

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ, ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΣ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ
ΤΗΣ ΑΠΟΚΑΡΒΟΞΥΛΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ
ΤΗΣ ΑΜΠΕΛΟΥ (*Vitis vinifera* L.)

ΝΙΚΟΛΑΟΣ Ι. ΠΡΙΜΗΚΥΡΙΟΣ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 1999

**ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ, ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΣ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ
ΤΗΣ ΑΠΟΚΑΡΒΟΞΥΛΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ
ΤΗΣ ΑΜΠΕΛΟΥ (*Vitis vinifera* L.)**

Από

ΝΙΚΟΛΑΟ Ι. ΠΡΙΜΗΚΥΡΙΟ

Πτυχ. Γεωπονικού Πανεπ. Αθηνών, 1990

**Υποβλήθηκε ως μέρος των απαιτήσεων για τον τίτλο
του Διδάκτορα Βιολογικών Επιστημών
με έμφαση τη Βιοχημεία και Μοριακή Φυσιολογία Φυτών
στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης**

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Κ. Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Κ. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης

Δ. Κυριακίδης, Καθηγητής Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

Κ. Κοτζαμπάσης, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Κ. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης

Δ. Κυριακίδης, Καθηγητής Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

Ν. Πανόπουλος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Ε. Στρατάκης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Κ. Κοτζαμπάσης, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Ε. Αθανασάκη-Βασιλειάδη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πανεπιστημίου

Κρήτης

Ε. Τσαγρή, Επίκουρος Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης

Στην οικογένεια και
τους φίλους μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας και Βιοχημείας Φυτών, του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, κατά το χρονικό διάστημα 1993-1998. Το Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, παρείχε την υλικοτεχνική υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα Καθηγήτρια Κ. Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, όχι μόνο για την ευκαιρία που μου προσέφερε να ασχοληθώ με τη φυσιολογία και τη βιοχημεία φυτών στο εργαστήριό της, αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για την ηθική, επιστημονική και οικονομική υποστήριξη και βοήθεια σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών και τη διάρκεια εκτέλεσης της διατριβής μου.

Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής μου, τον Καθηγητή του Α.Π.Θ. κ. Δ. Κυριακίδη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Πανεπιστημίου Κρήτης Κ. Κοτζαμπάση για τις πολύτιμες συμβουλές και την καθοδήγησή τους σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Καθηγητές Ν. Πανόπουλο και Ε. Στρατάκη, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε. Αθανασάκη και την Επίκουρο Καθηγήτρια Ε. Τσαγρή για την συμμετοχή τους στην Εξεταστική Επιτροπή της διατριβής μου, τις εύστοχες παρατηρήσεις τους και την ενθαρρυντική κριτική τους.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω όλα τα πρώην μέλη του εργαστηρίου Φυσιολογίας και Βιοχημείας Φυτών, για την άψογη συνεργασία τους και το φιλικό περιβάλλον. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τη Δρ. Μαρία Χρηστάκη-Χάμσα που με «μύησε» στις πολυαμίνες, το Δρ. Κώστα Λουλακάκη (Καθηγητή ΣΤΕΓ/ΤΕΙ Ηρακλείου) που με καθοδήγησε στα πρώτα μου βήματα στην πρωτεϊνοχημεία και βιοχημεία, το Δρ. Μπάμπη Συμινή (Λέκτορα του Γεωργικού Παν/μίου Αθηνών) που με εισήγαγε στο θαυμαστό κόσμο των *in vitro* καλλιεργειών και το Δρ. Άγγελο Κανελλή (Καθηγητή Α.Π.Θ.) για τις εποικοδομητικές του συμβουλές και τη γόνιμη επιστημονική συνεργασία μας.

Επίσης, ευχαριστώ τις κκ. Σοφία Τουφεξή, Ελένη Χατζηνικολάκη και Μαρία Δραμουντάνη και τον κ. Στέλιο Δαριβιανάκη, που ως τεχνικοί του εργαστηρίου δε μου αρνήθηκαν ποτέ τη βοήθειά τους.

Θερμά ευχαριστώ τον κ. Στέλιο Μαυράκη για τη σημαντική και ουσιαστική βοήθεια που παρείχε στην ανάπτυξη και διατήρηση κάθε είδους φυτού στο θερμοκήπιο.

Ιδιαίτερες και θερμότερες ευχαριστίες στους φίλους και συναδέλφους: Στάσα Παπαδάκη και Κώστα Πασχαλίδη, για τη συνεχή παρουσία και συμπαράστασή τους στις δύσκολες στιγμές κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου καθώς και για την άψογη συνεργασία μας, και Δρ. Αλεξάνδρα Βουτσινά, Δρ. Αριστεΐδη Κριτή, Δρ. Δημήτρη Κολλάρο, Δρ. Γιώργο Κωτούλα και Γιώργο Σκαρπέλη για την ανεκτίμητη επιστημονική τους βοήθεια και ενθάρρυνση.

Στα μέλη του Τμήματος Βιολογίας καθώς και του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας που βοήθησαν άμεσα ή έμμεσα στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, και ιδιαίτερα στα μέλη του εργαστηρίου της Εξελικτικής Βιολογίας, εκφράζω τις ευχαριστίες μου για τη συνεργασία τους.

Τέλος, θέλω να εκφράσω τη βαθιά ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια και τους φίλους μου για την κατανόηση, την αγάπη, την υπομονή και την αδιάκοπη ηθική συμπαράσταση τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Ιούνιος 1999

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ - ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ

MB	<u>M</u> οριακό <u>B</u> άρος
ΠΑ	Πολυαμίνες
ΠΣ	Πουτρεσκίνη
ΣΔ	Σπερμιδίνη
ΣΝ	Σπερμίνη
2,4 D	<u>2,4</u> - <u>D</u> ichlorophenoxyacetic Acid
ADC	<u>A</u> rginine <u>D</u> ecarboxylase
BAP	6- <u>b</u> enzyl <u>a</u> minopurine
BciP	<u>B</u> romo- <u>C</u> hloro- <u>i</u> ndolyl- <u>P</u> hosphate
Bp	<u>B</u> ase pair
BSA	<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin (fraction V)
CsCl	Cesium Chloride
CTAB	<u>C</u> etyl- <u>t</u> rimethyl- <u>a</u> mmonium <u>b</u> romide
DEPC	<u>D</u> iethyl pyro <u>c</u> arbonate
DNTP	<u>D</u> eoxy- <u>N</u> ucleotides <u>T</u> riphosphates
S	
DTT	DL- <u>D</u> ithio <u>t</u> hreitol
EDTA	<u>E</u> thylene- <u>d</u> iamine- <u>t</u> etraacetic <u>a</u> cid
GST	<u>G</u> lutathione- <u>S</u> - <u>T</u> ransferase
IAA	<u>I</u> ndole-3- <u>A</u> cetic <u>A</u> cid
<i>in situ</i>	Επί τόπου
<i>in vitro</i>	Στο σωλήνα, εκτός οργανισμού
<i>in vivo</i>	Εν ζωή, εντός οργανισμού
IPTG	<u>I</u> sopropyl-1- <u>t</u> hio-β-D-galactosite
KDa	<u>K</u> ilo <u>D</u> alton
Leupe	Acetyl-Leu-Leu-Arg-al
ptin	
MBP	<u>M</u> altose <u>B</u> inding <u>P</u> rotein
NAA	α- <u>N</u> aphthaleneacetic acid
NBT	<u>N</u> itro <u>B</u> lue <u>T</u> etrazolium
ODC	<u>O</u> rnithine <u>D</u> ecarboxylase
PBS	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline solution
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
PEG	<u>P</u> oly <u>e</u> thyleneglycol
PMSF	<u>P</u> henylmethyl <u>s</u> ulfonyl <u>f</u> luoride
PP	<u>P</u> yridoxal <u>P</u> hosphate
PVPP	<u>P</u> oly <u>v</u> inylpolypyrrolidone
Rnase	<u>R</u> ibon <u>n</u> uclease
SAM	<u>S</u> - <u>A</u> denosyl <u>M</u> ethionine <u>D</u> ecarboxylase
DC	
SDS	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate
TCA	<u>T</u> richloroacetic <u>A</u> cid
TEME	N,N,N'N'- <u>T</u> etramethylethylenediamine

D

Tris

Tris (hydroxymethyl) aminonethane

Triton

Polyoxyethylene ether

X-100

Tween

Polyoxyethylene sorbitan, monolaurate

-20

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
SUMMARY	3
ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
5	
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	
37	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Η αποκαρβοξυλάση της αργινίνης της αμπέλου (<i>Vitis vinifera</i> L.): Βιοχημικές ιδιότητες και ενζυμική ενεργότητα σε φυτικά όργανα και ιστούς διαφόρων οντογενετικών σταδίων	39
1.1 Περίληψη	41
1.2 Εισαγωγή	42
1.3 Υλικά και μέθοδοι	46
1.4 Αποτελέσματα	52
1.5 Συζήτηση	66
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Κλωνοποίηση και μοριακός χαρακτηρισμός cDNA της αποκαρβοξυλάσης της αργινίνης της αμπέλου (<i>Vitis vinifera</i> L.)	
77	
2.1 Περίληψη	79
2.2 Εισαγωγή	80
2.3 Υλικά και μέθοδοι	83
2.4 Αποτελέσματα	87
2.5 Συζήτηση	97
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη της έκφρασης της ADC σε κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου (<i>Vitis vinifera</i> L.) υπό την επίδραση διαφορετικών πηγών αζώτου, άλλων οργανικών αζωτούχων ενώσεων και των φυτικών ρυθμιστικών ουσιών NAA και 6-BAP	
103	
3.1 Περίληψη	105
3.2 Εισαγωγή	106
3.3 Υλικά και μέθοδοι	108
3.4 Αποτελέσματα	112
3.5 Συζήτηση	121
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Ανοσολογική μελέτη της ADC της αμπέλου (<i>Vitis vinifera</i> L.)	
129	
4.1 Περίληψη	131
4.2 Εισαγωγή	132
4.3 Υλικά και μέθοδοι	134
4.4 Αποτελέσματα	141
4.5 Συζήτηση	153

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	161
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	165

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

N. I. Πριμηκύριος (1999) Βιοχημικός, Μοριακός και Ανοσολογικός Χαρακτηρισμός και Ρύθμιση της Έκφρασης της Αποκαρβοξυλάσης της Αργινίνης της Αμπέλου (*Vitis vinifera* L.)

Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Επιβλέπων: Καθηγήτρια Κ. Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη

Οι πολυαμίνες σπερμιδίνη και σπερμίνη και ο υποχρεωτικός πρόδρομός τους, η πουτρεσκίνη, είναι μικρές αλειφατικές αμίνες που βρίσκονται σε όλα τα κύτταρα. Αν και ο ακριβής ρόλος τους και ο τρόπος δράσης τους δεν έχει, ακόμα, γίνει κατανοητός, πολυάριθμες μελέτες τις συνδέουν με ποικίλες φυσιολογικές διαδικασίες, που περιλαμβάνουν από την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση έως και την απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης. Το αρχικό και καθοριστικό στάδιο της βιοσύνθεσης των πολυαμινών είναι η αποκαρβοξυλίωση της ορνιθίνης και της αργινίνης από τις ομώνυμες αποκαρβοξυλάσες, προς πουτρεσκίνη και αγματίνη, αντίστοιχα. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ρύθμιση της βιοσύνθεσης των πολυαμινών από την αποκαρβοξυλάση της αργινίνης (ADC), σε ένα πολυετές φυτικό είδος, την άμπελο (*Vitis vinifera* L.), το οποίο δεν αποκρίνεται σε *in vitro* μορφογενετικούς χειρισμούς. Η ADC της αμπέλου έχει άριστο pH στο 8,0, άριστο θερμοκρασίας στους 37 °C, απαιτεί την παρουσία σουλφυδρυλομάδων και φωσφορικής πυριδοξάλης αλλά όχι κάποιου μεταλλικού παράγοντα για την επίδειξη του μέγιστου της ενεργότητάς της και η αγματίνη και η πουτρεσκίνη παρεμποδίζουν την ενεργότητα της σε μεγάλες, σχετικά, συγκεντρώσεις. Η ενεργότητα της ήταν υψηλότερη στους μεταβολικά ενεργότερους ιστούς ενώ στις ρίζες ήταν η χαμηλότερη. Σε σπορόφυτα της αμπέλου η ενεργότητα της ADC ήταν μεγαλύτερη με την έναρξη του φυτρώματος και μειωνόταν με το χρόνο όπως συνέβαινε και στις κυτταροκαλλιέργειες και στους κάλλους αμέσως μετά την υποκαλλιέργεια. Η αμινοξική αλληλουχία ενός cDNA κλώνου της ADC που απομονώθηκε (EMBL, accession no X96791) αποτελείται από 630 αμινοξέα (λείπουν περίπου 100 αμινοξέα από το αμινοτελικό άκρο), φέρει τα χαρακτηριστικά πρότυπα της

ομάδας IV των αποκαρβοξυλασών της Ορνιθίνης/ Dap/ Αργινίνης και εμφανίζει ταυτότητα 70-75% με τις αλληλουχίες της ADC των δικοτυλήδων, 40% με την ADC της βρώμης και 30% με τις βακτηριακές ADCs. Ανάλυση κατά Southern έδειξε την ύπαρξη ενός γονιδίου ομόλογου με το cDNA που απομονώθηκε ενώ σε ανάλυση northern ολικού RNA από διάφορους ιστούς της αμπέλου εντοπίστηκε ένα μετάγραφο, μεγέθους περίπου 3,1 kb, με διαφορετικό πρότυπο έκφρασης. Η *in vitro* ενεργότητα της ADC σε κυτταροκαλλιέργειες, αυξήθηκε με την προσθήκη αμμωνιακών και γλουταμίνης περισσότερο από ότι με την προσθήκη αργινίνης και γλουταμικού, δεν επηρεάστηκε από τα νιτρικά, ενώ μειώθηκε με την πουτρεσκίνη. Ανάλυση northern έδειξε ότι καμία από τις παραπάνω επεμβάσεις δεν προκάλεσε αλλαγές στην ποσότητα του mRNA της. Αντίθετα, τα επίπεδα της ενδογενούς ελεύθερης πουτρεσκίνης και αργινίνης ακολούθησαν τις αλλαγές στην ενεργότητα της ADC. Αντίσωμα, που παρασκευάστηκε εναντίον της ADC, αναγνωρίζει σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από διάφορους ιστούς κυρίως μία πρωτεϊνική ζώνη μεγέθους περίπου 80 kDa. Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από φύλλα και βλαστούς αμπέλου, σε διαφορετικά οντογενετικά στάδια, παρουσίασαν διαφορές στην ποσότητα της πρωτεϊνικής ζώνης των 80 kDa χωρίς όμως οι διαφορές αυτές να ακολουθούν τις αλλαγές στην ειδική ενεργότητα της ADC. Επίσης, σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυτταροκαλλιεργειών, με μεγάλες διαφορές στην ενεργότητα της ADC, δεν ανιχνεύθηκαν ποσοτικές διαφορές στην πρωτεϊνική ζώνη των 80 kDa που να συμβαδίζουν με αυτές. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι οι αλλαγές στην ενεργότητα της ADC δεν οφείλονται σε επαγωγή ή καταστολή του γονιδίου της και επομένως η ρύθμιση της στην άμπελο γίνεται μετα-μεταγραφικά και πιθανώς μετα-μεταφραστικά όπως συμβαίνει και με άλλα ένζυμα της βιοσύνθεσης των πολυαμινών.

SUMMARY

N. I. Primikirios (1999) Biochemical, Molecular and Immunological Characterisation and Regulation of Arginine Decarboxylase from Grapevine (*Vitis vinifera* L.)

Doctorate dissertation, Dept. of Biology, University of Crete

Supervisor: Professor K.A. Roubelakis–Angelakis

Polyamines spermidine and spermine and their obligatory precursor, putrescine, are small aliphatic amines, ubiquitous in living organisms. Even though their exact role and function is not yet understood, many studies relate them with various physiological procedures, including cellular development and differentiation to stress-induced responses. The preliminary and determinant stage of polyamine biosynthesis is the decarboxylation of ornithine and arginine from the homonymous decarboxylases, to putrescine and agmatine, respectively. In the present study, the regulation of polyamine biosynthesis from arginine decarboxylase (ADC) was examined. This was done in a woody perennial plant species, the grapevine (*Vitis vinifera* L.), which does not respond to *in vitro* morphogenetic manipulations. The optimum pH and temperature for grapevine enzyme were 8.0 and 37 °C, respectively. Grapevine ADC demanded the presence of soylfhydryl-groups and pyridoxal phosphate in order to exhibit maximum activity but there was no dependence on any metal factor. Agmatine and putrescine inhibited enzyme activity in relatively high concentrations. ADC activity was high in tissues with high metabolic activity and low in roots. In grapevine seedlings, ADC activity was high at the early stages of germination and was reduced later, similar to suspension cultures and calluses immediately after subculture. The deduced amino acid sequence of an isolated ADC cDNA clone (EMBL, accession no X96791) consists of 630 amino acid residues (about 100 amino acids are missing from the N-terminal) and includes the characteristic patterns of group IV of ornithine/ Dap/ arginine decarboxylases. The clone exhibits 70-75 % identity with other dicot ADCs, 40 % identity with the monocot

oat ADC and 30 % identity with bacterial ADCs. Southern blot analysis supports the presence of a single ADC gene in grapevine genome. Northern analysis of total RNA from different grapevine tissues indicates that grapevine ADC gene is expressed as a single transcript of approximately 3,1 kb with a tissue specific expression pattern. The addition of ammonium ion and glutamine to grapevine cell suspension cultures increased the *in vitro* ADC activity to a larger extent than the addition of arginine and glutamate. On the contrary, ADC activity was not affected by the addition of nitrates whereas it was reduced by the addition of putrescine. The changes in ADC activity were not accompanied by analogous changes in the ADC transcript levels. The endogenous free putrescine and arginine titers followed the changes in ADC activity. Antibody prepared against ADC detected a protein band of about 80 kDa in size, in total protein extracts from different grapevine tissues. Protein extracts from leaves and shoots in different developmental stages, presented differences in the quantity of the 80-kDa band, but these differences did not follow the changes in ADC specific activity. Furthermore, protein extracts from cell suspension cultures treated with ammonium or nitrate ions or putrescine, with pronounced differences in ADC specific activity, did not show equivalent quantitative differences in the 80-kDa protein band. From the above results it is concluded that changes in ADC activity are not due to induction or suppression of its gene. Therefore, ADC regulation in grapevine is post-transcriptional and possibly post-translational as for other enzymes of polyamine biosynthesis in plants and other kingdoms.

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΓΕΝΙΚΑ

Η ιστορία της βιοχημείας των πολυαμινών (ΠΑ) ξεκινάει πριν από περισσότερα από 300 χρόνια, όταν ο Ολλανδός έμπορος και ερασιτέχνης κατασκευαστής μικροσκοπίων Antoni van Leeuwenhoek παρατήρησε, το 1678 το σχηματισμό κρυστάλλων σε μικροσκοπικό παρασκεύασμα ανθρώπινου σπέρματος. Το βασικό συστατικό αυτών των κρυστάλλων, 200 χρόνια αργότερα αναγνωρίστηκε ως οργανική βάση και ονομάστηκε σπερμίνη και στα μέσα της δεκαετίας του 1920 προσδιορίστηκε η χημική του σύνθεση και δομή (Walters, 1987). Η βιολογική σημασία του μορίου όμως, έγινε αντιληπτή πολύ αργότερα και συγκεκριμένα μετά τη δημοσίευση το 1971 της προκλητικής μονογραφίας του Seymour Cohen "Εισαγωγή στις πολυαμίνες", δημοσίευση που προκάλεσε το ενδιαφέρον των επιστημόνων και ενθάρρυνε την έρευνα στο πεδίο των ΠΑ (Galston and Kaur-Sawhney, 1990).

Τα κύτταρα όλων των οργανισμών περιέχουν τη διαμίνη πουτρεσκίνη (ΠΣ: 1,4-διαμινο-βουτάνιο) και την τριαμίνη σπερμιδίνη (ΣΔ: N-(3-αμινοπροπυλ)-1,4-διαμινο-βουτάνιο) ενώ τα κύτταρα των ευκαρυωτικών περιέχουν και την τετραμίνη σπερμίνη (ΣΝ: N,N'-δι-(3-αμινοπροπυλ)-1,4-διαμινο-βουτάνιο) (Heby, 1981, Seiler and Dezeure, 1990).

Πουτρεσκίνη (ΠΣ):		$H_2N-(CH_2)_4-$ NH_2	
Σπερμιδίνη (ΣΔ):		$H_2N-(CH_2)_4-$	$(CH_2)_3-$
Σπερμίνη (ΣΝ):	H_2N- $(CH_2)_3$	$-HN-(CH_2)_4-$ $NH-$	$(CH_2)_3-$ NH_2

Εκτός των παραπάνω "οικουμενικών" ΠΑ και άλλες συναντώνται σε διάφορους οργανισμούς όπως η χιρουντονίνη στις βδέλλες (Walters, 1987), η καδαβερίνη (1,5-διαμινοπεντάνιο) και τα παράγωγά της στα ψυχανθή, το 1,3-διαμινο-προπάνιο στα αγροστόδη (Smith, 1982), η θερμοσπερμίνη (με πέντε ή περισσότερες αμινομάδες) σε θερμοφιλα βακτήρια (Galston and Kaur-Sawhney,

1990), η καναβαλμίνη (N,N-δι-(4-αμινοβουτυλ)-1,3-διαμινο-προπάνιο) στο ψυχανθές *Canavalia* (Smith, 1985) κά.

2. ΦΥΣΙΚΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΑΜΙΝΩΝ

Στις συνήθεις τιμές του κυτταρικού pH η ΠΣ, ΣΔ και ΣΝ είναι πρωτονιωμένες και φέρουν δύο, τρία και τέσσερα θετικά φορτία, αντίστοιχα. Λόγω του κατιονικού χαρακτήρα του μορίου τους, από πολύ παλιά είχε προταθεί ότι συνδέονται ηλεκτροστατικά με διάφορα αρνητικά φορτισμένα μικρο- και μακρομόρια του κυττάρου, όπως τα φωσφολιπίδια των μεμβρανών, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα, μειώνοντας τα αρνητικά φορτία τους.

Σήμερα, η ιοντική σύνδεση των ΠΑ με τα νουκλεϊκά οξέα έχει αποδειχθεί από κρυσταλλογραφικά πειράματα με ακτίνες-X (Smith, 1985). Ειδικά, η συμμετρική κατανομή των φορτίων του μορίου της ΣΝ του επιτρέπει να συνδέεται ισχυρά με δύο φωσφορικές ομάδες σε κάθε μία από τις δύο αλυσίδες της διπλής έλικας του DNA, καλύπτοντας τη μικρή ή τη μεγάλη αύλακα και σταθεροποιώντας την έλικα. Έτσι 1 mM ΣΝ προστατεύει το μόριο του DNA από ρήξεις που προκαλούν ενεργές ρίζες οξυγόνου (Ha et al, 1998). Έχει επίσης βρεθεί ότι οι ΠΑ μπορούν να προκαλέσουν παραμορφώσεις στη συνήθη B-μορφή του DNA όπως μετασχηματισμό της στην A- και Z-μορφή (Galston, 1983, Slocum et al, 1984). Οι αλλαγές αυτές μπορεί να έχουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση DNA-πρωτεϊνών στο κύτταρο. Αυξημένα επίπεδα ΠΑ ενίσχυσαν τη μεταγραφική ενεργότητα *in vivo* μίας σειράς προαγωγέων σε επιδερμικά κύτταρα (Bryans et al, 1996). Οι ΠΑ σταθεροποιούν και άλλες δομές διπλής έλικας, όπως μίσχοι και βρόγχοι σε rRNA και mRNA, και τη διαμόρφωση των tRNA συνδεόμενες σε ειδικές θέσεις. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις αποτελούν μάλλον και τη βάση της θετικής δράσης τους στη σύνθεση DNA, RNA και πρωτεϊνών (Slocum et al, 1984, Tabor and Tabor, 1984, Heby and Persson, 1990).

Στην *E. coli* έχουν απομονωθεί δύο προσδένουσες-ΠΑ περιπλασματικές πρωτεΐνες (PotD και PotF), που αποτελούν μέρη δύο μεμβρανικών συστημάτων

μεταφοράς ΠΑ (Kashiwagi et al, 1995). Παρόμοιες μεμβρανικές πρωτεΐνες βρέθηκαν και στα φυτά, επιβεβαιώνοντας την υπόθεση ότι η ειδική αλληλεπίδραση ΠΑ-κυτταροπλασματικής μεμβράνης λαμβάνει χώρα στο πρωτεϊνικό μέρος της μεμβράνης και πιθανόν αυτή η αλληλεπίδραση να αντιπροσωπεύει ένα από τα πρώτα στάδια δράσης των ΠΑ (Tassoni et al, 1998). Ακόμα, για τα φυτά έχει προταθεί ότι μερικές από τις πολυάριθμες φυσιολογικές δράσεις των ΠΑ μπορούν να εξηγηθούν με τη διαφορική ιονική αλληλεπίδρασή τους με θραύσματα πηκτινικών μορίων, τα οποία είναι γνωστό ότι επηρεάζουν μορφογενετικά και παθογενετικά φαινόμενα στα φυτά (Messian et al, 1997).

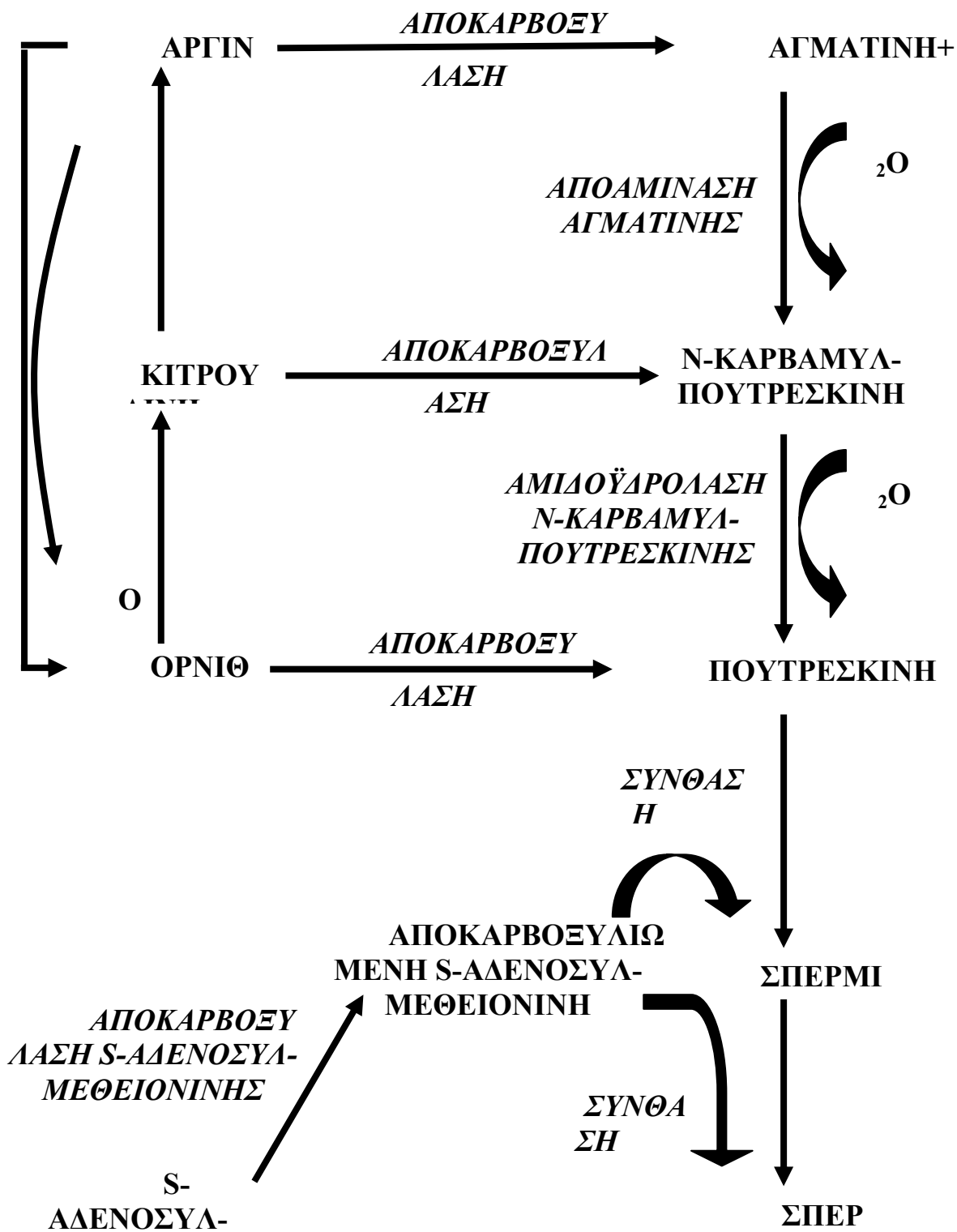
Οι ΠΑ επίσης βρίσκονται σε διάφορα κύτταρα, ομοιοπολικά ενωμένες με πρωτεΐνες σχηματίζοντας μονο-(γ-γλουτάμυλο) δεσμούς ή γέφυρες δι-(γ-γλουτάμυλο) πολυαμίνης μεταξύ των γ-καρβοξυλικών ομάδων δύο διαφορετικών γλουταμικών οξέων μίας πρωτεΐνης με τη βοήθεια ειδικών ενζύμων, των τρανσγλουταμινασών (EC 2.3.2.13) (Schrode and Folk, 1978, Haddox and Russell 1981, Apelbaum et al, 1988, Beninati et al, 1988, Serafini-Fracassini et al, 1995). Τέλος, η μετα-μεταφραστική τροποποίηση του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης της πρωτεϊνικής σύνθεσης eIF-4D με τη συμβολή της ΣΔ αποτελεί άλλο ένα παράδειγμα της σημασίας του ρόλου των ΠΑ (Tabor and Tabor, 1984).

3. Η ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΑΜΙΝΩΝ

Τόσο τα προκαρυωτικά όσο και τα ευκαρυωτικά κύτταρα συνθέτουν ΠΣ και ΣΔ, ενώ η σύνθεση της ΣΝ περιορίζεται στα ευκαρυωτικά μόνο. Γενικά, οι προκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις ΠΣ από ΣΔ αντίθετα με τους ευκαρυωτικούς που έχουν χαμηλές συγκεντρώσεις ΠΣ και υψηλές ΣΔ και ΣΝ (Heby, 1981).

Στα θηλαστικά και στους μύκητες το αρχικό και καθοριστικό στάδιο της βιοσύνθεσης των ΠΑ, είναι η αποκαρβοξυλίωση της ορνιθίνης προς ΠΣ (Εικ. 1). Η αντίδραση καταλύεται από το εξαρτώμενο από φωσφορική πυριδοξάλη ένζυμο της Αποκαρβοξυλάσης της Ορνιθίνης (ODC: EC 4.1.1.17). Στα βακτήρια και τα φυτά η βιοσύνθεση των ΠΑ είναι περισσότερο πολύπλοκη κατά το ότι

υπάρχει και δεύτερο μονοπάτι, εκτός του παραπάνω, εξίσου σημαντικό, που οδηγεί στην ΠΣ (Εικ. 1). Ξεκινώντας από την αποκαρβοξυλίωση της αργινίνης, με τη



Εικόνα 1. Η βιοσύνθεση των πολυαμινών.

βοήθεια του επίσης εξαρτώμενου από φωσφορική πυριδοξάλη ενζύμου, της Αποκαρβοξυλάσης της Αργινίνης (ADC: EC 4.1.1.19), προς αγματίνη, συνεχίζει με τη μετατροπή της τελευταίας, μέσω της Αποαμινάσης (ιμινοϋδρολάσης) της Αγματίνης (EC 3.5.3.12) σε N-καρβαμυλ-πουτρεσκίνη (N-Carbamoyl-putrescine, το αντίστοιχο αμίδιο της αγματίνης) για να καταλήξει σε ΠΣ με τη δράση του ενζύμου Αμιδοϋδρολάσης της N-καρβαμυλ-πουτρεσκίνη (N-Carbamoyl-putrescine Amidohydrolase, EC 3.5.1.-) (Slocum et al, 1984, Smith, 1985). Πρόσφατα, η ανίχνευση ADC ενεργότητας στον εγκέφαλο αρουραίου (Li et al, 1994) και η απομόνωση ενός μερικού cDNA κλώνου της ADC από νεφρό αρουραίου (Morrissey et al, 1995) ανέτρεψε την παραπάνω επικρατούσα άποψη. Ακόμα, η ολοκλήρωση του προσδιορισμού της αλληλουχίας των γενωμάτων μερικών βακτηρίων, αποκάλυψε ότι δεν υπάρχουν σε όλα αλληλουχίες που να μπορούν να αναγνωριστούν ότι κωδικοποιούν την ADC (πχ *Haemophilus influenzae*).

Οι ανώτερες ΠΑ, ΣΔ και ΣΝ συντίθενται από την ΠΣ με την πρόσθεση μίας αμινοπροπυλ-ομάδας προερχόμενης από την αποκαρβοξυλιωμένη S-αδενοσυλ-μεθειονίνη (Εικ. 1). Η αποκαρβοξυλίωση της S-αδενοσυλ-μεθειονίνης καταλύεται από το ένζυμο Αποκαρβοξυλάση της S-αδενοσυλ-μεθειονίνης (SAMDC: EC 4.1.1.50) και η προσθήκη της αμινοπροπυλ-ομάδας στην ΠΣ και ΣΔ από τις Συνθάσες της ΣΔ (PAPT: Αμινο-Προπυλ-Τρανσφεράση Πουτρεσκίνης, EC 2.5.1.16) και ΣΝ (SAPT: Αμινο-Προπυλ-Τρανσφεράση Σπερμιδίνης, EC 2.5.1.22) αντίστοιχα (Heby, 1981, Slocum et al, 1984, Smith, 1985).

Ο καταβολισμός των ΠΑ πραγματοποιείται από οξειδάσες: την Οξειδάση των Διαμινών για την ΠΣ (DAO: EC 1.4.3.6) που καταλύει την αντίδραση μετατροπής της ΠΣ σε πυρρολίνη, αμμωνία και υπεροξείδιο του υδρογόνου και την Οξειδάση των Πολυαμινών (PAO: EC 1.4.3.4) για τη ΣΔ και τη ΣΝ που δίνει 1-(3-αμινοπροπυλ)-πυρρολίνη, 1,3-διαμινο-προπάνιο και υπεροξείδιο του υδρογόνου στην περίπτωση της ΣΝ και 1,3-διαμινο-προπάνιο, πυρρολίνη και H₂O₂ στην περίπτωση της ΣΔ (Slocum et al, 1984, Smith, 1985) στα ανώτερα φυτά. Στα θηλαστικά η ΠΣ οξειδούμενη δίνει NH₃, H₂O₂ και 4-

αμινοβουταναλδεϋδη, η ΣΔ δίνει ΠΣ, H₂O₂ και 3-αμινοπροπαναλδεϋδη ενώ τέλος η ΣΝ δίνει ΣΔ, H₂O₂ και 3-αμινοπροπαναλδεϋδη (Heby, 1981).

Η ODC των θηλαστικών είναι ομοδιμερής με MB υπομονάδας 51 kDa (461 αο.). Κάθε υπομονάδα φέρει 12 κυστεΐνες και δύο PEST περιοχές (περιοχές πλούσιες σε προλίνη [P], γλουταμικό [E], σερίνη [S] και θρεονίνη [T], οι οποίες είναι χαρακτηριστικές πολλών πρωτεϊνών με βραχύ -μικρότερο των 2 ωρών-χρόνο ημιζωής), γεγονός που συμφωνεί με τον υψηλό ρυθμό ανακύκλωσης (turnover) του ενζύμου που έχει χρόνο ημιζωής 5-10 min. Η ομολογία της αμινοξικής αλληλουχίας του ενζύμου από ποντικό, αρουραίο και άνθρωπο είναι μεγαλύτερη του 90%. Το γονίδιο της ODC φέρει 11 ιντρόνια και στο 5' άκρο από το σημείο έναρξης της μεταγραφής βρίσκονται διάφοροι προαγωγείς και ενισχυτές: ένα TATA box, ένα CAAT box, ένα GC box, αλληλουχίες cAMP responsive element και μερικές θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1. Η περιοχή του προαγωγέα της ODC του ποντικού είναι μεταγραφικά λίγο ισχυρότερη από τον προαγωγέα του SV40. Το mRNA της ODC ανήκει στη μικρή εκείνη κατηγορία mRNA των θηλαστικών, που περιέχουν αλληλουχίες μακρύτερες των 200 νουκλεοτιδίων πριν την αρχή του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF). Στα mRNA της ODC του ποντικού, αρουραίου και ανθρώπου οι αλληλουχίες αυτές είναι περίπου 300 νουκλεοτίδια και τόσο πλούσιες σε G και C που είναι πιθανόν να σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές με υψηλή ενέργεια σταθεροποίησης (Seely et al, 1982, McConlogue et al, 1984, Tabor and Tabor, 1984, Heby and Persson, 1990, Kumar et al, 1995).

Διάφορα αυξητικά ερεθίσματα επάγουν δραματικά τη σύνθεση της ODC, υποδηλώνοντας ότι το ένζυμο είναι πιθανώς προϊόν πρωτοογκογονιδίου. Ακόμα, το γονίδιο της ODC αποτελεί μεταγραφικό στόχο της πρωτεΐνης καταστολής όγκων Wilm, μίας προσδεδεμένης σε DNA πρωτεΐνης που θεωρείται μεταγραφικός παράγοντας (Li et al, 1999). Οι ΠΑ ελέγχουν, μέσω αρνητικής ανάδρασης, τη σύνθεση του ενζύμου, για να προστατέψουν τα κύτταρα από την υπερβολική συσσώρευση ΠΑ που μπορεί να προκαλέσει κυτταροτοξικότητα. Έχουν προταθεί τρεις μηχανισμοί για τη ρύθμιση της σύνθεσης της ODC από τις ΠΑ: (1) μεταγραφική καταστολή, (2) επιτάχυνση της αποικοδόμησης της ODC

και (3) επαγωγή του αντιενζύμου, ενός πρωτεϊνικού αναστολέα της ODC. Εξωγενής προσθήκη ΠΑ *in vivo* προκαλεί τη μείωση της ενεργότητας της ODC με ένα χαρακτηριστικό πρότυπο: η μείωση ξεκινά μετά από μία μικρή φάση υστέρησης και ο ρυθμός της αυξάνεται γρηγορότερα από τη μείωση που προκαλεί το κυκλοεξιμίδιο. Η μείωση αναιρείται από την παρουσία κυκλοεξιμιδίου αλλά όχι και ακτινομυκίνης D, υποδεικνύοντας ότι, μία πρωτεΐνη που επάγεται από τις ΠΑ σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, προκαλεί την αυξημένη αποικοδόμηση της ODC (Hayashi et al, 1996).

Αυτή η επαγόμενη πρωτεΐνη, “το αντιένζυμο της ODC” παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της σύνθεσης της ODC στα ανώτερα θηλαστικά. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι το αντιένζυμο επάγει την εξαρτώμενη από ενέργεια αποικοδόμηση της ODC, μια διαδικασία που καταλύεται από το πρωτεόσωμα 26S. Επίσης, το αντιένζυμο των ανώτερων θηλαστικών καταστέλλει την πρόσληψη από το κύτταρο ΠΑ αλλά από την άλλη επάγεται από την ενδοκυτταρική συσσώρευση ΠΑ μέσω του ασυνήθιστου μηχανισμού της +1 μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης κατά τη μετάφραση (Hayashi and Murakami, 1995). Ακόμα, για το αντιένζυμο της ODC αναφέρθηκε ότι έχει αντιογκογόνο δράση (Iwata et al, 1999). Εκτός του αντιενζύμου της ODC και ένας παρεμποδιστής του αντιενζύμου συμμετέχει στον πολύπλοκο αυτό μηχανισμό ρύθμισης. Η κλωνοποίηση του παρεμποδιστή του αντιενζύμου αποκάλυψε μια πρωτεΐνη με υψηλή ομολογία με το ένζυμο της ODC η οποία ενώνεται με το αντιένζυμο με μεγαλύτερη συγγένεια από την ODC, απελευθερώνοντας το ένζυμο από το σύμπλεγμα ενζύμου-αντιενζύμου (Murakami et al, 1996).

Σχετικά πολύ λιγότερα είναι γνωστά για την ODC από ανώτερα φυτά. Μερικώς καθαρισμένη ODC από καπνό είχε μοριακό βάρος 107 kDa, απαιτούσε την παρουσία φωσφορικής πυριδοξάλης καθώς και διθειοθρεϊτόλης, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη μεγάλου αριθμού κυστεϊνών στο μόριο και γενικά παρουσίαζε παρόμοια χαρακτηριστικά με το ένζυμο των θηλαστικών (Heimer and Mizrahi, 1982). Εξωγενής ΠΣ ή ΣΔ παρεμποδίζει την ενεργότητα του ενζύμου επάγοντας τη σύνθεση ενός πρωτεϊνικού αναστολέα (antizyme),

μηχανισμός που παρατηρείται και στα θηλαστικά (Heller et al, 1978, Canellakis et al, 1985, Tsirka et al, 1986). Τέλος, σε φυτάρια κριθαριού, που φύτευαν παρουσία GA₃, και ακτινομυκίνης D, το 75% της ενεργότητας της ODC συνδεόταν με τη χρωματίνη και το υπόλοιπο 25% βρισκόταν στο κυτταρόπλασμα (Panagiotidis et al, 1982). Παρόμοιος φαίνεται να είναι ο υποκυτταρικός εντοπισμός της ODC και στον καπνό (Galston and Kaur-Sawhney, 1988, Slocum et al, 1984).

Η πρόσφατη απομόνωση φυτικών cDNA κλώνων της ODC από την ντατούρα (Michael et al, 1996), τον καπνό (Imanishi et al, 1998) και τη ντομάτα (Alabadi and Carbonell, 1998), έδειξε ότι τα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης που φέρουν αποτελούνται από 431-433 αο. και κωδικοποιούν πολυπεπίδια MB 47 kDa περίπου. Τα αμινοξικά υπολείμματα που έχουν δειχθεί ως σημαντικά για την ενεργότητα της ODC των θηλαστικών (ενεργό κέντρο, θέση πρόσδεσης συνενζύμου) είναι συντηρημένα και στα φυτικά ένζυμα αντίθετα με το καρβοξυτελικό άκρο των μορίων που δεν περιέχει τη συντηρημένη περιοχή σε θηλαστικά και βάτραχο η οποία εμπλέκεται στη γρήγορη αποικοδόμηση της πρωτεΐνης (*ibid*). Ακόμη, από τους φυτικούς cDNA κλώνους της ODC λείπουν οι μακριές 5' και 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές που υπάρχουν στα θηλαστικά και οι οποίες θεωρείται ότι συμμετέχουν σε μηχανισμούς μεταφραστικού ελέγχου.

Η ADC στο βακτήριο *E. coli* βρίσκεται σε δύο μορφές: τη βιοαποικοδομητική και τη βιοσυνθετική. Η βιοαποικοδομητική ADC επάγεται σε μερικά στελέχη της *E. coli*, όταν αναπτύσσονται σε όξινο περιβάλλον που περιέχει αργινίνη, προκειμένου να ρυθμίσει το pH καταναλώνοντας την περίσσεια των πρωτονίων. Η βιοσυνθετική ADC κωδικοποιείται από το *speA* γονίδιο, είναι τετραμερής, με MB υπομονάδας 70 kDa, και απαιτεί φωσφορική πυριδοξάλη και Mg²⁺ ως συμπαραγοντες. Το μονομερές συντίθεται ως ένα πρόδρομο πολυπεπίδιο MB 74 kDa, το οποίο μετα-μεταφραστικά μετατρέπεται στην ώριμη μορφή MB 70 kDa που εντοπίζεται στον εσωτερικό περιπλασματικό χώρο. Το *speA* γονίδιο υπόκειται σε μεταβολικό έλεγχο, καθώς το προϊόν της

ADC και τα παράγωγά του (ΠΣ και ΣΔ) το καταστέλλουν (Moore and Boyle, 1990).

Η ADC έχει βρεθεί σε όλα τα ανώτερα φυτά που έχουν εξετασθεί για την ενεργότητά της (Birecka et al, 1985a,b, Smith, 1985). Το ένζυμο έχει χαρακτηριστεί από λίγα φυτικά είδη και από ακόμα λιγότερα ο χαρακτηρισμός έγινε με καθαρό μέχρι ομοιογένειας παρασκεύασμα (βρώμη: Smith, 1979, ρύζι: Choudhuri and Ghosh, 1982, Reggiani, 1994, λάθυρο: Ramakrishna and Adiga, 1975, σόγια: Nam et al, 1997, πεδινή κράμβη (*Brassica campestris*): Das et al, 1996). Γενικά, είναι ένα εξαρτώμενο από φωσφορική πυριδοξάλη ένζυμο που απαιτεί παρουσία σουλφυδρυλομάδων για την επίδειξη του μέγιστου της ενεργότητάς του, το άριστο του pH είναι γύρω στο 8,0, το άριστο της θερμοκρασίας κυμαίνεται από 30 έως 45 °C, δε φαίνεται να εξαρτάται από κάποιο μεταλλικό παράγοντα και το ένα από τα προϊόντα του (η αμίνη αγματίνη) καθώς και άλλες αμίνες (διαμίνες ή ανώτερες ΠΑ) παρεμποδίζουν την ενεργότητά του (*ibid*). Ο χρόνος ημιζωής της ADC στα φυτά, όπως υπολογίστηκε σε πειράματα με κυκλοεξιμίδιο, είναι της τάξεως της μισής έως τεσσάρων ωρών (Montague et al, 1979, Suresh et al, 1979).

Η σύσταση και η δομή των φυτικών ADC δεν έχει διαλευκανθεί. Στη βρώμη το ένζυμο εμφανίζεται μετά τον καθαρισμό σε δύο μορφές με MB 118 και 195 kDa (Smith, 1979), ενώ αργότερα προτάθηκε η ομοεξαμερής σύστασή του με MB υπομονάδας 39 kDa (Smith, 1985). Όμως, η απομόνωση ενός cDNA κλώνου που κωδικοποιεί την ADC από τη βρώμη έδειξε ότι το προϊόν του mRNA είναι ένα πολυπεπτίδιο 66 kDa που ύστερα από μετα-μεταφραστική πρωτεολυτική επεξεργασία δίνει δύο πολυπεπτίδια 42 και 24 kDa (Bell and Malmberg, 1990, Malmberg et al, 1992, Malmberg and Cellino, 1994). Η ADC από το επίσης μονοκότυλο ρύζι, παρουσιάζεται ομοτριμερής με MB υπομονάδας 63 kDa και χωρίς ενδείξεις για μετα-μεταφραστική πρωτεολυτική επεξεργασία (Reggiani, 1994).

Στο λάθυρο η ADC βρέθηκε να είναι ομοεξαμερής με MB υπομονάδας 36 kDa (Ramakrishna and Adiga, 1975). Στο συγγενές είδος σόγια (ανήκει στην ίδια οικογένεια, Οικ. Fabaceae), το ένζυμο είναι ομοτριμερής με MB υπομονάδας 74

kDa (Nam et al, 1997), μέγεθος που συμφωνεί και με το πολυπεπίδιο που κωδικοποιεί το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης ενός cDNA κλώνου από το ίδιο φυτό (Nam et al, 1996). Στο επίσης συγγενές μπιζέλι, στο γαρύφαλλο και στο δασικό καπνό (*Nicotiana sylvestris*) τα πολυπεπίδια που κωδικοποιούν τα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης cDNA κλώνων που απομονώθηκαν, έχουν μέγεθος 79 kDa (Perez-Amador et al, 1995, Chang et al, 1996, Nakakita M, 1997: μόνο στη βάση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών GenEMBL). Η ADC της πεδινης κράμβης (*Brassica campestris*) είναι ομοτετραμερής με MB υπομονάδας 60 kDa (Das et al, 1996). Από τη συγγενής *Arabidopsis* (Οικ. Brassicaceae), έχουν απομονωθεί δύο cDNA κλώνοι που κωδικοποιούν πολυπεπίδια 76 και 77 kDa, όμως αντίσωμα αναγνώρισε σε western ανάλυση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ζώνη 42 kDa (ίδιου μεγέθους με το πρωτεολυτικό προϊόν της μετα-μεταφραστικής επεξεργασίας στη βρώμη, Watson et al, 1996).

Σε αντίθεση, τόσο με την ODC όσο και με την ADC, η SAMDC δεν εξαρτάται από φωσφορική πυριδοξάλη ως συνένζυμο, αλλά βασίζεται στην προσθετική ομάδα ενός ομοιοπολικά ενωμένου πυρουβικού. Η SAMDC αποτελεί το μοναδικό παράδειγμα από τα ένζυμα των θηλαστικών, που ανήκει στη μικρή κατηγορία των ενζύμων που φέρουν ομοιοπολικά ενωμένο πυρουβικό (Tabor and Tabor, 1984). Συντίθεται ως προένζυμο (MB 38 kDa, 333-334 αο.), που στη συνέχεια πρωτεολύεται αυτοκαταλυτικά μεταξύ δύο υπολειμμάτων σερίνης, δίνοντας δύο πολυπεπίδια που μαζί σχηματίζουν το ενεργό ένζυμο, το μικρότερο (6 kDa) με τη σερίνη στο καρβοξυτελικό άκρο και το μεγαλύτερο (32 kDa) με το πυρουβικό (στο οποίο έχει μετατραπεί η άλλη σερίνη) στο αμινοτελικό άκρο. Το ένζυμο στη φυσική του διαμόρφωση είναι ετεροτετραμερές, αποτελούμενο από δύο μικρές και δύο μεγάλες υπομονάδες και έχει επίσης υψηλό ρυθμό ανακύκλωσης (turnover) (φέρει μια PEST περιοχή στο C' άκρο της μεγάλης υπομονάδας). Η προσθήκη ΠΑ σε πειράματα *in vitro* μετάφρασης παρεμποδίζει τη σύνθεση της SAMDC περισσότερο από ότι την πρωτεϊνοσύνθεση γενικά, υποδεικνύοντας ότι η ρύθμιση της σύνθεσης του ενζύμου από τις ΠΑ γίνεται σε επίπεδο μετάφρασης (Heby and Persson, 1990). Το mRNA της SAMDC των θηλαστικών φέρει εκτενή αλληλουχία (~330

νουκλεοτιδίων), στο 5' άκρο από την αρχή του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης, με τη βοήθεια του οποίου οι ΠΑ ρυθμίζουν τη μετάφρασή του. Στην αλληλουχία αυτή βρίσκεται ένα αναρροϊκό ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (upstream ORF) που κωδικοποιεί ένα εξαπεπτίδιο, την αλληλεπίδραση του οποίου, με την πρωτεΐνη στόχο του, ρυθμίζουν οι ΠΑ (Ruan et al, 1996).

Οι φυτικές SAMDC, παρόλο που εμφανίζουν χαμηλή ομολογία σε αμινοξικό επίπεδο με τις αντίστοιχες των θηλαστικών, παρουσιάζουν τα ίδια χαρακτηριστικά: συνθέτονται σαν προένζυμα που ωριμάζουν με αυτοκαταλυτική πρωτεόλυση μεταξύ δύο υπολειμμάτων σερίνης που η μία θα μετατραπεί σε πυρουβικό, φέρουν στο καρβοξυτελικό άκρο τους PEST περιοχές και τα mRNA τους έχουν εκτενείς αλληλουχίες (>450 νουκλεοτιδίων) στις οποίες βρίσκεται επίσης ένα αναρροϊκό ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (upstream ORF), που κωδικοποιεί όμως ένα πολυπεπτίδιο 50 περίπου υπολειμμάτων με υψηλή συντήρηση μεταξύ των φυτικών ειδών (Taylor et al, 1992, Schroder and Schroder, 1995, Lee et al, 1997).

Οι συνθάσες της ΣΔ και ΣΝ στα θηλαστικά εκφράζονται συνεχώς και είναι ένζυμα πολύ πιο σταθερά από την ODC και SAMDC. Είναι ομοδιμερείς πρωτεΐνες με MB υπομονάδων περίπου 36 και 44 kDa αντίστοιχα και σχετικά ψηλά K_M για την αποκαρβοξυλιωμένη SAM και την ΠΣ και ΣΔ. Η ρύθμισή τους γίνεται στο επίπεδο της ενζυμικής ενεργότητας από τη διαθεσιμότητα των υποστρωμάτων τους (Heby and Persson, 1990).

Με βάση το παράδειγμα των θηλαστικών και του γεγονότος ότι οι δύο διαδοχικές μεταφορές της αμινοπρόπυλ- ομάδας, για τη σύνθεση της ΣΜ, γίνονται στα δύο αντίθετα άκρα του μορίου της ΠΣ, θεωρείται πως και στα φυτά οι συνθάσες της ΣΔ και της ΣΜ είναι δύο ξεχωριστά ένζυμα. Η συνθάση της ΣΔ έχει μερικώς καθαριστεί από δύο μόνο ανώτερα φυτά (από το καλαμπόκι: Hirasawa and Suzuki, 1983 και από το *Brassica pekinensis*: Yamanoha and Cohen, 1985), ενώ η συνθάση της ΣΜ δεν έχει χαρακτηριστεί από κανένα φυτό, αν και έχει αναφερθεί η ανίχνευση της ενεργότητάς του σε μία και μοναδική περίπτωση (Sindhu and Cohen, 1984). Αντίθετα, στη μηδική δε βρέθηκε ενεργότητα συνθάσης ΣΜ, όμως η συνθάση της ΣΔ, παρόλη την υψηλή

εξειδίκευση που έδειχνε για την ΠΣ, εκτός από ΣΔ τα προϊόντα της περιλάμβαναν τη ΣΜ και τη θερμοσπερμίνη σε μικρότερες ποσότητες (Bagga et al, 1997). Ακόμη, στο λάθυρο βρέθηκε εναλλακτικό μονοπάτι για τη σύνθεση της ΣΔ από την αποκαρβοξυλίωση του ενδιάμεσου καρβοξυσπερμιδίνης, που παράγεται όταν χρησιμοποιηθεί ως δότης της αμινοπρότυλ- ομάδας στην ΠΣ η L-ασπαρτυλ-β-σεμιαλδεΰδη (Adiga and Prasad, 1985).

4. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΗΣ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΑΜΙΝΩΝ

Η μελέτη τόσο της βιοσύνθεσης όσο και της φυσιολογικής δράσης των ΠΑ διευκολύνεται, όπως και για άλλα βιολογικά ενεργά μικρομόρια, από την ύπαρξη πειραματικών συστημάτων, στα οποία μία ή και περισσότερες εξ αυτών λείπουν. Η προφανής, αλλά όχι πάντοτε εφικτή λύση, είναι η απομόνωση μεταλλαγμάτων ανίκανων να συνθέσουν συγκεκριμένες ΠΑ. Με τέτοιου είδους μεταλλάγματα βακτηρίων και του σακχαρομύκητα έγινε ο αρχικός προσδιορισμός των βιοσυνθετικών μονοπατιών των ΠΑ. Το γεγονός όμως ότι όσο προχωρούμε προς ανώτερους οργανισμούς η δημιουργία και απομόνωση μεταλλαγμάτων γίνεται δυσκολότερη, οδήγησε στη δημιουργία και εφαρμογή αναστολέων των ενζύμων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των ΠΑ. Αυτού του είδους η προσέγγιση εμπεριέχει άλλα προβλήματα, όπως η πρόσληψη των αναστολέων από τα κύτταρα και η μη πλήρης εξάντληση της ενδογενούς ΠΑ τη σύνθεση της οποίας παρεμποδίζει ο αναστολέας, σε εύλογο χρονικό διάστημα, λόγω των μεγάλων χρόνων ημίσειας ζωής των ΠΑ (π.χ. για την ΣΔ και ΣΝ κυμαίνονται μεταξύ 7 και 42 ημερών, Heby, 1981).

Πίνακας 1. Κυριότεροι αναστολείς των ενζύμων βιοσύνθεσης των ΠΑ (από Heby, 1981, με συμπληρώσεις από Kallio et al, 1981, Slocum et al, 1984, Tabor and Tabor, 1984, Bitonti et al, 1987, Torrigiani et al, 1987, Walker et al, 1987, Galston and Kaur-Sawhney, 1990, Yakovleva and Dudits, 1993). Κατηγορία I: αντιστρεπτοί/ συναγωνιστικοί αναστολείς, Κατηγορία II: καταλυτικά μη αντιστρεπτοί αναστολείς.

ENZY	ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ	ΚΑΤΗ
ODC	<p>Παρόμοιος με το υπόστρωμα:</p> <ul style="list-style-type: none"> i) DL-α-Υδραζινο-ορνιθίνη ii) DL-α-Μεθυλ-ορνιθίνη iii) DL-α-Υδραζινο-α-μεθυλ-ορνιθίνη iv) Καναλίνη v) DL-α-Διφθορομεθυλ-ορνιθίνη (DFMO) vi) DL-α-Μονοφθορομεθυλ-ορνιθίνη (MFMO) <p>Παρόμοιος με το προϊόν:</p> <ul style="list-style-type: none"> i) trans-1,4-Διαμινο-2-βουτένιο ii) 1,4-Διαμινο-βουτανόνη iii) 1-Αμινοξυ-3-αμινοπροπάνιο iv) Ομόλογες διαμίνες με 3-12 άτομα C (α,ω-Διαμίνες) 	
ADC	<p>Παρόμοιος με το υπόστρωμα:</p> <ul style="list-style-type: none"> i) DL-α-Μεθυλ-αργινίνη ii) Καναβανίνη iii) DL-α-Διφθορομεθυλ-αργινίνη (DFMA) iv) DL-α-Μονοφθορομεθυλ-αργινίνη (MFMA) <p>Παρόμοιος με το προϊόν:</p> <ul style="list-style-type: none"> i) 1-Αμινοξυ-3-αμινοπροπάνιο 	
SAMD	<ul style="list-style-type: none"> i) Μεθυλ-γλυοξαλ-δι(γουανυλυδραζόνη) ii) S-Αδενοσυλ-DL-2-μεθυλ-μεθειονίνη 	
Συνθάσ	<ul style="list-style-type: none"> i) α,ω-Διαμίνες με 3-12 άτομα C ii) Κυκλο-εξυλαμίνη (CHA) 	
Συνθάσ η ΣΜ	<ul style="list-style-type: none"> i) α,ω-Διαμίνες με 3-12 άτομα C (1,3-Διαμινο-προπάνιο και 1,5-Διαμινο-πεντάνιο περισσότερο ενεργά) 	

Οι κυριότεροι από τους αναστολείς, που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των ΠΑ κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες: η πρώτη περιλαμβάνει τους αντιστρεπτούς και συναγωνιστικούς αναστολείς και η δεύτερη τους καταλυτικά μη αντιστρεπτούς. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι κυριότεροι από αυτούς.

5. Ο ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΑΜΙΝΩΝ

5.1. ΣΤΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ

Το απαραίτητο των ΠΑ στην ανάπτυξη αποδείχτηκε για πρώτη φορά το 1948 στο βακτήριο *Hemophilus parainfluenzae* και αργότερα σε μεταλλάγματα ελαττωματικά στη βιοσύνθεση των ΠΑ της *E. coli* και του *Saccharomyces cerevisiae* (Slocum et al, 1984). Από τότε, οι ΠΑ έχουν περιγραφεί ως αναπτυξιακοί παράγοντες σε διάφορους μικροοργανισμούς, κύτταρα θηλαστικών και ανώτερα φυτά.

Αυξημένος μεταβολισμός των ΠΑ σε ταχέως διαιρούμενα κύτταρα έχει αναφερθεί σε μικροοργανισμούς και όγκους φυτών και θηλαστικών. Η ODC στα θηλαστικά επάγεται κατά την ανάπτυξη του παγκρέατος, την αναγέννηση του συκωτιού μετά από μερική ηπατεκτομή, από ορμόνες όπως τεστοστερόνη και οιστραδιόλη και από καρκινογόνα, υποδεικνύοντας ότι η βιοσύνθεση των ΠΑ πρέπει να συνοδεύει τη βιοσύνθεση των νουκλεϊκών οξέων για τη συμπλήρωση του κυτταρικού κύκλου (Galston, 1983, Folsch et al, 1990). Το ότι η παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης των ΠΑ με τους κατάλληλους αναστολείς εγκλωβίζει τα κύτταρα στη φάση G₁ του κυτταρικού κύκλου, επάγωντας τις πρωτεΐνες παρεμποδιστές του κυτταρικού κύκλου p53, p21 και p27, και ακόμη περισσότερο το γεγονός του απεγκλωβισμού των κυττάρων μετά την προσθήκη ΠΑ υποστηρίζει την παραπάνω άποψη (Rupniak and Paul, 1978, Ray et al, 1999).

Έτσι πλέον, οι ΠΑ έχουν καταταχθεί στην κατηγορία των μορίων, των οποίων η σύνθεση ενεργοποιείται κατά τη διάρκεια της G₁ φάσης και τα οποία συμμετέχουν στην προετοιμασία του κυττάρου για το διπλασιασμό του DNA. Η δραματική αύξηση της ενεργότητας της ODC φαίνεται να είναι μία από τις

πρώτες αλλαγές, που πραγματοποιούνται κατά την είσοδο του κυττάρου στην G_1 φάση, όταν αυτό εισέρχεται σε κατάσταση πολλαπλασιασμού από μία εφησυχάζουσα (G_0) προηγούμενη κατάσταση. Η ενεργότητα της ODC παρουσιάζει ένα πρώτο μέγιστο νωρίς στην G_1 φάση και ένα δεύτερο στα όρια G_1/S φάσεων. Ένα παρόμοιο πρότυπο αλλαγών έχει παρατηρηθεί για την ενεργότητα της SAMDC (Tabor and Tabor, 1984).

Υπάρχουν δεδομένα, που υποστηρίζουν ότι το πρώιμο μέγιστο της G_1 φάσης στη σύνθεση των ΠΑ, που παρατηρείται μετά την εφαρμογή αυξητικών παραγόντων, δε συνδέεται με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Έτσι, ερεθίσματα, που δεν προκαλούν πολλαπλασιασμό των κυττάρων, επάγουν αύξηση στην ενεργότητα της ODC, αύξηση που αντιστοιχεί χρονικά με εκείνη που παρατηρείται νωρίς στην G_1 φάση. Για παράδειγμα αλλαγή στην ωσμωμοριακότητα του κυτταρικού περιβάλλοντος έχει αποδειχθεί ότι είναι σημαντικός παράγοντας στην ανεξάρτητη ορμόνης επαγωγή του αρχικού μέγιστου της ενεργότητας της ODC (Heby, 1981). Ακόμα έχει αναφερθεί ότι χαμηλές θερμοκρασίες ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$) επάγουν την ενεργότητα της ODC και τα επίπεδα της ΠΣ, στο χρυσόψαρο (Notari et al, 1998). Αντίθετα με τα εφησυχάζοντα κύτταρα που μπαίνουν στον κυτταρικό κύκλο, στα συνεχώς διαιρούμενα κύτταρα δεν παρατηρείται το αρχικό μέγιστο ενεργότητας της ODC στην G_1 . Είναι πιθανόν, το αρχικό αυτό μέγιστο να αποτελεί μέρος των απαραίτητων αλλαγών, που κάνουν ένα εφησυχάζον κύτταρο να εισέλθει στον κυτταρικό κύκλο. Οι αλλαγές, που εμφανίζονται όταν ένα κύτταρο από τη φάση G_0 αρχίσει να πολλαπλασιάζεται, δεν εκφράζονται σε συνεχώς διαιρούμενα κύτταρα. Η ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης σε κύτταρα στην G_0 φάση από αναπτυξιακά ερεθίσματα (π.χ. ορμόνες) περιλαμβάνει και την ταχεία επαγωγή των mRNA της ODC και SAMDC (Heby and Persson, 1990). Από την άλλη υπάρχουν δεδομένα, που υποστηρίζουν, ότι η πρώιμη ενεργοποίηση της ODC στη φάση G_1 είναι αποτέλεσμα του αυξημένου ρυθμού μετάφρασης και ότι το σταθερό mRNA της ODC, που υπάρχει στα εφησυχάζοντα κύτταρα, παρέχει τη βάση για την ενεργότητα του ενζύμου νωρίς στην G_1 (Tabor and Tabor, 1984).

Γενικό φαινόμενο των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο (τόσο των συνεχώς διαιρούμενων όσο και των προερχομένων από G_0) αποτελεί η αυξημένη ενεργότητα της ODC προς το τέλος της G_1 και αρχή της S-φάσης. Η ύπαρξη χρονικής συσχέτισης μεταξύ αυτής της ενεργότητας και της έναρξης του διπλασιασμού του DNA οδηγεί στην υπόθεση ότι η αύξηση της σύνθεσης των ΠΑ προς το τέλος της G_1 εμπλέκεται στην προετοιμασία του κυττάρου για τη σύνθεση του DNA. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από πειράματα που έχουν δείξει ότι: α) παράγοντες που καθυστερούν την S-φάση καθυστερούν επίσης και την επαγωγή της ενεργότητας της ODC και β) τα επίπεδα της ΠΣ στο τέλος της G_1 -φάσης σχετίζονται με το ποσοστό των κυττάρων, που έχουν αρχίσει να συνθέτουν DNA (Heby, 1981).

