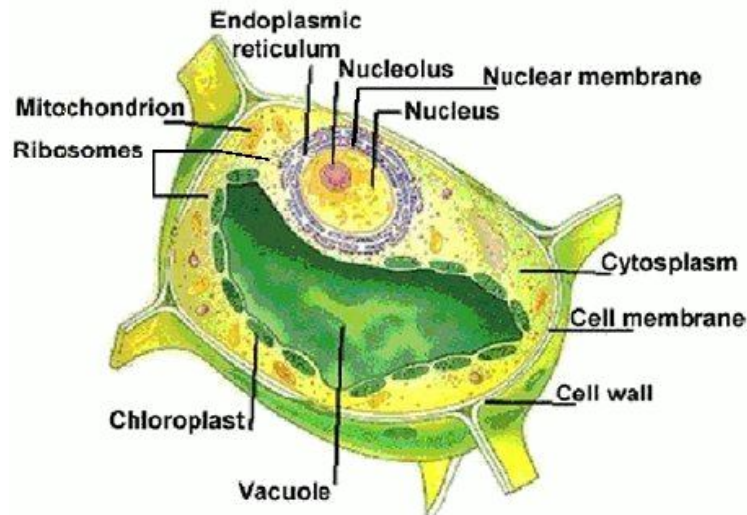


Διατριβή Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης

Ο Πιθανός Ρόλος του Καταβολισμού των Πολυαμινών και των Ενεργών Μορφών Οξυγόνου κατά την Καταπόνηση Αλατότητας σε Κυτταροκαλλιέργεια *Vitis vinifera* cv Souldanina

και

Κατασκευή Πλασμιδιακών Φορέων για την Απενεργοποίηση του Γονιδίου της Αποκαρβοξυλάσης της S-Αδενοσύλ-Μεθειονίνης



Δημήτρης Γιακουμάκης

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τμήμα Βιολογίας

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα

Μοριακή Βιολογία και Βιοτεχνολογία Φυτών

Ηράκλειο 2003

**Ο Πιθανός Ρόλος του Καταβολισμού των Πολυαμινών και των
Ενεργών Μορφών Οξυγόνου κατά την Καταπόνηση Αλατότητας σε
Κυτταροκαλλιέργεια *Vitis vinifera* cv *Soultanina*
και
Κατασκευή Πλασμιδιακών Φορέων για την Απενεργοποίηση του
Γονιδίου της Αποκαρβοξυλάσης της S-Αδενοσύλ-Μεθειονίνης**

**Από τον
Δημήτρη Γιακουμάκη**

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



Επιτροπή Αξιολόγησης:

Καθηγήτρια Καλλιόπη Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη

Καθηγητής Νικόλαος Πανόπουλος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ABSTRACT	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Πολυαμίνες	8
1.2 Βιοσύνθεση και Καταβολισμός των Πολυαμινών	9
1.3 Πολυαμίνες και Αιθυλένιο	10
1.4 Αλατότητα	11
1.5 Ενεργές Μορφές Οξυγόνου (ΕΜΟ)	13
1.6 Παραγωγή και απόσβεση των ΕΜΟ	13
1.7 Ρόλος και Λειτουργίες των ΕΜΟ	14
1.8 Προγραμματισμένος Κυτταρικός Θάνατος (PCD)	16
1.9 Γονιδιακή Σίγηση (Gene silencing)	18
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	20
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	21
2.1 Φυτικό Υλικό	21
2.2 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών	21
2.3 Ποσοτικός Προσδιορισμός Ολικών Πρωτεϊνών	21
2.4 Αποδιατακτική Ηλεκτροφόρηση των Πρωτεϊνών σε Πήκτωμα Πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)	22
2.5 Ανίχνευση ολικών πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης	22
2.6 Ανάλυση Western Blot και Ανοσοεντοπισμός της ΡΑΟ και της ADC	22
2.7 Προσδιορισμός Ενζυμικής Ενεργότητας Οξειδάσης των Πολυαμινών (ΡΑΟ)	23
2.8 Προσδιορισμός Ενζυμικής Ενεργότητας της Καταλάσης (CAT)	23
2.9 Απομόνωση γενωμικού DNA	24
2.10 Εκχύλιση για ΕΜΟ	24
2.10.1 Προσδιορισμός H ₂ O ₂	25
2.10.2 Προσδιορισμός O ₂	25
2.11 Διαδικασία κλωνοποίησης	26
2.11.1 Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων για μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> .	26
2.11.2 Πέψη του DNA με περιοριστικά ένζυμα και έκλουση γραμμικών τμημάτων DNA από το πήκτωμα αγαρόζης	26

2.11.3 Κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακό φορέα και εισαγωγή του σε δεκτικά κύτταρα <i>E. coli</i> (μετασχηματισμός)	27
2.11.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας από βακτηριακή καλλιέργεια (mini-prep), με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης κυττάρων	28
2.12 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	29
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	30
3.1 Βιωσιμότητα των κυττάρων σε συνθήκες αλατότητας	30
3.2 Ειδική ενεργότητα της ΡΑΟ	31
3.3 Ανοσοεντοπισμός της ΡΑΟ και της ADC	32
3.4 Ειδική ενεργότητα της Κατάλασης	34
3.5 Μελέτη της κατάτμησης του γενωμικού DNA	35
3.6 Προσδιορισμός των ΕΜΟ	36
3.7 Κατασκευή πλασμιδιακών φορέων με σκοπό τη δημιουργία ran handle για το γονίδιο της SAMDC	38
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	44
5. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	48
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	49

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε, κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2002-2003, στο εργαστήριο Φυσιολογίας και Βιοχημείας Φυτών του Τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Κρήτης. Για τη διεκπεραίωσή της απαιτήθηκε, πέραν της προσωπικής μου προσπάθειας, η πολύτιμη αρωγή και αμέριστη συμπαράσταση πολλών ανθρώπων, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά την υπεύθυνη του μεταπτυχιακού προγράμματος και επιβλέπουσα της διατριβής μου, Καθηγήτρια Κ. Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, όχι μόνο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, προσφέροντάς μου την ευκαιρία να ασχοληθώ με τη Φυσιολογία και Βιοχημεία Φυτών στο εργαστήριό της, αλλά και για την ηθική, επιστημονική και οικονομική υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Ν. Πανόπουλο για την καθοδήγησή του σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους «βετεράνους» του εργαστηρίου Στάσα Παπαδάκη και Κώστα Πασχαλίδη για την έμπρακτη απόδειξη της φιλίας τους, σ' όλες τις δυσκολίες που συνάντησα. Επίσης, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, Δάκη Σκοπελίτη, Ευθύμη Ανδρώνη, Ελένη Πλιακώνη και Γιάννη Ντελή για τη βοήθεια, την υπομονή και την κατανόησή τους. Στα υπόλοιπα παιδιά του μεταπτυχιακού προγράμματος εύχομαι κάθε επιτυχία για τα μελλοντικά τους σχέδια.

Τέλος, θέλω να εκφράσω τη βαθιά ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου και τη Γιώτα, και στους φίλους μου Γιάννη, Γιάννη, Γιάννη, Γιώργο, Θωμά και Μανώλη για τη στήριξη που μου έδωσαν και μου δίνουν, στη διάρκεια μιας επίπονης αλλά εξαιρετικά διδακτικής προσπάθειας.

ABSTRACT

Salinity is a complex environmental factor incorporating osmotic, and ionic stress as well as secondary stress factors such as oxidative stress. It has been documented that salt stress can lead to the formation and accumulation of reactive oxygen species (ROS), and to programmed cell death (PCD). At this work, an effort has been made to study the polyamine catabolism in *Vitis* cell cultures (*Vitis vinifera* cv Soutanina) during salt stress. It was hypothesized that ROS generation, through PAO activation, can trigger PCD in salt-treated cell cultures. The results showed: i) reduction of cell viability, ii) small increase of PAO specific activity, iii) fragmentation of genomic DNA (indication of PCD), iv) no significant generation of ROS.

Furthermore, plasmid vectors were constructed in an effort to silence the S-adenosyl-methionine decarboxylase gene, through a double incorporation of the same cDNA fragment in opposite orientation separated by an intron sequence between them (pan handle) for in vivo splicing. The final construct comprises a powerful tool for the study of polyamines-ethylene interaction during senescence, and of the role of polyamines in response to salt stress

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένας από τους αβιοτικούς παράγοντες που προκαλούν καταπόνηση στα φυτά είναι η υψηλή αλατότητα. Πρόκειται για έναν πολύπλοκο περιβαλλοντικό αναστολέα που παρουσιάζει τρεις παραμέτρους ως προς την επίδρασή του: την ωσμωτική, την τροφική και την ιοντική παράμετρο. Έχει αναφερθεί, αλλά δεν έχει αποδειχτεί, ότι η καταπόνηση με αλατότητα είναι δυνατό να οδηγήσει στη συσσώρευση ενεργών μορφών οξυγόνου, καθώς και σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε ο καταβολισμός των πολυαμινών κατά την καταπόνηση αλατότητας αιωρούμενων κυττάρων αμπελιού (*Vitis vinifera* cv Soultanina). Αρχικά ελέγχθηκε η τύχη των κυττάρων όσον αφορά τη βιωσιμότητα και την πορεία τους ή όχι προς τον κυτταρικό θάνατο, και έγινε προσπάθεια συσχέτισης της παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου με την ενεργότητα/ενεργοποίηση της οξειδάσης των πολυαμινών, ένζυμο καταβολισμού των ανώτερων πολυαμινών, και του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Τα αποτελέσματα έδειξαν: i) μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων, ii) μικρή αύξηση της ειδικής ενεργότητας της οξειδάσης των πολυαμινών, iii) κατάτμηση του γενωμικού DNA (πράγμα το οποίο συνιστά ένδειξη κυτταρικού θανάτου), iv) μη σημαντική παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου.

Παράλληλα, κατασκευάστηκαν πλασμιδιακοί φορείς με σκοπό τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών με απενεργοποιημένο το γονίδιο της SAMDC, μέσω της τεχνικής σιώπησης γονιδίων. Αυτά θα αποτελέσουν σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης πολυαμινών-αιθυλενίου στη διαδικασία της γήρανσης και της συμμετοχής των πολυαμινών στην απόκριση στην αλατότητα.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Πολυαμίνες

Οι πολυαμίνες αποτελούν μία κατηγορία αλειφατικών αμινών και απαντώνται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Πρόκειται για πολυκατιόντα μικρού μοριακού βάρους (σε συνηθισμένες τιμές pH) και οι κύριες μορφές τους είναι η πουτρεσίνη (Putrescine, βουτάνιο-1,4-διαμίνη), η σπερμιδίνη [Spermidine, N-(3-αμινοπρόπυλ)-βουτάνιο-1,4-διαμίνη] και η σπερμίνη [Spermine, NN'-δισ-(3-αμινοπρόπυλ)-βουτάνιο-1,4-διαμίνη]. Το γεγονός ότι είναι θετικά φορτισμένες χημικές ενώσεις, σε φυσιολογικό pH, είναι σημαντικό για τη βιολογική τους λειτουργία. Έτσι, δεσμεύονται ηλεκτροστατικά και αλληλεπιδρούν με ανιονικά μακρομόρια όπως DNA, RNA και φωσφολιπίδια, με συγκεκριμένες πρωτεΐνες (Arelbaum *et al.*, 1988; Tassoni *et al.*, 1998) και με ολιγοσακχαρίτες (Tiburcio *et al.*, 1989; Heby *et al.*, 1990; Slocum *et al.*, 1991). Οι πολυαμίνες εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, στα χυμοτόπια, στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες (Slocum *et al.*, 1991; Kotzabasis *et al.*, 1993) των φυτικών κυττάρων. Στα ανώτερα φυτά οι πολυαμίνες βρίσκονται είτε σε ελεύθερη μορφή, είτε ως συνδεδεμένα μόρια. Οι συνδεδεμένες πολυαμίνες περιλαμβάνουν τις συζευγμένες πολυαμίνες (με μικρά μόρια, όπως φαινολικά οξέα) και τις δεσμευμένες πολυαμίνες (με διάφορα μακρομόρια, όπως πρωτεΐνες) (Martin-Tanguy *et al.*, 1997; Tiburcio *et al.*, 1997). Οι πολυαμίνες έχουν σημαντικές λειτουργίες στους φυτικούς οργανισμούς, σε όλες τις φάσεις της ανάπτυξής τους καθώς και σε συνθήκες καταπονήσεων. Συνοπτικά οι διαδικασίες στις οποίες εμπλέκονται είναι οι εξής:

- i) Η ριζογένεση (Friedman *et al.*, 1985; Watson *et al.*, 1998; Hummel *et al.*, 2002).
- ii) Η εμβρυογένεση (Yadav *et al.*, 1997; Pedroso *et al.*, 1998).
- iii) Η ανάπτυξη των ανθέων και των καρπών (Galston and Kaur-Sawhney 1990; Kakkar and Rai 1993; Alabadi and Carbonell, 1998).
- iv) Η γήρανση (Evans and Malmberg, 1989; Kumar *et al.*, 1996; Paschalidis *et al.*, 2001; Wi and Park 2002; Mehta 2002; Song *et al.*, 2002).
- v) Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (Torrighiani *et al.*, 1987; Serafini Fracassini *et al.*, 1991; Kumria and Rajam, 2002).
- vi) Η κυτταρική διαφοροποίηση (Friedman *et al.*, 1985; Tiburcio *et al.*, 1989; Watson *et al.*, 1998; Hanzawa *et al.*, 2000; Hummel *et al.*, 2002).
- vii) Η απόκριση στις βιολογικές καταπονήσεις (Walters, 2003).
- viii) Η απόκριση σε αβιοτικές καταπονήσεις (Borrell *et al.*, 1997; Primikiriou and Roubelakis-Angelakis, 2000; Bouchereau *et al.*, 1999; Chattopadhyay *et al.*, 2002; Roy and Wu, 2002; Waie and Rajam, 2003).

1.2 Βιοσύνθεση και Καταβολισμός των Πολυαμινών

Το μονοπάτι βιοσύνθεσης των πολυαμινών ξεκινά από την ορνιθίνη, η οποία αποκαρβοξυλιώνεται από την αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης (ODC, EC 4.1.1.17) και μετατρέπεται σε πουτρεσίνη. Στα βακτήρια και στα φυτά η πουτρεσίνη προκύπτει και με αποκαρβοξυλίωση της αργινίνης από τη δράση της αποκαρβοξυλάσης της αργινίνης (ADC, EC 4.1.1.19) (Malmberg *et al.*, 1998). Στη συνέχεια, η S-αδενοσύλ-μεθειονίνη (SAM) εισάγεται στο μονοπάτι, αφού πρώτα αποκαρβοξυλιώνεται από τη δράση της αποκαρβοξυλάσης της SAM (SAMDC, EC 4.1.1.50). Η αποκαρβοξυλιωμένη SAM λειτουργεί ως δότης μιας αμινοπροπυλικής ομάδας για τη διαδοχική μετατροπή της πουτρεσίνης σε σπερμιδίνη, και στη συνέχεια σε σπερμίνη. Η μεταφορά της αμινοπροπυλικής ομάδας γίνεται (Tiburcio *et al.*, 1997):

- i) με τη δράση της συνθάσης της σπερμιδίνης (SPDS, EC 2.5.1.16) στην πουτρεσίνη, οδηγώντας στην παραγωγή της σπερμιδίνης, και
- ii) με τη δράση της συνθάσης της σπερμίνης (SPMS, EC 2.5.1.22) στη σπερμιδίνη και την μετατροπή της σε σπερμίνη.

Οι πολυαμίνες απαμινώνονται οξειδωτικά από τη δράση οξειδασών των αμινών. Σε αυτά τα ένζυμα ανήκουν οι οξειδάσες των διαμινών οι οποίες περιέχουν χαλκό (DAO, EC 1.4.2.6) και οι οξειδάσες των πολυαμινών που είναι φλαβοπρωτεΐνες (PAO, EC 1.4.3.4). Η DAO οξειδώνει την πουτρεσίνη. Τα προϊόντα του καταβολισμού είναι η πυρρολίνη, το H_2O_2 και η αμμωνία. Η PAO οξειδώνει την σπερμιδίνη παράγοντας πυρρολίνη, H_2O_2 , και διαμινοπροπάνιο (Dap). Επίσης οξειδώνει και τη σπερμίνη παράγοντας 1,5 διαζαδικυκλονονάνη, H_2O_2 , και διαμινοπροπάνιο (Dap). Το Dap μπορεί να μετατραπεί σε β-αλανίνη, ενώ η πυρρολίνη καταβολίζεται επιπλέον σε γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) με τη δράση της αφυδρογονάσης της πυρρολίνης. Το GABA απαμινώνεται και οξειδώνεται επιπλέον προς σουκκινικό οξύ το οποίο εισέρχεται στον κύκλο του Krebs (Federico and Angelini, 1991).

Οι οξειδάσες των πολυαμινών (PAO) έχουν απομονωθεί και μερικώς χαρακτηριστεί σε πολλά φυτικά είδη και κυρίως σε αυτά που ανήκουν στα *Graminaceae* (Federico and Angelini, 1991). Ολόκληρη η αμινοξική αλληλουχία της PAO στο καλαμπόκι έχει ταυτοποιηθεί πρόσφατα (Tavladoraki *et al.*, 1998), καθώς και η κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης (Sebela *et al.*, 2001).

Η PAO εντοπίζεται στο κυτταρικό τοίχωμα των μονοκότυλων φυτών. Το H_2O_2 το οποίο προκύπτει από την οξείδωση των πολυαμινών είναι σημαντικό για τη λιγνιτοποίηση του κυτταρικού τοιχώματος. Παράλληλα, εμπλέκεται στο cross-linking των εξτενσινών κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη, τον τραυματισμό και τη βιοτική καταπόνηση (Angelini *et al.*, 1993; Sebela *et al.*, 2001; Paschalidis *et al.*, unpublished). Επίσης, έχει προταθεί ότι το Dap έχει

προστατευτική δράση κατά την αβιοτική καταπόνηση, καθώς εμποδίζει την απώλεια χλωροφύλλης και τη δράση των πρωτεασών. Έχει δε, βρεθεί ότι η ΡΑΟ είναι ένζυμο που μπορεί να συμμετέχει ενεργά στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, τόσο στους ζωικούς όσο και στους φυτικούς οργανισμούς. Αυτό στηρίζεται στο γεγονός ότι:

- i) Από τη δράση της ΡΑΟ αποδομούνται οι πολυαμίνες, οι οποίες σε φυσιολογικά επίπεδα θεωρούνται μόρια αντιγήρανσης προστατεύοντας τα βιολογικά μακρομόρια και
- ii) Το H_2O_2 που παράγεται από τη δράση της ΡΑΟ είναι τοξικό και μπορεί να επάγει κάποιο μονοπάτι μεταφοράς σήματος που οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο (Ha *et al.*, 1997; Binda *et al.*, 2001; Maccarrone *et al.*, 2001; Sebela *et al.*, 2001; Papadakis and Roubelakis, unpublished).

1.3 Πολυαμίνες και Αιθυλένιο

Το αιθυλένιο είναι μια φυτική ορμόνη που επηρεάζει πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες, όπως η βλάστηση, η γήρανση των ανθέων και των φύλλων, η ωρίμανση των καρπών, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και οι αποκρίσεις σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Pandey *et al.*, 2000). Επίσης, το αιθυλένιο είναι υπεύθυνο για τη γνωστή τριπλή απόκριση, δηλαδή κοντές και παχιές ρίζες και υποκοτύλιο, και εξαιρετικά κυρτωμένο άγκιστρο.

Από τα παραπάνω εύκολα συμπεραίνεται ότι το αιθυλένιο και οι πολυαμίνες, που θεωρούνται ως ορμόνες αντιγήρανσης, έχουν ανταγωνιστική δράση. Αυτό αποτυπώνεται και στο γεγονός ότι χρησιμοποιούν και ανταγωνίζονται για ένα κοινό πρόδρομο μόριο, την S-αδενοσύλ-μεθειονίνη (SAM). Πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στο σημείο αυτό με τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών με κατασταλαμένη ή υπερεκφρασμένη τη SAMDC ή τη συνθάση του ACC, που ανταγωνίζονται τη SAM. Όταν η γενετική επέμβαση οδηγούσε σε μείωση των επιπέδων των πολυαμινών, επομένως και σε αύξηση των επιπέδων του αιθυλενίου, τα διαγονιδιακά φυτά παρουσίασαν προβληματικούς φαινότυπους, επιταχυνόμενη γήρανση και μικρότερη αντοχή σε καταπονήσεις. Αντίθετα, όταν η γενετική επέμβαση οδηγούσε σε αύξηση των επιπέδων των πολυαμινών, επομένως και σε μείωση των επιπέδων του αιθυλενίου, τα διαγονιδιακά φυτά παρουσίασαν καθυστερημένη γήρανση και μεγαλύτερη αντοχή σε καταπονήσεις (Kumar *et al.*, 1996; Mehta, 2002; Roy and Wu, 2002; Wi and Park, 2002; Waie and Rajam, 2003).

