

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ
ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ (GDH) ΥΠΟ
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΓΤΦ ΚΑΠΝΟΥ
(*Nicotiana tabacum*)**

ΧΡΗΣΤΟΣ Ν. ΒΕΛΑΝΗΣ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ: Καθ. Κ.Α ΡΟΥΜΠΕΛΑΚΗ-ΑΓΓΕΛΑΚΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2009

“Science is the only candle in the dark”

CARL SAGAN

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος	1
Περίληψη	2
Abstract	3
Εισαγωγή	4
• Το άζωτο στην βιόσφαιρα	4
• Πρόσληψη και αφομοίωση του αζώτου στα φυτά.....	6
• Αφομοίωση της αμμωνίας	9
• Η γλουταμική αφυδρογονάση	12
• Η γονιδιακή οργάνωση της GDH	12
• Δομή οργάνωση και υποκυτταρικός εντοπισμός του ολοενζύμου της GDH.....	14
• Ο φυσιολογικός ρόλος της GDH	17
• Σκοπός της εργασίας	22
Υλικά και μέθοδοι	24
• Το φυτικό υλικό	24
• Προετοιμασία του φυτικού υλικού για τις μεταχειρίσεις	26
• Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών	27
• Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών.....	27
• Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας.....	28
• Ανάλυση ισοενζυμικού προτύπου.....	29
• Απομόνωση ολικού RNA	30
• Ανάλυση κατά Northern	31
• Διαχωρισμός σε αποδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης και μεταφορά σε nylon μεμβράνη.....	31
• Κατασκευή ραδιενεργού ιχνηλάτη (ή ιχνηθέτη ή probe).....	32
• Προϋβριδοποίηση, υβριδοποίηση, ξεπλύματα κι έκθεση.....	33
• Χρήση σημασμένων με ¹⁵ N υποστρωμάτων για μελέτη της <i>in vivo</i> ενεργότητας της Γλουταμικής Αφυδρογονάσης και της ενσωμάτωσης	

του σημασμένου αζώτου σε διάφορα αζωτούχα βιομόρια..	
.....	34
• Απομόνωση και παραγοντοποίηση αμινοξέων για GC/MS.....	35
• Φαινοτυπική ανάλυση	35
Αποτελέσματα	38
Συζήτηση	59
Βιβλιογραφία	76

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια του διετούς Μεταπτυχιακού Προγράμματος Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας Φυτών για την απόκτηση μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτριά μου, κυρία Κ.Α Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καθοδήγησή της, αλλά κυρίως για την υπομονή της, απέναντι στην συχνά «αντάρτικη» συμπεριφορά μου. Ευχαριστώ επίσης τους καθηγητές κ.κ Νίκο Πανόπουλο και Κυριάκο Κοτζαμπάση, για τον χρόνο που διέθεταν κάθε φορά που ζητούσα την βοήθειά τους.

Σε αυτή την διετή πορεία μου υπήρξαν ορισμένοι άνθρωποι που με βοήθησαν έμπρακτα, ουσιαστικά και προπαντός ανιδιοτελώς. Η τυπική ευχαρίστησή τους, σε αυτόν τον πρόλογο, είναι κάτι που δεν ταιριάζει στον χαρακτήρα μου. Θα περιμένω την ευκαιρία, να εκφράσω στον καθένα ξεχωριστά, εξίσου έμπρακτα και ουσιαστικά την ευγνωμοσύνη μου.

Χρήστος.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γλουταμική αφυδρογονάση (GDH, E.C 1.4.1.4) καταλύει *in vitro* την οξειδωτική απαμίνωση του γλουταμικού οξέος καθώς και την αντιστρεπτή αντίδραση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού οξέος. Η *in planta* φυσιολογική λειτουργία του ενζύμου αποτελεί αντικείμενο συζητήσεων και διχογνωμιών στην επιστημονική κοινότητα για πάνω από τρεις δεκαετίες. Η GDH έχει ολιγομερική συγκρότηση, αποτελείται από δύο υπομονάδες (α- και β-), που κωδικοποιούνται από τουλάχιστον δύο πυρηνικά μη αλληλόμορφα γονίδια. Οι δύο υπομονάδες συνδυάζονται τυχαία δίνοντας γένεση σε επτά διαφορετικούς συνδυασμούς εξαμερών ισοενζύμων. Σήμερα είναι καλά τεκμηριωμένο ότι σε αντίθεση με τους μικροοργανισμούς το φυτικό ένζυμο επιτελεί πρωταρχικά καταβολικό ρόλο. Ωστόσο, φαίνεται ότι υπό συγκεκριμένες συνθήκες το ένζυμο είναι ικανό να διεκπεραιώσει αφομοιωτικό (αναβολικό έργο) και να δράσει συνεπικουρικά προς την βασική αφομοιωτική πορεία που φέρεται εις πέρας από τα ένζυμα γλουταμινική συνθετάση (GS E.C. 6.3.1.2) και γλουταμική συνθάση (GOGAT, Fd-GOGAT E.C. 1.4.7.1, NADH-GOGAT E.C.1.4.1.14). Στην παρούσα εργασία, γίνεται εκτενής μοριακή, βιοχημική και μεταβολική ανάλυση ΓΤΦ (υπερ-, υπό- και διπλής υπερέκφρασης για τα *GDHs*) καπνού, τα οποία υποβλήθηκαν σε καταπόνηση από υψηλή συγκέντρωση αλατιού. Τα αποτελέσματα τεκμηριώνουν ότι υπο συνθήκες καταπόνησης αυξάνεται η αφθονία των μεταγράφων του γονιδίου που κωδικοποιεί για την α-υπομονάδα του ενζύμου, αυξάνονται τα επίπεδα της ανοσοενεργής πρωτεΐνης και των ενεργών ανοδικών ισοενζύμων και η GDH συνεισφέρει *in planta* στο αφομοιωτικό έργο. Ταυτόχρονα διενεργήθηκε φαινοτυπική ανάλυση των ΓΤΦ από την οποία δεν προέκυψαν αξιόλογες φαινοτυπικές διαφοροποιήσεις.

ABSTRACT

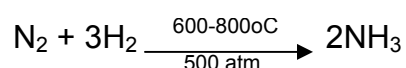
Glutamate dehydrogenase (GDH, E.C 1.4.1.4) catalyses in vitro the oxidative deamination of L-Glutamate as well as the reductive amination of α -ketoglutarate. Plant biologists have been struggling for more than three decades to reach a consensus upon the *in planta* physiological role of the enzyme. GDH is an oligomeric protein and in its native conformation it consists of two different subunits (designated α - and β -), which are encoded by at least two nuclear non allelic genes. The two subunits assemble in every possible combination giving rise to seven different hexameric isoforms. Unlike the GDHs of microorganisms, plants's enzymes function primarily towards the catabolic direction. However, it is possible that during stressful situations (e.g salinity) GDH may contribute to the main ammonia assimilatory pathway (GS/GOGAT cycle). In this study we have used transgenic tobacco plants which either overexpress the *GDHs* (one at a time or both genes simultaneously) or suppress one of the two genes. After treating these plants with high concentrations of salinity the *GDH;A* mRNA was found to accumulate, the immunoreactive α - subunit polypeptide was *de novo* synthesized and the corresponding anodic isoenzymes were assembled. Metabolic profiling of ^{15}N -fed plants carried out by GC-MS analysis indicated that under salinity GDH may contribute to the main ammonia assimilatory pathway. A detailed phenotypic analysis was also performed but our results did not indicate significant differences among the various lines tested.

Εισαγωγή

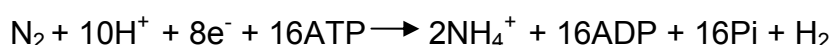
Το άζωτο στην βιόσφαιρα

Το άζωτο είναι το τέταρτο κατά σειρά αφθονίας χημικό στοιχείο, μετά τον άνθρακα, το υδρογόνο και το οξυγόνο, στην οργανική ύλη των οργανισμών. Συμμετέχει ως συστατικό σε βιομόρια υψίστης σπουδαιότητας για τη διατήρηση της ζωής στον πλανήτη, όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, συμπράγοντες ενζύμων και πληθώρα πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών με ιδιαίτερο βιολογικό ρόλο. Στην ποσοστιαία χημική σύσταση της ατμόσφαιρας αποτελεί το αφθονότερο στοιχείο, με περιεκτικότητα 78% (v/v) κύρια υπό την μορφή του μοριακού αζώτου N₂(g). Είναι συνεπώς προφανές ότι το άζωτο συγκαταλέγεται στους παράγοντες που επηρέασαν καθοριστικά την εξελικτική πορεία της ζωής (Lea and Morot-Gaudry, 2001; Διαμαντίδης, 2007; Loulakakis et al, 2009).

Ο πλούτος της βιόσφαιρας σε άζωτο είναι ως ένα βαθμό παραπλανητικός όσον αφορά στην διαθεσιμότητά του προς χρήση από τη ζώσα ύλη. Η χημική ιδιαιτερότητα του μοριακού αζώτου, να αποτελεί διατομικό μόριο με τριπλό ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ των συνδεδεμένων ατόμων, το καθιστά ιδιαίτερα σταθερό. Η ενσωμάτωσή του στην οργανική ύλη απαιτεί τη δέσμευσή του και την ακόλουθη αναγωγή σε αμμωνιακή μορφή. Πρόκειται για εξαιρετικά ενεργοβόρες διαδικασίες. Αρκεί να επισημανθεί ότι η αντίστοιχη βιομηχανική διαδικασία αζωτοδέσμευσης, που πραγματοποιείται με την μέθοδο Haber-Bosch, απαιτεί θέρμανση των αντιδρώντων στους 600-800 C^ο και άσκηση πίεσης 500 atm.



Οι ίδιοι θερμοδυναμικοί περιορισμοί διέπουν και τη βιολογική αζωτοδέσμευση, γεγονός που επιβάλλει στους οργανισμούς, σε όσους είναι ικανοί να την φέρουν σε πέρας, να δαπανούν 16 μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) για την παραγωγή δύο αμμωνιακών ιόντων από ένα μόριο αζώτου.



Το υψηλό ενεργειακό κόστος της αζωτοδέσμευσης και η απαίτηση για παρουσία συστημάτων παροχής ηλεκτρονίων (τα οκτώ ηλεκτρόνια που φαίνονται στην χημική εξίσωση δείχνουν ότι εκτός από ενέργεια, η διαδικασία κοστίζει και σε αναγωγική δύναμη) ίσως είναι και ο λόγος που η εξέλιξη «πρόικισε» λίγους οργανισμούς με την αζωτοδεσμευτική ικανότητα. Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται ελεύθερα ζώντα βακτήρια των γενών *Azotobacter*, *Clostridium* και *Azospirillum*, συμβιωτικά βακτήρια των γενών *Rhizobium*, *Frankia* και *Azorhizobium* που συμβιούν με φυτά, κυρίως της οικογένειας των ψυχανθών και τέλος, τα κυανοφύκη. Στον ενζυμικό εξοπλισμό που χρησιμοποιείται από τους παραπάνω οργανισμούς για να περατώσουν την αζωτοδεσμευτική τους δράση, κυρίαρχη θέση κατέχει το ένζυμο νιτρογενάση (nitrogenase, E.C. 1.18.6.1) (Howard and Rees, 1994; Rubio and Ludden 2008; Hu et al. 2008). Ιδίως στην περίπτωση των συμβιωτικών σχέσεων η εξέλιξη έχει οδηγήσει στη δημιουργία ειδικών ανατομικών προσαρμογών και στην ανάπτυξη θαυμαστών αλληλεπιδράσεων σε επίπεδο χημικής επικοινωνίας των συμβιωτών. Διεξοδικότερη ανάλυση και εμπάθυνση στο θέμα ξεφεύγει από τον σκοπό της παρούσας διατριβής. Ο ενδιαφερόμενος αναγνώστης παραπέμπεται σε πρόσφατα άρθρα ανασκόπησης της σχετικής βιβλιογραφίας (Oldroyd & Downie, 2008; Markmann and Parniske, 2009).

Το ατμοσφαιρικό άζωτο εισέρχεται στην οργανική ύλη ως αμμωνιακά ιόντα. Άλλες «πύλες εισόδου» στην δεξαμενή των αμμωνιακών ιόντων της βιόσφαιρας είναι η σαπροφυτική δράση των αποικοδομητών και η ανθρωπογενής προσθήκη λιπασμάτων. Τα αμμωνιακά ιόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας από τα φυτά και τους μικροοργανισμούς για την σύνθεση όλων των αζωτούχων ουσιών τους (Pathak et al, 2008). Ωστόσο, υπάρχει μια ομάδα βακτηρίων, τα καλούμενα νιτροποιητικά βακτήρια (Ferguson, 1998), τα οποία ευθύνονται για την διαδοχική οξειδωση, σε ορισμένα μάλιστα περιβάλλοντα ολόκληρης σχεδόν της διαθέσιμης ποσότητας αμμωνιακών ιόντων, προς νιτρώδη αρχικά και νιτρικά στην συνέχεια. Τα βακτήρια που επιτελούν το πρώτο βήμα ανήκουν στο γένος *Nitrosomonas* και αυτά που επιτελούν το δεύτερο βήμα ανήκουν στο γένος *Nitrobacter*. Το τελικό αποτέλεσμα της νιτροποίησης είναι η παραγωγή νιτρικών ιόντων και η αποκατάσταση μιας ισορροπίας μεταξύ αμμωνιακών και

νιτρικών στο υπόστρωμα. Η θέση της ισορροπίας αυτής καθορίζεται από πληθώρα παραγόντων, έτσι ώστε άλλα ενδαιτήματα είναι πλούσια σε αμμωνιακά ιόντα ενώ άλλα σε νιτρικά (Britto and Kronzucker, 2005).

Η ισορροπημένη ροή του αζώτου στη βιόσφαιρα απαιτεί την εξασφάλιση της επιστροφής μιας ποσότητας πίσω στην ατμόσφαιρα. Αυτό γίνεται με την απονιτροποίηση. Συντελείται με την δράση βακτηρίων που ονομάζονται απονιτροποιητικά και μετατρέπουν τα νιτρικά ιόντα σε αέριες μορφές αζώτου που επιστρέφουν στην ατμόσφαιρα (Ferguson, 1998; Hayatsu et al. 2008). Σημαντική έμμεση συμβολή στη διαδικασία αυτή φαίνεται να διαδραματίζει και η αναερόβια οξειδωση των αμμωνιακών ιόντων καθώς και η οξειδωση της αμμωνίας από αρχαιοβακτήρια (Francis et al. 2007; Hayatsu et al. 2008) εξασφαλίζοντας μια πρόσθετη πηγή υποστρώματος για την απονιτροποίηση. Οι διεργασίες αυτές τυγχάνουν ιδιαίτερης προσοχής από τους ερευνητές που δραστηριοποιούνται στον χώρο της περιβαλλοντικής βιολογίας (Kowalchuck and Stephen, 2001), λόγω και των δυνητικών εφαρμογών στην επεξεργασία λυμάτων με υψηλό αζωτούχο φορτίο (Adav et al. 2008).

Πρόσληψη και αφομοίωση αζώτου από τα φυτά.

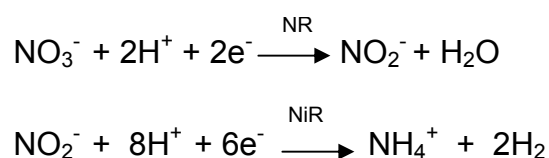
Στον κύκλο του αζώτου, ο ρόλος των φυτικών οργανισμών και δη των «ανώτερων» φυτών είναι πολύ σημαντικός. Τα φυτά, ως οι σημαντικότεροι παραγωγοί στα χερσαία οικοσυστήματα, προσλαμβάνουν και αφομοιώνουν το ανόργανο άζωτο και σε συνδυασμό με την ικανότητά τους να αξιοποιούν την ηλιακή ακτινοβολία παράγουν το μεγαλύτερο μέρος της βιομάζας. Ως εκ τούτου θα επιχειρηθεί στο σημείο αυτό μια λεπτομερέστερη θεώρηση της πρόσληψης και αφομοίωσης του αζώτου από τα φυτά, με μεγαλύτερη έμφαση στην αφομοίωση μιας και συναρτάται σε μεγαλύτερο βαθμό με τον σκοπό της παρούσας μελέτης.

Η περιρρέουσα τις ρίζες ριζόσφαιρα θέτει στην διάθεση του φυτού ποικίλες μορφές αζώτου. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται ανόργανες μορφές, κυρίως νιτρικά και αμμωνιακά ιόντα, αλλά και οργανικές πηγές όπως αμινοξέα και μικρά πεπτιδία (Schimel and Bennett, 2004; Bardgett, 2005). Ωστόσο, στα φυσικά οικοσυστήματα το μεγαλύτερο μέρος των οργανικών μορφών

καταναλώνεται από τους μικροβιακούς πληθυσμούς (Paul & Clark, 1996). Τα φυτά είναι ικανά να προσλάβουν απευθείας αμμωνιακά ιόντα από το έδαφος (Lea and Morot-Gaudry, 2001; Glass et al. 2002), μέσω συστημάτων ενεργού μεταφοράς. Μάλιστα το πολυφασικό πρότυπο που παρατηρείται στην πρόσληψη του αμμωνίου υπαινίσσεται την ύπαρξη πολλών διαφορετικών μεταφορέων. Έχουν παρατηρηθεί υψηλής συγγένειας συστήματα πρόσληψης, τα οποία επιδεικνύουν κλασσική κατά Michaelis-Menten κινητική συμπεριφορά, αλλά έχουν περιγραφεί και χαμηλής συγγένειας συστήματα τα οποία επιστρατεύονται σε υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνίου. Και των δύο τύπων τα συστήματα κωδικοποιούνται από την οικογένεια των AMT γονιδίων.(Wang et al., 1993; Mack and Tischner 1994; Maathuis 2009.) Οι σταθερές συγγενείας των μεταφορέων για το αμμώνιο κυμαίνονται μεταξύ 10-70 μM . (Buchanan et al. 2000; Glass et al. 2002, Britto and Kronzucker, 2005). Ωστόσο προτιμότερη πηγή αζώτου αποτελούν τα νιτρικά ιόντα (Pathak et al, 2008). Τα τελευταία εισέρχονται στο φυτικό σώμα από τα κύτταρα της ριζοδερμίδας, που τελούν υπό άμεση γεινίαση με το εδαφικό διάλυμα, αλλά και από τα κύτταρα του φλοιού της ρίζας που παραλαμβάνουν τα αποπλαστικά μεταφερόμενα ιόντα. Η είσοδος στο κύτταρο γίνεται με ενεργό μεταφορά, με την δράση συμμεταφορέων $\text{NO}^{-3}/\text{H}^{+}$ που εδράζονται στο πλασμαλήμμα, των οποίων η συγγένεια για το νιτρικό ιόν μπορεί να είναι είτε υψηλή (HATS) είτε χαμηλή (LATS) (Chen et al. 2008). Έρευνες διενεργηθείσες κατά κανόνα σε δημητριακά έχουν αποκαλύψει, ότι σε εξωτερικές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων χαμηλότερες του 1mM η πρόσληψη γίνεται μέσω συστημάτων υψηλής συγγένειας, ενώ όταν οι συγκεντρώσεις αυτές υπερβούν το 1mM η πρόσληψη συνεπικουρείται και από τα χαμηλής συγγένειας συστήματα (Lea and Ireland 1999). Ένα ενδιαφέρον στοιχείο γύρω από το ζήτημα της πρόσληψης των νιτρικών ιόντων από τα φυτά είναι, ότι εντείνεται σημαντικά, ωσάν θετικώς ανατροφοδοτούμενη διαδικασία, έπειτα από μια αρχική έκθεση σε συγκεκριμένη συγκέντρωση νιτρικών εξωτερικά των ριζών (Aslam et al., 1992; Kroznucker et al., 1995). Επιπρόσθετα, τα ιόντα αμμωνίου δύνανται να επηρεάσουν την συνολική είσοδο νιτρικών ιόντων, καθώς φαίνεται να επάγουν τις διαδικασίες αποβολής νιτρικών ιόντων (efflux of nitrates), ενώ έχει καταγραφεί και περιοριστική δράση στους μηχανισμούς επαγωγής των

συστημάτων μεταφοράς των νιτρικών ιόντων εντός του φυτού (Aslam *et al.*, 1995). Τέλος αξίζει να αναφερθεί, ότι πρωτογενής πρόσληψη νιτρικών και αμμωνιακών ιόντων μπορεί να λάβει χώρα και από εναέρια τμήματα του φυτού (Pearson and Stewart 1993; Lea *et al.*, 1996). Η πορεία όμως αυτή περιορίζεται ως προς την σημαντικότητά της κυρίως σε επίφυτα (Διαμαντίδης, 2007).

Τα νιτρικά ιόντα μπορούν είτε να αποθηκευτούν στο χυμοτόπιο, είτε να υποστούν αναγωγή προς νιτρώδη σε πρώτη φάση και προς αμμωνιακά εν συνεχεία, είτε να διοχετευτούν προς το ξύλωμα του αγωγού ιστού για μεταφορά σε υπέργεια όργανα του φυτού (Campbell 1996; Loulakakis *et al.*, 2009). Σε κάθε περίπτωση, τα νιτρικά προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για βιοσύνθεση αζωτούχων βιομορίων πρέπει να αναχθούν σε αμμωνιακά, διαδικασία η οποία συντελείται σε δύο στάδια. Αρχικά, τα νιτρικά ιόντα ανάγονται προς νιτρώδη στο κυτταρόπλασμα με αντίδραση, που καταλύεται από το ένζυμο νιτρική αναγωγή (NADH-NR E.C 1.6.6.1, NADPH-NR E.C 1.6.6.2). Στην συνέχεια τα νιτρώδη ιόντα μεταφέρονται στο χλωροπλάστη (ή τα πλαστίδια των μη φωτοσυνθετικών ιστών) όπου και υφίστανται την τελική αναγωγή προς αμμωνιακά μέσω της δράσης της νιτρώδους αναγωγάσης (Fd-NiR E.C 1.7.71 ; NAD(P)H-NiR E.C. 1.6.6.4) (Loulakakis *et al.* 2009)



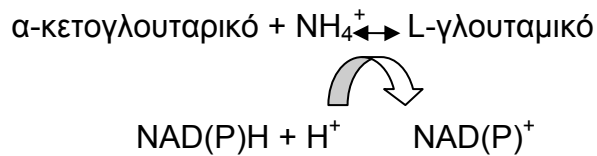
Το τελικό αποτέλεσμα της διαδοχικής δράσης της νιτρικής και της νιτρώδους αναγωγάσης είναι η ολοκλήρωση της αφομοίωσης των νιτρικών προς παραγωγή αμμωνίου, της μοναδικής μορφής ανόργανου αζώτου την οποία τα φυτά μπορούν να επιστρατεύσουν για τις βιοσυνθέσεις τους. Επιπρόσθετες πηγές αμμωνίου είναι διάφορες βιοχημικές διεργασίες συντελούμενες *in planta*, όπως η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση της γλυκίνης προς σερίνη κατά τη φωτοαναπνοή, πρωτεολυτικές αντιδράσεις και οι απαμινώσεις των αμινοξέων, ο μεταβολισμός των φαινυλπροπανοειδών, ο κύκλος της ουρίας, η αποδόμηση των ουρεϊδίων (για ορισμένα τουλάχιστον φυτά) και άλλων ενώσεων μεταφοράς και αποθήκευσης αζώτου. Τέλος, όπως ήδη

επισημάνθηκε, σε εδάφη όπου τα νιτροποιητικά βακτήρια δεν ευημερούν και η διαθεσιμότητα των νιτρικών είναι περιορισμένη, σημαντικό ρόλο έχει η πρόσληψη αμμωνιακών απευθείας από το έδαφος.

Αφομοίωση της αμμωνίας.

Επισημάνθηκε ήδη ότι η μετατροπή του ανόργανου αζώτου σε αμμωνιακά ιόντα αποτελεί μονόδρομο για την βιοσύνθεση των αζωτούχων βιομορίων. Η συσσώρευσή τους όμως στα φυτικά κύτταρα, πέραν ορισμένων ορίων, οδηγεί σε τοξικότητα. Παρατηρήσεις σχετικές με ενδεχόμενη τοξική δράση του NH_4^+ καταγράφονται τουλάχιστον από το 1882, όταν ο ίδιος ο Charles Darwin περιέγραψε την αναστολή της αύξησης του φυτού *Euphorbia pelrus* από το αμμώνιο (Schnek and Wehrmann, 1979). Η ευαισθησία στα αμμωνιακά ιόντα είναι ένα οικουμενικό βιολογικό φαινόμενο (Britto and Kronzucker, 2002), με εξαίρεση ίσως ορισμένους μικροοργανισμούς που στηρίζονται στην οξειδωσή τους ως μοναδική ενεργειακή πηγή (Hayatsu et al. 2008). Όσο κι αν εκπλήσσει όμως ως γεγονός, οι μηχανισμοί που προκαλούν την τοξικότητα αυτή είναι αιτία πολλών διαφωνιών μεταξύ των ειδικών. Ο ευρύτερα προτεινόμενος μηχανισμός κάνει λόγο για την δράση των αμμωνιακών ιόντων ως αποσυζευκτών των αλυσίδων μεταφοράς ηλεκτρονίων. Όμως πρόσφατες έρευνες κάνουν λόγο για αρκετά πολυπλοκότερη και σύνθετη δράση (Britto et al. 2001).

Με τον όρο αφομοίωση της αμμωνίας (ή του αμμωνίου, του συζυγούς οξέος της, που κατά κύριο λόγο απαντάται στις βιοχημικές διεργασίες) εννοείται η ενσωμάτωση των ιόντων αμμωνίου σε πολυπλοκότερα αζωτούχα βιομόρια. Στους μικροοργανισμούς σημαντικό ρόλο στην αφομοίωση της αμμωνίας διαδραματίζει το ένζυμο γλουταμική αφυδρογονάση (GDH, E.C 1.4.1.4). Είναι οικουμενικής εμφάνισης σε όλους τους οργανισμούς και καταλύει, τουλάχιστον *in vitro*, τόσο την αναγωγική αμίνωση του 2-οξογλουταρικού (ή α-κετογλουταρικού) οξέος προς γλουταμικό οξύ, όσο και την αντίστροφη πορεία της οξειδωτικής απαμίνωσης του αμινοξέος προς σχηματισμό α-κετογλουταρικού.



Έρευνες (Halpern and Umbarger, 1960; Vender and Rickenberg, 1964; Varricchio, 1969) στο πιο μελετημένο βακτήριο του 20^{ού} αιώνα υποδείκνυαν ότι: «είναι απίθανο η GDH να διαδραματίζει τον οποιονδήποτε καταβολικό ρόλο στην *E.coli*» (Tyler, 1978). Ανάλογα ήταν τα συμπεράσματα από έρευνες στον μύκητα *Candida utilis* (Sims and Folkes, 1964). Στα φυτά, επίσης, για πολλά χρόνια η αντίδραση, που καταλύεται από τη GDH, εθεωρείτο ως η σημαντικότερη πύλη εισόδου των αμμωνιακών ιόντων σε αμινοξέα και συγκεκριμένα στο γλουταμικό οξύ. Όμως, μετά την εργασία των Lea και Mifflin (1974) τεκμηριώθηκε πλέον ότι η κύρια οδός εισόδου των αμμωνιακών ιόντων σε φυτικά βιομόρια είναι οι αντιδράσεις, που καταλύονται από τη γλουταμινική συνθετάση (GS, E.C. 6.3.1.2) και τη γλουταμική συνθάση (Glutamate Oxoglutarate AmidoTransferase, Fd-GOGAT E.C. 1.4.7.1). Ήδη από το 1956 είχε καθαριστεί από φυτικό ιστό και είχε χαρακτηριστεί το ένζυμο GS (Mifflin and Habash, 2002). Η GS χρησιμοποιεί την αμμωνία ως υπόστρωμα με πολύ μεγαλύτερη συγγένεια (πολύ χαμηλότερο Km) σε σύγκριση με την GDH, για να συνθέτει γλουταμίνη από γλουταμικό, καταναλώνοντας παράλληλα ATP και είχε βρεθεί στα βακτήρια 4 χρόνια νωρίτερα (Tempest et al. 1970).

Η GS απαντάται στα φυτά σε δυο ισομορφές, τις GS1 και GS2. Η πρώτη εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και η δεύτερη στους χλωροπλάστες και τα πλαστίδια των μη φωτοσυνθετικών ιστών. Οι δύο ισομορφές διαφέρουν ελαφρώς στο μέγεθος, με την πλαστιδιακή να κυμαίνεται μεταξύ 44-45 kD και την κυτταροπλασματική μεταξύ 38-40 kD. Στα αγγειόσπερμα το χλωροπλαστικό ισοένζυμο κωδικοποιείται από ένα γονίδιο, ενώ για το αντίστοιχο κυτταροπλασματικό υπάρχουν από δύο έως πέντε γονίδια, ανάλογα με το είδος. Περιέργως στα κωνοφόρα, που ανήκουν στα γυμνόσπερμα, δεν υπάρχει μέχρι στιγμής απόδειξη για ύπαρξη της GS2 (Bernard and Habash 2009). Προκειμένου για το φυτό *Nicotiana tabacum*, στο

οποίο κατ'αποκλειστικότητα στηρίχτηκαν τα πειράματα που περιγράφονται στην παρούσα διατριβή, οι έρευνες έχουν καταδείξει την ύπαρξη ενός γονιδίου που κωδικοποιεί την GS2 και τουλάχιστον δύο γονιδίων για την αντίστοιχη κυτταροπλασματική μορφή, GS1 (Dubois et al. 1996).

Η δράση της GS στα φυτικά κύτταρα είναι συζευγμένη με την δράση της GOGAT. Πρόκειται για μια αμιδοτρανσφεράση, που χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τη γλουταμίνη, που συντίθεται με την δράση της GS, το ακετογλουταρικό και μια αναγωγική ουσία, οδηγεί στην σύνθεση δύο μορίων γλουταμικού οξέος. Η GOGAT απαντάται σε δύο διαφορετικές μορφές στα φυτά, ανάλογα με την αναγωγική ουσία που χρησιμοποιεί. Η μία μορφή του ενζύμου χρησιμοποιεί την ανηγμένη φερεδοξίνη (Fd-GOGAT E.C 1.4.7.1) και είναι ουσιαστικά το ένζυμο που ανακάλυψαν οι Lea και Mifflin το 1974. Το μέγεθός της κυμαίνεται μεταξύ 125-180 kD ανάλογα με το είδος (Anderson et al. 1989). Η άλλη μορφή χρησιμοποιεί το NADH (NADH-GOGAT E.C.1.4.1.14) και είναι αρκετά μεγαλύτερο ένζυμο, 200-240 kD. Και οι δύο μορφές φαίνεται να εντοπίζονται στα πλαστίδια, με την Fd-GOGAT να κυριαρχεί στους χλωροπλάστες των φωτοσυνθετικών ιστών αξιοποιώντας την ανηγμένη φερεδοξίνη που παρέχεται από την φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η NADH-GOGAT πρωτοεντοπίστηκε σε ιστοκαλλιέργειες (Dougall, 1974), αφθονεί στους μη φωτοσυνθετικούς ιστούς (Stewart et al. 1980) και αντλεί αναγωγική δύναμη από τον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών. Στην πλειοψηφία των φυτών και οι δύο μορφές της GOGAT φαίνεται να κωδικοποιούνται από τουλάχιστον δύο γονίδια (Forde and Lea, 2007).

Μολονότι η συνδυασμένη δράση της GS και της GOGAT είναι αδιαμφισβήτητη στην αφομοίωση της αμμωνίας (Mifflin and Habash, 2002; Dubois et al, 2003), πολλές λεπτομέρειες των ρυθμιστικών μηχανισμών και της ομοιόστασης του εν λόγω αφομοιωτικού κύκλου μένουν αδιευκρίνιστες. Οι πολλαπλές ισομορφές και τα πολλαπλά γονίδια που τις κωδικοποιούν παρέχουν την δυνατότητα πολλών διαφορετικών συνδυασμών για την συγκρότηση του ίδιου αφομοιωτικού μηχανισμού. Έτσι εξασφαλίζεται η απαιτούμενη διαφοροποίηση ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, τον ιστό, το αναπτυξιακό στάδιο, το εκάστοτε μεταβολικό *status quo* του φυτού και τις περιβαλλοντικές προκλήσεις. Δυστυχώς, τα περιθώρια επέκτασης πάνω στο

συγκεκριμένο θέμα στα πλαίσια της εισαγωγής αυτής της διατριβής είναι περιορισμένοι Παραπέμπουμε στην πλούσια σχετική βιβλιογραφία (Betti et al, 2006; Canovas et al, 2007; Forde and Lea, 2007; Tabuchi et al. 2007; Bernard and Habash, 2009).

Η Γλουταμική αφυδρογονάση

Καθώς στην σχετική βιβλιογραφία εδραιωνόταν η βασική πορεία της αφομοίωσης της αμμωνίας, αυξανόταν το επιστημονικό ενδιαφέρον για το φυσιολογικό ρόλο της GDH. Πριν ωστόσο παρουσιαστούν τα σημερινά δεδομένα σχετικά με το συγκεκριμένο ζήτημα, είναι σκόπιμο να δοθούν ορισμένες πληροφορίες για την γενωμική οργάνωση των γονιδίων που την κωδικοποιούν και για την οργάνωση και τον υποκυτταρικό εντοπισμό του ολοενζύμου.