Αύξηση στη σύνθεση των ΠΑ έχει παρατηρηθεί και κατά την G_2 ή M-φάση πολλών κυτταρικών σειρών. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το ότι οι ΠΑ επηρεάζουν την πρόωρη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων σε μεσοφασικούς πυρήνες, εγείρει το ερώτημα του κατά πόσον οι ΠΑ παίζουν ενεργό ρόλο στη μίτωση. Ο πιθανός ρόλος των ΠΑ στη μίτωση ενισχύεται από πειράματα, που έδειξαν ότι η ενεργότητα της ODC σε λευχαιμικά κύτταρα ποντικού της σειράς L1210 παρεμποδίζεται από τους αναστολείς της μίτωσης κολχικίνη και βινβλαστίνη, αλλά όχι και από τη λουμικολχικίνη και την κολχικεΐνη, δύο δομικά ανάλογα της κολχικίνης, που δεν επηρεάζουν τη δομή των μικροσωληνίσκων και δεν είναι αντιμιτωτικά. Ακόμα, η κολχικίνη και βινβλαστίνη παρεμπόδισαν κατά 50% την ενεργότητα της ODC σε συγκεντρώσεις 0.7 και 0.08 μM , αντίστοιχα, γεγονός που συνδέεται με τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα της βινβλαστίνης στην αποδιοργάνωση του συστήματος των μικροσωληνίσκων. Καμία από τις δύο αυτές ουσίες δεν επηρέασε την ενεργότητα του ενζύμου *in vitro* (από Heby, 1981). Το γεγονός της χρονικής συσχέτισης της προμιτωτικής επαγωγής στη σύνθεση των τουμπουλινών και της ενεργότητας της ODC υποδεικνύει την ύπαρξη κάποιου είδους αλληλεπίδρασης ΠΑ και μικροσωληνίσκων κατά τη μίτωση. Τα παραπάνω ενισχύονται από την απομόνωση μίας μεταλλαγμένης κυτταρικής σειράς από ωοθήκες κινέζικου κρικητού (κύτταρα CHO), που απαιτεί την

ύπαρξη ΠΑ στο μέσο καλλιέργειας, στην οποία η αφαίρεση των ΠΑ από το μέσο προκαλεί εξαφάνιση των δεσμών της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων αλλά δεν επηρεάζει το πρότυπο των ενδιάμεσων ινιδίων (Heby, 1981, Pohjanpelto et al, 1981).

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι η μείζων περιοχή δράσης των ΠΑ είναι της σύνθεσης του DNA, με δεύτερη εκείνη της μίτωσης. Το ερώτημα είναι πώς, με ποιο τρόπο πραγματοποιείται αυτή η δράση. Στην περίπτωση της σύνθεσης του DNA τα πειραματικά δεδομένα στηρίζουν δύο αντίθετες υποθέσεις. Ο μειωμένος ρυθμός σύνθεσης DNA αποδίδεται: α) σε ελάττωση του αριθμού των ενεργών μονάδων διπλασιασμού (ρεπλικονίων) ή β) σε μειωμένη ταχύτητα της διχάλας διπλασιασμού, γεγονός που θα σήμαινε ότι οι ΠΑ δε ρυθμίζουν το διπλασιασμό του DNA αλλά μάλλον συμμετέχουν άμεσα ως συμπαράγοντες στην αντίδραση σύνθεσής του (Tabor and Tabor, 1984). Στην περίπτωση της μίτωσης, οι ΠΑ φαίνεται να συμμετέχουν ως παράγοντες που διατηρούν τη δομή και λειτουργία μικροσωληνίσκων και ινιδίων ακτίνης, γεγονός που ενισχύεται και από *in vitro* πειράματα, όπου φυσιολογικές συγκεντρώσεις ΠΑ προάγουν τον πολυμερισμό της ακτίνης και τη μετατροπή των μορίων της από τη σφαιρική (G-ακτίνη) στην ινώδη διαμόρφωση (F-ακτίνη) (Heby, 1981, Pohjanpelto et al, 1981). Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι η ODC μεταφέρεται στην κυτταρική μεμβράνη, μετά τη φωσφορυλίωσή της, όπου συμμετέχει στις κυτταροσκελετικές ανακατατάξεις της μίτωσης (Heiskala et al, 1999).

Κατά τη διάρκεια της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης αυξημένη σύνθεση ΠΣ, ΣΔ και ΣΝ φαίνεται ότι αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τη συνέχισή της. Οι ΠΑ, μάλλον, παίζουν καθοριστικό ρόλο κατά τη γαστριδίωση, την αναπτυξιακή αυτή διαδικασία που σηματοδοτεί την έναρξη της αυτονομίας του εμβρύου, αλλά μπορεί επίσης να απαιτούνται και για άλλες αναπτυξιακές διαδικασίες (Heby, 1981).

Τέλος, η ΣΔ εμπλέκεται στη ρύθμιση τόσο του πολλαπλασιασμού των κυττάρων όσο και της διαφοροποίησής τους στο μαστικό αδέν. Σε πειράματα *in vitro* καλλιέργειας ολόκληρων οργάνων, που οδηγήθηκαν προς διαφοροποίηση

με συνδυασμό ορμονών, η προσθήκη στο μέσο καλλιέργειας του αναστολέα της SAMDC, MGBG παρεμπόδισε την έκφραση των αποτελεσμάτων των ορμονών, δηλαδή τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων και τη σύνθεση των πρωτεϊνών του γάλακτος. Παροχή, ειδικά ΣΔ, αντέστρεψε το αποτέλεσμα του αναστολέα και επανέφερε το πρότυπο του μάρτυρα (Heby, 1981).

5.2. ΣΤΑ ΦΥΤΑ

Η συντριπτική πλειοψηφία των βιβλιογραφικών αναφορών για τις ΠΑ στα φυτά, έχουν ηλικία μικρότερη των 30 ετών. Έτσι, τα στοιχεία που υπάρχουν είναι περισσότερο παρατηρήσεις συσχετίσεων μεταξύ των επιπέδων των ενδογενών ή των εξωγενώς χορηγούμενων ΠΑ και των φάσεων των κυτταρικών λειτουργιών παρά αποκρυσταλλωμένες και στέρεες θεωρίες για τον πιθανό ρόλο τους.

5.2.1. ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΥΚΛΟ

Έχει δειχθεί ότι οι ΠΑ επάγουν την ανάπτυξη διάφορων ανώτερων φυτών, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι ενδογενείς συγκεντρώσεις τους μπορεί να αποβούν περιοριστικοί παράγοντες της ανάπτυξης (Smith, 1985). Ακόμα έχουν συσχετισθεί τα αυξημένα επίπεδα των ΠΑ με τις κυτταρικές διαιρέσεις και η πτώση τους με κάθε επακολουθούσα μείωση της μεταβολικής δραστηριότητας.

Σε αιωρούμενες καλλιέργειες κυττάρων καπνού και σε ωοθήκες ντομάτας, για παράδειγμα, υπάρχει συσχέτιση της ενεργότητας της ODC και της συχνότητας των κυτταρικών διαιρέσεων (Cohen et al, 1982, Heimer et al, 1982). Σε νεαρά φυτά *Acer saccharum* δεν παρατηρήθηκε απλώς η ταυτόχρονη συσσώρευση των ΠΑ με τις κυτταρικές διαιρέσεις αλλά και η ταυτόχρονη παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης των ΠΑ (με κάποιους αναστολείς των ενζύμων) και των κυτταρικών διαιρέσεων (Walker et al, 1985). Ακόμα σε πρωτοπλάστες απομονωμένους από μεσόφυλλο των απειθάρχητων όσον αφορά μορφογενετικούς χειρισμούς, φυτών της βρώμης ή δύο μελών του γένους *Alnus*,

η παροχή ΠΑ επάγει τη σύνθεση DNA και μικρό αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων (Huhtinen et al, 1982).

Περισσότερο εστιασμένες μελέτες του κυτταρικού κύκλου φυτικών κυττάρων έδωσαν αποτελέσματα απόλυτα σύμφωνα με τις παρατηρήσεις που έχουν γίνει σε κατώτερους οργανισμούς και θηλαστικά. Έτσι, σε συγχρονισμένες με χρήση κατάλληλης φωτοπεριόδου, φωτοαυτότροφες καλλιέργειες του πράσινου φύκου *Euglena*, παρατηρήθηκαν τρία μέγιστα στα επίπεδα των ΠΑ κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου: το πρώτο προς το τέλος της G₁-φάσης και πριν την έναρξη σύνθεσης του DNA, το δεύτερο και περισσότερο σημαντικό στην G₂-φάση αμέσως πριν την αρχή των κυτταρικών διαιρέσεων και τέλος το τρίτο, συγκριτικά μικρότερο από τα δύο άλλα, σε χρονική περίοδο πριν την G₁-φάση (ένα είδος G₀-φάσης). Αυτό το τελευταίο μέγιστο οι συγγραφείς το αποδίδουν σε ερέθισμα που δε σχετίζεται με την προετοιμασία του κυττάρου για διπλασιασμό του DNA και διαίρεση (Adlakha et al, 1980).

Ένα εξαιρετο πειραματικό σύστημα για τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου και της επίδρασης των ΠΑ στα ανώτερα φυτά, είναι ο σε λήθαργο βολβός του *Helianthus tuberosus*. Ο ιστός αυτός, που αποτελείται από κύτταρα αποταμιευτικού παρεγχύματος με μεγάλα χυμοτόπια και λεπτά κυτταρικά τοιχώματα, όντας σε λήθαργο περιέχει ελάχιστα ποσά ορμονών και ΠΑ. Η λύση του λήθαργου μπορεί να γίνει με την επίδραση αυξίνης (IAA ή 2,4-D) ή, και το σημαντικότερο, ΠΑ. Τα κύτταρα, τότε εισέρχονται συγχρόνως στον κυτταρικό κύκλο, εμφανίζοντας μορφολογικές και φυσιολογικές αλλαγές. Το πρώτο από τα μεταβολικά γεγονότα που επάγει η επίδραση αυξίνης είναι η βιοσύνθεση ΠΑ: 15, μόλις, λεπτά μετά την εφαρμογή της είναι ανιχνεύσιμη η αύξηση των επιπέδων των ΠΑ που φτάνουν σε ένα πρώτο μέγιστο προς το τέλος της G₁-φάσης και ένα δεύτερο στη μέση της M-φάσης. Παρόμοια πρότυπα ακολουθούν και οι ενεργότητες των βιοσυνθετικών ενζύμων των ΠΑ με μια μικρή καθυστέρηση (Serafini Fracassini et al, 1980, Bagni et al, 1982, Torrigiani et al, 1987, Serafini Fracassini, 1991).

Σε ένα άλλο σύστημα (συγχρονισμένες καλλιέργειες κυττάρων καπνού, το οποίο πλεονεκτεί κατά το ότι τα κύτταρα που μπαίνουν στον κυτταρικό κύκλο

δεν προέρχονται από μία G₀-φάση όπως στο προηγούμενο, αλλά από μία M-φάση - συνεχώς διαιρούμενα κύτταρα) οι μεγαλύτερες μεταβολές παρατηρήθηκαν στα επίπεδα της ελεύθερης και συνδεμένης ΠΣ. Σε όλη τη διάρκεια της μεταχείρισης του συγχρονισμού με αφιδιχολίνη (παρεμποδιστής της DNA-πολυμεράσης α που συγκεντρώνει τα κύτταρα στην G₁-φάση), τα επίπεδα της ΠΣ αυξάνονταν, για να μειωθούν στο μισό 3 ώρες μετά την απομάκρυνση του παρεμποδιστή και όταν τα κύτταρα παρουσίαζαν το μέγιστο στη σύνθεση DNA. Μία δεύτερη αύξηση στα επίπεδα της ελεύθερης ΠΣ παρατηρήθηκε προς το τέλος της S και νωρίς στην G₂-φάση, ακολουθούμενη με καθυστέρηση από παρόμοια αύξηση της συνδεμένης ΠΣ προς το τέλος της G₂ και κατά τη διάρκεια της M-φάσης (Pfosser et al, 1990).

Σε συγχρονισμένες καλλιέργειες κυττάρων του φυτού *Catharanthus roseus*, τα επίπεδα της ΠΣ και ΣΔ παρουσίασαν δύο μέγιστα: ένα πριν την S-φάση και το δεύτερο στο όριο μεταξύ G₂- και M-φάσης. Ταυτόχρονη και διφασική ήταν επίσης η αύξηση των ενεργοτήτων της ADC και ODC κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, με τις τιμές της πρώτης να είναι σχεδόν δεκαπλάσιες της δεύτερης (Maki et al, 1991). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν και κατά τη μετάβαση κυττάρων σακχαρότευτλων σε αιωρούμενη καλλιέργεια από τη στάσιμη φάση στη φάση πολλαπλασιασμού (Fowler et al, 1996).

Είναι φανερό, από τα παραπάνω ότι τα πρότυπα των αλλαγών των ΠΑ και των βιοσυνθετικών τους ενζύμων στα φυτά, είναι παρόμοια, αν όχι ταυτόσημα, με εκείνα των θηλαστικών, κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη κοινών μηχανισμών συμμετοχής και δράσης των ΠΑ στην κυτταρική διαίρεση και συγκεκριμένα μέσω της διαδικασίας διπλασιασμού του DNA και του μηχανισμού της μίτωσης.

5.2.2. ΣΤΗ ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ

Πολλές μελέτες έχουν ερευνήσει το ρόλο των ΠΑ και της ADC κατά το σχηματισμό σωματικών εμβρύων από διάφορα φυτικά συστήματα, λόγω του ότι

η σωματική εμβρυογένεση αποτελεί σημαντικό μονοπάτι για την αναγέννηση φυτών, όπως και πιθανό σύστημα-μοντέλο για τη μελέτη μορφογενετικών φαινομένων *in vitro*.

Στο καρότο, μετά τη μεταφορά των κυττάρων, από το μέσο καλλιέργειας που περιείχε 2,4-D στο μέσο εμβρυογένεσης (χωρίς 2,4-D), παρουσιαζόταν ένας διπλασιασμός των επιπέδων της ΠΣ και της ενεργότητας της ADC σε χρόνο μικρότερο των 6 ωρών. Όπως φάνηκε, με τη χρήση παρεμποδιστών της σύνθεσης RNA και πρωτεϊνών, ο διπλασιασμός αυτός εξαρτιόταν από τη σύνθεση τόσο RNA όσο και πρωτεϊνών (Montague et al, 1978a, b). Σε άλλη έρευνα βρέθηκε ότι ο αναστολέας της ADC, α -DFMA μπορούσε να παρεμποδίσει τη μετάβαση των κυττάρων από τη μη οργανωμένη ανάπτυξη προς τη σωματική εμβρυογένεση (αλλά όχι και ο αναστολέας της ODC, α -DFMO) και ότι η προσθήκη ΠΑ μαζί με τον αναστολέα αποκαθιστούσε τη δυνατότητα εμβρυογένεσης. Χαρακτηριστικό είναι ότι το DFMA δεν παρεμπόδιζε την ανάπτυξη των κυττάρων στο μέσο καλλιέργειας με την αυξίνη (Feirer et al, 1984, Robie and Minocha, 1989). Ο αναστολέας της συνθάσης της ΣΔ, CHA, απλώς καθυστέρησε τη διαδικασία της εμβρυογένεσης ενώ ο αναστολέας της SAMDC, MGBG, μείωσε τα επίπεδα της ΣΔ και παρεμπόδισε την εμβρυογένεση. Η προσθήκη ΣΔ, αλλά όχι και ΣΝ, αποκαθιστούσε τη δυνατότητα εμβρυογένεσης (Kaur-Sawhney, 1988, Minocha and Khan 1991, Minocha et al, 1991).

Οι μελέτες της σωματικής εμβρυογένεσης στο καρότο έδειξαν ότι: (α) τα υψηλά ενδογενή επίπεδα των ΠΑ κατά τη σωματική εμβρυογένεση συσχετίζονται με αυξημένες ενζυμικές ενεργότητες της ADC και της SAMDC, (β) η ενζυμική ενεργότητα της ODC αυξάνεται αργότερα, μόνο αφού έχουν παραχθεί ώριμα, πράσινα σωματικά έμβρυα, (γ) η αναστολή των ενζύμων της ADC και της SAMDC παρεμποδίζει τη βιοσύνθεση των ΠΑ και τη σωματική εμβρυογένεση και (δ) η προσθήκη DFMO προκαλεί αύξηση της ενεργότητας της ADC, των ενδογενών ΠΑ και του αριθμού των σχηματιζόμενων σωματικών εμβρύων (Robie and Minocha, 1989). Τα παραπάνω επιβεβαιώθηκαν με τη χρήση διαγενετικών κυττάρων καρότου που υπερέκφραζαν το cDNA της ODC του ποντικού, τα οποία σχημάτιζαν σωματικά έμβρυα νωρίτερα από τα κοινά

κύτταρα, στο μέσο εμβρυογένεσης, ακόμα και υπό την παρουσία DFMA (Bastola and Minocha, 1995). Αυτό συσχετιζόταν με τα υψηλότερα ενδογενή επίπεδα ΠΣ, που η υπερεκφραζόμενη ODC, παρείχε στα διαγενετικά κύτταρα (*ibid*).

Ο αριθμός των σχηματιζόμενων σωματικών εμβρύων από δίσκους φύλλου μελιτζάνας ήταν μεγαλύτερος όταν οι δίσκοι προερχόταν από το κορυφαίο τμήμα του φύλλου, σε σύγκριση με το κατώτερο και συσχετιζόταν με τα ενδογενή επίπεδα των ΠΑ (Yadav and Rajam 1997, 1998). Η προσθήκη αναστολέων των βιοσυνθετικών ενζύμων των ΠΑ παρεμπόδισε τη σωματική εμβρυογένεση (περισσότερο το DFMA και λιγότερο το DFMO), ενώ η εξωγενής εφαρμογή ΠΑ την επανέφερε στα επίπεδα του μάρτυρα (*ibid*).

Στην καμέλια επίσης, ο αριθμός των σχηματιζόμενων σωματικών εμβρύων από έκφυτα φύλλων ήταν μεγαλύτερος στα έκφυτα που προέρχονταν από την κορυφή του φύλλου, σε σύγκριση με εκείνα από τη βάση, χωρίς όμως να υπάρχουν αντίστοιχες διαφορές στις ενδογενείς ΠΑ των δύο τμημάτων των φύλλων (Pedroso et al, 1997). Η αύξηση στις ενδογενείς ΠΑ εμφανίστηκε κατά την καλλιέργεια των εκφύτων στο μέσο επαγωγής της εμβρυογένεσης, και ήταν μεγαλύτερη στα έκφυτα με το μικρότερο εμβρυογενετικό δυναμικό.

Μία σημαντική γονοτυπική διαφορά ως προς το απαραίτητο των ΠΑ κατά τη σωματική εμβρυογένεση παρατηρήθηκε σε δύο σειρές της μηδικής. Και οι δύο παρουσίαζαν συσσώρευση ΠΣ στο μέσον που περιείχε αυξίνη και απότομη μείωση μετά τη μεταφορά στο μέσο χωρίς αυξίνη. Οι αναστολείς των βιοσυνθετικών ενζύμων των ΠΑ, CHA, MGBG, DFMO και DFMA μείωναν τα επίπεδα των ενδογενών ΠΑ και στους δύο γονότυπους, όμως η εμβρυογένεση παρεμποδιζόταν μόνο στον έναν από τους δύο. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι το απαραίτητο των ΠΑ στην έναρξη της σωματικής εμβρυογένεσης ίσως να μην είναι καθολικό αλλά να εξαρτάται από το γονότυπο (Meijer and Simmonds, 1988).

5.2.3. ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ

Ο πιθανός ρόλος των ΠΑ στην κυτταρική διαφοροποίηση στα φυτά έχει κυρίως μελετηθεί στη ριζογένεση και στην άνθηση.

Τα αποτελέσματα, από μελέτες της ριζογένεσης σε τομές υποκοτυλίου της φασολιάς και της *Vigna* με εφαρμογή της αυξίνης IBA, έχουν δείξει ότι οι ΠΑ δε σχετίζονται μόνο με την έναρξη και την πρώιμη ανάπτυξη των ριζών, αλλά μάλλον είναι απαραίτητες για την όλη διαδικασία όπως φάνηκε από τη δράση αναστολέων των βιοσυνθετικών ενζύμων των ΠΑ (Friedman et al, 1985, Smith, 1985). Παρομοίως, η διαμίνη καδαβερίνη, δείχθηκε απαραίτητη για την κανονική ανάπτυξη των ριζών κατά το φύτεμα του σπόρου στη σόγια (Gamarnik and Frydman, 1991). Ακόμα το DFMA προκάλεσε μείωση κατά 65-75% στον αριθμό των ριζών και των φύλλων που αναπτύχθηκαν και στο μήκος των ριζών και των βλαστών σε έκφυτα ενός κόμβου στη φράουλα (Tarenghi et al, 1995).

Στις περισσότερες περιπτώσεις η μελέτη διαφοροποίησης των ριζών γίνεται σε *in vitro* καλλιέργειες τμημάτων βλαστού, όπου οι καινούργιες ρίζες προέρχονται από κύτταρα κοντά σε αγγεία. Σε ένα άλλο σύστημα, αυτό της λεπτής στοιβάδας κυττάρων (TCL, Thin Cell Layer), τα έκφυτα αποτελούνται από επιδερμικά, υποδερμικά και φλοιώδη μόνο κύτταρα αλλά παρόλα αυτά η διαφοροποίηση ριζών μπορεί να επιτευχθεί από τα επιφανειακά αυτά κύτταρα *in vitro*. Σε αυτό, λοιπόν, το σύστημα η διαφοροποίηση ριζών εξαρτάται από τα επίπεδα ΠΣ και ΣΔ και η παρεμπόδιση των βιοσυνθετικών τους ενζύμων την αναστέλλουν (αναστολή που αίρεται με την προσθήκη ΠΣ) (Tiburcio et al, 1989, Torrigiani et al, 1989).

Οι ελεύθερες και συζευγμένες ΠΑ έχουν μελετηθεί σε σχέση με την άνθηση σε ολόκληρα φυτά και σε *in vitro* συστήματα. Στις περισσότερες μελέτες σε ολόκληρα φυτά, έχουν παρατηρηθεί συσχετίσεις της αναπτυξιακής ηλικίας και του αριθμού των ανθέων με την εμφάνιση ορισμένης κατηγορίας ουσιών, παραγώγων των ΠΑ (Kakkar and Pai, 1993). Έχουν γίνει, επίσης, μερικές συγκρίσεις μεταξύ φυτών που αναπτύσσονται υπό διαφορετικές φυσιολογικές συνθήκες και μεταξύ μεταλλαγμένων και αγρίου τύπου. Στον καπνό, παρατηρήθηκε συσσώρευση των προϊόντων του κινναμωμικού οξέος (3-π-

φαινυλπροπιονικού οξέος, HCA: Hydroxycinnamic acid) με ΠΑ στους κορυφαίους βλαστούς και φύλλα σε φυτά που αναπτύσσονταν στους 20 °C και τα οποία θα άνθιζαν όπως και σε φυτά αναπτυσσόμενα στους 30 °C που δε θα άνθιζαν. Η συσσώρευση αυτή εμφανίστηκε αργά στην ανάπτυξη και στις δύο θερμοκρασίες και παρόλο που δεν υπάρχει συσχέτιση με την ίδια την άνθηση, οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι συνδέεται με την ωρίμανση του φυτού για άνθηση και ότι στα φυτά στους 30 °C παρεμποδίστηκε η έκφρασή της (Cabanne et al, 1981).

Λόγω των δυσκολιών στον πειραματικό χειρισμό ολόκληρων φυτών διεξοδικότερη μελέτη του φαινομένου έγινε με τη χρήση του *in vitro* οργανογενετικού συστήματος TCL, όπως και στην περίπτωση της ριζογένεσης. Σε καλλιέργειες TCL, προερχομένων από ανθικούς μίσχους και βλαστούς καπνού, παρατηρήθηκε μία σύμπτωση του μέγιστου των παραγώγων του κινναμωμικού οξέος-ΠΑ και της πρώτης εμφάνισης ανθικών και βλαστικών καταβολών κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας (Torrighiani et al, 1987).

5.2.4. ΣΕ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΕΩΝ (STRESS)

Ένα ευρύ φάσμα αβιοτικών περιβαλλοντικών καταπονήσεων, επάγει τη συσσώρευση ΠΣ σε ολόκληρα φυτά ή σε *in vitro* συστήματα. Στις καταπονήσεις αυτές περιλαμβάνονται η ωσμωτική (Flores and Galston, 1982, 1984, Borell et al, 1996), αλατότητας (Basu and Ghosh, 1991, Das et al, 1995, Chattopadhyay et al, 1997, Santa-Cruz et al, 1997), όξινου περιβάλλοντος (Young and Galston, 1983, Santerre et al, 1990, Nam et al, 1997) οξειδωτική (Raab and Weinstein, 1990, An and Wang, 1997, Ye et al, 1997), υψηλών και χαμηλών θερμοκρασιών (Lovatt 1990, Roy and Ghosh, 1996, Lee, 1997, Sarjala et al, 1997) και ανοξία (Reggiani et al, 1989).

Η συσσώρευση της ΠΣ αρχίζει πολύ γρήγορα μετά την επίδραση των παραγόντων που επάγουν καταστάσεις καταπονήσεων. Για παράδειγμα, φύλλα βρώμης παρουσιάζουν συσσώρευση ΠΣ και ενεργοποίηση της ADC μια με δύο ώρες μετά την έκθεσή τους σε ένα υπερτονικό διάλυμα σορβιτόλης. Το κυκλοεξιμίδιο μπορεί να παρεμποδίσει αυτή τη διαδικασία, αν εφαρμοσθεί κατά

την πρώτη ώρα από την έναρξη της καταπόνησης, αλλά όχι αργότερα, πράγμα που σημαίνει ότι η σύνθεση πρωτεϊνών είναι απαραίτητη για να εκδηλωθεί η αύξηση στην ενεργότητα της ADC και ότι αυτή η σύνθεση ενεργοποιείται πολύ γρήγορα μετά την έναρξη της καταπόνησης. Το γεγονός ότι το α -DFMA παρεμποδίζει επίσης αποτελεσματικά αυτή τη διαδικασία, αλλά όχι και το α -DFMO, υποδεικνύει ότι μόνο η σύνθεση της ADC και όχι και της ODC, ενεργοποιείται κατά τις καταστάσεις καταπονήσεων (Flores and Galston, 1982, Flores and Galston, 1984). Για το λόγο αυτό, στην ADC είχε αποδοθεί ο ρόλος γενικού ενζύμου καταστάσεων καταπόνησης, ο οποίος μόνο πρόσφατα αμφισβητήθηκε από αποτελέσματα που δείχνουν ότι τόσο η ADC όσο και η ODC είναι απαραίτητες για τη σύνθεση ΠΣ σε ορισμένες τουλάχιστον περιβαλλοντικές καταπονήσεις (Bouchereau et al, 1999).

Επίσης, η συσσώρευση ΠΣ βρέθηκε ότι ήταν μία οικουμενική απόκριση των φυτών, σε τροφοπενία καλίου (Adams et al, 1990, Watson and Malmberg, 1996), σε τροφοπενίες άλλων ανόργανων στοιχείων (Basso and Smith, 1974, Lovatt, 1990, Shih and Kao 1996) και όταν η αζωτούχος θρέψη γινόταν με αμμωνιακά (Tonin et al, 1991, Altman and Levin, 1993, Triantaphylides et al, 1993). Τέλος, βιοτικές καταπονήσεις όπως μολύνσεις από μύκητες, βακτήρια και ιούς, επάγουν τη συσσώρευση ΠΑ και των συνδεδεμένων με μικρομόρια παραγώγων τους στα φυτά (Yamakawa et al, 1998).

5.2.5. ΣΤΟ ΓΗΡΑΣΜΟ

Λόγω της μεταβολικής σχέσης που υπάρχει μεταξύ ΠΑ και αιθυλενίου, μέσω της αμινοπρόπυλ-ομάδας του SAM (Apelbaum et al, 1985, Miyazaki and Yang, 1987) αρκετοί ερευνητές έχουν μελετήσει τη συμμετοχή των ΠΑ στην ωρίμανση των καρπών και το γηρασμό. Το αιθυλένιο και οι ΠΑ προκαλούν αντίθετα αποτελέσματα όσον αφορά την ωρίμανση των καρπών και το γηρασμό τους. Η μείωση των ενδογενών επιπέδων των ΠΑ αποτελεί ένα σημαντικό πρώιμο στάδιο για την έναρξη της διαδικασίας του γηρασμού που επιταχύνει η εξωγενής εφαρμογή αναστολέων των βιοσυνθετικών ενζύμων των ΠΑ, αυξάνοντας ταυτόχρονα την έκλυση αιθυλενίου (Kakkar and Rai, 1993).

Αντίθετα, υψηλές ενδογενείς συγκεντρώσεις ΠΑ ή εξωγενής εφαρμογή τους αναστέλλει το γηρασμό, μειώνοντας την παραγωγή αιθυλενίου και επιμηκύνει τη μετασυλλεκτική ζωή των καρπών (Galston and Kaur-Sawhney, 1990).

Το ανασταλτικό αποτέλεσμα, της βραχείας έκθεσης αποκομμένων φύλλων βρώμης σε ΠΑ, στη διαδικασία του γηρασμού εστιάζεται στη σταθεροποίηση των μεμβρανών και στην παρεμπόδιση της ενεργότητας RNAσών και πρωτεασών (Altman et al, 1977). Έχει αναφερθεί η παρεμποδιστική δράση της ΣΜ σε πρωτεάση από φύλλα μηδικής, παρεμπόδιση που οφείλεται στην αλλαγή της διαμόρφωσης του μορίου της πρωτεάσης (απώλεια του 16% της δευτεροταγούς δομής α -έλικας) (Balestrieri et al, 1987). Ο μηχανισμός παρεμπόδισης του γηρασμού από τις ΠΑ, μάλλον σχετίζεται και με την παρεμπόδιση της σύνθεσης αιθυλενίου (Apelbaum et al, 1981, Kaur-Sawhney et al, 1990). Όμως, έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις ταυτόχρονης αύξησης στη σύνθεση ΠΑ και αιθυλενίου σε διάφορα συστήματα (Lee and Chu, 1992, Yoza et al, 1996).

5.2.6. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΩΝ ΠΟΛΥΑΜΙΝΩΝ ΣΤΟ ΦΥΤΟ

Σήμερα, πλέον, υπάρχουν αρκετές μελέτες της γονιδιακής έκφρασης των βιοσυνθετικών και καταβολικών ενζύμων των ΠΑ σε διαφορετικά φυτικά είδη.

Η ενεργότητα της ODC στα φυτά συνδέεται με την κυτταρική διαίρεση, σε συστήματα όπως τα νεαρά λουλούδια ή τα αναπτυσσόμενα ωάρια και οι κυτταροκαλλιέργειες (Heimer et al, 1979, Heimer and Mizrahi, 1982, Slocum and Galston, 1985). Οι Michael et al (1996) μελέτησαν τα επίπεδα του mRNA των ODC, ADC και SAMDC ταυτόχρονα με τις ενζυμικές τους ενεργότητες και τα επίπεδα των ΠΑ σε καλλιέργειες ριζών ντατούρας, οι οποίες είχαν μετασχηματιστεί από το *Agrobacterium rhizogenes*. Και τα τρία ένζυμα παρουσίασαν αύξηση της ενεργότητας και μια παράλληλη αύξηση των επιπέδων του mRNA τους κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών από την υποκαλλιέργεια, την οποία ακολούθησε μία παράλληλη μείωση, καθώς οι καλλιέργειες

γερνούσαν. Παροδική αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της ODC παρατηρήθηκε σε ωοθήκες ντομάτας, μετά την επικονίαση, ή την εφαρμογή 2,4-D ή γιβερελλικού οξέως (Alabadi and Carbonell, 1998). Η προσθήκη μεθυλ-ιασμονικού οξέως (jasmonate, ενδογενής ουσία που συσσωρεύεται κατά τον τραυματισμό φυτικών ιστών και άλλες καταπονήσεις) σε κυτταροκαλλιέργειες καπνού αύξησε την έκφραση των γονιδίων της ODC και της μεθυλ-τρανσφεράσης της ΠΣ (PMT), αλλά όχι της ADC και της SAMDC και προκάλεσε συσσώρευση όχι ΠΣ αλλά μεθυλ-πουτρεσκίνης (πρόδρομος ένωση της νικοτίνης) και νικοτίνης (Imanishi et al, 1998).

Το φως φαίνεται ότι είναι ένας από τους παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση της ADC. Σε εκχλωιωτικά μπιζέλια η μετατροπή του φυτοχρώματος από την PR στην PFR μορφή αυξάνει την ενζυμική ενεργότητα της ADC στους οφθαλμούς ενώ τη μειώνει στο επικοτύλιο. Αυτή είναι, ίσως η μόνη γνωστή περίπτωση εξαρτώμενης από το φως και ταυτόχρονης επαγωγής και καταστολής του ίδιου ενζύμου σε διαφορετικά όργανα (Dai and Galston, 1981). Σε κομμένα φύλλα βρώμης, η ενεργότητα της ADC και τα επίπεδα των ΠΑ μειώνονται στο σκοτάδι ενώ αυξάνονται στο λευκό φως (Kaur-Sawhney et al, 1990). Η μεταφορά φυτών *Pharbitis nil* από το φως στο σκοτάδι προκάλεσε, επίσης, αύξηση της ενεργότητας της ADC στα φύλλα και η φωτοεπαγωγή αυτή παρεμποδίστηκε από το κυκλοεξιμίδιο (Yoshida and Hirasawa, 1998).

Η αύξηση στα επίπεδα του mRNA της ADC στην έναρξη της ωρίμανσης σε φρούτα ντομάτας άγριου τύπου αντιστοιχεί περίπου στην αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας της ADC που παρατηρήθηκε το ίδιο διάστημα (Rastogi et al, 1993). Όμως, οι καρποί της σειράς *alc* (Alcobaca, μεταλλαγή που παράγει καρπούς που χρειάζονται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για να ωριμάσουν) παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα ΠΣ και ενζυμική ενεργότητα της ADC, αλλά τα ίδια επίπεδα mRNA. Αυτό οδήγησε τους ερευνητές να υποθέσουν ότι στη σειρά *alc* της ντομάτας η αυξημένη ενζυμική ενεργότητα της ADC οφείλεται σε μετα-μεταγραφική ρύθμιση (*ibid*).

Οι Perez-Amador et al (1995) μελέτησαν τα επίπεδα του mRNA και της ενζυμικής ενεργότητας της ADC σε διάφορα στάδια ανάπτυξης του μπιζελιού,

και ιδιαίτερα σε γονιμοποιημένα και μη, ωάρια. Το mRNA αυξήθηκε περισσότερο στα μη-γονιμοποιημένα ωάρια, τρεις ημέρες μετά την εφαρμογή γιβρελλικού οξέως, χωρίς όμως η αύξηση αυτή να αντιστοιχεί στην αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας της ADC. Σε σπορόφυτα *Arabidopsis* ανεπτυγμένα σε μέσο ελλειμματικό σε κάλιο, τα επίπεδα της ενεργότητας της ADC αυξήθηκαν με την αναπτυξιακή ηλικία και παράλληλα δεκαπλασιάστηκαν ως αποτέλεσμα της έλλειψης καλίου (Watson et al, 1996). Τα επίπεδα του mRNA της ADC όπως και η ανοσοεντοπιζόμενη πρωτεΐνη, επίσης αυξήθηκαν με το χρόνο, αλλά δε διαφοροποιήθηκαν μεταξύ των φυτών του μάρτυρα και των φυτών που αναπτύχθηκαν υπό την έλλειψη καλίου. Αργότερα, η ίδια ομάδα έδειξε ότι υπάρχουν δύο γονίδια της ADC στα μέλη της οικογένειας Brassicaceae, που ανήκει και η *Arabidopsis* (Galloway et al, 1998). Η έλλειψη συσχέτισης ανάμεσα στα επίπεδα του mRNA ή την ανοσοεντοπιζόμενη πρωτεΐνη και την ενεργότητα της ADC, μπορεί να εξηγηθεί εάν ένα από τα δύο γονίδια της ADC ρυθμίζεται από την καταπόνηση που προκαλεί η τροφοπενία καλίου, και το άλλο όχι.

Η πρωτεόλυση της ADC της βρώμης που αναφέρθηκε παραπάνω στο Υποκεφάλαιο της βιοσύνθεσης των ΠΑ, παρέχει έναν πιθανό μετα-μεταφραστικό μηχανισμό ρύθμισης της ADC. Οι Malmberg και συνεργάτες (Malmberg et al, 1992, Malmberg and Cellino, 1994) ανακάλυψαν μια πρωτεολυτική επεξεργασία της ADC της βρώμης: το πρόδρομο πολυπεπτίδιο των 66 kDa που παράγεται κατά τη μετάφραση του mRNA της *in vivo*, δίνει δύο πολυπεπτίδια 42 και 24 kDa αντίστοιχα. Το προϊόν της *in vitro* μεταγραφής και μετάφρασης του cDNA της ADC της βρώμης ήταν το πλήρους μήκους πολυπεπτίδιο 66 kDa, το οποίο όμως μπορούσε να πρωτεολυθεί στα πολυπεπτίδια τα οποία ανιχνεύθηκαν *in vivo*, με τη δράση μίας πρωτεάσης από πρωτεϊνικό εκχύλισμα του φυτού. Η πρωτεάση αυτή αναστελλόταν από Zn^{2+} , αλλά όχι από τους συνηθισμένους αναστολείς πρωτεασών, ούτε από την προσθήκη ΠΑ στην *in vitro* αντίδραση. Η μετατροπή του προϊόντος της μετάφρασης στα δύο μικρότερα πολυπεπτίδια συνοδευόταν από αύξηση στην ενεργότητα της ADC.

Οι Borrell et al (1996) μελέτησαν τη ρύθμιση της ADC σε κομμένα φύλλα βρώμης υπό την επίδραση ωσμωτικής καταπόνησης. Η ωσμωτική καταπόνηση προκάλεσε την αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας και των επιπέδων του mRNA της ADC. Η προσθήκη 1 mM ΣΝ είχε σαν αποτέλεσμα μεγάλη μείωση της ενεργότητας της ADC. Η ίδια ομάδα παρήγαγε αντίσωμα εναντίον του πολυπεπτιδίου 24 kDa της ADC, που περιγράφηκε από τους Bell και Malmberg (1990), και το χρησιμοποίησε για ανοσοεντοπισμό της πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ΣΝ ανέστειλε τη διαδικασία της πρωτεολυτικής επεξεργασίας του πρόδρομου μορίου των 66 kDa προς το προϊόν των 24 kDa. Έτσι, υπάρχουν αποδείξεις τόσο από μελέτες *in vitro* όσο και από το σύστημα των κομμένων φύλλων, ότι στη βρώμη η πρωτεολυτική επεξεργασία μπορεί να είναι ένας μηχανισμός που συμμετέχει στη ρύθμιση της ενεργότητας της ADC.

Οι Borrell et al (1995) χρησιμοποίησαν περαιτέρω το αντίσωμά τους, για να εξετάσουν την κατανομή της ADC σε όργανα και υποκυτταρικά οργανίδια στη βρώμη. Ανέφεραν ότι η ADC εντοπίστηκε στα θυλακοειδή των χλωροπλαστών, ενώ δε βρέθηκε σε τομές ρίζας. Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με την άποψη ότι είναι πιθανόν να υπάρχουν πολλαπλοί τύποι φυτικών ADC, αφού η ενεργότητα της ADC έχει μετρηθεί στις ρίζες από άλλους ερευνητές (Michael et al, 1996, για παράδειγμα).

Συμπερασματικά, η ενζυμική ενεργότητα της ADC φαίνεται μάλλον, ότι ρυθμίζεται σε πολλαπλά επίπεδα από διαφορετικά ερεθίσματα. Αρκετές μελέτες μέχρι σήμερα έχουν δείξει αλλαγές στα επίπεδα του mRNA της ADC οι οποίες δεν αντιστοιχούν στα επίπεδα της ενζυμικής ενεργότητάς της, ενώ τουλάχιστον μία μετα-μεταφραστική τροποποίηση της ADC έχει αποδειχθεί.

Ο πρώτος φυτικός cDNA κλώνος της SAMDC απομονώθηκε από την πατάτα (Taylor et al, 1992). Τα επίπεδα του mRNA της SAMDC κατά τα πρώιμα στάδια της κονδυλοποίησης παρουσίασαν αύξηση κατά 25 έως 30 φορές, παρατήρηση που συσχετίστηκε αργότερα με αυξήσεις στην ενεργότητα του ενζύμου και στις ενδογενείς συγκεντρώσεις των ΠΑ στα ίδια στάδια (Taylor et al, 1993).

Οι Angelini et al (1996) κλωνοποίησαν και χαρακτήρισαν ένα cDNA που κωδικοποιεί την οξειδάση των διαμινών από τη φακή. Έδειξαν ότι ανήκει σε μια πολυγονιδιακή οικογένεια και ότι το mRNA της και τα επίπεδα της ενζυμικής της ενεργότητας συμβαδίζουν κατά την ανάπτυξη του επικοτυλίου αλλά στη συνέχεια, ενώ τα επίπεδα του mRNA φθίνουν η ενεργότητα παραμένει. Οι συγγραφείς πρότειναν ότι η οξειδάση των διαμινών πιθανόν να είναι μια πολύ σταθερή πρωτεΐνη, έτσι ώστε ενώ η αύξηση στην ενζυμική της ενεργότητα μπορεί να είναι μεταγραφική, η μείωση των επιπέδων του mRNA της δεν επιδρά στην ενεργότητά της.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Όταν ξεκίνησε αυτή η μελέτη, η ADC θεωρούνταν «προνόμιο» φυτών, βακτηρίων και κάποιων μυκήτων. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη συμμετοχή της σε μία πληθώρα διαφορετικών φυσιολογικών διεργασιών, από τη μορφογένεση ως τις αποκρίσεις σε καταστάσεις καταπονήσεων, αποτέλεσε το έναυσμα για τη μελέτη του ενζύμου σε ένα πολυετές ξυλώδες φυτό, την άμπελο.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν:

- Η κατανόηση του φυσιολογικού ρόλου της ADC στην άμπελο

Εξετάστηκε η ρύθμιση της ADC σε επίπεδο *in vitro* ενεργοτήτων και αφθονίας του mRNA και της πρωτεΐνης της.

Η προσέγγιση που έγινε περιέλαβε:

- ✓ Το βιοχημικό χαρακτηρισμό του ενζύμου από την άμπελο
- ✓ Τη μελέτη της αναπτυξιακής και οντογενετικής έκφρασης του
- ✓ Την παραγωγή μοριακών εργαλείων (αντισωμάτων και DNA ιχνηλάτη) και
- ✓ Το μοριακό και ανοσολογικό χαρακτηρισμό του

Η πορεία που ακολουθήθηκε αναπτύσσεται στις τέσσερις ενότητες που ακολουθούν:

1. Η αποκαρβοξυλάση της αργινίνης της αμπέλου: Βιοχημικές ιδιότητες και ενζυμική ενεργότητα σε φυτικά όργανα και ιστούς διαφόρων οντογενετικών σταδίων
2. Κλωνοποίηση και μοριακός χαρακτηρισμός cDNA της αποκαρβοξυλάσης της αργινίνης της αμπέλου
3. Μελέτη της έκφρασης της ADC σε κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου υπό την επίδραση διαφορετικών πηγών αζώτου, άλλων οργανικών αζωτούχων ενώσεων και των φυτικών ρυθμιστικών ουσιών NAA και 6-BAP
4. Ανοσολογική μελέτη της ADC της αμπέλου

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

**Η ΑΠΟΚΑΡΒΟΞΥΛΑΣΗ ΤΗΣ ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ ΤΗΣ ΑΜΠΕΛΟΥ
(*Vitis vinifera* L.): ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ
ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΣΕ ΦΥΤΙΚΑ ΟΡΓΑΝΑ
ΚΑΙ ΙΣΤΟΥΣ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΟΝΤΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΣΤΑΔΙΩΝ**

1.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι βιοχημικές ιδιότητες της αποκαρβοξυλάσης της αργινίνης (ADC) της αμπέλου μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας ημικαθαρισμένα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα φύλλων από αυτόριζα πρέμνα του θερμοκηπίου. Βρέθηκε ότι η ταχύτητα της αντίδρασης ήταν μέγιστη για τιμές pH μεταξύ 7,8 και 8,2, στους 37 °C με 1 mM τελική συγκέντρωση υποστρώματος και ήταν γραμμική με το χρόνο για τουλάχιστον μία ώρα. Το ένζυμο απαιτούσε την παρουσία σουλφουδρυλομάδων και φωσφορικής πυριδοξάλης για την επίδειξη του μέγιστου της ενεργότητάς. Το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης, η αγματίνη, καθώς και η διαμίνη πουτρεσκίνη παρεμπόδιζαν την ενεργότητα του ενζύμου μόνο σε μεγάλες συγκεντρώσεις (40 και 30% αντίστοιχα στα 20 mM). Λόγω των μειονεκτημάτων (υψηλό κόστος και χρονοβόρος) της ισοτοπικής μεθόδου προσδιορισμού της *in vitro* ενζυμικής ενεργότητας της ADC, δοκιμάστηκαν εναλλακτικές μέθοδοι και ιδιαίτερα η ποτενσιομετρική, με χρήση επιλεκτικού για το CO₂ ηλεκτροδίου. Για την ανίχνευση μικρών συγκεντρώσεων CO₂ κατασκευάστηκαν και δοκιμάστηκαν διάφορα επιλεκτικά ηλεκτρόδια και τελικά επιλέχθηκε ένα το οποίο αποτελείτο από pH μικροηλεκτρόδιο συνδυασμού και περατή σε αέρια μεμβράνη, που περιέκλειε τον ελάχιστο όγκο διαλύματος (10 μL, 7 mM NaHCO₃/200 mM NaCl) ικανό να διατηρεί την ηλεκτροχημική συνέχεια μεταξύ του ευαίσθητου στο pH γυαλιού και του αναφορικού ηλεκτροδίου. Το ηλεκτρόδιο είχε Nernstian απόκριση από τα 100 μM CO₂, ενώ μπορούσε να διαφοροποιήσει συγκεντρώσεις πάνω από 10 μM. Ο χρόνος απόκρισής του κυμαινόταν από 7 min (για συγκεντρώσεις 10 μM CO₂) έως και λιγότερο από 2 min (για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 100 μM). Με το ηλεκτρόδιο μετρήθηκαν με επιτυχία και ικανοποιητική ακρίβεια η ενζυμική ενεργότητα της ADC από ημικαθαρισμένα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μονοκοτυλήδων φυτών όχι όμως και από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα της αμπέλου, στα οποία η ενεργότητά της είναι μία έως δύο τάξεις μεγέθους χαμηλότερη. Ακολούθως, μελετήθηκε η αναπτυξιακή και οντογενετική έκφραση της ADC σε διάφορους ιστούς από αυτόριζα πρέμνα, που αναπτύχθηκαν στο

θερμοκήπιο, από *in vitro* καλλιεργημένα φυτά και σε σπορόφυτα κατά το φυτόμα καθώς και σε κάλλους και κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Τόσο στα αυτόριζα πρέμνα όσο και στα *in vitro* καλλιεργημένα φυτά η ενεργότητα της ADC ήταν ψηλότερη στους μεταβολικά ενεργότερους ιστούς (στις αυξανόμενες κορυφές) και μειωνόταν από τα νεώτερα προς τα γηραιότερα φύλλα καθώς και στα αντίστοιχα μεσογονάτια του βλαστού. Οι ρίζες των *in vitro* φυτών είχαν τη χαμηλότερη ενεργότητα. Στα σπορόφυτα της αμπέλου οι ενεργότητες της ADC ήταν μεγαλύτερες με την έναρξη του φυτώματος και μειωνόταν με το χρόνο ενώ, στα χλωρωτικά σπορόφυτα υπήρξε μια μικρή καθυστέρηση στο μέγιστο της ενεργότητας. Τέλος, στις κυτταροκαλλιέργειες και στους κάλλους, η ενεργότητα της ADC ήταν μεγαλύτερη αμέσως μετά την υποκαλλιέργεια και μειωνόταν στη συνέχεια. Η προσπάθεια για τον καθαρισμό της ADC από ιστούς αμπέλου με κλασσικές βιοχημικές μεθόδους, όπως κλασματώσεις και χρωματογραφία, ήταν ανεπιτυχής αφού οποιοσδήποτε χειρισμός του αρχικού εκχυλίσματος είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια της ενεργότητας του ενζύμου. Παρατηρήθηκε ότι, αντίθετα με τα εκχυλίσματα από πράσινους ιστούς, στα εκχυλίσματα από χλωρωτικά σπορόφυτα αυξανόταν η ενεργότητα μετά από αραιώση με το διάλυμα εκχύλισης. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν την ύπαρξη αρνητικών και θετικών παραγόντων στα εκχυλίσματα από πράσινους και χλωρωτικούς ιστούς, αντίστοιχα, που αλληλεπιδρούν με την ADC της αμπέλου. Οι παράγοντες αυτοί δεν έγινε δυνατόν να προσδιοριστούν.

1.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μέχρι πρόσφατα επικρατούσα άποψη ότι το ένζυμο της αποκαρβοξυλάσης της αργινίνης βρίσκεται αποκλειστικά σε φυτά και κάποια βακτήρια, ανατράπηκε με την ανίχνευση ADC ενεργότητας στον εγκέφαλο αρουραίου (Li et al, 1994) και την απομόνωση ενός μερικού cDNA κλώνου από νεφρό αρουραίου (Morrissett et al, 1995). Η ενεργότητα της ADC έχει βρεθεί σε όλα τα φυτικά είδη, που έχουν εξετασθεί (Birecka et al, 1985a, b, Smith, 1985

και οι αναφορές εκεί) στα μονοκυτλήδονα είναι 5 έως 500 φορές μεγαλύτερη από ότι στα δικοτυλήδονα και στα δικοτυλήδονα οι υψηλότερες ενεργότητες βρίσκονται στα μέλη της οικογένειας των ψυχανθών (Birecka et al, 1985b).

Το ένζυμο έχει χαρακτηριστεί από λίγα, σχετικά, είδη ενώ σε ελάχιστες περιπτώσεις ο χαρακτηρισμός έγινε με καθαρό μέχρι ομοιογένειας παρασκεύασμα (βρώμη: Smith, 1979, ρύζι: Choudhuri and Ghosh, 1982, Reggiani, 1994, λάθυρος: Ramakrishna and Adiga, 1975, σόγια: Nam et al, 1997, πεδινή κράμβη: Das et al, 1996). Γενικά, είναι ένα εξαρτώμενο από φωσφορική πυριδοξάλη ένζυμο, που απαιτεί την παρουσία σουλφυδρυλομάδων για την επίδειξη του μέγιστου της ενεργότητάς του. Έχει άριστο pH γύρω στο 8,0, άριστο θερμοκρασίας που κυμαίνεται από 30 έως 45 °C, δε φαίνεται να εξαρτάται από κάποιο μεταλλικό παράγοντα και το ένα από τα προϊόντα του (η αμίνη αγματίνη) καθώς και άλλες αμίνες (διαμίνες ή ανώτερες πολυαμίνες) παρεμποδίζουν την ενεργότητά του (*ibid*).

Κατά την αύξηση και ανάπτυξη των φυτών, η ενεργότητα της ODC έχει συνδεθεί με την κυτταρική διαίρεση ενώ η ενεργότητα της ADC με την αύξηση των κυττάρων (Smith, 1985) καθώς και με διάφορες μορφογενετικές αποκρίσεις. Η έκφραση του mRNA της ADC αυξάνεται κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης του καρπού της ντομάτας, όσο μεγεθύνονται τα κύτταρα και μειώνεται στη συνέχεια κατά την ωρίμανση (Rastogi et al, 1993). Παρομοίως, οι ποσότητες του mRNA της ADC στο μπιζέλι ήταν υψηλότερες στους νεαρούς αναπτυσσόμενους ιστούς και στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης των καρπών, σε σύγκριση με τα ώριμα όργανα (Perez-Amador et al, 1995).

Η σύνδεση της ενεργότητας της ADC με τη μορφογένεση έχει αποδειχθεί με την εφαρμογή των μη αντιστρεπτών αναστολέων των ODC και ADC, DFMO και DFMA, αντίστοιχα, σε *in vitro* συστήματα. Το DFMA, σε αντίθεση με το DFMO, προκαλεί καταστολή της μορφογενετικής έκφρασης των εκφύτων, καταστολή που αίρεται από την εφαρμογή εξωγενώς αγματίνης, πουτρεσκίνης ή ανώτερων πολυαμιμών (Martin-Tangui and Carre, 1993, Tarenghi et al, 1995). Επίσης, το DFMA παρεμποδίζει τη διαφοροποίηση αποδιαφοροποιημένων κυττάρων σε σωματικά έμβρυα (Feirer et al, 1984, Koetje et al, 1993, Torne et al,

1994, Yadav and Rajam, 1997, 1998). Από την άλλη, μετασχηματισμένα κύτταρα καρότου, με το cDNA της ODC του ποντικού, ανέπτυξαν διπλάσιο έως πενταπλάσιο αριθμό σωματικών εμβρύων συγκριτικά με τα μη μετασχηματισμένα καθώς και ανοχή στην εφαρμογή DFMA (Bastola and Minocha, 1995).

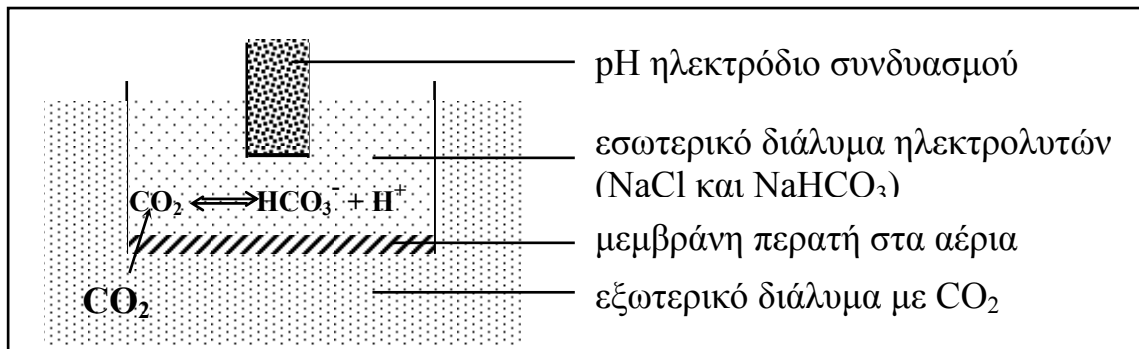
Η μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της αποκαρβοξυλάσης της αργινίνης *in vitro* γίνεται με τον προσδιορισμό των προϊόντων της, της αγματίνης ή του CO₂. Δεν έχει αναφερθεί μία εύκολη αναλυτική μέθοδος ποσοτικοποίησης της αμίνης αγματίνης· είναι απαραίτητος ο προηγούμενος χρωματογραφικός διαχωρισμός της, γεγονός που αποτελεί απαγορευτικό παράγοντα για τη χρήση της μεθόδου σε μεγάλη κλίμακα. Φωτομετρικές μέθοδοι που υπάρχουν στη βιβλιογραφία, με σύζευξη της αντίδρασης αποκαρβοξυλίωσης της αργινίνης με την οξειδάση των διαμινών και της περοξειδάσης (Smith, 1979a, b), απαιτούν υψηλές ενεργότητες ADC. Το πρόβλημα, λοιπόν, μετατίθεται στην ποσοτικοποίηση του άλλου προϊόντος της αντίδρασης, του εκλυόμενου CO₂.

Ο πρώτος που κατάφερε να ποσοτικοποιήσει βιολογικά παραγόμενο CO₂ ήταν ο Warbourg περίπου 75 χρόνια πριν, με το ομώνυμο σταθερού όγκου αναπνοόμετρό του (μία μανομετρική τεχνική που βασίζεται στις σχετικές πιέσεις των εμπλεκόμενων αερίων). Σήμερα, υπάρχουν περισσότερο ευαίσθητες συσκευές για τη μέτρηση του CO₂, που παράγεται ή καταναλώνεται από βιολογικές διεργασίες, όπως η αναπνοή και η φωτοσύνθεση (αναλυτές αερίων υπέρυθρου κά). Παρόλο που το αναπνοόμετρο του Warbourg ποσοτικοποιεί μεγάλες ποσότητες CO₂, όπως αυτές που παράγουν ή καταναλώνουν η αναπνοή και η φωτοσύνθεση, η συσκευή έχει χρησιμοποιηθεί και για την *in vitro* μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας αποκαρβοξυλασών (Smith, 1979a). Απαιτεί, όμως, μεγάλους όγκους ενζυμικού παρασκευάσματος, κάτι που δεν είναι πάντοτε εφικτό, και η ακρίβειά της είναι μικρή.

Η περισσότερο διαδεδομένη *in vitro* μέθοδος προσδιορισμού της ενζυμικής ενεργότητας αποκαρβοξυλασών είναι η ισοτοπική μέθοδος, η οποία στηρίζεται στη χρήση ραδιοσημασμένου στον καρβοξυλικό άνθρακα υποστρώματος, στην παγίδευση του εκλυόμενου ¹⁴CO₂ και μέτρηση της

παγιδευμένης ραδιενέργειας (Sissons, 1976 και οι αναφορές εκεί). Η μέθοδος είναι ευαίσθητη και δεν απαιτεί μεγάλους όγκους ενζυμικού παρασκευάσματος (~100 μL), όμως, έχει υψηλό κόστος και είναι χρονοβόρα.

Πρόσφατα, η ανάγκη για τη συνεχή παρακολούθηση *in vivo* των διακυμάνσεων των αερίων και των ηλεκτρολυτών του αίματος κατά τη διάρκεια εγχειρήσεων, είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη της τεχνολογίας των επιλεκτικών, για ιόντα, ηλεκτροδίων. Η τεχνική βασίζεται στην ποτενσιομετρία και για τον προσδιορισμό του CO_2 αναφερόμαστε σε ένα επιλεκτικό για το CO_2 ηλεκτρόδιο. Η απλούστερη από τις ποτενσιομετρικές μεθόδους προσδιορισμού της συγκέντρωσης CO_2 σε διάλυμα χρησιμοποιεί έναν αισθητήρα αερίων τύπου Severinghaus.



Εικόνα 1.1. Αισθητήρας αερίων Severinghaus

Η μέθοδος στηρίζεται στη μέτρηση της αλλαγής του pH σε μια λεπτή στοιβάδα διαλύματος ηλεκτρολυτών (NaCl και NaHCO_3), που βρίσκεται σε επαφή με ένα pH ηλεκτρόδιο συνδυασμού και διαχωρίζεται από το εξωτερικό μετρούμενο διάλυμα από μια υδρόφοβη μεμβράνη, περατή στο CO_2 αλλά όχι και στα ιόντα ή το νερό (Εικ. 1.1). Στον αισθητήρα αποκαθίσταται η ακόλουθη ισορροπία:



Η απόκριση του ηλεκτροδίου στο CO_2 εξαρτάται από την αλλαγή στο pH, που προκαλεί η διάλυση του CO_2 στο εσωτερικό διάλυμα, σύμφωνα με τις παρακάτω ισορροπίες:



Από τη στιγμή που οι μερικές πιέσεις του CO₂ θα εξισορροπηθούν και από τις δύο πλευρές της μεμβράνης (Εξίσωση 1), το ηλεκτροχημικό δυναμικό του στοιχείου θα περιγράφεται από μια εξίσωση της μορφής:

$$E = E_0 + k \times \log[\text{CO}_2]_{\text{δείγματος}} \quad (5)$$

και θα είναι ανάλογο δηλαδή με το λογάριθμο της συγκέντρωσης του CO₂ στο δείγμα.

Χρησιμοποιώντας ένα τέτοιο επιλεκτικό για το CO₂ ηλεκτρόδιο της εταιρίας Orion, οι Tonelli et al. (1981) μπόρεσαν να προσδιορίσουν με ακρίβεια την ενεργότητα πυκνού εμπορικού σκευάσματος της αποκαρβοξυλάσης της λυσίνης (200 nmoles CO₂ min⁻¹ mL⁻¹ σκευάσματος).

Στο Κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται δεδομένα για τις βιοχημικές ιδιότητες του ενζύμου της ADC: την εξάρτηση της ενεργότητάς της από το pH, τη θερμοκρασία, το χρόνο, τη συγκέντρωση του υποστρώματος, την παρουσία του συνενζύμου του και σουλφυδρυλομάδων καθώς και την παρεμποδιστική δράση του προϊόντος του και της διαμίνης πουτρεσκίνης. Περιγράφεται η κατασκευή ενός επιλεκτικού για το CO₂ ηλεκτροδίου και η χρησιμοποίησή του ως εναλλακτικού τρόπου προσδιορισμού του εκλυόμενου CO₂ από την αποκαρβοξυλιωτική δράση του ενζύμου. Επίσης, δίνονται πληροφορίες για την αναπτυξιακή και οντογενετική έκφραση του ενζύμου στο φυτό της αμπέλου. Τέλος, γίνεται μια προσπάθεια αιτιολόγησης της απώλειας της ενεργότητας του ενζυμικού εκχυλίσματος μετά από διαπίδυση ή αραίωση με το διάλυμα εκχύλισης.

1.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.3.1. Φυτικό Υλικό

Για τη βιοχημική μελέτη των ιδιοτήτων της αποκαρβοξυλάσης της αργινίνης χρησιμοποιήθηκαν φύλλα από αυτόριζα φυτά αμπέλου (*Vitis vinifera* L. cv Soultanina) ηλικίας ενός έτους, τα οποία προήλθαν από *in vitro* φυτά ενός κόμβου και αναπτύχθηκαν σε θερμοκήπιο ελεγχόμενης θερμοκρασίας. Τα φύλλα συλλέχθηκαν και επεξεργάστηκαν, όπως περιγράφεται από τους Roubelakis-

Angelakis and Kliewer (1983). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν ιστοί φύλλου, βλαστού και ρίζας από φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro*. Έκφυτα ενός κόμβου από βλαστούς *in vitro* αναπτυσσόμενων φυτών αμπέλου τοποθετήθηκαν ασηπτικά για ριζογένεση σε στερεό θρεπτικό υλικό καλλιέργειας (Roubelakis-Angelakis and Zivanovitch, 1991) και επώασθησαν σε θάλαμο ιστοκαλλιέργειας στους 25 ± 2 °C, με 16/8 h φωτοπερίοδο και φωτισμό από λαμπτήρες φθορισμού ψυχρού λευκού φωτός (Philipp's TLD 18W/54, 10 W m^{-2} ολική ενέργεια).

Σπορόφυτα αμπέλου (*Vitis vinifera* L. cv Vilana) αναπτύχθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε γυάλινα τρυβλία Petri πάνω σε απορροφητικό χαρτί Whatman εμποτισμένο με απιονισμένο νερό, στο φως και στο σκοτάδι. Οι σπόροι, πριν τοποθετηθούν για φύτευση, αποστειρώθηκαν με διάλυμα υποχλωριώδους ασβεστίου (3% σε ενεργό συστατικό), ξεπλύθηκαν τρεις φορές με αποστειρωμένο νερό και στρωματώθηκαν για δύο τουλάχιστον μήνες σε υγρή, αποστειρωμένη άμμο, στους 4 °C. Η ίδια διαδικασία, με εξαίρεση τη στρωμάτωση, ακολουθήθηκε για την ανάπτυξη σπορόφυτων βρώμης (*Avena sativa* L.) και κριθαριού (*Hordeum vulgare* L.) στο φως.

Τμήματα φύλλου, βλαστού και ρίζας από *in vitro* αναπτυγμένα φυτά αμπέλου, μήκους περίπου 0,5 cm, χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη κάλλων. Το στερεό θρεπτικό υλικό καλλιέργειας παρασκευάστηκε, σύμφωνα με τους Murashige and Skoog (1962), τροποποιημένο κατά το ότι περιείχε 20 mM KNO_3 ως μόνη πηγή αζώτου, και συμπληρώθηκε με 5 μM ναφθαλινοξικό οξύ (NAA) και 2 μM 6-βενζυλαμινοπουρίνη (6-BAP) όπως περιγράφεται από τους Katsirdakis and Roubelakis-Angelakis (1991). Η επώαση για καλλογένεση έγινε σε τρυβλία Petri διαμέτρου 9 cm (4-6 τμήματα ιστού ανά τριβλίο) σε θάλαμο ιστοκαλλιέργειας στους 25 ± 2 °C στο σκοτάδι για χρονικό διάστημα 4 εβδομάδων. Οι κάλλοι που αναπτύχθηκαν μεταφέρονταν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κάθε 4 εβδομάδες. Μετά από τρεις υποκαλλιέργειες οι κάλλοι χρησιμοποιήθηκαν για την εγκαθίδρυση κυτταροκαλλιιεργειών (cell suspension cultures), σε υγρό θρεπτικό μέσο της ίδιας σύστασης. Οι κυτταροκαλλιιεργειες διατηρούνταν στους 25 ± 1 °C σε κωνικές φιάλες υπό συνεχή ανάδευση (150 rpm) στο σκοτάδι, και μετά την εγκαθίδρυσή τους

μπορούσαν να πολλαπλασιαστούν σε θρεπτικό μέσο ελεύθερο φυτικών ρυθμιστικών ουσιών (NAA και 6-BAP). Οι κυτταροκαλλιέργειες μεταφέρονταν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κάθε 10 ημέρες. Δείγματα των κυττάρων λαμβάνονταν μετά από διύλιση υπό κενό και πλύσιμο με απιονισμένο νερό.

Όλοι οι παραπάνω φυτικοί ιστοί είτε χρησιμοποιούνταν άμεσα μετά τη συλλογή τους ή φυλάσσονταν στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε, είχε ελεγχθεί με τη μέθοδο ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), για την ύπαρξη ιώσεων της αμπέλου (Theodoropoulos and Roubelakis-Angelakis, 1990).

