



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

**Ανοσοεντοπισμός και ενεργότητα της πυροφωσφορυλάσης
της ουριδινοδιφωσφορογλυκόζης (UGPάσης) σε
αναπτυσσόμενους ανθοφόρους οφθαλμούς της τομάτας**



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΤΡΙΤΣΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΑΘΗΝΑ 2009

Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (συνεδρία 18^η/19-6-2008) κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η πενταμελής εξεταστική επιτροπή της μελέτης

Πενταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

**Επ. Καθηγητής Γ. Αϊβαλάκης, Επιβλέπων
Αν. Καθηγητής Κ. Φασσέας, Μέλος
Αν. Καθηγητής Σ. Κίντζιος, Μέλος
Επ. Καθηγήτρια Χ. Κιτσάκη, Μέλος
Επ. Καθηγητής Κ. Ακουμιανάκης, Μέλος**

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα.....	3
Πρόλογος.....	5
Περίληψη.....	6
Abstract.....	7
1. Εισαγωγή.....	9
1.1 Η τομάτα.....	9
1.1.1 Καταγωγή - Ιστορική Εξέλιξη.....	9
1.1.2 Βοτανικοί χαρακτήρες.....	10
1.1.3 Εδαφοκλιματικές απαιτήσεις.....	15
1.2 Η πυροφωσφορυλάση της ουριδινοδιφωσφορογλυκόζης (UGPάση).....	16
1.2.1 Γενικά.....	16
1.2.2 Δομή του ενζύμου.....	19
1.2.2.1 Δομή της UGPάσης στο <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
1.2.2.2 Δομή των υπομονάδων της Ugp1p.....	20
1.2.2.3 Κατάσταση ολιγομερίωσης της Ugp1p.....	20
1.2.2.4 Η UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνη (AGX1) ως πρότυπο των UGPασών.....	21
1.2.2.5 Δομή της UGPάσης στο <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
1.2.2.6 Κατάσταση ολιγομερίωσης της UGPάσης στο <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
1.2.3 Η ρύθμιση της ενεργότητας της UGPάσης.....	24
1.2.3.1 Η ολιγομερίωση ως γενικός ρυθμιστικός μηχανισμός των πυροφωσφορυλασών.....	24
1.2.3.2 Άλλοι μηχανισμοί ρύθμισης της ενεργότητας της UGPάσης.....	25
1.2.4 Η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου.....	26
1.2.4.1 Η ρύθμιση της έκφρασης της UGPάσης από τη σακχαρόζη.....	29
1.2.5 Πόσα γονίδια κωδικοποιούν την UGPάση.....	30
1.2.6 Η βιοσύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων και η UGPάση.....	31
1.2.7 Ο ρόλος της UGPάσης στη ροή των μεταβολιτών.....	34
1.3 Σκοπός της μελέτης.....	34
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	37
2.1 Μεθοδολογία.....	37
2.2 Ανοσοεντοπισμός της UGPάσης σε τομές.....	38
2.2.1 Φυτικό υλικό.....	38
2.2.2 Προσήλωση.....	38
2.2.3 Αφυδάτωση.....	38
2.2.4 Διαφανοποίηση.....	38
2.2.5 Εγκλεισμός των δειγμάτων σε παραφίνη.....	39
2.2.6 Προετοιμασία αντικειμενοφόρων.....	39
2.2.7 Μικροτόμηση.....	39
2.2.8 Αποπαραφίνωση.....	40
2.2.9 Εφαρμογή αντισωμάτων.....	40
2.3 Μελέτη της ενεργότητας της UGPάσης.....	42
2.3.1 Εκχύλιση του ενζύμου.....	42
2.3.2 Προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bearden.....	42
2.3.3 Προσδιορισμός της ενεργότητας της UGPάσης.....	43
2.4 Έλεγχος της καταλληλότητας των αντισωμάτων.....	44
2.4.1 Ηλεκτροφόρηση των μη μετουσιωμένων πρωτεϊνών.....	44

2.4.2 Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	45
2.4.3 Εφαρμογή αντισωμάτων στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης.....	46
2.5 Ανίχνευση της μεταφοράς της ακυλογλυκόζης	46
3. Αποτελέσματα	49
3.1 In situ ανοσοεντοπισμός της UGRάσης	49
3.2 Η διαφοροποίηση της ενεργότητας UGRάσης κατά την ανάπτυξη των ανθοφόρων οφθαλμών	55
3.3 Έλεγχος καταλληλότητας των αντισωμάτων.....	56
3.4 Προσδιορισμός της in vitro δραστηριότητας της UGRάσης.....	57
3.5 Ανίχνευση της μεταφοράς της ακυλογλυκόζης	58
4. Συζήτηση	61
4.1 Η UGRάση και η παρουσία της σε διαφορετικούς ιστούς.....	61
4.2 Η δραστηριότητα της UGRάσης	64
4.3 Δραστική μορφή της UGRάσης	65
5. Συμπεράσματα.....	67
6. Βιβλιογραφία	69

Πρόλογος

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την άμεση επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ. Γ. Αϊβαλάκι, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στην κατεύθυνση "Βιοδραστικά Προϊόντα & Πρωτεϊνική Τεχνολογία".

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κ. Γ. Αϊβαλάκι για τη βοήθειά του σε όλα τα στάδια πραγματοποίησης αυτής της μελέτης και για την μεταφορά της εμπειρίας του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Αν. Καθηγητές κ. Κ. Φασσέα και κ. Σ. Κίντζιο, την Επ. Καθηγήτρια κ. Χ. Κιτσάκη και τον Επ. Καθηγητή κ. Κ. Ακουμιανάκη, για τον χρόνο που διέθεσαν για τη μελέτη και την αξιολόγηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω το προσωπικό του εργαστηρίου Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών, τους συναδέλφους Η. Μπαδιεριτάκη, Β. Ρούνη και Π. Κώτση για την ομαλή συνεργασία και τη βοήθειά τους σε τρέχοντα ζητήματα της παρούσας μελέτης, καθώς και τον Γιάννη Καραπάνο και το Εργαστήριο Κηπευτικών Καλλιεργειών για την παροχή φυτικού υλικού.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου και τον Νίκο για την ηθική συμπαράσταση εκ μέρους τους και τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Περίληψη

Η παρουσία του ενζύμου της πυροφωσφορυλάσης της ουριδινοδιφωσφορογλυκόζης (UGPάσης) μελετήθηκε σε αναπτυσσόμενους ανθοφόρους οφθαλμούς τομάτας (*Solanum lycopersicum*) οι οποίοι διαχωρίστηκαν σε τέσσερις κατηγορίες με βάση το μέγεθός τους. Η πρώτη κατηγορία περιελάμβανε ανθοφόρους οφθαλμούς μήκους 0-3 mm, η δεύτερη 3-8 mm, η τρίτη από 8 mm έως λίγο πριν από την άνθηση και η τέταρτη κατηγορία περιελάμβανε ώριμα άνθη.

Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές του *in situ* εντοπισμού και ανοσοεντοπισμού του ενζύμου. Παράλληλα, μελετήθηκε η ηλεκτροφορητική συμπεριφορά και προσδιορίστηκε η *in vitro* δραστικότητα της UGPάσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η UGPάση εντοπίστηκε έντονα στην ωοθήκη, στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και την εξωτερική επιδερμίδα των ανθών και στον τάπητα (στα δύο πρώτα αναπτυξιακά στάδια), ενώ μικρότερη ήταν η ένταση του σήματος στην επιδερμίδα των πετάλων και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες των πετάλων και των σεφάλων. Από τις μετρήσεις της ενζυμικής δραστικότητας σε ολόκληρα άνθη, διαπιστώθηκε ότι το ένζυμο της UGPάσης ενεργοποιείται κυρίως κατά το αναπτυξιακό στάδιο της άνθησης με 129,1 nM NADH/min*μg πρωτεΐνης, ενώ η μικρότερη δραστικότητα εντοπίστηκε στο αναπτυξιακό στάδιο 3-8 mm με 47,4 nM NADH/min*μg πρωτεΐνης.

Τα πειραματικά δεδομένα αποκάλυψαν ότι το πρότυπο εντοπισμού της *in situ* ενεργότητας του ενζύμου συνέπεσε με το πρότυπο ανοσοεντοπισμού της πρωτεΐνης, ενώ η μελέτη της ηλεκτροφορητικής συμπεριφοράς του ενζύμου κατέδειξε την ύπαρξη πολλών ηλεκτροφορητικών ζωνών οι οποίες πιθανόν να αντιστοιχούν σε ολιγομερή ή σε πολυμερή ή σε διαφορετικές διαμορφώσεις του ενζύμου.

Τέλος, για πρώτη φορά ανιχνεύτηκε η τρανσφεράση της ακυλογλυκόζης, ένα ένζυμο που συμμετέχει στη βιοσύνθεση ακυλογλυκοζιδίων που επικαλύπτουν την επιδερμίδα.

Abstract

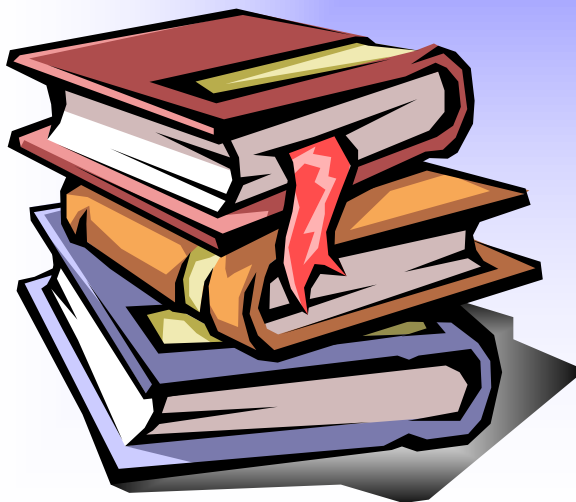
The presence of the uridine diphosphate pyrophosphorylase (UGPase) enzyme was studied in tomato (*Solanum lycopersicum*) growing flower buds which were divided to four categories according to their size. The first category included flower buds 0-3 mm in length, the second 3-8 mm, the third 8 mm to preanthesis and the fourth category included mature flowers.

For this purpose, the techniques of *in situ* activity localization and immunolocalization of the enzyme were used. The electrophoretic pattern was studied and the *in vitro* activity of UGPase was defined, as well. The results showed that UGPase was mainly localised in the ovary, in vascular bundle and overall epidermis of the anther and in the tapetum (in the first two stages of development), while signal tension was lower in petals epidermis and in petals and sepals of vascular bundles. Enzyme activity from flowers revealed that UGPase is active mainly during anthesis (129,1 nM NADH/min* μ g protein), while the smallest activity was found at the developing stage 3-8 mm (47,4 nM NADH/min* μ g protein).

Experimental data revealed that the pattern of the *in situ* activity localization of the enzyme coincided with that of the protein localization, while the study of enzyme electrophoretic pattern showed the existence of many bands which probably correspond to oligomers or polymers or different enzyme forms.

Finally, the presence of acyl-glucose transferase, an enzyme responsible for acyl-glucose synthesis, was verified for the first time, in flower epidermis.

Εισαγωγή



1. Εισαγωγή

1.1 Η τομάτα

1.1.1 Καταγωγή - Ιστορική Εξέλιξη

Οι πληροφορίες σχετικά με την καταγωγή της τομάτας ήταν συγκεχυμένες. Αρχικά επικρατούσε η άποψη ότι χώρα καταγωγής της τομάτας είναι το Περού, όμως με τις πληροφορίες (ιστορικές, αρχαιολογικές, εθνοβοτανικές) που έδωσε ο Jenkins (1948), αργότερα έγινε αποδεκτό ότι χώρα καταγωγής της καλλιεργούμενης τομάτας είναι το Μεξικό και μάλιστα η περιοχή Vera Cruz-Puebla, απ' όπου αρχικά μεταφέρθηκε τον 16^ο αιώνα στην Ευρώπη και στη συνέχεια διασκορπίστηκε σε αρκετές περιοχές της γης. Είναι γνωστοί οι φόβοι που επικρατούσαν μέχρι τον 20^ο αιώνα στις περιοχές της Μεσογείου, της Β. Ευρώπης και στην Β. Αμερική, ότι οι τομάτες περιέχουν ουσίες τοξικές, γεγονός που εμπόδιζε την κατανάλωση. Οι φόβοι αυτοί οφείλονταν στην παρουσία δηλητηριωδών γλυκοαλκαλοειδών στα φύλλα και τους καρπούς άλλων μελών της ίδιας οικογένειας (Solanaceae). Αυτό ξεπεράστηκε στις αρχές του 20^{ου} αιώνα και από τότε η κατανάλωση της τομάτας αυξήθηκε σημαντικά (Ολύμπιος, 2001). Στην Ελλάδα η εισαγωγή της τομάτας έγινε στην Αθήνα το 1918 ως κηπευτική καλλιέργεια. Ως βιομηχανική πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκε μετά τον πρώτο παγκόσμιο πόλεμο στα Δωδεκάνησα και τη Νότια Ελλάδα. Η μεγάλη επέκταση της καλλιέργειας άρχισε μετά το 1960 και κυρίως το 1975 με τη δημιουργία βιομηχανικών μονάδων για παραγωγή τοματοπολτού, αποφλοιωμένης τομάτας και άλλων παραγώγων (Αγγίδης, 1996).

Οι λόγοι που καθιστούν την τομάτα δημοφιλές λαχανικό είναι πολλοί. Οι σπουδαιότεροι είναι ότι εφοδιάζει τον οργανισμό με βιταμίνες (ιδίως τη βιταμίνη C), έχει ελκυστικό χρώμα και ιδιαίτερο άρωμα, γεγονός που την καθιστά αρεστή στη διατροφή. Ποικιλίες της έχουν εγκλιματιστεί σε ένα μεγάλο εύρος τύπων εδάφους και κλίματος, αν και θα πρέπει να τονιστεί ότι το φυτό απαιτεί θερμό κλίμα και εδάφη με καλή στράγγιση. Σήμερα η καλλιέργεια της τομάτας εκτείνεται από τις τροπικές περιοχές μέχρι και μερικές μοίρες από τον αρκτικό κύκλο και στις μεν περιοχές όπου η διάρκεια της θερμής περιόδου το επιτρέπει, η τομάτα καλλιεργείται στο ύπαιθρο, ενώ σε άλλες περιοχές και σε περιόδους "εκτός εποχής" καλλιεργείται σε θερμοκήπια

και άλλες κατασκευές υπό προστασία. Η μορφή καλλιέργειας της τομάτας ποικίλει από την εκτατική (μεγάλες εκτάσεις σε γραμμική καλλιέργεια πλήρως μηχανοποιημένη, με εφάπαξ συγκομιδή με μηχανικά μέσα) έως την εντατική (καλλιέργεια σε θερμοκήπια, υποστύλωση, κλάδεμα, επαναλαμβανόμενη συγκομιδή με το χέρι). Σε διεθνή κλίμακα, η καλλιέργεια της τομάτας καταλαμβάνει την τρίτη σε έκταση θέση μετά την πατάτα και τη γλυκοπατάτα, ενώ στην Ελλάδα η επιτραπέζια τομάτα καταλαμβάνει τη δεύτερη σε έκταση θέση μετά την πατάτα. Σήμερα η τομάτα παίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στη διατροφή, κυρίως των Μεσογειακών λαών. Καλλιεργείται για τον καρπό της, ο οποίος καταναλώνεται ώριμος, νωπός, αποξηραμένος, σε άλμη, ακέραιος ή σε πολτό. Ακόμη και άωροι καρποί (τοξικοί εάν καταναλωθούν νωποί) συντηρούνται σε άλμη ή ξύδι (Ολύμπιος, 2001).

1.1.2 Βοτανικοί χαρακτήρες

Η τομάτα (*Solanum lycopersicum*) ανήκει στην οικογένεια *Solanaceae* (Σολανίδες) της τάξης *Scrophulariales* (*Personatae* – Προσωπανθή). Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει φυτά ετήσια, διετή ή πολυετή, ποώδη, θαμνώδη ή δενδρύλλια, όρθια ή αναρριχόμενα. Οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες των βλαστών είναι αμφίπλευρες. Τα φύλλα συνήθως είναι απλά, φέρονται κατ' εναλλαγή και σπανιότερα αντίθετα. Τα άνθη είναι αρσενικοθήλυκα, σπάνια δίκλινα, ακτινόμορφα, σπάνια ελαφρά ζυγόμορφα. Η ταξιανθία είναι κυματοειδής, συνήθως χωρίς βράκτεια. Ο κάλυκας είναι πενταμερής ή αποτελείται από τέσσερα σέπαλα ή πέντε λοβούς. Η στεφάνη είναι συμπέταλη, σωληνοειδής, τροχοειδής, αποτελούμενη από πέντε λοβούς. Οι στήμονες είναι πέντε, σπάνια τέσσερις ή δύο, διδύναμοι ή κάπως έτσι, ισομήκεις ή ανισομήκεις, εκφυόμενοι από τη στεφάνη και εναλλασσόμενοι με τους λοβούς της. Συνήθως σε κάθε άνθος υπάρχουν ένα έως δύο στημονώδη. Η ωοθήκη είναι επιφυής, έχει παχύ πλακούντα και αποτελείται από δύο καρπόφυλλα. Ο στύλος είναι ένας και το στίγμα ακέραιο ή δίλοβο. Ο καρπός χωρίζεται συνήθως σε δύο, σπάνια σε έναν ή σε τρεις έως πέντε χώρους. Κάθε χώρος περιέχει μία ή περισσότερες ανάτροπες σπερμοβλάστες, αξονικά τοποθετημένες. Συνήθως στο άνθος υπάρχει υπόγυνος δίσκος. Ο καρπός είναι ράγα ή πολύσπερμη κάψα. Τα σπέρματα είναι λεία ή βοθρυωτά εξωτερικά. Το σπέρμα περιέχει κυρτό ή δακτυλοειδές έμβρυο και ενδοσπέρμιο. Ορισμένα είδη της οικογένειας αυτής είναι ζιζάνια, ενώ άλλα είδη είναι εδώδιμα, φαρμακευτικά ή καλλωπιστικά. Τα πιο σημαντικά γένη της οικογένειας αυτής είναι τα παρακάτω:

Atropa, Solanum, Datura, Hyoscyamus, Capsicum, Nicotiana, Cestrum, Schizanthus, Lycium, Petunia, Physalis, Lycopersicum, Solandra, Mandragora, Salpiglossis και *Browallia* (Βαρδαβάκης, 1993).

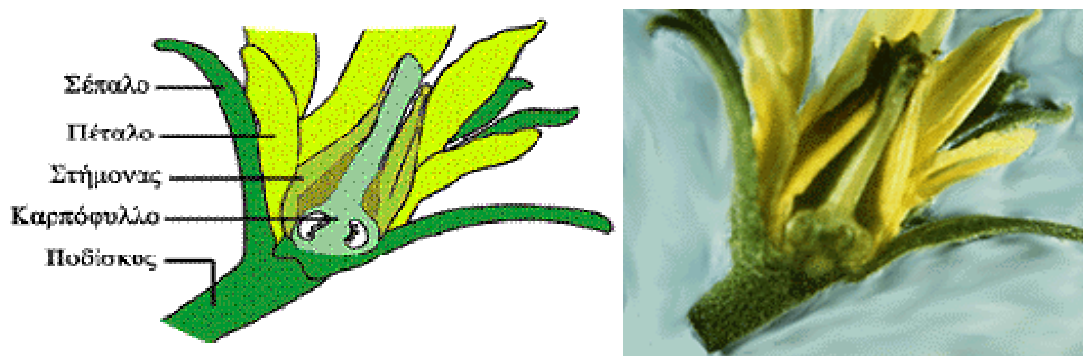
Η τομάτα είναι φυτό ποώδες, ετήσιο, διετές και σπανιότερα πολυετές, που φτάνει τα 1-3 m σε ύψος. Ολόκληρο το φυτό της τομάτας καλύπτεται από αδενώδεις τρίχες οι οποίες αναδίδουν ένα δυνατό άρωμα όταν σπάζουν. Το φυτό της τομάτας αναπτύσσει ευδιάκριτη κεντρική ρίζα, αρκετές δευτερεύουσες και ριζικά τριχίδια, όταν ο σπόρος σπέρνεται απευθείας στη μόνιμη θέση. Στην περίπτωση αυτή η πασσαλώδης ρίζα μπορεί να φτάσει σε βάθος 60 cm. Επειδή όμως, κατά κανόνα τουλάχιστον, στην καλλιέργεια στο θερμοκήπιο η τομάτα μεταφυτεύεται μία ή περισσότερες φορές, η κεντρική ρίζα κόβεται, καταστρέφεται και το φυτό αρχίζει να παράγει με "ευκολία" πολλές δευτερεύουσες πλευρικές ρίζες οι οποίες εξαπλώνονται επιφανειακά χωρίς να εισχωρούν σε μεγάλο βάθος. Οι δευτερεύουσες αυτές πλευρικές ρίζες παράγονται ακόμη και από το λαιμό του φυτού, γεγονός που θεωρείται πλεονέκτημα, γιατί διευκολύνει τη μεταφύτευση του φυτού ακόμη και με γυμνή ρίζα ή μπάλα χώματος, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι αυτή είναι και η ενδεδειγμένη τεχνική της καλλιέργειας της τομάτας. Το γεγονός ότι το φυτό εύκολα παράγει νέες ρίζες από το λαιμό του, βοηθά στη διαπίστωση των συνθηκών κάτω από τις οποίες ζει και αναπτύσσεται το ριζικό σύστημα. Για παράδειγμα, εάν παρατηρηθούν εξογκώματα ή εναέριες ρίζες στην περιοχή του λαιμού του φυτού, δημιουργείται η υποψία ότι η κατάσταση στο ριζόστρωμα είναι προβληματική, λόγω π.χ. κακού αερισμού, υπερβολικής υγρασίας, συμπίεσης του εδάφους, κ.α. (Ολύμπιος, 2001).

Ο βλαστός της τομάτας έχει κυλινδρικό σχήμα και εσωτερικά είναι πλήρης. Στα πρώτα στάδια της ανάπτυξής του είναι τρυφερός, εύθραυστος, χυμώδης και μαλακός. Αργότερα όμως γίνεται σταδιακά πιο σκληρός, αποκτά μηχανική αντοχή, χωρίς να ξυλοποιείται και είναι σχετικά εύθραυστος. Ο κεντρικός βλαστός φέρει τα πραγματικά φύλλα, στις μασχάλες των οποίων υπάρχουν οφθαλμοί που δίνουν πλευρικούς βλαστούς. Πολλές φορές, οι πλευρικοί βλαστοί που βρίσκονται κοντά στην κορυφή του φυτού είναι τόσο ζωντοί, που με δυσκολία μπορεί κανείς να ξεχωρίσει ποιος είναι ο κεντρικός βλαστός και ποιος ο πλευρικός. Στην κορυφή του στελέχους μπορεί να υπάρχουν ταξιανθίες ή διακλαδώσεις στελεχών (Ολύμπιος, 2001).

Το φυτό της τομάτας έχει σύνθετα πραγματικά φύλλα. Κάθε φύλλο αποτελείται από ζεύγη φυλλαρίων και παράφυλλων, με ένα μόνο φυλλάριο στην άκρη. Ο αριθμός των ζευγών φυλλαρίων σε κάθε φύλλο διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία και τη θέση

του φύλλου επί του βλαστού. Είναι δυνατόν να συναντηθούν ποικιλίες με τρία, τέσσερα ή πέντε ζεύγη φυλλαρίων. Τα πρώτα πραγματικά φύλλα μιας συγκεκριμένης ποικιλίας έχουν μικρότερο αριθμό ζευγών. Εκτός από τον αριθμό των ζευγών, και το μέγεθος των φύλλων (μήκος - πλάτος) που είναι χαρακτηριστικό της κάθε ποικιλίας, επηρεάζεται όμως και από τις συνθήκες καλλιέργειας. Συνήθως οι μεγαλόκαρπες ποικιλίες έχουν πιο μακριά και πιο πλατιά φύλλα, ενώ στις μικρόκαρπες ποικιλίες οι διαστάσεις των φύλλων είναι μικρότερες. Τα φύλλα εμφανίζονται σε ελικοειδή διάταξη πάνω στο βλαστό. Καλύπτονται από αδενώδεις τρίχες, που εκκρίνουν μια ουσία με χαρακτηριστικό άρωμα. Η επάνω επιφάνεια των φύλλων έχει χρώμα λαμπερό βαθύ πράσινο και η κάτω ελαιώδες ανοικτό πράσινο (Ολύμπιος, 2001).

