Bryopsida, την Lycorodiosida και από ένα μονοκύτταρο φωτοσυνθετικό οργανισμό, το φύκος *Chlamydomonas reinhardtii*, φτάνοντας στο σύνολο των 146 πρωτεϊνών. Αυτές οι πρωτεΐνες συλλέχθηκαν με την διαδικασία της αναζήτησης τοπικής στοίχισης (BLASTp) σε βάσεις δεδομένων. Πρώτα, χρησιμοποιήθηκε η αμινοξική αλληλουχία της AtDALL3 (Q3EBR6.2) και στη συνέχεια, κάθε μέλος της οικογένειας DAD1 (PLA1-Ialpha1, PLA1-Ialpha2, PLA1-Ibeta1, PLA1-Ibeta2, PLA1-Igamma1, PLA1-Igamma3, PLA1-IIalpha, PLA1-IIbeta, PLA1-IIgamma, PLA1-IIdelta, DAD1-like acylhydrolase) για την αναζήτηση όμοιων αλληλουχιών μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας NCBI BLASTp και ως βάσεις αναζήτησης τις Reference proteins (refseq_protein) ή non-redundant protein sequences (nr). Για κάθε πρωτεΐνη πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αναζητήσεις τοπικών στοιχίσεων για κάθε οργανισμό. Το ελάχιστο ποσοστό αμινοξικής ταυτότητα (identity) ήταν 42% με 55% θετικά και E-value 5e-126, ώστε να μπορούν να συμπεριληφθούν στην ανάλυση. Η λιπάση τριακυλογλυκερόλης του μύκητα *Rhizomucor mieher* χρησιμοποιήθηκε για ρίζα (outgroup) του δένδρου, καθώς είναι γνωστό ότι η αλληλουχία της περιέχει τα συντηρημένα χαρακτηριστικά (καταλυτική τριάδα και μοτίβο GX SXG) που χαρακτηρίζουν τις λιπάσες και η πρωτεϊνική δομή έχει αναλυθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X (Brady *et al.*, 1990; Ishiguro *et al.*, 2001).

Στο φυλογενετικό δένδρο που κατασκευάσαμε (Εικόνα 3.1.8.1), παρατηρούμε ότι η τάξη II διαχωρίζεται πλήρως από τις υπόλοιπες τάξεις και επιπλέον διαιρείται σε τέσσερις ομάδες: PLA1-IIα, PLA1-IIβ, PLA1-IIγ και PLA1-IIδ. Οι PLA1-IIα και PLA1-IIβ είναι παρούσες μόνο στα είδη *Arabidopsis thaliana* και *Eutrema salsugineum* (πιθανότατα μόνο στη τάξη των Brassicales) και έχουν καλή στήριξη (PP, MP, NJ bootstrap 100%). Οι λιπάσες PLA1-IIγ και PLA1-IIδ ομαδοποιούνται πολύ καλά και περιλαμβάνουν αντιπροσώπους των ενζύμων από κάθε είδος που μελετήθηκε με πολύ καλή στήριξη (100/ 83,3/ 96,6% και 100%). Επιπλέον, αυτές οι δύο ομάδες ομαδοποιούνται σε αδελφούς κλάδους με πολύ καλή στήριξη (100/ 83,3/ 99,8%). Μοναδική εξαίρεση αποτελεί η λιπάση του είδους *Selaginella moellendorffi*, η οποία τοποθετείται εκτός των PLA1-IIγ και PLA1-IIδ.

Οι ισομορφές PLA1-Iα1 και PLA1-Iα2 είναι και οι δύο παρούσες στα *Arabidopsis thaliana* και *Eutrema salsugineum*, ενώ στα υπόλοιπα είδη που μελετήθηκαν εντοπίζεται μία από τις δύο ισομορφές. Οι ισομορφές PLA1-Iγ1, PLA1-Iγ2 και 3, στα περισσότερα είδη που μελετήθηκαν ήταν όλες οι ισομορφές παρούσες εκτός από τους αντιπροσώπους των Poales που περιλαμβάνουν μόνο την PLA1-Iγ1, ενώ τα είδη *Beta vulgaris* και *Amborella trichopda*, η ισομορφή PLA1-Iγ2 είναι απύσα. Η ισομορφή PLA1-Iγ3 βρίσκεται στη βάση για τις άλλες δύο ισομορφές με πολύ καλή στήριξη (91 / 100/ 83,9%).

Η μοναδική πρωτεΐνη που χαρακτηρίζεται ως μιτοχονδριακή είναι αυτή του *Arabidopsis thaliana* (Ishiguro *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2011). Στο φυλογενετικό δένδρο που κατασκευάσαμε, ο κλάδος που περιλαμβάνει την συγκεκριμένη λιπάση ομαδοποιείται με πρωτεΐνες που έχουν χαρακτηριστεί ως PLA1-Iγ1 αλλά στην ανάλυση διαχωρίζονται από τις υπόλοιπες PLA1-Iγ1 που ομαδοποιούνται με τις PLA1-Iγ2.



Εικόνα 3.1.8.1: Φυλογενετικό δένδρο της οικογένειας των λιπασών όμοιες με την DAD1 στα Αγγειόσπερμα. Το δένδρο αυτό κατασκευάστηκε με μήτρα τις αμινοξικές αλληλουχίες των φωσφολιπασών με Μπαϊεσιανή ανάλυση (Bayesian, BI). Η φωσφολιπάση του φύκου *Chlamydomonas reinhardtii* χρησιμοποιήθηκε ως ρίζα του δένδρου. Για την αξιοπιστία των κλάδων χρησιμοποιήθηκε PP (πρώτος αριθμός), MP και NJ-bootsraps (δεύτερος και τρίτος αριθμός, αντίστοιχα). Χρωματίζονται με μπλε: PLA1-Iβ1, ανοιχτό μπλε: PLA1-Iβ2, καφέ: PLA1-III, ανοιχτό πράσινο: PLA1-Iγ3, πράσινο: PLA1-Iγ1,2, σκούρο μπλε: PLA1-Iα, ανοιχτό μωβ: PLA1-IIα,β, μωβ: PLA1-Iγ, κόκκινο: PLA1-IIδ. Οι φωσφολιπάσες έχουν διαχωριστεί βάσει της ταξινόμησης της οικογένειας At-DAD1. Οι σχηματισμένοι κλάδοι ομαδοποιούνται βάσει της παρουσίας των αντίστοιχων πρωτεϊνών AtPLA1-Iα, AtPLA1-Iβ1, AtPLA1-Iβ2, AtPLA1-Iγ1,2, AtPLA1-Iγ3, AtPLA1-IIα,β, AtPLA1-IIγ, AtPLA1-IIδ και AtPLA1-III. Η AtDALL3 (AtPLA1-Iγ2) βρίσκεται σε πλαίσιο.

3.2 Η Πρωτεάση όμοια με παπαΐνη AtRD19c

3.2.1 Ιστοειδική μελέτη της έκφρασης του γονιδίου AtRD19c

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε ανάλυση της ιστοειδικής έκφρασης του γονιδίου της πρωτεάσης. Η έκφραση ενός γονιδίου εξαρτάται από ρυθμιστικά στοιχεία που φέρει η αλληλουχία του υποκινητή, στα οποία προσδένονται μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι ρυθμίζουν την έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου. Για την εύρεση των ρυθμιστικών στοιχείων του υποκινητή επιλέχθηκε μια περιοχή ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής (-1072bp) και στη συνέχεια δημιουργήθηκαν 3 διαδοχικές απαλοιφές του 5'-άκρου αυτής: pRD19c-DEL1 (-647bp), pRD19c-DEL2 (-428bp), pRD19c-DEL3 (-177bp) (Εικόνα 3.2.1.1). Οι αλληλουχίες αυτές συντήχθηκαν μεταγραφικά με το γονίδιο αναφοράς β-γλουκουρονιδάσης (β-glucuronidase, GUS) στον δυαδικό πλασμιδιακό φορέα pCambia1301. Με τις κατασκευές αυτές παράχθηκαν διαγονιδιακά φυτά, έπειτα από μετασχηματισμό φυτών *Arabidopsis thaliana* αγρίου τύπου με την μεσολάβηση *Agrobacterium tumefaciens* που περιείχαν την αντίστοιχη πλασμιδιακή κατασκευή.

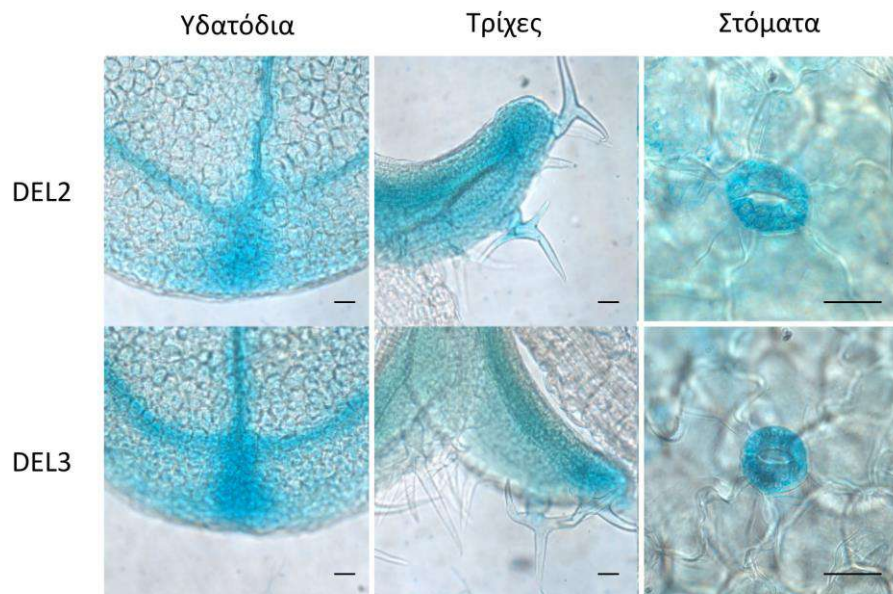
```
PiRD19c  A C T A A T T T A C C C T C A A G T T T T A T T A T T A A G G T G A C C T G A C C T G C T C T A T A T G T G A T A T T G T G A C C T G C T T T G C C T A T A T G G C T A T A T G T G A T A C C T 100
PiRD19c  A T A A T C A C A A G G A T A T T T C A G G T G G A A A T C A G A G A A A G A A A T T G A A G C T G A A T A A G A C A C T A T A T G G G A G A G A T T G A A A G G A A G C T G T T G G G C A T T T T 200
PiRD19c  G G T G T A G C G G G T C G C A A G T C G A G C G T G A G A C T T A T T G C T G T G C C A T T G C A G G A A T G C A A A C A G A G G A A A G A T T T C A C A A A T G G G A A A C G G A T A C A T G C T C 300
PiRD19c  A G A T G G T T G T T T T G T T G T A G G A A A T G C C T T T C A A T G A G T A T G T T A A A C G C T A G C T G T C C T G T T T A A T G G A C C G G T G A T G T C A T C T T G T C T T G C A C T G T G 400
PiRD19c  T G A G C A C A A C A A C T T G C A A T G T T T C D A T T G A T G C T G T A G C A G T C T C T C A C A T T A A G C T C T G G T T T G G A T G G C T A T G A A C A A G T T G A T T G G T A G A T A A G T T 500
PiRD19c  A A A A T G T T G T G A T T T G A A T C T G G A A T G A A T A G A A A G A T G T G A T T G G T A C T G A T G T A A A T T C A A T G C T T T A G A G A A T G T A T A C A G G C A A T A A T A T A C C A A T 600
PiRD19c  C A T T A T G T T A T T G C T G A C T A A G A G C C A C T C C T C T T T G C T G T T G C A A T T C G G C A A T C G T T C T A G A T A T G G T T C C A T T T C A A A T C A T G A T A T G C A T T G A C 700
PiRD19c  T T T T C C A T T G G C G T T C G G A A A T C T T T C A T C T A T A C T A C G T C T A C G T T G C A A G T T T T G C A A A A T G T T T A A A T T A G T A G A A T C T C A C G T A T A T A A A A A C T 800
PiRD19c  T T A G T C G C C A A A T T G A A A A T G G A G A A T G A A T G G T A A A C T A C T A G T T T A C C C T C A T A T T T T A G C T G A A A A A T A T C G T C A C A G C T G A C G A A G A A A T T A G A A A 900
PiRD19c  C A A C A A G C A A C G T G T C A C T T C T C A T G T C G T C G T T T T C C C A A G A A A T A T C C A A A C T A A C A C C C A A T T A C C T A A T G C C A C G T G T T T A C T C A C A C T C C C T T T A 1000
PiRD19c  A A C A A G C T C G T A A C T G T T T C A T C T T C T T G T C C C C A A A G T C T C C T C T T C C T T A T C T C T T G G A A A C C A A G A A G C 1072
```

Εικόνα 3.2.1.1: Απεικόνιση της αλληλουχίας του υποκινητή της AtRD19c (pRD19c, -1072bp) και τα τρία διαδοχικά ελλείμματα του 5'-άκρου αυτής. pRD19c-DEL1 (-647bp, μωβ), pRD19c-DEL2 (-428bp, μπλε), pRD19c-DEL3 (-177bp, πράσινο).

Τα φυτά που μετασχηματίστηκαν αποτελούν την πατρική γενιά (T₀), από τα οποία συλλέγονται τα σπέρματα αποτελώντας την γενετική δεξαμενή (pool) με μετασχηματισμένα και μη σπέρματα. Η επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών πραγματοποιείται σε τρυβλία παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών, στην περίπτωση του πλασμιδιακού φορέα pCambia1301, Υγρομυκίνη (30μg/ml) (Παράρτημα I, Εικόνα 2).

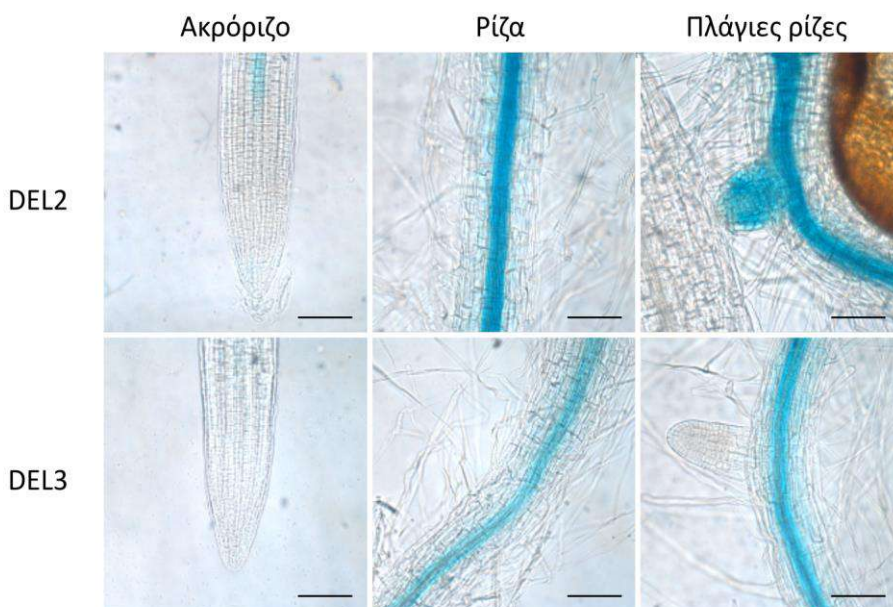
Τα φυτά της T₂ γενιάς παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο AxioPlan, έπειτα από χρώση GUS, ως προς το πρότυπο έκφρασής τους σε αρτίβλαστα 6 ημερών.

Για τα δύο μεγαλύτερα θραύσματα δεν υπήρχε κάποιο σταθερό πρότυπο, με πιο συχνό την μη χρώση τους, ενώ τα pRD19c-DEL2 και pRD19c-DEL3 παρουσιάζουν χρώση στο κεντρικό αγωγό κύλινδρο,

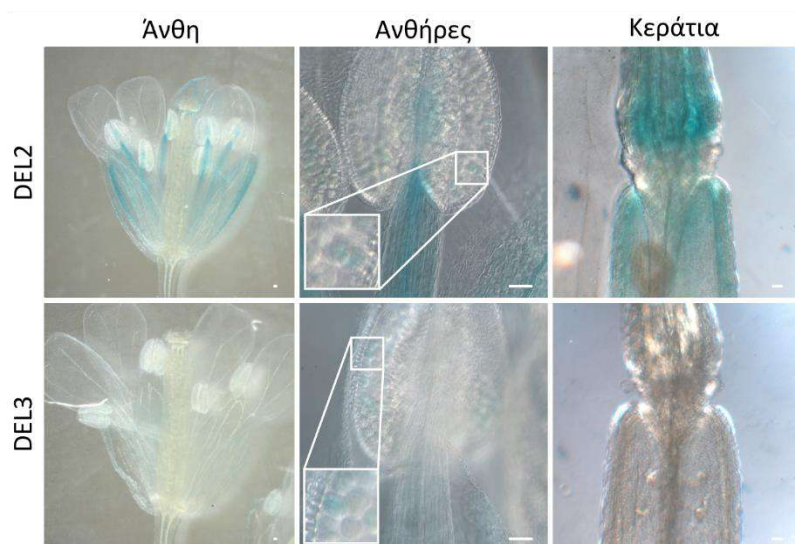


Εικόνα 3.2.1.2: Ιστοειδική έκφραση των $\rho RD19c$ -DEL2 και $\rho RD19c$ -DEL3 ελλειμμάτων στο υπέργειο τμήμα 6 ημερών αρτιβλάστων. Παρατηρείται χρώση σε υδατόδια, αγγειακό σύστημα, στα καταφρακτικά κύτταρα των στομάτων των κοτυληδόνων και των πρώτων φύλλων και στις τρίχες των πρώτων φύλλων (Μπάρα 20 μm).

στα υδατόδια, τα στόματα και το αγγειακό σύστημα των κοτυληδόνων και των πρώτων φύλλων, όπως και στις τρίχες των πρώτων φύλλων (Εικόνα 3.2.1.2) και τους γυρρεόκοκκους (Εικόνα 3.2.1.4). Χρώση ακόμα παρατηρείται όσον αφορά το θραύσμα PR-RD19c-DEL2, στο αγγειακό σύστημα των στημόνων και



Εικόνα 3.2.1.3: Ιστοειδική έκφραση των $\rho RD19c$ -DEL2 και $\rho RD19c$ -DEL3 στο ριζικό σύστημα 6 ημερών αρτιβλάστων. Παρατηρείται χρώση στον κεντρικό αγωγό κύλινδρο καθώς και απουσία έκφρασης στις πλάγιες ρίζες στο έλλειμμα $\rho RD19c$ -DEL3 (Μπάρα 50 μm).



Εικόνα 3.2.1.2: Ιστοειδική έκφραση των pRD19c-DEL2 και pRD19c-DEL3 σε άνθη και κεράτια φυτών τεσσάρων εβδομάδων (Μπάρα 50μm).

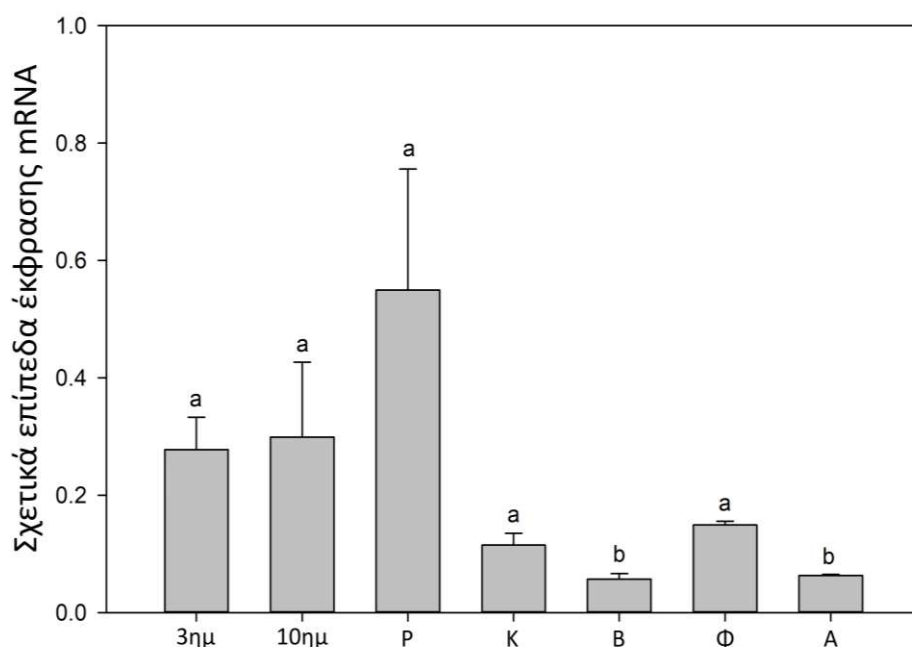
των σεπάλων, αλλά και στη βάση των κερατίων (Εικόνα 3.2.1.4). Επιπλέον, στο ριζικό σύστημα παρατηρείται επαγωγή στο κεντρικό κύλινδρο, με την έκφραση στο PR-RD19c-DEL2 να φτάνει μέχρι την περιοχή του ακρόριζου, ενώ εντοπίζεται και μια επιπρόσθετη διαφορά μεταξύ των δύο ελλειμμάτων. Στο μικρότερο θραύσμα απουσιάζει η επαγωγή στις πλάγιες ρίζες (Εικόνα 3.2.13). Για την διερεύνηση αυτών των διαφοροποιήσεων, η αλληλουχία από -428bp με -177bp, δηλαδή αυτή που απουσιάζει από το θραύσμα pRD19c-DEL3, χρησιμοποιήθηκε στη βάση δεδομένων PlantCARE (Lescot *et al.*, 2002) για την εύρεση ρυθμιστικών μοτίβων. Τα ρυθμιστικά μοτίβα που εντοπίστηκαν ήταν τα στοιχεία ABRE, G-box, MYC, τα οποία σχετίζονται με την απόκριση στο αποκοπτικό οξύ, το φως και την ξηρασία, αντίστοιχα, αλλά και το στοιχείο as-1, που έχει συνδεθεί με την έκφραση στη ρίζα. Τα ρυθμιστικά στοιχεία και πληροφορίες για αυτά παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 3.2.1.1.

Πίνακας 3.2.1.1: Λίστα των πιθανών ρυθμιστικών στοιχείων και των λειτουργιών τους, που εντοπίστηκαν με σάρωση στη βάση δεδομένων PlantCARE.

Ονομασία	Αλληλουχία	Αλυσίδα	Λειτουργία
ABRE	ACGTG	-	Απόκριση στο αποκοπτικό οξύ
G-box	TACGTG/GCCACGTGGA	-	Απόκριση στο φως
MYC	CATGTG	+	Απόκριση στο αποκοπτικό και στη ξηρασία
as-1	TGACG	+/-	Έκφραση στη ρίζα

3.2.2 Ποσοτική έκφραση της *AtRD19c* κατά την ανάπτυξη και την αβιοτική καταπόνηση

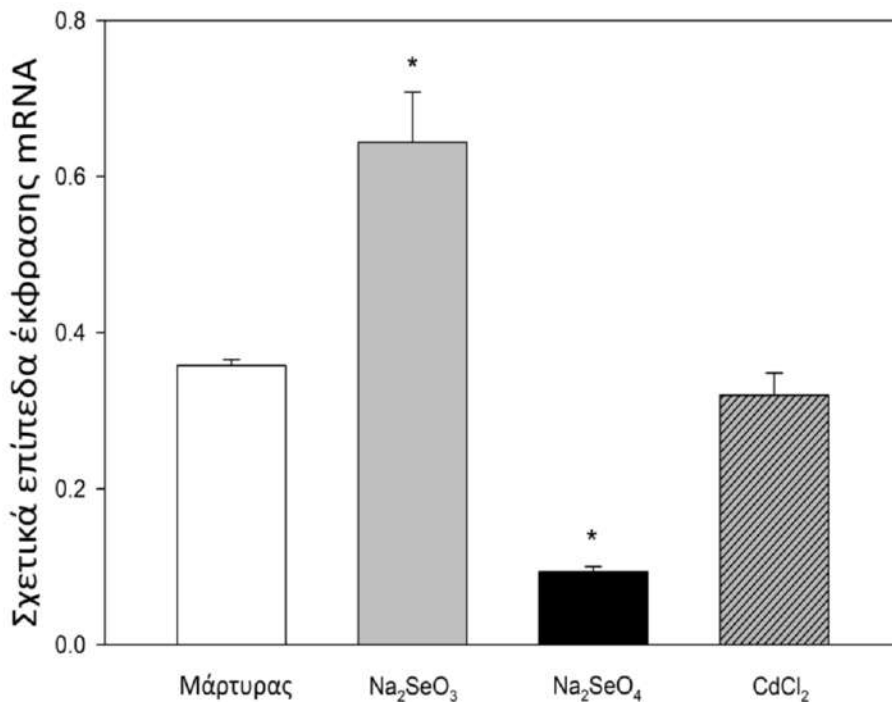
Για την μελέτη των επιπέδων έκφρασης της *AtRD19c* συλλέχθηκαν ιστοί 3 ημερών, 10 ημερών ολόκληρα αρτίβλαστα, ρίζα, κοτυληδόνες και βλαστοί, 4 εβδομάδων φύλλα ροζέτας και άνθη. Στη συνέχεια, απομονώθηκε RNA από αυτούς τους ιστούς και ακολούθησε η σύνθεση cDNA. Τα cDNA χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης τους με qPCR. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο $\Delta\Delta C_t$ και σχεδιάστηκε αντίστοιχο ιστόγραμμα.



Εικόνα 3.2.2.1: Ιστόγραμμα σχετικής έκφρασης mRNA της *AtRD19c* στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια και ιστούς. 3ημ: 3 ημερών, 10ημ: 10 ημερών, P: ρίζα από 10 ημερών αρτίβλαστα, K: κοτυληδόνες από 10 ημερών αρτίβλαστα, B: βλαστός από 10 ημερών αρτίβλαστα, Φ: φύλλα ροζέτας και A: άνθη. Τα γράμματα a,b υποδηλώνουν την στατιστική σημαντικότητα των μεταβολών μεταξύ των μελετώμενων ιστών. Οι μπάρες προσδιορίζουν την τυπική απόκλιση (SD).

Όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης της *AtRD19c*, στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν υπήρξε μια συνεχής παρουσία, με την μικρότερη έκφραση στον ιστό των βλαστών από 10 ημερών αρτίβλαστα και στο άνθος. Πιο αυξημένα φαίνονται τα επίπεδα στην ρίζα των αρτίβλαστων 10 ημερών αλλά χωρίς να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά (Εικόνα 3.2.21).

Στην μελέτη επίδρασης χημικών ενώσεων σεληνίου και καδμίου, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα έκφρασης της *AtRD19c*, έπειτα από επίδραση με σεληνώδες νάτριο (Na_2SeO_3) και στατιστικά σημαντική πτώση παρουσία σεληνικού νατρίου (Na_2SeO_4). Το κάδμιο δε φαίνεται να επηρέασε τα επίπεδα έκφρασής της (Εικόνα 3.2.2.2).



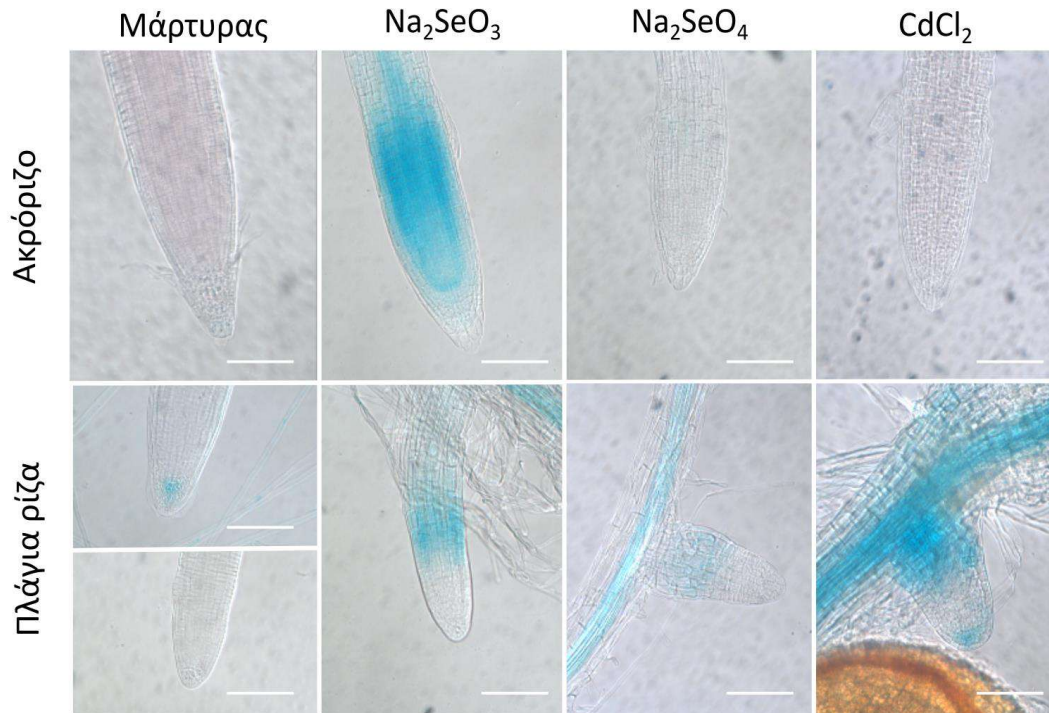
Εικόνα 3.2.2.2: Ιστόγραμμα σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA της *AtRD19c* έπειτα από επίδραση με σεληνώδες νάτριο (Na₂SeO₃), σεληνικό νάτριο (Na₂SeO₄) και χλωριούχο κάδμιο (CdCl₂). Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν την στατιστική σημαντικότητα των μεταβολών των κατεργασιών σε σχέση με τον μάρτυρα. Οι μπάρες προσδιορίζουν την τυπική απόκλιση (SD).

Επιπλέον, δημιουργήθηκαν μόνιμα μετασηματισμένα φυτά υπερέκφρασης και αποσιώπησης της *AtRD19c*, μέσω των πλασμιδιακών φορέων pCambia1301 και pHANNIBAL, αντίστοιχα. Στα φυτά αυτά έπειτα από τον έλεγχο της υπερέκφρασης και αποσιώπησης μελετήθηκαν ως προς τον φαινότυπό τους, χωρίς όμως να παρατηρηθεί κάποια μεταβολή (Παράρτημα III).

3.2.3 Ενεργότητα του υποκινητή της *AtRD19c* κατά την αβιοτική καταπόνηση

Για την μελέτη της ενεργότητας του υποκινητή της πρωτεάσης *AtRD19c* κατά την αβιοτική καταπόνηση χρησιμοποιήθηκαν τα διαγονιδιακά φυτά με την κατασκευή που φέρει το έλλειμμα pRD19c-DEL2, το οποίο θεωρήθηκε ότι μπορεί να δράσει ως λειτουργικός υποκινητής της πρωτεάσης. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε χρώση GUS σε αρτίβλαστα έπειτα από επίδραση με 150μM Na₂SeO₃, 150μM Na₂SeO₄ και 150μM CdCl₂.

Με τη μέθοδο αυτή παρατηρήθηκε αλλαγή στο πρότυπο έκφρασης στην περίπτωση της επίδρασης του σεληνώδους, όπου εντοπίζεται έντονη επαγωγή στην ακραία περιοχή της κεντρικής ρίζας, πιο συγκεκριμένα, στη ζώνη κυτταροδιαίρεσεων και ειδικότερα στο φλοιώμα και την ενδοδερμίδα του ακρόριζου. Στην περίπτωση των πλάγιων ριζών δεν εντοπίζεται έντονη διαφοροποίηση ως προς το πρότυπο έκφρασης καθώς σε όλες τις περιπτώσεις αλλά και σε φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει επαγωγή στις πλάγιες ρίζες, με τις περιπτώσεις του σεληνίου να μην επάγεται στη μεριστωματική περιοχή (Εικόνα 3.2.3.1).

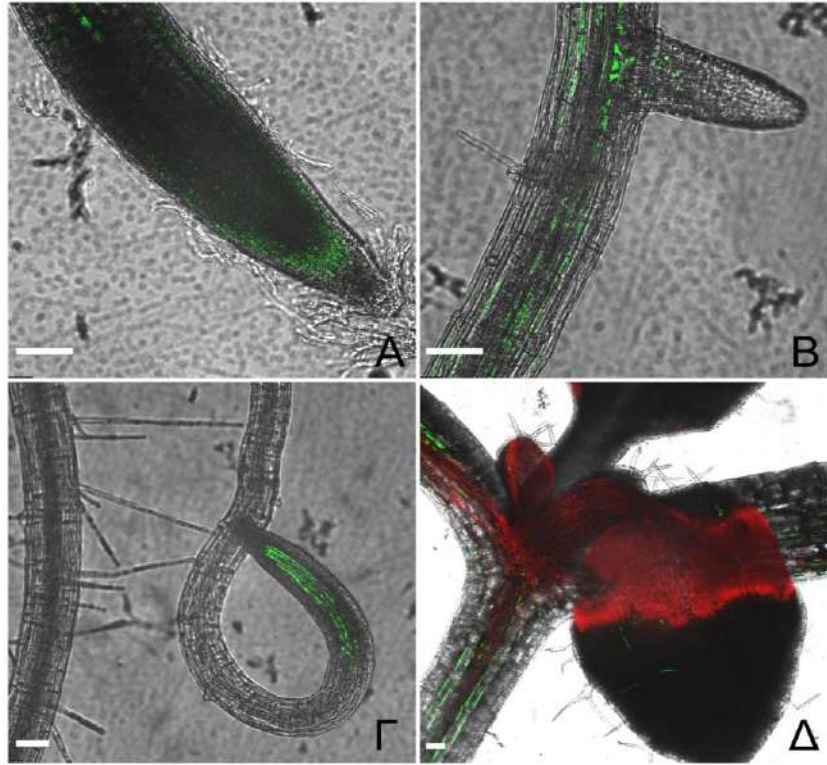


Εικόνα 3.2.3.1: Ιστοειδική ανάλυση του υποκινητή pRD19c-DEL2 παρουσία χημικών ενώσεων σεληνίου (Na₂SeO₃ και Na₂SeO₄) και καδμίου (CdCl₂) στην περιοχή του ακρόριζου και στις πλάγιες ρίζες (Μπάρα 50μm).

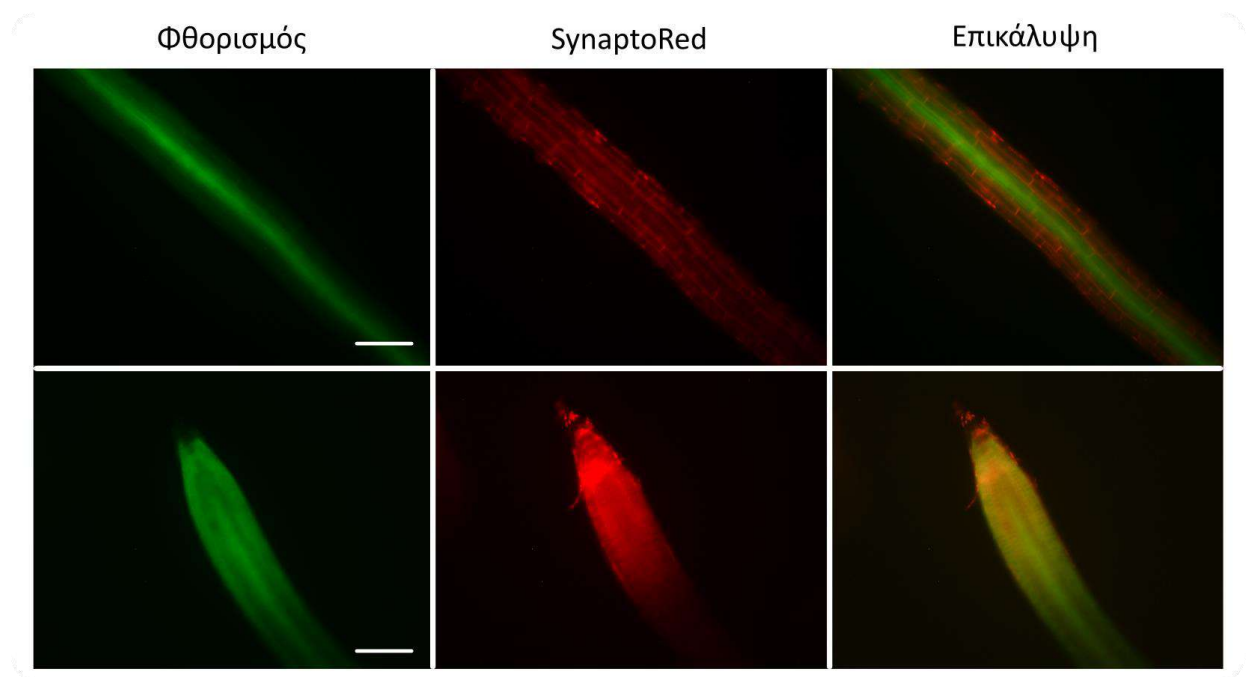
3.2.4 Υποκυτταρικός εντοπισμός της AtRD19c

Για την μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού δημιουργήθηκαν μόνιμα μετασηματισμένα φυτά που φέρουν το γονίδιο της πρωτεάσης σε μεταφραστική σύντηξη με το γονίδιο EYFP υπό τον έλεγχο ενός ισχυρού υποκινητή (x35S). Για τον προσδιορισμό της κυτταρικής έκφρασης, παρατηρήθηκαν αρτίβλαστα 10 ημερών σε συνεσιακό μικροσκόπιο φθορισμού (Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο). Επιπρόσθετα, σε αρτίβλαστα 6 ημερών έγινε χρώση με χρωστική SynaptoRed, σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Rigal και συνεργατών (Rigal *et al.*, 2015).

Στα αρτίβλαστα 10 ημερών παρατηρούμε φθορίζον σήμα στην ακραία περιοχή της ρίζας με χαρακτηριστικό πρότυπο σχήματος U (Εικόνα 3.2.4.1, Α), καθώς και στην ακραία περιοχή των πλάγιων ριζών (Εικόνα 3.2.4.1, Γ). Στις πλάγιες ρίζες παρατηρείται επίσης σήμα στα μεριστωματικά κύτταρα δημιουργίας αυτών (Εικόνα 3.2.4.1, Δ), ενώ τέλος εντοπίστηκε και στις τρίχες των πρώτων φύλλων (Εικόνα 3.2.4.1, Β). Η χρωστική SynaptoRed αρχικά, σημαίνει την πλασματική μεμβράνη και στη συνέχεια ακολουθεί τη διαδικασία της ενδοκύττωσης σημαίνοντας έτσι το δίκτυο κυστιδίων και το χυμοτόπιο. Έτσι, στα αρτίβλαστα 6 ημερών παρατηρούμε σήμα EYFP στον κεντρικό αγωγό ιστό, ενώ στο ακρόριζο φαίνεται να υπάρχει συνεντοπισμός της έκφρασης της AtRD19c με την χρωστική υποδεικνύοντας τον κυστιδιακό εντοπισμό της πρωτεάσης (Εικόνα 3.2.4.2).



Εικόνα 3.2.4.1: Υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐσης AtRD19c σε αρτίβλαστα 10 ημερών σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο). Α. Ακραία περιοχή ρίζας, Β. Τρίχες πρώτων φύλλων, Γ. Ακραία περιοχή πλάγιων ριζών, Δ. Περιοχή δημιουργίας πλάγιων ριζών. (Δέσποινα Μπερή, Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο) (Μπάρα 100μm).

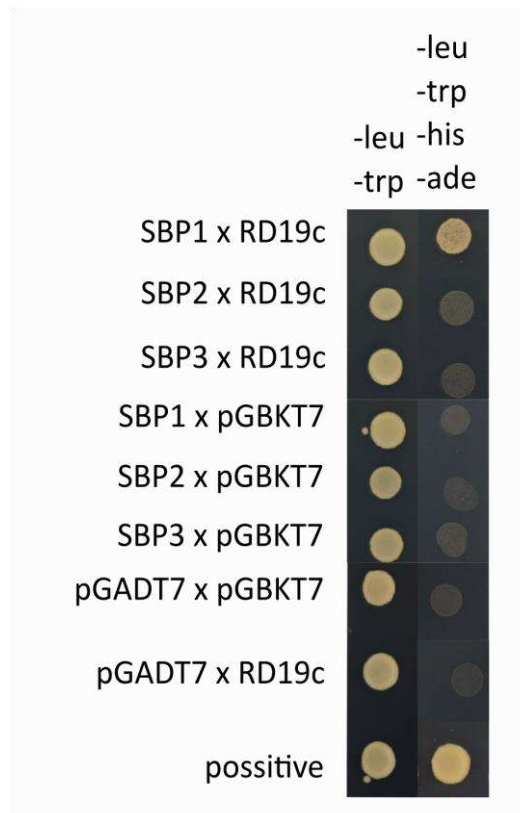


Εικόνα 3.2.4.2: Υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐσης AtRD19c σε αρτίβλαστα 6 ημερών και έπειτα από χρώση με SynaptoRed (Μπάρα 50μm).

3.2.5 Ανάλυση των αλληλεπιδράσεων της *AtRD19c* με την *AtSBP1* σε σύστημα ζύμης δύο υβριδίων

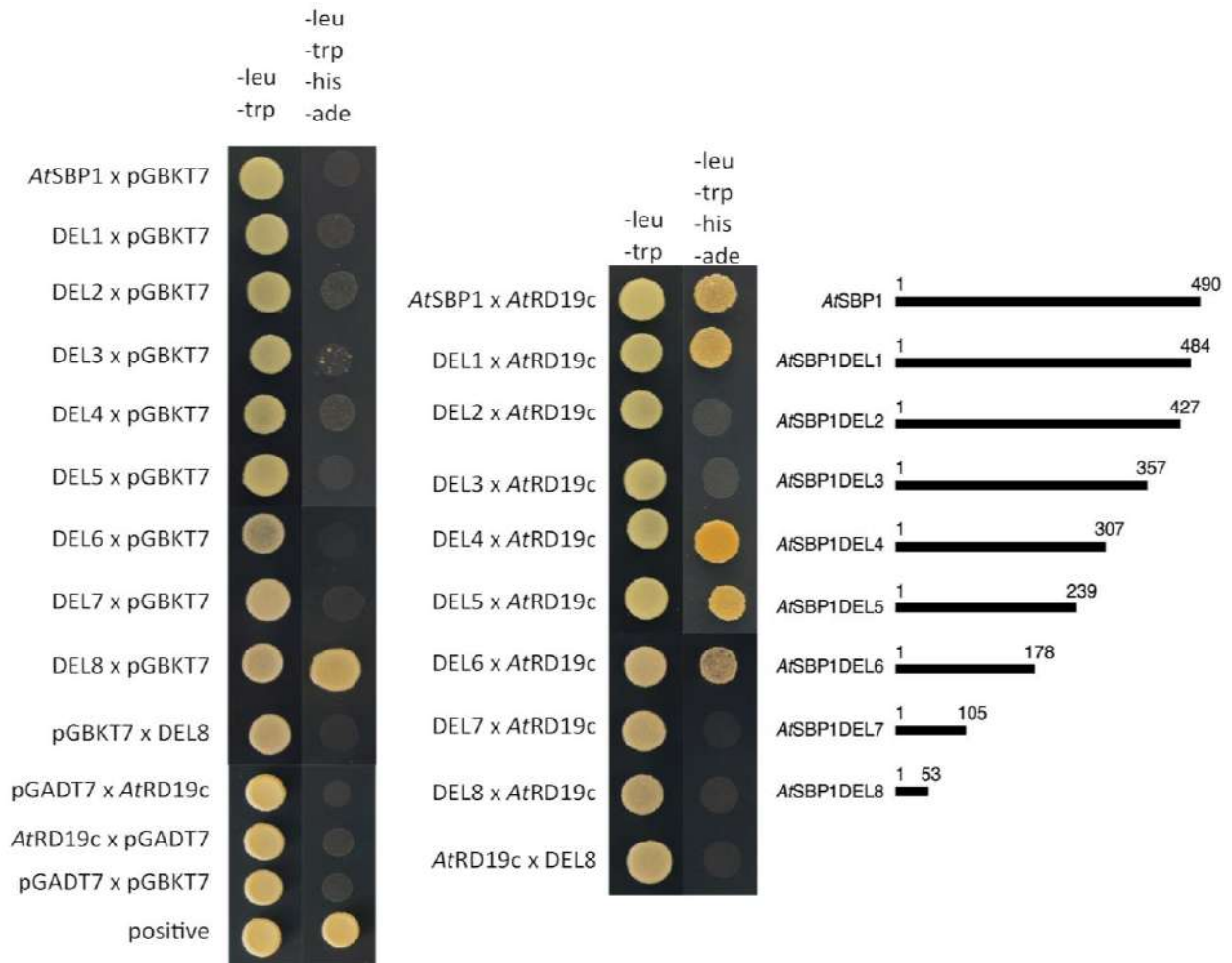
Για την διερεύνηση της ικανότητας της *AtSBP1* να αλληλεπιδρά με την *AtRD19c* χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ζύμης δύο υβριδίων με τον έλεγχο για αυξοτροφία. Συγκεκριμένα, η *AtSBP1* βρίσκεται σε μεταφραστική σύντηξη με την επικράτεια του ενεργού κέντρου του μεταγραφικού παράγοντα GAL4, ενώ η *AtRD19c* με την επικράτεια δέσμευσης του. Αρχικά, έγινε επιλογή των αποικιών που έχουν μετασηματιστεί και με τους δύο πλασμιδιακούς φορείς, σε θρεπτικό που απουσιάζουν τα αμινοξέα τρυπτοφάνη και λευκίνη, εφόσον οι πλασμιδιακοί φορείς φέρουν τα αντίστοιχα γονίδια. Στη συνέχεια γίνεται ο έλεγχος των αλληλεπιδράσεων σε θρεπτικό που δε περιέχει τα αμινοξέα λευκίνη, τρυπτοφάνη, ιστιδίνη και αδενίνη. Η *AtRD19c* ελέγχθηκε για αλληλεπίδραση και με τις τρεις *AtSBP* αλλά μόνο με την *AtSBP1* έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά (Εικόνα 3.2.5.1).

Στη συνέχεια, θελήσαμε να δούμε ποιες επικράτειες της *AtSBP1* είναι αυτές που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με την *AtRD19c*. Όπως έγινε και με την *AtDALL3*, δημιουργήθηκαν οχτώ διαδοχικά ελλείμματα του 5' άκρου της *AtSBP1* τα οποία ελέγχθηκαν για την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με την *AtRD19c*. Ταυτόχρονα χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες για την αποφυγή ψευδώς θετικών ή αρνητικών αποτελεσμάτων.



Εικόνα 3.2.5.1: Μελέτη αλληλεπίδρασης της *AtRD19c* με τις *AtSBPs* σε σύστημα ζύμης δύο υβριδίων. Κατάλληλοι συνδυασμοί χρησιμοποιήθηκαν για την εξακρίβωση ψευδώς θετικού σφάλματος καθώς και ο συνδυασμός pGADT7-T x pGBKT7-p53 ως θετικός μάρτυρας.

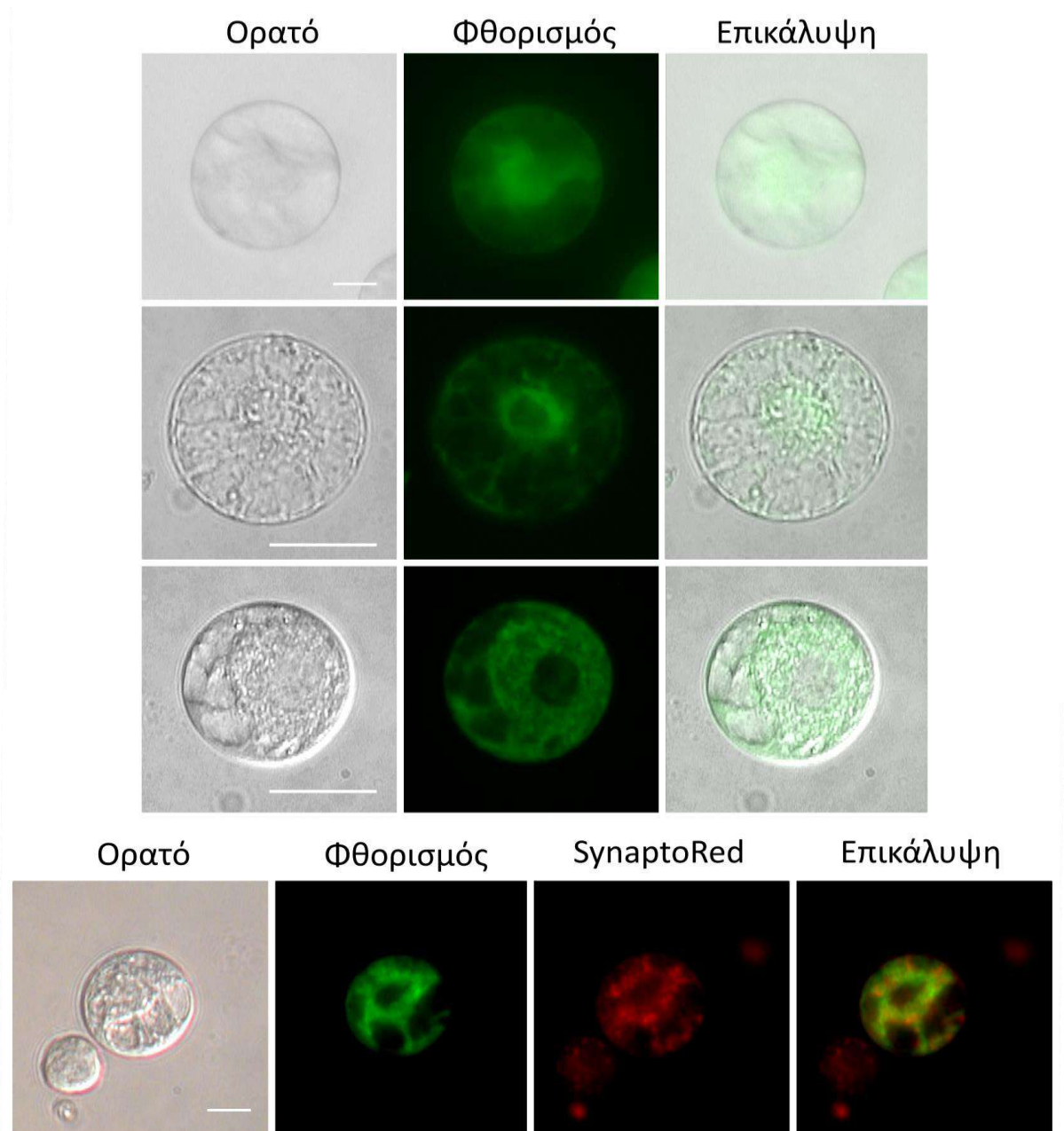
Το μικρότερο θραύσμα που μπορεί να αλληλεπιδρά με την *AtRD19c* είναι το *AtSBP1DEL6*, δηλαδή τα πρώτα 178 αμινοξέα, ενώ όλη η αλληλουχία φαίνεται να είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση (Εικόνα 3.2.5.2). Τέλος, φαίνεται ότι όταν αφαιρεθεί η περιοχή μεταξύ 357-484 η αλληλεπίδραση δεν είναι εφικτή. Αυτό πιθανότατα οφείλεται σε διαφορετικό δίπλωμα που λαμβάνει η πρωτεΐνη όταν απουσιάζει αυτή η αμινοξική περιοχή, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση.



Εικόνα 3.2.5.2: Μελέτη αλληλεπίδρασης των ελλειμμάτων της *AtSBP1* με την *AtRD19c* (κέντρο). Αριστερά όλοι οι απαραίτητοι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες. Δεξιά σχηματική απεικόνιση των διαδοχικών ελλειμμάτων του 5'-άκρου της *AtSBP1*. Ενώ αριστερά όλοι οι απαραίτητοι συνδυασμοί για την αποφυγή ψευδών θετικών αποτελεσμάτων καθώς και θετικός μάρτυρας (*pGADT7-T* x *pGBKT7-p53*).

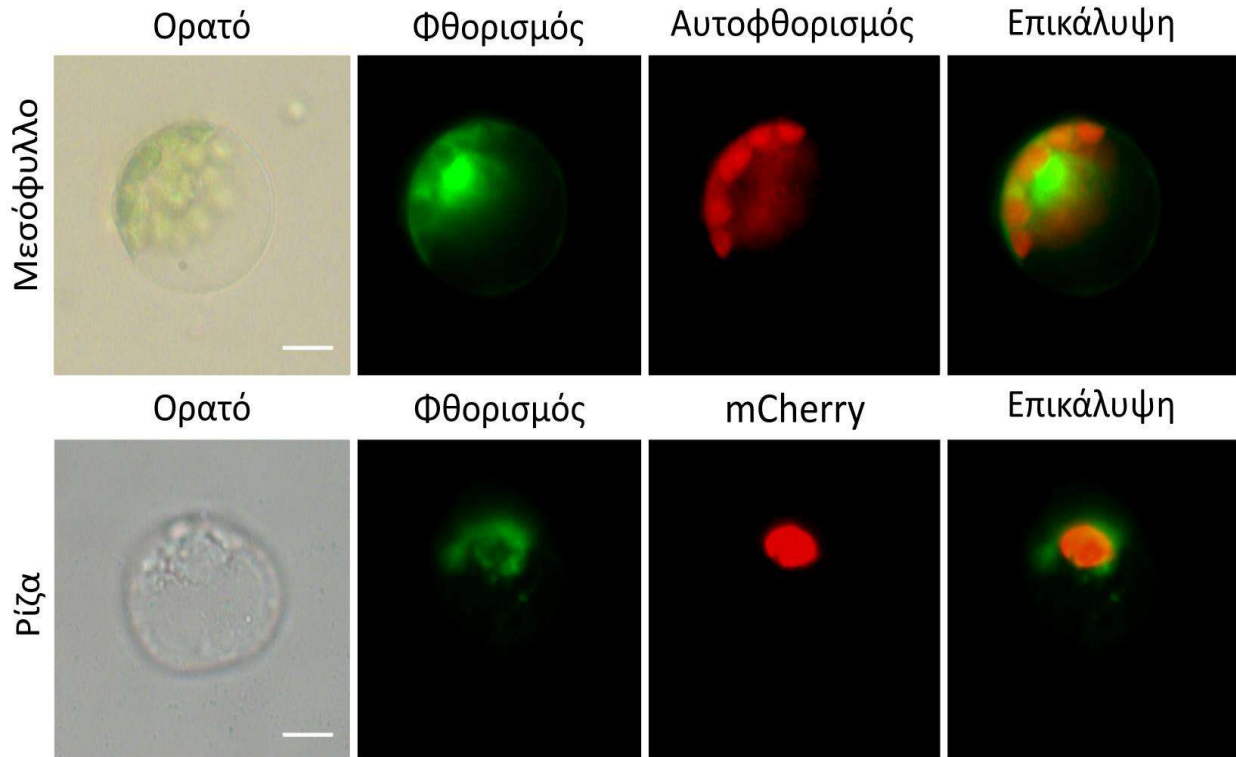
3.2.6 Υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεάσης AtRD19c και *in planta* αλληλεπίδραση με την AtSBP1 σε σύστημα πρωτοπλαστών

Αρχικά, για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της AtRD19c, απομονώθηκαν πρωτοπλάστες από ρίζες μόνιμων μετασηματισμένων φυτών που φέρουν την κατασκευή 35S::RD19c::EYFP. Η έκφραση φαίνεται να εντοπίζεται σε εσωτερικές μεμβράνες του κυττάρου που περιβάλλουν τον πυρήνα αλλά και εκτείνονται σε όλο το κύτταρο. Με σκοπό τον περαιτέρω χαρακτηρισμό του υποκυτταρικού εντοπισμού, έγινε



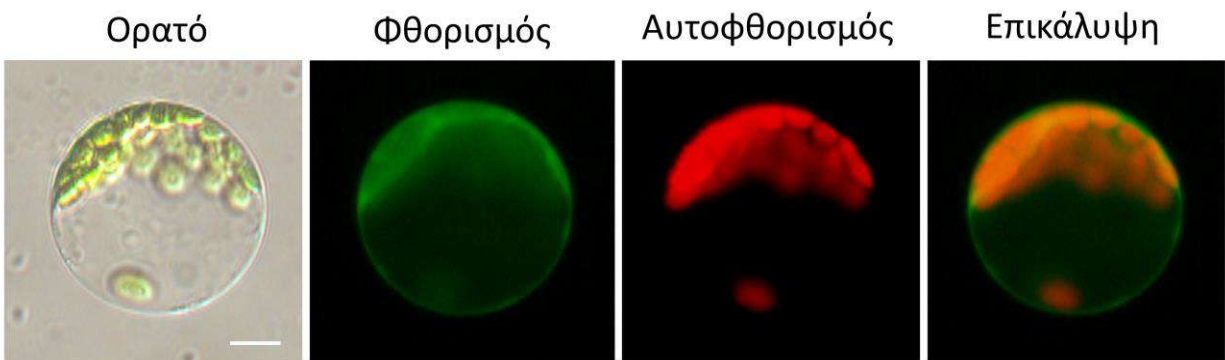
Εικόνα 3.2.6.1: Υποκυτταρικός εντοπισμός της AtRD19c σε σύστημα πρωτοπλαστών ρίζας από μόνιμα μετασηματισμένα φυτά με 35S::RD19c::EYFP. Στο ίδιο σύστημα πραγματοποιήθηκε και η χρώση με την χρωστική SynaptoRed (Μπάρα 10μm).

χρώση με τη χρωστική SynaptoRed (FM4-64) κατάλληλη για την χρώση κυστιδίων, καθώς ακολουθεί το μονοπάτι της ενδοκύττωσης. Έπειτα από αυτή την κατεργασία και την πάροδο 30min, έγινε παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού, όπου διαπιστώθηκε πως υπάρχει συνεντοπισμός της χρωστικής με την έκφραση της πρωτεΐνης (Εικόνα 3.2.6.2).



Εικόνα 3.2.6.2: Παροδικός μετασηματισμός πρωτοπλαστών μεσόφυλλου και ρίζας με πυρηνικό εντοπισμό με την πλασμιδιακή κατασκευή pSAT6/RD19c::EYFP (Μπάρα 10μm).

Για την περαιτέρω διερεύνηση του υποκυτταρικού εντοπισμού, πραγματοποιήθηκε παροδικός μετασηματισμός πρωτοπλαστών ρίζας και μεσόφυλλου με τη πλασμιδιακή κατασκευή pSAT6/RD19c::EYFP (Εικόνα 3.2.6.2), αλλά και την pSAT/ER::YFP, για τη στόχευση του ενδοπλασματικού δικτύου (Εικόνα 3.4.3.3) με σκοπό τη σύγκριση των προτύπων τους.



Εικόνα 3.2.6.3: Παροδικός μετασηματισμός πρωτοπλαστών μεσόφυλλου με τις πλασμιδιακές κατασκευές pSAT4/nCerulean-RD19c-C και pSAT1/SBP1-cCFP-N. Η αλληλεπίδραση εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (Μπάρα 10μm).

Με τον παροδικό μετασχηματισμό παρατηρούμε ότι η έκφραση της πρωτεάσης εντοπίζεται σε κυστιδιακές δομές με κάποιες να γειτνιάζουν ή να περιβάλλουν τον πυρήνα. Τέλος, το ενδοπλασματικό δίκτυο φαίνεται να περιβάλλει το πυρήνα, αλλά παρουσιάζει και χαρακτηριστικά πρότυπα (Εικόνα 3.4.3.3), διαφορετικά από αυτά της πρωτεάσης.

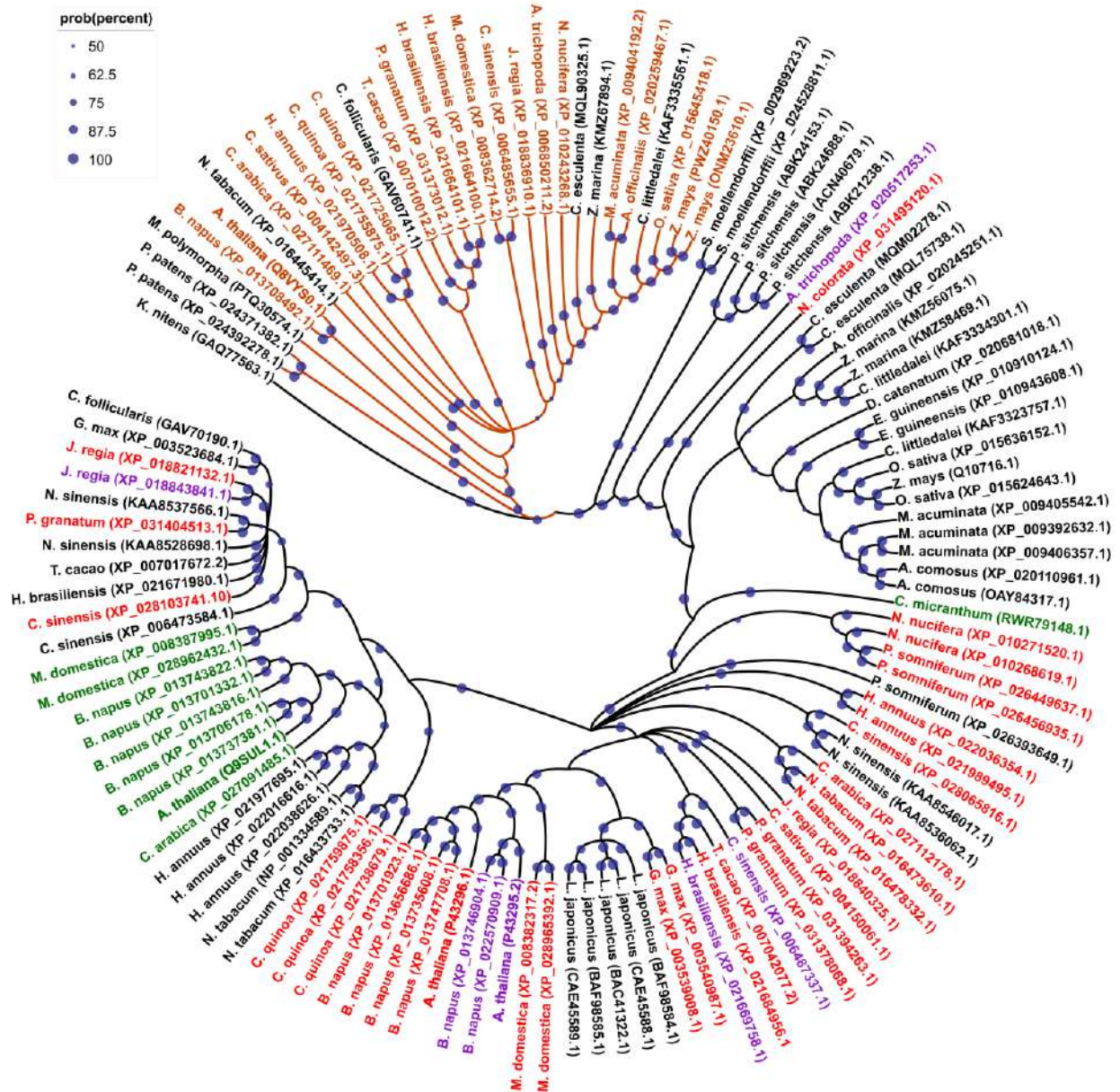
Η μελέτη της αλληλεπίδρασης της AtRD19c με την AtSBP1 με την μέθοδο της συμπληρωματικότητας διμοριακού φθορισμού πραγματοποιήθηκε, αρχικά με παροδικό μετασχηματισμό πρωτοπλαστών με τις κατασκευές pSAT4/RD19c-nCerulean-N και pSAT1/SBP1-cCFP-N. Οι κατασκευές αυτές φέρουν τα θραύσματα στο καρβοξυτελικό άκρο της παραγόμενης πρωτεΐνης και στην περίπτωση αυτή δε παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση. Στη συνέχεια όμως, πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία χρησιμοποιώντας για την πρωτεάση την κατασκευή pSAT4/nCerulean-RD19c-C, δηλαδή αλλάζοντας τη θέση του φθοροφόρου, στο αμινοτελικό άκρο της. Σε αυτή τη περίπτωση, παρατηρήθηκε φθορίζον σήμα και μάλιστα εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 3.2.6.3).