1.3.2. Εκχύλιση και Ποσοτικός Προσδιορισμός Ολικών Πρωτεϊνών

Οι ιστοί της αμπέλου λειοτριβήθηκαν σε υγρό άζωτο με τη βοήθεια γουδιού. Στη σκόνη από ιστό φύλλου, βλαστού και ρίζας προστέθηκε 0,2 g polyvinyl-pyrrolidone (PVPP) ανά γραμμάριο φρέσκου βάρους και αιωρήθηκε σε τετραπλάσιο όγκο (v/w) κρύου διαλύματος εκχύλισης. Η σύσταση του διαλύματος εκχύλισης ήταν 200 mM του ρυθμιστικού ιόντος (συνήθως Tris-HCl, pH 8,0, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά) 10% (v/v) γλυκερόλη, 5 mM διθειοθρεϊτόλη (DTT), 1 mM EDTA, 0,5 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF), 10 μM leupeptin, 50 μM φωσφορική πυριδοξάλη (PP) και 0,2% (v/v) Triton X-100. Τα κύτταρα από τις κυτταροκαλλιέργειες αιωρήθηκαν σε διπλάσιο όγκο (v/w) κρύου διαλύματος εκχύλισης, που διέφερε από το προηγούμενο στη συγκέντρωση του Tris-HCl (50 mM) και δεν προστέθηκε PVPP. Τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν στο διάλυμα εκχύλισης των πρωτεϊνών με Ultra Turax στις 20.000 rpm, στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ για τέσσερις φορές των 30 sec η καθεμία. Το ομογενοποίημα επώασθη για 20 min σε πάγο ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) με περιοδική ανάδευση και ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 25.000 g για 20 min στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Sorvall, DuPont, SS34). Το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε άμεσα για τον προσδιορισμό της ενζυμικής ενεργότητας της ADC και των ολικών πρωτεϊνών και το υπόλοιπο μοιράσθηκε και κρατήθηκε στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Για τις κλασματώσεις, στο υπερκείμενο, αμέσως μετά τη φυγοκέντρωση, προστέθηκε στερεό θειικό αμμώνιο μέχρι το 30% του κορεσμού, το αιώρημα αναδεύτηκε για 30 min και φυγοκεντρήθηκε στα 15.000 g για 20 min. Το νέο υπερκείμενο ρυθμίστηκε στο 60% του κορεσμού με την προσθήκη στερεού θειικού αμμωνίου, αναδεύτηκε για 30 min και φυγοκεντρήθηκε στα 15.000 g για 30 min. Στο τρίτο υπερκείμενο προστέθηκε στερεό θειικό αμμώνιο μέχρι το 90% του κορεσμού, αναδεύτηκε για 30 min και φυγοκεντρήθηκε στα 15.000 g για 30 min. Τα κατακρημνίσματα από τις τρεις φυγοκεντρήσεις συλλέχθηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε μικρό όγκο του διαλύματος εκχύλισης. Αυτά τα παρασκευάσματα καθώς και το υπερκείμενο του 90% του κορεσμού, υποβλήθηκαν σε διαπίδυση δύο φορές, διάρκειας τουλάχιστον 3 h η καθεμία, εναντίον του διαλύματος εκχύλισης με διαφορετική μοριακότητα του Tris-HCl (20 mM) και χρησιμοποιήθηκαν για τις ενζυμικές αντιδράσεις. Με παρόμοιο τρόπο έγινε η κλασμάτωση με 30%, 60% και 90% (v/v) προπαγωμένη στους -20 °C ακετόνη και με 50% (w/v) πολυαιθυλενογλυκόλη μέσου μοριακού βάρους 4.000 (PEG-4000). Όλα τα βήματα έγιναν στους 4 °C.

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα προσδιορίστηκε με τη μέθοδο των Lowry et al (1951) αφού προηγήθηκε κατακρήμιση με 10% (w/v, τελική συγκέντρωση) τριχλωροοξικού οξέος (TCA). Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε αλβουμίνη βοείου ορού (BSA).

1.3.3. Ισοτοπική Μέθοδος Προσδιορισμού της Ενεργότητας της ADC

Με την ισοτοπική μέθοδο οι ενζυμικές ενεργότητες της ADC προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας L-[1-¹⁴C] αργινίνη (55 mCi/ mmole, 0,1 mCi/ mL, American Radiolabeled Chemicals Inc., St Louis, MO) ως ραδιοσημασμένο υπόστρωμα, σε αναλογία ένα μόριο ραδιοσημασμένου προς εκατό μόρια κρύου, με εξαίρεση τις τελικές συγκεντρώσεις αργινίνης, που ήταν μικρότερες από 0,5 mM. Συνήθως, εκατό μL του ημικαθαρισμένου εκχυλίσματος επωάζονταν με 25 μL (0,078 μCi) L-[1-¹⁴C] αργινίνης (0,626 mCi/ mmole, 3,13 μCi/ mL, 1 mM τελική συγκέντρωση αργινίνης), σε 12×50 mm φιαλίδια

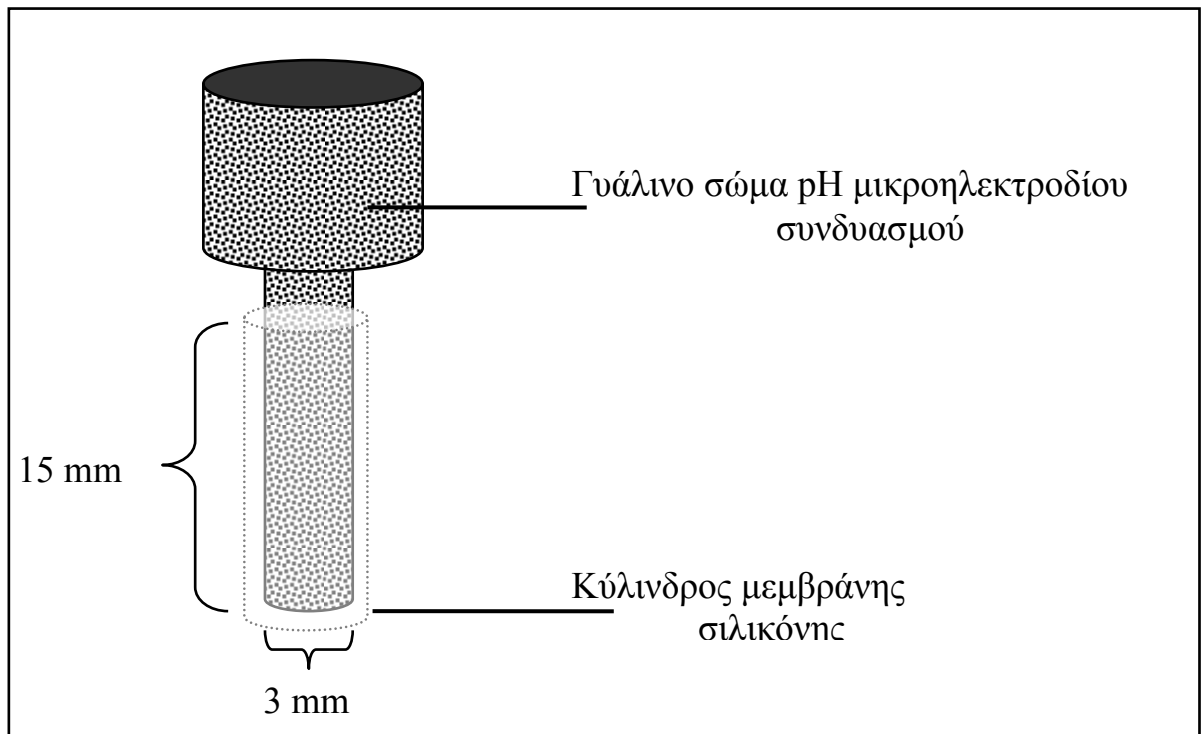
πολυπροπυλενίου. Τα φιαλίδια σφραγίζονταν με πλαστικό καπάκι που διαπερνούσε βελόνα 22 gauge, με την εξωτερική άκρη σφραγισμένη με ελαστικό πόμα, για να στερεωθεί επάνω της ένας χάρτινος δίσκος διαμέτρου 8 mm, εμποτισμένος με 40 μL 2N KOH. Τα φιαλίδια επωάζονταν για 1 h υπό ανάδευση σε υδατόλουτρο με ρυθμιζόμενη θερμοκρασία στους 37 °C και η αντίδραση σταματούσε με την έγχυση 150 μL 10% (w/v) TCA μέσω της βελόνας. Το μείγμα επωαζόταν περαιτέρω στους 50 °C για 30 min και κατόπιν οι χάρτινοι δίσκοι στέγνωσαν και τοποθετούνταν σε φιαλίδια σπινθηρισμού των 5 mL, που περιείχαν 4 mL υγρό σπινθηρισμού: 0,5% (w/v) PPO και 0,05% (w/v) POPOP σε τολουόλιο. Το ραδιοσημασμένο CO_2 , που ήταν παγιδευμένο στους χάρτινους δίσκους, μετρούνταν σε μετρητή σπινθηρισμού LS6000 SE (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA). Η μέτρηση της ενεργότητας έγινε με τρεις επαναλήψεις από κάθε εκχύλισμα και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες εκχυλίσεις. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε βρασμένο εκχύλισμα και η μη ενζυμική αποκαρβοξυλίωση ήταν σταθερά μικρότερη από το 5% των πειραματικών τιμών. Οι ειδικές ενεργότητες της ADC παρουσιάζονται σε U ανά mg πρωτεΐνης \pm το τυπικό σφάλμα του μέσου, όπου μία U ισούται με 1 nmole εκλύομένου CO_2 ανά ώρα στους 37 °C.

1.3.4. Κατασκευή του Επιλεκτικού για το CO_2 Ηλεκτροδίου

Το επιλεκτικό για το CO_2 ηλεκτρόδιο συναρμολογήθηκε από ένα pH μικροηλεκτρόδιο συνδυασμού Minitrode (Hamilton Company, Reno, ND), το οποίο περιβλήθηκε από κύλινδρο μεμβράνης διμεθυλ-σιλικόνης, μήκους 15 mm και διάφορων εσωτερικών διαμέτρων από 3,1 mm έως 3,5 mm όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.2, ο οποίος σφραγίστηκε με κόλλα σιλικόνης στο κάτω άκρο του. Ο σφραγισμένος κύλινδρος, αφού πληρώθηκε με το κατάλληλο εσωτερικό διάλυμα, προσαρμόστηκε γύρω από το γυάλινο σώμα του μικροηλεκτροδίου και στεγανοποιήθηκε το πάνω άκρο του με κόλλα σιλικόνης. Με τον τρόπο αυτό ο όγκος του εσωτερικού διαλύματος, που παγιδευόταν μεταξύ της μεμβράνης και του σώματος του μικροηλεκτροδίου, ήταν 10-40 μL . Το εσωτερικό διάλυμα

περιείχε 200 mM NaCl και διάφορες συγκεντρώσεις NaHCO₃ στο εύρος 1 έως 15 mM (Εικ. 1.2).

Οι ποτενσιομετρικές μετρήσεις έγιναν με τη χρήση μίας pH/ mV συσκευής Jenway (Jenway Ltd., Dunmow, England) και οι αλλαγές του ηλεκτροχημικού δυναμικού καταγράφονταν μετά από ενίσχυση από ενισχυτή αναλογικού σήματος, σε καταγραφικό.



Εικόνα 1.2. Διαστάσεις και κατασκευή του επιλεκτικού στο CO₂ ηλεκτροδίου από το pH μικροηλεκτρόδιο συνδυασμού και τη μεμβράνη σιλικόνης.

1.3.5. Κατασκευή της Καμπύλης Αναφοράς Συγκέντρωσης CO₂ / Ηλεκτροχημικού Δυναμικού και Μέτρηση Άγνωστων Δειγμάτων

Οι καμπύλες αναφοράς συγκέντρωσης CO₂ / ηλεκτροχημικού δυναμικού κατασκευάστηκαν από τις τιμές του ηλεκτροχημικού δυναμικού μετά την εξισορρόπηση (ορατή με ακρίβεια στο καταγραφικό) που προκαλούσε προσθήκη συγκεκριμένων ποσοτήτων NaHCO₃ σε ρυθμιστικό διάλυμα 200 mM κιτρικού οξέος pH 4,5, τελικού όγκου 1 mL, στο οποίο ήταν εμβαπτισμένο το ηλεκτρόδιο, σε θερμοκρασία δωματίου (~20 °C).

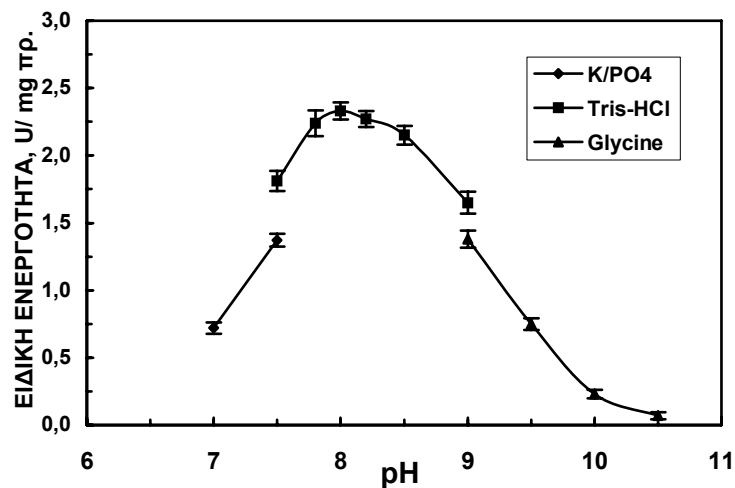
Στα δείγματα από τις ενζυμικές αντιδράσεις (200 μL) στο τέλος της επώασης γινόταν προσθήκη 800 μL διαλύματος, 200 mM κιτρικού οξέος, pH 4,0

και λαμβανόταν η τιμή του ηλεκτροχημικού δυναμικού. Το διάλυμα του κιτρικού οξέος καθώς και όλα τα διαλύματα, που χρησιμοποιήθηκαν για την ποτενσιομετρική μέτρηση του παραγόμενου CO₂ από την ενζυμική αντίδραση, ήταν απαερωμένα υπό κενό και φυλάσσονταν σε ερμητικά κλειστά γυάλινα δοχεία (desiccators) με δισκία KOH για την παγίδευση του CO₂ της ατμόσφαιρας.

1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1.1. Ιδιότητες της Αποκαρβοξυλάσης της Αργινίνης της Αμπέλου

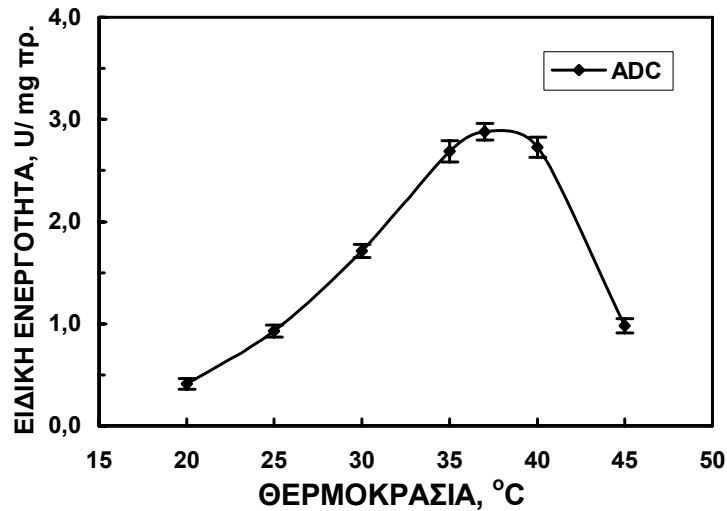
Η ενζυμική ενεργότητα της ADC της αμπέλου βρέθηκε μεγαλύτερη όταν η εκχύλιση γινόταν σε διάλυμα με τιμή pH μεταξύ 7,8 και 8,5, ενώ σε pH 7,5 και 9,0 η ενεργότητα μειωνόταν κατά 25%. Για τιμές pH μικρότερες από 7,0 και μεγαλύτερες από 9,5 η ενεργότητα μειωνόταν στο 30% της τιμής της στο άριστο pH (pH 8,0, Εικ. 1.3), ενώ σε pH πάνω από 10,0 η ενεργότητα μηδενιζόταν. Τα ιόντα του ρυθμιστικού διαλύματος επηρέαζαν την ενεργότητα σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl η ενεργότητα ήταν μεγαλύτερη για την ίδια τιμή pH σε σύγκριση με τα φωσφορικά ή τη γλυκίνη (Εικ. 1.3).



Εικόνα 1.3. Επίδραση του pH του διαλύματος εκχύλισης στην ενζυμική ενεργότητα της ADC της αμπέλου.

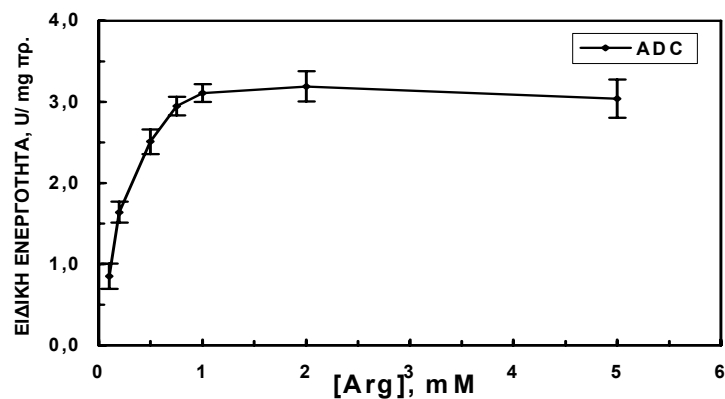
Το εύρος των θερμοκρασιών επώασης, που η ADC της αμπέλου έδειξε τις μεγαλύτερες ενεργότητες, κυμάνθηκε μεταξύ 35 και 40 °C. Μικρότερες ή μεγαλύτερες, κατά 5 °C θερμοκρασίες, μείωναν την τιμή της ενζυμικής

ενεργότητας κατά 50% τουλάχιστον. (Εικ. 1.4). Η ενζυμική ενεργότητα παρουσιάζοταν εξαιρετικά ευπαθής στην αποθήκευση στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (αδρανοποιούνταν) παρόλη την παρουσία 10% γλυκερόλης στο διάλυμα εκχύλισης. Δωδεκάωρη παραμονή του ενζυμικού εκχυλίσματος στον πάγο είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια του 50% της ενεργότητας.



Εικόνα 1.4. Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης στην ενζυμική ενεργότητα της ADC της αμπέλου.

Κινητική μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ενζυμική ενεργότητα της ADC έδειξε ότι η αντίδραση ερχόταν σε κορεσμό με συγκέντρωση 1 mM αργινίνης (Εικ. 1.5). Η εξειδίκευση της αντίδρασης εξετάστηκε με την προσθήκη των αναστολέων της ADC και της ODC (DFMA και DFMO, αντίστοιχα) στο διάλυμα της αντίδρασης σε τελική συγκέντρωση 1 mM καθώς και με την αντικατάσταση του υποστρώματος από λευκίνη. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.1, ο αναστολέας της ADC σχεδόν μηδένισε, ενώ ο



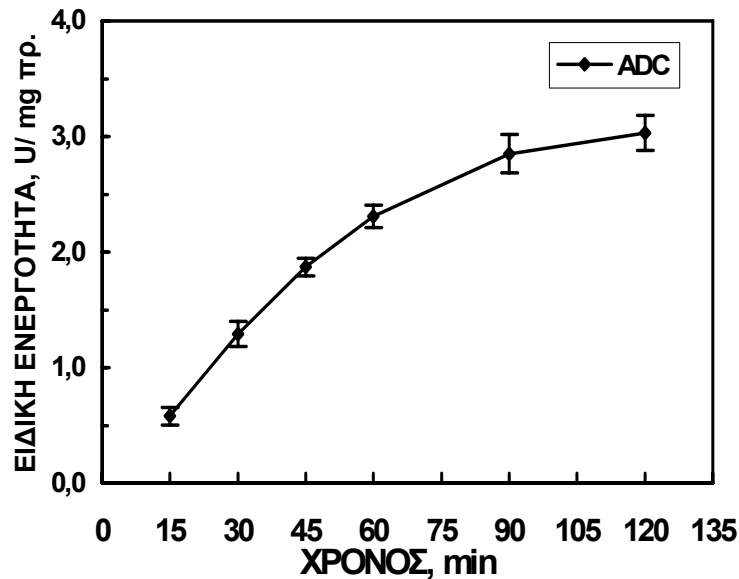
Εικόνα 1.5. Επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ενζυμική ενεργότητα της ADC της αμπέλου.

Πίνακας 1.1. Απελευθέρωση CO₂ από το ενζυμικό εκχύλισμα χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα 1 mM αργινίνη παρουσία και απουσία των μη αντιστρεπτών αναστολέων της ADC και της ODC και 1 και 5 mM λευκίνης.

	nmoles CO ₂ h ⁻¹ mg πρωτεΐνης ⁻¹	% Μάρτυρα
Μάρτυρας	2,97±0,12	100,0
1 mM DFMA	0,13±0,34	4,4
1 mM DFMO	2,87±0,31	96,9
1 mM Λευκίνη	0,08±0,17	3,0
5 mM Λευκίνη	0,28±0,14	9,4

αναστολέας της ODC δεν επηρέασε την παραγωγή CO₂ από την αργινίνη. Η μη ειδική αποκαρβοξυλίωση του αμινοξέος λευκίνη ήταν χαμηλή (3%) στη συγκέντρωση του 1 mM ενώ γινόταν μεγαλύτερη (9,4%) αλλά πάντως μικρότερη του 10% σε πενταπλάσια συγκέντρωση.

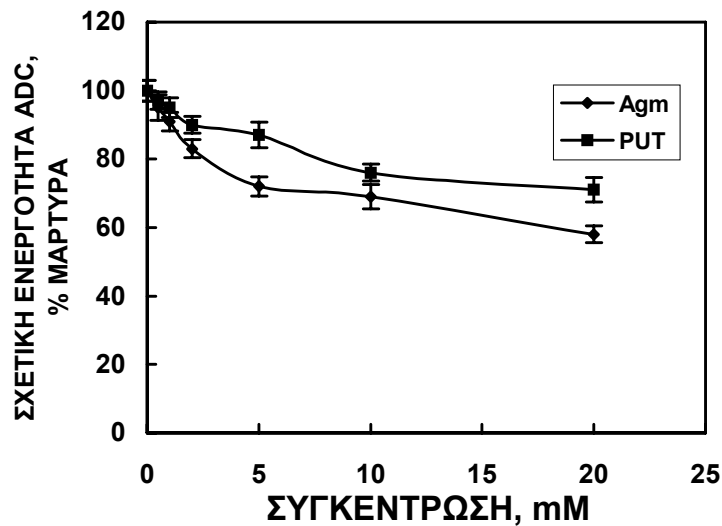
Στην Εικόνα 1.6 φαίνεται η επίδραση του χρόνου επώασης στην ενζυμική ενεργότητα της ADC. Ο ρυθμός παραγωγής CO₂ ήταν γραμμικός για τουλάχιστον 60 min ενώ μετά σε μεγαλύτερους χρόνους ο ρυθμός μειωνόταν αισθητά (27% και 40%, 1,5 και 2 h μετά).



Εικόνα 1.6. Επίδραση του χρόνου επώασης στην ενζυμική ενεργότητα της ADC της αμπέλου.

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση στην ενζυμική ενεργότητα της ADC της παρουσίας, στο διάλυμα εκχύλισης διθειοθρεϊτόλης (DTT) και φωσφορικής πυριδοξάλης (PP), και στο διάλυμα αντίδρασης των αμινών αγματίνης και πουτρεσκίνης. Η παρουσία DTT ήταν απαραίτητη για την επίδειξη ενεργότητας: η απουσία της προκαλούσε την απώλεια της ενεργότητας και η προσθήκη 5 mM DTT στην αντίδραση την επανέφερε μερικώς (55%). Η μερκαπτοαιθανόλη δεν αντικαθιστούσε αποτελεσματικά το DTT. Αντίθετα η απουσία PP από το διάλυμα εκχύλισης δεν προκαλούσε ολική απώλεια ενεργότητας: όμως, προσθήκη 20 έως 50 μ M PP είτε στο διάλυμα εκχύλισης ή στην αντίδραση αύξανε το ρυθμό της αποκαρβοξυλίωσης του υποστρώματος κατά 74%.

Η προσθήκη στο διάλυμα αντίδρασης αγματίνης ή πουτρεσκίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις παρεμπόδιζε την ενζυμική ενεργότητα της ADC (Εικ. 1.7). Η αγματίνη ήταν περισσότερο αποτελεσματική από την πουτρεσκίνη και στη συγκέντρωση 20 mM το επίπεδο της παρεμπόδισης ήταν 40% και 30% για τις δύο αμίνες, αντίστοιχα.



Εικόνα 1.7. Επίδραση των διαμινών αγματίνης και πουτρεσκίνης στην ενζυμική ενεργότητα της ADC της αμπέλου.

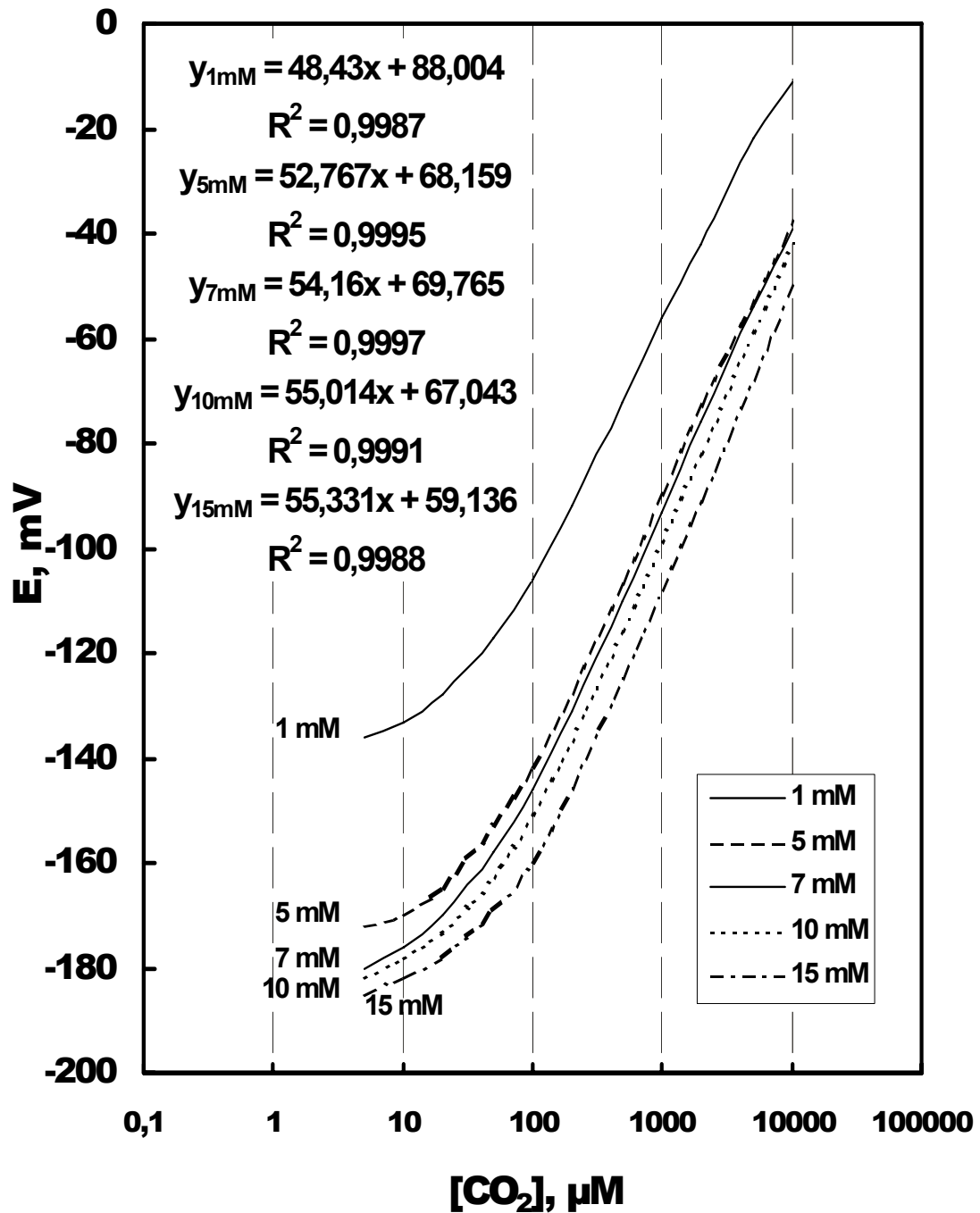
1.2. Ποτενσιομετρική Μέθοδος Προσδιορισμού της Ενζυμικής Ενεργότητας της Αποκαρβοξυλάσης της Αργινίνης

Κατά την κατασκευή του επιλεκτικού για το CO₂ ηλεκτροδίου, η πρώτη παράμετρος που μελετήθηκε ήταν η επίδραση του όγκου του εσωτερικού διαλύματος NaCl/ NaHCO₃, το οποίο βρίσκεται μεταξύ του γυάλινου σώματος του pH μικροηλεκτροδίου συνδυασμού και της περατής στα αέρια μεμβράνης σιλκόνης. Ο όγκος αυτός είναι συνάρτηση της εσωτερικής διαμέτρου του κυλίνδρου της μεμβράνης και όσο μεγαλύτερος είναι, σε σχέση με τον όγκο του διαλύματος στο οποίο ζητείται ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του CO₂, τόσο μεγαλύτερο σφάλμα προκαλεί στην εκτίμηση της συγκέντρωσης λόγω αραίωσης του CO₂ από το εξωτερικό της μεμβράνης διάλυμα στο εσωτερικό. Από τον Πίνακα 1.2 φαίνεται ότι για το μικρότερο όγκο εσωτερικού διαλύματος γίνεται η ακριβέστερη εκτίμηση της συγκέντρωσης του CO₂ και για μεγαλύτερους όγκους, το σφάλμα είναι μεγαλύτερο στις μεγάλες συγκεντρώσεις CO₂.

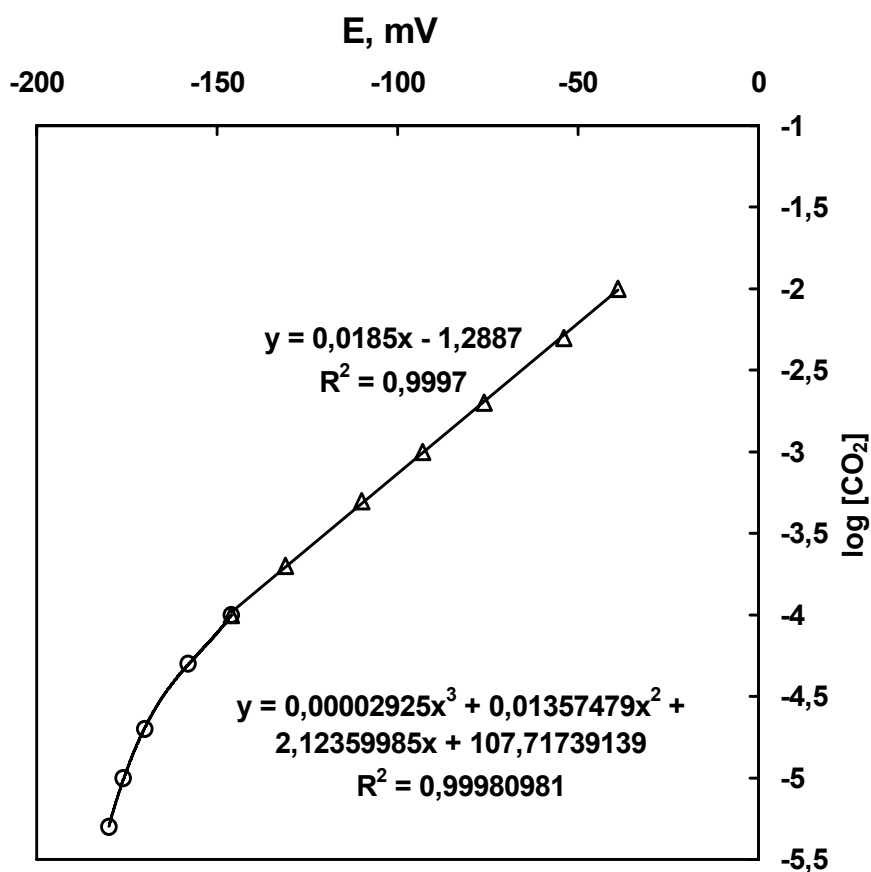
Πίνακας 1.2. Επίδραση του όγκου του εσωτερικού διαλύματος 200 mM NaCl / 15 mM NaHCO₃ στην εκτίμηση δύο γνωστών ποσοτήτων CO₂. Η εκτίμηση έγινε με βάση την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς για τη μοριακότητα 15 mM NaHCO₃ εσωτερικού διαλύματος ($E=55,331 \log[CO_2]+59,136$).

		Εσωτερική διάμετρος μεμβράνης σιλικόνης		
		3,5 mm	3,3 mm	3,1 mm
Όγκος εσωτερικού διαλύματος		~40 μ L	~25 μ L	~10 μ L
100 μ M CO ₂	Τιμή Ηλεκτροχημικού Δυναμικού	-163 mV	-162 mV	-162 mV
	Εκτίμηση της συγκέντρωσης του CO ₂	96 μ M	101 μ M	101 μ M
1000 μ M CO ₂	Τιμή Ηλεκτροχημικού Δυναμικού	-109 mV	-108 mV	-107 mV
	Εκτίμηση της συγκέντρωσης του CO ₂	915 μ M	954 μ M	994 μ M

Η δεύτερη παράμετρος που μελετήθηκε, ήταν η επίδραση της μοριακότητας του NaHCO₃ στο εσωτερικό διάλυμα. Στην Εικόνα 1.8 παρουσιάζονται οι καμπύλες αναφοράς του ηλεκτροδίου για 5 διαφορετικές μοριακότητες του NaHCO₃ στο εσωτερικό διάλυμα καθώς και οι εξισώσεις τους για τα γραμμικά κομμάτια των καμπυλών (από 100 έως 10.000 μ M). Η αύξηση της μοριακότητας του NaHCO₃ προκαλεί αύξηση της κλίσης της ευθείας από το 48,43 mV/ τάξη μεγέθους αύξησης στη συγκέντρωση του CO₂, για το 1 mM στα 55,33 για τα 15 mM και αύξηση του χρόνου απόκρισης (χρόνος που απαιτείται για την εξισορρόπηση) ειδικά στις χαμηλές συγκεντρώσεις CO₂ (> 10 min για 10



Εικόνα 1.8. Επίδραση της μοριακότητας του NaHCO₃ του εσωτερικού διαλύματος, στις καμπύλες αναφοράς του ηλεκτροδίου, για τις πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν. Στο πάνω αριστερό μέρος του σχεδιαγράμματος δίνονται οι εξισώσεις για το γραμμικό τμήμα τους (συγκεντρώσεις CO₂ από 100 έως 10.000 μM) κάθε καμπύλης καθώς και το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης που υπολογίστηκαν (x: ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης του CO₂ και y: το ηλεκτροχημικό δυναμικό του ηλεκτροδίου).



Εικόνα 1.9. Η αντίστροφη της καμπύλης αναφοράς (ηλεκτροχημικό δυναμικό / λογάριθμος συγκέντρωσης CO_2) του ηλεκτροδίου με εσωτερικό διάλυμα NaHCO_3 7 mM και οι εξισώσεις της για το γραμμικό και το πολυωνυμικό τμήμα της.

μM CO_2 στο ηλεκτρόδιο με μοριακότητα NaHCO_3 του εσωτερικού διαλύματος 15 mM).

Τελικά επιλέχθηκε η μοριακότητα NaHCO_3 εσωτερικού διαλύματος 7 mM. Σε αυτήν τη μοριακότητα, το ηλεκτρόδιο έδειξε τυπική Nernstian συμπεριφορά (γραμμική σχέση ηλεκτροχημικού δυναμικού και λογαρίθμου συγκέντρωσης CO_2) για συγκεντρώσεις CO_2 μεταξύ 100 μM και 10 mM, ενώ μπορούσε να διαφοροποιήσει συγκεντρώσεις πάνω από 10 μM . Η κλίση της ευθείας αναφοράς του ήταν 54,16 mV/ τάξη μεγέθους αύξησης στη συγκέντρωση του CO_2 ($E = 54,16 \log[\text{CO}_2] + 69,765$, $R^2 = 0,9997$). Στην Εικόνα 1.9 παρουσιάζεται η αντίστροφη της καμπύλης αναφοράς του (ηλεκτροχημικό δυναμικό με το λογάριθμο συγκέντρωσης CO_2) καθώς και οι εξισώσεις που υπολογίζουν το λογάριθμο της συγκέντρωσης του CO_2 από την τιμή του ηλεκτροχημικού δυναμικού: μία εξίσωση ευθείας για το γραμμικό τμήμα (0,1 έως 10 mM, $\log[\text{CO}_2] = 0,0185 E - 1,2887$) και μία τριτοβάθμια πολυωνυμική

εξίσωση παλινδρόμησης για το μη γραμμικό τμήμα (5 έως 100 μM , $\log[\text{CO}_2]=0,00002925 E^3+0,01357479 E^2+2,12359985 E+107,71739139$, $R^2=0,9998$). Ο χρόνος απόκρισης ήταν 7 min για συγκεντρώσεις CO_2 μικρότερες των 10 μM (1,5 έως 2 φορές γρηγορότερη απόκριση από το ηλεκτρόδιο με μοριακότητα NaHCO_3 εσωτερικού διαλύματος 15 mM) και μικρότερες των 2 min, για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 100 μM .

Η επαναληψιμότητα του ηλεκτροδίου δοκιμάστηκε με την πραγματοποίηση τριών διαφορετικών τιτλοδοτήσεων την ίδια ημέρα (Πίν. 1.3). Η μεγαλύτερη απόκλιση παρουσιάστηκε στη χαμηλή συγκέντρωση CO_2 (10 μM) ενώ στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις το ηλεκτρόδιο επέδειξε πολύ καλή επαναληψιμότητα.

Πίνακας 1.3. Επαναληψιμότητα των τιμών ηλεκτροχημικού δυναμικού (mV) του ηλεκτροδίου με μοριακότητα NaHCO_3 εσωτερικού διαλύματος 7 mM, για τρεις συγκεντρώσεις CO_2 , σε τρεις ανεξάρτητες τιτλοδοτήσεις την ίδια ημέρα.

Τιτλοδότηση	Συγκέντρωση CO_2 , μM		
	10	100	1000
	Ηλεκτροχημικό δυναμικό, mV		
#1	-176	-147	-93
#2	-174	-146	-92
#3	-177	-147	-93
Τυπικό Σφάλμα	1,5	0,6	0,6

Στη συνέχεια, συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα της ποτενσιομετρικής και της ισοτοπικής μεθόδου για τον προσδιορισμό της ενζυμικής ενεργότητας της ADC. Με το ηλεκτρόδιο μετρήθηκε με επιτυχία και ικανοποιητική ακρίβεια (απόκλιση μικρότερη του 10% από την ισοτοπική μέθοδο) η ενζυμική ενεργότητα της ADC από ημικαθαρισμένα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα σπορόφυτων 30 ημερών βρώμης και κριθαριού, όχι όμως και από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα φύλλων αμπέλου (Πίν. 1.4). Η ποτενσιομετρική μέθοδος υπερεκτιμούσε την τιμή της ενζυμικής ενεργότητας και μάλιστα το σφάλμα ήταν μεγαλύτερο στις χαμηλές συγκεντρώσεις CO_2 (χαμηλότερες των 10 μM , στα εκχυλίσματα από

φύλλα αμπέλου). Το όριο ευαισθησίας της μεθόδου ήταν γύρω στα 25-50 nmoles CO₂/ mL εκχυλίσματος, ώστε η τελική συγκέντρωση του CO₂ στο ένα mL με το κιτρικό, όπου γίνεται η μέτρηση του ηλεκτροχημικού δυναμικού του ηλεκτροδίου, να πλησιάζει τα 5-10 μM για να προκαλεί δυναμικό εντός του εύρους της τριτοβάθμιας πολυωνυμικής εξίσωσης παλινδρόμησης (τουλάχιστον -180 mV).

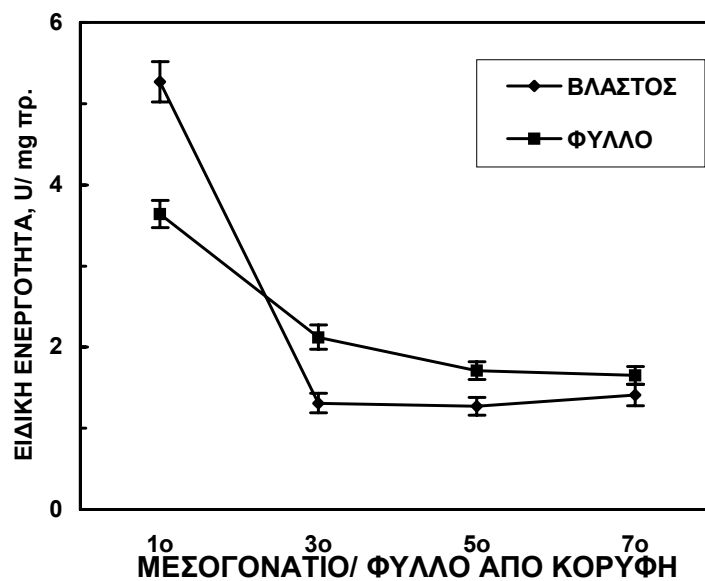
Πίνακας 1.4. Σύγκριση ισοτοπικής και ποτενσιομετρικής μεθόδου μέτρησης της ενζυμικής ενεργότητας της ADC. Η ενζυμική εκχύλιση και η αντίδραση με την ισοτοπική μέθοδο περιγράφονται στα Υλικά και Μέθοδοι. Για τις αντιδράσεις που μετρήθηκαν με την ποτενσιομετρική μέθοδο, 200 μL ενζυμικού εκχυλίσματος και 5 μL 40 mM αργινίνης, επώασθησαν στους 37 °C για 30 και 60 min, με πέντε επαναλήψεις. Στο τέλος του χρόνου επώασης, ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι το 1 mL με 200 mM κιτρικού οξέος pH 4,0 και η συγκέντρωση του CO₂ στο κάθε δείγμα εκτιμήθηκε από το ηλεκτροχημικό δυναμικό που προκαλούσε στο ηλεκτρόδιο (mV) με βάση την τριτοβάθμια πολυωνυμική εξίσωση παλινδρόμησης για το μη γραμμικό τμήμα της αντίστροφης καμπύλης αναφοράς ($E, \log[\text{CO}_2]$) του ηλεκτροδίου. ($\log[\text{CO}_2]=0,00002925 E^3+0,01357479 E^2+2,12359985 E+107,71739139$).

	Χρόνος επώασης (min)	Ενεργότητα ADC (nmoles CO ₂ / mL εκχυλίσματος)			
		Ισοτοπική Μέθοδος	Ποτενσιομετρική Μέθοδος	E (mV)	Απόκλιση %
Προέλευση εκχυλίσματος					
Σπορόφυτα	30	46,7±2,9	51,1±6,0	-175,8±0,8	+9,3
Βρώμης	60	91,7±2,5	94,7±4,6	-170,8±0,5	+3,3
Σπορόφυτα	30	55,2±2,7	59,4±4,4	-174,6±0,6	+7,6
Κριθαριού	60	113,8±2,9	116,2±5,9	-168,6±0,6	+2,1
Φύλλα	30	3,6±0,3	10,4±2,3	-184,4±0,9	+188,9
Αμπέλου	60	7,1±0,4	12,5±3,2	-183,6±1,1	+76,1

1.3. Η Ενζυμική Ενεργότητα της Αποκαρβοξυλάσης της Αργινίνης σε Ιστούς της Αμπέλου

Για να μελετηθεί η αναπτυξιακή και οντογενετική έκφραση της ADC της αμπέλου μετρήθηκε η ενζυμική της ενεργότητα σε διάφορους ιστούς και από διάφορα συστήματα.

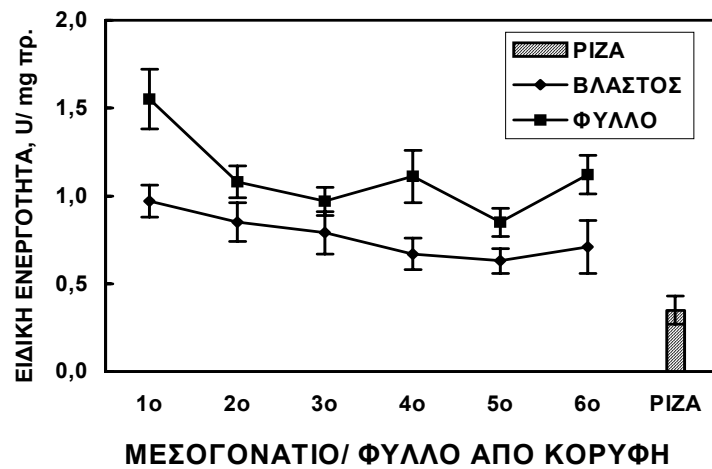
Η ενεργότητα της ADC ήταν υψηλότερη στα νεαρά αναπτυσσόμενα όργανα από αυτόριζα πρέμνα, ανεπτυγμένα στο θερμοκήπιο για ένα χρόνο, μετά τη μεταφορά τους από την *in vitro* καλλιέργεια. Πιο συγκεκριμένα, η ενεργότητα της ADC ακολουθούσε μία φθίνουσα βαθμίδα από την κορυφή (κορυφαίο μερίστωμα) προς τη βάση τόσο για τους βλαστούς (μεσογονάτια) όσο και για τα αντίστοιχα τους φύλλα (Εικ. 1.10). Στα φύλλα, με εξαίρεση το πρώτο, οι ενεργότητες ήταν ελαφρώς μεγαλύτερες από τους βλαστούς. Στο μεσογονάτιο “1” για το βλαστό συμπεριλήφθηκε το κορυφαίο μερίστωμα και το πρώτο ασχημάτιστο φύλλο. Το πρώτο φύλλο ήταν το πρώτο σχηματισμένο φύλλο το οποίο δεν είχε πάρει το τελικό του μέγεθος (αναπτυσσόμενο). Το μεσογονάτιο, που βρισκόταν πάνω από το γόνατο που εκφύονταν το κάθε φύλλο, θεωρούνταν ως ο αντίστοιχος του βλαστός. Το τρίτο φύλλο ήταν το πρώτο από τα φύλλα που είχαν αποκτήσει το τελικό τους μέγεθος.



Εικόνα 1.10. Η ειδική ενεργότητα της ADC στα μεσογονάτια και τα αντίστοιχα φύλλα κατά μήκος των βλαστών από αυτόριζα πρέμνα αμπέλου ανεπτυγμένα στο θερμοκήπιο. Η αρίθμηση ξεκινάει από την κορυφή προς τη βάση.

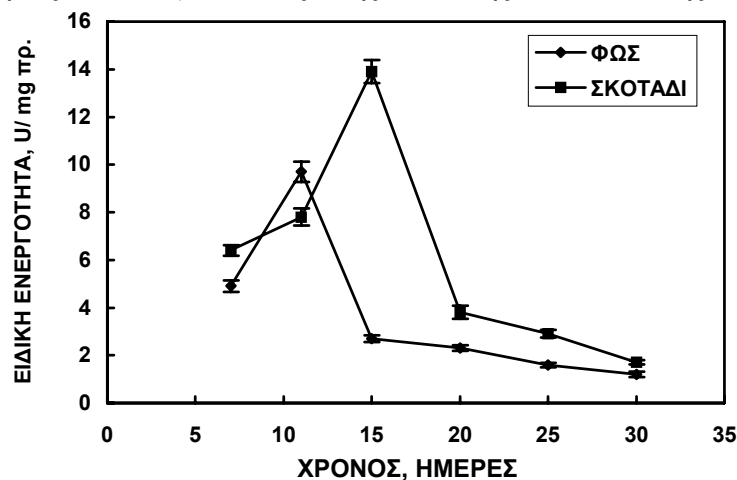
Παρόμοια εικόνα, με μικρές διαφορές, έδειξαν οι ενεργότητες της ADC σε βλαστούς και φύλλα από *in vitro* ανεπτυγμένα φυτά ηλικίας 6 εβδομάδων, που προήλθαν από έκφυτα ενός κόμβου (Εικ. 1.11). Η ενεργότητα στους βλαστούς ήταν σταθερή χωρίς να παρατηρηθεί αυξημένη στο πρώτο μεσογονάτιο ενώ στα φύλλα ήταν μεγαλύτερη στο πρώτο και μειωνόταν από το δεύτερο φύλλο. Στη ρίζα παρατηρήθηκε η χαμηλότερη ενεργότητα. Οι τιμές της

ενεργότητας από τα *in vitro* φυτά ήταν μικρότερες (περίπου οι μισές) σε σύγκριση με τις τιμές από τα αυτόριζα πρέμνα του θερμοκηπίου.



Εικόνα 1.11. Η ειδική ενεργότητα της ADC στα μεσογονάτια και τα αντίστοιχα φύλλα κατά μήκος των βλαστών από *in vitro* φυτά αμπέλου ανεπτυγμένα σε θάλαμο σταθερών συνθηκών. Η αρίθμηση ξεκινάει από την κορυφή.

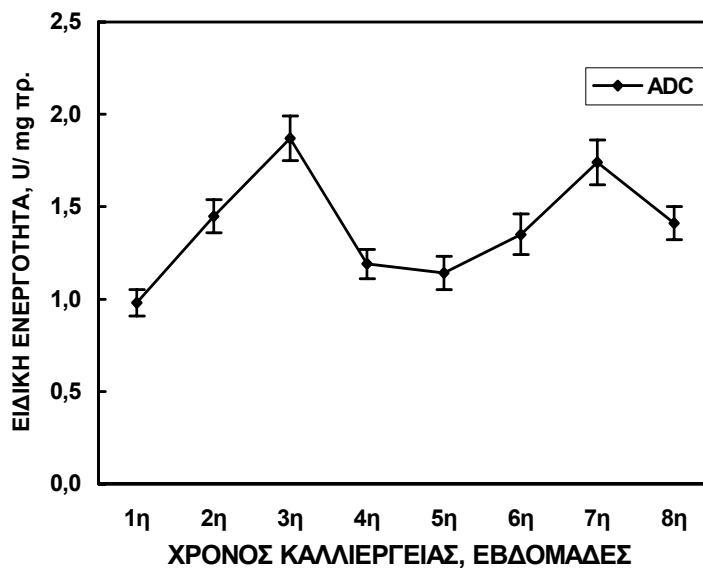
Σπόροι αμπέλου ποικιλίας Βηλάνα (*Vitis vinifera* cv Vilana) φύτευαν στο φως και στο σκοτάδι, όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι, και η ενεργότητα της ADC προσδιορίστηκε στα σπορόφυτα, που προέκυψαν σε διάστημα 30 ημερών. Η βλαστική ικανότητα των σπόρων ήταν πολύ χαμηλή (15-20%) και η βλάστησή τους ανομοιόμορφη. Σε κάθε δειγματοληψία έγινε προσπάθεια τα σπορόφυτα που λαμβάνονταν, να βρίσκονται περίπου στο ίδιο στάδιο. Επτά ημέρες μετά την τοποθέτηση των σπόρων στα τριβλία εμφανίστηκε το ριζίδιο (μήκος 3-4 mm). Μεταξύ της εικοστής και εικοστής πέμπτης ημέρας



Εικόνα 1.12. Η ειδική ενεργότητα της ADC σε ολόκληρα σπορόφυτα αμπέλου, ποικιλίας Βηλάνα, κατά το φύτευμα στο φως και το σκοτάδι.

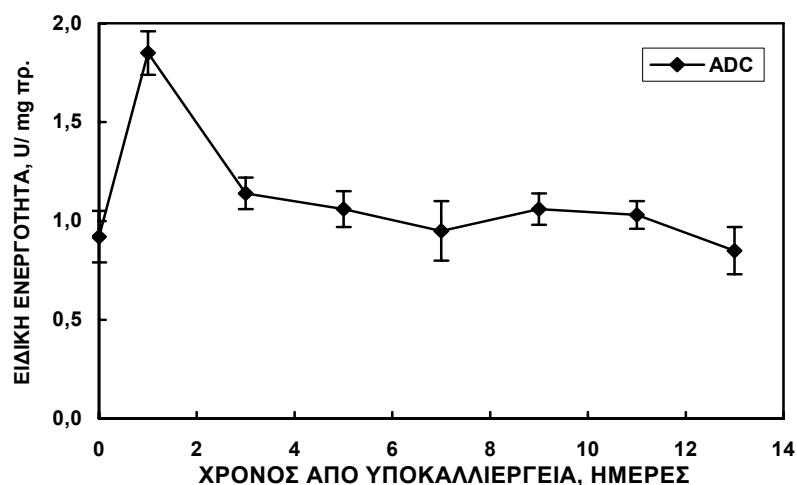
τα κοτυληδονόφυλλα είχαν πλήρως εκπτυχθεί και την τριακοστή ημέρα οι καταβολές των πρώτων πραγματικών φύλλων ήταν μόλις ορατές. Τα σπορόφυτα που φύτευαν στο σκοτάδι παρουσίασαν μία μικρή καθυστέρηση (4-5 ημερών) σε σχέση με τα σπορόφυτα που φύτευαν στο φως. Οι υψηλότερες τιμές της ενεργότητας της ADC παρατηρήθηκαν την ενδέκατη ημέρα για τα σπορόφυτα που φύτευαν στο φως (9,8 U/ mg πρωτεΐνης) και τη δέκατη πέμπτη για τα χλωρωτικά σπορόφυτα (14 U/ mg πρωτεΐνης, Εικ. 1.12). Από το σημείο αυτό οι τιμές της ενεργότητας μειώνονταν σταδιακά, για να φτάσουν την τριακοστή ημέρα τα 2 U/ mg πρωτεΐνης.

Κατά την υποκαλλιέργεια κάλλων αμπέλου, οι οποίοι είχαν εγκαθιδρυθεί 4 γενιές πριν, η ενεργότητα της ADC αυξήθηκε μεταξύ της πρώτης και τρίτης εβδομάδας από την καλλιέργεια και την τέταρτη μειώθηκε, για δύο διαδοχικές υποκαλλιέργειες (Εικ. 1.13).



Εικόνα 1.13. Η ειδική ενεργότητα της ADC σε κάλλους αμπέλου σε δύο διαδοχικές υποκαλλιέργειες. Οι υποκαλλιέργειες έγιναν την εβδομάδα 0 και 4.

Τέλος κατά την υποκαλλιέργεια κυττάρων αμπέλου η ενεργότητα της ADC παρουσιάστηκε ελαφρώς αυξημένη 24 h μετά την υποκαλλιέργεια και στη συνέχεια μειώθηκε και παρέμενε σταθερή σε όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας (Εικ. 1.14).



Εικόνα 1.14. Η ειδική ενεργότητα της ADC σε κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου κατά την καλλιέργεια. Η υποκαλλιέργεια έγινε στο χρόνο 0. Οι κυτταροκαλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς τους φυτικούς ρυθμιστικούς παράγοντες NAA και 6-BAP.

1.4. Προσπάθεια Καθαρισμού της Αποκαρβοξυλάσης της Αργινίνης της Αμπέλου

Το αρχικό ακαθάριστο πρωτεϊνικό εκχύλισμα από φύλλα αμπέλου κλασματώθηκε με θειικό αμμώνιο (30, 60, 90% του κορεσμού), ακετόνη (30, 60, 90% w/v) και πολυαιθυλενογλυκόλη μέσου μοριακού βάρους 4000 (PEG-4000, 50%, w/v). Οι κατακρημνισμένες, μετά από φυγοκέντρηση, πρωτεΐνες κάθε κλάσματος, επαναδιαλύθηκαν στο διάλυμα εκχύλισης και μαζί με τα υπερκείμενα των τελευταίων κλασμάτων (υπερκείμενα 90% θειικού αμμωνίου, 90% ακετόνης και 50% PEG-4000) υποβλήθηκαν σε διαπίδυση για 6-12 h, σε διάλυμα ίδιας σύστασης με το διάλυμα εκχύλισης, αλλά με συγκέντρωση Tris-HCl 20 mM. Σε κανένα από τα κλάσματα καθώς και τα τελικά υπερκείμενα του θειικού αμμωνίου και της ακετόνης δεν ανιχνεύθηκε ενζυμική ενεργότητα ADC. Στο κλάσμα 50% της PEG-4000 βρέθηκε το 20% της ενεργότητας του αρχικού εκχυλίσματος ενώ στο υπερκείμενο δε βρέθηκε ενεργότητα.

Παρατηρήθηκε επίσης, ότι το αρχικό ακαθάριστο πρωτεϊνικό εκχύλισμα έχανε την ενεργότητά του μετά από διαπίδυση σε μεμβράνη εμβαπτισμένη στο διάλυμα εκχύλισης. Η ενεργότητα χανόταν και όταν η διαπίδυση γινόταν με Amicon miniconcentrators αλλά η επανασύσταση του αρχικού εκχυλίσματος, μετά από συμπύκνωση του "εξωτερικού" διαλύματος (το διάλυμα με τα

μικρομόρια που έχουν περάσει από τους πόρους της μεμβράνης), επανέφερε την ενεργότητα. Δοκιμάστηκε η προσθήκη διαφόρων μονοσθενών και δισθενών ιόντων (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) και σε συγκεντρώσεις από 10 μM έως 5 mM, στο μείγμα της αντίδρασης με το ημικαθαρισμένο πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά τη διαπίδυση, χωρίς αποτέλεσμα. Το Mn^{2+} σε συγκέντρωση 1 mM στο μείγμα της αντίδρασης με το πρωτεϊνικό εκχύλισμα, πριν τη διαπίδυση, αύξανε την ενεργότητα της ADC κατά 10%, δεν επανέφερε όμως την ενεργότητα στα εκχυλίσματα μετά τη διαπίδυση.

Τέλος, παρατηρήθηκε ότι η αναλογία βάρους ιστού προς όγκο διαλύματος εκχύλισης επηρέαζε την εκτιμώμενη ειδική ενεργότητα της ADC. Αύξηση του όγκου διαλύματος εκχύλισης ανά g βάρους ιστού, όπως και η αραιώση του εκχυλίσματος με διάλυμα εκχύλισης, μείωνε την ειδική ενεργότητα της ADC σε εκχυλίσματα από πράσινους ιστούς ενώ αντίθετα την αύξανε σε εκχυλίσματα από χλωρωτικούς ιστούς (Πίν. 1.5). Μείγματα εκχυλισμάτων πράσινων και χλωρωτικών ιστών είχαν ειδικές ενεργότητες μικρότερες από τις αναμενόμενες και τις πλησίαζαν όσο περισσότερο συμμετείχε στο μείγμα το εκχύλισμα από το χλωρωτικό ιστό.

Πίνακας 1.5. Επίδραση της αραιώσης του ενζυμικού εκχυλίσματος, με διάλυμα εκχύλισης (ΔΕ), στην ειδική ενεργότητα της ADC εκχυλισμάτων πράσινων και χλωρωτικών σποροφύτων αμπέλου (*Vitis vinifera* cv. Vilana) και οι ειδικές ενεργότητες μειγμάτων των δύο εκχυλισμάτων σε τρεις διαφορετικές αναλογίες.

ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΣΤΑΣΗ ΜΕΙΓΜΑΤΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ	ADC ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ, (U / mg πρωτ.)	% ΤΗΣ ΑΝΑΜΕΝΟ- ΜΕΝΗΣ
Πράσινα Σπορόφυτα, 100 μL	2,55 \pm 0,11	
Πράσινα Σπορόφυτα, 50 μL + 50 μL ΔΕ	0,41 \pm 0,03	16,1
Πράσινα Σπορόφυτα, 20 μL + 80 μL ΔΕ	0,25 \pm 0,02	9,8
Χλωρωτικά Σπορόφυτα, 100 μL	4,12 \pm 0,19	
Χλωρωτικά Σπορόφυτα, 50 μL + 50 μL ΔΕ	5,80 \pm 0,21	140,8
Χλωρωτικά Σπορόφυτα, 20 μL + 80 μL ΔΕ	6,73 \pm 0,17	163,3
Πράσ. Σπορ. και Χλωρ. Σπορ., 90 μL + 10 μL	1,75 \pm 0,09	64,6
Πράσ. Σπορ. και Χλωρ. Σπορ., 50 μL + 50 μL	2,41 \pm 0,15	72,4

1.5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι άριστες τιμές pH και θερμοκρασίας (8,0 και 37 °C) για την ενζυμική ενεργότητα της αποκαρβοξυλάσης της αργινίνης της αμπέλου, (Εικ. 1.3 και 1.4), που παρατηρήθηκαν από τη μελέτη ημικαθαρισμένων πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων φύλλων, είναι παρόμοιες με αυτές που έχουν αναφερθεί για άλλα φυτικά είδη. Στα ψυχανθή λάθυρος (*Lathyrus sativus*) και σόγια (*Glycine max*), το καθαρισμένο μέχρι ομοιογένειας ένζυμο είχε άριστο pH και θερμοκρασίας 8,5 και 45 °C (Ramakrishna and Adiga, 1975) και 8,0 και 37 °C (Nam et al, 1997) για τα δυο είδη, αντίστοιχα. Στο καθαρό ένζυμο από την πεδινή κράμβη (*Brassica campestris*) και σε ημικαθαρισμένα εκχυλίσματα κοτυληδόνων αγγουριάς, οι άριστες τιμές των δύο παραπάνω παραμέτρων ήταν 8,0 και 30 °C (Das et al, 1996) και 8,3 και 40 °C (Suressh et al, 1978). Το μερικώς καθαρισμένο ένζυμο από το μεσοκάρπιο ώριμου αβοκάντο (*Persea americana* Mill.) είχε άριστο pH μεταξύ του 8,0 και 9,0 και ήταν θερμοσταθές με άριστο θερμοκρασίας στους 60 °C (Winer et al, 1984). Στα μονοκοτυλήδονα βρώμη και ρύζι, το καθαρισμένο μέχρι ομογένειας ένζυμο είχε άριστο pH και θερμοκρασίας 7,5 και 25 °C και 8,0 και 45 °C, αντίστοιχα για τα δύο είδη (Smith, 1979, Choudhuri and Ghosh, 1982). Η ADC της αμπέλου παρουσιάζει μεγάλη ευπάθεια, κατά την ψύξη – απόψυξη από τους –80 °C, και κατά την παραμονή για μεγάλα χρονικά διαστήματα στους 4 °C, όπως και το καθαρό ένζυμο του λάθουρου (Ramakrishna and Adiga, 1975).

Το K_M του καθαρού μέχρι ομοιογένειας ενζύμου για την αργινίνη κυμαίνεται από 30 μM έως και 1,7 mM σε διάφορα φυτικά είδη (βρώμη 30 μM , Smith, 1979, ρύζι 280 μM , Choudhuri and Ghosh, 1982, λάθυρος 1,7 mM, Ramakrishna and Adiga, 1975, σόγια 46 μM , Nam et al, 1997, και πεδινή κράμβη 310 μM , Das et al, 1996). Το ένζυμο από τα ημικαθαρισμένα εκχυλίσματα της αμπέλου ερχόταν σε κορεσμό από το 1 mM (Εικ. 1.5), γεγονός που υποδηλώνει ότι το K_M του είναι της τάξεως των μM , και αποκαρβοξυλίωσε

με μεγάλη εξειδίκευση την αργινίνη, όπως έδειξαν τα αποτελέσματα με τους μη αντιστρεπτούς αναστολείς της ADC και ODC (Πιν. 1.1).

Έναν παράγοντα σφάλματος, κατά τη μέτρηση της ενεργότητας της ADC σε ημικαθαρισμένα φυτικά ενζυμικά παρασκευάσματα, εισάγει, πιθανώς, η παρουσία αργινάσης και ουρεάσης σε αυτά. Η αργινάση αποικοδομεί την αργινίνη σε ορνιθίνη και ουρία. Η μεν ορνιθίνη μπορεί να αποκαρβοξυλιωθεί από την αντίστοιχη αποκαρβοξυλάση της, ενώ η ουρία μετατρέπεται σε αμμωνία και CO₂ από την ουρεάση. Το πρόβλημα της απελευθέρωσης CO₂ από την ουρεάση αντιμετωπίστηκε με χρήση αργινίνης σημασμένης μόνο στον καρβοξυλικό άνθρακα ([1-¹⁴C] αργινίνη), η ορνιθίνη όμως που μπορεί να παραχθεί από την πιθανή δράση της αργινάσης σε αυτό το υπόστρωμα είναι επίσης σημασμένη στον καρβοξυλικό άνθρακα. Η παρουσία, πάντως, του DFMO (μη αντιστρεπτός αναστολέας της ODC) στο διάλυμα της αντίδρασης κατά τη μέτρηση της ενεργότητας της ADC δε μείωσε το CO₂ που απελευθερωνόταν (Πιν. 1.1), πράγμα που σημαίνει ότι η αργινάση δεν αποικοδομούσε την αργινίνη στις συνθήκες της αντίδρασης (άριστο pH αργινάσης 9,5 και K_M για την αργινίνη 5-20 mM, Roubelakis and Kliewer, 1978), ή/ και η παραγόμενη ορνιθίνη δεν αποκαρβοξυλιωνόταν. Η μη ειδική αποκαρβοξυλίωση του αμινοξέος λευκίνη (στα φυτά δεν έχει αναφερθεί ενεργότητα αποκαρβοξυλάσης της λευκίνης) ήταν χαμηλή: 3 και 9,4% σε συγκεντρώσεις 1 και 5 mM αντίστοιχα (Πίν. 1.1) και πιθανόν να οφείλεται σε μη ειδική αποκαρβοξυλίωση από την ODC λόγω μεγαλύτερης ομοιότητας με το υπόστρωμά της, την ορνιθίνη. Οι Birecka et al (1985a, b) μελετώντας τις ενεργότητες της ADC σε εκχυλίσματα από δώδεκα φυτικά είδη (δικοτυλήδονα και μονοκοτυλήδονα) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μη ειδική αποκαρβοξυλίωση της αργινίνης, σε αντίθεση με εκείνη της ορνιθίνης, είναι σπάνιο γεγονός.