Η γονιδιακή οργάνωση της GDH

Η GDH είναι οικουμενικό ένζυμο σε ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς οργανισμούς. Έπειτα από στοίχιση και σύγκριση 21 δημοσιευμένων αλληλουχιών τα δεδομένα οδήγησαν στην διάκριση δύο μεγάλων οικογενειών γονιδίων και στην διατύπωση της άποψης, ότι υπήρχε μια αρχική αλληλουχία *GDH* από τον διπλασιασμό της οποίας προέκυψαν δυο καλά καθορισμένα γονίδια *GDH1* και *GDH2* (Benachenhou-Lahfa et al. 1993). Η υπόθεση αυτή ωστόσο απαιτούσε πολλές ανεξάρτητες διαδικασίες διπλασιασμού γονιδίων και παράλληλα γεγονότα εξαφάνισης γονιδίων. Με την δημοσίευση νέων αλληλουχιών και την διενέργεια νέων φυλογενετικών αναλύσεων καθορίστηκαν και άλλες οικογένειες, ενώ τουλάχιστον ένα τμήμα του δέντρου της εξέλιξης των γονιδιακών οικογενειών φαινόταν να έχει προκύψει με οριζόντια μεταφορά γονιδίων (Anderson and Roger, 2003).

Στα φυτά έχουν αναγνωρισθεί δύο μεγάλες ομάδες γονιδίων (Dubois et al. 2003). Στο γονιδίωμα της *Arabidopsis thaliana* υπάρχουν δύο πυρηνικά μη αλληλόμορφα γονίδια (Cammaerts and Jacobs, 1983) που κωδικοποιούν για τις δύο υπομονάδες, α- και β-, οι οποίες όπως θα περιγραφεί λεπτομερέστερα στην συνέχεια, συμμετέχουν στην δόμηση του ενεργού ολοενζύμου. Έχουν απομονωθεί δύο διαφορετικοί cDNA κλώνοι που κωδικοποιούν για την NADH-GDH. Οι κλώνοι αυτοί ονομάστηκαν *GDH1*, για την α-υπομονάδα

(Melo-Oliveira et al. 1996) και *GDH2* για την β-υπομονάδα (Turano et al, 1997). Ο *GDH1* έχει μέγεθος 1539 bp δίνοντας προϊόν 411 αμινοξέων, ενώ ο *GDH2* 1620 bp με προϊόν επίσης 411 αμινοξέων. Η μεταξύ τους ομολογία εκτιμήθηκε στο 81%, έχουν συντηρημένο μιτοχονδριακό οδηγό- πεπτιδίο στο αμινοτελικό τους άκρο καθώς επίσης και μοτίβα πρόσδεσης του α-κετογλουταρικού. Επιπρόσθετα, μόνο ο κλώνος *GDH2* που κωδικοποιεί για την β-υπομονάδα, βρέθηκε να περιέχει μοτίβο EF-hand loop, το οποίο σχετίζεται με την πρόσδεση ιόντων Ca^{2+} . Το προϊόν του γονιδίου *GDH1* υπολογίστηκε σε 43kD και του *GDH2* σε 42,5 kD (Turano et al. 1997).

Από το αμπέλι (*Vitis vinifera* cv Sultanina) έχουν απομονωθεί επίσης δύο διαφορετικοί cDNA κλώνοι. Ο κλώνος που κωδικοποιεί για την α-υπομονάδα απομονώθηκε από cDNA βιβλιοθήκη έκφρασης, έχει μέγεθος 1622 bp και κωδικοποιεί μια πρόδρομη πρωτεΐνη 411 αμινοξέων, με μοριακό βάρος 44,5 kD (Syntichaki et al. 1996). Ο κλώνος που κωδικοποιεί την β-υπομονάδα έχει απομονωθεί από ολικό RNA με στρατηγική βασισμένη στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (Σκοπελίτης, 2006). Και στους δύο κλώνους έχει αναγνωριστεί αμινοτελικό μιτοχονδριακό πεπτιδίο, μοτίβο πρόσδεσης του NADH, και μοτίβο πρόσδεσης γλουταμικού. Σχετικές προσεγγίσεις και σε άλλα φυτικά είδη έχουν οδηγήσει στην απομόνωση των αντίστοιχων γονιδίων. Όσον αφορά σε δικότυλα φυτά, έχουν απομονωθεί δύο γονίδια από το *Nicotiana plumbaginifolia* (Ficarelli et al. 1999), το *Nicotiana tabacum* (Purnell et al. 2005; Masclaux-Daubresse et al. 2002), το *Asparagus officinalis* (Pavesi et al. 2000) και το *Solanum lycopersicum* (Purnell et al. 1997) Τα μεγέθη και τα δομικά μοτίβα είναι παρόμοια με τα προαναφερθέντα για την *Arabidopsis* και το αμπέλι. Από μονοκότυλα φυτά, γονίδια της GDH έχουν απομονωθεί από το ρύζι (*Oryza sativa*) (Goff et al. 2002) και το καλαμπόκι (*Zea mays*) (Sakakibara et al. 1995). Από την μελέτη όλων των διαθέσιμων cDNA κλώνων από μονοκότυλα και δικότυλα φυτά τα στοιχεία που μπορούν να συνοψιστούν ως κοινά, για όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν και τις δύο υπομονάδες, είναι τα ακόλουθα (Σκοπελίτης, 2006):

- Ύπαρξη αμινοτελικού οδηγού πεπτιδίου για στόχευση του προϊόντος στο μιτοχόνδριο.
- Ένα μοτίβο πρόσδεσης α-κετογλουταρικού οξέος.

- Συντηρημένο μοτίβο για την πρόσδεση του συμπαραγόντα NADH.
- Συντηρημένο μοτίβο για την πρόσδεση γλουταμικού οξέος.

Κάποια γονίδια διαθέτουν επιπλέον και μοτίβο EF-hand loop, το οποίο σχετίζεται με την πρόσδεση του ασβεστίου (Haiech and Sallantin, 1985). Ως προς το θέμα αυτό η βιβλιογραφία οδηγεί σε μια φαινομενική σύγχυση, σχετικά με το αν η υπομονάδα που είναι σε θέση να προσδένει το ασβέστιο είναι η α- ή η β-. Για το αμπέλι, τον καπνό και την τομάτα, φυτά με τα οποία σχετίζεται αμεσότερα η παρούσα εργασία, η υπομονάδα που φέρει το υπο συζήτηση μοτίβο είναι η α- (Purnell et al. 2005; Skopelitis et al. 2006). Το αντίθετο ισχύει για την *Arabidopsis*, όπου το EF-hand loop φέρεται από την β- υπομονάδα (Turano et al. 1997). Η αποσαφήνιση αυτού του λεπτού σημείου θα επιχειρηθεί στην αμέσως επόμενη ενότητα, όπου θα συζητηθεί η δομή και η οργάνωση του ολοενζύμου της GDH. Παρά την σύγχυση στην ονοματοδοσία των υπομονάδων, φαίνεται ότι τα ολοένζυμα που αποτελούνται αποκλειστικά από την υπομονάδα που φέρει το μοτίβο πρόσδεσης του ασβεστίου, δείχνουν παρόμοιο πρότυπο κατανομής, ηλεκτροφορούμενα σε μη αποδιατακτικά gel ακρυλαμίδης (NATIVE PAGE), σε σχέση με τα υπόλοιπα ισοένζυμα. Σε κάθε περίπτωση, ανεξαρτήτως οργανισμού ή ονομασίας των υπομονάδων, μόνον το ένα εκ των δύο γονιδίων φέρει το EF-hand loop μοτίβο και ως εκ τούτου μόνον η μια από τις δύο υπομονάδες είναι σε θέση να προσδένει το ασβέστιο.

Δομή, οργάνωση, και υποκυτταρικός εντοπισμός του ολοενζύμου της GDH.

Όπως ήδη επισημάνθηκε η GDH τυγχάνει οικουμενικής εμφάνισης σε όλα τα βασίλεια. Παρουσιάζει ολιγομερική δομική συγκρότηση και είναι κατά κανόνα εξαμερής, υπάρχουν όμως και τετραμερείς μορφές οι οποίες απαντώνται κύρια σε ορισμένους «κατώτερους» ευκαρυώτες (Minambres et al. 2000). Η σύγχρονη εξελικτική θεώρηση της ιστορίας του ενζύμου κάνει λόγο για τέσσερις κατηγορίες GDH (Anderson and Roger, 2003). Στην κατηγορία

GDH1 εντάσσονται ένζυμα από τα ευβακτήρια και από τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η GDH2 έχει αντιπροσώπους σε όλα τα βασίλεια. Και οι δύο αυτές κατηγορίες περιλαμβάνουν εξαμερείς μορφές και χρησιμοποιούν ως συμπαραγόνα το NAD^+ ή NADP^+ . Στην τρίτη κατηγορία GDH3 ανήκουν μεγαλύτερου μοριακού βάρους ολοένζυμα, με μέγεθος υπομονάδας περί τα 115 kD και σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται ένζυμα που υπάρχουν σε μύκητες και πρώτιστα. Είναι στην πλειοψηφία τους τετραμερείς μορφές και χρησιμοποιούν ως συμπαραγόνα το NAD^+ . Στην τέταρτη κατηγορία, τέλος, εμπεριέχονται ένζυμα από τα ευβακτήρια, με μοριακό βάρος ολοενζύμου περί τα 180 kD. Μια ειδική περίπτωση, που εντοπίστηκε σε ψυχροανθεκτικά βακτήρια της ανταρκτικής, κάνει λόγο για διμερές ένζυμο, αλλά δεν έχει ενταχθεί αυτό το δεδομένο στις έως τώρα επιχειρηθείσες φυλογενετικές αναλύσεις (Camardella et al. 2002).

Στα φυτά το ενεργό ολοένζυμο αποτελείται από δύο υπομονάδες. Η ανίχνευση και ο προσδιορισμός των υπομονάδων έχει επιτευχθεί με ηλεκτροφορητικές προσεγγίσεις και προκειμένου για το αμπέλι έχουν ανιχνευτεί δύο υπομονάδες με μοριακά βάρη 43 και 42,5 kD (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1991), οι οποίες συμβατικά ονομάστηκαν α- και β-. Με ηλεκτροφόρηση δυο διαστάσεων (SDS-PAGE/IEF) βρέθηκε επιπρόσθετα, ότι εκτός από το μέγεθος διαφέρουν και στο συνολικό τους φορτίο. Στην *Arabidopsis* εντοπίστηκαν επίσης δύο υπομονάδες, με τα ίδια μοριακά βάρη, που επίσης ονομάστηκαν α- (43 kD) και β- (42,5 kD) (Turano et al. 1997). Ειδικά για την περίπτωση της *Arabidopsis* όμως, η υπομονάδα α- αντιστοιχεί στην β- του αμπελιού (καμιά τους δεν φέρει EF-hand μοτίβο), ενώ η υπομονάδα β- αντιστοιχεί στην α- του αμπελιού (και οι δύο φέρουν EF-hand μοτίβο). Η σύγχυση προκύπτει επειδή οι ερευνητές, που έκαναν την έρευνα στην *Arabidopsis*, επέλεξαν να ακολουθήσουν το πρότυπο της ονοματολογίας που προηγούμενα είχε προταθεί, κατά σύμβαση, για το αμπέλι. Ονόμασαν λοιπόν ως α- την μεγαλύτερου μοριακού βάρους υπομονάδα και ως β- την μικρότερου μοριακού βάρους υπομονάδα. Αν είχαν επιλέξει ως κριτήριο ονοματολογίας την δομική ομοιότητα (ύπαρξη ή όχι EF-hand) και όχι το μοριακό βάρος, η σύγχυση αυτή θα είχε αποφευχθεί. Από άλλα μονοκότυλα και δικότυλα φυτά, οι έρευνες έχουν οδηγήσει στον εντοπισμό, επίσης, δύο

υπομονάδων, με τα μοριακά βάρη να κυμαίνονται ανάμεσα σε 41-58 kD (Purnell et al. 1997; Ficarelli et al. 1999; Becker et al. 2000; Restivo, 2004).

Το ενεργό ολοένζυμο της GDH προέρχεται από την τυχαία σύνδεση των δύο υπομονάδων προς δημιουργία του ενεργού εξαμερούς. Η τυχαία σύνδεση έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό όλων των πιθανών συνδυασμών και έτσι προκύπτουν επτά ισομορφές. Οι εν λόγω ισομορφές παρουσιάζουν διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε μη αποδιατακτικό gel ακρυλαμίδης. Τα ισοένζυμα που μεταναστεύουν ταχύτερα προς την άνοδο, τα λεγόμενα ανοδικά ισοένζυμα, είναι ομοεξαμερή της α-υπομονάδας (προκειμένου για το αμπέλι και τα υπόλοιπα δίκωτυλα και μονοκότυλα φυτά, πλην της *Arabidopsis*, για τα οποία έχουν προσδιοριστεί οι δύο υπομονάδες). Αντίστοιχα, τα ισοένζυμα με την μικρότερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα, τα λεγόμενα καθοδικά ισοένζυμα, είναι ομοεξαμερή της β-υπομονάδας. Ειδικά για την *Arabidopsis* η ονοματολογία αντιστρέφεται και τα ανοδικά είναι ομοεξαμερή της β- ενώ τα καθοδικά είναι ομοεξαμερή της α-. Προκειμένου να μην δημιουργείται σύγχυση, με δεδομένο ότι η *Arabidopsis* δεν έχει άμεση σχέση με την παρούσα εργασία, εφεξής στο κείμενο θα διατηρείται η ονοματολογία που ισχύει για τα λοιπά είδη. Εντούτοις, αυτό που έχει σημασία να συγκρατήσει ο αναγνώστης για την κατανόηση των πορισμάτων αυτής της έρευνας είναι ότι, σε κάθε περίπτωση, συμπεριλαμβανομένης και της *Arabidopsis*, τα ανοδικά ισοένζυμα είναι ομοεξαμερή εκείνης της υπομονάδος, που φέρει το μοτίβο πρόσδεσης για το ασβέστιο.

Το μοριακό βάρος του ενεργού εξαμερούς κυμαίνεται μεταξύ 208-280 kD. Στο αμπέλι έχει προσδιοριστεί στα 252 kD (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1990). Έχει αναφερθεί και η ύπαρξη της τετραμερούς μορφής σε κάποια φυτά (Stewart et al. 1980; Srivastava and Singh, 1987).

Οι πρώτες έρευνες για τη διαλεύκανση του υποκυτταρικού εντοπισμού της GDH, είχαν δώσει ενδείξεις ότι απαντάται στα μιτοχόνδρια (Bone, 1959), με προσεγγίσεις που στηρίζονταν σε υποκυτταρική κλασμάτωση και διαφορικές υπερφυγοκεντρήσεις. Η πλειοψηφία των πιο πρόσφατων μελετών συνηγορούσε υπέρ των αρχικών αυτών ευρημάτων. Σε φύλλα και άνθη από αμπέλι η πρωτεΐνη εντοπιζόταν στα μιτοχόνδρια των συνοδών κυττάρων του ηθμού (Paczeck et al, 2002). Παρόμοια ευρήματα έδειχναν και πειράματα σε

φύλλα ρυζιού (Maki et al. 2002). Ωστόσο, υπήρξαν από παλαιότερα και αναφορές εντοπισμού της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα (Yakovleva et al, 1964; Chou and Splittstoesser, 1972). Παρά τον μετέπειτα ενδοιασμό ότι στις αρχικές εκείνες παρατηρήσεις όση πρωτεΐνη εντοπιζόταν στο διαλυτό κλάσμα του κυττάρου και όχι στα μιτοχόνδρια, αποτελούσε ίσως ψευδώς θετικό αποτέλεσμα και αποδιδόταν σε διαρροή από κατεστραμμένα μιτοχόνδρια κατά την πειραματική διαδικασία, σήμερα υπάρχουν αρκετά δεδομένα για να υποστηρίξουν την θέση ότι, υπό προϋποθέσεις, μεταξύ των οποίων ο συγκεκριμένος τύπος κυττάρου και το αναπτυξιακό στάδιο, μη αμελητέες ποσότητες του ενζύμου εδράζονται στο κυτταρόπλασμα (Dubois et al. 2003). Αν και όπως θα συζητηθεί και στην επόμενη ενότητα, η δράση της GDH στο κυτταρόπλασμα είναι εν πολλοίς άγνωστη, εικάζεται ότι όταν συσσωρεύεται σε αυτό το κυτταρικό διαμέρισμα, παίζει σημαντικό ρόλο στην ενδοκυτταρική ανακύκλωση αζώτου και άνθρακα (Dubois et al. 2003).

Ο φυσιολογικός ρόλος της GDH

Για πολλές δεκαετίες ο φυσιολογικός ρόλος της GDH παρέμενε και ουσιαστικά παραμένει, αινιγματικός. Το ενεργό ολοένζυμο είναι ικανό να καταλύσει *in vitro* τόσο την αναγωγική αμίνωση του α-κετογλουταρικού οξέος, όσο και την οξειδωτική απαμίνωση του γλουταμικού οξέος. Υπάρχει όμως σκεπτικισμός κατά πόσον οι *in vitro* προσεγγίσεις επιτρέπουν την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για την *in vivo* λειτουργία. Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι υπάρχουν μικροοργανισμοί στους οποίους το ένζυμο δρα κατά βάση προς την αναβολική κατεύθυνση (Tyler, 1978; Kanamori et al. 1987; Smith and Stanley, 2008). Όμως η αρκετά χαμηλή συγγένεια του ενζύμου για την αμμωνία δεν αφήνει περιθώρια να θεωρηθεί ο αναβολικός ρόλος ως ο κανόνας για την φυσιολογική λειτουργία της GDH. Στην ζωική βιβλιογραφία η επικρατούσα άποψη είναι ότι το ένζυμο συμβάλλει σε πολλές διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως προμήθεια σκελετών άνθρακα για τον κύκλο του Krebs, διαχείριση της ενδοκυτταρικής αμμωνίας και παραγωγή ενέργειας (Zaganas et al. 2009).

Προκειμένου για τα φυτά, ο μιτοχονδριακός εντοπισμός του ενζύμου οδήγησε, λίγο καιρό μετά την ανακάλυψη του κύκλου GS/GOGAT, στην

διατύπωση απόψεων που συνέδεαν την GDH με την αφομοίωση της φωτοαναπνευστικά παραγόμενης αμμωνίας (Neeman et al 1985). Όμως οι έρευνες που έχουν διεξαχθεί με μεταλλάγματα της *Arabidopsis*, του κριθαριού και του μπιζελιού, τα οποία έφεραν μεταλλάξεις σε μια μεγάλη ποικιλία ενζύμων και μεταφορέων που ενέχονται στις φωτοαναπνευστικές διαδικασίες, δεν συνηγορούν υπέρ της καθοριστικής συμμετοχής της GDH (Somerville and Ogren, 1979; Kendal, 1983, Blackwel et al, 1988, Wingler et al. 2000). Η μη βιωσιμότητα μεταλλαγμάτων της GS2, υπό συνθήκες εύνοιας της φωτοαναπνευστικής λειτουργίας, καθώς και η παρατήρηση ότι, υπό ανάλογες συνθήκες, το γονίδιο που κωδικοποιεί την GS2 επάγεται έως και τέσσερις φορές, ως προς την αφθονία του μεταγράφου (Edwards and Corruzzi, 1989), δεν αφήνουν περιθώρια για ουσιαστική συμβολή της GDH. Η σημερινή εικόνα για τον έλεγχο και την ρύθμιση της φωτοαναπνοής (Foyer et al. 2009), χωρίς να αποκλείει την περιστασιακή συμμετοχή, δεν τοποθετεί την GDH σε εξέχοντα ρόλο.

Με βάση τα ανωτέρω, εύκολα γίνεται αντιληπτό ότι ο φυσιολογικός ρόλος της GDH στα φυτά αποτελεί ακόμα αντικείμενο διχογνωμιών μεταξύ των ερευνητών. Η βιβλιογραφία βρίθει αναφορών που θέλουν την GDH να ασκεί σημαίνοντα αναβολικό ρόλο (Yamaya et al. 1986; Yamaya and Oaks, 1987; Magalhaes et al. 1990; Magalhaes, 1991; Melo-Oliveira et al. 1996) αλλά και αντίστοιχων αναφορών για πρωταρχικό καταβολικό ρόλο (Robinson et al. 1992; Fox et al. 1995; Stewart et al. 1995; Aubert et al. 2001). Υπό το κράτος τέτοιων αντικρουόμενων ευρημάτων, γρήγορα έγινε αντιληπτό ότι θα πρέπει να αλλάξουν οι μεθοδολογικές προσεγγίσεις και ότι θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το άμεσο, άθικτο κυτταρικό και μεταβολικό περιβάλλον της υπό μελέτη διαδικασίας, ώστε να είναι έγκυρη η εξαγωγή συμπερασμάτων (Labboun et al. 2009). Σύντομα, μια αρκετά σαφέστερη εικόνα του *in planta* ρόλου άρχισε να διαγράφεται και σήμερα ορισμένες απόψεις για τον φυσιολογικό ρόλο της GDH είναι καλά εδραιωμένες και τυγχάνουν ευρείας αποδοχής. Έρευνες σε γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού, που έφεραν το γονίδιο που κωδικοποιεί την β- υπομονάδα της GDH από τομάτα, έδειξαν ότι τα καθοδικά ισοένζυμα (εξαμερή με πλειοψηφία της β- υπομονάδας στην δομή του ολενζύμου) απαμινώνουν το γλουταμικό οξύ *in vivo* (Purnell et al. 2005). Λίγα χρόνια αργότερα παρόμοια προσέγγιση έδειξε ότι και τα ανοδικά

ισοένζυμα, στα οποία κυριαρχεί η α- υπομονάδα, συμπεριφέρονται δρώντας προς την ίδια καταβολική κατεύθυνση, αλλά επιδεικνύουν επιπλέον και μια μικρή συγκριτικά αμινωτική (αναβολική) δράση υπό φυσιολογικές συνθήκες (Skorpelitis et al. 2007). Σε πολύ πρόσφατη μελέτη αναδείχθηκε η σημαντική συνεισφορά της GDH στον έλεγχο της ομοιόστασης του γλουταμικού στα φύλλα του καπνού, με χρήση γενετικά τροποποιημένων φυτών και της τεχνολογίας του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) σε κατά το δυνατόν άθικτους ιστούς (Labboune et al. 2009).

Όσο πιο βαθιά μπαίνει κανείς στην αναζήτηση του φυσιολογικού ρόλου της γλουταμικής αφυδρογονάσης, τόσο πιο έντονα εδραιώνεται η πεποίθηση ότι το χρονίζον πλέον ερώτημα «αναβολικός ή καταβολικός ο ρόλος;» πρέπει να αναδιατυπωθεί, χωρίς την χρήση του διαζευτικού μορίου «ή». Ίσως μια δόκιμη επαναδιατύπωση θα ήταν «Υπό ποιες συνθήκες αναβολικός και υπό ποιές καταβολικός;». Η απάντηση φαίνεται να είναι ενδεικτική της πολυπλοκότητας που διέπει όλα τα βιολογικά συστήματα. Εξαρτάται από την ολοκλήρωση, σε επίπεδο φυτού (Whole plant level), εξωγενών (περιβαλλοντικών) κι ενδογενών (φυσιολογικών και αναπτυξιακών ερεθισμάτων). Ιδιαίτερα ενδιαφέρον πεδίο έρευνας φαίνεται να είναι ο ρόλος της GDH στην ανάπτυξη του φυτού. Σε βλασάνοντα σπέρματα λυκίσκου (lupine) έχει παρατηρηθεί αύξηση των καθοδικών ισοενζύμων, τα οποία φαίνεται να προκύπτουν από την *de novo* σύνθεση της β-υπομονάδας. Εντούτοις, ίσως θα πρέπει στο σημείο αυτό να αναφερθεί μια ιδιαιτερότητα των σπερμάτων του λυκίσκου, όσον αφορά στην GDH. Στον βλασάνοντα λυκίσκο έχουν παρατηρηθεί άνω των 20 μοριακών ισομορφών του ενζύμου, λόγω του μεγαλύτερου αριθμού, συγκριτικά με άλλα είδη, των ενεργών γονιδίων της GDH που φέρει το εν λόγω φυτό. Φαίνεται μάλιστα ότι υπάρχουν τουλάχιστον τρεις διαφορετικές υπομονάδες της GDH, που συνδυάζονται τυχαία για να αποτελέσουν το ενεργό εξαμερές ολοένζυμο (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1991; Loulakakis et al. 2009). Σε εμβρυακούς άξονες άνευ κοτυληδόνων του φυτού αυτού οι οποίοι καλλιεργήθηκαν απουσία πηγής άνθρακα, παρατηρήθηκε αύξηση και του αριθμού και της ενεργότητας των καθοδικών ισοενζύμων, με αντιστροφή των ευρημάτων κατόπιν της προσθήκης σακχαρόζης (Morkunas et al. 2000). Τα ανωτέρω, συνηγορούντα υπέρ της καταβολικής δράσης ευρήματα, ελήφθησαν παράλληλα με άλλα

που περιέπλεκαν το σενάριο. Οι Masclaux et al., (2000) αποπειρώμενοι να προσδιορίσουν το αναπτυξιακό «σημείο» στο οποίο η πρωτογενής αφομοίωση του αζώτου στα φύλλα-αποδέκτες των φωτοσυνθετικών προϊόντων (sink leaves) του καπνού, υποκαθίσταται από την κινητοποίηση (remobilization) του «αποθηκευμένου» αζώτου στα φύλλα- παραγωγούς (source leaves), κατέληξαν να επιβεβαιώνουν παλαιότερα ευρήματα (Loulakakis and Roubelakis-Aggelakis, 1991, 1992) τα οποία έκαναν λόγο για *de novo* σύνθεση των ανοδικών ισοενζύμων και πιθανό αναβολικό ρόλο. Οι Masclaux et al. (2000) καταλήγουν ότι πιθανόν, στα φύλλα όπου γίνεται η αφομοίωση της αμμωνίας που παράγεται κατά την κινητοποίηση του αποθηκευμένου αζώτου, η GDH να επιστρατεύεται για αφομοιωτικούς σκοπούς συνεπικουρώντας τον κύκλο GS/GOGAT (Masclaux et al. 2000).

Η GDH έχει προταθεί, εκτός των άλλων, ότι είναι ένα ένζυμο που αποκρίνεται σε ερεθίσματα καταπνήσεων (Syntichaki et al. 1996; Restivo, 2004). Η πρωτεΐνη παρουσιάζει αξιοσημείωτη θερμική σταθερότητα (Syntichaki et al. 1996) και όπως ήδη έχει αναφερθεί, η μια υπομονάδα φέρει περιοχή πρόσδεσης με το ασβέστιο, το οποίο είναι γνωστό ιόν με δράση δευτερογενούς σηματοδότη στην μεταγωγή σήματος πολλών ερεθισμάτων. Επιπρόσθετα, η υψηλή ενδοκυτταρική συγκέντρωση της αμμωνίας, εξωγενούς (Cammaerts and Jacobs, 1985; Srivastava and Singh Rana, 1987; Lea and Ireland, 1999), ή από υδρόλυση πρωτεϊνών (Masclaux et al. 2000; Limami et al. 2002), οδηγεί σε *de novo* σύνθεση της α- υπομονάδας, συγκρότηση των ανοδικών ισοενζύμων και αυξημένη *in vitro* αμινωτική ενεργότητα (Loulakakis and Roubelakis Aggelakis, 1992). Εντούτοις, δεν θα πρέπει να δημιουργηθεί η εσφαλμένη εντύπωση ότι η απόκριση του ενζύμου σε κάποιας μορφής καταπνίση, συνδέεται αναγκαστικά με την αναβολική λειτουργία. Πρόσφατες μελέτες που εστίασαν σε τροφοπενικές καταπνήσεις, στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, κατέδειξαν την αναγκαιότητα της αυξημένης απαμινωτικής (ήτοι καταβολικής) δράσης της GDH, ώστε να εξασφαλιστεί η απρόσκοπτη ροή άνθρακα προς τροφοδότηση του κύκλου του Krebs, υπό συνθήκες σκοτοεπαγώμενης έλλειψης ανθρακικών σκελετών (Miyashita and Good, 2008). Στο ρύζι (*Oryza sativa*) τα αποτελέσματα μελέτης του προτύπου έκφρασης των μελών της πολυγονιδιακής οικογένειας της GDH έδειξαν πολύ διαφορετική συμπεριφορά των διαφορετικών μελών στην έλλειψη φωσφόρου

και στην έλλειψη αζώτου (Qiu et al. 2009). Έντονο ενδιαφέρον παρουσιάζει τα τελευταία χρόνια και η συμπεριφορά της GDH σε καταπονήσεις από παρουσία βαρέων μετάλλων. Οι σχετικές έρευνες έχουν αναδείξει την GDH σε πολύ σημαντικό παράγοντα για την δυνατότητα του φυτού να αντεπεξέλθει σε τέτοιες καταπονήσεις (Astofli et al. 2004; Gupta et al. 2005; H.Maaroufi Dguimi et al. 2009). Επιπρόσθετα, σε μια πρόσφατη, ευρείας κλίμακας ανάλυση της απόκρισης της *Arabidopsis* σε καταπόνηση ψύχους, εντοπίστηκαν ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες μη συγχρονισμένες διακυμάνσεις της αφθονίας των μεταγράφων και της ενεργότητας της GDH (Usadel et al. 2008). Αντίστοιχης κλίμακας και έκτασης δουλειά στο ρύζι, που συμπεριλάμβανε και την καταπόνηση από ξηρασία και αλατότητα, έδειξε ότι σε επίπεδο μεταγράφου η GDH επάγεται (Rabhani et al. 2003). Ασφαλώς, η προσπάθεια εξαγωγής συμπερασμάτων σχετικά με την ρύθμιση και την πιθανή φυσιολογική σημασία της χρονικής ανακολουθίας που διέπει τις διακυμάνσεις που παρατηρήθηκαν στην *Arabidopsis*, είναι δύσκολη, αλλά όπως αρκούντως να ισχυριστούν και οι συγγραφείς «τα αποτελέσματα είναι ενδεικτικά ενός ιδιαίτερα πολύπλοκου δικτύου γεγονότων μεταγωγής σήματος, που ενορχηστρώνει τον μεταβολισμό του αζώτου υπό συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων, συμπεριλαμβανομένου του ψύχους, της ξηρασίας και της αλατότητας» (Usadel et al. 2008).

Βαίνοντας προς την ολοκλήρωση της επιχειρούμενης επισκόπησης του φυσιολογικού ρόλου της GDH, το ενδιαφέρον εστιάζεται στην καταπόνηση από αλατότητα. Η αλατότητα θεωρείται ιδιαίτερα οξεία καταπόνηση για τα φυτά. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η προκαλούμενη εκτροπή από την φυσιολογική λειτουργία του καταπονούμενου οργανισμού είναι συνέπεια του συνδυασμού ιοντικών, οξειδωτικών και οσμωτικών επιπτώσεων (Apel and Hirt, 2004; Munns and Tester, 2008). Είναι ευρύτερα αποδεκτό ότι μια από τις αδιαμφισβήτητες αποκρίσεις ενός φυτού, μετά από έκθεσή του σε υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού, είναι η δημιουργία ελεύθερων μορφών οξυγόνου (EMO ή ROS, από το Reactive oxygen species) (Apel and Hirt, 2004 και οι εν αυτώ αναφορές, Skopelitis et al. 2006; Moschou et al. 2008; Andronis et al. 2009). Σε φυτά και φυλλικούς δίσκους καπνού, καθώς και σε *in vitro* συστήματα αμπελιού, η αλατότητα οδήγησε στην αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης των EMO, οι οποίες και σηματοδότησαν την έκφραση

πρωτεασών. Οι πρωτεάσες με την σειρά τους επέτειναν τα πρωτεολυτικά γεγονότα εντός του κυττάρου, οδηγώντας σε αύξηση της συγκέντρωσης του αμμωνίου. Τα συσσωρευόμενα ιόντα αμμωνίου έδρασαν, αν και σε μικρότερο βαθμό από το πρωτογενές ερέθισμα της αλατότητας, προς την περαιτέρω παραγωγή ΕΜΟ, δημιουργώντας έναν κλάδο θετικής ανατροφοδότησης. Οι ΕΜΟ δρώντας ως ενδοκυτταρικοί σηματοδότες, με όχι ξεκάθαρο προς το παρόν μηχανισμό, βρέθηκαν να επάγουν την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την α- υπομονάδα της GDH. Το γεγονός αυτό με την σειρά του ευνόησε τη σύνθεση των ανοδικών ισοενζύμων του ενεργού ολοενζύμου και οδήγησε σε αυξημένη *in planta* αμινωτική ενεργότητα. Το παραγόμενο γλουταμικό βρέθηκε να διοχετεύεται προς σύνθεση προλίνης, η συσσώρευση της οποίας υπό συνθήκες αλατότητας είναι διαπιστωμένη (Skopelitis et al. 2006).

Η σηματοδοτική δράση των ΕΜΟ, όσον αφορά στην επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της GDH, τέθηκε πρόσφατα υπό αίρεση κατά την διενέργεια μελετών επί κυτταροκαλλιεργειών της *Arabidopsis* (Tarasenko et al. 2009). Οι συγγραφείς προτείνουν, ότι οι προκληθείσες από την καταπόνηση αλλαγές στην φυσιολογική λειτουργία της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και όχι οι ΕΜΟ είναι το σήμα για την επαγωγή του γονιδίου. Αν και πιθανή, μια τέτοια εξήγηση χρήζει περαιτέρω διερεύνησης με προσεγγίσεις, στις οποίες θα λαμβάνεται υπόψη ο συντονισμός των αποκρίσεων από ολόκληρο το φυτό, δεδομένου ότι η εξαγωγή συμπερασμάτων με οδηγό αποκλειστικά τα *in vitro* συστήματα μελέτης έχει πολλακίς οδηγήσει σε σύγχυση στην βιβλιογραφία.

