Διατριβή Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΚΛΩΝΟΥ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΜΠΕΛΟ (Vitis vinifera cv Sultanina)

•

Δαμιανός Σ. Σκοπελίτης

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ Ηράκλειο, 2001

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΚΛΩΝΟΥ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΜΠΕΛΟ (Vitis vinifera cv Sultanina)

Από το Δαμιανό Σ. Σκοπελίτη Πτυχίο Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, 2000

Διατριβή Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης στη Μοριακή Βιολογία και Βιοτεχνολογία Φυτών από το Πανεπιστήμιο Κρήτης

Επιτροπή Αξιολόγησης:

Καθηγήτρια ΚΑΛΛΙΟΠΗ Α. ΡΟΥΜΠΕΛΑΚΗ-ΑΓΓΕΛΑΚΗ

Καθηγητής ΠΑΝΟΠΟΥΛΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

Ηράκλειο, 2001

<u>HEPIEXOMENA</u>

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Γενικά	1
Λειτουργία της Γλουταμικής Αφυδρογονάσης (GDH)	3
Εντοπισμός και δομή της Γλουταμικής Αφυδρογονάσης (GDH)	5
Σκοπός – Στόχος Εργασίας	7

<u>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>

1.1 Υβριδισμός κατά SOUTHERN	
1.1.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από την άμπελο	9
1.1.2 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	10
1.1.3 Μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	10
1.1.4 Παρασκευή ραδιενεργών μορίων ανιχνευτή που διαφέρουν σε μήκος	12
1.1.5 Υβριδισμός των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης με ραδιοσημασμένα	14
μόρια ιχνηθέτη σε high και low stringency συνθήκες	
1.1.6 Πλυσίματα μεμβρανών και έκθεση	15
1.1.7 Αποϋβριδοποίηση μεμβρανών	15
α) σε αλκαλικές συνθήκες β) με βρασμό	
1.2 Σάρωση γενωμικής βιβλιοθήκης από την άμπελο (Vitis vinifera) με	
cDNA ανιχνευτή ομόλογο για το ένα από τα δυο γονίδια	
1.2.1 Κατασκευή MASTER PLATES	17
1.2.2 Προετοιμασία βακτηριακού στελέχους-ξενιστή XL1-MRA	18
1.2.3 Επώαση κυττάρων XL1-MRA με τον ιϊκό φορέα λ FIX II	18
1.2.4 Μεταφορά φαγοσωματίων σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης και	19
προϋβριδοποίηση	
1.2.5 Παρασκευή ραδιοσημασμένων μορίων ιχνηθέτη	21
1.2.6 Υβριδοποίηση μεμβρανών	21
1.2.7 Πλυσίματα μεμβρανών και έκθεση	21
1.2.8 Επιλογή θετικών πλακών και προσπάθεια απομόνωσης τους σε	22

1.3	Απομόνωση φαγικού DNA	
1.3.1	Επιμόλυνση βακτηριακού στελέχους XL1-MRA με φαγοσωμάτια λ	23
	FIX II	
1.3.2	Συλλογή φαγοσωματίων και απομόνωση φαγικού γενετικού υλικού	24
1.4	Άμεση κλωνοποίηση γενωμικών τμημάτων από τους φαγικούς	
	κλώνους στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript	
1.4.1	Πέψεις φαγικών κλώνων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	26
1.4.2	Πέψεις του πλασμιδιακού φορέα pBluescript με περιοριστικές	26
	ενδονουκλεάσες	
1.4.3	Ηλεκτροέκλουση γενωμικών τμημάτων και πλασμιδιακού φορέα	27
	από πήκτωμα αγαρόζης	
1.4.4	Καθαρισμός τμημάτων με φαινόλη/χλωροφόρμιο	28
1.4.5	Κλωνοποίηση των θραυσμάτων περιορισμού και του πλασμιδιακού	29
	φορέα	
1.4.6	Βακτηριακή μεταμόρφωση κυττάρων E.coli DH5A	30
1.4.7	Απομόνωση μικρής ποσότητας γενετικού υλικού από τις	31
	ανασυνδυασμένες αποικίες με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης	
	(Miniprep)	
1.5	Κλωνοποίηση γενωμικών τμημάτων μέσω της αλυσιδωτής	
	αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)	
1.5.1	Αντιστοίχιση του GDHA cDNA κλώνου με άλλους γνωστούς GDHA	33
	γενωμικούς κλώνους για ταυτοποίηση των άκρων των εξονίων	
1.5.2	PCR με κατάλληλους εκκινητές στους GDHA γενωμικούς κλώνους	34
1.5.3	Κλωνοποίηση των PCR τμημάτων σε ΤΑ πλασμιδιακό φορέα	35
	(pGEM)	
1.5.4	Αλληλούχιση και χαρακτηρισμός των εξονίων και των ιντρονίων	36
1.5.5	Χαρακτηρισμός του υποκινητή καθώς και της 5` και 3` UTR	37

1.6 Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας GDH σε κυτταροκαλλιέργειες

περιοχής

αμπελιού

1.6.1	Επαγωγή κυτταροκαλλιέργειας αμπελιού με KNO3 και (NH4)2SO4	37
1.6.2	Απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος	38
1.6.3	Ποσοτικοποίηση ολικών πρωτεϊνών με την μέθοδο Lowry	39
1.6.4	Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας	39

$\underline{A\Pi OTE \Lambda E \Sigma MATA - \Sigma Y Z H T H \Sigma H}$

1.1 Κατά SOUTHERN ανάλυση με ομόλογο ραδιοσημασμένο ανιχνευτή	
για την GDHA υπομονάδα	
1.1.1 Με πλήρους μήκους cDNA GDHA ιχνηθέτη	40
1.1.2 Με τμήμα του cDNA GDHA ιχνηθέτη	42
1.2 Σάρωση γενωμικής βιβλιοθήκης λ FIX II από αμπέλι με κατάλληλα	
ραδιοσημασμένο ιχνηθέτη	
1.2.1 Πρωτοταγής σάρωση της βιβλιοθήκης	43
1.2.2 Δευτεροταγής σάρωση της βιβλιοθήκης και απομόνωση κλώνων	44
1.3 Απομόνωση φαγικού DNA και πέψεις με περιοριστικές	
ενδονουκλεάσες	
1.3.1 Πέψεις γενωμικών κλώνων και πλασμιδιακού φορέα pBluescript με	48
περιοριστικές ενδονουκλεάσες	
1.3.2 Καθαρισμός και κλωνοποίηση των θραυσμάτων περιορισμού	51
1.4 Κλωνοποίηση PCR τμημάτων από τους γενωμικούς κλώνους στον	52
πλασμιδιακό φορέα pGEM	
1.5 Ανάλυση και χαρακτηρισμός της δομής του GDHA κλώνου	54
1.6 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας GDH σε κυτταροκαλλιέργειες	54
αμπελιού κάτω από διαφορετική πηγή αζώτου	
1.7 Δημοσίευση του γενωμικού κλώνου GDHA από το αμπέλι στην βάση	56
δεδομένων EMBL	

<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>

Στην οικογένειά μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Φυσιολογίας και Βιοχημείας Φυτών, του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, κατά το χρονικό διάστημα 2000-2001. Για την διεκπεραίωση της εργασίας αυτής, απαιτήθηκε εκτός από την προσπάθεια, η συνεργασία προσωπική και η αμέριστη συμπαράσταση πολλών προσώπων, τα οποία αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά. Ευχαριστώ ιδιαιτέρως την επιβλέπουσα καθηγήτρια κα Ρουμπελάκη Καλλιόπη για την αμέριστη υπομονή που υπέδειξε στην προσπάθεια δόμησης της επιστημονικής μου κατάρτισης, καθώς και για την πολύτιμη και ουσιαστική καθοδήγηση στην διεκπεραίωση αυτής της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να την ευχαριστήσω θερμά για την προσπάθεια της στην διοίκηση και οργάνωση ενός άριστα δομημένου μεταπτυχιακού προγράμματος, παρέχοντας μας την δυνατότητα συμμετοχής σε ένα υψηλών ήθελα προδιαγραφών πρόγραμμα. Επίσης, θα vα ευχαριστήσω θερμά τους καθηγητές Ν. Πανόπουλο και Ν. Μοσχονά για την συμμετοχή τους στην διαδικασία δόμησης της επιστημονικής μας προσωπικότητας, καθώς και για την υποστήριξη και την πολύτιμη καθοδήγηση τους. Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Νικόλαο Πριμηκύριο για την ουσιαστική και πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου προσέφερε σε όλες τις δύσκολες στιγμές στην διεκπεραίωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Η υπομονή και η διάθεση του στην μετάδοση γνώσεων, τον καθιστά ως έναν από τους πλέον ουσιαστικούς ''δασκάλους μου'' στην δόμηση της τεχνικής μου κατάρτισης. Επίσης, ευχαριστώ θερμά την Στάσα

Παπαδάκη για τις πολύτιμες συμβουλές της καθώς και για την έμπρακτη στήριξη στις δύσκολες στιγμές μου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα άτομα που συνέβαλαν σε αυτή την εργασία, με την επιστημονική και ηθική συμπαράσταση τους και ιδιαίτερα τον Γιάννη Ντελή, Αδρώνη Ευθύμη και Πλιακώνη Ελένη , καθώς και όλα τα υπόλοιπα παιδιά του Μεταπτυχιακού προγράμματος, με τα οποία μοιράστηκα κοινές αγωνίες και προβλήματα. Τέλος, θα ήθελα να ευχηθώ καλή επιτυχία και σταδιοδρομία σε όλα τα παιδιά του Μεταπτυχιακού προγράμματος.

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF GLUTAMATE DEHYDROGENASE (*GDH*) GENES IN VITIS VINIFERA (L.).

Glutamate dehydrogenase (GDH) is a key enzyme of the nitrogen assimilation pathway, with other possible functions too. In our effort, to identify the copy number of genes which encode for GDH in *Vitis vinifera* (L.), was performed blot analysis in genomic DNA from *Vitis vinifera* cv Sultanina. Two genes that encode for the two subunits of GDH were identified. Screening procedure in λ FIX II genomic library of *Vitis vinifera* cv Sultanina, with probe of full cDNA from *gdha* gene. Nine clones interacting with the probe were isolated. In order to characterize the molecular organization of the two genes of GDH, we cloned in pGEM vector intersected parts from each clone. We obtained the intersected parts with PCR reaction. From the sequencing and the alignment of the clones, we characterized the full length GDHA gene while GDHB is in preparation. GDHA gene consists of 9 exons and 8 introns. We also recognized, cis acting elements like TATA box in GDHA promoter region.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γλουταμική αφυδρογονάση είναι ένα ένζυμο-κλειδί στο μονοπάτι αφομοίωσης του αζώτου. Επιπλέον, πιο πρόσφατα δεδομένα εμπλέκουν πιθανόν το ένζυμο αυτό και σε άλλες λειτουργίες. Για την εύρεση του αριθμού των γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν τις δυο πρωτεϊνικές υπομονάδες του ολοενζύμου της GDH, πραγματοποιήθηκε κατά Southern ανάλυση σε γενωμικό DNA από την άμπελο. Από την ανάλυση αυτή, βρέθηκε ότι υπάργουν 2 γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τις δυο πρωτεϊνικές υπομονάδες του ενζύμου αυτού. Ακολούθησε σάρωση γενωμικής βιβλιοθήκης Vitis vinifera cv sultanina σε ιϊκό φορέα λ FIX II, κατά την οποία απομονώθηκαν 9 γενωμικοί κλώνοι που εμφάνισαν αλληλεπίδραση με τον cDNA ανιχνευτή, ομόλογο το gdha γονίδιο. Από τους κλώνους αυτούς, απομονώθηκαν με PCR, αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα από το gdha γονίδιο, τα οποία εν συνεχεία κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pGEM για να ακολουθήσει ο χαρακτηρισμός τους. Από την ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, βρέθηκε ότι το gdha γονίδιο αποτελείται από 9 εξόνια και 8 ιντρόνια. Επιπλέον, αναλύθηκε η περιοχή του υποκινητή του, η οποία περιέχει cis ρυθμιστικά στοιχεία όπως το TATA box. Επίσης, απομονώθηκαν και gdhb κλώνοι οι οποίοι βρίσκονται στην διαδικασία της ανάλυσης.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μια από τις σημαντικότερες και αποκλειστικές λειτουργίες που απαντάται στο φυτικό βασίλειο είναι η δέσμευση του ανόργανου αζώτου της ατμόσφαιρας καθώς και της ενσωμάτωσης και μετατροπής του σε οργανικά μόρια. Το ατμοσφαιρικό άζωτο βρίσκεται στον αέρα σε ποσοστό περίπου 78% και κατέχει ρόλο δομικού λίθου στη σύνθεση διάφορων βιολογικών μορίων, όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα νουκλεοτίδια, η χλωροφύλλη, οι πολυαμίνες και πλήθος άλλα. Ενώ όμως έχει βασικό ρόλο στην σύνθεση πολλών μορίων του φυτικού οργανισμού και αποτελεί σημαντικό ποσοστό του ξηρού του βάρους, δεν είναι άμεσα αξιοποιήσιμο με την μορφή του διατομικού αζώτου από τα ανώτερα φυτά. Μόνο ορισμένα βακτήρια έχουν την ικανότητα δέσμευσης του ατμοσφαιρικού αζώτου και την σύνθεση αμμωνίας από αυτό. Αυτή η περίπτωση περιλαμβάνει την συμβιωτική δράση των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων με τα ψυχανθή φυτά.

Οι υπόλοιποι ανώτεροι φυτικοί οργανισμοί, προσλαμβάνουν το άζωτο συνήθως ως νιτρικά και αμμωνιακά ιόντα από το έδαφος και στην συνέχεια χρησιμοποιούνται σε ποικίλες βιολογικές αντιδράσεις. Η σημαντικότερη πηγή εδαφικού αζώτου για τα φυτά είναι τα νιτρικά ιόντα, λόγω της ταχείας μετατροπής των αμμωνιακών ιόντων του εδάφους σε νιτρικά, κατά την αντίδραση νιτροποίησης (Beevers and Hageman 1980, Haynes 1986a).

Η πρόσληψη νιτρικών ιόντων από το έδαφος πραγματοποιείται μέσω του ριζικού συστήματος των φυτών. Τα NO₃⁻ ανάγονται προς NO₂⁻ από το ένζυμο NR (Nitrate reductase, E.C. 1.6.6.1-2). Στη συνέχεια, τα NO₂⁻ ανάγονται προς NH₃ από το ένζυμο NiR (Nitrite reductase, E.C. 1.7.7.1).

Άλλη σημαντική πηγή αμμωνίας, που χρησιμοποιούν τα φυτά για την βιοσύνθεση άλλων βιομορίων, είναι η αμμωνία που απελευθερώνεται από διάφορες βιολογικές αντιδράσεις, όπως η φωτοαναπνοή, η αποκαρβοξυλίωση της γλυκίνης, η αποδόμηση πρωτεϊνών, η απαμίνωση και άλλες υδρολυτικές αντιδράσεις (Κύκλος ουρίας), όπως φαίνονται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1. Πηγές αμμωνιακών ιόντων και συνοπτική πορεία τους προς τον ενδιάμεσο μεταβολισμό.

Τελικά, η αμμωνία που παράγεται από την αναγωγή των νιτρικών ιόντων ενσωματώνεται σε ανθρακικούς σκελετούς, που προέρχονται από τον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος (Κύκλος Krebs) προς σχηματισμό μεγάλου πλήθους σημαντικών βιομορίων. Η ενσωμάτωση της αμμωνίας στους ανθρακικούς σκελετούς επιτυγχάνεται με την δράση των ενζύμων της GS (Glutamine synthetase, EC 6.3.1.2) και GOGAT (Glutamate synthase, NADH-GOGAT EC 1.4.1.14, NADPH-GOGAT EC 1.4.1.13, Fd-GOGAT EC 1.4.1.7). Η GOGAT είναι μια αμινοτρανσφεράση, η οποία μεταφέρει μια αμινοομάδα από ένα μόριο γλουταμίνης σε ένα μόριο α-κετογλουταρικού προς σχηματισμό 2 μορίων L γλουταμικού οξέος, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2. Το γλουταμικό οξύ αποτελεί το πρόδρομο μόριο για την βιοσύνθεση πολλών άλλων όπως προαναφέρθηκε.

L-γλουταμικό οξύ + NH₃ + ATP \longrightarrow γλουταμίνη + ADP + Pi

Γλουταμίνη + α-κετογλουταρικό + red Fd [ή NAD(P)H] $\xrightarrow{\text{GOGAT}}$ 2 L γλουταμικό οξύ + ox Fd [ή NAD(P)⁺]

Εικόνα 2 Ενζυμικό σύστημα GS/GOGAT.

Εκτός από τα παραπάνω, ο ρόλος της GDH (Glutamate dehydrogenase, EC 1.4.1.2) στην αφομοίωση της αμμωνίας, σε συνθήκες χαμηλής ενδοκυτταρικής αμμωνίας, δεν έχει διευκρινισθεί. Η GDH χαρακτηρίζεται από αμινωτική και απαμινωτική δράση. Η αμινωτική δράση της GDH εστιάζεται στην ενσωμάτωση της αμμωνίας στο α-κετογλουταρικό οξύ προς σχηματισμό L γλουταμικού οξέος.

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ (GDH)

Όπως προαναφέρθηκε, η GDH καταλύει την αναγωγική αμίνωση (NADH-GDH) του α-κετογλουταρικού οξέος σε γλουταμικό οξύ και αντιστρόφως, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3. Ενώ, όμως, πρόκειται για μια μεγάλης σημασίας πρωτεΐνη που απαντάται όχι μόνο σε όλους τους φυτικούς οργανισμούς, τους ζωϊκούς οργανισμούς καθώς και τους προκαρυώτες, ο φυσιολογικός ρόλος της δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα.

α κετογλουταρικό + NH_3 + $NAD(P)H \xrightarrow{GDH} \Gamma$ λουταμικό οξύ + H_2O + $NAD(P)^+$

Εικόνα 3. Αμφίδρομη αντίδραση αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού από την γλουταμική αφυδρογονάση και αντιστρόφως.

Αρχικά, θεωρήθηκε ότι ο βασικός ρόλος της GDH ήταν η αφομοίωση της αμμωνίας για σχηματισμό L γλουταμικού οξέος, σύμφωνα με αποτελέσματα από *in vitro* αντίδραση.

Η συμμετοχή της GDH στην αμινωτική λειτουργία αμφισβητήθηκε με την ανακάλυψη του ενζυμικού συστήματος, της γλουταμινικής συνθετάσης (GS)/γλουταμικής συνθάσης (GOGAT). Η δράση του ενζυμικού συστήματος GS/GOGAT βρέθηκε να παίζει έναν πολύ πιο ουσιαστικό ρόλο στην αφομοίωση της αμμωνίας προς σύνθεση γλουταμικού οξέος μέσα στους χλωροπλάστες.

Η αμινωτική σημασία της GDH αμφισβητείται επειδή η GDH έχει μικρή συγγένεια για την αμμωνία (εμφανίζει τιμή Km=5,2–70,0 mM). Η συγκέντρωση

όμως της αμμωνίας στα φυτικά κύτταρα είναι σχετικά χαμηλή λόγο της υψηλής τοξικότητας της (Miflin and Lea 1976, 1980). Συνεπώς, δεν ευνοείται η δέσμευση της ενδοκυτταρικής αμμωνίας από την GDH.

