

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
“ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ
ΦΥΤΩΝ”**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΕΥΘΥΜΙΟΥ Α. ΑΝΔΡΩΝΗ**

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ-c ΣΤΟΝ
ΕΠΑΓΟΜΕΝΟ ΑΠΟ ΩΣΜΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΘΑΝΑΤΟ**

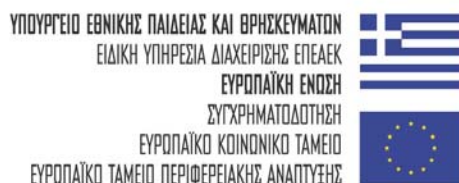
ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2009

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
“ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ
ΦΥΤΩΝ”**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΕΥΘΥΜΙΟΥ Α. ΑΝΔΡΩΝΗ**

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ-c ΣΤΟΝ
ΕΠΑΓΟΜΕΝΟ ΑΠΟ ΩΣΜΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΘΑΝΑΤΟ**



**Συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση και το
Ευρωπαϊκό Κοινό Ταμείο – ΕΠΕΑΕΚ II – ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ:
Υποτροφίες Έρευνας για το Πανεπιστήμιο Κρήτης**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2009

Ο Ρόλος του Κυτοχρώματος-c στον Επαγόμενο από Ωσμωτική Καταπόνηση Κυτταρικό Θάνατο

**Από
ΕΥΘΥΜΙΟ Α. ΑΝΔΡΩΝΗ
Βιολόγο, M.Sc. Πανεπιστημίου Κρήτης**

**Υποβλήθηκε ως μέρος των απαιτήσεων για τον τίτλο
του Διδάκτορα στη Μοριακή Βιολογία και Βιοτεχνολογία Φυτών
στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης**

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Καλλιόπη Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Κ.Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης
Ν.Ι. Πανόπουλος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
Κ. Κοτζαμπάσης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Κ.Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης
Ν.Ι. Πανόπουλος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
Κ. Κοτζαμπάσης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
Ε. Τσαγρή, Επίκουρος Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης
Ε. Αθανασάκη, Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης
Σ. Πυρίντσος, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
Ε. Λαδουκάκης, Λέκτορας Πανεπιστημίου Κρήτης

Στην Οικογένειά μου

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας και Βιοτεχνολογίας Φυτών, του Πανεπιστημίου Κρήτης κατά το χρονικό διάστημα 2003-2009. Συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή ένωση και το Ευρωπαϊκό κοινωνικό ταμείο – ΕΠΕΑΕΚ II – ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ. Το τμήμα Βιολογίας παρείχε την απαιτούμενη υλικοτεχνική υποστήριξη σε όλη την διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Η επίβλεψη και επιστημονική καθοδήγηση μου κατά την διάρκεια της ερευνητικής μου εργασίας, έγινε από την Καθηγήτρια Ρουμπελάκη-Αγγελάκη Καλλιόπη, την οποία και θέλω να ευχαριστήσω θερμά για την εμπιστοσύνη, που έδειξε στο άτομο μου. Η υποστήριξη κατά την διάρκεια της διατριβής μου, καθώς και η υπομονή και οι συμβουλές της, συνέβαλαν αποφασιστικά στην ολοκλήρωση της διατριβής αυτής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, Καθηγητή Νικόλαο Πανόπουλο και Καθηγητή Κυριάκο Κοτζαμπάση. Τους ευχαριστώ θερμά για την ηθική συμπαράσταση και την παροχή γνώσεων κατά την διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά, την Καθηγήτρια Ε. Τσαγρή, την Καθηγήτρια Ε. Αθανασάκη, τον Επίκουρο Καθηγητή Σ. Πυρίντσο και τον Λέκτορα Μ. Λαδουκάκη, για την συμμετοχή τους στην επταμελή εξεταστική επιτροπή, για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους και για την ενθαρρυντική κριτική τους.

Κάθε ταξίδι έχει αρχή και τέλος, και η αξία του καθορίζεται τόσο από τον τελικό προορισμό, όσο και από την διαδρομή. Για μένα ήταν μια δύσκολη και μεγάλη διαδρομή, στην οποία όμως συνάντησα πολλούς συνοδοιπόρους. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να τους χαιρετήσω και να αναγνωρίσω την προσφορά τους σε αυτό το ταξίδι. Ξεκινώντας θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου μας, παλαιότερους και νεότερους: Την Στάσα, η οποία υπήρξε δασκάλα μου, φίλη και βοηθός καθόλη την διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο. Τον Νικόλα και τον Κωστή, τόσο για την καθοδήγηση και την βοήθειά τους, όσο και για την παρέα τους κατά την διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο. Τον Δάκη, τον Γιάννη, τον Δημήτρη, την Ελένη, τον Παναγιώτη και τον Χρήστο για τις άπειρες ώρες που μοιραστήκαμε εντός και εκτός εργαστηρίου στα εύκολα και στα δύσκολα, στα καλά και στα άσχημα και για τα όσα ζήσαμε παρέα. Την Ιμέν, την Καταλίν και την Νικολέτα, για την προσφορά τους, ιδίως τις τελευταίες μέρες του διδακτορικού μου.

Τους λοιπούς συνεργάτες εκτός εργαστηρίου, το Λευτέρη Πινάκη, Νίκο Σκανδάλη, τον Παναγιώτη Σαρρή, τον Μάνο Τραντά, τον Τάσο Αλεξιάδη, την Αντιγόνη Παπανικολάου για την συνεργασία και την παρέα τους.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στο Κατερινάκι μου, την σύντροφό μου στην ζωή, την φίλη μου, την συνεργάτη, η βοήθεια και υποστήριξή της οποίας, τόσο σε ερευνητικό επίπεδο, όσο και σε προσωπικό μου έδωσε την δύναμη να συνεχίσω παρόλες τις δυσκολίες.

Τέλος ένα τεράστιο ευχαριστώ στους γονείς μου, στον Ανδρέα και την Ζήνα, οι οποίοι πιστέψαν σε μένα από την αρχή και ήταν εκεί δίπλα μου καθόλη την διάρκεια της πορείας μου. Χωρίς την ηθική και πρακτική τους υποστήριξη απ' την αρχή μέχρι και το τέλος τίποτα δεν θα ήταν δυνατό.

Πίνακας περιεχομένων

Συντμήσεις	1
Περίληψη	4
Γενική Εισαγωγή	6
Παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου από οξειδωτικά ενζυματικά και μη ενζυματικά συστήματα	8
Φυσιολογικές λειτουργίες των ενεργών μορφών οξυγόνου	13
Αντιοξειδωτική άμυνα των φυτών	15
Το μιτοχόνδριο ως πηγή ΕΜΟ	17
Το μονοπάτι της εναλλακτικής οξειδάσης	21
Μιτοχόνδριο και ΠΚΘ	23
Σκοπός της εργασίας	27
Κεφάλαιο 1	28
1.1 Περίληψη	28
1.2 Εισαγωγή	29
1.3 Υλικά και Μέθοδοι	31
1.4 Αποτελέσματα	43
1.5 Συζήτηση	53
Κεφάλαιο 2	59
Κεφάλαιο 2	59
2.1 Περίληψη	59
2.2 Εισαγωγή	60
2.3 Υλικά και Μέθοδοι	61
2.4 Αποτελέσματα	67
2.5 Συζήτηση	75
Κεφάλαιο 3	80
3.1 Περίληψη	80
3.2 Εισαγωγή	81
3.3 Υλικά και Μέθοδοι	86
3.4 Αποτελέσματα	89
3.5 Συζήτηση	100

Συμπεράσματα και προοπτικές	104
-----------------------------------	-----

Συντμήσεις

EMO: Ενεργές Μορφές Οξυγόνου

ΠΚΘ: Προγραμματισμένος Κυτταρικός Θάνατος

SOD: Superoxide dismutase, υπεροξειδική δισμουτάση

CAT: Catalase

POX: Peroxidase

APX: Ascorbate peroxidase

GPX: Glutathione peroxidase

DAO: Diamine oxidase

PAO: Polyamine oxidase

UV: Ultraviolet

NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, φωσφορικό νικοτιν-αδενιν-δινουκλεοσίδιο

LOX: Lipoxygenase

STG: S- glutathione transferase

HR: Hypersensitive reaction

SAR : systemic aquired resistance

ASA: Ascorbic acid

GSH: γλουταθειόνη

PAs: Polyamines

MDHA: Monodehydroascorbate

DHA: Dehydroascorbate

MDHAR: monodehydroascorbate reductase

DHAR: dehydroascorbate reductase

GSSG: οξειδωμένη γλουταθειόνη

GR: Glutathione reductase

COX : Cytochrome-c oxidase

AOX: Alternative oxidase

UQr : reduced ubiquinone

FMN: φλάβινο-μονονουκλεοτίδιο

Apaf: Apoptosis protease activating factor

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

NBT: Nitro blue tetrazolium

DAB: Diaminobenzidine

PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SSC: sodium citrate and sodium chloride

TCA: Trichloro acetic acid

BSA: Bovine serum albumin

PTOX: Plastid terminal oxidase

GFP: Green florescent protein

SHAM: Salicylhydroxamic acid

nPG: n-propyl gallate

DCIP: 2,6-dichlorophenol-indophenol

DMSO: dimethyl sulfoxide

PBS: Phosphate buffer saline

PMSF: phenylmethanesulfonyl fluoride

Cyt-c: Cytochrome-c

ΓΤ: Γενετικά τροποποιημένα

Spm: Spermine

Put: Putrescine

Spd: Spermidine

Cad: Cadaverine

S-PAs: soluble polyamines

SH-Pas: soluble hydrolyzed polyamines

PH-Pas: pellet hydrolyzed polyamines

ODC: Ornithine decarboxylase

ADC: Arginine decarboxylase

SPDS: spermidine synthase

SPMS: spermine synthase

AOs: amine oxidases

DAOs: Diamine oxidases

SMO: spermine oxidase

DAP: Diaminopropane

DCFH-DA: 2,7- dichlorodihydrofluorescein diacetate

PCA: perchloric acid

TEMED: tetramethylethylenediamine

DPI: diphenylidonium

Περίληψη

Από την βιβλιογραφία καθίσταται σαφές ότι αν και μέχρι σήμερα υπάρχουν αναφορές για ομοιότητες ανάμεσα στον φυτικό και ζωικό ΠΚΘ, το τοπίο παραμένει «θολό». Κομβικά σημεία του μονοπατιού του ΠΚΘ έχουν διαπιστωθεί σε φυτικά συστήματα, ιδίως κάτω από την επίδραση καταπόνησης ως επαγωγή, ενώ το μιτοχόνδριο αναδεικνύεται τελευταία όχι μόνο σε πηγή ΕΜΟ αλλά και σε επαγωγέα μορφών ΠΚΘ. Το εργαστήριό μας διαθέτει μια μακρά παράδοση στην αποσαφήνιση των μηχανισμών απόκρισης του φυτού σε καταπονήσεις και ιδίως στην αλατότητα. Έχουμε ήδη δείξει πως η καταπόνηση από αλατότητα οδηγεί στην συσσώρευση των ΕΜΟ και στην εκδήλωση του ΠΚΘ σε φυτά υπό την ρύθμιση των ΕΜΟ (Papadakis and Roubelakis-Angelakis, 2005; Skopelitis et al., 2006; Moschou et al., 2008a; Moschou et al., 2008b). Υπό το φως των αναφορών στην βιβλιογραφία για την συμβολή του μιτοχονδρίου στην απόκριση των φυτών σε αβιοτικές καταπονήσεις θεωρήθηκε σκόπιμη η διερεύνηση του ρόλου του μιτοχονδρίου και πιο συγκεκριμένα ο ρόλος του κυτοχρώματος-c υπό καθεστώς καταπόνησης. Ο λόγος που οδήγησε στην μελέτη αυτού του μορίου είναι ότι αποτελεί έναν κομβικό παράγοντα που συμβάλλει τόσο στην παραγωγή των ΕΜΟ από την αναπνευστική αλυσίδα του μιτοχονδρίου, με την απελευθέρωσή του από αυτή, όσο και στην επαγωγή του μονοπατιού του ΠΚΘ. Οι δοκιμές έγιναν σε φυτά καπνού, *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana, και διερευνήθηκαν παράμετροι όπως η αναπνευστική ικανότητα των φυτών, η συσσώρευση των ΕΜΟ, ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας του μιτοχονδρίου, και επαγωγή του μονοπατιού του ΠΚΘ.

Στην συνέχεια απομονώθηκε το γονίδιο του κυτοχρώματος-c και χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της παροδικής έκφρασης Αγροβακτηρίου, *Agrobacterium tumefaciens* ώστε να υπερεκφραστεί η πρωτεΐνη του κυτοχρώματος-c σε κύτταρα μεσόφυλλου καπνού. Επαναλήφθηκαν οι δοκιμές αλατότητας ώστε να διαπιστωθεί αν τα αυξημένα επίπεδα του κυτοχρώματος οδηγήσουν σε αντοχή στην καταπόνηση και έναν βελτιωμένο φαινότυπο. Τα μετασηματισμένα φυτά εμφάνισαν φαινότυπο ανθεκτικό στην καταπόνηση, αναδεικνύοντας τον ρόλο του κυτοχρώματος κατά την καταπόνηση από αλατότητα

Επιπλέον διερευνήθηκε και η συμβολή των πολυαμινών στο μονοπάτι επαγωγής των αποκρίσεων του μιτοχονδρίου κατά την καταπόνηση από αλατότητα.

Χρησιμοποιήθηκαν φυτά *Arabidopsis* αγρίου τύπου και τρανσγενικά με διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των πολυαμινών και πολυαμινικών οξειδασών, ώστε να διαπιστωθεί αν η επαγόμενη από τις πολυαμίνες παραγωγή των ΕΜΟ επηρεάζει την λειτουργία του μιτοχονδρίου. Αποδείχτηκε πως αν και η οξείδωση των πολυαμινών από το γονίδιο ΡΑΟ3 φαίνεται να μην επηρεάζει την μιτοχονδριακή λειτουργία, αντιθέτως η ενεργοποίηση της ΝΑDΡΗ οξειδάσης από την σπερμιδίνη οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης των ΕΜΟ και αυξημένη αναπνευστική δραστηριότητα στο φυτό.

Γενική Εισαγωγή

Τα φυτά αναπτύσσονται σε ένα συνεχώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον το οποίο συχνά θέτει σοβαρούς περιορισμούς στην αύξηση και ανάπτυξή τους. Οι περιορισμοί αυτοί συνήθως τίθενται από αντίξοες συνθήκες όπως αλατότητα, ακραίες θερμοκρασίες, ξηρασία, βαρέα μέταλλα, όζον, κ.ά.

Από τις παραπάνω καταπονήσεις, η αλατότητα επηρεάζει ίσως το μεγαλύτερο ποσοστό των καλλιεργούμενων εκτάσεων παγκοσμίως. Σύμφωνα με στοιχεία του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (F.A.O.) για το 2000, τουλάχιστον 3,97 δις στρέμματα γης παγκοσμίως εμφανίζουν υψηλή αλατότητα. Πιο συγκεκριμένα από τα 2.300 εκατομμύρια στρέμματα καλλιεργήσιμης γης, τουλάχιστον τα 450 εκατομμύρια επηρεάζονται από υψηλή αλατότητα, έκταση που αντιστοιχεί στο 19,5% της καλλιεργήσιμης γης (<http://www.fao.org>). Από τα παραπάνω γίνεται φανερό πως η αντιμετώπιση της αλατότητας, ιδιαίτερα στις καλλιεργήσιμες εκτάσεις είναι αναγκαία. Σύγχρονες γεωργικές πρακτικές όπως στάγδην άρδευση μπορούν να βελτιώσουν την αξιοποίηση του νερού από τα φυτά, μειώνοντας έτσι την επιζήμια επίδραση της αλατότητας στα καλλιεργούμενα εδάφη και μακρόχρονα αποκαθιστώντας το ισοζύγιο νερού. Για να είναι όμως αποτελεσματικές τέτοιες πρακτικές επιβάλλεται να συνδυαστούν με χρήση φυτών τα οποία εμφανίζουν αντοχή στην αλατότητα (Munns, 2002). Για να επιτευχθεί όμως αντοχή στην αλατότητα πρώτα πρέπει να κατανοηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί αντίδρασης των φυτών στην αλατότητα και η επίδρασή της στην αύξηση και ανάπτυξη των φυτών.

Η αλατότητα είναι ένας σύνθετος παράγοντας καταπόνησης ο οποίος περιλαμβάνει τόσο ωσμωτική και ιοντική καταπόνηση, όσο και δευτερεύουσες μορφές καταπόνησης όπως οξειδωτική καταπόνηση (Zhu, 2001). Τα αυξημένα ιόντα Na^+ στο έδαφος δημιουργούν ένα ωσμωτικό δυναμικό το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την έξοδο νερού από τα κύτταρα της ρίζας. Νερό το οποίο είναι αποθηκευμένο στα χυμοτόπια μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα ώστε να αντικαταστήσει αυτό που έχει αφαιρεθεί, με άμεσο αποτέλεσμα την απώλεια σπαργής σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα από την εμφάνιση NaCl στο έδαφος (Yeo et al., 1991). Τα ιόντα Na^+ προσλαμβάνονται από την ρίζα και μεταφέρονται στα φύλλα όπου και συσσωρεύονται στον αποπλάστη (Flowers et al., 1991). Τα αυξημένα ιόντα Na^+ και

Cl⁻, με την προϋπόθεση ότι διαμερισματοποιούνται στο χυμοτόπιο μπορούν να αποτελέσουν ένα εύχρηστο μέσο για αποκατάσταση της σπαργής. Η «αποθήκευση» όμως των ιόντων στο χυμοτόπιο δημιουργεί μια διαβάθμιση ωσμωτικού δυναμικού ανάμεσα στο χυμοτόπιο και το κυτταρόπλασμα, η οποία μειώνει την διαθεσιμότητα του νερού στο κυτταρόπλασμα. Σε αυτήν την περίπτωση το φυτικό κύτταρο επιστρατεύει ωσμολύτες και αντλίες ιόντων ώστε να αποκαταστήσει την ωσμωτική ισορροπία ανάμεσα σε χυμοτόπιο και κυτταρόπλασμα (Shabala and Cuin, 2008). Οι ωσμωτικές διαταραχές είναι όμως μόνο μια πλευρά της αρνητικής επίδρασης του Na⁺ στο φυτικό κύτταρο. Το Na⁺ εμφανίζει μεγάλη ομοιότητα με το K⁺ όσον αφορά τις φυσιολογικές τους ιδιότητες αλλά και την συμμετοχή των 2 ιόντων σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια, με αποτέλεσμα η αυξημένη παρουσία του Na⁺ στο κύτταρο να ανταγωνίζεται το απαραίτητο K⁺ (Marschner, 1995). Το φαινόμενο εντείνεται εφόσον η υψηλή συγκέντρωση Na⁺ στο έδαφος μειώνει την δυνατότητα πρόσληψης K⁺ με αποτέλεσμα ο λόγος K⁺ / Na⁺ να μειώνεται αισθητά. Στην μειωμένη πρόσληψη K⁺ προστίθεται και η απώλειά του, εξαιτίας της απώλειας δυναμικού της μεμβράνης η οποία δημιουργείται από την είσοδο Na⁺ και καθιστά την ενεργητική πρόσληψη K⁺ ακόμη πιο δύσκολη, ενώ παράλληλα εντείνει την απώλεια K⁺ από το κύτταρο. Η ενεργητική πρόσληψη γίνεται ακόμη πιο δύσκολη εξαιτίας της απώλειας ATP, το οποίο δαπανάται για την παραγωγή οσμολυτών (Shabala and Cuin, 2008).

Πέρα από τις αρνητικές επιδράσεις της αλατότητας στην ιοντική και ωσμωτική ομοιοστασία εξίσου σημαντικές είναι οι δευτερεύουσες μορφές καταπόνησης, όπως η οξειδωτική καταπόνηση. Όπως και στις περισσότερες αβιοτικές καταπονήσεις (ξηρασία, ακραίες θερμοκρασίες κτλ) η έκθεση σε NaCl προκαλεί διαταραχές στην μεταβολική ισορροπία των φυτών οδηγώντας σε αυξημένη παραγωγή και συσσώρευση των Ενεργών Μορφών Οξυγόνου (EMO). Οι EMO, αναγμένες μορφές του ατμοσφαιρικού οξυγόνου O₂, είναι εξαιρετικά «δραστήρια» μόρια τα οποία έχουν τη δυνατότητα να προκαλούν οξείδωση σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα, οδηγώντας στην οξειδωτική καταστροφή του κυττάρου (Mittler, 2002). Συνήθως η 1^η κατά σειρά ρίζα που παράγεται είναι το ενεργό οξυγόνο (singlet oxygen O₂¹) το οποίο με την μεταφορά ενός, δυο, ή τριών ηλεκτρονίων στο O₂ οδηγεί στον σχηματισμό του υπεροξειδίου (superoxide O₂^{•-}) του περοξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και της υδροξυλικής ρίζας (hydroxyl radical HO[•]).

Οι EMO μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν δευτερεύοντα προϊόντα του μεταβολισμού, γι αυτό και η παραγωγή τους στα φυτά αποδίδονταν σε αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την φωτοσύνθεση, ή την αναπνοή (Asada and Takahashi, 1987). Μεταγενέστερες έρευνες ανέδειξαν κι άλλες πηγές EMO όπως το σύμπλοκο της NADPH οξειδάσης (Papadakis and Roubelakis-Angelakis, 2005), και οξειδάσες των πολυαμινών (Moschou et al., 2008a). Η αυξημένη παραγωγή των EMO κατά τις καταπονήσεις αποτελεί απειλή για το κύτταρο αλλά επίσης επάγει την ενεργοποίηση αποκρίσεων στις καταπονήσεις και αμυντικών μηχανισμών (Knight and Knight, 2001). Η εικόνα των EMO ως επιζήμιων μορίων, η παρουσία των οποίων έχει αποκλειστικά και μόνο αρνητικό αντίκτυπο στο κύτταρο, τελευταία έχει ανατραπεί. Αυξανόμενα πειραματικά δεδομένα πλέον αναδεικνύουν την συμμετοχή των EMO στη μεταφορά σήματος μέσα στο κύτταρο. Πλέον είναι γνωστό πως οι EMO παίζουν διπλό ρόλο μέσα στο κύτταρο, αφενός αυτόν των τοξικών προϊόντων, αφετέρου το ρόλο ρυθμιστών «κλειδιά» σε πολλές βιολογικές διεργασίες όπως ανάπτυξη, κυτταρικός κύκλος, προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (ΠΚΘ) δράση ορμονών, βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Mittler et al., 2004; Foyer and Noctor, 2005 ; Fujita et al., 2006).

Κατά τις αβιοτικές καταπονήσεις, όπως η αλατότητα, οργανίδια με υψηλή μεταβολική δραστηριότητα, ή με έντονο ρυθμό μεταφοράς ηλεκτρονίων, όπως οι χλωροπλάστες, τα περοξεισώματα και τα μιτοχόνδρια θεωρούνται οι βασικές πηγές EMO (Foyer and Noctor, 2003; Mittler et al., 2004). Στους χλωροπλάστες η βασική πηγή των EMO είναι η αντίδραση Mehler και οι χρωστικές της φωτοσυνθετικής κεραίας, ενώ η συγκέντρωσή τους αυξάνεται υπό συνθήκες χαμηλού CO₂ (Asada and Takahashi, 1987). Κατά την καταπόνηση από αλατότητα τα ιόντα Na⁺ εισέρχονται μέσω της μεμβράνης του χλωροπλάστη στο εσωτερικό του με αποτέλεσμα την απόσπαση ζωτικών πρωτεϊνών του μηχανισμού διαχείρισης οξυγόνου και την επακόλουθη απενεργοποίησή του με άμεσο αποτέλεσμα την διαρροή ηλεκτρονίων στο μοριακό O₂ (Allakhverdiev et al., 2000).

Παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου από οξειδωτικά ενζυματικά και μη ενζυματικά συστήματα

Οι EMO αντιπροσωπεύουν προϊόντα διαδοχικών αναγωγών του οξυγόνου με μεταφορά ενός ηλεκτρονίου (e⁻). Οι κύριοι ενζυματικοί και μη ενζυματικοί

μηχανισμοί παραγωγής EMO στα κύτταρα παρουσιάζονται στην Εικόνα 1. Στην βασική του κατάσταση (ground state), το οξυγόνο (O_2) είναι ένα μόριο τριπλής κατάστασης (triplet state) και σχετικά ανενεργό. Από την άλλη το οξυγόνο μονής κατάστασης (singlet oxygen), 1O_2 είναι η πρώτη υψηλή ενεργειακή κατάσταση του μοριακού οξυγόνου. Παράγεται μέσω φωτοενεργοποίησης, μπορεί να οξειδώσει πολλά βιολογικά μόρια και κατά συνέπεια είναι τοξικό για τα κύτταρα. Η πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου από το μοριακό οξυγόνο από διάφορα αναγωγικά μέσα, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή της υπεροξειδικής ρίζας ($O_2^{\bullet-}$). Στα κύτταρα, το $O_2^{\bullet-}$ βρίσκεται σε ισορροπία με την πρωτονιωμένη του μορφή, την υπερουδροξυλική ρίζα (O_2H), η οποία σχηματίζεται σε συνθήκες κατά τις οποίες επικρατεί χαμηλό pH (Εικόνα 1, αντίδραση 1), είναι περισσότερο υδρόφιλη από το $O_2^{\bullet-}$ και μπορεί επομένως να διασχίζει πιο εύκολα μεμβράνες. Σε φυσιολογικό pH, το $O_2^{\bullet-}$ δεν είναι πολύ ενεργό κατά των μακρομορίων του κυττάρου, όμως η ρίζα πρωτονιωμένη ή μη, όταν βρεθεί σε υδατικό, βασικό ή ελαφρώς όξινο περιβάλλον, μετατρέπεται σε H_2O_2 και O_2 , αυθόρμητα ή μέσω της καταλυτικής μεσολάβησης της υπεροξειδικής δισμουτάσης (superoxide dismutase; SOD EC 1.15.1.1) (Εικόνα 1, αντίδραση 1). Η ενζυμικά καταλυόμενη παραγωγή του H_2O_2 μέσω της SOD πραγματοποιείται 10-φορές ταχύτερα σε σχέση με την αυθόρμητη αντίδραση. Η αντίδραση 1.1 στην Εικόνα 1 αντιπροσωπεύει την κύρια οδό απόσβεσης του $O_2^{\bullet-}$ στο κύτταρο (Lamb and Dixon, 1997).

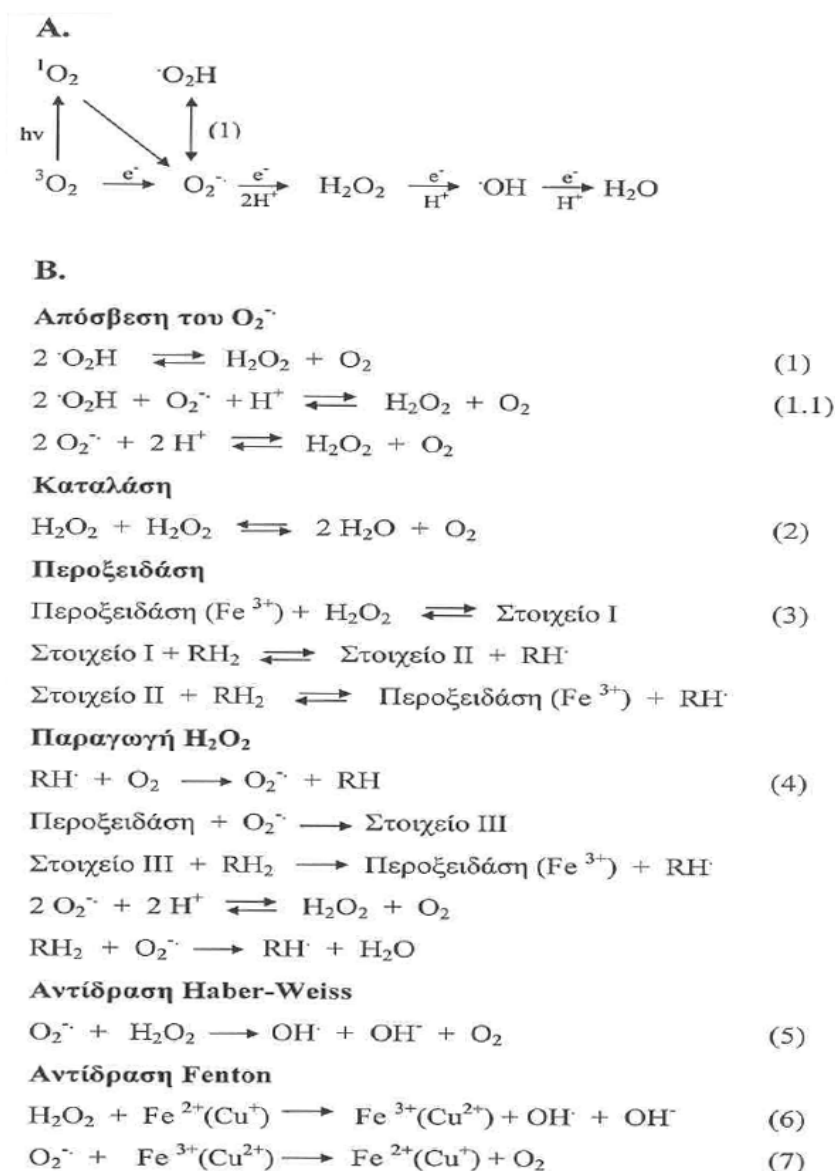
Το H_2O_2 , που είναι και παράγωγο των αμινικών οξειδασών, είναι σχετικά σταθερό μόριο και καθώς είναι ενδιάμεσα ενεργό και ηλεκτρικά ουδέτερο μπορεί εύκολα να περνά τις κυτταρικές μεμβράνες και να διαχέεται σε μακρινές αποστάσεις. Στα κύτταρα, το παραγόμενο H_2O_2 μπορεί (1) να σχηματίσει νερό και μοριακό οξυγόνο αυθόρμητα ή μέσω ενζυματικής κατάλυσης από την καταλάση (catalase; CAT EC 1.11.1.6; Εικόνα 1, αντίδραση 2), (2) να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα διαφόρων περοξειδασών (peroxidase; POX EC 1.11.1.17), όπως γενικές περοξειδάσες, ασκορβική περοξειδάση (ascorbate peroxidase; APX EC 1.11.1.11) ή περοξειδάση της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase; GPX EC 1.11.1.9), και να συμμετάσχει στη σύνθεση της λιγνίνης (Εικόνα 1, αντίδραση 3) ή (3) να αποσβεστεί μέσω του κύκλου των Halliwell-Asada.

Σε κατάλληλες συνθήκες και παρουσία κάποιου αναγωγικού, το H_2O_2 μπορεί να παραχθεί από τις περοξειδάσες σε μια σειρά αντιδράσεων (Εικόνα 1, αντίδραση

4), (Gross et al., 1977; Halliwell, 1978a). Η υδροξυλική ρίζα είναι από τις πλέον ενεργές μορφές EMO και μπορεί να σχηματιστεί κατά την άμεση αντίδραση μεταξύ $O_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 (αντίδραση Haber-Weiss, Εικόνα 1, αντίδραση 5). Σε φυσιολογικές συνθήκες, πραγματοποιείται η αντίδραση αυτή, ενώ αντίθετα, σημαντικά επίπεδα μπορούν να σχηματιστούν μέσω κυκλικών αντιδράσεων κατά τις οποίες πραγματοποιείται οξείδωση μετάλλων όπως τα μεταβατικά μέταλλα Fe^{2+} και Cu^+ (αντίδραση Fenton, Εικόνα 1, αντίδραση 6) και επακόλουθη αναγέννηση των οξειδωμένων ιόντων στην αναγμένη τους μορφή μέσω της αντίδρασης με το $O_2^{\bullet-}$ (Εικόνα 1, αντίδραση 7). Τα μεταβατικά μέταλλα δρουν ως καταλύτες των αντιδράσεων αυτών και η ευκολία προσέγγισής τους είναι πιθανώς οι σημαντικότεροι παράγοντες, που ελέγχουν την θέση παραγωγής του OH^{\bullet} (Wojtaszecz, 1997). Η υδροξυλική ρίζα, με την ικανότητά της να ξεκινά την αλυσίδα αντιδράσεων παραγωγής EMO, θεωρείται ως η κύρια υπεύθυνη μορφή EMO για τις μη αντιστρεπτές και καταστροφικές τροποποιήσεις των κυτταρικών μακρομορίων και οργανιδίων.

Τα προηγούμενα παράγωγα σχηματίζονται και κατά τις φυσιολογικές λειτουργίες στο κύτταρο. Γενικά, το $O_2^{\bullet-}$ παράγεται κατά την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια (αναπνοή), κατά την φωτοσύνθεση στους χλωροπλάστες και ως παραπροϊόν δράσης ενζύμων [οξειδάσης της ξανθίνης; (xanthine oxidase EC 1.1.3.22 και 1.2.3.22), αλδεϋδικής οξειδάσης; (aldehyde oxidase EC 1.2.3.1), καθώς και τα πολλά ένζυμα που εντάσσονται στη κατηγορία των φλαβινικών αφυδρογονασών; (flavin dehydrogenases); (Elstner, 1982; Fridovitch, 1986)]. Το H_2O_2 μπορεί να παραχθεί κατά την β-οξείδωση των λιπαρών οξέων (β-oxidation) στα μικροσώματα και την φωτοαναπνοή στα περοξεισώματα (Elstner, 1982; Asada, 1984), ή όπως προαναφέρθηκε από την δράση της διαμινικής οξειδάσης (DAO) και της οξειδάσης των πολυαμινών (PAO) (Smith, 1985a). Κυρίως όμως, η συσσώρευση των EMO αυξάνεται από τις βιοτικές ή αβιοτικές καταπονήσεις, όπως και κατά την έκθεση του φυτού σε UV ακτινοβολία, ζιζανιοκτόνα (paraquat, diquat), παθογόνα, ατμοσφαιρικές μολύνσεις (όζον, O_3), ακραίες θερμοκρασίας, υδατική καταπόνηση, βαρέα μέταλλα και χημικές ουσίες (Sutherland, 1991; Bowler et al., 1992; Papadakis and Roubelakis-Angelakis, 2005; Skopelitis et al., 2006; Moschou et al., 2008a; Paschalidis et al., 2009a; Paschalidis et al., 2009b).

Η ενζυματική παραγωγή των EMO έχει υποτεθεί ότι πραγματοποιείται κυρίως από την NAD(P)H-oxidase (οξειδάση του φωσφορικού νικοτιν-αδενιν-δινουκλεοτιδίου; Oxidase of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, EC 1.3.6.1). Το ενζυματικό αυτό σύστημα είναι ανάλογο με αυτό των ουδετερόφιλων κυττάρων των θηλαστικών (Papadakis and Roubelakis-Angelakis, 2005). Η NAD(P)H οξειδάση στα θηλαστικά αποτελείται από πρωτεΐνες συνδεδεμένες στην



Εικόνα 1. Παραγωγή και απόσβεση των EMO. Α, Σχέση μεταξύ μοριακού οξυγόνου και των EMO. Β, Χημικές αντιδράσεις κατά τις οποίες οι EMO αποσβένονται ή αλληλομετατρέπονται (Wojtaszc, 1997). O_2 : μοριακό οξυγόνο, 1O_2 : ενεργό οξυγόνο (singlet oxygen), $O_2^{\cdot-}$: υπεροξειδική ρίζα (superoxide), H_2O_2 : υπεροξείδιο του υδρογόνου (hydrogen peroxide), OH^{\cdot} : υδροξυλική ρίζα (hydroxyl radical), H_2O : νερό.

μεμβράνη καθώς και από πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα. Στο κέντρο της NADPH-οξειδάσης υπάρχει το ετεροδιμερές φλαβοκυτόχρωμα b558 (flavocytochrome b558), που δεσμεύει το NAD(P)H και το οποίο αποτελείται από δύο πρωτεΐνες: τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη gp91phox και την p22phox. Στο φλαβοκυτόχρωμα πραγματοποιείται η μεταφορά ηλεκτρονίων από το NAD(P)H στο μοριακό οξυγόνο.

Η παραγωγή H_2O_2 από τις περοξειδάσες είχε αρχικά αναφερθεί κατά τη διαδικασία της λιγνιτοποίησης (Gross et al., 1977; Elstner and Heupel, 1978; Halliwell, 1978a). Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, το $O_2^{\bullet-}$ σχηματίζεται σε ένα πολύπλοκο κύκλο, που εμπλέκει εξωκυτταρικά ένζυμα, την αφυδρογονάση του μηλικού (malate dehydrogenase EC 1.1.1.37) και την περοξειδάση, και η παροχή αναγωγικών στοιχείων γίνεται από τον κύκλο μηλικού-οξαλοξικού της κυτταρικής μεμβράνης. Ένας δεύτερος τρόπος παραγωγής, είναι η παραγωγή του αποπλάσματικού H_2O_2 , το οποίο παράγεται από ενζυματικά συστήματα εντοπισμένα στο κυτταρικό τοίχωμα (Bolwell et al., 1995). Σύμφωνα με το δεύτερο τρόπο, ένας διεγέρτης φτάνοντας στην επιφάνεια του κυττάρου αναγνωρίζεται από τον κατάλληλο υποδοχέα, γεγονός που ενεργοποιεί κανάλια ιόντων Ca^{2+} , K^+ , H^+ , που η μεταφορά τους έχει ως αποτέλεσμα την παροδική άνοδο του pH στον αποπλάστη ενεργοποιώντας κατά αυτό το τρόπο την εξαρτώμενη από το pH-περοξειδάση. Η αλλαγή στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, οδηγεί στο σχηματισμό του Στοιχείου III (FeII-OO) και ακολούθως στη γένεση $O_2^{\bullet-}$ το οποίο μπορεί αρχικά να αναχθεί κατά την οξειδωση της κυστεΐνης, που βρίσκεται κοντά στην αίμη, ενώ με την παροχή αναγωγικού, η παραγωγή H_2O_2 μπορεί να διατηρηθεί για αρκετό χρόνο (Bolwell et al., 1995). Το μοντέλο προτάθηκε αρχικά για την παραγωγή H_2O_2 από αιωρούμενα κύτταρα φασολιού κατά την επίδραση τμημάτων του κυτταρικού τοιχώματος του *Colletotrichum lindemuthianum*, και η ισχύς του έχει υποστηριχθεί από *in vitro* αλληλεπιδράσεις (Wojtaszecz, 1997).

Ένα τρίτο μοντέλο προτείνει συνέργεια και των δύο μηχανισμών, όπου κατά την αναγνώριση ενός διεγέρτη από τον κατάλληλο υποδοχέα, επάγεται κάποιο μονοπάτι σηματοδότησης και ενεργοποιείται τελικά η NAD(P)H οξειδάση. Τα κανάλια των ιόντων ενεργοποιούνται επίσης και ο αποπλάστης αλκαλοποιείται, ενώ τα $O_2^{\bullet-}$ πρωτονιώνονται με πρωτόνια που προέρχονται από τα χυμοτόπια. Στα φυτά αυτή η διαδικασία θα μπορούσε να συμβάλει στην αλκαλοποίηση του αποπλάστη

αυξάνοντας το pH στο 7-8 (από την αρχική τιμή περίπου 6) και ενεργοποιώντας τελικά, με συντονισμένη δράση των καναλιών ιόντων και της NAD(P)H οξειδάσης, την εξαρτώμενη από το pH-περοξειδάση και την παραγωγή του H₂O₂ με την συμμετοχή άγνωστων ακόμα, αναγωγικών στοιχείων (Wojtaszecz, 1997).

Η παραγωγή EMO κατά την οξειδωτική καταπόνηση θα μπορούσε να τελειώνει ως εξής: η μεταφορά ηλεκτρονίων και η επακόλουθη παραγωγή O₂^{•-} από την NAD(P)H οξειδάση συνοδεύεται από έξοδο πρωτονίων μέσω καναλιών H⁺, το άνοιγμα των οποίων πραγματοποιείται πριν την ενεργοποίηση της NAD(P)H οξειδάσης. Τα κανάλια αυτά παρέχουν H⁺ για την πρωτονίωση των O₂^{•-} και τελικά μειώνουν το pH του αποπλάστη τερματίζοντας την ενεργοποίηση της NAD(P)H οξειδάσης και της περοξειδάσης. Στα φυτά έχει περιγραφεί ήδη η ύπαρξη μεμβρανικών H⁺-ΑΤΡασών, επαγόμενων από διεγέρτες έχει περιγραφεί σε φυτά (Xing et al., 1997).

Το σύστημα της οξαλικής οξειδάσης (oxalate oxidase, EC 1.2.3.4), που είναι μια εξωκυτταρική γλυκοπρωτεΐνη, γνωστή και ως γερμίνη (germin), και ελευθερώνει H₂O₂ και CO₂ από το οξαλικό οξύ, δεν είναι πλήρως χαρακτηρισμένο, όσον αφορά την πρωτεΐνη και το υπόστρωμα, αποτελεί όμως το πρώτο παράδειγμα ενεργοποίησης ενός συστήματος παραγωγής H₂O₂ κατά την γενική απόκριση σε παθογόνα, χωρίς πιθανώς να σχετίζεται με την ανθεκτικότητα (Wojtaszecz, 1997). Η λιποξυγενάση (lipoxygenase; LOX EC 1.13.11.12), έχει προταθεί ως επί πλέον πηγή EMO κατά την οξειδωτική καταπόνηση (Baker and Orlandi, 1995).

Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι είναι πιθανό διάφορα συστήματα να συνεισφέρουν στη παραγωγή EMO με διαφορετικούς μηχανισμούς (Murphy et al., 1998), ενώ τα ενζυματικά συστήματα των αμινικών οξειδασών και η σχέση τους με τη παραγωγή EMO δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς.

Φυσιολογικές λειτουργίες των ενεργών μορφών οξυγόνου

Παρά την αναγκαιότητα του οξυγόνου για την υποστήριξη της ζωής, διάφορα παράγωγά του αποτελούν συνεχή πηγή κινδύνου για τα κύτταρα (Elstner, 1982). Όλες οι μορφές των EMO είναι τοξικές σε υψηλές συγκεντρώσεις για όλους τους οργανισμούς, αφού μπορούν να αντιδράσουν με τα ακόρεστα λιπαρά οξέα και να προκαλέσουν υπεροξείδωση μεμβρανικών λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης ή ακόμη και ενδοκυτταρικών οργανιδίων οδηγώντας στη καταστροφή τους. Οι

υπεροξειδωτικές καταστροφές στην κυτταρική μεμβράνη, οδηγούν σε διαρροή των κυτταρικών συστατικών και τελικά σε κυτταρικό θάνατο, ενώ αντίστοιχες καταστροφές σε μεμβράνες υποκυτταρικών οργανιδίων μπορούν να επηρεάσουν την αναπνοή στα μιτοχόνδρια, να προκαλέσουν βλάβες στις χρωστικές καθώς και απώλεια της μεταβολικής ενεργότητας των χλωροπλαστών (Scandalios, 1993). Ακόμα, πολλά ένζυμα του κύκλου του Calvin στους χλωροπλάστες είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στο H₂O₂ και υψηλά του επίπεδα αναστέλλουν άμεσα την αφομοίωση του CO₂ (Kaiser, 1976), ενώ σε συνδυασμό με κάποιες οξειδάσες, μπορούν να σημάνουν κάποια ένζυμα για πρωτεόλυση (Scandalios, 1993).

Συγκεκριμένα, η εξαιρετικά ενεργή υδροξυλική ρίζα αντιδρά με όλα τα μακρομόρια του κυττάρου, προκαλώντας σοβαρές βλάβες στα κυτταρικά συστατικά, ελλείψεις (deletions) και μεταλλαγές στο DNA και τελικά μη αντιστρεπτές μεταβολικές δυσλειτουργίες και κυτταρικό θάνατο (Scandalios, 1993). Το H₂O₂ μπορεί να έχει θετικό ρόλο στην αύξηση και την ανάπτυξη των φυτών και ακόμα να συμμετέχει στην άμυνα των φυτών κατά των παθογόνων, μέσω της συμμετοχής του σε αντιδράσεις, που σχηματίζουν ή ενισχύουν το κυτταρικό τοίχωμα, όπως σε αντιδράσεις που καταλύονται από αποπλασματικές περοξειδάσες και παράγουν EMO και πιθανότατα από τις αμινικές οξειδάσες για την αλληλοσύνδεση κυτταροτοιχοματικών πρωτεϊνών, πολυφαινολικών και σουβερίνης (cuticle) (Tenhaken et al., 1995; Paschalidis et al., 2009a). Το H₂O₂ συμμετέχει στην επαγωγή γονιδίων άμυνας, όπως της περοξειδάσης και της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (S-glutathione transferase, STG; EC 2.1.5.18), στη διέγερση της παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών, όπως οι φυτοαλεξίνες, στην εξέλιξη της αντίδρασης HR και πιθανώς στην διασυστηματική επίκτητη ανθεκτικότητα (systemic acquired resistance, SAR), υποστηρίζοντας την υπόθεση ότι ρυθμίζει την απόκριση των φυτών στα παθογόνα (Law et al., 1993; Yoda et al., 2003; Yoda et al., 2006). Η υπεροξειδωση των μεμβρανικών λιπιδίων, που οδηγεί σε δυσλειτουργία των μεμβρανών, έχει σχετιστεί με την συμμετοχή των EMO κατά την αντίδραση HR (Keppler and Baker, 1989), αλλά και με την παραγωγή του γιασμονικού, που μπορεί να ελέγχει την έκφραση γονιδίων σχετικών με την άμυνα του φυτού (Medhy, 1994).

Έχει αναφερθεί ότι οι EMO αποτελούν ένασμμα για τον ΠΚΘ, που συμβαίνει κατά την ανάπτυξη των φυτών ή/και κατά την απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Κατά την αντίδραση HR, έχει παρατηρηθεί άμεση και μαζική παραγωγή EMO, καθώς και ενεργοποίηση της NAD(P)H-οξειδάσης (Medhy, 1994; Xing et al.,

1997) Η ομοιοστασία των ΕΜΟ και άλλων μορίων, όπως το αιθυλένιο, ρυθμίζεται σε υποκυτταρικό επίπεδο σε συνδυασμό πιθανώς με την έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων, οπότε με τον τρόπο αυτό ελέγχεται ο ΠΚΘ (Pennel and Lamb, 1997).

Αντιοξειδωτική άμυνα των φυτών

Οι στόχοι των ΕΜΟ και κυρίως της υδροξυλικής ρίζας, είναι τα λιπίδια (υπεροξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων των μεμβρανών), οι πρωτεΐνες (αποδόμηση ενζύμων και καρβονυλίωσεις), οι υδατάνθρακες (διάσπαση πολυσακχαριτών), τα νουκλεϊκά οξέα (αποχωρισμός της διπλής έλικας, σπασίματα σε χρωματίδες, μεταλλάξεις), με τελικό αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο (Fridovitch, 1986). Για την αντιμετώπιση των καταστροφικών αυτών αποτελεσμάτων, τα αερόβια κύτταρα έχουν αναπτύξει ένα ευρύ φάσμα στρατηγικών, οι οποίες βασίζονται σε άμεση απόσβεση των ΕΜΟ από μικρού μοριακού βάρους μόρια, όπως το ασκορβικό οξύ (ASA), η γλουταθειόνη (GSH), η κυστεΐνη, η προλίνη, οι υδροξυκινόνες, η μανιτόλη, η τοκοφερόλη, τα φλαβονοειδή, κάποια αλκαλοειδή, οι πολυαμίνες (Pas) και το β-καροτένιο (Larson, 1988; Noctor and Foyer, 1998a; Papadakis and Roubelakis-Angelakis, 2005; Skopelitis et al., 2006) ή/και με ενζυμικά συστήματα (Scandalios, 1993; Foyer et al., 1994; Papadakis and Roubelakis-Angelakis, 2005; Skopelitis et al., 2006).

Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, που προαναφέρθηκαν και που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα καταλύουν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, οι οποίες βασίζονται σε παροχή ηλεκτρονίων από αναγωγικούς παράγοντες χαμηλού μοριακού βάρους. Η SOD είναι ο πρώτος κρίκος στην αλυσίδα των ενζυματικών συστημάτων των κυττάρων στη διαδικασία αποτοξίνωσης και μετατρέπει το $O_2^{\bullet-}$ σε H_2O_2 (Scandalios, 1993). Το H_2O_2 στην συνέχεια ανάγεται σε H_2O από τις CATs ή την APX, όμως η CAT έχει μικρή συγγένεια (υψηλό K_m) για το υπόστρωμα σε αντίθεση με την APX (χαμηλό K_m) (Foyer and Haliwell, 1976; Asada, 1992a; Alschler et al., 1997; Noctor and Foyer, 1998a). Η APX χρησιμοποιεί δύο μόρια ASA και ανάγει το H_2O_2 σε H_2O , με ταυτόχρονη παραγωγή δύο μορίων μονοδιϋδροασκορβικού (MDHA). Το MDHA είναι μια ρίζα με μικρή ημιζωή, οπότε αν δεν αναχθεί αμέσως, μετατρέπεται σε ASA και διϋδροασκορβικό (DHA).

