



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μελέτη της δράσης φωσφολιπασών D
κατά την απόκριση του φυτού *Gossypium hirsutum*
σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις**

**ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΜΠΟΥΡΤΣΑΛΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2017

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη της δράσης φωσφολιπασών D κατά την απόκριση του φυτού
Gossypium hirsutum σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις

Αγγελική Μπουρτσάλα

A.M.: 001104

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

Ντία Γαλανοπούλου, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Ντία Γαλανοπούλου, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Μαίρη Μαυρή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Αθανασία Σιαφάκα, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γ. Κόκοτος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Π. Κυρίτσης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Μ.-Ε. Λέκκα, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Κ. Χαραλαμπίδης, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας ΕΚΠΑ

Ν. Γαλανοπούλου, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Α. Σιαφάκα, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Μ. Μαυρή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 17/01/2017

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι φωσφολιπάσες D (PLD, E.C. 3.1.4.4) είναι υδρολυτικά ένζυμα που δρουν σε φωσφολιπίδια των μεμβρανών και απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς. Οι φυτικές PLD εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ποικιλία ισομορφών, που κατατάσσονται σε έξι τάξεις (α-ζ). Από αυτές, οι α και δ είναι οι πιο διαδεδομένες. Η δράση των PLD στα φυτά συνδέεται με αποκρίσεις σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις μέσω του παραγόμενου φωσφατιδικού οξέος (PtdOH), που δρα ως ενδοκυτταρικό σήμα. Στην περίπτωση παρουσίας πρωτοταγούς αλκοόλης, αναστέλλεται μερικώς η υδρολυτική δράση των PLD και καταλύεται η χαρακτηριστική για το ένζυμο αντίδραση μεταφωσφατιδυλίωσης.

Στο καλλιεργούμενο βαμβάκι (*Gossypium hirsutum*) εντοπίστηκε για πρώτη φορά δραστικότητα PLD στο κλάσμα των μικροσωμάτων. Μετά από μηχανικό τραυματισμό - που προσομοιάζει με βλάβη στον ιστό προερχόμενη είτε από βιοτικούς είτε από αβιοτικούς παράγοντες- παρατηρήθηκε άμεση αύξηση της δραστικότητας της ισομορφής α της PLD στα φύλλα, τοπικά και συστημικά. Ο προσδιορισμός των ενδογενών επιπέδων PtdOH αποκάλυψε ανάλογη, ραγδαία αύξηση της συγκέντρωσης του λιπιδίου τοπικά, ενώ διπλασιασμός των επιπέδων του παρατηρήθηκε ως ύστερη, τόσο τοπική όσο και συστημική, απόκριση στον τραυματισμό. Επιπλέον, βρέθηκε πως η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη είναι το προτιμώμενο υπόστρωμα της PLDα και, επίσης, καταναλώνεται σε προτεραιότητα κατά τα πρώτα στάδια μετά τον τραυματισμό. Μετά από 30 min, όμως, βρέθηκε μετατόπιση της προτίμησης προς τη φωσφατιδυλοχολίνη, πιθανώς λόγω της δράσης άλλων ισομορφών και, κυρίως, της δ.

Έλεγχος των επιπέδων RNA των ισομορφών PLDα και δ έδειξε πως τοπικά η έκφραση και των δύο ισομορφών επάγεται 30 min μετά τον τραυματισμό, ενώ συστημικά επάγεται η έκφραση μόνο της δ. Αυτό υποδεικνύει πως η PLDδ είναι κυρίως υπεύθυνη για τη συστημική απόκριση στον τραυματισμό, όπως επιβεβαιώνεται και από *in vitro* έλεγχο της δραστικότητάς της. Τέλος, πειράματα έκφρασης έδειξαν πως η λιποξυγενάση, η οξειδάση του NADPH και η συνθάση της κυτταρίνης επάγονται, επίσης, από τον τραυματισμό. Η *in vivo* επίδραση 1-βουτανόλης, που αναστέλλει την παραγωγή PtdOH, ανέστειλε και την επαγωγή των τριών γονιδίων, υποδεικνύοντας ότι αυτά είναι πιθανώς καθοδικοί στόχοι της δράσης της PLD κατά την καταπόνηση του φυτού.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Βιοχημεία Φυτών, μεταγωγή σήματος

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: φωσφολιπάση D, PLDα και PLDδ, φωσφατιδικό οξύ, καλλιεργούμενο βαμβάκι (*G. hirsutum*), τραυματισμός

ABSTRACT

Phospholipases D (PLD, E.C. 3.1.4.4) hydrolyze membrane phospholipids and are present in all organisms studied. Plant PLDs exist in a wide range of isoforms, classified into six classes (α - ζ). Among them, α and δ are the most common. PLD activity in plants is involved in environmental stress responses via its product, phosphatidic acid (PtdOH), a signalling molecule. In the presence of a primary alcohol, PLD hydrolytic activity is partially inhibited, as PLD transphosphatidylation reaction is preferentially catalyzed.

In this study, we have found for the first time PLD activity in microsomal fraction of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*). Upon mechanical wounding -resembling tissue damage caused by biotic or abiotic factors- acute increase of PLD α isoform activity was observed in leaves, both locally and systemically. Endogenous PtdOH determination revealed analogous, rapid increase of its concentration locally, while duplication in PtdOH levels was observed as a late, local and systemic, response to wounding. Moreover, it was found that phosphatidylethanolamine is the preferred PLD α substrate and it is also preferentially consumed during early stages after wounding. However, after 30 min, a shift in selectivity towards phosphatidylcholine was observed, possibly due to other PLD isoforms' activity, mainly δ .

Expression analysis of PLD α and δ isoforms showed mRNA accumulation of both isoforms in the wounded tissue, but only PLD δ was induced in systemic leaves, suggesting that PLD δ is mainly responsible for systemic response to wounding. This was confirmed by PLD δ activity assay. Finally, expression experiments showed that lipoxygenase, NADPH oxidase and cellulose synthase are wound-induced, as well. In vivo effect of 1-butanol, that suppresses PLD-derived PtdOH production, inhibits the induction of all three genes tested, implying that they are possible downstream PLD targets during *G. hirsutum* stress.

SUBJECT AREA: Plant Biochemistry, signal transduction

KEYWORDS: phospholipase D, PLD α and PLD δ , phosphatidic acid, cultivated cotton (*G. hirsutum*), wounding

*Στο Θεό, την οικογένειά μου
και τη Ντία*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	17
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	19
1.1 Φωσφολιπάσες D (PLD).....	19
1.2 Φυτικές PLD.....	26
1.2.1 Ισομορφές φυτικών PLD	26
1.2.2 Υποκυτταρικός εντοπισμός.....	32
1.2.3 Λειτουργίες φυτικών PLD	33
1.3 Φωσφατιδικό οξύ	35
1.3.1 Μέθοδοι προσδιορισμού φωσφατιδικού οξέος.....	37
1.3.1.1 Προσδιορισμός με φυσικά υποστρώματα.....	38
1.3.1.2 Προσδιορισμός με συνθετικά υποστρώματα	39
1.4 Απόκριση φυτών σε καταπονήσεις με δράση της PLD	40
1.4.1 Πορείες σηματοδότησης.....	40
1.5 Τραυματισμός.....	43
1.5.1 Τοπική σηματοδότηση.....	43
1.5.1.1 Πορείες με συμμετοχή φυτικών ορμονών	44
1.5.1.2 Οξειδωτική έκρηξη.....	53
1.5.1.3 Επούλωση.....	55
1.5.2 Συστημική μετάδοση σήματος.....	58
1.5.3 <i>Gossypium hirsutum</i>	60
2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	63
3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	65
3.1 Ανάπτυξη των φυτών <i>G. hirsutum</i> και εφαρμογή τραυματισμού.....	65
3.2 Απομόνωση PLD από φυτά βαμβακιού.....	65
3.2.1 Απομόνωση δραστικότητας PLD με κλασμάτωση.....	65
3.2.2 Απομόνωση δραστικότητας PLD μετά από εφαρμογή τραυματισμού	67
3.3 Προσδιορισμός πρωτεΐνης.....	67
3.4 Εκχύλιση λιπιδίων από φύλλα <i>G. hirsutum</i>	68
3.4.1 Εκχύλιση λιπιδίων μετά από εφαρμογή τραυματισμού.....	70
3.4.2 Εκχύλιση λιπιδίων μετά από επίδραση βουτανόλης.....	70
3.5 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)	71
3.6 Εκχύλιση λιπιδίων από τη χρωματογραφική πλάκα.....	73

3.7 Προσδιορισμός φωσφόρου.....	74
3.8 Προσδιορισμός δραστικότητας PLDα	76
3.8.1 Ενζυμική αντίδραση PLDα με χρήση ψυχρού υποστρώματος	76
3.8.2 Προσδιορισμός δραστικότητας PLDα με χρήση ραδιενεργού υποστρώματος.....	78
3.8.2.1 Ενζυμική αντίδραση PLDα με [³ H]PtdCho ως υπόστρωμα.....	78
3.8.2.2 Μέτρηση ραδιενέργειας	79
3.8.3 Φθορισμομετρική μέθοδος προσδιορισμού δραστικότητας PLDα.....	81
3.8.3.1 Έλεγχος ορίων ευαισθησίας της μεθόδου	81
3.8.3.2 Ενζυμική αντίδραση PLDα με χρήση φθορίζοντος υποστρώματος	84
3.8.3.3 Φθορισμομετρία.....	85
3.8.4 <i>In vitro</i> αναστολή της δραστικότητας PLDα από αλκοόλη.....	87
3.9 Προσδιορισμός δραστικότητας PLDδ	87
3.9.1 Απομόνωση PtdInsP ₂ από μίγμα φωσφοϊνοσιτιδίων.....	87
3.9.2 Παρασκευή υποστρώματος.....	89
3.9.3 Ενζυμική αντίδραση PLDδ με [³ H]PtdCho ως υπόστρωμα.....	90
3.9.4 Ενζυμική αντίδραση PLDδ με χρήση φθορίζοντος υποστρώματος.....	92
3.10 <i>In silico</i> αναζήτηση γονιδίων του οργανισμού <i>G. hirsutum</i>	93
3.11 Απομόνωση ολικού RNA από φύλλα <i>G. hirsutum</i>	94
3.11.1 Απομόνωση RNA με χρήση φαινόλης.....	94
3.11.2 Απομόνωση RNA με προπαρασκευασμένα αντιδραστήρια (kit).....	97
3.12 Ποσοτικός προσδιορισμός και έλεγχος καθαρότητας RNA.....	99
3.12.1 Ποσοτικοποίηση RNA με χρήση φωτομέτρου UV	99
3.12.2 Ποσοτικοποίηση RNA με χρήση συσκευής nanodrop	100
3.13 Ηλεκτροφόρηση RNA	100
3.14 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR)	102
3.15 Έλεγχος επιπέδων έκφρασης γονιδίων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR)	103
3.15.1 Σχεδιασμός εκκινητών για τη Real-Time PCR.....	103
3.15.2 Έλεγχος εκκινητών.....	103
3.15.3 Real-Time PCR.....	104
3.16 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	108
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	109
4.1 Μελέτη και χαρακτηρισμός της δραστικότητας PLD σε φυτά <i>Gossypium hirsutum</i>	109

4.1.1 Απομόνωση της δραστικότητας PLDα	109
4.1.2 Χαρακτηρισμός της δραστικότητας PLDα παρουσία πρωτοταγούς αλκοόλης	110
4.1.2.1 Επίδραση αλκοόλης <i>in vitro</i>	111
4.1.2.2 Επίδραση αλκοόλης <i>in vivo</i>	112
4.2 Μελέτη της δραστικότητας PLD φύλλων βαμβακιού μετά από τραυματισμό	114
4.2.1 Δραστικότητα PLDα	116
4.2.2 Δραστικότητα PLDδ.....	118
4.2.3 Παραγωγή φωσφατιδικού οξέος κατά τον τραυματισμό	122
4.3 Έλεγχος εκλεκτικότητας υποστρώματος PLD μετά από τραυματισμό	125
4.3.1 <i>In vivo</i> κατανάλωση υποστρώματος.....	125
4.3.2 Υδρόλυση υποστρωμάτων <i>in vitro</i>	127
4.4 Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης των ισομορφών PLDα και PLDδ στο βαμβάκι μετά από τραυματισμό	128
4.5 Μελέτη πιθανών πορειών μεταγωγής σήματος του τραυματισμού στο βαμβάκι. 132	
4.5.1 Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων λιποξυγενάσης, οξειδάσης του NADPH και συνθάσης της κυτταρίνης μετά τον τραυματισμό.....	134
4.5.2 Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων λιποξυγενάσης, οξειδάσης του NADPH και συνθάσης της κυτταρίνης μετά τον τραυματισμό σε συνθήκες αναστολής της δραστικότητας PLD από 1-βουτανόλη	140
5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	145
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	151
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....	155
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	157
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	161
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	163

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. Αντιδράσεις υδρόλυσης και μεταφωσφατιδυλίωσης καταλυόμενες από PLD.	19
Σχήμα 2. Δομές στερεοϊσομερών της PtdGro.....	20
Σχήμα 3. Ρόλος του φωσφατιδικού οξέος στο μεταβολισμό φωσφολιπιδίων και την αναμόρφωση των μεμβρανών.....	21
Σχήμα 4. Τεταρτοταγής δομή της PMFPLD.....	22
Σχήμα 5. Μηχανισμός δράσης της PLD.	23
Σχήμα 6. Πρωτοταγής δομή PLD από διάφορους οργανισμούς.	24
Σχήμα 7. Απεικόνιση της κωνικής δομής και του διπλού φορτίου του PtdOH στις μεμβράνες.....	35
Σχήμα 8. Συμμετοχή ισομορφών PLD στις αποκρίσεις σε υπερωσμωτικές καταπονήσεις.....	41
Σχήμα 9. Συμμετοχή του συστήματος PLD-PtdOH στην απόκριση των φυτών σε παθογόνα μέσω ρύθμισης της οργάνωσης του κυτοσκελετού και της κυκλοφορίας μεμβρανών.....	42
Σχήμα 10. Πιθανός μηχανισμός αντίληψης μηχανικού ερεθίσματος.....	44
Σχήμα 11. Μοντέλο αποκωδικοποίησης σημάτων μέσω του δικτύου των μικροσωληνίσκων.....	54
Σχήμα 12. Επίδραση της PLDα στη σύνδεση του κυτοσκελετού με την πλασματική μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμα.....	56
Σχήμα 13. Μοντέλο διάδοσης του σήματος του τραυματισμού συστημικά με H ₂ O ₂ στο φυτό <i>A. thaliana</i>	59
Σχήμα 14. Φυλογενετική σχέση και δομή των γονιδίων PLD του βαμβακιού.	62
Σχήμα 15. Λειτουργικό μοντέλο σηματοδότησης του τραυματισμού στα φυτά.....	64
Σχήμα 16. Εφαρμογή τραυματισμού σε αρτίβλαστο <i>G. hirsutum</i>	65
Σχήμα 17. Διαχωρισμός PtdOH, PtdEth και PtdCho σε TLC με σύστημα ανάπτυξης CHCl ₃ -CH ₃ OH-NH ₄ OH 65:35:5.....	73
Σχήμα 18. 1-ελαύλο-2-[12-[(7-νιτρο-2-1,3-βενζοξαδιαζο-4-υλο)αμινο]δωδεκανούλο]-sn-γλυκερο-3-φωσφατιδυλοχολίνη (18:1-12:0 NBD-PtdCho)	81
Σχήμα 19. Καμπύλη προτύπων NBD-PtdOH (0,04-40 nmol).....	83
Σχήμα 20. Καμπύλη προτύπων NBD-PtdOH (0,4-8 nmol).....	83
Σχήμα 21. Καμπύλη μονάδων ειδικής δραστηριότητας πρότυπης PLD	84
Σχήμα 22. Καθαρισμός δραστηριότητας PLDα από φυτά βαμβακιού.....	110

Σχήμα 23. Επίδραση τραυματισμού στη δραστικότητα PLDα φύλλων βαμβακιού τοπικά και συστημικά.	117
Σχήμα 24. Φωτογραφίες από μικροσκόπιο ανεστραμμένης φάσης (40x) μικκυλιακών δομών υποστρωμάτων PLDδ και PLDα.	119
Σχήμα 25. Επίδραση τραυματισμού στη δραστικότητα PLDδ φύλλων βαμβακιού τοπικά και συστημικά.	120
Σχήμα 26. Επίδραση τραυματισμού στα επίπεδα PtdOH φύλλων βαμβακιού.	123
Σχήμα 27. Επίδραση τραυματισμού στην περιεκτικότητα φύλλων βαμβακιού σε φωσφολιπίδια.	126
Σχήμα 28. Επίδραση τραυματισμού στα επίπεδα έκφρασης PLDα και PLDδ φύλλων βαμβακιού.....	131
Σχήμα 29. Σύγκριση αμινοξικών αλληλουχιών των <i>GhCeS</i> με κωδικούς πρόσβασης AAD39534.2 και AFB18638.1.....	135
Σχήμα 30. Ηλεκτροφόρημα ολικού RNA πριν και μετά την πέψη με DNάση.....	137
Σχήμα 31. Τοπική και συστημική επαγωγή έκφρασης των γονιδίων: (A) <i>GhLOX1</i> , (B) <i>GhNADPHox.</i> , (Γ) <i>GhCeSA10</i> σε φύλλα βαμβακιού μετά από τραυματισμό.....	138
Σχήμα 32. Καμπύλες αποδιάταξης των προϊόντων Real-Time PCR.....	139
Σχήμα 33. Επίδραση 1-βουτανόλης στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων <i>GhNADPHox.</i> και <i>GhCeSA10</i> φύλλων βαμβακιού.....	141
Σχήμα 34. Επίδραση 1-βουτανόλης στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων <i>GhNADPHox.</i> και <i>GhCeSA10</i> φύλλων βαμβακιού μετά από τραυματισμό.....	142
Σχήμα 35. Προφίλ έκφρασης των <i>TtPLD</i> σε συνθήκες ανάπτυξης (LI-h), ασπίας (S0-24) και σύζευξης (C0-18).	152
Σχήμα 36. Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων <i>T. thermophila</i> απουσία ή παρουσία αιθανόλης.	153
Σχήμα 37. Πορεία βιοσύνθεσης ιασμονικού οξέος.....	155
Σχήμα 38. Πορεία βιοσύνθεσης αιθυλενίου.....	156

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Απαιτήσεις για την <i>in vitro</i> δράση των φυτικών PLD	27
Πίνακας 2. Τιμές R _f πρότυπων φωσφολιπιδίων σε σύστημα ανάπτυξης CHCl ₃ -CH ₃ OH-NH ₄ OH 65:35:5.....	73
Πίνακας 3. Επίδραση αιθανόλης στην υδρολυτική δράση της PLDα.	111
Πίνακας 4. Ενδογενή επίπεδα φωσφολιπιδίων φύλλων βαμβακιού.	113
Πίνακας 5. <i>In vivo</i> επίδραση 1-βουτανόλης στα ενδογενή επίπεδα PtdOH φύλλων βαμβακιού.....	114
Πίνακας 6. Σύγκριση ειδικής δραστηριότητας PLDα μικροσωμικών κλασμάτων κατά τον καθαρισμό της από φυτά ή φύλλα βαμβακιού.	115
Πίνακας 7. Ειδικές δραστηριότητες PLDα μετά από τραυματισμό φύλλων βαμβακιού με χρήση φθορίζοντος υποστρώματος.....	122
Πίνακας 8. Προτίμηση υποστρώματος της PLDα μετά από τραυματισμό στο βαμβάκι με χρήση NBD-PtdCho ή NBD-PtdEth.	128
Πίνακας 9. Ζεύγη εκκινητών για τη μελέτη έκφρασης γονιδίων <i>GhPLDα</i> και <i>GhPLDδ</i>	129
Πίνακας 10. Ζεύγη εκκινητών για τη μελέτη έκφρασης των γονιδίων <i>GhLOX1</i> , <i>GhLOX2</i> , <i>GhNADPHox</i> . και <i>GhCeSA10</i> με ποσοτική Real-Time PCR.....	136
Πίνακας 11. Ικανότητα υβριδοποίησης εκκινητών.....	137
Πίνακας 12. Επίδραση του τραυματισμού στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων <i>GhNADPHox</i> . και <i>GhCeSA10</i> φύλλων βαμβακιού, παρουσία και απουσία του αναστολέα της δράσης PLD, 1-βουτανόλης.....	143
Πίνακας 13. Κωδικοί πρόσβασης γονιδίων και των αντίστοιχων πρωτεϊνών <i>TtPLD</i> ...	151
Πίνακας 14. Καταλυτικά κέντρα HKD των πρωτεϊνών <i>TtPLD</i>	151

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε κατά τα έτη 2011-2016 στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Ντίας Γαλανοπούλου, και χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα του ΙΚΥ «Υποτροφίες Αριστείας Ι.Κ.Υ. Μεταπτυχιακών Σπουδών στην Ελλάδα - Πρόγραμμα Siemens» για τα έτη 2012-2016.

Στο πλαίσιο της διατριβής, έγινε απομόνωση της δραστικότητας PLD από καλλιεργούμενο βαμβάκι (*Gossypium hirsutum*) και μελετήθηκε η δράση των ισομορφών PLDα και δ μετά από εφαρμογή τραυματισμού στα φύλλα του φυτού. Επιπλέον, έγινε προσπάθεια σύνδεσης της επαγόμενης από τραυματισμό δράσης PLD με μονοπάτια μετάδοσης του σήματος συστημικά, καθώς και με πορείες επούλωσης του τραύματος.

Η διεξαγωγή των πειραμάτων έγινε στο εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας, τα πειράματα ελέγχου της έκφρασης των ισομορφών PLD πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο της Ερευνήτριας Β' και συνεργάτιδας στο ερευνητικό πρόγραμμα Θ. Φαρμάκη στο ΕΚΕΤΑ-ΙΝΑ (Θέρμη Θεσσαλονίκης), ενώ ποικίλες ανάγκες που προέκυψαν καλύφθηκαν με την παραχώρηση εξοπλισμού και χώρων άλλων εργαστηρίων του Τμήματος Χημείας και του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ, καθώς και εργαστηρίων στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» και στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ. Για τη φιλοξενία, την καθοδήγηση και την πρόθυμη συνεισφορά, όποτε τους ζητήθηκε, θα ήθελα να ευχαριστήσω έναν προς ένα τους υπεύθυνους και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές/επιστημονικούς συνεργάτες των εργαστηρίων:

- Από το Τμήμα Χημείας:
 - Τον Καθηγητή Μ. Πιτσικάλη και το Δρ. Παναγιώτη Μπιλάλη (Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας) για την ευγενική και πάντα πρόθυμη προμήθεια με υγρό N₂ κάθε φορά που το απαιτούσε η διεξαγωγή των πειραμάτων
 - Την Καθηγήτρια Ε. Λιανίδου (Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας) για την άδεια χρήσης της συσκευής nanopdro του εργαστηρίου
- Από το Τμήμα Βιολογίας (Τομέα Βοτανικής):
 - Τον Καθηγητή Π. Αποστολάκο για την υποστήριξη και το Δρ. Παντελή Λιβανό για τη βοήθεια στη λήψη φωτογραφιών με το μικροσκόπιο ανεστραμμένης φάσης του εργαστηρίου
 - Τον Επίκουρο Καθηγητή Κ. Χαραλαμπίδη και την υποψήφια διδάκτορα Βαρβάρα Ποδιά για τη φιλοξενία των φυτών σε ειδικό θάλαμο ανάπτυξης και τις πολύτιμες συμβουλές για την επιτυχή απομόνωση RNA
 - Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ο. Τσιτσιλώνη (Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου) για τη φύλαξη δειγμάτων μας στην υπερκατάψυξη του εργαστηρίου

- Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δ. Βασιλακοπούλου, τη Δρ. Λάρα Κραβαρίτη και το Δρ. Σωτήρη Τσατσαρούνο (Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας) για την παραχώρηση χρήσης της υπερφυγοκέντρου και την άψογη συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής
- Από το ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»:
 - Την Ερευνήτρια Α' Α. Χρόνη (Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών) για την παραχώρηση της συσκευής Real-Time PCR και το Δρ. Γιάννη Δάφνη για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές ως προς το σχεδιασμό των πειραμάτων
 - Τον Ερευνητή Α' Ε. Στρατίκο (ΙΠΡΕΤΕΑ) για την παραχώρηση του φθορισμομέτρου και την καθοδήγηση στα πειράματα φθορισμού
- Από το Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ:
 - Τον Δρ. Νικόλαο Τράκα (Εργαστήριο Μοριακής Νευροβιολογίας και Ανοσολογίας) για την άψογη συνεργασία στη διάρκεια χρήσης της υπερφυγοκέντρου του εργαστηρίου.

Θα ήταν παράλειψη να μην αναφερθώ και στα παλαιότερα μέλη του Εργαστηρίου Βιοχημείας, τον χημικό Γιάννη Σιώκο και τον Λέκτορα στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων Γιώργο Λεονταρίτη για τη στήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές τους, όποτε τις χρειάστηκα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις καθηγήτριές μου Μαίρη Μαυρή και Νάση Σιαφάκα, που με ενδιαφέρον παρακολουθούν στενά την εξέλιξή μου μέχρι σήμερα και, συνολικά, τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής της διατριβής για τη συμμετοχή τους σε αυτή και για τις εποικοδομητικές διορθώσεις τους.

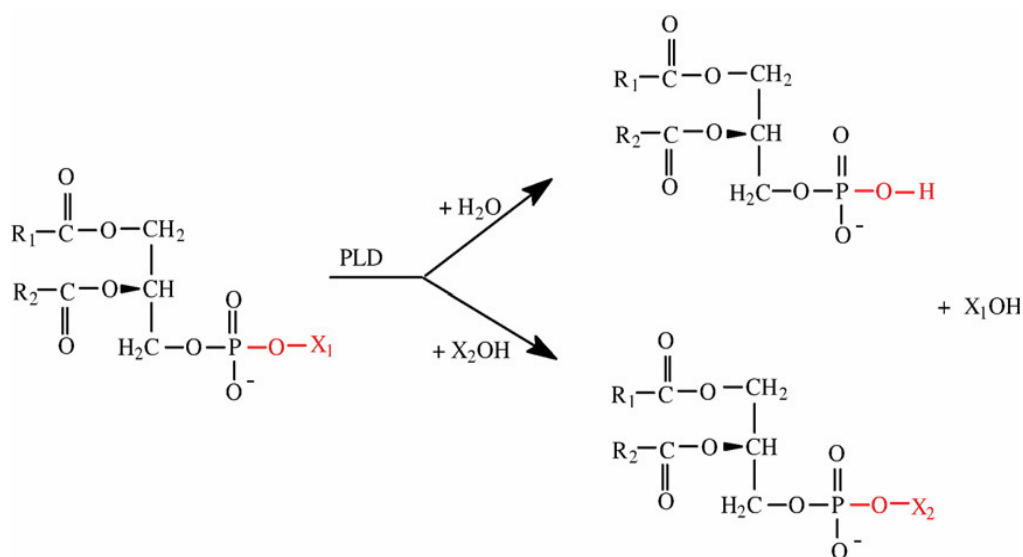
Τέλος, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω πιο πολύ απ' όλους την επιβλέπουσά μου κυρία Γαλανοπούλου για τη διαρκή και ουσιαστική παρουσία της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής, γιατί έκανε τα αδύνατα δυνατά και μου προσέφερε όλα τα εφόδια που χρειάζεται ένας νέος ερευνητής και δε με έκανε στιγμή να μετανιώσω για την επιλογή μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στους γονείς μου και τα αδέρφια μου για την ενθάρρυνση και τη διαρκή στήριξη.

Δόξα τῷ Θεῷ πάντων ἕνεκεν

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φωσφολιπάσες D (PLD)

Οι PLD είναι μία οικογένεια ενζύμων, που ανήκουν στις εστεράσες (E.C. 3.1.4.4) και υδρολύουν φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Η δραστηριότητα PLD ανιχνεύθηκε πρώτη φορά σε φυτά [1], όπου απαντώνται και οι περισσότερες ισομορφές. Σήμερα είναι καταχωρημένες στη βάση του NCBI πάνω από 4.000 αλληλουχίες PLD, που προέρχονται από ιούς, προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς [2]. Οι αντιδράσεις που καταλύουν οι PLD φαίνονται στο σχήμα 1 και είναι:



Σχήμα 1. Αντιδράσεις υδρόλυσης και μεταφωσφατιδυλίωσης καταλυόμενες από PLD.

Τα R₁, R₂ αντιπροσωπεύουν τις ακυλομάδες των φωσφολιπιδίων. Τα X₁OH, X₂OH αποτελούν την παραγόμενη αλκοόλη και την αλκοόλη-δέκτη, αντίστοιχα [5]

- Η υδρόλυση φωσφολιπιδίου προς σχηματισμό φωσφατιδικού οξέος (PtdOH) και μίας υδατοδιαλυτής αλκοόλης. Το PtdOH που παράγεται ενδέχεται να έχει και σηματοδοτικό ρόλο στα κύτταρα [3], ενώ υποστρώματα του ενζύμου μπορεί να είναι φωσφολιπίδια των μεμβρανών (φωσφατιδυλοχολίνη, PtdCho, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, PtdEth, φωσφατιδυλοσερίνη, PtdSer, φωσφατιδυλογλυκερόλη, PtdGro, φωσφατιδυλοϊνσιπόλη, PtdIns) [4-6], N-ακυλο-PtdEth (NAPE) [7], λυσο-PtdCho, καρδιολιπίνη (CL) [5] ακόμα και σφιγγολιπίδια [2, 8]. Η προτίμηση ως προς το υπόστρωμα εξαρτάται κάθε φορά από την προέλευση της PLD και δεν είναι αυστηρή για ένα λιπίδιο
- Η μεταφωσφατιδυλίωση, κατά την οποία πρωτοταγείς -ή σπανιότερα διακλαδισμένες [9]- αλκοόλες μικρής αλυσίδας δέχονται τη φωσφορική ομάδα, οπότε προκύπτουν οι αντίστοιχες φωσφατιδυλοαλκοόλες. Οι ενώσεις αυτές παράγονται αποκλειστικά από PLD, καθώς πρόκειται για χαρακτηριστική αντίδραση του ενζύμου, ενώ, με κατάλληλη επιλογή

της αλκοόλης, μπορεί να συντεθούν φωσφολιπίδια που δεν απαντώνται φυσιολογικά στις μεμβράνες. Η μοναδική προέλευσή τους και η σχετική μεταβολική τους σταθερότητα καθιστούν τις φωσφατιδυλοαλκοόλες ευαίσθητο μέσο ανίχνευσης της δραστηριότητας PLD [3]. Ειδικότερα, η προτίμηση των PLD για πρωτοταγείς αλκοόλες ως υπόστρωμα είναι πολύ μεγαλύτερη -μέχρι και 1.000 φορές- έναντι του νερού, γεγονός που επιτρέπει την κατάλυση μεταφωσφατιδυλίωσης σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις αλκοόλης [2]. Αξιοσημείωτα υψηλά ποσοστά μεταφωσφατιδυλίωσης, σε σχέση με τις φυτικές, έχουν οι μικροβιακές PLD [5]. Ωστόσο, κάποιες PLD δεν κάνουν καθόλου μεταφωσφατιδυλίωση. Τέτοιες είναι ορισμένες βακτηριακές και μιτοχονδριακές PLD των θηλαστικών [6]

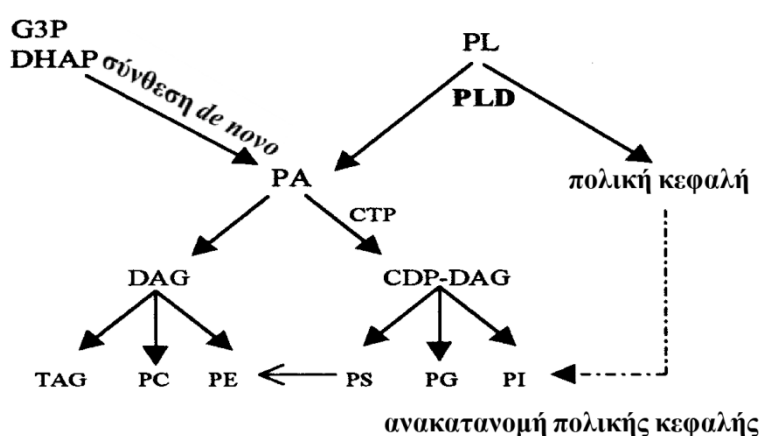
Αναφέρθηκε παραπάνω πως οι PLD εμφανίζουν προτίμηση ως προς κάποιο υπόστρωμα. Πέραν, όμως, της διάκρισης των φωσφολιπιδίων με βάση την πολική τους κεφαλή [10], εμφανίζεται προτίμηση και έναντι συγκεκριμένων λιπαρών οξέων που αυτά φέρουν. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί *in vitro* προτίμηση για PtdCho με τους εξής συνδυασμούς λιπαρών οξέων: 16:0/18:2, 16:0/18:1, 18:0/18:2 και 18:1/18:1. Ανάλογα *in vivo* δεδομένα δείχνουν ότι προτιμώνται μόρια PtdCho με: 16:0/18:1, 18:0/18:1, 18:1/18:1 και 18:0/18:2 [4, 11]. Όσον αφορά τη στερεοεκλεκτικότητα, η υδρόλυση φαίνεται ότι δίνει αυστηρά το ένα εναντιομερές της μορφής R, S (σχήμα 2) (στην περίπτωση της PtdGro: 1,2-διακυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφο-1'-sn-γλυκερόλη), αφού στη φύση μόνο τέτοια φωσφολιπίδια απαντώνται. Αντίθετα, η μεταφωσφατιδυλίωση δίνει μίγμα προϊόντων R,S και R,R. Η αναλογία του κάθε εναντιομερούς διαφέρει ανάλογα με την πηγή του ενζύμου [12, 13]. Οι προτιμήσεις αυτές δεν μπορούν να γενικευτούν για το σύνολο των PLD, καθώς κάθε ένζυμο εμφανίζει διαφορετική συγγένεια για τα πιθανά υποστρώματά του. Είναι, απλώς, ενδεικτικές της μεγάλης εξειδίκευσης των PLD ως προς το υπόστρωμα.



Σχήμα 2. Δομές στερεοϊσομερών της PtdGro.

(A) 1,2-διακυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφο-1'-sn-γλυκερόλη (R, S προσανατολισμός), (B) 1,2-διακυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφο-3'-sn-γλυκερόλη (R, R προσανατολισμός) [12]

Σύμφωνα με όσα προηγήθηκαν, η δραστηριότητα PLD έχει μελετηθεί εκτενώς. Ως εκ τούτου, ο φυσιολογικός ρόλος της υδρολυτικής δράσης της έχειδειχθεί πως είναι πολυσχιδής και οφείλεται κυρίως στο προϊόν της, το PtdOH. Συγκεκριμένα, το PtdOH εμπλέκεται στη σύντηξη μεμβρανών [4, 14], την ενδοκύτωση [15], την εξωκύτωση [3, 15], καθώς και στη δημιουργία συνάψεων σε εγκέφαλο αρουραίου [16]. Η δράση PLD επιφέρει αλλαγές στον κυττοσκελετό, αφού επάγει τον πολυμερισμό της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων [3, 17, 18]. Ακόμα, η PLD διαδραματίζει καίριο ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την ανάπτυξη [16, 18-20], ενώ είναι πλέον γνωστή η αντιαποπτωτική της δράση [21, 22]. Τέλος, μπορεί να συνεισφέρει στη σύνθεση φωσφολιπιδίων μέσω μετατροπής του PtdOH (σχήμα 3) [7].



Σχήμα 3. Ρόλος του φωσφατιδικού οξέος στο μεταβολισμό φωσφολιπιδίων και την αναμόρφωση των μεμβρανών.

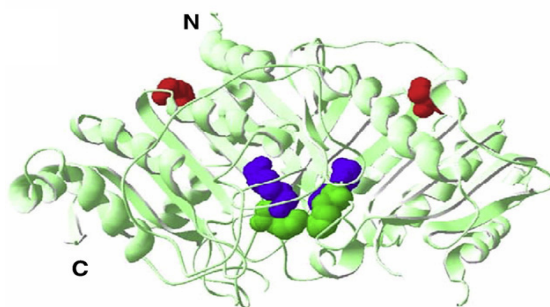
(DAG: διακυλογλυκερόλη, DHAP: φωσφορική διυδροξυκετόνη, G3P: 3-φωσφο-γλυκερόλη, PA: φωσφατιδικό οξύ, PC: φωσφατιδυλοχολίνη, PE: φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, PG: φωσφατιδυλογλυκερόλη, PI: φωσφατιδυλοϊνσιτόλη, PL: φωσφολιπίδιο, PS: φωσφατιδυλοσερίνη, TAG: τριακυλογλυκερόλη. Τροποποιημένο σχήμα από Wang [7])

Όσον αφορά την αντίδραση μεταφωσφατιδυλίωσης, ο ρόλος της δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί μέχρι και σήμερα. Η αντίδραση αυτή χρησιμοποιείται συνήθως *in vitro* για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας PLD ή για ευρείας κλίμακα σύνθεση φωσφολιπιδίων [23]. Για το λόγο αυτό, τα δεδομένα που αναφέρονται σε παρατηρήσεις *in vivo* είναι πολύ περιορισμένα. Ωστόσο, είναι αρκετά για να επιβεβαιώσουν τη σπουδαιότητα του ρόλου και της μεταφωσφατιδυλίωσης. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί σε κύτταρα ινοβλαστών πως η PLD καταλύει τη σύνθεση δις-PtdOH από μεταφωσφατιδυλίωση με υπόστρωμα το PtdOH και αλκοόλη τη διακυλογλυκερόλη (DAG) [24]. Προτείνεται, μάλιστα, πως έτσι συνδέονται τα μονοπάτια δράσης των PLD και PLC (φωσφολιπάση C) και ρυθμίζεται η σηματοδοτική τους δράση με κατανάλωση των προϊόντων τους (PtdOH και DAG, αντίστοιχα), η οποία οδηγεί στη λήξη του σήματος [7, 24]. Επίσης, σε κερατινοκύτταρα υποστηρίζεται πως η PLD συμμετέχει στην πρόσληψη γλυκερόλης προς σύνθεση PtdGro [25], ενώ ανάλογα

έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται στο μεταβολισμό αιθανόλης σε κύτταρα παγκρέατος [26]. Τέλος, φαίνεται πως με μεταφωσφατιδυλίωση ρυθμίζεται η παραγωγή PtdOH και συντίθενται κάποια φωσφολιπίδια των μεμβρανών [5].

Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής των PLD (σχήμα 4) οδηγεί στον εντοπισμό ορισμένων συντηρημένων δομικών περιοχών του ενζύμου. Οι κυριότερες περιγράφονται στη συνέχεια.

Μοτίβο HKD: Όλα τα μέλη της υπεροικογένειας PLD περιέχουν μία ή δύο φορές το συντηρημένο καταλυτικό μοτίβο HxKxxxxD (συντομογραφικά HKD), όπου x μπορεί να είναι οποιοδήποτε αμινοξύ [27]. Τα HKD συμμετέχουν άμεσα στο μηχανισμό δράσης του ενζύμου [28], γι' αυτό αντικατάσταση έστω και ενός εκ των H, K, D οδηγεί σε απώλεια της δραστηριότητας PLD [3]. Συγκεκριμένα, τα δύο μοτίβα σχηματίζουν το ενεργό κέντρο (σχήμα 4) με κατάλληλη αναδίπλωση του ενζύμου ή διμερισμό του στην περίπτωση ύπαρξης ενός μόνο καταλυτικού μοτίβου στην αλληλουχία [27, 29]. Επισημαίνεται πως είναι απαραίτητα και τα δύο μοτίβα HKD για την εμφάνιση δράσης PLD

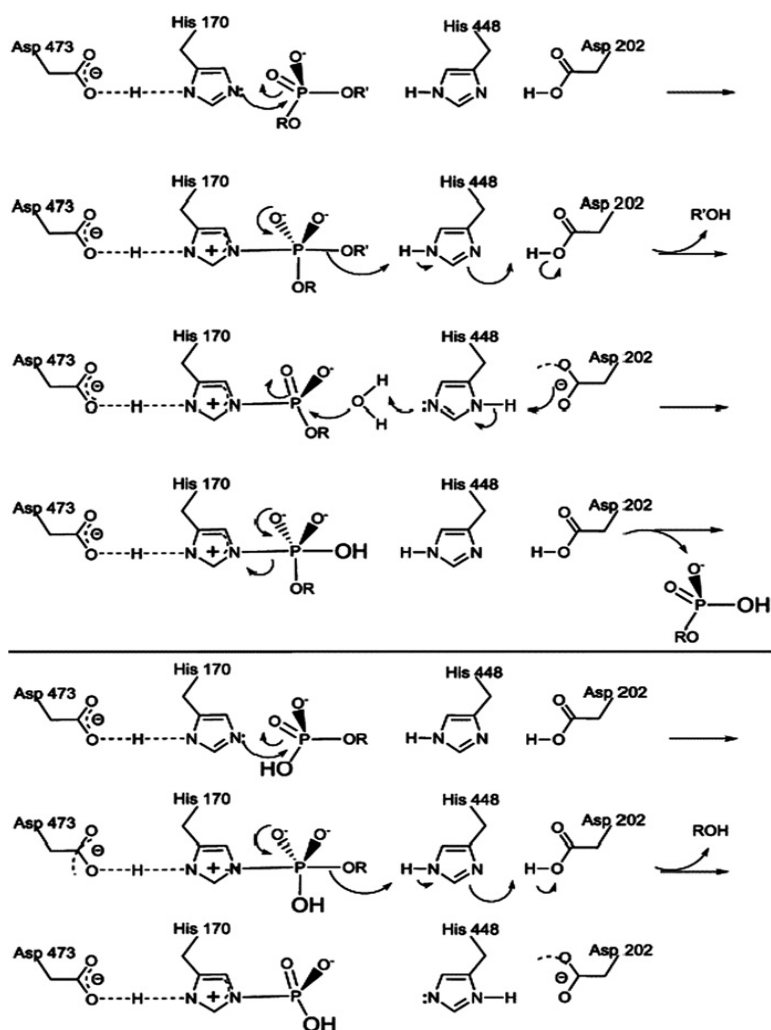


Σχήμα 4. Τεταρτοταγής δομή της PMFPLD.

Η δομή προέκυψε με χρήση του προγράμματος Swiss-PDB viewer. Τα συντηρημένα κατάλοιπα των μοτίβων HKD αναπαριστώνται ως εξής: His (πράσινο), Lys (μπλε), Asp (κόκκινο) [32]

Η πρώτη κρυσταλλική δομή PLD που βρέθηκε είναι της PLD από *Streptomyces* sp. PMF (PMFPLD) (σχήμα 4) [30, 31]. Πρόκειται για μονομερές που αποτελείται από δύο τομείς με παρεμφερή τοπολογία και δευτερεύοντα δομικά στοιχεία διαταγμένα σε μία α - β - α - β - α δομή sandwich. Το ενεργό κέντρο έχει κωνική γεωμετρία και εντοπίζεται στη μεσεπιφάνεια μεταξύ των δύο δομικών τομέων με άνοιγμα πλάτους 30 Å [30, 32]. Εκεί γίνεται η πρόσδεση του υποστρώματος, ενώ θηλιές στην είσοδο του ενεργού κέντρου σχετίζονται με την εκλεκτικότητα, τη σταθερότητα και τη θερμοανθεκτικότητα του ενζύμου [28, 30]. Τέλος, έχει δειχθεί πως, στην περίπτωση της μεταφωσφατιδυλίωσης, η αποχωρούσα πολική κεφαλή και η αλκοολική ομάδα δεν προσδένονται στο ίδιο σημείο του ενεργού κέντρου [5, 10].

Όσον αφορά το μηχανισμό δράσης της PLD, είναι κοινός και για τα δύο είδη αντιδράσεων που καταλύει και φαίνεται να περιλαμβάνει το σχηματισμό ενός ομοιοπολικού φωσφατιδυλοενζυμικού ενδιάμεσου (σχήμα 5).



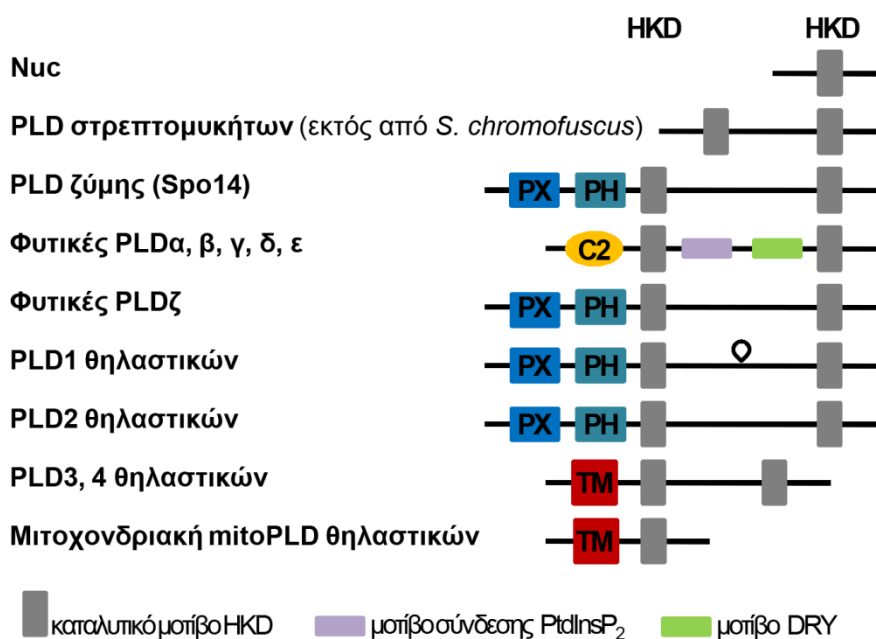
Σχήμα 5. Μηχανισμός δράσης της PLD.

Η αντίδραση που γίνεται όταν το PtdOH προσδεθεί εκ νέου στο ενεργό κέντρο περιγράφεται κάτω από την οριζόντια γραμμή (R=διακυλογλυκερόλη, R'=πολική κεφαλή) [32]

Αναλυτικά, τα βασικά στάδια του μηχανισμού είναι τα ακόλουθα (σχήμα 5): Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει πυρηνόφιλη προσβολή του φωσφόρου του υποστρώματος (π.χ. PtdCho) από το ιμιδαζολικό άζωτο της His¹⁷⁰ του μοτίβου HKD που βρίσκεται προς το αμινοτελικό άκρο του ενζύμου. Αμέσως μετά, η His⁴⁴⁸ του δεύτερου μοτίβου HKD πρωτονιώνει την αποχωρούσα ομάδα, ώστε να τη μετατρέψει στην αντίστοιχη αλκοόλη. Μέσω αυτής της διαδικασίας σχηματίζεται το φωσφατιδυλοενζυμικό ενδιάμεσο και ελευθερώνεται η αλκοόλη-κεφαλή του φωσφολιπιδίου. Στη συνέχεια, ένα μόριο νερού ή αλκοόλης, το οποίο έχει ενεργοποιηθεί από την His⁴⁴⁸, προσβάλλει το

φωσφατιδυλοενζυμικό ενδιάμεσο και ελευθερώνεται PtdOH ή μία φωσφατιδυλοαλκοόλη, αντίστοιχα, ενώ αναγεννάται ελεύθερο το ένζυμο. Λόγω της συντήρησης των τομέων HKD από τα βακτήρια μέχρι τα θηλαστικά, είναι βάσιμη η υπόθεση ότι ο παραπάνω μηχανισμός είναι γενικός [30, 32].

Συνολικά, οι πρωτοταγείς δομές διαφόρων ισομορφών PLD από πλήθος οργανισμών (θηλαστικά, φυτά, ζύμες, βακτήρια) αποκαλύπτουν την ύπαρξη συγκεκριμένων δομικών περιοχών συντηρημένων στο σύνολο των PLD (σχήμα 6) [18, 33]. Οι τομείς που επικρατούν μεταξύ των ισομορφών PLD είναι, εκτός του καταλυτικού HKD μοτίβου, οι: PH, PX και C2, για τους οποίους θα γίνει εν συνεχεία περιγραφή.



Σχήμα 6. Πρωτοταγής δομή PLD από διάφορους οργανισμούς. (PX, PH, C2: τομείς PX, PH, C2, αντίστοιχα, TM: διαμεμβρανική περιοχή)

Τομείς PH και PX: Στο αμινοτελικό τους άκρο, οι PLD1 και 2 των θηλαστικών, καθώς και ομόλογές τους (φυτικές PLDζ, PLD ζύμης) φέρουν τους τομείς PH και PX [29, 32, 34], η ύπαρξη των οποίων διευκολύνει την αλληλεπίδραση της PLD με μεμβράνες. Είναι γνωστό ότι οι τομείς PH και PX κατευθύνουν πρωτεΐνες που τους φέρουν από το κυτόπλασμα στις μεμβράνες. Πιο συγκεκριμένα, ο τομέας PH εξυπηρετεί στην αλληλεπίδραση του ενζύμου με τη μεμβράνη και τον καθορισμό της σωστής θέσης για το ένζυμο [35]. Ενδέχεται αυτό να γίνεται επειδή αλληλεπιδρά με φωσφοϊνοσιτίδια των μεμβρανών [27]. Ο τομέας PX αποτελείται από 100-140 αμινοξέα και περιέχει, μεταξύ άλλων συντηρημένων καταλοίπων, την πλούσια σε προλίνη δομή PxxP, καθώς και αρκετά βασικά αμινοξέα. Βρέθηκε ότι, μέσω των συντηρημένων βασικών καταλοίπων, ο εν λόγω τομέας κατευθύνει πρωτεΐνες σε συγκεκριμένους υποκυτταρικούς στόχους, συμβάλλοντας έτσι στον σωστό εντοπισμό

των πρωτεϊνών αυτών, ενώ αλληλεπιδρά με φωσφοϊνοσιτίδια και πρωτεΐνες με τομείς SH3 [36, 37]. Πιθανοί ρόλοι του τομέα αυτού περιλαμβάνουν μεταφορά κυστιδίων, πρόσδεση παραγόντων που επάγουν μετακίνηση ή ενεργοποίηση του ενζύμου και, τέλος, αλληλεπίδραση του ενζύμου με κινάσες που ρυθμίζουν τη φωσφορυλίωσή του [27].

Τομέας C2: Σε ορισμένες ισομορφές φυτικών PLD, το αμινοτελικό άκρο του ενζύμου έχει έναν τομέα C2, αντί των PH και PX [32]. Τέτοιου τύπου τομείς εντοπίζονται σε ένα ευρύ φάσμα πρωτεϊνών και προσδίδουν στο ένζυμο την ικανότητα να δεσμεύει όξινα φωσfolιπίδια με ασβεστιοεξαρτώμενο τρόπο [3]. Συγκεκριμένα, σε όξινα κατάλοιπα του τομέα δεσμεύονται 2 με 3 ιόντα Ca^{2+} [38]. Η σύνδεση του τομέα C2 πρωτεϊνών PLD με Ca^{2+} προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση -πολύ πιο έντονες από αυτές που επέρχονται σε αντίστοιχους τομείς C2 άλλων πρωτεϊνών- και αυξάνει τη συγγένεια του τομέα για λιπίδια [39, 40]. Ακόμα, οι εν λόγω ισομορφές PLD συμμετέχουν στη στρατολόγηση πρωτεϊνών με τομείς C2 σε συγκεκριμένα υποκυτταρικά διαμερίσματα [3]. Ως προς τη δομή, ο τομέας έχει δύο τοπολογικές παραλλαγές, αλλά οι τρισδιάστατες στερεοδιατάξεις τους είναι αυστηρά συντηρημένες [7]. Όπως θα αναφερθεί στην ενότητα των φυτικών PLD, διαφοροποιήσεις στα όξινα κατάλοιπα του τομέα C2 διαχωρίζουν τις αντίστοιχες ισομορφές του ενζύμου.

Λοιπά δομικά χαρακτηριστικά: Εκτός των τομέων που ήδη αναφέρθηκαν, στις αλληλουχίες των ισομορφών PLD εντοπίζονται και κάποια άλλα συντηρημένα μοτίβα. Αρχικά, το μοτίβο IYIENQFF, που βρίσκεται μεταξύ των δύο καταλυτικών μοτίβων HKD, περιέχει σημαντικό αριθμό αρωματικών καταλοίπων, όπως και ο υποδοχέας χολίνης, και εικάζεται ότι αυξάνει το ρυθμό υδρόλυσης της PtdCho ή/και ότι εξασφαλίζει εκλεκτικότητα για τη PtdCho. Επίσης, μπορεί να κατευθύνει το ένζυμο σε κοιλωματικά κυστίδια μέσω της αλληλουχίας ΦxΦxxxxΦ, όπου Φ αρωματικό κατάλοιπο [27]. Όσον αφορά το καρβοξυτελικό άκρο -σε αντίθεση με το αμινοτελικό- εμφανίζει υψηλό βαθμό συντήρησης ειδικά σε τέσσερα κατάλοιπα, η παραμικρή διαφοροποίηση των οποίων οδηγεί σε απώλεια της δραστηριότητας [27, 29]. Στην τεταρτοταγή δομή, κάποιες θηλιές παίζουν σημαντικό ρόλο στη δραστηριότητα. Συγκεκριμένα, η θηλιά μεταξύ των μοτίβων HKD στην PLD1 των θηλαστικών (σχήμα 6) φαίνεται πως παρέχει το απαραίτητο μήκος, ώστε γίνει σωστά η αναδίπλωση του ενζύμου [3], ενώ είναι πιθανό να ρυθμίζει αρνητικά τη δράση της PLD1, καθώς απώλειά της αυξάνει σημαντικά τη δραστηριότητα [4, 41]. Ανάλογα, στις βακτηριακές PLD, οι θηλιές βοηθούν στην καταλυτική δράση και την αναγνώριση του υποστρώματος [28].

1.2 Φυτικές PLD

1.2.1 Ισομορφές φυτικών PLD

Η γονιδιακή οργάνωση, οι βιοχημικές ιδιότητες και η δομή των φυτικών PLD είναι πολύ πιο σύνθετη απ' ό,τι σε άλλους οργανισμούς (12 γονίδια *AtPLD*, 5 σε θηλαστικά, 1 στον σακχαρομύκητα). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τις άλλες οικογένειες φωσφολιπασών (PLA_2 , PLC), όπου συναντάται μεγαλύτερη ποικιλία στα ζώα παρά στα φυτά. Κάτι τέτοιο πιθανόν υποδεικνύει πως τα φυτά ίσως χρησιμοποιούν περισσότερο την PLD στη σηματοδότηση και τους μηχανισμούς ρύθμισης κυτταρικών λειτουργιών, σε σύγκριση με τους άλλους οργανισμούς [2, 37].

Η εκτεταμένη μελέτη των διάφορων μορφών PLD στα φυτά έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα πως υπάρχουν, γενικά, πολλά γονίδια PLD στα κύτταρα των φυτών. Όπως αναφέρθηκε, στο φυτό *A. thaliana* έχουν βρεθεί 12 διαφορετικά γονίδια PLD (α_1 , α_2 , α_3 , β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2 , γ_3 , δ , ϵ , ζ_1 , ζ_2) [34, 42] και έχουν κλωνοποιηθεί 6 [11], ενώ έχουν ταυτοποιηθεί 2 προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος για την PLD δ (a, b). Επομένως οι ισομορφές PLD του φυτού *A. thaliana* ξεπερνούν τις 12 [37]. Χωρίζονται σε έξι τάξεις (α-ζ) με βάση την αρχιτεκτονική του γονιδίου, την ομολογία στην αλληλουχία, τη δομή των τομέων, τις βιοχημικές ιδιότητες και τη σειρά κλωνοποίησης του cDNA τους [42].

Παρά τη μεγάλη ποικιλία των γονιδίων PLD, τα γενικά δομικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων πρωτεϊνών παραμένουν σταθερά. Σε κάθε ισομορφή PLD συναντώνται δύο συντηρημένες αλληλουχίες (μοτίβα) HKD, ενώ σε πολλές φυτικές PLD έχει βρεθεί το μοτίβο DRY (D/e-R-Y/f/h/c), το οποίο διευκολύνει τη σύνδεση του ενζύμου με ετεροτριμερείς πρωτεΐνες G και είναι ομόλογο με τη συντηρημένη περιοχή των συνδεδεμένων με πρωτεΐνες G υποδοχέων [34, 43]. Στην αλληλουχία αυτή, το R είναι το κρίσιμο για τη σύνδεση αμινοξύ. Αμέσως μετά το DRY υπάρχει συνήθως μία συντηρημένη υδρόφοβη περιοχή (V-Y-V-V-V), υπεύθυνη για τη δέσμευση της PLD στις μεμβράνες [43]. Θέση σύνδεσης με φωσφοϊνοσιπίδια υπάρχει σε αλληλουχία κοντά στο δεύτερο μοτίβο HKD. Η αλληλουχία αυτή έχει τη μορφή (R/K)xxxx(R/K)x(R/K)(R/K). Στις PLD β και PLD γ , η παραπάνω αλληλουχία είναι απόλυτα συντηρημένη, ενώ στην PLD α κάποια αμινοξέα έχουν αντικατασταθεί με όξινα, μειώνοντας την τάση δέσμευσης με τη διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιπόλη ($PtdInsP_2$) [7, 39]. Μία ακόμα θέση δέσμευσης φωσφοϊνοσιπιδίων υπάρχει, όπως αναφέρθηκε, στην περιοχή αλληλεπίδρασης του ενζύμου με τη μεμβράνη (C2). Γενικά, ο ρόλος των φωσφοϊνοσιπιδίων στην αλληλεπίδραση ενζύμου-υποστρώματος φαίνεται όταν τα επίπεδα Ca^{2+} δεν είναι επαρκή. Τότε η ασθενής τάση σύνδεσης της

PLDα με τις μεμβράνες ενισχύεται από τη δέσμευση των αρνητικά φορτισμένων φωσφοϊνοσιπιδίων στα θετικά R/K της C2. Στις μορφές β και γ, η συγκέντρωση Ca^{2+} δεν έχει αντίκτυπο στην απαίτηση για φωσφοϊνοσιπίδια, τα οποία εδώ (PLDβ/γ) παίζουν ρόλο στην κατάλυση [7]. Τέλος, κοντά στο αμινοτελικό άκρο της PLDγ υπάρχει πιθανή θέση μυριστυλίωσης (MGxxxS), που δεν έχει εντοπιστεί ούτε στην PLDα ούτε στην PLDβ. Εν τούτοις, η ύπαρξη τομέα C2 σε μικρή απόσταση από τη θέση μυριστυλίωσης, υποδηλώνει ότι η μυριστυλίωση πιθανόν ρυθμίζει τη σύνδεση της PLDγ με τις μεμβράνες [39].

Με βάση τις αλληλουχίες που εκφράζονται στο αμινοτελικό άκρο δέσμευσης του υποστρώματος, διακρίνονται δύο κατηγορίες φυτικών PLD: (α) PX/PH-PLD, όπου οι τομείς PX και PH μεσολαβούν στην πρόσδεση της PLD στη μεμβράνη και συνδέονται με τη σηματοδότηση μέσω φωσφοϊνοσιπιδίων και (β) C2-PLD, όπου η περιοχή C2 μέσω της ασβεστιοεξαρτώμενης σύνδεσης λιπιδίων μεσολαβεί στην τοποθέτηση διαλυτών πρωτεϊνών στις μεμβράνες (σχήμα 6) [44].

Περαιτέρω διαχωρισμός των ισομορφών PLD μπορεί να επιτευχθεί αν ληφθεί υπόψη η ομολογία τους και η *in vitro* ρύθμιση της ενζυμικής δραστηότητάς τους. Έτσι προκύπτουν οι έξι τάξεις PLD (α-ζ) (πίνακας 1). Υπενθυμίζεται ότι η δέσμευση του Ca^{2+} γίνεται στον τομέα C2 της PLD [7] και προκαλεί τη σύνδεσή της με τις μεμβράνες [43] και τη δέσμευση της PtdCho, ενώ συγχρόνως παρεμποδίζει τη δέσμευση της PtdInsP₂ [5, 34]. Μία ακόμα θέση δέσμευσης των ιόντων Ca^{2+} υπάρχει αμέσως πριν το πρώτο μοτίβο HKD [7].

Πίνακας 1. Απαιτήσεις για την *in vitro* δράση των φυτικών PLD [44, 121]

Τάξη PLD	Εξάρτηση από PtdInsP ₂	Βέλτιστο pH	Συγκέντρωση Ca^{2+}
α	-	όξινο	mM/μM
β	+	ουδέτερο	<μM
γ	+	ουδέτερο	<μM
δ	+	?	μM-mM
ε	?	?	mM/μM
ζ	-	ουδέτερο	0

PLDα: Είναι η περισσότερο μελετημένη ισομορφή και έχει απομονωθεί από πολλά είδη φυτών [45]. Σε αντίθεση με τις άλλες ισομορφές, η τάξη α, που είναι η πιο κοινή και μαζί με τη δ διαθέτει τα περισσότερα μέλη [34, 44]. *In vitro* δρα σε ουδέτερο pH παρουσία mM

Ca²⁺ -ανεξάρτητα από φωσφοϊνοσιτίδια- ή σε όξινο (βέλτιστο pH δράσης 4,5-5,5) με επίπεδα Ca²⁺ της τάξεως των μM και παρουσία φωσφοϊνοσιτιδίων στα κυστίδια του υποστρώματος [7, 45]. Τα ιόντα Ca²⁺ συνδέονται στον τομέα C2, μήκους 130 αμινοξέων, του αμινοτελικού άκρου. Στην ίδια περιοχή δεσμεύονται, εκτός από Ca²⁺, φωσφολιπίδια (φωσφοϊνοσιτίδια) και πρωτεΐνες. Οι δύο παραλλαγές του C2 που έχουν εντοπιστεί παρουσιάζουν μόνο τοπολογικές διαφορές και έχουν την ίδια χωροδιάταξη. Συγκεκριμένα, στο C2 της PLDα δύο όξινα αμινοξέα έχουν αντικατασταθεί με θετικά ή ουδέτερα, γεγονός που μειώνει τη συγγένειά της για το Ca²⁺, συγκριτικά με άλλες ισομορφές της PLD [7].

Αλλαγές στη συγκέντρωση των φωσφοϊνοσιτιδίων δεν επηρεάζουν τη δράση της PLDα, εφόσον η συγκέντρωση Ca²⁺ είναι η βέλτιστη. Σε περίπτωση μικρότερης από τη βέλτιστη συγκέντρωσης Ca²⁺ (5 mM), η PLDα δέχεται σήμα από τα φωσφοϊνοσιτίδια, ενώ και σε όξινο pH, με μM Ca²⁺, αυτά αποτελούν συμπαραγόντα απαραίτητα για τη δράση της. Ωστόσο, η αλληλεπίδραση αυτή δεν περιλαμβάνει απευθείας σύνδεση με τα φωσφοϊνοσιτίδια [7, 39]. Όσον αφορά το είδος των φωσφοϊνοσιτιδίων που απαιτεί, φαίνεται πως δεν τα διαχωρίζει, αντίθετα από τις PLDβ και γ [7]. Ακόμα, απορρυπαντικά (π.χ. δωδεκυλο-σουλφονικό νάτριο, SDS) ενεργοποιούν *in vitro* τη δραστηριότητα PLDα διευκολύνοντας την πρόσβαση του ενζύμου στο υπόστρωμα. Αντίθετα δρουν οι λυσο-PtdEth και N-ακυλο-αιθανολαμίνη [7, 46].

Ως υπόστρωμα, η PLDα συνήθως προτιμά τη PtdCho έναντι της PtdEth [7]. Στο φυτό *A. thaliana* είναι γνωστό ότι η PLDα *in vitro* υδρολύει PtdCho, PtdEth και PtdGro [45, 47], αλλά όχι PtdSer ή NAPE [11]. Αν προστεθεί PtdInsP₂ στα κυστίδια του υποστρώματος, η υδρόλυση των PtdCho, PtdEth, PtdGro παραμένει στα ίδια επίπεδα [47]. Η PtdIns, η PtdInsP₂ και η καρδιολιπίνη είναι πολύ φτωχά υποστρώματα για τις AtPLDα [45, 47]. Σχετικά με την ακορεστότητα των ακυλομάδων των φωσφολιπιδίων, έχει φανεί ότι υπάρχει εκλεκτικότητα και σ' αυτό το σημείο, η οποία μάλιστα αλλάζει ανάλογα με τις συνθήκες. Για παράδειγμα, η AtPLDα προτιμά δι-ακόρεστη PtdEth, όμως υπό την επίδραση ψύχους η προτίμηση μετατοπίζεται στα πολυακόρεστα φωσφολιπίδια [11].

Ωστόσο, τίποτα από τα παραπάνω δεν μπορεί να γενικευτεί και να αφορά το σύνολο των φυτικών PLDα, αφού σε φυτά όπως η *Brassica oleracea* και *Ricinus communis*, η PtdEth είναι καλύτερο υπόστρωμα από τη PtdCho, ενώ υπάρχουν αναφορές για φυτικές PLD (σε *Papaver somniferum* L. και *Catharantus roseus*) οι οποίες δεν υδρολύουν καθόλου PtdEth [5, 10, 48].

PLDβ και γ: Οι τάξεις β και γ περιέχουν τομέα C2, οπότε δρουν παρουσία μM Ca²⁺ σε ουδέτερο pH, ενώ απαιτούν και PtdInsP₂ [44, 47]. Οι ισομορφές αυτές εξετάζονται μαζί,

γιατί έχουν πολλές ομοιότητες, λόγω του μεγάλου βαθμού ομολογίας τους. Συγκεκριμένα, στο φυτό *A. thaliana*, η PLD γ εμφανίζει 66% ομολογία με τη β , ενώ μόνο 41% με την α [39]. Οι PLD β και γ είναι αδρανείς απουσία Ca^{2+} και σε συγκεντρώσεις Ca^{2+} μεγαλύτερες από 100 μM , επειδή τότε εμποδίζεται η σύνδεση της PtdInsP_2 με το ένζυμο. Ρυθμίζονται θετικά σε μικρότερες συγκεντρώσεις Ca^{2+} και παρουσιάζουν μέγιστη δραστηριότητα στα 50 μM Ca^{2+} [7, 39]. Το βέλτιστο pH δράσης τους είναι 6,0-7,5. Παρ' όλα αυτά, μένουν ανεπηρέαστες από αλλαγές στο pH, όσον αφορά τις απαιτήσεις τους σε Ca^{2+} [7].

Πιο συγκεκριμένα, η PLD β είναι δραστική σε pH 7-7,5, παρουσία PtdInsP_2 και nM Ca^{2+} . Η απαίτηση για PtdInsP_2 μπορεί εν μέρει να υποκατασταθεί από φωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιπόλη (PtdInsP). Δε συμβαίνει το ίδιο, όμως, και για το Ca^{2+} . Η PLD β δρα σε στενό εύρος συγκεντρώσεων Ca^{2+} , που αντιστοιχούν στα φυσιολογικά ενδοκυτταρικά του επίπεδα (100 nM). Αρκεί, επομένως, μια σχετικά μικρή μεταβολή (σε 1 μM) της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης Ca^{2+} , ώστε το ένζυμο να μεταπέσει από την πλήρως ενεργή στην ανενεργό μορφή του. Η υψηλή ευαισθησία του ενζύμου στις αλλαγές συγκέντρωσης του Ca^{2+} οφείλεται στα όξινα αμινοξέα του τομέα C2, που αυξάνουν τη συγγένεια για το Ca^{2+} και καθιστούν το ένζυμο δραστικό σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις Ca^{2+} [49].

Παρόμοια με το Ca^{2+} δρουν και τα φωσφοϊνοσιτίδια, δηλαδή η ενεργοποίηση των PLD β και γ είναι ανάλογη της παρουσίας τους, με βέλτιστη συγκέντρωση τα 9 mol% [7]. Η ενίσχυση της δραστηριότητας πιθανόν επιτυγχάνεται μέσω ευνοϊκής αλλαγής στη δομή των μεμβρανικών σχηματισμών, όπου δρα η PLD [39]. Στην PLD β , η PtdInsP_2 έχει θέση πρόσδεσης στον τομέα C2 και κοντά στην καταλυτική περιοχή. Η ακριβής θέση, στην οποία τελικά προσδένεται, εξαρτάται από τη συγκέντρωση Ca^{2+} . Αν δηλαδή, τα επίπεδα Ca^{2+} είναι μηδενικά ή ανεπαρκή, η PtdInsP_2 μπορεί να δεσμευτεί στον C2, διαφορετικά δεσμεύεται στην καταλυτική περιοχή της PLD β προωθώντας τη δέσμευση της PtdCho και την κατάλυση [42]. Όσον αφορά το είδος των φωσφοϊνοσιτιδίων που απαιτεί η κάθε μορφή PLD, οι β και γ δείχνουν προτίμηση για PtdInsP_2 έναντι της PtdInsP [7], ενώ η PLD γ έχει μικρότερη εξάρτηση από τα πολυφωσφοϊνοσιτίδια για τη δράση της [47]. Ακόμα, με αύξηση της συγκέντρωσης φωσφοϊνοσιτιδίων πάνω από 8 mol% αναστέλλεται, αντίθετα από την PLD α . Τέλος, για εμφάνιση δράσης, οι PLD β και γ , απαιτούν και παρουσία PtdEth στα κυστίδια του υποστρώματος [7].

Η PLD β υδρολύει εξίσου τις PtdCho , PtdEth , NAPE, ενώ η PLD γ προτιμά τα περιέχοντα αιθανολαμίνη υποστρώματα (PtdEth , NAPE) έναντι της PtdCho [7]. Η δράση αυτή, όμως, λαμβάνει χώρα υπό προϋποθέσεις, διαφορετικές κάθε φορά. Συγκεκριμένα, οι PtdEth και

PtdSer υδρολύονται μόνο παρουσία PtdInsP₂ από τις β και γ ισομορφές, ενώ για την υδρόλυση των PtdCho, PtdGro και NAPE απαιτείται, εκτός της PtdInsP₂, και ύπαρξη PtdEth [45, 47]. Μάλιστα, η γ ισομορφή προτιμά τη NAPE έναντι της PtdCho, κάτι που δε συμβαίνει με την PLDβ, η οποία υδρολύει τα δύο φωσφολιπίδια στον ίδιο βαθμό [47]. Για τη PtdIns, τη PtdInsP₂ και την καρδιολιπίνη, οι δύο ισομορφές δεν παρουσιάζουν έντονη υδρολυτική δράση [45, 47].

Μεγάλο ρόλο στη δράση των PLDβ/γ παίζει και η σύσταση του κυστιδίου/μεμβράνης στο οποίο δρα το ένζυμο. Αν το μεμβρανικό τμήμα αποτελείται από μόνο ένα είδος λιπιδίου, οι PLDβ/γ είναι ανενεργές. Με την παρουσία και άλλων λιπιδίων αλλάζει η εκλεκτικότητα των PLD ως προς το υπόστρωμα, γεγονός που υποδεικνύει πως το περιβάλλον των μεμβρανών τις ρυθμίζει. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μέγιστη υδρόλυση PtdCho και PtdEth παρατηρείται όταν στο μεμβρανικό τμήμα ισχύει η αναλογία PtdCho/PtdEth 1:3 [7]. Αυτό δείχνει πως η PtdEth μάλλον παρουσιάζει με κατάλληλο τρόπο το υπόστρωμα στην PLD, παρά ότι λειτουργεί ως συμπαράγοντας [47]. Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει πως το PtdOH και η καρδιολιπίνη μπορούν μερικώς να υποκαταστήσουν τη δράση αυτή της PtdEth [7].