Η παρατήρηση αυτή, ώθησε στην πρόταση πιθανής συμπληρωματικής δράσης της GDH στην διαδικασία αφομοίωσης της αμμωνίας, σε συνδυασμό με την δράση του ενζυμικού συστήματος GS/GOGAT (Yamaya *et al.*, 1984; Srivastava and Singh, 1987; Rhodes *et al.* 1989). Το μοντέλο αυτό προτείνει μια πιθανή συνεργιστική δράση GDH/GS/GOGAT στην αφομοίωση αμμωνίας.

Αντίθετα, εντονότερα έχει υποστηριχτεί η άποψη της καταβολικής δραστηριότητας του ενζύμου αυτού. Η ισορροπία της αντίδρασης στην οποία συμμετέχει η GDH, ευνοείται προς την πλευρά της απαμίνωσης του γλουταμικού οξέος (Wallsgrove *et al.* 1983, 1987; Robinson *et al.*,1991). Το τελικό αποτέλεσμα είναι η απαμίνωση του γλουταμικού οξέος σε αμμωνία και α-κετογλουταρικό. Η αντίδραση αυτή πιθανόν να συμβαίνει σε καταστάσεις, που η ενδοκυτταρική συγκέντρωση σε ανθρακικούς σκελετούς είναι μικρή ή γενικότερα να υπάρχει ανάγκη διάθεσης μεγάλης ποσότητας αυτών πχ. γήρανση. Έτσι, η λειτουργία της GDH φαίνεται να σχετίζεται κυρίως με τον μεταβολισμό του άνθρακα και λιγότερο με του αζώτου.

Μια νέα πρόταση για το φυσιολογικό ρόλο της GDH, την θεωρεί ως ένα ένζυμο κλειδί για την απόσβεση υψηλών ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων αμμωνίας, η οποία μπορεί να είναι αρκετά τοξική για το φυτό. Η θεωρία αυτή σχετίζει τη δράση της GDH με την προσπάθεια αποτοξίνωσης του κυττάρου από την τοξική αμμωνία (Givan 1979, Primikirios and Roubelakis-Angelakis 1999, 2001, Benachenhou-Lahfa 1994). Στοιχείο που ενισχύει την λειτουργία της GDH ως βασικού ενζύμου για αποτοξίνωση του κυττάρου είναι η υψηλή αμινοξική ομολογία της α υπομονάδας της GDH από *Vitis vinifera* cv Sultanina με το αντίστοιχο ένζυμο από αρχαιοβακτήρια. Η υψηλή ομολογία αποτελεί ένδειξη λειτουργικής ή εξελικτικής σχέσης μεταξύ των GDH στα φυτά και στα αρχαιοβακτήρια, τα οποία επιβιώνουν σε συνθήκες υψηλού στρες. Επιπλέον, από άλλες μελέτες έχει αποδειχτεί η θερμοσταθερότητα της GDH σε κάποια βακτήρια. Η αντίδραση σε αυτήν την περίπτωση, δεν κατευθύνεται από την ανάγκη του

κυττάρου για παραγωγή L γλουταμικού οξέος, αλλά από την ανάγκη για απόσβεση ενδοκυτταρικής αμμωνίας. Η παραγωγή L γλουταμικού οξέος έρχεται ως αποτέλεσμα της ανάγκης απόσβεσης και δεν αποτελεί βασικό στόχο. Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ υψηλής ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης αμμωνίας, ενεργότητας, πρωτεΐνης και μεταγράφου GDH, ενεργότητας ADC και ελεύθερης αργινίνης και πουτρεσίνης σε αιωρούμενα κύτταρα *Vitis vinifera* L. (Primikirios *et al*, 2000, Loulakakis *et al*, 2001, 6th International Symposium On Inorganic Nitrogen Assimilation REIMS, Abstract 3-40).

ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ

Ελάχιστα είναι γνωστά μέχρι σήμερα για την γονιδιακή δομή της GDH στο αμπέλι. Από την γονιδιακή ανάλυση του ενζύμου αυτού σε άλλους φυτικούς οργανισμούς (Nicotiana plumbaginifolia, Arabidopsis thaliana, Oryza sativa) έχουν αναγνωριστεί και ταυτοποιηθεί δυο γονίδια, που κωδικοποιούν τις δυο υπομονάδες. Στο αμπέλι, έχει απομονωθεί μόνο μια πλήρους μήκους cDNA αλληλουχία, που κωδικοποιεί την μια από τις δυο υπομονάδες. Ο cDNA κλώνος απομονώθηκε από μια cDNA βιβλιοθήκη έκφρασης με ανοσοανίχνευση χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντίσωμα anti-GDH από αμπέλι (Syntichaki et al., 1996) Από ανάλυση της αλληλουχίας του κλώνου βρέθηκε ότι κωδικοποιεί μια πρόδρομη πρωτεΐνη, που αποτελείται από 411 αμινοξέα με μοριακό βάρος περίπου στα 44.517 kDa. Δεδομένου ότι η πρωτεΐνη αυτή πρέπει να μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια, στο προηγούμενο μοριακό βάρος συνυπολογίζεται και το αμινοτελικό οδηγό πεπτίδιο. Από ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας βρέθηκε στο αμινοτελικό άκρο μια περιοχή που χαρακτηρίζεται από υδρόφοβες και θετικά φορτισμένες αλληλουχίες, χαρακτηριστικό αλληλουχιών που περιέχουν μιτοχονδριακό οδηγό πεπτίδιο. Ο κλώνος αυτός εκφράστηκε μέσα σε βακτηριακό στέλεχος XL1-Blue, και ακολούθησε immunoblot ανάλυση. Βρέθηκε ότι ο cDNA κλώνος κωδικοποιεί μια ενεργή μορφή NAD(H)-GDH. Από την συσχέτιση της αλληλουχίας του cDNA GDH κλώνου από αμπέλι με άλλες cDNA αλληλουχίες

από άλλους οργανισμούς, βρέθηκε ότι η cDNA αλληλουχία του αμπελιού εμφανίζει υψηλότερη ομολογία με την αντίστοιχη από αρχαιοβακτήρια και λιγότερο με αυτές από άλλους ευκαρυώτες. Με ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας της GDH βρέθηκαν αμινοξικές περιοχές, που ήταν χαρακτηριστικές για τα αρχαιοβακτήρια. Δεδομένης της ικανότητας των αρχαιοβακτηρίων να επιβιώνουν σε περιβάλλον, που χαρακτηρίζεται από συνθήκες υψηλής καταπόνησης, διατυπώθηκε η άποψη ότι ενδεχομένως η λειτουργία της GDH σχετίζεται με καταπονήσεις (Syntichaki *et al*, 1996).

Η GDH εντοπίζεται ενδοκυτταρικά στα μιτοχόνδρια, όπως προαναφέρθηκε, και χρησιμοποιεί ως αναγωγική ενέργεια NADH ή NAD(P)Η για την αμινωτική της δράση, ενώ χρησιμοποιεί NAD ¨η NAD(P) στην απαμινωτική της δράση. Εντοπίζεται με την μορφή ενός ολοενζύμου με μοριακό βάρος περίπου 252 kDa και αποτελείται από δυο υπομονάδες. Οι υπομονάδες αυτές ονομάζονται συμβατικά α και β. Για την αναγνώριση και χαρακτηρισμό των υπομονάδων της GDH, κατασκευάστηκε και απομονώθηκε από κουνέλι αντίσωμα, εναντίον του πιο ανοδικού ισοενζύμου της GDH. Το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζει και προσδένεται σε όλες της ισομορφές της GDH. Από πειράματα με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση ολικών πρωτεϊνών από φύλλα αμπελιού και ανοσοανίχνευση της GDH βρέθηκε ότι το ολοένζυμο εμφανίζεται ως ένα εξαμερές αποτελούμενο από δυο υπομονάδες με αντίστοιχα μοριακά βάρη 42,5 και 43 kD, αντίστοιχα, οι οποίες εμφανίζουν παρόμοιες αντιγονικές ιδιότητες αλλά διαφορετικό φορτίο (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1990).

Στο αμπέλι υπάρχουν 7 ισοένζυμα GDH, που χαρακτηρίζονται από διαφορετική αναλογία των δυο υπομονάδων στην σύσταση του εξαμερούς ενζύμου. Τα ισοένζυμα 1 και 7 αποτελούν ομοεξαμερή των υπομονάδων α και β αντίστοιχα, ενώ όλα τα ενδιάμεσα ισοένζυμα αποτελούν υβρίδια των δυο υπομονάδων οι οποίες συμμετέχουν σε μια αντίστροφα κλιμακωτή διαβάθμιση τους. Τις κινητικές ιδιότητες του κάθε ισοενζύμου, τις καθορίζει η σύσταση του ισοενζύμου αυτού από τις δυο υπομονάδες (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1991).

Ο φυσιολογικός και μεταβολικός ρόλος των διάφορων ισοενζύμων δεν είναι γνωστός. Αρχικά, από την σύγκριση των ισοενζυμικών προτύπων με τον λόγο NADH-GDH/NAD-GDH προέκυψε ότι κάθε ισοένζυμο έχει διαφορετικό αναβολικό ή καταβολικό ρόλο (Cammaerts and Jacobs, 1985; Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1991). Όμως, από περαιτέρω μελέτες βρέθηκε ότι τα διάφορα ισοένζυμα έχουν την ίδια αναλογία *in vitro* αναβολικής και καταβολικής ενεργότητας.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την κάθε υπομονάδα του ολοενζύμου μπορεί να επάγεται από διαφορετική πηγή αζώτου. Αποδείχτηκε ότι σε κάλλους αμπελιού, που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε αμμωνιακά άλατα, επάχθηκε η αμινωτική δράση της GDH σημαντικά. Αυτή η αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας της GDH συνοδευόταν από αύξηση της α υπομονάδας. Ενώ όμως παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της α υπομονάδας, δεν ανιχνεύτηκε αύξηση της β υπομονάδας από την επίδραση της αμμωνίας (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1992). Από την μελέτη της μεταβολής του προτύπου των ισοενζύμων έπειτα από επαγωγή με αμμωνία, βρέθηκε ότι η αμμωνία προκάλεσε αύξηση της *de novo* σύνθεσης των πιο ανοδικών ισοενζύμων που αποτελούνται κυρίως από την α υπομονάδα. (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1992).

ΣΚΟΠΟΣ – ΣΤΟΧΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η εύρεση του αριθμού των γονιδίων, που κωδικοποιούν τις δυο υπομονάδες της GDH, η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός του γενωμικού κλώνου της α υπομονάδας του ενζύμου της γλουταμικής αφυδρογονάσης από την άμπελο (*Vitis vinifera* cv Sultanina). Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις κατά Southern για την διαλεύκανση του αριθμού των γονιδίων, που κωδικοποιούν τις δυο υπομονάδες της GDH. Ως ραδιοσημασμένος ιχνηθέτης χρησιμοποιήθηκε πλήρους και μερικού μήκους cDNA GDH-α από αμπέλι. Επιπλέον, η απομόνωση του κλώνου έγινε από γενωμική βιβλιοθήκη από *Vitis vinifera* (Primikirios and Roubelakis-Angelakis, unpublished) με την τεχνική της σάρωσης. Ο φορέας της γενωμικής βιβλιοθήκης είναι ο λ FIX ΙΙ. Ως ιχνηθέτης για την απομόνωση του γενωμικού κλώνου χρησιμοποιήθηκε ένας πλήρους μήκους cDNA κλώνος του γονιδίου της α υπομονάδας της GDH.

Στην συνέχεια, ακολούθησε η προσπάθεια της άμεσης κλωνοποίησης διάφορων τμημάτων των γενωμικών κλώνων, που προέκυψαν έπειτα από πέψη των μοναδικών φαγικών κλώνων με διάφορα ένζυμα περιορισμού. Αυτό συνάντησε αρκετές δυσκολίες. Έτσι, έγινε και νέα προσέγγιση του θέματος με ανάκτηση αλληλεπικαλυπτόμενων τμημάτων του γενωμικού φαγικού κλώνου μέσω PCR αντίδρασης. Τα PCR τμήματα εισήχθησαν στον πλασμιδιακό φορέα pGEM και ακολούθησε εκ νέου προσπάθεια αλληλούχισης και χαρακτηρισμού των αλληλεπικαλυπτόμενων τμημάτων.

Για την μελέτη της γονιδιακής ρύθμισης των δυο υπομονάδων της GDH, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της GDH σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα που απομονώθηκε από κυτταροκαλλιέργειες αμπελιού σε θρεπτικό μέσο LS (Linsmaier-Skoog, 1965). Οι κυτταροκαλλιέργειες αυτές επωάστηκαν για 6 h, 12 h και 24 h σε θρεπτικό μέσο LS με 20 mM KNO₃ ενώ κάποιες άλλες με 20 mM (NH₄)₂SO₄ για τα ίδια χρονικά διαστήματα (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1992).

ΥΛΙΚΑ/ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 Υβριδισμός κατά SOYTHERN

1.1.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από φύλλα αμπελιού

Για την απομόνωση γενωμικού DNA για την κατά Southern ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε ως αρχικός ιστός, νεαρά φύλλα αμπελιού. Για κάθε απομόνωση χρησιμοποιήθηκαν περίπου 3-4 gr ιστού. Τα νεαρά φύλλα κονιορτοποιήθηκαν παρουσία υγρού αζώτου μέσα σε γουδί. Στην συνέγεια, η σκόνη που προέκυψε αναμείχθηκε με διάλυμα εκχύλισης. Για κάθε 0.5 gr ιστού που κονιορτοποιήθηκε, αντιστοιχούν 5 ml διαλύματος εκχύλισης (20 mM Na-EDTA, 100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 2% CTAB, 0.2% β-mercaptoethanol, pH 8.0). Ακολούθησε καλή ανάδευση της σκόνης με το διάλυμα εκχύλισης. Αφού μεταφέρθηκε το μίγμα σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα, ακολούθησε προσθήκη 50 mgr PVP (polyvinylpolypyrrolidone, Sigma, P6755) έτσι ώστε η συγκέντρωση του PVP στο τελικό διάλυμα να είναι 100 mgr/gr ιστού. Πραγματοποιήθηκε επώαση για 25 min στους 60°C. Αφού το μίγμα απέκτησε και πάλι την θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκαν 0.6 όγκοι χλωροφορμίου και ακολούθησε καλή ανάδευση. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 6000 rpm για 15 min. Η υπερκείμενη υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα και επιδέχτηκε δεύτερη επεξεργασία με χλωροφόρμιο, ώστε να απομακρυνθούν πλήρως τα υπολείμματα PVP. Στην συνέχεια, προστέθηκαν στην υδατική φάση 0.5 όγκοι από NaCl 5M και αφού έγινε καλή ανάδευση, προστέθηκαν 2 όγκοι παγωμένης απόλυτης αιθανόλης. Το μίγμα επωάστηκε για 15-20 min στους 4°C όπου η κατακρήμνιση του DNA ήταν πλέον ορατή με γυμνό μάτι. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 3 min. Αφού απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, το ίζημα επιδέχτηκε πλύσιμο σε 75% αιθανόλη. Αφού αφαιρέθηκαν πλέον ακόμα και ίχνη αιθανόλης, το DNA επαναδιαλύθηκε σε 200-300 μl TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH:8.0).

Τέλος, το επαναδιαλυμένο DNA επωάστηκε με 2-3 μl RNase A στους 37°C για 15 min. Ακολούθησε ποσοτικοποίηση του DNA σε φωτόμετρο (A₂₆₀).

1.1.2 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Το γενωμικό DNA επιδέχτηκε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Eco*RI. Για κάθε ανάλυση κατά Southern, χρησιμοποιήθηκαν περίπου 20-30 μgr γενωμικού DNA. Για την διαδικασία αυτή, το γενωμικό DNA κατακρημνίστηκε και στην συνέχεια επαναδιαλύθηκε σε 70 μl ΤΕ. Ακολούθησε προσθήκη 10πλάσιας ποσότητας ενζύμου (200 Units) σε σύγκριση με την ελάχιστη προτεινόμενη (Minotech) και η επώαση έλαβε χώρα σε τελικό όγκο 200 μl, αφού έγινε προσθήκη κατάλληλου όγκου BSA (Bovine Serum Albumin) και του ρυθμιστικού διαλύματος της περιοριστικής ενδονουκλεάσης. Ο χρόνος επώασης ήταν περίπου 12 h στους 37°C. Στην συνέχεια, έλαβε χώρα ο έλεγχος μικρής ποσότητας από τον συνολικό όγκο πέψης σε 0.7% ΤΑΕ πήκτωμα αγαρόζης. Σε περίπτωση που η πέψη του γενωμικού DNA δεν είχε επιτευχθεί σε ικανοποιητικό ποσοστό, ακολούθησε προσθήκη επιπλέον 50 units ενζύμου σε τελικό όγκο αντίδρασης 300 μl. Η επιπλέον επώαση πραγματοποιήθηκε για περίπου 3-4 h.

1.1.3 Μεταφορά σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης

Μετά τον έλεγχο της πέψης του γενωμικού DNA με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Eco*RI, και εφόσον η αντίδραση είχε επιτευχθεί σχεδόν ολοκληρωτικά, ακολούθησε η λυοφιλοποίηση του. Στην συνέχεια, επαναδιαλύθηκε το DNA σε 30 μl loading buffer (0.25% μπλέ βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανό του ξυλενίου και 30% γλυκερόλη) και ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση του σε 0.7% TAE πήκτωμα αγαρόζης. Οι διαστάσεις του πηκτώματος ήταν 11 cm x 14 cm και η ηλεκτροφόρηση έλαβε χώρα στα 80 volt αρχικά μέχρι η πρώτη χρωστική (μπλέ βρωμοφαινόλης) να εισχωρήσει μέσα στο

πήκτωμα. Έπειτα, η ηλεκτροφόρηση συνεχίστηκε στα 100-120 volt για περίπου 5-6 ώρες. Αφού έγινε έλεγχος σε λάμπα UV σχετικά με την απόσταση που διάνυσε το επεξεργασμένο με *Eco*RI γενωμικό DNA, το πήκτωμα φωτογραφήθηκε δίπλα σε κλίμακα. Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε στην ηλεκτροφόρηση ήταν DNA από λ φάγο κομμένο με *Eco*RI και *Hind*III.

Στην συνέχεια, το πήκτωμα επωάστηκε σε διάλυμα 0.25 N HCl για περίπου 10-15 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε οι ζώνες του DNA μέσα στο πήκτωμα αγαρόζης, να υποστούν αποπουρίνωση. Αυτό βοηθάει στην μεταφορά του DNA από το πήκτωμα στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ακολούθησε επώαση σε διάλυμα αποδιάταξης (0.4 N NaOH, 0.6 M NaCl) για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να αποδιαταχθεί η δίκλωνη έλικα του DNA μέσα στο πήκτωμα αγαρόζης, και να μεταφερθεί το DNA σε μονόκλωνη μορφή. Έπειτα, ακολούθησε επώαση σε διάλυμα εξουδετέρωσης (0.5 M Tris-HCl, pH:7.5, 1.5 M NaCl) για 45 min για εξουδετέρωση των αλκαλικών συνθηκών.