Τα άνθη της τομάτας εμφανίζονται σε ταξιανθίες (σταυρούς) από δύο έως τρία άνθη ανά ταξιανθία μέχρι 20 ή και περισσότερα. Ένας μέσος επιθυμητός αριθμός ανθέων ανά ταξιανθία που θα εξελιχθεί σε καρπούς είναι έξι έως οχτώ άνθη. Οι ταξιανθίες εμφανίζονται επί των βλαστών του φυτού και διακλαδίζονται συμμετρικά ή ασύμμετρα, ανάλογα με την ποικιλία. Στο άκρο κάθε διακλάδωσης υπάρχει και ένα άνθος. Το άνθος (**Εικόνα 1**), φέρει πράσινο δερματώδη κάλυκα που αποτελείται από πέντε ή περισσότερα σέπαλα, στεφάνη κίτρινη με πέντε ή περισσότερα ενωμένα πέταλα, πέντε ή περισσότερους στήμονες ενωμένους στη βάση τους με τη στεφάνη και ενωμένους κατά μήκος μεταξύ τους, ώστε να σχηματίζουν κώνο γύρω από τον στύλο ο οποίος είναι συνήθως πιο κοντός και εγκλωβίζεται από τους ανθήρες, στίγμα και ύπερο με καλά αναπτυγμένη ωοθήκη. Η ωοθήκη είναι πολύχωρη με δύο έως επτά ή και περισσότερους χώρους και κάθε χώρος έχει πολλά ωάρια (Ολύμπιος, 2001).



Εικόνα 1: Ανατομία του άνθους της τομάτας

Τα άνθη είναι ερμαφρόδιτα και αυτογονιμοποιούνται, αν και κάτω από ορισμένες συνθήκες μπορεί να σταυρογονιμοποιηθούν. Η κατασκευή του άνθους με

το στύλο πιο κοντό και το στίγμα να περιβάλλεται από τον κώνο που σχηματίζουν οι ανθήρες, βοηθά στην αυτογονιμοποίηση. Η τομάτα είναι ουδέτερο φυτό όσον αφορά τον φωτοπεριοδοτισμό ή μπορεί να ευνοείται από συνθήκες μικρής ημέρας. Η γονιμοποίηση γίνεται δύο μέρες περίπου μετά την επικονίαση και επηρεάζεται σημαντικά από τη σχετική υγρασία του περιβάλλοντος, την ταχύτητα του ανέμου και τη θερμοκρασία. Μετά τη γονιμοποίηση η ανάπτυξη και ωρίμανση του καρπού γίνεται συνήθως σε διάστημα 45-60 ημερών, που εξαρτάται από την ποικιλία, τις κλιματικές και τις καλλιεργητικές συνθήκες.

Ο καρπός της τομάτας είναι πολύχωρος ράγα, με ποικίλα σχήματα και αποτελείται από τον φλοιό, τη σάρκα (πούλπα) και τους σπόρους. Ο φλοιός σχηματίζεται από άχρωμα ή κίτρινα πολυγωνικά, λεία κύτταρα που σχηματίζουν μία μεμβράνη. Η σάρκα σχηματίζεται από μεγάλα, ωοειδή κύτταρα που περιέχουν τη χρωστική ουσία λυκοπένιο. Ο καρπός ποικιλιών με δύο χώρους είναι συνήθως σφαιρικός, ενώ αυτών με τρεις, τέσσερις, πέντε ή περισσότερους χώρους είναι πεπλατυσμένος και μερικές φορές ακανόνιστος. Το βάρος του καρπού είναι, συνήθως, στις βιομηχανικές ποικιλίες 60-120 g και στις επιτραπέζιες 150-300 g. Το χρώμα του καρπού είναι συνήθως κόκκινο, υπάρχουν όμως και ποικιλίες που έχουν χρώμα πορτοκαλί, κίτρινο, ροζ ή λευκό. Ο χρωματισμός των καρπών της τομάτας οφείλεται σε δύο χρωστικές, το καροτένιο (κίτρινο) και το λυκοπένιο (κόκκινο), και επηρεάζεται από τη σχέση των χρωστικών αυτών και την θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Το κόκκινο χρώμα οφείλεται στο καροτενοειδές λυκοπένιο ενώ το πορτοκαλί στο β-καροτένιο (προβιταμίνη Α). Σε μικρότερες ποσότητες υπάρχουν επίσης άλλα καροτενοειδή και ξανθοφύλλες. Το λυκοπένιο δε χρειάζεται φως για να σχηματισθεί. Οι καρποί μετά τη συγκομιδή κοκκινίζουν και στο σκοτάδι. Θερμοκρασίες άνω των 32 °C εμποδίζουν τη σύνθεση του λυκοπένιου, όχι όμως του β-καροτένιου, γι' αυτό και όταν επικρατούν υψηλές θερμοκρασίες οι καρποί δεν έχουν βαθύ κόκκινο χρώμα αλλά πορτοκαλί.

Οι καρποί της τομάτας περιέχουν 94-95% νερό, ενώ το υπόλοιπο 5-6% συνίσταται κυρίως από σάκχαρα, οργανικά οξέα και άλλα συστατικά (**Εικόνα 2**). Κατά την ωρίμανσή τους, συμβαίνουν δραματικές μεταβολές στη χημική σύσταση οι οποίες προσδίδουν στον καρπό χαρακτηριστική γεύση, άρωμα και υφή (Tigchelaar, 1986).



Εικόνα 2: Συστατικά ενός ώριμου τυπικού καρπού τομάτας

Οι βιομηχανικές ποικιλίες έχουν πιο παχιά κυτταρικά τοιχώματα και υψηλότερη περιεκτικότητα σε διαλυτά στερεά. Οι καρποί είναι σημαντική πηγή αντιοξειδωτικών και βιταμίνης C. Μερικές ποικιλίες βελτιώνονται ειδικά για υπέρ υψηλή περιεκτικότητα σε καροτενοειδή και χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία. Η τομάτα αποτελεί ιδανικό φυτό για γενετικές μελέτες λόγω του απλού συστήματος αναπαραγωγής, της ευκολίας της καλλιέργειας και της μεγάλης γενετικής ποικιλομορφίας σε καλλιεργούμενα και αγρίου τύπου είδη (Tigchelaar, 1986).

Ο σπόρος της τομάτας είναι ωοειδής, πεπλατυσμένος, χρώματος κίτρινο-καφέ-χρυσάφενιος και η επιφάνειά του καλύπτεται με τριχοειδείς αποφύσεις που του δίνουν μεταξώδη επιφάνεια (διαφορά από μελιτζάνα και πιπεριά). Οι σπόροι διατάσσονται πάνω στον κεντρικό άξονα, στο κέντρο της ράγας και βρίσκονται μέσα σε καθορισμένους χώρους, που έχουν ακτινωτή διάταξη. Καλύπτονται από ένα κιτρινωπό υγρό που περιέχει κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και πηκτίνες. Το μέγεθος των σπόρων είναι μικρό με διάμετρο 3-5 mm. Εσωτερικά ο σπόρος φέρει κυρτό (σπειροειδές) έμβρυο που περιβάλλεται από ένα μικρό ενδοσπέρμιο. Ο σπόρος της τομάτας διατηρεί υπό κανονικές συνθήκες αποθήκευσης τη βλαστικότητα του για τέσσερα τουλάχιστον χρόνια μετά τη συγκομιδή του, εάν όμως αποθηκευτεί σε χαμηλή θερμοκρασία και με χαμηλή περιεκτικότητα των σπόρων σε υγρασία, εύκολα διατηρεί τη βλαστικότητά του για πάνω από 10 χρόνια. Ένα γραμμάριο σπόρου περιέχει περίπου 450 σπέρματα (Ολύμπιος, 2001).

1.1.3 Εδαφοκλιματικές απαιτήσεις

Η τομάτα είναι φυτό θερμής εποχής και ευπαθές στον παγετό, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 21-23°C. Οι πολύ χαμηλές και οι πολύ υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα στην διαμόρφωση του καρπού και παραμορφώσεις. Επίσης χρειάζεται άμεση ηλιοφάνεια. Τα σκιασμένα φυτά μπορεί να έχουν προβλήματα στην διαμόρφωση του καρπού ή καθυστέρηση καρποφορίας. Η τομάτα μπορεί να καλλιεργηθεί σε όλες σχεδόν τις κατηγορίες εδαφών (οργανικά, ελαφρά, μέσης συστάσεως, ακόμη και βαριά) αρκεί να στραγγίζουν καλά. Το άριστο pH εδάφους ανάπτυξης των φυτών κυμαίνεται μεταξύ 5.5 και 7.5. Σε όλες τις περιπτώσεις, είναι επιθυμητή η μεγάλη περιεκτικότητα του εδάφους σε οργανική ουσία καθώς και σε ανόργανα θρεπτικά στοιχεία. Πρέπει να αποφεύγονται τα αλατούχα εδάφη. Επίσης, είναι απαραίτητο να αποφεύγονται οι υψηλές συγκεντρώσεις των μεταλλικών αλάτων κοντά στο ριζικό σύστημα, γιατί προκαλείται περιορισμένη βλάστηση της καλλιέργειας και ατροφία στις ρίζες. Η διάρκεια του βιολογικού κύκλου της τομάτας, εξαρτάται από τις κλιματικές συνθήκες και κατά δεύτερο λόγο από την ποικιλία. Το φυτό χρειάζεται το λιγότερο τέσσερις μήνες χωρίς παγετούς για να μπορέσει να συμπληρώσει τον βιολογικό του κύκλο, από τη σπορά μέχρι την έναρξη της συγκομιδής.

1.2 Η πυροφωσφορυλάση της ουριδινοδιφωσφορογλυκόζης (UGPάση)

1.2.1 Γενικά

Η πυροφωσφορυλάση της ουριδινοδιφωσφορογλυκόζης (UGPάση) (EC 2.7.7.9) ανήκει στην οικογένεια των γλυκοζυλοτρανσφερασών (PF01702) (Sonnhammer *et al.*, 1997) και εμπλέκεται στην παραγωγή ουριδινοδιφωσφορογλυκόζης (UDP-γλυκόζη). Η UDP-γλυκόζη είναι η ενεργοποιημένη μορφή γλυκόζης που υπάρχει σε όλους τους οργανισμούς και θεωρείται ένα πρόδρομο μόριο κλειδί για τη σύνθεση πολυσακχαριτών. Εμπλέκεται στις αντιδράσεις μεταφοράς γλυκόζης καθώς και ως πρόδρομο μόριο για την παραγωγή πολλών ενεργοποιημένων μορφών σακχάρων. Η UGPάση απαντάται σε όλους τους προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των υδατανθράκων και καταλύει την αμφίδρομη αντίδραση παραγωγής UDP-γλυκόζης και πυροφωσφορικών (PPi) από 1-φωσφορογλυκόζη (Glc-1-P) και ουριδινοτριφωσφορικό οξύ (UTP). Η αντίδραση της UGPάσης, είναι συντηρημένη στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και γίνεται με την παρουσία ιόντος Mg^{+2} (Turnquist and Hansen, 1974):



Η παραπάνω αντίδραση εξαρτάται από την μεταβολική κατάσταση των ιστών. Σε φωτοσυνθετικούς ιστούς (ώριμα φύλλα), η UGPάση δρα σε συνεργασία με τη συνθάση της φωσφορικής σακχαρόζης (SPS), αφομοιώνει 1-φωσφορογλυκόζη σε UDP-γλυκόζη και εμπλέκεται κυρίως στη σύνθεση σακχαρόζης που είναι το κύριο φωτοσυνθετικό προϊόν. Η σακχαρόζη είτε αποθηκεύεται στο χυμοτόπιο είτε διακινείται προς τους μη φωτοσυνθετικούς ιστούς όπου υδρολύεται και χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας κατά τη διάρκεια της αναπνοής ή ως πηγή άνθρακα για τη βιοσύνθεση κυτταρικών τοιχωμάτων ή προϊόντων του ενδιάμεσου μεταβολισμού (Witt, 1992; Kleczkowski, 1994b; Amor *et al.*, 1995; Johansson *et al.*, 2002; Flores-Diaz *et al.*, 1997; Bishop *et al.*, 2002). Σε μη φωτοσυνθετικούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων και των φυλλικών καταβολών, που εξαρτώνται από τα εισαγόμενα αποθέματα άνθρακα, η UGPάση συνδέεται με τα μονοπάτια αποδόμησης της σακχαρόζης μέσω μετατροπής της UDP-γλυκόζης που παράγεται από τη συνθάση της σακχαρόζης (SuSy) (ap Rees, 1992; Winter and Huber, 2000) σε 1-φωσφορο-

γλυκόζη για τη χρήση της σε διάφορες μεταβολικές διεργασίες (Winter and Huber, 2000). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η δεξαμενή UDP-γλυκόζης στα ώριμα φύλλα προέρχεται από την 1-φωσφορογλυκόζη μέσω της αντίδρασης της UGPάσης ενώ στους ιστούς κατανάλωσης, η μεγαλύτερη παραγωγή UDP-γλυκόζης προέρχεται από τη SuSy (Zrenner *et al.*, 1995; Tang and Sturm, 1999). Η UGPάση και η SuSy καταλύουν αντιστρεπτές αντιδράσεις και κατά αυτό τον τρόπο μπορούν να εμπλέκονται στη σύνθεση και αποδόμηση της σακχαρόζης, κάτι που εξαρτάται από τη μεταβολική κατάσταση του κυττάρου. Σε αναπτυσσόμενα σπέρματα δημητριακών, η UGPάση μπορεί επίσης να συνδεθεί με την κυτοπλασματική AGPάση και να μετατρέψει άμεσα τη UDP-γλυκόζη σε ADP-γλυκόζη που χρησιμοποιείται στη βιοσύνθεση αμύλου (Kleczkowski, 1994a). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (Echeverria *et al.*, 1988; Sasaki *et al.*, 1980) η UDP-γλυκόζη είναι δυνατόν να συμμετέχει άμεσα στη βιοσύνθεση του αμύλου. Αυτό επιβεβαιώνει τη στενή σχέση των αντιδράσεων μεταβολισμού της σακχαρόζης και σύνθεσης αμύλου στα αναπτυσσόμενα σπέρματα.

Η σειρά πρόσδεσης των υποστρωμάτων της αντίδρασης είναι καθορισμένη. Πρώτα προσδένεται στο ένζυμο το UTP, κατόπιν η 1-φωσφορο-γλυκόζη, ενώ η UDP-γλυκόζη προσδένεται νωρίτερα σε σχέση με τα ανόργανα φωσφορικά στην αντίστροφη αντίδραση (Tsuboi *et al.*, 1969; Lamerz *et al.*, 2006). Η κατεύθυνση της αντίδρασης ποικίλει ανάλογα με την ιστοειδίκευση, προς παραγωγή UDP-γλυκόζης σε νεαρά και ώριμα φύλλα και στην αντίθετη κατεύθυνση στις φυλλικές καταβολές (Kleczkowski *et al.*, 2004).

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η UDP-γλυκόζη χρησιμοποιείται για τη σύνθεση αποθησαυριστικών πολυσακχαριτών όπως είναι το γλυκογόνο στα ζώα (Alonso *et al.*, 1995), τα τμήματα γλυκανών στα γλυκολιπίδια και στις γλυκοπρωτεΐνες, οι δισακχαρίτες τρεχαλόζης στις ζύμες, η σακχαρόζη που είναι η κύρια ουσία μεταφοράς των υδατανθράκων στα φυτά (Feingold and Barber, 1990; Mikami *et al.*, 2001; Bishop *et al.*, 2002; Yagi *et al.*, 2003) και οι δομικοί πολυσακχαρίτες π.χ. κυτταρίνη (Gibeaut, 2000). Πιο συγκεκριμένα, η UDP-γλυκόζη είναι πρόδρομο μόριο στη σύνθεση της κυτταρίνης και της καλλόζης που λαμβάνει χώρα στο πλασμάλλημα και συνεισφέρει κατά τον τρόπο αυτό έμμεσα στο σχηματισμό όλων των άλλων πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων (Schlöpmann *et al.*, 1994; Amor *et al.*, 1995; Gibeaut, 2000; Johansson *et al.*, 2002; Seifert, 2004). Η UDP-γλυκόζη είναι επίσης το πρόδρομο μόριο του UDP-

γλυκουρονικού οξέος (Aw and Jones, 1982, 1984) και της UDP-γαλακτόζης που είναι δότες γλυκοσυλίων και συνεισφέρουν σε διάφορες διαδικασίες όπως η σύνθεση των πρωτεογλυκανών (Silbert and Sugumaran, 1995). Στην αντίθετη κατεύθυνση, οι αντιδράσεις που καταλύονται από την τρανσφεράση της ουριδιλυλο-1-φωσφορογαλακτόζης (GALT) και την επιμεράση της UDP-γαλακτόζης απαιτούνται για την χρήση της γαλακτόζης (Frey, 1996). Λειτουργικά προβλήματα στα ένζυμα αυτού του μονοπατιού έχουν ως αποτέλεσμα τη γαλακτοζαιμία, μια σοβαρή ασθένεια που προκαλείται από τη δυσλειτουργία στο μεταβολισμό της γαλακτόζης. Το γενετικά απομακρυσμένο συγγενές βακτηριακό ομόλογο της UGPάσης (GalU), λαμβάνει μέρος στη σύνθεση πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου που θεωρείται σημαντικό για τη μολυσματικότητα ορισμένων παθογόνων βακτηρίων (Chang *et al.*, 1996; Dean and Goldberg, 2002).

Η σακχαρόζη είναι η κυριότερη μορφή μεταφοράς σκελετών άνθρακα στα φυτά καθώς είναι η κύρια πηγή ενέργειας και σκελετών άνθρακα όλων των βιομορίων. Προσφέρει επίσης τις πρώτες ύλες από τις οποίες τα φυτά βιοσυνθέτουν τα κυτταρικά τους τοιχώματα. Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι οποιαδήποτε ρύθμιση της βιοσύνθεσης των σακχάρων, ειδικότερα της σακχαρόζης είναι πρωτεύοντος ενδιαφέροντος στην κατανόηση των στρατηγικών αύξησης και ανάπτυξης ενός φυτού. Επιπλέον, τα σάκχαρα θεωρούνται ισχυροί ρυθμιστές της έκφρασης των γονιδίων μέσω π.χ της εξοζοκινάσης (HXK) και του μηχανισμού μετατροπής εξοζών (Kleczkowski *et al.*, 2004).

Παρά τη σημαντική θέση της στο σταυροδρόμι σύνθεσης ή και διάσπασης της σακχαρόζης, η UGPάση δεν έχει λάβει την απαραίτητη προσοχή σε σχέση με τα άλλα ένζυμα του μεταβολισμού της σακχαρόζης. Ένας από τους λόγους είναι ότι αυτό το ένζυμο έχει μεγάλη δραστηριότητα (σε σχέση με άλλα) στο μονοπάτι της σακχαρόζης και πιθανώς να μην έχει ρυθμιστικό ρόλο στη ροή άνθρακα από και προς την σακχαρόζη. Επιπλέον, μελέτη της UGPάσης της πατάτας με τη χρήση αντινοσηματικού RNA έδειξε ότι η μείωση κατά 96% της δραστηριότητας της UGPάσης στους κονδύλους δεν επέφερε καμία αλλαγή στα επίπεδα των σακχάρων (Zrenner *et al.*, 1993). Όμως, υπάρχουν πολλές ενδείξεις για το ρυθμιστικό ρόλο της UGPάσης σε επίπεδο γονιδίων και πρωτεϊνών και έχουν δημιουργηθεί ερωτήματα εάν κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες το ένζυμο καθορίζει την ταχύτητα των αντιδράσεων.

1.2.2 Δομή του ενζύμου

Το μόριο της UGRάσης στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς αποτελείται από 500 περίπου αμινοξέα και βρίσκεται σε αφθονία στο κυτταρόπλασμα. Οι ευκαρυωτικές αλληλουχίες είναι υψηλά συντηρημένες, π.χ η UGRάση του ανθρώπου και του *Saccharomyces cerevisiae* είναι κατά 55% ταυτόσημες πράγμα που πιθανόν να σημαίνει και υψηλή ομολογία σε δομικό επίπεδο (Daran *et al.*, 1995; Peng and Chang, 1993). Ισότυποι με υψηλή ομολογία υπάρχουν σε πολλά είδη (Bishop *et al.*, 2002; Duggleby *et al.*, 1996; Kleczkowski *et al.*, 2004).

Για τα φυτικά ομόλογα της UGRάσης έχει προταθεί η ύπαρξη μονομερών και διμερών μορφών που μπορεί να συνυπάρχουν (Kleczkowski *et al.*, 2005; Martz *et al.*, 2002), σε αντίθεση με τα ζώα που φαίνεται ότι σχηματίζουν οκταμερή σύμπλοκα (Turnquist and Hansen, 1974). Επίσης, έχει προταθεί ότι η δομή της UGRάσης του πρωτόζωου παράσιτου *Leishmania major* είναι μονομερής (Lamerz *et al.*, 2006).

1.2.2.1 Δομή της UGRάσης στο *Saccharomyces cerevisiae*

Οι Roeben *et al* (2006) μελέτησαν τη δομή της UGRάσης στη ζύμη. Η Ugr1p στο *S. cerevisiae* θεωρείται απαραίτητη για τη βιωσιμότητά της (Daran *et al.*, 1995). Η Ugr1p σχηματίζει ομοοκταμερή που αποτελούν την ενεργή μορφή του ενζύμου τόσο σε διαλύματα όσο και σε κρυσταλλική μορφή. Οι υπομονάδες της Ugr1p αποτελούνται από τρεις περιοχές, με το ενεργό κέντρο να εδράζεται στην κεντρική περιοχή SpsA GnT I (SGC). Η σύνδεση στο οκταμερές επιτυγχάνεται μεταξύ των αριστερόστροφων β-ελίκων στις C-τελικές περιοχές που σχηματίζουν μια δακτυλιοειδή σωληνοειδή δομή στον πυρήνα του συμπλόκου. Οι καταλυτικές περιοχές που συνδέονται με το πλαίσιο στήριξης του πυρήνα δεν επικοινωνούν άμεσα μεταξύ τους, πράγμα που συμφωνεί με απλές κινητικές Michaelis-Menten που βρέθηκαν για την Ugr1p. Η ύπαρξη συντηρημένων υδρόφοβων καταλοίπων στις επιφάνειες των υπομονάδων δείχνει ότι όλα τα ομόλογα των μυκήτων και των ζώων σχηματίζουν αυτή την τεταρτοταγή δομή σε αντίθεση με την μονομερή δομή των φυτικών UGRασών, που έχουν θετικά φορτισμένα κατάλοιπα σε αυτές τις περιοχές (Roeben *et al.*, 2006). Δομικά, η ευκαρυωτική UGRάση και πιθανόν το προκαρυωτικό της ομόλογο (GalU) ανήκουν στην υπεροικογένεια των πρωτεϊνών και μοιράζονται

το χαρακτηριστικό συντηρημένο μοτίβο LxxGxGTxxxxxxPK (Unligil and Rini, 2000; Wang-Gillam *et al.*, 2000; Mio *et al.*, 1998).

1.2.2.2 Δομή των υπομονάδων της Ugp1p

Οι Roeben *et al* (2006) έδειξαν ότι η Ugp1p είναι μια πρωτεΐνη που αποτελείται από τρεις περιοχές. Αυτές οι περιοχές είναι διευθετημένες με γραμμικό τρόπο έτσι ώστε οι N- και C- τελικές περιοχές να βρίσκονται στα άκρα και να μην συνδέονται άμεσα. Η συγκριτικά μικρότερη N-περιοχή που κατά μεγάλο ποσοστό σε κρυσταλλική δομή δεν παρουσιάζει ιδιαίτερη οργάνωση, αποτελείται από ένα κολεό, δύο ελικοειδείς περιοχές στο N-τελικό άκρο (κατάλοιπα 20-69) και δύο μεγάλους σε μέγεθος βρόγχους (κατάλοιπα 187-215 και 339-363) που προεξέχουν από τον κεντρικό τομέα και σχηματίζουν δομές β-hairpin. Ο κεντρικός τομέας ανήκει στην οικογένεια του SGC τομέα και αποτελείται από κεντρικό τμήμα οκτώ β-πτυχωτών επιφανειών που γειτνιάζουν με α-έλικες. Η C-τελική περιοχή αρχίζει στο κατάλοιπο 389 και ξεκινά με α-έλικα που ακολουθείται από μια μικρή δομή β-hairpin και οδηγεί σε αριστερόστροφη β-ελικοειδή δομή. Σε αυτό το δομικό στοιχείο, οι β-κλώνοι είναι γύρω από έναν τριγωνικό πυρήνα από παρεμβαλλόμενες υδροφοβες πλευρικές αλυσίδες με τους δεσμούς υδρογόνου να ευθυγραμμίζονται κατά μήκος του ελικοειδή άξονα.

1.2.2.3 Κατάσταση ολιγομερίωσης της Ugp1p

Οι Roeben *et al* (2006) έδειξαν ότι η ενδογενής Ugp1p στο *S. cerevisiae* απαντάται ως οκταμερές. Δεν παρατηρήθηκε αποδιοργάνωσή της σε μικρότερες μονάδες στις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις του πειράματος. Γι' αυτό φαίνεται απίθανο να λειτουργούν μηχανισμοί ρύθμισης της δραστηριότητας της UGPάσης της ζύμης για την οργάνωση και την αποδιοργάνωση του συμπλόκου. Αντίθετα, στην ομόλογη πρωτεΐνη του ανθρώπου UAP όπου οι C-τελικές περιοχές δεσμεύουν το ενεργό κέντρο των αντιτασσόμενων υπομονάδων στην διμερή κατάσταση, στη δομή της UGPάσης της ζύμης, οι καταλυτικοί τομείς της Ugp1p δεν συμμετέχουν στην ολιγομερίωση και γι' αυτό δεν αναμένεται καμιά σημαντική παρεμπόδιση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά τη διάρκεια οργάνωσης της πρωτεΐνης. Όμως, η UGPάση του κριθαριού σχηματίζει διμερή και ολιγομερή αλλά μόνο τα μονομερή

είναι δραστικά (Martz *et al.*, 2002). Οπότε στις φυτικές UGRάσες θα πρέπει να υπάρχει άλλος τρόπος οργάνωσης.

