

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Π. ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΑ
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ ΚΑΠΝΟΥ,
ΠΟΥ ΥΠΟΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΚΑΙ
ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΗ ΜΕΣΟΦΥΛΛΙΚΗ
ΚΑΤΑΛΑΣΗ, *CAT1*

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
Κ.Α. ΡΟΥΜΠΕΛΑΚΗ-ΑΓΓΕΛΑΚΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2000

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε, κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 1999-2000, στο εργαστήριο Φυσιολογίας 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. Πρώτη όλων, αξίζει τις ευχαριστίες μου η υπεύθυνη του μεταπτυχιακού προγράμματος και επιβλέπουσα της διατριβής μου, κα Ρουμπελάκη Καλλιόπη, για την επιστημονική, την ηθική, αλλά και την οικονομική στήριξή μου. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την επιστημονική μου υπεύθυνη, κα Μυλωνά Φωτεινή, για την εμπιστοσύνη της στο πρόσωπό μου, τη διάθεσή της να μου μεταδώσει τις γνώσεις της και την υπομονή της στις άτυχες στιγμές μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους «βετεράνους» του εργαστηρίου μου, Νικόλα Πριμηκύριο και Στάσα Παπαδάκη για την έμπρακτη απόδειξη της φιλίας τους, σ'όλες τις δυσκολίες που συνάντησα. Ευχαριστώ, επίσης, όλους εκείνους, που με τις συμβουλές, τις υποδείξεις και την παρότρυνσή τους συνέβαλαν στο χτίσιμο της εργαστηριακής μου γνώσης και εμπειρίας. Ανάμεσά τους, θα ήθελα να ξεχωρίσω τους «πρώτους διδάξαντες», Βέτα Παπακόστα και Δημήτρη Καρδάση, καθώς και εκείνους, που ακολούθησαν, Κρίτωνα Καλαντίδη, Σεργία Τζωρτζάκη, Αλεξάνδρα Μπούτλα και Martin Tabler. Επίσης, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου μου, Χαρά Σταματάκη, Κώστα Πασχαλίδη και Andriana Perales Duràn, καθώς και τους νεοσύλλεκτους, Δάκη Σκοπελίτη και Γιάννη Ντελή, για τη βοήθεια, την υπομονή και την κατανόησή τους. Ένα ειδικό ευχαριστώ στην ομάδα του εργαστηρίου Κυτταρικής Βιολογίας, Νίκη Κουρμούλη, Γιώργο Διαλυνά και Χρύσα Πετράκη, για την πολύτιμη συνδρομή τους στην παραγωγή των αντισωμάτων. Τέλος, θα ήθελα να ευχηθώ στα υπόλοιπα παιδιά του μεταπτυχιακού προγράμματος, Φάνη Δαβράζου, Τασούλα Θεοδωρίδου, Μαρίνα Μπαστάκη, Άρη Παπαϊωάννου και Γιάννη Παπαευθυμίου, κάθε επιτυχία για τα μελλοντικά τους σχέδια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΓΕΝΙΚΑ	1
ΟΙ ΚΑΤΑΛΑΣΕΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΑ ΦΥΤΑ	2
Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ	9
ΤΩΝ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ	

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ CAT-1	14
1.1.1. Παραγωγή της καταλάσης σε βακτηριακά κύτταρα της σειράς BL21(DE3)	14
1.1.2. Χρωματογραφικός καθαρισμός της CAT-1	15
1.1.3. Παραλαβή της CAT-1 από τα κυστίδια εγκλεισμού (inclusion bodies)	16
1.2. ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΕΙΣ	
1.2.1. Πρώτη ανοσοποίηση	17
1.2.2. Επαναληπτικές ανοσοποιήσεις	17
1.2.3. Τιτλοδότηση του ορού	18
2.1 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ ΚΑΠΝΟΥ	
2.1.1 Ανασυνδυασμένοι δυαδικοί φορείς	18
2.1.2 Αγροβακτηριακή διαμόλυνση εκφύτων καπνού και αναγέννηση των γενετικά τροποποιημένων φυτών	19
2.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΩΝ ΣΕ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΦΥΛΛΩΝ ΚΑΠΝΟΥ	19
2.2.1 Εκχύλιση πρωτεϊνών από φύλλα καπνού	
2.2.2 Μέτρηση της ενεργότητας της καταλάσης (CAT)	20
2.2.3 Μέτρηση της ενεργότητας της ασκορβικής περοξειδάσης (ΑΡΟ)	21
2.2.4 Μέτρηση της ενεργότητας της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης (GR)	21
2.2.5 Φυσική ηλεκτροφόρηση και χρώση ενεργότητας για την υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)	22

2.3 ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ	23
3. ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΙ ΚΑΤΑ NORTHERN	
3.1. Απομόνωση ολικού RNA από φύλλα καπνού	24
3.2. Ηλεκτροφορετική ανάλυση του RNA	25
4. ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΙ ΚΑΤΑ SOUTHERN	
4.1. Απομόνωση γενωμικού DNA	
4.2. Πέψη του γενωμικού DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού	26
4.3. Μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	27
4.4. Παρασκευή του ραδιενεργού ανιχνευτή	27
4.5. Υβριδισμός των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης με τον ραδιενεργό ανιχνευτή	28
<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	29
1.1. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ CAT1 ΣΕ ΚΟΛΩΝΑ Ni-NTA ΑΓΑΡΟΖΗΣ	
1.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΣ CAT1	31
2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΩΝ ΣΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΦΥΤΑ	
2.1. Μέτρηση της ενεργότητας της καταλάσης στα γενετικά τροποποιημένα φυτά	34
2.2. Μέτρηση της ειδικής ενεργότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), της ασκορβικής περοξειδάσης (APO) και της ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης (GR). στα γενετικά τροποποιημένα φυτά	36
2.3 Συμπεράσματα από τη γενετική τροποποίηση του καπνού, για το γονίδιο της καταλάσης με <i>sense</i> και <i>antisense</i> constructs	40
3. ΚΑΤΑ NORTHERN ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ	41
4. ΚΑΤΑ SOUTHERN ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ	42
ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	43
<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	48
	50

ABSTRACT

MODIFICATION OF CATALASE (*CAT1*) EXPRESSION IN TRANSGENIC TOBACCO PLANTS

Biotic and abiotic factors are known to induce generation of active oxygen species (AOS). Scavenging of AOS is implemented by a combination of enzymic and non-enzymic mechanisms. Catalase is considered to be of great significance, since it is one of the enzymes scavenging H₂O₂. It comprises several isoenzymes that reside mainly in the peroxisomal matrix and exhibit a tissue-specific distribution. We used tobacco as a model system to investigate the effects of altered catalase levels on important phenomena, such as morphogenic expression, hypersensitive response (HR) and systemic acquired resistance (SAR). There is strong evidence indicating that the low viability and regenerating potential of grapevine protoplasts, could originate, at least partially, from the oxidative burst and the altered redox state of the cells, which are induced by the procedures of protoplast isolation. Several lines of transgenic tobacco plants were developed, expressing *sense* and *antisense* *Cat1* transgenes. CAT-1 is considered to be the exclusive isozyme in mesophyll cells. Constructs that were used for the *Agrobacterium*-mediated transformation contained fragments of *Cat1* homologues, derived from closely related species, in *antisense* orientation under the control of 35S CaMV promoter. The complete *Cat1* cDNA clone in sense orientation driven by the 35S CaMV promoter, was also used to increase endogenous catalase. The obtained plants exhibit a minimum 40% reduction in catalase activity, compared to the untransformed. In addition, the identities of the selected transgenic plants were verified by Southern analysis, catalase immunodetection and Northern hybridizations. Ascorbate peroxidase (APO), glutathione reductase (GR) and superoxide dismutase (SOD) activities were also examined in the selected plants.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (EMO) είναι μια αναπόφευκτη συνέπεια του αερόβιου μεταβολισμού. Αυτά τα ασταθή προϊόντα της αναγωγής του οξυγόνου είναι ιδιαίτερα δραστικά και αντιδρούν μη ειδικά με μια μεγάλη ποικιλία βιομορίων, επιφέροντας θανατηφόρες καταστροφές στο κύτταρο. Κάτω από συνθήκες βιοτικής ή αβιοτικής καταπόνησης παρατηρείται μια υπέρμετρη συσσώρευση EMO, η απόσβεση των ποιων αποτελεί άμεση προτεραιότητα για το κύτταρο. Τα φυτά έχουν εξελικτικά συγκροτήσει μια αποτελεσματική άμυνα κατά των EMO, που περιλαμβάνει φυσικά αντιοξειδωτικά προϊόντα και ένζυμα.. Ανάμεσά τους, η καταλάση κατέχει εξέχουσα θέση, επειδή αποτελεί την κύρια εστία απόσβεσης του H₂O₂. Στα C₃ φυτά συναντάται με τρεις ισοενζυμικούς τύπους, που εμφανίζουν διαφορετική ιστοειδική κατανομή και λειτουργική αποστολή. Η οξειδωτική καταπόνηση, έχει συνδεθεί με ποικίλα φυσιολογικά φαινόμενα στα φυτά, όπως με την αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (PCD), την συστηματική (SAR) και την τοπική (LAR) εξάπλωση της ανθεκτικότητας, τον εγκλιματισμό σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες κ.α. Υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι και η αδυναμία αναγέννησης των πρωτοπλαστών πολλών φυτικών ειδών (recalcitrance) σχετίζεται με την οξειδωτική καταπόνηση, που υφίστανται, κατά τη διαδικασία απομόνωσής τους, με τοιχωματολυτικά ένζυμα. Στην παρούσα εργασία, δημιουργήθηκαν γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού, που υποεκφράζουν και υπερεκφράζουν τη μεσοφυλλική καταλάση, *CAT1*, με απώτερο στόχο τη μελέτη της συμβολής του συγκεκριμένου ενζύμου στην αναγεννητική συμπεριφορά των πρωτοπλαστών.

ΓΕΝΙΚΑ

Η εμφάνιση των πρώτων φωτοσυνθετικών οργανισμών στη Γη, που πραγματοποιούσαν οξυγονική φωτοσύνθεση, πριν από εκατομμύρια χρόνια, σηματοδότησε την οριστική αλλαγή του χαρακτήρα της ατμόσφαιρας στον πλανήτη. Οι πρωτόγονοι οργανισμοί προσαρμόσαν το μεταβολισμό τους στις νέες περιβαλλοντικές συνθήκες και εκμεταλλεύτηκαν τα ενεργειακά οφέλη, που απορρέουν από τη χρήση του οξυγόνου στην οξειδωτική αποδόμηση οργανικών υποστρωμάτων. Η αερόβια αναπνοή ώθησε την αλματώδη εξέλιξη της ζωής στον πλανήτη και επικράτησε, ως ο κύριος καταβολικός μηχανισμός, στη συντριπτική πλειοψηφία των οργανισμών. Ωστόσο, η χρήση του μοριακού οξυγόνου επιφυλάσσει και κινδύνους για το κύτταρο, καθώς τα ενδιάμεσα προϊόντα της αναγωγής του εκδηλώνουν μεγάλη τοξικότητα. Αυτή οφείλεται στην ικανότητά τους να αντιδρούν μη ειδικά, με μια μεγάλη ποικιλία σημαντικών βιομορίων, επιφέροντας θανατηφόρες καταστροφές (Elstner, 1982). Τα ασταθή παράγωγα, που προκύπτουν από τη σταδιακή μεταφορά ηλεκτρονίων προς το O_2 , καλούνται ενεργές μορφές οξυγόνου (EMO) και οι κυριότερες, κατά σειρά σχηματισμού, είναι το ενεργό οξυγόνο (1O_2), η υπεροξειδική ρίζα ($O_2^{\cdot-}$), το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), και η ρίζα του υδροξυλίου (OH^{\cdot}).

Στα φυτικά κύτταρα η παραγωγή των EMO συμβαίνει, τόσο στα πλαίσια του φυσιολογικού μεταβολισμού, όσο και κάτω από καταστάσεις βιοτικής ή αβιοτικής καταπόνησης. Το $O_2^{\cdot-}$ παράγεται φυσιολογικά, κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια, κατά τη φωτοσύνθεση στους χλωροπλάστες και ως παραπροϊόν της δράσης διάφορων ενζύμων (π.χ. οξειδάση της ξανθίνης) (Elstner, 1982; Fridovitch, 1986). Είναι ασταθής, δυσκίνητη ρίζα και αποσβένεται συνήθως στο σημείο σχηματισμού της με τη δράση των υπεροξειδικών δισμουτασών (superoxide dismutase, SOD, EC 1.15.1.1) ή μέσω της μη ενζυμικής αντίδρασής της με αντιοξειδωτικές ουσίες (π.χ. καροτενοειδή). Αντίστοιχα, το H_2O_2 σχηματίζεται, υπό κανονικές συνθήκες, στα περοξεισώματα, κατά τη φωταναπνοή και τη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων, όπως και στον αποπλάστη, κατά την λιγνιτοποίηση του κυτταρικού τοιχώματος, από τη δράση οξειδασών και περοξειδασών (π.χ. οξειδάσης των πολυαμινών) (Elstner, 1982; Asada, 1994). Το μόριο του H_2O_2 είναι σχετικά σταθερό, και ιδιαίτερα ευδιάχυτο. Η απόσβεσή του είναι δυνατό να συμβαίνει μακριά

από τη θέση παραγωγής του και γίνεται κυρίως ενζυμικά, με τη δράση της καταλάσης, της ασκορβικής περοξειδάσης ή των διαφόρων περοξειδασών. Επίσης, το H₂O₂ μπορεί και αντιδρά άμεσα με διάφορες αντιοξειδωτικές ουσίες (π.χ. ασκορβικό οξύ), χωρίς τη μεσολάβηση κάποιου ενζύμου.

Η υδροξυλική ρίζα είναι από τις πλέον ενεργές EMO. Σε φυσιολογικές καταστάσεις, παράγεται σε ακίνδυνα, μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, από την άμεση αντίδραση μεταξύ O₂⁻ και H₂O₂ (Αντίδραση Haber-Weiss). Αντίθετα, σημαντική συσσώρευση της υδροξυλικής ρίζας είναι δυνατό να συμβεί σε κυκλικές αντιδράσεις, που εμπλέκουν την οξειδωση μετάλλων, μεταβατικού βαθμού οξειδωσης, όπως ο δισθενής σίδηρος (Fe²⁺) και ο μονοσθενής χαλκός (Cu⁺) (Αντίδραση Fenton). Η υδροξυλική ρίζα, με την ικανότητά της να ξεκινά αλυσίδα αντιδράσεων παραγωγής EMO, θεωρείται η κύρια υπεύθυνη, για τις μη αντιστρεπτές και καταστροφικές τροποποιήσεις των κυτταρικών μακρομορίων και οργανιδίων.

Η συσσώρευση των EMO αυξάνεται σε καταστάσεις βιοτικής ή αβιοτικής καταπόνησης, όπως κατά την έκθεση του φυτών σε UV ακτινοβολία, σε ζιζανιοκτόνα (π.χ. paraquat, diquat), σε παθογόνους μικροοργανισμούς (Lamb and Dixon, 1997), σε ατμοσφαιρικούς ρυπαντές (π.χ. όζον, SO₂), σε ακραίες θερμοκρασίες και υδατική καταπόνηση (Sutherland, 1991; Bowler *et al.*, 1992), ακόμα και σε μηχανική καταπόνηση (Yahraus *et al.*, 1995). Τα στοιχεία αυτά συνηγορούν υπέρ του ιδιαίτερου ρόλου, που έχει αποδοθεί στις EMO και κυρίως στο H₂O₂, ως χημικών μηνυμάτων στη μεσολάβηση των κυτταρικών αντιδράσεων. Το H₂O₂ έχει, για παράδειγμα, συνδεθεί με την ενορχήστρωση της άμυνας των φυτών, κατά των παθογόνων μικροοργανισμών (Levine *et al.*, 1994), με τον εγκλιματισμό των φυτών σε υψηλές θερμοκρασίες (Dat *et al.*, 1998) και σε υψηλά επίπεδα όζοντος (Orvar *et al.*, 1997).

Τα φυτά, σε αντίθεση με τα ζώα, επειδή δεν έχουν τη δυνατότητα μετακίνησης, είναι υποχρεωμένα να αντιμετωπίζουν κάθε δυσμενή μεταβολή του περιβάλλοντός τους. Η επιτυχία τους στηρίχθηκε στο γενετικό πλούτο, που συσσώρευσαν, μέσα σε εκατομμύρια χρόνια εξελικτικής πορείας, καθώς και στον αποτελεσματικό έλεγχο, που ανέπτυξαν, για το χειρισμό της πληροφορίας αυτής. Δεν είναι τυχαίο, λοιπόν, ότι τα φυτά χαρακτηρίζονται γενικά, από μεγάλα γονιδιώματα και ότι η πλειοψηφία των γονιδίων τους είναι οργανωμένα σε ολιγομελείς ή πολυμελείς οικογένειες (Flavell and Moore, 1996). Υπολογίζεται ότι υπάρχουν 20000–30000 διαφορετικές οικογένειες

γονιδίων, σε ένα μεγάλο φυτικό γονιδίωμα, τα μέλη των οποίων έχουν διαφοροποιηθεί συνήθως, σε επίπεδο λειτουργίας και ρύθμισης.

Η πολυπλοκότητα αυτή αντανακλάται και στην αντιοξειδωτική άμυνα του φυτικού κυττάρου, η οποία στηρίζεται στην άμεση απόσβεση των ΕΜΟ από φυσικές ουσίες, με τη μεσολάβηση ή όχι ενζύμων. Στις αντιοξειδωτικές ουσίες ανήκουν απλά οργανικά προϊόντα, με κυριότερα το ασκορβικό οξύ, τη γλουταθειόνη, την κυστεΐνη, τις υδροξυκινόνες, τη μανιτόλη, την τοκοφερόλη, τα φλαβονοειδή, κάποια αλκαλοειδή και το β-καροτένιο. Τα σημαντικότερα ένζυμα, που συμμετέχουν στην αντιοξειδωτική προστασία του κυττάρου, είναι η υπεροξειδική δισμουτάση, η καταλάση (catalase, CAT, EC 1.11.1.6), τα ένζυμα του κύκλου γλουταθειόνης-ασκορβικού, η περοξειδάση της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase, GS-POX, EC 1.11.1.9) και διάφορες άλλες περοξειδάσες (peroxidase, POX, EC 1.11.1.7).

Οι SODs βρίσκονται στην πρώτη γραμμή της αντιοξειδωτικής άμυνας, λόγω της ικανότητας τους να αποσβένουν την υπεροξειδική ρίζα. Αποτελούν μια ετερογενή ομάδα ισοενζύμων, που εντοπίζονται σε όλα σχεδόν τα κυτταρικά διαμερίσματα (Scandalios, 1994). Πρόκειται για σύνθετες πρωτεΐνες, που φέρουν ως συμπαραγόνα μεταλλικά ιόντα Mn^{2+} , Fe^{3+} ή Cu^{2+}/Zn^{2+} (Elstner, 1982). Ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας τους στα ανώτερα φυτά, αποκάλυψε ότι οι MnSODs και FeSODs χαρακτηρίζονται από μεγάλο βαθμό ομολογίας μεταξύ τους και φυλογενετική συγγένεια με τα αντίστοιχα ένζυμα των προκαρυωτών. Οι MnSODs εντοπίζονται στη μιτοχονδριακή μήτρα (Baum and Scandalios, 1981), ενώ οι FeSODs στο στρώμα των χλωροπλαστών. Αντίθετα, οι Cu/ZnSODs είναι άσχετες δομικά με τις προηγούμενες και συναντώνται μόνο στους ευκαρυώτες (Bowler *et al.*, 1994). Εδράζονται στο κυτόπλασμα, τους χλωροπλάστες και τα περοξεισώματα (Asada, 1994; Bueno *et al.*, 1995; Ogawa *et al.*, 1995). Αλλαγές στα επίπεδα ενεργότητας των SODs, σε γενετικά τροποποιημένα φυτά ή μετά από φαρμακολογική αναστολή, φανέρωσε τη σπουδαιότητά τους στην προστασία των φυτών από τη φωτοοξειδωση, την επίδραση paraquat ή όζοντος και την υδατική καταπόνηση (Tsang *et al.*, 1991; McKersie *et al.*, 1993; Van Camp *et al.*, 1994)

Τα ένζυμα, που συμμετέχουν στον κύκλο γλουταθειόνης-ασκορβικού ή κύκλο Halliwell-Asada, από τα ονόματα των ερευνητών, που συνέβαλαν στην ανακάλυψή και τη διερεύνησή του, είναι η ασκορβική περοξειδάση (ascorbate peroxidase, APO, EC 1.11.1.11), η ρεδοκτάση του μονοδihυδροασκορβικού οξέος (monodehydroascorbate reductase, MDHAR, EC 1.6.5.4), η ρεδοκτάση του

διυδροασκορβικού (dihydroascorbate reductase, DHAR, EC 1.8.5.1) και η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (glutathione reductase, GR, EC 1.6.4.2) (Foyer and Halliwell, 1976). Ο οξειδοαναγωγικός αυτός κύκλος λειτουργεί στο κυτόπλασμα και τους χλωροπλάστες και αποσβένει το H_2O_2 , που παράγεται από τη δράση κυρίως των SODs. Το ασκορβικό οξύ (ASA) είναι ένας απλός υδατάνθρακας, που παράγεται σε αφθονία στο κυτόπλασμα του φυτικού κυττάρου και στη συνέχεια μεταφέρεται στα κυτταρικά οργανίδια και τον αποπλάστη. Αποτελεί το βασικό πρωτογενές αντιοξειδωτικό μόριο, που αντιδρά άμεσα με όλες τις EMO και η συγκέντρωσή του βρίσκεται πάντα σε επίπεδα mM στα κύτταρα. Η είσοδός του στον κύκλο γίνεται με τη δράση της APO, η οποία καταναλώνει ένα μόριο H_2O_2 για την οξείδωση δύο μορίων ASA, προς μονοδιυδροασκορβικό (MDHA). Η APO χαρακτηρίζεται από μεγάλη συγγένεια προς το H_2O_2 , ενώ αναστέλλεται σε υψηλές συγκεντρώσεις του, όπου η καταλάση εμφανίζεται αποτελεσματικότερη (Asada, 1992a). Έχουν αναγνωριστεί τέσσερις ισοενζυμικοί τύποι APO, που εδράζονται στο κυτόπλασμα, στα περοξεισώματα και τους χλωροπλάστες (Mittler and Zilinskas, 1991; Asada, 1992), ενώ υπάρχουν ενδείξεις και για μια πέμπτη μιτοχονδριακή μορφή.