Για την μεταφορά του DNA από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, χρησιμοποιήθηκε κατάλληλη διάταξη στην οποία λόγω τριχοειδούς φαινομένου, το DNA μεταφέρεται από ένα διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος σε διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος (Southern, 1975). Το διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος είναι διάλυμα άλατος 10X SSC (3 M NaCl, 0.3 M κιτρικό νάτριο, pH:7.0). Σε αυτό το διάλυμα εμβαπτίζεται χαρτί διήθησης Whatman και το οποίο εφάπτεται με το πήκτωμα αγαρόζης. Το πήκτωμα εφάπτεται επιπλέον με την μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ομοίων διαστάσεων, πάνω από την οποία τοποθετούνται τμήματα χάρτου διήθησης εμβαπτισμένα σε 1Χ διάλυμα αλάτων SSC. Πάνω από την όλη διάταξη, τοποθετήθηκε στήλη από διηθητικό χαρτί πάνω στην οποία εφαρμόστηκε κάποιο βάρος. Έτσι, από την διαφορά του υδατικού δυναμικού, μόρια DNA μεταφέρονται από το πήκτωμα πάνω στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, διατηρώντας την σχετική τους θέση. Έπειτα, η μεμβράνη πλύθηκε σε 2X SSC διάλυμα για την απομάκρυνση υπολειμμάτων αγαρόζης και αφέθηκε να στεγνώσει. Για την μονιμοποίηση των μορίων DNA πάνω στην μεμβράνη, η μεμβράνη ακτινοβολήθηκε με UV ακτινοβολία ενέργειας 0,12 Joules·cm⁻² (Stratalinker, Stratagene) για 30 sec. Τέλος, διατηρήθηκε σε στεγνή κατάσταση, μέχρι την ώρα της υβριδοποίησης.

1.1.4 Παρασκευή ραδιενεργών μορίων ανιχνευτή που διαφέρουν σε μήκος

Τα ραδιοσημασμένα μόρια ιχνηθέτη, που χρησιμοποιήθηκαν για την υβριδοποίηση με τις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, παρασκευάστηκαν με την τεχνική του random priming. Στην τεχνική αυτή, χρησιμοποιείται η πολυμεριστική δράση της πολυμεράσης Klenow (Stratagene), η οποία αποτελεί την μεγάλη υπομονάδα της DNA πολυμεράσης Ι, έπειτα από επεξεργασία της με σαμπτιλισίνη και διαχωρισμό της σε στήλη υδροξυπατίτη.

Ως μήτρα για την σύνθεση των ραδιοσημασμένων μορίων ιχνηθέτη, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικού μήκους τμήματα από τον πλήρους μήκους cDNA κλώνο της GDH-α υπομονάδας (Syntichaki et al. 1996), καθώς επίσης και τμήματος αυτού. Ο πλήρους μήκους cDNA κλώνος έχει μέγεθος 1562 bp. Για την απομόνωση του μερικού τμήματος αυτού, ο cDNA GDH-α κλώνος επωάστηκε με την περιοριστική ενδονουκλεάση BamHI, η οποία απελευθερώνει δυο ζώνες ίσου μεγέθους (300 bp), όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.



Full cDNA GDH-α clone

Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση του πλήρους μήκους cDNA GDH-α κλώνου από το αμπέλι.

Η απομόνωση αυτών των δυο ζωνών πραγματοποιήθηκε έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε 1% πήκτωμα ΤΑΕ. Ακολούθησε καθαρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο, όπως θα περιγραφεί παρακάτω στις ενότητες 1.4.3 και 1.4.4.

Στην αντίδραση σύνθεσης ραδιοσημασμένων μορίων συμμετείχαν 100 ngr αρχικών μορίων-μήτρας από τον cDNA GDH-α κλώνο, επαναδιαλυμένα σε 7,5 μL H₂O. Αφού βράστηκε για περίπου 5 min ώστε να αποδιαταχθεί και να εισέλθει στην μονόκλωνη κατάσταση, διατηρήθηκε μέσα σε πάγο ώστε να εμποδιστεί η εκ νέου υβριδοποίηση. Η ραδιοσήμανση έγινε με ραδιοσημασμένα νουκλεοτίδια κυτοσίνης [γ -³²P] CTP και αδενίνης [γ -³²P] ATP, ενώ για την σύνθεση των ραδιοσημασμένων αλυσίδων, χρησιμοποιήθηκε ένα μίγμα από τυχαίους εξανουκλεοτιδικούς εκκινητές. Ο τελικός όγκος αντίδρασης έγινε στα 25 μL. Στα 7,5 μL μονόκλωνου DNA μήτρας, προστέθηκαν 11,5 μL μίγματος 2X LS εκκινητών, 1 μL BSA (10 mg/ml), 1 μL πολυμεράσης Klenow (5 U/μL) και 2 μL από τα σημασμένα νουκλεοτίδια [γ -³²P]dCTP και [γ -³²P]dATP (10 mCi/mL).

Η σύσταση του μίγματος των LS εκκινητών είναι Hepes 1 M pH 6.6 : DTM : OL (25:25:7). Τα συστατικά του διαλύματος DTM (0.1 mM dGTP και 0.1 mM dTTP) είναι διαλυμένα σε διάλυμα TM (250 mM Tris HCl pH 8.0, 25 mM MgCl₂ και 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλη). Επιπλέον, το διάλυμα των τυχαίων ολιγονουκλεοτιδίων OL έχει σύσταση 1 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 7.5 και 90 units / ml oligos (random primers).

Στην συνέχεια, ο διαχωρισμός των ραδιοσημασμένων μορίων ιχνηθέτη από τα μη ενσωματωμένα ραδιενεργά νουκλεοτίδια πραγματοποιήθηκε με διαχωρισμό τους σε στήλη ρητίνης Sephadex G-50 (Pharmacia). Το πακετάρισμα της στήλης ρητίνης πραγματοποιήθηκε με την εξής διαδικασία. Αρχικά, τοποθετήθηκε η ρητίνη G-50 στην στήλη μιας σύριγγας ινσουλίνης και έπειτα φυγοκεντρήθηκε για 5 min στις 2.700 rpm. Στην κολώνα κάθε φορά τοποθετήθηκαν 200 μL TE. Το πακετάρισμα ήταν επιτυχές, όταν μετά το τέλος της φυγοκέντρησης συλλέχθηκε τόση ποσότητα ΤΕ όση με αυτήν, που τοποθετήθηκε αρχικά.

Μετά το πακετάρισμα της κολώνας, προστέθηκαν στα 25 μL της αντίδρασης του random priming άλλα 75 μL νερό, ώστε ο τελικός όγκος να γίνει 100 μL. Έπειτα το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 5 min στις 2.700 rpm και συλλέχθηκε ο ραδιοσημασμένος ιχνηθέτης του οποίου οι κρούσεις μετρήθηκαν σε μετρητή σπινθηρισμού.

1.1.5 Υβριδισμός των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης με ραδιοσημασμένα μόρια ιχνηθέτη σε συνθήκες high και low stringency

Οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης αρχικά επωάστηκαν για 5-10 min σε 2X SSC διάλυμα αλάτων ώστε να εξισορροπηθούν, για να ακολουθήσει στην συνέχεια η διαδικασία προϋβριδοποίησης. Μετά την επώαση στο 2X SSC διάλυμα, οι μεμβράνες τυλίχθηκαν και τοποθετήθηκαν σε γυάλινους κυλίνδρους υβριδισμού (Hybaid). Σε κάθε κύλινδρο τοποθετήθηκαν 15 mL διαλύματος υβριδοποίησης CHURCH (500 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ pH:7.2, 7% (w/v) SDS, 1% (w/v) BSA, 1 mM EDTA, pH:8.0), προθερμασμένου στους 60°C. Η BSA μπλοκάρει τις θέσεις πάνω στο φίλτρο νιτροκυτταρίνης, στις οποίες δεν έχει μεταφερθεί DNA, συντελώντας έτσι στην διαδικασία προϋβριδοποίησης. Η προϋβριδοποίηση λαμβάνει χώρα στους 60°C για 1,5-2 h μέσα σε φούρνο υβριδισμού Hybaid.

Μετά το τέλος της προϋβριδοποίησης, έλαβε χώρα η υβριδοποίηση. Ο ραδιοσημασμένος ιχνηθέτης, αφού βράστηκε για περίπου 5 min ώστε να αποδιαταχθεί, προστέθηκε μέσα σε 15 mL διαλύματος CHURCH προθερμασμένου στους 60°C. Στην συνέχεια, προστέθηκαν τα 15 mL CHURCH+ραδιοσημασμένου ιχνηθέτη, μέσα στα 15 mL CHURCH που προϋπήρχαν στον κύλινδρο υβριδοποίησης.

Η διαδικασία υβριδοποίησης έλαβε χώρα για 12 h. Η διαδικασία της υβριδοποίησης πραγματοποιήθηκε σε high (65°C) και low stringency (55°C) συνθήκες. Ο λόγος για τον οποίο πραγματοποιήθηκε η υβριδοποίηση στις δυο αυτές καταστάσεις ήταν ότι ο ραδιοσημασμένος ιχνηθέτης ήταν ομόλογος για το

gdha γονίδιο και ήταν επιθυμητό να αναγνωρίσουμε μετά την εμφάνιση των films, τα σήματα από ειδική και μη ειδική πρόσδεση του ιχνηθέτη. Ο σκοπός ήταν να αναγνωριστούν τα σήματα, που οφείλονταν στο gdha γονίδιο από αυτά που θα οφείλονταν σε πιθανό γονίδιο, που κωδικοποιεί τη δεύτερη υπομονάδα (GDH-β) της GDH.

1.1.6 Πλυσίματα μεμβρανών και έκθεση

Η διαδικασία του πλυσίματος των μεμβρανών αποσκοπεί στην απομάκρυνση του ραδιοσημασμένου ιχνηθέτη, ο οποίος δεν προσδέθηκε με την αλληλουχίαστόχο πάνω στο φίλτρο της νιτροκυτταρίνης. Αυτό αποσκοπεί στη μείωση κατά στο ελάχιστο δυνατό, της μη ειδικής πρόσδεσης του ιχνηθέτη.

Τα πλυσίματα πραγματοποιήθηκαν με διαλύματα διαφόρων συγκεντρώσεων SDS και SSC. Το πρώτο διάλυμα είχε σύσταση 0,1% SDS και 2X SSC και πραγματοποιήθηκαν 2 διαδοχικά πλυσίματα για 30 min στους 60°C. Έπειτα, ακολούθησε το δεύτερο διάλυμα με σύσταση 0.5% SDS και 1X SSC όπου και πάλι πραγματοποιήθηκαν 2 πλυσίματα για 30 min στους 60°C. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν 2 διαδοχικά διαλύματα με 1% SDS και 0,5% SSC για 10 min στους 60°C.

Οι μεμβράνες αφού στέγνωσαν, τοποθετήθηκαν μαζί με φιλμ αυτοραδιογραφίας (Kodak Scientific Imaging Film: X-OMAT/AR 35x40 cm) μέσα σε μεταλλικές κασέτες. Αφέθηκαν για περίπου 15 h στους –80°C. Μετά από αυτόν τον χρόνο έκθεσης, ακολούθησε η εμφάνιση του film σε αυτοματοποιημένο σύστημα Curex 60 της Agfa.

1.1.7 Αποϋβριδοποίηση μεμβρανών

Πολλές από τις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης χρειάστηκε να ξαναϋβριδοποιηθούν, τόσο με διαφορετικού μήκους cDNA GDH-α ραδιοσημασμένο ιχνηθέτη, όσο και σε διαφορετικές συνθήκες υβριδισμού (high και low stringency). Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε αποϋβριδοποίηση των εκάστοτε μεμβρανών, ώστε να χρησιμοποιηθούν εκ νέου στις νέες υβριδοποιήσεις. Η αποϋβριδοποίηση επιτυγχάνεται είτε με επεξεργασία των μεμβρανών με αλκάλια, είτε με απλό βρασμό. Η μέθοδος που επιλέγεται κάθε φορά, εξαρτάται από την ποιότητα της μεμβράνης.

α) Σε αλκαλικές συνθήκες

Σε αρκετές περιπτώσεις υβριδοποιήσεων χρησιμοποιήθηκαν πλαστικές μεμβράνες Nytran αντί μεμβρανών νιτροκυτταρίνης, λόγω της υψηλότερης ανθεκτικότητας, που εμφανίζουν οι πρώτες στις μεταχειρίσεις κατά την διαδικασία του υβριδισμού και των πλυσιμάτων. Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιείται η αποϋβριδοποίηση αυτών των πλαστικών μεμβρανών, είναι επεξεργασία με 0,4 N NaOH στους 25⁰C για περίπου 90 min. Στις συνθήκες αυτές, ο μονόκλωνος ραδιοσημασμένος ανιχνευτής αποϋβριδοποιείται από την αλληλουχία στόχο πάνω στην μεμβράνη και απομακρύνεται, ώστε να χρησιμοποιηθεί η μεμβράνη για εκ νέου υβριδοποίηση.

β) Με βρασμό

Σε κάποιες περιπτώσεις υβριδοποιήσεων χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Λόγω της πολύ υψηλής ευαισθησίας που εμφανίζουν όταν επεξεργάζονται με αλκάλια, η αποϋβριδοποίηση τους με NaOH καθίσταται αδύνατη. Οι μεμβράνες αυτού του τύπου αποϋβριδοποιούνται με βρασμό τους για περίπου 15-20 min, οπότε ο ραδιοσημασμένος ιχνηθέτης αποϋβριδοποιείται από την αλληλουχία στόχο πάνω στην μεμβράνη.

μίγμα επωάστηκε για 1 h σε πάγο και ξαναφυγοκεντρήθηκε στις προηγούμενες συνθήκες. Έγινε λήψη του υπερκείμενου στο οποίο προστέθηκαν 1/9 του όγκου 3.3 M οξικό νάτριο pH 6.1 και δυο όγκοι απόλυτης αιθανόλης. Το μίγμα τοποθετήθηκε στους -20°C για τουλάχιστον 1 h. Τελικά το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις προηγούμενες συνθήκες και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Η πελλέτα επαναδιαλύθηκε σε 50-100 μl ΤΕ. 1.2 Σάρωση γενωμικής βιβλιοθήκης από την άμπελο (*Vitis vinifera*) με cDNA ανιχνευτή ομόλογο για τον ένα από τους δυο κλώνους

1.2.1 Κατασκευή MASTER PLATES

Για την απομόνωση των γενωμικών κλώνων της GDH από το αμπέλι, πραγματοποιήθηκε διαδικασία σάρωσης σε γενωμική βιβλιοθήκη από Vitis vinifera cv Sultanina. Για την κατασκευή της γενωμικής βιβλιοθήκης, πραγματοποιήθηκε πέψη γενωμικού DNA με την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI (8 bp cutter). Τα γενωμικά τμήματα που προέκυψαν, μπήκαν στον ιϊκό φορέα αντικατάστασης λ FIX II (STRATAGENE).

Για τις ανάγκες της πρώτης διαδικασίας σάρωσης, κατασκευάστηκαν Master plates διαστάσεων 20 X 20 cm. Τα πιάτα αυτά παρέχουν τη δυνατότητα να περιέχουν έναν μεγάλο αριθμό κλώνων, οι οποίοι αντιπροσωπεύουν ένα σχετικά μεγάλο τμήμα του γενώματος του οργανισμού.

Η κατασκευή της γενωμικής βιβλιοθήκης, καθώς και των master plates έλαβε χώρα σε προηγούμενο στάδιο και αποτέλεσε προϋπάρχον υλικό στην υλοποίηση αυτής της εργασίας.



Στην Εικόνα 5 φαίνεται σχηματικά ο ιϊκός φορέας αντικατάστασης λ FIX II.

Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση του φορέα αντικατάστασης της γενωμικής βιβλιοθήκης, λ FIX ΙΙ. Στην περιοχή Polylinker περιλαμβάνονται οι περιοριστικές θέσεις, *Xba*I, *SacI*, *NotI*, *SalI*, *Xho*I και *Eco*RI.

Από τιτλοδότηση της βιβλιοθήκης, που πραγματοποιήθηκε στο παρελθόν, βρέθηκε ότι κάθε πιάτο περιείχε περίπου 1,5 X 10⁵ pfu, νούμερο το οποίο αντιπροσωπεύει ένα μεγάλο τμήμα του γενώματος του αμπελιού.

1.2.2 Προετοιμασία βακτηριακού στελέχους-ξενιστή XL1-MRA

Για τον πολλαπλασιασμό των φάγων λ FIX ΙΙ, απαιτείται συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος, το οποίο θα επιμολυνθεί. Το βακτηριακό αυτό στέλεχος είναι τα κύτταρα Ε. Coli, XL1-MRA. Για την καλλιέργεια και προετοιμασία αυτού του στελέχους, πραγματοποιείται αρχικά επώαση μοναδικής αποικίας από το βακτηριακό στέλεχος XL1-MRA με 30 mL θρεπτικού μέσου LB το οποίο περιέχει επιπλέον 10 mM MgSO₄ και 0,2 % μαλτόζη. Το MgSO₄ και η μαλτόζη παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ικανότητα πρόσδεσης του φάγου πάνω στην μεμβράνη του βακτηρίου κατά την διαδικασία της επιμόλυνσης. Αφού τα κύτταρα επωάστηκαν στους 37°C για περίπου 4-6 h με ανάδευση στα 200 rpm, μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση στα 600 nm. Όταν η οπτική απορρόφηση σε αυτό το μήκος κύματος έγινε περίπου 1, σταμάτησε η περαιτέρω ανάπτυξη της καλλιέργειας και ακολούθησε η συλλογή των κυττάρων. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των κυττάρων τις καλλιέργειας σε ταχύτητα 500 x g για 10 min. Ακολούθησε επαναιώρηση της βακτηριακής πελέττας στο μισό του αρχικού όγκου της καλλιέργειας με 10 mM MgSO₄. Τελικά, πραγματοποιήθηκε επαναδιάλυση των κυττάρων XL1-MRA σε 10 mM MgSO4 μέχρι που η οπτική πυκνότητα στα 600 nm έγινε $OD_{600}=0.5$

1.2.3 Επώαση κυττάρων XL1-MRA με τον ιϊκό φορέα λ FIX ΙΙ

Πριν πραγματοποιηθεί η διαδικασία επώασης των φάγων της βιβλιοθήκης με το βακτηριακό στέλεχος XL1-MRA, υπολογίστηκε ο βαθμός αραίωσης που έπρεπε να υποστεί η βιβλιοθήκη, ώστε σε κάθε τριβλίο να περιέχεται ένας σχετικά ικανοποιητικός αριθμός κλώνων, που να είμαστε όμως σε θέση να τον μεταχειριστούμε με ευκολία. Η αραίωση αυτή υπολογίστηκε περίπου 1:1000 για την πρώτη διαδικασία σάρωσης ώστε να αναπτυχθεί σε κάθε πιάτο ο επιθυμητός αριθμός πλακών, που υπολογίσθηκε με βάση την αρχική τιτλοδότηση της γενωμικής βιβλιοθήκης. Οι αραιώσεις της βιβλιοθήκης έγιναν σε διάλυμα SM (5,8 gr NaCl, 2 gr MgSO₄ H₂O, 5 gr yeast extract, 10 gr NZ Amine ανά lt διαλύματος).