PLDδ: Η τάξη δ (C2-PLD) δρα σε ουδέτερο pH, ανεξάρτητα από PtdInsP₂ [42, 44]. Ωστόσο, παρουσία PtdInsP₂ ενεργοποιείται, καθώς το ένζυμο διαθέτει περιοχή με βασικά κατάλοιπα προς σύνδεση PtdInsP₂ κοντά στο μοτίβο HKD, όπως συμβαίνει και με τις PLDβ και γ [50]. Η σύνδεση της PLDδ με τον παραπάνω ενεργοποιητή έχει δείξει ότι αυξάνει τη συγγένεια του ενζύμου προς τη PtdCho, διευκολύνοντας έτσι την υδρόλυση [42]. Επιπλέον, η δράση της επάγεται από ελαϊκό οξύ [42, 44], που λειτουργεί ως ειδικός ενεργοποιητής για την PLDδ και συνδέεται σε περιοχή 30 κατάλοιπα μετά το πρώτο μοτίβο HKD [42, 50]. Το ελαϊκό οξύ επηρεάζει τη δομή του υποστρώματος και ρυθμίζει την αλληλεπίδραση ενζύμου-υποστρώματος. Η απαίτηση για αυτό, ωστόσο, μπορεί να υποκατασταθεί με Triton X-100 [42]. Άλλα ακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως το λινελαϊκό και το λινολενικό, επιδρούν λιγότερο από το ελαϊκό, ενώ κορεσμένα λιπαρά οξέα, όπως το στεατικό και το παλμιτικό, δεν είναι αποτελεσματικά [37]. Τέλος, απαιτείται συγκέντρωση Ca²⁺ από υψηλά μM μέχρι χαμηλά mM (επίπεδα υψηλότερα από των β και γ) [42, 44].

PLDε: Η PLDε διαφοροποιείται από τις υπόλοιπες τάξεις PLD λόγω του τομέα C2 που, στην περίπτωση της, δεν έχει καθόλου όξινα κατάλοιπα για τη δέσμευση Ca²⁺. Ως εκ τούτου, εξαρτάται λιγότερο από το Ca²⁺, ενώ είναι και η λιγότερο απαιτητική από τις PLD όσον αφορά τις συνθήκες υπό τις οποίες δρα. Συγκεκριμένα, εμφανίζει δραστηριότητα σε ποικίλες συνθήκες αντίδρασης: σε mM Ca²⁺ με SDS και μονολιπιδικά κυστίδια όπως η PLDα, αλλά και σε μM Ca²⁺ παρουσία PtdInsP₂ ή/και ελαϊκού όπως οι PLDβ και γ ή η

PLDδ, αντίστοιχα. Τέλος, δρα *in vitro* σε μονολιπιδικά κυστίδια με σειρά προτίμησης PtdCho>PtdEth>PtdGro/PtdSer [51].

PLDζ: Είναι η μόνη τάξη που περιέχει τις αλληλουχίες PX/PH. Παρουσιάζει μεγαλύτερη ομολογία με τις PLD θηλαστικών και σακχαρομύκητα, παρά με άλλες φυτικές PLD (σχήμα 6) [34, 44]. Επιπλέον, δρα ανεξάρτητα από Ca^{2+} και για την *in vitro* δράση της απαιτεί ουδέτερο pH και PtdInsP₂ [42, 44], ενώ είναι ειδική για PtdCho [11, 34] και δεν απαιτεί PtdEth για να δράσει [37]. Και αυτή η αυστηρή προτίμησή της για PtdCho την καθιστά περισσότερο όμοια με τις PLD των θηλαστικών, παρά με τις υπόλοιπες ισομορφές των φυτικών PLD που προτιμούν κυρίως PtdEth [11].

PLDφ: Είναι μία νέα τάξη PLD που βρέθηκε πρόσφατα σε φυτά όπως η όρυζα, η παπαρούνα και το καλλιεργούμενο βαμβάκι. Στο N-άκρο, αντί για τους τομείς C2 ή PX/PH, διαθέτει μία σηματοδοτική αλληλουχία (Signal Peptide, SP), γι' αυτό χαρακτηρίζεται ως SP-PLD [52-54]. Δεν αριθμεί πολλά μέλη και δεν έχει μελετηθεί προς το παρόν.

Από τα παραπάνω φαίνεται εξάρτηση της *in vitro* δράσης κάθε ισομορφής από το pH, τη συγκέντρωση Ca^{2+} , την παρουσία και άλλων -εκτός του υποστρώματος- λιπιδίων, η οποία εγείρει ερωτήματα για την *in vivo* εκλεκτικότητα της κάθε ισομορφής [45].

Όπως είναι γνωστό, το υπόστρωμα αυξάνει τη δράση των φυτικών PLD όταν αποτελείται από συμπυκνωμένες λιπιδικές δομές και όχι από μονομερή. Σπουδαίο ρόλο διαδραματίζει επίσης ο τοπικός εμπλουτισμός μικροπεριοχών της μεμβράνης σε ανιονικά λιπίδια για την ενεργοποίηση των φυτικών PLD [5]. Ωστόσο, τα ανιονικά λιπίδια δεν είναι απαραίτητα στην περίπτωση που το υπόστρωμα είναι λυσο-φωσφολιπίδιο [55]. Τέλος, η ακίνη και η φωσφορυλίωση της PLD ρυθμίζουν θετικά το ένζυμο. Επιπλέον, η υπομονάδα α των πρωτεϊνών G (Gα) επηρεάζει την *in vitro* δράση των φυτικών PLD, αντίθετα απ' ό,τι συμβαίνει στα θηλαστικά, όπου η ρύθμιση προέρχεται από την υπομονάδα γ ή από μονομερείς πρωτεΐνες G [44].

Μία τελευταία παρατήρηση αφορά τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης των φυτικών PLD, που διαφοροποιείται ανάλογα με την πηγή του ενζύμου. Υπάρχουν PLD που δρουν σε περιοχή θερμοκρασιών 25-37°C [56, 57], υπάρχουν όμως και αναφορές σε PLD που έχουν μέγιστη δράση στους 70°C [58]. Τόσο υψηλά βέλτιστα έχουν βρεθεί σε PLD φυτών του γένους *Allium* και σπερμάτων μουστάρδας (*Brassica juncea*). Αξιοσημείωτο είναι ότι, σε μία τέτοια θερμοανθεκτική PLD, το 100% της δραστηριότητας επήλθε ύστερα από θέρμανση στους 60°C για 30 min, ενώ με επαναφορά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος η δραστηριότητα αυξήθηκε στο 167%. Η συμπεριφορά αυτή πιθανώς οφείλεται στην καλύτερη

αναδίπλωση του ενζύμου σε υψηλή θερμοκρασία και διατήρηση της δομής σε χαμηλότερες θερμοκρασίες ή στην αδρανοποίηση κάποιου ενδογενούς αναστολέα της PLD στις υψηλές θερμοκρασίες και επομένως ενεργοποίηση της PLD [58].

1.2.2 Υποκυτταρικός εντοπισμός

Είναι γνωστό ότι η PLDα, ανάλογα με το στάδιο του κυτταρικού κύκλου, αλλά και τον ιστό στον οποίο ανήκει, μπορεί να βρίσκεται είτε συνδεδεμένη στην πλασματική ή κάποια εσωτερική μεμβράνη, είτε να είναι διαλυτή στο κυτόπλασμα [7]. Στο φυτό *A. thaliana* και την τομάτα (*Lycopersicon esculentum*), η PLDα είναι παρούσα σε όλα τα φυτικά όργανα ρίζες, φύλλα, καρπούς [59]. Μάλιστα η AtPLDα2 αποτελεί την ιδιосуστατική ισομορφή του φυτού [60]. Κάτι ανάλογο παρατηρείται και για την PLDα στην όρυζα, η οποία εντοπίζεται σε μεμβράνες κυττάρων φύλλων, καθώς και σε κύτταρα των ριζών [43]. Στα φυτά η PLDα εντοπίζεται επίσης στα χυμοτόπια, όπου το pH είναι όξινο, απουσιάζουν όμως τα απαραίτητα για τη δράση της φωσφοϊνοσιτιδία και, επομένως, το ένζυμο εκεί είναι αδρανές. Αντίθετα, το ένζυμο που υπάρχει στην πλασματική μεμβράνη, λόγω της παρουσίας φωσφοϊνοσιτιδίων, ουδέτερου pH και μικρής ποσότητας Ca^{2+} , βρίσκεται σε «κατάσταση αναμονής» και ενεργοποιείται μετά την επίδραση κάποιου περιβαλλοντικού παράγοντα ή ορμονών [7]. Σε μεριστωματικά κύτταρα η PLDα έχει τη μεγαλύτερη δραστικότητα και βρίσκεται διαλυτή στο κυτόπλασμα. Αντίθετα, στα ώριμα κύτταρα είναι τοποθετημένη στις μεμβράνες. Η μεμβρανική μορφή της PLDα είναι αυξημένη κατά την κυτταρική γήρανση, την επίδραση αμπισισικού οξέος (ABA), καθώς και σε συνθήκες καταπόνησης π.χ. επίδραση ακτινοβολίας γ [7].

Οι PLDβ και γ, που βρίσκονται σε μικρότερες ποσότητες από την α σε όλα τα κύτταρα, συνδέονται περιφερειακά με τις μεμβράνες, ενώ υπάρχουν σε μεγαλύτερες ποσότητες σε γηρασμένα κύτταρα. Μάλιστα, η PLDγ έχει βρεθεί και στην πυρηνική μεμβράνη του φυτού *Arabidopsis* [7]. Η AtPLDδ συνδέεται με την πλασματική μεμβράνη, την τουμπουλίνη και τους μικροσωληνίσκους, ενώ εντοπίζεται κυρίως σε γηρασμένους ιστούς και κυρίως μετά από κάποια καταπόνηση [42, 61, 62]. Τέλος, η PLDε εκφράζεται πολύ λιγότερο από την PLDα1 στους φυτικούς ιστούς -εκτός από τα κύτταρα γύρης, όπου η έκφρασή της ξεπερνά αυτήν της PLDα [63]- και βρίσκεται κυρίως συνδεδεμένη με την πλασματική μεμβράνη, ενώ δεν έχει βρεθεί διαλυτή. Ο αποκλειστικός εντοπισμός της στις μεμβράνες επιτρέπει τη γρήγορη ενεργοποίησή της και την άμεση πρόσβαση στα μεμβρανικά υποστρώματα, χωρίς τη μετατόπιση που υφίστανται άλλες PLD [51].

Στις φυτικές PLD έχουν βρεθεί θέσεις δυνητικής γλυκοζυλίωσης, ακετυλίωσης του αμινοτελικού άκρου και φωσφορυλίωσης. Οι μεταμεταφραστικές αυτές τροποποιήσεις ίσως παίζουν ρόλο στη στόχευση θέσης ή τη δράση της PLD ή ακόμα και στην οργάνωση του ενδοκυτταρικού δικτύου ρύθμισής της [5].

1.2.3 Λειτουργίες φυτικών PLD

Οι λειτουργίες που εξυπηρετεί η δράση της PLD είναι η απόκριση σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις και η ρύθμιση σηματοδοτικών πορειών (π.χ. μεταγωγή σημάτων κυρίως μέσω του PtdOH), η αναμόρφωση των μεμβρανών, η αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες του κυτοσκελετού, η ανάπτυξη ριζικών τριχιδίων και ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, όπως θα περιγραφεί και στη συνέχεια. Ωστόσο, η δράση των PLD δε φαίνεται να επιδρά άμεσα στο φαινότυπο των φυτών, όπως έδειξε η απαλοιφή των γονιδίων PLDα1 ή/και PLDδ στην *A. thaliana*, που δεν επηρέασε την ανάπτυξη του φυτού [74]. Ειδικά οι σηματοδοτικές λειτουργίες θα εκτεθούν σε επόμενη ενότητα.

Κατ' αρχάς, η δράση των PLD ρυθμίζεται αυστηρά σε επίπεδο μεταγραφής, αλλά και μετάφρασης καθ' όλη τη διάρκεια ανάπτυξης των φυτών. Η PLDα βρίσκεται σε σχετικά σταθερά επίπεδα στο κύτταρο και μειώνεται μόνο κατά τη γήρανση. Από τις τρεις ισομορφές της, η PLDα1 εκφράζεται σε πρώιμα στάδια ανάπτυξης των φυτών και παίζει ρόλο στον πολλαπλασιασμό και την επιδιόρθωση των μεμβρανών [7, 64], ίσως ρυθμίζοντας μικρές GTPάσες και ενεργοποιώντας πρωτεΐνες που περιέχουν επαναλήψεις αγκυρίνης [65]. Η PLDα2 υπάρχει σε όλους τους ιστούς και σ' όλα τα στάδια ανάπτυξης (είναι η κυρίως ιδιοσυστατική μορφή). Τέλος, η PLDα3 εκφράζεται σε γηρασμένους ιστούς και, εκτός από το μηχανισμό της γήρανσης, συμμετέχει και στην απόκριση σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις [7, 64].

Όσον αφορά την αναμόρφωση των μεμβρανών, αυτή οφείλεται στην αντίδραση που καταλύει η PLD: η τοπική αύξηση του PtdOH αποτελεί μέσο τροποποίησης των μεμβρανών, καθώς τις εμπλουτίζει σε εξαγωνικές δομές μειώνοντας το ποσοστό της τυπικής μεμβρανικής διπλοστιβάδας [34, 64]. Αυτό θα αναλυθεί περαιτέρω στο επόμενο κεφάλαιο. Επιπλέον, η ενδιάμεση φωσφατιδυλο-PLD δρα ως παροδική θέση σύνδεσης πρωτεϊνών με τη μεμβράνη [64].

Όπως αναφέρθηκε, οι φυτικές PLD αλληλεπιδρούν με τον κυτοσκελετό. Οι ισομορφές, που κυρίως εμπλέκονται σε τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις, είναι οι PLDδ και PLDβ, που συνδέονται με τον κυτοσκελετό των μικροσωληνίσκων και της F-ακτίνης, αντίστοιχα [37, 61]. Πιο αναλυτικά, η PLDβ1 ενεργοποιεί τον πολυμερισμό της ακτίνης και αντίστροφα

ενεργοποιείται από την F-ακτίνη [2, 34]. Ανάλογα, η ισομορφή δ δρα ως γέφυρα μεταξύ των μικροσωληνίσκων και της πλασματικής μεμβράνης και μ' αυτό τον τρόπο επιτρέπει τη μεταφορά σημάτων από το περιβάλλον στο εσωτερικό του κυττάρου [37].

Μία ακόμη λειτουργία της PLD είναι η ρύθμιση της παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) και του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Είναι γνωστό ότι η PLD α 1 οδηγεί στην αύξηση των ROS και ακολούθως στην αύξηση της συγκέντρωσης του H₂O₂. Επιπλέον, το παραγόμενο PtdOH ενεργοποιεί τις GTPάσες Rho, οι οποίες οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο. Εν τούτοις, η αύξηση των ROS ενεργοποιεί την PLD δ . Αυτή με τη σειρά της ενεργοποιεί μία MAPK και μειώνει τη συγκέντρωση H₂O₂, αποτρέποντας έτσι τον κυτταρικό θάνατο. Επομένως, τελικά η τύχη του κυττάρου εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ των δράσεων των διαφορετικών μορφών PLD [34]. Επίσης, με τον έλεγχο των επιπέδων ROS, οι PLD ρυθμίζουν και το άνοιγμα των καναλιών Ca²⁺ στα κύτταρα [66]. Σε άλλη περίπτωση, αν η παραγωγή ROS λάβει χώρα στις ρίζες, επάγεται η έκφραση του γονιδίου RHD2 (καταλυτική υπομονάδα της οξειδάσης του NADPH) και, μέσω δράσης της PLD ϵ , η ανάπτυξη των ριζικών τριχιδίων [2, 66, 67].

Στην πορεία ανάπτυξης των ριζικών τριχιδίων, έχειδειχθεί ότι συμμετέχει και η PLD ζ 1, που εντοπίζεται στους μικροσωληνίσκους και εμπλέκεται στη μεταφορά κυστιδίων επικαλυμμένων με κλαθρίνη, μέσω αλληλεπίδρασης του τομέα PX της PLD με τον SH3 της κλαθρίνης [37, 61, 66]. Γενικότερα, η PX/PH-PLD ζ είναι η ισομορφή που μοιάζει δομικά με τις PLD των θηλαστικών και εμπλέκεται στην κυκλοφορία κυστιδίων κατά την ανάπτυξη των ριζών και των γυρεοσωλήνων (pollen tubes) [2, 64].

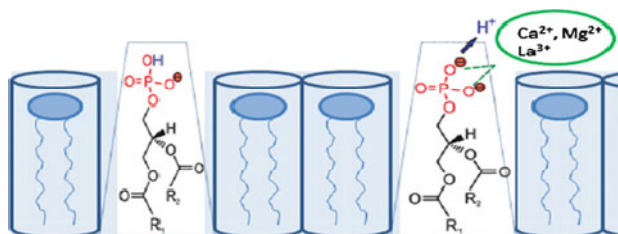
Τέλος, οι φυτικές ισομορφές PLD έχουν διασταυρούμενη λειτουργία με τις φωσφολιπάσες C και A, καθώς και μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, οι PLD μαζί με PLA₂ αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες του μηχανισμού COPII, οι οποίες συμμετέχουν στη διαμόρφωση σημείων αποκοπής εκκριτικών κυστιδίων στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου [68]. Ακόμα, η PLA₂ δρώντας σε PtdEth σχηματίζει το αντίστοιχο λυσοφωσφολιπίδιο, το οποίο αναστέλλει την PLD α . Ομοίως, οι NAE, που σχηματίζονται από δράση των PLD β και γ και επάγουν το κλείσιμο των στομάτων, παρεμποδίζουν την PLD α . Και η τελευταία όμως παίζει ρόλο ρυθμιστικό, αφού τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, που ελευθερώνονται έμμεσα απ' αυτήν (διαδοχική δράση PLD \rightarrow PLA₂), πιθανόν για σχηματισμό ιασημονικού οξέος (JA), ενεργοποιούν την PLD δ [37].

Είναι ενδιαφέρον ότι και στη βιομηχανία μπορούν να χρησιμοποιηθούν συγκεκριμένες PLD για τη σύνθεση φωσφολιπιδίων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η PLD-B από παπαρούνα (*Papaver somniferum* L.) η οποία, κατά τη μετατροπή της PtdCho σε PtdGro

και PtdEth, δεν δίνει παραπροϊόντα από παράλληλη υδρόλυση, ενώ δέχεται ως υποστρώματα για μεταφωσφατιδυλίωση και ανάλογα λιπιδίων [48].

1.3 Φωσφατιδικό οξύ

Το PtdOH συμμετέχει σε πολλαπλές λειτουργίες του κυττάρου. Κάποιες από αυτές οφείλονται στο κωνικό σχήμα και το διπλό αρνητικό φορτίο του λιπιδίου (σχήμα 7). Συγκεκριμένα, το αρνητικό φορτίο προωθεί το σχηματισμό και σταθεροποιεί πρωτεϊνικά σύμπλοκα, ενώ αποτελεί σημείο πρόσδεσης πρωτεϊνών στις μεμβράνες. Αναλυτικότερα, τα θετικά φορτισμένα κατάλοιπα Arg ή Lys της πρωτεΐνης συνδέονται με την αρνητικά φορτισμένη κεφαλή του PtdOH. Τα βασικά αυτά κατάλοιπα, σε ορισμένες πρωτεΐνες, εντοπίζονται σε τομέα αναγνώρισης PtdOH (PtdOH-binding motif) ακολουθούμενα από σειρά υδρόφοβων καταλοίπων. Για τη διαδικασία αγκυροβόλησης έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί. Σύμφωνα με τον πρώτο, η σύνδεση ξεκινά με ηλεκτροστατική έλξη της πρωτεΐνης και ολοκληρώνεται με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καταλοίπων της και λιπιδίων της μεμβράνης. Στον δεύτερο, η πρωτεΐνη και πάλι προσεγγίζει τη μεμβράνη λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, όμως, στη συνέχεια, ακολουθεί σταδιακή αποπρωτονίωση των μορίων PtdOH και δημιουργία δεσμών υδρογόνου. Η αποπρωτονίωση μπορεί να επέλθει μετά από προσέγγιση της πρωτεΐνης, μέσω αλληλεπιδράσεων με Ca^{2+} ή Mg^{2+} ή με αύξηση του pH [18].



Σχήμα 7. Απεικόνιση της κωνικής δομής και του διπλού φορτίου του PtdOH στις μεμβράνες. (τροποποιημένο σχήμα από Liu και συν. [18])

Μια ομάδα πρωτεϊνών-στόχων του PtdOH αποτελούν οι κινάσες (πρωτεϊνικές ή λιπιδικές). Ειδικότερα, σε κύτταρα καρότου η πρωτεϊνική κινάση CDPK ενεργοποιείται από ιόντα Ca^{2+} , όπως οι PKC των θηλαστικών με τις οποίες παρουσιάζει ομολογία, ενώ απαιτεί και την παρουσία PtdOH για να δράσει [69]. Επίσης, η PtdIns-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση (PDK) στην *A. thaliana* ενεργοποιείται συνδεδεμένη με PtdOH και αυτή με τη σειρά της ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση AGC2-1 καταλήγοντας στην ανάπτυξη των ριζικών τριχιδίων του φυτού [70, 71]. Το PtdOH, στις παραπάνω περιπτώσεις, υπάρχουν ενδείξεις ότι προέρχεται από δράση της PLDζ1 μετά από ενεργοποίησή της από το μεταγραφικό

παράγοντα GL2 [72]. Παρόμοια, ενεργοποιούνται από το PtdOH και οι σφιγγοσινικές κινάσες (SK). Έχει βρεθεί ότι στην *A. thaliana* η σηματοδότηση ABA ενεργοποιεί τη SK, η οποία επάγει το άνοιγμα καναλιών και την ενεργοποίηση της PLDα1. Κατόπιν, το - παραγόμενο από την PLD- PtdOH συνδέεται με τη SK και την ενεργοποιεί, δημιουργώντας ένα βρόχο ανάδρασης ως απόκριση στο ABA [73]. Ακόμα, από τη δράση της PLD ενεργοποιούνται και μονοπάτια MAPK [74, 75]. Στην περίπτωση αυτή, όμως, τα πράγματα είναι πιο πολύπλοκα, καθώς φαίνεται ότι οι MAPK υπόκεινται σε διαφορετικούς τρόπους ρύθμισης, που εξαρτώνται από το φυτό που μελετάται. Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση στην *A. thaliana* επέρχεται άμεσα, με σύνδεση του PtdOH στη MAPK. Η αλληλουχία σύνδεσης, μάλιστα, παρουσιάζει 50% ομολογία με αυτήν που υπάρχει στη Raf 1 των θηλαστικών [61, 76]. Αντίθετα, στη σόγια (*Glycine max*) φαίνεται πως μεταξύ του PtdOH και της MAPK παρεμβάλλεται η δράση πρωτεϊνικής κινάσης, η οποία φωσφορυλιώνει τη MAPK [77].

Το PtdOH, όμως, προσδένεται και σε πρωτεΐνες-μεταφορείς λιπιδίων. Παράδειγμα αποτελεί το σύμπλεγμα πρωτεϊνών της *A. thaliana* TGD1-4. Το μονοπάτι περιλαμβάνει μεταφορά της PtdCho από το ενδοπλασματικό δίκτυο στην εξωτερική μεμβράνη των χλωροπλαστών με το TGD4. Στη συνέχεια, η δράση της PLD στους χλωροπλάστες μετατρέπει τη PtdCho στο κωνικού σχήματος PtdOH. Το τελευταίο συνδέεται με το TGD2 και το σύμπλεγμα TGD1,2,3 μεταφέρει το PtdOH στην εσωτερική μεμβράνη των χλωροπλαστών για να ακολουθήσει η βιοσύνθεση γαλακτο-γλυκερολιπιδίων [78]. Άλλοι στόχοι του PtdOH είναι: η AtPDK, ο αναστολέας του ABA (ABI1), η καρβοξυλάση του φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικού (PEPC) και πρωτεΐνες με επαναλήψεις αγκυρίνης [65, 79]. Αναλυτικότερα, όταν τα επίπεδα PtdOH αυξάνονται, μετά από καταπονήσεις, το λιπίδιο συνδέεται με την PEPC και έτσι ρυθμίζεται η παραγωγή CO₂. Μάλιστα, η σύνδεση της PEPC με το PtdOH εξαρτάται από τη συγκέντρωση του PtdOH και όχι από την ποσότητα του ενζύμου, που έχει δείχθει ότι στην προκειμένη περίπτωση δεν μεταβάλλεται [80]. Όσον αφορά τον αναστολέα ABI 1 (ABA Insensitive 1), είναι από τους πρώτους στόχους του PtdOH στα φυτά και χαρακτηρίστηκε λειτουργικά το 2004. Για τον αναστολέα έχει πλέον εξακριβωθεί πως, αφού συνδεθεί με PtdOH, μετατοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη και ενεργοποιείται το σηματοδοτικό μονοπάτι του ABA. Αυτό γίνεται κατόπιν ενεργοποίησης της PLDα1 από το ABA. Η PDK1, απ' την άλλη πλευρά, ήταν γνωστό ότι στα θηλαστικά συμμετέχει σε σηματοδοτικά μονοπάτια κατά την ανάπτυξη [79].

Με τον τρόπο που περιγράφηκε, γίνεται η μετακίνηση διαλυτών πρωτεϊνών στις μεμβράνες και σύνδεσή τους με το PtdOH, όπως στην περίπτωση του αναστολέα δράσης του ABA

(ABI 1) ή της SK. Αντίθετα, όταν τα επίπεδα γλυκόζης είναι χαμηλά, μείωση του pH προκαλεί την πρωτονίωση του PtdOH και την ελευθέρωση του παράγοντα Ori1 από τις μεμβράνες. Η μετακίνησή του στον πυρήνα έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της σύνθεσης φωσφολιπιδίων [18]. Τέλος, κάποιες φορές, η αλληλεπίδραση αφορά περιοχές μεμβρανικών πρωτεϊνών και έχει ως αποτέλεσμα τη ρύθμιση της δράσης τους, όπως συμβαίνει με την οξειδάση του NADPH, η οποία παράγει ROS μετά τη σύνδεσή της με PtdOH [18, 34, 44].

Όσον αφορά το σχήμα ανεστραμμένου κώνου που διαθέτει το PtdOH (σχήμα 7), οδηγεί σε δομικές αλλαγές στη μεμβράνη [18]. Έτσι, συμμετέχει σε πορείες έκκρισης πρωτεϊνών [68, 81], ενώ ρυθμίζει και μεμβρανικές δομές στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τη συσκευή Golgi και μπορεί να ελέγχει την απελευθέρωση κυστιδίων (fission) από τα εν λόγω υποκυτταρικά διαμερίσματα [68]. Η συσσώρευση PtdOH προκαλεί αρνητικό κυματισμό στη μεμβράνη, ο οποίος επιδρά θετικά στη δημιουργία εγκολπώσεων (membrane budding) και τη σύντηξη μεμβρανών, με αποτέλεσμα τη διευκόλυνση ενδο- και εξω-κύτωσης [18, 82, 83]. Έχει δειχθεί δε πως το PtdOH που συμμετέχει σε πορείες κυκλοφορίας μεμβρανών προέρχεται από δράση της PLDζ [82]. Γενικότερα, τα όξινα φωσφολιπίδια (PtdOH, PtdSer, PtdInsP₂) πιθανότατα μέσω ρύθμισης του σχηματισμού συμπλόκων πρωτεϊνών SNARE (SNARE complexes) συμμετέχουν στις πορείες σύντηξης μεμβρανών. Και αντίστροφα, πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη σύντηξη μεμβρανών (π.χ. συνταξίνη 1A) οδηγούν στη συσσώρευση τέτοιων λιπιδίων, που επάγουν τη σύντηξη, στα σημεία δράσης τους [68]. Επιπλέον, η παρουσία του κωνικού PtdOH οδηγεί σε χαλαρό πακετάρισμα των λιπιδίων στη μεμβράνη και έκθεση των λιπαρών αλυσίδων, επιτρέποντας αλληλεπιδράσεις με υδρόφοβα κατάλοιπα των πρωτεϊνών [18]. Μάλιστα, φαίνεται ότι η παρουσία PtdEth ενισχύει τις αλληλεπιδράσεις αυτές [82].

Γενικότερα, το PtdOH επάγει την κυκλοφορία μεμβρανών και μέσω αλλαγών που επιφέρει στον κυτταρικό σκελετό [84], με αποτέλεσμα να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Τέλος, ρυθμίζει και τα επίπεδα ιόντων στο κύτταρο με ρύθμιση του ανοίγματος καναλιών [18, 85]. Ο σηματοδοτικός ρόλος του PtdOH τερματίζει με τη μετατροπή του σε λυσο-PtdOH ή DAG [81].

1.3.1 Μέθοδοι προσδιορισμού φωσφατιδικού οξέος

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής χρειάστηκε να αναπτυχθεί μέθοδος προσδιορισμού του PtdOH. Γι' αυτό και παρατίθενται, με βάση τη βιβλιογραφία, οι μέχρι σήμερα προσπάθειες στο ίδιο θέμα.

Στα περισσότερα φυτά έχει βρεθεί πως οι PLD εμφανίζουν μέγιστη δράση έναντι της PtdCho, ενώ αυτό είναι το επικρατέστερο υπόστρωμα και για τις PLD των θηλαστικών. Για το λόγο αυτό, οι μέθοδοι που αναπτύχθηκαν για τον *in vitro* προσδιορισμό του ενζύμου χρησιμοποιούν κυρίως PtdCho ως υπόστρωμα. Εναλλακτικά, γίνεται χρήση κάποιου συνθετικού αναλόγου της PtdCho (ραδιενεργού ή φθορίζοντος) ή σπανιότερα της φωσφατιδυλο-ρ-νιτροφαινόλης (Ptd-p-NP).

1.3.1.1 Προσδιορισμός με φυσικά υποστρώματα

Στις δοκιμασίες όπου χρησιμοποιείται PtdCho ως υπόστρωμα, ο προσδιορισμός της δραστηριότητας PLD γίνεται είτε με χημικό προσδιορισμό του φωσφατιδυλο-παραγώγου είτε με προσδιορισμό της χολίνης, που παράγεται κατά την αντίδραση.

Πιο συγκεκριμένα, στην πρώτη περίπτωση, με τη λήξη της ενζυμικής αντίδρασης εκχυλίζονται τα λιπίδια και διαχωρίζονται: (α) με υγρή χρωματογραφία (LC/MS) [86], (β) με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) ακολουθούμενη από προσδιορισμό φωσφόρου [87] ή ESI/MS/MS [88, 89], (γ) με HPTLC και ποσοτικοποίηση με πυκνομετρία (densitometry) [90] ή (δ) με χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού (SFC) και λιπιδομική ανάλυση [91]. Άλλες μέθοδοι εκμεταλλεύονται το αρνητικό φορτίο του παραγόμενου PtdOH και προσδιορίζουν τη δραστηριότητα της PLD με αγωγιμομετρία ή μέτρηση του pH στο διάλυμα της αντίδρασης [92-94]. Μία διαφορετική προσέγγιση βασίζεται στη σύζευξη της δράσης της PLD με τη δράση αλκαλικής φωσφατάσης [95]. Σε αυτή την περίπτωση, υδρολύεται το PtdOH από την αλκαλική φωσφατάση και ο ανόργανος φωσφόρος, αφού σχηματίσει φωσφομολυβδαινικά, ποσοτικοποιείται με φωτομέτρηση. Τέλος, σε περίπτωση ελέγχου της PLD μέσω της χαρακτηριστικής αντίδρασης μεταφωσφατιδυλίωσης, όπου με προσθήκη βουτανόλης (κυρίως) σχηματίζεται το αντίστοιχο φωσφατιδυλο-παραγώγο, αυτό μπορεί να αναλυθεί, όπως το PtdOH, με φασματομετρία μάζας (MS) [96].

Οι παραπάνω δοκιμασίες είναι τελικού σημείου, ωστόσο έχουν σχεδιαστεί και μέθοδοι προσδιορισμού της PLD με μετρήσεις σε πραγματικό χρόνο (real-time). Σε αυτές τις μεθόδους λαμβάνεται μέτρηση κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Η μέτρηση αυτή μπορεί να περιλαμβάνει: (α) λήψη φάσματος υπερύθρου (IR), όπου παρατηρείται με την εξέλιξη της αντίδρασης μείωση των χαρακτηριστικών κορυφών του υποστρώματος (1230 cm^{-1} για υπόστρωμα PtdCho) συνοδευόμενη από αντίστοιχη αύξηση των χαρακτηριστικών κορυφών του PtdOH (1115 και 1130 cm^{-1}) [97], (β) αντίδραση του παραγόμενου PtdOH με βαφή (safrazine, metachroic dye) [94, 98] ή συμπλοκοποίησή του [99] και φωτομέτρηση της ένωσης που σχηματίζεται σε πραγματικό χρόνο και, τέλος, (γ) λήψη δειγμάτων από το

διάλυμα της αντίδρασης και μέτρηση της πυκνότητας των ζωνών που προκύπτουν σε μικρής κλίμακας πλάκες TLC (short-bed/continuous developed TLC) [100].

Όσον αφορά τον προσδιορισμό της παραγόμενης χολίνης, αυτός γίνεται κατά κύριο λόγο μέσω σύζευξης της υδρόλυσης της PtdCho με ενζυμικές αντιδράσεις που περιλαμβάνουν δράση ενζύμων, όπως η οξειδάση της χολίνης, και στοχεύουν στην εμφάνιση χημειοφωταύγειας [101-104], το σχηματισμό έγχρωμης ένωσης που μπορεί να φωτομετρηθεί [105], απομόνωση της χολίνης και μέτρησή της [94] ή μέτρηση της μεταβολής της αγωγιμότητας στο διάλυμα της αντίδρασης, που οφείλεται στο θετικό φορτίο της χολίνης [94, 106]. Οι μέθοδοι αυτές, αν και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για έλεγχο της εκλεκτικότητας της PLD, ωστόσο έχουν επικρατήσει, λόγω της ευαισθησίας και της δυνατότητας να χρησιμοποιούνται σε ευρεία κλίμακα (π.χ. σε πλακίδια των 96 θέσεων). Επιπλέον, στις μεθόδους αυτές έχει βασιστεί και ο σχεδιασμός kit για τον έλεγχο δραστηριότητας της PLD από εταιρείες όπως η Sigma και η Molecular Probes. Ακόμα, η σύζευξη της δράσης PLD με δράση άλλων ενζύμων εφαρμόζεται για δοκιμές με ακινητοποίηση των ενζύμων σε μεμβράνη ή πηκτή [107, 108] και μέτρηση της έντασης των κηλίδων που σχηματίζονται. Τέλος, παρακολούθηση της δράσης PLD σε πραγματικό χρόνο, μέσω της χολίνης, επιτυγχάνεται με λήψη φασμάτων $^1\text{H-NMR}$, καθώς οι κορυφές των πρωτονίων της ομάδας της χολίνης του μορίου της PtdCho είναι μετατοπισμένες σε σχέση με τις κορυφές των πρωτονίων της ελεύθερης χολίνης [109].

1.3.1.2 Προσδιορισμός με συνθετικά υποστρώματα

Όπως στην προηγούμενη ενότητα, και σ' αυτήν το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται κατά βάση είναι η PtdCho. Οι τροποποιήσεις στο μόριό της αφορούν στην ύπαρξη ραδιενεργού ατόμου (^3H , ^{14}C ή ^{32}P) σε κάποια από τις λιπαρές αλυσίδες ή στην πολική κεφαλή της χολίνης. Με τη λήξη της αντίδρασης λαμβάνεται το κλάσμα με το ραδιενεργό προϊόν (PtdOH ή χολίνη) και γίνεται μέτρηση σε μετρητή σπινθηρισμού υγρών [87, 94, 96, 110, 111].

Ένας άλλος τρόπος επισήμανσης του υποστρώματος είναι με την προσθήκη φθορίζουσας ομάδας στο φωσφολιπίδιο, συνήθως σε κάποια λιπαρή αλυσίδα. Οι ομάδες που έχουν αναφερθεί είναι οι: BODIPY- [94, 112, 113], pyrenesulfonyl- [114], rhodamine- [115] και NBD- [47, 61, 116, 117]. Η πρώτη ομάδα έχει περισσότερες αναφορές, ωστόσο έχει βρεθεί ότι η PLD θηλαστικών εμφανίζει με αυτή διαφορετική δράση σε σχέση με το φυσικό υπόστρωμα. Η χρήση της ομάδας pyrenesulfonyl- εφαρμόζεται στην πολική κεφαλή της PtdEth και βασίζεται στο γεγονός ότι ο φθορισμός της ομάδας αυτής όταν βρίσκεται σε

κυστίδιο αποσβένυται από τα παρακείμενα μη επισημασμένα μόρια PtdOH. Όταν με δράση της PLD η επισημασμένη κεφαλή της αιθανολαμίνης ελευθερωθεί στο διάλυμα εκπέμπεται φθορισμός, ο οποίος και τελικά μετράται. Δεδομένου ότι η φθορίζουσα ομάδα είναι συνδεδεμένη στην κεφαλή του φωσφολιπιδίου, χωρίς να έχει δοκιμαστεί σε PtdCho, είναι παρακινδυνευμένη η χρήση της για πειράματα ελέγχου εκλεκτικότητας της PLD ως προς το υπόστρωμα.

Ένα απολύτως συνθετικό υπόστρωμα της PLD είναι η Ptd-p-NP. Με τη δράση του ενζύμου ελευθερώνεται η p-NP που εκπέμπει στα 405 nm [118, 119]. Τέλος, η ομάδα NBD- χρησιμοποιείται ευρύτερα για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας φωσφολιπασών [250]. Η ίδια ομάδα χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία.

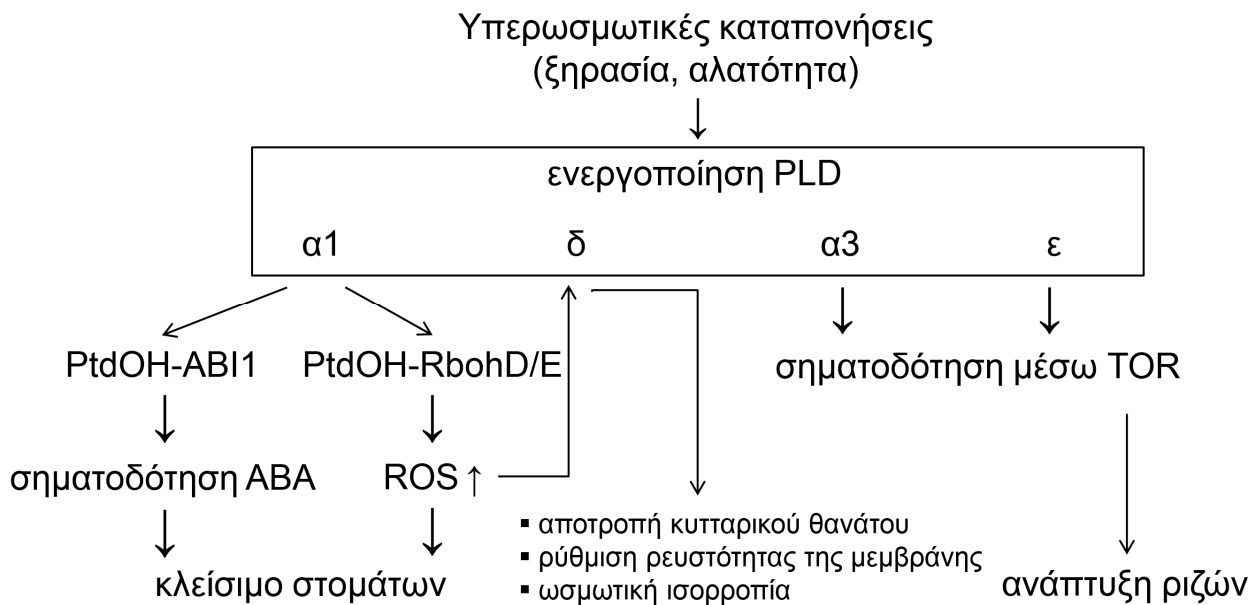
1.4 Απόκριση φυτών σε καταπονήσεις με δράση της PLD

1.4.1 Πορείες σηματοδότησης

Σε ενότητα που προηγήθηκε (ενότητα 1.3) παρατέθηκαν οι τρόποι δράσης του προϊόντος της PLD, ενώ έγινε αναφορά στις κυριότερες πρωτεΐνες-στόχους του στα φυτά. Σκοπός τώρα είναι να αναδειχθεί ο συντονισμένος τρόπος απόκρισης των φυτών σε συνήθεις καταπονήσεις, καθώς και ο κεντρικός ρόλος που διαδραματίζουν οι διάφορες ισομορφές PLD στην αντιμετώπιση των έκτακτων αυτών συνθηκών και στην αποκατάσταση πιθανών φθορών στο φυτικό οργανισμό. Τέτοιες καταπονήσεις είναι: οι υπερωσμωτικές καταπονήσεις (λειψυδρία, υψηλή αλατότητα), ο αβιοτικός (από βροχή, χαλάζι ή αέρα), αλλά και ο βιοτικός τραυματισμός (από παθογόνα, έντομα ή μηρυκαστικά), καθώς και η έλλειψη θρεπτικών συστατικών (P, N₂).

Ξεκινώντας από τις καταπονήσεις που αφορούν σε μεταβολή της ωσμωτικής πίεσης στα φυτά, είναι γνωστή η απόκριση μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού του ABA (σχήμα 8). Συγκεκριμένα, η PLDα1 δεσμεύει την υπομονάδα α μίας πρωτεΐνης G (μέσω του μοτίβου DRY) και το παραγόμενο PtdOH συνδέεται με τον αναστολέα ABI, προωθώντας τη σηματοδότηση μέσω ABA και επάγοντας το κλείσιμο των στομάτων [2, 34, 44, 63, 66, 120, 121]. Ωστόσο, το PtdOH συνδέεται και με RbohD/E προκαλώντας την παραγωγή ROS, ενώ παράλληλα μέσω σύνδεσης ενεργοποιεί και τις πρωτεΐνες 14-3-3 (ATPάση της πλασματικής μεμβράνης), PKC και MAPK (πρωτεϊνικές κινάσες) [63]. Η αυξημένη συγκέντρωση των ROS, στη συνέχεια, επάγει την PLDδ, η οποία δρα σε δεύτερο χρόνο ως ανιχνευτής καταστροφών [34, 65, 66]. Η τελευταία, μέσω του μονοπατιού MAPK, μειώνει τελικά τις ROS και αποτρέπει τον κυτταρικό θάνατο, ενώ ρυθμίζει τη ρευστότητα των μεμβρανών και την ωσμωτική ισορροπία [34, 44, 63]. Πέρα από την ενεργοποίηση

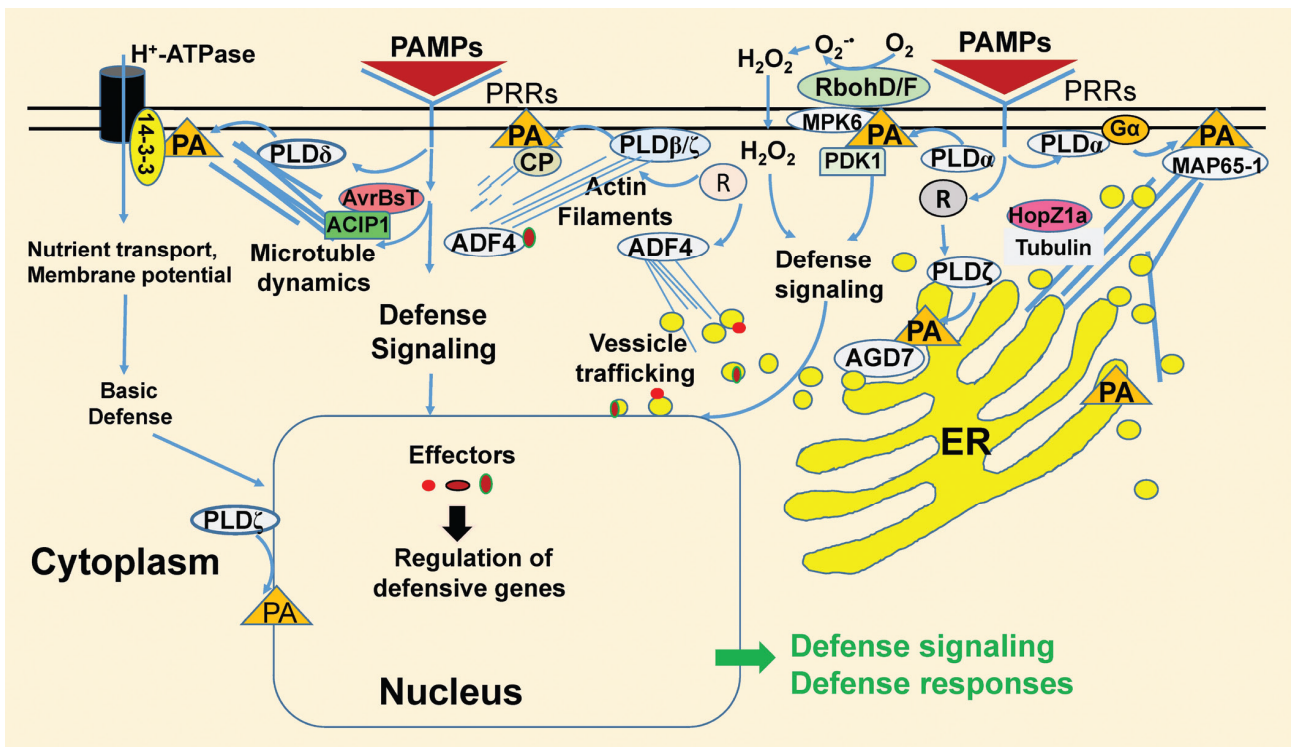
σηματοδοτικών μονοπατιών σε συνθήκες υπερωσμωτικής καταπόνησης, λαμβάνει χώρα και ανάπτυξη των ριζών προς ανεύρεση νερού. Στη διαδικασία αυτή συμμετέχουν οι PLDα3 και PLDε, που ενεργοποιούν μονοπάτια ανάπτυξης (μέσω TOR) του φυτού [63].



Σχήμα 8. Συμμετοχή ισομορφών PLD στις αποκρίσεις σε υπερωσμωτικές καταπονήσεις.

ABA: αμπισισικό οξύ, ABI1: αναστολέας ABA, RbohD/E: οξειδάσες του NADPH, ROS: ενεργές μορφές οξυγόνου, TOR: στόχος ραπαμυκίνης

Ο αβιοτικός τραυματισμός θα αναφερθεί σε επόμενη ενότητα. Όσο για τον βιοτικό τραυματισμό, είναι γνωστό ότι η PLD εμπλέκεται στην άμυνα των φυτών στην περίπτωση αυτή (σχήμα 9) [79]. Σε περίπτωση επιτυχούς αντιμετώπισης απ' το φυτό της προσβολής ενός βακτηρίου, παρατηρείται συσσώρευση (clustering) της PLD σε μεμβράνες που γειτνιάζουν με τα βακτηριακά κύτταρα [66]. Κατά την απόκριση σε παθογόνα ενεργοποιούνται πλήθος ισομορφών PLD: χαρακτηριστικά στην *A. thaliana* οι AtPLDα1, β1, γ1 και γ2 επάγονται μετά από μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas*, εκφράζονται όμως σε διαφορετικούς χρόνους [79]. Ωστόσο, κυρίως υπεύθυνη για τις αποκρίσεις κατά τον βιοτικό τραυματισμό είναι η PLDβ [84]. Ειδικότερα, μετά από επίδραση κάποιου επαγωγέα αυξάνεται η έκφραση της PLDβ κι έτσι μετριάζεται/ρυθμίζεται η οξειδωτική έκρηξη και, ακολούθως, ενεργοποιείται η πολυφαινολοξειδάση (PPO), που προωθεί αλλαγές στο κυτταρικό τοίχωμα προς αντιμετώπιση του εισβολέα [44, 84, 122]. Επιπλέον, η ισομορφή αυτή επάγει την έκφραση γονιδίων άμυνας σχετιζομένων με παθογόνα (pathogen related genes, PR), καταστέλλει τη σύνθεση σαλικυλικού (SA) και επάγει τη σηματοδότηση μέσω JA καταλήγοντας στην αύξηση της ανθεκτικότητας του φυτού στο παθογόνο [84, 123].



Σχήμα 9. Συμμετοχή του συστήματος PLD-PtdOH στην απόκριση των φυτών σε παθογόνα μέσω ρύθμισης της οργάνωσης του κυττοσκελετού και της κυκλοφορίας μεμβρανών.

Τα φυτικά κύτταρα αναγνωρίζουν τα παθογόνα μέσω σύνδεσης των PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) στους αντίστοιχους υποδοχείς (Pattern Recognition Receptors, PRR) ή εκκρινόμενοι επαγωγείς (effectors) από τα παθογόνα αναγνωρίζονται από τις πρωτεΐνες αντίστασης (R) των κυττάρων. Η σηματοδότηση ενεργοποιεί πλήθος ισομορφών PLD (α, β, δ, ζ) και επάγει αλλαγές στον κυττοσκελετό. Συνοπτικά, το προερχόμενο από δράση PLD, PtdOH (PA), μπορεί να συνδεθεί με την α υπομονάδα πρωτεϊνών G (Gα), την εξαρτώμενη από PtdIns πρωτεϊνική κινάση (PDK1), την MPK6 (Mitogen-activated Protein Kinase), την οξειδάση του NADPH (RbohD/F) ή την πρωτεΐνη 14-3-3 και να επάγει την παραγωγή ROS και την ενεργοποίηση σηματοδοτικών πορειών απόκρισης στα παθογόνα. Επιπλέον, η σύνδεση του PtdOH με την CP (Capping Protein) ή τη MAP65-1 (Microtubule-Associated Protein kinase) επάγουν αλλαγές στον κυττοσκελετό. Οι αλλαγές στον κυττοσκελετό, καθώς και η σύνδεση του PtdOH με την AGD7 (ARF GTP-ase activating Protein) ρυθμίζουν την κυκλοφορία των μεμβρανών [84]

Όσον αφορά τις υπόλοιπες ισομορφές PLD, έχει βρεθεί πως το PtdOH, το παραγόμενο από PLDβ και δ, ρυθμίζει τον πολυμερισμό της ακτίνης και της τουμπουλίνης. Οι PLDα και δ ενεργοποιούν μονοπάτια κινάσων (MAPK, σφιγγοσινική κινάση και PDK), ενώ η σύνδεση του PLDα/PtdOH με τη 14-3-3 ATPάση της πλασματικής μεμβράνης ρυθμίζει την άμυνα μέσω ρύθμισης του δυναμικού της μεμβράνης και της μεταφοράς θρεπτικών συστατικών. Παράλληλα, έχει δείχθει πως η PLDγ μετακινείται στο σημείο της προσβολής εγείροντας ισχυρή ανοσοαπόκριση (effective triggered immunity, ETI) [66, 79, 84]. Τέλος, η PLDζ παρέχει PtdOH που συμμετέχει στη μεταφορά συστατικών μέσω κυκλοφορίας κυστιδίων, στην ανάπτυξη του δικτύου της ακτίνης στα κύτταρα της ρίζας, καθώς και στη ρύθμιση της σηματοδότησης από βρασσινοστεροειδή. Συνοψίζοντας, την προσβολή από παθογόνα ακολουθεί ενεργοποίηση πολλαπλών ισομορφών PLD που οδηγεί σε έναρξη

πορειών σηματοδότησης, οξειδωτική έκρηξη και αναμόρφωση των κυτταρικών τοιχωμάτων [84].

Είδος καταπόνησης αποτελεί και η έλλειψη φωσφορικών. Τα φωσφολιπίδια λειτουργούν ως αποθήκες ανόργανου φωσφόρου, τον οποίο αποδεσμεύουν στο κύτταρο μετά τη διαδοχική δράση της PLDζ και της φωσφατάσης του PtdOH [44, 60]. Η PLDζ, αποκρινόμενη στην έλλειψη φωσφόρου, επάγει την ανάπτυξη της ρίζας του φυτού [44, 51], ενώ τα τελικά προϊόντα είναι ανόργανος φωσφόρος και DAG, η οποία χρησιμοποιείται περαιτέρω για τη σύνθεση γαλακτολιπιδίων. Τα τελευταία αποκαθιστούν την έλλειψη φωσφολιπιδίων που προκλήθηκε από τη δράση της PLD, επαναφέροντας τη δομική ισορροπία στις μεμβράνες [44].

Την ανάπτυξη των ριζών υπό συνθήκες έντονης έλλειψης αζώτου προωθεί η PLDε. Γενικά, ακόρεστα είδη PtdOH εμπλέκονται στον έλεγχο των επιπέδων των θρεπτικών συστατικών, ώστε να ρυθμίσουν την ανάπτυξη της ρίζας. Η επίδραση της PLDε στην ανάπτυξη και τη μορφολογία της ρίζας διαφέρει ανάλογα με τα επίπεδα αζώτου. Σε έντονη στέρση αζώτου (0,1-0,6 mM), προωθείται η επιμήκυνση της κύριας ρίζας και των ριζικών τριχιδίων. Όμως δεν παρατηρείται το ίδιο φαινόμενο όταν υπάρχει αρκετό άζωτο (6-60 mM), οπότε επάγεται η ανάπτυξη πλαγίων ριζών [51].

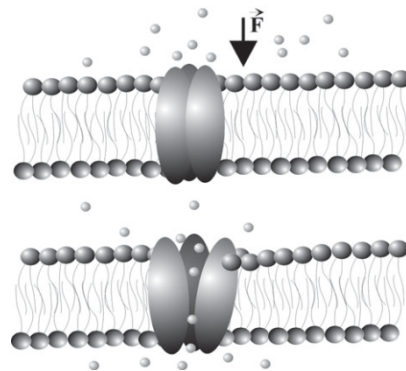
1.5 Τραυματισμός

Τα φυτά είναι διαρκώς εκτεθειμένα σε πιθανούς περιβαλλοντικούς παράγοντες καταπόνησης (βιοτικούς ή αβιοτικούς). Στην ενότητα αυτή θα παρουσιαστούν δεδομένα που αφορούν την απόκριση φυτών σε μηχανικές καταπονήσεις, που άλλωστε αποτελεί και ένα από τα αντικείμενα της παρούσας διατριβής. Η αντίδραση του φυτού είναι, όπως φαίνεται, ακαριαία και αποσκοπεί στην αντιμετώπιση του τραυματισμού τοπικά -με εναπόθεση ενώσεων στο σημείο του τραύματος και επούλωσή του- και την επαγωγή σηματοδότησης συστημικά για ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας στους γειτονικούς ή πιο απομακρυσμένους ιστούς, ώστε να προληφθεί και να αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά η επερχόμενη «απειλή» (συστημικό σήμα) [124].

1.5.1 Τοπική σηματοδότηση

Τα μονοπάτια σηματοδότησης, που εγείρονται μετά από τον τραυματισμό, στα «θιγμένα» κύτταρα δεν παρουσιάζουν εξειδίκευση για την περίπτωση μόνο του τραυματισμού, αλλά ενεργοποιούνται και από άλλες καταπονήσεις. Σε αυτά τα μονοπάτια κεντρικό ρόλο διαδραματίζουν οι ROS, το JA και τα ιόντα ασβεστίου. Επομένως, το φυτό αντιλαμβάνεται

και διαχωρίζει τις καταπονήσεις από το συνδυασμό των σημάτων που εγείρονται κάθε φορά. Στον τραυματισμό, τοπικά, φαίνεται πως τα κύτταρα αντιλαμβάνονται το μηχανικό ερέθισμα μέσω των μικροσωληνίσκων, που λειτουργούν ως αισθητήρες των εφαρμοζόμενων τάσεων στα φυτικά κύτταρα, ενώ η πίεση που ασκείται στα κύτταρα ανοίγει άμεσα τάσεοελεγχόμενα κανάλια Ca^{2+} (σχήμα 10). Άρα ο κυτταροσκελετός και η ρύθμιση της συγκέντρωσης Ca^{2+} στο κύτταρο «μεταφράζουν» το μηχανικό σήμα σε χημικό και εγείρουν τις υπόλοιπες αποκρίσεις στον τραυματισμό [125]. Μετά την λήψη του σήματος τραυματισμού τα κύτταρα κατευθύνονται έτσι, ώστε να συνθέσουν ορμόνες για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και οργάνωσης της άμυνας του φυτού. Τα γονίδια, των οποίων η έκφραση επηρεάζεται από τον τραυματισμό, ανήκουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια και προωθούν τη σύνθεση μορίων άμυνας (ορμόνες, ROS), επούλωσης του τραύματος (συνθάσες κυτταρίνης, υπεροξειδάσες) και μετάδοσης του σήματος στους γειτονικούς ιστούς (ορμόνες, ROS). Στις πορείες αυτές πιθανότατα εμπλέκεται και η PLD, όπως στην περίπτωση του *R. communis*, όπου μετά τον τραυματισμό αυξάνονται ενδοκυτταρικά τα επίπεδα Ca^{2+} και μετατοπίζεται η διαλυτή PLD στις μεμβράνες, οπότε ενεργοποιείται [126].



Σχήμα 10. Πιθανός μηχανισμός αντίληψης μηχανικού ερεθίσματος. Τάσεοελεγχόμενα κανάλια ιόντων ανοίγουν ως απόκριση στη μεταβολή της καμπυλότητας της μεμβράνης. Η αντίληψη του σήματος επιτυγχάνεται με την εκροή ιόντων στο κυτόπλασμα [125]

1.5.1.1 Πορείες με συμμετοχή φυτικών ορμονών

Αρχικά, παρατίθενται τα δεδομένα που αφορούν τα ρυθμιστικά ένζυμα βιοσύνθεσης ορμονών που εμπλέκονται στον τραυματισμό. Οι ορμόνες αυτές είναι το JA και το αιθυλένιο. Για το ABA δε βρέθηκαν επαρκή στοιχεία που να εντάσσουν τη βιοσύνθεσή του στις αποκρίσεις στον τραυματισμό.

Ιασμονικό οξύ

Το JA είναι η ορμόνη που σε φυσιολογικές συνθήκες ελέγχει το ρυθμό άνθισης και μετά από μηχανική καταπόνηση του φυτού προκαλεί καθυστέρηση της ανάπτυξής του και ρυθμίζει τον κυτταρικό θάνατο και τα επίπεδα H_2O_2 στα προσβεβλημένα κύτταρα [124, 127]. Σε επίπεδο κυττάρου, το JA προκαλεί αύξηση της δραστηριότητας της οξειδάσης του 1-αμινο-κυκλοπροπανο-1-καρβοξυλικού οξέος (ACC), με αποτέλεσμα την αύξηση του αιθυλενίου και την προώθηση της γήρανσης των φυτικών οργάνων [128]. Τα μονοπάτια σύνθεσης JA και αιθυλενίου αλληλεπιδρούν, καθώς, εκτός της επαγωγής της σύνθεσης αιθυλενίου από το JA, που ήδη αναφέρθηκε, το αιθυλένιο φαίνεται πως ενεργοποιεί τη συνθάση του αλλενοξειδίου (AOS), που είναι ρυθμιστικό ένζυμο της σύνθεσης του JA [129]. Επιπλέον, είναι γνωστό πως το σαλικυλικό οξύ (SA) είναι ισχυρός παρεμποδιστής της βιοσύνθεσης και δράσης του JA [128].

Η επαγωγή της σύνθεσης JA αρχίζει με τη μεταφορά του σήματος στο μεμβρανικό υποδοχέα και την απελευθέρωση λινολενικού οξέος από τις μεμβράνες [128]. Τα βιοσυνθετικά ένζυμα του JA εντοπίζονται στους χλωροπλάστες και στα υπεροξυσώματα, όπου αρχίζει και ολοκληρώνεται η σύνθεση της ορμόνης, αντίστοιχα (Παράρτημα II, σχήμα βιοσύνθεσης JA) [75]. Ωστόσο, υπάρχουν και δεδομένα από φυτά καπνού, όπου λαμβάνει χώρα κυτοσολικός σχηματισμός JA, μετά από ενεργοποίηση της AOS των χλωροπλάστων έτσι, ώστε να μην κατευθύνεται στους χλωροπλάστες. Με πειράματα υπερέκφρασης του ενζύμου σε φυσιολογικές συνθήκες βρέθηκε ότι δεν αλλάζουν τα επίπεδα JA. Όμως κατόπιν τραυματισμού, παράγεται JA και επάγονται γονίδια άμυνας από την κυτοσολική AOS [130].

Αρχικά, το JA θεωρήθηκε παρεμποδιστής της αύξησης. Σήμερα όμως, συνδέεται με αυξητικές διεργασίες, καθώς και με την άμυνα των φυτών [128]. Το JA είναι ένωση «κλειδί» για αντίσταση στα έντομα και συνδέει την αντίληψη του τραυματισμού με την έκφραση γονιδίων άμυνας (π.χ. Protease Inhibitors, PI, Vegetative Storage Proteins, VSP) [131]. Έχει προταθεί ότι ο τραυματισμός προκαλεί την απελευθέρωση ενός πεπτιδίου 18 αμινοξέων, της συστεμίνης, που κινείται στα αγγεία του ηθμού και μεταφέρει το μήνυμα για τη σύνθεση του JA και, ακολούθως, την επαγωγή των παραπάνω γονιδίων [128]. Έχει, επίσης, παρατηρηθεί αύξηση των επιπέδων JA στα τραυματισμένα κύτταρα μέσα σε 1-2 h [132].

Ο τρόπος επαγωγής της βιοσύνθεσης του JA μετά τον τραυματισμό έχει απασχολήσει πολλές ερευνητικές ομάδες και ακόμα παραμένει σημείο αμφιλεγόμενο. Το μόνο κοινώς αποδεκτό στοιχείο είναι η ενεργοποίηση PLD, μετά από μηχανική καταπόνηση [74, 75], και

η εμπλοκή τους στο βιοσυνθετικό μονοπάτι του JA. Ο ακριβής ρόλος τους, όμως, μένει να διαλευκανθεί. Τα σενάρια, που μέχρι στιγμής έχουν προταθεί, υποστηρίζουν πως η δράση PLD μετά τον τραυματισμό είτε παρέχει πρόδρομες ενώσεις για το σχηματισμό JA είτε επηρεάζει την έκφραση γονιδίων, που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της ορμόνης. Η τελευταία είναι και η επικρατέστερη άποψη, ενώ το πλήθος των γονιδίων που ενεργοποιεί η PLD αποκαλύπτει τον κεντρικό και πολυδιάστατο ρόλο της στη σηματοδότηση μέσω JA.

Πιο αναλυτικά, όσον αφορά την πρώτη εκδοχή, φαίνεται ότι η επαγωγή σύνθεσης του JA γίνεται επειδή, με τη λύση των κυττάρων, έρχεται σε επαφή το λινολενικό οξύ, που είναι πρόδρομο μόριο βιοσύνθεσης του JA, με τις λιπάσες και λιποξυγενάσες [128]. Πράγματι, ο τραυματισμός αυξάνει την έκφραση της PLD α 1 και της PLD δ . Η πρώτη υδρολύει συστατικά λιπίδια των μεμβρανών και, ίσως, με τα προϊόντα της δράσης της, να παρέχει δευτερογενώς πρόδρομες ενώσεις για τη σύνθεση JA, όπως το λινολενικό οξύ, που αποδεδειγμένα αυξάνεται μετά τον τραυματισμό [34, 37, 45].

Ωστόσο, το λινολενικό οξύ αποτελεί και θετικό ρυθμιστή της λιποξυγενάσης 2 (LOX2) [37, 45], ενώ στην *A. thaliana*, υπάρχουν ενδείξεις πως η ίδια η PLD στοχεύει στη LOX2 [132]. Ακόμα, η PLD δ επιδρά στην έκφραση γονιδίων και ρυθμίζει τις συγκεντρώσεις διαλυτών σακχάρων και ωσμωλυτών. Ενεργοποιεί, δηλαδή, άλλο σηματοδοτικό μονοπάτι για την αντιμετώπιση του τραυματισμού [34]. Άρα, σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, η συμμετοχή της PLD στο μονοπάτι του JA μετά τον τραυματισμό έγκειται στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων, όπως της λιποξυγενάσης. Πιο συγκεκριμένα, προτείνεται πως το -παραγόμενο από την PLD- PtdOH οδηγεί στο σχηματισμό JA, όχι παρέχοντας λινολενικό οξύ ούτε αυξάνοντας την έκφραση της -ρυθμιστικής για τη βιοσύνθεση του JA- LOX2 [74, 75], αλλά με μεσολάβηση του καταρράκτη των MAPK [75]. Η δράση της PLD οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης των DGL (DONGLE) και DAD1 (Defective in Anther Dehiscence 1) μέσω των MAPK [77]. Η DGL της *A. thaliana* έχει δράση γαλακτολιπάσης και ασθενούς PLA $_1$ και εκφράζεται στα φύλλα. Ο τραυματισμός αυξάνει την έκφραση αυτή σε 1 h και υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν ότι η DGL ρυθμίζει την ανάπτυξη των ιστών και ευθύνεται για τη γρήγορη παραγωγή JA μετά τον τραυματισμό. Δράση της DGL στα γαλακτολιπίδια των χλωροπλαστών παρέχει 12-οξο-10,15-φυτοδιενοϊκό οξύ (OPDA) για το σχηματισμό JA. Το έργο της DGL ολοκληρώνει η φωσφολιπάση DAD1, που ευθύνεται για την παραγωγή JA στα ύστερα στάδια του τραυματισμού παρέχοντας λινολενικό οξύ. Για την αύξηση της έκφρασης των δύο αυτών πρωτεϊνών πιθανολογείται ότι υπεύθυνη είναι η PLD α 1, που με αυτό τον τρόπο ρυθμίζει το σχηματισμό ενώσεων πρόδρομων του JA. Οπότε, σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, η παραγωγή JA μετά από τραυματισμό εξαρτάται μάλλον από

την παροχή του υποστρώματος της AOS, παρά από την ποσότητα του ενζύμου αυτού [75].

Τα πρώτα βήματα της σηματοδότησης μετά τον τραυματισμό, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, περιλαμβάνουν ενεργοποίηση της PLD. Ο τραυματισμός αυξάνει τη δραστικότητα της PLDα και μάλιστα στα πρώτα 15 min. Το σήμα στην PLD φαίνεται να δίνεται από τη διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος [132]. Το PtdOH, σε 1 h μετά τον τραυματισμό, έχει παρουσιάσει αύξηση της συγκέντρωσής του και είναι πιθανόν να ενεργοποιεί τη PLA₂. Τα λυσο-φωσφολιπίδια, που σχηματίζονται από τη δράση της τελευταίας, είναι παρεμποδιστές της δράσης των PLD και ίσως είναι αυτά που αναστέλλουν τελικά τη δράση της PLDα (ανάδραση) και εξασθενούν το σήμα του τραυματισμού [133].

Αιθυλένιο

Το αιθυλένιο είναι η μόνη φυτοορμόνη σε αέρια μορφή και προέρχεται από τους 3C και 4C της μεθειονίνης (Παράρτημα II, σχήμα βιοσύνθεσης αιθυλενίου). Συντίθεται σε όλα τα φυτικά όργανα, ενώ η σύνθεσή του επάγεται από άλλες φυτοορμόνες, όπως αυξίνες, κυτοκινίνες και ABA, καθώς και από διάφορες καταπονήσεις [128].

Σε επίπεδο κυτάρου το αιθυλένιο επιδρά στην έκφραση γονιδίων που επάγονται από καταπονήσεις, συμβάλλει στην αποδόμηση των χλωροφυλλών (αποπρασινισμός) και επάγει γονίδια που αποδομούν τα κυτταρικά τοιχώματα, όπως είναι η κυτταρινάση, η χιτρινάση και υπεροξειδάσες. Η ταχύτητα σύνθεσής του αυξάνεται όταν το ριζίδιο διαπερνά το σπερματικό περίβλημα και το αρτίβλαστο την εδαφική επιφάνεια. Επίσης, μεγάλες ποσότητες αιθυλενίου συντίθενται σε γηράσκοντα φυτικά όργανα και σε κλιμακτηριακούς καρπούς κατά τη φάση της ωρίμανσης. Επομένως, το αιθυλένιο παίζει ρόλο στην έναρξη της άνθισης, την ωρίμανση των καρπών, καθώς και την απόπτωση φυτικών οργάνων [128].

Ο τραυματισμός, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, επάγει το σχηματισμό αιθυλενίου [134, 135], το οποίο σε δεύτερο στάδιο ενεργοποιεί την PLDα [136, 137] και ίσως τελικά το φυτό καταλήγει στη γήρανση [137]. Το αιθυλένιο, ωστόσο, ρυθμίζει και την ενδογενή συγκέντρωσή του είτε με διάχυση προς την ατμόσφαιρα είτε με αυτοκατάλυση, δηλαδή παρεμπόδιση της σύνθεσής του. Έτσι, ο τραυματισμός, όταν τα επίπεδα του αιθυλενίου είναι αυξημένα, προωθεί την αυτοκατάλυση με μείωση της διαθεσιμότητας, και όχι της δραστικότητας, της συνθάσης του ACC [128].

Στο βαμβάκι, η συνθάση του ACC (GhACS1), που αποτελεί ρυθμιστικό ένζυμο της βιοσύνθεσης του αιθυλενίου [128], εκφράζεται παροδικά μετά από τραυματισμό στα φύλλα. Η έκφραση αυξάνεται ήδη από τα πρώτα 10 min μετά τον τραυματισμό, σε μισή ώρα έχει φτάσει στο μέγιστο και στις 2 h η έκφραση είναι σε επίπεδα μη ανιχνεύσιμα. Τέλος, επάγεται και από τη δράση ABA και ROS, ενώ το μεθυλο-JA δεν επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης υποδηλώνοντας πως η σηματοδότηση δεν περιλαμβάνει το δρόμο του JA [138].

Καθοδικοί στόχοι των ορμονών

Την τοπική απόκριση στον τραυματισμό, σύμφωνα με τα όσα έχουν αναφερθεί, την συντονίζουν κατά κύριο λόγο ορμόνες (JA, αιθυλένιο) με επίδραση στην έκφραση των βιοσυνθετικών ενζύμων των αντίστοιχων ορμονών. Εν τούτοις, έχουν βρεθεί και άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια ή γονίδια, που ρυθμίζουν τη βιοσύνθεση ή αποτελούν καθοδικούς στόχους των εν λόγω ορμονών.

Ένα τέτοιο σηματοδοτικό μονοπάτι είναι αυτό των MAPK, αφού το PtdOH οδηγεί στο σχηματισμό JA με μεσολάβηση του καταρράκτη των MAPK [75]. Γενικά, οι MAPK συγκροτούν πολύ διαδεδομένα μονοπάτια απόκρισης σε εξωτερικά ερεθίσματα και ενεργοποιούνται από ορμόνες, αβιοτικές καταπονήσεις, τραυματισμό, παθογόνα, αλλά και κατά την κυτταρική διαίρεση [139]. Ανάλογα με την ομολογία και τη συντήρηση των μοτίβων φωσφορυλίωσής τους, χωρίζονται σε τέσσερις ομάδες (A-D). Οι ομάδες A και B είναι περισσότερο μελετημένες, ενώ για την ομάδα C υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα [140].

Οι καταρράκτες των MAPK αποτελούνται από τρεις διαδοχικά ενεργοποιούμενες MAPK τις: (1) MAPKKK ή MAP3K, (2) MAPKK ή MAP2K και (3) MAPK [140]. Ενδεικτικά αναφέρεται πως η *A. thaliana* διαθέτει 20 MAPK, 10 MAPKK και 80 MAPKKK, ενώ στην όρουζα οι MAPK είναι 17 και στη λεύκα 21 [140, 141]. Κατά την ολοκλήρωση του καταρράκτη, οι MAPK, αφού φωσφορυλιωθούν, μετατοπίζονται και αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς παράγοντες επιδρώντας τελικά στην έκφραση γονιδίων [140]. Όπως είναι αναμενόμενο, οι καταρράκτες των MAPK αλληλεπιδρούν σε μεγάλο βαθμό με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια [139].