1.4 Αλατότητα

Ένας από τους αβιοτικούς παράγοντες που προκαλούν καταπόνηση στα φυτά είναι η υψηλή αλατότητα. Πρόκειται για έναν πολύπλοκο περιβαλλοντικό αναστολέα που παρουσιάζει τρεις παραμέτρους ως προς την επίδρασή του (Lefevre *et al.*, 2001; Zhu, 2001):

- i) Την ωσμωτική παράμετρο, όπου εξαιτίας του φαινομένου της ώσμωσης εξέρχεται νερό από το κύτταρο μέσω καναλιών νερού που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη,
- ii) Την ιοντική παράμετρο, όπου εισέρχονται στο κύτταρο ιόντα (κυρίως Na^+) μέσω των καναλιών K^+ . Τα ιόντα Na^+ αναστέλλουν τη δράση πολλών ενζύμων με αποτέλεσμα η συσσώρευσή τους να είναι επιζήμια για το φυτικό κύτταρο, και
- iii) Την τροφική παράμετρο, όπου προκαλείται μείωση των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών όπως είναι το κάλιο και το ασβέστιο (K^+ και Ca^+).

Το φυτικό κύτταρο έχει αναπτύξει μηχανισμούς προκειμένου να αντιμετωπίσει τις αρνητικές επιδράσεις της αλατότητας. Οι κυριότεροι είναι:

- i) Η βιοσύνθεση ωσμωλυτών (προλίνη, μαννιτόλη, φρουκτάνη, τρεχαλόζη, γλυκίνη-μπεταΐνη κ.α) και πολυαμινών και η συσσώρευσή τους σε υψηλά επίπεδα προκειμένου να επανέλθει η ωσμωτική ομοίωση στο κύτταρο (Bouchereau *et al.*, 1999; Lefevre *et al.*, 2001; Zhu, 2001; Chattopadhyay *et al.*, 2002; Konstantinova *et al.*, 2002; Roy and Wu, 2002; Waie and Rajam, 2003),
- ii) Η ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, προκειμένου να γίνει απόσβεση των ενεργών μορφών οξυγόνου, που συσσωρεύονται κατά την αλατότητα (Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2001),
- iii) Η ενεργοποίηση αντιμεταφορέων Na^+ / H^+ οι οποίοι βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη και στον τονοπλάστη και οδηγούν τα τοξικά ιόντα Na^+ στον αποπλάστη και στα χυμοτόπια αντίστοιχα (Hafter *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002).

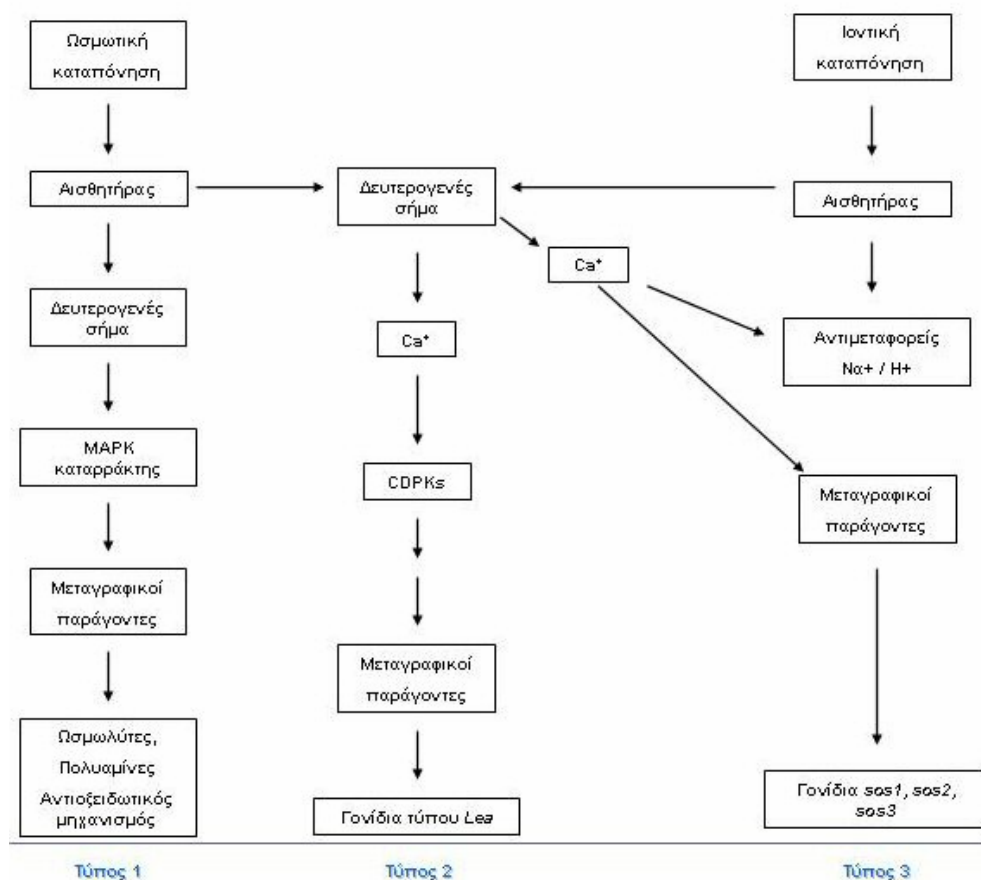
Οι αισθητήρες που αντιλαμβάνονται τον ιοντικό και τον ωσμωτικό παράγοντα μπορεί να είναι μεμβρανικοί υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης ή κανάλια Ca^+ . Τα μονοπάτια μεταφοράς σήματος που οδηγούν στις παραπάνω αποκρίσεις του φυτικού κυττάρου κατά την καταπόνηση με αλατότητα, μπορούν να χωριστούν σε τρεις τύπους (Xiong *et al.*, 2002). Συνοπτικά αυτοί είναι (Εικ. 1) :

- i) Η ωσμωτική καταπόνηση προκαλεί την παραγωγή δευτερογενών σημάτων (αυτά τα σήματα μπορεί να είναι ΕΜΟ, φωσφορυλιωμένες ινοσιτόλες ή και Ca^+), τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούν τον καταρράκτη φωσφορυλιώσεων μέσω των κινάσεων MAP. Αποτέλεσμα του γεγονότος αυτού είναι η ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, που ρυθμίζουν θετικά την έκφραση διαφόρων γονιδίων. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν ένζυμα

βιοσύνθεσης των ωσμωλυτών και των πολυαμινών, αλλά και ένζυμα του αντιοξειδωτικού μηχανισμού.

ii) Η ωσμωτική και η ιοντική καταπόνηση είναι δυνατό να οδηγήσει σε ενεργοποίηση καναλιών Ca^{2+} , με αποτέλεσμα την αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} . Έτσι, ενεργοποιούνται κινάσες, που εξαρτώνται από αυτό (CDPKs) και μέσω ενός καταρράκτη φωσφορυλίσεων ενεργοποιούνται μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν θετικά την έκφραση γονιδίων. Τα τελευταία κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μεταφορά σήματος κατά την απόκριση στην αλατότητα (π.χ αναστολείς της απόπτωσης, κινάσες MAP, μεταγραφικοί παράγοντες που διαθέτουν μοτίβα λευκίνης κ.α), και ομοιάζουν με τα *late embryonic abundant* γονίδια (*lea* τύπου γονίδια).

iii) Η ιοντική καταπόνηση είναι δυνατό να οδηγήσει σε ενεργοποίηση καναλιών Ca^{2+} είτε απευθείας, είτε μέσω της παραγωγής δευτερογενών σημάτων. Αποτέλεσμα αυτού είναι να αυξηθεί το ενδοκυτταρικό Ca^{2+} , γεγονός που οδηγεί είτε σε μετα-μεταφραστική ενεργοποίηση των αντιμεταφορέων Na^{+}/H^{+} , είτε σε μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες του συμπλόκου των αντιμεταφορέων (γονίδια *sos1, sos2* και *sos3*), προκειμένου να επανέλθει η ιοντική ομοιόσταση στο κύτταρο.



Εικόνα 1: Μονοπάτια μεταφοράς σήματος κατά την καταπόνηση με αλατότητα

1.5 Ενεργές Μορφές Οξυγόνου (ΕΜΟ)

Οι ενεργές μορφές οξυγόνου είναι μερικώς ανηγμένες μορφές του ατμοσφαιρικού οξυγόνου (O_2). Τυπικά, προκύπτουν από τη διέγερση του μοριακού O_2 που οδηγεί στο σχηματισμό του 1O_2 ή από τη μεταφορά ενός, δύο ή και τριών ηλεκτρονίων στο O_2 για να σχηματιστούν αντίστοιχα το σουπεροξειδικό ανιόν (O_2^-), το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και το ανιόν του υδροξυλίου (OH^\cdot). Σε αντίθεση με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο, οι ΕΜΟ είναι ικανές να προκαλέσουν οξειδωση των βιομορίων (πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα) (Asada *et al.*, 1999; Dat *et al.*, 2000).

1.6 Παραγωγή και απόσβεση των ΕΜΟ

Οι ΕΜΟ μπορούν φυσιολογικά να παραχθούν στα φυτά (Langebartels *et al.*, 2002; Mittler, 2002), κατά:

- i) Τη φωτοσύνθεση, στο χλωροπλάστη, όπου η μεταφορά ηλεκτρονίων στο μοριακό O_2 οδηγεί στο σχηματισμό του O_2^- .
- ii) Την αναπνοή, στο μιτοχόνδριο, όπου η μεταφορά ηλεκτρονίων στο μοριακό O_2 οδηγεί στο σχηματισμό του O_2^- .
- iii) Τη φωτοαναπνοή, στα περοξεισώματα, όπου με τη δράση της οξειδάσης του γλυκολικού οξέος παράγεται H_2O_2 .
- iv) Τη β-οξειδωση των λιπιδίων, στα περοξεισώματα, όπου παράγεται H_2O_2 .
- v) Τη δράση της NAD(P)H οξειδάσης, στην κυτταρική μεμβράνη, που παράγει O_2^- από το O_2 χρησιμοποιώντας ως αναγωγικό μέσο το NAD(P)H.
- vi) Τη δράση των κυτταροτοξωματικών περοξειδασών (μιας υποομάδας τους) και οι οποίες παράγουν H_2O_2 από μια ενδιάμεση μορφή του O_2^- . Για να γίνει αυτό απαιτείται η παρουσία αναγωγικού μέσου και η ύπαρξη αλκαλικού pH στον αποπλάστη.
- vii) Τη δράση των οξειδασών του οξαλικού οξέος, στον αποπλάστη, οι οποίες μετατρέπουν το οξαλικό οξύ και το O_2 σε H_2O_2 και CO_2 .
- viii) Τη δράση των οξειδασών των αμινών, στον αποπλάστη, που είναι η DAO για τις διαμίνες (πουτρεσίνη) και η PAO για τις τρι- και τέτρα-αμίνες (σπερμιδίνη-σπερμίνη). Οι οξειδάσες αυτές αποδομούν τις αμίνες παράγοντας H_2O_2 .
- ix) Τη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης, στα περοξεισώματα, η οποία οδηγεί στην παραγωγή O_2^- .
- x) Την αντίδραση Fenton, η οποία είναι μια μη ενζυμική αντίδραση που εξαρτάται από μέταλλα (π.χ Fe) και οδηγεί στο σχηματισμό των OH^\cdot .

Τα φυτά διαθέτουν ενζυμικούς και μη μηχανισμούς για την απόσβεση των ΕΜΟ (Mittler, 2002). Στους ενζυμικούς μηχανισμούς συμμετέχουν:

- i) Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η οποία μετατρέπει το O_2^- σε H_2O_2 . Η SOD μπορεί να έχει ως συμπαραγόντα τον σίδηρο, το μαγγάνιο ή τον χαλκό-ψευδάργυρο και εντοπίζεται στους χλωροπλάστες, στα μιτοχόνδρια, στο κυτταρόπλασμα, στα περοξεισώματα και στον αποπλάστη.
- ii) Οι καταλάσες (CAT), που αποσβένουν το H_2O_2 και εντοπίζονται στα περοξεισώματα,
- iii) Ο κύκλος ασκορβικού –γλουταθειόνης, στον οποίο εκτός από το ασκορβικό και την γλουταθειόνη συμμετέχουν και τα ένζυμα: ασκορβική περοξειδάση (APX), αναγωγή του μονοδιϋδροασκορβικού (MDAR), αναγωγή του διϋδροασκορβικού (DHAR) και αναγωγή της γλουταθειόνης (GR). Ο κύκλος αυτός γίνεται στους χλωροπλάστες, στα μιτοχόνδρια, στο κυτταρόπλασμα, στα περοξεισώματα και στον αποπλάστη και οδηγεί στην απόσβεση του H_2O_2 (Noctor and Foyer, 1998; Asada *et al.*, 1999).
- iv) Οι περοξειδάσες που αποσβένουν το H_2O_2 και εντοπίζονται στο κυτταρικό τοίχωμα, στο κυτταρόπλασμα και στα χυμοτόπια (Asada *et al.*, 1987)

Στους μη ενζυμικούς μηχανισμούς περιλαμβάνονται διάφορα μόρια που αποσβένουν τις ΕΜΟ, όπως η α-τοκοφερόλη και τα καροτενοειδή που αποσβένουν το O_2^1 και εντοπίζονται στις μεμβράνες και στους χλωροπλάστες αντίστοιχα (Asada *et al.*, 1987). Επίσης, αντιοξειδωτικά μόρια είναι το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειόνη που συμμετέχουν στον κύκλο ασκορβικού-γλουταθειόνης.

1.7 Ρόλος και Λειτουργίες των ΕΜΟ

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η παραγωγή των ΕΜΟ στο κύτταρο είναι χαμηλή και ελεγχόμενη. Ωστόσο, διάφορα είδη καταπονήσεων διακόπτουν την κυτταρική ομοιόσταση και οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή των ΕΜΟ. Οι καταπονήσεις αυτές μπορεί να είναι η έλλειψη νερού, η υψηλή αλατότητα, οι υψηλές ή χαμηλές θερμοκρασίες, τα βαρέα μέταλλα, η υπεριώδης ακτινοβολία, οι ατμοσφαιρικοί ρυπαντές, η μηχανική πίεση και ο τραυματισμός, η έλλειψη θρεπτικών στοιχείων, η επίθεση από παθογόνα και η υψηλή ηλιακή ακτινοβολία (Dat *et al.*, 2000; Hoeberichts and Woltering, 2002; Langebartels *et al.*, 2002). Οι ΕΜΟ κάτω από αυτές τις συνθήκες παράγονται κυρίως από τη φωτοσυνθετική μηχανή, τη φωτοαναπνοή, τη μιτοχονδριακή αναπνοή και τις NAD(P)H οξειδάσες. Οι ΕΜΟ λειτουργούν ως μόρια σήματα και ελέγχουν διαδικασίες όπως η απόκριση στις καταπονήσεις, η συστηματική μεταφορά σήματος και ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (Programmed Cell Death-PCD) (Mittler, 2002; Dat *et al.*, 2003). Ειδικότερα, σε χαμηλές συγκεντρώσεις έχουν ως σκοπό τη μεταφορά σήματος, ενώ σε δραματικά

αυξημένες συγκεντρώσεις (πάνω από το όριο αντοχής του κυττάρου) οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο άμεσα, εξαιτίας της οξειδωσης λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων, ή έμμεσα έχοντας και πάλι ρόλο σηματοδότησης.

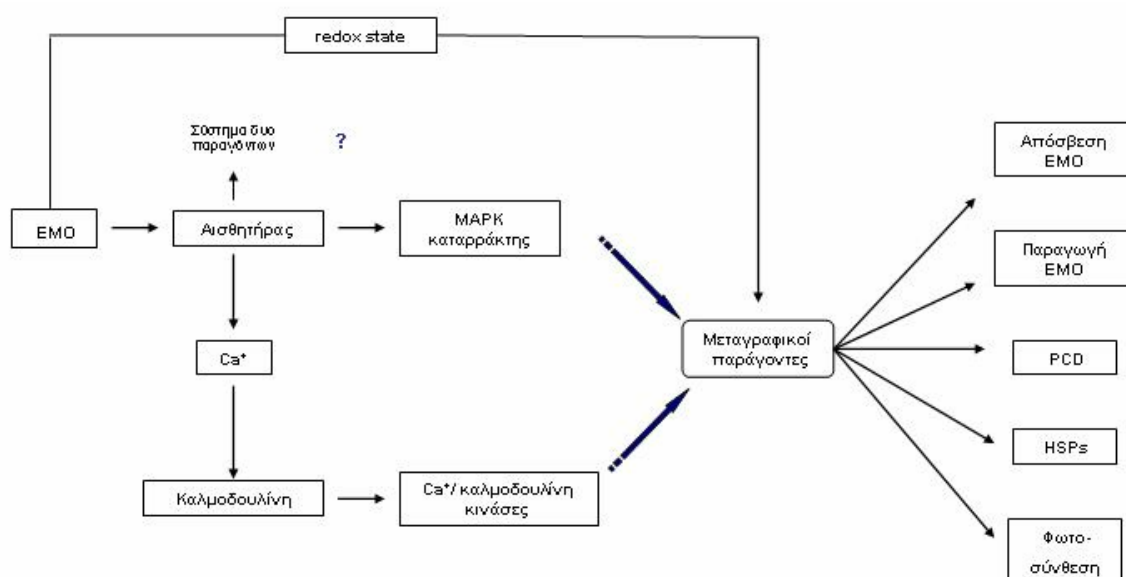
Κατά την απόκριση σε βιοτικές καταπονήσεις οι ΕΜΟ (κυρίως το H_2O_2) παίζουν κεντρικό ρόλο, συντελώντας στην αλυσίδα μεταφορά σήματος για την εκδήλωση της αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR). Η HR είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα PCD και εκδηλώνεται στην περιοχή του φυτού που έχει δεχθεί επίθεση από παθογόνα, οδηγώντας στη νέκρωσή της. Με τον τρόπο αυτό το παθογόνο εγκλωβίζεται και η μόλυνση δεν επεκτείνεται στο φυτό. Παράλληλα, το H_2O_2 έχει άμεση αντιμικροβιακή δράση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τις κυτταροτοξωματικές περοξειδάσες για την λιγνιτοποίηση των κυτταρικών τοιχωμάτων, απαραίτητης διαδικασίας για τον εγκλωβισμό των παθογόνων. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ΕΜΟ αλληλεπιδρούν με το σαλισυλικό οξύ (SA), με το αιθυλένιο και με το νιτρικό οξείδιο (NO). Αυτή η αλληλεπίδραση είναι σημαντική τόσο για την εκδήλωση της HR, όσο και για τη διάχυσή του SA και του NO σε γειτονικά κύτταρα προκειμένου να επαχθούν τα γονίδια άμυνας (επίκτητη διασυστηματική ανθεκτικότητα) (Hoeberichts and Woltering, 2002; Langebartels *et al.*, 2002; Mittler, 2002). Παράλληλα έχει βρεθεί ότι το αιθυλένιο επάγει την παραγωγή ΕΜΟ, ενώ το SA και το NO καταστέλλουν την APX και την CAT, γεγονότα που οδηγούν σε συσσώρευση των ΕΜΟ και κατ' επέκταση σε PCD (Mittler, 2002).

Στις αβιοτικές καταπονήσεις οι ΕΜΟ επάγουν την έκφραση γονιδίων άμυνας, καθώς επίσης και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, με συνέπεια να ακολουθεί μείωση των επιπέδων τους (Mittler, 2002). Βέβαια, στην περίπτωση που η αβιοτική καταπόνηση είναι μεγάλη, τότε είναι δυνατό να γίνει οξειδωτική έκρηξη και το κύτταρο να ακολουθήσει πορεία PCD (Langebartels *et al.*, 2002).