Αφού πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες αραιώσεις της βιβλιοθήκης, ακολούθησε η διαδικασία της επώασης των φάγων αυτών των αραιώσεων με τα βακτηριακά κύτταρα XL1-MRA. Έγινε προσθήκη 1 μL από την κατάλληλη αραίωση σε 200 μL κυττάρων XL1-MRA, που είχαν δεχτεί την επεξεργασία, που περιγράφηκε στην ενότητα 1.2.2. Η επιμόλυνση των βακτηρίων με τους φάγους έλαβε χώρα στους 37°C για 15 min. Έπειτα, προστέθηκαν στο μίγμα επώασης 3 mL top agar (Θρεπτικό μέσο NZYM, που περιέχει 0.7% αγαρόζη), το οποίο διατηρήθηκε σε θερμοκρασία 48°C και ακολούθησε αμέσως το άπλωμα του μίγματος top agar-βακτηρίων-φάγων στα διαστάσεων 20 X 20 cm πιάτα bottom agar (NZYM με 1,2% άγαρ), που είχαν προηγουμένως προθερμανθεί. Η σύσταση του μέσου NZYM είναι 10 gr NZ Amine, 5 gr NaCl ,5 gr Bacto yeast extract και 2 gr MgSO₄ 7H₂O ανά Lt διαλύματος. Ακολούθησε η επώαση των πιάτων στους 37°C για περίπου 8 h μέχρι που εμφανίστηκαν οι πλάκες.

Η ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθήθηκε κάθε φορά, που επαναλήφθηκε η διαδικασία σάρωσης, στην προσπάθεια να απομονωθούν μοναδικοί γενωμικοί κλώνοι λ FIX II, που να περιέχουν το επιθυμητό γονίδιο.

1.2.4 Μεταφορά φαγοσωματίων σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης και προϋβριδοποίηση

Αφού αναπτύχθηκαν οι πλάκες σε τέτοιο μέγεθος, ώστε να είναι ευδιάκριτες, ακολούθησε η μεταφορά τους και η ακινητοποίηση τους πάνω σε πλαστικές μεμβράνες Nytran. Η μεταφορά τους έγινε πιστά πάνω στην επιφάνεια της μεμβράνης, ώστε οι πλάκες να έχουν μεταξύ τους τις ίδιες σχετικές θέσεις με αυτές που είχαν πάνω στο τριβλίο. Για τον σκοπό αυτό μεμβράνες Nytran εφαρμόστηκαν πάνω στα τριβλία με τις σχηματισμένες πλάκες προσεκτικά ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες αέρος μεταξύ της μεμβράνης και του τριβλίου. Οι διαστάσεις της μεμβράνης ήταν ίδιες με αυτές του κάθε τριβλίου ώστε να διασφαλιστεί η μεταφορά όλων των πλακών από το κάθε τριβλίο. Η μεμβράνη αφέθηκε για περίπου 2 min σε θερμοκρασία δωματίου σε κάθε τριβλίο. Στην συνέχεια, κάθε μεμβράνη μαρκαρίστηκε με ασύμμετρες κουκίδες επί του τριβλίου, ώστε να μπορεί να γίνει μελλοντικά ταυτοποίηση πιθανού σήματος με μια συγκεκριμένη πλάκα από ένα συγκεκριμένο τριβλίο. Η μεμβράνη, η οποία περιείχε τα φαγοσωμάτια, που μεταφέρθηκαν από τα τριβλία, επωάστηκε με διάλυμα 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH για 2 min, ώστε να προκληθεί αποδιάταξη των φαγοσωματίων, που βρίσκονται πάνω σε αυτή. Σε έντονα αλκαλικές συνθήκες, η καπσιδιακή πρωτεΐνη των φάγων αποδιατάσσεται ώστε στην συνέχεια να εκβάλει το DNA τους πάνω στην επιφάνεια της μεμβράνης. Επιπλέον, οι αλκαλικές αυτές συνθήκες, οδηγούν σε ένα δεύτερο στάδιο, στην αποδιάταξη του δίκλωνου DNA των φάγων ώστε να μετατραπεί σε μονόκλωνο για την ανάγκη των υβριδοποιήσεων. Ακολούθησε έκθεση των μεμβρανών σε διάλυμα εξουδετέρωσης (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 8,0) για 5 min. Ο σκοπός του δεύτερου διαλύματος είναι η εξουδετέρωση των ισχυρών αλκαλικών συνθηκών που προκαλεί το πρώτο. Παρατεταμένη επώαση DNA σε ισχυρές αλκαλικές συνθήκες, μπορεί να του προκαλέσει ανεπιθύμητη θραύση. Τέλος, οι μεμβράνες πλύθηκαν με 0,2 M Tris-HCl, pH 7,5 και 2X SSC για περίπου 0,5 min ώστε να εξισορροπηθούν.

Έπειτα από αυτήν την διαδικασία, η μεμβράνες τοποθετήθηκαν σε διηθητικό χαρτί Whatman 3MM για σύντομο χρονικό διάστημα ώστε να στεγνώσουν. Αφού στέγνωσαν καλά οι μεμβράνες, πραγματοποιήθηκε ομοιοπολική πρόσδεση των μονόκλωνων τμημάτων DNA από κάθε πλάκα, πάνω στην επιφάνεια της μεμβράνης. Για τη διαδικασία αυτή, εκμεταλλευτήκαμε την ιδιότητα UV ακτινοβολίας, να προκαλεί ομοιοπολική πρόσδεση καταλοίπων θυμιδίνης πάνω στην ελεύθερη επιφάνεια της μεμβράνης. Η ομοιοπολική πρόσδεση του DNA πάνω στην μεμβράνη επιτεύχθηκε εκθέτοντας τις τελευταίες σε ακτινοβολία UV σε Stratalinker UV crosslinker στα 120.000 μJ για ~0.5 min. Μετά το τέλος της διαδικασίας ακινητοποίησης, τα πιάτα με τις σχηματισμένες πλάκες παρέμειναν και διατηρήθηκαν στους 4°C.

1.2.5 Παρασκευή ραδιοσημασμένων μορίων ιχνηθέτη

Για την παρασκευή ραδιοσημασμένων μορίων ιχνηθέτη για την σάρωση της βιβλιοθήκης, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του random priming, όπως ακριβώς αναλύθηκε στην ενότητα 1.1.4. Ως μήτρα για την σύνθεση του ιχνηθέτη χρησιμοποιήθηκε η πλήρους μήκους cDNA αλληλουχία της α υπομονάδας της GDH, που είχε απομονωθεί κατά το παρελθόν (Syntichaki et al. 1996). Η μέτρηση των κρούσεων έγινε με αυτοματοποιημένο μετρητή σπινθηρισμού όπως ακριβώς περιγράφηκε στην ενότητα 1.1.4.

1.2.6 Υβριδοποίηση μεμβρανών

Μετά την παρασκευή του ραδιοσημασμένου ιχνηθέτη, ακολούθησε η διαδικασία της υβριδοποίησης μεταξύ του ραδιοσημασμένου ιχνηθέτη και του γενετικού υλικού των πλακών. Η διαδικασία υβριδοποίησης είναι ακριβώς όμοια με την διαδικασία υβριδοποίησης που περιγράφηκε στην ενότητα 1.1.5. Ο ραδιοσημασμένος ιχνηθέτης έδινε τελική ενεργότητα μέσα στον τελικό όγκο υβριδοποίησης, περίπου 250-500.000 cpm/ml. Η υβριδοποίηση έλαβε χώρα στους 62°C για 12 h.

1.2.7 Πλυσίματα μεμβρανών και έκθεση

Για την αποδέσμευση μορίων ιχνηθέτη, που προσδέθηκαν μη ειδικά στις μεμβράνες, πραγματοποιήθηκαν πλυσίματα με διαλύματα, που περιείχαν SSC και SDS. Κάθε μεμβράνη πλύθηκε 3 φορές συνολικά σε τρία, διαφορετικής συγκέντρωσης σε SSC και SDS διαλύματα. Διαδοχικά, στα τρία αυτά διαλύματα, μειώνεται η συγκέντρωση σε SSC και αυξάνει σε SDS. Έτσι, διαδοχικά οι

αποδιατακτικές συνθήκες γίνονται πιο ισχυρές ώστε να αποδεσμευτούν όλα τα μη ειδικά προσδεμένα μόρια ιχνηθέτη.

Η διαδικασία είναι όμοια όπως περιγράφηκε στην ενότητα 1.1.5

1.2.8 Επιλογή θετικών πλακών και προσπάθεια απομόνωσης τους σε καθαρή κατάσταση

Αφού έγινε ταυτοποίηση των θετικών σημάτων των films μετά την εμφάνιση τους, με τις αντίστοιχες πλάκες πάνω στα πιάτα, ακολούθησε η επιλογή των θετικών πλακών από τις οποίες θα γίνει η απομόνωση του γενετικού υλικού. Για τις ανάγκες αναγνώρισης των θετικών πλακών επί των πιάτων, τοποθετήθηκαν τα film τα οποία περιείχαν τα θετικά σήματα, πάνω στα πιάτα. Στην σωστή τοποθέτηση των films βοήθησε η ύπαρξη ασύμμετρων κουκίδων που δημιουργήσαμε ενώ ακόμη πάνω στα πιάτα ήταν απλωμένες οι μεμβράνες. Έτσι, πιάτα και αντίστοιχες μεμβράνες, διαθέτουν τις ίδιες ασύμμετρες κουκίδες ώστε να μπορεί αργότερα να γίνει η αντιστοίχιση.

Πάνω στα film με τα θετικά σήματα, σημειώθηκαν οι ασύμμετρες κουκίδες αφού έγινε η αντιστοίχιση από τις μεμβράνες. Έπειτα, τα film αυτά αντιστοιχήθηκαν μετά αντίστοιχα πιάτα, πάντα αντιστοιχώντας τα ασύμμετρα στίγματα. Τελικά, επιλέχθηκαν οι θετικές πλάκες πάνω στα πιάτα και απομονώθηκαν. Οι πλάκες αυτές μεταφέρθηκαν σε 1 ml SM buffer (διάλυμα διάχυσης φάγων) για να διαχυθούν οι φάγοι έξω από το Bottom agar. Επίσης, μέσα στο SM buffer προστέθηκαν και 20 μL CHCl₃ για να λυθούν τα μη λυμένα κύτταρα που πιθανόν λάβαμε με την συλλογή βακτηριακής χλόης κατά την διαδικασία απομόνωσης των πλακών. Οι φάγοι διαχύθηκαν έξω από το bottom agar με ανακίνηση για 1-2 h στους 25°C ή εναλλακτικά στους 4°C για 12 h. Για την διαδικασία δευτερογενούς σάρωσης, προκειμένου να απομονωθούν θετικοί φάγοι σε μοναδική κατάσταση, δημιουργήθηκαν αραιώσεις 10⁻³, από το SM buffer μέσα στο οποίο έγινε η διάχυση των φάγων. Από αυτήν την αραίωση, λήφθηκαν 4 μL και επωάστηκαν μαζί με 200 μL κύτταρα XL1-MRA. Στην συνέχεια, για την δευτερογενή σάρωση, επαναλήφθηκε η διαδικασία σάρωσης όπως περιγράφηκε στις προηγούμενες ενότητες.

1.3 Απομόνωση φαγικού DNA

Αφού έγινε η επιλογή των θετικών κλώνων από τις διαδοχικές διαδικασίες σάρωσης της βιβλιοθήκης, ακολούθησε η προσπάθεια απομόνωσης μόνο των γονιδίων της GDH, μέσα από τους φαγικούς κλώνους. Η διαδικασία απομόνωσης και χαρακτηρισμού τους, απαιτούσε την προσφορά σε σχετικά μεγάλες ποσότητες, του γενωμικού τμήματος που περιεχόταν μέσα στους θετικούς φαγικούς κλώνους. Γι` αυτόν τον λόγο, ακολούθησε η διαδικασία απομόνωσης φαγικού DNA από τους θετικούς φάγους.

1.3.1 Επιμόλυνση βακτηριακού στελέχους XL1-MRA με φαγοσωμάτια λ FIX II

Η διαδικασία απομόνωσης σε μεγάλη κλίμακα, DNA από τα φαγοσωμάτια, εμπεριέχει ένα πρώτο στάδιο επιμόλυνσης ειδικού βακτηριακού στελέχους Ε. Coli, με τα φαγοσωμάτια του συγκεκριμένου κλώνου. Τα φαγοσωμάτια, σε αυτό το πρώτο στάδιο, επικολλούνται στην μεμβράνη των βακτηριακών κυττάρων XL1-MRA, ώστε να ακολουθήσει η είσοδος του γενετικού υλικού των φάγων μέσα στα βακτήρια, καθώς και η επακόλουθη λύση αυτών. Η λύση των βακτηριακών κυττάρων, ακολουθείται από απελευθέρωση μεγάλου αριθμού κόπιας του γενώματος του φάγου. Εκμεταλλευόμενοι την ιδιότητα του φαγικού γενώματος να πολλαπλασιάζεται μέσα στο κύτταρο-ξενιστή, προκαλούμε τεχνητά την παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα, του γενωμικού τμήματος που εμπεριέχεται μέσα στο φαγικό γενετικό υλικό.

Αρχικά, γίνεται προετοιμασία του βακτηριακού στελέχους XL1-MRA για την περαιτέρω μόλυνση με τους φάγους. Αρχικά, σε 3 mL θρεπτικού διαλύματος LB, έγινε επώαση μικρής ποσότητας κυττάρων XL1-MRA από glycerol stock ή από μοναδική αποικία. Τα κύτταρα αφέθηκαν να αναπτυχθούν στους 37°C για περίπου 12 h. Αφού έγινε η ανάπτυξη της καλλιέργειας, 1 mL από την καλλιέργεια αυτή, μεταφέρθηκε σε 50 mL θρεπτικού διαλύματος LB, εμπλουτισμένου σε 0.2% μαλτόζη και 10 mM MgSO₄. Η καλλιέργεια αναπτύχθηκε στους 37°C μέχρι που η οπτική πυκνότητα της έγινε στα 550 nm περίπου 1 (OD₅₅₀=1). Η μαλτόζη και το MgSO₄μέσα στο θρεπτικό διάλυμα, παίζουν ουσιαστικό ρόλο για την προετοιμασία των μεμβρανών των βακτηριακών κυττάρων, ώστε σε ένα επόμενο στάδιο, να γίνει εφικτή η προσκόλληση των φάγων πάνω σε αυτές. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 500 x g για 10 min. Αφού απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, η βακτηριακή πελλέτα επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα 10 mM MgSO₄, ώστε μετά την επαναδιάλυση η οπτική πυκνότητα των κυττάρων στα 550 nm, να είναι και πάλι περίπου 1.

Αφού έγινε η προετοιμασία των βακτηριακών κυττάρων, ακολούθησε η διαδικασία επιμόλυνσης. Αρχικά, επωάσθηκαν 100 μL XL1-MRA κυττάρων με 150 μL διαλύματος SM/φάγων, που απομονώθηκαν από τις σαρώσεις. Η επώαση πραγματοποιήθηκε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, ακολούθησε προσθήκη του μίγματος φάγων-κυττάρων, μέσα σε 50 ml NZY θρεπτικού μέσου και ακολούθησε επώαση στους 37°C για περίπου 12 h.

1.3.2 Συλλογή φαγοσωματίων και απομόνωση φαγικού γενετικού υλικού

Αφού μεγάλωσε αρκετά η καλλιέργεια, ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 7000 rpm για 10 min στους 4°C. Σε αυτό το στάδιο έγινε προσθήκη πολύ μικρής ποσότητας CHCl₃, το οποίο βοηθά στην λύση των μολυσμένων κυττάρων, που δεν έχουν προλάβει να λυθούν από τους φάγους. Το ίζημα που σχηματίζεται από την φυγοκέντρηση είναι μεμβράνες, πολυσακχαρίτες καθώς και άλλες μεγάλου μοριακού βάρους ουσίες, που προέρχονται από την λύση των κυττάρων. Στο υπερκείμενο της φυγοκέντρησης, παραμένουν τα φαγοσωμάτια. Γι` αυτό, ακολούθησε μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα και προσθήκη 8 mL 20% PEG (MW 8000) με 2,5 M NaCl. Η PEG μαζί με το άλας προκαλεί κατακρήμνιση των φαγοσωματίων ώστε να γίνει η συλλογή τους. Το μίγμα επωάστηκε στους 4°C για 1-2 h και έπειτα φυγοκεντρήθηκε στις 10000 rpm για 10 min στους 4°C. Έγινε αφαίρεση του άχρηστου υπερκείμενου και λάβαμε την πελλέτα που αποτελείται μόνο από φαγοσωμάτια. Κρίσιμης σημασίας αποτελεί το γεγονός ότι η PEG πρέπει να αφαιρεθεί πάρα πολύ καλά λόγω της ικανότητας της να μπλοκάρει την λειτουργία ενζύμων. Τελικά, η πελλέτα επαναδιαλύθηκε σε 500 μL TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA). Ακολούθησε προσθήκη 250 μL φαινόλης και 250 μL CHCl₃ για να καθαρίσει το μίγμα από πρωτεΐνες και άλλες άγρηστες ουσίες. Μετά από καλή ανάδευση του μίγματος, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 2 min. Η υδατική φάση η οποία περιέχει τα υδατοδιαλυτά νουκεϊκά οξέα, μεταφέρθηκε σε άλλο σωλήνα και έγινε επανάληψη καθαρισμού με φαινόλη/CHCl₃ ξανά. Για την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων από την υδατική φάση, ακολούθησε προσθήκη 1/10 του όγκου αντίδρασης 3 M NaCOOH pH 5,8 και 2,5 όγκοι απόλυτης παγωμένης αιθανόλης. Το άλας και η αιθανόλη δρουν ανταγωνιστικά με τα μόρια DNA για την δημιουργία δεσμών υδρογόνου με το H₂O. Τα πρώτα σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου πολύ πιο εύκολα απ' ότι το DNA. Τελικά, το DNA χάνει τους δεσμούς υδρογόνου με το H₂O και παύει να είναι ευδιάλυτο σε αυτό. Το DNA κατακρημνίστηκε στους -80°C για 15 min και το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 15 min στους 4°C. Το ίζημα πλύθηκε 2 φορές με 1 mL 70% αιθανόλη για τον καθαρισμό από τα αλάτια και τελικά επαναδιαλύθηκε σε 100 μL TE, pH 8,0.

1.4 Άμεση κλωνοποίηση γενωμικών τμημάτων από τους φαγικούς κλώνους στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript

Για την ανάλυση και τον χαρακτηρισμό του γονιδίου gdha, πραγματοποιήθηκαν πέψεις των γενωμικών φαγικών κλώνων με διάφορες περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Ακολούθησε η απομόνωση των ζωνών, που προέκυψαν από την κάθε πέψη, καθώς και η προσπάθεια κλωνοποίησης τους στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας τους.

1.4.1 Πέψεις φαγικών κλώνων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Για την εύρεση του μεγέθους του γενωμικού τμήματος του κάθε φαγικού κλώνου, πραγματοποιήθηκαν πέψεις μικρής ποσότητας DNA από κάθε κλώνο με την περιοριστική ενδονουκλεάση Notl. Η κατασκευή της γενωμικής βιβλιοθήκης που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των κλώνων, πραγματοποιήθηκε με πέψη του γενωμικού DNA αμπελιού με ένα ένζυμο που αναγνωρίζει αλληλουχία πέψης 4bp. Εν συνεχεία, ακολούθησε η διασύνδεση των θραυσμάτων περιορισμού με τους βραχίονες του φάγου λ FIX II. Η ενδονουκλεάση Notl αναγνωρίζει αλληλουχία πέψης 8bp και άρα αντιπροσωπεύεται σε ένα γένωμα, με συχνότητα (1/4)⁸ bp δηλαδή περίπου κάθε 65 Kb. Η θέση αναγνώρισης της ενδονουκλεάσης Notl βρίσκεται στα άκρα του φάγου και πέψη με αυτό το ένζυμο, απελευθερώνει το γενωμικό ένθεμα από αυτόν.