Πίνακας 1. Τα κύρια αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα

Ένζυμο	Συντόμευση	Αντίδραση
Υπεροξειδική δισμουτάση	(SOD, superoxide dismutase, EC 1.15.1.1)	$M^{(n+1)+} - SOD + O_2^- \rightarrow M^{n+} - SOD + O_2$ $M^{n+} - SOD + O_2^- + 2H^+ \rightarrow M^{(n+1)+} - SOD + H_2O_2$ M = Cu (n=1) ; Mn (n=2) ; Fe (n=2); Ni (n=2).
Ασκορβική περοξειδάση	(ascorbate peroxidase, EC 1.11.1.11)	ascorbate + H ₂ O ₂ → dehydroascorbate + 2 H ₂ O
Αναγωγή του μονοδιϋδροασκορβικού	(monodehydroascorbate reductase, EC 1.6.5.4)	NADH + H ⁺ + 2 monodehydroascorbate → NAD ⁺ + 2 ascorbate
Αναγωγή του διϋδροασκορβικού	(dihydroascorbate reductase, EC 1.8.5.1)	2 glutathione + dehydroascorbate → glutathione disulfide + ascorbate
Αναγωγή της γλουταθειόνης	(glutathione reductase, EC 1.8.1.7)	2 glutathione + NADP ⁺ → glutathione disulfide + NADPH + H ⁺
Κατάλυση	(catalase, EC 1.11.1.6)	2 H ₂ O ₂ → O ₂ + 2H ₂ O
Περοξειδάση της γλουταθειόνης	(glutathione peroxidase, EC 1.11.1.9)	2 glutathione + H ₂ O ₂ → glutathione disulfide + 2 H ₂ O
Περοξειδάση	(peroxidase, EC 1.11.1.7)	αναγωγικό + H ₂ O ₂ → οξειδωτικό + H ₂ O

Μέσα στο κύτταρο, το MDHA μπορεί να αναχθεί κατευθείαν σε ASA και ως δότης ηλεκτρονίων για την αναγωγή αυτή μπορεί να είναι ένα b-τύπου κυτόχρωμα, η αναγμένη φερεδοξίνη (Fd_{red}) ή NAD(P)H (Noctor and Foyer, 1998a). Η τελευταία αντίδραση καταλύεται από αναγωγάσες του μονοδιϋδροασκορβικού (monodehydroascorbate reductase; MDHAR, EC 1.6.5.4), οι οποίες υπάρχουν σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα. Το DHA ανάγεται σε ASA από την αναγωγή του DHA (dehydroascorbate reductase, DHAR EC 1.8.5.1), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την GSH (Foyer and Halliwell, 1976). Η αντίδραση αυτή παράγει την οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), η οποία με την σειρά της ανάγεται από το NAD(P)H σε μια αντίδραση που καταλύεται από την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR, EC 1.8.1.7). Η απομάκρυνση του H₂O₂ μέσω της προηγούμενης σειράς αντιδράσεων είναι γνωστή ως κύκλος ασκορβικού-γλουταθειόνης ή κύκλος των Halliwell-Asada. Η συμμετοχή του MDHA προτάθηκε από τον Asada (1994), σύμφωνα με τον οποίο η άμεση μεταφορά ηλεκτρονίων στο MDHA, μαζί με την NAD(P)H-εξαρτώμενη αναγωγή, που καταλύεται από την MDHAR, είναι η κύρια οδός αναγέννησης του ASA στους χλωροπλάστες, ενώ η αναγέννηση μέσω της GSH είναι λιγότερο σημαντική. Οι Foyer et al (Foyer and Halliwell, 1976; Asada, 1994;

Foyer et al., 1994) υποστηρίζουν ότι ο κύκλος ασκορβικού-γλουταθειόνης έχει σημαντικότερη συμμετοχή στο μέγεθος και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του κυττάρου.

Το μιτοχόνδριο ως πηγή ΕΜΟ

Το μιτοχόνδριο έχει αναδειχθεί σε σημαντικό παραγωγό ΕΜΟ. Τα μιτοχόνδρια, στη διπλή μεμβράνη των οποίων επιτελείται η οξειδωτική φωσφορυλίωση, αποτελούν άριστους παραγωγούς ATP με πρώτη ύλη μόρια υψηλής ενέργειας. Ηλεκτρόνια από οξειδωτικά υποστρώματα μεταφέρονται στο οξυγόνο μέσω μιας σειράς αναγωγικών αντιδράσεων με αποτέλεσμα την παραγωγή νερού. Κατά την διάρκεια αυτής της διαδικασίας πρωτόνια μεταφέρονται ενεργητικά από την μήτρα του μιτοχονδρίου, και κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου μέσω των συμπλόκων I, III, και IV. Όταν τα πρωτόνια επιστρέφουν στην μιτοχονδριακή μήτρα, κατά μήκος του ηλεκτροχημικού δυναμικού τους παράγεται ATP από το σύμπλοκο V (ATP Συνθάση) (Chan, 2006). Πιο συγκεκριμένα η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων των φυτικών μιτοχονδρίων περιλαμβάνει δύο μονοπάτια: το μονοπάτι του κυτοχρώματος (Cyt), το οποίο καταλήγει στην οξειδάση του κυτοχρώματος c, (COX) και το εναλλακτικό μονοπάτι (Alt), το οποίο καταλήγει στην εναλλακτική οξειδάση (AOX). Και τα δυο μονοπάτια δέχονται ηλεκτρόνια από την αναγμένη ουμπικινόνη (UQr) (Atkin et al., 2002). Το μονοπάτι του κυτοχρώματος αποτελείται από τα εξής τέσσερα σύμπλοκα: NADH: οξειδοαναγωγή της ουμπικινόνης (Σύμπλοκο1), ουμπικινόνη: ηλεκτρική αφυδρογονάση (Σύμπλοκο 2) ουμπικινόλη: οξειδοαναγωγή του κυτοχρώματος c (Σύμπλοκο 3) και οξειδάση του κυτοχρώματος c (Σύμπλοκο 4). Το σύμπλοκο 1 συνδέει την μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH στην ουμπικινόνη με μετατόπιση πρωτονίων κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης σε μία αναλογία 4 H^+ ανά 2 e^- και με τελικό αποδέκτη το σύμπλοκο 4 όπου και ο καταλυτικός κύκλος συνοδεύεται από μετατόπιση με μια στοιχειομετρία 2 πρωτονίων ανά δύο ηλεκτρόνια. (Joseph-Horne et al., 2001).

Η εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου περιλαμβάνει και άλλα ένζυμα τα οποία μεταφέρουν ηλεκτρόνια στην ουμπικινόνη, όπως η NADH, ή η NADPH αφυδρογονάση, η οποία παρακάμπτει το σύμπλοκο 1 (Douce and Neuburger, 1989). Κάποια από αυτά τα ένζυμα είναι προσανατολισμένα στην εξωτερική πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων, ώστε να επιτρέπεται η οξείδωση

κυτοπλασμικών μεταβολιτών οι οποίοι περνάνε την μεμβράνη του μιτοχονδρίου (Noctor et al., 2007).

Στο μιτοχόνδριο το $O_2^{\cdot-}$ παράγεται από την αναγωγή του O_2 , μια αντίδραση η οποία ευνοείται θερμοδυναμικά με βάση την συγκέντρωση O_2 στο μιτοχόνδριο και την μεταβολή της συγκέντρωσης του παραγόμενου $O_2^{\cdot-}$ (Murphy, 2009). Η πρώτη αναφορά για την παραγωγή των EMO από την αναπνευστική αλυσίδα δημοσιεύτηκε το 1966 από τον P.K. Jensen (1966) και ακολούθησε η δουλειά του Chance και των συνεργατών του (Loschen et al., 1971; Boveris and Chance, 1973 ; Chance et al., 1979) οι οποίοι έδειξαν πως απομονωμένα μιτοχόνδρια παράγουν H_2O_2 . Αργότερα επιβεβαιώθηκε ότι το H_2O_2 προέκυψε από την μετατροπή του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) το οποίο παράχθηκε μέσα στα μιτοχόνδρια (Forman and Kennedy, 1974; Loschen et al., 1974).

Υπάρχει ένα όριο ενδομιτοχονδριακού $O_2^{\cdot-}$ πριν η συγκέντρωσή του υπερβεί τα όρια των μηχανισμών απόσβεσης και παραχθεί αρκετό H_2O_2 ώστε να μετρηθεί εξωτερικά (Andreyev et al., 2005). Οι μιτοχονδριακές EMO παράγονται κατά κύριο λόγο από τα ενζυματικά σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας. Το σύμπλοκο I είναι το σημείο εισόδου των ηλεκτρονίων από το NADH στην αναπνευστική αλυσίδα. Πρόκειται για ένα σύμπλοκο IMD το οποίο αποτελείται από 45 πολυπεπίδια. Ένας συμπαράγοντας φλάβινο-μονονουκλεοτίδιο (FMN) δέχεται ηλεκτρόνια από το NADH και τα μεταφέρει μέσω μιας αλυσίδας 7 κέντρων σιδήρου-θείου (FeS) στο αναγωγικό κέντρο της ουμπικινόνης (Hirst et al., 2003). Τα 7 κέντρα FeS είναι «προστατευμένα» από το O_2 , οπότε είναι πιο πιθανό να δεχτεί ηλεκτρόνια από το FMN και την ουμπικινόνη (Sazanov, 2007). Το επικρατέστερο μοντέλο είναι πως το $O_2^{\cdot-}$ παράγεται από τον συμπαράγοντα FMN, γεγονός που εξηγεί και την αύξηση στην παραγωγή του $O_2^{\cdot-}$ παρουσία ροτενόνης, ενός αναστολέα ο οποίος μπλοκάρει την μεταφορά ηλεκτρονίων από τα FeS σύμπλοκα στην ουμπικινόνη. Παρουσία ροτενόνης τα ηλεκτρόνια επιστρέφουν πίσω στον συμπαράγοντα FMN και τον φορτίζουν ενεργειακά (Takeshige and Minakami, 1979). Υψηλές συγκεντρώσεις EMO προκύπτουν επίσης από το σύμπλοκο I κατά την αντίστροφη ροή ηλεκτρονίων. Σε αυτήν την περίπτωση η αναγμένη ουμπικινόνη, υπό την επίδραση μια έντονης πρωτονιακής κινητικής δύναμης αντί να μεταφέρει τα ηλεκτρόνια που δέχεται στο σύμπλοκο III τα επιστρέφει στο σύμπλοκο I οπότε και το NAD^+ ανάγεται πάλι σε NADH (Chance and Hollunger, 1961; Liu et al., 2002). Χρήση ροτενόνης κατά την

διαδικασία αυτή μπορεί να αποτρέψει τη συσσώρευση $O_2^{\bullet-}$ γεγονός που επιβεβαιώνει την προέλευση των ηλεκτρονίων (προς το σύμπλοκο I μέσω της ουμπικινόνης) (Lambert and Brand, 2004). Το σύμπλοκο III διοχετεύει ηλεκτρόνια από την ουμπικινόνη στο κυτόχρωμα c, έχει μέγεθος 240kD και απαρτίζεται από 11 πολυπεπτίδια, τρεις ομάδες αίμης και ένα κέντρο FeS και αλληλεπιδρά παροδικά με την ουμπικινόνη (Iwata et al., 1998). Το σύμπλοκο III θεωρούνταν στο παρελθόν ως η σημαντικότερη πηγή $O_2^{\bullet-}$ στο μιτοχόνδριο. Όταν ηλεκτρόνια διοχετεύονται από την αναγμένη ουμπικινόνη και η περαιτέρω μεταφορά ηλεκτρονίων εμποδίζεται, όπως για παράδειγμα από την αντιμυκίνη τότε το σύμπλοκο III παράγει πολύ μεγάλες ποσότητες $O_2^{\bullet-}$ από την αντίδραση με το O_2 (Cadenas et al., 1977). Παραδόξως παρεμπόδιση της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων σε σημείο πέραν του συμπλόκου 3 όπως για παράδειγμα με κυανίδιο ή με την απόσπαση ενδιάμεσων οξειδοαναγωγικών παραγόντων όπως το κυτόχρωμα c η παραγωγή $O_2^{\bullet-}$ δεν αυξάνεται, γεγονός που υποδηλώνει η αναγμένη κατάσταση της ουμπικινόνης δεν είναι αρκετή ώστε να οδηγήσει στην συσσώρευση $O_2^{\bullet-}$ στο σύμπλοκο III (Zhang et al., 1998). Αν και η συγκέντρωση $O_2^{\bullet-}$ μπορεί να αυξηθεί στο σύμπλοκο III, όπως για παράδειγμα με την χρήση αντιμυκίνης, και πάλι είναι αμελητέα σε σύγκριση με το σύμπλοκο I (Murphy, 2009).

Το H_2O_2 στο μιτοχόνδριο παράγεται κατά κύριο λόγο κατά την αποβολή το $O_2^{\bullet-}$ από τη SOD, (EC 1.15.1.1). Οι SODs είναι μεταλοπρωτεΐνες με μεγάλη ικανότητα στην απόσβεση της υπεροξειδικής ρίζας. Στα ανώτερα φυτά έχουν περιγραφεί 3 κύριες κατηγορίες των SODs, ανάλογα με το μέταλλο που φέρουν στην προσθετική τους ομάδα: Mn, Fe και Cu/Zn (Eltner, 1982). Στα ανώτερα φυτά στα μιτοχόνδρια, και συγκεκριμένα στο στρώμα, εδράζουν οι MnSODs (Baum and Scandalios, 1981). Επιπλέον μιτοχονδριακός μηχανισμός παραγωγής H_2O_2 είναι και η δράση των οξειδασών των αμινών οι οποίες βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου (Giorgio et al., 2007).

Απαραίτητα για την μεταφορά ηλεκτρονίων από το σύμπλοκο 3 στο σύμπλοκο 4 της αναπνευστικής αλυσίδας είναι τα κυτοχρώματα c. Πρόκειται για υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν μια προσθετική ομάδα αίμης, ομοιοπολικά δεμένη στην πρωτεΐνη (David et al., 1999). Είναι μια πρωτεΐνη της οποίας η τρισδιάστατη δομή είναι καλά μελετημένη. Έχει αποδειχθεί ότι βρίσκεται «δεμένη» στην εξωτερική πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου. Τα κυτοχρώματα c

συναντώνται τόσο στις προκαρυωτικές όσο και στις ευκαρυωτικές αναπνευστικές αλυσίδες (Thony-Meyer et al., 1995). Η μεταφορά ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα c δεν συνδέεται αυτή καθ' αυτή με παραγωγή ενέργειας.

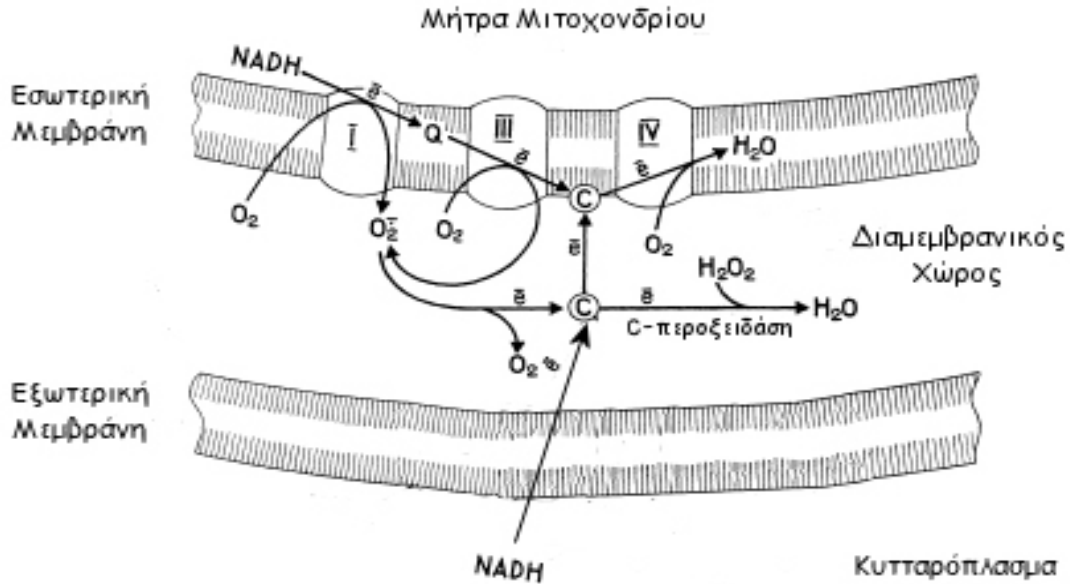
Η απόσπαση του κυτοχρώματος c από την αναπνευστική αλυσίδα παράγει «θανατηφόρα» επίπεδα EMO, παρεμποδίζοντας την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Blackstone and Green, 1999). Η απόσπαση του κυτοχρώματος μπορεί να προκληθεί από παράγοντες όπως η μεναδιόνη (Sun et al., 1999) και το σαλικυλικό οξύ (Xie and Chen, 1999), ενώ έχει βρεθεί ότι και η αλατότητα προκαλεί απόσπαση των κυτοχρωμάτων και συγκεκριμένα του κυτοχρώματος c_{550} από τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό και ακολούθως παραγωγή EMO στα βακτήρια (Allakhverdiev et al., 2000). Οι EMO προέρχονται από την ενεργειακή φόρτιση τα ουμπικινόνης και την αντίστροφη ροή ηλεκτρονίων προς το σύμπλοκο I. Τα ηλεκτρόνια που «επιστρέφουν» διαρρέουν στο μοριακό O_2 και το φορτίζουν ενεργειακά (Murphy, 2009). Παραδόξως πέρα από τον ρόλο του στη παραγωγή EMO γνωστές είναι και οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του κυτοχρώματος (Skulachev, 1998). Η αντιοξειδωτική δράση του κυτοχρώματος c εντοπίζεται στους παρακάτω τομείς (Εικόνα 2)

1. Οξειδωση του $O_2^{\bullet -}$ το οποίο παράγεται από τα σύμπλοκα I και III της αναπνευστικής αλυσίδας. Η αντίδραση αυτή γίνεται με ταυτόχρονη αναγωγή του κυτοχρώματος και επιταχύνεται όταν το κυτόχρωμα c απελευθερώνεται στον διαμεμβρανικό χώρο. Το κυτόχρωμα με την σειρά του οξειδώνεται και πάλι από το σύμπλοκο IV ώστε να επιστρέψει στην αρχική του μορφή. Στις ζύμες η περοξειδάση του κυτοχρώματος c, η οποία εντοπίζεται στον διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου, μπορεί να αντικαταστήσει το σύμπλοκο IV και να οξειδώσει το κυτόχρωμα c αντ' αυτού (Hay et al., 1984), ενώ έχει επίσης την δυνατότητα απόσβεσης του H_2O_2 (Skulachev, 1998).

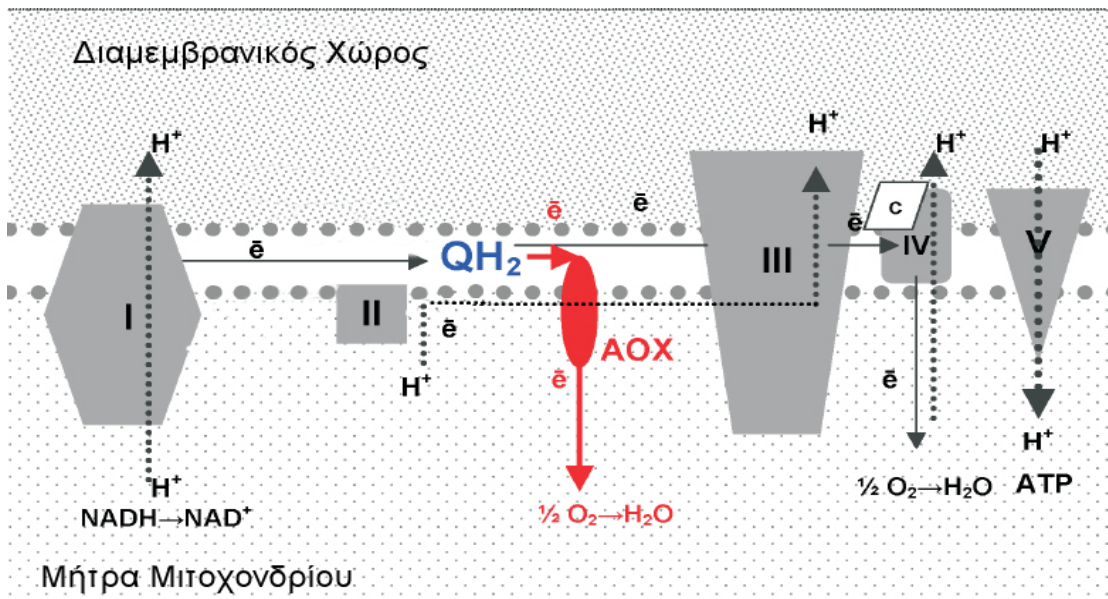
2. Ρυθμιζόμενη από το κυτόχρωμα c οξειδωση εξωγενούς NADH από το σύμπλοκο IV. Αυτό το μονοπάτι βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και παρακάμπτει τα σύμπλοκα I και III, τα οποία και είναι οι κύριοι «παραγωγοί» $O_2^{\bullet -}$, με κόστος σε ATP (Korshunov et al., 1997). Ενεργοποίηση αυτής της εξωτερικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων οδηγεί στην απομόνωση της μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω των συμπλόκων και επομένως μειώνει τα επίπεδα $O_2^{\bullet -}$.

Το μονοπάτι της εναλλακτικής οξειδάσης

Τα μιτοχόνδρια όλων των φυτών σε συνδυασμό με την COX διαθέτουν άλλη μία τελική οξειδάση, η οποία είναι ανθεκτική στην παρεμπόδιση από κυανιδίο (Εικόνα 3). Αυτή η εναλλακτική οξειδάση (AOX) βρίσκεται στην εσωτερική



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση ρόλου κυτοχρώματος-c στο αντιοξειδωτικό σύστημα του μιτοχονδρίου. I, III και IV, αναπαριστούν τα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας (NADH-CoQ αναγωγή της ουμπικινόνης, Ουμπικινόνη-αναγωγή του κυτοχρώματος c και οξείδωση του κυτοχρώματος c); c, κυτόχρωμα c. Το κυτόχρωμα c, μεταφέρεται στον διαμεμβρανικό χώρο και οξειδώνει το O_2^- , το οποίο παράγεται από τα σύμπλοκα I και III. Επίσης κυτόχρωμα c το οποίο έχει απελευθερωθεί στον διαμεμβρανικό χώρο δύναται να αναχθεί από το O_2^- , και να οξειδωθεί ξανά από την οξειδάση του κυτοχρώματος. (Skulachev, 1998)



Εικόνα 3 Σχηματική απεικόνιση της Εναλλακτικής οξειδάσης στην αναπνευστική αλυσίδα. Η εναλλακτική οξειδάση καταλύει την ανθεκτική σε κυανιδίο αναγωγή του οξυγόνου προς νερό χωρίς μετακίνηση πρωτονίων κατά μήκος της μιτοχονδριακής μεμβράνης. I, II, III, IV, V αναφέρονται στα 5 σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας, AOX, εναλλακτική οξειδάση, c, κυτόχρωμα c, QH₂, αναγμένη ουμπικινόνη (Juszczuk and Rychter, 2003)

μεμβράνη του μιτοχονδρίου και λαμβάνει ηλεκτρόνια από την αναγμένη ουμπικινόνη και καταλύει την αναγωγή του οξυγόνου σε νερό. Σε αυτήν την «διακλάδωση» της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων δεν μεταφέρονται πρωτόνια, οπότε και προκύπτει παραγωγή ATP (Siedow and Umbach, 1995).

Η εναλλακτική οξειδάση κωδικοποιείται από μια μικρή οικογένεια γονιδίων τα μέλη της οποίας παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης σε διαφορετικούς ιστούς (Clifton et al., 2006). Η εναλλακτική οξειδάση συναντάται ως διμερές και περιέχει ένα ρυθμιστικό σύστημα σουλφυδρυλικό-δισουλφιδικό (sulfhydryl-disulfide). Οι σουλφυδρυλικοί δεσμοί ανάμεσα στις συζευγμένες υπομονάδες πρέπει να αναχθούν για μέγιστη ενεργότητα (Umbach and Siedow, 1993). Η μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω αυτού του μονοπατιού είναι σημαντική σε φυτικά κύτταρα πλούσια σε ενέργεια, στον πρωτεύοντα και δευτερεύοντα μεταβολισμό, και κατά την οξείδωση περίσσειας υδατανθράκων (Noctor et al., 2007).

Όπως και η COX, έτσι και η AOX καταλύει την αναγωγή του οξυγόνου σε νερό, ενώ η αναγωγή του O₂ σε O₂⁻ γίνεται στα τρία υπόλοιπα σύμπλοκα. Το μονοπάτι μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω της εναλλακτικής οξειδάσης μπορεί να μειώσει την μιτοχονδριακή παραγωγή EMO (Robson and Vanlerberghe, 2002) από την αναγμένη ουμπικινόνη (Purvis and Shewfelt, 1993; Wagner and Krab, 1995) με κόστος σε αναγωγική ενέργεια, εφόσον αποτρέπεται η μετατόπιση πρωτονίων και παραγωγή ATP (Atkin et al., 2002).

Παρεμποδιστές του κυτοχρωμικού μονοπατιού επάγουν το μετάγραφο και αυξάνουν τα επίπεδα της πρωτεΐνης της AOX στα φυτά (Vanlerberghe and McIntosh, 1994) και συγκεκριμένα στον καπνό (Vanlerberghe and McIntosh, 1992). Το εναλλακτικό μονοπάτι επάγουν και περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως οι χαμηλές θερμοκρασίες (Gonzalez-Meler et al., 1999), η προσβολή από παθογόνα (Chivasa and Carr, 1998), η αλατότητα (Hilal et al., 1998), και οι καταπονήσεις γενικότερα (Umbach et al., 2005). Ο γενικότερος ρόλος του εναλλακτικού μονοπατιού, όπως υπαγορεύεται από τα μέχρι τώρα ερευνητικά δεδομένα είναι διατήρηση της ροής ηλεκτρονίων όταν το κυτοχρωμικό μονοπάτι δυσλειτουργεί. Επίσης η διακύμανση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού της ουμπικινόνης από την δράση της εναλλακτικής οξειδάσης επηρεάζει και την παραγωγή των EMO προσδίδοντάς της ουσιαστικό ρόλο στην απόσβεση των EMO στο μιτοχόνδριο (Maxwell et al., 1999).

Μιτοχόνδριο και ΠΚΘ

Κατά την απόσπαση του κυτοχρώματος από την αναπνευστική αλυσίδα, τα αυξημένα επίπεδα EMO, από την δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας, και τα σήματα ασβεστίου (Ca^{2+}) αλλάζουν την διαπερατότητα της μεμβράνης του μιτοχονδρίου, με αποτέλεσμα την έξοδο του κυτοχρώματος c από το μιτοχόνδριο. Ο αποπτωτικός «χαρακτήρας» του κυτοχρώματος ήρθε να διαταράξει το «δόγμα» της επιφανειακής απλότητας στην λειτουργία του το 1996 από την ομάδα του Wang (1996) οπότε και ανακαλύφθηκε η συμμετοχή του κυτοχρώματος στην αλληλουχία γεγονότων που οδηγούν στον ΠΚΘ.

Πέρα από την νέκρωση των κυττάρων η οποία οφείλεται σε τυχαίους παράγοντες όλοι οι πολυκύτταροι οργανισμοί διαθέτουν προγράμματα με γενετική βάση τα οποία κατά την ενεργοποίησή τους οδηγούν σε μια διαδικασία ελεγχόμενης «θανάτωσης» των κυττάρων, τον ΠΚΘ. Ο ΠΚΘ, είναι μια απαραίτητη φυσιολογική διαδικασία για την κανονική ανάπτυξη και διατήρηση της ομοιοστασίας των ιστών (Vaux and Korsmeyer, 1999) ενώ απαιτεί την έκφραση πολυάριθμων γονιδίων και την χρήση συγκεκριμένων ενδοκυτταρικών μονοπατιών. Η καλύτερα μελετημένη μορφή ΠΚΘ είναι η απόπτωση των ζωικών κυττάρων, η οποία χαρακτηρίζεται από ένα διακριτό σετ μορφολογικών χαρακτηριστικών τα οποία περιλαμβάνουν συρρίκνωση του κυττάρου, διόγκωση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, κύρτωση του πυρήνα και κατακερματισμό του DNA (Desagher and Martinou, 2000). Κύρια «συστατικά» του αποπτωτικού θανάτου είναι αποπτωτικοί παράγοντες όπως οι πρωτεΐνες Bcl-2, ο Araf-1 (αποπτωτικός παράγοντας ενεργοποίησης πρωτεασών 1) καθώς και μέλη της οικογένειας των κασπασών. Τα μιτοχόνδρια κατά την απόπτωση παίζουν πιλοτικό ρόλο στον συντονισμό της ενεργοποίησης των κασπασών μέσω της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c.

Ο αποπτωτικός ρόλος των μιτοχονδρίων προτάθηκε για πρώτη φορά όταν παρατηρήθηκε πως ήταν απαραίτητα για την εκδήλωση μορφολογικών αλλαγών χαρακτηριστικών της απόπτωσης σε αυγά *Xenopus* (Newmeyer et al., 1994). Περαιτέρω κλασμάτωση και καθαρισμός κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων φανέρωσε πως το κυτόχρωμα c είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση των κασπασών μαζί με το dATP και τον Araf-1. Το τρέχον μοντέλο για την εκδήλωση του ΠΚΘ σε ζωικά κύτταρα είναι πως κατά την απελευθέρωσή του στο κυτταρόπλασμα το κυτόχρωμα c ενώνεται με τον Araf-1. Κατά την παρουσία ATP ή

dATP αυτό το σύμπλοκο ενεργοποιεί την προκασπάση 9. Η ενεργοποιημένη κασπάση 9 με την σειρά της μπορεί να ενεργοποιήσει άλλες κασπάσες υπεύθυνες για την «εκτέλεση» του κυττάρου.

Οι κασπάσες (ειδικές πρωτεάσες κυστεΐνης – ασπαρτικού) συντίθενται ως ανενεργά προ-ένζυμα τα οποία ενεργοποιούνται κατά την πρωτεόλυσή τους αποκτούν την ιδιότητα να διασπούν καιρία ενδοκυτταρικά υποστρώματα (Budihardjo et al., 1999) με αποτέλεσμα την εκδήλωση μορφολογικών και βιολογικών αλλαγών οι οποίες σχετίζονται με την απόπτωση (Desagher and Martinou, 2000). Ανήκουν σε μια τάξη εξειδικευμένων πρωτεασών κυστεΐνης οι οποίες επιδεικνύουν έναν υψηλό βαθμό εξειδίκευσης και κόβουν την πολυπεπτιδική αλυσίδα μόνο μετά από υπόλειμμα ασπαρτικού οξέος, ενώ είναι απαραίτητη και η ύπαρξη 4 αμινοξέων τουλάχιστον, προς την κατεύθυνση του αμινοτελικού άκρου του πολυπεπτιδίου, σε σχέση με την περιοχή κοπής. Κατά την πρωτεόλυσή τους, μετά από σπάσιμο των πεπτιδικών δεσμών σε συγκεκριμένα σημεία, αφαιρείται το αμινοτελικό άκρο. Η λύση του δεσμού οδηγεί στον σχηματισμό μιας μεγάλης (α) υπομονάδας και μιας μικρής (β) οι οποίες και σχηματίζουν το ενζυμικά ενεργό ετεροδιμερές. Κάθε ενεργό ετεροδιμερές αποτελείται από 6 β -αλυσίδες και 5 α -έλικες. *In situ* το ενεργό μόριο κασπάσης υφίσταται ως ένα (α/β)₂ τετραμερές (Nicholson, 1999; Grutter, 2000).

Ο ΠΚΘ περιλαμβάνει την ενεργοποίηση μιας σειράς κασπασών κατά την οποία κασπάσες έναρξης (initiator) ενεργοποιούν κασπάσες «εκτελεστές» οι οποίες πρωτεολύουν μια πληθώρα στόχων οδηγώντας στον χαρακτηριστικό φαινότυπο του ΠΚΘ. Μία από τις βασικές κασπάσες έναρξης είναι η κασπάση 9, η οποία ενεργοποιείται στα ζώα μετά από αλληλεπίδραση με συγκεκριμένους παράγοντες όπως ο Araf1 και το κυτόχρωμα c. Αυτές οι πρωτεΐνες ενώνονται ώστε να σχηματίσουν το αποπτωτικό σωματίο το οποίο ενδέχεται να περιλαμβάνει και πρόσθετες πρωτεΐνες, πέρα από αυτές που αναφέρθηκαν παραπάνω. Οι κασπάσες έναρξης ενεργοποιούν κασπάσες «εκτελεστές» όπως η κασπάση 3, 6 και 7 (Hengartner, 2000). Στα φυτά κατά, τρόπο ανάλογο με τα ζώα έχει βρεθεί πως οι κασπάσες όχι μόνο συμμετέχουν αλλά και ρυθμίζουν την έκφραση του ΠΚΘ (Woltering et al., 2002).

ΠΚΘ σε Ζώα και Φυτά

Ο γηρασμός στα ζωικά κύτταρα ορίζεται ως η μη αναστρέψιμη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, επομένως μια λειτουργία του γηρασμού στα ζωικά κύτταρα σχετίζεται με την καταπολέμηση όγκων (Dimiri, 2005). Σε αντίθεση ο γηρασμός στα φυτά περιλαμβάνει μια γενετικά προδιαγεγραμμένη απώλεια της μεταβολικής δραστηριότητας η οποία σχετίζεται με δομικές αλλαγές, μειωμένη πρωτεΐνη και χλωροφύλλες, και απόσυρση των αποθεμάτων άνθρακα και αζώτου με κατάληξη στον ΠΚΘ (Buchanan-Wollaston et al., 2003).

Ο μοριακός μηχανισμός του ΠΚΘ στα ζωικά συστήματα είναι πολύ καλύτερα μελετημένος απ ότι στα φυτά. Αν και μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί πολλά κοινά σημεία ανάμεσα στον ζωικό και τον φυτικό ΠΚΘ, δεν έχει βρεθεί κάποιος φυτικός οργανισμός ο οποίος να εμφανίζει πλήρη ταύτιση ως προς την επαγωγή και εκτέλεση του ΠΚΘ με τα ζώα. Αντιθέτως όχι μόνο υπάρχουν διαφορές στα μονοπάτια ανάμεσα στα φυτά και τα ζώα, αλλά και ανάμεσα στα φυτά εμφανίζονται διαφορετικά μονοπάτια σε αντίθεση με την ομοιομορφία που συναντάται στα ζώα.

Το μονοπάτι του ΠΚΘ στα ζώα.

Ο ΠΚΘ στα ζώα έχει ως αποτέλεσμα την από-συναρμολόγηση (dis-assembly) του κυττάρου, με την μορφή συμύκνωσης, συρρίκνωσης και κλασμάτωσης του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα και «πακετάρισμα» των κλασμάτων στα λεγόμενα αποπτωτικά σωμάτια, τα οποία έπειτα καταστρέφονται μέσω της φαγοκυττάρωσης από τα μακροφάγα, ή από γειτονικά κύτταρα. Μέσω αυτής της διαδικασίας τα κατάλοιπα της κλασμάτωσης του κυττάρου καταστρέφονται. Πριν από την κλασμάτωση του πυρήνα πραγματοποιείται συμύκνωση της χρωματίνης, διαμερισματοποίησή της μέσα στον πυρήνα και κατακερματισμός του DNA. Όταν όλα τα παραπάνω γεγονότα συνδυάζονται τότε προκύπτει η χαρακτηριστική μορφολογική έκφραση του αποπτωτικού ΠΚΘ, ή αλλιώς απόπτωσης. Ο όρος απόπτωση χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Kerr et al. (1972) και αποτελεί μια μορφή ΠΚΘ αν και συχνά ο όρος απόπτωση χρησιμοποιείται ώστε να περιγράψει όλες τις μορφές ΠΚΘ (Miller and Marx, 1998).

Το μονοπάτι του ΠΚΘ στα φυτά.

Ο ΠΚΘ συναντάται και στα φυτά αν και υπάρχουν σημαντικές διαφορές με τον ΠΚΘ στα ζωικά κύτταρα. Η συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος συνντάται τόσο στα φυτικά όσο και στα ζωικά συστήματα, σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Συμπύκνωση της χρωματίνης και κατακερμάτιση του πυρήνα συναντάται σε όλα τα ζωικά κύτταρα, αλλά μόνο σε ορισμένες κατηγορίες φυτικών κυττάρων. Στα ζωικά κύτταρα τα «απομεινάρια» του κυττάρου εγκλείονται σε αποπτωτικά σώματα τα οποία όμως δεν συναντώνται στα φυτικά κύτταρα. Αντιθέτως, τα εκφυλισμένα συστατικά του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα καταστρέφονται μέσω της διαδικασίας της αυτοφαγείας (autophagy) (Krishnamurthy et al., 2000). Ο ΠΚΘ στα ζωικά κύτταρα διεξάγεται μέσω μιας διαδοχικής ενεργοποίησης πρωτεϊνών ρυθμιστικών και εκτελεστικών αυστηρά συνηρημένων σε οργανισμούς με διαφορετικά επίπεδα οργάνωσης και πολυπλοκότητας όπως θηλαστικά και έντομα. Αντιθέτως στα φυτικά κύτταρα η ενεργοποίηση του ΠΚΘ διαφέρει τόσο από τα ζωικά κύτταρα, όσο και ανάμεσα σε διαφορετικά είδη φυτικών κυττάρων. Χαρακτηριστικά η συμβολή των κασπασών δεν έχει δειχθεί ακόμη σε όλους τους τύπους φυτικών κυττάρων, ενώ η ομολογία τους με τις ζωικές κασπάσες είναι μικρή.

Ένας μηχανισμός κοινός σε φυτά και ζώα είναι η αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης Ca^{2+} . Πιο συγκεκριμένα τα επίπεδα ασβεστίου στα ζώα ενεργοποιούν κασπάσες και ενδονουκλεάσες, κατά τρόπο ανάλογο με τα φυτά. Επίσης, κοινή σε φυτά και ζώα είναι η ανίχνευση κατατετημημένου DNA (DNA laddering) καθώς επίσης και η θετική ανίχνευση με την μέθοδο του TUNEL.

Ο βαθμός συμμετοχής του μιτοχονδρίου στον ΠΚΘ δεν έχει διερευνηθεί πλήρως. Έχει βρεθεί ότι το κυτόχρωμα απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα κατά τον ΠΚΘ, επαγόμενο από υψηλές θερμοκρασίες (Balk et al., 1999) και από μεναδιόνη σε πρωτοπλάστες καπνού (Sun et al., 1999). Σημαντική συνεισφορά στην αποσαφήνιση του ρόλου του μιτοχονδρίου στον φυτικό ΠΚΘ προσέφεραν τα ευρήματα των Zhao et al., (1999), ότι το ζωικό κυτόχρωμα c μπορεί να ενεργοποιήσει συστατικά με συνάφεια στις κασπάσες σε απομονωμένο κυτταρόπλασμα καρότου. Η συμβολή των κασπασών στον φυτικό ΠΚΘ έχει ενδυναμωθεί από ευρήματα τα οποία πιστοποιούν ότι πεπτιδικοί αναστολείς των ζωικών κασπασών μπορούν να εμποδίσουν τον επαγόμενο από αντίδραση υπερ-ευαισθησίας κυτταρικό θάνατο στον καπνό.

Σκοπός της εργασίας

Από τα παραπάνω καθίσταται σαφές ότι το μιτοχόνδριο παίζει κομβικό ρόλο στην απόκριση σε αβιοτικές καταπονήσεις. Όχι μόνο συμβάλει στην συσσώρευση των ΕΜΟ αλλά διαθέτει και αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που συμβάλλουν στην ρύθμισή τους, ενώ η απελευθέρωση αποπτωτικών παραγόντων οδηγεί στην επαγωγή του ΠΚΘ. Το εργαστήριό μας διαθέτει μια μακρά παράδοση στην αποσαφήνιση των μηχανισμών απόκρισης του φυτού σε καταπονήσεις και ιδίως στην αλατότητα. Έχουμε ήδη δείξει πως η καταπόνηση από αλατότητα οδηγεί στην συσσώρευση των ΕΜΟ και στην εκδήλωση του ΠΚΘ σε φυτά υπό την ρύθμιση των ΕΜΟ (Papadakis and Roubelakis-Angelakis, 2005; Skopelitis et al., 2006; Moschou et al., 2008a; Moschou et al., 2008b). Σε αυτήν την ερευνητική εργασία γίνεται μια προσπάθεια να αποσαφηνιστεί ο ρόλος του μιτοχονδρίου γενικότερα και ειδικότερα του κυτοχρώματος-c στην απόκριση των φυτών στην αλατότητα. Στο πρώτο πακέτο εργασίας (Κεφάλαιο 1) διερευνήθηκε η συμβολή του μιτοχονδρίου στην διατήρηση της οξειδωτικής ομοιόστασης του φυτού, οι μεταβολές στην αναπνευστική αλυσίδα, καθώς και ο μηχανισμός ενεργοποίησης του μονοπατιού του ΠΚΘ. Στο δεύτερο πακέτο εργασίας (Κεφάλαιο 2) εξερευνήθηκε ο ρόλος του κυτοχρώματος-c στα παραπάνω γεγονότα, ενώ επίσης διερευνήθηκε και αν η υπερέκφραση του κυτοχρώματος-c οδηγεί σε βελτιωμένη απόκριση στην αλατότητα. Τέλος στο τρίτο πακέτο εργασίας (Κεφάλαιο 3) διερευνήθηκε η συμβολή των πολυαμινών και της οξείδωσης αυτών στην σηματοδότηση των αποκρίσεων του μιτοχονδρίου κατά τις καταπονήσεις.

Κεφάλαιο 1

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ ΣΤΟΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟ ΑΠΟ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΘΑΝΑΤΟ.

1.1 Περίληψη

Τα μιτοχόνδρια έχουν εδραιωθεί ως κέντρα παραγωγής ΕΜΟ κατά τις καταπονήσεις. Αποπόλωση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης οδηγεί στην απελευθέρωση αποπτωτικών παραγόντων κατά τρόπο ανάλογο με την επαγωγή του ζωικού ΠΚΘ. Μελέτη της απόκρισης φυτών καπνού στην καταπόνηση από αλατότητα φανέρωσε σημαντικές διαφορές ανάμεσα στον ζωικό ΠΚΘ και τον επαγόμενο από καταπόνηση φυτικό ΠΚΘ. Καταπόνηση από αλατότητα μικρής διάρκειας (3h) είχε ως αποτέλεσμα την αποπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης, απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c στο κυτταρόπλασμα, ενεργοποίηση πρωτεασών τύπου κασπάσης-3 και την επαγωγή ΠΚΘ σε φυτά καπνού αγρίου τύπου *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana. Σε αντίθεση με τις 3h καταπόνηση από αλατότητα μεγαλύτερης διάρκειας (24h) οδήγησε σε χαρακτηριστικά νεκρωτικού θανάτου σε συνδυασμό με κατάρρευση βασικών «συστατικών» της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, όπως το κυτόχρωμα-c και η εναλλακτική οξειδάση, μείωση ATP, και υψηλή ενεργότητα πρωτεασών. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως η καταπόνηση από αλατότητα σε φυτά καπνού *in planta* οδηγεί στην επαγωγή ΠΚΘ κατά τα πρότυπα των ζωικών συστημάτων μόνο στις πρώτες ώρες της καταπόνησης, ενώ καταπόνηση μεγαλύτερης διάρκειας οδηγεί σε νεκρωτικά χαρακτηριστικά.

1.2 Εισαγωγή

Τα φυτά πρέπει να ανταπεξέλθουν σε συνεχώς μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες οι οποίες περιορίζουν την αύξηση και ανάπτυξή τους. Η αλατότητα είναι μια από τις σοβαρότερες περιβαλλοντικές καταπονήσεις που επηρεάζει ιδιαίτερα αρνητικά την παγκόσμια γεωργία (Zhu, 2001). Περιορίζει την ικανότητα των φυτών να προσλαμβάνουν νερό και έχει ως αποτέλεσμα σοβαρούς περιορισμούς στον ρυθμό αύξησης, ανάπτυξης στον μεταβολισμό των φυτών (Munns, 2002). Υψηλή ενδοκυτταρική συγκέντρωση NaCl ανατρέπει την ιοντική ισορροπία του φυτού, προκαλώντας παράλληλα ιοντική και ωσμωτική καταπόνηση.

Οι ενεργές μορφές οξυγόνου (EMO) είναι αναπόφευκτα προϊόντα της αναγωγής του οξυγόνου στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες. Πέρα από τον ρόλο τους ως τοξικά παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού, αναγνωρίζονται ευρέως και ως μόρια σηματοδότες τα οποία ρυθμίζουν πολλές βιολογικές διαδικασίες στο κύτταρο. Οι EMO συμμετέχουν στην μεταφορά σήματος κατά τις καταπονήσεις (Zhu, 2001) και επάγουν το μονοπάτι του ΠΚΘ. (Skopelitis et al., 2006; Gadjev et al., 2008; Moschou et al., 2008a). Ο ΠΚΘ είναι μια φυσιολογική διαδικασία που οδηγεί στην «καταστροφή» των κυττάρων στους πολυκύτταρους οργανισμούς (Ellis et al., 1991; Vaux and Korsmeyer, 1999). Παίζει πρωταρχικό ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών και στις αποκρίσεις/προσαρμογές των φυτών στις περιβαλλοντικές μεταβολές (van Doorn and Woltering, 2005). Ο ΠΚΘ είναι μια φυσιολογική διαδικασία η οποία απαιτεί υψηλά επίπεδα ενέργειας με διακριτές διαφορές από την νέκρωση, το ανάλογο της «ολικής κατάρρευσης» του κυττάρου και των οργανιδίων του. Ο ΠΚΘ έχει παρατηρηθεί τόσο στα φυτά όσο και στα ζώα, αλλά η σχέση μεταξύ του φυτικού και ζωικού ΠΚΘ δεν είναι ξεκάθαρη αν και μοιράζονται πολλά κοινά χαρακτηριστικά (Krishnamurthy et al., 2000).

Ενώ στα ζωικά μιτοχόνδρια η κύρια πηγή υπεροξειδικών ανιόντων ($O_2^{\bullet-}$) είναι η «διαρροή» ηλεκτρονίων από το μονοπάτι της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Staniek and Nohl, 2000), στα φυτικά κύτταρα η παραγωγή τους από τη αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων του μιτοχονδρίου κατά τις αβιοτικές καταπονήσεις είναι κάτι το οποίο έχει αποδειχθεί πρόσφατα (Vacca et al., 2004; Noctor et al., 2007). Σε κυτταροκαλλιέργειες καπνού οι Vacca et al. (2004) έχουν δείξει πως οι αβιοτικές καταπονήσεις οδηγούν σε παραγωγή EMO μέσω της διακοπής της αλυσίδας

μεταφοράς ηλεκτρονίων του μιτοχονδρίου. Η διακοπή αυτή προκαλείται από την απόσπαση βασικών «συστατικών» της αλυσίδας όπως το κυτόχρωμα-c, ένας οξειδοαναγωγικός παράγοντας που εντοπίζεται ανάμεσα στα σύμπλοκα III και IV της αλυσίδας (Blackstone and Green, 1999). Για να διατηρηθεί το ισοζύγιο των παραγόμενων από το μιτοχόνδριο ΕΜΟ, τα μιτοχόνδρια είναι εξοπλισμένα με αντιοξειδωτικά συστήματα τα οποία όχι μόνο αποσβένουν τις ΕΜΟ αλλά αποτρέπουν και την συσσώρευσή τους (Korshunov et al., 1999). Στην δεύτερη κατηγορία ανήκει και το μονοπάτι που καταλήγει στην εναλλακτική οξειδάση. Η εναλλακτική οξειδάση δέχεται ηλεκτρόνια από την αναγμένη ουμπικινόνη και κατ' αυτόν τον τρόπο αποτρέπει την παραγωγή ΕΜΟ όταν το κυτοχρωμικό μονοπάτι δυσλειτουργεί (Yip and Vanlerberghe, 2001). Παραδόξως και το κυτόχρωμα-c διαθέτει αντιοξειδωτική δράση μετατρέποντας τα υπεροξειδία σε οξυγόνο (Korshunov et al., 1999). Κατά την παραγωγή των μιτοχονδριακών ΕΜΟ το κυτόχρωμα απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα, τόσο στα ζωικά (Giannattasio et al., 2008), όσο και στα φυτικά κύτταρα (Vacca et al., 2006). Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος στο κυτταρόπλασμα είναι γεγονός με ιδιαίτερη σημασία για την ενεργοποίηση του μονοπατιού του ΠΚΘ στα ζώα (Robson and Vanlerberghe, 2002). Πέρα από την έξοδο του κυτοχρώματος η ενεργοποίηση του ΠΚΘ στα ζώα περιλαμβάνει και άλλα «γεγονότα» όπως αποπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης, ενεργοποίηση κασπασών και κατακερμάτιση του πυρηνικού DNA από ενδονουκλεάσες.

Προηγούμενες δημοσιεύσεις του Εργαστηρίου μας έχουν εδραιώσει την παραγωγή και συσσώρευση των ΕΜΟ κατά την καταπόνηση από αλατότητα σε καπνό και αμπέλι (Skopelitis et al., 2006; Moschou et al., 2008a). Επίσης η καταπόνηση από αλατότητα επάγει την έξοδο σπερμιδίνης στον αποπλάστη όπου και οξειδώνεται από τις οξειδάσες των πολυαμινών και οδηγεί στην εκδήλωση ΠΚΘ σε αιωρούμενες κυτταροκαλλιέργειες καπνού (Moschou et al., 2008a). Σε αυτό το πακέτο εργασίας επιχειρήθηκε η διερεύνηση των αποκρίσεων του μιτοχονδρίου κατά την καταπόνηση από αλατότητα *in planta* και να ταυτοποιηθούν τα κοινά σημεία στην αλληλουχία γεγονότων που οδηγούν στον ΠΚΘ ανάμεσα σε φυτικά και ζωικά κύτταρα.

1.3 Υλικά και Μέθοδοι

1.3.1 Φυτικό Υλικό

Φυτά καπνού (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana) αναπτύχθηκαν σε χώμα σε θάλαμο σταθερών συνθηκών, φωτοπερίοδο 16 – 8h σε 25°C μέχρι να φτάσουν σε αναπτυξιακό στάδιο 4 φύλλων, περίπου 4cm σε ύψος. Οι μεταχειρίσεις έγιναν υπό τις ίδιες συνθήκες χρησιμοποιώντας διάλυμα NaCl συγκέντρωσης 250mM σε απονισμένο νερό και με χρονική διάρκεια 1,5, 3, 4, και 24h. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το μεσόφυλλο, πλήρως αναπτυγμένων ενδιάμεσων φύλλων. Για να διαπιστωθούν τα βέλτιστα χρονικά σημεία για την καταπόνηση και η ένταση της καταπόνησης έγιναν προκαταρκτικές δοκιμές σε φυτά καπνού, οι οποίες περιελάμβαναν μακροσκοπική παρατήρηση της ανάπτυξης των φυτών και εκτίμηση παραμέτρων όπως επαγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων, συσσώρευση EMO, επίπεδα ανοσοενεργής πρωτεΐνης εναλλακτικής οξειδάσης και κυτοχρώματος-c.