3.2.7 Φυλογενετική ανάλυση της υπο-οικογένειας όμοιων με την RD19A

Η κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου της υπο-οικογένειας όμοιων με την RD19A πραγματοποιήθηκε με τη χρήση 123 πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Συγκεκριμένα, συλλέχθηκαν πρωτεΐνες, από 25 τάξεις των Αγγειοσπέρμων, από την κλάση Bryopsida, την κλάση Lycorodiopsida, από το ηπατικό βρύο (*Marchantiopsida*) *Marchantia polymorpha* και από το νηματώδες φύκος *Klebsormidium nitens*, με την διαδικασία της αναζήτησης τοπικής στοίχισης (BLAST) σε βάσεις δεδομένων του NCBI. Το κάθε μέλος της υπο-οικογένειας της RD19A [AtRD19A (P43296), AtRD19B (P43295), AtRD19C (Q9SUL1), AtRD19D (Q8VYSO)] χρησιμοποιήθηκε για την αναζήτηση όμοιων αλληλουχιών μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας NCBI BLASTp. Η πρωτεάση του φύκου *Klebsormidium nitens* χρησιμοποιήθηκε ως ρίζα (outgroup) του δένδρου, ως ένας οργανισμός πρόγονος των χερσαίων φυτών.

Η αρχική σάρωση των αλληλουχιών των πρωτεασών όμοιων με την RD19A στους φυτικούς οργανισμούς, έδωσε τεράστιο αριθμό δεδομένων, λόγω της υψηλής ομοιότητας και με άλλες πρωτεάσες όμοιες με παπαΐνες. Για την μείωση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν οι πληροφορίες που αναφέρονται στη δημοσίευση των Richau και συνεργατών (Richau *et al.*, 2012), ως προς την δομή και τα χαρακτηριστικά των αλληλουχιών της RD19A υπο-οικογένειας. Συγκεκριμένα, αφαιρέθηκαν οι αλληλουχίες που δεν περιείχαν την συντηρημένη καταλυτική τριάδα Κυστεΐνης (Cys), Ιστιδίνης (His), Ασπαραγίνης (Asn), το συντηρημένο μοτίβο VXNF{S/T} και τέσσερα επιπρόσθετα συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης που σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς.

Στη φυλογενετική ανάλυση της υπο-οικογένειας των πρωτεασών όμοιων με την RD19A (Εικόνα 3.2.7.1) παρατηρούμε ότι η τάξη RD19D ομαδοποιείται ξεχωριστά από τις υπόλοιπες, ενώ οι RD19A, RD19B και RD19C δε παρουσιάζουν κάποια ομαδοποίηση.



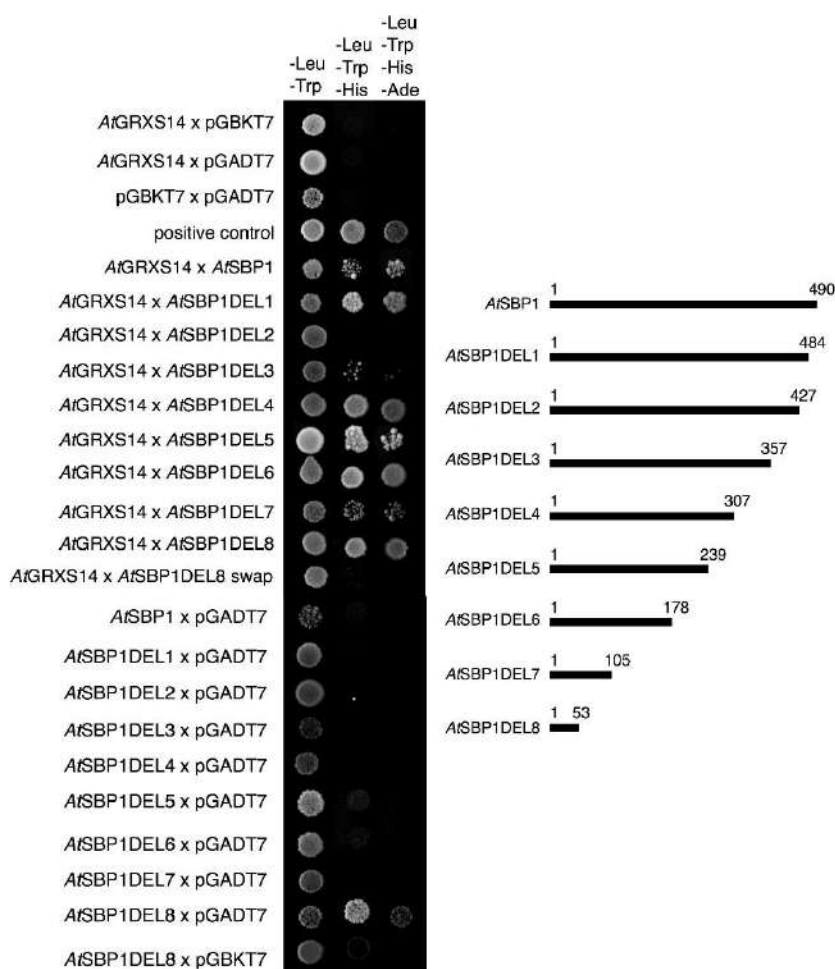
Εικόνα 3.2.7.1: Φυλογενετική ανάλυση της υπο-οικογένειας πρωτεϊνών όμοιων με την RD19A στα Αγγειόσπερμα. Ως ρίζα (outgroup) του δένδρου χρησιμοποιήθηκε η υποθετική πρωτεΐνα του νηματώδους φύκος *Klebsormidium nitens* (GAQ77563.1). Το δένδρο κατασκευάστηκε με την Μπαϊσιανή ανάλυση. Οι πρωτεΐνες σημειώνονται με διαφορετικό χρώμα βάσει του χαρακτηρισμού τους από τη βάση NCBI. Έτσι, με κόκκινο οι RD19A ή RD19A-like, μωβ οι RD19B, πράσινο οι RD19C, καφέ είναι οι RD19D και με μαύρο πρωτεΐνες που χαρακτηρίζονται ως 15A ή πρόκειται για μη χαρακτηρισμένες αλληλουχίες. Η αξιοπιστία των κλάδων αναπαρίσταται με κύκλους. Για την απεικόνιση του δένδρου χρησιμοποιήθηκε το διαδικτυακό εργαλείο iTOL.

3.3 Οι γλουταρεδοξίνες

3.3.1 Ανάλυση των αλληλεπιδράσεων της *AtGRXS14* με την *AtSBP1* σε σύστημα ζύμης δύο υβριδίων

Πειραματικές διαδικασίες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο σε σύστημα ζύμης δύο υβριδίων είχε δείξει ότι η *AtSBP1* αλληλεπιδρά με την *AtGRXS14*, καθώς και η *AtSBP3*, όχι όμως ισχυρά.

Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια προσδιορισμού των επικρατειών της *AtSBP1* που ευθύνονται για την αλληλεπίδρασή της με την *AtGRXS14*. Για τον σκοπό αυτό παράχθηκαν 8 διαδοχικά ελλείμματα του καρβοξυτελικού άκρου της *AtSBP1* (Εικόνα 3.1.1.1), καθένα από τα οποία ελέγχθηκε για την ικανότητα του να αλληλεπιδρά με την *AtGRXS14*.



Εικόνα 3.3.1.1: Ανάλυση ελλειμμάτων της *AtSBP1*. Το μικρότερο έλλειμμα που αλληλεπιδρά με την *AtGRXS14* είναι το *AtSBP1*DEL7, που είναι τα 105 αμινοξέα της αμινοτελικής περιοχής. Δεξιά σχηματική απεικόνιση των διαδοχικών ελλειμμάτων της *AtSBP1*.

Ο έλεγχος των αλληλεπιδράσεων πραγματοποιείται με την μέθοδο της αυξοτροφίας. Αρχικά, ο έλεγχος των μετασηματισμένων κυττάρων ζύμης γίνεται σε θρεπτικό χωρίς λευκίνη και τρυπτοφάνη, καθώς οι φορείς φέρουν τα αντίστοιχα γονίδια. Στη συνέχεια, τα κύτταρα που αναπτύσσονται χωρίς ι-στιδίνη και αδενίνη είναι αυτά που μπορούν και αλληλεπιδρούν. Έτσι, στην ανάλυση μας φαίνεται ότι τα πρώτα 178 αμινοξικά κατάλοιπα συμμετέχουν σε μια ισχυρή αλληλεπίδραση με την *AtGRXS14*, ενώ η

περιοχή μεταξύ των καταλοίπων 358-427, όταν αφαιρεθεί παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση (Εικόνα 3.1.1.1). Το γεγονός ότι τα ελλείματα *AtSBP1DEL2* και *AtSBP1DEL3* δεν αλληλεπιδρούν με την *AtSBP1*, ενώ περιέχουν τις περιοχές αλληλεπίδρασης, πιστεύουμε ότι οφείλεται σε διαφορετική τριτοταγής διαμόρφωση που λαμβάνουν λόγω των ελλειμμάτων, που εμποδίζουν την αλληλεπίδραση.

3.3.2 Ανάλυση Μοριακής Αγκυροβόλησης (Molecular Docking Analysis) για την αλληλεπίδραση *AtGRXS14* με *AtSBP1*

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου είχαν δείξει πως η *AtGRXS14* αλληλεπιδρά με την *AtSBP1* στο σύστημα ζύμης δύο υβριδίων. Για την περαιτέρω διερεύνηση της αλληλεπίδρασης πραγματοποιήθηκε Ανάλυση Μοριακής Αγκυροβόλησης (Molecular Docking Analysis). Για την συγκεκριμένη ανάλυση απαιτούνται οι τριτοταγείς δομές των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν. Στην περίπτωση της γλουταρεδοξίνης *AtGRXS14*, η δομή της είναι γνωστή (PDB: [3IPZ](#)) (Li *et al.*, 2010) και έχει προκύψει από κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ, ενώ για την *AtSBP1* κατασκευάστηκε ένα θεωρητικό μοντέλο της τριτοταγούς δομής της. Παρατηρώντας τη δομή του μοντέλου που κατασκευάστηκε φαίνεται η αφθονία των β-κλώνων που σχηματίζουν μια β-προπέλα με επτά λεπίδες, που περιβάλλεται από α-έλικες (Εικόνα 3.3.2.1). Η δομή αυτή έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές για την δομή της SBP1 από τον φυτικό οργανισμό *Arabidopsis thaliana* (Schild *et al.*, 2014) και του *Homo sapiens* (Raucci *et al.*, 2011) οι οποίες παράχθηκαν με μεθόδους μοντελοποίησης λόγω ομολογίας. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ως μήτρα για την δομή έχει χρησιμοποιηθεί η λυμένη δομή της υποθετικής SBP από το αρχαίο *Sulfolobus tokodaii* που έχει προκύψει από κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ (PDB: [2ECE](#)).

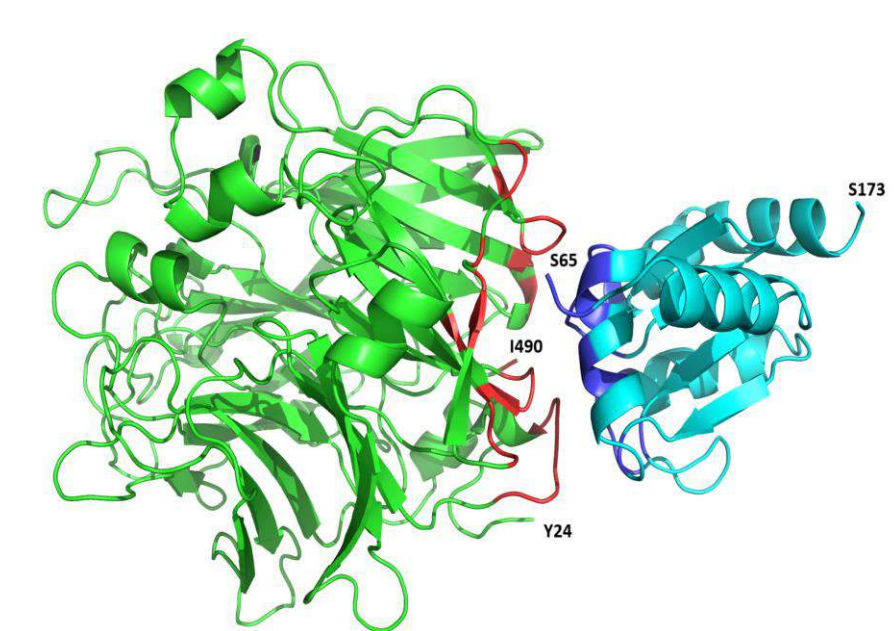
Όσον αφορά τη δομή της *AtGRXS14*, όπως ήδη αναφέρθηκε, έχει λυθεί με την μέθοδο της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ (Li *et al.*, 2010). Η κατατεθειμένη δομή αντιστοιχεί στην ώριμη μορφή της πρωτεΐνης (κατάλοιπα 65-173), καθώς τα πρώτα 1-63 αφορούν το πεπτιδίο σινιάλο που στοχεύει την πρωτε-



Εικόνα 3.3.2.1: Μοντέλο της δομής της *AtSBP1*, χρησιμοποιώντας το λογισμικό PyMOL. Η δομή της αποτελείται από β-πτυχωτές επιφάνειες που σχηματίζουν μια β-προπέλα από επτά-έλικες που περικλείεται από α-έλικες (Νικόλαος Παπανδρέου, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής).

ΐνη στους χλωροπλάστες. Το δίπλωμα που έχει η AtGRXS14 είναι αυτό των όμοιων με γλουταρεδοξίνες/θειορεδοξίνες, που αποτελούνται από τέσσερις παράλληλους β-κλώνους που πλαισιώνονται από πέντε α-έλικες (PDB:3IPZ) (Li *et al.*, 2010).

Για την πρόβλεψη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η Ανάλυση Μοριακής Αγκυροβόλησης, βάσει της οποίας προσδιορίστηκαν οι αμινοξικές περιοχές των οποίων συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση. Στην περίπτωση της AtSBP1 τα κατάλοιπα είναι 101-106, 160-163, 182, 184-186,

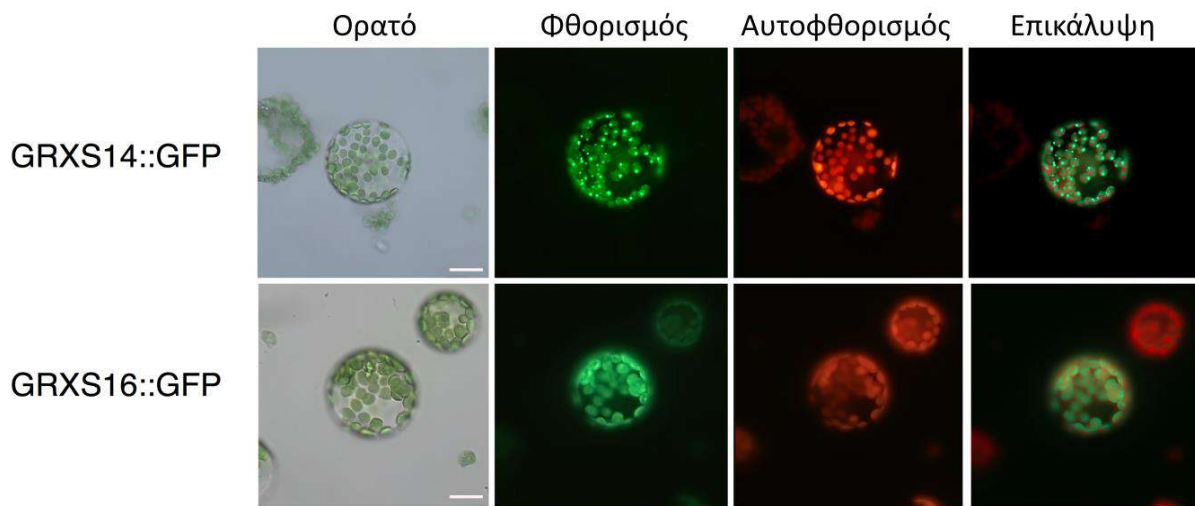


Εικόνα 3.3.2.2: Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης των AtSBP1-AtGRXS14 (πράσινο και κυανό, αντίστοιχα) με τη χρήση του λογισμικού PyMOL. Τα αλληλεπιδρώντα κατάλοιπα, που έχουν υπολογιστεί από το λογισμικό PISA, έχουν χρωματιστεί κόκκινα για την AtSBP1 και μπλε για την AtGRXS14 (Νικόλαος Παπανδρέου, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής).

191-192, 194, 196-197, 212, 214, 250-252, 254 και 490, ενώ για την AtGRXS14 είναι 65-66, 89, 96-99, 120, 126-127, 130-131, 134-138 και 152. Το σύμπλοκο σταθεροποιείται από ένα δίκτυο υδρογονικών δεσμών, που σχηματίζονται μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων των αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών. Επιπλέον, τα κατάλοιπα Asp103, Glu163 και Lys214 της AtSBP1 σχηματίζουν δεσμούς αλάτων με τα κατάλοιπα Lys89, Lys130 και Asp152 της AtGRXS14, αντίστοιχα (Εικόνα 3.3.2.2).

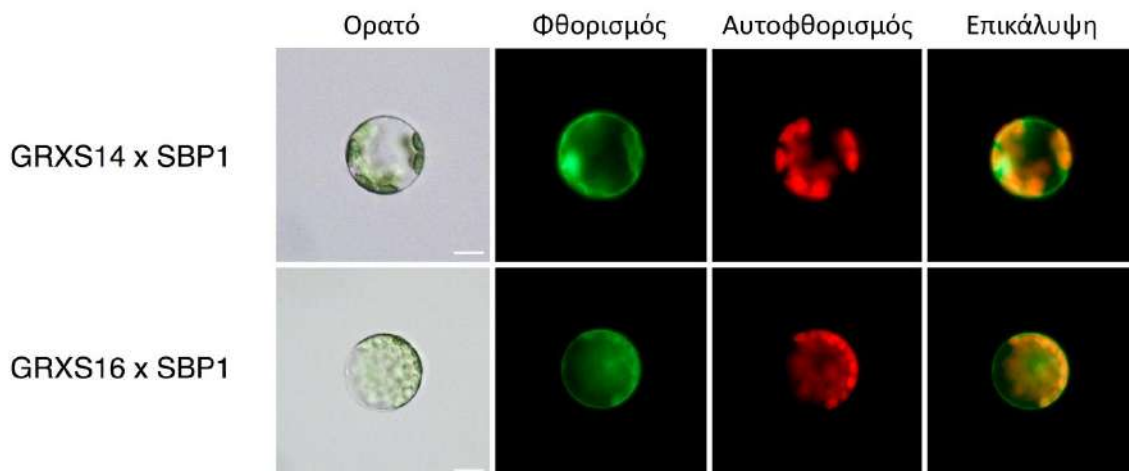
3.3.3 Υποκυτταρικός εντοπισμός των AtGRXS14 και AtGRXS16 και η *in planta* μελέτη αλληλεπίδρασης τους με την AtSBP1

Για τον υποκυτταρικό εντοπισμό των AtGRXS14 και AtGRXS16 χρησιμοποιήθηκαν σειρές μόνιμα μετασηματισμένων φυτών που φέρουν το γονίδιο μελέτης σε μεταφραστική σύντηξη με την φθορίζουσα πρωτεΐνη EYFP και υπό τον έλεγχο ενός ισχυρού υποκινητή. Αυτά τα φυτά χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση πρωτοπλαστών από το μεσόφυλλο, όπου φάνηκε ότι εντοπίζονται στους χλωροπλάστες. Συγκεκριμένα, η AtGRXS14 εντοπίζεται σε σφαιρικές δομές (speckle-like) στους χλωροπλάστες, ενώ η AtGRXS16 παρουσιάζει ένα διάχυτο πρότυπο στους χλωροπλάστες (Εικόνα 3.3.3.1).



Εικόνα 3.3.3.1: Πρωτοπλάστες μεσόφυλλου από μόνιμα μετασηματισμένα φυτά με τις κατασκευές 35S::GRXS14-EYFP και 35S::GRXS16-EYFP. Μπάρα 25μm.

Επιπρόσθετες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο, σε σύστημα ζύμης δύο υβριδίων έχουν δείξει, ότι η *AtGRXS14* αλληλεπιδρά με την *AtSBP1*, όπως ήδη έχει αναφερθεί, αλλά και η *AtGRXS16* αλληλεπιδρά και με τα τρία αλληλόμορφα της SBP. Για την εξακρίβωση της αλληλεπίδρασης *in planta* απομονώθηκαν πρωτοπλάστες από μεσόφυλλο και στη συνέχεια μετασηματίστηκαν με τις κατάλληλες πλασμιδιακές κατασκευές (Citovsky *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008). Η μελέτη της αλληλεπίδρασης στο σύστημα αυτό βασίζεται στη μέθοδο της συμπληρωματικότητας διμοριακού φθορισμού (BiFC)



Εικόνα 3.3.3.2: Παροδικός μετασηματισμός πρωτοπλαστών μεσόφυλλου με τις πλασμιδιακές κατασκευές pSAT4/GRXS14::nCerulean και pSAT1/35S::SBP1-cCFP και με pSAT4/GRXS16-nCerulean και pSAT1/SBP1-cCFP, αντίστοιχα. Μπάρα 25μm.

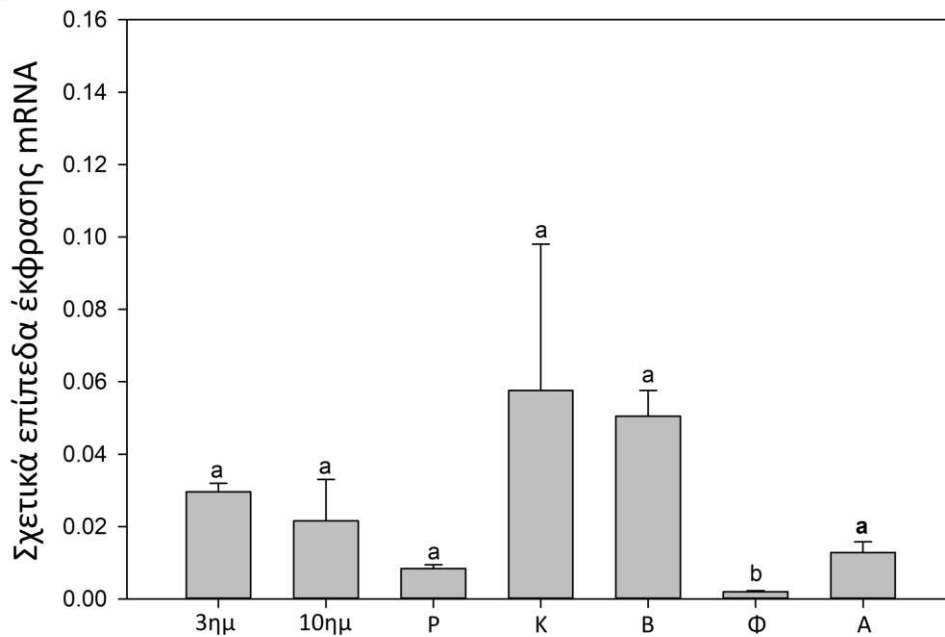
(Citovsky *et al.*, 2006; Kerppola, 2008). Πιο αναλυτικά, οι γλουταρεδοξίνες *AtGRXS14* και *AtGRXS16* συντήχθηκαν μεταφραστικά με το θραύσμα φθορίζουσας πρωτεΐνης nCerulean (pSAT₄), ενώ η *AtSBP1* με το θραύσμα cCFP (pSAT₁) (Lee *et al.*, 2008). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3.3.2, η *AtSBP1* αλληλεπιδρά με την *AtGRXS14* στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα, ενώ με την *AtGRXS16* μόνο στο κυτταρόπλασμα.

3.4 Το αλεργιογόνο *AtSAH7*

3.4.1 Ποσοτική έκφραση της *AtSAH7* κατά την ανάπτυξη και την αβιοτική καταπόνηση

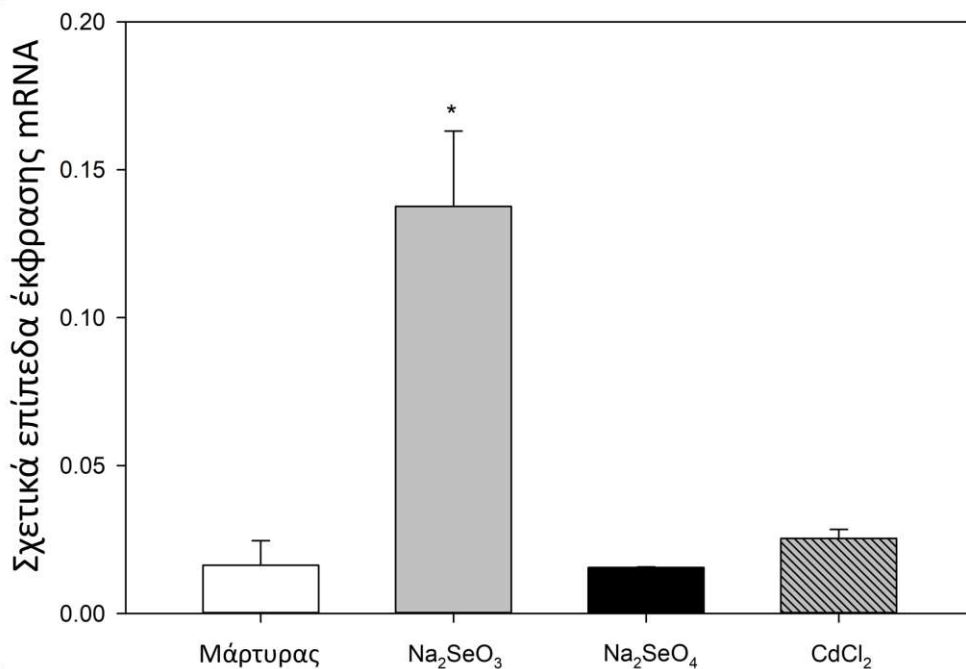
Για την μελέτη των επιπέδων έκφρασης της *AtSAH7* συλλέχθηκαν ιστοί 3 ημερών, 10 ημερών ολόκληρα αρτίβλαστα, ρίζα, κοτυληδόνες και βλαστοί, 4 εβδομάδων φύλλα ροζέτας και άνθη. Στη συνέχεια, απομονώθηκε RNA από αυτούς τους ιστούς και ακολούθησε η σύνθεση cDNA. Τα cDNA χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης τους με qPCR. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο δδCt και σχεδιάστηκε αντίστοιχο ιστόγραμμα.

Η έκφραση της *AtSAH7* είναι συνεχής σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια με υψηλότερη έκφραση στις κοτυληδόνες και τον βλαστό των 10 ημερών αρτίβλαστων χωρίς όμως να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση. Αντίθετα, στα φύλλα ροζέτας των 4 εβδομάδων φυτών εντοπίζεται η χαμηλότερη έκφραση (Εικόνα 3.4.1.1).



Εικόνα 3.4.1.1: Ιστόγραμμα σχετικής έκφρασης mRNA της *AtSAH7* στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια και ιστοί. 3ημ: 3 ημερών, 10ημ: 10 ημερών, P: ρίζα από 10 ημερών αρτίβλαστα, K: κοτυληδόνες από 10 ημερών αρτίβλαστα, B: βλαστός από 10 ημερών αρτίβλαστα, A: άνθη, Φ: φύλλα ροζέτας. Τα γράμματα a,b υποδηλώνουν την στατιστικά σημαντική μεταβολή μεταξύ των μελετώμενων ιστών. Οι μπάρες προσδιορίζουν την τυπική απόκλιση (SD).

Όσον αφορά την καταπόνηση από χημικές ενώσεις τα επίπεδα έκφρασης μελετήθηκαν σε ιστοί ρίζας έπειτα από επίδραση με 150μM Na₂SeO₃, 150μM Na₂SeO₄ και 150μM CdCl₂. Παρατηρούμε λοιπόν,



Εικόνα 3.4.1.2: Ιστόγραμμα σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA της *AtSAH7* έπειτα από από επίδραση με σεληνώδες νάτριο (Na_2SeO_3), σεληνικό νάτριο (Na_2SeO_4) και χλωριούχο κάδμιο (CdCl_2). Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τη στατιστικά σημαντική μεταβολή ανάμεσα στην κατεργασία και στον μάρτυρα. Οι μπάρες προσδιορίζουν την τυπική απόκλιση (SD).

ότι τα επίπεδα έκφρασης της *AtSAH7* αυξάνονται κατακόρυφα έπειτα από Na_2SeO_3 , ενώ παρουσία Na_2SeO_4 και CdCl_2 δεν παρουσιάστηκε κάποια μεταβολή (Εικόνα 3.4.1.2).

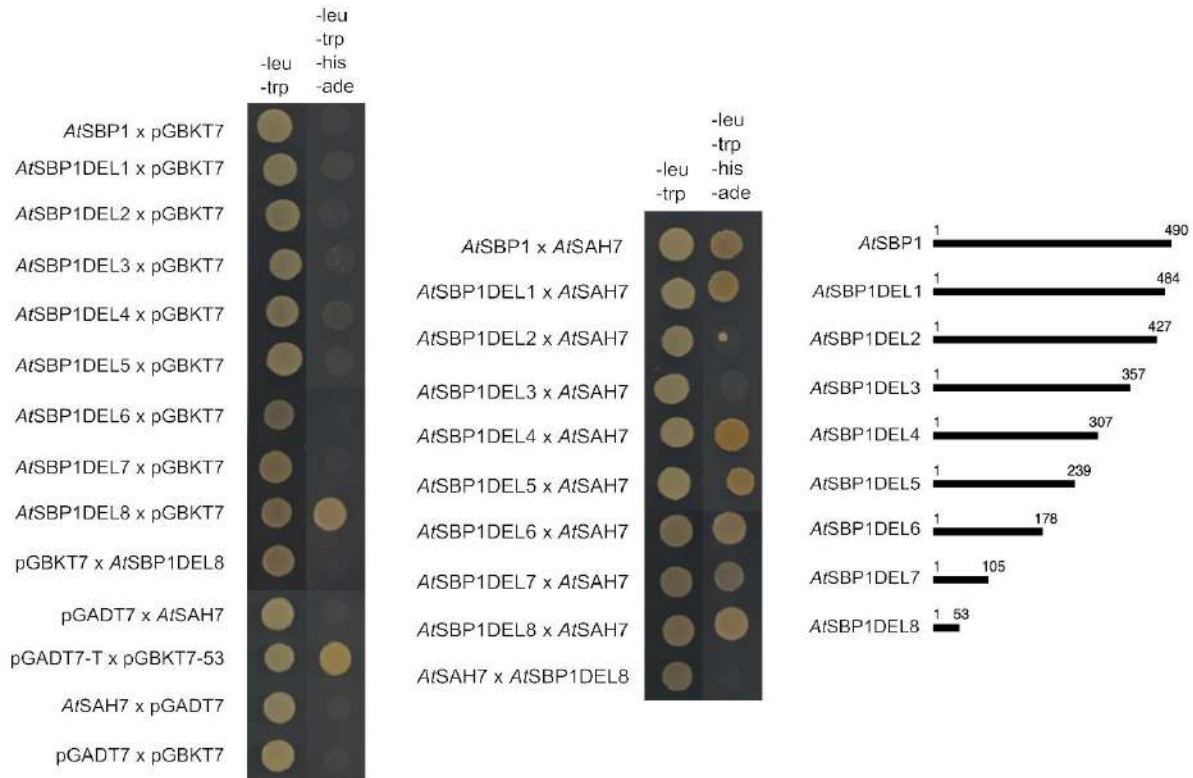
3.4.2 Ανάλυση των αλληλεπιδράσεων της *AtSAH7* με την *AtSBP1* σε σύστημα ζύμης δύο υβριδίων

Πειραματικές διαδικασίες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο σε σύστημα ζύμης δύο υβριδίων είχε δειχθεί ότι η *AtSBP1* αλληλεπιδρά με την *AtSAH7*.

Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια προσδιορισμού των επικρατειών της *AtSBP1* που ευθύνονται για την αλληλεπίδρασή της με την *AtSAH7*. Για τον σκοπό αυτό παράχθηκαν 8 διαδοχικά ελλείμματα του καρβοξυτελικού άκρου της *AtSBP1* (Εικόνα 3.4.2.1), καθένα από τα οποία ελέγχθηκε για την ικανότητα του να αλληλεπιδρά με το αλλεργιογόνο *AtSAH7*.

Ο έλεγχος των αλληλεπιδράσεων πραγματοποιείται με την μέθοδο της αυξοτροφίας. Αρχικά, ο έλεγχος των μετασχηματισμένων κυττάρων ζύμης γίνεται σε θρεπτικό χωρίς λευκίνη και τρυπτοφάνη, καθώς οι φορείς φέρουν τα αντίστοιχα γονίδια. Στη συνέχεια, τα κύτταρα που αναπτύσσονται χωρίς ι-στιδίνη και αδενίνη είναι αυτά που μπορούν και αλληλεπιδρούν. Έτσι, στην ανάλυση μας φαίνεται ότι τα πρώτα 105 αμινοξικά κατάλοιπα συμμετέχουν σε μια ισχυρή αλληλεπίδραση με την *AtSAH7*, ενώ η περιοχή μεταξύ των καταλοίπων 358-427, όταν αφαιρεθεί παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση (Εικόνα 3.4.1.1). Το γεγονός ότι τα ελλείμματα *AtSBP1DEL2* και *AtSBP1DEL3* δεν αλληλεπιδρούν με την *AtSBP1*,

ενώ περιέχουν τις περιοχές αλληλεπίδρασης, πιστεύουμε ότι οφείλεται σε διαφορετική τριτοταγής διαμόρφωση που λαμβάνουν λόγω των ελλειμμάτων, που εμποδίζουν την αλληλεπίδραση.



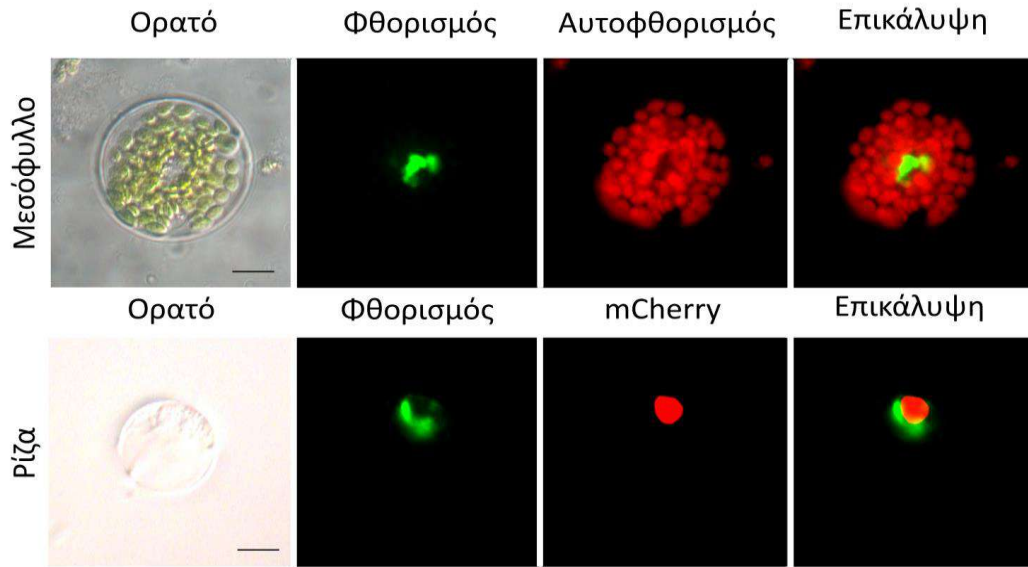
Εικόνα 3.4.2.1: Μελέτη αλληλεπίδρασης των ελλειμμάτων της *AtSBP1* με την *AtSAH7* (κέντρο). Αριστερά όλοι οι απαραίτητοι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες. Δεξιά σχηματική απεικόνιση των διαδοχικών ελλειμμάτων του 5'-άκρου της *AtSBP1*. Ενώ αριστερά όλοι οι απαραίτητοι συνδυασμοί για την αποφυγή ψευδών θετικών αποτελεσμάτων καθώς και θετικός μάρτυρας (pGADT7-T x pGBKT7-p53).

3.4.3 Υποκυτταρικός εντοπισμός του αλλεργιογόνου *AtSAH7* και η *in planta* μελέτη της αλληλεπίδρασης του με την *AtSBP1*

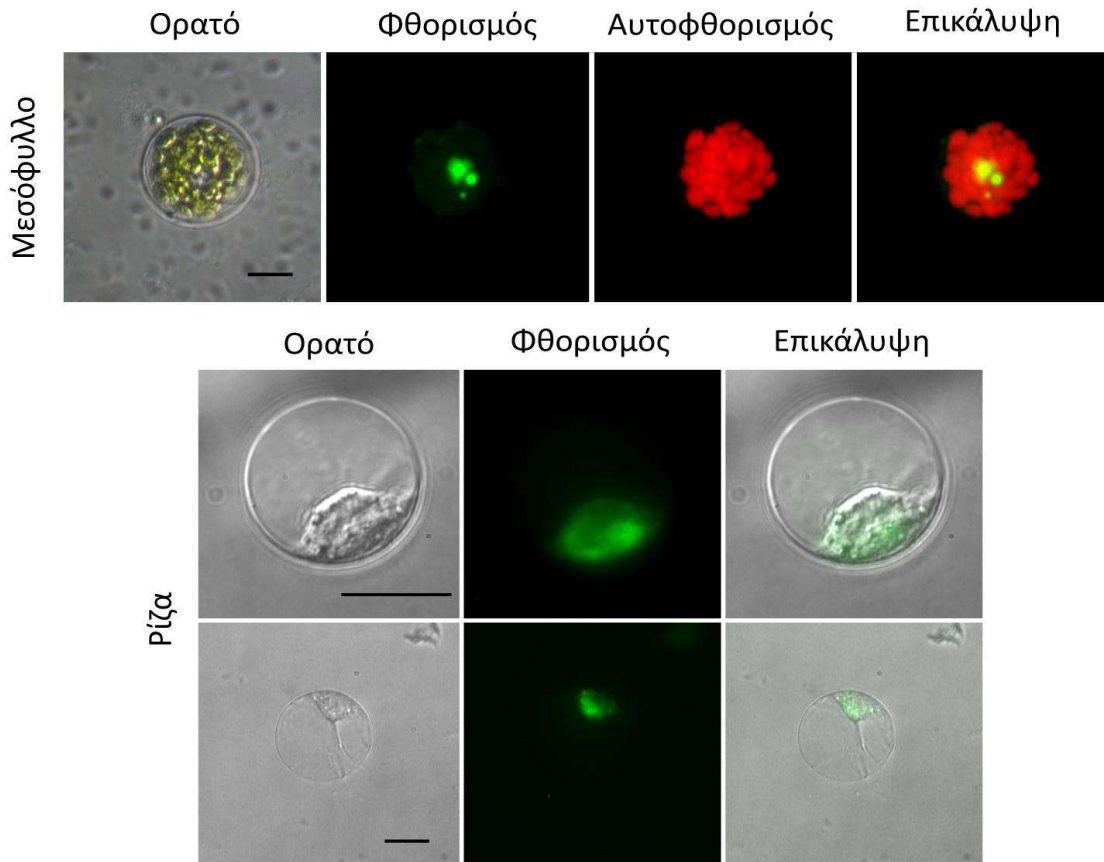
Για τον υποκυτταρικό εντοπισμό του αλλεργιογόνου *AtSAH7* απομονώθηκαν πρωτοπλάστες από μεσόφυλλο και ρίζα που φέρουν πυρηνικό εντοπισμό και ακολούθησε παροδικός μετασχηματισμός με την πλασμιδιακή κατασκευή pSAT6/SAH7-EYFP. Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε σε μικροσκόπιο φθορισμού AxioPlan και σήμα EYFP εντοπίστηκε σε δομή που περιβάλλει τον πυρήνα (Εικόνα 3.4.3.1).

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο, σε σύστημα ζύμης δύο υβριδίων έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη *AtSAH7* έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με την *AtSBP1*. Για να διαπιστωθεί ότι η παρατηρούμενη αλληλεπίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί και *in planta*, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της συμπληρωματικότητας διμοριακού φθορισμού (BiFC) στο σύστημα πρωτοπλαστών. Έτσι, οι πρωτοπλάστες μετασχηματίστηκαν με τις πλασμιδιακές κατασκευές pSAT1/SBP1-cCFP-N και pSAT4/SAH7-nCerulean-N. Παρατηρούμε ότι η αλληλεπίδραση εντοπίζεται σε δομή πλησίον του πυρήνα, όμοιο με αυτό της *AtSAH7::EYFP*, ενώ παρατηρούμε ότι σε κύτταρα ρίζας με πυρηνικό εντοπισμό, όταν εντοπίζεται

το φθορίζον σήμα της αλληλεπίδρασης, ο πυρήνας δε φθορίζει (Εικόνα 3.4.3.2). Επιπλέον, για την περαι-

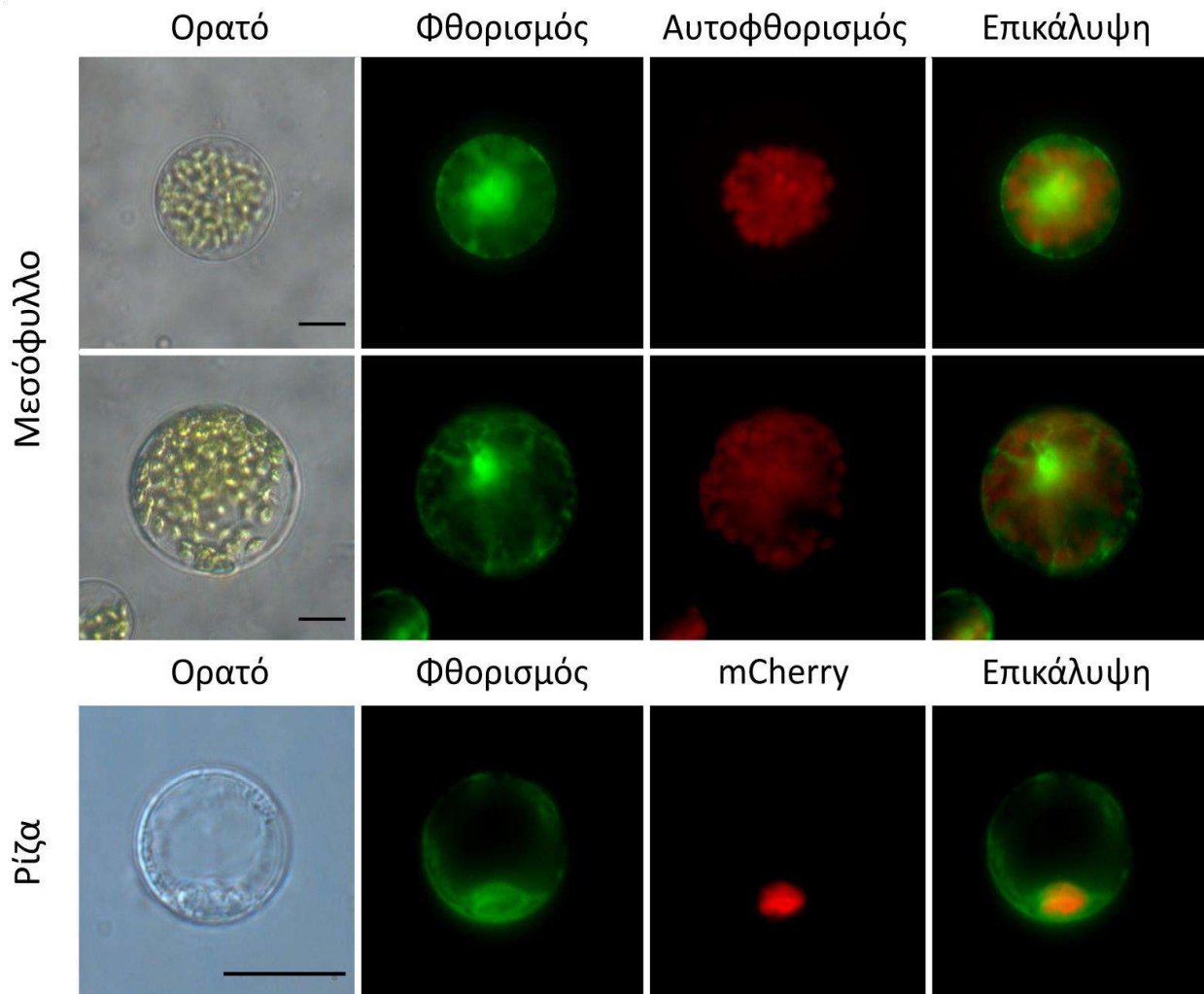


Εικόνα 3.4.3.2: Υποκυτταρικός εντοπισμός της AtSAH7 με παροδικό μετασχηματισμό πρωτοπλαστών μεσόφυλλου και ρίζας με πυρηνικό εντοπισμό (Μπάρα 10μm).



Εικόνα 3.4.3.1: Υποκυτταρικός εντοπισμός της αλληλεπίδρασης του αλλεργιογόνου AtSAH7 με την AtSBP1 σε σύστημα πρωτοπλαστών με την μέθοδο της συμπληρωματικότητας διμοριακού φθορισμού (BiFC) (Μπάρα 10μm).

τέρω διερεύνηση του υποκυτταρικού της εντοπισμού πραγματοποιήθηκε παροδικός μετασηματισμός πρωτοπλαστών ρίζας και μεσόφυλλου (Εικόνα 3.4.3.3).



Εικόνα 3.4.3.3: Παροδικός μετασηματισμός πρωτοπλαστών μεσόφυλλου και ρίζας με πυρηνικό εντοπισμό με τη πλασμιδιακή κατασκευή pSAT/ER::YFP, για στόχευση στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Μπάρα 10μm).

4. Συζήτηση

4.1 Η φωσφολιπάση AtDALL3

4.1.1 Χαρακτηριστικά αλληλουχίας και τριτοταγούς δομής της AtDALL3

Η φωσφολιπάση AtDALL3 (PLA1-Igammma2, At2G30550, Q3EBR6) μελετήθηκε ως μια πρωτεΐνη που πιθανόν αλληλεπιδρά με την AtSBP1, γεγονός που προέκυψε από την σάρωση βιβλιοθηκών cDNA για αλληλεπιδράσεις με την AtSBP1 σε σύστημα ζύμης δύο υβριδίων (Agalou *et al.*, 2006). Η φωσφολιπάση AtDALL3 φέρει ένα πεπτίδιο πλαστιδιακής στόχευσης (43 πρώτα αμινοξέα), μια συντηρημένη αλληλουχία GX SXG (316-321aa), χαρακτηριστική των λιπασών και την καταλυτική τριάδα σερίνης (S318), ασπαρτικού οξέος (D381) και ιστιδίνης (H437).

Η AtDALL3, όπως δείχθηκε στην παρούσα διατριβή, ανήκει στην υπεροικογένεια των υδρολασών α/β . Η συγκεκριμένη υπεροικογένεια διαθέτει το πιο ευρέως διαδεδομένο πρωτεϊνικό δίπλωμα (Nardini & Dijkstra, 1999) και εντοπίζεται σε όλες τις επικράτειες της ζωής με διαφορετικούς καταλυτικούς ρόλους. Περιλαμβάνει εστεράσες (esterases), λιπάσες (lipases), θειοεστεράσες (thioesterases), πρωτεάσες (proteases), αφαλογονάσες (dehalogenases), αλογονοϋπεροξειδάδες (haloperoxidases) κι υδρολάσες εποξειδίων (epoxide hydrolases) (Klenk *et al.*, 1997; Nardini & Dijkstra, 1999; De Simone *et al.*, 2001; Mindrebo *et al.*, 2016). Αυτές οι πρωτεΐνες μοιράζονται μια υψηλά συντηρημένη τριτοταγή δομή, παρά την χαμηλή τους ταυτοσημότητα σε επίπεδο αλληλουχίας (Mindrebo *et al.*, 2016).

Οι πρώτες δομές λιπασών που οι τριτοταγείς τους δομές προσδιορίστηκαν με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X ήταν της λιπάσης τριάκυλο-γλυκερόλης του *Rhizomucor miehei* και αυτής του παγκρέατος στον άνθρωπο (Winkler *et al.*, 1990). Οι λιπάσες εκτός από το χαρακτηριστικό δίπλωμα, μοιράζονται μια συντηρημένη καταλυτική τριάδα και ένα μοτίβο GX SXG. Πιο συγκεκριμένα, το βασικό δίπλωμα αποτελείται από μια β -πτυχωτή επιφάνεια με 8 κλώνους με τον δεύτερο ($\beta 2$) μόνο αντιπαράλληλο και τους $\beta 3$ - $\beta 8$ να συνδέονται με α -έλικες (Carrière *et al.*, 1998), δεδομένα που επιβεβαιώνουν και τα αποτελέσματά μας.

4.1.2 Φυλογενετική ανάλυση

Η οικογένεια των φωσφολιπασών όμοιες με την DAD1 χωρίζεται σε τρεις τάξεις βάση της παρουσίας σηματοδοτικών αμινοτελικών πεπτιδίων και ομοιοτήτων της αλληλουχίας της καταλυτικής περιοχής. Η τάξη I αποτελείται από χλωροπλαστιδιακές πρωτεΐνες, η τάξη II από τέσσερις κυτταροπλασματικές και η τάξη III από μία μιτοχονδριακή (Ishiguro *et al.*, 2001).

Στο φυλογενετικό δένδρο που κατασκευάστηκε, είναι ξεκάθαρος ο διαχωρισμός της τάξης II από τις υπόλοιπες τάξεις και επιπλέον διαιρείται σε τέσσερις ομάδες: PLA1-II α , PLA1-II β , PLA1-II γ και PLA1-II δ . Οι PLA1-II α και PLA1-II β είναι παρούσες μόνο στα είδη *Arabidopsis thaliana* και *Eutrema salsugineum* (πιθανότατα μόνο στη τάξη των Brassicales). Οι λιπάσες PLA1-II γ και PLA1-II δ ομαδοποιούνται πολύ καλά και περιλαμβάνουν αντιπροσώπους των ενζύμων από κάθε είδος που μελετήθηκε με πολύ καλή στήριξη. Επιπλέον, αυτές οι δύο ομάδες ομαδοποιούνται σε αδελφούς κλάδους. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί η λιπάση του είδους *Selaginella moellendorffi*, η οποία τοποθετείται εκτός των PLA1-II γ και PLA1-II δ . Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι αποτελεί την μοναδική λιπάση του είδους. Επιπλέον, η τάξη *Selaginella* έχει προταθεί ως εξελικτικός πρόγονος των αγγειοσπέρμων (Banks, 2009; Banks *et al.*, 2011), γεγονός που ενισχύει την τοποθεσία της στο φυλογενετικό δένδρο.

Οι ισομορφές PLA1-Ια1 και PLA1-Ια2 είναι και οι δύο παρούσες στα *Arabidopsis thaliana* και *Eutrema salsugineum*, ενώ στα υπόλοιπα μελετώμενα είδη εντοπίζεται μία από τις δύο ισομορφές. Οι ισομορφές PLA1-Ιγ1, PLA1-Ιγ2 και 3, στα περισσότερα είδη που μελετήθηκαν εντοπίστηκαν όλες οι ισομορφές, με την PLA1-Ιγ3 να βρίσκεται στη βάση για τις άλλες δύο με πολύ καλή στήριξη.

Η μοναδική πρωτεΐνη που χαρακτηρίζεται ως μιτοχονδριακή (τάξη III) είναι αυτή του *Arabidopsis thaliana* (Ishiguro *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2011). Στο φυλογενετικό δένδρο που κατασκευάστηκε, ο κλάδος που περιλαμβάνει την συγκεκριμένη λιπάση ομαδοποιείται με πρωτεΐνες που έχουν χαρακτηριστεί ως PLA1-Ιγ1 αλλά στην ανάλυση διαχωρίζονται από τις υπόλοιπες PLA1-Ιγ1 που ομαδοποιούνται με τις PLA1-Ιγ2. Όμως, η πλειοψηφία αυτών των πρωτεϊνών αφορούν μη καλά χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες. Επιπλέον, αυτή η ομάδα φαίνεται να σχετίζεται περισσότερο με τις ισομορφές PLA1-Ιβ1 και Ιβ2, παρά με τις PLA1-Ιγ, εισάγοντας την θεωρία για μια **σπενή οργανιδιακή σχέση**.

Στην φυλογενετική ανάλυση φαίνεται ότι η τάξη II μπορεί να θεωρηθεί πρόγονη των χλωροπλαστιδιακών και μιτοχονδριακών φωσφολιπασών όμοιων της DAD1, ενώ οι PLA1-ΙΙα και PLA1-ΙΙβ εμφανίζονται μόνο στην οικογένεια Brassicales, και ίσως είναι ένα πρόσφατο εξελικτικό γεγονός. Οι φωσφολιπάσες PLA1-Ιγ φαίνεται να είναι πιο συγγενικές με τις PLA1-Ια. Όμως, υπάρχει διαφορά μεταξύ των ισομορφών PLA1-Ιγ που βρίσκονται κοντά τις PLA1-Ιβ με αυτών που ομαδοποιούνται με τις μιτοχονδριακές PLA1. Αναλογιζόμενοι ότι πρόκειται για θεωρητικά χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες είναι πιθανό να αφορούν κακό προσδιορισμό αυτών, λόγω έλλειψης πειραματικών δεδομένων. Έτσι, θα μπορούσαμε να προτείνουμε την μιτοχονδριακή προέλευση τους, καθώς αυτή του *Arabidopsis thaliana* είναι πλήρως και καλά χαρακτηρισμένη (Seo *et al.*, 2011).

4.1.3 Γονιδιακή έκφραση

Αρχικά, μελετήθηκαν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης της *AtDALL3* σε διάφορους αναπτυξιακούς ιστούς. Τα υψηλότερα επίπεδα παρουσιάστηκαν στη ρίζα αρτιβλάστων 10 ημερών και στα άνθη, ενώ συνεχή έκφραση παρουσιάζει σε όλους τους ιστούς που μελετήθηκαν. Επιπλέον, σημαντική μείωση παρουσιάζει στο στάδιο των 10 ημερών σε σύγκριση με αυτό των 3 ημερών. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζουν οι Seo και συνεργάτες (Seo *et al.*, 2009), οι οποίοι μελέτησαν την έκφραση και των 7 μελών των χλωροπλαστιδιακών πρωτεϊνών της τάξης I της οικογένειας DAD1, και έδειξαν συνεχή έκφραση της *AtDALL3*, η οποία αυξάνεται στο στάδιο των 4 ημερών, στο βλαστό και στα φύλλα ροζέτας. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με αυτά από την βάση GENEVESTIGATOR, φαίνεται ότι στο ανθικό στάδιο η έκφραση στα φύλλα ροζέτας μειώνεται.

Επαγωγή της έκφρασης της *AtDALL3* έπειτα από αβιοτική καταπόνηση έχει ήδη αναφερθεί (Ellinger & Kubigsteltig, 2010). Επιπλέον, η *AtSBP1* έχει δείξει ότι ρυθμίζει διαφορετικά τα επίπεδα έκφρασης της έπειτα από επίδραση με σεληνώδες νάτριο (Na_2SeO_3) και σεληνικό νάτριο (Na_2SeO_4) (Valassakis *et al.*, 2018), ενώ το κάδμιο (CdCl_2) έχει θετική επίδραση στα επίπεδα έκφρασης της (Sarry *et al.*, 2006; Dutilleul *et al.*, 2008). Καθώς η *AtSBP1* αλληλεπιδρά με την *AtDALL3*, παρουσιάζει ενδιαφέρον ο προσδιορισμός των σχετικών επιπέδων έκφρασης της *AtDALL3* έπειτα από επεξεργασία φυτών με τις συγκεκριμένες χημικές ενώσεις. Για τον σκοπό αυτό μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των *AtSBP1* και *AtDALL3* σε ρίζες αρτιβλάστων φυτών μαρτύρων, καθώς και φυτών έπειτα από επεξεργασία με σεληνίο και κάδμιο. Στην ανάλυση μας τα επίπεδα έκφρασης της *AtDALL3* αυξάνονται οριακά έπειτα από κατεργασία

με σεληνικό νάτριο, ενώ μειώνεται σημαντικά έπειτα από σεληνώδες νάτριο, πρότυπο αντίθετο αυτού της *AtSBP1*, ενώ και τα δύο γονίδια επάγονται σημαντικά παρουσία καδμίου. Τα αποτελέσματα μας λοιπόν, ενισχύουν τις προηγούμενες παρατηρήσεις, ότι η *AtSBP1* ρυθμίζεται διαφορικά από το κάδμιο, το σεληνικό και το σεληνώδες (Agalou *et al.*, 2005; Sarry *et al.*, 2006; Dutilleul *et al.*, 2008; Hugouvioux *et al.*, 2009; Valassakis *et al.*, 2018), αλλά και ότι η ***AtDALL3* συμμετέχει στο δίκτυο γονιδίων που επηρεάζονται από τις συγκεκριμένες χημικές ενώσεις.**

Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* έχει δειχθεί ότι η οξειδωτική καταπόνηση που προκαλείται από έκθεση στο κάδμιο σχετίζεται με συσσώρευση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) (Cho & Seo, 2005), αλλά και ότι η επεξεργασία φυτών με ενώσεις σεληνίου οδηγεί στην συγκέντρωση ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) στις ρίζες (Valassakis *et al.*, 2018). Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η *AtSBP1* εκτός από την συμμετοχή της σε αποκρίσεις καταπονήσεων, είναι μέλος ενός πρωτεϊνικού δικτύου που αποκρίνεται στις οξειδοαναγωγικές μεταβολές του κυττάρου (Valassakis *et al.*, 2018).

Τα βαρέα μέταλλα προκαλούν μεταβολές στην λιπιδική σύσταση του κυττάρου (Urchurch, 2008), μια διαδικασία εξαρτώμενη από την δράση των φωσφολιπασών. Επιπλέον, το κάδμιο και οι ROS μπορούν να οδηγήσουν στην κινητοποίηση πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων και των φωσφολιπασών C και D, παράγοντας δευτερογενή σηματοδοτικά μόρια (Chmielowska-Bak *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2016). Ενδιαφέρον παρουσιάζουν μελέτες που συνδέουν την οξειδωτική καταπόνηση που προκαλείται από το κάδμιο και άλλων βαρέων μετάλλων, με αύξηση της παραγωγής ιασμονικού οξέος (JA) (Mithöfer *et al.*, 2004; Koeduka *et al.*, 2005; Maksymiec *et al.*, 2005; Maksymiec, 2007, 2011), επηρεάζοντας πιθανότατα αναπτυξιακές διαδικασίες (Maksymiec, 2011). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω, μπορεί να γίνει η υπόθεση ότι η **αύξηση της παραγωγής του ιασμονικού οξέος έπειτα από την παρουσία καδμίου, μπορεί να οφείλεται στην *AtDALL3***, για την οποία είναι γνωστό ότι συμμετέχει στη βιοσύνθεση του JA (Rudus *et al.*, 2014).

Η σύνδεση των *AtDALLs* με τον τραυματισμό και τη βιοσύνθεση ιασμονικού είναι ήδη γνωστή (Ellinger *et al.*, 2010; Rudus *et al.*, 2014). Επίσης, είναι γνωστό ότι ο τραυματισμός και τα παθογόνα επάγουν την παραγωγή ιασμονικού. Μελέτες με μικροσυστοιχίες έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης της *AtDALL3* δεν παρουσίασαν σημαντική αλλαγή 30min μετά τον τραυματισμό (Ellinger & Kubigsteltig, 2010), ενώ άλλες μελέτες αποκάλυψαν σημαντική αύξηση 80min μετά τον τραυματισμό (Rudus *et al.*, 2014). Επιπλέον, σε μεταλλάγματα *dall3* τα επίπεδα του ιασμονικού οξέος μειώνονται κατά το μισό (Ellinger *et al.*, 2010). Ο μηχανισμός με τον οποίο συμμετέχει η *AtDALL3* στην επαγωγή του JA από τραυματισμό, δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος, αλλά στοιχεία δείχνουν ότι συμβαίνει με τρόπο ανεξάρτητο των υποδοχέων COI1 και JA (Rudus *et al.*, 2014).