Το ένζυμο της ADC της αμπέλου χρησιμοποιεί ως συνένζυμο τη φωσφορική πυριδοξάλη και απαιτεί την παρουσία σουλφυδρυλομάδων για την επίδειξη ενεργότητας. Η φωσφορική πυριδοξάλη είναι συνένζυμο των αμινοτρανσφερασών και των περισσότερων αποκαρβοξυλασών των αμινοξέων (Sandmeier et al, 1994) και στις καθαρισμένες μέχρι ομοιογένειας φυτικές ADCs

όπου έχει μελετηθεί, δείχθηκε ότι η απομάκρυνση του συνενζύμου τις απενεργοποιεί (Ramakrishna and Adiga, 1975, Choudhuri and Ghosh, 1982). Η απαίτηση των σουλφυδρυλομάδων υποδεικνύει την ύπαρξη μεγάλου αριθμού κυστεϊνών στο μόριο του ενζύμου οι οποίες συμμετέχουν στη φυσική του διαμόρφωση. Όπως θα δειχθεί στο επόμενο Κεφάλαιο, στο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης του mRNA της ADC της αμπέλου υπάρχουν τουλάχιστον 17 κυστεΐνες, από τις οποίες οι 12 είναι συντηρημένες και στις άλλες γνωστές φυτικές αλληλουχίες. Οι αμίνες πουτρεσκίνη και η πρόδρομός της, αγματίνη (το προϊόν της αποκαρβοξυλίωσης της αργινίνης), προκαλούν μέτρια παρεμπόδιση στην ενζυμική ενεργότητα της ADC της αμπέλου (30 και 40%, αντίστοιχα στη συγκέντρωση 20 mM, Εικ. 1.7). Στο καθαρό ένζυμο του λάθουρου, η παρεμπόδιση ήταν 35 και 45%, αντίστοιχα για τις δύο αμίνες στην ίδια συγκέντρωση (Ramakrishna and Adiga, 1975), ενώ στο μερικώς καθαρισμένο ένζυμο από το αβοκάντο και το καθαρό ένζυμο της σόγιας, συγκέντρωση 5 mM πουτρεσκίνης προκαλούσε 80% παρεμπόδιση στα δύο ένζυμα και 5 mM αγματίνης 70 και 90% παρεμπόδιση για τα ένζυμα του αβοκάντο και της σόγιας, αντίστοιχα (Winer et al, 1984, Nam et al, 1997).

Η ενεργότητα της ADC της αμπέλου δε βρέθηκε να παρουσιάζει εξάρτηση από κάποιο μεταλλικό κατιόν, μονοσθενές ή δισθενές. Η μικρή αύξηση κατά 10% στην ενεργότητα, που προκαλούσε η προσθήκη 1 mM Mn^{2+} στο διάλυμα της αντίδρασης, πιθανόν να οφείλεται στην αποκαρβοξυλίωση από την ODC της παραγόμενης από την αργινάση (η οποία απαιτεί 1 mM Mn^{2+} για επίδειξη του μέγιστου της ενεργότητας, Roubelakis and Kliewer, 1978) ορνιθίνης. Από τις φυτικές, καθαρισμένες μέχρι ομοιογένειας ADCs, του λάθουρου, του ρυζιού και της σόγιας, ουδεμία παρουσιάζει εξάρτηση από μεταλλικά κατιόντα (Ramakrishna and Adiga, 1975, Choudhuri and Ghosh, 1982, Nam et al, 1997), αν και στο ένζυμο του λάθουρου η ενεργότητα αυξανόταν κατά 35% με την παρουσία 0,1 mM Mn^{2+} (Ramakrishna and Adiga, 1975). Αντίθετα με τις φυτικές ADCs, το ένζυμο από την *E. coli* απαιτεί Mg^{2+} (Moore and Boyle, 1991).

Η αρχή της ποτενσιομετρικής μεθόδου προσδιορισμού του CO₂ σε διάλυμα, που βασίζεται σε αισθητήρα αερίων τύπου Severinghaus, προϋποθέτει τις ακόλουθες συνθήκες (από Meyerhoff et al, 1983):

α. Οι σταθερές του Henry (K_H) για τα διαλυμένα αέρια είναι ίσες και στις δύο πλευρές της περατής στα αέρια μεμβράνης, έτσι ώστε κατά την ισορροπία (όταν έχουν εξισωθεί οι μερικές πιέσεις εκατέρωθεν της μεμβράνης) η συγκέντρωση των διαλυμένων αερίων να είναι ίσες. Αυτό ισχύει όταν η ιοντική ισχύ του δείγματος και του εσωτερικού της μεμβράνης διαλύματος, έχουν παρόμοιες τιμές.

β. Οι ωσμωγραμμομοριακότητες του δείγματος και του εσωτερικού διαλύματος είναι επίσης παρόμοιες, έτσι ώστε να μη διαχέονται υδρατμοί μέσω της μεμβράνης, προκαλώντας αραίωση ή συμπύκνωση του εσωτερικού διαλύματος.

γ. Για οποιαδήποτε συγκέντρωση του αερίου στην ισορροπία, δε θα μεταβάλλεται σημαντικά η συνολική ιοντική ισχύς του εσωτερικού διαλύματος.

δ. Ο όγκος του εσωτερικού διαλύματος είναι πολύ μικρός σε σχέση με τον όγκο του δείγματος που γίνεται ο προσδιορισμός. Το δείγμα, δηλαδή, θεωρείται σαν μη πεπερασμένη δεξαμενή αερίου και, κατά την ισορροπία, οι συγκεντρώσεις του αερίου στο εσωτερικό διάλυμα θα είναι οι ίδιες με του δείγματος και δε θα επηρεάζονται από την υδρόλυση του αερίου στο εσωτερικό διάλυμα.

Οι πρώτες δύο συνθήκες ικανοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας μοριακότητα NaCl στο εσωτερικό διάλυμα 200 mM, παρόμοια με τη μοριακότητα του διαλύματος στο οποίο γίνονταν οι προσδιορισμοί της συγκέντρωσης του CO₂ (200 mM κιτρικό). Η τρίτη συνθήκη αναφέρεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις CO₂, περίπτωση που δεν αντιμετωπίστηκε, ενώ για την τέταρτη, η δοκιμή τριών διαφορετικών όγκων εσωτερικού διαλύματος έδειξε ότι οι μεγαλύτεροι όγκοι προκαλούν σφάλμα στην εκτίμηση της συγκέντρωσης του CO₂ λόγω αραίωσης, όπως προβλέπει η θεωρία. Το σφάλμα αυτό ήταν μεγαλύτερο στις μεγάλες συγκεντρώσεις CO₂ στο δείγμα, λόγω της μεγαλύτερης διαφοράς στη

συγκέντρωση διαλυμένου CO_2 εκατέρωθεν της μεμβράνης (διάλυμα 15 mM NaHCO_3 περιέχει περίπου 161 μM διαλυμένου CO_2).

Έχει δειχθεί ότι το όριο ευαισθησίας και το εύρος της Nernstian απόκρισης (γραμμικής σχέσης λογαρίθμου συγκέντρωσης CO_2 και ηλεκτροχημικού δυναμικού) στους αισθητήρες CO_2 τύπου Severinghaus εξαρτώνται από τη συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών (NaHCO_3) στο εσωτερικό διάλυμα (Meyerhoff and Fraticelli, 1982). Η αύξηση της μοριακότητας του NaHCO_3 στο εσωτερικό διάλυμα έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του CO_2 και μικρή αύξηση του pH. Οι συγκεντρώσεις του CO_2 στο εσωτερικό διάλυμα και στο διάλυμα, που γίνεται ο προσδιορισμός, πρέπει να είναι της ίδιας τάξης μεγέθους. Όμως, πολύ μικρές μοριακότητες του NaHCO_3 στο εσωτερικό διάλυμα έχουν σαν αποτέλεσμα μικρότερες κλίσεις της ευθείας στη σχέση $\log[\text{CO}_2]$ και E (Εικ. 1.8) και μικρότερους χρόνους απόκρισης στις χαμηλές συγκεντρώσεις CO_2 . Η καθυστέρηση στην απόκριση στις μεγάλες μοριακότητες NaHCO_3 έχει αποδειχθεί, ότι οφείλονται σε μειωμένες ταχύτητες διάχυσης του CO_2 μέσω της μεμβράνης σιλικόνης και όχι στην αποκατάσταση της ισορροπίας μεταξύ διαλυτού CO_2 και HCO_3^- (Jensen and Rechnitz, 1972).

Επιλέχθηκε η μοριακότητα 7 mM NaHCO_3 για το εσωτερικό διάλυμα του ηλεκτροδίου, λόγω α) της μεγάλης κλίσης της ευθείας τιτλοδότησής του (54,16 mV/ τάξη μεγέθους αύξησης της συγκέντρωσης του CO_2 , Εικ. 1.8), η οποία ήταν πολύ κοντά στην κλίση της ευθείας αναφοράς του ηλεκτροδίου με εσωτερικό διάλυμα 15 mM (55,33 mV) και β) των καλών χρόνων απόκρισης (λιγότερο των 2 min για συγκεντρώσεις CO_2 πάνω από 100 μM και 7 min για συγκεντρώσεις κάτω των 10 μM). Η επαναληψιμότητα του ηλεκτροδίου, όταν ελέγχθηκε με τρεις διαφορετικές τιτλοδοτήσεις την ίδια μέρα, βρέθηκε πολύ καλή (Πίν. 1.3).

Το επιλεκτικό για το CO_2 ηλεκτρόδιο, όταν χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του CO_2 που παράγεται από τη δράση της ADC, παρατηρήθηκε ότι το υπερεκτιμούσε (συγκριτικά με τις τιμές που έδωσε η ισοτοπική μέθοδος). Το παραπάνω ανιχνευόμενο CO_2 οφείλεται στη διάλυση CO_2 της ατμόσφαιρας μετά την απαέρωση των διαλυμάτων κατά τους σιφωνισμούς, μια και τα πειράματα δε γινόντουσαν σε ατμόσφαιρα ελεύθερη CO_2 . Η ποσότητα αυτή του

CO₂ πρέπει να ήταν σταθερή (ίση για κάθε μετρούμενο δείγμα λόγω της ίδιας μεταχείρισης των δειγμάτων), αλλά ήταν της ίδιας τάξης μεγέθους με το ενζυμικά παραγόμενο CO₂ από τα εκχυλίσματα της αμπέλου. Το αποτέλεσμα ήταν ότι χαμηλές παραγωγές CO₂ (μικρότερες των 5 nmoles ανά ενζυμική αντίδραση ή 25 nmoles/ mL εκχυλίσματος) δε μπορούσαν να εκτιμηθούν. Αντίθετα, στις υψηλές παραγωγές του CO₂, από τη δράση της ADC των μονοκοτυλήδων, το CO₂ της ατμόσφαιρας που διαλυόταν κατά τους χειρισμούς ήταν ένα μικρό ποσοστό του παραγόμενου και η εκτίμηση του τελευταίου γινόταν με ικανοποιητική ακρίβεια (Πίν. 1.4).

Η μελέτη της αναπτυξιακής και οντογενετικής έκφρασης της ADC της αμπέλου έδειξε ότι η ενεργότητα του ενζύμου ήταν υψηλότερη στα νεαρά αναπτυσσόμενα όργανα (κορυφαίο μερίστωμα, επιμηκυνόμενοι βλαστοί, αναπτυσσόμενα φύλλα) και μειωνόταν στα πλήρως αναπτυγμένα όργανα, τόσο σε αυτόριζα πρέμνα, που αναπτύχθηκαν στο θερμοκήπιο όσο και σε *in vitro* φυτά. Παρόμοιο πρότυπο της ενεργότητας της ADC παρατηρήθηκε κατά μήκος του βλαστού του καπνού, όπου τα πλησιέστερα στην κορυφή μεσογονάτια είχαν τις υψηλότερες ενεργότητες ADC, ενώ βαθμιαία μειώθηκαν προς τη βάση. (Altamura et al, 1993). Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι η ενεργότητα της ADC μειώνεται με την ηλικία. Όταν μετρήθηκε η ενεργότητα της ADC στο πρώτο φύλλο σε σπορόφυτα βρώμης βρέθηκε ότι ήταν υψηλή αμέσως μετά την έκπτυξή του και μειωνόταν με την αύξηση της ηλικίας του (Kaur-Sawhney et al, 1982). Η έκφραση του mRNA της ADC είναι αυξημένη σε νεαρούς αναπτυσσόμενους ιστούς, συγκριτικά με τα ώριμα όργανα (Rastogi et al, 1993, Perez-Amador et al, 1995). Ακόμα, το mRNA της ADC εντοπίστηκε με *in situ* υβριδισμό στο κορυφαίο μερίστωμα της ντομάτας σε αυξημένες ποσότητες και με ειδικό πρότυπο κατανομής: εντοπιζόταν αποκλειστικά στο σώμα (corpus) του κορυφαίου μεριστώματος και καθόλου στο χιτώνα (tunica) (Fleming et al, 1993).

Στα νεαρά σπορόφυτα της αμπέλου, η ενεργότητα της ADC ήταν ιδιαίτερα υψηλή με την έναρξη του φυτρώματος και μειωνόταν στη συνέχεια. Οι ειδικές ενεργότητες της ADC ήταν 3 με 10 φορές υψηλότερες από οποιοδήποτε άλλο ιστό της αμπέλου και στα χλωρωτικά σπορόφυτα ήταν υψηλότερες από τα

σπορόφυτα που αναπτύχθηκαν στο φως. Σε φύλλα από φυτά καλαμποκιού, που αναπτύχθηκαν στο σκοτάδι, οι ενεργότητες της ADC ήταν υψηλότερες από φύλλα φυτών που αναπτύχθηκαν στο φως (μάρτυρας) και η έκθεση των χλωρωτικών φυτών στο φως μείωσε τις ενεργότητες στα επίπεδα του μάρτυρα (Andreadakis and Kotzabasis, 1996). Οι υψηλές ενεργότητες της ADC στα νεαρά σπορόφυτα κατά το φύτερωμα, είναι ο λόγος που επιλέγονται αποκλειστικά σαν αρχικό υλικό για τον καθαρισμό της ADC. Οι Ramakrishna και Adiga (1975) βρήκαν ότι η μέγιστη ενεργότητα της ADC σε σπορόφυτα λάθουρου παρουσιάζεται την 5η έως 7η ημέρα μετά το φύτερωμα και, παρόλο που η ειδική ενεργότητα ήταν 4 φορές μεγαλύτερη στους εμβρυϊκούς άξονες από τις κοτυληδόνες, οι κοτυληδόνες περιείχαν το 60% της ολικής ενεργότητας. Η ADC έχει καθαριστεί μέχρι ομοιογένειας (εκτός από σπορόφυτα λάθουρου, *ibid*) από σπορόφυτα βρώμης (Smith, 1979), σπορόφυτα ρυζιού (Choudhuri and Ghosh, 1982, Reggiani, 1994) και υποκοτύλια πέντε ημερών από βλαστώνοντα σπέρματα σόγιας (Nam et al, 1997).

Η υποκαλλιέργεια αποδιαφοροποιημένων κυττάρων αμπέλου τόσο σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (κάλλοι) όσο και σε υγρό (κυτταροκαλλιέργειες) προκαλούσε την αύξηση της ειδικής ενεργότητας της ADC. Το φαινόμενο ήταν περισσότερο έντονο στις υγρές καλλιέργειες, όπου το ερέθισμα του νέου θρεπτικού μέσου επηρέαζε άμεσα και όλα τα κύτταρα, σε σύγκριση με τις καλλιέργειες κάλλων, στις οποίες το καινούργιο θρεπτικό ερχόταν άμεσα σε επαφή μόνο με την κατώτερη στοιβάδα κυττάρων και διαχεόμενο επηρέαζε αργότερα, το σύνολο της μάζας του κάλλου. Η ενεργότητα της ADC έχει βρεθεί να ακολουθεί το πρότυπο της ενεργότητας της ODC, με μικρότερες όμως τιμές, κατά τις πρώτες διαιρέσεις συγχρονισμένων κυττάρων του φυτού *Catharanthus roseus* παρουσιάζει δηλαδή μέγιστες τιμές κατά τις G₁ και G₂ φάσεις του κυτταρικού κύκλου (Maki et al, 1990).

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η προερχόμενη από την ADC πουτρεσκίνη ή οι από αυτήν, ανώτερες πολυαμίνες, τουλάχιστον συνδέονται με την ολοκλήρωση διεργασιών, όπως η οργανογένεση στο κορυφαίο μερίστωμα και η μεγέθυνση των κυττάρων στα ανώτερα φύλλα και

μεσογονάτια. Πολυάριθμες μελέτες συνδέουν την ADC με τη μορφογένεση *in vitro* φυτικών εκφύτων. Στην άμπελο, έκφυτα ενός κόμβου απέτυχαν να δώσουν φυτά όταν ο μη αντιστρεπτός αναστολέας της ADC, DFMA, βρισκόταν στο θρεπτικό μέσο σε συγκεντρώσεις από 0,5 έως 2 mM (Martin-Tanguy and Carre, 1993). Η προσθήκη πουτρεσκίνης, στις ίδιες συγκεντρώσεις με τον αναστολέα, ανέστειλε τη δράση του ενώ ο μη αντιστρεπτός αναστολέας της ODC, DFMO, δεν επηρέαζε την ανάπτυξη του εκφύτου σε φυτό. Παρόμοια, αλλά πιο ήπια, ήταν η δράση του DFMA σε έκφυτα ενός κόμβου στη φράουλα (Tarengghi et al, 1995). Το DFMA προκαλούσε μείωση κατά 65-75% στον αριθμό των ριζών και των φύλλων που αναπτύχθηκαν, όπως και στο μήκος των ριζών και των βλαστών. Τέλος, το DFMA μείωνε δραστικά την ανάπτυξη κάλλων καπνού και καλαμποκιού (Torne et al, 1994) και το φρέσκο και το ξηρό βάρος κάλλων καπνού (80 και 20% αντίστοιχα μετά από 10 εβδομάδες καλλιέργειας, Burtin et al, 1989) και κατέστειλε την αύξηση κυτταροκαλλιέργειών ρυζιού και τη σωματική εμβρυογένεση (Koetje et al, 1993). Μεταλλάγματα στην ADC φυτών *Arabidopsis*, που απομονώθηκαν πρόσφατα, έχουν διαφορετική μορφολογία ριζών (Watson et al, 1998).

Τα αποτελέσματα από τη διαφορική επίδραση της αραίωσης των εκχυλισμάτων από πράσινους και χλωρωτικούς ιστούς στην ενεργότητα της ADC (Πίν. 1.5) υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός θετικού παράγοντα στα εκχυλίσματα από πράσινους ιστούς, που βρίσκεται σε υπό-βέλτιστη συγκέντρωση και ενός αρνητικού παράγοντα στα εκχυλίσματα από χλωρωτικούς ιστούς, που βρίσκεται σε κρίσιμη συγκέντρωση και ο οποίος αραιούμενος επιδεικνύει λιγότερο παρεμποδιστικά αποτελέσματα.

Όπως στα εκχυλίσματα από τα χλωρωτικά σπορόφυτα της αμπέλου η αραίωση προκαλούσε αύξηση της ενεργότητας της ADC, παρόμοιο φαινόμενο παρατήρησαν οι Kyriakidis et al, (1978) κατά τη διαδικασία καθαρισμού της βιοσυνθετικής ODC από *E. coli*. Η ενεργότητα της ODC αυξανόταν με την αραίωση των ενζυμικών παρασκευασμάτων αλλά η αύξηση μειωνόταν όσο προχωρούσε ο καθαρισμός, για να μηδενιστεί από ένα σημείο και πέρα. Το γεγονός εξηγήθηκε με την παρουσία στα ακαθάριστα εκχυλίσματα, ενός

μακρομοριακού μη ανταγωνιστικού παρεμποδιστή της ODC ο οποίος και απομονώθηκε. Είχε όλα εκείνα τα χαρακτηριστικά ώστε να μπορεί να ονομαστεί “αντιένζυμο της ODC”, όπως ο αντίστοιχος παράγοντας από ευκαρυωτικά κύτταρα. Ακόμα, εκτός του παρεμποδιστικού μακρομορίου, στην ίδια μελέτη, μπόρεσε να απομονωθεί και ένα ενεργοποιητικό της ODC μακρομόριο (Kyriakidis et al, 1978). Αργότερα, η ίδια ομάδα καθάρισε μέχρι ομοιογένειας τρεις μακρομοριακούς παρεμποδιστές των βιοσυνθετικών ODC και ADC από την *E. coli* (Heller et al, 1983): μια όξινη πρωτεΐνη μοριακού βάρους 49 kD και δύο βασικές με μοριακά βάρη 11 και 9 kD. Οι βασικές πρωτεΐνες αποδείχθηκε ότι ήταν οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες S20/L26 και L34 (Panagiotidis and Canellakis, 1984), ενώ το γονίδιο που κωδικοποιεί την όξινη πρωτεΐνη κλωνοποιήθηκε και το προϊόν του φάνηκε να είναι μία πρωτεΐνη με διπλή λειτουργικότητα – αντιένζυμο και πιθανός μεταγραφικός παράγοντας (Canellakis et al, 1993).

Το αντιένζυμο της ODC παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της σύνθεσης της ODC στα ανώτερα θηλαστικά. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι το αντιένζυμο επάγει την εξαρτώμενη από ενέργεια αποικοδόμηση της ODC, μία διαδικασία που καταλύεται από το πρωτεόσωμα 26S. Επίσης, το αντιένζυμο των ανώτερων θηλαστικών καταστέλλει την πρόσληψη από το κύτταρο πολυαμινών αλλά από την άλλη επάγεται από την ενδοκυτταρική συσσώρευση των πολυαμινών και της αγματίνης (το προϊόν της αποκαρβοξυλίωσης της αργινίνης από την ADC) μέσω του ασυνήθιστου μηχανισμού της +1 μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης κατά τη μετάφραση (Hayashi et al, 1996, Satriano et al, 1998). Εκτός του αντιενζύμου της ODC και ένας παρεμποδιστής του αντιενζύμου συμμετέχει στον πολύπλοκο αυτό μηχανισμό ρύθμισης. Η κλωνοποίηση του παρεμποδιστή του αντιενζύμου αποκάλυψε μια πρωτεΐνη με υψηλή ομολογία με το ένζυμο της ODC, η οποία ενώνεται με το αντιένζυμο με μεγαλύτερη συγγένεια από την ODC, απελευθερώνοντας το ένζυμο από το σύμπλεγμα ενζύμου-αντιενζύμου (Murakami et al, 1996).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, καθώς και το γεγονός της ύπαρξης αντιενζύμων της ODC και στα φυτά (Kyriakidis, 1983, Koromilas and

Kyriakidis, 1988), μια πιθανή εξήγηση της διαφορικής επίδρασης της αραίωσης των εκχυλισμάτων από πράσινα και χλωρωτικά σπορόφυτα στην ενεργότητα της ADC (Πίν. 1.5), δίνεται παρακάτω, υποθέτοντας ότι και για την ADC της αμπέλου υπάρχουν αντίστοιχα “παρεμποδιστές” και “ενεργοποιητές”. Για την περίπτωση του εκχυλίσματος από τον πράσινο ιστό, ο “παρεμποδιστής” (πιθανό αντιενζύμο της ADC) βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση ενώ ο “ενεργοποιητής” (πιθανός παρεμποδιστής του αντιενζύμου της ADC) βρίσκεται σε κρίσιμη συγκέντρωση, με αποτέλεσμα η αραίωση να δρα περισσότερο στον “ενεργοποιητή” και να μειώνεται η μετρούμενη ενεργότητα της ADC. Αντίθετα στο εκχύλισμα από το χλωρωτικό ιστό ο “ενεργοποιητής” βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση και ο “παρεμποδιστής” σε κρίσιμη, έτσι ώστε η αραίωση να επιδρά στον “παρεμποδιστή” και να αυξάνεται η μετρούμενη ενεργότητα της ADC.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

**ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
cDNA ΤΗΣ ΑΠΟΚΑΡΒΟΞΥΛΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ
ΤΗΣ ΑΜΠΕΛΟΥ (*Vitis vinifera L.*)**

2.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Γενωμικό DNA της αμπέλου, πολλαπλασιάστηκε με τη μέθοδο της PCR, χρησιμοποιώντας ως εκκινητές δύο εκφυλισμένα ολιγονουκλεοτίδια, που αντιστοιχούσαν σε δύο συντηρημένες περιοχές των πρωτεϊνών της αποκαρβοξυλάσης της αργινίνης της βρώμης και της ντομάτας. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε και προσδιορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία του. Έφερε ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, που κωδικοποιούσε 414 αμινοξέα και η αλληλουχία του παρουσίαζε 46% και 82% ταυτότητα με τις αμινοξικές αλληλουχίες της ADC της βρώμης και της ντομάτας, αντίστοιχα. Μια cDNA βιβλιοθήκη λ-ZAP-XR από κύτταρα αμπέλου ερευνήθηκε με ιχνηλάτη το προϊόν της PCR. Από τις 9×10^5 αποικίες, που εξετάστηκαν, τελικά απομονώθηκαν 25 θετικοί κλώνοι, που περιείχαν ενθέματα μεγέθους από 1,6 έως 2,1 kb. Ανάλυση αυτών των κλώνων με ένζυμα περιορισμού και με μερικό προσδιορισμό της αλληλουχίας τους έδειξε, ότι όλοι προέρχονταν από το ίδιο αρχικό μόριο mRNA. Προσδιορίστηκε πλήρως η νουκλεοτιδική αλληλουχία του κλώνου, που έφερε το μεγαλύτερο ένθεμα (2,1 kb) και η σύγκρισή της με άλλες γνωστές αλληλουχίες φυτικών ADC έδειξε ότι, στο cDNA που απομονώθηκε λείπει το 5' μη μεταφραζόμενο άκρο της αλληλουχίας της ADC καθώς και περίπου 300 νουκλεοτίδια από την κωδικοποιό περιοχή, φέρει δε 220 νουκλεοτίδια από το 3' μη μεταφραζόμενο άκρο. Η αλληλουχία του έχει κατατεθεί στην EMBL (accession no X96791). Η αμινοξική αλληλουχία του cDNA της ADC της αμπέλου αποτελείται από 630 αμινοξέα (λείπουν περίπου 100 αμινοξέα από το αμινοτελικό άκρο), φέρει τα χαρακτηριστικά πρότυπα της ομάδας IV των αποκαρβοξυλασών της Ορνιθίνης/ Dap/ Αργινίνης και εμφανίζει ταυτότητα 70-75% με τις αλληλουχίες της ADC των δικοτυλήδων, 40% με την ADC της βρώμης (μονοκοτυλήδων) και 30% με τις βακτηριακές ADCs. Η γενωμική οργάνωση του γονιδίου της ADC στην άμπελο μελετήθηκε με ανάλυση κατά Southern. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός γονιδίου ομόλογου με το cDNA, που απομονώθηκε. Παρομοίως, ανάλυση northern ολικού RNA, που εκχυλίστηκε από φύλλα, βλαστούς και ρίζες *in vitro* αναπτυγμένων φυτών καθώς και από κυτταροκαλλιέργεια αμπέλου, έδειξε την ύπαρξη ενός

μεταγράφου μεγέθους περίπου 3,1 kb. Το πρότυπο της έκφρασης διέφερε στα τρία αυτά όργανα και την κυτταροκαλλιέργεια. Η ποσότητα του mRNA της ADC ήταν μικρή στα πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα, ενδιάμεση στα νεαρά φύλλα, στους βλαστούς και τις ρίζες και μεγάλη στην κυτταροκαλλιέργεια.

2.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πρώτη νουκλεοτιδική αλληλουχία αποκαρβοξυλάσης της αργινίνης που έγινε γνωστή, ήταν της βιοσυνθετικής ADC της *E. coli* (Moore and Boyle, 1990). Ανεξάρτητα, το ίδιο έτος οι Bell και Malmberg (1990) κλωνοποίησαν την πρώτη φυτική ADC από μία cDNA βιβλιοθήκη από σπορόφυτα 9 ημερών του μονοκοτυλήδονου βρώμη (*Avena sativa*) και παρατήρησαν την ομοιότητα που παρουσίαζε, σε αμινοξικό επίπεδο, με την ADC του *E. coli*. Τρία χρόνια αργότερα οι Rastogi et al (1993) απομόνωσαν cDNA κλώνο της ADC από βιβλιοθήκη περικαρπίου του καρπού της ντομάτας (*Lycopersicon esculentum*), τον πρώτο από δικοτυλήδονο φυτό που, όπως αποδείχθηκε αργότερα, δεν ήταν πλήρης και περιείχε κωδικόνια τερματισμού στο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης. Ακολούθως, cDNA κλώνους της ADC από δικοτυλήδονα φυτά απομόνωσαν: οι Perez-Amador et al (1995) από νεαρούς καρπούς μπιζελιού (*Pisum sativum*), οι Watson και Malmberg (1996) από ιστούς ρίζας της *Arabidopsis thaliana* και οι Nam et al (1997) από υποκοτύλια σπορόφυτων σόγιας (*Glycine max*). Οι Morrissey et al (1995) απομόνωσαν ένα μερικό cDNA κλώνο της ADC από νεφρό αρουραίου (*Rattus norvegicus*) ανατρέποντας, την έως τότε επικρατούσα άποψη, ότι η ADC βρίσκεται μόνο σε φυτά και βακτήρια. Στις βάσεις δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών EMBL και GeneBank έχουν κατατεθεί αλληλουχίες cDNA κλώνων της ADC από το γαρύφαλλο (*Dianthus caryophyllus*, Chang et al, 1996), ένας δεύτερος από την *Arabidopsis* (Watson et al, 1997), και από το δασικό καπνό (*Nicotiana sylvestris*, Nakakita, 1998, μόνο στην EMBL). Ακόμη, από τα γενώματα οργανισμών, που έχει προσδιοριστεί πλήρως η νουκλεοτιδική τους αλληλουχία, έχουν βρεθεί αλληλουχίες ομόλογες με τις παραπάνω ADCs στο κυανοβακτήριο *Synechocystis* PCC6803 και το βακτήριο *Helicobacter pylori*.

Όλες οι παραπάνω αλληλουχίες παρουσιάζουν μέτρια ομολογία σε αμινοξικό επίπεδο και αποτελούν, μαζί με τις ευκαρυωτικές αποκαρβοξυλάσες της ορνιθίνης και τις προκαρυωτικές και ευκαρυωτικές αποκαρβοξυλάσες του διαμινοπιμελικού (DapDC) οξέος (συμμετέχει στη βιοσύνθεση της λυσίνης), την ομάδα IV των αποκαρβοξυλασών των αμινοξέων (Sandmeier et al, 1994). Στην ομάδα αυτή δεν ανήκουν οι προκαρυωτικές ODCs (συστατικές και επαγόμενες), καθώς και οι βιοαποικοδομητικές (επαγόμενες) ADCs των προκαρυωτικών, οι οποίες μαζί με τις προκαρυωτικές αποκαρβοξυλάσες της λυσίνης απαρτίζουν την ομάδα III των αποκαρβοξυλασών (Sandmeier et al, 1994). Σε αντίθεση με άλλα εξαρτώμενα από φωσφορική πυριδοξάλη ένζυμα, που δρουν στα ίδια υποστρώματα, όπως οι αμινοτρανσφεράσες οι οποίες αποτελούν μία οικογένεια ομόλογων πρωτεϊνών (Alexander et al, 1994), οι αποκαρβοξυλάσες των α-αμινοξέων έχουν προέλθει εξελικτικά από πολλαπλούς προγόνους και ακόμη περισσότερο, ένζυμα με την ίδια εξειδίκευση υποστρώματος (ADCs ή ODCs) ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες. Η τρανσαμίνωση είναι μία αντιστρεπτή αντίδραση, που εμπλέκει δύο υποστρώματα και που προκαλεί αλλαγές στους ομοιοπολικούς δεσμούς του Ca ατόμου του υποστρώματος και του C4' του συνενζύμου, ενώ η αποκαρβοξυλίωση είναι μία σαφώς απλούστερη αντίδραση, μη αντιστρεπτή, που εμπλέκει ένα υπόστρωμα και που προκαλεί αλλαγή μόνο στο Ca άτομο του (Cox and Beker, 1987). Η πολυπλοκότητα της αντίδρασης της τρανσαμίνωσης πιθανόν να εμπόδιζε την εξέλιξη από πολλαπλούς προγόνους των ενζύμων, που την καταλύουν.

Τα μέλη της ομάδας IV των αποκαρβοξυλασών διαφέρουν στον αριθμό των αμινοξικών τους υπολειμμάτων και η μεταξύ τους ομολογία δεν εκτείνεται σε όλο το μήκος των αλληλουχιών τους. Οι ευκαρυωτικές ODCs και οι DapDCs έχουν μήκος 400-500 αμινοξικά υπολείμματα, ενώ οι ADCs 660-730, με εξαίρεση της βρώμης, που είναι βραχύτερη (607). Παρά την ανομοιογένεια του μήκους τους, παρουσιάζουν περιοχές με ισχυρή συντήρηση. Οι περιοχές αυτές, βάση ομολογιών με τις ODCs των θηλαστικών που έχουν μελετηθεί λεπτομερώς (Lu et al, 1991, Poulin et al, 1992, Tsirka and Coffino, 1992), είναι η περιοχή της θέσης πρόσδεσης του συνενζύμου και δύο περιοχές, που θεωρείται ότι

συμμετέχουν στη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου, στη μία από τις οποίες ενώνεται ομοιοπολικά ο μη αντιστρεπτός αναστολέας της ODC (DFMO).

Από τα επτά φυτικά είδη, που έχει κλωνοποιηθεί η ADC, μόνο στη ντομάτα, τη σόγια και την *Arabidopsis* έχει γίνει γενωμική ανάλυση. Στα μεν ντομάτα και σόγια, τα αποτελέσματα από ανάλυση κατά Southern υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός μοναδικού γονιδίου (Rastogi et al, 1993, Nam et al, 1997), στη δε *Arabidopsis* έχουν απομονωθεί δύο cDNA κλώνοι της ADC (Watson and Malmberg, 1996, Watson et al, 1997). Επίσης, ανάλυση κατά Southern σε δύο ποικιλίες ρυζιού, με τμήμα DNA 498 bp του ομόλογου γονιδίου της ADC, το οποίο απομονώθηκε με PCR και είχε 100% ομολογία με την αντίστοιχη αλληλουχία της βρώμης, έδειξε την ύπαρξη ενός μόνο γονιδίου της ADC στο ρύζι (Chattopadhyay et al, 1997). Πρόσφατη έρευνα της οργάνωσης του γονιδίου της ADC σε 13 αντιπροσώπους της οικογένειας Brassicaceae (όπου ανήκει και η *Arabidopsis*) και στα *Polanisia dedecandra*, *Carica papaya* και *Theobroma cacao* των Galloway et al (1998), έδειξε ότι η ύπαρξη του δεύτερου γονιδίου της ADC περιορίζεται μόνο στην οικογένεια Brassicaceae.

Η έκφραση του γονιδίου της ADC είναι αυξημένη κατά την επιμήκυνση των κυττάρων σε νεαρούς αναπτυσσόμενους ιστούς και όργανα. Στο περικάρπιο του καρπού της ντομάτας τα επίπεδα του mRNA αυξάνονται από το σχηματισμό του καρπού μέχρι την εμφάνιση των πρώτων πορτοκαλί κηλίδων στο περικάρπιο και στη συνέχεια μειώνονται (Rastogi et al, 1993). Παρομοίως, η έκφραση της ADC στο μπιζέλι είναι υψηλότερη στους νεαρούς αναπτυσσόμενους ιστούς και στα πρώτα στάδια ανάπτυξης του καρπού σε σύγκριση με τα ώριμα όργανα (Perez-Amador et al, 1995).

Σε αυτό το κεφάλαιο περιγράφεται η πορεία κλωνοποίησης ενός τμήματος του γονιδίου της ADC της αμπέλου, με PCR σε γενωμικό DNA και η απομόνωση, με τη βοήθειά του, ενός κλώνου από μία cDNA βιβλιοθήκη. Γίνεται σύγκριση του κλώνου σε νουκλεοτιδικό και αμινοξικό επίπεδο με τις γνωστές, μέχρι σήμερα, αλληλουχίες ADC από φυτά και βακτήρια και συζητούνται οι ομολογίες, που παρατηρούνται σε συγκεκριμένες περιοχές σε σχέση με τη δομή

και τη λειτουργία του ενζύμου της ADC. Τέλος, μελετάται η οργάνωση του γονιδίου της ADC στην άμπελο καθώς και η οργανοειδική έκφρασή του.

2.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.3.1. Απομόνωση Γενωμικού DNA

Γενωμικό DNA υψηλού μοριακού βάρους, από φύλλα φυτών αμπέλου καλλιεργημένων *in vitro*, απομονώθηκε με μία τροποποιημένη cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) μέθοδο (Lodhi et al, 1994). Πιο συγκεκριμένα, σε κονιορτοποιημένο με γουδί και γουδοχέρι, παρουσία υγρού αζώτου, ιστό φύλλων, προστέθηκε 10% (w/w) polyvinyl-polypyrrolidone (PVPP) και διάλυμα εκχύλισης (1:10, w/v), που περιείχε 20 mM EDTA, 200 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1,4 M NaCl, 2% (w/v) CTAB και 0,2% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη. Το αιώρημα που προέκυψε επώασθηκε για 25 min στους 60 °C, αφέθηκε να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος χλωροφορμίου-οκτανόλης (24:1, v/v). Μετά από προσεκτική ανάδευση, φυγοκεντρήθηκε στα 3.000 g για 15 min, και στην υδατική φάση που απομονώθηκε έγινε και δεύτερη εκχύλιση με το διάλυμα χλωροφορμίου-οκτανόλης. Τελικά, στην υδατική φάση από τη δεύτερη εκχύλιση προστέθηκε 0,5 και 2 όγκοι, 5 M NaCl και κρύας (-20 °C) 95% αιθανόλης αντίστοιχα, τα νήματα του DNA που σχηματίστηκαν συλλέχθηκαν με γυάλινη ράβδο και πλύθηκαν δύο φορές με κρύα (4 °C) 75% αιθανόλη. Μετά από φυγοκέντρηση στα 1.500 g το κατακρημνισμένο DNA επαναδιαλύθηκε σε μικρό όγκο διαλύματος 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, επώασθηκε με RNase για 15 min στους 37 °C και έγινε ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του με φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer 515S UV/VIS (Perkin Elmer Corp., Foster City, CA), στα 230, 260 και 280 nm.

2.3.2. Σχεδιασμός Εκκινήτων

Με βάση τη στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών της ADC της ντομάτας (Rastogi et al, 1993) και της βρώμης (Bell and Malmberg, 1990) επιλέχθηκαν δύο ισχυρά συντηρημένες περιοχές, που δεν αντιστοιχούσαν σε

καμία από τις γνωστές ή πιθανές θέσεις πρόσδεσης του συνενζύμου, του υποστρώματος ή του μη αντιστρεπτού αναστολέα του ενζύμου, για το σχεδιασμό δύο εκφυλισμένων εκκινητών (Εικ. 2.1, πρόσθιος εκκινητής: CTNGARGCNGGNTCNAARCC αντίστροφος εκκινητής: GGNCCNCCRAANAGRTRTG).

ADC ΝΤΟΜΑΤΑΣ	-----MPLVVRFPDVLKNRLETL
ADC ΒΡΩΜΗΣ	MAKNYGDVYHVEGWGPEPYFAVNKDGHLVCVRIYGRETLPGQEIDVLSVIEQATSADGTGKKLQPFMILRFPDVLRRHNSL
*...*****.*.*	
	Θέση Πρόσδεσης PP
ADC ΝΤΟΜΑΤΑΣ	QSAFDMAINSQGYEAHYQGVYFNKCMQDRFVVEDIVKFGSPYRFGLEAGSKPELLLAMNCLSKGSADALLVCNGFKDTEY
ADC ΒΡΩΜΗΣ	HTAFANAICYTQYGSVYQGVYFNKCMQHKDVVQDMVHFGYDHSYGLEAGSKPELLIAMSCLTKAKPGAYLVCNGYKDSAY
****.*.*.*	
ADC ΝΤΟΜΑΤΑΣ	ISLALVARKLLNSVIVLEQEEELDLVIDISRKMSVRPVI GLRAKLRTKHSGHFGSTSGEKGKFGLTQTILRVVKLDE
ADC ΒΡΩΜΗΣ	VALALARAMGLNVIIVLEMEEELDIVIEESSKLGVEPVI GVRAKLLTKIPGHFGSTAGKHGKFGLPAAEKIYEVAKLKA
* **	
	Πιθανή Θέση Υποστρώματος
ADC ΝΤΟΜΑΤΑΣ	SGMLDCLQLLHFHIGSQIPTTELLADGVGEATQIYSELVRLG--AGMKFIDIGGGIGIDYDGSKSSNSDVSVCYSIEEYA
ADC ΒΡΩΜΗΣ	LNLKHLWLLHFHVGSMIPTTDIVFKAASEASDIYCALVKEYGVETMTTLDCCGGIGVDYDGTSGSSDMSVAYGLEEYA
**.*.*.*	
ADC ΝΤΟΜΑΤΑΣ	SAVVQAVLYVCDRKGKHPVICSESGRAIVSHHSILIFEAVSASTSHVSTQPSSGGLQSLVETLNEADARADYRNLAAAV
ADC ΒΡΩΜΗΣ	SSIVQAVRLKCDYHGVPVLCETESGRAMASYHSMILEALSAP---E-PKD---DEDEATTEQLHGRIRDLS-KL
* **	
ADC ΝΤΟΜΑΤΑΣ	RGEYDTCLIYSDQLKQRCVEQFKDGSLEQLAAVDSICDWVSKAIGVADPVRTYHVNLVSFTSIPDFWGFSQLFPVPI
ADC ΒΡΩΜΗΣ	QPTGLSMSSHAVHIKKGHEMYKLG-----KKLSKSVTTDAHTIYNYHMNLSVFSLMPDYWGIQHLFPMPV
***.*.*	
	Πιθανή Θέση DFMA
ADC ΝΤΟΜΑΤΑΣ	HRLDEKPTMRGI LSDLTCDSGK VDKFIGGESSLPHEIGSGDGGRYLGMFLGGAYEEALGGI HNLFGG SVVRVMQSD
ADC ΒΡΩΜΗΣ	SRLDEKPTHKAT LVDVTCDSGK VDKFIRDTEMLPLHPLDPKLG-YYVAVLLTGAYQEALS NKHNLFGG SLVRVVGTS
*****.*.*.*	
ADC ΝΤΟΜΑΤΑΣ	SPHSFA-----
ADC ΒΡΩΜΗΣ	NGGAFNVEAALLGSTTEELIGTVSYDVNKQDISSVIEERARENKWEMVEKLVESGLHTMPYLADYKPPMA
.	

Εικόνα 2.1. Στοιχίση των αμινοξικών αλληλουχιών της ADC της ντομάτας (Rastogi et al, 1993) και της βρώμης (Bell and Malmberg, 1990). Τα γκριζα κουτιά περικλείουν τη συντηρημένη περιοχή, που επιλέχθηκε για το σχεδιασμό των εκκινητών της PCR.

2.3.3. Εκλεκτική Επέκταση Γενωμικού DNA της Αμπέλου με PCR

Το γενωμικό DNA (0,5 μg) χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις PCR, συνολικού όγκου 50 μL, που περιείχαν 50 pmoles από κάθε εκκινητή, 200 μM από κάθε τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο (Promega Corp, Madison, WI), 1 mM MgCl₂, 1× ρυθμιστικό διάλυμα *Taq* και 2,5 μονάδες *Taq* πολυμεράσης (Minotech, Ηράκλειο, Ελλάδα). Η PCR πραγματοποιήθηκε σε συσκευή GeneAmp 9600 (Perkin Elmer Corp., Foster City, CA), προγραμματισμένη ως

εξής: 94 °C για 5 min, και στη συνέχεια 40 κύκλοι 94 °C για 1 min, 55 °C για 2 min και 72 °C για 1,5 min. Οι εκκινητές φωσφορυλιώθηκαν χρησιμοποιώντας την T4- πολυνουκλεοτιδική κινάση (NEN, Boston, MA) και τα προϊόντα της PCR κλωνοποιήθηκαν στην αποφωσφορυλιωμένη *Sma*I θέση του βακτηριακού πλασμιδιακού φορέα pUC18.

2.3.4. Διαλογή από τη cDNA Βιβλιοθήκη της Αμπέλου

Σε μια cDNA βιβλιοθήκη λ ZAP-XR, κατασκευασμένη από poly(A)⁺RNA που απομονώθηκαν από κυτταροκαλλιέργεια αμπέλου (Loulakakis, Kanellis and Roubelakis-Angelakis, αδημοσίευτα), έγινε διαλογή κλώνων της ADC της αμπέλου. Περίπου 9×10^5 ανασυνδιασμένες αποικίες σαρώθηκαν με το 5' *Hind*III τμήμα του κλωνοποιημένου προϊόντος της PCR (Εικ. 2.2), σημασμένο με $\alpha^{32}\text{P}$ με τυχαία υποκίνηση (Feinberg and Vogelstein, 1983), χρησιμοποιώντας καθιερωμένες μεθόδους (Sambrook et al, 1989).

Τα φίλτρα προϋβριδοποιήθηκαν στους 65 °C σε διάλυμα προϋβριδισμού (Church and Gilbert, 1984), για 2 ώρες και μετά υβριδοποιήθηκαν για 12-16 ώρες στους 65 °C στο ίδιο διάλυμα παρουσία του ραδιοσημασμένου ιχνηλάτη. Τα φίλτρα πλύθηκαν μία φορά σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min με 2× SSC, 0,1% SDS και μετά τρεις φορές για 20 min σε 2× SSC, 0,1% SDS στους 65 °C. Μετά από τρεις κύκλους διαλογής, απομονώθηκαν 25 θετικοί cDNA κλώνοι και χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω.

Αξιοποιώντας τις ιδιότητες *in vivo* εκτομής του φορέα λ-ZAP-XR, οι θετικοί κλώνοι με τη χρήση του βοηθού φάγου ExAssist σε κύτταρα SOLR δημιούργησαν φαγεμίδια (υποκλώνους), στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript SK(-) (Stratagene, La Jolla, CA).

2.3.5. Προσδιορισμός της Νουκλεοτιδικής Αλληλουχίας Μορίων DNA

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των ενθεμάτων του ds-DNA από το κλωνοποιημένο τμήμα του προϊόντος της PCR και τους απομονωμένους cDNA

κλώνους, επιτεύχθηκε με τη μέθοδο τερματισμού της αλυσίδας του DNA με διδεόξυ-νουκλεοτίδια (Sanger et al, 1977) και τη Sequenase version 2.0 (USB Corp., Cleveland, OH).

Οι αλληλουχίες προσδιορίστηκαν σε αμφότερες τις κατευθύνσεις με περαιτέρω υποκλωνοποίηση κατάλληλων περιοριστικών τμημάτων στον πλασμιδιακό φορέα pUC18 και χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές. Οι νουκλεοτιδικές και αμινοξικές αλληλουχίες στοιχίσθηκαν και αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό του Genetics Computer Group (GCG) και το πρόγραμμα ClustalW (Thompson et al, 1994). Οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν με δεδομένα από τις τράπεζες πληροφοριών EMBL και GeneBank.

2.3.6. Ανάλυση κατά Southern

DNA υψηλού μοριακού βάρους εκχυλίστηκε από φύλλα αμπέλου, όπως ήδη περιγράφηκε, κόπηκε με τα ένζυμα περιορισμού *KpnI*, *BglII*, *EcoRV*, *EcoRI* και *HindIII* (Minotech, Ηράκλειο, Ελλάδα), αναλύθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% και τελικά μεταφέρθηκε σε μεμβράνη GeneScreen (NEN) με 20× SSC. Ο προϋβριδισμός, ο υβριδισμός και τα πλυσίματα πραγματοποιήθηκαν με τον τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω για τα φίλτρα, με τη διαφορά ότι υβριδισμός και πλυσίματα έγιναν τόσο σε αυστηρές (65 °C) όσο και σε ήπιες (50 °C) συνθήκες. Ως ιχνηλάτης χρησιμοποιήθηκε τμήμα *HindIII* / *HindIII* (0,81 kb) από το cDNA που απομονώθηκε, το οποίο καθαρίστηκε σε πήκτωμα αγαρόζης και ραδιοσημάνθηκε (ειδική ενεργότητα 10⁹ cpm/ μg DNA).

2.3.7. Απομόνωση Ολικού RNA και Ανάλυση Northern

Η εκχύλιση ολικού RNA από ιστούς αμπέλου έγινε σύμφωνα με τους Loulakakis et al (1996). Περιληπτικά, οι κονιορτοποιημένοι με γουδί και γουδοχέρι παρουσία υγρού αζώτου, φυτικοί ιστοί ομογενοποιήθηκαν με διάλυμα εκχύλισης (1:5 w/v) που περιείχε τα ήπια αποδιατακτικά που περιγράφουν οι

Hughes and Galau (1988) και 10% (w/w) PVPP. Τα RNAs που απομονώθηκαν μετά από κατακρημνίσεις με ισοπροπανόλη και με οξικό κάλιο υπερφυγοκεντρήθηκαν σε CsCl και επαναδιαλύθηκαν σε DEPC νερό. Ακολούθησαν κατακρημνίσεις με 3 M LiCl και με αιθανόλη.

Δείγματα RNA (20 μ g) αναλύθηκαν σε πήκτωμα 1,2% αγαρόζης-φορμαλδεύδης και μεταφέρθηκε σε μεμβράνες GeneScreen. Προϋβριδισμός, υβριδισμός και πλυσίματα εκτελέστηκαν όπως περιγράφεται παραπάνω, τόσο σε αυστηρές όσο και σε ήπιες συνθήκες. Οι ποσότητες RNA, που χρησιμοποιήθηκαν, υπολογίστηκαν βάση των ριβοσωμικών RNA. Αντίστοιχες ποσότητες ολικού RNA αναλύθηκαν ταυτόχρονα σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα, στο οποίο επιβεβαιώθηκαν οι ίσες ποσότητες των rRNAs μετά από χρώση του με βρωμιούχο εθίδιο.

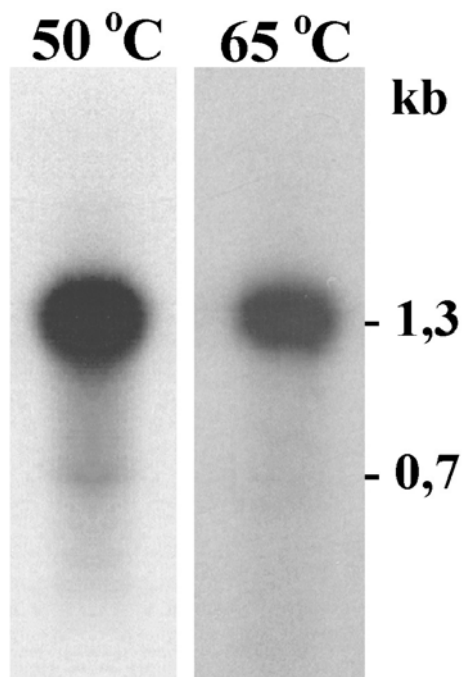
2.3.8. Άλλες Μέθοδοι

Η πέψη πλασμιδίων και ευθύγραμμων μορίων DNA με περιοριστικά ένζυμα, η τροποποίηση των άκρων μορίων DNA σε τυφλά με τη χρήση του θραύσματος Klenow της DNA πολυμεράσης I, η ηλεκτροφορητική ανάλυση τμημάτων DNA σε πηκτώματα αγαρόζης και η απομόνωση τους από το πήκτωμα μετά από ηλεκτρέκλυση, οι αντιδράσεις σύνδεσης μορίων DNA με το ένζυμο λιγάση, ο μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων, τα θρεπτικά μέσα καλλιέργειας των βακτηρίων και άλλες ευρέως εφαρμοζόμενες τεχνικές της μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιήθηκαν, έγιναν σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχουν οι προμηθεύτριες εταιρίες για τα προϊόντα τους και τους Sambrook et al (1989). Οι αυτοραδιογραφίες από τα Southern και northern blots ψηφιοποιήθηκαν με σαρωτή HP ScanJet 6100 (Hewlett Packard, Paco Alto, CA), ενσωματώθηκαν στο κείμενο και εκτυπώθηκαν σε εκτυπωτή HP LaserJet 4000N PS (1200 dpi), χωρίς ορατή διαφορά από τα πρωτότυπα.

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1. Ανάλυση Προϊόντων της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR)

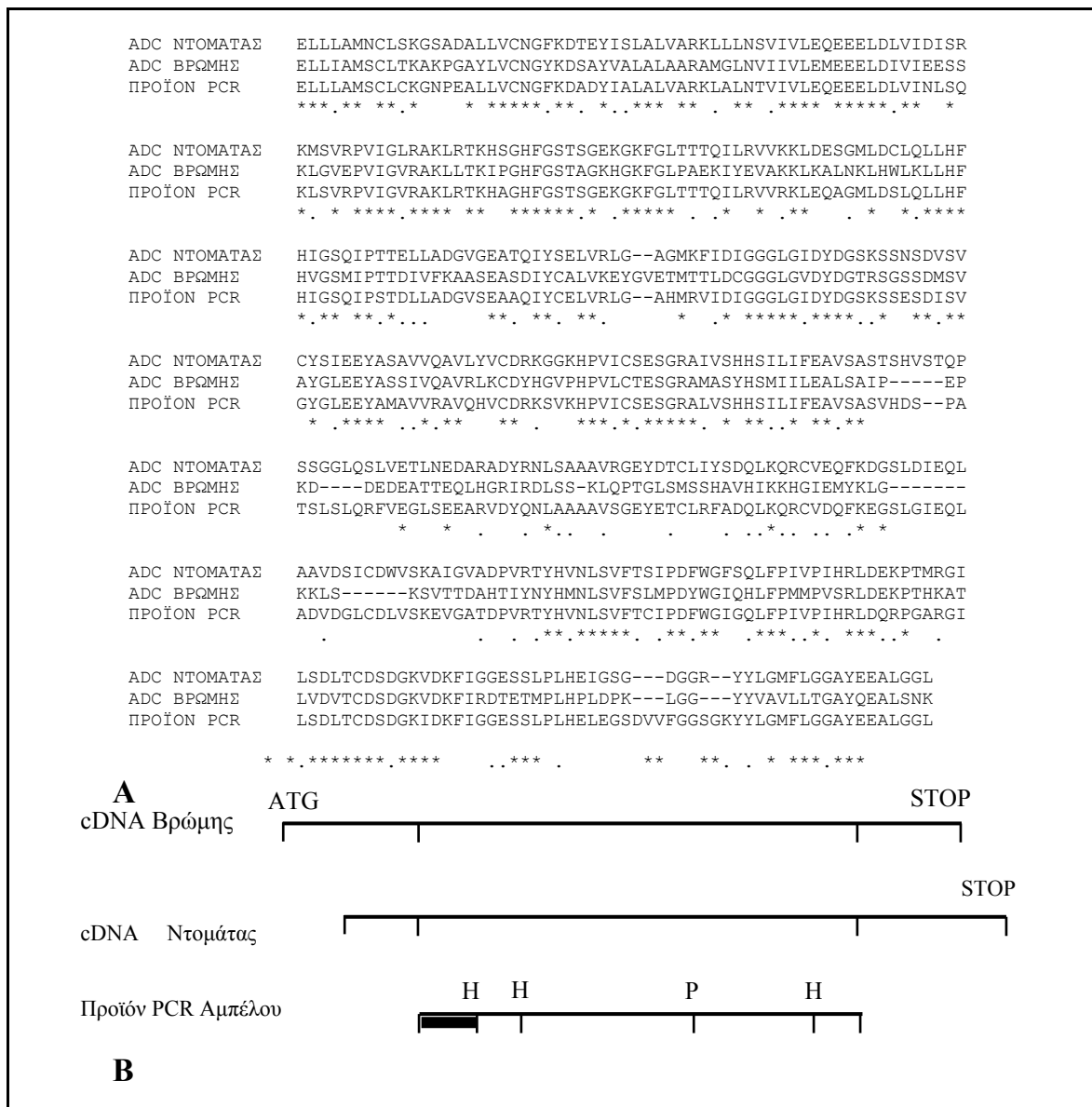
Γενωμικό DNA της αμπέλου πολλαπλασιάστηκε με τη μέθοδο της PCR χρησιμοποιώντας ως εκκινητές τα δύο εκφυλισμένα ολιγονουκλεοτίδια, που περιγράφονται στα Υλικά και Μέθοδοι. Ανάλυση του προϊόντος της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης έδειξε, ότι περιείχε δύο τμήματα DNA μεγέθους 1,3 και 0,7 kb περίπου. Το DNA του πηκτώματος μεταφέρθηκε σε μεμβράνη και υβριδοποιήθηκε τόσο σε αυστηρές (65 °C) όσο και σε ήπιες συνθήκες (50 °C) με το ραδιοσημασμένο, ολόκληρο κλώνο cDNA της ντομάτας. Ο ιχνηλάτης και στις δύο συνθήκες, υβριδοποιήθηκε μόνο με το μεγάλο τμήμα DNA (1,3 kb, Εικ. 2.2), το οποίο στη συνέχεια και κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pUC18. Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του, έδειξε ότι περιείχε ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame) που κωδικοποιούσε 413 αμινοξέα και του οποίου η αμινοξική αλληλουχία εμφάνισε 46% και 82% ταυτότητα με τις αντίστοιχες αλληλουχίες της ADC της βρώμης και της ντομάτας.



Εικόνα 2.2. Ανάλυση κατά Southern του προϊόντος πολλαπλασιασμού γενωμικού DNA της αμπέλου με τη μέθοδο της PCR και τους εκκινητές που περιγράφονται στα Υλικά και Μέθοδοι. Η μεμβράνη υβριδοποιήθηκε με το ραδιοσημασμένο ολόκληρο κλώνο cDNA της ADC της ντομάτας σε ήπιες (50 °C) και σε αυστηρές συνθήκες (65 °C) και εκτέθηκε σε φιλμ αυτοραδιογραφίας για 30 min.

Στην Εικόνα 2.3 φαίνεται η στοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης, που κωδικοποιεί το προϊόν της PCR από το

γενωμικό DNA της αμπέλου με τις αντίστοιχες αμινοξικές αλληλουχίες της ADC της βρώμης και της ντομάτας (Εικ. 2.3 A) καθώς και η σχετική θέση του τμήματος του DNA από την άμπελο, συγκριτικά με τις κωδικές περιοχές των cDNA της ADC της βρώμης και της ντομάτας και μερικές θέσεις ενζύμων περιορισμού (Εικ. 2.3 B).



Εικόνα 2.3. Η στοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης που κωδικοποιεί το προϊόν της PCR από το γενωμικό DNA της αμπέλου με τις αντίστοιχες αμινοξικές αλληλουχίες της ADC της βρώμης και της ντομάτας (A) καθώς και η σχετική θέση του τμήματος του DNA από την άμπελο συγκριτικά με τις κωδικές περιοχές των cDNA της ADC της βρώμης και της ντομάτας και μερικές θέσεις ενζύμων περιορισμού (B). H: *HindIII*, P: *PstI*. Η έντονη γραμμή πριν την πρώτη *HindIII* θέση, δείχνει το τμήμα από το κλωνοποιημένο προϊόν της PCR που χρησιμοποιήθηκε ως ιχνηλάτης για τη διαλογή της βιβλιοθήκης cDNA.

2.2. Απομόνωση και Χαρακτηρισμός cDNA Κλώνων της ADC της Αμπέλου

Με τη βοήθεια του 5' / Hind III τμήματος (200 bp, Εικ. 2.3) σαρώθηκε μία cDNA βιβλιοθήκη λ-ZAP-XR από αιωρούμενη καλλιέργεια κυττάρων αμπέλου (Loulakakis, Kanellis and Roubelakis-Angelakis, αδημοσίευτα). Από τις 9×10^5 αποικίες που εξετάστηκαν, μετά από τρεις κύκλους διαλογής απομονώθηκαν, τελικά, 25 θετικοί κλώνοι. Χρησιμοποιώντας τις ιδιότητες *in vivo* εκτομής του φορέα λ-ZAP-XR, οι θετικοί κλώνοι υποκλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript για περαιτέρω ανάλυση. Τα cDNA τμήματα, που έφεραν αυτοί οι κλώνοι, είχαν μεγέθη από 1,6 έως 2,1 kb. Η ανάλυσή τους με ένζυμα περιορισμού και με μερικό προσδιορισμό της αλληλουχίας τους έδειξε, ότι όλοι προέρχονταν από το ίδιο mRNA μόριο. Προσδιορίστηκε πλήρως η νουκλεοτιδική αλληλουχία του κλώνου, που έφερε το μεγαλύτερο cDNA τμήμα (2.120 bp) και η αλληλουχία αυτή έχει κατατεθεί στην EMBL (accession no X96791, Εικ. 2.4).

Η σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του cDNA της ADC της αμπέλου, με τις αλληλουχίες των φυτικών ADCs, που έχουν κλωνοποιηθεί μέχρι σήμερα (Πίν. 2.1), έδειξε ότι από το cDNA που απομονώθηκε, λείπει το 5' μη μεταφραζόμενο άκρο του καθώς και περίπου 300 νουκλεοτίδια από την κωδικοποιό περιοχή, αλλά φέρει 220 περίπου νουκλεοτίδια μετά το κωδικόνιο τερματισμού στη θέση 1891 (3' μη μεταφραζόμενο άκρο, Εικ. 2.4). Σε αυτά τα 220 νουκλεοτίδια δεν περιέχεται η αλληλουχία σηματοδότησης της πολυαδενυλίωσης των θηλαστικών (AATAAA) ούτε μία παρόμοια (AATGAA), που έχει βρεθεί σαν σήμα πολυαδενυλίωσης στα cDNA της ζεΐνης και της Rubisco του μπιζελιού (Hunt, 1994), το οποίο πιθανώς σημαίνει ότι λείπουν νουκλεοτίδια και από το 3' μη μεταφραζόμενο άκρο μέχρι το σημείο έναρξης των polyA.