1.3.2 Μακροσκοπική παρατήρηση ανάπτυξης φυτών

Επιλέχθηκαν 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl, 100, 250 και 400mM ώστε να μελετηθεί η επίδρασή τους σε φυτά καπνού και να διαπιστωθεί ποια είναι η βέλτιστη για τις περαιτέρω μεταχειρίσεις. Πλήρως αναπτυγμένα φυτά υποβλήθηκαν σε καταπόνηση από αλατότητα μέσα στο θάλαμο ανάπτυξης. Πιο συγκεκριμένα διάλυμα NaCl χορηγήθηκε στις γλάστρες όπου αναπτύσσονταν τα φυτά. Επιλέχθηκε ένα σταθερό σημείο όπου και τοποθετήθηκε ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Nikon μοντέλο Coolpix 4500. Η φωτογραφική παρέμεινε στο ίδιο σημείο καθόλη την διάρκεια της μεταχείρισης και τα φυτά φωτογραφήθηκαν ανά 15min μετά την μεταχείριση με NaCl.

1.3.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του περοξειδίου του υδρογόνου με τη μέθοδο της λουμινόλης

Η παραγωγή του H₂O₂ μελετήθηκε με την βιοδοκιμή της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης (luminol, Sigma, Munchen, Germany), όπως έχει ήδη περιγραφεί (Murphy and Huerta, 1990; Papadakis and Roubelakis-Angelakis, 2005; Skopelitis et al., 2006) Η βιοδοκιμή πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 2 mL τοποθετώντας σε δοκιμαστικό σωλήνα σπινθηρισμού τα ακόλουθα: 0,8 mL διαλύματος αντίδρασης [10 mM Tris-MES pH 7,0, 1 mM CaCl₂ και 0,1 mM KCl], 0,2 mL από 1 mM φρέσκου

διαλύματος λουμινόλης, 0,1 units περοξειδάσης (type I, Sigma) σε 20 mM φωσφορικού καλίου (pH 7,4) (Auh and Murphy, 1995) , καθώς και 0,1 mL εκχυλίσματος (σε 20 mM Tris-HCl pH 6,7). Ο δοκιμαστικός σωλήνας σπινθηρισμού τοποθετήθηκε αμέσως σε μετρητή σπινθηρισμού (LS 8000, Beckman) και μετρήθηκε η χημειοφωταύγεια. Οι κρούσεις μετρήθηκαν κάθε 15 sec για 1 min και οι δύο τελευταίες τιμές χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της μέσης τιμής.

1.3.4 Προσδιορισμός των υπεροξειδικών ιόντων με τη μέθοδο της λουσιγενίνης

Η παραγωγή των $O_2^{\bullet-}$ μελετήθηκε με την βιοδοκιμή της χημειοφωταύγειας της λουσιγενίνης (lucigenin, Sigma, Munchen, Germany), η οποία είναι ειδική για την ανίχνευση του $O_2^{\bullet-}$ (Papadakis and Roubelakis-Angelakis, 2005; Skopelitis et al., 2006). Η βιοδοκιμή πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 2 mL τοποθετώντας σε δοκιμαστικό σωλήνα σπινθηρισμού τα ακόλουθα: 0,8 mL διαλύματος αντίδρασης (που περιείχε 0,1 M Glycine-NaOH, pH 9,0 και 1 mM EDTA), 0,2 mL από 1 mM διαλύματος λουσιγενίνης, και 0,1 mL από το φυτικό εκχύλισμα όπως περιγράφεται παραπάνω (Auh and Murphy, 1995). Όλες οι άλλες συνθήκες, που περιγράφηκαν για την βιοδοκιμή του H_2O_2 , ακολουθήθηκαν και στην περίπτωση του $O_2^{\bullet-}$. Οι κρούσεις μετρήθηκαν κάθε 6 sec για 0,5 min και οι δύο τελευταίες τιμές χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της μέσης τιμής.

1.3.5 Προσδιορισμός Ενζυμικών Ενεργοτήτων της SOD και CAT

Για τον προσδιορισμό των ενεργοτήτων της SOD και CAT χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός. Η συνολική ενεργότητα της SOD προσδιορίστηκε με την χρησιμοποίηση της φωτοχημικής μεθόδου των Misra and Fridovich (1977). Στο διάλυμα αντίδρασης (10 mM φωσφορικό κάλιο, pH 7,5, 0,222 mM o-dianisidine, 0,014 mM riboflavin) προστέθηκαν 20 μ g ολικής πρωτεΐνης, σε συνολικό όγκο 1 mL. Η οξειδωση του o-dianisidine μετρήθηκε στα 460 nm στους 25°C, ανά 5 min και για συνολικό χρόνο 30 min, στο μεσοδιάστημα των οποίων τα δείγματα ήταν τοποθετημένα σε έντονο φως (cool white). Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της SOD χρησιμοποιήθηκε το γραμμικό τμήμα της καμπύλης. Η μονάδα ενεργότητας της SOD στα πρωτεϊνικά δείγματα ορίστηκε συγκριτικά με την χρησιμοποίηση μίας μονάδας ενεργότητας καθαρής SOD (Horseradish SOD, Sigma). Η ενεργότητα της CAT εκτιμήθηκε μετρώντας τη διάσπαση του H_2O_2 στα 240 nm

($\epsilon=0.036 \text{ mM cm}^{-1}$). Το διάλυμα αντίδρασης αποτελούνταν από 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7,0 και 15 mM H_2O_2 .

1.3.6 Χρώση ενεργότητας και διαχωρισμός ισοενζύμων της SOD

Η χρώση ενεργότητας της SOD πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Beauchamp and Fridovitch (1971) σε 7,5% πηκτές ακρυλαμίδης. Για την ανάλυση των ισοενζύμων της SOD, τα πρωτεϊνικά δείγματα διαχωρίστηκαν με φυσική ηλεκτροφόρηση (native-PAGE) στους 4°C με το σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων του Davis (Davis 1964). Για την ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκαν 1,5 mm πάχους επίπεδα πηκτώματα και η συσκευή mini Protean II της BioRad. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, οι ζώνες με ενεργότητα SOD, εντοπίστηκαν με την μέθοδο των Beauchamp and Fridovitch (1971). Συγκεκριμένα, η πηκτή επωάστηκε με 2 mg mL⁻¹ 4-nitroblue tetrazolium chloride (NBT) σε διάλυμα 50 mM φωσφορικού καλίου, pH 7,4, για 30 min στο σκοτάδι. Στη συνέχεια οι πηκτές μεταφέρθηκαν στο διάλυμα χρώσης, το οποίο περιείχε 0,1 mg mL⁻¹ ριβοβλαβίνη και 0,25% (v/v) TEMED σε 50 mM φωσφορικό κάλιο, pH 7,4, για 20 min στο σκοτάδι. Τέλος, παρουσία φωτός, εμφανίστηκαν οι ζώνες των ισοενζύμων.

1.3.7 Χρώση ενεργότητας και διαχωρισμός ισοενζύμων της CAT

Η χρώση ενεργότητας της CAT πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Clare et al. (1984). Για την ανάλυση των ισοενζύμων της CAT, τα πρωτεϊνικά δείγματα διαχωρίστηκαν με φυσική ηλεκτροφόρηση (native-PAGE) στους 4°C με το σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων του Davis (Davis 1964). Για την ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκαν 1,5 mm πάχους επίπεδα πηκτώματα και η συσκευή mini Protean II της BioRad. Συγκεκριμένα, μετά από ηλεκτροφόρηση τα πηκτώματα επωάζονται σε ΡΔ 50 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7,0, horseradish peroxidase (50 pg ml) στους 23°C για 45 min. Το H_2O_2 (υπόστρωμα της δοκιμής) προστέθηκε σε συγκέντρωση 5 mM και η επώαση συνεχίστηκε για 10 min. Τα πηκτώματα τοποθετήθηκαν άμεσα σε dH_2O και προστέθηκε στο διάλυμα 3,3'-διαμινοβενζιδίνη [3,3'-DAB (0,5 mg ml⁻¹)] έως ότου να γίνει εμφανής η χρώση.

1.3.8 Ανίχνευση των κύριων ενεργών μορφών οξυγόνου στον ιστό

Για την *in situ* ανίχνευση του H_2O_2 , χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένη η μέθοδος, που περιγράφεται από τους Yoda et al. (2003). Στο τέλος της μεταχείρισης, ενέθηκε στο

φύλλο 3,3'-διαμινοβενζιδίνη (3,3'-DAB, 1 mg ml⁻¹, pH 3,8) και τα φύλλα επώαστηκαν για 1h. Παρουσία H₂O₂ το DAB σχηματίζει ιζήματα τα οποία γίνονται εμφανή μετά τον αποχρωματισμό του φύλλου σε ζέουσα απόλυτη αιθανόλη.

Η *in situ* ανίχνευση του O₂⁻, πραγματοποιήθηκε όπως και του H₂O₂ με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε 0,5 mg ml⁻¹ NBT (σε ιστούς που δεν έχουν υποστεί καταπόνηση) ή 0,1 mg ml⁻¹ NBT (σε ιστούς που έχουν υποστεί καταπόνηση) σε 50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7.8.

1.3.9 Απομόνωση ολικού mRNA

Η απομόνωση ολικού mRNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τροποποιημένο πρωτόκολλο κατά Iandolo et al. (2004). Συγκεκριμένα, ανά gr νωπού βάρους ιστού προστέθηκε μίγμα 2,5 ml όξινης φαινόλης (acid phenol παρασκευασμένη από κρυσταλλική φαινόλη, Sigma, USA) pH 4,0 και 2,5 ml διαλύματος εκχύλισης RNA, [σύστασης 100 mM LiCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0, και 1% (w/v) Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)], το οποίο προηγουμένως είχε υποστεί βρασμό ώστε να δημιουργηθεί ένα ομοιογενές μίγμα των δύο φάσεων, οργανικής και ανόργανης. Στη συνέχεια προστέθηκε μισός όγκος χλωροφορμίου [CHCl₃ (2,5 ml)], και τα δείγματα ανακινήθηκαν (vortex) για 30 sec. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (10 min 10000 g 4°C). Στο υπερκείμενο προστέθηκε ίσος όγκος CHCl₃, ενώ οι δύο φάσεις οι οποίες προέκυψαν ανακινήθηκαν για 30 sec και ακολούθησε φυγοκέντρηση (10 min 10000 g 4°C). Στη συνέχεια, η υπερκείμενη φάση μεταφέρθηκε σε νέο erpendorf και προστέθηκε LiCl (από διάλυμα συγκέντρωσης 10 M) ώστε η τελική συγκέντρωσή του να είναι 3,6 M. Τα δείγματα αφέθηκαν για τουλάχιστον 3 h στους -20°C και ακολούθησε φυγοκέντρηση (30 min 13000 g 4°C). Μετά την απόρριψη του υπερκειμένου, το ιζηματοποιημένο ολικό mRNA εκπλύθηκε 2-φορές με 70% (v/v) αιθανόλη ώστε να απομακρυνθούν τα επί πλέον άλατα LiCl και επαναδιαλύθηκε σε διπλά αποστειρωμένο ddH₂O. Το επαναδιαλυμένο ολικό mRNA αποθηκεύτηκε μέχρι τη χρήση του στους -80°C, ενώ μέρος του διαχωρίστηκε και σε αυτό προστέθηκε 100% (v/v) αιθανόλη το οποίο επίσης αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία -80°C. Η αιθανόλη αναστέλλει τη δράση των RNAσών οι οποίες μπορεί να καταστρέψουν την ακεραιότητα του RNA.

Μέρος του απομονωμένου ολικού mRNA ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2 % (w/v) το οποίο περιείχε EtBr με τελική συγκέντρωση 0,5 μg ml⁻¹ και η συγκέντρωσή του εκτιμήθηκε σε nanodrop (nanodrop, ND 1000). Να σημειωθεί ότι

όλα τα πλαστικά και γυάλινα υλικά είχαν αποστειρωθεί πριν τη χρήση, όπως επίσης και όλα τα χημικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν, εκτός φαινόλης και χλωροφορμίου.

1.3.10 Ανάλυση ολικού mRNA κατά Northern

Η ανάλυση κατά Northern του ολικού mRNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Sambrook et al. (1989). Συγκεκριμένα, τουλάχιστον 20 μg ολικού RNA διαχωρίστηκαν σε αποδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης 1,5% (w/v), το οποίο περιείχε φορμαλδεΰδη. Για την παρασκευή του πηκτώματος διαλύθηκαν με τη βοήθεια βρασμού σε 74 ml ddH₂O 1,5 gr αγαρόζης [για πήκτωμα 1.5% (w/v)]. Όταν το διάλυμα κρύωσε αρκετά, προστέθηκαν 10 ml διαλύματος 10x MOPS και η προσθήκη 16 ml 37% (v/v) formaldehyde. Η πηκτή προ-ηλεκτροφορήθηκε για 5 min στα 5 V/cm σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης με σύσταση όπως της πηκτής (dH₂O/formaldehyde/ 10x MOPS). Τα δείγματα ετοιμάστηκαν με την προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος φόρτωσης, σύστασης 10x MOPS, formaldehyde και formamide ώστε πάντα ο συνολικός όγκος να είναι <50 μL και τοποθετήθηκαν για 15 min στους 65°C και αμέσως μετά σε πάγο. Ακολούθησε η προσθήκη διαλύματος χρωστικής, η οποία περιείχε μπλε της βρωμοφαινόλης 0,1% και γλυκερόλη 30% (v/v). Αφού τοποθετήθηκαν τα δείγματα στα βοθρία του πηκτώματος, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση για περίπου 3,5 h στα 4 V/cm. Στη συνέχεια, το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε dH₂O υπό συνεχή ανακίνηση για περίπου 2 h, με αλλαγή του dH₂O κάθε 15 min ώστε να απομακρυνθεί η φορμαλδεΰδη. Ακολούθως, το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε διάλυμα χρώσης 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ EtBr για 20 min και στη συνέχεια σε ddH₂O για 5 min και φωτογραφήθηκε με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και το λογισμικό Kodak Digital Science v1.9 με την παράλληλη προσθήκη κανόνα ώστε το μηδέν της κλίμακας να αντιστοιχεί στα βοθρία. Το πήκτωμα ξεπλύθηκε με ddH₂O και τοποθετήθηκε ανάποδα για μεταφορά πάνω σε Whatman του οποίου τα άκρα διαβρεχόταν συνεχώς με διάλυμα 10x SSC (sodium citrate and sodium chloride). Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε πάνω στο πήκτωμα όπως ήταν τοποθετημένο, εξισορροπημένη μεμβράνη σε 2x SSC τύπου NY plus porablot (Macherey-Nagel, Germany) ίδιου μεγέθους με το πήκτωμα. Πάνω από τη μεμβράνη τοποθετήθηκαν 2 φύλλα Whatman εξισορροπημένα σε 2x SSC και 2 φύλλα Whatman στεγνά. Πάνω από τα φύλλα Whatman, τοποθετήθηκαν χαρτοπετσέτες σε ύψος περίπου 5 cm, ίδιου μεγέθους με τα Whatman και τέλος ένα βιβλίο βάρους 1 kg και η μεταφορά αφέθηκε για 16-24 h.

Η στερέωση του RNA (RNA cEMOs-linking), πραγματοποιήθηκε σε στεγνή μεμβράνη, με έκθεση σε UV ακτινοβολία (Stratalinker, Stratagene, USA) η επιφάνεια της οποίας βρισκόταν σε επαφή με το πήκτωμα, συνολικής ενέργειας $1200 \mu\text{J cm}^{-2}$. Η μεμβράνη διατηρήθηκε σε RT μέχρι τη χρησιμοποίησή της.

1.3.11 Κατασκευή ραδιενεργού ιχνηλάτη

Για την κατασκευή ραδιενεργού ιχνηλάτη, χρησιμοποιήθηκαν ραδιενεργά νουκλεοτίδια και συγκεκριμένα A- α [P^{32}], και C- α [P^{32}] (1 mCi), και η μέθοδος του τυχαίου εκκινητή. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην εκκίνηση πολυμερισμού από αλληλουχίες μίγματος εξαμερών νουκλεοτιδίων, οι οποίες παρουσιάζουν στατιστική ομολογία με την προς σήμανση αλληλουχία, η οποία χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα της αντίδρασης. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε διάλυμα το οποίο περιείχε 4 μL δεόξυγουανοσίνη (G), 4 μL δεόξυθυμιδίνη (T), 2.5 μL ραδιενεργή δεόξυαδενοσίνη (1 mCi) και 2.5 ραδιενεργή κυτιδίνη (1 mCi), 5 unit ενζύμου Klenow (Minotech), 10x BSA (bovine serum albumin) και τυχαίοι εκκινητές (random primers; $150 \mu\text{g mL}^{-1}$). Κατά τη διάρκεια παρασκευής του προηγούμενου διαλύματος, ολόκληρο το cDNA *ZmPAO* $\leq 200 \text{ ng}$ (Tavladoraki et al. 1998), αραιώθηκε μέχρι τα 21 μL με ddH₂O και το διάλυμα υπέστη ζέση για 5 min. Μετά, το δείγμα τοποθετήθηκε σε πάγο και στη συνέχεια προστέθηκε στο διάλυμα, το οποίο περιείχε τα ραδιενεργά νουκλεοτίδια. Ακολούθως, η αντίδραση επώαστηκε στους 37°C για 1,5-2 h.

Στη συνέχεια, ο ιχνηλάτης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης μοριακής διήθησης (spun column chromatography), όπως περιγράφεται από τους Sambrook et al. (1989). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε σύριγγα του 1 ml στην οποία τοποθετήθηκε ποσότητα Sephadex G-25, και ακολούθησε 5 min φυγοκέντριση στα 3000 g σε RT. Στη συνέχεια προστέθηκε εκ νέου Sephadex G-25 και η διαδικασία επαναλήφθηκε έως ότου ο όγκος του Sephadex να είναι περίπου 0,9-1 ml. Ακολούθησε εξισορρόπηση της κολώνας με 50 μL TE (Tris-HCl, EDTA) pH 8,0, ώστε να ενυδατωθεί η κολώνα και φυγοκέντριση της κολώνας για 5 min στα 3000 g σε RT. Η διαδικασία επαναλήφθηκε έως ότου η εκλούμενη ποσότητα TE προσεγγίσει τα 50 μL . Ακολούθως, εφαρμόστηκε στο πάνω μέρος της κολώνας η αντίδραση του ιχνηλάτη και φυγοκετρήθηκε (5 min 3000 g) σε RT. Ο εκλούμενος όγκος τοποθετήθηκε σε eppendorf και βράστηκε για 5 min και κατόπιν τοποθετήθηκε σε πάγο.

1.3.12 Προϋβριδοποίηση, υβριδοποίηση, ξεπλύματα και έκθεση

Οι μεμβράνες, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για υβριδοποίηση, εξισορροπήθηκαν σε διάλυμα αλάτων 2x SSC και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε διάλυμα προϋβριδοποίησης κατά Church μέσα σε περιστρεφόμενο κύλινδρο. Το διάλυμα Church περιείχε 100 mM Na₂HPO₄/NaHPO₄, pH 7,2, 7% (w/v) SDS, 1 gr 100 ml⁻¹ BSA και 1 mM EDTA pH 8,0. Η προϋβριδοποίηση πραγματοποιήθηκε στους 60°C για 2 h. Στη συνέχεια προστέθηκε ο ραδιενεργός ιχνηλάτης και η υβριδοποίηση πραγματοποιήθηκε στους 60°C για 16 h.

Μετά την παρέλευση των 16 h, πραγματοποιήθηκαν τα ακόλουθα ξεπλύματα: 2x SSC για 10 min, 2x SSC 0.1% SDS για 10 min, 1x SSC 0.2% SDS για 2 x 5 min, στους 60°C. Στη συνέχεια, η μεμβράνη αφέθηκε για έκθεση σε Kodak X-Ray film (Kodak Scientific Imaging Film: X-OMAT/AR 35x40 cm), για 3-5 d.

1.3.13 Εκχύλιση πρωτεϊνών και ποσοτικοποίηση

Η εκχύλιση ολικών πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε όπως έχει ήδη περιγραφεί (Primikiriios and Roubelakis-Angelakis, 2001). Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε μετά την τήξη του ιστού σε υγρό άζωτο και την λειοτριβήσή του με τη χρήση γουδιού και γουδοχειριού. Στον λειοτριβημένο ιστό, προστέθηκε [200 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM PMSF, 5 mM DDT, 10 μM leupeptin, 10% (v/v) γλυκερόλης και 0,25% Triton X-100] σε αναλογία 1:4 (w/v), ώστε για κάθε gr ιστού να αντιστοιχούν 4 ml διαλύματος εκχύλισης πρωτεϊνών. Τα δείγματα αφέθηκαν στον πάγο για 20 min με περιοδική ανάδευση. Ακολούθησε φυγοκέντριση (12000 g/ 20 min στους 4°C) και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο erpendorf. Από αυτό λήφθηκαν 100 μL στα οποία προστέθηκαν 30 μL διαλύματος φόρτωσης [loading buffer; 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% (v/v) γλυκερόλη, 2% (w/v) SDS και 5% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλης] (Mattoo et al., 1981) και ακολούθησε βρασμός του μίγματος για 5 min.

Τα δείγματα με loading buffer χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοεντοπισμό πρωτεϊνών, ενώ το υπόλοιπο υπερκείμενο για τον προσδιορισμό της ενζυμικής ενεργότητας της ΡΑΟ, καθώς και για τη ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών.

Για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Lowry et al., (1951). Συγκεκριμένα, 20-25 μL πρωτεϊνικού εκχυλίσματος κατακρημνίσθηκαν με την προσθήκη ίσου όγκου 20% (v/v) TCA και με την τοποθέτηση των δειγμάτων στους 4°C για τουλάχιστον 30 min. Ακολούθησε φυγοκέντριση (10000 g για 10 min), απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιάλυση

του ιζήματος με προσθήκη 100 μL διαλύματος Α (10 gr Na_2CO_3 , 0,1 gr K-Na Tartrate, 2 gr NaOH ανά 100 mL Α). Στη συνέχεια, προστέθηκε 1 ml διαλύματος Γ το οποίο περιείχε ανά 10 ml διαλύματος Α 0.2 ml διαλύματος Β (0,5 gr $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ανά 100 mL). Κατόπιν, προστέθηκαν 100 μL διαλύματος Δ το οποίο περιείχε το αντιδραστήριο φαινόλης Folin Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Germany) αραιωμένη 1:1 (v/v) με dH_2O . Τα δείγματα επώαστηκαν σε RT για 30 min και φωτομετρήθηκαν στα 625 nm, λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι οπτική πυκνότητα 1 αντιστοιχεί σε 80 mg πρωτεΐνης, βάση πρότυπης καμπύλης κατασκευασμένης με bovine serum albumin (BSA). Ως αρνητικό πείραμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε δείγμα χωρίς πρωτεΐνες.

Η σχετική συγκέντρωση των πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε επί πλέον με χρώση πηκτώματος SDS-PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) με Coomassie brilliant blue G25. Συγκεκριμένα, πήκτωμα 7-10% ακρυλαμίδης φορτώθηκε σύμφωνα με την προσδιορισμένη συγκέντρωση πρωτεϊνών μέσω της μεθόδου Lowry, ώστε για όλα τα δείγματα να φορτωθεί ίση ποσότητα πρωτεΐνης. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πεδίο 20 mA για την πηκτή συγκέντρωσης (stacking gel) και 40 mA για την πηκτή διαχωρισμού (resolving gel). Η πηκτή, μετά την λήξη της ηλεκτροφόρησης, τοποθετήθηκε σε διάλυμα Coomassie brilliant blue R-250: Το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε διάλυμα 50 % μεθανόλης, 10 % οξικό οξύ, 0.002 % Coomassie brilliant blue R-250 με ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 1 h και ακολούθησε αποχρωματισμός με διάλυμα 20% (v/v) μεθανόλης, 7% οξικού οξέος (v/v) για περίπου 2 h). Το πήκτωμα ξεπλύθηκε με dH_2O και φωτογραφήθηκε με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή κάνοντας χρήση του λογισμικού Kodak Digital Science v1.9.

1.3.14 Ανάλυση των επιπέδων των AOX, PTOX και κυτοχρώματος-c κατά Western

Τα εκχυλίσματα ολικών πρωτεϊνών διαχωρίστηκαν με SDS-PAGE, σύμφωνα με το σύστημα Laemmli (Laemmli, 1970), χρησιμοποιώντας πηκτώματα 1,5 mm πάχους και το μοντέλο Protean II της Bio-Rad. Η συγκέντρωση της πολυακρυλαμίδης στην πηκτή διαχωρισμού ήταν 10%. Η αποδιάταξη των πρωτεϊνών έγινε κατά επώαση των δειγμάτων στους 100°C για 5 min, μετά την προσθήκη συμπυκνωμένου SDS αποδιατακτικού σε τελική συγκέντρωση 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% (v/v) γλυκερόλη, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης ήταν 15 mA για την πηκτή συσσώρευσης και 20 mA για την πηκτή διαχωρισμού. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν

ηλεκτροφορητικά (Western blot) σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (0,2 μm , Schleicher και Schuell), όπως έχει ήδη περιγραφεί (Towbin et al. 1979). Το διάλυμα μεταφοράς περιείχε 25 mM Tris-192 mM γλυκίνης, pH 8,3. Η μεταφορά έγινε σε συσκευή Mini-Protean II (BioRad), στα 80V για 1,5 h.

Τα αντισώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ήταν εναντίον της εναλλακτικής οξειδάσης AOX από το *Sauromatum guttatum* (Elthon et al., 1989), της πλαστιδιακής τελικής οξειδάσης PTOX (Josse et al., 2000) και του κυτοχρώματος-c (MAB1800, Chemicon International). Τα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε αραίωση 1:1000 της αρχικής συγκέντρωσης του αντιορού. Μετά το τέλος της επώασης με το αντίσωμα, η μεμβράνη πλύθηκε 5 φορές για 5min με διάλυμα πλυσίματος και επώαστηκε 1 h με το δεύτερο αντίσωμα (alkaline phosphatase προσδεμένη σε anti-rabbit IgG), με αραίωση 1:2000.

1.3.15 Απόκτηση cDNA και πλασμιδιακής κατασκευής CYT-c – GFP

Η σχετική τεχνική περιγράφεται στο αντίστοιχο κεφάλαιο.

1.3.16 Μετασχηματισμός αγροβακτηρίων

Κύτταρα του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* στελέχους C58C1 μετασχηματίστηκαν με τους κατάλληλους δυαδικούς φορείς χρησιμοποιώντας τη μέθοδο παγώματος-τήξης. Συγκεκριμένα, το DNA του δυαδικού φορέα (σε σχετικά υψηλή ποσότητα), προστέθηκε σε ποσότητα δεκτικών αγροβακτηρίων και το μίγμα επώαστηκε στο πάγο για 5 min. Στη συνέχεια το μίγμα τοποθετήθηκε σε υγρό άζωτο για 5 min και στους 37°C για 5-15 min. Ακολούθως, προστέθηκαν 1 ml LB και τα βακτήρια επώαστηκαν σε RT για 2-4 h και στη συνέχεια επιστρώθηκαν σε τριβλία LB που περιείχαν ριφαμπικίνη/καναμυκίνη/υγρομυκίνη (80/100/30 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Μετά από 48 h οι κλώνοι που είχαν αναπτυχθεί στο τριβλίο ελέγχθηκαν με colony PCR.

1.3.17 Παραδοική έκφραση και συνεντοπισμός

Οι θετικοί κλώνοι του μετασχηματισμένου *Agrobacterium tumefaciens* αναπτύχθηκαν ολονύκτια σε 3 ml LB που περιείχε Rif/Kan/Hygr (80/100/30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) και κατόπιν σε 50 ml LB με Rif/Kan/Hygr (80/100/30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) καθώς και 0.2 mM ακετοσυριγγόνης (acetosyringone), έως ότου η οπτική τους πυκνότητα να είναι 0.5 (OD600). Τα κύτταρα συλλέχτηκαν με τη βοήθεια φυγοκέντρωσης (3000g 20 min). Στη συνέχεια επαναδιαλύθηκαν σε MMA (Murashige and Skoog salts, 10 mM MES, pH 5.7, 0.2

mM acetosyringone, 3% Suc) ώστε η $OD_{600}=0.5$ και επώαστηκαν 1 h σε RT και στη συνέχεια ενέθηκαν σε φύλλα *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana, χρησιμοποιώντας σύριγγα του 1-ml. Τα φύλλα αναλύθηκαν μετά από 48 h χρησιμοποιώντας συνεστιακό μικροσκόπιο Confocal Leica TCS-NT, με χρήση του αντικειμενικού φακού 40X. Η διέγερση/εκπομπή πραγματοποιήθηκε στα 480/508 nm για το GFP, και 587/610 nm για το mCherry. Το πλασμίδιο mCherry-Mito (Shaner et al., 2004), προέρχεται από τη βάση καταχώρησης ABRC Stock Center (<http://www.arabidopsis.org>).

Ο συνεντοπισμός (colocalization) πραγματοποιήθηκε με τη μίξη των επαναδιαλυμένων σε MMA αγροβακτηρίων με τα GFP:cDNAs με αυτά των mCherry-Mito σε αναλογία 1,2:1 (v/v). Η σύμπτυξη των διαφορετικών εικόνων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Leica Confocal software έκδοση 2,61.

1.3.18 Μετρήσεις αναπνοής με την μέθοδο της πολαρογραφίας

Ο ρυθμός κατανάλωσης οξυγόνου εκτιμήθηκε πολαρογραφικά στους 30°C με την χρήση ενός ηλεκτροδίου οξυγόνου τύπου Clark (Hansatech Instruments, Kings's Lynn, Norfolk, UK), παρουσία και απουσία του καταστολέα της εναλλακτικής οξειδάσης Salicylhydroxamic acid (SHAM), του καταστολέα της κυτοχρωμικής οξειδάσης KCN και του καταστολέα της εναλλακτικής και χλωροαναπνοής n-propyl gallate (nPG). Φυλλικοί δίσκοι διαμέτρου 35mm κόπηκαν από το μεσόφυλλο πλήρως ανεπτυγμένων φυτών καπνού και μετρήθηκε η κατανάλωση οξυγόνου για διάστημα 5 λεπτών. Για την μελέτη της επίδρασης των παρεμποδιστών οι φυλλικοί δίσκοι επώαστηκαν σε 15mM SHAM, σε 3% μεθανόλη, 1mM KCN σε dH₂O και 2mM nPG σε 0.3% μεθανόλη για περίοδο 10min πριν την μέτρηση. Επώσεις έγιναν και σε dH₂O, 3% μεθανόλη και 0.3% μεθανόλη για να εκτιμηθεί η επίδραση των αντιστοιχών μέσων επώασης. Η κατανάλωση οξυγόνου εκφράστηκε ανά gr φρέσκου βάρους.

1.3.19 Απομόνωση μιτοχονδρίων

Μιτοχόνδρια απομονώθηκαν από φυτά υπό καταπόνηση και μάρτυρες (control) φυτά. Ιστός από μεσόφυλλο πλήρως ανεπτυγμένων φύλλων αναμείχθηκε με παγωμένο διάλυμα αιώρησης μιτοχονδρίων (20mM MOPS-KOH pH 7.5, 300mM sucEMOe, 1mM EDTA, 1mM MgCl₂, and 0,2% (w/v) BSA) σε αναλογία 1:4. Ο ιστός ομογενοποιήθηκε χρησιμοποιώντας γουδί και γουδοχέρι και πέρασε από διηθητικό

χαρτί Miracloth (Calbiochem, USA). Το ομογενοποιημένο διάλυμα φυγοκεντρίθηκε στα 200g για 5min για να διαχωριστούν τα οργανίδια από τα υπόλοιπα κυτταρικά κατάλοιπα. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και φυγοκεντρίθηκε στα 2000g για 5min ώστε να διαχωριστούν τα μιτοχόνδρια. Το πλούσιο σε μιτοχόνδρια υπερκείμενο συλλέχθηκε και φυγοκεντρίθηκε σε 12000g για 10min ώστε να συλλεχθούν τα μιτοχόνδρια στην στερεή φάση (ίζημα). Τα κατακρημνισμένα μιτοχόνδρια επαναιωρήθηκαν σε 2ml διαλύματος αιώρησης και καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας μια διαβάθμιση περκόλης (10, 21, 27, 45 και 60% περκόλη σε 20mM MOPS-KOH, pH7.5, 0.2% BSA) στις 25,000 σ.α.λ. για 30 λεπτά χρησιμοποιώντας μια υπερφυγόκεντρο Beckman L8-M. Τα απομονωμένα μιτοχόνδρια «πλύθηκαν» χρησιμοποιώντας διάλυμα αιώρησης ώστε να απομακρυνθούν τα κατάλοιπα περκόλης. Η ενζυμική ενεργότητα της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης χρησιμοποιήθηκε για εκτίμηση της αρτιότητας των μιτοχονδρίων. Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας πραγματοποιήθηκε τόσο στο διάλυμα επώασης όσο και σε σκόπια κατακερματισμένα μιτοχόνδρια. Η εκτίμηση έγινε φασματοσκοπικά χρησιμοποιώντας DCIP και ηλεκτρικό οξύ ως υποστρώματα σε συγκεντρώσεις 0.5mM και 0.2mM αντίστοιχα και 20μg πρωτεΐνης. Η αντίδραση αναγωγής του DCIP παρακολούθηθηκε φασματοσκοπικά στα 600nm.

1.3.20 Χρώση με τον σημαντή JC-1, οπτικοποίηση και ανάλυση φασμάτων φθορισμού

Απομονωμένα μιτοχόνδρια επώαστηκαν με τον σημαντή JC-1 σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Simeonova et al. (2004). Ο σημαντής διαλύθηκε σε dimethyl sulfoxide (DMSO) σε συγκέντρωση 5mg/ml. Το παραπάνω διάλυμα αραιώθηκε περαιτέρω σε τελική συγκέντρωση 5μg/ml σε διάλυμα αιώρησης μιτοχονδρίων, και χρησιμοποιήθηκε για την χρώση απομονωμένων μιτοχονδρίων. Τα μιτοχόνδρια επώαστηκαν στο διάλυμα χρώσης για 10 λεπτά και έπειτα παρατηρήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα μικροσκόπιο φθορισμού Nikon Eclipse 800.

Για την ανάλυση των φασμάτων φθορισμού απομονωμένα μιτοχόνδρια τοποθετήθηκαν σε κυψελίδα χαλαζία και προστέθηκε διάλυμα χρώσης JC-1 σε τελική συγκέντρωση 1.25 μg/ml. Οι μετρήσεις φθορισμού πραγματοποιήθηκαν μετά από επώαση 10min, στους 28^oC, στο σκοτάδι. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα φθορίζον φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer LS50-B με μήκος κύματος διέγερσης 490 nm. Οι σαρώσεις φθορισμού πραγματοποιήθηκαν σε κλίμακα

μήκους κύματος εκπομπής από 490 ως 800nm. Οι μετρήσεις φθορισμού πραγματοποιήθηκαν 5 φορές.

1.3.21 Εκτίμηση της κατακερμάτισης του πυρηνικού DNA

Η εκτίμηση του κατακερματισμού του πυρηνικού DNA αποτελεί ένα δείκτη της επαγωγής του PCD. Για την εκτίμησή του, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Papadakis and Roubelakis-Angelakis (2005). Συγκεκριμένα, μετά από έκθεση των κυττάρων στον παράγοντα, που επάγει ΠΚΘ για 18 h, τα κύτταρα στερεώθηκαν σε διάλυμα 4% (w/v) παραφορμαλδεΐδης σε PBS (pH 7.4), όπως περιγράφεται από τους Asai et al. (2000). Για τον εντοπισμό των πυρήνων, τα κύτταρα επώαστηκαν σε diamidino-2-phenylindole (1 mg ml^{-1}) και οι 3'-OH τελικές ομάδες των κατακερματισμένων DNA σημάνθηκαν με τη μέθοδο Tunel (TdT-mediated dUTP nick-end labelling), χρησιμοποιώντας το εμπορικό προϊόν In Situ Cell Death Detection Kit (Promega, Madison, WI), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι εικόνες προέρχονται από μικροσκόπιο φθορισμού (Nikon Eclipse E800 1, Tokyo, Japan) με φίλτρο διέγερσης (excitation filter) EX 450-490 και φίλτρο εκπομπής (emission filter) BA 520 χρησιμοποιώντας ως σύστημα καταγραφής και απεικόνισης το SONY 655 SONY DXC-950P (Tokyo, Japan).

1.3.22 Δοκιμή ενεργότητας πρωτεασών τύπου κασπάσης-3

Η ενεργότητα πρωτεασών τύπου κασπάσης-3 εκτιμήθηκε στο μεσόφυλλο πλήρως αναπτυγμένων φυτών μετρώντας την διάσπαση του ειδικού για πρωτεάσες τύπου κασπάσης 3 υποστρώματος Ac-DEVD-pNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Aranha et al. (2007). Δύο γραμμάρια φυτικού ιστού κονιορτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας υγρό άζωτο. Στην συνέχεια στον κονιορτοποιημένο ιστό προστέθηκε 1mL διαλύματος εκχύλισης (50mM HEPES, 1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF, 20% glycerol, pH 7.5). Το ομογενοποιημένο διάλυμα φυγοκεντρίθηκε στα 20,000g, για 15 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν τα κυτταρικά υπολείματα. Η πρωτεολυτική αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα εκχύλισης χωρίς γλυκερόλη, το οποίο περιείχε 50μg πρωτεΐνης και 50μM υποστρώματος. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 2h και ο σχηματισμός pNA διαπιστώθηκε μετρώντας την απορρόφηση του διαλύματος στα 405nm.

1.3.23 Εκχύλιση ATP

Περίπου 0,2 g φυγοκεντρημένων κυττάρων (3000 rpm για 5 min) κονιορτοποιήθηκαν με υγρό άζωτο. Ο κονιορτοποιημένος ιστός αναμείχθηκε με 1 mL 2,5% (v/v) TCA. Ακολούθησε ανάδευση, παραμονή στον πάγο για 20 min και φυγοκέντριση στις 12000 rpm για 20 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και αποθηκεύθηκε στην κατάψυξη (Finazzi et al., 1999).

1.3.24 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση ATP με υγρή χρωματογραφία υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (HPLC)

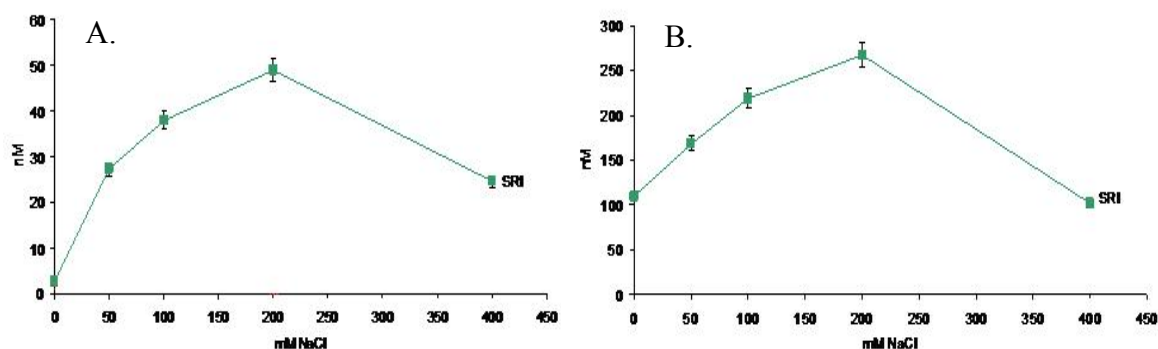
Από τα εκχυλισμένα δείγματα (όπως ακριβώς περιγράφηκε παραπάνω) παίρνουμε 20 μ L και τα αραιώνουμε με 380 μ L Tris-Cl σε pH 7,1. Για την ποιοτική και την ποσοτική ανάλυση των ποσοτήτων του ATP έγινε χρήση HPLC συστήματος

Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν A: ακετονιτρίλιο ACN και B: buffer φωσφορικών (pH 7.00, 60 mM K_2HPO_4 και 40 mM KH_2PO_4) στο ακόλουθο gradient: 0 min. 100% B, 4 min. 98% B, 5 min. 97% B, 8 min. 96% B, 15 min. 96% B, 15.01 min. 100% B, με σταθερή ροή 1 mL/min και θερμοκρασία διαχωρισμού 25 °C. Η ποιοτική ανάλυση έγινε βάσει του φάσματος απορρόφησης των επιμέρους μεγίστων του HPLC-προφίλ, ενώ η ποσοτική εκτίμηση έγινε με την βοήθεια γνωστών συγκεντρώσεων ATP.

1.4 Αποτελέσματα

1.4.1 Επίδραση αλατότητας στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό

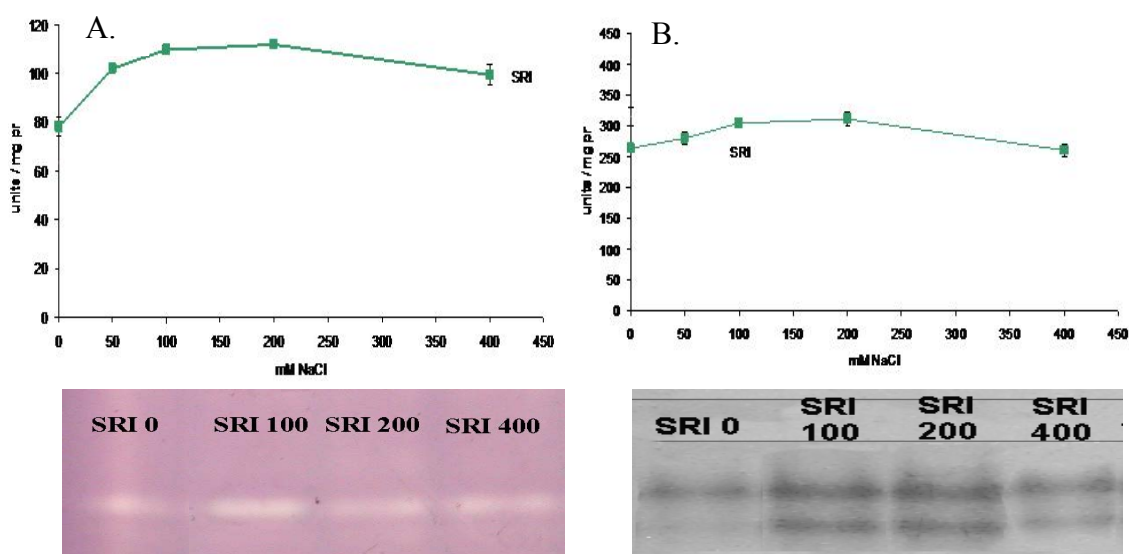
Διερευνήθηκε η επίδραση της καταπόνησης από αλατότητα στην αντιοξειδωτική



Εικόνα 4. Εκτίμηση συσσώρευσης A. H₂O₂ και B. O₂⁻ σε φυτά καπνού (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana) τα οποία έχουν υποβληθεί σε καταπόνηση αλατότητας έντασης 100, 250 και 400 mM για χρονικό διάστημα 24 ωρών. Οι τιμές είναι μέσος όρος 4 επαναλήψεων του πειράματος.

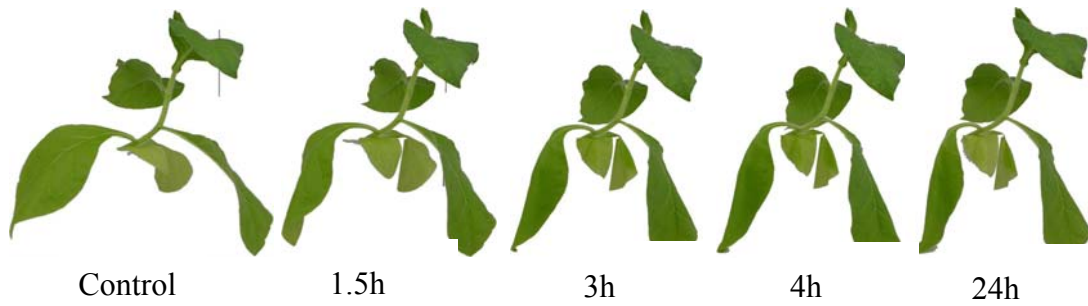
άμυνα φυτών καπνού. Τα φυτά υποβλήθηκαν σε καταπόνηση από αλατότητα διαφορετικής έντασης για διάρκεια 24h. Εκτιμήθηκε η συσσώρευση των EMO και η απόκριση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Αυξανόμενη ένταση καταπόνησης οδήγησε σε αύξηση της συγκέντρωσης τόσο του H₂O₂ όσο και του O₂⁻ μέχρι την συγκέντρωση των 250mM, ενώ καταπόνηση μεγαλύτερης έντασης (400mM) οδήγησε σε μείωση της συγκέντρωσης των EMO, μέχρι και 50% σε σχέση με τα 250mM (Εικόνα 4). Η ενζυμική ενεργότητα της SOD και CAT ακολούθησε ένα παρόμοιο πρότυπο μεταβολής εμφανίζοντας αύξηση αναλογικά με την αυξανόμενη συγκέντρωση NaCl, με εξαίρεση την συγκέντρωση 400mM (Εικόνα 5). Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η συγκέντρωση των 250mM NaCl είναι αρκετά υψηλή ώστε να προκαλέσει ένα «ευδιάκριτο» αποτέλεσμα.

Παραδόξως τα 400mM NaCl φαίνεται να προκαλούν πτώση τόσο στην



Εικόνα 5. Εκτίμηση ενζυμικής ενεργότητας SOD (Α.) και CAT (Β.) σε φυτά καπνού (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana) τα οποία έχουν υποβληθεί σε καταπόνηση αλατότητας έντασης 100, 250 και 400 mM για χρονικό διάστημα 24h. Οι τιμές είναι μέσος όρος 4 επαναλήψεων του πειράματος.

συγκέντρωση των EMO όσο και στην ενεργότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Τα αποτελέσματα μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα 400mM NaCl αντιπροσωπεύουν μια εξαιρετικά υψηλή συγκέντρωση αλατιού, στην οποία το φυτό δεν μπορεί να ανταπεξέλθει. Για να επιλεγούν τα κατάλληλα χρονικά σημεία καταπόνησης, φυτά καπνού υποβλήθηκαν σε καταπόνηση από NaCl έντασης 250mM και εκτιμήθηκε μακροσκοπικά η απόκριση των φυτών (Εικόνα 6).

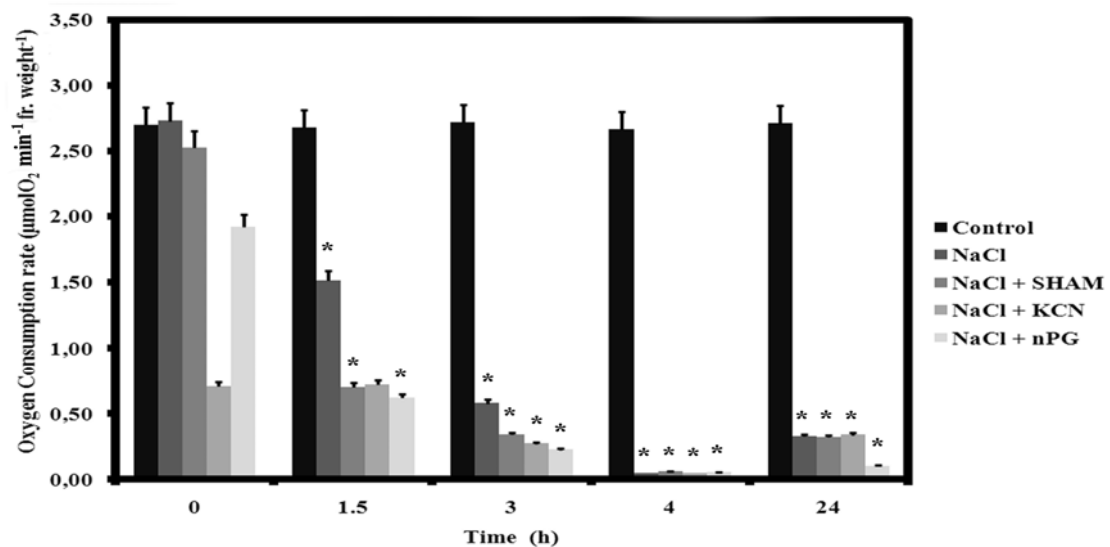


Εικόνα 6. Μακροσκοπική παρατήρηση φυτών που έχουν υποβληθεί σε καταπόνηση αλατότητας 250mM για χρονική διάρκεια 1.5, 3, 4, 24h

Οι προκαταρκτικές δοκιμές υπέδειξαν ως βέλτιστες συνθήκες καταπόνησης τα 250mM NaCl και τα χρονικά σημεία 1.5, 3, 4 και 24h. Η συγκέντρωση των 250mM επιλέχθηκε εφόσον ήταν αρκετά υψηλή ώστε να προκαλέσει εμφανή απόκριση από το φυτό, αλλά όχι υπερβολικά υψηλή ώστε να «αποκρυφτεί» ο φαινότυπος. Αντίστοιχα η επιλογή των χρονικών σημείων έγινε με βάση το γεγονός ότι ενώ μέχρι τις 3h μετά την καταπόνηση είναι εμφανής η απώλεια σπαργής, μετά τις 4h και μέχρι τις 24h παρατηρείται μια ανάκτηση της σπαργής, σημάδι πιθανής προσαρμογής του φυτού.

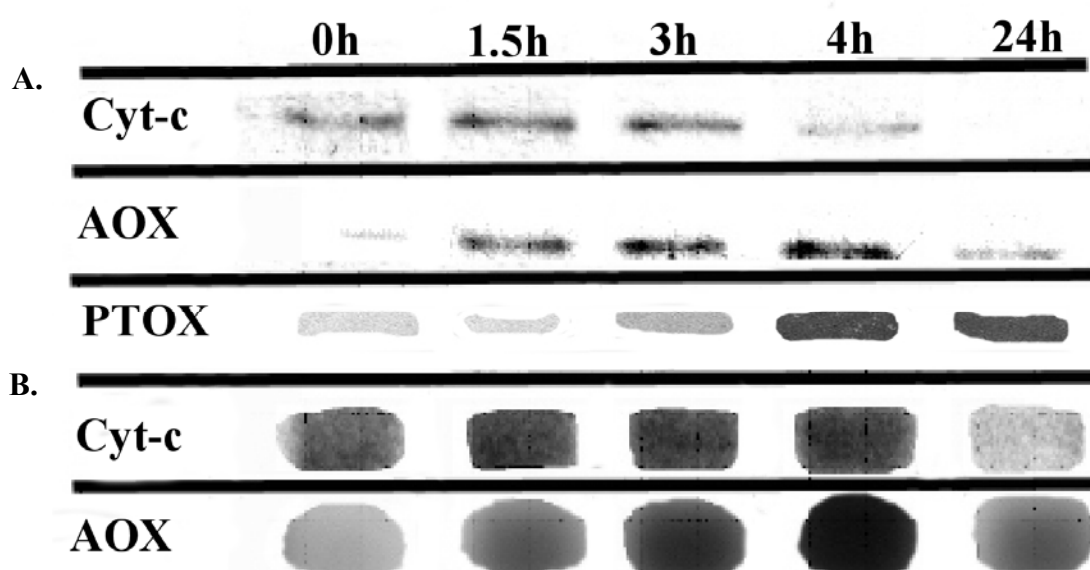
1.4.2 Η αλατότητα επάγει ταχεία μείωση στην αναπνευστική δραστηριότητα και το διαθέσιμο ATP, ενώ η μείωση του μεταγράφου και της ανοσοενεργής πρωτεΐνης του κυτοχρώματος απαιτεί καταπόνηση μεγαλύτερης διάρκειας

Πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της κατανάλωσης οξυγόνου φύλλων από φυτά καπνού



Εικόνα 7 Επίδραση της καταπόνησης από αλατότητα στην αφομοίωση οξυγόνου φυτών καπνού παρουσία και απουσία παρεμποδιστών. Οι τιμές είναι μέσος όρος 4 επαναλήψεων του πειράματος.