Έτσι, στη συνέχεια δημιουργήθηκε το ερώτημα, πως ο τραυματισμός επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων της *AtSBP* οικογένειας σε σύγκριση με την *AtDALL3*. Τραυματισμένα φύλλα και φύλλα μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση της έκφρασης των *AtDALL3*, *AtSBP1*, *AtSBP2* και *AtSBP3*. Όπως αναμέναμε, η *AtDALL3* παρουσιάζει σημαντική επαγωγή στον τραυματισμό, γεγονός που επιβεβαιώνεται και με προηγούμενες μελέτες (Rudus *et al.*, 2014). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η απόκριση των *AtSBPs*, όπου η έκφραση και των τριών μελών της οικογένειας εμφανίζει στατιστικά σημαντική μείωση. Μια γρήγορη αύξηση των επιπέδων H_2O_2 , γνωστή ως οξειδωτική έκρηξη, λαμβάνει μέρος στους φυτικούς ιστούς έπειτα από τραυματισμό (Zhang *et al.*, 1995; Pastori & Foyer, 2002). Προηγούμενα αποτελέσματα του

εργαστηρίου δείχνουν ότι τουλάχιστον η έκφραση της *AtSBP1* συνδέεται στενά με διαδικασίες αποτοξίνωσης που σχετίζονται με την οξειδωτική καταπόνηση, καθώς επηρεάζεται αρνητικά σε ROS-επαγόμενα φυτά, παρουσία του αντιοξειδωτικού N-ακετυλο κυστεΐνης (NAC) (Valassakis *et al.*, 2018). Παραδείγματα αρνητικής ρύθμισης γονιδίων που είναι αισθητήρες καταπονήσεων έχουν παρατηρηθεί. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι 9 αβιοτικές καταπονήσεις, συμπεριλαμβανομένου κι αυτού του τραυματισμού, προκαλούν μείωση σε χλωροπλαστιδιακές πρωτεΐνες που είτε αποκρίνονται στην αυξίνη (*At3g20220*) είτε ρυθμίζονται από αυτή (*At2g21210*) (Swindell, 2006). Η αρνητική ρύθμιση γονιδίων που αποκρίνονται στην αυξίνη έχει παρατηρηθεί ως απόκριση στην καταπόνηση του τραυματισμού, όχι όμως σε άλλες καταπονήσεις (Cheong *et al.*, 2002). Για την διαπίστωση συσχέτισης τουλάχιστον της *AtSBP1* με την αυξίνη, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασής της μετά από επεξεργασία με διαφορετικές μορφές και συγκεντρώσεις αυξίνης, όπου διαπιστώθηκε η επαγωγή της σε όλες τις περιπτώσεις. Επομένως, μπορούμε να υποθέσουμε ότι **κατά τον τραυματισμό, η αρνητική ρύθμιση των γονιδίων της οικογένειας των SBP αποτελεί μέρος του μηχανισμού σηματοδότησης της καταπόνησης.**

Τέλος, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των *AtSBP1*, *AtSBP2* και *AtSBP3* σε μεταλλάγματα *dall3*. Παρατηρήσαμε λοιπόν, ότι η απουσία της *AtDALL3* οδηγεί σε αύξηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης των *AtSBP1* και *AtSBP2*, ενώ δε παρατηρήθηκε μεταβολή στην *AtSBP3*. Όπως, ήδη έχει αναφερθεί η *AtDALL3* συμμετέχει στη βιοσύνθεση του JA ενώ είδαμε ότι η *AtSBP1* επηρεάζεται από την αυξίνη. Είναι γνωστό επίσης ότι οι ορμόνες βρίσκονται σε ένα περίπλοκο σύστημα αλληλεπιδράσεων ρυθμίζοντας λειτουργίες είτε ανταγωνίζοντας η μία την άλλη είτε δρώντας συνεργατικά. Αντίστοιχα, έχει βρεθεί σύνδεση και για τις ορμόνες αυξίνη και ιασμονικό οξύ (Nagral *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2013; Hentrich *et al.*, 2013). Σύμφωνα με τα παραπάνω φαίνεται ότι τουλάχιστον η ***AtSBP1* συνδέεται με την *AtDALL3*, είτε άμεσα είτε και έμμεσα από τα μονοπάτια σηματοδότησης του ιασμονικού ή/και της αυξίνης.**

4.1.4 Ενεργότητα υποκινητή της *AtDALL3*

Για την μελέτη της επαγωγής του υποκινητή της *AtDALL3* μελετήθηκαν 5 διαδοχικά ελλείμματα της 5'- περιοχής ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής της *AtDALL3*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μικρότερο θραύσμα των 622 pb, μπορεί να θωρηθεί ως ο λειτουργικός υποκινητής της. Η έκφραση του γονιδίου αναφοράς GUS παρατηρήθηκε στον ιστό της ρίζας στον αγωγό κύλινδρο με πιο έντονη χρώση στο ξύλωμα. Στο εναέριο τμήμα του φυτού, χρώση βρέθηκε στα υδατόδια και στο αγωγό σύστημα των κοτυληδόνων και των πρώτων φύλλων, καθώς και στα στόματα. Επιπρόσθετα, χρώση GUS παρατηρήθηκε και στο στίγμα των ανθέων και στο αγγειακό σύστημα των στηλών των ανθών και των ωοθηκών.

Το παραπάνω πρότυπο έκφρασης φαίνεται να **ταυτίζεται με αυτό του υποκινητή της *AtSBP1*** (Valassakis *et al.*, 2018) υποδηλώνοντας την συνύπαρξη των μετάγραφων της *AtDALL3* και *AtSBP1*. Τα υδατόδια επιτρέπουν την μεταφορά του νερού (Candela *et al.*, 1999) και αποτελούν τις πρωταρχικές θέσεις παραγωγής υψηλών επιπέδων αυξίνης στα πρωταρχικά στάδια ανάπτυξης των φύλλων (Aloni *et al.*, 2003). Στο καλαμπόκι, σε *in vivo* μελέτες φάνηκε ότι μια φωσφολιπάση A εμπλέκεται στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος της αυξίνης για την επιμήκυνση του κολεόπτου (Yi *et al.*, 1996). Σε αυτό το σύστημα, η φωσφολιπάση A προτάθηκε ότι ενεργοποιείται από την αυξίνη και τα προϊόντα της ενζυμικής της δράσης, λυσοφωσφολιπίδια και λιπαρά οξέα, προκαλούν την μείωση του pH του αποπλάστη μέσω ενεργοποίησης αντλίων-H⁺ (Yi *et al.*, 1996).

Όπως ήδη αναφέρθηκε οι ορμόνες συνεργάζονται με ποικίλους τρόπους και εμπλέκονται σε πολλές λειτουργίες. Η αυξίνη και το ιασμονικό οξύ μπορεί να λειτουργήσουν συνεργατικά ή ανταγωνιστικά στις συστημικές λειτουργίες. Υπάρχουν μελέτες που παρουσιάζουν την ικανότητα μερικών φωσφολιπασών A να επάγονται από την αυξίνη (Paul *et al.*, 1998; Scherer *et al.*, 2007), και τα λιπαρά οξέα και λυσοφωσφοπλίδια που παράγονται από την δράση τους, να δρουν ως πιθανοί δευτερογενείς σηματοδότες στην δράση της αυξίνης (Paul *et al.*, 1998). Γενικά, **οι φωσφολιπάσες A έχουν προταθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση των αποκρίσεων της αυξίνης** (Labusch *et al.*, 2013). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι **γονίδια που σχετίζονται με την αυξίνη και το ιασμονικό οξύ συνεργάζονται για το σχηματισμό ενός λειτουργικού και γόνιμου άνθους** (Ghelli *et al.*, 2018). Ειδικότερα, η ανάπτυξη του άνθους του *Arabidopsis* είναι μια διαδικασία που ελέγχεται από την αυξίνη, η οποία ρυθμίζει τα γονίδια ARF, μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού μέχρι στιγμής. Τα γονίδια ARF6 και ARF8 έμμεσα ενεργοποιούν το γονίδιο *DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE1 (DAD1)*, το οποίο αποτελεί το πρώτο γονίδιο στη βιοσύνθεση του JA (Nagpal *et al.*, 2005; Tabata *et al.*, 2010; Ghelli *et al.*, 2018).

Επιπρόσθετες μελέτες πραγματοποιήθηκαν για την μελέτη της επίδρασης χημικών ενώσεων καδμίου και σεληνίου στην ενεργότητα του υποκινητή της *AtDALL3*. Αρχικά, παρατηρήθηκε αλλαγή στο πρότυπο έκφρασης παρουσία σεληνίου. Συγκεκριμένα, το πρότυπο επεκτάθηκε κατά μήκος του αγωγού κυλίνδρου της ρίζας, ενώ εντοπίστηκε και στο ακρόριζο της κεντρικής ρίζας και των πλάγιων ριζών. Η μελέτη της ποσοτικοποίησης της ενεργότητας του υποκινητή παρουσίασε έντονη επαγωγή παρουσία και των τριών ενώσεων, με μεγαλύτερη αυτή παρουσίας καδμίου. Τα παραπάνω ενισχύουν την θεωρία ότι η ***AtDALL3* εμπλέκεται στο δίκτυο των πρωτεϊνών απόκρισης σε σελήνιο και κάδμιο**.

4.1.5 Υποκυτταρικός εντοπισμός

Για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της *AtDALL3* παράχθηκαν σειρές μόνιμων μετασηματισμένων φυτών με *35S::AtDALL3::EYFP*. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι οι ιστοί που ήταν αρνητικοί στη χρώση GUS, ήταν θετικοί στην χιμαιρική φθορίζουσα πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα, φθορίζον σήμα εντοπίστηκε στα πλαστίδια της κορυφαίας περιοχής της ρίζας, στα πλαστίδια της κεντρικής ρίζας και στα πλαστίδια των πλάγιων ριζών. Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι **η ώριμη πρωτεΐνη *AtDALL3* μεταφέρεται στους συγκεκριμένους τύπους κυττάρων**. Ταύτιση γονιδιακής έκφρασης και υποκυτταρικού εντοπισμού παρατηρήθηκε στα καταφρακτικά κύτταρα των στομάτων, όπου η *AtDALL3* εντοπίζεται στους χλωροπλάστες που περιβάλλουν τον πυρήνα αυτών των κυττάρων. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της *AtDALL3* αφορούν κυρίως παροδικό μετασηματισμό κυττάρων. Τα αποτελέσματά τους όμως ενισχύουν τις παρατηρήσεις μας για **πλαστιδιακό εντοπισμό** (Seo *et al.*, 2009; Grienberger *et al.*, 2010).

4.1.6 Ανάλυση αλληλεπιδράσεων

Μελέτες για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της SBP στον άνθρωπο έχουν αναφέρει τον κυτταροπλασματικό και πυρηνικό εντοπισμό της (Chang *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2009), ενώ έχει εντοπιστεί και σε κυστίδια Golgi (Porat *et al.*, 2000). Στους φυτικούς οργανισμούς η έκφρασή της έχει εντοπιστεί σε μεμβρανικά κυστίδια (Flemetakis *et al.*, 2002) αλλά και στο κυτταρόπλασμα (Luo *et al.*, 2020). Όμως στο φυτό *Arabidopsis thaliana* δείχθηκε, ότι οι *AtSBPs* εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και

τον πυρήνα, στο σύστημα πρωτοπλαστών, όπου απομονώθηκαν πρωτοπλάστες από μόνιμα μετασηματισμένα φυτά που φέρουν το αντίστοιχο γονίδιο σε μεταφραστική σύντηξη με EYFP. Για να διαλευκάνουμε τον υποκυτταρικό εντοπισμό της AtDALL3 στο αντίστοιχο σύστημα, ακολούθησε ο παροδικός μετασηματισμός πρωτοπλαστών μεσόφυλλου με την κατασκευή 35S::AtDALL3::EYFP, όπου φάνηκε να εντοπίζεται σε σφαιρικές δομές που εφάπτονται στους χλωροπλάστες. Οι σφαιρικές αυτές δομές που εφάπτονται στους χλωροπλάστες έχουν παρατηρηθεί ξανά σε μελέτες για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της στο ετερόλογο σύστημα καπνού, όπου η AtDALL3 και AtDALL4 μελετήθηκαν ως φωσφολιπάσες που επάγονται στην φυτική άμυνα (Grienenberger *et al.*, 2010). Επιπλέον, όμοιες δομές παρατηρήθηκαν στις μελέτες υποκυτταρικού εντοπισμού και άλλων χλωροπλαστιδιακών πρωτεϊνών της DAD1 οικογένειας, όπως η DGL (Hyun *et al.*, 2008; Ellinger *et al.*, 2010) και η DAD1 (Hyun *et al.*, 2008).

Στο σύστημα ζύμης δύο υβριδίων δείχθηκε η ικανότητα της AtDALL3 να αλληλεπιδρά με τις AtSBP1, AtSBP2 και AtSBP3, αλλά και ότι τα πρώτα 178 αμινοξέα της AtSBP1 παρουσιάζουν ισχυρή και πλήρη ικανότητα αλληλεπίδρασης με την AtDALL3. Για την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης σε ένα *in planta* σύστημα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της συμπληρωματικότητας διμοριακού φθορισμού (Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC) σε πρωτοπλάστες *Arabidopsis* (Kerppola, 2008; Lee *et al.*, 2008). Έτσι στο σύστημα πρωτοπλαστών μεσόφυλλου, η AtSBP1 αλληλεπιδρά σε σφαιρικές δομές που εφάπτονται με τους χλωροπλάστες, ενώ παρόμοιες δομές εμφανίζουν και οι αλληλεπιδράσεις της AtDALL3 με τις AtSBP2 και AtSBP3. Επομένως, οι αλληλεπιδράσεις που παρατηρήθηκαν στο σύστημα ζύμης μπορούν και πραγματοποιούνται και *in planta*.

Επιπλέον, διερευνήθηκαν οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις και σε ομόλογο σύστημα απουσίας χλωροπλαστών, δηλαδή σε πρωτοπλάστες που απομονώθηκαν από ρίζες του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Το πρότυπο που παρατηρήθηκε για τις αλληλεπιδράσεις είναι το ίδιο με αυτό που παρατηρήθηκε στους πρωτοπλάστες ρίζας από μόνιμα μετασηματισμένα φυτά 35S::AtDALL3::EYFP και εντοπίζεται στα πλαστίδια.

Οι φωσφολιπάσες της τάξης I της οικογένειας λιπασών όμοιες με DAD1 έχουν χαρακτηριστεί ως χλωροπλαστιδιακές (Seo *et al.*, 2009). Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με τις προηγούμενες μελέτες για χλωροπλαστιδιακή στόχευση, παρατηρήθηκε όμως, ότι η έκφραση εντοπίζεται ειδικότερα σε σφαιρικές δομές που εφάπτονται τους χλωροπλάστες. Τέτοιες δομές έχουν περιγραφεί για πρωτεΐνες που εντοπίζονται στην εξωτερική μεμβράνη των χλωροπλαστών (Ruppel *et al.*, 2011; Machettira *et al.*, 2012) και για πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο χώρο μεταξύ της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης του χλωροπλαστιδιακού φακέλου (Ruppel *et al.*, 2011). Για την περαιτέρω διερεύνηση του εντοπισμού της AtDALL3 χρησιμοποιήθηκε ένας διαδικτυακός αλγόριθμος πρόβλεψης χλωροπλαστιδιακού εντοπισμού, LNP-Chlo (Wan *et al.*, 2016), που αποκάλυψε τον εντοπισμό της στον **χλωροπλαστιδιακό φάκελο**. Επομένως, μπορούμε να υποθέσουμε ότι εκεί εντοπίζονται και οι αλληλεπιδράσεις της με τις AtSBPs.

4.2 Η πρωτεάση AtRD19c

4.2.1 Ιστοειδική έκφραση

Για την μελέτη της επαγωγής του υποκινητή της AtRD19c μελετήθηκαν 4 διαδοχικά ελλείμματα της 5'- περιοχής ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής της AtRD19c. Τα αποτελέσματα έδειξαν

διαφορές στο πρότυπο έκφρασης μεταξύ των δύο μικρότερων ελλειμμάτων. Συγκεκριμένα, και στα δύο ελλείμματα η έκφραση του γονιδίου αναφοράς GUS παρατηρήθηκε στον αγωγό κύλινδρο της ρίζας, στα υδατόδια, στα στόματα και στο αγωγό σύστημα των κοτυληδόνων και των πρώτων φύλλων, καθώς και στις τρίχες των πρώτων φύλλων. Διαφορά διαπιστώθηκε στις πλάγιες ρίζες και στο ακρόριζο αυτών, στα σέπαλα των ανθέων και στους στήμονες, όπου απουσιάζει από το PR-RD19c-DEL3.

Στη συνέχεια, εντοπίσαμε τα ρυθμιστικά μοτίβα της περιοχής που απουσιάζει από το θραύσμα PR-RD19c-DEL3, δηλαδή την περιοχή -428bp με -177bp με τη χρήση της βάσης δεδομένων PlantCARE (Lescot *et al.*, 2002). Στη συγκεκριμένη περιοχή εντοπίστηκαν μοτίβα που σχετίζονται με αποκρίσεις στο αποκοπτικό οξύ (ABRE, MYC), στη ξηρασία (MYC), στο φως (G-box), καθώς και το μοτίβο as-1 (activation sequence 1) που έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με την έκφραση στη ρίζα (Elmayan & Terfer, 1995; Dey & Maiti, 1999; Vijaybhaskar *et al.*, 2008; Banerjee *et al.*, 2015). Επιπλέον, το ρυθμιστικό στοιχείο MYC έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη των ανθέων στο ρύζι αλλά και στο φυτό *Arabidopsis* (Sorensen *et al.*, 2003; Boter, 2004; Wei *et al.*, 2018; Acosta & Przybyl, 2019). Από τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η διαφορά στο πρότυπο έκφρασης στο ριζικό σύστημα οφείλεται στην απουσία του **as-1** στοιχείου από το PR-RD19c-DEL3 θραύσμα του υποκινητή, ενώ στην περίπτωση των ανθέων η απουσία του **MYC** πιθανότατα οδηγεί στη μη χρώση των σεπάλων και ανθήρων.

Τέλος, βάση των παραπάνω παρατηρήσεων μπορούμε να υποθέσουμε ότι το θραύσμα **PR-RD19c-DEL2 (428bp)** μπορεί να θεωρηθεί ως ο λειτουργικός υποκινητής του γονιδίου **AtRD19c**, επάγοντας την έκφραση στον αγωγό κύλινδρο της ρίζας και των πλάγιων ριζών, στο ακρόριζο των πλάγιων ριζών, στο αγωγό σύστημα, τα στόματα και τα υδατόδια των κοτυληδόνων και των φύλλων, καθώς και στις τρίχες των φύλλων.

Το παραπάνω πρότυπο έκφρασης φαίνεται να **ταυτίζεται με αυτό του υποκινητή της AtSBP1** (Valassakis *et al.*, 2018) υποδηλώνοντας την συνύπαρξη των μετάγραφων της **AtRD19c** και **AtSBP1**. Τα υδατόδια επιτρέπουν την μεταφορά του νερού (Candela *et al.*, 1999) και αποτελούν τις πρωταρχικές θέσεις παραγωγής υψηλών επιπέδων αυξίνης στα πρωταρχικά στάδια ανάπτυξης των φύλλων (Aloni *et al.*, 2003). Επιπλέον, δεδομένα από το GENENVESTIGATOR δείχνουν πως τα επίπεδά της επάγονται παρουσία αυξίνης.

4.2.2 Φυλογενετική ανάλυση

Η φυλογενετική ανάλυση της υποοικογένειας RD19A, πραγματοποιήθηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να αποκλειστούν, όσο των δυνατών περισσότερες πρωτεάσες που δεν ανήκουν σε αυτή την υποοικογένεια, γεγονός δύσκολο καθώς τα μέλη της οικογένειας των πρωτεασών κυστεΐνης όμοιων με παπαΐνες παρουσιάζουν μεγάλες ομοιότητες στην αμινοξική τους αλληλουχία. Παρά όλα αυτά, παρατηρούμε την ομαδοποίηση των RD19D πρωτεασών, ενώ οι υπόλοιπες δε φαίνεται να παρουσιάζουν κάποιο διαχωρισμό. Επιπλέον, η **RD19D ομάδα φαίνεται να είναι πρόδρομη όλων των υπόλοιπων πρωτεασών της οικογένειας αυτής.**

4.2.3 Γονιδιακή έκφραση

Τα αποτελέσματα από την μελέτη των επιπέδων έκφρασης στη ρίζα παρουσία σεληνίου και καδμίου έδειξαν ότι, έπειτα από κατεργασία με σεληνώδες νάτριο η έκφραση αυξάνεται, ενώ παρουσία σεληνικού τα επίπεδα μειώνονται σημαντικά. Επίσης, το κάδμιο δε προκάλεσε κάποια μεταβολή.

Μελέτες των πρωτεασών κυστεΐνης όμοιες με παπαΐνη (Papain-Like Cysteine Proteases, PLCPs) έχουν συνδέσει τις πρωτεάσες με την επαγωγή τους σε αβιοτικές καταπονήσεις (Liu *et al.*, 2018). Επίσης, πρόσφατες μελέτες έχουν αποκαλύψει την συμμετοχή των PLCPs στην καταπόνηση από βαρέα μέταλλα, μέσω της διαδικασίας του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Programmed Cell Death, PCD) (Sychta *et al.*, 2020). **Βάσει των παραπάνω φαίνεται ότι η AtRD19c συμμετέχει στο πρωτεϊνικό δίκτυο απόκρισης στο σελήνιο και πιθανότατα επάγοντας PCD.**

4.2.4 Υποκυτταρικός εντοπισμός

Για τον υποκυτταρικό εντοπισμό χρησιμοποιήθηκαν μόνιμα μετασηματισμένα φυτά που φέρουν την κατασκευή 35S::RD19c::EYFP. Αυτά παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο, όπου διαπιστώθηκε ο εντοπισμός τους στις τρίχες φύλλων, στη ρίζα, στην ακραία περιοχή του ακρόριζου και στις πλάγιες ρίζες. Επιπλέον, για να διερευνηθεί περαιτέρω ο εντοπισμός αυτός, έγινε χρώση αυτών με την χρωστική SynaptoRed, η οποία έπειτα από μία ώρα χρωματίζει κυστίδια και εσωτερικές μεμβράνες που προκύπτουν από τη διαδικασία της ενδοκύττωσης. Από αυτή τη διαδικασία προέκυψε επικάλυψη των προτύπων. Με σκοπό την καλύτερη απεικόνιση του εντοπισμού της πρωτεάσης απομονώθηκαν κύτταρα ρίζας αυτών των μόνιμα μετασηματισμένων φυτών, όπου παρατηρήθηκαν ιδιαίτερα πρότυπα και φάνηκε να εντοπίζεται σε εσωτερικούς μεμβρανικούς σχηματισμούς. Επιπλέον, έγινε και σε αυτά χρώση με SynaptoRed όπου τα φθορίζοντα πρότυπα που παρατηρήθηκαν παρουσίασαν επικάλυψη επομένως, **η AtRD19c πρόκειται για κυστιδιακή πρωτεΐνη.** Τα αποτελέσματά μας φαίνεται να συμφωνούν με προηγούμενες πρωτεομικές μελέτες που την εντόπισαν σε κυστίδια (Carter *et al.*, 2004; Endler *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2013), αλλά και με αυτή των Bernoux και συνεργατών που την εντόπισαν στο ετερόλογο σύστημα του καπνού αντίστοιχα σε κυστίδια (Bernoux *et al.*, 2008).

4.2.5 Ανάλυση αλληλεπίδρασης

Στο σύστημα ζύμης δύο υβριδίων δείχθηκε η ικανότητα της AtRD19c να αλληλεπιδρά με την AtSBP1 καθώς επίσης κι ότι τα πρώτα 178 αμινοξέα της AtSBP1 παρουσιάζουν ισχυρή και πλήρη ικανότητα αλληλεπίδρασης με αυτή. Για την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης σε ένα *in planta* σύστημα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της συμπληρωματικότητας διμοριακού φθορισμού (Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC) σε πρωτοπλάστες *Arabidopsis* (Kerppola, 2008; Lee *et al.*, 2008). Έτσι, στο σύστημα πρωτοπλάστων μεσόφυλλου, η AtRD19c αλληλεπιδρά στο κυτταρόπλασμα. Επομένως, οι αλληλεπιδράσεις που παρατηρήθηκαν στο σύστημα ζύμης μπορούν και πραγματοποιούνται και *in planta*.

Η AtRD19c είναι ένζυμο που υδρολύει πρωτεΐνες και αλληλεπιδρά με της AtSBP1 στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που υποδεικνύει την **συμμετοχή της AtSBP1 σε διαδικασίες αποικοδόμησης πρωτεϊνών.** Παρόμοια συμμετοχή έχει βρεθεί και για την ομόλογη της στον άνθρωπο, όπου έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με την von Hippel-Lindau protein (pVHL)-interacting deubiquitinating enzyme 1 (VDU1), συστατικό του μονοπατιού αποικοδόμησης πρωτεϊνών μέσω ουβικιτίνωσης/απο-ουβικιτίνωσης (Jeong *et*

al., 2009). Επίσης, η HsSBP1 έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με διαδικασίες μεταφοράς πρωτεϊνών μεταξύ των δεξαμενών Golgi (Intra-Golgi transport) (Porat *et al.*, 2000), επομένως έχει υπάρξει σύνδεση της με κυτταρικές δομές.

4.3 Γλουταρεδοξίνες

4.3.1 Μελέτη αλληλεπίδρασης AtGRXS14 με AtSBP1

Αρχικά, στο σύστημα ζύμης δύο υβριδίων φάνηκε ότι η AtSBP1 αλληλεπιδρά με την AtGRXS14, όπως και η AtGRXS16. Επιπλέον προσδιορίστηκε στο ίδιο σύστημα, ότι τα πρώτα 178 αμινοξέα της AtSBP1 είναι απαραίτητα και ικανά για να αλληλεπιδράσουν με την AtGRXS14. Επιπλέον, για την μελέτη της αλληλεπίδρασης κατασκευάστηκε ένα θεωρητικό μοντέλο της AtSBP1, το οποίο συμφωνεί με την λυμένη δομή της ορθόλογης της στο αρχαίο *Sulfolobus tokodaii* (PDB: [2ECE](#)). Συγκεκριμένα, β-κλώνι σχηματίζουν μια β-προπέλα με εφτά λεπίδες που περικλύονται από α-έλικες. Η τριτοταγής δομή της γλουταρεδοξίνης AtGRXS14 είναι γνωστή και αποτελείται από τέσσερις παράλληλους κλώνους που πλαισιώνονται από πέντε α-έλικες (PDB:[3IPZ](#)) (Li *et al.*, 2010). Στη συνέχεια, με Ανάλυση Μοριακής Αγκυροβόλησης φάνηκε ότι τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση είναι 101-106, 160-163, 182, 184-186, 191-192, 194, 196-197, 212, 214, 250-252, 254 και 490 της AtSBP1, ενώ της AtGRXS14 65-66, 89, 96-99, 120, 126-127, 130-131, 134-138 και 152. Το σύμπλοκο σταθεροποιείται από ένα δίκτυο υδρογονικών δεσμών, που σχηματίζονται μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων των αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών. Επιπλέον, τα κατάλοιπα Asp103, Glu163 και Lys214 της AtSBP1 σχηματίζουν δεσμούς αλάτων με τα κατάλοιπα Lys89, Lys130 και Asp152 της AtGRXS14, αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα της μοριακής αγκυροβόλησης ενισχύουν τα πειραματικά αποτελέσματα από το σύστημα ζύμης δύο υβριδίων, τα οποία δείχνουν την σημαντικότητα της αμινοξικής περιοχής της AtSBP1 για την αλληλεπίδραση με την AtGRXS14 και επιπρόσθετα, επισημαίνεται ο ρόλος ολόκληρης της αλληλουχίας της AtSBP1 για την αλληλεπίδραση, καθώς το καρβοξυτελικό άκρο (κατάλοιπο 490) είναι μέλος της προβλεπόμενης αλληλεπιδρώσας επιφάνειας.

Βασιζόμενοι στο γεγονός ότι συγκεκριμένα κατάλοιπα της AtGRXS14, όπως Lys89, Lys130 και Asp152 συμμετέχουν στη δέσμευση με την γλουταθειόνη (GSH), θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η **GSH ανταγωνίζεται την AtGRXS14 για την δέσμευση με την AtSBP1**, καθώς υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η SBP1 μπορεί να λειτουργεί στην αποτοξίνωση από το κάδμιο (Duttilleul *et al.*, 2008), ενεργώντας παράλληλα με την GSH και τις φυτοχλατίνες.

4.3.2 Υποκυτταρικός εντοπισμός και *in planta* αλληλεπιδράσεις της AtRD19c

Ήδη αναφέρθηκε πως οι AtSBPs εντοπίζονται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα σε πρωτοπλάστες μεσόφυλλου μόνιμα μετασχηματισμένων φυτών με 35S::AtSBPs::EYFP. Αντίστοιχα, για τις γλουταρεδοξίνες AtGRXS14 και AtGRXS16 δείξαμε σε ανάλογο σύστημα ότι η AtGRXS14 εντοπίζεται στους χλωροπλάστες με ένα σικτό πρότυπο, ενώ η AtGRXS16 το φθορίζον σήμα εντοπίστηκε στους χλωροπλάστες με ένα πιο διάχυτο πρότυπο.

Χλωροπλαστιδιακός εντοπισμός των GrxS14 και GrxS16 του φυτού *Populus trichocarpa* έχει δειχθεί στο ετερόλογο σύστημα καπνού με παροδικό μετασχηματισμό φύλλων του, όπου εντοπίστηκαν στους χλωροπλάστες των καταφρακτικών κυττάρων των στομάτων (Bandyopadhyay *et al.*, 2008). Επιπρόσθετα, παροδικός μετασχηματισμός της κατασκευής AtGRXS16::GFP στο μεσόφυλλο των φύλλων καπνού έδειξε χλωροπλαστιδιακό εντοπισμό (Liu *et al.*, 2013). Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με τις προαναφερθείσες μελέτες, αλλά στο ομόλογο σύστημα της *Arabidopsis* αποκαλύπτεται και ένα καινούργιο πρότυπο, όσον αφορά την AtGRXS14.

Όσον αφορά την αλληλεπίδραση των παραπάνω πρωτεϊνών με την AtSBP1, αποδείξαμε ότι μπορεί να συμβεί *in planta* και συγκεκριμένα, στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα για την AtGRXS14, ενώ μόνο στο κυτταρόπλασμα με την AtGRXS16. Μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι γλουταρεδοξίνες προτού μεταφερθούν στους χλωροπλάστες παραμένουν στο κυτταρόπλασμα για να αλληλεπιδράσουν με την AtSBP1, ή ακόμα και στον πυρήνα για την AtGRXS14. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι υπάρχουν συγκεκριμένοι κυτταροπλασματικοί παράγοντες, όπως είναι οι πρωτεΐνες 14-3-3, Hsp70, Hsp90 και FKBP που δεσμεύονται σε συγκεκριμένα πεπτίδια και θεωρούνται ότι διευκολύνουν την χλωροπλαστιδιακή στόχευση (May & Soll, 2000; Qbadou *et al.*, 2006; Fellerer *et al.*, 2011).

Οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν σελήνιο έχουν ήδη συνδεθεί με τον οξειδοαναγωγικό έλεγχο του κυττάρου (Valassakis *et al.*, 2018), ενώ οι γλουταρεδοξίνες έχουν χαρακτηριστεί ως ένα σύστημα ανίχνευσης των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS), που παράγονται σε καταπονήσεις (Li, 2014). Ειδικότερα, η AtGRXS14 έχει δειχθεί ότι έχει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των χλωροπλάστων (Cheng *et al.*, 2006). Επομένως, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι οι αλληλεπιδράσεις των γλουταρεδοξινών με την AtSBP1 αποτελούν μέρος του **πρωτεϊνικού δικτύου που σχετίζεται με αποκρίσεις στην οξειδωτική καταπόνηση**.

Επιπλέον, και οι δύο μελετώμενες γλουταρεδοξίνες έχει δειχθεί ότι συμμετέχουν στη βιοσύνθεση συμπλεγμάτων Fe-S στους χλωροπλάστες και μέσω αυτών συμμετέχουν στην ομοιόσταση του σιδήρου (Bandyopadhyay *et al.*, 2008; Rouhier, 2010; Couturier *et al.*, 2011). Επιπρόσθετα, ενδιαφέρον παρουσιάζει η πρωτεΐνη cpNifS, η οποία είναι απαραίτητη και αυτή για τον σχηματισμό συμπλόκων Fe-S στους χλωροπλάστες, ενώ διαθέτει και δράση λυάσης της σεληνοκυστεΐνης, απελευθερώνοντας στοιχειακό σελήνιο (Van Hoewyk *et al.*, 2008). Έτσι, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι και οι AtGRXS14 και AtGRXS16 εμπλέκονται με παρόμοιο μηχανισμό ή σε συνεργασία με την cpNifS για την **απομάκρυνση του σεληνίου που δεσμεύει η AtSBP1**.

4.4 Το αλλεργιογόνο AtSAH7

4.4.1 Γονιδιακή έκφραση

Η έκφραση του αλλεργιογόνου AtSAH7 παρουσιάζει μια συνεχή έκφραση με μέγιστο στις κοτυληδόνες και στο βλαστό χωρίς όμως σημαντικά στατιστική διαφορά ενώ ελάχιστη παρουσιάζεται στα φύλλα ροζέτας.

Τα αποτελέσματα από την μελέτη των επιπέδων έκφρασης στη ρίζα παρουσία σεληνίου και καδμίου έδειξαν ότι, έπειτα από κατεργασία με σεληνώδες νάτριο η έκφραση αυξάνεται σημαντικά, ενώ

παρουσία σεληνικού και καδμίου δε παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή. Επομένως, **το αλλεργιογόνο αυτό συμμετέχει στο δίκτυο αποκρίσεων που σχετίζεται με το σεληνώδες νάτριο.**

4.4.2 Υποκυτταρικός εντοπισμός και *in planta* αλληλεπιδράσεις της AtSAH7

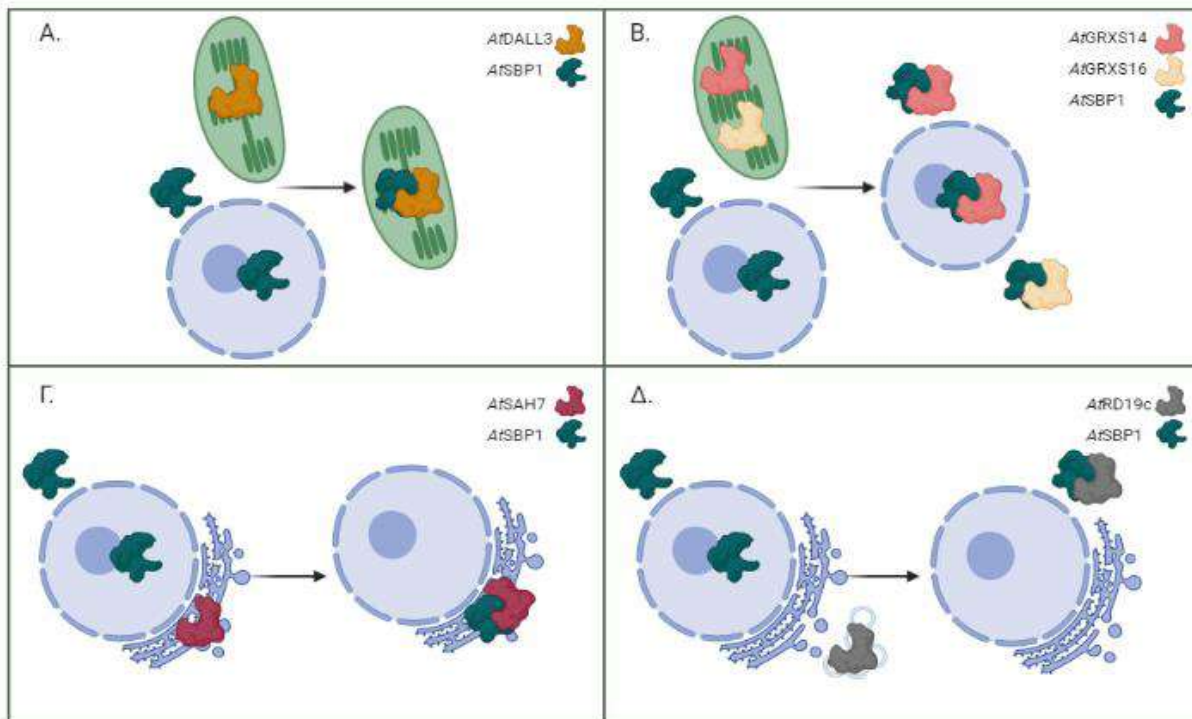
Η μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού στο σύστημα πρωτοπλαστών αποκάλυψε φθορίζον σήμα σε μια δομή όμοια με πέταλο που περιβάλλει τον πυρήνα, υποδηλώνοντας ότι πρόκειται για μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Σύγκριση του προτύπου των πρωτοπλαστών που μετασηματίστηκαν για ενδοπλασματική στόχευση, δείχνει την επικάλυψη των προτύπων με αυτό της AtSAH7 να παρουσιάζει ένα πολύ εξειδικευμένο μοτίβο. Μελέτες που αφορούν το αλλεργιογόνο Ole e 1 της ελιάς αλλά και άλλων μελών της οικογένειας έχουν παρουσιάσει την στόχευσή τους στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (Martín-Orozco *et al.*, 1994; Rodríguez-García *et al.*, 1995a; b; Alché *et al.*, 1999, 2004). Έτσι, σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα αλλά και το γεγονός ότι η AtSAH7 ανήκει στην οικογένεια Ole e 1, μπορούμε να θεωρήσουμε **το αλλεργιογόνο αυτό ότι εντοπίζεται στο Αδρό Ενδοπλασματικό Δίκτυο.**

Όσον αφορά την *in planta* αλληλεπίδραση του αλλεργιογόνου με την AtSBP1 φάνηκε πως οι δυο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν ισχυρά. Η αλληλεπίδραση φάνηκε να πραγματοποιείται σε δομές πλησίον του πυρήνα που στο μεσόφυλλο φαίνονται ως κυστίδια, ενώ στους πρωτοπλάστες ρίζας, αν και φέρουν πυρηνικό εντοπισμό, οι αλληλεπιδράσεις που παρατηρήθηκαν δεν εμφάνισαν αυτόν τον εντοπισμό. Το γεγονός αυτό αν και θα μπορούσε να είναι τυχαίο, μπορεί να υποδηλώνει ότι **η αλληλεπίδραση λαμβάνει χώρα κατά την διαδικασία απόπτωσης του κυττάρου, ή ότι αυτή οδηγεί στην απόπτωση με κάποιον μέχρι στιγμής άγνωστο μηχανισμό.**

4.5 Συμπεράσματα

Η Selenium-binding protein 1 φαίνεται ότι συμμετέχει σε ένα πρωτεϊνικό δίκτυο με σκοπό την απόκριση σε καταπονήσεις. Σε αυτό το πρωτεϊνικό δίκτυο συμμετέχουν μέχρι στιγμής εκτός της AtSBP1, μια αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης χωρίς τη δραστηριότητα φωσφορυλίωσης εξαρτώμενη από NADP (ALDH11A3), η οποία παλιότερα είχε χαρακτηριστεί ως GAPDH, την αλδολάση 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης (FBA1/FBA2), δυο γλουταρεδοξίνες (GRXS14 και GRXS16), μια φωσφολιτάση (DALL3) και ένα αλλεργιογόνο (SAH7). Πρόκειται για πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε διαδικασίες γλυκόλυσης και γλυκονεογένεσης, οξειδοαναγωγικού ελέγχου, βιοσύνθεση ορμονών και μεταβολισμό φωσφολιπιδίων.

Η AtSBP1 αν και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα, παρατηρήθηκε πως ο εντοπισμός της μπορεί να μεταβληθεί για να αλληλεπιδράσει με άλλες πρωτεΐνες, όπως παρατηρήθηκε στην περίπτωση της φωσφολιπάσης και του αλλεργιογόνου (Εικόνα 4.5.1 Α, Γ). Συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση της με την φωσφολιπάση εντοπίστηκε στους χλωροπλάστες, όπου αρχικά εντοπίζεται η AtDALL3 (Εικόνα 4.5.1 Α). Εκεί πιθανότατα, επάγεται η μεταβολή της μεμβρανικής τους σύστασης αλλά και η παραγωγή του ιασμονικού οξέος, καθώς η φωσφολιπάση συμμετέχει στην βιοσύνθεσή του.



Εικόνα 4.5.1: Σχηματική απεικόνιση των υποκυτταρικών εντοπισμών των μελετώμενων πρωτεϊνών και των αλληλεπιδράσεων τους. Α. *AtDALL3*, Β. *AtGRXS14* και *AtGRXS16*, Γ. *AtSAH7*, Δ. *AtRD19c*. Δημιουργήθηκε με την διαδικτυακή εφαρμογή BioRender (<https://biorender.com/>).

Η πρωτεάση βρέθηκε να αλληλεπιδρά με την *AtSBP1* στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 4.5.1 Δ). Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να οδηγεί στην πρωτεόλυση άλλων πρωτεϊνών έπειτα από καταπονήσεις με σκοπό την παραγωγή κι άλλων μορίων που δρουν ως δευτερογενή σηματοδοτικά μόρια. Επιπλέον, είναι πιθανό να οδηγεί στη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, έπειτα από έντονες καταπονήσεις.

Τέλος, η γλουταρεδοξίνη *AtGRXS14* με την *AtSBP1* εντοπίστηκε στον πυρήνα υποδηλώνοντας την πιθανή συμμετοχή του συμπλόκου στην μεταγραφική ρύθμιση άλλων γονιδίων (Εικόνα 4.5.1 Β). Επιπλέον, αυτή η αλληλεπίδραση όπως και αυτή που αφορά στην *AtGRXS16* ανιχνεύθηκε στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 4.5.1 Β). Οι γλουταρεδοξίνες μεταφέρουν ηλεκτρόνια από τη γλουταθειονη σε κατάλοιπα κυστεΐνης. Η *AtSBP1* διαθέτει το μοτίβο CSSC το οποίο έχει συνδεθεί και με οξειδωτική δράση. Έτσι, οι γλουταρεδοξίνες μπορούν να ανακυκλώνουν την SBP1 με σκοπό την επαναχρησιμοποίηση της για οξείδωση άλλων πρωτεϊνών.

Αντίστοιχα, η αλληλεπίδραση με τη *AtSAH7* παρατηρήθηκε σε μεμβρανική δομή που περιβάλλει τον πυρήνα και φαίνεται να είναι το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (Εικόνα 4.5.1 Γ). Παρά όλα αυτά, καμία λειτουργία δεν είναι γνωστή σχετική με το αλλεργιογόνο. Λόγω του υποκυτταρικού του εντοπισμού, μπορούμε να υποθέσουμε ότι επάγει μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις άλλων πρωτεϊνών ή συμμετέχει στις διαδικασίες μεταφοράς πρωτεϊνών μέσω κυστιδίων. Η τελευταία υπόθεση συνδέεται και με άλλες παρατηρήσεις που αφορούν την SBP που την έχουν συνδέσει με διαδικασίες μεταφοράς πρωτεϊνών

(Porat *et al.*, 2000), ενώ η απουσία του πυρηνικού εντοπισμού στη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μπορεί να υποδηλώνει ότι η αλληλεπίδραση οδηγεί στη διαδικασία της απόπτωσης.

Επομένως, εντοπίσαμε ένα νέο πρωτεϊνικό δίκτυο στο οποίο η SBP1 κατέχει κυρίαρχο ρόλο και φαίνεται να σχετίζεται με την απόκριση σε οξειδωτική καταπόνηση, καθώς και οι πρωτεΐνες που μελετήσαμε αποκρίνονται στη παρουσία τουλάχιστον του σεληνώδους, επίδραση που οδηγεί σε μεταβολή του οξειδωτικού περιεχομένου. Επιπλέον, η δράση της SBP1 μπορεί να σχετίζεται με την πιθανή της ενεργότητα ως οξειδάση της μεθανοθειόλης.

4.6 Μελλοντικοί στόχοι

Η περαιτέρω μελέτη των πρωτεϊνών που δεσμεύουν σελήνιο αποτελεί αναγκαία συνθήκη για την κατανόηση του πρωτεϊνικού δικτύου στο οποίο ανήκουν. Η δημιουργία μεταλλαγμάτων καταστολής και των τριών πρωτεϊνών που δεσμεύουν σελήνιο (*sbp1sbp2sbp3*) με τη μέθοδο CRISPR/Cas9 θα αποτελέσει κομβικό σημείο για την κατανόηση του ρόλου τους και της λειτουργίας τους. Αυτά τα μεταλλάγματα θα πρέπει να αναλυθούν αρχικά ως προς τον φαινότυπό τους, για την εξακρίβωση της συμμετοχής τους σε αναπτυξιακά στάδια, αλλά και με ομικές προσεγγίσεις. Η ανάλυση του μεταγραφώματος και του μεταβολώματος αυτών σε φυσιολογικές συνθήκες, σε οξειδωτική αλλά και χημική καταπόνηση είναι σημαντική για την κατανόηση του δικτύου στο οποίο συμμετέχουν οι SBPs. Επίσης, από τα αποτελέσματα αυτά θα προκύψουν νέα ερωτήματα που θα βοηθήσουν στη δημιουργία πιο στοχευμένων προσεγγίσεων.

Άλλος μελλοντικός στόχος, είναι η δημιουργία μόνιμων μετασχηματισμένων φυτών με κατασκευές βασιζόμενες στη μέθοδο της συμπληρωματικότητας του διμοριακού φθορισμού. Η έκφραση των γονιδίων σε αυτές τις κατασκευές θα πρέπει να βρίσκεται υπό τον έλεγχο των ενδογενών τους υποκινητών, για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων στο σύνολο του φυτού. Με αυτή την προσέγγιση, η έκφραση αυτών θα ελέγχεται από τους υποκινητές τους και άρα θα αποκρίνονται βάσει των ερεθισμάτων που δέχεται το φυτό. Έτσι, μπορεί να αποσαφηνιστεί η μελέτη των συνθηκών κατά των οποίων πραγματοποιούνται οι αλληλεπιδράσεις αλλά και ο υποκυτταρικός τους εντοπισμός στο σύνολο του φυτού.

Επιπλέον, η δημιουργία μεταλλαγμάτων καταστολής των αλληλεπιδρώντων γονιδίων και η μελέτη των μεταβολών των SBPs σε αυτά, θα αποσαφηνίσει περαιτέρω τη σχέση μεταξύ αυτών.

Τέλος, σημαντικό βήμα στην κατανόηση της SBP1 είναι η μελέτη της ενζυμικής της ενεργότητας. Έχει εξακριβωθεί η ενζυμική δράση ως οξειδάση της μεθανοθειόλης στον άνθρωπο και παραμένει το ερώτημα αν αυτή η ενεργότητα εντοπίζεται και στα φυτά ή έχει εξελιχθεί σε κάποια άλλη ή ακόμα αν έχει χαθεί.

Βιβλιογραφία

- Abraham, M.J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J.C., Hess, B., *et al.* 2015. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1–2: 19–25.
- Acosta, I.F. & Przybyl, M. 2019. Jasmonate Signaling during Arabidopsis Stamen Maturation. *Plant Cell Physiol* 60: 2648–2659.
- Agalou, A., Roussis, A. & Spaink, H.P. 2005. The Arabidopsis selenium-binding protein confers tolerance to toxic levels of selenium. *Funct. Plant Biol.* 32: 881.
- Agalou, A., Spaink, H.P. & Roussis, A. 2006. Novel interaction of selenium-binding protein with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and fructose-bisphosphate aldolase of Arabidopsis thaliana. *Funct Plant Biol* 33: 847–856.
- Ahmed, S.U., Rojo, E., Kovaleva, V., Venkataraman, S., Dombrowski, J.E., Matsuoka, K., *et al.* 2000. The Plant Vacuolar Sorting Receptor Atelp Is Involved in Transport of Nh₂-Terminal Propeptide-Containing Vacuolar Proteins in Arabidopsis thaliana. *J Cell Biol* 149: 1335–1344.
- Akterin, S., Cowburn, R., Miranda-Vizueté, A., Jiménez, A., Bogdanovic, N., Winblad, B., *et al.* 2006. Involvement of glutaredoxin-1 and thioredoxin-1 in β -amyloid toxicity and Alzheimer's disease. *Cell Death Differ* 13: 1454–1465.
- Alché, J. de D., Castro, A.J., Olmedilla, A., Fernández, M. del C., Rodríguez, R., Villalba, M., *et al.* 1999. The major olive pollen allergen (Ole e I) shows both gametophytic and sporophytic expression during during anther development, and its synthesis and storage takes place in the RER. *J Cell Sci* 112: 2501–2509.
- Alché, J. de D., M'rani-Alaoui, M., Castro, A.J. & Rodríguez-García, M.I. 2004. Ole e 1, the Major Allergen from Olive (*Olea europaea* L.) Pollen, Increases its Expression and is Released to the Culture Medium during in vitro Germination. *Plant Cell Physiol* 45: 1149–1157.
- Aloni, R., Schwalm, K., Langhans, M. & Ullrich, C.I. 2003. Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in Arabidopsis. *Planta* 213: 841–853.
- Alves, R., Vilaprinyo, E., Sorribas, A. & Herrero, E. 2009. Evolution based on domain combinations: the case of glutaredoxins. *BMC Evol Biol* 9: 66.
- Amar, S., Ovadia, O., Maier, W., Ebstein, R., Belmaker, R., Mishmar, D., *et al.* 2010. Copy number variation of the SELENBP1 gene in schizophrenia. *Behav Brain Funct* 6: 10.
- Andersson, M.X., Hamberg, M., Kourtchenko, O., Brunnström, Å., McPhail, K.L., Gerwick, W.H., *et al.* 2006. Oxylin Profiling of the Hypersensitive Response in Arabidopsis thaliana: FORMATION OF A NOVEL OXOPHYTODIENOIC ACID-CONTAINING GALACTOLIPID, ARABIDOPSISIDE E. *J. Biol. Chem.* 281: 31528–31537.
- Andresen, E. & Küpper, H. 2013. Cadmium Toxicity in Plants. In: Cadmium: From Toxicity to Essentiality (A. Sigel, H. Sigel, & R. K. Sigel, eds), pp. 395–413. Springer Netherlands, Dordrecht.

- Ansong, E., Ying, Q., Ekoue, D.N., Deaton, R., Hall, A.R., Kajdacsy-Balla, A., *et al.* 2015. Evidence That Selenium Binding Protein 1 Is a Tumor Suppressor in Prostate Cancer. *PLoS ONE* 10: e0127295.
- Arazi, T., Kaplan, B., Sunkar, R. & Fromm, H. 2000. Cyclic-nucleotide- and Ca²⁺/calmodulin-regulated channels in plants: targets for manipulating heavy-metal tolerance, and possible physiological roles. *Biochem Soc Trans* 28: 5.
- Avanci, N.C., Luche, D.D., Goldman, G.H. & Goldman, M.H.S. 2010. Review Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genet. Mol. Res.* 9: 484–505.
- Balk, J. & Pilon, M. 2011. Ancient and essential: the assembly of iron–sulfur clusters in plants. *Trends Plant Sci* 16: 218–226.
- Balk, J. & Schaedler, T.A. 2014. Iron Cofactor Assembly in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65: 125–153.
- Bandyopadhyay, S., Gama, F., Molina-Navarro, M.M., Gualberto, J.M., Claxton, R., Naik, S.G., *et al.* 2008. Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe–2S] clusters. *EMBO J* 27: 1122–1133.
- Banerjee, J., Sahoo, D.K., Raha, S., Sarkar, S., Dey, N. & Maiti, I.B. 2015. A Region Containing an α -1 Element of Dahlia Mosaic Virus (DaMV) Subgenomic Transcript Promoter Plays a Key Role in Green Tissue- and Root-Specific Expression in Plants. *Plant Mol Biol Rep* 33: 532–556.
- Banks, J.A. 2009. Selaginella and 400 Million Years of Separation. *Annu Rev Plant Biol* 60: 223–238.
- Banks, J.A., Nishiyama, T., Hasebe, M., Bowman, J.L., Gribskov, M., dePamphilis, C., *et al.* 2011. The Selaginella Genome Identifies Genetic Changes Associated with the Evolution of Vascular Plants. *Sci* 332: 960–963.
- Bansal, M.P., Oborn, C.J., Danielson, K.G. & Medina, D. 1989. Evidence for two selenium-binding proteins distinct from glutathione peroxidase in mouse liver. *Carcinogenesis* 10: 541–546.
- Bargmann, B.O.R. & Birnbaum, K.D. 2010. Fluorescence Activated Cell Sorting of Plant Protoplasts. *J Vis Exp JOVE*, doi: 10.3791/1673.
- Barr, L.A. & Calvert, J.W. 2014. Discoveries of Hydrogen Sulfide as a Novel Cardiovascular Therapeutic. *Circ J* 78: 2111–2118.
- Batanero, E., Villalba, M. & Rodríguez, R. 1994. Glycosylation site of the major allergen from olive tree pollen. Allergenic implications of the carbohydrate moiety. *Mol Immunol* 31: 31–37.
- Bent, A. 2006. Arabidopsis thaliana Floral Dip Transformation Method. In: *Agrobacterium Protocols*, pp. 87–104. Humana Press, New Jersey.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., *et al.* 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28: 235–242.

- Bernoux, M., Timmers, T., Jauneau, A., Brière, C., de Wit, P.J.G.M., Marco, Y., *et al.* 2008. RD19, an Arabidopsis Cysteine Protease Required for RRS1-R-Mediated Resistance, Is Relocalized to the Nucleus by the Ralstonia solanacearum PopP2 Effector. *Plant Cell* 20: 2252–2264.
- Boter, M. 2004. Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and Arabidopsis. *Genes Dev* 18: 1577–1591.
- Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., *et al.* 1990. A serine protease triad forms the catalytic centre of triacylglycerol lipase. *Lett Nature* 343: 767–770.
- Bray, E.A. 2002. Classification of Genes Differentially Expressed during Water-deficit Stress in Arabidopsis thaliana: an Analysis using Microarray and Differential Expression Data. *Ann Bot* 89: 803–811.
- Buchet, J., Lauwerys, R., Roels, H., Bernard, A., Bruaux, P., Claeys, F., *et al.* 1990. Renal effects of cadmium body burden of the general population. *Lancet* 336: 699–702.
- Buono, R.A., Hudecek, R. & Nowack, M.K. 2019. The roles of proteases during developmental programmed cell death in plants. *J Exp Bot* 70: 2097–2112.
- Caarls, L., Pieterse, C.M.J. & Van Wees, S.C.M. 2015. How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Front. Plant Sci.* 6.
- Cai, Y.-M., Yu, J., Mironov, A. & Gallois, P. 2018. Two proteases with caspase-3-like activity, cathepsin B and proteasome, antagonistically control ER-stress-induced programmed cell death in Arabidopsis. *New Phytol* 1143–1155.
- Candela, H., Martínez-Laborda, A. & Luis Micol, J. 1999. Venation Pattern Formation in Arabidopsis thaliana Vegetative Leaves. *Dev Biol* 205: 205–216.
- Carrière, F., Withers-Martinez, C., van Tilbeurgh, H., Roussel, A., Cambillau, C. & Verger, R. 1998. Structural basis for the substrate selectivity of pancreatic lipases and some related proteins. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1376: 417–432.
- Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E.L., Girke, T. & Raikhel, N.V. 2004. The Vegetative Vacuole Proteome of Arabidopsis thaliana Reveals Predicted and Unexpected Proteins. *Plant Cell* 16: 3285–3303.
- Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G. & Marty, A. 2012. Lipases: An Overview. In: *Lipases and Phospholipases* (G. Sandoval, ed), pp. 3–30. Humana Press, Totowa, NJ.
- Chang, P.W.G., Tsui, S.K.W., Liew, C., Lee, C., Waye, M.M.Y. & Fung, K. 1997. Isolation, characterization, and chromosomal mapping of a novel cDNA clone encoding human selenium binding protein. *J Cell Biochem* 64: 217–224.
- Chang, Y.-S., Chang, Y.-J., Lin, C.-T., Lee, M.-C., Wu, C.-W. & Lai, Y.-H. 2013. Nitrogen fertilization promotes the phytoremediation of cadmium in Pentas lanceolata. *Int Biodeter Biodegr* 85: 709–714.

- Chau, E.J., Mostaid, M.S., Cropley, V., McGorry, P., Pantelis, C., Bousman, C.A., *et al.* 2018. Downregulation of plasma SELENBP1 protein in patients with recent-onset schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 85: 1–6.
- Chen, G., Snyder, C.L., Greer, M.S. & Weselake, R.J. 2011. Biology and Biochemistry of Plant Phospholipases. *Crit Rev Plant Sci* 30: 239–258.
- Chen, G., Wang, H., Miller, C.T., Thomas, D.G., Gharib, T.G., Misek, D.E., *et al.* 2004. Reduced selenium-binding protein 1 expression is associated with poor outcome in lung adenocarcinomas. *J. Pathol.* 202: 321–329.
- Cheng, N.-H. & Hirschi, K.D. 2003. Cloning and Characterization of CXIP1, a Novel PICOT Domain-containing Arabidopsis Protein That Associates with CAX1. *J. Biol. Chem.* 278: 6503–6509.
- Cheng, N.-H., Liu, J.-Z., Brock, A., Nelson, R.S. & Hirschi, K.D. 2006. AtGRXcp, an Arabidopsis Chloroplastic Glutaredoxin, Is Critical for Protection against Protein Oxidative Damage. *J. Biol. Chem.* 281: 26280–26288.
- Cheng, Z., Zhang, J., Liu, Y., Wang, B., Li, H. & Lu, H. 2020. β VPE is involved in tapetal degradation and pollen development by activating proprotease maturation in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 71: 1941–1955.
- Cheong, Y.H., Chang, H.-S., Gupta, R., Wang, X., Zhu, T. & Luan, S. 2002. Transcriptional Profiling Reveals Novel Interactions between Wounding, Pathogen, Abiotic Stress, and Hormonal Responses in Arabidopsis. *Plant Phys* 129: 661–677.
- Chmielowska-Błak, J., Gzyl, J., Rucinska-Sobkowiak, R., Arasimowicz-Jelonek, M. & Deckert, J. 2014. The new insights into cadmium sensing. *Front Plant Sci* 5.
- Cho, U.-H. & Seo, N.-H. 2005. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Sci* 168: 113–120.
- Citovsky, V., Lee, L.-Y., Vyas, S., Glick, E., Chen, M.-H., Vainstein, A., *et al.* 2006. Subcellular Localization of Interacting Proteins by Bimolecular Fluorescence Complementation in Planta. *J Mol Biol* 362: 1120–1131.
- Cleene, M. 1985. The Susceptibility of Monocotyledons to *Agrobacterium tumefaciens*. *J Phytopathol* 113: 81–89.
- Clemens, S. 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212: 475–486.
- Clemens, S. 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88: 1707–1719.
- Cobbett, C. & Goldsbrough, P. 2002. Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 159–182.
- Cobbett, C.S. 2000. Phytochelatins and Their Roles in Heavy Metal Detoxification. *Plant Physiol.* 123: 825–832.

- Coulombe, R., Grochulski, P., Sivaraman, J., Ménard, R., Mort, J.S. & Cygler, M. 1996. Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *EMBO J* 15: 5492–5503.
- Couturier, J., Jacquot, J.-P. & Rouhier, N. 2009. Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms. *Cell. Mol. Life Sci.* 66: 2539–2557.
- Couturier, J., Ströher, E., Albetel, A.-N., Roret, T., Muthuramalingam, M., Tarrago, L., *et al.* 2011. Arabidopsis Chloroplastic Glutaredoxin C5 as a Model to Explore Molecular Determinants for Iron-Sulfur Cluster Binding into Glutaredoxins. *J. Biol. Chem.* 286: 27515–27527.
- Covey, S.N., Al-Kaff, N.S., Lángara, A. & Turner, D.S. 1997. Plants combat infection by gene silencing. *Nature* 385: 781–782.
- Creelman, R.A. & Mullet, J.E. 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc Natl Acad Sci* 92: 4114–4119.
- DalCorso, G., Farinati, S. & Furini, A. 2010. Regulatory networks of cadmium stress in plants. *Plant Signal Behav* 5: 663–667.
- Dawson, N.L., Lewis, T.E., Das, S., Lees, J.G., Lee, D., Ashford, P., *et al.* 2017. CATH: an expanded resource to predict protein function through structure and sequence. *Nucleic Acids Res* 45: D289–D295.
- De Maria, L., Vind, J., Oxenbøll, K.M., Svendsen, A. & Patkar, S. 2007. Phospholipases and their industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 290–300.
- De Simone, G., Menchise, V., Manco, G., Mandrich, L., Sorrentino, N., Lang, D., *et al.* 2001. The Crystal Structure of a Hyper-thermophilic Carboxylesterase from the Archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *J Mol Biol* 314:507-518.
- de Vries, S.J. & Bonvin, A.M.J.J. 2011. CPORT: A Consensus Interface Predictor and Its Performance in Prediction-Driven Docking with HADDOCK. *PLoS ONE* 6: e17695.
- Degryse, F., Buekers, J. & Smolders, E. 2004. Radio-labile cadmium and zinc in soils as affected by pH and source of contamination. *Eur J Soil Sci* 55: 113–122.
- Desikan, R., A.-H.-Mackerness, S., Hancock, J.T. & Neill, S.J. 2001. Regulation of the Arabidopsis Transcriptome by Oxidative Stress. *Plant Physiol.* 127: 159–172.
- Dey, N. & Maiti, I.B. 1999. Structure and promoter/leader deletion analysis of mirabilis mosaic virus (MMV) full-length transcript promoter in transgenic plants. *Plant Mol Biol* 40: 771–782.
- Diaz-Mendoza, M., Dominguez-Figueroa, J.D., Velasco-Arroyo, B., Cambra, I., Gonzalez-Melendi, P., Lopez-Gonzalez, A., *et al.* 2016. HvPap-1 C1A Protease and HvCPI-2 Cystatin Contribute to Barley Grain Filling and Germination. *Plant Physiol.* 170: 2511–2524.
- Dietz, K.-J. 2014. Redox Regulation of Transcription Factors in Plant Stress Acclimation and Development. *Antioxid Redox Signal* 21: 1356–1372.

- Dominguez, C., Boelens, R. & Bonvin, A.M.J.J. 2003. HADDOCK: A Protein–Protein Docking Approach Based on Biochemical or Biophysical Information. *J Am Chem Soc* 125: 1731–1737.
- Domínguez, M.T., Marañón, T., Murillo, J.M. & Redondo-Gómez, S. 2011. Response of Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota*) and mastic shrub (*Pistacia lentiscus* L.) seedlings to high concentrations of Cd and Tl in the rhizosphere. *Chemosphere* 83: 1166–1174.
- Du, H., Liu, H. & Xiong, L. 2013. Endogenous auxin and jasmonic acid levels are differentially modulated by abiotic stresses in rice. *Front. Plant Sci.* 4.
- Dutilleul, C., Jourdain, A., Bourguignon, J. & Hugouvieux, V. 2008. The Arabidopsis Putative Selenium-Binding Protein Family: Expression Study and Characterization of SBP1 as a Potential New Player in Cadmium Detoxification Processes. *Plant Physiol.* 147: 239–251.
- Eckardt, N.A. 2010. Redox Regulation of Auxin Signaling and Plant Development. *Plant Cell* 22: 295.
- Ecker, J.R. & Davis, R.W. 1986. Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci* 83: 5372–5376.
- Elhodaky, M. & Diamond, A. 2018. Selenium-Binding Protein 1 in Human Health and Disease. *IJMS* 19: 3437.
- Elhodaky, M., Hong, L. & Diamond, A. 2019. Selenium-Binding Protein 1 Reduces Oxygen Consumption and Activates AMPK in Prostate Cancer Cells (OR11-04-19). *Curr Dev in Nutr* 3: nzz044.OR11-04-19.
- Ellinger, D. & Kubigsteltig, I.I. 2010. Involvement of DAD1-like lipases in response to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav* 5: 1269–1271.
- Ellinger, D., Stingl, N., Kubigsteltig, I.I., Bals, T., Juenger, M., Pollmann, S., *et al.* 2010. DONGLE and DEFECTIVE IN ANTHHER DEHISCENCE1 Lipases Are Not Essential for Wound- and Pathogen-Induced Jasmonate Biosynthesis: Redundant Lipases Contribute to Jasmonate Formation. *Plant Physiol* 153: 114–127.
- Elmayan, T. & Tepfer, M. 1995. Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the *rolD* promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S2 promoter. *Transgenic Res* 4: 388–396.
- Endler, A., Meyer, S., Schelbert, S., Schneider, T., Weschke, W., Peters, S.W., *et al.* 2006. Identification of a Vacuolar Sucrose Transporter in Barley and Arabidopsis Mesophyll Cells by a Tonoplast Proteomic Approach. *Plant Physiol.* 141: 196–207.
- Enenkel, C. & Wolf, D.H. 1993. BLHI Codes for a Yeast Thiol Aminopeptidase, the Equivalent of Mammalian Bleomycin Hydrolase. *J Biol Chem* 268: 7036–7043.
- Eyice, Ö., Myronova, N., Pol, A., Carrión, O., Todd, J.D., Smith, T.J., *et al.* 2018. Bacterial SBP56 identified as a Cu-dependent methanethiol oxidase widely distributed in the biosphere. *ISME J* 12: 145–160.
- Farmer, E.E., Alméras, E. & Krishnamurthy, V. 2003. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr Opin Plant Biol* 6: 372–378.