Γενικά, οι MAPK εμπλέκονται στην απόκριση σε καταπονήσεις. Ειδικότερα, MAPK των ομάδων A και B ενεργοποιούνται από καταπονήσεις όπως η ξηρασία, η αλατότητα, το ψύχος και η παραγωγή ABA, ενώ MAPK της ομάδας A (*At*MPK3 και 6) εμπλέκονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι του αιθυλενίου και επάγουν το σχηματισμό του ενεργοποιούμενες

από παθογόνα [140, 142]. Τέλος, οι AtMPK4 και 6 (ομάδα B1 και A2, αντίστοιχα) επάγονται γρήγορα από τραυματισμό [141]. Όσον αφορά τις MAPK της ομάδας C, στην *A. thaliana*, το μπιζέλι, τον αραβόσιπο και το βαμβάκι αποκρίνονται στο ABA, το μηχανικό τραυματισμό και την αυξημένη συγκέντρωση H₂O₂ [140]. Μάλιστα, οι AtMPK1, AtMPK2 και PsMPK2, που ανήκουν στην υποομάδα C1, επάγονται από το JA κατά τον τραυματισμό, ενώ το σήμα φαίνεται ότι μεταδίδεται με τη συμμετοχή και άλλων μονοπατιών, όπως του ABA και του H₂O₂ [139, 143]. Ένας ακόμα ρόλος των MAPK της ομάδας C είναι η απόκριση στα παθογόνα, όπως μαρτυρούν δεδομένα που αφορούν τις AtMPK1, 2, 7, 14 και τη GhMPK7. Στις παραπάνω περιπτώσεις καταπόνησης (τραυματισμός, παθογόνα) είναι γνωστό ότι οι πρώτες αποκρίσεις περιλαμβάνουν και αύξηση των ROS. Ωστόσο, οι καταρράκτες MAPK δεν επάγονται μόνο από ROS, αλλά και ρυθμίζουν τα επίπεδά τους μέσω της επίδρασής τους στη δράση της καταλάσης. Πιο συγκεκριμένα, στην *A. thaliana* ο καταρράκτης MKK1-MPK6 ρυθμίζει τα επίπεδα H₂O₂ μέσω της καταλάσης, CAT1, ενώ η CAT2 ρυθμίζεται από τις MEKK1-MPK4, που σχετίζονται με την άμυνα του φυτού και τη συσσώρευση SA [141, 144]. Επιπλέον, ο τραυματισμός, μέσω της αύξησης των επιπέδων Ca²⁺ και της καλμοδουλίνης, ενεργοποιεί τη MPK8, η οποία σε 30 min μειώνει τα επίπεδα H₂O₂ με ανάλογη επίδραση στα γονίδια RbohD και OXI1 [145]. Τέλος, η όποια ενεργοποίηση των MAPK φαίνεται ότι λαμβάνει χώρα κυρίως σε μεταγραφικό επίπεδο και όχι στο επίπεδο της μετάφρασης [146].

Εστιάζοντας στην εμπλοκή των MAPK στις αποκρίσεις κατά τον τραυματισμό, είναι γνωστό πως MAPK και CPK εμπλέκονται στην απόκριση σε αβιοτικό τραυματισμό [147]. Αυτό γίνεται μάλιστα μέσω της δράσης PLD, η οποία ενεργοποιείται κατά τον τραυματισμό και στοχεύει στο μονοπάτι των MAPK [74, 75]. Για την ενεργοποίηση των MAPK φαίνεται πως ευθύνεται το PtdOH [77], όπως έχει δείχθει ότι συμβαίνει στην *A. thaliana*, όπου ο τραυματισμός αυξάνει τα επίπεδα H₂O₂ μέσα στο κύτταρο και ακολουθεί διαδοχικά ενεργοποίηση της PLDδ και της MAPK, με αποτέλεσμα την αναστολή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου [61].

Η μελέτη της ενεργοποίησης των MAPK κατά τον τραυματισμό στα διάφορα είδη φυτών έχει δείξει πως η δράση τους αφενός οδηγεί στο σχηματισμό JA, αφετέρου μπορεί να επάγεται από αυτό. Στην τομάτα η συστεμίνη -και όχι το JA- ενεργοποιούν ταχύτατα (μέγιστη δράση σε 15 min) την κινάση MBP (Myelin Basic Protein) και αυτή επάγει τις αποκρίσεις στον τραυματισμό [148]. Παρόμοια, στον καπνό, η WIPK (Wound-Induced Protein Kinase, MAPK) αποκρίνεται πολύ γρήγορα στον τραυματισμό με αύξηση της έκφρασής της και επαγωγή του σχηματισμού του JA [149, 150]. Επιπλέον, στο βαμβάκι η

MPK2 αποκρίνεται στον τραυματισμό με αύξηση της έκφρασής της άμεσα (σε 15 min) και παροδικά (σε 1 h επιστρέφει στα φυσιολογικά επίπεδα) [146, 149, 150]. Στην αύξηση αυτή δεν εμπλέκεται το H₂O₂, αφού η αύξησή του παρατηρείται σε 1 h, μετά την αντίστοιχη επαγωγή της MPK2. Ωστόσο, επίδραση H₂O₂ μπορεί να επάγει αύξηση στην έκφραση της MPK2 σε 1 h με μέγιστο στις 6 h, ενώ αποκρίνεται σε ορμόνες (ABA, JA, SA) και, δεδομένου ότι ανήκει στην ομάδα C των MAPK, αποκρίνεται και σε άλλες καταπονήσεις (παθογόνα, αλατότητα, ξηρασία) [140, 146]. Επομένως, ο ρόλος της δεν παρουσιάζει εξειδίκευση ως προς μία συγκεκριμένη καταπόνηση, αλλά ρυθμίζει την άμυνα στις καταπονήσεις γενικότερα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το ABA, που αυξάνει την έκφρασή της σε 1 h και με πειράματα υπερέκφρασης της MPK2 φάνηκε ότι: (1) ρυθμίζονται θετικά γονίδια αποκρινόμενα στις καταπονήσεις (stress-related genes) (π.χ. DIN1, *Nt*LEA5, osmotin), (2) μειώνεται η ευαισθησία σε ABA (ίσως ανάδραση) και (3) αυξάνονται οι ιστοί, κάτι που υποδεικνύει ως πιθανό στόχο των MAPK τις VSP. Παρόμοιο προφίλ έκφρασης με την MPK2 έχει και η MPK7 στο βαμβάκι, γεγονός που υποδηλώνει την αλληλεπίδραση διαφόρων MAPK κατά την αντιμετώπιση καταπονήσεων [140].

Η σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού του JA, μετά τη σύνθεση της ορμόνης, συνεχίζεται με τη σύζευξή του με ισολευκίνη [127, 151, 152], με δράση του JAR1 (JAsmonate Resistant 1) [127]. Το JA-Ile συνδεόμενο στον υποδοχέα του (COronatin Insensitive, COI1) οδηγεί σε αποικοδόμηση των καταστολέων του JA (JAZ protein family) και ακολούθως, επιτρέπει την ολοκλήρωση της σηματοδότησης μέσω JA [127, 151, 152]. Έτσι, τελικά ενεργοποιείται, μεταξύ άλλων, και η συνθάση της κυτταρίνης [151, 152], η οποία δρα ως ανάδραση στο μονοπάτι, αφού δίνει το σήμα της επανόρθωσης του κυτταρικού τοιχώματος με καταστολή της δράσης της DGL [153]. Να σημειωθεί εδώ πως ο κεντρικός ρυθμιστής του μονοπατιού μετάδοσης του σήματος του JA είναι ο COI1 [154].

Εκτός των MAPK και των υποδοχέων JA, ο τραυματισμός είναι ενεργοποιητής της έκφρασης των αποταμιευτικών πρωτεϊνών VSP. Η ενεργοποίηση αυτή μάλιστα, όπως φαίνεται από την *A. thaliana*, εξαρτάται από τη σηματοδότηση μέσω JA, καθώς σε μεταλλάγματα των *jar1*, *coi1*, *jin1* και 4 παρατηρείται μείωση των αντιγράφων VSP. Και στη σόγια η συμπεριφορά των VSP εξαρτάται από την πορεία του JA, αφού ο προαγωγέας τους αποκρίνεται σε μεθυλο-JA, ενώ τόσο ο τραυματισμός όσο και τα φυτοφάγα επάγουν τις VSPα και β. Όσον αφορά τις λειτουργίες που εξυπηρετούν, στην *A. thaliana* έχει δειχθεί πως συμμετέχουν στη συστημική απόκριση. Ωστόσο, παρουσιάζουν πιο υψηλή αύξηση έκφρασης σε τοπικό επίπεδο 3-6 h μετά από τραυματισμό. Αυτό υποδεικνύει το ρόλο τους στο μηχανισμό προσαρμογής του φυτού και όχι τόσο στην

άμυνά του στους βιοτικούς ή αβιοτικούς παράγοντες τραυματισμού. Όντως, οι VSP είναι υπεύθυνες για την αποταμίευση θρεπτικών συστατικών στο φυτό και, όταν γίνουν πάλι ευνοϊκές οι συνθήκες, προάγουν την ανάπτυξή του [131].

Τέλος, το JA επάγει την έκφραση και άλλων πρωτεϊνών, όπως τη JIP21 (Jasmonic-Induced Protein) στην τομάτα, η οποία επάγεται από τραυματισμό και μεθυλο-JA. Πιο συγκεκριμένα, ο τραυματισμός οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης στα φύλλα τοπικά σε 6-72 h (μέγιστο στις 48 h) και συστηματικά σε 24-48 h (μέγιστο στις 24 h). Η εικόνα είναι ανάλογη μετά από επίδραση μεθυλο-JA, με πιο γρήγορη και μεγαλύτερης διάρκειας (>7 d) έκφραση του γονιδίου. Η JIP21, ωστόσο, δεν επάγεται από επίδραση παθογόνων, αν και έχει δράση αναστολέα χυμοθρυψίνης (αναστολέας σερινο-πρωτεασών), που δυσχεραίνει την πέψη στα φυτοφάγα [155].

Τέλος, στα φυτά έχουν βρεθεί και γονίδια που αποκρίνονται ειδικά στο αιθυλένιο, όπως μαρτυρούν και τα ονόματά τους. Για παράδειγμα, τα γονίδια ERF (Ethylene Response Factors) στο βαμβάκι, που αποκρίνονται στο αιθυλένιο και εν μέρει στο JA. Η δράση τους οδηγεί σε ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας με ρύθμιση της έκφρασης ανάλογων γονιδίων, καθώς οι πρωτεΐνες ERF διαθέτουν τομέα σύνδεσης με το DNA (AP2). Από το σύνολο των *GhERF*, στο JA αποκρίνεται η ERF-IXα5, με μέγιστη έκφραση σε 1 h, ενώ το αιθυλένιο εγείρει τις ERF-IXα1 και 2 σε 1 και 2 h, αντίστοιχα. Συνδυασμός δράσης αιθυλενίου και JA ενισχύει την παρατηρούμενη αύξηση της έκφρασης των ERF-IXα1, 2, 5, χωρίς να επιδρά στο χρόνο που αυτή εμφανίζει μέγιστο (~1-2 h) [156].

Το ABA είναι μια ορμόνη που δεν αναφέρθηκε μέχρι στιγμής, αφού ο τραυματισμός δεν εμπλέκει τη συγκεκριμένη ορμόνη. Είναι σαφές πως η ορμόνη αυτή έχει ως κύριο ρόλο την αντιμετώπιση υδατικών καταπονήσεων στα φυτά και επάγει την έκφραση των πρωτεϊνών LEA (Late Embryogenesis Abundant). Ωστόσο, φαίνεται πως δευτερευόντως ίσως παίζει κάποιο ρόλο στην αντιμετώπιση των μηχανικών καταπονήσεων, καθώς το ABA ενεργοποιεί την PLDα1 στην *A. thaliana* [157], τη συνθάση του ACC στο βαμβάκι [138] και μέσω της *GhMPK2* φαίνεται ότι αυξάνει την έκφραση των γονιδίων άμυνας DIN1 και LEA5 [140]. Επιπλέον, στην τομάτα, υπάρχουν ενδείξεις για επαγωγή έκφρασης γονιδίων τύπου LEA (LeER5) από το ABA, το αιθυλένιο, αλλά και τον τραυματισμό, γεγονός που ενισχύει την άποψη πως ίσως οι LEA, και δη οι υδρόφοβες, εμπλέκονται πιθανόν στην απόκριση στον τραυματισμό [158].

Οι LEA είναι μια οικογένεια φυτικών πρωτεϊνών που συσσωρεύονται σε υψηλές συγκεντρώσεις κατά τη φάση της ωρίμανσης της εμβρυογένεσης του βαμβακιού, γι' αυτό ονομάστηκαν Late Embryogenesis Abundant [159]. Απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν

πρώτη φορά στο βαμβάκι από τους Dure και Galau [160, 161]. Τα γονίδιά τους κωδικοποιούν πρωτεΐνες που δρουν προστατευτικά σε περίπτωση ξηρασίας και εκφράζονται κατά το στάδιο της ύστερης ανάπτυξης του εμβρύου στους ιστούς (φύλλα, ρίζες). Εκφράζονται, επίσης, κατά την ανάπτυξη των σπερμάτων, ενώ επάγονται και από ξηρασία, ωσμωτική καταπόνηση, αλατότητα, υπεριώδη ακτινοβολία, χαμηλές θερμοκρασίες και το ABA [158, 159, 162]. Κάποιες LEA δεν αποκρίνονται στο ABA ή ρυθμίζονται από αυτό κατά την ανάπτυξη, όχι όμως μετά από κάποιου είδους καταπόνηση. Επιπλέον, υπάρχουν αναφορές για LEA που ρυθμίζονται και από άλλα μονοπάτια, εκτός του ABA [159]. Εν γένει, είναι υδρόφιλες πρωτεΐνες, που δεν έχουν εγγενώς οργανωμένη δομή (unstructured), όμως σε υψηλές θερμοκρασίες ή ξηρασία υιοθετούν ειδική δομή [162]. Αυτή η ιδιότητά τους επιτρέπει την παρομοίωσή τους με τις πρωτεΐνες-συνοδούς και τη χρήση ανάλογων *in vitro* δοκιμών για την επιβεβαίωση του προστατευτικού τους ρόλου [159, 162]. Φαίνεται πως οι LEA προστατεύουν ενζυμικές δραστηριότητες ή αλληλεπιδρούν με σάκχαρα, ώστε να αποτρέψουν συσσωμάτωση πρωτεϊνών [162].

Από το σύνολο των LEA αξίζει να σημειωθεί πως οι περισσότερες αποκρίνονται στο ABA και είναι υδρόφιλες. Μία μόνο ομάδα LEA περιέχει σε αφθονία υδρόφοβα τμήματα [158]. Σ' αυτήν ανήκουν και οι *GhLEA5* (D73) και *GhLEA14* (D95), που επάγονται ισχυρά από υδατικές καταπονήσεις και είναι αδιάλυτες μετά από βρασμό, κάτι που δείχνει πως υιοθετούν σφαιρική διαμόρφωση [158, 159, 163]. Η τελευταία μάλιστα είναι ομόλογή της *LeER-5* και αποκρίνεται, εκτός από την ξηρασία και το ABA, και σε αιθυλένιο και τραυματισμό. Τα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν πως, κατά τον τραυματισμό, η αύξηση στην έκφραση σε 3 h οφείλεται εν μέρει, αλλά δεν μπορεί να αποδοθεί εξ ολοκλήρου, στο αιθυλένιο [158]. Οι υπόλοιπες είναι εξαιρετικά υδρόφιλες και πιστεύεται ότι αντικαθιστούν ή συνδέονται με μόρια νερού σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης [163] και σ' αυτό έγκειται και ο προστατευτικός τους ρόλος.

Αναφέρθηκε ήδη πως η *PLDα1* επάγεται υπό την επίδραση ABA. Πράγματι, μετά από επίδραση ABA έχει παρατηρηθεί ότι αύξηση του *PtdOH* και της 1-φωσφορικής φυτοσφιγγοσίνης οδηγεί σε αποκρίσεις στην ορμόνη. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η σφιγγοσινική κινάση ενεργοποιείται μετά από σύνδεσή της σε μεμβράνες πλούσιες σε *PtdOH* [164]. Το ABA ενεργοποιεί την *PLDα1* [157] και το προϊόν της δράσης της ενεργοποιεί δύο σφιγγοσινικές κινάσες στην *A.thaliana* (*SPHK1,2*) [164, 165]. Η 1-φωσφορική φυτοσφιγγοσίνη, που παράγεται, προωθεί τη σηματοδότηση και ενεργοποιεί εκ νέου την *PLDα1* ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο το σήμα του ABA [164, 165].

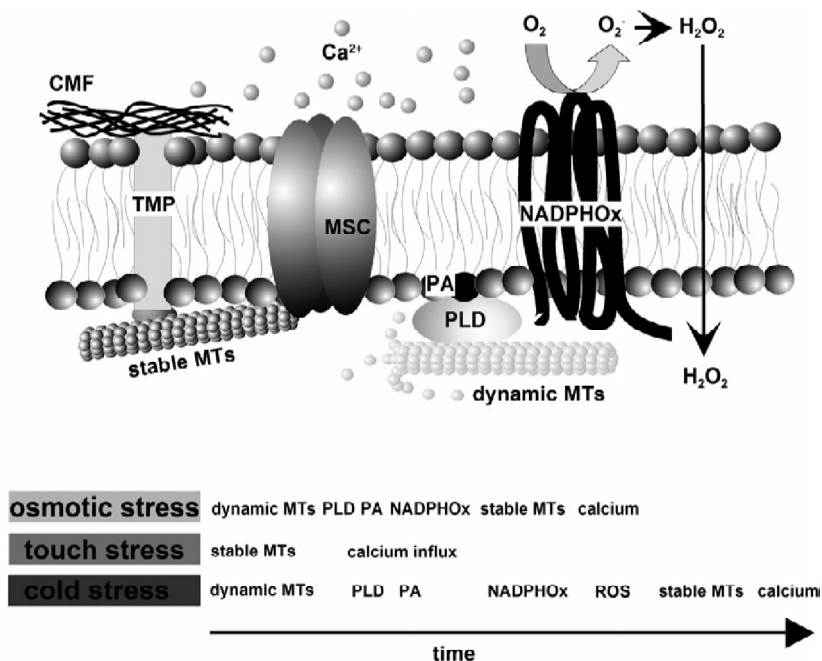
Πώς όμως, η ενεργοποίηση της PLDα από το ABA εμπλέκει την ορμόνη αυτή στην απόκριση στον τραυματισμό; Είναι γνωστό πως το προϊόν δράσης της PLDα1 (PtdOH) συνδεόμενο με τον αναστολέα του ABA (ABI1) επιτρέπει την ολοκλήρωση της σηματοδότησης. Συγκεκριμένα, η σύνδεση με το PtdOH αποσπά τον ABI1 από το μεταγραφικό ρυθμιστή ATHB6 στον πυρήνα, ενώ παράλληλα μειώνει τη δραστικότητα πρωτεϊνικής φωσφατάσης (PP2C) του αναστολέα προωθώντας τη σηματοδότηση [157]. Η απενεργοποίηση αυτή του ABI1 δε γίνεται εξ ολοκλήρου από το PtdOH, αλλά και από το H₂O₂ και λιπαρά οξέα, όπως το λινολενικό οξύ [166]. Συμπερασματικά, παράγοντες οι οποίοι αποδεδειγμένα αποτελούν αποκρίσεις στον τραυματισμό (παραγωγή λινολενικού οξέος, ROS) επάγουν τη σηματοδότηση μέσω ABA, οπότε είναι λογικό να θεωρηθεί πως το σηματοδοτικό μονοπάτι του ABA ίσως ενεργοποιείται σε δεύτερη φάση μετά τον τραυματισμό, με σκοπό να ενισχύσει το σήμα που παράγεται πρωτογενώς από άλλες ορμόνες (JA, αιθυλένιο) ή καθαυτό τον τραυματισμό.

1.5.1.2 Οξειδωτική έκρηξη

Όπως αναφέρθηκε, σε μηχανισμούς άμυνας και μετάδοσης σήματος εμπλέκονται ROS. Μετά την επίδραση μηχανικού τραυματισμού έχει παρατηρηθεί στον αποπλάστη αύξηση των επιπέδων O₂⁻ και H₂O₂, αλλά και αύξηση της δραστικότητας υπεροξειδάσης [61, 124]. Η αύξηση αυτή είναι τόσο ραγδαία, ώστε να αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως οξειδωτική έκρηξη (oxidative burst). Η παραγωγή ROS μετά από τραυματισμό αποτελεί σήμα τόσο τοπικού όσο και συστημικού χαρακτήρα για τα κύτταρα και ρυθμίζει κυτταρικές διεργασίες, όπως ο κυτταρικός θάνατος [124]. Συγκεκριμένα, για το H₂O₂ είναι γνωστό πως, όταν η συγκέντρωσή του είναι χαμηλή, αυξάνεται η αντοχή στις καταπονήσεις, ενώ αν αυξηθεί πολύ επάγεται ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος [61]. Παρ' όλα αυτά, εμπλοκή της PLDδ μπορεί να αλλάξει την τύχη του κυττάρου, αφού ενεργοποιείται από την αύξηση H₂O₂ και το παραγόμενο PtdOH μέσω του μονοπατιού των MAPK οδηγεί σε αποτροπή του κυτταρικού θανάτου [61, 77]. Επομένως, το H₂O₂ είναι μόριο που εμπλέκεται στους μηχανισμούς άμυνας των φυτών, ενώ φαίνεται ότι σηματοδοτεί την ολοκλήρωση του σήματος από τραυματισμό ή παθογόνα [146].

Για την αλληλεπίδραση των PLD με τη διαδικασία της οξειδωτικής έκρηξης λίγα είναι γνωστά και αναφέρονται στις ισομορφές α και β. Για παράδειγμα, η PLDα αυξάνει τη δραστικότητα της οξειδάσης του NADPH και ακολούθως οδηγεί σε αύξηση του H₂O₂. Αυτή η στόχευση της οξειδάσης από την PLD γίνεται μέσω του PtdOH (σχήμα 11) [125, 167]. Στην τομάτα (*L. esculentum*), από την άλλη πλευρά, η δράση της PLDβ1 συνδέεται με μείωση των επιπέδων H₂O₂ και εξασθένιση της οξειδωτικής έκρηξης. Επιπλέον, η

LePLDβ1 είναι αρνητικός ρυθμιστής της πολυφαινουλοξειδάσης (PPO), επομένως, μειώνεται και η τροποποίηση του κυτταρικού τοιχώματος μετά από δράση της [122]. Τέλος, στην όρυζα η δράση της PLDβ1 επάγει την οξειδωτική έκρηξη [168]. Τα παραπάνω δείχνουν πως τα επακόλουθα δράσης των διάφορων ισομορφών PLD ποικίλουν από φυτό σε φυτό, όσον αφορά τη ρύθμιση της οξειδωτικής έκρηξης, και δεν μπορούν να προβλεφθούν απολύτως.



Σχήμα 11. Μοντέλο αποκωδικοποίησης σημάτων μέσω του δικτύου των μικροσωληνίσκων. Οσμωτική καταπόνηση, τραυματισμός και ψύχος προβλέπεται να αλληλεπιδρούν διαφορετικά με τις δομές των μικροσωληνίσκων (MT) οδηγώντας σε εξειδικευμένη ερμηνεία του κάθε ερεθίσματος στη μονάδα του χρόνου [125]

Τα επίπεδα ROS στα κύτταρα είναι αυστηρά ρυθμιζόμενα, κατά τις αποκρίσεις σε τραυματισμό, από τα επίπεδα Ca^{2+} , φωσφορυλιώσεις πρωτεϊνών και ένζυμα μεταβολισμού των ROS. Στα πρώτα στάδια της απόκρισης στον τραυματισμό έχει βρεθεί ότι παράγεται παροδικά H_2O_2 . Στη συνέχεια, εκφράζεται η υπεροξειδάση του ασκορβικού (APX2), που αποτοξινώνει τα κύτταρα από το κυτοσολικό H_2O_2 και επαναφέρει τα επίπεδά του στα φυσιολογικά. Η έκφραση της APX2 μάλιστα είναι ανεξάρτητη από σήματα τραυματισμού, όπως το JA, εξαρτάται, όμως, από την οξειδάση του NADPH, που είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση του H_2O_2 [124]. Υπάρχει λοιπόν αυστηρή ρύθμιση της σύνθεσης και αποικοδόμησης του σηματοδοτικού H_2O_2 .

Στην *A. thaliana* ο τραυματισμός αυξάνει τη συγκέντρωση Ca^{2+} . Το Ca^{2+} με τη σειρά του ενεργοποιεί την οξειδάση RbohC -ομόλογη της οξειδάσης του NADPH των θηλαστικών- και οδηγεί στο σχηματισμό H_2O_2 στο κυτταρικό τοίχωμα. Τα σήματα της απόκρισης στον

τραυματισμό (Ca^{2+} , φωσφορυλιώσεις, H_2O_2) συντονίζονται από τη MPK8, η οποία ρυθμίζει αρνητικά την παραγωγή H_2O_2 , μέσω ρύθμισης της οξειδάσης RbohD. Από τα παραπάνω φαίνεται πως ίσως άμεσα το σήμα ξεκινά με σχηματισμό H_2O_2 από δράση της RbohC και αργότερα, μέσα από σηματοδότηση με MAPK, λήγει το σήμα και τα επίπεδα του H_2O_2 επανέρχονται στα φυσιολογικά με τη δράση της RbohD. Επομένως, η άμεση ενεργοποίηση MAPK και ο σχηματισμός H_2O_2 από τα πρώτα λεπτά μετά τον τραυματισμό (σε 10 min) υποδεικνύουν τη σηματοδοτική δράση των μορίων αυτών, ενώ η καθυστέρηση (σε 1-2 h) στη βιοσύνθεση JA εντάσσει την ορμόνη στους μηχανισμούς άμυνας [124].

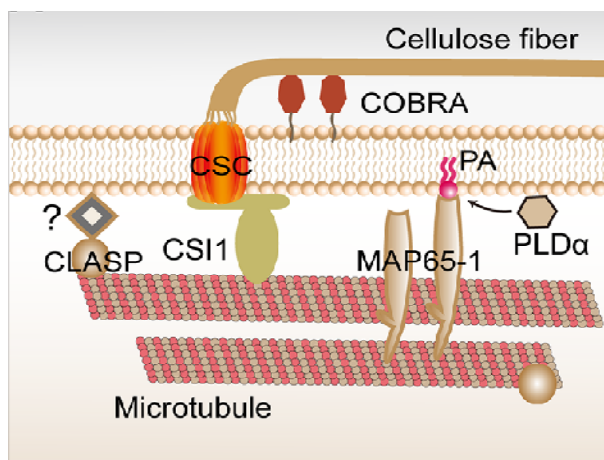
Η οξειδωτική έκρηξη, τελικά, καταλήγει στη συσσώρευση καλλόζης και φαινολικών (λιγνινοποίηση), τα οποία ενισχύουν τα κυτταρικά τοιχώματα και καταλήγουν στην επούλωση του τραύματος, η οποία θα αναλυθεί στη συνέχεια [124].

1.5.1.3 Επούλωση

Παράλληλα με τη διαδικασία οργάνωσης της άμυνας μετά τον τραυματισμό, τα φυτά δρομολογούν και την άμεση επούλωση του τραύματος για την αποφυγή εισβολής παθογόνων και τυχόν εξάπλωση των μολύνσεων. Στη διαδικασία αυτή, της επανόρθωσης του κυτταρικού τοιχώματος, συμμετέχουν πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων, συνθάσες δομικών πρωτεϊνών του τοιχώματος (π.χ. συνθάση της κυτταρίνης) και οξειδάσες. Η δράση τους αναλύεται στη συνέχεια.

Οι πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων (Lipid Transfer Proteins, LTP) συμμετέχουν στους μηχανισμούς άμυνας των φυτών. Συγκεντρώνονται στην επιφάνεια συγκεκριμένων ιστών αποκρινόμενες σε καταπονήσεις, όπως η ξηρασία, οι υψηλές θερμοκρασίες ή τα παθογόνα. Προωθούν τη συσσώρευση προστατευτικών πολυμερών (όπως η χιτίνη) στην επιφάνεια ιστών, ενώ είναι ανθεκτικές στη δράση πρωτεασών. Τέλος, μπορούν να συνδέονται, λόγω της υδροφοβικότητάς τους, με το κυτταρικό τοίχωμα, του οποίου, μεταξύ άλλων, επάγουν την επέκταση [169]. Στις LTP ανήκουν και οι εξειδικευμένες για τη μεταφορά PtdIns, PITP. Η υπερωσμωτική καταπόνηση, μέσω δράσης κινάσης σερίνης/θρεονίνης (SPK), ενεργοποιεί τις PITP, οι οποίες με τη σειρά τους αυξάνουν τη δραστηριότητα των PtdIns3- και PtdIns4-κινασών [170]. Είναι γνωστό ότι οι PITP μπορεί να έχουν ως υπόστρωμα και PtdOH και επομένως να ενεργοποιούνται απ' αυτό και να το μεταφέρουν στα υποκυτταρικά διαμερίσματα [171]. Άρα, ίσως η PLD, μέσω του προϊόντος της, να ενεργοποιεί πρωτεΐνες μεταφοράς πρωτεϊνών, όπως οι PITP, και έτσι να προωθεί την αναδόμηση του κατεστραμμένου κυτταρικού τοιχώματος.

Ο τραυματισμός προκαλεί ρήξη του κυτταρικού τοιχώματος και ένας από τους καταληκτικούς στόχους του σήματος αυτού είναι η συνθάση της κυτταρίνης. Το ένζυμο αυτό φαίνεται πως ευθύνεται για τον τερματισμό του σήματος του τραυματισμού, καθώς απαλοιφή του οδηγεί σε διαρκή σύνθεση JA και γονιδίων άμυνας, ενώ επιφέρει και αλλαγές στη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος [153]. Πιο συγκεκριμένα, σε πειράματα τραυματισμού, όπου η συνθάση της κυτταρίνης ήταν ανενεργή -οπότε δεν γινόταν επανόρθωση του κατεστραμμένου κυτταρικού τοιχώματος- η λιπάση DGL δρούσε επί μακρόν. Άρα, όπως φαίνεται, το σήμα επανόρθωσης του κυτταρικού τοιχώματος δίνεται από τη συνθάση της κυτταρίνης και στοχεύει στην αναστολή δράσης της DGL και ακολούθως τη διακοπή σχηματισμού JA [75]. Όσον αφορά τον τρόπο δράσης μετά από τραυματισμό, είναι γνωστό πως το δίκτυο των μικροσωληνίσκων κατευθύνει τα σύμπλοκα συνθασών της κυτταρίνης (Cellulose Synthase Complexes, CSC) στη μεμβράνη προς σχηματισμό ινών κυτταρίνης και ενίσχυση/επούλωση του κυτταρικού τοιχώματος [125, 172]. Μάλιστα, η σύνδεση των CSC με τους μικροσωληνίσκους γίνεται μέσω άλλων πρωτεϊνών, όπως οι PLD α , PLD δ και MAP (Microtubule-Associated Proteins), που λειτουργούν ως γέφυρα μεταξύ του κυτοσκελετού και της πλασματικής μεμβράνης (σχήμα 12) [172, 173].



Σχήμα 12. Επίδραση της PLD α στη σύνδεση του κυτοσκελετού με την πλασματική μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμα.

Οι μικροσωληνίσκοι είναι συνδεδεμένοι εσωτερικά με την πλασματική μεμβράνη, όπου κατευθύνουν τα σύμπλοκα συνθασών της κυτταρίνης (CSC) με τη βοήθεια της πρωτεΐνης CSI1 (Cellulose Synthase Interactor). Τα ενεργά σύμπλοκα CSC σχηματίζουν κατά μήκος των μικροσωληνίσκων ίνες κυτταρίνης. Στη διαδικασία της κρυστάλλωσης βοηθούν οι αγκυροβολημένες πρωτεΐνες COBRA. Η CLASP συνδέει το άκρο του μικροσωληνίσκου με την επιφάνεια του κυττάρου, μέσω άγνωστου μηχανισμού. Η PLD α σχηματίζει PtdOH (PA) στη μεμβράνη. Στο PtdOH δεσμεύεται η συνδεόμενη με μικροσωληνίσκους πρωτεΐνη MAP65-1, σταθεροποιεί τον μικροσωληνίσκο και επάγει τη δεματοποίησή του [172]

Εναλλακτικά, η εναπόθεση των CSC στη μεμβράνη γίνεται μέσω κυκλοφορίας κυστιδίων, τα οποία φέρουν στη μεμβράνη τις ροζέτες CSC που συντήκονται με αυτήν, ενώ

παράλληλα ελευθερώνουν πολυσακχαρίτες πηκτίνης. Είναι δε πολύ ενδιαφέρον ότι η απόθεση κυτταρίνης επάγεται και από αυξημένα επίπεδα Ca^{2+} (50 mM), γεγονός που υποδηλώνει πως, και στην περίπτωση του τραυματισμού, ίσως η ενδοκυτταρική αύξηση του Ca^{2+} επάγει τη δράση της συνθάσης της κυτταρίνης [174].

Τέλος, μετά τον τραυματισμό έχει αποδειχθεί ότι οξειδάσες (PPO, υπεροξειδάσες) συμμετέχουν στην αποκατάσταση του κυτταρικού τοιχώματος. Οι PPO εντοπίζονται στον αυλό των θυλακοειδών μεμβρανών στα φυτά και, με τον τραυματισμό και τη ρήξη των κυττάρων, έρχονται σε επαφή με το υπόστρωμά τους και συμβάλουν στην τροποποίηση του κυτταρικού τοιχώματος [122]. Οι υπεροξειδάσες (POX) είναι διλειτουργικά ένζυμα, που καταλύουν είτε την οξειδοαναγωγή μεταξύ του H_2O_2 και διαφόρων αναγωγικών είτε τη δημιουργία ROS [175-177]. Δεν έχουν εξειδίκευση ως προς τα αναγωγικά και ορισμένες ούτε καν προς το H_2O_2 , μπορούν, ωστόσο, να χρησιμοποιήσουν ως υπόστρωμα και λιπαρά οξέα, όπως το λινελαϊκό [175, 178]. Είναι οικογένεια ενζύμων που εκκρίνονται ή βρίσκονται στα χυμοτόπια [176, 178]. Ρυθμίζονται από αιθυλένιο, παράγοντες ανάπτυξης, παθογόνα, τραυματισμό, ξηρασία, ψύχος, ενώ η έκφρασή τους μπορεί να ανιχνευθεί μόνο μετά από καταπονήσεις [176].

Το σύνολο των υπεροξειδασών ενός φυτού ποικίλει, ωστόσο, παρουσιάζει ομοιότητες από φυτό σε φυτό. Οι ισομορφές POX διαφέρουν ως προς την αλληλουχία των αμινοξέων και το προφίλ έκφρασης. Οι POX σε ένα φυτό παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς το όργανο όπου εκφράζονται και στην απόκριση στις καταπονήσεις. Είναι, όμως, δύσκολο να αποδοθεί συγκεκριμένη λειτουργία στις διάφορες POX, γιατί έχουν χαμηλή εξειδίκευση *in vitro* ως προς το υπόστρωμα και απαντώνται σε πολλές ισομορφές. Επομένως, ο συνδυασμός χαρακτηριστικών (*in vitro* ιδιότητες, εντοπισμός, προφίλ έκφρασης) είναι αυτός που καθορίζει τη λειτουργία που εξυπηρετεί η κάθε POX [175].

Οι POX εμπλέκονται σε πολλά στάδια της ανάπτυξης από τη βλάστηση μέχρι τη γήρανση. Είναι δε αξιοσημείωτο ότι η δράση τους σχετίζεται με τις διαδικασίες επέκτασης του κυτταρικού τοιχώματος, αλλά και τις πορείες που περιορίζουν την ανάπτυξη. Πιο αναλυτικά, κατά τη διάρκεια της βλάστησης, οι POX σχηματίζουν ROS, οι οποίες δρουν προστατευτικά και αποτρέπουν πιθανές εισβολές παθογόνων στην «τραυματισμένη» περιοχή από όπου το αρτίβλαστο διαπέρασε το σπερματικό περίβλημα. Στη φάση της κυτταρικής ανάπτυξης, οι παραγόμενες ROS οδηγούν στη χαλάρωση του κυτταρικού τοιχώματος και επιτρέπουν την αύξηση του όγκου του κυττάρου και επομένως την ανάπτυξή του. Κατόπιν, πάλι με δράση POX, το H_2O_2 συνεισφέρει στη σκλήρυνση και

ενίσχυση του τοιχώματος με σταυροσύνδεση των δομικών πολυμερών του. Τέλος, η εξέλιξη της γήρανσης προωθείται από τις ROS που παράγουν οι POX [177].

Οι λειτουργίες που επιτελούν οι POX υπό την επίδραση καταπονήσεων είναι: (1) τροποποιήσεις του κυτταρικού τοιχώματος (λιγνινοποίηση, σουβερινοποίηση), (2) καταβολισμός αυξίνης, (3) επούλωση τραυμάτων και (4) άμυνα στη μόλυνση από παθογόνα. Για τις τροποποιήσεις του κυτταρικού τοιχώματος είναι γνωστό πως οι POX οξειδώνουν μεταξύ άλλων και φαινολικές ομάδες πολυσακχαριτών και κατάλοιπα τυροσίνης δομικών πρωτεϊνών του κυτταρικού τοιχώματος σχηματίζοντας πιο μεγάλα και πολύπλοκα μόρια στο τοίχωμα. Στην περίπτωση τραυματισμού, λαμβάνει χώρα σουβερινοποίηση, κατά την οποία πολυμερίζονται λιπαρά οξέα και φαινολικές ενώσεις στο εξωτερικό τοίχωμα. Επίσης, οι POX πολυμερίζουν μακρομόρια, τα οποία εν συνεχεία αποτίθενται στην εξωκυτταρική επιφάνεια. Έτσι, ενισχύεται το κυτταρικό τοίχωμα, περιορίζεται η είσοδος των παθογόνων και δίνεται ορισμένο σχήμα και αντοχή στο κύτταρο [175, 177, 178].

Πώς επάγονται οι POX μετά από τραυματισμό; Ο τραυματισμός επάγει την έκφραση των σχετιζόμενων με άμυνα γονιδίων (defense-related) και ενζύμων που οδηγούν στο σχηματισμό φαινυλοπροπανοειδών, μέσω δράσης ABA, αιθυλενίου, JA. Οι POX επάγονται όντως από ορμόνες, που ποικίλουν ανάλογα με το υπό εξέταση φυτό, ενώ η τοπική αύξηση των επιπέδων Ca^{2+} στη μεμβράνη φαίνεται πως κατευθύνει τις POX ως προς το σημείο δράσης. Για παράδειγμα, οι POX επάγονται από ABA στην πατάτα και την τομάτα και από αιθυλένιο και μεθυλο-JA στην όρυζα [175, 178, 179]. Στον καπνό, επάγεται γρήγορα και συστημικά, όχι όμως από τους «συνήθεις υπόπτους» (αιθυλένιο, SA, μεθυλο-JA), αλλά από κάποιο άλλο, άγνωστο σηματοδοτικό μονοπάτι [175].

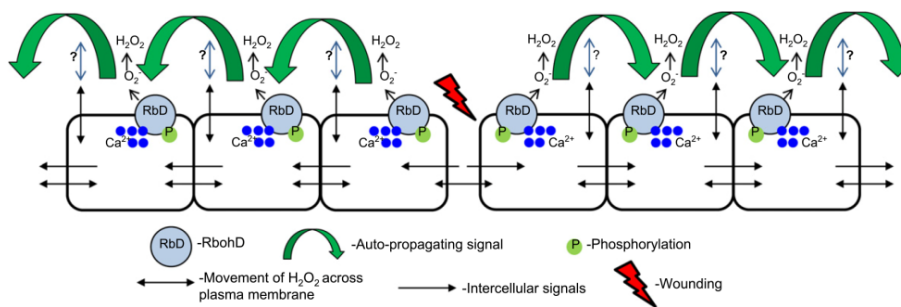
1.5.2 Συστημική μετάδοση σήματος

Στα πλαίσια της αντιμετώπισης του τραυματισμού, εκτός από την τοπική απόκριση, το φυτό εγείρει και μηχανισμούς μετάδοσης του σήματος στους γειτονικούς και πιο απομακρυσμένους ιστούς. Τα συστημικά σήματα μετά από τραυματισμό περιλαμβάνουν το σχηματισμό ROS, παραγωγή ηλεκτρικών ώσεων και διάδοσή τους κατά μήκος του αγωγού ιστού και παραγωγή και κυκλοφορία ορμονών (JA, αιθυλένιο, ABA) [124].

Οι ROS όντως συμμετέχουν στη διακυτταρική επικοινωνία μέσω κίνησης μέσα από τις πλασμοδέσμες και με διακυτταρική κυκλοφορία της μεμβρανοσύνδετης θειορεδοξίνης και μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν τα επίπεδα των ROS. Στη μετάδοση του σήματος του τραυματισμού από κύτταρο σε κύτταρο εμπλέκονται και οξειδάσες του

NADPH, που είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό H_2O_2 , ιόντα ασβεστίου και φωσφορυλιώσεις πρωτεϊνών [124].

Από το σύνολο των ROS ξεχωρίζει το H_2O_2 , γιατί έχει σχετικά μεγάλο χρόνο ζωής, διέρχεται εύκολα από τις κυτταρικές μεμβράνες και διαχέεται ελεύθερα ανάμεσα στα κύτταρα. Επομένως, είναι ένα εν δυνάμει σημαντικό σηματοδοτικό μόριο, το οποίο κάλλιστα θα μπορούσε να συνεισφέρει στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων. Πράγματι, για την εμφάνιση συστημικών αποκρίσεων είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση της οξειδάσης του NADPH (Rboh), η οποία κατόπιν επάγει τη βιοσύνθεση μεθυλο-JA και H_2O_2 στους συστημικούς ιστούς. Η RbohD είναι απαραίτητη για την έναρξη και ενίσχυση του συστημικού σήματος, το οποίο υπάρχουν αναφορές ότι μεταδίδεται με ταχύτητα 8,4 cm/min [124]. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως το συστημικό σήμα του εξωκυτταρικού H_2O_2 δεν προέρχεται από διάχυσή του, αφού δε μειώνεται η ένταση του σήματος ανάλογα με την απόσταση. Αντίθετα, το H_2O_2 προκαλεί το ίδιο το σχηματισμό νέου H_2O_2 στα γειτονικά κύτταρα (αυτοενίσχυση) κι έτσι επιτυγχάνεται η διάδοση του σήματος, χωρίς να παρατηρείται απόσβεσή του (σχήμα 13). Στην *A. thaliana* η -ομόλογη της οξειδάσης του NADPH- RbohD είναι απαραίτητη για την έναρξη και διάδοση του συστημικού σήματος προκαλούμενου από τραυματισμό. Το σήμα αυτό αποδεικνύεται πως συνοδεύεται και εξαρτάται από την παραγωγή και συσσώρευση H_2O_2 στο χώρο μεταξύ των κυττάρων [124].



Σχήμα 13. Μοντέλο διάδοσης του σήματος του τραυματισμού συστημικά με H_2O_2 στο φυτό *A. thaliana*.

Η οξειδάση RbohD (RbD) απαιτείται για την έναρξη και διάδοση του άμεσου σήματος του τραυματισμού συστημικά. Το σήμα αυτό συνοδεύεται και εξαρτάται από την παραγωγή και συσσώρευση ROS εξωκυτταρικά. Διαδίδεται δε σε μεγάλες αποστάσεις με αυτοενίσχυση, καθώς επάγει το σχηματισμό ROS από κάθε κύτταρο κατά μήκος της διαδρομής [124]

Εκτός από τις ROS, το σήμα του τραυματισμού μπορεί να μεταδίδεται και μέσω της κυκλοφορίας ορμονών. Μια τέτοια ορμόνη, για την οποία υπάρχουν ενδείξεις συμμετοχής της στη μετάδοση του σήματος είναι το αιθυλένιο. Αυτό προκύπτει από το ρυθμιστικό ένζυμο της σύνθεσης αιθυλενίου, που αποκρίνεται πολύ σύντομα στον τραυματισμό (σε 10 min), ενώ τα επίπεδά του είναι μη ανιχνεύσιμα στις 2 h [138]. Συνεπώς, μπορεί το

άμεσα παραγόμενο αιθυλένιο να μεταφέρει το σήμα του τραυματισμού συστημικά, ενώ και το JA μπορεί να διαδραματίσει ανάλογο ρόλο, όπως ήδη αναφέρθηκε [34].

Τέλος, μετά τη λήψη του σήματος από τους μη τραυματισμένους ιστούς, η απόκριση σε αυτό περιλαμβάνει σηματοδοτικά μονοπάτια MAPK και πιθανή εμπλοκή PLD. Κάτι τέτοιο συμβαίνει στη σόγια, όπου η αύξηση των επιπέδων του PtdOH προκαλεί την ενεργοποίηση MAPK, τόσο τοπικά όσο και συστημικά [77]. Υπάρχουν, ωστόσο, και ενδείξεις ότι οι δράσεις των PLD και MAPK συστημικά στην *A. thaliana* είναι ανεξάρτητες [74].

1.5.3 *Gossypium hirsutum*

Το καλλιεργούμενο βαμβάκι (*G. hirsutum*) είναι ένα φυτό που διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο τόσο στην παγκόσμια όσο και στην εγχώρια οικονομία. Οι ίνες βαμβακιού είναι η επικρατέστερη φυσική πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται στην υφαντουργία και αποτελούν σημαντικό στήριγμα της παγκόσμιας οικονομίας [180], αφού υπολογίζεται ότι αποδίδουν περί τα \$500 δις το χρόνο παγκοσμίως [181]. Η ποικιλία αυτή καλλιεργείται ευρέως σε πάνω από 80 χώρες και αποδίδει περισσότερο από το 90% των ινών βαμβακιού παγκοσμίως [54].

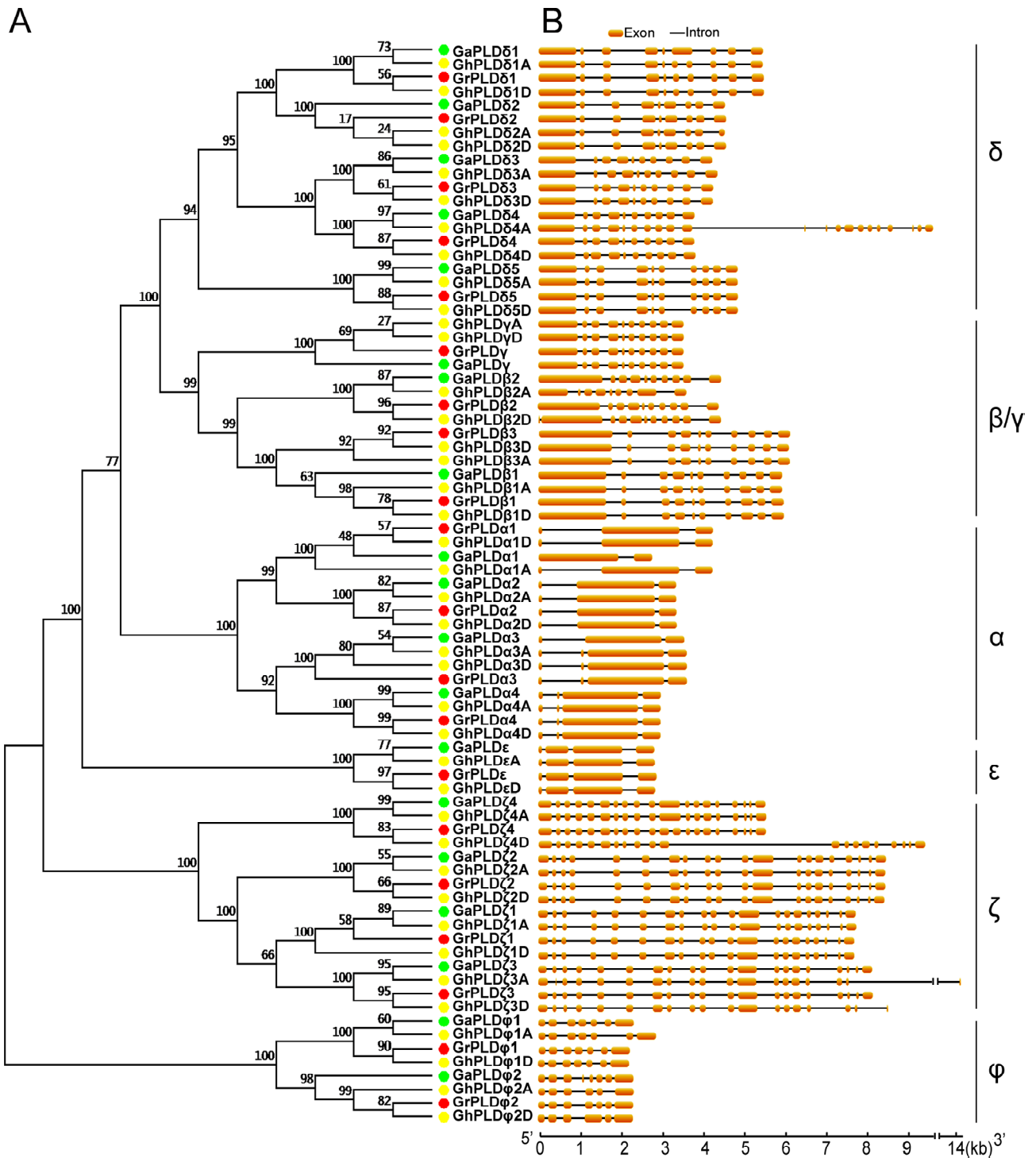
Το βαμβάκι ανήκει στα αγγειόσπερμα, στο γένος *Gossypium* της οικογένειας *Malvaceae*. Υπάρχουν τέσσερα καλλιεργούμενα είδη βαμβακιού τα: *G. arboreum*, *G. herbaceum*, *G. hirsutum* και *G. barbadense*. Τα δύο πρώτα είναι διπλοειδή ($2n=26$), ενώ τα δύο άλλα αλλοτετραπλοειδή (AADD, $2n=4x=52$) [180]. Το *G. hirsutum*, που μελετάται και ως μοντέλο πολυπλοειδούς φυτού, προήλθε πριν από 1-2 εκατομμύρια χρόνια από ετερόλογη διασταύρωση μεταξύ των διπλοειδών γονιδιωμάτων: *Gossypium arboreum* (AA, $2n=2x=26$) και *Gossypium raimondii* (DD, $2n=2x=26$). Γενικά, τα αλλοπολυπλοειδή φυτά είναι πιο ανθεκτικά και ευπροσάρμοστα σε σχέση με τους προγόνους τους. Για το λόγο αυτό, το αλλοτετραπλοειδές, καλλιεργούμενο βαμβάκι *G. hirsutum* αποδίδει περισσότερη σοδειά και καλύτερης ποιότητας ίνες συγκριτικά με τους διπλοειδείς προγόνους του σε όμοιες συνθήκες [54].

Οι ίνες της ποικιλίας *G. hirsutum* υπολογίζεται ότι συνεισφέρουν στο 90% της παγκόσμιας παραγωγής ινών [180]. Σημαντικό είναι όμως ότι αποτελούν και ένα εξαιρετικό μονοκύτταρο μοντέλο για τη μελέτη πολλών βασικών βιολογικών λειτουργιών στα φυτά. Κάθε ίνα είναι ένα κύτταρο που επιμηκύνεται. Η επιμήκυνση αυτή χαρακτηρίζεται από συγχρονισμό μεταξύ των ινών και επιταχύνεται μετά την άνθηση [181]. Γενικά, οι ίνες αναπτύσσονται και φτάνουν μέχρι και τα 30-40 mm σε μήκος και 15 μm σε πάχος [180,

181], είναι δε τα πιο γρήγορα αναπτυσσόμενα και τα πιο επιμήκη κύτταρα σε όλο το φυτικό βασίλειο [181].

Όσον αφορά την PLD στο βαμβάκι, λίγες είναι οι μελέτες που έχουν γίνει προς αυτή την κατεύθυνση, αφού όλο το ενδιαφέρον είχε στραφεί στην ανάπτυξη των ινών του. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί NAPE-PLD σε σπέρματα *G. hirsutum* L., η οποία είναι συνδεδεμένη με τις μεμβράνες και δρα σε κατεστραμμένους ιστούς, ανεξάρτητα από Ca^{2+} . Το προϊόν αυτής της δράσης (NAE) φαίνεται να μειώνει τη διαπερατότητα των εσωτερικών μεμβρανών σε ιόντα [182]. Ακόμα, από πρωτεομική ανάλυση προκύπτει πως η PLDα έχει σημαντικό ρόλο σε αποκρίσεις του φυτού, καθώς και στη ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης, ενώ είναι σαφές πως η δράση της είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική μορφογένεση των ινών [181]. Τέλος, σε αναπτυσσόμενες ίνες ανιχνεύτηκαν τέσσερις ισομορφές PLDα, που ίσως συμμετέχουν στη μετάδοση σήματος για την ελευθέρωση ROS μέσω της οξειδάσης της NADPH στα κύτταρα αυτά [181]. Ανάλογη μελέτη που αφορά το χαρακτηρισμό ισομορφών PLDα έγινε από τους Καργιωτίδου και συν. [183], στην οποία διαπιστώθηκε επαγωγή των συγκεκριμένων ισομορφών από το ψύχος. Η έκφρασή τους φάνηκε, επίσης, ότι εξαρτάται από το φως [183]. Τέλος, το 2016, δημοσιεύτηκαν μελέτες συγκριτικής ανάλυσης (genome-wide) των γονιδίων της PLD στο *G. arboreum* [184] και στα *G. raimondii* και *G. hirsutum* [54]. Στο σχήμα 14 φαίνονται η φυλογενετική σχέση και η δομή των γονιδίων PLD του βαμβακιού [54]. Στο σχήμα, επίσης, υπάρχουν οι δομές των ιντρονίων και εξονίων για κάθε γονίδιο PLD. Το *G. hirsutum* διαθέτει 40 γονίδια PLD που ανήκουν σε όλες τις ισομορφές (συμπεριλαμβανομένης και της φ). Τα γονίδια αυτά διατηρούν υψηλή ομολογία και εκφράζονται όλα σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια [54]. Αξίζει να σημειωθεί ότι το πλήρες γονιδίωμα του *G. hirsutum* χαρτογραφήθηκε μόλις το 2015 [185] από Κινέζους και Αμερικάνους ερευνητές (Cotton Genome Consortium): περιέχει 76.493 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και μεταθετά στοιχεία, κυρίως ρετροτρανσποζόνια που κατέχουν το 67,2% του γονιδιώματος του φυτού [185, 186].

Τι ισχύει, όμως, για το βαμβάκι σε περίπτωση τραυματισμού; Αυτό το ερώτημα προς το παρόν δεν έχει απαντηθεί, καθώς λίγες και σποραδικές είναι οι σχετικές αναφορές, ενώ περιορίζονται στο επίπεδο μελέτης της έκφρασης. Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί η επαγωγή από τον τραυματισμό: της *GhACS* [138], της κινάσης *GhMPK2* [140, 146], του μεταγραφικού παράγοντα *GhWRKY3* [187], της RNA πολυμεράσης *GhRDR6* [188] και της αναγωγάσης του κυτοχρώματος P-450 *GhCPR2* [189]. Μένουν ακόμα να βρεθούν πολλά.



Σχήμα 14. Φυλογενετική σχέση και δομή των γονιδίων PLD του βαμβακιού.

(**A**) Το φυλογενετικό δέντρο κατασκευάστηκε με χρήση του λογισμικού MEGA 6.0. Οι κουκίδες διαφορετικού χρώματος δείχνουν τα διαφορετικά είδη βαμβακιού (πράσινο: *G. arboreum*, κόκκινο: *G. raimondii*, κίτρινο: *G. hirsutum*). (**B**) Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης εξονίων-ιντρονίων των γονιδίων PLD του βαμβακιού. Τα πορτοκαλί πλαίσια και οι μαύρες γραμμές αναπαριστούν τα εξόνια και τα ιντρόνια, αντίστοιχα [54]

2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι PLD είναι φωσφοδιεστεράσες που υδρολύουν μεμβρανικά φωσφολιπίδια προς σχηματισμό φωσφατιδικού οξέος (PtdOH), μορίου που δρα ως δεύτερος αγγελιοφόρος και εμπλέκεται σε πορείες μεταγωγής σήματος, ενώ προάγει και τη σύντηξη των μεμβρανών λόγω των δομικών του χαρακτηριστικών. Οι PLD απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς από τον άνθρωπο μέχρι τα βακτήρια. Ωστόσο, στα φυτά η γονιδιακή οργάνωση των PLD είναι η πιο σύνθετη (12 γονίδια PLD στην *A. thaliana*, 5 σε θηλαστικά και 1 σε σακαχαρομύκητες), υποδεικνύοντας το ρυθμιστικό ρόλο που κατέχουν οι PLD σε πλήθος λειτουργιών στα φυτά.

Οι φυτικές PLD έχουν εκτενώς μελετηθεί στο φυτό-μοντέλο *A. thaliana* και ταξινομούνται σε έξι τάξεις (α-ζ), σύμφωνα με τις απαιτήσεις τους σε συμπαράγοντες για εμφάνιση δράσης *in vitro*. Από το σύνολο των ισομορφών PLD, οι α και δ είναι οι πιο κοινές και έχουν συνδεθεί με σηματοδοτικές πορείες απόκρισης των φυτών σε καταπονήσεις, όπως η αλατότητα, η ξηρασία, το ψύχος, ο αβιοτικός και ο βιοτικός τραυματισμός.

Παρά τις εκτενείς αναφορές για τις ισομορφές και τη δράση των PLD στην *A. thaliana*, στο μεγάλο οικονομικού ενδιαφέροντος καλλιεργούμενο βαμβάκι (*G. hirsutum*) η έρευνα σχετικά με τις PLD και την εμπλοκή τους σε αποκρίσεις στις καταπονήσεις είναι πολύ περιορισμένη. Πρόσφατα βρέθηκαν δύο γονίδια PLDα στο βαμβάκι, η επαγωγή της έκφρασης των οποίων ρυθμίζεται από το ψύχος και το φως. Επίσης, το 2016, κατά τη μελέτη του αλλοτετραπλοειδούς *G. hirsutum*, εντοπίστηκαν 40 γονίδια που ανήκουν σε όλες τις διαφορετικές ισομορφές PLD.

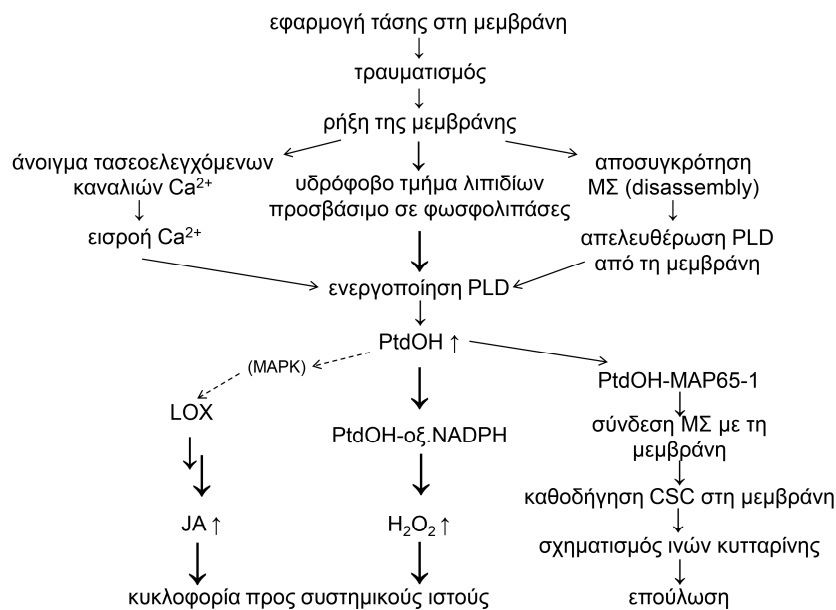
Με τα παραπάνω δεδομένα, η παρούσα διδακτορική διατριβή στοχεύει:

α) Στην απομόνωση και το χαρακτηρισμό της δραστηριότητας PLD του φυτού *G. hirsutum*. Ειδικότερα, θα μελετηθεί *in vitro* η δραστηριότητα της ιδιοσυστατικής ισομορφής PLDα σε πρωτεϊνικά παρασκευάσματα του φυτού και θα γίνει η προσπάθεια να επιβεβαιωθεί η δραστηριότητα με τη χαρακτηριστική για το ένζυμο αντίδραση μεταφωσφατιδύλιωσης.

β) Θα εφαρμοστεί μηχανικός τραυματισμός σε φύλλα βαμβακιού, ένα είδος καταπόνησης που προσομοιάζει σε φθορές του φυτικού ιστού από αβιοτικούς (άνεμο, χαλάζι) ή βιοτικούς (φυτοφάγα) παράγοντες και θα μελετηθεί και πάλι η δραστηριότητα, τοπικά και συστημικά. Θα μελετηθούν, επίσης, οι μεταβολές στα επίπεδα του προϊόντος της δραστηριότητας PLD (PtdOH), ενώ θα γίνει προσπάθεια *in vitro* μελέτης και της ισομορφής δ.

γ) Θα ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης των ισομορφών PLD (α και δ) τοπικά και συστηματικά και θα γίνει προσπάθεια να συσχετιστούν χρονικά με τις μεταβολές της δραστηριότητας PLD κατά τον τραυματισμό.

δ) Θα διερευνηθεί η συμμετοχή της PLD σε πορείες απόκρισης και μεταγωγής του σήματος του τραυματισμού. Συνδυασμός δεδομένων από τη βιβλιογραφία, όπως εκτεταμένα εκτίθεται στην ενότητα 1.5, οδηγεί στη διαμόρφωση του υποθετικού μηχανισμού του σχήματος 15, όπου φαίνεται ο μετασχηματισμός του μηχανικού σήματος (τραυματισμός) σε χημικό (εισροή Ca^{2+} , αναμόρφωση κυτοσκελετού των μικροσωληνίσκων), που καταλήγει σε τρεις τρόπους απόκρισης στον τραυματισμό: 1) τη σύνθεση ορμονών, 2) την οξειδωτική έκρηξη και 3) την επούλωση του τραύματος. Από κάθε πορεία απόκρισης θα επιλεγεί ένα χαρακτηριστικό (ρυθμιστικό) γονίδιο και θα ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασής του μετά από τραυματισμό. Ανάλογη μελέτη έκφρασης θα γίνει και υπό την επίδραση 1-βουτανόλης, η οποία θα μελετηθεί ως *in vivo* αναστολέας της υδρολυτικής δράσης της PLD.



Σχήμα 15. Λειτουργικό μοντέλο σηματοδότησης του τραυματισμού στα φυτά. (CSC: σύμπλοκα συνθασών της κυτταρίνης, MAP65-1: πρωτεΐνη συνδεόμενη με ΜΣ, ΜΣ: μικροσωληνίσκοι, οξ. NADPH: οξειδάση του NADPH)

3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

3.1 Ανάπτυξη των φυτών *G. hirsutum* και εφαρμογή τραυματισμού

Αρτίβλαστα βαμβακιού (*G. hirsutum*) αναπτύσσονται σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 25°C, με υγρασία 60-70% και φωτοπερίοδο 16 h φως/8 h σκοτάδι για 6 εβδομάδες.



Σχήμα 16. Εφαρμογή τραυματισμού σε αρτίβλαστο *G. hirsutum*

Για την περίπτωση του τραυματισμού (μηχανική καταπόνηση), τα αρτίβλαστα παραμένουν στο θάλαμο έως ότου αναπτυχθεί πλήρως το πρώτο ζεύγος φύλλων (45-50 ημέρες). Η εφαρμογή μηχανικής καταπόνησης πραγματοποιείται στο ένα φύλλο, ώστε το απέναντι να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της συστημικής απόκρισης στον τραυματισμό. Συγκεκριμένα, με αποστειρωμένο ψαλίδι, τραυματίζεται το έλασμα του φύλλου σε τέσσερις θέσεις, όπως φαίνεται στο σχήμα 16. Τα φύλλα παραμένουν στο αρτίβλαστο και μετά από ορισμένο χρονικό

διάστημα (5-60 min) αποκόπτονται φύλλα (τραυματισμένα και ατραυματίστα) για απομόνωση δραστηκότητας PLD, εκχύλιση λιπιδίων ή απομόνωση ολικού RNA.

3.2 Απομόνωση PLD από φυτά βαμβακιού

3.2.1 Απομόνωση δραστηκότητας PLD με κλασμάτωση

Υλικά-Συσκευές

- Τρις-υδροξυλαμινομεθάνιο (Tris-HCl), MP Biomedicals
- Χλωριούχο κάλιο (KCl), Mallinckrodt
- Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ (EDTA), Merck
- Φαινυλο-μεθυλο-σουλφονυλοφθορίδιο (PMSF), Sigma
- Διθειοθρεϊτόλη (DTT), Sigma
- Νερό millipore από συσκευή Milli-Q Academic, Millipore
- Υγρό άζωτο
- Πορσελάνινο γουδί
- Πεχάμετρο 410A, Orion
- Φυγόκεντρος RC-5B, Sorvall
- Υπερφυγόκεντρος L5-75B, Beckman

Διαλύματα

- PMSF 100 mM: Το PMSF δεν διαλύεται σε νερό, αλλά σε διμεθυλοσουλφοξειδίο (DMSO), αιθανόλη ή ισοπροπανόλη. Ο διαλύτης που επιλέχθηκε στην προκειμένη περίπτωση ήταν η αιθανόλη
- DTT 1 M: Ζυγίζονται ~15 mg DTT και διαλύονται σε νερό millipore ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 1 M
- Ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0,5 mM, DTT 2 mM: Για την παρασκευή 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος, 0,606 g Tris-HCl διαλύονται σε ~90 mL νερού millipore και προστίθενται 74,56 mg KCl, 500 μL PMSF 100 mM, 200 μL παγωμένο DTT 1 M και 37,22 mg EDTA. Ρυθμίζεται το pH στο 7,5 με προσθήκη σταγόνων HCl 8 N και κατόπιν συμπληρώνεται ο όγκος ως τα 100 mL με νερό millipore [190]

Πορεία εργασίας

Το υπέργειο τμήμα αρτιβλάστου βαμβακιού, που αναπτύχθηκε για 6 εβδομάδες όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.1, αποκόπτεται και ψύχεται απότομα σε υγρό N₂. Κατόπιν, κονιοροτοποιείται σε πορσελάνινο γουδί, που επίσης περιέχει υγρό N₂, και στη σκόνη που προκύπτει προστίθενται 3,5 όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος Tris-KCl-EDTA-PMSF-DTT (δηλαδή διαλύματος που περιέχει αναστολέα πρωτεασών και παράγοντα διατήρησης των S-S ομάδων των πρωτεϊνών). Μετά την παραμονή της σκόνης για περίπου 20 min στο ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης, η απομόνωση της δραστηριότητας συνεχίζεται με διήθηση από διπλή γάζα και φυγοκέντρηση του διηθήματος στα 1.500 g για 15 min. Το υπερκείμενο θερμαίνεται στους 55°C για 5 min και κατόπιν ψύχεται απότομα σε πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 10.000 g για 5 min και το υπερκείμενο υπερφυγοκεντρείται στα 100.000 g για 45 min. Να σημειωθεί ότι η όλη διαδικασία γίνεται στους 4°C, ώστε να αποτραπεί η καταστροφή του ενζύμου (PLD) από τη δράση πρωτεασών που ελευθερώνονται κατά τη λύση.

Τα ιζήματα αναδιαλύονται σε ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης (200-1.000 μL). Ο όγκος αναδιάλυσης επιλέγεται έτσι ώστε να γίνεται ποσοτική παραλαβή του ιζήματος, χωρίς το ίζημα να αραιώνεται πολύ. Συγκεκριμένα, το ίζημα 10.000 g συνήθως αναδιαλύεται σε 300 μL, ενώ για το ίζημα 100.000 g αρκούν 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος. Τέλος, όλα τα κλάσματα (υπερκείμενο 1.500 g, υπερκείμενο 10.000 g, ίζημα 10.000 g, υπερκείμενο 100.000 g, ίζημα 100.000 g) φυλάσσονται στους -20°C.

3.2.2 Απομόνωση δραστικότητας PLD μετά από εφαρμογή τραυματισμού

Υλικά-Συσκευές-Διαλύματα

Όμοια με αυτά της ενότητας 3.2.1

Πορεία εργασίας

Σε αρτίβλαστα βαμβακιού εφαρμόζεται μηχανική καταπόνηση, όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.1. Από τις δύο ομάδες φύλλων που συλλέγονται (τραυματισμένα, ατραυμάτιστα) απομονώνεται η δραστικότητα PLD με κονιορτοποίηση σε υγρό N₂, όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.2.1. Μόνη διαφορά είναι ο λόγος του νωπού βάρους του ιστού (g) προς τον όγκο του ρυθμιστικού διαλύματος (mL) για την ομογενοποίηση (1:7). Για το δείγμα ελέγχου λαμβάνονται φύλλα από ατραυμάτιστα αρτίβλαστα.

3.3 Προσδιορισμός πρωτεΐνης

Υλικά-Συσκευές

- Αντιδραστήριο Folin Ciocalteu (περιέχει άλατα Mo, W και φωσφορικό οξύ), Merck
- Αλβουμίνη βοδινού ορού (BSA), Serva
- Ανθρακικό νάτριο (Na₂CO₃), SDS
- Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH), Merck
- Θειικός χαλκός (CuSO₄·5H₂O), Fluka
- Τρυγικό καλιονάτριο, Merck
- Φωτόμετρο, Ηελιος β, Unicam

Διαλύματα

- Διάλυμα BSA, 0,33 mg/mL
- Διάλυμα Α: Na₂CO₃ 2% σε 0,1 M NaOH
- Διάλυμα Β: CuSO₄·5H₂O 0,5% σε 1% τρυγικό καλιονάτριο
- Διάλυμα Γ: Διάλυμα Α + Διάλυμα Β σε αναλογία 50:1. Παρασκευάζεται πριν από τον προσδιορισμό

Αρχή της μεθόδου

Με προσθήκη διαλύματος Γ στο πρωτεϊνικό διάλυμα (αλκαλικό περιβάλλον), ο Cu^{2+} συμπλοκοποιείται με τους πεπτιδικούς δεσμούς (το σύμπλοκο εμφανίζει ελαφρά ιώδες χρώμα) και ανάγεται μερικώς προς Cu^+ . Κατόπιν, προστίθεται το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu, το οποίο περιέχει φωσφομολυβδαινικό/βολφραμικό οξύ ($3\text{H}_2\text{O}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\cdot 13\text{WO}_3\cdot 5\text{MoO}_3\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ και $3\text{H}_2\text{O}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\cdot 14\text{WO}_3\cdot 4\text{MoO}_3\cdot 10\text{H}_2\text{O}$). Τα μολυβδαινικά και βολφραμικά ανάγονται από τον Cu^+ , από τη θρυπτοφάνη, την τυροσίνη και σε μικρότερο βαθμό την κυστεΐνη και την ιστιδίνη των πρωτεϊνών, δίνοντας κυανό χρώμα στο διάλυμα. Το χρώμα που τελικά φωτομετρείται είναι συνδυασμός του χρώματος του συμπλόκου χαλκού-πεπτιδικών δεσμών και των ανηγμένων μολυβδαινικών και βολφραμικών [191].

Πορεία εργασίας

Από το προς προσδιορισμό πρωτεϊνικό δείγμα λαμβάνονται 15-155 μL και αραιώνονται σε τελικό όγκο 600 μL με νερό (παρασκευάζονται διπλά δείγματα). Προστίθενται 3 mL πρόσφατα παρασκευασμένου διαλύματος Γ και τα μίγματα αφήνονται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, προστίθενται 0,3 mL διαλύματος Folin Ciocalteu. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα (vortex) και παραμονή για 30 min, ώστε να αναπτυχθεί το τελικό χρώμα. Παράλληλα, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς με διαλύματα BSA, που έχουν υποστεί την ίδια κατεργασία (δείγματα 100, 200 και 600 μL από το διάλυμα BSA 0,33 mg/mL). Τα διαλύματα, καθώς και τα πρότυπα, φωτομετρούνται στα 750 nm και υπολογίζεται η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε πρωτεΐνη με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς [192].