Στο οκταμερές σύμπλοκο της ζύμης, οι περιφερειακοί N-τελικοί τομείς φαίνεται να λειτουργούν ως ρυθμιστικές μονάδες της ενζυμικής δραστικότητας (Roeben *et al.*, 2006). Παρόλα αυτά, οι λεπτομέρειες της ρύθμισης δεν έχουν βρεθεί. Τέλος, είναι πιθανόν το N-τελικό άκρο της Ugr1p το οποίο είναι εκτεθειμένο στο οκταμερές σύμπλοκο του ενζύμου να έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ενζυμικής δραστικότητας.

1.2.2.4 Η UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνη (AGX1) ως πρότυπο των UGRάσων

Μεγάλη πρόοδος στις μελέτες των πυροφωσφορυλασών ήταν η κρυστάλλωση της ανθρώπινης AGX1 (Peneff *et al.*, 2001). Αυτή η πρωτεΐνη σχετίζεται λειτουργικά και έχει περίπου 40% ομολογία στην πρωτεϊνική της ακολουθία με τις UGRάσες. Σε παλαιότερες έρευνες η δομή της AGX1 χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο για την UGRάση του κριθαριού.

Η γενικά θεωρούμενη τρισδιάστατη δομή του μονομερούς της UGRάσης έχει μορφή μπολ (bowl-like) με το ενεργό κέντρο να βρίσκεται σε ένα κεντρικό αυλάκι. Αυτό το σχήμα είναι κοινό για την AGX1 και την UGRάση και ίσως για όλες τις πρωτεΐνες τύπου πυροφωσφορυλασών (Peneff *et al.*, 2001). Το ενεργό κέντρο της UGRάσης περιέχει αρκετά αμινοξικά κατάλοιπα που είναι σημαντικά για την πρόσδεση του υποστρώματος και την κατάλυση του ενζύμου. Η Trp-191, η Trp-302, και η Lys-260 (βασισμένα σε αμινοξική αλληλουχία της UGRάσης του κριθαριού) έχουν προταθεί ότι εμπλέκονται στη πρόσδεση της UDP-γλυκόζης στην UGRάση (Kazuta *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1996). Στη δομή της UGRάσης του κριθαριού το θετικό φορτίο της Lys-260 μπορεί να σταθεροποιήσει τα αρνητικά φορτία των δύο φωσφορικών της UDP-γλυκόζης. Οι Gly-91 και Cys-99 βρίσκονται ανάμεσα σε αυτό που οι Peneff *et al.* (2001) αναφέρουν ως δακτύλιο NB, έναν τομέα κοινό για τις πυροφωσφορυλάσες. Η Cys-99 του κριθαριού βρίσκεται στο μέσο του δακτυλίου και πάνω από τα δύο φωσφορικά της UDP-γλυκόζης, μια ιδανική δηλαδή θέση για πρόσδεση και σταθεροποίηση της γέφυρας των πυροφωσφορυλασών. Αντίθετα η Gly-91 βρίσκεται στο άκρο του δακτυλίου NB και αντιδρά με το κατάλοιπο της UDP-γλυκόζης.

1.2.2.5 Δομή της UGRάσης στο *Arabidopsis thaliana*

Οι McCoy *et al* (2007) παρουσίασαν τρεις κρυσταλλικές δομές της UGRάσης που κωδικοποιούνται από το γονίδιο At3g03250 στο *Arabidopsis thaliana*. Η πρώτη δομή αναφέρεται στο ένζυμο και οι άλλες δύο παρουσιάζουν το ένζυμο προσδεμένο με την UDP-γλυκόζη ή το UTP αντίστοιχα. Οι τρεις δομές αποκάλυψαν μια καταλυτική περιοχή παρόμοια με αυτή άλλων νουκλεοτιδυλο-γλυκοζυλο-πυροφωσφορυλασών με μια C-τελική περιοχή β-έλικας με μοναδικό προσανατολισμό. Παρατηρήθηκαν αλλαγές στη διαμόρφωση του πρωτεϊνικού μορίου μεταξύ του ενζύμου και του συμπλόκου δέσμησης του υποστρώματος. Ο νουκλεοτιδικός δακτύλιος πρόσδεσης και η C-τελική περιοχή που περιλαμβάνουν το καταλυτικά σημαντικό κατάλοιπο Lys360 κινούνται εντός και εκτός του ενεργού κέντρου με συντονισμένο τρόπο.

Η UGRάση σχηματίζει τέσσερις δομικές περιοχές (**Εικόνα 3**) οι οποίες αποτελούνται από 469 κατάλοιπα. Η μεγαλύτερη περιοχή περιλαμβάνει τα κατάλοιπα 56-160, 193-249, 291-317 και 334-359. Αυτή η κεντρική περιοχή αποτελείται από μια β-πτυχωτή επιφάνεια οκτώ κλώνων που σχηματίζει τον πυρήνα του ενζύμου. Η β-πτυχωτή επιφάνεια περιβάλλεται από έλικες και από τις δύο πλευρές και επεκτείνεται σε μια μικρή β-πτυχωτή επιφάνεια δύο κλώνων. Οι άλλες τρεις περιοχές είναι μικρότερες, προεξέχουν της κεντρικής και σχηματίζουν μια θετικά φορτισμένη κοιλότητα ενεργού κέντρου. Η μεγαλύτερη περιοχή από αυτές είναι η C-τελική περιοχή που περιέχει τα κατάλοιπα 360-469. Αυτή η περιοχή αποτελείται κυρίως από μια β-έλικα που σχηματίζεται από δύο παράλληλες πτυχωτές επιφάνειες, λίγες έλικες και μια β-πτυχωτή επιφάνεια δύο κλώνων. Η N-τελική περιοχή αποτελείται από τα κατάλοιπα 6-40, 161-192 και 318-333, ενώ η περιοχή όπου προσδέεται η σακχαρόζη αποτελείται από τα κατάλοιπα 41-55 και 250-290 που έχουν κυρίως δομή έλικας αλλά αποτελούνται και από δύο β-κλώνους και σχηματίζουν μια β-πτυχωτή επιφάνεια τεσσάρων αντιπαράλληλων κλώνων. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου βρίσκεται σε κοιλότητα της επιφάνειας των παραπάνω τεσσάρων περιοχών, με ευδιάκριτη δυνατότητα θετικής ηλεκτροστατικής επιφάνειας (McCoy *et al.*, 2007).



Εικόνα 3: Η δομή του μονομερούς της UGRάσης στο *Arabidopsis thaliana*. Οι περιοχές που αποτελούν το ένζυμο είναι οι εξής: κεντρική περιοχή (μπλε), C-τελική περιοχή (κόκκινο), N-τελική περιοχή (μωβ), περιοχή πρόσδεση της σακχαρόζης (πράσινο) (McCoy *et al.*, 2007).

1.2.2.6 Κατάσταση ολιγομερίωσης της UGRάσης στο *Arabidopsis thaliana*

Η κρυσταλλική δομή κατέδειξε την παρουσία διμερούς μορφής του ενζύμου παρά τις ενδείξεις που πρότειναν την ύπαρξη μόνο μονομερών. Ο προσανατολισμός των μονομερών στο διμερές είναι τέτοιος ώστε η N-τελική περιοχή κάθε μονομερούς να γειτνιάζει με το ενεργό κέντρο του άλλου μονομερούς. Τα κατάλοιπα των αμινοξέων που συμμετέχουν σε αυτή την αλληλεπίδραση είναι τα 170-182, 256, 320-328, 395-402 και 446 και των δύο αλυσίδων, όπως επίσης και τα κατάλοιπα 5 και 6 της A αλυσίδας και τα κατάλοιπα 91, 92, 280-284 και 423-426 της B αλυσίδας. Αναλύσεις των αποστάσεων μεταξύ των πολικών ατόμων προτείνουν ότι οι υδρόφοβοι δεσμοί δημιουργούνται μεταξύ των καταλοίπων Lys401 και Asp325 των δύο αλυσίδων, μεταξύ της Thr5 της A αλυσίδας και της Lys284 της B αλυσίδας καθώς και μεταξύ της Asp171 της A αλυσίδας και της Lys256 της B αλυσίδας (McCoy *et al.*, 2007).

1.2.3 Η ρύθμιση της ενεργότητας της UGRάσης

1.2.3.1 Η ολιγομερίωση ως γενικός ρυθμιστικός μηχανισμός των πυροφωσφορυλασών

Η ολιγομερίωση είναι μία από τις ρυθμιστικές διαδικασίες που έχουν σχέση με τη λειτουργία και τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών (Torshin, 1999; Peneff *et al.*, 2001; Wilczynska *et al.*, 2003; Perugini *et al.*, 2005). Σε πολλά ένζυμα η ενεργός μορφή είναι το μονομερές ενώ η ανενεργή είναι το ολιγομερές (ή αντίστροφα), κάτι που υπογραμμίζει τη σημασία των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μονομερών. Παρόλο που το φαινόμενο της ολιγομερίωσης έχει μελετηθεί αρκετά *in vitro* ως μέρος των διαδικασιών αναδίπλωσης των πρωτεϊνών, οι φυσιολογικοί μηχανισμοί και οι βιολογικοί ρόλοι της ολιγομερίωσης δεν είναι πλήρως κατανοητοί.

Με τη χρήση χρωματογραφίας μοριακών ηθμών και ηλεκτροφόρηση μη μετουσιωμένων πρωτεϊνών, βρέθηκε ότι η UGRάση του κριθαριού υπάρχει σε μίγμα μονομερών, διμερών και υψηλότερης τάξης ολιγομερών, με το μονομερές να είναι πιο δραστικό (Martz *et al.*, 2002). Η ολιγομερίωση της UGRάσης πιθανόν έχει ρυθμιστικό ρόλο και είναι σημαντική για οποιαδήποτε διαδικασία που απαιτεί UDP-γλυκόζη ως υπόστρωμα.

Οι Kleczkowski *et al* (2005) ερεύνησαν τους παράγοντες που επηρεάζουν την κατάσταση ολιγομερίωσης του ενζύμου με τη χρήση ανασυνδυασμένης UGRάσης του κριθαριού. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι επάγεται ολιγομερίωση μετά από επώαση της UGRάσης άγριου τύπου με φωσφορικά ή ρυθμιστικό διάλυμα Tris, ενώ τα ρυθμιστικά διαλύματα Mops και Hepes αποδιατάσσουν τελείως τα ολιγομερή σε μονομερή που είναι και η ενεργός μορφή του ενζύμου. Παρόμοια αποτελέσματα με τους παραπάνω χειρισμούς παρατηρήθηκαν και από τα μεταλλάγματα της UGRάσης KK127-128LL και C99S. Παρόλα αυτά, τα ρυθμιστικά διαλύματα είχαν μικρή δράση στην κατάσταση ολιγομερίωσης του μεταλλάγματος LIV135-137NIN. Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος δεν έπαιξε ρόλο στη δραστηριότητα της UGRάσης εφόσον η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν μικρότερη από 20 ng/ml. Όμως σε υψηλότερες συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης το Tris, αλλά όχι το Mops και το Hepes είχε ως αποτέλεσμα την υποεκτίμηση της δραστηριότητας του ενζύμου. Τέλος, αναφέρεται (Kleczkowski *et al.*, 2005) ότι η κατάσταση ολιγομερίωσης της UGRάσης

μπορεί να ελεγχθεί από λεπτές αλλαγές του ρυθμιστικού διαλύματος και από την αραίωση της πρωτεΐνης.

Οι Kleczkowski *et al* (2005) έδειξαν ότι: (α) η ολιγομερίωση της UGRάσης άγριου τύπου αλλά όχι του NIN μεταλλάγματος είναι αναστρέψιμη, (β) κάποια ρυθμιστικά διαλύματα έχουν αντίθετα αποτελέσματα στη δομική συνάφεια των μονομερών της UGRάσης και (γ) η αραίωση του ενζύμου πιθανόν επάγει την αποολιγομερίωση της πρωτεΐνης ανεξάρτητα του χρησιμοποιούμενου ρυθμιστικού διαλύματος και οδηγεί στο σχηματισμό δραστικών μονομερών. Η κατάσταση ολιγομερίωσης του ενζύμου μπορεί να ελεγχθεί από λεπτές αλλαγές του υδρόφοβου περιβάλλοντος καθώς και από συνθήκες μοριακού συνωστισμού.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως το μετάλλαγμα της UGRάσης του κριθαριού LIV135-137NIN το οποίο παρουσίαζε αδυναμία αποολιγομερισμού, είχε επίσης πολύ μικρή ενζυμική δραστηριότητα (Martz *et al.*, 2002). Αυτό ίσως σημαίνει ότι η ικανότητα αποπολυμερισμού μπορεί να είναι σημαντική για την καταλυτική αποτελεσματικότητα του ενζύμου.

1.2.3.2 Άλλοι μηχανισμοί ρύθμισης της ενεργότητας της UGRάσης

Σε ζωικούς ιστούς και μύκητες, η UGRάση υπόκειται σε ρύθμιση σε αρκετά επίπεδα και αυτό επειδή λειτουργεί στο σταυροδρόμι κατανάλωσης υδατανθράκων μέσω της γλυκόλυσης και δημιουργίας του αποθηκευτικού γλυκογόνου. Στη ζύμη *S. cerevisiae*, η PAS κινάση (μία κινάση σερίνης/θρεονίνης) "ενοχοποιείται" για τη μείωση της έκφρασης της UGRάσης και της σύνθεσης του γλυκογόνου μέσω άμεσης φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης μεταφραστικών παραγόντων (Rutter *et al.*, 2002). Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις για τη ρύθμιση των φυτικών UGRασών σε επίπεδο αντιγραφής (Ciereszco *et al.*, 2001a,b).

Εκτός της ολιγομερίωσης, στους πιθανούς μεταμεταφραστικούς τρόπους ρύθμισης της UGRάσης, περιλαμβάνονται η φωσφορυλίωση (Rutter *et al.*, 2002) και η Ο-γλυκοζυλίωση (Wells *et al.*, 2003). Οι παράγοντες που σχετίζονται με τη δραστηριότητα της UGRάσης μέσω μεταμεταφραστικής ρύθμισης περιλαμβάνουν καταπόνηση μέσω έλλειψης φωσφορικών, έκθεση στο ψύχος ή και στο φως, τροφοδοσία σακχαρόζης, αλατότητα και τοξικότητα καδμίου (Ciereszko *et al.*, 2001a,b, 2005; Goulard *et al.*, 2001; Repetto *et al.*, 2003; Kleczkowski *et al.*, 2004; Ciereszko and Kleczkowski, 2005).

Οι Ciereszko *et al* (2005) μελέτησαν τις επιπτώσεις της έλλειψης ανόργανων φωσφορικών, της προσθήκης σακχαρόζης και της έκθεσης σε φως και σε σκοτάδι στην έκφραση του γονιδίου της UGPάσης στο *Arabidopsis*. Η έλλειψη των φωσφορικών αύξησε την έκφραση του Ugp γονιδίου, τη δραστηριότητα της UGPάσης και τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Στα μεταλλάγματα rho1 (που παρουσίαζαν έλλειψη φωσφορικών) το γονίδιο εκφράστηκε περισσότερο σε φύλλα που εκτέθηκαν στο σκοτάδι αλλά όχι στα φύλλα των φυτών αγρίου τύπου. Στα φυτά αγρίου τύπου όσο και στα μεταλλάγματα rho η καθημερινή έκθεση στο φως αύξησε την έκφραση του γονιδίου. Στα φύλλα των μεταλλαγμάτων rho1 και rho2 (που παρουσίαζαν συσσώρευση φωσφορικών) το ποσοστό της γλυκόζης και της φρουκτόζης παρέμεινε αμετάβλητο, ανεξαρτήτως των συνθηκών φωτισμού. Τα rho1 φυτά όμως, είχαν πολύ μεγαλύτερα επίπεδα σακχαρόζης και αμύλου στο σκοτάδι σε σύγκριση με τα rho2 φυτά και αυτά του αγρίου τύπου. Η έκφραση του γονιδίου αυξήθηκε όταν φύλλα φυτών αγρίου τύπου τροφοδοτήθηκαν με σακχαρόζη, αλλά η έκφρασή του στα rho2 φυτά ήταν μικρότερη μετά από αυτόν το χειρισμό σε σχέση με τα rho1 φυτά και αυτά του αγρίου τύπου. Η έκφραση του Ugp στα μεταλλάγματα rpgm1 και sex1 που παρουσίαζαν ανωμαλίες στη συσσώρευση αμύλου ή και σακχαρόζης, δεν εξαρτιόταν από τη συγκέντρωση του αμύλου και δεν είχε στενή σχέση με τα επίπεδα διαλυτής σακχαρόζης. Το οκαδαϊκό οξύ (OKA) μπλόκαρε αποτελεσματικά την έλλειψη ανόργανων φωσφορικών και την εξαρτώμενη της σακχαρόζης έκφραση του Ugp σε αποκομμένα φύλλα, ενώ η σταυροπροστατίνη (STA) είχε πολύ μικρή επίδραση σε αυτά τα δύο φαινόμενα (ειδικά στα φύλλα με τροφοπενία φωσφόρου).

Οι Ciereszko *et al* (2005) πρότειναν ότι η έκφραση του γονιδίου Ugp ρυθμίζεται από αλληλεπιδράσεις σημάτων που προέρχονται από την έλλειψη φωσφορικών, το ποσοστό της σακχαρόζης και τις συνθήκες έκθεσης σε φως ή και σκοτάδι. Τέλος, αναφέρεται ότι το φως, η σακχαρόζη και η έλλειψη φωσφορικών μπορεί να έχουν προσθετικές επιδράσεις στην έκφραση του γονιδίου.

1.2.4 Η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου

Στο γονιδίωμα του ρυζιού έχουν βρεθεί δύο ομόλογα γονίδια της UGPάσης, τα Ugp1 και Ugp2 (Chen *et al.*, 2007). Υπάρχουν ενδείξεις ότι το Ugp1 εκφράζεται με μεγαλύτερη ένταση στα σταχίδια και πιο συγκεκριμένα στη γύρη κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του ανθήρα. Σίγαση του γονιδίου αυτού με RNAi ή μείωση της έκφρασής

του, είχε ως αποτέλεσμα στείρα αρσενικά άνθη (Woo *et al.*, 2008), γεγονός που φανερώνει ότι η UGPάση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της γύρης. Η έκφραση του δίκλωνου RNAi στα Ugp1-RI φυτά είχε ως αποτέλεσμα την συνκαταστολή των Ugp1 και Ugp2, η οποία οδήγησε σε διάφορες αναπτυξιακές ανωμαλίες που υποδηλώνουν τον κρίσιμο ρόλο της UGPάσης στην αύξηση και την ανάπτυξη των φυτών. Επιπλέον, στα φυτά που είχαν υποβληθεί σε καταστολή και των δύο γονιδίων, ανιχνεύθηκαν μη ώριμα τμήματα RNA. Τα μεταγραφήματα αυτά υπόκεινταν σε ωρίμανση στα σταχίδια, που εξαρτιόταν από τη θερμοκρασία, πράγμα που οδηγεί σε μια ‘νέου τύπου’ αρρενοστεριότητα. Τα μητρικά κύτταρα των μικροσπορίων των Ugp1 σιγημένων φυτών εμφανίζονταν φυσιολογικά πριν τη μείωση, αλλά κατά τη διάρκεια αυτής, υπήρχε διακοπή της φυσιολογικής εναπόθεσης καλλόζης. Επομένως, τα μητρικά κύτταρα των μικροσπορίων εκφυλίζονταν στα αρχικά στάδια της μείωσης, γεγονός το οποίο επέφερε ολοκληρωτική καταστροφή της γύρης. Επιπρόσθετα, παρεμποδίστηκε ο εκφυλισμός του τάπητα και του ενδιάμεσου επιτοίχιου. Τα αποτελέσματα αυτά φανερώνουν ότι το γονίδιο Ugp1 είναι απαραίτητο στις διαδικασίες εναπόθεσης της καλλόζης κατά τη διάρκεια της μείωσης των μητρικών κυττάρων των γυρεοκόκκων (Chen *et al.*, 2007; Woo *et al.*, 2008).

Γενετικά τροποποιημένα είδη του γένους *Dictyostelium* απέτυχαν να ολοκληρώσουν τον αναπτυξιακό τους κύκλο λόγω ανεπαρκών αποθεμάτων της UDP-γλυκόζης που χρησιμοποιείται στη βιοσύνθεση της κυτταρίνης (Dimond *et al.*, 1976). Όταν η έκφραση του γονιδίου UgpB του *Dictyostelium discoideum* παρεμποδίστηκε, τα κύτταρα παρουσίασαν ανωμαλίες στη διαφοροποίηση και την ανάπτυξή τους με παράλληλη μείωση της ζωτικότητας των σπορίων και των επιπέδων του γλυκογόνου (Bishop *et al.*, 2002). Επίσης, υπάρχουν αναφορές ότι το γονίδιο Ugp εμπλέκεται στη βιοσύνθεση κυτταρίνης στο *Acetobacter xylinum* (Valla *et al.*, 1989). Μείωση κατά 10 φορές της δραστηριότητας της UGPάσης σε κλώνους ζύμης επέφερε μείωση της συγκέντρωσης της β-γλυκάνης των κυτταρικών τοιχωμάτων (Daran *et al.*, 1995). Μεταλλάξεις θέσεων στο γονίδιο Ugp οδήγησε σε ανεπάρκεια UDP-γλυκόζης και μείωση των επιπέδων γλυκογόνου (Flores-Diaz *et al.*, 1997).

Τα γονίδια Ugp εκφράζονται σε όλους τους ιστούς των φυτών όπως στελέχη, φύλλα, ρίζες, κόνδυλοι και αναπτυσσόμενα σπέρματα (Zrenner *et al.*, 1993; Abe *et al.*, 2002). Η έκφρασή τους μπορεί να αυξηθεί σε συνθήκες έλλειψης ανόργανων φωσφορικών, έκθεσης σε φως και παροχής σακχαρόζης. Πιο συγκεκριμένα, αύξηση της έκφρασης του γονιδίου Ugp μετά από παροχή σακχαρόζης γίνεται μέσω

μονοπατιού που είναι ανεξάρτητο της εξοζοκινάσης και του αμπσισικού οξέος. Ο μηχανισμός αυτός εμπλέκει μια ΟΚΑ-εξαρτώμενη πρωτεϊνική φωσφατάση (Ciereszko *et al.*, 2001a,b; Kleczkowski *et al.*, 2004). Σε αντινοηματικά φυτά *Arabidopsis thaliana*, μείωση της δραστηριότητας της UGRάσης κατά 30% οδήγησε σε μεγάλη μείωση του επιπέδου των υδατανθράκων, αλλά χωρίς ανιχνεύσιμες αλλαγές σε παραμέτρους αύξησης (Johansson, 2003). Επιπλέον, μελέτη της UGRάσης της πατάτας με τη χρήση αντινοηματικού RNA έδειξε ότι η μείωση κατά 96% της δραστηριότητας της UGRάσης στους κονδύλους δεν επέφερε καμία αλλαγή στα επίπεδα των σακχάρων (Zrenner *et al.*, 1993).

Δύο κλώνοι της UGRάσης με υψηλή ομολογία, οι Ugp1 και Ugp2, απομονώθηκαν από cDNA βιβλιοθήκες ενός υβριδίου λεύκας (*Populus tremula x tremuloides*). Μέσω της μεθόδου μικροσυστοιχιών DNA και της αφθονίας των EST μεταγραφημάτων, μελετήθηκε η έκφραση των δύο γονιδίων και συγκρίθηκαν με τρία γονίδια της συνθάσης της σακχαρόζης (SuS1-3) που εμπλέκονται επίσης στη σύνθεση της UDP-γλυκόζης. Η έκφραση των γονιδίων της UGRάσης ήταν χαμηλότερη από αυτή των γονιδίων SuS1 και SuS2 (ιδιαίτερα στο κάμβιο και το ξύλο τάσης tension) με αξιοσημείωτες εξαιρέσεις σε φύλλα, πρωτογενείς ρίζες και άνθη. Με την τεχνική του ποσοτικού PCR εκτιμήθηκε ότι τα μεταγραφήματα του Ugp1 στο ξύλο των ριζών, των φύλλων και των αρρένων ανθέων ήταν σημαντικά αφθονότερα από αυτά του Ugp2, ενώ σε άλλους ιστούς τα Ugp1 και Ugp2 είχαν παρόμοια έκφραση. Σε αποκομμένα φύλλα, τα μεταγραφήματα του γονιδίου Ugp1 εμφάνιζαν αυξημένη έκφραση μετά από έκθεση σε φως ή παροχή σακχαρόζης, ενώ του Ugp2 όχι. Χειρισμοί με ψύχος οδήγησαν σε μεγάλες οργανοειδικευμένες αλλαγές στην έκφραση και των δύο γονιδίων, με το Ugp2 να εκφράζεται περισσότερο είτε παροδικά (στα φύλλα), είτε για μεγάλο χρονικό διάστημα (στα στελέχη), είτε καθόλου (στις ρίζες), ενώ το Ugp1 εκφραζόταν σε όλα τα όργανα. Τα πρότυπα έκφρασης της UGRάσης συσχετιζόνταν, ξεχωριστά ή συνολικά, σε μικρό βαθμό με τη δραστηριότητα και την ποσότητα της πρωτεΐνης.