- Fellerer, C., Schweiger, R., Schöngruber, K., Soll, J. & Schwenkert, S. 2011. Cytosolic HSP90 Cochaperones HOP and FKBP Interact with Freshly Synthesized Chloroplast Preproteins of Arabidopsis. *Mol Plant* 4: 1133–1145.
- Fernández, M.C., Olmedilla, A., Alché, J. de D., Palomino, P., Lahoz, C. & Rodríguez-García, M.I. 1996. Immunogold probes for light and electron microscopic localization of Ole e I in several Oleaceae pollens. *J Histochem Cytochem* 44: 151–158.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- Flemetakis, E., Agalou, A., Kavroulakis, N., Dimou, M., Martsikovskaya, A., Slater, A., *et al.* 2002. Lotus japonicus Gene Ljsbp is highly conserved among plants and animals and encodes a homologue to the mammalian Selenium-Binding Proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15: 313–322.
- Flückiger, R., De Caroli, M., Piro, G., Dalessandro, G., Neuhaus, J.-M. & Di Sansebastiano, G.-P. 2003. Vacuolar system distribution in Arabidopsis tissues, visualized using GFP fusion proteins. *J Exp Bot* 54: 1577–1584.
- Fox, N.K., Brenner, S.E. & Chandonia, J.-M. 2014. SCOPe: Structural Classification of Proteins—extended, integrating SCOP and ASTRAL data and classification of new structures. *Nucl. Acids Res.* 42: D304–D309.
- Gao, P.-T., Ding, G.-Y., Yang, X., Dong, R.-Z., Hu, B., Zhu, X.-D., *et al.* 2018. Invasive potential of hepatocellular carcinoma is enhanced by loss of selenium-binding protein 1 and subsequent upregulation of CXCR4. *Am J Cancer Res* 8: 1040–1049.
- Gelman, A. & Rubin, D.B. 1992. Inference from iterative simulation using multiple sequences. *Stat Sci* 7: 457–511.
- Gelvin, S.B. 2003. Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *MMBR* 67: 16–37.
- Gepstein, S., Sabehi, G., Carp, M.-J., Hajouj, T., Neshor, M.F.O., Yariv, I., *et al.* 2003. Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *Plant J* 629–42.
- Ghasemi Pirbalouti, A., Sajjadi, S.E. & Parang, K. 2014. A Review (Research and Patents) on Jasmonic Acid and Its Derivatives: Jasmonic Acid and Its Derivatives. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 347: 229–239.
- Ghelli, R., Brunetti, P., Napoli, N., De Paolis, A., Cecchetti, V., Tsuge, T., *et al.* 2018. A Newly Identified Flower-Specific Splice Variant of AUXIN RESPONSE FACTOR8 Regulates Stamen Elongation and Endothecium Lignification in Arabidopsis. *Plant Cell* 30: 620–637.
- Glatt, S.J., Everall, I.P., Kremen, W.S., Corbeil, J., a ik, R., Khanlou, N., *et al.* 2005. Comparative gene expression analysis of blood and brain provides concurrent validation of SELENBP1 up-regulation in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci* 102: 15533–15538.
- Goda, H., Sawa, S., Asami, T., Fujioka, S., Shimada, Y. & Yoshida, S. 2004. Comprehensive Comparison of Auxin-Regulated and Brassinosteroid-Regulated Genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 134: 1555–1573.

- Grienenberger, E., Geoffroy, P., Mutterer, J., Legrand, M. & Heitz, T. 2010. The interplay of lipid acyl hydrolases in inducible plant defense. *Plant Signal Behav* 5: 1181–1186.
- Grudkowska, M. & Zagdańska, B. 2004. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochim Pol* 51: 609–624.
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. & Gascuel, O. 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59: 307–321.
- Guo, Y., Cai, Z. & Gan, S. 2004. Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence. *Plant Cell Environ* 27: 521–549.
- Guo, Y. & Gan, S.-S. 2014. Translational researches on leaf senescence for enhancing plant productivity and quality. *J Exp Bot* 65: 3901–3913.
- Guo, Y., Huang, C., Xie, Y., Song, F. & Zhou, X. 2010. A tomato glutaredoxin gene SIGRX1 regulates plant responses to oxidative, drought and salt stresses. *Planta* 232: 1499–1509.
- Gupta, M. & Gupta, S. 2017. An Overview of Selenium Uptake, Metabolism, and Toxicity in Plants. *Front. Plant Sci.* 7.
- Hammond, J.P., Bennett, M.J., Bowen, H.C., Broadley, M.R., Eastwood, D.C., May, S.T., *et al.* 2003. Changes in Gene Expression in Arabidopsis Shoots during Phosphate Starvation and the Potential for Developing Smart Plants. *Plant Physiol.* 132: 578–596.
- Han, J., Li, H., Yin, B., Zhang, Y., Liu, Y., Cheng, Z., *et al.* 2019. The papain-like cysteine protease CEP1 is involved in programmed cell death and secondary wall thickening during xylem development in Arabidopsis. *J Exp Bot* 70: 205–215.
- Hasan, S., Fariduddin, Q., Ali, B., Hayat, S. & Ahmad, A. 2009. Cadmium: Toxicity and tolerance in plants. *J Env Biol* 30: 167–174.
- He, S., Yang, X., He, Z. & Baligar, V.C. 2017. Morphological and Physiological Responses of Plants to Cadmium Toxicity: A Review. *Pedosphere* 27: 421–438.
- Hentrich, M., Böttcher, C., Düchting, P., Cheng, Y., Zhao, Y., Berkowitz, O., *et al.* 2013. The jasmonic acid signaling pathway is linked to auxin homeostasis through the modulation of YUCCA8 and YUCCA9 gene expression. *Plant J* 12.
- Hettiarachchi, G.M. & Pierzynski, G.M. 2002. In Situ Stabilization of Soil Lead Using Phosphorus and Manganese Oxide: Influence of Plant Growth. *J Environ Qual* 31: 564–572.
- Hirai, M.Y., Fujiwara, T., Awazuhara, M., Kimura, T., Noji, M. & Saito, K. 2003. Global expression profiling of sulfur-starved Arabidopsis by DNA microarray reveals the role of O⁶-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *Plant J* 33: 651–663.

- Hirai, M.Y. & Saito, K. 2004. Post-genomics approaches for the elucidation of plant adaptive mechanisms to sulphur deficiency. *J. Exp. Bot.* 55: 1871–1879.
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. & Schilperoort, R.A. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Lett Nature* 303: 179–180.
- Holmgren, A. & Åslund, F. 1995. Glutaredoxin. *Method Enzymol* 252: 283-292.
- Hong, Y., Wang, T.-W., Hudak, K.A., Schade, F., Froese, C.D. & Thompson, J.E. 2000. An ethylene-induced cDNA encoding a lipase expressed at the onset of senescence. *Proc Natl Acad Sci* 97: 8717–8722.
- Hou, J., Zhang, Q., Zhou, Y., Ahammed, G.J., Zhou, Y., Yu, J., *et al.* 2018. Glutaredoxin GRXS16 mediates brassinosteroid-induced apoplastic H₂O₂ production to promote pesticide metabolism in tomato. *Environ Pollut* 240: 227–234.
- Howe, G.A. & Jander, G. 2008. Plant Immunity to Insect Herbivores. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 41–66.
- Hu, B., Liu, B., Liu, L., Liu, C., Xu, L. & Ruan, Y. 2014. Epigenetic control of Pollen Ole e 1 allergen and extensin family gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Acta Physiol Plant* 36: 2203–2209.
- Hu, Y., Wu, Q., Sprague, S.A., Park, J., Oh, M., Rajashekar, C.B., *et al.* 2015. Tomato expressing *Arabidopsis* glutaredoxin gene AtGRXS17 confers tolerance to chilling stress via modulating cold responsive components. *Hortic Res* 2: 15051.
- Huang, C., Ding, G., Gu, C., Zhou, J., Kuang, M., Ji, Y., *et al.* 2012. Decreased Selenium-Binding Protein 1 enhances Glutathione Peroxidase 1 activity and downregulates HIF-1 α to promote hepatocellular carcinoma invasiveness. *Clin. Cancer Res.* 18: 3042–3053.
- Huang, K.-C., Park, D.C., Ng, S.-K., Lee, J.Y., Ni, X., Ng, W.-C., *et al.* 2006. Selenium binding protein 1 in ovarian cancer. *Int. J. Cancer* 118: 2433–2440.
- Hugouvieux, V., Dutilleul, C., Jourdain, A., Reynaud, F., Lopez, V. & Bourguignon, J. 2009. *Arabidopsis* Putative Selenium-Binding Protein1 Expression Is Tightly Linked to Cellular Sulfur Demand and Can Reduce Sensitivity to Stresses Requiring Glutathione for Tolerance. *Plant Physiol.* 151: 768–781.
- Hyun, Y., Choi, S., Hwang, H.-J., Yu, J., Nam, S.-J., Ko, J., *et al.* 2008. Cooperation and Functional Diversification of Two Closely Related Galactolipase Genes for Jasmonate Biosynthesis. *Dev Cell* 14: 183–192.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I. & Okada, K. 2001. The DEFECTIVE IN ANTHHER DEHISCENCE1 Gene Encodes a Novel Phospholipase A1 Catalyzing the Initial Step of Jasmonic Acid Biosynthesis, Which Synchronizes Pollen Maturation, Anther Dehiscence, and Flower Opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 2191–2209.
- Jeong, D., Kim, J.M., Cha, H., Oh, J.G., Park, J., Yun, S.-H., *et al.* 2008. PICOT Attenuates Cardiac Hypertrophy by Disrupting Calcineurin–NFAT Signaling. *Circ Res* 102: 711–719.
- Jeong, J.-Y., Wang, Y. & Sytkowski, A.J. 2009. Human selenium binding protein-1 (hSP56) interacts with VDU1 in a selenium-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 379: 583–588.

Jerome-Morais, A., Wright, M.E., Liu, R., Yang, W., Jackson, M.I., Combs, G.F., *et al.* 2012. Inverse association between glutathione peroxidase activity and both selenium-binding protein 1 levels and gleason score in human prostate tissue. *Prostate* 72: 1006–1012.

Jiang, S.-Y., Jasmin, P.X.H., Ting, Y.Y. & Ramachandran, S. 2005. Genome-wide Identification and Molecular Characterization of Ole_e_I, Allerg_1 and Allerg_2 Domain-containing Pollen-Allergen-like Genes in *Oryza sativa*. *DNA Res* 12: 167–179.

Jiménez-López, Rodríguez-García, M.I. & Alché, J. de D. 2011. Systematic and Phylogenetic Analysis of the Ole e 1 Pollen Protein Family Members in Plants. In: *Systems and Computational Biology - Bioinformatics and Computational Modeling* (N.-S. Yang, ed). InTech.

Jonak, C., Nakagami, H. & Hirt, H. 2004. Heavy Metal Stress. Activation of Distinct Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways by Copper and Cadmium. *Plant Physiol.* 136: 3276–3283.

Jung, J.-Y., Ahn, J.H. & Schachtman, D.P. 2018. CC-type glutaredoxins mediate plant response and signaling under nitrate starvation in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol* 18: 281.

Kalinina, E.V., Chernov, N.N. & Novichkova, M.D. 2014. Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochemistry Moscow* 79: 1562–1583.

Kanazawa, T., Chana, G., Glatt, S.J., Mizuno, H., Masliah, E., Yoneda, H., *et al.* 2008. The utility of SELENBP1 gene expression as a biomarker for major psychotic disorders: Replication in schizophrenia and extension to bipolar disorder with psychosis. *Am. J. Med. Genet.* 147B: 686–689.

Kanazawa, T., Glatt, S.J., Faraone, S.V., Hwu, H.-G., Yoneda, H. & Tsuang, M.T. 2009. Family-based association study of SELENBP1 in schizophrenia. *Schizophr Res* 113: 268–272.

Kantyka, T., Shaw, L.N. & Potempa, J. 2011. Papain-Like Proteases of *Staphylococcus aureus*. In: *Cysteine Proteases of Pathogenic Organisms* (M. W. Robinson & J. P. Dalton, eds), pp. 1–14. Springer US, Boston, MA.

Kato, T., Morita, M.T., Fukaki, H., Yamauchi, Y., Uehara, M., Niihama, M., *et al.* 2002. SGR2, a Phospholipase-Like Protein, and ZIG/SGR4, a SNARE, Are Involved in the Shoot Gravitropism of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 33–46.

Kerppola, T.K. 2008. Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis as a Probe of Protein Interactions in Living Cells. *Annu Rev Biophys* 37: 465–487.

Kim, H., Kang, H.J., You, K.T., Kim, S.H., Lee, K.Y., Kim, T.I., *et al.* 2006. Suppression of human selenium-binding protein 1 is a late event in colorectal carcinogenesis and is associated with poor survival. *Proteomics* 6: 3466–3476.

Kim, M.-J., Mizuno, H., Sumiya, S. & Kitamura, K. 1992. Crystal structure of papain-E64-c complex. *Biochem J* 287: 797–803.

King, T.P., Hoffman, D., Lowenstein, H., Marsh, D.G., Platts-Mills, T.A.E. & Thomas, W. 1994. Allergen Nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. *Int Arch Allergy Immunol* 105: 224–233.

Klenk, H.-P., Clayton, R.A., Tomb, J.-F., White, O., Nelson, K.E., Ketchum, K.A., *et al.* 1997. The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* 390: 364–370.

Koeduka, T., Matsui, K., Hasegawa, M., Akakabe, Y. & Kajiwara, T. 2005. Rice fatty acid -dioxygenase is induced by pathogen attack and heavy metal stress: activation through jasmonate signaling. *J Plant Physiol* 162: 912–920.

Kohl, J.B., Mellis, A.-T. & Schwarz, G. 2019. Homeostatic impact of sulfite and hydrogen sulfide on cysteine catabolism: Homeostatic impact of sulfite and H₂S on cysteine catabolism. *Br J Pharmacol* 176: 554–570.

Köhnlein, K., Urban, N., Guerrero-Gómez, D., Steinbrenner, H., Urbánek, P., Priebs, J., *et al.* 2020. A *Caenorhabditis elegans* ortholog of human selenium-binding protein 1 is a pro-aging factor protecting against selenite toxicity. *Redox Biol* 28: 101323.

Kolbert, Z., Lehotai, N., Molnár, Á. & Feigl, G. 2016. “The roots” of selenium toxicity: A new concept. *Plant Signal Behav* 11: e1241935.

Koo, A.J.K. & Howe, G.A. 2009. The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry* 70: 1571–1580.

Krissinel, E. & Henrick, K. 2007. Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. *J Mol Biol* 372: 774–797.

Kroemer, G. & Jäättelä, M. 2005. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 5: 886–897.

Kumagai, M.H., Donson, J., della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K. & Grill, L.K. 1995. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc Natl Acad Sci* 92: 1679–1683.

Küpper, H., Parameswaran, A., Leitenmaier, B., Trtílek, M. & Šetlík, I. 2007. Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol* 175: 655–674.

Labusch, C., Shishova, M., Effendi, Y., Li, M., Wang, X. & Scherer, G.F.E. 2013. Patterns and Timing in Expression of Early Auxin-Induced Genes Imply Involvement of Phospholipases A (pPLAs) in the Regulation of Auxin Responses. *Mol Plant* 6: 1473–1486.

Lane, T.W. & Morel, F.M.M. 2000. A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc Natl Acad Sci* 97: 4627–4631.

Lanfear, J., Fleming, J., Walker, M. & Harrison, P. 1993. Different patterns of regulation of the genes encoding the closely related 56 kDa selenium- and acetaminophen-binding proteins in normal tissues and during carcinogenesis. *Carcinogenesis* 14: 335–340.

Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y.W. & Guindon, S. 2012. PartitionFinder: Combined Selection of Partitioning Schemes and Substitution Models for Phylogenetic Analyses. *Mol Biol Evol* 29: 1695–1701.

- Lanfear, R., Frandsen, P.B., Wright, A.M., Senfeld, T. & Calcott, B. 2016. PartitionFinder 2: New Methods for Selecting Partitioned Models of Evolution for Molecular and Morphological Phylogenetic Analyses. *Mol Biol Evol* 34:772–773.
- Laporte, D., Olate, E., Salinas, P., Salazar, M., Jordana, X. & Holuigue, L. 2012. Glutaredoxin GRXS13 plays a key role in protection against photooxidative stress in Arabidopsis. *J Exp Bot* 63: 503–515.
- Lauzurica, P., Gurbindo, C., Maruri, N., Galocha, B., Diaz, R., Gonzalez, J., *et al.* 1988. Olive (*Olea europea*) pollen allergens—I immunochemical characterization by immunoblotting, crie and immunodetection by a monoclonal antibody. *Mol Immunol* 25: 329–335.
- Lee, L.-Y., Fang, M.-J., Kuang, L.-Y. & Gelvin, S.B. 2008. Vectors for multi-color bimolecular fluorescence complementation to investigate protein-protein interactions in living plant cells. *Plant Methods* 4: 24.
- Lehotai, N., Feigl, G., Koós, Á., Molnár, Á., Ördög, A., Pető, A., *et al.* 2016. Nitric oxide–cytokinin interplay influences selenite sensitivity in Arabidopsis. *Plant Cell Rep* 35: 2181–2195.
- León, J. & Sánchez-Serrano, J.J. 1999. Molecular biology of jasmonic acid biosynthesis in plants. *Plant Physiol Biochem* 37: 373–380.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., *et al.* 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 30: 325–327.
- Letunic, I. & Bork, P. 2019. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* 47: W256–W259.
- Li, L., Cheng, N., Hirschi, K.D. & Wang, X. 2010. Structure of Arabidopsis chloroplastic monothiol glutaredoxin AtGRXcp. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66: 725–732.
- Li, S. 2014. Redox Modulation Matters: Emerging Functions for Glutaredoxins in Plant Development and Stress Responses. *Plants* 3: 559–582.
- Li, T., Yang, W., Li, M., Byun, D.-S., Tong, C., Nasser, S., *et al.* 2008. Expression of selenium-binding protein 1 characterizes intestinal cell maturation and predicts survival for patients with colorectal cancer. *Mol. Nutr. Food Res*. 52: 1289–1299.
- Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Anderson, M.X., Arondel, V., Bates, P.D., *et al.* 2013. Acyl-Lipid Metabolism. In: *The Arabidopsis Book*.
- Lillig, C.H., Berndt, C. & Holmgren, A. 2008. Glutaredoxin systems. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1780: 1304–1317.
- Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J.L., Dror, R.O., *et al.* 2010. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins* 78: 1950–1958.
- Liu, H., Hu, M., Wang, Q., Cheng, L. & Zhang, Z. 2018. Role of Papain-Like Cysteine Proteases in Plant Development. *Front. Plant Sci.* 9: 1717.

- Liu, X. & Baird, W.V. 2003. Differential Expression of Genes Regulated in Response to Drought or Salinity Stress in Sunflower. *Crop Sci.* 43: 678–687.
- Liu, X., Liu, S., Feng, Y., Liu, J.-Z., Chen, Y., Pham, K., *et al.* 2013. Structural insights into the N-terminal GIY–YIG endonuclease activity of Arabidopsis glutaredoxin AtGRXS16 in chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 9565–9570.
- Lo, M. 2004. Characterization of an Ultraviolet B-Induced Lipase in Arabidopsis. *Plant Physiol* 135: 947–958.
- Lohman, K.N., Gan, S., John, M.C. & Amasino, R.M. 1994. Molecular analysis of natural leaf senescence in Arabidopsis thaliana. *Physiol Plant* 92: 322–328.
- López-Otín, C. & Matrisian, L.M. 2007. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 7: 800–808.
- López-Otín, C. & Overall, C.M. 2002. Protease degradomics: A new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 509–519.
- Luo, F., Zhu, D., Zou, R., Duan, W. & Yan, Y. 2020. Wheat (*Triticum aestivum* L.) selenium-binding protein-A enhances cadmium tolerance via interaction between CXXC motif and cadmium and detoxification. *Au-thorea* doi: 10.22541/au.159986255.54120052.
- Machettira, A.B., Groß, L.E., Tillmann, B., Weis, B.L., English, G., Sommer, M.S., *et al.* 2012. Protein-Induced Modulation of Chloroplast Membrane Morphology. *Front Plant Sci* 2.
- Maksymiec, W. 2011. Effects of jasmonate and some other signalling factors on bean and onion growth during the initial phase of cadmium action. *Biologia Plantarum* 55: 112–118.
- Maksymiec, W. 2007. Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 29: 177–187.
- Maksymiec, W., Wianowska, D., Dawidowicz, A.L., Radkiewicz, S., Mardarowicz, M. & Krupa, Z. 2005. The level of jasmonic acid in Arabidopsis thaliana and Phaseolus coccineus plants under heavy metal stress. *J Plant Physiol* 162: 1338–1346.
- Malheiros, R.S.P., Costa, L.C., Ávila, R.T., Pimenta, T.M., Teixeira, L.S., Brito, F.A.L., *et al.* 2019. Selenium downregulates auxin and ethylene biosynthesis in rice seedlings to modify primary metabolism and root architecture. *Planta* 250: 333–345.
- Man, S.M. & Kanneganti, T.-D. 2016. Regulation of lysosomal dynamics and autophagy by CTSB/cathepsin B. *Autophagy* 12: 2504–2505.
- Mansfeld, J. 2009. Plant phospholipases A2: perspectives on biotechnological applications. *Biotechnology Letters* 31: 1373–1380.
- Martinez, M. & Diaz, I. 2008. The origin and evolution of plant cystatins and their target cysteine proteinases indicate a complex functional relationship. *BMC Evol Biol* 8: 198.

- Martín-Orozco, E., Cárđaba, B., del Pozo, V., de Andrés, B., Villalba, M., Gallardo, S., *et al.* 1994. Ole e I: Epitope Mapping, Cross-Reactivity with Other Oleaceae Pollens and Ultrastructural Localization. *Int Arch Allergy Immunol* 104: 160–170.
- Martins Alves, A.M., Pereira Menezes, S., Matos Lima, E., Peres Gramacho, K., Silva Andrade, B., Macêdo Ferreira, M., *et al.* 2019. The selenium-binding protein of *Theobroma cacao*: A thermostable protein involved in the witches' broom disease resistance. *Plant Physiol Biochem* 142: 472–481.
- Matos, A.R. & Pham-Thi, A.-T. 2009. Lipid deacylating enzymes in plants: Old activities, new genes. *Plant Physiol Biochem* 47: 491–503.
- Matsui, K., Fukutomi, S., Ishii, M. & Kajiwara, T. 2004. A tomato lipase homologous to DAD1 (LeLID1) is induced in post-germinative growing stage and encodes a triacylglycerol lipase. *FEBS Lett* 569: 195–200.
- May, T. & Soll, J. 2000. 14-3-3 Proteins Form a Guidance Complex with Chloroplast Precursor Proteins in Plants. *Plant Cell* 12: 53–64.
- Mazorra-Manzano, M.A., Ramírez-Suarez, J.C. & Yada, R.Y. 2018. Plant proteases for bioactive peptides release: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 58: 2147–2163.
- McKerrow, J.H., Caffrey, C., Kelly, B., Loke, P. & Sajid, M. 2006. PROTEASES IN PARASITIC DISEASES. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 1: 497–536.
- Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D. & Koornneef, M. 1998. *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* 282: 662–682.
- Meyer, Y., Buchanan, B.B., Vignols, F. & Reichheld, J.-P. 2009. Thioredoxins and Glutaredoxins: Unifying Elements in Redox Biology. *Annu. Rev. Genet.* 43: 335–367.
- Mindrebo, J.T., Nartey, C.M., Seto, Y., Burkart, M.D. & Noel, J.P. 2016. Unveiling the functional diversity of the alpha/beta hydrolase superfamily in the plant kingdom. *Curr Opin Struct Biol* 41: 233–246.
- Misas-Villamil, J.C., van der Hoorn, R.A.L. & Doehlemann, G. 2016. Papain-like cysteine proteases as hubs in plant immunity. *New Phytol* 212: 902–907.
- Mithöfer, A., Schulze, B. & Boland, W. 2004. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Lett* 566: 1–5.
- Miyaguchi, K. 2004. Localization of selenium-binding protein at the tips of rapidly extending protrusions. *Histochem Cell Biol* 121: 371–376.
- Módis, K., Bos, E.M., Calzia, E., van Goor, H., Coletta, C., Papapetropoulos, A., *et al.* 2014. Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part II. Pathophysiological and therapeutic aspects: Pathophysiology of H₂S and mitochondrial function. *Br J Pharmacol* 171: 2123–2146.
- Mueller, M.J. 1997. Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiol Plant* 100: 653–663.

- Nagpal, P., Ellis, C.M., Weber, H., Ploense, S.E., Barkawi, L.S., Guilfoyle, T.J., *et al.* 2005. Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* 132: 4107–4118.
- Nakamura, H., Nishinaka, Y., Ueda, S., Sasada, T., Ohshio, G., Imamura, M., *et al.* 2000. Expression of thioredoxin and glutaredoxin, redox-regulating proteins, in pancreatic cancer. *Cancer Detect Prev* 24: 53–60.
- Nardini, M. & Dijkstra, B.W. 1999. α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol* 9: 732–737.
- Nikiforova, M.N., Kimura, E.T., Gandhi, M., Biddinger, P.W., Knauf, J.A., Basolo, F., *et al.* 2003a. BRAF Mutations in Thyroid Tumors Are Restricted to Papillary Carcinomas and Anaplastic or Poorly Differentiated Carcinomas Arising from Papillary Carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 5399–5404.
- Nikiforova, V., Freitag, J., Kempa, S., Adamik, M., Hesse, H. & Hoefgen, R. 2003b. Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *Plant J.* 33: 633–650.
- Noctor, G., Reichheld, J.-P. & Foyer, C.H. 2018. ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Semin Cell Dev Biol* 80: 3–12.
- Noiriel, A., Benveniste, P., Banas, A., Stymne, S. & Bouvier-Navé, P. 2004. Expression in yeast of a novel phospholipase A1 cDNA from *Arabidopsis thaliana*: A. *thaliana* cDNA encoding a novel phospholipase A1. *Eur J Biochem* 271: 3752–3764.
- Novinec, M. & Lenarčič, B. 2013. Papain-like peptidases: structure, function, and evolution. *BioMol Concepts* 4: 287–308.
- Ohkubo, Y., Tanaka, M., Tabata, R., Ogawa-Ohnishi, M. & Matsubayashi, Y. 2017. Shoot-to-root mobile polypeptides involved in systemic regulation of nitrogen acquisition. *Nature Plants* 3: 17029.
- Oñate-Sánchez, L. & Vicente-Carbajosa, J. 2008. DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. *BMC Res Notes* 1: 1–7.
- Orengo, C.A. & Taylor, W.R. 1996. SSAP: Sequence structure alignment program for protein structure comparison. *Method Enzymol* 226: 617–635.
- Pastori, G.M. & Foyer, C.H. 2002. Common Components, Networks, and Pathways of Cross-Tolerance to Stress. The Central Role of “Redox” and Abscisic Acid-Mediated Controls. *Plant Physiol* 129: 460–468.
- Paul, R.U., Holk, A. & Scherer, G.F.E. 1998. Fatty acids and lysophospholipids as potential second messengers in auxin action. Rapid activation of phospholipase A2 activity by auxin in suspension-cultured parsley and soybean cells. *Plant J* 16: 601–611.
- Pauwels, L., Inzé, D. & Goossens, A. 2009. Jasmonate-inducible gene: what does it mean? *Trends Plant Sci* 14: 87–91.

- Peng, M., Bi, Y.-M., Zhu, T. & Rothstein, S.J. 2007. Genome-wide analysis of Arabidopsis responsive transcriptome to nitrogen limitation and its regulation by the ubiquitin ligase gene *NLA*. *Plant Mol Biol* 65: 775–797.
- Perfus-Barbeoch, L., Leonhardt, N., Vavasseur, A. & Forestier, C. 2002. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J* 32: 539–548.
- Philipp, T.M., Will, A., Richter, H., Winterhalter, P.R., Pohnert, G., Steinbrenner, H., *et al.* 2021. A coupled enzyme assay for detection of selenium-binding protein 1 (SELENBP1) methanethiol oxidase (MTO) activity in mature enterocytes. *Redox Biol* 43: 101972.
- Pilon-Smits, E.A.H. 2017. Mechanisms of Plant Selenium Hyperaccumulation. In: *Selenium in plants* (E. A. H. Pilon-Smits, L. H. E. Winkel, & Z.-Q. Lin, eds), pp. 53–66. Springer International Publishing, Cham.
- Pilon-Smits, E.A.H. & Quinn, C.F. 2010. Selenium Metabolism in Plants. In: *Cell Biology of Metals and Nutrients* (R. Hell & R.-R. Mendel, eds), pp. 225–241. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Pleiss, J., Fischer, M., Peiker, M., Thiele, C. & Schmid, R.D. 2000. Lipase engineering database Understanding and exploiting sequence–structure–function relationships. *J Mol Catal B-Enzym* 10: 491–508.
- Pohl, N.M., Tong, C., Fang, W., Bi, X., Li, T. & Yang, W. 2009. Transcriptional Regulation and Biological Functions of Selenium-Binding Protein 1 in Colorectal Cancer In Vitro and in Nude Mouse Xenografts. *PLoS ONE* 4: e7774.
- Pol, A., Renkema, G.H., Tangerman, A., Winkel, E.G., Engelke, U.F., de Brouwer, A.P.M., *et al.* 2018. Mutations in SELENBP1, encoding a novel human methanethiol oxidase, cause extraoral halitosis. *Nat Genet* 50: 120–129.
- Porat, A., Sagiv, Y. & Elazar, Z. 2000. A 56-kDa Selenium-binding Protein Participates in Intra-Golgi Protein Transport. *J. Biol. Chem.* 275: 14457–14465.
- Prabucka, B., Drzymala, A. & Grabowska, A. 2013. Molecular cloning and expression analysis of the main gliadin-degrading cysteine endopeptidase EP8 from triticale. *J Cereal Sci* 58: 284–289.
- Qbadou, S., Becker, T., Mirus, O., Tews, I., Soll, J. & Schleiff, E. 2006. The molecular chaperone Hsp90 delivers precursor proteins to the chloroplast import receptor Toc64. *EMBO J* 25: 1836–1847.
- Rakashanda, S., Rana, F., Rafiq, S., Masood, A. & Amin, S. 2012. Role of proteases in cancer: A review. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 7: 90–101.
- Ramel, F., Sulmon, C., Cabello-Hurtado, F., Tacconat, L., Martin-Magniette, M.-L., Renou, J.-P., *et al.* 2007. Genome-wide interacting effects of sucrose and herbicide-mediated stress in Arabidopsis thaliana: novel insights into atrazine toxicity and sucrose-induced tolerance. *BMC Genomics* 8: 450.
- Rauci, R., Colonna, G., Guerriero, E., Capone, F., Accardo, M., Castello, G., *et al.* 2011. Structural and functional studies of the human selenium binding protein-1 and its involvement in hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Proteins Proteom* 1814: 513–522.

- Rawlings, N.D. 2020. Twenty-five years of nomenclature and classification of proteolytic enzymes. *Biochim Biophys Proteins Proteom* 1868: 140345.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J. & Bateman, A. 2010. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 38: D227–D233.
- Rawlings, N.D., Pearl, L.H. & Buttle, D.J. 1992. The Baculovirus *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Genome Includes a Papain-Like Sequence. *Biol Chem Hoppe Seyler* 373: 1211–1215.
- Rey, P., Becuwe, N., Tourrette, S. & Rouhier, N. 2017. Involvement of *Arabidopsis glutaredoxin S14* in the maintenance of chlorophyll content. *Plant Cell Environ* 40: 2319–2332.
- Richau, K.H., Kaschani, F., Verdoes, M., Pansuriya, T.C., Niessen, S., Stüber, K., *et al.* 2012. Subclassification and Biochemical Analysis of Plant Papain-Like Cysteine Proteases Displays Subfamily-Specific Characteristics. *Plant Physiol.* 158: 1583–1599.
- Richmond, G.S. & Smith, T.K. 2011. Phospholipases A1. *Int J Mol Sci* 12: 588–612.
- Rigal, A., Doyle, S.M. & Robert, S. 2015. Live Cell Imaging of FM4-64, a Tool for Tracing the Endocytic Pathways in *Arabidopsis* Root Cells. In: *Plant Cell Expansion* (J. M. Estevez, ed), pp. 93–103. Springer New York, New York, NY.
- Rodríguez, R., Villalba, M., Batanero, E., Gonzalez, E.M., Monsalve, R.I., Huecas, S., *et al.* 2002. Allergenic diversity of the olive pollen. *Allergy* 57: 6–16.
- Rodríguez-García, M.I. & Fernández, M. del C. 1990. Ultrastructural evidence of endoplasmic reticulum changes during the maturation of the olive pollen grain (*Olea europaea* L., Oleaceae). *Pl Syst Evol* 171: 221–231.
- Rodríguez-García, M.I., Fernández, M.C. & Alché, J.D. 1995a. Immunocytochemical localization of allergenic protein (Oie e I) in the endoplasmic reticulum of the developing pollen grain of olive. *Planta* 196: 558–563.
- Rodríguez-García, M.I., Fernández, M.C., Alché, J.D. & Olmedilla, A. 1995b. Endoplasmic reticulum as a storage site for allergenic proteins in pollen grains of several Oleaceae. *Protoplasma* 187: 111–116.
- Romero-Puertas, M.C., Corpas, F.J., Rodríguez-Serrano, M., Gómez, M., del Río, L.A. & Sandalio, L.M. 2007. Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *J Plant Physiol* 164: 1346–1357.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., *et al.* 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Syst Biol* 61: 539–542.
- Rouhier, N. 2010. Plant glutaredoxins: pivotal players in redox biology and iron-sulphur centre assembly. *New Phytol* 186: 365–372.

Rouhier, N., Lemaire, S.D. & Jacquot, J.-P. 2008. The Role of Glutathione in Photosynthetic Organisms: Emerging Functions for Glutaredoxins and Glutathionylation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 143–166.

Roy, A., Kucukural, A. & Zhang, Y. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5: 725–738.

Ruduś, I., Terai, H., Shimizu, T., Kojima, H., Hattori, K., Nishimori, Y., *et al.* 2014. Wound-induced expression of DEFECTIVE IN ANTHHER DEHISCENCE1 and DAD1-like lipase genes is mediated by both CORONATIVE INSENSITIVE1. *Plant Cell Rep* 33: 849–860.

Ruppel, N.J., Logsdon, C.A., Whippo, C.W., Inoue, K. & Hangarter, R.P. 2011. A Mutation in Arabidopsis SEEDLING PLASTID DEVELOPMENT1 Affects Plastid Differentiation in Embryo-Derived Tissues during Seedling Growth. *Plant Physiol* 155: 342–353.

Ryu, S.B. 2004. Phospholipid-derived signaling mediated by phospholipase A in plants. *Trends Plant Sci* 9: 229–235.

Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gómez, M., Romero-Puertas, M.C. & del Río, L.A. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J Exp Bot* 52: 2115–2126.

Sarry, J.-E., Kuhn, L., Ducruix, C., Lafaye, A., Junot, C., Hugouvieux, V., *et al.* 2006. The early responses of Arabidopsis thaliana cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics* 6: 2180–2198.

Sasaki-Sekimoto, Y., Taki, N., Obayashi, T., Aono, M., Matsumoto, F., Sakurai, N., *et al.* 2005. Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in Arabidopsis: Metabolism regulated by jasmonates in Arabidopsis. *Plant J* 44: 653–668.

Sato, M., Mitra, R.M., Collier, J., Wang, D., Spivey, N.W., Dewdney, J., *et al.* 2007. A high-performance, small-scale microarray for expression profiling of many samples in Arabidopsis-pathogen studies: High-performance, small-scale microarray. *Plant J* 49: 565–577.

Sawada, K., Hasegawa, M., Tokuda, L., Kameyama, J., Kodama, O., Kohchi, T., *et al.* 2004. Enhanced Resistance to Blast Fungus and Bacterial Blight in Transgenic Rice Constitutively Expressing OsSBP, a Rice Homologue of Mammalian Selenium-binding Proteins. *Biosci Biotech Bioch* 68: 873–880.

Sawada, K., Tokuda, L. & Shinmy, A. 2003. Characterization of the rice blast fungal elicitor-responsive gene OsSBP encoding a homolog to the mammalian Selenium-binding Proteins. *Plant Biotechnol.* 20: 177–181.

Scherer, G.F.E., Zahn, M., Callis, J. & Jones, A.M. 2007. A role for phospholipase A in auxin-regulated gene expression. *FEBS Lett* 581: 4205–4211.

Schild, F., Kieffer-Jaquinod, S., Palencia, A., Cobessi, D., Sarret, G., Zubieta, C., *et al.* 2014. Biochemical and Biophysical Characterization of the Selenium-binding and Reducing Site in Arabidopsis thaliana Homologue to Mammals Selenium-binding Protein 1. *J. Biol. Chem.* 289: 31765–31776.

- Scortegagna, M., Martin, R.J., Kladney, R., Neumann, R.G. & Arbeit, J.M. 2009. Hypoxia-Inducible Factor-1 α Suppresses Squamous Carcinogenic Progression and Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cancer Res.* 69: 2638–2646.
- Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., *et al.* 2001. Monitoring the Expression Pattern of 1300 Arabidopsis Genes under Drought and Cold Stresses by Using a Full-Length cDNA Microarray. *Plant Cell* 13: 61–72.
- Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.-J., Lee, Y.-H., Lee, Y.-W., Hwang, I., *et al.* 2001. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc Natl Acad Sci* 98: 4788–4793.
- Seo, Y.S., Kim, E.Y., Kim, J.H. & Kim, W.T. 2009. Enzymatic characterization of class I DAD1-like acylhydrolase members targeted to chloroplast in Arabidopsis. *FEBS Lett* 583: 2301–2307.
- Seo, Y.S., Kim, E.Y. & Kim, W.T. 2011. The Arabidopsis sn-1-specific mitochondrial acylhydrolase AtDLAH is positively correlated with seed viability. *J Exp Bot* 62: 5683–5698.
- Seo, Y.S., Kim, E.Y., Mang, H.G. & Kim, W.T. 2007. Heterologous expression, and biochemical and cellular characterization of CaPLA1 encoding a hot pepper phospholipase A1 homolog: Hot pepper phospholipase A1. *Plant J* 53: 895–908.
- Sharma, R., Priya, P. & Jain, M. 2013. Modified expression of an auxin-responsive rice CC-type glutaredoxin gene affects multiple abiotic stress responses. *Planta* 238: 871–884.
- Shen, J., Suen, P.K., Wang, X., Lin, Y., Lo, S.W., Rojo, E., *et al.* 2013. An in vivo expression system for the identification of cargo proteins of vacuolar sorting receptors in Arabidopsis culture cells. *Plant J* 75: 1003–1017.
- Shindo, T. & Van Der Hoorn, R.A.L. 2008. Papain-like cysteine proteases: key players at molecular battlefields employed by both plants and their invaders. *Mol Plant Pathol* 9: 119–125.
- Sigrist, C.J.A., Cerutti, L., de Castro, E., Langendijk-Genevaux, P.S., Bulliard, V., Bairoch, A., *et al.* 2010. PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. *Nucleic Acids Res* 38: D161–D166.
- Siklos, M., BenAissa, M. & Thatcher, G.R.J. 2015. Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 5: 506–519.
- Sorensen, A.-M., Kröber, S., Unte, U.S., Huijser, P., Dekker, K. & Saedler, H. 2003. The Arabidopsis ABORTED MICROSPORES (AMS) gene encodes a MYC class transcription factor. *Plant J* 33: 413–423.
- Stöver, B.C. & Müller, K.F. 2010. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics* 11.

- Ströher, E., Grassl, J., Carrie, C., Fenske, R., Whelan, J. & Millar, A.H. 2016. Glutaredoxin S15 Is Involved in Fe-S Cluster Transfer in Mitochondria Influencing Lipoic Acid-Dependent Enzymes, Plant Growth, and Arsenic Tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol* 170: 1284-1299.
- Sundaram, S., Rathinasabapathi, B., Ma, L.Q. & Rosen, B.P. 2008. An Arsenate-activated Glutaredoxin from the Arsenic Hyperaccumulator Fern *Pteris vittata* L. Regulates Intracellular Arsenite. *J. Biol. Chem.* 283: 6095–6101.
- Sundaram, S., Wu, S., Ma, L.Q. & Rathinasabapathi, B. 2009. Expression of a *Pteris vittata* glutaredoxin PvGRX5 in transgenic *Arabidopsis thaliana* increases plant arsenic tolerance and decreases arsenic accumulation in the leaves. *Plant Cell Environ* 32: 851–858.
- Swindell, W.R. 2006. The Association Among Gene Expression Responses to Nine Abiotic Stress Treatments in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 174: 1811–1824.
- Sworfford, D.L. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods).
- Sychta, K., Dubas, E., Yamada, K., Słomka, A., Krzewska, M. & Kuta, E. 2020. Papain-like cysteine proteases are involved in programmed cell death in plants under heavy metal stress. *Environ Exp Bot* 174: 104041.
- Szabo, C., Ransy, C., Módis, K., Andriamihaja, M., Murghes, B., Coletta, C., *et al.* 2014. Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms: Biochemistry of H₂S and mitochondrial function. *Br J Pharmacol* 171: 2099–2122.
- Tabata, R., Ikezaki, M., Fujibe, T., Aida, M., Tian, C., Ueno, Y., *et al.* 2010. Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR6 and 8 Regulate Jasmonic Acid Biosynthesis and Floral Organ Development via Repression of Class 1 KNOX Genes. *Plant Cell Physiol* 51: 164–175.
- Tamaoki, M., Freeman, J.L. & Pilon-Smits, E.A.H. 2008. Cooperative Ethylene and Jasmonic Acid Signaling Regulates Selenite Resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 146: 1219–1230.
- Tamaoki, M. & Maruyama-Nakashita, A. 2017. Molecular Mechanisms of Selenium Responses and Resistance in Plants. In: *Selenium in plants* (E. A. H. Pilon-Smits, L. H. E. Winkel, & Z.-Q. Lin, eds), pp. 35–51. Springer International Publishing, Cham.
- Thieme, C.J., Rojas-Triana, M., Stecyk, E., Schudoma, C., Zhang, W., Yang, L., *et al.* 2015. Endogenous Arabidopsis messenger RNAs transported to distant tissues. *Nature Plants* 1: 15025.
- Turk, B. 2006. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* 5: 785–799.
- Udawela, M., Money, T.T., Neo, J., Seo, M.S., Scarr, E., Dean, B., *et al.* 2015. SELENBP1 expression in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Transl Psychiatry* 5: e615–e615.
- Upchurch, R.G. 2008. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnol Lett* 30: 967–977.

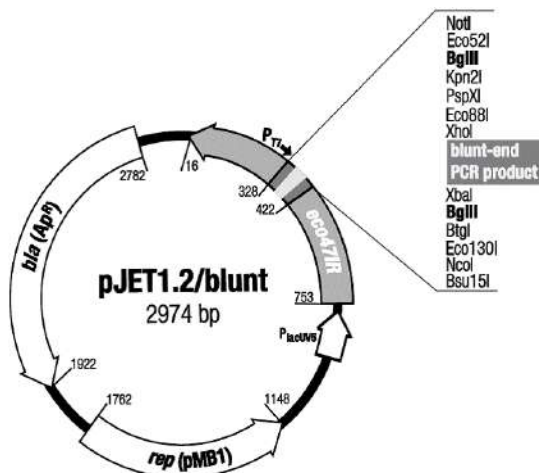
- Valassakis, C., Dervisi, I., Agalou, A., Papandreou, N., Kapetsis, G., Podia, V., *et al.* 2019. Novel interactions of Selenium Binding Protein family with the PICOT containing proteins AtGRXS14 and AtGRXS16 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 281: 102–112.
- Valassakis, C., Livanos, P., Minopetrou, M., Haralampidis, K. & Roussis, A. 2018. Promoter analysis and functional implications of the selenium binding protein (SBP) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol* 224–225: 19–29.
- van der Hoorn, R.A.L. 2008. Plant Proteases: From Phenotypes to Molecular Mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 191–223.
- van der Hoorn, R.A.L., Leeuwenburgh, M.A., Bogyo, M., Joosten, M.H.A.J. & Peck, S.C. 2004. Activity Profiling of Papain-Like Cysteine Proteases in Plants. *Plant Physiol.* 135: 1170–1178.
- Van Hoewyk, D. 2018. Defects in endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) increase selenate sensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* 13: e1171451.
- Van Hoewyk, D., Pilon, M. & Pilon-Smits, E.A.H. 2008. The functions of NifS-like proteins in plant sulfur and selenium metabolism. *Plant Sci* 174: 117–123.
- van Zundert, G.C.P., Rodrigues, J.P.G.L.M., Trellet, M., Schmitz, C., Kastiris, P.L., Karaca, E., *et al.* 2016. The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *J Mol Biol* 428: 720–725.
- Verma, S., Dixit, R. & Pandey, K.C. 2016. Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. *Front. Pharmacol.* 7.
- Vijaybhaskar, V., Subbiah, V., Kaur, J., Vijayakumari, P. & Siddiqi, I. 2008. Identification of a root-specific glycosyltransferase from *Arabidopsis* and characterization of its promoter. *J Biosci* 33: 185–193.
- Villalba, M., Batanero, E., Lopez-Otin, C., Sanchez, L.M., Monsalve, R.I., Gonzalez De La Pena, M.A., *et al.* 1993. The amino acid sequence of Ole e I, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen. *Eur J Biochem* 216: 863–869.
- Villalba, M., Batanero, E., Monsalve, R.I., González De La Peña, M.A., Lahoz, C. & Rodríguez, R. 1994. Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen. Polymorphism analysis and tissue specificity. *J Biol Chem* 269: 15217–15222.
- Wan, S., Mak, M.-W. & Kung, S.-Y. 2016. Ensemble Linear Neighborhood Propagation for Predicting Subchloroplast Localization of Multi-Location Proteins. *J Proteome Res* 15: 4755–4762.
- Wang, N., Chen, Y., Yang, X. & Jiang, Y. 2014. Selenium-binding protein 1 is associated with the degree of colorectal cancer differentiation and is regulated by histone modification. *Oncol Rep* 31: 2506–2514.
- Wang, X. 2001. PLANT PHOSPHOLIPASES. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 211-231.

- Wang, Y., Fang, W., Huang, Y., Hu, F., Ying, Q., Yang, W., *et al.* 2015. Reduction of selenium-binding protein 1 sensitizes cancer cells to selenite via elevating extracellular glutathione: A novel mechanism of cancer-specific cytotoxicity of selenite. *Free Radic Biol Med* 79: 186–196.
- Wang, Y., Zhu, W., Chen, X., Wei, G., Jiang, G. & Zhang, G. 2020. Selenium-binding protein 1 transcriptionally activates p21 expression via p53-independent mechanism and its frequent reduction associates with poor prognosis in bladder cancer. *J Transl Med* 18: 17.
- Wasternack, C. 2007. Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Ann Bot* 100: 681–697.
- Wei, D., Liu, M., Chen, H., Zheng, Y., Liu, Y., Wang, X., *et al.* 2018. INDUCER OF CBF EXPRESSION 1 is a male fertility regulator impacting anther dehydration in Arabidopsis. *PLoS Genet* 14: e1007695.
- Welss, T., Papoutsaki, M., Michel, G., Reifenberger, J., Chimenti, S., Ruzicka, T., *et al.* 2003. Molecular basis of basal cell carcinoma: Analysis of differential gene expression by differential display PCR and expression array. *Int. J. Cancer* 104: 66–72.
- White, P.J. 2018. Selenium metabolism in plants. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1862: 2333–2342.
- Winkler, F.K., D’Arcy, A. & Hunziker, W. 1990. Structure of human pancreatic lipase. *Lett Nature* 343: 771–774.
- Wolf, A.E., Dietz, K.-J. & Schröder, P. 1996. Degradation of glutathione S -conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole. *FEBS Letters* 384: 31–34.
- Wu, F.-H., Shen, S.-C., Lee, L.-Y., Lee, S.-H., Chan, M.-T. & Lin, C.-S. 2009. Tape-Arabidopsis Sandwich - a simpler Arabidopsis protoplast isolation method. *Plant Methods* 5: 10.
- Wu, Q., Lin, J., Liu, J.-Z., Wang, X., Lim, W., Oh, M., *et al.* 2012. Ectopic expression of Arabidopsis glutaredoxin AtGRXS17 enhances thermotolerance in tomato: Ectopic expression of AtGRXS17 in tomato. *Plant Biotechnol J* 10: 945–955.
- Wu, Q., Yang, J., Cheng, N., Hirschi, K.D., White, F.F. & Park, S. 2017. Glutaredoxins in plant development, abiotic stress response, and iron homeostasis: From model organisms to crops. *Environ Exp Bot* 139: 91–98.
- Xing, S. & Zachgo, S. 2008. ROXY1 and ROXY2, two Arabidopsis glutaredoxin genes, are required for anther development. *Plant J* 53: 790–801.
- Yang, J., Roy, A. & Zhang, Y. 2013. Protein–ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. *Bioinformatics* 29: 2588–2595.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. & Zhang, Y. 2015. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods* 12: 7–8.

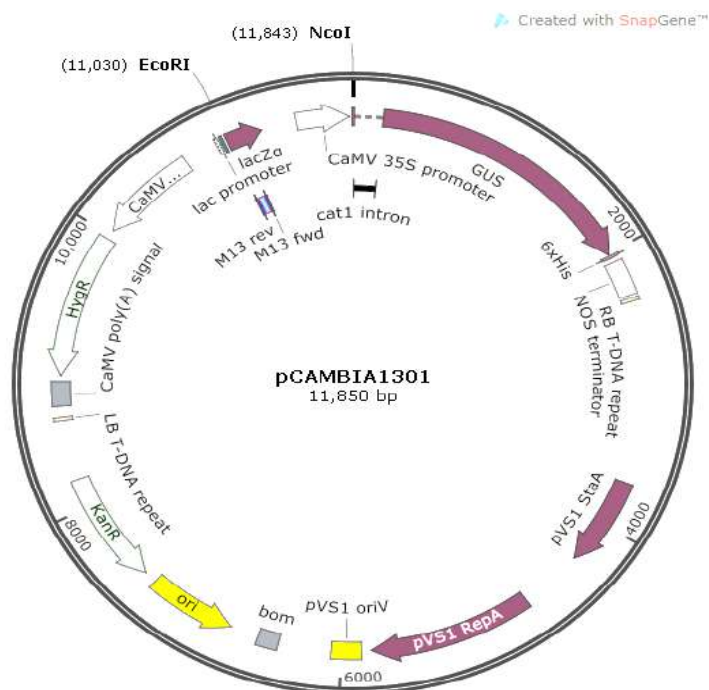
- Yang, L., Ji, J., Harris-Shultz, K.R., Wang, H., Wang, H., Abd-Allah, E.F., *et al.* 2016. The Dynamic Changes of the Plasma Membrane Proteins and the Protective Roles of Nitric Oxide in Rice Subjected to Heavy Metal Cadmium Stress. *Front Plant Sci* 7.
- Yang, M. & Sytkowski, A.J. 1998. Differential Expression and Androgen Regulation of the Human Selenium-binding Protein Gene HSP56 in Prostate Cancer Cells. *Cancer Res* 3150–3153.
- Yang, W. & Diamond, A.M. 2013. Selenium-binding protein 1 as a tumor suppressor and a prognostic indicator of clinical outcome. *Biomark Res* 1: 15.
- Yi, H., Park, D. & Lee, Y. 1996. In vivo evidence for the involvement of phospholipase A and protein kinase in the signal transduction pathway for auxin-induced corn coleoptile elongation. *Physiologia Plantarum* 96: 359–368.
- Ying, Q., Ansong, E., Diamond, A.M., Lu, Z., Yang, W. & Bie, X. 2015. Quantitative Proteomic Analysis Reveals That Anti-Cancer Effects of Selenium-Binding Protein 1 In Vivo Are Associated with Metabolic Pathways. *PLoS ONE* 10: e0126285.
- Yu-Rice, Y., Edassery, S.L., Urban, N., Hellstrom, I., Hellstrom, K.E., Deng, Y., *et al.* 2017. Selenium-Binding Protein 1 (SBP1) autoantibodies in ovarian disorders and ovarian cancer. *Reproduction* 153: 277–284.
- Zhang, C., Wang, Y.E., Zhang, P., Liu, F., Sung, C.J., Steinhoff, M.M., *et al.* 2010. Progressive loss of selenium-binding protein 1 expression correlates with increasing epithelial proliferation and papillary complexity in ovarian serous borderline tumor and low-grade serous carcinoma. *Hum Pathol* 41: 255–261.
- Zhang, N. & Jones, B.L. 1995. Characterization of Germinated Barley Endoproteolytic Enzymes by Two-dimensional Gel Electrophoresis. *J Cereal Sci* 145–153.
- Zhang, Z., Collinge, D.B. & Thordal-Christensen, H. 1995. Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant J* 8: 139–145.
- Zhao, C., Johnson, B.J., Kositsup, B. & Beers, E.P. 2000. Exploiting Secondary Growth in Arabidopsis. Construction of Xylem and Bark cDNA Libraries and Cloning of Three Xylem Endopeptidases. *Plant Physiol.* 123: 1185–1196.
- Zhao, Y., Hull, A.K., Gupta, N.R., Goss, K.A., Alonso, J., Ecker, J.R., *et al.* 2002. Trp-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes Dev.* 16: 3100–3112.
- Zhu-Salzman, K., Salzman, R.A., Ahn, J.-E. & Koiwa, H. 2004. Transcriptional Regulation of Sorghum Defense Determinants against a Phloem-Feeding Aphid. *Plant Physiol.* 134: 420–431.
- Ziebuhr, J., Thiel, V. & Gorbalenya, A.E. 2001. The Autocatalytic Release of a Putative RNA Virus Transcription Factor from Its Polyprotein Precursor Involves Two Paralogous Papain-like Proteases That Cleave the Same Peptide Bond. *J. Biol. Chem.* 276: 33220–33232.
- Zou, Z., Xie, G. & Yang, L. 2017. Papain-like cysteine protease encoding genes in rubber (*Hevea brasiliensis*): comparative genomics, phylogenetic, and transcriptional profiling analysis. *Planta* 246: 999–1018.

Zupan, J., Muth, T.R., Draper, O. & Zambryski, P. 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J* 23: 11–28.

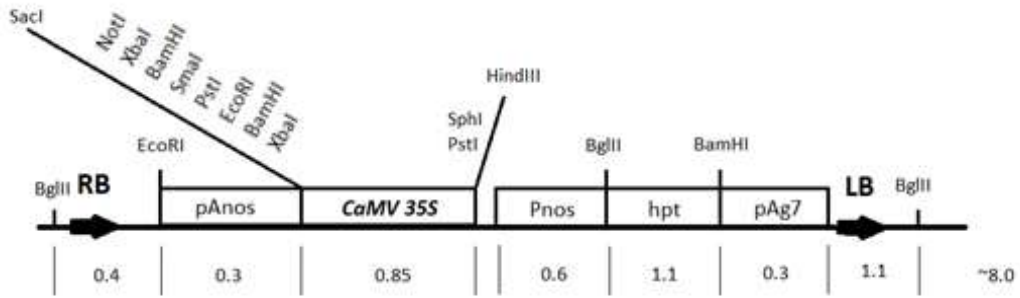
Παράρτημα Ι



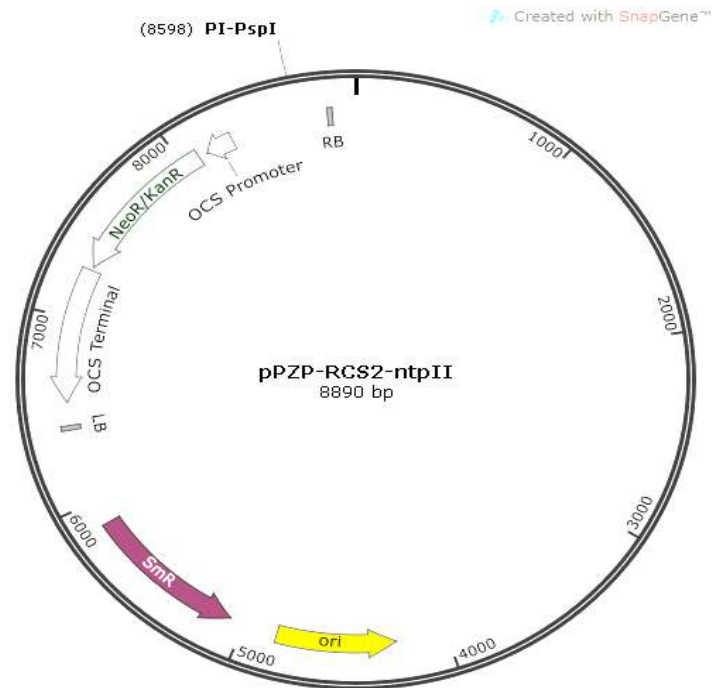
Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα pJET1.2/blunt και την αναλυτική παρουσίαση των πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (MCS).



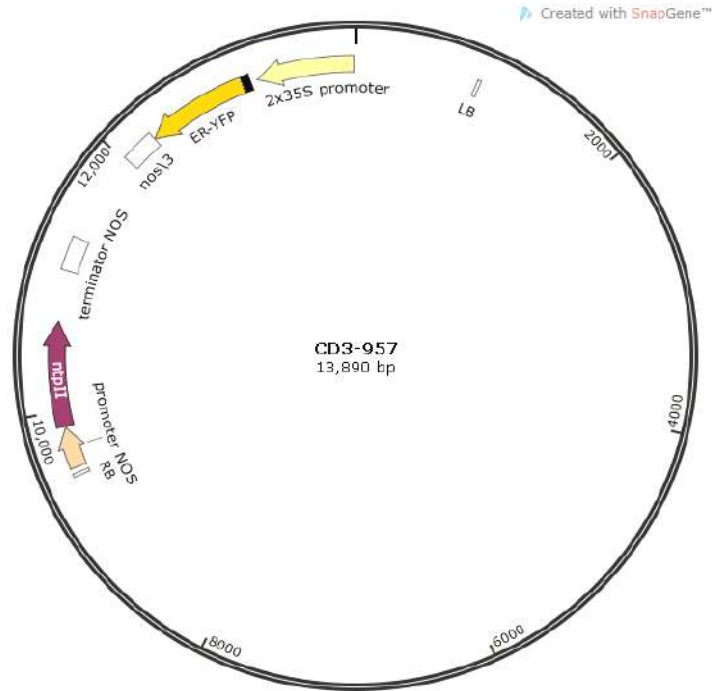
Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα pCambia-1301 με την περιοχή T-DNA, η οποία φέρει γονίδιο αναφοράς GUS, την MCS και το γονίδιο ανθεκτικότητας σε υγρομυκίνη. Δημιουργήθηκε με την εφαρμογή SnapGene.



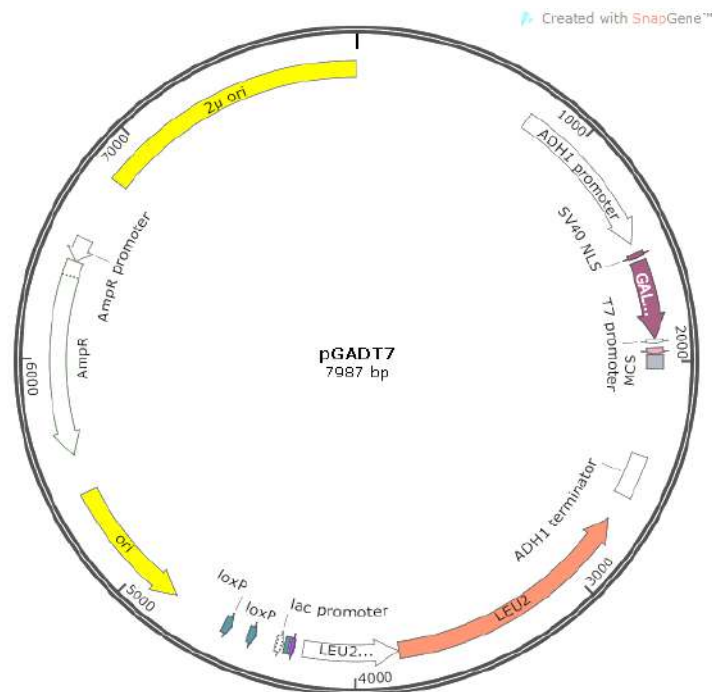
Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της T-DNA περιοχής του πλασμιδιακού φορέα pGPTV-HPT.



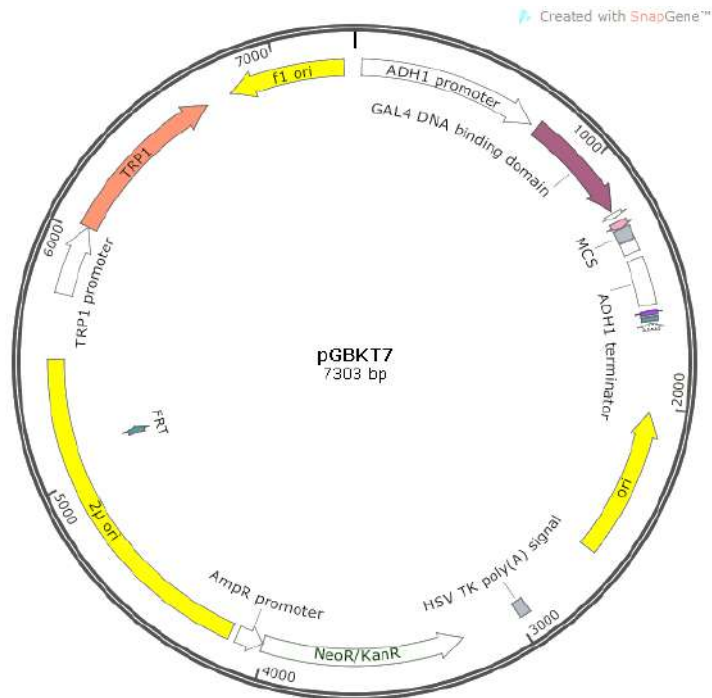
Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα pPZP-RCS2-ntpII (CD3-1061) με την περιοχή T-DNA, η οποία φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας σε καναμυκίνη (KanR). Δημιουργήθηκε με την εφαρμογή SnapGene.