Στη συνέχεια του κύκλου, το MDHA, είτε μετατρέπεται αυθόρμητα σε διυδροασκορβικό (DHA), είτε ανάγεται προς ASA με την δράση της MDHAR και την αναγωγική ενέργεια του NADPH ή άλλων ηλεκτρονιακών δοτών (Asada, 1994; Noctor and Foyer, 1998a). Το DHA επίσης ανάγεται προς ASA με τη δράση της DHAR, που συγχρόνως οξειδώνει την αναγμένη γλουταθειόνη (GSH) προς την οξειδωμένη της μορφή (GSSG).

Η γλουταθειόνη ανήκει σε μια ευρύτερη ομάδα μη πρωτεϊνικών θειολών με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Είναι ένα τριπεπτίδιο, (L-γ -glutamyl- L-cysteinyl-glycine; GSH) με μεγάλη σπουδαιότητα για το μεταβολισμό του θείου, την αποτοξίνωση από ξενοβιοτικούς παράγοντες και βαρέα μέταλλα και, βεβαίως, την αντιοξειδωτική άμυνα. Η συνολική ποσότητα γλουταθειόνης στο κύτταρο, καθώς και ο λόγος της αναγμένης προς την οξειδωμένη της μορφή (GSH/GSSG) αποτελούν έναν ευαίσθητο αισθητήρα της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου (Foyer *et al.*, 1997). Σε κανονικές συνθήκες, η γλουταθειόνη βρίσκεται κυρίως στην αναγμένη της μορφή, ενώ σε ποικίλες καταστάσεις καταπόνησης, παρατηρείται σημαντική ελάττωση του παραπάνω λόγου.

Η αναγέννηση της GSH στον κύκλο γλουταθειόνης-ασκορβικού γίνεται από τη δράση της GR, με την αναγωγική ενέργεια του NADPH. Η GR είναι μια

φλαβοπρωτεΐνη, που χρησιμοποιεί το συνένζυμο FAD, ως ενδιάμεσο δότη ηλεκτρονίων. Έχουν περιγραφεί πολλαπλές ισομορφές του ενζύμου, οι οποίες προέρχονται από εναλλακτική συρραφή του πρωτογενούς RNA ή από πιθανές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως αλλαγές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση, γλυκοσυλίωση ή φωσφορυλίωση (Edwards *et al.*, 1990; Creissen *et al.*, 1999). Τόσο η GR, όσον και η APO εξασφαλίζουν με τη δράση τους τη ροή του οξειδοαναγωγικού κύκλου. Η σημασία τους έχει καταδειχθεί σε ΓΤ φυτά με αλλοιωμένα επίπεδα ενζυμικής ενεργότητας. Η υπερέκφραση της APO στο κυτόπλασμα ή τον χλωροπλάστη προκάλεσε βελτιωμένη ανθεκτικότητα στο παρακουάτ (Allen *et al.*, 1997), ενώ η καταστολή της έκφρασης της APO δημιούργησε φυτά περισσότερο ευαίσθητα στο όζον (Orvar and Ellis, 1997). Από την άλλη πλευρά, γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού και λεύκης με υπερέκφραση της GR, είχαν μεγαλύτερη ικανότητα διατήρησης των ενδογενών επιπέδων του ASA και της GSH κατά την έκθεση σε παρακουάτ (Foyer *et al.*, 1991; 1995).

ΟΙ ΚΑΤΑΛΑΣΕΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΑ ΦΥΤΑ

Η καταλάση συγκαταλέγεται στα βασικότερα ένζυμα της αντιοξειδωτικής άμυνας του φυτικού κυττάρου. Είναι μια σύνθετη τετραμερής πρωτεΐνη, αποτελούμενη από συνδυασμούς, όμοιων ή διαφορετικών πολυπεπτιδικών υπομονάδων και φέρει, ως συμπαράγοντα, το μόριο της αίμης. Με την τεχνική της ισοηλεκτρικής εστίασης (IEF) δείχθηκε ότι, τουλάχιστον στη *Nicotiana plumbaginifolia*, η κύρια καταλάση των φύλλων (CAT1) διαχωρίζεται σε 5 ισομορφές, που αντιπροσωπεύουν όλους τους δυνατούς συνδυασμούς των υπομονάδων α και β . Στον καπνό (*N. tabacum*) και το αμπέλι (*Vitis vinifera*), η υπομονάδα α παρουσιάζει ασθενή όξινο χαρακτήρα και κινείται προς την κάθοδο, σε αντίθεση με την υπομονάδα β , που κινείται προς την άνοδο και συνεπώς εμφανίζεται περισσότερο όξινη. Μάλιστα δείχθηκε ότι, όσο μεγαλύτερη είναι η συμμετοχή της υπομονάδας α στο τετραμερές σύμπλοκο της καταλάσης, τόσο περισσότερο αυξάνεται η ενεργότητα του ενζύμου και αντίστροφα (Siminis *et al.*, 1994). Τα πολυπεπτίδια α και β είναι προϊόντα διαφορετικών γονιδιακών αλληλόμορφων. Το πλήθος των αλληλόμορφων καταστάσεων, που έχουν καταγραφεί για το γονίδιο της μεσοφυλλικής καταλάσης, ποικίλει στα C_3 φυτά. Στο φασόλι (*Phaseolus vulgaris*) και

τη φακή (*Lens culinaris*) υπάρχει πιθανότατα ένα μόνο αλληλόμορφο, στο σπανάκι (*Spinacia oleracea*), δύο, ενώ στη μουστάρδα (*Sinapis alba*) υπάρχουν τουλάχιστον τρία αλληλόμορφα (Galston *et al.*, 1951; Drumm and Schorfer, 1974; Schiefer *et al.*, 1976; Braber, 1980).

Εκτός από το γνωστό ρόλο της καταλάσης στην απόσβεση του H₂O₂ (καταλατική δράση: 2H₂O₂ → 2H₂O + O₂), το ένζυμο εμφανίζει και μια ασθενέστερη περοξειδική δράση, με την οποία οξειδώνει απλά οργανικά υποστρώματα, όπως είναι η αιθανόλη και το φορμικό οξύ. Η καταλάση εμφανίζει, παραδόξως, υψηλή τιμή Km για το κύριο υπόστρωμά της (Km: 5.3 mM), γεγονός που περιορίζει την αποτελεσματικότητά της σε μεγάλες συγκεντρώσεις H₂O₂, όπως συμβαίνει για παράδειγμα κατά την διάρκεια του γλυκολικού κύκλου και την οξείδωση των λιπαρών οξέων. Σε χαμηλότερα επίπεδα παραγωγής H₂O₂ φαίνεται να δραστηριοποιείται η ασκορβική περοξειδάση (APO), η οποία χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη συγγένεια προς το H₂O₂ (Km: 46 μM) και αναστέλλεται όταν η συγκέντρωση αυτού υπερβεί τα 2.5 mM (Asada, 1992).

Στα ανώτερα φυτά, η καταλάση απαντάται συνήθως με περισσότερους του ενός ισοενζυμικούς τύπους. Στο απλοειδές γονιδίωμα της *N. plumbaginifolia* έχουν αναγνωρισθεί τρεις ισοενζυμικές μορφές καταλάσης, οι CAT1, CAT2 και CAT3, που ελέγχονται γενετικά από ισάριθμα γονίδια (Willekens *et al.*, 1994). Στον αραβόσιτο (*Zea mays*), αντίστοιχα, έχουν καταγραφεί τρία ισοένζυμα, που κωδικοποιούνται από τα μέλη μιας μικρής οικογένειας ασύνδετων γονιδίων (Scandalios, 1994). Με βάση ομοιότητες στη νουκλεοτιδική αλληλουχία των γονιδίων τους, την ιστοειδική κατανομή τους και τον προτεινόμενο φυσιολογικό ρόλο τους, οι καταλάσες στα φυτά C₃ διακρίνονται σε τρεις κλάσεις. Στην κλάση I εντάσσονται οι καταλάσες, που χαρακτηρίζουν τους φωτοσυνθετικά δραστήριους ιστούς του φυτού, δηλαδή, κυρίως τα κύτταρα του μεσόφυλλου και το χλωροφυλλούχο παρέγχυμα του βλαστού. Στην κλάση αυτή ανήκουν τα προϊόντα των γονιδίων *CAT1* της *N. plumbaginifolia*, *CAT2* της *Arabidopsis thaliana*, *CATST1* της πατάτας (*Solanum tuberosum*), *SU2* του βαμβακιού (*Gossypium hirsutum*) κ.α. Τα ένζυμα αυτά αντιπροσωπεύουν την κύρια καταλατική δράση (>90%) στα φύλλα των C₃ φυτών (Havir and McHale, 1987; Zelitch, 1992; Willekens *et al.*, 1994) και ευθύνονται για την απομάκρυνση του H₂O₂, που παράγεται στα περοξεισώματα, κατά τη διάρκεια του γλυκολικού κύκλου. Ο κύριος φυσιολογικός ρόλος τους αναγνωρίστηκε σε φυσικά μεταλλάγματα καπνού με

αυξημένη φωτοσυνθετική απόδοση, κάτω από συνθήκες έντονης φωταναπνοής (Zelitch *et al.* 1991). Στα μεταλλάγματα αυτά διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα της καταλατικής ενεργότητας ήταν αυξημένα, κατά το ήμισυ, σε σύγκριση με τα φυτά-μάρτυρες. Επιπλέον, ΓΤ φυτά με χαμηλά επίπεδα μεσοφυλλικής καταλάσης παρουσιάζουν συμπτώματα νέκρωσης, όταν εκτίθενται σε συνθήκες έντονου φωτισμού ή υψηλής πίεσης οξυγόνου (Chamngpol *et al.*, 1996; Takahashi *et al.*, 1997; Brisson *et al.*, 1998).

Από την άλλη πλευρά, αντιφατικός είναι ο ρόλος που αποδίδεται στις καταλάσεις της κλάσης I, κατά την εκδήλωση της αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR), όπως και της τοπικής (LAR) και συστημικής (SAR) εξάπλωσης της ανθεκτικότητας στο φυτό. Οι Chen *et al.* (1993a) αναγνώρισαν σε εκχυλίσματα φύλλων καπνού την παρουσία μιας πρωτεΐνης με ικανότητα δέσμευσης του σαλικυλικού οξέος (SA). Το τελευταίο έχει καταδειχθεί ως το χημικό μόριο-κλειδί, για την εκδήλωση της LAR και της SAR, σε ένα μεγάλο αριθμό φυτικών ειδών (Friedrich *et al.*, 1995). Στη συνέχεια δείχθηκε ότι η πρωτεΐνη-αποδέκτης του SA εκδηλώνει την κύρια καταλατική ενεργότητα στα εκχυλίσματα των φύλλων και, έτσι, ταυτίστηκε με την καταλάση (Chen *et al.*, 1993b). Με πειράματα κινητικής δείχθηκε ότι το SA, καθώς και τα βιοενεργά ανάλογά του έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται *in vitro* από την καταλάση και να αναστέλουν τη δράση της. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει τη θέση των Levine και συνεργατών (1994), σχετικά με το ρόλο που διαδραματίζει το H₂O₂, ως χημικό μήνυμα, τόσο στην εκδήλωση της αντίδρασης υπερευαισθησίας, σε κύτταρα που έχουν εκτεθεί σε κάποιο «ήπιος» (avirulent) βακτηριακό στέλεχος, όσον και στην τοπική και συστημική εξάπλωση της ανθεκτικότητας. Προς την κατεύθυνση αυτή κινήθηκαν ερευνητικά πολλά εργαστήρια, που επιχείρησαν να ανακαλύψουν τον συνδετικό κρίκο ανάμεσα στην καταλάση, το SA και τα φαινόμενα της HR, της LAR και της SAR.

Σε ΓΤ φυτά καπνού, που υποεκφράζουν τη μεσοφυλλική καταλάση, διαπιστώθηκε ότι, κάτω από συνθήκες έντονου φωτισμού, εκδηλώνεται εκτεταμένη νέκρωση στα παλαιότερα φύλλα και συνεχής παραγωγή της PR-1 πρωτεΐνης (ενός σταθερού δείκτη της SAR κατάστασης) στο υπόλοιπο υγιές φύλλωμα (Takahashi *et al.*, 1997; Chamngpol *et al.*, 1998). Όταν τα φυτά αυτά εκτέθηκαν σε χαμηλό φωτισμό, δεν παρατηρήθηκε νέκρωση, ούτε και η προηγούμενη συσσώρευση της PR-1 πρωτεΐνης, γεγονός που υποδηλώνει ότι η εκδήλωση της νέκρωσης στα φύλλα είναι προαπαιτούμενο στοιχείο για την τοπική και συστημική επαγωγή της PR-1.

Αντίστοιχα, όταν τα φυτά αυτά διασταυρώθηκαν με ΓΤ φυτά *NAHG*, που παράγουν το ένζυμο αποδόμησης του SA (Friedrich *et al.*, 1995), η συστηματική επαγωγή της PR-1 εξαφανίστηκε στους απογόνους, υποδεικνύοντας ότι η καταστολή της καταλάσης δεν αρκεί και πάλι, από μόνη της, για την εκδήλωση της LAR ή της SAR (Du and Klessig, 1997).

Η εγκυρότητα, εξάλλου, της συστηματικής καταστολής της καταλάσης από το SA (Durner and Klessig, 1995) έχει τεθεί υπό αμφισβήτηση (Bi *et al.*, 1995; Neuenschwander *et al.*, 1995). Σύμφωνα με τα επιχειρήματά τους, η ανασταλτική δράση του SA, μπορεί να εκδηλωθεί μόνο στον τόπο της μόλυνσης, όπου η συγκέντρωσή του είναι ικανή να αναστείλει την ενεργότητα της καταλάσης (Bi *et al.*, 1995). Στην περίπτωση αυτή, η απουσία της καταλατικής ενεργότητας θα επέτρεπε την αύξηση της συγκέντρωσης του H₂O₂ στις τιμές εκείνες (6-8 mM), που απαιτούνται για την ενεργοποίηση της HR στα προσβεβλημένα κύτταρα (Tenhaken *et al.*, 1995).

Η δεύτερη κλάση καταλασών περιλαμβάνει ισοένζυμα, που εντοπίζονται στα ηθμώδη στοιχεία του βλαστού, των φύλλων και της ρίζας. Οι καταλάσες της κλάσης II είναι επιφορτισμένες με μια, όχι απολύτως κατανοητή, αποστολή. Στη *N. plumbaginifolia* παρατηρήθηκε επαγωγή του γονιδίου της *CAT2*, ύστερα από την επίδραση ποικίλων παραγόντων αβιοτικής καταπόνησης, όπως όζοντος, UV-B ακτινοβολίας και SO₂ (Willekens *et al.*, 1997), ενώ ο τραυματισμός δείχθηκε να καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου της (Orvar *et al.*, 1997). Στην πατάτα διαπιστώθηκε ότι το γονίδιο της ομόλογης καταλάσης, *CAT2ST*, ενεργοποιείται μεταγραφικά, τόσο τοπικά στο σημείο της μόλυνσης, όσο και συστηματικά στο υπόλοιπο, υγιές τμήμα του φυτού, ύστερα από την προσβολή των κονδύλων ή των φύλλων του φυτού, από νηματώδεις, μύκητες ή βακτήρια (Yu *et al.*, 1999; Nieben *et al.*, 1995). Επιπλέον, ο Chen και οι συνεργάτες του (1993) αναγνώρισαν την *CAT2* στα φύλλα του καπνού ως τον κύριο αποδέκτη του SA (πάνω από 50% της δεσμευτικής ικανότητας), παρότι αντιπροσωπεύει λιγότερο από το 20% της καταλατικής ενεργότητας στο φύλλο. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην υπόθεση (Nieben *et al.*, 1995) ότι η *CAT2* αποτελεί τον ευαίσθητο στο SA διακόπτη, που μεσολαβεί, δια της αναστολής της δράσης της στην ενίσχυση ενός κύματος H₂O₂, που ταξιδεύει, αυτοκαταλυόμενο, από τα μολυσμένα προς τα υγιή τμήματα του φυτού. Εντούτοις, ΓΤ φυτά καπνού, που υποεκφράζουν εκλεκτικά την *CAT2*, δεν

παρουσίασαν κάτω από συνθήκες έντονου φωτισμού την αναμενόμενη συσσώρευση της PR-1 πρωτεΐνης (Champongrol *et al.*, 1996).

Τέλος, η τρίτη κλάση καταλασών (III) περιλαμβάνει ισοενζυμικές μορφές που απαντώνται αποκλειστικά στα γλυοξεισώματα του ενδοσπέρμιου. Πιθανώς, ρόλος τους περιορίζεται στην απόσβεση του H₂O₂, που παράγεται κατά τη βλάστηση των σπερμάτων, από τη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων (Willekens *et al.*, 1994). Φαίνεται ότι όλα τα ισοένζυμα της καταλάσης στα C₃ φυτά εδράζονται στα μικροσώματα. Το πεπτίδιο συνθήματος για την τοπογένεσή τους, αναγνωρίστηκε στη μεσοφυλλική (κλάση I) καταλάση του βαμβακιού και είναι μια εκφυλισμένη παραλλαγή του γενικού μοτίβου SKL (σερίνη-λυσίνη-λευκίνη) στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης (Mullen *et al.*, 1997).

Η προηγούμενη διάκριση των καταλασών σε τρεις κλάσεις δεν συμπίπτει με του ισοενζυμικούς τύπους, που αναγνωρίζονται στα C₄ φυτά, όπως είναι ο αραβόσιτος. Στον τελευταίο έχουν χαρακτηριστεί τρία ισοένζυμα καταλάσης (Scandalios *et al.*, 1980), οι CAT-1, CAT-2 και CAT-3, που παρουσιάζουν ένα ιδιαίτερο πρότυπο ιστολογικής κατανομής και μια ιδιόμορφη λειτουργική αποστολή, στενά συνυφασμένη με τα χαρακτηριστικά του πρωτογενούς μεταβολισμού στα C₄ φυτά. Συγκεκριμένα, η CAT-1 εκφράζεται στα κύτταρα του μεσόφυλλου σε βασικά επίπεδα, χωρίς να επηρεάζεται από την ποιότητα, την ένταση ή την περίοδο του φωτός (Redinbaugh *et al.*, 1990). Το H₂O₂, που παράγεται στα κύτταρα του δεσμικού κολεού κατά τη διάρκεια της φωταναπνοής, απομακρύνεται με τη δράση της CAT-2, που εκφράζεται αποκλειστικά στο συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο και είναι φωτοεπαγόμενη (Skadsen and Scandalios, 1987). Όσον αφορά την CAT-3, είναι η μόνη καταλάση στο φυτικό βασίλειο για την οποία έχειδειχθεί ότι εδράζεται στα μιτοχόνδρια των κυττάρων του μεσόφυλλου (Acevendo and Scandalios, 1991) και ότι η έκφρασή της ακολουθεί κερκαδική περιοδικότητα (Boldt and Scandalios, 1995).

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ

Η εφαρμογή της τεχνολογίας των πρωτοπλαστών στην δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών προσφέρει λύσεις, όταν οι ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι αποδεικνύονται, για ποικίλους λόγους, αναποτελεσματικές. Τεχνικές, όπως ο σωματικός υβριδισμός, η διανομή «γυμνού» DNA ή η μεταφορά οργανιδίων, που

επιτρέπουν την άμεση προσέγγιση του στόχου, εφαρμόζονται αποκλειστικά σε πρωτοπλάστες. Η αναγέννηση του πλήρους φυτού από τους πρωτοπλάστες στηρίζεται στο ολοδυναμικό των φυτικών κυττάρων, δηλαδή στην ικανότητά τους να αποδιαφοροποιούνται και να ανακτούν τις εμβρυονικές τους ιδιότητες. Ωστόσο, όλα τα φυτικά είδη δεν αποκρίνονται ομοιοτρόπως στους καλλιεργητικούς χειρισμούς, με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλη διακύμανση αναγεννητικής συμπεριφοράς στο φυτικό κόσμο. Η αναγεννητική ικανότητα των πρωτοπλαστών συνίσταται στην ικανότητα των γυμνών κυττάρων να επανασχηματίσουν το κυτταρικό τους τοίχωμα, να διαρευθούν και να οδηγηθούν, μέσω καλλογένεσης, στη διαδικασία της οργανογένεσης ή της σωματικής εμβρυογένεσης. Στα καλούμενα “recalcitrant” (σε ελεύθερη απόδοση: δύστροπα) φυτικά είδη, η πορεία από τους πρωτοπλάστες προς το πλήρες φυτό διακόπτεται συνήθως σε κάποιο πρώιμο στάδιο, γεγονός που ώθησε το επιστημονικό ενδιαφέρον στη διερεύνηση των αιτιών αυτού του φαινομένου. Οι Potrykus και Shillito (1986) υποστήριξαν ότι η ολοδυναμικότητα είναι προνόμιο ορισμένων μόνο κυτταρικών τύπων και ότι η απώλεια της σχετίζεται με επιγενετικές αλλαγές, που συνοδεύουν την κυτταρική διαφοροποίηση. Για το λόγο αυτό, τόσο ο τραυματισμός, που συμβαίνει με την αφαίρεση του κυτταρικού τοιχώματος, όσον και οι καλλιεργητικοί χειρισμοί δεν είναι σε θέση να αφυπνίσουν τις μεριστωματικές ιδιότητες σε κύτταρα, που στερούνται της ικανότητας αυτής. Στον αντίποδα των παραπάνω απόψεων βρίσκονται οι Hahne *et al.* (1989), που υποστήριξαν ότι όλα τα φυτικά κύτταρα διατηρούν την ολοδυναμική τους ικανότητα, την οποία μπορούν να εκδηλώσουν, όταν δεχθούν το κατάλληλο ερέθισμα.

Η απομόνωση των πρωτοπλαστών επάγει ριζικές αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση και επιφέρει, ανάμεσα στα άλλα, την απορύθμιση της αντιοξειδωτικής άμυνας του κυττάρου. Η οξειδωτική καταπόνηση στην οποία υποβάλλονται οι πρωτοπλάστες, κατά τη διαδικασία αφαίρεσης του κυτταρικού τους τοιχώματος, έχει ενοχοποιηθεί για την απώλεια της ολοδυναμικότητας (Cutler *et al.*, 1991; Roubelakis-Angelakis, 1993). Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι η επίδραση των υδρολυτικών ενζύμων, που χρησιμοποιούνται για την πέψη του κυτταρικού τοιχώματος, διεγείρει την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (EMO) από διαφορετικά οξειδοαναγωγικά συστήματα της πλασματικής μεμβράνης. Ανάμεσα στα δραστικά παράγωγα του οξυγόνου, το H₂O₂ φαίνεται να διαδραματίζει κεντρικό ρόλο, τόσο στη σύζευξη των φαινολικών συστατικών της λιγνίνης, μια διαδικασία που πραγματοποιείται στα πλαίσια της ανασύστασης του κυτταρικού τοιχώματος, όσον και στις οξειδωτικές

καταστροφές, που αφυπνίζουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (PCD) στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες (Pennel and Lamb, 1997). Εξάλλου, έχει δειχθεί ότι η οξειδωτική καταπόνηση και ειδικότερα η συσσώρευση του H_2O_2 , επηρεάζει τη διαιρετική ικανότητα των φυτικών κυττάρων, εμποδίζοντας τη μετάβαση από τη φάση G1 στη S φάση του κυτταρικού κύκλου (Reichheld *et al.*, 1999).