Επίσης, πραγματοποιήθηκαν πέψεις των φαγικών κλώνων με την περιοριστική ενδονουκλεάση Sal I. Η ενδονουκλεάση αυτή αναγνωρίζει αλληλουχία πέψης 6 bp και άρα αντιπροσωπεύεται κάθε 4 Kb περίπου. Πέψεις με αυτό το ένζυμο πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την απομόνωση θραυσμάτων περιορισμού, τα οποία τα προέρχονται μέσα από το γενωμικό ένθεμα του φάγου. Για κάθε πέψη φαγικού κλώνου χρησιμοποιήσαμε περίπου 10-15 μg DNA με περίσσεια (4πλάσια ποσότητα ~40 Units) περιοριστικής ενδονουκλεάσης. Η τελική συγκέντρωση του Buffer αντίδρασης ήταν 1Χ. Στην αντίδραση συμπεριλαμβάνονταν επίσης RNase A σε τελική συγκέντρωση 10 μgr/μL για αποδόμηση του RNA, καθώς επίσης και BSA (Bovin Serum Albumin)σε τελική συγκέντρωση 10 μgr/μL για προστασία των ενζύμων περιορισμού. Οι πέψεις πραγματοποιήθηκαν στους 37°C για περίπου 4 h.

1.4.2 Πέψεις του πλασμιδιακού φορέα pBluescript με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Με την πέψη των φαγικών κλώνων με την περιοριστική ενδονουκλεάση Sall, πραγματοποιήθηκε απελευθέρωση τμημάτων των γενωμικών ενθεμάτων μέσα από
αυτούς. Απώτερος σκοπός ήταν η απομόνωση αυτών των τμημάτων και η εισαγωγή τους μέσα σε κάποιον πλασμιδιακό φορέα, για περαιτέρω ανάλυση. Ο πλασμιδιακός φορέας που επιλέχτηκε για την εισαγωγή αυτών των θραυσμάτων, ήταν ο pBluescript II SK (+/-) phagemid. Πρόκειται για έναν πλασμιδιακό φορέα μεγέθους 2961 bp με ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη που διαθέτει το σύστημα άμεσης επιλογής blue/white selection. Η περιοχή ένθεσης βρίσκεται ενδιάμεσα στους υποκινητές T7 και T3 και περιέχει πολλές από τις γνωστές θέσεις περιορισμού. Το ρεπλικόνιο του είναι το ColE1 και πρόκειται για ένα high copy πλασμίδιο.

Στην περίπτωση αυτού του πλασμιδιακού φορέα, πραγματοποιήθηκαν πέψεις με την περιοριστική ενδονουκλεάση Sall, η οποία εντοπίζεται μέσα στην περιοχή polylinker. Με πέψη με το ένζυμο αυτό, απελευθερώνεται ένα μικρό τμήμα της περιοχής polylinker και δημιουργούνται συμπληρωματικά Sall άκρα. Έτσι, ήταν εφικτή η υβριδοποίηση με τα συμπληρωματικά άκρα των θραυσμάτων περιορισμού από τις πέψεις των φαγικών κλώνων. Για την απομόνωση γραμμικής μορφής πλασμιδιακού φορέα pBluescript, πραγματοποιήθηκε πέψη 10 μgr υπερελικωμένου πλασμιδιακού φορέα, με την ενδονουκλεάση SalI. Χρησιμοποιήθηκε περίσσεια ενζύμου (4πλάσια ποσότητα). Η τελική αντίδραση περιελάμβανε και πάλι RNase A και BSA, στις ίδιες τελικές συγκεντρώσεις, όπως στις πέψεις των φαγικών κλώνων. Οι όγκοι και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων ταυτίζονται πλήρως με τα αντίστοιχα των πέψεων στην περίπτωση των πέψεων των φαγικών κλώνων. Οι πέψεις έλαβαν χώρα στους 37°C για περίπου 2-3 h.

1.4.3 Ηλεκτροέκλουση γενωμικών τμημάτων και πλασμιδιακού φορέα από πήκτωμα αγαρόζης

Μετά το τέλος των πέψεων, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας από την κάθε μία σε 1 % ΤΑΕ πήκτωμα αγαρόζης (40 mM Tris Acetate, 10 mM EDTA).

Αφού διαπιστώθηκε ότι η διαδικασία πέψης επιτεύχθηκε επιτυχώς, ακολούθησε η ηλεκτροέκλουση των επιθυμητών ζωνών έξω από το πήκτωμα αγαρόζης. Κατά την διαδικασία της ηλεκτροέκλουσης, αφού απομονώθηκε το κομμάτι του πηκτώματος που περιείχε την επιθυμητή ζώνη, τοποθετήθηκε μέσα σε μεμβράνη διάλυσης, η οποία περιείχε 1 mL 1X ΤΕ διάλυμα. Η μεμβράνη στην συνέχεια σφραγίστηκε με ειδικά clips η κατασκευή αυτή τοποθετήθηκε μέσα σε συσκευή ηλεκτροφόρησης. Με την διαδικασία ηλεκτροφόρησης που ακολούθησε, πραγματοποιήθηκε η έξοδος όλης της ποσότητας DNA από την ζώνη που απομονώθηκε, μέσα στο διάλυμα ΤΕ στην μεμβράνη διάλυσης.

1.4.4 Καθαρισμός τμημάτων με φαινόλη/χλωροφόρμιο

Τα τμήματα που απομονώθηκαν με την διαδικασία της ηλεκτροέκλουσης, περιέχουν ξένα ανεπιθύμητα μόρια (πχ μόρια αγαρόζης, βρωμιούχο αιθίδιο) τα οποία απομονώθηκαν μαζί με το DNA. Τα μόρια αυτά μπορούν να προκαλέσουν την καταστολή της λειτουργίας κάποιων ενζύμων. Θεωρείτε λοιπόν κρίσιμης σημασίας, ο καθαρισμός των δειγμάτων μας από αυτά τα μόρια, για την επιτυχή κλωνοποίηση των ζωνών στο μέλλον.

Ο καθαρισμός του DNA πραγματοποιείται με φαινόλη και CHCl₃. Η φαινόλη αποτελεί έναν οργανικό διαλύτη, ο οποίος έχει την ικανότητα να δεσμεύει τις πρωτεΐνες που βρίσκονται μέσα σε ένα διάλυμα. Για τον καθαρισμό αναμιγνύεται φαινόλη με το διάλυμα TE από την ηλεκτροέκλουση, σε αναλογία όγκου ως προς 8/10 ως προς το διάλυμα αυτό. Έπειτα, το μίγμα καθαρίστηκε με διάλυμα CHCl₃/ισοαμυλική αλκοόλη 24:1 για απομάκρυνση της φαινόλης που πιθανόν να παρέμεινε. Ο φαινολικός δακτύλιος έχει την ικανότητα να μπλοκάρει την λειτουργία διάφορων ενζύμων. Για τον λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η απομάκρυνση ακόμα και ίχνους φαινόλης. Το CH₃Cl δεσμεύει τα ίχνη φαινόλης από τα δείγματα μας ενώ η λειτουργία της ισοαμυλικής αλκοόλης είναι να δημιουργεί καλή μεσόφαση, για τον εύκολο διαχωρισμό μεταξύ υποκείμενης φάση CH₃Cl και υπερκείμενης υδατικής φάσης. Τέλος, με προσθήκη διπλάσιου όγκου απόλυτης αιθανόλης και 1/10 του όγκου ΝαCOOH 3M pH 5.4. Το όξινο pH

του διαλύματος εξουδετερώνει το αρνητικό φορτίο που φέρουν οι φωσφορικές ομάδες των νουκλεοτιδίων του DNA. Το φορτίο που διαθέτουν αυτές σε ουδέτερο και αλκαλικό pH, είναι υπεύθυνο για την δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ αυτών και μορίων του διαλύτη. Με την εξουδετέρωση του αρνητικού φορτίου, το DNA χάνει την ικανότητα δημιουργίας αυτών των δεσμών και μειώνεται η διαλυτότητα του. Παράλληλα, η απόλυτη αιθανόλη και το πυκνό οξικό νάτριο, δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με τα ελεύθερα μόρια νερού, μειώνοντας έτσι ακόμη περισσότερο την διαλυτότητα του DNA. Σαν τελικό αποτέλεσμα, επιτυγχάνεται η κατακρήμνιση του DNA. Μετά την κατακρήμνιση, ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 10 min οπότε το DNA σχημάτισε πελλέτα στον δοκιμαστικό σωλήνα. Αφού αφαιρέθηκε όλη η απόλυτη αιθανόλη, πραγματοποιήθηκαν πλυσίματα των πελλετών με 75% αιθανόλη για απομάκρυνση ποσότητας αλάτων από το DNA. Τα άλατα που δεσμεύονται μαζί με το DNA καταστέλλουν και αυτά με την σειρά τους αρκετά περιοριστικά ένζυμα και προσδίδουν ανώμαλες κινητικές ιδιότητες στο DNA. Μετά το πλύσιμο ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 10 min. Αφού στέγνωσε καλά η πελλέτα, επαναδιαλύθηκε σε 20-30 μL TE pH 8.0.

1.4.5 Κλωνοποίηση των θραυσμάτων περιορισμού και του πλασμιδιακού φορέα

Αφού απομονώθηκαν σε καθαρή κατάσταση ποσότητες του πλασμιδιακού φορέα pBluescript κομμένου με *Sal*I και θραυσμάτων περιορισμού από τους φαγικούς κλώνους, επίσης κομμένων με *Sal*I, ακολούθησε η διαδικασία κλωνοποίησης των θραυσμάτων μέσα στον πλασμιδιακό φορέα.

Για την διαδικασία της διασύνδεσης (ligation) μορίων pBluescript με συμπληρωματικά άκρα για τα θραύσματα περιορισμού από φαγικούς κλώνους, χρησιμοποιήθηκαν περίπου 50 ngr από το καθένα. Μεγαλύτερη ποσότητα επηρεάζει αρνητικά την κινητική των μορίων για την διαδικασία της διασύνδεσης. Η αναλογία μορίων pBluescript και μορίων από την ηλεκτροέκλουση πρέπει να υπολογίζεται να είναι περίπου 1:1 μέσα στην αντίδραση. Επιπλέον, στην αντίδραση προστέθηκε BSA σε τελική συγκέντρωση 10 μgr/μL, 0,5 units T4 λιγάσης, 1X T4 buffer λιγάσης.

Επιπλέον στην αντίδραση διασύνδεσης, συμμετέχει το ένζυμο T4 λιγάση (1u/μL) καθώς και το ρυθμιστικό διάλυμα αυτού σε τελική συγκέντρωση 1Χ. Επιπλέον, η λιγάση απαιτεί για την λειτουργία της, μόρια ATP. Για τον σκοπό αυτό, προσθέσαμε 1 μL ATP συγκέντρωσης 5 mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 10 μL. Η διαδικασία της διασύνδεσης πλασμιδιακού φορέα και ενθέματος περιορισμού έλαβε χώρα στους 16°C για 4 h ή και στους 4°C για 12 h.

1.4.6 Βακτηριακή μεταμόρφωση κυττάρων E.coli DH5A

Μετά το πέρας της αντίδρασης διασύνδεσης πλασμιδιακού φορέα και θραυσμάτων των γενωμικών κλώνων, ακολουθεί η εισαγωγή του μίγματος αντίδρασης μέσα σε βακτηριακό στέλεχος DH5A με σκοπό την απόκτηση μοναδικών αποικιών, που θα περιέγουν την επιθυμητή πλασμιδιακή κατασκευή pBluescript-θραύσμα γενωμικού κλώνου. Για την διαδικασία αυτή χρησιμοποιούμε κύτταρα τα οποία έχουν επιδεχτεί ειδική επεξεργασία ώστε να είναι επιδεκτικά στην πρόσληψη γενετικού υλικού από το εξωτερικό περιβάλλον. Σε 50 μL επιδεκτικών κυττάρων DH5A, προσθέσαμε ~10 μL από την αντίδραση διασύνδεσης. Το όλο μίγμα επωάστηκε για 30 min στον πάγο. Κατά το στάδιο αυτό, η πλασμιδιακή κατασκευή από την αντίδραση διασύνδεσης προσδένεται στην επιφάνεια των επιδεκτικών κυττάρων, ώστε να ακολουθήσει σε επόμενο στάδιο, η είσοδος του στο βακτηριακά κύτταρα. Στην συνέχεια, τα κύτταρα δέχτηκαν θερμικό στρες για 20 sec στους 37°C και έπειτα επανατοποθετήθηκαν για 2 min σε πάγο. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν μέσα σε 950 μL LB, YT ή S.O.C. θρεπτικό μέσο και ακολούθησε επώαση για 1-2 h στους 37°C. Τέλος, το θρεπτικό μέσο με τα κύτταρα απλώθηκε σε κατάλληλο πιάτο θρεπτικού μέσου το οποίο περιείχε το κατάλληλο αντιβιοτικό (Αμπικιλίνη) καθώς και μίγμα Xgal/IPTG το οποίο μας παρέχει την δυνατότητα να γίνει blue/white επιλογή των αποικιών.

1.4.7 Απομόνωση μικρής ποσότητας γενετικού υλικού από τις ανασυνδυασμένες αποικίες με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης (Miniprep)

Τα βακτήρια που κατάφεραν να λάβουν από το περιβάλλον τους την πλασμιδιακή κατασκευή pBluescript-θραύσμα, αναπτύχθηκαν και έδωσαν αποικίες. Κάθε αποικία έχει προέλθει από ένα μόνο βακτήριο με μονογονική αναπαραγωγή. Συνεπώς, μια αποικία περιέχει πανομοιότυπα κύτταρα τα οποία περιέχουν την ίδια πλασμιδιακή κατασκευή με το ίδιο ένθεμα. Το αντιβιοτικό στο θρεπτικό μέσο εξασφαλίζει ότι δεν θα αναπτυχθούν άλλα βακτήρια από μόλυνση ενώ λόγω της ύπαρξης Xgal, οι ανασυνδυασμένες αποικίες εμφανίζουν λευκό χρώμα ενώ οι μη ανασυνδυασμένες μπλέ.

Η διαδικασία της λύσης κυττάρων από καλλιέργεια και απομόνωσης γενετικού υλικού, γίνεται με επεξεργασία των κυττάρων με αλκάλια. Αρχικά, τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο σωλήνα 3 mL LB + Amp (100 µgr/ml) μαζί με μια αποικία και πραγματοποιείται επώαση για 12 h στους 37°C. Ο λόγος για τον οποίο επωάζεται μέσα στο θρεπτικό μέσο αυστηρά μια μόνο αποικία είναι για την επίτευξη της απομόνωσης μιας μόνο πλασμιδιακής κατασκευής με ένα μόνο ένθεμα. Η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στις 12000 rpm για περίπου 4-5 min και ακολούθησε η συλλογή του βακτηριακού ιζήματος. Η πελλέτα των βακτηρίων επαναδιαλύθηκε σε 100 μL διαλύματος Ι (25 mM Tris-Cl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 150 mM γλυκόζη) και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Ακολούθησε προσθήκη 200 μL διαλύματος ΙΙ (0,2 N NaOH, 1% SDS). Το SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) αποτελεί ένα ισχυρό ανιοντικό απορρυπαντικό το οποίο εισέρχεται μεταξύ των φωσφολιπιδίων των μεμβρανών και προκαλεί καταστροφή των μεμβρανών. Έγινε ανάδευση του μίγματος και ακολούθησε επώαση για 5 min στον πάγο. Μετά την επώαση, ακολούθησε προσθήκη 150 μL διαλύματος ΙΙΙ (3M KCOOH, 10% CH₃COOH) και ήπια ανάδευση του μίγματος. Έπειτα, το μίγμα τοποθετήθηκε στον πάγο για 5 min ώστε να εξουδετερωθούν οι αλκαλικές συνθήκες από το δεύτερο διάλυμα, και παράλληλα να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες από το οξικό κάλιο. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 5 min στις 12000

rpm και έγινε λήψη του υπερκείμενου. Στο τελευταίο, προστέθηκαν 400 μL μίγματος φαινόλη/CHCl₃ σε αναλογία 1:1, και ακολούθησε ανάδευση του μίγματος και φυγοκέντρηση για 5 min στις 12000 rpm. Αφού έγινε λήψη της υπερκείμενης υδατικής φάσης, ακολούθησε προσθήκη 1 ml απόλυτης αιθανόλης. Σκοπός της απόλυτης αιθανόλης είναι η κατακρήμνιση του γενετικού υλικού. Σε αντιδιαστολή με την διαδικασία καθαρισμού DNA με φαινόλη/CH₃Cl, σε αυτήν την περίπτωση δεν προσθέτουμε άλας διότι περιέχει ήδη το οζικό κάλιο από το διάλυμα III. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 min για την κατακρήμνιση του DNA. Έπειτα, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και έγινε προσθήκη 1 mL 70% αιθανόλης και φυγοκέντρηση για 2 min. Η 70% αιθανόλη χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των αλάτων από την πελλέτα του νουκλεϊκού οξέος. Αφού αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει από τα υπολείμματα της 70% αιθανόλης. Τέλος, το DNA διαλυτοποιήθηκε σε 20 μL TE + RNase A (20μgr/ml).

1.5 Κλωνοποίηση γενωμικών τμημάτων μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Λόγω της ιδιαίτερης δυσκολίας κλωνοποίησης των θραυσμάτων γενωμικών φαγικών κλώνων μέσα στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript, η προσπάθεια ανάλυσης τους έγινε και με μια άλλη προσέγγιση. Με πρότυπο τον cDNA GDH-a κλώνο, πραγματοποιήθηκε στοίχιση της αλληλουχίας του με άλλες γνωστές αλληλουχίες GDH-α, που βρίσκονται καταχωρημένες στην βάση δεδομένων Genbank. Η στοίχιση πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του προγράμματος Clustal. Με την βοήθεια της στοίχισης αυτής, έγινε εφικτός ο προσδιορισμός και η οριοθέτηση του κάθε εξονίου κατά μήκος της αλληλουχίας του cDNA GDH-a κλώνου. Έτσι, κατασκευάστηκαν κατάλληλη εκκινητές οι οποίοι να υβριδοποιούνται στα άκρα των εξονίων. Κάνοντας PCR με αυτούς τους εκκινητές στους φαγικούς γενωμικούς κλώνους, πολλαπλασιάστηκαν τμήματα τα οποία στα άκρα τους φέρουν μερικές αλληλουχίες από τα εξόνια αλλά περιέχουν και τις ενδιάμεσες περιοχές των ιντρονίων. Με αυτήν την προσέγγιση επιτεύχθηκε ο χαρακτηρισμός του γενωμικού GDHA κλώνου.