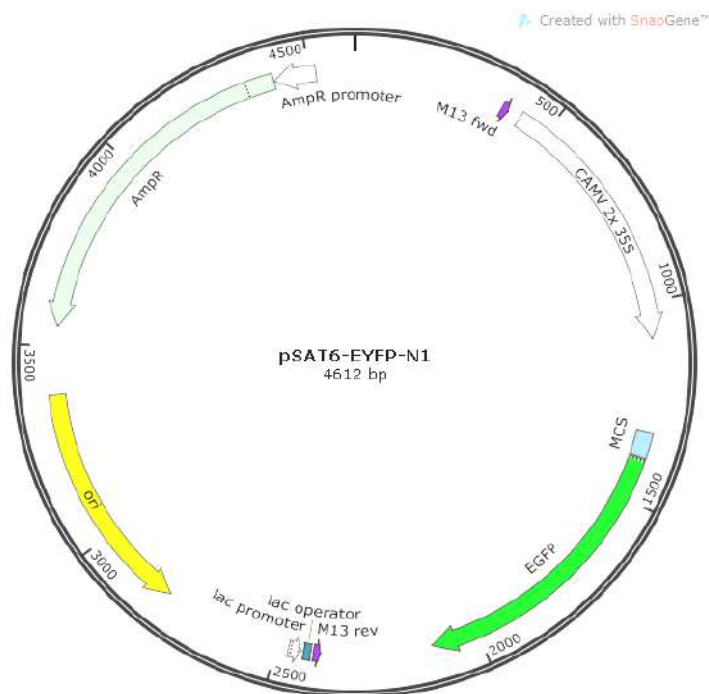
Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση του δυαδικού φορέα CD3-957 (ER-957) για στόχευση στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Δημιουργήθηκε με την εφαρμογή SnapGene.



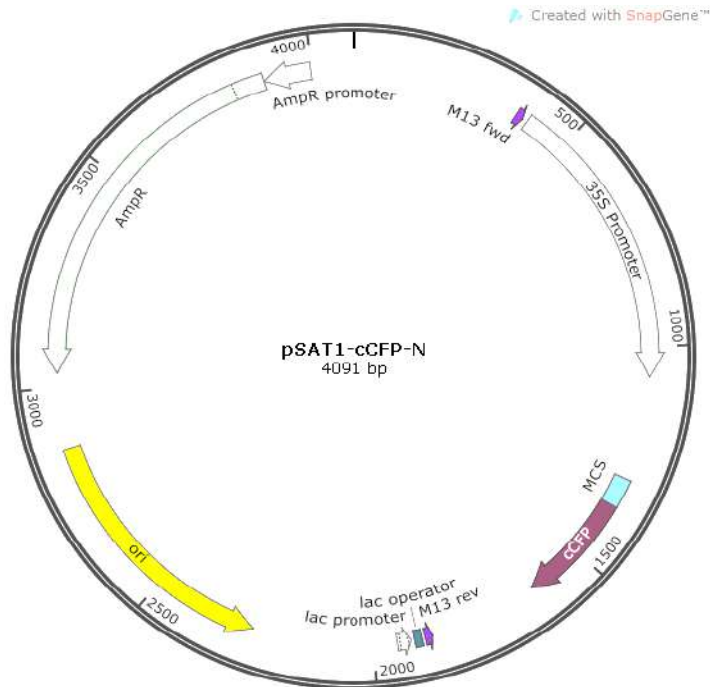
Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα pGADT7 που φέρει τα στοιχεία GAL4 AD μαζί με το πεπτίδιο πυρηνικού εντοπισμού SV40 NLS, την περιοχή πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (MCS), το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (AmpR) για επιλογή στα βακτήρια και το γονίδιο βιοσύνθεσης της λευκίνης (LEU2) για επιλογή στη ζύμη. Δημιουργήθηκε με την εφαρμογή SnapGene.



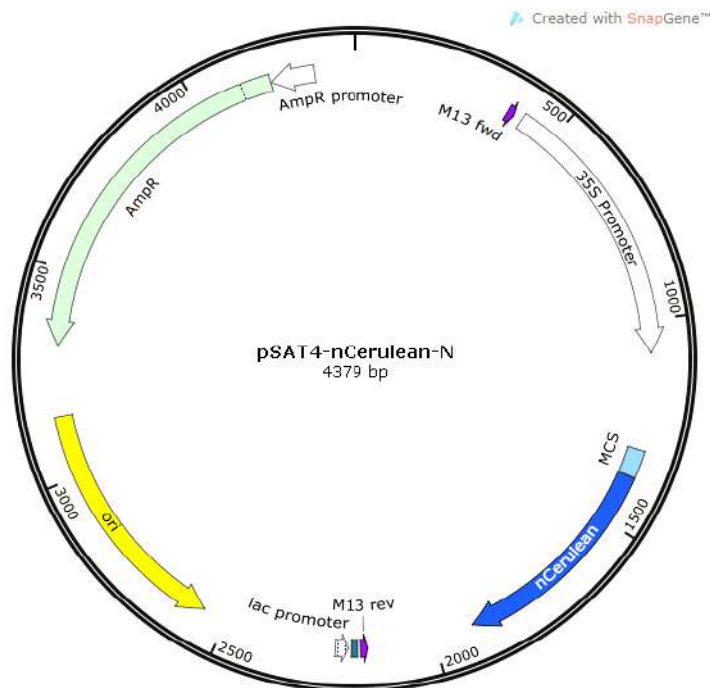
Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδικού φορέα pGBKT7, ο οποίος φέρει τα στοιχεία GAL4 DNA-BD, την περιοχή πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (MCS), το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμικίνη (KanR) για επιλογή στα βακτήρια και το γονίδιο βιοσύνθεσης τρυπτοφάνης (Trp) για επιλογή στη ζύμη. Δημιουργήθηκε με την εφαρμογή SnapGene.



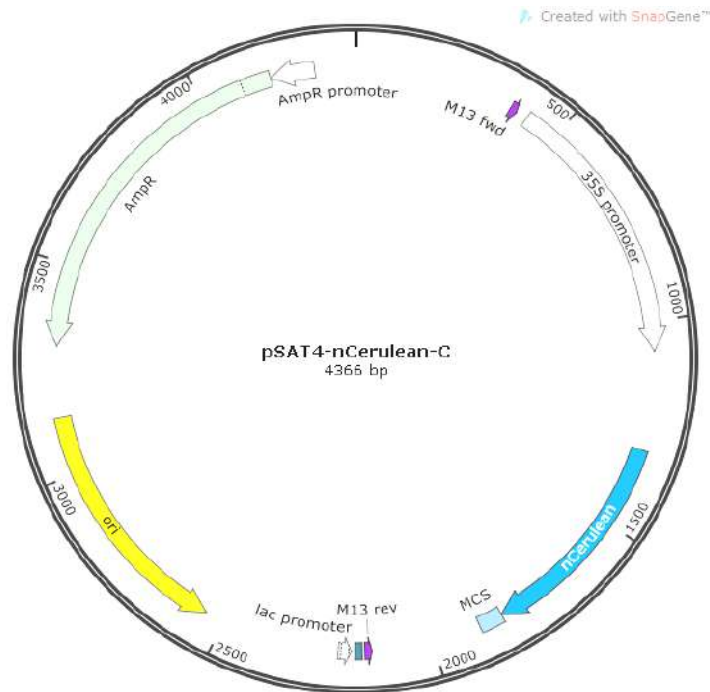
Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδικού φορέα pSAT6-EYFP-N1 (pE3225) που φέρει την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, EYFP σε συνέχεια της περιοχής των πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης υπό τον έλεγχο ενός ισχυρού υποκινητή (CaMV 35S), ενώ φέρει και το γονίδιο ανθεκτικότητας σε αμικικιλίνη (AmpR). Δημιουργήθηκε με την εφαρμογή SnapGene.



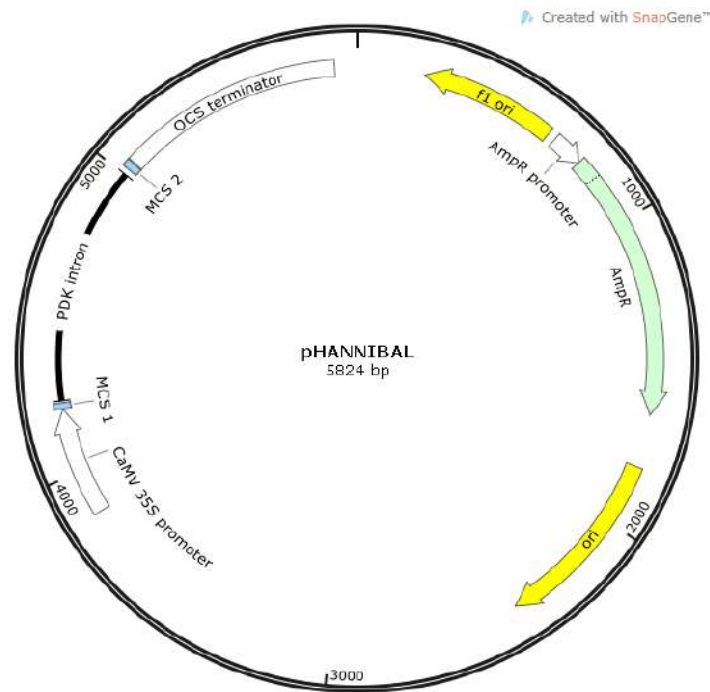
Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα pSAT1-cCFP-N (pE3449) φέρει τη περιοχή cCFP σε ακολουθία με την περιοχή των πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (MCS) και υπό τον έλεγχο ενός ισχυρού υποκινητή (35S). Τέλος, φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (AmpR). Δημιουργήθηκε με την εφαρμογή SnapGene.



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα pSAT4-nCerulean-N (pE3309) φέρει τη περιοχή nCerulean σε ακολουθία με την περιοχή των πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (MCS) και υπό τον έλεγχο ενός ισχυρού υποκινητή (35S). Τέλος, φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (AmpR). Δημιουργήθηκε με την εφαρμογή SnapGene.



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα pSAT4-nCerulean-C (pE3416) φέρει τη περιοχή nCerulean σε ακολουθία με την περιοχή των πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (MCS) και υπό τον έλεγχο ενός ισχυρού υποκινητή (35S). Τέλος, φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (AmpR). Δημιουργήθηκε με την εφαρμογή SnapGene.



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα pHANNIBAL όπου φαίνονται οι περιοχές πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (MCS1, MCS2), το εσώνιο PDK, ο ισχυρός υποκινητής 35S και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (AmpR) για τα βακτήρια. Δημιουργήθηκε με την εφαρμογή SnapGene.

Παράρτημα II

Πίνακας 1: Πληροφορίες των πρωτεϊνικών αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου της οικογένειας των φωσφολιπασών DAD1.

Είδος	Κωδικός	Μήκος(aa)	Φύλο	Τάξη	Πρωτεϊνικός χαρακτηρισμός
<i>Rhizomucor mieher</i>	P19515.2	363	Mucoromycota	Mucorales	Triacylglycerol lipase
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	XP_001694655.1	557	Chlorophyta	Chlamydomonadales	predicted protein
<i>Glycine max</i>	XP_003551710.1	430	Streptophyta	Fabales	phospholipase A(1) DAD1, chloroplastic
<i>Punica granatum</i>	PKH56392.1	447	Streptophyta	Myrtales	hypothetical protein CRG98_050308
<i>Prunus mume</i>	XP_008232525.1	455	Streptophyta	Rosales	PREDICTED: phospholipase A(1) DAD1, chloroplastic-like
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q948R1.1	447	Streptophyta	Brassicales	Phospholipase A(1) DAD1, chloroplastic
<i>Eutrema salsugineum</i>	XP_006397662.2	448	Streptophyta	Brassicales	phospholipase A(1) DAD1, chloroplastic
<i>Quercus suber</i>	XP_023896578.1	466	Streptophyta	Fagales	phospholipase A(1) DAD1, chloroplastic-like
<i>Ricinus communis</i>	XP_002511581.1	446	Streptophyta	Malpighiales	PREDICTED: phospholipase A(1) DAD1, chloroplastic
<i>Citrus clementina</i>	XP_006445434.2	454	Streptophyta	Sapindales	phospholipase A(1) DAD1, chloroplastic
<i>Gossypium hirsutum</i>	XP_016732158.1	429	Streptophyta	Malvales	PREDICTED: phospholipase A(1) DAD1, chloroplastic-like
<i>Beta vulgaris subsp. vulgaris</i>	XP_019107687.1	511	Streptophyta	Caryophyllales	PREDICTED: phospholipase A(1) DAD1, chloroplastic
<i>Nicotiana sylvestris</i>	XP_009779306.1	467	Streptophyta	Solanales	PREDICTED: phospholipase A(1) DAD1, chloroplastic-like
<i>Helianthus annuus</i>	XP_022031666.1	368	Streptophyta	Asterales	phospholipase A(1) DAD1, chloroplastic-like
<i>Nelumbo nucifera</i>	XP_010275454.1	426	Streptophyta	Proteales	PREDICTED: phospholipase A(1) DAD1, chloroplastic-like
<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	XP_015616106.1	286	Streptophyta	Poales	PREDICTED: phospholipase A(1) DAD1, chloroplastic-like

<i>Zea mays</i>	XP_023158082.1	385	Streptophyta	Poales	phospholipase A(1) DAD1, chloroplastic
<i>Asparagus officinalis</i>	XP_020242517.1	385	Streptophyta	Asparagales	phospholipase A(1) DAD1, chloroplastic, partial
<i>Amborella trichopoda</i>	XP_006837391.3	391	Streptophyta	Amborellales	phospholipase A(1) DAD1, chloroplastic
<i>Beta vulgaris subsp. vulgaris</i>	XP_010677111.1	543	Streptophyta	Caryophyllales	PREDICTED: phospholipase A1-lbeta2, chloroplastic
<i>Helianthus annuus</i>	XP_022018790.1	524	Streptophyta	Asterales	phospholipase A1-lbeta2, chloroplastic-like
<i>Nicotiana sylvestris</i>	XP_009789580.1	530	Streptophyta	Solanales	PREDICTED: phospholipase A1-lbeta2, chloroplastic-like
<i>Punica granatum</i>	PKI39749.1	567	Streptophyta	Myrtales	hypothetical protein CRG98_039794
<i>Gossypium hirsutum</i>	XP_016728768.1	538	Streptophyta	Malvales	PREDICTED: phospholipase A1-lbeta2, chloroplastic
<i>Citrus clementina</i>	XP_006440208.1	533	Streptophyta	Sapindales	phospholipase A1-lbeta2, chloroplastic
<i>Nelumbo nucifera</i>	XP_010275455.1	543	Streptophyta	Proteales	PREDICTED: phospholipase A1-lbeta2, chloroplastic-like
<i>Glycine max</i>	XP_003517405.1	524	Streptophyta	Fabales	Phospholipase A1-lbeta2, chloroplastic
<i>Ricinus communis</i>	XP_002532349.1	526	Streptophyta	Malpighiales	phospholipase A1-lbeta2, chloroplastic
<i>Prunus mume</i>	XP_008238400.1	548	Streptophyta	Rosales	PREDICTED: phospholipase A1-lbeta2, chloroplastic
<i>Quercus suber</i>	XP_023924797.1	548	Streptophyta	Fagales	phospholipase A1-lbeta2, chloroplastic
<i>Arabidopsis thaliana</i>	O23522.2	517	Streptophyta	Brassicales	Phospholipase A1-lbeta2, chloroplastic
<i>Eutrema salsugineum</i>	XP_024005473.1	517	Streptophyta	Brassicales	phospholipase A1-lbeta2, chloroplastic
<i>Amborella trichopoda</i>	XP_006837394.1	575	Streptophyta	Amborellales	phospholipase A1-lbeta2, chloroplastic

<i>Zea mays</i>	XP_008678284.1	499	Streptophyta	Poales	phospholipase A1- β 2, chloroplastic
<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	XP_015626938.1	544	Streptophyta	Poales	Phospholipase A1- β 2, chloroplastic
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9C8G6	529	Streptophyta	Brassicales	Lipase, putative
<i>Eutrema salsugineum</i>	XP_006415481.1	529	Streptophyta	Brassicales	phospholipase A1- γ 1, chloroplastic
<i>Gossypium hirsutum</i>	XP_016701255.1	528	Streptophyta	Malvales	PREDICTED: phospholipase A1- γ 1, chloroplastic-like
<i>Ricinus communis</i>	XP_002531054.1	521	Streptophyta	Malpighiales	Phospholipase A1- γ 1, chloroplastic
<i>Quercus suber</i>	XP_023891870.1	523	Streptophyta	Fagales	phospholipase A1- γ 1, chloroplastic-like
<i>Beta vulgaris subsp. vulgaris</i>	XP_010685025.1	496	Streptophyta	Caryophyllales	PREDICTED: phospholipase A1- γ 3, chloroplastic
<i>Helianthus annuus</i>	XP_022012132.1	497	Streptophyta	Asterales	phospholipase A1- γ 1, chloroplastic
<i>Nicotiana sylvestris</i>	XP_009792730.1	505	Streptophyta	Solanales	PREDICTED: phospholipase A1- γ 1, chloroplastic
<i>Citrus clementina</i>	XP_006448978.1	520	Streptophyta	Sapindales	phospholipase A1- γ 1, chloroplastic
<i>Prunus mume</i>	XP_008225538.1	514	Streptophyta	Rosales	PREDICTED: phospholipase A1- γ 1, chloroplastic
<i>Glycine max</i>	XP_003532708.1	497	Streptophyta	Fabales	Phospholipase A1- γ 1, chloroplastic
<i>Nelumbo nucifera</i>	XP_010245170.1	534	Streptophyta	Proteales	PREDICTED: phospholipase A1- γ 1, chloroplastic-like
<i>Asparagus officinalis</i>	XP_020275066.1	556	Streptophyta	Asparagales	phospholipase A1- γ 1, chloroplastic
<i>Physcomitrella patens</i>	XP_001779106.1	469	Streptophyta (Bryophyta)	Funariales	predicted protein [la]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9C8J6.1	527	Streptophyta	Brassicales	Phospholipase A1- γ 3, chloroplastic

<i>Eutrema salsugineum</i>	XP_006393053.1	542	Streptophyta	Brassicales	phospholipase A1-Igama3, chloroplastic
<i>Glycine max</i>	XP_003538937.1	505	Streptophyta	Fabales	Phospholipase A1-Igama3, chloroplastic
<i>Prunus mume</i>	XP_008227339.1	517	Streptophyta	Rosales	PREDICTED: phospholipase A1-Igama3, chloroplastic
<i>Beta vulgaris subsp. vulgaris</i>	XP_010673678.1	514	Streptophyta	Caryophyllales	PREDICTED: phospholipase A1-Igama3, chloroplastic
<i>Punica granatum</i>	OWM69176.1	536	Streptophyta	Myrtales	hypothetical protein CDL15_Pgr025363
<i>Citrus clementina</i>	XP_006446147.1	535	Streptophyta	Sapindales	phospholipase A1-Igama3, chloroplastic
<i>Gossypium hirsutum</i>	XP_016671706.1	495	Streptophyta	Malvales	PREDICTED: phospholipase A1-Igama3, chloroplastic-like
<i>Ricinus communis</i>	XP_015571240.1	510	Streptophyta	Malpighiales	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: phospholipase A1-Igama3, chloroplastic
<i>Quercus suber</i>	XP_023875575.1	516	Streptophyta	Fagales	phospholipase A1-Igama3, chloroplastic
<i>Nicotiana sylvestris</i>	XP_009801144.1	507	Streptophyta	Solanales	PREDICTED: phospholipase A1-Igama3, chloroplastic
<i>Nelumbo nucifera</i>	XP_010246745.1	507	Streptophyta	Proteales	PREDICTED: phospholipase A1-Igama3, chloroplastic-like
<i>Helianthus annuus</i>	XP_022000896.1	459	Streptophyta	Asterales	phospholipase A1-Igama3, chloroplastic
<i>Amborella trichopoda</i>	XP_006853086.1	559	Streptophyta	Amborellales	phospholipase A1-Igama3, chloroplastic
<i>Helianthus annuus</i>	XP_021999019.1	486	Streptophyta	Asterales	phospholipase A1-Igama2, chloroplastic-like
<i>Nelumbo nucifera</i>	XP_010274199.1	537	Streptophyta	Proteales	PREDICTED: phospholipase A1-Igama1, chloroplastic-like isoform X1
<i>Nelumbo nucifera</i>	XP_010274200.1	458	Streptophyta	Proteales	PREDICTED: phospholipase A1-Igama2, chloroplastic-like isoform X2

<i>Citrus clementina</i>	XP_024047936.1	518	Streptophyta	Sapindales	phospholipase A1-Igama2, chloroplastic
<i>Glycine max</i>	XP_006576919.2	497	Streptophyta	Fabales	Phospholipase A1-Igama2, chloroplastic isoform X1
<i>Glycine max</i>	XP_003518894.2	530	Streptophyta	Fabales	Phospholipase A1-Igama1, chloroplastic
<i>Beta vulgaris subsp. vulgaris</i>	XP_010679169.1	549	Streptophyta	Caryophyllales	PREDICTED: phospholipase A1-Igama1, chloroplastic
<i>Nicotiana sylvestris</i>	XP_009782117.1	521	Streptophyta	Solanales	PREDICTED: phospholipase A1-Igama2, chloroplastic-like
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q941F1.2	515	Streptophyta	Brassicales	Phospholipase A1-Igama1, chloroplastic
<i>Eutrema salsugineum</i>	XP_006417878.2	522	Streptophyta	Brassicales	phospholipase A1-Igama1, chloroplastic
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q3EBR6.2	529	Streptophyta	Brassicales	Phospholipase A1-Igama2, chloroplastic
<i>Eutrema salsugineum</i>	XP_006410159.2	562	Streptophyta	Brassicales	phospholipase A1-Igama2, chloroplastic
<i>Punica granatum</i>	OWM75230.1	526	Streptophyta	Myrtales	hypothetical protein CDL15_Pgr023751
<i>Punica granatum</i>	PKI64070.1	484	Streptophyta	Myrtales	hypothetical protein CRG98_015514
<i>Ricinus communis</i>	XP_015575832.1	483	Streptophyta	Malpighiales	Phospholipase A1-Igama2, chloroplastic
<i>Citrus clementina</i>	XP_006443915.1	526	Streptophyta	Sapindales	phospholipase A1-Igama1, chloroplastic
<i>Quercus suber</i>	XP_023895713.1	519	Streptophyta	Fagales	phospholipase A1-Igama2, chloroplastic-like
<i>Gossypium hirsutum</i>	XP_016699811.1	513	Streptophyta	Malvales	PREDICTED: phospholipase A1-Igama2, chloroplastic-like
<i>Gossypium hirsutum</i>	XP_016709858.1	500	Streptophyta	Malvales	PREDICTED: phospholipase A1-Igama1, chloroplastic-like
<i>Prunus mume</i>	XP_008235325.1	510	Streptophyta	Rosales	PREDICTED: phospholipase A1-Igama2, chloroplastic

<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	XP_015637490.1	602	Streptophyta	Poales	Phospholipase A1-Igamma1, chloroplastic
<i>Zea mays</i>	XP_008656338.1	576	Streptophyta	Poales	phospholipase A1-Igamma1, chloroplastic
<i>Asparagus officinalis</i>	XP_020254548.1	508	Streptophyta	Asparagales	phospholipase A1-Igamma2, chloroplastic-like
<i>Amborella trichopoda</i>	XP_006853094.1	536	Streptophyta	Amborellales	phospholipase A1-Igamma1, chloroplastic
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9MA46.1	471	Streptophyta	Brassicales	Galactolipase DONGLE, chloroplastic (Ia1)
<i>Eutrema salsugineum</i>	XP_006417987.1	472	Streptophyta	Brassicales	galactolipase DONGLE, chloroplastic
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SIN9.1	484	Streptophyta	Brassicales	Phospholipase A1-lalpha2, chloroplastic
<i>Eutrema salsugineum</i>	XP_006410299.1	486	Streptophyta	Brassicales	phospholipase A1-lalpha2, chloroplastic
<i>Citrus clementina</i>	XP_006443133.2	468	Streptophyta	Sapindales	phospholipase A1-lalpha2, chloroplastic
<i>Ricinus communis</i>	XP_015584049.1	393	Streptophyta	Malpighiales	phospholipase A1-lalpha2, chloroplastic
<i>Glycine max</i>	XP_003530907.1	489	Streptophyta	Fabales	Galactolipase DONGLE, chloroplastic
<i>Gossypium hirsutum</i>	XP_016673012.1	432	Streptophyta	Malvales	PREDICTED: galactolipase DONGLE, chloroplastic
<i>Prunus mume</i>	XP_008222660.1	471	Streptophyta	Rosales	PREDICTED: galactolipase DONGLE, chloroplastic
<i>Quercus suber</i>	XP_023872044.1	446	Streptophyta	Fagales	galactolipase DONGLE, chloroplastic-like
<i>Helianthus annuus</i>	XP_022041179.1	416	Streptophyta	Asterales	galactolipase DONGLE, chloroplastic-like
<i>Nicotiana sylvestris</i>	XP_009798317.1	459	Streptophyta	Solanales	PREDICTED: galactolipase DONGLE, chloroplastic
<i>Punica granatum</i>	OWM70965.1	438	Streptophyta	Myrtales	hypothetical protein CDL15_Pgr013146

<i>Nelumbo nucifera</i>	XP_010245971.1	474	Streptophyta	Proteales	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: galactolipase DONGLE, chloroplastic-like
<i>Asparagus officinalis</i>	XP_020245099.1	433	Streptophyta	Asparagales	galactolipase DONGLE, chloroplastic-like
<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	XP_015616645.1	460	Streptophyta	Poales	Phospholipase A1 EG1, chloroplastic/mitochondrial-like
<i>Zea mays</i>	NP_001168442.1	461	Streptophyta	Poales	uncharacterized protein LOC100382214
<i>Amborella trichopoda</i>	XP_006852124.2	430	Streptophyta	Amborellales	phospholipase A1-lalpha2, chloroplastic
<i>P.patens__</i>	PNR55419.1	545	Streptophyta (Bryophyta)	Funariales	hypothetical protein PHYPA_006316 [Igamma]
<i>P.patens__</i>	XP_001781080.1	401	Streptophyta (Bryophyta)	Funariales	predicted protein, partial [II]
<i>Selaginella moellendorffii</i>	XP_002982537.1	418	Streptophyta	Selaginellales	phospholipase A1-IIdelta
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SJI7.1	412	Streptophyta	Brassicales	Phospholipase A1-IIdelta
<i>Eutrema salsugineum</i>	XP_006411539.1	396	Streptophyta	Brassicales	phospholipase A1-IIdelta
<i>Beta vulgaris subsp. vulgaris</i>	XP_010689845.1	426	Streptophyta	Caryophyllales	PREDICTED: phospholipase A1-IIdelta
<i>Glycine max</i>	XP_003540985.2	226	Streptophyta	Fabales	Phospholipase A1-IIdelta
<i>Ricinus communis</i>	XP_002518706.1	417	Streptophyta	Malpighiales	Phospholipase A1-IIdelta
<i>Quercus suber</i>	XP_023921770.1	464	Streptophyta	Fagales	phospholipase A1-IIdelta
<i>Punica granatum</i>	OWM73338.1	423	Streptophyta	Myrtales	hypothetical protein CDL15_Pgr001452
<i>Citrus clementina</i>	XP_006446810.1	416	Streptophyta	Sapindales	phospholipase A1-IIdelta
<i>Helianthus annuus</i>	XP_022033619.1	434	Streptophyta	Asterales	phospholipase A1-IIdelta-like
<i>Nicotiana sylvestris</i>	XP_009766306.1	470	Streptophyta	Solanales	PREDICTED: phospholipase A1-IIdelta-like
<i>Prunus mume</i>	XP_008228927.1	455	Streptophyta	Rosales	PREDICTED: phospholipase A1-IIdelta

<i>Gossypium hirsutum</i>	XP_016698912.1	418	Streptophyta	Malvales	PREDICTED: phospholipase A1-IIdelta-like
<i>Nelumbo nucifera</i>	XP_010276983.1	428	Streptophyta	Proteales	PREDICTED: phospholipase A1-IIdelta
<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	XP_015622065.1	465	Streptophyta	Poales	Phospholipase A1-II 5
<i>Zea mays</i>	XP_008675114.1	469	Streptophyta	Poales	phospholipase A1-II 5
<i>Asparagus officinalis</i>	XP_020243990.1	446	Streptophyta	Asparagales	LOW QUALITY PROTEIN: phospholipase A1-II 5-like
<i>Amborella trichopoda</i>	XP_011628527.1	433	Streptophyta	Amborellales	LOW QUALITY PROTEIN: phospholipase A1-IIdelta
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LNC2.1	423	Streptophyta	Brassicales	Phospholipase A1-IIalpha
<i>Eutrema salsugineum</i>	XP_006417941.1	411	Streptophyta	Brassicales	phospholipase A1-IIalpha
<i>Arabidopsis thaliana</i>	O82274.2	414	Streptophyta	Brassicales	Phospholipase A1-IIbeta
<i>Eutrema salsugineum</i>	XP_006410236.1	414	Streptophyta	Brassicales	phospholipase A1-IIbeta
<i>Helianthus annuus</i>	XP_021990083.1	447	Streptophyta	Asterales	phospholipase A1-IIgamma-like
<i>Nicotiana glauca</i>	XP_009775805.1	401	Streptophyta	Solanales	PREDICTED: phospholipase A1-IIgamma-like
<i>Beta vulgaris subsp. vulgaris</i>	XP_010686320.1	411	Streptophyta	Caryophyllales	PREDICTED: phospholipase A1-IIgamma [Beta vulgaris subsp. vulgaris]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	O49523.1	419	Streptophyta	Brassicales	Phospholipase A1-IIgamma
<i>Eutrema salsugineum</i>	XP_006414089.1	436	Streptophyta	Brassicales	phospholipase A1-IIgamma
<i>Citrus clementina</i>	XP_006449477.1	420	Streptophyta	Sapindales	phospholipase A1-IIgamma
<i>Gossypium hirsutum</i>	XP_016666219.1	417	Streptophyta	Malvales	PREDICTED: phospholipase A1-IIgamma-like
<i>Prunus mume</i>	XP_008225210.1	431	Streptophyta	Rosales	PREDICTED: phospholipase A1-IIgamma
<i>Glycine max</i>	XP_003541709.1	421	Streptophyta	Fabales	Phospholipase A1-IIgamma

<i>Ricinus communis</i>	XP_002522554.2	429	Streptophyta	Malpighiales	Phospholipase A1-IIgamma
<i>Punica granatum</i>	PKI46270.1	399	Streptophyta	Myrtales	hypothetical protein CRG98_033340
<i>Quercus suber</i>	XP_023874852.1	401	Streptophyta	Fagales	phospholipase A1-IIgamma-like
<i>Nelumbo nucifera</i>	XP_010279086.1	398	Streptophyta	Proteales	PREDICTED: phospholipase A1- IIgamma-like
<i>Oryza sativa Ja- ponica Group</i>	XP_015618497.1	396	Streptophyta	Poales	PREDICTED: phospholipase A1- II 4
<i>Zea mays</i>	XP_008675277.1	395	Streptophyta	Poales	phospholipase A1-II 1
<i>Asparagus offic- inalis</i>	XP_020268041.1	394	Streptophyta	Asparagales	LOW QUALITY PROTEIN: phos- pholipase A1-II 1-like
<i>Amborella trichop- oda</i>	XP_006852476.2	459	Streptophyta	Amborellales	phospholipase A1-II 1

Πίνακας 2: Πληροφορίες των πρωτεϊνικών αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου της υπο-οικογένειας πρωτεασών όμοιων με την RD19A.

Είδος	Κωδικός	Μήκος (aa)	Order	Πρωτεϊνικός χαρακτηρισμός
<i>Klebsormidium nitens</i>	GAQ77563.1	355	Klebsormidiales	hypothetical protein KFL_000010120
<i>Selaginella moellendorffii</i>	XP_024528811.1	369	Selaginellales	cysteine proteinase 15A
<i>Selaginella moellendorffii</i>	XP_002969223.2	369	Selaginellales	cysteine proteinase 15A
<i>Picea sitchensis</i>	ABK24688.1	366	Pinales	unknown
<i>Picea sitchensis</i>	ABK21238.1	366	Pinales	unknown
<i>Picea sitchensis</i>	ACN40679.1	366	Pinales	unknown
<i>Picea sitchensis</i>	ABK24153.1	394	Pinales	unknown
<i>Amborella trichopoda</i>	XP_020517253.1	365	Amborellales	probable cysteine protease RD19B
<i>Nymphaea colorata</i>	XP_031495120.1	364	Nymphaeales	cysteine protease RD19A-like
<i>Colocasia esculenta</i>	MQL75738.1	470	Alismatales	hypothetical protein Taro_008126, partial
<i>Colocasia esculenta</i>	MQM02278.1	462	Alismatales	hypothetical protein Taro_035043
<i>Asparagus officinalis</i>	XP_020245251.1	354	Asparagales	cysteine proteinase 1-like, partial
<i>Zostera marina</i>	KMZ56075.1	386	Alismatales	Cysteine proteinase cathepsin F
<i>Carex littledalei</i>	KAF3334301.1	366	Poales	Cysteine proteinase 15A
<i>Zostera marina</i>	KMZ58469.1	377	Alismatales	Cysteine proteinase cathepsin F
<i>Elaeis guineensis</i>	XP_010943608.1	371	Arecales	cysteine proteinase 1
<i>Elaeis guineensis</i>	XP_010910124.1	374	Arecales	cysteine proteinase 1

<i>Musa acuminata</i> <i>subsp. malaccensis</i>	XP_009405542.1	366	Zingiberales	PREDICTED: cysteine proteinase 1
<i>Musa acuminata</i> <i>subsp. malaccensis</i>	XP_009406357.1	372	Zingiberales	PREDICTED: cysteine proteinase 1-like
<i>Musa acuminata</i> <i>subsp. malaccensis</i>	XP_009392632.1	369	Zingiberales	PREDICTED: cysteine proteinase 1-like
<i>Ananas comosus</i>	OAY84317.1	388	Poales	Cysteine proteinase 1
<i>Ananas comosus</i>	XP_020110961.1	387	Poales	cysteine proteinase 1-like
<i>Carex littledalei</i>	KAF3323757.1	386	Poales	cysteine proteinase 1-like
<i>Oryza sativa</i> Ja- <i>ponica Group</i>	XP_015624643.1	373	Poales	cysteine proteinase 1
<i>Zea mays</i>	Q10716.1	371	Poales	cysteine proteinase 1 precursor
<i>Oryza sativa</i> Ja- <i>ponica Group</i>	XP_015636152.1	381	Poales	cysteine proteinase 1
<i>Dendrobium cat-</i> <i>enatum</i>	XP_020681018.1	368	Asparagales	cysteine proteinase 1-like
<i>Cinnamomum</i> <i>micranthum</i> f. <i>kanehirae</i>	RWR79148.1	364	Lurales	putative cysteine protease RD19C
<i>Nyssa sinensis</i>	KAA8536062.1	364	Cornales	hypothetical protein F0562_028540
<i>Nyssa sinensis</i>	KAA8546017.1	362	Cornales	hypothetical protein F0562_028541
<i>Camellia sinensis</i>	XP_028065816.1	366	Ericales	cysteine protease RD19A-like
<i>Nicotiana taba-</i> <i>cum</i>	XP_016478332.1	366	Solanales	PREDICTED: cysteine protease RD19A- like
<i>Nicotiana taba-</i> <i>cum</i>	XP_016473610.1	370	Solanales	PREDICTED: cysteine protease RD19A- like
<i>Coffea arabica</i>	XP_027112178.1	372	Gentianales	cysteine protease RD19A

<i>Hevea brasiliensis</i>	XP_021669758.1	372	Malpighiales	probable cysteine protease RD19B
<i>Hevea brasiliensis</i>	XP_021684956.1	372	Malpighiales	cysteine protease RD19A-like
<i>Theobroma cacao</i>	XP_007042077.2	373	Malvales	PREDICTED: cysteine protease RD19A
<i>Citrus sinensis</i>	XP_006487337.1	373	Sapindales	probable cysteine protease RD19B
<i>Juglans regia</i>	XP_018840325.1	374	Fagales	cysteine protease RD19A-like
<i>Punica granatum</i>	XP_031394263.1	371	Myrtales	cysteine protease RD19A-like
<i>Punica granatum</i>	XP_031378068.1	359	Myrtales	cysteine protease RD19A-like
<i>Malus domestica</i>	XP_008382317.2	369	Rosales	LOW QUALITY PROTEIN: cysteine protease RD19A
<i>Malus domestica</i>	XP_028965392.1	371	Rosales	cysteine protease RD19A
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P43296.1	368	Brassicales	Cysteine protease RD19A
<i>Brassica napus</i>	XP_013735608.1	367	Brassicales	cysteine protease RD19A-like
<i>Brassica napus</i>	XP_013747708.1	367	Brassicales	cysteine protease RD19A
<i>Brassica napus</i>	XP_013656686.1	369	Brassicales	cysteine protease RD19A-like
<i>Brassica napus</i>	XP_013701923.1	368	Brassicales	cysteine protease RD19A
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P43295.2	361	Brassicales	Probable cysteine protease RD19B
<i>Brassica napus</i>	XP_013746904.1	362	Brassicales	Probable cysteine protease RD19B
<i>Brassica napus</i>	XP_022570909.1	363	Brassicales	Probable cysteine protease RD19B
<i>Glycine max</i>	XP_003539008.1	363	Fabales	cysteine protease RD19A
<i>Glycine max</i>	XP_003540987.1	365	Fabales	cysteine protease RD19A
<i>Lotus japonicus</i>	BAF98584.1	360	Fabales	CM0216.500.nc
<i>Lotus japonicus</i>	BAC41322.1	358	Fabales	hypothetical protein
<i>Lotus japonicus</i>	CAE45588.1	359	Fabales	papain-like cysteine proteinase-like protein 1

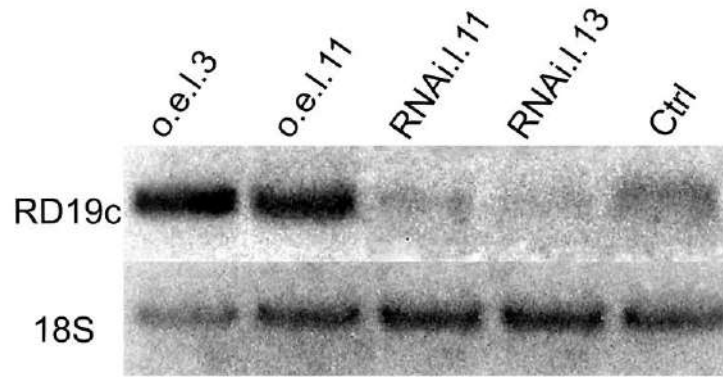
<i>Lotus japonicus</i>	CAE45589.1	361	Fabales	papain-like cysteine proteinase-like protein 2
<i>Lotus japonicus</i>	BAF98585.1	360	Fabales	CM0216.510.nc
<i>Cucumis sativus</i>	XP_004150061.1	377	Cucurbitales	cysteine protease RD19A
<i>Nyssa sinensis</i>	KAA8528698.1	374	Cornales	hypothetical protein F0562_036053
<i>Nyssa sinensis</i>	KAA8537566.1	369	Cornales	hypothetical protein F0562_027174
<i>Punica granatum</i>	XP_031404513.1	372	Myrtales	cysteine protease RD19A-like
<i>Juglans regia</i>	XP_018821132.1	385	Fagales	cysteine protease RD19A-like
<i>Juglans regia</i>	XP_018843841.1	364	Fagales	probable cysteine protease RD19B
<i>Theobroma cacao</i>	XP_007017672.2	401	Malvales	PREDICTED: cysteine proteinase 15A
<i>Hevea brasiliensis</i>	XP_021671980.1	366	Malpighiales	probable cysteine protease RD19C
<i>Camellia sinensis</i>	XP_028103741.1	379	Ericales	cysteine protease RD19A-like
<i>Cephalotus follicularis</i>	GAV70190.1	371	Oxalidales	Peptidase_C1 domain-containing protein/Inhibitor_I29 domain-containing protein
<i>Glycine max</i>	XP_003523684.1	366	Fabales	cysteine proteinase 15A
<i>Citrus sinensis</i>	XP_006473584.1	369	Sapindales	cysteine proteinase 15A-like
<i>Malus domestica</i>	XP_008387995.1	365	Rosales	probable cysteine protease RD19C
<i>Malus domestica</i>	XP_028962432.1	364	Rosales	probable cysteine protease RD19C
<i>Coffea arabica</i>	XP_027091485.1	376	Gentianales	probable cysteine protease RD19C
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SUL1.1	373	Brassicales	Probable cysteine protease RD19C
<i>Brassica napus</i>	XP_013706178.1	366	Brassicales	Probable cysteine protease RD19C
<i>Brassica napus</i>	XP_013737381.1	367	Brassicales	Probable cysteine protease RD19C
<i>Brassica napus</i>	XP_013743822.1	368	Brassicales	Probable cysteine protease RD19C
<i>Brassica napus</i>	XP_013701332.1	368	Brassicales	Probable cysteine protease RD19C

<i>Brassica napus</i>	XP_013743816.1	368	Brassicales	Probable cysteine protease RD19C
<i>Helianthus annuus</i>	XP_021977695.1	363	Asterales	cysteine proteinase 15A
<i>Helianthus annuus</i>	XP_022016616.1	360	Asterales	cysteine proteinase 15A
<i>Helianthus annuus</i>	XP_022038626.1	365	Asterales	cysteine proteinase 15A
<i>Nicotiana tabacum</i>	NP_001334589.1	363	Solanales	cysteine proteinase 15A-like precursor
<i>Nicotiana tabacum</i>	XP_016433733.1	365	Solanales	PREDICTED: cysteine proteinase 15A-like
<i>Chenopodium quinoa</i>	XP_021759875.1	383	Caryophyllales	cysteine protease RD19A-like
<i>Chenopodium quinoa</i>	XP_021758356.1	381	Caryophyllales	cysteine protease RD19A-like
<i>Chenopodium quinoa</i>	XP_021738679.1	371	Caryophyllales	cysteine protease RD19A-like
<i>Helianthus annuus</i>	XP_021989495.1	363	Asterales	cysteine protease RD19A
<i>Helianthus annuus</i>	XP_022036354.1	370	Asterales	cysteine protease RD19A
<i>Papaver somniferum</i>	XP_026393649.1	368	Ranunculales	cysteine protease RD19A-like
<i>Nelumbo nucifera</i>	XP_010271520.1	370	Proteales	PREDICTED: cysteine protease RD19A-like
<i>Papaver somniferum</i>	XP_026456935.1	376	Ranunculales	cysteine protease RD19A-like
<i>Papaver somniferum</i>	XP_026449637.1	376	Ranunculales	cysteine protease RD19A-like
<i>Nelumbo nucifera</i>	XP_010268619.1	369	Proteales	PREDICTED: cysteine protease RD19A-like
<i>Physcomitrium patens</i>	XP_024371382.1	369	Funariales	cysteine proteinase 15A-like

<i>Physcomitrium patens</i>	XP_024392278.1	369	Funariales	cysteine proteinase 15A-like
<i>Marchantia polymorpha</i>	PTQ30574.1	375	Marchantiales	hypothetical protein MARPO_0122s0009
<i>Amborella trichopoda</i>	XP_006850211.2	362	Amborellales	probable cysteine protease RD19D
<i>Zostera marina</i>	KMZ67894.1	351	Alismatales	Cysteine proteinase cathepsin F
<i>Asparagus officinalis</i>	XP_020259467.1	360	Asparagales	probable cysteine protease RD19D
<i>Musa acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i>	XP_009404192.2	409	Zingiberales	PREDICTED: probable cysteine protease RD19D
<i>Carex littledalei</i>	KAF3335561.1	360	Poales	Cysteine proteinase 15A
<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	XP_015645418.1	376	Poales	probable cysteine protease RD19D
<i>Zea mays</i>	ONM23610.1	368	Poales	putative cysteine protease RD19D
<i>Zea mays</i>	PWZ40150.1	367	Poales	putative cysteine protease RD19D
<i>Colocasia esculenta</i>	MQL90325.1	404	Alismatales	hypothetical protein Taro_022929
<i>Nelumbo nucifera</i>	XP_010243268.1	370	Proteales	PREDICTED: probable cysteine protease RD19D
<i>Juglans regia</i>	XP_018836910.1	372	Fagales	probable cysteine protease RD19D
<i>Citrus sinensis</i>	XP_006485655.1	373	Sapindales	probable cysteine protease RD19D
<i>Malus domestica</i>	XP_008362714.2	372	Rosales	probable cysteine protease RD19D
<i>Cephalotus follicularis</i>	GAV60741.1	384	Oxalidales	Peptidase_C1 domain-containing protein/Inhibitor_I29 domain-containing protein
<i>Hevea brasiliensis</i>	XP_021664100.1	375	Malpighiales	probable cysteine protease RD19D isoform X1
<i>Hevea brasiliensis</i>	XP_021664101.1	381	Malpighiales	probable cysteine protease RD19D isoform X2

<i>Punica granatum</i>	XP_031373012.1	387	Myrtales	probable cysteine protease RD19D
<i>Theobroma cacao</i>	XP_007010012.2	382	Malvales	PREDICTED: probable cysteine protease RD19D
<i>Cucumis sativus</i>	XP_004142497.3	409	Cucurbitales	probable cysteine protease RD19D
<i>Helianthus annuus</i>	XP_021970508.1	374	Asterales	probable cysteine protease RD19D
<i>Chenopodium quinoa</i>	XP_021725065.1	375	Caryophyllales	probable cysteine protease RD19D
<i>Chenopodium quinoa</i>	XP_021755875.1	377	Caryophyllales	probable cysteine protease RD19D
<i>Coffea arabica</i>	XP_027111469.1	397	Gentianales	probable cysteine protease RD19D
<i>Nicotiana tabacum</i>	XP_016445414.1	388	Solanales	PREDICTED: cysteine proteinase 15A-like
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8VYS0.1	367	Brassicales	probable cysteine protease RD19D
<i>Brassica napus</i>	XP_013708492.1	364	Brassicales	probable cysteine protease RD19D

Παράρτημα ΙΙΙ



Εικόνα 1: Εικόνα ηλεκτροφόρησης ελέγχου σειρών μόνιμων μετασηματισμένων φυτών υπερέκφρασης και αποσιώπισης της πρωτεΐνης RD19c.

Βιογραφικό σημείωμα

Βιογραφικό σημείωμα

Ειρήνη-Φωτεινή Δερβίση

Βιολόγος

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Διεύθυνση Καλύβια Αττικής, 19010
Τηλέφωνο +30 22990 47204 **Κινητό:** +30 697 68 42 909
Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο eidervisi@bio.uoa.gr, eidervisi@hotmail.com
Ημερομηνία γέννησης 14 Οκτωβρίου 1993

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

2017-σήμερα **Υποψήφια διδάκτορας**, Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ). Θέμα διδακτορικής διατριβής: «Μελέτη γονιδίων των οποίων τα προϊόντα τους αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη SBP (Selenium-binding Protein 1) του *Arabidopsis thaliana*».

2011-2017 **Πτυχίο Βιολογίας**, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ). Διπλωματική εργασία: «Μελέτη του γονιδιακού τόπου AT2G30550 στο φυτό *Arabidopsis thaliana*».

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ/ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Ξένες Γλώσσες Αγγλικά C2 – Certificate of Proficiency in English, University of Michigan.

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ/ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

04.2019 -10.2019 **Βιολόγος**, στο Εργαστήριο Ιολογίας, Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο στο πρόγραμμα: «Παροχή υπηρεσιών εργαστηριακών εξετάσεων για την ανίχνευση παρουσίας παθογόνων οργανισμών σε πολλαπλασιαστικό υλικό δενδρωδών».

2017-2020 **Επικουρικό έργο** στα εργαστήρια του προπτυχιακού μαθήματος **Φυσιολογίας Φυτών**, Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ).

2017-2021 **Συμμετοχή στην επίβλεψη διπλωματικών εργασιών** προπτυχιακών φοιτητών στο Εργαστήριο Μοριακής Φυσιολογίας Φυτών, Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ).

ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Workshops

08-12.03.2021 Training School - Basic laboratory techniques in Synthetic Biology. Omic-Engine.

9-11.04.2019 Algea4a-b, Exploring biodiversity for novel bioactivities Workshop, Athens, Greece.

Certificates

CRISPR CRISPR: Revolutionising Genome Editing Advanced Certificate Program.
CPD Provider Organisation CRISPR Biotech Engineering.

Introduction to Genomic Technologies Introduction to Genomic Technologies.
An online non-credit course authorized by Johns Hopkins University and offered through Coursera.

ECDL Word, Excel, Internet

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

2021 Dervisi Irene, Roussis Andreas. Investigation of Selenium-Binding Protein 1 interactions. Plant Biology Europe (PBE) 2021 Congress, Turin, Italy (2021).

2021 Dervisi Irene, Roussis Andreas. Investigation of the protein interaction of Selenium-binding Protein 1 (SBP1) with a papain-like protease (RD19c) in *Arabidopsis thaliana*. International E-Conference on Plant Science and Biology, United Research Forum, London, UK (2021).

2020 Δερβίση Ε., Ρούσσης, Α. Αλληλεπίδραση της Φωσφολιπάσης DALL3 με την Πρωτεΐνη που δεσμεύει σελήνιο 1 (Selenium Binding Protein 1, SBP 1). Πρακτικά 1^{ης} ΠΕΣΦΦ, Αθήνα (2020)

- 2019** Δερβίση Ε., Βαλασάκη Χ., Αγάλου Α., Ποδιά Β., Χαραλαμπίδης Κ., Ρούσσης Α. Αλληλεπίδραση των Πρωτεϊνών που δεσμεύουν σελήνιο (Selenium Binding Proteins, SBPs) με τις Γλουταρεδοξίνες AtGRXS14 και AtGRXS16. Πρακτικά 41^{ου} συνεδρίου Ε.Ε.Β.Ε., Κατερίνη (2019)
- 2017** Δερβίση Ε., Βαλασάκη Χ., Χαραλαμπίδης Κ., Ρούσσης Α. Μελέτη της Φωσφολιπάσης A1 (AT2G30550) στο φυτό *Arabidopsis thaliana*. Πρακτικά 39^{ου} συνεδρίου Ε.Ε.Β.Ε., Λαμία (2017)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- 2020** Irene Dervisi, Chrysanthi Valassakis, Adamantia Agalou, Nikolaos Papandreou, Varvara Podia, Kosmas Haralampidis, Vassiliki A. Iconomidou, Vassili N. Kouvelis, Herman P. Spaink, Andreas Roussis, Investigation of the interaction of DAD1-LIKE LIPASE 3 (DALL3) with Selenium Binding Protein 1 (SBP1) in *Arabidopsis thaliana*. Plant Science, 291. [doi: 10.1016/j.plantsci.2019.110357](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110357)
- 2019** Chrysanthi Valassakis*, Irene Dervisi*, Adamantia Agalou, Nikolaos Papandreou, Georgios Kapetsis, Varvara Podia, Kosmas Haralampidis, Vassiliki A. Iconomidou, Herman P. Spaink, Andreas Roussis. (2019) Novel interactions of Selenium Binding Protein family with PICOT containing proteins AtGRXS14 and AtGRXS16 in *Arabidopsis thaliana*. Plant Science, 281, 102-112. [doi: 10.1016/j.plantsci.2019.01.021](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.01.021) * shared first authorship

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

- 2018-2021** Υποτροφία ΙΚΥ για την εκπόνηση διδακτορικής διατριβής.

ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

- Μοριακές Τεχνικές** Απομόνωση νουκλεϊνικών οξέων DNA/RNA από φυτικούς οργανισμούς.
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια *E. coli* και *A. tumefaciens*.
Καθαρισμός νουκλεϊνικών οξέων από πήκτωμα αγαρόζης.
Αντίστροφη μεταγραφή (RT-PCR).
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).
Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR).
Κατασκευή δεκτικών κυττάρων *E. Coli* και *A. Tumefaciens* και μετασχηματισμός τους.
Σταθερός μετασχηματισμός φυτών *A. thaliana*.

	<p>Απομόνωση και μετασχηματισμός πρωτοπλαστών από φύλλα ροζέτα και ρίζες του φυτού <i>A. thaliana</i>. Μέθοδος συμπληρωματικότητας διμοριακού φθορισμού (BiFC) Σύστημα ζύμης δύο υβριδίων (Y2H). Χρώση GUS.</p>
Βιοπληροφορικές Μέθοδοι	<p>Χρήση νουκλεϊνικών και πρωτεϊνικών βάσεων δεδομένων. Αναζήτηση ομοιότητας ακολουθιών σε βάσεις δεδομένων (BLAST). Στοιχίση ακολουθιών. Κατασκευή φυλογενετικών δένδρων (MEGA, PAUP, MrBayes, TreeView, iTOL, CIPRES).</p>
Τεχνικές Μικροσκοπίας	<p>Χρήση οπτικού μικροσκοπίου και στερεοσκοπίου. Χρήση μικροσκοπίου φθορισμού.</p>

Δημοσιεύσεις



Novel interactions of Selenium Binding Protein family with the PICOT containing proteins AtGRXS14 and AtGRXS16 in *Arabidopsis thaliana*

Chrysanthi Valassakis^{a,2}, Irene Dervisi^{a,2}, Adamantia Agalou^{c,1}, Nikolaos Papandreou^b, Georgios Kapetsis^a, Varvara Podia^a, Kosmas Haralampidis^a, Vassiliki A. Iconomidou^b, Herman P. Spink^c, Andreas Roussis^{a,*}

^a Department of Botany, Faculty of Biology, National & Kapodistrian University of Athens, 15784, Athens, Greece

^b Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, National & Kapodistrian University, 15784, Athens, Greece

^c Institute of Biology, Leiden University, Leiden, the Netherlands

ARTICLE INFO

Keywords:

Selenium Binding Protein
SBP1
AtGRXS14
AtGRXS16

ABSTRACT

During abiotic stress the primary symptom of phytotoxicity can be ROS production which is strictly regulated by ROS scavenging pathways involving enzymatic and non-enzymatic antioxidants. Furthermore, ROS are well-described secondary messengers of cellular processes, while during the course of evolution, plants have accomplished high degree of control over ROS and used them as signalling molecules. Glutaredoxins (GRXs) are small and ubiquitous glutathione (GSH) -or thioredoxin reductase (TR)-dependent oxidoreductases belonging to the thioredoxin (TRX) superfamily which are conserved in most eukaryotes and prokaryotes. In *Arabidopsis thaliana* GRXs are subdivided into four classes playing a central role in oxidative stress responses and physiological functions. In this work, we describe a novel interaction of AtGRXS14 with the Selenium Binding Protein 1 (AtSBP1), a protein proposed to be integrated in a regulatory network that senses alterations in cellular redox state and acts towards its restoration. We further show that SBP protein family interacts with AtGRXS16 that also contains a PICOT domain, like AtGRXS14.

1. Introduction

Aerobic metabolism is characterised by the production of an unavoidable chemical entity that includes molecules collectively called reactive oxygen species (ROS) [1,2]. ROS, as by product of aerobic metabolism, include free radicals such as superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical ($\cdot OH$), as well as nonradical molecules like hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen (1O_2), and so forth. In plants, their production is strictly confined to cellular compartments with strong electron flow, and their formation is caused by the leakage of electrons to O_2 from the electron transfer activities that chloroplasts, mitochondria and plasma membranes exhibit, or alternatively from metabolic pathways of different cellular compartments [3–5]. Their destructive activity is exerted by a wide range of physiological responses in plants, changes in cellular structure and the degradation of enzymes, proteins, nucleic acids, etc [2]. During abiotic stress the primary symptom of phytotoxicity can be ROS production which is strictly regulated by ROS scavenging pathways involving enzymatic and non-enzymatic

antioxidants. Furthermore, ROS are well-described secondary messengers of cellular processes including tolerance to environmental stresses [6–8], while during the course of evolution, plants have accomplished high degree of control over ROS and used them as signaling molecules [9]. Many studies have demonstrated the important role of ROS in signaling, such as the modulation of the activity of MAP kinases [10] and the stimulation of abiotic stress tolerance [11].

Glutaredoxins (GRXs) are small and ubiquitous glutathione (GSH) -or thioredoxin reductase (TR)-dependent oxidoreductases belonging to the thioredoxin (TRX) superfamily which are conserved in most eukaryotes and prokaryotes [12–15]. Roughly 30 different GRX isoforms have been identified in higher plants and in *Arabidopsis thaliana* GRXs are subdivided into four classes [16], playing a central role in oxidative stress responses and physiological functions [15,17,18]. In the last years, plant GRXs have been shown to participate in key developmental processes, as well [19–21]. Among the *Arabidopsis* class II GRXs, GRXS14 was recently shown to possess specific functions in the maintenance of chlorophyll content depending on environmental and light

* Corresponding author.

E-mail address: aroussis@biol.uoa.gr (A. Roussis).

¹ Current address: Developmental Biology, Biomedical Research Foundation Academy of Athens, Soranou Ephessiou 4, 11527, Athens, Greece.

² These authors contributed equally to this work.

Table 1
Sequences of primers used in this study.

Primer name	Sequence
AtAy157988_F(Y2H)	CTCCCATATGGCTCTCCGATCTGTCAAACGCGG
AtAY157988_R(Y2H)	GAGGCTGCAGAGACACATAGCTTTCTCCACCTC
AtAY157989_F(Y2H)	CTCCCATATGGCTGCAATCACCATTCTTCCTCC
AtAY157989_R(H2Y)	GAGGCTGCAGGTTCAAGATATTGGCAAGTTCACC
HsSBP1-F-NdeI	CTCATATGGCTACGAAATGTGGG
HsSBP1-R-BamHI	TAGGGATCCAATCCAGATGTCAGAGCTAC
18S-F	TTGATTCTATGGGTGGTGGT
18S-R	CCTTGTACGACTTCTCCTT
RT-SBP1-F	CCGACTGGTCTCTTACCTTTG
RT-SBP1-R	CATCTTACTCCCTTTTTTATTCAACTC
RT-SBP2-F	TTGCATATTTATCAATGGCCT
RT-SBP2-R	GAGTAAGAACAACCTTTAATTGTCT
RT-SBP3-F	GGCCCGGTTTACCAAAGGATTTG
RT-SBP3-R	CTGTTCCGATTTCCATAGAAATCCTTGATT
15803F	GATGAATTCATGGCGACGAAACGGAAGTTGTAGC
U15803Rsplit	CATCCCGGAATCCAGATATCGGAAGTGCAGTCTCC
15274F	GATGAATTCATGCAACCGAAACCGTATTAGCCACGGCCA
U15274Rsplit	CATCCCGGGATCCAGATATCGGAAGTGCAGTCTC
50289F	GATGAATTCATGGAAGCGGCGATGAACAACCACG
U50289Rsplit	CATCCCGGGAACCCAGATATCTGAGGTGCAGTCCGACC
T7-F	TAATACGACTCACTATAGGGGAATT
AtSBP1DEL1-R	GATATCCAGGTGGAGACTGC
AtSBP1DEL2-R	CTCGCTGTTAGCGCATGG
AtSBP1DEL3-R	CAGTACAACATAGAGGACCC
AtSBP1DEL4-R	ACATGGAGCCATGAGGTTGT
AtSBP1DEL5-R	CAGCAGGTTGCTGATGGC
AtSBP1DEL6-R	GAGGGGAATGCTAAGGGG
AtSBP1DEL7-R	TGCCATGGTGATGCTTCTGT
AtSBP1DEL8-R	GCCGTCTACACCGGAAT
CXIP1F-NdeI	CATATGGCTCTCCGATCTGTCAA
CXIP1R-BamHIDEL11	CATATGGCTCTCCGATCTGTCAA
CXIP1F-NdeIDEL10	CATATGAAAGTGGTCTGTTTATGAAAGG
CXIP1R-BamHIDEL1	GGATCCAGAGCACATAGCTTTCTCCAC
CXIP1-F-HindIII	AAGCTTCATGGCTCTCCGATCTGT
CXIP1-R-BamHI	GGATCCGAGAGCACATAGCTTTCTCC
CXIP2-F- EcoRI	GAATTCATGGCTGCAATCACATTTT
CXIP2-R-BamHI	GAATCCGGTTCAAGATATTGGCAAG

conditions [22].

AtGRXS14 (also referred to as AtCXIP1 or AtGRXcp) was initially isolated as a protein that associates with the cation exchanger of *Arabidopsis*, CAX1, a high capacity Ca^{2+} transporter [23]. AtGRXS14 contains a highly conserved through evolution PICOT domain and in a yeast expression system, it interacted with the N terminus of CAX1 in order to modify $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiport activity [23]. Computational analysis revealed the similarity of AtGRXS14 to the yeast monothiol GRXs, the bacterial GRX4 and both zebrafish and mice GRX5 [24]. It has also been shown that loss of *AtGRXS14* (*AtGRXcp*) in *Arabidopsis* leads to protein oxidation in chloroplasts and seedlings sensitive to external oxidants, thus implicating a critical role of AtGRXS14 in redox state regulation in the chloroplasts [24].

It has been previously reported that AtGRXS14 (or AtCXIP1) interacts with AtSBP1 Selenium Binding Protein 1 (AtSBP1) [25]. Efforts to elucidate the biological role of SBP1 in plants have been made in the model legume *Lotus japonicus*, in *Arabidopsis thaliana* and rice [25–33]. Studies in *Arabidopsis* plants with altered endogenous levels of SBP1 suggested that there is a correlation between expression levels of the *Atsbp1* gene and tolerance to selenium toxicity caused by selenite [26]. Furthermore, it has been shown that SBP1 protein accumulates in response to cadmium (Cd) in *Arabidopsis* cultured cells [34] as well as in intact plants [27], while SBP1 overexpression confers enhanced tolerance to Cd thereby suggesting that this gene participates in a novel detoxification mechanism that plants use to overcome metal toxicity [27].

In this work, we characterize the novel interaction of AtGRXS14 with AtSBP1, a protein proposed to be integrated in a regulatory network that senses alterations in cellular redox state and acts towards its

restoration [35]. In vitro binding assays have shown that in *Arabidopsis* SBP1 participates in a novel protein network consisting of at least SBP, a NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and a fructose-bisphosphate aldolase (FBA), that is possibly part of the physiological regulation and metabolism of selenium [25] given the fact that in *Escherichia coli* GAPDH and a prokaryotic aldolase (deoxyribose-5-phosphate aldolase; DPA) were shown to bind selenium [36]. A major step towards understanding SBP1 function in plants and its involvement in Se metabolism and detoxification mechanisms was the identification of the selenium binding site and the involvement of two Cys residues in AtSBP1, as well as the function of selenite (SeO_3^{2-}) reduction that this protein was shown to drive [33]. To further characterize the protein network that AtSBP1 protein participates in, we studied its interaction with AtGRXS14. Furthermore, we show that SBP protein family interacts with AtGRXS16 that also contains a PICOT domain, as AtGRXS14.