Σύμφωνα με το πιο πιθανό μοντέλο του μονοπατιού μεταφοράς σήματος κατά την οξειδωτική καταπόνηση ισχύουν τα παρακάτω (Zhang and Klessig, 2001; Mittler, 2002) (Εικόνα 2):

Οι ΕΜΟ γίνονται αντιληπτοί από έναν 'αισθητήρα', αλληλεπιδρούν με αυτόν και τον ενεργοποιούν. Ο 'αισθητήρας' αυτός μπορεί να είναι ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο και να αποτελεί σύστημα δυο παραγόντων. Στη συνέχεια είτε γίνεται ενεργοποίηση του μονοπατιού των κινασών MAP είτε ενεργοποιούνται κανάλια Ca^{+2} . Στη δεύτερη περίπτωση γίνονται αλλαγές στα επίπεδα των ιόντων Ca^{+2} και της καλμοδουλίνης στο κύτταρο με αποτέλεσμα να ενεργοποιούνται πρωτεϊνικές κινάσες που εξαρτώνται από αυτά. Είτε οι τελευταίες, είτε οι κινάσες MAP φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες, καθώς και άλλες πρωτεΐνες, προκαλώντας τους μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων των οποίων οι πρωτεΐνες είναι δυνατό να συμμετέχουν στην παραγωγή ή την απόσβεση των ΕΜΟ, στον προγραμματισμένο

κυτταρικό θάνατο (π.χ κασπάσες και νουκλεάσες), στη φωτοσύνθεση και στην άμυνα-απόκριση του κυττάρου σε καταπόνηση (π.χ heat shock πρωτεΐνες). Επίσης, είναι γνωστό ότι το H_2O_2 μπορεί να αλληλεπιδράσει άμεσα μεταγραφικούς παράγοντες και να τους ενεργοποιήσει ή να τους καταστείλει. Τέλος, σημαντικό είναι το γεγονός ότι η έκφραση των αντιοξειδωτικών γονιδίων εξαρτάται από την οξειδοαναγωγική κατάσταση (redox state) του κυττάρου, δηλαδή από το λόγο ανηγμένη μορφή/οξειδωμένη μορφή των αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως είναι το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειόνη. Ο παραπάνω, όμως, λόγος μεταβάλλεται κάθε φορά και εξαρτάται από τα επίπεδα των ΕΜΟ, τα οποία επηρεάζουν και με αυτόν τον τρόπο τη έκφραση των παραπάνω γονιδίων.



Εικόνα 2: Μονοπάτι μεταφοράς σήματος κατά την οξειδωτική καταπόνηση

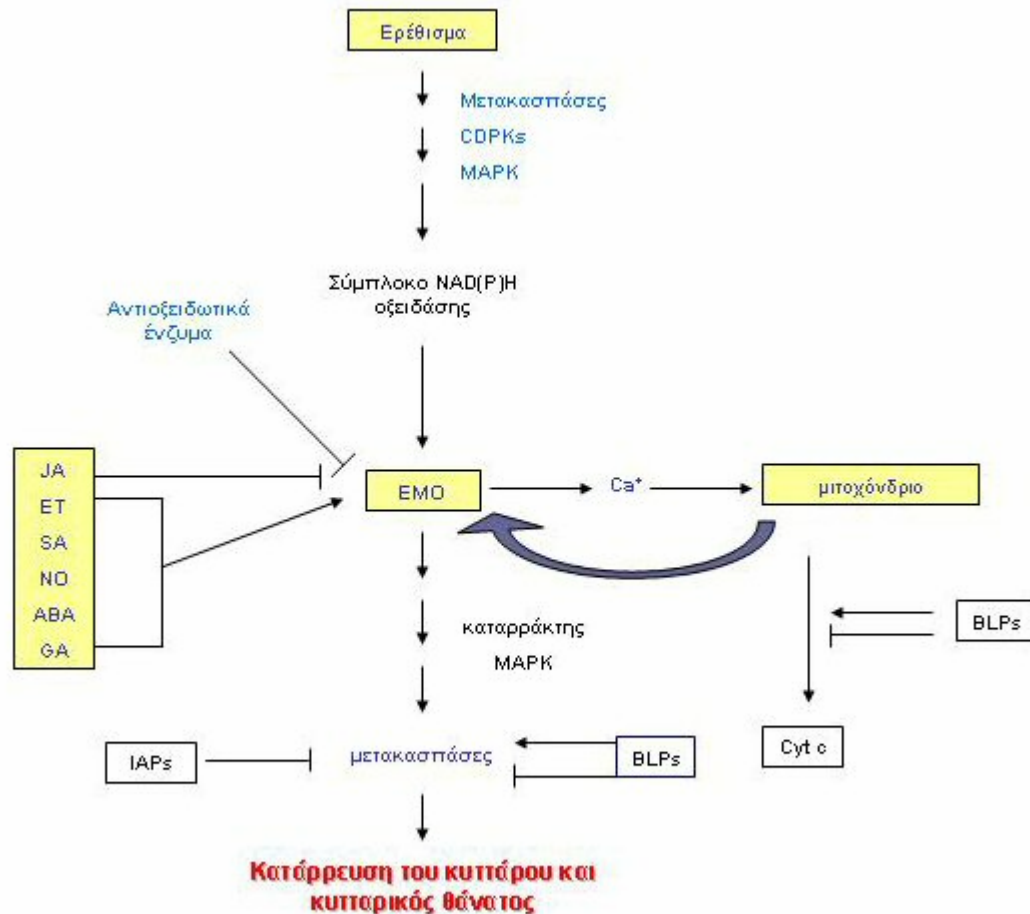
1.8 Προγραμματισμένος Κυτταρικός Θάνατος (PCD)

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι μια απαραίτητη διαδικασία κατά την ανάπτυξη όλων των οργανισμών. Πρόκειται για μια ενεργητική διαδικασία, που διαφέρει από τη νέκρωση που είναι μια παθητική διαδικασία. Στα φυτά εμπλέκεται φυσιολογικά στην ξυλογένεση, στο σχηματισμό του αερεγχύματος, στην ωρίμανση των πετάλων και στην ανάπτυξη του ενδοσπερμίου. Επίσης, παρατηρείται κατά τις βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις, όπου σκοπό έχει την εξάλειψη ελαττωματικών και βλαβερών κυττάρων. Το φαινόμενο αυτό έχει μελετηθεί ιδιαίτερα στους ζωικούς οργανισμούς, ενώ τελευταία μελετάται έντονα και στα φυτά. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και τα βιοχημικά γεγονότα που χαρακτηρίζουν τον PCD είναι παρόμοια στους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς

(Hoeberichts and Woltering, 2002). Αυτά είναι: i) συρρίκνωση του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος, ii) κατάτμηση του γενωμικού DNA σε μεγάλα (50 έως 300 kb) και στη συνέχεια σε μικρά (200 bp) νουκλεοσωμικά κομμάτια (DNA laddering) που προκύπτουν από τη δράση ειδικών νουκλεασών, iii) αποδόμηση των πρωτεϊνών, λόγω της ενεργοποίησης ειδικών πρωτεασών, που δρουν σε κατάλοιπα κυστεΐνης και ονομάζονται κασπάσες στους ζωϊκούς οργανισμούς, ενώ στους φυτικούς ονομάζονται μετακασπάσες, και iv) αλλαγές στη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης και απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Στους ζωϊκούς οργανισμούς παρατηρείται, επιπλέον, και η κατάτμηση του κυττάρου σε μεμβρανικά κυστίδια (αποπτωτικά σωμάτια).

Σύμφωνα με το πιο πιθανό μοντέλο η διαδικασία με την οποία γίνεται ο κυτταρικός θάνατος στα φυτά είναι η ακόλουθη (Hoeberichts and Woltering, 2002) (Εικόνα 3): Κάποιο ερέθισμα, το οποίο μπορεί να είναι βιοτικός (παθογόνο) ή αβιοτικός (π.χ όζον) παράγοντας ή κάποια ουσία-σήμα (π.χ αιθυλένιο) που παράγει το φυτό κατά τη διαφοροποίηση, οδηγεί σε αύξηση των EMO. Ο παράγοντας αυτός ενεργοποιεί έναν καταρράκτη φωσφορυλιώσεων, στον οποίο είναι δυνατό να συμμετέχουν οι κινάσες MAP και κινάσες που εξαρτώνται από το ασβέστιο (CDPK) (εφόσον ο παράγοντας αυτός οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων Ca^{+2}). Αποτέλεσμα αυτού του καταρράκτη φωσφορυλιώσεων είναι να ενεργοποιείται το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο της NAD(P)H οξειδάσης και να παράγει O_2^- , το οποίο μπορεί να μετατραπεί σε H_2O_2 αυθόρμητα ή από τη δράση της SOD. Στην ενεργοποίηση του συμπλόκου της NAD(P)H οξειδάσης πιθανό να εμπλέκονται και οι μετακασπάσες (πρωτεολύοντας αναστολείς του συμπλόκου αυτού). Επίσης, οι ορμόνες αιθυλένιο (ET), το αμπισισικό οξύ (ABA) και γιββερειλλινικό οξύ (GA), όπως και οι ουσίες σαλισυλικό οξύ (SA) και νιτρικό οξείδιο (NO) επάγουν την παραγωγή των EMO και ενισχύουν τη δράση τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχουν παράγοντες που είναι δυνατό να σταματήσουν τη συσσώρευση των EMO, και κατ' επέκταση την πορεία του κυττάρου προς την απόπτωση. Αυτοί είναι ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός (όπως έχει ήδη αναφερθεί) αλλά και το γιασμονικό οξύ (JA), που δρα κυρίως σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης. Εφόσον ξεπεραστούν οι παραπάνω φραγμοί, επιτυγχάνεται σημαντική άνοδος στα επίπεδα των EMO, γεγονός που οδηγεί στην αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων του Ca^{+2} . Οι EMO και το Ca^{+2} οδηγούν με τη σειρά τους σε αλλαγές στη διαπερατότητα της μεμβράνης του μιτοχονδρίου, σε αναστολή της λειτουργίας του και σε απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Όλα αυτά οδηγούν σε επιπλέον αύξηση των EMO (feed back amplification loop). Σημαντικό ρόλο στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c παίζουν και οι BLPs πρωτεΐνες (αντίστοιχες των αντιαποπτωτικών BCL-2 πρωτεϊνών) οι οποίες είτε επάγουν είτε καταστέλλουν (ανάλογα με το ποιο μέλος της οικογένειάς τους ενεργοποιείται) τη διαδικασία, επηρεάζοντας την πορεία του κυττάρου προς την απόπτωση. Στο επόμενο στάδιο οι EMO ενεργοποιούν ένα καταρράκτη φωσφορυλιώσεων μέσω των κινάσων MAP που έχει ως

αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των μετακασπάσων και κατ' επέκταση την αποδόμηση των πρωτεϊνών και τον κυτταρικό θάνατο. Ωστόσο, υπάρχουν πρωτεΐνες που μπορούν να αναστείλουν τις μετακασπάσες. Αυτές είναι οι IAPs (inhibitors of apoptosis) και Heat Shock πρωτεΐνες (HSPs). Πάλι οι BLPs μπορούν είτε να επάγουν είτε να καταστείλουν τις μετακασπάσες (Εικ. 3).



Εικόνα 3: Μοντέλο εκδήλωσης κυτταρικού θανάτου

1.9 Γονιδιακή Σίγηση (Gene silencing)

Η σίγηση γονιδίων μέσω RNA έχει μελετηθεί και παρατηρηθεί στα φυτά, στα ζώα και στους μύκητες. Το φαινόμενο αυτό, όπου κεντρικό ρόλο παίζει η παρουσία dsRNA, βασίζεται στην ομολογία αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων, γι' αυτό και ονομάζεται σίγηση γονιδίων εξαρτώμενη από ομολογία (Homology Dependent Gene Silencing, HDGS) (Matzke *et al.*, 2001). Το HDGS είναι ένα διαδεδομένο φαινόμενο στα φυτά και μπορεί να διαχωριστεί σε δύο κατηγορίες : i) στη μεταγραφική σίγηση γονιδίων (TGS) και ii) στη μετα-μεταγραφική σίγηση γονιδίων (PTGS) (Sijen *et al.*, 2000).

Στην περίπτωση του PTGS γίνεται η μεταγραφή, αλλά στη συνέχεια αποδομούνται τα μετάγραφα. Τα dsRNAs αναγνωρίζονται από ένα ενζυμικό σύμπλοκο με ενεργότητα RNAσης, που μοιάζει με τη βακτηριακή RNAση III. Από τη *Drosophila* έχει κλωνοποιηθεί ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για ένα τέτοιο σύμπλοκο. Το πρωτεϊνικό αυτό σύμπλοκο (DICER) αποτελείται από μια RNAση τύπου III, από μια RNA ελικάση και περιοχές τύπου PAZ (Matzke *et al.*, 2001). Ένα ομόλογο γονίδιο έχει κλωνοποιηθεί από την *A.thaliana*. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί ονομάζεται CAF (carpel factory). Τα πρωτεϊνικά αυτά σύμπλοκα δρουν στο dsRNA και το κόβουν σε μικρά δίκλινα μόρια μήκους 21-23 νουκλεοτιδίων, που ονομάζονται small interfering RNAs (siRNAs). Η πέψη του dsRNA και η δημιουργία των siRNAs γίνεται στο κυτταρόπλασμα, αλλά είναι πολύ πιθανό να συμβαίνει και στον πυρήνα. Στο επόμενο βήμα τα siRNAs δεσμεύονται σε ένα άλλο πρωτεϊνικό σύμπλοκο, το RNA επαγόμενο Σύμπλοκο Σίγησης (RISC complex). Το RISC πιθανό να αποτελείται από μία ενδονουκλεάση, μια εξωνουκλεάση, μια ελικάση και μια περιοχή με λειτουργία την εύρεση ομολογίας μεταξύ siRNAs και μονόκλωνου mRNA. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι περιλαμβάνει μια περιοχή PAZ μέσω της οποίας αλληλεπιδρά με το DICER. Το RISC δρα κυρίως στο κυτταρόπλασμα και αποκτά την εξειδίκευσή του αφού συνδεθεί με τα siRNAs, που προκύπτουν από τη δράση του DICER. Έτσι καθοδηγείται εξειδικευμένα στα μονόκλινα mRNAs και τα κόβει στη μέση της περιοχής υβριδοποίησης των siRNAs με το συμπληρωματικό τους mRNA (Matzke *et al.*, 2001). Τα διάφορα κομμάτια μονόκλωνου mRNA, που προκύπτουν, αποδομούνται ακόμα περισσότερο από το σύμπλοκο RISC. Είναι όμως πιθανό κάποια από αυτά να χρησιμοποιούνται ως μήτρα από την cRdRP, να προκύπτουν dsRNA ενισχύοντας και επιταχύνοντας με αυτό τον τρόπο το PTGS.

Αξίζει να σημειωθεί ότι από τη δράση του DICER σε dsRNAs είναι δυνατό να προκύψουν τα small temporal RNAs (stRNAs) που είναι μονόκλινα και αλληλεπιδρούν με τη 3' μη-μεταφραζόμενη περιοχή των mRNAs και εμποδίζουν τη μετάφραση, σε αντίθεση με τα siRNAs που επηρεάζουν τη σταθερότητα των mRNAs. Το PTGS είναι μια συστηματική διαδικασία. Το σήμα είναι μόρια νουκλεϊκού οξέος. Είναι πιθανό το ρόλο αυτό να το έχουν τα siRNAs, αλλά και μεγαλύτερα dsRNAs ή aberrant RNAs. Το σήμα μετακινείται μέσω των πλασμοδεσμάτων από κύτταρο σε κύτταρο και μέσω του φλοιώματος για μεγαλύτερες αποστάσεις. Στη μεταφορά του σήματος εμπλέκονται και μεγαλύτερες πρωτεΐνες που δεσμεύουν, προστατεύουν και μετακινούν το σήμα και αλληλεπιδρούν με τα πλασμοδέσματα (Matzke *et al.*, 2001).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σκοπός της διατριβής αυτής ήταν η αποσαφήνιση του μηχανισμού δια μέσου του οποίου η αλατότητα προκαλεί κυτταρικό θάνατο. Γι' αυτό μελετήθηκε ο καταβολισμός των πολυαμινών κατά την καταπόνηση αλατότητας αιωρούμενων κυττάρων αμπελιού (*Vitis vinifera* cv Souldanina). Αρχικά ελέγχθηκε η τύχη των κυττάρων όσον αφορά τη βιωσιμότητα και την πορεία τους ή όχι προς τον κυτταρικό θάνατο, και έγινε προσπάθεια συσχέτισης της παραγωγής ΕΜΟ με την ενεργότητα/ενεργοποίηση της ΡΑΟ, ένζυμο καταβολισμού των ανώτερων πολυαμινών, και του ΡCD. Παλαιότερη δουλειά του εργαστηρίου, έχει συσχετίσει την οξειδωτική καταπόνηση, δηλαδή την αυξημένη παραγωγή των ΕΜΟ συγχρόνως με την καταστολή του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, με την έλλειψη αναγεννητικής ικανότητας των πρωτοπλαστών αμπελιού (Siminis *et al.*, 1993;1994; de Marco and Roubelakis-Angelakis, 1996a; 1996b;1997; Papadakis and Roubelakis-Angelakis, 1999, 2002; Papadakis *et al.*, 2001). Επίσης, αδημοσίευτα αποτελέσματα τείνουν να συσχετίσουν την ενεργοποίηση της ΡΑΟ με την πορεία προς τον ΡCD των πρωτοπλαστών.

Συγχρόνως, κατασκευάστηκαν πλασμιδιακοί φορείς με σκοπό τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών με απενεργοποιημένο το γονίδιο της SAMDC, μέσω της τεχνικής σιώπησης γονιδίων. Αυτά θα αποτελέσουν σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης πολυαμινών-αιθυλενίου στη διαδικασία της γήρανσης και της συμμετοχής των πολυαμινών στην απόκριση στην αλατότητα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτικό Υλικό

Χρησιμοποιήθηκαν αιωρούμενες κυταροκαλλιέργειες *Vitis vinifera* cv Soultanina. Η ανανέωση των κυταροκαλλιεργειών γινόταν κάθε 8 ημέρες (σε αναλογία 70% του τελικού όγκου προστίθονταν θρεπτικό και 30 % πυκνής καλλιέργειας) και οι μεταχειρίσεις την τρίτη ημέρα μετά την ανανέωση. Μετά τις μεταχειρίσεις τα κύτταρα στραγγίζονταν, ξεπλένονταν με απιονισμένο νερό και ακολουθούσε φύλαξή τους στους -80 °C μέχρι τη χρησιμοποίησή τους. Τα διαλύματα, θρεπτικά μέσα και αντικείμενα που χρησιμοποιήθηκαν για τις κυταροκαλλιέργειες, αποστειρώθηκαν με κλιβανισμό. Όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε εστία νηματικής ροής.

2.2 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών

Τα κύτταρα αραιώθηκαν σε τετραπλάσιο όγκο (v/w) κρύου διαλύματος εκχύλισης. Η σύσταση του διαλύματος εκχύλισης ήταν 200 mM του ρυθμιστικού ιόντος (συνήθως Tris-HCl, pH 8.0, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά) 10% (v/v) γλυκερόλη, 5 mM διθειοθρεϊτόλη (DTT), 1 mM EDTA, 0.5 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF), 10 μM leupeptin και 0.2% (v/v) Triton X-100. Τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν στο διάλυμα εκχύλισης των πρωτεϊνών με Ultra Turax στις 20000 rpm, στους 4 °C για τέσσερις φορές των 30 sec η καθεμία. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm, και στη συνέχεια ελήφθη το υπερκείμενο.

2.3 Ποσοτικός Προσδιορισμός Ολικών Πρωτεϊνών

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

2.4 Αποδιατακτική Ηλεκτροφόρηση των Πρωτεϊνών σε Πήκτωμα Πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Οι ολικές πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) μίας διάστασης και το σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων του Laemmli (Laemmli, 1970), χρησιμοποιώντας επίπεδα πηκτώματα 16 cm × 18 cm και πάχους 1.5 mm. Η συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης (acrylamide: bis, 30: 0.8) στα πηκτώματα διαχωρισμού (resolving) ήταν 10% (w/v) ή γραμμικές διαβαθμίσεις 10-18% (w/v) σε 375 mM Tris-HCl, pH 8.8 και στα πηκτώματα συσσώρευσης (stacking) 4% (w/v) σε 125 mM Tris-HCl, pH 6.8. Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών έγινε στα 20 mA για το πήκτωμα συσσώρευσης και στα 25 mA για το πήκτωμα διαχωρισμού, σε θερμοκρασία δωματίου, παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 25 mM Tris - 192 mM γλυκίνης, pH 8.3 και 0.1% SDS σε μεγάλη συσκευή ηλεκτροφόρησης της LKB (LKB-Producter AB, Bromma, Sweden). Τα δείγματα επώασθησαν πριν την ηλεκτροφόρηση στους 100 °C για 5 min παρουσία 3% SDS και 5% β-μερκαπτοαιθανόλης.

2.5 Ανίχνευση ολικών πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Η ανίχνευση ολικών πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης έγινε με χρώση Coomassie Brilliant blue R-250: Το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε διάλυμα 50% μεθανόλης, 10% οξικό οξύ, 0.002% Coomassie Brilliant blue R-250 για 1-2 h με ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί αποχρωματισμός του πηκτώματος σε διάλυμα 10% μεθανόλης, 7% οξικού οξέος μέχρι οι πρωτεϊνικές ζώνες να γίνουν ορατές και στη συνέχεια διατηρείται σε 0.07% οξικό οξύ, 7% γλυκερόλη ή ξηραίνεται.