Σκοπός της εργασίας

Τα πειράματα που περιγράφονται στην παρούσα διατριβή εκπονήθηκαν με σκοπό να τύχει περαιτέρω διαλεύκανσης ο φυσιολογικός ρόλος της GDH, ιδίως υπό συνθήκες καταπόνησης από αλατότητα. Χρησιμοποιήθηκαν γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού, που είτε υπερεκφράζουν το καθένα ή και τα δύο μαζί, είτε υποεκφράζουν το καθένα από τα δύο γονίδια που κωδικοποιούν για την σύνθεση των υπομονάδων της GDH. Τα φυτά υποβλήθηκαν σε συγκεκριμένη συγκέντρωση αλατιού και για

συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, με οδηγό για την επιλογή των συνθηκών αυτών τις βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με την συγκέντρωση και τον χρόνο όπου μεγιστοποιείται η επαγωγή του γονιδίου, που κωδικοποιεί για την α- υπομονάδα (Skopelitis et al, 2006). Στο υπόστρωμα των φυτών προστέθηκαν σημασμένες με ισότοπο ^{15}N πηγές αζώτου, ενώ παράλληλα χορηγήθηκαν εξωγενώς αναστολείς της δράσης του κύκλου GS/GOGAT, αλλά και των τρανσαμινασών. Από τα φυτά που υπέστησαν την ανωτέρω δοκιμασία και από τα αντίστοιχα φυτά ελέγχου, ελήφθη φυλλικός ιστός και προσδιορίστηκε η έκφραση της GDH σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο. Στον ίδιο ιστό, έγινε προσπάθεια να παρακολουθηθεί η τύχη που είχε *in planta* το σημασμένο άζωτο, με μεταβολική ανάλυση στηριζόμενη σε GC/MS. Από την σχετική αφθονία και κατανομή, που παρατηρήθηκε στους αζωτούχους μεταβολίτες, εξήχθησαν συμπεράσματα για τον φυσιολογικό ρόλο του ενζύμου. Διενεργήθηκε, τέλος, λεπτομερής φαινοτυπική ανάλυση των φυτών υπερ- και υπο-έκφρασης προκειμένου να διαπιστωθεί ενδεχόμενη ανθεκτικότητα στην καταπόνηση από το αλάτι, σε κάποια από τις τρανσγενικές σειρές.

Υλικά και Μέθοδοι.

Φυτικό υλικό

Για την εκπόνηση της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν φυτά καπνού (*Nicotiana spp*), φυσικού τύπου (wild type, WT) και γενετικά τροποποιημένα (ΓΤ), ως προς τα επίπεδα έκφρασης της GDH, φυτά. Μεταξύ των ΓΤ σειρών υπήρχαν αντιπροσωπευτικές σειρές υπερέκφρασης και υποέκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν τις δύο διαφορετικές υπομονάδες της GDH. Η υπερεκφράζουσες σειρές ήταν κατασκευασμένες με σκοπό να φέρουν αυξημένα επίπεδα είτε του ενός είτε του άλλου γονιδίου είτε και των δύο μαζί. Αντίθετα, στις υποεκφράζουσες σειρές ο στόχος ήταν η σίγηση του ενός εκ των δύο κάθε φορά γονιδίων.

Συγκεκριμένα, ως WT φυτά χρησιμοποιήθηκαν φυτά *Nicotiana tabacum* var. Xanthi. Για την υπερέκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την α- υπομονάδα της GDH, φυτά της ανωτέρω ποικιλίας μετασχηματίστηκαν με τις κατάλληλες γονιδιακές κατασκευές (Σκοπελίτης, 2006, Labboun et al. 2009) και προέκυψαν διάφορες διαγονιδιακές σειρές. Εξ αυτών επελέγησαν οι sense *S-GDH;A* σειρές S2, S5 και S7 (Σκοπελίτης, PhD thesis 2006), καθώς και οι sense *S-GDH;A* σειρές A1 και A2 (Labboun et al. 2009). Στις δύο αυτές εργασίες χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές γονιδιακές κατασκευές για τον μετασχηματισμό των φυτών. Έτσι, οι σειρές S2, S5 και S7 φέρουν ως τρανσγονίδιο το γονίδιο που κωδικοποιεί την α-υπομονάδα της GDH από το αμπέλι (*V.vinifera*) *VvGDH-NAD;A1*, υπό την μεταγραφική ρύθμιση του υποκινητή CaMV 35S. Αντίθετα οι σειρές A1 και A2 φέρουν υπό την μεταγραφική ρύθμιση του ίδιου υποκινητή το γονίδιο της α-υπομονάδας της GDH (*NpGDH-NAD;A1*) από ένα άλλο είδος καπνού, το *Nicotiana plumbaginifolia*. Προκειμένου να αποφεύγεται η σύγχυση, τα φυτά που υπερεκφράζουν το γονίδιο που κωδικοποιεί την α-υπομονάδα της GDH, θα συμβολίζονται εφεξής ως *S-GDH;A* (ήτοι, Sense-*GDH;A*) και όπου είναι απαραίτητο θα ορίζεται για ποιά σειρά πρόκειται.

Για την κατασκευή φυτών που υποεκφράζουν την α-υπομονάδα, φυτά *Nicotiana tabacum* var *Xanthi* μετασχηματίστηκαν με την βοήθεια αγροβακτηρίων που έφεραν κατάλληλη πλασμιδιακή κατασκευή με δομή φουρκέτας (pan-handle) (Σκοπελίτης, 2006). Σε αυτή τη μελέτη, από τις προκύψασες σειρές υποέκφρασης επελέγησαν οι σειρές A5 και A7. Εφεξής θα συμβολίζονται ως A-GDH;A (ήτοι Antisense-GDH;A) και όπου κρίνεται απαραίτητο θα διευκρινίζεται περί ποιας σειράς πρόκειται.

Για την υπερέκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την β-υπομονάδα της GDH, φυτά *Nicotiana tabacum* var *Xanthi* μετασχηματίστηκαν με αγροβακτήρια που έφεραν σε κατάλληλη πλασμιδιακή κατασκευή γονίδιο *NpGDH-NAD;B1* του *Nicotiana plumbaginifolia* υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του CaMV 35S υποκινητή (Labboun et al. 2009). Χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο σειρές, B1 και B2, που κατασκευάστηκαν από τους Labboun et al. (2009). Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκαν και δύο ακόμα σειρές υπερέκφρασης της β-υπομονάδας, οι S4H και S49H, όπου αφορούν σε μετασχηματισμό φυτών *Nicotiana tabacum* L.var. *Ti68* με διαγονίδιο από τομάτα (*Solanum lycopersicum*) (Purnell et al, 2005). Οι σειρές υπερέκφρασης των γονιδίων της β-υπομονάδας θα συμβολίζονται εφεξής ως S-GDH;B και θα διευκρινίζεται περί ποιας σειράς πρόκειται, όπου κρίνεται απαραίτητο.

Για την υποέκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την β-υπομονάδα της GDH χρησιμοποιήθηκε μόνον μία σειρά, η A63H (Purnell et al. 2005). Στα πλαίσια της διατριβής αυτής η σειρά θα ονομάζεται A-GDH;B. Λόγω του γεγονότος ότι για την δημιουργία της διαγονιδιακής αυτής σειράς καθώς και των S4H και S49H, χρησιμοποιήθηκε μια άλλη ποικιλία καπνού (*Nicotiana tabacum* L.var. *Ti68*), ως WT φυτό για τις απαραίτητες συγκρίσεις ελήφθη η σειρά A63NS, η οποία θα συμβολίζεται εδώ NS-A-GDH;B, και η οποία αποτελεί τον ισογενικό μάρτυρα των A63H, S4H και S49H (Purnell et al. 2005).

Τέλος, για την δημιουργία φυτών που υπερεκφράζουν ταυτόχρονα τα δύο γονίδια, που κωδικοποιούν για τις δυο διαφορετικές υπομονάδες της GDH, έγιναν διασταυρώσεις μεταξύ των σειρών A2 και B1 (Labboun et al. 2009) στις οποίες έκαστη εκ των δύο γονεϊκών σειρών χρησιμοποιήθηκε είτε ως δότης γύρης είτε ως δότης θηλυκού γαμέτη. Προέκυψαν έτσι δύο επιπλέον σειρές διπλής υπερέκφρασης, οι A2b1 και B1a2 (όπου με κεφαλαίο

συμβολίζεται ο δότης του ωαρίου και με μικρό ο δότης γύρεως). Οι διπλά διαγονιδιακές σειρές θα συμβολίζονται εφεξής ως S-GDH;AB και θα ονοματίζεται η συγκεκριμένη σειρά όπου δη.

Προετοιμασία φυτικού υλικού για τις μεταχειρίσεις

Για όλες τις μεταχειρίσεις η διαδικασία ανάπτυξης των φυτών έλαβε χώρα ως ακολούθως: Σπέρματα από κάθε σειρά υφίσταντο επιφανειακή αποστείρωση με εμβάπτιση σε αραιωμένο διάλυμα χλωρίνης εμπορίου (10% (v/v) NaClO) για 10 min. Έπειτα ξεπλένονταν με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό και τοποθετούντο σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο 1/2XMS (Murashige and Skoog, 1962) χωρίς πηγή άνθρακα και με νιτρικά ιόντα ως μόνη πηγή αζώτου. Αυτά αφήνονταν να βλαστήσουν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών, με φωτοπερίοδο 16/8 h, στους 25°C και σχετική υγρασία 75%. Τα αρτίβλαστα αναπτύσσονταν συνολικά επί 15-20 ημέρες προτού υποβληθούν σε οιονδήποτε χειρισμό. Μόλις τα φυτά έφταναν στην ηλικία των 25 ημερών περίπου, μεταφυτεύοντο σε γλάστρες με μίγμα κομπόστας-τύρφης-περλίτη 3:1:1, και αφήνονταν για ακόμα 10-15 ημέρες, ποτιζόμενα μια φορά ημερησίως. Όταν έφταναν στο αναπτυξιακό στάδιο κατά το οποίο το πρώτο φύλλο είχε αποκτήσει μήκος τουλάχιστον 5 cm, τα φυτά μεταφέροντο σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα 1/10X MS, του οποίου η συγκέντρωση αυξανόταν ανά διήμερο σε 1/5X και 1/2X, που αποτέλεσε και την τελική συγκέντρωση. Κάθε μέρα το θρεπτικό υπόστρωμα ανανεωνόταν για να μην ευνοείται η ανάπτυξη μικροοργανισμών. Μετά από 2 περίπου ημέρες παραμονής σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα 1/2X MS, τα φυτά που προορίζονταν για την μεταχείριση με αλάτι μεταφέρονταν σε υγρό 1/2X MS + 100mM NaCl για 24h και έπειτα σε 1/2X MS+250 mM NaCl. Μετά 48h υπό την επίδραση του τελευταίου μίγματος κι ευρισκόμενα στην μέση περίπου της φωτοπεριόδου, τα φυτά συλλέγονταν, τα φύλλα διαχωρίζονταν και όλος ιστός (φύλλα+λοιπά όργανα του φυτού) μεταφερόταν άμεσα σε υγρό άζωτο και αποθηκεύονταν στους -80 °C. Η ακολουθούμενη διαδικασία για τα φυτά που θα ελάμβαναν σημασμένες με ¹⁵N πηγές αζώτου και θα προορίζοντο για την ανάλυση του μεταβολικού τους προφίλ με GC/MS θα παρουσιαστεί λεπτομερέστερα παρακάτω.

Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών

Για την απομόνωση των ολικών πρωτεϊνών φυτικός ιστός (φύλλα εν προκειμένω) γνωστού βάρους κονιορτοποιήθηκε με υγρό άζωτο και αναμίχθηκε με το διάλυμα εκχύλισης σε αναλογία ιστού:διαλύματος εκχύλισης 1:3. Η σύσταση του διαλύματος εκχύλισης ήταν 200mM Tris-HCl, pH 8.0, 5mM DTT ή εναλλακτικά 14mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 10μM leupeptin, 0.5mM PMSF, 1mM EDTA, 3mM MgCl₂, 0.5% (v/v) 10% (v/v) γλυκερόλη, Triton X-100 και 0.2gr PVPP ανά gr ιστού. Έπειτα από 20min επώασης στον πάγο, με ανάδευση σε vortex ανα 5min, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 12000 rpm για 20min. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης συλλέγονταν το υπερκείμενο που αποτελεί το πρωτεϊνικό εκχύλισμα (crude extract).

Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών πρωτεϊνών στο εκχύλισμα γινόταν με την μέθοδο Lowry (Lowry et al.1951). Η διαδικασία είχε ως ακολούθως: 20μl εκχυλίσματος αναμιγνύονταν με ίσο όγκο διαλύματος τριχλωροοξικού οξέος (TCA) 20% (v/v). Το μίγμα επωαζόταν στους 4 °C για χρονικό διάστημα τουλάχιστον 30 min. Εν συνεχεία φυγοκεντρείτο επί 20 min στις 14000 rpm και μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης λαμβανόταν το ίζημα (που αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες που κατακρημνίσθηκαν από το TCA). Το ίζημα διαλυόταν σε 100μl αλκαλικού διαλύματος ανθρακικών αλάτων νατρίου και τρυγικών αλάτων νατρίου και καλίου (διάλυμα A), με την εξής ακριβή σύσταση: 2g NaOH, 10g Na₂CO₃ και 0,1g τρυγικό Na-K διαλυμένα σε 500ml dH₂O. Μετά την πλήρη επαναδιάλυση του ιζήματος στο προκύψαν διάλυμα προστίθονταν 1ml διαλύματος που παρασκευαζόταν φρέσκο κάθε φορά με ανάμιξη 10ml διαλύματος A και 0,2ml διαλύματος θειικού χαλκού (0,5g CuSO₄*H₂O, διάλυμα B). Ακολουθούσε επώαση για 10min και έπειτα προστίθονταν 100μl Folin-Ciocalteu αντιδραστήριο. Το μίγμα επωαζόταν για 30min σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα προσδιοριζόταν η απορρόφηση στα 625nm. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών προσδιοριζόταν

από πρότυπη καμπύλη προκύψασα από την ίδια διαδικασία για διάφορες γνωστές συγκεντρώσεις της BSA (Bovine serum albumin).

Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας

Προσδιορίστηκε η *in vitro* ενζυμική ενεργότητα της αμινωτικής αντίδρασης (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1990b) της GDH. Το διάλυμα προσδιορισμού της ενζυμικής ενεργότητας περιείχε 100mM Tris-HCl, pH 8.0, 20mM α -ketoglutarate, 200mM NH₄Cl και 1mM CaCl₂. Σε 925μl από το κάθε διάλυμα προστέθηκαν NADH σε τελική συγκέντρωση 0.2mM, καθώς και 25μl από το πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Η *in vitro* ενεργότητα προσδιορίστηκε από την μεταβολή της απορρόφησης στα 340 nm. Ενεργότητα GDH ίση με 1 unit ορίζεται ως η ποσότητα GDH που χρειάζεται για την αναγωγή 1 mmol NADH σε 1min στους 30 °C. Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της NADH-GOGAT (Matoh and Takahashi, 1982), πενήντα μικρόλιτρα εκχυλίσματος αναμίχθηκαν με 100mM K-phosphate pH 7.5, 10mM α -ketoglutarate, 10mM L-glutamine και 0.22mM NADH. Η ενεργότητα της NADH-GOGAT προσδιορίστηκε από την μεταβολή της απορρόφησης στα 340 nm. Ενεργότητα NADH-GOGAT ίση με 1 unit ορίζεται η ποσότητα GOGAT που χρειάζεται για το σχηματισμό 1 mmol γλουταμικού σε 1min στους 30 °C. Τέλος, για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της GS (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1996), είκοσι μικρογραμμάρια ολικής πρωτεΐνης αναμίχθηκαν με 100mM Tris-HCl, pH 7.2, 30mM L-glutamine, 3mM MnCl₂ και 60mM NH₂OH-NaOH. Η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη 20mM sodium arsenate και 0.4mM ADP και έλαβε χώρα στους 30 °C για 30min. Η αντίδραση τερματίστηκε με διάλυμα 24% TCA, 10% FeCl₂ σε 0.2N HCl και 6N HCl. Το προϊόν της αντίδρασης προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά στα 535 nm. Ενεργότητα GS ίση με 1 unit ορίζεται η ποσότητα GS που χρειάζεται για το σχηματισμό 1 mmol α -glutamyl hydroxamate σε 1min στους 30 °C. Η ενεργότητα της αμινοτρανσφεράσης του ασπαρτικού προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά στα 340 nm στους 25 °C. Το διάλυμα αντίδρασης περιείχε 50 mM K—phosphate buffer (pH 7.5), 0.04% (v/v) TritonX-100, 5 mM

2-oxoglutarate, 0.25 mM NADH, 5 µg antimycin-A, περί τα 250 mg mitochondrial protein, και 5 units/ml NADH-μηλική αφυδρογονάση, σε τελικό όγκο 2,6 ml. Η αντίδραση ξεκινούσε με προσθήκη ασπαρτικού. (Dry and Wiskich, 1986).

Ανάλυση ισοενζυμικού προτύπου

Για την ανάλυση του ισοενζυμικού προτύπου της GDH (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1991), 100µg ολικής πρωτεΐνης διαχωρίστηκαν σε 7% πήκτωμα ακρυλαμίδης απουσία αποδιατακτικών παραγόντων. Η διαδικασία ηλεκτροφόρησης ήταν η ίδια με αυτήν που περιγράφηκε, με την διαφορά ότι το πήκτωμα και το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης δεν περιείχαν SDS. Επιπλέον, δεν προστέθηκε στα δείγματα διάλυμα αποδιάταξης. Έτσι εξασφαλίστηκε ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών στην λειτουργική του κατάσταση. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν για περίπου 3 h στα 80 volt στους 4 °C. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, τα δείγματα επώαστηκαν στο διάλυμα σύστασης 100mM Tris-Cl pH 9.1, 20 µM CaCl₂, 800 mg L-γλουταμικό οξύ (Sigma cat#G-1626), 30 mg NAD⁺(Sigma cat#N-7004), 20 mg NBT (Sigma cat#N-6876) και 4 mg PMS (Sigma cat#P-9625) μέχρι να εμφανιστούν τα ισοένζυμα της GDH.

Ανάλυση κατά Western

Η διαδικασία της ανάλυσης κατά Western (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1991) των πεπτιδίων της GDH πραγματοποιήθηκε με ανάμιξη του δείγματος σε αναλογία 1:2 με αποδιατακτικό διάλυμα σύστασης 80mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% β-mercaptoethanol, 2% SDS, 10% Glycerin, Bromphenol Blue και βράστηκε για 5min. Τα δείγματα διαχωρίστηκαν σε μη συνεχές πήκτωμα ακρυλαμίδης. Το πήκτωμα ανάλυσης ήταν 8% ενώ το πήκτωμα συμπύκνωσης 4%. Το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης ήταν 0.025M Tris, 0.2M Glycine και 0.1% SDS. Τα δείγματα αναλύθηκαν στα 25mA ένταση πεδίου. Μετά το τέλος της ανάλυσης, ακολούθησε η μεταφορά των

πρωτεϊνικών δειγμάτων σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0.45 μ m (Porablot NCP Macherey-nagel cat# 741280) σε ρυθμιστικό διάλυμα 192mM glycine, 0.1% SDS, 50mM Tris- HCl και 20% MeOH για 1h στα 80volt. Η μεμβράνη επώαστηκε σε PBS (136mM NaCl, 26mM KCl, 17mM KH₂PO₄, 100mM Na₂HPO₄) 2% BSA για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη πλύθηκε 3 φορές από 5min σε PBS, 0.05% Tween 20. Ακολούθησε η ανίχνευση του αντιγόνου με αντίσωμα GDH (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1990a) σε αραιώση 1:5000 σε διάλυμα PBS, 0.05% Tween 20, 1% BSA για 2h σε θερμοκρασία δωματίου. Εν συνεχεία, πλύθηκε 3 φορές για 5min με PBS, 0.05% Tween 20. Τέλος, έγινε επώαση με αντι-αντίσωμα αλκαλικής φωσφατάσης (Sigma Anti-Rabbit IgG cat# A-3687) σε PBS, 0.05% Tween 20, 1% BSA για 2h σε θερμοκρασία δωματίου και πλύσιμο με PBS, 0.05% Tween 20 για 10min. Η ανίχνευση των ζωνών έγινε με επώαση της μεμβράνης σε διαιθανολαμίνη (DEA) για 10min και έπειτα εμφάνιση σε 30ml διάλυμα 1X DEA με 3mg NBT (Nitro Blue Tetrazolium, Sigma cat# N-6876) και 300 μ g BciP (Roche cat# 1-383-221) για 1h στους 25 °C.

Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση ολικού mRNA πραγματοποιήθηκε ως εξής: ανά gr ιστού προστέθηκε μίγμα 2,5 ml όξινης φαινόλης pH 4,0 και 2,5 ml διαλύματος εκχύλισης RNA, σύστασης 100 mM LiCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0, και 1% (w/v) SDS, το οποίο προηγουμένως είχε βραστεί ώστε να δημιουργηθεί ένα ομοιογενές μίγμα των δύο φάσεων, οργανικής και ανόργανης. Στη συνέχεια προστέθηκε μισός όγκος CHCl₃ (2,5 ml), και τα δείγματα ανακινήθηκαν για 30 sec. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 min στα 10000 g στους 4 °C. Στο υπερκείμενο προστέθηκε ίσος όγκος CHCl₃, ενώ οι δύο φάσεις οι οποίες προέκυψαν ανακινήθηκαν για 30 sec και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 min στα 10000 g στους 4°C. Στη συνέχεια, η υπερκείμενη φάση μεταφέρθηκε σε καινούργιο erpendorf και προστέθηκε LiCl ώστε η τελική συγκέντρωσή του να είναι 3,6 M. Τα δείγματα αφέθηκαν για τουλάχιστον 3 h στους -20 °C και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 30 min στα 13000 g στους 4°C. Μετά την απόρριψη του υπερκειμένου, το

ιζηματοποιημένο ολικό mRNA πλύθηκε 2 φορές με 70% (v/v) αιθανόλη ώστε να απομακρυνθούν τα άλατα και επαναδιαλύθηκε σε αποστειρωμένο ddH₂O. Το επαναδιαλυμένο ολικό mRNA αποθηκεύτηκε μέχρι τη χρήση του στους -80 °C, ενώ μέρος του διαχωρίστηκε και σε αυτό προστέθηκε 100% (v/v) αιθανόλη το οποίο επίσης αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία -80°C. Η αιθανόλη αναστέλλει τη δράση των RNασών οι οποίες μπορεί να καταστρέψουν την ακεραιότητα του RNA. Μέρος του απομονωμένου ολικού mRNA ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2 % (w/v) το οποίο περιείχε EtBr με τελική συγκέντρωση 0,5 μg ml⁻¹. Σημειώνεται ότι όλα τα πλαστικά και γυάλινα υλικά είχαν αποστειρωθεί πριν τη χρήση, όπως επίσης και όλα χημικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν, εκτός της φαινόλης και του χλωροφορμίου.

Ανάλυση κατά Northern

Διαχωρισμός σε αποδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης και μεταφορά σε nylon μεμβράνη.

Η ανάλυση κατά Northern του ολικού mRNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Sambrook et al. (1989). Συγκεκριμένα, τουλάχιστον 20 μg RNA διαχωρίστηκαν σε αποδιατακτικό (denaturing) πήκτωμα αγαρόζης 1,5% (w/v), το οποίο περιείχε φορμαλδεΰδη. Για την παρασκευή του πήκτωματος διαλύθηκαν με τη βοήθεια βρασμού σε 74 ml dH₂O 1,5 gr αγαρόζης [για πήκτωμα 1.5% (w/v)]. Όταν το διάλυμα κρύωσε αρκετά, προστέθηκαν 10 ml διαλύματος 10X MOPS και η προσθήκη 16 ml 37% (v/v) formaldehyde. Η πηκτή προ-ηλεκτροφορήθηκε για 5 min στα 5 V/cm σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης με σύσταση όπως της πηκτής (dH₂O/ formaldehyde/ 10X MOPS). Τα δείγματα ετοιμάστηκαν με την προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος φόρτωσης (loading buffer), σύστασης 10X MOPS, formaldehyde και formamide ώστε πάντα ο συνολικός όγκος να είναι <50 μL και τοποθετήθηκαν για 15 min στους 65°C και αμέσως μετά σε πάγο. Ακολούθησε η προσθήκη διαλύματος χρωστικής, η οποία περιείχε μπλε της βρωμοφαινόλης 0,1% και γλυκερόλη 30% (v/v). Αφού τοποθετήθηκαν τα

δείγματα στα βοθρία του πηκτώματος, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση για περίπου 3,5 h στα 4 V/cm. Στη συνέχεια, το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε ddH₂O υπό συνεχή ανακίνηση για περίπου 2 h, με αλλαγή του ddH₂O κάθε 15 min ώστε να απομακρυνθεί η φορμαλδεΐδη. Ακολούθως, το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε διάλυμα χρώσης 0,5 μg mL⁻¹ EtBr για 20 min και στη συνέχεια σε ddH₂O για 5 min και φωτογραφήθηκε με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και το λογισμικό Kodak Digital Science v1.9 με την παράλληλη προσθήκη κανόνα ώστε το μηδέν της κλίμακας να αντιστοιχεί στα βοθρία. Το πήκτωμα ξεπλύθηκε με ddH₂O και τοποθετήθηκε ανάποδα για μεταφορά πάνω σε Whatman του οποίου τα άκρα διαβρεχόταν συνεχώς με διάλυμα 10X SSC (sodium citrate and sodium chloride). Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε πάνω στο πηκτωμα όπως ήταν τοποθετημένο, εξισορροπημένη μεμβράνη σε 2X SSC τύπου NY plus porablot (Lab supplies) ίδιου μεγέθους με το πήκτωμα. Πάνω από τη μεμβράνη τοποθετήθηκαν 2 φύλλα Whatman εξισορροπημένα σε 2X SSC και 2 φύλλα Whatman στεγνά. Πάνω από τα φύλλα Whatman, τοποθετήθηκαν χαρτοπετσέτες σε ύψος περίπου 5 cm, ίδιου μεγέθους με τα Whatman και τέλος ένα βιβλίο για να λειτουργήσει βαρίδι η μεταφορά αφέθηκε για 16-24 h. Η στερέωση του RNA (RNA cross-linking), πραγματοποιήθηκε σε στεγνή μεμβράνη, με έκθεση σε UV ακτινοβολία (Stratalinker, Stratagene, USA) η επιφάνεια της οποίας βρισκόταν σε επαφή με το πήκτωμα, συνολικής ενέργειας 1200 μJ cm². Η μεμβράνη διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη χρησιμοποίησή της

Κατασκευή ραδιενεργού ιχνηλάτη (ή ιχνηθέτη, probe)

Για την κατασκευή ραδιενεργού ιχνηλάτη (ή ιχνηθέτη, probe) χρησιμοποιήθηκαν τα ραδιενεργά νουκλεοτίδια A-α[³²P], C-α[³²P] και η μέθοδος του τυχαίου εκκινήτη (random priming). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην εκκίνηση πολυμερισμού από αλληλουχίες μίγματος εξαμερών νουκλεοτιδίων, οι οποίες παρουσιάζουν στατιστική ομολογία με την προς σήμανση αλληλουχία, η οποία χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα της αντίδρασης. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε διάλυμα το οποίο περιείχε 4 μL γουανίνη, 4 μL θυμίνη, 2.5 μL ραδιενεργή αδενίνη και 2.5 ραδιενεργή κυτοσίνη, 5 μL διαλύματος Klenow (Minotech), BSA 10x και random primers

(150 µg µL⁻¹). Κατά τη διάρκεια παρασκευής του προηγούμενου διαλύματος, cDNA του γονιδίου *NpGDH-NAD;B1* (accession number Y08293) (Ficarelli *et al.*, 1999, Purnell *et al.*, 2005) ή cDNA του γονιδίου *NpGDH-NAD;A1*, σε ποσότητες ≤ 200 ng, αραιώθηκαν μέχρι τελικού όγκου 21 µL και το διάλυμα βράστηκε για 5 min. Μετά, το δείγμα τοποθετήθηκε σε πάγο και στη συνέχεια προστέθηκε στο διάλυμα, το οποίο περιείχε τα ραδιενεργά νουκλεοτίδια. Ακολούθως, προστέθηκαν στην αντίδραση 1-2 µL Klenow πολυμεράσης 5u µL⁻¹ (Minotech) και η αντίδραση επωάστηκε στους 37°C για 1,5-2 h. Η Klenow προστέθηκε τελευταία διότι έχει δράση εξωνουκλεάσης και μπορεί να δράσει καταστρέφοντας το cDNA εάν προστεθεί από την αρχή. Στη συνέχεια, ο probe καθαρίστηκε με χρωματογραφία κολώνας (sprun column chromatography), όπως περιγράφεται από τους Sambrook *et al.* (1989). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε σύριγγα του 1 ml στην οποία τοποθετήθηκε ποσότητα Sephadex G-25, και ακολούθησε 5 min φυγοκέντρηση στα 3000 g. Στη συνέχεια προστέθηκε εκ νέου Sephadex G-25 και η διαδικασία επαναλήφθηκε έως ότου ο όγκος του Sephadex γίνει περίπου 0,9-1 ml. Ακολούθησε εξισορρόπηση της κολώνας με 50 µL TE pH 8,0, ώστε να ενυδατωθεί η κολώνα και φυγοκέντρηση της κολώνας για 5 min στα 3000 g. Η διαδικασία επαναλήφθηκε έως ότου η εκλούμενη ποσότητα TE προσεγγίσει τα 50 µL. Ακολούθως, εφαρμόστηκε στο πάνω μέρος της κολώνας η αντίδραση του ιχνηλάτη και φυγοκεντρήθηκε για 5 min στα 3000 g. Ο εκλούμενος όγκος τοποθετήθηκε σε erpendorf και βράστηκε για 5 min και κατόπιν τοποθετήθηκε σε πάγο και εν συνεχεία στους -20°C.

Προϋβριδοποίηση, Υβριδοποίηση, Ξεπλύματα και Έκθεση

Οι μεμβράνες, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για υβριδοποίηση, εξισορροπήθηκαν σε 2x SSC και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε διάλυμα προϋβριδοποίησης κατά Church μέσα σε περιστρεφόμενο κύλινδρο. Το διάλυμα περιείχε 100 mM Na-φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,2, 7% (w/v) SDS, 1 gr 100 ml⁻¹ BSA και 50 mM EDTA, pH 8,0. Η προϋβριδοποίηση πραγματοποιήθηκε στους 60°C για 2 h. Στη συνέχεια προστέθηκε ο ραδιενεργός ιχνηλάτης και η υβριδοποίηση πραγματοποιήθηκε στους 60 °C για 16 h. Μετά την παρέλευση των 16 h, πραγματοποιήθηκαν τα ακόλουθα

ξεπλύματα: 2X SSC για 10 min, 2X SSC 0.1% SDS για 10 min, SSC 0.2% SDS για 2 x 5 min, στους 60 °C. Στη συνέχεια, η μεμβράνη αφέθηκε για έκθεση σε Kodak X-Ray film, για 3-5 ημέρες για τα φυτά υπερέκφρασης και 25-30 ημέρες για τα αντίστοιχα υποέκφρασης.

Χρήση σημασμένων με ^{15}N υποστρωμάτων για μελέτη της *in vivo* ενεργότητας της Γλουταμικής Αφυδρογονάσης και της ενσωμάτωσης του σημασμένου αζώτου σε διάφορα αζωτούχα βιομόρια

Στην ενότητα «προετοιμασία του φυτικού υλικού για τις μεταχειρίσεις» περιγράφηκε η ακολουθούμενη διαδικασία έως ότου τα φυτά μεταφερθούν σε υγρό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (1/2X MS). Συνεχίζοντας από αυτό το σημείο, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Τα φυτά μεταφέρθηκαν σε υγρό 1/2X MS + 100mM NaCl στο οποίο και παρέμειναν 24h. Έπειτα, το υγρό καλλιέργειας αντικαταστάθηκε από 1/2X MS + 250mM NaCl στο οποίο παρέμειναν άλλες 24h. Εν συνεχεία τα φυτά μεταφέρθηκαν σε διάλυμα φωσφονοθρισίνης (PPT), (1:1000 αραιώση του εμπορικώς διαθέσιμου διαλύματος PPT, υπό την επωνυμία basta). Στο ανωτέρω διάλυμα παραμειναν για 15min, κατά την διάρκεια των οποίων ψεκάζονταν τα υπέργεια μέρη του φυτού με το ίδιο διάλυμα. Κατόπιν τα φυτά επέστρεψαν σε 1/2X MS + 250mM στο οποίο βρίσκονταν προτού υποστούν την μεταχείριση με φωσφονοθρισίνη. Παρέμειναν στις συνθήκες αυτές επί 3h περίπου και έπειτα μεταφέρθηκαν σε 1/2x MS + 250mM NaCl, στο οποίο είχε προστεθεί είτε 10mM $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ είτε 10mM ^{15}Glu ως μοναδική πηγή αζώτου. Στο ίδιο υγρό μέσο καλλιέργειας προστέθηκε είτε 1μM αμινοξικό οξύ (aminoxyacetic acid, AOA) (Skopelitis et al. 2006) είτε 1mM AOA (Purnell et al. 2007; Labboun et al. 2009) σε περίπτωση που στοχεύεται η παρεμπόδιση της δράσης ενζύμων που φέρουν την φωσφορική πυριδοξάλη ως συμπ παράγοντα (,GDC E.C 4.1.2.15., Transaminases). Μετά την παρέλευση 48h (για την περίπτωση των $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ -fed φυτών) ή 4h (προκειμένου για τα ^{15}Glu -fed φυτά) κι ενώ τα φυτά βρίσκονταν στη μέση περίπου της φωτοπεριόδου, συλλέγηκαν, διαχωρίστηκαν τα φύλλα (στα οποία θα ακολουθήσει η εκχύλιση των αμινοξέων) και αποθηκεύθηκαν στους -80 °C.