2. Material and methods

2.1. Yeast strains and plant materials

S.cerevisiae strain SG335 (MATa *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *ura1-52*, *his3-200*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *GAL2-ADE2*, *LYS2::GAL1-HIS3*, *met2::GAL7-lacZ*) was used in all yeast experiments in this study. Yeast two-hybrid screening was performed as described by Agalou et al. [25]. *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia (Col-0) and transgenic *Arabidopsis* plants harbouring SBPs::GFP and GRXs::GFP expression cassettes were used in the present study. Growth conditions were described in Valassakis et al. [35].

2.2. Nucleic acid extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from plant tissues using the procedure described by Onate-Sanchez and Vicente Carbajosa [37]. RNA samples were treated with DNase I (Biolabs, Ipswich, England) according to the manufacturer's instructions. The RNA purity and quantity were checked by electrophoresis in a 0.8% w/v agarose gel. Following electrophoresis, the RNA was stained with ethidium bromide (100 µg/l, Sigma Aldrich) and visualized under UV light. First-strand cDNA synthesis was performed using 1 µg of total RNA template and PrimeScript Reverse Transcriptase (Takara-Clontech, Kyoto, Japan). All PCR reactions were performed in a thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

PCR products for cloning were amplified with Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. In particular, for the isolation of *Arabidopsis thaliana* GRXS14 and GRXS16 cDNA was synthesized from total RNA of 10-days-old wild type *A. thaliana* (L.) Heynh (ecotype Columbia-0) seedlings and the following sets of primers were used: AtGRXS14: AtAy157988_F(Y2H), AtAY15798_R(Y2H), AtGRXS16: AtAY157989_F(Y2H), AtAY157989_R(H2Y) (Table 1). For the isolation of human SBP1 cDNA, total RNA from *Homo sapiens* (kindly provided by Prof. P. Kollia) was used and PCR was performed using HsSBP1-F-NdeI and HsSBP1-R-BamHI primers (Table 1). PCR products were separated by electrophoresis on 1% agarose gels, visualized under UV light after staining with ethidium bromide (100 µg/l, Sigma Aldrich) and purified using a Nucleospin Gel and PCR Clean up kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany). Finally, the isolated cDNAs were cloned into the pJET1.2/blunt Cloning Vector (CloneJET™ PCR Cloning Kit, Thermo Scientific™) and sequenced.

2.3. Treatment of plants and gene expression analysis

Arabidopsis seeds plated on half-strength MS medium were grown vertically for 4 days. At this point, young seedlings were transplanted onto plates containing half-strength MS medium plus either of 150 µM sodium selenite (Na₂SeO₃, Sigma-Aldrich), 150 µM sodium selenate (Na₂SeO₄, Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany) or 150 µM cadmium chloride (CdCl₂, Sigma-Aldrich) and grown under the conditions mentioned above for 6 additional days. The chemicals used for the treatments were maintained as 50 mM stock solutions in distilled water. Seedlings transplanted onto plates containing only half-strength MS medium were used as controls. Roots from 10-days-old control and treated seedlings were collected, weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C for further use in semi-quantitative RT-PCR analysis.

cDNA was synthesized from total RNA extracted from plant tissues grown in physiological conditions (3-days-old and 10-days-old seedlings, roots, cotyledons and shoots/leaves from 10-days-old seedlings, rosette leaves and flowers from mature plants) and from 10-days-old roots treated as described above.

For semiquantitative RT-PCR, the Kapa Taq PCR Kit (Kapa Biosystems, Woburn, MA, USA) was used according to manufacturer's instructions. All PCR products were separated by electrophoresis on 1–1.2% agarose gels and visualized under UV light after staining with ethidium bromide (100 µg/l, SigmaAldrich). The primers used to amplify the genes of interest are listed below: 18S-F, 18S-R, SBP1: RT-SBP1-F, RT-SBP1-R, SBP2: RT-SBP2-F, RT-SBP2-R, SBP3: RT-SBP3-F, RT-SBP3-R, GRXS14: AtAy157988_F(Y2H), AtAY157988_R(Y2H), GRXS16: AtAY157989_F(Y2H), AtAY157989_R(H2Y) (Table 1). Densitometric analysis was performed with the GELEval (Frogdance) software.

2.4. Constructs for yeast assays

In the present study pGADT7 and pGBKT7 provided from Clontech were used as yeast vectors. ORFs from *AtSBPs*, *HsSBP1* and *AtGRXS*

were amplified from the respective pJET1.2 clones with specific pairs of primers using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. These primers introduced *NdeI* and *SmaI* ends at the 5' and 3' ends of the amplified sequences of *AtSBP1*, *AtSBP2* and *AtSBP3*, *NdeI* and *BamHI* sites in the *HsSBP* and *NdeI* and *PstI* sites in the *AtGRXS*. PCR products were purified using a Nucleospin Gel and PCR Clean up kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany) and cloned into yeast vectors. Particularly, *AtSBP1*, *AtSBP2*, *AtSBP3* and *HsSBP1* were cloned into the pGADT7 vector while *GRXS14* and *GRXS16* into the pGBKT7 vector. Furthermore, eight fragments of the coding region of *AtSBP1* resulting from the sequential deletion of its nucleotide sequence (*AtSBP1DEL1-8*) were cloned into the pGADT7 vector with *NdeI/BamHI* sites, as well as two fragments of the *AtGRXS14* (*AtGRXS14* +/- PICOT) with *NdeI/BamHI* sites into the pGBKT7 vector. There was also swap of coding regions-vectors, where it was necessary. The sets of primers used are listed below: *AtSBP1*: 15,803F, U15803Rsplit, *AtSBP2*: 15,274F, U15274Rsplit, *AtSBP3*: 50,289F, U50289Rsplit, *HsSBP1*: *HsSBP1-F-NdeI*, *HsSBP1-R-BamHI*, *GRXS14*: AtAy157988_F(Y2H), AtAY15798_R(Y2H), *GRXS16*: AtAY157989_F(Y2H), AtAY157989_R(H2Y), *AtSBP1DEL1*: T7-F, *AtSBP1DEL1-R*, *AtSBP1DEL2*: T7-F, *AtSBP1DEL2-R*, *AtSBP1DEL3*: T7-F, *AtSBP1DEL3-R*, *AtSBP1DEL4*: T7-F, *AtSBP1DEL4-R*, *AtSBP1DEL5*: T7-F, *AtSBP1DEL5-R*, *AtSBP1DEL6*: T7-F, *AtSBP1DEL6-R*, *AtSBP1DEL7*: T7-F, *AtSBP1DEL7-R*, *AtSBP1DEL8*: T7-F, *AtSBP1DEL8-R*, *AtGRXS14* + PICOT: CXIP1F-NdeI, CXIP1R-BamHI, *AtGRXS14* –PICOT: CXIP1F-NdeI, CXIP1R-BamHI (Table 1).

2.5. Construction of vectors for plant transformation

Subcellular localization experiments of the *AtSBP* and *AtGRX* proteins were carried out by using pSAT6.eGFP-N1 vector [38]. In brief, the full-length coding regions of *AtSBPs* were extracted from the same pJET1.2 plasmids used in yeast transformation, described above, using *EcoRI/XmaI* as restriction enzymes, purified using a Nucleospin Gel and PCR Clean up kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany), and cloned into pSAT6.eGFP-N1 vector, in frame with N-terminus of eGFP protein. The full length ORFs of *AtGRXS14* and *AtGRXS16* were PCR amplified using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), from the respective pJET1.2 plasmids used in yeast transformation (described above), with the following set of primers: CXIP1-F-HindIII, CXIP1-R-BamHI and CXIP2-F-EcoRI, CXIP2-R-BamHI. The sites created for each fragment were *HindIII/BamHI* for *AtGRXS14* and *EcoRI/BamHI* for *AtGRXS16*. The PCR products were then purified using a Nucleospin Gel and PCR Clean up kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany), cloned in pGEM-T (pGEM®-T Easy, Promega), and finally cloned into pSAT6.eGFP-N1 vector. For the construction of stable lines of *Arabidopsis* with GFP constructs, the coding regions of *AtSBPs* and *AtGRXS*s with GFP cassette were isolated from pSAT6.eGFP-N1 vector using *Pi-PspI* restriction enzyme and cloned into pPZP-RCS2.nptII binary vector [38].

Multicolour Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) was carried out with the pSAT vector system [38–40]. *AtSBPs* were isolated as described above using *EcoRI/XmaI* as restriction enzymes and finally cloned into pSAT1.cCFP-N1 vector, in frame with the C-terminus of cCFP (Cyan Fluorescent Protein) protein. *AtGRXS14* and *AtGRXS16* were isolated from pGEM-T vector construct using *HindIII/BamHI* and *EcoRI/BamHI*, respectively, and cloned into pSAT4.nCerulean-N1. For the single transformation in BiFC, coding regions of *AtSBPs* and cCFP cassette were isolated from pSAT1.cCFP-N1 using *Asc-I* restriction enzyme and cloned into pBluescript KS⁺.RCS2 vector, while the coding regions of *AtGRXS*s and the nCerulean cassette were isolated from pSAT4.nCerulean-N1 using *I-SceI* enzyme and finally cloned into pBluescript KS⁺.RCS2, which already contained the coding regions of *AtSBPs* and the cCFP cassette. All constructs were checked by restriction enzyme analysis and sequencing.

2.6. Plant transformation

Agrobacterium tumefaciens strain GV3101 competent cells were transformed with the proper constructs, using the general freeze-thaw method as described by An et al. [41]. The transformed bacteria were used for the stable transformation of *Arabidopsis* (Col-0) plants via the floral dip method [42].

For *Arabidopsis* protoplast isolation and transfection, the Tape *Arabidopsis*-Sandwich method was used [43]. Protoplasts were isolated from 5-week-old *Arabidopsis* Col-0 rosette leaves, grown under long day conditions. For each transformation experiment 30 µg of plasmid DNA was added to the protoplasts.

2.7. Microscopy

The samples were visualized with a Zeiss AxioScope epifluorescence microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany), equipped with a Zeiss Axiocam MRc5 digital camera, a differential interference contrast (DIC) system and proper filters. In particular, a filter set with exciter BP450-490 and barrier BP515-595, a set with exciter G-365 and barrier LP420 and a set with exciter BP510-560 and barrier LP590 were used.

2.8. Protein molecular modeling and structural prediction of protein-protein interactions

Three dimensional (3D) prediction of Selenium-binding protein 1 (SBP1) from *Arabidopsis thaliana* was generated by using I-TASSER (Iterative Threading ASSEmblY Refinement), an online server that is designed for automated protein structure and function prediction (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ITASSER>), without changing the default parameters of the software [44,45]. The protein sequence of SBP1 from *Arabidopsis thaliana* was retrieved from Uniprot [46] (Accession number O23246). The structural model of SBP1 was constructed from multiple threading alignments and iterative structural assembly simulations. Comparison of the produced models with other known protein structures provides insights for the function of proteins being investigated [47]. Images containing structural models were prepared by the PyMol Molecular Visualization System (<http://www.pymol.org>). Prediction of protein-protein interactions (docking experiments) between SBP1 and CAX-interacting protein 1 (CXIP1) from *Arabidopsis thaliana* were carried out via utilization of the “Prediction Interface” of HADDOCK2.2 web server [48,49]. The 3D structure of SBP1 used in the docking experiment, corresponds to the model constructed by I-TASSER, while in the case of CXIP1 its experimentally determined structure [50] was retrieved from Protein Data Bank [51] (PDB ID: 3IPZ) that corresponds to the mature form of the protein (residues 65 to 173). In order to identify the protein-protein interface residues, the CPORT prediction algorithm was suitably employed on [52]. HADDOCK score, being the weighted sum of inter-molecular electrostatic (Eelec), van der Waals (EvdW), desolvation (ΔG_{solv}) and ambiguous interaction restraint (AIR) energies, was used to rank the generated poses. The resulted models were visualized with the PyMol Molecular Visualization System. Calculations of the properties of the interfaces of the interacting proteins were carried out utilizing PISA software [53].

3. Results and discussion

3.1. Isolation of AtGRXS14 (AtGRXcp or AtCXIP1) as an interacting protein of AtSBP1 and sequence analysis of AtGRXS14

To study the function of SBP in plants we screened an *A. thaliana* cDNA library for potential interacting proteins of SBP1 using the yeast two hybrid system. Amongst the clones we identified in this manner was AtGRXS14, known at the time of the experiment as AtCXIP1 [23].

AtGRXS14 (NP_191050) constitutes a protein of 173 aa (Fig. 1A). It

contains a GRX PICOT-like domain between aa 74–164 (indicated by a grey arrow) and a GSH binding domain (within the PICOT) (Fig. 1A). AtGRXS14 shares 20% identity, particularly in the PICOT domain region, with AtGRXS16 (or AtCXIP2) (NP_565885) (Fig. 1B), a 293 aa protein. The alignment of the two proteins is shown in Fig. 1C and a graphical domain overview alignment in Fig. 1D.

AtGRXS14 and AtGRXS16 are both plastidial class II GRXs, possessing dual in vitro biochemical functions, namely reductase and Fe-S cluster ligase activity [22].

Several proteins that contain a PICOT-HD also contain a Trx-HD, including *Arabidopsis* AtGRXS16. Proteins containing the Trx-HD are important in a range of cellular process, including controlling the redox state of the cell [23,54]. The human PICOT protein is involved in the interaction with protein kinase C through this Trx-HD and negatively regulates the c-Jun N-terminal kinase/AP-1 and NF- κ B pathway [55]. AtGRXS14 is 43% similar to AtGRXS16 overall and is 54% identical to AtGRXS16 within the PICOT-HD. Human PICOT has been characterized as an iron-sulfur (Fe/S) protein [56], similar to the PICOT homolog in yeast, Grx3, which was shown to play a crucial role in intracellular iron trafficking and sensing [57]. Iron-sulfur proteins are ubiquitously expressed and participate in diverse biochemical functions in virtually every living cell. They consist of two or more iron atoms bridged by sulfur ligands and are involved in diverse processes, including respiration, oxidation-reduction reactions, heme biosynthesis, iron homeostasis, and regulation of gene expression [58].

3.2. AtSBP protein family interactions with AtGRXS14 and AtGRXS16

The identification of protein-protein interactions comprises a prerequisite towards understanding protein networks and functions, as proteins normally function in macromolecular complexes. Describing such interactions, although it may be of great interest, it can be challenging, since they may be transient, or may involve different partners and overlapping binding sites [59].

In order to verify the positive interaction of AtGRXS14 with AtSBP1 revealed by the yeast two-hybrid (Y2H) screening (with AtSBP1 as bait), the respective genes were amplified from total *Arabidopsis* root RNA and cloned in appropriate vectors and individual protein-protein interaction experiments were performed. Additionally, *AtSBP2*, *AtSBP3* and *AtGRXS16* were also amplified and cloned due to their high degree of homology with the bait and prey proteins, respectively (Supplementary Fig. 1, Fig. 1). Due to the highly conserved nature of selenium binding proteins and glutaredoxins we also attempted to utilize the human homologue of SBP1 in interaction assays with the plant glutaredoxins and therefore HsSBP1 was amplified from human cDNA and cloned in frame with the GAL4 activation domain.

Yeast cells coexpressing various construct combinations in pairs, were used to study protein-protein interactions (Fig. 2A). This assay confirmed initially a strong positive interaction of AtGRXS14 with AtSBP1 and a weaker one with AtSBP3. Interestingly, all three AtSBP proteins also strongly interacted with AtGRXS16. These interactions were revealed by the choice we made to test the particular pairs, based on the significant homology of AtGRXS14 and AtGRXS16 within the PICOT domain, since AtGRXS16 was not identified as an interacting partner in the Y2H screening. It is noteworthy, that HsSBP1 physically binds to AtGRXS16, in a weak manner though, demonstrating a presumed functionally conserved protein network. No unspecific activation was detected when bait and prey proteins were used in combination with the respective empty vectors (pGBKT7 or pGADT7).

Our data point to the existence of a novel protein-protein interaction network, consisting of the selenium binding protein family and the plastidial glutaredoxins AtGRXS14 and AtGRXS16, where AtGRXS14 specifically binds AtSBP1, while AtGRXS16 binds to all three SBP members. Taking into account the properties and the suggested functions of the participating proteins, it is plausible to speculate that this network is part of the plant's response to oxidative stress.

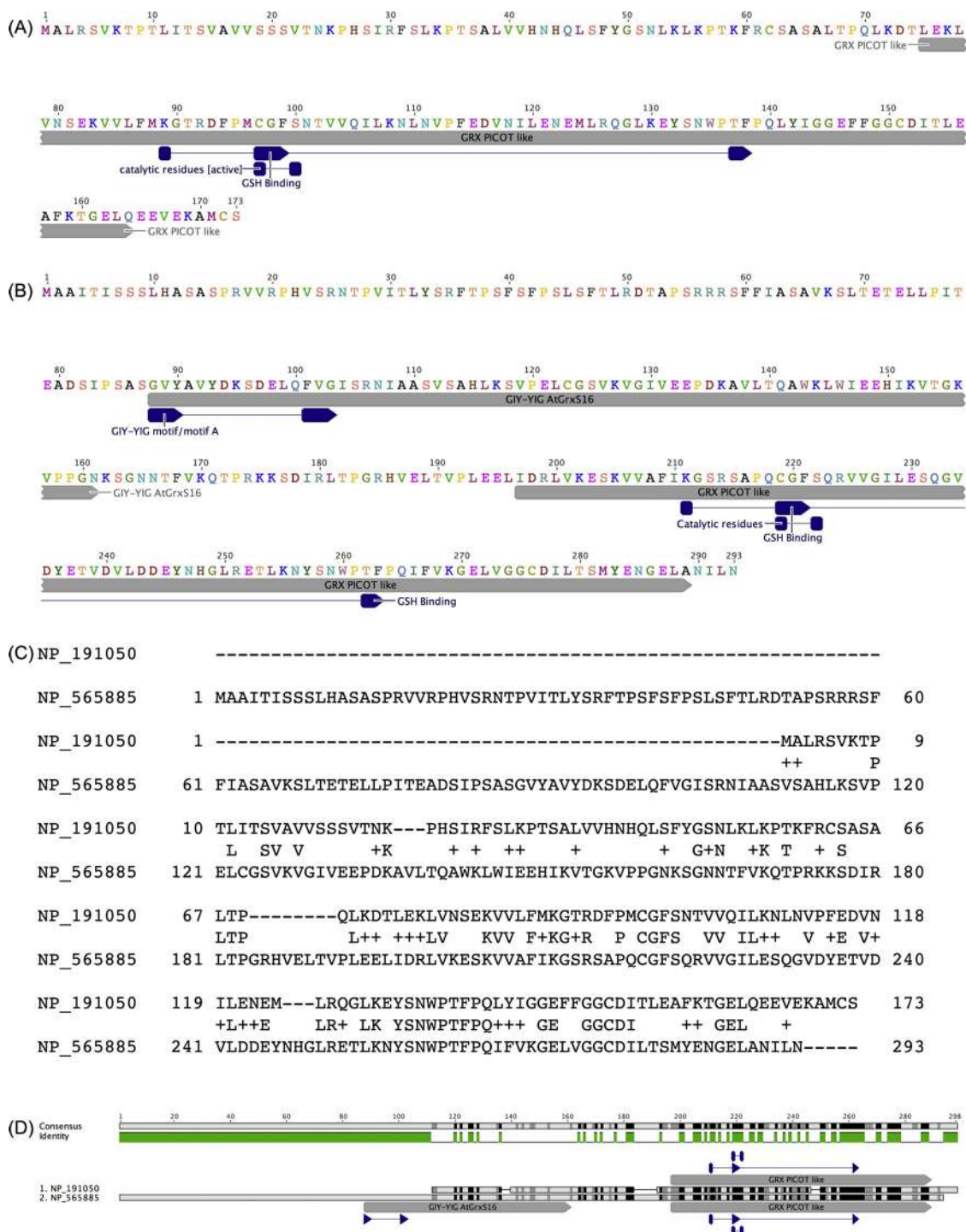


Fig. 1. Sequence characteristics of AtGRXS14 and AtGRXS16. (A) and (B) aminoacid sequence of AtGRXS14 and AtGRXS16 respectively. The PICOT-like domains are shown as gray bars and the catalytic residues along with the GSH binding sites are shown as blue boxes. (C) Aminoacid sequence comparison of AtGRXS14 and AtGRXS16. A significant degree of conservation is observed within the PICOT domain towards the carboxy terminal. (D) Graphical alignment of the annotated domains of AtGRXS14 and AtGRXS16 (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

Moreover, we tried to determine domains in the AtSBP1 polypeptide, responsible for binding of AtGRXS14. We generated a series of C-terminal truncated AtSBP1 polypeptides (Fig. 2E) and studied in yeast cells their binding capacity to AtGRXS14. Firstly, we investigated whether these truncated polypeptides cloned in frame with the binding domain of GAL4 react in an unspecific manner with the activation domain of the empty vector (Fig. 2B). Indeed, we demonstrated that this was the case for the first 53 aa of AtSBP1 (AtSBP1DEL8). On the contrary, when we swapped domains and AtSBP1DEL8 was fused to the

activation domain of GAL4 no unspecific growth was detected with the binding domain of the empty vector (pGBKT7) (Fig. 2B). We then analyzed the auxotrophy of yeast cells while harboring in pairs AtGRXS14 and each of the eight truncated polypeptides of AtSBP1 (Fig. 2C). Our analysis showed that the first 178 aa of AtSBP1 maintain strong, full binding capacity to AtGRXS14, while the region between aa 358–427, when deleted, interferes with proper binding. We believe that the behavior of constructs AtSBP1DEL2 and AtSBP1DEL3 is due to conformational changes that might occur to the truncated protein,

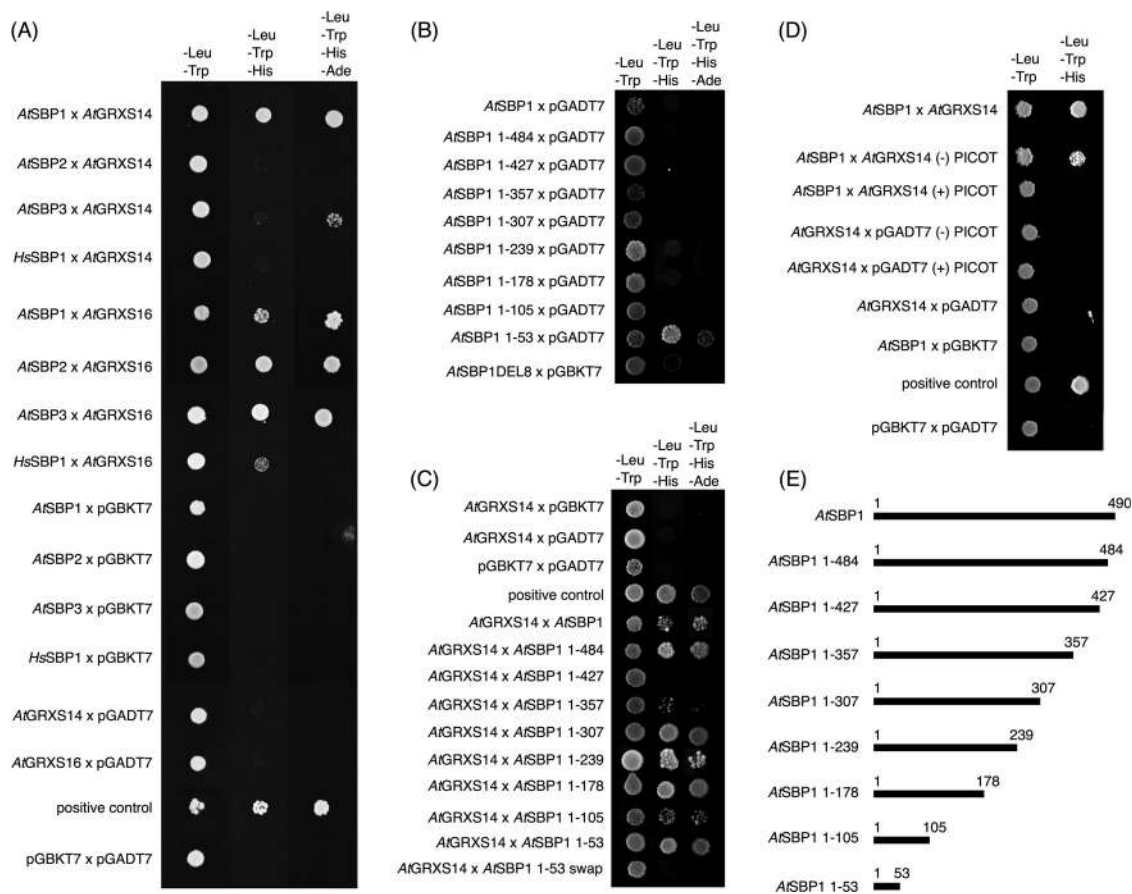


Fig. 2. Yeast two-hybrid assays. (A) Confirmation that AtGRXS14 from the yeast two-hybrid screening interacts with the bait protein AtSBP1. Furthermore, AtGRXS16 interacts with all members of the SBP protein family. A weak interaction of the human SBP1 with AtGRXS16 was also observed. Proper controls to exclude unspecific vector activation were included along with the 53/T positive control. (B) Evaluation of the effect of the GAL4 activation domain (AD) in terms of false positive appearance. The AD of the empty vector unspecifically binds to the truncated version of AtSBP1, AtSBP1DEL8. Immediately below this interaction the same truncated version of AtSBP1 is shown, after domain swapping. (C) Deletion analysis of AtSBP1. The shortest truncated version of AtSBP1 that interacts with AtGRXS14 is AtSBP1DEL7 of 105 N-terminal aminoacids. (D) AtSBP1 does not bind the PICOT domain of AtGRXS14. The interaction of AtGRXS14 with AtSBP1 is confined to N-terminal half of AtGRXS14 that does not contain the PICOT domain. Proper negative and positive controls were included. (E) The truncated polypeptides of AtSBP1 used for deletion analysis in (C). The relative position of the last aminoacid in each deletion is indicated by a number.

resulting in a folding arrangement that interferes with proper binding of GRXS14 to SBP1.

PICOT-HD is a highly conserved protein domain that is often associated with thioredoxin and glutaredoxin modules [60]. Therefore, we asked if the PICOT domain of AtGRXS14 is directly involved in AtSBP1 binding. We prepared two truncated versions of AtGRXS14 with and without the PICOT domain and translationally fused them to the binding domain of GAL4. These polypeptides comprised of aa 1–82 and 83–173 respectively, the latter containing only the PICOT domain. These constructs were transferred to yeast cells along with AtSBP1 fused to GAL4 activation domain and the relative strains were tested for auxotrophy (Fig. 2D). Our data showed that AtSBP1 interacts with the N-terminal region of AtGRXS14 upstream of the PICOT domain.

3.3. Docking experiments

Results from yeast two-hybrid (Y2H) screening regarding the AtSBP1-AtGRXS14 complex reveal the significance of the residues located at the N-terminus of AtSBP1 in order interaction between them to be achieved. They also indicate that truncated sequences of AtSBP1 fail to interact with AtGRXS14 in a proper manner, suggesting that the full sequence of AtSBP1 is necessary for the formation of the complex.

In order to predict the mode of interaction between AtSBP1 and AtGRXS14 in *Arabidopsis thaliana*, driven docking experiments were performed utilizing the HADDOCK2.2 Web Server. Since the three-

dimensional structure of AtSBP1 has not been experimentally determined a theoretical model of the protein was constructed by I-TASSER server, providing as input the sequence of AtSBP1 from Uniprot. In order to estimate the quality of the predicted model by I-TASSER, the C-score was calculated. C-score is a confidence score that its value typically ranges from -5 to +2. A high value of C-score indicates high confidence in the model. The predicted model was also evaluated utilizing both the template modeling-score (TM-score) and the root mean-square difference (RMSD). TM-score corresponds to a scale for measuring the structural similarity between two proteins with different tertiary structures. A value of TM-score over +0.5 indicates that the topology of the predicted model is correct, while a value below +0.17 indicates random similarity. In our case, the values of C-score, TM-score and RMSD for the predicted model are -0.02, 0.71 ± 0.12 and $7.3 \pm 4.2 \text{ \AA}$, respectively. These values indicate that our predicted model is reliable in order to be used in subsequent docking experiments with the exception of residues 1 to 23 at the N terminus of the protein. This is due to the fact that there is no proper template available that can be used to model that part. A detailed observation of the resulted model indicates the abundance of beta-strands that form a seven-blade beta-propeller surrounded by α -helices (Fig. 3A). The overall structure is in agreement with previously reported structural models of SBP1 from *Arabidopsis thaliana* [33] and *Homo sapiens* [61] that were produced by the homology modeling method. This is due to the fact that in all cases the template structure used, was the hypothetical selenium-binding

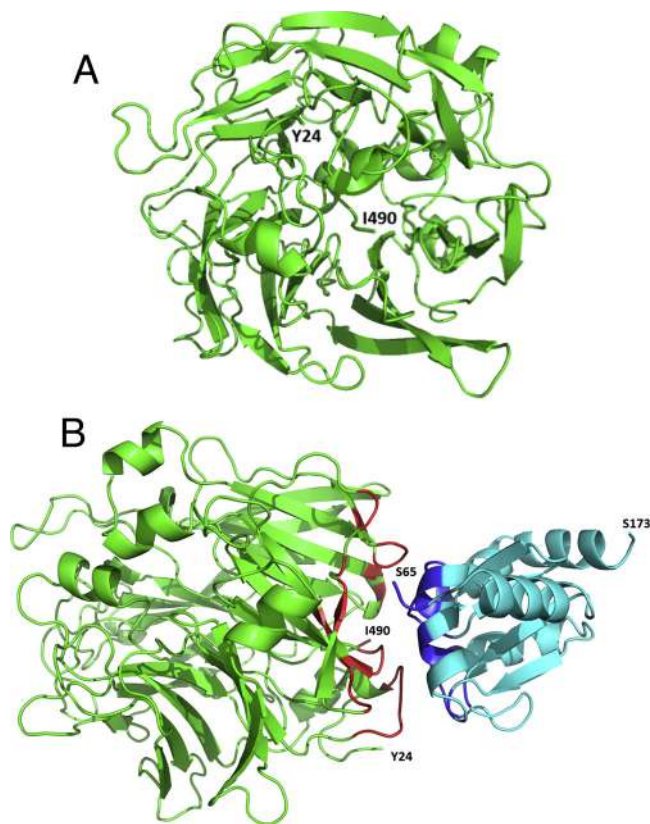


Fig. 3. A ribbon model of AtSBP1 structure and a representation of the predicted AtSBP1-AtGRXS14 complex. (A) A ribbon model of AtSBP1 structure (colored in green), displayed using the software PyMOL. The overall structure of AtSBP1 is comprised of a seven-blade beta-propeller surrounded by α -helices. (B) A cartoon representation of the predicted AtSBP1-AtGRXS14 complex (colored in green and cyan, respectively), displayed using the software PyMOL. The interfacing residues, calculated by PISA, are colored red (AtSBP1) and blue (AtGRXS14), respectively (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

protein from *Sulfolobus tokodaii* (PDB ID: 2ECE) resulting in models with very similar structural features.

On the other hand, the structure of AtGRXS14 is experimentally determined by X-ray Crystallography (PDB ID: 3IPZ) [3]. The deposited structure corresponds to the mature form of the protein (residues 65–173) while residues 1–63 form a signal peptide that targets the protein to the chloroplast. It adopts a glutaredoxin/thioredoxin-like fold that consists of a four-stranded parallel β -sheet surrounded by five α -helices [50].

For the prediction of the protein-protein interface residues that will be provided subsequently as input to the HADDOCK2.2 Web Server, the CPORT algorithm was used. The driven docking experiment provided a solution (Fig. 3B) that exhibited a HADDOCK score of -136.4, with the values of energies (Kcal/mole) having been calculated as following: (a) van der Waals energy: -36.2; (b) electrostatic energy: -375.2; (c) desolvation energy: -48.5; (d) restraints violation energy: 233.7 and (e) total buried surface area (BSA): 1667.5 \AA^2 . It must be noted that the high value of restraints violation energy is due to the fact that a large number of residues that were considered as active by the CPORT algorithm were not taken into account during the docking experiment. The residues that participate in the interface between AtSBP1 and AtGRXS14 were calculated with PISA software. In the case of AtSBP1 these residues are 101–106, 160–163, 182, 184–186, 191–192, 194, 196–197, 212, 214, 250–252, 254 and 490 while in AtGRXS14 these are 65–66, 89, 96–99, 120, 126–127, 130–131, 134–138 and 152. The

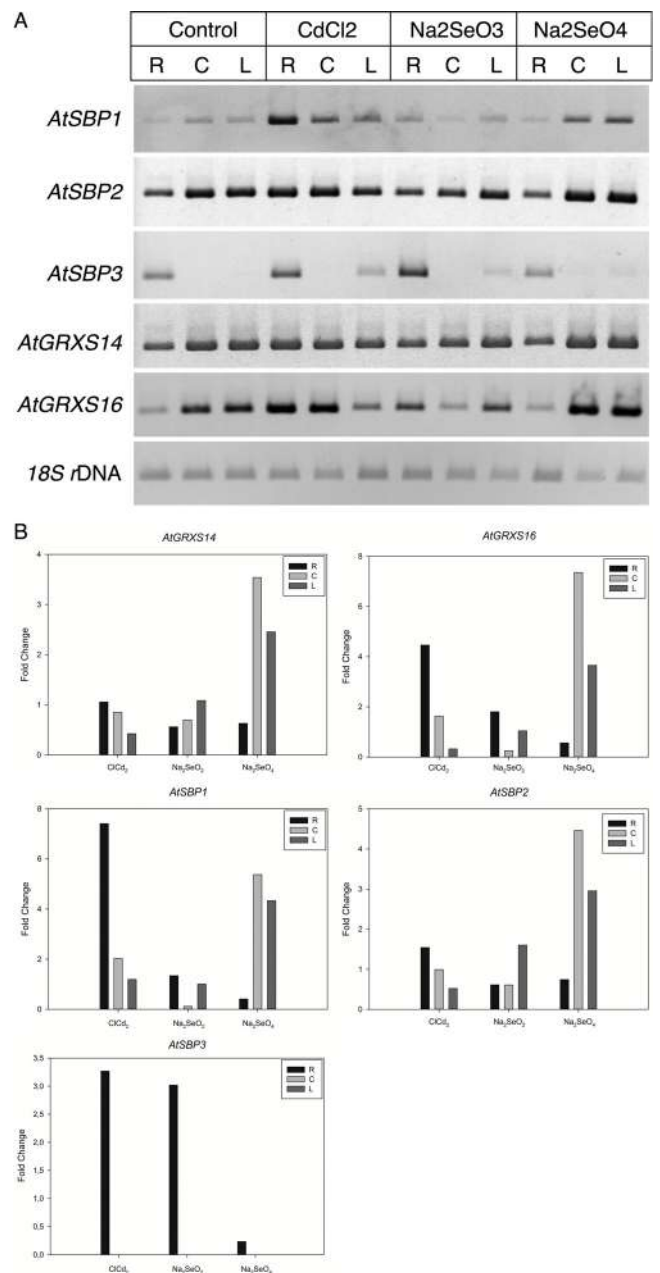


Fig. 4. RT-PCR analysis of SBP genes, AtGRXS14 and AtGRXS16 upon treatment with oxidative stress inducers. (A) Plants were treated with 150 μM CdCl₂, Na₂SeO₃ and Na₂SeO₄ and transcript levels were compared to untreated control plants. Samples were normalized with the housekeeping 18S rDNA. (R) Roots, (C) Cotyledons, (L) Leaves. The PCR cycles were as follows: SBP1(28), SBP2(35), SBP3(35), GRXS14(33), GRXS16(33), 18S(26). (B) Bar charts depicting expression levels of genes studied, following densitometric analysis of the bands presented in (A). Differences in gene expression are shown as fold-change over the control after normalization with the housekeeping 18S rDNA. (R) Roots, (C) Cotyledons, (L) Leaves.

complex is stabilized by a network of hydrogen bonds, that is formed between the interfacing residues of these two proteins. Moreover, residues Asp103, Glu163 and Lys214 from AtSBP1 form salt bridges with residues Lys89, Lys130 and Asp152 from AtGRXS14, respectively.

Consequently, the results of the docking experiment strongly support the experimental results showing the significance of the N-terminus of AtSBP1 for the interaction with AtGRXS14 and they, additionally, stress the role of the full sequence of AtSBP1 in the interaction, since the C-terminus (residue 490) is also part of the

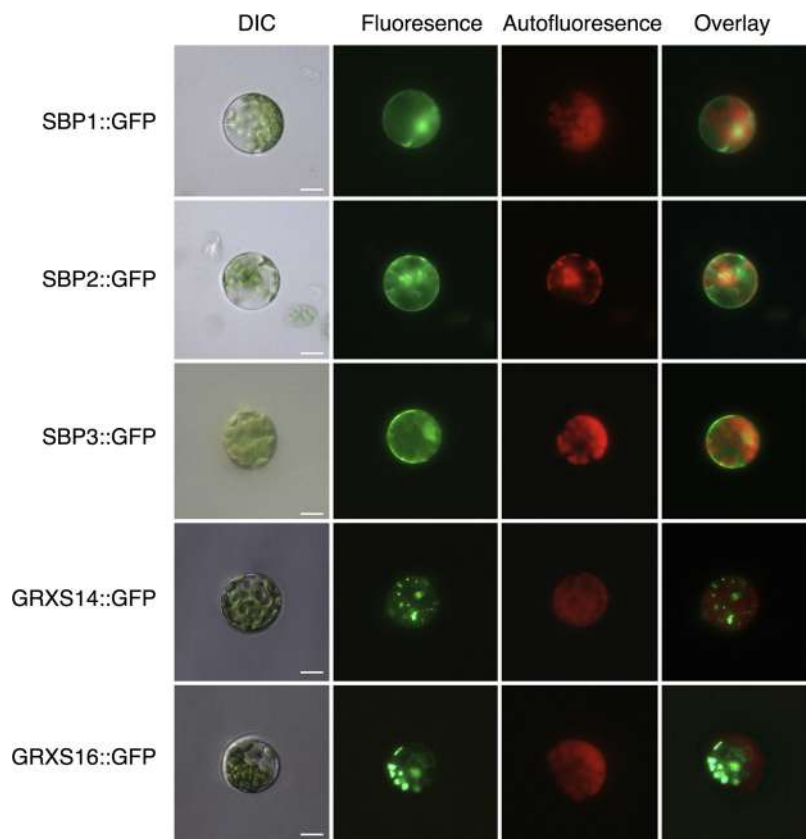


Fig. 5. Transient expression assays in Arabidopsis protoplasts. The genes of interest were fused to GFP to generate the chimeric constructs indicated on the left of the panel. SBP proteins were localized in the cytoplasm and the nucleus. AtGRXS14 localized in speckle-like structures associated with the chloroplasts and AtGRXS16 in the chloroplast body. Cells were visualized under an epifluorescence microscope equipped with DIC optics and GFP filter sets. Bars 25 μ m.

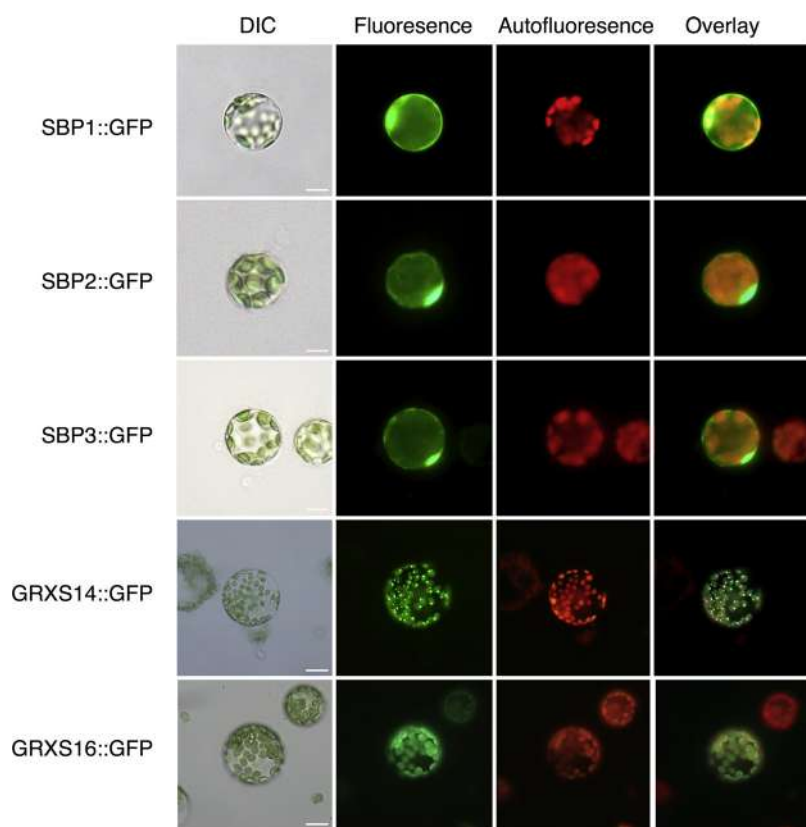


Fig. 6. Transgenic protoplasts from stably transformed Arabidopsis plants. Chimeric constructs indicated on the left of the panel were used to stably transform plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. Rosette protoplasts were assayed for GFP expression. SBP proteins were localized in the cytoplasm and the nucleus. AtGRXS14 localized in speckle-like structures associated with the chloroplasts and AtGRXS16 in the chloroplast body. Cells were visualized under an epifluorescence microscope equipped with DIC optics and GFP filter sets. Bars 25 μ m.

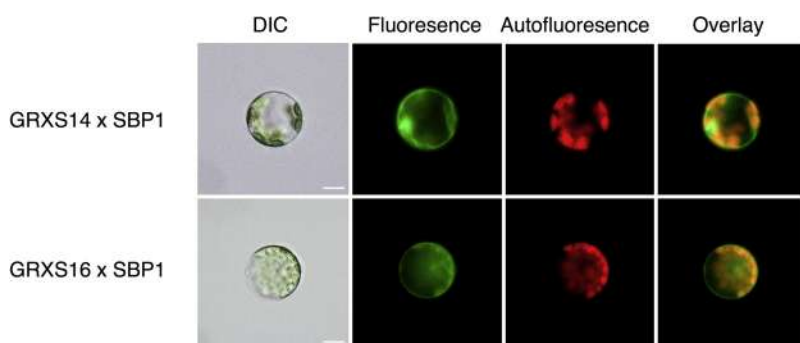


Fig. 7. BiFC in Arabidopsis protoplasts. AtSBP1 interacts *in planta* with AtGRXS14 in the nucleus and the cytoplasm while the interaction signal with AtGRXS16 is confined in the cytoplasm only. Cells were visualized under an epifluorescence microscope equipped with DIC optics and GFP filter sets. Bars 25 μ m. Negative controls were included (Supplementary Fig. 2).

predicted interface.

Based on the fact that certain residues of AtGRXS14 like Lys89, Lys130 and Asp152 are involved in GSH binding, one could speculate that GSH competes with AtGRS14 for binding to AtSBP1, since Dutilleul et al. [27] have provided evidence that SBP1 protein can function in Cd detoxification, acting in parallel with GSH and phytochelatin.

3.4. Gene expression analysis of AtSBP family, AtGRXS14 and AtGRXS16

Since *AtSBP* gene family is differentially regulated by sodium selenite and sodium selenate [35] and *AtSBP1* is upregulated by cadmium [27,34] it would be interesting to determine the relative transcript accumulation of *AtGRXS14* and *AtGRXS16* after treatment of plants with the aforementioned compounds (Fig. 4). Therefore, we investigated the gene expression patterns of the *AtSBP* gene family and those of *AtGRXS14* and *AtGRXS16* in control plants, as well as, in response to cadmium and selenium compounds.

AtSBP1 is strongly induced by 150 μ M CdCl₂ in the roots and marginally upregulated in cotyledons and leaves of 10-day-old plants, after treatment with 150 μ M Na₂SeO₄. *AtSBP2* is constitutively expressed under all treatments. *AtSBP3* is expressed only in the roots of untreated plants and it is induced in roots and leaves after CdCl₂ and Na₂SeO₃ treatment. *AtGRXS14*, like *AtSBP2*, is constitutively expressed under all conditions tested. *AtGRXS16* transcript accumulates at higher levels in the cotyledons and leaves of untreated plants. Upon treatment with CdCl₂ it is highly induced in the roots with an approximate two-fold induction in the cotyledons. From the two selenium compounds tested only Na₂SeO₄ treatment leads to the upregulation of *AtGRXS16* in cotyledons and leaves. The reason why we included *AtGRXS16* in this analysis was that *AtGRXS16* interacted in yeast with the members of the *AtSBP* protein family.

Concerning the *AtSBP* family, the expression patterns observed are, generally, in line with previous studies [29,34,35], but we show additionally that also *AtSBP3* participates in the network of genes upregulated in response to CdCl₂ and Na₂SeO₃. Overall, these data further strengthen previous observations that indeed *AtSBP* gene family is differentially regulated by cadmium, selenite and selenate.

In *Arabidopsis thaliana*, it has been shown that, oxidative stress due to cadmium exposure relates to hydrogen peroxide accumulation [62] and that treatment of plants with selenium compounds led to ROS accumulation in the roots [35]. It has also been proposed, that in addition to the importance of SBP1 in stress responses, SBP2 and SBP3, along with SBP1, constitute integrated components of a network that responds to the cellular redox state [35]. Furthermore, studies using plate-grown plantlets and leaf discs have implicated GRXS14 and GRXS16 in oxidative stress responses [24,63], while GRXS14 deficiency results in the reduction of chlorophyll content in dark and its overexpression is correlated with both altered chlorophyll content and reduced amounts of NFU2, a scaffold protein required for [4Fe-4S] and ferredoxin iron-sulphur cluster assembly [22,64]. Taken together the above and considering the interactions of AtGRXS14 and AtGRXS16 with the members of the *AtSBP* protein family (see below), it is

tempting to speculate that this gene and/or protein network functions in a concerted manner in response to oxidative stress.

3.5. Subcellular localization and in-planta interactions

It has been reported previously that the human SBP1 localizes in the cytosol and the nucleus [65–67], while studies in plants demonstrated the expression of SBP in cytoplasmically dense cell types and membrane vesicles [28]. In order to elucidate in which cellular compartments our proteins of interest are localized, we initially performed transient expression assays in Arabidopsis protoplasts. *AtSBPs*, *AtGRXS14* and *AtGRXS16* were translationally fused to GFP and used to transform rosette leaf protoplasts (Fig. 5). This analysis showed that SBP protein fusions can be present both in the cytoplasm and the nucleus, while the respective *AtGRXS14* and *AtGRXS16* fusions relate to the chloroplasts. Interestingly, *AtGRXS14* localized in speckle-like structures, whereas the *AtGRXS16* derived signal was evenly distributed in the chloroplast body.

To further enhance the detail of our observations we utilized protoplasts from plants stably transformed with the GFP fusions (Fig. 6). The expression patterns observed with transient assays were confirmed in a clearer manner but in the case of *AtGRXS14* it became evident that intense signal is formed in the chloroplast and usually in one speckle-like structure associated with it.

The chloroplastic localization of the *Populus trichocarpa* GrxS14 and GrxS16 has also been shown in the heterologous system of tobacco leaves by transient expression assays [68], where GFP fusions were expressed in the guard cells of the stomata. Furthermore, *AtGRXS16*-GFP was transiently expressed in tobacco mesophyll cells and localized in the chloroplasts [69]. Our data are in line with the aforementioned studies, but they also reveal in the homologous Arabidopsis system a new expression pattern, as far as *AtGRXS14* is concerned.

We then asked if the interactions revealed by the yeast two-hybrid screening occur *in planta*. To answer this question we employed bimolecular fluorescence complementation (BiFC) to probe the protein interactions in living protoplast cells [40,70]. Arabidopsis protoplasts were transiently transformed with constructs of the interacting pairs in the pSAT vector system [39,40]. As shown in Fig. 7, *AtSBP1* interacts *in planta* with *AtGRXS14* in the nucleus and the cytoplasm while the interaction signal with *AtGRXS16* is confined in the cytoplasm only.

Our subcellular localization analyses define for the first time the compartmentalized expression pattern of the *AtSBP* protein family and reveal in a homologous system a novel pattern for *AtGRXS14* (Fig. 5). Furthermore, we show that probably prior to their translocation to the chloroplast *AtGRXS14* and *AtGRXS16* are retained in the cytoplasm to interact with *AtSBP1* (and even in the nucleus in the case of *AtGRXS14*) (Fig. 7), when ectopically expressed. It is known that certain cytosolic factors such 14-3-3 protein, Hsp70, Hsp90 and FKBP bind to particular peptides and are thought to facilitate protein targeting to the chloroplasts [71–73]. It remains unclear and worth further investigation under which conditions the described interactions occur *in vivo*.

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the NKUA Special Account for Research Grants (S.A.R.G.). Irene Dervisi was supported by the Greek State Scholarships Foundation (IKY).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.01.021>.

References

- [1] B. Halliwell, Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life, *Plant Physiol.* 141 (2006) 312–322.
- [2] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, 1985.
- [3] O. Blokhina, K.V. Fagerstedt, Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems, *Physiol. Plant.* 138 (2010) 447–462.
- [4] E. Heyno, V. Mary, P. Schopfer, A. Krieger-Liszak, Oxygen activation at the plasma membrane: relation between superoxide and hydroxyl radical production by isolated membranes, *Planta* 234 (2011) 35–45.
- [5] K. Shah, R.G. Kumar, S. Verma, R.S. Dubey, Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings, *Plant Sci.* 161 (2001) 1135–1144.
- [6] R. Desikan, S. A-H-Mackerness, J.T. Hancock, S.J. Neill, Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress, *Plant Physiol.* 127 (2001) 159–172.
- [7] S. Neill, R. Desikan, J. Hancock, Hydrogen peroxide signalling, *Curr. Opin. Plant Biol.* 5 (2002) 388–395.
- [8] J. Yan, N. Tsuchihara, T. Etoh, S. Iwai, Reactive oxygen species and nitric oxide are involved in ABA inhibition of stomatal opening, *Plant Cell Environ.* 30 (2007) 1320–1325.
- [9] R. Mittler, S. Vanderauwera, M. Gollery, F. Van Breusegem, Reactive oxygen gene network of plants, *Trends Plant Sci.* 9 (2004) 490–498.
- [10] M.C. Rentel, D. Lecourieux, F. Ouaked, S.L. Usher, L. Petersen, H. Okamoto, H. Knight, S.C. Peck, C.S. Grierson, H. Hirt, M.R. Knight, OX1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in Arabidopsis, *Nature* 427 (2004) 858–861.
- [11] D. Gollack, C. Li, H. Mohan, N. Probst, Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks, *Front. Plant Sci.* 5 (2014) 151.
- [12] A.P. Fernandes, M. Fladvad, C. Berndt, C. Andresen, C.H. Lillig, P. Neubauer, M. Sunnerhagen, A. Holmgren, A. Vlamis-Gardikas, A novel monothiol glutaredoxin (Grx4) from *Escherichia coli* can serve as a substrate for thioredoxin reductase, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 24544–24552.
- [13] Y. Meyer, B.B. Buchanan, F. Vignols, J.P. Reichheld, Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology, *Annu. Rev. Genet.* 43 (2009) 335–367.
- [14] N. Rouhier, E. Gelhaye, J.P. Jacquot, Plant glutaredoxins: still mysterious reducing systems, *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (2004) 1266–1277.
- [15] N. Rouhier, S.D. Lemaire, J.P. Jacquot, The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation, *Annu. Rev. Plant Biol.* 59 (2008) 143–166.
- [16] J. Couturier, J.P. Jacquot, N. Rouhier, Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms, *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (2009) 2539–2557.
- [17] Y. Meyer, W. Siala, T. Bashandy, C. Riondet, F. Vignols, J.P. Reichheld, Glutaredoxins and thioredoxins in plants, *Biochim. Biophys. Acta* 1783 (2008) 589–600.
- [18] S. Xing, A. Lauri, S. Zachgo, Redox regulation and flower development: a novel function for glutaredoxins, *Plant Biol. (Stuttg.)* 8 (2006) 547–555.
- [19] N.H. Cheng, J.Z. Liu, X. Liu, Q. Wu, S.M. Thompson, J. Lin, J. Chang, S.A. Whitham, S. Park, J.D. Cohen, K.D. Hirschi, Arabidopsis monothiol glutaredoxin, AtGRXS17, is critical for temperature-dependent postembryonic growth and development via modulating auxin response, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 20398–20406.
- [20] L. Hong, D. Tang, K. Zhu, K. Wang, M. Li, Z. Cheng, Somatic and reproductive cell development in rice anther is regulated by a putative glutaredoxin, *Plant Cell* 24 (2012) 577–588.
- [21] C. Riondet, J.P. Desouris, J.G. Montoya, Y. Chartier, Y. Meyer, J.P. Reichheld, A dicotyledon-specific glutaredoxin GRXC1 family with dimer-dependent redox regulation is functionally redundant with GRXC2, *Plant Cell Environ.* 35 (2012) 360–373.
- [22] P. Rey, N. Becuwe, S. Tourrette, N. Rouhier, Involvement of Arabidopsis glutaredoxin S14 in the maintenance of chlorophyll content, *Plant Cell Environ.* 40 (2017) 2319–2332.
- [23] N.H. Cheng, K.D. Hirschi, Cloning and characterization of CXIP1, a novel PICOT domain-containing Arabidopsis protein that associates with CAX1, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 6503–6509.
- [24] N.H. Cheng, J.Z. Liu, A. Brock, R.S. Nelson, K.D. Hirschi, AtGRXcp, an Arabidopsis chloroplastic glutaredoxin, is critical for protection against protein oxidative damage, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 26280–26288.
- [25] A. Agalou, H.P. Spaink, A. Roussis, Novel interaction of selenium-binding protein with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and fructose-bisphosphate aldolase of Arabidopsis thaliana, *Funct. Plant Biol.* 33 (2006) 847–856.
- [26] A. Agalou, A. Roussis, H.P. Spaink, The Arabidopsis selenium-binding protein confers tolerance to toxic levels of selenium, *Funct. Plant Biol.* 32 (2005) 881–890.
- [27] C. Dutilleul, A. Jourdain, J. Bourguignon, V. Hugouvieux, The Arabidopsis putative selenium-binding protein family: expression study and characterization of SBP1 as a potential new player in cadmium detoxification processes, *Plant Physiol.* 147 (2008) 239–251.
- [28] E. Fletmetakis, A. Agalou, N. Kavroulakis, M. Dimou, A. Martsikovskaya, A. Slater, H.P. Spaink, A. Roussis, P. Katinakis, Lotus japonicus gene LjSBP is highly conserved among plants and animals and encodes a homologue to the mammalian selenium-binding proteins, *Mol. Plant Microbe Interact.* 15 (2002) 313–322.
- [29] V. Hugouvieux, C. Dutilleul, A. Jourdain, F. Reynaud, V. Lopez, J. Bourguignon, Arabidopsis putative selenium-binding protein1 expression is tightly linked to cellular sulfur demand and can reduce sensitivity to stresses requiring glutathione for tolerance, *Plant Physiol.* 151 (2009) 768–781.
- [30] K. Sawada, M. Hasegawa, L. Tokuda, J. Kameyama, O. Kodama, T. Kohchi, K. Yoshida, A. Shinmyo, Enhanced resistance to blast fungus and bacterial blight in transgenic rice constitutively expressing OsSBP, a rice homologue of mammalian selenium-binding proteins, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68 (2004) 873–880.
- [31] K. Sawada, M. Iwata, Isolation of blast fungal cerebroside elicitor-responsive genes in rice plants, *J. Gen. Plant Pathol.* 68 (2002) 128–133.
- [32] K. Sawada, L. Tokuda, A. Shinmyo, Characterization of the rice blast fungal elicitor-responsive gene OsSBP encoding a homolog to the mammalian selenium-binding proteins, *Plant Biotechnol.* 20 (2003) 177–181.
- [33] F. Schild, S. Kieffer-Jaquinod, A. Palencia, D. Cobessi, G. Sarret, C. Zubieta, A. Jourdain, R. Dumas, V. Forge, D. Testemale, J. Bourguignon, V. Hugouvieux, Biochemical and biophysical characterization of the selenium-binding and reducing site in Arabidopsis thaliana homologue to mammalian selenium-binding protein 1, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 31765–31776.
- [34] J.E. Sarry, L. Kuhn, C. Ducruix, A. Lafaye, C. Junot, V. Hugouvieux, A. Jourdain, O. Bastien, J.B. Fievet, D. Vailhen, B. Amekraz, C. Moulin, E. Ezan, J. Garin, J. Bourguignon, The early responses of Arabidopsis thaliana cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses, *Proteomics* 6 (2006) 2180–2198.
- [35] C. Valassakis, P. Livanos, M. Minopetrou, K. Haralampidis, A. Roussis, Promoter analysis and functional implications of the selenium binding protein (SBP) gene family in Arabidopsis thaliana, *J. Plant Physiol.* 224–225 (2018) 19–29.
- [36] G.M. Lacourciere, R.L. Levine, T.C. Stadman, Direct detection of potential selenium delivery proteins by using an *Escherichia coli* strain unable to incorporate selenium from selenite into proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 9150–9153.
- [37] L. Onate-Sanchez, J. Vicente-Carbajosa, DNA-free RNA isolation protocols for Arabidopsis thaliana, including seeds and siliques, *BMC Res. Notes* 1 (2008) 93.
- [38] T. Tzfira, G.W. Tian, B. Lacroix, S. Vyas, J. Li, Y. Leitner-Dagan, A. Krichevsky, T. Taylor, A. Vainstein, V. Citovsky, pSAT vectors: a modular series of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants, *Plant Mol. Biol.* 57 (2005) 503–516.
- [39] V. Citovsky, L.Y. Lee, S. Vyas, E. Glick, M.H. Chen, A. Vainstein, Y. Gafni, S.B. Gelvin, T. Tzfira, Subcellular localization of interacting proteins by bimolecular fluorescence complementation in planta, *J. Mol. Biol.* 362 (2006) 1120–1131.
- [40] L.Y. Lee, M.J. Fang, L.Y. Kuang, S.B. Gelvin, Vectors for multi-color bimolecular fluorescence complementation to investigate protein-protein interactions in living plant cells, *Plant Methods* 4 (2008) 24.
- [41] G. An, P.R. Ebert, A. Mitra, S.B. Ha, Binary vectors, in: S.B. Gelvin, R.A. Schilperoort, D.P.S. Verma (Eds.), *Plant Molecular Biology Manual*, Springer, Netherlands, Dordrecht, 1989, pp. 29–47.
- [42] A.M. Davis, A. Hall, A.J. Millar, C. Darrah, S.J. Davis, Protocol: streamlined sub-protocols for floral-dip transformation and selection of transformants in Arabidopsis thaliana, *Plant Methods* 5 (2009) 1–7.
- [43] F.-H. Wu, S.-C. Shen, L.-Y. Lee, S.-H. Lee, M.-T. Chan, C.-S. Lin, Tape-Arabidopsis sandwich—a simpler Arabidopsis protoplast isolation method, *Plant Methods* 5 (2009) 1–10.
- [44] A. Roy, A. Kucukural, Y. Zhang, I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction, *Nat. Protoc.* 5 (2010) 725–738.
- [45] J. Yang, R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson, Y. Zhang, The I-TASSER suite: protein structure and function prediction, *Nat. Methods* 12 (2015) 7–8.
- [46] C. The UniProt, UniProt: the universal protein knowledgebase, *Nucleic Acids Res.* 45 (2017) D158–D169.
- [47] J. Yang, A. Roy, Y. Zhang, Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment, *Bioinformatics (Oxf. Engl.)* 29 (2013) 2588–2595.
- [48] C. Dominguez, R. Boelens, A.M. Bonvin, HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 1731–1737.
- [49] G.C.P. van Zundert, J. Rodrigues, M. Trellet, C. Schmitz, P.L. Kastriitis, E. Karaca, A.S.J. Melquiond, M. van Dijk, S.J. de Vries, A. Bonvin, The HADDOCK2.2 web server: user-friendly integrative modeling of biomolecular complexes, *J. Mol. Biol.* 428 (2016) 720–725.
- [50] L. Li, N. Cheng, K.D. Hirschi, X. Wang, Structure of Arabidopsis chloroplastic monothiol glutaredoxin AtGRXcp, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66 (2010) 725–732.