3.4 Εκχύλιση λιπιδίων από φύλλα *G. hirsutum*

Υλικά-Συσκευές

- Ισοπροπανόλη, αναλυτικής καθαρότητας, Carlo Erba
- Χλωροφόρμιο (CHCl_3), αναλυτικής καθαρότητας, SDS
- Μεθανόλη (CH_3OH), αναλυτικής καθαρότητας, Mallinckrodt
- Βουτυλιωμένο υδροξυ-τολουόλιο (BHT), Sigma
- Χλωριούχο κάλιο (KCl), Mallinckrodt
- Υδρόλουτρο με ρεύμα νερού, Clifton

- Φυγόκεντρος RC-5B, Sorvall

Διαλύματα

- Ισοπροπανόλη με 0,01% BHT (w/v): 0,005 g BHT διαλύονται σε 50 mL ισοπροπανόλης
- Μίγμα $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1 με 0,01% BHT (w/v): 0,03 g BHT διαλύονται σε 200 mL CHCl_3 και 100 mL CH_3OH
- KCl 1 M

Πορεία εργασίας

Φύλλο από αρτίβλαστο *G. hirsutum* αποκόπτεται και κατευθείαν εμβαπτίζεται σε γυάλινο σωλήνα με 3 mL ζεστής (75°C) ισοπροπανόλης με 0,01% BHT, όπου παραμένει πωματισμένο για 15 min. Το βήμα αυτό της εκχύλισης είναι πολύ κρίσιμο, καθώς η ισοπροπανόλη σε συνδυασμό με τη θέρμανση αναστέλλουν τη λιπολυτική δράση ενζύμων και ιδίως της PLD, που ενεργοποιείται με το κόψιμο του φύλλου. Το BHT χρησιμοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της εκχύλισης ως αντιοξειδωτικό.

Στη συνέχεια, στο σωλήνα με το φύλλο προστίθενται 1,5 mL CHCl_3 και 0,6 mL νερό και ακολουθεί ισχυρή ανακίνηση σε κυκλοαναδευτήρα. Ο σωλήνας παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h και ανακινείται σε τακτά χρονικά διαστήματα σε κυκλοαναδευτήρα. Μετά το πέρας της 1 h, παραλαμβάνεται το υγρό εκχύλισμα με μακριά πιπέτα pasteur σε κωνική φιάλη. Στο σωλήνα προστίθενται 4 mL $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1 με 0,01% BHT, ο σωλήνας ανακινείται ισχυρά σε τακτά χρονικά διαστήματα και μετά από 30 min το εκχύλισμα παραλαμβάνεται με την πιπέτα pasteur και συλλέγεται στην κωνική φιάλη. Το τελευταίο βήμα, επαναλαμβάνεται ακόμα τέσσερις φορές, ώσπου να αποχρωματιστεί το φύλλο.

Στην κωνική φιάλη με το σύνολο των εκχυλισμάτων προστίθεται 1 mL KCl 1 M, το εκχύλισμα αναδεύεται και χωρίζεται σε κωνικούς σωλήνες φυγοκέντρου, όπου φυγοκεντρείται στα 500 g για 10 min. Η χλωροφορμική (κάτω) φάση συλλέγεται πάλι στην κωνική φιάλη, όπου προστίθενται 2 mL νερό και ακολουθεί η ίδια διαδικασία για τη φυγοκέντρηση. Μετά την απόρριψη της υδατικής φάσης, τα εκχυλίσματα εξατμίζονται σε ρεύμα N_2 , μεταφέρονται σε γυάλινο βιδωτό σωλήνα με προσθήκη μίγματος $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1 και φυλάσσονται στους -20°C σε ατμόσφαιρα N_2 .

Το φύλλο, τέλος, συλλέγεται και μένει σε φούρνο στους 105°C για όλη τη νύχτα, ώστε την επόμενη μέρα να προσδιοριστεί το ξηρό βάρος του [193].

Η ανάλυση συνεχίζεται με διαχωρισμό των λιπιδίων με TLC, εκχύλισή τους από την πλάκα και ποσοτικοποίηση με προσδιορισμό φωσφόρου, όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

3.4.1 Εκχύλιση λιπιδίων μετά από εφαρμογή τραυματισμού

Υλικά-Συσκευές-Διαλύματα

Όμοια με αυτά της ενότητας 3.4

Πορεία εργασίας

Σε αρτίβλαστα βαμβακιού εφαρμόζεται μηχανική καταπόνηση, όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.1. Από τις δύο ομάδες φύλλων που συλλέγονται (τραυματισμένα, ατραυμάτιστα) εκχυλίζεται το σύνολο των λιπιδίων, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην ενότητα 3.4. Για τον υπολογισμό των ενδογενών επιπέδων φωσφολιπιδίων σε φυσιολογικές συνθήκες, γίνεται εκχύλιση από δείγμα ελέγχου, στο οποίο το φύλλο προέρχεται από ατραυμάτιστο αρτίβλαστο.

3.4.2 Εκχύλιση λιπιδίων μετά από επίδραση βουτανόλης

Υλικά-Συσκευές-Διαλύματα

Όμοια με αυτά της ενότητας 3.3 με μόνη προσθήκη:

- 1-Βουτανόλη, αναλυτικής καθαρότητας, Carlo Erba

Αρχή της μεθόδου

Οι πρωτοταγείς αλκοόλες είναι γνωστό ότι αναστέλλουν τη δράση PLD. Για το λόγο αυτό ελέγχεται *in vivo* σε φύλλα *G. hirsutum* η επίδραση 1-βουτανόλης στη δράση PLD, μέσω ελέγχου των ενδογενών επιπέδων PtdOH μετά από επίδραση με 1-βουτανόλη.

Πορεία εργασίας

Σε φύλλο αρτιβλάστου *G. hirsutum* με πλήρως ανεπτυγμένο το πρώτο ζεύγος φύλλων (ηλικίας 45-50 ημερών), που έχει αναπτυχθεί όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.1, τοποθετείται και εφαρμόζει εκατέρωθεν του ελάσματος απορροφητικό χαρτί εμποτισμένο με υδατικό διάλυμα 1-βουτανόλης 1%. Μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα (10-60 min) αποκολλάται το χαρτί και πιέζεται ελαφρά το έλασμα, ώστε να καθαριστεί από υπολείμματα βουτανόλης. Να σημειωθεί ότι καθ' όλη τη διάρκεια κάλυψης του ελάσματος με το εμποτισμένο χαρτί, παρέχεται στήριξη στο φύλλο, ώστε να μη γέρνει υπό το πρόσθετο βάρος του χαρτιού. Το καθαρό πλέον φύλλο αποκόπτεται, εμβαπτίζεται

κατευθείαν σε ζεστή ισοπροπανόλη και ακολουθεί εκχύλιση και ανάλυση των λιπιδίων του, όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.4.

Πέραν της εκχύλισης μετά την επίδραση n-βουτανόλης για ορισμένα χρονικά διαστήματα (10, 30, 60 min), έγινε και εκχύλιση μετά από επίδραση με 1-βουτανόλη (για 10 ή 20 min) και παραμονή στον αέρα (για 30 min), ώστε να ελεγχθεί αν η ανασταλτική δράσης της 1-βουτανόλης στην PLD εμφανίζεται και μετά την απομάκρυνσή της. Πραγματοποιήθηκαν, τέλος, εκχυλίσεις λιπιδίων και από δείγματα φύλλων ελέγχου, όπου δεν είχε επιδράσει τίποτα ή είχε τοποθετηθεί χαρτί εμποτισμένο με νερό για 1 h.

Ανάλογα ελέγχθηκαν τα ενδογενή επίπεδα φωσφολιπιδίων σε φύλλα μετά από τραυματισμό, υπό την επίδραση 1-βουτανόλης. Πιο συγκεκριμένα, μετά από επίδραση βουτανόλης για 10 min, το έλασμα τραυματίζεται κατά τα γνωστά (ενότητα 3.1.2) και είτε παραμένει υπό την επίδραση της βουτανόλης και μετά τον τραυματισμό είτε καθαρίζεται από τη βουτανόλη προτού τραυματιστεί. Μετά από 15 min τραυματισμού αποκόπτεται το φύλλο, σε κάθε περίπτωση, και το σύνολο των λιπιδίων του εκχυλίζεται και αναλύεται (ενότητα 3.4). Να σημειωθεί ότι μόνο στο τραυματισμένο φύλλο τοποθετείται χαρτί με βουτανόλη, ενώ εκχυλίζονται τα λιπίδια και από το γειτονικό φύλλο (συστημικά).

3.5 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Υλικά-Συσκευές

- Silica gel H, Merck
- Οξαλικό κάλιο, $(\text{COOK})_2$, Ferak
- Οργανικοί διαλύτες: χλωροφόρμιο (CHCl_3), μεθανόλη (CH_3OH)
- Πολικοί διαλύτες: υδροξειδίο του αμμωνίου (NH_4OH)
- Μίγμα $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1
- Πρότυπα διαλύματα λιπιδίων (NBD-PtdOH, PtdOH, PtdCho, PtdEth, PtdEtOH), 1% σε $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1, Avanti/Sigma
- Γυάλινες πλάκες 20 x 20 cm²
- Συσκευή Desaga για την επίστρωση πλακών και ειδική βάση τοποθέτησης πλακών
- Ξηραντικός θάλαμος (περιέχει ενεργοποιημένο blue silica gel, Macherey-Nagel)
- Γυάλινος θάλαμος ανάπτυξης και θάλαμος I₂
- Φορητή λάμπα υπεριώδους, UV (UVP, model UVGL-58, 254/366 nm)

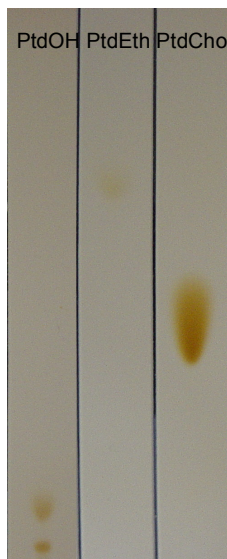
Παρασκευή πλακών TLC silica gel H

Ζυγίζονται σε κωνική φιάλη 36,5 g silica gel H και αναμιγνύονται με 100 mL διαλύματος $(\text{COOK})_2$ 2,1%, με ισχυρή ανακίνηση για 2 min και 40 s ακριβώς. Στη συνέχεια, το μίγμα μεταφέρεται αμέσως στη συσκευή Desaga, η οποία έχει ρυθμιστεί σε πάχος πλάκας 0,5 mm και ακολουθεί επίστρωση των πλακών. Οι πλάκες αφήνονται να στεγνώσουν και μετά ενεργοποιούνται με θέρμανση στους 130°C για 1 h. Αν δεν χρησιμοποιηθούν αμέσως, φυλάσσονται στον ξηραντικό θάλαμο και ενεργοποιούνται με θέρμανση στους 130°C για 30 min, πριν τη χρήση τους.

Διαχωρισμός λιπιδίων

- Προετοιμασία θαλάμου ανάπτυξης: Τοποθετείται το σύστημα διαλυτών CHCl_3 - CH_3OH - NH_4OH (65:35:5, v/v/v) και διηθητικό χαρτί στα τοιχώματα του θαλάμου. Ο θάλαμος σφραγίζεται με ταινία και αφήνεται να κορεσθεί. Η προπαρασκευή του θαλάμου γίνεται τουλάχιστον 4 h πριν το διαχωρισμό των λιπιδίων
- Προετοιμασία πλακών και τοποθέτηση δειγμάτων: Οι ενεργοποιημένες πλάκες χωρίζονται σε ισοπαχείς λωρίδες με τη βοήθεια ειδικού χάρακα. Τα δείγματα αποτίθενται σε απόσταση ~2 cm από τη βάση της πλάκας. Τα πρότυπα δείγματα (συνήθως 5-20 μL διαλυμάτων 1%) τοποθετούνται με αυτόματες πιπέτες, υπό μορφή κηλίδας, στο μέσο κάθε λωρίδας. Τα λιπιδικά δείγματα, τα προερχόμενα από εκχύλιση λιπιδίων (ενότητα 3.4), αφού εξατμιστούν σε ρεύμα N_2 , αναδιαλύονται σε $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1 (150 μL) και αποτίθενται με αυτόματη πιπέτα (ρυθμισμένη στα 50 μL) υπό μορφή ζώνης πάχους περίπου 5 mm. Για ποσοτική μεταφορά του δείγματος στην πλάκα, γίνεται επιπλέον δύο φορές έκπλυση του σωλήνα με 100 μL $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1 κάθε φορά και προσθήκη των εκπλυμάτων στις ζώνες
- Ανάπτυξη χρωματογραφημάτων: Οι πλάκες τοποθετούνται κατακόρυφα στον κορεσμένο θάλαμο. Το σύστημα διαλυτών ανεβαίνει λόγω τριχοειδών φαινομένων και παρασύρει τα λιπίδια με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη της συγγενείας τους προς το προσροφητικό υλικό της πλάκας. Όταν ο διαλύτης φτάσει στο πάνω μέρος της πλάκας (~18 cm), αυτή εξάγεται από το θάλαμο και μεταφέρεται στον απαγωγό για να στεγνώσει
- Εμφάνιση λιπιδίων: Μετά την ανάπτυξη, και αφού στεγνώσει, η πλάκα μπαίνει σε θάλαμο I_2 . Παραμένει εκεί για περίπου 10 min, οπότε τα λιπίδια εμφανίζονται ως κίτρινες κηλίδες (σχήμα 17, πίνακας 2). Το χρώμα αυτό σταδιακά εξαφανίζεται κατά την παραμονή της πλάκας εκτός θαλάμου. Σε περίπτωση διαχωρισμού NBD-επισημασμένων λιπιδίων δε

χρειάζεται η χρώση με I₂. Οι ζώνες των λιπιδίων εμφανίζονται απλά με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV)



Σχήμα 17. Διαχωρισμός PtdOH, PtdEth και PtdCho σε TLC με σύστημα ανάπτυξης CHCl₃-CH₃OH-NH₄OH 65:35:5

Πίνακας 2. Τιμές R_f πρότυπων φωσφολιπιδίων σε σύστημα ανάπτυξης CHCl₃-CH₃OH-NH₄OH 65:35:5

Λιπίδιο	R _f
PtdOH	0,10
PtdCho	0,48
PtdEth	0,68
PtdEtOH	0,82

3.6 Εκχύλιση λιπιδίων από τη χρωματογραφική πλάκα

Υλικά-Συσκευές

- Χλωροφόρμιο (CHCl₃), αναλυτικής καθαρότητας, SDS
- Μεθανόλη (CH₃OH), αναλυτικής καθαρότητας, Mallinckrodt
- Πυκνό υδροχλωρικό οξύ (π. HCl), αναλυτικής καθαρότητας, Merck
- Ειδική μεταλλική λεπίδα
- Φυγόκεντρος RC-5B, Sorvall

Διαλύματα

- Μίγμα CHCl₃/CH₃OH 1:2
- Μίγμα CHCl₃/CH₃OH 2:1
- HCl 0,2 N

Πορεία εργασίας

- Απομάκρυνση silica gel από την πλάκα: Με τη βοήθεια της μεταλλικής λεπίδας απομακρύνονται από την πλάκα και συλλέγονται σε αλουμινόχαρτο οι περιοχές που δεν ενδιαφέρουν. Στη συνέχεια, κάθε προς εκχύλιση ζώνη απομακρύνεται με τον ίδιο τρόπο προσεκτικά και, με τη βοήθεια χαρτιού ζύγισης, μεταφέρεται σε κωνικό σωλήνα φυγόκεντρου

- Όξινη εκχύλιση Bligh-Dyer [194]: Σε κάθε κωνικό σωλήνα προστίθενται διαδοχικά τα παρακάτω, ώστε να προκύψει διφασικό σύστημα στο οποίο τα λιπίδια κατανέμονται στη χλωροφορμική φάση:

- 1,875 mL CHCl₃/CH₃OH 1:2
- 0,5 mL απεσταγμένο νερό
- 0,625 mL HCl 0,2 N
- 0,625 mL CHCl₃

Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 500 g για 10 min. Στη συνέχεια, με πιπέτα pasteur, από κάθε κωνικό σωλήνα παραλαμβάνεται η χλωροφορμική φάση και εξατμίζεται σε ρεύμα N₂.

Το λιπίδιο συνήθως αναδιαλύεται σε 500 μL CHCl₃/CH₃OH 2:1 και απ' αυτά λαμβάνονται από 200 μL σε δύο σωλήνες rygex προς προσδιορισμό φωσφόρου (διπλά δείγματα). Τα δείγματα εξατμίζονται προσεκτικά μέχρι ξηρού σε ρεύμα N₂ πριν από τον προσδιορισμό φωσφόρου.

Στην περίπτωση NBD-επισημασμένων λιπιδίων, παραλαμβάνεται το σύνολο της χλωροφορμικής φάσης σε γυάλινο βιδωτό σωλήνα με σκούρα τοιχώματα. Κατόπιν, εξατμίζεται μέχρι ξηρού, ώστε να αναδιαλυθεί σε γνωστό όγκο διαλύτη (CHCl₃) λίγο πριν τη μέτρηση σε φθορισμόμετρο.

3.7 Προσδιορισμός φωσφόρου

Υλικά-Συσκευές

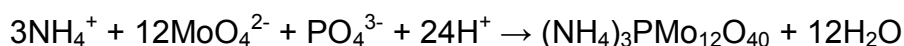
- Υπερχλωρικό οξύ (HClO₄) 72%, αναλυτικής καθαρότητας, Merck
- Μολυβδαινικό αμμώνιο 0,4%, Merck
- 1,2,4-αμινο-ναφθολο-σουλφονικό οξύ (ANSA), Merck
- Θειώδες νάτριο (Na₂SO₃), Mallinckrodt
- Όξινο θειώδες νάτριο (NaHSO₃), Merck
- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH₂PO₄), Merck
- Αμμόλουτρο 170-180°C
- Φωτόμετρο, Ηελιος β, Unicam

Διαλύματα

- Διάλυμα ANSA: Διαλύονται 30 g NaHSO₃ και 6 g Na₂SO₃ σε 250 mL νερό. Προστίθεται 0,5 g ANSA. Αν σε 3 h σχηματιστεί ίζημα, το διάλυμα διηθείται και φυλάσσεται σε ψύξη. Το διάλυμα θεωρείται κατάλληλο προς χρήση επί ένα μήνα από την ημέρα παρασκευής του
- Αντιδραστήριο ANSA: Παρασκευάζεται πριν από τον προσδιορισμό με ανάμειξη 4 mL διαλύματος ANSA και 6 mL νερού
- Πρότυπο διάλυμα φωσφόρου (KH₂PO₄), 4 μg P/mL: 1,7575 g KH₂PO₄ διαλύονται σε 100 mL νερού. Το KH₂PO₄ ξηραίνεται στους 105°C για 1 h πριν ζυγιστεί

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός φωσφόρου βασίζεται στη μετατροπή του οργανικού φωσφόρου σε ανόργανα φωσφορικά μετά από καύση παρουσία υπερχλωρικού οξέος. Στη συνέχεια, με προσθήκη μολυβδαινικού αμμωνίου, σχηματίζεται φωσφομολυβδαινικό αμμώνιο σύμφωνα με την αντίδραση



που ανάγεται προς κυανούν του φωσφομολυβδαινίου με θέρμανση σε όξινο περιβάλλον. Ως αναγωγικό χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο ANSA [191].

Πορεία εργασίας

Τα δείγματα (που πρέπει να περιέχουν 0,5-5 μg P) έχουν εξαμιστεί μέχρι ξηρού και βρίσκονται σε σωλήνες rygex, οι οποίοι έχουν προηγουμένως πλυθεί με χρωμοθειικό οξύ. Προστίθεται 0,5 mL HClO₄ 72% και οι σωλήνες τοποθετούνται σε αμμόλουτρο 170-180°C για 1 h ή παραπάνω μέχρι τον πλήρη αποχρωματισμό των δειγμάτων. Μετά την καύση, τα δείγματα ψύχονται και προστίθενται κατά σειρά 1 mL νερού, 3 mL μολυβδαινικού αμμωνίου 0,4% και 0,5 mL αντιδραστηρίου ANSA. Μετά από ισχυρή ανάδευση, οι σωλήνες τοποθετούνται σε υδρόλουτρο 100°C για 10 min. Αφήνονται για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου και φωτομετρούνται στα 820 nm. Παράλληλα, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς με διάφορες συγκεντρώσεις KH₂PO₄ (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 mL από το πρότυπο διάλυμα KH₂PO₄) [195].

3.8 Προσδιορισμός δραστικότητας PLDα

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός δραστικότητας της PLDα βασίζεται στην *in vitro* μέτρηση της υδρολυτικής δράσης ενζυμικών παρασκευασμάτων PLDα έναντι μικκυλίων PtdCho –ή, κατά περίπτωση, PtdEth- σε ελαφρώς όξινο pH, παρουσία mM Ca²⁺ και ενεργοποιητών (SDS) της ιδιοσυστατικής αυτής ισομορφής PLD.

Η PLD δρα σε υδατικό σύστημα που περιέχει σε μικκυλιακή μορφή το λιπιδικό υπόστρωμα [196] και παράγει PtdOH. Μετά τη λήξη της αντίδρασης διαχωρίζονται τα λιπίδια - εναπομένει υπόστρωμα και προϊόν- με TLC, εκχυλίζεται από την πλάκα η ζώνη του PtdOH και ποσοτικοποιείται είτε με προσδιορισμό φωσφόρου είτε με προσδιορισμό της ομάδας με την οποία έχει επισημανθεί (³H] ή NBD) το λιπίδιο.

3.8.1 Ενζυμική αντίδραση PLDα με χρήση ψυχρού υποστρώματος

Υλικά-Συσκευές

- Φωσφατιδυλοχολίνη (DPPC, P0763), Sigma
- Χλωροφόρμιο (CHCl₃), αναλυτικής καθαρότητας, SDS
- Μεθανόλη (CH₃OH), αναλυτικής καθαρότητας, Mallinckrodt
- Υδροξείδιο του αμμωνίου (NH₄OH), Merck
- HEPES, MP Biomedicals
- Χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂·2H₂O), Merck
- Δωδεκυλο-σουλφονικό νάτριο (SDS), MP Biomedicals
- Χλωριούχο κάλιο (KCl), Mallinckrodt
- Νερό millipore από συσκευή Milli-Q Academic, Millipore
- Σωλήνες πολυστυρενίου
- Λουτρό υπερήχων, S15 H-Elmasonic, Elma
- Υδρόλουτρο με ρεύμα νερού, Clifton
- Φυγόκεντρος RC-5B, Sorvall

Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 100 mM, pH 6,5: Για την παρασκευή 500 mL διαλύματος ζυγίζονται 11,9152 g HEPES και διαλύονται σε ~470 mL νερού millipore. Ρυθμίζεται το pH στο 6,5 με προσθήκη NaOH 8 N και συμπληρώνεται ο όγκος ως τα 500 mL με νερό millipore
- CaCl₂ 500 mM: Η διάλυση του CaCl₂·2H₂O γίνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 100 mM, pH 6,5
- SDS 5 mM: Η διάλυση του SDS γίνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 100 mM, pH 6,5
- Μίγμα CHCl₃/CH₃OH 1:2
- Μίγμα CHCl₃/CH₃OH 2:1
- Προετοιμασία υποστρώματος: Κατάλληλη ποσότητα διαλύματος PtdCho (0,4 μmol PtdCho/δείγμα αντίδρασης) εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα N₂ και προστίθεται νερό millipore (τελική συγκέντρωση PtdCho 20 mM). Η PtdCho διασπείρεται στο νερό με εφαρμογή υπερήχων μέχρι πλήρους παραλαβής του λιπιδίου (~20 min), σε θερμοκρασία δωματίου. Πριν την προσθήκη στο μίγμα της αντίδρασης, το μικκυλιακό υπόστρωμα αναδεύεται με τη χρησιμοποιούμενη αυτόματη πιπέτα
- KCl 2 M: Η διάλυση του KCl γίνεται σε νερό millipore

Πορεία εργασίας

Στο σωλήνα της αντίδρασης προστίθενται 20 μL διαλύματος CaCl₂ 500 mM, 20 μL διαλύματος SDS 5 mM, 20 μL από το υπόστρωμα, 10-15 μg πρωτεΐνης (ήτοι 10-20 μL ενζυμικού παρασκευάσματος) και ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 100 mM (pH 6,5) προς συμπλήρωση του όγκου μέχρι τα 200 μL. Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη του ενζυμικού παρασκευάσματος και λαμβάνει χώρα στους 30°C για 30 min. Διακόπτεται με προσθήκη 750 μL CHCl₃/CH₃OH 1:2 και έντονη ανάδευση [87].

Μετά τη διακοπή της αντίδρασης με CHCl₃/CH₃OH 1:2, προστίθενται διαδοχικά 200 μL KCl 2 M και 200 μL CHCl₃. Μετά από κάθε προσθήκη ακολουθεί ισχυρή ανάδευση. Στο διφασικό σύστημα που προκύπτει, οι φάσεις διαχωρίζονται με φυγοκέντρηση στα 500 g για 5 min και παραλαμβάνεται η χλωροφορμική (κάτω) φάση με το σύνολο των λιπιδίων [87].

Για τον υπολογισμό της ειδικής δραστηριότητας ακολουθεί διαχωρισμός των λιπιδίων με TLC σε σύστημα διαλυτών CHCl₃-CH₃OH-NH₄OH (65:35:5, v/v/v) (ενότητα 3.5), εκχύλιση

της ζώνης του PtdOH (ενότητα 3.6) και ποσοτικοποίηση με προσδιορισμό φωσφόρου (ενότητα 3.7).

3.8.2 Προσδιορισμός δραστικότητας PLDα με χρήση ραδιενεργού υποστρώματος

3.8.2.1 Ενζυμική αντίδραση PLDα με [³H]PtdCho ως υπόστρωμα

Υλικά-Συσκευές

Όμοια με αυτά της ενότητας 3.8.1, με μόνη προσθήκη:

- [2-παλμιτυλο-9,10-³H]φωσφατιδυλοχολίνη ([³H]PtdCho, 60Ci mmol⁻¹, 1mCi mL⁻¹), ARC

Διαλύματα

Όμοια με αυτά της ενότητας 3.8.1, με μόνη διαφορά:

- Προετοιμασία υποστρώματος: Κατάλληλη ποσότητα διαλύματος PtdCho (0,4 μmol PtdCho/δείγμα αντίδρασης) εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα N₂. Κατόπιν, προστίθεται ποσότητα ραδιενεργής [³H]PtdCho (22 nCi, ειδική ραδιενέργεια 50 cpm nmol⁻¹), η οποία ομοίως εξατμίζεται σε ρεύμα N₂. Τα λιπίδια αναδιαλύονται σε μικρή ποσότητα CHCl₃ και ακολουθεί εξάτμιση μέχρι ξηρού και προσθήκη νερού millipore (τελική συγκέντρωση PtdCho 20 mM). Η διασπορά στο νερό γίνεται με εφαρμογή υπερήχων μέχρι πλήρους παραλαβής του λιπιδίου (~20 min), σε θερμοκρασία δωματίου. Για έλεγχο της καλής διασποράς του υποστρώματος λαμβάνονται 3 μL απ' αυτό σε ειδικό φιαλίδιο μέτρησης ραδιενέργειας και, μετά από προσθήκη του κατάλληλου σπινθηριστή, μετράται η ραδιενέργεια (ενότητα 3.8.2.2)
- Καθαρισμός φωσφολιπιδίων (PtdCho, [³H]PtdCho): Είναι γνωστό πως τα φωσφολιπίδια κατά την παραμονή τους, ακόμα και σε συνθήκες ψύξης, υδρολύονται προς σχηματισμό του αντίστοιχου λυσο-φωσφολιπιδίου κι ενός λιπαρού οξέος. Ανάλογα, και η PtdCho μπορεί να υδρολύεται προς λυσο-PtdCho, η οποία με διαχωρισμό TLC συμπίπτει με τη ζώνη PtdOH. Για το λόγο αυτό, σε τακτά χρονικά διαστήματα απαιτείται ο καθαρισμός του λιπιδίου (ψυχρού ή θερμού) προς αποφυγή σφαλμάτων κατά τον προσδιορισμό της δραστικότητας PLD. Σε κορεσμένο θάλαμο, λοιπόν, με σύστημα διαλυτών CHCl₃-CH₃OH-NH₄OH (65:35:5, v/v/v) και πλάκες silica gel H, αναπτύσσονται 0,4 μmol ψυχρής ή 6500 cpm θερμής PtdCho. Στην πρώτη περίπτωση (ψυχρή PtdCho), ο καθαρισμός γίνεται με ακόλουθη εμφάνιση των λιπιδίων σε θάλαμο I₂ και εκχύλιση της καθαρής PtdCho από την πλάκα (ενότητες 2.5, 2.6). Στην περίπτωση της ραδιενεργής [³H]PtdCho, απομακρύνεται η ζώνη της καθαρής [³H]PtdCho και ακολουθεί εκχύλιση του

λιπιδίου από την πλάκα με όξινη Bligh-Dyer (ενότητα 3.6). Η ζώνη που θα παραληφθεί από την πλάκα επιλέγεται με βάση κηλίδα πρότυπης PtdCho, που έχει αναπτυχθεί παράλληλα με το ραδιενεργό λιπίδιο στην ίδια πλάκα

Πορεία εργασίας

Η ενζυμική αντίδραση γίνεται όπως ακριβώς περιγράφεται στην ενότητα 3.8.1. Η διαφορά έγκειται στη σύνθεση του υποστρώματος και στον τρόπο ποσοτικοποίησης του προϊόντος, PtdOH.

Πιο συγκεκριμένα, μετά το διαχωρισμό των λιπιδίων της χλωροφορμικής φάσης με TLC, ακολουθεί απόξεση ζωνών καθορισμένου πλάτους (0,5-2 cm) καθ' όλο το μήκος ανάπτυξης της πλάκας και η μεταφορά τους σε ειδικά φιαλίδια μέτρησης ραδιενεργών. Στην περίπτωση αυτή, δεν παρεμβάλλεται εκχύλιση του λιπιδίου από την πλάκα.

Από το σύνολο των κρούσεων στο αναπτυγμένο δείγμα υπολογίζεται το ποσοστό κρούσεων της ζώνης PtdOH. Σε κάθε πλάκα αναπτύσσονται 5-6 δείγματα. Λαμβάνεται ο μέσος όρος των συνολικών κρούσεων ανά δείγμα και με βάση την τιμή αυτή κανονικοποιούνται οι κρούσεις PtdOH για κάθε δείγμα. Η ειδική δραστηριότητα, τέλος, προκύπτει από τις κανονικοποιημένες κρούσεις της ζώνης PtdOH και την ειδική ραδιενέργεια του υποστρώματος.

3.8.2.2 Μέτρηση ραδιενέργειας

Υλικά-Συσκευές

- 2,5-διφαινυλοξαζόλιο (PPO), 99% Alfa Aesar
- 1,4-δισ-(5-φαινυλο-2-οξαζολο)-βενζόλιο (POPOP), Sigma
- Τολουόλιο, Merck
- Διοξάνη, SDS
- Ναφθαλίνιο, Aldrich (scintillation grade)
- Μεθανόλη (CH₃OH), Mallinckrodt
- Μετρητής σπινθηρισμού υγρών, Wallac 1209 Rackbeta, Pharmacia

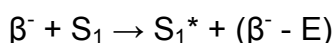
Διαλύματα

- Κοκτέιλ σπινθηριστή με βάση το τολουόλιο (toluene base): Σε 1 L τολουολίου διαλύονται 5 g PPO και 0,3 g POPOP

- Κοκτέηλ σπινθηριστή με βάση τη διοξάνη (dioxanne base): Σε 1 L διοξάνης διαλύονται 7 g PPO, 0,3 g POPOP και 100 g ναφθαλινίου
- Κοκτέηλ σπινθηριστή με βάση τη διοξάνη και το νερό (dioxanne/water base): 1 L dioxanne base αναμιγνύεται με 200 mL νερό

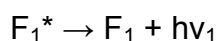
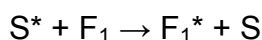
Αρχή της μεθόδου

Η μέτρηση ραδιενεργών δειγμάτων σε μετρητές σπινθηρισμού υγρών είναι μία αποτελεσματική τεχνική ανίχνευσης σωματιδίων β^- . Το φως, που παράγεται κατά τη διάρκεια μέτρησης των εκπεμπόμενων β^- σωματιδίων, προκύπτει από την τοποθέτηση του ραδιενεργού δείγματος σε ένα κοκτέηλ σπινθηριστών. Το κοκτέηλ αυτό περιέχει τον διαλύτη που διεγείρεται και μία ή περισσότερες ενώσεις που φθορίζουν. Τα εκπεμπόμενα σωματίδια β^- έρχονται σε επαφή με τον διαλύτη (S_1) και μεταφέρουν μέρος της ενέργειάς τους στα μόριά του. Αυτό δίνει ένα μόριο διαλύτη διεγερμένο (S_1^*) και ένα σωματίδιο β^- που περιέχει λιγότερη ενέργεια (E):



Η ενέργεια που απαιτείται για τη διέγερση ενός μορίου διαλύτη σ' αυτή την αντίδραση είναι συνήθως μικρή, σε σύγκριση με την ενέργεια ενός β^- σωματιδίου. Γι' αυτό το λόγο, η υπόλοιπη ενέργεια ($\beta^- - E$) είναι σε θέση να διεγείρει πολλά μόρια διαλύτη, πριν εκφυλιστεί τελείως. Άρα ο αριθμός των μορίων του διαλύτη, που έχουν διεγερθεί, είναι ευθέως ανάλογος της ενέργειας του σωματιδίου β^- .

Τα διεγερμένα μόρια διαλύτη μεταφέρουν τη διέγερσή τους σε άλλα μόρια του διαλύτη και ενδεχομένως σε μόρια φθορίζουσας ουσίας (F_1), που εκπέμπουν τότε ένα φωτόνιο ($h\nu_1$) και αποδιδεγείρονται στην αρχική τους κατάσταση:



Τα φωτόνια, που παράγονται από τις φθορίζουσες ενώσεις, ανιχνεύονται στο μετρητή από ένα φωτοπολλαπλασιαστή. Ο χρόνος, που το σωματίδιο β^- διαπερνά τον ανιχνευτή, η διέγερση του διαλύτη και η εκπομπή των φωτονίων από τις φθορίζουσες ενώσεις, είναι μικρής διάρκειας σε σύγκριση με το χρόνο απόκρισης του συστήματος του φωτοπολλαπλασιαστή. Γι' αυτό τα φαινόμενα, που ακολουθούν μια β^- εκπομπή, ανιχνεύονται από το σύστημα ως ένας παλμός μόνο, του οποίου η ενέργεια είναι ανάλογη με τον αριθμό των φωτονίων που παρήχθησαν από την εκπομπή του β^- σωματιδίου. Οι παλμοί αυτοί καταγράφονται από ένα σύστημα μέτρησης ως ξεχωριστές κρούσεις και η

συσσώρευση τους για ορισμένο διάστημα δίνει τον αριθμό κρούσεων ανά λεπτό (counts per minute, cpm) [197].

Πορεία εργασίας

Σε κάθε φιαλίδιο μέτρησης, που περιέχει μία ζώνη απομονωμένη από τη χρωματογραφική πλάκα (ενότητα 3.6), προστίθεται 0,5 mL CH₃OH και κατόπιν 5 mL toluene base. Ισχυρή ανακίνηση μετά την προσθήκη της CH₃OH βοηθά στην καλύτερη παραλαβή του λιπιδίου από τη silica gel, με αποτέλεσμα να ενισχύεται έτσι το τελικό σήμα. Στη συνέχεια, τα φιαλίδια τοποθετούνται στο μετρητή σπινθηρισμού υγρών και στο καθένα μετρώνται οι κρούσεις για 5 min, οπότε καταγράφεται ο μέσος όρος κρούσεων ανά λεπτό (cpm). Για τα υδατικά δείγματα προς μέτρηση (ενότητα 3.8.2.1, προετοιμασία υποστρώματος) προστίθενται 10 mL dioxane/water base και, μετά από έντονη ανακίνηση σε κυκλοαναδευτήρα, μετρώνται οι κρούσεις για 5 min.

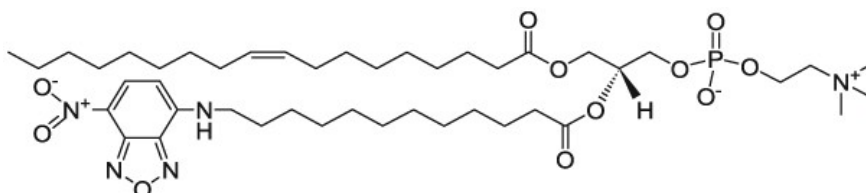
3.8.3 Φθορισμομετρική μέθοδος προσδιορισμού δραστικότητας PLDα

3.8.3.1 Έλεγχος ορίων ευαισθησίας της μεθόδου

Υλικά-Συσκευές

Όμοια με αυτά της ενότητας 3.8.1, με τις παρακάτω προσθήκες:

- Φθορίζοντα φωσφολιπίδια: NBD-PtdCho (810133C, σχήμα 18), NBD-PtdOH (810176C), Avanti (αντί της φωσφατιδυλοχολίνης (DPPC, P0763), Sigma)
- Πρότυπη φωσφολιπάση D (PLD) 50 U/mL, τύπος IV από λάχανο, Sigma
- Φθορισμόμετρο Photon Technology International με λυχνία LPS 220B και ανιχνευτή BryteBox
- Λογισμικό ανάλυσης φθορισμού Felix32, Photon Technology International



Σχήμα 18. 1-ελαύλο-2-[12-[(7-νιτρο-2-1,3-βενζοξαδιαζο-4-υλο)αμινο]δωδεκανούλο]-sn-γλυκερο-3-φωσφατιδυλοχολίνη (18:1-12:0 NBD-PtdCho) (<http://www.avantilipids.com/>)

Διαλύματα

Όμοια με αυτά της ενότητας 3.8.1, με τις εξής διαφορές:

- NBD-PtdCho 2 mM, NBD-PtdOH 2 mM: Τα φθορίζοντα φωσφολιπίδια διαλύονται σε CHCl_3 και η τελική συγκέντρωσή τους ρυθμίζεται μετά από ποσοτικοποίησή τους με προσδιορισμό φωσφόρου (ενότητα 3.7)
- Πρότυπη PLD 5 U/mL: Το καθαρό ένζυμο σε μορφή σκόνης από τη Sigma διαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0,5 mM, DTT 2 mM (ενότητα 3.2.1) και μοιράζεται σε σωλήνες erpendorf. Φυλάσσεται στους -20°C μέχρι τη χρήση
- Προετοιμασία υποστρώματος: Κατάλληλη ποσότητα διαλύματος NBD-PtdCho (0,04 μmol NBD-PtdCho/δείγμα αντίδρασης) εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Κατόπιν, προστίθεται νερό millipore (τελική συγκέντρωση NBD-PtdCho 2 mM). Η διασπορά στο νερό γίνεται με εφαρμογή υπερήχων μέχρι πλήρους παραλαβής του λιπιδίου (~20 min), σε θερμοκρασία δωματίου. Για έλεγχο της καλής διασποράς του υποστρώματος λαμβάνονται 5 μL σε βιδωτό φιαλίδιο με σκούρα τοιχώματα και ακολουθεί φθορισμομετρικός προσδιορισμός (ενότητα 3.8.3.3)

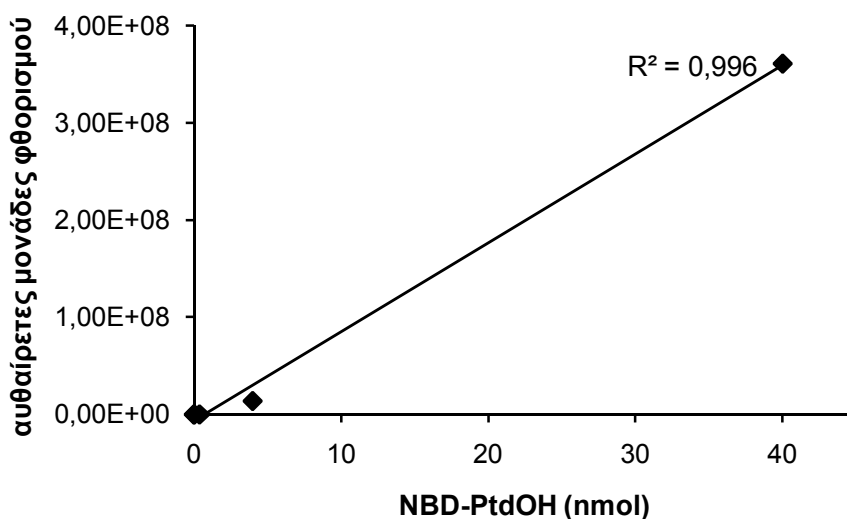
Πορεία εργασίας

Για τη διερεύνηση των ορίων ευαισθησίας της φθορισμομετρικής μεθόδου που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο, με σκοπό τον προσδιορισμό δραστικότητας PLDα και δ, έγινε έλεγχος σε δύο επίπεδα:

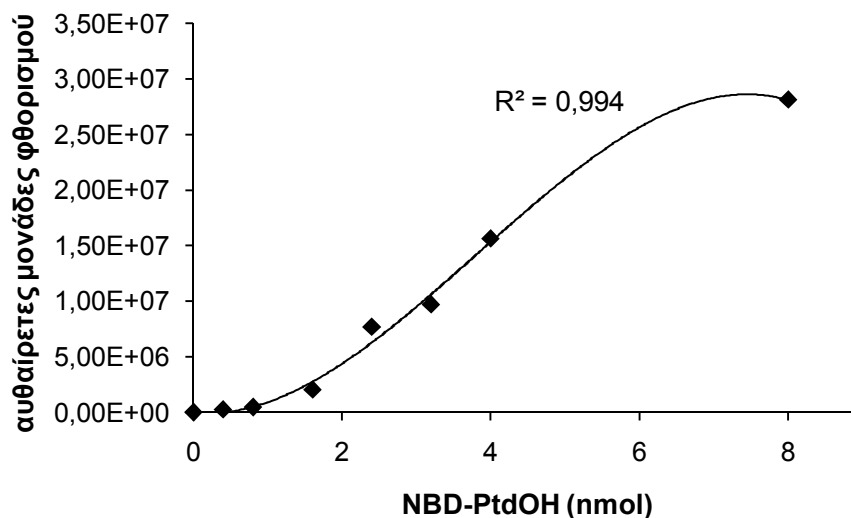
- Έλεγχος γραμμικής περιοχής συγκεντρώσεων: Κατασκευάστηκαν καμπύλες με διάφορες συγκεντρώσεις NBD-PtdOH (0,04-40 nmol). Πιο αναλυτικά, από stock διάλυμα NBD-PtdOH 2 mM, λαμβάνονται σε βιδωτά φιαλίδια με σκούρα τοιχώματα ποσότητες (0,04, 0,4, 0,8, 1,6, 2,4, 3,2, 4, 8 ή 40 nmol) του φθορίζοντος λιπιδίου. Ακολουθεί εξάτμιση μέχρι ξηρού σε ρεύμα N_2 και αναδιάλυση με προσθήκη 300 μL CHCl_3 . Τα φιαλίδια φυλάσσονται στους -20°C σε ατμόσφαιρα N_2 μέχρι τη φθορισμομετρία (ενότητα 3.8.3.3)
- Έλεγχος ορίων ανίχνευσης δραστικότητας PLD: Κατασκευάστηκε καμπύλη δραστικότητας PLD, με χρήση πρότυπης PLD του εμπορίου (0,005-100 mU) και NBD-PtdCho ως υπόστρωμα. Συγκεκριμένα, έγινε *in vitro* δοκιμασία PLD, όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.8.1, ενώ το παραγόμενο (NBD-)PtdOH προσδιορίστηκε φθορισμομετρικά (ενότητα 3.8.3.3)

Η εικόνα που προέκυψε από τους παραπάνω ελέγχους φαίνεται στα διαγράμματα των σχημάτων 18 και 19:

- Έλεγχος γραμμικότητας



Σχήμα 19. Καμπύλη προτύπων NBD-PtdOH (0,04-40 nmol)

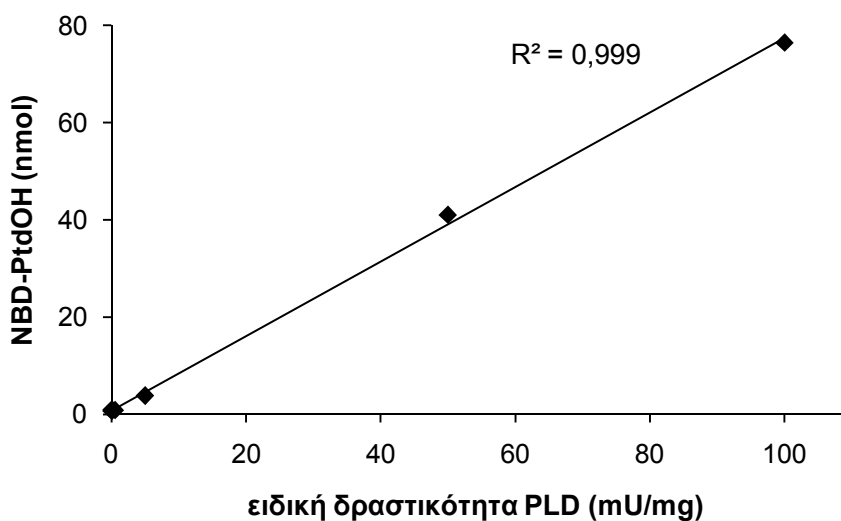


Σχήμα 20. Καμπύλη προτύπων NBD-PtdOH (0,4-8 nmol)

Από τα παραπάνω διαγράμματα (σχήμα 19, 20) επιβεβαιώνεται η γραμμικότητα της μεθόδου για περιοχή τιμών 1-7 nmol PtdOH, ενώ για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις η σχέση δεν είναι πλέον γραμμική. Η περιοχή, ωστόσο, 1-7 nmol καλύπτει την ελάχιστη αναμενόμενη τιμή nmol PtdOH από ενζυμικό παρασκεύασμα PLD φύλλων βαμβακιού, ήτοι 4 nmol, όπως προκύπτει από αντίστοιχες δοκιμές με ραδιενεργό υπόστρωμα. Όσον

αφορά τη μέγιστη τιμή, αν κάποιο δείγμα βρίσκεται εκτός της γραμμικής περιοχής, τότε μπορεί εύκολα να αραιωθεί και να μετρηθεί ο φθορισμός του με αξιοπιστία.

- **Έλεγχος ορίων ανίχνευσης**



Σχήμα 21. Καμπύλη μονάδων ειδικής δραστηριότητας πρότυπης PLD

Ανάλογα, από το σχήμα 21 προκύπτει ότι η ευαισθησία της μεθόδου επιτρέπει μετρήσεις δραστηριότητας PLD από 1 mU και πάνω, αφού τα nmol PtdOH που προκύπτουν από χαμηλότερη δραστηριότητα PLD βρίσκονται κάτω από τα όρια ευαισθησίας της μεθόδου (1 nmol), ενώ ακόμα και σε μεγάλες δραστηριότητες PLD διατηρείται η γραμμικότητα της μεθόδου.

Συνοψίζοντας, η φθορισμομετρική μέθοδος προσδιορισμού δραστηριότητας PLD μπορεί ασφαλώς να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της δραστηριότητας από φύλλα *G. hirsutum*, όπου η ελάχιστη αναμενόμενη παραγωγή (NBD-)PtdOH είναι περίπου 4 nmol.

3.8.3.2 Ενζυμική αντίδραση PLDα με χρήση φθορίζοντος υποστρώματος

Υλικά-Συσκευές

Όμοια με αυτά της ενότητας 3.7.1 με τις παρακάτω προσθήκες:

- Φθορίζοντα φωσφολιπίδια: NBD-PtdCho (810133C), NBD-PtdEth (810156C), Avanti (αντί της φωσφατιδυλοχολίνης (DPPC, P0763), Sigma)
- Φθορισμόμετρο Photon Technology International με λυχνία LPS 220B και ανιχνευτή BryteBox
- Λογισμικό ανάλυσης φθορισμού Felix32, Photon Technology International

Διαλύματα

Όμοια με αυτά της ενότητας 3.8.1, με την εξής διαφορά:

- Προετοιμασία υποστρώματος: Κατάλληλη ποσότητα διαλύματος NBD-PtdCho ή NBD-PtdEth (0,04 μmol NBD-PtdCho ή NBD-PtdEth/δείγμα αντίδρασης) εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Κατόπιν, προστίθεται νερό millipore (τελική συγκέντρωση NBD-PtdCho ή NBD-PtdEth 2 mM). Η διασπορά στο νερό γίνεται με εφαρμογή υπερήχων μέχρι πλήρους παραλαβής του λιπιδίου (~20 min), σε θερμοκρασία δωματίου. Στην περίπτωση της NBD-PtdEth, η υπερήχηση γίνεται μόνο για 5 min στους 55°C και με προσθήκη 5 μL διαλύματος NaOH 0,1 N. Για έλεγχο της καλής διασποράς του υποστρώματος λαμβάνονται 5 μL σε βιδωτό φιαλίδιο με σκούρα τοιχώματα και ακολουθεί φθορισμομετρία (ενότητα 3.8.3.3)

Πορεία εργασίας

Η ενζυμική αντίδραση γίνεται όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.8.1 με τη διαφορά ότι η ποσοτικοποίηση του (NBD-)PtdOH γίνεται με φθορισμομετρία, αντί για προσδιορισμό φωσφόρου. Να σημειωθεί πως καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, επιδιώκεται να υπάρχει όσο το δυνατόν λιγότερο φως στο χώρο εργασίας, καθώς τα φθορίζοντα λιπίδια είναι ευαίσθητα σε αυτό.

3.8.3.3 Φθορισμομετρία

Υλικά-Συσκευές

- Χλωροφόρμιο (CHCl_3), αναλυτικής καθαρότητας, SDS
- Κυψελίδα Quartz (101-QS), Hellma Analytics
- Φθορισμόμετρο Photon Technology International με λυχνία LPS 220B και ανιχνευτή BryteBox
- Λογισμικό ανάλυσης φθορισμού Felix32, Photon Technology International

Αρχή της μεθόδου

Όταν ένα μόριο διεγείρεται με απορρόφηση ακτινοβολίας, τείνει να αποβάλει την ενέργεια που έχει προσλάβει και να επανέλθει στη θεμελιώδη κατάσταση. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η επιπλέον ενέργεια αποδίδεται στο περιβάλλον με μορφή θερμότητας. Κάτω από ορισμένες συνθήκες, και εφ' όσον το επιτρέπει η δομή του μορίου, η επιπλέον

ενέργεια αποβάλλεται με μορφή δευτερεύουσας ακτινοβολίας. Η εκπομπή αυτή της ακτινοβολίας γίνεται σε χρόνο 10^{-8} s περίπου και λέγεται φθορισμός.

Χαρακτηριστικό του φαινομένου του φθορισμού είναι ότι η υπεύθυνη για το φθορισμό ηλεκτρονιακή ενεργειακή μετάπτωση δεν περιλαμβάνει μεταβολή του ηλεκτρονιακού spin. Συνεπώς, ο φθορισμός είναι βραχύβιο φαινόμενο και η παραγόμενη φωταύγεια εξαφανίζεται αμέσως ($<10^{-5}$ s). Κατά κανόνα, η εκπεμπόμενη ακτινοβολία φθορισμού περιέχει μήκη κύματος μεγαλύτερα από εκείνα της ακτινοβολίας διέγερσης.

Στην τεχνική της φθορισμομετρίας, τα μόρια του αναλύτη διεγείρονται σε καθορισμένο μήκος κύματος λόγω απορρόφησης φωτονίων και, στη συνέχεια, καταγράφεται το φάσμα εκπομπής ως συνάρτηση του μήκους κύματος. Με αυτόν τον τρόπο παρέχονται χρήσιμες πληροφορίες για ποιοτική και ποσοτική ανάλυση. Ακόμα, κάτω από ορισμένες συνθήκες, η σχέση που συνδέει την ένταση φθορισμού (F) με τη συγκέντρωση (C) της ουσίας που φθορίζει, είναι γραμμική. Αυτό επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας με βάση τη σχέση $F=kC$.

Ιδιαίτερα σημαντικό πλεονέκτημα της τεχνικής της φθορισμομετρίας είναι τα πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης, τα οποία τυπικά βρίσκονται στην περιοχή των ppb (parts per billion). Ένα ακόμα βασικό πλεονέκτημα είναι οι μεγάλες γραμμικές περιοχές συγκεντρώσεων, ενώ πολύ σημαντική είναι και η εκλεκτικότητα της μεθόδου. Τέλος, παράγοντες που επηρεάζουν το φθορισμό είναι η θερμοκρασία, η συγκέντρωση, το pH και ο διαλύτης και πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψη κατά τις μετρήσεις [198].

Πορεία εργασίας

Για τη μέτρηση του φθορισμού τα δείγματα, που βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου κατά τη μέτρηση, αραιώνονται μέχρι τελικού όγκου 1,5 mL με CHCl_3 και τοποθετούνται σε κυψελίδα χαλαζία των 5 mL. Το φωτόμετρο ρυθμίζεται να έχει άνοιγμα σχισμής εισόδου 0,25 mm και εξόδου 2,00 mm. Κάθε δείγμα διεγείρεται στα 460 nm και λαμβάνεται το φάσμα εκπομπής για μήκη κύματος 480-600 nm, με διάρκεια μέτρησης 1 s/nm. Στη συνέχεια, γίνεται ολοκλήρωση του σήματος φθορισμού και το εμβαδόν του φάσματος εκπομπής αποτελεί την τιμή η οποία αντιστοιχίζεται σε nmol NBD-PtdOH, με τη βοήθεια της καμπύλης προτύπων (0,8, 1,6, 2,4, 3,2, 4, 4,8 και 6 nmol NBD-PtdOH).

Να σημειωθεί πως, επειδή η φύση του διαλύτη επηρεάζει το σήμα του φθορισμού, το υδατικό δείγμα του υποστρώματος, που είχε παραληφθεί αμέσως μετά την υπερήχηση (ενότητα 3.8.3.2), εκχυλίζεται με όξινη Bligh-Dyer (βλ. αναλογίες από ενότητα 3.6) και ακολούθως το λιπίδιο αναδιαλύεται σε CHCl_3 , όπως τα υπόλοιπα δείγματα. Παράλληλα,

πραγματοποιείται μέτρηση καθαρού CHCl_3 (blank), το οποίο αφαιρείται από τις μετρήσεις των δειγμάτων ως σήμα υποβάθρου.

3.8.4 *In vitro* αναστολή της δραστηριότητας PLDα από αλκοόλη

Υλικά-Συσκευές

Όμοια με αυτά της ενότητας 3.8.1 με προσθήκη:

- Απόλυτη αιθανόλη, αναλυτικής καθαρότητας, Merck

Διαλύματα

Όμοια με αυτά της ενότητας 3.8.1

Πορεία εργασίας

Η ενζυμική αντίδραση παρουσία αιθανόλης γίνεται με πρωτεϊνικό παρασκεύασμα (ίζημα 100.000 g) από φυτά *G. hirsutum*, με χρήση PtdCho ως υποστρώματος, όπως ακριβώς περιγράφεται στην ενότητα 3.8.1. Η διαφορά έγκειται στην προσθήκη 2 μL απόλυτης αιθανόλης (τελική συγκέντρωση 1%) στο διάλυμα της αντίδρασης.

3.9 Προσδιορισμός δραστηριότητας PLDδ

Ο προσδιορισμός δραστηριότητας της PLDδ βασίζεται στην *in vitro* μέτρηση της υδρολυτικής δράσης ενζυμικών παρασκευασμάτων PLDδ έναντι μικκυλίων PtdCho -ή, κατά περίπτωση, PtdEth- σε ουδέτερο pH, παρουσία μM Ca^{2+} και ειδικών ενεργοποιητών (ελαϊκό οξύ, PtdInsP₂) αυτής της ισομορφής PLD. Η απομόνωση του απαραίτητου για τον προσδιορισμό PtdInsP₂ γίνεται από μίγμα φωσφοϊνοσιπιδίων, όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.9.1.

Η PLD δρα σε υδατικό σύστημα που περιέχει σε μικκυλιακή μορφή το λιπιδικό υπόστρωμα [196] και παράγει PtdOH. Μετά τη λήξη της αντίδρασης διαχωρίζονται τα λιπίδια - εναπομένει υπόστρωμα και προϊόν- με TLC, εκχυλίζεται από την πλάκα η ζώνη του PtdOH και ποσοτικοποιείται με προσδιορισμό της ομάδας με την οποία έχει επισημανθεί ($[^3\text{H}]$ ή NBD) το λιπίδιο.

3.9.1 Απομόνωση PtdInsP₂ από μίγμα φωσφοϊνοσιπιδίων

Υλικά-Συσκευές

- Μίγμα φωσφοϊνοσιπιδίων (PI) από εγκέφαλο βοδιού (P6023, 25 mg), Sigma

- Χλωροφόρμιο (CHCl_3), αναλυτικής καθαρότητας, SDS
- Μεθανόλη (CH_3OH), αναλυτικής καθαρότητας, Mallinckrodt
- Υδροξείδιο του αμμωνίου (NH_4OH), Merck
- Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ (EDTA), Merck
- Πυκνό υδροχλωρικό οξύ (π. HCl), Merck
- Φυγόκεντρος RC-5B, Sorvall

Διαλύματα

- Μίγμα $\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCl}$ 1 N 1:1
- Μίγμα $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1
- Μίγμα $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:2
- EDTA 0,1 M, pH 6,5: Η διάλυση του EDTA γίνεται σε νερό millipore και το pH ρυθμίζεται στο 6,5
- HCl 2,4 M

Πορεία εργασίας

- Διάλυση PI: Τα PI παραλαμβάνονται σε γυάλινο σωλήνα φυγοκέντρου με προσθήκη CHCl_3 . Σε ρεύμα N_2 εξατμίζεται ο διαλύτης και τα λιπίδια αναδιαλύονται σε 2 mL CHCl_3 . Κατόπιν, προστίθενται 2 mL μίγματος $\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCl}$ 1 N 1:1, ο σωλήνας ανακινείται ισχυρά και ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 800 g για 8 min. Παραλαμβάνεται η οργανική (κάτω) φάση σε βιδωτό σωλήνα και εκπλένεται η υδατική με 1 mL CHCl_3 και φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες. Η νέα οργανική φάση συλλέγεται στο βιδωτό σωλήνα και ακολουθεί εξάτμιση σε ρεύμα N_2 . Τελικά, τα PI αναδιαλύονται σε 4 mL μίγματος $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1
- Απομόνωση PtdInsP_2 : Σε πλάκα TLC επιστρωμένη με silica gel H (ενότητα 3.4) εντίθενται 800 μL (ή ~5 mg) μίγματος PI σε ζώνη μήκους ~17 cm. Σε διπλανές ζώνες εντίθενται 5 μL PI και 10 μL διαλύματος NBD-PtdOH 1 mM (το λιπίδιο αυτό έχει, στο συγκεκριμένο σύστημα διαλυτών, R_f παρόμοιο με αυτό της PtdIns). Σημειώνεται στην πλάκα σημείο σε απόσταση 15 cm από τη βάση της και τα PI διαχωρίζονται σε θάλαμο με σύστημα διαλυτών $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-NH}_4\text{OH-H}_2\text{O}$ (86:76:6:16, v/v/v/v). Σημειώνεται ότι ο θάλαμος έχει ετοιμαστεί για κορεσμό από την προηγούμενη ημέρα. Η πλάκα μένει στο θάλαμο έως ότου το δείγμα του NBD-PtdOH φτάσει στο σημείο των 15 cm από τη βάση (~2 h 15 min). Τα λιπίδια, αφού στεγνώσει η πλάκα, εμφανίζονται με έκθεση σε ατμούς I_2

και σημειώνονται οι ζώνες των διαφόρων PI. Η ζώνη της PtdInsP₂ εμφανίζεται εκτεταμένη ακριβώς πάνω από το σημείο ένθεσης των PI

- Εκχύλιση PtdInsP₂ από την πλάκα: Η ζώνη της PtdInsP₂ συλλέγεται από την πλάκα, η silica μοιράζεται σε 6 κωνικούς σωλήνες φυγοκέντρου και το λιπίδιο εκχυλίζεται κατά Schacht [199]. Συγκεκριμένα, σε κάθε σωλήνα:

- Προσθήκη 2,4 mL παγωμένου μίγματος CHCl₃/CH₃OH 1:2 και ανακίνηση σε vortex
- Παραμονή σε παγόλουτρο (0°C) για 30 min και ανακίνηση κατά διαστήματα
- Επαναφορά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 0,8 mL EDTA 0,1 M, pH 6,5
- Προσθήκη 0,8 mL HCl 2,4 M
- Προσθήκη 0,8 mL CHCl₃
- 1.000 g για 10 min → παραλαβή οργανικής φάσης (A)
- Προσθήκη 0,8 mL CHCl₃ στην υδατική φάση → 1.000 g για 10 min → παραλαβή οργανικής φάσης (μαζί με A) (x2)

Το σύνολο της χλωροφορμικής φάσης εξατμίζεται σε ρεύμα N₂, το λιπίδιο αναδιαλύεται σε μίγμα CHCl₃/CH₃OH 2:1 και, μετά από προσδιορισμό φωσφόρου (ενότητα 3.7), ρυθμίζεται η συγκέντρωσή του στα 2 mM

3.9.2 Παρασκευή υποστρώματος

Υλικά-Συσκευές

- Φωσφατιδυλοχολίνη (DPPC, P0763), Sigma
- Ελαϊκό οξύ (O1008), Sigma
- Ελαϊκό νάτριο (O7501), Sigma
- HEPES, MP Biomedicals
- Χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂), Mallinckrodt
- Χλωριούχο κάλιο (KCl), Mallinckrodt
- Χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂·2H₂O), Merck
- Νερό millipore από συσκευή Milli-Q Academic, Millipore
- Πεχάμετρο 410A, Orion

- Λουτρό υπερήχων, S15 H-Elmasonic, Elma
- Μικροσκόπιο ανεστραμμένης φάσης AxioPlan, Carl Zeiss, West Germany

Διαλύματα

- Ελαϊκό οξύ 0,08 M: Το ελαϊκό οξύ διαλύεται σε CHCl_3
- Ελαϊκό νάτριο 24 mM: Το ελαϊκό νάτριο διαλύεται σε νερό millipore
- PtdCho 20 mM: Η PtdCho διαλύεται σε μίγμα $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1
- PtdInsP₂ 2 mM: Η PtdInsP₂ διαλύεται σε μίγμα $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1
- Ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 100 mM, MgCl_2 2 mM, KCl 80 mM, CaCl_2 100 μM (pH 7,0)

Πορεία εργασίας

Σε γυάλινο σωλήνα προστίθεται συγκεκριμένη ποσότητα λιπιδίων (PtdCho, ελαϊκό οξύ, PtdInsP₂). Τα λιπίδια εξατμίζονται σε ρεύμα N_2 και, κατόπιν, στο σωλήνα προστίθεται είτε νερό millipore είτε ρυθμιστικό διάλυμα, που προσομοιάζει στις συνθήκες της ενζυμικής αντίδρασης της ειδικής για την ισομορφή PLDδ. Στη συνέχεια, ο σωλήνας τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για 10 min, ώστε να γίνει ομοιόμορφη διασπορά των λιπιδίων και, τέλος, γίνεται παρατήρηση των δομών που σχηματίζουν τα εν δυνάμει υποστρώματα της PLD σε μικροσκόπιο ανεστραμμένης φάσης. Κάποιες από τις δομές αυτές δίνονται στα Αποτελέσματα (σχήμα 24). Να σημειωθεί ότι το ελαϊκό νάτριο προστίθεται στο μίγμα μετά την υπερήχηση.

3.9.3 Ενζυμική αντίδραση PLDδ με [³H]PtdCho ως υπόστρωμα

Υλικά-Συσκευές

- Φωσφατιδυλοχολίνη (DPPC, P0763), Sigma
- [2-παλμιτυλο-9,10-³H]φωσφατιδυλοχολίνη ([³H]PtdCho, 60Ci mmol⁻¹, 1mCi mL⁻¹), ARC
- Χλωροφόρμιο (CHCl_3), αναλυτικής καθαρότητας, SDS
- Μεθανόλη (CH_3OH), αναλυτικής καθαρότητας, Mallinckrodt
- Υδροξείδιο του αμμωνίου (NH_4OH), Merck
- HEPES, MP Biomedicals
- Χλωριούχο ασβέστιο ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Merck
- Χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl_2), Mallinckrodt

- Χλωριούχο κάλιο (KCl), Mallinckrodt
- 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PtdInsP₂), απομονώνεται από μίγμα PI (ενότητα 3.9.1)
- Ελαϊκό νάτριο (O7501), Sigma
- Νερό millipore από συσκευή Milli-Q Academic, Millipore
- Σωλήνες πολυστυρενίου
- Λουτρό υπερήχων, S15 H-Elmasonic, Elma
- Υδρόλουτρο με ρεύμα νερού, Clifton
- Φυγόκεντρος RC-5B, Sorvall

Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα 1 (HEPES 100 mM, pH 7,0): Ποσότητα HEPES διαλύεται σε νερό millipore και ρυθμίζεται το pH στο 7,0 με προσθήκη NaOH 8 N
- Διάλυμα stock CaCl₂ 20 mM: Η διάλυση του CaCl₂·2H₂O γίνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 100 mM, pH 7,0
- Ρυθμιστικό διάλυμα 2 (MgCl₂ 4 mM, KCl 160 mM, CaCl₂ 200 μM, pH 7,0): Η διάλυση των MgCl₂ και KCl γίνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 100 mM, pH 7,0. Ως πηγή Ca²⁺ χρησιμοποιείται το διάλυμα stock CaCl₂ 20 mM
- Ελαϊκό νάτριο 24 mM: Το ελαϊκό νάτριο διαλύεται σε νερό millipore
- Μίγμα CHCl₃/CH₃OH 1:2
- Μίγμα CHCl₃/CH₃OH 2:1
- Προετοιμασία υποστρώματος: Κατάλληλη ποσότητα PtdCho (0,03 μmol PtdCho/δείγμα αντίδρασης) και PtdInsP₂ (6 nmol/δείγμα αντίδρασης) προστίθενται σε γυάλινο σωλήνα και εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα N₂. Κατόπιν, προστίθεται ποσότητα ραδιενεργής [³H]PtdCho (22 nCi, ειδική ραδιενέργεια 1750 cpm nmol⁻¹), η οποία ομοίως εξατμίζεται σε ρεύμα N₂. Τα λιπίδια αναδιαλύονται σε μικρή ποσότητα CHCl₃ και ακολουθεί εξάτμιση μέχρι ξηρού και προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος 2 (15 μL/δείγμα αντίδρασης). Η διασπορά στο διάλυμα γίνεται με εφαρμογή υπερήχων μέχρι πλήρους παραλαβής του λιπιδίου (~10 min), σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, γίνεται προσθήκη ελαϊκού νατρίου (0,12 μmol/δείγμα αντίδρασης). Για έλεγχο της καλής διασποράς του υποστρώματος

λαμβάνονται 3 μL απ' αυτό σε ειδικό φιαλίδιο μέτρησης ραδιενέργειας και, μετά από προσθήκη του κατάλληλου σπινθηριστή, μετράται η ραδιενέργεια (ενότητα 3.8.2.2)

- KCl 2 M: Η διάλυση του KCl γίνεται σε νερό millipore

Πορεία εργασίας

Στο σωλήνα της αντίδρασης προστίθενται 80 μL ρυθμιστικού διαλύματος 2, 20 μL υποστρώματος, 10-15 μg πρωτεΐνης (ήτοι 10-20 μL ενζυμικού παρασκευάσματος) και ρυθμιστικό διάλυμα 1 προς συμπλήρωση του όγκου μέχρι τα 200 μL . Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη του ενζυμικού παρασκευάσματος και λαμβάνει χώρα στους 30°C για 30 min. Διακόπτεται με προσθήκη 1 mL $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:2 και έντονη ανακίνηση [50].

Μετά τη διακοπή της αντίδρασης με $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:2, προστίθενται 100 μL KCl 2 M και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση. Στο διφασικό σύστημα που προκύπτει, οι φάσεις διαχωρίζονται με φυγοκέντρηση στα 500 g για 5 min και παραλαμβάνεται η χλωροφορμική (κάτω) φάση με το σύνολο των λιπιδίων.

Κατόπιν, διαχωρίζονται τα λιπίδια της χλωροφορμικής φάσης με TLC, ακολουθεί απόξεση ζωνών καθορισμένου πλάτους (0,5-2 cm) καθ' όλο το μήκος ανάπτυξης της πλάκας και η μεταφορά τους σε ειδικό φιαλίδιο μέτρησης ραδιενέργειας. Στην περίπτωση αυτή, δεν παρεμβάλλεται εκχύλιση του λιπιδίου από την πλάκα, αλλά μετράται η ραδιενέργεια σε μετρητή σπινθηρισμού υγρών (ενότητα 3.8.2.2). Η ειδική δραστηριότητα, τέλος, προκύπτει από τις κανονικοποιημένες κρούσεις της ζώνης PtdOH και την ειδική ραδιενέργεια του υποστρώματος, όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.8.2.1.

3.9.4 Ενζυμική αντίδραση PLD δ με χρήση φθορίζοντος υποστρώματος

Υλικά-Συσκευές

Όμοια με αυτά της ενότητας 3.9.3 με μόνη προσθήκη:

- Φθορίζοντα φωσφολιπίδια: NBD-PtdCho (810133C), NBD-PtdEth (810156C), Avanti (αντί για: 1) φωσφατιδυλοχολίνη (DPPC, P0763, Sigma) και 2) [2-παλμιτυλο-9,10- ^3H]φωσφατιδυλοχολίνη ($[^3\text{H}]\text{PtdCho}$, 60Ci mmol $^{-1}$, 1mCi mL $^{-1}$), ARC)

Διαλύματα

Όμοια με αυτά της ενότητας 3.9.3, με την εξής διαφορά:

- Προετοιμασία υποστρώματος: Το υπόστρωμα προετοιμάζεται όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.9.3, αλλά αντί για προσθήκη PtdCho και $[^3\text{H}]\text{PtdCho}$, προστίθεται NBD-PtdCho

ή NBD-PtdEth (0,03 μmol NBD-PtdCho ή NBD-PtdEth/δείγμα αντίδρασης). Στην περίπτωση της NBD-PtdEth, η υπερήχηση γίνεται μόνο για 5 min στους 55°C και με προσθήκη 5 μL διαλύματος NaOH 0,1 N. Για έλεγχο της καλής διασποράς του υποστρώματος λαμβάνονται 5 μL σε βιδωτό φιαλίδιο με σκούρα τοιχώματα και ακολουθεί φθορισμομετρικός προσδιορισμός (ενότητα 3.8.3.3)

Πορεία εργασίας

Η ενζυμική αντίδραση γίνεται όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.9.3 με τη διαφορά ότι η ποσοτικοποίηση του (NBD-)PtdOH γίνεται με φθορισμομετρία (ενότητα 3.8.3.3), αντί για μέτρηση ραδιενέργειας. Να σημειωθεί πως καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, επιδιώκεται να υπάρχει όσο το δυνατόν λιγότερο φως στο χώρο εργασίας, καθώς τα φθορίζοντα λιπίδια είναι ευαίσθητα σε αυτό.

3.10 *In silico* αναζήτηση γονιδίων του οργανισμού *G. hirsutum*

Πορεία εργασίας

Η αναζήτηση γονιδίων του οργανισμού *G. hirsutum*, τα οποία θεωρήθηκαν κρίσιμα στις αποκρίσεις του φυτού στον τραυματισμό (λιποξυγενάση, οξειδάση του NADPH, συνθάση της κυτταρίνης), έγινε βιοπληροφορικά. Συγκεκριμένα, στη βάση δεδομένων του NCBI, nucleotide [200] έγινε αναζήτηση με βάση τον κωδικό ταξονομίας του *G. hirsutum* (taxon ID: 3635) γράφοντας: “txid3635[organism] (όνομα γονιδίου, π.χ. lipoxygenase)” → search. Όταν δεν υπήρχε αποτέλεσμα στο NCBI, nucleotide, όπως συνέβη κατά την αναζήτηση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών για την οξειδάση του NADPH, η αναζήτηση γινόταν ανάλογα στο NCBI, EST [201]. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την αναζήτηση στο NCBI, συγκρίθηκαν με αυτά από άλλες βάσεις δεδομένων [202, 203] πιο ειδικές για φυτά. Ωστόσο, φάνηκε εκ του αποτελέσματος ότι το NCBI ήταν πλήρως ενημερωμένο και πιο φιλικό στο χρήστη. Γι' αυτό και η μελέτη συνεχίστηκε αποκλειστικά με χρήση αυτής της βάσης δεδομένων.

Στην περίπτωση που η αναζήτηση οδηγούσε σε πληθώρα αλληλουχιών, όπως συνέβη με τη συνθάση της κυτταρίνης, επιλέχθηκε αλληλουχία από άλλο φυτό (*A. thaliana*), η οποία σύμφωνα με αναφορές συμμετέχει στην επούλωση τραυμάτων [75, 153]. Με οδηγό την αλληλουχία αυτή πλέον έγινε αναζήτηση ομόλογων αλληλουχιών στο *G. hirsutum* με blastn [204] και μετά από ευθυγράμμιση των -νουκλεοτιδικών και πρωτεϊνικών-αλληλουχιών [205] εντοπίστηκαν οι διαφορές και επελέγη η πιο κοντινή στην επιλεγμένη από την *A. thaliana*.