Απομόνωση και παραγοντοποίηση αμινοξέων για ανάλυση με GC/MS

Ο φυτικός ιστός λειοτριβήθηκε με την βοήθεια υγρού αζώτου και εκχυλίστηκαν τα αμινοξέα με 1 ml 0.01 N HCl (Sobolevsky et al. 2003). Εκατό μικρόλιτρα από το εκχύλισμα εξατμίστηκαν στους 90 °C υπό συνεχή ροή αζώτου και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100 μl ακετονιτρίλιο και 100 μl MTBSTFA (Pierce cat#48920). Το μίγμα επωάστηκε στους 70 °C για 30 min και ακολούθησε προσθήκη 4.3 μg εσωτερικού προτύπου 1-chlorohexadecane και φιλτράρισμα. Ένα μικρόλιτρο από το παραγοντοποιημένο εκχύλισμα αναλύθηκε στον φασματογράφο Hewlett-Packard 5971A με ανιχνευτή επιλεκτικής μάζας. Η ανάλυση GC-MS πραγματοποιήθηκε στον χρωματογράφο Hewlett-Packard 5971A ανιχνευτή επιλεκτικής μάζας με το κατάλληλο λογισμικό. Ένα σύστημα αέριας χρωματογραφίας Hewlett-Packard Model 5890 gas, εξοπλισμένο με ένα τύπου Grob ψεκαστή διαχωρισμού, συνδέθηκε απευθείας με τριχοειδή κολώνα τύπου (HP-5 MS με 0.25 mm film, 30 m x 0.25 mm I.D.) στην πηγή ιόντων. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο σε πίεση 0.8 atm. Η 135 θερμοκρασία του ψεκαστήρα ήταν 280 °C και το πρόγραμμα της θερμοκρασίας του φούρνου ξεκίνησε από τους 70 °C. Παρέμεινε εκεί για δυο min και έπειτα αυξήθηκε μέχρι τους 290°C με ρυθμό 5 °C /min. Στους 290 °C παρέμεινε για 10min. Τα ιόντα που χρησιμοποιήθηκαν για τους υπολογισμούς του εμπλουτισμού με ¹⁵N ήταν για την προλίνη (Pro) m/z 184, 185, για το ασπαρτικό (Asp) 418, 419, για το γλουταμικό (Glu) 432, 433, για την ασπαραγγίνη (Asn) 417, 419 και για την γλουταμίνη (Gln) 431, 433, για το γ- αμινοβουτυρικό (GABA) 275 και 276, για την πουτρεσίνη (Put) 260, 261 και 317, 318 και τέλος για την ορνιθίνη (418, 419)

Φαινοτυπική ανάλυση επιλεγμένων σειρών υπό την επήρεια καταπόνησης από αλατότητα

Προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανότητα, η αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης της GDH να προσδίδει σχετική ανθεκτικότητα εν συγκρίσει με τα

φυσικού τύπου φυτά υπό συνθήκες καταπόνησης από αυξημένη συγκέντρωση άλατος στο υπόστρωμα, διενεργήθηκε εκτεταμένη φαινοτυπική ανάλυση ορισμένων σειρών. Συγκεκριμένα, επιλέγησαν αντιπροσωπευτικές σειρές από κάθε ομάδα ΓΤ φυτών (υπερ- υπό- και διπλης υπέρ-έκφρασης) και περί τα 40 σπέρματα από έκαστη αφέθηκαν να βλαστήσουν σε θάλαμο ελεγχόμενης θερμοκρασίας και υγρασίας στο θερμοκήπιο. Οι επιλεγείσες σειρές ήταν οι ακόλουθες: Wt: *Nicotiana tabacum* var Xanthi, S-GDH;A : S7, A-GDH;A : A5, S-GDH;B : B2, A-GDH;B : A63H , NS-A-GDH;B : A63NS (ισογενικός μάρτυρας της A63H, βλ Purnell et al., 2005), S-GDH;AB : B1a2. Τρεις με τέσσερις εβδομάδες μετά την εκβλάστηση και αφού επιλέγησαν 18 φυτά συνολικά για έκαστη διαγονιδιακή σειρά, που βρίσκονταν σε παρόμοιο αναπτυξιακό στάδιο, ώστε να εξασφαλιστεί η κοινή αναπτυξιακή αφετηρία για όλα τα φυτά που θα υφίσταντο την καταπόνηση από το αλάτι, κάθε νεαρό φυτό μεταφέρθηκε σε ξεχωριστή ευρύχωρη γλάστρα ώστε να μην αποτελέσει περιοριστικό παράγοντα της ανάπτυξης του ριζικού συστήματος (και άρα μια επιπλέον καταπόνηση για το φυτό). Το υπόστρωμα σε κάθε γλάστρα ήταν μίγμα τύρφης-κομπόστας εμπορίου (Terraplant pH 5-6,5) 1:2. Τα 18 φυτά έκαστης σειράς χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες των 6 φυτών και κάθε ομάδα θα υφίστατο και διαφορετικό χειρισμό. Περίπου 10-12 εβδομάδες μετά την εκβλάστηση τα φυτά είχαν φθάσει σε ικανοποιητικό μέγεθος που θα εξυπηρετούσε την διευκόλυνση της διεξαγωγής των μετρήσεων, οπότε και ξεκίνησε το πότισμα με διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Η μια εκ των τριών ομάδων αποτελούσε τα φυτά μάρτυρες και ως εκ τούτου τα συγκεκριμένα άτομα δεν ποτίζονταν με αλάτι. Για τις υπόλοιπες δύο ομάδες, η εφαρμοζόμενη συγκέντρωση NaCl ήταν 100mM και 200mM, αντίστοιχα. Ανα τέσσερις (4) ημέρες, για χρονικό διάστημα δύο εβδομάδων, για όλα τα φυτά όλων των ομάδων, διενεργούντο μετρήσεις προσδιορισμού του μήκους του πρώτου πραγματικού φύλλου (first true leaf) (από την βάση του μίσχου ως την άκρη του ελάσματος), της απόστασης αυτού από το κορυφαίο μερίστωμα, καθώς και του μήκους των δύο μεσογονατιαίων διαστημάτων άνωθεν του πρώτου πραγματικού φύλλου. Μετά την παρέλευση των δύο εβδομάδων συνεχίστηκαν οι ίδιες μετρήσεις ανά δέκα (10) ημέρες. Η λήψη των δεδομένων αυτών συνεχίστηκε έως την άνθιση των φυτών. Προκειμένου να γίνει η ανάλυση του ρυθμού ανάπτυξης, επιπρόσθετα προς τις ανωτέρω μετρήσεις,

προσδιορίζονταν και το ύψος έκαστο φυτού, μετρούμενο από την βάση του υπέργειου τμήματος ως και την κορυφή αυτού. Όταν όλα τα φυτά έφθασαν στην ανθοφορία προσδιορίστηκε το νωπό τους βάρος, ζυγίζοντας μόνο το υπέργειο τμήμα τους, επειδή κατά την εκρίζωση μέρος το ριζικού συστήματος αποκόπτονταν από το φυτό και δεν ήταν εφικτό να ελεγχθεί το συνολικό βάρος του ριζικού συστήματος.

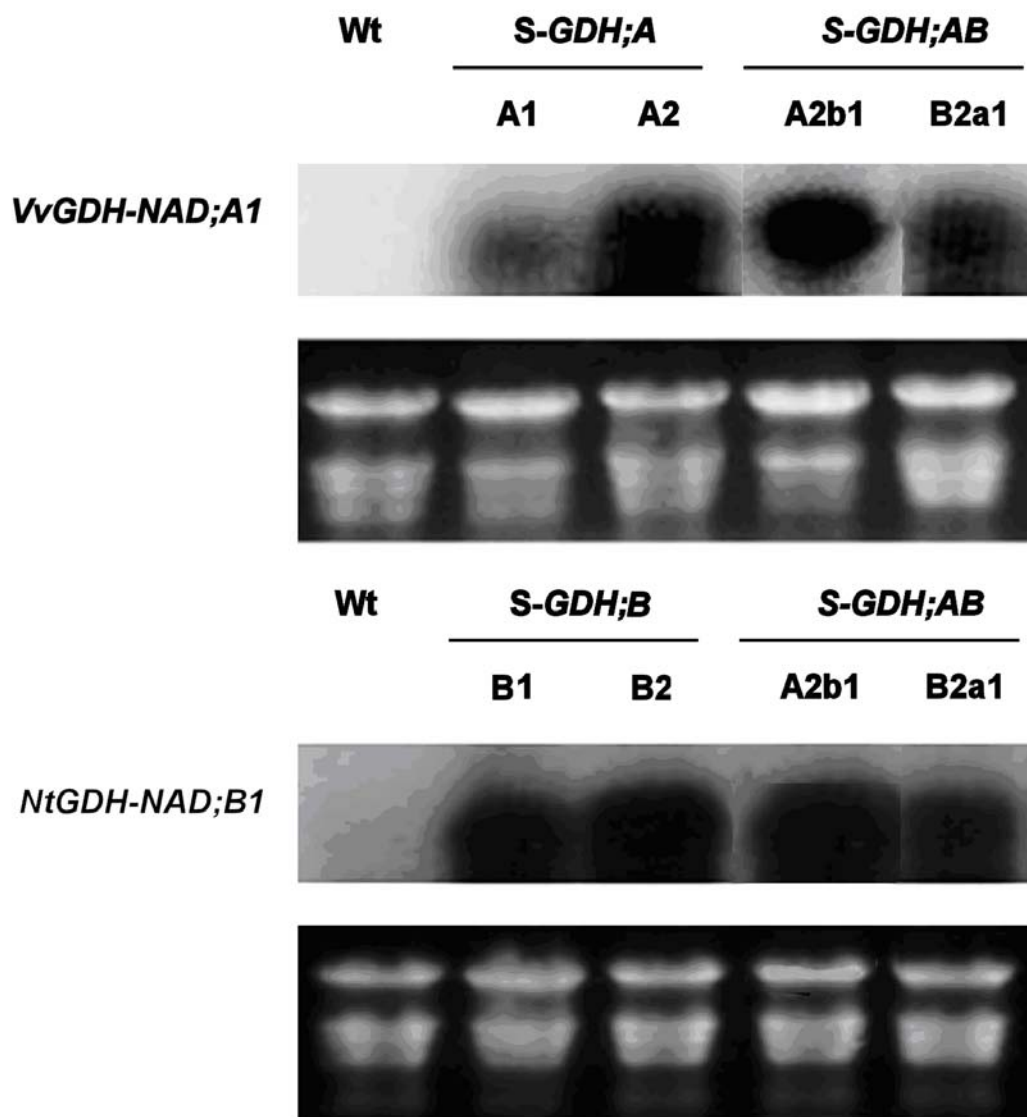
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ένα διακριτό τμήμα δουλειάς που εκπονήθηκε στα πλαίσια της υπό παρουσίαση διατριβής, αφορούσε στον χαρακτηρισμό ΓΤΦ, των οποίων σπέρματα παρασχέθηκαν από τους Labboun et al. (2009) στα πλαίσια ερευνητικής συνεργασίας. Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι», στο παρόν κείμενο θα ακολουθηθεί η παρακάτω ονοματολογία για τις ΓΤ σειρές που χρησιμοποιήθηκαν: οι υπερεκφράζουσες τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις α- και β- GDH υπομονάδες σειρές, θα συμβολίζονται ως *S-GDH;A* και *S-GDH;B*, αντίστοιχα. Τα υπερεκφράζοντα και τα δύο γονίδια ταυτόχρονα ΓΤ φυτά θα συμβολίζονται ως *S-GDH;AB*. Τέλος, τα υποεκφράζοντα είτε το γονίδιο της α- είτε της β-υπομονάδας θα συμβολίζονται ως *A-GDH;A* και *A-GDH;B*, αντιστοίχως. Τα φυσικού τύπου φυτά θα συμβολίζονται ως WT, εκτός αν ως φυτό μάρτυρας για κάποια σειρά χρησιμοποιήθηκε μια ισογενική προς αυτήν σειρά. Από τους Labboun et al. (2009) παραχωρήθηκαν σπέρματα των εξής σειρών (βλ . Labboun et al., 2009) :

- *S-GDH;A* σειρές A1 και A2
- *S-GDH;B* σειρές B1 και B2
- *S-GDH;AB* σειρές B1a2 και A2b1

Τα σπέρματα καλλιεργήθηκαν σύμφωνα με τα αναγραφόμενα στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι» και από τα προκύψαντα φυτά ελήφθη φυλλικός ιστός και προσδιορίστηκαν η αφθονία των μεταγράφων του γονιδίου *GDH* με Northern blotting, οι ενζυμικές ενεργότητες των ενζύμων *GDH*, *GOGAT* και *GS*. Επίσης έγινε ανάλυση του ισοενζυμικού προτύπου της *GDH* σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της ανοσοενεργής πρωτεΐνης (*GDH*) με Western blotting.

Όπως φαίνεται στην Εικ.1, είναι αδιαμφισβήτητη η μεγαλύτερη αφθονία των mRNAs των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις δύο υπομονάδες της *GDH*, στις σειρές που υπερεκφράζουν το ένα από τα δύο γονίδια, αλλά και στις διπλά ΓΤ σειρές. Η πυκνομετρική ανάλυση (densitometric analysis) αποκάλυψε ότι η αφθονία του mRNA του *GDH;A* είναι αυξημένη κατά 10 φορές για την σειρά A1 και

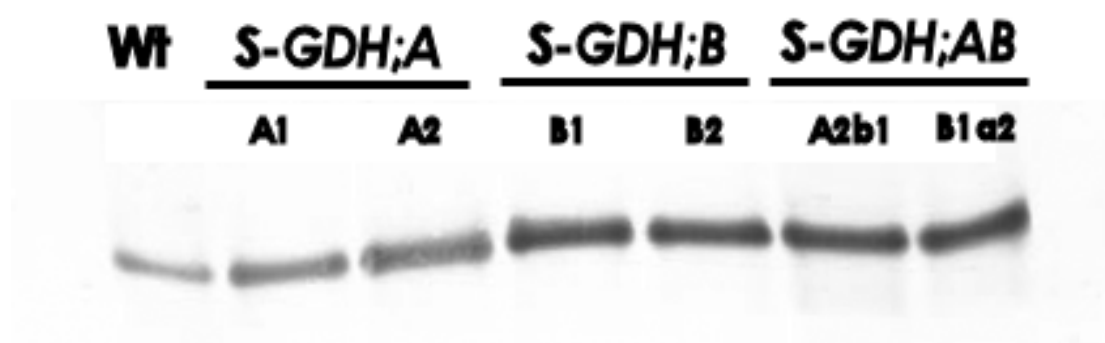


Εικ.1 Αφθονία των μεταγράφων του *GDH* σε φύλλα από τις ΓΤ σειρές, όπως προσδιορίστηκαν με Northern blotting. Για τις σειρές που υπερεκφράζουν το γονίδιο της α-υπομονάδας χρησιμοποιήθηκε probe κατασκευασμένος με την τεχνική του random priming από cDNA του γονιδίου *VvGDH-NAD;A1* ενώ για τις υπερεκφράζουσες την β-υπομονάδα χρησιμοποιήθηκε το cDNA του γονιδίου *NtGDH-NAD;B1*.

κατά 20-25 φορές για τις σειρές A2, A2b1 και B1a2. Αντιστοίχως, όταν η υβριδοποίηση έγινε με probe ειδικό για το mRNA του γονιδίου της β-

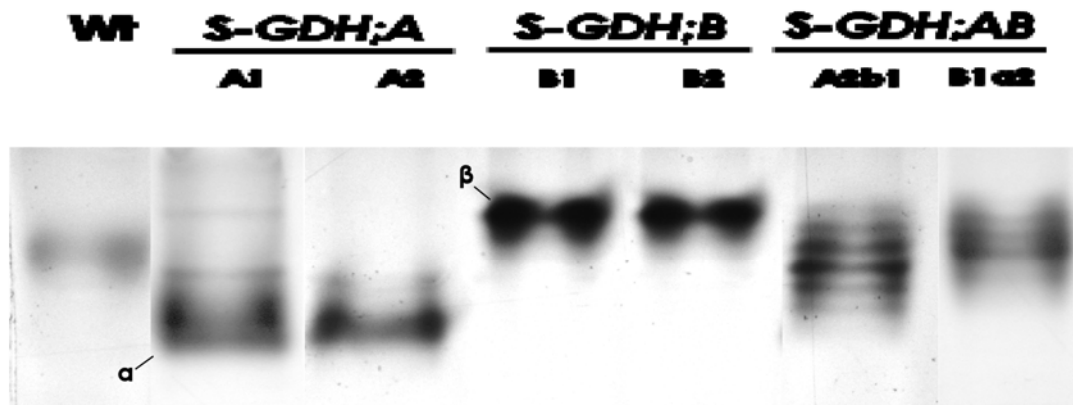
υπομονάδας, όλες οι σειρές έδειξαν αύξηση του σήματος κατά περίπου 30 φορές.

Τα επίπεδα της ανοσοενεργής πρωτεΐνης της GDH, φαίνονται στην Εικ.2. Παρατηρείται αύξηση του σήματος σε όλες τις διαγονιδιακές σειρές. Η πυκνομετρική ανάλυση έδειξε ότι τα επίπεδα της ανοσοενεργής πρωτεΐνης είναι αυξημένα κατά 3 περίπου φορές για την σειρά A1, κατά 4 φορές για την σειρά A2, και κατά 5-7 φορές για τις υπόλοιπες σειρές.



Εικ.2. Western blotting σε φυλλικό ιστό από τις ΓΤ σειρές.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης του ισοενζυμικού προτύπου παρουσιάζονται στην Εικ.3. Οι σειρές B1 και B2 ενώ έχουν εμφανώς αυξημένα τα καθοδικά ισοένζυμα συγκριτικά με το WT (10-15 φορές μεγαλύτερη ένταση σήματος, σύμφωνα με την πυκνομετρική ανάλυση). Αντιστοίχως, οι σειρές A1 και A2 παρουσιάζουν ιδιαίτερα αυξημένη την αφθονία των ανοδικών ισοενζύμων, με ένταση σήματος περί τις 7-8 φορές αυξημένη συγκριτικά με το WT. Τέλος, οι διπλά ΓΤ σειρές παρουσιάζουν πιο έντονο σήμα στα ενδιάμεσα ετεροεξαμερή της GDH, όπως αναμένεται από την ταυτόχρονη υπερέκφραση και των δύο υπομονάδων. Η ένταση του σήματος καταγράφεται στα ίδια περίπου επίπεδα με αυτή των σειρών A1 και A2.

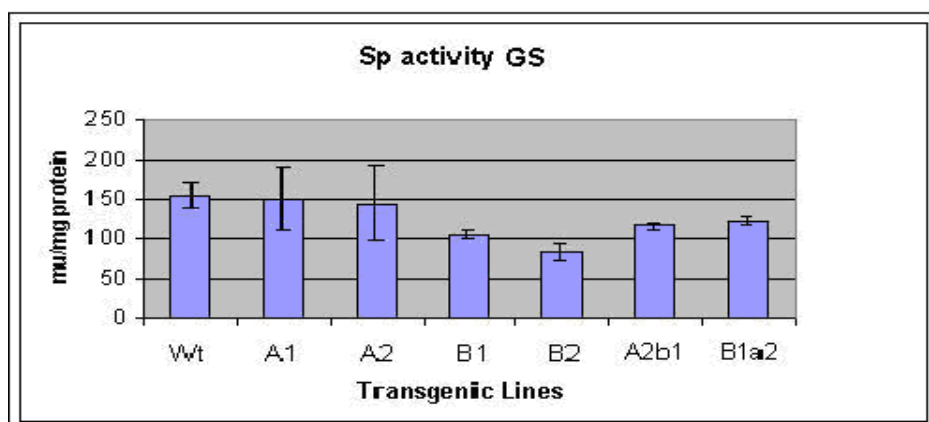
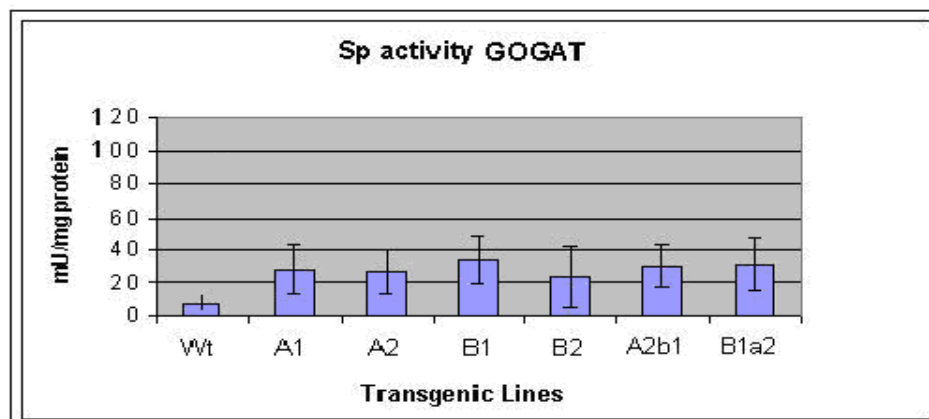
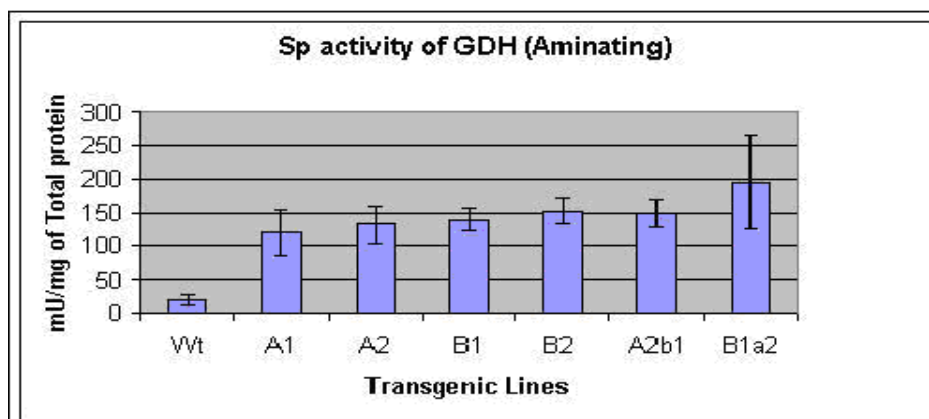


Εικ.3 Ανάλυση ισοενζυμικού προτύπου της GDH από φυλλικό ιστό των ΓΤ σειρών.

Ολοκληρώνοντας την ανάλυση των ΓΤ σειρών που παραχωρήθηκαν από τους Labboun et al. (2009), παρατίθενται παρακάτω (Εικ.4) οι *in vitro* ενζυμικές ενεργότητες των GDH, NADH-GOGAT και GS, όπως προσδιορίστηκαν σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα φύλλων. Σε όλες τις σειρές η αμινωτική ενεργότητα της GDH είναι αυξημένη κατά τουλάχιστον 5 φορές. Ως προς την ειδική ενεργότητα της GS, οι διάφορες σειρές δεν έδωσαν σημαντικές διαφοροποιήσεις. Τέλος, ως προς την ειδική ενεργότητα της NADH-GOGAT τα αποτελέσματα είναι, ως προς την διαφαινόμενη τάση, σε απόλυτη συμφωνία με τα δημοσιευμένα από τους Labboun et al. (2009), παρά το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκε άλλη μέθοδος προσδιορισμού της ενεργότητας, βασισμένη σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Φαίνεται ότι όλες οι ΓΤ σειρές έχουν μεταξύ τους παρόμοια ειδική ενεργότητα της NADH-GOGAT, ενώ συγκριτικά με το WT οι τιμές όλων είναι ελαφρά υψηλότερες.

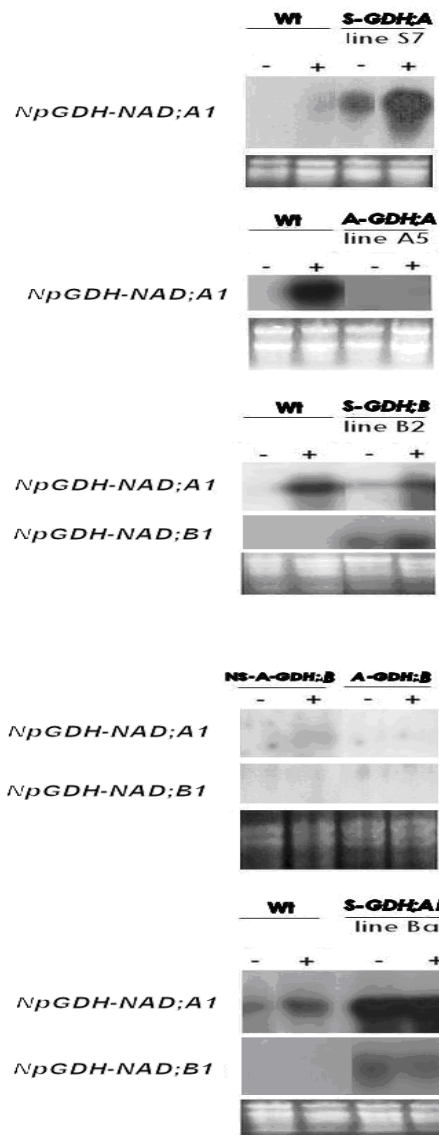
Μετά τη μοριακή και βιοχημική ανάλυση των ΓΤ φυτών, σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης (Εικ. 1-4), ακολούθησε η μελέτη της αντίδρασης των ΓΤΦ σε συνθήκες αλατότητας. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η αφθονία των μεταγράφων *GDH*, η σταθερότητα των mRNA και των παραγόμενων πρωτεϊνών (Usadel et al. 2008) και των προϊόντων τους καθώς και η *in vivo* ενεργότητα της GDH, με χρήση σημασμένων με $^{15}\text{N-NH}_4$ και $^{15}\text{N-Glu}$ και

ανάλυση με αέρια χρωματογραφία-φασματοφωτομετρία μάζας (Gas Chromatography-Mass spectrometry, GC/MS) της μεταβολικής τους τύχης, παρουσία αναστολέων της GS, βασικού πρωταγωνιστή στην αφομοίωση της αμμωνίας, αλλά και των τρανσαμινασών και αποκαρβοξυλασών.

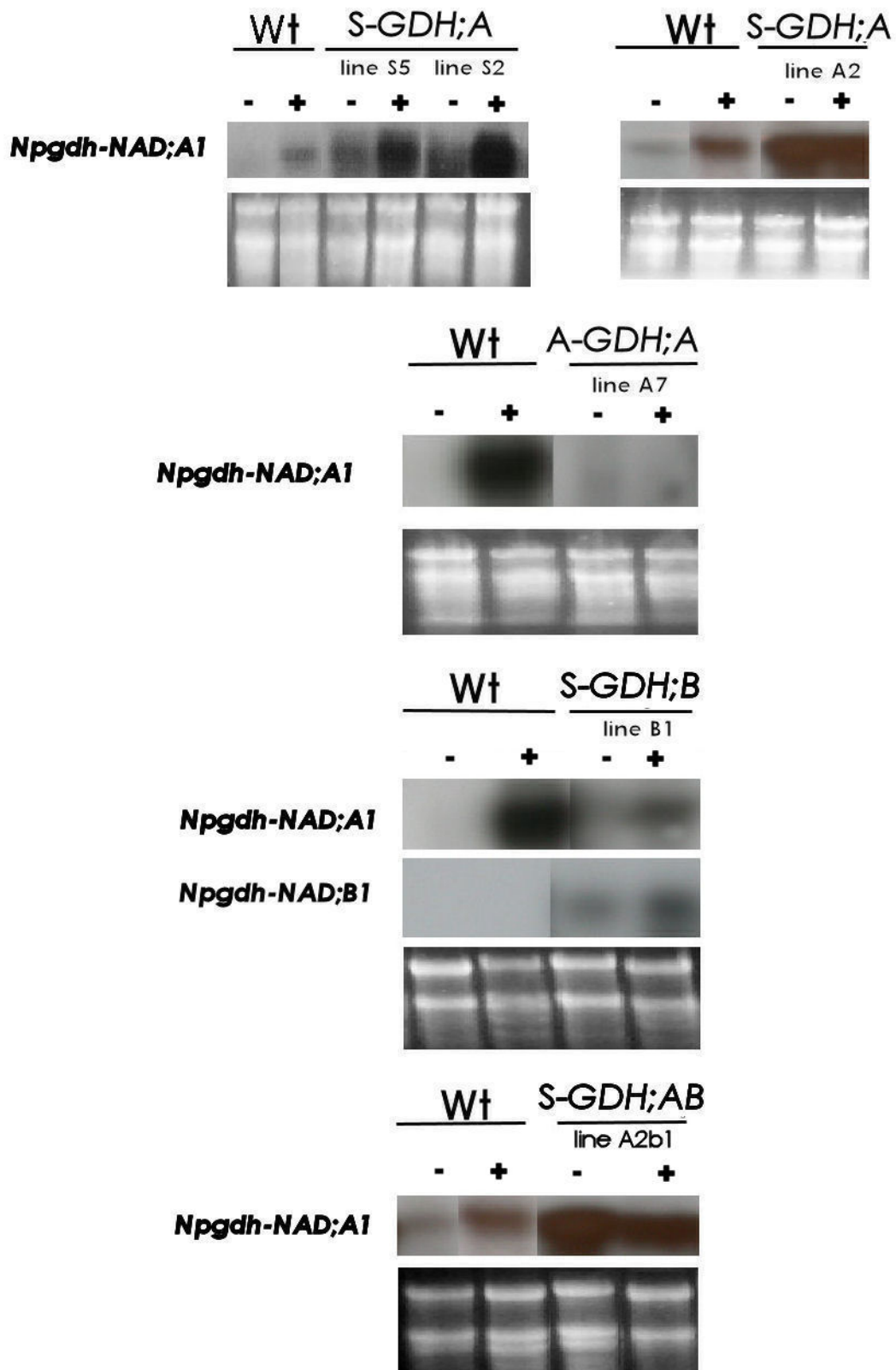


S-GDH;A S-GDH;B S-GDH;AB

Εικ 4. Ειδικές ενεργότητες των ενζύμων αφομοίωσης του αζώτου σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα φυλλικού ιστού των ΓΤ *GDH* σειρών. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι τριών ανεξάρτητων προσδιορισμών \pm SE.