Η συγκριτική μελέτη αναγεννώμενων πρωτοπλαστών καπνού και μη αναγεννώμενων πρωτοπλαστών αμπέλου, φανέρωσε την αδυναμία των τελευταίων, αφενός να υποστηρίξουν μια συσσώρευση H_2O_2 στη εξωτερική πλευρά του πλασμαλλήματος, που είναι απαραίτητη για την αναδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος και αφετέρου να αποσβέσουν ένα κύμα οξειδωτικού καταγισμού, που σηματοδοτεί την έναρξη του κυτταρικού θανάτου (de Marco and Roubelakis-Angelakis, 1996).

Πιθανές πηγές προέλευσης του αποπλαστικού H_2O_2 είναι, με βάση τα σύγχρονα δεδομένα τρεις. Η πρώτη απ' αυτές είναι το $O_2^{\cdot -}$, που παράγεται με την δράση των μεμβρανικών περοξειδασών, οι οποίες καταλύουν τις αντιδράσεις λιγνιτοποίησης των φαινολικών συστατικών του τοιχώματος (Halliwell, 1978). Το $O_2^{\cdot -}$ στη συνέχεια μετατρέπεται σε H_2O_2 . Ένα δεύτερο μοντέλο προτείνει ότι το σύμπλοκο O_2 -αίμης και μιας αποπλαστικής περοξειδάσης, με την βοήθεια αναγωγικών ουσιών που εξάγονται από το κυτόπλασμα, ανάγεται στο συστατικό III, που υδρολύεται και ελευθερώνει H_2O_2 (Bolwell *et al.*, 1995) Η όλη διαδικασία πυροδοτείται από την παρουσία κάποιου μικροβιακού παράγοντα που δρα ως επαγωγέας (elicitor). Τέλος, σύμφωνα με την τρίτη υπόθεση, η παραγωγή του H_2O_2 γίνεται από μια μεμβρανική NAD(P)H οξειδάση, η οποία χρησιμοποιεί το κυτοπλασμικό NAD(P)H για να ανάγει το O_2 σε $O_2^{\cdot -}$ (Doke and Miura, 1995). Ο μηχανισμός αυτός ενεργοποιείται από διάφορους παθογονικούς επαγωγείς και βρέθηκε πως είναι ομόλογος με την NADPH οξειδάση, που λειτουργεί στη μεμβράνη των φαγοκυττάρων των θηλαστικών (Xing *et al.*, 1997). Επιπλέον, δείχθηκε ότι αναστέλλεται από το διφαινυλικό ιωδόνιο (DPI), γνωστό αναστολέα της μεμβρανικής οξειδάσης των φαγοκυττάρων των θηλαστικών (Auh and Murphy, 1995). Η NADPH-οξειδάση αποτελείται από μια αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, στην οποία συμμετέχουν μόνιμα μεμβρανικά συστατικά, αλλά και πρωτείνες του κυτοπλάσματος, που μεταναστεύουν στη λειτουργική θέση τους, ύστερα από αλληλεπίδραση κάποιου

μικροβιακού επαγωγέα με τον αντίστοιχο υποδοχέα (Segal and Abo, 1993). Το H_2O_2 που παράγεται, αφενός λειτουργεί ως μικροβιοκτόνος παράγοντας (Apostol *et al.*, 1989), και αφετέρου οδηγεί στην επιβολή της αντιδράσεως υπερευαισθησίας (HR) στο φυτικό κύτταρο (Levine *et al.*, 1994).

Στους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού φαίνεται πως δρουν δύο ανεξάρτητες πηγές H_2O_2 . Η πρώτη εξαρτάται από το NADPH και παρουσιάζει τα χαρακτηριστικά μιας φαγοκυτταρικού τύπου μεμβρανικής οξειδάσης. Η δεύτερη είναι μια NAD(P)H οξειδάση-περοξειδάση, που σχετίζεται πιθανότατα με τη δραστηριότητα αναδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος (Papadakis and Roubelakis-Angelakis, 1999). Η ενεργοποίηση της NADPH-οξειδάσης στους πρωτοπλάστες του καπνού, σχετίζεται με την χρήση ακάθαρτης κυτταρινάσης στη διαδικασία απομόνωσης. Η τελευταία προέρχεται από το μύκητα *Trichoderma viridae* και βρέθηκε ότι περιέχει προσμίξεις ξυλανάσης και πηκτινικής λύσης. Για τα ένζυμα αυτά, έχει δειχθεί ότι προκαλούν, ύστερα από παρατεταμένη έκθεση, νέκρωση σε κυτταροκαλλιέργειες αγρωστωδών ειδών (Ishii, 1988), όπως και σε πρωτοπλάστες καπνού (Sharon *et al.*, 1993). Η υδρολυτική δράση τους ελευθερώνει προϊόντα μικρού μοριακού βάρους από το κυτταρικό τοίχωμα (Bucheli *et al.*, 1990), που διεγείρουν πιθανότατα τη μεμβρανική NADPH-οξειδάση. Στον αντίλογο ανήκουν απόψεις, που υποστηρίζουν ότι είναι τα ίδια τα ένζυμα, που αναγνωρίζονται, ως πρωτεϊνικές δομές, από υποδοχείς του κυττάρου (Hanania and Avni, 1997).

Η αύξηση του χρόνου επίδρασης των λυτικών ενζύμων του κυτταρικού τοιχώματος, οδήγησε σε απώλεια της αναγεννητικής ικανότητας και των πρωτοπλαστών καπνού (Siminis *et al.*, 1993). Συγκριτική μελέτη, ανάμεσα σε αναγεννώμενους και μη πρωτοπλάστες καπνού, αποκάλυψε ότι η απώλεια της αναγεννητικής ικανότητας συνοδεύεται από ελάττωση της ολικής ενεργότητας περοξειδάσης και την πλήρη απουσία της ενεργότητας της NADH-περοξειδάσης (Siminis *et al.*, 1993; de Marco and Roubelakis-Angelakis, 1996). Η περοξειδική ενεργότητα σχετίζεται με την αναδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος και είναι απαραίτητη για την εκδήλωση της διαιρετικής δραστηριότητας. Παράλληλα, στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες διαπιστώθηκε ελάττωση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού τους, οφειλόμενη πιθανότατα στην παρατεταμένη συσσώρευση EMO κατά την διαδικασία απομόνωσής τους.

Στους μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες αμπελιού φαίνεται να απουσιάζει η ενεργότητα της NADPH-οξειδάσης (Papadakis and Roubelakis, 1999). Επιπλέον, η

εξέταση της ενεργότητας των κυριότερων αντιοξειδωτικών ενζύμων αποκάλυψε ότι η οξειδωτική καταπόνηση, που υφίστανται κατά την απομόνωσή τους, δεν κατόρθωσε να επάγει τους απαραίτητους αμυντικούς μηχανισμούς. Σύμφωνα με τα παραπάνω είναι και η δραματική ελάττωση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού τους, που παρατηρείται (Papadakis and Roubelakis, 1999). Επίσης, σύγκριση της καταλατικής ενεργότητας, ανάμεσα σε αναγεννώμενους πρωτοπλάστες καπνού και μη αναγεννώμενους πρωτοπλάστες αμπέλου, φανέρωσε ότι ήταν αισθητά υψηλότερη στο πρώτο πληθυσμό. Η παρατηρούμενη διαφορά αποδόθηκε στη διαφορετική συμμετοχή των υπομονάδων α και β στα ένζυμα του καπνού και της αμπέλου (Siminis *et al.*, 1994).

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, οδηγηθήκαμε στην πεποίθηση ότι η συστατική έκφραση κάποιων ενζύμων της αντιοξειδωτικής μηχανής πιθανότατα να βελτιώσει την αναγεννητική ικανότητα πολλών «δύστροπων» φυτικών ειδών. Ένα από τα υπονήφια ένζυμα είναι η καταλάση. Στα πλαίσια αυτής της εργασίας, επιχειρήθηκε η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών καπνού, που υποεκφράζουν ή υπερεκφράζουν τη μεσοφυλλική καταλάση (*CATI*). Τα φυτά αυτά θα αξιοποιηθούν στη μελέτη της συμβολής της αντιοξειδωτικής προστασίας, που παρέχει η καταλάση, στην αναγεννητική ικανότητα των πρωτοπλαστών καπνού.

1.1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ CAT-1

1.1.1. Παραγωγή της καταλάσης σε βακτηριακά κύτταρα της σειράς BL21(DE3)

Για την παραγωγή της πρωτεΐνης σε βακτηριακά κύτταρα, ο πλήρης cDNA κλώνος της *CAT-1* (Schultes *et al.*, 1994) εισήχθη στον προκαρυωτικό φορέα έκφρασης pET16b (Novagen), υπό τον έλεγχο του υποκινητή T7 και στις θέσεις περιορισμού *BamHI* και *XhoI*. Για να δημιουργηθούν οι τελευταίες, το γονίδιο της καταλάσης κλωνοποιήθηκε αρχικά στον φορέα pBLKS (Minotech) στη θέση περιορισμού *EcoRI* και στη συνέχεια επιλέχθηκαν βακτηριακοί κλώνοι με τον ορθό προσανατολισμό αναγνωστικού πλαισίου. Ο φορέας έκφρασης pET16b χρησιμοποιεί τον φαγικό υποκινητή T7 και περιέχει εντός του αναγνωστικού πλαισίου εννιά συνεχόμενα κωδικόνια ιστιδίνης, που δημιουργούν έναν επίτοπο διαδοχικών ιστιδινών στο αμινοτελικό άκρο της συντιθέμενης πρωτεΐνης - στοιχείο απαραίτητο για τον χρωματογραφικό καθαρισμό της (βλ. Καθαρισμός). Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού και η DNA λιγάση, που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των ανασυνδυασμένων φορέων, ήταν προϊόντα της New England Biolabs.

Η έκφραση του κλωνοποιημένου γονιδίου έγινε σε κύτταρα *E.coli* της σειράς DE3, που περιλαμβάνει λυσιγονικά παράγωγα του φάγου DE3. Τα στελέχη, που ανήκουν στη συγκεκριμένη σειρά, φέρουν στο βακτηριακό χρωμόσωμα ένα αντίγραφο της φαγικής T7 RNA πολυμεράσης, υπό την έκφραση του υποκινητή *lacUV5*. Ο τελευταίος επάγεται παρουσία του χημικού αναλόγου της λακτόζης, ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτοπυρανοσίδη (IPTG). Επιλέχθηκε το στέλεχος BL21, που είναι γενετικά απαλλαγμένο από δύο κύριους ενζυμικούς μηχανισμούς πρωτεόλυσης του βακτηριακού κυττάρου, για να αποφευχθούν προβλήματα αποδόμησης της παραγόμενης πρωτεΐνης. Για τη μεταμόρφωση των βακτηριακών κυττάρων με τον ανασυνδυασμένο φορέα εφαρμόστηκε η μέθοδος του heat shock σε κύτταρα που έχουν υποστεί προηγουμένως την κατεργασία εκείνη, που τα καθιστά δεκτικά στο μετασχηματισμό (competent cells) (Sambrook *et al.*, 1989).

Η επαγωγή της σύνθεσης της πρωτεΐνης από τα μεταμορφωμένα βακτήρια έγινε σε υγρές καλλιέργειες θρεπτικού μέσου LB (Luria-Bertani) και επιλογής αμπικιλίνης (100 μg/mL, Sigma), με την προσθήκη IPTG (Sigma) σε τελική συγκέντρωση 250 μM. Η προσθήκη του επαγωγέα έγινε όταν η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας έφθασε την τιμή των 0,45-0,55 OD₆₀₀. Η παραγωγή της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε

στους 30°C, με συνεχή ανάδευση στις 180 rpm, για 3h. Κατόπιν, τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 min (Heraeus, Biofuge 22R) και η πελλέτα φυλάχθηκε στους -20°C. Δείγματα όγκου 1 mL λήφθηκαν πριν και μετά από την επαγωγή της καλλιέργειας, για να ελεγχθεί το αποτέλεσμα της διαδικασίας.

1.1.2. Χρωματογραφικός καθαρισμός της CAT-1

Για τον καθαρισμό της καταλάσης από το μίγμα των βακτηριακών συστατικών, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα χρωματογραφίας *QIAexpress* (QIAGEN). Η αρχή λειτουργίας του στηρίζεται στην ιδιότητα του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης να σχηματίζει χηλικά σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα. Το υλικό διαχωρισμού περιέχει ιόντα Ni δεσμευμένα, μέσω του νιτριλο-τριοξικού οξέος (Ni-NTA) στην επιφάνεια σφαιριδίων αгарόζης. Το νιτριλο-τριοξικό οξύ καταλαμβάνει τέσσερις από τις έξι μονάδες σθένους του ιόντος του νικελίου. Συνεπώς, για κάθε ιόν υπάρχουν δύο ελεύθερες μονάδες σθένους, που μπορούν να συνδεθούν με ισάριθμους ιμιδαζολικούς δακτυλίους. Ο επίτοπος, που προσαρτήθηκε στην πολυπεπτιδική αλυσίδα της CAT-1, περιέχει εννιά διαδοχικές ιστιδίνες, οι οποίες μπορούν να δεσμεύσουν πολλαπλές θέσεις πάνω στο ίδιο ή σε γειτονικά σφαιρίδια αгарόζης. Η διαδικασία απομόνωσης έλαβε χώρα σε τρία στάδια: τη λύση των βακτηριακών κυττάρων, την έλευση του κυτταρικού εκχυλίσματος μέσα από τη στήλη διαχωρισμού και τη βαθμιαία κλασμάτωση της πρωτεΐνης. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 4°C, προκειμένου να διατηρηθεί ακέραια η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης.

Αρχικά, η πελλέτα των κυττάρων επαναδιαλύθηκε σε 10πλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος λύσης, που περιείχε 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM ιμιδαζόλη, 0,05% Triton X100, 1 mM PMSF και 5 mM DTT. Για τη λύση της βακτηριακής καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν υπέρηχοι ισχύος 60 Watt και συχνότητας 20 kHz και πραγματοποιήθηκαν έξι επαναλήψεις των 30 sec στους 0°C (Bioblock Scientific; Vibra Cell). Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10000 rpm, για 30 min στους 4°C (Sorvall, RC 5B plus).

Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης προστέθηκε στην κορυφή στήλης Ni-NTA αгарόζης, όγκου 2 ml, που είχε προηγουμένως εξισορροπηθεί με το διάλυμα λύσης. Η ροή του εκχυλίσματος έγινε υπό το κράτος της βαρύτητας, ώστε να αυξηθεί ο χρόνος αλληλεπίδρασης του επίτοπου των ιστιδινών με τα ιόντα Ni. Το υγρό, που

απομακρύνθηκε από τη στήλη, συλλέχθηκε, για να πιστοποιηθεί η κατακράτηση της CAT-1 από το υλικό της στήλης.

Για την κλασμάτωση της πρωτεΐνης από τη χρωματογραφική στήλη, διοχετεύτηκαν διαδοχικοί όγκοι διαλύματος έκλουσης (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 0,05% (v/v) Triton X100, 1 mM PMSF και 5 mM DTT) με αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζόλης. Οι συγκεντρώσεις ιμιδαζόλης, που χρησιμοποιήθηκαν, κατά σειρά, ήταν 20 mM, 50 mM, 100 mM και 300 mM. Η έκλουση της πρωτεΐνης εμφανίζεται για πρώτη φορά στα 100 mM ιμιδαζόλης και ολοκληρώνεται στα 300 mM της ουσίας. Όλα τα κλάσματα της στήλης ελέγχθηκαν ηλεκτροφορητικά.

Η πρωτεΐνη, που απομονώθηκε, απαλλάχθηκε από τις συνοδευτικές ουσίες της έκλουσης με την τεχνική της διαπίδυσης. Όλα τα κλάσματα αυτής συγκεντρώθηκαν μέσα σε μεμβρανικό ασκό διαπίδυσης (Medicell: Dialysis Tubing-Visking) και βυθίστηκαν σε εκατονταπλάσιο όγκο διαλύματος 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, όπου και παρέμειναν για 12h, με συνεχή ανάδευση στους 4°C. Ο τελικός όγκος του διαλύματος της πρωτεΐνης ρυθμίστηκε με λυοφιλοποίηση.

1.1.3. Παραλαβή της CAT-1 από τα κυστίδια εγκλεισμού (inclusion bodies)

Η ελευθέρωση της πρωτεΐνης από τα κυστίδια εγκλεισμού (βλ. Αποτελέσματα) επιτεύχθηκε με την επαναδιάλυση της πελλέτας των κυτταρικών υπολειμμάτων (που λαμβάνεται μετά από τη λύση των βακτηρίων και τη φυγοκέντρηση του κυτταρικού εκχυλίσματος) σε διάλυμα 8 M ουρίας, που περιείχε 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl και 10 mM ιμιδαζόλης. Το προϊόν επεξεργασίας της πελλέτας με το διάλυμα της ουρίας προστέθηκε απευθείας σε χρωματογραφική στήλη Ni-NTA αγαρόζης, που είχε προηγουμένως εξισορροπηθεί με το ίδιο διάλυμα. Η απομάκρυνση της ουρίας έγινε σταδιακά, με έκπλυση της στήλης με διαδοχικούς όγκους διαλύματος 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM ιμιδαζόλης και φθίνουσας συγκέντρωσης ουρίας. Οι συγκεντρώσεις ουρίας, που χρησιμοποιήθηκαν κατά σειρά, ήταν: 6 M, 4 M, 2 M, 1 M, 0,5 M, 0,25 M και 0 M. Ακολούθησε, η άμεση έκλουση της πρωτεΐνης, με την προσθήκη διαλύματος 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 0,05% (v/v) Triton X100, 1 mM PMSF, 5 mM DTT και 300 mM ιμιδαζόλης.

1.2. ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Η παραγωγή αντισωμάτων κατά της CAT-1 του καπνού πραγματοποιήθηκε σε κουνέλια ανοσοποιημένα με την απομονωθείσα πρωτεΐνη. Τα δύο κουνέλια, που επιλέχθηκαν ήταν ενήλικα θηλυκά άτομα, που δεν προήλθαν από ομομεικτικές διασταυρώσεις. Δύο εβδομάδες πριν την πρώτη ανοσοποίηση, τα ζώα υποβλήθηκαν σε προληπτική θεραπεία, με τη χορήγηση αντιβιοτικών και παρασιτοκτόνων ουσιών. Σε όλη την πορεία των ανοσοποιήσεων τα κουνέλια παρέμειναν, σε άριστες συνθήκες υγιεινής και διατροφής στο ζωοτροφείο του πανεπιστημιακού νοσοκομείου (ΠΕΠΑΓΝΗ). Το πρόγραμμα των ανοσοποιήσεων που εφαρμόστηκε περιγράφεται στη συνέχεια και ακολούθησε τις υποδείξεις των Harlow and Dane (1988).

1.2.1. Πρώτη ανοσοποίηση

Υδατικό διάλυμα της πρωτεΐνης αναμείχθηκε σε αναλογία όγκου 1:1 με το πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freund (Complete Freund's' Adjuvant, Sigma) και το μίγμα γαλακτοματοποιήθηκε με χρήση υπερήχων. Η συνολική ποσότητα της πρωτεΐνης, που ενέθηκε ανά ζώο, ρυθμίστηκε στα 300 μg. Πραγματοποιήθηκαν τρεις υποδερμικές ενέσεις κατά μήκος της ράχης του ζώου, όγκου 300 μL εκάστη, καθώς και μία ενδομυϊκή, όγκου 100 μL στον μηρό. Επιπλέον, έγινε δοκιμαστική αιμοληψία, προκειμένου να ελεγχθεί το ενδεχόμενο παρουσίας φυσικών αντισωμάτων στον ορό των πειραματόζωων.

1.2.2. Επαναληπτικές ανοσοποιήσεις

Η δεύτερη ανοσοποίηση, όπως και οι επόμενες, πραγματοποιήθηκαν σε χρονική απόσταση 40 ημερών μεταξύ τους. Στις επαναληπτικές ανοσοποιήσεις χρησιμοποιήθηκε μικρότερη ποσότητα πρωτεΐνης (100 μg/ζώο) και το πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freund αντικαταστάθηκε από την ήπια παραλλαγή του (Incomplete Freund's' Adjuvant, Sigma). Οι ενέσεις έγιναν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο, όπως και στην πρώτη ανοσοποίηση. Δέκα ημέρες, μετά τη χορήγηση της κάθε επαναληπτικής δόσης, έγινε αιμοληψία, προκειμένου να ελεγχθεί η πρόοδος στην παραγωγή αντισωμάτων.

1.2.3. Τίτλοδοότηση του ορού

Ο προσδιορισμός του τίτλου των αντισωμάτων στον ορό των πειραματόζωων έγινε εμπειρικά, με την τεχνική του Western Blot (περιγράφεται σε σχετική ενότητα). Διαδοχικές αραιώσεις του ορού σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών [PBS, 1% (w/v) BSA, 0,05% (v/v) Tween 20] χρησιμοποιήθηκαν για τον ανοσοεντοπισμό της καταλάσης σε εκχυλίσματα φύλλων καπνού. Οι αραιώσεις, που πραγματοποιήθηκαν, ήταν 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:2000 και 1:5000 (v/v). Η εκτίμηση του τίτλου στηρίχθηκε στην σχετική ένταση της ζώνης, που λαμβάνεται στο ύψος των 57 kD και η οποία αντιστοιχεί στη ζητούμενη πρωτεΐνη (CAT-1). Η αναγνώριση του ύψους των 57 kD έγινε μετά από παροδική χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με την χρωστική Ponceau. Η τελευταία αποκαλύπτει την ζώνη της μεγάλης υπομονάδας της Rubisco (55 kD), που χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς.

2.1 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ ΚΑΠΝΟΥ

2.1.1 Ανασυνδασμένοι δυαδικοί φορείς

Οι ανασυνδασμένοι φορείς (constructs) pBZ1 και pBZ2, που χρησιμοποιήθηκαν, παραχωρήθηκαν από το εργαστήριο του Dr. Zelitch και περιγράφονται σε σχετική δημοσίευση (Plant Physiology: 1998: 116: 259-269). Συνοπτικά, το construct pBZ1 προήλθε από την κλωνοποίηση ενός τμήματος μήκους 0,7 kb, του μερικού cDNA κλώνου της καταλάσης, *CAT-1*, της *Nicotiana sylvestris* στον φορέα pAC1352L, σε *antisense* προσανατολισμό ως προς τον υποκινητή (35S CaMV). Ο ανασυνδασμένος φορέας pBZ2 προέκυψε από την κλωνοποίηση του πλήρους cDNA κλώνου της *CAT-1* της *Nicotiana tabacum*, μήκους 1,9 kb στον pAC1352L, αλλά με *sense* προσανατολισμό.