Να σημειωθεί ότι, σήμερα, έχει ολοκληρωθεί η αλληλούχιση του γονιδιώματος του *G. hirsutum* και είναι διαθέσιμο στην επίσημη ιστοσελίδα για το βαμβάκι [206].

3.11 Απομόνωση ολικού RNA από φύλλα *G. hirsutum*

3.11.1 Απομόνωση RNA με χρήση φαινόλης

Υλικά-Συσκευές

- Φαινόλη, pH 4,5-5 (P4682), Sigma
- Τρις-υδροξυλαμινομεθάνιο (Tris-HCl), MP Biomedicals
- Δωδεκυλο-σουλφονικό νάτριο (SDS), MP Biomedicals
- Χλωροφόρμιο (CHCl_3), αναλυτικής καθαρότητας, SDS
- Ισοαμυλική αλκοόλη, αναλυτικής καθαρότητας, Sigma
- Οξικό νάτριο (CH_3COONa), Mallinckrodt
- Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ (EDTA), Merck
- DNάση (Recombinant DNase I, RNase free, 5 units/ μL), TaKaRa
- Ρυθμιστικό διάλυμα DNάσης (Tris-HCl 400 mM pH 7,5, MgCl_2 80 mM, DTT 50 mM), TaKaRa
- Νερό απαλλαγμένο από νουκλεάσες (DEPC), Demo S.A.
- Απόλυτη αιθανόλη, αναλυτικής καθαρότητας, Merck
- Υγρό N_2
- Πορσελάνινο γουδί, σπάτουλα, μεταλλική λαβίδα, ψαλίδι: αποστειρωμένα στους 180°C για 1 h
- Σωλήνες errendorf (απαλλαγμένοι από RNάσες, Kisker): αποστειρωμένοι στους 121°C για 20 min
- Ρύγχη αυτόματων πιπετών με φίλτρο, Kisker
- Φυγόκεντρος MIKRO 200, Hettich
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος Labofuge 400R, Heraeus
- Υδρόλουτρο 14 L, Clifton

Διαλύματα

- Διάλυμα ομογενοποίησης ιστού (HOMO): Tris-HCl 100mM, pH 9,5, SDS 0,5% (w/v) (αποστειρωμένο στους 121°C για 20 min)
- Διάλυμα Sevag: CHCl₃/ισοαμυλική αλκοόλη 24:1 (v/v)
- Διάλυμα CH₃COONa 3M, pH 5,2 (αποστειρωμένο στους 121°C για 20 min)
- Διάλυμα EDTA 100 mM, pH 5,2 (αποστείρωση με πέρασμα από φίλτρο Millex-GV 0,22 μm)
- Αιθανόλη 75%
- Αιθανόλη 70%

Αρχή της μεθόδου

Κατά την απομόνωση RNA με φαινόλη και διάλυμα Sevag σε όξινο pH, δημιουργείται διφασικό σύστημα με κατανομή του RNA στην υδατική φάση. Η φαινόλη δρα αποδιατακτικά στις πρωτεΐνες και αναστέλλει τη δράση των RNασών. Το CHCl₃ αυξάνει την υδροφοβικότητα της οργανικής φάσης και αποτρέπει τη συσσώρευση πολυ(A)+ RNA στη μεσόφαση, υπό τη μορφή αδιάλυτων συμπλόκων με πρωτεΐνες. Επιπλέον, έχει αποδιατακτική δράση έναντι των πρωτεϊνών, όπως και η φαινόλη, ενώ ως υδρόφοβος διαλύτης απομακρύνει και τα λιπίδια από την υδατική φάση. Τέλος, η προσθήκη του CHCl₃ στο διφασικό σύστημα αυξάνει την υδροφοβικότητα και την πυκνότητα της οργανικής φάσης, βελτιώνοντας έτσι το διαχωρισμό της από την υδατική.

Ωστόσο, η φαινόλη έχει μικρή διαλυτότητα στο νερό και μετά το διαχωρισμό παραμένουν ίχνη της στην υδατική φάση (7%). Αυτή η μικρή παρουσία φαινόλης μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή της δράσης ενζύμων (DNάση, αντίστροφη μεταγραφάση, DNA πολυμεράση) που προστίθενται σε επόμενα στάδια επεξεργασίας του RNA. Για το λόγο αυτό, γίνεται στο τέλος της απομόνωσης έκπλυση με CHCl₃, ώστε να καθαριστεί η υδατική φάση από ανεπιθύμητα υπολείμματα φαινόλης.

Όσον αφορά την ισοαμυλική αλκοόλη, είναι παράγοντας που αποτρέπει τον αφρισμό, ενώ αναστέλλει και τις RNάσες. Η ρύθμιση του pH είναι, επίσης, κρίσιμη για την απομόνωση του RNA. Είναι γνωστό πως σε pH≥7 το DNA βρίσκεται διαλυτό στο νερό, ενώ σε pH<6 η διαλυτότητα του DNA στο νερό μειώνεται και καταβυθίζεται στην οργανική φάση. Με αυτό τον τρόπο καθαρίζει η υδατική φάση από DNA και λαμβάνεται καθαρό RNA.

Πορεία εργασίας

Από φυτά βαμβακιού (*G. hirsutum*), που έχουν αναπτυχθεί για 6 εβδομάδες όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.1, λαμβάνεται δείγμα από φύλλα. Κάθε δείγμα (φύλλο) κατά τη συλλογή του τυλίγεται σε αλουμινόχαρτο και βυθίζεται αμέσως σε δοχείο με υγρό N₂. Στη συνέχεια, μεταφέρεται σε γουδί πορσελάνης, που επίσης περιέχει υγρό N₂, και κονιοροποιείται. Ποσότητα σκόνης (~100 mg) μεταφέρεται με τη βοήθεια σπάτουλας σε σωλήνα errendorf και, αμέσως, προστίθενται 400 μL HOMO. Το δείγμα ανακινείται ισχυρά και τοποθετείται σε πάγο. Η απομόνωση συνεχίζεται στον απαγωγό (στείρο θάλαμο) ως εξής:

- Προσθήκη 400 μL φαινόλης → ισχυρή ανακίνηση → 11.000 g για 5 min → παραλαβή υδατικής φάσης (x2)
- Προσθήκη, στην υδατική φάση, ίσου όγκου μίγματος φαινόλης-Sevag 1:1 → ισχυρή ανακίνηση → 11.000 g για 3 min → παραλαβή υδατικής φάσης (x3)
- Προσθήκη, στην υδατική φάση, ίσου όγκου διαλύματος Sevag → ισχυρή ανακίνηση → 11.000 g για 2 min → παραλαβή υδατικής φάσης (x2)
- Προσθήκη, στην υδατική φάση (όγκου V), 2V ψυχρής απόλυτης αιθανόλης και 0,1V διαλύματος CH₃COONa 3 M (pH 5,2) → ελαφρά ανακίνηση → -20°C για 1 h

Στη συνέχεια, ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 15.000 g για 15 min (4°C). Το υπερκείμενο παραλαμβάνεται με πιπέτα και απορρίπτεται, ενώ στο ίζημα προστίθενται 400 μL ψυχρής αιθανόλης 75%. Πραγματοποιείται δεύτερη φυγοκέντρηση στα 15.000 g για 10 min (4°C). Το υπερκείμενο απορρίπτεται και πάλι με τον ίδιο τρόπο. Μετά από σύντομη φυγοκέντρηση (spin down) απορρίπτεται και η τελευταία σταγόνα, και τα δείγματα αφήνονται ανοιχτά στον απαγωγό μέχρι να στεγνώσουν (~10 min). Τέλος, το ίζημα του RNA αναδιαλύεται σε 80 μL νερού DEPC. Από αυτά λαμβάνονται 5 μL για ηλεκτροφόρηση και το υπόλοιπο δείγμα RNA μοιράζεται σε 2 σωλήνες errendorf (40 μL και 35 μL) και φυλάσσεται στους -80°C για μελλοντική χρήση [207].

Για την πέψη με DNάση, σε σωλήνα errendorf, που περιέχει 30-40 μL ολικού RNA, προστίθενται 5 μL ρυθμιστικού διαλύματος DNάσης, 0,6 μL DNάσης και νερό DEPC, ώστε ο τελικός όγκος κάθε δείγματος να είναι 50 μL. Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση και επώαση στους 37°C για 20 min, όπως υπαγορεύει το πρωτόκολλο της εταιρείας.

Για απομάκρυνση της DNάσης, δοκιμάστηκε οι εξής παραλλαγές :

α) κατακρήμνιση του RNA μετά από θερμική κατεργασία, παρουσία αναστολέα DNάσης:

- Προσθήκη 12,5 μL EDTA 100 mM (αναστολέας) \rightarrow 80°C για 2 min
- Προσθήκη 41,5 μL νερού DEPC, 250 μL απόλυτης αιθανόλης και 10 μL CH_3COONa 3 M, pH 5,2 \rightarrow ελαφρά ανακίνηση \rightarrow -20°C για 1 h

β) εκχύλιση του RNA με φαινόλη/Sevag παρουσία αναστολέα DNάσης:

- Προσθήκη 15 μL EDTA 100 mM (αναστολέας), 35 μL νερού DEPC, 50 μL φαινόλης και 50 μL Sevag \rightarrow 12.000 g για 5 min \rightarrow παραλαβή υδατικής φάσης
- Προσθήκη, στην υδατική φάση, 100 μL Sevag \rightarrow 12.000 g για 5 min \rightarrow παραλαβή υδατικής φάσης
- Προσθήκη, στην υδατική φάση, 250 μL απόλυτης αιθανόλης και 10 μL CH_3COONa 3 M pH 5,2 \rightarrow ελαφρά ανακίνηση \rightarrow -20°C για 1 h

Σε κάθε περίπτωση, ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 12.000 g για 10 min (4°C). Το υπερκείμενο παραλαμβάνεται με αυτόματη πιπέτα και απορρίπτεται, ενώ στο ίζημα προστίθεται 1 mL ψυχρής αιθανόλης 70%. Πραγματοποιείται δεύτερη φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 5 min (4°C). Το υπερκείμενο απορρίπτεται και πάλι με τον ίδιο τρόπο. Μετά από σύντομη φυγοκέντρηση απορρίπτεται και η τελευταία σταγόνα, και τα δείγματα αφήνονται ανοιχτά στον απαγωγό μέχρι να στεγνώσουν (~10 min). Τέλος, το ίζημα του RNA αναδιαλύεται στον αρχικό όγκο (30-40 μL) με νερό DEPC.

Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία γίνεται ηλεκτροφόρηση, όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.13, ώστε να διαπιστωθεί αν έχει πράγματι απομακρυνθεί όλο το γενωμικό DNA και αν η ποιότητα του RNA είναι ικανοποιητική για να εκτελεστεί το επόμενο στάδιο της πειραματικής πορείας (RT-PCR) (ενότητα 4.5.1, σχήμα 30).

3.11.2 Απομόνωση RNA με προπαρασκευασμένα αντιδραστήρια (kit)

Υλικά-Συσκευές

- 1-Βουτανόλη, αναλυτικής καθαρότητας, Carlo Erba
- Προπαρασκευασμένα αντιδραστήρια για την απομόνωση RNA, NucleoSpin RNA Plus kit (740984.50), Macherey-Nagel. Περιέχει: διάλυμα λύσης ιστών και κυττάρων με βάση τη θειοκυανική γουανιδίνη, διάλυμα σύνδεσης RNA, διάλυμα έκπλυσης 1 με βάση τη θειοκυανική γουανιδίνη, αιθανολικό διάλυμα έκπλυσης 2, νερό απαλλαγμένο από RNάσες, στήλες απομάκρυνσης γενωμικού DNA, στήλες πρόσδεσης RNA, συλλέκτες εκλουσμάτων (2,0 mL), σωλήνες erpendorf (1,5 mL)
- Υγρό N_2

- Πορσελάνινο γουδί, σπάτουλα, μεταλλική λαβίδα, ψαλίδι: αποστειρωμένα στους 180°C για 1 h
- Σωλήνες errendorf (απαλλαγμένοι από RNάσες, Kisker): αποστειρωμένοι στους 121°C για 20 min
- Ρύγχη αυτόματων πιπετών με φίλτρο, Kisker
- Φυγόκεντρος MIKRO 200, Hettich

Πορεία εργασίας

Σε αρτίβλαστα βαμβακιού εφαρμόζεται μηχανική καταπόνηση, όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.1. Από τις δύο ομάδες φύλλων που συλλέγονται (τραυματισμένα, ατραυμάτιστα) απομονώνεται το RNA.

Κάθε δείγμα (φύλλο) κατά τη συλλογή του τυλίγεται σε αλουμινόχαρτο και βυθίζεται αμέσως σε δοχείο με υγρό N₂. Στη συνέχεια, μεταφέρεται σε γουδί πορσελάνης, που επίσης περιέχει υγρό N₂, και κονιορτοποιείται. Ποσότητα σκόνης (~100 mg) μεταφέρεται ταχέως με τη βοήθεια σπάτουλας σε σωλήνα errendorf και, αμέσως, βυθίζεται σε υγρό N₂. Είναι σημαντικό, κατά τη θραύση του ιστού και μέχρι τη συλλογή της σκόνης, να γίνονται γρήγορες κινήσεις, ώστε να μη στεγνώνει τελείως το υγρό N₂ στο γουδί, γιατί με την άνοδο της θερμοκρασίας υπάρχει κίνδυνος αποδόμησης του RNA από RNάσες. Γενικότερα, τα δείγματα δεν είναι ασφαλές να βγουν από το υγρό N₂ πριν προστεθεί σε αυτά το διάλυμα λύσης, το οποίο περιέχει χαστροπικό αντιδραστήριο και αναστέλλει τις RNάσες. Όταν ολοκληρωθεί η θραύση όλων των φύλλων και η συλλογή δειγμάτων σε σωλήνες errendorf, τα δείγματα μεταφέρονται σε απαγωγό (στείρο θάλαμο), όπου γίνεται η απομόνωση του RNA, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας.

Αναλυτικότερα, στο σωλήνα errendorf με τη σκόνη του ιστού προστίθεται διάλυμα λύσης και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα για 2 min. Το δείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου στον απαγωγό, μέχρι να προστεθεί διάλυμα λύσης σε άλλα 5 το πολύ δείγματα. Επαναλαμβάνεται ισχυρή ανακίνηση των δειγμάτων για 1 min και σύντομη φυγοκέντρηση, ώστε να καταβυθιστούν σκόνη ιστού και άθραυστα κύτταρα. Λαμβάνεται το υπερκείμενο και φορτώνεται στη στήλη απομάκρυνσης γενωμικού DNA. Μετά από φυγοκέντρηση λαμβάνεται το απαλλαγμένο από DNA διήθημα, στο οποίο προστίθεται διάλυμα σύνδεσης RNA. Ακολουθεί πρόσδεση του RNA στην αντίστοιχη στήλη και διαδοχικές εκπλύσεις της στήλης με τα διαλύματα έκπλυσης 1 και 2. Το RNA τελικά εκλούεται με προσθήκη 20 μ L νερού απαλλαγμένου από RNάσες. Για αύξηση της

απόδοσης το τελευταίο βήμα επαναλαμβάνεται και τα 40 μL , πλέον, RNA φυλάσσονται στους -80°C για μελλοντική χρήση (ποιοτικό έλεγχο με ηλεκτροφόρηση, ποσοτικοποίηση, σύνθεση cDNA). Σημειώνεται πως, μετά την απομόνωση RNA με το συγκεκριμένο kit, δεν απαιτείται πέψη με DNάση. Αυτό επιβεβαιώθηκε με αντίδραση ποσοτικής PCR, όπου δείγμα RNA δεν έδωσε προϊόν για το γονίδιο αναφοράς.

Η απομόνωση RNA με προπαρασκευασμένα αντιδραστήρια έγινε και μετά από τραυματισμό με ταυτόχρονη επίδραση 1-βουτανόλης στα τραυματισμένα φύλλα. Πιο συγκεκριμένα, μετά από επίδραση 1-βουτανόλης για 10 min, το έλασμα τραυματίζεται κατά τα γνωστά (ενότητα 3.1) και είτε παραμένει υπό την επίδραση βουτανόλης και μετά τον τραυματισμό είτε καθαρίζεται από τη βουτανόλη προτού τραυματιστεί. Μετά από 15 min τραυματισμού αποκόπτεται το φύλλο, σε κάθε περίπτωση, και απομονώνεται το RNA. Να σημειωθεί ότι μόνο στο τραυματισμένο φύλλο τοποθετείται χαρτί με βουτανόλη, ενώ απομονώνεται RNA και από το γειτονικό φύλλο (συστημικά).

3.12 Ποσοτικός προσδιορισμός και έλεγχος καθαρότητας RNA

3.12.1 Ποσοτικοποίηση RNA με χρήση φωτομέτρου UV

Υλικά-Συσκευές

- Νερό millipore, αποστειρωμένο
- Ρύγχη αυτόματων πιπετών με φίλτρο, Kisker
- Ειδικές κυψελίδες UV (1 mL), neoLab
- Φωτόμετρο, Ηελιος β, Unicam

Πορεία εργασίας

Η ποσοτικοποίηση του RNA είναι απαραίτητη, ώστε να υπολογιστεί η ποσότητα του RNA που θα χρησιμοποιηθεί στο επόμενο στάδιο, δηλαδή στο πρωτόκολλο της αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR). Επιπλέον, με τη συγκεκριμένη μέθοδο προσδιορίζεται και ο βαθμός καθαρότητας του RNA.

Λαμβάνονται 10 μL από δείγμα RNA απαλλαγμένο από DNA και τοποθετούνται στην ειδική κυψελίδα. Η κυψελίδα συμπληρώνεται με αποστειρωμένο νερό ως το 1 mL. Ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκη κύματος: 260, 280 και 320 nm.

Η τιμή απορρόφησης στα 280 nm είναι ανάλογη της περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνη, ενώ η μέτρηση στα 320 nm χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της

καθαρότητας του περιεχομένου της κυψελίδας. Η απορρόφηση στα 260 nm, τέλος, προσδιορίζει την ποσότητα RNA που υπάρχει στο δείγμα, αφού: $1 \text{ O.D.}_{260} = 40 \text{ ng RNA}/\mu\text{L}$.

Η καθαρότητα δίνεται από την τιμή Q, όπου: $Q = (A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$

Η επιθυμητή τιμή του Q είναι μεταξύ 1,8 και 2,0.

3.12.2 Ποσοτικοποίηση RNA με χρήση συσκευής nanodrop

Υλικά-Συσκευές

- Φασματοφωτόμετρο NanoDrop-1000, Thermo Scientific
- Λογισμικό NanoDrop-1000 v3.8, Thermo Scientific

Πορεία εργασίας

Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας RNA με το nanodrop απαιτείται μόλις 1 μL δείγματος, το οποίο τοποθετείται με αυτόματη πιπέτα στο άκρο ενός ινώδους οπτικού καλωδίου (ινώδες λήψης). Ένα δεύτερο ινώδες οπτικό καλώδιο ερχόμενο σε επαφή με το υγρό δείγμα δημιουργεί μία γέφυρα μεταξύ των άκρων των δύο οπτικών καλωδίων. Το κενό ρυθμίζεται αυτόματα στο 1 mm. Μία λάμπα παλμικής λάμψης ξένου εκπέμπει φως, το οποίο διέρχεται μέσα από το δείγμα και αναλύεται μέσω μίας γραμμικής συστοιχίας CCD. Το μηχάνημα είναι συνδεδεμένο με υπολογιστή, που έχει το λειτουργικό πρόγραμμα ND-1000. Μετά τη μέτρηση, στην οθόνη παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης, όπως η συγκέντρωση RNA και η καθαρότητα. Πριν τη μέτρηση του δείγματος το όργανο μηδενίζεται με 1 μL αποστειρωμένου νερού [208].

3.13 Ηλεκτροφόρηση RNA

Υλικά-Συσκευές

- Τρις-οξικό-EDTA (TAE) 50x, Merck
- Αγαρόζη, BioRad
- Βρωμιούχο αιθίδιο (5 mg/mL), Sigma
- Διάλυμα φόρτωσης 6x (loading dye solution), Fermentas
- Δείκτης μεγεθών DNA 100-3.000 bp (100 bp DNA ladder, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Nippon Genetics
- Νερό απαλλαγμένο από νουκλεάσες (DEPC), Demo S.A.

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης Wide mini-sub cell, BioRad
- Ειδική κτένα για το σχηματισμό θέσεων ένθεσης των δειγμάτων
- Συσκευή παροχής ηλεκτρικού ρεύματος Power Pac 300, BioRad
- Τράπεζα UV, Vilber Lourmat 365/312 nm

Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης: TAE 1x

Αρχή της μεθόδου

Με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός μεγάλων μακρομορίων, όπως τα νουκλεϊνικά οξέα. Τα μόρια του RNA σε ένα τέτοιο σύστημα, όντας αρνητικά φορτισμένα λόγω των φωσφορικών ομάδων, κινούνται από την κάθοδο (-) προς την άνοδο (+) και διαχωρίζονται σύμφωνα με το μέγεθός τους, καθώς αναγκάζονται να περάσουν μέσω των πόρων της αγαρόζης, η οποία δρα ως μοριακό φίλτρο. Έτσι, μικρότερα τμήματα RNA κινούνται ταχύτερα και διανύουν μεγαλύτερη απόσταση.

Το RNA, επίσης, έχει την ικανότητα να δέχεται παρεμβολή από ορισμένες αρωματικές χρωστικές ουσίες, ανάμεσα στις στιβάδες των αζωτούχων βάσεων. Μια τέτοια χρωστική είναι το βρωμιούχο αιθίδιο, που παρεμβάλλεται με υψηλή σταθερά δέσμευσης. Το RNA «βάφεται» κατά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό με αυτήν και οι ζώνες των τμημάτων RNA ανιχνεύονται στο τέλος του διαχωρισμού με έκθεση σε ακτινοβολία UV. Επιπλέον, στα δείγματα RNA προστίθεται και διάλυμα φόρτωσης με γλυκερόλη, η οποία εμποδίζει τη διάχυση των δειγμάτων στο διάλυμα της ηλεκτροφόρησης. Τέλος, παράλληλα με τα δείγματα χρησιμοποιείται δείκτης μεγεθών, ο οποίος, εκτός από τμήματα DNA γνωστού μεγέθους, περιέχει και χρωστική που επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης ανά πάσα στιγμή.

Πορεία εργασίας

- Παρασκευή της πηκτής: Σε TAE 1x προστίθεται αγαρόζη (τελική συγκέντρωση 1,5%, w/v). Το μίγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι διαύγασης και αφήνεται να κρυώσει (~7 min). Έπειτα, προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (τελική συγκέντρωση 5%, v/v). Το διάλυμα αποχύνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, ενώ τοποθετείται και η ειδική κτένα για το σχηματισμό των θέσεων ένθεσης των δειγμάτων. Η πηκτική είναι έτοιμη σε ~15 min
- Προετοιμασία των δειγμάτων: Σε σωλήνες erpendorf τοποθετούνται 5 μL από κάθε δείγμα που προορίζεται για ηλεκτροφόρηση. Έπειτα, σε κάθε δείγμα προστίθενται 2 μL

από το διάλυμα φόρτωσης και 3 μL νερό DEPC. Ετοιμάζεται ένα ακόμα δείγμα που περιέχει 8 μL νερό DEPC και 2 μL δείκτη μεγεθών DNA

- Τοποθέτηση των δειγμάτων: Διάλυμα TAE 1x τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και, κατόπιν, στις θέσεις της πηκτής γίνεται τοποθέτηση με αυτόματη πιπέτα των 10 μL από τα δείγματα και από το διάλυμα δεικτών μοριακής μάζας
- Ηλεκτροφόρηση: Συνδέεται η συσκευή της ηλεκτροφόρησης με την πηγή του ηλεκτρικού ρεύματος και ρυθμίζεται η τάση στα 120 V. Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί 20 min
- Εμφάνιση των νουκλεϊνικών οξέων στην πηκτή: Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, αποσυνδέονται τα ηλεκτρόδια από τους πόλους της πηκτής ρεύματος και εμφανίζονται τα νουκλεϊνικά οξέα (γενωμικό DNA, RNA, σπασμένο RNA) με έκθεση σε ακτινοβολία UV

3.14 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR)

Υλικά-Συσκευές

- Διάλυμα εκκινήτων (τυχαία εξαμερή) (SO142, 100 μM), Thermo Scientific
- Διάλυμα αζωτούχων βάσεων του DNA (dNTP, 10 mM το καθένα), HT Biotechnology LTD
- Νερό απαλλαγμένο από νουκλεάσες (DEPC), Demo S.A.
- Ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης (Tris-HCl 250 mM pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl_2 15 mM), TaKaRa
- Αντίστροφη μεταγραφάση (PrimeScript Reverse Transcriptase, 200 units/ μL), TaKaRa
- Ρύγχη αυτόματων πιπετών με φίλτρο, Kisker
- Αποστειρωμένοι, θερμοανθεκτικοί σωλήνες PCR, Kisker
- Συσκευή PCR MultiGene II, Labnet

Πορεία εργασίας

Για κάθε αντίδραση, σε σωλήνα PCR προστίθενται: 1 μg RNA, 1 μL διαλύματος τυχαίων εξαμερών και νερό DEPC, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 15,5 μL . Μετά από σύντομη φυγοκέντρηση τα δείγματα θερμαίνονται στους 65°C για 7 min, στη συσκευή της PCR. Αμέσως μετά τη θέρμανση μεταφέρονται σε πάγο, ώστε να μη σχηματιστούν δευτεροταγείς δομές στο RNA, που θα μπορούσαν να εμποδίσουν το σχηματισμό του cDNA. Στη συνέχεια, προστίθενται 4 μL ρυθμιστικού διαλύματος αντίστροφης μεταγραφάσης, 1 μL διαλύματος αζωτούχων βάσεων και 0,5 μL αντίστροφης

μεταγραφάσης. Η αντίδραση εκτελείται στη συσκευή της PCR, με θέρμανση στους 30°C για 10 min και, στη συνέχεια, στους 42°C για 90 min. Τα δείγματα cDNA φυλάσσονται στους -20°C για μελλοντική χρήση.

3.15 Έλεγχος επιπέδων έκφρασης γονιδίων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR)

3.15.1 Σχεδιασμός εκκινητών για τη Real-Time PCR

Πορεία εργασίας

Οι εκκινητές για τη Real-Time PCR σχεδιάζονται με το πρόγραμμα Primer3 [209]. Πιο συγκεκριμένα, εισάγεται τμήμα (~500 βάσεις) ή ολόκληρη η διαθέσιμη αλληλουχία mRNA του γονιδίου-στόχου και ρυθμίζονται οι παρακάτω παράμετροι ως εξής:

- Tm: min 60.0 – opt 60.0 – max 63.0
- max Tm difference ≤ 1
- primer %GC: min 50.0 – opt 50.0 – max 60.0
- product size ranges: 50-100 (ή 50-200)
- max 3' self complementarity: 1.00
- max poly-x: 3

Οι υπόλοιπες ρυθμίσεις παραμένουν ως έχουν. Με την επιλογή “get primers” το πρόγραμμα προτείνει ζεύγη εκκινητών.

3.15.2 Έλεγχος εκκινητών

Πορεία εργασίας

Κάθε ζεύγος εκκινητών από το πρόγραμμα Primer3 ελέγχεται περαιτέρω ως εξής:

- Θερμοκρασία υβριδισμού: Κάθε εκκινητής χωριστά εισάγεται στο πρόγραμμα OligoCalc [210, 211], επιλέγεται το “calculate” και σημειώνεται η θερμοκρασία υβριδισμού παρουσία αλάτων (“salt-adjusted”). Στη συνέχεια, επιλέγεται ο έλεγχος ομο-συμπληρωματικότητας (“check self-complementarity”). Το αποτέλεσμα πρέπει να είναι “none”, δηλαδή καμιά δευτεροταγής δομή δε σχηματίζεται λόγω συμπληρωματικότητας του εκκινητή. Τελικά, συγκρίνονται οι θερμοκρασίες υβριδοποίησης (“salt-adjusted”) των δύο εκκινητών και εφόσον διαφέρουν μέχρι το πολύ 1°C, το ζεύγος θεωρείται κατάλληλο για ποσοτική PCR και περνάει στο δεύτερο στάδιο ελέγχου

- Έλεγχος ειδικότητας: Στο δεύτερο στάδιο ελέγχου, το ζεύγος εκκινητών ελέγχεται ως προς την ειδικότητα αναγνώρισης του γονιδίου-στόχου με το πρόγραμμα “pick primers” του NCBI [212, 213]. Η είσοδος στο πρόγραμμα αυτό γίνεται και μέσα από τη σελίδα του γονιδίου-στόχου στο NCBI, nucleotide ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/\(accession_no_γονιδίου-στόχου\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/(accession_no_γονιδίου-στόχου))) επιλέγοντας το “pick primers” στα δεξιά της σελίδας. Στο πρόγραμμα αυτό εισάγονται: η αλληλουχία-στόχος (“PCR template”), οι αλληλουχίες των δύο εκκινητών (πρόσθιος, ανάστροφος), στο πεδίο “organism” συμπληρώνεται ο κωδικός ταξονομίας του *G. hirsutum*, 3635, και επιλέγεται η βάση δεδομένων στην οποία θα αναζητηθούν οι αλληλουχίες-στόχοι (“database”). Στην περίπτωση μας επιλέγεται η βάση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών “nr”. Το πρόγραμμα κάνει blast με τις αλληλουχίες των εκκινητών, με κάθε δυνατό προσανατολισμό (πρόσθιο και ανάστροφο). Τελικά, καταλήγει σε συμπέρασμα ειδικότητας ή μη των εκκινητών για το συγκεκριμένο γονίδιο-στόχο. Είναι πολύ ενδιαφέρον και βολικό ότι με το πρόγραμμα αυτό ελέγχεται και η δυνατότητα μη-ειδικής υβριδοποίησης των εκκινητών (mismatch) με άλλα γονίδια του οργανισμού που επιλέχθηκε

Έλεγχος ικανότητας υβριδοποίησης: Εφόσον ένα ζεύγος εκκινητών έχει εγκριθεί ως προς τις θερμοκρασίες υβριδοποίησης και την ειδικότητα, περνάει στο τρίτο στάδιο ελέγχου. Κατά το στάδιο αυτό ελέγχεται το πόσο αποτελεσματικά υβριδοποιείται το ζεύγος εκκινητών στην αλληλουχία-στόχο. Για το σκοπό αυτό, κατασκευάζεται καμπύλη συγκεντρώσεων cDNA. Πιο συγκεκριμένα, γίνονται αντιδράσεις Real-Time PCR με ορισμένη συγκέντρωση για το ζεύγος εκκινητών (συνήθως βέλτιστη συγκέντρωση 200 nM) και διαφορετικές συγκεντρώσεις cDNA (5, 10, 15, 20 και 30 ng cDNA/αντίδραση). Από τους κύκλους εμφάνισης προϊόντος στην PCR (C_T) για τις διάφορες συγκεντρώσεις cDNA, προκύπτει διάγραμμα $C_T=f(\log(\text{ng cDNA}))$. Η ικανότητα υβριδοποίησης (efficiency) ισούται με: $10^{-1/\alpha}$, όπου α η κλίση της ευθείας. Ιδανικά η ικανότητα υβριδοποίησης είναι 2.

3.15.3 Real-Time PCR

Υλικά-Συσκευές-Διαλύματα

- Διαλύματα cDNA από φύλλα *G. hirsutum* (ενότητα 3.11.1-2) 10 ng/μL
- Διαλύματα πρόσθιων και ανάστροφων εκκινητών για τα γονίδια-στόχους και το γονίδιο αναφοράς, 10 μM, VBC Biotech
- Προπαρασκευασμένα αντιδραστήρια για Real-Time PCR, SYBR FAST Master Mix (2X) (KK4601), KAPA. Περιέχει: 1) Διάλυμα qPCR Master Mix με DNA πολυμεράση,

συμπαράγοντες δράσης της (Mg^{2+} , dNTP) και χρωστική SYBR Green, 2) διάλυμα χρωστικής αναφοράς, ROX low

- Νερό απαλλαγμένο από νουκλεάσες (DEPC), Demo S.A.
- Ρύγξη αυτόματων πιπετών με φίλτρο, Kisker
- Σωλήνες erpendorf (απαλλαγμένοι από RNάσες, Kisker): αποστειρωμένοι στους $121^{\circ}C$ για 20 min
- Συστοιχίες σωλήνων PCR (FG-016FC), Nippon Genetics
- Συσσκευή ποσοτικής PCR MxPro-Mx3000P, Stratagene

Αρχή της μεθόδου

Με τη μέθοδο της PCR είναι δυνατός ο πολλαπλασιασμός μιας περιοχής DNA (αλληλουχία-στόχος), που βρίσκεται ανάμεσα σε δύο τμήματα γνωστής αλληλουχίας βάσεων. Ο πολλαπλασιασμός αυτός επιτυγχάνεται με τη χρήση εναρκτήριων μορίων γνωστής αλληλουχίας βάσεων (εκκινητές), τα οποία είναι συμπληρωματικά προς τα άκρα της αλληλουχίας-στόχου. Αρχικά, το DNA-εκμαγείο αποδιατάσσεται σε θερμοκρασία $95^{\circ}C$, ακολουθεί υβριδοποίηση των εκκινητών στα άκρα της αλληλουχίας-στόχου ($58-62^{\circ}C$) και επέκταση των εκκινητών με τη δράση της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης ($72^{\circ}C$). Έτσι, συντίθενται νέοι κλώνοι DNA συμπληρωματικοί των αρχικών. Σε αυτό το στάδιο, τα μόρια του DNA υφίστανται ως δίκλινα μόρια. Νέα κύκλος σύνθεσης ξεκινά με θερμικό διαχωρισμό των μορίων DNA και οδηγεί, τελικά, στο διπλασιασμό των μορίων DNA για δεύτερη φορά. Η διαδοχή των σταδίων θερμικής αποδιάταξης, υβριδοποίησης κι επέκτασης των μορίων DNA αποτελούν έναν κύκλο PCR, με αποτέλεσμα τα αντίγραφα της αλληλουχίας-στόχου του DNA να αυξάνονται εκθετικά με την ολοκλήρωση κάθε κύκλου.

Η Real-Time PCR είναι μια γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος, η οποία επιτρέπει και την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων. Στο τέλος κάθε κύκλου, μέχρι τη λήξη της αντίδρασης, μετράται η ποσότητα των δίκλωνων μορίων DNA (αρχικών και νεοσυντιθέμενων) μέσω παρακολούθησης των επιπέδων φθορισμού, που προέρχονται από δέσμευση φθορίζουσας ένωσης στα μόρια DNA. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη των μορίων DNA και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Από τις μετρήσεις του φθορισμού, προκύπτει η καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), στην οποία διακρίνονται τρεις φάσεις: η εκθετική, η γραμμική και η φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε

κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά βρίσκονται σε περίσσεια. Καθώς, συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση (linear phase), κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται. Στη συγκεκριμένη φάση, η ενίσχυση του σήματος μειώνεται, αφού μειώνεται σταδιακά η απόδοση της αντίδρασης. Τελικά, η αντίδραση σταματάει και η καμπύλη ενίσχυσης φτάνει στη φάση κορεσμού (plateau). Το σήμα που καταγράφεται στη Real-Time PCR (threshold cycle, C_T) βρίσκεται στην εκθετική φάση της καμπύλης ενίσχυσης και δεν προκύπτει από ανάλυση τελικού σημείου, όπως στη συμβατική μέθοδο PCR. Συγκεκριμένα, η τιμή του C_T αποτελεί τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης, που απαιτούνται για να φτάσει η τιμή φθορισμού σε ένα συγκεκριμένο όριο (threshold) υψηλότερο από την τιμή φθορισμού του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή C_T είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας μορίων DNA, εξ ου και η Real-Time PCR χαρακτηρίζεται ως ποσοτική μέθοδος [208].

Στην παρούσα εργασία, η ποσότητα των μορίων DNA προσδιορίζεται με χρήση της φθορίζουσας ένωσης SYBR Green. Στην αρχή της ενίσχυσης, το μίγμα της αντίδρασης περιέχει αποδιαταγμένα μόρια DNA, τους εκκινητές και τη χρωστική. Τα μη δεσμευμένα μόρια SYBR Green εκπέμπουν ασθενή φθορισμό παράγοντας ένα πολύ χαμηλό σήμα υποβάθρου, αντίστοιχο με αυτό της χρωστικής αναφοράς, ROX. Μετά τον υβριδισμό των εκκινητών και τη σύνθεση δίκλωνων μορίων DNA κατά την PCR, τα μόρια της SYBR Green δεσμεύονται στη διπλή έλικα του DNA και εκπέμπουν φθορισμό. Κατά την έναρξη του επόμενου κύκλου, όπου αποδιατάσσονται τα μόρια DNA, η χρωστική ελευθερώνεται και ο φθορισμός μειώνεται πάλι. Ωστόσο, στο τέλος κάθε κύκλου μετράται το σήμα του φθορισμού, οπότε η χρωστική είναι δεσμευμένη σε δίκλινα μόρια DNA, και παρατηρείται η προοδευτική αύξηση του σήματος με το πέρας των κύκλων. Μάλιστα, η ένταση του μετρούμενου φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των μορίων DNA.

Πορεία εργασίας

- Αραιωμένο διάλυμα ζεύγους εκκινητών: Σε σωλήνα erpendorf αναμειγνύονται, σε αναλογία 1:1, ο πρόσθιος με τον ανάστροφο εκκινητή του γονιδίου-στόχου ή του γονιδίου αναφοράς και αραιώνονται με προσθήκη νερού DEPC, ώστε στο τελικό διάλυμα ο κάθε εκκινητής να βρίσκεται σε συγκέντρωση 4 pmol/7,6 μ L. Στην περίπτωση των εκκινητών για τη LOX1, η τελική συγκέντρωση ρυθμίζεται στα 3 pmol/7,6 μ L. Τα διαλύματα προετοιμάζονται και φυλάσσονται σε πάγο

- Αραιωμένα δείγματα cDNA: Σε σωλήνες erpendorf αραιώνονται τα δείγματα cDNA σε τελική συγκέντρωση 10 ng/μL, με προσθήκη νερού DEPC. Τα διαλύματα προετοιμάζονται και φυλάσσονται σε πάγο
- Διάλυμα χρωστικών: Σε σωλήνα erpendorf αναμειγνύονται τα διαλύματα χρωστικών του kit. Για κάθε αντίδραση PCR υπολογίζονται 10 μL διαλύματος qPCR Master Mix και 0,4 μL διαλύματος χρωστικής αναφοράς (ROX low). Το διάλυμα χρωστικών φυλάσσεται σε πάγο και ο σωλήνας τυλίγεται με αλουμινόχαρτο, αφού οι χρωστικές είναι φωτοευαίσθητες
- Σε κάθε σωλήνα PCR προστίθενται διαδοχικά: 7,6 μL αραιωμένου διαλύματος ζεύγους εκκινήτων, 2 μL αραιωμένου δείγματος cDNA και, τέλος, 10,4 μL διαλύματος χρωστικών. Στα τυφλά δείγματα αντί για δείγμα cDNA προστίθενται 2 μL νερού DEPC. Κατά την προσθήκη των αντιδραστηρίων, οι συστοιχίες σωλήνων PCR βρίσκονται εκτός πάγου. Κατόπιν, μέχρι την προετοιμασία όλων των σωλήνων και την έναρξη της αντίδρασης, φυλάσσονται πάλι σε πάγο καλυμμένοι με αλουμινόχαρτο
- Αντίδραση Real-Time PCR: Οι συστοιχίες σωλήνων τοποθετούνται στη συσκευή ποσοτικής PCR και ρυθμίζεται το πρόγραμμα:

- 95°C για 3 min Προ-αποδιάταξη (pre-denaturation)
 - 95°C για 3 s Αποδιάταξη (denaturation)
 - 62°C για 20 s Υβριδοποίηση (annealing)
 - 72°C για 10 s Επέκταση (extension)
- } x45

• Έλεγχος προϊόντων της PCR: Τα προϊόντα της PCR ελέγχονται με καμπύλη αποδιάταξης (dissociation curve), κατά την οποία σημειώνεται η θερμοκρασία αποδιάταξης του προϊόντος. Στην περίπτωση ενίσχυσης αλληλουχιών γονιδίων PLD, έγινε έλεγχος με High Resolution Melting, όπου η θερμοκρασία αποδιάταξης του προϊόντος καταγράφεται με μεγαλύτερη ακρίβεια (σχήμα 32)

• Ποσοτικοποίηση έκφρασης: Τα επίπεδα έκφρασης για κάθε δείγμα υπολογίζονται σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου αναφοράς (ουβικιτίνη), σύμφωνα με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta C_T}$ [214]. Πιο συγκεκριμένα:

$$\Delta\Delta C_T = (C_{T, \text{γονιδίου στόχου}} - C_{T, \text{γονιδίου αναφοράς}})_{\text{δείγματος}} - (C_{T, \text{γονιδίου στόχου}} - C_{T, \text{γονιδίου αναφοράς}})_{\text{control}}$$

$$\text{ή } \Delta\Delta C_T = (C_{T, \text{δείγματος}} - C_{T, \text{control}})_{\text{γονιδίου στόχου}} - (C_{T, \text{δείγματος}} - C_{T, \text{control}})_{\text{γονιδίου αναφοράς}}$$

$$\text{Άρα: } 2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-[(C_{T, \text{δείγματος}} - C_{T, \text{control}})_{\text{γονιδίου στόχου}} - (C_{T, \text{δείγματος}} - C_{T, \text{control}})_{\text{γονιδίου αναφοράς}}]}$$

$$\text{ή } 2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-[(C_{T, \text{δείγματος}} - C_{T, \text{control}})_{\text{γονιδίου στόχου}}] / 2^{-[(C_{T, \text{δείγματος}} - C_{T, \text{control}})_{\text{γονιδίου αναφοράς}}]}} \quad (1)$$

Στον τύπο (1) το 2 αποτελεί την θεωρητική τιμή της ικανότητας υβριδοποίησης για τα ζεύγη εκκινητών του γονιδίου στόχου και του γονιδίου αναφοράς. Στην περίπτωση μας, οι ικανότητες υβριδοποίησης έχουν υπολογιστεί για τα ζεύγη εκκινητών, οπότε ο παραπάνω τύπος διαμορφώνεται σε:

$$\alpha^{-[(C_{T, \text{ δείγματος}} - C_{T, \text{ control}}) \text{ γονιδίου στόχου}]} / \beta^{-[(C_{T, \text{ δείγματος}} - C_{T, \text{ control}}) \text{ γονιδίου αναφοράς}]}$$

όπου α: η ικανότητα υβριδοποίησης του ζεύγους εκκινητών για το γονίδιο στόχο

και β: η ικανότητα υβριδοποίησης του ζεύγους εκκινητών για το γονίδιο αναφοράς

3.16 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων (σχήματα 23, 26, 33 και 34) έγινε με τη χρήση t-test (two-tailed, unpaired).

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Μελέτη και χαρακτηρισμός της δραστικότητας PLD σε φυτά *Gossypium hirsutum*

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετάται ο ρόλος της PLD στο μεγάλο οικονομικού ενδιαφέροντος φυτό *Gossypium hirsutum* (καλλιεργούμενο βαμβάκι). Στόχος είναι η μελέτη της παρουσίας και της δραστικότητας ισομορφών της PLD του βαμβακιού και, κυρίως, η συμμετοχή τους σε πιθανή ρύθμιση λειτουργιών του φυτού ως απόκριση στον τραυματισμό, που μπορεί να προέρχεται τόσο από αβιοτικές (άνεμο, βροχή ή χαλάζι), όσο και από βιολογικές καταπονήσεις (διατροφή εντόμων από τα φύλλα του φυτού, επίδραση παθογόνων). Ειδικά η μελέτη της συστημικής απόκρισης του φυτού μπορεί να οδηγήσει σε ενδιαφέροντα συμπεράσματα για την πιθανή προσαρμογή του φυτού στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Η δραστικότητα PLD μελετάται τόσο με έλεγχο της υδρολυτικής δράσης του ενζύμου όσο και με έλεγχο της, χαρακτηριστικής για το ένζυμο, δράσης μεταφωσφατιδυλίωσης.

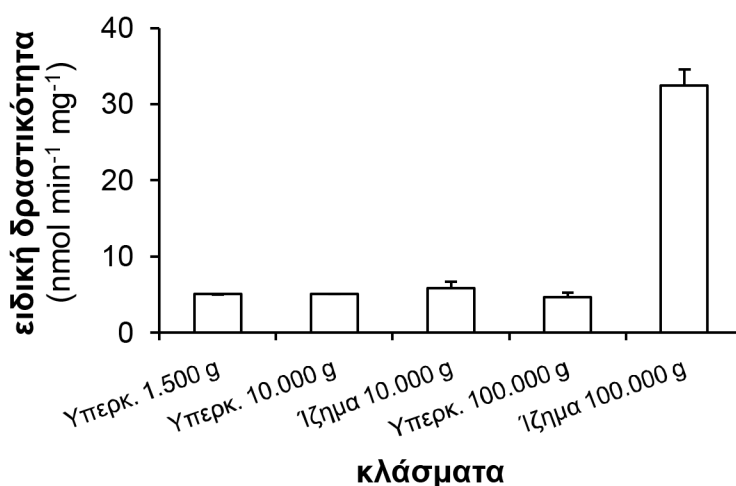
Ωστόσο, μπορεί να γίνει και διάκριση της δραστικότητας μεταξύ των διαφόρων ισομορφών PLD *in vitro*. Οι φυτικές PLD ταξινομούνται σε έξι τάξεις (α-ζ), όπως ήδη αναφέρθηκε στην Εισαγωγή, και εμφανίζουν δραστικότητα σε διαφορετικές συνθήκες pH, ενώ είναι γνωστές οι απαιτήσεις τους σε συμπαράγοντες. Με αυτά τα δεδομένα, στην παρούσα εργασία μελετώνται ξεχωριστά οι δραστικότητες των PLDα και PLDδ στο βαμβάκι με τελικό σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου τους -μεμονωμένα ή συνδυαστικά- σε σηματοδοτικές πορείες μετά τον τραυματισμό.

4.1.1 Απομόνωση της δραστικότητας PLDα

Με απώτερο στόχο το βιοχημικό χαρακτηρισμό της PLD στο βαμβάκι, διαμορφώθηκε στο εργαστήριο πρωτόκολλο καθαρισμού της δραστικότητας με διαφορική φυγοκέντρηση [215]. Συγκεκριμένα, το υπέργειο τμήμα φυτών βαμβακιού (ηλικίας 6 εβδομάδων) συλλέγεται και θραύεται σε πορσελάνινο γουδί με υγρό N₂. Η σκόνη διασπείρεται σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris (pH 7,5), που περιέχει αναστολέα πρωτεασών (PMSF) και παράγοντα διατήρησης των δισουλφιδικών δεσμών των πρωτεϊνών (DTT). Κατόπιν, το ομογενοποίημα διηθείται, θερμαίνεται στους 55°C επί 5 min και ακολουθεί διαφορική φυγοκέντρηση. Στα κλάσματα που προκύπτουν γίνεται έλεγχος της δραστικότητας PLD, με μέθοδο που διαμορφώθηκε με τροποποίηση του πρωτοκόλλου των Ryu και συν. [87]. Η μέθοδος αυτή είναι εξειδικευμένη για την ιδιοσυστατική (conventional) ισομορφή α των φυτών και χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα μικκύλια PtdCho. Ο υπολογισμός της ειδικής

δραστικότητας PLDa για το κάθε κλάσμα γίνεται με μέτρηση του παραγόμενου PtdOH, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους (ενότητα 3.8.1), τα δε αποτελέσματα για τα διάφορα κλάσματα δίνονται στο σχήμα 22.

Από τα αποτελέσματα του σχήματος 22, φαίνεται πως η δραστικότητα PLDa εντοπίζεται στο κλάσμα των μικροσωμάτων (ίζημα 100.000 g), το οποίο είναι σημαντικά (6,4 φορές) εμπλουτισμένο σε δραστικότητα PLDa, σε σχέση με το αρχικό ομογενοποίηση (υπερκείμενο 1.500 g). Επομένως, το ένζυμο εντοπίζεται στις μικροσωμικές μεμβράνες, όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες στο φυτό-μοντέλο *Arabidopsis thaliana*, καθώς και σε φυτά όρυζας, φασολιού και φράουλας, όπου η δραστικότητα PLDa εντοπίζεται επίσης σε μεμβρανικά κλάσματα [43, 56, 126, 216, 217]. Για το λόγο αυτό, το ίζημα των 100.000 g χρησιμοποιείται στο εξής ως πηγή της δραστικότητας PLDa.



Σχήμα 22. Καθαρισμός δραστικότητας PLDa από φυτά βαμβακιού.

Η δραστικότητα PLDa απομονώθηκε από το υπέργριο τμήμα φυτών 6 εβδομάδων και καθαρίστηκε με διαφορική φυγοκέντρηση, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους. Στα κλάσματα που προέκυψαν έγινε έλεγχος της δραστικότητας PLDa με ψυχρή PtdCho ως υπόστρωμα. Για τον υπολογισμό της ειδικής δραστικότητας, το παραγόμενο PtdOH διαχωρίζεται με TLC και ποσοτικοποιείται με προσδιορισμό φωσφόρου (n=3)

Είναι σημαντικό να σημειωθεί εδώ πως η δραστικότητα διατηρείται και μετά τη θέρμανση στους 55°C, που γίνεται κατά τη διάρκεια της απομόνωσης του ενζύμου. Κάτι τέτοιο δεν είναι παράδοξο, αφού υπάρχουν αναφορές για θερμοανθεκτικές PLD και από άλλες φυτικές πηγές (*Brassica*, *A. sativum*) [58, 218], ενώ είναι γνωστή η δράση PLD σε συνθήκες θερμικών και άλλων καταπονήσεων [59, 84, 183, 219].

4.1.2 Χαρακτηρισμός της δραστικότητας PLDa παρουσία πρωτοταγούς αλκοόλης

Όπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή, οι πρωτοταγείς αλκοόλες αναστέλλουν τη δράση της PLD τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Συγκεκριμένα, καταλύουν την υποκατάσταση της

πολικής κεφαλής του φωσφολιπιδίου από την αλκοξυ-ομάδα της αλκοόλης καταλήγοντας στη σύνθεση ενός νέου φωσφολιπιδίου, που, ανάλογα και με την επιλογή της αλκοόλης, συνήθως δεν απαντάται φυσιολογικά στις μεμβράνες. Η αντίδραση αυτή της μεταφωσφατιδυλίωσης είναι χαρακτηριστική για τις PLD, καθώς δεν καταλύεται από συνδυαστική δράση άλλων ενζύμων, σε αντίθεση με την αντίδραση της υδρόλυσης, το προϊόν της οποίας μπορεί να προέλθει από διαδοχική δράση PLC και κινάσης της DAG σε φωσφολιπίδια των μεμβρανών [79]. Είναι γνωστό δε, πως η μεταφωσφατιδυλίωση ανταγωνίζεται την υδρόλυση, γι' αυτό και οι πρωτοταγείς αλκοόλες χρησιμοποιούνται ευρέως ως αναστολείς των PLD, κυρίως σε *in vitro* πειράματα. Ενδεικτικά, με χρήση αιθανόλης έχει γίνει χαρακτηρισμός των PLD σε φασόλι, σόγια και ηλίανθο [220, 221], ενώ ως αναστολέας της δράσης της PLD έχει χρησιμοποιηθεί και η 1-βουτανόλη σε PLD καθαρισμένα από ζύμη και λάχανο [9].

4.1.2.1 Επίδραση αλκοόλης *in vitro*

Για τον χαρακτηρισμό της δραστηριότητας PLD στο βαμβάκι και με σκοπό την ταυτοποίηση της δραστηριότητας που ανιχνεύθηκε στο κλάσμα των μικροσωμάτων, έγινε *in vitro* έλεγχος της δραστηριότητας PLDα παρουσία αλκοόλης. Χρησιμοποιήθηκε αρχικά, στο μίγμα προσδιορισμού της δραστηριότητας, αιθανόλη σε τελική συγκέντρωση 1% (v/v). Τα αποτελέσματα της επίδρασης της αλκοόλης στη δραστηριότητα φαίνονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3. Επίδραση αιθανόλης στην υδρολυτική δράση της PLDα.

Από φυτά βαμβακιού 6 εβδομάδων απομονώθηκε το κλάσμα των μικροσωμάτων (ίζημα 100.000 g), όπως περιγράφεται στις Μεθόδους, και ελέγχθηκε η δραστηριότητα PLDα παρουσία και απουσία αιθανόλης στο μίγμα της αντίδρασης. Για τον υπολογισμό των ειδικών δραστηριοτήτων υδρόλυσης και μεταφωσφατιδυλίωσης τα παραγόμενα PtdOH και PtdEtOH, αντίστοιχα, διαχωρίζονται με TLC και ποσοτικοποιούνται με προσδιορισμό φωσφόρου (n=3)

συγκέντρωση αιθανόλης	ειδική δραστηριότητα (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	
	υδρόλυση	μεταφωσφατιδυλίωση
0%	31,99 ± 1,99	-
1%	13,98 ± 1,90	37,43 ± 1,08

Όπως ήταν αναμενόμενο, η παρουσία αιθανόλης οδηγεί στην παράλληλη παραγωγή PtdEtOH, σε αναλογία 2,7:1 ως προς το επίσης παραγόμενο PtdOH. Η παρατηρούμενη αναστολή της υδρολυτικής δράσης του ενζύμου, σε σύγκριση με τη δράση απουσία

αλκοόλης, είναι της τάξης του 56%. Ανάλογα επίπεδα αναστολής έχουν αναφερθεί και για PLDα από άλλες φυτικές πηγές παρουσία πρωτοταγών αλκοολών [10].

Με την προοπτική να διαμορφωθεί μέθοδος *in vivo* αναστολής της PLD στο βαμβάκι, έγινε έλεγχος της επίδρασης και άλλων αλκοολών στη δραστικότητα PLD. Αυτό κρίθηκε απαραίτητο, καθώς είναι γνωστό ότι η επίδραση αιθανόλης μπορεί να αφυδατώσει τον φυτικό ιστό [222]. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκε η κανονική βουτανόλη (1-βουτανόλη), η οποία χρησιμοποιείται ευρύτατα ως *in vivo*, αλλά και *in vitro*, αναστολέας της PLD [9, 22, 223-226]. Επιπλέον, πειράματα μελέτης της επίδρασης των δύο πρωτοταγών αλκοολών (αιθανόλης και 1-βουτανόλης) στην ανάπτυξη του πρωτοζώου *T. thermophila* (βλ. Παράρτημα Ι), έδειξαν πως η 1-βουτανόλη προκαλεί εντονότερη αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων σε σύγκριση με την αιθανόλη. Το γεγονός αυτό μπορεί να συσχετιστεί με την αναστολή της δράσης της PLD από τις συγκεκριμένες αλκοόλες [227] και πιθανόν υποδεικνύει πως η 1-βουτανόλη αναστέλλει πιο ισχυρά την PLD, τουλάχιστον στα κύτταρα αυτά.

4.1.2.2 Επίδραση αλκοόλης *in vivo*

Έχοντας επιλέξει την 1-βουτανόλη ως παράγοντα αναστολής της PLD στο βαμβάκι έγινε έλεγχος της ανασταλτικής της δράσης σε φύλλα *in vivo*. Ο έλεγχος έγινε με προσδιορισμό των μεταβολών των ενδογενών επιπέδων φωσφολιπιδίων του PtdOH, προϊόντος της δραστικότητας PLD, μετά την επίδραση 1-βουτανόλης στα φύλλα. Στον πίνακα 4 δίνονται τα βασικά επίπεδα του λιπιδίου αυτού, καθώς και τα βασικά επίπεδα των κύριων μεμβρανικών λιπιδίων (PtdCho, PtdEth) των φύλλων βαμβακιού. Τα βασικά επίπεδα των τριών λιπιδίων είναι χρήσιμα και στη μελέτη των μεταβολών τους κατά τον τραυματισμό των φύλλων, που θα παρουσιαστούν στις ενότητες 4.2 και 4.3 των Αποτελεσμάτων.

Για τη μελέτη των ενδογενών επιπέδων των τριών φωσφολιπιδίων εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο εκχύλισης λιπιδίων που περιγράφεται αναλυτικά στις Μεθόδους (ενότητα 3.4). Στη συνέχεια, τα λιπίδια διαχωρίζονται με TLC και ποσοτικοποιούνται με προσδιορισμό φωσφόρου μετά την εκχύλισή τους από τη χρωματογραφική πλάκα. Από την ποσοτικοποίηση αυτή προκύπτουν τα ποσοστά του πίνακα 4.

Πίνακας 4. Ενδογενή επίπεδα φωσφολιπιδίων φύλλων βαμβακιού.

Εκχυλίστηκαν τα λιπίδια των φύλλων, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους. Ακολούθησε διαχωρισμός με TLC, εκχύλιση από την πλάκα και προσδιορισμός φωσφόρου. Τα βασικά επίπεδα των κυρίων φωσφολιπιδίων (PtdCho, PtdEth) και του PtdOH παρουσιάζονται ως ποσοστά επί του αθροίσματος των τριών (n=4)

φωσφολιπίδιο	% συνολικών φωσφολιπιδίων
PtdCho	54,05 ± 1,14
PtdEth	40,33 ± 0,45
PtdOH	5,63 ± 0,70

Οι τιμές του πίνακα 4 δείχνουν ότι τα επίπεδα PtdOH εμπίπτουν στα όρια ευαισθησίας της μεθόδου προσδιορισμού φωσφόρου και, αν και πρόκειται για σηματοδοτικό μόριο, αυτό μπορεί με αξιοπιστία να ανιχνευθεί με εφαρμογή του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου εκχύλισης. Επομένως, η συγκεκριμένη μέθοδος είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί και για τη μελέτη της διακύμανσης των επιπέδων PtdOH και σε άλλες περιπτώσεις. Εν προκειμένω, θα χρησιμοποιηθεί στον έλεγχο των επιπέδων του προϊόντος της PLD μετά από *in vivo* επίδραση 1-βουτανόλης.

Αναλυτικότερα, σε φύλλα βαμβακιού τοποθετούνται εκατέρωθεν φύλλα χαρτιού εμποτισμένα με υδατικό διάλυμα 1-βουτανόλης 1% (v/v) και αφήνονται για ορισμένο χρονικό διάστημα. Με το πέρας του διαστήματος αυτού, τα χαρτιά αφαιρούνται, τα φύλλα καθαρίζονται ελαφρά από τα υπολείμματα αλκοόλης, αποκόπτονται και αμέσως εμβαπτίζονται σε ζεστή ισοπροπανόλη για την εκχύλιση των λιπιδίων. Δοκιμάζονται διάφοροι χρόνοι παραμονής των φύλλων υπό την επίδραση 1-βουτανόλης (10, 30 και 60 min), με σκοπό να διαπιστωθεί ποιο είναι το χρονικό διάστημα, το απαραίτητο για την αναστολή της PLD. Επιπλέον, ελέγχθηκε και το πόσο διαρκεί η ανασταλτική αυτή δράση της αλκοόλης με εκχύλιση των λιπιδίων 30 min μετά την αφαίρεσή της από τα φύλλα. Στο δείγμα ελέγχου η εκχύλιση έγινε κατευθείαν, χωρίς επίδραση κάποιου παράγοντα, ενώ εκχυλίστηκαν τα λιπίδια και από φύλλο στο οποίο είχαν τοποθετηθεί χαρτιά εμποτισμένα με νερό. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5. *In vivo* επίδραση 1-βουτανόλης στα ενδογενή επίπεδα PtdOH φύλλων βαμβακιού.

Χαρτί εμποτισμένο με διάλυμα 1-βουτανόλης ή νερό τοποθετήθηκε εκατέρωθεν των φύλλων για τα συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Αμέσως μετά την επίδραση ή και μετά από 30 min, κατά περίπτωση, τα φύλλα αποκόπτονται, εκχυλίζονται τα λιπίδια και μετά από διαχωρισμό με TLC προσδιορίζονται τα επίπεδα PtdOH (λιπιδικού φωσφόρου). Η % μείωση PtdOH προκύπτει από σύγκριση των αντίστοιχων επιπέδων με τα δείγματα ελέγχου

επίδραση	χρόνος επίδρασης	χρόνος μετά την επίδραση	% μείωση PtdOH/ ξηρό βάρος (μmol/g)
βουτανόλη 1%	10 min	-	49,52
βουτανόλη 1%	30 min	-	55,24
βουτανόλη 1%	60 min	-	52,38
βουτανόλη 1%	10 min	30 min	79,05
H ₂ O	60 min	-	6,67

Όπως φαίνεται στον πίνακα 5, σε κάθε περίπτωση επίδρασης με 1-βουτανόλη τα επίπεδα PtdOH, σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, είναι μειωμένα κατά τουλάχιστον 50%. Αξίζει να σημειωθεί πως η μείωση εμφανίζεται ήδη κατά τα πρώτα 10 min επίδρασης και εντείνεται 30 min μετά από αυτήν, όταν το φύλλο απαλλαγμένο από την αλκοόλη παραμένει εκτεθειμένο στον αέρα πριν αποκοπεί προς εκχύλιση και προσδιορισμό του PtdOH. Επομένως, αποδεικνύεται πως η 1-βουτανόλη δρα ανασταλτικά στην ενδογενή δραστηριότητα PLD των φύλλων βαμβακιού και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα συνδυαστικά με τραυματισμό για τον έλεγχο πιθανών καθοδικών στόχων της δράσης PLD.

4.2 Μελέτη της δραστηριότητας PLD φύλλων βαμβακιού μετά από τραυματισμό

Η δραστηριότητα PLD από φυτά βαμβακιού, με βάση τα όσα ήδη αναφέρθηκαν, απομονώνεται στο κλάσμα των μικροσωμάτων (ίζημα 100.000 g) και μπορεί να μετρηθεί *in vitro* με χρήση μικκυλιακών παρασκευασμάτων PtdCho. Το επόμενο βήμα αφορά τη μελέτη της δραστηριότητας του ενζύμου μετά από μηχανικό τραυματισμό των φύλλων. Πιο αναλυτικά, με ψαλίδι κόβεται σε τέσσερα σημεία φύλλο από φυτό ηλικίας 6 εβδομάδων (με πλήρως ανεπτυγμένο, εκτός των κοτυληδόνων, και ένα ζευγάρι φύλλων) και, μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα, αποκόπτεται από το φυτό τόσο το τραυματισμένο φύλλο (τοπικός ιστός) όσο και το γειτονικό ατραυματιστό (συστημικός ιστός). Από τα δείγματα που συλλέγονται απομονώνεται και μετράται η δραστηριότητα PLD και, συνεπώς, η τοπική

και συστηματική απόκριση του ενζύμου στον τραυματισμό. Αυτή τη φορά για τον *in vitro* ενζυμικό προσδιορισμό γίνεται χρήση ραδιενεργού υποστρώματος ($[^3\text{H}]\text{PtdCho}$), όπως περιγράφεται στις Μεθόδους (ενότητα 3.8.2). Ο λόγος για την αλλαγή αυτή είναι πως η δραστηριότητα στα φύλλα είναι αρκετά χαμηλότερη από αυτή του ολόκληρου φυτού, όπως φαίνεται και στον πίνακα 6, και απαιτείται μεγαλύτερη ευαισθησία στη μέθοδο προσδιορισμού της.

Πίνακας 6. Σύγκριση ειδικής δραστηριότητας PLDa μικροσωμικών κλασμάτων κατά τον καθαρισμό της από φυτά ή φύλλα βαμβακιού.

Η δραστηριότητα PLDa απομονώθηκε από το υπέργειο τμήμα φυτών ή φύλλων βαμβακιού και καθαρίστηκε με διαφορετική φυγοκέντρηση, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους. Στο αρχικό (υπερκείμενο 1.500 g) και το μικροσωμικό κλάσμα (ίζημα 100.000 g) που προέκυψαν έγινε έλεγχος της δραστηριότητας PLDa με $[^3\text{H}]\text{PtdCho}$, ως υπόστρωμα. Για τον υπολογισμό της ειδικής δραστηριότητας το παραγόμενο PtdOH διαχωρίζεται με TLC, εκχυλίζεται από την πλάκα και ποσοτικοποιείται σε μετρητή σπινθηρισμού υγρών ($v=3$)

κλάσμα	ειδική δραστηριότητα ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	
	φυτά	φύλλα
υπερκείμενο 1.500 g	4,31 ± 0,09	4,31 ± 0,39
ίζημα 100.000 g	12,01 ± 3,63	7,23 ± 0,27

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι έγινε συστηματική παρατήρηση για διάστημα ενός μηνός φυτών με τραυματισμένα φύλλα. Δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στον φαινότυπο των φύλλων, αλλά και ολόκληρου του φυτού. Το δε τραύμα παρέμεινε ως είχε αρχικά, χωρίς εμφανή σημεία επούλωσης ή γήρανσης (αποπρασινισμό). Επιπλέον, η ανάπτυξη του φυτού συνεχίστηκε κανονικά, αφού -χωρίς χρονική υστέρηση σε σχέση με φυτό ελέγχου- σχηματίστηκαν νέα φύλλα.

Από τα δεδομένα του πίνακα 6 φαίνεται πως, παρά τη διαφορά στην απόλυτη τιμή της δραστηριότητας PLDa μεταξύ φυτών και φύλλων, στα φύλλα το πιο εμπλουτισμένο κλάσμα εξακολουθεί να είναι το μικροσωμικό, όπως συμβαίνει και στην περίπτωση της PLDa από ολόκληρο φυτά. Εν τούτοις, συναντάται υψηλότερη δραστηριότητα στο υπέργειο τμήμα του φυτού συγκριτικά με τα φύλλα. Αυτό δεν είναι παράδοξο, καθώς και σε άλλα φυτά έχουν παρατηρηθεί μεταβολές στη δραστηριότητα PLD, ανάλογα με τον ιστό που εξετάζεται κάθε φορά. Συγκεκριμένα, σε σπόρους υψηλότερη δραστηριότητα εμφανίζεται μετά τη γονιμοποίηση στις ρίζες και τις κοτυληδόνες [228]. Κάτι τέτοιο ίσως υποδεικνύει πως οι PLD διαδραματίζουν ρόλο και στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των φυτών.

Να σημειωθεί εδώ, πως παρατηρείται σημαντική διαφορά στην τιμή της ειδικής δραστηριότητας του ιζήματος 100.000 g από φυτά βαμβακιού, ανάλογα με το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται κατά τον προσδιορισμό της. Συγκεκριμένα, με τη χρήση [³H]PtdCho ως υποστρώματος η μετρούμενη ειδική δραστηριότητα αντιστοιχεί περίπου στο ένα τρίτο αυτής που προέκυψε από προσδιορισμό με χρήση ψυχρής PtdCho (12,01 και 32,44 nmol min⁻¹ mg⁻¹, αντίστοιχα). Η μείωση αυτή οφείλεται στην κατακράτηση μέρους του τριτίου στο υλικό επίστρωσης των πλακών TLC και, συνεπώς, στη μείωση της απόδοσης ραδιενέργειας μετά την εκχύλιση του παραγόμενου [³H]PtdOH από την πλάκα [229].

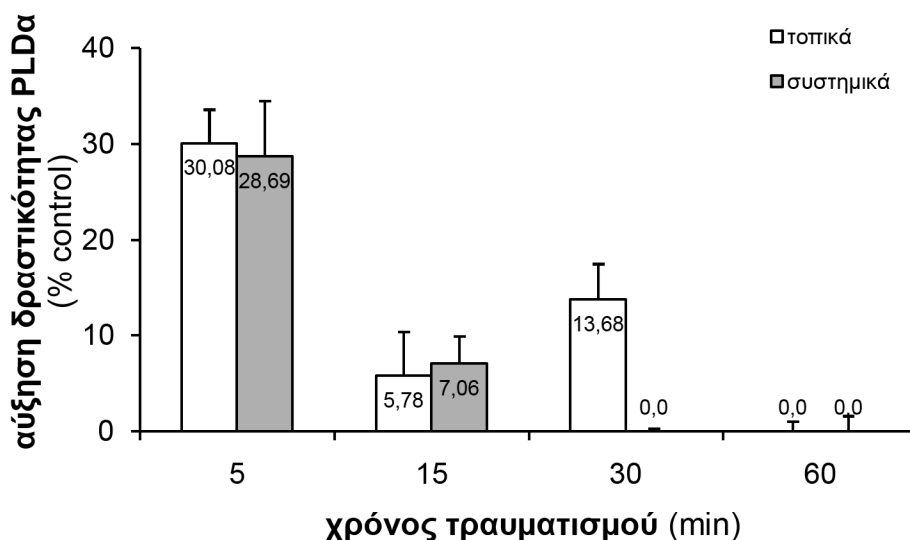
Μετά την εφαρμογή τραυματισμού σε φυτά έχει αναφερθεί η συμμετοχή περισσότερων από μία ισομορφών PLD, επικρατέστερες δε ισομορφές στην εμπλοκή στις αποκρίσεις μετά τον τραυματισμό έχουν αναδειχθεί οι PLDα και δ [74, 75, 132]. Γι' αυτό και στην παρούσα διατριβή μελετάται η δραστηριότητα των ισομορφών α και δ τόσο *in vitro* όσο και μέσω άμεσου προσδιορισμού των ενδογενών επιπέδων του προϊόντος δράσης της PLD (PtdOH) μετά από τραυματισμό.

4.2.1 Δραστηριότητα PLDα

Από το σύνολο των ισομορφών των φυτικών PLD, η PLDα αποτελεί την ιδιοσυστατική ισομορφή, η οποία έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στις αποκρίσεις φυτών κατά τα πρώτα λεπτά μετά από κάποια περιβαλλοντική καταπόνηση [60, 66, 183, 230]. Στην περίπτωση του τραυματισμού, μάλιστα, διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στη ρύθμιση και ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών μετά τον τραυματισμό, κυρίως μέσω του προϊόντος δράσης της (PtdOH), που δρα ως δεύτερος αγγελιοφόρος [34, 44]. Επιπλέον, στο βαμβάκι είχαμε ήδη ενδείξεις ότι επάγεται η έκφραση ισομορφών PLDα στους τραυματισμένους ιστούς, άμεσα μετά τον τραυματισμό [215].

Με αυτά τα δεδομένα, έγινε μελέτη της δραστηριότητας PLDα μετά τον τραυματισμό, τοπικά και συστημικά. Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει την απομόνωση της δραστηριότητας από φύλλα (τραυματισμένα ή γειτονικά ατραυμάτιστα) μετά από ορισμένο χρόνο τραυματισμού (5, 15, 30 και 60 min). Στη συνέχεια, τα μικροσωμικά κλάσματα από κάθε δείγμα ελέγχονται ως προς τη δραστηριότητα PLDα με χρήση [³H]PtdCho ως υποστρώματος. Σε αυτό το σημείο, είναι σημαντικό να υπενθυμίσουμε πως είναι δυνατή η *in vitro* διάκριση της δραστηριότητας μεταξύ των διάφορων ισομορφών PLD λόγω των διαφορετικών απαιτήσεών τους σε συμπαραγόντες (Ca²⁺, SDS, PtdInsP₂, ελαϊκό οξύ), όπως αναλυτικά περιγράφεται στην Εισαγωγή. Τα αποτελέσματα από τα συγκεκριμένα

πειράματα παρουσιάζονται στο σχήμα 23, ως % αυξήσεις σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (χρόνος = 0 min, ειδική δραστηριότητα: $3,66 \pm 0,27 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$).