1.5.1 Αντιστοίχιση του GDH-α cDNA κλώνου με άλλους γνωστούς GDH-α γενωμικούς κλώνους για ταυτοποίηση των άκρων των εξονίων

Σε ένα αρχικό στάδιο, έγινε στοίχιση του cDNA GDH-α κλώνου με άλλους cDNA GDH κλώνους από Nicotiana plumbaginifolia, Arabidopsis taliana, Zea mays και Asparagus officinalis. Από την στοίχιση αυτή διαπιστώθηκε ο πολύ υψηλός βαθμός ομολογίας των αλληλουχιών της GDH μεταξύ των διαφορετικών ειδών. Ο βαθμός ομολογίας μέσα στις εξονικές περιοχές κυμαινόταν από 85% έως και 92% σε κάποια αρκετά συντηρημένα τμήματα. Με την αντιστοίχηση αυτή, αναγνωρίστηκαν τα άκρα του κάθε εξονίου κατά μήκος της αλληλουχίας του cDNA κλώνου. Συνοπτικά η διαδικασία περιγράφεται στην Εικόνα 6



ΓΕΝΩΜΙΚΟΣ ΚΛΩΝΟΣ GDHA ΑΠΟ Nicotiana plumbaginifolia

cDNA GDHA κλώνος από αμπέλι

Εικόνα 6. Σχηματική διάταξη της διαδικασίας στοίχισης των εξονίων του κλώνου cDNA GDH-α από αμπέλι, με τον αντίστοιχο γενωμικό GDH-α από καπνό

1.5.2 PCR με κατάλληλους εκκινητές στους GDHA γενωμικούς κλώνους

Από την αντιστοίχηση του cDNA GDH-α κλώνου από αμπέλι, με τον γενωμικό GDH-α κλώνο από *Nicotiana plumbaginifolia*, έγινε εφικτή η κατασκευή ομόλογων εκκινητών. Οι εκκινητές αυτοί, υβριδοποιούνται στα άκρα των εξονικών περιοχών και με κατεύθυνση προς τις ενδιάμεσες ιντρονικές περιοχές, όπως φαίνεται στην Εικόνα 7.



Γενωμική αλληλουχία GDH-α από Vitis vinifera

cDNA αλληλουχία GDH-α από Vitis vinifera

Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση της στοίχισης της cDNA αλληλουχίας GDHA από αμπέλι με την γενωμική από το ίδιο είδος. Στο σχήμα φαίνεται η επιλογή των εκκινητών ώστε να πολλαπλασιαστούν οι ενδιάμεσες ιντρονικές περιοχές.

Κάνοντας PCR με αυτά τα ζεύγη εκκινητών, λαμβάνουμε μέσα στα PCR προϊόντα, τα ενδιάμεσα ιντρονικά τμήματα. Με κλωνοποίηση των αλληλεπικαλυπτόμενων PCR προϊόντων σε κατάλληλο φορέα, πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση και χαρακτηρισμός αυτών των τμημάτων.

Τα ζεύγη εκκινητών, με τα οποία λήφθηκαν τα αλληλεπικαλυπτόμενα PCR προϊόντα ήταν τα παρακάτω.

Ζεύγη εκκινητών	Tm
1 Sense: 5`-GCTCTAGCAGCCCACAAACCG-3`	54.5°C
1 Antisense: 5` -CCATGTCCGGTGCAGGTAC - 3`	54.2°C
2 Sense: 5`-GGGTGCACCCCAAAGGACTT - 3`	54.5°C
2 Antisense: 5` -AACAGCTCCAGTGACGTCGC - 3`	54.5°C
3 Sense: 5`-GGTAGCAAGACTCATCGGTGAG -3`	55°C
3 Antisense: 5`-CTGGATTCAGTAGGATGATTTGCTG-3`	53.7°C
4 Sense: 5`-GCTGCGGATGTTAAGGCAAAGTTC -3`	55.4°C
4 Antisense: 5` -CTTCCCAACCCCTTAGCGTTG -3`	54.8°C

Στις PCR αντιδράσεις, χρησιμοποιήθηκαν περίπου 50-100 ngr μήτρα φαγικού γενωμικού κλώνου μαζί με 10 μM τελική συγκέντρωση από τον κάθε εκκινητή. Επίσης, συμμετείχαν dNTPs σε τελική συγκέντρωση 2,5 mM, 0,5 μL Taq πολυμεράση (1u/μL) (Minotech), 1X Taq buffer και 1,5 mM MgCl₂. Ο τελικός όγκος αντίδρασης ήταν στα 20 μL. Οι συνθήκες υβριδισμού ήταν Tm=55°C για 3°, 4° ζεύγος εκκινητών, Tm=59°C για 1°C ζεύγος εκκινητών, και Tm=61°C για 2° ζεύγος εκκινητών. Σε όλες τις αντιδράσεις, ο χρόνος επέκτασης (extension time) των αλυσίδων δεν υπερέβαινε τα 3 min με χρόνο υβριδοποίησης (annealing time) 1:30 min.

1.5.3 Κλωνοποίηση των PCR τμημάτων σε ΤΑ πλασμιδιακό φορέα (pGEM T easy vector)

Για τον χαρακτηρισμό των προϊόντων PCR, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση των προϊόντων αυτών σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα. Ο φορέας αυτός είναι ο pGEM T easy vector (Promega Cat.#A1360). Πρόκειται για έναν TA πλασμιδιακό φορέα που έχει την ικανότητα να δέχεται PCR προϊόντα για κλωνοποίηση, ως έχουν. Ο φορέας αυτός είναι σε γραμμική κατάσταση υπό κανονικές συνθήκες. Δεν έχει τυφλά άκρα (blunt end) αλλά αντιθέτως, διαθέτει από ένα κατάλοιπο θυμιδίνης σε κάθε 5` άκρο του (5` protruding thimidine). Αυτή η ιδιότητα εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι στην PCR αντίδραση, το προϊόν δεν έχει τυφλά άκρα. Στην πραγματικότητα, η Τας πολυμεράση προσθέτει στο τέλος των αλυσίδων στο 3` άκρο, από ένα κατάλοιπο αδενίνης. Έτσι, η 3` αδενίνη από το κάθε άκρο του PCR προϊόντος, υβριδοποιείται με μια 5` θυμιδίνη του ενός άκρου του πλασμιδιακού φορέα. Η αντίδραση της διασύνδεσης των μορίων γίνεται άμεσα με την προσθήκη PCR προϊόντος με κατάλληλη ποσότητα πλασμιδιακού φορέα. Ο φορέας αυτός περιέχει και το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (lacZ), ώστε να μας παρέχει την άμεση επιλογή των ανασυνδυασμένων αποικιών. Έχει μέγεθος 3015 bp, παρέγει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη και διαθέτει πολλές θέσεις περιορισμού εντός της περιοχής polylinker. Επιπλέον, περιέχει τους υποκινητές της T7 και SP6 RNA πολυμεράσης εκατέρωθεν της περιοχής polylinker. Οι υποκινητές αυτοί μας παρέχουν την δυνατότητα να αλληλουχηθούν τα ενθέματα από PCR χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές.

Για κάθε αντίδραση κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκαν 2-3 μL PCR προϊόντος (~100-200 ngr), 1 μL pGEM T easy vector (50 ngr), 1 μL T4 λιγάση (3 u/μL), 5 μL του ρυθμιστικού διαλύματος της και ο τελικός όγκος αντίδρασης έγινε στα 10 μL. Η αντίδραση έλαβε χώρα στους 37° για 1 h ή στους 4° C για 12 h.

1.5.4 Αλληλούχιση και χαρακτηρισμός των εξονίων και των ιντρονίων

Οι πλασμιδιακές κατασκευές με τα PCR ενθέματα, αλληλουχήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν πλήρως. Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε σε αυτόματους αναλυτές αλληλουχιών (sequencers). Οι αλληλουχίες, που προέκυψαν ήταν αλληλεπικαλυπτόμενες στα άκρα τους και τελικά χαρακτηρίστηκαν όλα τα εξόνια και τα ιντρόνια.

1.5.5 Χαρακτηρισμός του υποκινητή καθώς και της 5' και 3' UTR περιοχής

Εκτός από τον χαρακτηρισμό των εξονίων και των ιντρονίων, ακολούθησε και χαρακτηρισμός των περιοχών 5` και 3` UTR (Untranslated region). Οι περιοχές αυτές δεν κωδικοποιούν τίποτε και δεν μεταφράζονται. Ο ρόλος τους περιορίζεται σε άλλου είδους λειτουργίες όπως πρόσδεση ριβοσώματος στο 5` UTR κ.α. Επιπλέον, αναγνωρίστηκε η περιοχή του υποκινητή στο 5` άκρο του γονιδίου. Η εύρεση του υποκινητή πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια on-line προγράμματος από την διεύθυνση <u>http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html</u>. Με βάση αυτό το site, αναγνωρίστηκε η αλληλουχία του υποκινητή με βαθμό εμπιστοσύνης 92%. Αναγνωρίστηκε η αλληλουχία TATA Box στην –35 bp περιοχή (TAAAAATTAATTTTAAATGGGCAAAGATCAAAATTTAGTC**AC**TATTTCG) καθώς και η αλληλουχία CAT box (CAAT) upstream του TATA box. Επίσης, βρέθηκε το σημείο έναρξης της μεταγραφής.

1.6 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας GDH σε κυτταροκαλλιέργειες αμπελιού

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης εξωγενούς πηγής αζώτου στην ενεργότητα της GDH, έγινε επαγωγή κυτταροκαλλιεργειών αμπελιού με νιτρικά και αμμωνιακά ιόντα για διάφορα χρονικά διαστήματα. Ακολούθησε η εκχύλιση πρωτεϊνών από την κάθε καλλιέργεια για το κάθε χρονικό διάστημα καθώς και ο προσδιορισμός της ειδικής ενεργότητας της GDH σε κάθε περίπτωση.

1.6.1 Επαγωγή κυτταροκαλλιέργειας αμπελιού με KNO3 και (NH4)2SO4

Το σύστημα κυτταροκαλλιεργειών αμπελιού αναπτύχθηκε αρχικά από in vitro ανεπτυγμένους κάλλους από αμπέλι (*Vitis vinifera* cv Sultanina). Οι κάλλοι αναπτύχθηκαν για 2 συνεχόμενες γενιές σε συνθήκες σκότους στους 25°C, μέσα σε θρεπτικό μέσο Murashige and Skoog (1962), τροποποιημένο ώστε να περιέχει μόνο 20 mM KNO₃ ως μοναδική πηγή αζώτου, καθώς επίσης και 5 μM NAA (α-

naphthaleneacetic acid) και 2 μM 6 BAP (N⁶-benzylaminopurine). Στην συνέχεια, μεταφέρθηκε ποσότητα κυττάρων από τους κάλλους σε θρεπτικό μέσο LS, το οποίο αποτελείται από την ίδια σύνθεση με το θρεπτικό μέσο MS, με μοναδική διαφορά την αντικατάσταση της ορμόνης κυτοκινίνης 6 BAP με την 2,4 D. Τα κύτταρα επωάστηκαν σε συνθήκες σκότους για περίπου 7-8 μέρες στους 25° C σε συνθήκες σκότους μέσα σε θρεπτικό μέσο LS. Αφού απομονώθηκαν δεύτερης γενιάς κυτταροκαλλιέργειες, το σύστημα ήταν έτοιμο για την πραγματοποίηση της επαγωγής κυτταροκαλλιεργειών με διαφορετική πηγή αζώτου.

Οι δυο υπομονάδες της GDH φαίνεται τα ρυθμίζονται σε μοριακό επίπεδο από την πηγή του αζώτου (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1992). Από τις ενδείξεις αυτές, φαίνεται πως η α υπομονάδα του ολοενζύμου της GDH επάγεται από αμμωνιακά άλατα ενώ η β από νιτρικά. Για τον σκοπό αυτό, για την μελέτη της ενζυμική ενεργότητας της GDH, πραγματοποιήθηκε επαγωγή κυτταροκαλλιεργειών από αμπέλι με 20 mM KNO3 ως πηγή νιτρικών ιόντων ενώ σε κάποιες άλλες πραγματοποιήθηκε επαγωγή με 20 mM (NH4)2SO4 ως πηγή NH_4^+ . Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους $25^{\circ}C$ σε συνθήκες σκοτός. Έγινε λήψη 30 ml από κάθε καλλιέργεια στους χρόνους 0 h (control), 6 h, 12 h και 24 h. Αφού έγινε η απομόνωση των κυττάρων από το θρεπτικό μέσο σε κάθε χρονική ένδειξη, τα κύτταρα διατηρήθηκαν στους -80°C.

1.6.2 Απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος

Η πρωτεϊνική εκχύλιση πραγματοποιήθηκε στην μάζα κυττάρων που απομονώθηκαν από τις κυτταροκαλλιέργειες κατά τις διάφορες χρονικές στιγμές επαγωγής. Η μάζα των κυττάρων αναμίχθηκε σε 3 όγκους (v/w) κρύου διαλύματος εκχύλισης, το οποίο περιείχε 200 mM Tris-Cl pH 8.0, 5 mM DTT (dithiothreitol) ή εναλλακτικά 14 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 10 μM leupeptin, 0.5 mM PMSF, 1 mM EDTA, 3 mM MgCl₂, 0.5% (v/v) Triton X-100 και 0.2 gr PVPP ανά gr κυττάρων. Ακολούθησε ομογενοποίηση σε Omnimixer homogenizer για 3 φορές, 30 sec το καθένα. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 25000 g για 20 min και συλλέχθηκε το υπερκείμενο. Η διαδικασία εκχύλισης έλαβε χώρα στους 4°C.

1.6.3 Ποσοτικοποίηση ολικών πρωτεϊνών με την μέθοδο Lowry

Για την διαδικασία ποσοτικοποίησης ολικών πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν 50 μl από το κάθε πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Αναμίχθηκαν 50 μl από το κάθε εκχύλισμα με 20 μl TCA 20% και τα δείγματα επωάστηκαν στους 4°C για 30 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 10 min και αφαιρέθηκε πολύ καλά η υπερκείμενη φάση. Στην πελλέτα προστέθηκαν 100 μl διαλύματος Lowry Α. Έπειτα από ζωηρή ανάδευση ακολούθησε προσθήκη 1 ml διαλύματος Γ (10 ml A + 0.2 ml B) και το μίγμα επωάστηκε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, ακολούθησε προσθήκη 100 μl διαλύματος Δ (1 ml distilled water + 1 ml Faulin). Έπειτα από επώαση για 30 min μετρήθηκε η απορρόφηση του κάθε δείγματος στα 625 nm.

1.6.4 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας

Από το κάθε πρωτεϊνικό εκχύλισμα πραγματοποιήθηκαν 3 μετρήσεις συνολικά και υπολογίστηκε ο μέσος όρος από αυτές για το κάθε δείγμα. Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής ενεργότητας, μετρήθηκε η αλλαγή της απορρόφησης στα 340 nm. Το διάλυμα προσδιορισμού της ενζυμικής ενεργότητας περιείχε 100 mM Tris-Cl pH 8.0, 20 mM α-κετογλουταρικό, 200 mM NH₄Cl και 1 mM CaCl₂. Σε 925 μl από το διάλυμα αυτό το οποίο είχε προθερμανθεί προηγουμένως στους 27°C, προστέθηκαν 50 μl NADH σε τελική συγκέντρωση 0.2 mM, καθώς και 25 μl από το πρωτεϊνικό εκχύλισμα, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 1 ml. Η μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας προγματοποιήθηκε στα 340 nm.

$A\Pi OTE A E \Sigma MATA - \Sigma Y Z H T H \Sigma H$

1.1 Κατά SOUTHERN ανάλυση με ομόλογο ραδιοσημασμένο ανιχνευτή για την GDHA υπομονάδα

1.1.1 Με πλήρους μήκους cDNA GDH-α ιχνηθέτη

Ο πλήρους μήκους cDNA GDHA ιχνηθέτης είναι περίπου 1.6 Kb και υβριδοποιείται στις ομόλογες αλληλουχίες των εξονίων, τόσο του gdha γονιδίου, όσο και σε οποιαδήποτε άλλη αλληλουχία, που εμφανίζει υψηλό επίπεδο ομολογίας με το gdha γονίδιο. Η γενωμική αλληλουχία του gdha γονιδίου περιέχει μια θέση, που αναγνωρίζεται από την *EcoRI* περιοριστική ενδονουκλεάση, στη θέση 113 bp, όπως φαίνεται στην Εικόνα 8.



Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση της γενωμικής αλληλουχίας του γονιδίου *gdha*. Με πέψη γενωμικού DNA με *EcoR*I και υβριδοποίηση με πλήρους μήκους ιχνηθέτη cDNA GDHA, προκύπτουν 2 σήματα για το *gdha* γονίδιο.

Όπως φαίνεται από την παραπάνω απεικόνιση της γενωμικής αλληλουχίας του gdha γονιδίου, πέψη γενωμικού DNA με την ενδονουκλεάση *EcoR*I και υβριδοποίηση με πλήρους μήκους cDNA GDHA ιχνηθέτη, θα αποδώσει δυο σήματα για το gdha γονίδιο. Το πρώτο σήμα υπολογίζεται να είναι μεγαλύτερο από 113 bp ενώ το δεύτερο μεγαλύτερο από 2.8 Kb. Οποιοδήποτε άλλο σήμα από αυτήν την υβριδοποίηση, οφείλεται σε δεύτερη κόπια του γονιδίου, που κωδικοποιεί την GDH-β υπομονάδα. Πράγματι, όπως φαίνεται στην Εικόνα 5, από τυ συγκεκριμένη υβριδοποίηση ελήφθησαν 4 σήματα συνολικά, από τα οποία τα δυο αντιστοιχούν στο gdha γονίδιο όπως φαίνεται στην Εικόνα 9.



Εικόνα 9. Κατά Southern ανάλυση γενωμικού DNA από αμπέλι, με ραδιοσημασμένο ιχνηθέτη πλήρους μήκους cDNA GDHA. Όπως φαίνεται από το αυτοραδιογράφημα, εμφανίζονται 4 σήματα που υποδηλώνουν την ύπαρξη 2 ή 3 γονιδίων.

Άρα, συμπεραίνεται ότι υπάρχουν συνολικά 2 ή 3 γονίδια που κωδικοποιούν για το ολοένζυμο της GDH. Η συγκεκριμένη υβριδοποίηση έλαβε χώρα και σε Low και σε High stringency συνθήκες για να αναγνωριστούν ποια από τα σήματα αντιστοιχούν στο gdha γονίδιο και ποια σε άλλες κόπιες. Και στις δυο περιπτώσεις, η ένταση των σημάτων παρέμεινε αρκετά υψηλή και δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στην απεικόνιση του film. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στην υψηλή νουκλεοτιδική ομολογία που παρατηρείται μεταξύ της αλληλουχίας των γονιδίων που κωδικοποιούν τις υπομονάδες της GDH, όπως φαίνεται και από πολλούς άλλους οργανισμούς.

1.1.2 Με τμήμα του cDNA GDHA ιχνηθέτη

Πέψη του cDNA GDHA κλώνου με την περιοριστική ενδονουκλεάση *BamH*I οδήγησε στην ελευθέρωση 2 ζωνών ίδιου μεγέθους (~300 bp) όπως φαίνεται στην Εικόνα 3. Με απομόνωση και καθαρισμό αυτών των ζωνών, έγινε λήψη DNA μήτρας για να κατασκευαστούν στην συνέχεια, ραδιοσημασμένα μόρια, ομόλογα για τις δυο αυτές ζώνες. Όπως φαίνεται από την Εικόνα 4, οι ζώνες αυτές περιέχονται μόνο στο τμήμα του γονιδίου που εμφάνισε το 2° σήμα. Συνεπώς, κατασκευάζοντας ραδιοσημασμένους ιχνηθέτες από αυτές τις δυο ζώνες και υβριδοποιώντας με γενωμικό DNA από αμπέλι, που είχε επεξεργαστεί προηγουμένως με την ενδονουκλεάση *EcoR*I, ήταν αναμενόμενο να εξαφανιστεί το 1° σήμα. Όντως, όπως φαίνεται από την Εικόνα 10, εμφανίζονται πλέον μόνο 2 σήματα. Και σε αυτήν την περίπτωση, το πείραμα επαναλήφθηκε σε χαμηλής και υψηλής αυστηρότητας συνθήκες. Όπως και στην πρώτη περίπτωση, έτσι και σε αυτήν δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στην ένταση των σημάτων λόγω της πιθανής υψηλής νουκλεοτιδικής ομολογίας.