τα οποία είχαν υποβληθεί σε καταπόνηση από αλατότητα. Ο ρυθμός απορρόφησης οξυγόνου ήταν σαφώς χαμηλότερος σε φυτά υπό καταπόνηση σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες (Εικόνα 7). Η μείωση ήταν εμφανής από την 1^η ώρα μετά την καταπόνηση οπότε και ο ρυθμός αφομοίωσης οξυγόνου μειώθηκε κατά 44.5%, ενώ μετά από 2h έφτασε στο 95.2% του ρυθμού που μετρήθηκε για τα φυτά μάρτυρες. Μετά από 24h η αναπνοή των φυτών παρέμεινε χαμηλή, σχεδόν 20 φορές πιο χαμηλά από την αντίστοιχη τιμή για τα φυτά μάρτυρες. Για να διερευνηθεί περαιτέρω η επίδραση της αλατότητας στα «συστατικά» της αναπνευστικής αλυσίδας, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση του μεταγράφου και της ανοσοενεργής πρωτεΐνης του κυτοχρώματος-c στα φύλλα καταπονημένων φυτών και φυτών μαρτύρων (Εικόνα 8).

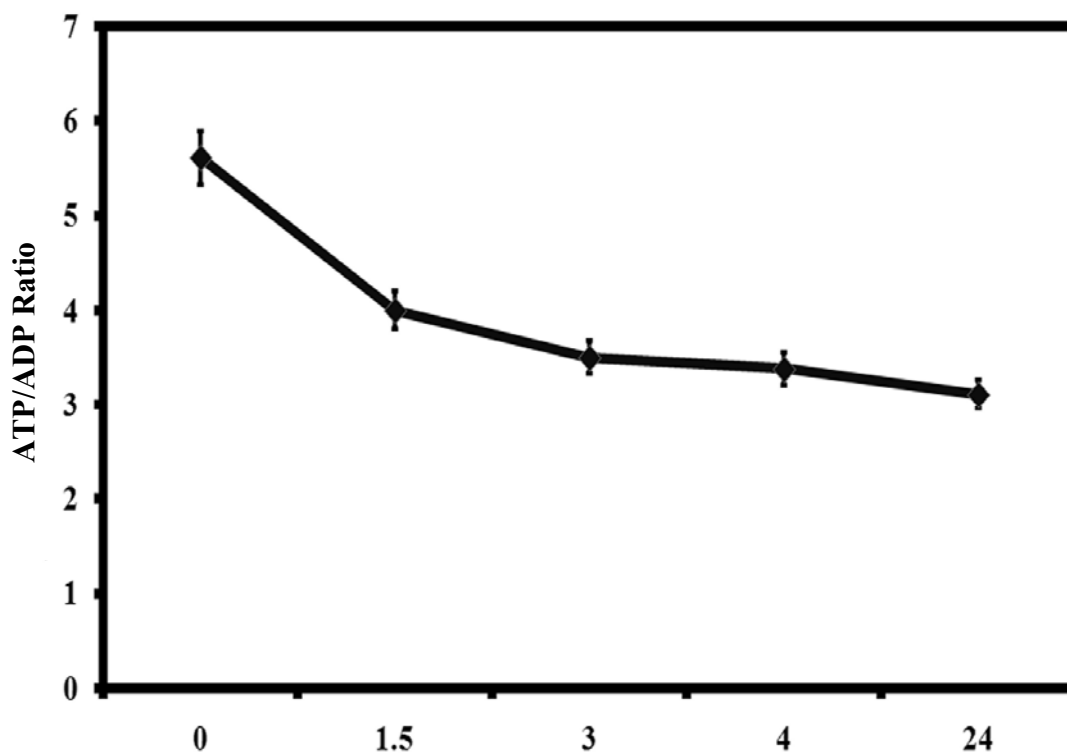


Εικόνα 8 Α. Ανάλυση κατά Western της ανοσοενεργής πρωτεΐνης του κυτοχρώματος-c, της εναλλακτικής οξειδάσης (AOX) και της πλαστιδιακής τελικής οξειδάσης (PTOX) και Β. Ανάλυση κατά Northern της έκφρασης του μεταγράφου του κυτοχρώματος-c και της εναλλακτικής οξειδάσης σε φυτά καπνού μάρτυρες και φυτά που έχουν υποβληθεί σε καταπόνηση έντασης 250mM για χρονική διάρκεια 1.5, 3, 4, 24h. Για την ανάλυση κατά western 50μg πρωτεΐνης για το κυτόχρωμα-c και 20 μg πρωτεΐνης για την AOX, διαχωρίστηκαν με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης.

Καταπόνηση μικρής διάρκειας (1.5 – 3h) δεν οδήγησε σε ουσιαστική μεταβολή της ανοσοενεργής πρωτεΐνης του κυτοχρώματος-c, ενώ αντίθετα 4h και 24h μετά την καταπόνηση το επίπεδο της ανοσοενεργής πρωτεΐνης έπεσε κατά 66% και 100% αντίστοιχα σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες. Παραδόξως το μετάγραφο του κυτοχρώματος εμφάνισε διαφορετικό πρότυπο μεταβολής. Πιο συγκεκριμένα έως και 4h μετά την καταπόνηση παρατηρήθηκε μια αύξηση της τάξης του 23% σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες ενώ 24h μετά την καταπόνηση τα επίπεδα του μεταγράφου έπεσαν κατά 37% σε σχέση με τον μάρτυρα.

Ο παρεμποδιστής του εναλλακτικού μονοπατιού salicylhydroxamic acid (SHAM) χρησιμοποιήθηκε ώστε να εκτιμηθεί η δυνατότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων του κυτοχρωμικού μονοπατιού, και αν οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στα μεταγράφα και την ανοσοενεργή πρωτεΐνη έχουν αντίκτυπο στην αναπνευστική ικανότητα του φυτού. Η δυνατότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω του κυτοχρωμικού μονοπατιού μειώθηκε σημαντικά 1.5h μετά την καταπόνηση, ενώ 4h μετά την καταπόνηση έπεσε κάτω από τα όρια ανίχνευσης, παρά τα ανιχνεύσιμα επίπεδα μεταγράφου και ανοσοενεργής πρωτεΐνης του κυτοχρώματος. Στις 24h το SHAM δεν είχε πλέον επίδραση στην αναπνοή ενδεχομένως εξαιτίας μιας ολικής «κατάρρευσης» της μιτοχondριακής αναπνευστικής ικανότητας.

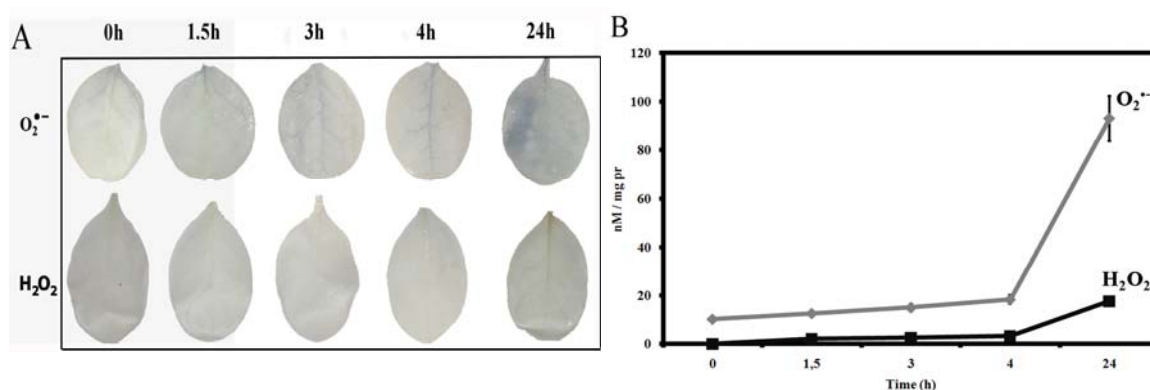
Πραγματοποιήθηκε εκτίμηση λόγου ATP/ADP ως ένδειξη της λειτουργίας του μονοπατιού της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Εικόνα 9). Σε συμφωνία με την μειωμένη απόδοση της αναπνευστικής αλυσίδας ο λόγος ATP/ADP μειώθηκε κατά 29.5% 1.5h μετά την μεταχείριση σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες, ενώ 24h μετά την καταπόνηση στα καταπονημένα φυτά διέθεταν ο ίδιος λόγος έπεσε στο 55% της αντίστοιχης τιμής των αμεταχειριστων φυτών.



Εικόνα 9 Εκτίμηση λόγου ATP/ADP σε φυτά καπνού μάρτυρες και φυτά που έχουν υποβληθεί σε καταπόνηση έντασης 250mM για χρονική διάρκεια 1.5, 3, 4, 24h. Οι τιμές είναι μέσος όρος 4 επαναλήψεων του πειράματος.

1.4.3 Η παραγωγή υπεροξειδίου ξεκινά στα πρώιμα στάδια της καταπόνησης, με ταυτόχρονη επαγωγή της έκφρασης της εναλλακτικής οξειδάσης και χλωροαναπνοής.

Προηγούμενα πειραματικά δεδομένα του εργαστηρίου μας έχουν αναδείξει την συσσώρευση των EMO κατά την καταπόνηση από αλατότητα (Skopelitis et al., 2006). Εφόσον τα μιτοχόνδρια αποτελούν πηγές EMO, θεωρήθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί η συμβολή του μιτοχονδρίου στην παραγωγή EMO, κατά την καταπόνηση από αλατότητα. Η συγκέντρωση του $O_2^{\bullet-}$ αυξήθηκε 1.5h μετά την μεταχείριση και συνέχισε να αυξάνεται μέχρι και τις 24h όπου και παρατηρήθηκε η μέγιστη συγκέντρωσή του (Εικόνα 10). Η αρχή της παραγωγής υπεροξειδικών ιόντων συμπίπτει με τα πρώτα «σημάδια» επίδρασης της καταπόνησης στην μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα. Το περοξειδίο του υδρογόνου ανιχνεύθηκε μόνο 24h μετά την



Εικόνα 10 Εκτίμηση EMO σε φυτά καπνού τα οποία έχουν υποβληθεί σε καταπόνηση από αλατότητα έντασης 250mM για χρονική διάρκεια 1.5, 3, 4, 24h. Α. *In situ* χρώση με την μέθοδο της DAB, για το H_2O_2 , και NBT για το $O_2^{\bullet-}$. Β. εκτίμησης συγκέντρωσης EMO με την μέθοδο χημειοφωταύγειας λουμιμόλης για το H_2O_2 και λουσιγενίνης για το $O_2^{\bullet-}$. Οι τιμές είναι μέσος όρος 4 επαναλήψεων του πειράματος.

καταπόνηση σε συμφωνία με προηγούμενα δεδομένα του Εργαστηρίου (Skopelitis et al. 2006; Moschou et al. 2008). Πέραν από το κυτοχρωμικό μονοπάτι, τα μιτοχόνδρια των φυτών διαθέτουν και ένα εναλλακτικό αναπνευστικό μονοπάτι, το οποίο απαρτίζεται από μια ομοδιμερή τελική οξειδάση, την εναλλακτική οξειδάση (AOX). Υπό συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης έχει αποδειχθεί πως η AOX λειτουργεί ως ένας αποσβέστης των παραγόμενων EMO (Robson and Vanlerberghe, 2002; Czarna and Jarmuszkiewicz, 2005). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω θεωρήθηκε σκόπιμη η μελέτη της μεταβολής της AOX κατά την καταπόνηση από αλατότητα σε φυτά καπνού. Σε φυτά μάρτυρες η ανοσοενεργή πρωτεΐνη της AOX, ανιχνεύθηκε σε χαμηλά επίπεδα σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (Εικόνα 8). Καταπόνηση από αλατότητα μικρής διάρκειας (1.5h) δεκαπλασίασε τα επίπεδα ανοσοενεργής πρωτεΐνης της AOX σε αντίθεση με καταπόνηση μεγαλύτερης διάρκειας (24h).

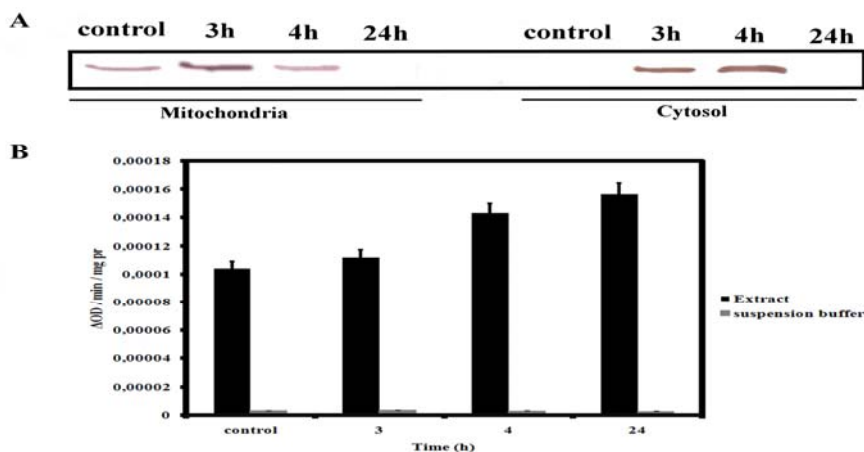
Η απορρόφηση οξυγόνου μετρήθηκε παρουσία του παρεμποδιστή της κυτοχρωμικής οξειδάσης κυανιούχο κάλιο (KCN) και του διπλού παρεμποδιστή της εναλλακτικής και χλωροαναπνοής n-propyl gallate (nPG). Παρουσία του KCN τα φυτά μάρτυρες παρουσίασαν μια μείωση στην απορρόφηση οξυγόνου της τάξης του 74% σε σύγκριση με την αναπνοή που μετρήθηκε απουσία του παρεμποδιστή. Σε καταπονημένα φυτά η μείωση στον ρυθμό αφομοίωσης οξυγόνου ήταν όμοια με αυτήν που παρατηρήθηκε παρουσία του SHAM τόσο 1.5h όσο και 3h μετά την μεταχείριση. Σε αντίθεση τόσο στις 4h όσο και στις 24h μετά την καταπόνηση δεν παρατηρήθηκε επίδραση των παρεμποδιστών στην κατανάλωση οξυγόνου.

Η προσθήκη του nPG είχε ελάχιστη επίδραση στην αφομοίωση οξυγόνου των αμεταχειριστων φυτών ενώ στις 1.5, 3 και 4h μετά την μεταχείριση η μείωση στην αφομοίωση οξυγόνου ήταν ανάλογη αυτής που παρατηρήθηκε παρουσία του SHAM. Αντίθετα 24h μετά την μεταχείριση το nPG ήταν ο μοναδικός παρεμποδιστής ο οποίος φάνηκε να επιδρά στην αναπνοή των καταπονημένων φυτών, όπου και προκάλεσε μείωση της τάξης του 69% σε σχέση με τον ρυθμό που μετρήθηκε απουσία του παρεμποδιστή.

1.4.4 Απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c κατά την καταπόνηση από αλατότητα σε φυτά καπνού.

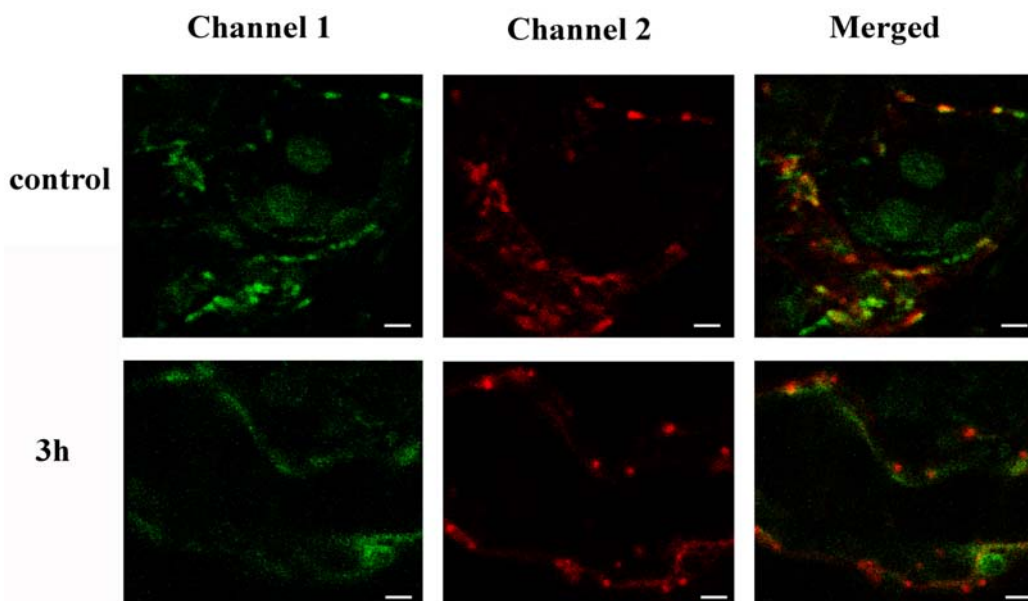
Για να διαπιστωθεί αν η καταπόνηση από αλατότητα επάγει την έξοδο του κυτοχρώματος-c από το μιτοχόνδριο, επιχειρήθηκε ανάλυση κατά Western της ανοσοενεργής πρωτεΐνης του κυτοχρώματος-c σε απομονωμένα ζωντανά μιτοχόνδρια και κυτοπλασμικά κλάσματα. Η ποσότητα της ανοσοενεργής πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια που προήλθαν από φυτά τα οποία είχαν απομονωθεί από καταπονημένα φυτά ήταν σαφώς μειωμένη σε σχέση με τα μιτοχόνδρια που προήλθαν από φυτά μάρτυρες (Εικόνα 11A). Για να επιβεβαιωθεί ότι η απελευθέρωση του κυτοχρώματος δεν οφείλεται σε διάρρηξη των μιτοχονδρίων από την καταπόνηση, ή την διαδικασία απομόνωσης, εκτιμήθηκε η ενζυμική ενεργότητα του ενζύμου ηλεκτρική αφυδρογονάση. Η ηλεκτρική αφυδρογονάση είναι ένα ενζυμικό σύμπλοκο το οποίο εδράζεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Όντας ισχυρά προσδεμένο στην μιτοχονδριακή μεμβράνη το ένζυμο αυτό δεν απελευθερώνεται κατά το άνοιγμα του μιτοχονδριακού πόρου, παρά μόνο σε περίπτωση διάρρηξης της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Επομένως η εκτίμηση της ενεργότητας αυτού του ενζύμου μπορεί να

χρησιμοποιηθεί ως δείκτης αρτιότητας της μεμβράνης του μιτοχονδρίου. Η ενζυμική ενεργότητα της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης εκτιμήθηκε στο μέσο αιώρησης απομονωμένων μιτοχονδρίων και σε απομονωμένα, «σπασμένα» μιτοχόνδρια (Εικόνα 11). Στο μέσο αιώρησης δεν διαπιστώθηκε ενζυμική ενεργότητα ηλεκτρικής αφυδρογονάσης σε αντίθεση με τα μιτοχόνδρια υποδεικνύοντας την αρτιότητα των απομονωμένων μιτοχονδρίων.



Εικόνα 11 Α. Ανάλυση κατά Western της ανοσοενεργής πρωτεΐνης του κυτοχρώματος-c σε απομονωμένα μιτοχόνδρια και κυτοπλασμικά κλάσματα από φυτά καπνού τα οποία έχουν υποβληθεί σε καταπόνηση από αλατότητα έντασης 250mM για χρονική διάρκεια 1.5, 3, 4, 24h Β. Εκτίμηση της ενζυμικής ενεργότητας της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης στο μέσο αιώρησης μιτοχονδρίων και απομονωμένα μιτοχόνδρια. Οι τιμές είναι μέσος όρος 4 επαναλήψεων του πειράματος. Για την ανάλυση κατά western του κυτόχρωματος-c, 50μg πρωτεΐνης, διαχωρίστηκαν με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης.

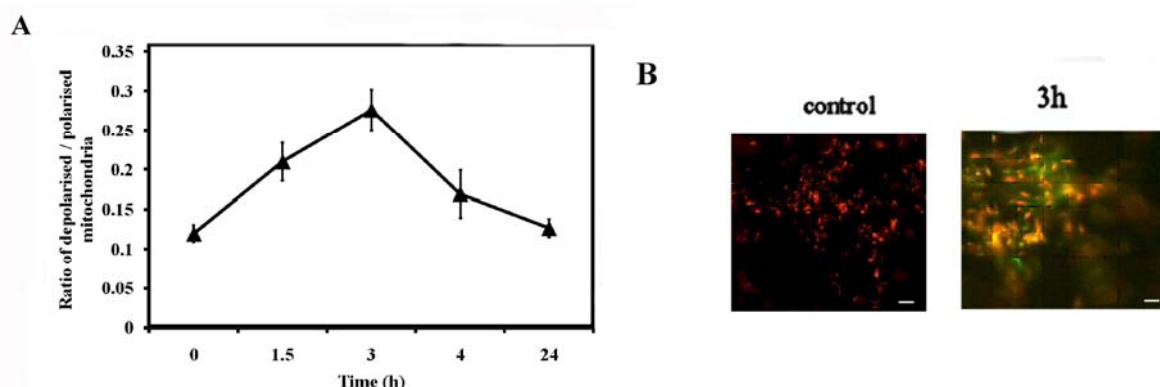
Εναλλακτικά η απελευθέρωση του κυτοχρώματος διερευνήθηκε χρησιμοποιώντας μοριακές τεχνικές. Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη του κυτοχρώματος ενώθηκε με το μόριο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (CYT-c-GFP), ενώ τα



Εικόνα 12 Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας από κύτταρα μεσοφύλλου άθικτων φύλλων καπνού. Στα αμεταχειριστά φυτά (control) τα σήματα από το GFP και mCherry συμπίπτουν, ενώ στα φυτά τα οποία έχουν υποστεί μεταχείριση αλατότητας (3h) τα σήματα είναι διακριτά μεταξύ τους. Channel1: υβριδικό μόριο κυτοχρώματος-GFP, Channel2: σηματοδοτούμενα με mCherry μιτοχόνδρια, Merged: μίξη και των 2 καναλιών.

μιτοχόνδρια σημάθηκαν με το φθορίζων προϊόν του φορέα mCherry. Φύλλα από φυτά τα οποία έφεραν και τις δύο «κατασκευές» παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal). Ο συνεντοπισμός του σήματος από το GFP και το mCherry σε άθικτα φύλλα από φυτά τα οποία είχαν υποβληθεί σε καταπόνηση από αλατότητα επιβεβαίωσε την απελευθέρωση του κυτοχρώματος (Εικόνα 12).

Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος κατά τις καταπονήσεις έπεται αλλαγών στην περατότητα της μεμβράνης του μιτοχονδρίου και του ανοίγματος του μιτοχονδριακού πόρου τόσο σε ζωικά όσο και σε ανθρώπινα κύτταρα (Simeonova et al., 2004). Για να διαπιστωθεί αν τα παραπάνω αληθεύουν και για φυτικά κύτταρα υπό καταπόνηση, χρησιμοποιήθηκε ο εξειδικευμένος για το μιτοχόνδριο σημαντής JC-1. Ο λόγος των υγιών / αποπολωμένων μιτοχονδρίων αυξήθηκε από 0.119 σε 0.209 1.5h μετά την μεταχείριση (Εικόνα 13A), ενώ αυξήθηκε στο 0.276 3h μετά την μεταχείριση. Για να επιβεβαιωθεί ότι ο φθορισμός οφείλεται στα σημασμένα μιτοχόνδρια τα δείγματα φωτογραφήθηκαν χρησιμοποιώντας φθορίζουσα μικροσκοπία (Εικόνα 13B).

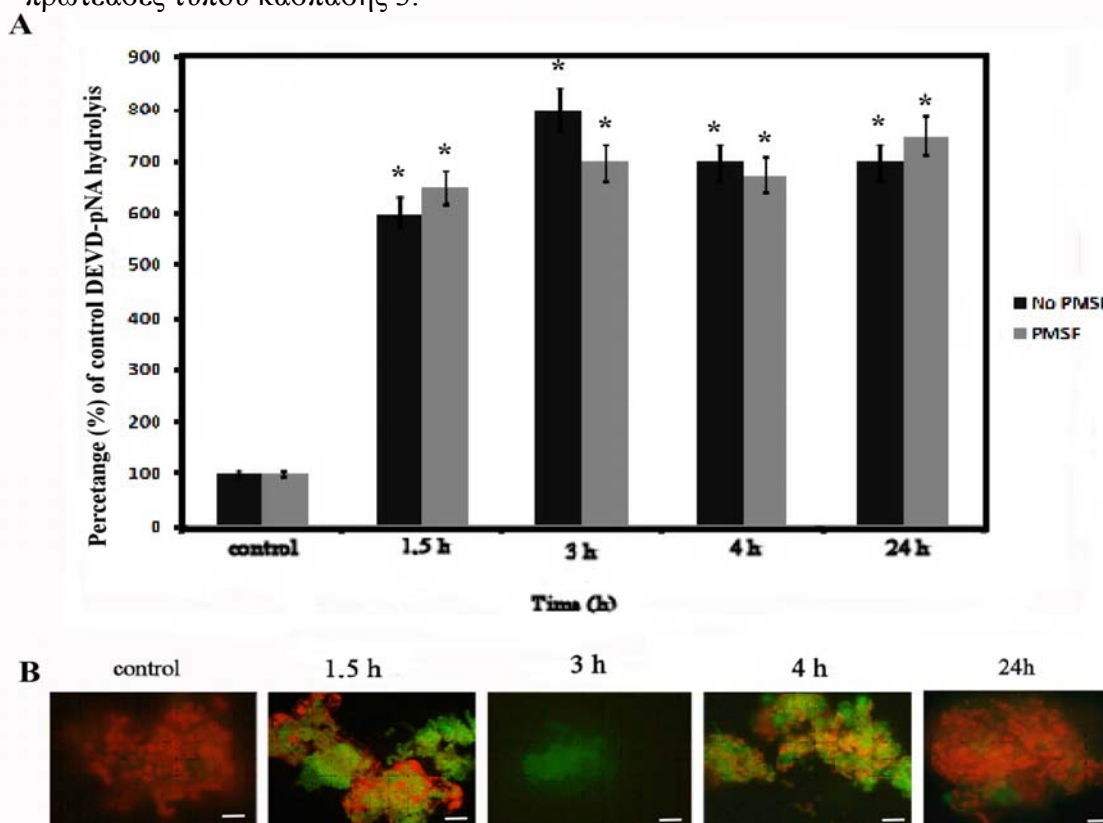


Εικόνα 13 Αποπόλωση της μεμβράνης του μιτοχονδρίου σε φυτά υπό καταπόνηση και φυτά μάρτυρες. Α. Φάσματα φθορισμού JC-1 Β. Εικόνες φθορίζουσας μικροσκοπίας. Οι τιμές είναι μέσος όρος 4 επαναλήψεων του πειράματος.

1.4.5 Η αλατότητα επάγει το σύνδρομο του ΠΚΘ

Στα ζωικά κύτταρα ένας βασικός μηχανισμός της επαγωγής του ΠΚΘ είναι η ενεργοποίηση πρωτεασών τύπου κασπάσης. Για να διαπιστωθεί αν κατά την καταπόνηση από αλατότητα επάγονται πρωτεάσες τύπου κασπάσης, δοκιμάστηκε η υδρόλυση του ειδικού υποστρώματος για πρωτεάσες τύπου κασπάσης 3 Ac-DEVD-pNA. Η ενεργότητα κασπάσης 3 αυξήθηκε 6 φορές 3h μετά την καταπόνηση και παρέμεινε στα ίδια υψηλά επίπεδα καθ' όλη την διάρκεια της δοκιμής (Εικόνα 13A). Για να αποκλεισθεί η περίπτωση η πρωτεόλυση του υποστρώματος να οφείλεται σε

μη ειδική αντίδραση, το ίδιο πρωτόκολλο επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας υψηλή συγκέντρωση του καταστολέα πρωτεασών σερίνης κυστεΐνης phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF). Ανάμεσα στις δυο επαναλήψεις δεν βρέθηκαν ουσιαστικές διαφορές οδηγώντας στο συμπέρασμα πως η πρωτεόλυση του υποστρώματος οφειλόταν σε πρωτεάσες τύπου κασπάσης 3.



Εικόνα 14 A. Ενεργότητα πρωτεασών τύπου κασπάσης 3 και B. ανίχνευση κατατμημένου DNA με την μέθοδο του TUNEL σε κύτταρα μεσόφυλλου από φυτά καπνού τα οποία έχουν υποβληθεί σε καταπόνηση από αλατότητα έντασης 250mM για χρονική διάρκεια 1.5, 3, 4, 24h. Οι τιμές είναι μέσος όρος 4 επαναλήψεων του πειράματος.

Ίσως το πιο χαρακτηριστικό γνώρισμα του ΠΚΘ είναι η κατακερμάτιση του πυρηνικού DNA υπό την επίδραση ενδονουκλεασών. Πραγματοποιήθηκε ανίχνευση κατατμημένου DNA με την μέθοδο TUNEL σε φυτά καπνού τα οποία είχαν υποβληθεί σε καταπόνηση από αλατότητα για να διαπιστωθεί αν η αλατότητα οδηγεί στην επαγωγή του ΠΚΘ. Σε αντίθεση με τα αμεταχειρίστα φυτά, φυτά τα οποία είχαν υποβληθεί σε καταπόνηση αλατότητας παρουσίασαν κατάτμηση του πυρηνικού DNA σε μεγάλο βαθμό, ιδίως 3h μετά την μεταχείριση (Εικόνα 14). Παραδόξως 24h μετά την μεταχείριση αντί οι πυρήνες που εμφανίζουν κατακερματισμένο DNA να αυξηθούν, μειώθηκαν προσεγγίζοντας τις αναλογίες που παρατηρήθηκαν σε αμεταχειρίστα φυτά.

1.5 Συζήτηση

Το Εργαστήριό μας έχει αναδείξει την επαγόμενη από αβιοτικές καταπονήσεις παραγωγή ΕΜΟ στον καπνό και στο αμπέλι, τόσο σε *in vitro* συστήματα όσο και σε κυτταροκαλλιέργειες (Skopelitis et al., 2006). Η παραγωγή των ΕΜΟ και πιο συγκεκριμένα του H_2O_2 πηγάζει από την οξείδωση της σπερμιδίνης στον αποπλασματικό χώρο από τις πολυαμινικές οξειδάσες. Η ενδογενής ομοιοστασία των πολυαμινών καθορίζει την έκφραση γονιδίων σχετικών με την ανθεκτικότητα, ή το μονοπάτι ΠΚΘ (Moschou et al. 2008).

Τα μιτοχόνδρια έχουν αναδειχθεί σε έναν από τους σημαντικούς παραγωγούς ΕΜΟ στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Η παραγωγή ΕΜΟ από την μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα είναι μια φυσιολογική και συνεχής διαδικασία, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή μέχρι και 2% του οξυγόνου που καταναλώνεται από το ηλεκτρονιακό φορτίο (Braidot et al., 1999; Kowaltowski and Vercesi, 1999; Tiwari et al., 2002; Asada, 2006). Υπό φυσιολογικές συνθήκες η τοξική επίδραση των ΕΜΟ ελαχιστοποιείται από τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό. Αντίθετα υπό την επίδραση βιοτικών, ή αβιοτικών καταπονήσεων η συγκέντρωση των ΕΜΟ μέσα στο κύτταρο μπορεί να αυξηθεί σημαντικά ώστε να προκαλέσει την ενεργοποίηση του μονοπατιού του ΠΚΘ (Lamb and Dixon, 1997). Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει τον κεντρικό ρόλο των φυτικών μιτοχονδρίων στην οργάνωση των αποκρίσεων σε διαφορετικά ερεθίσματα, και πέρα από ένα κομβικό σημείο στην ενεργοποίηση του ΠΚΘ (Lam et al., 1999; Jones, 2000).

Σε αυτό το πακέτο εργασίας αναλύσαμε τον ρόλο του μιτοχονδρίου κατά τις μοριακές αποκρίσεις του φυτού στην καταπόνηση από αλατότητα. Η μελέτη της επίδρασης της αλατότητας έγινε σε ολόκληρα φυτά και οι αναλύσεις έγιναν στα φύλλα των φυτών που υποβλήθηκαν στην δοκιμή σε αντίθεση με τα *in vitro* συστήματα τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί επί το πλείστον. Σε συνθήκες φωτισμού οι ΕΜΟ που παράγονται από τον χλωροπλάστη υπερτερούν αυτών που παράγονται από τα μιτοχόνδρια ενώ σε συνθήκες σκότους τα μιτοχόνδρια ανάγονται σε πρωταρχικούς παραγωγούς ΕΜΟ στα φυτά. Οι γνωστές πηγές ΕΜΟ από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων του μιτοχονδρίου είναι τα σύμπλοκα I και III της αλυσίδας, ενώ η συγκέντρωση των παραγόμενων ΕΜΟ επηρεάζεται από την αναγωγή της ουμπικινόνης. Η παραγωγή των ΕΜΟ δύναται να μειωθεί όταν υπάρχει ικανοποιητική ροή ηλεκτρονίων προς εναλλακτικές τελικές οξειδώσεις (Rhoads et al.,

2006). Η ροή ηλεκτρονίων μέσω του εναλλακτικού μονοπατιού έχει αποδειχθεί πως μειώνει την παραγωγή των μιτοχονδριακή ΕΜΟ και αίρει τους αναπνευστικούς περιορισμούς που θέτει η δυσλειτουργία της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων του μιτοχονδρίου (Yip and Vanlerberghe, 2001).

Σε συμφωνία με τα παραπάνω, σε φυτά καπνού τα οποία υποβλήθηκαν σε καταπόνηση αλατότητας παρατηρήθηκε συσσώρευση των ΕΜΟ (Εικόνα 10). Η συγκέντρωση των ΕΜΟ, και πιο συγκεκριμένα του $O_2^{\cdot-}$ αυξήθηκε αγγίζοντας το μέγιστο μετά από 24h καταπόνησης. Παρόλα αυτά η συσσώρευση των ΕΜΟ αν εξεταστεί μεμονωμένα δεν αποτελεί αποδεικτικό στοιχείο μιτοχονδριακής καταπόνησης, εφόσον η επαγόμενη από αλατότητα συσσώρευση των ΕΜΟ μπορεί να πηγάζει από τον αποπλάστη, τον χλωροπλάστη, ή τα περοξεισώματα. Για να διαπιστωθεί αν η καταπόνηση από αλατότητα οδήγησε σε δυσλειτουργία του μιτοχονδρίου, ελέγησαν η αναπνευστική λειτουργία (Εικόνα 7), και τα επίπεδα του κυτοχρώματος-c και της εναλλακτικής οξειδάσης, τόσο σε επίπεδο ανοσοενεργής πρωτεΐνης, όσο και σε επίπεδο μεταγράφου (Εικόνα 8). Πράγματι η καταπόνηση από αλατότητα οδήγησε σε μείωση της αναπνευστικής ικανότητας, σύμφωνα με ανάλογα πειραματικά δεδομένα από άλλες καταπονήσεις, όπως για παράδειγμα καταπόνηση υψηλής θερμοκρασίας (Vacca et al., 2004). Επίσης 3h μετά την έναρξη της καταπόνησης παρατηρήθηκε επαγωγή του μεταγράφου της *AOX* και αύξηση της ανοσοενεργής πρωτεΐνης, αποκρίσεις που οφείλονται στην επίδραση της καταπόνησης στο μιτοχόνδριο. Παραδόξως, αν και ο ρυθμός κατανάλωσης O_2 μειώθηκε κατά τις πρώτες ώρες καταπόνησης (1.5 και 3h) τόσο το μετάγραφο όσο και ανοσοενεργή πρωτεΐνη αυξήθηκαν (Εικόνα 8). Δοκιμές οι οποίες έγιναν παρουσία του παρεμποδιστή της εναλλακτικής οξειδάσης, SHAM και της κυτοχρωμικής οξειδάσης, κυανιούχο κάλλιο φανέρωσαν σημαντική μείωση στην συνολική ικανότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων και των δυο μονοπατιών, 1.5h μετά την καταπόνηση για το κυτοχρωμικό μονοπάτι και 3h μετά την καταπόνηση για το εναλλακτικό μονοπάτι, παρά την αρχική αύξηση σε μετάγραφο και ανοσοενεργή πρωτεΐνη και για τα δυο μονοπάτια. Τα πρότυπα στην μεταβολή των *AOX* και κυτοχρώματος-c, παρά το γεγονός ότι δεν προκαλούν κάποια αλλαγή στην αναπνευστική ικανότητα του φυτού, φανέρωσαν μια απόκριση του μιτοχονδρίου στην καταπόνηση. Επίσης στα καταπονημένα φυτά διαπιστώθηκε μείωση του λόγου *ATP/ADP* σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες, ένδειξη μείωσης στην απόδοση της

οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και σύνθεσης ATP. Τα παραπάνω μας ωθούν να αναζητήσουμε μια εναλλακτική λειτουργία για το κυτόχρωμα-c κατά την καταπόνηση από αλατότητα πέρα της μεταφοράς ηλεκτρονίων. Πράγματι το κυτόχρωμα-c έχει προταθεί ως αντιοξειδωτικό μόριο (Giannattasio et al., 2008), επιτελώντας την οξείδωση του $O_2^{\cdot-}$ σε O_2 , αναστολή της παραγωγής EMO, (Abdullaev et al., 2002) και αναστολή του σχηματισμού H_2O_2 όταν το κυτοχρωμικό μονοπάτι παρεμποδίζεται. Πράγματι το H_2O_2 ανιχνεύθηκε μόνο στις 24h σε φυτά καπνού καταπονημένα από αλατότητα, συμπίπτοντας με την ολική μείωση τόσο της ανοσοενεργής πρωτεΐνης όσο και του μεταγράφου του κυτοχρώματος (Εικόνα 10). Επομένως η επαγωγή του κυτοχρώματος κατά τις πρώτες ώρες μετά την καταπόνηση συνεισφέρει ουσιαστικότερα στην αντιοξειδωτική άμυνα του φυτού, παρά στην ανάκαμψη της αναπνευστικής ικανότητας.

Παρά την ολική μείωση σε βασικούς μεταφορείς της αναπνευστικής αλυσίδας του μιτοχονδρίου μετά τις 24h καταπόνησης παρατηρείται κατανάλωση οξυγόνου, η οποία ενδεχομένως προέρχεται από μια πηγή πέρα του μιτοχονδρίου. Τα τελευταία 10 χρόνια έχει εμφανιστεί μια πληθώρα πειραματικών δεδομένων τα οποία υποστηρίζουν την ύπαρξη μιας εναλλακτικής αναπνευστικής αλυσίδας μέσα στον χλωροπλάστη, γνωστή με το όνομα χλωροαναπνοή. Ως χλωροαναπνοή ορίζεται μια αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων η οποία εδράζεται στις χλωροπλαστικές μεμβράνες, αλληλεπιδρά με την φωτοσυνθετική μεταφορά ηλεκτρονίων και περιλαμβάνει τόσο την μη-φωτοχημική αναγωγή και οξείδωση των πλαστοκινών όσο και την κατανάλωση οξυγόνου (Diaz et al., 2007). Έχει βρεθεί πως η χλωροαναπνοή έχει προστατευτικό ρόλο απέναντι στις αβιοτικές καταπονήσεις, όπως υψηλές θερμοκρασίες (Wang et al., 2006), οπότε και δύναται να ευθύνεται για την κατανάλωση οξυγόνου 24h μετά την καταπόνηση. Για να διαπιστωθεί αν η χλωροαναπνοή εμπλέκεται στην απόκριση στην αλατότητα χρησιμοποιήθηκε ο διπλός παρεμποδιστής, της εναλλακτικής οξειδάσης και χλωροαναπνοής n-Propyl Gallate (nPG). Παρουσία του nPG μειώθηκε η κατανάλωση οξυγόνου σε φυτά μάρτυρες, αναδεικνύοντας την συμβολή του μονοπατιού της χλωροαναπνοής στην ολική αναπνευστική δραστηριότητα των φυτών καπνού. Η αναπνοή των καταπονημένων φυτών μειώθηκε σε ποσοστό ανάλογο με αυτό που διαπιστώθηκε παρουσία του κυανιούχου καλίου, γεγονός που οφείλεται στην διπλή παρεμπόδιση από το nPG. Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την καταπόνηση, τόσο ο καταστολέας του

κυτοχρωμικού όσο και του εναλλακτικού μονοπατιού δεν προκάλεσαν κάποια μεταβολή στην αφομοίωση οξυγόνου σε αντίθεση με το nPG το οποίο μείωσε σημαντικά την αναπνοή (Εικόνα 7), αποδεικνύοντας την λειτουργία του μονοπατιού της χλωροαναπνοής. Τέλος, ανάλυση κατά Western χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την πλαστιδιακή, τελική οξειδάση (PTOX), η οποία είναι η τελική οξειδάση που επάγει την αναγωγή του οξυγόνου κατά την χλωροαναπνοή (Josse et al., 2003; Diaz et al., 2007), υπέδειξε αύξηση στην ανοσοενεργή πρωτεΐνη σε καταπονημένα φυτά καπνού.

Το κυτόχρωμα-c, πέραν από τον ρόλο του στη μεταφορά ηλεκτρονίων ανάμεσα στα σύμπλοκα III και IV της αναπνευστικής αλυσίδας έχει αναγνωριστεί ως βασικό μόριο στην ενεργοποίηση του ΠΚΘ σε πολλά διαφορετικά μονοπάτια (Skulachev, 1998; Korshunov et al., 1999; Giannattasio et al., 2008), μεταξύ αυτών και κατά τον επαγόμενο από υψηλές θερμοκρασίες φυτικό ΠΚΘ (Vacca et al., 2006). Το κυτόχρωμα-c είναι ένας από τους συμμετέχοντες στο μονοπάτι του ΠΚΘ, τόσο στα ζωικά όσο και στα φυτικά μονοπάτια (Krishnamurthy et al., 2000). Σε όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές η απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c αναγνωρίζεται ως ένα από τα πρώτα βήματα κατά την ενεργοποίηση του μονοπατιού του ΠΚΘ. Αυτό το κομμάτι εργασίας επιβεβαίωσε την απελευθέρωση του κυτοχρώματος στο κυτταρόπλασμα σε καταπονημένα φυτά καπνού. Αν και η απελευθέρωση του κυτοχρώματος έχει διαπιστωθεί σε αβιοτικές καταπονήσεις πέρα της αλατότητας, για πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκε μια μοριακή τεχνική για να προσφέρει αποδείξεις για την έξοδο του κυτοχρώματος σε φυτά καπνού υπό καταπόνηση (Εικόνα 12). Πέραν αυτού, άλλα «βήματα» στην ενεργοποίηση του μονοπατιού του επαγόμενου από καταπονήσεις φυτικού ΠΚΘ, όπως αποπόλωση της μεμβράνης του μιτοχονδρίου, άνοιγμα του μιτοχονδριακού πόρου και ενεργοποίηση κασπασών είναι ακόμη υπό διερεύνηση (Krishnamurthy et al., 2000; Noctor et al., 2007). Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η μεταβολή στην περατότητα της μεμβράνης του μιτοχονδρίου και η αποπόλωση της μεμβράνης του είναι τα πρώτα γεγονότα κατά την ενεργοποίηση του ΠΚΘ σε ζώα και ανθρώπους (Halestrap et al., 2000). Αποπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης οδηγεί στο άνοιγμα του μιτοχονδριακού πόρου και απελευθέρωση αποπτωτικών παραγόντων στο κυτταρόπλασμα, όπως το κυτόχρωμα-c τόσο σε ζώα όσο και σε φυτά. Το κυτόχρωμα-c μετά την απελευθέρωσή του στο κυτταρόπλασμα ενεργοποιεί το μονοπάτι των κασπασών (Simeonova et al., 2004).

Οι πρωτεάσες κυστεΐνης (κασπάσες) διαδραματίζουν καίριο ρόλο σε πολλές μορφές φυτικού ΠΚΘ (Poizo and Lam, 1998). Σε ζωικά συστήματα τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται άμεσα στην ενεργοποίηση των κασπασών μέσω της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος-c στο κυτταρόπλασμα (Green and Reed, 1998). Μετατόπιση του κυτοχρώματος από το μιτοχόνδριο έχει δειχθεί κατά την καταπόνηση από υψηλές θερμοκρασίες στο αγγούρι (*Cucumis sativus*) (Balk et al., 1999), και στον επαγόμενο από μεναδιόνη κυτταρικό θάνατο σε πρωτοπλάστες καπνού (Sun et al., 1999). Από την άλλη μεριά στην πετούνια (*Petunia hybrida*), η απελευθέρωση του κυτοχρώματος αποδείχθηκε απαραίτητη για την επαγωγή του ΠΚΘ (Xu and Hanson, 2000). Στην παρούσα εργασία ενισχύεται η συμμετοχή μηχανισμών αναλόγων του ζωικού ΠΚΘ στον επαγόμενο από αλατότητα ΠΚΘ σε φυτά καπνού. Η καταπόνηση από αλατότητα προκάλεσε απώλεια του διαμεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων, ενεργοποίηση πρωτεασών τύπου κασπάσης-3 και κατάτμηση πυρηνικού DNA (Εικόνες 9, 10, 11).

Πιο προσεκτική παρατήρηση της αλληλουχίας των γεγονότων κατά την απόκριση των φυτών καπνού στην καταπόνηση από αλατότητα, φανέρωσε ένα επαναλαμβανόμενο πρότυπο διαφορετικής απόκρισης ανάμεσα στην βραχυ-πρόθεσμη (3h) και μακρο-πρόθεσμη (24) καταπόνηση. Τα μετάγραφα και η ανοσοενεργή πρωτεΐνη τόσο του κυτοχρώματος όσο και της AOX αυξήθηκαν μετά τις 3h από την εφαρμογή της καταπόνησης, ενώ μειώθηκαν σε μην ανιχνεύσιμα επίπεδα μετά τις 24h (Εικόνα 8). Η επαγωγή της AOX είναι ενδεικτική της απόκρισης στην καταπόνηση, και αναμενόμενη υπό τις συνθήκες της δοκιμής. Η μείωση/καταστολή της ωστόσο οδηγεί σε δυο πιθανά συμπεράσματα: α. το φυτό προσαρμόστηκε στην καταπόνηση οπότε και η παρουσία της AOX σε υψηλές ποσότητες δεν ήταν πλέον απαραίτητη β. η ένταση και διάρκεια της καταπόνησης οδήγησαν στην «κατάρρευση» των αμυντικών μηχανισμών του φυτού. Κατά τρόπο ανάλογο, ενώ κατά την βραχυ-πρόθεσμη καταπόνηση στους περισσότερους πυρήνες ανιχνεύθηκε κατατμημένο DNA, κατά την μακρο-πρόθεσμη καταπόνηση ο λόγος «υγιών» πυρήνων προς πυρήνες που εκδήλωσαν κατάτμηση DNA αυξήθηκε (Εικόνα 14.) Το ίδιο μπορεί να ειπωθεί και για τον λόγο «υγιών» προς αποπολωμένων μιτοχονδρίων (Εικόνα 13), ενώ στις 3h μετά την καταπόνηση η πλειονότητα των απομονωμένων μιτοχονδρίων ήταν αποπολωμένα, 24h μετά την μεταχείριση ο λόγος υγιών/αποπολωμένων μιτοχονδρίων αυξήθηκε. Εξετάζοντας τα παραπάνω

οδηγούμαστε στο συμπέρασμα πως 3h μετά την μεταχείριση, ενεργοποιούνται τόσο αμυντικοί μηχανισμοί, όπως η AOX και η αύξηση των επιπέδων του κυτοχρώματος-c, όσο και το μονοπάτι του ΠΚΘ, ώστε να καταστραφούν τα κύτταρα που έχουν ζημιωθεί από την καταπόνηση. Ωστόσο η ενεργότητα πρωτεασών τύπου κασπάσης διαπιστώθηκε να είναι υψηλή καθ' όλη την διάρκεια της μεταχείρισης. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω διαμορφώνεται ένα πιο πιθανό σενάριο. Καταπόνηση μικρής διάρκειας προκαλεί την επαγωγή αμυντικών μηχανισμών όπως η ενεργοποίηση της AOX και αύξηση στο μετάγραφο και την ανοσοενεργή πρωτεΐνη του κυτοχρώματος. Το κυτόχρωμα-c που απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα ενεργοποιεί τον ΠΚΘ, ώστε να καταστραφούν τα «ελαττωματικά» κύτταρα. Συνεχιζόμενη καταπόνηση οδηγεί σε αυξημένη πρωτεόλυση η οποία οδηγεί στην πρωτεολυτική αποδόμηση του κυτοχρώματος. Η αποδόμηση του κυτοχρώματος δίνει έναυσμα στην διαδοχή του ΠΚΘ από την νέκρωση. Η εκδήλωση της νέκρωσης συνοδεύεται από μια υπερσυσσώρευση των EMO, πιθανώς από την αδυναμία του αντιοξειδωτικού μηχανισμού να ανταπεξέλθει, όπως έχουν δείξει οι Moschou et al. (2008b). Η διαδοχή του ΠΚΘ από την νέκρωση έχει αναλογίες με το μοντέλο που έχει προταθεί για την επαγόμενη από EMO μιτοχονδριακή αυτοφαγία (Scherz-Shouval and Elazar, 2007). Η αυτοφαγία είναι μια διαδικασία κατά την οποία μακρομόρια αποδομούνται και ανακυκλώνονται ως απόκριση στην υπέρμετρη συσσώρευση των EMO. Σε συμφωνία με το παραπάνω μοντέλο η συγκέντρωση των EMO παραμένει χαμηλή κατά την βραχυ-πρόθεσμη καταπόνηση και επαγωγή του ΠΚΘ. Σε αντίθεση, 24h μετά την καταπόνηση παρατηρήθηκε συσσώρευση των EMO, και μείωση του διαθέσιμου ATP εξαιτίας δυσλειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας.