Λαμβάνοντας υπόψη πόσο σημαντική είναι η UDP-γλυκόζη συνολικά στο μεταβολισμό, προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι λίγα είναι γνωστά για τη ρύθμιση των φυτικών UGRασών τόσο σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης όσο και σε επίπεδο ενζυμικής δραστηριότητας. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η δραστηριότητα της UGRάσης αυξάνεται σε συνθήκες έλλειψης φωσφορικών μέσω ρύθμισης της μεταγραφής (Ciereszko *et al.*, 2001a, 2005; Ciereszko and Kleczkowski, 2005, 2006), σε συνθήκες

τοξικότητας καδμίου (Repetto *et al.*, 2003) και μετά από παροχή σακχαρόζης στα φύλλα και έκθεση σε ψύχος (Borovkov *et al.*, 1996; Ciereszko *et al.*, 2001b, 2005). Η αύξηση των μεταγραφημάτων της UGRάσης λόγω παροχής σακχαρόζης στους ιστούς μπορεί να οφείλεται σε έναν πολύπλοκο μηχανισμό ανάδρομης αντίδρασης, αφού η σακχαρόζη είναι το βασικό προϊόν του μονοπατιού της UGRάσης στα φύλλα. Σε πρωτεϊνικό επίπεδο η UGRάση του κριθαριού βρέθηκε ότι είχε την ιδιότητα να ολιγομερίζεται και να αποολιγομερίζεται. Τα αποολιγομερισμένα μόρια πιθανόν να είναι σημαντικά για την καταλυτική λειτουργία του ενζύμου (Martz *et al.*, 2002; Kleczkowski *et al.*, 2005).

Η UGRάση του κριθαριού μπορεί να προσδεθεί σε μια 14.3.3 πρωτεΐνη (Alexander and Morris, 2006). Περισσότερα όμως είναι γνωστά για τη ρύθμιση της SuSy που μπορεί να αντιδρά με 14.3.3 πρωτεΐνες (Alexander and Morris, 2006) και υπόκειται σε αντιστρεπτή φωσφορυλίωση στις μεμβράνες (Winter and Huber, 2000). Η έκφραση των γονιδίων της SuSy ρυθμίζεται από το επίπεδο των υδατανθράκων και τις αβιοτικές καταπονήσεις με παράλληλες επιδράσεις στη δραστηριότητα ή και το πρωτεϊνικό περιεχόμενο της SuSy (Koch *et al.*, 1992; Déjardin *et al.*, 1999; Ciereszko and Kleczkowski, 2002, 2005; Baud *et al.*, 2004; Gonzali *et al.*, 2005; Chiu *et al.*, 2006). Συνήθως υπάρχουν αρκετά γονίδια SuS σε κάθε είδος π.χ έξι στο *Arabidopsis* (Baud *et al.*, 2004), τουλάχιστον δέκα στο ρύζι και έντεκα στη λεύκα (Geisler-Lee *et al.*, 2006) πράγμα που δυσκολεύει τις μελέτες που σχετίζονται με συγκεκριμένες λειτουργίες κάθε ισότυπου της SuSy.

Το γονιδίωμα του ρυζιού περιέχει δύο ομόλογα γονίδια της UGRάσης, το Ugp1 στο χρωμόσωμα 9 (Abe *et al.*, 2002) και Ugp2 στο χρωμόσωμα 2 (Mu, 2002). Το γονίδιο Ugp1 του ρυζιού κλωνοποιήθηκε πρώτα από άωρο ενδοσπέρμιο. Τα επίπεδα του mRNA ήταν υψηλά 10 με 15 ημέρες μετά την άνθηση και χαμηλότερα μέχρι και 35 ημέρες μετά την άνθηση (Abe *et al.*, 2002). Εντυπωσιακό θεωρήθηκε το γεγονός ότι το γονίδιο Ugp2 στο χρωμόσωμα 2 εκφράζεται μόνο στη διπύρνηνη γύρη (Mu, 2002) και όχι στα μονοκύτταρα μικροσπόρια.

1.2.4.1 Η ρύθμιση της έκφρασης της UGRάσης από τη σακχαρόζη

Η έκφραση της UGRάσης στα φύλλα του *Arabidopsis* ρυθμίζεται από τη σακχαρόζη, ενώ δεν επηρεάζεται από τη γλυκόζη ή το οσμωτικό δυναμικό (Ciereszko

et al., 2001b). Η ρύθμιση της UGRάσης από τη σακχαρόζη έχει παρατηρηθεί επίσης σε κονδύλους πατάτας (*Spychalla et al.*, 1994).

Στο *Arabidopsis*, το φαινόμενο της αύξησης των μεταγραφημάτων της UGRάσης από τη σακχαρόζη ήταν ανεξάρτητο από το επίπεδο της εξοζοκινάσης και παρεμποδιζόταν τελείως από το οκαδικό οξύ (ΟΚΑ), έναν ισχυρό παρεμποδιστή των πρωτεϊνικών φωσφατασών PP1 και PP2A (*Ciereszko et al.*, 2001b). Το φαινόμενο αυτό συνοδευόταν από σημαντική αύξηση των μεταγραφημάτων της SuSy από το ΟΚΑ το οποίο ήταν ευαίσθητο σε ρύθμιση μέσω εξοζοκινάσης ή/και οσμωτικών (*Dejardin et al.*, 1999; *Ciereszko and Kleczkowski*, 2002). Τα αποτελέσματα της δράσης του ΟΚΑ δείχνουν ότι μια φωσφοροπρωτεΐνη (X-P) που δρα ως υπόστρωμα της PP1 ή/και της PP2A, είναι αυτή που μεσολαβεί για την αύξηση των μεταγραφημάτων της SuS1. Αντίθετα, η υπερρύθμιση της UGRάσης απαιτεί διφωσφορυλίωση της X-P ή κάποιων άλλων φωσφοροπρωτεϊνών που δρουν ως υπόστρωμα για την PP1 ή/και την PP2A. Τα παραπάνω δείχνουν ότι η εξόζη (ή/και τα οσμωτικά) και τα μονοπάτια που σηματοδοτούνται μέσω της σακχαρόζης μπορεί να δρουν ανταγωνιστικά τουλάχιστον για τη SuS1 και την UGRάση. Η παρουσία των ευδιάκριτων σηματοδοτικών μονοπατιών των γονιδίων Ugr και SuS1 μπορεί να αντιπροσωπεύουν ένα μηχανισμό όπου σίγουρα παράγεται UDP-γλυκόζη ακόμα και αν ένα από τα μονοπάτια που λαμβάνουν μέρος η SuSy ή η UGRάση μπλοκάρονται ή είναι αδρανή.

1.2.5 Πόσα γονίδια κωδικοποιούν την UGRάση

Αρχικά υπήρχε η υπόθεση ότι η UGRάση αντιπροσωπεύεται από ένα μόνο γονίδιο Ugr στα φυτά. Συστηματική εξέταση κλώνων cDNA κριθαριού για την εύρεση γονιδίων Ugr, έδειξε μόνο έναν ισότυπο σε φύλλα, έμβρυο και ενδοσπέρμιο (*Eimert et al.*, 1996). Επίσης, μικρές διαφοροποιήσεις στην αλληλουχία των κλώνων cDNA της πατάτας αποδόθηκε σε αλληλικό πολυμορφισμό (*Sowokinos et al.*, 1997). Παρόλα αυτά, από βάσεις δεδομένων του γονιδιώματος του *Arabidopsis*, είναι πλέον φανερό ότι υπάρχουν δύο γονίδια Ugr με υψηλή ομολογία, τα At3g03250 και At5g17310, τα οποία εδράζονται στα χρωμοσώματα 3 και 5 αντίστοιχα (*Kleczkowski et al.*, 2004). Επίσης, βρέθηκαν δύο ομόλογα γονίδια της UGRάσης σε cDNA βιβλιοθήκες της λεύκας (*Populus spp.*), του ρυζιού (*Oryza sativa*) και του μυξομύκητα *Dictyostelium discoideum*. Φαίνεται ότι τα γονίδια έχουν διαφορετικούς

ρόλους στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του μυξομύκητα όπως προκύπτει από τις αναλύσεις βιώσιμων μεταλλαγμάτων (Bishop *et al.*, 2002).

Σύγκριση των φυτικών UGRασών σε αμινοξικό επίπεδο έδειξε ότι τα αμινοξέα ήταν ταυτόσημα σε ποσοστό 59-96% (Katsube *et al.*, 1990; Eimert *et al.*, 1996; Pua *et al.*, 2000; Abe *et al.*, 2002) και περίπου 55% με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες από τον μυξομύκητα (Bishop *et al.*, 2002), το σκώτι θηλαστικών (Konishi *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1996) και τη ζύμη *S. cerevisiae* (Daran *et al.*, 1995). Οι ευκαρυωτικές UGRάσες αποκλίνουν σημαντικά από τις βακτηριακές καθώς είναι ταυτόσημες μόλις κατά 8%. Οι φυτικές UGRάσες είναι κατά 13-15% ταυτόσημες με τις AGXs φυτικής και ζωικής προέλευσης και έχουν μόνο 40% ομολογία όταν γίνει αντικατάσταση ομόλογων αμινοξέων.

Παρόλο που για την τομάτα δεν έχουν κατατεθεί νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της UGRάσης, έρευνα στις βάσεις δεδομένων (DFCI) δείχνει ότι πρέπει να υπάρχουν τουλάχιστον δύο ισότυποι του ενζύμου.

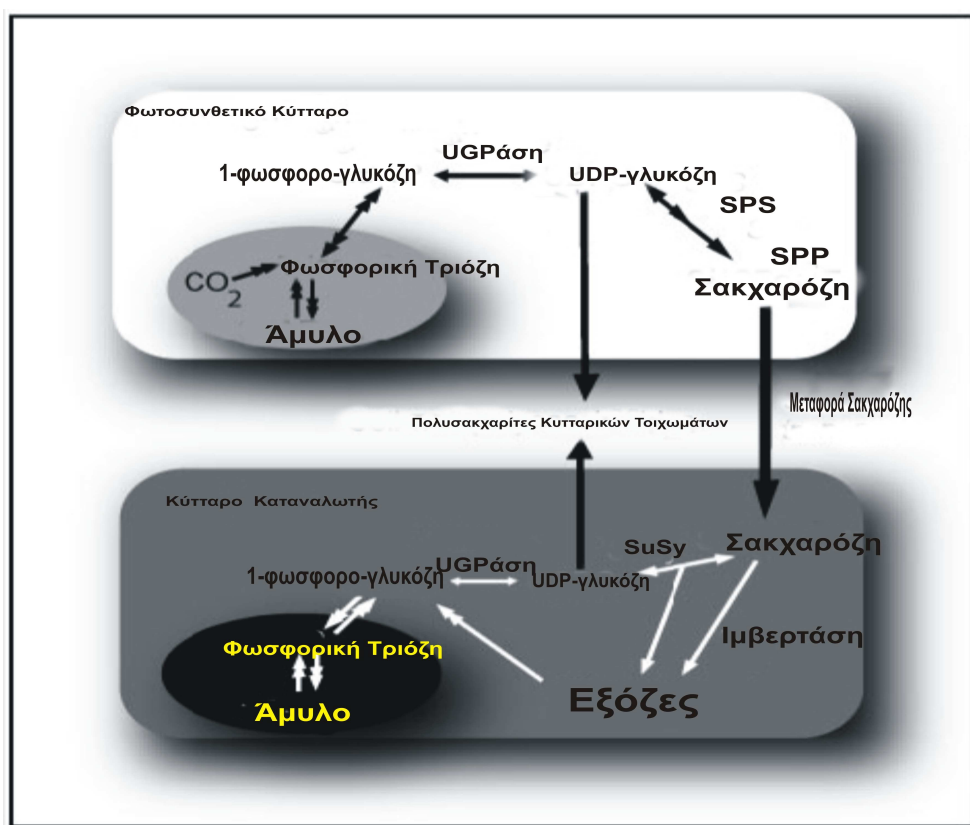
1.2.6 Η βιοσύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων και η UGRάση

Η UDP-γλυκόζη, το υπόστρωμα ή/και παράγωγο του ενζύμου της UGRάσης, είναι ένας μεταβολίτης κλειδί για το μεταβολισμό των υδατανθράκων σε φωτοσυνθετικούς και μη φωτοσυνθετικούς ιστούς (**Εικόνα 4**). Χρησιμοποιείται στα βιοχημικά μονοπάτια της σακχαρόζης και στη βιοσύνθεση των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος, αντανακλώντας έτσι το σημαντικό ρόλο της ως πρόδρομο μόριο στη βιογένεση των κυτταρικών τοιχωμάτων (Gibeaut, 2000). Ένας ακόμη σημαντικός ρόλος της, είναι η εμπλοκή της στη σύνθεση τμημάτων υδατανθράκων των γλυκολιπιδίων και γλυκοπρωτεϊνών (Flores-Diaz *et al.*, 1997; Bishop *et al.*, 2002). Η επικρατέστερη άποψη είναι ότι η UGRάση βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Ανοσοεντοπισμός του ενζύμου σε κύτταρα του ρυζιού έδειξε ότι η πλειοψηφία των UGRασών βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα αλλά και σε κάποιο βαθμό στους αμυλοπλάστες και τα οργανίδια Golgi (Kimura *et al.*, 1992). Μικρή δραστηριότητα της UGRάσης αποδόθηκε στα μικροσώματα μέσω κλασμάτωσης υποκυτταρικών συστατικών κυττάρων ρυζιού και καπνού (*Nicotiana tabacum*) (Mikami *et al.*, 2001), ενώ στο κριθάρι μεγάλη δραστηριότητα των UGRασών βρέθηκε στο μεμβρανικό κλάσμα (Becker *et al.*, 1995). Αυτή η μεμβρανική σχέση της UGRάσης παραπέμπει σε ιδιότητες της SuSy η οποία είχε προταθεί ότι προσδένεται

στο πλασμάλλημα και παρέχει άμεσα UDP-γλυκόζη στη συνθάση της κυτταρίνης (Amor *et al.*, 1995). Η φωσφορυλίωση και η αποφωσφορυλίωση είναι απαραίτητες για την πρόσδεση της SuSy στο πλασμάλλημα (Winter and Huber, 2000). Το φωσφορυλιωμένο ένζυμο είναι διαλυτό, ενώ η αποφωσφορυλίωση επάγει την πρόσδεση της SuSy στη μεμβράνη. Αν και δεν υπάρχει αμφιβολία για τη συμμετοχή της SuSy στη βιοσύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων (Amor *et al.*, 1995; Ruan *et al.*, 2003), ο πιθανός ρόλος της UGPάσης σε αυτή τη διαδικασία πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω και ειδικότερα σε ιστούς πηγές. Γενικά, ώριμα φύλλα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες περιέχουν χαμηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης SuSy (Dejardin *et al.*, 1999) ενώ η δραστηριότητα της UGPάσης στα εκχυλίσματα των φύλλων είναι υψηλή (Igamberdiev and Kleczkowski, 2000). Στα φύλλα, ευνοείται η παραγωγή UDP-γλυκόζης από δεσμευμένο άνθρακα μέσω της αντίδρασης της UGPάσης (ap Rees, 1992; Kleczkowski, 1994b). Για να είναι δραστική η UGPάση σε ιστούς καταβόθρες πρέπει να υπάρχει απόθεμα της 1-φωσφορογλυκόζης ώστε να παράγει UDP-γλυκόζη. Αυτό μπορεί να γίνει έμμεσα από τη φρουκτόζη, ένα προϊόν της αντίδρασης της SuSy, όπου απελευθερώνεται ένα μόριο φρουκτόζης για κάθε μόριο UDP-γλυκόζης που φτιάχνεται κατά τη διάρκεια υδρόλυσης της σακχαρόζης, ή από την αντίδραση της ιμπερτάσης.

Μέσω της UDP-γλυκόζης είναι δυνατόν να βιοσυντίθεται κυτταρίνη και καλλόζη που σχηματίζονται κατ' ευθείαν στο πλασμάλλημα, ενώ άλλοι πολυσακχαρίτες (π.χ ημικυτταρίνες και πηκτίνες) βιοσυντίθεται στα οργανίδια Golgi και μεταφέρονται στον περιπλασμικό χώρο με κυστίδια (Gibeaut, 2000). Δραστηριότητες που παρέχουν UDP-γλυκόζη για μετέπειτα διαδικασίες πρέπει να έχουν σχέση με τα οργανίδια Golgi ή πρέπει να υπάρχουν μεταφορείς που επιτρέπουν μεταφορά της UDP-γλυκόζης από το κυτόπλασμα μέσω της μεμβράνης Golgi. Σε βλαστούς μπιζελιού βρέθηκε ότι η UDP-γλυκόζη μεταφέρεται στα οργανίδια Golgi σε ανταλλαγή με UMP και υπήρχε γρήγορη ενσωμάτωση του κατάλοιπου της γλυκόζης της UDP-γλυκόζης (Neckelmann and Orellana, 1998). Μέσω χρήσης μεταλλαγμάτων ζυμών βρέθηκε ότι η UGPάση εμπλέκεται στη σύνθεση κυτταρικών τοιχωμάτων. Σε μεταλλάγματα ζυμών, η δραστηριότητα της UGPάσης μειώθηκε κατά δέκα φορές και αυτό οδήγησε σε μείωση του περιεχομένου της β-γλυκάνης στα κυτταρικά τοιχώματα (Daran *et al.*, 1995). Επίσης, μεταλλαγμένα βακτήρια *Acetobacter xylinum* που δεν είχαν τη δυνατότητα παραγωγής κυτταρίνης παρουσίαζαν έλλειψη της UGPάσης (Valla *et al.*, 1989). Σε αυτούς τους οργανισμούς

δεν υπάρχει δραστηριότητα της SuSy, οπότε σε συνθήκες έλλειψης της UGRάσης τα φαινόμενα που αφορούν τα κυτταρικά τοιχώματα δεν προκαλούν έκπληξη. Παρόλα αυτά η υπερέκφραση των γονιδίων UGRάσης και SuSy (μονοί και διπλοί μετασχηματισμοί) στον καπνό, επέφερε σε αρκετές σειρές φυτών με μονό μετασχηματισμό αύξηση στο ύψος και αυξημένα ποσά κυτταρίνης όπως και σε όλες τις σειρές διπλού μετασχηματισμού (Coleman *et al.*, 2003). Σε μελέτες ξυλογέννησης στην περιοχή του καμβίου σε στελέχη λεύκας με τη χρήση μικροσυστοιχιών DNA, βρέθηκε ότι εκφράζεται περισσότερο ένα γονίδιο της UGRάσης κατά τη διάρκεια επιμήκυνσης των κυττάρων και κατά τη διάρκεια σχηματισμού των δευτερογενών κυτταρικών τοιχωμάτων (Hertzberg *et al.*, 2001). Επίσης, σε ιστούς που βρισκόταν στη διαδικασία σχηματισμού του εγκάρδιου ξύλου στον κορμό της μαύρης καρδιάς (*Juglans nigra*), η δραστηριότητα της UGRάσης συσχετίστηκε με αυξημένη αποσύνθεση σακχαρόζης από τα τέλη του καλοκαιριού μέχρι τις αρχές του χειμώνα (Magel *et al.*, 2001).



Εικόνα 4: Πιθανή εμπλοκή της UGRάσης στη βιοσύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων σε φωτοσυνθετικούς ιστούς και ιστούς πηγές. Σε φωτοσυνθετικούς ιστούς, η UGRάση συνθέτει UDP-γλυκόζη και συνεργάζεται με τη συνθάση της φωσφοροσακχαρόζης (SPS) και τη φωσφατάση της φωσφοροσακχαρόζης (SPP) για να παραχθεί σακχαρόζη. Σε ιστούς πηγές (π.χ ρίζες), η UGRάση δρα σε συνδυασμό με τη SuSy ή και τις ιμβερτάσες για την αποδόμηση της σακχαρόζης αλλά μπορεί επίσης να χρησιμοποιήσει την 1-φωσφορογλυκόζη προς παραγωγή UDP-γλυκόζης. Τέλος, η UDP-γλυκόζη χρησιμοποιείται για τη σύνθεση πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος και στους φωτοσυνθετικούς ιστούς και στους ιστούς κατανάλωσης. (Σχήμα προσαρμοσμένο από τους (Kleczkowski *et al.*, 2004).

1.2.7 Ο ρόλος της UGRάσης στη ροή των μεταβολιτών

Οι αναφορές για το αν οι μεταβολές στη δραστικότητα ή και το περιεχόμενο της UGRάσης σε αναπτυσσόμενους κονδύλους πατάτας μπορούν να επιφέρουν αλλαγές στη ροή των μεταβολιτών, δεν είναι ξεκάθαρες. Οι Zrenner *et al* (1993) έδειξαν ότι η δραστικότητα της UGRάσης σε αναπτυσσόμενους κονδύλους πατάτας μπορούσε να μειωθεί μέχρι και 96% χωρίς να επιφέρει αλλαγές στο μεταβολισμό των υδατανθράκων. Οι Srychalla *et al* (1994) και Boronkov *et al* (1996) απέτυχαν να παράγουν κονδύλους πατάτας με παρεμπόδιση της δραστικότητας της UGRάσης μεγαλύτερη από 30%, αλλά αυτός ο βαθμός παρεμπόδισης ήταν αρκετός για να επιφέρει μείωση της περιεκτικότητας σακχάρων στους αποθηκευμένους κονδύλους. Στο *Arabidopsis*, μια μικρή σχετικά παρεμπόδιση (30%) της δραστικότητας της UGRάσης στα φύλλα φυτών μετασηματισμένων με RNAi οδήγησε σε μείωση του περιεχομένου των σακχάρων και σε κάποιο βαθμό μείωση του επιπέδου του αμύλου (Johansson, 2003), το οποίο σημαίνει ότι το ένζυμο μπορεί να έχει κάποιο ρόλο στον έλεγχο της ταχύτητας της σύνθεσης των υδατανθράκων. Με την παρουσία δύο γονιδίων UGRάσης στο *Arabidopsis* είναι πιθανόν τα φαινομενικά συγκρουόμενα αποτελέσματα των αντινοσηματικών μελετών στην πατάτα, να οφείλονται στην παρεμπόδιση διαφορετικών γονιδίων.

Η *in vitro* δραστικότητα της UGRάσης ιδιαίτερα στους ιστούς καταβόθρες, αλλά και στα φύλλα, υπερβαίνει κατά πολύ τις ανάγκες του ρυθμού μεταβολισμού του άνθρακα στα φυτά (Igamberdiev and Kleczkowski, 2000). Το γεγονός αυτό πιθανόν να σχετίζεται με το ενδεχόμενο της δυνατότητας να διατηρεί η UGRάση σταθερούς ρυθμούς μεταβολισμού των υδατανθράκων ακόμα και αν η έκφρασή της ρυθμίζεται *in vivo*. Παρόλα αυτά, είναι πολύ πιθανό σε *in vivo* συνθήκες η δραστικότητα της UGRάσης να είναι πολύ χαμηλότερη και στην πραγματικότητα να περιορίζεται στα μεταβολικά μονοπάτια που είναι συνδεδεμένα με τη σύνθεση ή και την αποδόμηση των σακχάρων.

1.3 Σκοπός της μελέτης

Η UGRάση εμπλέκεται στο μεταβολισμό της σακχαρόζης και τη σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων. Παρόλο που ο μεταβολισμός της σακχαρόζης και η σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων συμβαίνει κατά κανόνα στους ίδιους ιστούς, ο

ανοσοεντοπισμός της UGRάσης καθώς επίσης και ο *in situ* εντοπισμός της ενεργότητας του ενζύμου, είναι δυνατόν να μας δώσουν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη δράση του ενζύμου στους διάφορους ιστούς των φυτών. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η παρουσία του ενζύμου της UGRάσης σε αναπτυσσόμενους ανθοφόρους οφθαλμούς τομάτας.

Υλικά και Μέθοδοι



2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Μεθοδολογία

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για τη μελέτη του ενζύμου της UGRάσης σε ανθοφόρους οφθαλμούς και ώριμα άνθη τομάτας απεικονίζεται στην **εικόνα 5**.