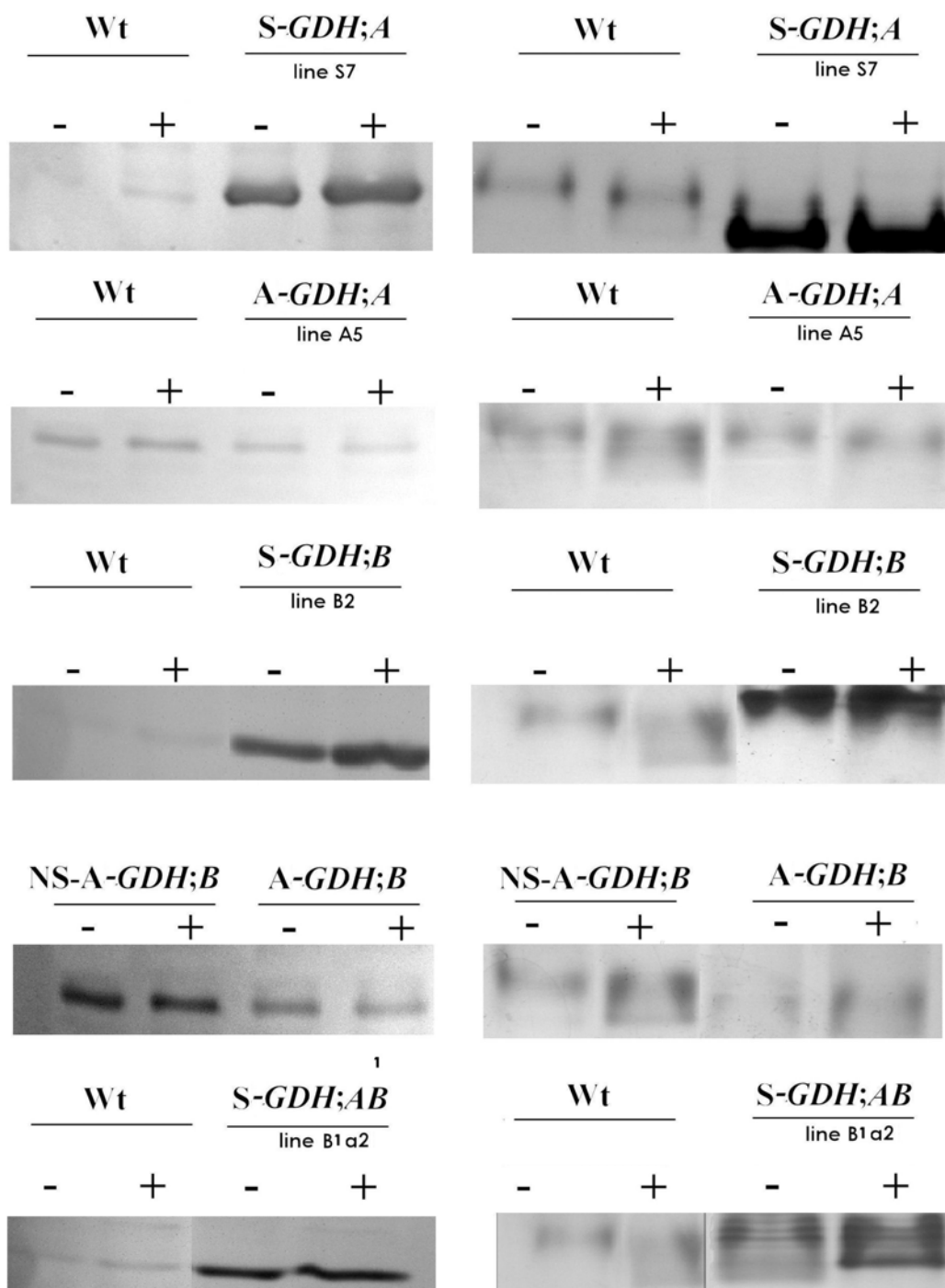
Εικ. 5 Northern blotting για αντιπροσωπευτικές σειρές από κάθε κατηγορία ΓΤ φυτών. Αριστερά από κάθε εικόνα φαίνεται το γονίδιο του οποίου το cDNA χρησιμοποιήθηκε ως template για την κατασκευή ραδιενεργού probe. Σε ξεχωριστό ένθετο έχουν τοποθετηθεί σε όλες τις περιπτώσεις τα αντίστοιχα πρότυπα χρώσης με EtBr. - : Control, + : 250mM NaCl



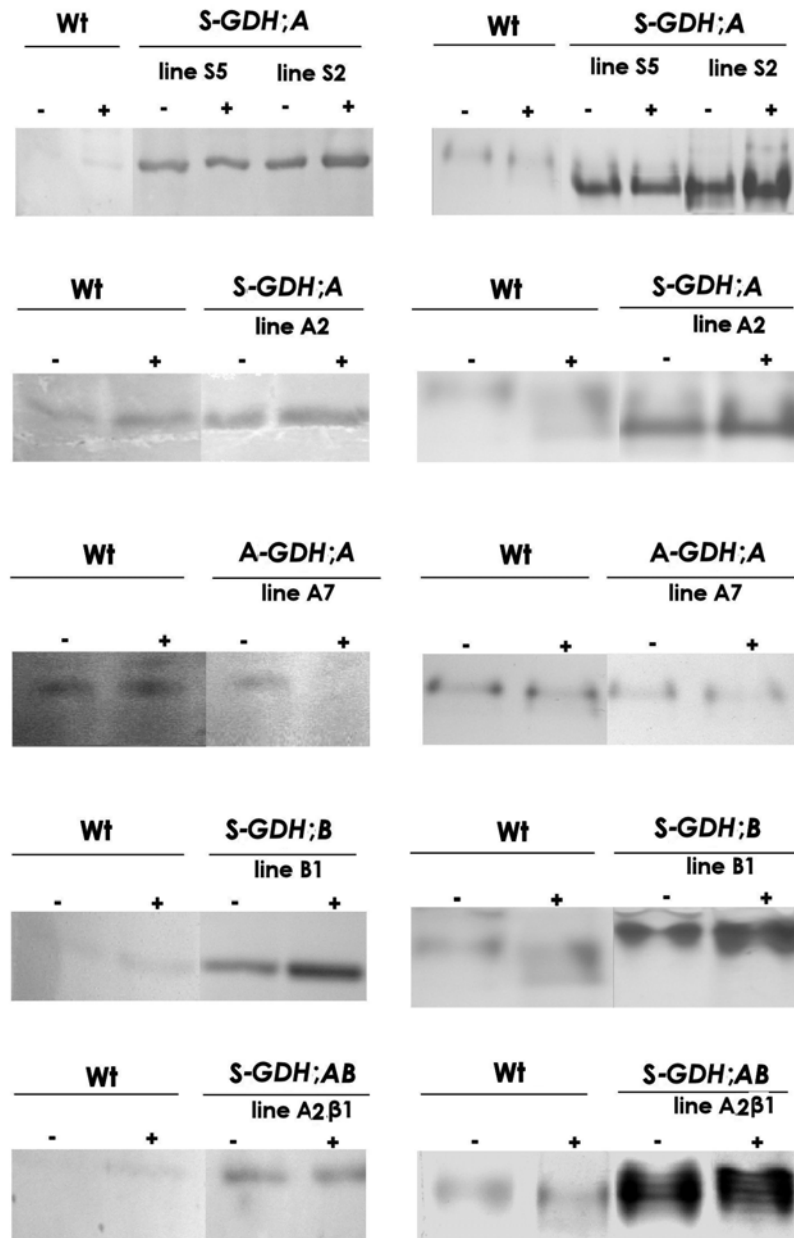
Εικ. 6 Συμπληρωματική εικόνα από Northern blotting για τις υπόλοιπες σειρές από κάθε κατηγορία ΓΤ φυτών. Αριστερά από κάθε εικόνα φαίνεται το γονίδιο του οποίου το cDNA χρησιμοποιήθηκε ως template για την κατασκευή ραδιενεργού probe. Σε ξεχωριστό ένθετο έχουν τοποθετηθεί σε όλες τις περιπτώσεις τα αντίστοιχα πρότυπα χρώσης με EtBr.

Όπως μπορούμε να διαπιστώσουμε από τις Εικ. 5 και 6, η μεταχείριση με αλάτι προκάλεσε επαγωγή έκφρασης του *GDH-A* γονιδίου, που κωδικοποιεί για την α -υπομονάδα της *GDH* και αύξηση της αφθονίας του αντίστοιχου μεταγράφου, τόσο στα *WT* φυτά (*N.tabacum* var *Xanthi*, και *NS-A-GDH;B* ισογενικό control της *A-GDH;B*), όσο και στα *S-GDH;A* (πλην της *A2*). Δεν ισχύει το ίδιο για το mRNA της β -υπομονάδας. Η πυκνομετρική ανάλυση έδειξε αύξηση από 3 έως και 30 φορές για τα *WT*, ανάλογα με τον χρόνο έκθεσης, ο οποίος ήταν διαφορετικός κάθε φορά εξαιτίας της ετερογένειας των *GT* σειρών με τις οποίες συγκρίνονταν τα *WT* φυτά. Για τις *S-GDH;A* σειρές καταγράφηκαν οι ακόλουθες αυξήσεις: 6-7 φορές για την *S7*, 3 φορές για την *S5* και 4-5 φορές για την *S2*. Για την *A2* σειρά δεν παρατηρήθηκε αύξηση της αφθονίας του μεταγράφου. Προκειμένου για τις σειρές υποέκφρασης, η *A5 (A-GDH;A)* και η *A63H (A-GDH;B)* δεν έδωσαν ανιχνεύσιμο σήμα, ακόμα και ύστερα από μεγάλο χρόνο έκθεσης, ενώ η *A7 (A-GDH;A)* έδωσε αχνή ζώνη σε κανονικές συνθήκες, ενώ το σήμα μειώθηκε κατά 2 περίπου φορές σε συνθήκες αλατότητας. Στις σειρές *B1* και *B2 (S-GDH;B)* η υβριδοποίηση με probe ειδικό για το mRNA της α -υπομονάδας έδειξε, σε συνθήκες αλατότητας, αύξηση της αφθονίας του μεταγράφου κατά 6 φορές, ενώ η υβριδοποίηση με probe ειδικό για το mRNA της β -υπομονάδας οδήγησε σε λήψη σήματος 2-3 φορές ισχυρότερου από ότι σε control συνθήκες. Τέλος όσον αφορά στις διπλά διαγονιδιακές σειρές, η υβριδοποίηση με στόχο το mRNA του γονιδίου της α -υπομονάδας οδήγησε σε όμοιας έντασης σήματα, απουσία ή παρουσία αλατιού, για την σειρά *B1a2*. Στις αντίστοιχες μεταχειρίσεις και υπό τις ίδιες συνθήκες υβριδοποίησης το μετάγραφο μειώθηκε κατά 50% περίπου στη σειρά *A2b1*. Η υβριδοποίηση με probe ειδικό για το mRNA της β -υπομονάδας έδειξε μείωση κατά περίπου 50% της έντασης του σήματος στη μεταχείριση με αλάτι για την σειρά *B1a2*, ενώ στην σειρά *A2b1* το αποτέλεσμα ήταν ίδιας έντασης σήμα για τους δύο χειρισμούς.

Τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις της αφθονίας της ανοσοενεργής *GDH* και η ανάλυση του ισοενζυμικού προτύπου φαίνονται στις Εικ 7 και 8.



Εικ.7 Western blottings (αριστερά panels) και activity stainings μετά από Native PAGE (δεξιά panels) για αντιπροσωπευτικές σειρές από κάθε κατηγορία ΓΤΦ. - : Control, + : 250mM NaCl.



Εικ.8 Συμπληρωματική εικόνα από Western blottings (αριστερά panels) και activity stainings μετά από Native PAGE (δεξιά panels) για τις υπόλοιπες σειρές από κάθε κατηγορία διαγονιδιακών φυτών - : Control, + : 250mM NaCl

Στα WT φυτά, παρατηρήθηκε αύξηση της αφθονίας της ανοσοενεργής πρωτεΐνης παρουσία 250mM NaCl σε σχέση με τον αντίστοιχο μάρτυρα. Πυκνομετρική ανάλυση έδειξε ότι η αύξηση κυμαινόταν από 25% (NS-A-GDH;B) έως και 110% (2-fold) (WT στο blot μαζί με το S-GDH;A). Το ισοενζυμικό πρότυπο έδειξε παράλληλα μια μετακίνηση της έντασης του σήματος προς τις ανοδικές ισομορφές. Στις σειρές S-GDH;A και S-GDH;B η

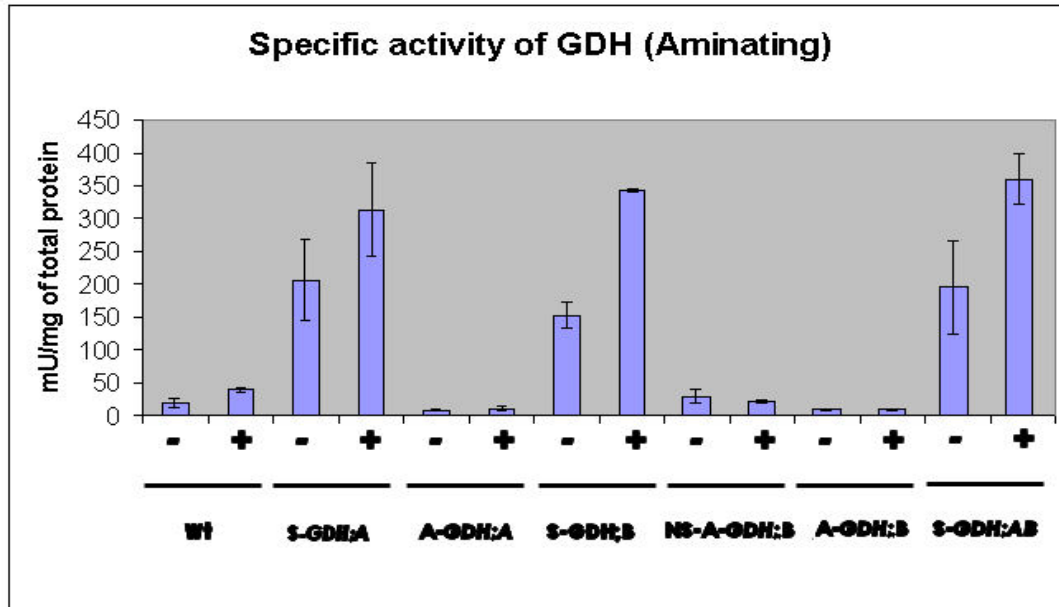
ανοσοενεργή πρωτεΐνη είχε αύξηση από 0 σε 250mM NaCl, η οποία είναι της τάξεως του 25% για την σειρά S7, 100% (2-fold) για την σειρά S2 και περί το 150% για τις σειρές B1 και B2. Μόνο για την σειρά S5 κατεγράφη πολύ μικρή μείωση (10-15%). Κατ' αντιστοιχία, αυξημένη ένταση στο σήμα παρατηρήθηκε και στα ισοενζυμικά πρότυπα των ίδιων σειρών υπό τις ίδιες συνθήκες. Ωστόσο, στη σειρά S7 η αύξηση ήταν της τάξεως του 60%, σε αντίθεση με την αύξηση κατά 25% που έδειξε στο Western. Στις σειρές S-GDH;AB η αφθονία της ανοσοενεργής πρωτεΐνης δεν δείχνει να μεταβάλλεται μεταξύ των παρουσίας 250mM NaCl. Όμως, στο ισοενζυμικό πρότυπο το σήμα εντάθηκε κατά 35-40% για την σειρά B1a2, ενώ ήταν αμετάβλητο ως προς την ένταση για την σειρά A2b1. Τέλος, για τις σειρές A-GDH;A η ένταση του σήματος στο Western blot μειώθηκε στα 250mM NaCl, με πιο εμφανή την ελάττωση στην σειρά A7, όπου το σήμα είναι πρακτικά μη ανιχνεύσιμο. Στην σειρά A5 η μείωση ήταν της τάξεως του 60%. Για την σειρά A63H (A-GDH;B) η πυκνομετρική ανάλυση έδειξε οριακή μείωση, της τάξεως του 10-15%. Όσον αφορά στο ισοενζυμικό πρότυπο, στις σειρές A5 και A7 η ένταση σήματος ήταν πρακτικώς ίδια, με την πυκνομετρική ανάλυση να αποκαλύπτει μικρή μείωση της τάξεως του 10-15%. Τέλος, η σειρά A63H έδειξε υπερδιπλάσια αύξηση του σήματος στα 250mM NaCl (Εικ. 7).

Η ειδική αμινωτική ενεργότητα της GDH βρέθηκε να αυξάνεται σε όλες τις υπερεκφράζουσες σειρές στα 250mM NaCl. Από τα WT φυτά, η σειρά A63NS (isogenic control της A63H) διατήρησε πρακτικά σταθερή τιμή ειδικής ενεργότητας ενώ στα φυτά *N. tabacum* var. Xanthi παρατηρήθηκε αύξηση. Τέλος, στις σειρές υποέκφρασης δεν εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ 0 και 250mM NaCl (Εικ. 9).

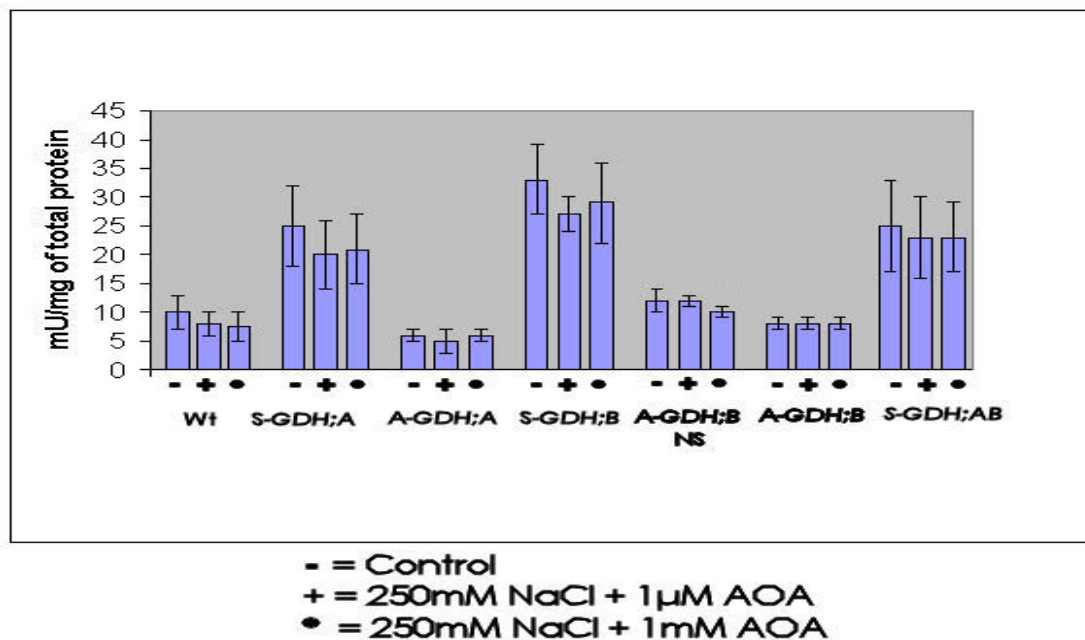
Προκειμένου για την NADH-GOGAT (Εικ. 10) υπό κανονικές συνθήκες (0mM NaCl, 0μM AOA) η ενεργότητα της NADH-GOGAT ήταν αυξημένη στις σειρές υπερέκφρασης ενώ συγκρινόμενη με το μάρτυρα δε βρέθηκαν ουσιαστικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων μεταχειρίσεων, που μελετήθηκαν σε όλες τις ΓΤ σειρές.

Όσον αφορά στην ειδική ενεργότητα της GS (Εικ. 11), παρατηρήθηκε η αναμενόμενη μείωση των τιμών μετά από χειρισμό με τους αναστολείς PPT και MSX. Η μείωση ήταν της τάξεως του 80% για τις περισσότερες σειρές που εξετάστηκαν, είτε με τον ένα είτε με τον άλλο αναστολέα. Μεγαλύτερη μείωση,

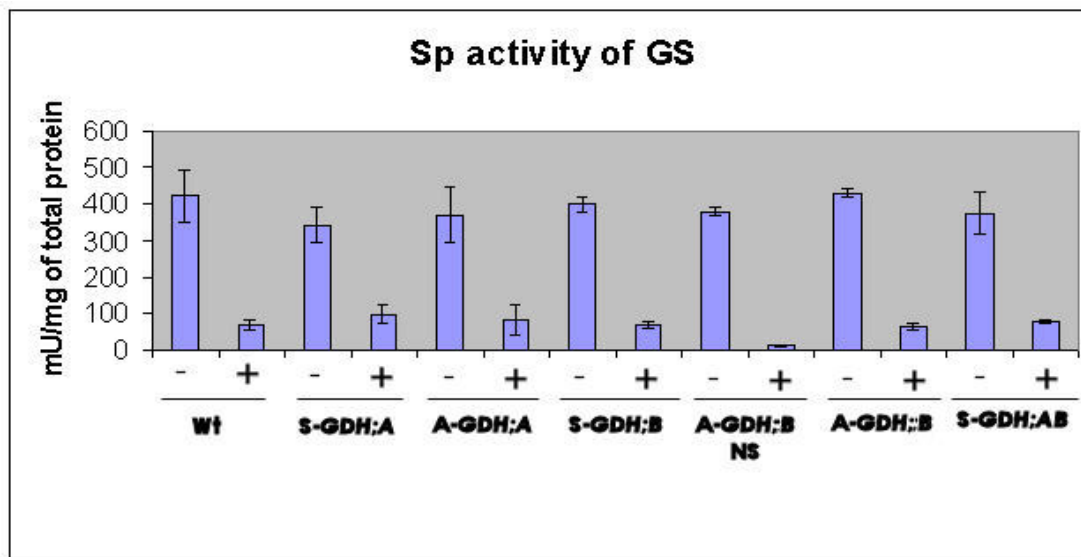
κυμαινόμενη μεταξύ 85-95%, σημειώθηκε για την σειρά A63NS (η οποία αποτελεί τον ισογενικό μάρτυρα της σειράς A36H).



Εικ. 9 Ειδική αμινωτική ενεργότητα της GDH σε ΓΤΦ. Οι τιμές είναι μέσοι όροι από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα ± SE. - : Control, + : 250mM NaCl.



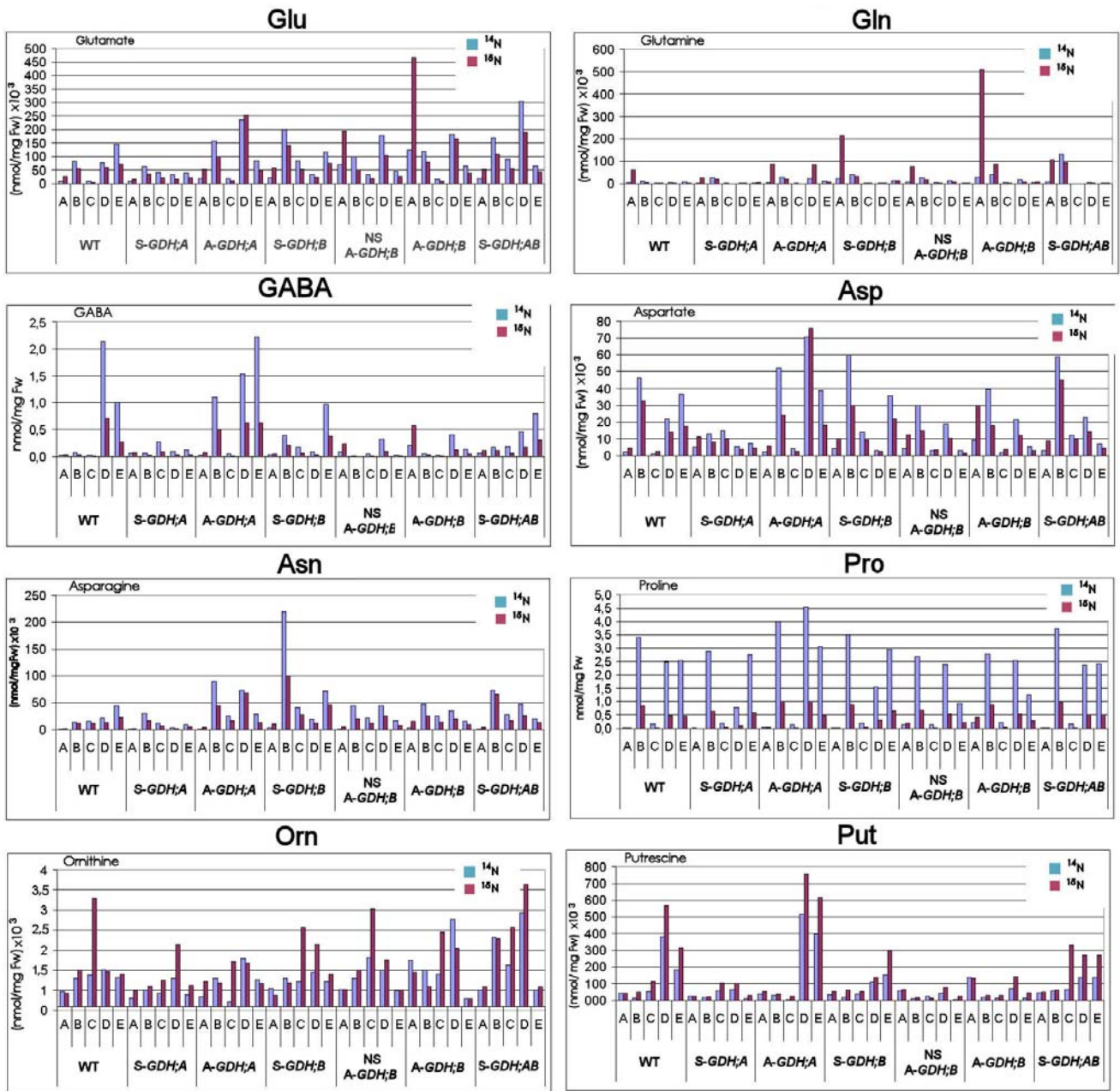
Εικ. 10 Ειδική ενεργότητα της NADH-GOGAT σε ΓΤΦ. Οι τιμές είναι μέσοι όροι από τρεις ανεξάρτητες επαναλήψεις ± SE.



Εικ. 11 Ειδική ενεργότητα της GS σε ΓΤΦ. Οι τιμές είναι μέσοι όροι από τρεις ανεξάρτητες επαναλήψεις ± SE. - : Control, + : 250mM NaCl+ PPT (ή MSX)

Σε ότι αφορά την μεταβολική τύχη των σημασμένων $^{15}\text{N-NH}_4$ και $^{15}\text{N-Glu}$, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις Εικ. 12 και 13. Οι τάσεις των διακυμάνσεων των ανιχνευόμενων μεταβολιτών παρουσιάζονται σε ξεχωριστό ιστόγραμμα για κάθε μεταβολίτη. Στην κορυφή κάθε εικόνας διευκρινίζεται η πηγή του σημασμένου αζώτου στο θρεπτικό υπόστρωμα των φυτών και στη βάση επεξηγούνται οι μεταχειρίσεις.

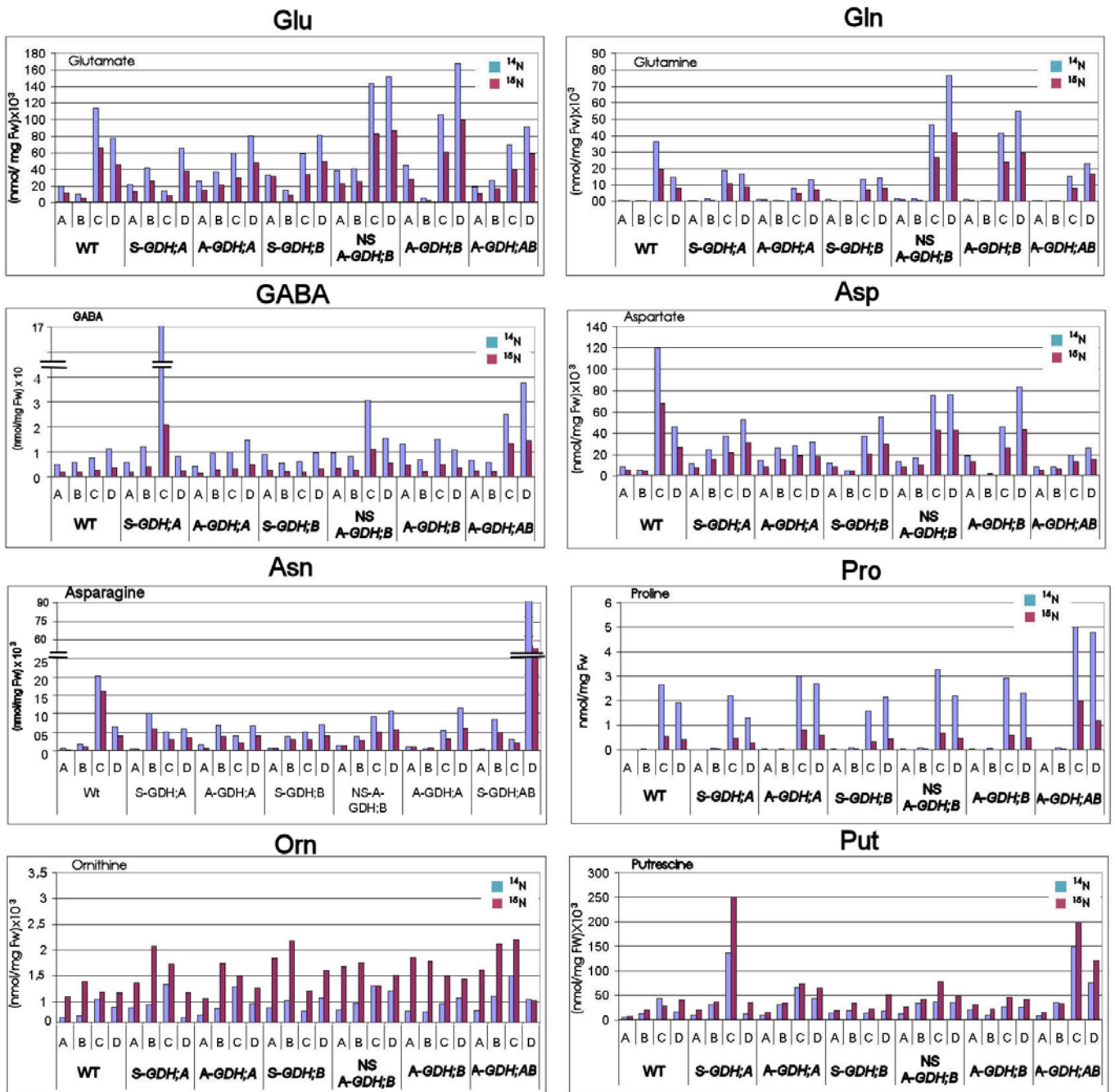
Τα αποτελέσματα (Εικ. 12 και 13) αφορούν σε δύο τουλάχιστον σειρές από κάθε κατηγορία ΓΤΦ. Εξαιρέση αποτελεί μόνον η κατηγορία *A-GDH;B*, όπου υποεκφράζεται το γονίδιο της β-υπομονάδας της GDH, για την οποία είχαμε στην διάθεσή μας μία μόνον σειρά, την A63H (Purnell et al. 2005). Έτσι, από την κατηγορία *S-GDH;A* εξετάστηκαν οι σειρές S5, S7, S2 (Σκοπελίτης, 2006) και A2 (Labboun et al. 2009). Από την κατηγορία *A-GDH;A* εξετάστηκαν οι σειρές A5 και A7 (Σκοπελίτης, 2006), από την κατηγορία *S-GDH;B*, εξετάστηκαν οι σειρές B1 και B2 (Labboun et al. 2009) και από την *S-GDH;AB* εξετάστηκαν οι σειρές A2b1 και B1a2 (Labboun et al. 2009). Τέλος, η κατηγορία *NS-A-GDH;B* αντιπροσωπευόταν από την σειρά A63NS (Purnell et al. 2005) η οποία αποτελεί ισογενικό μάρτυρα της A63H



A= Control, B= 250mM NaCl, C= PPT + AOA (1 μ M), D= 250mM NaCl +PPT, E= 250mM NaCl + AOA (1 μ M) + PPT

Εικ.12 Ανάλυση της μεταβολικής τύχης του σημασμένου αζώτου σε φυτά για τα οποία η μοναδική εξωγενής πηγή αζώτου ήταν το $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$

¹⁵Glu



A= Control, B= PPT + AOA (1μM), C= 250mM NaCl + PPT, D= 250mM NaCl + AOA (1μM) + PPT

Εικ.13 Ανάλυση της μεταβολικής τύχης του σημασμένου αζώτου σε φυτά για τα οποία η μοναδική εξωγενής πηγή αζώτου ήταν το ¹⁵N-Glu.

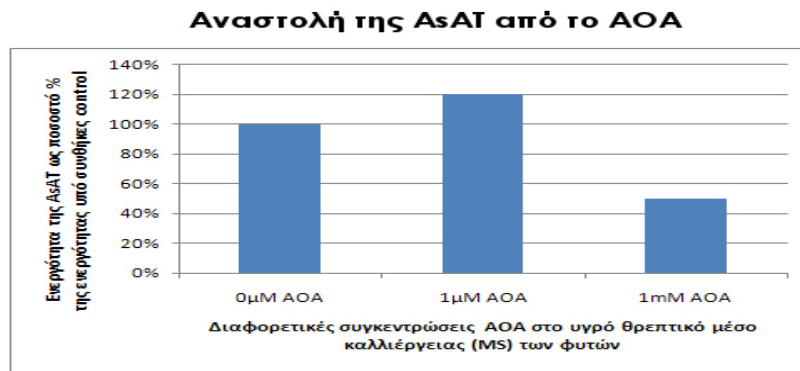
Γίνεται εύκολα αντιληπτό, ότι τα αποτελέσματα δεν είναι δηλωτικά ξεκάθαρων τάσεων για τους υπό εξέταση μεταβολίτες. Σε κάθε περίπτωση όμως και παρά τις εξαιρέσεις, μπορούμε να συλλάβουμε μια γενική εικόνα. Στα φυτά, στο θρεπτικό υπόστρωμα των οποίων προστέθηκε σημασμένη αμμωνία (χλωριούχο αμμώνιο), διαφαίνεται μια αυξητική τάση για το γλουταμικό, για την πλειοψηφία των ΓΤΦ παρουσία NaCl. Όμως τα φυτά *S-GDH;A* δεν επιδεικνύουν την ίδια συμπεριφορά. Η συνδυαστική χρήση των αναστολέων χωρίς προσθήκη αλατιού, δεν δείχνει να οδηγεί σε ανάλογη συσσώρευση του γλουταμικού. Αναπάντεχα έντονη παρουσία γλουταμικού παρατηρούμε σε control συνθήκες στα φυτά *A-GDH;B*. Η γλουταμίνη φαίνεται να είναι (κατά τα αναμενόμενα) αρκετά μειωμένη σε όλους τους χειρισμούς όπου έχει προστεθεί PPT, με εξαίρεση την κατηγορία *A-GDH;A*, όπου ο συνδυασμός αλατιού με PPT δεν επηρέασε τα επίπεδα της γλουταμίνης συγκριτικά με το μάρτυρα. Ιδιαίτερα έντονα είναι τα επίπεδά της σε κανονικές συνθήκες στα φυτά που υποεκφράζουν το γονίδιο της β-υπομονάδας, μια παρατήρηση που συνάδει με την αντίστοιχη συμπεριφορά του γλουταμικού στο ίδια φυτά και μεταχείριση. Η ασπαραγίνη και το ασπαρτικό, τα δύο έτερα αμινοξέα υψηλής αφθονίας στα φυτά (μαζί με την γλουταμίνη και το γλουταμικό), δείχνουν να αυξάνονται παρουσία NaCl, είτε αυτό χρησιμοποιηθεί μόνο του είτε σε συνδυασμό με τους αναστολείς. Η συνδυαστική χρήση των αναστολέων μόνο, χωρίς καταπόνηση, δεν δείχνει να προκαλεί αντίστοιχη αυξητική τάση. Η προλίνη είναι ίσως ο μεταβολίτης του οποίου η συμπεριφορά είναι η πλέον ξεκάθαρη. Παρατηρείται σαφής αύξηση της συγκέντρωσής της μετά από καταπόνηση από αλάτι, χωρίς όμως να είμαστε σε θέση να αποφανθούμε με ασφάλεια αν σε κάποια κατηγορία ΓΤ φυτών αυτή η αύξηση είναι εντονότερη.