Συνοψίζοντας καταπόνηση από αλατότητα μικρής διάρκειας οδηγεί σε μείωση της αναπνευστικής ικανότητας τόσο του κυτοχρωμικού όσο και του εναλλακτικού μονοπατιού, μείωση της ολικής αναπνοής, επαγωγή αμυντικών μηχανισμών, και εκδήλωση του ΠΚΘ, με την μορφή αποπόλωσης της μιτοχονδριακής μεμβράνης, απελευθέρωση του κυτοχρώματος στο κυτταρόπλασμα, ενεργοποίηση πρωτεασών τύπου κασπάσης-3 και κατάτμηση πυρηνικού DNA. Καταπόνηση από αλατότητα μεγαλύτερης διάρκειας (24h) οδηγεί σε υπέρμετρη συσσώρευση EMO, κατάρρευση του αναπνευστικού μηχανισμού και την εκδήλωση νεκρωτικού θανάτου.

Κεφάλαιο 2

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ-C ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΦΥΤΩΝ ΚΑΠΝΟΥ *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana ΣΕ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ ΑΠΟ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ.

2.1 Περίληψη

Η καταπόνηση από αλατότητα οδηγεί στην δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας του μιτοχονδρίου, αποπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης, απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c στο κυτταρόπλασμα, και επαγωγή του ΠΚΘ σε φυτά καπού (Κεφ.1). Με βάση τα παραπάνω δεδομένα θεωρήθηκε σκόπιμη η διερεύνηση του ρόλου του κυτοχρώματος-c σε κατά την καταπόνηση από αλατότητα. Κύτταρα μεσόφυλλου από φυτά καπού *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana, μετασηματίστηκαν με τον cDNA κλώνο του κυτοχρώματος-c του αμπελιού υπό τον έλεγχο του 35S υποκινητή, χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο παροδικής έκφρασης Αγροβακτηρίου. Ο μετασηματισμός οδήγησε σε αυξημένη ανοσοενεργή πρωτεΐνη του κυτοχρώματος-c και της εναλλακτικής οξειδάσης. Τα μετασηματισμένα φυτικά κύτταρα εμφάνισαν βελτιωμένη αναπνευστική ικανότητα, όταν υποβλήθηκαν σε καταπόνηση αλατότητας έντασης 250mM και διάρκειας 3 και 24h. Τρεις και είκοσι τέσσερις ώρες μετά την μεταχείριση παρατηρήθηκε άνοιγμα του μιτοχονδριακού πόρου και απελευθέρωση του κυτοχρώματος στο κυτταρόπλασμα, χωρίς όμως να μειωθεί η ανοσοενεργή πρωτεΐνη του κυτοχρώματος στο μιτοχόνδριο. Τέλος 24h μετά την μεταχείριση τόσο η ενεργότητα πρωτεασών τύπου κασπάσης-3 όσο και οι πυρήνες που εμφάνισαν κατακερματισμένο DNA μειώθηκαν, πιθανώς από την κατασταλτική δράση της υψηλής συγκέντρωσης ATP και του κυτοχρώματος-c στον μηχανισμό ενεργοποίησης των κασπασών και του ΠΚΘ.

2.2 Εισαγωγή

Η μελέτη του κυτοχρώματος πρωτοδημοσιεύτηκε το 1930 από τον Davin Keilin (Keilin, 1930), ενώ η αλληλουχία του καθώς επίσης και η τρισδιάστατη δομή του είναι γνωστά εδώ και πολλά χρόνια. Το κυτόχρωμα c είναι μια μικρή (104 αμινοξέα στα θηλαστικά) και πολύ σταθερή πρωτεΐνη η οποία διαθέτει μια ομοιοπολικά δεμένη ομάδα αίμης ως προσθετική ομάδα. Είναι προσδεμένο στην εξωτερική επιφάνεια της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Για πάνω από 60 χρόνια θεωρούνταν μια μικρή, σταθερή, υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη με μοναδικό ρόλο την μεταφορά ηλεκτρονίων από το σύμπλοκο III στο σύμπλοκο IV της αναπνευστικής αλυσίδας του μιτοχονδρίου. Η μεταφορά ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα-c δεν συνδέεται άμεσα με την παραγωγή ενέργειας, οπότε αρχικά το κυτόχρωμα θεωρούνταν απλώς ένα «μέσο μεταφοράς» ηλεκτρονίων. Η ανακάλυψη ότι εμπλέκεται και στην επαγωγή του μονοπατιού του ΠΚΘ οδήγησε στην αναθεώρηση του φυσιολογικού ρόλου του κυτοχρώματος c (Skulachev, 1998). Η απελευθέρωση του στο κυτταρόπλασμα αποδείχθηκε απαραίτητη για την επαγωγή του μονοπατιού του ΠΚΘ σε πολλά κυτταρικά συστήματα (Liu et al., 1996; Kluck et al., 1997), ενώ επακόλουθη μελέτη μηχανισμών αντιοξειδωτικής απόκρισης φανέρωσε πρόσθετες αντιοξειδωτικές ιδιότητες του κυτοχρώματος-c. Πιο συγκεκριμένα: (α). Οξείδωση του υπεροξειδίου σε οξυγόνο από το κυτόχρωμα που έχει αποσπαστεί από την μιτοχονδριακή μεμβράνη. (β). Παρεμπόδιση της παραγωγής των EMO στα πρωταρχικά τμήματα της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων από το εξω-μιτοχονδριακό κυτόχρωμα (Skulachev, 1998; Korshunov et al., 1999). Μετά την ανακοίνωση και των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του κυτοχρώματος η «θεωρία» του απλού ρόλου καταρρίφθηκε και αναδείχθηκε η πολύπλευρη συνεισφορά του μορίου στην φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου.

Στην προηγούμενη ενότητα κατέστη φανερή η έντονη και ενεργή συμμετοχή του μιτοχονδρίου στην απόκριση φυτών καπνού στην αλατότητα. Η αλατότητα οδήγησε σε ενεργοποίηση μιτοχονδριακών αμυντικών μηχανισμών όπως η AOX, έξοδο του κυτοχρώματος-c στο κυτταρόπλασμα και δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας, παρά την επαγωγή του μεταγράφου και της ανοσοενεργής πρωτεΐνης τόσο του κυτοχρώματος όσο και της AOX. Σε μια προσπάθεια να αποσαφηνιστεί το παραπάνω παράδοξο επιχειρήθηκε απομόνωση και μελέτη του cDNA κλώνου του κυτοχρώματος-c και μετασχηματισμός κυττάρων από μεσόφυλλο

καπνού. Δοκιμάστηκαν διαφορετικές φυσιολογικές παράμετροι σχετικές με την λειτουργία του κυτοχρώματος ώστε να αποσαφηνισθεί ο πραγματικός ρόλος του κυτοχρώματος κατά την καταπόνηση από αλατότητα.

2.3 Υλικά και Μέθοδοι

2.3.1 Φυτικό υλικό

Για τις μεταχειρίσεις χρησιμοποιήθηκαν πλήρως ανεπτυγμένα φυτά αγρίου καπνού *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana, και ΓΤ φυτά τα οποία έφεραν το cDNA του κυτοχρώματος-c σε σύντηξη με GFP. Τα φυτά φυτεύτηκαν σε χώμα και αναπτύχθηκαν σε θάλαμο με σταθερή φωτοπερίοδο 16h μέρα και 8h νύχτα και θερμοκρασία 25⁰C. Ποτίστηκαν με απιονισμένο νερό μέχρι αναπτυξιακό στάδιο 4 φύλλων και ύψος 4 cm περίπου. Στο προηγούμενο κεφάλαιο αναγνωρίστηκαν 2 κομβικά χρονικά σημεία, 3 και 24h καταπόνησης, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν και σε αυτήν την μελέτη, ενώ η ένταση της καταπόνησης ήταν 250mM NaCl.

2.3.2 Απομόνωση ολικού RNA

Η τεχνική περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

2.3.3 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Δέκα μικρογραμμάρια ολικού RNA καθαρίστηκαν σε κολώνα OligodT, όπως περιγράφεται στο εγχειρίδιο (GIBCO BRL, cat# 5940SB) για απαλλαγή του δείγματος από ριβοσωμικά RNA και εμπλουτισμό του δείγματος σε mRNA. Το mRNA ποσοτικοποιήθηκε φωτομετρικά στα 260nm. Ακολούθησε κατασκευή σε πρώτο στάδιο μονόκλωνης cDNA αλυσίδας, χρησιμοποιώντας έναν oligodT(20) AP εκκινητή. Ο εκκινητής αυτός αποτελείται από 20 κατάλοιπα θυμίνης και στο 5' άκρο του περιέχει μια αλληλουχία 20 βάσεων (oligodT(20) AP: 5'-CTGGAGGGTAAGGTAAGGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'). Για την αντίδραση της αντιστρεπτής μεταγραφής χρησιμοποιήθηκαν 200ng mRNA σε τελικό όγκο 20μl. Ο oligodT AP εκκινητής χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 1μM. Το mRNA μαζί με τον εκκινητή, επωάστηκε στους 65⁰C για 10min. Έπειτα, προστέθηκε 0.5mM dNTPs, 10 unit RNAase inhibitor, 1X RT buffer και 4 Unit RT πολυμεράση (Omniscript Reverse transcriptase, QIAGEN). Η αντίδραση έλαβε χώρα στους 37⁰C για 2h. Το τελικό προϊόν φυλάχτηκε στους -80⁰C.

2.3.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Για την απομόνωση τμήματος του γονιδίου του κυτοχρώματος-c, πραγματοποιήθηκε στοίχιση αλληλουχιών κυτοχρώματος-c από τα φυτά, *A. thaliana*, *H. annuus*, *F. agrestis* και *O. sativa*. Εκφυλισμένοι εκκινητές κατασκευάστηκαν για καλά συντηρημένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Δυο μικρόλιτρα από την αντίδραση αντιστρεπτής μεταγραφής χρησιμοποιήθηκαν σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για απομόνωση τμήματος του cDNA κλώνου. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες (CytSense forward: 5' CICAATGTCACACCGTCG 3' και CytASense reverse: 5' CCAGGGAAIACCATCTTTGT3'). Η αντίδραση έλαβε χώρα αρχικά με τον αντίστροφο εκκινητή για την κατασκευή παρουσία 5 pmole από τον κάθε εκκινητή, 1.5mM MgCl₂, 0.25μM dNTPs, 1X ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (1X: 67mM Tris-HCl, pH 8.8, 16.6mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% Tween 20). Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν 1) 94°C για 2min 2) 94°C για 1min 3) 54°C για 40sec 4) 72°C για 2min. Το πρόγραμμα επαναλήφθηκε για 32 κύκλους.

2.3.5 Κλωνοποίηση των PCR σε pGEM T easy vector πλασμιδιακό φορέα

Τα προϊόντα της PCR κλωνοποιήθηκαν μέσα στον πλασμιδιακό φορέα pGEM T easy vector (Promega, cat# A1360). Για την κλωνοποίηση των τμημάτων αυτών, χρησιμοποιήθηκαν 50ng πλασμιδίου με 5μl 2X ligation buffer, 1μl λιγάση (~1 unit) και 200ng PCR ένθεμα, σε τελικό όγκο αντίδρασης 10μl. Η αντίδραση επώαστηκε στους 16°C για 12h. Τα προϊόντα της αντίδρασης αφού κλωνοποιήθηκαν αλληλουχήθηκαν και αναγνωρίστηκαν ως ο μερικού μήκους cDNA κλώνος του κυτοχρώματος-c, και πλήρους μήκους cDNA κλώνος της εναλλακτικής οξειδάσης.

2.3.6 Σάρωση cDNA βιβλιοθήκης

Η βιβλιοθήκη βρίσκεται κλωνοποιημένη μέσα στον ιικό φορέα λ FIX II. Η διαδικασία σάρωσης και η προετοιμασία των βακτηριακών στελεχών έγινε όπως περιγράφεται στο εγχειρίδιο (Uni-ZAP® XR Vector Kit, cat# 237211 STRATAGENE). Για την διαδικασία σάρωσης, χρησιμοποιήθηκε ως ραδιοσημασμένος ιχνηθέτης η μερικού μήκους cDNA αλληλουχία του κυτοχρώματος-c από τον καπνό. Η υβριδοποίηση έγινε σε συνθήκες υψηλής αυστηρότητας, ώστε ο ιχνηθέτης να ανιχνεύσει τον cDNA κλώνο του κυτοχρώματος. Για τις ανάγκες της πρώτης διαδικασίας σάρωσης, κατασκευάστηκαν Master plates

διαστάσεων 20 X 20 cm. Έπειτα από τιτλοδότηση της βιβλιοθήκης, βρέθηκε ότι σε κάθε πιάτο σαρώθηκαν περίπου 1.5×10^5 rfu/μl.

2.3.7 Προετοιμασία βακτηριακού στελέχους-ξενιστή XL1-MRF

Βακτηριακό στέλεχος XL1-MRF αναπτύχθηκε σε 30ml LB, το οποίο περιείχε 10mM MgSO₄ και 0.2% μαλτόζη. Τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37°C για περίπου 6h με ανάδευση στα 200g. Η πυκνότητα της καλλιέργειας καθορίστηκε φωτομετρικά στα 600nm και όταν έγινε ίση με ένα, ακολούθησε συλλογή των κυττάρων στα 500g για 10min. Ακολούθησε επαναιώρηση του βακτηριακού ιζήματος σε 10mM MgSO₄ ώστε η οπτική πυκνότητα στα 600nm έγινε OD₆₀₀=0.5.

2.3.8 Επιμόλυνση κυττάρων XL1-MRF με την βιβλιοθήκη

Σε κάθε κύριο πιάτο σάρωσης 20X20 cm, περίπου 200.000 rfu, βάση της αρχικής τιτλοδότησης της βιβλιοθήκης, επώαστηκαν με 200μL κυττάρων XL1-MRF (Uni-ZAP® XR Vector Kit, cat# 237211 STRATAGENE). Συνολικά, σαρώθηκαν περίπου 2×10^6 κλώνοι. Η επιμόλυνση των βακτηρίων με τους φάγους έλαβε χώρα στους 37°C για 15min. Έπειτα, προστέθηκαν στο μίγμα επώασης 3ml top agar (Θρεπτικό μέσο NZYM: 10gr NZ amine, 5gr NaCl, 5gr Bacto yeast extract και 2gr MgSO₄ 7H₂O/lit, με 0.7% αγαρόζη), το οποίο διατηρήθηκε σε θερμοκρασία 48°C και ακολούθησε αμέσως άπλωμα του μίγματος σε πιάτα με bottom agar (NZYM με 1.2% άγαρ), που είχαν προηγουμένως προθερμανθεί στους 50°C. Ακολούθησε η επώαση των πιάτων στους 37°C για περίπου 8h μέχρι που εμφανίστηκαν οι πλάκες. Η ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθήθηκε κάθε φορά, που επαναλήφθηκε η διαδικασία σάρωσης, στην προσπάθεια να απομονωθούν μοναδικοί γενωμικοί κλώνοι λ FIX II, που να περιέχουν το επιθυμητό γονίδιο.

2.3.9 Μεταφορά πλακών σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης και προϋβριδοποίηση

Μεμβράνες Nytran προσαρμόστηκαν πάνω στα τριβλία με τις σχηματισμένες πλάκες. Οι μεμβράνες αφέθηκαν για περίπου 2min σε θερμοκρασία δωματίου σε κάθε τριβλίο. Ακολούθησε επώαση σε διάλυμα 1.5M NaCl, 0.5M NaOH για 2min, και έκθεση των μεμβρανών σε διάλυμα εξουδετέρωσης (1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl, pH 8.0) για 5min. Τέλος, οι μεμβράνες πλύθηκαν με 0.2M Tris-HCl, pH 7.5 και 2X SSC για περίπου 0.5min. Έπειτα από αυτήν την διαδικασία, οι μεμβράνες τοποθετήθηκαν σε διηθητικό χαρτί Whatman 3M για σύντομο χρονικό διάστημα ώστε να στεγνώσουν

και στην συνέχεια έγινε η ομοιοπολική πρόσδεση του DNA πάνω στην επιφάνεια της μεμβράνης χρησιμοποιώντας ακτινοβολία UV στα 120.000 μJ για ~ 0.5 min.

2.3.10 Υβριδοποίηση μεμβρανών

Για την κατασκευή του ραδιοσημασμένου ιχνηθέτη, η μερικού μήκους cDNA αλληλουχία του κυτοχρώματος από τον καπνό που απομονώθηκε παραπάνω χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό καλούπι σε αντίδραση τυχαίων εκκινητών. Οι πλαστικές μεμβράνες αρχικά επώαστηκαν για 5-10min σε 2X SSC διάλυμα αλάτων. Έπειτα ακολούθησε η διαδικασία προϋβριδοποίησης των μεμβρανών σε 15ml διαλύματος CHURCH (500mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7.2, 7% (w/v) SDS, 1% (w/v) BSA, 1mM EDTA, pH 8.0) στους 60°C για 1.5-2h. Ο ραδιοσημασμένος ιχνηθέτης, αφού βράστηκε για περίπου 5min ώστε να αποδιαταχθεί, προστέθηκε μέσα στο διάλυμα προϋβριδοποίησης, σε τελική ενεργότητα 250-500.000 cpm/ml. Η διαδικασία υβριδοποίησης έλαβε χώρα για 12h σε συνθήκες υψηλής αυστηρότητας υβριδοποίησης (60°C). Μετά το πέρας της υβριδοποίησης, οι μεμβράνες πλύθηκαν σε συνθήκες υψηλής αυστηρότητας και ακολούθησε αυτοραδιογραφία (Kodak Scientific Imaging Film: XOMAT/AR 35x40 cm) με έκθεση στους -80°C . Απομονώθηκαν περιοχές των πιάτων, που αντιστοιχούσαν σε θετικά σήματα από την αυτοραδιογραφία και οι πλάκες αυτές μεταφέρθηκαν σε 1ml SM buffer (5.8gr NaCl, 2gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50ml 1M Tris-HCl, pH 7.5, 5ml 2% (w/v) gelatin/lit). Για την διαδικασία δευτερογενούς σάρωσης, προκειμένου να απομονωθούν θετικοί φάγοι σε μοναδική κατάσταση, δημιουργήθηκαν αραιώσεις 10^{-3} σε SM buffer. Από αυτήν την αραιώση, λήφθηκαν 4 μl και επώαστηκαν μαζί με 200 μl κύτταρα XL1-MRF.

2.3.11 In vivo εξαγωγή φαγεμιδίου

Μετά το πέρας της απομόνωσης πιθανών θετικών φαγικών κλώνων, ακολούθησε η εξαγωγή του φαγεμιδίου με την διαδικασία της in vivo εξαγωγής (Uni-ZAP® XR Vector Kit, cat# 237211 STRATAGENE). Βακτηριακά στελέχη XL1-Blue MRF' και SOLR μεγάλωσαν σε θρεπτικό μέσο LB στους 30°C για 12h. Έπειτα φυγοκεντρήθηκαν στα 1000g για 5min και επαναιωρήθηκαν σε 10mM MgSO_4 ώστε τελικά η οπτική πυκνότητα στα 600 nm να είναι $\text{OD}_{600}=1$. Διακόσια μικρόλιτρα από τα XL1-Blue MRF' επώαστηκαν με 250 μl από τον πιθανό θετικό κλώνο και 1 μl από τον βοηθό φάγο ExAssist helper phage στους 37°C για 15min. Ακολούθησε προσθήκη 3ml LB και επώαση στους 37°C για 3h. Έπειτα, το δείγμα θερμάνθηκε

στους 70 °C για 20min και ακολούθησε φυγοκέντριση στα 1000g για 15min. Το υπερκείμενο, που περιείχε το φαγεμίδιο διατηρήθηκε στους -80 °C. Δέκα μικρόλιτρα από το φαγεμίδιο αναμίχθηκαν με 200μl SOLR κύτταρα και ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 15min. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε LB καναμυκίνη (100μg/ml) στους 37 °C για 12h. Βακτηριακές αποικίες επιλέχθηκαν, και αφού απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA μικρής κλίμακας, έγινε έλεγχος της αλληλουχίας του ενθέματος με αντίδραση αλληλούχισης. Η αντίδραση αλληλούχισης φανέρωσε το απομονωμένο τμήμα ως τον πλήρους μήκους cDNA κλώνο του κυτοχρώματος-c του αμπελιού.

2.3.12 Απόκτηση πλασμιδιακής κατασκευής CYT-c – GFP

Το cDNA κλωνοποιήθηκε στο φορέα pDONR207 με χρήση του εμπορικά διαθέσιμου προϊόντος GATEWAY (Invitrogen, USA) μέσω της αντίδρασης BP. Από κει μέσω επιπλέον αντιδράσεων GATEWAY τα κλωνοποιημένα τμήματα μεταφέρθηκαν στον φορέα pGWB5 (cDNA:GFP) (MBP:cDNA, Hammrastrom et al. 2002) μέσω αντιδράσεων LR. Όλοι οι φορείς που κατασκευάστηκαν αλληλουχήθηκαν. Οι φορείς της σειράς pGWB περιγράφονται στον ιστότοπο http://www-urgv.versailles.inra.fr/pub/pGWB_manual.pdf (Nakagawa et al., 2007).

2.3.13 Δημιουργία δεκτικών προς μετασχηματισμό κυττάρων *E.coli*

Για τη δημιουργία δεκτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος DH5a του εντεροβακτηρίου *E.coli*. Το πρωτόκολλο το οποίο ακολουθήθηκε για τη δημιουργία δεκτικών προς μετασχηματισμό κυττάρων *E.coli* περιγράφεται από τους Sambrook et al., (1989).

2.3.14 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E.coli*

Το πρωτόκολλο μετασχηματισμού, το οποίο ακολουθήθηκε σε όλους τους μετασχηματισμούς, περιγράφεται από τους Sambrook et al., (1989).

2.3.15 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης μετά από ολονύκτια καλλιέργεια σε θρεπτικό LB (Sambrook et al., 1989).

2.3.16 Μετασηματισμός αγροβακτηρίων

Η τεχνική περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

2.3.17 Παροδική έκφραση

Η τεχνική περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

2.3.18 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του περοξειδίου του υδρογόνου με τη μέθοδο της λουμινόλης

Η τεχνική περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

2.3.19 Προσδιορισμός των υπεροξειδικών ιόντων με τη μέθοδο της λουσιγενίνης

Η τεχνική περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

2.3.20 Ανίχνευση των κύριων ενεργών μορφών οξυγόνου στον ιστό

Η τεχνική περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

2.3.21 Ανάλυση ολικού mRNA κατά Northern

Η τεχνική περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

2.3.22 Κατασκευή ραδιενεργού ιχνηλάτη

Η τεχνική περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

2.3.23 Προϋβριδοποίηση, υβριδοποίηση, ξεπλύματα και έκθεση

Η τεχνική περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

2.3.24 Εκχύλιση πρωτεϊνών και ποσοτικοποίηση

Η τεχνική περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

2.3.25 Ανάλυση των επιπέδων των AOX, και κυτοχρώματος-c κατά Western

Η τεχνική περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

2.3.26 Μετρήσεις αναπνοής με την μέθοδο της πολαρογραφίας

Η τεχνική περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

2.3.27 Απομόνωση μιτοχονδρίων

Η τεχνική περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

2.3.28 Χρώση με τον σημαντή JC-1 και ανάλυση φασμάτων φθορισμού

Η τεχνική περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

2.3.29 Δοκιμή ενεργότητας πρωτεασών τύπου κασπάσης-3

Η τεχνική περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

2.3.30 Εκτίμηση της κατακερμάτισης του πυρηνικού DNA

Η τεχνική περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

2.3.31 Εκχύλιση ATP

Η τεχνική περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

2.3.32 Ποιοτική και Ποσοτική Ανάλυση ATP με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Διαχωριστικής Ικανότητας (HPLC)

Η τεχνική περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

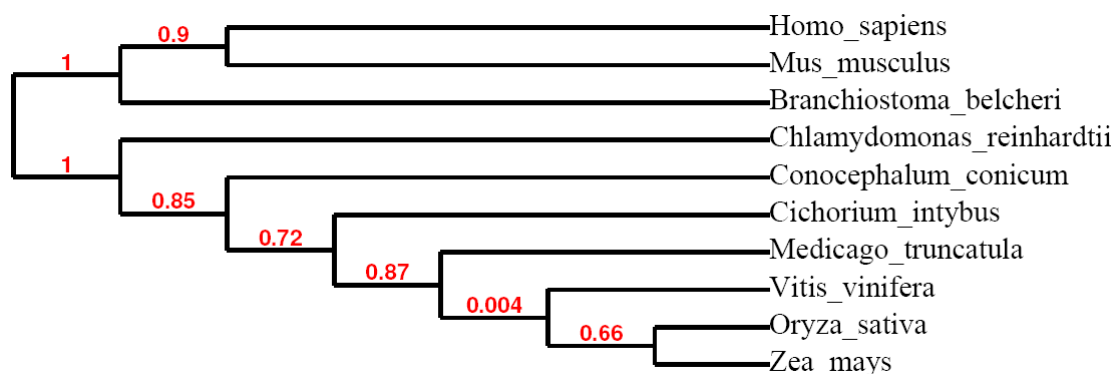
2.4 Αποτελέσματα

2.4.1 Απομόνωση – χαρακτηρισμός cDNA κλώνου του κυτοχρώματος-c.

Για την απομόνωση και το χαρακτηρισμό του cDNA κλώνου, που κωδικοποιεί το κυτόχρωμα-c του αμπελιού, πραγματοποιήθηκε σάρωση cDNA βιβλιοθήκης από *Vitis vinifera* cv Sultanina. Η βιβλιοθήκη αυτή κατασκευάστηκε σε προηγούμενη φάση στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και Βιοτεχνολογίας φυτών (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1996), μέσα σε φαγικό φορέα λ με το σύστημα Uni-ZAP XR (Stratagene cat# 237211). Για την διαδικασία της σάρωσης χρησιμοποιήθηκε ως ραδιοσημασμένος ιχνηθέτης, η μερικού μήκους αλληλουχία του κυτοχρώματος από το αμπέλι. Περίπου 300.000-350.000 κλώνοι σαρώθηκαν με τον παραπάνω ιχνηθέτη, σε συνθήκες υψηλής αυστηρότητας υβριδισμού (60°C). Συνολικά, ανιχνεύτηκαν 6 κλώνοι από την αρχική σάρωση, οι οποίοι μετά από διαδοχικές αραιώσεις και σαρώσεις καθαρίστηκαν και απομονώθηκαν. Ακολούθησε η διαδικασία εξαγωγής (*in vivo* excision) του πλασμιδίου pBluescript SK- με το cDNA ένθεμα, από το φαγεμίδιο και η είσοδος του σε κατάλληλο βακτηριακό στέλεχος *E.coli* SOLR. Έπειτα από απομόνωση πλασμδιακού DNA, πραγματοποιήθηκε αντίδραση αλληλούχισης για τους έξι αυτούς κλώνους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο ένας από τους κλώνους αντιστοιχούσε στον πλήρους μήκους cDNA κλώνο του κυτοχρώματος-

c του αμπελιού. Η αλληλουχία κατατέθηκε στην τράπεζα δεδομένων της NCBI (accession number EU595418).

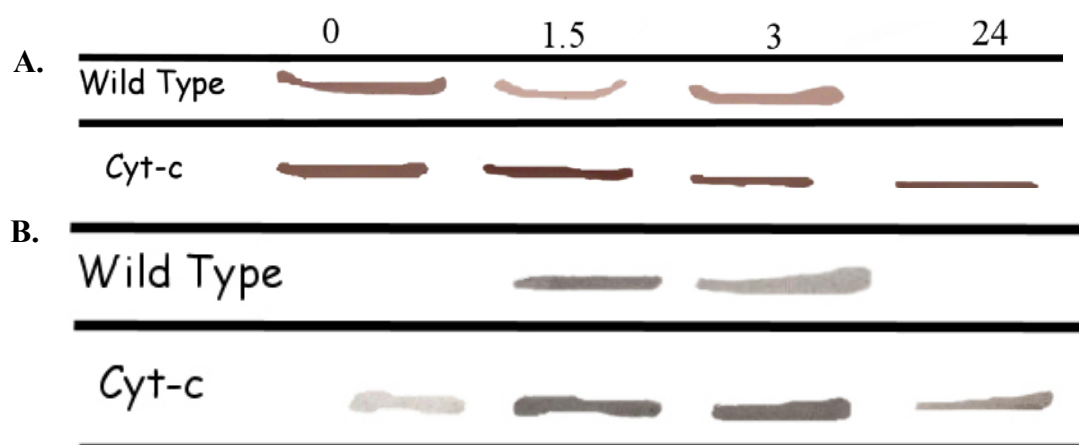
Για την αλληλουχία, που απομονώθηκε, ακολούθησε *in silico* ανάλυση. Έπειτα από *in silico* μετάφραση της αλληλουχίας του cDNA κλώνου, βρέθηκε πως ο κλώνος αντιστοιχεί σε μια αμινοξική αλληλουχία 112 αμινοξέων με μοριακό βάρος 12.1789 kD και θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο 9.37. Το μήκος της προβλεπόμενης αλληλουχίας συμφωνεί με τις μέχρι τώρα δημοσιευμένες αμινοξικές αλληλουχίες οι οποίες έχουν μήκος ~12kDa. Στοιχίση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με γνωστές αλληλουχίες ανώτερων φυτών φανέρωσε ομολογία μεγαλύτερη από 80%. Στην συνέχεια έγινε αναζήτηση συντηρημένων αλληλουχιών, η οποία όμως δεν έδωσε κάποιο αποτέλεσμα. Η τοπολογία του πρωτεϊνικού προϊόντος της αλληλουχίας αναγνωρίστηκε στο μιτοχόνδριο, παρόλο που δεν αναγνωρίστηκε κάποια από τις γνωστές αλληλουχίες που αποτελούν μιτοχονδριακό οδηγό πεπτίδιο. Ο εντοπισμός στο μιτοχόνδριο αποδόθηκε αποκλειστικά και μόνο στην ομολογία της αλληλουχίας με τις γνωστές αλληλουχίες για το κυτόχρωμα-c, οι οποίες έχουν ως στόχο το μιτοχόνδριο. Τέλος γνωστές αλληλουχίες του κυτοχρώματος-c από διάφορους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, του ποντικού (*Mus musculus*), μονοκύτταρων φωτοσυνθετικών οργανισμών (*Chlamydomonas reinhardtii*) και ανώτερων φυτών (*Zea mays*, *Oryza sativa*), στοιχήθηκαν και κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο με την βοήθεια του προγράμματος TreeView. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 15 η αλληλουχία για το κυτόχρωμα-c του αμπελιού ομαδοποιείται μαζί με τις αλληλουχίες ανώτερων φυτών και μονοκύτταρων φωτοσυνθετικών οργανισμών. Όπως ήταν αναμενόμενο, αν και οι αλληλουχίες από τα θηλαστικά μοιράζονται ομολογίες με τον απομονωμένο cDNA κλώνο, παρόλα αυτά ομαδοποιούνται σε διαφορετική ομάδα.



Εικόνα 15 Ομαδοποίηση αλληλουχιών του κυτοχρώματος-c από διάφορους οργανισμούς.

2.4.2 Μετασχηματισμός φυτικών κυττάρων μεσόφυλλου καπνού με την cDNA κλώνο του κυτοχρώματος-c οδήγησε σε υψηλότερα επίπεδα ανοσοενεργής πρωτεΐνης κυτοχρώματος-c, εναλλακτικής οξειδάσης και ATP, αλλά όχι σε σημαντικές διαφορές στην αναπνοή

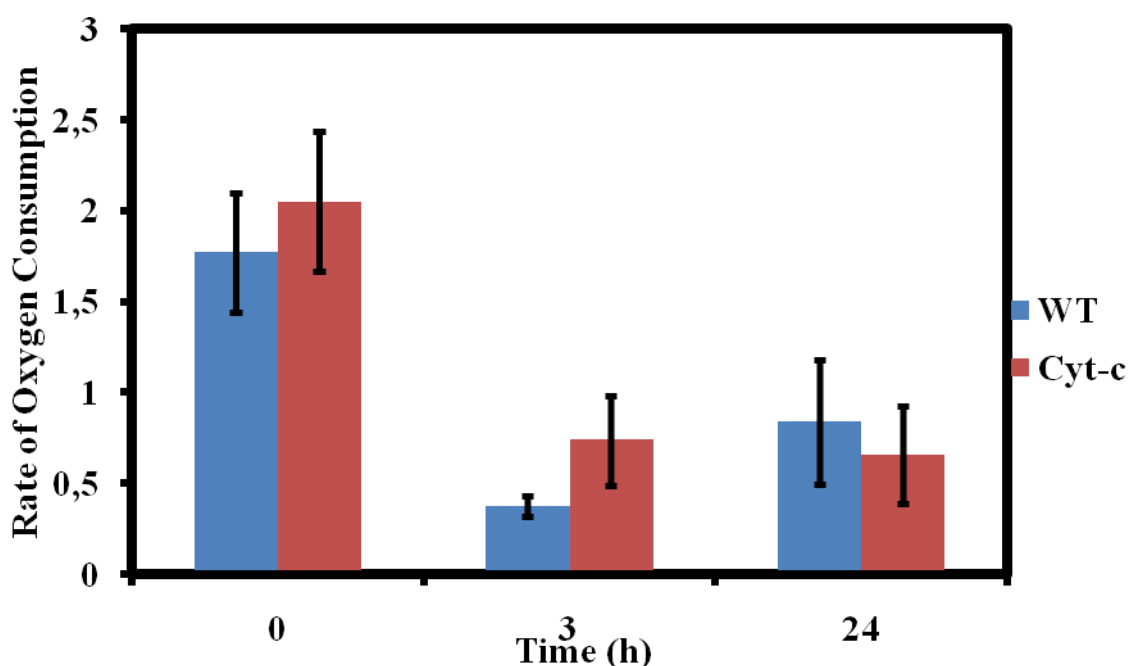
Θεωρήθηκε σκόπιμη η διερεύνηση της μεταβολής της ανοσοενεργής πρωτεΐνης του κυτοχρώματος και της εναλλακτικής οξειδάσης σε φυτά καπνού αγρίου τύπου, και στα μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα τα οποία υπερεκφράζουν το κυτόχρωμα. Στα μετασχηματισμένα κύτταρα τα επίπεδα της ανοσοενεργής πρωτεΐνης βρέθηκαν να είναι υψηλότερα, σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά, 15% σε σύγκριση με τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες (Εικόνα 16). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η σταθερά υψηλή ανοσοενεργή πρωτεΐνη του κυτοχρώματος-c μέχρι και 24h μετά την



Εικόνα 16 Ανάλυση κατά Western της ανοσοενεργής πρωτεΐνης του κυτοχρώματος-c (A) και της εναλλακτικής οξειδάσης (B) σε αγρίου τύπου φυτά καπνού (Wild Type) και φυτικά κύτταρα που υπερεκφράζουν το κυτόχρωμα-c (Cyt-c) τα οποία έχουν υποβληθεί σε καταπόνηση από αλατότητα έντασης 250mM με διάρκεια 1.5, 3, και 24h. Για την ανάλυση κατά western διαχωρίστηκαν 50μg πρωτεΐνης με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης.

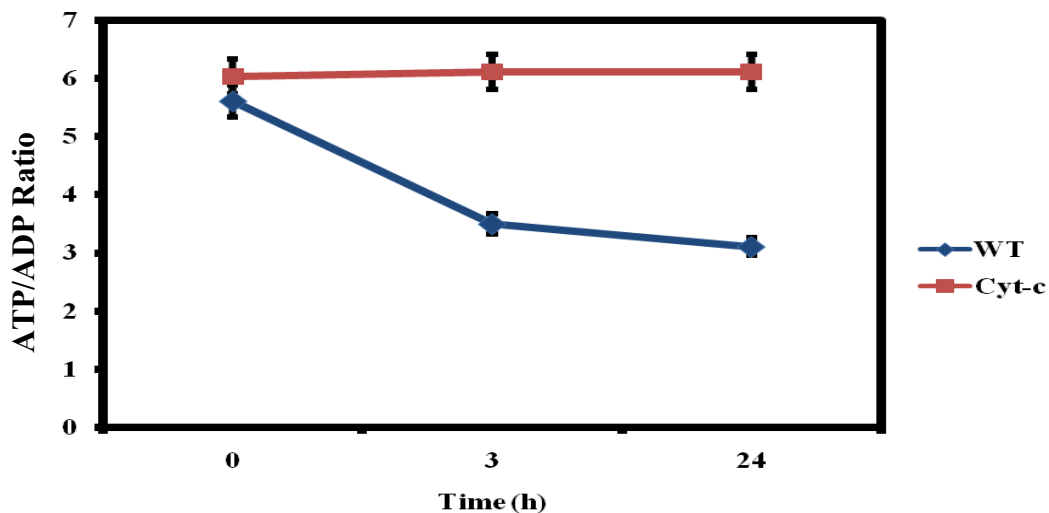
μεταχείριση στα μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα, σε αντίθεση με τα φυτά αγρίου τύπου, στα οποία δεν ήταν ανιχνεύσιμη 24h μετά την μεταχείριση. Επίσης αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως η ανοσοενεργή πρωτεΐνη της εναλλακτικής οξειδάσης μετά από μια αύξηση 1.5h μετά την μεταχείριση παραμένει σταθερά σε υψηλά επίπεδα ως και 24h μετά την μεταχείριση στα μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα. Αντίθετα στα αγρίου τύπου φυτά, 24h μετά την καταπόνηση η ανοσοενεργή πρωτεΐνη δεν ήταν ανιχνεύσιμη.

Παρόλο που η ανοσοενεργή πρωτεΐνη τόσο της AOX όσο και του κυτοχρώματος-c ήταν σε υψηλά επίπεδα καθ' όλη την διάρκεια της δοκιμής δεν παρατηρήθηκε ανάλογη αλλαγή και στα επίπεδα κατανάλωσης οξυγόνου (Εικόνα



Εικόνα 17 Κατανάλωση οξυγόνου σε αγρίου τύπου φυτά καπνού (WT) και φυτικά κύτταρα μετασχηματισμένα με τον cDNA κλώνο του κυτόχρωματος-c (Cyt-c) τα οποία έχουν υποβληθεί σε καταπόνηση από αλατότητα έντασης 250mM με διάρκεια 3 και 24h. Οι τιμές είναι μέσος όρος 4 επαναλήψεων του πειράματος.

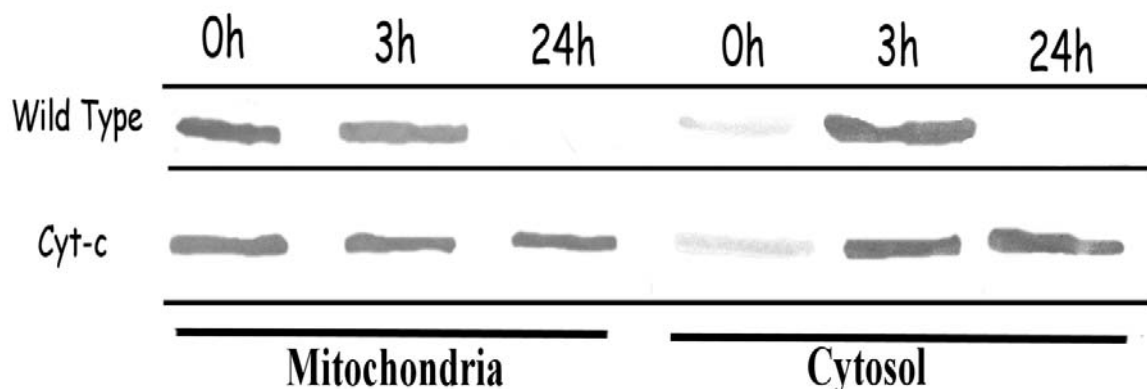
17). Στα φυτά μάρτυρες η διαφορά ανάμεσα στα αγρίου τύπου και μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα έφτασε μόλις το 16% της κατανάλωσης που μετρήθηκε για το αγρίου τύπου φυτό, αν και η διαφορά είναι μέσα στα όρια του στατιστικού λάθους. Αντίθετα στις 3h μετά την καταπόνηση η κατανάλωση οξυγόνου στα μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα βρέθηκε κατά 95% αυξημένη σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου φυτά. Τέλος 24h μετά την καταπόνηση δεν διαπιστώθηκαν ουσιαστικές διαφορές ανάμεσα στα αγρίου τύπου και μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα κατά τρόπο ανάλογο με τα αμεταχειρίστα φυτά. Τέλος σημαντική διαφορά ανάμεσα σε αγρίου τύπου και μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα παρατηρήθηκε και στον λόγο ATP/ADP (Εικόνα 18). Ενώ στα αγρίου τύπου φυτά ο λόγος μειώθηκε αναλογικά με την διάρκεια της καταπόνησης, στα μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα παρέμεινε στο επίπεδο των μαρτύρων φυτών καθ' όλη την διάρκεια της δοκιμής.



Εικόνα 18 Εκτίμηση λόγου ATP/ADP σε αγρίου τύπου φυτά καπνού (WT) και φυτά που υπερεκφράζουν το κυτοχρώμα-c (Cyt-c) τα οποία έχουν υποβληθεί σε καταπόνηση από αλατότητα έντασης 250mM με διάρκεια 3 και 24h. Οι τιμές είναι μέσος όρος 4 επαναλήψεων του πειράματος.

2.4.3 Η καταπόνηση από αλατότητα οδηγεί σε έξοδο του κυτοχρώματος-c τόσο σε αγρίου τύπου όσο και σε ΓΤ φυτά καπνού.

Η έξοδος του κυτοχρώματος-c διερευνήθηκε με ανοσοδιάγνωση σε απομονωμένα

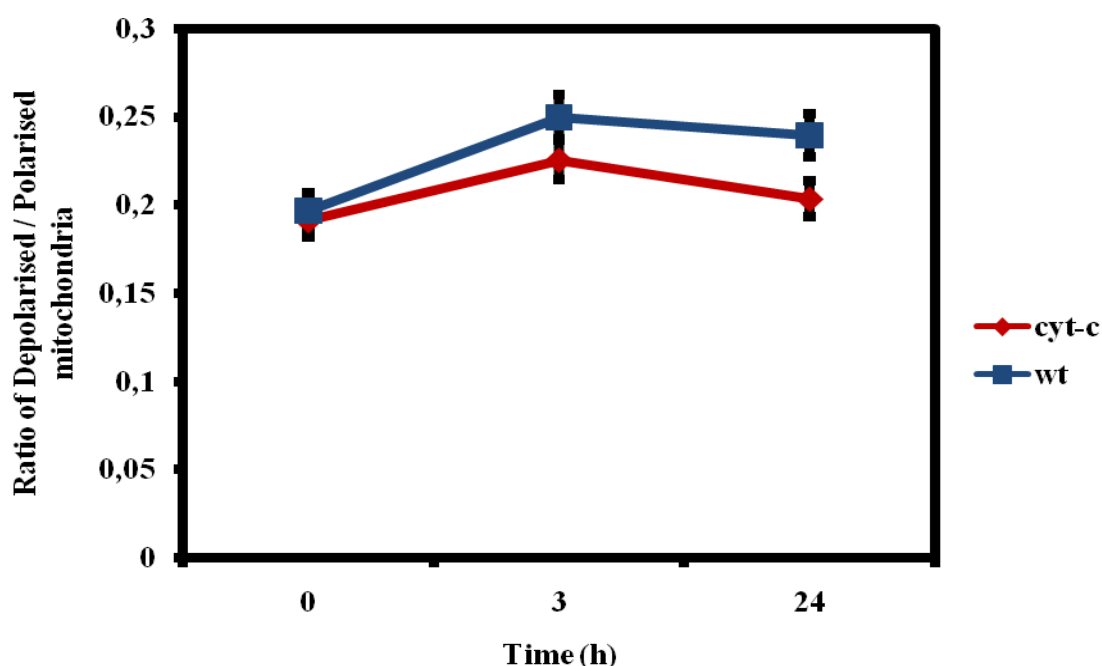


Εικόνα 19 Ανάλυση κατά Western της ανοσοενεργής πρωτεΐνης του κυτοχρώματος-c σε κυτοπλασμικά και μιτοχονδριακά κλάσματα που έχουν απομονωθεί από αγρίου τύπου φυτά καπνού (Wild Type) και φυτά που υπερεκφράζουν το κυτοχρώμα-c (Cyt-c) τα οποία έχουν υποβληθεί σε καταπόνηση από αλατότητα έντασης 250mM με διάρκεια 3 και 24h. Για την ανάλυση κατά western διαχωρίστηκαν 50μg πρωτεΐνης με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης.

μιτοχόνδρια από αγρίου τύπου και μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα καπνού. Η υπερέκφραση του κυτοχρώματος δεν προκάλεσε καμία αλλαγή στα φυτά μάρτυρες (Εικόνα 19), ενώ τόσο στα αγρίου τύπου, όσο και στα μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα παρατηρήθηκε έξοδος του κυτοχρώματος-c στο κυτταρόπλασμα 3h μετά την μεταχείριση. Αντιθέτως 24h μετά την μεταχείριση παρατηρήθηκαν ουσιαστικές διαφορές ανάμεσα στους 2 τύπους φυτών. Πιο συγκεκριμένα ενώ στα αγρίου τύπου φυτά η ανοσοενεργή πρωτεΐνη δεν ήταν ανιχνεύσιμη, στα μετασχηματισμένα φυτικά

κύτταρα, τόσο στα μιτοχονδριακά, όσο και σε κυτταροπλασματικά κλάσματα διαπιστώθηκε σταθερά υψηλή, στα επίπεδα των αμεταχειριστων φυτών.

Η απώλεια του μεμβρανικού δυναμικού του μιτοχονδρίου συνήθως προηγείται του ανοίγματος του μιτοχονδριακού πόρου και της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος-c. Παραπάνω έγινε φανερό πως η υπερέκφραση του κυτοχρώματος δεν προκάλεσε ουσιαστικές διαφορές στα χρονικά σημεία που διαπιστώθηκε έξοδος του στο κυτταρόπλασμα. Με βάση τα παραπάνω θεωρήθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί αν τα χρονικά σημεία στα οποία διαπιστώθηκε έξοδος του κυτοχρώματος, συνέπεσαν με την απώλεια του μεμβρανικού δυναμικού. Ανάλυση των φασμάτων εκπομπής του σημαντή JC-1 φανέρωσαν πως τόσο στα αγρίου τύπου όσο και στα μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα καπνού 3h μετά την καταπόνηση διαπιστώθηκε

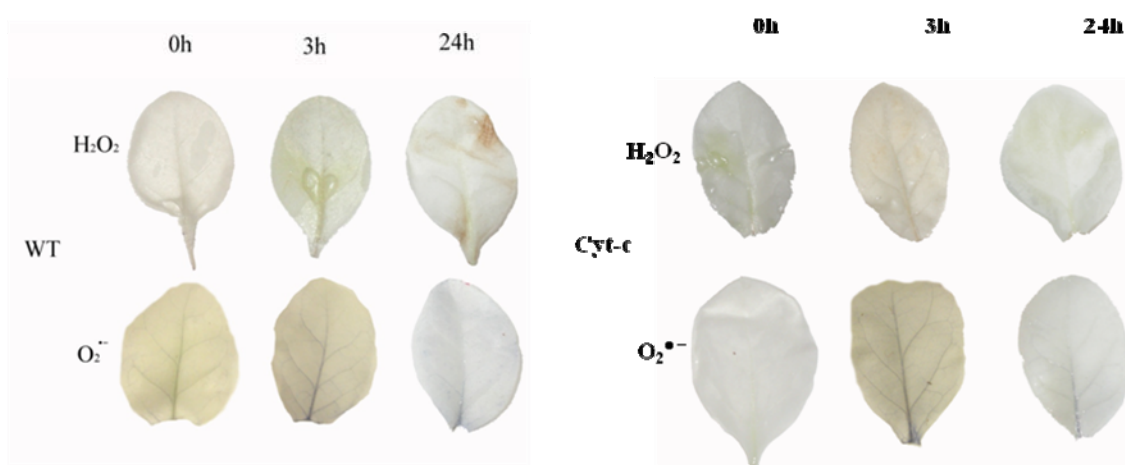


Εικόνα 20 Λόγος αποπολωμένων / πολωμένων μιτοχονδρίων. Ο λόγος έχει υπολογιστεί μέσω ανάλυσης των φασμάτων εκπομπής που λήφθηκαν από τον σημαντή JC-1 μετά την εφαρμογή του σε από αγρίου τύπου φυτά καπνού (WT) και φυτά που υπερεκφράζουν το κυτόχρωμα-c (Cyt-c) τα οποία έχουν υποβληθεί σε καταπόνηση από αλατότητα έντασης 250mM με διάρκεια 3 και 24h. Οι τιμές είναι μέσος όρος 4 επαναλήψεων του πειράματος.

αύξηση του λόγου αποπολωμένων/πολωμένων μιτοχονδρίων (Εικόνα 20). Σε διάστημα 24h μετά την καταπόνηση ωστόσο ο παραπάνω λόγος επανήλθε στα επίπεδα των φυτών μαρτύρων.

2.4.4 Η καταπόνηση από αλατότητα οδήγησε σε συσσώρευση των ΕΜΟ, ενεργοποίηση κασπασών και εκδήλωση ΠΚΘ σε αγρίου τύπου φυτά καπνού αλλά όχι σε μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα.