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας για τον ανοσοεντοπισμό του ενζύμου της UGRάσης σε ανθοφόρους οφθαλμούς και ώριμα άνθη τομάτας.

2.2 Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης σε τομές

2.2.1 Φυτικό υλικό

Φυτά τομάτας ποικιλίας Dombito αναπτύχθηκαν σε θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Κηπευτικών Καλλιεργειών σύμφωνα με τις συνήθειες καλλιεργητικές πρακτικές. Η συλλογή των ανθοφόρων οφθαλμών και των ανθέων πραγματοποιήθηκε το μήνα Νοέμβριο, την ενδέκατη πρωινή ώρα, από δεύτερη ταξιανθία. Η μεταφορά τους από το θερμοκήπιο στο εργαστήριο έγινε με δοχείο που περιείχε θρυμματισμένο πάγο και διαχωρίστηκαν σε τέσσερις κατηγορίες με βάση το μέγεθός τους. Η πρώτη κατηγορία περιελάμβανε ανθοφόρους οφθαλμούς μήκους 0-3 mm, η δεύτερη 3-8 mm, η τρίτη από 8 mm έως λίγο πριν από την άνθηση και η τέταρτη κατηγορία περιελάμβανε ώριμα άνθη.

2.2.2 Προσήλωση

Οι ανθοφόροι οφθαλμοί και τα ώριμα άνθη, συλλέχθηκαν σε ψυχόμενα γυάλινα μικρά μπουκάλια και προσηλώθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεύδης αλκοόλης οξεικού οξέος (FAA) (Ruzin, 1999).

2.2.3 Αφυδάτωση

Για την αφυδάτωση των ιστών χρησιμοποιήθηκε μια σειρά διαλυμάτων κατά αύξουσα περιεκτικότητα σε αιθυλική αλκοόλη: 50%, 70%, 80%, 90%, 95% και 100% (3 φορές) EtOH. Οι ιστοί παρέμειναν σε κάθε διάλυμα αιθανόλης για 1 ώρα.

2.2.4 Διαφανοποίηση

Για τη διαφανοποίηση των ιστών χρησιμοποιήθηκε μια σειρά διαλυμάτων κατά αύξουσα περιεκτικότητα σε ξυλένιο: 25% ξυλένιο-75% EtOH, 50% ξυλένιο-50% EtOH, 75% ξυλένιο-25% EtOH, 100% ξυλένιο (3 φορές). Οι ιστοί παρέμειναν σε κάθε διάλυμα για 30 λεπτά.

2.2.5 Εγκλεισμός των δειγμάτων σε παραφίνη

Για τον εγκλεισμό των δειγμάτων σε παραφίνη χρησιμοποιήθηκαν μεταλλικά εκμαγεία σε σχήμα κύβου, τα οποία τοποθετήθηκαν σε δοχείο που περιείχε πάγο, ώστε η θερμοκρασία του μικροπεριβάλλοντος να διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα. Ακολούθησε η τοποθέτηση των ιστών στο εσωτερικό του μεταλλικού εκμαγείου το οποίο περιείχε λιωμένη παραφίνη, κατά τέτοιο τρόπο ώστε να έχουν τον επιθυμητό προσανατολισμό. Για να πήξει η παραφίνη σταδιακά και ομοιόμορφα από κάτω προς τα πάνω και για να αποφευχθεί ο εγκλεισμός φυσαλίδων αέρα στο εσωτερικό του κύβου, η επιφάνεια της παραφίνης παρέμενε υγροποιημένη με τη βοήθεια μιας λαβίδας την οποία θερμαίναμε τακτικά σε λύχνο. Τέλος, αφήσαμε τον κύβο για 45 περίπου λεπτά στον πάγο, ώστε να πήξει πολύ καλά η παραφίνη.

2.2.6 Προετοιμασία αντικειμενοφόρων

Η προετοιμασία των αντικειμενοφόρων αφορά στον χειρισμό αυτών με πολυλυσίνη, που έγινε σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

1. Οι αντικειμενοφόροι εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα 1% SDS για 2 περίπου ώρες, για να απομακρυνθούν από αυτές οι τυχόν λιποδιαλυτές ουσίες.
2. Ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό, σε συνεχή ροή.
3. Εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα υδροχλωρίου 5% για 2 περίπου ώρες.
4. Ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό και αποστειρώθηκαν.
5. Εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα 1% w/v πολυλυσίνης.
6. Αφήθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ημέρες.

2.2.7 Μικροτόμηση

Ο κύβος παραφίνης που περικλείει τον ιστό, τοποθετήθηκε σε χειροκίνητο μικροτόμο (Leica) και το πάχος των τομών ρυθμίστηκε στα 10 μm . Ακολούθησε επιλογή των καλύτερων τομών μετά από παρατήρησή τους σε οπτικό μικροσκόπιο. Σε αντικειμενοφόρους επεξεργασμένες με πολυλυσίνη τοποθετήθηκε μικρή ποσότητα απεσταγμένου νερού πάνω στο οποίο τοποθετήθηκαν οι επιλεγμένες τομές. Έπειτα, οι αντικειμενοφόροι μεταφέρθηκαν σε θερμαινόμενη πλάκα στους 42 °C, όπου και παρέμειναν για 10 λεπτά ώστε να απλώσουν οι ιστοί. Η περίσσεια του νερού

αφαιρέθηκε προσεκτικά με διηθητικό χαρτί και οι αντικειμενοφόροι παρέμειναν στη θερμαινόμενη πλάκα για 48-72 ώρες για την πλήρη απομάκρυνση του νερού και την προσκόλληση των τομών στις αντικειμενοφόρους.

2.2.8 Αποπαραφίνωση

Η αποπαραφίνωση των τομών αφορά την απομάκρυνση της παραφίνης από τις τομές και έγινε με διαδοχική εμβάπτιση των ιστών στα ακόλουθα διαλύματα:

1. 100% Ξυλένιο (I) για 30 λεπτά
2. 100% Ξυλένιο(II) για 30 λεπτά
3. 50 % Ξυλένιο-50% EtOH για 20 λεπτά
4. 100 % EtOH για 15 λεπτά
5. 95 % EtOH για 15 λεπτά
6. 70 % EtOH για 15 λεπτά
7. Απιονισμένο νερό για 15 λεπτά

2.2.9 Εφαρμογή αντισωμάτων

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

TBST

20 mM Tris-HCl (pH 7.5)

150 mM NaCl

0.05% Tween 20

Διάλυμα χρωματικής αντίδρασης

5 ml ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της αλκαλικής φωσφατάσης

33 μl BCIP

16,5 μl NBT

Ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της αλκαλικής φωσφατάσης

100 mM Tris-HCl (pH 9.5)

100 mM NaCl

50 mM MgCl₂

Έπειτα, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Οι τομές καλύφθηκαν με διάλυμα δεσμεύσεως μη ενεργών θέσεων (TBST με 1% BSA) και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα.

2. Οι τομές επώαστηκαν σε 1:1000 αραιώση του πρωτογενούς αντισώματος (Rabbit anti-barley UGPase), σε διάλυμα TBST με 1% BSA, για τουλάχιστον 12 ώρες σε θερμοκρασία 4°C.
3. Το μη δεσμευμένο πρωτογενές αντίσωμα ξεπλύθηκε με διάλυμα TBST για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Οι τομές επώαστηκαν σε διάλυμα TBST με 1% BSA, το οποίο περιείχε κατάλληλη αραιώση (1:5000) δευτερογενούς αντισώματος, που φέρει συζευγμένη αλκαλική φωσφατάση (AP-mouse-anti-rabbit, Promega), για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Το μη δεσμευμένο δευτερογενές αντίσωμα ξεπλύθηκε με διάλυμα TBST για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Οι τομές καλύφθηκαν με διάλυμα χρωματικής αντίδρασης.
7. Η χρωματική αντίδραση πραγματοποιήθηκε στο σκοτάδι, ενώ η ανάπτυξη του χρώματος ελεγχόταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα στο οπτικό μικροσκόπιο, ώστε να προληφθεί η ανάπτυξη σήματος θορύβου.
8. Η αντίδραση σταμάτησε με ξέπλυμα των αντικειμενοφόρων με απιονισμένο νερό.
9. Οι τομές αφυδατώθηκαν με διαδοχικές εμβαπτίσεις σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης: 70%, 90%, 95% και 100% για 1-2 λεπτά σε κάθε διάλυμα.
10. Οι τομές αφού στέγνωσαν καλά, καλύφθηκαν με DPX και μονιμοποιήθηκαν.

Οι τομές φωτογραφήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο Zeiss Axiolab με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Canon, Powershot A620.

Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές από κάθε αναπτυξιακό στάδιο οι οποίες επώαστηκαν με ορρό κουνελιού προ της ανοσοποίησης. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε δευτερογενές αντίσωμα και διάλυμα χρωματικής αντίδρασης. Επειδή οι τομές δεν χρωματίστηκαν, έγινε ακολούθως χρώση 0.1% Orange G in Abs EtOH για 20 λεπτά.

2.3 Μελέτη της ενεργότητας της UGPάσης

2.3.1 Εκχύλιση του ενζύμου

Για την εκχύλιση χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα εκχύλισης πρωτεϊνών από άνθη τομάτας κατά τους Stenzel *et al* (2003):

50 mM Tris-HCl (pH 7.5)

15% Γλυκερόλη

0.02% Πρωτενη του ορρού του βοδιού (BSA)

2mM Ανηγμένη γλουταθειόνη

4% Διαλυτή πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP)

0.1% Triton X

20 mM Na₂SO₃

Τα φυτικά δείγματα ζυγίστηκαν και λειοτριβήθηκαν με γουδί στους 4°C, δεδομένου ότι η ενζυμική δραστηριότητα διατηρείται καλύτερα σε χαμηλές θερμοκρασίες, προσθέτοντας τον αντίστοιχο όγκο εκχυλιστικού διαλύματος σε αναλογία: 1:1 (w/v) στο στάδιο 0-3 mm, 1:1 (w/v) στο στάδιο 3-8 mm, 1:1 (w/v) στο στάδιο 8 mm έως λίγο πριν την άνθηση και 1:0.8 (w/v) στο στάδιο της άνθησης. Τα εκχυλίσματα συλλέχθηκαν σε erpendorfs τοποθετημένα στον πάγο και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 15000 στροφές για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο υγρό που προέκυψε, φυλάχθηκε σε αντίστοιχα erpendorfs, για κάθε στάδιο χωριστά.

2.3.2 Προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bearden

Για τη μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου κρίθηκε απαραίτητος ο προσδιορισμός των συνολικών πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων ο οποίος έγινε με τη μέθοδο Bearden (1978). Αρχικά παρασκευάστηκε το διάλυμα Bearden:

1. Ζυγίστηκαν 10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva 17524).
2. Διαλύθηκαν σε 40 ml 85% φωσφορικού οξέος.
3. Προστέθηκαν 200 ml απεσταγμένου νερού.
4. Το διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών την επόμενη ημέρα.

Για κάθε στάδιο ανάπτυξης έγιναν τρεις επαναλήψεις. Τα δείγματα περιείχαν 1.5 ml dH₂O, 20 μl αντίστοιχου εκχυλίσματος και 1.5 ml διαλύματος Bearden. Ως

μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα που περιείχε 1.5 ml dH₂O και 1.5 ml διαλύματος Bearden. Έπειτα, έγινε φωτομέτρηση στα 595 nm σε φασματοφωτόμετρο UV-160A (Shimadzu) και υπολογίστηκε η συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης βάσει της πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη εξάρτησης της απορρόφησης του δείγματος από τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών (BSA) σχεδιάστηκε χρησιμοποιώντας ποσότητες BSA από 5 έως 50 μg.

Στη συνέχεια, τα εκχυλίσματα από το κάθε στάδιο χωρίστηκαν σε δύο μέρη. Στο ένα μέρος προστέθηκαν λίγοι κόκκοι της χρωστικής κυανού της βρωμοφαινόλης και χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση, ενώ το άλλο μέρος χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της UGPάσης.

2.3.3 Προσδιορισμός της ενεργότητας της UGPάσης

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του ενζύμου ακολουθήθηκε η μέθοδος των Sergeeva και Vreugdenhil (2002). Αρχικά παρασκευάστηκε το διάλυμα ανίχνευσης της UGPάσης:

100 mM HEPES-NaOH (pH 7.5)

1 mM EDTA

5 mM Mg(NO₃)₂ 6H₂O

1 mM NAD

1 U/ml Φωσφορογλυκομουτάση (PGM)

1 U/ml Αφυδρογονάση της 6-φωσφορογλυκόζης

20 μM 1,6 διφωσφορογλυκόζη

0.9 mM πυροφωσφορικό (PPi)

5 mM Ουριδίνιο-διφωσφορογλυκόζη (UDP-glucose)

Για κάθε στάδιο ανάπτυξης πραγματοποιήθηκαν πέντε διαφορετικές μετρήσεις. Τα δείγματα περιείχαν 1 ml διαλύματος και 20 μl αντίστοιχου εκχυλίσματος. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 1 ml διαλύματος ανίχνευσης χωρίς UDP-γλυκόζη και 20 μl αντίστοιχου εκχυλίσματος. Σε αρχικά πειράματα μελετήθηκε η πορεία της αντίδρασης κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας (25°C) και συγκέντρωσης υποστρώματος και ενζύμου. Επειδή η ταχύτητα της αντίδρασης παρέμενε σταθερή για 1 ώρα επιλέχθηκε η μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου στα 30 λεπτά με φωτομέτρηση στα 340 nm σε φασματοφωτόμετρο UV-160A (Shimadzu), δηλαδή μετρήθηκε το παραγόμενο NADH.

2.4 Έλεγχος της καταλληλότητας των αντισωμάτων

2.4.1 Ηλεκτροφόρηση των μη μετουσιωμένων πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 6% ολικής συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου με 2.7% bis-ακρυλαμίδιο, σε ασυνεχές σύστημα του οποίου τα συστατικά ήταν τα παρακάτω:

A. Πηκτή ανάλυσης (Resolving Gel)

Acrylamide-Bisacrylamide stock solution (30%, 2.7%)	2.87ml
Ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης	2.50ml
dH ₂ O	6.0ml
10% Υπερθειικό αμμώνιο	50μl
TEMED	10μl

Ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης

378 mM Tris-HCl (pH 8.9)

B. Πηκτή συσσώρευσης (Stacking Gel)

Acrylamide-Bisacrylamide stock solution (30%, 2.7%)	1.25ml
Ρυθμιστικό διάλυμα συσσώρευσης	5.0ml
dH ₂ O	3.50ml
10% Υπερθειικό αμμώνιο	150μl
TEMED	10μl

Ρυθμιστικό διάλυμα συσσώρευσης

63 mM Tris-HCl (pH 6.8)

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών

25 mM Tris

192 mM Γλυκίνη

Τα δείγματα πρωτεΐνης (40μg) από κάθε ιστό αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση. Εφαρμόστηκε τάση 70 V για 2 περίπου ώρες και έπειτα αυξήθηκε στα 120 V μέχρι το τέλος της ηλεκτροφόρησης. Ακολούθως, η πηκτή τοποθετήθηκε στο διάλυμα αντίχενωσης της UGRάσης:

100 mM HEPES-NaOH (pH 7.5)

1 mM EDTA

5 mM Mg(NO₃)₂ 6H₂O

1 mM NAD

1 U/ml Φωσφορογλυκομουτάση
1 U/ml Αφυδρογονάση της 6-φωσφορογλυκόζης
20 μM 1,6 διφωσφορογλυκόζη
0.9 mM Πυροφωσφορικό
5 mM Ουριδινο-διφωσφορογλυκόζη
0.03% NBT

Η πηκτική αφέθηκε στο παραπάνω διάλυμα για λίγες ώρες μέχρι την εμφάνιση σήματος και έπειτα φωτογραφήθηκε μέσω σάρωσής της με επίπεδο σαρωτή.

2.4.2 Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτική σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Για την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, παρασκευάστηκε το διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών:

24 mM Tris
192 mM Γλυκίνη
20% Μεθανόλη

και ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

1. Η πηκτική, 2 φύλλα διηθητικού χαρτιού 3MM και δύο μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, επώαστηκαν στο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς για 20 περίπου λεπτά.
2. Τοποθετήθηκαν στο πλέγμα του συστήματος με την εξής σειρά: 1 φύλλο διηθητικού χαρτιού 3MM, μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και η πηκτική.
3. Πάνω από αυτά τοποθετήθηκαν: μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και 1 φύλλο διηθητικού χαρτιού 3MM. Οι τυχόν φυσαλίδες αέρα αφαιρέθηκαν με χρήση πιπέτας.
4. Ακολούθησε η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών στα 200 mA για 45 λεπτά, στους 4°C.
5. Μετά την ηλεκτροφόρηση σημειώθηκε η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που είχε τοποθετηθεί προς την κάθοδο (+) και φυλάχτηκε μεταξύ δύο φύλλων διηθητικού χαρτιού στο σκοτάδι.

2.4.3 Εφαρμογή αντισωμάτων στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης

Για τον ανοσοεντοπισμό της UGPάσης στις μεμβράνες της νιτροκυτταρίνης ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

1. Κόπηκαν ταινίες νιτροκυτταρίνης (πλάτους 5mm) από την (+) μεμβράνη, αποφεύγοντας την επαφή με τα χέρια.
2. Οι ταινίες καλύφθηκαν με διάλυμα 2% ζελατίνης για δέσμευση των μη ενεργών θέσεων σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα.
3. Οι ταινίες επώστηκαν σε 1:500 αραίωση του πρωτογενούς αντισώματος (Agriseria AS05086, πολυκλωνικά αντισώματα από ανασυνδυασμένη UGPase) σε διάλυμα TBST με 1% BSA, για τουλάχιστον 12 ώρες.
4. Το μη δεσμευμένο πρωτογενές αντίσωμα ξεπλύθηκε με διάλυμα TBST για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Οι ταινίες επώστηκαν σε διάλυμα TBST με 1% BSA, το οποίο περιείχε κατάλληλη αραίωση (1:5000) δευτερογενούς αντισώματος, που φέρει συζευγμένη αλκαλική φωσφατάση (AP-Mouse-Anti-Rabbit, Promega), για 1 ώρα και 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Το μη δεσμευμένο δευτερογενές αντίσωμα ξεπλύθηκε με διάλυμα TBST για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Οι ταινίες καλύφθηκαν με διάλυμα χρωματικής αντίδρασης.
8. Μετά από λίγα λεπτά, οι ταινίες της νιτροκυτταρίνης φωτογραφήθηκαν μέσω σάρωσής τους με επίπεδο σαρωτή.

2.5 Ανίχνευση της μεταφοράς της ακυλογλυκόζης

Τα δείγματα της πρωτεΐνης (40μg) από κάθε ιστό αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση. Για την ανίχνευση ενεργότητας της μεταφοράς της ακυλογλυκόζης χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω διάλυμα:

- 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)
- 4 mM Ουριδινό διφωσφορογλυκόζη
- 4 mM Δωδεκανοϊκό οξύ
- 200 mM KCl
- 20 mM MgCl₂ 6H₂O
- 10 mM Φωσφοροενολοπυροσταφυλικό οξύ

10 mM Γλυκόζη

2 mM NAD

0.03% NBT

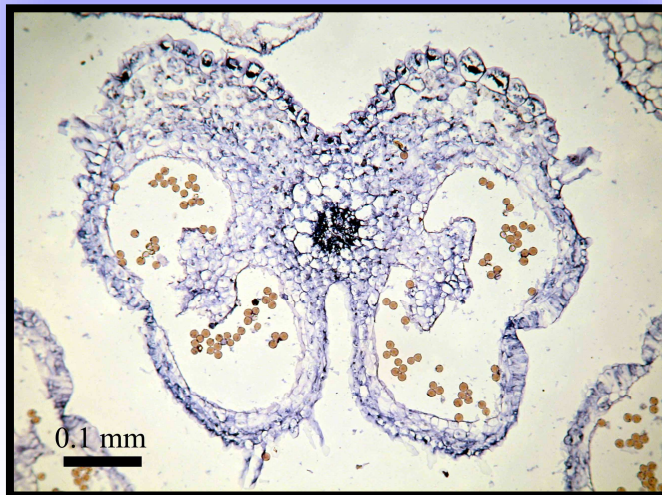
15 U/ml Κινάση του πυροσταφυλικού

5 U/ml Εξοζοκινάση

2 U/ml Αφυδρογονάση της 6-φωσφοργλυκόζης

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



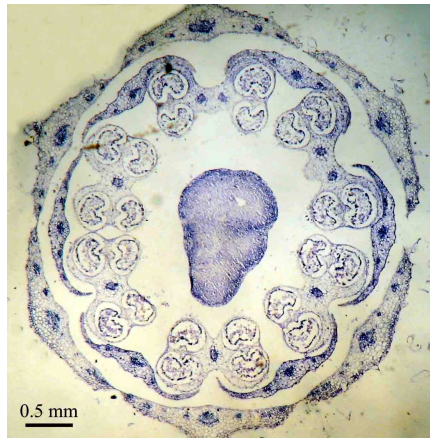
3. Αποτελέσματα

3.1 *In situ* ανοσοεντοπισμός της UGRάσης

Ο ανοσοεντοπισμός είναι μία τεχνική η οποία επιτρέπει τον *in situ* εντοπισμό ενζύμων στους φυτικούς ιστούς και παρέχει πληροφορίες για τη σχετική αφθονία τους. Για τον ανοσοεντοπισμό του ενζύμου της UGRάσης χρησιμοποιήθηκαν εγκάρσιες τομές ανθοφόρων οφθαλμών (μήκους 0-3 mm, 3-8 mm, 8 mm έως λίγο πριν από την άνθηση) και ώριμων ανθέων τομάτας. Γενικά, ο *in situ* ανοσοεντοπισμός του ενζύμου στις τομές ανθοφόρων οφθαλμών και ανθέων έδειξε ότι το ένζυμο, ανεξαρτήτως σταδίου, ανιχνεύεται κυρίως στην ωοθήκη, στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στον τάπητα. Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς την ένταση του σήματος της UGRάσης στα επιμέρους αναπτυξιακά στάδια.

Στο αναπτυξιακό στάδιο 0-3 mm (**Εικόνα 6**), διαμορφώνεται σε μεγάλο βαθμό το τοίχωμα των ασκών γύρης των ανθών, το οποίο αποτελείται από μία εξωτερική στοιβάδα, την επιδερμίδα, τρία ή τέσσερα στρώματα ενδιάμεσου επιτοίχιου και μονόστρωμο τάπητα, ο οποίος περιβάλλει το σποριογόνο ιστό. Ο ιστός αυτός αποτελείται από τα μητρικά κύτταρα των μικροσπορίων (**Εικόνα 7**).

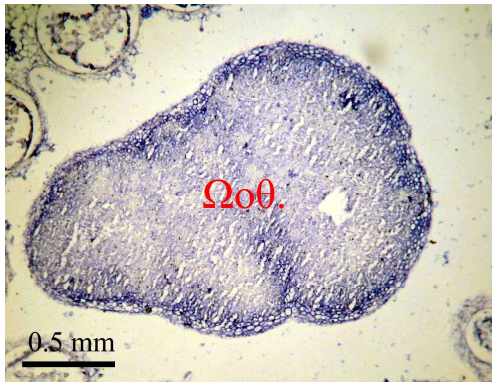
Ο *in situ* ανοσοεντοπισμός έδειξε ότι το ένζυμο ανιχνεύεται έντονα περιμετρικά της ωοθήκης (**Εικόνα 8**), στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και τον τάπητα των ασκών (**Εικόνα 9**), στα μητρικά κύτταρα των μικροσπορίων, στην επιδερμίδα των πετάλων καθώς και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες των πετάλων (**Εικόνα 10**) και των σεπάλων (**Εικόνα 11**).



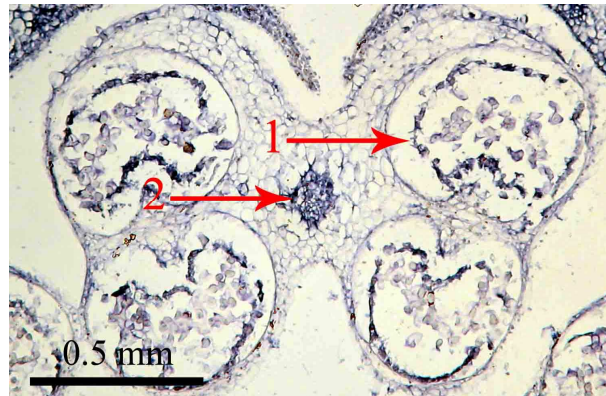
Εικόνα 6: Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης σε ανθοφόρο οφθαλμό τομάτας στο στάδιο 0-3 mm. Το ένζυμο ανιχνεύεται έντονα στην ωσθήκη, στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και τον τάπητα των ανθών, στα πέταλα και στα σέπαλα.