Το GABA, ένας μεταβολίτης για τον οποίο αναμέναμε μια πιο ξεκάθαρη εικόνα, δεδομένης της καλά εδραιωμένης στη βιβλιογραφία συσχέτισής του με καταστάσεις καταπόνησης, παρουσιάζει ένα μάλλον συγκεκριμένο πρότυπο. Ίσως η μόνη συνεπής με την γενική εικόνα δήλωση που θα μπορούσε να γίνει, είναι ότι το αλάτι σε συνδυασμό με τους αναστολείς προκαλεί αυξητικές τάσεις στην συγκέντρωση του μεταβολίτη. Σε μία τουλάχιστον περίπτωση (*A-*

GDH;A) καταγράφεται ξεκάθαρη αύξηση στο αλάτι χωρίς τους αναστολείς. Προκειμένου για την ορνιθίνη, είναι εμφανές το κοινό πρότυπο διακύμανσης της συγκέντρωσής της, για κάθε κατηγορία ΓΤ φυτών, μεταξύ των διάφορων μεταχειρίσεων. Μέγιστη συγκέντρωση φαίνεται να επιτυγχάνεται όταν παρέχονται οι δύο αναστολείς συνδυαστικά χωρίς αλάτι. Τέλος, σε ότι αφορά στην πουτρεσίνη, διαφαίνεται η αυξητική επίδραση που έχει στην συγκέντρωσή της η συνδυαστική εφαρμογή αλατιού και αναστολέων.

Στα ΓΤ φυτά, στα οποία χορηγήθηκε σημασμένο ^{15}N -Glu, η συνδυαστική δράση αλατιού και αναστολέων προκάλεσε εμπλουτισμό της δεξαμενής του γλουταμικού στα φύλλα (Εικ. 13). Απολύτως ξεκάθαρη είναι η αυξητική επίδραση των χειρισμών συνδυασμού αλατιού κι αναστολέων στην συγκέντρωση της γλουταμίνης καθώς επίσης της προλίνης, του ασπαρτικού και της ασπαραγίνης. Ωστόσο, τουλάχιστον για το ασπαρτικό, οι αναστολείς μόνοι τους φαίνεται να τείνουν να το αυξήσουν, αν και σε λιγότερο βαθμό συγκριτικά με την ταυτόχρονη προσθήκη αλατιού. Το GABA σε όλες τις κατηγορίες ΓΤ φυτών δείχνει τάση αύξησης παρουσία NaCl . Εκπληκτικά υψηλή τιμή φαίνεται να παρουσιάζεται στα φυτά της κατηγορίας *S-GDH;A* παρουσία $\text{NaCl}+\text{PPT}$. Ομοίως με το GABA, η πουτρεσίνη φαίνεται να αυξάνεται παρουσία NaCl και αναστολέων. Τέλος για την ορνιθίνη, όπως και στην περίπτωση των φυτών στα οποία η πηγή αζώτου ήταν η σημασμένη αμμωνία, μπορούμε να εντοπίσουμε ένα κοινό πρότυπο στη συγκέντρωσή της, με μέγιστο να εντοπίζεται και πάλι στους χειρισμούς όπου παρέχονται οι δύο αναστολείς.

Επειδή μετά την εξέταση των παραπάνω αποτελεσμάτων η γενική εντύπωση ήταν συγκεχυμένη, αποφασίστηκε να επαναληφθούν τα πειράματα με προσθήκη αυξημένης συγκέντρωσης AOA (1mM AOA). Όπως φαίνεται στην Εικ 14, η συγκέντρωση αυτή ήταν μακράν αποδοτικότερη στην παρεμπόδιση της δράσης της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (AsAT), μιας εκ των κυρίαρχων τρانشαμινασών των φυτικών κυττάρων. Τα αποτελέσματα από τη χρήση PPT (ή MSX) και 1mM AOA παρουσία $^{15}\text{N-NH}_4$ και 250 mM NaCl φαίνονται στην Εικ. 15.

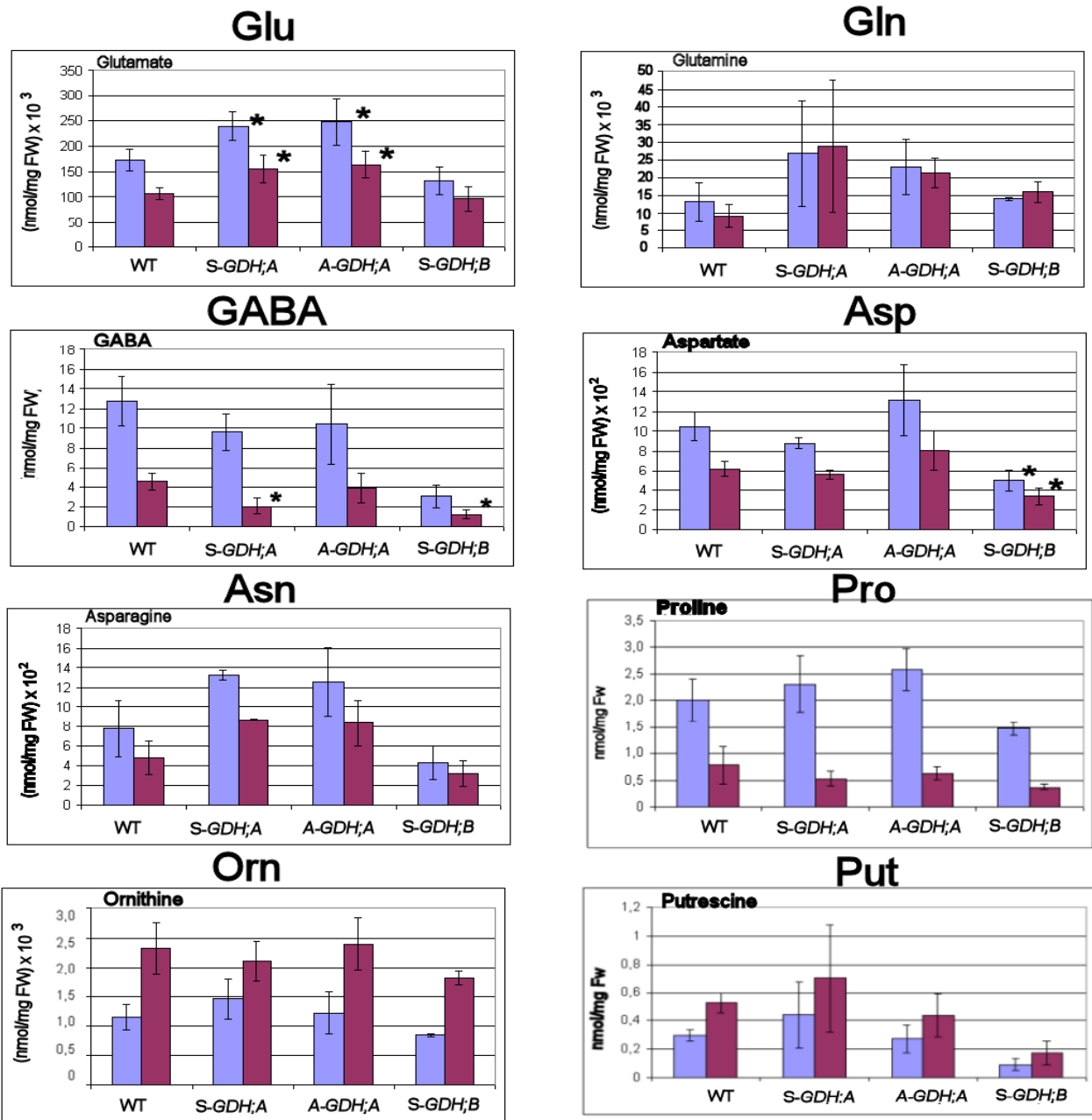


Εικ.14. Αναστολή της AsAT παρουσία 1μM και 1mM AOA.

Από τα αποτελέσματα, που παρουσιάζονται στην Εικ. 15 είναι ξεκάθαρη η αύξηση των επιπέδων ολικού και σημασμένου γλουταμικού σε δύο κατηγορίες ΓΤ φυτών, την *S-GDH;A* και την *A-GDH;A*, εν συγκρίσει με το WT και τα *S-GDH;B* φυτά. Τέτοιο συμπέρασμα δεν διαγράφηκε κατά το προηγούμενο πείραμα με χρήση 1μM AOA. Η συγκέντρωση της γλουταμίνης, αντίθετα, εκτιμάται ίδια σε όλες τις κατηγορίες φυτών, ως αναμένεται άλλωστε από την ανασταλτική επίδραση του PPT ή MSX. Η ολική ποσότητα του GABA φαίνεται ίδια σε όλες τις κατηγορίες, πλην της *S-GDH;B*, όπου και είναι εμφανώς μειωμένη. Η ποσότητα του σημασμένου GABA στα φυτά *S-GDH;A* και *S-GDH;B* είναι περίπου ίδια, και ταυτόχρονα σημαντικά μικρότερη ($P < 0,05$) συγκριτικά με το WT και τα *A-GDH;A*. Η ασπαραγίνη και το ασπαρτικό (ολικά και σημασμένα) είναι εμφανώς χαμηλότερα στα φυτά *S-GDH;B*, ενώ στα *S-GDH;A* και στα *A-GDH;A* η μεν ασπαραγίνη είναι αυξημένη συγκριτικά με τα άλλα ΓΤ φυτά, το δε ασπαρτικό φαίνεται περίπου στα ίδια επίπεδα. Παραδόξως η προλίνη δεν φαίνεται να διαφοροποιείται μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών, ενώ ανάλογο είναι το συμπέρασμα και για την ορνιθίνη. Τέλος, η πουτρεσίνη εμφανίζεται σημαντικά μειωμένη στα *S-GDH;B* φυτά.

Σχετικά με την ανάλυση του φαινοτύπου των ΓΤ σειρών σε συνθήκες αλατότητας, τα αποτελέσματα φαίνονται στις Εικ. 16 και 17.

$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$
250mM NaCl + AOA (1mM) + PPT (or MSX)

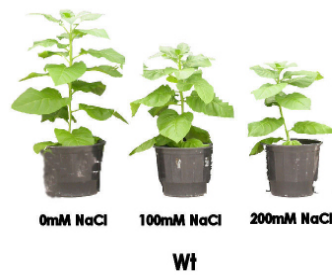


Εικ.15. Ανάλυση της μεταβολικής τύχης του σημασμένου αζώτου σε φυτά για τα οποία η μοναδική εξωγενής πηγή αζώτου ήταν το ^{15}N -Glu και υπέστησαν μεταχείριση 250mM NaCl + 1mM AOA + PPT (or MSX) Οι τιμές για κάθε κατηγορία ΓΤ φυτών αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο τριών ανεξάρτητων μετρήσεων, έκαστη εκ των οποίων αφορά σε σύνθετο δείγμα φυλλικού ιστού από τρία διαφορετικά φυτά \pm SE ενώ ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0,05$).

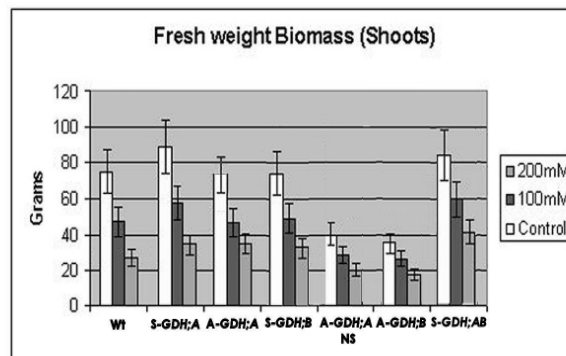
A.



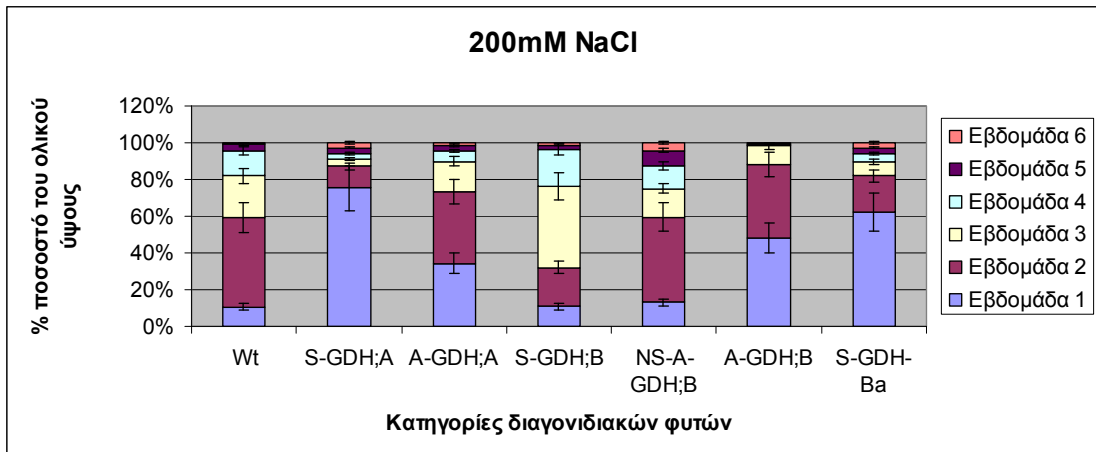
B.



C.



Εικ.16 Φαινοτυπική ανάλυση των ΓΤ φυτών υπό συνθήκες καταπόνησης από αλατότητα. A.1: Φυτά ηλικίας 50 ημερών πριν την έναρξη της καταπόνησης. A.2: Φυτά ηλικίας 110 ημερών πριν συλλεχθεί το υπέργειο τμήμα, προκειμένου να προσδιοριστεί το νωπό βάρος. B: Φυτά WT, ηλικίας 75 ημερών, βρισκόμενα επί 25 μέρες σε 0, 100 και 200mM NaCl. Όλες οι υπόλοιπες κατηγορίες ΓΤ φυτών δεν εμφάνιζαν εμφανείς φαινοτυπικές διαφοροποιήσεις από τα αντίστοιχα WT. C: Νωπό βάρος του υπέργειου τμήματος του φυτού υπό συνθήκες 0, 100 και 200mM NaCl. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο από 6 διαφορετικά φυτά \pm SE.



Εικ. 17 Φαινοτυπική ανάλυση των ΓΤ φυτών ανά εβδομάδα μέτρησης, εκφρασμένη ως το εκάστοτε ποσοστό επί της τελικής τιμής της μετρούμενης παραμέτρου \pm SE.

Στις δύο πρώτες εβδομάδες στα ΓΤ φυτά *S-GDH;A* και *S-GDH;AB* διαπιστώθηκαν μικρές διαφορές στην σπαργή των φύλλων. Επιπρόσθετα, εμφανίστηκαν με ελαφρά καθυστέρηση συγκριτικά με τα υπόλοιπα τα συμπτώματα χλώρωσης των φύλλων από την ιοντική ανισορροπία που προκαλεί η υψηλή συγκέντρωση αλατιού, στα φυτά *S-GDH;A* και *S-GDH;AB*. Όπως καταδεικνύεται και από την Εικ. 17, τα φυτά αυτών των δύο κατηγοριών στην πρώτη εβδομάδα της καταπόνησης είχαν ήδη φτάσει ένα πολύ σημαντικό ποσοστό του τελικού τους ύψους και έδειχναν να επηρεάζονται λιγότερο από τα υπόλοιπα. Πολύ σύντομα όμως, ανεκόπη ο ρυθμός ανάπτυξης τους και στην τελική σύγκριση οι διαφορές δεν στατιστικά σημαντικές μετά από ανάλυση ANOVA.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

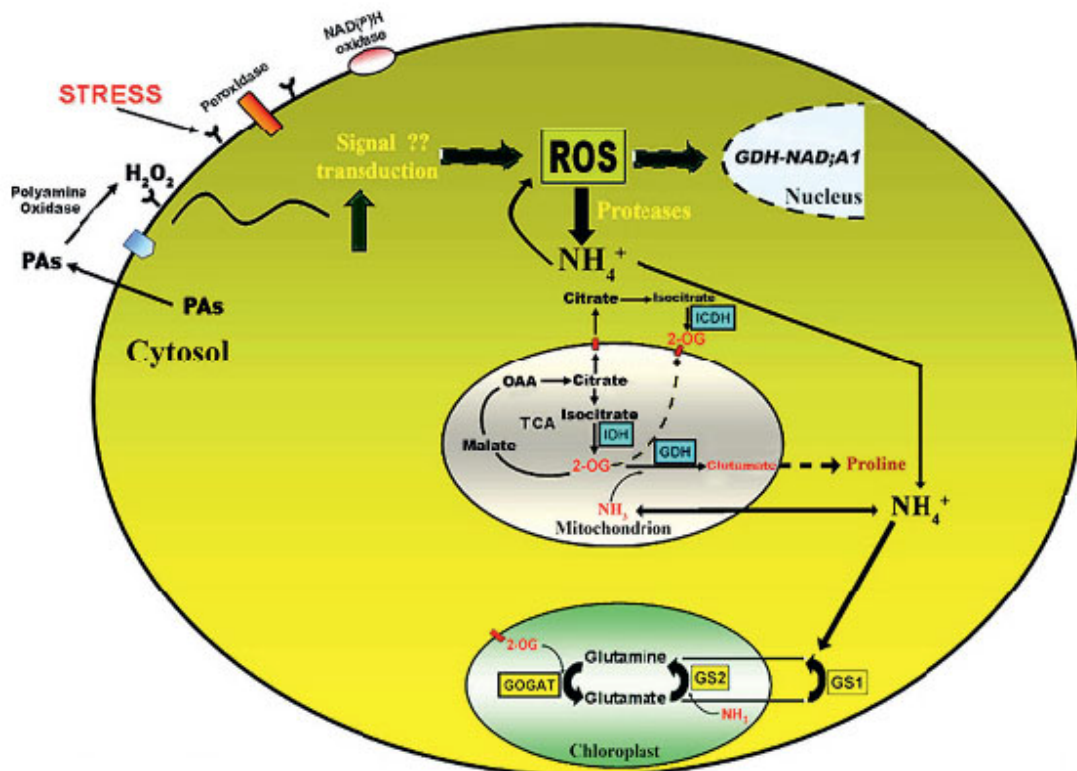
Αυτή η εργασία εκπονήθηκε με σκοπό να συμβάλει στη διαλεύκανση του φυσιολογικού ρόλου της GDH σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, που αποτελεί μια από τις πλέον οξείες αβιοτικές καταπονήσεις (Munns and Tester 2008). Όπως έχουμε ήδη αναφέρει στο κεφάλαιο «Εισαγωγή», τα τελευταία χρόνια έχουν δημοσιευθεί αποτελέσματα που υποστηρίζουν σημαντική συμβολή της GDH στην προσπάθεια του φυτού να αντεπεξέλθει σε αβιοτικές καταπονήσεις. Οι Syntichaki et al. (1996) αναφέρουν αυξημένη θερμοανθεκτικότητα της GDH και επί τη βάση αυτού του δεδομένου προτείνουν ενδεχόμενο σημαντικό ρόλο στις αποκρίσεις που επάγονται από τις καταπονήσεις. Λίγα χρόνια αργότερα οι Purnell et al. (2005) παρέθεσαν δεδομένα που συνηγορούν υπέρ της ανθεκτικότητας της GDH έναντι των πρωτεολυτικών γεγονότων που επάγονται κατά τις ποικίλες μορφές καταπονήσεων. Φαίνεται ωστόσο, ότι ο επιτελούμενος φυσιολογικός ρόλος του ενζύμου δεν ο ίδιος για όλες τις περιπτώσεις στρεσογόνων καταστάσεων. Το ένζυμο δείχνει μια πλαστικότητα ως προς την εκάστοτε επιτελούμενη λειτουργία, ανάλογα με τις διαφορετικές φυσιολογικές ανάγκες που προκύπτουν κατά περίπτωση. Για παράδειγμα, κατά την σκοτοεπαγόμενη έλλειψη σε αποθέματα ανθρακικών σκελετών, η GDH εμφανίζεται να επιτελεί πρωτίστως καταβολικό έργο, ώστε να αποτελέσει μια οδό διοχέτευσης α-κετογλουταρικού οξέος προς τον κύκλο του Krebs (Miyashita and Good, 2008). Αντίθετα, όταν κατά την οξειδωτική καταπόνηση (μια εκ των συνιστωσών της καταπόνησης από αλατότητα), εντείνονται τα πρωτεολυτικά γεγονότα και αυξάνεται η ενδογενής συγκέντρωση αμμωνίου, η GDH αναλαμβάνει συνεπικουρικό αφομοιωτικό ρόλο (Skopelitis et al. 2006; Tarasenko et al., 2009).

Αξίζει στο σημείο αυτό να αντιπαραβάλλουμε μια εναλλακτική απόκριση της GDH στο οξειδωτικό στρες. Στο βακτήριο *Pseudomonas fluorescence* το α-κετογλουταρικό έχει βρεθεί ότι συντελεί στην μείωση των EMO με την σύγχρονη παραγωγή ηλεκτρικού οξέος. Κατά την διάρκεια μεταχειρίσεων του βακτηρίου με μεναδιόνη, ισχυρού οξειδωτικού (Skopelitis et al. 2006), καταγράφηκε επαγωγή της απαμινωτικής ενεργότητας της GDH

(Mailloux et al. 2009). Λόγω του καλά εδραιωμένου καταβολικού, υπό φυσιολογικές συνθήκες, ρόλου της GDH στα φυτά (Purnell et al. 2007, Skopelitis et al. 2007, Labboun et al. 2009), τα ευρήματα που υποδεικνύουν ενδεχόμενη αναβολική δραστηριότητα αντιμετωπίζονται με σκεπτικισμό στην βιβλιογραφία (Forde and Lea, 2007), γεγονός που από μόνο του καθιστά το συγκεκριμένο θέμα έρευνας ελκυστικό.

Σε φυτά και φυλλικούς δίσκους καπνού, καθώς και σε *in vitro* συστήματα αμπελιού, η αλατότητα προκάλεσε αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης των ελεύθερων μορφών οξυγόνου (EMO), που ακολούθως σηματοδότησαν την έκφραση πρωτεασών, προκαλώντας αύξηση της συγκέντρωσης του αμμωνίου (Skopelitis et al. 2006). Τα συσσωρευόμενα ιόντα αμμωνίου έδρασαν, αν και σε μικρότερο βαθμό από το πρωτογενές ερέθισμα της αλατότητας, προς περαιτέρω παραγωγή EMO, δημιουργώντας θετική ανατροφοδότηση. Οι EMO δρώντας ως ενδοκυτταρικοί σηματοδότες, με όχι γνωστό προς το παρόν μηχανισμό, επήγαγαν την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την α- υπομονάδα της GDH. Το γεγονός αυτό με την σειρά του οδήγησε προς τη συγκρότηση των ανοδικών ισοενζύμων του ενεργού ολοενζύμου και οδήγησε σε αυξημένη *in planta* GDH αμινωτική ενεργότητα. Το παραγόμενο γλουταμικό βρέθηκε ότι διοχετεύεται προς σύνθεση προλίνης, η συσσώρευση της οποίας υπό συνθήκες αλατότητας είναι διαπιστωμένη (Stewart and Lee 1974, Treichel 1975, Silveira et al. 2003, Skopelitis et al. 2006,). Με αφετηρία το παραπάνω σενάριο (Εικ. 18), ο βασικός στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν να εδραιωθούν ορισμένα από τα επιμέρους στοιχεία του μοντέλου, με την χρήση ΓΤ φυτών. Συγκεκριμένα, η άνοδος υπό συνθήκες στρες των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί για την α-υπομονάδα της GDH, συνακόλουθα δε και των αντίστοιχων επιπέδων της α- υπομονάδας αυτής καθαυτής και των ενεργών ισοενζύμων στην συγκρότηση των οποίων συμμετέχει, ήταν ορισμένα σημεία που σκοπεύαμε να επιβεβαιώσουμε, με παράλληλη ανάλυση της *in planta* ενεργότητας της GDH και την ταυτοποίηση των αζωτούχων μεταβολιτών που συσσωρεύονταν στα φύλλα των ΓΤ φυτών. Ο λόγος είναι ότι, όποια και αν είναι τα συμβάντα σε επίπεδο γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης, οι μεταβολίτες είναι ο τελευταίος κρίκος της αλυσίδας και οι βασικοί συντελεστές της παρατηρούμενης κάθε φορά απόκρισης.

Για την επίτευξη αυτού του στόχου χρησιμοποιήθηκαν φυτά με σταθερή ενσωμάτωση διαγονιδίων, υπό την μεταγραφική ρύθμιση ισχυρού, σταθερά υψηλής ενεργότητας υποκινητή.



Εικ. 18. Προτεινόμενο μοντέλο για την αφομοίωση της αμμωνίας, την συγκέντρωση της οποίας αυξάνουν τα επαγόμενα από τις ΕΜΟ πρωτεολυτικά γεγονότα, κατά την διάρκεια καταπόνησης από αλάτι (από Skorpelitis et al. 2006; Loulakakis et al. 2009).

Καθώς ορισμένες από τις ΓΤ σειρές των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν αδημοσίευτες και μη αναλυμένες, προηγήθηκε η μοριακή και βιοχημική τους ανάλυση. Όπως φαίνεται στην Εικ.1, οι εν λόγω σειρές παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερη αφθονία *GDH*-μεταγράφων από τα WT φυτά. Ανάλογα συμπεράσματα εξάγονται και από την ανάλυση κατά Western αλλά και από την μελέτη των ισοενζυμικών προτύπων (Εικ 2-3). Τα αποτελέσματα από την μέτρηση των ενζυμικών ενεργοτήτων ήταν

αναμενόμενα και σε πλήρη συμφωνία με τα δημοσιευμένα από την ίδια ερευνητική ομάδα που κατασκεύασε τα ΓΤ φυτά (Labboun et al. 2009). Η αμινωτική ενεργότητα της GDH όλων των σειρών υπερέκφρασης είναι αυξημένη σε σύγκριση με το WT. Είναι γνωστό ότι και οι δύο υπομονάδες φέρουν θέση πρόσδεσης για το α-κετογλουταρικό (Turano et al. 1997; Restivo, 2004; Skopelitis 2006). Συνεπώς, ανεξάρτητα από το αν είναι αυξημένα τα επίπεδα της μίας ή της άλλης υπομονάδας ή και των δύο, αν ο προσδιορισμός γίνει υπό συνθήκες που εξασφαλίζουν περίσσεια υποστρωμάτων που ευνοούν την αμινωτική πορεία, η αυξημένη μετρούμενη ενεργότητα είναι αναμενόμενη. Γι'αυτό, η σημασία της *in vitro* ενζυμικής ενεργότητας της GDH έχει αμφισβητηθεί (Skopelitis et al. 2007).

Η ενεργότητα της GS φαίνεται να κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα σε όλα τα φυτά ενώ η ενεργότητα της NADH-GOGAT είναι εμφανώς μειωμένη στα WT φυτά (Εικ 4). Οι Labboun et al. (2009) παραθέτουν στοιχεία και για την Fd-GOGAT την οποία βρίσκουν να κυμαίνεται σε παρόμοια επίπεδα σε όλα τα φυτά. Μια πιθανή ερμηνεία των ευρημάτων μας για την NADH-GOGAT είναι η εξής: δεδομένου ότι είναι πλέον ευρύτερα αποδεκτό ότι ο πρωταρχικός *in vivo* ρόλος της GDH είναι καταβολικός, υπό φυσιολογικές συνθήκες (Purnell et al. 2007; Skopelitis et al. 2007; Labboun et al. 2009), ίσως η μεγάλη αύξησή της στα ΓΤ φυτά που εξετάσαμε να επάγει ως κάποιο βαθμό την NADH-GOGAT ως παράγοντα αντιστάθμισης του αυξημένου καταβολισμού του γλουταμικού. Το ότι η GOGAT που επάγεται είναι η NADH-GOGAT και όχι η Fd-GOGAT (Labboun et al. 2009), είναι πιθανόν ότι η Fd-GOGAT είναι η δεσπόζουσα μορφή στους φωτοσυνθετικούς ιστούς (Forde and Lea, 2007), όπου η GDH δεν είναι τόσο άφθονη (Purnell et al. 2007; Loulakakis et al., 2009), ενώ στους μη φωτοσυνθετικούς, όπου η GDH αφθονεί, υπερέχει η NADH-GOGAT.

Το γενικό και αναμενόμενο συμπέρασμα από τις αναλύσεις κατά Northern, Western αλλά και από τα ισοενζυμικά πρότυπα, είναι ότι υπό συνθήκες καταπόνησης στα WT φυτά αυξάνεται η αφθονία των μεταγράφων του *GDH*-mRNA που κωδικοποιεί για την α-υπομονάδα, αυξάνονται τα επίπεδα της ανοσοενεργούς πρωτεΐνης και η συγκρότηση των ενεργών ανοδικών ισοένζυμων, που αποτελούνται κατά πλειοψηφία από την α-υπομονάδα (Εικ.5 6, 7 και 8) σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα

(Skopelitis et al., 2006). Αντίθετα, δε βρέθηκε αύξηση για το mRNA που κωδικοποιεί για την β-υπομονάδα ούτε αυξημένα επίπεδα καθοδικών ισοενζύμων σε WT φυτά (Εικ.5 6, 7 και 8) .

Από τις αναλύσεις της αφθονίας των μεταγράφων και των πρωτεϊνών στα ΓΤ φυτά, σε κανονικές αλλά και σε συνθήκες καταπόνησης, μπορούν να εξαχθούν τα επόμενα συμπεράσματα. Σε πολλές από τις ΓΤ σειρές παρατηρείται αύξηση του ανιχνευόμενου σήματος μετά από καταπόνηση από αλάτι. Υπενθυμίζεται ότι τα διαγονίδια είναι υπό την μεταγραφική ρύθμιση ενός ισχυρού, σταθερής ενεργότητας υποκινητή (35S CaMV). Υπάρχουν βέβαια αναφορές στην βιβλιογραφία που αναφέρουν ενδεχόμενη, επαγόμενη από το stress, αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή (Moschou et al. 2008) αλλά στον κύριο όγκο της βιβλιογραφίας ο υποκινητής αυτός θεωρείται σταθερής ενεργότητας (constitutive) (Ortega et al. 2001). Κατά συνέπεια, η σε ορισμένες περιπτώσεις ραγδαία αύξηση του εντοπιζόμενου σήματος στα πειράματά μας προκαλεί έντονο προβληματισμό.

Σαφώς, το ανιχνευόμενο σήμα είναι άθροισμα των σημάτων του ενδογενούς γονιδίου και του τρανσγονιδίου, αλλά η πυκνομετρική ανάλυση καταδεικνύει σαφώς ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού είχαν επαγωγική επίδραση και επί των μεταγράφων του τρανσγονιδίου. Η πιο πιθανή εξήγηση είναι πως για την περίπτωση των τρανσγονιδίων, η παρατηρούμενη επαγωγή δεν άπτεται της μεταγραφής αλλά οφείλεται σε διεργασίες συντελούμενες σε μεταμεταγραφικό επίπεδο. Υπέρ αυτής της θεώρησης συνηγορούν τα ευρήματα σχετικά με την πιθανή ρύθμιση της κυτταροπλασματικής GS1 (Ortega et al. 2001). Σε αυτή την εργασία οι ερευνητές διαπίστωσαν ανάλογες διακυμάνσεις στην αφθονία των μεταγράφων, που ήταν υπό τη μεταγραφική ρύθμιση του 35S υποκινητή, μετά από αλλαγές στις συνθήκες θρέψης. Εντούτοις, όταν χρησιμοποίησαν τον ίδιο υποκινητή με γονίδια μάρτυρες (reporter genes) όπως το GUS, διαπίστωσαν ότι οι ίδιες συνθήκες δεν επηρέαζαν την αφθονία των μεταγράφων του γονιδίου μάρτυρα. Πρότειναν λοιπόν ότι, ενδεχομένως η GS1 ρυθμίζεται σε μεταμεταγραφικό επίπεδο, με διεργασίες που άπτονται της σταθερότητας των μεταγράφων και της ανακύκλωσης των πρωτεϊνών. Διόλου απίθανο κάτι τέτοιο να συμβαίνει και με την GDH. Η GDH και η GS συμμετέχουν άμεσα στον κύκλο της αμμωνίας εντός του φυτού. Είναι συχνά απαντώμενο φαινόμενο στην βιοχημεία, ένζυμα

που συμμετέχουν στις ίδιες διαδικασίες να τελούν υπό κοινούς μηχανισμούς ρύθμισης. Επιπρόσθετα, έχει τεκμηριωθεί ότι η GDH μπορεί να προσδένεται στο RNA (Osuji et al. 2004). Αυτό το γεγονός, σε συνδυασμό με το ότι πρόσφατα η GDH έχει εμπλακεί στην διαδικασία του RNA-editing (Takenaka et al. 2007) μας ενθαρρύνει στην διατύπωση των παραπάνω ισχυρισμών. Το RNA-editing είναι μια βιοχημική διεργασία, που έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή των βάσεων πάνω στο mRNA με χημική τροποποίηση (Alfonzo et al. 1997). Προκειμένου για τα φυτά έχει βρεθεί ότι συμβαίνει στα μετάγραφα τόσο πυρηνικών όσο και μιτοχονδριακών γονιδίων και οι τροποποιούμενες βάσεις ανήκουν είτε στην κωδική περιοχή είτε στις 5' και 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές (5'UTRs και 3'UTRs) (Hiesel et al. 1989). Είναι γνωστό ότι οι 5'UTR περιοχές είναι αυτές, που συμμετέχουν στη δημιουργία των 5' καλυμμάτων (5'cap structures) των οποίων ο ρόλος είναι η σταθεροποίηση των mRNA και η προστασία τους από εξωνουκλεάσες (Kapp, 2004). Επιπρόσθετα, στις 3'UTR περιοχές εντοπίζονται πολλές αλληλουχίες στις οποίες προσδένονται πρωτεΐνες με σταθεροποιητικό ρόλο για το mRNA αυτό καθαυτό, που επιπλέον επηρεάζουν την πρόσδεση των ριβοσωμάτων και ως εκ τούτου την μετάφραση (Wang et al. 2006). Είναι πιθανόν η GDH, δια της ικανότητάς της να συμμετέχει άμεσα στην διαδικασία του RNA-editing (Takenaka et al. 2007), να τροποποιεί σε καταστάσεις καταπονήσεων το mRNA πολλών γονιδίων, αυξάνοντας τη σταθερότητά τους ή τους ρυθμούς μετάφρασής τους. Οι Ortega et al (2006) προσπαθώντας να ερμηνεύσουν παλαιότερα αποτελέσματά τους (Ortega et al. 2001), απέδειξαν ότι προκειμένου για την GS1, η μεταμεταγραφική και μεταφραστική ρύθμισή της συναρτάται άμεσα με την 3'UTR περιοχή του μεταγράφου. Είναι πιθανό ένα ανάλογο σενάριο να ισχύει και για την GDH. Επεκτείνοντας τον συλλογισμό μας και στο μεταμεταφραστικό επίπεδο, αν η τροποποίηση (από το RNA-editing) γίνει εντός της κωδικής αλληλουχίας αντί των μη μεταφραζόμενων περιοχών, αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ελαφρά διαφορετική στερεοδιαμόρφωση του προκύπτοντος πολυπεπτιδίου. Τέτοιου είδους αλλαγές αποδεδειγμένα σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στην πρωτεόλυση, η οποία επιπλέον συναρτάται άμεσα με την θερμοανθεκτικότητα (Markeret et al. 2001). Συνεπώς, η εικασία μας καθίσταται απολύτως βάσιμη αν λάβουμε υπόψη ότι η GDH έχει δείχθει ότι είναι θερμοανθεκτικό ένζυμο (Syntichaki et al. 1996) κι

έχει προταθεί ότι ανθίσταται στην επαγόμενη από την καταπόνηση πρωτεόλυση (Purnell et al. 2005.)