Ο ανασυνδασμένος φορέας pCAT-1AS παραχωρήθηκε από το εργαστήριο του Dr. van Montagu (The Plant Journal: 1996: 10: 491-503). Περιέχει, δε, ένα κομμάτι μεγέθους 1,22 kb από το γονίδιο της καταλάσης, *CAT-1*, της *Nicotiana plumbaginifolia* σε *antisense* προσανατολισμό, κλωνοποιημένο στο φορέα pKYLKX71-35S².

2.1.2 Αγροβακτηριακή διαμόλυνση εκφύτων καπνού και αναγέννηση των γενετικά τροποποιημένων φυτών.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το μη ογκογονικό, αγροβακτηριακό στέλεχος (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404, μετασχηματισμένο με τους κατάλληλους ανασυνδυασμένους δυαδικούς φορείς (pBZ1, pBZ2 και pCAT-1AS). Επιλέχθηκαν μεμονωμένες βακτηριακές αποικίες και καλλιεργήθηκαν για ~18h στους 28 °C μέσα σε 10 mL θρεπτικού μέσου LB, που περιείχε ως παράγοντα επιλογής καναμυκίνη (ανθεκτικότητα φορέα) και στρεπτομυκίνη (ενδογενής ανθεκτικότητα στελέχους LB4404), σε συγκεντρώσεις 50 µg/mL και 250 µg/mL, αντίστοιχα. Η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας στα 600 nm υπολογίστηκε κατά προσέγγιση $OD_{600} \sim 0,5$.

Οι φυλλικοί δίσκοι προήλθαν από ώριμα φύλλα καπνού (*Nicotiana tabacum cv. Petit Havana SRI*), αξονικού μήκους 9-15 cm. Τα φύλλα, αμέσως μετά την αποκοπή τους, υποβλήθηκαν σε επιφανειακή απολύμανση με διάλυμα υποχλωριώδους οξέος (εμπορικό σκεύασμα) σε αραιώση 10% v/v όπου και παρέμειναν για 12 min. Η κοπή των φυλλικών δίσκων έγινε με διακορευτή διαμέτρου 7 mm, από τις μεσονεύριες περιοχές των φύλλων, σε ασηπτικές συνθήκες. Οι δίσκοι, πριν χάσουν την σπαργή τους, εμβαπτίστηκαν στην καλλιέργεια του αγροβακτηρίου για 20 sec και μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια των βακτηρίων, που δεν προσκολλήθηκαν στην επιφάνεια τομής. Κατόπιν, τοποθετήθηκαν με τη ραχιαία πλευρά προς τα κάτω σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS (Murashige and Skoog, 1962), συμπληρωμένο με τις ορμόνες μορφογένεσης, α-ναφθαλινοξικό οξύ (NAA) και 6-βενζυλάμινο πουρίνη (BAP) σε συγκεντρώσεις 0.1 µg/mL και 1 µg/mL, αντίστοιχα, απουσία παράγοντα επιλογής. Τα τριβλία παρέμειναν στο σκοτάδι, στους 28°C για 48h (διάστημα συγκαλλιέργειας μέσα στο οποίο πραγματοποιείται η γενετική τροποποίηση των φυτικών κυττάρων). Στη συνέχεια, οι δίσκοι μεταφέρθηκαν σε στερεό μέσο MS επιλογής, παρουσία καναμυκίνης (300 µg/mL) και καρμπενικυλίνης (50 µg/mL – χρησιμοποιείται για την εξόντωση του αγροβακτηρίου), συμπληρωμένο, επίσης, με τις ορμόνες μορφογένεσης στις συγκεντρώσεις, που αναφέρθηκαν παραπάνω. Τα τριβλία διατηρήθηκαν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών με φωτοπερίοδο 16/8h, ένταση φωτεινής ακτινοβολίας 40 $\mu\text{mole}\cdot\text{photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ και θερμοκρασία $25,5\pm 0,5^\circ\text{C}$. Με την ορμονική δράση, οι φυλλικοί δίσκοι σχημάτισαν μέσω κάλλου

τις πρώτες καταβολές βλαστών, μέσα στις πρώτες 3 εβδομάδες από την μεταφορά τους. Όταν οι καταβολές εμφάνισαν το πρώτο ζεύγος φύλλων, αποκόπηκαν από τον μητρικό κάλλο και μεταφυτεύθηκαν σε θρεπτικό μέσο MS με καναμυκίνη (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και χωρίς ορμόνες. Στο στάδιο αυτό, η ενδογενής αυξίνη που παράγεται από το κορυφαίο μερίστωμα είναι ικανή να επάγει την ριζοβολία των εκφύτων. Όταν τα ριζοβολημένα φυτάρια απέκτησαν ύψος 2-3 cm, μεταφέρθηκαν σε μίγμα χώματος, τύρφης και περλίτη (4:2:1, v/v/v) και εξακολούθησαν να παραμένουν στο θάλαμο σταθερών συνθηκών, ώστε να σκληραγωγηθούν βαθμιαία στις εδαφοκλιματικές συνθήκες του φυσικού περιβάλλοντος. Η μεταφορά τους στο θερμοκήπιο έγινε όταν το ύψος τους ξεπέρασε τα 15 cm.

Για την κλωνοποίηση των γενοτύπων που επιλέχθηκαν, ύστερα από μετρήσεις της ειδικής ενεργότητας της καταλάσης, χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο MS, με την ορμονική σύσταση του μέσου βλαστογένεσης. Οι πολλαπλοί βλαστοί, που σχηματίστηκαν αποκόπηκαν από το μητρικό έκφυτο και διαχωρίστηκαν. Κατόπιν, μεταφέρθηκαν σε μέσο καλλιέργειας χωρίς ορμόνες, προκειμένου να ριζοβολήσουν.

2.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΩΝ ΣΕ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΦΥΛΛΩΝ ΚΑΠΝΟΥ

2.2.1 Εκχύλιση πρωτεϊνών από φύλλα καπνού

Για όλες τις πρωτεϊνικές εκχυλίσεις, επιλέχθηκε το 4^ο – 5^ο φύλλο από τη βάση, φυτών ύψους 12-15 cm (στάδιο 6^{ου}-8^{ου} φύλλου). Μετά την αφαίρεση του κεντρικού νεύρου, μέρος του φύλλου (~ 0,5 gr) λειοτριβήθηκε μέσα σε 1 mL παγωμένου διαλύματος εκχύλισης [50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 500 μM PMSF, 10 μM Leupeptin, 0,1% (v/v) Triton X100 και 10% (w/v) PVPP], με τη βοήθεια μικρής ποσότητας λεπτής, χαλαζιακής άμμου. Ειδικότερα, για τη μέτρηση της ειδικής ενεργότητας της ασκορβικής περοξειδάσης (APO), το διάλυμα εκχύλισης συμπληρώθηκε με ασκορβικό οξύ, σε τελική συγκέντρωση 1 mM, ενώ για τη φυσική ηλεκτροφόρηση της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), παραλείφθηκε η προσθήκη EDTA. Το προϊόν της εκχύλισης φυγοκεντρήθηκε στις 14000 rpm για 20 min στους 4°C (Heraeus, Biofuge 22R). Το διαυγές υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για τις ενζυμικές αντιδράσεις, ενώ μια ποσότητα φυλάχθηκε ως 10% stock γλυκερόλης

στους -20°C , προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στον ανοσοεντοπισμό της καταλάσης. Σε όλα τα βήματα της διαδικασίας, τα φυτικά εκχυλίσματα παρέμειναν στους 0°C .

2.2.2 Μέτρηση της ενεργότητας της καταλάσης (CAT)

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας της καταλάσης πραγματοποιήθηκε σε εκχυλίσματα φύλλων και βασίστηκε στην αποδόμηση του H_2O_2 , όπως αυτή προσδιορίζεται ποσοτικά με φασματοφωτομετρία. Συγκεκριμένα, μετρήθηκε ο ρυθμός ελάττωσης της απορρόφησης του H_2O_2 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 K_2HPO_4 – KH_2PO_4 , pH 8,0, 15 μM H_2O_2 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). Τέλος, ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνη πραγματοποιήθηκε, σύμφωνα με τους Lowry *et al.* (1951).

2.2.3 Μέτρηση της ενεργότητας της ασκορβικής περοξειδάσης (APO)

Η μέτρηση της (ειδικής) ενεργότητας της ασκορβικής περοξειδάσης (APO) στα εκχυλίσματα των φύλλων πραγματοποιήθηκε, επίσης, φασματοφωτομετρικά, με βάση το ρυθμό κατανάλωσης του H_2O_2 στην αντίδραση οξειδωσης του ασκορβικού οξέος. (Nakano and Asada, 1981). Το μίγμα αντίδρασης, όγκου 1 ml, περιείχε 50 mM KH_2PO_4 – K_2HPO_4 , pH 7,0, 5 mM ασκορβικό οξύ, 0,1 mM H_2O_2 και ποσότητα εκχυλίσματος, ισοδύναμη με 20 μg συνολικής πρωτεΐνης. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε χαλαζιακές κυβέτες του 1 mL και ο προσδιορισμός της

ταχύτητάς της έγινε με μέτρηση της μεταβολής της OD₂₉₀ στους 25°C, για 2 min. Για κάθε φυτό, πραγματοποιήθηκαν τρεις ανεξάρτητες επαναλήψεις της αντίδρασης. Η μετατροπή της μετρούμενης διαφοράς απορρόφησης σε μονάδες ενζυμικής ενεργότητας έγινε με βάση το μοριακό συντελεστή απορρόφησης, $\epsilon = 2,8 \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ και οι τιμές ανάχθηκαν στο 1 mg πρωτεΐνης (ειδική ενεργότητα).

2.2.4 Μέτρηση της ενεργότητας της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης (GR)

Η μέτρηση της ενεργότητας της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης (GR) στα εκχυλίσματα των φύλλων, βασίστηκε στο φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό του ρυθμού κατανάλωσης του NADPH, στην αντίδραση αναγωγής της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε, κατά τους Foyer και Halliwell (1976), σε τελικό όγκο 1 mL διαλύματος 100 mM Tris-HCl, pH 7,5 1mM EDTA, 1mM GSSG και 0,05 mM NADPH, με την προσθήκη ποσότητας εκχυλίσματος, ισοδύναμης με 20 μg συνολικής πρωτεΐνης. Ο προσδιορισμός της ταχύτητάς της έγινε με μέτρηση της μεταβολής της OD₃₄₀ στους 25°C, για 2 min. Για κάθε φυτό πραγματοποιήθηκαν τρεις ανεξάρτητες επαναλήψεις της αντίδρασης. Η μετατροπή της μετρούμενης διαφοράς απορρόφησης σε μονάδες ενζυμικής ενεργότητας έγινε με βάση το μοριακό συντελεστή απορρόφησης, $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ και οι τιμές ανάχθηκαν στο 1 mg πρωτεΐνης (ειδική ενεργότητα).

2.2.5 Φυσική ηλεκτροφόρηση και χρώση ενεργότητας για την υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Για την ανάλυση των ισοενζύμων της SOD, τα πρωτεϊνικά δείγματα διαχωρίστηκαν με φυσική ηλεκτροφόρηση στους 4°C με το σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων του Davis (Davis, 1964). Για τη διαδικασία αυτή, χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, πάχους 1,5 mm και η συσκευή της. Η πηκτική διαχωρισμού περιείχε 7,5% μίγματος ακρυλαμίδης (ακρυλαμίδη:bis-ακρυλαμίδη, 30:0,2), ενώ η περιεκτικότητα της πηκτής συσσώρευσης σε ακρυλαμίδη ήταν 4%. Σε κάθε πηγάδι της πηκτής φορτώθηκε ποσότητα εκχυλίσματος, ισοδύναμη με 50 μg συνολικής πρωτεΐνης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή τιμή έντασης 15 mA, για την πηκτική συσσώρευσης και 20 mA, για την πηκτική διαχωρισμού,

στους 4°C και διήρκεσε, μέχρι την έξοδο του μετώπου των φυσικών χρωστικών από την πηκτή.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης οι ζώνες με ενεργότητα οπτικοποιήθηκαν με τη μέθοδο των Beauchamp και Fridovitch (1971). Συγκεκριμένα, η πηκτή επωάστηκε σε διάλυμα 50 mM K₂HPO₄-KH₂PO₄, pH 8,0 και 2 mg/mL NBT (μπλε του νιτροτετραζολίου), για 30 min στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια οι πηκτή μεταφέρθηκε σε διάλυμα χρώσης [50 mM K₂HPO₄-KH₂PO₄, pH 8,0, 0,1 mg/mL ριβοφλαβίνη και 0,25% (v/v) TEMED], όπου και παρέμεινε για 20 min στο σκοτάδι. Η εμφάνιση των ζωνών ενεργότητας SOD, έγινε με έκθεση της πηκτής σε “cool white” φωτισμό. Η χρώση, που παράγεται, είναι αρνητική και στηρίζεται στην αναστολή του οξειδωτικού πολυμερισμού του άλατος NBT στις θέσεις κατανάλωσης της O₂⁻ ρίζας.

2.3 ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ

Στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, που συντηρήθηκαν στους -20°C, έγινε ανοσοανίχνευση της καταλάσης, CAT-1, του καπνού με τη χρήση πολυκλωνικού ορού κατά του ίδιου ενζύμου του καπνού, που παρασκευάστηκε από το εργαστήριό μας. Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το σύστημα Laemmli (Laemmli, 1970) και χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Mini Protean II της BioRad. Η περιεκτικότητα της πηκτής διαχωρισμού σε πολυακρυλαμίδη ήταν 7,5% και το πάχος της 1,5 mm. Η μετουσίωση των πρωτεϊνικών δειγμάτων έγινε με την προσθήκη SDS-αποδιατακτικού διαλύματος σε τελική συγκέντρωση 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% (v/v) γλυκερόλη, 2% (w/v) SDS και 5% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλης (Mattoo *et al.*, 1981). Σε κάθε βοθρίο φορτώθηκαν 20-30 μg ολικής πρωτεΐνης. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης ήταν 15 mA για την πηκτή συσσώρευσης και 20 mA για την πηκτή διαχωρισμού.

Για την τεχνική του western blot χρησιμοποιήθηκε η συσκευή μεταφοράς Mini Trans Blot της BioRad και μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0,2 m (Schleicher & Schuell). Η μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Towbin *et al.*, 1979) πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα 25 mM Tris- γλυκίνης, pH 8,3, σε σταθερή τάση 80 V και συνεχίστηκε, μέχρι ότου, η τιμή της έντασης του ρεύματος φθάσει τα 400 mA (περίπου 45 min). Μετά το πέρας της μεταφοράς, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

πλύθηκε σε διάλυμα PBS [0,8% (w/v) NaCl, 0,02% (w/v) KCl, 0,115% (w/v) Na₂HPO₄, 0,02% (w/v) KH₂PO₄] για 10 min και τοποθετήθηκε σε διάλυμα PBS - 5% (w/v) αποβουτυρωμένης σκόνης γάλακτος, όπου και παρέμεινε, υπό ελαφρά ανάδευση, για 1h. Η διαδικασία αυτή μπλοκάρει τις αδέσμευτες θέσεις στην επιφάνεια της μεμβράνης. Ακολούθησε έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα PBS / 0,05% (v/v) Tween-20 (3 φορές για 5 min) και στη συνέχεια, η μεμβράνη επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 2h, με το, ειδικό για την καταλάση του καπνού, αντίσωμα [σε αραιώση 1:2000 (v/v)]. Η αραιώση του αρχικού ορού έγινε σε διάλυμα PBS, 0,05% (v/v) Tween-20 και 1% (w/v) BSA. Κατόπιν, η μεμβράνη ξεπλύθηκε σε διάλυμα PBS - 0,05% (v/v) Tween-20 (3 φορές για 5 min), για να ακολουθήσει η επίδραση του δεύτερου αντισώματος. Το δεύτερο αντίσωμα (anti-Rabbit IgG; Sigma), αναγνωρίζει τη σταθερή περιοχή, Fc, των ανοσοσφαιρινών τάξεως IgG του κουνελιού και φέρει προσαρτημένο το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης. Η επώαση με το δεύτερο αντίσωμα πραγματοποιήθηκε, επίσης, σε θερμοκρασία δωματίου, για 2h και με συνεχή ανακίνηση. Η μεμβράνη ξεπλύθηκε αρχικά με διάλυμα PBS - 0,05% (v/v) Tween-20 (2 φορές για 5 min) και στη συνέχεια με διάλυμα 0,1 M διαιθανολαμίνης (DEA), pH 9,6 (επίσης, 2 φορές για 5 min). Η χρώση της μεμβράνης από τη δράση της αλκαλικής φωσφατάσης στηρίζεται στον οξειδωτικό πολυμερισμό του άλατος του τετραζολίου NBT (μπλε του νιτροτετραζολίου), προς κεραμέρυθρη φορμαζάνη. Το απαιτούμενο οξειδοαναγωγικό δυναμικό προκύπτει από τη μετατροπή του υποστρώματος του ενζύμου, 5-βρώμο-4-χλώρο-3-ίνδοιο φωσφορικού οξέος (BCIP) Το διάλυμα αντίδρασης περιείχε 0,1 M DEA, pH 9,6, 0,01% (w/v) NBT και 1% (w/v) BCIP. Η αντίδραση τερματίστηκε με εμβάπτιση της μεμβράνης σε απιονισμένο ύδωρ.

3. ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΙ ΚΑΤΑ NORTHERN

3.1. Απομόνωση ολικού RNA από φύλλα καπνού

Για την απομόνωση του ολικού RNA από τα φύλλα του καπνού, εφαρμόστηκε η διαδικασία, που αναπτύχθηκε από τους Thompson *et al.* (1983). Χρησιμοποιήθηκαν φυτά στο στάδιο του 6^{ου}-8^{ου} φύλλου, που μεγάλωσαν κάτω από σταθερές συνθήκες φωτισμού, εντάσεως 40 $\mu\text{moles}\cdot\text{photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ και φωτοπεριόδου 16h. Από κάθε

φυτό επιλέχθηκε το 5^ο-6^ο, από τη βάση, φύλλο. Συνοπτικά, 1 g ιστού θρυμματίστηκε μέσα σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια αιωρήθηκε σε 4 mL παγωμένου διαλύματος εκχύλισης* [10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1% (w/v) SDS, 1% τρι-ισοπρόπυλο-ναφθαλινο-σουλφονικό οξύ (TPNS), 4% (w/v) p-αμινοσαλικυλικό οξύ (PAS), 1 mM τρικαρβοξυ-ροσολικό οξύ (ATA) και 0,3 M β-μερκαπτοαιθανόλη]. Ακολούθησε προσθήκη ίσου όγκου μίγματος φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) και άμεση ομογενοποίηση στις 20000 rpm για 2 min (Ultra Turax). Το παχύρρευστο μίγμα, που σχηματίστηκε, φυγοκεντρήθηκε στις 5000 rpm για 10 min στους 4°C και συλλέχθηκε η υπερκείμενη, υδατική φάση. Στην τελευταία προστέθηκαν LiCl και ATA σε τελικές συγκεντρώσεις 2 M και 1 mM, αντίστοιχα. και το διάλυμα παρέμεινε στον πάγο, για 24h. Το RNA κατακρημνίστηκε, με φυγοκέντρηση στις 5000 rpm, για 20 min στους 4°C και η πελλέτα επαναδιαλύθηκε σε 1 mL διαλύματος 50 μM ATA. Στη συνέχεια προστέθηκε LiCl σε τελική συγκέντρωση 1 M και το διάλυμα μεταφέρθηκε στον πάγο, όπου και παρέμεινε για άλλες 24h. Την τρίτη ημέρα το RNA συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση (5000 rpm, για 20 min στους 4°C) και η πελλέτα επαναδιαλύθηκε σε 200 μL διαλύματος 50 μM ATA. Κατόπιν, προστέθηκαν οξικό αμμώνιο, σε τελική συγκέντρωση 0,8 M και τριπλάσιος όγκος καθαρής αιθανόλης. Το διάλυμα παρέμεινε για 1h στους -20°C και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 12000 rpm, για 30 min στους 4°C. Η πελλέτα του RNA διαλύθηκε, τελικά, σε 100 μL διαλύματος 50 μM ATA και πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφορετικός έλεγχος της ποιότητάς του σε gel 1% TBE-αγαρόζης. Τέλος, έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσής του, με μέτρηση της OD₂₆₀ και τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -80°C, μέχρι τη χρήση τους.

* Όλα τα υδατικά διαλύματα, που χρησιμοποιήθηκαν, παρασκευάστηκαν με DEPC-κατεργασμένο ύδωρ.

3.2. Ηλεκτροφορετική ανάλυση του RNA

Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων του RNA πραγματοποιήθηκε σε αποδιατακτικό gel 1% αγαρόζης [20 mM MOPS, 5 mM οξικό νάτριο, 1 mM EDTA, pH 7,0, 1,8% (w/w) φορμαλδεύδη], διαστάσεων 11 x 14 cm. Είχε προηγηθεί ποσοτική αντιστάθμιση των δειγμάτων με βάση την ποσότητα του ριβοσωμικού RNA, όπως αυτό οπτικοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε gel 1% TBE-αγαρόζης και

χρώση αιθιδίου. Για την προετοιμασία των δειγμάτων, 20 µg RNA αναμείχθηκαν με τριπλάσιο όγκο διαλύματος κατεργασίας [26 mM MOPS, 6,5 mM οξικό νάτριο, 1,3 mM EDTA, pH 7,0, 23% (v/v) φορμαλδεύδη και 66% (v/v) φορμαμίδιο] και παρέμειναν στους 65°C για 15 min. Στη συνέχεια ψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και συμπληρώθηκαν με 2 µL loading buffer [50% (v/v) γλυκερόλη, 1 mM EDTA, pH 8,0, 0,25% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης και 0,25% (w/v) κυανό του ξυλένιου]. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 30 V, για 18h. Ακολούθησε έκπλυση του gel με DEPC-ύδωρ, για 30 min, προκειμένου να απομακρυνθεί η φορμαλδεύδη.

Για τη μεταφορά του RNA σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εφαρμόστηκε η διαδικασία, που περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 4.5, με μοναδική απόκλιση, την παράλειψη του σταδίου της αλκαλικής υδρόλυσης του RNA. Η σύνθεση του ραδιενεργού ανιχνευτή και ο υβριδισμός του με τη μεμβράνη πραγματοποιήθηκαν, όπως ακριβώς και στην περίπτωση των υβριδισμών κατά Southern (παράγραφοι 4.5 και 4.6).

4. ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΙ ΚΑΤΑ SOUTHERN

4.1. 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 φύλλου από κάθε φυτό κονιοροποιήθηκε, με λειοτρίβηση παρουσία υγρού αζώτου και η λεπτή σκόνη, που σχηματίστηκε, αιωρήθηκε σε 15 mL διαλύματος εκχύλισης (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM β-μερκαπτοαιθανόλη). Ακολούθησε προσθήκη 1 mL διαλύματος 20% SDS και, μετά από ήπια ανάδευση, το αιώρημα επώαστηκε 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 πελλέτα υπόλευκου χρώματος και επαναδιαλύθηκε σε 400 μL ρυθμιστικού διαλύματος TE (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA). Η διαδικασία συνεχίστηκε με την προσθήκη 400 μL διαλύματος 2% CTAB [200 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA, 2 M NaCl και 2%(w/v) βρωμιούχο σετριμόνιο] και επώαση στους 65°C για 15 min. Ακολούθησε σχολαστική ανάμιξη με ίσο όγκο διαλύματος φαινόλης–χλωροφορμίου–ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1), συλλογή της υδατικής φάσης και κατακρήμνιση του DNA, με την προσθήκη υποδεκαπλάσιου όγκου διαλύματος 3 M οξικού νατρίου, pH 5,4, διπλάσιου όγκου 100% αιθανόλης και φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 15 min στους 4°C . Η πελλέτα ξεπλύθηκε σε 70% αιθανόλη και επαναδιαλύθηκε σε 100 μL διαλύματος TE. Η συγκέντρωση του DNA προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά, με μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους 4°C .

4.2. Πέψη του γενωμικού DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Από κάθε γενότυπο λήφθηκαν 20 μg γενωμικού DNA και λυοφιλοποιήθηκαν. Στη συνέχεια επαναδιαλύθηκαν μέσα σε 50 μL του διαλύματος αντίδρασης της ενδονουκλεάσης περιορισμού και παρέμειναν στους 4°C για 16h, ώστε να δημιουργηθεί το απαραίτητο ιοντικό μικροπεριβάλλον γύρω από όλες τις θέσεις αναγνώρισης. Κατόπιν, σε κάθε δείγμα προστέθηκε πενταπλάσια ενεργότητα ενζύμου (100 U), σε σχέση με την ελάχιστη προτεινόμενη από την προμηθεύτρια εταιρεία (Gibco BRL, Minotech) και με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου, έγινε ήπια ανάδευση του διαλύματος. Η πέψη διήρκεσε 16h στους 37°C και με το πέρας αυτής, προστέθηκε, εκ νέου, ποσότητα ενζύμου, ισοδύναμη με 50 U, για να ακολουθήσει μια συντομότερη περίοδος επώασης. Από κάθε δείγμα αφαιρέθηκαν 5 μL , προκειμένου να ελεγχθεί ηλεκτροφορητικά το αποτέλεσμα σε 0,8% gel TAE-αγαρόζης. Για να πιστοποιηθεί η ενσωμάτωση του διαγονιδίου, πραγματοποιήθηκε πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού *EcoRI* (Gibco BRL) ενώ, για να προσδιοριστεί ο αριθμός των ενσωματωθέντων αντιγράφων αυτού, χρησιμοποιήθηκαν οι ενδονουκλεάσες *SacI* και *XbaI* (Minotech).

4.3. Μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Τα προϊόντα της πέψης λυοφιλοποιήθηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε 25 μL loading buffer [0.25% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% (w/v) κυανό του ξυλένιου, 30% (v/v) γλυκερόλης]. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε 0.8% gel TBE-αγαρόζης (11cm \times 14cm) στα 28 V και συνεχίστηκε μέχρι την έξοδο του μετώπου της πρώτης χρωστικής (μπλε της βρωμοφαινόλης) από το gel (περίπου 18 h). Ακολούθησε κατεργασία του gel με διάλυμα 0,25 N HCl, για 10 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαδικασία αυτή οδηγεί στην αποπουρίνωση του DNA. Κατόπιν, το gel βυθίστηκε σε διάλυμα 0,4 N NaOH / 0,6 M NaCl για 30 min. Η επίδραση του αλκαλικού pH οδηγεί σε θραύση των φωσφοδιεστερικών δεσμών στις θέσεις αποπουρίνωσης. Η κατάτμηση του DNA ευνοεί τη μετακίνηση μεγαλύτερων κομματιών από το gel προς τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στην επόμενη φάση. Τέλος, η ρύθμιση του pH στο gel έγινε με παραμονή του σε διάλυμα 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5, 1,5 M NaCl, για 45 min.

Η μεταφορά των μορίων του DNA από το gel αγαρόζης στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης έγινε με τη δημιουργία τριχοειδούς ροής διαλύματος αλάτων x10 SSC (3 M NaCl, 0,3 M κιτρικό νάτριο, pH 7,0) προς τη συγκεκριμένη κατεύθυνση (Southern, 1975). Η μεταφορά ολοκληρώθηκε μετά από 24 h, ενώ στο ενδιάμεσο διάστημα το διηθητικό χαρτί ανανεώθηκε αρκετές φορές, ώστε να διατηρηθεί η απαραίτητη διαφορά υδατικού δυναμικού. Κατόπιν, η μεμβράνη ξεπλύθηκε από τα υπολείμματα αγαρόζης με διάλυμα 2x SSC και αφέθηκε να στεγνώσει. Η σταθεροποίηση των μορίων του DNA (fixing) στη μεμβράνη επιτεύχθηκε με την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας, ισχύος 0,12 Joules $\cdot\text{cm}^{-2}$ (Stratalinker, Stratagene), για 30 sec. Οι μεμβράνες φυλάχτηκαν σε άνυδρο περιβάλλον, μέχρι τον υβριδισμό τους με το ραδιενεργό ανιχνευτή.

4.4. Παρασκευή του ραδιενεργού ανιχνευτή

Η σύνθεση του ραδιενεργού ανιχνευτή (probe), έγινε με την πολυμεριστική δράση του τμήματος Klenow της DNA πολυμεράσης I (Stratagene). Ως μήτρα αντιγραφής (template), χρησιμοποιήθηκε το τμήμα των 1,9 kb του γονιδίου της καταλάσης, όπως αυτό απομονώθηκε από το φορέα pET16b, ύστερα από πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRI και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε

0.8% gel TAE-αγαρόζης. Ο καθαρισμός του τμήματος των 1,9 kb από το gel έγινε με χρήση του συστήματος ηλεκτροέκλουσης Quick Pik της Stratagene, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας. Ως αρχικά τμήματα (primers), χρησιμοποιήθηκαν τυχαία εξανουκλεοτίδια (Amersham), ενώ η ραδιενεργή σήμανση του προϊόντος έγινε με την προσθήκη νουκλεοτιδίων [γ - 32 P] αδενίνης και κυτοσίνης στο μίγμα της αντίδρασης. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25 μ L με την ανάμιξη 7,5 μ L DNA template (100 ng), 11,5 μ L διαλύματος 2x LS, 1 μ L BSA (10 mg/ml), 1 μ L πολυμεράσης Klenow (5 U/ μ L) και 2 μ L από τα σημασμένα νουκλεοτίδια [γ - 32 P]dCTP και [γ - 32 P]dATP (10 mCi/mL). Η σύσταση του διαλύματος 2x LS ήταν η παρακάτω:

<i>2x LS:</i>	1 M HEPES, pH 6,6 : DTM : OL (25:25:7)
<i>DTM:</i>	250 mM Tris-HCl, pH 8,0, 25 mM MgCl ₂ , 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 0,1 mM dGTP, 0,1 mM dTTP
<i>OL:</i>	1 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1mM EDTA, pH 8,0, 90 U/ mL τυχαία εξαμερή

Λίγο πριν την ανάμιξη των συστατικών της αντίδρασης, το DNA υποβλήθηκε σε πεντάλεπτο βρασμό και κατόπιν μεταφέρθηκε αμέσως στον πάγο, ώστε να περιέλθει και να παραμείνει σε μονόκλωνη κατάσταση. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 1h. Ακολούθησε η κλασμάτωση των προϊόντων του πολυμερισμού σε στήλη Sephadex G-50 (Pharmacia). Η ποιότητα του ανιχνευτή ελέγχθηκε με τη μέτρηση των ραδιενεργών κρούσεων σε μετρητή σπινθηρισμού (LS 8000, Beckman).

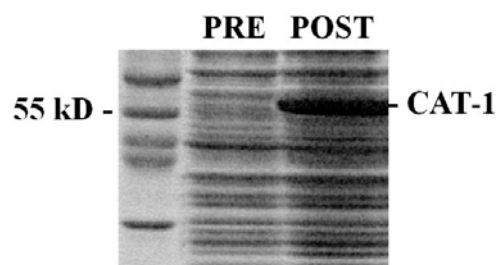
4.5. Υβριδισμός των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης με τον ραδιενεργό ανιχνευτή

Οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης τυλίχθηκαν και τοποθετήθηκαν σε γυάλινους κυλίνδρους υβριδισμού (Hybaid). Σε κάθε κύλινδρο προστέθηκαν 15 mL διαλύματος υβριδισμού [500 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ pH 7,2, 7% (w/v) SDS, 1% (w/v) BSA, 1 mM EDTA, pH 8,0] (Church and Gilbert, 1984), που είχε προηγουμένως θερμανθεί στους 60°C και οι κύλινδροι τοποθετήθηκαν σε φούρνο υβριδισμού (Hybaid), όπου και παρέμειναν, για τουλάχιστον 1h στην αυτή θερμοκρασία. Μετά το πέρας της διαδικασίας του προϋβριδισμού, σε κάθε κύλινδρο προστέθηκαν 15 mL διαλύματος

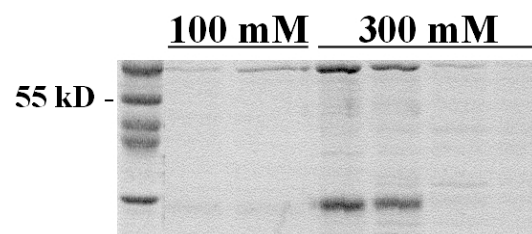
υβριδισμού (60°C), που περιείχε, επιπλέον, το ραδιενεργό ανιχνευτή. Λίγο πριν την ανάμιξη του ανιχνευτή με το διάλυμα υβριδισμού, είχε προηγηθεί πεντάλεπτος βρασμός του πρώτου, ώστε να εξασφαλιστεί η μονόκλωνη κατάσταση των μορίων του. Ο υβριδισμός του ανιχνευτή με τις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 60°C και διήρκεσε περίπου 18h. Ακολούθησε η έκπλυση των μεμβρανών με διάλυμα 0.1% SDS / 2x SSC, για 15 min στους 60°C. Οι πλύσεις επαναλήφθηκαν, μέχρι την απομάκρυνση της περίσσειας των αδέσμευτων μορίων του ανιχνευτή από τις μεμβράνες. Τέλος, οι μεμβράνες τοποθετήθηκαν σε μεταλλικές κασέτες έκθεσης με film αυτοραδιογραφίας (Kodak Scientific Imaging Film: X-OMAT/AR 35x40 cm) και παρέμειναν στους -80°C για 1, 3 και 7 ημέρες, διαδοχικά. Η εμφάνιση του film πραγματοποιήθηκε με το αυτοματοποιημένο σύστημα Curex 60 της Agfa.

1.1. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ CAT1 ΣΕ ΚΟΛΩΝΑ Ni-NTA ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η απομόνωση της υβριδικής πρωτεΐνης στηρίζεται στην εκλεκτική δέσμευσή της από το υλικό διαχωρισμού της στήλης. Ο επίτοπος των συνεχόμενων ιστιδινών σχηματίζει ένα είδος «μοριακής άγκυρας», που καθηλώνει την πρωτεΐνη στα μικροσφαιρίδια της αγαρόζης. Αντίστοιχα, για την έκλυση της πρωτεΐνης από τη στήλη αξιοποιείται, επίσης, η ιδιότητά του ιμιδαζολικού δακτυλίου να σχηματίζει χημικά σύμπλοκα με τα ιόντα του νικελίου και πραγματοποιείται σε υψηλές συγκεντρώσεις ιμιδαζόλης. Το μόριο της τελευταίας, λόγω του μικρότερου μεγέθους του, προκαλεί τον ανταγωνιστικό εκτοπισμό της πρωτεΐνης από τη στήλη.

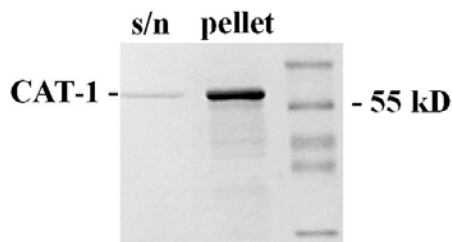


Εικ.1.1. Ηλεκτροφορετικός έλεγχος της παραγωγής της CAT1, πριν (pre) και 3h μετά (post) την προσθήκη του επαγωγέα., σε 8% SDS-PAGE



Εικ.1.2. Ηλεκτροφορετική ανάλυση των κλασμάτων έκλυσης της στήλης Ni-NTA στα 100 mM και τα 300 mM ιμιδαζόλης, σε 8% SDS-PAGE

Η πρώτη προσπάθεια καθαρισμού της υβριδικής CAT1 σε κολώνα Ni-NTA αγαρόζης δεν έφερε το αναμενόμενο αποτέλεσμα. Συγκεκριμένα, ενώ πιστοποιήθηκε η παραγωγή της πρωτεΐνης από τα βακτηριακά κύτταρα, τρεις ώρες μετά την προσθήκη του επαγωγέα (Εικ.1.1), διαπιστώθηκε η πλήρης απουσία αυτής από όλα τα κλάσματα της έκλυσης, περιλαμβανόμενου του αρχικού όγκου εκκροής (Εικ. 1.2). Το γεγονός αυτό οδήγησε στην αναζήτηση της πρωτεΐνης, τόσο στην υπερκείμενη φάση όσο και στο ίζημα, που σχηματίζονται μετά από τη λύση της βακτηριακής καλλιέργειας και τη φυγοκέντρηση του κυτταρικού εκχυλίσματος. Όπως έγινε αντιληπτό (Εικ. 1.3), η παραχθείσα πρωτεΐνη, αν και διαλυτή στη φυσιολογική της μορφή, συγκεντρώθηκε σχεδόν αποκλειστικά στην αδιάλυτη φάση.



Εικ.1.3. Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών στο υπερκείμενο (s/n) και την πελλέτα (pellet), σε 8% SDS-PAGE

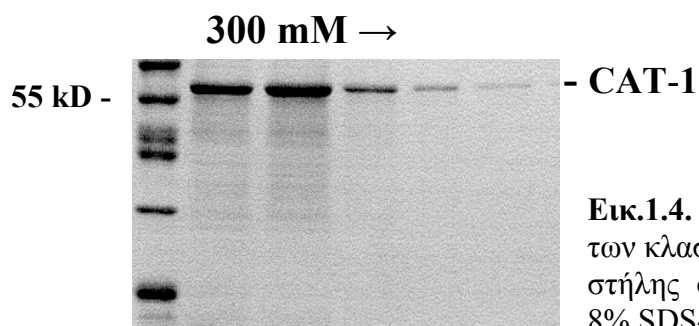
Το φαινόμενο αυτό δεν είναι πρωτόγνωρο στην τεχνολογία παραγωγής πρωτεϊνών ευκαρυωτικής προέλευσης σε βακτήρια και αποδίδεται στην απουσία κατάλληλων κυτταρικών μηχανισμών, που να υποστηρίζουν την ορθή αναδίπλωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας στο χώρο. Επιπλέον, έχει καταγραφεί σε πολλές περιπτώσεις ότι η ραγδαία και συνάμα μαζική παραγωγή κάποιου γονιδιακού προϊόντος στα κατά Graham αρνητικά βακτήρια, όπως είναι το *E. coli*, επιφέρει τη συσσώρευση της παραγόμενης πρωτεΐνης σε αμέμβρανους κυτοπλασμικούς σχηματισμούς (inclusion bodies). Μέσα σε αυτούς, η πρωτεΐνη βρίσκεται σε ποικίλες καταστάσεις αναδίπλωσης, που πιθανότατα αντιπροσωπεύουν ενδιάμεσες της τελικής διαμορφώσεις (Mitraki and King, 1989).

Η κατεργασία των κυττάρων, που απομακρύνθηκαν από την καλλιέργεια κατά τη δειγματοληψία ελέγχου, με διάλυμα 2% SDS και βρασμό, προκάλεσε την επαναφορά της πρωτεΐνης στη διαλυτή κατάσταση. Αντίθετα, η λύση των κυττάρων της καλλιέργειας με υπέρηχους και η απουσία μετουσιωτικών παραγόντων στο περιβάλλον μέσο, δεν ελευθέρωσαν την πρωτεΐνη από τις ενδοκυτταρικές αποθέσεις της, με αποτέλεσμα αυτή να παραμένει παγιδευμένη στο ίζημα των κυτταρικών υπολειμμάτων.

Έχει παρατηρηθεί ότι, σε αρκετές περιπτώσεις, οι χαμηλές θερμοκρασίες και οι ήπιες συνθήκες επαγωγής ευνοούν γενικά τη σύνθεση πρωτεϊνών με φυσιολογική διαμόρφωση (Korpetzki *et al.*, 1989; Schein, 1989). Έτσι, η παραγωγή της CAT1 επαναλήφθηκε σε χαμηλότερη θερμοκρασία (25°C) και με την προσθήκη μικρότερης ποσότητας του επαγωγέα IPTG (τελική συγκέντρωση 100 μM). Ωστόσο, ούτε οι χειρισμοί αυτοί ελευθέρωσαν την παραγόμενη πρωτεΐνη από τις αδιάλυτες συμπυκνώσεις.

Τελικά, η παραλαβή της CAT1 από το ίζημα των κυτταρικών υπολειμμάτων έγινε με κατεργασία του ιζήματος με διάλυμα 8 M ουρίας. Η τελευταία σε υψηλές συγκεντρώσεις αποτελεί ισχυρό χαιοτροπικό παράγοντα, που με τη δράση του επιφέρει τη διαλυτοποίηση της πρωτεΐνης. Παράλληλα, δείχθηκε ότι η παρουσία της ουρίας στο διάλυμα δεν επηρεάζει την ικανότητα δέσμευσης του επίτοπου των

ιστιδινών στα ιόντα νικελίου. Έτσι, ο καθαρισμός της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε άμεσα σε στήλη Ni-NTA αραρόζης. Μετά τη σταδιακή απομάκρυνση της ουρίας από το περιβάλλον της στήλης, η έκλυση της πρωτεΐνης έγινε με αύξηση της συγκέντρωσης της ιμιδαζόλης στα 300 mM, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.4.



Εικ.1.4. Ηλεκτροφορητική ανάλυση των κλασμάτων έκλυσης της Ni-NTA στήλης στα 300 mM ιμιδαζόλης, σε 8% SDS-PAGE

Η διαμόρφωση του μορίου της εκλουόμενης πρωτεΐνης, δεν αποτέλεσε αντικείμενο προβληματισμού, επειδή οι δραστικές συνθήκες παρασκευής του εμβολίου (γαλακτοματοποίηση με χρήση υπέρηχων υψηλής συχνότητας) καταστρέφουν, ούτως ή άλλως, την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών. Τέλος, η επίδραση του πρωτεολυτικού παράγοντα Χα για την αφαίρεση του επίτοπου των ιστιδινών δεν κρίθηκε αναγκαία, επειδή όλες οι βιβλιογραφικές πληροφορίες υποστηρίζουν ότι οι συνεχόμενες ιστιδίνες εκδηλώνουν ασθενή ανοσογόνο δράση.

1.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΣ CAT1

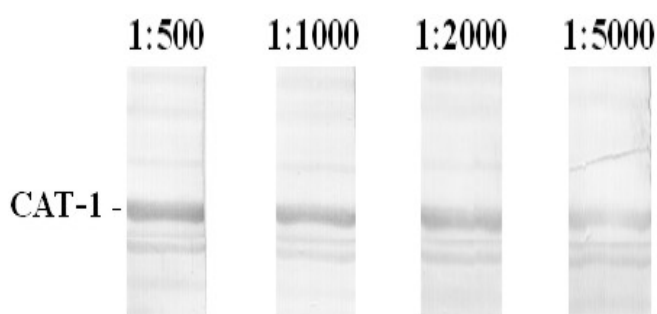
Η επιλογή των κουνελιών για την παραγωγή αντισωμάτων παρουσιάζει πληθώρα πλεονεκτημάτων, που αφορούν τόσο το πρακτικό μέρος των ανοσοποιήσεων όσο και το τελικό αποτέλεσμα αυτών. Ανάμεσα στα σημαντικότερα περιλαμβάνονται ο εύκολος χειρισμός των πειραματόζωων, η δυνατότητα τακτικής αιμοληψίας, ο σχετικά μεγάλος όγκος αίματος, που μπορεί να αφαιρεθεί ακίνδυνα από το ζώο και η προοπτική βελτίωσης της ειδίκευσης του ορού, μέσα από ένα μακροπρόθεσμο πρόγραμμα ανοσοποιήσεων. Από την άλλη πλευρά, η απουσία ομομεικτικών σειρών στο είδος συνιστά, ίσως, το σοβαρότερο μειονέκτημα. Αυτή η έλλειψη αυτή γενετικής ομοιομορφίας επηρεάζει, ενίοτε, το αποτέλεσμα των ανοσοποιήσεων, γεγονός που διαπιστώθηκε και στη συγκεκριμένη περίπτωση.

Για την παραγωγή αντισωμάτων κατά της CAT1 επιλέχθηκαν δύο διαφορετικοί γενότυποι. Πριν από την έναρξη των ανοσοποιήσεων έγινε δοκιμαστική αιμοληψία, προκειμένου να ελεγχθεί η πιθανότητα ύπαρξης φυσικών αντισωμάτων κατά της καταλάσης. Το αποτέλεσμα ήταν αρνητικό για αμφότερα τα πειραματόζωα και έτσι υποβλήθηκαν στον πρώτο εμβολιασμό. Η χορήγηση του αντιγόνου έγινε υποδορίως και ενδομυϊκώς με στόχο την έναρξη της ανοσολογικής αντίδρασης από τους περιφερειακούς λεμφαδένες. Για την αποτελεσματική κινητοποίηση του ανοσοποιητικού μηχανισμού, χρησιμοποιήθηκε το ενισχυτικό του Freund. Το τελευταίο είναι ένα σύνθετο μέσο για τη μεγιστοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης και αποτελείται από μίγμα μη αποδομήσιμων ελαίων παραφίνης και νεκρά μυκοβακτήρια. Τα μυκήλια, που σχηματίζονται μετά την γαλακτοματοποίηση με το υδατικό διάλυμα του αντιγόνου, εξασφαλίζουν την αργή απελευθέρωση του αντιγόνου στον οργανισμό και την παρατεταμένη έκθεση των κυττάρων APC σ' αυτό.