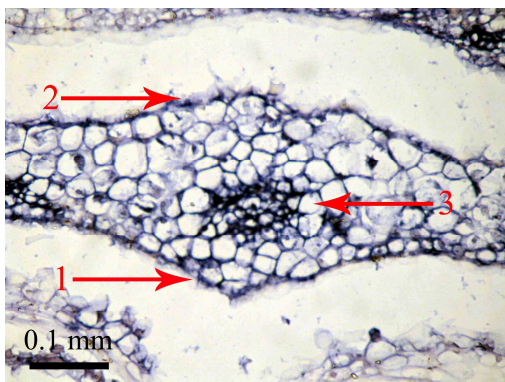
Εικόνα 7: Λεπτομέρεια του ασκού γύρης στην οποία διακρίνονται τα μητρικά κύτταρα της γύρης (βέλος).



Εικόνα 8: Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης στην ωσθήκη. Το ένζυμο ανιχνεύεται έντονα περιμετρικά της ωσθήκης.



Εικόνα 9: Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης στον ανθήρα. Το ένζυμο ανιχνεύεται έντονα στα κύτταρα του τάπητα (βέλος 1) και στην ηθμαγγειώδη δεσμίδα (βέλος 2).



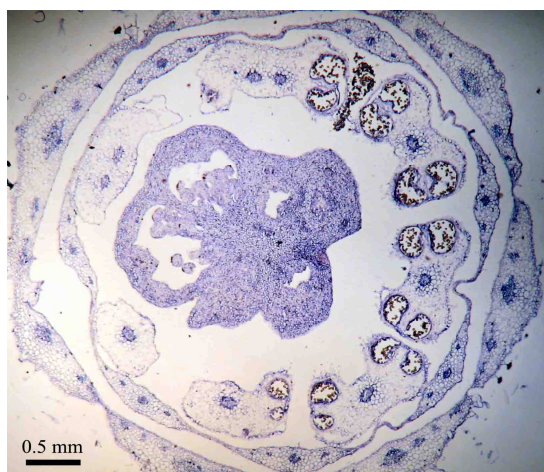
Εικόνα 10: Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης στο πέταλο. Το ένζυμο ανιχνεύεται έντονα στην εσωτερική (βέλος 1) και την εξωτερική (βέλος 2) στοιβάδα κυττάρων του πετάλου, καθώς και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (βέλος 3).



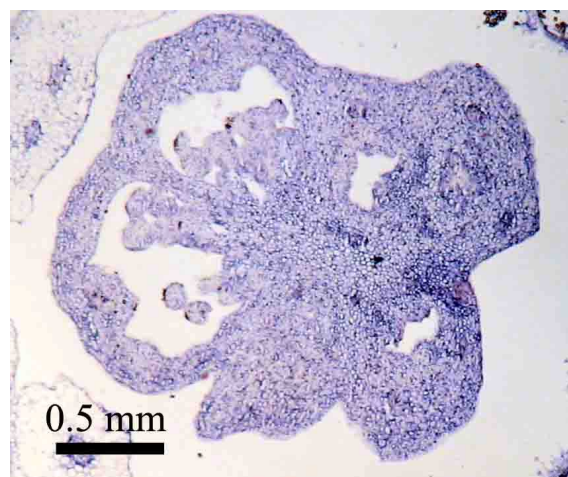
Εικόνα 11: Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης στο σέπαλο. Το ένζυμο ανιχνεύεται έντονα στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (βέλος).

Στο αναπτυξιακό στάδιο 3-8 mm (**Εικόνα 12**), γίνεται εμφανής η παρουσία του τάπητα ως στοιβάδα πλασματοβριθών κυττάρων τα οποία αποτελούν την εσωτερική στρώση των τοιχωμάτων του ασκού. Μέσα στον ασκό τα μητρικά κύτταρα γύρης βρίσκονται στο στάδιο της μείωσης. Παράλληλα, αρχίζουν να διαφοροποιούνται ορισμένα επιδερμικά κύτταρα στην περιοχή που πρόκειται να διαρρηχθεί ο ασκός. Τα κύτταρα αυτά ακολούθως μεγεθύνονται κατά τη διάρκεια του επόμενου σταδίου. Η γενική τους μορφή παραπέμπει στο ινώδες στρώμα το οποίο σχηματίζεται σε αυτήν την περιοχή στους ανθήρες άλλων φυτών κατά το ίδιο αναπτυξιακό στάδιο.

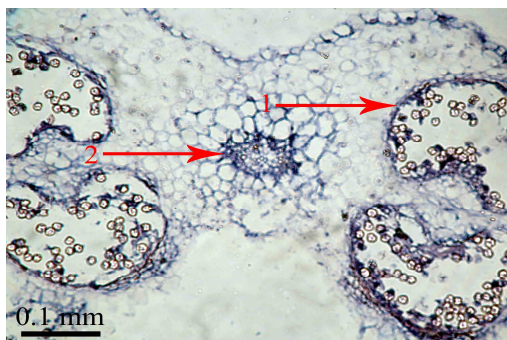
Ο *in situ* ανοσοεντοπισμός έδειξε ότι το ένζυμο ανιχνεύεται σε ολόκληρη την ωοθήκη (**Εικόνα 13**), στην ηθμαγγειώδη δεσμίδα και τον τάπητα των ασκών γύρης (**Εικόνα 14**), ενώ μικρότερη είναι η ένταση του σήματος στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες των πετάλων (**Εικόνα 15**) και των σεπάλων (**Εικόνα 16**).



Εικόνα 12: Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης σε ανθοφόρο οφθαλμό τομάτας στο στάδιο 3-8 mm. Το ένζυμο ανιχνεύεται έντονα στην ωοθήκη, στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και τον τάπητα των ανθέρων, στα πέταλα και στα σέπαλα.



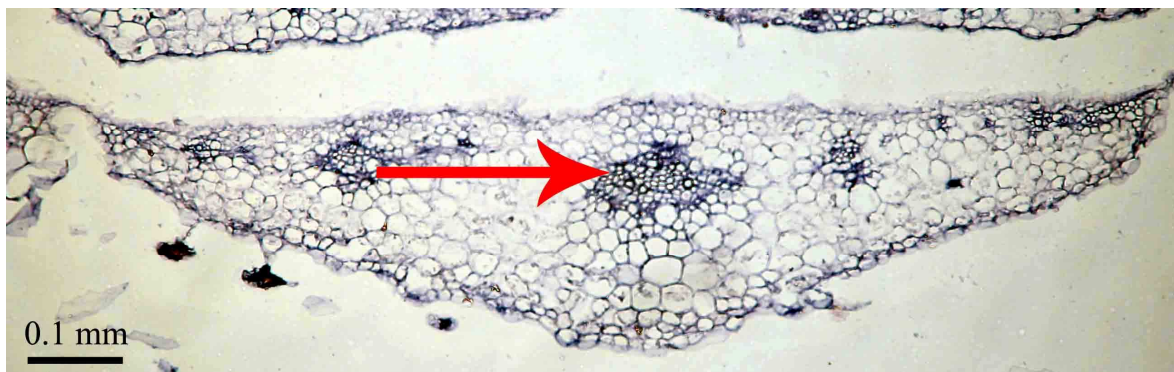
Εικόνα 13: Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης στην ωοθήκη. Το ένζυμο ανιχνεύεται έντονα σε ολόκληρη την ωοθήκη.



Εικόνα 14: Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης στον ανθήρα. Το ένζυμο ανιχνεύεται έντονα στα κύτταρα του τάπητα (βέλος 1) και στην ηθμαγγειώδη δεσμίδα (βέλος 2).



Εικόνα 15: Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης στο πέταλο. Το ένζυμο ανιχνεύεται στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (βέλος).



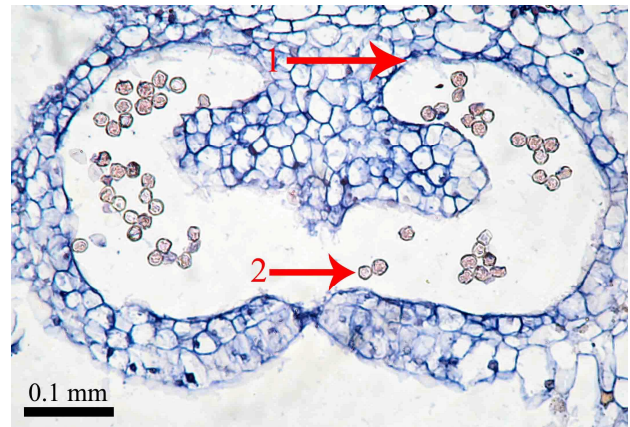
Εικόνα 16: Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης στο σέπαλο. Το ένζυμο ανιχνεύεται έντονα στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (βέλος).

Στο αναπτυξιακό στάδιο 8 mm έως λίγο πριν από την άνθηση (**Εικόνα 17**), έχει εξαφανιστεί ο τάπητας και έχει ήδη αρχίσει η επένδυση του εξωστρώματος στους ανώριμους γυρεόκοκκους. Οι γυρεόκοκκοι διαφοροποιούνται σε σχέση με το προηγούμενο στάδιο καθώς ο ιστός που βρίσκεται κάτω από την περιοχή του στομίου της θήκης του ανθήρα αποδομείται, σχηματίζοντας ένα μεγάλο γυρεόσακκο (**Εικόνα 18**).

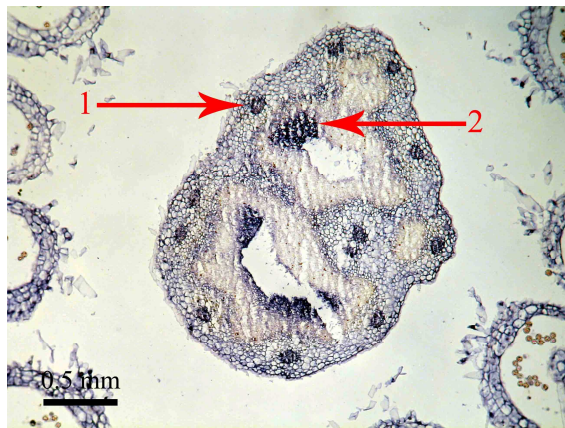
Ο *in situ* ανοσοεντοπισμός έδειξε ότι το ένζυμο ανιχνεύεται έντονα στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στα κύτταρα που περιβάλλουν το κοίλωμα του στύλου (αγωγό ιστό) (**Εικόνα 19**), στην εξωτερική επιδερμίδα και στην ηθμαγγειώδη δεσμίδα των ανθών (**Εικόνα 20**), ενώ μικρότερη είναι η ένταση του σήματος στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες των πετάλων (**Εικόνα 21**) και των σεπάλων (**Εικόνα 22**).



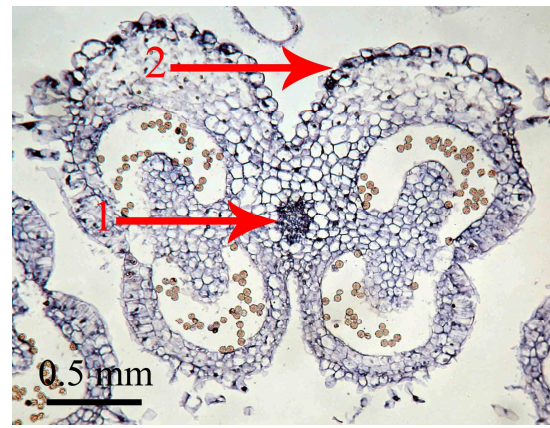
Εικόνα 17: Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης σε ανθοφόρο οφθαλμό τομάτας στο στάδιο 8 mm-προάνθηση. Το ένζυμο ανιχνεύεται έντονα στην ωοθήκη, στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και τον τάπητα των ανθήρων, στα πέταλα και στα σέπала.



Εικόνα 18: Λεπτομέρεια ασκού γύρης στο στάδιο 8 mm-προάνθηση που χαρακτηρίζεται από την απουσία τάπητα (βέλος 1), την επένδυση του εξωστρώματος στους ανώριμους γυρέοκοκκους (βέλος 2) και το σχηματισμό ενιαίων γυρέοσακκων.



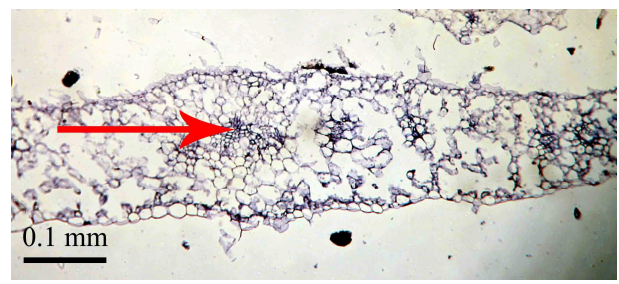
Εικόνα 19: Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης στην ωοθήκη. Το ένζυμο ανιχνεύεται έντονα στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (βέλος 1) και στον αγωγό ιστό (βέλος 2).



Εικόνα 20: Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης στον ανθήρα. Το ένζυμο ανιχνεύεται έντονα στην ηθμαγγειώδη δεσμίδα (βέλος 1) και στην εξωτερική επιδερμίδα (βέλος 2).



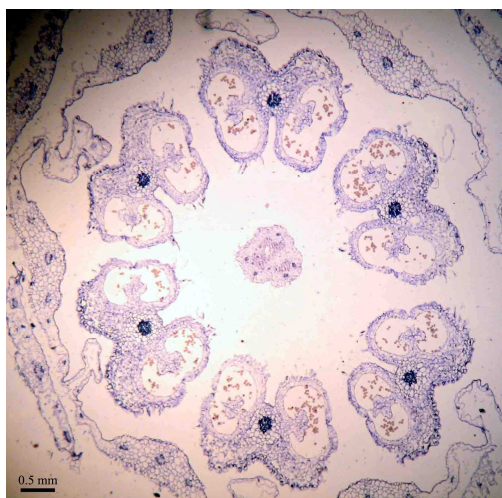
Εικόνα 21: Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης στο πέταλο. Το ένζυμο ανιχνεύεται έντονα στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (βέλος).



Εικόνα 22: Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης στο σέπало. Το ένζυμο ανιχνεύεται έντονα στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (βέλος).

Στην άνθηση (**Εικόνα 23**), οι ανθήρες ωριμάζουν και διαρρηγνύονται στην περιοχή μεταξύ των παρακείμενων ασκών και οι γυρέοκοκκοί διασπείρονται. Τα κύτταρα του στομίου εκφυλίζονται και στην κοιλότητα του ανθήρα παραμένουν μόνο μερικοί γυρέοκοκκοί.

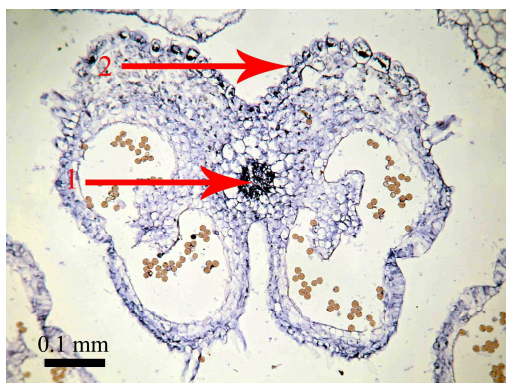
Ο *in situ* ανοσοεντοπισμός έδειξε ότι το ένζυμο ανιχνεύεται έντονα στον αγωγό ιστό της ωοθήκης (**Εικόνα 24**), στην ηθμαγγειώδη δεσμίδα και την εξωτερική επιδερμίδα των ανθήρων (**Εικόνα 25**), ενώ μικρότερη είναι η ένταση του σήματος στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες των πετάλων (**Εικόνα 26**) και των σεπάλων.



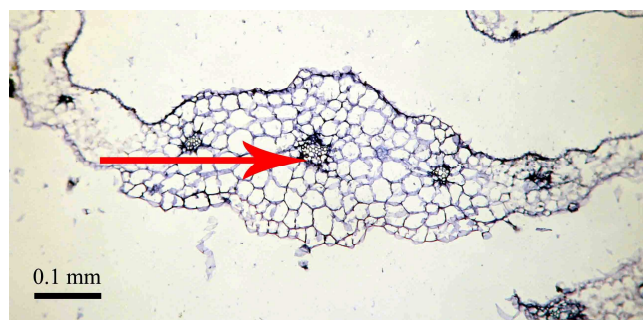
Εικόνα 23: Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης σε ανθοφόρο οφθαλμό τομάτας στο στάδιο της άνθησης. Το ένζυμο ανιχνεύεται έντονα στην ωοθήκη, στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και τον τάπητα των ανθήρων, στα πέταλα και στα σέπαλα.



Εικόνα 24: Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης UGRάσης στην ωοθήκη. Το ένζυμο ανιχνεύεται έντονα στον αγωγό ιστό (βέλος).



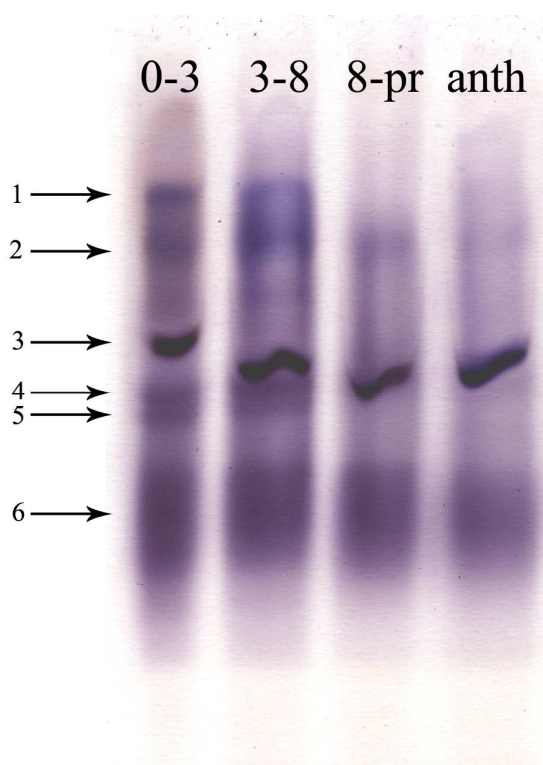
Εικόνα 25: Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης στον ανθήρα. Το ένζυμο ανιχνεύεται έντονα στην ηθμαγγειώδη δεσμίδα (βέλος 1) και στην εξωτερική επιδερμίδα (βέλος 2).



Εικόνα 26: Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης στο πέταλο. Το ένζυμο ανιχνεύεται έντονα στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (βέλος).

3.2 Η διαφοροποίηση της ενεργότητας UGRάσης κατά την ανάπτυξη των ανθοφόρων οφθαλμών

Για να διαπιστωθεί ο αριθμός των ισοενζύμων UGRάσης και η τυχόν διαφορική έκφρασή τους ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο σε οφθαλμούς και άνθη τομάτας, διενεργήθηκε εκχύλιση των ιστών και ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδης. Μετά την ηλεκτροφόρηση των μη μετουσιωμένων πρωτεϊνών, η πηκτική πολυακρυλαμίδης επώαστηκε στο διάλυμα ανίχνευσης UGRάσης για σύντομο χρονικό διάστημα μέχρι την εμφάνιση σήματος και έπειτα φωτογραφήθηκε μέσω σάρωσής της με επίπεδο σαρωτή (Εικόνα 27).



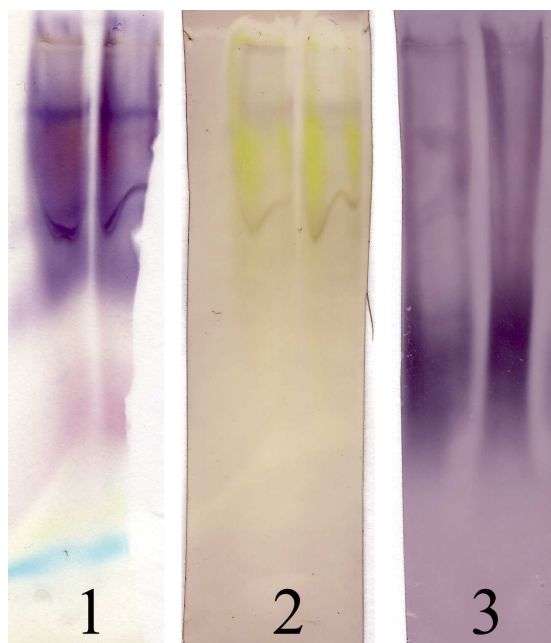
Εικόνα 27: Λεπτομέρεια ηλεκτροφόρησης της UGRάσης σε τέσσερα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια ανθοφόρων οφθαλμών τομάτας. Με βέλη σημειώνονται οι διαφορετικές ζώνες που εντοπίστηκαν.

Όπως διαπιστώνεται στην παραπάνω εικόνα, το ένζυμο της UGRάσης εντοπίστηκε και στα τέσσερα στάδια ανάπτυξης των ανθέων που εξετάστηκαν. Συνολικά ανιχνεύθηκαν τουλάχιστον έξι διαφορετικές ζώνες σε όλα τα στάδια. Συγκεκριμένα στο στάδιο 0-3 mm εντοπίστηκαν έξι διαφορετικές ζώνες UGRάσης, στο στάδιο 3-8 mm εντοπίστηκαν έξι ζώνες UGRάσης, στο στάδιο 8 mm έως λίγο πριν την άνθηση εντοπίστηκαν τρεις (ζώνες 2, 3 και 6) και ομοίως στο στάδιο της άνθησης εντοπίστηκαν οι ίδιες ζώνες UGRάσης. Φαίνεται λοιπόν από την διαφορική έκφραση

της ενζυμικής δραστηριότητας ότι ίσως ενεργοποιούνται διαφορετικοί γενετικοί τόποι για τη μεταγραφή και μετάφραση ισοενζύμων, εξειδικευμένων σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια.

3.3 Έλεγχος καταλληλότητας των αντισωμάτων

Με τη χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων UGRάσης είναι δυνατός ο εντοπισμός των 'πραγματικών' ζωνών UGRάσης μετά από τη χρώση στο διάλυμα ανίχνευσης UGRάσης, καθώς μερική ενζυμική δραστηριότητα UGRάσης μπορεί να έχουν και άλλα ένζυμα. Έτσι, για τον ανοσοεντοπισμό της UGRάσης πραγματοποιήθηκε ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών του σταδίου 3-8 mm από την πηκτή πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ακολούθησε επώαση στο διάλυμα ανίχνευσης UGRάσης για να ελεγχθεί η επιτυχής μεταφορά. Κατόπιν, διενεργήθηκε ο ανοσοεντοπισμός των πρωτεϊνών UGRάσης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με το αντίσωμα (**Εικόνα 28**).



Εικόνα 28: Έλεγχος καταλληλότητας των αντισωμάτων. (1) Ενζυμική δραστηριότητα ηλεκτροφορήματος πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. (2) Ενζυμική δραστηριότητα των μεταφερθέντων πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. (3) Ανοσοεντοπισμός των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

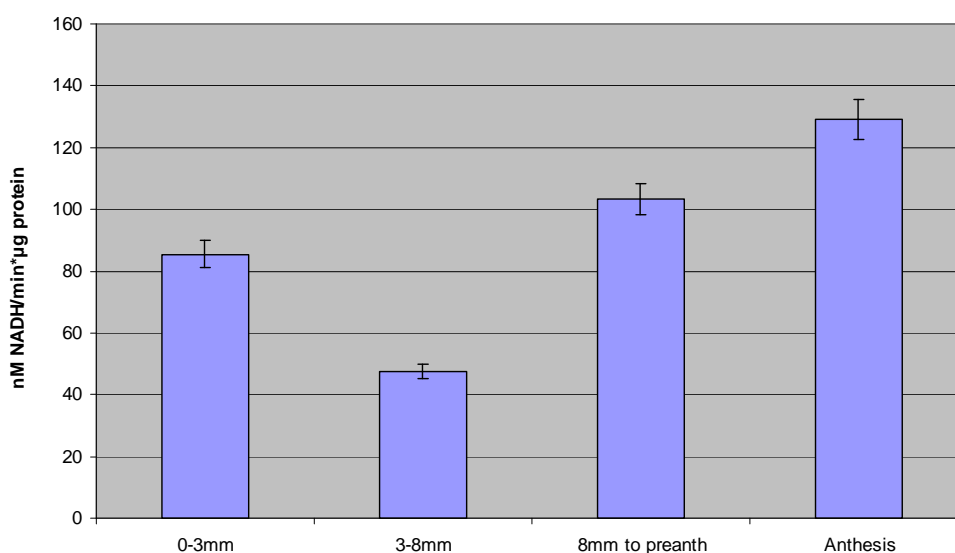
Παρατηρήθηκε ότι με το αντίσωμα αναγνωρίστηκαν όλες οι ηλεκτροφορητικές ζώνες δραστηριότητας που εντοπίστηκαν στην πηκτή πολυακρυλαμίδης.