Όσον αφορά στις *in vitro* ενζυμικές ενεργότητες, η ειδική ενεργότητα της GDH αυξάνεται στους χειρισμούς με αλάτι (Εικ.9) σε συμφωνία με την GDH-πρωτεΐνη (Εικ. 7-8) και τα GDH-mRNAs (Εικ. 5-6). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται να προστεθούν σε μια πληθώρα βιβλιογραφικών αναφορών που υπαινίσσονται σημαντική συμβολή της GDH στην αντιμετώπιση των καταπονήσεων. Ξεκάθαρη αύξηση της *in vitro* αμινωτικής ενεργότητας της GDH έχει καταγραφεί κατά την καταπόνηση φυτών τομάτας από αλάτι (Debouba et al. 2006a; 2006b) Η επίδραση με τα βαρέα μέταλλα κάδμιο, λανθάνιο και υδράργυρο έχει δειχθεί να αυξάνει την αμινωτική ενεργότητα ενώ, ειδικά στην περίπτωση του καδμίου, είναι ενδιαφέρον ότι αυτή η αύξηση εμφανίζεται ταυτόχρονα με αυξημένη ενεργότητα πρωτεασών, σε συμφωνία με παλαιότερα αποτελέσματα για την καταπόνηση από αλάτι (Gurta and Gadre, 2005; Skopelitis et al. 2006; Cao et al. 2007; Maaroufi-Dquimi et al. 2009) Επίσης, έχει δειχθεί η επαγωγή της GDH σε φύλλα καπνού, σε επίπεδο μεταγραφικό, πρωτεϊνικό και ενεργότητας, σε αποκρίσεις μετά από βιοτική καταπόνηση, καθώς και μετά από κατεργασία των φυτών με ορμόνες που επάγονται κατά την διάρκεια καταπονήσεων (Pageauet et al. 2006). Στην ίδια μάλιστα εργασία συγκρίνονται οι αποκρίσεις της GDH με αυτές της κυτταροπλασματικής GS (GS1) και οι συγγραφείς προτείνουν ότι σε αντίθεση με το γονίδιο *GS1*, το οποίο έδειχνε να επάγεται επιλεκτικά σε κάποιες μόνο μορφές καταπόνησης, η επαγωγή του *GDH* ήταν γενική. Προτείνουν λοιπόν οι ερευνητές ότι η GDH και η GS1 έχουν πολύ διακριτούς ρόλους κατά τις αποκρίσεις στις καταπονήσεις (Pageauet et al. 2006).

Η ειδική ενεργότητα της GS μειώνεται παρουσία PPT ή MSX, γεγονός που δείχνει την επιτυχή καταστολή της. Η εναπομείνασα ενεργότητα είναι της τάξεως του 20% της αντίστοιχης σε κανονικές συνθήκες (Εικ. 11). Η ειδική ενεργότητα της NADH-GOGAT δεν δείχνει να επηρεάζεται από το AOA, επειδή το AOA είναι αναστολέας των τρανσαμινασών (ή αμινοτρανσφερασών) και όσων άλλων ενζύμων φέρουν την προσθετική ομάδα της φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP) (πχ αποκαρβοξυλάση του γλουταμικού και άλλες αποκαρβοξυλάσες, συνθάσες πολυαμινών κ.α). Για τον προσδιορισμό του ποσοστού της αναστολής των τρανσαμινασών από το AOA, μετρήθηκε η

ειδική ενεργότητα της αμινοτρανσφεράσης του ασπαρτικού (AsAT) σε φυτά που είχαν υποστεί χειρισμό με 1μM και 1mM AOA. Οι τρανσαμινάσες είναι κεντρικά ένζυμα στην ενδοκυτταρική ανακύκλωση του αζώτου και μαζί με τις αποκαρβοξυλάσες των αμινοξέων ρυθμίζουν σε μεγάλο βαθμό τις ροές των μεταβολιτών. Όπως φαίνεται στην Εικ.14, σε φυτά στα οποία χορηγήθηκε 1μM AOA, η ενεργότητα όχι μόνο δεν μειώθηκε, αλλά βρέθηκε ελαφρώς αυξημένη. Τέτοια αποτελέσματα δεν είναι ασυνήθη όταν χρησιμοποιούνται χαμηλές συγκεντρώσεις αναστολέων. Ανάλογη περίπτωση έχει καταγραφεί και για το MSX σε ανθρώπινα έμβρυα, όπου η εφαρμογή του MSX ενώ οδήγησε αρχικά σε πτώση της ενεργότητας της GS, γρήγορα επέφερε αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης για την αποκατάσταση των φυσιολογικών τιμών της ενεργότητας (Vermulen et al. 2008). Αλλά και σε φυτά έχει βρεθεί ότι χαμηλές συγκεντρώσεις του MSX και του PPT επάγουν αντί να καταστέλλουν τη GS, με συνακόλουθες ευεργετικές συνέπειες για την αύξηση και την παραγωγικότητα του φυτού (Solovneva et al. 1995; Evstigneeva et al. 2003). Αντίθετα, σε φυτά στα οποία χορηγήθηκε 1mM AOA η ενεργότητα της AsAT βρέθηκε κατά 50% μειωμένη. Αυτή η συγκέντρωση του AOA είναι και η συνήθως χρησιμοποιούμενη (Purnell et al. 2007; Labboun et al. 2009). Η χρησιμοποίηση της συγκέντρωσης 1μM κρίθηκε αναγκαία, καθώς το βασικό μοντέλο που περιγράφηκε στην αρχή της συζήτησης (Εικ.18) και αποτέλεσε τον οδηγό για τη μελέτη που παρουσιάζεται εδώ, βασίστηκε σε πειράματα με 1μM AOA.

Για την πραγματοποίηση των μεταβολικών αναλύσεων χορηγήθηκαν σημασμένα αζωτούχα υποστρώματα $^{15}\text{N-NH}_4$ και $^{15}\text{N-Glu}$, ως μοναδικές πηγές αζώτου, σε αντιπροσωπευτικές σειρές από κάθε κατηγορία ΓΤΦ, στα οποία είτε είχε χορηγηθεί αλάτι, παρουσία/απουσία των αναστολέων της GS, PPT (ή MSX), καθώς και του αναστολέα AOA, που παρεμποδίζει τα ένζυμα που φέρουν την φωσφορική πυριδοξάλη ως προσθετική ομάδα (τρανσαμινάσες, αποκαρβοξυλάσες αμινοξέων κ.α). Η χρήση των αναστολέων αυτών ήταν επιβεβλημένη, διότι για να εξαχθούν συμπεράσματα για ενδεχόμενο αφομοιωτικό ρόλο της GDH έπρεπε να κατασταλεί η βασική αφομοιωτική πορεία (κύκλος GS/GOGAT). Επιπρόσθετα, δεδομένου ότι η μεταβολική ανάλυση αποτυπώνει το μεταβολικό στιγμιότυπο στο χρονικό σημείο της δειγματοληψίας, έπρεπε να παρεμποδιστούν κατά το δυνατόν οι

αντιδράσεις τρανσαμίνωσης και αποκαρβοξυλίωσης των αμινοξέων, που θα μείωναν σημαντικά την συγκέντρωση των μεταβολιτών που αναζητήθηκαν.

Οι Osuji and Madhu (1995) αναφέρουν ότι η εφαρμογή του αναστολέα MSX μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγή της δομής του ολοενζύμου της GDH, παρεμποδίζοντας τη δράση του. Ωστόσο πληθώρα δημοσιεύσεων δείχνουν ότι η χρήση του MSX ή του PPT δεν παρεμποδίζει αισθητά τη δράση της GDH (Cunliffe et al. 1983, Manderscheid and Wild, 1986; Laquesta et al. 1990a 1990b, Robinson et al. 1991, Skopelitis et al. 2006). Το AOA έχει δειχθεί ότι δεν επηρεάζει την μη αντιστρεπτή απενεργοποίηση της GS από το MSX. Ωστόσο χορηγούμενο σε συνδυασμό με το MSX προκαλεί μείωση της συσσώρευσης των ιόντων αμμωνίου (που προκαλεί το MSX χορηγούμενο αμιγώς) και περιορίζει την επαγόμενη από MSX μείωση των αμινοξέων γλουταμικό αλανίνη και ασπαραγίνη, γεγονός που δείχνει ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες τα συγκεκριμένα αμινοξέα καταβολίζονται σε μεγαλύτερο βαθμό από αντιδράσεις τρανσαμίνωσης παρά από αντιδράσεις αφυδρογόνωσης (Brunk and Rhodes, 1988). Όμως, η δική μας ερευνητική προσπάθεια εστιάζεται στην καταπόνηση από αλατότητα, ένα από τα συμπτώματα της οποίας είναι η άνοδος των ενδογενών συγκεντρώσεων αμμωνίας που επιφέρουν οι επαχθείσες από το στρες πρωτεολυτικές διαδικασίες (Skopelitis et al. 2006). Δεδομένου ότι ως μοναδική εξωγενής πηγή αζώτου των φυτών χρησιμοποιήθηκε σημασμένο χλωριούχο αμμώνιο, εξασφαλίζεται ότι η ενδογενής δεξαμενή αμμωνίου θα είναι εμπλουτισμένη σε σημασμένο αμμώνιο.

Η μεταβολική ανάλυση έγινε για οκτώ μεταβολίτες, εκ των οποίων οι πέντε είναι πρωτεϊνικά αμινοξέα (γλουταμικό, γλουταμίνη, ασπαρτικό, ασπαραγίνη και προλίνη), οι άλλοι δύο μη πρωτεϊνικά αμινοξέα (γ-αμινοβουτυρικό και ορνιθίνη) και ο τελευταίος είναι μια διαμίνη (πλουτρεσίνη). Η επιλογή τους βασίστηκε στο ότι από ενδεχόμενο αφομοιωτικό ρόλο της GDH το πρώτο μόριο που συντίθεται θα είναι το γλουταμικό. Έπρεπε ωστόσο να προσδιοριστούν και τα επίπεδα της προλίνης, δεδομένου ότι έχει δειχθεί πως είναι ένα μόριο που δρα ως ωσμολύτης και συσσωρεύεται στους φυτικούς ιστούς κατά την διάρκεια καταπονήσεων (Nanjo et al., 1999a, 1999b). Επιπλέον, οι Skopelitis et al. (2006) αναφέρουν ότι το παραγόμενο από την GDH γλουταμικό, σε WT φυτά που έχουν υποστεί χειρισμό με

υψηλές συγκεντρώσεις άλατος, διοχετεύεται προς σύνθεση προλίνης. Ο προσδιορισμός των επιπέδων της γλουταμίνης ήταν αναγκαίος για να πιστοποιηθεί η δυσλειτουργία της GS και να επικυρωθούν τα αποτελέσματα από την μέτρηση της *in vitro* ενζυμικής ενεργότητάς της. Η ασπαραγίνη και το ασπαρτικό είναι δύο αμινοξέα υψηλής αφθονίας στα φύλλα και καλοί δείκτες των επιπέδων μείωσης των τρανσαμινασών. Επιπρόσθετα, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του μη πρωτεϊνικού αμινοξέος γ-αμινοβουτυρικό (GABA), που προκύπτει από την αποκαρβοξυλίωση του γλουταμικού από το ένζυμο αποκαρβοξυλάση του γλουταμικού (GDC) το οποίο φέρει ως προσθετική ομάδα την φωσφορική πυριδοξάλη. Αποτελεί και αυτό, μόριο που συσσωρεύεται κατά την διάρκεια ποικίλων αβιοτικών καταπονήσεων, συμπεριλαμβανομένης της αλατότητας (Bouchet and Fromme 2004; Vasquez-Roubinet et al. 2008). Τέλος, η ορνιθίνη και η πουτρεσίνη είναι δυο άλλα αζωτούχα βιομόρια, που αναζητήσαμε κατά τη μεταβολική ανάλυση. Την πουτρεσίνη ως μια διαμίνη, που είναι γνωστό ότι συσσωρεύεται κατά την διάρκεια αβιοτικών καταπονήσεων (Flores et al. 1989; Rhodes 1999; Moschou et al. 2008,) και είχε ενδιαφέρον να εξετάσουμε τα επίπεδά της, υπό το φως πρόσφατων δεδομένων ότι ο καταβολισμός των πολυαμινών, δια των οξειδασών των πολυαμινών, επίσης παράγει EMO για την σηματοδότηση των επόμενων αποκρίσεων στην αλατική καταπόνηση (Moschou et al. 2008). Την ορνιθίνη επιλέξαμε να εξετάσουμε ως μια ουσία που αποτελεί άμεσο πρόδρομο της βιοσύνθεσης της πουτρεσίνης.

Από τα αποτελέσματά μας μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ακόμα και στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε 1μM AOA, συγκέντρωση στην οποία οι τρανσαμινάσες παραμένουν ενεργές και μειώνεται κατά πολύ ο χρόνος ημιζωής των μεταβολιτών που αναζητήσαμε, διαφαίνεται πιθανός αναβολικός ρόλος για την GDH. Ασφαλώς, στην αφομοιωτική διαδικασία συμμετέχει και η GS με την εναπομείνασα 20%, επί της συνολικής, ενεργότητάς της. Όμως αν η αφομοίωση προερχόταν αποκλειστικά από την GS, θα έπρεπε να παρατηρούμε το ίδιο ποσοστό σήμανσης μεταξύ όλων των ΓΤΦ που εξετάσαμε, στα οποία σημειωτέον η ενεργότητα της GS κυμαίνεται σε παρόμοια επίπεδα. Κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει και οι διάφορες σειρές διαφέρουν ως προς την ενσωμάτωση του σημασμένου αζώτου στους μεταβολίτες. Άλλωστε, πρέπει να έχουμε υπόψη ότι ο κύριος ρόλος της GDH

in vivo είναι καταβολικός (Purnell et al. 2007, Skopelitis et al. 2007; Lebboun et al. 2009), υπό φυσιολογικές συνθήκες και κατά συνέπεια στις σειρές υπερέκφρασης, που στο αλάτι φαίνεται να αυξάνουν ακόμα περισσότερο η αφθονία μεταγράφων και πρωτεϊνών, είναι αναμενόμενο η αφομοιωτική δράση να είναι μικρή εν συγκρίσει με τον επιτελούμενο καταβολισμό. Αυτός είναι ίσως ο λόγος που η αναβολική δράση της GDH στις σειρές *S-GDH;A* δεν καταγράφηκε με σαφήνεια, όταν χρησιμοποιήθηκε 1μM AOA (1μM AOA + 250mM NaCl + PPT, ¹⁵NH₄-fed φυτά). Όταν όμως χρησιμοποιήθηκε 1mM AOA (1mM AOA + 250mM NaCl + PPT or MSX, ¹⁵NH₄-fed φυτά), η κατά 50% παρατηρούμενη πτώση της δράσης των τρανσαμινασών ήταν αρκετή για να καταδειχθεί στατιστικά σημαντική ($P < 0,05$) αύξηση των επιπέδων του ανιχνευόμενου σημασμένου γλουταμικού. Την ίδια στιγμή, υπό τις ίδιες συνθήκες, τα φυτά *S-GDH;B* δεν παρουσίασαν την ίδια συμπεριφορά (Εικ 15). Οι αναλύσεις των σειρών υποέκφρασης επίσης συνηγορούν υπέρ του πρωτεύοντος καταβολικού ρόλου του ενζύμου, αφού η σειρά A63H (*A-GDH;B*) παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα γλουταμικού και γλουταμίνης (ολικά και σημασμένα) λόγω μειωμένου καταβολισμού (control, ¹⁵NH₄-fed φυτά). Υπενθυμίζεται ότι σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας για την εν λόγω σειρά, τα επίπεδα των mRNAs, τόσο του *GDH;A* όσον και του *GDH;B*, που κωδικοποιούν για την α- και τη β-GDH υπομονάδα, αντίστοιχα (Εικ. 5 και 6) ήταν ελάχιστα ανιχνεύσιμα στα φύλλα. Τα επίπεδα γλουταμικού στον χειρισμό της συνδυαστικής παροχής αναστολέων και αλατιού για τα *A-GDH;A* (1μM AOA + 250mM NaCl + PPT, ¹⁵NH₄-fed φυτά) είναι κατά πολύ υψηλότερα συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα στα *S-GDH;A*. Στον αντίστοιχο χειρισμό με 1mM AOA (1mM AOA + 250mM NaCl + PPT, ¹⁵NH₄-fed φυτά) δεν παρατηρήθηκε τέτοια ραγδαία διαφοροποίηση αλλά τα επίπεδα του γλουταμικού ήταν περίπου ίδια για τα *A-GDH;A* και *S-GDH;A* φυτά. Ως ένα βαθμό η εξήγηση έχει να κάνει με τον μειωμένο καταβολισμό του γλουταμικού στα φυτά υποέκφρασης.

Επισημάναμε νωρίτερα πως έχει διατυπωθεί η άποψη ότι ο καταβολισμός του γλουταμικού διενεργείται κυρίως με αντιδράσεις τρανσαμίνωσης (Brunk and Rhodes, 1988). Όμως, τα τελευταία χρόνια έχουν συσσωρευτεί πολλά δεδομένα υπέρ της σημαντικής συμβολής της GDH σε αυτόν τον καταβολισμό, είτε υπό φυσιολογικές συνθήκες (Purnell et al. 2007;

Skopelitis et al. 2007) είτε υπό συνθήκες, που απαιτείται αυξημένη παροχή ανθρακικών σκελετών (Myashita and Good, 2008). Από τα πειράματά μας δεν φάνηκε ότι η υποέκφραση της μιας υπομονάδας επηρεάζει αισθητά τα επίπεδα των ενεργών ισοενζύμων, στην συγκρότηση των οποίων υπερτερεί η άλλη υπομονάδα (Εικ. 7 και 8). Όμως το ζήτημα του ισοζυγίου μεταξύ των δύο υπομονάδων, της αλληλεπίδρασής τους και συνακόλουθα των ενεργών ισοενζύμων απαιτεί περισσότερη διερεύνηση.

Σε μια πολύ ενδιαφέρουσα εργασία αναφέρεται ότι, αν εισαχθεί στην *E.coli* η ανασυνδυασμένη GDH από το *Pyrobaculum islandicum* (pis-GDH), τότε το ανασυνδυασμένο ένζυμο έχει πολύ μικρότερη ενεργότητα από το φυσικό της *E.coli*. Αν όμως το ανασυνδυασμένο ένζυμο βραστεί στους 90°C ή υποστεί κατεργασία με 5M ουρίας, τότε αυξάνεται κατακόρυφα η ενεργότητά του πλησιάζοντας τα επίπεδα του φυσικού ενζύμου της *E.coli*. Κατόπιν κρυσταλλογραφικών αναλύσεων οι ερευνητές οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα, ότι για την αύξηση της ενεργότητας του ανασυνδυασμένου ενζύμου απαιτείται η αλλαγή της τεταρτοταγούς δομής του εξαμερούς ολοενζύμου (Goda et al. 2005). Μπορούμε συνεπώς να εικάσουμε, για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των μεταβολικών αναλύσεων των A-GDH;A φυτών, ότι είναι πιθανόν η μείωση των επιπέδων της α- υπομονάδας να επάγει αύξηση της ενεργότητας των ισοενζύμων, που συγκροτούνται από τις εναπομείνουσες α- υπομονάδες, κατόπιν μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων των υπομονάδων, που με τη σειρά τους συνεπάγονται ελαφρές αλλαγές στην τεταρτοταγή δομή του ολοενζύμου. Το αποτέλεσμα θα ήταν να μην γίνεται «αισθητή» η καταστολή σε επίπεδο ενεργότητας του ολοενζύμου. Το ότι κάτι τέτοιο δεν το παρατηρούμε στις μετρούμενες *in vitro* ενεργότητες ή στα ισοενζυμικά πρότυπα, οφείλεται στο ότι αφενός οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις δεν διατηρούνται υπό τις συνθήκες της εκχύλισης, αφετέρου μικρές αλλαγές στην τεταρτοταγή δομή δεν είναι απαραίτητο να καταλήγουν σε αλλαγή της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας.

Οι συγκεντρώσεις του ασπαρτικού και της ασπαραγίνης στου χειρισμούς με αλάτι και 1μM AOA δείχνουν αυξητικές τάσεις (Εικ 12). Αυτό το αποτέλεσμα μπορούμε να ερμηνεύσουμε με το δεδομένο ότι οι τρανσαμινάσες είναι ενεργές. Έτσι μεγάλο ποσοστό του γλουταμικού απαμινώνεται προς παραγωγή ασπαρτικού από την AsAT, ενώ με την δράση

της συνθετάσης της ασπαραγίνης (AS) συντίθενται τα υψηλά επίπεδα της ασπαραγίνης. Ένα επίσης ενδιαφέρον σημείο είναι ότι οι διακυμάνσεις της ορνιθίνης δεν φαίνεται να συμβαδίζουν απόλυτα με αυτές της πουτρεσίνης στους διάφορους χειρισμούς. Η εξήγηση ίσως σχετίζεται με το ότι η αποκαρβοξυλίωση της ορνιθίνης (καταλυόμενη από την αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης, ODC) στην επαγόμενη από καταπόνηση σύνθεση της πουτρεσίνης συμβάλλει σε αμελητέο ποσοστό συγκριτικά με την οδό βιοσύνθεσης που συμμετέχει η αποκαρβοξυλάση της αργινίνης (ADC) (Rhodes, 1999, Primikiriou and Roubelakis-Angelakis, 1999).

Από τα αποτελέσματα των μεταβολικών αναλύσεων των ¹⁵Glu-fed φυτών οδηγούμαστε σε ανάλογα συμπεράσματα με τα ως τώρα διατυπωθέντα. Παρατηρείται τάση αύξησης στα επίπεδα του γλουταμικού των ΓΤΦ υποέκφρασης (1μM AOA +250mM NaCl + PPT, ¹⁵Glu-fed φυτά) συγκριτικά με τα υπερέκφρασης, πιθανότατα λόγω του ότι τα τελευταία καταβολίζουν εντονότερα. Το ότι στους αντίστοιχους χειρισμούς η γλουταμίνη δεν ακολουθεί πιστά το ίδιο πρότυπο διακυμάνσεων, οφείλεται στο ότι το προσλαμβανόμενο από το υπόστρωμα γλουταμικό διοχετεύεται γρήγορα και προς άλλες οδούς με τη δράση των τρανσαμινασών. Το πρότυπο της διακύμανσης του ασπαρτικού ακολουθεί το αντίστοιχο του γλουταμικού στους διάφορους χειρισμούς, αποτέλεσμα απολύτως συμβατό με την απρόσκοπτη λειτουργία της αμινοτρανσφεράσης του ασπαρτικού. Στους χειρισμούς με αλάτι αυξάνονται, κατά τα αναμενόμενα, η πουτρεσίνη, η προλίνη και το GABA (Εικ.13).

Αυτό που προκαλεί εντύπωση σε κάποιον που παρακολουθεί την σχετική βιβλιογραφία, είναι πως ο *in vivo* αφομοιωτικός ρόλος της GDH υποστηρίζεται απρόθυμα και διστακτικά από τους ερευνητές ακόμα κι όταν τα αποτελέσματά των ερευνών τους δίνουν σαφείς ενδείξεις. Για παράδειγμα, οι Limami et al. (2008), μελετώντας καταστάσεις υποξίας, αναφέρουν επαγωγή του γονιδίου *GDH1* (ακολουθούν την ονοματολογία κατά Turano et al. 1997) και αυξημένη ενεργότητα της GDH. Μελετώντας την μεταβολική τύχη ¹⁵N-NH₄ με πειράματα παρόμοια με αυτά που περιγράφονται στην παρούσα εργασία, εντοπίζουν σημαντική ενσωμάτωση της σήμανσης στο γλουταμικό όταν χρησιμοποιούν MSX και 20-30mM ¹⁵N-NH₄. Περιέργως ωστόσο, κάνουν λόγο για μη ενζυμική ενσωμάτωση σημασμένου αζώτου στο γλουταμικό και

αποδίδουν στην GDH βασικό καταβολικό ρόλο (Limami et al. 2008). Όμως τονίζουμε και πάλι, ο καταβολισμός που κατά κύριο λόγο επιτελεί η GDH *in planta*, δεν τίθεται υπό αίρεση από τα αποτελέσματά μας. Τουναντίον, εξηγούνται επαρκώς μόνο εφόσον έχουμε κατά νου αυτήν την πρωταρχική ιδιότητα του ενζύμου. Μια ιδιότητα που περιπλέκει *a priori* το εγχείρημά μας, καθώς επιχειρήσαμε, υπερκεράζοντας ένα ένζυμο που ασκεί πρωτίστως μεταβολικό έργο, να ανιχνεύσουμε την κατά πολύ μικρότερο βαθμό επιτελούμενη αναβολική συνιστώσα της δράσης του. Επιπρόσθετα, οι Labium et al (2009) σχολιάζοντας τα αποτελέσματά τους καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η πρωταρχική μεταβολική δραστηριότητα της GOD συνεισφέρει στην διατήρηση της ομοιόστασης του υλοτομικού οξέος εντός του κυττάρου. Θα μπορούσε κανείς να ισχυριστεί, ότι επειδή σε τόσο σημαντικούς μεταβολίτες, όπως το υλοτομικό οξύ, οι ομοιωματικοί μηχανισμοί δεν επιτρέπουν τεράστιες αποκλίσεις από το επίπεδο ισορροπίας που υφίσταται υπό φυσιολογικές συνθήκες (steady state level), δεν θα μπορούσαμε να ανιχνεύσουμε την αναβολική δραστηριότητα με την προσέγγισή μας. Όμως, η υπερκέραση σε φυτά καπνού της GOD από *E.coli*, έναν οργανισμό όπου η GOD κατά κανόνα αναβλύζει, οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων και του υλοτομικού και της γλυτωμένης (Munggrup et al. 2005). Άρα, στα δικά μας πειράματα, ο λόγος που οι διαφορές που εντοπίζουμε (στις οποίες και βασίζουμε την επιχειρηματολογία μας υπέρ του επαγόμενου αφομοιωτικού ρόλου) δεν είναι ιδιαίτερα έντονες (είναι όμως στατιστικά σημαντικές, EAK 15), οφείλεται όχι σε υποκείμενους ομοιωματικούς μηχανισμούς, αλλά σε αυτή καθαυτή την φύση της φυτικής GOD, η οποία πρωτίστως καταβολίζει και υπό συνθήκες καταπόνησης αναβολίζει συνεπικουρικά.

Πάρα πολύ ενδιαφέροντα ευρήματα απέφεραν έρευνες της επίδρασης αλατιού στο σιτάρι (*Triticum aestivum*). Όταν τα φυτά υποβλήθηκαν σε μέτριας οξύτητας καταπόνηση, με χορήγηση 150 mM αλατιού για πέντε ημέρες, παρατηρήθηκε αύξηση στην ενεργότητα της GS αλλά όχι στην αμινωτική ενεργότητα της GDH. Αντίθετα, όταν η συγκέντρωση του αλατιού διπλασιάστηκε, τότε στο ίδιο χρονικό διάστημα η ενεργότητα της GS βρέθηκε να μειώνεται και η αμινωτική ενεργότητα της GDH αυξήθηκε σημαντικά. Παράλληλα όμως, στα 300mM αλατιού αλλά όχι στα 150mM, εντοπίστηκε

αυξημένη και η ενεργότητα της 1-πυρρολίνιο-5-καρβοξυλικής αναγωγάσης (P5CS). Το ένζυμο αυτό καταλύει το ρυθμοκαθοριστικό στάδιο στην βιοσύνθεση της προλίνης. Οι ερευνητές προτείνουν ότι υπό μέτριας οξύτητας καταπόνηση τον κύριο αφομοιωτικό ρόλο διατηρεί η GS αλλά στην πολύ οξεία καταπόνηση η αμινωτική πορεία της GDH συμβάλλει σημαντικά (Wang et al. 2007). Πιο ήπιες συγκεντρώσεις άλατος χρησιμοποίησαν, επίσης, οι Silveira et al. (2003) δουλεύοντας με φύλλα του *Anacardium occidentale*. Καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η GS ασκεί το κύριο αφομοιωτικό έργο κατά τις συνθήκες καταπόνησης που εφάρμοσαν. Ακριβώς για αυτόν τον λόγο στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκαν οι αναστολείς της GS, ώστε όποια και να ήταν η επίδραση του αλατιού σε αυτή, να εξασφαλιστεί η δραστική μείωσή της στα ίδια επίπεδα (Εικ 11) σε όλες τις τρανσγενικές σειρές που χρησιμοποιήσαμε, και να δειχθεί, επί τη βάση της επιχηρηματολογίας που ήδη αναπτύξαμε, ο αφομοιωτικός ρόλος της GDH.

Επειδή στόχος της δημιουργίας των ΓΤΦ ήταν και η πιθανή ανάδειξη ανθεκτικότητας στην αλατότητα, πραγματοποιήθηκε και λεπτομερής φαινοτυπική ανάλυση των ΓΤΦ και των αντίστοιχων WT παρουσία και απουσία αλατιού. Το ενδιαφέρον μας προς αυτή την κατεύθυνση υποκινήθηκε από το γεγονός ότι, αν παρατηρούσαμε κάποια αυξημένη παραγωγικότητα σε κάποια εκ των ΓΤ σειρών υπό συνθήκες control ή φαινότυπο ανθεκτικότητας υπό συνθήκες χορήγησης αλατιού, το βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον θα ήταν τεράστιο. Και αυτό, διότι ο ολοένα αυξανόμενος πληθυσμός της γής επιβάλλει την διαρκώς εντατικότερη χρήση αζωτούχων λιπασμάτων στην πρακτικά σταθερής έκτασης καλλιεργήσιμη γη. Οι περιβαλλοντικές προκλήσεις είναι τεράστιες και η απαίτηση για φυτά ικανά προς αυξημένη αποδοτικότητα χρήσης αζώτου (Nitrogen Use Efficiency , NUE) στρέφει την έρευνα προς τις πορείες αφομοίωσης αζώτου (Hirel et al. 2007). Ταυτόχρονα, περί τα 800 εκατομμύρια εκτάρια γης ανά την υφήλιο επηρεάζονται από υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού (Munns and Tester, 2008). Είναι εξαιρετικά ελκυστική η έρευνα γύρω από τα ανθεκτικά στην αλατότητα φυτά υπό το κράτος αυτών των δεδομένων. Δυστυχώς όμως, όπως καταδεικνύεται από τα αποτελέσματά μας, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην βιομάζα ανάμεσα στις σειρές που εξετάστηκαν, ούτε κάποια εξ αυτών παρουσίαζε ανθεκτικό φαινότυπο (Εικ 16 και 17).

Συμπερασματικά, η συνεκτίμηση όλων των αποτελεσμάτων στα οποία οδήγησε η εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας επιτρέπει τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Επιβεβαιώνεται ότι η καταπόνηση από αλάτι οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του mRNA, που κωδικοποιεί για την α- υπομονάδα της GDH, αύξηση των επιπέδων της ανοσοενεργούς α-υπομονάδας και των συγκροτούμενων από αυτήν ανοδικών ισοενζύμων (Εικ. 5, 6, 7, 8).
- Επιβεβαιώνεται ότι ο φυσιολογικός ρόλος όλων των ισοενζύμων είναι πρωτίστως καταβολικός, υπό φυσιολογικές συνθήκες. Μόνο τα ανοδικά ισοένζυμα παρουσιάζουν μικρή αναβολική αφομοιωτική ενεργότητα σε καταστάσεις καταπόνησης, συνεπικουρώντας στον κύκλο GS/GOGAT από τον οποίο επιτελείται το κύριο αφομοιωτικό έργο (Εικ 12, 13, 15).
- Η αλλαγή των επιπέδων έκφρασης της GDH σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο με χρήση ΓΤΦ (σταθερής ενσωμάτωσης του διαγονιδίου) δεν οδηγεί σε αυξημένη ικανότητα του φυτού να αντεπεξέλθει στα συμπτώματα, που συνοδεύουν την καταπόνηση από αλατότητα, ούτε σε αυξημένη βιομάζα υπό κανονικές συνθήκες ανάπτυξης.
- Προκύπτουν ενδείξεις σύμφωνα με τις οποίες η ρύθμιση της ανόδου του mRNA της α- υπομονάδας, που προκαλείται με την καταπόνηση από το αλάτι, δεν επιτελείται μόνο σε μεταγραφικό επίπεδο μέσω των stress responsive elements του ενδογενούς υποκινητή του αντίστοιχου γονιδίου, αλλά και σε μεταμεταγραφικό επίπεδο. Ο μηχανισμός της μεταμεταγραφικής αυτής ρύθμισης ενδεχομένως σχετίζεται με αύξηση της σταθερότητας του mRNA. Αντίστοιχα, ο ίδιος μηχανισμός ενδεχομένως σχετίζεται με την διαπιστωμένη ανθεκτικότητα της GDH στην επαγόμενη από την καταπόνηση πρωτεόλυση.