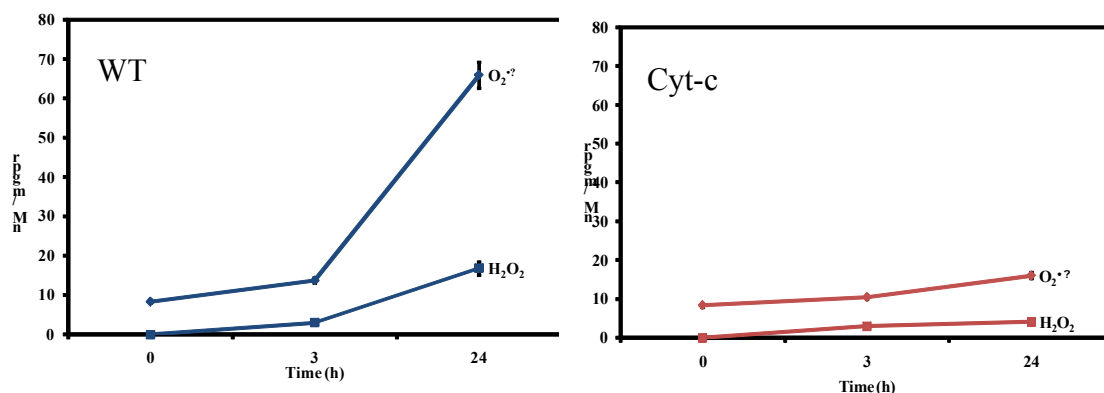
Η συσσώρευση των ΕΜΟ έχει συνδεθεί με διάφορες μορφές αβιοτικών καταπονήσεων. Προηγούμενα πειραματικά δεδομένα του Εργαστηρίου μας έχουν συνδέσει την καταπόνηση από αλατότητα με την οξειδωτική καταπόνηση, ενώ στο πρώτο κεφάλαιο περιγράφεται η συμβολή του μιτοχονδρίου στην αύξηση της συγκέντρωσης των ΕΜΟ κατά την αλατότητα. Με βάση τα παραπάνω διερευνήθηκε αν η καταπόνηση από αλατότητα έχει επίδραση στη μεταβολή της ομοιοστασίας των ΕΜΟ και την επαγόμενη από αλατότητα οξειδωτική καταπόνηση. Η ενδογενής συγκέντρωση των ΕΜΟ εκτιμήθηκε τόσο με τα πρωτόκολλα του *in situ* εντοπισμού $O_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 με NBT και DAB, αντίστοιχα όσο και με την μέθοδο χημειοφωταύγειας λουμινόλης για το H_2O_2 και λουσιγενίνης για το $O_2^{\bullet-}$. Ο *in situ* εντοπισμός φανέρωσε αύξηση της μπλε χρώσης στην νεύρωση του φύλλου χαρακτηριστικής της αντίδρασης του $O_2^{\bullet-}$ με το NBT, 3h μετά την καταπόνηση (Εικόνα 21). Η εντονότερη χρώση στην νεύρωση ενδεχομένως να οφείλεται και στο πρωτόκολλο της χρώσης, το οποίο υπαγορεύει την χρήση κενού για την απορρόφηση της χρώσης από το φύλλο. Το φαινόμενο εμφανίστηκε τόσο στα αγρίου τύπου όσο



Εικόνα 21 *In situ* εντοπισμός της παραγωγής $O_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 σε αγρίου τύπου φυτά καπνού (WT) και φυτά που υπερεκφράζουν το κυτόχρωμα-c (Cyt-c) τα οποία έχουν υποβληθεί σε καταπόνηση από αλατότητα έντασης 250mM με διάρκεια 3 και 24h

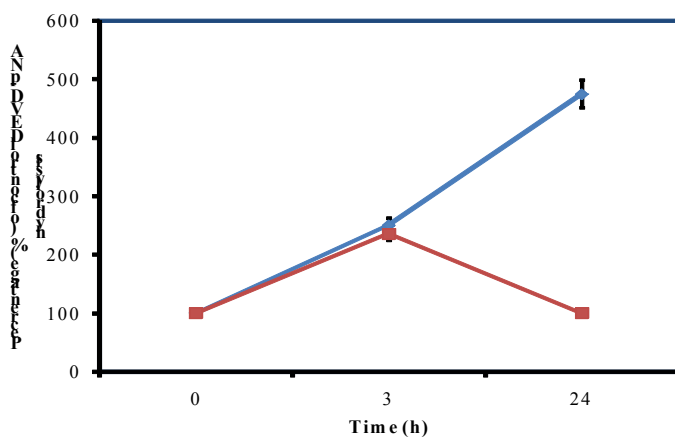
και στα μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα. Αντιθέτως 24h μετά την καταπόνηση η χαρακτηριστική χρώση εμφανίστηκε μόνο στα αγρίου τύπου φυτά, και ήταν διαχυμένη στο μεσόφυλλο. Σε αντίθεση το H_2O_2 εντοπίστηκε μόνο 24h μετά την

καταπόνηση και μόνο σε αγρίου τύπου φυτά καπνού. Η παραπάνω εικόνα επαληθεύτηκε και με το πρωτόκολλο χημειοφωταύγειας της λουμινόλης και λουσιγενίνης (Εικόνα 22).



Εικόνα 22 Εκτίμηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης EMO σε αγρίου τύπου φυτά καπνού (WT) και φυτά που υπερεκφράζουν το κυτόχρωμα-c (Cyt-c) τα οποία έχουν υποβληθεί σε καταπόνηση από αλατότητα έντασης 250mM με διάρκεια 3 και 24h. Οι τιμές είναι μέσος όρος 4 επαναλήψεων του πειράματος.

Κατά τις αβιοτικές καταπονήσεις οι EMO που παράγονται στο κυτταρόπλασμα και στο μιτοχόνδριο από την δυσλειτουργία της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων σηματοδοτούν την αποπόλωση του μιτοχονδρίου, άνοιγμα του μιτοχονδριακού πόρου, την απελευθέρωση αποπτωτικών παραγόντων στο κυτταρόπλασμα και το έναυσμα του ΠΚΘ μέσω της ενεργοποίησης πρωτεασών «εκτελεστών» όπως οι κασπάσες-3. Έχοντας παρατηρήσει ως τώρα αποπόλωση του μιτοχονδρίου, απελευθέρωση του κυτοχρώματος και συσσώρευση EMO ως λογική συνέχεια εκτιμήθηκε η ενεργότητα πρωτεασών τύπου κασπάσης-3 σε αγρίου τύπου και μετασηματισμένα φυτά καπνού. Τόσο τα φυτά αγρίου τύπου, όσο και τα μετασηματισμένα φυτικά κύτταρα έδειξαν επαγωγή της ενεργότητας κασπάσης-3 3h

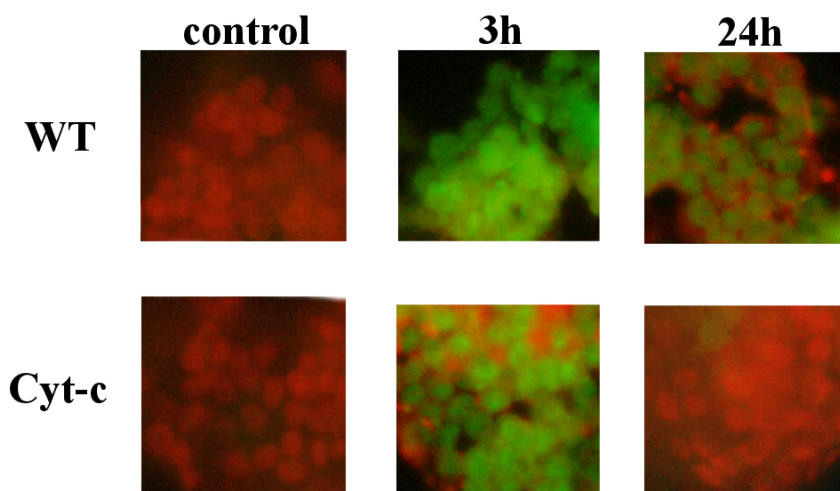


Εικόνα 23 Ενεργότητα πρωτεασών τύπου κασπάσης-3 σε αγρίου τύπου φυτά καπνού (WT) και φυτά που υπερεκφράζουν το κυτόχρωμα-c (Cyt-c) τα οποία έχουν υποβληθεί σε καταπόνηση από αλατότητα έντασης 250mM με διάρκεια 3 και 24h. Οι τιμές είναι μέσος όρος 4 επαναλήψεων του πειράματος.

μετά την μεταχείριση (Εικόνα 23). Αντιθέτως 24h μετά την μεταχείριση, ενώ στα

αγρίου τύπου φυτά η ενεργότητα κασπάσης-3 αυξήθηκε κατά 90% σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές στις 3h καταπόνησης, στα μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα έπεσε στο ίδιο επίπεδο με τα φυτά μάρτυρες.

Στην προηγούμενη ενότητα διαπιστώθηκε πως είναι δυνατόν να έχουμε ενεργότητα κασπάσης-3 χωρίς όμως αυτή να συνεπάγεται εκδήλωση ΠΚΘ. Για τον λόγο αυτό κρίθηκε απαραίτητο η εκδήλωση του ΠΚΘ να δειχθεί και με την ανίχνευση καταταμημένου πυρηνικού DNA με την μέθοδο TUNEL. Η μέθοδος TUNEL περιλαμβάνει την ενσωμάτωση dUTPs, συνδεδεμένων με ένα φθορίζον μόριο σε σημεία του DNA όπου έχουν γίνει «τομές». Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η όραση του κατακεραματισμένου πυρηνικού DNA σε κύτταρα με την χρήση φθορίζουσας μικροσκοπίας. Η δοκιμή φανέρωσε «θετικούς» ως προς την ύπαρξη καταταμημένου DNA πυρήνες τόσο σε αγρίου τύπου, όσο και σε μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα 3h μετά την καταπόνηση (Εικόνα 24).



Εικόνα 24 Ανίχνευση καταταμημένου DNA με την μέθοδο TUNEL σε αγρίου τύπου φυτά καπνού (WT) και φυτά που υπερεκφράζουν το κυτόχρωμα-c (Cyt-c) τα οποία έχουν υποβληθεί σε καταπόνηση από αλατότητα έντασης 250mM με διάρκεια 3 και 24h.

2.5 Συζήτηση

Το κυτόχρωμα-c είναι μια αναπνευστική πρωτεΐνη η οποία εντοπίζεται στην επιφάνεια της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, με προσανατολισμό προς τον διαμεμβρανικό χώρο και είναι απαραίτητο για την μεταφορά ηλεκτρονίων από το σύμπλοκο III στο σύμπλοκο IV της αναπνευστικής αλυσίδας (Sherman and Stewart, 1971), η οποία κωδικοποιείται από ένα πυρηνικό γονίδιο. Η ανακάλυψη ότι

εμπλέκεται και στην επαγωγή του μονοπατιού του ΠΚΘ οδήγησε στην αναθεώρηση του φυσιολογικού ρόλου του κυτοχρώματος c (Skulachev, 1998). Η έξοδος του στο κυτταρόπλασμα αποδείχθηκε απαραίτητη για την επαγωγή του μονοπατιού του ΠΚΘ σε πολλά κυτταρικά συστήματα (Liu et al., 1996; Kluck et al., 1997), ενώ επακόλουθη μελέτη μηχανισμών αντιοξειδωτικής απόκρισης φανέρωσε πρόσθετες αντιοξειδωτικές ιδιότητες του κυτοχρώματος-c (Skulachev, 1998; Korshunov et al., 1999). Στην προηγούμενη ενότητα δείξαμε ότι η καταπόνηση από αλατότητα οδηγεί στην συσσώρευση των ΕΜΟ, μείωση του λόγου ATP/ADP, έξοδο του κυτοχρώματος-c στο κυτταρόπλασμα, δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας, ενεργοποίηση πρωτεασών τύπου κασπάσης-3 και επαγωγή του ΠΚΘ. Από τα παραπάνω γίνεται φανερός ο ενεργός ρόλος του κυτοχρώματος-c κατά την καταπόνηση από αλατότητα. Σε μια προσπάθεια να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος του κυτοχρώματος-c κατά την καταπόνηση από αλατότητα, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός κυττάρων από το μεσόφυλλο φυτών καπνού, *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana, με τον cDNA κλώνο του *Cyt-c*, χρησιμοποιώντας την μέθοδο της παροδικής έκφρασης Αγροβακτηρίου. Η υπερέκφραση του *Cyt-c* και γενικότερα των συστατικών της αναπνευστικής αλυσίδας είναι μια καινοτόμα ιδέα όσον αφορά τον τομέα των φυτών η οποία στο παρελθόν έχει πραγματοποιηθεί μόνο στο ρύζι, *Oryza sativa*, και στα πλαίσια της διερεύνησης του υποκινητή του γονιδίου (Jang et al., 2002). Στα φυτά τα οποία υπερέκφραζαν το *Cyt-c* δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή στην αναπνευστική ικανότητα, τόσο στα φυτά μάρτυρες, όσο και σε φυτά τα οποία είχαν υποβληθεί σε καταπόνηση αλατότητας, 24h μετά την μεταχείριση (Εικόνα 17). Αντιθέτως 3h μετά την μεταχείριση τα μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα καταναλώνουν οξυγόνο με ρυθμό που προσεγγίζει το 2άσιο του αντίστοιχου ρυθμού για τα αγρίου τύπου φυτά, αν και σημαντικά χαμηλότερο από τις αντίστοιχες τιμές για τα φυτά μάρτυρες.

Λαμβάνοντας υπόψη πως το κυτόχρωμα-c είναι μόνο ένα από τα «συστατικά» της αναπνευστικής αλυσίδας, είναι αναμενόμενο η αύξηση της ανοσοενεργής πρωτεΐνης να μην επιφέρει «θεαματικές» αλλαγές στην ολική αναπνευστική ικανότητα, καθώς αυτή εξαρτάται από την συνολική ικανότητα και των συμπλόκων που απαρτίζουν την αναπνευστική αλυσίδα. Κατά τρόπο ανάλογο η υπερέκφραση της οξειδάσης του κυτοχρώματος (COX, σύμπλοκο IV της αναπνευστικής αλυσίδας) σε κύτταρα HeLa ενώ δεν οδήγησε σε σημαντική διαφορά της κατανάλωσης οξυγόνου

σε φυσιολογικές συνθήκες, οδήγησε σε σημαντικές διαφορές παρουσία παραγόντων, που διαταράσσουν την ροή ηλεκτρονίων (Li Campian et al., 2007). Ομοίως υπερέκφραση της αφυδρογονάσης του NADH (NADH dehydrogenase, σύμπλοκο I) στο θετικό κατά gram βακτήριο *Corynebacterium glutamicum* οδήγησε σε μικρές αλλαγές στην αναπνευστική ικανότητα του βακτηρίου (Nantapong et al., 2004). Οι συγγραφείς σχολιάζοντας τα σχετικά ερευνητικά αποτελέσματα αναφέρουν πως αν και η ενεργότητα του ενζύμου αυξήθηκε σημαντικά, δεν υπήρχε ανάλογη μεταβολή στα κυτοχρωμικά «συστατικά» της αλυσίδας. Επίσης η αναπνευστική ικανότητα του φυτού πέρα από την ικανότητα της μεταφοράς των ηλεκτρονίων, βασίζεται και στην σταθερή «παροχή» μεταβολιτών όπως το ηλεκτρικό οξύ και η γλυκόζη ώστε να υπάρχει η απαραίτητη ροή ηλεκτρονίων κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσίδας.

Στα μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα έγινε και εκτίμηση φυσιολογικών παραμέτρων όπως τα επίπεδα της ανοσοενεργής πρωτεΐνης του κυτοχρώματος-c και της εναλλακτικής οξειδάσης, ο λόγος ATP/ADP καθώς και η συγκέντρωση των παραγόμενων EMO. Στα φυτά μάρτυρες τα επίπεδα της ανοσοενεργής πρωτεΐνης ήταν ελάχιστα αυξημένα, περίπου 10% παραπάνω από τις αντίστοιχες τιμές που μετρήθηκαν στα αγρίου τύπου φυτά. Αντιθέτως κατά την καταπόνηση από αλατότητα, ενώ στα αγρίου τύπου φυτά ανάλυση κατά Western φάνερωσε πως η ανοσοενεργή πρωτεΐνη μειώθηκε σημαντικά τόσο στις 3h μετά την μεταχείριση όσο και στις 24h, στα ΓΤ η ανοσοενεργή πρωτεΐνη του κυτοχρώματος παρέμεινε σε σταθερά υψηλά επίπεδα. Επίσης σε υψηλά επίπεδα παρέμεινε τόσο η ανοσοενεργή πρωτεΐνη της εναλλακτικής οξειδάσης (Εικόνα 16), όσο και ο λόγος ATP/ADP (Εικόνα 18). Η εναλλακτική οξειδάση ενεργοποιείται κατά την δυσλειτουργία του κυτοχρωμικού μονοπατιού αποτρέποντας την συσσώρευση των EMO. Αντιοξειδωτικές ιδιότητες διαθέτει και το κυτόχρωμα-c ενεργώντας τόσο ως αποσβέστης του H_2O_2 όσο και του $O_2^{\cdot-}$. Βάση των παραπάνω η αυξημένη ανοσοενεργή πρωτεΐνη τόσο της εναλλακτικής οξειδάσης όσο και του κυτοχρώματος-c αναμένεται να οδηγήσει σε μειωμένη συγκέντρωση των EMO. Σε συμφωνία με τα παραπάνω η συγκέντρωση του H_2O_2 και του $O_2^{\cdot-}$ βρέθηκαν χαμηλές σε μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα με το cDNA του κυτοχρώματος-c τα οποία είχαν υποβληθεί σε καταπόνηση αλατότητας σε αντίθεση με τα αγρίου τύπου φυτά. Πέραν από τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του κυτοχρώματος-c και της AOX, και η αυξημένη απόδοση της αναπνευστικής αλυσίδας μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη παραγωγή

EMO. Οι Li Campian et al., (2007) παρατήρησαν πως σε κύτταρα HeLa τα οποία υπερέκφραζαν την οξειδάση του κυτοχρώματος, η συγκέντρωση των EMO σε περιβάλλον υπεροξίας ήταν σαφώς μειωμένη σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές για τα αγρίου τύπου κύτταρα. Η μείωση αυτή αποδόθηκε στην μειωμένη «παρουσία» αναγμένων ενδιάμεσων «συστατικών» της αναπνευστικής αλυσίδας όπως η ουμπικινόνη, που με την σειρά του αποδόθηκε στην αυξημένη δυνατότητα απόσβεσης ηλεκτρονίων της αναπνευστικής αλυσίδας. Το ίδιο θεωρούμε πως έγινε και κατά την υπερέκφραση του κυτοχρώματος-c στα φυτά καπνού. Η ενεργή παρουσία του στα μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα, σε αντίθεση με τα αγρίου τύπου φυτά, αφενός έχει ως αποτέλεσμα την απόσβεση των παραγόμενων EMO, αφετέρου συμβάλλει στην αποτροπή της παραγωγής τους. Η βελτιωμένη εικόνα του φυτού είναι φανερή τόσο στον αυξημένο λόγο ATP/ADP, όσο και στην δυνατότητα διατήρησης μηχανισμών άμυνας, όπως η AOX.

Στην προηγούμενη ενότητα παρατηρήθηκε πως η καταπόνηση από αλατότητα οδήγησε στο άνοιγμα του μιτοχονδριακού πόρου και την έξοδο του κυτοχρώματος στο κυτταρόπλασμα. Ένα από τα πιθανά σενάρια κατά την υπερέκφραση του κυτοχρώματος-c είναι και η επαγωγή του ΠΚΘ, από το απελευθερωμένο στο κυτταρόπλασμα κυτόχρωμα. Η υπερέκφραση του κυτοχρώματος-c σε κύτταρα θηλαστικών οδήγησε στην εκδήλωση απόπτωσης πολύ συντομότερα από ότι στα μη μετασχηματισμένα κύτταρα (Okazaki et al., 1998). Το φαινόμενο αποδόθηκε στην αδυναμία της αναπνευστικής αλυσίδας να απορροφήσει το πλεόνασμα του κυτοχρώματος και την επακόλουθη απελευθέρωση στο κυτταρόπλασμα και επαγωγή του ΠΚΘ. Στα μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα μάρτυρες δεν παρατηρήθηκε ούτε πρόωρη έξοδος του κυτοχρώματος (Εικόνα 19) σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου φυτά, αλλά ούτε και επαγωγή του ΠΚΘ (Εικόνες 23, 24). Αντιθέτως 3h μετά την μεταχείριση παρατηρήθηκε κατάρρευση του διαμεμβρανικού μιτοχονδριακού δυναμικού (Εικόνα 20), έξοδος του κυτοχρώματος και εκδήλωση ΠΚΘ. Επομένως η υπερέκφραση του κυτοχρώματος-c αν και απέτρεψε την συσσώρευση των EMO δεν εμπόδισε την απελευθέρωσή του στο κυτταρόπλασμα. Το παράδοξο ωστόσο είναι ότι παρά την έξοδο του κυτοχρώματος-c η ανοσοενεργή πρωτεΐνη στα μιτοχονδριακά κλάσματα παρέμεινε σταθερά υψηλή καθ' όλη την διάρκεια της μεταχείρισης, γεγονός που αιτιολογεί και τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των ΓΤ φυτών.

Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την μεταχείριση παρατηρήθηκε μειωμένη πρωτεολυτική δραστηριότητα πρωτεασών τύπου κασπάσης-3 σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές 3h μετά την μεταχείριση, ενώ οι πυρήνες που εμφάνισαν κατακερματισμένο DNA ήταν επίσης σημαντικά λιγότεροι, παρά την παρουσία του κυτοχρώματος-c στο κυτταρόπλασμα. Στα περισσότερα συστήματα η παρουσία του κυτοχρώματος-c στο κυτταρόπλασμα είναι συνυφασμένη με την επαγωγή των κασπασών και του ΠΚΘ. Παρόλα αυτά οι Mishra and Delivoria-Papadopoulos, (2004) περιγράφουν ένα μηχανισμό παρεμπόδισης της ενεργοποίησης των κασπασών και του κυτταρικού θανάτου, παρά την παρουσία του κυτοχρώματος-c στο κυτταρόπλασμα στον φλοιό του εγκεφάλου από νεογέννητους χοίρους. Πιο συγκεκριμένα αναφέρουν πως υψηλές συγκεντρώσεις κυτοχρώματος-c και ATP είναι δυνατόν να παρεμποδίσουν την ενεργοποίηση των κασπασών και την επαγωγή του ΠΚΘ. Αντίστοιχα οι Samali et al., (2007) αναφέρουν την παρεμπόδιση της απόπτωσης σε κύτταρα καρδιάς τα οποία έχουν υψηλά επίπεδα ATP. Μάλιστα προτείνουν πως η μείωση του ATP είναι ένα προαποπτωτικό γεγονός, που συμβάλλει στην εκδήλωση του κυτταρικού θανάτου. Ενδεχομένως η αδυναμία να ανιχνευθούν πυρήνες θετικοί ως προς τον ΠΚΘ στα υπό καταπόνηση μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα καπνού να οφείλεται στους ίδιους παράγοντες. Στα μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα τόσο ο λόγος ATP/ADP όσο και η ανοσοενεργή πρωτεΐνη του κυτοχρώματος παραμένουν σε υψηλά επίπεδα παρά την επίδραση της καταπόνησης. Αντίστοιχα αν και επιβεβαιώνεται η έξοδος του κυτοχρώματος τόσο η ενεργότητα πρωτεασών τύπου κασπάσης-3 όσο και το κατακερματισμένο DNA στους πυρήνες των κυττάρων δεν ανιχνεύονται.

Ανακεφαλαιώνοντας, ο cDNA κλώνος του κυτοχρώματος-c υπό τον έλεγχο του υποκινητή 35S χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό κυττάρων μεσόφυλλου από φυτά καπνού με την μέθοδο της παροδικής έκφρασης. Ο μετασχηματισμός δεν παρεμπόδισε την έξοδο του κυτοχρώματος στο κυτταρόπλασμα, ενώ τα μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα ανταποκρίθηκαν καλύτερα στην καταπόνηση από αλατότητα από τα αγρίου τύπου φυτά. Τέλος 24h μετά την μεταχείριση παρά την «παρουσία» του κυτοχρώματος στο κυτταρόπλασμα, παρεμποδίστηκε η ενεργότητα πρωτεασών τύπου κασπάσης-3 και η επαγωγή του ΠΚΘ παρεμποδίστηκαν πιθανώς από την υψηλή συγκέντρωση ATP και την ανοσοενεργή πρωτεΐνη του κυτοχρώματος-c.

Κεφάλαιο 3

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΑΜΙΝΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΣΕ ΦΥΤΑ *Arabidopsis thaliana*

3.1 Περίληψη

Οι πολυαμίνες καθώς και τα προϊόντα οξειδωσής τους έχουν δειχθεί ως ρυθμιστές αποκρίσεων σε καταπονήσεις στα φυτά. Τελευταία ερευνητικά δεδομένα του Εργαστηρίου μας έχουν δείξει την συμβολή των πολυαμινών και των υπεύθυνων για την οξειδωσή τους ενζύμων στην επαγωγή αποκρίσεων στην αλατότητα και του μονοπατιού του ΠΚΘ, ενώ στις ίδιες διεργασίες ενεργό ρόλο παίζει και το μιτοχόνδριο (Κεφ.1 – Κεφ.2). Σε αυτό το πακέτο εργασίας έγινε προσπάθεια διερεύνησης των μηχανισμών αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις πολυαμίνες και το μιτοχόνδριο. Ως εργαλεία χρησιμοποιήθηκαν φυτά *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia καθώς και ΓΤ φυτά τα οποία υπερεκφράζουν το γονίδιο *AtPAO3*, και μετάλλαγμα με έλλειψη του γονιδίου *PAO3*. Τα φυτά υποβλήθηκαν σε καταπόνηση από αλατότητα και διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση πολυαμινών και μιτοχονδρίου τόσο σε φυτά υπό καταπόνηση όσο και σε φυτά μάρτυρες. Οι δοκιμές ανάδειξαν τον ρόλο της σπερμιδίνης στην επαγωγή της παραγωγής $O_2^{\bullet-}$ από το σύμπλοκο της NADPH-οξειδάσης. Το παραγόμενο $O_2^{\bullet-}$, καθώς και το H_2O_2 που παράγεται από την δράση της SOD οδηγούν σε αύξηση της αναπνευστικής ικανότητας των φυτών με απώτερο σκοπό την απόσβεση των ΕΜΟ.

3.2 Εισαγωγή

Η ανακάλυψη της πρώτης πολυαμίνης (PA), τη σπερμίνης (Spermine; Spm) (Ladenburg and Abel, 1888) πραγματοποιήθηκε το 1678 (Leeuwenhoek, 1678), ενώ το όνομα σπερμιδίνη (Spermidine; Spd) δόθηκε σε μία PA, που απομονώθηκε αργότερα από το πάγκρεας του βοδιού (Dudley et al., 1927). Δύο άλλες PAs που απαντώνται στη φύση, η πουτρεσίνη (Putrescine; Put) και η καδαβερίνη (Cadaverine; Cad) είναι προϊόντα της αποδόμησης των βακτηρίων με χαρακτηριστική οσμή (Brieger, 1885). Οι δυο τους συνεισφέρουν στη χαρακτηριστική οσμή, που αναδύεται από τα πτώματα (Cadaver). Η δομή των μορίων έγινε γνωστή, όπως και της Spd, μετά από σύγκριση με τα ήδη χημικά συντιθέμενα μόρια (Ladenburg, 1886; Udransky and Baumann, 1888)

Οι PAs διακρίνονται σε συνήθεις (usual) και ασυνήθεις (unusual). Στις συνήθεις PAs κατατάσσονται η διαμίνη Put ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$; 1,4-διαμινο-βουτάνιο), η τριαμίνη Spd ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$; N-(3-αμινοπροπυλ)-1,4-διαμινο-βουτάνιο) και η τετραμίνη Spm ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$; N,N'-δι-(3-αμινοπροπυλ)-1,4-διαμινο-βουτάνιο), οι οποίες απαντούν σε αφθονία στα κύτταρα, όπου πολλές φορές οι συγκεντρώσεις τους φτάνουν σε επίπεδα mM. Τα μέλη και των δύο κατηγοριών είναι μικρού μοριακού βάρους πολυκατιόντα, τα οποία συναντώνται σε όλους τους οργανισμούς, προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς (Cohen, 1998). Εξ αιτίας της πολυκατιοντικής φύσης τους σε φυσιολογικό pH, είναι δυνατή η πρόσδεσή τους σε αρνητικά φορτισμένα μόρια, όπως φωσφολιπίδια, νουκλεϊκά οξέα και συγκεκριμένες πρωτεΐνες, με σκοπό τη σταθεροποίηση των μακρομοριακών αυτών δομών, ενώ η πρόσδεσή τους σε κάποιες περιπτώσεις είναι αντιστρεπτή (Bachrach, 2005; Narayana et al., 2006). Επίσης, εκτός των ιοντικών αλληλεπιδράσεων λόγω φορτίου, οι PAs παρουσιάζουν και στερεοχημική συγγένεια με διάφορα βιομόρια (Shen et al., 2003; Umekage and Ueda, 2006). Οι PAs απαντούν σε ελεύθερες μορφές (soluble; S-PAs), ως συζευγμένες με μόρια μικρού μοριακού βάρους (soluble hydrolyzed; SH-PAs), καθώς και ως συζευγμένες με μόρια μεγάλου μοριακού βάρους, όπως πρωτεΐνες, λιγνίνη και ημικυτταρίνες (pellet hydrolyzed; PH-PAs).

Η βιοσύνθεση της Put, η οποία αποτελεί το πρόδρομο μόριο βιοσύνθεσης των ανωτέρων PAs (Spd και Spm), πραγματοποιείται από την ορνιθίνη ή/και από την αργινίνη με τη δράση των ενζύμων αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης (ornithine

decarboxylase, ODC, E.C. 4.1.1.17) και αποκαρβοξυλάση της αργινίνης (arginine decarboxylase, ADC, E.C. 4.1.1.19). Η Spd και η Spm συνθέτονται με διαδοχικές προσθήκες ομάδων αμινοπροπυλίου, το οποίο προέρχεται από την αποκαρβοξυλιωμένη dcSAM. Όπως προαναφέρθηκε, η σύνθεση της Spd και της Spm καταλύεται από τα ένζυμα συνθάση της σπερμιδίνης (spermidine synthase, SPDS, E.C. 2.5.1.16) και συνθάση της σπερμίνης (spermine synthase, SPMS, E.C. 2.5.1.22). Οι τρεις αποκαρβοξυλάσες, ADC, ODC και SAMDC, έχουν μία κοινή ιδιότητα, το μικρό χρόνο ημιζωής τους (~1 h) (Cohen, 1998), υποδηλώνοντας ότι η όλη πορεία είναι αυστηρά ρυθμιζόμενη.

Ένας από τους τρόπους ρύθμισης των ενδοκυτταρικών επιπέδων των PAs είναι ο καταβολισμός τους. Οι PAs καταβολίζονται μέσω της δράσης της οικογένειας των ενζύμων των οξειδασών των αμινών (amine oxidases, AOs, E.C. 1.4.3.4 και E.C. 1.4.3.4). Οι AOs περιλαμβάνουν κυρίως τις Cu-οξειδάσες (CuAO ή Diamine oxidases; DAOs, EC 1.4.3.6), που οξειδώνουν τις διαμίνες Put και Cad στις κυρίως αμινικές ομάδες και τις πολυαμινικές οξειδάσες οι οποίες περιέχουν την φλαβίνη FAD (Polyamine oxidases; PAOs, EC 1.5.3.11) και οξειδώνουν τις ανώτερες PAs στις δευτερεύουσες αμινικές ομάδες, παράγοντας διαφορετικά προϊόντα αναλόγως με το *taxon* (Bolkenius and Seiler, 1981; Federico and Angelini, 1991).

Στα φυτά, οι PAO εντοπίζονται στον αποπλάστη ή σε υποκυτταρικά οργανίδια/διαμερίσματα, όπως τα περοξεισώματα και το κυτταρόπλασμα. Οι αποπλάσματικές PAO συνδέονται με τα πρωτογενή και δευτερογενή κυτταρικά τοιχώματα, που είναι πλούσια σε μεγαλομοριακούς υδατάνθρακες, όπως η λιγνίνη, σουβερίνη κ.ά. και βρίσκονται κυρίως στο ξύλωμα, στο ξυλικό παρέγχυμα, στην ενδοδερμίδα και στην επιδερμίδα, καθώς και στο φλοιώδες παρέγχυμα κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων αναπτυξιακών διαδικασιών (Federico and Angelini, 1991; Slocum and Furey, 1991; Liu et al., 1995; Laurenzi et al., 2001; Paschalidis and Roubelakis-Angelakis, 2005b). Ο ρόλος των ενζύμων αυτών εξωκυτταρικά εκ πρώτης όψεως δεν είναι κατανοητός. Είναι πολύ πιθανόν να γίνεται ελεγχόμενη μεταφορά PAs στον αποπλάστη, κάτω από συγκεκριμένες φυσιολογικές καταστάσεις ή υπό συνθήκες καταπόνησης. Γενικά, δεν είναι γνωστά για την μεταφορά των φυτικών διαμινών και PAs ή για τον υποκυτταρικό τους εντοπισμό και τους ρόλους τους στο εξωκυτταρικό περιβάλλον.

Οι PAOs είναι ένζυμα που καταλύουν την οξειδωτική απαμίνωση των PAs που περιέχουν πάνω από μία αμινικές ομάδες, περιέχουν FAD στο ενεργό τους κέντρο συνδεδεμένο με μη ομοιοπολικούς δεσμούς και χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα αποκλειστικά N¹-ακετυλιωμένες (N¹-acetylated) PAs στα θηλαστικά (Bolkenius and Seiler, 1981), ενώ στα φυτικά κύτταρα δεν παρουσιάζουν τόση εξειδίκευση. Εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στα μονοκοτυλήδονα φυτά, ενώ μπορούν να διαχωριστούν αδρά σε τρεις ομάδες: (1) αυτές που πραγματοποιούν τον τελικό καταβολισμό των PAs, (2) αυτές που εμπλέκονται στην αλληλομετατροπή των PAs της Spd/Put (back-conversion), και (3) αυτές που περιέχουν μια δομικά αυτοτελή περιοχή PAO αλλά δεν απαμινώνουν PAs. Στα σπονδυλωτά, οι PAOs μετατρέπουν τα N¹-ακετυλ παράγωγα της Spd και Spm σε Put και Spd, αντίστοιχα και επιπλέον παράγουν 3-ακεταμιδοπροπανάλη και H₂O₂, συμμετέχοντας με αυτό τον τρόπο στην αλληλομετατροπή των PAs (Tabor and Tabor, 1984; Seiler, 1995; Cohen, 1998). Η PAO από τον αραβόσιτο (MPAO) είναι η πλέον μελετημένη πρωτεΐνη της οικογένειας των AOs (Cervelli et al., 2000). Είναι μία μονομερής γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 53 kD και περιέχει ένα μόριο FAD (Kim et al., 1987; Tavliadoraki et al., 1998). Τα προϊόντα οξείδωσης είναι τα 4-αμινοβουτανάλη και N-(3-αμινοπρόπυλ)-4-αμινοβουτανάλη, από Spd και Spm, αντίστοιχα, ενώ παράλληλα παράγονται DAP και H₂O₂ (Cona et al., 2006).

Η παραγωγή του H₂O₂ μέσω της οξείδωσης των PAs έχει συσχετιστεί με την οξειδωτική έκρηξη, τον κυτταρικό θάνατο, τη λιγνιτοποίηση και την πορεία σουβερίνωσης, η οποία παρουσιάζεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και σε αμυντικές αποκρίσεις (Allan and Fluhr, 1997; Møller and McPherson, 1998; Rea et al., 1998).

Η κατηγορία των ενζύμων αυτών φαίνεται να απουσιάζει πλήρως από τα ζωικά κύτταρα. Όπως και η DAO, η PAO απαντά σε αφθονία σε γηραιούς ιστούς στους οποίους παρατηρείται αυξημένος κυτταρικός θάνατος (Paschalidis and Roubelakis-Angelakis, 2005b), συσχετίζοντας άμεσα την εμφάνιση του ΠΚΘ, με χαμηλά επίπεδα των PAs, τα οποία παρατηρούνται σε γηραιούς ιστούς λόγω της αυξημένης ενεργότητας των οξειδασών.

Η δεύτερη κατηγορία αφορά κυρίως ένζυμα ζωικής προέλευσης και περιλαμβάνει τις PAOs που εντοπίζονται στα περοξεισώματα και παράγουν από διακετυλιωμένη Spm διαδοχικά, AcSpd και AcPut, μαζί με 3-ακετυλάμινο-1-

προπανάλη (3-acetylamino-1-propanal) και H_2O_2 (Beard et al., 1985; Wu et al., 2003). Επί πλέον, η οξειδάση της Spm (spermine oxidase; SMO, EC 1.5.3.3), μια FAD-εξαρτώμενη αμινική οξειδάση καταλύει τη μετατροπή της Spm σε Spd με ταυτόχρονη παραγωγή 3-αμινο-1-προπανάλης και H_2O_2 .

Οι PAs συχνά συσσωρεύονται ως απόκριση τόσο στις αβιοτικές όσο και στις βιοτικές καταπονήσεις (Bouchereau et al., 1999; Urano et al., 2003; Alcazar et al., 2005). Η συμμετοχή των PAOs και DAOs στις καταπονήσεις των φυτών, υποστηρίζεται συνεχώς από νέα πειραματικά δεδομένα (Rea et al., 1998; Yoda et al., 2003; Paschalidis and Roubelakis-Angelakis, 2005b; Cona et al., 2006). Δεδομένου του εξωκυτταρικού εντοπισμού των ενζύμων αυτών και της παραγωγής H_2O_2 , μπορεί να δρουν μαζί με τις περοξειδάσες για την ένωση πρωτεϊνών και την εναπόθεση λιγνίνης στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης. Επίσης, το παραγόμενο H_2O_2 , συνδέεται με την οξειδωτική καταπόνηση και τον PCD κατά τη διάρκεια της οντογένεσης και ως αντίδραση σε βιοτική και αβιοτική καταπόνηση (Allan and Fluhr, 1997; Møller and McPherson, 1998; Yoda et al., 2003).

Φυτά που υπερεκφράζουν γονίδια βιοσύνθεσης των PAs δείχνουν ανθεκτικότητα σε αβιοτικές καταπονήσεις (Capell et al., 1998; Kasukabe et al., 2004). Αντίθετα, απώλεια λειτουργίας κάποιου από αυτά τα γονίδια, ή μείωση των επιπέδων των PAs προκαλεί μείωση της ανθεκτικότητας (Urano et al., 2005; Yamaguchi et al., 2006; Kusano et al., 2007).

Η οξείδωση των PAs είναι το βασικό μονοπάτι με το οποίο οι PAs καταβολίζονται. Στα θηλαστικά, ειδικά η οξείδωση των PAs πραγματοποιείται από πολλαπλές ενζυματικές ενεργότητες. Τα ένζυμα αυτά εντοπίζονται κυρίως στα περοξεισώματα και μετατρέπουν τη Spm σε Put, διαμέσου της Spd παράγοντας H_2O_2 (Schrader and Fahimi, 2004). Τα καλύτερα υποστρώματα για την αλληλομετατροπή των PAs (δηλ. τη μετατροπή της Spm σε Put), είναι τα ακετυλιωμένα παράγωγα των συνήθων PAs Spd και Spm (Schrader and Fahimi, 2004). Σε αντίθεση, στα φυτά, η οξείδωση των PAs ήταν γνωστό μέχρι τώρα ότι πραγματοποιείται κυρίως από τις αποπλασματικές PAOs, οξειδώνοντας τη Spm και Spd σε DAP και H_2O_2 , παράγοντας ταυτόχρονα και κάποια αλδεΐδη, όντας κατά αυτό τον τρόπο υπεύθυνες για τον τελικό καταβολισμό (terminal catabolism) των PAs (Rea et al., 2004; Cona et al., 2006).

Μόλις πρόσφατα ο καταβολισμός των PAs στα φυτά άρχισε να κερδίζει το ενδιαφέρον των ερευνητών, ως συνέπεια δύο κυρίως παραγόντων, της πλήρους ανάλυσης των μονοπατιών βιοσύνθεσης των PAs και της συσχέτισής του με τον PCD (Tiburcio et al., 1994; Yoda et al., 2003; Rea et al., 2004; Paschalidis and Roubelakis-Angelakis, 2005b; Moschou et al., 2008a; Moschou et al., 2008b). Μελέτη του γονιδιώματος του φυτού *Arabidopsis thaliana*, οδήγησε στην αναγνώριση 5 γονιδίων *AtPAOs*. Η βιοχημική ανάλυση έδωσε ένα απροσδόκητο αποτέλεσμα, το οποίο ήταν η μη ύπαρξη ανάμεσα στα ένζυμα αυτά κάποιου, που να καταλύει τον τελικό καταβολισμό των ανώτερων PAs. Όλες οι πρωτεΐνες, που χαρακτηρίστηκαν, εκτός από μία (*AtPAO5*), εμπλέκονταν στο μονοπάτι της αλληλομετατροπής των ανώτερων PAs. Συγκεκριμένα, τα ένζυμα *AtPAO1* και *AtPAO4* καταλύουν τη μετατροπή της Spm σε Spd, τα ένζυμα *AtPAO2* και *AtPAO3* καταλύουν τη μετατροπή της Spm σε Spd και της Spd σε Put, ενώ η *AtPAO5* δεν βρέθηκε να οξειδώνει κάποια από αυτές τις PAs. Οι *AtPAO2*, *AtPAO3*, *AtPAO4* εντοπίζονται στα περοξεισώματα επίσης, όντας το δεύτερο παράδειγμα PAOs στα φυτά που εντοπίζονται στα περοξεισώματα, ενώ η πρώτη ήταν η PAO της βρώμης (Cervelli et al., 2004). Το H₂O₂ που παράγεται από τη δράση των *AtPAOs* μπορεί να δρα ως δευτερογενές σήμα, που σηματοδοτεί τις δευτερογενείς αποκρίσεις υπό συνθήκες καταπονήσεων (Takahashi et al., 2004; Vacca et al., 2004; Sasaki-Sekimoto et al., 2005; Skopelitis et al., 2006).

Νωρίτερα (Κεφ. 1-2) περιγράφηκε η συμμετοχή του μιτοχονδρίου στην παραγωγή των EMO και την επαγωγή του ΠΚΘ κατά την απόκριση σε καταπόνηση από αλατότητα. Επίσης πρόσφατα πειραματικά δεδομένα έδειξαν πως οι αβιοτικές καταπονήσεις οδηγούν στην έξοδο της Spd στο αποπλάστη, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή H₂O₂ και την επαγωγή του ΠΚΘ (Moschou et al., 2008a). Δοκιμές με ΓΤ φυτά που υπερεκφράζουν τις PAO έδειξαν πως η οξείδωση της Spd στον αποπλάστη μεταβάλλει τα επίπεδα του H₂O₂ και αναλόγως επάγει αποκρίσεις ανθεκτικότητας στο μιτοχόνδριο, ή την επαγωγή του ΠΚΘ. Τα κοινά σημεία ανάμεσα στα 2 μονοπάτια, συσσώρευση των EMO και επαγωγή του ΠΚΘ, έφεραν στο προσκήνιο το ερώτημα αν οι PAs, μέσω της οξείδωσής τους ενεργοποιούν αποκρίσεις στο μιτοχόνδριο. Για να διερευνηθεί η αλληλεπίδραση ανάμεσα στις PAs και τους μηχανισμούς ομοιοστασίας τους, με τις μιτοχονδριακές αποκρίσεις κατά την καταπόνηση από αλατότητα, επιλέχθηκαν φυτά τα οποία υπερέκφραζαν το γονίδιο της *AtPAO3* και μετάλλαγμα στο οποίο δεν λειτουργεί το εν λόγω γονίδιο. Ο λόγος

για τον οποίο επιλέχθηκαν τα εν λόγω φυτά είναι γιατί η ΡΑΟ3 εντοπίζεται στα περοξεισώματα, οπότε θεωρήθηκε πως η αλληλεπίδραση ανάμεσα σε δυο υποκυτταρικά οργανίδια είναι πιο πιθανή, από την αλληλεπίδραση αποπλάστη και μιτοχονδρίου. Τα φυτά αυτά υποβλήθηκαν σε καταπόνηση αλατότητας και εκτιμήθηκαν παράμετροι όπως η αναπνευστική τους ικανότητα και η ανοσοενεργή πρωτεΐνη των συστατικών της αναπνευστικής αλυσίδας. Επίσης ελέγχθηκε η συγκέντρωση των ενδογενών ΡΑs ώστε να διαπιστωθεί αν οι ΡΑs, ή τα προϊόντα οξειδωσής τους προκαλούν μεταβολές στην αναπνευστική ικανότητα.

3.3 Υλικά και Μέθοδοι

3.3.1 Φυτικό Υλικό

Σπέρματα του *Arabidopsis thaliana* οικότυπου Columbia-0 αποστειρώθηκαν επιφανειακά με χρήση εμπορικού διαλύματος υποχλωριώδους νατρίου (NaOCl₄) και επιστρώθηκαν σε τριβλία που περιείχαν διάλυμα MS (Murashige and Skoog, 1962; Duchefa) το οποίο περιείχε 0,5% (w/v) σακχαρόζη σε θάλαμο σταθερών συνθηκών με συνθήκες ανάπτυξης 16/8 h φως/σκοτάδι, θερμοκρασία 25 ± 1°C και υγρασία 75%. Τα νεαρά σπορόφυτα μεταφέρθηκαν σε γλαστράκια με χώμα, διαμέτρου 8cm.

Για τις μεταχειρίσεις χρησιμοποιήθηκε πλεόνασμα διαλύματος αλατότητας 75mM στο γλαστράκι για χρονικό διάστημα 3 και 24h. Όλες οι εξωγενείς επιδράσεις έγιναν με εμβάπτιση ολόκληρου του φυτού σε υδατικό διάλυμα του παρεμποδιστή, ή της χημικής ουσίας της μεταχείρισης.

3.3.2 Ανίχνευση ενεργών μορφών οξυγόνου στον ιστό

Ο *in situ* εντοπισμός του H₂O₂ πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την ειδική για ανίχνευση H₂O₂ φθορίζουσα χρωστική 2,7- dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Molecular Probes, Eugene, OR). Συγκεκριμένα, φυτά 20 d επώαστηκαν σε 1 ml διάλυμα χρώσης [20 mM K-phosphate, pH 6.0, με 50 mM DCFH-DA and 3 mg ml⁻¹ horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich)] για 10 min στους 25°C σε σκοτάδι. Στη συνέχεια τα φυτά ξεπλύθηκαν στο ίδιο διάλυμα χωρίς τη χρωστική και παρατηρήθηκαν άμεσα σε μικροσκόπιο φθορισμού (Nikon Eclipse E800 1, Tokyo, Japan) με φίλτρο διέγερσης (excitation filter) EX 450-490 και φίλτρο εκπομπής (emission filter) BA 520 χρησιμοποιώντας ως σύστημα καταγραφής και απεικόνισης το SONY 655 SONY DXC-950P (Tokyo, Japan).

3.3.3 Ανίχνευση των κύριων ενεργών μορφών οξυγόνου στον ιστό

Η τεχνική περιγράφεται στο πρώτο κεφάλαιο.

3.3.4 Εκχύλιση πρωτεϊνών και ποσοτικοποίηση

Η τεχνική περιγράφεται στο πρώτο κεφάλαιο.

3.3.5 Ανάλυση των επιπέδων των AOX, και κυτοχρώματος-c κατά Western

Η τεχνική περιγράφεται στο πρώτο κεφάλαιο.

3.3.6 Απομόνωση μιτοχονδρίων

Η τεχνική περιγράφεται στο πρώτο κεφάλαιο.

3.3.7 Μετρήσεις αναπνοής με την μέθοδο της πολαρογραφίας

Η τεχνική περιγράφεται στο πρώτο κεφάλαιο.

3.3.8 Εκχύλιση και ποσοτικοποίηση των ενδογενών PAs

Οι ενδογενείς PAs αναλύθηκαν ποιοτικά και ποσοτικά σύμφωνα με τους Kotzabasis et al, (1993). Συνοπτικά, φυτικός ιστός γνωστού βάρους ομογενοποιήθηκε σε 1/5 (w/v) 5% (v/v) ψυχρό υπερχλωρικό οξύ (perchloric acid; PCA). Το ομογενοποίημα φυγοκεντρίθηκε (20000 g 30 min 4°C). Διακόσια µL από το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των S-PAs, 200 µL για την ποσοτικοποίηση των SH-PAs και 400 µL από το επαναδιαλυμένο ίζημα σε 1N NaOH (τελική συγκέντρωση) χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των PH-PAs. Προκειμένου να ποσοτικοποιηθούν οι PAs και στα τρία κλάσματα παραγοντοποιήθηκαν με τη πυρηνόφιλη προσθήκη βενζολικών δακτυλίων (benzylation) στα μόριά τους. Συγκεκριμένα, σε 200 µL δείγματος προστέθηκαν 1 ml 2N NaOH και 10 µL βενζουλοχλωριδίου (BZ; benzoyl chloride; Sigma) και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση για 30 sec και επώαση για 20 min σε RT. Η αντίδραση βενζυλίωσης έληξε με την προσθήκη 2 ml κορεσμένου διαλύματος NaCl και στη συνέχεια προστέθηκαν 2 ml διαιθυλ-αιθέρα (diethyl-ether; Riedel de Haen). Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση για 30 sec και στη συνέχεια φυγοκέντρωση (3000 g 5 min RT). Η φάση του διαιθυλ-αιθέρα συλλέχθηκε με τη βοήθεια γυάλινης πιπέτας Pasteur και εξατμίστηκε μέχρι ξηρότητας στους 68°C σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα. Οι PAs επαναδιαλύθηκαν σε 200 µl 63% (v/v) μεθανόλης (Fluka; chromatography grade). Πριν βενζυλιωθούν οι SH-PAs, προστέθηκε στα 200 µL του

υπερκειμένου τα οποία αντιστοιχούσαν σε αυτό το κλάσμα, ίσος όγκος 12 N HCl και τα δείγματα επώστηκαν στους 118°C για 16 h σε βιδωτούς σωλήνες. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε thermo-block θερμοκρασίας 70°C ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η υδατική φάση. Κατόπιν, προστέθηκαν 200 μ L 5% (v/v) PCA και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση για 30 sec. Στη συνέχεια ακολούθησε βενζυλίωση όπως περιγράφεται παραπάνω.