2.6 Ανάλυση Western Blot και Ανοσοεντοπισμός της PAO και της ADC

Οι ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένες πρωτεΐνες σε πηκτώματα SDS-πολυακρυλαμίδης, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (0.2 μm μέγεθος πόρων, Schleicher & Schuell, Keene, NH) με ηλεκτροαποτύπωση (electroblotting). Κατά τη διαδικασία αυτή τοποθετείται το πήκτωμα και η μεμβράνη στο μέσο δύο ηλεκτροδίων γραφίτη εμποτισμένων με διάλυμα 25 mM Tris base, 192 mM γλυκίνη, 20% μεθανόλη. Εφαρμόζεται τάση στα ηλεκτρόδια σύμφωνα με τον αριθμητικό τύπο $0.3 \text{ mA} \times \text{cm}^2$ για 12 h ή $0.8 \text{ mA} \times \text{cm}^2$ για 90 min, και στην συνέχεια η μεμβράνη ξηραίνεται στον αέρα.

Μετά το τέλος της μεταφοράς των πρωτεϊνών, οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης πλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φυσιολογικού ορού με φωσφορικά [PBS: 0.89% (w/v) NaCl, 0.02% (w/v) KCl, 0.115% (w/v) Na₂HPO₄, 0.02% (w/v) KH₂PO₄]. Οι ελεύθερες θέσεις

πάνω στις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης δεσμεύθηκαν με 2% (w/v) BSA ή σκόνη γάλακτος σε PBS για 1 h. Οι μεμβράνες πλύθηκαν 3 φορές από 5 min, με διάλυμα πλύσης [PBS συμπληρωμένο με 0.05% (v/v) Tween-20] και επώασθηκαν με το αντίσωμα της PAO (Tavladoraki *et al.*, 1998) ή της ADC (Primikiriou and Roubelakis-Angelakis, 1999) με ελαφρή ανάδευση για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου ή για 12 h στους 4 °C. Μετά το τέλος της επώασης με το αντίσωμα, οι μεμβράνες πλύθηκαν 5 φορές των 5 min με το διάλυμα πλύσης και επώασθηκαν για 1 h με το δεύτερο αντίσωμα [ραφανιδική υπεροξειδάση (horseradish peroxidase) συζευγμένη σε anti-mouse IgG, σε αραιώση 1:10.000]. Οι αραιώσεις του πρώτου και του δεύτερου αντισώματος έγιναν σε PBS, που περιείχε 1% (w/v) BSA και 0.05% (v/v) Tween-20. Μετά από πλύσιμο των μεμβρανών τα σύμπλοκα αντιγόνου-αντισώματος έγιναν ορατά με τη διαδικασία της χημειοφωταυγίας.

2.7 Προσδιορισμός Ενζυμικής Ενεργότητας Οξειδάσης των Πολυαμινών (PAO)

Η μέτρηση της ενεργότητας της οξειδάσης των πολυαμινών υπολογίστηκε φασματοφωτομετρικά ακολουθώντας το σχηματισμό ενός κίτρινου προϊόντος προερχομένου από το συνδυασμό Δ¹-πυρρολίνης με ο-αμινοβενζαλδεΐδης (Federico *et al.*, 1985). Το μείγμα αντίδρασης περιείχε 430 μl πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και 50 μl Spm 100 mM διαλυμένα σε 10 mM M K-φωσφορικό οξύ (pH 7.5). Μετά από επώαση στους 37 °C για 2 h, η αντίδραση σταμάτησε προσθέτοντας 0.5 ml 10% (w/v) τριχλωροακετικό οξύ, ακολουθούμενο από 7.5 ml (10 mg ml⁻¹) ο-αμινοβενζαλδεΐδης σε αιθανόλη. Η απορρόφηση στα 430 nm μετρήθηκε μετά από αφαίρεση των πρωτεϊνών με φυγοκέντρηση ($E_{0} = 1.86 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Ένα unit (U) αντιστοιχεί στο ποσό του ενζύμου που καταλύει το σχηματισμό 1 μmol Δ¹-πυρρολίνης ανά λεπτό.

2.8 Προσδιορισμός Ενζυμικής Ενεργότητας της Καταλάσης (CAT)

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας της καταλάσης πραγματοποιήθηκε σε εκχυλίσματα φύλλων και βασίστηκε στην αποδόμηση του H₂O₂, όπως αυτή προσδιορίζεται ποσοτικά με φασματοφωτομετρία. Συγκεκριμένα, μετρήθηκε ο ρυθμός ελάττωσης της απορρόφησης του H₂O₂ στα 240 nm στους 30°C (Havir and McHale, 1987). Η αντίδραση της καταλάσης πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο της Perkin-Elmer (*Lambda 20*) και χρησιμοποιήθηκαν χαλαζιακές κυβέτες των 3 ml. Το διάλυμα αντίδρασης, όγκου 3 ml, περιείχε 50 mM K₂HPO₄-KH₂PO₄, pH 8,0, 15 μM H₂O₂ και ποσότητα εκχυλίσματος, ισοδύναμη με 20 μg ολικής πρωτεΐνης. Για την λήψη μετρήσεων εφαρμόστηκε αυτοματοποιημένο πρόγραμμα, σύμφωνα με το οποίο για κάθε αντίδραση λαμβάνονται τιμές απορρόφησης στα 240 nm, ανά 0,5 sec και για συνολική διάρκεια 1 min από τη στιγμή

προσθήκης του εκχυλίσματος. Για κάθε φυτό πραγματοποιήθηκαν τρεις ανεξάρτητες επαναλήψεις της αντίδρασης, για κάθε μέτρηση. Η μετατροπή της μετρούμενης διαφοράς απορρόφησης σε μονάδες ενζυμικής ενεργότητας (Units), έγινε με βάση το μοριακό συντελεστή απορρόφησης, $\epsilon = 0,036 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ και οι τιμές ανάχθηκαν στο 1 mg πρωτεΐνης (ειδική ενεργότητα).

2.9 Απομόνωση γενωμικού DNA

Για την απομόνωση του γενωμικού DNA από φύλλα εφαρμόστηκε παραλλαγή του πρωτοκόλλου που καθιερώθηκε από τους Delaporta *et al.* (1983). Αναλυτικότερα, 1 g κυττάρων από κάθε φυτό κονιορτοποιήθηκε, με λειοτρίβηση παρουσία υγρού αζώτου και η λεπτή σκόνη, που σχηματίστηκε, αιωρήθηκε σε 15 ml διαλύματος εκχύλισης (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM β-μερκαπτοαιθανόλη). Ακολούθησε προσθήκη 1 ml διαλύματος 20% SDS και, μετά από ήπια ανάδευση, το αιώρημα επωάστηκε στους 65 °C, για 15 min. Στη συνέχεια, εξισορροπήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και προστέθηκαν 5 ml παγωμένου διαλύματος 5 M οξικού καλίου. Το αιώρημα αναμείχθηκε ελαφρά και παρέμεινε στον πάγο για 30 min. Κατόπιν, φυγοκεντρήθηκε στις 5000 rpm για 15 min στους 4 °C και συλλέχθηκε το διαυγές υπερκείμενο. Για την αποτελεσματικότερη απομάκρυνση των υπολειμμάτων φυτικού ιστού, το υπερκείμενο διηθήθηκε μέσα από φίλτρο Miracloth (Hoechst; 18" x 50'). Στο διήθημα προστέθηκαν 10 ml ισοπροπανόλης και το διάλυμα μεταφέρθηκε στους -20°C, όπου και παρέμεινε για 30 min. Ύστερα από φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 30 min στους 4 °C, το γενωμικό DNA εμφανίστηκε ως πελλάτα υπόλευκου χρώματος και επαναδιαλύθηκε σε 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA). Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους 4 °C, και ηλεκτροφορήθηκαν φρέσκα σε πηκτή αγαρόζης πυκνότητας 1.5%, σε τάση 27 volt και για 16 h.

2.10 Εκχύλιση για EMO

Για εκχύλιση EMO, τα κυτταρικό εναιώρημα συλλέχθηκε, και φυγοκεντρήθηκε στις 2,500 rpm. Στην συνέχεια ελήφθη το υπερκείμενο (εξωκυττάριο υγρό) ενώ το ίζημα (τα κύτταρα) διαλύθηκε σε 100 mM Κ-φωσφορικό οξύ (pH 6.8) και ομογενοποιήθηκε με Ultra Turrax σε 20,000 rpm στους 4 °C. Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε στις 12,000 rpm στους 4 °C για 20 min. Για τον εσωτερικό έλεγχο του πρωτοκόλλου προστέθηκε στο διάλυμα εκχύλισης H₂O₂ γνωστής συγκέντρωσης

2.10.1 Προσδιορισμός H_2O_2

Η μέτρηση της συγκέντρωσης H_2O_2 τόσο ενδοκυτταρικά όσο και εξωκυτταρικά έγινε με την βιοδοκιμή της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης (luminol, Sigma, Munchen, Germany) όπως έχει ήδη περιγραφεί (Murphy and Huerta, 1990).

i) Προσδιορισμός ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης H_2O_2

Ο προσδιορισμός ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης H_2O_2 πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 1 ml, τοποθετώντας σε δοκιμαστικό σωλήνα σπινθηρισμού τα ακόλουθα: 690 μl διαλύματος αντίδρασης (που περιείχε 10 mM Tris pH 7,0, 1 mM $CaCl_2$ και 0,1 mM KCl), 100 μl από 1 mM φρέσκου διαλύματος λουμινόλης, 0,1 μονάδα περοξειδάσης σε 20 mM K_3PO_4 (pH 7,4) και 200 μl εκχύλισμα ΕΜΟ. 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. Κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη προκειμένου να συσχετιστούν οι τιμές της χημειοφωταύγειας (cpm) με την συγκέντρωση του H_2O_2 και επίσης χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι μάρτυρες για κάθε περίπτωση.

ii) Προσδιορισμός εξωκυτταρικής συγκέντρωσης H_2O_2

Ο προσδιορισμός της εξωκυτταρικής συγκέντρωσης H_2O_2 πραγματοποιήθηκε κατά τα ίδια πρότυπα χρησιμοποιήθηκαν 390 μl διαλύματος αντίδρασης και 500 μl εξωκυττάρου υγρού.

2.10.2 Προσδιορισμός O_2^-

Η παραγωγή του O_2^- ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά μελετήθηκε με την βιοδοκιμή της χημειοφωταύγειας της λουσιγενίνης (lucigenin, Sigma, Munchen, Germany), η οποία είναι ειδική για την ανίχνευση του O_2^- (Corbisier *et al.*, 1987).

i) Προσδιορισμός ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης O_2^-

Η μέτρηση ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης O_2^- πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 1 ml, τοποθετώντας σε δοκιμαστικό σωλήνα σπινθηρισμού τα ακόλουθα: 700 μl διαλύματος αντίδρασης (που περιείχε 0,1 M Glycine NaOH pH 9,0 και 1 mM EDTA), 100 μl από 1 mM διαλύματος λουσιγενίνης, και 200 μl εκχυλίσματος ΕΜΟ. Όλες οι άλλες συνθήκες, που περιγράφηκαν για την βιοδοκιμή του H_2O_2 ακολουθήθηκαν και στην περίπτωση του O_2^- . Οι κρούσεις μετρήθηκαν κάθε 6 sec για 0,5 min και οι δύο τελευταίες τιμές χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της μέσης τιμής.

ii) Προσδιορισμός εξωκυτταρικής συγκέντρωσης O_2^-

Όπως και στην περίπτωση του H_2O_2 ο προσδιορισμός της εξωκυτταρικής συγκέντρωσης O_2^- πραγματοποιήθηκε όπως για την ενδοκυτταρική συγκέντρωση με μόνη διαφορά, ότι χρησιμοποιήθηκαν 400 μ l διαλύματος αντίδρασης και 500 μ l.

2.11 Διαδικασία κλωνοποίησης

2.11.1 Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων για μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων *E.coli*.

- Δεκτικά κύτταρα είναι εκείνα τα βακτηριακά κύτταρα τα οποία έχουν τροποποιηθεί κατάλληλα ώστε η κυτταρική τους μεμβράνη να γίνει περισσότερο διαπερατή από πλασμιδιακό DNA.
- Ετοιμάζεται βακτηριακή καλλιέργεια από το κατάλληλο στέλεχος (εδώ το Jm83) σε 100 ml θρεπτικό μέσο LB (για 1lt διαλύματος :10 g bacto-tryptone, 5 g bacto-yeast extract, 10 g NaCl) στους 37 °C με ανακίνηση για τη διάρκεια της νύκτας.
- Σε φλάσκα 2 λίτρων προστίθενται 200 μ l από αυτή την καλλιέργεια σε 100 ml LB και αφήνεται στους 37 °C με ανακίνηση περίπου 2 h μέχρι $O.D_{560nm} = 0.45$
- Μεταφέρεται η καλλιέργεια σε 2 falcon των 50ml.
- Γίνεται φυγοκέντρηση για 10 min, στις 2500 rpm (rounds per minute), στους 4 °C. Λαμβάνεται το κυτταρικό ίζημα.
- Επαναδιάλυση των κυττάρων σε 20ml διαλύματος TFB1 (100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 30 mM CH₃COOK, 10 mM CaCl₂ και 87% γλυκερόλη. pH 5,8).
- Επωάση στον πάγο για 20 min.
- Γίνεται φυγοκέντρηση για 5 min, στις 2500 rpm, στους 4 °C και λαμβάνεται εκ νέου το κυτταρικό ίζημα.
- Γίνεται επαναδιάλυση του ιζήματος σε 4 ml διαλύματος TFBII (0.2 % MOPS, 10 mM RbCl₂, 87% γλυκερόλη. pH 7.0 Το εναιώρημα τοποθετείται σε σωληνάκια erpendorf των 1.5 ml (τα οποία έχουν καταψυχθεί στους -80 °C) βάζοντας 200 μ l από αυτό (το εναιώρημα) σε κάθε erpendorf. Τα κύτταρα φυλάσσονται στους -80 °C.

2.11.2 Πέψη του DNA με περιοριστικά ένζυμα και έκλουση γραμμικών τμημάτων DNA από το πήκτωμα αγαρόζης

Γίνεται η αντίδραση πέψης του DNA με τα επιθυμητά περιοριστικά ένζυμα, με τα κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα και στην κατάλληλη θερμοκρασία. Η ποσότητα του

ενζύμου δεν πρέπει να ξεπερνά το 10% του τελικού όγκου της αντίδρασης, γιατί η γλυκερόλη στην οποία διατηρούνται τα ένζυμα, μπορεί αν βρεθεί σε μεγάλες συγκεντρώσεις να μειώσει σημαντικά την ενεργότητά τους. Η τελική του συγκέντρωση πρέπει να είναι τουλάχιστον 1 u/μg. Η αντίδραση αφήνεται για 1-2 h ή και παραπάνω.

Η πέψη ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης (συγκέντρωσης ανάλογης με τα μεγέθη του DNA που περιμένουμε να δούμε) και από το πήκτωμα απομονώνονται, με τη βοήθεια νυστεριού, οι επιθυμητές ζώνες και τοποθετούνται σε σωληνάκια eppendorf. Η έκλουση γίνεται με το εμπορικό kit της εταιρίας BIO101 (GENECLEAN III με βάση τον κατάλογο BIO 101, 2000 Guide to Protocols Procedures).

2.11.3 Κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακό φορέα και εισαγωγή του σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* (μετασχηματισμός)

Μετά την απομόνωση των γραμμικών τμημάτων του φορέα και του ενθέματος που θέλουμε να εισάγουμε σε αυτόν, πραγματοποιείται αντίδραση σύνδεσης (ligation reaction) χρησιμοποιώντας:

- i) 100–300 ng από το φορέα
- ii) Ποσότητα ενθέματος, που καθορίζεται από την αναλογία μορίων φορέα προς τα μόρια του ενθέματος. Η ιδανική αναλογία μορίων ενθέματος/φορέα είναι για προεξέχοντα άκρα 4/1.
- iii) 1/10 του όγκου από 10x ρυθμιστικού διαλύματος λιγάσης (το οποίο περιέχει και ATP).
- iv) 3-5 units από T4 DNA λιγάση.
- v) H₂O μέχρι τελικό όγκο 10 ή 15 μl.

Η αντίδραση αφήνεται στους 16 °C για 3-4 h ή για τη διάρκεια της νύκτας. Το προϊόν φυλάσσεται στους –20 °C.

Στην περίπτωση που τα άκρα του φορέα είναι συμπληρωματικά (δηλαδή ο φορέας έχει κοπεί με ένα ένζυμο), τότε γίνεται αποφωσφορυλίωσή του με το ένζυμο CIP, πριν από τη χρησιμοποίησή του στην αντίδραση λιγάσης. Η CIP είναι μία φωσφατάση που αφαιρεί από τα 5' άκρα του γραμμικού τμήματος DNA (στη συγκεκριμένη περίπτωση του ανοιγμένου φορέα) τις φωσφορικές ομάδες, με αποτέλεσμα να μην μπορεί ο φορέας να "ξανακλείσει" από μόνος του με τη δράση της λιγάσης. Το μισό προϊόν της αντίδρασης λιγάσης προστίθεται σε 100 μl δεκτικών κυττάρων (τα οποία έχουν αφεθεί στον πάγο για 10 min προκειμένου να ξεπαγώσουν), για μετασχηματισμό. Το μίγμα αφήνεται στον πάγο για 30 min, και στη συνέχεια τα κύτταρα υφίστανται θερμικό σοκ στους 42 °C για 1 λεπτό. Το μίγμα τοποθετείται πίσω στον πάγο για άλλα 2-3 min και μετά προστίθενται 400 μl LB. Τα κύτταρα επωάζονται στους 37 °C, για 45 min με ανακίνηση, προκειμένου να πολλαπλασιαστούν. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 min, στις 2500 rpm, ώστε τα κύτταρα να πέσουν ως ίζημα.

Αφαιρείται το περισσότερο υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύεται με το υπόλοιπο υπερκείμενο. Μετά γίνεται επίστρωση του σε τρυβλία LB που έχουν κάποιο μέσο επιλογής, συνήθως αντιβιοτικό (π.χ αμπικιλίνη, στεκτινομυκίνη). Μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε επιπλέον ως μέσο επιλογής και X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) (χρωμογόνο υπόστρωμα για τη β-γαλακτοσιδάση). Με αυτόν τον τρόπο, όσα κύτταρα έχουν φορέα με ένθεμα (οπότε δεν παράγεται σε αυτά το ένζυμο της β-γαλακτοσιδάσης) θα δίνουν άσπρες αποικίες, ενώ όσα κύτταρα διαθέτουν μόνο φορέα (παράγεται σε αυτά το ένζυμο της β-γαλακτοσιδάσης) θα δίνουν μπλε αποικίες.

2.11.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας από βακτηριακή καλλιέργεια (mini-prep), με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης κυττάρων

- Από βακτηριακές αποικίες που έχουν επιλεγεί μετά το μετασχηματισμό, απομονώνεται μικρή ποσότητα DNA, για να ελεγχθεί αν είναι επιτυχημένη η κλωνοποίηση του ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα (το τελευταίο γίνεται με πέψεις με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα). Η διαδικασία είναι η εξής:
- Ετοιμάζονται καλλιέργειες LB + το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής και ακολουθεί επώαση στους 37 °C με ανακίνηση (~16 h).
- Μεταφέρεται το 1ml από αυτές τις καλλιέργειες σε erpendorf των 1.5 ml και γίνεται φυγοκέντρηση ώστε τα κύτταρα να πέσουν ως ίζημα. Αφαιρείται το περισσότερο από το υπερκείμενο.
- Προστίθενται 100 μl διαλύματος I (solution I) (according to Sambrook *et al*). Γίνεται επαναδιάλυση των κυττάρων και τα δείγματα αφήνονται 5 min στον πάγο.
- Προστίθεται 200 μl διαλύματος II (solution II), ελαφριά ανακίνηση και τα δείγματα αφήνονται 2 min στον πάγο.
- Προστίθεται 150 μl διαλύματος III (solution III), ελαφριά ανακίνηση και τα δείγματα αφήνονται 5 min στον πάγο.
- solution I :50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 10mM EDTA
- solution II :0.2 N NaOH, 1% SDS (φτιάχνεται λίγο πριν τη χρήση)
- solution III: 5 M potassium acetate 60 ml, glacial acetic acid 11.5 ml και H₂O 28.5 ml.
- Γίνεται φυγοκέντρηση για 5 min, στις 13.000 rpm, στους 4 °C και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf.
- Προστίθεται ίσος όγκος φαινόλη/χλωροφόρμιο (1/1). Γίνεται ισχυρή ανάδευση (vortex)
- Γίνεται φυγοκέντρηση για 2 min, στις 13.000 rpm και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf .

- Προστίθεται 100% αιθανόλη σε ποσότητα ίση με δύο φορές τον όγκο του υπερκειμένου και γίνεται ανακίνηση. Η αιθανόλη προκαλεί την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA.
- Αφήνεται 2 min σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση για 5 min, στις 13.000 rpm.
- Ακολουθεί ξέπλυμα του ιζήματος με 70% αιθανόλη και τελικά επαναδιαλύεται σε 50 μl TE pH 7.6.

Προκειμένου να βρεθεί σε ποιες βακτηριακές αποικίες υπάρχει η επιθυμητή πλασμιδιακή κατασκευή, (φορέας και το επιθυμητό ένθεμα), μετά από μετασχηματισμό:

α) Λαμβάνονται οι αποικίες και γίνεται απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας από βακτηριακή καλλιέργεια.

β) Γίνονται πέψεις με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα (βέβαια είναι ήδη γνωστά τα μεγέθη των τμημάτων DNA που θα προκύψουν από την επιθυμητή πλασμιδιακή κατασκευή).

γ) Ηλεκτροφορούνται τα δείγματα.

δ) Ελέγχεται αν κάποιο από τα δείγματα DNA των αποικιών δίνει τα αναμενόμενα τμήματα DNA.

2.12 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκαν δύο εκκινητές όπου ο πρώτος υβριδοποιούνταν στη θέση 20 του cDNA τμήματος (μεγέθους 1105 bp) του cDNA κλώνου της SAMDC από καπνό (Michael *et al.*, unpublished) και ο δεύτερος στη θέση 510. Ο πρώτος ονομάζεται SAMDC sense και διαθέτει περιοριστική θέση για το ένζυμο XbaI και ο δεύτερος ονομάζεται SAMDC antisense και διαθέτει περιοριστική θέση για το ένζυμο KpnI. Για να γίνει ο πολλαπλασιασμός του τμήματος cDNA μεγέθους 490 bp, που βρίσκεται μεταξύ των σημείων που υβριδοποιούνται οι δύο παραπάνω εκκινητές, χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα 100 ng πλασμιδιακού DNA (pBluescript + cDNA τμήμα (μεγέθους 1105 bp) από το cDNA κλώνο της SAMDC (Michael *et al.*, unpublished), και σε τελική συγκέντρωση: 1.2 mM MgCl₂, 0.6 mM dNTPs, 1 μM από τον κάθε εκκινητή, 0.3 units Taq πολυμεράση (Minotech) 1x διάλυμα αντίδρασης Taq πολυμεράσης (Minotech). Στην αρχή της αντίδρασης έγινε αποδιάταξη του DNA για 3 min στους 95 °C και στη συνέχεια σε κάθε κύκλο γινόταν αποδιάταξη του DNA για 1 min στους 95 °C, υβριδοποίηση των εκκινητών για 30 sec και στους 50 °C, και επέκταση για 45 sec και στους 72 °C.

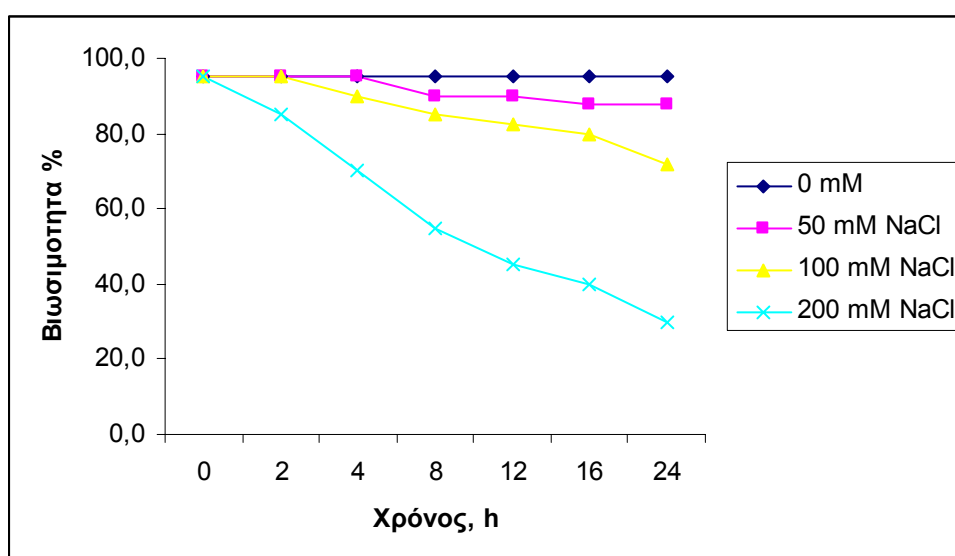
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Βιωσιμότητα των κυττάρων σε συνθήκες αλατότητας

Οι αιωρούμενες κυταροκαλλιέργειες *Vitis vinifera* cv Soultanina υποβλήθηκαν σε καταπονήσεις με NaCl. Οι μεταχειρίσεις γινόταν τρεις ημέρες μετά την ανανέωση των κυταροκαλλιεργειών και σε συγκεντρώσεις 0, 50, 100 και 200 mM NaCl. Η διάρκειά τους ήταν 15 min, 30 min, 45 min, 1h, 2 h, 4 h, 8 h και 12 h, 16 h και 24 h.

Σε κάθε μεταχείριση μελετήθηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων με χρώση Evan's blue και παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Οι καλλιέργειες πριν τις μεταχειρίσεις, καθώς και στη συγκέντρωση 0 mM NaCl, παρουσίαζαν σταθερό ποσοστό βιωσιμότητας 95% (Εικ. 4).

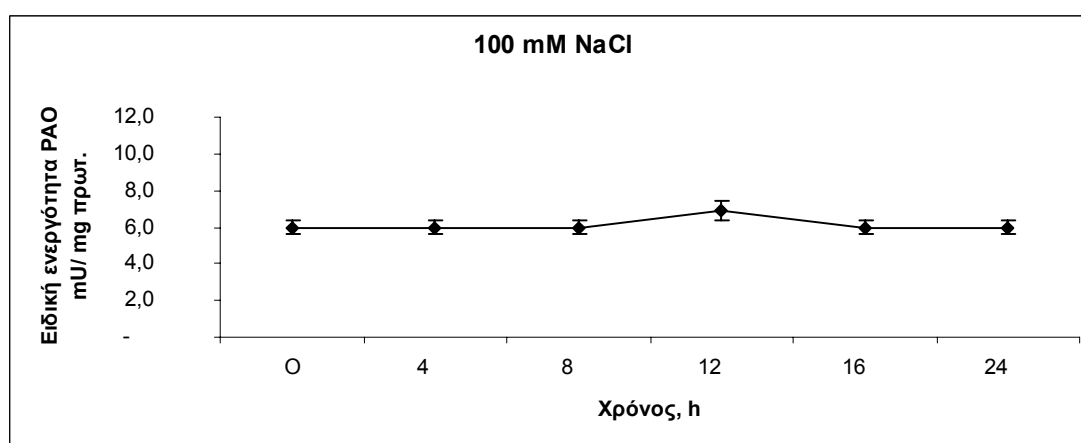
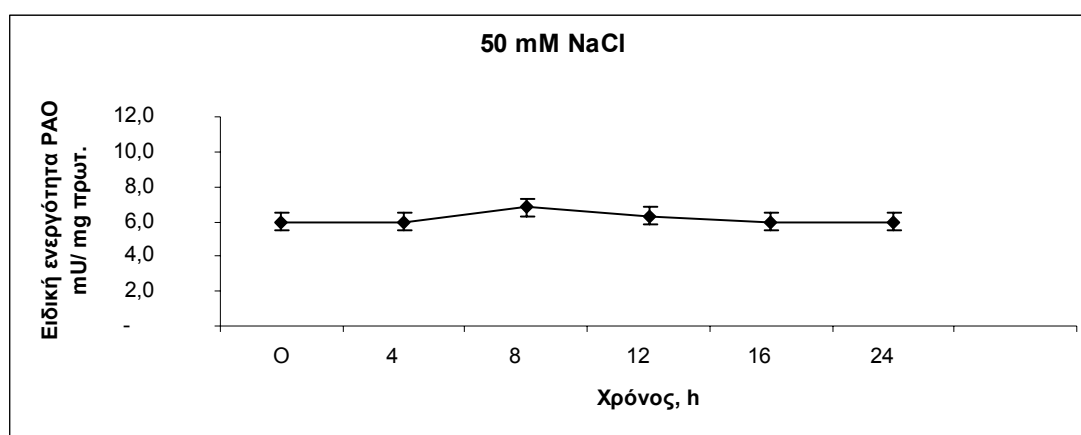
Παρουσία 50 mM NaCl παρατηρήθηκε μικρό ποσοστό θνησιμότητας. Συγκεκριμένα, στις 8 h η βιωσιμότητα ήταν 90%. Το παραπάνω ποσοστό διατηρήθηκε σταθερό μέχρι και τις 24 h. Μεταχείριση με 100 mM NaCl προκάλεσε μείωση της βιωσιμότητας. Αλλαγές στη βιωσιμότητα των κυττάρων παρατηρήθηκαν και εδώ μετά τις 8 h, όπου το 85% των κυττάρων ήταν βιώσιμο, ενώ στις 12 h το παραπάνω ποσοστό μειωνόταν στο 80% και στο 72% στις 24 h. Τέλος, συγκέντρωση 200 mM NaCl προκάλεσε εντυπωσιακά αποτελέσματα. Η μείωση της βιωσιμότητας ήταν ραγδαία: στις 2 h το 85% των κυττάρων ήταν βιώσιμο, στις 4 h το 70%, στις 8 h το 55% και στις 12 h το 45%, στις 16 h το 40% και στις 24 h το 30%. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι η αύξηση της θνησιμότητας των κυττάρων είναι εξαρτώμενη από την ένταση της αλατότητας (dose response effect).

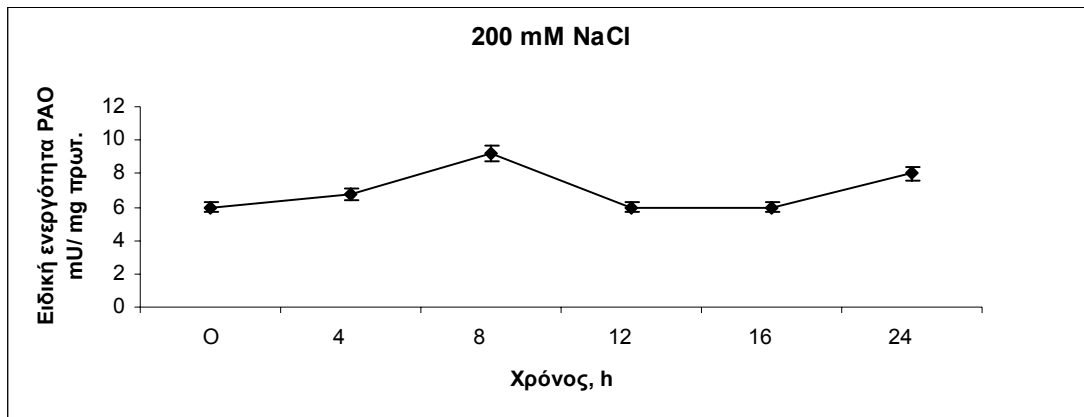


Εικόνα 4: Επίδραση της αλατότητας στη βιωσιμότητα.

3.2 Ειδική ενεργότητα της ΡΑΟ

Κατά τις μεταχειρίσεις που, έχουν ήδη αναφερθεί, προσδιορίστηκε η ειδική ενεργότητα της ΡΑΟ. Παρουσία 50 και 100 mM NaCl, η ειδική ενεργότητα της ΡΑΟ δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τον μάρτυρα, σε όλες τις χρονικές στιγμές που μελετήθηκαν. Στα 200 mM NaCl η ειδική ενεργότητα της ΡΑΟ δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τον μάρτυρα μέχρι και τις 4 h. Στις 8 h η ειδική ενεργότητα της ΡΑΟ; αυξήθηκε κατά 55% σε σχέση με το μάρτυρα. Στη συνέχεια ακολούθησε πτώση στα επίπεδα του μάρτυρα μέχρι και τις 16 h ενώ στις 24 h παρουσίασε ξανά αύξηση κατά 30% σε σχέση με το μάρτυρα (Εικ. 5).



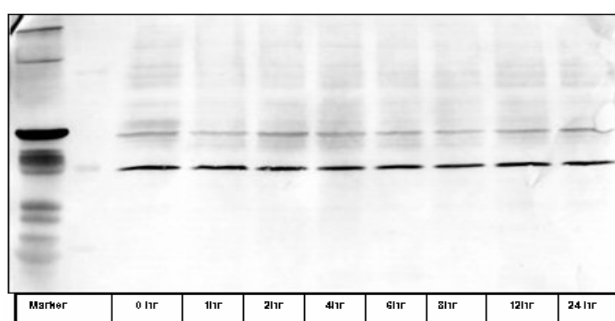


Εικόνα 5: Ειδική ενεργότητα της PAO κατά τις μεταχειρίσεις κυτταροκαλλιεργειών αμπελιού με 0 mM, 50 mM, 100 mM και 200 mM NaCl .

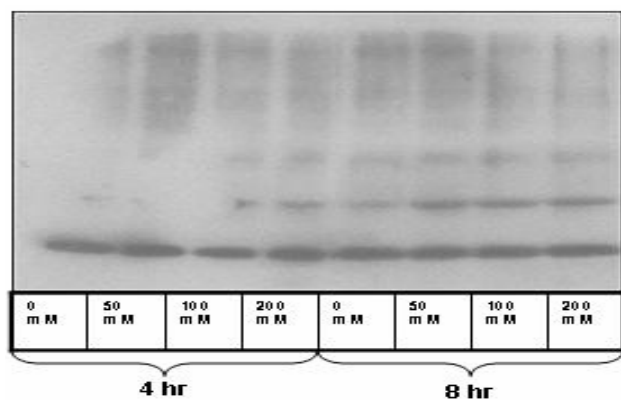
3.3 Ανοσοεντοπισμός της PAO και της ADC

Κατά τις μεταχειρίσεις, που έχουν ήδη αναφερθεί, έγινε ανοσοεντοπισμός της PAO, προκειμένου να βρεθεί αν η έκφρασή της, κάτω από την επίδραση της αλατότητας, ρυθμίζεται σε μεταφραστικό επίπεδο, και κατ' επέκταση αν οι αυξήσεις στην ενεργότητά της που αναφέρθηκαν προηγουμένως οφείλονται σε αύξηση της πρωτεΐνης ή σε μετα-μεταφραστική ενεργοποίηση της PAO. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα πρωτεϊνικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον ανοσοεντοπισμό της PAO ήταν ίδια με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της ειδικής της ενεργότητας.

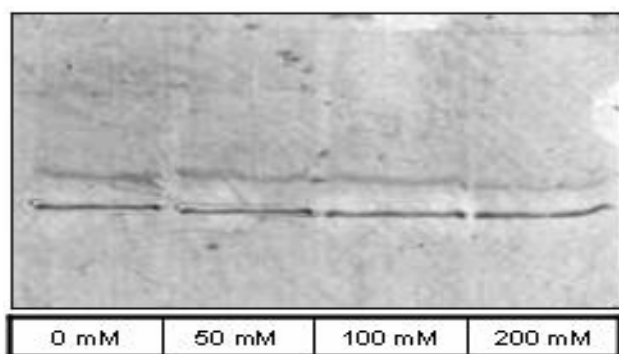
Όπως φαίνεται στις Εικόνες 6, 7 και 8 παρουσία 50, 100 και 200 mM NaCl η ποσότητα της ανοσοενεργής PAO δεν μεταβάλλεται, σε σχέση με το μάρτυρα, σε όλες τις χρονικές στιγμές. Παράλληλα, ανοσοεντοπισμός της ADC παρουσία 100 mM NaCl έδειξε ότι η ανοσοενεργή ποσότητα της ADC παραμένει σταθερή σε σχέση με το μάρτυρα (Εικόνα 9).



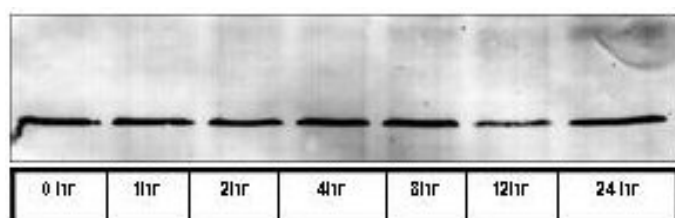
Εικόνα 6: Ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης PAO μετά από μεταχειρίσεις με 100mM NaCl για 24 h.



Εικόνα 7: Άνοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης PAO μετά από μεταχειρίσεις με 0, 50, 100 και 200 mM NaCl για χρόνους 4 και 8 h.



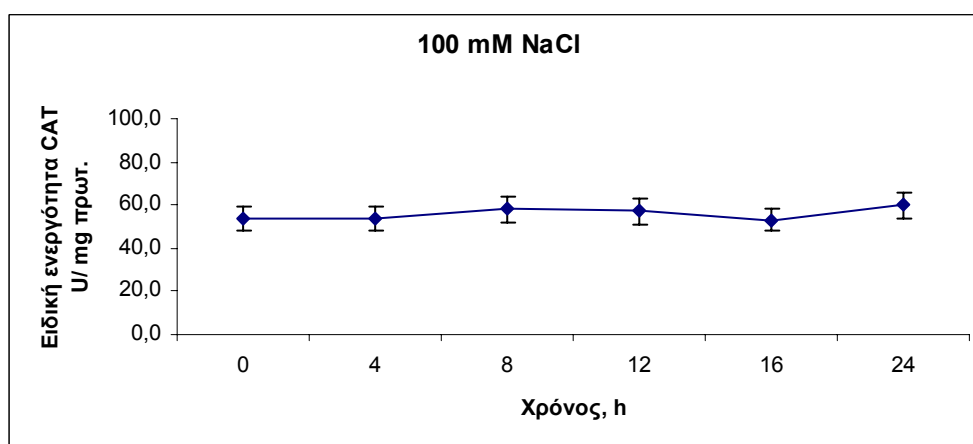
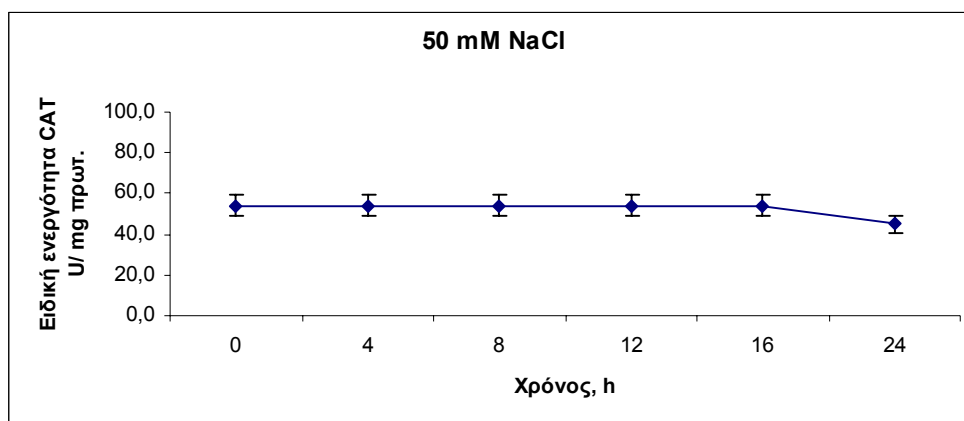
Εικόνα 8: Άνοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης PAO μετά από μεταχειρίσεις με 0, 50, 100 και 200 mM NaCl για 12 h.

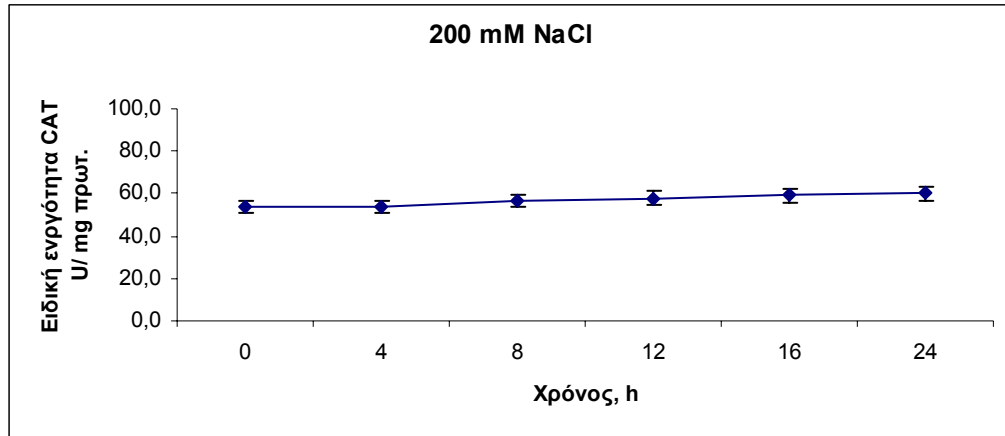


Εικόνα 9: Άνοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης ADC μετά από μεταχειρίσεις με 100 mM NaCl για 24 h.