Σχήμα 23. Επίδραση τραυματισμού στη δραστηριότητα PLDa φύλλων βαμβακιού τοπικά και συστημικά. Τραυματισμένα (τοπικά) και γειτονικά ατραυμάτιστα (συστημικά) φύλλα, από φυτά που είχαν υποστεί μηχανικό τραυματισμό για ορισμένο χρονικό διάστημα, ομογενοποιήθηκαν και κλασματώθηκαν, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους. Τα προκύπτοντα μικροσωμικά κλάσματα ελέγχθηκαν για δραστηριότητα PLDa με χρήση [^3H]PtdCho ως υποστρώματος. Για τον υπολογισμό της ειδικής δραστηριότητας το παραγόμενο [^3H]PtdOH ποσοτικοποιήθηκε σε μετρητή σπινθηρισμού υγρών μετά από διαχωρισμό με TLC. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αυξήσεις της ειδικής δραστηριότητας σε σχέση με το δείγμα ελέγχου ($n=3$). Οι % αλλαγές της ειδικής δραστηριότητας είναι στατιστικά σημαντικές ($P<0,01$)

Όπως φαίνεται στο σχήμα 23, ο τραυματισμός προκαλεί ταχεία αύξηση της δραστηριότητας PLDa τόσο στα τραυματισμένα όσο και στα ατραυμάτιστα φύλλα. Ωστόσο, η ενεργοποίηση της PLDa τοπικά εμφανίζεται σε δύο ώσεις, στα 5 και στα 30 min, αντίστοιχα, ενώ επιστρέφει στα αρχικά επίπεδα σε 60 min. Αντίθετα, συστημικά η αύξηση της δραστηριότητας PLDa είναι παροδική, καθώς επανέρχεται στα αρχικά επίπεδα ήδη από τα 30 min. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν μια άμεση, τοπική ενεργοποίηση της PLDa. Επίσης, το σήμα του τραυματισμού μοιάζει να μεταδίδεται στα γειτονικά φύλλα και να προκαλεί συστημικά αποκρίσεις που περιλαμβάνουν και την παρατηρούμενη ενεργοποίηση της PLDa. Παρόμοια, ραγδαία σηματοδότηση σε τραυματισμένα και ατραυμάτιστα φύλλα έχει αναφερθεί και σε παλαιότερες μελέτες σε φυτά, όπως σε φύλλα *R. communis*, όπου η επαγόμενη από τραυματισμό ενεργοποίηση της PLDa δεν περιορίζεται μόνο στο σημείο του τραυματισμού, αλλά παρατηρείται και σε απομακρυσμένα σημεία του φύλλου [126]. Μάλιστα, στη μελέτη αυτή, οι Ryu και Wang έδειξαν και ότι η ενεργοποίηση της PLDa οφείλεται σε μετακίνηση του ενζύμου από το κυτόπλασμα στο μικροσωμικό κλάσμα.

Για να εξετάσουμε αν και στο βαμβάκι συμβαίνει ανάλογη μετακίνηση του ενζύμου, ελέγχθηκε η δραστικότητα PLDα σε υπερκείμενα 100.000 g παράλληλα με τα αντίστοιχα ιζήματα 100.000 g, που προέκυψαν από διαφορεική φυγοκέντρηση, πριν και 15 min μετά τον τραυματισμό. Από ενδεικτικό πείραμα φάνηκε πως, πιθανόν, λαμβάνει χώρα μετατόπιση του ενζύμου από το κυτόπλασμα στις μεμβράνες. Συγκεκριμένα, στο διαλυτό κλάσμα (υπερκείμενο 100.000 g) παρατηρείται μείωση της δραστικότητας, τοπικά και συστημικά, σε ποσοστό περίπου 20%, ενώ παράλληλα σημειώνονται ανάλογες αυξήσεις, της τάξης του 20%, στο μεμβρανικό κλάσμα (ίζημα 100.000 g). Είναι ενδιαφέρον πως και σε φύλλα φασολιάς έχει παρατηρηθεί μετά από τραυματισμό μετατόπιση της ενζυμικής δραστικότητας στις μεμβράνες μετά από τα πρώτα λεπτά του τραυματισμού και, μάλιστα, η μεταβολή αυτή υπολογίζεται επίσης στο 20% [126].

4.2.2 Δραστικότητα PLDδ

Μετά τον έλεγχο της δραστικότητας PLDα στο βαμβάκι και τις μεταβολές της κατά τον τραυματισμό, μελετήθηκε η δραστικότητα της ισομορφής δ, που, σύμφωνα με τα όσα έχουν ήδη αναφερθεί, αποτελεί τον πιθανότερο «συνεργάτη» της α κατά την απόκριση του φυτού στον τραυματισμό. Κάτι τέτοιο είναι εφικτό, λόγω της απαίτησης ειδικά των ισομορφών δ σε ελαϊκό οξύ και μειωμένα επίπεδα Ca^{2+} σε σχέση με τις PLDα, οι οποίες μελετήθηκαν μέχρις εδώ. Η μελέτη της δραστικότητας έγινε με *in vitro* προσδιορισμό σε μικροσωμικά κλάσματα που είχαν απομονωθεί από τραυματισμένα και ατραυμάτιστα φύλλα μετά από ορισμένο χρόνο τραυματισμού.

Η ενζυμική αντίδραση γίνεται με χρήση [3H]PtdCho, ως υποστρώματος, και παρουσία μM Ca^{2+} , ελαϊκού και PtdInsP₂, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους (ενότητα 3.9.3). Η παρασκευή του υποστρώματος για τις PLDδ μας προβλημάτισε, καθώς υπήρχαν αναφορές για χρήση τόσο ελαϊκού οξέος όσο και του ελαϊκού νατρίου στο υπόστρωμα. Επιπλέον, η διασπορά μπορούσε να γίνεται είτε σε νερό είτε στο ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης, που περιέχει ιόντα K^+ , Mg^{2+} και Ca^{2+} [50, 231].

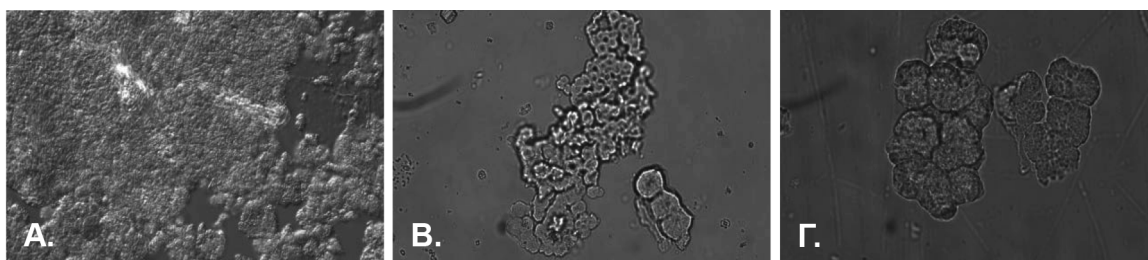
Με σκοπό την επιλογή των βέλτιστων συνθηκών για την προετοιμασία υποστρώματος για την PLDδ, έγινε παρασκευή των υποστρωμάτων και παρατήρηση των δομών που προκύπτουν σε μικροσκόπιο ανεσταραμμένης φάσης. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν οι παρακάτω διασπορές PtdCho παρουσία ελαϊκού οξέος ή του αλατός του, όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.9.2:

- PtdCho 1,5 M-ελαϊκό οξύ 6 M σε νερό millipore
- PtdCho 1,5 M-ελαϊκό νάτριο 6 M σε νερό millipore

- PtdCho 1,5 M-ελαϊκό οξύ 6 M σε ρυθμιστικό διάλυμα
- PtdCho 1,5 M-ελαϊκό νάτριο 6 M σε ρυθμιστικό διάλυμα
- PtdCho 1,5 M-ελαϊκό οξύ 6 M-PtdInsP₂ 0,3 M σε ρυθμιστικό διάλυμα.

Ακολούθως, εξετάστηκαν σε μικροσκόπιο ανεστραμμένης φάσης οι μικκυλιακές δομές που σχηματίστηκαν σε κάθε περίπτωση και φάνηκε πως οι διασπορές που περιέχουν ελαϊκό οξύ δίνουν ελάχιστες μικκυλιακές δομές. Αυτό συμβαίνει είτε χρησιμοποιείται νερό ως μέσο διασποράς είτε ρυθμιστικό διάλυμα. Σε μία από τις δοκιμές προστέθηκε, κατά την παρασκευή του υποστρώματος, και PtdInsP₂ (η οποία απομονώνεται από μίγμα φωσφοϊνοσιπιδίων της Sigma, ενότητα 3.9.1), καθώς υπάρχουν στη βιβλιογραφία ενδείξεις ότι και αυτή μπορεί να λειτουργήσει ως συμπαράγοντας της PLDδ. Ωστόσο, δε φάνηκε να επιδρά στις δομές που σχηματίζονται μετά την υπερήχηση. Όσον αφορά τις δομές παρουσία άλατος του ελαϊκού, δεν παρατηρήθηκε βελτιστοποίηση στην περίπτωση διασποράς σε νερό. Ωστόσο, όταν δοκιμάστηκε χρήση ρυθμιστικού διαλύματος σε συνδυασμό με το ελαϊκό νάτριο, οι δομές που προέκυψαν ήταν πυκνές, όπως φαίνεται στο σχήμα 24A. Με αυτά τα δεδομένα, επελέγη ο συγκεκριμένος τρόπος παρασκευής υποστρώματος για τον ενζυμικό προσδιορισμό της PLDδ (ενότητα 3.9.3).

Ανάλογα, έγινε έλεγχος της επίδρασης ιόντων και στη διασπορά καθαρής PtdCho (υπόστρωμα της PLDα). Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν οι δομές που σχηματίζονται μετά την υπερήχηση PtdCho σε ρυθμιστικό διάλυμα και σε νερό (σχήμα 24B-Γ). Από την παρατήρηση των δομών προέκυψε πως σε νερό -απουσία ιόντων- σχηματίζονται ελαφρώς πιο πλούσιες και πυκνές μικκυλιακές δομές PtdCho. Η παρατήρηση αυτή δείχνει πως η προετοιμασία υποστρώματος PLDα (ενότητα 3.7.1) γίνεται με ορθό τρόπο.

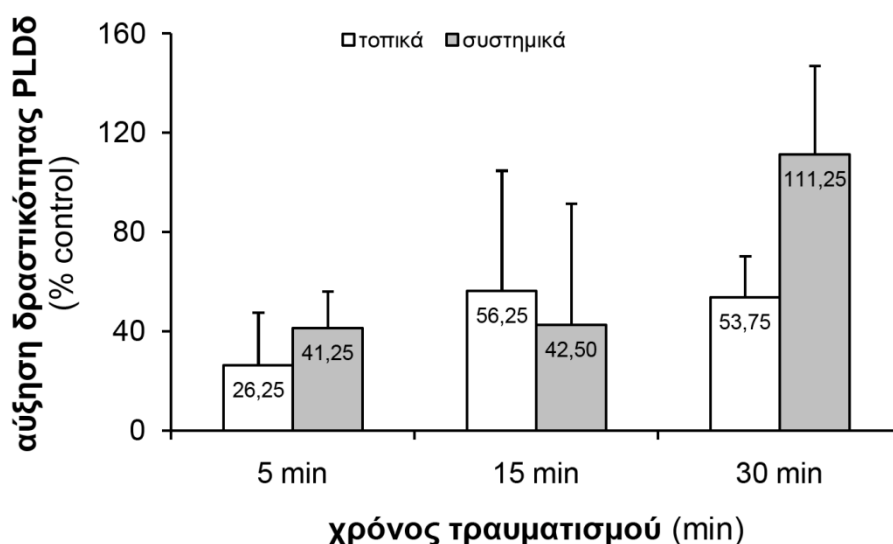


Σχήμα 24. Φωτογραφίες από μικροσκόπιο ανεστραμμένης φάσης (40x) μικκυλιακών δομών υποστρωμάτων PLDδ και PLDα. (A) PtdCho 1,5 M-ελαϊκό νάτριο 6 M σε ρυθμιστικό διάλυμα, (B) PtdCho 1,5 M σε ρυθμιστικό διάλυμα, (Γ) PtdCho 1,5 M σε νερό (τελικές συγκεντρώσεις). Η διασπορά του λιπιδίου έγινε όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.9.2

Έχοντας πλέον οριστικοποιήσει τη μέθοδο προσδιορισμού δραστηρότητας για την PLDδ ισομορφή, έγινε *in vitro* έλεγχος σε μικροσωμικά κλάσματα από φύλλα βαμβακιού, με

χρήση [³H]PtdCho ως υποστρώματος. Τα εγγενή επίπεδα δραστικότητας για αυτή την ισομορφή υπολογίστηκαν σε $0,20 \pm 0,03 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, τιμή σημαντικά χαμηλότερη από αυτή της δραστικότητας PLDα (πίνακας 6). Η μεγάλη διαφορά που παρατηρείται στα επίπεδα δραστικότητας των δύο ισομορφών έρχεται σε συμφωνία με τα χαμηλά επίπεδα RNA σε φύλλα βαμβακιού και δεν είναι παράδοξη, αν ληφθεί υπόψη πως η α είναι η ιδιοσυστατική ισομορφή της PLD στα φυτά και, επομένως, αυτή που δρα σε φυσιολογικές συνθήκες. Αντίθετα, σύμφωνα με αναφορές από άλλα φυτά, η PLDδ ενεργοποιείται κατόπιν ερεθίσματος. Τα δεδομένα αυτά, ωστόσο, αφορούν μόνο επίπεδα έκφρασης και όχι δραστικότητας, καθώς σύμφωνα με τα όσα γνωρίζουμε δεν έχει γίνει στο παρελθόν προσδιορισμός της δραστικότητας της PLDδ, παρά μόνο μετά από κλωνοποίηση [50].

Στο σχήμα 25 φαίνονται οι μεταβολές της ισομορφής αυτής, σε σύγκριση με τη δραστικότητα δείγματος ελέγχου. Μετά τον τραυματισμό παρατηρείται, όπως αναμενόταν, ενεργοποίηση της PLDδ τόσο τοπικά όσο και συστηματικά. Εν τούτοις, η αύξηση αυτή στα ατραυμάτιστα φύλλα είναι εντονότερη, με μεγαλύτερη την αύξηση 110% στα 30 min μετά τον τραυματισμό. Όσον αφορά την τοπική απόκριση, η ενεργοποίηση της PLDδ είναι σταθερή από τα 15 min κι έπειτα, με σαφώς χαμηλότερη δραστικότητα από τη συστηματικά παρατηρούμενη. Τα παραπάνω υποδεικνύουν σαφή εμπλοκή, εκτός της PLDα, και της ισομορφής PLDδ στις αποκρίσεις στον τραυματισμό στο βαμβάκι, ιδιαίτερος δε συστηματικά και κατά τα ύστερα στάδια.



Σχήμα 25. Επίδραση τραυματισμού στη δραστικότητα PLDδ φύλλων βαμβακιού τοπικά και συστηματικά. Τραυματισμένα (τοπικά) και γειτονικά ατραυμάτιστα (συστημικά) φύλλα, από φυτά που είχαν υποστεί μηχανικό τραυματισμό για ορισμένο χρονικό διάστημα, ομογενοποιήθηκαν και κλασματώθηκαν, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους. Τα μικροσωμικά κλάσματα ελέγχθηκαν για δραστικότητα PLDδ με χρήση [³H]PtdCho ως υποστρώματος. Για τον υπολογισμό της ειδικής δραστικότητας το παραγόμενο [³H]PtdOH ποσοτικοποιήθηκε σε μετρητή σπινθηρισμού υγρών μετά από διαχωρισμό με TLC. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αυξήσεις της ειδικής δραστικότητας σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (n=4)

Η πολύ χαμηλή εγγενής δραστικότητα της PLD δ επιβεβαιώνεται και από πειράματα ελέγχου των επιπέδων έκφρασης του αντίστοιχου γονιδίου στο βαμβάκι και θα συζητηθεί σε επόμενο κεφάλαιο. Επιπλέον, η πολύ χαμηλή δραστικότητα εξαιτίας του τρόπου παρασκευής του υποστρώματος και της υψηλής ειδικής ραδιενέργειας (1750 cpm nmol⁻¹ εδώ, έναντι 50 cpm nmol⁻¹ στην περίπτωση της PLD α) κάνει τις μεταβολές που επιφέρει ο τραυματισμός στη δραστικότητα PLD δ να είναι δύσκολα ανιχνεύσιμες.

Στην κατεύθυνση αυτή, διαμορφώθηκε μέθοδος προσδιορισμού των δραστικότητων PLD (α ή δ) με χρήση φθορίζοντος (NBD-PtdCho) υποστρώματος, που, όμως, χρησιμοποιήθηκε κυρίως για τη μελέτη της προτίμησης υποστρώματος που περιγράφεται στην ενότητα 4.3.2 των Αποτελεσμάτων. Το κύριο πλεονέκτημα της νέας μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι ο υπολογισμός του παραγόμενου προϊόντος (NBD-PtdOH) γίνεται άμεσα, με μέτρηση του φθορισμού του. Πιο συγκεκριμένα, το παραγόμενο NBD-PtdOH ποσοτικοποιείται με λήψη φάσματος εκπομπής φθορισμού στα 480-600 nm και ολοκλήρωσή του, ο υπολογισμός δε της ειδικής δραστικότητας γίνεται με αντιστοίχιση του σήματος του προϊόντος σε nmol NBD-PtdOH, με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης. Δεν υπάρχει, επομένως, η ανάγκη συσχέτισης με το υπόστρωμα που είχε αρχικά προστεθεί στο μίγμα της αντίδρασης, όπως συμβαίνει στην περίπτωση χρήσης ραδιενεργού υποστρώματος για τον υπολογισμό της ειδικής ραδιενέργειας. Επιπλέον, αυξάνεται η ευαισθησία προσδιορισμού της δραστικότητας (ενώ, παράλληλα, τα φθορίζοντα υποστρώματα είναι ασφαλή στη χρήση και σημαντικά οικονομικότερα από τα ραδιενεργά).

Πραγματοποιήθηκε, λοιπόν, σειρά πειραμάτων ελέγχου της δραστικότητας PLD α μετά τον τραυματισμό με τη νέα μέθοδο, όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.8.3, με σκοπό να εφαρμοστεί στο μέλλον και για τον προσδιορισμό της σημαντικά χαμηλότερης δραστικότητας PLD δ . Η μέθοδος του *in vitro* προσδιορισμού έγινε με χρήση της φθορίζουσας (NBD-)PtdCho, ενώ προσαρμόστηκε ανάλογα η μέθοδος και για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της PLD δ (ενότητα 3.9.3). Από τα πειράματα αυτά προέκυψαν τα αποτελέσματα του πίνακα 7.

Πίνακας 7. Ειδικές δραστηριότητες PLDα μετά από τραυματισμό φύλλων βαμβακιού με χρήση φθορίζοντος υποστρώματος.

Μικροσωμικά κλάσματα από τραυματισμένα (τοπικός ιστός) και γειτονικά ατραυματίστη (συστημικός ιστός) φύλλα, μετά από 5 min τραυματισμού, ελέγχονται για δραστηριότητα PLDα με χρήση μικκυλίων NBD-PtdCho ως υποστρώματος, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους. Το παραγόμενο NBD-PtdOH διαχωρίζεται με TLC, εκχυλίζεται από την πλάκα και ποσοτικοποιείται με φθορισμομετρία ($n=3$)

ιστός	χρόνος τραυματισμού	ειδική δραστηριότητα PLDα ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
ελέγχου	0 min	$3,03 \pm 0,92$
τοπικός	5 min	$4,22 \pm 0,98$
συστημικός	5 min	$4,88 \pm 1,13$

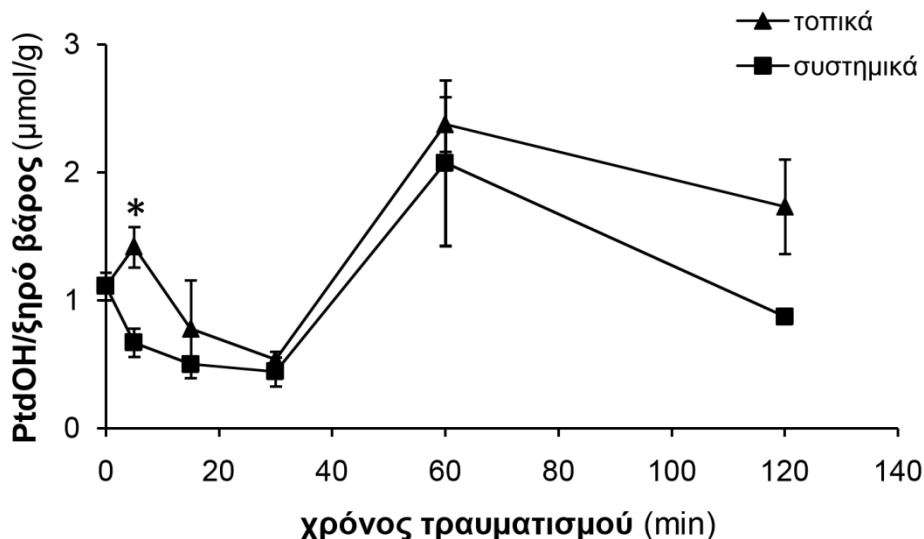
Από τα δεδομένα του πίνακα 7, η τιμή της εγγενούς δραστηριότητας της PLDα (χρόνος = 0 min), όπως αυτή προσδιορίστηκε με τη νέα φθορισμομετρική μέθοδο είναι παρόμοια με αυτή που προέκυψε από τον κλασικό ενζυμικό προσδιορισμό, με χρήση ραδιενεργού υποστρώματος (ήτοι $3,66 \pm 0,27 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Επιπλέον, εφαρμογή της μεθόδου σε πρωτεϊνικά παρασκευάσματα φύλλων βαμβακιού μετά από τραυματισμό έδειξαν την ίδια άμεση και ισχυρή ενεργοποίηση της PLDα, τοπικά και συστημικά, όπως είχε παρατηρηθεί και με την προηγούμενη μέθοδο προσδιορισμού (σχήμα 23). Καταλήγοντας, η φθορισμομετρική μέθοδος που διαμορφώθηκε στο εργαστήριο, είναι αξιόπιστη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο μέλλον για τον προσδιορισμό και των PLDδ ισομορφών, και σε συνδυασμό με εφαρμογή καταπονήσεων, όπως ο τραυματισμός.

4.2.3 Παραγωγή φωσφατιδικού οξέος κατά τον τραυματισμό

Μετά τον έλεγχο της δραστηριότητας PLD (α και δ) φύλλων βαμβακιού, όπου διαπιστώθηκε ενίσχυση και των δύο εξεταζόμενων ισομορφών ήδη από τα πρώτα λεπτά μετά τον τραυματισμό, η μελέτη συνεχίστηκε με έλεγχο του προϊόντος δράσης PLD *in vivo*. Κι αυτό γιατί τα αποτελέσματα των πειραμάτων *in vitro* ελέγχου της δραστηριότητας PLD αποτελούν μεν ισχυρή ένδειξη της επαγωγής της δράσης του ενζύμου μετά από τραυματισμό και των πιθανών σηματοδοτικών λειτουργιών που αυτό εξυπηρετεί για ρύθμιση των αποκρίσεων του φυτού τοπικά και συστημικά, ωστόσο, η εικόνα αυτή ενδέχεται να διαφέρει *in vivo*.

Για το λόγο αυτό, ακολούθησε μελέτη του ενδογενούς σχηματισμού PtdOH κατά τη διάρκεια του τραυματισμού των φύλλων βαμβακιού. Αναλυτικότερα, στα φύλλα εφαρμόστηκε μηχανικός τραυματισμός, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους, και, μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα, έγινε εκχύλιση των ολικών λιπιδίων από τοπικά και συστημικά

δείγματα φύλλων. Το PtdOH διαχωρίστηκε από τα υπόλοιπα λιπίδια με TLC και ποσοτικοποιήθηκε με προσδιορισμό φωσφόρου, ύστερα από εκχύλιση από την πλάκα. Τα αποτελέσματα των προσδιορισμών αυτών, ως $\mu\text{mol PtdOH/g}$ ξηρού βάρους του ιστού, φαίνονται στο σχήμα 26 (ξηρό βάρος φύλλου 20-30 mg).



Σχήμα 26. Επίδραση τραυματισμού στα επίπεδα PtdOH φύλλων βαμβακιού.

Από φύλλα βαμβακιού, τραυματισμένα (τοπικά) ή γειτονικά ατραυματίστη (συστημικά), εκχυλίστηκαν τα λιπίδια μετά από ορισμένο χρόνο τραυματισμού, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους. Ακολούθησε διαχωρισμός των λιπιδίων με TLC, εκχύλιση του PtdOH από την πλάκα και προσδιορισμός φωσφόρου. Τα ενδογενή επίπεδα PtdOH παρουσιάζονται ως $\mu\text{mol PtdOH/g}$ ξηρού βάρους του ιστού. Τα αποτελέσματα προέρχονται από τέσσερα δείγματα, δύο ανεξάρτητων πειραμάτων (* $P < 0,01$ ως προς το δείγμα ελέγχου)

Όπως φαίνεται στο σχήμα 26, και σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από τον έλεγχο δραστηριότητας PLDα, τα επίπεδα PtdOH αυξάνονται στα τραυματισμένα φύλλα αμέσως μετά τον τραυματισμό (σχεδόν κατά 30% σε 5 min). Κάτι τέτοιο είναι δηλωτικό του πρωτεύοντος σηματοδοτικού ρόλου που το PtdOH διαδραματίζει στα πρώτα λεπτά μετά τον τραυματισμό στα φυτά βαμβακιού. Επιπλέον, η παρατηρούμενη αύξηση των ενδογενών επιπέδων του σε 60 min πιθανότατα συνδέεται με τη δεύτερη ώση ενεργοποίησης της δραστηριότητας PLDα, όπως αυτή παρουσιάζεται στο σχήμα 23, και συντελεί στο διπλασιασμό των επιπέδων PtdOH τοπικά στο χρόνο αυτό. Η εν λόγω αύξηση των επιπέδων PtdOH διατηρείται μέχρι τις 3,5 h και μπορεί να οφείλεται, εκτός της δράσης της α ισομορφής, στην PLDδ. Η τελευταία, όπως ήδη αναφέρθηκε, δρα κατά τα ύστερα στάδια του τραυματισμού σε συνεργασία με την PLDα και συμβάλλει και αυτή στην παραγωγή του PtdOH. Φαίνεται, λοιπόν, πως αρχικά ο τραυματισμός προκαλεί ενεργοποίηση της ιδιοσυστατικής ισομορφής, PLDα, προς παραγωγή του σηματοδοτικού μορίου PtdOH κι, έπειτα, ως αποτέλεσμα της σηματοδότησης αυτής, ενεργοποιείται η πιθανόν πιο ειδική για τον τραυματισμό PLDδ, η οποία ενισχύει την παραγωγή PtdOH.

Από την άλλη πλευρά, στους συστημικούς ιστούς (ατραυμάτιστα φύλλα) η εικόνα των μεταβολών PtdOH μετά τον τραυματισμό παρουσιάζει αναλογίες με την τοπικά παρατηρούμενη, μόνο που οι αυξήσεις είναι αρκετά χαμηλότερες και απουσιάζει η ραγδαία αύξηση PtdOH στα 5 min. Συγκεκριμένα, συστημικά το PtdOH αυξάνεται άπαξ στα 60 min, χωρίς να εμφανίζει άμεση και οξεία απόκριση στον τραυματισμό. Αυτό είναι λογικό, δεδομένου ότι στα ατραυμάτιστα φύλλα δεν υπάρχει καταστροφή του ιστού, αλλά μόνο σήμα για «επερχόμενο κίνδυνο» διάρρηξης των μεμβρανών, χωρίς να είναι επί του παρόντος γνωστό πώς αυτό μεταδίδεται. Προσπάθεια εντοπισμού του γίνεται στην ενότητα 4.5 των Αποτελεσμάτων. Αξίζει να αναφερθεί πως, ενώ *in vitro* σημειώθηκε ενεργοποίηση της PLDα στα 5 min συστημικά, τα επίπεδα ενδογενούς PtdOH δεν επιβεβαιώνουν την επαγωγή της δράσης αυτής. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην ύπαρξη αυξημένης ποσότητας του ενζύμου (PLDα) συστημικά, αλλά σε κατάσταση «αναμονής». Έτσι, ναι μεν ανιχνεύεται η δραστηριότητα *in vitro*, όπου εξασφαλίζονται οι βέλτιστες συνθήκες δράσης (συγκέντρωση mM Ca²⁺, όξινο pH), ταυτόχρονα όμως, *in vivo* δεν παρατηρείται αύξηση του προϊόντος δράσης της PLDα. Επομένως, χωρίς τη μελέτη *in vivo* δεν είναι δυνατόν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα μόνο από την εικόνα *in vitro*. Όσον αφορά την παραγωγή PtdOH που σημειώνεται συστημικά στα 30 min μετά τον τραυματισμό, μπορεί με ασφάλεια να αποδοθεί τόσο στη δράση της PLDδ (σχήμα 26, 25), η οποία φαίνεται να είναι η κυρίως υπεύθυνη ισομορφή για τις συστημικές αποκρίσεις όσο και σε μεταβολές στο συνολικό μεταβολισμό των μεμβρανικών λιπιδίων, που μπορεί εξίσου να ευθύνονται για την παρατηρούμενη αύξηση μέσω *de novo* σύνθεσης PtdOH. Η τελευταία παρατήρηση πιθανόν ισχύει και για την τοπική απόκριση.

Τα πειραματικά δεδομένα τραυματισμού στο βαμβάκι μάλλον αποκλείουν και το ενδεχόμενο μετακίνησης του ίδιου του PtdOH σε γειτονικούς ιστούς (συστημικά) για μετάδοση του σήματος, αφού οι αυξήσεις του τοπικά και συστημικά συμβαίνουν ταυτόχρονα. Σε ανάλογα συμπεράσματα είχε καταλήξει και η ομάδα των Lee και συν. [232] σχετικά με τη συστημική αύξηση του PtdOH. Συνολικά, τα μέχρι τώρα αποτελέσματα στο βαμβάκι δίνουν την εικόνα ύπαρξης ενός πολύ συντονισμένου μηχανισμού απόκρισης στον τραυματισμό, που περιλαμβάνει τη δράση περισσότερων της μίας ισομορφών PLD, ενώ ανάλογα μπορεί να διαφέρει στην πάροδο του χρόνου μετά τον τραυματισμό και ο ρόλος του σχηματιζόμενου PtdOH, από σηματοδότηση μέχρι κυκλοφορία και αναδόμηση μεμβρανών, όπως άλλωστε αναφέρεται και στη βιβλιογραφία [68, 172].

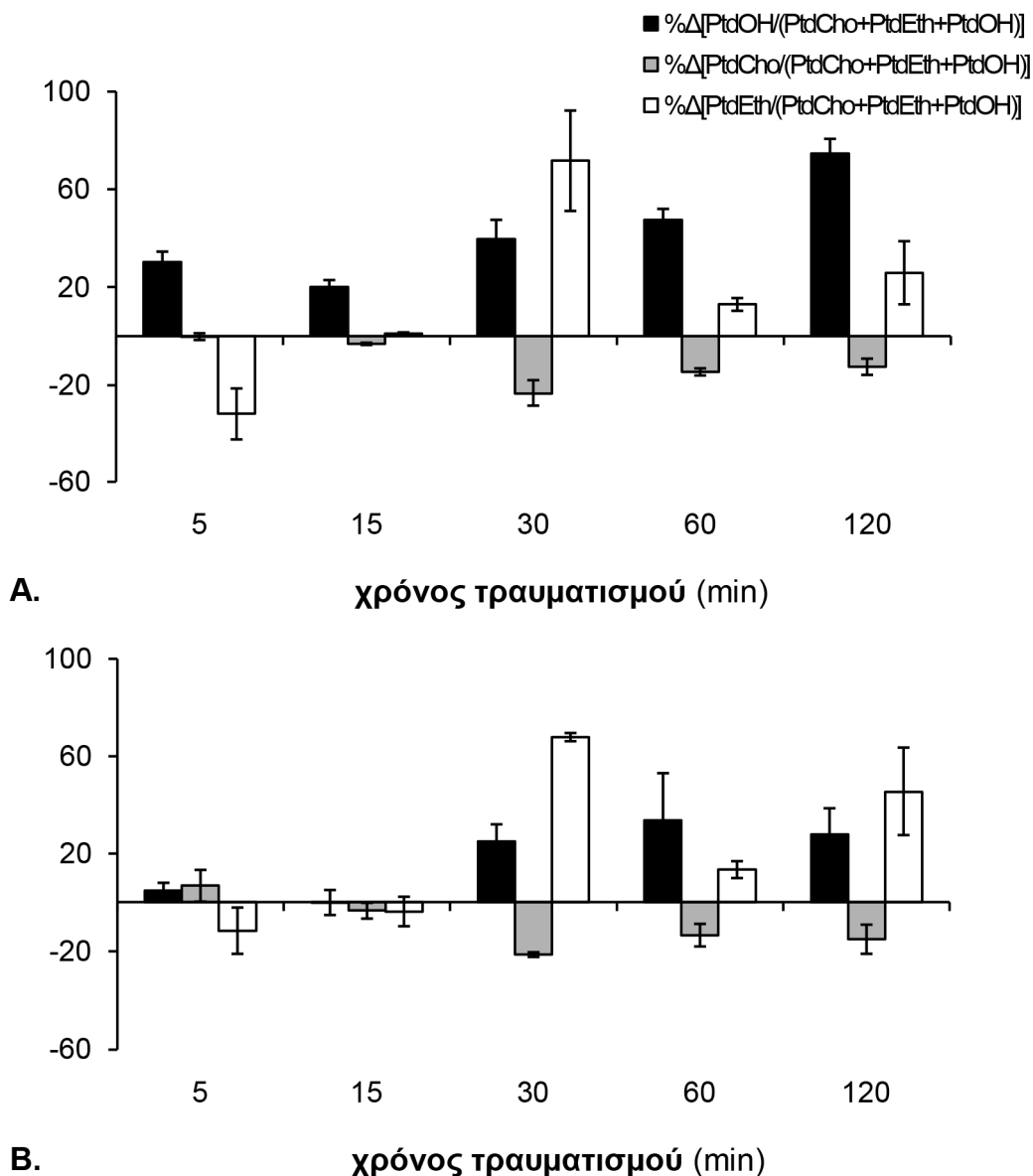
4.3 Έλεγχος εκλεκτικότητας υποστρώματος PLD μετά από τραυματισμό

Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν μέχρι στιγμής συνηγορούν στη λειτουργία των δύο ισομορφών PLD στην περίπτωση του τραυματισμού στο βαμβάκι. Οι συνολικές αποκρίσεις PLD του φυτού σε αυτό το είδος καταπόνησης μπορούν να διακριθούν με βάση: 1) το χρόνο ενεργοποίησης (συμμετοχή στα πρώτα στάδια μετά τον τραυματισμό, 5 min, ή στα ύστερα, 30 min), 2) το χώρο εμφάνισης αυξημένης δράσης (τοπικά ή συστημικά), 3) την αύξηση των επιπέδων PtdOH και τον πιθανό ρόλο του (ραγδαία και παροδική αύξηση PtdOH → σηματοδότηση ή υψηλή και διατηρούμενη αύξηση PtdOH → λειτουργικός ρόλος όπως π.χ. η αναδόμηση μεμβρανών. Ωστόσο, οι ποικίλες αυτές αποκρίσεις δε μπορούν με ακρίβεια να αποδοθούν στη μία ή την άλλη ισομορφή ή, ακόμα, σε άλλες ισομορφές για τις οποίες δεν υπάρχουν εξειδικευμένες βιοχημικές δοκιμασίες. Μία καλύτερη προσέγγιση στις συγκεκριμένες ισομορφές δίνει η μελέτη της έκφρασής τους που παρουσιάζεται στην ενότητα 4.4 των Αποτελεσμάτων.

Ένας ακόμη τρόπος διάκρισης της δράσης των PLD, που δεν έχει εξεταστεί προς το παρόν στο βαμβάκι, είναι η εκλεκτικότητά τους ως προς το υπόστρωμα. Η μελέτη της παραμέτρου αυτής μπορεί να δώσει ενδιαφέροντα αποτελέσματα, καθώς υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν πως οι διάφορες ισομορφές PLD (και ιδίως οι κοινές α και δ) έχουν συγκεκριμένες και διακριτές μεταξύ τους προτιμήσεις υποστρώματος [233, 234]. Εξάλλου, στην *A. thaliana* έχει αναφερθεί μεταβολή στην κατανάλωση φωσφολιπιδίων από την PLD με την πάροδο του χρόνου από τον τραυματισμό [45].

4.3.1 *In vivo* κατανάλωση υποστρώματος

Η μελέτη της προτίμησης υποστρώματος από την ενδογενή δραστηριότητα PLD στο βαμβάκι μετά από τραυματισμό έγινε με μελέτη των μεταβολών των επιπέδων των κύριων φωσφολιπιδίων (PtdCho, PtdEth, εν δυνάμει υποστρωμάτων PLD). Οι βασικές τιμές των φωσφολιπιδίων αυτών, καθώς και του PtdOH, δίνονται στον πίνακα 4 (ενότητα 4.1.2.2). Ελήφθησαν δείγματα φύλλων τοπικά και συστημικά σε διάφορα χρονικά διαστήματα μετά τον τραυματισμό, κατά τα γνωστά. Ακολούθησε εκχύλιση του συνόλου των λιπιδίων και διαχωρισμός τους με TLC, εκχύλιση από τη χρωματογραφική πλάκα και ποσοτικοποίηση των τριών φωσφολιπιδίων με προσδιορισμό φωσφόρου. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής φαίνονται στο σχήμα 27 ως % μεταβολές του κάθε λιπιδίου ως προς τη συνολική τιμή και των τριών φωσφολιπιδίων.



Σχήμα 27. Επίδραση τραυματισμού στην περιεκτικότητα φύλλων βαμβακιού σε φωσφολιπίδια. Από φύλλα, **(A)** τραυματισμένα (τοπικά) ή **(B)** γειτονικά ατραυμάτιστα (συστημικά), εκχυλίστηκαν τα λιπίδια μετά από ορισμένο χρόνο τραυματισμού, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους. Ακολούθησε διαχωρισμός τους με TLC, εκχύλιση των επιμέρους λιπιδίων από την πλάκα και προσδιορισμός φωσφόρου. Τα ενδογενή επίπεδα των κύριων φωσφολιπιδίων (PtdCho, PtdEth) και του PtdOH παρουσιάζονται ως % μεταβολές επί του συνολικού περιεχομένου φωσφολιπιδίων (n=4)

Από το σχήμα 27, φαίνεται πως, τοπικά, στα 5 min μετά τον τραυματισμό, μειώνονται τα επίπεδα PtdEth στα φύλλα, υποδεικνύοντας ότι η PtdEth είναι το πιθανότερο υποστρώμα της ενδογενούς δραστηριότητας PLD αμέσως μετά τον τραυματισμό. Αντίθετα, από τα 30 min και μετά η μείωση αφορά μόνο στη PtdCho, παρατηρείται δηλαδή μία μετακίνηση στην προτίμηση υποστρώματος της PLD. Η εικόνα κατανάλωσης είναι παρόμοια στα γειτονικά, ατραυμάτιστα φύλλα. Συνολικά τα αποτελέσματα αυτά, δείχνουν πως η προτίμηση υποστρώματος για την PLD μετά την εφαρμογή τραυματισμού είναι χρονοεξαρτώμενη, αφού, αν και αρχικά δείχνει να καταναλώνει PtdEth, μετά τη μισή ώρα χρησιμοποιεί

PtdCho ως υπόστρωμα. Αυτή η διαφοροποίηση ίσως οφείλεται στην ενεργοποίηση άλλης ισομορφής PLD στα 30 min, όπως προτείνουν και για το φυτό *A. thaliana* οι Pappan και συν. [47]. Τα μέχρι τώρα δεδομένα, αλλά και τα αποτελέσματα της μελέτης της έκφρασης που θα παρουσιαστούν στη συνέχεια, συνηγορούν στην εμπλοκή της ισομορφής PLD δ , παράλληλα με την α μετά τον τραυματισμό στο βαμβάκι.

Τέλος, εκτός των μειούμενων επιπέδων των κύριων υποστρωμάτων PLD μετά τον τραυματισμό, σημειώνεται και σημαντική αύξηση των επιπέδων PtdEth από τα 30 min κι έπειτα. Η ενίσχυση του φωσφολιπιδίου αυτού δε φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με τη δράση της PLD, πιθανότατα δε οφείλεται σε *de novo* σύνθεση του φωσφολιπιδίου κατά τον βασικό μεταβολισμό λιπιδίων του φυτού [81].

4.3.2 Υδρόλυση υποστρωμάτων *in vitro*

Είναι σημαντικό να διευκρινιστεί εδώ πως με την *in vivo* εξέταση των επιπέδων των φωσφολιπιδίων, και πιθανών υποστρωμάτων της PLD, συλλέγονται στοιχεία που αποτελούν ενδείξεις για τη χωρο-χρονική δράση των ισομορφών PLD. Μπορεί να δίνουν την εικόνα σύστασης των μεμβρανών σε πραγματικό χρόνο, όμως δεν μπορεί να αποδοθεί οποιαδήποτε μεταβολή παρατηρείται σε συγκεκριμένο μηχανισμό των κυττάρων. Για να γίνει κάτι τέτοιο απαιτείται μελέτη *in vitro*, η οποία μπορεί να συσχετιστεί επιτυχώς με *in vivo* αποτελέσματα και να στηρίξει κάποιες υποθέσεις.

Έτσι, στην ενότητα αυτή, στόχος είναι η διερεύνηση της προτίμησης υποστρώματος των δύο εμπλεκόμενων στον τραυματισμό ισομορφών PLD (α και δ), καθώς και η πιθανότητα αλλαγής προτίμησης στη διάρκεια του χρόνου μετά τον τραυματισμό. Τα αποτελέσματα προέρχονται από τον *in vitro* έλεγχο δραστηριότητας PLD α με χρήση είτε NBD-PtdCho είτε NBD-PtdEth, ως υποστρωμάτων. Τα πειράματα αφορούν δείγματα φύλλων, τοπικά και συστημικά, μετά από τραυματισμό (5, 15 και 30 min). Για την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιείται καμπύλη προτύπων NBD-PtdOH, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους (ενότητα 3.8.3). Οι ειδικές δραστηριότητες που προέκυψαν για την PLD α παρουσιάζονται στον πίνακα 8.

Πίνακας 8. Προτίμηση υποστρώματος της PLDα μετά από τραυματισμό στο βαμβάκι με χρήση NBD-PtdCho ή NBD-PtdEth.

Μικροσωμικά κλάσματα από τραυματισμένα (τοπικός ιστός) και γειτονικά ατραυματίστα (συστημικός ιστός) φύλλα, μετά από ορισμένο χρόνο τραυματισμού, ελέγχονται για δραστικότητα PLDα με χρήση μικκυλίων NBD-PtdCho ή NBD-PtdEth, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους. Το παραγόμενο NBD-PtdOH διαχωρίζεται με TLC, εκχυλίζεται από την πλάκα και ποσοτικοποιείται με φθορισμομετρία. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως λόγοι των αντίστοιχων δραστικότητων ($n=3$)

ιστός	χρόνος τραυματισμού	ειδική δραστικότητα PLDα NBD-PtdEth/NBD-PtdCho
ελέγχου	0 min	1,38 ± 0,31
	5 min	2,30 ± 0,57
τοπικός	15 min	1,67 ± 0,49
	30 min	1,71 ± 0,34
συστημικός	5 min	2,01 ± 0,24
	15 min	2,10 ± 0,42
	30 min	1,79 ± 0,30

Από τα παραπάνω, αποδεικνύεται πως: α) σε φυσιολογικές συνθήκες η PtdEth αποτελεί το προτιμώμενο υπόστρωμα για την PLDα στο βαμβάκι (κάτι που θα συζητηθεί και στη συνέχεια) και β) η εκλεκτικότητα του ενζύμου για τη PtdEth διατηρείται και μετά τον τραυματισμό. Εντούτοις, ενώ στα 5 min μετά τον τραυματισμό υπάρχει σαφής προτίμηση για τη PtdEth έναντι της PtdCho, στα 30 min η προτίμηση βαίνει μειούμενη και τείνει να επιστρέψει στα αρχικά επίπεδα. Παρόμοια είναι η εικόνα όσον αφορά τη συστηματική απόκριση. Η εικόνα αυτή είναι συμβατή με τα *in vivo* αποτελέσματα (σχήμα 27). Με ανάλογο σχεδιασμό πειραμάτων μπορεί να γίνει και η περαιτέρω μελέτη της προτίμησης υποστρώματος για την PLDδ.

4.4 Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης των ισομορφών PLDα και PLDδ στο βαμβάκι μετά από τραυματισμό

Από όσα πειραματικά δεδομένα έχουν ήδη παρατεθεί, εξάγεται ασφαλώς το συμπέρασμα πως ο τραυματισμός φύλλων σε φυτά βαμβακιού επιφέρει αλλαγές στη δράση περισσότερων από μίας ισομορφών PLD. Συγκεκριμένα, δείχθηκε πως η PLDα δρα άμεσα μετά τον τραυματισμό τοπικά και προκαλεί δευτερογενώς ενεργοποίηση αποκρίσεων στον τραυματισμό συστηματικά. Οι τελευταίες, όπως έδειξε η *in vitro* μελέτη δραστικότητας, περιλαμβάνουν τη δράση των ισομορφών PLDα και PLDδ προς παραγωγή PtdOH στα 30 min μετά τον τραυματισμό.

Με σκοπό την απόκτηση μιας πληρέστερης εικόνας σε ό,τι αφορά το ρόλο των PLD στο βαμβάκι μετά από τραυματισμό, η μελέτη συνεχίστηκε με πειράματα ελέγχου της έκφρασης των PLD. Όσα έχουν εκτεθεί μέχρι εδώ στηρίζουν την ενεργοποίηση και δράση δύο ισομορφών PLD, των α και δ. Ωστόσο, σύμφωνα με πρόσφατη δημοσίευση [54], το *G. hirsutum* διαθέτει πλήθος γονιδίων PLD (20 προερχόμενα από το είδος *G. raimondii* και 19 από το *G. arboreum*), τα οποία εκφράζονται παρουσιάζοντας το καθένα συγκεκριμένο προφίλ έκφρασης και διαδραματίζοντας ξεχωριστό ρόλο στην ανάπτυξη του φυτού.

Από το σύνολο των PLDα επιλέχθηκε η μελέτη της έκφρασης τεσσάρων γονιδίων που είχαν ήδη μελετηθεί και στην περίπτωση της καταπόνησης ψύχους. Στη μελέτη εκείνη, που έγινε από τους Καργιωτίδου και συν. [183], αποδείχθηκε πως τα συγκεκριμένα γονίδια PLDα έχουν αυξημένη έκφραση υπό την επίδραση ψύχους, ενώ ρυθμίζονται και από τις συνθήκες φωτισμού των φυτών. Παράλληλα, μελετήθηκε μετά την εφαρμογή τραυματισμού ο έλεγχος των δύο ισομορφών PLDδ, που είχαν αλληλουχηθεί όταν ξεκίνησε η εν λόγω μελέτη (2012). Πιο αναλυτικά, από τραυματισμένα και γειτονικά ατραυμάτιστα φύλλα φυτών βαμβακιού απομονώθηκε το ολικό RNA, σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα μετά τον τραυματισμό (5-210 min). Ακολούθησε σύνθεση cDNA με αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής και έλεγχος της έκφρασης των επιλεγέντων γονιδίων *GhPLDα* (GU569957.1, GU569956.1, GU569953.1 και GU569958.1) και *GhPLDδ* (AY138251.1 και AY138252.1) με ποσοτική Real-Time PCR. Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τις PLDα και PLDδ παρουσιάζονται στον πίνακα 9.

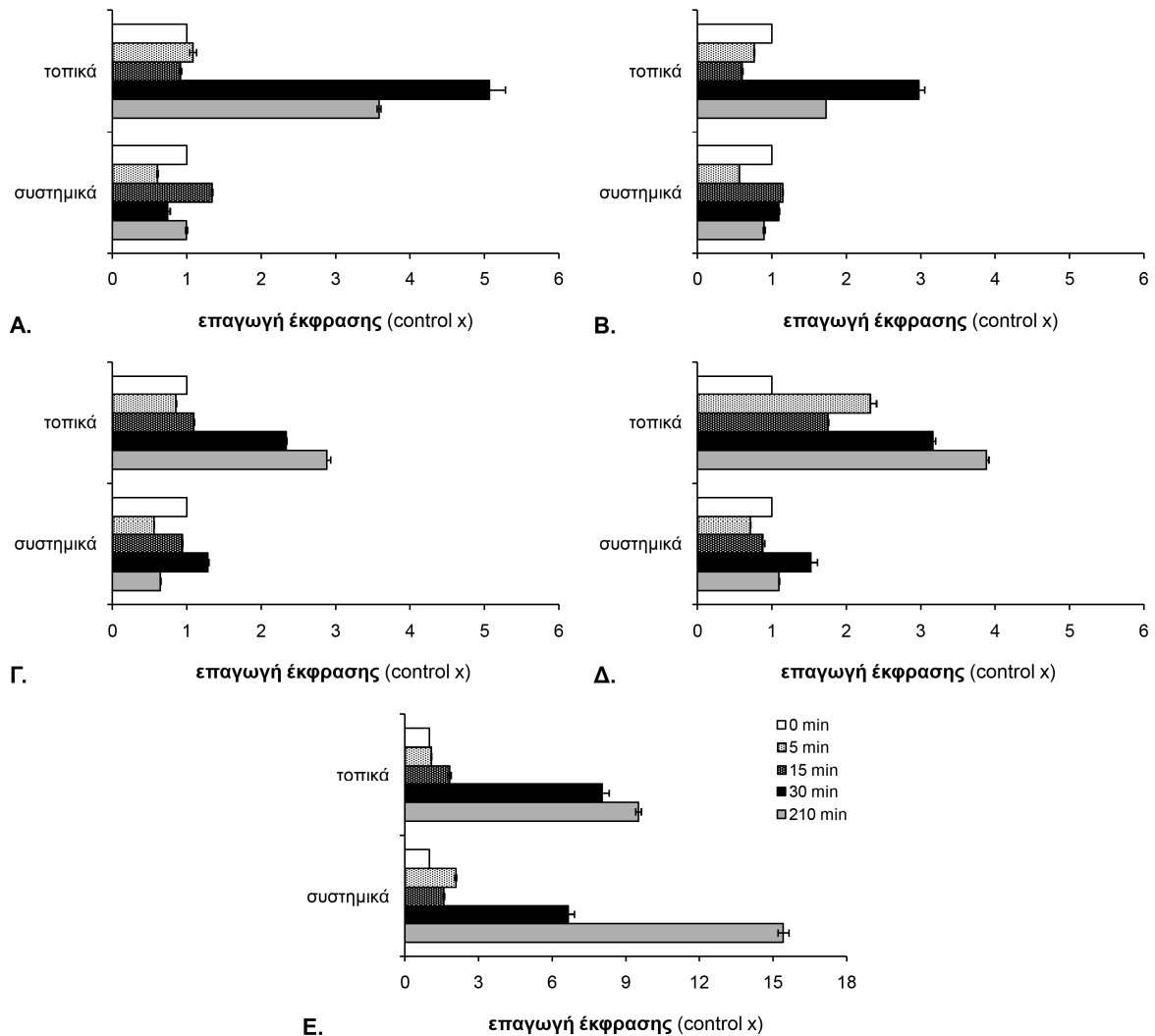
Πίνακας 9. Ζεύγη εκκινητών για τη μελέτη έκφρασης γονιδίων *GhPLDα* και *GhPLDδ*.

Στον πίνακα παρατίθενται οι αλληλουχίες, τα τεχνικά χαρακτηριστικά, το γονίδιο-στόχος και το μήκος της αλληλουχίας που ενισχύει το κάθε ζεύγος εκκινητών [183]. Οι εκκινητές για τη δ δεν έχουν ακόμα δημοσιευτεί

Γονίδιο	Κωδικός πρόσβασης	Πρόσθιος/Ανάστροφος εκκινητής (5'→3')	Ποσοστό GC (%)	Μήκος ενισχυόμενης αλληλουχίας (bp)
<i>GhPLDα</i> 1-1	GU569957.1	ACTCACTCTCACTTCTGCCTTG/	50,00	193
		GCCAATGCCAATAGTCTCCTGAACATTTG	44,83	
<i>GhPLDα</i> 1-2	GU569956.1	GCTCACTTTCACTGCTGCTTTG/	50,00	193
		GCCAATGCCAATAGTCTCCTGAACATTTG	44,83	
<i>GhPLDα</i> 2-1	GU569953.1	TTATCTTATGTTAATATCTCTCTGGC/	30,77	194
		GCCAATGCCAATAGTCTCCTGAACATTTG	44,83	
<i>GhPLDα</i> 2-2	GU569958.1	TTATCTTATGTTAATATCTCTCTGTC/	26,92	194
		GCCAATGCCAATAGTCTCCTGAACATTTG	44,83	
<i>GhPLDδ</i>	AY138251.1	CAGGTTGTTGGAACCATGTTTACAC/	44,00	199
	AY138252.1	CAGGAAAAGTAGGATTATGAAAATCATCC	34,48	

Να σημειωθεί πως, ενώ οι πρόσθιοι εκκινητές των PLDα στοχεύουν σε αλληλουχίες της 5' αμετάφραστης περιοχής (untranslated region, UTR) και είναι ειδικοί ώστε να διακρίνουν τις ισομορφές που προκύπτουν από εναλλακτικά ματίσματα των γονιδίων PLDα, ο ανάστροφος υβριδοποιείται και στις τέσσερις PLDα [183]. Επίσης, το ζεύγος εκκινητών για τις PLDδ ενισχύει και τα δύο γονίδια. Αυτό συμβαίνει λόγω μη ειδικής υβριδοποίησης στο AY138252.1, οπότε τα αποτελέσματα έκφρασης για τις PLDδ αφορούν τα επίπεδα RNA και των δύο γονιδίων. Παρ' όλα αυτά, θα μπορούσαν να εξεταστούν οι δύο PLDδ και ξεχωριστά, με αύξηση της θερμοκρασίας υβριδοποίησης στη Real-Time PCR. Κάτι τέτοιο, όμως, δεν κρίθηκε απαραίτητο στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.

Τα αποτελέσματα της ποσοτικής PCR για τα γονίδια *GhPLD* φαίνονται στο σχήμα 28:



Σχήμα 28. Επίδραση τραυματισμού στα επίπεδα έκφρασης PLDα και PLDδ φύλλων βαμβακιού. Από φύλλα, τραυματισμένα (τοπικά) και γειτονικά ατραυματίστη (συστημικά), απομονώθηκε ολικό RNA μετά από ορισμένο χρόνο τραυματισμού, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους. Ακολούθησε αντίστροφη μεταγραφή και έλεγχος των επιπέδων έκφρασης με Real-Time PCR των (Α) *GhPLDα1-1* (GU569957.1), (Β) *GhPLDα1-2* (GU569956.1), (Γ) *GhPLDα2-1* (GU569953.1), (Δ) *GhPLDα2-2* (GU569958.1) και (Ε) *GhPLDδ* (AY138251.1 και AY138252.1). (Α-Ε) Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως πολλαπλάσια των επιπέδων έκφρασης δείγματος ελέγχου (ατραυματίστη φύλλο, t=0) και αποτελούν μέσους όρους ± SD (n=3)

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του σχήματος 28, επάγεται η αύξηση της έκφρασης όλων των εξεταζόμενων ισομορφών PLD στο βαμβάκι μετά από τραυματισμό. Η αύξηση δεν είναι άμεση (κάτι που συνάδει με την υπόθεσή μας για ενεργοποίηση προϋπάρχουσας δραστηριότητας PLD με τον τραυματισμό), παρατηρείται όμως τοπικά συσσώρευση mRNA και των τεσσάρων PLDα, 30 min μετά τον τραυματισμό (3-5 φορές αύξηση), η οποία διατηρείται ως και τις 3,5 h. Ανάλογη επαγωγή της έκφρασης, ωστόσο, δεν παρατηρείται συστηματικά για τις ισομορφές α. Αντίθετα, οι PLDδ αποκρίνονται πιο ισχυρά στον τραυματισμό, τόσο τοπικά όσο και συστηματικά (8 και 6,7 φορές αύξηση, αντίστοιχα) σε 30 min μετά τον τραυματισμό. Είναι δε αξιοσημείωτα, στην περίπτωση της συστημικής

απόκρισης, τα επίπεδα συσσώρευσης mRNA των PLDδ, που καταλήγουν να είναι ενισχυμένα ως προς το δείγμα ελέγχου μέχρι και 15 φορές.

Τα παραπάνω δεδομένα αποδεικνύουν και σε επίπεδο έκφρασης την εμπλοκή τόσο των PLDα όσο και των δ στις αποκρίσεις μετά τον τραυματισμό, καθώς και την άμεση μετάδοση του σήματος στους ατραυμάτιστους ιστούς (συστημικά). Επιπλέον, φαίνεται ότι οι ισομορφές δ είναι οι κυρίως υπεύθυνες για τη συστημική απόκριση. Ως εκ τούτου, μπορεί στη δράση τους να αποδοθούν τα αυξημένα επίπεδα PtdOH που παρατηρούνται συστημικά μετά από τραυματισμό. Συνολικά, προκύπτει ότι η συνδυασμένη έκφραση των γονιδίων PLDα και PLDδ μπορεί να ερμηνεύσει επαρκώς τα επίπεδα δραστηριότητας PLD *in vitro*, καθώς και τις διακυμάνσεις στα ενδογενή επίπεδα PtdOH μετά από τραυματισμό στο βαμβάκι. Είναι δε προφανές πως οι δύο ισομορφές έχουν διαφορετική μεταγραφική ρύθμιση και, από όσα έχουν ήδη αναφερθεί, βιοχημικές ιδιότητες. Επομένως, πιθανόν, διαδραματίζουν διακριτό ρόλο στις αποκρίσεις του φυτού σε καταπονήσεις, όπως ο τραυματισμός.

4.5 Μελέτη πιθανών πορειών μεταγωγής σήματος του τραυματισμού στο βαμβάκι

Όπως εκτέθηκε και στην Εισαγωγή και αναφέρθηκε και στο Σκοπό της εργασίας (σχήμα 15), ανασκόπηση της βιβλιογραφίας σχετικά με τις αποκρίσεις φυτών σε τραυματισμό (βιοτικό ή αβιοτικό) υποδεικνύει τρεις πιθανές πορείες για την επούλωση και τη μεταγωγή του σήματος [54, 74, 75, 122, 124, 128, 134, 157, 169, 171]:

α) την επαγωγή γονιδίων στα τραυματισμένα κύτταρα προς αποκατάσταση της ρήξης της κυτταρικής μεμβράνης. Σε αυτή τη διαδικασία εμπλέκονται κυρίως πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων, συνθάσες δομικών πρωτεϊνών του κυτταρικού τοιχώματος (π.χ. συνθάση της κυτταρίνης) και οξειδάσες

β) την επαγωγή σύνθεσης ορμονών -κυρίως JA και δευτερευόντως αιθυλενίου και ABA- οι οποίες μπορεί να παίξουν ρόλο διακομιστή του σήματος του τραυματισμού στους γειτονικούς ιστούς

και

γ) την οξειδωτική έκρηξη, δηλαδή την παραγωγή ROS, με δράση τοπική (ρύθμιση κυτταρικού θανάτου), αλλά και συστημική (ταχεία μετάδοση σήματος του τραυματισμού μέσω κυκλοφορίας του H₂O₂). Στην πορεία αυτή ρυθμιστικό ρόλο παίζουν οι οξειδάσες του NADPH.

Τέθηκε, λοιπόν, το ερώτημα αν σε κάποια/ες από τις αποκρίσεις αυτές εμπλέκεται η ενεργοποίηση της PLD, καθώς καταπονήσεις στα φυτά έχει δειχθεί ότι την ενεργοποιούν [64]. Συγκεκριμένα, ο τραυματισμός επάγει τις ισομορφές α και δ στην *A. thaliana* [74] και μάλιστα η δράση της *AtPLD α 1* μετά τον τραυματισμό: α) ρυθμίζει τα μονοπάτια σχηματισμού του JA [132], που μπορεί να λειτουργεί ως μέσο διάδοσης του σήματος του τραυματισμού στους γειτονικούς ιστούς [128] και β) οδηγεί στη δημιουργία ROS, στις οποίες αποκρίνεται η *AtPLD δ* [79]. Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί πως η PLD δ συνδέεται με το δίκτυο των μικροσωληνίσκων [61], ενώ φαίνεται πως λειτουργεί και ως ανιχνευτής καταστροφών (damage control) στο φυτικό κύτταρο και επεμβαίνει στη σηματοδότηση ύστερων σταδίων της απόκρισης στην ξηρασία [65]. Έτσι, με τη συνδυασμένη δράση των δύο ισομορφών φαίνεται ότι εξασφαλίζεται η μετάδοση του σήματος και η πιθανή επούλωση του τραύματος. Με βάση τα παραπάνω, φαίνεται πιθανό τα μονοπάτια σύνθεσης JA και ROS να εμπλέκονται στη μετάδοση του σήματος της PLD συστημικά [128], ενώ οι συνθάσεις της κυτταρίνης αναφέρονται ως καταληκτικός στόχος του δρόμου του JA και επιδιορθώνουν βλάβες στο κυτταρικό τοίχωμα [151, 152].

Με βάση τα παραπάνω, έγινε στην παρούσα εργασία επιλογή συγκεκριμένων γονιδίων προς εξέταση, με γνώμονα το ρυθμιστικό ρόλο που επιτελούν οι εκφραζόμενες από αυτά πρωτεΐνες στις πορείες που ήδη περιγράφηκαν. Τα γονίδια στα οποία καταλήξαμε είναι τα εξής:

(α) Οι λιποξυγενάσες (και κυρίως η LOX2). Είναι ρυθμιστικά ένζυμα της βιοσυνθετικής πορείας του JA, για το οποίο υπάρχουν αναφορές από άλλα φυτά πως εμπλέκεται στην απόκριση και τη μετάδοση σημάτων κατά τον τραυματισμό [74, 75].

(β) Η οξειδάση του NADPH. Συμμετέχει στην παραγωγή ROS μετά τον τραυματισμό [235] και κατά την αναδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος [175].

(γ) Η συνθάση της κυτταρίνης (CeS). Είναι γνωστό πως οι πολυσακχαρίτες μεταφέρονται στο κυτταρικό τοίχωμα με εξωκύτωση λείων κυστιδίων από τη συσκευή Golgi, η μεμβράνη τους ενσωματώνεται στο πλασμόλημμα και το περιεχόμενο προωθείται στον αποπλάστη. Με αυτό το μηχανισμό πιθανολογείται πως μεταφέρεται και η κυτταρίνη στο σημείο του τραυματισμού και επουλώνει το κυτταρικό τοίχωμα μετά τον τραυματισμό. Επιπλέον, η δράση του ενζύμου αυτού ρυθμίζεται από το δίκτυο των μικροσωληνίσκων, όπου εντοπίζεται η αποκρινόμενη στον τραυματισμό PLD δ [127]. Επομένως, είναι πιθανόν η ισομορφή αυτή να ρυθμίζει και τη δράση της συνθάσης.

4.5.1 Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων λιποξυγενάσης, οξειδάσης του NADPH και συνθάσης της κυτταρίνης μετά τον τραυματισμό

Μετά τη βιβλιογραφική μελέτη, που οδήγησε στην επιλογή εξέτασης συγκεκριμένων πορειών απόκρισης στον τραυματισμό, μέσω τριών αντιπροσωπευτικών γονιδίων (λιποξυγενάση, οξειδάση του NADPH και συνθάση της κυτταρίνης), επόμενο βήμα αποτέλεσε η *in silico* αναζήτηση αντίστοιχων γονιδίων στο *G. hirsutum*.

Δεδομένου ότι η αλληλούχιση του γονιδιώματος του *G. hirsutum* δεν είχε ολοκληρωθεί όταν ξεκίνησε η *in silico* μελέτη (Μάρτιος 2013) δεν υπήρχε κάποια επίσημη ιστοσελίδα με συγκεντρωμένες τις αλληλουχίες γονιδίων και πρωτεϊνών του *G. hirsutum*. Γι' αυτό, μετά από εκτενή αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων plantGDB.org [202] και cottondb.org [203] και σύγκριση των αποτελεσμάτων καταλήξαμε στη χρήση της πλέον ενημερωμένης, όπως αποδείχθηκε, βάσης δεδομένων του NCBI [200], όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.10.

Πιο αναλυτικά, αναζητώντας "lipoxygenase" στο NCBI-nucleotide με χρήση του αριθμού ταυτότητας (taxon id) του *G. hirsutum* (ενότητα 3.10) βρέθηκαν 2 αποτελέσματα λιποξυγενασών με αριθμό πρόσβασης (accession number): AF361893.4 (LOX1) και JF967645.1 (LOX2), ενώ blast (tblastn) των εκφραζόμενων πρωτεϊνών τους (AAK50778.4 και AEI71780.1, αντίστοιχα) έδειξε υψηλή ομολογία (55-71%) με τις LOX1 (NM104376.2) και LOX5 (NM113137.3) του φυτού-μοντέλου *A. thaliana*, όχι όμως με τη AtLOX2.

Ανάλογα, έγινε η αναζήτηση στο NCBI-nucleotide αλληλουχίας οξειδάσης του NADPH ("NADPH oxidase"). Το αποτέλεσμα ήταν ένα και μόνο EST με αριθμό πρόσβασης DT049218. Τέλος, η αναζήτηση για συνθάση της κυτταρίνης ("cellulose synthase") στο βαμβάκι έδωσε 44 αποτελέσματα. Σκοπός, ωστόσο της μελέτης μας ήταν η εξέταση των επιπέδων έκφρασης αντιπροσωπευτικού γονιδίου από το κάθε πιθανό μονοπάτι απόκρισης στον τραυματισμό. Για το λόγο αυτό, ως κριτήριο επιλογής χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία της καταλυτικής υπομονάδας της συνθάσης της κυτταρίνης της *A. thaliana* (AF027174.1), η οποία σύμφωνα με αναφορές ρυθμίζει τις αποκρίσεις του φυτού στον τραυματισμό [75, 153]. Μετά και από blast (tblastn) της συγκεκριμένης αλληλουχίας προέκυψαν από τη βάση του NCBI δύο αλληλουχίες συνθάσης του *G. hirsutum* ομόλογες με αυτή της *A. thaliana* οι AF150630.2 και JQ345697.1. Η πρώτη καταχωρήθηκε το 2000 και είχε μήκος 3723bp, ενώ η δεύτερη το 2013 και αριθμούσε 3775bp. Ευθυγράμμιση των δύο -νουκλεοτιδικών και αμινοξικών- αλληλουχιών έδειξε μικρές διαφορές μεταξύ τους, που εντοπίζονται κυρίως στις πρώτες βάσεις ή κατάλοιπα, αντίστοιχα (σχήμα 29).

gi | 6446577 | gb | AAD39534.2 | MESEGDIGGKPMKNLGGQTCQICGDNVGNKNTDGDFFIACNICAFVPCRCYCYEYERKDGNO
gi | 376315430 | gb | AFB18638.1 | M DATADS-VAKSGKIGGQVCQICSDNVGSNADGESFVACHICAFVPCRCYCYEYERKDGTO
*:. * :*:*.***.***.*:*. *:*.*.*****.***.*

gi | 6446577 | gb | AAD39534.2 | SCPQCKTRYKWKQKSPAILGDRETGGDADDGASD-FIYSENQEQKQKLAERMQGWNAKYG
gi | 376315430 | gb | AFB18638.1 | SCPQCKTKYKRHKGSPAIGGEEVEDAVANNVANNSNQTSRTQGEYKKAERTLSWDTNYS
*****:* :***** *:. * :*: *:. *..* : * *** .*:***.

gi | 6446577 | gb | AAD39534.2 | RGEDVGAPTYDKEISHNHIPLLTSGQEVSGELSAASPERLSMASPGV-AGGKSSIRVVDP
gi | 376315430 | gb | AFB18638.1 | RVSDMAPPIDYDKEVPLNHI PFLTNGSSVSGELSAASPSRTSMAS PESGIRGKGNIRLVDP
* .*: . * ****: ****:*.*..*****.* ***** *..*:*:***

gi | 6446577 | gb | AAD39534.2 | VREFGSSGLGNVAKKERVGDGWMKQEKNTVPMSTCQATS-ERGLGDI DASTDVLVDDSQL
gi | 376315430 | gb | AFB18638.1 | AREFGSLGFGNVAKKERVGDGWMKQEKNTVPMSTCQATS-ERGLGDI DASTDVLVDDSQL
.***** * :*****:*****.* ****:*..* * ** * :*****:*** *

gi | 6446577 | gb | AAD39534.2 | NDEARQPLSRKVSVSSSKINPYRMVII LRLVILCIFLHYRITNPVFNAYALWLVISVCEI
gi | 376315430 | gb | AFB18638.1 | NDEARQPLSRKVSIPSSRINPYRMVIVLRLVILSIFLHYRITNPVFNAYALWLVISVCEI
*****:***:*****:*****.*****.*****.*****.*****.*****

gi | 6446577 | gb | AAD39534.2 | WFAISWILDQFPKWLVPVNRETYLDRLALRYDREGPESELAAVDIFVSTVDPLKEPPLVTA
gi | 376315430 | gb | AFB18638.1 | WFAISWILDQFPKWLVPVNRETYLDRLALRYDREGPEPYQLAAVDIFVSTVDPLKEPPLVTA
*****:***:*****:*****.*****.*****.*****.*****.*****

gi | 6446577 | gb | AAD39534.2 | NTVLSILAVDYPVDKVCYVSDDGAAMLTFEALSETSEFARKWVPFCKKYNI EPRAP EWY
gi | 376315430 | gb | AFB18638.1 | NTVLSILAVDYPVDKVCYVSDDGAAMLTFEALSETSEFARKWVPFCKKYNI EPRAP EWY
*****:***:*****:*****.*****.*****.*****.*****.*****

gi | 6446577 | gb | AAD39534.2 | FAQKIDYLDKVKVQTSFVKDRRAMKREYEEFKVRINGLVAKAQKVP EEGWIMQDGTWPWPGN
gi | 376315430 | gb | AFB18638.1 | FALKIDYLDKVKVQDFVKERRAMKREYEEFKVRINGLVAKAQKVP EEGWIMQDGTWPWPGN
** ***** .*:*****.*****.*****.*****.*****.*****

gi | 6446577 | gb | AAD39534.2 | NTRDHPGMIQVFLGQSGGLDAEGNELPRLVYVSREKRPGFQHHKAGAMNALVRVSAVLT
gi | 376315430 | gb | AFB18638.1 | NTRDHPGMIQVFLGHSGGLSDGDEL PRLVYVSREKRPGFQHHKAGAMNALVRVSAVLT
*****:***:*****:*****.*****.*****.*****.*****.*****

gi | 6446577 | gb | AAD39534.2 | NGAFLNLDCDHYINNSKALREAMCFMLDPNLGKQVCYVQFPQRFQDIDRNDRYANRNTV
gi | 376315430 | gb | AFB18638.1 | NGPFLNLDCDHYINNSKALREAMCFMLDPNLGKQVCYVQFPQRFQDIDRNDRYANRNTV
** *****:*****.*****.*****.*****.*****.*****

gi | 6446577 | gb | AAD39534.2 | FFDINLRGLDGIQGFVYVGTGCVFNRTALYGYEPLKPKHKRKTGILSSLCGGSRKKS SKS
gi | 376315430 | gb | AFB18638.1 | FFDINLRGLDGIQGFVYVGTGCVFNRTALYGYEPLKPKHKRKTGILSSLCGGSRKKS SKS
*****:***:*****:*****.*****.*****.*****.*****.*****

gi | 6446577 | gb | AAD39534.2 | SKKSDSKKSGKHVDSTVPFNLEIEEGVEGAGFDEKSL LMSQMSLEKRFQGS AVFVA
gi | 376315430 | gb | AFB18638.1 | SKKDSSNKKSGKHVNSTVPIYNLEDI-EGVEGAGFDDENSHLMSQMTLEKRFQGS AVFVS
*** *.:*****:***:*****:***** *****:***:*****:*****:*****

gi | 6446577 | gb | AAD39534.2 | STLMENGGVQSATPETLLKEAIIHVISCGYEDKTDWGSEIGWIYGSVTE DILTGFKMHAR
gi | 376315430 | gb | AFB18638.1 | STLMENGGVQSATPESLLKEAIIHVISCGYEDKTDWGSEIGWIYGSVTE DILTGFKMHAR
*****:***:*****:*****.*****.*****.*****.*****.*****

gi | 6446577 | gb | AAD39534.2 | GWRSIYCMKRPAPFKGSAPINLSDRLNQVLRWALGSVEILFSRHCFIWIYGSGR LKWLER
gi | 376315430 | gb | AFB18638.1 | GWRSIYCMPLRPAFKGSAPINLSDRLNQVLRWALGSVEILFSRHCFIWIYGSGR LKWLER
***** *****:*****.*****.*****.*****.*****.*****

gi | 6446577 | gb | AAD39534.2 | FAYVNTTIYPVTAIPLLMYCTLPVAVCLLTNKFIIPQISNLASIWFI SLFLSIFATGILKM
gi | 376315430 | gb | AFB18638.1 | FAYVNTTIYPITAIPLLAYCTLPVAVCLLTGKFIIPQISNIASIWFI SLFLSIFATGILEM
*****:***:*****:***** *****:*****.*****.*****.*****.*****

gi | 6446577 | gb | AAD39534.2 | KWNGVGIDQWRRNEQFWVIGGVS AHLFAV FQGLLKVLAGIDTNTFTVTSKASDEDGDFAE L
gi | 376315430 | gb | AFB18638.1 | RWSGVGIDEWRRNEQFWVIGGVS AHLFAV FQGLLKVLAGIDTNTFTVTSKASDEDGDFAE L
:*.*****:*****.*****.*****.*****.*****.*****

gi | 6446577 | gb | AAD39534.2 | YMFKWTTLIIPPTLLIINLVGVVAGISYVINSGYQSWGPLFGKLF FAFWVI IHLYPFLK
gi | 376315430 | gb | AFB18638.1 | YMFKWTTLIIPPTLLIINLVGVVAGVSYAINSGYQSWGPLFGKLF FAFWVI IHLYPFLK
*****:***:*****:*****.*****.*****.*****.*****.*****

gi | 6446577 | gb | AAD39534.2 | GLMGRQNRPTIVVWVSI LLASIFSLWVRIDPFTTRVTPGDVEQCGINC
gi | 376315430 | gb | AFB18638.1 | GLMGRQNRMPTIVVWVAI LLASIFSLWVRIDPFTTKVTGPDVEQCGINC
***** *****:*****.*****.*****.*****.*****.*****

Σχήμα 29. Σύγκριση αμινοξικών αλληλουχιών των *GhCeS* με κωδικούς πρόσβασης AAD39534.2 και AFB18638.1. Η ευθυγράμμιση έγινε με χρήση του προγράμματος clustal omega [205]

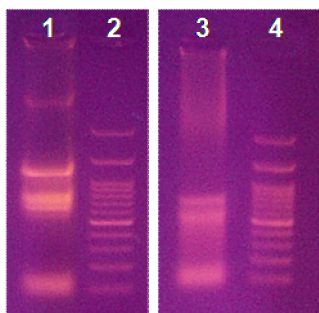
Μετά την επιλογή των γονιδίων που θα εξεταστούν, έγινε σχεδιασμός εκκινητών για τον έλεγχο της έκφρασής τους με ποσοτική Real-Time PCR. Επιλέγη, επίσης, το γονίδιο της ουβικιτίνης (Ubi7, DQ116441.1) ως γονίδιο ελέγχου. Τα ζεύγη εκκινητών που σχεδιάστηκαν για τα προς μελέτη γονίδια, καθώς και αυτό της ουβικιτίνης, που ήταν δημοσιευμένο [236], φαίνονται στον πίνακα 10.