Η παραγωγή ειδικών, για το αντιγόνο που ενύεται, αντισωμάτων κορυφώνεται στις δέκα με δεκατέσσερις μέρες μετά τη διανομή του εμβολίου. Η ελάχιστη χρονική απόσταση, που τηρήθηκε μεταξύ των διαδοχικών ανοσοποιήσεων, ήταν σαράντα μέρες, επειδή τα επίπεδα των ειδικών αντισωμάτων στον ορό του ζώου εξακολουθούν να παραμένουν ανασταλτικά, για τη χορήγηση νέας ποσότητας αντιγόνου, ακόμα και ένα μήνα μετά την ανοσοποίηση.

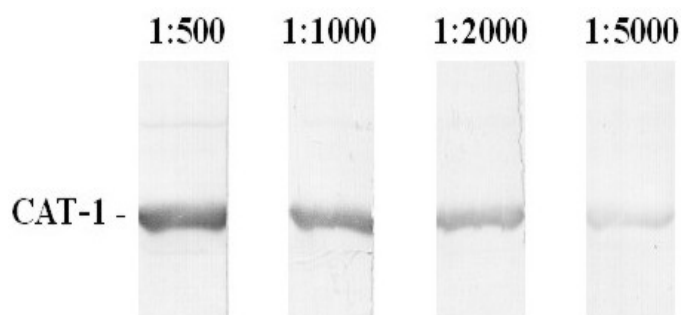
Το αποτέλεσμα της πρώτης ανοσοποίησης (πρωτογενής ανοσολογική απόκριση) δεν ελέγχθηκε άμεσα, επειδή τα ειδικά αντισώματα που παράγονται

ανήκουν, ούτως ή άλλως, στην τάξη των IgM ανοσοσφαιρινών και ο τίτλος τους είναι, σχετικά, χαμηλός. Έντεκα μέρες μετά τη δεύτερη ανοσοποίηση, πραγματοποιήθηκε ο πρώτος έλεγχος (Εικ.2.1). Για την αναγνώριση της θέσης της καταλάσης (57 kD) στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης χρησιμοποιήθηκε τόσο η θέση της μεγάλης υπομονάδας της Rubisco (55 kD) όσο και ορός, που αναγνωρίζει το ομόλογο ένζυμο στην τομάτα (*Lycopersicon esculentum*). Από τον έλεγχο προέκυψε ότι μόνο το κουνέλι No2 αποκρίθηκε στον εμβολιασμό. Ο τίτλος των αντισωμάτων στον ορό ήταν ικανοποιητικός, με εμφανή αντίδραση σε αραιώση 1:2000. Ωστόσο, η παρουσία έντονης μη ειδικής αναγνώρισης επέβαλε την απόρριψη του δείγματος του ορού. Ο «θόρυβος» που εμφανίστηκε, ερμηνεύτηκε ως γενικότερη αναστάτωση του ανοσοποιητικού συστήματος του ζώου, πιθανώς οφειλόμενη σε κάποια λοίμωξη. Για το λόγο αυτό, το κουνέλι No2 αποσύρθηκε από τους εμβολιασμούς.



Εικ.2.1. Ανοσοεντοπισμός της CAT1 από αντισώματα του ορού, που λήφθηκε από το κουνέλι No 2, έντεκα ημέρες μετά τη δεύτερη ανοσοποίηση. Χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις 1:500, 1:1000, 1:2000 και 1:5000 του αυθεντικού ορού

Αντίθετα, το κουνέλι No 1 παρουσίασε μια αργοπορημένη απόκριση στις μεταχειρίσεις. Ύστερα από δύο ανεπιτυχείς εμβολιασμούς, η τρίτη επανάληψη προκάλεσε διέγερση της παραγωγής ειδικών αντισωμάτων στο πειραματόζωο. Το αποτέλεσμα της τρίτης ανοσοποίησης στο κουνέλι No 1 παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.2.



Εικ.2.2. Ανίχνευση της CAT1 από αντισώματα του ορού, που λήφθηκε από το κουνέλι No 1, έντεκα ημέρες μετά από την τρίτη ανοσοποίηση. Οι αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν 1:500, 1:1000, 1:2000 και 1:5000

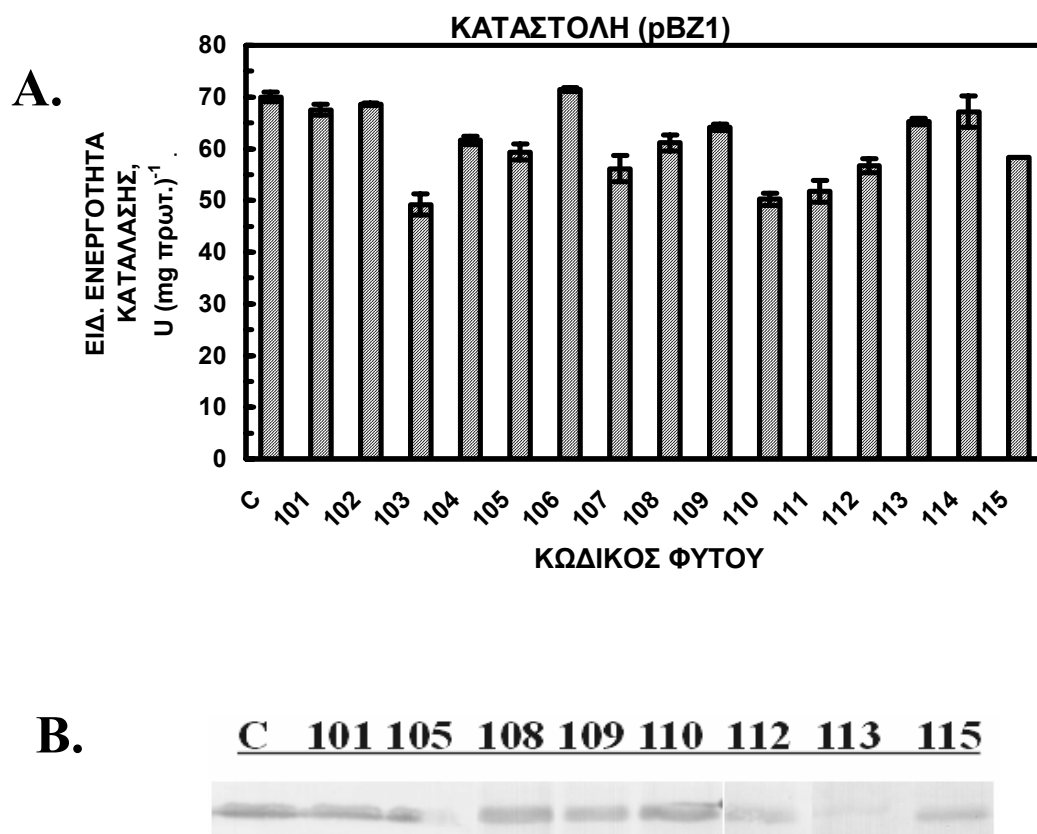
2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΩΝ ΣΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΦΥΤΑ

2.1. Μέτρηση της ενεργότητας της καταλάσης στα γενετικά τροποποιημένα φυτά

Οι μετρήσεις της ενζυμικής ενεργότητας της καταλάσης σε γενετικά τροποποιημένα φυτά και φυτά - μάρτυρες πραγματοποιήθηκαν στο ίδιο περίπου αναπτυξιακό στάδιο και πριν ακόμα τα φυτά απομακρυνθούν από το θάλαμο σταθερών συνθηκών, προκειμένου να εξασφαλισθεί η ομοιομορφία. Τα φυτά, που έχουν μεταμορφωθεί με το construct pBZ1 αριθμούνται ως 101, 102, ..., 115, εκείνα που μεταμορφώθηκαν με το construct pBZ2 αριθμούνται ως 201, 202, ..., 212, ενώ για τα φυτά, στη γενετική τροποποίηση των οποίων χρησιμοποιήθηκε το construct pCAT1AS, η αρίθμηση αρχίζει από το 301 και τελειώνει στο 323. Τα constructs pBZ1 και pCAT1AS περιέχουν τμήματα του γονιδίου της ομόλογης καταλάσης από τα συγγενή του καπνού φυτά, *N. sylvestris* και *N. plumbaginifolia*, αντίστοιχα, σε antisense προσανατολισμό και υπό τον έλεγχο ισχυρού υποκινητή (35S CaMV), ώστε να επιφέρουν την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Από την άλλη πλευρά, το construct pBZ2 περιέχει τον πλήρη cDNA κλώνο της CAT1 του καπνού (*N. tabacum*), υπό τον έλεγχο του ίδιου υποκινητή, αλλά σε sense προσανατολισμό, προκειμένου να προκαλέσει την υπερέκφραση του γονιδίου.

Η εξέταση, συνολικά, 15 φυτών τροποποιημένων με το construct pBZ1, 12 φυτών για το pBZ2 και 23 φυτών για το pCAT1AS, δεν αποκάλυψε θεαματικές αλλαγές στην ενεργότητα της καταλάσης. Αναλυτικότερα, ανάμεσα στους 15 γενοτύπους, που αποτελούν τον πληθυσμό των φυτών pBZ1, το μέγιστο της καταστολής που μετρήθηκε ($103: 49.168 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$) υπολογίζεται περίπου στο 30% με βάση τις φυσιολογικές τιμές ειδικής ενεργότητας καταλάσης στα φυτά μάρτυρες ($\sim 70 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$). Τα υπόλοιπα φυτά παρουσίασαν μια ήπια, έως αμελητέα, ελάττωση της ενζυμικής ενεργότητας (Εικ. 2.1.A). Ο ανοσοεντοπισμός της καταλάσης, με τον, ειδικό για την πρωτεΐνη, πολυκλωνικό ορό, έδειξε ότι, γενικά, η ενζυμική ενεργότητα συμβαδίζει με την ποσότητα της πρωτεΐνης (Εικ. 2.1.B). Εξαιρέση αποτελούν τα φυτά 112 και 113 στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των οποίων, η ποσότητα της καταλάσης ήταν μόλις ανιχνεύσιμη, αλλά η μετρούμενη ενεργότητα ήταν, σχεδόν, κανονική (112: $56.714 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$, 113: $65.271 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$). Αυτό, ίσως υποδηλώνει ενδεχόμενη μετά-μεταφραστική τροποποίηση της ενεργότητας του ενζύμου. Η

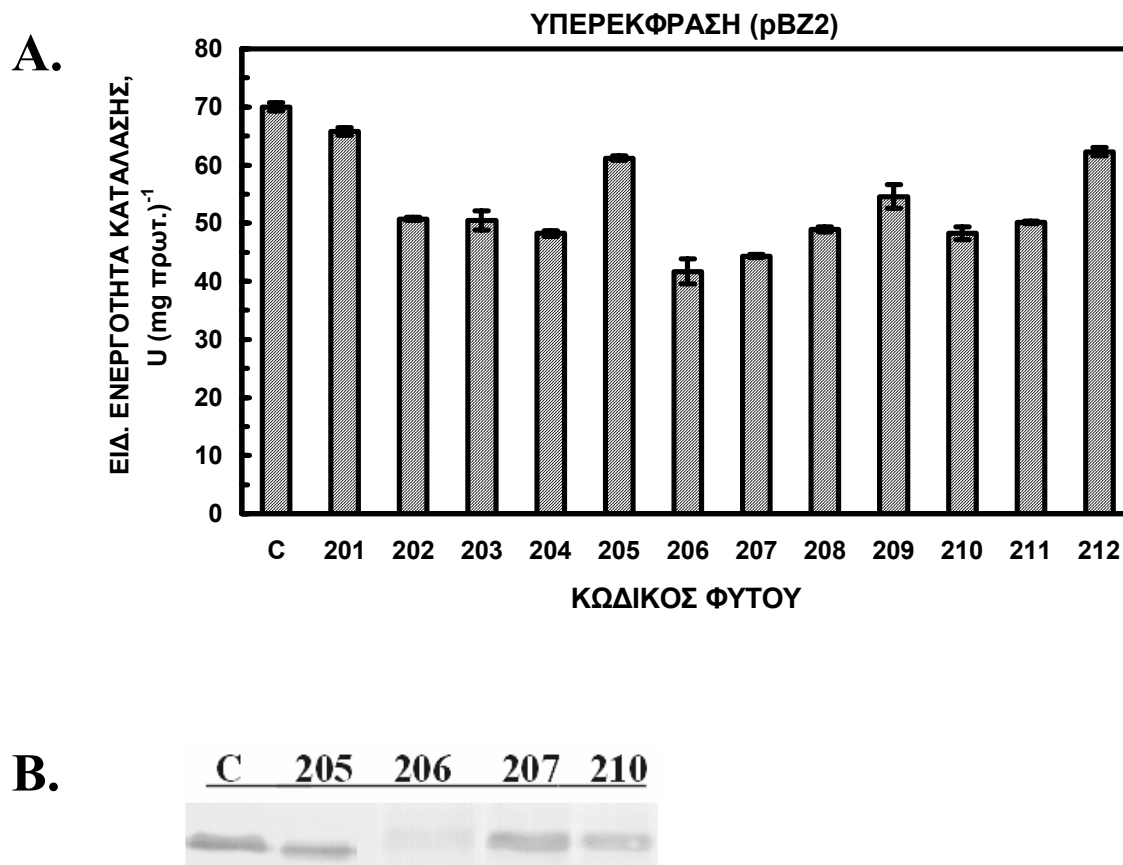
υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι η καταλάση είναι ένα ιδιαίτερα αποτελεσματικό ένζυμο, και μικρές ποσότητες αυτής αρκούν για την προστασία του φυτικού κυττάρου από το H₂O₂, που παράγεται κάτω από συνθήκες χαμηλού φωτισμού (< 100 μmole·photons·m⁻²·sec⁻¹). Μια εναλλακτική εξήγηση είναι ότι για κάποιον άγνωστο λόγο τα, ειδικά για την καταλάση, αντισώματα δεν αναγνωρίζουν την πρωτεΐνη στα συγκεκριμένα φυτικά εκχυλίσματα.



Εικ. 2.1. A. Ειδική ενεργότητα καταλάσης στα φύλλα των pBZ1 σειρών (C:control). B. Ανοσοεντοπισμός της καταλάσης στα αντίστοιχα φυτικά εκχυλίσματα.

εκχυλίσματα. Στον πληθυσμό των pBZ2 σειρών, οι μετρούμενες ενεργότητες καταλάσης κυμάνθηκαν στα όρια του φυσιολογικού, με εξαίρεση το φυτό 206 (41.674 U·mg⁻¹), που παρουσίασε μείωση της ενζυμικής ενεργότητας, κατά 40% (Εικ. 2.2.A και B). Η αποτυχία υπερέκφρασης της καταλάσης στα φυτά αυτά, αποδίδεται στην καταστολή του διαγονιδίου από παράγοντες, που δρουν σε επιγενετικό επίπεδο και αντιμάχονται την ανατροπή της γονιδιακής δόσης, που επιχειρείται να επιβληθεί, με την εισαγωγή ομολόγων αλληλουχιών στο φυτικό γένωμα (Finnegan and McElroy, 1994; Matzke and Matzke, 1995). Τα φαινόμενα της καλούμενης «συγκαταστολής»,

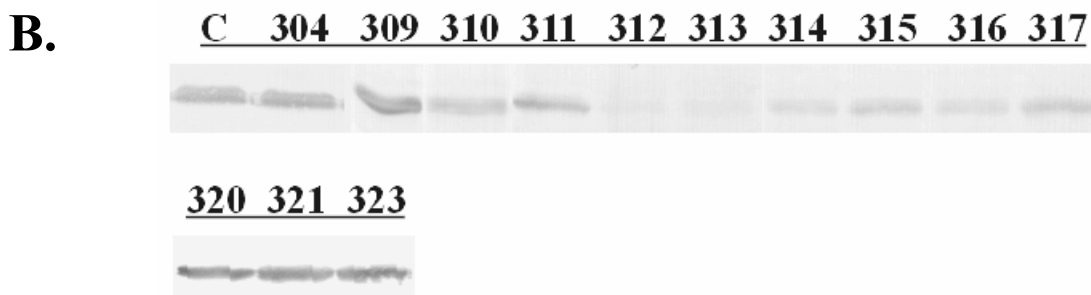
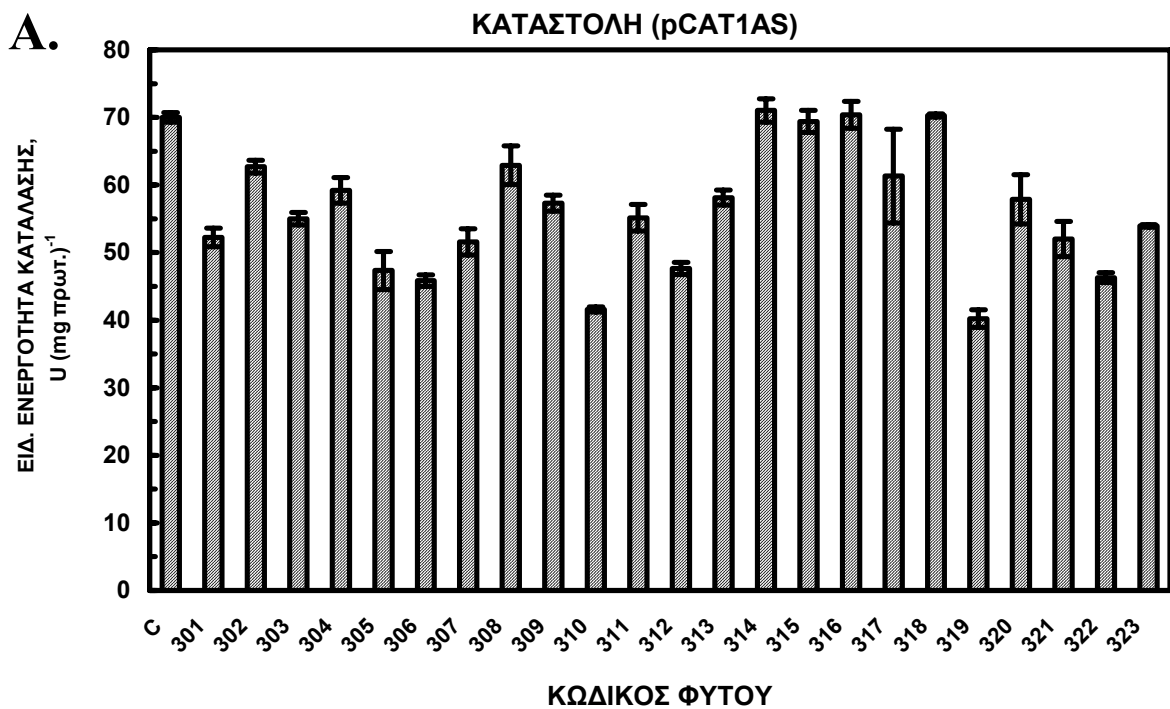
επηρεάζουν αρνητικά την έκφραση και των ενδογενών γονιδίων, οδηγώντας τελικά στο αντίθετο, του επιθυμητού, αποτέλεσμα, όπως, χαρακτηριστικά, συνέβη στην περίπτωση της σειράς 206.



Εικ. 2.2 A. Ειδική ενεργότητα καταλάσης στα φύλλα των pBZ2 σειρών (C:control). **B.** Ανοσοεντοπισμός της καταλάσης στα αντίστοιχα φυτικά εκχυλίσματα.

Όσον αφορά τον πληθυσμό των pCAT1AS φυτών, η εξέταση της ενεργότητας της καταλάσης σε 24 άτομα οδήγησε στην επιλογή δύο σειρών (305: 43,348 U·mg⁻¹ και 310: 41,588 U·mg⁻¹), που διατηρούν το 50-60% της φυσιολογικής ενεργότητας του ενζύμου (Εικ.2.3.A και B). Τα επίπεδα της ενζυμικής πρωτεΐνης στα φυτά του πληθυσμού ήταν, με κάποιες εξαιρέσεις, αντίστοιχα της μετρούμενης ενεργότητας. Ασυμφωνία, ανάμεσα στο επίπεδο της πρωτεΐνης και της αντίστοιχης ενεργότητας, παρουσιάστηκε κυρίως στις σειρές 312 και 313. Τα φυτά που επιλέχθηκαν, δεν παρουσίασαν καμία φαινοτυπική διαφορά από τα φυτά μάρτυρες (μη μεταμορφωμένα). Στην ίδια διαπίστωση οδηγήθηκαν οι Chamnongpol *et al.* (1996), οι οποίοι απέτυχαν να αναγνωρίσουν συμπτώματα οξειδωτικής καταπόνησης σε ΓΤΦ

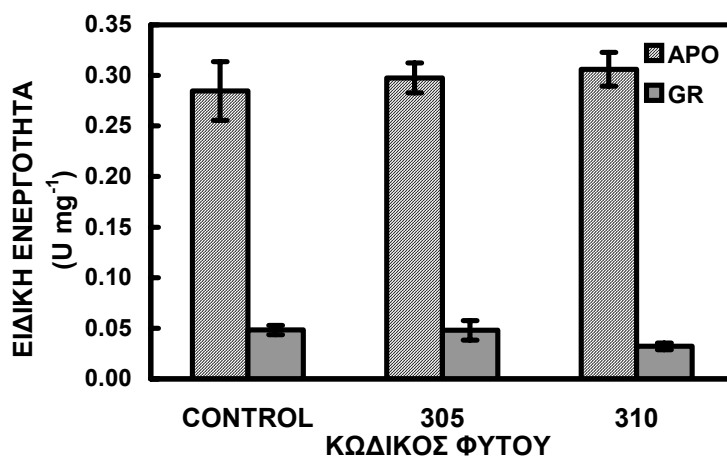
pCAT1AS, που διατηρούσαν μόνο το 20% της κανονικής ενεργότητας καταλάσης στα φύλλα τους, όταν αναπτύσσονταν σε καθεστώς ήπιου φωτισμού. Το γεγονός αυτό οφείλεται πιθανότατα στην ενεργοποίηση άλλων μηχανισμών της αντιοξειδωτικής άμυνας του φυτικού κυττάρου, ενζυμικών και μη, που φαίνεται να αντεπεξέρχονται στο ρόλο τους, όταν ο ρυθμός της φωταναπνοής παραμένει χαμηλός. Δεν αποκλείεται, ωστόσο, η ενεργότητα καταλάσης, που παραμένει στο κύτταρο, να επαρκεί για την εξουδετέρωση του παραγόμενου H₂O₂, κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες.



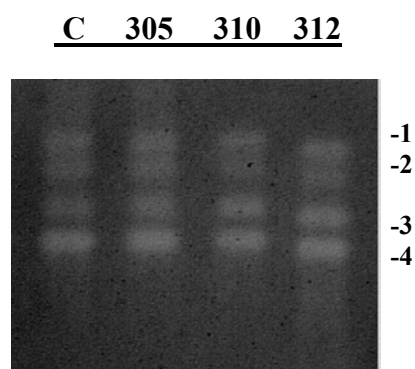
Εικ. 2.3 **A.** Ειδική ενεργότητα καταλάσης στα φύλλα των pCAT1AS σειρών (C:control). **B.** Ανοσοεντοπισμός της καταλάσης στα αντίστοιχα φυτικά εκχυλίσματα.