Οι βενζυλιωμένες PAs διαχωρίστηκαν σε κολώνα τύπου λεπτής διατομής C-18 narrow-bore, με διάμετρο σφαιριδίων 5 μ m, διαστάσεων 200x2.0 mm (ODS, Hypersil) και με τη χρήση του συστήματος Hewlett Packard 1100 HPLC (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany). Για το διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκαν δύο διαλύτες A (μεθανόλη) και B (ddH₂O) με διαβάθμιση ροής (Gradient Elution από 45% A έως 100% σε χρονικό διάστημα 35 min). Η ροή ήταν 200 μ L min⁻¹, η θερμοκρασία στήλης 25°C (εισόδου-εξόδου) και η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε σε UV 254 nm (DAD detector). Η ποσοτικοποίηση των PAs πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πρότυπων καμπύλων και εκφράστηκε σε nmol g⁻¹ FW \pm SE, ή σε nmol mg⁻¹ πρωτεΐνης \pm SE.

Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών στη περίπτωση έκφρασης σε (nmol mg⁻¹ πρωτεΐνης) πραγματοποιήθηκε με την αρχική επαναδιάλυση του ιζήματος σε 1 N NaOH, ίσου όγκου με το αρχικό PCA. Μετά την επαναδιάλυση λήφθηκαν 20 μ L και η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Lowry et al. (1951), όπως περιγράφεται παραπάνω.

3.3.9 Χρώση ενεργότητας και διαχωρισμός ισοενζύμων της ασκορβικής περοξειδάσης

Για τη χρώση ενεργότητας της APX, 10 mM ASA προστέθηκαν στο ΡΔ ηλεκτροφόρησης και οι 10% πηκτές ακρυλαμίδης προ-ηλεκτροφορήθηκαν πριν την τοποθέτηση των δειγμάτων, στο σκοτάδι για 30 min στα 20 mA (Rao et al. 1995). Τα πρωτεϊνικά δείγματα διαχωρίστηκαν με φυσική ηλεκτροφόρηση (native-PAGE) στους 4°C με το σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων του Davis (Davis 1964). Για την ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκαν επίπεδα πηκτώματα πάχους 1,5 mm και η συσκευή mini Protean II της BioRad. Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων (20 mA για τη πηκτική stacking και 40 mA για τη πηκτική resolving), οι πηκτές εμβαπτίστηκαν στο σκοτάδι σε διάλυμα εξισορρόπησης [50 mM K-phosphate, pH 7.0, και 2 mM ASA] για 30 min. Ακολούθως, η πηκτική επώστηκε για 30 min σε διάλυμα αντίδρασης [50 mM K-phosphate, pH 7.0, 4 mM ASA και 2 mM H₂O₂]. Η

χρώση πραγματοποιήθηκε με επώαση στο διάλυμα χρώσης [50 mM K-phosphate, pH 7.8, 14 mM tetramethylethylenediamine (TEMED) και 1.2 mM nitroblue tetrazolium (NBT)]. Το πήκτωμα ξεπλύθηκε με dH₂O και φωτογραφήθηκε με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή κάνοντας χρήση του λογισμικού (Kodak Digital Science v1.9).

3.3.10 Χρώση ενεργότητας και διαχωρισμός ισοενζύμων της NADPH οξειδάσης

Ο διαχωρισμός των ισοενζύμων της NADPH οξειδάσης και η χρώση ενεργότητας πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Carter et al. (2007). Ιστός από φυτά *Arabidopsis* συλλέχθηκαν και κονιορτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας υγρό άζωτο. Ο ιστός ομογενοποιήθηκε σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο περιείχε 50mM φωσφορικό νάτριο, pH 6.8, και 0.5% Triton X-100. Εκατό μικρογραμμάρια πρωτεΐνης φορτώθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10% σε περιεκτικότητα και διαχωρίστηκαν σε συνθήκες φυσικής ηλεκτροφόρησης στους 4°C. Μετά την ηλεκτροφόρηση τα πήκτωμα επώαστηκαν σε 0.5 mg/mL NBT σε 10 mM Tris, pH 7.4, και 134 mM NADPH μέχρι την εμφάνιση των ζωνών.

3.3.11 Χρώση ενεργότητας και διαχωρισμός ισοενζύμων της υπεροξειδικής δισμουτάσης

Η τεχνική περιγράφεται στο πρώτο κεφάλαιο.

3.3.12 Χρώση ενεργότητας και διαχωρισμός ισοενζύμων της καταλάσης

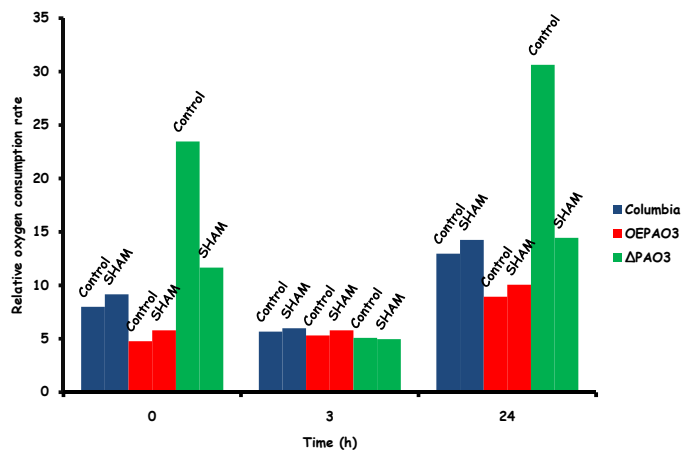
Η τεχνική περιγράφεται στο πρώτο κεφάλαιο.

3.4 Αποτελέσματα

3.4.1 Τα μεταλλάγματα της PAO3 εμφανίζουν υψηλή αναπνοή και επαγωγή της ανοσοενεργής πρωτεΐνης της AOX και του κυτοχρώματος-c.

Σε μία προσπάθεια να διασαφηνιστεί ο ρόλος των πολυαμινών και της οξειδωσης αυτών στην σηματοδότηση αποκρίσεων καταπόνησης στο μιτοχόνδριο επιχειρήθηκε εκτίμηση του ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου σε φυτά *Arabidopsis thaliana* αγρίου τύπου (Columbia), γενετικά τροποποιημένα (ΓΤ) φυτά τα οποία υπερεκφράζουν την οξειδάση των πολυαμινών 3 (OEPAO3) και σε μεταλλάγματα της αντίστοιχης οξειδάσης (*Δραο3*). Τα αποτελέσματα ανέδειξαν ουσιαστικές διαφορές στην

κατανάλωση οξυγόνου ανάμεσα στους 3 γονότυπους (Εικόνα 25). Τα ΟΕΡΑΟ3 φυτά σε όλες τις μεταχειρίσεις εμφάνισαν μειωμένη αναπνευστική ικανότητα σε σχέση με τους υπόλοιπους γονότυπους. Στα αγρίου τύπου φυτά η καταπόνηση από αλατότητα οδήγησε σε αύξηση της αναπνευστικής ικανότητας των φυτών ενώ χρήση

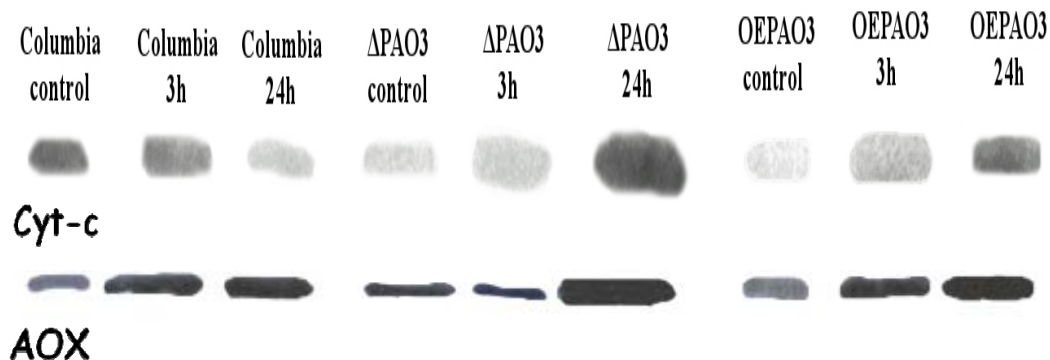


Εικόνα 25 Εκτίμηση αναπνευστικής ικανότητας παρουσία του παρεμποδιστή του εναλλακτικού μονοπατιού Salicylhydroxamic Acid (SHAM; 15mM) σε φυτά *Arabidopsis thaliana* αγρίου τύπου, ΓΤ φυτά που υπερεκφράζουν την ΡΑΟ3 (ΟΕΡΑΟ3) και μεταλλάγματα της ΡΑΟ3 (ΔΡΑΟ3) που έχουν υποβληθεί σε καταπόνηση από αλατότητα έντασης 75mM και διάρκειας 3 και 24h. Οι τιμές είναι μέσος όρος 4 επαναλήψεων του πειράματος.

του παρεμποδιστή του εναλλακτικού μονοπατιού Salicylhydroxamic acid (SHAM) δεν οδήγησε σε ουσιαστικές αλλαγές στον ρυθμό κατανάλωσης οξυγόνου τόσο των υπό καταπόνηση φυτών όσο και των φυτών μαρτύρων. Αξιοσημείωτη αύξηση στην αναπνευστική ικανότητα εμφάνισαν τα μεταλλάγματα παρουσιάζοντας αύξηση της τάξης του 120%, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές των αγρίου τύπου φυτών, ενώ μεταχείριση με SHAM επανέφερε τον ρυθμό κατανάλωσης οξυγόνου στα επίπεδα του αγρίου τύπου γονότυπου.

Η εκτίμηση της αναπνευστικής ικανότητας των φυτών εμφάνισε σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους γονότυπους τόσο στα φυτά μάρτυρες, όσο και στα καταπονημένα φυτά. Για να διαπιστωθεί αν αυτές οι αλλαγές αντικατοπτρίζουν επιμέρους αλλαγές σε κομβικούς παράγοντες της αναπνευστικής αλυσίδας επιχειρήθηκε ανοσοεντοπισμός του κυτοχρώματος-c και της AOX σε όλους τους

γονότυπους σε control συνθήκες και συνθήκες καταπόνησης (Εικόνα 26). Στα αγρίου



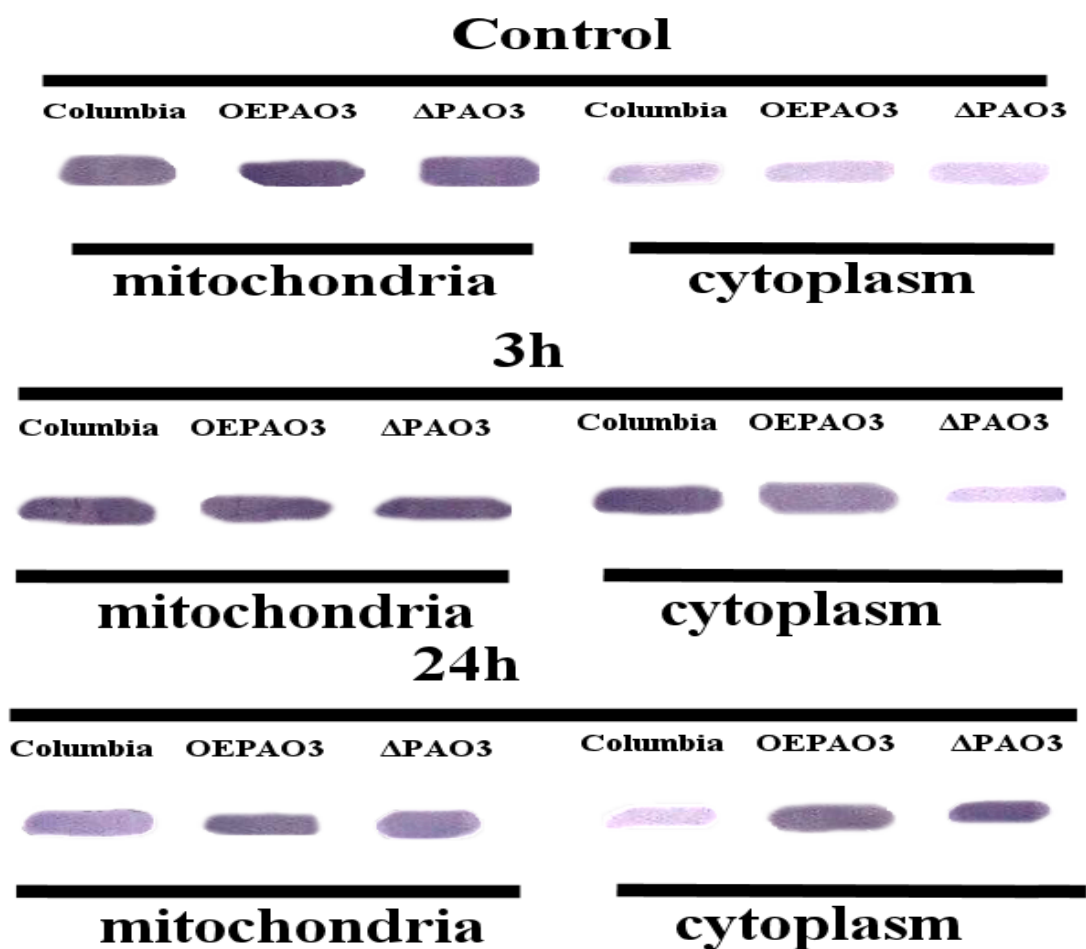
Εικόνα 26 Ανάλυση κατά western της ανοσοενεργής πρωτεΐνης του κυτοχρώματος-c και της AOX σε φυτά *Arabidopsis thaliana* αγρίου τύπου, ΓΤ φυτά που υπερεκφράζουν την PAO3 (OEPAO3) και μεταλλάγματα της PAO3 (Δ paο3) που έχουν υποβληθεί σε καταπόνηση από αλατότητα έντασης 75mM και διάρκειας 3 και 24h.

τύπου φυτά η καταπόνηση από αλατότητα οδήγησε σε μείωση της ανοσοενεργής πρωτεΐνης 3h και 24h μετά την μεταχείριση. Αντίστοιχα μεταχείριση αλατότητας έντασης 75mM οδήγησε σε σημαντική επαγωγή 3h μετά την μεταχείριση, και παρέμεινε στα ίδια επίπεδα μέχρι και τις 24h μετά την μεταχείριση. Τόσο τα OEPAO3 όσο και τα Δ paο3 φυτά εμφάνισαν εξ' ολοκλήρου διαφορετικό πρότυπο μεταβολής της ανοσοενεργής πρωτεΐνης τόσο για την AOX όσο και για το κυτοχρώμα-c. Πιο συγκεκριμένα τόσο στα OEPAO3 όσο και στα Δ paο3 φυτά η αλατότητα οδήγησε σε αντίθετη απόκριση, προκαλώντας μια έντονη επαγωγή του κυτοχρώματος, ιδίως 24h μετά την μεταχείριση. Από τους 2 τροποποιημένους γονότυπους οι πιο έντονες μεταβολές παρατηρήθηκαν στον Δ paο3 όπου και η επαγωγή της ανοσοενεργής πρωτεΐνης του κυτοχρώματος-c ξεπέρασε κατά πολύ τις αντίστοιχες τιμές για όλους τους γονότυπους σε όλες τις μεταχειρίσεις. Όσον αφορά την ανοσοενεργή πρωτεΐνη της AOX αν και η ανάλυση κατά Western υπέδειξε παρόμοιο πρότυπο μεταβολής σε όλους τους γονότυπους οι μεταβολές στα OEPAO3 και Δ paο3 ήταν πιο έντονες απ' ό τι στα αγρίου τύπου φυτά.

3.4.2 Η καταπόνηση από αλατότητα οδήγησε σε απελευθέρωση του κυτοχρώματος και συσσώρευση των EMO στα αγρίου τύπου και ΓΤ φυτά *Arabidopsis*

Στις προηγούμενες ενότητες διαπιστώθηκε πως καταπόνηση από αλατότητα οδήγησε σε άνοιγμα του μιτοχονδριακού πόρου και έξοδο του κυτοχρώματος-c στο κυτταρόπλασμα. Για να διαπιστωθεί αν οι μεταβολές στην αναπνευστική ικανότητα των φυτών σχετίζεται με τον υποκυτταρικό εντοπισμό του κυτοχρώματος-c πραγματοποιήθηκε υποκυτταρική κλασμάτωση σε ιστό, από όλους τους γονότυπους,

σε συνθήκες control και συνθήκες καταπόνησης. Στα μιτοχονδριακά και κυτταροπλασματικά κλάσματα πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Western της ανοσοενεργής πρωτεΐνης του κυτοχρώματος-c. Στα αγρίου τύπου φυτά το κυτόχρωμα-c ανιχνεύθηκε στα κυτταροπλασματικά κλάσματα 3h μετά την μεταχείριση, ενώ 24h μετά την μεταχείριση μειώθηκε σημαντικά τόσο στα μιτοχονδριακά όσο και τα κυτταροπλασματικά κλάσματα (Εικόνα 27). Αντιθέτως στα

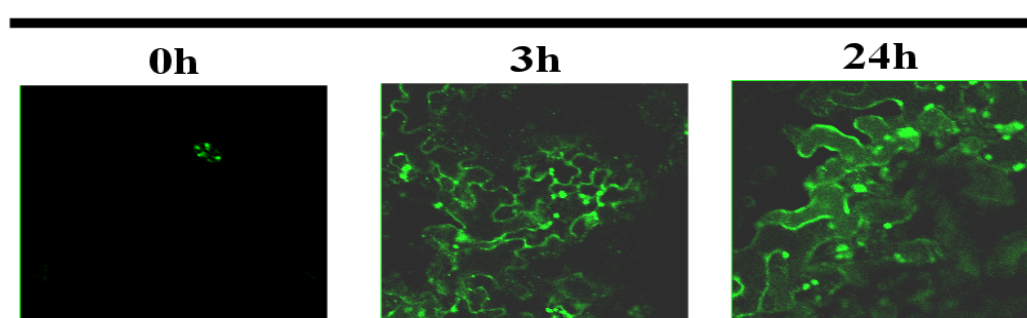


Εικόνα 27 Ανάλυση κατά western της ανοσοενεργής πρωτεΐνης του κυτοχρώματος-c σε μιτοχονδριακά και κυτταροπλασματικά κλάσματα από φυτά *Arabidopsis thaliana* αγρίου τύπου, ΓΤ φυτά που υπερεκφράζουν την PAO3 (OEPAO3) και μεταλλάγμα της PAO3 (*Δpao3*) που έχουν υποβληθεί σε καταπόνηση από αλατότητα έντασης 75mM και διάρκειας 3 και 24h.

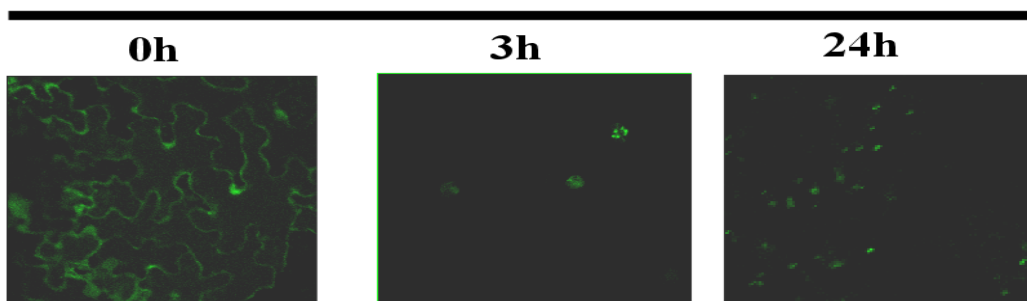
OEPAO3 φυτά αν και το κυτόχρωμα-c εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα 3h μετά την μεταχείριση, κατά τρόπο ανάλογο μετα αγρίου τύπου φυτά, 24h μετά την μεταχείριση η πρωτεΐνη εξακολουθεί να εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Στα *Δpao3* φυτά η ανοσοενεργή πρωτεΐνη στο μιτοχόνδριο παραμένει σταθερά υψηλή καθ' όλη την διάρκεια της δοκιμής, ενώ στο κυτταρόπλασμα εντοπίζεται κατά κύριο λόγο 24h μετά την μεταχείριση.

Η έξοδος του κυτοχρώματος-c επάγεται από ενδοκυτταρικά σήματα τα οποία μεταφέρονται από τις ΕΜΟ, ενώ παράλληλα οδηγεί και σε συσσώρευση μιτοχονδριακών ΕΜΟ. Για να διαπιστωθεί αν η απελευθέρωση του κυτοχρώματος συμπίπτει με μεταβολές στην συγκέντρωση των ΕΜΟ πραγματοποιήθηκε *in situ* ανίχνευση H₂O₂ χρησιμοποιώντας έναν ειδικό για το H₂O₂ σημαντή και φθορίζουσα μικροσκοπία. Στα αγρίου τύπου φυτά η μεταχείριση από αλατότητα οδήγησε σε συσσώρευση του H₂O₂ τόσο 3h όσο και 24h μετά την μεταχείριση (Εικόνα 28), απόκριση αναμενόμενη αν λάβουμε υπόψην πως είναι γνωστή η επαγωγή της

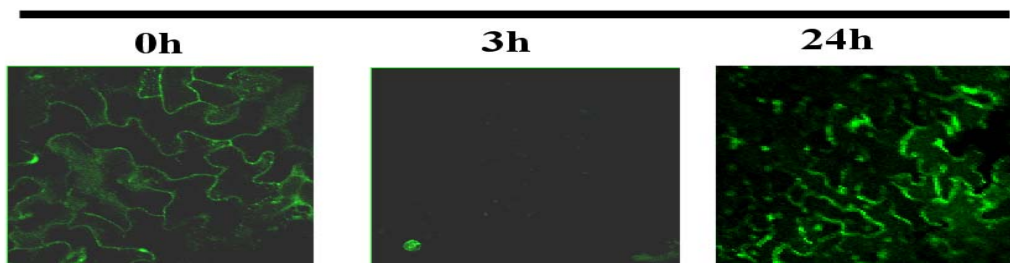
Columbia



OEPAO3



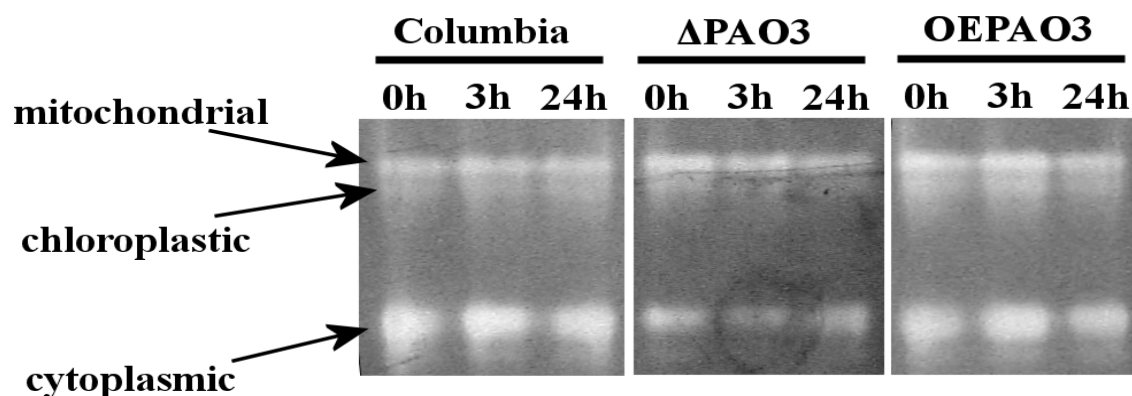
ΔPAO3



Εικόνα 28 Εντοπισμός παραγωγής H₂O₂ σε φυτά *Arabidopsis thaliana* αγρίου τύπου, ΓΤ φυτά που υπερεκφράζουν την PAO3 (OEPAO3) και μεταλλάγματα της PAO3 (ΔPAO3) που έχουν υποβληθεί σε καταπόνηση από αλατότητα έντασης 75mM και διάρκειας 3 και 24h. Η χρώση έγινε με την χρήση του φθορίζοντος υποστρώματος DCFH-DA

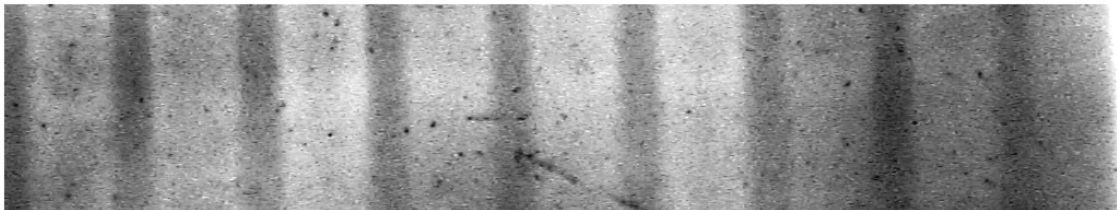
παραγωγής H_2O_2 κατά την καταπόνηση από αλατότητα. Στα ΟΕΡΑΟ3 φυτά διαπιστώθηκε παραγωγή H_2O_2 παραδόξως μόνο στα φυτά μάρτυρες ενώ τόσο 3h όσο και 24h μετά την μεταχείριση δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση H_2O_2 στα υπό καταπόνηση φυτά. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η παρατήρηση των Δραο3 φυτών, κατά την οποία παρατηρήθηκε αύξηση στην συγκέντρωση των ΕΜΟ τόσο στα φυτά μάρτυρες όσο και 24h μετά την μεταχείριση, ενώ δεν ανιχνεύθηκε καθόλου H_2O_2 , 3h μετά την μεταχείριση.

Για να διαπιστωθεί αν η παραγωγή του H_2O_2 είναι συνυφασμένη με την δυσλειτουργία του μιτοχονδρίου πραγματοποιήθηκε χρώση ενεργότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD και APX. Η τεχνική της χρώσης ενεργότητας της SOD επιτρέπει όχι μόνο την εκτίμηση της ολικής ενζυμικής ενεργότητας, αλλά και των επιμέρους ισοενζύμων που εδράζονται σε διαφορετικά διαμερίσματα του κυττάρου. Στα αγρίου τύπου φυτά περισσότερο ενεργά εμφανίστηκαν τα κυτταροπλασματικά ισοένζυμα της SOD σε αντίθεση με τα μιτοχονδριακά και χλωροπλαστικά (Εικόνα 29). Στα Δραο3 και ΟΕΡΑΟ3 φυτά παρατηρείται μείωση της ενεργότητας των κυτταροπλασματικών ισοενζύμων, σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου φυτά, και παράλληλα αύξηση των μιτοχονδριακών. Η διάρκεια της μεταχείρισης φαίνεται να έχει αντίστροφη επίδραση στην ενζυμική ενεργότητα της SOD ανάμεσα στα αγρίου τύπου και Δραο3 – ΟΕΡΑΟ3 φυτά. Στα πρώτα η αλατότητα φαίνεται να επάγει την ενεργότητα της μιτοχονδριακής SOD, ενώ αντίθετα στα ΓΤ φυτά συμβαίνει το αντίθετο, δηλαδή 3h και 24h μετά την μεταχείριση η ενεργότητα μειώνεται αντί να αυξάνεται.



Εικόνα 29 Χρώση ενεργότητας Υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) σε φυτά *Arabidopsis thaliana* αγρίου τύπου, ΓΤ φυτά που υπερεκφράζουν την ΡΑΟ3 (ΟΕΡΑΟ3) και μεταλλάγματα της ΡΑΟ3 (ΔΡΑΟ3) που έχουν υποβληθεί σε καταπόνηση από αλατότητα έντασης 75mM και διάρκειας 3 και 24h.

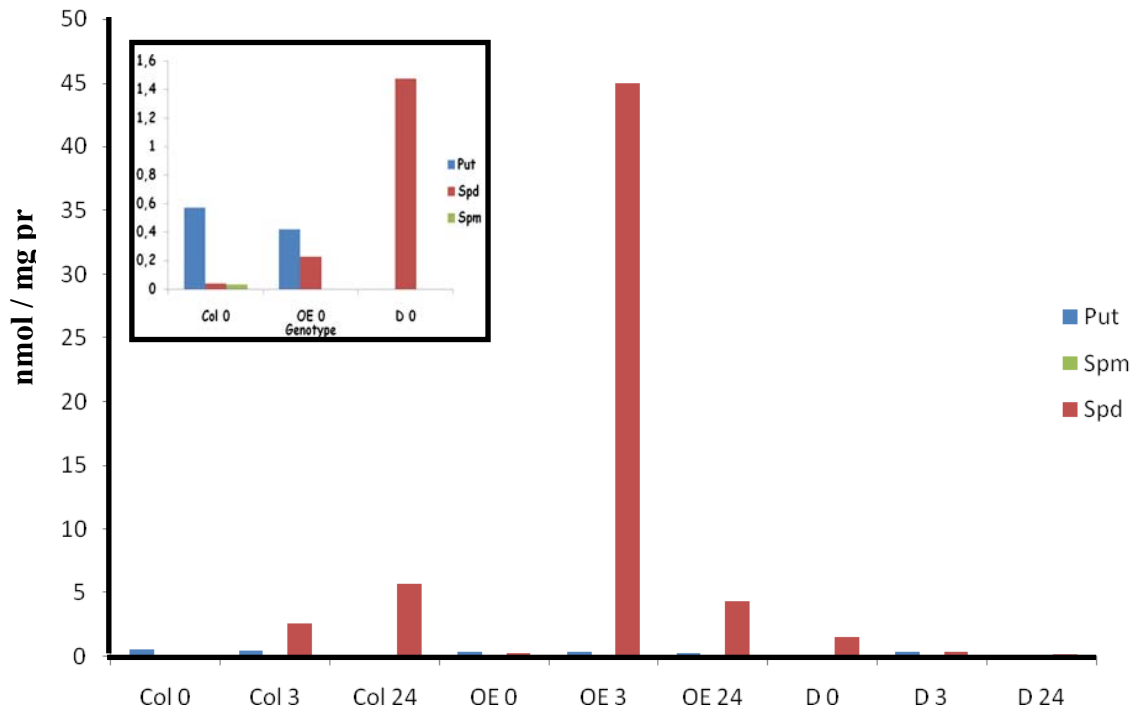
Ως δείκτης καταπόνησης του μιτοχονδρίου και κατ' επέκταση και του κυττάρου πραγματοποιήθηκε χρώση ενεργότητας του ενζύμου ασκορβική περοξειδάση (APX). Πρόκειται για ένα ένζυμο που εντοπίζεται και στα μιτοχόνδρια και αποσβένει το H₂O₂. Η ενζυμική ενεργότητα της APX βρέθηκε ιδιαίτερα αυξημένη στα Δραο3 φυτά ανεξαρτήτως διάρκειας μεταχείρισης (Εικόνα 30). Στα αγρίου τύπου φυτά η ενζυμική ενεργότητα αυξήθηκε σε συνάρτηση με την διάρκεια της καταπόνησης, ενώ τέλος στα ΟΕΡΑΟ3 φυτά δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στην ενεργότητα του ενζύμου.

Columbia			ΔΡΑΟ3			ΟΕΡΑΟ3		
0h	3h	24h	0h	3h	24h	0h	3h	24h
								

Εικόνα 30 Χρώση ενεργότητας Ασκορβικής περοξειδάσης (APX) σε φυτά *Arabidopsis thaliana* αγρίου τύπου, ΓΤ φυτά που υπερεκφράζουν την ΡΑΟ3 (ΟΕΡΑΟ3) και μεταλλάγματα της ΡΑΟ3 (ΔΡΑΟ3) που έχουν υποβληθεί σε καταπόνηση από αλατότητα έντασης 75mM και διάρκειας 3 και 24h.

3.4.3 Μεταβολές στην ενδογενή συγκέντρωση σπερμιδίνης οδηγούν σε μεταβολές στην αναπνευστική ικανότητα των φυτών και στην συγκέντρωση των παραγόμενων ΕΜΟ.

Σε μια προσπάθεια να αποσαφηνιστεί η διαφορετική απόκριση των φυτών στην καταπόνηση από αλατότητα, όσον αφορά την αναπνευστική ικανότητα και την παραγωγή των ΕΜΟ, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση των ενδογενών ελεύθερων ΡΑs σε όλους τους γονότυπους σε control συνθήκες και συνθήκες καταπόνησης. Με μια πρώτη παρατήρηση των επιπέδων των ελεύθερων πολυαμινών ξεχωρίζει η υψηλή συγκέντρωση Spd, σε όλους τους γενότυπους (Εικόνα 31). Στα αγρίου τύπου φυτά μάρτυρες η συγκέντρωση Spd είναι ιδιαίτερα χαμηλή (ένθετο γράφημα Εικόνα 31) αν και αυξάνεται σε απόκριση στην καταπόνηση από αλατότητα μέχρι και 24h μετά την μεταχείριση. Ομοίως η συγκέντρωση Spd στα αμεταχειρίστα ΟΕΡΑΟ3 φυτά επίσης παραμένει χαμηλή ενώ η καταπόνηση από αλατότητα οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσής της. Το αξιοσημείωτο είναι πως 3h μετά την μεταχείριση η Spd εμφανίζει μια υπέρμετρη αύξηση, σχεδόν 200 φορές σε σύγκριση με τα ΟΕΡΑΟ3 μάρτυρες. Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την μεταχείριση παρατηρείται νέα μείωση της

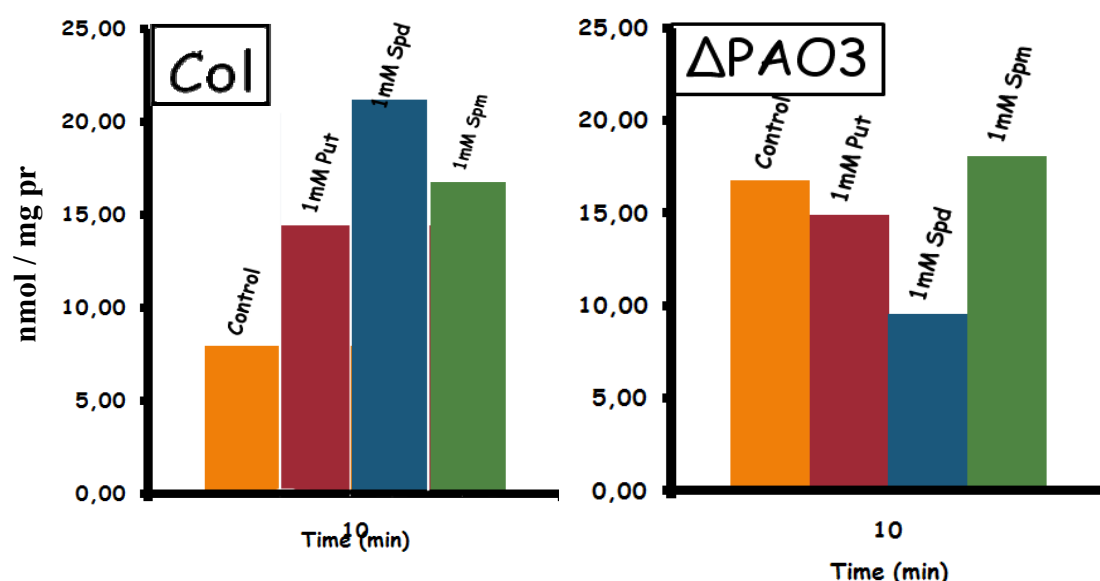


Εικόνα 31 Εκτίμηση ενδογενών ελεύθερων πολυαμινών σε φυτά *Arabidopsis thaliana* αγρίου τύπου, ΓΤ φυτά που υπερεκφράζουν την PAO3 (OEPAO3) και μεταλλάγματα της PAO3 (ΔPAO3) που έχουν υποβληθεί σε καταπόνηση από αλατότητα έντασης 75mM και διάρκειας 3 και 24h. Οι τιμές είναι μέσος όρος 4 επαναλήψεων του πειράματος.

Spd, 18 φορές περισσότερο από την αντίστοιχη τιμή που μετρήθηκε στα αμεταχειρίστα φυτά. Η συγκέντρωση της Spd στις 24h για τα OEPAO3 φυτά συμπίπτει με την αντίστοιχη για τα αγρίου τύπου φυτά. Τέλος τα Δραo3 φυτά μάρτυρες αν και εμφανίζουν την υψηλότερη συγκέντρωση Spd ανάμεσα στα υπόλοιπα control φυτά μειώνεται σε απόκριση στην αλατότητα.

Η έντονη παρουσία της Spd στα φυτά θεωρήθηκε ιδιαίτερης σημασίας, οπότε και κρίθηκε σκόπιμο να δοκιμαστεί η εξωγενής επίδραση τόσο της Spd όσο και των Put και Spm στην αναπνευστική ικανότητα των φυτών. Και οι 3 PAs οδήγησαν σε αύξηση της κατανάλωσης οξυγόνου από τα φυτά αγρίου τύπου. Η εντονότερη επίδραση παρατηρήθηκε κατά την προσθήκη Spd οπότε και η κατανάλωση οξυγόνου αυξήθηκε 3 φορές, σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες, ενώ με την προσθήκη Spm και Put διπλασιάστηκε ο ρυθμός κατανάλωσης οξυγόνου (Εικόνα 32). Παραδόξως η επίδραση στα Δραo3 φυτά ήταν πολύ διαφορετική. Τόσο η Put και η Spm δεν οδήγησαν σε κάποια μεταβολή του ήδη αυξημένου ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου των μεταλλαγμάτων, ενώ η Spd οδήγησε σε μείωση της κατανάλωσης οξυγόνου. Τέλος στα OEPAO3 φυτά δεν παρουσιάστηκε καμία μεταβολή στον ρυθμό κατανάλωσης οξυγόνου ανεξαρτήτως της πολυαμίνης που προστέθηκε εξωκυτταρικά.

Στην πρώτη σειρά πειραμάτων η αύξηση του ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου παρατηρήθηκε παράλληλα με την συσσώρευση H₂O₂. Παρατηρώντας την επίδραση

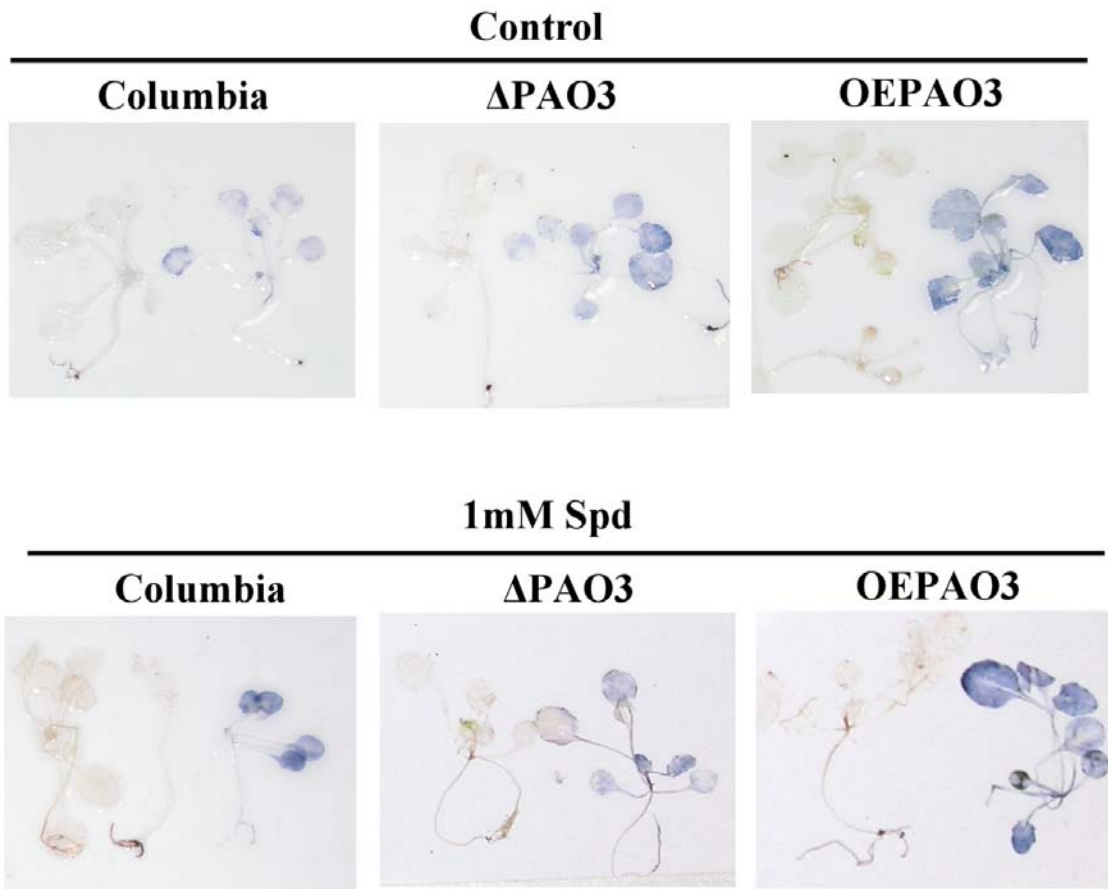


Εικόνα 32 Επίδραση εξωγενών πολυαμινών σε φυτά *Arabidopsis thaliana* αγρίου τύπου, ΓΤ και μεταλλάγματα της ΡΑΟ3 (ΔΡΑΟ3). Οι τιμές είναι μέσος όρος 4 επαναλήψεων του πειράματος.

των εξωγενών ΡΑs στην αναπνευστική ικανότητα των αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων φυτών, θεωρήθηκε σκόπιμο να διαπιστωθεί αν αυτή συνοδεύεται από αλλαγές στην ομοιοστασία των ΕΜΟ. Για τον σκοπό αυτό έγινε *in situ* εκτίμηση της συγκέντρωσης του H₂O₂ και O₂^{•-} σε φύλλα φυτών στα οποία είχε γίνει επίδραση εξωγενούς σπερμιδίνης, και φυτά μαρτύρων. Στα αμεταχειρίιστα, αγρίου τύπου φυτά τόσο η χρώση H₂O₂, όσο και O₂^{•-} δεν φανέρωσε παρουσία ενεργών ριζών, σε αντίθεση με τα ΓΤ φυτά στα οποία φάνηκε αυξημένη συγκέντρωση τόσο του H₂O₂, όσο και του O₂^{•-} (Εικόνα 33). Η εξωγενής επίδραση Spd οδήγησε σε σημαντική αύξηση των ΕΜΟ στα αμεταχειρίιστα φυτά, σε αντίθεση με τα Δραο3 όπου και το χαρακτηριστικό καφέ και μπλε χρώμα όρασης του περοξειδίου του υδρογόνου και υπεροξειδίου μειώθηκε. Στα ΟΕΡΑΟ3 φυτά, όπως και κατά την εκτίμηση του ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου δεν παρουσιάστηκαν ουσιαστικές διαφορές κατά την επίδραση της Spd.

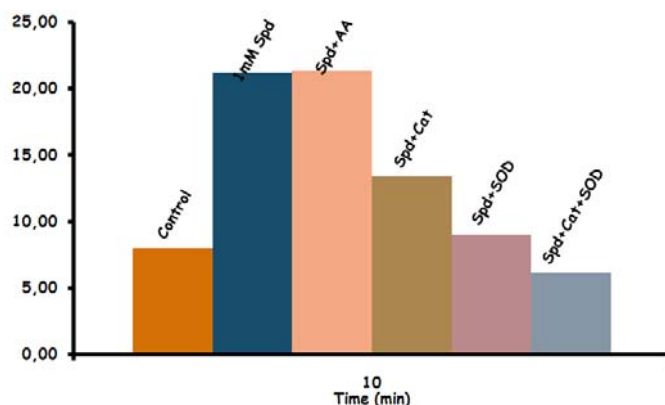
Το γενικότερο συμπέρασμα που προκύπτει από τα παραπάνω δεδομένα είναι πως αύξηση στην αναπνευστική ικανότητα μέσω της επίδρασης Spd είναι συνυφασμένη και με την συσσώρευση H₂O₂, και O₂^{•-}, γεγονός που εύλογα θέτει το ερώτημα αν οι ΕΜΟ προκύπτουν από την αλλαγή στην λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας, ή προκαλούν αυτήν την αλλαγή. Για να δοθεί απάντηση στο παραπάνω

ερώτημα επιχειρήθηκε μέτρηση του ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου παρουσία εξωγενούς Spd, του φυσικού αντιοξειδωτικού ασκορβικού οξέος και των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD και CAT. Προσθήκη τόσο CAT όσο και



Εικόνα 33 *In situ* εκτίμηση της συγκέντρωσης H_2O_2 , και $O_2^{\cdot-}$, σε φυτά *Arabidopsis thaliana* αγρίου τύπου, ΓΤ φυτά που υπερεκφράζουν την ΡΑΟ3 (ΟΕΡΑΟ3) και μεταλλάγματα της ΡΑΟ3 (ΔΡΑΟ3) που έχουν υποβληθεί σε εξωγενή επίδραση σπερμιδίνης

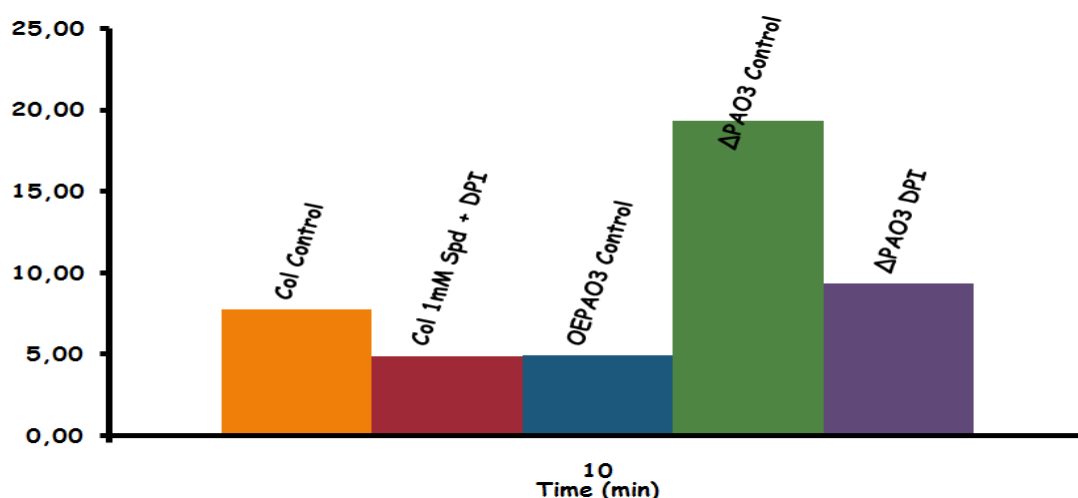
SOD επανέφερε την αναπνοή στον ρυθμό που μετρήθηκε πριν την προσθήκη Spd οδηγώντας στο συμπέρασμα πως οι ΕΜΟ στην συγκεκριμένη περίπτωση πιθανώς είναι η αιτία της μεταβολής της αναπνοής στα φυτά και όχι το αποτέλεσμα (Εικόνα



Εικόνα 34 Επίδραση εξωγενούς σπερμιδίνης, καταλάσης και υπεροξειδικής δισμουτάσης στην αναπνευστική ικανότητα φυτών *Arabidopsis thaliana* αγρίου τύπου. Οι τιμές είναι μέσος όρος 4 επαναλήψεων

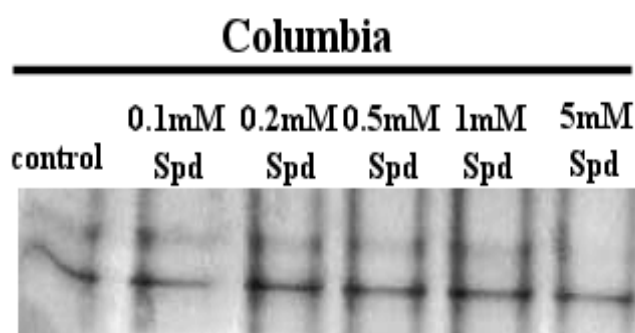
34). Αντιθέτως το ασκορβικό οξύ δεν είχε καμία επίδραση στον ρυθμό κατανάλωσης οξυγόνου των φυτών.

Επίσης διερευνήθηκε η «πηγή» των επαγόμενων από την Spd EMO. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν πως δεν υπάρχει ενεργή συμμετοχή της αναπνευστικής αλυσίδας του μιτοχονδρίου στην επαγόμενη από Spd παραγωγή των EMO. Γι αυτόν τον λόγο και αναζητήθηκε εναλλακτικός μηχανισμός παραγωγής EMO. Ένας από αυτούς είναι και η παραγωγή O_2^- από το σύμπλοκο της NADPH οξειδάσης και η επακόλουθη μετατροπή του σε H_2O_2 από το ενζυμικό σύστημα της SOD. Για να διαπιστωθεί αν οι παραγόμενες από την NADPH οξειδάση EMO συμβάλουν στην σηματοδότηση αποκρίσεων του μιτοχονδρίου χρησιμοποιήθηκε ο χημικός παρεμποδιστής της, diphenylidonium (DPI), σε συνδυασμό με την εξωγενή Spd. Μετά την προσθήκη του DPI η αναπνοή τόσο των αγρίου τύπου φυτών στα οποία είχε επιδράσει εξωγενής Spd, όσο και των μεταλλαγμάτων επανήλθε στα επίπεδα των αμεταχειριστων αγρίου τύπου φυτών και αναλόγως μεταβλήθηκε και η συγκέντρωση των EMO (Εικόνα 35)



Εικόνα 35 Επίδραση του DPI σε αγρίου τύπου φυτά τα οποία έχουν υποβληθεί σε εξωγενή επίδραση σπερμιδίνης και ΓΤ φυτά τα οποία υπερεκφράζουν και παρουσιάζουν έλλειψη της PAO3. Οι τιμές είναι μέσος όρος 4 επαναλήψεων του πειράματος.

Τέλος επιχειρήθηκε η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων εξωγενούς Spd στην αναπνοή φυτών *Arabidopsis* ώστε να διαπιστωθεί αν οι PAs μπορούν να ασκήσουν διαφορετικό έλεγχο στον αναπνευστικό μηχανισμό ανάλογα με τη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται. Δοκιμάστηκαν 5 συγκεντρώσεις, 0.1, 0.2, 0.5, 1 και 5mM σπερμιδίνης. Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις δοκιμάστηκαν μέσω της επίδρασής τους στην δράση του συμπλόκου της NADPH οξειδάσης. Παρατηρήθηκε πως μικρές συγκεντρώσεις ως και 1mM επάγουν την ενεργότητα της NADPH οξειδάσης ενώ υψηλότερες, (5mM) την καταστέλλουν (Εικόνα 36).



