

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

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

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

Το μονοξείδιο του αζώτου (nitric oxide, NO), όπως και το  $H_2O_2$ , δρουν ως θετικοί ρυθμιστές στην άμυνα των φυτών έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων. Το NO απαντάται σε αέρια μορφή, η οποία του δίνει τη δυνατότητα να διαχέεται εύκολα και γρήγορα μέσα και ενδιάμεσα στα κύτταρα. Αλληλεπιδρά με μέταλλα και σύμπλοκα καθώς και με πρωτεΐνες και νουκλεϊνικά οξέα. Εμπλέκεται σε διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες όπως η επιμήκυνση των ριζών, το κλείσιμο των στομάτων, την απόπτωση και τον κυτταρικό θάνατο. Έχει την ικανότητα να προσδένεται σε θειόλες κυστεϊνών προκαλώντας S-νιτροσουλίωση, μια διαδικασία που μεταβάλλει την ενζυμική δραστηριότητα των πρωτεϊνών στόχων. Το NO μπορεί επίσης να αλληλεπιδρά με EMO και να σχηματίζει ενεργές μορφές αζώτου και μία από αυτές, το υπεροξεινιτρώδες, προκαλεί την μετα-μεταφραστική τροποποίηση της νίτρωσης καταλοίπων τυροσίνης.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν να διερευνηθεί η ύπαρξη ομολόγων PHGPX ισομορφών στο φυτό *Medicago truncatula* και να μελετηθεί η συμπεριφορά τους σε απάντηση του NO σε μεταγραφικό επίπεδο όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Στα πλαίσια αυτά απομονώθηκαν δύο ισομορφές (MtPHGPXα και MtPHGPXβ) και συγκρίθηκαν με γνωστές PHGPX από άλλους οργανισμούς. Βρέθηκε πως περιέχουν όλες τις συντηρημένες περιοχές, και εναλλακτικά περιέχουν από ένα διαφορετικό πεπτίδιο στο αμινοτελικό τους άκρο. Με στόχο να διερευνηθεί μια πιθανή εμπλοκή των πεπτιδίων αυτών στον υποκυτταρικό εντοπισμό των ισομορφών, οι κωδικές περιοχές τους αλλά και η πλήρης αλληλουχία του γονιδίου συντήχθηκαν με την GFP πρωτεΐνη και υπερεκφράστηκαν σε φύλλα καπνού. Και οι δύο

ισομορφές βρέθηκαν να είναι κυτταροπλασματικές και η κατασκευή του γονιδίου, επίσης έδωσε μια πρωτεΐνη με κυτταροπλασματικό εντοπισμό. Η μελέτη της επίδρασης του NO και του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στην αντιπροσώπευση των μεταγραφημάτων σε φύλλα και ρίζες έδειξε διαφορετικά πρότυπα. Στην προσπάθεια διαλεύκανσης των μηχανισμών, στους οποίους το NO μπορεί να ρυθμίζει τα επίπεδα των MtPHGPX χρησιμοποιήθηκε μια προσέγγιση για τον έλεγχο της σταθεροποίησης των mRNA μορίων και βρέθηκε πως το NO ήταν σε θέση να επιμηκύνει την ημίσεια ζωή των μεταγράφων.

Ένα επιπλέον αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν να προσδιοριστεί το βέλτιστο υπόστρωμα και ο βέλτιστος δότης ηλεκτρονίων για την MtPHGPX. Η πρωτεΐνη υπερεκφράστηκε σε βακτήρια και ακολούθησε καθαρισμός. Βρέθηκε ότι το βέλτιστο υπόστρωμα είναι το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και ο βέλτιστος δότης ηλεκτρονίων είναι η θειορεδοξίνη. Το NO δεν φαίνεται να επηρεάζει τη δραστηριότητα του ενζύμου και μόνο το υπεροξεινιτρώδες προκαλεί σημαντική αναστολή της δραστηριότητας. Οι κυστεΐνες της MtPHGPX βρέθηκε ότι υπόκεινται σε S-νιτροσουλίωση και οι τυροσίνες σε νίτρωση. Τέλος, η MtPHGPX πιθανότατα αλληλεπιδρά με μια άγνωστη πρωτεΐνη του φυτού και η αλληλεπίδραση αυτή παρεμποδίζεται από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Η μελέτη αυτή έδωσε σημαντικές πληροφορίες για τη συμπεριφορά των δύο MtPHGPX ισομορφών υπό συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης, όπως αυτές προσομοιώθηκαν από την προσθήκη NO και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Διαπιστώθηκε πως τα δύο μετάγραφα είναι προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος και η αντιπροσώπευσή τους ρυθμίζεται από το NO και το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στα φύλλα και τις ρίζες. Οι ισομορφές παρουσιάζουν στενή συγγένεια με ομόλογες άλλων ψυχανθών και περιέχουν όλες τις συντηρημένες περιοχές εκτός των πεπτιδίων στο αμινοτελικό τους άκρο. Μεγάλο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι και οι δύο ισομορφές είναι κυτταροπλασματικές, ένα φαινόμενο που φαίνεται να είναι χαρακτηριστικό των ψυχανθών.

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

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