3.4 Ειδική ενεργότητα της Καταλάσης

Κατά τις μεταχειρίσεις που, έχουν ήδη αναφερθεί, προσδιορίστηκε η ειδική ενεργότητα της καταλάσης (CAT). Παρουσία 50, 100 και 200 mM NaCl, η ειδική ενεργότητα της CAT δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τον μάρτυρα, σε όλες τις χρονικές στιγμές που μελετήθηκαν (Εικ. 10).

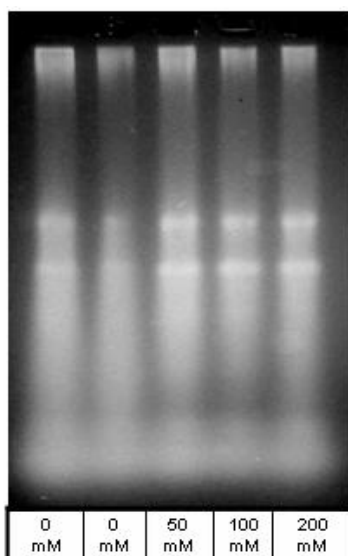




Εικόνα 10: Ειδική ενεργότητα της CAT κατά τις μεταχειρίσεις κυτταροκαλλιιεργειών αμπελιού με 50 mM, 100 mM και 200 mM NaCl .

3.5 Μελέτη της κατάτμησης του γενωμικού DNA

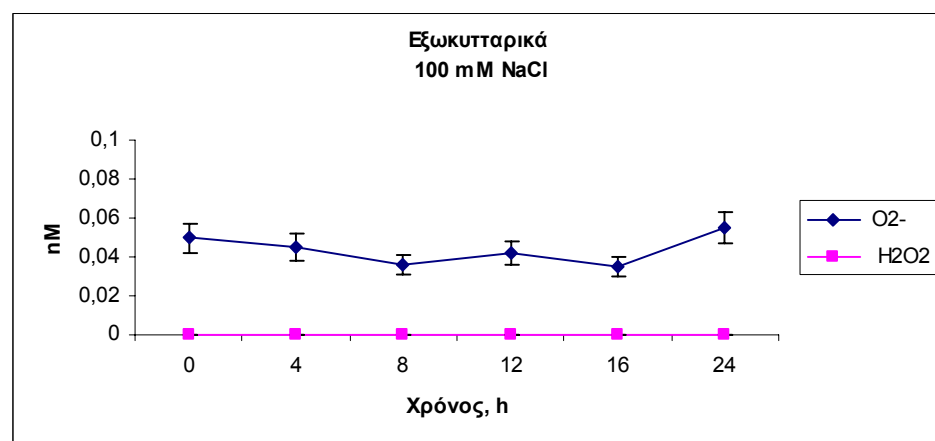
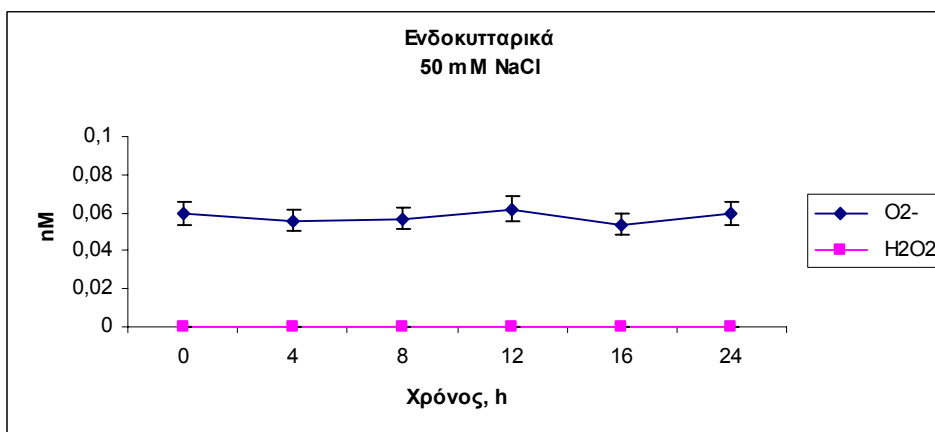
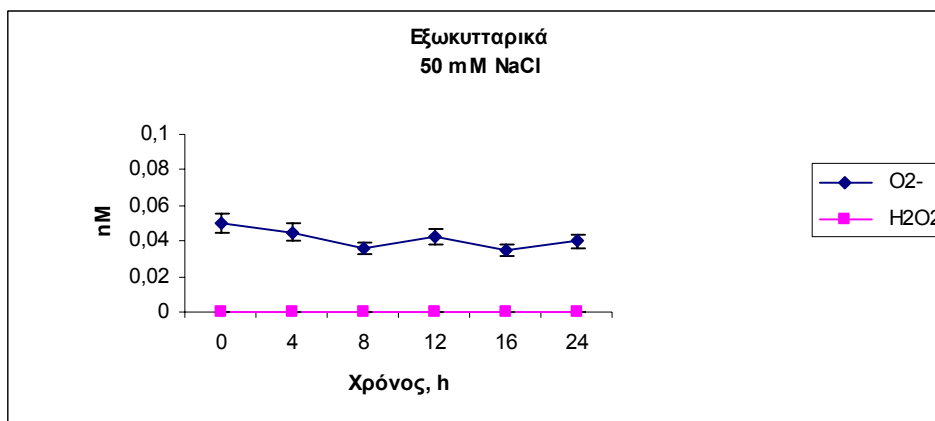
Σε μεταχειρίσεις με 50, 100 και 200 mM NaCl έγινε απομόνωση γενωμικού DNA στο χρόνο 8h προκειμένου να μελετηθεί κατά πόσο η καταπόνηση με αλατότητα επιδρά στην κατάτμηση του DNA μέσω της ενεργοποίησης ειδικών νουκλεασών, που είναι ένα χαρακτηριστικό φαινόμενο που παρατηρείται στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων γενωμικού DNA που απομονώθηκε (Εικόνα 11) έδειξε ότι η αποδόμηση του DNA ήταν αυξημένη (κατά 100%) στις μεταχειρίσεις σε σχέση με το μάρτυρα.

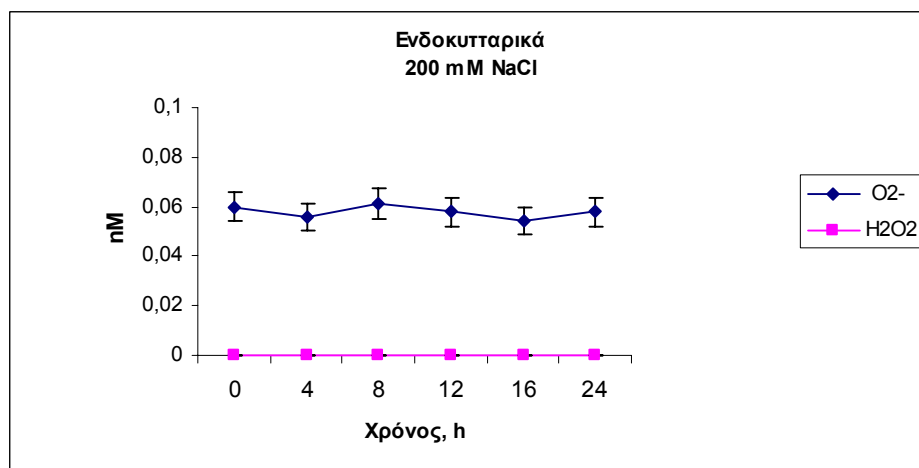
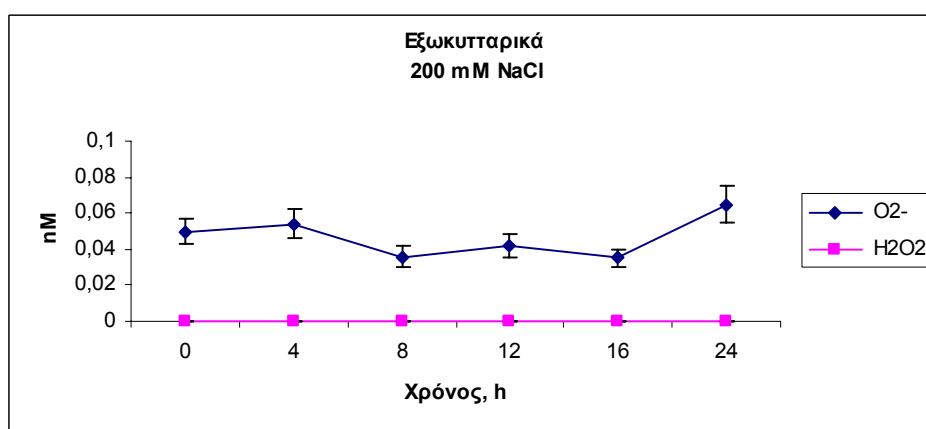
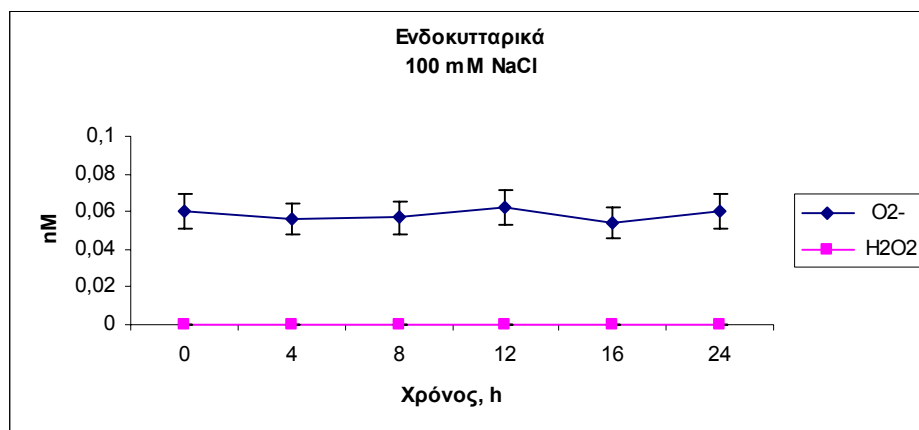


Εικόνα 11: Ηλεκτροφόρηση γενωμικών DNAs που απομονώθηκαν από κυτταροκαλλιέργειες μετά από μεταχειρίσεις με 0, 50, 100 και 200 mM NaCl για 8 h.

3.6 Προσδιορισμός των ΕΜΟ

Παρουσία 0, 50, 100 και 200 mM NaCl έγινε προσδιορισμός (ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά) των ΕΜΟ σε όλες τις χρονικές στιγμές. Σε κάθε περίπτωση τα επίπεδα του O_2^- ήταν χαμηλότερα σε σχέση με τον μάρτυρα, ενώ το H_2O_2 δεν ανιχνεύτηκε (Εικόνα 12).



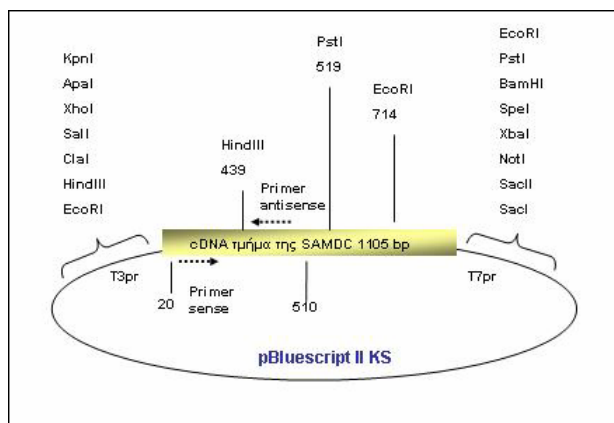


Εικόνα 12: Συγκέντρωση των ΕΜΟ κατά τις μεταχειρίσεις κυτταροκαλλιεργειών αμπελιού με 0, 50 mM, 100 mM και 200 mM NaCl. Οι τιμές αναφέρονται σε mg πρωτεΐνης.

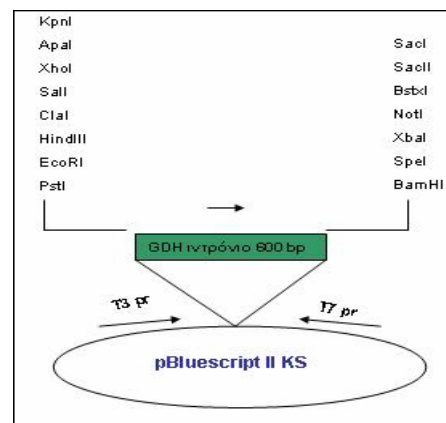
3.7 Κατασκευή πλασμιδιακών φορέων με σκοπό τη δημιουργία rap handle για το γονίδιο της SAMDC

Για την απενεργοποίηση του γονιδίου της SAMDC εφαρμόστηκε η τεχνική σιώπησης γονιδίων με την τεχνολογία του rap handle. Πρόκειται για μια τεχνολογία, όπου σε κατάλληλο φορέα κλωνοποιείται ένα τμήμα κάποιου γονιδίου (σε αυτή την περίπτωση του γονιδίου της SAMDC) δύο φορές σε ανάστροφη φορά. Μεταξύ των δύο αυτών πανομοιότυπων τμημάτων του γονιδίου παρεμβάλλεται ένα ιντρόνιο. Τα διαγονιδιακά φυτά που προκύπτουν, θα εκφράζουν το rap handle του τμήματος SAMDC, και μετά την απομάκρυνση του ιντρονίου, λόγω ματίσματος, θα προκύπτει ds RNA από τα μετάγραφα των δύο τμημάτων SAMDC. Έτσι, θα γίνει καταστολή του ενδογενούς γονιδίου της SAMDC πρωτεΐνης μέσω του φαινομένου του PTGS όπως αυτό περιγράφηκε στην εισαγωγή

Για την κατασκευή πλασμιδιακών φορέων, προκειμένου να δημιουργηθεί rap handle για το γονίδιο της SAMDC χρησιμοποιήθηκαν δύο κατασκευές. Στη μία (Εικ. 13) ένα τμήμα (1105 bp) μερικού μήκους cDNA κλώνου της SAMDC (Michael *et al.*, unpublished), είχε κλωνοποιηθεί στον φορέα pBluescript KS, στον polylinker, στη θέση EcoRI. Στην άλλη κατασκευή (Εικ. 14), ένα ιντρόνιο του γονιδίου της γλουταμικής αφυδρογονάσης (593 bp) (Scopelitis, 2001) είχε κλωνοποιηθεί στο φορέα pBluescript KS, στον polylinker, στη θέση SmaI.



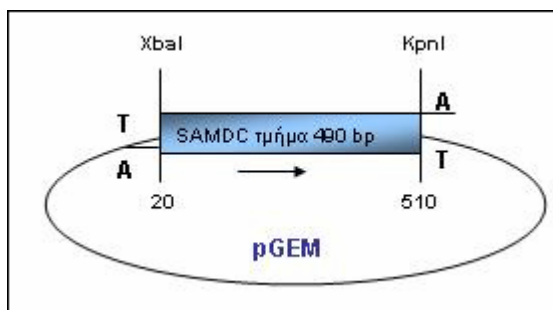
Εικόνα 13



Εικόνα 14

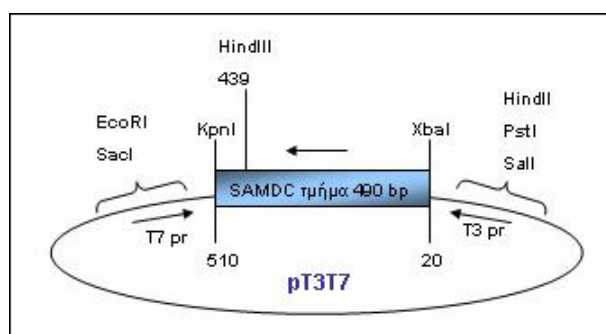
i) Αρχικά έγινε PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές SAMDC sense και SAMDC antisense, όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Το PCR προϊόν που προέκυψε κλωνοποιήθηκε σε γραμμικό φορέα pGEM T-easy (Promega). Για την αντίδραση σύνδεσης μεταξύ PCR προϊόντος και pGEM T-easy χρησιμοποιήθηκαν οι αδενίνες (A) που προσθέτει

η Ταq πολυμεράση στα 3΄άκρα του PCR προϊόντος (τμήμα SAMDC) και οι θυμίνες που διαθέτει ο γραμμικός φορέας ρGEM T-easy στα 3΄άκρα του. Έτσι προέκυψε η κατασκευή 1 (Εικ. 15).



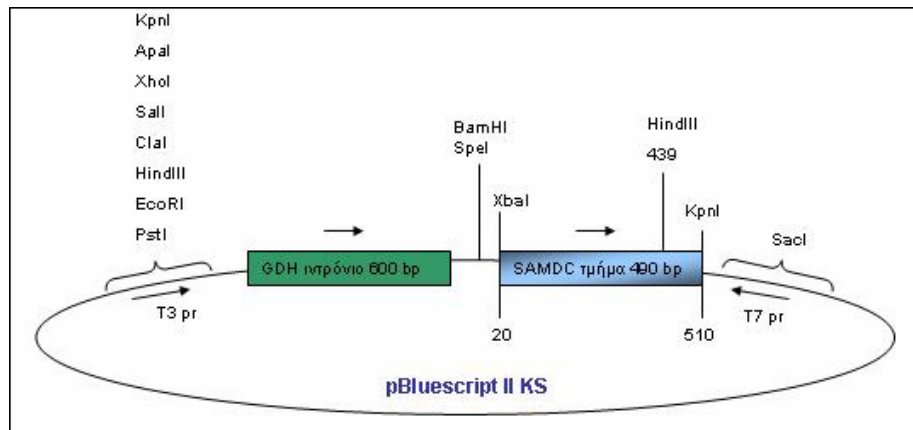
Εικόνα 15: Κατασκευή 1

ii) Στο επόμενο βήμα ελήφθη το τμήμα SAMDC από τον ρGEM T-easy με πέψη KpnI/XbaI και κλωνοποιήθηκε στον φορέα ρT3T7 (ο οποίος είχε γίνει γραμμικός με πέψη με KpnI/XbaI). Έτσι προέκυψε η κατασκευή 2 (Εικ. 16)



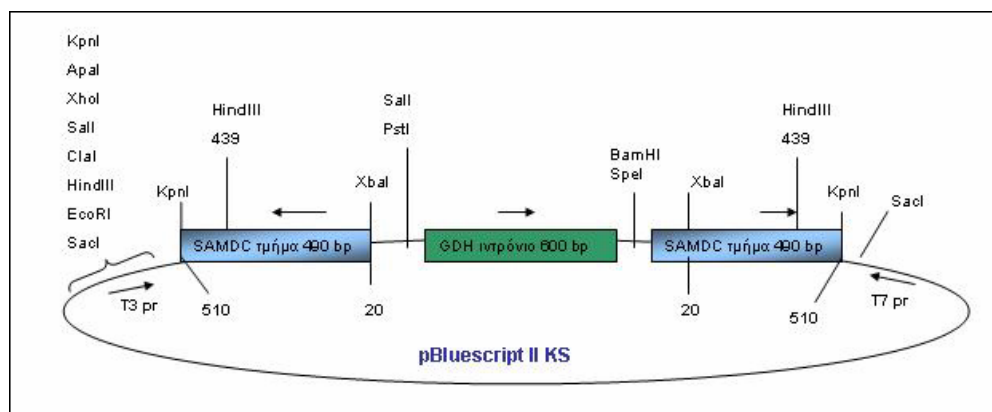
Εικόνα 16: Κατασκευή 2

iii) Στη συνέχεια ελήφθη το τμήμα SAMDC από τον ρT3T7 με πέψη SacI/XbaI και κλωνοποιήθηκε στην κατασκευή της Εικόνας 14 (η οποία είχε γίνει γραμμική με πέψη με SacI/XbaI). Έτσι προέκυψε η κατασκευή 3 (Εικ. 17). Όπως φαίνεται η κατεύθυνση μεταγραφής του τμήματος SAMDC στη κατασκευή της Εικόνας 17 είναι αντίθετη από αυτή της Εικόνας 16



Εικόνα 17: Κατασκευή 3

iv) Στη συνέχεια από τον pT3T7 ελήφθη πάλι το τμήμα SAMDC με πέψη με EcoRI/PstI και κλωνοποιήθηκε στη κατασκευή της Εικόνας 17. Έτσι προέκυψε η κατασκευή 4 της Εικόνας 18 (rap handle). Σε αυτήν την περίπτωση η κατεύθυνση μεταγραφής τμήματος SAMDC στη κατασκευή της Εικόνας 18 είναι ίδια με αυτή της Εικόνας 16. Στο σημείο αυτό, στην κατασκευή 4 της Εικόνας 18 έγινε αλληλούχηση που επιβεβαίωσε ότι το rap handle είχε κλωνοποιηθεί στον pBluescript II KS.