Τελικά, από τις αναλύσεις κατά Southern, με τους δυο διαφορετικού μεγέθους ιχνηθέτες, αποσαφηνίστηκε η ύπαρξη δυο γονιδίων που κωδικοποιούν τις υπομονάδες της GDH.



Εικόνα 10. Στην παραπάνω αυτοραδιογραφία φαίνεται η έλλειψη των ζωνών μεγέθους 600 bp και 2 Kb. Η υβριδοποίηση έγινε με μερικού μήκους cDNA GDHA Ιχνηθέτη. Τα δυο άλλα ψηλά σήματα διατηρούνται. Η μεμβράνη υβριδοποίησης προήλθε από streaping της προηγούμενης στην Εικόνα 8

1.2 Σάρωση γενωμικής βιβλιοθήκης λ FIX ΙΙ από την άμπελο με κατάλληλα ραδιοσημασμένο ιχνηθέτη

1.2.1 Πρωτοταγής σάρωση της βιβλιοθήκης

Για την διεκπεραίωση της πειραματικής αυτής διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε σάρωση γενωμικής βιβλιοθήκης από άμπελο (*Vitis vinifera* cv Sultanina) (Primikirios and Roubelakis-Angelakis, unpublished), η οποία βρίσκεται μέσα στον ιϊκό φορά λ FIX II. Σκοπός ήταν η απομόνωση και κατά το δυνατόν χαρακτηρισμός, του γονιδίου της α υπομονάδας της GDH. Η κατασκευή των Master plates για την σάρωση της βιβλιοθήκης, καθώς και η ίδια η γενωμική βιβλιοθήκη, είχαν κατασκευαστεί κατά το παρελθόν και είχε πραγματοποιηθεί η πρώτη σάρωση της βιβλιοθήκης. Στην Εικόνα 11α και 11β, φαίνεται το φιλμ από την πρώτη σάρωση της βιβλιοθήκης.

Από αυτά τα Master plates επιλέχθηκαν συνολικά 20 πλάκες που έδωσαν θετικό σήμα κατά την υβριδοποίηση. Οι πλάκες, που επιλέχθηκαν, ήταν οι 1-12 από το 4α πιάτο και 1-8 από το 3β πιάτο.

1.2.2 Δευτεροταγής σάρωση της βιβλιοθήκης και απομόνωση κλώνων

Οι 20 κλώνοι, που επιλέχθηκαν στην πρώτη διαδικασία σάρωσης, τοποθετήθηκαν σε 900 μL SM buffer και ανακινήθηκαν ήπια στους 4^{0} C για ~12 h, ώστε να διαχυθούν οι φάγοι έξω από το θρεπτικό μέσο. Για το άπλωμα των πιάτων της δευτεροταγούς σάρωσης, έγινε αραίωση 1:1000 και εν συνεχεία έγινε λήψη 3 μL από αυτήν την αραίωση. Αφού έγινε εκ νέου επιμόλυνση XL1-MRA κυττάρων με τα 3μL φάγων από την 10^{-3} αραίωση, ακολούθησε 2^{η} σάρωση. Η διαδικασία δευτεροταγούς σάρωσης είναι όμοια με την πρωτοταγή σε όλα τα υπόλοιπα βήματα. Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν 4 διαδοχικές διαδικασίες σαρώσεων, όπου κάθε φορά γινόταν σάρωση φαγοσωματίων, που είχαν εμφανίσει θετικό σήμα από την προηγούμενη σάρωση.

Τελικά, καταλήξαμε σε μοναδικές πλάκες, που έδιναν θετικό σήμα υβριδοποίησης και απομονώθηκαν οι μοναδικοί κλώνοι **A2**, **A5**, **A6**, **A10**, **A11** και A12. Στην Εικόνα 12, φαίνεται το φιλμ από την δεύτερη σάρωση.



Εικόνα 11α. Φιλμ 3α από την πρώτη σάρωση της γενωμικής βιβλιοθήκης της αμπέλου με cDNA GDH-α ιχνηθέτη. Τα θετικά σήματα είναι εμφανή.



Εικόνα 11β. Φιλμ 4β από την πρώτη σάρωση της γενωμικής βιβλιοθήκης της άμπελου με cDNA GDHA ιχνηθέτη. Τα θετικά σήματα είναι και εδώ εμφανή.



Εικόνα 12. Φιλμ μεμβρανών από δευτερογενή σάρωση με ιχνηθέτη cDNA GDHA.

Είναι εμφανής η αύξηση της έντασης του σήματος στο 2° screening καθώς και η αύξηση του αριθμού των σημάτων. Αυτό οφείλεται στον πολλαπλασιασμό των φάγων που περιέχουν το επιθυμητό γονίδιο, από σάρωση σε σάρωση. Ο βαθμός αντιπροσώπευσης ενός θετικού φάγου σε σχέση με τους υπόλοιπους που συλλέγονται κατά την διαδικασία συλλογής θετικών πλακών, αυξάνεται καθώς αυξάνεται ο βαθμός σάρωσης (1^{ης} σάρωση, 2^{ης} σάρωση κτλ.).

1.3 Απομόνωση φαγικού DNA και πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Για τον χαρακτηρισμό των γενωμικών ενθεμάτων των φαγικών κλώνων, ακολούθησε απομόνωση φαγικού DNA από τον κάθε κλώνο. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πέψεις των κλώνων αυτών, με την ενδονουκλεάση *Sal*I για απομόνωση τμημάτων των γενωμικών ενθεμάτων. Απώτερος σκοπός ήταν η απομόνωση αυτών των τμημάτων και η κλωνοποίηση τους στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript SK II.

1.3.1 Πέψεις γενωμικών κλώνων και πλασμιδιακού φορέα pBluescript με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Από τον κάθε μοναδικό κλώνο, που απομονώθηκε από τις διαδοχικές σαρώσεις, επωάστηκαν καλλιέργειες για απομόνωση φαγικού DNA, το οποίο περιείχε ως ένθεμα το επιθυμητό γονίδιο ή τμήμα αυτού. Συνολικά, καλλιέργειες αναπτύχθηκαν για τους κλώνους A2, A5, A6, A10, A11 και A12.

Από τις καλλιέργειες αυτές, χρησιμοποιήθηκε ποσότητα για πέψη περιορισμού με κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Αρχικά, έγινε πέψη όλων των γενωμικών κλώνων με το ένζυμο *Not*I. Το ένζυμο αυτό κόβει και από τις δυο πλευρές του polylinker του φάγου απελευθερώνοντας το γενωμικό κομμάτι που περιέχεται σε αυτόν. Από την πέψη αυτή διαπιστώθηκε πως το μικρότερο

γενωμικό τμήμα που περιλαμβάνεται μέσα στους απομονωμένους φάγους είναι περίπου 6 Kb και το μεγαλύτερο φτάνει τα 10-11 Kb.

Ακολούθησαν και άλλες πέψεις με Sall, για απομόνωση τμημάτων από τα γενωμικά ενθέματα των φάγων. Στις παρακάτω φωτογραφίες φαίνονται ορισμένα από τα τμήματα περιορισμού, που προήλθαν από τους γενωμικούς κλώνους μετά από πέψη με Sall και από ηλεκτροφόρησή τους σε 1% ΤΑΕ πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 13 και 14)



Εικόνα 13. Πήκτωμα αγαρόζης των θραυσμάτων περιορισμού των γενωμικών κλώνων A11 και A12, έπειτα από πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση SalI.



Εικόνα 14. Πήκτωμα αγαρόζης των θραυσμάτων περιορισμού από τους γενωμικούς κλώνους A2, A5, A6 καιA12 έπειτα από επεξεργασία τους με Sall.

Ο pBluescript, έπειτα από πέψη του με *Sal*I, εμφανίζει μία μόνο ζώνη μεγέθους περίπου **3Kb** όπως φαίνεται στην Εικόνα 15.



Εικόνα 15. Πήκτωμα αγαρόζης του πλασμιδιακού φορέα pBluescript έπειτα από επεξεργασία με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Sal*I

Συνολικά, από τις πέψεις των γενωμικών κλώνων με Sall, προέκυψαν οι ζώνες που αναλύονται στον παρακάτω πίνακα, των οποίων ακολούθησε προσπάθεια κλωνοποίησης σε πλασμιδιακό φορέα pBluescript x Sall

Κλώνος	Ζώνες
A2	500 bp
A5	4.7 Kb
	4.3 Kb
	1.5 Kb
A12	5 Kb
	1.5 Kb

1.3.2 Καθαρισμός και κλωνοποίηση των θραυσμάτων περιορισμού

Μετά την απομόνωση των αντίστοιχων τμημάτων πηκτώματος αγαρόζης, που περιείχαν τα επιθυμητά θραύσματα περιορισμού, έγινε ηλεκτροέκλουση και καθαρισμός αυτών με μίγμα φαινόλης/CHCl₃.

Με την διάθεση τμημάτων των γενωμικών κλώνων με κολλώδη άκρα Sall καθώς και πλασμιδιακού φορέα pBluescript επίσης με κολλώδη άκρα Sall, ξεκίνησε η προσπάθεια κλωνοποίησης των διάφορων τμημάτων μέσα στον πλασμιδιακό φορέα.

Η κλωνοποιήσεις έδειξαν ιδιαίτερη δυσκολία. Από το σύνολο των προσπαθειών κλωνοποίησης, ελάχιστες φορές αναπτύχθηκαν αποικίες. Στις περιπτώσεις, που αναπτύχθηκαν αποικίες, αυτές συλλέχθηκαν για απομόνωση μικρής κλίμακας γενετικού υλικού (miniprep). Ακολούθησε πέψη αυτού του υλικού με κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες για έλεγχο και ταυτοποίηση. Σε ουδεμία από τις περιπτώσεις αυτές, εντοπίστηκε αποικία η οποία να περιείχε την ανασυνδυασμένη πλασμιδιακή κατασκευή. 1.4 Κλωνοποίηση PCR τμημάτων από τους γενωμικούς κλώνους στον πλασμιδιακό φορέα pGEM

Ο χαρακτηρισμός του gdha γονιδίου επιτεύχθηκε με PCR προϊόντα που απομονώθηκαν από τους κλώνους A10, A11 και A12. Οι τρεις αυτοί φαγικοί κλώνοι, περιέχουν το gdha γονίδιο. Από τις PCR αντιδράσεις, που πραγματοποιήθηκαν σε αυτούς τους φαγικούς γενωμικούς κλώνους με το κατάλληλο ζεύγος εκκινητών, προέκυψαν τα αλληλεπικαλυπτόμενα PCR προϊόντα τα οποία φαίνονται στις Εικόνες 16, 17, 18 και 19.



Εικόνα 16. PCR σε γενωμικούς κλώνους με το 3° ζεύγος εκκινητών. Το θετικό προϊόν φαίνεται στους κλώνους A10, A11 και A12. Για θετικό control χρησιμοποιείται cDNA GDHA από αμπέλι.



Εικόνα 17. PCR με το 1° ζεύγος εκκινητών. Το θετικό προϊόν φαίνεται στους κλώνους A10, A11 και A12. Σαν θετικό control χρησιμοποιείται cDNA GDHA από αμπέλι.



A10

λ

EcoRI

+ control

Εικόνα 18. PCR με το 2° ζεύγος εκκινητών στους γενωμικούς κλώνους A10, A11 και A12. Σαν θετικό control χρησιμοποιείται cDNA GDHA από αμπέλι.



Εικόνα 19. PCR με το 4° ζεύγος εκκινητών στους γενωμικούς κλώνους A10, A11 και A12. Σαν θετικό control χρησιμοποιείται cDNA GDHA από αμπέλι.

Όπως φαίνεται από τις Εικόνες 16-19 αυτές, με το πρώτο ζεύγος εκκινητών παράχθηκε ένα τμήμα περίπου 1 Kb, με το δεύτερο ζεύγος εκκινητών παράχθηκε ένα τμήμα περίπου 700 bp, με το τρίτο ζεύγος εκκινητών παράχθηκε ένα τμήμα περίπου 500 bp και με το τέταρτο ζεύγος εκκινητών παράχθηκε ένα τμήμα περίπου 500 bp. Ως θετικό μάρτυρα σε όλες αυτές τις αντιδράσεις, χρησιμοποιήθηκε η cDNA GDH-α αλληλουχία. Σε κάθε περίπτωση, η ζώνη του

A11

A12

βρέθηκε να είναι μικρότερη του αντίστοιχου προϊόντος από των γενωμικό κλώνο, λόγω της περιεκτικότητας του τελευταίου σε ιντρονικές αλληλουχίες.

Τα προϊόντα αυτά εισήχθησαν επιτυχώς μέσα στο πλασμιδιακό TA φορέα pGEM T easy vector. Έγινε αναπαραγωγή της ανασυνδυασμένης αυτής πλασμιδιακής κατασκευής, σε μεγάλες ποσότητες.

1.5 Ανάλυση και χαρακτηρισμός της δομής του GDH-α κλώνου

Από τις αντιδράσεις αλληλουχίσεων, προέκυψαν τα ακριβή μεγέθη και οι ακριβείς αλληλουχίες των PCR τμημάτων. Επιπλέον, διευκρινίστηκε η ακριβής αλληλουχία των εξονικών και ιντρονικών περιοχών αυτών. Τα ακριβή μεγέθη των προϊόντων ήταν 1° ζεύγος εκκινητών 1125 bp, 2° ζεύγος εκκινητών 697 bp, 3° ζεύγος εκκινητών 525 bp και 4° ζεύγος εκκινητών 536 bp. Το μέγεθος του γονιδίου gdha βρέθηκε να είναι 2934 bp χωρίς τον υποκινητή και 3146 bp μαζί με τον υποκινητή. Περιέχει συνολικά 8 ιντρόνια και 9 εξόνια. Λεπτομερέστερες πληροφορίες σχετικά με αυτό το γονίδιο, ακολουθούν στην ενότητα 1.6, όπου φαίνεται η δημοσίευση αυτού του κλώνου στην βάση δεδομένων EMBL. Οι σχετικές διαστάσεις των ιντρονίων και των εξονίων του γονιδίου gdha, φαίνονται στην Εικόνα 20.

5 1 1 2 2 3 3 4 4 5 5 6 6 7 7 8 8 9

Εικόνα 20 Απεικόνιση των σχετικών διαστάσεων εξονίων και ιντρονίων στο γονίδιο gdha.

1.6 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας GDH σε κυτταροκαλλιέργειες αμπελιού κάτω από διαφορετική πηγή αζώτου

Από την μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της GDH σε κυτταροκαλλιέργειες που επάχθηκαν για τα χρονικά διαστήματα 0 h, 6 h, 12 h και 24 h σε διαφορετική πηγή αζώτου, πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις. Σε κάθε επανάληψη, χρησιμοποιήθηκαν 25 μL πρωτεϊνικού εκχυλίσματος για τον προσδιορισμό της ενζυμικής ενεργότητας. Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης για το NADH είναι a_m =6,22 10⁻³. Υπολογίστηκε ο συντελεστής μετατροπής της διαφοράς της απορρόφησης με βάση τον νόμο Lambert-Beer (A= a_m Cl) και βρέθηκε ότι είναι ίσος με 0,16. Με βάση αυτόν τον συντελεστή εκφράστηκαν οι ενζυμικές ενεργότητες σε Units (1 Unit=1 μmole/min NADH). Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η ειδική ενεργότητα του κάθε πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από την κάθε καλλιέργεια.

ΔΕΙΓΜΑ	ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDΗ (Units/mgr πρωτεΐνης)
Control	0,1044
KNO3 12 h επαγωγή	0,1210
KNO3 24 h επαγωγή	0,1042
(NH ₄) ₂ SO ₄ 6 h επαγωγή	0,1066
(NH ₄) ₂ SO ₄ 12 h επαγωγή	0,1091
(NH ₄) ₂ SO ₄ 24 h επαγωγή	0,1200

Από τον πίνακα αυτόν φαίνεται καθαρά ότι υπό την επίδραση των νιτρικών ιόντων μετά από επαγωγή 12 h, η GDH εμφανίζει μια αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας. Όμως, μετά από 24h επαγωγής με νιτρικά ιόντα, η GDH εμφανίζει μια μείωση της ενζυμικής ενεργότητας. Υπό την επίδραση των αμμωνιακών ιόντων, δεν φαίνεται να επάγεται η δράση της GDH για τις πρώτες 6 και 12 h ενώ στις 24 h εμφανίζεται μια μικρή επαγωγή. Οι ενζυμικές ενεργότητες της GDH στους διαφορετικούς χρόνους επαγωγής σε διαφορετικές πηγές αζώτου, φαίνεται στην Εικόνα 21.



Εικόνα 21 Ειδική ενεργότητα της GDH από τις κυτταροκαλλιέργειες με διαφορετικό χρόνο επαγωγής σε διαφορετική πηγή αζώτου.

1.7 Δημοσίευση του γενωμικού κλώνου GDHA από το αμπέλι στην βάση δεδομένων EMBL

Το γονίδιο gdha, του οποίου η δομή αναλύθηκε λεπτομερώς, καταχωρήθηκε στην βάση δεδομένων EMBL με αριθμό καταχώρησης AJ303070. Παρακάτω, φαίνεται η καταχώρηση αυτή καθώς και διάφορα στοιχεία για την δομή και την οργάνωση αυτού του γονιδίου.