Η αμινοξική αλληλουχία του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης, που φέρει το cDNA, όπως προκύπτει από μετάφραση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, αποτελείται από 630 αμινοξικά υπολείμματα (λείπουν περίπου 100 αμινοξέα από

το αμινοτελικό άκρο) και συμπεριλαμβάνει τις δύο αλληλουχίες “μοτίβα” της ομάδας IV των αποκαρβοξυλασών ορνιθίνης/ διαμινοπιμελικού οξέος/ αργινίνης (Bairoch A., 1993, Prosite Dictionary of protein sites and patterns, Εικ. 2.4). Στην αμινοξική αλληλουχία της ADC της αμπέλου βρίσκονται 17 υπολείμματα κυστεΐνης από τα οποία τα 12 είναι συντηρημένα σε όλες τις αλληλουχίες των δικοτυλήδων (Εικ. 2.5).

```

CATCAAGAGATTGATCTGATGAAGATCGTTAAGAAAGTTTCGGATCCGAAATCTGCGGGAGGACTCGGTTTCAGCTTCTCTCATCGTT -90
H Q E I D L M K I V K K V S D P K S A G G L G L Q L P L I V -30

CGATTGCCTGATGTGCTCCAGAATCGTCTGGAGTCTCTGCAGTCTGCGTTTCGACTTCGCAATCCAATCTCAAGGCTACGAATCTCACTAC -180
R L P D V L Q N R L E S L Q S A F D F A I Q S Q G Y E S H Y -60
MOTIBO I
CAAGGTGTTTCCCCCTGAAATGCAATCAGGACCGGTTTCATCGTGAAGATGTCGTGAAGTTCGGTTCGGCTTCCGGTTCGGCTCGAA -270
Q G V F P V K C N Q D R F I V E D V V K F G S A F R F G L E -90
GCTGGTCCAAACCGGAGCTCCTTCTGGCCATGAGCTGTTTGTGCAAGGAAACCCCTGAAGCTTCTTGGTTCGAATGGCTTCAAAGAT -360
A G S K P E L L L A M S C L C K G N P E A L L V C N G F K D -120
GCTGACTACATTGCGCTTGCTCTGGTTCGAGGAAACTTGCTTTGAATACTGTGATCGTTCCTTGAGCAAGAGGAAGAGCTTGACTCTGGT -450
A D Y I A L A L V A R K L A L N T V I V L E Q E E E L D L V -150

rHindIII
ATTAATCTAAGCCAGAAGCTTTCCGTCGCTCCGTAATTTGGTGTCCGAGCCAAGCTGAGGACTAAGCACGCTGGCCATTTTGGGTCCAGC -540
I N L S Q K L S V R P V I G V R A K L R T K H A G H F G S T -180

rHindIII
TCTGGCGAGAAAGGAAGTTTGGGTTGACTACGACACAGATTTTCGAGTAGTAAGAAAGCTTGAACAAGCAGGAATGCTTGATTCTCTG -630
S G E K G K F G L T T T Q I L R V V R K L E Q A G M L D S L -210
CAATTACTGCATTTCCACATCGGATCTCAGATTCCTTCTACAGACTTGCTCGCAGATGGGGTCAGTGAAGCTGCTCAGATTTACTGTGAA -720
Q L L H F H I G S Q I P S T D L L A D G V S E A A Q I Y C E -240
MOTIBO II
TTGGTCCGTCGCTGCCATATGCGAGTCAATGACATTGGAGGGGCTCGGTTATGATTATGATGGATCGAAGTTCAGTTCAGTCTGAT -810
L V R L G A H M R V I D I G G G L G I D Y D G S K S S E S D -270
ATTTCTGTTGGTTATGGGCTTGAAGAGTATGCTATGGCAGTAGTTCGAGCTGCCAGCATGATGTGATCGCAAGTTCAGTGAACACCCT -900
I S V G Y G L E E Y A M A V V R A V Q H V C D R K S V K H P -300
GTGATTTGACAGTGAAGTGGCCGGGCTTGTGCTCTCACCATTCAATTTTGTATCTTGGAGGCTGTTTCGGCAAGTGTACATGATTCACCT -990
V I C S E S G R A L V S H H S I L I F E A V S A S V H D S P -330

rPstI
GCTACTTCACTCAGTTTACAGCGCTTTTGGGAGGACTTTTCTGAGGAAGCCCGTGTGATTACCAGAATCTGGCTGCTGCTCAGTTAGT -1080
A T S L S L Q R F V E G L S E E A R V D Y Q N L A A A A V S -360
GGCGAGTATGAGACTTGCTGCGTTTTGCTGATCAATTAAGCAAAAGATGTGTTGATCAATTAAGCAAAAGGTCGTTAGGATTAAGACAG -1170
G L L H F T C L R F A D Q L K Q R C V D Q F K E G S L G I Y C E -390
CTTGTGACGTTGATGGGCTGTGACTTGGTTTCCAAGGAGTGGTGGCCACTGATCCAGTGCACCTTACCATGTGAATTTATCAGTC -1260
L A D V D G L C D L V S K E V G A T D P V R T Y H V N L S V -420
TTCACATGATTTCTGATTTCTGGGGTATTGGGACGCTGTTCCCTATAGTCCCAATTCACCGACTCGACAGAGGCTGGGCGAGGGGC -1350
F T C I P D F W G I G Q L F P I V P I H R L D Q R P G A R G -450

rC457 rHindIII
ATTTTATCGGATTTGACCTGTGACAGTATGGGAAGATTGATAAGTTTCATTTGGCGGTGAGTCAAGCTTGCCCTCTGCATGAACAGAGGT -1440
I L S D L T C D S D G K I D K F I G G E S S L P L H E L E G -480
TCAGATGTTGTTTTGGTGGTAGTGGGAAGTACTACTTGGGGATGTTCTTGGGCGGGGCTTACGAGGAGGCCCTCGGTTGGTTGCACAAT -1530
S D V V F G G S G K Y Y L G M F L G G A Y E E A L G G L H N -510
CTGTTGGTGGCCGAGTGTGTTTCGGGTGTTCAGAGCGATGGACCTCACAGCTTCGCAAGTACGCGTGCATGCCAGGGGCTTCCTGTC -1620
L F G G P S V V R V L Q S D G P H S F A V T R A M P G P S C -540
GGAGATGTGCTCCGAGTATGACAGCATGAGCCTGAGCTCATGTTCCGAGCACTTAAGCACCGCTGAGGAGTGCAGTGCAGGATGGT -1710
G D V L R V M Q H E P E L M F E T L K H R A E E C G H E D G -570
ATGACCAATGGTTCTTCTGCTAGTGGACTTCCCTTTCCTTCCACAAGATGCCCTATCTTGTGGCGGGTCTTCTTGTGCTGATGACTAAC -1800
M T N G S L A S G L A L S F H K M P Y L V A G S S C C M T N -600
AGCGGTACTATTAATGGCAATGAAGACAACACTACAGTTCGTTGCTGATTTCTGCTGCTGGGATGATGACCATTTGGTCTTACTGCTTTGCT -1890
S G Y Y Y G N E D N Y S R V A D S A A G D D D H W S Y C F A -630
TGAGCTAGTCTTGGCATCCCATGTTTTGTTTCTCGTGGAGTGCCTTAATTTTTTTTCTTTTTTTTTTTAGTTTGGTTAGAACAGT -1980
*
rEcoRI
TTTCTGAATCTGTGAAGAAGAGGGGAATGGGCCGCAATCAGACCCCTGTAAATTCGGAATCTTATTTCCCTTTTTCTGTAATCTTTT -2070
TATTTCCATCTAGTAAACTTTGGAATTTTAGTTTAAAAAAA

```

Εικόνα 2.4. Η νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία του cDNA κλώνου της ADC της αμπέλου, οι θέσεις των χαρακτηριστικών μοτίβων I και II των αποκαρβοξυλασών της ομάδας IV και οι κυριότερες θέσεις περιοριστικών ενζύμων.

Πίνακας 2.1. Μεγέθη σε bp των 5' και 3' μη μεταφραζόμενων άκρων, της κωδικής περιοχής και το συνολικό μέγεθος των μέχρι σήμερα κλωνοποιημένων φυτικών cDNAs της ADC.

ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	5' UTR	3' UTR	ΚΩΔΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ	ΣΥΝΟΛΟ
<i>Vitis vinifera</i>	-	222	1.890	2.112
<i>Lycopersion esculentum</i>	-	216	1.845	2.061
<i>Nicotiana sylvestris</i>	447	213	2.199	2.859
<i>Pisum sativum</i>	557	420	2.184	3.161
<i>Glycine max</i>	369	354	2.076	2.799
<i>Arabidopsis thaliana</i> (1)	404	185	2.106	2.695
<i>Arabidopsis thaliana</i> (2)	83	232	2.133	2.448
<i>Dianthus caryophyllus</i>	143	265	2.178	2.586
<i>Avena sativa</i>	17	286	1.821	2.124

Η σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας της ADC της αμπέλου με τις υπόλοιπες γνωστές αλληλουχίες ADC της ομάδας IV των αποκαρβοξυλασών (όλες οι φυτικές, συνολικά οκτώ, και όλες οι βακτηριακές, τρεις τον αριθμό, πλην της βιοαποικοδομητικής ADC της *E. coli* που ανήκει στην ομάδα III), έδειξε ταυτότητα 70-75% με τις αλληλουχίες της ADC των άλλων δικοτυλήδων, 40% με την ADC της βρώμης (μονοκοτυλήδων) και 27-32% με τις βακτηριακές ADC (Πίν. 2.2).

Η στοίχιση των παραπάνω αλληλουχιών και της μερικής αλληλουχίας της ADC του αρουραίου, έδειξε ότι μοιράζονται οκτώ περιοχές με σημαντική ομολογία (“περιοχές 1 έως 8” στην Εικόνα 2.5). Οι έξι από τις οκτώ περιοχές βρίσκονται στο πρώτο μισό της αλληλουχίας (έως το αμινοξικό υπόλειμμα 309 της αλληλουχίας της αμπέλου) και μόνο οι δύο στο καρβοξυτελικό μισό. Στο αμινοτελικό (πριν την “περιοχή 1”) και στο καρβοξυτελικό (μετά την “περιοχή 8”) άκρο, οι αλληλουχίες δεν παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες. Επίσης μεταξύ των “περιοχών 6 και 7” υπάρχει ένα μεγάλο τμήμα με πολύ μικρή ομολογία. Το τμήμα αυτό έχει μήκος 80-90 αμινοξικά υπολείμματα στις

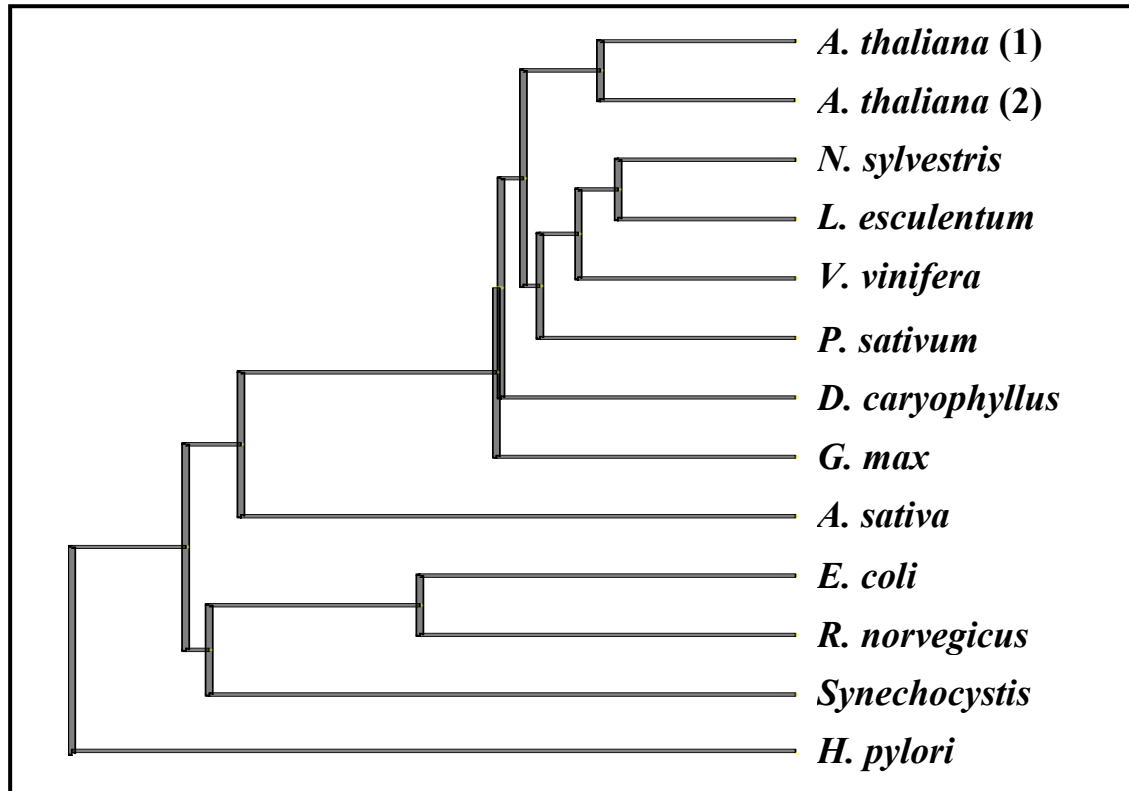
Πίνακας 2.2. Ταυτότητα, συντηρητικές αλλαγές και ομοιότητα του cDNA της αμπέλου με τις κλωνοποιημένες ADCs από την ομάδα IV των αποκαρβοξυλασών.

ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	ΤΑΥΤΟΣΗΜΑ ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΕΣ		ΣΥΝΟΛΟ % (ΟΜΟΙΟΤΗΤΑ)
	ΑΜΙΝΟΞΕΑ (ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ)	%ΑΛΛΑΓΕΣ %	
<i>Nicotiana sylvestris</i>	75,0	9,3	84,3
<i>Lycopersicon esculentum</i>	73,8	10,4	84,2
<i>Arabidopsis thaliana</i> (1)	73,6	8,1	81,7
<i>Arabidopsis thaliana</i> (2)	72,9	11,0	83,9
<i>Pisum sativum</i>	73,4	13,0	86,4
<i>Glycine max</i>	69,7	10,6	80,3
<i>Dianthus caryophyllus</i>	71,3	13,5	84,8
<i>Avena sativa</i>	40,0	18,0	58,0
<i>Synechocystis</i> PCC6803	32,0	19,8	51,8
<i>Escherichia coli</i>	29,9	18,8	48,7
<i>Helicobacter pylori</i>	26,8	18,8	45,6

αλληλουχίες των δικοτυλήδων, 65 στην αλληλουχία της βρώμης και πάνω από 100 στις τρεις βακτηριακές αλληλουχίες και η ομολογία, που παρουσιάζουν οι αλληλουχίες, είναι σημαντικά μικρότερη από την ολική ομολογία (<50%, <15% και <10%, για τις τρεις ομάδες οργανισμών, αντίστοιχα, Πίν. 2.2). Στο τέλος αυτού του τμήματος υπάρχει η θέση πρωτεολυτικής επεξεργασίας του προπεπτιδίου της βρώμης. Στην Εικόνα 2.6 παρουσιάζεται το εξελικτικό δέντρο των γνωστών ADCs της ομάδας IV των αποκαρβοξυλασών των αμινοξέων.

Εικόνα 2.5. (Επόμενη σελίδα) Στοίχιση με το πρόγραμμα ClustalW (Thompson et al, 1994) των αμινοξικών αλληλουχιών της ADC της αμπέλου (*V. vinifera*), του καπνού (*N. sylvestris*), της ντομάτας (*L. esculentum*), της *Arabidopsis* (*A. thaliana* 1 και 2), του μπιζελιού (*P. sativum*), της σόγιας (*G. max*), του γαρίφαλου (*D. caryophyllus*), της βρώμης (*A. sativa*), του *Synechocystis*, της *E. coli*, του *H. pylori* και του αρουραίου (*R. norvegicus*). Οι οκτώ συντηρημένες περιοχές δείχνονται υπογραμμισμένες, ενώ δηλώνονται: με παύλες (-) κενά που εισήχθησαν από το πρόγραμμα για βελτιστοποίηση της στοίχισης, με λατινικό ερωτηματικό (?) αμινοξικά υπολείμματα από μη πλήρης αλληλουχίες, με αστερίσκο (*) κάτω από τις αλληλουχίες συντηρημένο αμινοξικό υπόλειμμα σε όλες και με τελεία (.) συντηρητικές αλλαγές.

V.vin. GAYEHALGGLNHLFGGFSVVRVLSQSDGPFSAVTRAMFGPSCGDVLRVMQHEFELMFE TLKERRAEHCGH-----EDGMTNG-----SLASGLALSFFHKMFFLVAGSSCCMTNSG-----YYYGNEDN-YSRVADSAAGDDDDHWSYCF
L.esc. GAYEHALGGLNHLFGGFSVVRVMSQSDSFPSTSPXTCVAVFGPSCADVLRAMQHEFELMFE TLKERRAEHSL-----QGEGE--GVAFGSLTSSLAQSFNNMFFLS---SCCFTAEATANANTNTNNGGYYYSED-----NAAAEEDHWSY
N.syl. GAYEHALGGLNHLFGGFSVLRVLSQSDSFPSTSPXTCVAVFGPSCADVLRAMQHEFELMFE TLKERRAEHCVH-----NDDEQEEDKGLAFASLASSLAQSFNNMFFLVVNSCCCLTAAA-----NNGGYYCNDENIVGVGAE SAAAEELWFSYCV
A.th.1 GAYEHALGGLNHLFGGFSVVRVLSQSDGPFSAVTRAVMGOSSADVLRAMQHEFELMFE TLKERRAEHPRNNNNKACGDKGNDK----LVVASCLAKSFFNNMFFLSMETS--TNALTAAVN----NLGVYXCDEAAAGG---GGKGDENWSYFG-
A.th.2 GAYEHALGGLNHLFGGFSVVRVLSQSDGPFSAVTRAVFGQSSADVLRAMQHEFELMFE TLKERRAEHMMHTKGGSEGENEEEEDEFFNNVAASLDRSFFNNMFFLATEQASPSNSLSAAIS-----NLGFYXCDEDVY-----DYISA
G.max GAYEHALGGLNHLFGGFSVVRVLSQSDGPFSAVTRAVFGPSCGDVLRVMQHEFELMFE TLKERRAEHYVSHDN-----AAALLAAGLARTFDRMFFLLSL-----SFVADDVAAVPAQDLG--EQWSY
P.sat. GAYEHALGGLNHLFGGFSVVRVLSQSDGPFSAVTRAVAGSSCADVLRVMQHEFELMFE TLKERRAEHFCGQHDD-----DSVVNAGVLANSLAQSFNNMFFLVSSSTCCCLNALTNNNG--FYICSGDDFSADTVSVATSVAGED---ENWSY
D.car. GAYEHALGGLNHLFGGFSVVRVLSQSDGPFSAVTRAVFGPSSADVLRVMQHEFELMFE TLKERRAEHCDN-----DYTAG-----PLADMLAQSFNNMFFLVPGHATGSCGFSNGSG-LVNGCREYFYGVDDGCNAAAVDAAAGEEQWSYVC
A.sat. GAYQEALSNNKHLFGGFSVVRVVGTTGNGGAFNVFAALLGSTTEELIGTVSVDVKQDISSVIEERARENK-----VWEMVEKLVESGLHTMFFLYADYKPPMA-----
Synh. GAYQEIMGNLEHLFGDINVVHIATT--FQGYQIESVVRGDTMTEVRLGYVQYDSDDLLEGRLRRHTLALS--NGQITL-----ESRRLLEDYEQLRRYTYLS-----
E.coli GAYQEILGNMHLFGDTEAVDFVFP-DGSVEVELSDEGDTVADMLQYVQLDFTLLTQFRDQVKKTDLD-----AELQQQFLEEFEAGLYGTYLEDE-----
H.pyl. GAYQEVLCMKHLFTHFTEFSVVFDE-KGDYEVEDICEAQTILDVLDLDDYDTEIERLLKQKIDNNQ-----LDME---EKKEIMGRLYVMLSENGYLRITIS-----
PEPIOX8*.*.*.***

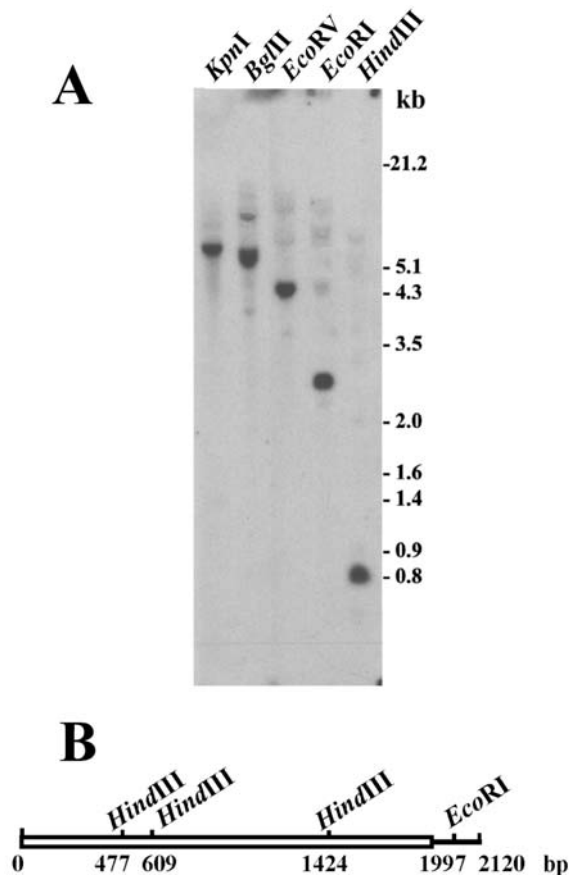


Εικόνα 2.6. Φυλογενετικό δέντρο των γνωστών ADCs της ομάδας IV των αποκαρβοξυλασών των αμινοξέων που έγινε χρησιμοποιώντας προγράμματα του πακέτου PHYLIP (Felsenstein, 1989).

2.3. Γενωμική Οργάνωση του Γονιδίου της ADC στην Αμπελο

Για να προσδιοριστεί η οργάνωση και ο αριθμός των γονιδίων της ADC στο γένωμα της αμπέλου πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Southern. Γενωμικό DNA της αμπέλου, μετά από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *KpnI*, *BglII*, *EcoRV*, *EcoRI* και *HindIII*, ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης και μεταφορά σε μεμβράνη, υβριδοποιήθηκε με το τμήμα *HindIII/ HindIII* μεγέθους 815 bp από το

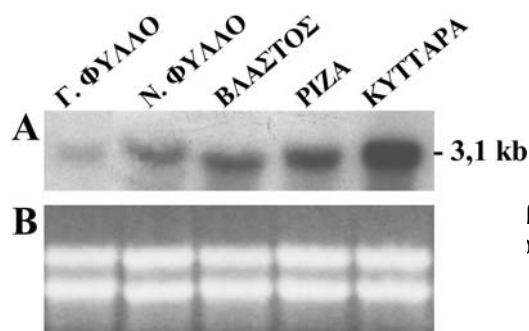
cDNA της ADC της αμπέλου, που χρησιμοποιήθηκε σαν ιχνηλάτης. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.7, για κάθε περιοριστικό ένζυμο ο ιχνηλάτης υβριδοποιείται σε μία έντονη ζώνη και μερικές μικρότερης έντασης. Όταν η υβριδοποίηση και τα πλυσίματα έγιναν σε ήπιες συνθήκες, ο λόγος των σχετικών εντάσεων των έντονων ζωνών προς τις αχνότερες δεν άλλαξε (δε δείχνεται). Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη ενός μόνο γονιδίου ομόλογου με το απομονωθέν cDNA στο γένωμα της αμπέλου. Οι αχνότερα υβριδοποιούμενες ζώνες υποδηλώνουν την ύπαρξη σχετιζόμενων αλληλουχιών στο γένωμα της αμπέλου, οι οποίες πιθανόν να αντιστοιχούν σε άλλες αποκαρβοξυλάσες ή ακόμα και μερική πέψη του DNA, χωρίς να αποκλείεται η ύπαρξη ενός δεύτερου γονιδίου της ADC με πολύ χαμηλή ομολογία, όμως, προς το πρώτο.



Εικόνα 2.7. (A) Ανάλυση κατά Southern γενωμικού DNA της αμπέλου. Ολικό γενωμικό DNA κόπηκε με τα ένζυμα περιορισμού *KpnI*, *BglII*, *EcoRV*, *EcoRI* και *HindIII*, αναλύθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8%, μεταφέρθηκε σε μεμβράνη και υβριδοποιήθηκε με το τμήμα *HindIII* / *HindIII* μεγέθους 815 bp από το cDNA της ADC της αμπέλου σε αυστηρές συνθήκες. Στα δεξιά φαίνονται οι θέσεις δεικτών μοριακού μεγέθους σε kb. (B) Χάρτης περιοριστικών θέσεων του cDNA της ADC της αμπέλου. Το ανοικτό πλαίσιο αντιστοιχεί στην κωδική περιοχή ενώ η γραμμή, στην 3' μη κωδική περιοχή.

2.4. Οργανοειδική Έκφραση της ADC στην Αμπελο

Για να μελετηθεί η οργανοειδική έκφραση του mRNA της ADC της αμπέλου πραγματοποιήθηκε ανάλυση northern. Ολικό RNA εκχυλίστηκε από φύλλα, βλαστούς και ρίζες *in vitro* ανεπτυγμένων φυτών και από κυτταροκαλλιέργεια αμπέλου, αναλύθηκε σε αποδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης, μεταφέρθηκε σε μεμβράνη και υβριδοποιήθηκε σε αυστηρές και ήπιες συνθήκες με το τμήμα HindIII/ HindIII μεγέθους 815 bp από το cDNA της ADC της αμπέλου. Ο ιχνηλάτης και στις δύο συνθήκες υβριδοποιήθηκε με ένα μοναδικό μετάγραφο μεγέθους περίπου 3,1 kb (Εικ. 2.8). Το πρότυπο της έκφρασης ήταν διαφορετικό στα τρία όργανα και την κυτταροκαλλιέργεια. Η ποσότητα του mRNA της ADC ήταν μικρή στα πλήρως αναπτυγμένα φύλλα, ενδιάμεση στα νεαρά αναπτυσσόμενα φύλλα, στους βλαστούς και στις ρίζες και τέλος μεγάλη στην κυτταροκαλλιέργεια.



Εικόνα 2.8. Ανάλυση northern, RNA από διάφορους ιστούς αμπέλου. (A) Ολικό RNA (20 μg), από γηραιά φύλλα (φύλλα της βάσης), νεαρά φύλλα (φύλλα της κορυφής), βλαστούς και ρίζες *in vitro* ανεπτυγμένων φυτών και κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου, αναλύθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης-φορμαλδεΰδης, μεταφέρθηκε σε μεμβράνη και υβριδοποιήθηκε με το τμήμα *HindIII* / *HindIII* μεγέθους 815 bp από το cDNA της ADC της αμπέλου, σε αυστηρές συνθήκες. ρόζης και χρώση με βρωμιούχο εθίδιο, αντίστοιχων ποσοτήτων ολικού RNA, για να πιστοποιηθεί, με ιτήτων.

2.5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά το σχεδιασμό των εκκινητών της PCR αποφεύχθηκε η επιλογή περιοχών, που ήταν γνωστό ότι αντιστοιχούσαν στην περιοχή πρόσδεσης του συνενζύμου και σε περιοχές, που έχουν προταθεί ότι συμμετέχουν στη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου του ενζύμου (Εικ. 2.1) για να αποφευχθεί η ενίσχυση αλληλουχιών, άλλων συγγενών αποκαρβοξυλασών, όπως της ορνιθίνης ή του διαμινοπιμελικού οξέως (Moore and Boyle, 1990). Παρόλα αυτά, το προϊόν της PCR περιείχε δύο τμήματα DNA (μεγέθους 1,3 και

0,7 kb) από τα οποία μόνο το μεγαλύτερο υβριδοποιήθηκε, τόσο σε αυστηρές όσο και σε ήπιες συνθήκες, με το cDNA της ντομάτας (Εικ. 2.2). Είναι πιθανόν, το μικρότερο τμήμα DNA να αντιστοιχούσε σε αλληλουχία μίας από τις προαναφερθείσες αποκαρβοξυλάσες ή άλλου ενζύμου με το ίδιο συνένζυμο (π.χ. αμινοτρανσφεράσες) ή με εξειδίκευση για παρόμοιο υπόστρωμα (αργινάση, ιμινοϋδρολάση της αγματίνης, ουρεοϋδρολάση της αγματίνης). Η πρόσφατη κλωνοποίηση της πρώτης φυτικής ODC από τη ντατούρα έδειξε ότι οι περιοχές σχεδίασης των δύο εκκινητών της PCR παρουσιάζουν μικρές ομοιότητες στο αμινοξικό επίπεδο μεταξύ των φυτικών ADCs και ODCs (Michael et al, 1996).

Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης που έφερε το, μεγέθους 1,3 kb, προϊόν της PCR, παρουσίαζε 46 και 82 % ταυτότητα με τις αμινοξικές αλληλουχίες της βρώμης και της ντομάτας, αντίστοιχα, και ακόμα περιείχε όλες τις συντηρημένες περιοχές που εμφανίζονται στις δύο αυτές αλληλουχίες και στις αντίστοιχες θέσεις (Εικ. 2.3), επιβεβαιώνοντας ότι το τμήμα αυτό του γενωμικού DNA αντιπροσωπεύει νουκλεοτιδική αλληλουχία της ADC της αμπέλου.

Παρά το μεγάλο αριθμό των αποικιών που εξετάστηκαν (9×10^5) και των θετικών κλώνων που απομονώθηκαν (25), δεν έγινε δυνατό να απομονωθεί ένας πλήρης cDNA κλώνος της ADC από τη βιβλιοθήκη της αμπέλου. Από τον Πίνακα 2.1 φαίνεται ότι, εκτός από τα περίπου 300 νουκλεοτίδια της κωδικής περιοχής, πρέπει να λείπουν ακόμα 400-500 νουκλεοτίδια από το 5' μη μεταφραζόμενο άκρο και 100-200 νουκλεοτίδια από το 3' μη μεταφραζόμενο άκρο, έτσι ώστε το cDNA να φτάσει το μέγεθος του mRNA (3,1 kb) όπως αυτό εκτιμήθηκε από την ανάλυση northern (Εικ. 2.8).

Οι αλληλουχίες, που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη της ADC, αν και διαφέρουν σε μήκος (2.076-2.199 bp, Πίν. 2.1) έχουν συντηρηθεί κατά την εξέλιξη. Η αμινοξική αλληλουχία της ADC της αμπέλου παρουσιάζει ολική ομολογία 70-75% με τις ADC των δικοτυλήδων, 40% με την ADC του μονοκοτυλήδων βρώμη και 27-32% με τις βακτηριακές ADC (Πίν. 2.2). Στις συντηρημένες περιοχές όμως (“περιοχές 1-8”, Εικ. 2.5), τα ποσοστά αυτά γίνονται 95-100%, 70-95% και 50-75% για τις τρεις ομάδες οργανισμών,

αντίστοιχα. Ακόμα περισσότερο, εκτός των “περιοχών 2, 3 και 8”, οι υπόλοιπες πέντε είναι ισχυρά συντηρημένες ανάμεσα σε όλα τα μέλη της ομάδας IV των αποκαρβοξυλασών (ADC, ODC και αποκαρβοξυλάση του διαμινοπιμελικού οξέος, Michael et al, 1996). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει το σημαντικό ρόλο, που παίζουν αυτές οι “περιοχές”, στη δομή και τη λειτουργία του ενζύμου.

Η “περιοχή 1” περιλαμβάνεται στην αλληλουχία του “μοτίβου I” και περιέχει τη λυσίνη 67 (Εικ. 2.4), η οποία έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί τη θέση πρόσδεσης της φωσφορικής πυριδοξάλης στην ODC του ποντικού (Poulin et al, 1992) και η μεταλλαγή της σε αργινίνη προκαλεί αδρανοποίηση του ενζύμου (Tsirka and Coffino, 1992). Η περιοχή αυτή παρουσιάζει υψηλή ομολογία στις αλληλουχίες, όχι μόνο των ADCs (Εικ. 2.5), αλλά και των δύο άλλων μελών (ODC, DapDC) της ομάδας IV των αποκαρβοξυλασών (Michael et al, 1996). Η συντήρηση των αμινοξέων γύρω από αυτή τη λυσίνη υποδηλώνει, ότι αυτή είναι η θέση πρόσδεσης του συνενζύμου για όλα τα μέλη της ομάδας IV. Οι γνωστές αλληλουχίες των αποκαρβοξυλασών των βασικών αμινοξέων κατατάσσονται σε δύο, καταφανώς μη σχετιζόμενες, ομάδες (III και IV), που διαφέρουν στη θέση της λυσίνης στην οποία προσδέεται το συνένζυμο (Sandmeier et al, 1994). Η ομάδα III περιλαμβάνει τις βακτηριακές αποκαρβοξυλάσες της λυσίνης, της ορνιθίνης (συστατική και επαγόμενη) και της αργινίνης (μόνο τη βιοαποικοδομητική) και η θέση πρόσδεσης του συνενζύμου βρίσκεται περίπου στη μέση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Αντίθετα, η ομάδα IV περιλαμβάνει τις ευκαρυωτικές ODCs και ADCs, τη βιοσυνθετική ADC της *E. coli* και τις αποκαρβοξυλάσες (βακτηριακές και ευκαρυωτικές) του διαμινοπιμελικού οξέος και η θέση πρόσδεσης του συνενζύμου βρίσκεται προς το αμινοτελικό άκρο.

Οι “περιοχές 2 και 3”, παρόλο που είναι πολύ καλά συντηρημένες στις αλληλουχίες των ADCs (Εικ. 2.5), παρουσιάζουν μικρή ομολογία με τις αντίστοιχες των ODCs και DapDC (<50%). Η αντίστοιχη λυσίνη της “περιοχής 3” στην ODC του ποντικού (K115), όταν μεταλλάχθηκε σε αργινίνη προκάλεσε ολική απώλεια της ενεργότητας του ενζύμου (Tsirka and Coffino, 1992). Η “περιοχή 4”

είναι πολύ καλά συντηρημένη τόσο στις ADCs, όσο και μεταξύ όλων των μελών της ομάδας IV. Η δεύτερη ιστιδίνη της περιοχής, όταν μεταλλάχθηκε σε αλανίνη, στην ODC του ποντικού, προκάλεσε αδρανοποίηση του ενζύμου (Lu et al, 1991).

Η “περιοχή 5” περιλαμβάνεται στην αλληλουχία του “μοτίβου II”, περιέχει τρία διαδοχικά υπολείμματα γλυκίνης (G254-G256, Εικ. 2.4) και είναι ισχυρά συντηρημένη σε όλες τις αλληλουχίες της ομάδας IV των αποκαρβοξυλασών. Οι Moore and Boyle (1990) πρότειναν ότι, η περιοχή αυτή αποτελεί μέρος της περιοχής πρόσδεσης του υποστρώματος, στηριζόμενοι σε παρατηρήσεις ομολογίας της αλληλουχίας της σε ένζυμα με δομικά παρόμοια υποστρώματα (DapDC, ODC, ADC, αργινάση και ουρεοϋδρολάση της αγματίνης). Όμως το “μοτίβο” των αποκαρβοξυλασών της ομάδας IV (υ[D/N]υGGG[F/L], όπου “υ” συμβολίζει υδρόφοβο αμινοξικό υπόλειμμα) απαντάται με μικρές αλλαγές (εκτός των τριών γλυκινών), στις μεθυλτρανσφεράσες και στις συνθάσες της σπερμιδίνης, όπου αποτελεί μέρος της θέσης πρόσδεσης της S-αδενοσυλ-μεθειονίνης (Michael et al, 1996). Πάντως, δεν υπάρχουν άλλα βιβλιογραφικά δεδομένα για το αν οι αποκαρβοξυλάσες της ομάδας IV δεσμεύουν αποκαρβοξυλιωμένη S-αδενοσυλ-μεθειονίνη ή αν ρυθμίζονται από αυτήν.

Η “περιοχή 6” είναι πολύ καλά συντηρημένη στις φυτικές ADC και λιγότερο στις βακτηριακές. Η αλληλουχία της περιοχής έχει υψηλή ομολογία και με άλλα μέλη της ομάδας IV των αποκαρβοξυλασών. Στην “περιοχή 7” βρίσκεται η κυστεΐνη 457, που πιθανόν να συμμετέχει στη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου του ενζύμου λόγω ομολογίας της αλληλουχίας γύρω της με την αλληλουχία γύρω από την κυστεΐνη 360 της ODC του ποντικού, στην οποία προσδένεται ομοιοπολικά ο μη αντιστρεπτός της αναστολέας, DFMO (Poulin et al, 1992). Η υπόθεση ενισχύεται από το γεγονός ότι στη βρώμη, η ομόλογη περιοχή που φέρει την κυστεΐνη αυτή, βρίσκεται στο 24 kDa πεπτίδιο στο οποίο προσδένεται ομοιοπολικά το DFMA και το οποίο προκύπτει μετά την πρωτεολυτική επεξεργασία του πρόδρομου 66 kDa μορίου (Bell and Malmberg, 1990, Malmberg et al, 1992).

Ο μεγάλος αριθμός κυστεϊνικών υπολειμμάτων, η συντήρησή τους (στις φυτικές ADC τουλάχιστον) και η συμμετοχή τους σε κρίσιμες περιοχές του μορίου, όπως αυτή του ενεργού κέντρου, δικαιολογούν την απαίτηση σουλφυδρυλομάδων για την επίδειξη ενεργότητας από το ένζυμο (Κεφάλαιο 1). Τέλος η “περιοχή 8” είναι ισχυρά συντηρημένη στις φυτικές ADC, και λιγότερο στις βακτηριακές, ενώ δεν παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με τις αντίστοιχες αλληλουχίες των άλλων αποκαρβοξυλασών της ομάδας IV.

Η σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας της ADC της αμπέλου, με τις άλλες γνωστές ADCs της ομάδας IV, όπως και το εξελικτικό δέντρο που κατασκευάστηκε, τη συσχετίζει περισσότερο με τις ADCs των δικοτυλήδων και πιο συγκεκριμένα με τις δύο αλληλουχίες της οικογένειας Solanaceae (ντομάτα και καπνός) και με το ένα από τα δύο ψυχανθή (μπιζέλι). Η αλληλουχία του δεύτερου ψυχανθούς (της σόγιας), όχι μόνο δεν τοποθετείται με το μπιζέλι, αλλά δημιουργείται ξεχωριστό σκέλος από όλα τα υπόλοιπα δικοτυλήδονα. Κατά τα άλλα, στο δέντρο είναι τοποθετημένες μαζί οι φυτικές αλληλουχίες (σε ξεχωριστό σκέλος τα δικοτυλήδονα από το μονοκοτυλήδονο βρώμη), μαζί οι αλληλουχίες της *E. coli*, του αρουραίου και του κυανοβακτηρίου *Synechocystis* και ξεχωριστά από όλα του βακτηρίου *Helicobacter pylori*.

Το αποτέλεσμα της ανάλυσης κατά Southern υποστηρίζει την ύπαρξη ενός μοναδικού γονιδίου ADC στο γένωμα της αμπέλου (Εικ. 2.7). Ένα γονίδιο ADC βρήκαν οι Rastogi et al (1993), οι Nam et al (1997) και οι Chattopadhyay et al (1997) στη ντομάτα, τη σόγια και το ρύζι, αντίστοιχα. Αντίθετα, η ομάδα του Malmberg έχει απομονώσει από την *Arabidopsis* δύο cDNA κλώνους (Watson and Malmberg, 1996, Watson et al, 1997). Ο διπλασιασμός του γονιδίου της ADC στην *Arabidopsis* συνέβη σχετικά πρόσφατα στην ιστορία των δικοτυλήδων (Malmberg et al, 1998) και ίσως μόνο στην τάξη Capparales (αν όχι, μόνο στην οικογένεια Brassicaceae) της υπόκλασης Dileniidae, όπως υποδεικνύουν καινούρια αποτελέσματα της ίδιας ομάδας (Galloway et al, 1998). Ακόμα περισσότερο, τα ψυχανθή, η άμπελος και οι σολανίδες ανήκουν σε τάξεις συγγενείς μεταξύ τους στις υποκλάσεις Rosidae τα πρώτα και Asteridae οι σολανίδες, οι οποίες είναι απομακρυσμένες από την υπόκλαση Dileniidae, στην οποία ανήκει η *Arabidopsis*. Έτσι, οι

λιγότερο έντονα υβριδοποιούμενες ζώνες στο Southern του γενωμικού DNA της αμπέλου είναι πιθανότερο να οφείλονται είτε σε μερική πέψη είτε σε σχετιζόμενες αλληλουχίες. Την ύπαρξη σχετιζόμενων αλληλουχιών υποδεικνύει και το διπλό προϊόν (1,3 και 0,7 kb) της PCR, με τους εκφυλισμένους εκκινητές, από τα οποία μόνο το μεγαλύτερο αντιπροσώπευε αλληλουχία της ADC.

Το μέγεθος του mRNA μετάγραφου της ADC της αμπέλου, όπως προσδιορίστηκε από ανάλυση northern ολικού RNA, είναι περίπου 3,1 kb (Εικ. 2.8) και βρίσκεται σε καλή αντιστοιχία με τα μεγέθη των πλήρων cDNA κλώνων από άλλα δικοτυλήδονα φυτά (Πίν. 2.1). Η έκφρασή του ήταν χαμηλή στα πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα, ενδιάμεση στα νεαρά αναπτυσσόμενα φύλλα, τους βλαστούς και τις ρίζες και υψηλότερη στην κυτταροκαλλιέργεια. Η αυξημένη έκφραση της ADC στα αναπτυσσόμενα όργανα σε σχέση με τα ώριμα έχει αναφερθεί στην ντομάτα και το μπιζέλι (Rastogi et al, 1993, Perez-Amador et al, 1995) και έχει ήδη συζητηθεί στο προηγούμενο Κεφάλαιο. Τα παρόμοια επίπεδα έκφρασης της ADC σε βλαστούς και ρίζες, με εκείνα των αναπτυσσόμενων φύλλων, πιθανώς δικαιολογούνται από τη δευτερογενή ανάπτυξη στα δύο αυτά όργανα. Τέλος, η υψηλότερη έκφραση της ADC στις κυτταροκαλλιέργειες μπορεί να οφείλεται στην αλλαγή του αναπτυξιακού προγράμματος αυτών των κυττάρων (αποδιαφοροποίηση) και τη συνεχή τους διαίρεση μέχρι τον κορεσμό του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ADC ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΑΜΠΕΛΟΥ ΥΠΟ ΤΗΝ
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΗΓΩΝ ΑΖΩΤΟΥ,
ΑΛΛΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΑΖΩΤΟΥΧΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ
ΚΑΙ ΤΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ
ΝΑΑ ΚΑΙ 6-ΒΑΡ**

3.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων παραγόντων στην ενεργότητα της ADC, στην έκφραση του γονιδίου της καθώς και στα επίπεδα των ενδογενών πολυαμινών, της αργινίνης και της ορνιθίνης σε κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου. Κύτταρα αμπέλου καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς αμμωνία και μετά τη λογαριθμική φάση της ανάπτυξής τους τροφοδοτήθηκαν με 20 mM αμμωνιακών ή 20 mM νιτρικών ή 5 mM αργινίνης ή 5 mM πουτρεσκίνης ή 10 mM γλουταμικού ή 10 mM γλουταμίνης. Η *in vitro* ενζυμική ενεργότητα της ADC αυξήθηκε με την προσθήκη των αμμωνιακών και της γλουταμίνης περισσότερο από ότι με την προσθήκη αργινίνης και γλουταμικού. Αντίθετα, η ειδική ενεργότητα της ADC δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την προσθήκη των νιτρικών, ενώ μειώθηκε με την προσθήκη της πουτρεσκίνης. Ανάλυση northern ολικού RNA, έδειξε ότι ουδεμία από τις επεμβάσεις προκάλεσε αλλαγές στη σχετική ποσότητα του mRNA της ADC. Τα επίπεδα της ενδογενούς ελεύθερης πουτρεσκίνης και αργινίνης γενικά ακολούθησαν τις αλλαγές της ειδικής ενεργότητας της ADC. Προσθήκη αμμωνιακών αύξησε την πουτρεσκίνη και μείωσε την αργινίνη ενώ η προσθήκη των νιτρικών δεν επηρέασε σημαντικά την ελεύθερη πουτρεσκίνη ούτε την αργινίνη. Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι οι αλλαγές της ειδικής ενζυμικής ενεργότητας, που παρατηρήθηκαν, και των αντίστοιχων συγκεντρώσεων της πουτρεσκίνης, δεν οφειλόταν σε επαγωγή ή καταστολή του γονιδίου της ADC και επομένως η ρύθμιση του συστήματος δε βρίσκεται στο επίπεδο της μεταγραφής. Στη συνέχεια μελετήθηκε η πιθανή επίδραση των φυτικών ρυθμιστικών ουσιών NAA και 6-BAP, που χρησιμοποιούνται στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των κυττάρων, στη μεταγραφή του γονιδίου της ADC. Κύτταρα αμπέλου καλλιεργήθηκαν για πέντε γενεές σε μέσο χωρίς NAA και 6-BAP και αυτά προστέθηκαν χωριστά σε κύτταρα που βρίσκονταν στη στάσιμη φάση. Ανάλυση northern ολικού RNA έδειξε ότι οι ποσότητες του μεταγράφου της ADC δεν επηρεάστηκαν από την προσθήκη των παραπάνω παραγόντων.

3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πρώτη αναφορά των πολυαμινών στη φυσιολογία φυτών ήταν η ανακάλυψη των Richards και Coleman το 1952, ότι η έλλειψη καλίου προκαλεί δραματική συσσώρευση πουτρεσκίνης στο κριθάρι (από Altman and Levin, 1993). Η συσσώρευση πουτρεσκίνης βρέθηκε ότι ήταν μία οικουμενική απόκριση των φυτών, σε τροφοπενία καλίου (Adams et al, 1990, Watson and Malmberg, 1996), σε τροφοπενίες άλλων ανόργανων στοιχείων (Basso and Smith, 1974, Lovatt, 1990, Shih and Kao, 1996) και όταν η αζωτούχος θρέψη γινόταν με αμμωνιακά (Tonin et al, 1991, Altman and Levin, 1993, Triantaphylides et al, 1993).

Βρέθηκε ακόμα, ότι μία σειρά αβιοτικών περιβαλλοντικών καταπονήσεων, επάγουν τη συσσώρευση πουτρεσκίνης σε ολόκληρα φυτά ή σε *in vitro* συστήματα. Οι καταπονήσεις αυτές είναι: ωσμωτική (Flores and Galston, 1982, 1984, Borell et al, 1996), αλατότητας (Basu and Ghosh, 1991, Das et al, 1995, Chattopadhyay et al, 1997, Santa-Cruz et al, 1997), όξινου περιβάλλοντος (Young and Galston, 1983, Santerre et al, 1990, Nam et al, 1997), οξειδωτική (Raab and Weinstein, 1990, An and Wang, 1997, Ye et al, 1997), υψηλών και χαμηλών θερμοκρασιών (Lovatt 1990, Roy and Ghosh, 1996, Lee, 1997, Sarjala et al, 1997) και ανοξίας (Reggiani et al, 1989). Με τη χρήση των μη αντιστρεπτών αναστολέων της ADC και ODC, DFMA και DFMO αντίστοιχα, βρέθηκε ότι η απόκριση οφείλεται σε *de novo* σύνθεση πουτρεσκίνης από την ADC.

Οι σημαντικές αλλαγές, που προκαλούν περιβαλλοντικές καταπονήσεις, στα πρότυπα του διάμεσου και δευτερογενούς μεταβολισμού του αζώτου στα φυτά, είναι γνωστές από παλαιότερα (Stewart and Larher, 1980). Η προσοχή, όμως, στις περισσότερες περιπτώσεις, έχει εστιαστεί στη συσχέτιση που παρατηρείται μεταξύ της ικανότητας μερικών φυτών να συσσωρεύουν αζωτούχες ενώσεις, όπως προλίνη, γλυκίνη, βεταΐνη και πουτρεσκίνη και της ιδιότητάς τους να είναι ανθεκτικά σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Η μεταβολική λογική της συσσώρευσης αυτών των ενώσεων παραμένει άγνωστη, ούτε έχει αποσαφηνιστεί το αν και πώς κάποιες από αυτές τις ενώσεις συνεισφέρουν στην ανθεκτικότητα στις καταπονήσεις ή είναι απλά συμπτώματά τους.

Κοινή, πρόιμη απόκριση των φυτών, σε μία σειρά αβιοτικών καταπονήσεων, αποτελεί η αυξημένη παραγωγή αμμωνιακών ιόντων (Flores and Galston, 1982, Lovatt, 1990). Όμως, τα αμμωνιακά είναι τοξικά για το φυτικό κύτταρο, λόγω της ικανότητας αποσύζευξης της αναπνοής ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, οπότε πρέπει να μετατραπούν το γρηγορότερο, σε μη τοξικές οργανικές ενώσεις. Οι Slocum και Weinstein (1990) πρότειναν ότι η συσσώρευση πουτρεσκίνης είναι το αποτέλεσμα της αφομοίωσης των αμμωνιακών σε γλουταμικό, της μέσω ακετυλίωσης εισαγωγής του γλουταμικού στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της ορνιθίνης και αργινίνης και τέλος της αποκαρβοξυλίωσης της τελευταίας από την ADC. Η αφομοίωση όμως, των αμμωνιακών παράγει περίσσεια πρωτονίων (H^+), τα οποία οξυνίζουν το κυτταρικό pH. Έχει προταθεί, ότι οι παραγόμενες πολυαμίνες, κατά κύριο λόγο, αλλά και οι άλλες αζωτούχες ενώσεις (που φέρουν το άζωτο στη μορφή αμινομάδας), δρουν ως μεταβολικές “ρυθμιστικές

ουσίες”, διατηρώντας το ενδοκυτταρικό pH, λόγω της πολυκατιονικής φύσης τους και συνεισφέροντας στην κυτταρική ομοιόσταση (Altman and Levin, 1993).

Εκτός της αζωτούχου θρέψης με αμμωνιακά και των περιβαλλοντικών καταπονήσεων, και οι πέντε κατηγορίες φυτικών ρυθμιστικών ουσιών, επηρεάζουν τα ενδογενή επίπεδα των πολυαμινών και την ενεργότητα της ADC. Η φυσική αυξίνη IAA προκάλεσε αύξηση των ενδογενών επιπέδων πουτρεσκίνης, σπερμιδίνης και σπερμίνης και της ενεργότητας της ADC σε κυτταροκαλλιέργειες καπνού (Park and Lee, 1994) καθώς και σε λεπτά έκφυτα από βλαστούς καπνού καλλιεργημένα *in vitro* (Scaramagli et al, 1995). Οι κυτοκινίνες και οι γιββελλίνες επάγουν την ενεργότητα της ADC και αυξάνουν τα επίπεδα της διαλυτής πουτρεσκίνης (Carbonell and Navarro, 1989, Dumbroff, 1990 και οι αναφορές εκεί, Perez-Amador et al, 1995) και το αμπισικό προκαλεί μια παρόμοια με των καταπονήσεων συσσώρευση πουτρεσκίνης μέσω του μονοπατιού της ADC (Palavan et al, 1984, Bueno and Matilla, 1992, Aurisano et al, 1993). Τέλος, για τη δράση του αιθυλενίου στην ενεργότητα της ADC και τα επίπεδα των ενδογενών πολυαμινών, η βιβλιογραφία δε συμφωνεί. Σε άλλα φυτά και συστήματα το αιθυλένιο προκαλεί μείωση της ενεργότητας της ADC και των επιπέδων των πολυαμινών (Apelbaum et al, 1985), ενώ σε άλλα έχει τα αντίθετα αποτελέσματα (Lee and Chu, 1992, Park and Lee, 1994).

Στο Κεφάλαιο αυτό μελετώνται η ενεργότητα της ADC, η έκφραση του γονιδίου της ADC, και τα επίπεδα των ενδογενών διαλυτών πολυαμινών σε κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου υπό την επίδραση διαφορετικών πηγών αζώτου (αμμωνιακών και νιτρικών), άλλων αζωτούχων ενώσεων (αργινίνης, πουτρεσκίνης, γλουταμικού και γλουταμίνης) και των φυτικών ρυθμιστικών ουσιών NAA και 6-BAP. Οι αιωρούμενες καλλιέργειες κυττάρων αποτελούν το καταλληλότερο σύστημα για τη μελέτη της επίδρασης παραγόντων, όπως οι παραπάνω, στην έκφραση γονιδίων που ρυθμίζονται και αναπτυξιακά, για δύο λόγους. Ο πρώτος είναι ότι στις καλλιέργειες των αποδιαφοροποιημένων κυττάρων δεν εμπλέκονται αναπτυξιακοί παράγοντες, που θα μπορούσαν να αλλοιώσουν τα αποτελέσματα των επεμβάσεων και ο δεύτερος είναι η ίδια η φύση των κυτταροκαλλιεργειών, η οποία επιτρέπει την ταυτόχρονη και ομοιόμορφη επίδραση του εξεταζόμενου παράγοντα σε όλα τα κύτταρα. Τα αποτελέσματα συζητούνται σε σχέση με τη βιβλιογραφική πληροφορία και προτείνεται μοντέλο για την εξήγηση της συσσώρευσης των ενδογενών πολυαμινών σε καταστάσεις αυξημένης εξωγενούς αμμωνίας και περιβαλλοντικών καταπονήσεων.

3.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.3.1. Φυτικό Υλικό

Για τα πειράματα, που περιγράφονται σε αυτό το Κεφάλαιο, χρησιμοποιήθηκαν αιωρούμενες καλλιέργειες κυττάρων αμπέλου (cell suspension cultures, κυτταροκαλλιέργειες), η εγκαθίδρυση των οποίων περιγράφεται στην αντίστοιχη παράγραφο των Υλικών και Μεθόδων του πρώτου Κεφαλαίου. Οι καλλιέργειες αναπτύσσονταν σε θρεπτικό μέσο MS (Murashige and Skoog, 1962), τροποποιημένο ώστε να περιέχει 20 mM KNO₃, ως μόνη πηγή αζώτου και συμπληρωμένο με 5 μM NAA και 2 μM 6-BAP. Για κάθε ζεύγος επεμβάσεων, από κωνική φιάλη 500 mL που περιείχε 200 mL της κυτταροκαλλιέργειας στη στάσιμη φάση της (7 ημέρες μετά την υποκαλλιέργεια), γινόταν δειγματοληψία 20 mL (μάρτυρας 0 h), το υπόλοιπο μοιραζόταν σε δύο αποστειρωμένες κωνικές φιάλες των 250 mL και σε κάθε μία από τις φιάλες γινόταν η προσθήκη, μέσα από φίλτρο 22 μm, 10 mM (NH₄)₂SO₄ ή 20 mM KNO₃, 5 mM αργινίνης ή 5 mM πουτρεσκίνης, 10 mM γλουταμικού ή 10 mM γλουταμίνης. Στη συνέχεια γινόταν δειγματοληψίες από τις φιάλες, υπό ασηπτικές συνθήκες, 3, 12, 24 και 72 h μετά την επέμβαση και το θρεπτικό μέσο απομακρύνονταν από τα κύτταρα με διύλιση υπό κενό και πλύσιμο με απιονισμένο νερό.

Για τη μελέτη της επίδρασης του NAA και της 6-BAP, οι κυτταροκαλλιέργειες υποκαλλιεργήθηκαν για 5 γενεές, σε θρεπτικό μέσο ελεύθερο των δύο αυτών φυτικών ρυθμιστικών ουσιών, και η προσθήκη τους έγινε σε κύτταρα στη στάσιμη φάση, όπως περιγράφεται παραπάνω, και σε τελικές συγκεντρώσεις 5 και 2 μM για το NAA και την 6-BAP, αντίστοιχα. Το κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τουλάχιστον δύο φορές.

3.3.2. Εκχύλιση και Προσδιορισμός Ενζυμικών Ενεργοτήτων ADC και Αργινάσης

Η εκχύλιση και ποσοτικοποίηση των ολικών πρωτεϊνών από τις κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου καθώς και ο προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας της ADC με την ισοτοπική μέθοδο, έγιναν όπως περιγράφεται στις αντίστοιχες παραγράφους, στα Υλικά και Μέθοδοι του πρώτου Κεφαλαίου.

Η ενζυμική ενεργότητα της αργινάσης προσδιορίστηκε όπως περιγράφεται από τους Roubelakis and Kliewer (1978), ως ο ρυθμός σχηματισμού ορνιθίνης σε μείγμα αντίδρασης που περιείχε 100 mM Tris-HCl, pH 9,7, 25 mM L-αργινίνης (ρυθμισμένη σε pH 9,7), 1,5 mM MnCl₂ και 0,1 mL πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, σε τελικό όγκο 1 mL. Τα εκχυλίσματα προεπώσθησαν με το MnCl₂ για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και η εκκίνηση της αντίδρασης έγινε με την προσθήκη του υποστρώματος, ενώ η λήξη της, μετά από 30 min επώασης στους 37 °C, με την προσθήκη 0,5 mL 15% (v/v) PCA. Οι πρωτεΐνες απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση

και το περιεχόμενο του υπερκειμένου σε ορνιθίνη, προσδιορίστηκε χρωματομετρικά σύμφωνα με τη μέθοδο του Chinard (1952). Έγιναν τρεις επαναλήψεις από κάθε εκχύλισμα και δύο τουλάχιστον ανεξάρτητες εκχυλίσεις από κάθε δείγμα. Βρασμένα ενζυμικά παρασκευάσματα και αντιδράσεις, στις οποίες η προσθήκη του PCA γινόταν πριν επωασθούν, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Η ενεργότητα της αργινάσης υπό αυτές τις συνθήκες ήταν γραμμική συνάρτηση α) του χρόνου επώασης, τουλάχιστον για τα πρώτα 45 min, β) της συγκέντρωσης του υποστρώματος έως 10 mM και γ) της ποσότητας του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Οι ειδικές ενεργότητες της αργινάσης παρουσιάζονται ως U ανά mg πρωτεΐνης \pm το τυπικό σφάλμα του μέσου, όπου μία U ισούται με 1 μ mol παραγόμενης ορνιθίνης ανά ώρα στους 37 °C.

3.3.3. Εκχύλιση και Προσδιορισμός Ενδογενών Πολυαμινών, Αργινίνης και Ορνιθίνης

Όλες οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν στους 4 °C. Οι διαλυτές πολυαμίνες εκχυλίστηκαν και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους έγινε σύμφωνα με τους Kotzabasis et al (1993). Περιληπτικά, 200 mg φιλτραρισμένων κυττάρων, ομογενοποιήθηκαν σε 1 mL 5% (v/v) PCA. Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε στα 20.000 g και οι διαλυτές στο υπερκείμενο πολυαμίνες, όπως και οι διαλυτές συζευγμένες και οι συζευγμένες σε μακρομόρια πολυαμίνες, που απελευθερώθηκαν μετά από δεκαεξάωρη υδρόλυση με πυκνό HCl στους 110 °C, βενζυλιώθηκαν. Οι βενζυλιωμένες πολυαμίνες εκχυλίστηκαν από την υδατική φάση με διέθυλ-αιθέρα, η φάση του αιθέρα συλλέχθηκε και εξατμίστηκε εντελώς και το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 200 μ L, 63% (v/v) μεθανόλης. Οι βενζυλιωμένες πολυαμίνες κλασματώθηκαν μέσω μίας C-18 στήλης ανάστροφης φάσης, σε σύστημα HPLC, Hewlett-Packard 1090 (Hewlett Packard, Wadbronn, Germany), εφοδιασμένο με ανιχνευτή DAD. Ο ποσοτικός προσδιορισμός πουτρεσκίνης, σπερμιδίνης και σπερμίνης επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας πρότυπες καμπύλες.

Η ενδογενής αργινίνη και ορνιθίνη εκχυλίστηκαν σε 100 mM κιτρικού νατρίου, pH 5,0. Ένα γραμμάριο φιλτραρισμένων κυττάρων ομογενοποιήθηκε σε 5 mL διαλύματος κιτρικού νατρίου, χρησιμοποιώντας έναν Ultra Turrax T25 ομογενοποιητή στην ταχύτητα 20.000 rpm. Τα εκχυλίσματα φυγοκεντρήθηκαν στα 25.000 g, για 20 min, στους 4 °C και τα υπερκείμενα χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό αργινίνης και ορνιθίνης. Τα ιζήματα επαναδιαλύθηκαν σε 5 mL 0,1 N NaOH, 0,2 M NaCO₃, 1 mM ταρταρικό Na/K, ομογενοποιήθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν ξανά, όπως περιγράφηκε προηγουμένως και οι ολικές πρωτεΐνες προσδιορίστηκαν στα καινούρια υπερκείμενα με τη μέθοδο των Lowry et al (1951). Η αργινίνη και η ορνιθίνη προσδιορίστηκαν χρωματομετρικά σε 0,5 mL του πρώτου υπερκειμένου σύμφωνα με τις μεθόδους των Ceriotti and Spandrio (1957) και Chinard (1952), αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer 515S UV/VIS (Perkin Elmer Corp., Foster City,

CA). Οι ενδογενείς διαλυτές πολυαμίνες, η αργινίνη και η ορνιθίνη εκφράζονται σε nmoles ανά mg πρωτεΐνης \pm το τυπικό σφάλμα του μέσου.

3.3.4. Απομόνωση Ολικού RNA και Ανάλυση Northern

Ολικό RNA εκχυλίστηκε από τα κύτταρα των αιωρούμενων καλλιεργειών της αμπέλου σύμφωνα με τη μέθοδο των Hughes και Galau (1988). Η σύσταση του διαλύματος εκχύλισης ήταν 200 mM Tris-HCl, pH 8,5, 1,5% LiDS (δωδεκυλ-θειικό λίθιο), 300 mM LiCl, 10 mM Na₃EDTA, 1% (w/v) δεοξυχολικό νάτριο, 1% (v/v) NP-40, 5 mM θειουρία, 1 mM aurintricarboxylic acid και 10 mM διθειοθρεϊτόλη. Τα κύτταρα ομογενοποιούνταν με διάλυμα εκχύλισης σε αναλογία 1:5 (βάρος κυττάρων: όγκος διαλύματος), με τη βοήθεια ενός Ultra Turrax T25 ομογενοποιητή. Την εκχύλιση ακολουθούσε κατακρήμνιση με 6,5 M οξικού καλίου, pH 8,5, στον πάγο και το RNA του υπερκειμένου κατακρημνιζόταν ξανά με 1/9 όγκου 3,3 M οξικού νατρίου, pH 6,1, και ίσο όγκο ισοπροπανόλης. Ανάλογα με την καθαρότητα του παρασκευάσματος σε αυτό το στάδιο, γινόταν περαιτέρω καθαρισμός με κατακρημνίσεις α) LiCl, σε τελική συγκέντρωση 2 M β) οξικού καλίου, σε τελική συγκέντρωση 3 M και χωρίς ρύθμιση του pH και γ) αιθανόλης και οξικού νατρίου, pH 6,1, σε τελικές συγκεντρώσεις 67% (v/v) και 0,33 M, αντίστοιχα. Η ανάλυση δειγμάτων ολικού RNA (20 μ g) σε αποδιατακτικά πηκτώματα αγαρόζης-φορμαλδεΐδης, η μεταφορά σε μεμβράνες, ο προϋβριδισμός, ο υβριδισμός και τα πλυσίματα εκτελέστηκαν όπως περιγράφεται στην αντίστοιχη παράγραφο των Υλικών και Μεθόδων του Κεφαλαίου 2.

3.1.1. 3.3.5. Άλλες Μέθοδοι

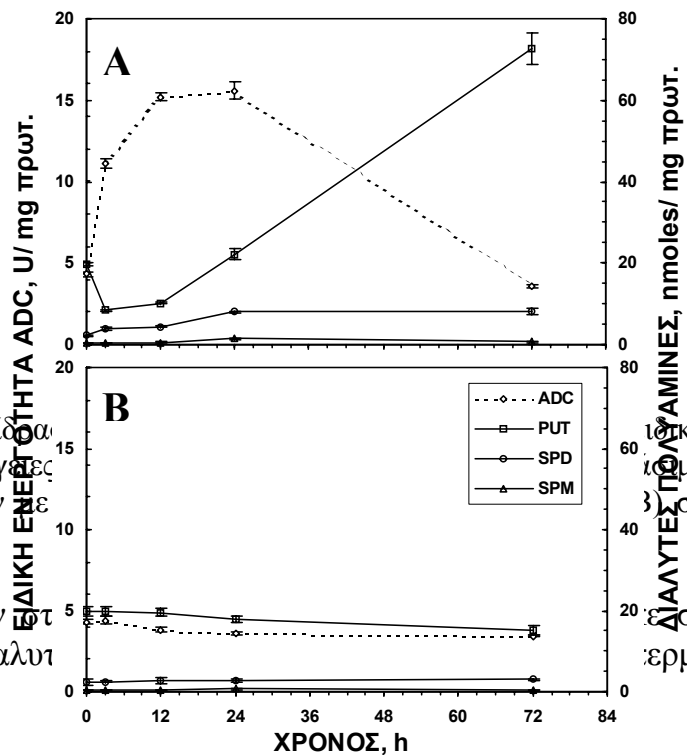
Η πέψη πλασμιδίων και ευθύγραμμων μορίων DNA με περιοριστικά ένζυμα, η απομόνωση τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης μετά από ηλεκτρέκλυση και η ραδιοσήμανσή τους, έγινε όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι του Κεφαλαίου 2. Οι αυτοραδιογραφίες από τα northern blots ψηφιοποιήθηκαν με σαρωτή HP ScanJet 6100 (Hewlett Packard, Paco Alto, CA), ενσωματώθηκαν στο κείμενο και εκτυπώθηκαν σε εκτυπωτή HP LaserJet 4000N PS (1200 dpi), χωρίς ορατή διαφορά από τα πρωτότυπα.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.4.5. Επίδραση Εξωγενών Αμμωνιακών και Νιτρικών Ιόντων σε Κυτταροκαλλιέργειες Αμπέλου

4.1.1. I. Στην Ειδική Ενεργότητα της ADC, στα Επίπεδα των Διαλυτών Πολυαμινών και στα Επίπεδα του mRNA της ADC

Η ειδική ενεργότητα της ADC αυξήθηκε 2,5 φορές, 3 h μετά την προσθήκη 20 mM NH₄⁺, συνέχισε να αυξάνει μέχρι τις 12 h και παρέμεινε σταθερή μεταξύ 12 και 24 h, για να μειωθεί ραγδαία, σε επίπεδα χαμηλότερα του αρχικού, στη συνέχεια (Εικ. 3.1Α). Μια απρόσμενη, αρχική μείωση, της διαλυτής πουτρεσκίνης παρατηρήθηκε 3 h μετά την επέμβαση και στη συνέχεια, η ποσότητα της πουτρεσκίνης άρχισε να αυξάνεται ραγδαία, για να αποκτήσει στις 72 h, τιμή τετραπλάσια της αρχικής. Η διαλυτή σπερμιδίνη διπλασιάστηκε στις 3 h και διπλασιάστηκε ξανά στις 12 h, ενώ σε μεγαλύτερους χρόνους τα επίπεδα



Εικόνα 3.1. Επίδραση κυτταροκαλλιέργειας τροφοδοτηθήκαν με σπερμίνη.

της παρέμειναν συνδεδεμένοι, διαλυμένοι (Πίν. 3.1).

ιστική ενεργότητα της ADC και στα επίπεδα των διαλυτών πολυαμινών, σε ελεύθερη φάση, που αναπτύσσονταν σε θρεπτικό μέσο ελεύθερο NH_4^+ , στο χρονικό σημείο 0 h. PUT: πουτρεσκίνη, SPD: σπερμιδίνη και SPM:

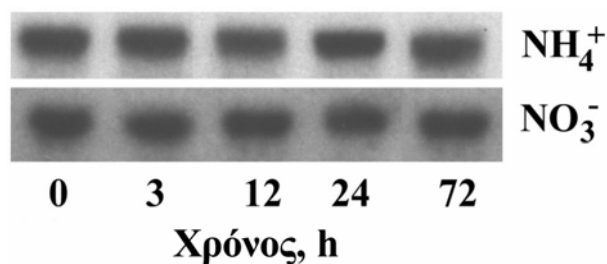
στα επίπεδα της διαλυτής σπερμίνης 24 h μετά την προσθήκη. Οι σπερμιδίνης και σπερμίνης δεν παρουσίασαν αξιόλογες μεταβολές (Πίν.

Πίνακας 3.1. Επίδραση των αμμωνιακών ιονίων στα επίπεδα των συνδεδεμένων, διαλυτών και αδιάλυτων πολυαμινών, σε κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου.