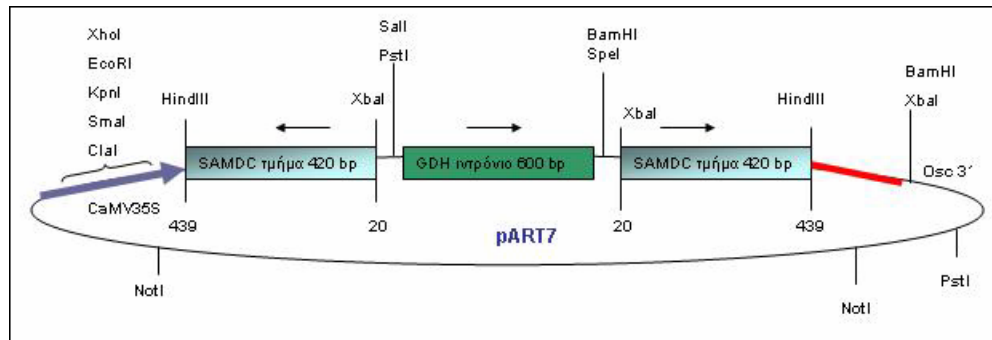


Εικόνα 18: Κατασκευή 4

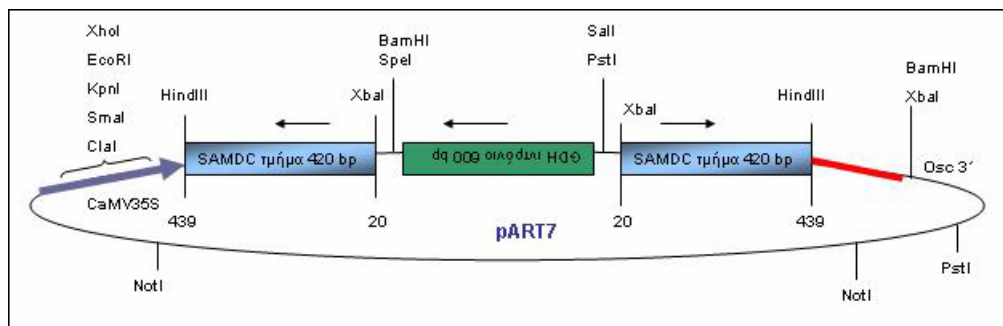
v) Εν συνεχεία, μέρος του rap handle της προηγούμενης κατασκευής (1430 bp από 1580 bp) ελήφθη με πέψη με HindIII και κλωνοποιήθηκε σε φορέα pART7. Ο φορέας pART7 είχε κοπεί με HindIII και είχε αποφωσφορυλιωθεί προηγουμένως. Στο σημείο αυτό χρειάστηκε ιδιαίτερη προσοχή γιατί η φορά μεταγραφής του ιντρονίου δεν έπρεπε να αλλάξει (δε θα γίνονταν μάτισμα του ιντρονίου στα διαγονιδιακά φυτά). Έτσι, αρχικά επιλέχθηκαν οι αποικίες στις οποίες μέρος του rap handle είχε κλωνοποιηθεί στον pART7 και στη συνέχεια αυτές στις οποίες είχε εντεθεί με τη σωστή φορά. Η επιλογή αυτή έγινε με πέψεις με το περιοριστικό ένζυμο PstI. Το ένζυμο αυτό δρα εντός και εκτός της περιοχής του rap handle

και προκύπτουν διαφορετικά τμήματα DNA, ανάλογα με την κατεύθυνση ένθεσης του ran handle στον φορέα pART7.

Στην Εικόνα 19 (α) απεικονίζεται το ran handle το οποίο έχει εντεθεί στον pART7 με τη “σωστή” φορά (κατασκευή 5) και στην Εικόνα 19 (β) το ran handle το οποίο έχει εντεθεί στον pART7 με τη “λανθασμένη” κατεύθυνση. Στην πρώτη περίπτωση, η πέψη με PstI έδωσε τμήματα DNA με μέγεθος **1700 bp** και **4800 bp**, ενώ στη δεύτερη **1200 bp** και **5400 bp**.

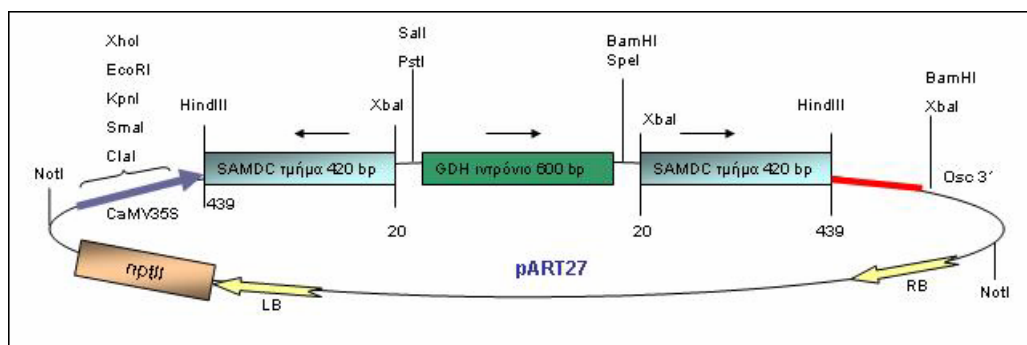


Εικόνα 19α: Κατασκευή 5

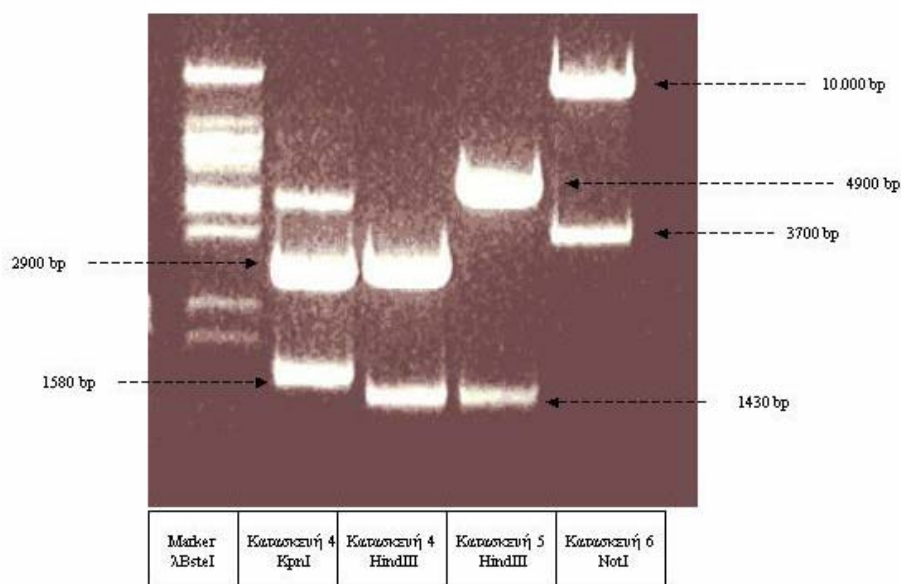


Εικόνα 19β: Ο CaMV 35S είναι ένας ισχυρός υποκινητής ενεργός στα φυτά, και το osc 3’ είναι το γονίδιο συνθάσης της οκτοπίνης, σπίνη που χρησιμοποιείται από το Αγροβακτήριο. Στο 3’ άκρο του βρίσκεται αλληλουχία λήξης της μεταγραφής, που στην Εικόνα 20 σημειώνεται ως Osc, και είναι η αλληλουχία λήξης του Osc γονιδίου.

vi) Στο τελευταίο βήμα έγινε πέψη στην κατασκευή 5 της Εικόνας 19 (α) με NotI. Ελήφθη το τμήμα μεγέθους 3700 kb, της Εικόνας 19 (α) και κλωνοποιήθηκε στον pART27, σε θέση NotI, αφού ο τελευταίος είχε κοπεί με το ένζυμο αυτό και είχε αποφωσφορυλιωθεί (κατασκευή 6-Εικ. 20)



Εικόνα 20: Κατασκευή 6, Το *nptII* είναι γονίδιο που κωδικοποιεί για την φωσφοτρανσφεράση της νεομυκίνης και της καναμυκίνης. Πρόκειται για ένα ένζυμο που φωσφορυλιώνει τα δύο παραπάνω αντιβιοτικά και προσδίδει ανθεκτικότητα στο διαγονιδιακό φυτό. Επίσης, απεικονίζονται το left border (LB) και το right border (RB), του T-DNA.



Εικόνα 21: Από αριστερά προς δεξιά απεικονίζονται (i) ο μάρτυρας που είναι DNA του φάγου λ κομμένο με το ένζυμο BstE I, (ii) η κατασκευή 4 κομμένη με το ένζυμο KpnI, όπου τα αναμενόμενα τμήματα ήταν 2900 bp (pBluescript) και 1580 bp (pan Handle), γεγονός που επιβεβαιώνεται, (iii) η κατασκευή 4 κομμένη με το ένζυμο HindIII, όπου τα αναμενόμενα τμήματα ήταν 2900 bp (pBluescript) και 1430 bp (μέρος του pan Handle), γεγονός που επιβεβαιώνεται, (iv) η κατασκευή 5 κομμένη με το ένζυμο HindIII, όπου τα αναμενόμενα τμήματα ήταν 4900 bp (pART7) και 1430 bp (μέρος του pan Handle), γεγονός που επιβεβαιώνεται, (v) η κατασκευή 6 κομμένη με το ένζυμο NotI, όπου τα αναμενόμενα τμήματα ήταν 10000 bp (pART27) και 3700 bp (CaMV35S + μέρος του pan Handle + Osc 3'), γεγονός που επιβεβαιώνεται.

Το επόμενο βήμα θα είναι ο μετασχηματισμός Αγροβακτηρίου με τον ανασυνδρασμένο φορέα pART27. Αυτό θα γίνει με τη μέθοδο της τριγωνικής σύζευξης. Στη συνέχεια τα μετασχηματισμένα Αγροβακτήρια θα χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών καπνού (*N. benthamiana*) (μεταφορά μέσω αγροβακτηρίου). Τα φυτά αυτά θα έχουν τροποποιηθεί με το τμήμα DNA που περιλαμβάνεται μεταξύ των περιοχών LB και RB (Εικ. 20).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα πειράματα που έγιναν στις κυτταροκαλλιέργειες αμπελιού βρέθηκαν συνοπτικά τα εξής:

- i) Η βιωσιμότητα των κυττάρων, σε μεταχειρίσεις με NaCl, επηρεάζεται τόσο από το χρόνο της μεταχείρισης, όσο και από τη συγκέντρωση του NaCl. Στα 50 και στα 100 mM NaCl η θανάτωση των κυττάρων λόγω της καταπόνησης γίνεται με αργό ρυθμό. Αντιθέτως, στα 200 mM η κυτταρική θανάτωση γίνεται με πολύ γρήγορο ρυθμό και φτάνει ως και το 70% μετά από 24 h (Εικ. 4).
- ii) Η καταπόνηση με αλατότητα προκαλεί ενεργοποίηση της PAO, αφού η ειδική της ενεργότητα βρέθηκε αυξημένη, σε σχέση με το μάρτυρα, κατά 55% στα 200 mM NaCl στις 8 h και κατά 30 % στις 24 h (Εικ. 5).
- iii) Η ποσότητα της ανοσοενεργής PAO δεν επηρεάζεται από την καταπόνηση της αλατότητας στις συγκεντρώσεις NaCl και στις χρονικές στιγμές που αυτή ανοσοεντοπίστηκε, και παραμένει αμετάβλητη (Εικ. 6, 7, 8). Αυτό, σε συνδυασμό με το παραπάνω, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η καταπόνηση με αλατότητα οδηγεί σε ενεργοποίηση της PAO, η οποία δεν οφείλεται σε θετική ρύθμιση σε μεταφραστικό επίπεδο, αλλά σε μετα-μεταφραστική θετική ρύθμιση.
- iv) Η καταπόνηση με αλατότητα δεν οδηγεί στη συσσώρευση των EMO, στα κύτταρα αμπελιού (Εικ. 12).
- v) Η καταπόνηση με αλατότητα δεν προκαλεί ενεργοποίηση της CAT, αφού η ειδική της ενεργότητα δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με το μάρτυρα, (Εικ. 10).
- vi) Η καταπόνηση με αλατότητα προκαλεί κατάτμηση του γενωμικού DNA, γεγονός που χαρακτηρίζει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Εικ. 11)

Η μετα- μεταφραστική ενεργοποίηση της PAO (άρα και μια ενεργοποίηση του καταβολισμού των πολυαμινών με σκοπό τη μείωση των ενδογενών επιπέδων τους), που βρέθηκε, δεν είναι σύμφωνη με μία σειρά μελετών καταπόνησης με αλατότητα που έχουν γίνει σε διάφορα φυτικά συστήματα. Τα επίπεδα των ενδογενών πολυαμινών αυξάνονται κατά την καταπόνηση με αλατότητα, παίζοντας προστατευτικό ρόλο και συμβάλλοντας έτσι στην αντοχή του φυτού (Bouchergau *et al.*, 1999). Παράλληλα, ανθεκτικές ποικιλίες φυτών στην αλατότητα έχουν υψηλότερα επίπεδα ενδογενών πολυαμινών σε σχέση με ευαίσθητες ποικιλίες (Chattopadhyay *et al.*, 2002). Επίσης, οι ανώτερες πολυαμίνες λειτουργούν ως αποσβέστες των EMO και αναστέλλουν την παραγωγή του αιθυλενίου, το οποίο παράγεται κατά την καταπόνηση με αλατότητα. Τέλος, διαγονιδιακά φυτά που υπερεκφράζουν το

γονίδιο της SAMDC και κατ' επέκταση συσσωρεύουν τις ανώτερες πολυαμίνες, είναι ανθεκτικά στην αλατότητα (Roy and Wu, 2002; Waie and Rajam, 2003)

Ωστόσο υπάρχουν και μελέτες με τις οποίες είναι σύμφωνη η μετα- μεταφραστική αυτή ενεργοποίηση της PAO. Σύμφωνα με αυτές, η καταπόνηση με αλατότητα οδηγεί σε ενεργοποίηση του καταβολισμού των πολυαμινών. Αποτέλεσμα αυτού είναι να αυξάνονται τα ενδογενή επίπεδα του , που παράγεται, το οποίο μπορεί να καθυστερήσει τη γήρανση (Boucherau *et al.*, 1999).

Μια υπόθεση η οποία θα μπορούσε διαμινοπροπανίου να ερμηνεύσει τα αποτελέσματα των πειραμάτων στις κυτταροκαλλιέργειες αμπελιού, που έγιναν στα πλαίσια της διατριβής αυτής, αλλά και τα αποτελέσματα των μελετών που αναφέρθηκαν (τόσο αυτών που συμφωνούν με την ενεργοποίηση του καταβολισμού των πολυαμινών, εξαιτίας της αλατότητας, όσο και αυτών που διαφωνούν) είναι η εξής:

Στα 50 mM και στα 100 mM NaCl και σε όλες τις χρονικές στιγμές, η καταπόνηση που δέχονται οι κυτταροκαλλιέργειες δεν είναι μεγάλης έντασης- δεν ξεπερνάει τα όρια αντοχής των συγκεκριμένων κυττάρων. Αυτό αποτυπώνεται στο γεγονός ότι η θνησιμότητα τους σε αυτές τις συγκεντρώσεις δεν ξεπερνάει το 10% και το 28%, αντίστοιχα, στις 24 h (Εικ. 4), παρόλο που παρατηρήθηκε αύξηση της κατάτμησης του γενωμικού DNA σε σχέση με το μάρτυρα (Εικ. 11). Στην περίπτωση αυτή τα κύτταρα δεν χρειάζεται να ενεργοποιήσουν τον καταβολισμό των πολυαμινών με σκοπό τη μείωση των ενδογενών επιπέδων τους. Αυτές είναι απαραίτητες για να συμμετέχουν στην απόκριση των κυττάρων στην αλατότητα και να παίξουν τον προστατευτικό τους ρόλο.

Στα 200 mM NaCl η καταπόνηση που δέχονται οι κυτταροκαλλιέργειες είναι υψηλής έντασης και ξεπερνάει τα όρια αντοχής των κυττάρων, αφού η θνησιμότητα τους αυξάνεται ραγδαία φτάνοντας το 70% (Εικ. 4) στις 24 h. Αποτέλεσμα αυτού είναι τα κύτταρα να ενεργοποιούν τη διαδικασία που οδηγεί σε PCD, ή απλά να γίνεται νέκρωση, που είναι μια παθητική διαδικασία. Όμως, μάλλον πρόκειται για PCD αφού υπάρχει η αύξηση της κατάτμησης του γενωμικού DNA (Εικ. 11). Στις 8 h, όπου η θνησιμότητα των κυττάρων είναι 45%, η ειδική ενεργότητα της PAO αυξάνεται κατά 55% σε σχέση με το μάρτυρα, στη συνέχεια μειώνεται στα αρχικά της επίπεδα και στις 24 h όπου η θνησιμότητα των κυττάρων είναι 70%, η ειδική ενεργότητα της PAO αυξάνεται ξανά κατά 30% σε σχέση με το μάρτυρα. Αν γίνεται PCD, τότε με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, μπορεί κανείς να πει ότι η PAO συμμετέχει σ' αυτόν. Όπως ήδη έχει αναφερθεί, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η PAO συμμετέχει στον PCD (Ha *et al.*, 1997; Binda *et al.*, 2001; Maccarrone *et al.*, 2001; Sebela *et al.*, 2001; Papadakis and Roubelakis-Angelakis, unpublished) κυρίως, μέσω της παραγωγής H₂O₂. Τότε, όμως, γιατί κατά τα πειράματα προσδιορισμού των EMO δεν παρατηρήθηκε συσσώρευση τους; Μήπως δεν παράγονται ή μήπως η συγκεκριμένη τεχνική ανίχνευσής τους που χρησιμοποιήθηκε δεν είναι κατάλληλη; Στο σημείο αυτό αξίζει να

σημειωθεί ότι σε μεταχειρίσεις των κυτταροκαλλιεργειών με μεναδιόνη παρατηρήθηκε συσσώρευση των ΕΜΟ (αποτελέσματα δε δείχνονται), οδηγώντας έτσι στο συμπέρασμα ότι η συγκεκριμένη τεχνική είναι κατάλληλη. Η μεναδιόνη θεωρείται μια ουσία που προκαλεί οξειδωτική έκρηξη και ενεργοποιεί τον ΡCD. Έτσι, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι κατά τα παραπάνω πειράματα που έγιναν στις κυτταροκαλλιέργειες αμπελιού η καταπόνηση με NaCl δεν οδήγησε στη συσσώρευση ΕΜΟ. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τη βιβλιογραφία, δηλαδή ότι η αλατότητα μπορεί να προκαλέσει τη συσσώρευση ΕΜΟ (Mittler *et al.*, 2002). Σε πειράματα που έγιναν στο εργαστήριο Φυσιολογίας και Βιοχημείας Φυτών, καταπόνηση φυλλικών δισκίων και ολόκληρων φυτών καπνού με αλατότητα, οδήγησαν στη συσσώρευση ΕΜΟ. Παράλληλα, σε διαγονιδιακά φυτά καπνού με υπερεκφρασμένη την κυτταροπλασματική καταλάση (CAT1), δεν παρατηρήθηκε συσσώρευση ΕΜΟ κατά την καταπόνηση με αλατότητα (Andronis, 2003). Και αφού δεν παράγονται ΕΜΟ τότε πως γίνεται ΡCD; Μια πιθανή εξήγηση για όλα αυτά είναι ότι στα πειράματα που έγιναν στα πλαίσια της διατριβής αυτής, η αλατότητα, η οποία δεν προκάλεσε οξειδωτική έκρηξη, οδήγησε σε ΡCD μέσω μονοπατιών που δεν περιλαμβάνουν τη συσσώρευση ΕΜΟ, αλλά την παραγωγή άλλων δευτερογενών σημάτων τα οποία όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή μπορεί να είναι φωσφορυλιωμένες ινοσιτόλες και Ca^{+} . Πιθανά ο ιοντικός παράγοντας, ο οποίος εμπλέκεται άμεσα με την άνοδο του ενδοκυτταρικού Ca^{+} (Xiong *et al.*, 2002) και όχι τόσο με την παραγωγή ΕΜΟ, να οδήγησε σε ΡCD. Όντως υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι ο ιοντικός παράγοντας της αλατότητας προκαλεί ΡCD (Huh *et al.*, 2002). Η ΡΑΟ συμμετείχε σ' αυτή τη διαδικασία του ΡCD με το να μειώσει τα ενδογενή επίπεδα των πολυαμινών, οι οποίες θα μπορούσαν να προστατεύσουν τα κύτταρα και να αναστείλουν τον ΡCD εξαιτίας της αλατότητας.