LOCUS VVI303070 3146 bp 11-DNA PLNDEC-2000 DEFINITION vinifera gdhA NADH glutamate Vitis gene for dehydrogenase, exons 1-9. ACCESSION AJ303070 AJ303070.1 GI:11691871 VERSION

KEYWORDS gdhA gene; NADH glutamate dehydrogenase. SOURCE Vitis vinifera. ORGANISM Vitis vinifera Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicots; Vitaceae; Vitis. REFERENCE 1 (bases 1 to 3146) Skopelitis, D.S., Primikirios, N.I. and Roubelakis-AUTHORS Angelakis,K.A. Genomic organisation of GDH genes in grapevine (Vitis TITLE vinifera cv. Sultanina) JOURNAL Unpublished 2 (bases 1 to 3146) REFERENCE AUTHORS Skopelitis, D.S. TITLE Direct Submission Submitted (08-DEC-2000) Skopelitis D.S., Biology, JOURNAL University of Crete, Vassilika Vouton, P.O. Box 2208, Heraklion, Crete, 714 09, GREECE FEATURES Location/Qualifiers 1..3146 source /organism="Vitis vinifera" /cultivar="sultanina" /db_xref="taxon:29760" mRNA join(214..321,485..598,1123..1344,1418..1492,1618..1734, 1823..2073,2599..2674,2752..2838,2961..3146) /gene="gdhA" 214..3146 gene /gene="gdhA" 214..321 exon /gene="gdhA" /number=1 CDS join(214..321,485..598,1123..1344,1418..1492,1618..1734, 1823..2073,2599..2674,2752..2838,2961..3146) /gene="gdhA" /EC_number="1.4.1.2" /codon_start=1 /product="NADH glutamate dehydrogenase" /protein_id="CAC18730.1" /db_xref="GI:11691872" /translation="MNALAATNRNFRHASRILGLDSKLEKSLLIPFREIKVECTIPKD DGSLATYVGFRVQHDNARGPMKGGIRYHPEVDPDEVNALAQLMTWKTAVVDIPYGGAK

 ${\tt GGIGCTPKDLSMSELERLTRVFTQKIHDLIGTHTDVPAPDMGTNAQTMAWILDEYSKF}$

 ${\tt HGHSPAVVTGKPIALGGSLGREAATGRGVVFATEALLAQHGKSIKGLTFVIQGFGNVG}$

 ${\tt SWVARLIGERGGKIIAVSDVTGAVKNQNGLDIVDLLRHKEETGCLTNFSGGDHMDPNE}$

 ${\tt LLTHECDVLIPCALGGVLNKENAADVKAKFIIEAANHPTDPEADEILSKKGVVILPDI$

YANAGGVTVSYFEWVQNIQGFMWEEEKVNNELQKYMTKAFHNIKAMCQSHNCSLRMGA		
FTLAVNRVACATTLRGWEA"		
intron	322484	
	/gene="gdhA"	
	/number=1	
exon	485598	
	/gene="gdhA"	
	/number=2	
intron	599 1122	
<u></u>	/gene="adh"	
	/number-2	
exon	1123 1344	
	$\frac{1}{223}$	
	/gene= guna	
intron	124E 1417	
	1343141/ /mana_wadbaw	
	/number=3	
exon	14181492	
	/gene="gdhA"	
	/number=4	
intron	14931617	
	/gene="gdhA"	
	/number=4	
exon	16181734	
	/gene="gdhA"	
	/number=5	
intron	17351822	
	/gene="gdhA"	
	/number=5	
exon	18232073	
	/gene="gdhA"	
	/number=6	
intron	20742598	
	/gene="gdhA"	
	/number=6	
exon	25992674	
	/gene="gdhA"	
	/number=7	
intron	26752751	
	/gene="gdhA"	
	/number=7	
exon	2752 2838	
	/gene="adhA"	
	/number=8	
introp	2839 2960	
	/gene = "adhl"	
	/ yenc- yenn / number-8	
exon	2961 3146	
EXOII	$2 \rightarrow 0 + \rightarrow + 0$	
	y = 10 - y = 0	
	/ IIulliDer=9	

BASE COUNT 800 a 535 c 721 g 1090 t ORIGIN 61 cctacccatcattcagttcattcacatttctgttttattctctttctactcctcaattct 121 ccaattttttctctcattttcttgcattttcttttctgggtctgcttcttttcctagcaa 241 aattttcgccatgcttcccgcattcttgggttggactccaagctggagaagagtcttctg 301 atacctttcagagagatcaaggttggaattctggggtttttgttcatgggttctatttga 361 ttcccgggaattatttgtttatttatttccttagccggaatcttgtttttgggttcatg 421 ggttgtgtttgtttcctgagaatttttttccagaattttgatcttttggtggtgtgttg 481 ttaggtggagtgcacgattccgaaggatgatggaagcctggcgacgtatgtggggttccg 601 ttgtgatttactgattcttttgtttgctttcggatttgtcctgtttggttgctgagaaga 721 gtatgctgtggggcttacttgacttcgtaacttcttggagcagaacatgagattcgggat 781 tgtgggattgtgggattgtgggattgtagtttgttttttcttggcttttcccccctattt 841 tctcggcaagcaaacagattatagggagtttgcttttaggttcttggaatttccggtcga 901 tttgggttttggctaagtggtttttgggtgtcctatggaaagggagttgttcaaatgcaa 961 tagtcatagtggaatgatttcatttcatgatggatccaaacatgcccttattgtatcttg 1081 gcatttagttttactgaaacgtttcttcatttgttttcaaaggtggatcctgatgaggta 1141 aatgccctggctcaattgatgacatggaagaccgccgtagtcgacattccctatggtggt 1201 gcaaagggtggcattgggtgcaccccaaaggacttgagtatgagcgagttggaacgtctc 1261 actcgtgtctttactcaaaagattcatgatcttattggaactcatactgatgtacctgca 1321 ccggacatgggaactaatgctcaggttatcttttgtctgtaacactcttgaaatattctc 1381 tcattcatgaaqctgaaatatttataattatqqqcaqactatqqcatqqattttqqacqa 1501 ttgcgacaaaaaaccgagcatctatgatttagatttgtgtaaacctttgaagtcgagaaa 1561 caaaatttgtaactgttgtttcttgttctttggactcatttacatttgggcttttaggct 1621 cttggtggttccctcggtagggaggctgcaactggtcgaggtgttgttttcgcaactgaa 1681 gctttacttgcgcaacatgggaagtcaatcaagggtttgacatttgttattcaggtaaaa 1741 tattggattaaatcctttctatttctgttcttgatgcttagaaagttgggttatttaaat 1801 ggaaaataaaaaaacttttcagggttttggcaatgttggatcttgggtagcaagactcat 1861 cggtgagagaggtggtaaaatcatagcggtgagcgacgtcactggagctgttaagaacca 1921 aaatgggcttgatatagtggatttgcttaggcacaaagaagagactggttgtctaacgaa 1981 tttcagtggcggagatcacatggatccgaatgaactgctcacacatgaatgtgatgttct 2041 cateccatgtgctctaggtggagttcttaacaagttgagtccttgttttcctcagaaact 2101 tgctccttgcctttcagtttctttttacttggtgccttttttgttttgggtttcttttga 2161 catgggccttttttgaattgagaaagttgtcttttccatacattaagatcataaaaacaa 2221 tgaacatacacataaaatgaagtagacacatctcaataccatgaagaaacatgatgcaac 2281 tctgtttgagatactatgttgaatctgaaagatcgaatcagaatgctgcaattgtatcaa 2341 attgccatacgatgaattgccaatgtttaggtaaagatgttacatgtgttctgttaccct 2401 tcaattgtgggcagaagtttcatgaaatgtgcttgtgctgtatttagttactaagtgaat 2461 atccaatcgtttttcaggttagaaaccacacaaatcttttgatggtaaaaagtggaaaag 2581 gttttttcccctctgaagagaaaatgctgcggatgttaaggcaaagttcataatagaagc 2641 agcaaatcatcctactgatccagaagctgatgaggtaacatagtgtttatggtgcatact 2701 taaatgccatagaggaaagaagttggcgttgatgatatattgtctctgcagattctatcc 2761 aagaagggagttgtaatccttcccgacatctatgctaatgctggaggtgtgaccgtgagc 2821 tattttgagtgggttcaggtaattccccctatatttcttatatatgatggatttgacaat 2881 gaattatatcgtttgaaacatagataatggataggaaaagtagtagtaacatcttaggat 2941 taatggttttatgttggcagaatattcaaggttttatgtgggaagaagagaggtgaata 3001 atgagetteagaagtacatgaceaaagetttteataacattaaggeaatgtgteaatege 3061 acaactgcagtcttcgaatgggagccttcacattggcagtgaatcgagttgcttgtgcca 3121 caacgctaaggggttgggaagcttag

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά την διάρκεια αυτής της εργασίας έγινε προσπάθεια απομόνωσης και χαρακτηρισμού των γονιδίων, που κωδικοποιούν για τις δυο υπομονάδες της γλουταμικής αφυδρογονάσης. Στην προσπάθεια αυτή, πραγματοποιήθηκαν κατά Southern αναλύσεις οι οποίες έδειξαν ότι ο αριθμός των γονιδιών που κωδικοποιούν για τις δυο υπομονάδες είναι δυο. Αυτό δεν αποκλείει το γεγονός να υπάρχουν και ψευδογονίδια. Πιθανόν, λόγω όμοιου μεγέθους αλληλουχιών μεταξύ γονιδίου και ψευδογονιδίου, καθώς και λόγω της υψηλής νουκλεοτιδικής ομολογίας των κωδικών περιοχών που εμπεριέχουν τις αλληλουχίες των θέσεων περιορισμού, κάποιο σήμα στην κατά Southern ανάλυση να αντιστοιχεί σε γονίδιο και ψευδογονίδιο ταυτόχρονα.

Επίσης, έγινε προσπάθεια απομόνωσης γενωμικών κλώνων, που να περιέχουν το γονίδιο της GDH, από γενωμική βιβλιοθήκη Vitis vinifera. Απώτερος σκοπός είναι η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός και των δυο γονιδίων της GDH (α και β) ώστε να γίνει εφικτή η μελέτη της ρύθμισης των δυο υπομονάδων. Για μια τέτοια μελέτη, απαραίτητη είναι η διάθεση των υποκινητών των δυο υπομονάδων ή ακόμη και της 3` UTR περιοχής που εμφανίζει την υψηλότερη ποικιλομορφία. Η απομόνωση και των δυο κλώνων, ή και περισσότερων στην περίπτωση ύπαρξης ψευδογονιδίων, επιτεύχθηκε με την χρήση ανιχνευτή ομόλογου μόνο για το γονίδιο gdha, λόγω της υψηλής νουκλεοτιδικής ομολογίας μεταξύ των υπομονάδων.

Με την τεχνική της σάρωσης, απομονώθηκαν κάποιοι γενωμικοί κλώνοι, που περιείχαν το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρώτη υπομονάδα της GDH. Όμως, δεν έγινε εφικτή η κλωνοποίηση θραυσμάτων περιορισμού μέσα στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript. Οι μεγάλες δυσκολίες κλωνοποίησης των κομματιών ενδεχομένως να οφείλονται στην μέθοδο απομόνωσης του φαγικού DNA. Πιθανόν, η PEG να είναι υπεύθυνη για την αδυναμία αυτών των κλωνοποιήσεων.

Τελικά, η λήψη τμημάτων του γονιδίου gdha επιτεύχθηκε με την τεχνική της PCR. Χρησιμοποιώντας εκκινητές ομόλογους για κάποιες περιοχές εξονίων, γνωστών από την cDNA gdha αλληλουχία, πολλαπλασιάστηκαν όλα τα επιμέρους

τμήματα του γονιδίου gdha. Σε ένα επόμενο στάδιο, θα γίνει προσπάθεια λήψης τμήματος του δεύτερου κλώνου (gdhb), με την βοήθεια εκφυλισμένων εκκινητών και PCR, ώστε να απομονωθούν και τα δυο γονίδια, καθώς και απομόνωση των υποκινητών τους.

Από την μέτρηση των ενζυμικών ενεργοτήτων GDH της σε κυτταροκαλλιέργειες αμπελιού που επάχθηκαν για 0 h, 6 h, 12 h και 24 h σε διαφορετική πηγή αζώτου, ενδιαφέρον εμφάνισε η αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας υπό την επίδραση 20 mM KNO3 στις πρώτες 6 h επαγωγής ενώ δημιουργούνται σημαντικά ερωτήματα για την μείωση αυτής στις 12 και 24 h επαγωγής. Μελλοντικό στόχο θα αποτελέσει η προσπάθεια διερεύνησης του μηχανισμού εξαιτίας του οποίου μειώνεται η ενζυμική ενεργότητα σε παρατεταμένη επαγωγή με ΚΝΟ₃. Επιπλέον, η μικρή αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας που παρατηρήθηκε έπειτα από επαγωγή με αμμωνιακά ιόντα, προδιαθέτει για νέους πειραματισμούς με μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα επαγωγής, αφού όπως φάνηκε από το διάγραμμα στα αποτελέσματα, πιθανόν η επαγωγή να ξεκινάει από τις 24 h και έπειτα.

Μελλοντικό στόχο αποτελεί η μοριακή μελέτη των υποκινητών των δυο υπομονάδων και ιδιαίτερα η προσπάθεια εύρεσης των cis acting ρυθμιστικών στοιχείων μέσα στους υποκινητές, τα οποία ελέγχουν τα επίπεδα μεταγραφής των δυο γονιδίων συναρτήσει της πηγής αζώτου καθώς επίσης και παρουσία κάποιων αμινοξέων. Μια προσέγγιση του θέματος θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί με την δημιουργία μεταλλαγμάτων που θα φέρουν ελλείμματα μέσα στους υποκινητές και την κατασκευή γενετικά τροποποιημένων φυτών στα οποία οι ελλειμματικοί υποκινητές από τις δυο υπομονάδες, θα βρίσκονται σε σύντηξη με κατάλληλους μοριακούς μάρτυρες.

Βιβλιογραφία

- Beevers, L and Hageman RH (1980) Nitrate and nitrite reduction. *In*: B.J. Miflin (ed), The Biochemistry of Plants. Amino Acids and Derivatives. Academic Press, New York, pp. 856-858. Current Genetics 34:50-9.
- 2. Benachenhou-Lanhfa N, Labedan B, and Forterre P (1994) PCR-mediated cloning and sequencing of the gene encoding glutamate dehydrogenase from the archeon Sulfolobus shibatae: identification of putative amino-acid signatures for extremophilic adaptation. Gene. 140:17-24.
- Calle F, Martin M, and Sabater B (1986) Cytoplasmic and mitochondrial localization of the glutamate dehydrogenase induced by senescence in barley (*Hordeum vulgare*). Physiol. Plant. 66: 451-456.
- Cammaerts DM, and Jacobs M (1985) A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. Planta. 163: 517-526.
- Cardoza RE, Moralejo FJ, Gutierrez S, Casqueiro J, Fierro F and Martin JF (1998) Characterization and nitrogen-source regulation at the transcriptional level of the gdhA gene of Aspergillus awamori encoding an NADP-dependent glutamate dehydrogenase. Curr Genet. 34(1):50-9.
- Ficarelli A, Tassi F and Restivo M (1999) Isolation and characterization of two cDNA clones encoding for glutamate dehydrogenase in Nicotiana plumbaginifolia. Plant cell Physiology 40(3):339-342.
- Givan CV (1979) Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. Phytochemistry 18: 375-382.
- Godson O. Osuji and Wenceslaus C. Madu (1994) Ammonium iondependent isomerization of glutamate dehydrogenase in relation to glutamate synthesis in maize. Phytochemistry 39:495-503.
- Godson O. Osuji and Wenceslaus C. Madu (1997) Regulation of peanut glutamate dehydrogenase by methionine sulphoximine. Phytochemistry 46:817-825.
- Haynes RJ (1986) Uptake and assimilation of mineral nitrogen by plants.
 In: R.J. Haynes (ed), Mineral Nitrogen in the Plant-Soil System. Academic Press, London, pp. 303-378.
- 11. Lancien M, Gadal P and Hodges M (2000) Enzyme redundancy and the importance of 2-Oxoglutarate in higher plant ammonium assimilation. Plant Physiology 123:817-824.
- 12. Lea PJ, and Miflin JL (1974) Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. Nature 251: 614-616.
- 13. Loulakakis KA and Roubelakis-Angelakis KA (1990) Immunocharacterization of NADH-Glutamate Dehydrogenase from *Vitis vinifera* L. Plant Physiology 94: 109-113.
- 14. Loulakakis KA and Roubelakis-Angelakis KA (1990) Intracellular localization and properties of NADH-Glutamate Dehydrogenase from *Vitis vinifera* L.: Purification and characterization of the major leaf isoenzyme. J. Exp. Bot. 41: 231:1223-1230.
- 15. Loulakakis KA and Roubelakis-Angelakis KA (1991) Plant NAD(H)-Glutamate Dehydrogenase consists of two subunit polypeptides and their participation in the seven isoenzymes occurs in an ordered ratio. Plant Physiology 97: 104-111.
- 16. Loulakakis KA and Roubelakis-Angelakis KA (1992) Ammonium-induced increase in NADH-glutamate dehydrogenase activity is caused by *de novo* synthesis of α-subunit. Planta 187: 322-327.
- 17. Loulakakis KA and Roubelakis-Angelakis KA (1996) The seven NAD(H)glutamate dehydrogenase isoenzymes exhibit similar anabolic and catabolic activities. Physiologia Plantarum 96:29-35.
- 18. Loulakakis KA and Roubelakis-Angelakis KA (1997) Molecular cloning and characterization of cDNAs coding for ferredoxin-dependent glutamate synthase from *Vitis vinifera*. Physiologia Plantarum 101:220-228.
- 19. Loulakakis KA, Primikirios NI, Nikolandonakis NA, and Roubelakis-Angelakis KA (2001) Immunocharacterization of *Vitis vinifera* L.

ferredoxin dependent glutamate synthase and its spatial and temporal changes during leaf development (Submitted)

- 20. Miflin BJ and Lea PJ (1976) The pathway of nitrogen assimilation in plants. Phytochemistry 15:873-885.
- 21. Miflin BJ and Lea PJ (1980) Ammonia assimilation. *In*: P.K. Stumpf and E. Conn, (Eds), The Biochemistry of Plants, Academic press, New York, pp. 169-203.
- 22. Primikirios NI and Roubelakis-Angelakis KA (1998) Cloning and expression of an arginine decarboxylase cDNA from *Vitis vinifera* L. cell-suspension cultures. Planta 208: 574-582.
- 23. Primikirios NI, Loulakakis KA, Lefort F and Roubelakis-Angelakis KA (2000) Nitrogen metabolism and recycling genes cloned from Vitis vinifera (L.). Acta Horticulturae 528: 231-239
- 24. Purnell MP, Stewart GR and Botella JR (1997) Cloning and characterization of a glutamate dehydrogenase cDNA from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Gene 186:249-54.
- 25. Rhodes D, Brunk DG and Magalhaes JR (1989) Assimilation of ammonia by glutamate dehydrogenase? *In*: J.E. Poulton, J.T. Romeo, E.E. Conn, (Eds), Plant Nitrogen Metabolism. Plenum Press, New York, pp. 191-206.
- 26. Schaap PJ, Muller Y, Baars JJ, Op den Camp HJ, Sonnenberg AS, van Griensven LJ and Visser J. (1996) Nucleotide sequence and expression of the gene encoding NADP+-dependent glutamate dehydrogenase (gdhA) from Agaricus bisporus. Molecular and General Genetics 250(3):339-47.
- 27. Srivastava HS, and Singh RP (1987) Role and regulation of L-glutamate dehydrogenase activity in higher plants. Phytochemistry 26: 597-610.
- 28. Syntichaki KM, Loulakakis KA and Roubelakis-Angelakis KA (1996) The amino-acid sequence similarity of plant glutamate dehydrogenase to the extremophilic archaeal enzyme conforms to its stress-related function. Gene 168: 87-92.
- 29. Thomas W. Becker, Elisa Carrayol, and Bertrand Hirel (2000) Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase isoforms in maize leaves:

localization, relative proportion and their role in ammonium assimilation or nitrogen transport. Planta 211:800-806.

- 30. Wallsgrove RM, Keys AJ, Lea PJ and Miflin BJ (1983) Photosynthesis, photorespiration and nitrogen metabolism. Plant Cell Environ. 6: 301-309.
- 31. Wallsgrove RM, Turner JC, Hall NP, Kendall AC and Bright SWJ (1987) Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase. Biochemical and genetic analysis. Plant Physiology. 83: 155-158.
- 32. Wen Z and Morrison M (1996) The NAD(P)H-dependent glutamate dehydrogenase activities of Prevotella ruminicola B(1)4 can be attributed to one enzyme (GdhA), and gdhA expression is regulated in response to the nitrogen source available for growth. Applications to Environmental Microbiology. 52(10): 3826-33.