Στις μελλοντικές προοπτικές του θέματος, που πραγματεύεται η παρούσα διατριβή, μπορούμε να προτείνουμε την ανάλυση των υποκινητών των γονιδίων, που κωδικοποιούν για τις δύο υπομονάδες της GDH, ώστε να απαντηθούν τα ερωτηματικά σχετικά με την μεταγραφική ρύθμιση, αλλά και ο έλεγχος της υπόθεσης εργασίας που διατυπώνεται με οδηγό ορισμένα από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, ότι

δηλαδή για τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις δύο υπομονάδες της GDH ενδεχομένως η ρύθμιση επιτελείται και σε μεταμεταγραφικό επίπεδο.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adav, S.S., Lee, D.-J., Show, K.-Y., Tay, J.-H (2008).** Aerobic granular sludge: Recent advances *Biotechnology Advances* 26 (5), pp. 411-423
- Alfonzo, J.D., Thiemann, T. and Simpson, L. (1997)** The mechanism of U insertion/deletion RNA editing in kinetoplastid mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 25, 3751-3759
- Anderson, M. P., Vance, C, P., Heichel, G, H., and Miller, S. S.(1989).** Purification and characterization of NADH-glutamate synthase from alfalfa root nodules . *Plant Physiol.*, 90: 351-358
- Andersson, J. & Roger, A. (2003)** Evolution of glutamate dehydrogenase genes: evidence for lateral gene transfer within and between prokaryotes and eukaryotes. *BMC Evolutionary Biology* 3, article 14
- Andronis and K.A Roubelakis Angelakis (2009)** Short term salinity stress in tobacco plants leads to the onset of animal-like PSD hallmarks *in planta* in contrast to long term stress. In press
- Apel K and H. Hirt, (2004)** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, pp. 373–399
- Aslam, M., Travis, R. L., and Huffaker, R. C. (1992).** Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiol.*, 99 1124-1133.
- Aslam, M., Travis, R. L., and Nuffaker, R. C. (1994).** Stimulation of nitrate and nitrite efflux by ammonium in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiol.* 1, 06: 1293-1301
- Astolfi S, Zuchi S, Passera C. (2004).** Role of sulphur availability on cadmium-induced changes of nitrogen and sulphur metabolism in maize (*Zea mays* L.) leaves. *J. Plant Physiol.* 161: 795-802
- Aubert S, Bligny R, Douce R, Ratcliffe RG, Roberts JKM (2001)** Contribution of glutamate dehydrogenase to mitochondrial metabolism studied by ¹³C and ³¹P nuclear magnetic resonance. *J Exp Bot* 52 37–45

- Bardgett RD. (2005).** *The biology of soil: a community and ecosystem approach.* Oxford, UK: Oxford University Press.
- Becker TW, Carrayol E, Hirel B (2000).** Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase isoforms in maize leaves: localization, relative proportion and their role in ammonium assimilation or nitrogen transport *Planta*. Nov;211(6):800-6
- Benachenhou-Lahfa, P. Forterre and B. Labedan, (1993)** Evolution of glutamate dehydrogenase genes: evidence for two paralogous protein families and unusual branching patterns of the archaeobacteria in the universal tree of life. *J. Mol. Evol.* 36 (1993), pp. 335–346
- Bernard SM, Habash DZ. (2009)** The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytologist* 182(3): 608-620
- Betti M, Arcondeguy T, Marquez AJ. (2006).** Molecular analysis of two mutants from *Lotus japonicus* deficient in plastidic glutamine synthetase: functional properties of purified GLN2 enzymes. *Planta* **224**: 1068–1079.
- Blackwell RD, Murray AJS, Lea PJ, Kendall A, Hall NP, Turner JC, Wallsgrove RM. (1988).** The value of mutants unable to carry out photorespiration. In: Govindjee, Bohnert HJ, Bottomley W, Bryant DA, Mullett JE, Ogren WL, Pakrasi H, Somerville CR, eds. *Molecular biology of photosynthesis.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 677–698
- Bone, D. H. (1959).** Glutamic dehydrogenase of mung bean mitochondria. – *Nature* **184**: 990
- Britto, D.T., Kronzucker, H.J. (2002).** NH₄⁺ toxicity in higher plants: A critical review.. *Journal of Plant Physiology*
- Britto DT, Kronzucker HJ. (2005).** Plant nitrogen transport and its regulation in changing soil environments. *Journal of Crop Improvement* 15: 1–23
- Britto, D.T., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., Kronzucker, H.J. (2001).** Futile transmembrane NH₄⁺ cycling: A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants.. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 98, 4255-4258

- BRUNK D.G., AND DAVID RHODES* (1988)** Amino Acid Metabolism of *Lemna minor* L.1 III. RESPONSES TO AMINOOXYACETATE *Plant Physiol.* 87, 447-453
- Camardella, L., Di Fraia, R., Antignani, A., Ciardiello, M. A., di Prisco, G., Coleman, J. K., Buchon, L., Guespin, J. & Russell, N. J. (2002).** The Antarctic *Psychrobacter* sp. TAD1 has two cold-active glutamate dehydrogenases with different cofactor specificities. Characterisation of the NAD⁺-dependent enzyme. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **131**, 559–567
- Cammaerts and Jacobs, (1983).** D. Cammaerts and M. Jacobs, A study of the polymorphism and the genetic control of the glutamate dehydrogenase isozymes in *Arapidopsis thaliana*. *Plant Sci. Lett.* 31 (1983), pp. 65–73
- Campbell WH (1996)** Nitrate reductase biochemistry comes of age. *Plant Physiol* 111:355-361
- Cánovas FM, Ávila C, Cantón FR, Canas RA, de la Torre F. (2007).** Ammonium assimilation and amino acid metabolism in conifers. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2307–2318
- Cao R, Huang XH, Zhou Q, Cheng XY. (2007)** Effects of lanthanum(III) on nitrogen metabolism of soybean seedlings under elevated UV-B radiation. *J Environ Sci (China)*;19(11):1361-6.
- Chen YF, Wang Y, Wu WHL (2008)** Membrane transporters for nitrogen, phosphate and potassium uptake in plants. *J Integr Plant Biol*, 50:835-848.
- Cunliffe, D., Leason, M., Parkin, D., and LePa. ,J . (1983).** The inhibition of glutamate dehydrogenase by derivatives of isophthalic acid. *phytochemistry*, **22**: 1357-1360
- Διαμαντίδης Γρηγόρης, (2007)** Εισαγωγή στη Βιοχημεία. University studio press
- Debouba, M., Gouia, H., Suzuki, A., Ghorbel, M.H. (2006)** NaCl stress effects on enzymes involved in nitrogen assimilation pathway in tomato "*Lycopersicon esculentum*" seedlings *Journal of Plant Physiology* 163 (12), pp. 1247-1258.
- Debouba, M., Gouia, H., Valadier, M.-H., Ghorbel, M.H., Suzuki, A. (2006)** Salinity-induced tissue-specific diurnal changes in nitrogen assimilatory

enzymes in tomato seedlings grown under high or low nitrate medium *Plant Physiology and Biochemistry* 44 (5-6), pp. 409-419

Dry IB, Wiskich JT (1986) Comparative aspects of amino-oxyacetate inhibition of glycine oxidation and aminotransferase activity in pea leaf mitochondria. *Plant Sci* 44: 23–28

Dougall, D. K. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58, 639-646

Dubois, F., Brugiere, N., Sangwan, R. S., and Hirel, (1996). Localization of tobacco cytosolic glutamine synthetase enzymes and the corresponding transcripts shows organ specific and cell specific patterns of protein synthesis and gene expression *P. lant Mol. Biol.*, 31: 803-817.

Dubois, F., Terce´ -Laforgue, T., Gonzalez-Moro, M.B., Estavillo, J.M., Sangwan, R., Gallais, A., and Hirel, B. (2003). Glutamate dehydrogenase in plants: Is there a new story for an old enzyme? *Plant Physiol. Biochem.* 41, 565–576.

Edwards J.W. & G.M. Corruzzi, (1990). Cell-specific gene expression in plants. *Ann. Rev. Genet.* 24: 275–303

Evstigneeva, Z. G., N. A. Solov'eva, and L. I. Sidel'nikova Methionine Sulfoximine and Phosphinothrycin (2003) : A Review of Their Herbicidal Activity and Effects on Glutamine Synthetase *Applied Biochemistry and Microbiology, Vol. 39, No. 6, , pp. 539–543.*

Ferguson, S. J. (1998). Nitrogen cycle enzymology. *Curr Opin Chem Biol* 2, 182–193

.Ficarelli, A., Tassi, F., and Restivo, F.M. (1999). Isolation and characterization of two cDNA clones encoding for glutamate dehydrogenase in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Cell Physiol.* 40, 339–342.

Flores, H. E., Protacio, C. M., and Signs, M. W. (1989). Primary and secondary metabolism of polyamines in plants. *Plant Nitrogen Metabolism* (J. E. Poulton, J. T. Romeo, E. E. Conn,eds.), *Recent Adv. Phytochem.*, 23: 329-393.

Forde BG, Lea PJ. 2007. Glutamate in plants: metabolism, regulation and signalling. *Journal of Experimental Biology* 58: 2339–2358.

Fox GG, Ratcliffe RG, Robinson SA, Stewart GR (1995) Evidence for deamination by glutamate dehydrogenase in higher plants. Commentary. *Can J Bot* 73 1112–1115

Foyer CH, Bloom AJ, Queval G, Noctor G. (2009). Photorespiratory metabolism: Genes, mutants, energetics and redox signaling. *Annu Rev Plant Biol* 60. In press.

Francis, C. A., J. M. Beman, and M. M. M. Kuypers. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *The ISME Journal* 1:19-27

Glass ADM, Britto DT, Kaiser BN, Kinghorn JR, Kronzucker HJ, Kumar A, Okamoto M, Rawat S, Siddiqi MY, Unkles SE et al. 2002. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 855–864.

Goda S, Kojima M, Nishikawa Y, Kujo C, Kawakami R, Kuramitsu S, Sakuraba H, Hiragi Y, Ohshima T. (2005) Intersubunit interaction induced by subunit rearrangement is essential for the catalytic activity of the hyperthermophilic glutamate dehydrogenase from *Pyrobaculum islandicum*. *Biochemistry*. 22;44(46):15304-13.

Goff S.A., Ricke D., Lan T.-H., Presting G., Wang R., Dunn M., Glazebrook J., Briggs S (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica) *Science*, 296 (5565), pp. 92-100

Gupta P, Gadre R. (2005) Increase in NADH-glutamate dehydrogenase activity by mercury in excised bean leaf segments. *Indian J Exp Biol*. Sep;43(9):824-8.

Gupta KJ, Stoimenova M, Kaiser WM (2005) . In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, in vitro and in situ. *J. Exp. Bot.* 56: 2601-2609.

Haiech, J., & Sallantin, J. (1985) Computer search of calcium binding sites in a gene data bank: use of learning techniques to build an expert system *Biochimie* 67, 555-560.

HALPERNY, . S. & UMBARGEHR,. E. (1960). Conversion of ammonia to amino groups in *Escherichia coli*. *J . Bact.* 80, 285.

Hayatsu, M., Tago, K., Saito, M. (2008). Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54, 33-45

Hiesel, R., Wissinger, B., Schuster, W. and Brennicke, A.(1989) RNA editing in plant mitochondria. *Science* 246, 1632-1634

Hirel B, Le Gouis J, Ney B, Gallais A (2007) The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches.. *J Exp Bot.*;58(9):2369-87

Howard J. B., D. C. Rees (1994), *Annu. Rev. Biochem.* 63, 235

Hu Y, Fay AW, Lee CC, Yoshizawa J, Ribbe MW (2008) . Assembly of nitrogenase MoFe protein. *Biochemistry.*;47:3973–3981

KANAMORKI, , WEISS,R . L. & ROBERTSJ,. D. (1987). Ammonia assimilation in *Bacillus polymyxa*. *Journal of Biological Chemistry* 262, 11038-1 1045.

Kapp, L.D.; Lorsch, J.R. (2004), "The Molecular Mechanics of Eukaryotic Translation", *Annual Review of Biochemistry* 73 (1): 657–704

Kendall A, Keys A, Turner J, Lea P, Mifflin B. (1983). The isolation and characterization of a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 159, 505–511

Kronzucker, H.J., Siddiqi, M. Y., and Glass, A.D.M (1995).

Compartmentation and Flux characteristics of nitrate in spruce. *Planta*, 196: 674-682

Kowalchuk G A; Stephen J R (2001) Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annual review of microbiology* ;55():485-529

KUO-HOWERE CHOU AND WALTER E. SPLITTSTOESSER (1972) Glutamate Dehydrogenase from Pumpkin Cotyledons *Plant Physiol.* 49, 550-554

Labboun, Thérèse Tercé-Laforgue, Albrecht Roscher, Magali Bedu, Francesco M. Restivo, Christos N. Velanis, Damianos S. Skopelitis, Panagiotis N. Moshou, Kalliopi A. Roubelakis-Angelakis, Akira Suzuki and Bertrand Hirel (2009) Resolving the Role of Plant Glutamate Dehydrogenase. I. in vivo Real Time Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Experiments *Plant and Cell Physiology* 50(10):1761-1773

Lacuesta, M., B. González-Moro, C. González-Murua, and A. Muñoz-Rueda. (1990a.) Temporal study of the effect of phosphinothricin on the

activity of glutamine synthesis, glutamate dehydrogenase and nitrate reductase in *Medicago sativa* L. J. Plant Physiol 136:410–414.

Lacuesta, M., B. González-Moro, C. González-Murua, and A. Muñoz-

Rueda. (1990b) Time-course effect of phosphinothricin (PPT) on photosynthesis in *Medicago sativa*. Plant Physiol 93:(Suppl. 1). 161.

Lea, P.J. and Ireland, R.J. (1999) "Nitrogen metabolism in higher plants" in "Plant Amino Acids" edited by B. Singh. Marcel Dekker, NY publ. pp 1-47.

Lea, P.J., and Mifflin, B.J. (1974). An alternative route for nitrogen assimilation in plants. Nature 251, 680–685.

Lea PJ, Morot-Gaudry. 2001. *Plant nitrogen*. Berlin: Springer-Verlag.

Lea, P. J., Rowland-Bamford, A.J., and Wolfenden J. (1996). The effect of air pollutants and elevated carbon dioxide on nitrogen metabolism. Plant Responses to Air Pollution (M. Yunus and M. Iqbal, eds) John Wiley & Sons, New York, pp. 319-352

Limami AM, Rouillon C, Glevarec G, Gallais A, Hirel B (2002). Genetic and physiological analysis of germination efficiency in maize in relation to nitrogen metabolism reveals the importance of cytosolic glutamine synthetase. Plant Physiol **130** 1860–1870

Limami , A.M. , Glivarec , G. , Ricoult , C. , Cliquet , J.B. and Planchet , E. (2008) Concerted modulation of alanine and glutamate metabolism in young *Medicago truncatula* seedlings under hypoxic stress . *J. Exp. Bot.* 59 : 2325 – 2335

Loulakakis K.A., J.F. Morot-Gaudry, C.N. Velanis, D.S. Skopelitis , P.N. Moschou, B. Hirel & K.A. Roubelakis-Angelakis (2009). ADVANCEMENTS IN NITROGEN METABOLISM IN GRAPEVINE Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology, pp 161-197

Loulakakis KA, Roubelakis-Angelakis KA (1990a) Intracellular localization and properties of NADH-Glutamate dehydrogenase from *Vitis vinifera* L: purification and characterization of the major leaf isoenzyme. J Exp Bot 41:1223-1230

Loulakakis KA, 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 Physiol 97:104-111

- Loulakakis KA, Roubelakis-Angelakis KA, Kanellis AK (1996)** Isolation of functional RNA from grapevine tissues poor in nucleic acid content. *Am J Enol Vitic* 47:181-185
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951)** Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275
- Maaroufi Dguimi H, Debouba M, Ghorbel MH, Gouia H (2009)**. Tissue-specific cadmium accumulation and its effects on nitrogen metabolism in tobacco (*Nicotiana tabaccum*, Bureley v. Fb9). *C R Biol. Jan*;332(1):58-68.
- Maathuis FJ. (2009)** Physiological functions of mineral macronutrients
Curr Opin Plant Biol. Jun;12(3):250-8
- Mack G, Tischner R (1994)** Constitutive and inducible net NH₄⁺ uptake of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *J Plant Physiol* 144: 351-357
- Mailloux RJ, Singh R, Brewer G, Auger C, Lemire J, et al. (2009)** Alpha-ketoglutarate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase work in tandem to modulate the antioxidant alpha-ketoglutarate during oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* 191: 3804–3810
- Magalhaes JR, Grace PJ, Rich D, Rhodes D (1990)** Kinetics of ¹⁵NH₄ assimilation in *Zea mays*. *Plant Physiol* 94 647–656
- Magalhaes JR (1991)** Kinetics of ¹⁵NH₄ assimilation in tomato plants: evidence for ¹⁵NH₄ assimilation via GDH in tomato roots
- Maki H., Ushioda A., Abiko T., Hayakawa T., Yamaya T. 2002.** Cloning and expression analysis of NADH-glutamate dehydrogenase in rice plants. - *Plant Cell Physiol.* 43 (Suppl.): 127.
- Manderscheid, R and Wild,A (1986):** Studies on the mechanism of inhibition by PPT on glutamine synthetase isolated from *Triticum Aestivum*. L. *Plant physiology* 123., 135-142
- Markmann K, Parniske M. (2009)** Evolution of root endosymbiosis with bacteria: How novel are nodules? *Trends Plant Sci.* Feb;14(2):77-86.
- Markert,Y., Koditz,J., Mansfeld,J., Ulrich, A., Ulbrich-Hofmann, R . (2001)** Increased proteolytic resistancsc of ribonuclease A by protein engineering *Prot. Eng.* Vol 14, No 10 pp 791-714

- Masclaux-Daubresse C, Valadier M-H, Carrayol E, Reisdorf-Cren M, Hirel B (2002)** Diurnal changes in the expression of glutamate dehydrogenase and nitrate reductase are involved in the C/N balance of tobacco source leaves. *Plant, Cell and Environment* **25**: 1451-1462
- Masclaux C, Valadier MH, Brugière N, Morot-Gaudry JF, Hirel B (2000)** Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* **211**:510-518
- Mastorodemos, V., Kotzamani, D., Zaganas, I., Arianoglou, G., Latsoudis, H., Plaitakis, A (2009).** Human GLUD1 and GLUD2 glutamate dehydrogenase localize to mitochondria and endoplasmic reticulum *Biochem. Cell. Biol*
- Matoh, T., and Takahashi, E. (1982).** Changes in the activities of ferredoxin- and NADH-glutamate synthase during seedling development of peas. *Planta* **154**, 289–294.
- Melo-Oliveira, R., Cinha-Oliveira, I., and Coruzzi, G.M. (1996).** Arabidopsis mutant analysis and gene regulation define a non-redundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 4718–4723.
- Mifflin BJ, Habash DZ. 2002.** The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *Journal of Experimental Botany* **53**: 979–987.
- Minambres, B., E. R. Olivera, R. A. Jensen, and J. M. Luengo. (2000).** A new class of glutamate dehydrogenase (GDH). Biochemical and genetic characterization of the first member, the AMP-requiring NAD-specific GDH of *Streptomyces clavuligerus*. *J. Biol. Chem.* **275**:39529–39542.
- Miyashita Y, Good AG (2008)** NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation. *J Exp Bot* **59**:667–680
- Morkunas I, Lehmann T, Ratajczak W, Ratajczak L, Tomaszewska B (2000).** The involvement of glutamate dehydrogenase in the adaptation of mitochondria to oxidize glutamate in sucrose starved pea embryos. *Acta Physiol Plant* **22**(4): 389–394

Moschou PN, Paschalidis KA, Delis ID, Andriopoulou AH, Lagiotis GD, Yakoumakis DI, Roubelakis-Angelakis KA (2008) Spermidine exodus and oxidation in the apoplast induced by abiotic stress is responsible for H₂O₂ signatures that depict tolerance responses in tobacco. *Plant Cell* 20:1708-1724

Mungur R, Glass AD, Goodenow DB, Lightfoot DA (2005) . Metabolite fingerprinting in transgenic *Nicotiana tabacum* altered by the *Escherichia coli* glutamate dehydrogenase gene *J Biomed Biotechnol.* Jun 30;2005(2):198-214.

Munns R. and M. Tester (2008), Mechanisms of salinity tolerance, *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, pp. 651–681

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497

Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1999a). Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 461, 205–210.

Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Sanada, Y., Wada, K., Tsukaya, H., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1999b). Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 18, 185–193.

Neeman M, Aviv D, Degani H, Galun E (1985) Glucose and glycine metabolism in regenerating tobacco protoplasts: followed nondestructively by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiol* 77 374–378

Nicolas Bouché—and Hillel FrommeGABA in plants (2004) : just a metabolite? *Trends in Plant Science* Volume 9, Issue 3, , Pages 110-115

Nigel M. Crawford Michael L. Kahn Thomas Leustek Sharon R. Long (2001). Nitrogen and sulphur- *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, chapter 16

Ortega, J.L., Temple, S.J. and Sengupta-Gopalan, C. (2001) Constitutive overexpression of cytosolic glutamine synthetase (GS1) gene in transgenic alfalfa demonstrates that GS1 may be regulated at the level of RNA stability and protein turnover. *Plant Physiol.* 126, 109–121.

- Ortega J. L , Salvador Moguel-Esponda, Carol Potenza, Cristina F. Conklin, Anita Quintana and Champa Sengupta-Gopalan (2006).** The 3A untranslated region of a soybean cytosolic glutamine synthetase (GS1) affects transcript stability and protein accumulation in transgenic alfalfa *The Plant Journal* 45, 832–846
- Osuji, G. O. and Madu W.C. C. (1995).** Ammonium ion-dependent isomerisation of glutamate dehydrogenase in relation to glutamate synthesis in maize. *Phytochemistry* 39 : 495-503.
- Osuji GO, Konan J, M'Mbijewe (2004).** RNA synthetic activity of glutamate dehydrogenase: determination of enzyme purity, RNA characteristics, and deamination/amination ratio. *Appl Biochem Biotechnol.* Dec;119(3):209-28
- Oldroyd G. E., Downie J. A. (2008)** Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology* 59 519-546
- Pageau K, Reisdorf-Cren M, Morot-Gaudry JF, Masclaux-Daubresse C. 2006** The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. *J Exp Bot.*;57(3):547-57
- Paczek V, Dubois F, Sangwan R, Morot-Gaudry JF, Roubelakis-Angelakis KA, Hirel B (2002)** Cellular and subcellular localisation of glutamine synthetase and Glutamate dehydrogenase in grapes give new insights on the regulation of C and N metabolism. *Planta* 216:245-254
- Pathak BK, Kazama F, Tanaka Y, Mori K, Sumino T. (2007)** Quantification of anammox populations enriched in an immobilized microbial consortium with low levels of ammonium nitrogen and at low temperature *Appl Microbiol Biotechnol.* Oct;76(5):1173-9
- Paul EA, Clark FE. (1996).** *Soil microbiology and biochemistry*, 2nd edn. San Diego, CA, USA: Academic Press Ltd.
- Pavesi A., Ficarelli A., Tassi F. and Restivo F.M. (2000).** Cloning of two glutamate dehydrogenases cDNA from *Asparagus officinalis*: Sequence analysis and evolutionary implications. *Genome* 43: 306–316

- Pearson, J. and Stewart, G. R. (1993).** The deposition of atmospheric ammonia and its effects on plants. *New Phytol.*, 125: 283-305
- Primikiriou NI, Roubelakis-Angelakis KA (1999).** Cloning and expression of an arginine decarboxylase cDNA from *Vitis vinifera* L. cell-suspension cultures *Planta*. Jun;208(4):574-82
- Purnell, M.P., Skopelitis, D.S., Roubelakis-Angelakis, K.A., and Botella, J.R. (2005).** Modulation of higher-plant NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase activity in transgenic tobacco via alteration of beta subunit levels. *Planta* 222, 167–180.
- Purnell MP, Botella JR (2007)** Tobacco isoenzyme 1 of NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase catabolizes glutamate *in vivo*. *Plant Physiol* 143:530-539
- Purnell MP, Stewart GR, Botella JR (1997)** Cloning and characterisation of a glutamate dehydrogenase cDNA from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Gene* 186:249–254
- Rabbani, M.A., K. Maruyama and H. Abe et al (2003),** Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and ABA application using cDNA microarray and RNA gel-blot analysis, *Plant Physiol* 133, pp. 1755–1767.
- Rhodes D, Versluets, Sharp (1999)** Role of amino acids in plant abiotic resistance. In “plant aminoacids” pp 319
- Restivo, F.M. (2004).** Molecular cloning of glutamate dehydrogenase genes of *Nicotiana glauca*: Structure analysis and regulation of their expression by physiological and stress condition. *Plant Sci*. 166, 971–982.
- Robinson SA, Stewart GR, Phillips P (1992)** Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension cultures. *Plant Physiol* 98 1190–1195
- Robinson, S. A., Slade, A. P., Fox, G. G., Phillips, R., Ratcliffe R, G., and Stewart, G.R. (1991).** The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. *Plant Physiol.*, 95 809-816.
- Rubio LM, Ludden PW. (2008).** Biosynthesis of the Iron-Molybdenum Cofactor of Nitrogenase. *Annu Rev Microbiol*. Epub ahead of print PMID: 18429691.

- Sakakibara, H., Fujii, K., and Sugiyama, T. (1995).** Isolation and characterization of cDNA that encodes maize glutamate dehydrogenase *Plant Cell Physiol.*, 36 789-797.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989)** Molecular Cloning. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Schimel JP, Bennett J. 2004.** Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm. *Ecology* 85: 591–602.
- Schenk, M., and J. Wehrmann. (1979).** The influence of ammonia in nutrient soil solution on growth and metabolism of cucumber plants. *Plant Soil* 52:403-414
- Silveira, J.A., R.A. Viegas, I.M. da Rocha, A.C. Moreira, R.A. Moreira and J.T. Oliveira, (2003).** Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves, *Journal of Plant Physiology* **160**, pp. 115–123
- Sims AP, Folkes BF (1964)** A kinetic study of the assimilation of ¹⁵N-ammonia and the synthesis of amino acids in an exponentially growing culture of *Candida utilis*. *Proc. Roy. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 159: 479-502.
- Skopelitis DS (2006)** Analysis of the physiological role of glutamate dehydrogenase isoenzymes in wild type and genetically modified tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L). Ph.D. Dissertation, University of Crete, Greece
- Skopelitis DS, Paranychiankis NV, Paschalidis KA, Plianokis ED, Delis ID, Yakoumakis DI, Kouvarakis A, Papadakis A, Stephanou EG, Roubelakis-Angelakis KA (2006).** Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic Glutamate dehydrogenase to form Glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. *Plant Cell* 18:2767-2781
- Skopelitis DS, Paranychiankis NV, Kouvarakis A, Spyros A, Stephanou EG, Roubelakis- Angelakis KA (2007)** The isoenzyme 7 of tobacco NAD(H)-dependent Glutamate dehydrogenase exhibits high deaminating and low aminating activity. *Plant Physiol* 145:1-9
- Smith, T., Stanley, C., (2008).** Untangling the glutamate dehydrogenase allosteric nightmare. *Trends Biochem. Sci.* 33, 557–564.
- Sobolevsky, T.G., Revelsky, A.I., Miller, B., Oriedo, V., Chernetsova, E.S., and Revelsky, I.A. (2003).** Comparison of silylation and esterification/

acylation procedures in GC-MS analysis of amino acids. *J. Sep. Sci.* 26, 1474–1478.

Solov'eva, N.A., Sidel'nikova, L.I., Voronkova, G.I., et al. (1995), , *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, vol. 31, no. 1, pp. 17–20.

Somerville CR, Ogren WL. (1981). Photorespiration-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* lacking mitochondrial serine transhydroxymethylase activity. *Plant Physiology* 67, 666–671

Stewart GR, Mann AF, Fentem PA (1980). Enzymes of Glu tamate formation: Glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase, and Glutamate synthase. In: Mifflin BJ (ed) *The Biochemistry of Plants*. Academic Press, New York

Srivastava, H.S., Singh, R.P (1987) : Role and regulation of L-glutamate dehydrogenase activity in higher plants. *Phytochemistry* 26: 597–610,

Stewart GR, Shatilov VR, Turnbull MH, Robinson SA, Goodall R (1995) Evidence that glutamate dehydrogenase plays a role in oxidative deamination of glutamate in seedlings of *Zea mays*. *Aust J Plant Physiol* 22 805–809

Syntichaki, K.M., Loulakakis, K.A., and Roubelakis-Angelakis, K.A. (1996). The amino acid sequence similarity of plant glutamate dehydrogenase with the extremophilic archaeal enzyme conforms to its stress related function. *Gene* 168, 87–92.

Takenaka M, Verbitskiy D, van der Merwe JA, Zehrmann A, Plessmann U, Urlaub H, Brennicke (2007) A In vitro RNA editing in plant mitochondria does not require added energy. *FEBS Lett.* Jun 12;581(14):2743-7

Tarasenko, V.I, E. Yu. Garnik, V. N. Shmakov and Yu. M. Konstantinov (2009) Induction of *Arabidopsis gdh2* gene expression during changes in redox state of the mitochondrial respiratory chain *Biochemistry (Moscow)*, , Vol. 74, No. 1, pp. 47_53.

Tabuchi M, Abiko T, Yamaya T. (2007). Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* 58: 2319–2327.

Tempest DW, Meers JL, Brown CM (1970) Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route. *Biochem. J.* 117: 405-407.

- Turano, F.J., Thakkar, S.S., Fang, T., and Weisemann, J.M. (1997).** Characterization and expression of NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 113, 1329–1341.
- Tyler B (1978)** Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. In: Snell EE, Boyer PD, Meister A, Richardson CC (eds) Annual review of biochemistry, vol 47. Annual Review Inc., California, pp 1147–1162
- Usadel B, Bläsing OE, Gibon Y, Poree F, Höhne M, Günter M, Trethewey R, Kamlage B, Poorter H, Stitt M. (2008)** Multilevel genomic analysis of the response of transcripts, enzyme activities and metabolites in Arabidopsis rosettes to a progressive decrease of temperature in the non-freezing range. *Plant Cell Environ.* Apr;31(4):518-47
- Varricchio, F (1969).** Control of glutamate dehydrogenase synthesis in *Escherichia coli*. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* 177, 560–564
- Vasquez-Robinet , Shrinivasrao P. Mane, Alexander V. Ulanov, Jonathan I. Watkinson, Verlyn K. Stromberg, David De Koeyer, Roland Schafleitner, David B. Willmot, Merideth Bonierbale, Hans J. Bohnert and Ruth Grene (2008)** Physiological and molecular adaptations to drought in Andean potato genotypes *Journal of Experimental Botany* 59(8):2109-2123
- VENDER J, RICKENBERG HV. AMMONIA METABOLISM IN A MUTANT OF ESCHERICHIA COLI LACKING GLUTAMATE DEHYDROGENASE .** (1964) *Biochim Biophys Acta.* Jul 15;90:218–220
- Vermeulen, T ; Görg, B ; Vogl, T ; Wolf, M ; Varga, G ; Toutain, A ; Paul, R ; Schliess, F ; Häussinger, D ; Häberle, J; (2008)** Glutamine synthetase is essential for proliferation of fetal skin fibroblasts. *Arch Biochem Biophys*, Oct, 01; 478(1):96-102
- Wang, M. Y., Siddiqi, M. Y., Ruth, T. J., and Glass, A. D. M, (1993).** Ammonium uptake by rice roots. *Plant Physiol.* 1, 03: 1259-1267.
- Wang, J., Pitarque, M. and Ingelman-Sundberg, M. (2006)** 3'-UTR polymorphism in the human CYP2A6 gene affects mRNA stability and enzyme expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 340, 491-497
- Wang ZQ, Yuan YZ, Ou JQ, Lin QH, Zhang CF. J Plant Physiol. 2007** Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially

to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity. *Jun*;164(6):695-701

Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC. (2000). Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B—Biological Sciences* 355, 1517–1529

Xuhua Qiu, Weibo Xie, Xingming Lian and Qifa Zhang (2009). Molecular analyses of the rice *glutamate dehydrogenase* gene family and their response to nitrogen and phosphorous deprivation *Plant Cell Rep* 28:1115–1126

Yamaya, T., Oaks, A. (1987) Synthesis of glutamate by mitochondria. An anaplerotic function for glutamate dehydrogenase. *Physiol. Plant.* **70**, 749–756

Yamaya T, Oaks A, Rhodes D, Matsumoto H (1986) Synthesis of [¹⁵N]glutamate from [¹⁵N]H₄⁺ and [¹⁵N]glycine by mitochondria isolated from pea and corn roots. *Plant Physiol* 81 754–757

Yakovleva, V. I., Kretovich, V. L. Gilmanov, M. K. (1964). Localization of glutamate dehydrogenase in corn roots. – *Biokhimiya* **29**: 463–469