ΧΡΟΝΟΣ , h	ΣΥΝΔΕΜΕΝΕΣ ΔΙΑΛΥΤΕΣ			ΣΥΝΔΕΜΕΝΕΣ ΑΔΙΑΛΥΤΕΣ		
	PUT	SPD	SPM	PUT	SPD	SPM
0	45,2±5,8	64,2±4,7	15,9±2,4	24,3±2,9	10,5±1,1	-
3	40,8±5,2	70,3±5,2	12,1±2,1	20,3±2,5	12,3±1,7	1,1±0,3
12	42,1±3,3	67,7±6,1	14,3±1,7	27,1±2,8	13,6±2,2	-
24	46,9±6,1	63,4±3,6	13,2±2,3	25,1±1,9	9,7±1,3	-
72	53,1±7,8	68,2±5,9	12,4±2,0	23,9±2,2	11,4±1,5	1,7±0,5

Αντίθετα, η προσθήκη 20 mM NO_3^- δεν προκάλεσε σημαντικές αλλαγές. Η ειδική ενεργότητα της ADC μειώθηκε ελαφρώς, για να φτάσει, 72 h μετά την επέμβαση, στο 70% της αρχικής τιμής (Εικ. 3.1B). Παρομοίως, μόνο μία μικρή μείωση (20%) παρατηρήθηκε στα επίπεδα της ελεύθερης πουτρεσκίνης, 72 h αργότερα, χωρίς να επηρεαστούν τα επίπεδα ελεύθερης σπερμίνης και σπερμίνης (Εικ. 3.1B).

Η ανάλυση northern ολικού RNA, που απομονώθηκε από τα ίδια δείγματα κυττάρων, έδειξε ότι τα επίπεδα του μεταγράφου της ADC παρέμειναν σταθερά, μετά την προσθήκη των δύο διαφορετικών πηγών αζώτου (Εικ. 3.2).

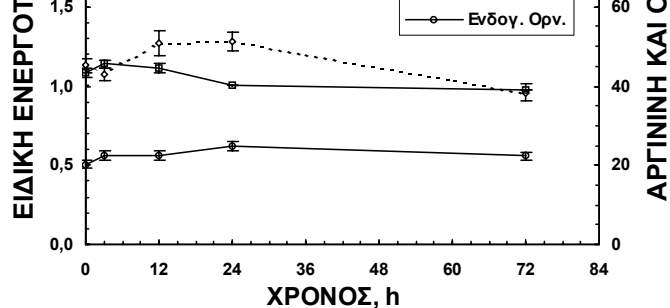


Εικόνα 3.2. Επίδραση αμμωνιακών και νιτρικών ιόντων στα επίπεδα του mRNA της ADC, σε κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου. Κυτταροκαλλιέργειες στη στάσιμη φάση, που αναπτύσσονταν σε θρεπτικό μέσο ελεύθερο NH_4^+ , τροφοδοτήθηκαν με 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (NH_4^+) ή 20 mM KNO_3 (NO_3^-) στο χρονικό σημείο 0 h.

4.1.2. II. Στα Επίπεδα της Ενδογενούς Αργινίνης και Ορνιθίνης και στην Ειδική Ενεργότητα της Αργινάσης

Η προσθήκη των NH_4^+ στα κύτταρα, προκάλεσε μία απότομη και ραγδαία μείωση (υποτριπλασιασμό) των επιπέδων της ενδογενούς αργινίνης, μόλις 3 h μετά, ενώ στη συνέχεια παρέμειναν σταθερά, μέχρι και τις 72 h. Αντίθετα, τα επίπεδα της ενδογενούς ορνιθίνης αυξήθηκαν σταδιακά, φτάνοντας στις 24 h, τη διπλάσια από την αρχική (στο χρόνο 0) τιμή τους και παρέμειναν σταθερά από εκεί και πέρα (Εικ. 3.3A). Η ειδική ενεργότητα της αργινάσης δεν επηρεάστηκε για τουλάχιστον 24 h μετά την επέμβαση, αλλά στις 72 h, παρουσίασε τιμή σχεδόν διπλάσια της αρχικής.

Παρουσία των NO_3^- , τα επίπεδα της αργινίνης μειώθηκαν ελαφρώς (10%) μεταξύ των 12 και 24 h, ενώ τα επίπεδα της ορνιθίνης αυξήθηκαν με τον ίδιο ρυθμό (Εικ. 3.3B). Η ειδική ενεργότητα της αργινάσης παρουσίασε μία παροδική αύξηση παρόμοιου μεγέθους κατά τη διάρκεια της περιόδου αυτής.



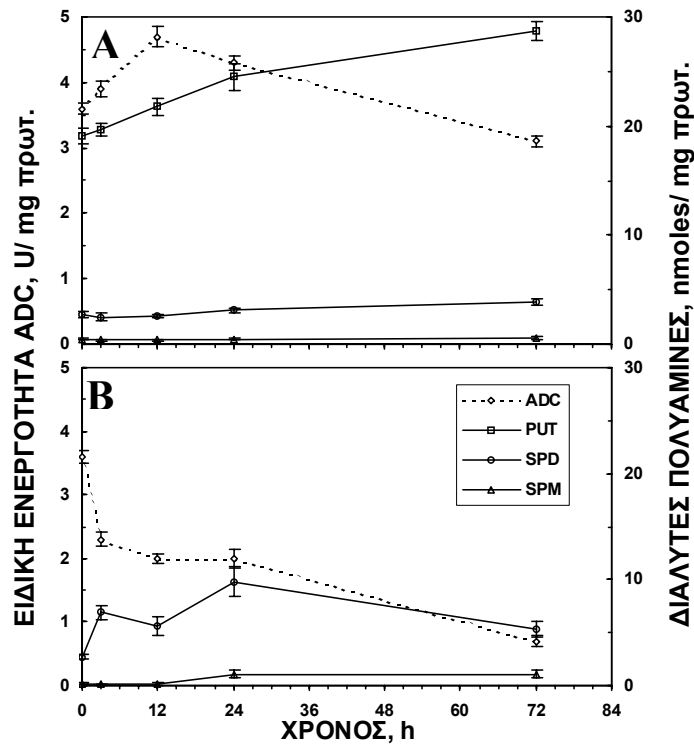
Εικόνα 3.3. Επίδραση αμμωνιακών και νιτρικών στην ειδική ενεργότητα της αργινάσης και στα επίπεδα των ενδογενών αργινίνης και ορνιθίνης, σε κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου. Κυτταροκαλλιέργειες στη στάσιμη φάση, που αναπτύσσονταν σε θρεπτικό μέσο ελεύθερο NH_4^+ , τροφοδοτήθηκαν με 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (A) ή 20 mM KNO_3 (B) στο χρονικό σημείο 0 h.

3.4.6. Επίδραση Εξωγενούς Αργινίνης και Πουτρεσκίνης σε Κυτταροκαλλιέργειες Αμπέλου

4.1.3. I. Στην Ειδική Ενεργότητα της ADC, στα Επίπεδα των Διαλυτών Πολυαμινών και στα Επίπεδα του mRNA της ADC

Η προσθήκη 5 mM αργινίνης στο θρεπτικό μέσο της κυτταροκαλλιέργειας, προκάλεσε μία μικρή αύξηση στην ειδική ενεργότητα της ADC στις 12 h (25%, Εικ. 3.4A), ενώ στη συνέχεια επανήλθε στα πριν την επέμβαση επίπεδα. Για τα επίπεδα της ελεύθερης πουτρεσκίνης παρατηρήθηκε μία μικρή αύξηση 12 h μετά την επέμβαση, η οποία συνεχίστηκε, για να καταλήξει στις 72 h σε τιμή 30% μεγαλύτερη από την αρχική. Για τις ελεύθερες σπερμιδίνη και σπερμίνη ουδεμία σημαντική μεταβολή παρατηρήθηκε.

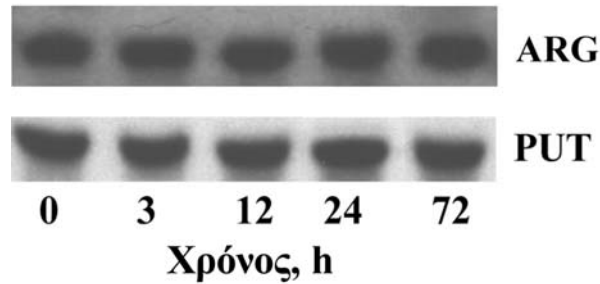
Αντίθετα, η προσθήκη 5 mM πουτρεσκίνης στην καλλιέργεια είχε ως αποτέλεσμα μείωση κατά 50% της ειδικής ενεργότητας της ADC μετά από 12 h



Εικόνα 3.4. Επίδραση εξωγενούς αργινίνης και πουτρεσκίνης στην ειδική ενεργότητα της ADC και στα επίπεδα των διαλυτών πολυαμινών, σε κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου. Κυτταροκαλλιέργειες στη στάσιμη φάση, που αναπτύσσονταν σε θρεπτικό μέσο ελεύθερο NH_4^+ , τροφοδοτήθηκαν με 5 mM αργινίνης (A) ή 5 mM πουτρεσκίνης (B) στο χρονικό σημείο 0 h. PUT: πουτρεσκίνη, SPD: σπερμιδίνη και SPM: σπερμίνη.

και τελικά μείωση κατά 75% της αρχικής τιμής της στις 72 h (Εικ. 3.4B). Η πουτρεσκίνη που προστέθηκε εξωγενώς δεν μπορούσε να απομακρυνθεί αποτελεσματικά με ήπιες μεθόδους από τα κύτταρα (εξαιτίας των ιοντικών δεσμών με τα κυτταρικά τοιχώματα) και επομένως, η ενδογενής ελεύθερη πουτρεσκίνη δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί. Η ελεύθερη σπερμιδίνη πάντως, διπλασιάστηκε στις 3 h και συνέχισε να αυξάνει έως τις 24 h. Παρομοίως, τα επίπεδα της ελεύθερης σπερμίνης υπερδιπλασιάστηκαν 24 h μετά την

επέμβαση.

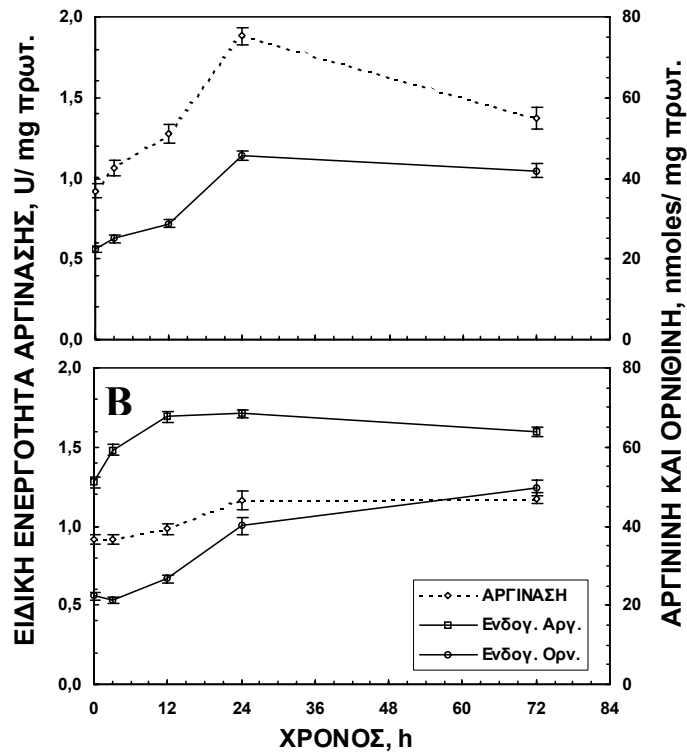


Εικόνα 3.5. Επίδραση εξωγενούς αργινίνης και πουτρεσκίνης στα επίπεδα του mRNA της ADC, σε κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου. Κυτταροκαλλιέργειες στη στάσιμη φάση, που αναπτύσσονταν σε θρεπτικό μέσο ελεύθερο NH_4^+ , τροφοδοτήθηκαν με 5 mM αργινίνης (ARG) ή 5 mM πουτρεσκίνης (PUT) στο χρονικό σημείο 0 h.

Ουδεμία από τις δύο επεμβάσεις προκάλεσε αλλαγές στην έκφραση του γονιδίου της ADC, όπως φαίνεται από τις ποσότητες του mRNA πριν και μετά την εφαρμογή τους (Εικ. 3.5).

4.1.4. II. Στα Επίπεδα της Ενδογενούς Αργινίνης και Ορνιθίνης και στην Ειδική Ενεργότητα της Αργινάσης

Η εξωγενής αργινίνη, όπως και η εξωγενής πουτρεσκίνη, δεν έγινε δυνατόν να απομακρυνθεί από τα κύτταρα μετά τη δειγματοληψία, προκειμένου να γίνει ο προσδιορισμός των ενδογενών επιπέδων της. Η παρουσία της στο θρεπτικό μέσο της κυτταροκαλλιέργειας, διπλασίασε τα επίπεδα της ενδογενούς ορνιθίνης στις 24 h (Εικ. 3.6A) και δεν προκάλεσε άλλη μεταβολή στη συνέχεια. Η ειδική ενεργότητα της αργινάσης ακολούθησε το πρότυπο αλλαγών της ενδογενούς ορνιθίνης, με μόνη διαφορά ότι μεταξύ 24 και 72 h μειώθηκε κατά 25% (Εικ. 3.6A).

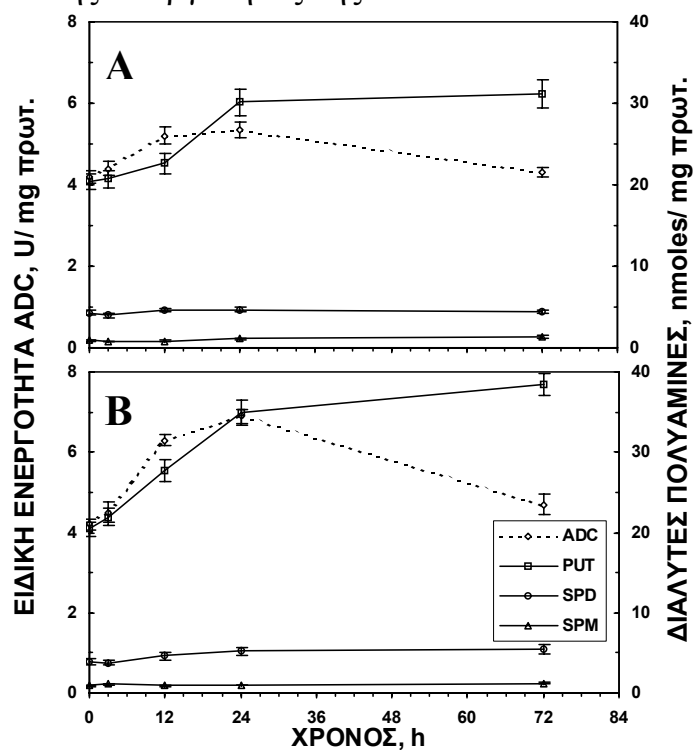


Εικόνα 3.6. Επίδραση εξωγενούς αργινίνης και πουτρεσκίνης στην ειδική ενεργότητα της αργινάσης και στα επίπεδα της ενδογενούς αργινίνης και ορνιθίνης, σε κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου. Κυτταροκαλλιέργειες στη στάσιμη φάση, που αναπτύσσονταν σε θρεπτικό μέσο ελεύθερο NH_4^+ , τροφοδοτήθηκαν με 5 mM αργινίνης (A) ή 5 mM πουτρεσκίνης (B) στο χρονικό σημείο 0 h.

Η προσθήκη της πουτρεσκίνης στην καλλιέργεια, αύξησε την ενδογενή αργινίνη κατά τη διάρκεια των πρώτων 12 h από την επέμβαση. Μετά, παρέμεινε σταθερή και μειώθηκε ελαφρά στις 72 h (Εικ. 3.4B). Τα επίπεδα ενδογενούς ορνιθίνης δεν επηρεάστηκαν κατά τις 3 πρώτες ώρες αλλά αργότερα αυξήθηκε για να φτάσει διπλάσια τιμή στις 72 h. Η ειδική ενεργότητα της αργινάσης ακολούθησε παρόμοιο πρότυπο με την ενδογενή ορνιθίνη με τη διαφορά ότι η τιμή της στις 72 h, ήταν μόνο 25% υψηλότερη από την αρχική, στο χρόνο 0.

3.4.7. Επίδραση Εξωγενούς Γλουταμικού και Γλουταμίνης στην Ειδική Ενεργότητα της ADC, στα Επίπεδα των Διαλυτών Πολυαμινών και στα Επίπεδα του mRNA της ADC σε Κυτταροκαλλιέργειες Αμπέλου

Η προσθήκη 10 mM γλουταμικού στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας προκάλεσε μία μικρή παροδική αύξηση κατά 25% της ειδικής ενεργότητας της

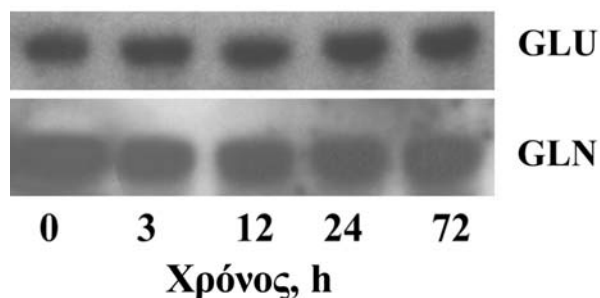


Εικόνα 3.7. Επίδραση εξωγενούς γλουταμικού και γλουταμίνης στην ειδική ενεργότητα της ADC και στα επίπεδα των διαλυτών πολυαμινών, σε κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου. Κυτταροκαλλιέργειες στη στάσιμη φάση, που αναπτύσσονταν σε θρεπτικό μέσο ελεύθερο NH_4^+ , τροφοδοτήθηκαν με 10 mM γλουταμικού (A) ή 10 mM γλουταμίνης (B) στο χρονικό σημείο 0 h. PUT: πουτρεσκίνη, SPD: σπερμιδίνη και SPM: σπερμίνη.

ADC μεταξύ των 12 και 24 h μετά την επέμβαση, ενώ στις 72 h η ενεργότητα επανήλθε σε επίπεδα μικρότερα από τα αρχικά (Εικ. 3.7A). Η παροδική αύξηση της ADC προκάλεσε μία αντίστοιχη μικρή αύξηση των επιπέδων της διαλυτής πουτρεσκίνης από τις 24 έως τις 72 h, χωρίς να επηρεάσει τα επίπεδα της διαλυτής σπερμιδίνης και σπερμίνης (Εικ. 3.7A).

Αντίθετα, μετά την προσθήκη 10 mM γλουταμίνης, παρατηρήθηκε μία αύξηση κατά 50% της ειδικής ενεργότητας της ADC τις 12 πρώτες ώρες (Εικ. 3.7B). Η αυξημένη τιμή της ενεργότητας διατηρήθηκε μέχρι τις 24 h και στη συνέχεια μειώθηκε σε επίπεδα χαμηλότερα των αρχικών. Η διαλυτή πουτρεσκίνη και σπερμιδίνη αυξήθηκαν μεταξύ 3 και 24 h μετά την επέμβαση (κατά 75% η πρώτη και 25% η δεύτερη), ενώ τα επίπεδα της διαλυτής σπερμίνης παρέμειναν σταθερά.

Τα επίπεδα του mRNA της ADC, όπως προκύπτει από τη σύγκριση του μάρτυρα (0 h) με τα χρονικά σημεία μετά την επέμβαση, δεν επηρεάστηκε από την προσθήκη των δύο αμινοξέων (Εικ. 3.8).

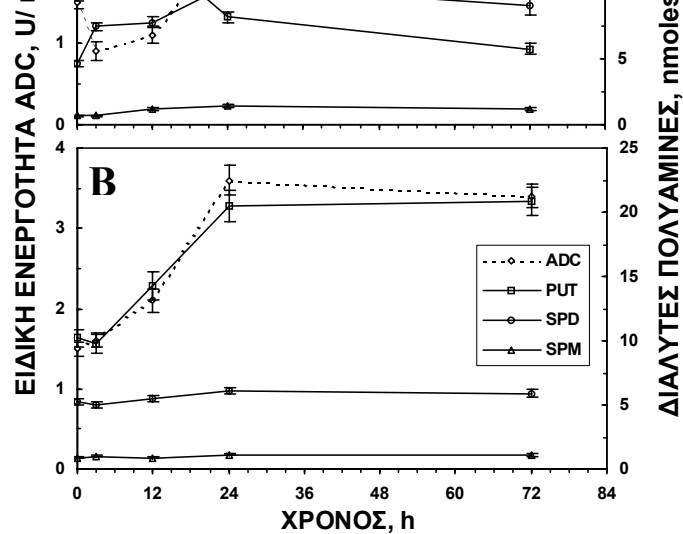


Εικόνα 3.8. Επίδραση εξωγενούς γλουταμικού και γλουταμίνης στα επίπεδα του mRNA της ADC, σε κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου. Κυτταροκαλλιέργειες στη στάσιμη φάση, που αναπτύσσονταν σε θρεπτικό μέσο ελεύθερο NH_4^+ , τροφοδοτήθηκαν με 10 mM γλουταμικού (GLU) ή 10 mM γλουταμίνης (GLN) στο χρονικό σημείο 0 h.

3.4.8. ADC, στα Επίπεδα των Διαλυτών Πολυαμινών και στα Επίπεδα του mRNA της ADC σε Κυτταροκαλλιέργειες Αμπέλου

Στα πειράματα, που παρουσιάστηκαν προηγουμένως, στο θρεπτικό μέσο των κυτταροκαλλιεργειών υπήρχαν 5 μM NAA και 2 μM 6-BAP. Η παρουσία των δύο παραπάνω φυτικών ρυθμιστικών ουσιών πιθανόν να επάγει τη σταθερή και αυξημένη έκφραση του γονιδίου της ADC, η οποία μπορεί να καλύπτει πιθανές αυξομειώσεις στην έκφραση του γονιδίου προκαλούμενες από τους

παράγοντες που εξετάστηκαν. Για να ελεγχθεί αυτή η υπόθεση, κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου καλλιεργήθηκαν για πέντε γενεές σε μέσο χωρίς NAA και 6-BAP και οι δύο αυτές φυτικές ρυθμιστικές ουσίες προστέθηκαν χωριστά σε κύτταρα, που βρίσκονταν στη στάσιμη φάση (7 ημέρες από την υποκαλλιέργεια).

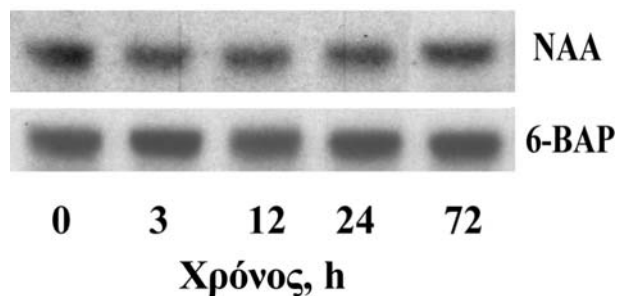


Εικόνα 3.9. Επίδραση NAA και 6-BAP στην ειδική ενεργότητα της ADC και στα επίπεδα των διαλυτών πολυαμινών, σε κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου. Κυτταροκαλλιέργειες στη στάσιμη φάση, που αναπτύσσονταν σε θρεπτικό μέσο ελεύθερο των δύο παραπάνω φυτικών ρυθμιστικών παραγόντων και NH_4^+ , τροφοδοτήθηκαν με 5 μM NAA (A) ή 2 μM 6-BAP (B) στο χρονικό σημείο 0 h. PUT: πουτρεσκίνη, SPD: σπερμιδίνη και SPM σπερμίνη.

Με την προσθήκη 5 μM NAA η ειδική ενεργότητα της ADC μειώθηκε 3 h μετά, διατηρήθηκε μειωμένη μέχρι τις 12 h και αυξήθηκε κατά 100% μεταξύ των 12 και 24 h (Εικ. 3.9A). Η διαλυτή πουτρεσκίνη μειώθηκε στο διάστημα μεταξύ 12 και 24 h, ενώ οι διαλυτές σπερμιδίνη και σπερμίνη αυξήθηκαν σταδιακά κατά 100%, τις πρώτες 24 h μετά την επέμβαση (Εικ. 3.9A).

Η παρουσία 2 μM 6-BAP στο θρεπτικό μέσο της κυτταροκαλλιέργειας, προκάλεσε διπλασιασμό της ειδικής ενεργότητας της ADC μεταξύ των 3 και 24 h (Εικ. 3.9B). Τα επίπεδα της διαλυτής πουτρεσκίνης ακολούθησαν την αύξηση της ενεργότητας της ADC και διπλασιάστηκαν στο ίδιο χρονικό διάστημα, ενώ η διαλυτή σπερμιδίνη και σπερμίνη δεν παρουσίασαν σημαντικές αλλαγές (Εικ. 3.9B).

Αντίθετα με τις ειδικές ενεργότητες της ADC, η ποσότητα του mRNA της, δεν επηρεάστηκε από την προσθήκη καμίας από τις δύο αυτές φυτικές ρυθμιστικές ουσίες (Εικ. 3.10).



Εικόνα 3.10. Επίδραση NAA και 6-BAP στα επίπεδα του mRNA της ADC, σε κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου. Κυτταροκαλλιέργειες στη στάσιμη φάση, που αναπτύσσονταν σε θρεπτικό μέσο ελεύθερο των δύο παραπάνω φυτικών ρυθμιστικών ουσιών και NH_4^+ , τροφοδοτήθηκαν με 5 μM NAA (NAA) ή 2 μM 6-BAP (6-BAP) στο χρονικό σημείο 0 h.

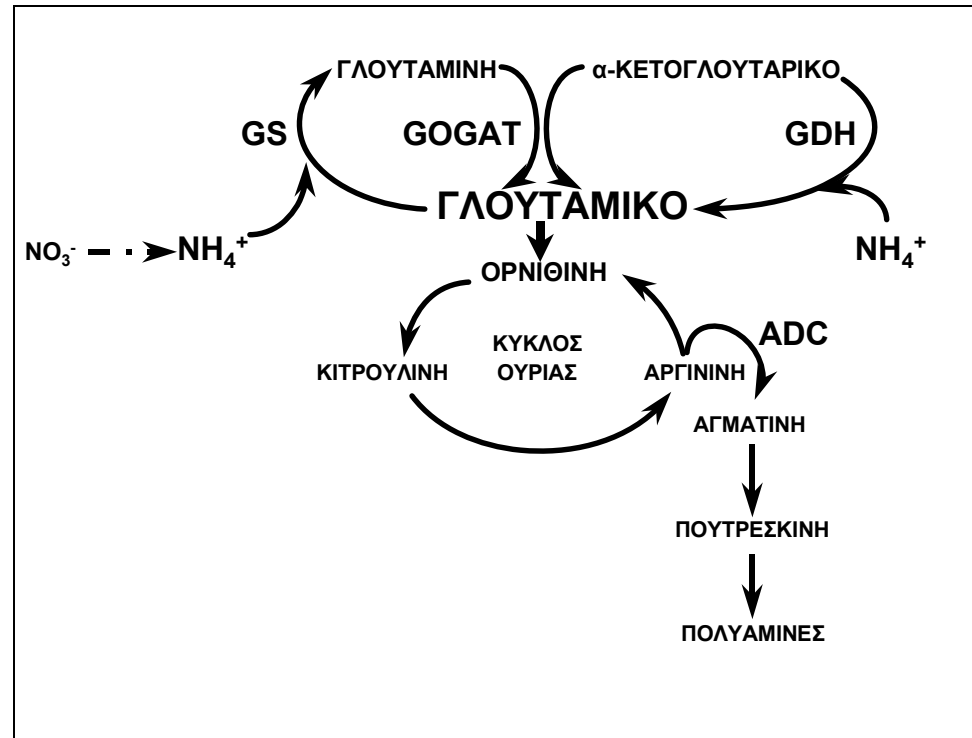
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ενδοκυτταρική συσσώρευση αμμωνιακών ιόντων στα φυτά μπορεί να προέλθει, εκτός από την άμεση πρόσληψη, την αναγωγή των νιτρικών και τη φωτοαναπνοή στα φύλλα, και από τον αυξημένο καταβολισμό αζωτούχων ενώσεων κατά τη διάρκεια καταπονήσεων ή γηρασμού (Flores and Galston, 1982, Lovatt, 1990). Αντιδρώντας στα αυξημένα ενδογενή επίπεδα αμμωνίας λόγω διάφορων αβιοτικών περιβαλλοντικών καταπονήσεων, τα φυτά συσσωρεύουν ορισμένα αμινοξέα, όπως η προλίνη, και άλλες αζωτούχες ενώσεις, όπως οι πολυαμίνες και η βεταΐνη (Stewart and Larher, 1980). Στις κυτταροκαλλιέργειες της αμπέλου, τα εξωγενή ιόντα αμμωνίου είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση της ειδικής ενεργότητας της ADC, καθώς και των επιπέδων της ενδογενούς διαλυτής πουτρεσκίνης, σπερμιδίνης, σπερμίνης, ορνιθίνης και αυξημένη ειδική ενεργότητα αργινάσης, με επακόλουθη μείωση στα επίπεδα της ενδογενούς αργινίνης (Εικ. 3.1A, 3.3A). Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι συμβατά με την υπόθεση των Altman και Levin (1993) ότι οι πολυαμίνες ενεργούν ως μεταβολική “ρυθμιστική ουσία” και διατηρούν το κυτταρικό pH σταθερό σε συνθήκες όπου η αφομοίωση των αμμωνιακών προκαλεί περίσσεια πρωτονίων. Η υπόθεση όμως αυτή, αποτελεί φαύλο κύκλο, γιατί η αφομοίωση των αμμωνιακών με τελικό προϊόν τις πολυαμίνες, είναι ταυτόχρονα η γενεσιουργός αιτία και η λύση του προβλήματος.

Η *de novo* σύνθεση πολυαμινών, παρουσία αμμωνιακών ιόντων, πιθανότερο να ενεργεί προς την κατεύθυνση της αμμωνιακής αποτοξίνωσης, όπως πρότειναν οι Slocum και Weinstein (1990) και υποστήριξαν περαιτέρω οι Turano και Kramer (1993). Σε κύτταρα αμπέλου, που καλλιεργήθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες, η προσθήκη αμμωνιακών αυξάνει σημαντικά την ποσότητα του mRNA που κωδικοποιεί την α -υπομονάδα της γλουταμικής αφυδρογονάσης (GDH, EC 1.4.1.2) και ακολούθως τα ανιονικά ισοένζυμα και την ενζυμική ενεργότητα της GDH (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1991, 1992, Λουλακάκης και Ρουμπελάκη-

Αγγελάκη, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Είναι πιθανό ότι η περίσσεια των διαθέσιμων ιόντων αμμωνίου, που δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από το μεταβολικό δρόμο της γλουταμινικής συνθετάσης/ γλουταμικής συνθάσης (GS/ GOGAT), χρησιμοποιείται από την GDH, η οποία έχει υψηλό K_M για την αμμωνία για τη σύνθεση γλουταμικού. Το τελευταίο υποστηρίζεται περαιτέρω από τη σχετιζόμενη με περιβαλλοντικές καταπονήσεις λειτουργία της GDH των φυτών, όπως προκύπτει από τη μεγαλύτερη λειτουργική και εξελικτική της συγγένεια με τις GDH των αρχαιοβακτηρίων παρά με εκείνες των ευβακτηρίων και άλλων ευκαρυωτικών οργανισμών (Syntichaki et al, 1996). Το γλουταμικό είναι ο κεντρικός πρόδρομος της σύνθεσης της ορνιθίνης, η οποία εισερχόμενη στον κύκλο των Krebs-Henseleit έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση της αργινίνης. Αυτά τα δύο αμινοξέα αποτελούν τα υποστρώματα της ODC και ADC, αντίστοιχα (Εικ. 3.11).

Πριν τα κύτταρα ξεκινήσουν τη σύνθεση νέας πουτρεσκίνης, κατά τη διάρκεια των πρώτων 3 h καλλιέργειας, μέρος της διαθέσιμης ενδογενούς πουτρεσκίνης μετατράπηκε σε σπερμιδίνη και σπερμίνη, οι οποίες παρέμειναν κυρίως στη διαλυτή τους μορφή (Εικ. 3.1A, Πίν. 1). Τα επίπεδα της ενδογενούς αργινίνης ρυθμίστηκαν από τη δράση τόσο της ADC όσο και της αργινάσης, με τέτοιο τρόπο ώστε όταν η ενεργότητα της ADC ήταν υψηλή, η αργινάση παρέμενε χαμηλή και αντιστρόφως (Εικ. 3.1A και 3.3A). Η αυξημένη ορνιθίνη στα κύτταρα της αμπέλου, που καλλιεργήθηκαν παρουσία ιόντων NH_4^+ είναι πιθανό ότι προήλθε είτε από την *de novo* σύνθεση της από γλουταμικό ή από την υδρόλυση της αργινίνης στον κύκλο των Krebs-Henseleit ή και τα δύο, αφού η ενεργότητα της αργινάσης επίσης αυξήθηκε σημαντικά (Εικ. 3.3A).



Εικόνα 3.11. Σχηματική αναπαράσταση των βιοχημικών μονοπατιών μέσω των οποίων γίνεται η αμμωνιακή αποτοξίνωση. Η περίσσεια της διαθέσιμης αμμωνίας, υπό συνθήκες καταπόνησης, αφομοιώνεται από την GDH προς γλουταμικό, το οποίο εισερχόμενο στον κύκλο της ουρίας καταλήγει μέσω της αργινίνης σε πουτρεσκίνη και στις ανώτερες πολυαμίνες.

Η καλλιέργεια κυττάρων αμπέλου παρουσία νιτρικών είχε ως αποτέλεσμα μία ελαφρά μείωση της ειδικής ενεργότητας της ADC και των επιπέδων της διαλυτής πουτρεσκίνης χωρίς να επηρεάσει τα επίπεδα σπερμιδίνης και σπερμίνης (Εικ. 3.1B). Τα επίπεδα ενδογενούς αργινίνης και ορνιθίνης δεν επηρεάστηκαν σημαντικά ενώ παρατηρήθηκε μια αύξηση 20% στην ειδική ενεργότητα της αργινάσης (3.3B). Το γεγονός ότι η παρουσία νιτρικών δεν επηρέασε σημαντικά τα επίπεδα αργινίνης και ορνιθίνης και μόνο ελαφρώς και παροδικά την αργινάση, σε συνδυασμό με την παρατήρηση, ότι τα νιτρικά προκαλούν αυξημένες ενεργότητες

GS/ GOGAT, αλλά όχι και GDH (Crawford, 1995, Λουλακάκης και Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, αδημοσίευτα αποτελέσματα), υποστηρίζουν την άποψη ότι η περίσσεια των αμμωνιακών ιόντων στα κύτταρα απομακρύνονται μέσω της αμινωτικής ενεργότητας της GDH, και το γλουταμικό που παράγεται χρησιμοποιείται για σύνθεση πρωτεϊνών και άλλων αζωτούχων ενώσεων. Η τελευταία υπόθεση υποστηρίζεται περαιτέρω και από τα αποτελέσματα των Slocum και Weinstein (1990). Οι ερευνητές αυτοί βρήκαν ότι σε τεμάχια αποκομμένων φύλλων βρώμης, που υποβλήθηκαν σε ωσμωτική καταπόνηση, τα επίπεδα της πουτρεσκίνης ήταν διπλάσια παρουσία εξωγενούς γλουταμικού και δεκαπλάσια από αυτά του μάρτυρα. Παρομοίως, σε κύτταρα αμπέλου που ακτινοβολήθηκαν με UV, η φύση της ανόργανης πηγής αζώτου στο μέσο καλλιέργειας έπαιξε σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση της πουτρεσκίνης (Triantaphylides et al, 1993). Η συσσώρευση πουτρεσκίνης στα κύτταρα παρατηρήθηκε μόνο παρουσία ιόντων NH_4^+ και ήταν περισσότερο έντονη στα κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν. Στα ίδια κύτταρα, η ενεργότητα της ADC, επίσης αυξήθηκε παρουσία ιόντων NH_4^+ . Η παρουσία νιτρικών αποτελεί για τα φυτικά κύτταρα “σήμα” που επάγει αφενός την πρόσληψη, την αναγωγή και την αφομοίωσή τους από την GS/ GOGAT και αφετέρου το μεταβολισμό των οργανικών οξέων, που θα προσφέρει τους σκελετικούς άνθρακες (Crawford, 1995, Scheible et al, 1997). Έτσι, η αρνητική επίδραση των εξωγενών νιτρικών μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα κύτταρα ρυθμίζουν την αναγωγή των νιτρικών σε αμμωνιακά με ρυθμό συμβατό με την αφομοίωση της αμμωνίας από το μεταβολικό δρόμο της GS/ GOGAT και αυτή η δεξαμενή συντιθέμενου γλουταμικού χρησιμοποιείται για άλλα βιοσυνθετικά μονοπάτια.

Η εξωγενής αργινίνη στο θρεπτικό μέσο των κυτταροκαλλιεργειών αμπέλου, προκάλεσε αύξηση κατά 25% στην ενεργότητα της ADC και στα επίπεδα της ενδογενούς διαλυτής πουτρεσκίνης, χωρίς να επηρεάσει σπερμιδίνη και σπερμίνη (Εικ. 3.4A) και διπλασιασμό της ενεργότητας της αργινάσης και των επιπέδων ενδογενούς ορνιθίνης (Εικ. 5.6A). Τα επίπεδα της ενδογενούς αργινίνης δεν έγινε δυνατό να προσδιοριστούν, αλλά είναι γνωστή η ύπαρξη συστήματος μεταφοράς της στην άμπελο (Theodoropoulos and Roubelakis-Angelakis, 1989). Η εξωγενής αργινίνη είχε ως αποτέλεσμα αύξηση των ενδογενών της επιπέδων, μεγαλύτερη διαθεσιμότητά της στα καταβολικά της ένζυμα, ADC και αργινάση και συσσώρευση των προϊόντων καταβολισμού της, πουτρεσκίνης, ορνιθίνης, ουρίας και πιθανόν και αμμωνιακών ιόντων από τη δράση της ουρεάσης (EC 3.5.1.5). Συσσώρευση πουτρεσκίνης παρατηρήθηκε και σε φύλλα σόγιας που επώασθηκαν για 6 h σε διάλυμα με 20 mM αργινίνης (Turano and Kramer, 1993), ενώ εξωγενής αργινίνη διπλασίασε την ενεργότητα της αργινάσης σε ασηπτικά καλλιεργημένες ρίζες της *Atropa belladonna* (Nyman et al, 1993).

Παρόμοια αποτελέσματα, στην ειδική ενεργότητα της ADC και τα επίπεδα των ενδογενών διαλυτών πολυαμινών, προκάλεσε η προσθήκη εξωγενούς γλουταμικού και γλουταμίνης στις κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου. Το γλουταμικό λιγότερο και η γλουταμίνη περισσότερο, αύξησαν παροδικά την ενεργότητα της ADC και τα επίπεδα της διαλυτής πουτρεσκίνης (Εικ. 3.7). Αύξηση της

ενδογενούς πουτρεσκίνης παρατηρήθηκε σε φύλλα βρώμης και σόγιας, που επώασθηκαν σε διαλύματα με 10 και 20 mM, αντίστοιχα, γλουταμικού ή γλουταμίνης (Slocum and Weinstein, 1990, Turano and Kramer, 1993). Τα δύο παραπάνω αμινοξέα, μέσω του ακετυλιωμένου γλουταμικού, εισέρχονται στον κύκλο των Krebs-Henseleit για να μετατραπούν σε αργινίνη και στη συνέχεια σε πουτρεσκίνη (Εικ. 3.11).

Αντίθετα, η προσθήκη πουτρεσκίνης στην κυτταροκαλλιέργεια προκάλεσε αρνητική ρύθμιση στην ενεργότητα της ADC (Εικ. 3.4B). Οι ενδογενείς σπερμιδίνη και σπερμίνη αυξήθηκαν (Εικ. 3.4B), όπως και τα επίπεδα ενδογενούς αργινίνης και ορνιθίνης (Εικ. 3.6B). Η αυξημένη ενδογενής αργινίνη προκάλεσε μία μικρή αντίστοιχη αύξηση στην ενεργότητα της αργινάσης, η οποία θα μπορούσε επίσης να ρυθμιστεί από το μέγεθος της δεξαμενής των ενδιάμεσων του κύκλου Krebs-Henseleit.

Η παρουσία της αυξίνης NAA στις κυτταροκαλλιέργειες της αμπέλου προκάλεσε μείωση στα επίπεδα της ελεύθερης πουτρεσκίνης και αύξηση στα επίπεδα σπερμιδίνης και σπερμίνης και στην ενεργότητα της ADC (Εικ. 3.9A). Από την άλλη, η παρουσία της κυτοκινίνης 6-BAP προκάλεσε αύξηση τόσο στην ενεργότητα της ADC όσο και στα επίπεδα ενδογενούς πουτρεσκίνης, χωρίς να επηρεάσει σπερμιδίνη και σπερμίνη (Εικ. 3.9). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί σε κυτταροκαλλιέργειες καπνού, όπου η φυσική αυξίνη IAA αύξησε τα επίπεδα της ελεύθερης σπερμιδίνης και σπερμίνης και αύξησε την ενεργότητα της ADC (Park and Lee, 1994). Η ίδια αυξίνη στο θρεπτικό μέσο, που καλλιεργήθηκαν λεπτά έκφυτα από βλαστό καπνού, ενεργοποίησε την ADC και τη βιοσύνθεση πουτρεσκίνης (Scaramagli et al, 1995). Τέλος, κατά το επαγόμενο από κυτοκινίνη πρασίνισμα των κοτυληδόνων αγγουριάς στο φως, η ενεργότητα της ADC αυξήθηκε όπως και τα επίπεδα της ενδογενούς πουτρεσκίνης (Suresh et al, 1978, Dumbroff, 1990).

Όλες οι παραπάνω μεταχειρίσεις, με εξαίρεση ίσως εκείνη των νιτρικών, επέδρασαν λιγότερο ή περισσότερο στην ενεργότητα της ADC, χωρίς όμως να επηρεάσουν την έκφραση του γονιδίου της (Εικ. 3.2, 3.5, 3.8 και 3.10). Η ρύθμιση δηλαδή, της ενεργοποίησης ή της καταστολής της ενεργότητας γίνεται μετα-μεταγραφικά, κατά τη μετάφραση ή και μετα-μεταφραστικά. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα, σε αυτό το σημείο είναι αντικρουόμενα. Οι Flores και Galston (1982, 1984) ανέφεραν ότι ο παρεμποδιστής της μετάφρασης, κυκλοεξιμίδιο, ανέστειλε πλήρως την αύξηση των επιπέδων της πουτρεσκίνης σε φύλλα αγρωστωδών, που υπέστησαν ωσμωτική καταπόνηση, ενώ παρεμποδιστές της μεταγραφής, όπως η ακτινομυκίνη D και η κορδισεπίνη, δεν είχαν το ίδιο αποτέλεσμα. Οι Turano και Kramer (1993), μελετώντας την επαγωγή της ενζυμικής ενεργότητας της ADC από διάφορα αμινοξέα σε φύλλα σόγιας, παρατήρησαν ότι αυτή αποτρεπόταν από το κυκλοεξιμίδιο αλλά όχι και από την ακτινομυκίνη D. Φυτά *Arabidopsis* αντέδρασαν στην καταπόνηση από έλλειψη καλίου, αυξάνοντας την ενεργότητα της ADC (Watson and Malmberg, 1996). Έλλειψη συσχετισμού μεταξύ των επιπέδων της ενεργότητας της ADC και του mRNA της στον καρπό της ντομάτας, έχει αναφερθεί επίσης από τους Rastogi et al (1993). Αντίθετα, σε νεαρά σπορόφυτα ρυζιού και σόγιας, που υποβλήθηκαν σε καταπονήσεις αλατότητας και

όξινου περιβάλλοντος, αντίστοιχα, τα επίπεδα του mRNA της ADC αυξήθηκαν ταυτόχρονα με την επαγωγή της ενεργότητάς της (Chattopadhyay et al, 1997, Nam et al, 1997). Επίσης, αλλαγές στα επίπεδα του μεταγράφου της ADC παρατηρήθηκαν κατά την καρπόδεση στο μπιζέλι με ή χωρίς την επίδραση διάφορων φυτικών ρυθμιστικών ουσιών (Perez-Amador et al, 1995). Πιθανόν, στα δύο παραπάνω συστήματα, τα νεαρά σπορόφυτα και τους νεαρούς καρπούς σε αύξηση, οι αλλαγές στο mRNA της ADC να οφείλονται στην αλληλεπίδραση του αναπτυξιακού σταδίου του ιστού, με τον υπό εξέταση παράγοντα. Το μετάγραφο της ADC αυξάνει ούτως ή άλλως κατά τη βλάστηση των σπόρων της σόγιας, χωρίς την επέμβαση της όξινης καταπόνησης (Nam et al, 1997), όπως αυξάνει και στις ωοθήκες του μπιζελιού αμέσως μετά τη γονιμοποίηση (Perez-Amador et al, 1995). Τέλος, στο *E. coli* το γονίδιο *speA* κωδικοποιεί τη βιοσυνθετική ADC και η έκφρασή του ρυθμίζεται αρνητικά από την πουτρεσκίνη και το cAMP. Προσθήκη 10 mM πουτρεσκίνης σε στελέχη του *E. coli* είχε ως αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφής του *speA* γονιδίου (Moore and Boyle, 1991).

Τα αποτελέσματα, που παρουσιάζονται σε αυτό το Κεφάλαιο και η μέχρι σήμερα βιβλιογραφική πληροφορία υποδεικνύουν, ότι τουλάχιστον στα φυτά, η ρύθμιση της ADC από εξωγενείς παράγοντες βρίσκεται σε μετα-μεταγραφικό, μεταφραστικό ή ακόμα και μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Οι Malmberg et al (1992) και οι Malmberg και Cellino (1994) απέδειξαν ότι η ADC της βρώμης κόβεται από ένα 66 kDa πρόδρομο πολυπεπίδιο σε δύο πολυπεπίδια 42 και 24 kDa. Η πρωτεολυτική αυτή σχάση είναι το αποτέλεσμα ενός ειδικού πρωτεολυτικού ενζύμου, που οδηγεί σε ενεργοποίηση της ADC. Ακόμα, οι Borell et al (1996) βρήκαν ότι εξωγενής σπερμίνη αναστέλλει αυτήν την “επεξεργασία” (processing) του προενζύμου της ADC.

6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ADC ΤΗΣ ΑΜΠΕΛΟΥ (*Vitis vinifera* L.)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Με τη χρήση των βακτηριακών φορέων έκφρασης pGEX1 και pMALc2 επιτεύχθηκε η έκφραση τμήματος 615 αμινοξικών υπολειμμάτων του cDNA της ADC της αμπέλου, ως υβριδικής πρωτεΐνης με την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) και την προσδεδεμένη στη μαλτόζη πρωτεΐνη (MBP), αντίστοιχα. Οι υβριδικές πρωτεΐνες καθαρίστηκαν με προπαρασκευαστική αποδιατακτική (SDS) ηλεκτροφόρηση ή/ και χρωματογραφία συγγένειας και χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοποίηση ποντικών και κουνελιού. Οι αντιοροί, που απομονώθηκαν και από τα δύο ζώα, αναγνωρίζουν σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από φύλλο, βλαστό, ρίζα και κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου, που υποβλήθηκαν σε western blot ανάλυση, κυρίως μία πρωτεϊνική ζώνη μεγέθους περίπου 80 kDa και σε μικρότερη ένταση άλλες πρωτεϊνικές ζώνες μικρότερου μεγέθους. Οι προάνοσοι οροί ουδεμία αντίδραση έδωσαν με πρωτεϊνικές ζώνες εκχυλισμάτων από ιστούς αμπέλου. Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από φύλλα και βλαστούς αμπέλου σε διαφορετικά οντογενετικά στάδια παρουσίασαν διαφορές, τόσο στην ποσότητα της πρωτεϊνικής ζώνης των 80 kDa όσο και στο πρότυπο των άλλων πρωτεϊνικών ζωνών, που αναγνωρίζει ο αντιορός, χωρίς όμως οι διαφορές αυτές να ακολουθούν τις αλλαγές στην ειδική ενεργότητα της ADC. Επίσης, western blot ανάλυση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κυτταροκαλλιεργειών αμπέλου με μεγάλες διαφορές στην ειδική ενεργότητα της ADC, δεν ανίχνευσε διαφορές στις ποσότητες τόσο της πρωτεϊνικής ζώνης μεγέθους 80 kDa όσο και των μικρότερου μεγέθους ζωνών, οι οποίες να συμβαδίζουν με τις αλλαγές στην ειδική ενεργότητα της ADC στα αντίστοιχα δείγματα. Η πέψη της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC, με την ειδική πρωτεάση “παράγοντας Xa” δημιούργησε πολυπεπτίδιο MB 90 kDa περίπου αντί των αναμενόμενων δύο πολυπεπτιδίων, μεγέθους 43 kDa και 66 kDa. Τέλος ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από βλαστό αμπέλου επώασθηκε με τον “παράγοντα Xa” και με την υβριδική πρωτεΐνη μαζί με τον “παράγοντα Xa”. Μετά την επώαση τα παρασκευάσματα υποβλήθηκαν σε western blot ανάλυση, όπου διαπιστώθηκε ότι ενώ ο “παράγοντας Xa” μόνος του δεν προκάλεσε μεταβολή στη ζώνη των 80 kDa, η υβριδική πρωτεΐνη μαζί με τον “παράγοντα Xa” τη διέσπασε,

εξαφανίζοντας την, παράγοντας δύο νέες ζώνες με μεγέθη περίπου 38 και 42 kDa. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν την πιθανότητα ύπαρξης αυτοκαταλυτικής πρωτεολυτικής ιδιότητας στην πρωτεΐνη της ADC, η οποία φαίνεται να ρυθμίζει μετα-μεταφραστικά τα επίπεδα ή/ και την ενεργότητά της, όπως έχει δειχθεί και σε άλλα ένζυμα της βιοσύνθεσης των πολυαμινών.

2.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η δομή και το μέγεθος των υπομονάδων του ενζύμου της ADC των ανώτερων φυτών δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί. Η μέχρι σήμερα βιβλιογραφία δε συμφωνεί για τον αριθμό και τα χαρακτηριστικά των υπομονάδων. Το ένζυμο από το λάθυρο έχει αναφερθεί ως εξαμερές με MB υπομονάδας 36-36,5 kDa (Ramakrishna and Adiga, 1975). Στη βρώμη, η ADC διαχωρίστηκε με χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε δύο κλάσματα: το κλάσμα A (MB 195 kDa), και το κλάσμα B (MB 118 kDa) (Smith, 1979), ο λόγος των MB των οποίων, όπως σημειώνει ο συγγραφέας, δεν υποδεικνύει ένα απλό πολυμερικό σύστημα. Σε αποδιατακτική SDS ηλεκτροφόρηση, ωστόσο, το ένζυμο της βρώμης έδωσε μια μοναδική ζώνη μεγέθους 39 kDa σύμφωνα με τους Flores και συνεργάτες (από Smith, 1985). Στο ρύζι, επίσης, η ADC μπορούσε να διαχωριστεί σε δύο κλάσματα: A (MB 174 kDa) και B (MB 88 kDa), που αντιστοιχούν σχεδόν τέλεια στο διμερές και μονομερές (από Smith, 1985). Νέα απομόνωση της ADC από το ρύζι, έδειξε ότι το ένζυμο είναι ομοτριμερές με MB υπομονάδας 63 kDa (Reggiani, 1994).

Πρόσφατα, η ομάδα του Malmberg απέδειξε ότι η ADC της βρώμης παράγεται σαν ένα πρόδρομο μόριο 66 kDa, το οποίο έπειτα από μετα-μεταφραστική πρωτεολυτική επεξεργασία, με τη βοήθεια ειδικής πρωτεάσης δίνει δύο πολυπεπίδια 42 και 24 kDa που συμμετέχουν στη δομή του ενεργού ενζύμου (Malmberg et al, 1992, Malmberg and Cellino, 1994). Ακόμη στην *Arabidopsis*, ενώ ένας cDNA κλώνος της ADC που απομονώθηκε, φέρει ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης που κωδικοποιεί πρωτεΐνη MB 76 kDa,

μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάστηκε εναντίον του προϊόντος του, αναγνωρίζει πρωτεΐνη MB 42 kDa σε western blot ανάλυση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων του φυτού, υποδεικνύοντας ότι και εδώ απαντάται μετα-μεταφραστική επεξεργασία της πρωτεΐνης της ADC (Watson and Malmberg, 1996). Αντίθετα, στην πεδινή κράμβη το ένζυμο βρέθηκε ομοτετραμερές με MB υπομονάδας 60 kDa (Das et al, 1996).

Εξίσου θολή είναι η εικόνα της έκφρασης της πρωτεΐνης της ADC στα φυτά. Αντισώματα εναντίον φυτικών ADCs έχουν παρασκευαστεί για το λάθυρο (πολυκλωνικό, Ramakrishna and Adiga, 1975), τη βρώμη (μονοκλωνικό και πολυκλωνικά, Malmberg et al, 1992 και πολυκλωνικό, Borrell et al, 1995), το ρύζι (πολυκλωνικό, Reggiani, 1994) και την *Arabidopsis* (μονοκλωνικό, Watson and Malmberg, 1996). Από αυτά, μόνο τα τρία τελευταία έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες έκφρασης της πρωτεΐνης της ADC με ανάλυση western blot. Οι Borrell et al (1995) έδειξαν ότι, ωσμωτική καταπόνηση σε φύλλα βρώμης αυξάνει την ανοσοεντοπιζόμενη ζώνη 24 kDa σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα παράλληλα με την ενεργότητα της ADC. Παρομοίως, αυξημένη σύνθεση και ενεργότητα της ADC αναφέρθηκε υπό αναερόβιες συνθήκες σε σπορόφυτα ρυζιού (Reggiani, 1994). Αντίθετα, η έλλειψη K^+ στην *Arabidopsis*, παρόλο που προκάλεσε δεκαπλασιασμό της ειδικής ενεργότητας της ADC σε σχέση με το μάρτυρα, δεν αύξησε την ανοσοεντοπιζόμενη πρωτεϊνική ζώνη 42 kDa (Watson and Malmberg, 1996).

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι, διαφορές στους μηχανισμούς ρύθμισης της έκφρασης της πρωτεΐνης της ADC υπάρχουν, τόσο μεταξύ των δύο κλάσεων των αγγειοσπέρμων (δικότυλα και μονοκότυλα) όσο και μεταξύ συγγενικών μελών της ίδιας κλάσης. Ο έλεγχος της έκφρασης της ADC με μετα-μεταφραστική επεξεργασία του πρόδρομου πεπτιδίου φαίνεται ότι υφίσταται στη βρώμη και την *Arabidopsis* (μονοκότυλο και δικότυλο, αντίστοιχα) αλλά όχι στο ρύζι και την πεδινή κράμβη (είδη της ίδιας οικογένειας με τη βρώμη και την *Arabidopsis*, αντίστοιχα). Ακόμα, ενώ στη βρώμη η ανοσοεντοπιζόμενη πρωτεΐνη συμβαδίζει με την ειδική ενεργότητα του ενζύμου της ADC, δε συμβαίνει το ίδιο στην *Arabidopsis*. Η ρύθμιση και άλλων ενζύμων της βιοσύνθεσης των

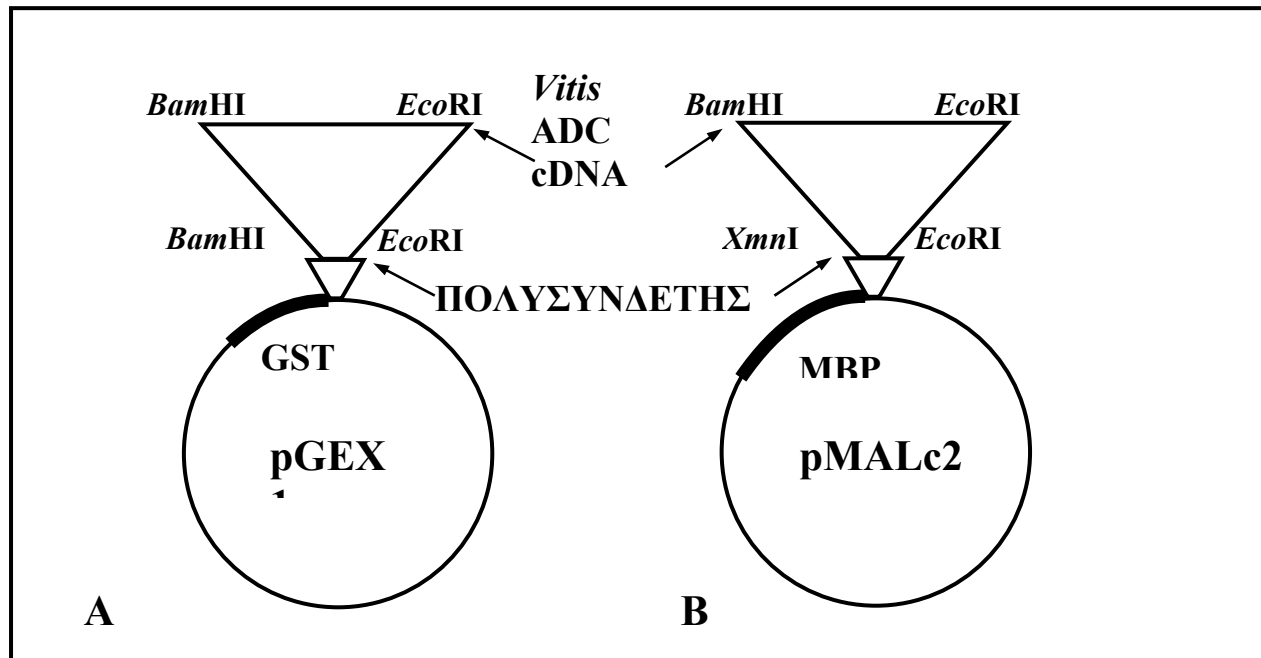
πολυαμινών έχει αποδειχθεί ότι υπόκειται σε μετα-μεταφραστικό έλεγχο. Τουλάχιστον στα θηλαστικά, τα επίπεδα της ODC ρυθμίζονται από τις πολυαμίνες μέσω της εξαρτώμενης από ενέργεια αποικοδόμησης του ενζύμου στα 26S πρωτεοσώματα με τη μεσολάβηση του αντιενζύμου της ODC (Hayashi and Murakami, 1995). Επίσης, η αποκαρβοξυλάση της S-αδενόσυλ-μεθειονίνης, τόσο στα θηλαστικά, όσο και στα φυτά, παράγεται ως προένζυμο που ωριμάζει με αυτοκαταλυτική πρωτεόλυση μεταξύ δύο υπολειμμάτων σερίνης (Heby and Persson, 1990, Schroder and Schroder, 1995).

Σε αυτό το Κεφάλαιο, περιγράφεται η έκφραση σε βακτήρια τμήματος 615 αμινοξικών υπολειμμάτων του cDNA της ADC της αμπέλου ως υβριδικής πρωτεΐνης με την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) και την προσδεδεμένη στη μαλτόζη πρωτεΐνη (MBP), ο καθαρισμός τους, η ανοσοποίηση ποντικών και κουνελιού με αυτές και η εξειδίκευση των αντιορών, που παρήχθησαν εναντίον της φυσικής πρωτεΐνης της ADC της αμπέλου. Δίνονται πληροφορίες για το μέγεθος και την ποσότητα της ανοσοεντοπιζόμενης πρωτεΐνης από διάφορους ιστούς αμπέλου σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια καθώς και σε κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου και γίνεται σύγκριση της έντασης της ανοσοεντοπιζόμενης πρωτεϊνικής ζώνης με τις ειδικές ενεργότητες του ενζύμου της ADC. Τέλος, παρουσιάζονται αποτελέσματα, που υποδεικνύουν την πιθανότητα ύπαρξης αυτοκαταλυτικής πρωτεολυτικής ιδιότητας στην πρωτεΐνη της ADC, η οποία πιθανόν να ρυθμίζει μετα-μεταφραστικά τα επίπεδα ή/ και την ενεργότητά της, όπως συμβαίνει και με άλλα ένζυμα της βιοσύνθεσης των πολυαμινών στα φυτά και σε άλλα βασίλεια.

4.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1.1. 4.3.1. Πλασμιδιακές Κατασκευές

Το τμήμα *Bam*HI-*Eco*RI, (1944 bp) του cDNA της ADC της αμπέλου παρεμβλήθηκε στην αντίστοιχη θέση του πολυσυνδέτη του βακτηριακού πλασμιδιακού φορέα έκφρασης pGEX1 (Amrad Corp. Ltd., Kew, Australia) (Εικ. 4.1A). Με τον τρόπο αυτό, αλληλουχία από το cDNA της ADC της αμπέλου, που κωδικοποιεί 615 αμινοξικά υπολείμματα, φέρει το κωδικόνιο τερματισμού και κομμάτι 93 bp από την 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή, ακολούθησε στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης την αλληλουχία της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST). Η κατασκευή αυτή κωδικοποιεί την υβριδική πρωτεΐνη GST-ADC μεγέθους περίπου 93 kDa.



Εικόνα 4.1. Οι δύο πλασμιδιακές κατασκευές έκφρασης των υβριδικών πρωτεϊνών GST-ADC (A) και MBP-ADC (B).

Το ίδιο τμήμα του cDNA της ADC της αμπέλου (τροποποιημένο, πριν την πέψη του με το περιοριστικό ένζυμο *EcoRI*, με το θραύσμα Klenow της DNA πολυμεράσης I σε τυφλό) εισήχθη στη θέση *XmnI-EcoRI* του βακτηριακού πλασμιδιακού φορέα έκφρασης pMAL-c2 (New England Biolabs Inc., Beverly, MA) (Εικ. 4.1B). Έτσι επιτεύχθηκε η ένθεση της αλληλουχίας από το cDNA της ADC της αμπέλου, που περιγράφεται παραπάνω, στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με την προσδεδεμένη στη μαλτόζη πρωτεΐνη (MBP). Η κατασκευή αυτή κωδικοποιεί την υβριδική πρωτεΐνη MBP-ADC μεγέθους, περίπου 109 kDa.

Με τις δύο παραπάνω κατασκευές έγινε μετασχηματισμός κυττάρων του στελέχους XL1-Blue της *E. coli* (Stratagene, La Jolla, CA). Και στις δύο περιπτώσεις η ένθεση του θραύσματος της ADC της αμπέλου στο σωστό πλαίσιο ανάγνωσης επιβεβαιώθηκε με μερικό προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA των πλασμιδιακών κατασκευών στην περιοχή σύνδεσης της πλασμιδιακής πρωτεΐνης (GST ή MBP) με την ADC.

6.1.2. 4.3.2. Επαγωγή Έκφρασης και Παραγωγή των Υβριδικών Πρωτεϊνών

Σε καλλιέργειες (2×10^8 κύτταρα, $OD_{600}=0,4-0,6$) των μετασχηματισμένων *E. coli* σε θρεπτικό μέσο LB με 0,2% γλυκόζη και 100 μg/ml αμπικιλίνης στους 37 °C, έγινε επαγωγή της έκφρασης των υβριδικών πρωτεϊνών με την προσθήκη 20 έως 200 μM τελική συγκέντρωση ισοπρόπυλ-1-θείο-β-D-γαλακτοζίτη (IPTG) και επώαση για 1-3 h στους 25-37 °C. Μετά το τέλος της επώασης, τα βακτηριακά κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στα 4.000 g για 20 min, στους 4 °C. Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα A (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA και 10 mM β-μερκαπτοαιθανόλη) που περιείχε 1 mM

PMSF και 10 μM leupeptin και υπέστη κατεργασία με υπερήχους στους 4 $^{\circ}\text{C}$, προκειμένου να σπάσουν τα βακτηριακά κύτταρα και να απελευθερωθούν οι πρωτεΐνες τους. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 20.000 g για 20 min στους 4 $^{\circ}\text{C}$ και το υπερκείμενο (ακαθάριστο πρωτεϊνικό εκχύλισμα), χρησιμοποιήθηκε ως πηγή των υβριδικών πρωτεϊνών.

6.1.3. 4.3.3. Καθαρισμός της Υβριδικής Πρωτεΐνης MBP-ADC με Χρωματογραφία Συγγένειας και Πέψη με τον “Παράγοντα Xa”

Το ακαθάριστο πρωτεϊνικό εκχύλισμα, μετά από αραιώση 1:5 με ρυθμιστικό διάλυμα A εφαρμόστηκε με ελεύθερη ροή (περίπου 60 ml/h) σε στήλη ρητίνης αμυλόζης (New England Biolabs), η οποία είχε εξισορροπηθεί προηγουμένως με 8 όγκους στήλης του ρυθμιστικού διαλύματος A. Ακολούθησε πλύσιμο της στήλης με 12πλάσιο του όγκου της ρυθμιστικό διάλυμα A. Η έκλουση της υβριδικής πρωτεΐνης έγινε με 10 mM μαλτόζης στο ρυθμιστικό διάλυμα A και συλλέχθηκαν τα 10 πρώτα κλάσματα όγκου 1 mL το καθένα.

Για την πέψη της υβριδικής πρωτεΐνης και την απομάκρυνση του τμήματος της προσδεδεμένης στη μαλτόζη πρωτεΐνης με την ειδική πρωτεάση “παράγοντα Xa”, παρασκεύασμα της υβριδικής πρωτεΐνης (1 mg/mL) σε 2 mM CaCl_2 στο ρυθμιστικό διάλυμα A, επώασθη με τον “παράγοντα Xa” (New England Biolabs) σε αναλογία 1:50 (w/w, “παράγοντας Xa” : υβριδική πρωτεΐνη) σε θερμοκρασία δωματίου για 3, 6, 12 και 24 h.