Πίνακας 10. Ζεύγη εκκινητών για τη μελέτη έκφρασης των γονιδίων *GhLOX1*, *GhLOX2*, *GhNADPHox*. και *GhCeSA10* με ποσοτική Real-Time PCR.

Στον πίνακα παρατίθενται οι αλληλουχίες, τα τεχνικά χαρακτηριστικά, το γονίδιο-στόχος και το μήκος της αλληλουχίας που ενισχύει το κάθε ζεύγος εκκινητών, καθώς και τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά των εκκινητών για το γονίδιο ελέγχου, *GhUbi7*

Γονίδιο	Κωδικός πρόσβασης	Πρόσθιος/Ανάστροφος εκκινητής (5'→3')	Tm (°C)	Ποσοστό GC (%)	Μήκος ενισχυόμενης αλληλουχίας (bp)
Λιποξυγενάση 1 (LOX1)	AF361893.4	TTTCCGAACTGATGGAGCCC/ GGGTTAACTCCAGCCAGCAT	60,5 60,5	55,00 55,00	120
Λιποξυγενάση 2 (LOX2)-A	JF967645.1	CTGCAATCCCTGACCGTCAT/ GGAATTGCATCGGTGGTCCA	60,5 60,5	55,00 55,00	107
Λιποξυγενάση 2 (LOX2)-B	JF967645.1	TTCCCTCCAGTGAGCGACTT/ TTTTTGCTCGTCAGTGCCCTCC	60,5 60,5	55,00 55,00	121
Οξειδάση του NADPH (NADPHox.)	DT049218.1	TCAACTCCTTGGTTAGTGCTGG/ CGCCCTACATCATCCTGACG	62,1 62,5	50,00 60,00	71
Συνθάση της κυτταρίνης (CeSA10)	JQ345697.1	TGGCATTGGTCCTGTTAGAGAC/ TCGCCACTGAATCTGCTGTTG	62,1 61,2	50,00 52,38	53
Ουβικιτίνη 7 (Ubi7) [236]	DQ116441.1	GAAGGCATTCACCTGACCAAC/ CTTGACCTTCTTCTTCTGTGCTTG	64,2 64,1	54,55 44,00	198

Στη συνέχεια, αναζητήθηκε αποτελεσματικός τρόπος απομόνωσης RNA από φύλλα του *G. hirsutum*. Έτσι, εφαρμόστηκε η μέθοδος της απομόνωσης με φαινόλη [207], η οποία έδωσε καλής ποιότητας και επαρκούς ποσότητας RNA (σχήμα 30). Το μόνο μειονέκτημα είναι πως μαζί με το RNA απομονώνεται και DNA, οπότε απαιτείται η πέψη με DNάση πριν τη σύνθεση cDNA και τη Real-Time PCR.



Σχήμα 30. Ηλεκτροφόρημα ολικού RNA πριν (διαδρομή 1) και μετά (διαδρομή 3) την πέψη με DNάση. Στις διαδρομές 2 και 4 φαίνεται ο δείκτης μοριακών βαρών DNA

Στην επόμενη φάση, έγιναν δοκιμές προς επιλογή της βέλτιστης θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών στην ποσοτική Real-Time PCR. Ο έλεγχος ξεκίνησε από τους 58°C και κατέληξε στους 62°C (βέλτιστη θερμοκρασία υβριδοποίησης), όπου ελαχιστοποιείται ο σχηματισμός διμερών των εκκινητών, χωρίς να μειώνεται η ευαισθησία της υβριδοποίησης. Έγιναν καμπύλες cDNA για τα ζεύγη των εκκινητών, από τις οποίες προέκυψε πως οι βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης (τελικές συγκεντρώσεις) με τους συγκεκριμένους εκκινητές είναι: 1mM (ήτοι 20ng) cDNA, 200 nM από κάθε εκκινητή (150 nM για τους εκκινητές της LOX1) και 62°C θερμοκρασία υβριδοποίησης. Από τις καμπύλες αυτές υπολογίστηκε, επίσης, και η ικανότητα υβριδοποίησης των εκκινητών (efficiency), όπως φαίνεται στον πίνακα 11. Να σημειωθεί εδώ ότι η ιδανική ικανότητα υβριδοποίησης είναι ίση με 2,0.

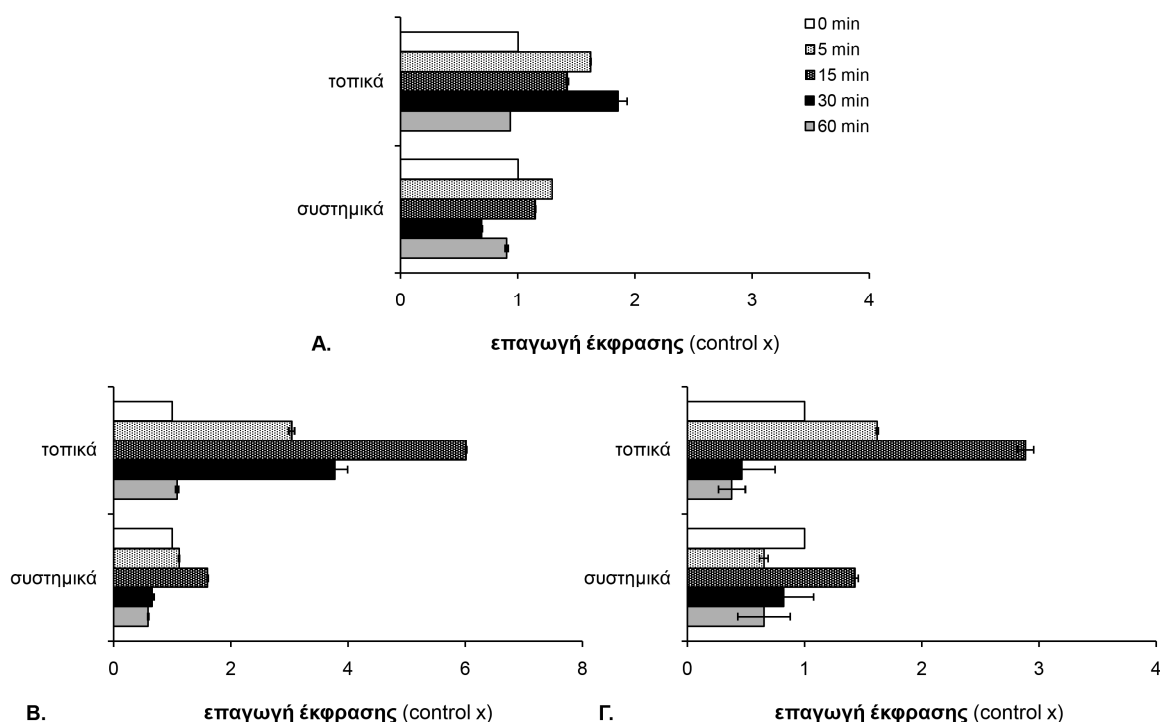
Πίνακας 11. Ικανότητα υβριδοποίησης εκκινητών

Γονίδιο	Κωδικός πρόσβασης	Πρόσθιος/Ανάστροφος εκκινητής (5'→3')	Ικανότητα υβριδοποίησης (efficiency)
Λιποξυγενάση 1 (LOX1)	AF361893.4	TTTCCGAAGCTGATGGAGCCC/ GGGTAACTCCAGCCAGCAT	1,7
Οξειδάση του NADPH (NADPHox.)	DT049218.1	TCAACTCCTTGGTTAGTGCTGG/ CGCCCTACATCATCCTGACG	2,0
Συνθάση της κυτταρίνης (CeSA10)	JQ345697.1	TGGCATTTGGTCCTGTTAGAGAC/ TCGCCACTGAATCTGCTGTTG	1,7
Ουβικιτίνη 7 (Ubi7) [236]	DQ116441.1	GAAGGCATTCACCTGACCAAC/ CTTGACCTTCTTCTTCTGTGCTTG	1,9

Στα αποτελέσματα αυτά εξαίρεση αποτελεί το ζεύγος εκκινητών που σχεδιάστηκε για τη LOX2 (LOX2-A), όπου τα διμερή δεν κατέστη δυνατόν να μειωθούν ικανοποιητικά. Παρόμοια ήταν και η εικόνα από το νέο ζεύγος εκκινητών που σχεδιάστηκε για τη LOX2

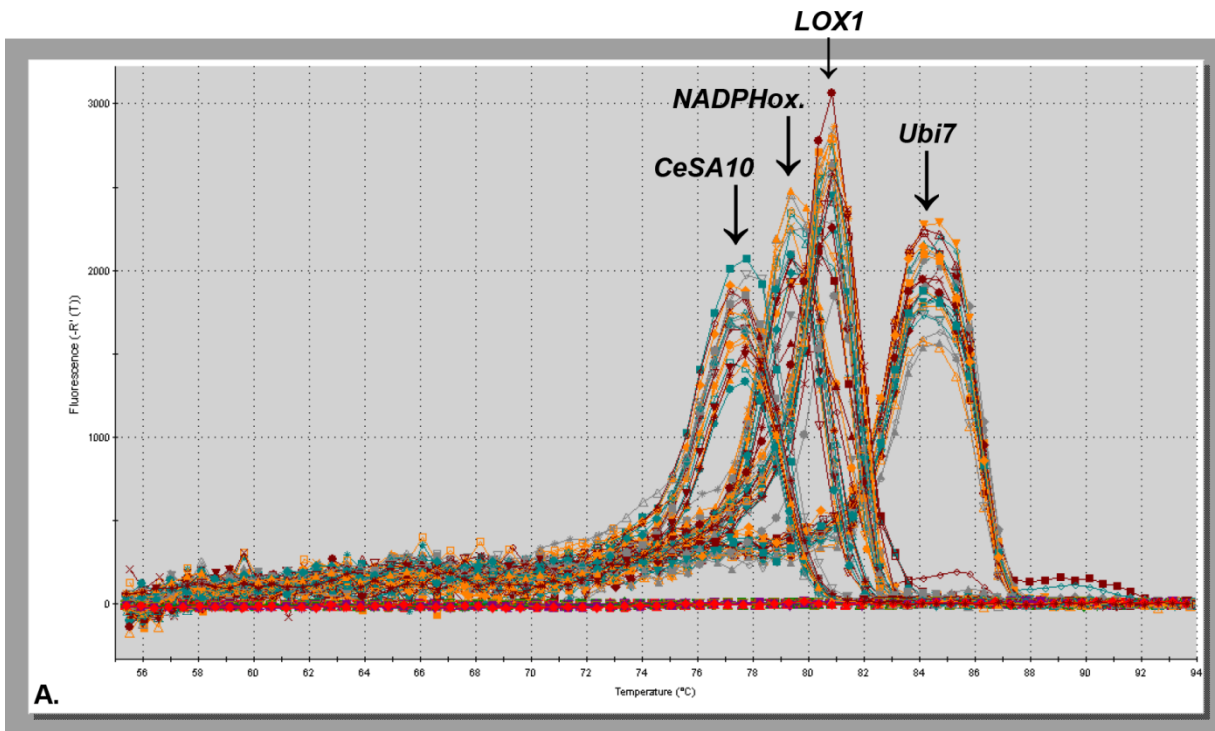
(LOX2-B), οπότε δεν έγινε τελικά η μελέτη του γονιδίου αυτού στα πλαίσια της παρούσας διατριβής.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων αυτών μετά από τραυματισμό. Πιο συγκεκριμένα, μετά από εφαρμογή τραυματισμού για ορισμένα χρονικά διαστήματα σε φυτά βαμβακιού, συλλέχθηκαν φύλλα (τραυματισμένα και γειτονικά ατραυμάτιστα) και απομονώθηκε το ολικό RNA (ενότητα 3.11.2). Μετά από αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής, στο cDNA που προέκυψε έγινε έλεγχος των επιπέδων των γονιδίων με Real-Time PCR, ενώ τα προϊόντα ταυτοποιήθηκαν με καμπύλες αποδιάταξης. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τα τρία γονίδια φαίνονται στα σχήματα 31 και 32. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η μέθοδος απομόνωσης με φαινόλη εγκαταλείφθηκε, εξαιτίας συχνών επιμολύνσεων της DNάσης με RNάσες και καταστροφή των δειγμάτων RNA. Αντί αυτής της μεθόδου, το ολικό RNA για τα συγκεκριμένα πειράματα -και στο εξής- απομονώνεται με ένα νέο kit της Macherey-Nagel (NucleoSpin RNA plus), το οποίο δίνει RNA απαλλαγμένο από γενωμικό DNA, με αποτέλεσμα να μη χρειάζεται το επιπλέον βήμα του καθαρισμού με DNάση.

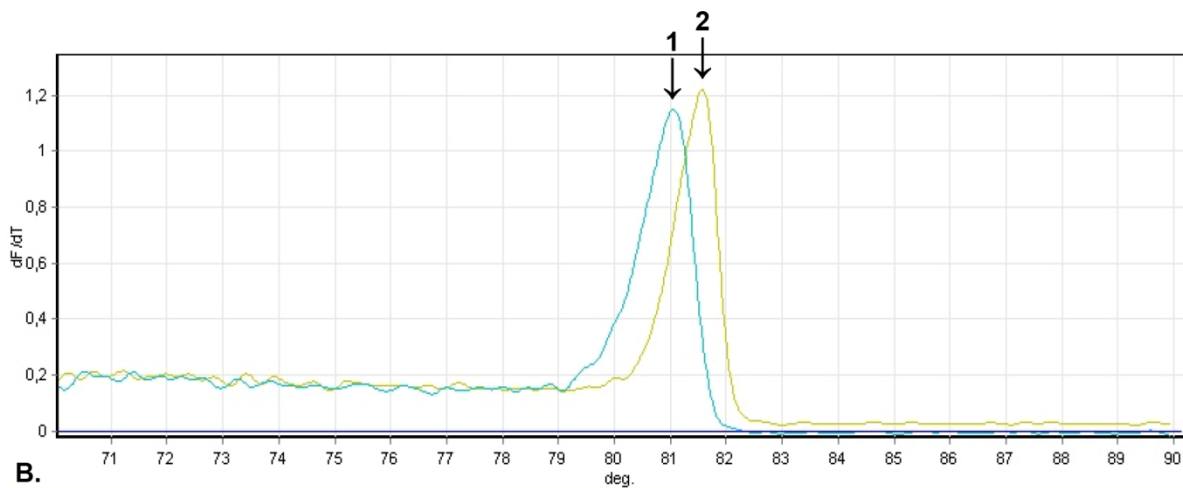


Σχήμα 31. Τοπική και συστηματική επαγωγή έκφρασης των γονιδίων: (Α) *GhLOX1*, (Β) *GhNADPHox.*, (Γ) *GhCeSA10* σε φύλλα βαμβακιού μετά από τραυματισμό.

Από φύλλα, τραυματισμένα (τοπικά) και γειτονικά ατραυμάτιστα (συστημικά), απομονώθηκε ολικό RNA μετά από ορισμένο χρόνο τραυματισμού, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους. Ακολούθησε αντίστροφη μεταγραφή και έλεγχος των επιπέδων έκφρασης με Real-Time PCR. Τα αποτελέσματα προέρχονται από τρεις διαφορετικές απομονώσεις RNA και παρουσιάζονται ως πολλαπλάσια των επιπέδων έκφρασης δείγματος ελέγχου (ατραυμάτιστο φύλλο, t=0) και αποτελούν μέσους όρους \pm S.E.M (v=6)



A.



B.

Σχήμα 32. Καμπύλες αποδιάταξης των προϊόντων Real-Time PCR.

(**A**) Οι καμπύλες αποδιάταξης (dissociation curves) προέκυψαν με χρήση του προγράμματος Mx-Pro για τα γονίδια συνθάσης της κυτταρίνης (*GhCeSA10*), οξειδάσης του NADPH (*GhNADPHox.*), λιποξυγενάσης (*GhLOX1*) και ουβικιίνης (*GhUbi7*), (**B**) Οι καμπύλες HRM αφορούν τις ενισχυόμενες αλληλουχίες δύο γονιδίων *GhPLDα* (1: GU569957.1, 2: GU569956.1), που έχουν μήκος 193bp και διαφέρουν σε 6 βάσεις

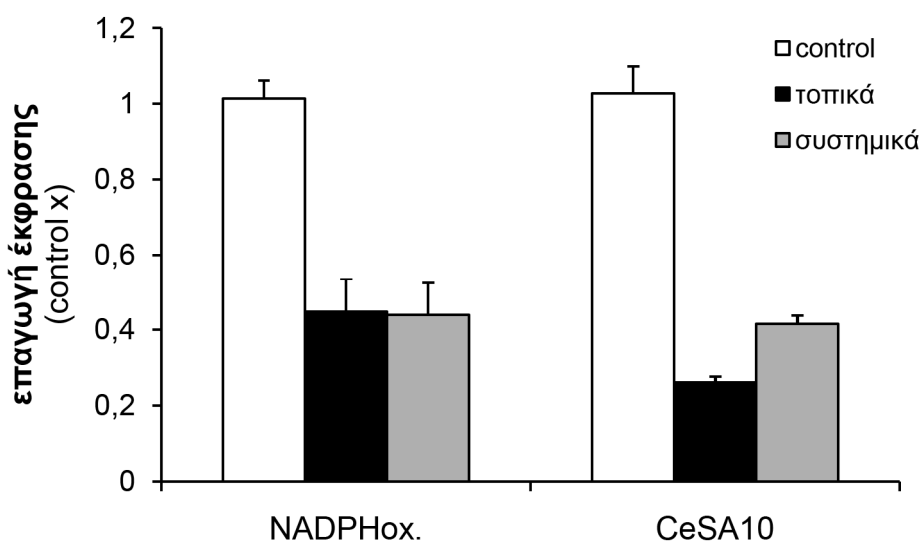
Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων από τα πειράματα αυτά δείχνουν πως ο τραυματισμός επάγει τοπικά όλα τα γονίδια που εξετάστηκαν, ήδη από τα πρώτα 5 min (σχήμα 31). Η επαγωγή μάλιστα για τα δύο από αυτά (οξειδάση του NADPH, συνθάση της κυτταρίνης) παρουσιάζεται ενισχυμένη στα 15 min (εξαπλάσια και τριπλάσια, αντίστοιχα, ενώ μειώνεται στη συνέχεια). Αντίθετα, συστηματικά δεν παρατηρείται σημαντική επαγωγή της έκφρασης σε κανένα από τα γονίδια που εξετάστηκαν.

4.5.2 Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων λιποξυγενάσης, οξειδάσης του NADPH και συνθάσης της κυτταρίνης μετά τον τραυματισμό σε συνθήκες αναστολής της δραστηριότητας PLD από 1-βουτανόλη

Σύμφωνα με τα όσα έχουν παρουσιαστεί μέχρι εδώ, οι PLD ενεργοποιούνται και οδηγούν σε παραγωγή PtdOH ήδη από τα πρώτα 5 min μετά τον τραυματισμό τοπικά. Επιπλέον, τόσο η PLDα όσο και η PLDδ εκφράζονται σε επόμενα στάδια μετά τον τραυματισμό τοπικά (και συστημικά, αλλά στην περίπτωση αυτή μόνο η δ). Στο προηγούμενο κεφάλαιο παρουσιάστηκαν, επίσης, αποτελέσματα που δείχνουν ότι, παράλληλα με την ενεργοποίηση/έκφραση των PLD, εμφανίζεται με τον τραυματισμό τοπικά αυξημένη έκφραση και γονιδίων που ανήκουν σε πορείες μεταγωγής σήματος, όπως αυτό του τραυματισμού (οξειδωτική έκρηξη, αναδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος). Ωστόσο, δεν έχει ακόμα διαπιστωθεί αν και πώς συνδέονται οι συγκεκριμένες πορείες με τη δράση της PLD στο βαμβάκι.

Για να μελετηθεί αυτό, έγινε εκ νέου έλεγχος των επιπέδων των πιθανών καθοδικών στόχων της δράσης της PLD μετά από επίδραση 1-βουτανόλης στα φύλλα. Η πρωτοταγής αυτή αλκοόλη μπορεί όντως να αποτελέσει υπόστρωμα για την PLD του βαμβακιού, καθώς μικροσωμικά κλάσματα από φύλλα εμφανίζουν *in vitro* δράση μεταφωσφατιδυλίωσης έναντι της 1-βουτανόλης σχηματίζοντας φωσφατιδυλοβουτανόλη. Εξάλλου, σύμφωνα με τον πίνακα 5, *in vivo* επίδραση με 1-βουτανόλη μειώνει τα επίπεδα του PtdOH κατά τουλάχιστον 50%. Στην προκειμένη περίπτωση του ελέγχου των επιπέδων έκφρασης γονιδίων με παράλληλη αναστολή της PLD από 1-βουτανόλη, στις δύο πλευρές φύλλων βαμβακιού εναποτίθενται φύλλα χαρτιού εμποτισμένα με διάλυμα βουτανόλης 1% και, μετά το πέρασμα 10 min, απομονώνεται το ολικό RNA. Μετά και την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής, στα cDNA που προκύπτουν ελέγχονται με ποσοτική Real-Time PCR τα επίπεδα έκφρασης των τριών γονιδίων που έχουμε επιλέξει. Η αναστολή δράσης PLD από την 1-βουτανόλη, όπως εκφράζεται από τα μειωμένα επίπεδα PtdOH, επηρεάζουν και τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων NADPHox. και CeSA10 στο βαμβάκι (σχήμα 33). Φαίνεται ότι η μειωμένη παραγωγή PtdOH προκαλεί, άμεσα ή έμμεσα, μείωση της έκφρασης και των δύο γονιδίων, τόσο σε τοπικό όσο και σε συστημικό επίπεδο. Η αναστολή, μάλιστα, της έκφρασης του CeSA10 τοπικά φτάνει το 80% (υπενθυμίζεται ότι η πρωτεΐνη CeSA10 χρησιμοποιείται για την αποκατάσταση του ιστού σε περίπτωση τραυματισμού [174]). Αυτό, εξάλλου, φάνηκε και κατά τη μελέτη των ενδογενών επιπέδων PtdOH φύλλων βαμβακιού (πίνακας 5), που μειώθηκαν κατά 50% ήδη από τα πρώτα 10 min της *in vivo* επίδρασης 1-βουτανόλης σε αυτά.

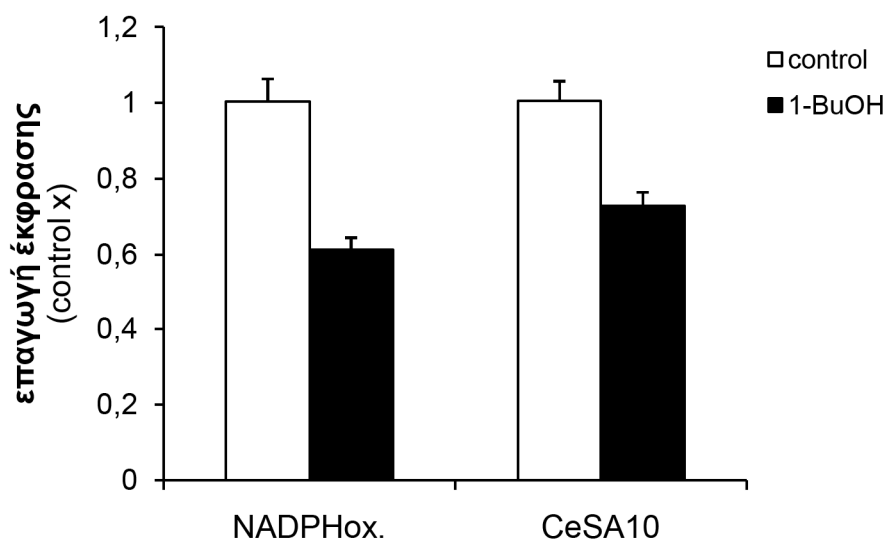
Να σημειωθεί εδώ, πως η παρουσία 1-βουτανόλης μειώνει και τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς (ουβικιτίνη). Ωστόσο, η αναστολή της έκφρασης στα παραπάνω γονίδια που εξετάστηκαν ήταν αρκετά ισχυρότερη από αυτή της ουβικιτίνης, γι' αυτό και μπορέσαμε να έχουμε τα αποτελέσματα του σχήματος 33. Αντίθετα, στην περίπτωση ελέγχου των επιπέδων έκφρασης της LOX1, η αναστολή από την 1-βουτανόλη ήταν ασθενέστερη -και συγκρίσιμη με αυτήν της ουβικιτίνης- οπότε η επεξεργασία των αποτελεσμάτων δεν μπόρεσε να αποδείξει την παρατηρούμενη (από τα C_T) αναστολή. Για το λόγο αυτό, η ουβικιτίνη θα αντικατασταθεί στο μέλλον από το γονίδιο 18S rRNA.



Σχήμα 33. Επίδραση 1-βουτανόλης στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *GhNADPHox* και *GhCeSA10* φύλλων βαμβακιού.

Από φύλλα (τοπικά και συστημικά) απομονώθηκε ολικό RNA μετά από 10 min επίδρασης με 1-βουτανόλη, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους. Ακολούθησε αντίστροφη μεταγραφή και έλεγχος των επιπέδων έκφρασης με Real-Time PCR, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους. Τα αποτελέσματα προέρχονται από δύο διαφορετικές απομονώσεις RNA και παρουσιάζονται ως πολλαπλάσια των επιπέδων έκφρασης δείγματος ελέγχου χωρίς επίδραση 1-βουτανόλης (control) ($n=3 \pm$ S.E.M.). Οι μειώσεις των επιπέδων έκφρασης για τα δύο γονίδια παρουσία 1-βουτανόλης (τοπικά και συστημικά) σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου είναι στατιστικά σημαντικές ($P<0,0005$)

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, που επιβεβαιώνουν τη σύνδεση των γονιδίων NADPHox και CeSA10 με τη δραστικότητα PLD, έγινε ανάλογο πείραμα με παράλληλη επίδραση τραυματισμού για 15 min. Συγκεκριμένα, έγινε για 10 min επίδραση με 1-βουτανόλη σε φύλλα βαμβακιού και ακολούθησε τραυματισμός τους για 15 min. Τα φύλλα ελέγχου πριν εφαρμοστεί τραυματισμός καθαρίστηκαν από την αλκοόλη, ενώ στα δείγματα για έλεγχο της αναστολής η βουτανόλη παρέμεινε και κατά τον τραυματισμό. Ακολούθησε απομόνωση του ολικού RNA, αντίστροφη μεταγραφή και έλεγχος της έκφρασης με Real-Time PCR. Τα αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης φαίνονται στο σχήμα 34.



Σχήμα 34. Επίδραση 1-βουτανόλης στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *GhNADPHox* και *GhCeSA10* φύλλων βαμβακιού μετά από τραυματισμό.

Σε φύλλα έγινε επίδραση με 1-βουτανόλη για 10 min και, ακολούθως, τραυματισμός για 15 min απουσία (control) ή παρουσία (1-BuOH) 1-βουτανόλης. Απομονώθηκε το ολικό RNA και, μετά από αντίστροφη μεταγραφή, ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης με Real-Time PCR, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους. Τα αποτελέσματα προέρχονται από δύο διαφορετικές απομονώσεις RNA και παρουσιάζονται ως πολλαπλάσια των επιπέδων έκφρασης δείγματος ελέγχου (control) ($n=3 \pm S.E.M.$). Οι μειώσεις των επιπέδων έκφρασης για τα δύο γονίδια παρουσία 1-βουτανόλης σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου είναι στατιστικά σημαντικές ($P<0,005$)

Τα επίπεδα έκφρασης του σχήματος 34, για τα γονίδια *NADPHox* και *CeSA10*, δείχνουν πως ο αναστολέας της PLD, 1-βουτανόλη, κρατά χαμηλά τα επίπεδα έκφρασης των εν λόγω γονιδίων και σε περίπτωση τραυματισμού. Αν και, θεωρητικά, ο τραυματισμός αναμένεται να αυξήσει τη δραστηριότητα, τόσο της PLDα (σχήμα 23) όσο και της PLDδ (σχήμα 25). Η παρατηρούμενη «συγκράτηση» των επιπέδων έκφρασης, ωστόσο, είναι αναμενόμενη, καθώς, σύμφωνα με τον πίνακα 5, το προϊόν δράσης της PLD παραμένει μειωμένο και μετά την απομάκρυνση της 1-βουτανόλης. Έτσι, η μείωση στην έκφραση που παρατηρείται τοπικά σε 15 min μετά τον τραυματισμό για τα γονίδια *NADPHox* και *CeSA10*, όχι απλώς δεν αναιρείται με επίδραση 1-βουτανόλης στα τραυματισμένα φύλλα, αλλά επιτείνεται καταλήγοντας σε επίπεδα έκφρασης χαμηλότερα κι από τα φυσιολογικά (basal) (πίνακας 12). Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν μία ακόμα ένδειξη για εμπλοκή της δραστηριότητας PLD του βαμβακιού σε συγκεκριμένες πορείες σηματοδότησης (οξειδωτική έκρηξη και αναδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος) μετά από τραυματισμό.

Πίνακας 12. Επίδραση του τραυματισμού στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *GhNADPHox*. και *GhCeSA10* φύλλων βαμβακιού, παρουσία και απουσία του αναστολέα της δράσης PLD, 1-βουτανόλης. Φύλλα τραυματίστηκαν για 15 min απουσία ή παρουσία 1-βουτανόλης. Απομονώθηκε το ολικό RNA και, μετά από αντίστροφη μεταγραφή, ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης με Real-Time PCR, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους. Τα αποτελέσματα προέρχονται από δύο διαφορετικές απομονώσεις RNA και παρουσιάζονται ως πολλαπλάσια των επιπέδων έκφρασης δείγματος ελέγχου (control) ($n \geq 3 \pm S.E.M.$)

εξεταζόμενο γονίδιο	επίπεδα έκφρασης μετά από τραυματισμό (control x)	
	απουσία βουτανόλης	παρουσία βουτανόλης
NADPHox.	6,01 ± 0,66	0,61 ± 0,03
CeSA10	2,88 ± 0,18	0,73 ± 0,04

Με αυτά τα δεδομένα, τα δύο εξεταζόμενα γονίδια μπορούν να διερευνηθούν περαιτέρω και με προσδιορισμό της δραστηριότητας των αντίστοιχων πρωτεϊνών, μετά από τραυματισμό, καθώς και με *in vivo* προσδιορισμό των προϊόντων δράσης τους.

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι PLD, ένζυμα που υδρολύουν τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια προς PtdOH, είναι ιδιαίτερα διαδεδομένες στα φυτά. Σήμερα, έχει πλέον αποδειχθεί ότι τα φυτά χρησιμοποιούν εκτεταμένα το σύστημα PLD/PtdOH τόσο για τη μεταγωγή περιβαλλοντικών σημάτων, όσο και για την αναμόρφωση της δομής των μεμβρανών τους. Η PLD, επομένως, παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των φυτών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ανάπτυξη των γυρεοσωλήνων του καπνού που ρυθμίζεται από το PtdOH [85]. Την κύρια πηγή πληροφοριών αποτελούν οι μελέτες στο φυτό-μοντέλο *A. thaliana*. Στο φυτό αυτό έχουν εντοπιστεί 12 ισομορφές PLD, οι οποίες έχουν καταταγεί σε 6 τάξεις (α, β, γ, δ, ε και ζ). Πολλές από αυτές έχουν εντοπιστεί και μελετηθεί και σε άλλα φυτά [10, 48, 55, 56, 58, 62], στην περίπτωση δε της όρυζας έχει αναφερθεί μια ακόμα ισομορφή, η φ, που διαθέτει στο αμινοτελικό άκρο, αντί των C2 ή PX/PH, μία σηματοδοτική αλληλουχία (SP) [52]. Οι ισομορφές α-ζ διακρίνονται *in vitro* λόγω των διαφορετικών απαιτήσεών τους σε βέλτιστο pH δράσης και συγκέντρωση Ca^{2+} , ενώ η PLDδ ενεργοποιείται και από ελαϊκό οξύ που τροποποιεί *in vitro* τη δομή του υποστρώματος [42]. Οι ισομορφές α και δ είναι οι πιο διαδεδομένες και αυτές που έχουν κυρίως μελετηθεί. Πληροφορίες για το μεγάλο οικονομικού ενδιαφέροντος καλλιεργούμενο βαμβάκι (*G. hirsutum*) και τις αποκρίσεις του σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις θα είχαν μεγάλο ενδιαφέρον. Υπενθυμίζεται ότι οι ίνες βαμβακιού είναι η επικρατέστερη φυσική πρώτη ύλη στην υφαντουργία και υπολογίζεται ότι το εμπόριό τους αποδίδει περί τα \$500 δις το χρόνο στην παγκόσμια οικονομία [180, 181]. Ωστόσο, τα δεδομένα για τις PLD στο βαμβάκι είναι μάλλον περιορισμένα. Υπάρχουν μόνο κάποιες αναφορές που συσχετίζουν το ένζυμο με ρύθμιση της σύνθεσης δευτερογενούς κυτταρικού τοιχώματος σε ίνες βαμβακιού [181] και, πρόσφατα, για την εμπλοκή σε αποκρίσεις του φυτού στο ψύχος, αποκρίσεις οι οποίες φαίνεται να ρυθμίζονται και από το φως [183].

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετάται ο ρόλος της PLD στο βαμβάκι. Στόχος είναι η μελέτη της παρουσίας και της δραστηριότητας ισομορφών της PLD του βαμβακιού και, κυρίως, η συμμετοχή τους σε πιθανή ρύθμιση λειτουργιών του φυτού ως απόκριση στον τραυματισμό, που μπορεί να προέρχεται τόσο από αβιοτικές (άνεμο, βροχή ή χαλάζι), όσο και από βιολογικές καταπονήσεις (διατροφή εντόμων από τα φύλλα του φυτού, επίδραση παθογόνων). Ειδικά η μελέτη της συστημικής απόκρισης του φυτού μπορεί να οδηγήσει σε ενδιαφέροντα συμπεράσματα για την πιθανή προσαρμογή του φυτού στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Στο πλαίσιο της διατριβής:

α) Εντοπίστηκε για πρώτη φορά και χαρακτηρίστηκε η δραστικότητα PLDa (είναι η ιδιοσυστατική ισομορφή των φυτών) σε φυτά βαμβακιού. Η δραστικότητα του ενζύμου εμφανίζεται στο μεμβρανικό κλάσμα των μικροσωμάτων, που είναι εμπλουτισμένο κατά 6,4 φορές σε σχέση με το αρχικό ομογενοποίημα. Ο χαρακτηρισμός έγινε με *in vitro* αντίδραση μεταφωσφατιδυλίωσης που έδειξε ότι η παρουσία 1% αιθανόλης στο μίγμα αντίδρασης ανέστειλε κατά 56% την υδρολυτική δράση του ενζύμου. Η τιμή είναι συγκρίσιμη με την αναστολή PLDa άλλων φυτών παρουσία πρωτοταγών αλκοολών [10]. Η προσπάθεια αναστολής της δραστικότητας PLD *in vivo* έγινε με 1-βουτανόλη, καθώς η αιθανόλη είναι πιθανό να προκαλεί αφυδάτωση του ιστού. Και στην περίπτωση αυτή, βρέθηκε αναστολή της παραγωγής του ενδογενούς PtdOH κατά 50% σε 10 min. Η αναστολή διατηρήθηκε μάλιστα και μετά την απομάκρυνση της βουτανόλης για 30 min, έφθασε δε στην περίπτωση αυτή το 80%.

β) Εφαρμόστηκε μηχανικός τραυματισμός στα φύλλα του φυτού και προσδιορίστηκαν οι *in vitro* μεταβολές στη δραστικότητα PLDa, τοπικά και συστημικά και σε διάφορα χρονικά διαστήματα μετά τον τραυματισμό. Τόσο σε τραυματισμένα (τοπικά) όσο και σε γειτονικά, ατραυμάτιστα φύλλα (συστημικά) σημειώθηκε ταχεία αύξηση της δραστικότητας PLDa μετά τον τραυματισμό, κάτι που έρχεται σε συμφωνία με παλαιότερες αναφορές, στις οποίες η ενεργοποίηση της PLD ήταν άμεση (δευτερόλεπτα-λεπτά) στα τραυματισμένα κύτταρα, αλλά και σε κύτταρα απομακρυσμένα από το σημείο του τραυματισμού [126, 237]. Ωστόσο, στην παρούσα εργασία, η τοπική ενεργοποίηση της δράσης PLDa πραγματοποιήθηκε σε δύο ώσεις (σε 5 και 30 min, αντίστοιχα) κι επέστρεψε στα βασικά επίπεδα σε 60 min. Αντίθετα, στα συστημικά φύλλα, η αύξηση της δραστικότητας PLDa ήταν παροδική και κατέληξε στα βασικά επίπεδα σε 30 min. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με προσδιορισμό των ενδογενών επιπέδων PtdOH στα ίδια χρονικά διαστήματα μετά τον τραυματισμό. Η τοπική αύξηση των επιπέδων PtdOH μετά τον τραυματισμό ήταν άμεση (σχεδόν 30% σε 5 min) και, δεδομένου ότι ανάλογη ήταν και η αύξηση που παρατηρήθηκε στη δραστικότητα PLDa, μπορεί ο σχηματισμός PtdOH να αποδοθεί στην ενεργοποίηση της PLDa. Μια δεύτερη, μεταγενέστερη αύξηση του PtdOH σε 60 min, πιθανώς συνδέεται με τη δεύτερη ώση ενεργοποίησης της PLDa ή με συνδυασμένη δράση της PLDa με άλλες ισομορφές PLD που εκφράζονται αργότερα ή, ακόμα, με αλλαγές στο συνολικό μεταβολισμό των λιπιδίων. Είναι ενδιαφέρον ότι στα ατραυμάτιστα φύλλα η αύξηση των επιπέδων PtdOH γίνεται μόνο μία φορά, στα 60 min, όταν συστημικά δεν ανιχνεύεται καθόλου δραστικότητα PLDa. Επομένως, και η συστημική

παραγωγή PtdOH θα μπορούσε να αποδοθεί σε άλλες ισομορφές PLD, με επικρατούσα την ισομορφή δ.

Καθώς έχει δειχθεί ότι, στην *A. thaliana*, η καταπόνηση είναι δυνατό να προκαλέσει μετακίνηση της PLD από το κυτόπλασμα στην πλασματική μεμβράνη [126], εξετάσαμε τη δραστικότητα του κλάσματος των μικροσωμάτων και του υπερκειμένου του πριν και μετά τον τραυματισμό. Πιθανόν και στη δική μας περίπτωση να γίνεται μετατόπιση της PLDα, καθώς με τον τραυματισμό το υπερκείμενο χάνει 20% της δραστικότητάς του, ενώ παρουσιάζεται ανάλογη αύξηση στο μεμβρανικό κλάσμα.

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας οργανώθηκε και μία νέα μέθοδος προσδιορισμού της δραστικότητας PLD με χρήση φθορίζοντος υποστρώματος. Εφαρμογή της στον προσδιορισμό της δραστικότητας PLDα πριν και μετά τον τραυματισμό έδωσε αποτελέσματα παρόμοια με αυτά της χρήσης ραδιενεργού υποστρώματος (πίνακας 7).

γ) Παρ' ότι η PLDδ έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται σε πολλών ειδών καταπονήσεις στην *A. thaliana*, λίγα είναι τα δεδομένα για τον τραυματισμό και τη συμμετοχή της PLDδ στη συγκεκριμένη απόκριση [74]. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας, σε συνδυασμό με ευρήματα από την εφαρμογή άλλων καταπονήσεων [61, 238-1], συνηγορούν στο ότι ο ρόλος της PLDδ σε σηματοδοτικές πορείες των φυτών μετά από περιβαλλοντικές καταπονήσεις είναι συμπληρωματικός αυτού της PLDα.

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής οργανώθηκε μέθοδος προσδιορισμού της PLDδ με τη συμμετοχή στο μίγμα της *in vitro* αντίδρασης ελαϊκού οξέος, μετά δε από πολλαπλές δοκιμές χρησιμοποιήθηκε εν τέλει το ελαϊκό νάτριο. Η δραστικότητα PLDδ βρέθηκε σημαντικά χαμηλότερη από αυτή της PLDα (0,20 vs. 3,66 nmol min⁻¹ mg⁻¹), ο τραυματισμός ωστόσο ενεργοποιεί και αυτή την ισομορφή. Είναι ενδιαφέρον ότι η αύξηση της δραστικότητας της PLDδ αφορά κυρίως τα συστημικά φύλλα και τα ύστερα στάδια του τραυματισμού, είναι δε στην περίπτωση αυτή διπλάσια από την αντίστοιχη τοπική ενεργοποίηση. Απ' όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη φορά που αποδεικνύεται σε επίπεδο δραστικότητας η ενεργοποίηση της PLDδ από κάποιου είδους καταπόνηση.

Συνολικά, όπως αναφέρθηκε και στα Αποτελέσματα, ενώ *in vitro* σημειώθηκε ενεργοποίηση της PLDα στα 5 min συστημικά, τα επίπεδα ενδογενούς PtdOH δεν επιβεβαιώνουν την επαγωγή της δράσης αυτής. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην ύπαρξη αυξημένης ποσότητας της PLDα στα συστημικά φύλλα, αλλά σε κατάσταση «αναμονής». Έτσι, ναι μεν ανιχνεύεται η δραστικότητα *in vitro*, όπου εξασφαλίζονται οι βέλτιστες συνθήκες δράσης (συγκέντρωση mM Ca²⁺, όξινο pH), ταυτόχρονα όμως, *in vivo* δεν

παρατηρείται αύξηση του προϊόντος δράσης της PLDα. Όσον αφορά την παραγωγή PtdOH που σημειώνεται τοπικά και συστηματικά στα 30 min μετά τον τραυματισμό, μπορεί με ασφάλεια να αποδοθεί τόσο στη δράση της PLDδ, η οποία φαίνεται να είναι η κυρίως υπεύθυνη ισομορφή για τις συστηματικές αποκρίσεις, όσο και σε μεταβολές στο συνολικό μεταβολισμό των μεμβρανικών λιπιδίων, που μπορεί εξίσου να ευθύνονται για την παρατηρούμενη αύξηση μέσω *de novo* σύνθεσης PtdOH.

Τα πειραματικά δεδομένα τραυματισμού στο βαμβάκι μάλλον αποκλείουν το ενδεχόμενο μετακίνησης του ίδιου του PtdOH σε γειτονικούς ιστούς για μετάδοση του σήματος, αφού οι αυξήσεις του τοπικά και συστηματικά συμβαίνουν ταυτόχρονα. Σε ανάλογα συμπεράσματα είχε καταλήξει και η ομάδα των Lee και συν. [232] σχετικά με τη συστηματική αύξηση του PtdOH. Συνολικά, τα μέχρι τώρα αποτελέσματα στο βαμβάκι δίνουν την εικόνα ύπαρξης ενός πολύ συντονισμένου μηχανισμού απόκρισης στον τραυματισμό, που περιλαμβάνει τη δράση περισσότερων της μίας ισομορφών PLD, ενώ ανάλογα μπορεί να διαφέρει στην πάροδο του χρόνου μετά τον τραυματισμό και ο ρόλος του σχηματιζόμενου PtdOH, από σηματοδότηση μέχρι κυκλοφορία και αναδόμηση μεμβρανών, όπως άλλωστε αναφέρεται και στη βιβλιογραφία [68, 172].

δ) Η συμμετοχή της PLDδ στη συστηματική απόκριση των φύλλων βαμβακιού επιβεβαιώθηκε και από πειράματα έκφρασης. Η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης στα τραυματισμένα φύλλα έδειξε συσσώρευση του mRNA και των δύο ισομορφών (PLDα και PLDδ) 30 min μετά τον τραυματισμό. Αυτό δείχνει ότι, πρώτον, η αύξηση δεν είναι άμεση, κάτι που συνάδει με την υπόθεσή μας για αρχική (στα 5min) ενεργοποίηση προϋπάρχουσας δραστηριότητας PLDα με τον τραυματισμό. Η εν συνεχεία νέα έκφραση της PLDα είναι πιθανόν υπεύθυνη για τη δευτερογενή αύξηση των επιπέδων του PtdOH στα 60 min. Δεύτερον, δεν παρατηρήθηκε επαγωγή στην έκφραση των PLDα συστηματικά και μόνο η PLDδ εμφάνισε συστηματικά σταθερά υψηλή έκφραση. Έτσι, θεωρούμε την ισομορφή αυτή ως την κυρίως υπεύθυνη για την παραγωγή PtdOH που παρατηρήθηκε μετά τον τραυματισμό συστηματικά. Είναι προφανές πως οι δύο ισομορφές διαφέρουν ως προς τη μεταγραφική τους ρύθμιση, όπως και ως προς τις βιοχημικές τους ιδιότητες. Επομένως, αναμένει κανείς οι PLDα και PLDδ να διαδραματίζουν διακριτό ρόλο στις αποκρίσεις των φυτών *G. hirsutum* στις καταπονήσεις.

ε) Παράλληλα με τον προσδιορισμό των επιπέδων του ενδογενούς PtdOH στη διάρκεια του τραυματισμού, έγινε προσδιορισμός και των επιπέδων των δύο κύριων μεμβρανικών λιπιδίων των φύλλων του βαμβακιού (PtdCho και PtdEth, 54,0 και 40,3% του συνόλου των λιπιδίων, αντίστοιχα). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η PtdCho, που κυρίως

χρησιμοποιείται και στην παρούσα εργασία ως *in vitro* υπόστρωμα της PLDα, αποτελεί ένα από τα κύρια υποστρώματα της PLD. Έχει, ωστόσο, βρεθεί πως η PtdEth και η PtdGro είναι εξίσου καλά υποστρώματα για τις ιδιοσυστατικές PLD [45, 47]. Κατά τον προσδιορισμό των ενδογενών υποστρωμάτων σε διάφορα χρονικά διαστήματα μετά τον τραυματισμό, παρατηρήθηκε μεταβολή στην προτίμηση υποστρώματος της PLD από τη PtdEth (στα 5 min, όπου σημειώθηκε 30% αύξηση στη δραστικότητα PLDα) στη PtdCho (στα 30-120 min, όπου εμφανίζει μέγιστη δράση η PLDδ). Παρόμοια εικόνα εμφανίζουν και οι συστημικές αποκρίσεις. Οι συγκεκριμένες αλλαγές στην προτίμηση υποστρώματος πιθανότατα συνδέονται με τη διαφοροποιημένη έκφραση των δύο ισομορφών PLD και δείχνουν πως η PtdCho θα μπορούσε να είναι το προτιμώμενο υπόστρωμα για την PLDδ, ενώ η PtdEth της PLDα. Το τελευταίο επαληθεύτηκε όταν διαμορφώθηκε η μέθοδος με τα φθορίζοντα υποστρώματα (NBD-PtdCho και -PtdEth) και διαπιστώθηκε όχι μόνο ενίσχυση της προτίμησης για PtdEth, έναντι της PtdCho, 5 min μετά τον τραυματισμό, αλλά και ότι, στο βαμβάκι, καλύτερο υπόστρωμα για την PLDα σε βασικές συνθήκες αποτελεί η PtdEth.

στ) Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν μέχρις εδώ υποστηρίζουν ένα μοντέλο συμμετοχής των PLD του βαμβακιού στις αποκρίσεις στον τραυματισμό σύμφωνα με το οποίο η τοπική ενεργοποίηση PLDα/αύξηση PtdOH έχει διπλή δράση: ίσως εξυπηρετεί τοπικά στην αποκατάσταση της ρήξης της πλασματικής μεμβράνης και συστημικά, μέσω της έκφρασης της PLDδ, στην αποτροπή της «διάδοσης» της καταστροφής του φυτικού ιστού [124, 242]. Σύμφωνα και με το συνοπτικό σχήμα που παρατέθηκε στο Σκοπό της διατριβής, τόσο την τοπική αντιμετώπιση του τραυματισμού, όσο και τη μεταγωγή του σήματος στα γειτονικά ατραυμάτιστα φύλλα είναι δυνατό να ρυθμίζουν οι πορείες της σύνθεσης JA, της παραγωγής H₂O₂ και της δευτερογενούς δημιουργίας κυτταρικού τοιχώματος. Επελέγη έτσι να μελετηθεί, σε συνθήκες τραυματισμού, η έκφραση της λιποξυγενάσης, της οξειδάσης του NADPH και της συνθάσης της κυτταρίνης, αντίστοιχα. Τα επίπεδα έκφρασης και των τριών γονιδίων έδειξαν ότι ο τραυματισμός επάγει τοπικά όλα τα γονίδια και μάλιστα τα επίπεδα του NADPHox. και του CeSA10 εμφανίζονται τριπλάσια και εξαπλάσια, αντίστοιχα, στα 15 min. Υπενθυμίζεται ότι το H₂O₂ μεταδίδει το σήμα συστημικά, ενώ η σύνθεση μικροϊνιδίων κυτταρίνης οδηγεί στην επούλωση του τραύματος, υπάρχουν δε βιβλιογραφικά δεδομένα που εμπλέκουν το -προερχόμενο από δράση PLD- PtdOH στην επαγωγή των γονιδίων αυτών [124, 172, 173].

Μία τελευταία σειρά πειραμάτων έδειξε ότι η *in vivo* αναστολή της δράσης PLD από την 1-βουτανόλη (πίνακας 5) επηρεάζει και τα επίπεδα έκφρασης των NADPHox. και CeSA10. Σε πειράματα δε παράλληλης επίδρασης βουτανόλης και τραυματισμού (στα οποία

αναμενόταν ο τραυματισμός να λειτουργήσει αντισταθμιστικά στην αναστολή από βουτανόλη), τα επίπεδα έκφρασης των δύο γονιδίων διατηρούνται χαμηλά. Γνωρίζοντας ότι η αναστολή της PLD από την 1-βουτανόλη παραμένει (πίνακας 5), τα προκαταρκτικά αυτά αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η δράση της PLD πιθανόν συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης των καθοδικών γονιδίων που εξετάστηκαν.

Συνοπτικά, λοιπόν, στην παρούσα διατριβή, μελετώνται ένζυμα αποκρινόμενα σε καταπονήσεις του καλλιεργούμενου βαμβακιού, ενός φυτού με μεγάλο οικονομικό ενδιαφέρον. Πιστεύουμε ότι τέτοιες μελέτες πρέπει να προηγηθούν ερευνών που αποσκοπούν στη βελτίωση της αντοχής των φυτών σε καταπονήσεις και στην ανάπτυξη ανθεκτικών ποικιλιών. Τέλος, προτείνουμε το *G. hirsutum* ως ένα φυτό πολύ κατάλληλο για διερεύνηση των ρόλων του συστήματος PLD/PtdOH κατά τις αποκρίσεις γενικότερα στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Με σκοπό τη μελέτη των PLD στο μονοκύτταρο οργανισμό *Tetrahymena thermophila*, έγινε αναζήτηση γονιδίων PLD στη βάση δεδομένων Tetrahymena Genome Database (TGD) [243, 244] και βρέθηκαν έξι γονίδια (πίνακας 13). Ανάλυση των αλληλουχιών των αντίστοιχων πρωτεϊνών *Tt*PLD έγινε στο SMART domain [245, 246] με εισαγωγή της πρωτεϊνικής αλληλουχίας σε μορφή FASTA, επιλογή της εφαρμογής “PFAM domains” → sequence SMART. Οι δομικές περιοχές των πρωτεϊνών *Tt*PLD, καθώς και οι αλληλουχίες των καταλυτικών κέντρων HKD (PLDc) παρατίθενται στους πίνακες 13 και 14, αντίστοιχα.

Πίνακας 13. Κωδικοί πρόσβασης γονιδίων και των αντίστοιχων πρωτεϊνών *Tt*PLD.

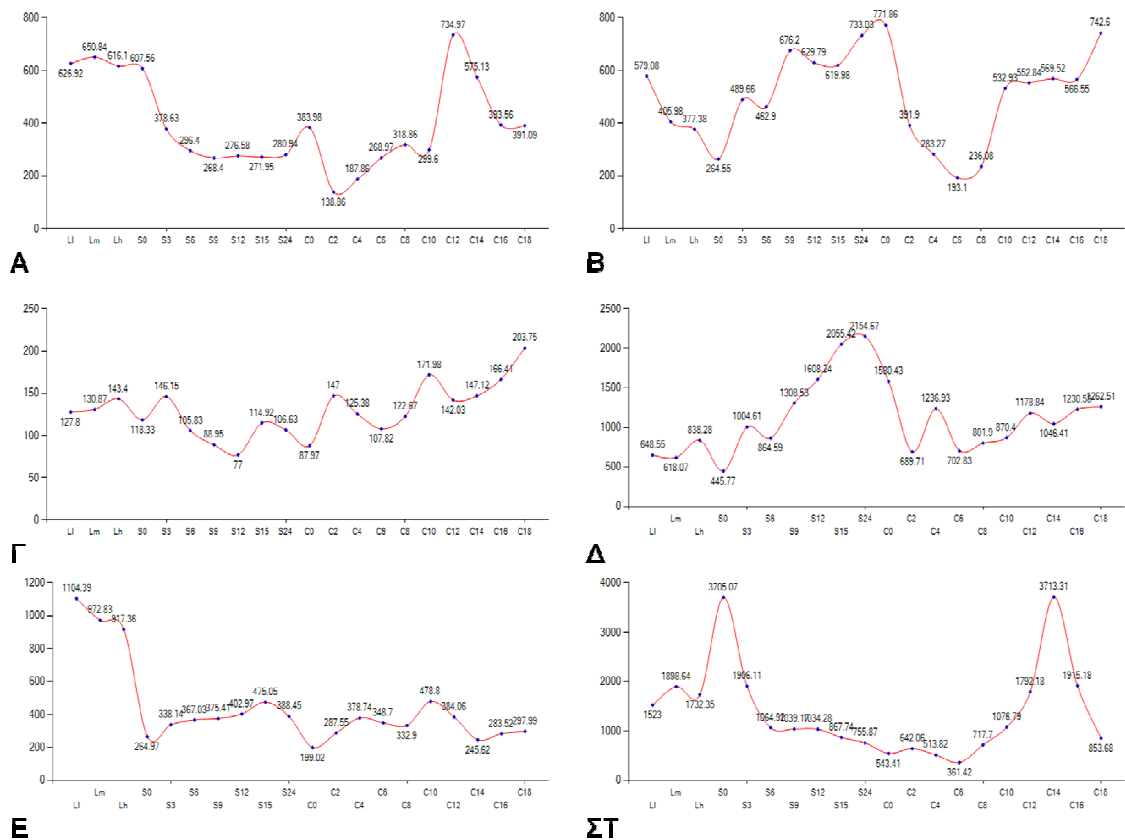
Στον πίνακα παρατίθενται και στοιχεία που αφορούν το μέγεθος και τα δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών [243-246]

Κωδικός γονιδίου	Κωδικός πρωτεΐνης	Κατάλοιπα	Δομικές περιοχές
TTHERM_00187130	XP_001008879.1	1406	Pfam:PX, 2 PLDc
TTHERM_00827020	XP_001031348.1	1375	Pfam:PX, PH, 2 PLDc
TTHERM_00327420	XP_001026505.1	1203	2 PLDc
TTHERM_00048790	XP_001014775.1	1164	PH, 2 PLDc
TTHERM_01109760	XP_001030185.1	458	2 PLDc
TTHERM_00540150	XP_001007940.1	349	PLDc

Πίνακας 14. Καταλυτικά κέντρα HKD των πρωτεϊνών *Tt*PLD [245, 246]

Κωδικός γονιδίου	Καταλυτικά κέντρα (PLDc)
TTHERM_00187130	FLWSH[E]KMVII[Q]QIGYLGGLDLCYGR (518-545) EIIYV[SKLMIV]DKFVIIGSANINDRS (1216-1243)
TTHERM_00827020	LLWSH[E]KMVVI[Q]IYGFLLGGLDLCYGR (468-495) EIIYV[SKLMIV]DNYVIMGSANINDRS (1201-1228)
TTHERM_00327420	FMWSH[E]KIVVV[Q]EVGFLGGLDLCYGR (527-554) EMVYV[SKMMII]DQIAIIGSANINDRS (1031-1156)
TTHERM_00048790	FMWSH[E]KMVVI[Q]KVGFLGGLDLCYGR (413-440) EIVYV[SKLMIV]DRVVIMGSANINDRS (990-1017)
TTHERM_01109760	FFRRH[E]KILVI[Q]NYACIGSANIEDCY (126-152) TDRLL[MKTYMV]NKHFTVGSFNDRWS (311-338)
TTHERM_00540150	KDAHM[E]HKYVVI[Q]DKMIATGSFNWTSAA (97-124)

Τέλος, βρέθηκε στη βάση δεδομένων Tetrahymena Genome Expression Database (TGED) [247] το προφίλ έκφρασης για κάθε γονίδιο PLD (σχήμα 35). Σημειώνεται πως η συγκεκριμένη ιστοσελίδα αντικαταστάθηκε το 2013 από τη νέα και πιο εμπλουτισμένη: Tetrahymena Genome Functional Database (TGFD) [248].

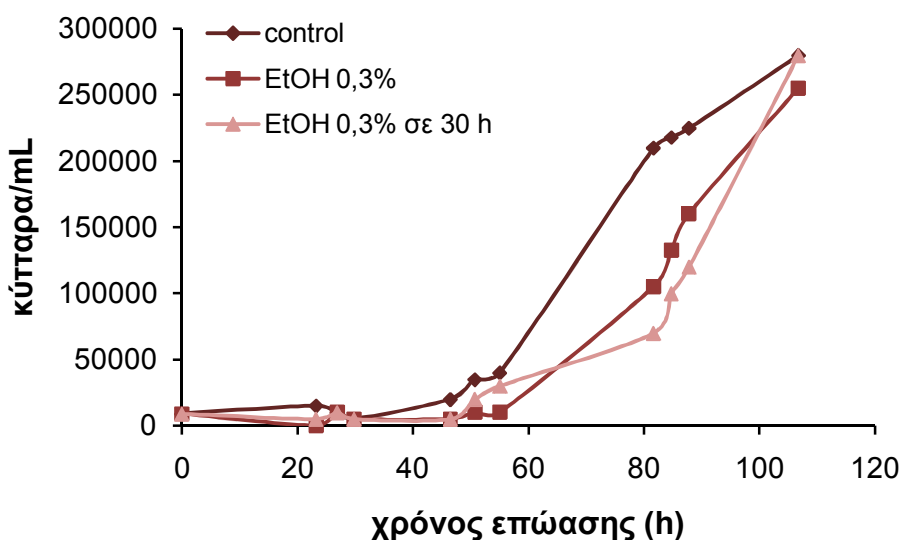


Σχήμα 35. Προφίλ έκφρασης των *TtPLD* σε συνθήκες ανάπτυξης (LI-h), αστίας (S0-24) και σύζευξης (C0-18).

Τα δεδομένα για τα γονίδια: **(Α)** THERM_00187130, **(Β)** THERM_00827020, **(Γ)** THERM_00327420, **(Δ)** THERM_00048790, **(Ε)** THERM_01109760 και **(ΣΤ)** THERM_00540150, προέρχονται από 50 δείγματα (τριπλά για L, S και διπλά για C) που επεξεργάστηκαν οι ομάδες των Goronsky και Μίαιο. Τα δείγματα ανάπτυξης, L-l, L-m, L-h, αντιστοιχούν κατά προσέγγιση σε 10^5 κύτταρα/mL, $3,5 \times 10^5$ κύτταρα/mL και 10^6 κύτταρα/mL. Τα δείγματα S_i (2×10^5 κύτταρα/mL) συλλέχθηκαν μετά από 0, 3, 6, 9, 12, 15 και 24 h αστίας. Για τη σύζευξη αναμείχθηκαν ίσοι όγκοι κυττάρων B2086 και CU428, ενώ συλλέχθηκαν δείγματα (C_i) 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 και 18 h μετά την ανάμειξη [247]

Με απώτερο στόχο το χαρακτηρισμό της *TtPLD*, απομονώθηκε ομογενοποίημα κυττάρων από καλλιέργεια *T. thermophila*, που βρισκόταν στο τέλος της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης, και προσδιορίστηκε η δραστικότητα PLD *in vitro*. Η απομόνωση έγινε μετά από απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού (Neff's: 0,25% πρωτεόζη-πεπτόνη, 0,25% εκχύλισμα ζύμης, 0,5% γλυκόζη, 1% FeSO₄-EDTA) με φυγοκέντρηση 1.000 g για 10 min και ακόλουθη έκπλυση των κυττάρων ($\sim 5 \times 10^7$ κύτταρα) με ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Το ίζημα με τα κύτταρα αναδισπάρη σε ~ 5 mL ισότονου διαλύματος και ομογενοποιήθηκε με εφαρμογή υπερήχων (6x30 s). Η δραστικότητα προσδιορίστηκε σε ομογενοποίημα με χρήση [³H]PtdCho ως υποστρώματος (ενότητα 3.8.2) και βρέθηκε ίση με $4,92 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Ανάλογος έλεγχος της δραστικότητας πραγματοποιήθηκε και μετά από επώαση στους 55°C για 5 min. Η θέρμανση ενίσχυσε τη δραστικότητα PLD στο ομογενοποίημα κατά 17%. Αντίθετα, μελέτη μετά από ομογενοποίηση καλλιέργειας που είχε υποστεί αστία για

24 h έδωσε παρόμοια επίπεδα δραστηριότητας σε σχέση με καλλιέργεια αναφοράς (βλ. σχήμα 35). Επομένως, η δραστηριότητα TtPLD είναι ανθεκτική και σε πιο υψηλές θερμοκρασίες, ενώ δε μοιάζει να συμμετέχει σε αποκρίσεις στην ασιτία. Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν πως η PLD στην *Tetrahymena* παίζει ρόλο στην ανάπτυξη. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί πως εμφανίζει μέγιστη δράση κατά την πρώιμη λογαριθμική φάση, ενώ η δράση της είναι απαραίτητη για τη μετάβαση από τη λανθάνουσα στη λογαριθμική φάση [227, 249]. Δεδομένου ότι οι αλκοόλες μπορεί να δρουν ανασταλτικά στη δράση PLD μελετήθηκε η επίδρασή τους στην ανάπτυξη καλλιεργειών *T. thermophila*. Ειδικότερα, έγινε έλεγχος με *in vivo* επίδραση αιθανόλης (EtOH) ή 1-βουτανόλης. Δοκιμάστηκε η επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων αλκοόλης (0,2, 0,3 ή 1%), ενώ η προσθήκη πραγματοποιήθηκε είτε κατά τον εμβολιασμό της καλλιέργειας (λανθάνουσα φάση ανάπτυξης) είτε 30 h μετά τον εμβολιασμό (τέλος λανθάνουσας φάσης-αρχή λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης). Η μελέτη αφορά μέτρηση των κυττάρων με αιματοκυττόμετρο και κατασκευή καμπυλών ανάπτυξης (σχήμα 36).



Σχήμα 36. Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων *T. thermophila* απουσία ή παρουσία αιθανόλης.

Κύτταρα *T. thermophila* αναπτύχθηκαν απουσία αλκοόλης (control) ή παρουσία αιθανόλης σε τελική συγκέντρωση 0,3%. Η αιθανόλη προστίθεται είτε κατά τον εμβολιασμό (EtOH 0,3%) είτε 30 h μετά τον εμβολιασμό (EtOH 0,3% σε 30 h). Στο διάγραμμα φαίνεται ο πληθυσμός των κυττάρων, όπως προέκυψε από μετρήσεις σε οπτικό μικροσκόπιο

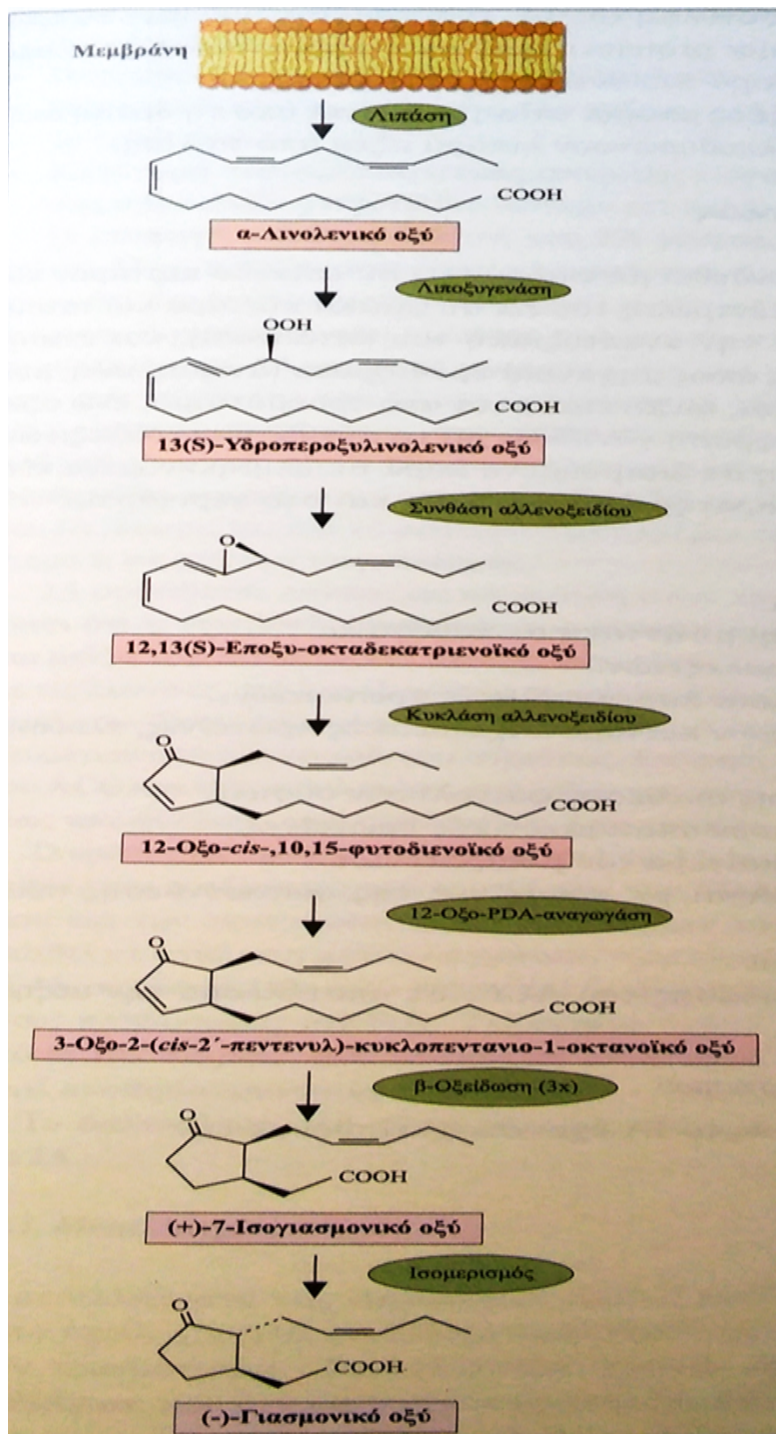
Η παρατήρηση στο μικροσκόπιο έδειξε ότι, παρουσία EtOH 0,3%, τα κύτταρα αναπτύσσονται κανονικά και μόνο μετά από ~30 h εμφανίζονται ελαφρά συρρικνωμένα (υποτονικό σοκ;). Όταν όμως προστέθηκε EtOH 0,3% 30 h μετά τον εμβολιασμό, τα κύτταρα, οπτικά, δε φαίνεται να επηρεάζονται. Σύμφωνα με τους Rasmussen και συν. [227], η δραστηριότητα PLD είναι απαραίτητη για τη μετάβαση των κυττάρων *Tetrahymena*

στη φάση του πολλαπλασιασμού (λογαριθμική φάση). Τα αποτελέσματά μας ενισχύουν το εύρημα αυτό, καθώς η αλκοόλη επιβραδύνει την ανάπτυξη της καλλιέργειας μόνο εφόσον προστεθεί τη στιγμή του εμβολιασμού. Όσον αφορά τις καλλιέργειες στις οποίες έγινε προσθήκη 1-βουτανόλης 0,2% 30 h μετά τον εμβολιασμό ή EtOH 1%, τα κύτταρα υπέστησαν ισχυρότερο σοκ. Στην περίπτωση της 1-βουτανόλης, ο πληθυσμός των κυττάρων μειώθηκε σημαντικά, ενώ σημαντικές ήταν και οι μεταβολές στο σχήμα και την ταχύτητα κίνησης των κυττάρων. Τα κύτταρα άρχισαν να επανέρχονται σε φυσιολογική κατάσταση 55 h μετά την προσθήκη 1-βουτανόλης και άρχισαν να πολλαπλασιάζονται στις ~110 h. Στην περίπτωση της EtOH 1%, δεν εμφανίζεται πολλαπλασιασμός ούτε στις 110 h.