Όσον αφορά το H_2O_2 που παράχθηκε από τη δράση της ΡΑΟ, αυτό δεν εντοπίστηκε γιατί αποσβέστηκε από τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό. Το πιο πιθανό ένζυμο που πραγματοποίησε την απόσβεση αυτή είναι η ασκορβική περοξειδάση (ΑΡΟ), αφού η ειδική ενεργότητα της CAT δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με το μάρτυρα, (Εικ. 10). Σ' αυτό συνηγορεί και το γεγονός ότι η ΡΑΟ παρουσίασε χαμηλά επίπεδα ειδικής ενεργότητας (της τάξεως των mU/mg πρωτ.), άρα και το παραγόμενο H_2O_2 από τη δράση της ήταν και αυτό λίγο σε ποσότητα. Είναι, άλλωστε γνωστό ότι η ΑΡΟ έχει υψηλή συγγένεια για το H_2O_2 και επάγεται όταν εκείνο βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο κύτταρο, ενώ η CAT έχει χαμηλή συγγένεια για το H_2O_2 και επάγεται όταν εκείνο βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο κύτταρο.

Ο πλασμιδιακός φορέας της Εικόνας 20 θα χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών καπνού. Τα φυτά αυτά θα έχουν κατασταλαμένο το γονίδιο της SAMDC και καταστολή θα γίνεται σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Παρόμοιες μελέτες έχουν γίνει και στο παρελθόν. Σε κάποιες από αυτές υπερεκφράστηκε το γονίδιο της SAMDC με

συνεχόμενο, αλλά κυρίως με επαγωγίμο τρόπο (Roy and WU, 2002; Thu-Hang *et al.*, 2002; Waie and Rajam, 2003). Τα διαγονιδιακά αυτά φυτά είχαν υψηλότερα επίπεδα ενδογενούς σπερμιδίνης και σπερμίνης και παρουσίαζαν αυξημένη ανθεκτικότητα σε αβιοτικές (αλατότητα) και βιοτικές καταπονήσεις, σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες. Σε κάποιες άλλες έγινε είτε συνεχόμενη είτε επαγωγίμη καταστολή του γονιδίου της SAMDC με τη χρήση της τεχνολογίας αντικωδικονίου (Kumar *et al.*, 1996). Στην περίπτωση της συνεχόμενης καταστολής του γονιδίου, τα φυτά παρουσίασαν μειωμένη ενεργότητα της SAMDC από 10 έως 28% σε σχέση με το μάρτυρα και μειωμένα επίπεδα ενδογενών πολυαμινών έως 16% σε σχέση με το μάρτυρα. Κάποια από τα διαγονιδιακά αυτά φυτά παρουσίασαν προβληματικούς φαινότυπους, όπως νανισμό, μικρά φύλλα και φτωχή ανάπτυξη των ριζών, ενώ κάποια είχαν σχεδόν φυσιολογικούς φαινότυπους. Μόνο ένα φυτό παρουσίασε πολύ χαμηλά επίπεδα αιθυλενίου, υποδεικνύοντας έτσι μεταβολικό ανταγωνισμό μεταξύ πολυαμινών και αιθυλενίου. Στην περίπτωση της επαγωγίμης καταστολής τα διαγονιδιακά φυτά παρουσίασαν μειωμένη ενεργότητα της SAMDC και αυξημένα επίπεδα αιθυλενίου.

Τα διαγονιδιακά φυτά που θα δημιουργηθούν και θα είναι μετασχηματισμένα με το φορέα της Εικόνας 20 αναμένεται να δείξουν καταστολή του γονιδίου της SAMDC σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90%, αφού και ομόλογο είναι το τμήμα SAMDC, που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του φορέα, σε σχέση με το ενδογενές γονίδιο και η τεχνολογία του rap handle είναι πιο αποτελεσματική από αυτή της antisense. Με αυτόν τον τρόπο θα είναι δυνατή μια πιο ξεκάθαρη μελέτη της αλληλεπίδρασης πολυαμινών και αιθυλενίου, αλλά και της συμμετοχής των πολυαμινών στην απόκριση στην αλατότητα.

5. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Όσον αφορά τα πειράματα που έγιναν στις κυτταροκαλλιέργειες αμπελιού με μεταχειρίσεις με NaCl υπάρχουν αρκετά αναπάντητα ερωτήματα. Κατ' αρχήν απαιτείται να απαντηθεί αν γίνεται PCD ή όχι. Γι' αυτό πρέπει να γίνει βαφή κατά Tunel σε μεταχειρίσεις των κυτταροκαλλιεργειών αυτών με NaCl και κυρίως στη συγκέντρωση 200 mM και στις χρονικές στιγμές 8 h και 24 h. Στη συνέχεια και εφόσον γίνεται PCD είναι απαραίτητο να επιβεβαιωθεί αν όντως η ΡΑΟ έχει ενεργή συμμετοχή σ' αυτόν και σε πιο βαθμό. Γι' αυτό το σκοπό απαιτείται η χρήση αναστολέων ειδικών για την ΡΑΟ (Sebela *et al.*, 2003) σε μεταχειρίσεις των κυτταροκαλλιεργειών με NaCl προκειμένου να βρεθεί κατά πόσο η αναστολή της ΡΑΟ θα επηρεάσει την πορεία των κυττάρων προς τον κυτταρικό θάνατο κάτω από την επίδραση της αλατότητας. Παράλληλα είναι αναγκαίο να προσδιοριστούν τα επίπεδα των ενδογενών πολυαμινών τόσο σε κυτταροκαλλιέργειες σε μεταχειρίσεις με NaCl, όσο και σε κυτταροκαλλιέργειες σε μεταχειρίσεις με NaCl και αναστολέων της ΡΑΟ. Από εκεί και μετά μπορούν να μελετηθούν πολλά, και κυρίως τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται κατά την καταπόνηση με αλατότητα (κυρίως η αποσαφήνιση του ρόλου του Ca^{+2} και το αν και κατά πόσο συμπλέκεται η αλατότητα με την οξειδωτική καταπόνηση π.χ με μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες άλλων φυτικών ειδών, όπως καπνού).

Όσον αφορά τους πλασμιδιακούς φορείς που κατασκευάστηκαν ανοίγουν νέους δρόμους. Δημιουργία διαγονιδιακών φυτών μετασχηματισμένων με αυτούς θα επιτρέψει την εκτενέστερη μελέτη της συμμετοχής των πολυαμινών και του αιθυλενίου στην καταπόνηση με αλατότητα και στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, καθώς και της αλληλεπίδρασης των δύο αυτών μορίων-παραγόντων. Αν ο φαινότυπος είναι θνησιγόνος και δεν είναι δυνατή η λήψη διαγονιδιακών φυτών, αυτό θα αποτελεί μια ισχυρή απόδειξη ότι οι πολυαμίνες εμπλέκονται και είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική ανάπτυξη των φυτών και ότι ανταγωνίζονται το αιθυλένιο που είναι μια ορμόνη γήρανσης. Παράλληλα, όμως, απαιτείται η δημιουργία διαγονιδιακών φυτών στα οποία θα καταστέλλεται το γονίδιο της SAMDC με επαγωγίμο τρόπο (π.χ με το σύστημα της τετρακυκλίνης). Αυτό θα επιτρέψει τη μελέτη των παραπάνω σε οποιοδήποτε αναπτυξιακό στάδιο και σε οποιοδήποτε φυτικό σύστημα (π.χ κυτταροκαλλιέργεια) επιθυμείται.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Alabadi D and Carbonell J** (1998) Expression of ornithine decarboxylase is transiently increased by pollination, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and gibberellic acid in tomato ovaries. *Plant Physiol* **118**: 323-328
- **Andronis EA** (2003) Response of the antioxidative machinery to salinity stress in *Nicotiana tabacum* plants and leaf discs. University of Crete. M.S. Thesis, PP. 87.
- **Angelini R, Bragaloni MK, Infantino A, Porta-Puglia A** (1993) Involvement of polyamines, diamine oxidase and peroxidase in resistance of chickpea to *Ascochyta rabiei*. *J Plant Physiol* **142**: 704-709
- **Apelbaum A, Canellakis ZN, Applewhite PB, Kaur-Sawhney R and Galston A** (1988) Binding of spermidine to a unique protein in thin-layer tobacco tissue culture. *Plant Physiol* **88**: 996-998
- **Asada K, Takahashi, M** (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. *Trends Plant Scie* 227-287
- **Asada K** (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen species and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* **50**: 601-639
- **Binda C, Angelini R, Federico R, Ascanzi P, Mattevi A** (2001) Structural bases for inhibitor binding and catalysis in polyamine oxidase. *Biochemistry* **40**: 2766-2776
- **Borrell A, Carbonell L, Farras R, Puig-Parellada, Tiburcio AF** (1997) Polyamines inhibit lipid peroxidation in senescing oat leaves. *Physiol Plant* **99**: 385-390
- **Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J** (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci* **140**:103-125
- **Chattopadhyay MK, Tiwari BS, Chattopadhyay G, Bose A, Sengupta N, Grosh B** (2002) *Physiol Plant* **116**:192-199

- **Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, VanBreusegem F (2000)** Dual action of reactive oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life. Scie* **57**: 779-795
- **Dat GF, Pellinen R, Beekman T, Van De Cotte B, Langebartels C, Kangasjarvi J, Inze D, Van Breusegem (2003)** Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *Plant J* **33**: 621-632
- **de Marco A, Roubelakis-Angelakis KA (1996a)** The complexity of enzymic control of hydrogen peroxide concentration may affect the regeneration potential of plant protoplasts. *Plant Physiol* **110**: 137-145
- **de Marco A, Roubelakis-Angelakis KA (1996b)** Hydrogen peroxide plays a bivalent role in the regeneration of protoplasts. *J Plant Physiol* **149**: 109-114
- **de Marco A, Roubelakis-Angelakis KA (1997)** Laccase activity could contribute to cell-wall reconstitution in regenerated protoplasts. *Phytochemistry* **46**: 421-425
- **Evans PT and Malberg RL (1989)** Do polyamines have roles in plant development? *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**: 235-269
- **Federico R, Angelini R (1991)** Polyamine catabolism in plants, in: R.D. Slocum, H.E. Flores (Eds), *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*, CRC Press, Boca Raton, 1991, pp 41-56
- **Friedman R, Altman A and Bachrach U (1985)** Polyamines and root formation in mung bean hypocoty cuttings. II. Incorporation of precursors into polyamines. *Plant Physiol* **79**: 80-83
- **Ha HC, Woster PM, Yager JD, Casero RA (1997)** The role of polyamine catabolism in polyamine analogue-induced programmed cell death. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **97**:11557-11562.
- **Halfter U, Ishihati M, Zhu JK (2000)** The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by calcium-binding protein SOS3. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **97**: 3730-3734

- **Hanzawa Y, Takahashi T, Michael AJ, Burtin D, Long D, Pineiro, Coupland G, Komeda Y** (2000) *ACAULIS5*, an *Arabidopsis* gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase. *EMBO J* **19**: 4248-4256
- **Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ** (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Mol. Plant Physiol* **51**: 463-499
- **Heby O and Persson L** (1990) Molecular genetics of polyamine synthesis in eukariotic cells. *TIBS* **15**: 153-158
- **Hoeberichts FA, Woltering EJ** (2002) Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *BioEssays* **25**: 47-57
- **Huh GH, Damsz B, Matsumoto TK, Reddy MP, Rus AM, Ibeas JI, Narasimhan L, Bressan RA, Hasagawa PM** (2002) Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *Plant J* **29**: 649-659
- **Hummel I, Couee I, El Amrani A, Martin-Tanguie J, Hennion F** (2002) Involvement at low temperature in the subantarctic species *Pringlea antiscorbutica*. *J Exp Bot* **53**: 1463-73
- **Kakkar RK and Rai VK** (1993) Plant polyamines in flowering and fruit ripening. *Phytochemistry* **33**: 1281-1288
- **Kaur-Sawhney R, Kandpal G, McGonigle B and Galston AW** (1990) Further experiments on spermidine-mediated floral-bud formation in thin-layer explants of Wisconsin 38 tobacco. *Planta* **181**: 212-215
- **Konstantinova T, Parvanova D, Atanassov A, Djilianov D** (2002) Freezing tolerant tobacco, transformed to accumulate osmoprotectants. *Plant Sci* **163**: 157-164
- **Kotzabasis K, Christakis-Hampsas MD, Roubelakis-Angelakis KA** (1993) A Narrow-Bore HPLC method for the identification and quantisation of free, conjugated and bound polyamines. *Anal Biochem* **214**: 484-489
- **Kumar A, Taylor MA, Mad Arif SA, Davies HV** (1996) Potato plants expressing

antisense and sense s-adenosylmethionine decarboxylase transgenes show altered levels of polyamines and ethylene: antisense plants display abnormal phenotypes. *Plant J* **9**:147-158

- **Kumria R, Rajam MV** (2002) Alteration in polyamine titres during *Agrobacterium*-mediated transformation of *indica rice* with ornithine decarboxylase gene affects plant regeneration potential. *Plant Sci* **00**: 1-9
- **Martin-Tanguy J** (1997) Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiol Plant* **100**:675-688
- **Langebartels C, Wohlgemuth H, Kschieschan S, Grun S, Sandermann** (2002). Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiol. Biochem* **40**: 567-575
- **Lefevre I, Gratia E, Lutts S** (2001) Discrimination between the ionic and osmotic components of salt stress in relation to free polyamine level in rice (*Oryza sativa*). *Plant Sci* **161**: 943-952
- **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-275
- **Maccarone M, Bari M, Battista N, Di Rienzo M, Falciglia K, Agro FA** (2001) Oxidation products of polyamines induce mitochondrial uncoupling and cytochrome c release. *FEBS Let* **507**: 30-34
- **Malmberg RL, Watson MB, Galloway G and Yu W** (1998) Molecular Genetic Analyses of Plant Polyamines. *Critical Reviews in Plant Sci* **17**: 199-204
- **Martin-Tanguy J** (1997) Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiol Plant* **100**:675-688
- **Matzke M., Matzke A. J, and Kooter, J.M.** (2001) RNA: guiding gene silencing. *Science*. **293**:1080-3
- **Mehta RA, Cassol T, Nasreen NL, Handa AK, Mattoo AK** (2002) Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality and

vine life. *Nature Biotech* **20**: 613-618

- **Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trens Plant Scie* **7**: 405-410
- **Noctor G, Foyer C** (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* **49**: 249-279
- **Qiu Q, Guo Y, Dietrich M, Shumaker KS, Zhu JK** (2002) Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc. Natl. Acad.* in press
- **Pandey S, Ranade SA, Nagar PK, Kumar N** (2000) Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *J Biosci* **25**: 291-293
- **Papadakis AK, Roubelakis-Angelakis KA** (1999) The generation of active oxygen species differs in *Nicotiana* and *Vitis* plant protoplasts. *Plant Physiol* **121**:197-245
- **Papadakis AK, Siminis CI, Roubelakis-Angelakis KA** (2001b) Reduced activity of antioxidant machinery is correlated with suppression of totipotency in plant protoplasts. *Plant Physiol* **126**: 434-444
- **Papadakis AK, Roubelakis-Angelakis KA** (2002) Oxidative stress could be responsible for the recalcitrance of plant protoplast. *Plant Physiol Biochem* **40**: 549-559
- **Paschalides KA, Aziz A, Geny L, Primikirios NI, Roubelakis-Angelakis KA** (2001) Polyamines in grapevine. *In* Roubelakis-Angelakis KA (ed) *Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 109-152, ISBN 0-7923-6949-1
- **Pedroso MC, Primikirios NI, Roubelakis-Angelakis KA, Pais MS** (1997) Free and conjugated polyamines in embryogenic and non-embryogenic leaf regions of camellia leaves before and during direct somatic embryogenesis. *Physiol Plant* **101**:213-219

- **Primikirios NI, Roubelakis-Angelakis KA** (1999) Cloning and expression of an arginine decarboxylase cDNA from *Vitis vinifera* L. cell-suspension cultures. *Planta* **208**:574-582
- **Primikirios NI, Roubelakis-Angelakis KA** (2000) Indications for post-transcriptional regulation of *Vitis vinifera* L. arginine decarboxylase. *Plant Mol. Biol* **45**: 669-678
- **Roy M, Wu R** (2002) Overexpression of S-adenosylmethionine decarboxylase gene in rice increases polyamine level and enhances sodium chloride-stress tolerance. *Plant Sci* **163**: 987-992
- **Scopelitis DS** (2001) Isolation and characterization of glutamate dehydrogenase (GDH) genes in *Vitis vinifera* (L.). University of Crete. M.S. Thesis, PP. 65
- **Sebela M, Radova A, Angelini R, Tavladoraki P, Frebort I I, Pec P** (2001) FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researchers in biochemistry and physiology of plants. *Plant Sci* **160**:197-207
- **Sebela M, Lamplot Z, Petrivalsky M, Kopečný D, Lemr K, Frebort K, Pec P** (2003) Recent news related to substrates and inhibitors of plant amine oxidases. *Biochim. Biophys. Acta* in press
- **Serafini-Fracassini D** (1991) Polyamine biosynthesis and conjugation to macromolecules during the cell cycle of *Helianthus tuberosus* tuber. In Lecture Course on Polyamines as Modulators of Plant Development. (Fundacion Juan March), pp. 40-45
- **Shi H, Quintero FJ, Pardo JM, Zhu JK** (2002) The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long distance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell* **14**: 465-477
- **Sijen, T. and Kooter, J.M.** (2000) Post-transcriptional gene silencing: RNAs on the attack or on the defense. *BioEssays* **22** :520-531
- **Siminis CI, Kanellis AK, Roubelakis-Angelakis KA** (1993) Differences in protein synthesis and peroxidase isoenzymes between recalcitrant and regenerating protoplasts. *Physiol Plant* **87**: 263-270

- **Siminis CI, Kanellis AK, Roubelakis-Angelakis KA** (1994) Catalase is differentially expressed in dividing and non dividing protoplasts. *Plant Physiol* **105**: 1375-1383
- **Slocum RD, Furey MJ** (1991) Electron-microscopic cytochemical localization of diamine and polyamine oxidases in pea and maize tissues. *Planta* **183**: 443-450
- **Song J, Nada K, Tachibana S** (2002) Suppression of S-adenosylmethionine decarboxylase activity is a major cause for high-temperature inhibition of pollen germination and tube growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Plant Cell Physiol* **43**: 619-627
- **Tassoni A, Antognoni F, Battistini ML, Sanvido O and Bagni N** (1998) Characterization of spermidine binding to solubilized plasma membrane proteins from zucchini hypocotyls. *Plant Physiol* **117**: 971-977
- **Tavladoraki P, Schinima ME, Cecconi F, Di Agostino S, 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
- **Thu-Hang P, Bassie L, Safwat G, Trung-Nghia P, Christou P, Capell T** (2002) Expression of a heterologous s-adenosylmethionine decarboxylase cDNA in plants demonstrates that changes in s-adenosyl-L-methionine decarboxylase activity determine levels of the higher polyamines spermidine and spermine. *Plant Physiol* **129**: 1744-1754
- **Tiburcio AF, Gendy CA and Tran Thanh Van K** (1989) Morphogenesis in tobacco subepidermal cells: Putrescine as a marker of root differentiation. *Plant Cell Tissue Org Cult* **19**: 43-54
- **Tiburcio AF, Altabella T, Borrell A, Masgrau C** (1997) Polyamine metabolism and its regulation. *Physiol Plant* **100**: 664-674
- **Torrigiani P, Serafini-Fracassini D and Bagni N** (1987) Polyamine biosynthesis and effect of dicyclohexylamine during the cell cycle of *Helianthus tuberosus* tuber. *Plant Physiol* **84**: 148-152

- **Waie B, Rajam MV** (2003) Effect of increased polyamine biosynthesis on stress responses in transgenic tobacco by introduction of human S-adenosylmethionine gene. *Plant Sci* **164**: 727-734
- **Walters DR** (2003) Polyamines and plant disease. *Phytochemistry* in press
- **Watson MB, Emory KK, Piatak RM, Malmberg RL** (1998) Arginine decarboxylase (polyamine synthesis) mutants of *Arabidopsis thaliana* exhibit altered root growth. *Plant J* **13**:231-239
- **Xiong L, Shumaker KS, Zhu JK** (2002) Cell signalling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell supplement*: 165-183
- **Yadav JS and Rajam MV** (1997) Spatial distribution of free and conjugated polyamines in leaves of *Solanum melongena* L. associated with differential morphogenetic capacity: efficient somatic embryogenesis with putrescine. *J Exp Bot* **48**: 1537-1545
- **Zhang S, Klessig DF** (2001) MAPK cascades in plant defense signalling. *Trens Plant Sci* **6**: 520-527
- **Zhu JK** (2001) Plant salt tolerance. *Trens Plant Sci* **6**: 66-71