6.1.4. 4.3.4. Αποδιατακτική Ηλεκτροφόρηση των Πρωτεϊνών σε Πήκτωμα Πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Οι ολικές πρωτεΐνες από τα βακτήρια, τους ιστούς και τις κυτταροκαλλιέργειες της αμπέλου διαχωρίστηκαν με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) μίας διάστασης και το σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων του Laemmli (Laemmli, 1970), χρησιμοποιώντας επίπεδα πηκτώματα 16 cm × 18 cm και πάχους 1,5 mm. Η συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης (acrylamide: bis, 30: 0,8) στα πηκτώματα διαχωρισμού (resolving) ήταν 10% (w/v) ή γραμμικές διαβαθμίσεις 10-18% (w/v) σε 375 mM Tris-HCl, pH 8,8 και στα πηκτώματα συσσώρευσης (stacking) 4% (w/v) σε 125 mM Tris-HCl, pH 6,8. Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών έγινε στα 20 mA για το πήκτωμα συσσώρευσης και στα 25 mA για το πήκτωμα διαχωρισμού, σε θερμοκρασία δωματίου, παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 25 mM Tris - 192 mM γλυκίνης, pH 8,3 και 0,1% SDS σε μεγάλη συσκευή ηλεκτροφορησης της LKB (LKB-Producter AB, Bromma, Sweden). Τα δείγματα επώασθησαν πριν την ηλεκτροφόρηση στους 100 °C για 5 min παρουσία 3% SDS και 5% β-μερκαπτοαιθανόλης.

Με τη συμπλήρωση της ηλεκτροφόρησης, έγινε χρώση των πρωτεϊνών στο πήκτωμα με 0,1% Coomassie brilliant blue R-250 σε 50% (v/v) μεθανόλη και 10% (v/v) οξικό οξύ για 2 h και αποχρωματίστηκαν σε διάλυμα 10% (v/v) μεθανόλης και 7% (v/v) οξικού οξέος. Τα MB εκτιμήθηκαν, χρησιμοποιώντας τις πρωτεΐνες δείκτες MB της Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA): φωσφορυλάση B (97 kDa), αλβουμίνη (67 kDa), οβαλβουμίνη (45 kDa), καρβονική ανυδράση (31 kDa), αναστολέα της τρυψίνης (21,5 kDa) και α-λακταλβουμίνη (14,4 kDa).

Η παρασκευαστική αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση έγινε με τον ίδιο τρόπο με μόνη διαφορά ότι κατά την προετοιμασία του πηκτώματος συσσώρευσης χρησιμοποιήθηκε ενιαίο χτένι, αντί εκείνου με τις πολλαπλές θέσεις φορτώματος, που χρησιμοποιείται συνήθως για την ανάλυση πολλών δειγμάτων.

6.1.5. 4.3.5. Ανοσοποίηση και Παραγωγή Αντισωμάτων

Αντισώματα εναντίον των δύο υβριδικών πρωτεϊνών της ADC της αμπέλου (GST-ADC και MBP-ADC), αναπτύχθηκαν σε 10 ποντίκια και ένα λευκό κουνέλι Νέας Ζηλανδίας, στα εργαστήρια Ανοσολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης και Εφαρμοσμένης Βιοχημείας και Ανοσολογίας του I.M.B.B., I.T.E., αντίστοιχα. Στα ζώα έγινε ένεση υποδορίως μίας δόσης της καθαρισμένης σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης υβριδικής πρωτεΐνης (περίπου 50 και 500 μg πρωτεΐνης για το κάθε ζώο, αντίστοιχα). Το πήκτωμα αναμείχθηκε με πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freund σε αναλογία 1:1. Υπενθυμίσεις έγιναν 3 και 6 εβδομάδες αργότερα στο κουνέλι (στα ποντίκια έγινε μόνο η πρώτη), χρησιμοποιώντας τη μισή ποσότητα πρωτεΐνης, γαλακτωματοποιημένης με ατελές ανοσοενισχυτικό του Freund σε αναλογία 1:1. Δύο εβδομάδες μετά την τελευταία υπενθύμιση, και κάθε δύο εβδομάδες για διάστημα 2 μηνών, γίνονταν αφαίμαξη του κουνελιού, ενώ στα ποντίκια έγινε ολική αφαίμαξη. Προάνοσος ορός συλλέχθηκε, και από τα δύο ζώα, πριν την ανοσοποίηση.

6.1.6. 4.3.6. Ανάλυση Western Blot και Ανοσοεντοπισμός της ADC

Οι ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένες πρωτεΐνες σε πηκτώματα SDS-πολυακρυλαμίδης, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (0,2 μm μέγεθος πόρων, Schleicher & Schuell, Keene, NH) όπως περιγράφεται από τους Towbin et al. (1979). Το διάλυμα μεταφοράς περιείχε 25 mM Tris-192 mM γλυκίνη και 20% (v/v) μεθανόλη. Η μεταφορά έγινε ηλεκτροφορητικά στα 40 V για 12 h ή στα 90 V για 2 h, χρησιμοποιώντας τη συσκευή LKB 2005 Transphor. Μετά το τέλος της μεταφοράς των πρωτεϊνών, η

μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φυσιολογικού ορού με φωσφορικά [PBS: 0,89% (w/v) NaCl, 0,02% (w/v) KCl, 0,115% (w/v) Na₂HPO₄, 0,02% (w/v) KH₂PO₄]. Οι ελεύθερες θέσεις πάνω στις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης δεσμεύθηκαν με 2% (w/v) BSA σε PBS για 1 h. Οι μεμβράνες πλύθηκαν 3 φορές από 5 min, με διάλυμα πλύσης [PBS συμπληρωμένο με 0,05% (v/v) Tween-20] και επώασθησαν με το αντίσωμα της ADC (1:500 και 1:2.000 αραιώση για το αντίσωμα από τα ποντίκια και το κουνέλι, αντίστοιχα), υπό ελαφρά ανάδευση για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου ή για 12 h στους 4 °C. Μετά το τέλος της επώασης με το αντίσωμα, οι μεμβράνες πλύθηκαν 5 φορές των 5 min με το διάλυμα πλύσης και επώασθησαν για 1 h με το δεύτερο αντίσωμα [ραφανιδική υπεροξειδάση (horseradish peroxidase) συζευγμένη σε anti-mouse IgG ή αλκαλική φωσφατάση συζευγμένη σε anti-rabbit IgG, αραιώση 1:5.000]. Οι αραιώσεις του πρώτου και του δεύτερου αντισώματος έγιναν σε PBS, που περιείχε 1% (w/v) BSA και 0,05% (v/v) Tween-20. Μετά από πλύσιμο των μεμβρανών τα σύμπλοκα αντιγόνου-αντισώματος έγιναν ορατά ανάλογα με το συζευγμένο ένζυμο με την 4-chloro-1-naphthol αντίδραση ανάπτυξης χρώματος στην περίπτωση της ραφανιδικής υπεροξειδάσης και με την BCiP (Bromo-Chloro-indolyl-Phosphate) αντίδραση ανάπτυξης χρώματος στην περίπτωση της αλκαλικής φωσφατάσης. Το διάλυμα αντίδρασης ήταν στην πρώτη περίπτωση PBS, το οποίο περιείχε 0,6 mg/ mL 4-chloro-1-naphthol (διαλυμένη σε 10% μεθανόλη, τελική συγκέντρωση) και 0,03% (v/v) H₂O₂ και στη δεύτερη 100 mM διαιθανολαμίνης με 0,1 mg/ mL Nitroblue tetrazolium και 0,05 mg/ mL BCiP.

6.1.7. 4.3.7. Ανοσοκατακρήμνιση

Ανοσοκατακρήμνιση της ADC από ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα φύλλων, βλαστών και κυτταροκαλλιιεργειών αμπέλου έγινε με επώαση του πρωτεϊνικού παρασκευάσματος, στο οποίο είχε προστεθεί 0,89% (w/v) NaCl, με διάφορους όγκους του αντιορού για

1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Τα σύμπλοκα αντιγόνου-αντισώματος, που σχηματίστηκαν, κατακρημνίσθηκαν με τη βοήθεια επώασης 1 h με sepharose-πρωτεΐνη A σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στα 10.000 g για 10 min. Στο υπερκείμενο προσδιορίστηκε η ενζυμική ενεργότητα της ADC, ενώ το ανοσοκατακρήμνισμα πλύθηκε δύο φορές με 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, και επαναδιαλύθηκε σε μικρό όγκο διαλύματος 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 3% (w/v) SDS, 5% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλης και 10% (v/v) γλυκερόλης. Μετά από επώαση στους 100 °C για 5 min, για την αποδιάταξη των πρωτεϊνικών συμπλόκων, οι ανοσοκατακρημνισμένες πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με αποδιατακτική (SDS) ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα πολυακρυλαμίδης 10% (w/v) και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, όπως περιγράφεται παραπάνω.

6.1.8. 4.3.8. Άλλες Μέθοδοι

Η πέψη πλασμιδίων και ευθύγραμμων μορίων DNA με περιοριστικά ένζυμα, η τροποποίηση των άκρων μορίων DNA σε τυφλά με τη χρήση του θραύσματος Klenow της DNA πολυμεράσης I, η απομόνωση τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης μετά από ηλεκτρέκλυση, οι αντιδράσεις σύνδεσης μορίων DNA με το ένζυμο λιγάση, ο μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με τις πλασμιδιακές κατασκευές pGEX1-ADC και pMALc2-ADC, τα θρεπτικά μέσα καλλιέργειας των βακτηρίων και άλλες ευρέως εφαρμοζόμενες τεχνικές της μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιήθηκαν, έγιναν σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχουν οι προμηθεύτριες εταιρίες για τα προϊόντα τους και τους Sambrook et al (1989). Ο μερικός προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των πλασμιδιακών κατασκευών, για την επιβεβαίωση ότι η ένθεση έγινε στο σωστό πλαίσιο ανάγνωσης, έγινε όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι του Κεφαλαίου 2.

Η *in vitro* καλλιέργεια φυτών και κυτταροκαλλιέργειών αμπέλου, η εκχύλιση των ολικών πρωτεϊνών και ο ποσοτικός τους προσδιορισμός από ιστούς και κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου καθώς και ο προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας της ADC έγινε όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι του Κεφαλαίου 1.

Τα αποχρωματισμένα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης μετά τη χρώση τους για την εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών, φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Kodak DC120 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY) και ο υπολογισμός των MB των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με το πρόγραμμα Kodak Digital Science 1D Analysis Software. Οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, μετά την αντίδραση ανάπτυξης χρώματος, ψηφιοποιήθηκαν σε σαρωτή HP ScanJet (Hewlett Packard, Paco Alto, CA) και ο υπολογισμός των MB των ανοσοεντοπισμένων πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με το παραπάνω πρόγραμμα.

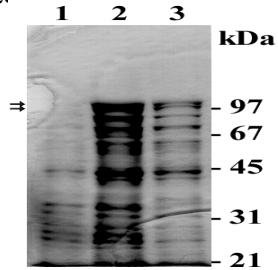
4.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1.9. 4.4.1. Παραγωγή και Καθαρισμός των Υβριδικών Πρωτεϊνών

Προκειμένου να παραχθεί αντίσωμα εναντίον της ADC της αμπέλου, χρησιμοποιήθηκε ως αντιγόνο εκφρασμένη σε βακτήρια πρωτεΐνη, μέσω των πλασμιδιακών κατασκευών που περιγράφονται στα Υλικά και Μέθοδοι. Στα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα με την κατασκευή pGEX1-ADC η επαγωγή της έκφρασης της υβριδικής πρωτεΐνης GST-ADC ήταν επιτυχής, πλην όμως το σύνολό της βρισκόταν στα κυτταρικά έγκλειστα (inclusion bodies) σε αδιάλυτη μορφή. Η υβριδική πρωτεΐνη παρέμεινε στα κυτταρικά έγκλειστα και όταν η επαγωγή της έκφρασής της έγινε με πολύ χαμηλή τελική συγκέντρωση IPTG (20 μ M) και σε χαμηλή θερμοκρασία (25 °C). Για το λόγο αυτό, η υβριδική πρωτεΐνη GST-ADC καθαρίστηκε με προπαρασκευαστική αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση, μετά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων με επώαση 10 min στους 100 °C σε διάλυμα που περιείχε 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 3% (w/v) SDS, 5% (v/v) β -μερκαπτοαιθανόλη και 10% (v/v) γλυκερόλη.

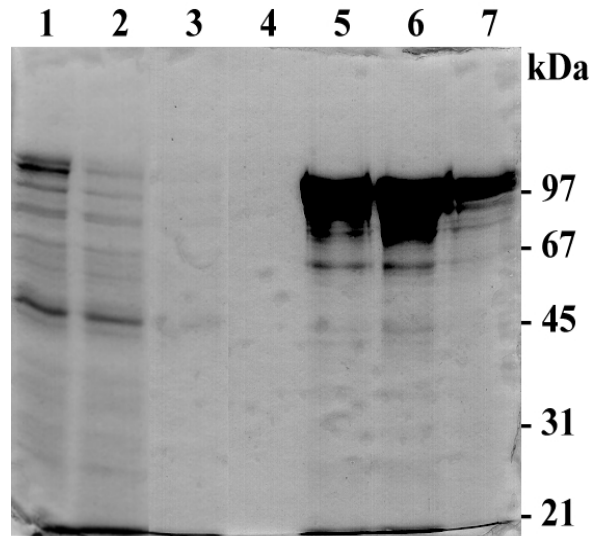
Η επαγωγή της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC έγινε επιτυχώς (Εικ. 4.2) και σε μεγάλο ποσοστό βρισκόταν στο ακαθάριστο πρωτεϊνικό εκχύλισμα των βακτηριακών κυττάρων μετά την κατεργασία τους με υπερήχους.

Το ακαθάριστο πρωτεϊνικό εκχύλισμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία συγγένειας σε ρητίνη αμυλόζης και οι πρωτεΐνες, που δεσμεύθηκαν στη ρητίνη, εκλούσθηκαν με μαλτόζη. Ανάλυση των κλασμάτων, που συλλέχθηκαν με SDS αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση, έδειξε ένα πρότυπο πολλαπλών πρωτεϊνικών ζωνών από τις οποίες οι τρεις με τα μεγαλύτερα MB, αντιπροσώπευαν περισσότερο από το 95% της ολικής πρωτεΐνης (Εικ. 4.3 και 4.5). Το MB της



Εικόνα 4.2. Πρωτεϊνική σύσταση, μετά από SDS αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση, των βακτηριακών κυττάρων με την πλασμιδιακή κατασκευή έκφρασης της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC πριν την επαγωγή της (στήλη 1), μετά την επαγωγή της με 50 μ M IPTG (2) και των διαλυτών πρωτεϊνών των βακτηριακών κυττάρων μετά την επαγωγή (3). Τα βέλη δείχνουν τα πολυπεπίδια που εμφανίζονται μετά την επαγωγή. Η θέση των δεικτών MB σε kDa φαίνονται στα δεξιά της Εικόνας.

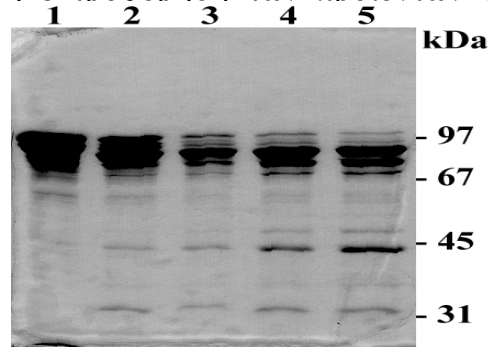
υψηλότερης ζώνης, η οποία ήταν και η αφθονότερη, ήταν μεγαλύτερο από 105 kDa (πολύ κοντά στο προβλεπόμενο 109 kDa), ενώ των δύο χαμηλότερων υπολογίσθηκε στα 97 και 93 kDa, αντίστοιχα (Εικ. 4.5). Μείωση του χρόνου έκφρασης στα βακτήρια, δεν άλλαξε την ποσοτική αναλογία μεταξύ των τριών πρωτεϊνικών ζωνών (δε δείχνεται).



Εικόνα 4.3. Αποδιατακτική SDS ηλεκτροφόρηση δειγμάτων κατά τον καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας σε ρητίνη αμυλόζης της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC. Το ακαθάριστο πρωτεϊνικό εκχύλισμα των βακτηριακών κυττάρων, που προέκυψε μετά την κατεργασία με υπέρηχους (στήλη 1), πρωτεΐνες που δε δεσμεύτηκαν στη στήλη (2), πρωτεΐνες που απομακρύνθηκαν με το πλύσιμο (3), το πρώτο (4), το δεύτερο (5), το τρίτο (6) και το τέταρτο (7) κλάσμα κατά την έκλυση με 10 mM μαλτόζη.

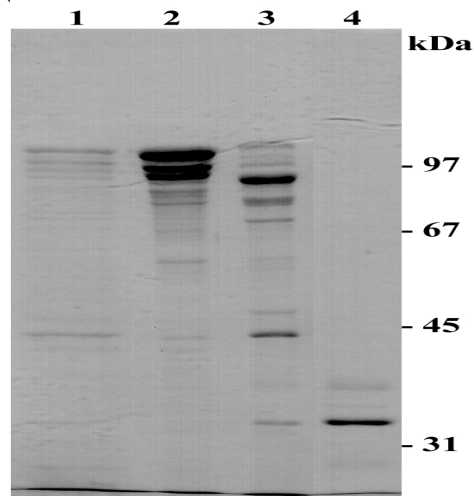
6.1.10. 4.4.2. Πέψη της Υβριδικής Πρωτεΐνης MBP-ADC με τον “Παράγοντα Χα”

Η πέψη της καθαρισμένης με χρωματογραφία συγγένειας υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC με την ειδική πρωτεάση “παράγοντα Χα”, αναμενόταν να διαχωρίσει τα δύο κομμάτια της υβριδικής πρωτεΐνης, δίνοντας, για το πλήρες μόριο τουλάχιστον, δύο πολυπεπίδια μεγέθους 43 και 66 kDa (αντιστοιχούν στο κομμάτι της MBP και στο κομμάτι της ADC της αμπέλου). Αποδιατακτική SDS ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης έδειξε (Εικ. 4.4 και 4.5) ότι ενώ οι



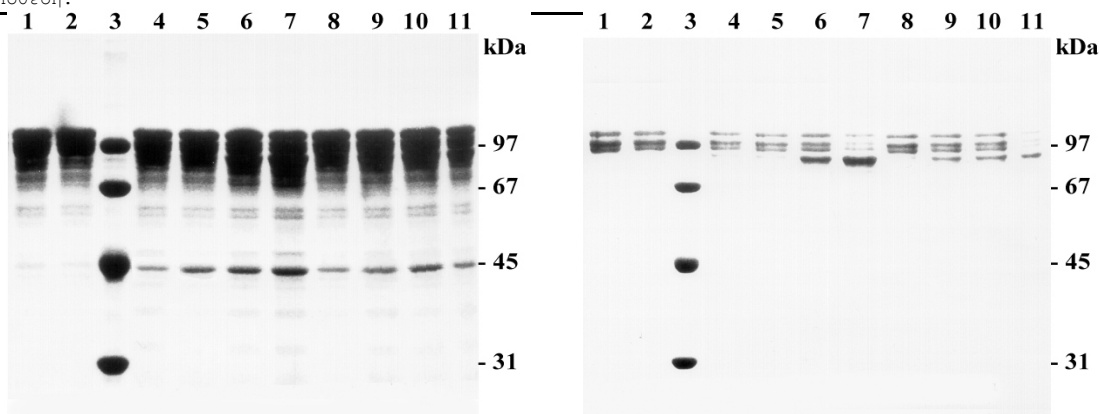
Εικόνα 4.4. Αποδιατακτική SDS ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης παρασκευάσματος της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC με τον “παράγοντα Χα”. Παρασκεύασμα της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC (20 μ g) επώασθη με 0,4 μ g του “παράγοντα Χα” για 0 (στήλη 1), 3 (2), 6 (3), 12 (4) και 24 h (5).

τρεις κύριες ζώνες του καθαρισμένου με χρωματογραφία συγγένειας παρασκευάσματος της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC μειώθηκαν μέχρι εξαφάνισης με την πρόοδο της πέψης, δεν εμφανίσθηκαν ανάλογης έντασης πρωτεϊνικές ζώνες στο ύψος των 66-50 kDa (ούτε αυξήθηκε στο ίδιο ποσοστό η ένταση της πρωτεϊνικής ζώνης των 43 kDa). Αντίθετα, με την πρόοδο της πέψης συσσωρεύτηκε μία πρωτεϊνική ζώνη MB περίπου 90 kDa και σε μικρότερο βαθμό τρεις πρωτεϊνικές ζώνες με MB μεταξύ των 70 και 80 kDa (Εικ. 4.4 και 4.5).



Εικόνα 4.5. Αποδιατακτική SDS ηλεκτροφόρηση δειγμάτων κατά τον καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας σε ρητίνη αμυλόζης της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC και την πέψη της με τον “παράγοντα Χα”. Το ακαθάριστο πρωτεϊνικό εκχύλισμα των βακτηριακών κυττάρων που προέκυψε μετά την κατεργασία με υπέρηχους (στήλη 1), η υβριδική πρωτεΐνη MBP-ADC μετά την έκλυση από τη ρητίνη αμυλόζης (15 μ g, 2), τα προϊόντα της πέψης παρασκευάσματος της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC με τον “παράγοντα Χα” (10 μ g της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC επώασθηκαν με 0,2 μ g του “παράγοντα Χα” για 24 h, 3) και 1,5 μ g πρωτεΐνης του “παράγοντα Χα” (4).

Η αναμενόμενη αμινοξική αλληλουχία του κομματιού της ADC της αμπέλου, που περιέχεται στην υβριδική πρωτεΐνη MBP-ADC δεν έχει ειδική θέση για τον "παράγοντα Xa" (Ile-Glu-Gly-Arg) ώστε να δικαιολογείται η ανυπαρξία πρωτεϊνικής ζώνης στα 66 kDa. Για να αιτιολογηθεί το φαινόμενο έγινε η εξής υπόθεση: τουλάχιστον ένα από τα παραγόμενα πρωτεϊνικά μόρια, μετά την απομάκρυνση του κομματιού 43 kDa της MBP έχει κάποια ειδική πρωτεολυτική δράση τόσο στον εαυτό του όσο και στα τρία υβριδικά πρωτεϊνικά μόρια της MBP-ADC. Για να ελεγχθεί η υπόθεση, παρασκευάσαμε της υβριδικής πρωτεΐνης (καθαρισμένο με χρωματογραφία συγγένειας) επώασθη για 3, 6, 12 και 24 h με 5% και 2% της ποσότητάς της (w/w) με παρασκευάσμα της υβριδικής πρωτεΐνης, που είχε επωασθεί προηγουμένως με τη συνιστώμενη από τον κατασκευαστή ποσότητα του "παράγοντα Xa" για 24 h (η συγκέντρωση του "παράγοντα Xa" τελικά ήταν 20 και 50 φορές μικρότερη από τη βέλτιστη). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.6, η αποδιατακτική SDS ηλεκτροφόρηση των προϊόντων έδειξε τη συσσώρευση μίας πρωτεϊνικής ζώνης MB 90 kDa περίπου, με το χρόνο της επώασης, γεγονός που υποστηρίζει την παραπάνω υπόθεση.



A

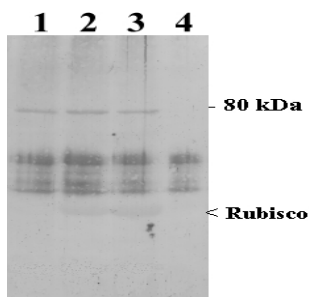
B

Εικόνα 4.6. (A) Αποδιατακτική SDS ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της επώασης σε θερμοκρασία δωματίου παρασκευάσματος της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC (20 μg) με 1 μg (στήλες 4-7) και 0,4 μg (στήλες 8-11) παρασκευάσματος της που είχε προηγουμένως επωασθεί για 24 h με τη συνιστώμενη από τον κατασκευαστή ποσότητα του "παράγοντα Xa", για 3 h (στήλες 4 και 8), 6 h (5 και 9), 12 h (6 και 10) και 24 h (7 και 11). Στις στήλες 1 και 2, παρασκευάσμα της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC (20 μg), που επώασθη για 24 h με 0,02 και 0,008 μg του "παράγοντα Xa" (την ποσότητα, δηλαδή, που υπήρχε τελικά στις αντιδράσεις των στηλών 4-7 και 8-11, αντίστοιχα) και στη στήλη 3 πρωτεΐνες δείκτες MB. (B) Φωτογραφία του ίδιου πηκτώματος με μεγαλύτερη ένταση διερχόμενου φωτός, όπου φαίνονται καθαρότερα οι κύριες εξαφανιζόμενες και νεοεμφανιζόμενες πρωτεϊνικές ζώνες.

Λόγω των παραπάνω, το παρασκευάσμα της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC μετά τη χρωματογραφία συγγένειας υποβλήθηκε σε προπαρασκευαστική αποδιατακτική SDS ηλεκτροφόρηση, από την οποία απομονώθηκε η με μεγαλύτερο MB πρωτεϊνική ζώνη και χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση του κουνελιού και τις απαραίτητες υπενθυμίσεις.

6.1.11.4.4.3. Εξειδίκευση των Αντιορών των Ποντικών και του Κουνελιού Εναντίον της ADC της Αμπέλου

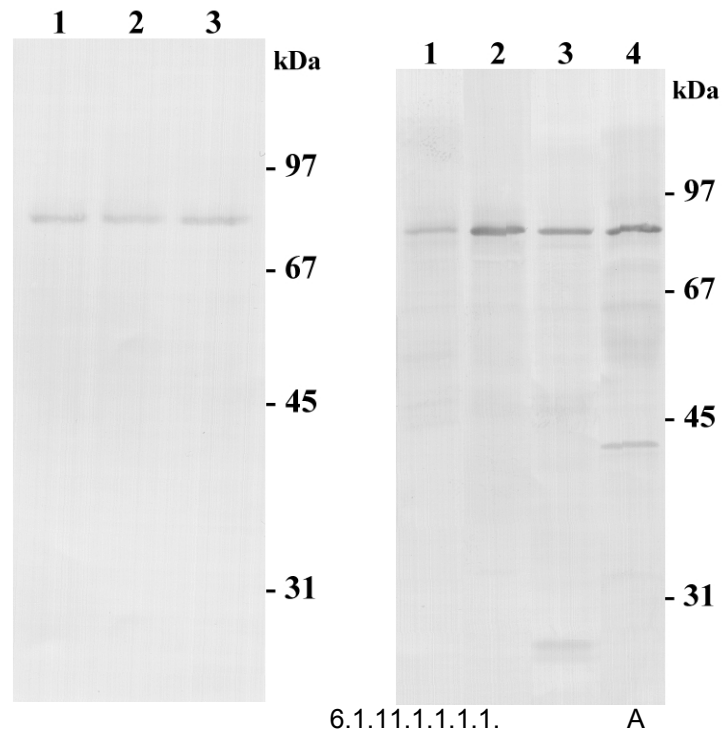
Οι ειδικοί αντιοροί που παρασκευάστηκαν από τα ποντίκια και το κουνέλι εναντίον των υβριδικών πρωτεϊνών GST-ADC και MBP-ADC αντίστοιχα, χρησιμοποιήθηκαν σε western blot ανάλυση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από φύλλα, βλαστούς και ρίζες αμπέλου. Τα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τους ιστούς της αμπέλου, αναλύθηκαν με αποδιατακτική SDS ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα 10% πολυακρυλαμίδης, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης και οι ανοσοαντιδρούσες πρωτεΐνες ανιχνεύθηκαν με τους αντιορούς από τα ποντίκια και το κουνέλι. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.7, ο αντιορός από τα ποντίκια αντιδρά με δύο πρωτεϊνικές ζώνες: εντονότερα με ζώνη MB 80 kDa περίπου και ασθενέστερα με ζώνη MB 55 kDa (αντιστοιχεί στη μεγάλη υπομονάδα της Rubisco με βάση τη σχετική ποσότητα και την ιστοειδικότητα). Αντιορός από ποντίκια εναντίον της GST πρωτεΐνης δεν



Εικόνα 4.7. Ανάλυση western blot πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από ρίζα (στήλη 1), βλαστό (2) και φύλλο (3) *in vitro* ανεπτυγμένων φυτών αμπέλου. Ολικές πρωτεΐνες (20 μg) από τους παραπάνω ιστούς, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, μετά την ανάλυσή τους με SDS αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση, η οποία επώασθη με τον αντιορό που παρασκευάστηκε στα ποντίκια εναντίον της υβριδικής πρωτεΐνης GST-ADC σε αραιώση 1:500 για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου. Οι πρωτεϊνικές ζώνες εμφανίστηκαν μετά από χρώση με την αντίδραση της ραφανιδικής περοξειδάσης. Στη στήλη 4 φαίνεται το ψευδές αποτέλεσμα που δίνει το διάλυμα επεξεργασίας των δειγμάτων (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 3% SDS και 5% β-μερκαπτοαιθανόλη).

ανίχνευσε πρωτεϊνική ζώνη στο MB των 80 kDa (δε δείχνεται). Παρόλα αυτά, ο χαμηλός τίτλος του αντιορού, που παρασκευάστηκε στα ποντίκια (χρήση του σε αραιώση 1:500), επέβαλε την επανάληψη της προσπάθειας παραγωγής αντισώματος εναντίον της ADC της αμπέλου.

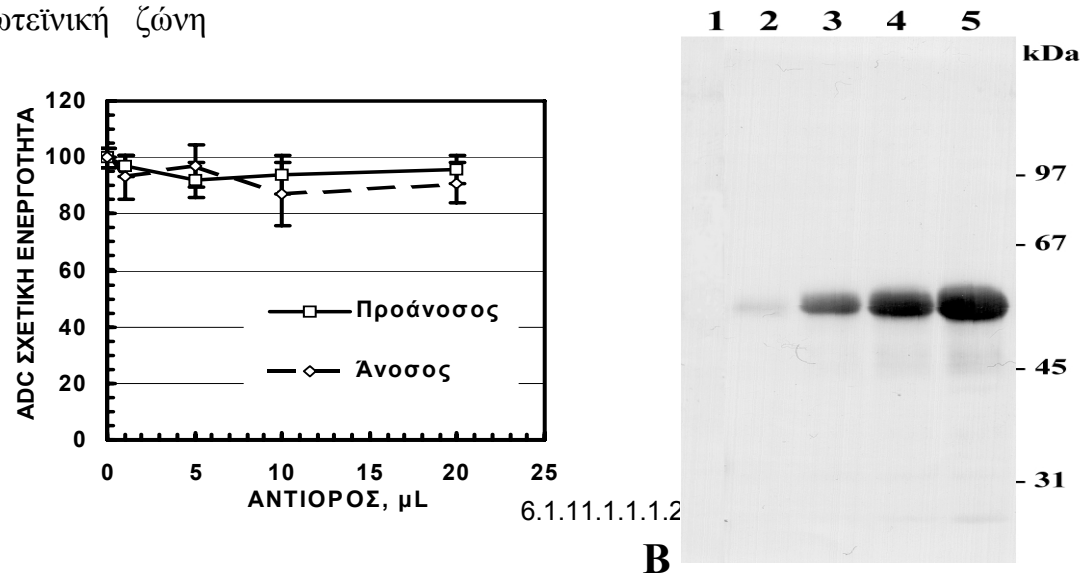
Ο αντιορός που παρασκευάστηκε στο κουνέλι εναντίον της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC, σε ανάλυση western blot ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιστών της αμπέλου, αντιέδρασε με μία πρωτεϊνική ζώνη μεγέθους 80 kDa περίπου, όταν η επώαση έγινε στους 4 °C (Εικ. 4.8A) και ασθενέστερα με πρωτεϊνικές ζώνες MB 25 και 43 kDa περίπου από το εκχύλισμα του φύλλου και των κυτταροκαλλιιεργειών, όταν η επώαση έγινε σε θερμοκρασία δωματίου (Εικ. 4.8B). Πολυκλωνικό αντίσωμα εναντίον της MBP δεν ανίχνευσε καμία πρωτεϊνική ζώνη σε western blot ανάλυση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων αμπέλου (δε δείχνεται).



Εικόνα 4.8. Ανάλυση western blot πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από ιστούς *in vitro* ανεπτυγμένων φυτών και κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου. Ολικές πρωτεΐνες (20 μ g), μετά την ανάλυσή τους με αποδιατακτική SDS ηλεκτροφόρηση, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, οι οποίες επώασθησαν με τον αντιγόνο εναντίον της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC, που παρασκευάστηκε στο κουνέλι σε αραιώση 1:2000 για 12 h στους 4 °C (A) ή για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου (B). Οι πρωτεϊνικές ζώνες εμφανίστηκαν μετά από χρώση με την αντίδραση της αλκαλικής φωσφατάσης. Ολικές πρωτεΐνες ρίζας (στήλη 1), βλαστού (2), φύλλου (3) και κυτταροκαλλιεργειών (4).

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε μελέτη της συμπεριφοράς του ενζύμου της ADC από φύλλα αμπέλου με ποσοτική ανοσοκατακρήμιση. Σταθερή ποσότητα ενζυμικού εκχυλίσματος από φύλλα επώασθηκε με αυξανόμενους όγκους του αντιγόνου εναντίον της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC και η ενεργότητα της ADC μετρήθηκε στα υπερκείμενα μετά την αφαίρεση των

συμπλόκων αντιγόνου-αντισώματος με επώαση με Sepharose-πρωτεΐνη A και φυγοκέντρηση. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.9A, η αύξηση της συγκέντρωσης του αντιορού δεν προκάλεσε ανάλογη μείωση της ενζυμικής ενεργότητας της ADC. Τα αντίστοιχα ιζήματα αναλύθηκαν σε αποδιατακτική SDS ηλεκτροφόρηση, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης και σε αυτές έγινε ανίχνευση των πρωτεϊνών που αντιδρούν με τον αντιορό εναντίον της MBP-ADC. Στην εικόνα 4.9B φαίνεται ότι δεν υπάρχει πρωτεϊνική ζώνη

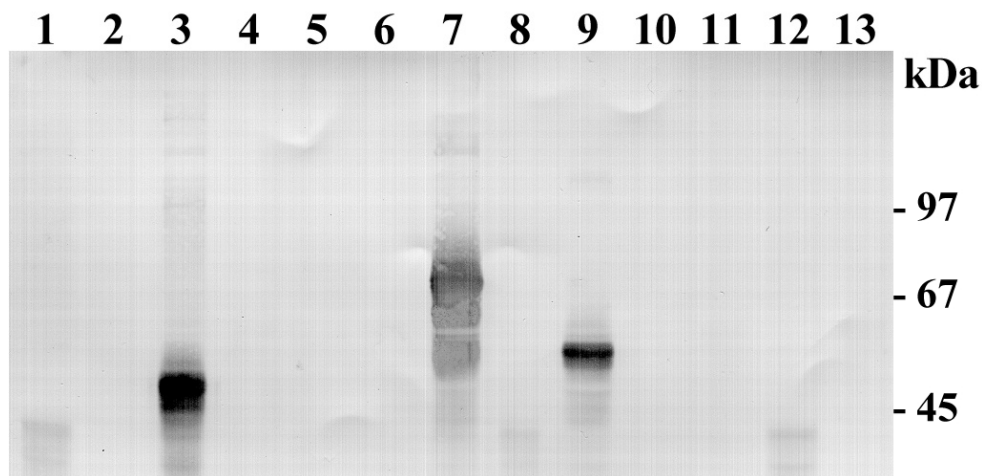


Εικόνα 4.9. (A) Καμπύλη ανοσοτιτλοδότησης της ADC από φύλλο αμπέλου. Εκχύλισμα ολικών πρωτεϊνών του φύλλου (400 μg, με ειδική ενεργότητα ADC 3,5 nmoles CO₂ h⁻¹ mg⁻¹ πρωτ.), επώασθησαν με αυξανόμενους όγκους του αντιορού που παρασκευάστηκε εναντίον της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC στο κουνέλι ή προάνοσου ορού του ίδιου ζώου. Τα σύμπλοκα αντιγόνου-αντισώματος απομακρύνθηκαν, μετά από επώαση με Sepharose-πρωτεΐνη A, με φυγοκέντρηση και στα υπερκείμενα προσδιορίστηκε η ενζυμική ενεργότητα της ADC. (B) Ανάλυση western blot των πρωτεϊνών του ανοσοκατακρημνίσματος από 0, 1, 5, 10 και 20 μL του αντιορού (στήλες 1, 2, 3, 4 και 5, αντίστοιχα) μετά από επώαση για 5 min στους 100 °C σε διάλυμα 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 3% SDS και 5% β-μερκαπτοαιθανόλης και ανάλυση με

αποδιατακτική SDS ηλεκτροφόρηση. Η μεμβράνη επώασθη με τον αντιορό εναντίον της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC σε αραιώση 1:2000 για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου.

μεγέθους μεγαλύτερου από τα 55 kDa (αντιστοιχεί στη βαριά αλυσίδα των αντισωμάτων), που να ανιχνεύεται από τον αντιορό. Ποσοτική ανοσοκατακρήμνιση σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από βλαστό και ρίζα αμπέλου έδωσε το ίδιο αποτέλεσμα (δε δείχνεται).

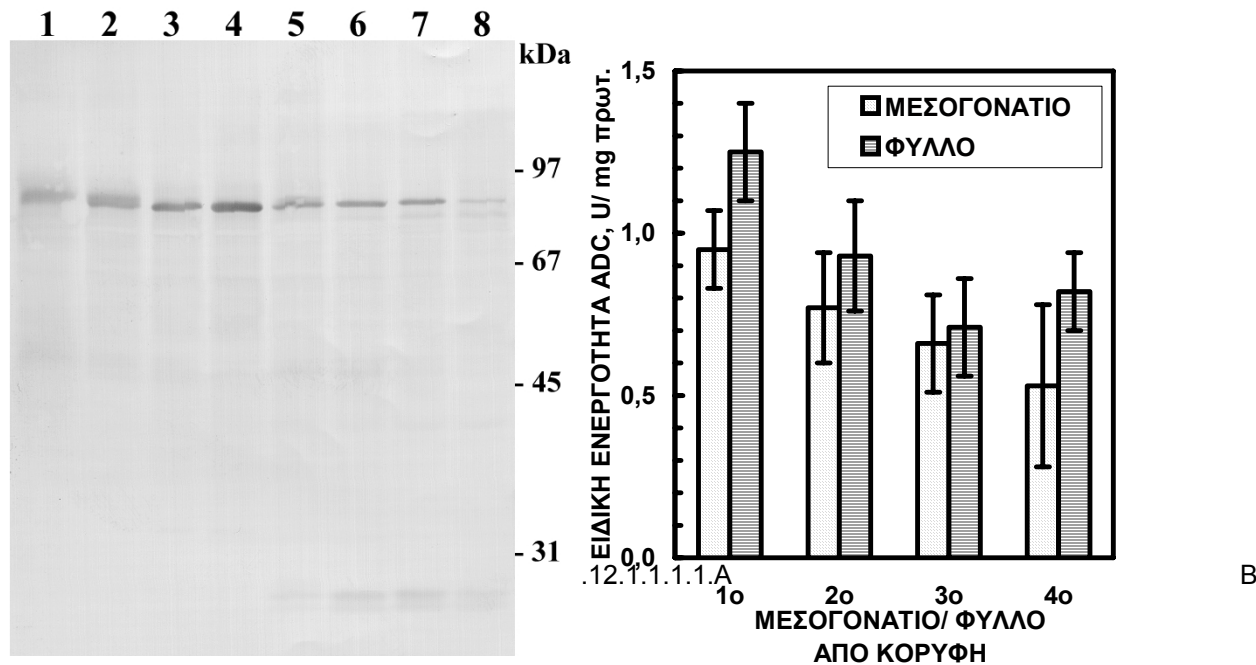
Για να αποδειχθεί η ειδικότητα του αντιορού εναντίον της ADC της αμπέλου, χρησιμοποιήθηκε η ιδιότητα έκφρασης του cDNA ενθέματος της ADC ως υβριδικής πρωτεΐνης με το *lacZ'*α στους θετικούς υποκλώνους (φαγεμίδια) της λ-ZAP-XR βιβλιοθήκης, οι οποίοι φέρουν το ένθεμα στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με το *lacZ'*α. Σε 13 θετικούς κλώνους έγινε επαγωγή με IPTG και οι ολικές πρωτεΐνες των βακτηρίων αναλύθηκαν με western blot. Τελικά, 3 από τους 13 θετικούς κλώνους που εξετάστηκαν έδωσαν θετική αντίδραση, αποδεικνύοντας ότι ο αντιορός που παρασκευάστηκε στο κουνέλι έχει εξειδίκευση για την ADC της αμπέλου (Εικ. 4.10).



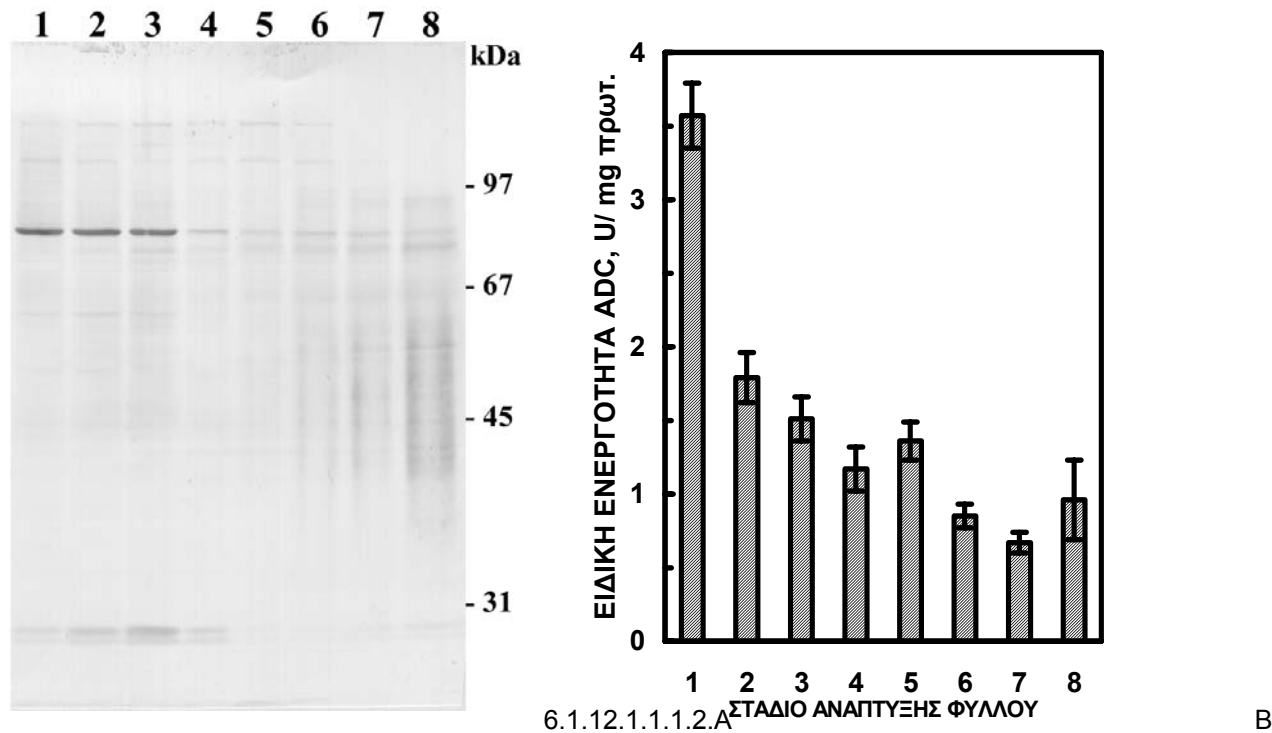
Εικόνα 4.10. Ανάλυση western blot ολικών πρωτεϊνών 13 κλώνων (στήλες 1-13) βακτηριακών κυττάρων, που φέρουν το βακτηριακό πλασμιδιακό φορέα pBluescript με διαφορετικό cDNA ένθεμα της ADC της αμπέλου (προήλθαν από την *in vivo* εκτομή φορέων λ-ZAP-XR), μετά από επαγωγή με 50 μM IPTG για 2 h. Όπου το cDNA ένθεμα της ADC της αμπέλου βρίσκεται στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με το *lacZ'*, εκφράζεται ως υβριδική πρωτεΐνη με περίπου 4 kDa της πρωτεΐνης του *lacZ'* στο αμινοτελικό άκρο του υβριδίου. Η μεμβράνη επώασθη με τον αντιγόνο εναντίον της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC σε αραιώση 1:5.000, για 2 h στους 4 °C.

6.1.12.4.4.4. Ανοσολογική Μελέτη της ADC σε Διάφορους Ιστούς της Αμπέλου

Η ποσότητα της ανοσοεντοπιζόμενης πρωτεΐνης της ADC, μελετήθηκε σε σύγκριση με την ενζυμική της ενεργότητα σε ιστούς βλαστού και φύλλου *in vitro* ανεπτυγμένων φυτών, φύλλων αυτόριζων πρέμων ανεπτυγμένων στο θερμοκήπιο σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια και σε κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου υπό την επίδραση αμμωνιακών, νιτρικών και πουτρεσκίνης. Στα νεαρά όργανα (μη πλήρως εκπτυγμένα φύλλα και τα ανώτερα μεσογονάτια) από τα *in vitro* ανεπτυγμένα φυτά, εκτός από την κύρια πρωτεϊνική ζώνη στα περίπου 80 kDa, εμφανίζεται και μία δεύτερη, ελαφρώς μεγαλύτερου μεγέθους, μετά από western blot ανάλυση (Εικ. 4.11A). Ακόμη, αποκλειστικά στα φύλλα ανοσοεντοπίζονται και άλλες πρωτεϊνικές ζώνες: η πρώτη ελαφρώς μικρότερου MB και άλλες δύο με μεγέθη περίπου 25 kDa (Εικ. 4.11A και 4.12A). Η ποσότητα της ανοσοεντοπιζόμενης πρωτεϊνικής ζώνης 80 kDa είναι μεγαλύτερη στα νεαρά φύλλα και μειώνεται στα κατώτερα (Εικ. 4.11A) και στα γηραιότερα (Εικ. 4.12A), ενώ αντίθετα αυξάνεται από τα κορυφαία μεσογονάτια του βλαστού προς τα κατώτερα (Εικ. 4.11A). Οι αλλαγές στην ποσότητα της ανοσοεντοπιζόμενης πρωτεϊνικής ζώνης 80 kDa δεν ακολουθούν τις αλλαγές στην ειδική ενζυμική ενεργότητα της ADC (Εικ. 4.11B και 4.12B).

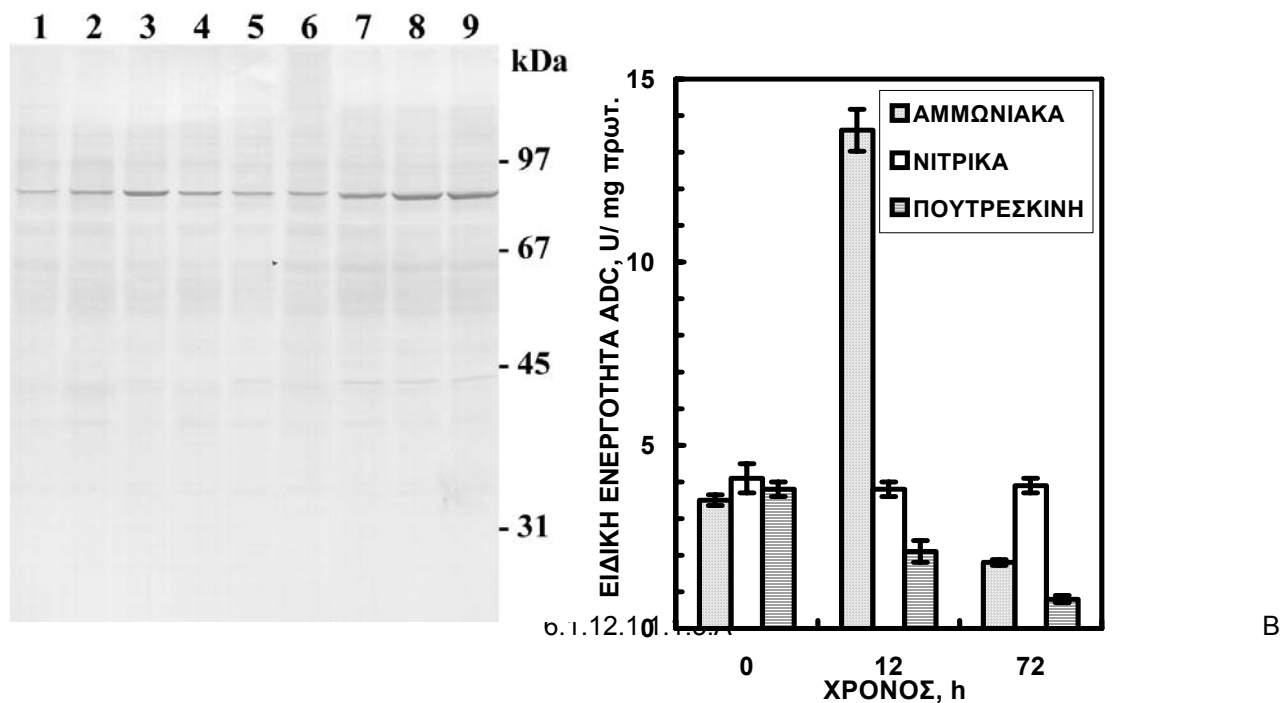


Εικόνα 4.11. (A) Ανάλυση western blot ολικών πρωτεϊνών (20 μg) βλαστών (μεσογονατίων, στήλες 1-4) και φύλλων (5-8) *in vitro* ανεπτυγμένων φυτών αμπέλου. Η μεμβράνη επώασθη με το αντιγόνο κατά της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC αραίωση 1:2000, για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου. Βλαστοί και φύλλα ακολουθούν αριθμηση από την κορυφή (στήλη 1: το μεσογονάτιο με το κορυφαίο μερίστωμα και στήλη 5: το φύλλο που βρίσκεται στον κόμβο του παραπάνω μεσογονατίου). (B) Η ειδική ενεργότητα της ADC στους παραπάνω ιστούς. Ένα Unit αντιπροσωπεύει παραγωγή 1 nmole CO_2 στους 37 °C ανά h.



Εικόνα 4.12. (A) Ανάλυση western blot ολικών πρωτεϊνών (20 μg) φύλλων αυτόριζων φυτών αμπέλου ανεπτυγμένων στο θερμοκήπιο. Οι συνθήκες επώασης της μεμβράνης περιγράφονται στην Εικόνα 4.11. Τα φύλλα ακολουθούν αρίθμηση από το νεαρότερο (πρώτο πλήρες εκπτυγμένο, στήλη 1) προς το γηραιότερο (έναρξη απώλειας χλωροφύλλης στήλη 8). (B) Η ειδική ενεργότητα της ADC στα παραπάνω φύλλα.

Στις κυτταροκαλλιέργειες της αμπέλου, υπό την επίδραση των αμμωνιακών, η ανοσοεντοπιζόμενη πρωτεϊνική ζώνη 80 kDa αυξήθηκε ελαφρώς 12 h μετά (η ειδική ενεργότητα της ADC είχε τετραπλασιαστεί), αλλά αυξήθηκε ακόμα περισσότερο στις 72 h όταν η ειδική ενεργότητα της ADC βρισκόταν σε επίπεδα χαμηλότερα από τα αρχικά. Υπό την επίδραση των νιτρικών η πρωτεϊνική ζώνη 80 kDa μειώθηκε ελαφρώς, χωρίς να παρατηρηθεί μείωση στην ειδική ενεργότητα της ADC. Παρομοίως, υπό την επίδραση της πουτρεσκίνης η πρωτεϊνική ζώνη 80 kDa αυξήθηκε, ενώ η ειδική ενεργότητα της ADC υποτετραπλασιάστηκε (Εικ. 4.13A και B). Στις κυτταροκαλλιέργειες της αμπέλου, εκτός από την πρωτεϊνική ζώνη 80 kDa, εμφανίστηκε και μία δεύτερη μεγέθους περίπου 43 kDa (Εικ. 4.13A). Όμως, ούτε οι αλλαγές έντασης αυτής της ζώνης, ακολουθούν τις σημαντικές αλλαγές που παρατηρήθηκαν στην ειδική ενζυμική ενεργότητα της ADC (Εικ. 4.13B).



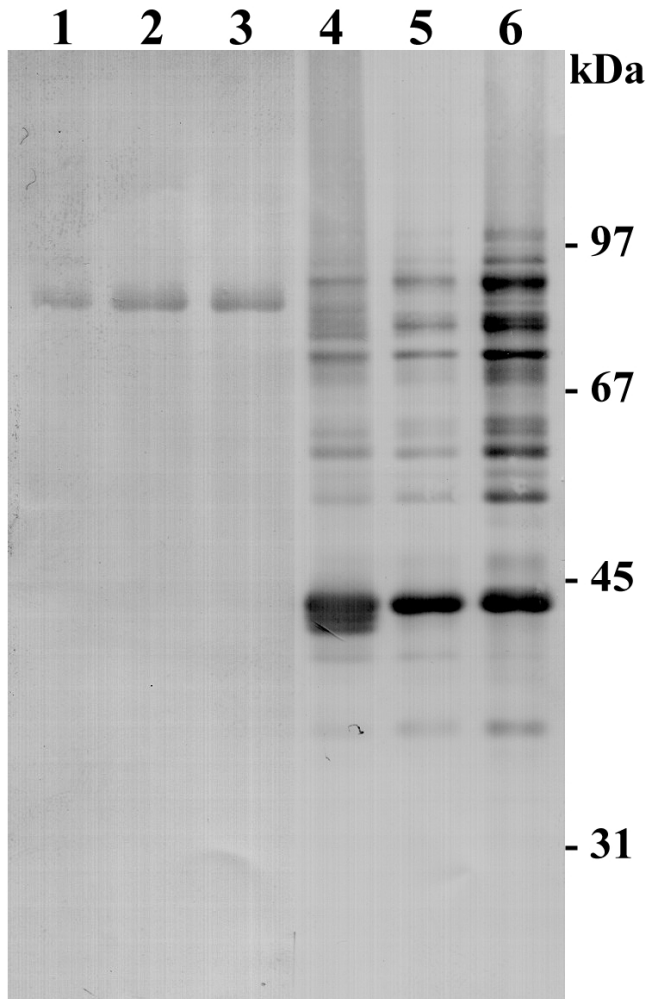
Εικόνα 4.13. (A) Ανάλυση western blot ολικών πρωτεϊνών (20 µg) κυττάρων αμπέλου μετά την επίδραση 20 mM NH₄⁺ (στήλες 1-3), 20 mM NO₃⁻ (4-6) και 5 mM πουτρεσκίνης (7-9). Οι στήλες 1, 4 και 7 αντιστοιχούν σε χρόνο 0 h (μάρτυρες), οι 2, 5 και 8 στις 12 h μετά την επέμβαση και οι 3, 6 και 9 στις 72 h μετά την επέμβαση. Οι συνθήκες επώασης της μεμβράνης περιγράφονται στην Εικόνα 4.11. (B) Η ειδική ενεργότητα της ADC στα κύτταρα 0, 12 και 72 h μετά την επίδραση 20 mM NH₄⁺, 20 mM NO₃⁻ και 5 mM πουτρεσκίνης.

6.1.13.4.4.5. Η Δράση των Προϊόντων της Πέψης της Υβριδικής Πρωτεΐνης MBP-ADC με τον “Παράγοντα Χα” στη Φυσική Πρωτεΐνη της

ADC της Αμπέλου και του Ολικού Πρωτεϊνικού Εκχυλίσματος της Αμπέλου στην Υβριδική Πρωτεΐνη MBP-ADC

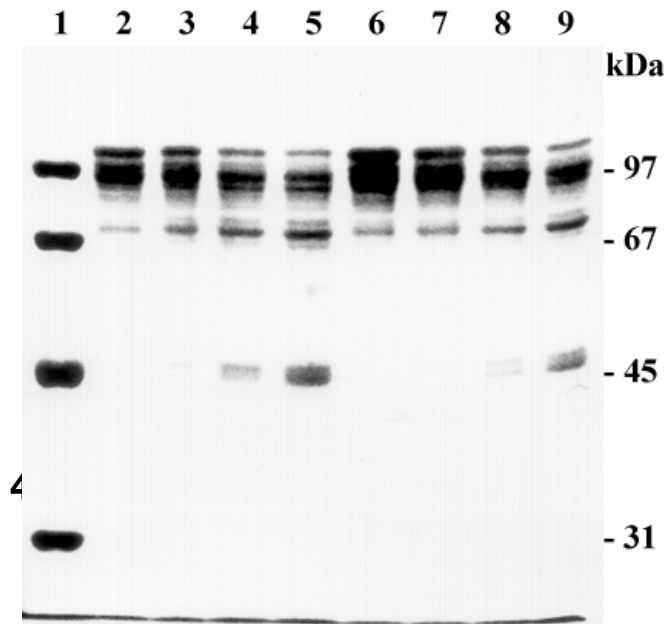
Για να διερευνηθεί περαιτέρω η υπόθεση ότι, κάποιο από τα προϊόντα της επώασης του παρασκευάσματος της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC με τον “παράγοντα Χα” έχει ειδική πρωτεολυτική δράση, εξετάστηκε η επίδραση αυτών των προϊόντων στο

ανοσοεντοπιζόμενο πρωτεϊνικό μόριο 80 kDa της ADC της αμπέλου. Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από βλαστό αμπέλου (50 μg πρωτεΐνης), επώασθη με τον “παράγοντα Xa” (5 μg πρωτεΐνης) και με παρασκεύασμα της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC, που είχε προηγουμένως επωασθεί για 24 h με τον “παράγοντα Xa” (5 μg πρωτεΐνης, αναλογία MBP-ADC : “παράγοντα Xa” 50 : 1, w/w), για 8 h. Μετά την επώαση τα παρασκευάσματα υποβλήθηκαν σε western blot ανάλυση, όπου διαπιστώθηκε ότι ενώ ο “παράγοντας Xa” μόνος του δεν προκάλεσε μεταβολή στην ανοσοεντοπιζόμενη ζώνη των 80 kDa του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος της αμπέλου, τα προϊόντα της πέψης της υβριδικής πρωτεΐνης με τον “παράγοντα Xa” τη διασπούν, εξαφανίζοντας την, και παράγουν δύο νέες ζώνες με μεγέθη περίπου 38 και 40 kDa (Εικ. 4.14).



Εικόνα 4.14. Ανάλυση western blot των προϊόντων της επώασης ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από βλαστό αμπέλου (50 μg πρωτεΐνης) για 8 h σε θερμοκρασία δωματίου (στήλη 2), με 5 μg του “παράγοντα Xa” (στήλη 3) και με 5 μg παρασκευάσματος της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC που είχε προηγουμένως επωασθεί για 24 h με τον “παράγοντα Xa” (στήλη 4). Στη στήλη 1: ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από βλαστό αμπέλου (30 μg πρωτεΐνης), στη στήλη 5: παρασκεύασμα της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC (5 μg) μετά από 24 h επώαση με τον “παράγοντα Xa” και στη στήλη 6, παρασκεύασμα της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC (20 μg) μετά από 24 h επώαση με τον “παράγοντα Xa”, που έχει παραμείνει επιπλέον 8 h σε θερμοκρασία δωματίου. Οι συνθήκες επώασης της μεμβράνης περιγράφονται στην Εικόνα 4.11.

Τέλος, παρασκεύασμα της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC (30 µg) επώασθη με 6 και 3 µg ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από βλαστό αμπέλου, για 3, 6, 12 και 24 h. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.15, η επώαση του παρασκευάσματος της υβριδικής πρωτεΐνης με το πρωτεϊνικό εκχύλισμα της αμπέλου είχε ως αποτέλεσμα τη σταδιακή εξαφάνιση των δύο πρωτεϊνικών ζωνών με τα μεγαλύτερα MB και τη μείωση σε μικρότερο βαθμό της τρίτης πρωτεϊνικής ζώνης από το παρασκεύασμα της υβριδικής πρωτεΐνης και την εμφάνιση τεσσάρων ευδιάκριτων νέων ζωνών με MB περίπου 90, 70, 46 και 45 kDa.



Εικόνα 4.15. Αποδιατακτική SDS ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της επώασης παρασκευάσματος της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC (30 µg) με 6 µg (στήλες 2-5) και 3 µg (6-9) ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από βλαστό αμπέλου, για 3 (στήλες 2 και 6), 6 (3 και 7), 12 (4 και 8) και 24 h (5 και 9). Στη στήλη 1 φαίνονται πρωτεΐνες δείκτες MB.

Η έκφραση στην *E. coli* ξένων πρωτεϊνών, ως υβριδίων με πρωτεΐνες όπως η τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) και η προσδεδεμένη στη μαλτόζη πρωτεΐνη (MBP), αποτελεί έναν εύκολο τρόπο παραγωγής και καθαρισμού σε μη αποδιατακτικές

συνθήκες μεγάλης ποσότητας ξένης πρωτεΐνης, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντιγόνο για ανοσοποίηση ζώων ή ακόμα και για βιοχημικές μελέτες της πρωτεΐνης, εφόσον αυτή αποκτήσει τη σωστή διαμόρφωση στο βακτηριακό κύτταρο. Πολλές φορές, όμως, συναντώνται διάφορα προβλήματα κατά την έκφραση και τον καθαρισμό τέτοιων υβριδικών πρωτεϊνών, τα κυριότερα από τα οποία αφορούν τη διαλυτότητα των παραγόμενων πρωτεϊνών και τη σταθερότητά τους στο βακτηριακό κύτταρο.

Η υβριδική πρωτεΐνη GST-ADC, μετά την επαγωγή της έκφρασής της, βρισκόταν σε αδιάλυτη μορφή στα κυτταρικά έγκλειστα. Η μείωση της συγκέντρωσης του IPTG κατά 5-10 φορές (20 μ M) και η μείωση της θερμοκρασίας ανάπτυξης των βακτηρίων από τους 37 °C στους 25 °C (τρόποι που συνιστώνται για την αύξηση της διαλυτότητας της υβριδικής πρωτεΐνης, Smith and Corcoran, 1994), δε βελτίωσαν την κατάσταση. Το φαινόμενο δεν είναι ασυνήθιστο και απαντάται συχνότερα, όσο το μέγεθος της υβριδικής πρωτεΐνης αυξάνει (ειδικά πάνω από τα 50 kDa) ή όταν η ξένη πρωτεΐνη περιέχει ισχυρά υδρόφοβες ή με μεγάλο φορτίο περιοχές (*ibid*).

Αντίθετα, η υβριδική πρωτεΐνη MBP-ADC μετά την επαγωγή της έκφρασής της και την κατεργασία των βακτηριακών κυττάρων με υπερήχους, εντοπίστηκε σε μεγάλο ποσοστό σε διαλυτή μορφή στο ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα των βακτηρίων (Εικ. 2.2). Ο καθαρισμός του ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με χρωματογραφία συγγένειας σε ρητίνη αμυλόζης έδειξε ότι υπήρχαν τρεις πληθυσμοί μορίων (με εκτιμώμενα MB 105, 97 και 93 kDa), με τη δυνατότητα να προσδένονται στην αμυλόζη και ακολούθως να εκλούνται με μαλτόζη (Εικ. 4.5). Για το μεγαλύτερο από τα τρία μόρια, είναι δύσκολο να αποφασισθεί αν η διαφορά μεταξύ του εκτιμώμενου MB και του αναμενόμενου (105 και 109 kDa αντίστοιχα) είναι πραγματική ή οφείλεται σε σφάλμα της εκτίμησης. Η παραγωγή των δύο μικρότερων μορίων (με εκτιμώμενα MB 97 και 93 kDa), μπορεί να δικαιολογηθεί από πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης στο βακτήριο ή/ και πρωτεολυτική αποικοδόμηση *in vivo*. Η αστάθεια της υβριδικής πρωτεΐνης είναι ένα συχνά απαντώμενο πρόβλημα κατά την έκφραση ξένων πρωτεϊνών στην *E. coli* και μπορεί να αντιμετωπισθεί μερικώς με μείωση του χρόνου έκφρασης (Riggs, 1994). Η μείωση του χρόνου έκφρασης σε 1 h, δεν άλλαξε την ποσοτική αναλογία των τριών πρωτεϊνικών μορίων, γεγονός που υποδεικνύει ότι η παραγωγή των δύο μικρότερων οφείλεται μάλλον σε πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης.

Η πέψη των τριών αυτών πρωτεϊνικών μορίων με την ειδική πρωτεάση “παράγοντα Xa” είχε ως αποτέλεσμα την αποικοδόμησή τους και την παραγωγή κυρίως, δύο νέων πρωτεϊνικών μορίων με MB 90 και 43 kDa αντί των αναμενόμενων με MB 62-66, 54, 50 και 43 kDa (το κομμάτι της MBP). Η βιβλιογραφία αναφέρει ότι μόνο στο 50% των περιπτώσεων η αντίδραση της πέψης δίνει τα αναμενόμενα αποτελέσματα, ενώ στο υπόλοιπο 50% διακρίνονται δύο κατηγορίες περιπτώσεων: υβριδικές πρωτεΐνες, που δεν κόβονται από τον “παράγοντα Xa” και υβριδικές πρωτεΐνες, που κόβονται σε άλλες θέσεις μέσα στην υπό μελέτη πρωτεΐνη (Riggs, 1994). Για την πρώτη κατηγορία περιπτώσεων υπάρχουν δύο πιθανές εξηγήσεις: (α) η πρωτοταγής δομή γύρω από τη θέση αναγνώρισης (Ile-Glu-Gly-Arg, αν και ο “παράγοντας Xa” έχει χαμηλό βαθμό διάκρισης του υπολείμματος, που ακολουθεί την

αργινίνη στη θέση αναγνώρισης, δε δρα αν αυτό είναι προλίνη) και (β) η τριτοταγής διαμόρφωση της υβριδικής πρωτεΐνης, που μπορεί να παρεμποδίσει τη δράση του “παράγοντα Xa” (*ibid*).