2.2. Μέτρηση της ειδικής ενεργότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), της ασκορβικής περοξειδάσης (APO) και της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης (GR) στα γενετικά τροποποιημένα φυτά

Για να ελεγχθεί η υπόθεση αν η ενεργότητα καταλάσης, που παραμένει στις επιλεγμένες σειρές, επαρκεί για την προστασία του φυτών από το H₂O₂, που παράγεται σε συνθήκες ήπιου φωτισμού (<100 μmole·photons·m⁻²·sec⁻¹), έγινε προσδιορισμός της ενεργότητας τριών βασικών, αντιοξειδωτικών ενζύμων, της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), της ασκορβικής περοξειδάσης (APO) και της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης (GR) στα εκχυλίσματα των φύλλων τους. Τα ένζυμα αυτά επάγονται, όπως και η καταλάση, σε συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης και είναι αξιόπιστοι δείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων (Scandalios, 1993; Foyer *et al.*, 1994).



Εικ. 2.4. Ειδική ενεργότητα της ασκορβικής περοξειδάσης (APO) και της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης (GR) στα φύλλα των επιλεγμένων σειρών και των μαρτύρων (control).



Εικ.2.5. Χρώση ενεργότητας για τη SOD μετά από φυσική ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών του φύλλου σε πηκτή 7,5% PAGE. Με 1 έως 4 σημειώνονται τα διαφορετικά ισοένζυμα της SOD, που αναγνωρίζονται στα φύλλα των φυτών.

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε κλώνους των επιλεγμένων σειρών, για τους οποίους δείχθηκε ότι εξακολουθούσαν να διατηρούν τα επίπεδα καταστολής της καταλάσης. Τα αποτελέσματα (Εικ. 2.4, 2.5) δεν φανέρωσαν κάποια ουσιαστική διαφορά στις ενεργότητες των τριών ενζύμων, ανάμεσα στα φυτά-μάρτυρες και τις επιλεγμένες σειρές. Συνεπώς, η καταστολή της ενεργότητας της καταλάσης κατά 40% δεν δημιουργεί κάποιο ορατό, φυσιολογικό πρόβλημα στα φυτά, όταν αυτά αναπτύσσονται σε καθεστώς ήπιου φωτισμού

2.3 Συμπεράσματα από τη γενετική τροποποίηση του καπνού, για το γονίδιο της καταλάσης, με *sense* και *antisense* constructs

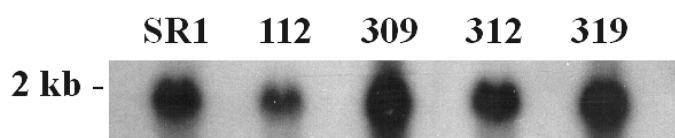
Σύγκριση της αποτελεσματικότητας των δύο *antisense* constructs, που χρησιμοποιήθηκαν για την καταστολή της καταλάσης (pBZ1 και pCAT1AS), έδειξε ότι δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ τους, όσον αφορά το πλήθος των διαφορετικών σειρών, που αναγεννήθηκαν (pBZ1: 15 άτομα έναντι pCAT1AS: 24 άτομα) και το μέσο επίπεδο καταστολής του ενζύμου στους δύο πληθυσμούς (pBZ1: 60.57 U·mg⁻¹ έναντι pCAT1AS: 58.06 U·mg⁻¹).

Από την άλλη πλευρά, η αποτυχία δημιουργίας ΓΤΦ. με αυξημένη ενεργότητα καταλάσης, μπορεί να αποδοθεί στον μικρό αριθμό υποψήφιων σειρών, που δημιουργήθηκαν με το pBZ2 construct. Στην όλη πορεία, από τους φυλλικούς δίσκους μέχρι τα ώριμα φυτά, υπήρξαν σημαντικές απώλειες γενοτύπων (περίπου 30%), οφειλόμενες, κυρίως, σε μολύνσεις των καλλιεργειών και στην αδυναμία πολλών εκφύτων να ριζοβολήσουν, με αποτέλεσμα να ελαττωθεί σημαντικά ο αριθμός των διαθέσιμων φυτών. Είναι, εξάλλου, γνωστό (Finnegan and McElroy, 1994), ότι ο μοναδικός τρόπος για να ηττηθούν οι άγνωστοι μηχανισμοί, που αντιμάχονται την εισβολή και εγκατάσταση του «ξένου» DNA στο φυτικό γονιδίωμα, είναι η αύξηση του πληθυσμιακού μεγέθους των υποψήφιων γενοτύπων.

Τέλος, από την εξέταση της καταλατικής ενεργότητας, της ενζυμικής πρωτεΐνης, αλλά και των μεταγραφημάτων του γονιδίου της καταλάσης (βλ. παρακάτω) σε έναν μεγάλο αριθμό φυτών, προέκυψε ότι το μόνο αξιόπιστο κριτήριο για την αξιολόγηση των επιπέδων καταστολής ή υπερέφρασης της καταλάσης είναι η μέτρηση της καθατής ενζυμικής ενεργότητας.

3. ΚΑΤΑ NORTHERN ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ

Η ανάλυση του επιπέδου των μεταγραφημάτων της καταλάσης, στα φυτά-μάρτυρες και τις επιλεγμένες σειρές, έδειξε ότι υπάρχει μια ασυμφωνία, ανάμεσα στην ποσότητα του mRNA της *CATI* και τη μετρούμενη ενεργότητα καταλάσης. Συγκεκριμένα, η σειρά 310, που επιλέχθηκε, με βάση την ελάττωση της καταλατικής ενεργότητας (<60% της ενεργότητας του μάρτυρα) και τη χαμηλή ποσότητα ενζυμικής πρωτεΐνης στα φύλλα, παρουσίασε μια απρόσμενη συσσώρευση μεταγραφημάτων, που υπερβαίνει ακόμα και εκείνη του μάρτυρα.(Εικ. 3.1). Αντίθετα, οι σειρές 112 και 312, που χαρακτηρίζονται από μειωμένη συγκέντρωση της ενζυμικής πρωτεΐνης, πλην όμως διατηρούν κανονικά επίπεδα καταλατικής ενεργότητας στα φύλλα τους, παρουσίασαν μειωμένη συσσώρευση των μεταγραφημάτων της *CATI*, σε σχέση με τους μάρτυρες. Από την άλλη πλευρά, η σειρά 319 στην ίδια εικόνα, αποτελεί μια περίπτωση απόλυτης σύμπτωσης, ανάμεσα στην καταλατική ενεργότητα, την ποσότητα της πρωτεΐνης και του επιπέδου των μεταγραφημάτων της *CATI*.



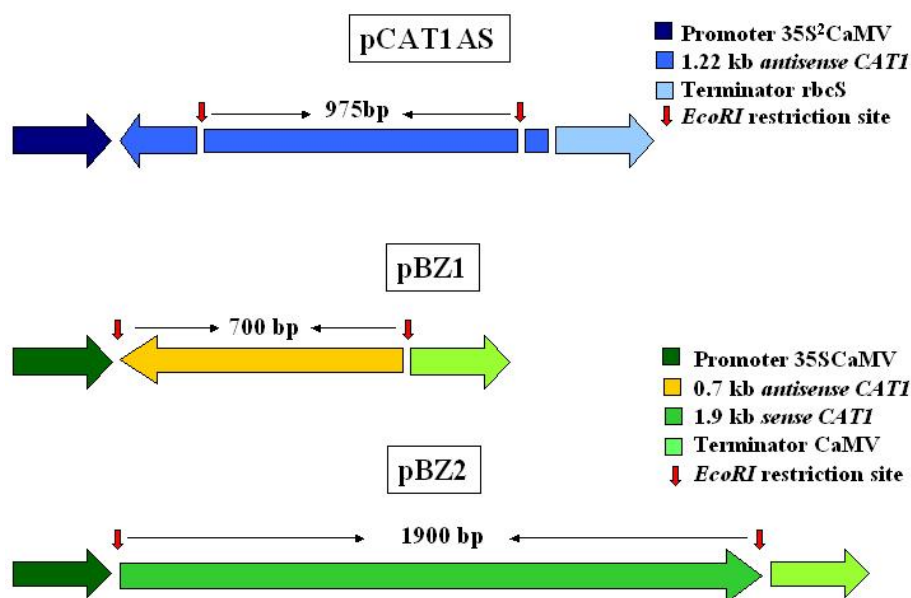
Εικ.3.1. Υβριδισμοί κατά northern, για το γονίδιο της *CATI* στα φυτά μάρτυρες (SR1) και σε επιλεγμένα Γ.Τ. φυτά.

Το παράδοξο αυτό φαινόμενο, έχει καταγραφεί και στο παρελθόν από τους Brisson *et al.* (1998), οι οποίοι ασχολήθηκαν με την *antisense* καταστολή του γονιδίου της *CATI* σε Γ.Τ. φυτά καπνού. Στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων τους υποστήριξαν ότι, η ασυμφωνία, που προκύπτει μεταξύ της μετρούμενης καταλατικής ενεργότητας και της μεταγραφικής δραστηριότητας του γονιδίου της καταλάσης (*CATI*), οφείλεται πιθανότατα σε μετά-μεταγραφικό έλεγχο της ροής της γενετικής πληροφορίας, από άγνωστους πυρηνικούς παράγοντες. Μία όχι τόσο διαφορετική υπόθεση, που αναπτύχθηκε από τους Ingelbrecht *et al.* (1994), υποστηρίζει ότι, συχνά σε καταστάσεις ομόλογης γονιδιακής καταστολής, η δυσανάλογη συσσώρευση των μεταγραφημάτων του γονιδίου-στόχου, συγκριτικά με την ποσότητα της παραγόμενης

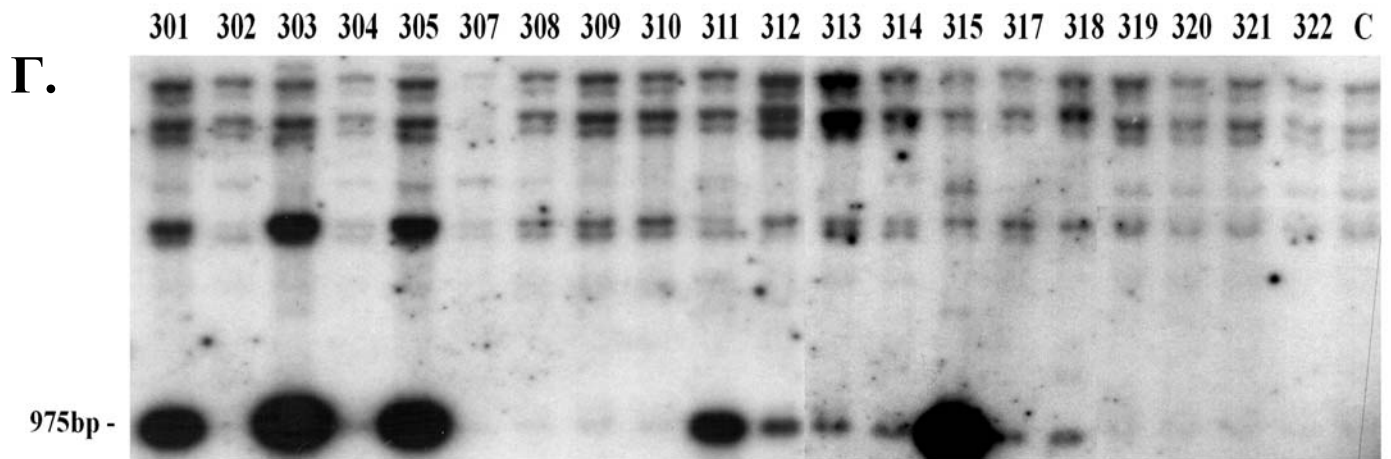
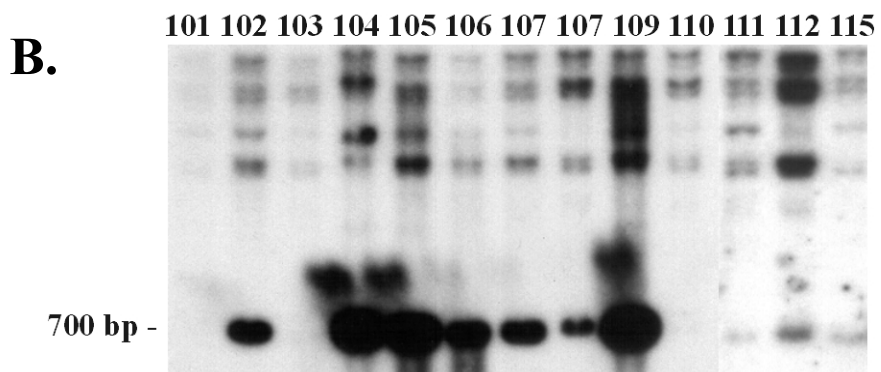
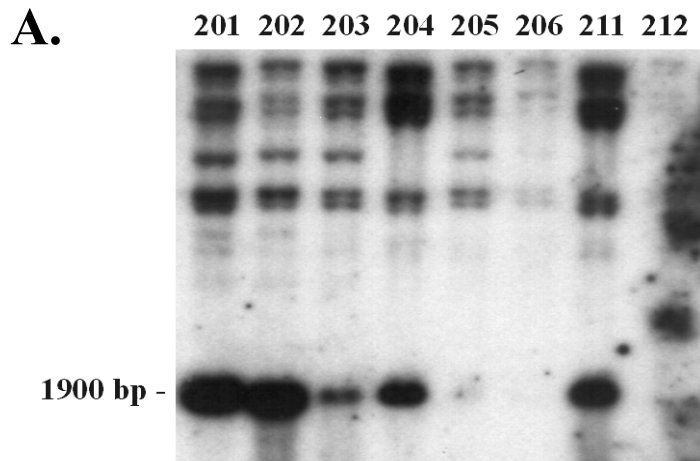
πρωτεΐνης, οφείλεται στην ενδογενή αδυναμία των μεταγραφημάτων αυτών να μεταφραστούν. Το γεγονός ότι τα επίπεδα της ενζυμικής πρωτεΐνης στη σειρά 310, συμπίπτουν πλήρως με τη μετρούμενη καταλακτική ενεργότητα, συνηγορεί υπέρ της ερμηνείας αυτής.

4. ΚΑΤΑ SOUTHERN ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ (ΓΤ) ΦΥΤΩΝ

Η πέψη του γενωμικού DNA, που απομονώθηκε από τα υπογήφια ΓΤ φυτά, με την ενδονουκλεάση περιορισμού *EcoRI*, ελευθερώνει, σε κάθε περίπτωση, από το διαγονίδιο ένα κομμάτι, που υβριδίζεται με τα μόρια του ραδιενεργά σημασμένου ανιχνευτή. Το μέγεθός του διαφέρει μεταξύ των τριών ανασυνδιασμένων φορέων (constructs), pBZ1, pBZ2 και pCAT1AS, που χρησιμοποιήθηκαν για τη γενετική τροποποίηση του καπνού. Πιο αναλυτικά, οι κλώνοι, που αποτελούν προϊόν γενετικής τροποποίησης με τους φορείς pBZ1 και pBZ2, αναμένεται να εμφανίσουν μια ζώνη υβριδισμού στο ύψος των 700 bp και των 1900 bp, αντίστοιχα. Επίσης, οι κλώνοι, που προήλθαν από γενετική τροποποίηση με το φορέα pCAT1AS, αναμένεται να παρουσιάζουν σήμα υβριδισμού στο ύψος των 978 bp (Εικ.4.1).



Εικ.4.1. Σχηματική αναπαράσταση του τμήματος του διαγονιδίου, που ελευθερώνεται, με την δράση της ενδονουκλεάσης περιορισμού *EcoRI* και αναγνωρίζεται από τα μόρια του ανιχνευτή στους αντίστοιχους φορείς.



Εικ.4.2. Αυτοραδιογραφία της, κατά Southern, ανάλυσης των υποψήφιων διαγονιδιακών φυτών. Παρουσιάζονται οι πληθυσμοί pBZ2 (Α.), pBZ1 (Β.) και pCAT1AS (Γ.). C: control.

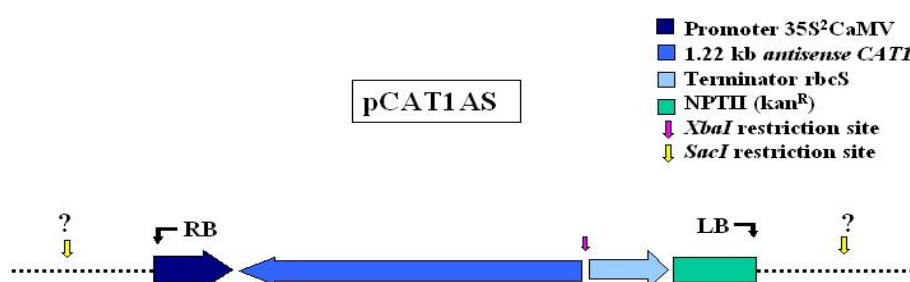
Τα αποτελέσματα της κατά Southern ανάλυσης παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.2. Όπως προκύπτει σχεδόν όλα τα φυτά που επιβίωσαν από την αυστηρή επιλογή της καναμυκίνης (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) φέρουν ενσωματωμένο στο γονιδίωμά τους ένα ή περισσότερα αντίγραφα της T-DNA περιοχής. Η παρουσία υψηλού αριθμού αντιγράφων στο γονιδίωμα των ΓΤ φυτών παρήγαγε έντονο σήμα υβριδισμού, ορατό από το πρώτο εικοσιτετράωρο έκθεσης (π.χ. σειρές 109, 201 και 315). Αντίθετα, σε αρκετές περιπτώσεις η εμφάνιση του σήματος απαίτησε την παράταση της έκθεσης σε τρεις έως και επτά ημέρες (π.χ. σειρές 115, 205 και 309). Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στο χαμηλό αριθμό των ενσωματωμένων αντιγράφων του διαγονιδίου (π.χ. σειρές 111, 205 και 321). Σε κάποιες άλλες περιπτώσεις, η ποσότητα του DNA, που έχει καθηλωθεί στη μεμβράνη είναι ανεπαρκής για την ανίχνευση του διαγονιδίου (π.χ. σειρές 101, 206 και 307) ή συντρέχουν και οι δύο λόγοι. Για την γενετική ταυτότητα αυτών των φυτών δεν μπορούμε να αποφανθούμε με βεβαιότητα, αν και η αναγέννησή τους σε υψηλή συγκέντρωση καναμυκίνης, αποτελεί εγγύηση.

Συσχέτιση, ανάμεσα στο πλήθος των αντιγράφων του διαγονιδίου, όπως αυτό εκτιμάται από την ένταση του σήματος υβριδισμού και τη μετρούμενη ενεργότητα καταλάσης, υποδεικνύει ότι ο υψηλός αριθμός αντιγράφων του διαγονιδίου δεν εξασφαλίζει το επιθυμητό αποτέλεσμα, τόσο στα *sense* όσο και στα *antisense* φυτά. Αντίθετα, οι γενότυποι, που επιλέχθηκαν από τον πληθυσμό των pCATIAS σειρών, χαρακτηρίζονται, γενικά, από χαμηλό αριθμό αντιγράφων (με εξαίρεση, ίσως, τη σειρά 305). Τα παραπάνω συμφωνούν πλήρως με αποτελέσματα της έρευνας, που εκπονείται την τελευταία δεκαετία, γύρω από τα διαγονιδιακά φυτά. Τα πιο πρόσφατα αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι το γενετικό περιβάλλον στο οποίο εντάσσεται το διαγονίδιο και διάφορα, άλλα επιγενετικά φαινόμενα, που περιγράφονται με το γενικό όρο “homology dependent gene silencing” αποτελούν τους βασικούς καθοριστές της τύχης του διαγονιδίου στο γονιδίωμα του φυτού-δέκτη (Matzke and Matzke, 1995).

Η ενσωμάτωση μεγάλου αριθμού αντιγράφων του διαγονιδίου, σε θέσεις *cis* ή *trans*, οδηγεί, με διάφορους μηχανισμούς στην μεθυλίωση, ολόκληρου ή μέρους του διαγονιδίου και τη συνακόλουθη καταστολή της έκφρασής του (Stam *et al.*, 1997). Στην *Arabidopsis*, διαπιστώθηκε ότι η χρήση μιας T-DNA κασέτας, που περιείχε πολλαπλές επαναλήψεις του γονιδίου ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη, οδήγησε στη δημιουργία ΓΤ φυτών, με ευαισθησία στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό (Assaad *et al.*, 1993). Ανάλυση της περιοχής με ένζυμα περιορισμού, μετά από την ενσωμάτωσή της

στο φυτικό γονιδίωμα, αποκάλυψε την παρουσία εκτεταμένης μεθυλίωσης, εντός των ορίων της. Ο μηχανισμός, που προτείνεται για την ερμηνεία του φαινομένου, προβλέπει ότι το πιθανό ζευγάρωμα, μεταξύ των συμπληρωματικών αλληλουχιών, δημιουργεί δευτεροταγείς διαμορφώσεις του DNA, που αποτελούν στόχους μεθυλίωσης. Κάτι ανάλογο έχει αποδειχθεί ότι συμβαίνει στο μύκητα *Ascobolus immersus* (Rossignol and Faugeron, 1994).

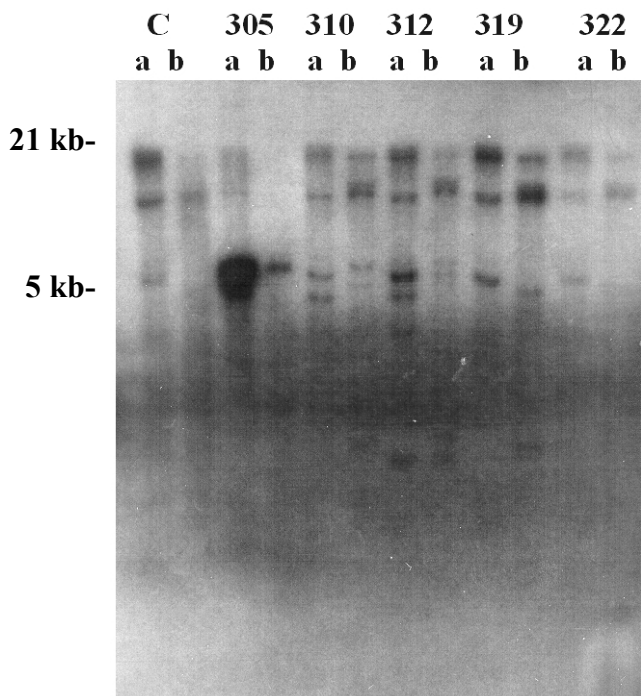
Μια δεύτερη εκδοχή, για την ερμηνεία των συνεπειών της πολλαπλής ενσωμάτωσης ενός διαγονιδίου στην ενεργότητα των αντιγράφων του, δέχεται ότι η (δια)γονιδιακή καταστολή είναι το αποτέλεσμα μιας εκτοπικής, DNA-DNA αλληλεπίδρασης, ανάμεσα στις ομόλογες αλληλουχίες, που εισήλθαν στο γονιδίωμα. Σύμφωνα με την παραπάνω ερμηνεία, η μεθυλίωση ενός αρχικού αντίγραφου του διαγονιδίου προκαλεί τη μετατροπή του σε ενεργό κέντρο καταστολής όλων των ομολόγων αλληλουχιών, μέσα στο γονιδίωμα. Η διαδικασία αυτή είναι διφασική και περιλαμβάνει τη γένεση του κέντρου καταστολής και, σε δεύτερο επίπεδο, την εκδήλωση της δράσης του (Matzke *et al.*, 1994).