- [51] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, The protein data bank, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 235–242.
- [52] S.J. de Vries, A.M. Bonvin, CPOR: a consensus interface predictor and its performance in prediction-driven docking with HADDOCK, *PLoS One* 6 (2011) e17695.
- [53] E. Krissinel, K. Henrick, Inference of macromolecular assemblies from crystalline state, *J. Mol. Biol.* 372 (2007) 774–797.
- [54] Y. Balmer, B.B. Buchanan, Yet another plant thioredoxin, *Trends Plant Sci.* 7 (2002) 191–193.
- [55] S. Witte, M. Villalba, K. Bi, Y. Liu, N. Isakov, A. Altman, Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase/AP-1 and NF- κ B pathways by PICOT, a novel protein kinase C-interacting protein with a thioredoxin homology domain, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 1902–1909.
- [56] P. Haunhorst, C. Berndt, S. Eitner, J.R. Godoy, C.H. Lillig, Characterization of the human monothiol glutaredoxin 3 (PICOT) as iron-sulfur protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394 (2010) 372–376.
- [57] U. Muhlenhoff, S. Molik, J.R. Godoy, M.A. Uzarska, N. Richter, A. Seubert, Y. Zhang, J. Stubbe, F. Pierrel, E. Herrero, C.H. Lillig, R. Lill, Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster, *Cell Metab.* 12 (2010) 373–385.
- [58] K. Anna, P. Ranjan Nath, M. Keren, I. Noah, PICOT: a multidomain protein with multiple functions, *ISRN Immunol.* 2011 (2011).
- [59] I.M. Nooren, J.M. Thornton, Diversity of protein-protein interactions, *EMBO J.* 22 (2003) 3486–3492.
- [60] N. Isakov, S. Witte, A. Altman, PICOT-HD: a highly conserved protein domain that is often associated with thioredoxin and glutaredoxin modules, *Trends Biochem. Sci.* 25 (2000) 537–539.
- [61] R. Raucci, G. Colonna, E. Guerriero, F. Capone, M. Accardo, G. Castello, S. Costantini, Structural and functional studies of the human selenium binding protein-1 and its involvement in hepatocellular carcinoma, *Biochim. Biophys. Acta* 1814 (2011) 513–522.
- [62] U.-H. Cho, N.-H. Seo, Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation, *Plant Sci.* 168 (2005) 113–120.
- [63] Y.S. Guo, C.J. Huang, Y. Xie, F.M. Song, X.P. Zhou, A tomato glutaredoxin gene SIGRX1 regulates plant responses to oxidative, drought and salt stresses, *Planta* 232 (2010) 1499–1509.
- [64] B. Touraine, J.P. Boutin, A. Marion-Poll, J.F. Briat, G. Peltier, S. Lobreaux, Nfu2: a scaffold protein required for [4Fe-4S] and ferredoxin iron-sulphur cluster assembly in *Arabidopsis* chloroplasts, *Plant J.* 40 (2004) 101–111.
- [65] P.W. Chang, S.K. Tsui, C. Liew, C.C. Lee, M.M. Wayne, K.P. Fung, Isolation, characterization, and chromosomal mapping of a novel cDNA clone encoding human selenium binding protein, *J. Cell. Biochem.* 64 (1997) 217–224.
- [66] G. Chen, H. Wang, C.T. Miller, D.G. Thomas, T.G. Gharib, D.E. Misek, T.J. Giordano, M.B. Orringer, S.M. Hanash, D.G. Beer, Reduced selenium-binding protein 1 expression is associated with poor outcome in lung adenocarcinomas, *J. Pathol.* 202 (2004) 321–329.
- [67] J.Y. Jeong, Y. Wang, A.J. Sytkowski, Human selenium binding protein-1 (hSP56) interacts with VDU1 in a selenium-dependent manner, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379 (2009) 583–588.
- [68] S. Bandyopadhyay, F. Gama, M.M. Molina-Navarro, J.M. Gualberto, R. Claxton, S.G. Naik, B.H. Huynh, E. Herrero, J.P. Jacquot, M.K. Johnson, N. Rouhier, Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters, *EMBO J.* 27 (2008) 1122–1133.
- [69] X. Liu, S. Liu, Y. Feng, J.-Z. Liu, Y. Chen, K. Pham, H. Deng, K.D. Hirschi, X. Wang, N. Cheng, Structural insights into the N-terminal GIY-YIG endonuclease activity of *Arabidopsis* glutaredoxin AtGRXS16 in chloroplasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 9565–9570.
- [70] T.K. Kerppola, Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells, *Annu. Rev. Biophys.* 37 (2008) 465–487.
- [71] C. Fellerer, R. Schweiger, K. Schongrubler, J. Soll, S. Schwenkert, Cytosolic HSP90 cochaperones HOP and FKBP interact with freshly synthesized chloroplast pre-proteins of *Arabidopsis*, *Mol. Plant* 4 (2011) 1133–1145.
- [72] T. May, J. Soll, 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants, *Plant Cell* 12 (2000) 53–64.
- [73] S. Qbadou, T. Becker, O. Mirus, I. Tews, J. Soll, E. Schleiff, The molecular chaperone Hsp90 delivers precursor proteins to the chloroplast import receptor Toc64, *EMBO J.* 25 (2006) 1836–1847.



Investigation of the interaction of DAD1-LIKE LIPASE 3 (DALL3) with Selenium Binding Protein 1 (SBP1) in *Arabidopsis thaliana*

Irene Dervisi^a, Chrysanthi Valassakis^a, Adamantia Agalou^{b,1}, Nikolaos Papandreou^c, Varvara Podia^a, Kosmas Haralampidis^a, Vassiliki A. Iconomidou^c, Vassili N. Kouvelis^d, Herman P. Spink^b, Andreas Roussis^{a,*}

^a Department of Botany, Faculty of Biology, National & Kapodistrian University of Athens, 15784, Athens, Greece

^b Institute of Biology, Leiden University, Leiden, the Netherlands

^c Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, National & Kapodistrian University, 15784, Athens, Greece

^d Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, National & Kapodistrian University of Athens, 15784, Athens, Greece

ARTICLE INFO

Keywords:

SBP1
Selenium Binding Protein 1
DALL3
Phospholipase

ABSTRACT

Phospholipase PLA₁-Iy2 or otherwise DAD1-LIKE LIPASE 3 (DALL3) is a member of class I phospholipases and has a role in JA biosynthesis. AtDALL3 was previously identified in a yeast two-hybrid screening as an interacting protein of the Arabidopsis Selenium Binding Protein 1 (SBP1). In this work, we have studied AtDALL3 as an interacting partner of the Arabidopsis Selenium Binding Protein 1 (SBP1). Phylogenetic analysis showed that DALL3 appears in the PLA1-Igamma1, 2 group, paired with PLA1-Igamma1. The highest level of expression of AtDALL3 was observed in 10-day-old roots and in flowers, while constitutive levels were maintained in seedlings, cotyledons, shoots and leaves. In response to abiotic stress, DALL3 was shown to participate in the network of genes regulated by cadmium, selenite and selenate compounds. DALL3 promoter driven GUS assays revealed that the expression patterns defined were overlapping with the patterns reported for AtSBP1 gene, indicating that DALL3 and SBP1 transcripts co-localize. Furthermore, quantitative GUS assays showed that these compounds elicited changes in activity in specific cells files, indicating the differential response of DALL3 promoter. GFP::DALL3 studies by confocal microscopy demonstrated the localization of DALL3 in the plastids of the root apex, the plastids of the central root and the apex of emerging lateral root primordia. Additionally, we confirmed by yeast two hybrid assays the physical interaction of DALL3 with SBP1 and defined a minimal SBP1 fragment that DALL3 binds to. Finally, by employing bimolecular fluorescent complementation we demonstrated the *in planta* interaction of the two proteins.

1. Introduction

Phospholipases are a group of enzymes that hydrolyze phospholipids and are categorized based on their positional specificity toward phospholipid substrates. In plants, it is known that there are phospholipases A (PLA), C (PLC) and D (PLD) while phospholipases B have not been identified [1,2]. These enzymes are involved in a wide range of cellular functions such as cellular regulation, lipid metabolism, membrane homeostasis, stress responses and cell signaling [1,2].

The PLA superfamily contains a broad range of enzymes that are designated with Greek letters and have been classified into three subtypes: PLA₁ and PLA₂, which hydrolyse acyl groups from the *sn*-1 and *sn*-2 positions of phospholipids respectively, and patatin-like PLAs

(PAT-PLA) all exhibiting activity towards both positions [1]. Furthermore, the molecules mediated by PLAs act as secondary signal messengers that mediate cell elongation, gravitropism, anther dehiscence, biosynthesis of jasmonic acid and defense [3]. It is noteworthy that these enzymes play a significant role in important applications of food and biotechnology industries, such as degumming of vegetable oils, dairy, baking or egg yolk treatment and biodiesel production [4,5].

Specifically, PLA₁ proteins hydrolyze phospholipids and produce 2-acyl-lysophospholipids and fatty acids [6] and they are involved in a wide range of cellular functions including jasmonic acid biosynthesis [7,8], defense signaling induced by ultraviolet (UV) radiation [9], cell and tissue growth [10], onset of senescence [11], storage lipid accumulation [11,12] and shoot gravitropism [13]. All PLA₁ proteins

* Corresponding author.

E-mail address: aroussis@biol.uoa.gr (A. Roussis).

¹ Current address: Developmental Biology, Biomedical Research Foundation Academy of Athens, Soranou Ephessiou 4, 11527, Athens, Greece.

contain a Gly-X-Ser-X-Gly (GX SXG) motif and a catalytic triad (Ser, Asp, His) and have molecular weights of about 45–50 kDa [1,14,15]. This superfamily can be further divided into five groups I, II, III, lecitin:cholesterol acyltransferase-like PLA₁ (LCAT- PLA₁) and PA- PLA₁ [1,3]. However, classes I, II and III are usually referred to, as PLA₁ phospholipases [1].

In the Arabidopsis genome 12 isoforms of PLA₁ family have been identified [3], one of which is DEFECTIVE IN ANTH ER DEHISCENCE1 (DAD1) and the other 11 proteins are homologues of it. These proteins are further grouped into the three previously mentioned classes (I,II,III) based on the presence of N-terminal stretches and sequence similarities in the catalytic region [3,8,16]. Class I, contains seven proteins, that have been shown to be localized in the chloroplasts [16] and are involved in jasmonic acid (JA) biosynthesis. Class II consists of four proteins and class III of one protein, which are predicted to be localized in the cytosol and mitochondria, respectively [3,8,16]. These lipases possess the α/β hydrolase fold [17] and the lipase active site is characterized by an active center. This, is composed of a serine (nucleophile), an aspartic (acidic residue) and a histidine and by the GX SXG consensus sequence, including the serine residue of the catalytic triad [8,16].

Analytically, the α/β fold is generally composed of a central, parallel β -sheet of eight beta- strands, with only the second strand antiparallel. Another characteristic is the presence of disulfide bridges that given the enzyme stability, are often important for the catalytic activity. The tetrahedral intermediate formed during the catalytic mechanism of lipases is stabilized by the presence of hydrogen bonds with two amino acids form the so-called lipase oxyanion hole. These amino acids stabilize the intermediate through hydrogen bonds between their backbone amide proton and the oxygen of the substrate carbonyl group [18,19].

Phospholipase PLA₁-I γ 2 or otherwise DAD1-LIKE LIPASE 3 (DALL3, AT2G30550) is a member of class I phospholipases and has a role in JA biosynthesis as its knockout halved the JA levels in untreated leaves [20]. Wounded plants produce high amounts of JA, and this phospholipase is induced upon wounding, however, it is also expressed in unwounded leaves [7,20,21]. Other experiments using JA-biosynthetic and JA-response mutants revealed that wound induction of DALL3 is regulated in a COI1-independent and JA-independent manner [20]. Furthermore, AT2G30550 has two isoforms generated by alternative splicing from which AT2G30550.2 encodes the functional protein [16]. Seo and colleagues [16] also showed that this phospholipase has strong PLA₁ activity and can hydrolyze Phosphatidylcholine (PC), Monogalactosyldiacylglycerol (MGDM), Diglycosyl diacylglycerols (DGDG) and Triacylglycerol (TAG). Microarray experiments showed that DALL3 expression increases after abiotic and biotic stress [22] and may play a role in the Pathogen-associated Motif Patterns (PAMPs)-response pathway [23].

AtDALL3 was previously identified in a yeast two-hybrid screening as an interacting protein of the Arabidopsis Selenium Binding Protein 1 (SBP1) [24]. In Arabidopsis, SBP1 could be considered as a general stress-responsive gene as revealed by microarray analyses [25–29], while in rice, plants overexpressing OsSBP showed enhanced resistance to a virulent strain of rice blast fungus as well as to rice bacterial blight possibly by increasing plant sensitivity to endogenous defense responses [30–32]. *in vitro* binding assays have shown that in Arabidopsis SBP1 participates in a novel protein network consisting of at least SBP, a NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and a fructose-bisphosphate aldolase (FBA) [24]. Additionally, SBP1 also interacts with the PICOT-containing glutaredoxins AtGRXS14 and AtGRXS16 [33]. Finally, it has been suggested that SBP gene family may participate in the mechanisms that sense redox imbalance [34]. In this work, we have studied AtDALL3 as an interacting partner of the Arabidopsis Selenium Binding Protein 1 (SBP1). Both proteins are involved in plant stress responses and we propose that they are part of a novel interaction network active in abiotic stress induced

by selenium and cadmium compounds as well as in wounding.

2. Material and methods

2.1. Plant material and growth conditions

Arabidopsis thaliana ecotype Columbia (Col-0) and transgenic Arabidopsis plants harbouring prDALL3-DELS::GUS and 35S::DALL3::eGFP expression cassettes were used in the present study. Seeds were initially stratified for two days at 4 °C, surface sterilized for two min in 75 % (v/v) ethanol, 4 min in 25 % (v/v) bleach and washed with sterile distilled water. Afterwards, they were transferred to soil (Postground P, Klasmann-Deilmann, Geeste, Germany) or plated on Petri dishes containing solid half-strength MS medium (Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands) [35] supplemented with 0.05 % MES (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) pH 5.7, Gamborg's B5 vitamins, a micronutrient mixture (Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands), 2 % (w/v) sucrose and 1.2 % (w/v) agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). The seeds were germinated and grown in a plant growth chamber under long-day conditions at 22 °C (16 h photoperiod).

2.2. Yeast two-hybrid assays

10-days seedling cDNA was used to amplify DALL3. The set of oligonucleotides used for the amplification was designed based on the nucleotide sequence available in the NCBI database for the accession number [NM_128607](#), and properly modified to include unique restriction sites. The forward primer (5'- GCTTCTCACATATGGCGGCTATTC CTTCC- 3') contained the *NdeI* restriction site where the reverse primer (5'-GCGTGAATTCTTAACAAGGATGATCAAGACGG-3') the *EcoRI* site. For the amplification, LongAmp Taq DNA Polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) was used. After amplification, the full length DALL3 cDNA was cloned into the pJET1.2 vector (Thermo Scientific™). To construct the bait vector, the pJE1.2/DALL3 was digested with *NdeI/EcoRI* and then cloned to the same restriction sites of the pGBKT₇ fused with the Gal4 binding domain. The deletions of SBP1 (DEL1-8) from the full length *AtSBP1* cDNA were cloned in the *NdeI/BamHI* sites of pGADT7 vector fused with the activation domain of Gal4, except *AtSBP1DEL8* for which domain swapping was performed, essentially as described by Valassakis et al. [33]. For the yeast transformation and interaction study we followed the Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3 protocol, (Takara-Clontech, Kyoto, Japan) and the yeast strain used was *Saccharomyces cerevisiae* SG335 (*MATa trp1-901, leu2-3, 112, ura1-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , GAL2-ADE2, LYS2::GAL1-HIS3, met2::GAL7lacZ*). Yeast two-hybrid screening was performed as described by Agalou et al. [24].

2.3. Treatment of plants with chemical compounds and wounding

Arabidopsis seeds plated on half-strength MS medium were grown vertically for 4 days. At this point, young seedlings were transplanted onto plates containing half-strength MS medium plus 150 μ M selenite (Na₂SeO₃; Sigma-Aldrich), 150 μ M sodium selenate (Na₂SeO₄; Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany) and 150 μ M cadmium chloride (CdCl₂; Fluka Honeywell) and grown under the conditions mentioned above for 4 days. The chemicals used for the treatments were maintained in 50 mM stock solutions in distilled water. Seedlings transplanted onto plates containing only half-strength MS medium were used as controls. Roots from 8-days old control and treated seedlings were collected, weighted, frozen in liquid nitrogen and stored in –80 °C for use in real-time quantitative RT-PCR analysis, while intact plants were collected for histochemical and fluorometric GUS assays. For the wounding study we followed the protocol described by Rudaś and colleagues [20].

2.4. RNA extraction, cDNA synthesis and gene expression analysis

The transcript levels of *AtDALL3* gene were analyzed using total RNA following the procedure described by Oñate-Sanchez and Vicente-Carbajosa [36]. RNA samples were treated with DNase I (Biolabs, Ipswich, England) according to the manufacturer's instructions. The RNA purity and quantity were checked by electrophoresis in a 0.8 % w/v agarose gel. Following electrophoresis, the RNA was stained with ethidium bromide ($100 \mu\text{g l}^{-1}$, Sigma-Aldrich) and visualized under UV light.

First-strand cDNA synthesis was performed using $1 \mu\text{g}$ of total RNA as template and SMART MMLV RT (Takara-Clontech, Kyoto, Japan). For quantitative (q) RT-PCR, KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2x) Kit (Kapa Biosystems, Woburn, MA, USA) were used according to the manufacturer's instructions. The reactions were performed in a thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Ubiquitin 10 (UBQ10) and Protein Phosphatase 2 (PP2A) were used as housekeeping controls for normalization. Gene expression experiments were performed in triplicate. The relative expression levels of target genes and SD values were calculated using the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ Livak method [37], and statistically significant differences in expression between samples were detected using a *t*-test. Those with $P < 0.05$ were considered statistically significant. SigmaPlot statistical software (SigmaPlot 10.0) was used to analyze statistical significance. Variance analysis was performed using one-way ANOVA. All PCR products were separated by electrophoresis in 1.2 % agarose gels and visualized under UV light after staining with ethidium bromide ($100 \mu\text{g l}^{-1}$). The primers used for amplification were as follows: Ubiquitin 10, UBQ10 (At4g05320): RLT-UBQ10-F (5'-AGAAGTTCAATGTTTCGTTTCATGTAA -3') RLT-UBQ10-R (5'- GAACGGAACATAGTAGAACACTTATTCA -3'), DAD1-Like Lipase 3, DALL3 (At2g30550): RLT-DALL3-F (5'- CGTGATATCGCGATTGCG TGG -3') RLT-DALL3-R (5'- GTCGCGGTGTTCTTCCACTAAC -3'), Serine/Threonine Protein Phosphatase 2A, PP2A (At1g69960): RLT-PP2A-F (5'- TGATCCAGATGACCGATGCG -3') RLT-PP2A-R (5'- GAGTGGTTTCGGGTTTCGACT -3').

2.5. Construction of vectors for plant transformation

The promoter sequences of DAD1-Like Lipase 3 were obtained from TAIR. The *DALL3* (AT2G30550) promoter deletions from *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyn. (ecotype Columbia) genomic DNA were PCR amplified using specific pairs of primers. These primers introduced *EcoRI* and *NcoI* restriction enzyme sites (9 bp length each) at the 5' and 3' ends of the amplified sequences, respectively. PCR was performed using LongAmp *Taq* DNA Polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) for 30 cycles. PCR products were separated by electrophoresis on 0.8 % agarose gels, visualized under UV light after staining with ethidium bromide ($100 \mu\text{g l}^{-1}$) and purified using a Nucleospin Gel and PCR Clean up kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). All plasmids were purified using Nucleospin Plasmid kits (Macherey-Nagel, Düren, Germany). The first pair of primers (PR-DALL3-F, 5'-CGCGAATTCAT TGAGTTTCTTGAACCATATGC-3' and PR-DALL3-R, 5'-GCCGCCATGGT TGAGAAGCTTCAAAGC-3') amplified a 3.116bp region before the transcription site. This PCR product it was first cloned in pJET1.2 vector (Thermo Scientific™) and afterwards pJET1.2/PR-DALL3 was used for the amplification of the five 5'- deletions. The primers used for the five detions were: PR-DALL3-DEL1-F (5'- GCTAAAGAATTCGGTACATCCG CACATGT -3') PR-DALL3-DEL2-F (5'- CTCCTATCGAATCTTACTTTCT CTTGTGTGC -3') PR-DALL3-DEL3-F (5'- GAAAATTGAATTCGCAACCT CCTAGCTAAGTGAC -3') PR-DALL3-DEL4-F (5'- GGATCCATGAATTCT GATCTGTACCAGATTGC -3') PR-DALL3-DEL5-F (5'- GTTGAGGAATTC AATTCTTGTCACTTACCGG -3') keeping the same reverse primer. All PCR products were first cloned in pJET1.2 vector and then cloned into the *EcoRI/NcoI* sites of pCambia 1301 binary vector upstream of the β -glucuronidase (GUS) reporter gene, generating the following plasmid constructs: pCambia 1301-prDALL3::GUS, pCambia 1301-prDALL3-

DEL1::GUS, pCambia 1301-prDALL3-DEL2::GUS, pCambia 1301-prDALL3-DEL3::GUS, pCambia 1301-prDALL3-DEL4::GUS, pCambia 1301-prDALL3-DEL5::GUS.

For the localization study we constructed 35S::DALL3::eGFP plants. Firstly, the gene *AtDALL3* was amplified from pJIE1.2/DALL3 using the following primers: F-DALL3-pSAT, 5'-GATCTCAGAGGAGGAATTCCAT ATGGCGGC-3' and R-DALL3-pSAT, 5'- CCCCAGGAACTCTTGACAAGG ATG-3'. This PCR product cloned in pGBKT₇ with restriction sites *EcoRI/XmaI*. Then with *EcoRI/SalI* digestion from pGBKT₇ cloned in pSAT₆-eGFP-N by cloning the open reading frame, forming pSAT₆-DALL3::eGFP. The 35S::DALL3::eGFP cassette was cloned in the binary vector pPZP-RCS2-ntpII (CD3-1061) with the restriction site *PI-PspI*.

2.6. Plant transformation

Competent cells of *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 were transformed with the aforementioned vectors by the general freeze thaw method, as described by An et al. [38]. The transformed bacteria were then used for the stable transformation of *Arabidopsis* (Columbia-0) plants via the floral dip method [39].

2.7. Histochemical and fluorometric GUS assays

GUS histochemical analysis was performed in 7-day seedlings as well as 4–5 weeks old flowers and seedlings. For GUS staining, the samples were prefixed in 90 % acetone for 30 min at 4 °C and washed twice with 100 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 containing 0.1 M $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 0.1 M $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ and 10 % (v/v) Triton X-100. The samples were then incubated at 37 °C overnight in reaction buffer containing 0.9 mg ml⁻¹ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide sodium salt as substrate (Melford Laboratories Ltd., Ipswich, England) in the same buffer [40]. Samples were cleared in graded ethanol series (20 %, 35 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 % v/v) for 30 min each and immersed in 90 % (v/v) ethanol for 30 min. Finally, the samples were kept overnight at room temperature in an aqueous chloral hydrate clearing solution containing glycerol and stored in the same solution. The samples were examined with a Zeiss Axioplan microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a differential interference contrast (DIC) optical system and an Axiocam MRc5 digital camera (Zeiss) or with a Zeiss Stemi 2000-C stereomicroscope equipped with a Jenoptik ProgRes3 (Jenoptik, Jena, Germany) digital camera. Fifteen to twenty independent T2 lines were stained for each construct. More than 10 seedlings were examined from each line.

For the quantification of the enzymatic activity we followed the protocols described by Jefferson et al. and Gallagher et al. [40,41]. Total protein quantification was performed by the Bradford Assay [42]. Standard curves were prepared with 4-MU (Sigma). Specific GUS activity is shown in units of nanomoles 4-MU produced per milligram of protein per minute. All measurements were repeated three times on eight to 12 independently transformed plants from each construct.

2.8. Protoplast analysis

The construct of pSAT₆-DALL3::eGFP was described previously. For the pSAT₄-DALL3::nCerulean-N₁ construct, *AtDALL3* was isolated from pGBKT₇/DALL3 with *EcoRI/SalI* ends and cloned in the open reading frame of pSAT₄-nCerulean-N₁. *AtSBPs* were cloned in pSAT1-cCFP-N₁ with *EcoRI/XmaI* as it has been described in Valassakis et al. [33] forming pSAT1-SBP1::cCFP-N₁, pSAT1-SBP2::cCFP-N₁ and pSAT1-SBP3::cCFP-N₁. For the isolation and transformation of mesophyll protoplasts we followed the Tape-Arabidopsis Sandwich method, as described by Wu and colleagues [43], while for the isolation of root protoplasts we used the protocol of Bargmann and Birnbaum [44]. The protoplasts were observed in a Zeiss Axioplan fluorescence microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany), and photographs of each sample were taken using an Axiocam MRc5 digital camera (Zeiss) using the same

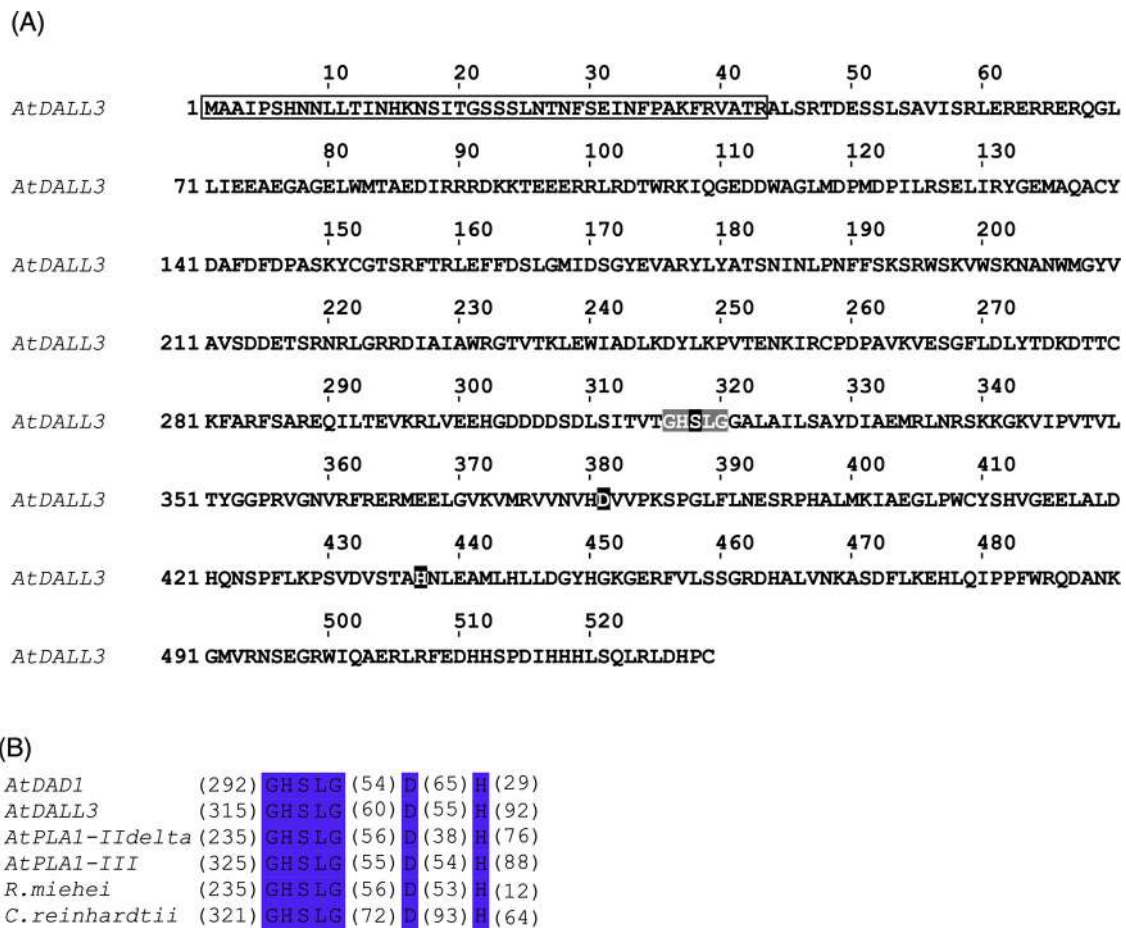


Fig. 1. Amino acid sequence and multiple protein alignment of AtDALL3. (A) Linear sequence of AtDALL3. The boxed area indicates the chloroplastic target peptide. Shaded amino acid residues represent the consensus motif GX SXG and the catalytic triad which is constituted by serine, aspartic acid and histidine residues. (B) Amino acid alignment in the catalytic region of AtDALL3 and its homologues from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Rhizomucor miehei* and *Arabidopsis thaliana* (AtDAD1, AtPLA1-IIdelta, AtPLA1-III). Numbers in brackets indicate the number of amino acids. The residues are highlighted based on the identity, using JalView 2.10.5. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

exposure time.

2.9. GFP imaging

To determine the cellular expression of the phospholipase we followed a propidium iodine (PI) staining as described by Prof. Philip N. Benfey's Laboratory (<https://sites.duke.edu/benfey/protocols/>). After dipping whole plants or dissected roots in PI (Sigma) Solution $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, we subsequently dipped them in double distilled water. Specimens were examined on a multiphoton confocal microscope Leica TCS SP8 MP (Wetzlar, Germany) equipped with an Argon laser (excitation lines at 458, 476, 488, 496, and 514 nm) and an IR MaiTai DeepSee Ti:Sapphire laser (Spectra-Physics, Santa Clara, CA, USA) for multiphoton applications. Images were acquired with the spectral detector of the microscope using appropriate emission wavelength ranges. For the detection of Green Fluorescence Protein excitation peak centered at about 488 nm, emission was 500–550 nm, while for PI excitation was at 591 nm and emission was in the range 590–700 nm. Acquisition was performed with the LAS X software (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Germany) using the same parameters (laser power, gain, pinhole, speed and analysis) for all specimens. Images were acquired as stacks for stomata and the root apex of 10–15 optical sections, while for root and lateral root of 60–75 optical sections with a Z-step of $1 \mu\text{m}$.

2.10. Phylogenetic analysis

Phospholipases A1, members of the DAD1-like lipase family, were collected from 15 out of 59 different orders of Angiosperm, Bryophytes, Lycopods and a unicellular photosynthetic organism *Chlamydomonas reinhardtii* comprising a matrix of 146 proteins. These proteins were collected by BLASTp, firstly with DALL3 (Phospholipase A1-Igamma2, Q3EBR6.2) and then using the protein sequences of the members of DAD1 family [(Phospholipase A1-Ialpha1 (Q9MA46.1), Phospholipase A1-Ialpha2 (Q9SIN9.1), Phospholipase A1-Ibeta1 (DAD1, Q948R1.1), Phospholipase A1-Ibeta2 (O23522.2), Phospholipase A1-Igamma1 (Q941F1.2), Phospholipase A1-Igamma3 (Q9C8J6), Phospholipase A1-Ialpha (Q9LNC2.1), Phospholipase A1-Ibeta (O82274.2), Phospholipase A1-Igamma (O49523.1), Phospholipase A1-IIdelta (Q9SJI7.1), DAD1-like acylhydrolase (Q9C8G6)] in the NCBI BLASTp using as database Reference proteins (refseq_protein) or Non-redundant protein sequences (nr). For each protein, serial blasts were performed in different organisms. The cutoff amino acid identity was 42 % with 55 % positives and E-values $5e-126$ in order to be included in this analysis. The Triacylglycerol lipase of *Rhizomucor miehei* was used as outgroup, as it is known that it contains the conserved sequence characteristics (catalytic triad and GX SXG motif) and its protein structure has been analyzed by X-ray crystallography [8,45]. The representatives from Angiosperms were collected by scanning all plant groups based on the APG IV system focused on rosids. From Basal Angiosperms, *Amborella trichopoda* was selected and from Monocots, *Asparagus officinalis*, *Oryza*

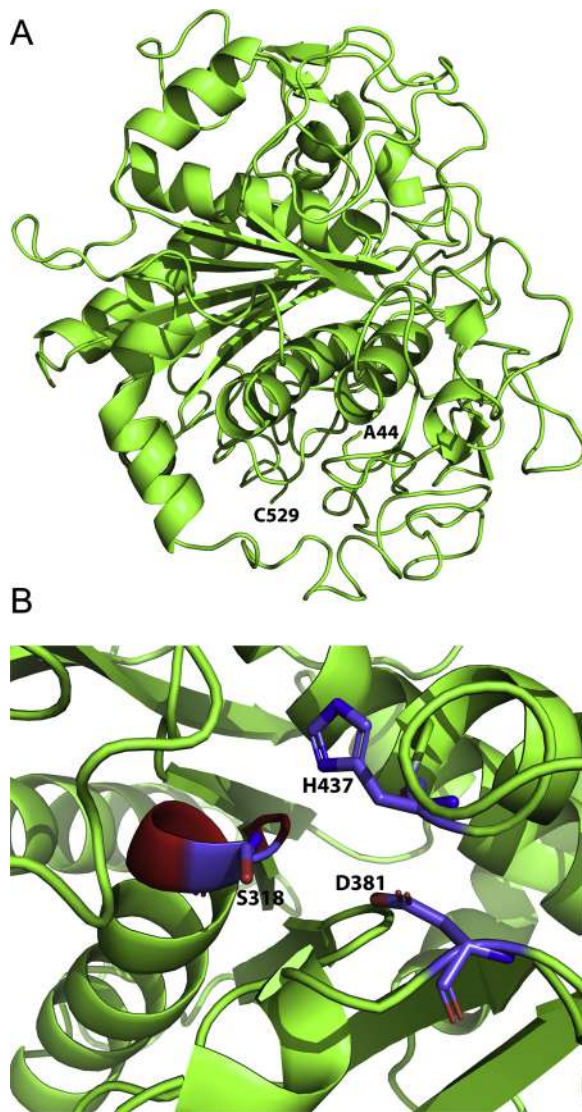


Fig. 2. Modeling of AtDALL3. (A) A cartoon representation of AtDALL3 structural model (colored in green), displayed using the software PyMOL. The overall structure of AtDALL3 is comprised of a central beta sheet surrounded by α -helices. (B) The catalytic triad, which is conserved among lipases, is also present in AtDALL3. It is formed by residues Ser318, Asp381 and H437. The catalytic residues are represented as stick models. The G-X-S-X-G consensus sequence (residues 316–320) containing the catalytic serine is colored red. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

sativa and *Zea mays*. The representatives from the eudicot clade were collected from the orders *Fabales*, *Malpighiales*, *Fagales*, *Rosales*, *Myrtales*, *Sapindales*, *Brassicales*, *Malvales*, *Caryophyllales*, *Solanales*, *Asterales*, and *Proteales*. Furthermore, *Physcomitrella patens* was used as a member of Bryophytes while *Selaginella moellendorffii* of Lycopods.

All protein sequences were aligned with Clustal Omega (EMBL-EBI). The alignment was transferred to the program PAUP 4.0 beta Win [46], in order to construct Neighbour Joining and Maximum Parsimony trees. To run MrBayes, the best model was found (WAG + I + G + F) using PartitionFinder2 [47–49]. MrBayes v3.2.6 [50] was employed in order to run four independent MCMCMC searches using different random starting points and 1 M generations were applied with sampling every 5 K generations. Convergence was estimated with the PSRF index (Potential Scale Reduction Factor) [51] as it approached 1 and also checked visually by plotting likelihood scores vs. generation for the different runs. Based on this analysis, the burn-in was set to 25 %. The

nodes from all three trees were compared using TreeGraph 2 (2.14.0-771 beta) [52]. Finally, reliability of nodes was assessed using 1000 and 100 bootstrap iterations for the NJ and MP, respectively, and posterior probabilities for the BI analysis. The BI tree is presented using FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

2.11. Protein molecular modeling

A three dimensional (3D) model of Phospholipase PLA1- $I\gamma_2$ or otherwise DAD1-LIKE LIPASE 3 (DALL3) from *Arabidopsis thaliana* was predicted by using I-TASSER (Iterative Threading ASSEMBly Refinement), an online server for automated protein 3D structure and function prediction from protein primary structure (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ITASSER>) [53,54]. During the procedure, we applied the default parameters of the software. The amino acid sequence of DALL3 from *Arabidopsis thaliana* was retrieved from Uniprot [55] (Accession number Q3EBR6) and consists of 529 residues. Residues 1–43 correspond to the transit peptide that is responsible for the transport of the protein to the chloroplast.

Our attempt to build a structural model of DALL3 involved the mature form of the protein (residues 44–529) that is located in the chloroplast. The structural model of DALL3 was constructed from multiple threading alignments and iterative structural assembly simulations. Comparison of the produced models with other known protein structures provides insights for the function of proteins being investigated [56]. The derived model was subsequently subjected to energy minimization utilizing GROMACS v. 2016.3 [57] and the AMBER 99SB-ILDN force field [58] in order to remove clashes between side chains. Images containing structural models were generated through the PyMol Molecular Visualization System (<http://www.pymol.org>).

3. Results and discussion

3.1. Sequence characteristics of AtDALL3 and 3D modeling

To study the function of SBP in plants we screened an *Arabidopsis* cDNA library for potential interacting proteins of SBP1 using the yeast two-hybrid system. Amongst the clones we identified in this manner was the chloroplastic/plastidial Phospholipase A1- $I\gamma_2$ (AtDALL3) [24]. AtDALL3 (Q3EBR6, At2g30550) constitutes a protein of 529 aa (Fig. 1A). It contains a conserved domain between amino acids 316–320 defined by the sequence GX SXG and a catalytic triad which is constituted by serine (aa318), aspartic acid (aa381) and histidine (aa437) residues (Fig. 1B).

AtDALL3 is a member of the α/β hydrolase superfamily. This superfamily has the most widespread protein fold [59] in all domains of life with different catalytic roles in metabolism, comprising esterases, thioesterases lipases, proteases, dehalogenases, haloperoxidases and epoxide hydrolases [59–62]. These proteins share a highly conserved three dimensional architecture, although the sequence identity is very low [60].

The first lipase structures of triacylglycerol lipase [45] were determined by X-ray crystallography in *Rhizomucor miehei* and in human pancreas [63]. Lipases, except the characterized fold, share a conserved catalytic triad and possess the consensus motif GX SXG. More specifically, the core fold is an 8-stranded β -sheet with only the second strand antiparallel (β_2) and the β_3 – β_8 strands connected by α -helices. The three dimensional architecture reveals that the active site is surrounded by three loops β_5 , β_9 and a lid domain [64]. The lid domain is composed of one or more α -helices, joined to the main structure of the enzyme by a flexible structure. It is a mobile element which uncovers the active site under the appropriate conditions [18,65–68]. Moreover, lipases are characterized by disulfide bridges that are important for enzyme stability and catalytic activity [18].

The conserved catalytic triad consists of a serine as nucleophile residue, an aspartate/glutamate as the acidic residue and a histidine

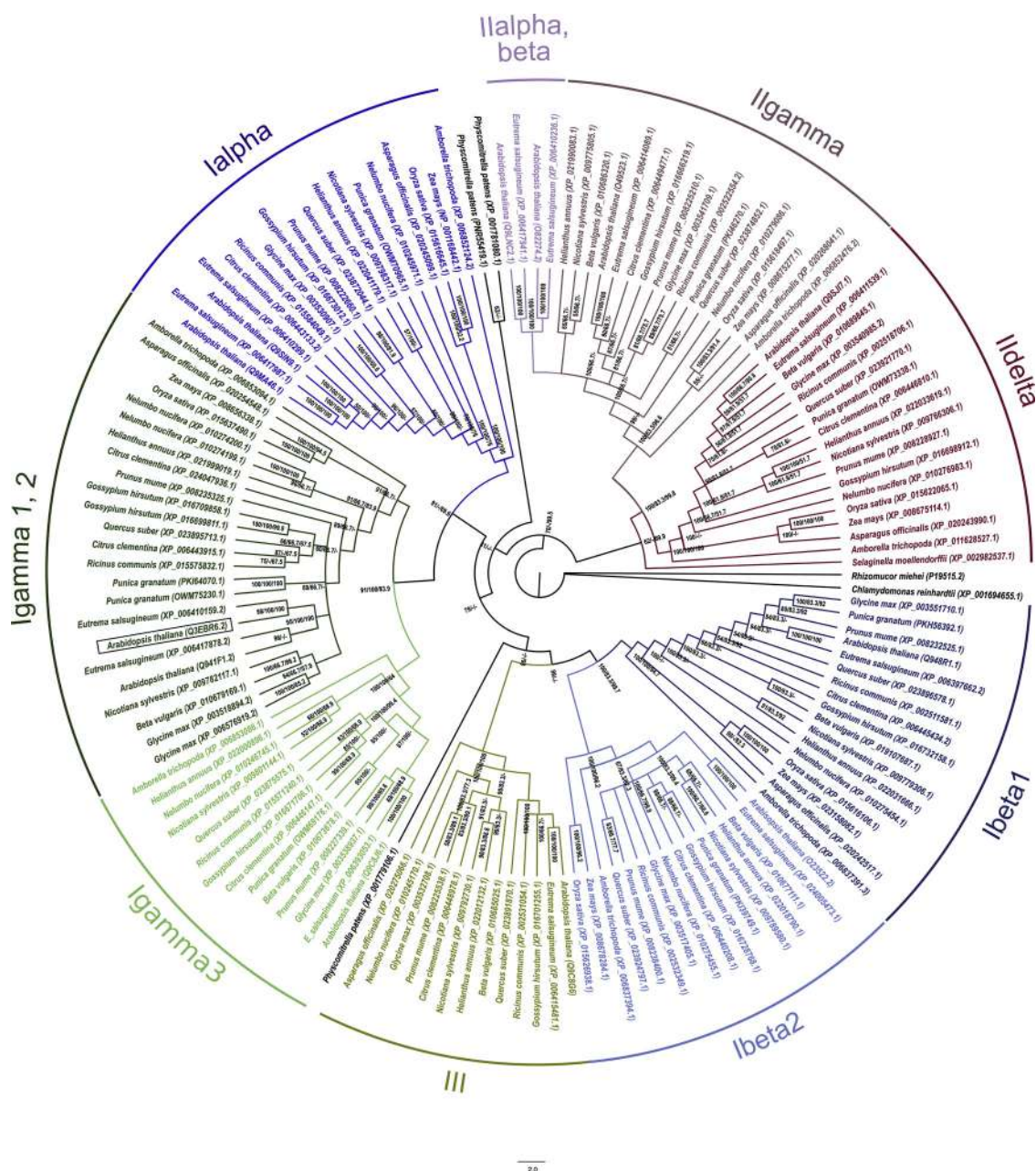


Fig. 3. Phylogenetic tree of the DAD1-Like Lipases Family in Angiospermae. Phylogenetic tree constructed by the amino acid matrix of phospholipases as produced by Bayesian (BI) analysis. The phospholipase of *Chlamydomonas reinhardtii* was used to root the tree. Clade credibility using PP (1st number), MP and NJ-bootstrap (2nd and 3rd number, respectively) are shown. The different coloring used as follows, blue: PLA1-Ibeta1, light blue: PLA1-Ibeta2, brown: PLA1-III, light green: PLA1-Igamma3, green: PLA1-Igamma1,2, electric blue: PLA1-Ialpha, light mauve: PLA1-IIalpha,beta, mauve: PLA1-Igamma, red: PLA1-IIdelta. The phospholipases are divided based on the AtDAD1 family classification. The formed clades are grouped based on the presence of each protein in AtPLA1-Ialpha, AtPLA1-Ibeta1, AtPLA1-Ibeta2, AtPLA1-Igamma1, 2, AtPLA1-Igamma3, AtPLA1-IIalpha, beta, AtPLA1-Igamma, AtPLA1-IIdelta and class III. AtDALL3 (AtPLA1-Igamma2) is boxed. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

[45,60,63]. The catalytic serine is located after the $\beta 5$ strand and before the following α -helix. The acidic residue (Asp/Asn) is almost always positioned after strand $\beta 7$ and the histidine residue located in the loop after the last β strand [18,59,69]. Carriere et al. [64], showed that the difference between animal phospholipases A1 and lipases is based on the shorter $\beta 9$ loop and lid domain of PLA1, features that increase the active site accessibility.

Since there is not an experimentally determined 3D structure of DALL3 from *Arabidopsis thaliana* a theoretical model was built by I-TASSER server, providing as input the sequence of DALL3 from Uniprot, excluding the transit peptide (residues 1–43). Estimation of the quality of the predicted model by I-TASSER was done by calculation of the C-

score, the template modeling score (TM-score) and the root mean square difference (RMSD). C-score is a confidence score that its value typically ranges from -5 to +2. A high value of C-score indicates high confidence of the model. TM-score is a scale for measuring the structural similarity between two proteins with different tertiary structures. A value of TM-score over +0.5 indicates that the topology of the predicted model is correct, while a value below +0.17 indicates random similarity. In this case, the values of C-score, TM-score and RMSD in correlation with the C-score for the predicted model are -1.16 , 0.57 ± 0.15 and $9.9 \pm 4.4 \text{ \AA}$, respectively. These values indicate that our predicted model is reliable and that can be used for analysis and suggestion of the structural features of DALL3 from *Arabidopsis thaliana*.

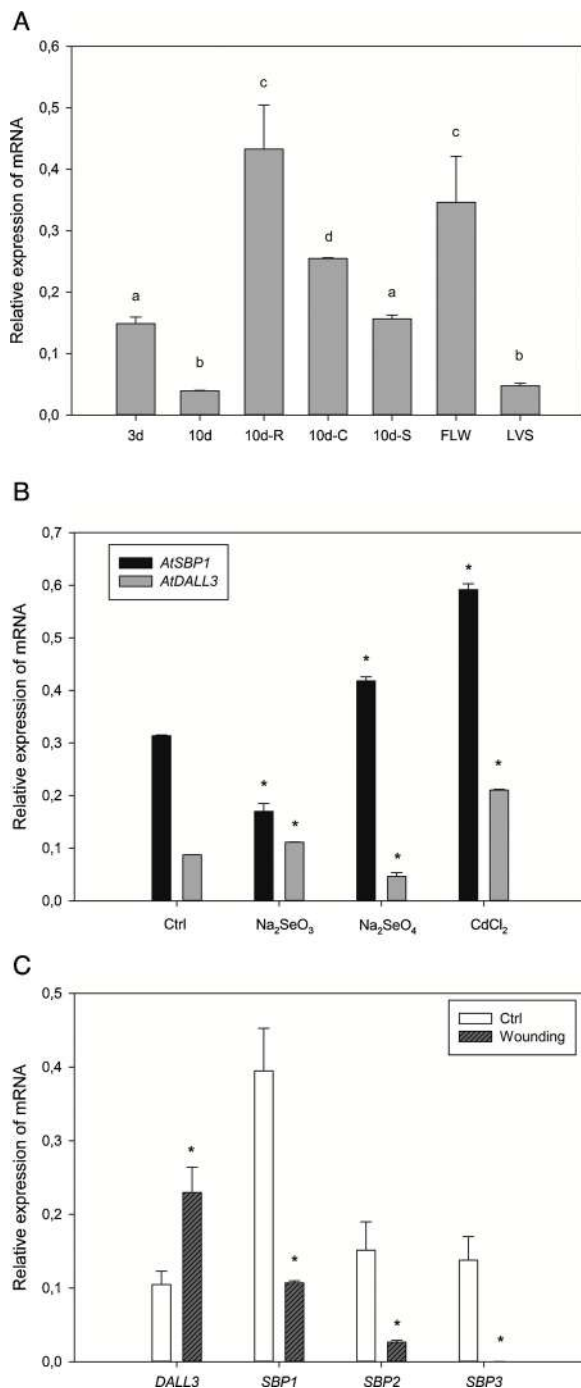


Fig. 4. Gene expression analysis of *AtSBP1* and *AtDALL3*. (A) Relative expression of *AtDALL3* in *Arabidopsis thaliana* tissues at different developmental stages. 3d: 3 days old seedlings, 10d: 10 days old seedlings, R: Root, C: Cotyledons, S: Shoots, Flw: Flowers and Lvs: Rosette leaves. (B) Relative expression of *AtSBP1* and *AtDALL3* in *Arabidopsis thaliana* in plants treated with selenium and cadmium compounds. There is significant upregulation of *SBP1* and *DALL3* genes upon treatment with cadmium. (C) Relative expression of *AtSBP1* and *AtDALL3* in *Arabidopsis thaliana* in response to wounding. Two-fold induction of *AtDALL3* is observed in relation to significant downregulation of *SBP* genes.

In all three experiments values \pm SD were normalized to the geometrical mean of *UBQ10* and *PP2A* and represent the mean of three biological samples analyzed in triplicate. Significant differences at $P \leq 0.05$ are indicated by different letters (A) and asterisks (B, C).

The model was further subjected to energy minimization utilizing GROMACS in order to refine its geometry and remove clashes between side chains.

Observation of the structure shows that it is composed of a central parallel β -sheet, with the second strand antiparallel, surrounded by α -helices (Fig. 2A). These findings indicate that *DALL3* belongs to the class of α/β proteins adopting the alpha/beta-hydrolase fold that is present in lipases [18]. This conclusion is supported by the results retrieved, when our model was scanned against the classified domains in CATH database [70], a publicly-accessible, online resource of protein domain structure classification of experimentally determined 3D structures deposited in Protein Data Bank (PDB) [71]. The similarity of the domains from CATH with the submitted structure is calculated by the Sequential Structure Alignment Program (SSAP) method [72]. In general, SSAP scores above 80 are associated with highly similar structures. All the structures (PDB codes 2YIJ, 3 TGL and 1UWC) that match best to the model of *DALL3* (with values of SSAP score > 80) are classified as ab proteins at the Class level, forming a 3-Layer (aba) Sandwich at the level of Architecture. Besides the SSAP score, the RMSD value between the model and the structure that was used as template for model construction (PDB ID 2YIJ) is 0.8 Å, indicating high similarity between the two structures. Furthermore, an additional research regarding these PDB entries in SCOPe database [73] indicated that they belong to the Class of α/β proteins that adopt alpha/beta-hydrolase fold, further supporting our suggestion that *DALL3* adopts this fold. As far as the catalytic residues of *DALL3* are concerned, the conserved domain between amino acids 316–320, defined by the sequence GX SXG, and a catalytic triad, constituted by serine (aa318), aspartic acid (aa381) and histidine (aa437) residues, are in close proximity in the proposed model, allowing this way to perform its catalytic role (Fig. 2B).

3.2. Phylogenetic analysis of *AtDALL3*

Phylogenetic analysis of *DALL3* was performed in order to examine if its amino acid sequence coincides with the expected data of all PLA1-Igamma2 lipases. Moreover, in this work there was an effort to classify all different lipases from representative plant species of Angiosperms (Supplementary table 1). Our analysis showed that *DALL3* appears in the PLA1-Igamma1 as expected, which groups with PLA1-Igamma2 OTUs (Fig. 3).

The DAD1-like lipase family is divided into three classes, based on the presence of N-terminal stretches and sequence similarities in the catalytic region. Class I consists of chloroplastic proteins, class II of four cytoplasmic proteins, while class III of one mitochondrial isoform [8]. In the phylogenetic tree (Fig. 3), it is evident that the class II is completely divided from the other classes and is further divided into four clusters: PLA1-Ialpha, PLA1-Ibeta, PLA1-Igamma and PLA1-Idelta. PLA1-Ialpha and PLA1-Ibeta that are present only in *Arabidopsis thaliana* and *Eutrema salsugineum* (most probably only in the Order Brassicales) are fully supported (i.e., PP, MP, NJ bootstrap 100 %). PLA1-Igamma and PLA1-Idelta lipases clustered well, containing all representatives of each enzyme category with excellent support (100/83,3/96,6 % and 100 %, respectively) no matter the bootstrap method used. Moreover, these two groups clustered as sister clades with perfect support (i.e. 100/83,3/99,8 %). The sole exception was the lipase of *Selaginella moellendorffii* which was placed outside the Igamma and Idelta lipases. This may be due to the unique representation of the lipase's gene in the genome of this species (data not shown). Additionally, *Selaginella* is evolutionary suggested as a living descendant of the land vascular plant ancestor [74,75], which may further verify its unique topology.

Moreover, the chloroplastic proteins of PLA1-Ibeta1, which are renamed as DAD1 proteins (DEFECTIVE ANther DEHISCENCE 1) [8,20], and those of PLA1-Ibeta2 are clustered as sister clades with outstanding support (100/83,3/99,7 %) (Fig. 3). All examined species

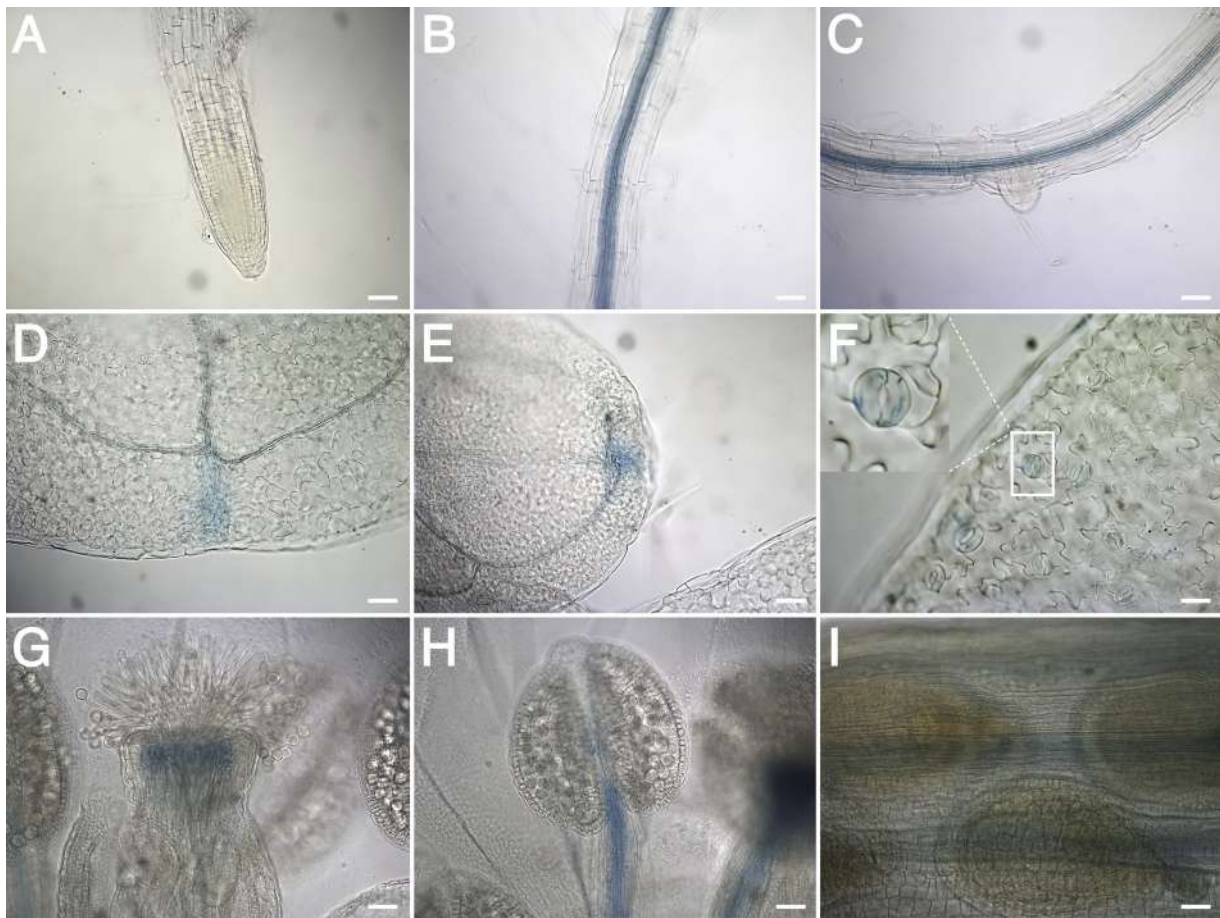


Fig. 5. Analysis of *AtDALL3* promoter activity in *Arabidopsis thaliana* plants transformed with GUS gene reporter fusions. GUS expression is observed in the hydatodes, the guard cells of cotyledons and first leaves (D–F) and the vasculature of all examined tissues. A–C: Root, D: cotyledons, E: First leaves, F: Guard cells of cotyledons, G: Stigma, H: Filaments, I: Siliques. Bars 50 μm . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

contained both isoforms of PLA1-Ibeta with the exception of *Asparagus officinalis* and *Physcomitrella patens*. The first species lacked the Ibeta2 isoform and the second species had no such protein.

The isoforms PLA1-Ialpha1 and PLA1-Ialpha2 are both present in *Arabidopsis thaliana* and *Eutrema salsugineum*, while the other species contain one of the isoforms. For the PLA1-Igamma1, 2 and 3, most of the studied species contain all three isoforms except the representatives of the order Poales that contain only the PLA1-Igamma1, while in *Beta vulgaris* and *Amborella trichopoda*, PLA1-Igamma2 is absent (Supplementary Table 2). The PLA1-Igamma3 is basal to the other two isoform categories with very good support (91/ 100/ 83,9 %).

The only protein that is characterized as mitochondrial is that of the *Arabidopsis thaliana* [8,76]. In the constructed phylogenetic tree, the clade that includes this protein is grouped with proteins which were previously characterized as PLA1-Igamma1 but in our analysis they excised from the respective PLA1-Igamma1 group that clusters with PLA1-Igamma2 (Fig. 3). However, most of the proteins are characterized as predicted. Furthermore, this group is rather closely related to the isoforms PLA1-Ibeta1 and beta2, than the PLA1-Igamma, introducing the notion of an organellar close relationship.

This phylogenetic analysis shows that the class II might be the ancestor of the other chloroplastic and mitochondrial DAD1-like lipases where PLA1-IIalpha and PLA1-IIbeta appears only in Brassicales, and thus, this may be a late evolutionary event. PLA1-Igamma proteins seem to be relatives of PLA1-Ialpha. However, there are different PLA1-Igamma isoforms which are closely related to PLA1-Ibeta and group with the mitochondrial PLA1. Considering the fact that these proteins

are characterized as putative then it might be possible that they are misannotated due to the lack of experimental evidence. Thus, it may be suggested that they are of mitochondrial origin, since the mt PLA1 is fully and well characterized in *Arabidopsis thaliana* [76].

3.3. Gene expression analysis of *AtDALL3* during development and abiotic stress

Initially, we studied the relative expression levels of *AtDALL3* mRNA in developing tissues of *Arabidopsis thaliana* (Fig. 4A). The highest level of expression was observed in 10-day-old roots and in flowers, while constitutive levels were maintained in seedlings, cotyledons, shoots and leaves. A three-fold downregulation of *DALL3* occurred in 10-day-old seedlings when compared to earlier stages of development (3-day-old seedlings). RT-PCR experiments from Seo et al. [16] who studied the expression of the seven Class I chloroplastic proteins, have shown the constitutive expression of *DALL3* being elevated in 4d-seedlings, stems and rosette leaves. Comparison of our data with those of GENEVESTIGATOR shows evidence that in the bolting stage expression in rosette leaves decreases.

Regulation of *DALL3* expression under abiotic stress conditions has previously been reported [22]. Furthermore, we have recently shown that AtSBP1 (an interacting partner of *AtDALL3*) is differentially regulated at the gene expression level by sodium selenite (Na_2SeO_3) and sodium selenate (Na_2SeO_4) [34] and is upregulated by cadmium (CdCl_2) [77,78]. Thus, it would be interesting to determine the relative transcript accumulation of *AtDALL3* after treatment of plants with the

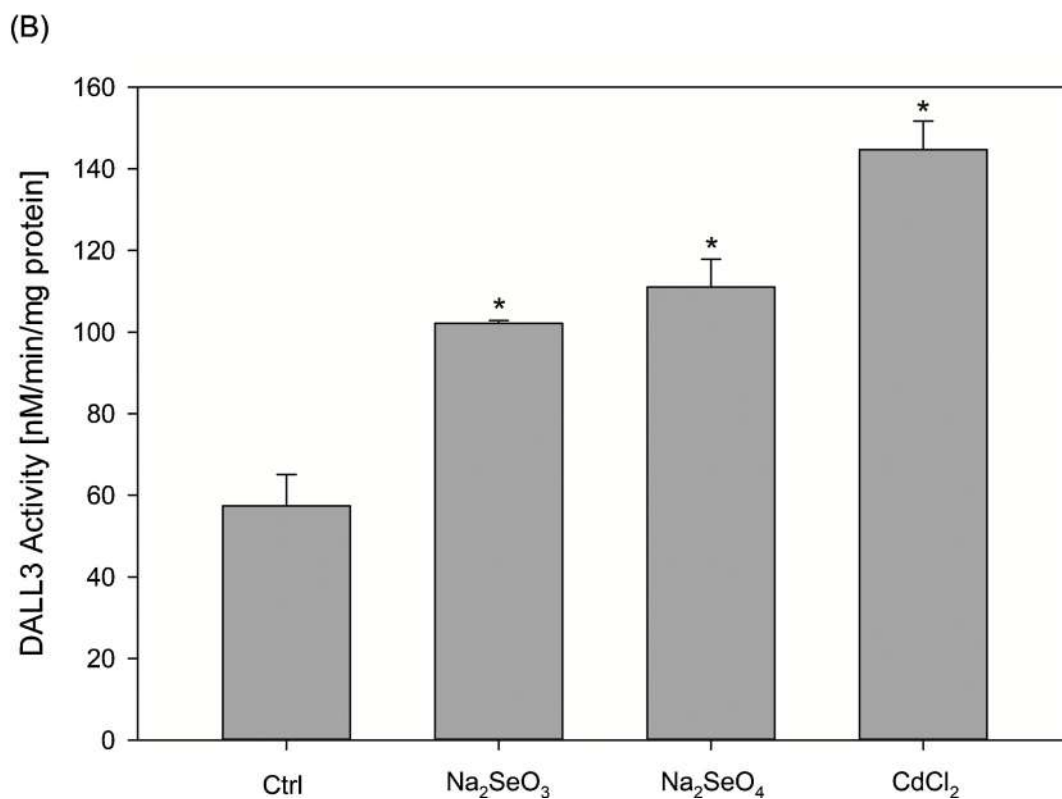
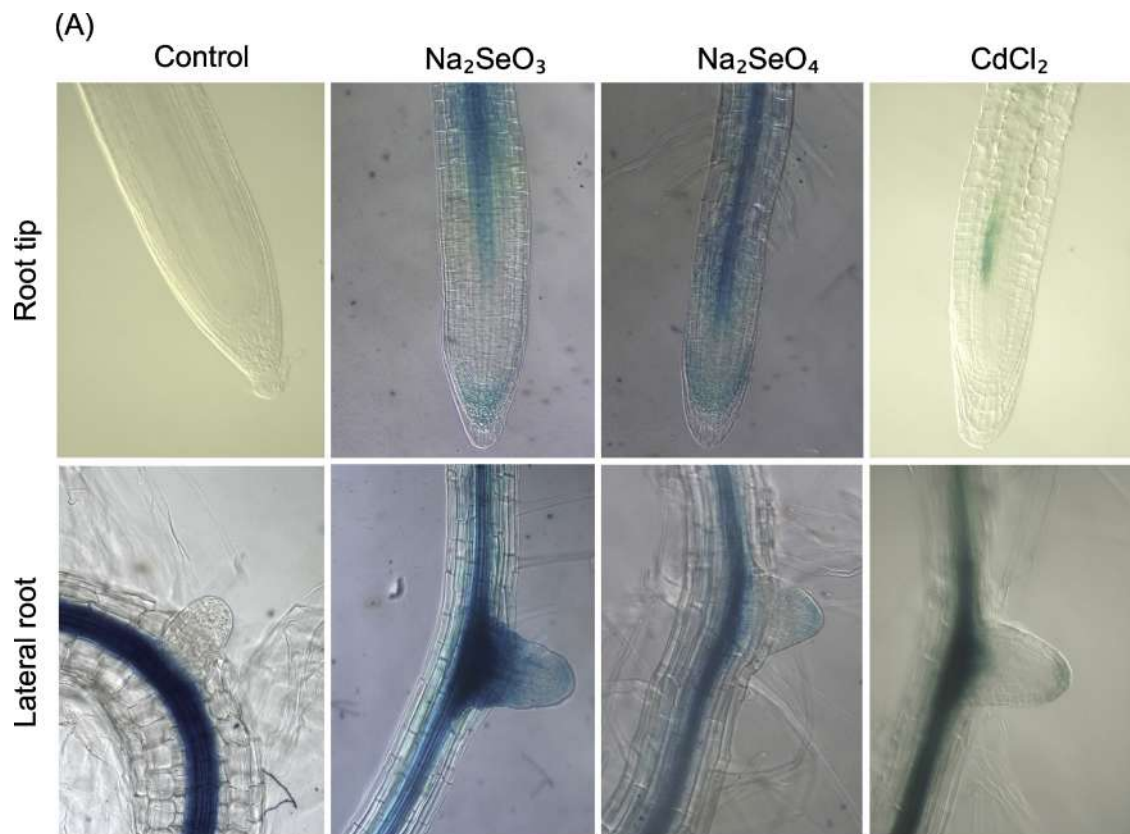


Fig. 6. Responses of *AtDALL3* promoter to abiotic stress. (A) Histochemical GUS assays defining the response of *DALL3* promoter to selenium and cadmium compounds as observed in the root apex and lateral root primordia. *AtDALL3* promoter differentially regulates GUS expression in distinct cell files depending on the compound used. (B) GUS activity in *Arabidopsis* plants transformed with *AtDALL3* promoter construct under physiological conditions and after treatment with selenium and cadmium compounds. Fluorometric GUS assays were performed in triplicate and the mean value was calculated. Error bars represent SD. Significant differences at $P \leq 0.05$ are indicated by asterisks. Specific GUS activity is shown in units of nanomoles 4-MU produced per milligram of protein per minute. All measurements were repeated three times on eight to 12 independently transformed plants. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

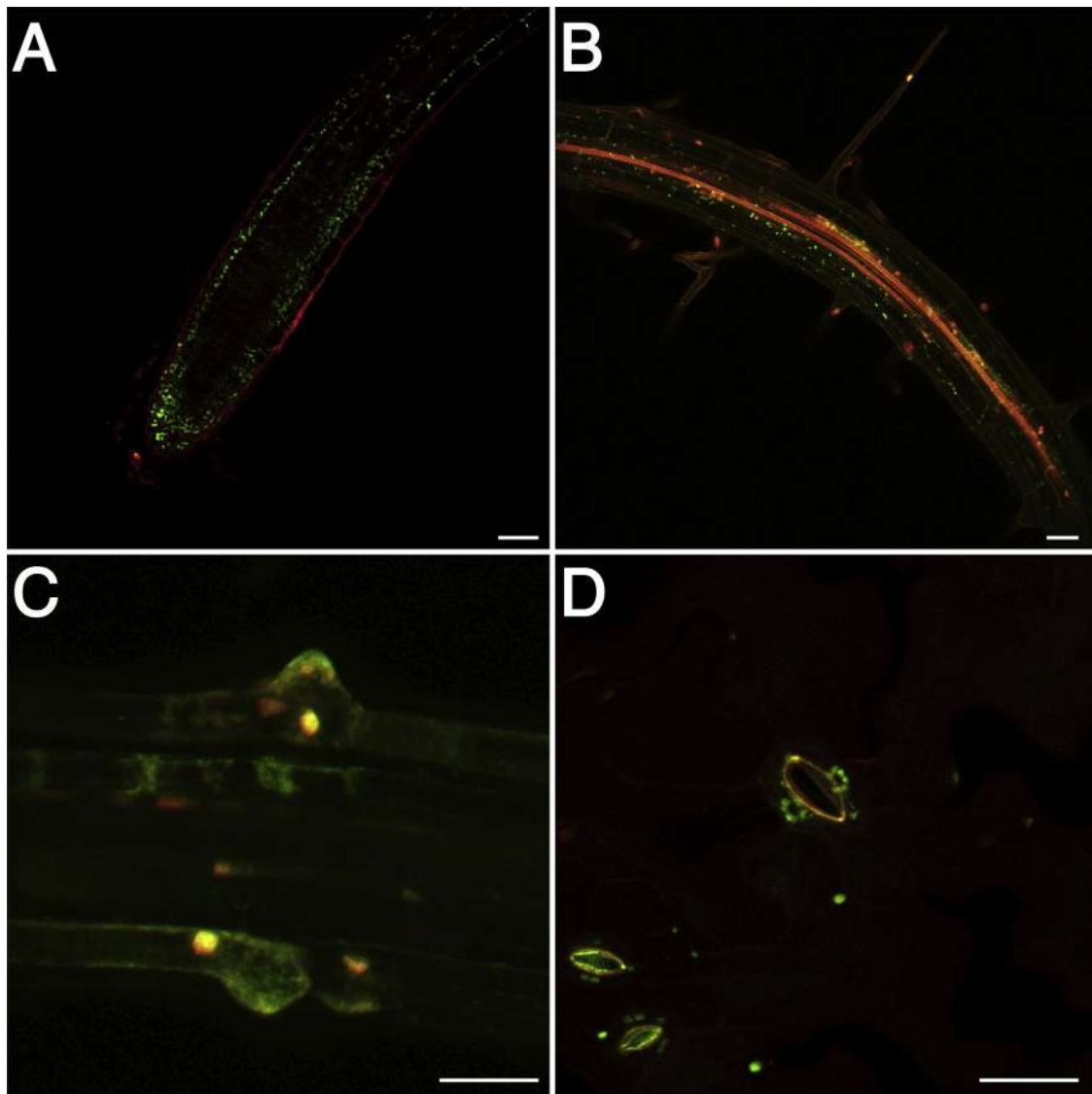


Fig. 7. Sub-cellular localization of *AtDALL3* in 10 days old seedlings of chimeric *AtDALL3::eGFP* stably transformed plants. Confocal microscopy reveals GFP signal in the plastids of the root apex (A) and endodermis along the root stele (B), in the cytoplasm of lateral roots (C) and in chloroplasts of guard cells of the stomata (D). Bars 34 μ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

forementioned compounds. Therefore, we investigated the gene expression patterns of the *AtSBP1* and *AtDALL3* in control plants, as well as, in response to treatments with cadmium and selenium compounds (Fig. 4B). Our analysis showed that *AtDALL3* is marginally upregulated by 150 μ M Na_2SeO_3 and significantly downregulated by 150 μ M Na_2SeO_4 . A statistically notable, concerted induction of *AtSBP1* and *AtDALL3* was recorded in response to 150 μ M CdCl_2 . Overall, our data further strengthen previous observations that indeed *AtSBP1* gene is differentially regulated by cadmium, selenite and selenate [34,77,78], but we show additionally that also *AtDALL3* participates in the network of genes regulated in response to these compounds.