Για την υβριδική πρωτεΐνη MBP-ADC, αφενός το υπόλειμμα, που ακολουθεί την αργινίνη στη θέση αναγνώρισης του “παράγοντα Xa”, είναι ασπαραγινικό και αφετέρου παράγεται μία ποσότητα του πρωτεϊνικού μορίου με MB 43 kDa, γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν υφίσταται ζήτημα στερεοπαρεμπόδισης. Για τη δεύτερη κατηγορία περιπτώσεων, έχει παρατηρηθεί πέψη της υβριδικής πρωτεΐνης σε σημείο της αλληλουχίας της υπό μελέτη πρωτεΐνης σε υπολείμματα αργινίνης, που δε συμμετέχουν στη θέση αναγνώρισης του “παράγοντα Xa” και τα οποία καθορίζονται μάλλον από την τριτοταγή διαμόρφωση της πρωτεΐνης στην περιοχή (Riggs, 1994). Αν και δεν μπορεί να αποκλειστεί αυτό το ενδεχόμενο, το γεγονός ότι η επώαση της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC με τα προϊόντα της πέψης της με τον “παράγοντα Xa” σε αναλογία 20:1 και 50:1 (w/w) έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή του πρωτεϊνικού μορίου με MB 90 kDa (Εικ. 4.6), υποδεικνύει την πιθανότητα ύπαρξης ειδικής πρωτεολυτικής δράσης σε ένα από τα παραγόμενα πρωτεϊνικά μόρια μετά την απομάκρυνση του κομματιού 43 kDa της MBP.

Αυτό ενισχύεται ακόμη από τα παρακάτω ευρήματα: (α) ο “παράγοντας Xa” μόνος του δεν έχει δράση πάνω στη φυσική πρωτεΐνη της ADC της αμπέλου (Εικ. 4.14), (β) τα προϊόντα της πέψης της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC με τον “παράγοντα Xa” πρωτεολύουν σε ειδική θέση τη φυσική πρωτεΐνη της ADC της αμπέλου (Εικ. 4.14) και (γ) αντιστρόφως, ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα αμπέλου πρωτεολύει σε ειδικές θέσεις τα τρία υβριδικά πρωτεϊνικά μόρια MBP-ADC (Εικ. 4.15).

Οι αντιοροί που παρασκευάστηκαν στα ποντίκια και στο κουνέλι εναντίον των υβριδικών πρωτεϊνών GST-ADC και MBP-ADC αντίστοιχα, αντιδρούν κυρίως με μια πρωτεϊνική ζώνη MB 80 kDa περίπου σε western blot ανάλυση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιστών αμπέλου (Εικ. 4.7 και 4.8). Αυτό το MB βρίσκεται πολύ κοντά με τα MB των πρωτεϊνών, που κωδικοποιούνται από τα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης πλήρων cDNA κλώνων της ADC από άλλα δικότυλα φυτά (74-79 kDa, Πίνακας 4.1). Ο αντιορός εναντίον της MBP-ADC, αναγνωρίζει, εκτός της πρωτεϊνικής ζώνης MB 80 kDa, και πρωτεϊνικές ζώνες MB περίπου 25 και 43 kDa σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από φύλλο και κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου, αντίστοιχα, με μικρότερη εξειδίκευση (μικρότερη ένταση της χρώσης και μόνο όταν η επώαση με τον αντιορό γίνει σε θερμοκρασία δωματίου και όχι στους 4 °C, Εικ. 4.8B).

Πίνακας 4.1. Το αναμενόμενο (όπως προκύπτει από το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης των cDNA κλώνων) και το παρατηρηθέν (μετά από SDS αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση) MB της υπομονάδας του ενζύμου της ADC, καθώς και η δομή του από τα φυτικά είδη που έχει μελετηθεί και την *E. coli*.

ΟΣ	ΟΡΓΑΝΙΣΜ	6.2. ΜΟΡΙΑΚΟ ΒΑΡΟΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ	ΔΟΜΗ ENZΥΜΟΥ
ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟ ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝ			
	ΔΙΚΟΤΥΛΑ		
	Οικ. Brassicaceae		
(ADC1)	<i>Arabidopsis</i>	76.235	42 kDa
			-
(ADC2)	<i>Arabidopsis</i>	77.219	
			-
	<i>Brassica</i>	-	60 kDa
			4μερής
	Οικ. Fabaceae		
	<i>Glycine</i>	74.594	74 kDa
			3μερής
	<i>Pisum</i>	78.710	-
			-
	<i>Lathyrus</i>	-	36,5 kDa
			6μερής
	<i>Nicotiana</i>	79.025	-
			-
	<i>Dianthus</i>	79.025	-
			-
	ΜΟΝΟΚΟΤΥΛΑ		
	Οικ. Poaceae		
	<i>Avena</i>	66.705	42 & 24 kDa
			ετεροβμ ερής?
	<i>Oryza</i>	-	63 kDa
			3μερής
	<i>E. coli</i>	73.983	70 kDa
			4μερής

Ο αντιορός εναντίον της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC δεν κατακρήμνισε την ενζυμική ενεργότητα της ADC από ενζυμικά εκχυλίσματα φύλλου, βλαστού και ρίζας αμπέλου σε πειράματα ποσοτικής ανοσοκατακρήμνισης (Εικ. 4.9). Φαίνεται ότι ο αντιορός, που παρασκευάστηκε εναντίον της αποδιεταγμένης με SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC, δεν αναγνωρίζει επιτόπους στο φυσικό μόριο της ADC της αμπέλου. Η έλλειψη μιας άμεσης απόδειξης της εξειδίκευσης του αντιορού εναντίον της ADC της αμπέλου, που θα προσέφερε η ανοσοκατακρήμνιση της ενζυμικής ενεργότητας της ADC από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ιστών του φυτού με τη βοήθειά του, μας οδήγησε στην αναζήτηση μιας έμμεσης. Έτσι, η εξειδίκευση του αντιορού που παρασκευάστηκε στο κουνέλι, εναντίον τουλάχιστον της αποδιεταγμένης με SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη ADC της αμπέλου, αποδείχθηκε με την αντίδρασή του με το προϊόν έκφρασης εκείνων, από τους θετικούς cDNA κλώνους της ADC της αμπέλου, που έφεραν το ένθεμα στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με το *lacZ*'α (Εικ. 4.10).

Η ποσότητα της ανοσοεντοπιζόμενης πρωτεϊνικής ζώνης 80 kDa σε western blot ανάλυση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από *in vitro* ανεπτυγμένα φυτά αμπέλου αυξανόταν από την κορυφή προς τη βάση, στα μεσογονάτια, ενώ μειωνόταν στα φύλλα (Εικ. 4.11A). Επίσης, μείωση της ζώνης αυτής παρατηρήθηκε σε αυξανόμενης ηλικίας φύλλα από αυτόριζα φυτά αμπέλου, που αναπτύχθηκαν στο θερμοκήπιο (Εικ. 4.12A). Οι αλλαγές αυτές όμως, δεν αντανακλώνται και στην ειδική ενεργότητα της ADC (Εικ. 4.11B και 4.12B). Ακόμη περισσότερο, αλλαγές στην ποσότητα της ανοσοεντοπιζόμενης πρωτεϊνικής ζώνης 80 kDa που να ακολουθούν την ειδική ενεργότητα της ADC, δε βρέθηκαν ούτε σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυτταροκαλλιιεργειών υπό την επίδραση αμμωνιακών και πουτρεσκίνης, η οποία τετραπλασίασε και υποτετραπλασίασε, αντίστοιχα, την ειδική ενεργότητα της ADC (Εικ. 4.13AB). Η συσσώρευση της πρωτεϊνικής ζώνης 80 kDa (Εικ. 4.13A, στήλες 1-3 και 7-9), συσχετίζεται με την αύξηση των ενδογενών επιπέδων των πολυαμινών που προκαλείται είτε από *de novo* σύνθεση (επίδραση αμμωνιακών, Εικ. 3.1A, Κεφάλαιο 3), είτε από την εξωγενή προσθήκη πουτρεσκίνης (Εικ. 3.4B, Κεφάλαιο 3). Έχει ήδη αποδειχθεί το ανασταλτικό αποτέλεσμα εξωγενούς

σπερμίνης στην πρωτεολυτική επεξεργασία του προενζύμου 66 kDa της ADC της βρώμης (Borrell et al, 1996). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το ανοσοεντοπιζόμενο πρωτεϊνικό μόριο MB 80 kDa δεν ταυτίζεται αποκλειστικά με την ενεργή φυσική πρωτεΐνη της ADC της αμπέλου. Το μόριο αυτό φαίνεται να είναι, το πιθανότερο, πρόδρομο μόριο που, όπως στην περίπτωση της ADC της βρώμης, απαιτεί κάποια μετα-μεταφραστική τροποποίηση για να ενεργοποιηθεί, είτε το προϊόν απενεργοποίησης του ενεργού ενζύμου ή μπορεί, τέλος, να απαιτεί άλλο παράγοντα, ο οποίος και να ρυθμίζει την ενεργότητά του. Προκαταρκτικά δεδομένα για την ADC της βρώμης υποστηρίζουν ότι είναι φωσφοπρωτεΐνη, φωσφορυλιωμένη σε αμινοξικό υπόλειμμα θρεονίνης (Malmberg et al, 1998).

Αναντιστοιχία μεταξύ ειδικής ενεργότητας και ανοσοεντοπιζόμενης πρωτεΐνης της ADC έχει αναφερθεί και στην *Arabidopsis*, όπου ενώ η έλλειψη K^+ δεκαπλασίασε την ειδική ενεργότητα της ADC σε σχέση με το μάρτυρα, δεν αύξησε και την ανοσοεντοπιζόμενη πρωτεϊνική ζώνη 42 kDa (προϊόν, πιθανόν, μετα-μεταφραστικής επεξεργασίας του πρόδρομου μορίου MB 76 kDa που κωδικοποιεί το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης cDNA κλώνου που απομονώθηκε), με την οποία αντιδρά μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον της ADC αυτού του φυτού (Watson and Malmberg, 1996).

Ενδείξεις, για την πιθανότητα ύπαρξης και στην άμπελο μετα-μεταφραστικής πρωτεολυτικής επεξεργασίας της ADC, και μάλιστα αυτοκαταλυτικής, δίνουν εκτός από τα αποτελέσματα της πέψης της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC με τον “παράγοντα Xa” (Εικ. 4.5 και 4.6) και τα αποτελέσματα (α) της επώασης ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος βλαστού αμπέλου με τα προϊόντα της πέψης της υβριδικής πρωτεΐνης με τον “παράγοντα Xa” (Εικ. 4.14) και (β) της επώασης της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC με ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα βλαστού αμπέλου (Εικ. 4.15). Το μοντέλο, που μπορεί να προταθεί με τα υπάρχοντα δεδομένα, είναι το παρακάτω: το πρόδρομο μόριο 80 kDa υφίσταται μετα-μεταφραστική πρωτεολυτική επεξεργασία (το πιθανότερο αυτοκαταλυτική), η οποία ρυθμίζεται μέσω άλλου παράγοντα (πιθανό αντιένζυμο της ADC, φωσφορυλίωση) από τα ενδογενή επίπεδα πολυαμινών και το προϊόν της αποτελεί την ενεργή μορφή του ενζύμου της ADC. Το προϊόν αυτό βρίσκεται σε μικρές ποσότητες in vivo, γεγονός που δικαιολογεί και τις χαμηλές ειδικές ενεργότητες της ADC της αμπέλου in vitro (0-10 nmoles CO_2 h^{-1} mg^{-1} πρωτ.) και είναι κάτω από

τα όρια ανίχνευσης της τεχνικής western blot και ανοσοεντοπισμού, με τον αντιγόνο που παρασκευάστηκε στο κουνέλι εναντίον της υβριδικής πρωτεΐνης MBP-ADC.

Η διαφορά στη μετα-μεταφραστική πρωτεόλυση της ADC μεταξύ του δικοτυλήδονου αμπέλου και του μονοκοτυλήδονου βρώμης (αυτοκαταλυτική και μη, πρωτεόλυση, αντίστοιχα) μπορεί να δικαιολογηθεί από τη μη ύπαρξη ομολογίας, σε αμινοξικό επίπεδο, στην περιοχή γύρω από τη θέση τομής του πρόδρομου μορίου της βρώμης (το τμήμα μεταξύ των συντηρημένων “περιοχών 6 και 7”, Εικ. 2.5, Κεφάλαιο 2). Από την άλλη, η επιτυχής συμπλήρωση, του ελλειμματικού σε ODC στελέχους Y357 του *S. cerevisiae*, με τα γονίδια της ADC της βρώμης και της ουρεοϋδρολάσης της αγματίνης (AUH) της *E. coli* (Klein et al, 1999), πιθανώς να υποδεικνύει ότι η επεξεργασία του προενζύμου της ADC της βρώμης δε γίνεται απαραίτητα από ειδική πρωτεάση του φυτού, η οποία δεν είναι δυνατόν να υπάρχει σε έναν, εξελικτικά, τόσο απομακρυσμένο οργανισμό, που μάλιστα δεν έχει καν το εναλλακτικό μονοπάτι βιοσύνθεσης της πουτρεσκίνης μέσω της ADC.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στην εργασία αυτή εξετάσθηκε το ένζυμο της αποκαρβοξυλάσης της αργινίνης, το οποίο καταλύει την πρώτη αντίδραση του εναλλακτικού μονοπατιού βιοσύνθεσης των πολυαμινών και το οποίο συμμετέχει σε ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών διεργασιών στα φυτά, από τη μορφογένεση ως τις αποκρίσεις σε καταστάσεις καταπονήσεων. Η εργασία έγινε σε ένα πολυετές ξυλώδες φυτό, το οποίο δεν αποκρίνεται σε *in vitro* μορφογενετικούς χειρισμούς, την άμπελο, και περιέλαβε το βιοχημικό, μοριακό και ανοσολογικό χαρακτηρισμό του, τη μελέτη της αναπτυξιακής και οντογενετικής έκφρασής του και τη ρύθμισή του υπό την επίδραση διαφόρων εξωγενών παραγόντων, σε επίπεδο αφθονίας του mRNA και της πρωτεΐνης του και της ενεργότητάς του. Τα βασικότερα συμπεράσματα που προκύπτουν από τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής, για την ADC της αμπέλου είναι τα παρακάτω:

1. Το ένζυμο της αμπέλου έχει παρόμοια βιοχημικά χαρακτηριστικά με τις ADCs από άλλα δικοτυλήδονα και μονοκοτυλήδονα φυτά: έχει άριστο pH στο 8,0, άριστο θερμοκρασίας στους 37 °C, απαιτεί την παρουσία σουλφυδρυλομάδων και φωσφορικής πυριδοξάλης αλλά όχι κάποιου μεταλλικού παράγοντα για την επίδειξη του μέγιστου της ενεργότητάς του και η αγματίνη και η πουτρεσκίνη παρεμποδίζουν την ενεργότητα του σε μεγάλες, σχετικά, συγκεντρώσεις.
2. Η ενεργότητα της ADC ήταν υψηλότερη στους μεταβολικά ενεργότερους ιστούς της αμπέλου, ενώ στις ρίζες ήταν η χαμηλότερη. Σε σπορόφυτα η ενεργότητα της ADC ήταν μεγαλύτερη με την έναρξη του φυτρώματος και μειωνόταν με το χρόνο όπως συνέβαινε και στις κυτταροκαλλιέργειες και στους κάλλους αμέσως μετά την υποκαλλιέργεια.
3. Η αμινοξική αλληλουχία cDNA κλώνου της ADC της αμπέλου φέρει τα χαρακτηριστικά πρότυπα της ομάδας IV των αποκαρβοξυλασών της Ορνιθίνης/ Διαμινοπιμελικού οξέος/ Αργινίνης και εμφανίζει ταυτότητα 70-75% με τις αλληλουχίες της ADC των δικοτυλήδονων, 40% με την ADC της βρώμης και 30% με τις βακτηριακές ADCs.

4. Στο γένωμα της αμπέλου υπάρχει ένα γονίδιο που κωδικοποιεί την ADC, ενώ το μετάγραφό του έχει μέγεθος περίπου 3,1 kb και διαφορετικό πρότυπο έκφρασης σε διάφορα όργανα του φυτού.
5. Η *in vitro* ενεργότητα της ADC σε κυτταροκαλλιέργειες, αυξήθηκε με την προσθήκη αμμωνιακών και γλουταμίνης περισσότερο, από ότι με την προσθήκη αργινίνης και γλουταμικού, δεν επηρεάστηκε από τα νιτρικά, ενώ μειώθηκε με την πουτρεσκίνη. Τα επίπεδα της ενδογενούς ελεύθερης πουτρεσκίνης και αργινίνης ακολούθησαν, γενικά, τις αλλαγές στην ενεργότητα της ADC. Όμως, καμία από τις παραπάνω επεμβάσεις δεν προκάλεσε αλλαγές στα επίπεδα του mRNA της ADC.
6. Η ποσότητα της ανοσοεντοπιζόμενης πρωτεϊνικής ζώνης των 80 kDa, με αντίσωμα εναντίον της ADC, από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα φύλλων και βλαστών αμπέλου, σε διαφορετικά οντογενετικά στάδια, καθώς και από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυτταροκαλλιεργειών, με μεγάλες διαφορές στην ενεργότητα της ADC, δεν παρουσίασε διαφορές που να ακολουθούν τις αλλαγές στην ειδική ενεργότητα της ADC.
7. Οι αλλαγές στην ειδική ενεργότητα της ADC δεν οφείλονται σε επαγωγή ή καταστολή του γονιδίου της και επομένως η ρύθμιση της στην άμπελο γίνεται μετα-μεταγραφικά και πιθανώς μετα-μεταφραστικά μέσω αυτοκαταλυτικής πρωτεολυτικής επεξεργασίας του προϊόντος της μετάφρασης του mRNA της, όπως συμβαίνει και με άλλα ένζυμα της βιοσύνθεσης των πολυαμινών στα φυτά και σε άλλα βασίλεια.

Αυτός ο μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης της ADC είναι μάλλον κοινός, τουλάχιστον στα δικοτυλήδονα φυτά. Προκαταρκτικά αποτελέσματα για την ADC του καπνού, έδειξαν ότι η ωσμωτική καταπόνηση πολλαπλασίασε την ειδική ενεργότητά της σε φύλλα, με ταυτόχρονη αύξηση της ενδογενούς πουτρεσκίνης αλλά χωρίς την παράλληλη αλλαγή της ποσότητας της ανοσοεντοπιζόμενης πρωτεϊνικής ζώνης 80 kDa. Ακόμα, με το αντίσωμα εναντίον της ADC της αμπέλου έχει ανιχνευθεί πρωτεϊνική

ζώνη γύρω στα 80 kDa και σε άλλα δικοτυλήδονα φυτά (ντομάτα, λάχανο, *Arabidopsis*), ενώ μόνο μία φορά, σε καταπονημένα από σήψη φυτάρια *Arabidopsis*, ανιχνεύθηκε πρωτεϊνική ζώνη 42 kDa [το MB που αναφέρουν οι Watson and Malmberg (1998) για την ADC της *Arabidopsis*].

Η απομόνωση ενός πλήρους κλώνου της ADC της αμπέλου θα συμβάλλει στη διαλεύκανση του παραπάνω μηχανισμού ρύθμισης από δύο πλευρές. (α) Η έκφρασή του σε βακτήρια και ο καθαρισμός της πρωτεΐνης θα βοηθήσει στη διερεύνηση της πρωτεολυτικής επεξεργασίας του πρόδρομου μορίου και των παραγόντων από τους οποίους αυτή εξαρτάται *in vitro* και *in vivo* και (β) Η παραγωγή αντισωμάτων με μεγάλες ειδικότητες εναντίον του αμινο- και καρβοξυ- τελικού άκρου του πρωτεϊνικού μορίου θα επιτρέψει την ανίχνευση των προϊόντων της πρωτεολυτικής επεξεργασίας και τη συσχέτισή τους με τις *in vitro* ειδικές ενεργότητες της ADC.

Ακόμα, ενδιαφέρον έχει η μελέτη του γονιδίου της ADC και ιδιαίτερα των 5' cis στοιχείων που του επιτρέπουν διαφορική αναπτυξιακή και οργανο- ή ιστο- ειδική έκφραση αλλά δεν επηρεάζουν την έκφρασή του σε καταστάσεις καταπονήσεων. Η διαφορά αυτή είναι πιθανό να έχει σημαντική φυσιολογική σημασία καθώς, οι καταστάσεις καταπονήσεων αποτελούν ερέθισμα για συνολικές και σημαντικές αλλαγές στο μεταβολισμό του αζώτου του φυτικού κυττάρου, που εμπλέκουν μία σειρά αλληλεξαρτώμενων γονιδίων. Σε καταστάσεις καταπονήσεων, η ταυτόχρονη μελέτη των ενζύμων των γειτονικών, τουλάχιστον, βιοσυνθετικών μονοπατιών (αργινάσης, ODC, SAMDC) θα αποκαλύψει τυχόν αλληλεπιδράσεις τους φωτίζοντας περαιτέρω το φυσιολογικό ρόλο των άμεσων και έμμεσων προϊόντων τους (πολυαμίνες) σε αυτές.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams DO, Franke KE and Christensen LP** (1990) Elevated putrescine levels in grapevine leaves that display symptoms of potassium deficiency. *Am J Enol Vitic* 41: 121-125
- Adiga PR and Prasad** (1985) Biosynthesis and regulation of polyamines in higher plants. *Plant Growth Regul* 3: 205-226
- Adlakha RC, Villavuenaa VR, Calvayrac R and Edmunds LN** (1980) Arrest of cell division blocks the utilization of polyamines in synchronized cultures of photoautotrophically grown *Euglena*. *Arch Biochem Biophys* 201: 660-668
- Alabadi D and Carbonell J** (1998) Expression of ornithine decarboxylase is transiently increased by pollination, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and gibberellic acid in tomato ovaries. *Plant Physiol* 118: 323-328
- Alexander FW, Sandmeier E, Mehta K and Christen P** (1994) Evolutionary relationships among pyridoxal-5-phosphate-dependent enzymes. Regio-specific α , β and γ families. *Eur J Biochem* 219: 953-960
- Altamura MM, Torrigiani P, Falasca G, Rossini P and Bagni N** (1993) Morpho-functional gradients in superficial and deep tissues along tobacco stem: Polyamine levels, biosynthesis and oxidation, and organogenesis *in vitro*. *J Plant Physiol* 142:543-551
- Altman A, Friedman R, Amir D and Levin N** (1982) Polyamine effects and metabolism in plants under stress conditions. *Proceedings of the 11th International Conference on Plant Growth Substances*, (July, 1982), pp. 483-494
- Altman A, Kaur-Sawhney R and Galston AW** (1977) Stabilization of oat leaf protoplast through polyamine-mediated inhibition of senescence. *Plant Physiol* 60: 570-574
- Altman A and Levin N** (1993) Interactions of polyamines and nitrogen nutrition in plants. *Physiol Plant* 89: 653-658
- An LZ and Wang XL** (1997) Changes in polyamine contents and arginine decarboxylase activity in wheat leaves exposed to ozone and hydrogen fluoride. *J Plant Physiol* 150:184-187
- Andreadakis A and Kotzabasis K** (1996) Changes in the biosynthesis and catabolism of polyamines in isolated plastids during chloroplast photodevelopment. *J Photochem and Photobiol B: Biol* 33: 163-170
- Andersen SE, Bastola DR and Minocha SC** (1998) Metabolism of polyamines in transgenic cells of carrot expressing a mouse ornithine decarboxylase cDNA. *Plant Physiol* 116: 299-307
- Angelini R, Rea G, Federico R and Dovidio R** (1996) Spatial-distribution and temporal accumulation of messenger RNA encoding diamine oxidase during lentil (*Lens culinaris medicus*) seedling development. *Plant Sci* 119: 103-113

- Apelbaum A, Burgoon AC, Anderson JD and Lieberman M** (1981) Polyamines inhibit biosynthesis of ethylene in higher plant tissue and fruit protoplasts. *Plant Physiol* 68: 453-456
- Apelbaum A, Canellakis ZN, Applewhite PB, Kaur-Sawhney R and Galston A** (1988) Binding of spermidine to a unique protein in thin-layer tobacco tissue culture. *Plant Physiol* 88: 996-998
- Apelbaum A, Goldlust A and Icekson I** (1985) Control by ethylene of arginine decarboxylase activity in pea seedlings and its implication for hormonal regulation of plant growth. *Plant Physiol* 79: 635-640
- Bagga S, Rochford J, Klaene Z, Kuehn GD and Phillips GC** (1997) Putrescine aminopropyltransferase is responsible for biosynthesis of spermidine, spermine and multiple uncommon polyamines in osmotic stress-tolerant alfalfa. *Plant Physiol* 114: 445-454
- Bagni N, Serafini-Fracassini D and Torrigiani P** (1982) Polyamines and cellular growth processes in higher plants. Proceedings of the 11th International Conference on Plant Growth Substances, (July, 1982), pp. 473-482
- Balestreri E, Cioni P, Romagnoli A, Bernini S, Fissi A and Felicioli R** (1987) Mechanism of polyamine inhibition of a leaf protease. *Arch Biochem Biophys* 255: 460-463
- Basso LC and Smith TA** (1974) Effect of mineral deficiency on amine formation in higher plants. *Phytochemistry* 13: 875-883
- Bastola DR and Minocha SC** (1995) Increased Putrescine Biosynthesis through transfer of mouse ornithine decarboxylase cDNA in carrot promotes somatic embryogenesis. *Plant Physiol* 109: 63-71
- Basu R and Ghosh B** (1991) Polyamines in various rice (*Oryza sativa*) genotypes with respect to sodium chloride salinity. *Physiol Plant* 82: 575-581
- Bell E and Malmberg RL** (1990) Analysis of a cDNA encoding arginine decarboxylase from oat reveals similarity to the *Escherichia coli* arginine decarboxylase and evidence of protein processing. *Mol Gen Genet* 224: 431-436
- Beninati S, Piacentini M, Cocuzzi ET, Autuori F and Folk JE** (1988) Covalent incorporation of polyamines as γ -glutamyl derivatives into CHO cell protein. *BBA* 952: 325-333
- Birecka H, Bitonti AJ and McCann PP** (1985a) Assaying ornithine and arginine decarboxylase in some plant species. *Plant Physiol* 79: 509-514
- Birecka H, Bitonti AJ and McCann PP** (1985b) Activities of arginine and ornithine decarboxylases in various plant species. *Plant Physiol* 79: 515-519
- Bitonti AJ, Casara PJ, McCann PP and Bey P** (1987) Catalytic irreversible inhibition of bacterial and plant arginine decarboxylase activities by novel substrate and product analogues. *Biochem J* 242: 69-74

- Borrell A, Besford RT, Altabella T, Masgrau C and Tiburcio AF** (1996) Regulation of arginine decarboxylase by spermine in osmotically-stressed oat leaves. *Physiol Plant* 98: 105-110
- Borrell A, Carbonell L, Farras R, Puig-Parellada P and Tiburcio AF** (1997) Polyamines inhibit lipid peroxidation in senescing oat leaves. *Physiol Plant* 99: 385-390
- Borrell A, Culiarez-Macia FA, Altabella T, Besford RT, Flores D and Tiburcio AF** (1995) Arginine decarboxylase is localized in chloroplasts. *Plant Physiol* 109: 771-776
- Bouchereau A, Aziz A, Larher F, and Martin-Tanguy J** (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci* 140: 103-125
- Bryans M, Harley E and Gilmour SK** (1996) Elevated cellular polyamine levels enhance promoter activity *in vivo*. *Biochem Biophys Res Comm* 226: 618-625
- Bueno M and Matilla A** (1992) Abscisic acid increases the content of free polyamines and delays mitotic activity induced by spermine in isolated embryonic axes of chick-pea seeds. *Physiol Plant* 85: 531-536
- Burtin D, Martin-Tanguy J, Paynot M and Rossin N** (1989) Effects of the suicide inhibitors of arginine and ornithine decarboxylase activities on organogenesis, growth, free polyamine and hydroxycinnamoyl putrescine levels in leaf explants of *Nicotiana Xanthi* nc. cultivated *in vitro* in a medium producing callus formation. *Plant Physiol* 89: 104-110
- Burtin D, Martin-Tanguy J and Tepfer D** (1991) α -DL-DFMO, a specific, irreversible inhibitor of Put biosynthesis, induces phenotype in tobacco similar to that ascribed to the root-inducing, left hand transferred DNA of *A. rhizogenes*. *Plant Physiol* 95: 461-68
- Cabanne F, Dalebroux MA, Martin-Tanguy J and Martin C** (1981) Hydroxycinnamic acid amides and ripening to flower of *Nicotiana tabacum* var *xanthi* nc. *Physiol Plant* 53: 399-404
- Canellakis E, Kyriakidis D, Rinehart C, Huang S, Panagiotidis C and Fong W** (1985) Regulation of polyamine biosynthesis by antizyme and some recent developments relating the induction of polyamine biosynthesis to cell growth. *Biosci Reports* 5: 189-204
- Canellakis ES, Paterakis AA, Huang SC Panagiotidis CA and Kyriakidis DA** (1993) Identification, cloning, and nucleotide sequencing of the ornithine decarboxylase antizyme gene of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7129-7133
- Carbonell J and Navarra JL** (1989) Correlation of spermine levels with ovary senescence and fruit set and development in *Pisum sativum* (L.). *Planta* 178: 482-487

- Ceriotti G and Spandrio L** (1957) An improved method for the microdetermination of arginine by use of 8-hydroxyquinoline. *Biochem J* 66: 603-607
- Chang KS, Nam KH, Lee MM, Lee SH and Park KY** (1996) Nucleotide sequence of cDNA encoding arginine decarboxylase from carnation flowers (PGR96-092). *Plant Physiol* 112: 863
- Chattopadhyay MK, Gupta S, Sengupta DN and Ghosh B** (1997) Expression of arginine decarboxylase in seedlings of indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars as affected by salinity stress. *Plant Mol Biol* 34: 477-483
- Chinard FP** (1952) Photometric estimation of proline and ornithine. *J Biol Chem* 199: 91-95
- Choudhuri MM and Ghosh B** (1982) Purification and partial characterization of arginine decarboxylase from rice embryos (*Oryza sativa* L.). *Agric Biol Chem* 46: 739-743
- Chriqui D, D'Orazi D and Bagni N** (1986) Ornithine and arginine decarboxylases and polyamine involvement during in vivo differentiation and in vitro dedifferentiation of *Datura innoxia* leaf explants. *Physiol Plant* 68: 589-596
- Church GM and Gilbert W** (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1991-1995
- Cohen E, Arad M, Heimer YM and Mizrahi Y** (1982) Participation of ornithine decarboxylase in early stages of tomato fruit development. *Plant Physiol* 70: 540-543
- Cox TT and Boeker EA** (1987) Analysis of enzyme kinetics by using integrated rate equations. Arginine decarboxylase. *Biochem J* 245: 59-65
- Crawford NM** (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* 7: 859-868
- Dai Y and Galston AW** (1981) Simultaneous phytochrome-controlled promotion and inhibition of arginine decarboxylase activity in buds and epicotyls of etiolated peas. *Plant Physiol* 67: 266-269
- Das S, Bose A and Ghosh B** (1995) Effect of salt stress on polyamine metabolism in *Brassica campestris*. *Phytochemistry* 39: 283-285
- Das S, Bhaduri TJ, Bose A and Ghosh B** (1996) Purification and partial characterization of arginine decarboxylase from *Brassica campestris*. *J Plant Biochem Biotech* 5: 123-126
- Dumbroff EB** (1990) Polyamines-Functions and Relationships with Ethylene and Cytokinins. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp:256-266
- Evans PT and Malberg RL** (1989) Do polyamines have roles in plant development? *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 235-269
- Fallon KM and Phillips R** (1988) Polyamines in relation to growth in carrot cell cultures. *Plant Physiol* 88: 224-227

- Faure O, Mengoli M, Nougarede A, and Bagni N** (1991) Polyamine pattern and biosynthesis in zygotic and somatic embryo stages of *Vitis vinifera*. *J Plant Physiol* 138: 545-549
- Feinberg AP and Vogelstein B** (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specificity. *Anal Biochem* 132: 6-13
- Feirer RP, Mignon G and Litvay JD** (1984) Arginine decarboxylase and polyamine required for embryogenesis in the wild carrot. *Science* 223: 1433-1435
- Felsenstein J** (1989) PHYLIP – Phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166
- Fleming AJ, Mandel I, Roth I, and Kuhlemeier C** (1993) The patterns of gene expression in the tomato shoot apical meristem. *Plant Cell* 5: 297-309
- Flores HE and Galston AW** (1982) Polyamines and plant stress: activation of putrescine biosynthesis by osmotic shock. *Science* 217: 1259-1261
- Flores HE and Galston AW** (1984) Osmotic stress-induced polyamine accumulation in cereal leaves. I. Physiological parameters of the response. *Plant Physiol* 75: 102-109
- Folsch UR, Loser C and Alves F** (1990) Polyamines in pancreatic growth. *Digestion* 46: 345-351
- Fowler MR, Kirby MJ, Scott NW, Slater A and Elliott MC** (1996) Polyamine metabolism and gene regulation during the transition of autonomous sugar beet cells in suspension culture from quiescence to division. *Physiol Plant* 98: 439-446
- Friedman R, Altman A and Bachrach U** (1985) Polyamines and root formation in mung bean hypocoty cuttings. II. Incorporation of precursors into polyamines. *Plant Physiol* 79: 80-83
- Galloway GL, Malmberg RL and Price RA** (1998) Phylogenetic utility of the nuclear gene arginine decarboxylase: an example from Brassicaceae. *Mol Biol Evol* 15: 1312-1320
- Galston AW** (1983) Polyamines as modulators of plant development. *Bioscience* 33: 382-388
- Galston AW and Kaur-Sawhney R** (1988) Polyamines as endogenous growth regulators. In *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*, PJ Davis, ed. (Kluwer Academic Publishers), pp. 280-295
- Galston AW and Kaur-Sawhney R** (1990) Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol* 94: 406-410
- Gamarnik A and Frydman RB** (1991) Cadaverine an essential diamine for the normal root development of germinating soybean (*Glycine max*) seeds. *Plant Physiol* 97: 778-785
- Ha HC, Yager JD, Woster PA and Casero RA** (1998) Structural specificity of polyamines and polyamine analogues in the protection of DNA from strand breaks induced by reactive oxygen species *Biochem Biophys Res Comm* 244: 298-303

- Haddox MK and Russell DH** (1981) Increased nuclear conjugated polyamines and transglutaminase during liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 1712-1716
- Hayashi S and Murakami Y** (1995) Rapid and regulated degradation of ornithine decarboxylase. *Biochem J* 306: 1-10
- Hayashi S, Murakami Y and Matsufuji S** (1996) Ornithine decarboxylase antizyme: a novel type of regulatory protein. *TIBS* 21: 27-30
- Heby O** (1981) Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* 19: 1-20
- Heby O and Persson L** (1990) Molecular genetics of polyamine synthesis in eukariotic cells. *TIBS* 15: 153-158
- Heimer YM and Mizrahi Y** (1982) Characterization of ornithine decarboxylase of tobacco cells and tomato ovaries. *Biochem J* 201: 373-376
- Heimer YM, Mizrahi Y and Bachrach U** (1979) Ornithine decarboxylase activity in rapidly proliferating plant cells. *FEBS Lett* 104: 146-148
- Heiskala M, Zhang J, Hayashi S, Holtta E, Andersson LC** (1999) Translocation of ornithine decarboxylase to the surface membrane during cell activation and transformation. *EMBO J* 18:1214-1222
- Heller JS, Chen KY, Kyriakidis DA, Fong WF and Canellakis ES** (1978) The modulation of induction of ornithine decarboxylase by spermine, spermidine and diamines. *J Cell Physiol* 96: 225-234
- Heller JS, Rostomily R, Kyriakidis DA and Canellakis ES** (1983) Regulation of polyamine biosynthesis in *Escherichia coli* by basic proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 5181-5184
- Hiatt AC, McIndoo J and Malmberg RL** (1986) Regulation of polyamine biosynthesis in tobacco. *J Biol Chem* 261: 1293-1298
- Hibi N, Higashiguchi S, Hashimoto T and Yamada Y** (1994) Gene expression in tobacco low-nicotine mutants. *Plant Cell* 6: 723-735
- Hirasawa E and Suzuki Y** (1983) Biosynthesis of spermidine in maize seedlings. *Phytochemistry* 22: 103-106
- Hughes DW and Galau G** (1988) Preparation of RNA from cotton leaves and pollen *Plant Mol Biol Reporter* 6: 253-257
- Huhtinen O, Honkanen J and Simola LK** (1982) Ornithine- and putrescine-supported divisions and cell colony formation in leaf protoplasts of alders (*Alnus glutinosa* and *A. incana*). *Plant Sci Lett* 28: 3-9
- Hunt AG** (1994) Messenger RNA 3' end formation in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45: 47-60
- Imanishi S, Hashizume K, Nakakita M, Kojima H, Matsubayashi Y, Hashimoto T, Sakagami Y, Yamada Y, and Nakamura K** (1998) Differential induction by methyl jasmonate of genes encoding ornithine decarboxylase and other enzymes involved in nicotine biosynthesis in tobacco cell cultures. *Plant Mol Biol* 38: 1101-1111

- Iwata S, Sato Y, Asada M, Takagi M, Tsujimoto A, Inaba T, Yamada T, Sakamoto S, Yata J, Shimogori T, Igarashi K and Mizutani S** (1999) Anti-tumor activity of antizyme which targets the ornithine decarboxylase (ODC) required for cell growth and transformation. *Oncogene* 18: 165-72
- Jensen MA and Rechnitz GA** (1979) Response time characteristics of the pCO₂ electrode. *Anal Chem* 51: 1972-1977
- Kakkar RK and Rai VK** (1993) Plant polyamines in flowering and fruit ripening. *Phytochemistry* 33: 1281-1288
- Kallio A, McCann PP and Bey P** (1981) DL- α -(Difluoro-methyl) arginine: A potent enzyme-activated irreversible inhibitor of bacterial arginine decarboxylases. *Biochem* 20: 3163-3166
- Kashiwagi K, Endo H, Kobayashi H, Takio K and Igarashi K** (1995) Spermidine-preferential uptake system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 270: 25377-25382
- Katsirdakis KC and Roubelakis-Angelakis KA** (1991) Callogenic potentiality of leaf segments and shoot proliferation response of *Vitis spp.* genotypes. *J Wine Res* 2: 83-95
- Kaur-Sawhney R, Flores HE and Galston AW** (1980) Polyamine- induced DNA synthesis and mitosis in oat leaf protoplasts. *Plant Physiol* 65: 368-371
- Kaur-Sawhney R, Kandpal G, McGonigle B and Galston AW** (1990) Further experiments on spermidine-mediated floral-bud formation in thin-layer explants of Wisconsin 38 tobacco. *Planta* 181: 212-215
- Kaur-Sawhney R, Shih L, Flores HE and Galston AW** (1982) Relation of polyamine synthesis and titer to aging and senescence in oat leaves. *Plant Physiol* 69: 405-410
- Kaur-Sawhney R, Tiburcio AF and Galston AW** (1988) Spermidine and flower-bud differentiation in thin-layer explant of tobacco. *Planta* 173: 282-284
- Khan AJ and Minocha SC** (1991) Polyamines and somatic embryogenesis in carrot. II. The effects of cyclohexylammonium phosphate. *J Plant Physiol* 137: 446-452
- Klein RD, Geary TG, Gibson AS, Favreau MA, Winterrowd CA, Upton SJ, Keithly JS, Zhu G, Malmberg RL, Martinez MP and Yarlett N** (1999) Reconstruction of a bacterial/ plant polyamine biosynthesis pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 145: 301-307
- Koetje DS, Kononowicz H and Hodges TK** (1993) Polyamine metabolism associated with growth and embryogenic potential of rice. *J Plant Physiol* 141: 215-221
- Koromilas AE and Kyriakidis DA** (1988) The existence of ornithine decarboxylase-antizyme complex in germinated barley seeds. *Physiol Plant* 72: 718-724

- Kotzabasis K, Christakis-Hampsas MD and Roubelakis-Angelakis KA** (1993) A Narrow-Bore HPLC method for the identification and quantitation of free, conjugated and bound polyamines. *Anal Biochem* 214: 484-489
- Kumar AP, Mar PK, Zhao B, Montgomery RL, Kang D and Butler AP** (1995) Regulation of rat ornithine decarboxylase promoter activity by binding of transcription factor Sp1. *J Biol Chem* 270: 4341-4348
- Kyriakidis DA** (1983) Effect of plant growth hormones and polyamines on ornithine decarboxylase activity during the germination of barley seeds. *Physiol Plant* 57: 499-504
- Kyriakidis DA, Heller JS and Canellakis ES** (1978) Modulation of ornithine decarboxylase activity in *Escherichia coli* by positive and negative effectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4699-4703
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the head of of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lee MM, Lee SH and Park KY** (1997) Characterization and expression of two members of the S-adenosylmethionine decarboxylase gene family in carnation flower. *Plant Mol Biol* 34: 371-382
- Lee T** (1997) Polyamine regulation of growth and chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) roots cultured in vitro. *Plant Sci* 122: 111-117
- Lee T and Chu C** (1992) Ethylene-induced polyamine accumulation in rice coleoptiles. *Plant Physiol* 100: 238-245
- Li G, Regunathan S and Reis DJ** (1994) Argmatine is synthesized by a mitochondrial arginine decarboxylase in rat brain. *Ann NY Acad Sci*: 321-329
- Li RS, Law GL, Seifert RA, Romaniuk PJ and Morris DR** (1999) Ornithine decarboxylase is a transcriptional target of tumor suppressor WT1. *Exp Cell Res* 247: 257-266
- Lodhi MA, Ye GN, Weeden NF and Reisch BI** (1994) A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Mol Biol Rep* 12: 6-13
- Loulakakis KA and Roubelakis-Angelakis KA** (1991) Plant NAD(H)-glutamate dehydrogenase consists of two subunit polypeptides and their participation in the seven isoenzymes occurs in an ordered ratio. *Plant Physiol* 97: 104-111
- Loulakakis KA and Roubelakis-Angelakis KA** (1992) Ammonium-induced increase in NADH-glutamate dehydrogenase activity is caused by de novo synthesis of the α -subunit. *Planta* 187: 322-327
- Loulakakis KA, Roubelakis-Angelakis KA and Kanellis AK** (1996) Isolation of functional RNA from grapevine tissues poor in nucleic acid content. *Am J Enol Vitic* 47: 181-185

- Lovatt CJ** (1990) Stress alters ammonia and arginine metabolism. *In* HE Flores, RN Arteca, JC Shannon, eds, Polyamines and Ethylene: Biochemistry, Physiology, and Interactions. Current Topics in Plant Physiology, Vol 5. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 157-165
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
- Lu L, Stanley BA and Pegg AE** (1991) Identification of residues in ornithine decarboxylase essential for enzymic activity and for rapid protein turnover. *Biochem J* 277: 671-675
- Maki H, Ando S, Kodama H and Komamine A** (1991) Polyamines and the cell cycle of *Catharanthus roseus* cells in culture. *Plant Physiol* 96: 1008-1013
- Malmberg RL, Smith KE, Bell E and Cellino ML** (1992) Arginine decarboxylase of oats is clipped from a precursor into two polypeptides found in the soluble enzyme. *Plant Physiol* 100: 146-152
- Malmberg RL and Cellino ML** (1994) Arginine decarboxylase of oats is activated by enzymatic cleavage into two polypeptides. *J Biol Chem* 269: 2703-2706
- Malmberg RL, Watson MB, Galloway G and Yu W** (1998) Molecular Genetic Analyses of Plant Polyamines. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17(2): 199-204
- Martin-Tanguy J, Tepfer D, Paynot M, Heisler L and Martin C** (1990) Inverse relationship between polyamine levels and the degree of phenotypic alteration induced by the root-inducing, left hand transferred DNA from *A. rhizogenes*. *Plant Physiol* 92: 912-18
- Martin-Tanguy J and Carre M** (1993) Polyamines in grapevine microcuttings cultivated in vitro. Effects of amines and inhibitors of polyamine biosynthesis on polyamine levels and microcutting growth and development. *Plant Growth Regul* 13: 269-280
- Masgrau C, Altabella T, Farras R, Flores D, Thompson AJ, Besford RT, and Tiburcio AF** (1997) Inducible overexpression of oat arginine decarboxylase in transgenic tobacco plants. *Plant J* 11: 465-473
- Matsuda H** (1984) Some properties of the arginine decarboxylase in *Vicia faba* leaves. *Plant Cell Physiol* 25: 523-530
- McConlogue L, Gupta M, Wu L and Coffino P** (1984) Molecular cloning and expression of the mouse ornithine decarboxylase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 540-544
- Meijer EJM and Simmonds J** (1988) Polyamine levels in relation to growth and somatic embryogenesis in tissue cultures of *Medicago sativa* (L.). *J Exp Bot* 39: 787-794
- Messiaen J, Cambier P and Van Cutsem P** (1997) Polyamines and pectins. *Plant Physiol* 113: 387-395

- Meyerhoff ME and Fraticelli YM, Opdycke WN, Bachas LG and Gordus AD** (1983) Theoretical predictions on the response properties of potentiometric gas sensors based on internal polymer membrane electrodes. *Anal Chim Acta* 154: 17-31
- Michael AJ, Furze JM, Rhodes JC and Burtin D** (1996) Molecular cloning and functional identification of a plant ornithine decarboxylase cDNA. *Biochem J* 314: 241-248
- Minocha SC and Khan AJ** (1991) Effects of combinations of polyamine biosynthetic inhibitors on cellular polyamines in carrot cell cultures. *J Plant Physiol* 137: 507-510
- Minocha SC, Papa NS, Khan AJ and Samuelsen AI** (1991) Polyamines and somatic embryogenesis in carrot. III. Effects of methylglyoxal bis(guanylhydrazone). *Plant Cell Physiol* 32: 395-402
- Miyazaki H and Yang SF** (1987) The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. *Physiol Plant* 69: 366-370
- Montague MJ, Koppenbrink JW and Jaworski EG** (1978) Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*. I. Changes in intracellular content and rates of synthesis. *Plant Physiol* 62: 430-433
- Montague MJ, Armstrong TA and Jaworski EG** (1979) Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*. II. Changes in arginine decarboxylase activity. *Plant Physiol* 63: 341-345
- Moore RC and Boyle SM** (1990) Nucleotide sequence and analysis of the *speA* gene encoding biosynthetic arginine decarboxylase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172: 4631-4640
- Moore RC and Boyle SM** (1991) Cyclic AMP inhibits and putrescine represses expression of the *speA* gene encoding biosynthetic arginine decarboxylase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 173: 3615-3621
- Morrissey J, McCracken R, Ishidoya S and Klahr S** (1995) Partial cloning and characterization of an arginine decarboxylase in the kidney. *Kidney Int* 47: 1458-1461
- Murakami Y, Ichiba T, Matsufuji S and Hayashi S** (1996) Cloning of antizyme inhibitor, a highly homologous protein to ornithine decarboxylase. *J Biol Chem* 271: 3340-3342
- Murashige I and Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Nam KH, Lee SH and Lee J** (1997) Differential expression of ADC mRNA during development and upon acid stress in soybean (*Glycine max*) hypocotyls. *Plant Cell Physiol* 38: 1156-1166
- Nam KH, Lee SH and Lee J** (1997) Purification and characterization of arginine decarboxylase from soybean (*Glycine max*) hypocotyls. *Plant Cell Physiol* 38: 1150-1155

- Notari S, Lucchi R and Poli A** (1998) Effect of cold exposure on polyamine levels and ornithine decarboxylase activity of goldfish tissues. *Cell Mol Life Sci* 54: 277-281
- Nyman S, Soderman A and Simola LK** (1993) Metabolism of arginine and ornithine in suspension-cultured cells and aseptic roots of intact plants of *Atropa belladonna*. *J Exp Bot* 44: 869-877
- Palavan, N, Goren R and Galston AW** (1984) Effect of some growth regulators on polyamine biosynthetic enzymes in etiolated pea seedlings. *Plant Cell Physiol* 25: 541-546
- Panagiotidis CA, Georgatsos JG and Kyriakidis DA** (1982) Superinduction of cytosolic and chromatin-bound ornithine decarboxylase activities of germinating barley seeds by actinomycin D. *FEBS Letters* 146: 193-196
- Panagiotidis CA and Canellakis ES** (1984) Comparison of the basic *Escherichia coli* antizyme 1 and antizyme 2 with the ribosomal proteins S20/L26 and L34. *J Biol Chem* 259: 15025-15027
- Park KY and Lee SH** (1994) Effects of ethylene and auxin on polyamine levels in suspension-cultured tobacco cells. *Physiol Plant* 90: 382-390
- Pedroso MC, Primikirios N, Roubelakis-Angelakis KA and Pais MS** (1997) Free and conjugated polyamines in embryogenic and non-embryogenic leaf regions of camellia leaves before and during direct somatic embryogenesis. *Physiol Plant* 101: 213-219
- Perez-Amador MA, Carbonell J and Granell A** (1995) Expression of arginine decarboxylase is induced during early fruit development and in young tissues of *Pisum sativum* (L.). *Plant Mol Biol* 28: 997-1009
- Pfossier M, Konigshofer H and Kandelers R** (1990) Free, conjugated, and bound polyamines during the cell cycle of synchronized cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *J Plant Physiol* 136: 574-579
- Pilz RB, Steglich C and Scheffler IE** (1990) Molecular and genetic characterization of an ornithine decarboxylase-deficient chinese hamster cell line. *J Biol Chem* 265: 8880-8886
- Pohjanpelto P, Virtanen I and Holtta E** (1981) Polyamine starvation causes disappearance of actin filaments and microtubules in polyamine-auxotrophic CHO cells. *Nature* 293: 475-477
- Poulin R, Lu L, Ackermann B, Bey P and Pegg AE** (1992) Mechanism of the irreversible inactivation of mouse ornithine decarboxylase by α -difluoromethylornithine. *J Biol Chem* 267: 150-158
- Primikirios NI and Roubelakis-Angelakis KA** (1999) Cloning and expression of an arginine decarboxylase cDNA from *Vitis vinifera* L. cell-suspension cultures. *Planta* (in press)

- Raab MM and Weinstein LH** (1990) Polyamine and ethylene metabolism in *Triticum aestivum* (var. Vona). In HE Flores, RN Arteca, JC Shannon, eds, Polyamines and Ethylene: Biochemistry, Physiology, and Interactions. Current Topics in Plant Physiology, Vol 5. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 408-410
- Ramakrishna S and Adiga R** (1975) Arginine decarboxylase from *Lathyrus sativus* seedlings. Eur J Biochem 59:377-386
- Rastogi R, Dulson J and Rothstein SJ** (1993) Cloning of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) arginine decarboxylase gene and its expression during fruit ripening. Plant Physiol 103: 829-834
- Ray RM, Zimmermann BJ, McCormack SA, Patel TB, Johnson LR** (1999) Polyamine depletion arrests cell cycle and induces inhibitors p21 (Waf1/Cip1), p27(Kip1), and p53 in IEC-6 cells. Am J Physiol 276:C684-91
- Reggiani R** (1994) Purification and synthesis under anaerobic conditions of rice arginine decarboxylase. Plant Cell Physiol 35: 1245-1249
- Reggiani R, Hochkoeppler A and Bertani A** (1989) Polyamines in rice seedlings under oxygen-deficit stress. Plant Physiol 91: 1197-1201
- Riggs P** (1994) Expression and purification of maltose-binding protein fusions. In I Ausubel, M Frederick eds, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, pp 16.6.1-16.6.14
- Robie CA and Minocha SC** (1989) Polyamines and somatic embryogenesis in carrot. I. The effects of difluoromethyl-ornithine and difluoromethyl-arginine. Plant Sci 65: 45-54
- Roubelakis KA and Klieber WM** (1978) Enzymes of Krebs-Henseleit cycle in *Vitis vinifera* L. III. In vivo and in vitro studies of arginase. Plant Physiol 62: 344-347
- Roubelakis-Angelakis KA and Zivanovic SI** (1991) A new culture medium for in vitro rhizogenesis of grapevine (*Vitis spp.*) genotypes. HortSci 26: 1551-1553
- Roy M and Ghosh B** (1996) Polyamines both common and uncommon, under heat stress in rice (*Oryza sativa*) callus. Physiol Plant 98: 196-200
- Ruan H, Shantz LM, Pegg AE and Morris DR** (1996) The upstream open reading frame of the mRNA encoding S-adenosylmethionine decarboxylase is a polyamine-responsive translational control element. J Biol Chem 271: 29576-29582
- Rupniak HT and Paul D** (1978) Inhibition of spermidine and spermine synthesis leads to growth arrest of rat embryo fibroblasts in G₁. J Cell Physiol 94: 161-170
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T** (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Ed 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

- Sandmeier E, Hale TI and Christen P** (1994) Multiple evolutionary origin of pyridoxal-5-phosphate-dependent amino acid decarboxylases. *Eur J Biochem* 221: 997-1002
- Sanger F, Nicklen S and Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
- Santa-Cruz A, Estan MT, Rus A, Bolarin MC and Acosta M** (1997) Effects of NaCl and Mannitol Iso-osmotic stresses on the free polyamine levels in leaf discs of tomato species differing in salt tolerance. *J Plant Physiol* 151: 754-758
- Santerre A, Markiewicz M and Villanueva VR** (1990) Effect of acid rain on polyamines in *Picea*. *Phytochemistry* 29: 1767-1769
- Sarjala T, Taulavuori K, Savonen EM and Edfast AB** (1997) Does availability of potassium affect cold hardening of Scots pine through polyamine metabolism? *Physiol Plant* 99: 56-62
- Satriano J, Matsufuji S, Murakami Y, Lortie MJ, Schwartz D, Kelly CJ, Hayashi S and Blantz RC** (1998) Agmatine suppresses proliferation by frameshift induction of antizyme and attenuation of cellular polyamine levels. *J Biol Chem* 273:15313-15316
- Scaramagli S, Bueno M, Torrigiani P, Altamura MM, Capitani F and Bagni N** (1995) Morphogenesis in cultured thin layers and pith explants of tobacco. II. Early hormone-modulated polyamine biosynthesis. *J Plant Physiol* 147: 113-117
- Scheible WR, Gonzalez-Fontes A, Lauerer M, Muller-Rober B, Caboche M and Stitt M** (1997) Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell* 9:783-798
- Schrode J and Folk JE** (1978) Transglutaminase-catalyzed cross-linking through diamines and polyamines. *J Biol Chem* 253: 4837-4840
- Schroder G and Schroder J** (1995) cDNAs for S-adenosyl-L-methionine decarboxylase from *Catharanthus roseus*, heterologous expression, identification of the proenzyme-processing site, evidence for the presence of both subunits in the active enzyme, and a conserved region in the 5' mRNA leader. *Eur J Biochem* 228: 74-78
- Seely JE, Poso H and Pegg AE** (1982) Purification of ornithine decarboxylase from kidneys of androgen-treated mice. *Biochem* 21: 3394-3399
- Seiler N and Dezeure F** (1990) Polyamine transport in mammalian cells. *Int J Biochem* 3: 211-218
- Serafini-Fracassini D** (1991) Polyamine biosynthesis and conjugation to macromolecules during the cell cycle of *Helianthus tuberosus* tuber. In *Lecture Course on Polyamines as Modulators of Plant Development*. (Fundacion Juan March), pp. 40-45
- Serafini-Fracassini D, Bagni N, Cionini PG and Bennici A** (1980) Polyamines and nucleic acids during the first cell cycle of *Helianthus tuberosus* tissue after the dormancy break. *Planta* 148: 332-337
- Serafini-Fracassini D, Del Duca S and Beninati S** (1995) Plant transglutaminases. *Phytochemistry* 40: 355-365

- Sharma P and Rajam MV** (1995) Spatial and temporal changes in endogenous polyamine levels associated with somatic embryogenesis from different hypocotyl segments of eggplant (*Solanum melongena* L.). *J Plant Physiol* 146: 658-664
- Shih CY and Kao CH** (1996) Growth inhibition in suspension-cultured rice cells under phosphate deprivation is mediated through putrescine accumulation. *Plant Physiol* 111: 721-724
- Sindhu RK and Cohen SS** (1984) Propylamine transferases in Chinese cabbage leaves. *Plant Physiol* 74: 645-649
- Sissons CH** (1976) Improved technique for accurate and convenient assay of biological reactions liberating $^{14}\text{CO}_2$. *Anal Biochem* 70: 454-462
- Slocum RD and Galston AW** (1985) Changes in polyamine biosynthesis associated with postfertilization growth and development in tobacco ovary tissues. *Plant Physiol* 79: 336-343
- Slocum RD, Kaur-Sawhney R and Galston AW** (1984) The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Arc Biochem Biophys* 235: 283-303
- Slocum RD and Weinstein LH** (1990) Stress-induced putrescine accumulation as a mechanism of ammonia detoxification in cereal leaves. *In* HE Flores, RN Arteca, JC Shannon, eds, *Polyamines and Ethylene: Biochemistry, Physiology, and Interactions. Current Topics in Plant Physiology, Vol 5.* American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 157-165
- Smith DB and Corcoran LM** (1994) Expression and purification of glutathione-S-transferase fusion proteins. *In* I Ausubel, M Frederick eds, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York, pp 16.7.1-16.7.8
- Smith TA** (1978) Spectrophotometric method for the estimation of arginine decarboxylase. *Anal Biochem* 92: 331-337
- Smith TA** (1979) Arginine decarboxylase of oat seedlings. *Phytochemistry* 18: 1447-1452
- Smith TA** (1982) The function and metabolism of polyamines in higher plants. *Proceedings of the 11th International Conference on Plant Growth Substances* (July, 1982), pp.463-472
- Smith TA** (1985) Polyamines. *Ann Rev Plant Physiol* 36: 117-143
- Stewart GR and Lahrer F** (1980) Accumulation of amino acids and related compounds in relation to environmental stress. *In* PK Stumpf, EE Conn, eds, *The Biochemistry of Plants, Vol 5.* Academic Press, New York, pp 609-635
- Suresh, MR, Ramakrishna S and PR Adiga** (1978) Regulation of arginine decarboxylase and putrescine levels in *Cucumis sativus* cotyledons. *Phytochemistry* 17: 57-63
- Suzuki Y and Hirasawa E** (1980) S-adenosylmethionine decarboxylase of corn seedlings. *Plant Physiol* 66: 1091-1094
- Syntichaki KM, Loulakakis KA and Roubelakis-Angelakis KA** (1996) The amino-acid sequence similarity of plant glutamate dehydrogenase to the extremophilic archaeal enzyme conforms to its stress-related function. *Gene* 168: 87-92

- Tabor CW and Tabor H** (1984) Polyamines. *Ann Rev Biochem* 53: 749-790
- Tarengi E, Carre M, and Martin-Tanguy J** (1995) Effects of inhibitors of polyamine biosynthesis and of polyamines on strawberry microcutting growth and development. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 42: 47-55
- Tassoni A, Antognoni F, Battistini ML, Sanvido O and Bagni N** (1998) Characterization of spermidine binding to solubilized plasma membrane proteins from zucchini hypocotyls. *Plant Physiol* 117: 971-977
- Taylor MA, Burch LR and Davies HV** (1992) Changes in polyamine biosynthesis during the initial stages of tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). *J Plant Physiol* 141: 370-372
- Taylor MA, Mad Arif SA, Kumar A, Davis HV Scobie LA, Pearce SR and Flavell AJ** (1992) Expression and sequence analysis of cDNAs induced during the early stages of tuberization in different organs of the potato plant (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Mol Biol* 20: 641-651
- Theodoropoulos PA and Roubelakis-Angelakis KA** (1989) Mechanism of arginine transport in *Vitis vinifera* L. protoplasts. *J Exp Bot* 40: 1223-1230
- Thompson JF** (1980) Arginine synthesis, proline synthesis, and related processes. *In* PK Stumpf, EE Conn, eds, *The Biochemistry of Plants*, Vol 5. Academic Press, New York, pp: 375-402
- Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ** (1994) Clustal-W-improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680
- Tiburcio AF, Kaur-Sawhney R, Ingersoll RB and Galston AW** (1985) Correlation between polyamines and pyrrolidine alkaloids in developing tobacco callus. *Plant Physiol* 78: 323-326
- Tiburcio AF, Gendy CA and Tran Thanh Van K** (1989) Morphogenesis in tobacco subepidermal cells: Putrescine as a marker of root differentiation. *Plant Cell Tissue Org Cult* 19: 43-54
- Tonelli D, Budini R, Gattavecchia E and Girotti S** (1981) A simple and continuous assay for decarboxylase activity using a carbon dioxide-selective electrode. *Anal Biochem* 111: 189-194
- Tonin GS, Wheeler CT and Crozier A** (1991) Effect of changes in nitrogen nutrition on the polyamine content of *Alnus glutinosa*. *Plant Cell Envir* 14: 415-421
- Torne JM, Claparols I, Marce M, Guergue AM and Santos MA** (1994) Influence of pretreatments with inhibitors of putrescine synthesis on polyamine metabolism and differentiation process of maize calluses. *Plant Sci* 100:15-22
- Torrigiani P, Altamura MM, Pasquq G, Monacelli B, Serafini-Fracassini D and Bagni N** (1987) Free and conjugated polyamines during de novo floral and vegetative bud formation in thin cell layers of tobacco. *Physiol Plant* 70: 453-460

- Torrighiani P, Serafini-Fracassini D and Bagni N** (1987) Polyamine biosynthesis and effect of dicyclohexylamine during the cell cycle of *Helianthus tuberosus* tuber. *Plant Physiol* 84: 148-152
- Torrighiani P, Serafini-Fracassini D, Biondi S and Bagni N** (1985) Evidence for the subcellular localization of polyamines and their biosynthetic enzymes in plant cells. *J Plant Physiol* 124: 23-29
- Torrighiani P, Altamura MM, Capitani F, Serafini-Fracassini D and Bagni N** (1989) De novo root formation in thin cell layers of tobacco: changes in free and bound polyamines. *Physiol Plant* 77: 294-301
- Triantaphylides C, Nespoulous L and Chervin C** (1993) Ammonium requirement for radiation-induced accumulation of polyamines in suspension-cultured grape cells. *Physiol Plant* 87: 389-395
- Tsirka S and Coffino P** (1992) Dominant negative mutants of ornithine decarboxylase. *J Biol Chem* 267: 23057-23062
- Tsirka SA, Sklaviadis TK and Kyriakidis DA** (1986) Non- competitive inhibition of ornithine decarboxylase by a phosphopeptide and phosphoamino acids. *BBA* 884: 482-489
- Turano FJ and Kramer GF** (1993) Effect of metabolic intermediates on the accumulation of polyamines in detached soybean leaves. *Phytochemistry* 34: 959-968
- Walden R, Cordeiro A and Tiburcio AF** (1997) Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiol* 113: 1009-1013
- Walker MA, Roberts DR, Shih CY and Dumbroff EB** (1985) A requirement for polyamines during the cell division phase of radicle emergence in seeds of *Acer saccharum*. *Plant Cell Physiol* 26: 967-971
- Walters D** (1987) **Polyamines: The Cinderellas of cell biology. *Biologist* 34: 73-76**
- Watson MB and Malmberg RL** (1996) Regulation of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh arginine decarboxylase by potassium deficiency stress. *Plant Physiol* 111: 1077-1083
- Watson MB, Yu W, Galloway G and Malmberg RL** (1997) Isolation and characterization of a second arginine decarboxylase cDNA from *Arabidopsis* (PGR97-114). *Plant Physiol* 114: 1569
- Watson MB, Emory KK, Piatak RM and Malmberg RL** (1998) Arginine decarboxylase (polyamine synthesis) mutants of *Arabidopsis thaliana* exhibit altered root growth. *Plant J* 13: 231-239
- Winer L, Vinkler C and Apelbaum A** (1984) Partial purification and characterization of arginine decarboxylase from avocado fruit, a thermostable enzyme. *Plant Physiol* 76: 233-237

- Yadav JS and Rajam MV** (1997) Spatial distribution of free and conjugated polyamines in leaves of *Solanum melongena* L. associated with differential morphogenetic capacity: efficient somatic embryogenesis with putrescine. *J Exp Bot* 48: 1537-1545
- Yadav JS and Rajam MV** (1998) Temporal regulation of somatic embryogenesis by adjusting cellular polyamine content in eggplant. *Plant Physiol* 116: 617-625
- Yakovleva GM and Dudits D** (1993) Effect of an aminoxy analogue of putrescine on wheat cell cultures (*Triticum monococcum* L.). *J Plant Physiol* 142: 218-221
- Yamakawa H, Kamada H, Satoh M and Ohashi Y** (1998) Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* 118: 1213-1222
- Yamanoha B and Cohen SS** (1985) S-adenosylmethionine decarboxylase and spermidine synthase from Chinese cabbage. *Plant Physiol* 78: 784-790
- Ye B, Muller HH, Zhang J and Gressel J** (1997) Constitutively elevated levels of putrescine and putrescine-generating enzymes correlated with oxidant stress resistance in *Conyza bonariensis* and wheat. *Plant Physiol* 115: 1443-1451
- Yoshida I and Hirasawa E** (1998) Photoinduction of arginine decarboxylase activity in leaves of *Pharbitis nil*. *Phytochemistry* 49: 2255-2259
- Young ND and Galston AW** (1983) Putrescine and acid stress. Induction of arginine decarboxylase activity and putrescine accumulation by low pH. *Plant Physiol* 71: 767-771
- Yoza KI, Takeda Y, Sekiya K, Nogata Y and Ohta H** (1996) Putrescine accumulation in wounded green banana fruit. *Phytochemistry* 42: 331-334