Εικ.4.3. Σχηματική απεικόνιση της T-DNA κασέτας και των θέσεων αναγνώρισης για τις ενδονουκλεάσες περιορισμού *XbaI* και *SacI*.

Ανεξάρτητα, από τους μηχανισμούς, που προκαλούν την «αποσιώπηση» του διαγονιδίου, ο προσδιορισμός του αριθμού των αντιγράφων του, εξυπηρετεί και μια πρακτική σκοπιμότητα: εκείνη του χειρισμού της κληρονομικότητας. Για τον προσδιορισμό του αριθμού των αντιγράφων του διαγονιδίου, που έχουν ενσωματωθεί στο γονιδίωμα των ΓΤ φυτών, που επιλέχθηκαν για την καταστολή της καταλάσης, πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητες γενωμικές πέψεις, με τις ενδονουκλεάσες

περιορισμού *XbaI* και *SacI*. Η πρώτη αναγνωρίζει μια θέση περιορισμού στο 3' άκρο της κωδικής περιοχής του διαγονιδίου, ενώ για τη δεύτερη δεν υπάρχουν θέσεις αναγνώρισης, εντός των ορίων της T-DNA κασέτας (Εικ. 4.3).



Εικ.4.4. Αυτοραδιογραφία της κατά Southern ανάλυσης των σειρών, που επιλέχθηκαν από τον πληθυσμό των pCAT1AS ΓΤ φυτών. Για κάθε σειρά παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της πέψης με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού *SacI* (a) και *XbaI* (b) C: Control.

Από την ανάλυση των σειρών, που επιλέχθηκαν (Εικ.4.4), προέκυψε ότι στο γονιδίωμα του φυτού 305 έχουν ενσωματωθεί τουλάχιστον δύο αντίγραφα του διαγονιδίου, ενώ τα φυτά 310 και 312 φέρουν από τρία και πέντε, αντίστοιχα, αντίγραφα του. Στη σειρά 319 μετρήθηκαν δύο περιπτώσεις ένθεσης του διαγονιδίου, ενώ για τη σειρά 322 δεν μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η χρήση των ΓΤ φυτών στη σύγχρονη έρευνα, αποτελεί πλέον μια συνηθισμένη προσέγγιση των ερευνητικών ζητημάτων. Ιδιαίτερα στο χώρο της μοριακής φυσιολογίας φυτών, η εισαγωγή των ΓΤ φυτών, από τις αρχές της προηγούμενης δεκαετίας, οδήγησε στην αντικατάσταση των φυσικών ή τεχνητών μεταλλαγμάτων, η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός, των οποίων, είναι διαδικασίες επίπονες και χρονοβόρες. Το γεγονός αυτό οδήγησε σε σημαντικές ανακαλύψεις και επιτάχυνε την πρόοδο της επιστήμης. Η γενετική τροποποίηση του καπνού, για το γονίδιο της μεσοφυλλικής καταλάσης, δεν διεκδικεί, βεβαίως, την πρωτοπορεία. Εξάλλου, οι ανασυνδυασμένοι φορείς, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, προέρχονται από πρόσφατες ερευνητικές εργασίες, τα αποτελέσματα των οποίων έχουν ήδη δημοσιευθεί (Brisson *et al.*, 1998, Chamnongpol *et al.*, 1996). Με τις εργασίες αυτές δείχθηκε αφενός, η σημασία της καταλάσης, *CAT1*, στη φωτοσυνθετική απόδοση των C_3 φυτών και αφετέρου, η συμβολή της στο φαινόμενο της συστηματικής εξάπλωσης της ανθεκτικότητας (SAR).

Τα ΓΤ φυτά, που δημιουργήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, όπως και ΓΤ φυτά καπνού, που υπερεκφράζουν μια μεταλλαγμένη μεσοφυλλική καταλάση, η οποία στερείται του πεπτιδίου τοπογένεσης, θα αποτελέσουν υλικό για μια σειρά πειραμάτων, με απώτερο σκοπό να δοθεί απάντηση σε μια σειρά από ερωτήματα. Αυτά αφορούν αφενός, την επίδραση των αλλαγών στην ενεργότητα της καταλάσης στη μορφογενετική συμπεριφορά των πρωτοπλαστών και αφετέρου, τις γενικότερες επιπτώσεις για το φυτό, από τη μεταφορά της κύριας καταλατικής ενεργότητας στο κυτόπλασμα των κυττάρων του μεσόφυλλου.

Προκαταρκτικά πειράματα, έχουν ήδη διεξαχθεί, με την επίδραση μεναδιόνης και paraquat, σε φύλλα, κυτταροκαλλιέργειες και πρωτοπλάστες, που απομονώθηκαν από τα επιλεγμένα *antisense* φυτά. Οι χημικοί αυτοί παράγοντες, ύστερα από κατάλληλη διέγερση, μετατρέπονται σε εστίες παραγωγής EMO στο κύτταρο. Η μεναδιόνη, είναι μια υδροξυκινόνη, που οξειδώνεται από περοξειδάσες (POX) του κυτοπλάσματος και της μεμβράνης, με σύγχρονη απελευθέρωση H_2O_2 . Από την άλλη πλευρά, το paraquat λαμβάνει ηλεκτρόνια από το φωτοσύστημα I και ελευθερώνει την $O_2^{\cdot-}$ ρίζα στους χλωροπλάστες. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της παραγωγής των EMO στο φύλλο και τους πρωτοπλάστες, πραγματοποιήθηκε στο υγρό μέσο

καλλιέργειας του φύλλου, καθώς και στο υγρό μέσο καλλιέργειας και το ενδοκυτταρικό περιβάλλον των πρωτοπλαστών. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε η βιοδοκιμή χημειοφωταύγειας της λουμινόλης, για το H₂O₂ (Murphy and Huerta, 1990) και της λουσιγενίνης, για το O₂⁻ (Corbisier *et al.*, 1987). Τα αποτελέσματα, που λήφθηκαν, για το *ex planta* σύστημα του φύλλου, δεν ήταν αξιοποιήσιμα, γιατί οι παραγόμενες ΕΜΟ πιθανότατα δεν διαχέονται στο μέσο καλλιέργειας. Από την άλλη πλευρά η εγκατάσταση κυτταροκαλλιιεργειών υγρής φάσης, από άμορφο κάλλο, στάθηκε αδύνατη, γιατί τα κύτταρα δεν αποκρίθηκαν στους ορμονικούς χειρισμούς.

Έτσι, ο πειραματικός σχεδιασμός στράφηκε αποκλειστικά προς τους πρωτοπλάστες. Από τα πρώιμα αποτελέσματα, προκύπτει ότι, οι συγκεντρώσεις μεναδιόνης, που χρησιμοποιήθηκαν, με βάση δεδομένα από αντίστοιχα πειράματα σε κυτταροκαλλιέργειες (Reichheld *et al.*, 1999), ήταν ιδιαίτερα τοξικές, για τους καταπονημένους, από τη διαδικασία απομόνωσης, πρωτοπλάστες. Στο αντίθετο άκρο, κινήθηκαν πειράματα με την επίδραση paraquat σε πρωτοπλάστες, όπου οι προτεινόμενες από τη βιβλιογραφία συγκεντρώσεις paraquat (Morita *et al.*, 1999), δεν κατόρθωσαν να προκαλέσουν τις αναμενόμενες διαφορές, ανάμεσα στις διαφορετικές μεταχειρίσεις.

Παράλληλα, επαναλήφθηκε η γενετική τροποποίηση καπνού, με τον ανασυνδυασμένο φορέα pBZ2, με στόχο την απομόνωση γενοτύπων υπερέκφρασης της καταλάσης, *CAT1*.

- Acevedo A, Scandalios JG** (1991) Catalase and superoxide dismutase gene expression and distribution during stem development in maize. *Dev Genet* **12**: 423-430
- Allen RD, Webb RP, Sheryl AS** (1997) Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. *Free Rad Biol Med* **23**: 473-479
- Apostol I, Heinsteins PF, Low PS** (1989) Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiol* **90**: 109-116
- Asada K** (1992a) Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* **85**: 235-241
- Asada K** (1994) Production and action of oxygen species in photosynthetic tissues. In CH Foyer, PM Mullineaux, eds, *Causes of photo-oxidative stress and amelioration of defense systems in plants*, CRC Press, Boca Raton, pp 77-104
- Assaad F, Tucker KL, Singer ER** (1993) Epigenetic repeat induced gene silencing (RIGS) in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **22**: 1067-1085
- Auh CK, Murphy TM** (1995) Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O_2^- and H_2O_2 by *Phytophthora* elicitor-stimulated rose cells. *Plant Physiol* **107**: 1241-1247
- Baum JA, Scandalios JG** (1981) Isolation and characterization of the cytosolic and mitochondrial superoxide dismutases of maize. *Arch Biochem Biophys* **206**: 249-264
- Beauchamp C, Fridovitch I** (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* **44**: 276-287
- Bi Y-M, Kenton P, Mur L, Darby R, Draper. J** (1995) Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. *Plant J* **8**: 235-245
- Boldt R, Scandalios JG** (1995) Circadian regulation of the *Cat3* catalase gene in maize (*Zea mays* L.) entrainment of the circadian rhythm of *Cat3* by different light treatments. *Plant J* **7**: 989-999
- Bolwell GP, Butt VS, Davies DR, Zimmerlin A** (1995) The origin of the oxidative burst in plants. *Free Rad Res* **23**: 517-532
- Bowler C, VanCamp W, VanMontagu M, Inze D** (1994) Superoxide dismutases in plants. *Crit Rev Plant Sci* **13**: 199-218

- Bowler C, VanMontagu M, Inze D** (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **43**: 83-116
- Braber JM** (1980) Catalase and peroxidase in primary bean leaves during development and senescence. *Z. Pflanzenphysiol* **97**: 135-144
- Brisson LF, Zelitch I, Havir EA** (1998) Manipulation of catalase levels produces altered photosynthesis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol* **116**: 259-269
- Bucheli P, Doares SH, Albersheim P, Darvill A** (1990) Host-pathogen interactions. XXXVI. Partial purification and characterization of heat-labile molecules secreted by the rice blast pathogen that solubilize plant cell wall fragments that kill plant cells. *Physiol Mol Plant Pathol* **36**: 159-173
- Bueno P, Varela J, Gimeenez- Gallego G, delRio LA** (1995) Peroxisomal copper, zinc superoxide dismutase. Characterization of the isoenzyme from watermelon cotyledons. *Plant Physiol* **108**: 1151-1160
- Chamnongpol S, Willekens H, Langerbartels C, VanMontagu M, Inze D, VanCamp W** (1996) Transgenic tobacco with a reduced catalase activity develops necrotic lesions and induces pathogenesis-related expression under high light. *Plant J* **10**: 491-503
- Chamnongpol S, Willekens H, Moeder W, Langerbartels C, Sandermann H, VanMontagu M, Inze D, VanCamp W** (1998) Defence activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 5818-5823
- Chen Z, Ricigliano JW, Klessig DF** (1993a) Purification and characterization of a soluble salicylic acid-binding protein from tobacco. *Proc Natl Acad Sci* **90**: 9533-9537
- Chen Z, Silva H, Klessig DF** (1993b) Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* **262**: 1883-1886
- Church GM, Gilbert W** (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci* **81**: 1991-1995
- Corbisier P, Houbion A, Remacle A** (1987) A new technique for highly sensitive detection of superoxide dismutase activity by chemiluminescence. *Anal Biochem* **164**: 240-247

- Creissen G, Firmin J, Fryer M, Kular B, Leyland N, Reynolds H, Pastori G, Welburn F, Baker N, Welburn A, Mullineaux P** (1999) Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *Plant Cell* **11**: 1277-1291
- Cutler A, Saleem M, Wang H** (1991) Cereal protoplast recalcitrance. *In Vitro Cell Dev Biol* **27**: 104-111
- Dat JF, Lopez-Delgado, Foyer CH, Scott IM** (1998) Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiol* **116**: 1351-1357
- Davis BJ** (1964) Disc electrophoresis. II Method and application to human serum proteins. *Annals NY Acad Sci* **121**: 404-427
- 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
- Doke N, Miura Y** (1995) In vitro activation of NADPH-dependent superoxide generating system in a plasma membrane- rich fraction of potato tuber tissues by treatment with an elicitor from *Phytophthora infestans* or with digitonin. *Physiol Mol Plant Path* **46**: 17-28
- Drumm H, Schopfer P** (1974) Effect of phytochrome on development of catalase activity and isozyme pattern in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Planta* **120**: 1-30
- Du H, Klessig DF** (1997) Role of salicylic acid in the activation of defense responses in catalase-deficient transgenic tobacco. *MPMI* **10**: 922-925
- Durner J, Klessig DF** (1995) Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defence responses. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 11312-11316
- Edwards EA, Rawsthorne S, Mullineaux PM** (1990) Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea. *Planta* **180**: 278-284
- Elstner EF** (1982) Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annu Rev Plant Physiol* **33**: 73-96

- Finnegan J, McElroy D** (1994) Transgene inactivation: Plants Fight Back! *BioTech* **12**: 883-889
- Foyer C, Lelandais M, Galap C, Kunert KJ** (1991) Effects of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *Plant Physiol* **97**: 863-872
- Foyer CH, Descourvieres P, Kunert KJ** (1994) Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Envir* **17**: 507-523
- Foyer CH, Halliwell B** (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**: 21-25
- Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JE, Scott IM** (1997) Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol Plant* **100**: 241-254
- Foyer CH, Souriau N, Perret S, Lelandais M, Kunert KJ** (1995) Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant Physiol* **109**: 1047-57
- Fridovitch I** (1986) Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* **247**: 1-11
- Friedrich L, Vernooij B, Gaffney T, Morse A, Ryals J** (1995) Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene. *Plant Mol Biol* **29**:
- Galston A W, Bonnichsen R, K, , Arnon DI** (1951) The preparation of highly purified spinach leaf catalase. *Acta Chem Scand* **5**: 781-790
- Hahne E, Fleck J, Hahne G** (1989) Colony formation from mesophyll protoplasts of a cereal, oat. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 6157-6160
- Halliwell B** (1978a) Lignin synthesis: the generation of hydrogen peroxide and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese (II) and phenols. *Planta* **40**: 81-88
- Hanania U, Avni A** (1997) High-affinity binding site for ethylene-inducing xylanase elicitor on *Nicotiana tabacum* membranes. *Plant ZJ* **12**: 113-120
- Harlow E, Lane D** (1988) *Antibodies: A laboratory manual*

- Havir EA, McHale NA** (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol* **84**: 450-455
- Ingelbrecht I, Van Houdt H, Van Montagu M, Depicker A** (1994) Post-transcriptional silencing of reporter transgenes in tobacco is correlated with DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci* **91**:
- Ishii S** (1988) Factors influencing protoplast viability of suspension-cultured rice cells during isolation process. *Plant Physiol* **88**: 26-29
- Kopetzki E, Schumacher G, Buckel P** (1989) Control formation of active soluble or inactive insoluble baker's yeast alpha-glucosidase in *Escherichia coli* by induction and growth conditions. *Mol Gen Genet* **216**: 149-155
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lamb C, Dixon R** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 251-275
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent 1. *J Biol Chem* **193**: 265-275
- Mattoo AK, Pick U, Hoffman-Falk H, Edelman M** (1981) The rapidly metabolized 32000 D polypeptide of the chloroplast is the proteinaceous shield regulating photosystem II electron transport and mediating diuron herbicide sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* **787**: 1572-1576
- Matzke MA, Matzke AM** (1995) How and why do plants inactivate homologous (trans)genes. *Plant Physiol* **107**: 679-685
- McKersie BD, Chen Y, de Beus M, Bowley SR, Bowler C, Inze D, D'Halluin K, Botterman J** (1993) SOD enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa. *Plant Physiol* **103**: 1155-1163
- Mitraki A, King J** (1989) Protein folding intermediates and inclusion body formation. *BioTech* **7**: 690-697
- Mittler R, Zilinskas BA** (1991) Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiol* **97**: 962-968
- Morita S, Kamikana H, Masumura T, Tanaka K** (1999) Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress; the involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signalling. *Plant Cell Physiol* **40**: 417-422
- Mullen RT, Lee MS, Trelease RN** (1997) Identification of the peroxisomal targeting signal for cottonseed catalase. *Plant J* **12**: 312-322

- Murphy TM, Huerta AJ** (1990) Hydrogen peroxide formation in cultured rose cells in response to UV-C radiation. *Physiol Plant* **78**: 247-253
- Nakano Y, Asada K** (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **22**: 867-880
- Neuenschwander U, Vernooij B, Friedrich L, Uknes S, Kessmann H, Ryals J** (1995) Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant J* **8**: 227-233
- Nieben A, Heungens K, Bartels N, Inze D, Van Montagu M, Gheysen G** (1995) Characterization of a pathogen-induced potato catalase and its systemic expression upon nematode and bacterial infection. *Mol Plant Microb Interact* **3**: 371-378
- Noctor G, Foyer CH** (1998a) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Mol Biol* **49**: 249-79
- Ogawa K, Kanematsu S, Takebe K, Asada K** (1995) Attachment of Cu, Zn SOD to thylakoid membranes at the site of superoxide generation (PSI) in spinach chloroplasts: Detection by immunogold labeling after rapid freezing. *Plant Cell Physiol* **36**: 565-573
- Orvar BL, Ellis BE** (1997) Transgenic tobacco plants expressing antisense RNA for cytosolic ascorbate peroxidase show increased susceptibility to ozone injury. *Plant J* **11**: 1297-1305
- Orvar BL, McPherson AJ, Ellis BE** (1997) Pre-activation wounding response in tobacco prior to high-level ozone exposure prevents necrotic injury. *Plant J* **20**: 203-212
- Papadakis AK, Roubelakis-Angelakis KA** (1999) The generation of active oxygen species differs in *Nicotiana* and *Vitis* plant protoplasts. *Plant Physiol* **121**: 197-245
- Pennel RI, Lamb C** (1997) Programmed cell death. *Plant Cell* **9**: 1157-1168
- Potrykus I, Shillito RD** (1986) Protoplasts: isolation, culture, plant regeneration. *Methods Enzymol* **118**: 549-578
- Redinbaugh MG, Sabre M, Scandalios JG** (1990) Expression of the maize Cat3 catalase gene is under the influence of a circadian rhythm. *Proc Natl Acad Sci* **87**: 6853-6857

- Reichheld J-P, Vernoux T, Lardon F, Van Montagu M, Inze D** (1999) Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress. *Plant J* **17**: 647-656
- Rossignol J-L, Faugeron G** (1994) Gene inactivation triggered by recognition between DNA repeats. *Experientia* **50**: 307-317
- Roubelakis-Angelakis KA** (1993) An assessment of possible factors contributing to recalcitrance of plant protoplasts. *In* KA Roubelakis-Angelakis, K Tran Thanh Van, eds, *Morphogenesis in Plants: Molecular Approaches*, Plenum, New York, pp 201-220
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Scandalios JG** (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol* **101**: 7-12
- Scandalios JG** (1994) Molecular biology of superoxide dismutase. *In* RG Alscher, AR Wellburn, eds, *Plant responses to the gaseous environment. Molecular, metabolic and Physiological Aspects*, ISBN 0-4125-8170-1, Butterworth's London, pp 147-164
- Scandalios JG, Tong W-F, Roupakias DG** (1980) Cat 3, a third gene locus coding for tissue-specific catalase in maize: genetics, intracellular localization, and some biochemical properties. *Mol Gen* **179**: 3-41
- Schein CH** (1989) Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *BioTech* **7**: 1141-1149
- Schiefer S, Teifel W, Kindl H** (1976) Purification and characterization of catalase from leaves of *Lens culinaris*. *Z Physiol Chem* **357**: 163-175
- Segal AW, Abo AW** (1993) The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biochem Sci* **18**: 43-47
- Sharon A, Fuchs Y, Anderson JD** (1993) The elicitation of ethylene biosynthesis by a *Trichoderma* xylanase is not related to the cell wall degradation activity of the enzyme. *Plant Physiol* **102**: 1325-1329
- 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
- Skadsen RW, Scandalios JG** (1987) Translational control of photo-induced expression of the Cat2 catalase gene during leaf development in maize. *Proc Natl Acad Sci* **84**: 2785-2789
- Stam M, Mol JNM, Kooter JM** (1997) The silence of genes in transgenic plants. *Annal Bot* **79**: 3-12
- Sutherland MW** (1991) The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiol Mol Plant Path* **9**: 79-93
- Takahashi H, Chen Z, Du H, Liu Y, Klessig DF** (1997) Development of necrosis and activation of disease resistance in transgenic tobacco plants with severely reduced catalase levels. *Plant J* **11**: 993-1005
- Tenhaken R, Levine A, Brisson LF, Dixon RA, Lamb C** (1995) Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4158-4163
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J** (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350-4354
- Tsang EWT, Bowler C, Herouart D, Van Camp W, Villarroel R, Genetello C, Van Montagu M, Inze D** (1991) Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *Plant Cell* **3**: 783-792
- Van Camp W, Willekens H, Bowler C, Van Montagu M, Inze D, Reupold-Popp P, Sandermann H, Langebartels C** (1994) Elevated levels of SOD protect transgenic plants against ozone damage. *Biotech* **12**: 165-168
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, VanMontagu M, Inze D, VanCamp W** (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *EMBO J* **16**: 4806-4816
- Willekens H, Langerbartels C, Tire C, VanMontagu M, Inze D, VanCamp W** (1994) Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Proc Natl Acad Sci* **91**: 10450-10454

- Xing H, Higgins VJ, Blumwald E** (1997) Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* promote translocation of cytosolic components of NADPH oxidase to the plasma membrane of tomato cells. *Plant Cell* **9**: 249-259
- Yahraus T, Chandra S, Legendre L, Low PS** (1995) Evidence for a mechanically induced oxidative burst. *Plant Physiol* **109**: 1259-1266
- Zelitch I** (1992) Factors affecting expression of enhanced catalase activity in a tobacco mutant with O₂-resistant photosynthesis. *Plant Physiol* **98**: 1330-1335