In *Arabidopsis thaliana*, it has been shown that, oxidative stress due to cadmium exposure relates to hydrogen peroxide accumulation [79] and that treatment of plants with selenium compounds led to ROS accumulation in the roots [34]. It has also been proposed, that in addition to the importance of SBP1 in stress responses, SBP1, may be part of a protein network that responds to the cellular redox state [34].

Heavy metals cause modifications in the lipid cellular component [80], a process depended on phospholipase activity. Furthermore, cadmium and ROS can lead to the mobilization of proteins including phospholipases C and D, producing secondary messenger molecules

[81,82]. Interestingly, there are many studies connecting the oxidative stress caused from Cd and heavy metals with the increasing production of Jasmonic acid [83–87], probably affecting growth procedures [87]. Taking into account our data, the JA upregulation could be due to *DALL3* and other DAD1-like lipases, which participate in JA biosynthesis.

There are many studies connecting DALLs with wounding and JA biosynthesis. It is known that JA is induced by wounding and pathogens. Microarray studies showed that there are no significant changes in the transcription levels 30 min after wounding [22], while Ruduś et al. [20] revealed a significant increase in the relative expression 80 min after wounding. Furthermore, JA levels halved in the *DALL3* knockout [21]. The mechanism by which *DALL3* participates in wound induction, is still not clear, but evidence shows that this occurs in a COI1- and JA-independent manner [20].

Consequently, we investigated how wounding influences the regulation of SBP gene family in comparison to *DALL3* (Fig. 4C). Wounded plants were assayed for gene expression of *AtDALL3*, *AtSBP1*, *AtSBP2* and *AtSBP3* over control plants. As expected, *AtDALL3* demonstrated a 2,5-fold induction upon wounding, a response which is in line with previous studies [20]. Interestingly, a significant decrease of the

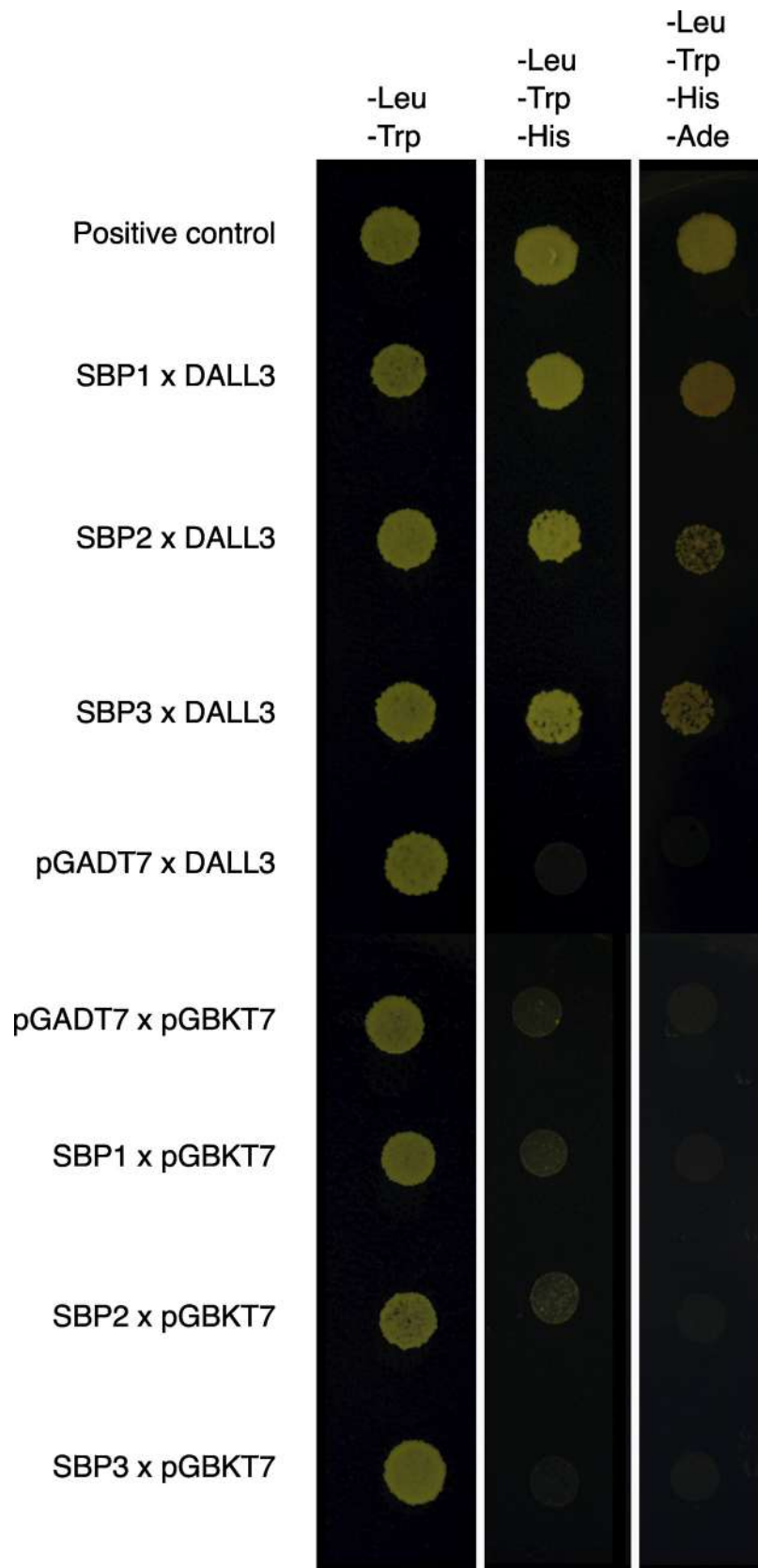


Fig. 8. Yeast two-hybrid assay. *in vivo* interaction of AtDALL3 with all members of the AtSBP protein family in yeast. Proper controls to exclude unspecific vector activation were included along with the 53/T positive control.

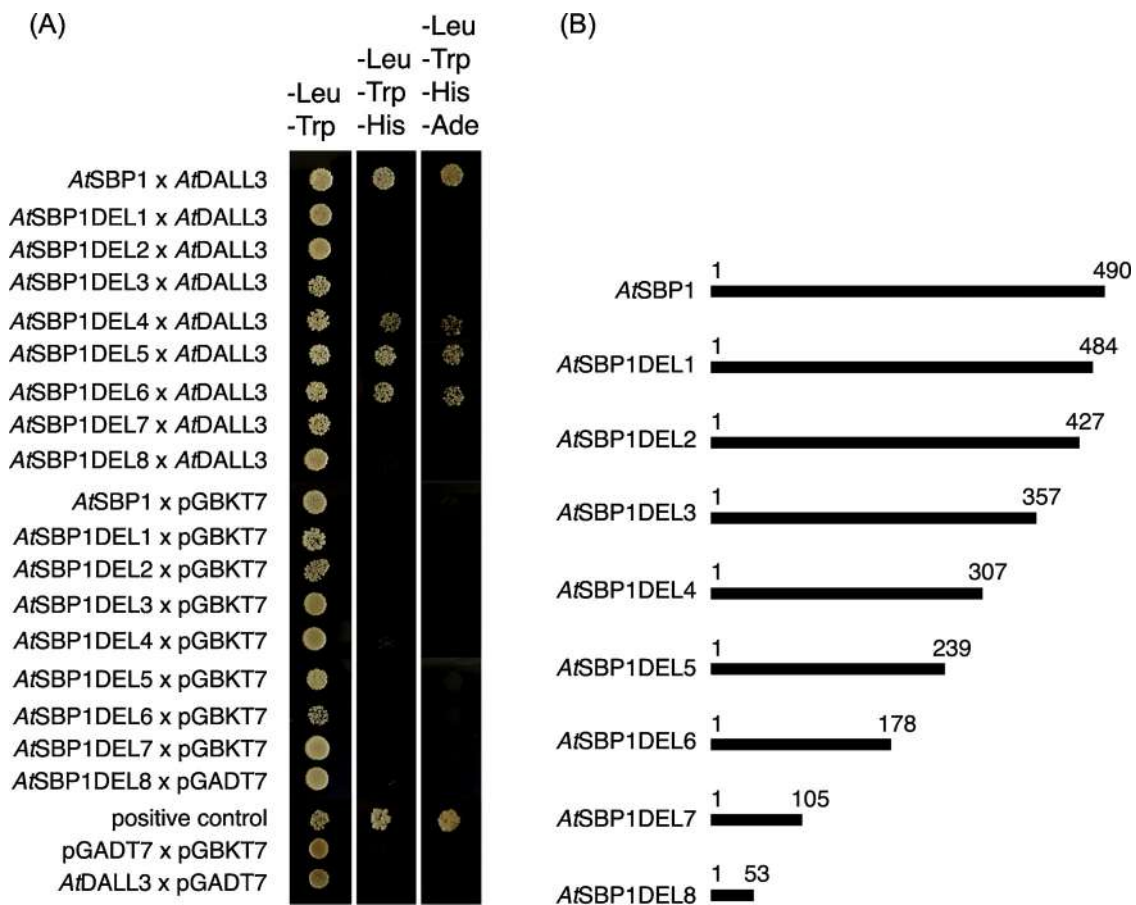


Fig. 9. Physical interaction of AtDALL3 as revealed by deletion analysis of AtSBP1. (A) The shortest truncated version of AtSBP1 that interacts with AtDALL3 is AtSBP1DEL6 of 178 N- terminus amino acids. (B) The truncated polypeptides of AtSBP1 used for deletion analysis in (A). Several negative controls to exclude unspecific activation were included.

expression levels of all the members of the *SBP* gene family was observed. A rapid increase in H_2O_2 level, commonly known as an oxidative burst, occurs in plant tissue after wounding [88,89]. Our previous results have provided evidence that at least *SBP1* expression is tightly linked to detoxification processes related to oxidative stress, since it is downregulated in ROS-induced plants in the presence of N-acetylcysteine [34], a thiol-containing antioxidant of low molecular weight with free-radical-scavenging properties [90,91]. Examples of downregulated stress sensors, though, there exist. Swindell has shown [92], that in nine abiotic stress treatments (including wounding) the auxin-responsive (At3g20220) and the auxin-regulated (At2g21210) chloroplast proteins were both downregulated. The downregulation of auxin-responsive genes had been previously documented as a response to wounding stress, but such downregulation had not previously been noted under other abiotic stress treatments [93]. Thus, it is tempting to speculate that at least in response to wounding, downregulation of *SBP* genes may be considered part of a stress signaling mechanism.

3.4. Promoter activity of AtDALL3

To investigate the transcriptional potential of the *DALL3* promoter in Arabidopsis, we generated transgenic plants harboring a 622 bp fragment, located upstream the transcriptional start site, fused to the *GUS* reporter gene (pr*DALL3*::*GUS*). This 622 bp fragment was chosen after promoter deletion analysis of a 2804 bp fragment (data not shown). The analysis of the reporter gene activity in the roots and the aerial parts of the plants in independent transgenic lines revealed a spatial expression pattern of the *DALL3* gene (Fig. 5). *GUS* expression was detected neither in the root apex, the meristematic and elongation

zones (Fig. 5A), nor in protruding lateral root primordia (Fig. 5C). In the root tissues examined, *GUS* staining primarily localized in the vascular cylinder of the main root (Fig. 5B, C) with a more intense signal in the xylem (Fig. 5B). In the aerial parts of the plant *GUS* staining was observed in the hydathodes and the vasculature of cotyledons and of the first emerging leaves (Fig. 5D, E), as well as, in the stomata (Fig. 5F). Furthermore, in the reproductive organs, *GUS* signal was detected in the stigma (Fig. 5G) and the vascular tissue of the stamen and the ovaries (Fig. 5H, I).

The expression patterns revealed with the above approach were overlapping with the patterns reported for *AtSBP1* gene [34] indicating that *DALL3* and *SBP1* transcripts co-localize. Hydathodes enable water conduction [94] and are the primary sites of the high-level production of free auxin in developing leaf primordia [95]. In corn, there is *in vivo* evidence that phospholipase A is involved in the signal transduction pathway of auxin induced coleoptile elongation [96]. It was proposed that phospholipase A is activated by auxin and that the products of the enzyme, lysophospholipids and fatty acids, induce acidification of the apoplast by activating the H^+ -pump [96].

It is known that hormones cooperate in different ways and are implicated in several processes. Auxin and jasmonic acid can work synergistically or antagonistically upon systemic functions. There are studies indicating that some phospholipases A are induced by auxin [97,98] whereas the fatty acids and lysophospholipids produced by phospholipases act as potential second messengers in auxin action [98]. Generally, it is proposed that phospholipases A play an important role in the regulation of auxin responses [99]. It has also been shown that genes associated with auxin and jasmonic acid cooperate to form a functional, fertile anther [100]. Specifically, in Arabidopsis anther

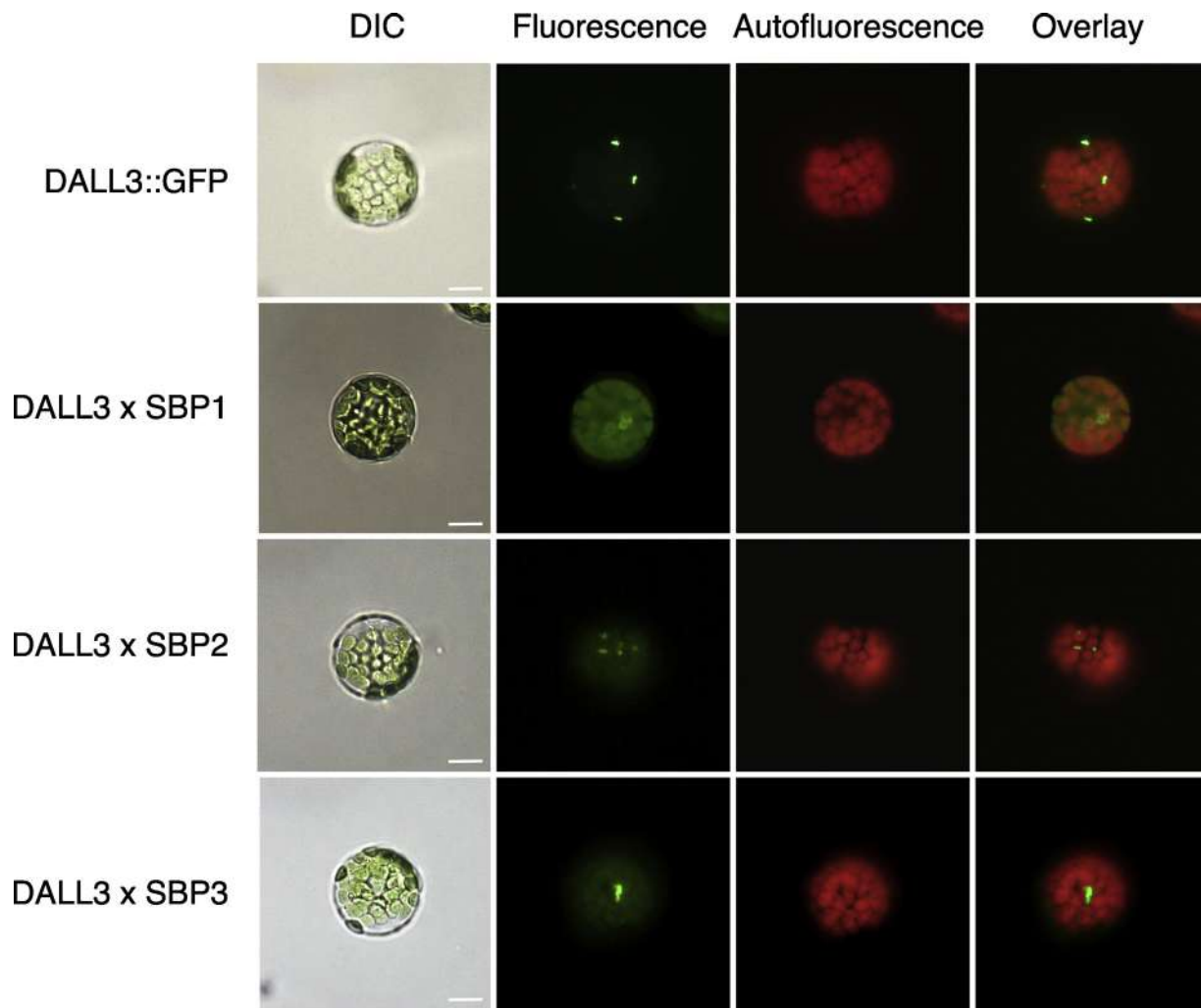


Fig. 10. Transient expression of *AtDALL3* and BiFC assays in Arabidopsis protoplasts. *AtDALL3* was fused to GFP and nCerulean to generate chimeric constructs while SBPs were fused to cFP. *AtDALL3* interacts *in planta* with all *AtSBPs* in speckle-like structures in the chloroplast's surface, where *AtDALL3* is detected too. Bars 25 μm . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

development is a process controlled by auxin, which regulates ARF genes, via an unknown mechanism. ARF6 and ARF8 indirectly activate *DEFECTIVE IN ANTER DEHISCENCE1 (DAD1)*, which is the first gene in JA biosynthesis [100–102].

We further studied the effect of selenium and cadmium compounds on *DALL3* promoter activity. Fig. 6 summarizes the tissue specific expression changes and the fluorometric GUS activity in young chemically treated Arabidopsis plants. Major changes in GUS expression patterns were primarily observed in the root apex and the lateral roots of young seedlings (Fig. 6A). Sodium selenite and sodium selenate treatments induced GUS expression in the central cylinder and to some extent in the surrounding cortical cells. Staining was also evident in most collumella and lateral root cap cell layers, including the collumella initials. On the contrary, and in line with the untreated roots, *DALL3* is not expressed in the quiescent center and the cells of the meristematic zone. Additionally, while in untreated plants no GUS expression was observed in lateral root primordia strong induction in a tissue-specific manner was documented upon treatment with all the compounds tested (Fig. 6A). Staining was evident in the founder cells of the pericycle that initiate the formation of the lateral root primordia and the differentiating root cap cells. As with the primary root, *DALL3* expression was absent in the meristematic zone of the lateral roots. These observations are further validated by measuring GUS activity changes driven by the *DALL3* promoter in intact young seedlings when treated with the

mentioned compounds (Fig. 6B). The highest overall induction of GUS activity was observed in treatments with cadmium chloride (2.5-fold change) when compared to the control untreated samples. Selenium compounds also elicited changes in activity indicating the differential response of *DALL3* promoter. Both selenium compounds and cadmium chloride induce a two- to three-fold induction of gene expression compared to the control untreated samples, indicating the differential response of *DALL3* promoter (Fig. 6B).

3.5. Localization of *AtDALL3::EGFP* fusion by confocal microscopy

To gain insight into the localization of *DALL3* protein in Arabidopsis we generated stably transformed lines with the *AtDALL3::EGFP* translational fusion and assayed intact plants (Fig. 7). It was interesting to observe that tissues negative for GUS staining (e.g. root apex and lateral roots) (Fig. 5A, C), were positive for the chimeric protein expression (Fig. 7A, C). In more detail, GFP signal was detected in the plastids of the root apex (Fig. 7A), the plastids of the central root (Fig. 7B) and the apex of emerging lateral root primordia (Fig. 7C). This indicates that the mature *DALL3* protein is transported to these cell types following gene expression in the particular aforementioned tissues. The only overlap between gene expression and protein localization observed, was in the stomata (Figs. 5F and 7 D). As shown in Fig. 7D, *DALL3* localizes in the periphery of the guard cells (orange color due to overlap

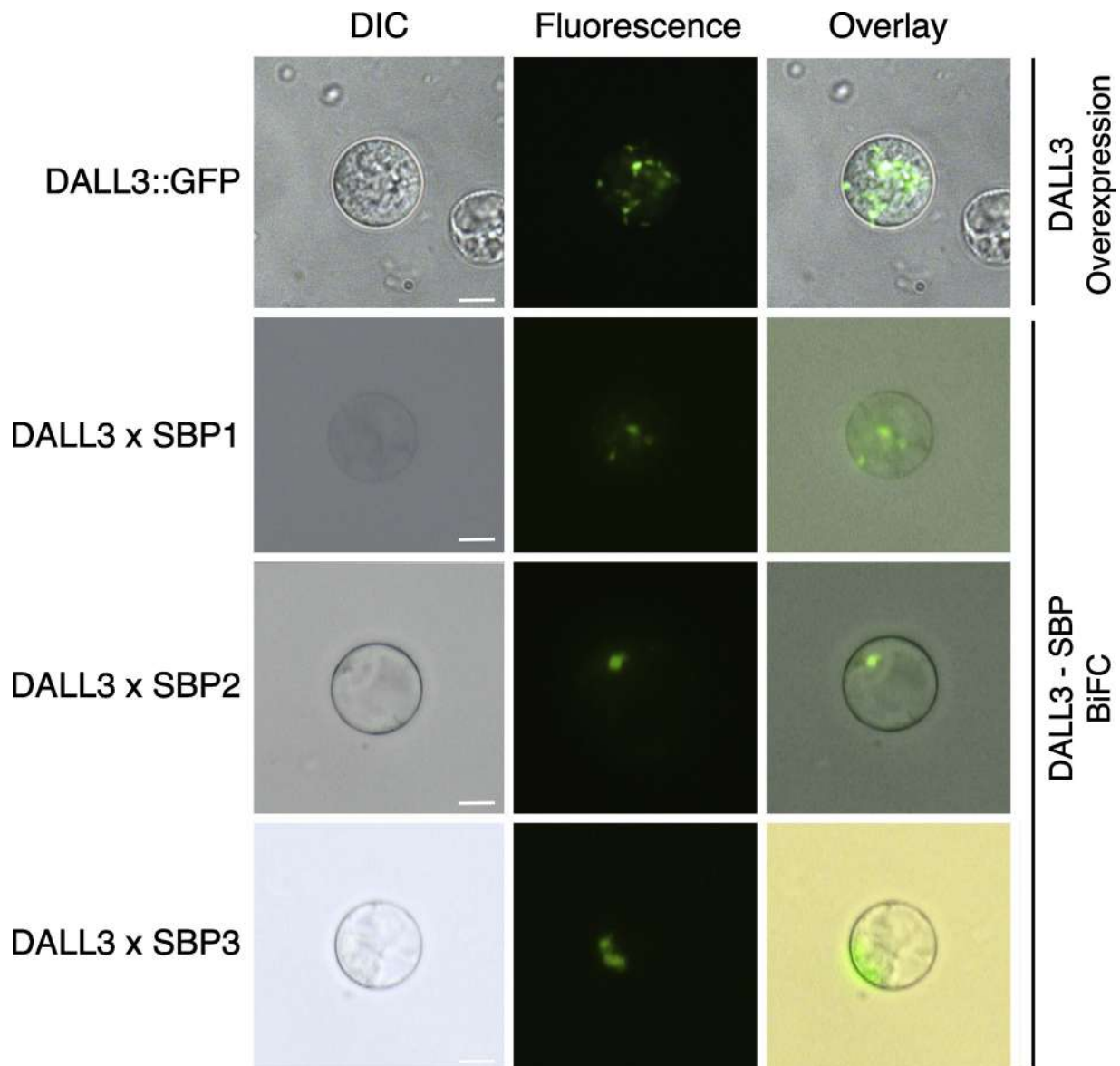


Fig. 11. BiFC assays in Arabidopsis root protoplasts. Isolated protoplasts from roots of 10 – days-old plants were transformed with DALL3::GFP and the interacting pairs of DALL3 and the SBP proteins of our BiFC system. The same plastidial localization pattern for the ectopically expressed DALL3 was observed and identical was the case for the interacting pairs of DALL3 with the three SBP proteins. Bars 15 μ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

of GFP and PI staining) and in the characteristic “donut” shape the chloroplasts form, around the nucleus of the guard cells. The available few studies on the localization of DALL3 are mainly performed by transient protoplast transformation. Their results, however, support ours as they indicate a chloroplastic localization [16,103].

3.6. Analysis of AtDALL3 interactions with yeast two-hybrid assays

The identification of protein-protein interactions comprises a prerequisite towards understanding protein networks and functions, as proteins normally function in macromolecular complexes. Describing such interactions, although it may be of great interest, it can be challenging, since they may be transient, or may involve different partners and overlapping binding sites [104].

In order to verify the positive interaction of AtDALL3 with AtSBP1 revealed by the yeast two-hybrid (Y2H) screening (with AtSBP1 as bait), the respective genes were amplified from total Arabidopsis root RNA, cloned in appropriate vectors and individual protein-protein

interaction experiments were performed. Additionally, AtSBP2 and AtSBP3 were also amplified and cloned due to their high degree of homology with the bait protein.

Yeast cells coexpressing various construct combinations in pairs, were used to study protein-protein interactions (Fig. 8). This assay confirmed initially a strong positive interaction of AtDALL3 with AtSBP1. Interestingly, all three AtSBP proteins also strongly interacted with AtDALL3. No unspecific activation was detected when bait and prey proteins were used in combination with the respective empty vectors (pGBKT7 or pGADT7). Our data point to the existence of a novel protein-protein interaction network, consisting of the selenium binding protein family and the plastidial DALL3. Taking into account the properties and the suggested functions of the participating proteins, it is plausible to speculate that this network is part of the plant’s response to oxidative stress.

Moreover, we tried to determine domains in the AtSBP1 polypeptide, responsible for binding of AtDALL3. We generated a series of C-terminal truncated AtSBP1 polypeptides (Fig. 9B) and studied in yeast

cells their binding capacity to AtDALL3. Firstly, we investigated whether these truncated polypeptides cloned in frame with the binding domain of GAL4 react in an unspecific manner with the activation domain of the empty vector (Fig. 9A). We then analyzed the auxotrophy of yeast cells while harboring in pairs AtDALL3 and each of the eight truncated polypeptides of AtSBP1 (Fig. 9A). Our analysis showed that the first 178 aa of AtSBP1 maintain strong, full binding capacity to AtDALL3, while the region between aa 427–490, when deleted, interferes with proper binding. It is noteworthy, that aa 1–178 were recently identified as the interaction region with the stress related glutaredoxin AtGRXS14 [33].

3.7. BiFC assays of AtDALL3 with the AtSBP protein family

It has been reported previously that the human SBP1 localizes in the cytosol and the nucleus [105–107], while studies in plants demonstrated the expression of SBP in cytoplasmically dense cell types and membrane vesicles [108]. Furthermore, we have recently shown that in Arabidopsis protoplasts SBP::GFP protein fusions can be present both in the cytoplasm and the nucleus [33]. In order to elucidate in which cellular compartment DALL3 is localized, we initially performed transient expression assays in Arabidopsis protoplasts (Fig. 10). DALL3 was translationally fused to GFP and used to transform rosette leaf protoplasts. This analysis showed that DALL3 protein fusion was present in speckle-like structures that seemed attached to the chloroplasts (Fig. 10). The speckle-like structures attached to the chloroplasts in DALL3 localization studies have been previously observed in a heterologous system, via transient expression assays in tobacco, where DALL3 and DALL4 were studied as phospholipases induced in plant defense [103]. Moreover, these structures can be noticed in studies for other chloroplastic proteins of the DAD1-like family, such as DGL [7,21] and DAD1 [7].

We then asked if the interactions revealed by the yeast two-hybrid screening occur *in planta*. To answer this question, we employed bimolecular fluorescence complementation (BiFC) to probe the protein interactions in living protoplast cells [109,110]. Arabidopsis protoplasts were transiently transformed with constructs of the interacting pairs in the pSAT vector system [109,111]. As shown in Fig. 10, AtSBP1 interacts *in planta* with AtDALL3 in speckle-like structures and in the chloroplasts, while similar structures with confined BiFC signal were revealed for the DALL3 x SBP2 and DALL3 x SBP3 interactions. Our subcellular localization analyses define for the first time the compartmentalized expression pattern of the AtDALL3 in a homologous system (Fig. 10). Furthermore, we show that when ectopically expressed the bait and prey proteins defined by our H2Y screening, interact *in planta* in the plastids of isolated protoplasts. It remains unclear and worth further investigation under which conditions the described interactions occur *in vivo*.

We further investigated the aforementioned interactions in a homologous chloroplast-free system, that is, root protoplasts of *Arabidopsis thaliana*. We used the protocol of Bargmann and Birnbaum [44] to isolate protoplasts from roots of 10 – days-old plants and transformed them with DALL3::GFP and the interacting pairs of DALL3 and the SBP proteins of our BiFC system. With this analysis, the same plastidial localization pattern for the ectopically expressed DALL3 was observed and identical was the case for the interacting pairs of DALL3 with the three SBP proteins (Fig. 11).

Class I phospholipases of DAD1-Like Lipase Family have been described and shown to be chloroplastic proteins [16]. Our results agree with previous studies; however, we noticed the speckle-like structures. Suchlike structures have been described before for outer membrane proteins [112,113] and for proteins which are located in the space between the outer and inner membranes of the chloroplast envelope [113]. For further investigation, we run an online algorithm for subchloroplast localization prediction, the LNP-Chlo [114], that also revealed an envelope localization.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Acknowledgements

This research is co-financed by Greece and the European Union (European Social Fund- ESF) through the Operational Programme “Human Resources Development, Education and Lifelong Learning” in the context of the project “Strengthening Human Resources Research Potential via Doctorate Research” (MIS-5000432), implemented by the State Scholarships Foundation (IKY) (Irene Dervisi). We thank the laboratory of Prof. E. Flemetakis (Agricultural University of Athens, Greece) for technical assistance and Michael Zachariadis, National Center for Scientific Research “Demokritos”, Institute of Biosciences and Applications for confocal assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110357>.

References

- [1] G. Chen, C.L. Snyder, M.S. Greer, R.J. Weselake, Biology and biochemistry of plant phospholipases, *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 30 (2011) 239–258.
- [2] X. Wang, Plant phospholipases, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52 (2001) 211–231.
- [3] S.B. Ryu, Phospholipid-derived signaling mediated by phospholipase A in plants, *Trends Plant Sci.* 9 (2004) 229–235.
- [4] J. Mansfeld, Plant phospholipases A2: perspectives on biotechnological applications, *Biotechnol. Lett.* 31 (2009) 1373–1380.
- [5] L. De Maria, J. Vind, K.M. Oxenbøll, A. Svendsen, S. Patkar, Phospholipases and their industrial applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74 (2007) 290–300.
- [6] G.S. Richmond, T.K. Smith, Phospholipases A1, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 588–612.
- [7] Y. Hyun, S. Choi, H.J. Hwang, J. Yu, S.J. Nam, J. Ko, J.Y. Park, Y.S. Seo, E.Y. Kim, S.B. Ryu, W.T. Kim, Y.H. Lee, H. Kang, I. Lee, Cooperation and functional diversification of two closely related galactolipase genes for jasmonate biosynthesis, *Dev. Cell* 14 (2008) 183–192.
- [8] S. Ishiguro, A. Kawai-Oda, J. Ueda, I. Nishida, K. Okada, The DEFECTIVE IN ANTHWER DEHISCENCE1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis, *Plant Cell* 13 (2001) 2191–2209.
- [9] M. Lo, C. Taylor, L. Wang, L. Nowack, T.-W. Wang, J. Thompson, Characterization of an ultraviolet B-induced lipase in Arabidopsis, *Plant Physiol.* 135 (2004) 947–958.
- [10] Y.S. Seo, E.Y. Kim, H.G. Mang, W.T. Kim, Heterologous expression, and biochemical and cellular characterization of CaPLA1 encoding a hot pepper phospholipase A1 homolog: hot pepper phospholipase A1, *Plant J.* 53 (2007) 895–908.
- [11] Y. Hong, T.-W. Wang, K.A. Hudak, F. Schade, C.D. Froese, J.E. Thompson, An ethylene-induced cDNA encoding a lipase expressed at the onset of senescence, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (2000) 8717–8722.
- [12] A. Noiriél, P. Benveniste, A. Banas, S. Stymne, P. Bouvier-Navé, Expression in yeast of a novel phospholipase A1 cDNA from Arabidopsis thaliana, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 3752–3764.
- [13] T. Kato, M.T. Morita, H. Fukaki, Y. Yamauchi, M. Uehara, M. Niihama, M. Tasaka, SGR2, a phospholipase-like protein, and ZIG/SGR4, a SNARE, are involved in the shoot gravitropism of Arabidopsis, *Plant Cell* 14 (2002) 33–46.
- [14] K. Matsui, S. Fukutomi, M. Ishii, T. Kajiwara, A tomato lipase homologous to DAD1 (*LeLID1*) is induced in post-germinative growing stage and encodes a triacylglycerol lipase, *FEBS Lett.* 569 (2004) 195–200.
- [15] A.R. Matos, A.-T. Pham-Thi, Lipid deacylating enzymes in plants: old activities, new genes, *Plant Physiol. Biochem.* 47 (2009) 491–503.
- [16] Y.S. Seo, E.Y. Kim, J.H. Kim, W.T. Kim, Enzymatic characterization of class I DAD1-like acylhydrolase members targeted to chloroplast in Arabidopsis, *FEBS Lett.* 583 (2009) 2301–2307.
- [17] Y. Li-Beisson, B. Shorrosh, F. Beisson, M.X. Andersson, V. Arondel, P.D. Bates, S. Baud, D. Bird, A. DeBono, T.P. Durrett, R.B. Franke, I.A. Graham, K. Katayama, A.A. Kelly, T. Larson, J.E. Markham, M. Miquel, I. Molina, I. Nishida, O. Rowland, L. Samuels, K.M. Schmid, H. Wada, R. Welti, C. Xu, R. Zallot, J. Ohlrogge, *Acyl-Lipid Metabolism*, The Arabidopsis Book, (2013).
- [18] L. Casas-Godoy, S. Duquesne, F. Bordes, G. Sandoval, A. Marty, Lipases: an overview, in: G. Sandoval (Ed.), *Lipases and Phospholipases*, Humana Press, Totowa, NJ, 2012, pp. 3–30.

- [19] J. Pleiss, M. Fischer, M. Peiker, C. Thiele, R.D. Schmid, Lipase Engineering Database Understanding and Exploiting Sequence–Structure–Function Relationships, (2000), p. 18.
- [20] I. Ruduš, H. Terai, T. Shimizu, H. Kojima, K. Hattori, Y. Nishimori, H. Tsukagoshi, Y. Kamiya, M. Seo, K. Nakamura, J. Kepczyński, S. Ishiguro, Wound-induced expression of DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE1 and DAD1-like lipase genes is mediated by both CORONATINE INSENSITIVE1-dependent and independent pathways in *Arabidopsis thaliana*, Plant Cell Rep. 33 (2014) 849–860.
- [21] D. Ellinger, N. Stingl, I.I. Kubigsteltig, T. Bals, M. Juenger, S. Pollmann, S. Berger, D. Schuenemann, M.J. Mueller, DONGLE and DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE1 lipases are not essential for wound- and pathogen-induced jasmonate biosynthesis: redundant lipases contribute to jasmonate formation, Plant Physiol. 153 (2010) 114–127.
- [22] D. Ellinger, I.I. Kubigsteltig, Involvement of DAD1-like lipases in response to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*, Plant Signal. Behav. 5 (2010) 1269–1271.
- [23] M. Sato, R.M. Mitra, J. Coller, D. Wang, N.W. Spivey, J. Dewdney, C. Denoux, J. Glazebrook, F. Katagiri, A high-performance, small-scale microarray for expression profiling of many samples in *Arabidopsis*-pathogen studies, Plant J. 49 (2007) 565–577.
- [24] A. Agalou, H.P. Spaink, A. Roussis, Novel interaction of selenium-binding protein with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and fructose-bisphosphate aldolase of *Arabidopsis thaliana*, Funct. Plant Biol. 33 (2006) 847.
- [25] R. Desikan, S.A.-H. Mackerness, J.T. Hancock, S.J. Neill, Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress, Plant Physiol. 127 (2001) 159–172.
- [26] V. Nikiforova, J. Freitag, S. Kempa, M. Adamik, H. Hesse, R. Hoefgen, Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity, Plant J. 33 (2003) 633–650.
- [27] X. Liu, W.V. Baird, Differential expression of genes regulated in response to drought or salinity stress in Sunflower, Crop Sci. 43 (2003) 10.
- [28] Y. Zhao, A.K. Hull, N.R. Gupta, K.A. Goss, J. Alonso, J.R. Ecker, J. Normanly, J. Chory, J.L. Celenza, Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3, Genes Dev. 16 (2002) 3100–3112.
- [29] K. Zhu-Salzman, Ra. Salzman, J.-E. Ahn, H. Koiwa, Transcriptional regulation of sorghum defense determinants against a phloem-feeding aphid, Plant Physiol. 134 (2004) 420–431.
- [30] K. Sawada, M. Iwata, Isolation of blast fungal cerebrosidase elicitor-responsive genes in rice plants, J. Gen. Plant Pathol. 68 (2002) 128–133.
- [31] K. Sawada, L. Tokuda, A. Shinmyo, Characterization of the rice blast fungal elicitor-responsive gene OsSBP encoding a homologue to the mammalian Selenium-binding Proteins, Plant Biotechnol. 20 (2003) 177–181.
- [32] K. Sawada, M. Hasegawa, L. Tokuda, J. Kameyama, O. Kodama, T. Kohchi, K. Yoshida, A. Shinmyo, Enhanced resistance to blast fungus and bacterial blight in transgenic rice constitutively expressing *OsSBP*, a rice homologue of mammalian Selenium-binding Proteins, Biosci. Biotechnol. Biochem. 68 (2004) 873–880.
- [33] C. Valassakis, I. Dervisi, A. Agalou, N. Papandreou, G. Kapetsis, V. Podia, K. Haralampidis, V.A. Iconomidou, H.P. Spaink, A. Roussis, Novel interactions of Selenium Binding Protein family with the PICOT containing proteins AtGRXS14 and AtGRXS16 in *Arabidopsis thaliana*, Plant Sci. 281 (2019) 102–112.
- [34] C. Valassakis, P. Livanos, M. Minopetrou, K. Haralampidis, A. Roussis, Promoter analysis and functional implications of the selenium binding protein (SBP) gene family in *Arabidopsis thaliana*, J. Plant Physiol. 224–225 (2018) 19–29.
- [35] T. Murashige, F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant. 15 (1962) 473–497.
- [36] L. Onate-Sánchez, J. Vicente-Carabajosa, DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques, BMC Res. Notes 1 (2008) 93.
- [37] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method, Methods. 25 (2001) 402–408.
- [38] G. An, P.R. Ebert, A. Mitra, S.B. Ha, Binary vectors, in: S.B. Gelvin, R.A. Schilperoort, D.P.S. Verma (Eds.), Plant Molecular Biology Manual, Springer, Dordrecht, 1989, pp. 29–47.
- [39] A.M. Davis, A. Hall, A.J. Millar, C. Darrach, S.J. Davis, Protocol: streamlined sub-protocols for floral-dip transformation and selection of transformants in *Arabidopsis thaliana*, Plant Methods 5 (2009) 3.
- [40] R.A. Jefferson, T.A. Kavanagh, M.W. Bevan, GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, EMBO J. 6 (1987) 3901–3907.
- [41] S.R. Gallagher, Quantitation of GUS activity by fluorometry, in: S.R. Gallagher (Ed.), GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter Gene of Gene Expression, Academic Press Inc, California, 1992, pp. 47–59.
- [42] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72 (1976) 248–254.
- [43] F.-H. Wu, S.-C. Shen, L.-Y. Lee, S.-H. Lee, M.-T. Chan, C.-S. Lin, Tape-*Arabidopsis* Sandwich - a simpler *Arabidopsis* protoplast isolation method, Plant Methods 5 (2009) 10.
- [44] B.O.R. Bargmann, K.D. Birnbaum, Fluorescence activated cell sorting of plant protoplasts, J. Vis. Exp. (2010) 1673.
- [45] L. Brady, A.M. Brzozowski, Z. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J.P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Høge-Jensen, L. Nørskov, L. Thim, U. Menge, A serine protease triad forms the catalytic centre of triacylglycerol lipase, Lett. Nature. 343 (1990) 767–770.
- [46] D.L. Sworffor, PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2002.
- [47] R. Lanfear, B. Calcott, S.Y.W. Ho, S. Guindon, PartitionFinder: Combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses, Mol. Biol. Evol. 29 (2012) 1695–1701.
- [48] R. Lanfear, P.B. Frandsen, A.M. Wright, T. Senfeld, B. Calcott, PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses, Mol. Biol. Evol. (2016) 772–773.
- [49] S. Guindon, J.-F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk, O. Gascuel, New algorithms and methods to estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0, Syst. Biol. 59 (2010) 307–321.
- [50] F. Ronquist, M. Teslenko, P. van der Mark, D.L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M.A. Suchard, J.P. Huelsenbeck, MrBayes 3.2: efficient Bayesian Phylogenetic inference and Model choice across a large model space, Syst. Biol. 61 (2012) 539–542.
- [51] A. Gelman, D.B. Rubin, Inference from iterative simulation using multiple sequences, Stat. Sci. 7 (1992) 457–511.
- [52] B.C. Stöver, K.F. Müller, TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses, BMC Bioinformatics 11 (2010).
- [53] A. Roy, A. Kucukural, Y. Zhang, I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction, Nat. Protoc. 5 (2010) 725–738.
- [54] J. Yang, R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson, Y. Zhang, The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction, Nat. Methods 12 (2015) 7–8.
- [55] The UniProt Consortium, UniProt: the universal protein knowledgebase, Nucleic Acids Res. 46 (2018) 2699.
- [56] J. Yang, A. Roy, Y. Zhang, Protein–ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment, Bioinformatics. 29 (2013) 2588–2595.
- [57] M.J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J.C. Smith, B. Hess, E. Lindahl, GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers, SoftwareX 1–2 (2015) 19–25.
- [58] K. Lindorff-Larsen, S. Piana, C. Palmo, P. Maragakis, J.L. Klepeis, R.O. Dror, D.E. Shaw, Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field, Proteins 78 (2010) 1950–1958.
- [59] M. Nardini, B.W. Dijkstra, A/β Hydrolyase fold enzymes: the family keeps growing, Curr. Opin. Struct. Biol. 9 (1999) 732–737.
- [60] J.T. Mindrebo, C.M. Nartey, Y. Seto, M.D. Burkart, J.P. Noel, Unveiling the functional diversity of the alpha/beta hydrolase superfamily in the plant kingdom, Curr. Opin. Struct. Biol. 41 (2016) 233–246.
- [61] H.-P. Klenk, R.A. Clayton, J.-F. Tomb, O. White, K.E. Nelson, K.A. Ketchum, R.J. Dodson, M. Gwinn, E.K. Hickey, J.D. Peterson, D.L. Richardson, A.R. Kerlavage, D.E. Graham, N.C. Kyrpides, R.D. Fleischmann, J. Quackenbush, N.H. Lee, G.G. Sutton, S. Gill, E.F. Kirkness, B.A. Dougherty, K. McKenney, M.D. Adams, B. Loftus, S. Peterson, C.I. Reich, L.K. McNeil, J.H. Badger, A. Glodek, L. Zhou, R. Overbeek, J.D. Gocayne, J.F. Weidman, L. McDonald, T. Utterback, M.D. Cotton, T. Spriggs, P. Artiach, B.P. Kaine, S.M. Sykes, P.W. Sadow, K.P. D'Andrea, C. Bowman, C. Fujii, S.A. Garland, T.M. Mason, G.J. Olsen, C.M. Fraser, H.O. Smith, C.R. Woese, J.C. Venter, The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*, Nature 390 (1997) 364–370.
- [62] G. De Simone, V. Menchise, G. Manco, L. Mandrich, N. Sorrentino, D. Lang, M. Rossi, C. Pedone, The Crystal structure of a hyper-thermophilic carboxylesterase from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*, J. Mol. Biol. 314 (2001) 507–518.
- [63] F.K. Winkler, A. D'Arcy, W. Hunziker, Structure of human pancreatic lipase, Nature 343 (1990) 771–774.
- [64] F. Carrière, C. Withers-Martinez, H. van Tilbeurgh, A. Roussel, C. Cambillau, R. Verger, Structural basis for the substrate selectivity of pancreatic lipases and some related proteins, Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 1376 (1998) 417–432.
- [65] A.M. Brzozowski, H. Savage, C.S. Verma, J.P. Turkenburg, D.M. Lawson, A. Svendsen, S. Patkar, Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* Lipase, Biochemistry 39 (2000) 15071–15082.
- [66] Z.S. Derewenda, U. Derewenda, Relationships among serine hydrolases: evidence for a common structural motif in triacylglyceride lipases and esterases, Biochem. Cell Biol. 69 (1991) 842–851.
- [67] P. Grochulski, Y. Li, F. Bouthillier, P. Smith, D. Harrison, B. Rubin, M. Cygler, Insights into interfacial activation from an “open” structure of *Candida rugosa* lipase, J. Biol. Chem. 268 (1993) 12843–12847.
- [68] P. Grochulski, Y. Li, J.D. Schrag, M. Cygler, Two conformational states of *Candida rugosa* lipase, Prot. Sci. 3 (1993) 82–91.
- [69] Z.S. Derewenda, U. Derewenda, G.G. Dodson, The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9Å resolution, J. Mol. Biol. 227 (1992) 818–839.
- [70] N.L. Dawson, T.E. Lewis, S. Das, J.G. Lees, D. Lee, P. Ashford, C.A. Orengo, I. Sillitoe, CATH: an expanded resource to predict protein function through structure and sequence, Nucleic Acids Res. 45 (2017) D289–D295.
- [71] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, The protein data bank, Nucleic Acids Res. 28 (2000) 235–242.
- [72] C.A. Orengo, W.R. Taylor, [36] SSAP: Sequence structure alignment program for protein structure comparison, Methods Enzymol. 226 (1996) 617–635.
- [73] N.K. Fox, S.E. Brenner, J.-M. Chandonia, SCOPe: Structural Classification of Proteins—extended, integrating SCOP and ASTRAL data and classification of new structures, Nucl. Acids Res. 42 (2014) D304–D309.
- [74] J.A. Banks, Selaginella and 400 million years of separation, Annu. Rev. Plant Biol. 60 (2009) 223–238.
- [75] J.A. Banks, T. Nishiyama, M. Hasebe, J.L. Bowman, M. Gribskov, C. dePamphilis, V.A. Albert, N. Aono, T. Aoyama, B.A. Ambrose, N.W. Ashton, M.J. Axtell, E. Barker, M.S. Barker, J.L. Bennetzen, N.D. Bonawitz, C. Chapple, C. Cheng,

- L.G.G. Correa, M. Dacre, J. DeBarry, I. Dreyer, M. Elias, E.M. Engstrom, M. Estelle, L. Feng, C. Finet, S.K. Floyd, W.B. Frommer, T. Fujita, L. Gramzow, M. Gutensohn, J. Harholt, M. Hattori, A. Heyl, T. Hirai, Y. Hiwatashi, M. Ishikawa, M. Iwata, K.G. Karol, B. Koehler, U. Kolkuisaoglu, M. Kubo, T. Kurata, S. Lalonde, K. Li, Y. Li, A. Litt, E. Lyons, G. Manning, T.P. Maruyama, T.P. Michael, K. Mikami, S. Miyazaki, S.-i. Morinaga, T. Murata, B. Mueller-Roeber, D.R. Nelson, M. Obara, Y. Oguri, R.G. Olmstead, N. Onodera, B.L. Petersen, B. Pils, M. Prigge, S.A. Rensing, D.M. Riano-Pachon, A.W. Roberts, Y. Sato, H.V. Scheller, B. Schulz, C. Schulz, E.V. Shakhov, N. Shibagaki, N. Shinohara, D.E. Shippen, I. Sorensen, R. Sotooka, N. Sugimoto, M. Sugita, N. Sumikawa, M. Tanurdzic, G. Theissen, P. Ulvskov, S. Wakazuki, J.-K. Weng, W.W.G.T. Willats, D. Wipf, P.G. Wolf, L. Yang, A.D. Zimmer, Q. Zhu, T. Mitros, U. Hellsten, D. Loque, R. Otiilar, A. Salamov, J. Schmutz, H. Shapiro, E. Lindquist, S. Lucas, D. Rokhsar, I.V. Grigoriev, The Selaginella genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants, *Science*. 332 (2011) 960–963.
- [76] Y.S. Seo, E.Y. Kim, W.T. Kim, The *Arabidopsis* *sn-1*-specific mitochondrial acyl-hydrolase AtDLAH is positively correlated with seed viability, *J. Exp. Bot.* 62 (2011) 5683–5698.
- [77] C. Dutilleul, A. Jourdain, J. Bourguignon, V. Hugouvieux, The Arabidopsis Putative Selenium-Binding Protein Family: expression study and characterization of SBP1 as a potential new player in cadmium detoxification processes, *Plant Physiol.* 147 (2008) 239–251.
- [78] J.-E. Sarry, L. Kuhn, C. Ducruix, A. Lafaye, C. Junot, V. Hugouvieux, A. Jourdain, O. Bastien, J.B. Fievet, D. Vailhen, B. Amekraz, C. Moulin, E. Ezan, J. Garin, J. Bourguignon, The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses, *Proteomics* 6 (2006) 2180–2198.
- [79] U.-H. Cho, N.-H. Seo, Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation, *Plant Sci.* 168 (2005) 113–120.
- [80] R.G. Upchurch, Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress, *Biotechnol. Lett.* 30 (2008) 967–977.
- [81] L. Yang, J. Ji, K.R. Harris-Shultz, H. Wang, H. Wang, E.F. Abd-Allah, Y. Luo, X. Hu, The dynamic changes of the plasma membrane proteins and the protective roles of nitric oxide in rice subjected to heavy metal cadmium stress, *Front. Plant Sci.* 7 (2016).
- [82] J. Chmielowska-Bąk, J. Gzyl, R. Rucinska-Sobkowiak, M. Arasimowicz-Jelonek, J. Deckert, The new insights into cadmium sensing, *Front. Plant Sci.* 5 (2014).
- [83] W. Maksymiec, D. Wianowska, A.L. Dawidowicz, S. Radkiewicz, M. Mardarowicz, Z. Krupa, The level of jasmonic acid in *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus coccineus* plants under heavy metal stress, *J. Plant Physiol.* 162 (2005) 1338–1346.
- [84] W. Maksymiec, Signaling responses in plants to heavy metal stress, *Acta Physiol. Plant.* 29 (2007) 177–187.
- [85] T. Koeduka, K. Matsui, M. Hasegawa, Y. Akakabe, T. Kajiwara, Rice fatty acid-dioxygenase is induced by pathogen attack and heavy metal stress: activation through jasmonate signaling, *J. Plant Physiol.* 162 (2005) 912–920.
- [86] A. Mithöfer, B. Schulze, W. Boland, Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals, *FEBS Lett.* 566 (2004) 1–5.
- [87] W. Maksymiec, Effects of jasmonate and some other signalling factors on bean and onion growth during the initial phase of cadmium action, *Biol. Plant.* 55 (2011) 112–118.
- [88] Z. Zhang, D.B. Collinge, H. Thordal-Christensen, Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus, *Plant J.* 8 (1995) 139–145.
- [89] G.M. Pastori, C.H. Foyer, Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “Redox” and abscisic acid-mediated controls, *Plant Physiol.* 129 (2002) 460–468.
- [90] K.R. Atkuri, J.J. Mantovani, L.A. Herzenberg, L.A. Herzenberg, N-Acetylcysteine—a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency, *Curr. Opin. Pharmacol.* 7 (2007) 355–359.
- [91] A.M. Sadowska, B. Manuel-Y-Keenoy, W.A. De Backer, Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: discordant in vitro and in vivo dose-effects: a review, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 20 (2007) 9–22.
- [92] W.R. Swindell, The association among gene expression responses to nine abiotic stress treatments in *Arabidopsis thaliana*, *Genetics* 174 (2006) 1811–1824.
- [93] Y.H. Cheong, H.-S. Chang, R. Gupta, X. Wang, T. Zhu, S. Luan, Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 129 (2002) 661–677.
- [94] H. Candela, A. Martínez-Laborda, J. Luis Micol, Venation pattern formation in *Arabidopsis thaliana* vegetative leaves, *Dev. Biol.* 205 (1999) 205–216.
- [95] R. Aloni, K. Schwalm, M. Langhans, C.I. Ullrich, Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*, *Planta* 213 (2003) 841–853.
- [96] H. Yi, D. Park, Y. Lee, In vivo evidence for the involvement of phospholipase A and protein kinase in the signal transduction pathway for auxin-induced corn coleoptile elongation, *Physiol. Plant.* 96 (1996) 359–368.
- [97] G.F.E. Scherer, M. Zahn, J. Callis, A.M. Jones, A role for phospholipase A in auxin-regulated gene expression, *FEBS Lett.* 581 (2007) 4205–4211.
- [98] R.U. Paul, A. Holk, G.F.E. Scherer, Fatty acids and lysophospholipids as potential second messengers in auxin action. Rapid activation of phospholipase A2 activity by auxin in suspension-cultured parsley and soybean cells, *Plant J.* 16 (1998) 601–611.
- [99] C. Labusch, M. Shishova, Y. Effendi, M. Li, X. Wang, G.F.E. Scherer, Patterns and timing in expression of early auxin-induced genes imply involvement of phospholipases A (pPLAs) in the regulation of auxin responses, *Mol. Plant* 6 (2013) 1473–1486.
- [100] R. Ghelli, P. Brunetti, N. Napoli, A. De Paolis, V. Cecchetti, T. Tsuge, G. Serino, M. Matsui, G. Mele, G. Rinaldi, G.A. Palumbo, F. Barozzi, P. Costantino, M. Cardarelli, A newly identified flower-specific splice variant of AUXIN RESPONSE FACTOR8 regulates stamen elongation and endothecium lignification in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 30 (2018) 620–637.
- [101] R. Tabata, M. Ikezaki, T. Fujibe, M. Aida, C. Tian, Y. Ueno, K.T. Yamamoto, Y. Machida, K. Nakamura, S. Ishiguro, Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR6 and 8 regulate jasmonic acid biosynthesis and floral organ development via repression of class 1 KNOX genes, *Plant Cell Physiol.* 51 (2010) 164–175.
- [102] P. Nagpal, C.M. Ellis, H. Weber, S.E. Ploense, L.S. Barkawi, T.J. Guilfoyle, G. Hagen, J.M. Alonso, J.D. Cohen, E.E. Farmer, J.R. Ecker, J.W. Reed, Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation, *Development*. 132 (2005) 4107–4118.
- [103] E. Grienemberger, P. Geoffroy, J. Mutterer, M. Legrand, T. Heitz, The interplay of lipid acyl hydrolases in inducible plant defense, *Plant Signal. Behav.* 5 (2010) 1181–1186.
- [104] I.M.A. Nooren, J.M. Thornton, Diversity of protein-protein interactions, *EMBO J.* 22 (2003) 3486–3492.
- [105] G. Chen, H. Wang, C.T. Miller, D.G. Thomas, T.G. Gharib, D.E. Misk, T.J. Giordano, M.B. Orringer, S.M. Hanash, D.G. Beer, Reduced Selenium-Binding Protein 1 expression is associated with poor outcome in lung adenocarcinomas, *J. Pathol.* 202 (2004) 321–329.
- [106] J.-Y. Jeong, Y. Wang, A.J. Sytkowski, Human Selenium Binding Protein-1 (hSP56) interacts with VDU1 in a selenium-dependent manner, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379 (2009) 583–588.
- [107] P.W.G. Chang, S.K.W. Tsui, C. Liew, C. Lee, M.M.Y. Waye, K. Fung, Isolation, characterization, and chromosomal mapping of a novel cDNA clone encoding human selenium binding protein, *J. Cell. Biochem.* 64 (1997) 217–224.
- [108] E. Fletmetakis, A. Agalou, N. Kavroulakis, M. Dimou, A. Martsikovskaya, A. Slater, H.P. Spaink, A. Roussis, P. Katinakis, *Lotus japonicus* gene *Ljsbp* is highly conserved among plants and animals and encodes a homologue to the mammalian Selenium-Binding Proteins, *Mol. Plant Microbe Interact.* 15 (2002) 313–322.
- [109] L.-Y. Lee, M.-J. Fang, L.-Y. Kuang, S.B. Gelvin, Vectors for multi-color bimolecular fluorescence complementation to investigate protein-protein interactions in living plant cells, *Plant Methods* 4 (2008) 24.
- [110] T.K. Kerppola, Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells, *Annu. Rev. Biophys.* 37 (2008) 465–487.
- [111] V. Citovsky, L.-Y. Lee, S. Vyas, E. Glick, M.-H. Chen, A. Vainstein, Y. Gafni, S.B. Gelvin, T. Tzfira, Subcellular localization of interacting proteins by Bimolecular Fluorescence Complementation in *planta*, *J. Mol. Biol.* 362 (2006) 1120–1131.
- [112] A.B. Machettira, L.E. Groß, B. Tillmann, B.L. Weis, G. Englich, M.S. Sommer, M. Königer, E. Schleiff, Protein-induced modulation of chloroplast membrane morphology, *Front. Plant Sci.* 2 (2012).
- [113] N.J. Ruppel, C.A. Logsdon, C.W. Whipps, K. Inoue, R.P. Hangarter, A Mutation in *Arabidopsis* SEEDLING PLASTID DEVELOPMENT1 affects plastid differentiation in embryo-derived tissues during seedling growth, *Plant Physiol.* 155 (2011) 342–353.
- [114] S. Wan, M.-W. Mak, S.-Y. Kung, Ensemble linear neighborhood propagation for predicting subchloroplast localization of multi-location proteins, *J. Proteome Res.* 15 (2016) 4755–4762.