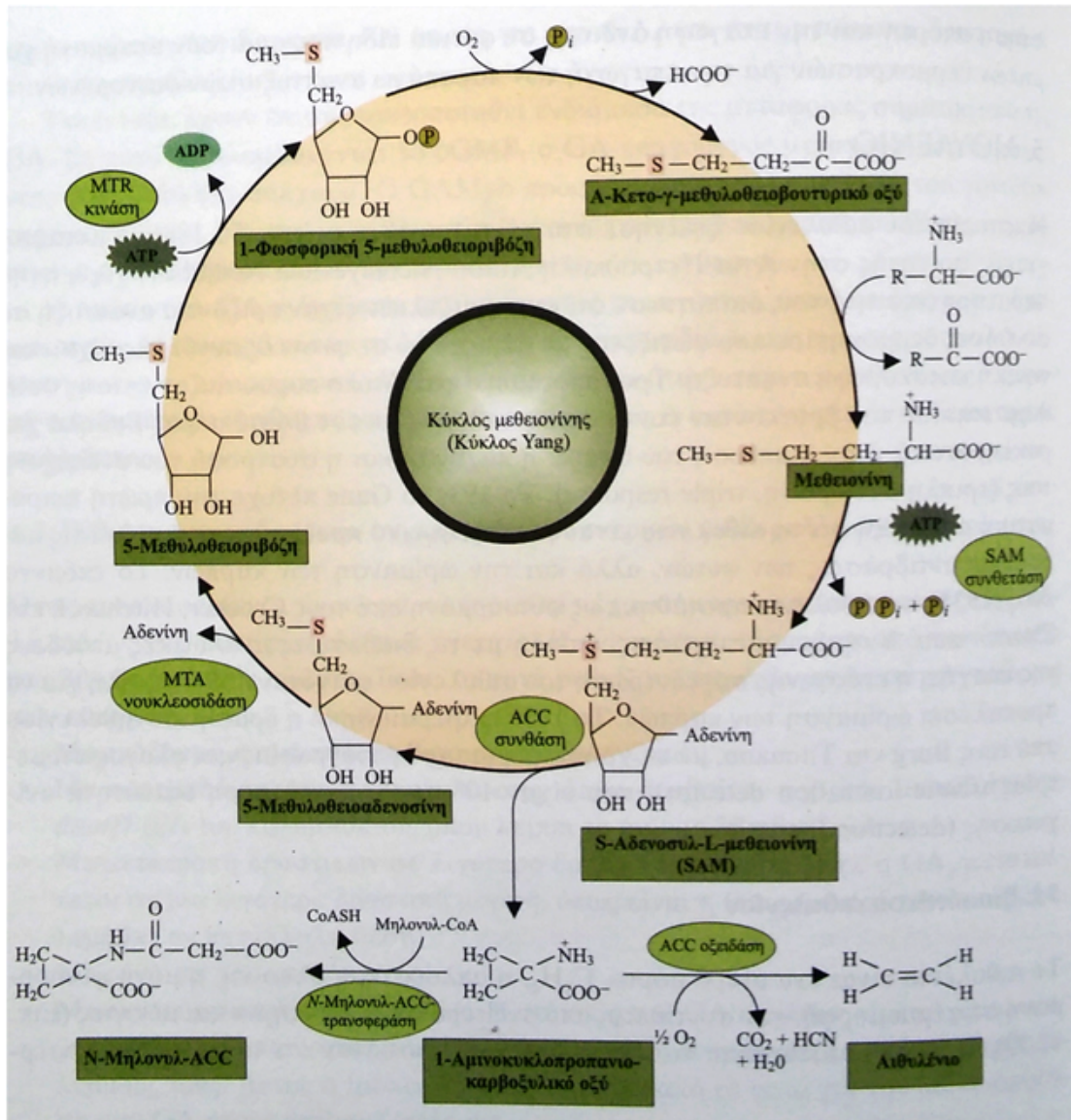
Συμπερασματικά, η προσθήκη αιθανόλης κατά τον εμβολιασμό επιδρά αρνητικά στην ανάπτυξη των κυττάρων *T. thermophila*. Η επίδραση, μάλιστα, είναι ανάλογη της συγκέντρωσης που προστίθεται. Σε περίπτωση, όμως, της προσθήκης αλκοόλης (αιθανόλης ή 1-βουτανόλης) στις 30 h, φάνηκε πως η 1-βουτανόλη αναστέλλει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ίσως όχι μόνο λόγω αναστολής της PLD, αλλά και μέσω επίδρασης και σε άλλες μεταβολικές πορείες.

Αν και η πρόθεσή μας ήταν να χρησιμοποιήσουμε τα αποτελέσματα αυτά για να προκύψουν συμπεράσματα πριν επιδράσουμε *in vivo* με 1-βουτανόλη σε φύλλα *G. hirsutum*, φαίνεται ότι οι τελείως διαφορετικοί οργανισμοί αντιδρούν διαφορετικά, π.χ. τα φύλλα του βαμβακιού δεν εμφάνισαν καμία φαινοτυπική μεταβολή.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ



Σχήμα 37. Πορεία βιοσύνθεσης ιασμονικού οξέος [128]



Σχήμα 38. Πορεία βιοσύνθεσης αιθυλενίου [128]

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Συντμήσεις και ανάπτυξή τους

ABA	αμπισισικό οξύ
ABI1	αναστολέας ABA
ACC	1-αμινοκυκλοπροπανο-καρβοξυλικό οξύ
ANSA	1,2,4-αμινο-ναφθολο-σουλφονικό οξύ
AOS	συνθάση του αλλενοξειδίου
BODIPY-	4,4-διφθορο-4-βορο-3a,4a-διαζο-s-ινδακενο-
BSA	αλβουμίνη βοδινού ορού
C2	τομέας ομολογίας της PKCa2
cDNA	συμπληρωματικό DNA
CDPK	πρωτεϊνική κινάση εξαρτώμενη από ασβέστιο
CeS	συνθάση της κυτταρίνης
CSC	σύμπλοκο συνθασών της κυτταρίνης
C _T	threshold cycle
DAG	διακυλογλυκερόλη
DEPC	διαιθυλο-πυρανθρακικό
DGL	γαλακτολιπάση DONGLE
dNTP	τριφωσφορικό δεοξυ-ριβονουκλεοτίδιο
DPPC	διπαλμιτυλο-φωσφατιδυλοχολίνη
DTT	διθειοθρεϊτόλη
EDTA	αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ
EST	Expressed Sequence Tag
HEPES	4-(2-υδροξυαιθυλο)-1-πιπεραζινο-αιθανολο-θειικό οξύ
HRM	High Resolution Melting
JA	ιασμονικό οξύ
LEA	Late Embryogenesis Abundant

LOX	λιποξυγενάση
MAP	κινάση συνδεδεμένη με μικροσωληνίσκους
MAPK	πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα
NADPH	φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (ανηγμένο)
NADPHox.	οξειδάση του NADPH
NAE	N-ακυλο-αιθανολαμίνη
NAPE	N-ακυλο-φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη
NBD-	1-παλμιτυλο-2-[6-N-{7-νιτροβενζο-2-ο-1,3-διαζολο-4-υλο}αμινο]καπρυλο-
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PDK	κινάση εξαρτώμενη από φωσφοϊνοσιτίδια
PH	τομέας ανάλογος της πλεκστρίνης (pleckstrin)
PI	φωσφοϊνοσιτίδιο
PKC	πρωτεϊνική κινάση C
PLA ₂	φωσφολιπάση A ₂
PLC	φωσφολιπάση C
PLD	φωσφολιπάση D
PMSF	φαινυλο-μεθυλο-σουλφονυλοφθορίδιο
POPOP	1,4-δισ-(5-φαινυλο-2-οξαζολο)-βενζόλιο
POX	υπεροξειδάση
PPO	πολυφαινυλοξειδάση (στο κεφάλαιο 3: 2,5-διφαινυλοξαζόλιο)
PtdCho	φωσφατιδυλοχολίνη
PtdEth	φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη
PtdEtOH	φωσφατιδυλοαιθανόλη
PtdGro	φωσφατιδυλογλυκερόλη
PtdIns	φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη

PtdInsP	φωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη
PtdInsP ₂	διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη
Ptd-p-NP	φωσφατιδυλο-p-νιτρο-φαινόλη
PtdOH	φωσφατιδικό οξύ
PtdSer	φωσφατιδυλοσερίνη
PX	τομέας ομολογίας των υπομονάδων του συμπλόκου της οξειδάσης των φαγοκυττάρων
Real-Time PCR	PCR σε πραγματικό χρόνο
ROS	ενεργές μορφές οξυγόνου
SA	σαλικυλικό οξύ
SH3	υποτομέας ομολογίας της τυροσινικής κινάσης Src3
SDS	δωδεκυλο-θειικό νάτριο
SK	σφιγγοσινική κινάση
SP	σηματοδοτική αλληλουχία
TAE	τρεις-οξικό-EDTA
TLC	χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
TOR	στόχος της ραπαμυκίνης
Tris	τρεις-υδροξυλαμινο-μεθάνιο
VSP	αποταμιευτικές πρωτεΐνες

Συντμήσεις αμινοξέων και ανάπτυξή τους

A, Ala	αλανίνη
C, Cys	κυστεΐνη
D, Asp	ασπαρτικό οξύ
E, Glu	γλουταμικό οξύ
F, Phe	φαινυλαλανίνη
G, Gly	γλυκίνη
H, His	ιστιδίνη
I, Ile	ισολευκίνη
K, Lys	λυσίνη
L, Leu	λευκίνη
M, Met	μεθειονίνη
N, Asn	ασπαραγίνη
P, Pro	προλίνη
Q, Gln	γλουταμίνη
R, Arg	αργινίνη
S, Ser	σερίνη
T, Thr	θρεονίνη
V, Val	βαλίνη
W, Trp	θρυπτοφάνη
Y, Tyr	τυροσίνη

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός όρος
aggregation	συσσωμάτωση
autopropagation	αυτοενίσχυση
caveolae	κοιλωματικά κυστίδια
chaperones	πρωτεΐνες-συνοδοί
clathrin-coated vesicle	κυστίδιο επικαλυμμένο με κλαθρίνη
clustering	συσσώρευση
constitutive	ιδιοσυστατικός
domain	τομέας
downstream target	καθοδικός στόχος
feedback	ανάδραση
membrane fission	σχάση μεμβρανών
membrane fusion	σύντηξη μεμβρανών
membrane remodeling	αναμόρφωση μεμβρανών
membrane repair	επιδιόρθωση μεμβρανών
membrane trafficking	κυκλοφορία μεμβρανών
oxidative burst	οξειδωτική έκρηξη
PtdOH-binding motif	τομέας αναγνώρισης PtdOH
recruitment	στρατολόγηση
root hair	ριζικά τριχίδια
Signal Peptide (SP)	σηματοδοτική αλληλουχία
signal transduction	μεταγωγή σήματος
stress	καταπόνηση
transphosphatidylation	μεταφωσφατιδυλίωση
vesicle trafficking	κυκλοφορία/μεταφορά κυστιδίων

Η μετάφραση των επιστημονικών όρων έγινε σύμφωνα με το «Αγγλοελληνικό Λεξικό Βιοχημείας, Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας» της ΕΕΒΜΒ (2^η Έκδοση, 2015)

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. D.J. Hanahan, and I.L. Chaikoff, A new phospholipide-splitting enzyme specific for the ester linkage between the nitrogenous base and the phosphoric acid grouping, *J. Biol. Chem.*, vol. 169, no. 3, Aug. 1947, pp. 699-705.
2. P.E. Selvy, R.R. Lavieri, C.W. Lindsley, and H.A. Brown, Phospholipase D - enzymology, functionality, and chemical modulation, *Chem. Rev.*, vol. 111, no. 10, Sep. 2011, pp. 6064-6119.
3. M. Liscovitch, M. Czarny, G. Fiucci, and X. Tang, Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family, *Biochem. J.*, vol. 345, Feb. 2000, pp. 401-415.
4. G.M. Jenkins, and M.A. Frohman, Phospholipase D: a lipid centric review, *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 62, no. 19-20, Oct. 2005, pp. 2305-2316.
5. J. Mansfeld, and R. Ulbrich-Hofmann, Modulation of phospholipase D activity in vitro, *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1791, no. 9, Sep. 2009, pp. 913-926.
6. H. Yang, and M.F. Roberts, Phosphohydrolase and transphosphatidylase reactions of two *Streptomyces* phospholipase D enzymes: covalent versus noncovalent catalysis, *Protein Sci.*, vol. 12, no. 9, Sep. 2003, pp. 2087-2098.
7. X. Wang, Multiple forms of phospholipase D in plants: the gene family, catalytic and regulatory properties, and cellular functions, *Prog. Lipid Res.*, vol. 39, no. 2, Mar. 2000, pp. 109-149.
8. T. Tanaka, T. Kida, H. Imai, J.i. Morishige, R. Yamashita, H. Matsuoka, S. Uozumi, K. Satouchi, M. Nagano, and A. Tokumura, Identification of a sphingolipid-specific phospholipase D activity associated with the generation of phytoceramide-1-phosphate in cabbage leaves, *FEBS J.*, vol. 280, no. 16, May 2013, pp. 3797-3809.
9. K.M. Eila, J.W. Dolan, and K.E. Meier, Characterization of a regulated form of phospholipase D in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. J.*, vol. 307, no. 3, 1995, pp. 799-805.
10. M. Dippe, and R. Ulbrich-Hofmann, Substrate specificity in phospholipid transformations by plant phospholipase D isoenzymes, *Phytochemistry*, vol. 70, no. 3, Feb. 2009, pp. 361-365.
11. S.A. Arisz, F. Valianpour, A.H. van Gennip, and T. Munnik, Substrate preference of stress-activated phospholipase D in *Chlamydomonas* and its contribution to PA formation, *Plant J.*, vol. 34, no. 5, Jun. 2003, pp. 595-604.

12. Y. Itabashi, and A. Kuksis, Reassessment of stereochemical configuration of natural phosphatidylglycerols by chiral-phase high-performance liquid chromatography and electrospray mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, vol. 254, no. 1, Dec. 1997, pp. 49-56.
13. R. Sato, Y. Itabashi, T. Hatanaka, and A. Kuksis, Asymmetric in vitro synthesis of diastereomeric phosphatidylglycerols from phosphatidylcholine and glycerol by bacterial phospholipase D, *Lipids*, vol. 39, no. 10, Oct. 2004, pp. 1013-1018.
14. M. Corrotte, S. Chasserot-Golaz, P. Huang, G. Du, N.T. Ktistakis, M.A. Frohman, N. Vitale, M.F. Bader, and N.J. Grant, Dynamics and function of phospholipase D and phosphatidic acid during phagocytosis, *Traffic*, vol. 7, no. 3, Mar. 2006, pp. 365-377.
15. S. Cockcroft, Signalling roles of mammalian phospholipase D1 and D2, *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 58, no. 11, Oct. 2001, pp. 1674-1687.
16. K.E. Meier, T.C. Gibbs, S.M. Knoepp, and K.M. Ella, Expression of phospholipase D isoforms in mammalian cells, *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1439, no. 2, Jul. 1999, pp. 199-213.
17. M. Vorland, V.A. Thorsen, and H. Holmsen, Phospholipase D in platelets and other cells, *Platelets*, vol. 19, no. 8, Dec. 2008, pp. 582-594.
18. Y. Liu, Y. Su, and X. Wang, "Phosphatidic acid-mediated signaling," *Lipid-mediated Protein Signaling*, D.G.S. Capelluto, ed., Dordrecht: Springer Netherlands, 2013, pp. 159-176.
19. H. Yang, and M.F. Roberts, Cloning, overexpression, and characterization of a bacterial Ca²⁺-dependent phospholipase D, *Protein Sci.*, vol. 11, no. 12, Dec. 2002, pp. 2958-2968.
20. G. Komis, H. Quader, B. Galatis, and P. Apostolakos, Macrotubule-dependent protoplast volume regulation in plasmolysed root-tip cells of *Triticum turgidum*: involvement of phospholipase D, *New Phytol.*, vol. 171, no. 4, Apr. 2006, pp. 737-750.
21. K.O. Kim, K.H. Lee, Y.H. Kim, S.K. Park, and J.S. Han, Anti-apoptotic role of phospholipase D isozymes in the glutamate-induced cell death, *Exp. Mol. Med.*, vol. 35, no. 1, Feb. 2003, pp. 38-45.
22. Y.H. Jang, B.H. Ahn, S. Namkoong, Y.M. Kim, J.K. Jin, Y.S. Kim, and D.S. Min, Differential regulation of apoptosis by caspase-mediated cleavage of phospholipase D isozymes, *Cell. Signal.*, vol. 20, no. 12, Dec. 2008, pp. 2198-2207.

23. Y. Nakazawa, M. Uchino, Y. Sagane, H. Sato, and K. Takano, Isolation and characterization of actinomycetes strains that produce phospholipase D having high transphosphatidylase activity, *Microbiol. Res.*, vol. 164, no. 1, Nov. 2009, pp. 43-48.
24. W.J. van Blitterswijk, and H. Hilkmann, Rapid attenuation of receptor-induced diacylglycerol and phosphatidic acid by phospholipase D-mediated transphosphatidylase: formation of bisphosphatidic acid, *EMBO J.*, vol. 12, no. 7, 1993, pp. 2655-2662.
25. X. Zheng, S. Ray, and W.B. Bollag, Modulation of phospholipase D-mediated phosphatidylglycerol formation by differentiating agents in primary mouse epidermal keratinocytes, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1643, no. 1-3, Dec. 2003, pp. 25-36.
26. G. Rydzewska, G. Jurkowska, and A. Gabryelewicz, Phospholipase D mediated transphosphatidylase as a possible new pathway of ethanol metabolism in isolated rat pancreatic acini, *J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 47, no. 2, Jun. 1996, pp. 385-395.
27. M.A. Frohman, and A.J. Morris, Phospholipase D structure and regulation, *Chem. Phys. Lipids*, vol. 98, no. 1-2, Apr. 1999, pp. 127-140.
28. Y. Uesugi, J. Arima, M. Iwabuchi, and T. Hatanaka, C-terminal loop of Streptomyces phospholipase D has multiple functional roles, *Protein Sci.*, vol. 16, no. 2, Feb. 2007, pp. 197-207.
29. J.H. Exton, Regulation of phospholipase D, *FEBS Lett.*, vol. 531, no. 1, Oct. 2002, pp. 58-61.
30. Y. Uesugi, K. Mori, J. Arima, M. Iwabuchi, and T. Hatanaka, Recognition of phospholipids in Streptomyces phospholipase D, *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 28, Jul. 2005, pp. 26143-26151.
31. C.L. Aikens, A. Laederach, and P.J. Reilly, Visualizing complexes of phospholipids with Streptomyces phospholipase D by automated docking, *Proteins*, vol. 57, no. 1, Oct. 2004, pp. 27-35.
32. Y. Uesugi, and T. Hatanaka, Phospholipase D mechanism using Streptomyces PLD, *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1791, no. 9, Sep. 2009, pp. 962-969.
33. J. Gomez-Cambronero, Phospholipase D in cell signaling: from a myriad of cell functions to cancer growth and metastasis, *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 33, Jul. 2014, pp. 22557-22566.
34. X. Wang, Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses, *Plant Physiol.*, vol. 139, no. 2, Oct. 2005, pp. 566-573.

35. N.T. Ktistakis, C. Delon, M. Manifava, E. Wood, I. Ganley, and J.M. Sugars, Phospholipase D1 and potential targets of its hydrolysis product, phosphatidic acid, *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 31, no. 1, Feb. 2003, pp. 94-97.
36. R.V. Stahelin, B. Ananthanarayanan, N.R. Blatner, S. Singh, K.S. Bruzik, D. Murray, and W. Cho, Mechanism of membrane binding of the phospholipase D1 PX domain, *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 52, Dec. 2004, pp. 54918-54926.
37. X. Wang, Phospholipase D in hormonal and stress signaling, *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 5, no. 5, Oct. 2002, pp. 408-414.
38. J. Rizo, and T.C. Südhof, C2-domains, structure and function of a universal Ca^{2+} -binding domain, *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 26, Jun. 1998, pp. 15879-15882.
39. W. Qin, K. Pappan, and X. Wang, Molecular heterogeneity of phospholipase D (PLD). Cloning of PLDgamma and regulation of plant PLDgamma, -beta, and -alpha by polyphosphoinositides and calcium, *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 45, Nov. 1997, pp. 28267-28273.
40. L. Zheng, R. Krishnamoorthi, M. Zolkiewski, and X. Wang, Distinct Ca^{2+} binding properties of novel C2 domains of plant phospholipase D α and β , *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 26, Jun. 2000, pp. 19700-19706.
41. C. Riebeling, S. Bourgoin, and D. Shields, Caspase cleavage of phospholipase D1 in vitro alters its regulation and reveals a novel property of the "loop" region, *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1781, no. 8, Aug. 2008, pp. 376-382.
42. C. Qin, C. Wang, and X. Wang, Kinetic analysis of Arabidopsis phospholipase Ddelta. Substrate preference and mechanism of activation by Ca^{2+} and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 51, Dec. 2002, pp. 49685-49690.
43. J.D. McGee, J.L. Roe, T.A. Sweat, X. Wang, J.A. Guikema, and J.E. Leach, Rice phospholipase D isoforms show differential cellular location and gene induction, *Plant Cell Physiol.*, vol. 44, no. 10, Oct. 2003, pp. 1013-1026.
44. B.O. Bargmann, and T. Munnik, The role of phospholipase D in plant stress responses, *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 9, no. 5, Oct. 2006, pp. 515-522.
45. C.A. Zien, C. Wang, X. Wang, and R. Welti, In vivo substrates and the contribution of the common phospholipase D, PLDalpha, to wound-induced metabolism of lipids in Arabidopsis, *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1530, no. 2-3, Feb. 2001, pp. 236-248.
46. S.L. Austin-Brown, and K.D. Chapman, Inhibition of Phospholipase D α by N-acyl ethanolamines, *Plant Physiol.*, vol. 129, no. 4, Apr. 2002, pp. 1892-1898.

47. K. Pappan, S. Austin-Brown, K.D. Chapman, and X. Wang, Substrate selectivities and lipid modulation of plant phospholipase D alpha, -beta, and -gamma, *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 353, no. 1, May 1998, pp. 131-140.
48. M. Oblozinsky, R. Ulbrich-Hofmann, and L. Bezakova, Head group specificity of phospholipase D isoenzymes from poppy seedlings (*Papaver somniferum* L.), *Biotechnol. Lett.*, vol. 27, no. 3, Feb. 2005, pp. 181-185.
49. K. Pappan, W. Qin, J.H. Dyer, L. Zheng, and X. Wang, Molecular cloning and functional analysis of polyphosphoinositide-dependent phospholipase D, PLDbeta, from *Arabidopsis*, *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 11, Mar. 1997, pp. 7055-7061.
50. C. Wang, and X. Wang, A novel phospholipase D of *Arabidopsis* that is activated by oleic acid and associated with the plasma membrane, *Plant Physiol.*, vol. 127, no. 3, Nov. 2001, pp. 1102-1112.
51. Y. Hong, S.P. Devaiah, S.C. Bahn, B.N. Thamasandra, M. Li, R. Welti, and X. Wang, Phospholipase D epsilon and phosphatidic acid enhance *Arabidopsis* nitrogen signaling and growth, *Plant J.*, vol. 58, no. 3, May 2009, pp. 376-387.
52. G. Li, F. Lin, and H.W. Xue, Genome-wide analysis of the phospholipase D family in *Oryza sativa* and functional characterization of PLD β 1 in seed germination, *Cell Res.*, vol. 17, no. 10, Oct. 2007, pp. 881-894.
53. Q. Liu, C. Zhang, Y. Yang, and X. Hu, Genome-wide and molecular evolution analyses of the phospholipase D gene family in poplar and grape, *BMC Plant Biol.*, vol. 10, Jun. 2010, pp. 117.
54. K. Tang, C.J. Dong, and J.Y. Liu, Genome-wide comparative analysis of the phospholipase D gene families among allotetraploid cotton and its diploid progenitors, *PLoS ONE*, vol. 11, no. 5, May 2016, e0156281.
55. C. Virto, I. Svensson, and P. Adlercreutz, Hydrolytic and transphosphatidylation activities of phospholipase D from savoy cabbage towards lysophosphatidylcholine, *Chem. Phys. Lipids*, vol. 106, no. 1, Jun. 2000, pp. 41-51.
56. H. Yuan, L. Chen, G. Paliyath, A. Sullivan, and D.P. Murr, Characterization of microsomal and mitochondrial phospholipase D activities and cloning of a phospholipase D alpha cDNA from strawberry fruits, *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 43, no. 6, Jun. 2005, pp. 535-547.
57. J.R. Simkhada, H.J. Lee, S.Y. Jang, J.H. Kim, H.C. Lee, J.K. Sohng, and J.C. Yoo, A novel low molecular weight phospholipase D from *Streptomyces* sp. CS684, *Biores. Technol.*, vol. 100, no. 3, Feb. 2009, pp. 1388-1393.

58. H. Khatoon, S. Talat, and H. Younus, Phospholipase D from *Allium sativum* bulbs: A highly active and thermal stable enzyme, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 42, no. 4, May 2008, pp. 380-385.
59. B.O. Bargmann, A.M. Laxalt, B. ter Riet, B. van Schooten, E. Merquiol, C. Testerink, M.A. Haring, D. Bartels, and T. Munnik, Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants, *Plant Cell Physiol.*, vol. 50, no. 1, Jan. 2009, pp. 78-89.
60. Y. Peng, J. Zhang, G. Cao, Y. Xie, X. Liu, M. Lu, and G. Wang, Overexpression of a PLD α 1 gene from *Setaria italica* enhances the sensitivity of arabidopsis to abscisic acid and improves its drought tolerance, *Plant Cell Rep.*, vol. 29, no. 7, Jul. 2010, pp. 793-802.
61. W. Zhang, C. Wang, C. Qin, T. Wood, G. Olafsdottir, R. Welti, and X. Wang, The oleate-stimulated phospholipase D, PLD δ , and phosphatidic acid decrease H₂O₂-induced cell death in Arabidopsis, *Plant Cell*, vol. 15, no. 10, Oct. 2003, pp. 2285-2295.
62. J.C. Gardiner, J.D.I. Harper, N.D. Weerakoon, D.A. Collings, S. Ritchie, S. Gilroy, R.J. Cyr, and J. Marc, A 90-kD phospholipase D from tobacco binds to microtubules and the plasma membrane, *Plant Cell*, vol. 13, no. 9, Jun. 2001, pp. 2143-2158.
63. Y. Hong, W. Zhang, and X. Wang, Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity, *Plant Cell Environ.*, vol. 33, no. 4, Nov. 2010, pp. 627-635.
64. B.O.R. Bargmann, and T. Munnik, The role of phospholipase D in plant stress responses, *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 9, no. 5, Jul. 2006, pp. 515-522.
65. S.P. Mane, C. Vasquez-Robinet, A.A. Sioson, L.S. Heath, and R. Grene, Early PLD α -mediated events in response to progressive drought stress in arabidopsis: a transcriptome analysis, *J. Exp. Bot.*, vol. 58, no. 2, Nov. 2007, pp. 241-252.
66. W. Zhang, L. Yu, Y. Zhang, and X. Wang, Phospholipase D in the signaling networks of plant response to abscisic acid and reactive oxygen species, *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1736, no. 1, Sep. 2005, pp. 1-9.
67. J. Foreman, V. Demidchik, J.H.F. Bothwell, P. Mylona, H. Miedema, M.A. Torres, P. Linstead, S. Costa, C. Brownlee, J.D.G. Jones, J.M. Davies, and L. Dolan, Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth, *Nature*, vol. 422, no. 6930, Mar. 2003, pp. 442-446.
68. S. Melser, D. Molino, B. Batailler, M. Peypelut, M. Laloi, V. Wattlelet-Boyer, Y. Bellec, J.D. Faure, and P. Moreau, Links between lipid homeostasis, organelle

- morphodynamics and protein trafficking in eukaryotic and plant secretory pathways, *Plant Cell Rep.*, vol. 30, no. 2, Nov. 2011, pp. 177-193.
69. P.K. Farmer, and J.H. Choi, Calcium and phospholipid activation of a recombinant calcium-dependent protein kinase (DcCPK1) from carrot (*Daucus carota* L.), *Biochim. Biophys. Acta - Protein Structure Mol. Enzymol.*, vol. 1434, no. 1, Sep. 1999, pp. 6-17.
70. M. Deak, A. Casamayor, R.A. Currie, C. Peter Downes, and D.R. Alessi, Characterisation of a plant 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 homologue which contains a pleckstrin homology domain, *FEBS Lett.*, vol. 451, no. 3, 1999, pp. 220-226.
71. R.G. Anthony, R. Henriques, A. Helfer, T. Mészáros, G. Rios, C. Testerink, T. Munnik, M. Deák, C. Koncz, and L. Bögre, A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in arabidopsis, *EMBO J.*, vol. 23, no. 3, Jan. 2004, pp. 572-581.
72. Y. Ohashi, A. Oka, R. Rodrigues-Pousada, M. Possenti, I. Ruberti, G. Morelli, and T. Aoyama, Modulation of phospholipid signaling by GLABRA2 in root-hair pattern formation, *Science*, vol. 300, no. 5624, Apr. 2003, pp. 1427.
73. L. Guo, and X. Wang, Crosstalk between phospholipase D and sphingosine kinase in plant stress signaling, *Front. Plant Sci.*, vol. 3, Mar. 2012, pp. 51.
74. B.O. Bargmann, A.M. Laxalt, B. ter Riet, C. Testerink, E. Merquiol, A. Mosblech, A. Leon-Reyes, C.M. Pieterse, M.A. Haring, I. Heilmann, D. Bartels, and T. Munnik, Reassessing the role of phospholipase D in the arabidopsis wounding response, *Plant Cell Environ.*, vol. 32, no. 7, Jul. 2009, pp. 837-850.
75. 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, and I. Lee, Cooperation and functional diversification of two closely related galactolipase genes for jasmonate biosynthesis, *Dev. Cell*, vol. 14, no. 2, Feb. 2008, pp. 183-192.
76. L. Yu, J. Nie, C. Cao, Y. Jin, M. Yan, F. Wang, J. Liu, Y. Xiao, Y. Liang, and W. Zhang, Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana*, *New Phytol.*, vol. 188, no. 3, Jul. 2010, pp. 762-773.
77. S. Lee, H. Hirt, and Y. Lee, Phosphatidic acid activates a wound-activated MAPK in *Glycine max*, *Plant J.*, vol. 26, no. 5, Feb. 2001, pp. 479-486.
78. B. Lu, and C. Benning, A 25-amino acid sequence of the arabidopsis TGD2 protein is sufficient for specific binding of phosphatidic acid, *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 26, May 2009, pp. 17420-17427.

79. C. Testerink, and T. Munnik, Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants, *Trends Plant Sci.*, vol. 10, no. 8, Aug. 2005, pp. 368-375.
80. C. Testerink, H.L. Dekker, Z.Y. Lim, M.K. Johns, A.B. Holmes, C.G. de Koster, N.T. Ktistakis, and T. Munnik, Isolation and identification of phosphatidic acid targets from plants, *Plant J.*, vol. 39, no. 4, May 2004, pp. 527-536.
81. K. Athenstaedt, and G. Daum, Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism, *Europ. J. Biochem.*, vol. 266, no. 1, 1999, pp. 1-16.
82. J. Sekereš, R. Pleskot, P. Pejchar, V. Žárský, and M. Potocký, The song of lipids and proteins: dynamic lipid-protein interfaces in the regulation of plant cell polarity at different scales, *J. Exp. Bot.*, vol. 66, no. 6, Mar. 2015, pp. 1587-1598.
83. R. Blumenthal, M.J. Clague, S.R. Durell, and R.M. Epand, Membrane fusion, *Chem. Rev.*, vol. 103, no. 1, Jan. 2003, pp. 53-70.
84. J. Zhao, Phospholipase D and phosphatidic acid in plant defence response: from protein-protein and lipid-protein interactions to hormone signalling, *J. Exp. Bot.*, vol. 66, no. 7, Dec. 2015, pp. 1721-1736.
85. M. Potocký, M. Eliáš, B. Profotová, Z. Novotná, O. Valentová, and V. Žárský, Phosphatidic acid produced by phospholipase D is required for tobacco pollen tube growth, *Planta*, vol. 217, no. 1, Nov. 2003, pp. 122-130.
86. F. Rached, M. Lhomme, L. Camont, F. Gomes, C. Dauteuille, P. Robillard, R.D. Santos, P. Lesnik, C.V. Serrano, Jr., M.J. Chapman, and A. Kontush, Defective functionality of small, dense HDL3 subpopulations in ST segment elevation myocardial infarction: Relevance of enrichment in lysophosphatidylcholine, phosphatidic acid and serum amyloid A, *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1851, no. 9, Sep. 2015, pp. 1254-1261.
87. S.B. Ryu, B.H. Karlsson, M. Özgen, and J.P. Palta, Inhibition of phospholipase D by lysophosphatidylethanolamine, a lipid-derived senescence retardant, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 94, no. 23, Sep. 1997, pp. 12717-12721.
88. S. Lu, S. Yao, G. Wang, L. Guo, Y. Zhou, Y. Hong, and X. Wang, Phospholipase D ϵ enhances *Brassica napus* growth and seed production in response to nitrogen availability, *Plant Biotechnol. J.*, vol. 14, no. 3, Mar. 2016, pp. 926-937.
89. S. Svane, V. Gorshkov, and F. Kjeldsen, Charge inversion of phospholipids by dimetal complexes for positive ion-mode electrospray ionization mass spectrometry analysis, *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 17, Sep. 2015, pp. 8732-8739.
90. I. Aurich, F. Hirche, and R. Ulbrich-Hofmann, The determination of phospholipase D activity in emulsion systems, *Anal. Biochem.*, vol. 268, no. 2, Mar. 1999, pp. 337-342.

91. L. Laboureur, M. Ollero, and D. Touboul, Lipidomics by supercritical fluid chromatography, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 6, Jun. 2015, pp. 13868-13884.
92. T.T. Allgyer, and M.A. Wells, Phospholipase D from savoy cabbage: purification and preliminary kinetic characterization, *Biochemistry*, vol. 18, no. 24, Nov. 1979, pp. 5348-5353.
93. M. Mezna, and A.J. Lawrence, Conductimetric assays for the hydrolase and transferase activities of phospholipase D enzymes, *Anal. Biochem.*, vol. 218, no. 2, May 1994, pp. 370-376.
94. A.J. Morris, M.A. Frohman, and J. Engebrecht, Measurement of phospholipase D activity, *Anal. Biochem.*, vol. 252, no. 1, Oct. 1997, pp. 1-9.
95. S.F. Martin, R.L. DeBlanc, and P.J. Hergenrother, Determination of the substrate specificity of the phospholipase D from *Streptomyces chromofuscus* via an inorganic phosphate quantitation assay, *Anal. Biochem.*, vol. 278, no. 2, Feb. 2000, pp. 106-110.
96. S.A. Scott, C.T. Spencer, M.C. O'Reilly, K.A. Brown, R.R. Lavieri, C.H. Cho, D.I. Jung, R.C. Larock, H.A. Brown, and C.W. Lindsley, Discovery of desketoraloxifene analogues as inhibitors of mammalian, *Pseudomonas aeruginosa*, and NAPE phospholipase D enzymes, *ACS Chem. Biol.*, vol. 10, no. 2, Feb. 2015, pp. 421-432.
97. D. Do le, R. Buchet, S. Pikula, A. Abousalham, and S. Mebarek, Direct determination of phospholipase D activity by infrared spectroscopy, *Anal. Biochem.*, vol. 430, no. 1, Nov. 2012, pp. 32-38.
98. A. Rawyler, and P.A. Siegenthaler, A single and continuous spectrophotometric assay for various lipolytic enzymes, using natural, non-labelled lipid substrates, *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1004, no. 3, Aug. 1989, pp. 337-344.
99. M. Dippe, and R. Ulbrich-Hofmann, Spectrophotometric determination of phosphatidic acid via iron(III) complexation for assaying phospholipase D activity, *Anal. Biochem.*, vol. 392, no. 2, Sep. 2009, pp. 169-173.
100. C.J. Welsh, and K. Schmeichel, Assays for investigations of signal transduction mechanisms involving phospholipase D: mass measurements of phosphatidate, phosphatidylethanol, and diacylglycerol in cultured cells, *Anal. Biochem.*, vol. 192, no. 2, Feb. 1991, pp. 281-292.
101. M. Lucas, V. Sanchez-Margalet, C. Pedrera, and M.L. Bellido, A chemiluminescence method to analyze phosphatidylcholine-phospholipase activity in plasma membrane preparations and in intact cells, *Anal. Biochem.*, vol. 231, no. 2, Nov. 1995, pp. 277-281.

102. J. Sajdok, J. Jandus, O. Valentová, Z. Novotná, J. Káš, and J. Daussant, A microplate technique for phospholipase D activity determination, *Anal. Chim. Acta*, vol. 315, no. 1, Oct. 1995, pp. 109-112.
103. M. Becker, U. Spohn, and R. Ulbrich-Hofmann, Detection and characterization of phospholipase D by flow injection analysis, *Anal. Biochem.*, vol. 244, no. 1, Jan. 1997, pp. 55-61.
104. P. Rauch, E.N. Ferri, S. Girotti, H. Rauchova, G. Carrea, R. Bovara, F. Fini, and A. Roda, A chemiluminescent flow sensing device for determination of choline and phospholipase D activity in biological samples, *Anal. Biochem.*, vol. 245, no. 2, Feb. 1997, pp. 133-140.
105. G.M. Carman, A.S. Fischl, M. Dougherty, and G. Maerker, A spectrophotometric method for the assay of phospholipase D activity, *Anal. Biochem.*, vol. 110, no. 1, Jan. 1981, pp. 73-76.
106. I. Karube, K. Hara, I. Satoh, and S. Suzuki, Amperometric determination of phosphatidyl choline in serum with use of immobilized phospholipase D and choline oxidase, *Anal. Chim. Acta*, vol. 106, no. 2, May 1979, pp. 243-250.
107. Y. Iwasaki, S. Nishikawa, M. Tsuneda, T. Takahashi, and T. Yamane, Detection of phospholipase D on solid materials, *Anal. Biochem.*, vol. 329, no. 1, Jun. 2004, pp. 157-159.
108. E. Vrbová, I. Kroupová, O. Valentová, Z. Novotná, J. Káš, and C. Thévenot, Determination of phospholipase D activity with a choline biosensor, *Anal. Chim. Acta*, vol. 280, no. 1, Aug. 1993, pp. 43-48.
109. V. Dorovska-Taran, R. Wick, and P. Walde, A ^1H nuclear magnetic resonance method for investigating the phospholipase D-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine in liposomes, *Anal. Biochem.*, vol. 240, no. 1, Aug. 1996, pp. 37-47.
110. N. Hatton, E. Lintz, M. Mahankali, K.M. Henkels, and J. Gomez-Cambronero, Phosphatidic acid increases epidermal growth factor receptor expression by stabilizing mRNA decay and by inhibiting lysosomal and proteasomal degradation of the internalized receptor, *Mol. Cell. Biol.*, vol. 35, no. 18, Sep. 2015, pp. 3131-3144.
111. H.A. Brown, S. Gutowski, C.R. Moomaw, C. Slaughter, and P.C. Sternweis, ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity, *Cell*, vol. 75, no. 6, Dec. 1993, pp. 1137-1144.

112. D. Kemken, K. Mier, H.A. Katus, G. Richardt, and T. Kurz, A HPLC-fluorescence detection method for determination of cardiac phospholipase D activity in vitro, *Anal. Biochem.*, vol. 286, no. 2, Nov. 2000, pp. 277-281.
113. K.M. Ella, G.P. Meier, C.D. Bradshaw, K.M. Huffman, E.C. Spivey, and K.E. Meier, A fluorescent assay for agonist-activated phospholipase D in mammalian cell extracts, *Anal. Biochem.*, vol. 218, no. 1, Apr. 1994, pp. 136-142.
114. S.K. Wu, and W.W. Cho, A continuous fluorometric assay for phospholipases using polymerized mixed liposomes, *Anal. Biochem.*, vol. 221, no. 1, Aug. 1994, pp. 152-159.
115. A. Orr, W. Wickner, S.F. Rusin, A.N. Kettenbach, and M. Zick, Yeast vacuolar HOPS, regulated by its kinase, exploits affinities for acidic lipids and Rab:GTP for membrane binding and to catalyze tethering and fusion, *Mol. Biol. Cell*, vol. 26, no. 2, Jan. 2015, pp. 305-315.
116. T. Holler, J.M. Cermak, and J.K. Blusztajn, Dietary choline supplementation in pregnant rats increases hippocampal phospholipase D activity of the offspring, *FASEB J.*, vol. 10, no. 14, Dec. 1996, pp. 1653-1659.
117. M. Danin, V. Chalifa, H. Möhn, U.S. Schmidt, and M. Liscovitch, "[2] - Rat brain membrane-bound phospholipase D," *Methods in Neurosciences*, N.F. John, ed., Academic Press, 1993, pp. 14-24.
118. T. Hagishita, M. Nishikawa, and T. Hatanaka, A spectrophotometric assay for the transphosphatidylolation activity of phospholipase D enzyme, *Anal. Biochem.*, vol. 276, no. 2, Dec. 1999, pp. 161-165.
119. P. D'Arrigo, V. Piergianni, D. Scarcelli, and S. Servi, A spectrophotometric assay for phospholipase D, *Anal. Chim. Acta*, vol. 304, no. 2, Mar. 1995, pp. 249-254.
120. H. Tsuruta, R. Hayashi, H. Ohkawa, N. Ohkatsu, M. Morimoto, K. Nishimoto, S. Santou, and Y. Aizono, Characteristics and gene cloning of phospholipase D of the psychrophile, *Shewanella* sp, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 71, no. 10, Oct. 2007, pp. 2534-2542.
121. M. Li, Y. Hong, and X. Wang, Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants, *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1791, no. 9, Sep. 2009, pp. 927-935.
122. B.O.R. Bargmann, A.M. Laxalt, B.t. Riet, E. Schouten, W. Van Leeuwen, H.L. Dekker, C.G. De Koster, M.A. Haring, and T. Munnik, LePLD β 1 activation and relocalization in suspension-cultured tomato cells treated with xylanase, *Plant J.*, vol. 45, no. 3, Oct. 2006, pp. 358-368.

123. L. Wang, X. Zhu, J. Liu, X. Chu, J. Jiao, and Y. Liang, Involvement of phospholipases C and D in the defence responses of riboflavin-treated tobacco cells, *Protoplasma*, vol. 250, no. 2, May 2013, pp. 441-449.
124. N. Suzuki, and R. Mittler, Reactive oxygen species-dependent wound responses in animals and plants, *Free Rad. Biol. Med.*, vol. 53, no. 12, Dec. 2012, pp. 2269-2276.
125. P. Nick, Microtubules, signalling and abiotic stress, *Plant J.*, vol. 75, no. 2, Dec. 2013, pp. 309-323.
126. S.B. Ryu, and X. Wang, Activation of phospholipase D and the possible mechanism of activation in wound-induced lipid hydrolysis in castor bean leaves, *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1303, no. 3, Oct. 1996, pp. 243-250.
127. E.W. Chehab, C. Yao, Z. Henderson, S. Kim, and J. Braam, Arabidopsis touch-induced morphogenesis is jasmonate mediated and protects against pests, *Curr. Biol.*, vol. 22, no. 8, Apr. 2012, pp. 701-706.
128. Β. Γαλάτης, Δ. Γανωτάκης, Κ. Γκανή-Σπυροπούλου, Γ. Καραμπουρνιώτης, Κ. Κοτζαμπάσης, Ε.Ι. Κωνσταντινίδου, Ι. Μανέτας, and Κ.Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, *Φυσιολογία φυτών: Από το μόριο στο περιβάλλον*, Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2003.
129. S. Sivasankar, B. Sheldrick, and S.J. Rothstein, Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato, *Plant Physiol.*, vol. 122, no. 4, Dec. 2000, pp. 1335-1342.
130. C. Wang, S. Avdiushko, and D.F. Hildebrand, Overexpression of a cytoplasm-localized allene oxide synthase promotes the wound-induced accumulation of jasmonic acid in transgenic tobacco, *Plant Mol. Biol.*, vol. 40, no. 5, Jul. 1999, pp. 783-793.
131. S. Berger, T. Mitchell-Olds, and H.U. Stotz, Local and differential control of vegetative storage protein expression in response to herbivore damage in *Arabidopsis thaliana*, *Physiol. Plant.*, vol. 114, no. 1, Jan. 2002, pp. 85-91.
132. C. Wang, C.A. Zien, M. Afithile, R. Welti, D.F. Hildebrand, and X. Wang, Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in arabidopsis, *Plant Cell*, vol. 12, no. 11, Aug. 2000, pp. 2237-2246.
133. X. Wang, The role of phospholipase D in signaling cascades, *Plant Physiol.*, vol. 120, no. 3, Jul. 1999, pp. 645-652.
134. J.E. Lincoln, A.D. Campbell, J. Oetiker, W.H. Rottmann, P.W. Oeller, N.F. Shen, and A. Theologis, LE-ACS4, a fruit ripening and wound-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Expression in

- Escherichia coli, structural characterization, expression characteristics, and phylogenetic analysis, *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 26, Sep. 1993, pp. 19422-19430.
135. T. Boller, and H. Kende, Regulation of wound ethylene synthesis in plants, *Nature*, vol. 286, no. 5770, Jul. 1980, pp. 259-260.
136. T. Munnik, Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger, *Trends Plant Sci.*, vol. 6, no. 5, May 2001, pp. 227-233.
137. L. Fan, S. Zheng, and X. Wang, Antisense suppression of phospholipase D α retards abscisic acid- and ethylene-promoted senescence of postharvest arabidopsis leaves, *Plant Cell*, vol. 9, no. 12, Dec. 1997, pp. 2183-2196.
138. X. Wang, Y. Zhang, J. Zhang, C. Cheng, and X. Guo, Molecular characterization of a transient expression gene encoding for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in cotton (*Gossypium hirsutum* L.), *J. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 40, no. 5, Sep. 2007, pp. 791-800.
139. D. Ortiz-Masia, M.A. Perez-Amador, J. Carbonell, and M.J. Marcote, Diverse stress signals activate the C1 subgroup MAP kinases of arabidopsis, *FEBS Lett.*, vol. 581, no. 9, Mar. 2007, pp. 1834-1840.
140. L. Zhang, D. Xi, S. Li, Z. Gao, S. Zhao, J. Shi, C. Wu, and X. Guo, A cotton group C MAP kinase gene, GhMPK2, positively regulates salt and drought tolerance in tobacco, *Plant Mol. Biol.*, vol. 77, no. 1, May 2011, pp. 17-31.
141. A.K. Sinha, M. Jaggi, B. Raghuram, and N. Tuteja, Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress, *Plant Signal. Behav.*, vol. 6, no. 2, Dec. 2011, pp. 196-203.
142. J. Shi, H.L. An, L. Zhang, Z. Gao, and X.Q. Guo, GhMPK7, a novel multiple stress-responsive cotton group C MAPK gene, has a role in broad spectrum disease resistance and plant development, *Plant Mol. Biol.*, vol. 74, no. 1, 2010, pp. 1-17.
143. D. Ortiz-Masia, M.A. Perez-Amador, P. Carbonell, F. Aniento, J. Carbonell, and M.J. Marcote, Characterization of PsMPK2, the first C1 subgroup MAP kinase from pea (*Pisum sativum* L.), *Planta*, vol. 227, no. 6, 2008, pp. 1333-1342.
144. A. Pitzschke, A. Djamei, F. Bitton, and H. Hirt, A Major Role of the MEKK1–MKK1/2–MPK4 pathway in ROS signalling, *Mol. Plant*, vol. 2, no. 1, Oct. 2009, pp. 120-137.
145. G. Tena, M. Boudsocq, and J. Sheen, Protein kinase signaling networks in plant innate immunity, *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 14, no. 5, Jun. 2011, pp. 519-529.
146. M. Wang, Y. Zhang, J. Wang, X. Wu, and X. Guo, A novel MAP kinase gene in cotton (*Gossypium hirsutum* L.), GhMAPK, is involved in response to diverse environmental stresses, *J. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 40, no. 3, May 2007, pp. 325-332.

147. C. Rampitsch, and N.V. Bykova, The beginnings of crop phosphoproteomics: exploring early warning systems of stress, *Front. Plant Sci.*, vol. 3, Jun. 2012, doi: 10.3389/fpls.2012.00144.
148. J.W. Stratmann, and C.A. Ryan, Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 94, no. 20, Aug. 1997, pp. 11085-11089.
149. S. Seo, H. Sano, and Y. Ohashi, Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase, *Plant Cell*, vol. 11, no. 2, Feb. 1999, pp. 289-298.
150. S. Seo, M. Okamoto, H. Seto, K. Ishizuka, H. Sano, and Y. Ohashi, Tobacco MAP kinase: a possible mediator in wound signal transduction pathways, *Science*, vol. 270, no. 5244, 1995, pp. 1988.
151. B. Thines, L. Katsir, M. Melotto, Y. Niu, A. Mandaokar, G. Liu, K. Nomura, S.Y. He, G.A. Howe, and J. Browse, JAZ repressor proteins are targets of the SCFCO11 complex during jasmonate signalling, *Nature*, vol. 448, no. 7154, Aug. 2007, pp. 661-665.
152. A. Chini, S. Fonseca, G. Fernandez, B. Adie, J.M. Chico, O. Lorenzo, G. Garcia-Casado, I. Lopez-Vidriero, F.M. Lozano, M.R. Ponce, J.L. Micol, and R. Solano, The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling, *Nature*, vol. 448, no. 7154, Aug. 2007, pp. 666-671.
153. C. Ellis, I. Karafyllidis, C. Wasternack, and J.G. Turner, The arabidopsis mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses, *Plant Cell*, vol. 14, no. 7, Mar. 2002, pp. 1557-1566.
154. J.T. Kim, A. Camargo, A. Devoto, V. Moulton, and J. Turner, Computational modeling of the regulatory network organizing the wound response in *Arabidopsis thaliana*, *Artif. Life*, vol. 18, no. 4, Oct. 2012, pp. 445-460.
155. P. Lisón, I. Rodrigo, and V. Conejero, A novel function for the cathepsin D inhibitor in tomato, *Plant Physiol.*, vol. 142, no. 3, Nov. 2006, pp. 1329-1339.
156. A. Champion, E. Hebrard, B. Parra, C. Bournaud, P. Marmey, C. Tranchant, and M. Nicole, Molecular diversity and gene expression of cotton ERF transcription factors reveal that group IXa members are responsive to jasmonate, ethylene and *Xanthomonas*, *Mol. Plant Pathol.*, vol. 10, no. 4, 2009, pp. 471-485.

157. W. Zhang, C. Qin, J. Zhao, and X. Wang, Phospholipase D α 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 101, no. 25, May 2004, pp. 9508-9513.
158. H. Zegzouti, B. Jones, C. Marty, J.M. Lelievre, A. Latche, J.C. Pech, and M. Bouzayen, ER5, a tomato cDNA encoding an ethylene-responsive LEA-like protein: characterization and expression in response to drought, ABA and wounding, *Plant Mol. Biol.*, vol. 35, no. 6, Dec. 1997, pp. 847-854.
159. M. Battaglia, Y. Olvera-Carrillo, A. Garcarrubio, F. Campos, and A.A. Covarrubias, The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins, *Plant Physiol.*, vol. 148, no. 1, Jul. 2008, pp. 6-24.
160. L. Dure, and C. Chlan, Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: XII. Purification and properties of principal storage proteins, *Plant Physiol.*, vol. 68, no. 1, 1981, pp. 180-186.
161. L. Dure, and G.A. Galau, Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: XIII. Regulation of biosynthesis of principal storage proteins, *Plant Physiol.*, vol. 68, no. 1, 1981, pp. 187-194.
162. N. Bies-Ethève, P. Gaubier-Comella, A. Debures, E. Lasserre, E. Jobet, M. Raynal, R. Cooke, and M. Delseny, Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol. Biol.*, vol. 67, no. 1, Jan. 2008, pp. 107-124.
163. G.A. Galau, H.Y. Wang, and D.W. Hughes, Cotton *Lea5* and *Lea14* encode atypical late embryogenesis-abundant proteins, *Plant Physiol.*, vol. 101, no. 2, 1993, pp. 695-696.
164. L. Guo, G. Mishra, K. Taylor, and X. Wang, Phosphatidic acid binds and stimulates arabidopsis sphingosine kinases, *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 15, Feb. 2011, pp. 13336-13345.
165. L. Guo, G. Mishra, J.E. Markham, M. Li, A. Tawfall, R. Welti, and X. Wang, Connections between sphingosine kinase and phospholipase D in the abscisic acid signaling pathway in arabidopsis, *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 11, Jan. 2012, pp. 8286-8296.
166. M. Meinhard, P.L. Rodriguez, and E. Grill, The sensitivity of ABI2 to hydrogen peroxide links the abscisic acid-response regulator to redox signalling, *Planta*, vol. 214, no. 5, 2002, pp. 775-782.

167. Y. Sang, D. Cui, and X. Wang, Phospholipase D and phosphatidic acid-mediated generation of superoxide in arabidopsis, *Plant Physiol.*, vol. 126, no. 4, May 2001, pp. 1449-1458.
168. T. Yamaguchi, E. Minami, J. Ueki, and N. Shibuya, Elicitor-induced activation of phospholipases plays an important role for the induction of defense responses in suspension-cultured rice cells, *Plant Cell Physiol.*, vol. 46, no. 4, Apr. 2005, pp. 579-587.
169. N.J. Wang, C.C. Lee, C.S. Cheng, W.C. Lo, Y.F. Yang, M.N. Chen, and P.C. Lyu, Construction and analysis of a plant non-specific lipid transfer protein database (nsLTPDB), *BMC Genomics*, vol. 13, no. Suppl 1, Jan. 2012, pp. S9.
170. D.E. Monks, K. Aghoram, P.D. Courtney, D.B. DeWald, and R.E. Dewey, Hyperosmotic stress induces the rapid phosphorylation of a soybean phosphatidylinositol transfer protein homolog through activation of the protein kinases SPK1 and SPK2, *Plant Cell*, vol. 13, no. 5, Mar. 2001, pp. 1205-1220.
171. K. Garner, A.N. Hunt, G. Koster, P. Somerharju, E. Groves, M. Li, P. Raghu, R. Holic, and S. Cockcroft, Phosphatidylinositol transfer protein, cytoplasmic 1 (PITPNC1) binds and transfers phosphatidic acid, *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 38, Jul. 2012, pp. 32263-32276.
172. Z. Liu, S. Persson, and Y. Zhang, The connection of cytoskeletal network with plasma membrane and the cell wall, *J. Int. Plant Biol.*, vol. 57, no. 4, Feb. 2015, pp. 330-340.
173. Q. Zhang, F. Lin, T. Mao, J. Nie, M. Yan, M. Yuan, and W. Zhang, Phosphatidic acid regulates microtubule organization by interacting with MAP65-1 in response to salt stress in arabidopsis, *Plant Cell*, vol. 24, no. 11, Oct. 2012, pp. 4555-4576.
174. I. Foissner, and G.O. Wasteneys, The characean internodal cell as a model system for studying wound healing, *J. Microscopy*, vol. 247, no. 1, Oct. 2012, pp. 10-22.
175. S. Hiraga, K. Sasaki, H. Ito, Y. Ohashi, and H. Matsui, A large family of class III plant peroxidases, *Plant Cell Physiol.*, vol. 42, no. 5, May 2001, pp. 462-468.
176. E.K. Bae, H. Lee, J.S. Lee, E.W. Noh, and J. Jo, Molecular cloning of a peroxidase gene from poplar and its expression in response to stress, *Tree Physiol.*, vol. 26, no. 11, Nov. 2006, pp. 1405-1412.
177. F. Passardi, C. Penel, and C. Dunand, Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall, *Trends Plant Sci.*, vol. 9, no. 11, Nov. 2004, pp. 534-540.

178. F. Minibayeva, R.P. Beckett, and I. Kranner, Roles of apoplastic peroxidases in plant response to wounding, *Phytochemistry*, vol. 112, Apr. 2015, pp. 122-129.
179. H. Ito, S. Hiraga, H. Tsugawa, H. Matsui, M. Honma, Y. Otsuki, T. Murakami, and Y. Ohashi, Xylem-specific expression of wound-inducible rice peroxidase genes in transgenic plants, *Plant Sci.*, vol. 155, no. 1, Jun. 2000, pp. 85-100.
180. Y.M. Qin, and Y.X. Zhu, How cotton fibers elongate: a tale of linear cell-growth mode, *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 14, no. 1, Feb. 2011, pp. 106-111.
181. Y.W. Yang, S.M. Bian, Y. Yao, and J.Y. Liu, Comparative proteomic analysis provides new insights into the fiber elongating process in cotton, *J. Proteome Res.*, vol. 7, no. 11, Nov. 2008, pp. 4623-4637.
182. K.D. Chapman, I. Lin, and A.D. De Souza, Metabolism of cottonseed microsomal N-acylphosphatidylethanolamine, *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 318, no. 2, Apr. 1995, pp. 401-407.
183. A. Kargiotidou, I. Kappas, A. Tsaftaris, D. Galanopoulou, and T. Farmaki, Cold acclimation and low temperature resistance in cotton: *Gossypium hirsutum* phospholipase D α isoforms are differentially regulated by temperature and light, *J. Exp. Bot.*, vol. 61, no. 11, Jun. 2010, pp. 2991-3002.
184. K. Tang, C. Dong, and J. Liu, Genome-wide analysis and expression profiling of the phospholipase D gene family in *Gossypium arboreum*, *Sci. China Life Sci.*, vol. 59, no. 2, Feb. 2016, pp. 130-141.
185. X.F. Cao, Whole genome sequencing of cotton-a new chapter in cotton genomics, *Sci. China Life Sci.*, vol. 58, no. 5, May 2015, pp. 515-516.
186. T. Zhang, Y. Hu, W. Jiang, L. Fang, X. Guan, J. Chen, J. Zhang, C.A. Saski, B.E. Scheffler, D.M. Stelly, A.M. Hulse-Kemp, Q. Wan, B. Liu, C. Liu, S. Wang, M. Pan, Y. Wang, D. Wang, W. Ye, L. Chang, W. Zhang, Q. Song, R.C. Kirkbride, X. Chen, E. Dennis, D.J. Llewellyn, D.G. Peterson, P. Thaxton, D.C. Jones, Q. Wang, X. Xu, H. Zhang, H. Wu, L. Zhou, G. Mei, S. Chen, Y. Tian, D. Xiang, X. Li, J. Ding, Q. Zuo, L. Tao, Y. Liu, J. Li, Y. Lin, Y. Hui, Z. Cao, C. Cai, X. Zhu, Z. Jiang, B. Zhou, W. Guo, R. Li, and Z.J. Chen, Sequencing of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. acc. TM-1) provides a resource for fiber improvement, *Nat. Biotechnol.*, vol. 33, no. 5, May 2015, pp. 531-537.
187. R. Guo, F. Yu, Z. Gao, H. An, X. Cao, and X. Guo, GhWRKY3, a novel cotton (*Gossypium hirsutum* L.) WRKY gene, is involved in diverse stress responses, *Mol. Biol. Rep.*, vol. 38, no. 1, Mar. 2011, pp. 49-58.

188. M. Wang, S. Li, H. Yang, Z. Gao, C. Wu, and X. Guo, Characterization and functional analysis of GhRDR6, a novel RDR6 gene from cotton (*Gossypium hirsutum* L.), *Biosci. Rep.*, vol. 32, no. 2, Apr. 2012, pp. 139-151.
189. C.Q. Yang, S. Lu, Y.B. Mao, L.J. Wang, and X.Y. Chen, Characterization of two NADPH: Cytochrome P450 reductases from cotton (*Gossypium hirsutum*), *Phytochemistry*, vol. 71, no. 1, Jan. 2010, pp. 27-35.
190. K. Pappan, S. Zheng, and X. Wang, Identification and characterization of a novel plant phospholipase D that requires polyphosphoinositides and submicromolar calcium for activity in arabidopsis, *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 11, Mar. 1997, pp. 7048-7054.
191. N. Γαλανοπούλου, Κ. Δημόπουλος, Μ. Μαυρή, and Ν. Σιαφάκα, *Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοχημείας*, Αθήνα, 2001.
192. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, vol. 193, no. 1, Nov. 1951, pp. 265-275.
193. R. Welti, W. Li, M. Li, Y. Sang, H. Biesiada, H.E. Zhou, C.B. Rajashekar, T.D. Williams, and X. Wang, Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in arabidopsis, *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 35, Aug. 2002, pp. 31994-32002.
194. E.G. Bligh, and W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.*, vol. 37, no. 8, Aug. 1959, pp. 911-917.
195. G.V. Marinetti, Chromatographic separation, identification, and analysis of phosphatides, *J. Lipid Res.*, vol. 3, no. 1, Jan. 1962, pp. 1-20.
196. D.E. Vance, and J. Vance, *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, ed., Elsevier, 1996.
197. J.M. Clark, and R.L. Switzer, *Πειραματική Βιοχημεία*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1992.
198. D.A. Skoog, F.J. Holler, and T.A. Nieman, *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, 5η Έκδοση, 2007.
199. J. Schacht, Extraction and purification of polyphosphoinositides, *Methods Enzymol.*, vol. 72, 1981, pp. 626-631.
200. National Institutes for Health, U.S. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information, "<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>." [ανάκτηση: Μάρτιος, 2013].

201. National Institutes for Health, U.S. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information, "<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/>." [ανάκτηση: Μάρτιος, 2013].
202. J. Duvick, V. Brendel, K. Dorman, S. Lal, and Y. El-Manzalawy, "<http://www.plantgdb.org/GhGDB/cgi-bin/search.pl>." [ανάκτηση: Μάρτιος, 2013].
203. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, "www.cottondb.org." [ανάκτηση: Μάρτιος, 2013].
204. National Institutes for Health, U.S. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information, "https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome." [ανάκτηση: Μάρτιος, 2013].
205. European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute, "<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>." [ανάκτηση: Μάρτιος, 2013].
206. Washington State University, Mainlab, "<https://www.cottongen.org/organism/Gossypium/hirsutum>." [ανάκτηση: 2016].
207. K. Haralampidis, D. Milioni, S. Rigas, and P. Hatzopoulos, Combinatorial interaction of cis elements specifies the expression of the arabidopsis AtHsp90-1 gene, *Plant Physiol.*, vol. 129, no. 3, Feb. 2002, pp. 1138-1149.
208. Ι. Δάφνης, *Μελέτη της σχέσης δομής και λειτουργίας της απολιποπρωτεΐνης E στον εγκέφαλο*, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2011.
209. Whitehead Institute for Biomedical Research, Rozen, S., A. Untergasser, M. Remm, T. Koressaar, and H. Skaletsky, "primer3.ut.ee." [ανάκτηση: Μάρτιος, 2014].
210. W.A. Kibbe, OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator, *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. suppl 2, Jul. 2007, pp. W43-W46.
211. W.A. Kibbe, "<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>." [ανάκτηση: Μάρτιος, 2014].
212. J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen, and T.L. Madden, Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction, *BMC Bioinform.*, vol. 13, Jun. 2012, pp. 134-134.
213. National Institutes for Health, U.S. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information, "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>." [ανάκτηση: Μάρτιος, 2014].

214. K.J. Livak, and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method, *Methods*, vol. 25, no. 4, Dec. 2001, pp. 402-408.
215. Α. Μπουρτσάλα, *Μελέτη της δραστικότητας φωσφολιπάσης D σε φυτά βαμβακιού (Gossypium hirsutum). Πιθανή συμμετοχή στην απόκριση του φυτού σε τραυματισμό.*, Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2011.
216. L. Fan, S. Zheng, D. Cui, and X. Wang, Subcellular distribution and tissue expression of phospholipase D α , D β , and D γ in arabidopsis, *Plant Physiol.*, vol. 119, no. 4, Dec. 1999, pp. 1371-1378.
217. L. Xu, A.Q. Paulsen, S.B. Ryu, and X. Wang, Intracellular localization of phospholipase D in leaves and seedling tissues of castor bean, *Plant Physiol.*, vol. 111, no. 1, Feb. 1996, pp. 101-107.
218. H. Khatoon, S. Talat, and H. Younus, Identification and partial characterization of a highly active and stable phospholipase D from Brassica juncea seeds, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 40, no. 3, Feb. 2007, pp. 232-236.
219. C. Testerink, and T. Munnik, Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants, *J. Exp. Bot.*, vol. 62, no. 7, Apr. 2011, pp. 2349-2361.
220. X. Wang, J.H. Dyer, and L. Zheng, Purification and immunological analysis of phospholipase D from castor bean endosperm, *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 306, no. 2, Nov. 1993, pp. 486-494.
221. S. Abdelkafi, and A. Abousalham, The substrate specificities of sunflower and soybean phospholipases D using transphosphatidylolation reaction, *Lipids Health Disease*, vol. 10, Nov. 2011, pp. 196-196.
222. M.J. Talbot, and R.G. White, Methanol fixation of plant tissue for Scanning Electron Microscopy improves preservation of tissue morphology and dimensions, *Plant Methods*, vol. 9, Sep. 2013, pp. 36-36.
223. J. Gardiner, D.A. Collings, J.D. Harper, and J. Marc, The effects of the phospholipase D-antagonist 1-butanol on seedling development and microtubule organisation in arabidopsis, *Plant Cell Physiol.*, vol. 44, no. 7, Jul. 2003, pp. 687-696.
224. M.E. Saltveit, Y.J. Choi, and F.A. Tomás-Barberán, Involvement of components of the phospholipid-signaling pathway in wound-induced phenylpropanoid metabolism in lettuce (*Lactuca sativa*) leaf tissue, *Physiol. Plant.*, vol. 125, no. 3, 2005, pp. 345-355.

225. J.A. Monreal, F.J. López-Baena, J. Vidal, C. Echevarría, and S. García-Mauriño, Involvement of phospholipase D and phosphatidic acid in the light-dependent up-regulation of sorghum leaf phosphoenolpyruvate carboxylase-kinase, *J. Exp. Bot.*, vol. 61, no. 10, Apr. 2010, pp. 2819-2827.
226. Y. Jia, F. Tao, and W. Li, Lipid profiling demonstrates that suppressing arabidopsis phospholipase D δ retards ABA-promoted leaf senescence by attenuating lipid degradation, *PLoS ONE*, vol. 8, no. 6, Jun. 2013, pp. e65687.
227. M. Rasmussen, and L. Rasmussen, Phospholipase D in Tetrahymena: activity and significance, *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem.Mol. Biol.*, vol. 124, no. 4, Dec. 1999, pp. 467-473.
228. R.H. Quarles, and R.M.C. Dawson, The distribution of phospholipase D in developing and mature plants, *Biochem. J.*, vol. 112, no. 5, 1969, pp. 787-794.
229. R. Rosson, R. Jakiel, S. Klima, B. Kahn, and P. Fledderman, Correcting tritium concentrations in water vapor monitored with silica gel, *Health Phys.*, vol. 78, no. 1, Jan. 2000, pp. 68-73.
230. M. de Torres Zabela, I. Fernandez-Delmond, T. Niittyta, P. Sanchez, and M. Grant, Differential expression of genes encoding arabidopsis phospholipases after challenge with virulent or avirulent *Pseudomonas* isolates, *Mol. Plant Microbe Interact.*, vol. 15, no. 8, Aug. 2002, pp. 808-816.
231. Y. Banno, K. Tamiya-Koizumi, H. Oshima, A. Morikawa, S. Yoshida, and Y. Nozawa, Nuclear ADP-ribosylation factor (ARF)- and oleate-dependent phospholipase D (PLD) in rat liver cells. Increases of ARF-dependent PLD activity in regenerating liver cells, *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 8, Feb. 1997, pp. 5208-5213.
232. S. Lee, S. Suh, S. Kim, R.C. Crain, J.M. Kwak, H.G. Nam, and Y. Lee, Systemic elevation of phosphatidic acid and lysophospholipid levels in wounded plants, *Plant J.*, vol. 12, no. 3, Apr. 1997, pp. 547-556.
233. C. Qin, and X. Wang, The arabidopsis phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD ζ 1 with distinct regulatory domains, *Plant Physiol.*, vol. 128, no. 3, Dec. 2002, pp. 1057-1068.
234. Y.S. Kolesnikov, K.P. Nokhrina, S.V. Kretynin, I.D. Volotovski, J. Martinec, G.A. Romanov, and V.S. Kravets, Molecular structure of phospholipase D and regulatory mechanisms of its activity in plant and animal cells, *Biochem. (Moscow)*, vol. 77, no. 1, 2012, pp. 1-14.
235. Y. Zhang, H. Zhu, Q. Zhang, M. Li, M. Yan, R. Wang, L. Wang, R. Welti, W. Zhang, and X. Wang, Phospholipase D α 1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase

- activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in arabidopsis, *Plant Cell*, vol. 21, no. 8, Jul. 2009, pp. 2357-2377.
236. M. Ding, Y. Jiang, Y. Cao, L. Lin, S. He, W. Zhou, and J. Rong, Gene expression profile analysis of Ligon lintless-1 (Li1) mutant reveals important genes and pathways in cotton leaf and fiber development, *Gene*, vol. 535, no. 2, Feb. 2014, pp. 273-285.
237. G. Miller, K. Schlauch, R. Tam, D. Cortes, M.A. Torres, V. Shulaev, J.L. Dangl, and R. Mittler, The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli, *Sci. Signal.*, vol. 2, no. 84, Aug. 2009, pp. ra45.
238. A.M. Distéfano, M.A. Valiñas, D. Scuffi, L. Lamattina, A. Ten Have, C. García-Mata, and A.M. Laxalt, Phospholipase D δ knock-out mutants are tolerant to severe drought stress, *Plant Signal. Behav.*, vol. 10, no. 11, Nov. 2015, e1089371.
239. F. Pinoso, N. Buhot, M. Kwaaitaal, P. Fahlberg, H. Thordal-Christensen, M. Ellerström, and M.X. Andersson, Arabidopsis phospholipase D δ is involved in basal defense and nonhost resistance to powdery mildew fungi, *Plant Physiol.*, vol. 163, no. 2, Oct. 2013, pp. 896-906.
240. W. Li, M. Li, W. Zhang, R. Welti, and X. Wang, The plasma membrane-bound phospholipase D δ enhances freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*, *Nat. Biotechnol.*, vol. 22, no. 4, Apr. 2004, pp. 427-433.
241. T. Katagiri, S. Takahashi, and K. Shinozaki, Involvement of a novel arabidopsis phospholipase D, AtPLD δ , in dehydration-inducible accumulation of phosphatidic acid in stress signalling, *Plant J.*, vol. 26, no. 6, Jun. 2001, pp. 595-605.
242. A.L. Schillmiller, and G.A. Howe, Systemic signaling in the wound response, *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 8, no. 4, Aug. 2005, pp. 369-377.
243. Institute for Genomic Research, "www.ciliate.org", [ανάκτηση: Μάρτιος, 2012].
244. N.A. Stover, C.J. Krieger, G. Binkley, Q. Dong, D.G. Fisk, R. Nash, A. Sethuraman, S. Weng, and J.M. Cherry, Tetrahymena Genome Database (TGD): a new genomic resource for Tetrahymena thermophila research, *Nucleic Acids Research*, vol. 34, no. Database issue, Oct. 2006, pp. D500-D503.
245. European Molecular Biology Laboratory, "<http://smart.embl-heidelberg.de/>." [ανάκτηση: Μάρτιος, 2012].
246. J. Schultz, F. Milpetz, P. Bork, and C.P. Ponting, SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 95, no. 11, May 1998, pp. 5857-5864.
247. J. Xiong, X. Lu, Y. Lu, H. Zeng, D. Yuan, L. Feng, Y. Chang, B. Josephine, M. Gorovsky, C. Fu, and W. Miao, Tetrahymena Gene Expression Database (TGED): A

- resource of microarray data and co-expression analyses for Tetrahymena, *Sci. China Life Sci.*, vol. 54, no. 1, Jan. 2011, pp. 65-67.
248. J. Xiong, Y. Lu, J. Feng, D. Yuan, M. Tian, Y. Chang, C. Fu, G. Wang, H. Zeng, and W. Miao, Tetrahymena Functional Genomics Database (TetraFGD): an integrated resource for Tetrahymena functional genomics, *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, vol. 2013, Feb. 2013, doi:10.1093/database/bat008.
249. S. Wang, Y. Banno, S. Nakashima, and Y. Nozawa, Enzymatic characterization of phospholipase D of protozoan Tetrahymena cells, *J. Eukaryot. Microbiol.*, vol. 48, Mar. 2001, pp. 194-201.
250. E.I. Kitsioui, G. Nakos, and M.E. Lekka, Differential determination of phospholipase A₂ and PAF-acetylhydrolase in biological fluids using fluorescent substrates, *J. Lipid Res.*, vol. 40, Dec. 1999, pp. 2346-2356.