3.4 Προσδιορισμός της *in vitro* δραστηριότητας της UGRάσης

Η δραστηριότητα της UGRάσης προσδιορίστηκε φωτομετρικά στα τέσσερα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια των ανθέων τομάτας. Για το σκοπό αυτό προσδιορίστηκε πρώτα το χρονικό διάστημα της επώασης των δειγμάτων και η ποσότητα του ενζυμικού εκχυλίσματος κατά τα οποία η παραγωγή του NADH αυξανόταν γραμμικά. Τα αρχικά πειράματα έδειξαν ότι με δεδομένη συγκέντρωση υποστρώματος η ταχύτητα της αντίδρασης παρέμενε σταθερή για περίπου μία ώρα. Κατόπιν τούτου επιλέχθηκε η μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου για εκχυλίσματα που περιείχαν 40 μg πρωτεΐνης σε χρονικό διάστημα 30 λεπτών.

Από τις μετρήσεις της ενζυμικής δραστηριότητας (**Εικόνα 29**), φαίνεται ότι η δραστηριότητα UGRάσης είναι μεγαλύτερη κατά το αναπτυξιακό στάδιο της άνθησης με 129,1 nM NADH/min* μg πρωτεΐνης και ακολουθείται από το αναπτυξιακό στάδιο 8mm έως λίγο πριν από την άνθηση με 103,3 nM NADH/min* μg πρωτεΐνης. Η μικρότερη δραστηριότητα εντοπίστηκε στο αναπτυξιακό στάδιο 3-8 mm με 47,4 nM NADH/min* μg πρωτεΐνης. Αυτό είναι σε συμφωνία με τον *in situ* ανοσοεντοπισμό του ενζύμου της UGRάσης σε τομές οφθαλμών και ανθέων, αφού κατά το αναπτυξιακό στάδιο 3-8 mm το σήμα υβριδισμού δεν είναι τόσο έντονο όσο στο αναπτυξιακό στάδιο της άνθησης.

Ενεργότητα της UGRάσης σε ολόκληρο το άνθος

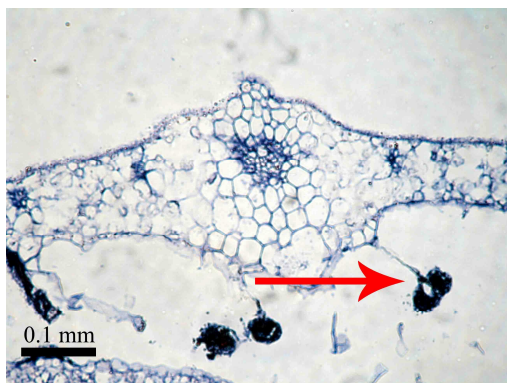


Στάδια ανάπτυξης ανθέων τομάτας

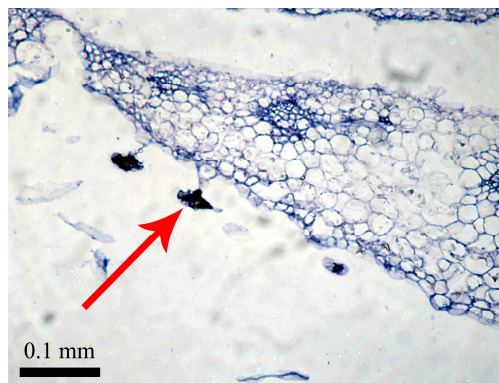
Εικόνα 29: Ενεργότητα της UGRάσης στους ανθοφόρους οφθαλμούς της τομάτας κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους. Οι μπάρες δείχνουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου

3.5 Ανίχνευση της μεταφοράς της ακυλογλυκόζης

Όπως τουλάχιστον φαίνεται από τον ανοσοεντοπισμό της UGRάσης, στην εξωτερική επιδερμίδα του ασκού (**Εικόνα 25**) και στις αδενώδεις τρίχες (**Εικόνες 30, 31**), υπάρχει αυξημένη συγκέντρωση UGRάσης. Για τη διερεύνηση του ρόλου του ενζύμου στους ιστούς αυτούς ελέγχθηκε η υπόθεση της παραγωγής UDP-γλυκόζης που εν συνεχεία πιθανόν να χρησιμοποιείται για την παραγωγή εστέρων γλυκόζης.

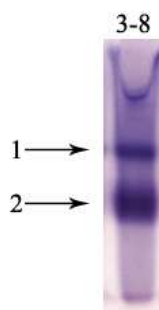


Εικόνα 30: Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης σε πέταλο. Με το βέλος εντοπίζονται οι τριχοειδείς κατασκευές. Είναι εμφανής η υψηλή συγκέντρωση του ενζύμου της UGRάσης.



Εικόνα 31: Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης σε σέπαλο. Με το βέλος εντοπίζονται οι τριχοειδείς κατασκευές. Είναι εμφανής η υψηλή συγκέντρωση του ενζύμου της UGRάσης

Επιπλέον βασικό ένζυμο του μεταβολισμού της UDP-γλυκόζης είναι η μεταφορά της ακυλογλυκόζης. Για την ανίχνευση των ισοενζύμων της μεταφοράς της ακυλογλυκόζης διενεργήθηκε απομόνωση μη μετουσιωμένων πρωτεϊνών ανθοφόρων οφθαλμών τομάτας του αναπτυξιακού σταδίου 3-8 mm και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση (**Εικόνα 32**).



Εικόνα 32: Λεπτομέρεια ηλεκτροφόρησης της μεταφοράς της ακυλογλυκόζης στο αναπτυξιακό στάδιο 3-8 mm. Με βέλη σημειώνονται οι διαφορετικές ζώνες που εντοπίστηκαν

Παρατηρείται η ύπαρξη δύο σαφώς διαχωρισμένων ζωνών στο δείγμα. Η ύπαρξη αυτών των ζωνών μας δίνει τη δυνατότητα να υποστηρίξουμε την ύπαρξη ενζυμικής δραστηριότητας της τρανσφεράσης της ακυλογλυκόζης στους συγκεκριμένους ιστούς.

Συζήτηση



4. Συζήτηση

4.1 Η UGRάση και η παρουσία της σε διαφορετικούς ιστούς

Το ένζυμο της UGRάσης εντοπίστηκε σε εγκάρσιες τομές ανθοφόρων οφθαλμών μήκους 0-3 mm, 3-8 mm, 8 mm έως λίγο πριν από την άνθηση και ώριμων ανθέων τομάτας. Ανοσοεντοπισμός με τη χρήση αντισωμάτων που έφεραν χρυσό έχει δείξει ότι περισσότερο από το 90% της UGRάσης εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα αλλά σε ένα μικρό ποσοστό εντοπίζεται επίσης στους αμυλοπλάστες, στο σύμπλεγμα Golgi και στα μικροσώματα (Kimura *et al.*, 1992; Mikami *et al.*, 2001). Επίσης, στο κριθάρι έχει αναφερθεί η δράση ενός ενζύμου UGRάσης προσδεδεμένο σε μεμβράνη (Becker *et al.*, 1995). Υπάρχουν πολύ λίγες αναφορές σχετικά με τον ανοσοεντοπισμό ή και την ενεργότητα της UGRάσης στους ιστούς και τα όργανα των φυτών. Οι Meng *et al* (2007) αναφέρουν ότι υψηλή δραστικότητα του ενζύμου εντοπίζεται στα αναπτυσσόμενα αγγεία του ξύλου, κάτι που επιβεβαιώνει τις μελέτες (π.χ Gibeaut 2000) που αναφέρουν τον πρωταρχικό ρόλο της UGRάσης στη βιοσύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων. Η Roberts (1990) ανίχνευσε ενεργότητα του ενζύμου σε ακρορρίζια καλαμποκιού μήκους 2 mm και οι Appeldoorn *et al* (2002) σε αναπτυσσόμενους κονδύλους πατάτας. Στα ίδια δείγματα εντοπίστηκε γενικευμένη δραστικότητα του ενζύμου κατά μήκος του κονδύλου και δεν εντοπίστηκαν μεγάλες διαφορές στην ένταση του σήματος μεταξύ της υπομεριστωματικής περιοχής και του υπόλοιπου στόλωνα. Τέλος, μετά την έναρξη της κονδυλοποίησης, η μετάβαση στη φάση αποδόμησης της σακχαρόζης μέσω της SuSy και η αύξηση της ροής των υδατανθράκων προς τον αυξανόμενο κόνδυλο (Merlo *et al.*, 1993) δεν απαιτεί ανάλογη αύξηση της UDP-γλυκόζης για να διατηρηθεί ο αυξημένος ρυθμός αποδόμησης της σακχαρόζης στον αυξανόμενο κόνδυλο (Appeldoorn *et al.*, 1997).

Οι Sergeeva και Vreugdenhil (2002) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του *in situ* εντοπισμού σε καρπούς τομάτας εντόπισαν μεγάλη δραστικότητα της UGRάσης στα αναπτυσσόμενα σπέρματα, στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στο εξωτερικό παρέγχυμα του περικαρπίου και μικρότερη στο εσωτερικό παρέγχυμα του περικαρπίου. Επίσης, σε στελέχη πετούνιας διαπιστώθηκε δράση της UGRάσης στους περισσότερους ιστούς. Η υψηλότερη όμως δραστικότητα του ενζύμου εντοπίστηκε στον εσωτερικό και εξωτερικό ηθμό, καθώς και στο φωτοσυνθετικό παρέγχυμα του φλοιώδους παρεγχύματος. Ακόμη, σε σαρκώδη φύλλα του *Gasteria verrucosa*

παρατηρήθηκε δραστικότητα της UGRάσης στο πασσαλώδες και στο σπογγώδες παρέγχυμα, ενώ η δραστικότητα του ενζύμου ήταν πάρα πολύ χαμηλή στα επιδερμικά κύτταρα και στο κεντρικό μη φωτοσυνθετικό παρέγχυμα.

Οι Chen *et al* (2007) εντόπισαν την πρωτεΐνη, με τη χρήση αντισωμάτων, στους ανθήρες του ρυζιού. Εντονότερο σήμα παρατηρήθηκε στα μητρικά των μικροσπορίων γύρης. Σε φυτά που είχαν υποστεί συνκαταστολή των δύο γονιδίων του ρυζιού (Ugr1 και Ugr2), δεν εντοπίστηκε η πρωτεΐνη και παρατηρήθηκε διακοπή της φυσιολογικής εναπόθεσης καλλόζης και παραγωγή γύρης μειωμένης ζωτικότητας, κάτι που δείχνει τον πρωταρχικό ρόλο της UGRάσης στη βιοσύνθεση των γλυκανών των κυτταρικών τοιχωμάτων.

Στα δείγματά μας, το πρότυπο του εντοπισμού της UGRάσης στην ωοθήκη, στον τάπητα και στην ηθμαγγειώδη δεσμίδα του ανθήρα, στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες των σεπάλων και των πετάλων και στα μητρικά των μικροσπορίων συμφωνεί με τα παραπάνω αποτελέσματα. Οι ανθήρες έχουν υψηλή ισχύ καταβόθρας σε όλο το άνθος και μεγάλες ποσότητες σακχάρων κινούνται προς τους ανθήρες στην έναρξη της ανάπτυξής τους (Clément *et al.*, 1996; Castro and Clément, 2007).

Επιπλέον, η παρουσία της UGRάσης και της μεταφοράς της ακυλογλυκόζης (που πρώτη φορά σε αυτή τη μελέτη ανιχνεύθηκε) στο άνθος είναι δυνατόν να συνδέεται με τη βιοσύνθεση υλικών που σχετίζονται με την προστασία του οργάνου αυτού. Είναι γνωστό ότι στην επιδερμίδα των ανθέων και σε αδενώδεις ιστούς συσσωρεύονται εστέρες γλυκόζης, πρόδρομα μόρια των τερπενοειδών που εκκρίνονται και χρησιμοποιούνται για την άμυνα κατά εντόμων και λοιπών παθογόνων οργανισμών (McCaskill and Croteau, 1999). Στην άγρια τομάτα (*Lycopersicon pennellii*) έχει αναφερθεί η βιοσύνθεση εξειδικευμένων προϊόντων (εστέρων της τριακυλογλυκόζης), τα οποία εκκρίνονται από τις αδενώδεις τρίχες των φύλλων (Fobes *et al.*, 1985; Burke *et al.*, 1987; Kuai *et al.*, 1997).

Ο τάπητας έχει ως κύρια λειτουργία τη μεταφορά πρόδρομων ουσιών των κυτταρικών τοιχωμάτων των μικροσπορίων στο εσωτερικό του ασκού (Southworth, 1990; Stieglitz, 1977). Η παρουσία λοιπόν της UGRάσης σε αυτόν τον ιστό πιθανόν να σχετίζεται με την υδρόλυση συστατικών του αμύλου. Πράγματι, ο Nishiyama (1984) έχει παρατηρήσει διαστολή του τάπητα ως αποτέλεσμα της αυξανόμενης συγκέντρωσης σακχάρων και της πίεσης λόγω σπαργής. Ο τάπητας είναι μεταβολικά πολύ ενεργός ιστός και δεν έχει κεντρικό ρόλο μόνο στην θρέψη των σχηματιζόμενων μικροσπορίων, αλλά συμβάλλει επίσης στη βιοσύνθεση των περισσοτέρων ή όλων

των δομικών συστατικών του εξωστρώματος της γύρης (Scott *et al.*, 2004). Στο ρύζι, από το στάδιο των νεαρών μικροσπορίων μέχρι την ανάπτυξη των γυρεοκόκκων (Oliver *et al.*, 2007) ο τάπητας λειτουργεί στο μέγιστο.

Σε όλες τις δημοσιευμένες αναφορές το ένζυμο της UGRάσης εντοπίζεται κυρίως στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Appeldoorn *et al.*, 2002; Sergeeva and Vreugdenhil, 2002). Επιπλέον, στην πετούνια το ένζυμο εντοπίστηκε στον εσωτερικό και εξωτερικό ηθμό (Sergeeva and Vreugdenhil, 2002). Ο εντοπισμός του ενζύμου στα αγγεία του ξύλου καθώς και στα αυξανόμενα κύτταρα του κεντρικού κυλίνδρου της ρίζας παραπέμπει κυρίως στο ρόλο της UGRάσης στη βιοσύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων. Μεταλλαγμένα βακτήρια του *Acetobacter xylinum* που δεν είχαν την ικανότητα παραγωγής της κυτταρίνης παρουσίασαν επίσης και έλλειψη της UGRάσης (Valla *et al.*, 1989). Ομοίως, σε μεταλλάγματα ζυμών στα οποία μειώθηκε κατά δέκα φορές η δραστηριότητα της UGRάσης, μειώθηκε επίσης η συγκέντρωση β-γλυκάνης στα κυτταρικά τοιχώματα (Daran *et al.*, 1995). Ακόμα, κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης των κυττάρων και το σχηματισμό των δευτερογενών κυτταρικών τοιχωμάτων στα στελέχη της λεύκας βρέθηκε αυξημένη έκφραση ενός γονιδίου UGRάσης (Hertzberg *et al.*, 2001). Εξάλλου, υπερέκφραση των γονιδίων UGRάσης και SuSy είχε ως αποτέλεσμα αυξημένα ποσά κυτταρίνης στα κυτταρικά τοιχώματα και αύξηση του ύψους των φυτών (Coleman *et al.*, 2003). Η εμπλοκή της UGRάσης στη βιοσύνθεση γλυκανών, φαίνεται και από την παρεμπόδιση της εξέλιξης των μικροσπορίων και τη δημιουργία γύρης σε μεταλλάγματα ρυζιού στα οποία είχε επιβληθεί συνκαταστολή και των δύο ισοτύπων του ενζύμου (Chen *et al.*, 2007). Η παρουσία της UGRάσης και της Susy (Wachter *et al.*, 2003) στους ηθμοσωλήνες θα μπορούσε να αποδοθεί στη συμβολή τους στην παροχή αναπνευστικών υποστρωμάτων για την αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα των ηθμοσωλήνων λόγω της απαιτούμενης μεταφοράς των ουσιών μέσω των κυττάρων αυτών. Οι Sergeeva και Vreugdenhil (2002), αναφέρουν γενικευμένο εντοπισμό της UGRάσης στο σπογγώδες και το πασσαλώδες παρέγχυμα στα σαρκώδη φύλλα του *Gasteria verrucosa*. Σε ώριμα φύλλα η UGRάση εμπλέκεται στη σύνθεση σακχαρόζης σε συνεργασία με την SPS (Stitt, 1989). Οι χλωρωτικές κοτύλες των αναπτυσσόμενων φυταρίων παρέχουν θρεπτικές ουσίες για την ανάπτυξη των εμβρυικών ιστών. Είναι λοιπόν πιθανόν η UGRάση να συμβάλλει στη σύνθεση της σακχαρόζης στα όργανα αυτά. Η δραστηριότητα της SPS σε ετερότροφους ιστούς έχει αναφερθεί από αρκετούς ερευνητές (Huber and Huber 1996; Winter and Huber 2000; Im 2004). Η αυξημένη

ροή των μεταβολιτών στη γλυκονεογέννεση απαιτεί την δράση της UGPάσης (Hammond *et al.*, 1990). Ο εντοπισμός της UGPάσης πιθανόν λοιπόν να σχετίζεται με τη χρήση της παραγόμενης 1-φωσφορογλυκόζης σε μεταβολικές διαδικασίες που απαιτούνται για τις κυτταροδιαιρέσεις και την επιμήκυνση των κυττάρων.

4.2 Η δραστηριότητα της UGPάσης

Η μελέτη της δραστηριότητας της UGPάσης έδειξε ότι η *in vitro* δραστηριότητα του ενζύμου σε εκχυλίσματα από ολόκληρο άνθος μειώνεται από το πρώτο (0-3 mm) στο δεύτερο στάδιο (3-8 mm) και αυξάνεται από το τρίτο στάδιο (8mm μέχρι την προάνθηση) έως το τέταρτο στάδιο (άνθηση) όπου και παρατηρείται η μέγιστη τιμή της. Οι τιμές της ενεργότητας της UGPάσης βρέθηκαν μεταξύ 47,4 nM NADH/min*μg πρωτεΐνης και 129,1 nM NADH/min*μg πρωτεΐνης. Η ενεργότητα της UGPάσης υπολογίστηκε στο βερίκοκο (*Prunus armeniaca*) στα 12 μmol/min/g N.B. (Pina and Errea, 2008) που είναι εντός του εύρους των δικών μας τιμών. Επιπλέον, φαίνεται ότι η UGPάση παρουσιάζει υψηλή δραστηριότητα σε σχέση με τα περισσότερα ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της σακχαρόζης, της τάξης των 5 nmoles υποστρώματος/μg πρωτεΐνης*min. Οι Kleczkowski *et al* (2004) αναφέρουν ότι η UGPάση παρουσιάζει υψηλή δραστηριότητα και πιθανολογούν μη ρυθμιστικό ρόλο του ενζύμου στη ροή άνθρακα από και προς τη σακχαρόζη.

Το γεγονός ότι η μεγαλύτερη δραστηριότητα UGPάσης παρατηρείται στο στάδιο της άνθησης ίσως οφείλεται στο ότι κατά την άνθηση αυξάνεται σε μέγεθος η ωοθήκη. Επιπλέον, στο στάδιο 3-8 mm παρατηρείται η μικρότερη δραστηριότητα και αυτό ίσως επειδή το άνθος της τομάτας είναι πρωτανδρικό και στο στάδιο αυτό έχει ολοκληρωθεί η ανάπτυξη των ανθών. Επιπλέον, σε αυτό το στάδιο συντελείται η μείωση των μητρικών κυττάρων γύρης και οι ανάγκες σε UGPάση είναι περιορισμένες, αφού σε αυτό είναι γνωστό ότι κατά τη μείωση των μητρικών κυττάρων γύρης και το σχηματισμό γυρεοκκόκων δεν παρατηρούνται έντονες μιτωτικές διαιρέσεις ή αύξηση κυττάρων, που είναι διεργασίες απαιτητικές σε ενέργεια.

4.3 Δραστική μορφή της UGRάσης

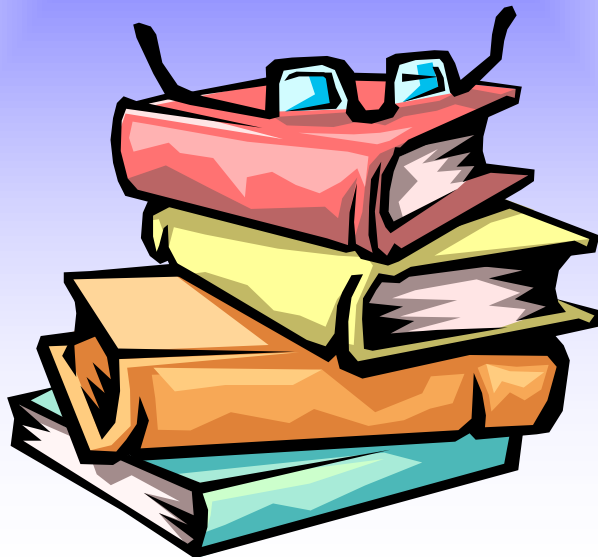
Αρχικά μελετήθηκε η ηλεκτροφορητική συμπεριφορά της UGRάσης από εκχυλίσματα ανθοφόρων οφθαλμών και ώριμων ανθέων τομάτας σε τέσσερα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Συγκεκριμένα, η πρώτη κατηγορία περιελάμβανε ανθοφόρους οφθαλμούς μήκους 0-3 mm, η δεύτερη 3-8 mm, η τρίτη από 8 mm έως λίγο πριν από την άνθηση και η τέταρτη κατηγορία περιελάμβανε ώριμα άνθη. Η πηκτή ακρυλαμίδης που επώαστηκε σε διάλυμα που περιείχε UDP-γλυκόζη κατέδειξε την ύπαρξη έξι διαφορετικών ζωνών. Η παρουσία περισσότερων της μιας ζωνών, είναι ενδεικτική του γεγονότος ότι το ένζυμο πιθανόν να υπάρχει σε ισότυπους. Αυτό το αποτέλεσμα συμφωνεί εν μέρει με τις βιβλιογραφικές αναφορές που σχετίζονται με τον αριθμό των γονιδίων που κωδικοποιούν την UGRάση. Αρχικά, είχε διατυπωθεί η θεωρία ότι η UGRάση στο κριθάρι κωδικοποιείται από μόνο ένα γονίδιο (Eimert *et al.*, 1996). Στο γονιδίωμα του ανθρώπου έχει χαρακτηριστεί μόνο ένα γονίδιο Ugr το οποίο παράγει δύο διαφορετικά ώριμα mRNAs (Geisler *et al.*, 2004). Οι Bishop *et al* (2002) χαρακτήρισαν δύο γονίδια Ugr στον μυξομύκητα *Dictyostelium discoideum* και αργότερα οι Kleczkowski *et al* (2004) χαρακτήρισαν δύο γονίδια Ugr στο *Arabidopsis*. Το γονιδίωμα του ρυζιού περιέχει τρία ομόλογα γονίδια της UGRάσης, το Ugr1 στο χρωμόσωμα 9 (Abe *et al.*, 2002), το Ugr2 στο χρωμόσωμα 2 (Mu, 2002) και πιθανόν στο χρωμόσωμα 1 (Ohyanagi *et al.*, 2006). Τέλος, οι Meng *et al* (2007) χαρακτήρισαν δύο γονίδια Ugr στη λεύκα. Οι παραπάνω αναφορές δείχνουν ότι στους περισσότερους οργανισμούς η UGRάση κωδικοποιείται από δύο γονίδια. Είναι λοιπόν πιθανόν στην τομάτα το ένζυμο να κωδικοποιείται από περισσότερα του ενός γονίδια. Είναι επίσης γνωστό ότι η UGRάση υπάρχει σε μίγμα μονομερών, διμερών και υψηλότερης τάξης ολιγομερών και από ετερόλογη έκφραση του ενζύμου της UGRάσης του κριθαριού σε κύτταρα *E. coli*, το μονομερές είναι πιο δραστικό (Martz *et al.*, 2002). Από τη μελέτη της ηλεκτροφορητικής συμπεριφοράς του ενζύμου στα ηλεκτροφορήματά μας, προκύπτει ότι το ένζυμο της UGRάσης απαντά σε πολλαπλές ηλεκτροφορητικές ζώνες οι οποίες πιθανόν να αντιστοιχούν σε ολιγομερή ή σε πολυμερή ή σε διαφορετικές διαμορφώσεις του ενζύμου, όπως έχει αναφερθεί και από τους Martz *et al* (2002).



5. Συμπεράσματα

- 1) Η UGRάση εντοπίστηκε και στα τέσσερα αναπτυξιακά στάδια των ανθέων της τομάτας.
- 2) Η ένταση του σήματος ήταν σταθερά υψηλή στην ωοθήκη και ιδιαίτερα στον "αγωγό" ιστό αυτής.
- 3) Στους ανθήρες η UGRάση εντοπίστηκε εντονότερα στον τάπητα και στα μητρικά των μικροσπορίων στο στάδιο πριν από τη μείωση και στο αμέσως επόμενο μόνο στον τάπητα.
- 4) Στα τελευταία στάδια της ανάπτυξης του ανθήρα, ισχυρό σήμα εντοπίστηκε και στην επιδερμίδα του.
- 5) Η UGRάση εντοπίστηκε έντονα και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες όλων των οργάνων του άνθους.
- 6) Η UGRάση εμφανίζει πολλές ηλεκτροφορητικές ζώνες.
- 7) Ανιχνεύτηκε η παρουσία της μεταφοράς της ακυλογλυκόζης σε εκχυλίσματα του άνθους.