Εικόνα 36 Εξωγενής επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων σπερμιδίνης στην ικανότητα παραγωγής $O_2^{\cdot-}$ του συμπλόκου της NADPH οξειδάσης

3.5 Συζήτηση

Οι PAs κατέχουν πολύ σημαντική θέση στην απόκριση των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης (Alcazar et al., 2006). Γονότυποι με βελτιωμένη ανθεκτικότητα στις καταπονήσεις εμφανίζουν αυξημένη βιοσύνθεση PAs κατά τις αβιοτικές καταπονήσεις σε σύγκριση με τους ευαίσθητους. Παρά το γεγονός ότι αλλαγές στον μηχανισμό βιοσύνθεσης των PAs οδηγεί σε ανθεκτικότητα σε πολλαπλές αβιοτικές καταπονήσεις, ο ρόλος του καταβολισμού τους κατά τις αποκρίσεις αυτές παραμένει ασαφής (Cona et al., 2006). Προηγούμενα πειραματικά δεδομένα του Εργαστηρίου μας έχουν συνδέσει τον καταβολισμό των PAs από την δράση της αποπλάσματικής PAO στον καπνό με την συσσώρευση των EMO κατά την καταπόνηση από αλατότητα. Υψηλότερη συγκέντρωση PAs και ιδιαίτερος της Spd, που εκκρίνεται στον αποπλάστη κατά τις καταπονήσεις, προκαλεί επαγωγή αποκρίσεων στην καταπόνηση. Όταν η ενεργότητα της PAO αυξηθεί, όπως σε *SPAO* ΓΤ φυτά, τότε η αυξημένη οξείδωση και παραγωγή EMO επάγει το σύνδρομο του ΠΚΘ (Moschou et al., 2008a).

Αντίστοιχα, η καταπόνηση από αλατότητα βρέθηκε πως επάγει αποκρίσεις καταπόνησης στο μιτοχόνδριο, απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c στο κυτταρόπλασμα και επαγωγή του ΠΚΘ (Andronis and Roubelakis-Angelakis, 2009). Είναι φανερό πως τα δύο μονοπάτια έχουν κοινά σημεία και κατάληξη. Η εύλογη συνέχεια ήταν να διερευνηθεί η πιθανή αλληλεπίδραση ανάμεσα στα δύο μονοπάτια, δηλαδή κατά πόσο η συγκέντρωση των PAs και η επακόλουθη οξειδωσή τους οδηγεί στην επαγωγή αποκρίσεων καταπόνησης στο μιτοχόνδριο. Τα «εργαλεία» που χρησιμοποιήθηκαν ήταν φυτά *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia, ΓΤ τα οποία υπερεκφράζουν το γονίδιο *AtPAO3* (*OEPAO3*) και μετάλλαγμα με έλλειψη του γονιδίου (*Δραο3*). Η PAO3 είναι μια περοξεισωματική πρωτεΐνη, που καταλύει την back-conversion των ανώτερων Pas (Moschou et al., 2008c). Εκτίμηση του ρυθμού κατανάλωσης του οξυγόνου φανέρωσε έντονες διαφορές ανάμεσα στους 3 γονότυπους (Εικόνα 25). Τα *OEPAO3* φυτά εμφάνισαν το χαμηλότερο ρυθμό κατανάλωσης οξυγόνου από όλα τα φυτά της δοκιμής ενώ τα *Δραο3* φυτά εμφάνισαν σταθερά υψηλή κατανάλωση οξυγόνου με μόνη εξαίρεση 3h μετά την μεταχείριση, οπότε όλοι οι γονότυποι εμφάνισαν σταθερά χαμηλή αναπνευστική ικανότητα. Η υψηλή αναπνοή στο μετάλλαγμα συνοδεύτηκε από επαγωγή της ανοσοενεργής πρωτεΐνης του κυτοχρώματος-c και της AOX (Εικόνα 26). Μετρήσεις παρουσία του παρεμποδιστή του εναλλακτικού μονοπατιού υπέδειξε πως υπήρξε ουσιαστική μεταβολή τόσο στην ικανότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων του κυτοχρωμικού μονοπατιού, όσο και στην απόδοση του εναλλακτικού μονοπατιού, όπως φαίνεται και από την επαγωγή της ανοσοενεργής πρωτεΐνης του κυτοχρώματος-c και της AOX. Η αύξηση στην αναπνευστική δραστηριότητα του μιτοχονδρίου, ιδίως μέσω του εναλλακτικού μονοπατιού, είναι μια αρκετά διαδεδομένη απόκριση στην καταπόνηση. Η επαγωγή της ανοσοενεργής πρωτεΐνης της AOX (Robson and Vanlerberghe, 2002; Czarna and Jarmuszkiwicz, 2005) χρησιμεύει στην αποφόρτιση του κυτοχρωμικού μονοπατιού και την αποτροπή συσσώρευσης των EMO. Αντίστοιχα και στο κυτόχρωμα-c έχουν αποδοθεί αντιοξειδωτικές ιδιότητες, τόσο κατά την φυσιολογική του λειτουργία, όσο και κατά την απόσπασή του από την αναπνευστική αλυσίδα (Korshunov et al., 1999; Abdullaev et al., 2002; Giannattasio et al., 2008). Επομένως η επαγωγή της αναπνοής μπορεί να εξηγηθεί ως απόκριση στην αυξημένη ενδοκυτταρική συγκέντρωση των EMO. Όντως χρήση *in situ* τεχνικών φανέρωσε τη συσσώρευση των EMO τόσο σε φυτά αγρίου τύπου κατά την καταπόνηση όσο και στα *Δραο3* φυτά σε φυτά μάρτυρες και 24h μετά την

μεταχείριση από αλατότητα, χρονικά σημεία τα οποία συμπίπτουν με την αύξηση στην αναπνοή που παρατηρήθηκε (Εικόνα 28). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως αυξημένη αναπνοή και ταυτόχρονη συσσώρευση των ΕΜΟ παρατηρήθηκε μόνο σε φυτά στα οποία εξήλθε το κυτόχρωμα-c στο κυτταρόπλασμα αλλά παράλληλα διατήρησαν υψηλά μιτοχονδριακά επίπεδα κυτοχρώματος. Επίσης στο μετάλλαγμα παρατηρήθηκε επαγωγή μιτοχονδριακών αντιοξειδωτικών μηχανισμών, όπως η μιτοχονδριακή SOD (Εικόνα 29) και η APX (Εικόνα 30), γεγονός που φανερώνει απόκριση των μιτοχονδριακών αντιοξειδωτικών και οξειδωτική καταπόνηση του μιτοχονδρίου.

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό πως τα *Δραο3* εμφανίζουν όχι μόνο υψηλή αναπνευστική ικανότητα, αλλά και αυξημένη συσσώρευση ΕΜΟ. Για να διερευνηθεί το αίτιο των παραπάνω αποκρίσεων στα *Δραο3* φυτά έγινε εκτίμηση των ενδογενών PAs, αφού αυξημένα επίπεδά τους έχουν συνδεθεί με αύξηση στην αναπνευστική ικανότητα διαφόρων οργανισμών (Giffin et al., 1986). Εκτίμηση των ενδογενών PAs φανέρωσε υψηλότερα επίπεδα Spd τόσο στα υπό καταπόνηση αγρίου τύπου φυτά, όσο και στους μάρτυρες και στα υπό καταπόνηση ΓΤ φυτά (Εικόνα 31). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως τα υψηλά επίπεδα αναπνοής στα *Δραο3* φυτά συνοδεύονται με τα υψηλότερα επίπεδα Spd και στους τρεις γονότυπους στα φυτά-μάρτυρες, γεγονός που οδηγεί στο πιθανό συμπέρασμα πως η αυξημένη αναπνοή σχετίζεται με την Spd.

Για να επιβεβαιωθεί ο παραπάνω συλλογισμός επιχειρήθηκε μεταχείριση με εξωγενή Spd σε όλους του γονότυπους, με απώτερο σκοπό να διερευνηθούν οι αποκρίσεις των γονοτύπων. Οι μεταχειρίσεις με εξωγενή Spd στα αγρίου τύπου φυτά οδήγησαν σε αύξηση της αναπνευστικής ικανότητας ανάλογης των μαρτύρων *Δραο3* φυτών (Εικόνα 32). Αντιθέτως εξωγενής επίδραση Spd στα *Δραο3* φυτά είχε ακριβώς το αντίθετο αποτέλεσμα. Τέλος επίδραση Spd στα *ΟΕΡΑΟ3* φυτά δεν είχε καμία επίδραση.

Η επαγωγή αναπνοής στα αγρίου τύπου φυτά, συνοδεύτηκε από αντίστοιχη αύξηση στην παραγωγή και συσσώρευση των ΕΜΟ (Εικόνα 33), γεγονός που φανερώνει μια αλληλεπίδραση στις δύο αποκρίσεις. Παρόλα αυτά το ερώτημα που προέκυψε είναι αν η παραγωγή των ΕΜΟ προκύπτει από τις μεταβολές στην αναπνευστική ικανότητα του μιτοχονδρίου, ή το αντίθετο, οι παραγόμενες ΕΜΟ οδηγούν σε μεταβολές στην αναπνοή. Για να διερευνηθεί αυτή η σχέση

χρησιμοποιήθηκαν παράλληλες μεταχειρίσεις Spd και αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως SOD, CAT και ασκορβικού οξέος. Επίδραση Spd -SOD και Spd -CAT οδήγησε σε σημαντική μείωση της αναπνοής. Αντίστοιχα, επίδραση τόσο CAT όσο και SOD στα *Δραο3* φυτά μείωσε την αναπνευστική τους δραστηριότητα στα επίπεδα των αγρίου τύπου φυτών. Τα παραπάνω μας οδηγούν στο συμπέρασμα πως η υψηλή συγκέντρωση των EMO παρουσία Spd επάγει αύξηση στην αναπνευστική δραστηριότητα του φυτού. Η Spd έχει συνδεθεί στο παρελθόν με την παραγωγή υπεροξειδίων σε ανθρώπινα λευκά αιμοσφαίρια (Guarnieri et al., 1987). Πιο συγκεκριμένα περιγράφεται πως Spd σε συγκέντρωση ως και 100μM οδηγεί σε συσσώρευση του παραγόμενου από το σύμπλοκο της NADPH οξειδάσης $O_2^{\cdot-}$. Αντίθετα συγκεντρώσεις μέχρι και 25mM δεν έχει επίδραση ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις παρεμποδίζουν την παραγωγή του $O_2^{\cdot-}$. Από τα παραπάνω μπορεί να εξηγηθεί και η μείωση στις παραγόμενες EMO κατά την επίδραση εξωγενούς Spd στα *Δραο3* φυτά, τα οποία έχουν φυσιολογικά αυξημένη ενδογενή Spd.

Η επίδραση των EMO στην αναπνοή είναι επίσης κάτι το οποίο έχει καταγραφεί στην βιβλιογραφία. Οι Guidot et al. (1995) περιγράφουν στην *Saccharomyces cerevisiae* την επαγωγή της αναπνευστικής αλυσίδας ως απόκριση στο εξωγενές υπεροξείδιο, ώστε να επιτευχθεί η απόσβεσή του. Τα ευρήματα των Guarnieri et al. (1987) και Guidot et al. (1995) σε συνδυασμό με τα παρόντα ερευνητικά ευρήματα ζωγραφίζουν ένα ενδιαφέρον μοντέλο. Η Spd σε χαμηλές συγκεντρώσεις επάγει την παραγωγή των υπεροξειδίων και επακόλουθη αύξηση της αναπνοής, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις η NADPH-οξειδάση δεν επηρεάζεται, ή και παρεμποδίζεται με αντίστοιχες μεταβολές στην αναπνοή. Βάση αυτού του μοντέλου εξηγούνται οι χαμηλές τιμές αναπνοής στα *ΟΕΡΑΟ3* φυτά, τα οποία εμφανίζουν υπέρμετρη συσσώρευση Spd κατά την καταπόνηση. Αντίστοιχα, σε φυσιολογικές συνθήκες τα *Δραο3* φυτά εμφανίζουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις Spd, συνοδεύονται με υψηλές EMO και αναπνοή, ενώ η εξωγενής επίδραση Spd προκάλεσε το αντίθετο φαινόμενο. Τέλος στα αγρίου τύπου φυτά, τόσο η καταπόνηση από αλατότητα, όσο και η προσθήκη Spd, αύξησαν την ενδογενή συγκέντρωσή της.

Για να επιβεβαιωθεί η παραπάνω θεωρία επιχειρήθηκε ταυτόχρονη επίδραση Spd και DPI, το οποίο είναι χημικός παρεμποδιστής της NADPH-οξειδάσης. Όντως, η προσθήκη του DPI όχι μόνο μείωσε την αναπνευστική δραστηριότητα και τις

παραγόμενες EMO σε αγρίου τύπου φυτά με εξωγενή επίδραση Spd αλλά και στα *Δραο3* φυτά-μάρτυρες, ενώ στα *ΟΕΡΑΟ3* φυτά δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση (Εικόνα 35). Τέλος έγινε και μια dose-response δοκιμή ώστε να επιβεβαιωθεί η διαφορετική επίδραση της Spd στην επαγωγή της NADPH-οξειδάσης σε συνάρτηση με την συγκέντρωσή της. Σε συμφωνία με το παραπάνω μοντέλο, συγκεντρώσεις Spd μέχρι και 1mM επάγουν την NADPH-οξειδάση ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μειώνουν την ενεργότητα του ενζύμου. Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες δημοσιεύσεις του εργαστηρίου μας πάνω στην ρύθμιση της NADPH-οξειδάσης από την εξωγενή Spd (Papadakis and Roubelakis-Angelakis, 2005), όπου και αναφέρεται πως εξωγενής επίδραση Spd σε συγκέντρωση 2.5mM οδήγησε σε παρεμπόδιση του ενζύμου και μείωση του παραγόμενου $O_2^{\cdot-}$.

Ανακεφαλαιώνοντας, τα πειραματικά δεδομένα αυτής της ενότητας φανέρωσαν αλληλεπίδραση ανάμεσα στην ενδογενή συγκέντρωση Spd και την επαγωγή των αποκρίσεων καταπόνησης στο μιτοχόνδριο. Συγκέντρωση Spd μέχρι και 1mM οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 , μέσω του συμπλόκου της NADPH-οξειδάσης/SOD και επακόλουθη επαγωγή της αναπνευστικής αλυσίδας για την απόσβεση των EMO. Αντίστοιχα, υψηλότερη συγκέντρωση Spd δεν επηρέασε την ενεργότητα του συμπλόκου και δεν επέφερε αλλαγές στην αναπνευστική λειτουργία. Τέλος δεν διαπιστώθηκε σχέση ανάμεσα στην δράση του ενζύμου *ΡΑΟ3* και την απόκριση του μιτοχονδρίου.

Συμπεράσματα και προοπτικές

Προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας έχουν αναδείξει την συμβολή των EMO στην σηματοδότηση αποκρίσεων στην αλατότητα, καθώς επίσης και την συμβολή των PAs και των προϊόντων οξείδωσής τους σε αυτές τις αποκρίσεις. Σε αυτήν την εργασία διερευνήθηκε η συμβολή του μιτοχονδρίου γενικότερα και του κυτοχρώματος-c στα παραπάνω γεγονότα. Επίσης διερευνήθηκε η συμβολή των PAs στην σηματοδότηση των παραπάνω αποκρίσεων. Τα βασικότερα συμπεράσματα της παρούσας εργασίας είναι τα εξής:

1. Μελέτη της απόκρισης φυτών καπνού στην καταπόνηση από αλατότητα φανέρωσε σημαντικές διαφορές ανάμεσα στον ζωικό ΠΚΘ και τον επαγόμενο από καταπονήσεις φυτικό ΠΚΘ. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως η καταπόνηση από αλατότητα σε φυτά καπνού *in planta* οδηγεί στην επαγωγή

ΠΚΘ κατά τα πρότυπα των ζωικών συστημάτων μόνο στις πρώτες ώρες της καταπόνησης, ενώ καταπόνηση μεγαλύτερης διάρκειας οδηγεί σε νεκρωτικά χαρακτηριστικά. Επίσης η αλατότητα οδηγεί σε δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας και ενεργοποίηση των αμυντικών μηχανισμών του μιτοχονδρίου.

2. Υπερέκφραση του κυτοχρώματος-c οδήγησε σε βελτιωμένη εικόνα των ΓΤ φυτών σε συνθήκες καταπόνησης. Αν και παρατηρήθηκε έξοδος του κυτοχρώματος, παρόλα αυτά τα ενδο-μιτοχονδριακά επίπεδα της πρωτεΐνης παρέμειναν υψηλά. Τα ΓΤ φυτά εμφάνισαν χαμηλότερη συγκέντρωση EMO από τα αντίστοιχα αγρίου τύπου φυτά, ενώ η υψηλή συγκέντρωση ATP και εξωκυτταρικού κυτοχρώματος-c οδήγησε σε παρεμπόδιση του ΠΚΘ.
3. Η Spd παίζει ρόλο σηματοδότη στις αποκρίσεις του μιτοχονδρίου. Η Spd επάγει την παραγωγή EMO από ενζυματικούς μηχανισμούς (NADPH-οξειδάση, SOD) που οδηγούν σε ενεργοποίηση της αναπνευστικής αλυσίδας.

Τα παραπάνω αποτελέσματα αν και απαντούν σε αρκετά ερωτήματα όσο αφορά την λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας κατά την καταπόνηση από αλατότητα, δημιουργούν και πολλά ερωτήματα:

1. Διερεύνηση περαιτέρω ομοιοτήτων ανάμεσα στον αποπτωτικό μηχανισμό, και τον επαγόμενο από καταπονήσεις ΠΚΘ. Αν και έχουν ήδη διαπιστωθεί πολλές και σημαντικές ομοιότητες ανάμεσα στα δυο μονοπάτια, το μονοπάτι του ΠΚΘ στα φυτά δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως.
2. Διερεύνηση της απόκρισης των υπολοίπων «συστατικών» της αναπνευστικής αλυσίδας κατά τις αβιοτικές καταπονήσεις. Το κυτόχρωμα-c έχει αναδειχθεί σε κομβικό παράγοντα στις αποκρίσεις κατά την αλατότητα, αλλά η μεταφορά ηλεκτρονίων και κατ' επέκταση και η αλυσίδα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης εξαρτάται τόσο από τα ενζυμικά σύμπλοκα όσο και από την παροχή μεταβολιτών.
3. Αν και υπάρχουν πολυάριθμες αναφορές για την συμβολή των PAs στον έλεγχο της αναπνευστικής λειτουργίας, ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτό παραμένει ασαφής. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο μηχανισμός παραγωγής των EMO από τις PAs, καθώς και η ιδιαίτερη φύση της αλληλεπίδρασης EMO και μιτοχονδρίου.

- Abdullaev ZK, Bodrova ME, Chernyak BV, Dolgikh DA, Kluck RM, Pereverzev MO, Arseniev AS, Efremov RG, Kirpichnikov MP, Mokhova EN, Newmeyer DD, Roder H, Skulachev VP** (2002) A cytochrome c mutant with high electron transfer and antioxidant activities but devoid of apoptogenic effect. *Biochem J* **362**: 749-754
- Alcazar R, Garcia-Martinez J, Cuevas JC, Tiburcio AF, Altabella T** (2005) Overexpression of ADC2 in *Arabidopsis* induces dwarfism and lateflowering through GA deficiency. *Plant J* **43**: 425–436
- Alcazar R, Marco F, Cuevas JC, Patron M, Ferrando A, Carrasco P, Tiburcio AF, Altabella T** (2006) Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnol Lett* **28**: 1867–1876
- Allakhverdiev SI, Sakamoto A, Nishiyama Y, Inaba M, Murata N** (2000) Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiol* **123**: 1047-1056
- Allakhverdiev SI, Sakamoto A, Nishiyama Y, Inaba M, Murata N** (2000) Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiol* **123**: 1047-1056
- Allan AC, Fluhr R** (1997) Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell* **9**: 1559–1572
- Alscher RG, Donahue J, Cramer CL** (1997) Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiol Plant* **100**: 224-233
- Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA** (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)* **70**: 200–214
- Andronis EA, Roubelakis-Angelakis KA** (2009) Short-term salinity stress in tobacco plants leads to the onset of animal-like PCD hallmarks in planta in contrast to long-term stress. *Planta*: Accepted for Publication
- Aranha MM, Matos AR, Teresa Mendes A, Vaz Pinto V, Rodrigues CMP, Arrabaca JD** (2007) Dinitro-*o*-cresol induces apoptosis-like cell death but not alternative oxidase expression in soybean cells. *J Plant Physiol* **164**: 675-684

- Asada K** (1984) Chloroplasts: Formation of active oxygen and its scavenging. *Methods Enzymol* **105**: 422-429
- Asada K** (1992a) Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* **85**: 235-241
- Asada K** (1994) Production and action of oxygen species in photosynthetic tissues. *In* CH Foyer, PM Mullineaux, eds, Causes of photo-oxidative stress and amelioration of defence systems in plants,. CRC Press Boca Raton, pp 77-104
- Asada K** (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* **141**: 391-396
- Asada K, Takahashi M** (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. *In* DJ Kyle, CB Osmond, CJ Arntzen, eds, Photoinhibition. Elsevier, Amsterdam – New York – Oxford pp 227-287
- Atkin OK, Zhang Q, Wiskich JT** (2002) Effect of temperature on rates of alternative and cytochrome pathway respiration and their relationship with the redox poise of the quinone pool. *Plant Physiol* **128**: 212-222
- Auh CK, Murphy TM** (1995) Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O₂⁻ and H₂O₂ by Phytophthora elicitor-simulated rose cells. . *Plant Physiol* **107**: 1241-1247
- Bachrach U** (2005) Naturally occurring polyamines: Interaction with Macromolecules. *Current Protein and Peptide Science* **6**: 559-566
- Baker CJ, Orlandi JD** (1995) Active oxygen in plant morphogenesis. *Annu Rev Phytopathol* **33**: 299-321
- Balk J, Leaver CJ, McCabe PF** (1999) Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants. *FEBS Lett* **463**: 151-154
- Baum JA, Scandalios JG** (1981) Isolation and characterization of the cytosolic and mitochondrial superoxide dismutases of maize. *Arch Biochem Biophys* **206**: 249-264

Beard ME, Baker R, Conomos P (1985) Oxidation of oxalate and polyamines by rat peroxisomes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **33**: 460-464

Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* **44**: 276-287.

Blackstone NW, Green DR (1999) The evolution of a mechanism of cell suicide. *BioEssays* **21**: 84-88

Blackstone NW, Green DR (1999) The evolution of a mechanism of cell suicide. *BioEssays* **21**: 84-88

Bolkenius FN, Seiler N (1981) Acetyl derivatives as intermediates in polyamine catabolism. *Inter J Biochem* **13**: 287-292

Bolwell GP, Butt VS, Davies DR, Zimmerlin A (1995) The origin of the oxidative burst in plants. *Free Rad Res* **23**: 517-532

Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J (1999) Polyamines and environmental challenges: recent developments. *Plant Sci* **140**: 103-125

Boveris A, Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* **134**: 707-716

Bowler C, Montagu MV, Inze D (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **43**: 83-116

Braidot E, Petrusa E, Vianello A, Macri F (1999) Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing complex I or complex II substrates. *FEBS Lett* **451**: 347-350

Brieger L (1885) Ueber Spaltungsprodukte der Bacterien, Zweite Mittheilung. *Zeitschr Physiol Chem* **9**: 1-7

Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, Pink D (2003) The molecular analysis of leaf senescence--a genomics approach. *Plant Biotechnol J* **1**: 3-22

Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 269-290

Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AO (1977) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. . *Arch Biochem Biophys* **180**: 248-257

Capell T, Escobar C, Lui H, Burtin D, Lepri O, Christou P (1998) Overexpression of the oat arginine decarboxylase cDNA in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) affects normal development patterns in vitro and results in putrescine accumulation in transgenic plants. *Theor Appl Genet* **97**: 246-254

Carter C, Healy R, O'Tool NM, Naqvi SMS, Ren G, Park S, Beattie GA, Horner HT, Thornburg RW (2007) Tobacco Nectaries Express a Novel NADPH Oxidase Implicated in the Defense of Floral Reproductive Tissues against Microorganisms. *Plant Physiol* **143**: 389-399

Cervelli M, Caro O, Penta A, Angelini R, Federico R, Vitale A, Mariottini P (2004) A novel C-terminal sequence from barley polyamine oxidase is a vacuolar sorting signal. *Plant J* **40**: 410-418

Cervelli M, Tavladoraki P, Agostino SD, Angelini R, Federico R, Mariottini P (2000) Isolation and characterization of three polyamine oxidase genes from *Zea mays*. *Plant Physiol Biochem* **38**: 667-677

Chan DC (2006) Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development. *Cell* **125**: 1241

Chance B, Hollunger G (1961) The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria. I. General properties and nature of the products of succinate-linked reduction of pyridine nucleotide. . *J Biol Chem* **236**: 1534-1543

Chance B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* **59**: 527-605

Chivasa S, Carr JP (1998) Cyanide restores N gene-mediated resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tobacco expressing salicylic acid hydroxylase. *Plant Cell* **10**: 1489-1498

Clifton R, Millar AH, Whelan J (2006) Alternative oxidases in Arabidopsis: A comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1757**: 730-741

Cohen SS (1998) *A Guide to the Polyamines*. Oxford University Press, New York

Cona A, Rea G, Angelini R, Federico R, Tavladoraki P (2006) Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends Plant Sci* **11**: 80-88

Czarna M, Jarmuszkiewicz W (2005) Activation of alternative oxidase and uncoupling protein lowers hydrogen peroxide formation in amoeba *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *FEBS Lett* **579**: 3136-3140

David PS, Morrison MR, Wong S-L, Hill BC (1999) Expression, purification and characterization of recombinant forms of membrane-bound cytochrome c-550nm from *Bacillus subtilis*. *Protein Expression and Purification* **15**: 69-76

Desagher S, Martinou JC (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* **10**: 369-377

Diaz M, De-Haro V, Munoz R, Quiles MJ (2007) Chlororespiration is involved in the adaptation of Brassica plants to heat and high light intensity. *Plant Cell & Environ* **30**: 1578-1585

Dimri GP (2005) What has senescence got to with cancer? . *Cancer Cell* **7**: 505–512

Douce R, Neuburger M (1989) The uniqueness of plant mitochondria. . *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**: 371–414

Dudley HW, Rosenheim O, Starling WW (1927) The constitution and synthesis of spermidine, a newly discovered base isolated from animal tissues. *Biochem J* **21**: 97–103

Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* **7**: 663-698

Elstner EF (1982) Oxygen activation and oxygen toxicity. . *Annu Rev Plant Physiol* **33**: 73-96

Elstner EF, Heupel A (1978) Formation of H₂O₂ by isolated cell-walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia*). *Planta* **130**: 175-180

Elthon TE, Nickels RL, McIntosh L (1989) Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. *Plant Physiol* **89**: 1311-1317

Federico R, Angelini R (1991) Polyamine catabolism in plants. *In* RD Slocum, HE Flores, eds, *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 41–56

Finazzi G, Furia A, Barbagallo RP, Forti G (1999) State transitions, cyclic and linear electron transport and photophosphorylation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* **1413**: 117-129

Flowers TJ, Hajibagherp MA, Yeo AR (1991) Ion accumulation in the cell walls of rice plants growing under saline conditions: evidence for the Oertli hypothesis. *Plant, Cell and Environment* **14**: 319-325

Forman HJ, Kennedy JA (1974) Role of superoxide radical in mitochondrial dehydrogenase reactions. . *Biochem Biophys Res Commun* **60**: 1044–1050

Foyer CH, Descourvieres P, Kunert KJ (1994) Production against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. . *Plant Cell Envir* **17**: 507-523

Foyer CH, Haliwell B (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**: 21-25

Foyer CH, Noctor G (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. . *Physiol Plant* **119**: 355–364

Foyer CH, Noctor G (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. . *Plant Cell* **17**: 1866–1875

Fridovitch I (1986) Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* **247**: 1-11

Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, K.Yamaguchi-Shinozaki, Shinozaki K (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 436–442

Gadjev I, Stone JM, Gechev TS (2008) Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. *Int Rev Cell Mol Biol* **270**: 87-144

Giannattasio S, Atlante A, Antonacci L, Guaragnella N, Lattanzio P, Passarella S, Marra E (2008) Cytochrome c is released from coupled mitochondria of yeast en route to acetic acid-induced programmed cell death and can work as an electron donor and a ROS scavenger. *FEBS Lett* **582**: 1519-1525

Giffin BF, McCann PP, Bacchi CJ (1986) Effect of putrescine on the respiration of *Trypanosoma brucei brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **20**: 165-171

Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG (2007) Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 722-728

Gonzalez-Meler MA, Ribas-Carbo M, Giles L, Siedow JN (1999) The effect of growth and measurement temperature on the activity of the alternative respiratory pathway. *Plant Physiol* **120**: 765-772

Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**: 1309-1312

Gross GG, Janse C, Elstner EF (1977) Involvement of malate, monophenols and the superoxide radical in hydrogen peroxide formation by isolated cell wall from horseradish (*Armoracia lepathifolia* Gilib). *Planta* **136**: 271-276

Grutter MG (2000) Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol* **10**: 649-655

Guarnieri C, Georgountzos A, Caldarera I, Flamigni F, Ligabue A (1987) Polyamines stimulate superoxide production in human neutrophils activated by N-fMet-Leu-Phe but not by phorbol myristate acetate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **930**: 135-139

Guidot DM, Repine JE, Kitlowski AD, Flores SC, Nelson SK, Wright RM, McCord JM (1995) Mitochondrial respiration scavenges extramitochondrial superoxide anion via a nonenzymatic mechanism. *The Journal of Clinical Investigation* **96**: 1131-1136

Halestrap AP, Gillespie JP, O'Toole A, Doran E (2000) Mitochondria and cell death: a pore way to die? *Symp Soc Exp Biol* **52**: 65-80

Halliwell B (1978a) Lignin synthesis: the generation of hydrogen peroxide and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese (II) and phenols. *Planta* **40**: 81-88

Hay R, Bohni P, Gasser S (1984) How mitochondria import proteins. *Biochim Biophys Acta* **779**: 65-87

Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770-776

Hilal M, Zenoff AM, Ponessa G, Moreno H, Massa EM (1998) Saline stress alters the temporal patterns of xylem differentiation and alternative oxidase expression in developing soybean roots. *Plant Physiol* **117**: 695-701

Hirst J, Carroll J, Fearnley IM, Shannon RJ, Walker JE (2003) The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1604**: 135-150

Iwata S, Lee JW, Okada K, Lee JK, Iwata M, Rasmussen B, Link TA, Ramaswamy S, Jap BK (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *Science* **281**: 64-71

Jang I-C, Choi W-B, Lee K-H, Song SI, Nahm BH, Kim J-K (2002) High-Level and Ubiquitous Expression of the Rice Cytochrome c Gene *OsCc1* and Its Promoter Activity in Transgenic Plants Provides a Useful Promoter for Transgenesis of Monocots. *Plant Physiol* **129**: 1473-1481

Jensen PK (1966) Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles. I. pH dependency and hydrogen peroxide formation. . *Biochim Biophys Acta* **122**: 157–166

Jones A (2000) Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Trends Plant Sci* **5**: 225-230

Joseph-Horne T, Hollomon DW, Wood PM (2001) Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochimica et Biophysica Acta* **1504**: 179-195

Josse E-M, Alcaraz J-P, Labourt A-M, Kuntz M (2003) In vitro characterization of a plastid terminal oxidase (PTOX). *Eur J Biochem* **270**: 3787-3794

Josse E-M, Simkin AJ, Gaffe J, Laboure A-M, Kuntz M, Carol P (2000) A Plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. *Plant Physiol* **123**: 1427-1436

Juszczuk IM, Rychter AM (2003) Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochim Pol* **50**: 1257-1271

Kaiser W (1976) The effect of hydrogen peroxide on CO₂ fixation of isolated intact chloroplasts. . *Biochem Biophys Acta* **440**: 476-482

Kasukabe Y, He L, Nada K, Misawa S, Ihara I, Tachibana S (2004) Overexpression of Spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **45**: 712-722

Keilin D (1930) Cytochrome and intracellular oxidase. *Proc R Soc London, Ser B* **106**: 418-444

Kepler LD, Baker CJ (1989) O₂-initiated lipid peroxidation in a bacteria-induced hypersensitive reaction in tobacco suspensions. . *Phytopath* **79**: 555-562

- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR** (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**: 239-257
- Kim BG, Sobota A, Bitonti AJ, McCann PP, Byers TJ** (1987) Polyamine metabolism in *Acanthamoeba*: polyamine content and synthesis of ornithine, putrescine, and diaminopropane. *J Protozool* **34**: 278–284
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD** (1997) The Release of Cytochrome c from Mitochondria: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis. *Science* **275**: 1132-1136.
- Knight H, Knight MR** (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci* **6**: 262–267
- Korshunov SS, Krasnikov BF, Pereverzev MO, Skulachev VP** (1999) The antioxidant functions of cytochrome c. *FEBS Lett* **462**: 192-198
- Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA** (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* **416**: 15-18
- Kowaltowski AJ, Vercesi AE** (1999) Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **26**: 463-471
- Krishnamurthy KV, Krishnaraj R, Chozhavendan R, Christopher FS** (2000) The programme of cell death in plants and animals – A comparison. *Curr Sci* **79**: 1169-1181
- Kusano T, Yamaguchi K, Berberich T, Takahashi Y** (2007) Advances in polyamine research in 2007. *J Plant Res* **120**: 345–350
- Ladenburg A** (1886) Über die Identität des Cadaverin mit dem Pentamethyldiamin. . *Ber Dtsch Chem Ges* **19**: 2585–2586
- Ladenburg A, Abel J** (1888) Ueber das Aethylenimin (Spermin?). *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **21**: 758-766

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Lam E, Pontier D, del Pozo O (1999) Die and let live - programmed cell death in plants. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 502-507

Lamb C, Dixon RA (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 251-275

Lambert AJ, Brand MD (2004) Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem* **279**: 39414–39420

Larson RA (1988) The antioxidants of higher plants. *Phytochem* **27**: 969-978

Laurenzi M, Tipping AJ, Marcus SE, Knox JP, Federico R, Angelini R, McPherson MJ (2001) Analysis of the distribution of copper amine oxidase in cell walls of legume seedlings. *Planta* **214**: 37–45

Law MY, Charles SA, Halliwell B (1993) Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinachea oleracea*) chloroplasts. *Biochem J* **210**: 899-903

Leeuwenhoek Av (1678) *Observationes D. Anthonii Leeuwenhoek, de natis e semine genitali animalculis*. *Philos Trans R Soc Lond* **12**: 1040–1043

Li Campian J, Gao X, Qian M, Eaton JW (2007) Cytochrome c Oxidase Activity and Oxygen Tolerance. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 12430-12438

Liu L, Eriksson KEL, Dean JFD (1995) Localization of hydrogen peroxide production in *Pisum sativum* L. using epi-polarization microscopy to follow cerium perhydroxide deposition. *Plant Physiol* **107**: 501–506

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**: 147-157

Liu Y, Fiskum G, Schubert D (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* **80**: 780–787

Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohe L (1974) Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. . FEBS Lett **42**: 68–72

Loschen G, Flohe L, Chance B (1971) Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria. . FEBS Lett **18**: 261–264

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. . J Biol Chem **193**: 265-275

Marschner H (1995) The Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London

Mattoo AK, Pick U, Hoffman-Falk H, Edelman M (1981) The rapidly metabolized 32000 D polypeptide of the chloroplast is the proteinaceous shield regulating photosystem II electron transport and mediating diuron herbicide sensitivity. Proc Natl Acad Sci USA **78**: 1572-1576

Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells Proc Natl Acad Sci USA **96**: 8271–8276

Medhy MC (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. Plant Physiol **105**: 467-472

Miller LJ, Marx J (1998) Apoptosis. Science **281**: 1301-

Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M (2004) ATP and cytochrome c-dependent inhibition of caspase-9 activity in the cerebral cortex of newborn piglets. Neuroscience Letters **364**: 119-123

Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science **7**: 405-410

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Breusegem FV (2004) Reactive oxygen gene network of plants. . Trends Plant Sci **9**: 490–498

Møller SG, McPherson MJ (1998) Developmental expression and biochemical analysis of the Arabidopsis *atao1* gene encoding an H₂O₂-generating diamine oxidase. *Plant J* **13**: 781–791

Moschou PN, Delis ID, Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA (2008b) Transgenic tobacco plants overexpressing polyamine oxidase are not able to cope with oxidative burst generated by abiotic factors. *Physiol Plant* **133**: 140-156

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

Moschou PN, Sanmartin M, Andriopoulou AH, Rojo E, Sanchez-Serrano JJ, Roubelakis-Angelakis KA (2008c) Bridging the Gap between Plant and Mammalian Polyamine Catabolism: A Novel Peroxisomal Polyamine Oxidase Responsible for a Full Back-Conversion Pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol* **147**: 1845-1857

Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell & Environ* **25**: 239-250

Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* **417**: 1-13

Murphy TM, Asard H, Cross AR (1998) Possible sources of reactive oxygen species during the oxidative stress in plants. *In* H Asard, A Berczi, RJ Caubergs, eds, Plasma membrane redox systems and their role in biological stress disease. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp 215-247

Murphy TM, Huerta AJ (1990) Hydrogen peroxide formation in cultured rose cells in response to UV-C radiation. *Physiol Plant* **78**: 247-253

Nakagawa T, Suzuki T, Murata S, Nakamura S, Hino T, Maeo K, Tabata R, Kawai T, Tanaka K, Niwa Y, Watanabe Y, Nakamura K, Kimura T, Ishiguro S (2007) Improved gateway binary vectors: High-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants. *IBios Biotech Biochem* **71**: 2095-2100

Nantapong N, Kugimiya Y, Toyama H, Adachi O, Matsushita K (2004) Effect of NADH dehydrogenase-disruption and over-expression on respiration-related metabolism in *Corynebacterium glutamicum* KY9714. *Applied Microbiology and Biotechnology* **66**: 187-193

Narayana N, Shamala N, Ganesh KN, Viswamitra MA (2006) Interaction between the Z-Type DNA duplex and 1,3-propanediamine: Crystal structure of d(CACGTG)₂ at 1.2 Å resolution. *Biochem* **45**: 1200-1211

Newmeyer DD, Farschon DM, Reed JC (1994) Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell* **79**: 353-364

Nicholson DW (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* **6**: 1028-1042

Noctor G, De Paepe R, Foyer CH (2007) Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends Plant Sci* **12**: 125-134

Noctor G, Foyer CH (1998a) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Mol Biol* **49**: 249-279

Okazaki M, Ishibashi Y, Asoh S, Ohta S (1998) Overexpressed Mitochondrial Hinge Protein, a Cytochrome-c-Binding Protein, Accelerates Apoptosis by Enhancing the Release of Cytochrome-c from Mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **243**: 131-136

Papadakis AK, Roubelakis-Angelakis KA (2005) Polyamines inhibit NADPH oxidase-mediated superoxide generation and putrescine prevents programmed cell death induced by polyamine oxidase-generated hydrogen peroxide. *Planta* **220**: 826-837

Paschalidis KA, Moschou PN, Aziz A, Toumi I, Roubelakis-Angelakis KA (2009b) New insights on polyamines in the grapevine. . *In* *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*. Springer Publ

- Paschalidis KA, Moschou PN, Toumi I, Roubelakis-Angelakis KA** (2009a) Polyamine anabolic/catabolic regulation along the woody grapevine plant axis. *J Plant Physiol*: in press
- Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA** (2005b) Sites and regulation of polyamine catabolism in the tobacco plant. Correlations with cell division/expansion, cell cycle progression, and vascular development. *Plant Physiol* **138**: 2174-2184
- Pennel RI, Lamb C** (1997) Programmed cell death. *Plant Cell* **9**: 1157-1168
- Pozo Od, Lam E** (1998) Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Curr Biol* **8**: 1129-1132
- Primikirios NI, Roubelakis-Angelakis KA** (2001) Indications for posttranslational regulation of *Vitis vinifera* L. arginine decarboxylase. *Plant Mol Biol* **45**: 669-678
- Purvis AC, Shewfelt RL** (1993) Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues. *Physiol Plant* **88**: 712-718
- Rea G, Laurenzi M, Tranquilli E, Ovidio RD, Federico R, Angelini R** (1998) Developmentally and wound regulated expression of the gene encoding a cell wall copper amino oxidase in chickpea seedlings. *FEBS Lett* **437**: 177-182
- Rea G, Pinto MCd, Tavazza R, Biondi S, Gobbi V, Ferrante P, Gara LD, Federico R, Angelini R, Tavladoraki T** (2004) Ectopic Expression of Maize Polyamine Oxidase and Pea Copper Amine Oxidase in the Cell Wall of Tobacco Plants. *Plant Physiol* **134**: 1414-1426
- Rhoads DM, Umbach AL, Subbaiah CC, Siedow JN** (2006) Mitochondrial Reactive Oxygen Species. Contribution to Oxidative Stress and Interorganellar Signaling. *Plant Physiol* **141**: 357-366
- Robson CA, Vanlerberghe GC** (2002) Transgenic plant cells lacking mitochondrial alternative oxidase have increased susceptibility to mitochondria-dependent and -independent pathways of programmed cell death. *Plant Physiol* **129**: 1908-1920

Robson CA, Vanlerberghe GC (2002) Transgenic plant cells lacking mitochondrial alternative oxidase have increased susceptibility to mitochondria-dependent and -independent pathways of programmed cell death. *Plant Physiol* **129**: 1908-1920

Samali A, O'Mahoney M, Reeve J, Logue S, Szegezdi E, McMahon J, Fearnhead H (2007) Identification of an inhibitor of caspase activation from heart extracts; ATP blocks apoptosome formation. *Apoptosis* **12**: 465-474

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sasaki-Sekimoto Y, Taki N, Obayashi T, Aono M, Matsumoto F, Sakurai N, Suzuki H, Ohta H (2005) Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J* **44**: 653-668

Sazanov LA (2007) Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain. *Biochemistry* **46**: 2275–2288

Scandalios JG (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol* **101**: 7-12

Scherz-Shouval R, Elazar Z (2007) ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol* **17**: 422-427

Schrader M, Fahimi DH (2004) Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol* **122**: 383–393

Seiler N (1995) Polyamine oxidase, properties and functions. *Prog Brain Res* **106**: 333–344

Shabala S, Cuin TA (2008) Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum* **133**: 651-669

Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BNG, Palmer AE, Tsien RY (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **22** 1567 - 1572

Shen W, Clark AC, Huber SC (2003) The C-terminal tail of Arabidopsis 14-3-3 ω functions as an auto inhibitor and may contain a tenth α -helix. *Plant J* **34**: 473-484

Sherman F, Stewart JW (1971) Genetics and Biosynthesis of Cytochrome. *Annual Review of Genetics* **5**: 257-296

Siedow JN, Umbach AL (1995) Plant Mitochondrial Electron Transfer and Molecular Biology. *Plant Cell* **7**: 821-831

Simeonova E, Garstka M, Koziol-Lipinska J, Mostowska A (2004) Monitoring the mitochondrial transmembrane potential with the JC-1 fluorochrome in programmed cell death during mesophyll leaf senescence. *Protoplasma* **223**: 143-153

Skopelitis DS, Paranychianakis NV, Paschalidis KA, Pliakonis ED, Delis ID, Yakoumakis DI, Kouvarakis A, Papadakis AK, Stephanou EG, Roubelakis-Angelakis KA (2006) Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. *Plant Cell* **18**: 2767-2781

Skulachev VP (1998) Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett* **423**: 275-280

Slocum RD, Furey MJ (1991) Electron-microscopic cytochemical localization of diamine and polyamine oxidases in pea and maize tissues. *Planta* **183**: 443-450

Smith TA (1985a) The di- and polyamine oxidases of higher plants. *Biochem Soc Trans* **13**: 319-322

Staniek K, Nohl H (2000) Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics* **1460**: 268-275

Sun Y-L, Zhao Y, Hong X, Zhai Z-H (1999) Cytochrome c release and caspase activation during menadione-induced apoptosis in plants. *FEBS Lett* **462**: 317-321

Sun Y-L, Zhao Y, Hong X, Zhai Z-H (1999) Cytochrome c release and caspase activation during menadione-induced apoptosis in plants. *FEBS Letters* **462**: 317-321

Sutherland MW (1991) The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiol Mol Plant Path* **9**: 79-93

Tabor CW, Tabor H (1984) Polyamines. *Annu Rev Biochem* **53**: 749–790

Takahashi Y, Uehara Y, Berberich T, Ito A, Saitoh H, Miyazaki A, Terauchi R, Kusano T (2004) A subset of hypersensitive response marker genes, including HSR203J, is the downstream target of a spermine signal transduction pathway in tobacco. *Plant J* **40**: 586–595

Takehige K, Minakami S (1979) NADH- and NADPH-dependent formation of superoxide anions by bovine heart submitochondrial particles and NADH–ubiquinone reductase preparation. *Biochem J* **180**: 129–135

Tavladoraki P, Schininà ME, Cecconi F, Agostino SD, Manera F, Rea G, Mariottini P, Federico R, Angelini R (1998) Maize polyamine oxidase: primary structure from protein and cDNA sequencing. *FEBS Lett* **426**: 62–66

Tenhaken R, Levine A, Brisson LF, Dixon RA, Lamb C (1995) Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4158-4163

Thony-Meyer L, Fischer F, Kunzler P, Ritz D, Hennecke H (1995) *Escherichia coli* genes required for cytochrome c maturation. *Journal of Bacteriology*: 4321-4326

Tiburcio AF, Besford RT, Borrell A (1994) Posttranslational regulation of arginine decarboxylase synthesis by spermine in osmotically-stressed oat leaves. *Biochem Soc Trans* **22**: 455

Tiwari BS, Belenghi B, Levine A (2002) Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. *Plant Physiol* **128**: 1271-1281

Udransky Lv, Baumann E (1888) Über die Identität des Putrescins und des Tetramethylendiamins. *Ber Dtsch Chem Ges* **21**: 2938–2941

Umbach AL, Fiorani F, Siedow JN (2005) Characterization of transformed Arabidopsis with altered alternative oxidase levels and analysis of effects on reactive oxygen species in tissue. *Plant Physiol* **139**: 1806-1820

Umbach AL, Siedow JN (1993) Covalent and noncovalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. *Plant Physiol* **103**: 845-854

Umekage S, Ueda T (2006) Spermidine inhibits transient and stable ribosome subunit dissociation. *FEBS Lett* **580**: 1222-1226

Urano K, Hobo T, Shinozaki K (2005) Arabidopsis ADC genes involved in polyamine biosynthesis are essential for seed development. *FEBS Lett* **FEBS Lett**: 1557–1564

Urano K, Yoshiba Y, Nanjo T, Igarashi Y, Seki M, Sekiguchi F, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2003) Characterization of Arabidopsis genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant Cell Environ* **26**: 1917–1926

Vacca RA, de Pinto MC, Valenti D, Passarella S, Marra E, De Gara L (2004) Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiol* **134**: 1100-1112

Vacca RA, Valenti D, Bobba A, Merafina RS, Passarella S, Marra E (2006) Cytochrome c is released in a reactive oxygen species-dependent manner and is degraded via caspase-like proteases in Tobacco BY-2 cells en route to heat shock-induced cell death. *Plant Physiol* **141**: 208-219

van Doorn WG, Woltering EJ (2005) Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends Plant Sci* **10**: 117-122

Vanlerbeghe GC, McIntosh L (1992) Lower growth temperature increases alternative pathway capacity and alternative oxidase protein in tobacco. *Plant Physiol* **100**: 115-119

Vanlerberghe GC, McIntosh L (1994) Mitochondrial Electron Transport Regulation of Nuclear Gene Expression (Studies with the Alternative Oxidase Gene of Tobacco). *Plant Physiol* **105**: 867-874

Vaux DL, Korsmeyer SJ (1999) Cell death in development. *Cell* **96**: 245-254

Vaux DL, Korsmeyer SJ (1999) Cell death in development. *Cell* **96**: 245-254

Wagner AM, Krab K (1995) The alternative respiration pathway in plants: role and regulation. *Physiol Plant* **95**: 318-325

Wang P, Duan W, Takabayashi A, Endo T, Shikanai T, Ye J-Y, Mi H (2006) Chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in tobacco leaves functions in alleviation of oxidative damage caused by temperature stress. *Plant Physiol* **141**: 465-474

Wojtaszecz P (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J* **322**: 681-692

Woltering EJ, van der Bent A, Hoeberichts FA (2002) Do Plant Caspases Exist? *Plant Physiol* **130**: 1764-1769

Wu T, Yankovskaya V, McIntire WS (2003) Cloning, sequencing, and heterologous expression of the murine peroxisomal flavoprotein N1-acetylated polyamine oxidase. *J Biol Chem* **278**: 20514–20525

Xie Z, Chen Z (1999) Salicylic acid induces rapid inhibition of mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation in tobacco cells. *Plant Physiol* **120**: 217-225

Xing H, Higgins VJ, Blumwald E (1997) Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* promote translocation of cytosolic components of NADPH oxidase to the plasma membrane of tomato cells. *Plant Cell* **9**: 249-259

Xu Y, Hanson MR (2000) Programmed cell death during pollination-induced petal senescence in petunia. *Plant Physiol* **122**: 1323-1333

Yamaguchi K, Takahashi Y, Berberich T, Imai A, Miyazaki A, Takahashi T, Michael A, Kusano T (2006) The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **580**: 6783

Yeo AR, Lee S, Izard P, Boursier PJ, Flowers TJ (1991) Short- and Long-Term Effects of Salinity on Leaf Growth in Rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot* **42**: 881-889

Yip JY, Vanlerberghe GC (2001) Mitochondrial alternative oxidase acts to dampen the generation of active oxygen species during a period of rapid respiration induced to support a high rate of nutrient uptake. *Physiol Plantarum* **112**: 327-333

Yoda H, Hiroi Y, Sano H (2006) Polyamine oxidase is one of the key elements for oxidative burst to induce programmed cell death in tobacco cultured cells. *Plant Physiol* **142**: 193–206

Yoda H, Yamaguchi Y, Sano H (2003) Induction of hypersensitive cell death by hydrogen peroxide produced through polyamine degradation in tobacco plants. . *Plant Physiol* **132**: 1973–1981

Yoda H, Yamaguchi Y, Sano H (2003) Induction of hypersensitive cell death by hydrogen peroxide produced through polyamine degradation in tobacco plants. . *Plant Physiol* **132**: 1973–1981

Zhang L, Yu L, Yu CA (1998) Generation of superoxide anion by succinate–cytochrome c reductase from bovine heart mitochondria. . *J Biol Chem* **273**: 33972–33976

Zhao Y, Jiang ZF, Sun YL, Zhai ZH (1999) Apoptosis of mouse liver nuclei induced in the cytosol of carrot cells. *FEBS Letters* **448**: 197-200.

Zhu J-K (2001) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci* **6**: 66-71