Βιβλιογραφία



6. Βιβλιογραφία

1. Abe T, Niiyama H, Sasahara T (2002). Cloning of cDNA for UDP-glucose pyrophosphorylase and the expression of mRNA in rice endosperm. *Theor. Appl. Genet.* **105**: 216-221.
2. Alexander RD, Morris PC (2006). A proteomic analysis of 14:3:3 binding proteins from developing barley grains. *Proteomics* **6**: 1886-1896.
3. Alonso MD, Lomako J, Lomako WM, Whelan WJ (1995). A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J.* **9**: 1126-1137.
4. Amor Y, Haigler CH, Johnson S, Wainscott M, Delmer DP (1995). A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9353-9357.
5. ap Rees T (1992). Synthesis of storage starch. In CR Pollock, JF Farrar, AJ Gordon, eds, Carbon Partitioning Within and Between Organisms. *Bios Scientific Publishers, Oxford*, pp 115-131.
6. Appeldoorn NJG, de Bruijn SM, Koot-Gronsveld EAM, Visser RGF, Vreugdenhil D, van der Plas LHW (1997). Developmental changes of enzymes involved in conversion of sucrose to hexosephosphate during early tuberisation of potato. *Planta* **202**: 220-226.
7. Appeldoorn NJG, Sergeeva L, Vreugdenhil D, van der Plas LHW, Visser RGF (2002). In situ analysis of enzymes involved in sucrose to hexose-phosphate conversion during stolon-to-tuber transition of potato. *Physiologia Plantarum* **115**: 303-310.
8. Aw TY, Jones DP (1982). Direct determination of UDP-glucuronic acid in cell extracts by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **127**: 32-36.
9. Aw TY, Jones DP (1984). Control of glucuronidation during hypoxia. Limitation by UDP-glucose pyrophosphorylase. *Biochem. J.* **219**: 707-712.
10. Baud S, Vaultier MN, Rochat C (2004). Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **55**: 397-409.
11. Bearden JC (1978). Quantitation of submicrogram quantities of protein by an improved protein-dye binding assay. *Biochimica et Biophysica Acta* **533**: 525-529.
12. Becker M, Vincent C, Reid JSG (1995). Biosynthesis of (1,3)(1,4)- β -glucan and (1,3)- β -glucan in barley (*Hordeum vulgare* L.): properties of the membrane-bound glucan synthases. *Planta* **195**: 331-338.
13. Bishop JD, Moon BC, Harrow F, Gomer RH, Dottin RP, Brazill DT (2002). A second UDP-glucose pyrophosphorylase is required for differentiation and development in *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* **277**: 32430-32437.
14. Borovkov AY, McClean PE, Sowokinos JR, Ruud SH, Secor GA (1996). Effect of expression of UDP-glucose pyrophosphorylase ribozyme and antisense RNAs on the enzyme activity and carbohydrate composition of field-grown transgenic potato plants. *J. Plant Physiol.* **147**: 644-652.
15. Burke BA, Goldsby G, Mudd JB (1987). Polar epicuticular lipids of *Lycopersicon pennellii*. *Phytochemistry* **26**: 2567-2571.
16. Castro AJ and Clément C (2007). Sucrose and starch catabolism in the anther of *Lilium* during its development: a comparative study among the anther wall, locular fluid and microspore/pollen fractions. *Planta* **225**: 1573-1582.
17. Chang HY, Peng HL, Chao YC, Duggleby RG (1996). The importance of conserved residues in human liver UDP-glucose pyrophosphorylase. *Eur. J. Biochem.* **236**: 723-728.

18. Chen R, Zhao X, Shao Z, Zhu L, He G (2007). Multiple isoforms of UDP-glucose pyrophosphorylase in rice. *Physiologia Plantarum* **129**: 725-736.
19. Chiu WB, Lin CH, Chang CJ, Hsieh MH, Wang AY (2006). Molecular characterization and expression of four cDNAs encoding sucrose synthase from green bamboo *Bambusa oldhamii*. *New Phytol.* **170**: 53-63.
20. Ciereszko I, Johansson H, Hurry V, Kleczkowski LA (2001a). Phosphate status affects the gene expression, protein content and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase in wild-type and pho mutants of *Arabidopsis*. *Planta* **212**: 598-605.
21. Ciereszko I, Johansson H, Kleczkowski LA (2001b). Sucrose and light regulation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in *Arabidopsis*. *Biochem. J.* **354**: 67-72.
22. Ciereszko I, Johansson H, Kleczkowski LA (2005). Interactive effects of phosphate deficiency, sucrose and light/dark conditions on gene expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Arabidopsis*. *J. Plant Physiol.* **162**: 343-353.
23. Ciereszko I, Kleczkowski LA (2002). Glucose and mannose regulate the expression of a major sucrose synthase gene in *Arabidopsis* via hexokinase-dependent mechanisms. *Plant Physiol. Biochem.* **40**: 907-911.
24. Ciereszko I, Kleczkowski LA (2005). Expression of several genes involved in sucrose/starch metabolism as affected by different strategies to induce phosphate deficiency in *Arabidopsis*. *Acta Physiol. Plant* **27**: 147-155.
25. Ciereszko I, Kleczkowski LA (2006). Phosphate deficiency-dependent upregulation of UDP-glucose pyrophosphorylase genes is insensitive to ABA and ethylene status in *Arabidopsis* leaves. *Acta Physiol. Plant* **28**: 387-393.
26. Clément C, Burrus M, Audran JC (1996). Floral organ growth and carbohydrate content during pollen development in *Lilium*. *Am. J. Bot.* **83**: 459-469.
27. Coleman H, Ellis D, Gilbert M, Mansfield SD (2003). Increased growth and yield by altered carbohydrate allocation. In B Sundberg, ed, Tree Biotechnology UPSC Publishers, Umeå, Sweden, pp S10.41.
28. Daran JM, Dallies N, Thines-Sempoux D, Francois J (1995). Genetic and biochemical characterization of the UGP1 gene encoding UDP-glucose pyrophosphorylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **233**: 520-530.
29. Dean CR, Goldberg JB (2002). *Pseudomonas aeruginosa* galU is required for a complete lipopolysaccharide core and repairs a secondary mutation in a PA103 (serogroup O11) wbpM mutant. *FEMS Microbiol. Letters* **210**: 277-283.
30. Dejardin A, Sokolov LN, Kleczkowski LA (1999). Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stressresponsive sucrose synthase genes in *Arabidopsis*. *Biochem. J.* **344**: 503-509.
31. Dimond RL, Farnsworth PA, Loomis WF (1976). Isolation and characterization of mutations affecting UDPG pyrophosphorylase activity in *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.* **50**: 169-181.
32. Duggleby RG, Chao YC, Huang JG, Peng HL, Chang HY (1996). Sequence differences between human muscle and liver cDNAs for UDP-glucose pyrophosphorylase and kinetic properties of the recombinant enzymes expressed in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **235**: 173-179.
33. Echeverria E, Boyer CD, Thomas PA, Liu KC, Shannon JC (1988). Enzyme activities associated with maize kernel amyloplasts. *Plant Physiol.* **86**: 786-792.
34. Eimert K, Villand P, Kilian A, Kleczkowski LA (1996). Cloning and characterization of several cDNAs for UDP-glucose pyrophosphorylase from barley

- (*Hordeum vulgare*) tissues. *Gene* **170**: 227-232.
35. Feingold DS, Barber GA (1990). Nucleotide sugars. In: Dey, P.M. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry* **2**: 39-78. Academic Press, London.
 36. Flores-Diaz M, Alape-Giron A, Persson B, Pollesello P, Moss M, Eichel-Streiber C, Thelestam M, Florin I (1997). Cellular UDP-glucose deficiency caused by a single point mutation in the UDP-glucose pyrophosphorylase. *J. Biol. Chem.* **272**: 23784-23791.
 37. Fobes JF, Mudd JB, Marsden MPF (1985). Epicuticular lipids on the leaves of *Lycopersicon pennellii* and *Lycopersicon esculentum*. *Plant Physiol.* **77**: 567-570.
 38. Frey PA (1996). The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB J.* **10**: 461-470.
 39. Geisler M, Wilczynska M, Karpinski S, Kleczkowski LA (2004). Toward a blueprint for UDP-glucose pyrophosphorylase structure/function properties: homology-modeling analyses. *Plant Mol. Biol.* **56**: 783-794.
 40. Geisler-Lee J, Geisler M, Coutinho PM, Segerman B, Nishikubo N, Takahashi J, Aspeborg H, Djerbi S, Master E, Andersson-Gunneras S, Sundberg B, Karpinski S, Teeri TT, Kleczkowski LA, Henrissa B, Mellerowicz. EJ (2006). Poplar carbohydrate active enzymes (CAZymes). Gene identification and expression analyses. *Plant Physiol.* **140**: 946-962.
 41. Gibeaut DM (2000). Nucleotide sugars and glucosyltransferases for synthesis of cell wall matrix polysaccharides. *Plant Physiol. Biochem.* **38**: 69-80.
 42. Gonzali S, Loreti E, Novi G, Poggi A, Alpi A, Perata P (2005). The Use of Microarrays to Study the Anaerobic Response in *Arabidopsis*. *Annals of Botany* **96**: 661-668.
 43. Goulard F, Diouris M, Quere G, Deslandes E, Floch JY (2001). Salinity effects on NDP-sugars, floridoside, starch, and carrageenan yield, and UDP-glucose pyrophosphorylase and epimerase activities of cultivated *Solieria chordalis*. *J. Plant Physiol.* **158**: 1387-1394.
 44. Hammond BL, Lester WA Jr, Braga M, Taft CA (1990). Theoretical study of the interaction of ionized transition metals (Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu) with argon. *The American Physical Society* **41**: 10447-10452.
 45. Hertzberg M, Aspeborg H, Schrader J, Andersson A, Erlandsson R, Blomqvist K, Bhalerao R, Uhlen M, Teeri TT, Lundeberg J (2001). A transcriptional roadmap to wood formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 14732-14737.
 46. Huber SC, Huber JL (1996). Role and regulation of sucrosephosphate synthase in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 431-444.
 47. Igamberdiev AU, Kleczkowski LA (2000). Capacity for NADPH/NADP turnover in the cytosol of barley seed endosperm: the role of NADPHdependent hydroxypyruvate reductase. *Plant Physiol. Biochem.* **38**: 747-753.
 48. Im KH (2004). Expression of sucrose-phosphate synthase (SPS) in nonphotosynthetic tissues of maize. *Mol. Cells* **17**: 404-409.
 49. Jenkins JA (1948). The origin of the cultivated tomato. *Econ. Bot.* **2**: 379-392.
 50. Johansson H (2003). Gene regulation of UDP-glucose synthesis and metabolism in plants. PhD thesis, Umeå University, Umeå, Sweden.
 51. Johansson H, Sterky F, Amini B, Lundeberg J, Kleczkowski LA (2002). Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding poplar UDPglucose dehydrogenase, a key enzyme of hemicellulose/pectin formation. *Biochim. Biophys. Acta* **1576**: 53-58.

52. Katsube T, Kazuta Y, Mori H, Nakano K, Tanizawa K, Fukui T (1990). UDP-glucose pyrophosphorylase from potato tuber: cDNA cloning and sequencing. *J. Biochem.* **108**: 321-326.
53. Kazuta Y, Omura Y, Tagaya M, Nakano K, Fukui T (1991). Identification of lysyl residues located at the substrate-binding site in UDP-glucose pyrophosphorylase from potato tuber: affinity labeling with uridine di- and triphosphopyridoxals. *Biochemistry* **30**: 8541-8545.
54. Kimura S, Mitsui T, Matsuoka T, Igaue I (1992). Purification, characterization and localization of rice UDP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol. Biochem.* **30**: 683-693.
55. Kleczkowski LA (1994a). Glucose activation and metabolism through UDPglucose pyrophosphorylase in plants. *Phytochemistry* **37**: 1507-1515.
56. Kleczkowski LA (1994b). Inhibitors of photosynthetic enzymes/carriers and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**: 339-367.
57. Kleczkowski LA, Geisler M, Ciereszko I, Johansson H (2004). UDP-Glucose Pyrophosphorylase. An Old Protein with New Tricks. *Plant Physiology* **134**: 912-918.
58. Kleczkowski LA, Martz F, Wilczynska M (2005). Factors affecting oligomerization status of UDP-glucose Pyrophosphorylase. *Phytochemistry* **66**: 2815-2821.
59. Koch KE, Nolte KD, Duke ER, McCarty DR, Avigne WT (1992). Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes. *Plant Cell* **4**: 59-69.
60. Konishi Y, Tanizawa K, Muroya S, Fukui T (1993). Molecular cloning and affinity labeling of bovine liver UDP-glucose pyrophosphorylase. *J. Biochem.* **114**: 61-68.
61. Kuai JP, Changas GS, and Steffens JC (1997). Regulation of Triacylglycerol Fatty Acid Composition' Uridine Diphosphate Glucose:Fatty Acid Glucosyltransferases with Overlapping Chain-Length Specificity. *Plant Physiol.* **115**: 1581-1587.
62. Lamerz AC, Haselhorst T, Bergfeld AK, von Itzstein M, Gerardy-Schahn R (2006). Molecular cloning of the *Leishmania major* UDP-glucose pyrophosphorylase, functional characterization, and ligand binding analyses using NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **281**: 16314-16322.
63. Magel E, Abdel-Latif A, Hampp R (2001). Non-structural carbohydrates and catalytic activities of sucrose metabolizing enzymes in trunks of two *Juglans* species and their role in heartwood formation. *Holzforschung* **55**: 135-145.
64. Martz F, Wilczynska M, Kleczkowski LA (2002). Oligomerization status, with the monomer as active species, defines catalytic efficiency of UDP-glucose pyrophosphorylase. *Biochem. J.* **367**: 295-300.
65. McCaskill D, Croteau R (1999). Strategies for bioengineering the development and metabolism of glandular tissues in plants. *Nature Biotechnology* **17**: 31-36.
66. McCoy JG, Bitto E, Bingman CA, Wesenberg GE, Bannen RM, Kondrashov DA, Phillips GN Jr (2007). Structure and Dynamics of UDP-Glucose Pyrophosphorylase from *Arabidopsis thaliana* with Bound UDP-Glucose and UTP. *J. Mol. Biol.* **366**: 830-841.
67. Meng M, Geisler M, Johansson H, Mellerowicz EJ, Karpinski S, Kleczkowski LA (2007). Differential tissue/organ-dependent expression of two sucrose- and cold-responsive genes for UDP-glucose pyrophosphorylase in *Populus*. *Gene* **389**: 186-195.
68. Merlo L, Geigenberger P, Hajirezaei MR, Stitt M (1993). Changes of carbohydrates, metabolites and enzyme activities in potato tubers during development, and within a single tuber along a stolon-apex gradient. *J. Plant Physiol.* **142**: 392-402.

69. Mikami S, Hori H, Mitsui T (2001). Separation of distinct compartments of rice Golgi complex by sucrose density gradient centrifugation. *Plant Sci.* **161**: 665-675.
70. Mio T, Yabe T, Arisawa M, Yamada-Okabe H (1998). The eukaryotic UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylases. Gene cloning, protein expression and catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.* **273**: 14392-14397.
71. Mu H (2002). Screening of Genes Related to Pollen Development in a Thermo-Sensitive Male Sterile Rice (*Oryza sativa* L.): Cloning and Characterization of UDP-Glucose Pyrophosphorylase. *PhD dissertation (Hong Kong, China: University of Hong Kong)*.
72. Neckelmann G, Orellana A (1998). Metabolism of uridine 5-diphosphateglucose in Golgi vesicles from pea stems. *Plant Physiol.* **117**: 1007-1014.
73. Nishiyama I (1984). Climate influence on pollen formation and fertilization. In: Tsunoda S, Takahashi N, editors. *Biology of rice. Amsterdam (Netherlands): Elsevier*. pp 153-171.
74. Ohyanagi H, Tanaka T, Sakai H, Shigemoto Y, Yamaguchi K, Habara T, Fujii Y, Antonio BA, Nagamura Y, Imanishi T (2006). The Rice Annotation Project Database (RAP-DB): hub for *Oryza sativa* ssp. japonica genome information. *Nucleic Acids Res.* **34**: 741-744.
75. Oliver SN, Dennis ES and Dolferus R (2007). ABA Regulates Apoplastic Sugar Transport and is a Potential Signal for Cold-Induced Pollen Sterility in Rice. *Plant Cell Physiol.* **48(9)**: 1319-1330.
76. Peneff C, Ferrari P, Charrier V, Taburet Y, Monnier C, Zamboni V (2001). Crystal structures of two human pyrophosphorylase isoforms in complexes with UDPGlc(Gal)NAc: role of the alternatively spliced insert in the enzyme oligomeric assembly and active site architecture. *EMBO J.* **20**: 6191-6202.
77. Peng HL, Chang HY (1993). Cloning of a human liver UDP-glucose pyrophosphorylase cDNA by complementation of the bacterial galU mutation. *FEBS Letters*, **329**: 153-158.
78. Perugini MA, Griffin MDW, Smith BJ, Webb LE, Davis AJ, Handman E, Gerrard JA (2005). Insight into the self-association of key enzymes from pathogenic species. *Eur. Biophys. J.* **34**: 469-476.
79. Pina A, Errea P (2008). Influence of graft incompatibility on gene expression and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Science* **174**: 502-509.
80. Pua EC, Lim SSW, Liu P, Liu JZ (2000). Expression of UDP-glucose pyrophosphorylase cDNA during fruit ripening of banana. *Aust. J. Plant Physiol.* **27**: 1151-1159.
81. Repetto O, Bestel-Corre G, Dumas-Gaudot E, Berta G, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (2003). Targeted proteomics to identify cadmium-induced protein modifications in *Glomus mosseae*-inoculated pea roots. *New Phytol.* **157**: 555-567.
82. Roberts KMJ (1990). Observation of uridine triphosphate: glucose-1-phosphate uridylyltransferase activity in maize root tips by saturation transfer ³¹P-NMR. Estimation of cytoplasmic PPI. *Biochimica et Biophysica Acta* **1051**: 29-36.
83. Roeben A, Plitzko J M, Körner Böttcher RU, Siegers MK, Hayer-Hartl M, Bracher A (2006). Structural Basis for Subunit Assembly in UDP-glucose Pyrophosphorylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **364**: 551-560.
84. Ruan YL, Llewellyn DJ, Furbank RT (2003). Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development. *Plant Cell* **15**: 952-964.
85. Rutter J, Probst BL, McKnight SL (2002). Coordinate regulation of sugar flux and translation by PAS kinase. *Cell* **111**: 17-28.

86. Ruzin SE (1999). *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press, New York Oxford. pp 57-75.
87. Sasaki M, Nishida C, Takagi N, Hori H (1980). Sex-chromosomes of the elegant crested tinamou, *Eudromia elegans* (Aves: Tinamiformes: Tinamidae). *Chromosome Info Serv.* **29**: 19-21.
88. Schlüpmann H, Bacic A, Read S.M (1994). Uridine-diphosphate glucose metabolism and callose synthases in cultured pollen tubes of *Nicotiana alata*. *Plant Physiol.* **105**: 659-670.
89. Scott RJ, Spielman M, Dickinson HG (2004). Stamen structure and function. *Plant Cell* **16**: S46-S60.
90. Seifert GJ (2004). Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: how to bring the inside to the outside. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 1-8.
91. Sergeeva LI, Vreugdenhil D (2002). In situ staining of activities of enzyme involved in carbohydrate metabolism in plant tissues. *J. Exp.Bot.* **53**: 361-70.
92. Silbert JE, Sugumaran G (1995). Intracellular membranes in the synthesis, transport, and metabolism of proteoglycans. *Biochim. Biophys. Acta* **1241**: 371-384.
93. Sonnhammer EL, Eddy SR, Durbin R (1997). Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins* **28**: 405-420.
94. Southworth D (1990). Exine biochemistry. In S Blackmore, RB Knox, eds, *Microspores: Evolution and Ontogeny*. Academic Press, London, pp 193–212.
95. Sowokinos JR, Thomas C, Burrell MM (1997). Allelic polymorphism of UDP-glucose pyrophosphorylase in potato cultivars and its association with tuber resistance to sweetening in the cold. *Plant Physiol.* **113**: 511-517.
96. Spsychalla JP, Scheffler BE, Sowokinos JR, Bevan MW (1994). Cloning, antisense RNA inhibition and the coordinated expression of UDP-glucose pyrophosphorylase with starch biosynthetic genes in potato tubers. *J. Plant Physiol.* **144**: 444-453.
97. Stenzel I, Hause B, Maucher H, Pitzschke A, Miersch O, Ziegler J, Ryan CA, Wasternack C (2003). Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato – amplification in wound signalling. *Plant J.* **33**: 577-589.
98. Stieglitz H (1977). Role of β -1, 3-glucanase in postmeiotic microspore release. *Dev. Biol.* **57**: 87-97.
99. Stitt M (1989). Control analysis of photosynthetic sucrose synthesis: assignment of elasticity coefficients and fluxcontrol coefficients to the cytosolic fructose 1,6-bisphosphatase and sucrose-phosphate synthase. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **323**: 327-338.
100. Tang GQ, Sturm A (1999). Antisense repression of sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.) affects growth rather than sucrose partitioning. *Plant Mol. Biol.* **41**: 465-479.
101. Tigchelaar EC (1986). *Breeding Vegetable Crops*. Edited by Mark J. Bassett.
102. Torshin I (1999). Activating oligomerization as intermediate level of signal transduction: analysis of protein–protein contacts and active sites in several glycolytic enzymes. *Front. Biosci.* **4**: 557-570.
103. Tsuboi KK, Fukunaga K, Petricciani JC (1969). Purification and specific kinetic properties of erythrocyte uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase. *J Biol. Chem.* **244**: 1008-1015.
104. Turnquist RL, Hansen RG (1974). Uridine diphosphoryl glucose pyrophosphorylase. In *The Enzymes* **8**: 51-72 (Boyer, P. D., ed.), 3rd edit. Academic Press, New York.
105. Unligil UM, Rini JM (2000). Glycosyltransferase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**: 510-517.

106. Valla S, Coucheron DH, Fjaervik E, Kjosbakken J, Weinhouse H, Ross P, Amikam D, Benziman M (1989). Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: complementation of cellulosenegative mutants by the UDPG pyrophosphorylase structural gene. *Mol. Gen. Genet.* **217**: 26-30.
107. Wachter R, Langhans M, Aloni R, Gotz S, Weilmunster A, Koops A, Temguia L, Mistrik I, Pavlovkin J, Rascher U, Schwalm K, Koch KE, Ullrich CI (2003). Vascularization, High-Volume Solution Flow, and Localized Roles for Enzymes of Sucrose Metabolism during Tumorigenesis by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology* **133**: 1-14.
108. Wang-Gillam A, Pastuszak I, Stewart M, Drake RR, Elbein AD (2000). Identification and modification of the uridine-binding site of the UDPGalNAc (GlcNAc) pyrophosphorylase. *J. Biol. Chem.* **275**: 1433-1438.
109. Wells L, Whalen SA, Hart GW (2003). O-GlcNAc: a regulatory posttranslational modification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**: 435-441.
110. Wilczynska M, Lobov S, Ny T (2003). The spontaneous polymerization of plasminogen activator inhibitor type-2 and Z-antitrypsin are due to different molecular aberrations. *FEBS Lett.* **537**: 11-16.
111. Winter H, Huber SC (2000). Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Crit. Rev. Plant Sci.* **19**: 31-67.
112. Witt HJ (1992). UDP-glucose metabolism during differentiation and dedifferentiation of *Riella helicophylla*. *J. Plant Physiol.* **140**: 276-281.
113. Woo M O, Ham T H, Ji H S, et al (2008). Inactivation of UGPase1 gene causes genic male sterility and endosperm chalkiness in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant J.* **54**(2): 190-204
114. Yagi T, Baroja-Fernandez E, Yamamoto R, Munoz FJ, Akazawa T, Hong KS, Pozueta-Romero J (2003). Cloning, expression and characterization of a mammalian Nudix hydrolase-like enzyme that cleaves the pyrophosphate bond of UDPglucose. *Biochem. J.* **370**: 409-415.
115. Zrenner R, Salanoubat M, Willmitzer L, Sonnewald U (1995). Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* **7**: 97-107.
116. Zrenner R, Willmitzer L, Sonnewald U (1993). Analysis of the expression of potato uridinediphosphate-glucose pyrophosphorylase and its inhibition by antisense RNA. *Planta* **190**: 247-252.
117. Αγγίδης Α (1996). Τομάτα υπαίθρια (επιτραπέζια - βιομηχανική - καλλιέργεια - αξιοποίηση). Θεσσαλονίκη.
118. Βαρδαβάκης Μ (1993). Συστηματική Βοτανική (Κρυπτόγαμα - Σπερματοφύτα). Εκδόσεις Δ.Κ. Σαλονικίδη.
119. Ολύμπιος Χ (2001). Η τεχνική της καλλιέργειας των κηπευτικών στα θερμοκήπια. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλη.