



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ
ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΑ ΕΜΒΡΥΑ ΤΟΥ ARABIDOPSIS

Επιμέλεια : Νυχάς Εμμανουήλ

Επιβλέπων : Χατζόπουλος Πολυδεύκης Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

Συνεπιβλέπουσα : Παπαδοπούλου Καλλιόπη Καθηγήτρια

Βιοτεχνολογίας Φυτών

Τριμελής Επιτροπή : Χατζόπουλος Πολυδεύκης , Παπαδοπούλου

Καλλιόπη, Ψαρά Άννα-Μαρία

Θα ήθελα καταρχήν να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην τριμελή μου επιτροπή κα. Καλλιόπη Παπαδοπούλου , τον κ. Πολυδεύκη Χατζόπουλο και την κα. Άννα Μαρία Ψαρά για την καθοδήγηση , την επιμέλεια και το χρόνο που διέθεσαν για την τη πτυχιακής μου εργασία.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ θερμά την καθηγήτρια του τμήματος μου κα. Καλλιόπη Παπαδοπούλου που με το μάθημα της με ενέπνευσε να ασχοληθώ με τον κλάδο της Βιοτεχνολογίας των φυτών. Επίσης είμαι ευγνώμων στον καθηγητή του τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Πολυδεύκη Χατζόπουλο που μου άνοιξε τις πόρτες του εργαστηρίου του, όπου εκπονήθηκε η παρούσα εργασία, και με ενσωμάτωσε στην ερευνητική του ομάδα.

Μεγάλη ευγνωμοσύνη και πολλές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον μεταδιδάκτορα κ. Γεράσιμο Δάρα για την αστείρευτη παροχή επιστημονικής γνώσης, για την εκμάθηση τεχνικών, για τη ηθική υποστήριξη του, την βοήθεια του και τις συμβουλές του, ανεξαρτήτως ημέρας και ώρας, ο οποίος με ανεξάντλητη υπομονή με καθοδήγησε στην εκπόνηση των εργαστηριακών πειραμάτων και τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης το προσωπικό του εργαστηρίου του Μοριακής Βιολογίας για την άψογη συνεργασία και την ευχάριστη ατμόσφαιρα που υπήρχε σε όλη τη διάρκεια της παραμονής μου εκεί και ιδιαίτερα τον μεταδιδάκτορα Ντικράν Τσιτσεκιάν τον υποψήφιο διδάκτορα Δημήτρη Τεμπλαλέξη και τον επίκουρο καθηγητή Σταμάτη Ρήγα για τις πολύτιμες συμβουλές τους, που με βοήθησαν καθοριστικά σε πολλά στάδια της εργαστηριακής μου πορείας.

Contents

Abstract	6
1.Εισαγωγή	7
1.1 Εμβρυογένεση στο φυτό <i>Arabidopsis thaliana</i>	7
1.2 Η μετάλλαξη <i>lefkothea</i>	11
1.2.1 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του μεταλλάγματος <i>lefkothea2</i>	11
1.2.2 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του αλληλόμορφου <i>lefkothea1</i>	12
1.2.3 Η πρωτεΐνη LEFKO περιέχει το τμήμα DUF860 ή PORR.....	14
1.2.4 Το τμήμα PORR εντοπίζεται μόνο σε γονίδια φυτικών οργανισμών	15
1.3 Πρωτεΐνες που βρίσκονται σε αφθονία στο σπέρμα του <i>Arabidopsis</i>	16
1.3.1 Seed Storage Proteins	16
1.3.2 Oleosins.....	17
1.3.3 Late Embryogenesis Abundant proteins (LEA).....	18
ΣΚΟΠΟΣ	19
2. Materials and Methods	20
2.1 Φυτικό υλικό - περιβάλλον ανάπτυξης	20
2.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA από έμβρυα <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
2.3 Πρωτόκολλο απομόνωσης γενωματικού DNA από <i>Arabidopsis</i> CTAB DNA miniprep (Clark J.D.)	22
2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης	23
2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	24
2.5.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	24
2.5.2 RT-PCR.....	25
2.5.3 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν.....	27
2.6 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικών πρωτεϊνών από ιστούς <i>Arabidopsis</i>	29
2.6.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης.....	29
2.6.2 Χρώση πηκτής SDS-πολυακρυλαμίδης.....	32
2.6.3 Μεταφορά πρωτεϊνών σε σταθερό υπόστρωμα.....	33
2.6.4 Ανοσοανίχνευση πολυπεπτιδίου - στόχου	34
2.6.5 Ανίχνευση σήματος.....	35
2.7 Gene Ontology Analysis	36
2.7.1 PANTHER.....	36
2.7.2 Gorilla.....	36

3. Results	38
3.1 Ο φαινότυπος του <i>lefko1</i> στην ανάπτυξη του σπέρματος	38
3.2 RNA Sequencing και παρατήρηση δεδομένων	38
3.3 Ανάλυση RNA	42
3.4 Πρωτεομική Ανάλυση	45
4. DISCUSSION	50
4.1 Μεταγραφικοί παράγοντες που ελέγχουν την έκφραση πρωτεϊνών κατά την ωρίμανση του εμβρύου και του σπόρου	50
4.1.1 Πριν από την σύνθεση της πρωτεΐνης αποθήκευσης των σπόρων	50
4.1.2 Εισαγωγή στην πλήρωση των σπόρων	51
4.1.3 Η διακοπή σύνθεσης πρωτεϊνών αποθήκευσης του σπόρου	54
4.1.4 Ρόλοι που παίζονται από φυτικές ορμόνες	55
4.1.5 Ο ρόλος που διαδραματίζει η μεταβολική ρύθμιση	55
4.2 ABA	57
4.2.1 Εισαγωγικά.....	57
4.2.2 Βιοσύνθεση.....	58
4.2.3 Αναπτυξιακή ρύθμιση βιοσύνθεσης του ABA	59
REFERENCES	61

Περίληψη

Η πρωτεΐνη LEFKOTHEA είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη του φυτού και πρόσφατα αποτελέσματα έδειξαν πως συμμετέχει στην συγχρονισμένη ωρίμανση των mRNA στον πυρήνα και στο χλωροπλάστη. Τα ομοζυγωτά μεταλλάγματα *lefko1* παρουσιάζουν αναστολή της ανάπτυξης του εμβρύου στα στάδια του καρδιοσχήματος. Πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση του RNA (RNA-seq) από το θνησιγόνο μετάλλαγμα στο στάδιο του εμβρύου, και τα αποτελέσματα έδειξαν μεγάλη αλλαγή στην έκφραση πολλών ομάδων γονιδίων όπως είναι οι Seed Storage Proteins, Oleosins, Late Embryogenesis Abundant, Glycine Rich Proteins. Στη συνέχεια, η υπερέκφραση αυτή εξετάστηκε και σε επίπεδο πρωτεΐνης μέσω ανάλυσης σε gel πολυακρυλαμίδης με χρώση Coomassie και μέσω ανοσοανίχνευσης (Western), όπου ήταν εμφανής η μεγάλη διαφορά στην έκφραση των πρωτεϊνών μεταξύ *Col-0* και *lefko1*. Οι μεταγραφικοί παράγοντες που ελέγχουν την έκφραση των παραπάνω γονιδίων είναι επίσης υψηλά εκφραζόμενοι στο θνησιγόνο μετάλλαγμα και διερευνάται η σχέση της πρόωρης βιοσύνθεσης του ABA και του μεταλλάγματος *lefko1*.

Abstract

LEFKOTHEA protein is vital for plant growth and recent results show that it participates in the synchronous maturation of mRNAs in the nucleus and chloroplast. Homologous mutations of *lefk1* show inhibition of fetal growth in the heart stages of its development. RNA sequencing was performed from the lethal mutant at the heart stage and the results showed a large change in the expression of many gene groups such as seed storage proteins, oleosins, late embryogenesis abundant proteins, glycine-rich proteins. Subsequently, this overexpression was also examined at protein level by polyacrylamide gel analysis by Coomassie chromatography and by Western immunoassay, where the large difference in protein expression between Col-0 and *lefk1* was observed. The transcription factors that control the expression of the above-mentioned genes are also highly expressed in the lethal mutant and the relationship between the early biosynthesis of ABA and the *lefk1* mutant is investigated.

1.Εισαγωγή

Οι λειτουργίες των μιτοχονδρίων και των χλωροπλαστών εξαρτώνται κυρίως από πρωτεΐνες που συντίθενται στο κυτταρόπλασμα και κωδικοποιούνται από τον πυρήνα. Έχει υπολογισθεί ότι το πρωτόμα των μιτοχονδρίων και των χλωροπλαστών αποτελείται από 2000 και 2700 πρωτεΐνες, αντίστοιχα (Millar *et al.*, 2006). Τα φυτικά κύτταρα έχουν διαχωρίσει τη φωτοσύνθεση, την οξειδωτική φωσφορλίωση και γενικότερα ένα μεγάλο αριθμό άλλων πρωτογενών βιοχημικών μονοπατιών ανάμεσα στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες. Αυτός ο διαχωρισμός είναι κρίσιμος για τη διατήρηση όλων των φυσιολογικών και βιοχημικών ιδιοτήτων του κυττάρου, προκειμένου τα κύτταρα να βρίσκονται σε ομοιόσταση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτικών ιστών. Γίνεται εύκολα αντιληπτό, ότι οι πρωτεΐνες πρέπει να κωδικοποιούνται και να τοποθετούνται στα οργανίδια υπό τον έλεγχο πολύπλοκων μηχανισμών οι οποίοι καθορίζονται από φυσιολογικούς, περιβαλλοντικούς και αναπτυξιακούς παράγοντες. Μέρος αυτών των μηχανισμών είναι και η επικοινωνία μεταξύ πυρήνα και οργανιδίων η οποία είναι πολύ κρίσιμη ώστε να επέλθει η άμεση απόκριση στα περιβαλλοντικά και αναπτυξιακά ερεθίσματα. Η μελέτη των μηχανισμών διακίνησης των πρωτεϊνών ανάμεσα στα οργανίδια και τον πυρήνα, παράλληλα με την ανάλυση των περιβαλλοντικών και αναπτυξιακών παραγόντων, καθίσταται εξαιρετικά σημαντική προκειμένου να κατανοηθεί ο ρόλος της βιογένεσης και λειτουργίας των οργανιδίων στην ανάπτυξη των φυτών. Το μετάλλαγμα που μελετήθηκε, είναι το *lefko1* το οποίο έχει προκληθεί από μια ένθεση T-DNA στο γονίδιο *Lefkothea* του *Arabidopsis thaliana*. Το γονίδιο *Lefkothea* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία περιέχει τμήμα αναγνώρισης και πρόσδεσης σε οργανιδιακό RNA. Η πρωτεΐνη *Lefkothea* είναι ζωτικής σημασίας στην εμβρυογένεση του φυτού και υπάρχουν ενδείξεις ότι συμμετέχει στο μάτισμα των οργανιδιακών ιντρονίων, ενώ παράλληλα έχει τη δυνατότητα να τοποθετείται και στον πυρήνα του κυττάρου.

1.1 Εμβρυογένεση στο φυτό *Arabidopsis thaliana*

Ως εμβρυογένεση μπορεί να ορισθεί το μέρος της φυτικής ανάπτυξης που λαμβάνει χώρα στον εμβρυόσασκο της σπερματικής βλάστης ή στο ανώριμο σπέρμα. Κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης καθιερώνονται αρκετά βασικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα του πρωτογενούς φυτικού σώματος σε υποτυπώδη μορφή. Αυτή η διαδικασία συμβαίνει σε καλά προσδιορισμένα στάδια, που προκύπτουν από ειδικά πρότυπα της κυτταρικής διαίρεσης. Η πρώτη περιγραφή της εμβρυογένεσης έγινε το 1870 από τον Hanstein, για το φυτό *Capsella bursa-pastoris*.

Κατά την εμβρυογένεση μετατρέπεται το γονιμοποιημένο ωάριο σε πολυκύτταρο οργανισμό με οργανωμένη δομή σε τρεις επικαλυπτόμενες φάσεις:

- (i) Διαφοροποίηση των ιστών,
- (ii) Κυτταρική αύξηση
- (iii) Ωρίμανση /αφυδάτωση

Μετά τη γονιμοποίηση, εγκαθιδρύεται πολικότητα και άξονας συμμετρίας στο γονιμοποιημένο ωάριο. Η συμμετοχή του μητρικού ιστού στην εγκαθίδρυση της πολικότητας αμφισβητείται, χωρίς να αποκλείεται, επειδή ίδια πολικότητα εγκαθιδρύεται στα σωματικά έμβρυα, που δεν περιβάλλονται από μητρικό ιστό. Ως πιθανοί μηχανισμοί, που ενδεχομένως επάγουν την πολικότητα, θεωρούνται φυσικά αίτια ή/και μικρά μόρια που διαχέονται προς το γονιμοποιημένο ωάριο.

Ο άξονας κορυφής-βάσης του σποροφύτου διαιρείται σε 5 ζώνες (Εικόνα 1.1):

- (i) κορυφαίο μερίστωμα,
- (ii) κοτυληδόνες,
- (iii) υποκοτύλιο,
- (iv) ρίζα και
- (v) μερίστωμα ρίζας.

Το αξονικό πρότυπο κορυφής - βάσης του εμβρύου καθιερώνεται κατά τη διάρκεια της πρώτης διαίρεσης του ζυγωτού, η οποία είναι ασύμμετρη. Η πρώτη διαίρεση του ζυγωτού από λειτουργική άποψη δημιουργεί πολικότητα στο έμβρυο σε ένα κορυφαίο και ένα κύτταρο της βάσης, τα οποία έχουν διαφορετική τύχη. Το μικρότερο, κορυφαίο θυγατρικό κύτταρο παίρνει περισσότερο κυτταρόπλασμα από το μεγαλύτερο κύτταρο της βάσης, το οποίο κληρονομεί το μεγάλο χυμοτόπιο του ζυγωτού. Το κορυφαίο κύτταρο επακολούθως διαιρείται επανειλημμένα για να παράγει το μεγαλύτερο τμήμα του εμβρύου, ενώ το μεγάλο κύτταρο της βάσης που περιέχει ένα μεγάλο χυμοτόπιο, διαιρείται μόνο κάποιες φορές πριν τα παράγωγά του διαφοροποιηθούν για να δώσουν τον αναρτήρα. Ο αναρτήρας συνδέει το έμβρυο με το κύτταρο της βάσης. Μόνο η υπόφυση (hypophysis), ο πιο κορυφαίος απόγονος του κυττάρου της βάσης συμβάλλει στη δομή του εμβρύου. Η υπόφυση θα σχηματίσει ένα μέρος του κορυφαίου μεριστώματος της ρίζας.

Οι 5 ζώνες του άξονα του σποροφύτου δεν προέρχονται από τη ταυτόχρονη διαίρεση του άξονα, αλλά δημιουργούνται σταδιακά. Τα στάδια που μεσολαβούν, από τη γονιμοποίηση μέχρι τη δημιουργία του εμβρύου, έχουν μελετηθεί σε πολλά δικοτυλήδονα φυτά, συμπεριλαμβανομένου του φυτού *Arabidopsis* και είναι τα παρακάτω :

•**Στάδιο των δυο-κυττάρων.** Ο ζυγώτης διαιρείται ασύμμετρα, δίνοντας δύο θυγατρικά κύτταρα με διαφορετικό μέγεθος και προορισμό. Η μορφογενετική τύχη κάθε κυττάρου εξαρτάται από τη θέση του. Από το μικρότερο κορυφαίο κύτταρο δημιουργείται το μεγαλύτερο μέρος του εμβρύου, ενώ από το μεγαλύτερο κύτταρο του δικύτταρου εμβρύου δημιουργείται κυρίως ο αναρτήρας (suspensor) και μέρος του ριζιδίου, όπως αναφέρθηκε προηγουμένα

•**Στάδιο της οκτάδας.** Το κορυφαίο κύτταρο υφίσταται μια σειρά υψηλώς διατεταγμένων, στερεοτυπικών διαιρέσεων με αποτέλεσμα ένα οκτακύτταρο γλοβοειδές έμβρυο 30 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Το έμβρυο αυτό αποτελείται από ανώτερη και τη κατώτερη σειρά κυττάρων και η κάθε μια αποτελείται από τέσσερα κύτταρα. Οι δυο αυτές σειρές κυττάρων του σταδίου αυτού διαφοροποιούν και διαιρούν το έμβρυο σε δύο μισά, σε εκείνο της κορυφής και στο αντίστοιχο της βάσης, αντανακλώντας το αξονικό πρότυπο που επιβάλλεται στο έμβρυο κατά την πρώτη διαίρεση του ζυγωτού. (εικόνα 1.1)

•**Στάδιο σφαιρικό (globular).** Στο στάδιο αυτό γίνονται πλευρικές διαιρέσεις έτσι, ώστε να διαχωριστεί το πρωτόδερμα από τα εσωτερικά κύτταρα. Το πρωτόδερμα περιβάλλει και τα δύο ήμισυ του εμβρύου με σκοπό τη παραγωγή των επιδερμικών ιστών του φυτού. Εσωτερικά του πρωτοδέρματος βρίσκονται τα κύτταρα του θεμελιώδους μεριστώματος, τα οποία θα δημιουργήσουν τους ιστούς του φλοιού και την ενδοδερμίδα της ρίζας και του υποκοτύλιου. Το ακτινωτό πρότυπο διαφοροποίησης των ιστών είναι ορατό στο στάδιο αυτό. (εικόνα 1.1)

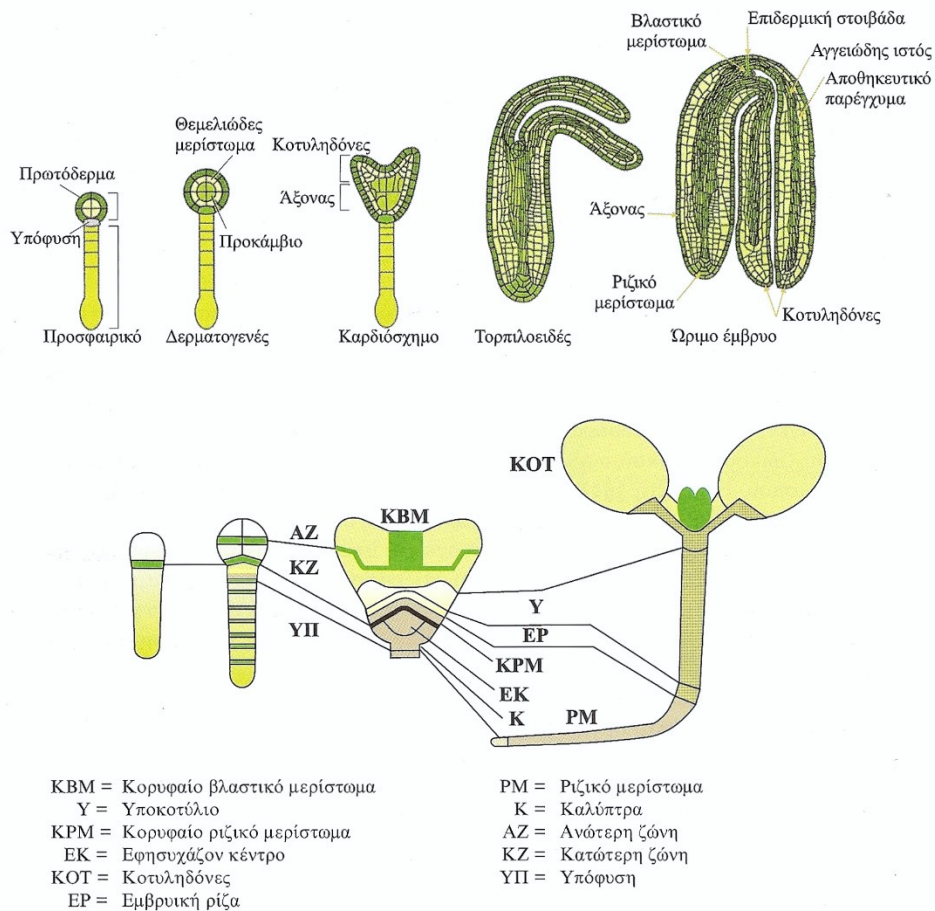
•**Στάδιο της καρδιάς (heart-stage embryo).** Στο στάδιο αυτό, η ανώτερη στιβάδα των τεσσάρων 4 κυττάρων σχηματίζει τις καταβολές των κοτυληδόνων και του βλαστιδίου. Η κεντρική περιοχή, που προέρχεται από τα κατώτερα τέσσερα κύτταρα, υποδιαιρείται σε δύο επιμέρους περιοχές, την πάνω-κάτω και την κάτω-κάτω. Στο στάδιο αυτό αναγνωρίζονται τρεις αξονικές περιοχές : Η κορυφαία περιοχή, η οποία δημιουργεί τις κοτυληδόνες και το κορυφαίο μερίστωμα του βλαστού, μια ενδιάμεση περιοχή, η οποία δημιουργεί το υποκοτύλιο και η περιοχή της βάσης, η οποία δημιουργεί τη ρίζα. (εικόνα 1.1)

•**Στάδιο της τορπίλης και ώριμου εμβρύου.** Στα στάδια αυτά ολοκληρώνεται η διαμόρφωση του εμβρύου, με τη δημιουργία του υποκοτύλιου, του μεριστώματος της ρίζας και της κεντρικής καλύπτρας.

Τα πρωτογενή μεριστώματα του βλαστού και της ρίζας δημιουργούνται στους πόλους του άξονα (εικόνα 1.1) του εμβρύου. Το βλαστίδιο είναι οργανωμένο σε ζώνες και στιβάδες. Από το κορυφαίο μερίστωμα προέρχονται οι κοτυληδόνες, όργανα ομόλογα των φύλλων, που δημιουργούνται στην κορυφή του βλαστού, ενώ από το ριζικό μερίστωμα προέρχεται η ρίζα. Οι κοτυληδόνες σε πολλά

φυτικά είδη αυξάνουν σημαντικά μετά από το στάδιο της τορπίλης, αυξάνοντας σε αριθμό κυττάρων και σε μέγεθος και μπορούν να αποτελέσουν το 90% της συνολικής εμβρυακής μάζας.

Οι κοτυληδόνες αποτελούν τα αποθησαυριστικά όργανα των θρεπτικών συστατικών σε πολλά είδη. Κατά τη διάρκεια της φάσης αύξησης των κοτυληδόνων, αυτές συνθέτουν και αποθηκεύουν πρωτεΐνες, άμυλο και λιπίδια, που θα χρησιμοποιηθούν στη φάση της βλάστησης των σπερμάτων και μάλιστα κατά τη διάρκεια της ετεροτρόφου αύξησης. Παρόλο που αποθέματα τροφής αποθηκεύονται στις κοτυληδόνες του *Arabidopsis*, η αύξηση των κοτυληδόνων δεν είναι τόσο έντονη, όσο σε άλλα .



Εικόνα 1.1 Η εμβρυογένεση του φυτού *Arabidopsis thaliana* χαρακτηρίζεται από ένα ακριβές πρότυπο κυτταρικής διαιρέσεως. Αναπαριστώνται διαδοχικά στάδια της εμβρυογένεσης. Πάνω : Στάδια ανάπτυξης εμβρύου στο *Arabidopsis*. Κάτω : Αντιστοιχία περιοχής του εμβρύου και φυτικών οργάνων.

1.2 Η μετάλλαξη *lefkothea*

1.2.1 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του μεταλλάγματος *lefkothea2*

Από σάρωση μεταλλαγμάτων που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας η μετάλλαξη *lefkothea2* επιλέχθηκε μεταξύ άλλων μεταλλαγμάτων εξαιτίας του ιδιαίτερου φαινοτύπου που σχετίζεται με αποκλειστική λεύκανση των κοτυληδόνων (εικόνα 1.2). Ο χαρακτηριστικός αυτός φαινότυπος αποτέλεσε το κίνητρο επιλογής του ονόματος “Λευκοθέα” που σύμφωνα με τη μυθολογία αποτελεί μία από τις λευκές νηριίδες της θάλασσας.

Το μεταλλάγμα *lefkothea2* (*lefko2*) προέρχεται από χημική μεταλλαξογένεση με EMS (Ethane Methane Sulfonate). Στο *lefko2* η μετάλλαξη χαρτογραφήθηκε στο γονίδιο At5g62990, το οποίο έχει μία αμινοξική υποκατάσταση της Γλυκίνης (373) σε Ασπαρτικό οξύ ($G_{373} \rightarrow D$), εξαιτίας της αλλαγής της βάσης G στη θέση 1188bp σε A, αναφορικά του κωδικονίου έναρξης της μετάφρασης (Αθανασιάδη, 2008).



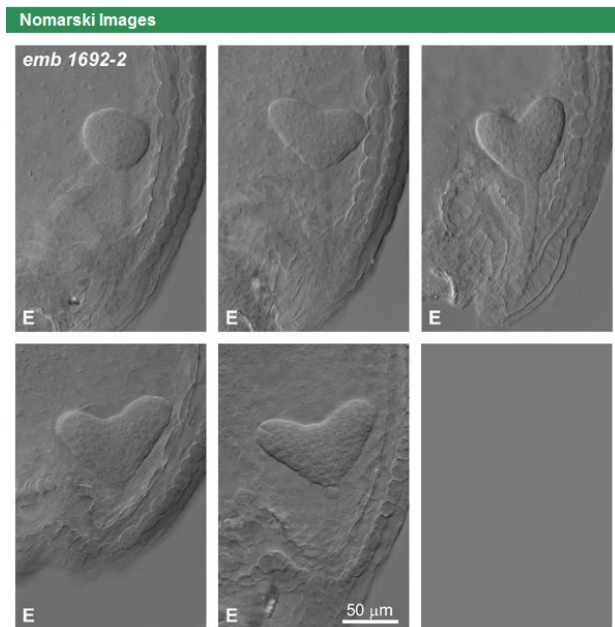
Εικόνα 1.2 Χαρακτηριστικές φαινοτυπικές ανωμαλίες του μεταλλάγματος *lefko2*

A) Φαινότυπος σποροφύτων και B) Χαρακτηριστική χλώρωση *lefko2* κοτυληδόνων φυτών ηλικίας 5 ημερών.

Σε αντίθεση με τις κοτυληδόνες τα φύλλα του μεταλλάγματος *lefko2* είναι πράσινα. Βιομετρικές αναλύσεις αποκάλυψαν ότι η ανάπτυξη του μεταλλάγματος υστερεί εμφανώς στα πρώτα στάδια μετά τη βλαστικότητα των σπερμάτων συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου *Col-0*.

1.2.2 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του αλληλόμορφου *lefkothea1*

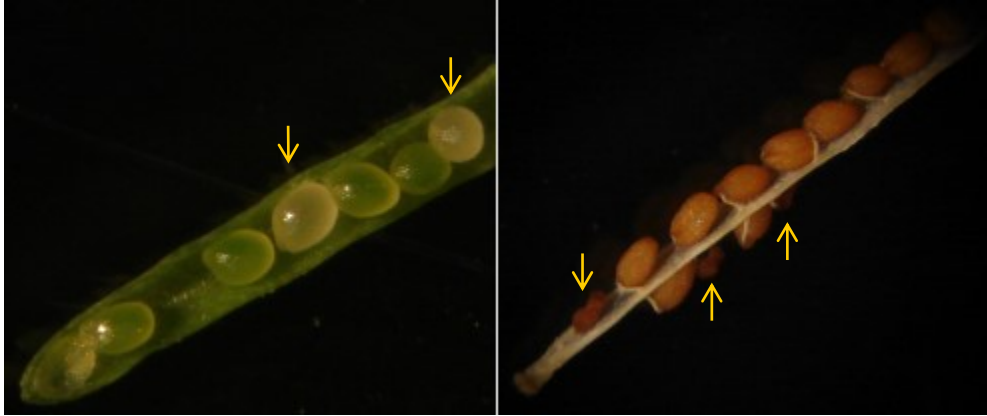
Βιοπληροφορική αναζήτηση και άλλων αλληλομόρφων μεταλλαγμάτων οδήγησε στον εντοπισμό του αλληλόμορφου *lefkothea1*, που οφείλεται σε T-DNA ένθεση στο γονίδιο At5g62990 (Εικόνα 1.6), ανωφερικά 30bp από το κωδικόνιο έναρξης. Η ίδια σειρά T-DNA είχε προηγουμένα μελετηθεί (Tzafirir, 2003; Tzafirir, 2004) και χαρακτηρίσθει ως *emb1692*. Η σειρά αυτή διατίθεται από τον ερευνητή Meinke, ο οποίος την εντόπισε στα πλαίσια μιας γενικότερης έρευνας για μεταλλάγματα που εμπλέκονται στη εμβρυογένεση. Έχει μελετηθεί η μορφολογία των εμβρύων της σειράς με μικροσκοπία Nomarski και παρουσιάζεται στη βάση δεδομένων www.seedgenes.org (Εικόνα 1.3). Περαιτέρω παρατήρηση των καρποταξιών του T-DNA αλληλομόρφου *lefko1* επιβεβαίωσαν τη Μενδελιανή διάσχιση του θνησιγόνου φαινότυπου σε κατάσταση ομοζυγωτίας (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.3 Εικόνες μικροσκοπίας Nomarski από τη βάση δεδομένων www.seedgenes.org

A. Εικόνες από την εμβρυακή ανάπτυξη αγρίου τύπου φυτού Col-0

B. Εικόνες από την εμβρυακή ανάπτυξη του μεταλλάγματος *emb1692/lefko1*. Η ανάπτυξη του μεταλλάγματος σταματάει στο στάδιο της καρδιάς



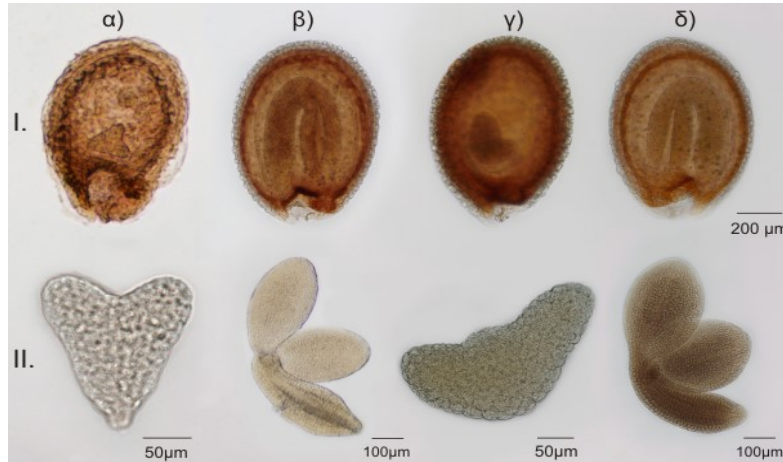
Εικόνα 1.4 Καρποταξίες ετερόζυγων ως προς την ένθεση φυτών *lefko1*. Παρατηρείται ανομοιομορφία των αναπτυσσόμενων σπερμάτων

Με αστεράκια και βέλη σημειώνονται τα μη φυσιολογικά σπέρματα. Κάτω δεξιά, φαίνονται σπέρματα από ετερόζυγη για την ένθεση, ώριμη καρποταξία, ανάμεσα στα οποία διακρίνονται 3 συρρικνωμένα (ομόζυγα για την T-DNA ένθεση)

Τα ώριμα σπέρματα εξετάστηκαν περισσότερο για να ελεγχθεί αν παρουσιάζουν κάποια ανωμαλία στη δομή ή στην ανάπτυξη των εμβρύων που εμπεριέχουν, σαν κι αυτές που παρουσιάζουν άλλα μεταλλάγματα όπως τα *sco 1-2*, *sco 1-3* (Ruppel and Hangarter, 2007) και το *raspberry3* (Aryua, 2002). Η επεξεργασία ώριμων σπερμάτων ετερόζυγων ως προς την ένθεση φυτών *lefko1* με NaOH έδειξε πως το ¼ των εμβρύων, που αντιστοιχούν στα ομόζυγα ως προς την ένθεση σπέρματα, έφτανε ως το καρδιόσχημα στάδιο ανάπτυξης (Εικόνα 1.5 γ), ενώ τα υπόλοιπα ¾ (Εικόνα 1.5 δ) ολοκλήρωναν την ανάπτυξή τους φυσιολογικά, σχηματίζοντας κοτυληδόνες και ριζίδιο. Μολονότι η ανάπτυξη των ομόζυγων ως προς την ένθεση εμβρύων σταματά στο καρδιόσχημα στάδιο, το έμβρυο ακόμη και στη φάση αυτή, δεν έχει την οργανωμένη και συνεκτική δομή που παρουσιάζει το αντίστοιχης ηλικίας *Col-0* έμβρυο (Εικόνα 1.5 α). Στο τελικό, όμως, στάδιο ανάπτυξης των εμβρύων, η εικόνα που παρουσιάζουν τα *Col-0* έμβρυα (Εικόνα 1.5 β) είναι όμοια με τα έμβρυα που φέρουν την ένθεση σε ετεροζυγωτή κατάσταση .

Σύμφωνα με τα παραπάνω και επειδή η μοριακή ανάλυση του μεταλλάγματος *lefko1* δεν καθίσταται εύκολη λόγω της θνησιμότητας του εμβρύου, ο αλληλόμορφος *lefko2* αποτελεί το πλέον κατάλληλο γενετικό υπόβαθρο για τη διεξοδική μελέτη της λειτουργίας αφού ναι μεν η αμινοξική υποκατάσταση ($G_{373} \rightarrow D$) ευθύνεται για σημαντικές φαινοτυπικές ανωμαλίες, τα φυτά όμως μπορούν να αναπτυχθούν, γονιμοποιούνται και δίνουν απογόνους.





Εικόνα 1.5. Μορφολογία σπερμάτων και εμβρύων από το αγρίου τύπου φυτό *Col-0* και το αλληλόμορφο μετάλλαγμα *lefko1*

I. Σπέρματα από α) *Col-0* φυτό στη φάση ανάπτυξης καρδιάσχημου εμβρύου, β) *Col-0* φυτό στη φάση του ώριμου εμβρύου γ), δ) από καρποταξία ετεροζυγωτού ως προς την ένθεση φυτού. Στο γ) φαίνεται σπέρμα από ομόζυγο ως προς την T-DNA ένθεση έμβρυο (1/4), ενώ στο δ) σπέρμα που περιέχει έμβρυο με την ένθεση T-DNA σε ετεροζυγική κατάσταση ή χωρίς ένθεση (3/4). II. Παρουσιάζονται τα αντίστοιχα έμβρυα από τα σπέρματα που βρίσκονται άνωθέν τους.

1.2.3 Η πρωτεΐνη LEFKO περιέχει το τμήμα DUF860 ή PORR

Σε πρωτεϊνικό επίπεδο, το γονίδιο *Lefko1* (At5g62990) αποτελείται από τρεις κύριες δομές. Το N-τελικό άκρο που περιλαμβάνει το πεπτιδίο συνθήματος για τοποθέτηση στον χλωροπλάστη, το οποίο εκτείνεται από το πρώτο έως το 60ο αμινοξύ), το τμήμα DUF 860 (*Domain of Unknown Function 860*) μεγέθους 319aa (61 – 380) και το C-τελικό άκρο μεγέθους 114aa (381–494aa) (Εικόνα 1.6). Το τμήμα DUF860 παρουσιάζεται αποκλειστικά σε γονίδια φυτικών οργανισμών.



Εικόνα 1.6 Σχηματική απεικόνιση των δομών του γονιδίου *LEFKO1* και η θέση των μεταλλάξεων

Το γονίδιο *LEFKO1* αποτελείται από το N-άκρο, το τμήμα DUF860/PORR και το C-άκρο. Η μετάλλαξη *lefko2* βρίσκεται στο τμήμα DUF860/PORR. Η μετάλλαξη *lefko2* είναι η ένθεση T-DNA 30bp ανωφορικά του κωδικονίου έναρξης του γονιδίου και απεικονίζεται με το ανεστραμμένο τρίγωνο.

Πρόσφατα, για πρώτη φορά στο φυτό *Zea mays* αναγνωρίσθηκε και μελετήθηκε πρωτεΐνη που περιέχει το τμήμα DUF860 (*domain of unknown function*) (Kroeger *et al.*, 2009). Η πρωτεΐνη WTF1 (**W**hat's **t**his **f**actor 1) εντοπίστηκε να ανοσοκαθίζει με τα ιντρόνια χλωροπλαστικών RNA της ομάδας II (splicing intron group II). Σχηματίζει ομοδιμερές σύμπλοκο με την πρωτεΐνη RNC1 (RNase III-domain protein) και φαίνεται ότι είναι απαραίτητη για την ομαλή λειτουργία του ματίσματος των χλωροπλαστικών ιντρονίων (Kroeger *et al.*, 2009). Πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι το τμήμα DUF860 έχει ένα μέχρι τώρα άγνωστο μοτίβο *in vitro* σύνδεσης με το RNA (Kroeger *et al.*, 2009). Συνεπώς το DUF860 μετονομάστηκε σε PORR (**P**lant **O**rganelle **R**NA **R**ecognition motif). Το *Arabidopsis thaliana* έχει 15 ομόλογα γονίδια που φέρουν το τμήμα DUF860, μεταξύ των οποίων είναι το γονίδιο *Lefko1* (At5g62990) και το ορθόλογο At4g01037 του *Zea mays* WTF1 στο *Arabidopsis*. Τα περισσότερα μέλη της οικογένειας DUF860 φαίνεται να στοχεύουν στους χλωροπλάστες ή στα μιτοχόνδρια, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι πρωτεΐνες με αυτό το τμήμα πιθανόν να έχουν πολλαπλούς ρόλους στο μεταβολισμό του RNA και στα δύο οργανίδια. Παρόλα αυτά, από βιοπληροφορικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν, υπάρχουν ενδείξεις ότι παράλληλα τοποθετούνται και στον πυρήνα των κυττάρων και έτσι προκύπτουν σημαντικές ερωτήσεις σε σχέση με τη λειτουργία τους, την εξέλιξη των μηχανισμών επικοινωνίας μεταξύ οργανιδίων και πυρήνα σε συνάρτηση με την ανάπτυξη του φυτού.

1.2.4 Το τμήμα PORR εντοπίζεται μόνο σε γονίδια φυτικών οργανισμών

Ερευνώντας για άλλες πρωτεΐνες *Lefko1* εκτός του *Arabidopsis thaliana* μέσω του προγράμματος BlastP (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI), βρέθηκε ότι μόνο στους φυτικούς οργανισμούς υπάρχουν ομόλογες πρωτεΐνες με το τμήμα PORR. Στις βάσεις δεδομένων και ιδιαίτερα στο TAIR (www.arabidopsis.org) και NCBI, το PORR είχε προηγουμένως χαρακτηριστεί ως DUF860 (**D**omain of **U**nknown **F**unction) ή λανθασμένα ως υδρολάση του καρβόξυ-άκρου της ουμπικουιτίνης. Πρόσφατη αναφορά ανέτρεψε αυτό τον χαρακτηρισμό, αφού παρουσιάστηκε ότι το τμήμα PORR συνδέεται με οργανιδιακό RNA και συμμετέχει στο μάτισμα των οργανιδιακών ιντρονίων κατηγορίας II, ενώ παράλληλα η ομολογία σε αμινοξικό επίπεδο με τις υδρολάσεις του καρβόξυ-άκρου της ουμπικουιτίνης είναι ελάχιστη (Kroeger *et al.*, 2009). Τα περισσότερα μέλη της οικογένειας PORR/DUF860 προβλέπεται ότι τοποθετούνται στα μιτοχόνδρια ή στους χλωροπλάστες, είτε στον

πυρήνα, οπότε η λειτουργία τους μάλλον θα πρέπει να σχετίζεται με βασικές διεργασίες μεταβολισμού του RNA στα υποκυτταρικά αυτά διαμερίσματα που περιέχουν νουκλεϊνικά οξέα.

1.3 Πρωτεΐνες που βρίσκονται σε αφθονία στο σπέρμα του *Arabidopsis*

1.3.1 Seed Storage Proteins

Οι πρωτεΐνες αποθήκευσης των φυτών μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες. Πρωτεΐνες αποθήκευσης σπόρων (Seed Storage Proteins-SSP) και πρωτεΐνες φυτικής αποθήκευσης (Vegetative Storage Proteins - VSPs). Τα SSPs είναι ένα σύνολο πρωτεϊνών που συσσωρεύονται σε υψηλά επίπεδα στους σπόρους κατά τα τελευταία στάδια ανάπτυξης σπόρων, ενώ τα VSPs είναι πρωτεΐνες που συσσωρεύονται σε φυτικούς ιστούς όπως φύλλα, μίσχοι και, ανάλογα με το είδος των φυτών στους κονδύλους. Κατά τη διάρκεια της βλάστησης των σπόρων, τα SSP αποικοδομούνται και τα προκύπτοντα αμινοξέα χρησιμοποιούνται από τα αναπτυσσόμενα φυτά ως θρεπτική πηγή. Τα SSPs είναι οι κυριότερες πρωτεΐνες στους κόκκους και, στις φυτικές πρωτεΐνες, αντιπροσωπεύουν εκείνες που καταναλώνονται περισσότερο από τον άνθρωπο.

Τα γονίδια SSP είναι κλασικοί στόχοι για τη μοριακή βιολογία των φυτών. Η άφθονη έκφρασή τους στους σπόρους επέτρεψε την εύκολη ανίχνευση των μεταγραφών των γονιδίων και της κλωνοποίησης του cDNA κατά την αρχή της φυτικής μοριακής βιολογίας στα τέλη της δεκαετίας του 70 έως τις αρχές της δεκαετίας του 80. Η έκφρασή τους περιορίζεται αυστηρά στην ανάπτυξη σπόρων κατά τη διάρκεια των μεσαίων και αργών σταδίων της εμβρυογένεσης, χαρακτηριστικό που τα καθιστά ιδανικά για τη μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων σε ιστό και χρονία.

Οι κύριες SSP του *Arabidopsis* αποτελούνται από 12S globulins και 2S albumins. Αυτή η ταξινόμηση των SSP σε albumins ή globulins βασίζεται στο κατά πόσο οι πρωτεΐνες είναι υδατοδιαλυτές ή διαλυτές στο διάλυμα άλατος, αντίστοιχα. Εκτός από αυτήν την ταξινόμηση, οι SSP των καλλιεργειών έχουν συχνά και συγκεκριμένα ονόματα. Για παράδειγμα, γλυκίνη, γλουτελίνη και ζεΐνη αντιπροσωπεύουν ειδικά κλάσματα SSP από σόγια, ρύζι και αραβόσιτο, αντίστοιχα. Τα SSP *Arabidopsis* έχουν επίσης ονομαστεί με βάση αυτές του *Brassica napus*. Οι πρωτεΐνες 12S globulins αναφέρονται ως cruciferins, ενώ οι 2S albumins αναφέρονται είτε ως napins είτε ως arabins. Οι SSPs είναι η κύρια πηγή φυτικών πρωτεϊνών στη διατροφή του ανθρώπου, έτσι υπάρχει ενδιαφέρον για την παραγωγή μεταλλαγμάτων με αυξημένο περιεχόμενο ή αυξημένη ποσότητα απαραίτητων αμινοξέων (Λυσίνη Μεθειονίνη Τρυπτοφάνη)

1.3.2 Oleosins

Οι ελαιούχοι σπόροι συσσωρεύουν λιπίδια για να παρέχουν τις ενεργειακές απαιτήσεις για την ανάπτυξη του δενδρυλλίου μετά τη βλάστηση. Τέτοια λιπίδια αποθηκεύονται γενικά ως τριακυλγλυκερόλες (TAG) σε σφαιρικά διαμερίσματα που αναφέρονται ως σφαιροειδή (Frey-Wyssling et al., 1963), ή αλλιώς ως ελαιωσώματα (Murphy, 1990). Αυτά τα οργανίδια προκύπτουν από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), το οποίο είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση του TAG. Τα ελαιωσώματα είναι απλά οργανίδια που περιλαμβάνουν μια μήτρα τριακυλγλυκερόλης που περιβάλλεται από μία μονοστοιβάδα φωσφολιπιδίων ενσωματωμένη και καλυμμένη με μοναδικές πρωτεΐνες που ονομάζονται ολεοσίνες.

Οι ολεοσίνες των φυτών είναι μικρές (15-26 kDa) αλκαλικές πρωτεΐνες ενσωματωμένες εντός της μονοστοιβάδας φωσφολιπιδίων και διαχωρίζουν τη θέση αποθήκευσης τριακυλγλυκερόλης σε υποκυτταρικά σωματίδια τοποθετημένα σε έμβρυα που ονομάζονται ολεοσώματα ή ελαιώδη κύτταρα από το κυτταρόπλασμα κυττάρων ελαιούχων σπόρων. Οι ολεοσίνες χαρακτηρίζονται από μία μοναδική, εξαιρετικά διατηρημένη και ασυνήθιστα μακρά κεντρική υδρόφοβη περιοχή. Αυτή η περιοχή περιέχει ένα σχετικά υδρόφιλο μοτίβο κόμβου προλίνης που διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη στόχευση της πρωτεΐνης στα ελαιωσώματα. Αυτός ο υδρόφοβος τομέας πλαισιώνεται από υδρόφιλα ή αμφιπαθή N και O άκρα τα οποία ποικίλουν σημαντικά στο μήκος και την αλληλουχία σε διαφορετικά είδη φυτών. Κατά τη διάρκεια των τελικών σταδίων ωρίμανσης των σπόρων, όταν μειώνεται το δυναμικό νερού, τα ελαιωσώματα υφίστανται κυτταροπλασματική συμπίεση και αναγκάζονται να έλθουν σε επαφή μεταξύ τους. Παραδόξως, αυτά τα οργανίδια αντιστέκονται στη συνένωση και παραμένουν ως μικρές μεμονωμένες μονάδες. Συνεπώς ο φυσιολογικός ρόλος των ελαιοσίνων είναι η αποτροπή της σύντηξης μεταξύ των ελαιωσμάτων κατά την ωρίμανση των σπόρων και την αποξήρανση. Έτσι, τα πλούσια σε ολεοσίνες ελαιωσώματα παραμένουν μικρά (0.5-2,5 μm) και αρκετά σταθερά, παρέχοντας υψηλή αναλογία επιφάνειας προς όγκο, πιθανόν για να βοηθήσουν στην αποτελεσματική και ταχεία δράση των λιπασών κατά τη διάρκεια της βλάστησης.

Το *Arabidopsis* περιέχει τέσσερις ισομορφές ολεοσινών (Richmond et al., 1997, Jolivet et al., 2004). Η ισομορφή των 18kD, που ονομάζεται επίσης OLEO1 (At4g25140), συσσωρεύεται σε υψηλότερα επίπεδα και αντιπροσωπεύει ~65% των πρωτεϊνών που σχετίζονται με τα ελαιωσώματα. OLEO2 και OLEO4 (At5g40420 και At3g27660, αντίστοιχα) είναι ισομορφές υψηλότερης μοριακού βάρους που αντιπροσωπεύουν από κοινού ~ 30% πρωτεϊνών των ελαιωσμάτων. Οι άλλες πρωτεΐνες αποτελούνται από την ισομορφή OLEO3 με χαμηλότερο μοριακό βάρος (At5g51210) και από άλλες

πρωτεΐνες που σχετίζονται με το ελαιosώματα , όπως η καλοζίνη ή η στερολεοσίνη (Chen et al., 1999, Lin et al, 2002).

1.3.3 Late Embryogenesis Abundant proteins (LEA)

Ένας αριθμός γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες διαφορετικές από τις SSP εκφράζονται επίσης άφθονα κατά το τέλος της εμβρυογένεσης. Αυτά περιλαμβάνουν τις ελαιosίνες και τις πλούσιες σε αργά εμβρυογένεση πρωτεΐνες (LEA).

Η διαδικασία ωρίμανσης της ανάπτυξης του εμβρύου συσχετίζεται με την απόκτηση ανοχής αποξήρανσης και με την ειδική επαγωγή ενός συνόλου πρωτεϊνών που περιγράφηκε αρχικά ως LEA (Late Embryogenesis Abundant) . Τα γονίδια LEA είναι ένα σύνολο γονιδίων που εκφράζονται σε μεταγενέστερα στάδια εμβρυογένεσης. Η έκφραση γονιδίων LEA, ωστόσο, δεν περιορίζεται πάντοτε αυστηρά στην καθυστερημένη εμβρυογένεση αλλά και υπό διάφορες συνθήκες στρες όπως κρύο, οσμωτικό στρες και θερμότητα. Η ωρίμανση των σπόρων χαρακτηρίζεται από την έκφραση και τη συσσώρευση πρωτεϊνών LEA στο έμβρυο. Οι πρωτεΐνες LEA βρίσκονται σε διαφορετικούς ιστούς και σε όλους τους τύπους κυττάρων. Έχουν βρεθεί ότι συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα και τα πλαστίδια. Γενικά, η έκφραση των πρωτεϊνών LEA έχει συσχετιστεί με ανεπάρκεια νερού σε φυτικούς ιστούς και αφυδάτωση σε σπόρους.

Τρεις κύριες ομάδες (αριθμημένες 1, 2 και 3) των πρωτεϊνών LEA έχουν αναγνωριστεί σε μια σειρά διαφορετικών φυτών και φυτικών ιστών. Ομόλογα πρωτεϊνών της ομάδας 1 και 3 έχουν επίσης βρεθεί σε βακτήρια και σε ορισμένα ασπόνδυλα. Ωστόσο, η ακριβής μοριακή τους λειτουργία δεν ήταν σαφής.

Αυτές οι μικρές πρωτεΐνες είναι πανταχού παρούσες σε χερσαία φυτά από τις πρώτες ταξινομικές ομάδες όπως Βρύα, μέσα από είδη γυμνοσπερμών και αγγειόσπερμου. Οι περισσότερες από αυτές ανήκουν στην οικογένεια "υδροφιλινών", μια ομάδα εξαιρετικά υδρόφιλων, ενδογενών ασταθών πρωτεϊνών (IUPs) που χαρακτηρίζονται από μια προκατειλημμένη σύνθεση αμινοξέων εμπλουτισμένη σε Gly και άλλα μικρά υπολείμματα που ευνοούν μια εύκαμπτη διαμόρφωση σε υδατικά διαλύματα. Αυτά τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά είναι ευρέως διαδεδομένα στις περισσότερες πρωτεΐνες LEA, οι διαφορές στις αλληλουχίες αμινοξέων τους αποκαλύπτουν τουλάχιστον επτά ομάδες.

ΣΚΟΠΟΣ

Το γονίδιο *Lefkothea* του *Arabidopsis thaliana* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη του φυτού. Το μετάλλαγμα λόγω ένθεσης στο γονίδιο προκαλεί διακοπή της ανάπτυξης σε πρόωρο εμβρυικό στάδιο. Η πρωτεΐνη LEFKOTHEA κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που συμμετέχει στο μάτισμα πυρηνικών και χλωροπλαστικών γονιδίων μέσω μίας σύνθετης μετακίνησης και τοποθέτησης της πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο. Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης αποτελεί η διερεύνηση σε μεταγραφικό και πρωτεομικό επίπεδο των επιδράσεων που επιφέρει η θνησιγόνος μετάλλαξη *lefko1* στο φυτό. Μέσω ολικής αλληλούχισης του RNA μελετώνται ποια γονίδια υπερεκφράζονται, αν αυτό αντιπροσωπεύεται σε πρωτεομικό επίπεδο και διερευνάται πώς ελέγχεται η υπερέκφραση αυτών το γονιδίων στο στάδιο της θνησιμότητας του φυτού.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Φυτικό υλικό - περιβάλλον ανάπτυξης

Για την ανάπτυξη των φυτών, σπέρματα *Arabidopsis thaliana* (οικότυποι *Columbia* και *Landsberg erecta*) τοποθετούνται σε θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS. Η σύσταση του υποστρώματος είναι η εξής :

- 1xMS (MS : Murashige and Skoog medium 2.2g/l Duchefa, μακρο – μικροστοιχεία και βιταμίνες)
- MES : 0.05 % (για σταθεροποίηση του pH, SIGMA P-8164)
- Σακχαρόζη : 1 % (πηγή άνθρακα)
- KOH 1N (για ρύθμιση του pH στο 5.7)
- Phytigel (SIGMA M8250-100G) : 0.33 % ή Αγαρόζη : 1 % (για στερεοποίηση υποστρώματος)

Αρχικά, τα φυτά αναπτύσσονται υπό ασηπτικές συνθήκες :

- Σπέρματα *Arabidopsis thaliana* τοποθετούνται στους 4°C για 24h προκειμένου να διακοπεί ο λήθαργος.
- Στη συνέχεια απολυμαίνονται με 20% διάλυμα χλωρίνης για 2-5 λεπτά. Το διάλυμα απομακρύνεται και η πλύση επαναλαμβάνεται.
- Τα σπέρματα ξεπλένονται 5 φορές με αποστειρωμένο ddH₂O.
- Με τη βοήθεια πιπέτας Gilson, τα απολυμασμένα σπέρματα επιστρώνονται σε τριβλίο που περιέχει θρεπτικό μέσο ½ MS.
- Τα τριβλία τοποθετούνται σε θάλαμο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22°C, φωτοπερίοδος 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι και σχετική υγρασία περίπου 40%).
- Μετά από 3 περίπου ημέρες τα σπέρματα βλαστάνουν και εμφανίζονται σταδιακά η εμβρυακή ρίζα και οι κοτυληδόνες.

Έπειτα από δύο βδομάδες τα φυτά έχουν αναπτύξει τον κορυφαίο βλαστό. Στο στάδιο αυτό μπορούν να μεταφερθούν στο χώμα, όπου για τις τρεις πρώτες μέρες παραμένουν καλυμμένα με διάφανη μεμβράνη και διατηρούνται σε περιβάλλον υψηλής σχετικής υγρασίας για να ξεπεράσουν την

καταπόνηση από τη μεταφύτευση. Στη συνέχεια αφήνονται να αναπτυχθούν μέχρι να ολοκληρώσουν το βιολογικό τους κύκλο και γίνεται η συλλογή των σπερμάτων.

2.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA από έμβρυα *Arabidopsis thaliana*

Το πρωτόκολλο που ακολουθεί αποτελεί τροποποίηση του πρωτοκόλλου από την αναφορά των Onate-Sanchez *et al.*, 2008.

Έμβρυα από το κατάλληλο στάδιο του φυτού *Arabidopsis thaliana*, απομονώνονται με τη βοήθεια λαβίδας και στερεοσκοπίου

- Στα έμβρυα προστίθεται το διάλυμα απομόνωσης (όσο το δυνατό λιγότερο όγκος, μέχρι 150μl). Μέσα στο διάλυμα τα έμβρυα μπορούν να αποθηκευτούν και στους -80°C
- Με μικρογουδί ομογενοποιούνται στα έμβρυα
- Σε 150μl διάλυμα ομογενοποίησης (έμβρυα και διάλυμα απομόνωσης) προστίθενται 150μl χλωροφόρμιο και ακολουθεί ισχυρή ανακίνηση για 30".
- Φυγοκέντρηση για 5'
- Μεταφέρεται το υπερκείμενο σε νέο erpendorf tube και προστίθενται 300μl φαινόλης, ακολουθεί ισχυρή ανακίνηση για 1'. Στη συνέχεια προστίθενται 150μl χλωροφόρμιο κα ισχυρή ανακίνηση για 3'.
- Φυγοκέντρηση για 5'
- Μεταφέρεται το υπερκείμενο σε νέο erpendorf tube (~250μl) και προστίθεται 1/3 του όγκου 8M LiCl (83μl). Ακολουθεί ελαφριά ανακίνηση. Το δείγμα αφήνεται στους -20°C για 1h
- Φυγοκέντρηση για 30' στους 4°C
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε 30μl ddH₂O
- Ακολουθεί αντίδραση DNase (στα 60μl) όπως αναφέρεται παρακάτω
- Μετά την αντίδραση DNase προστίθενται στο δείγμα 440μl ddH₂O, 7μl 3M NaAc pH:5.2 (Sodium Acetate) και 250μl 100% αιθανόλης
- Φυγοκέντρηση για 10' στους 4°C. (Με αυτόν τον τρόπο απομακρύνονται τα συστατικά της αντίδρασης DNase και όλοι οι πολυσακχαρίτες)
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf tube και εκεί προστίθενται 43μl 3M NaAc pH:5.2 και 750μl 100% αιθανόλης. Ανακινείται ελαφρά και αφήνεται ο/η στους -20°C
- Φυγοκέντρηση για 30' στους 4°C
- Απομακρύνεται προσεχτικά το υπερκείμενο, ακολουθεί μια γρήγορη φυγοκέντρηση για να απομακρυνθεί τυχόν υπερκείμενο που έχει μείνει και το ίζημα επαναιωρείται στα 20-25μl με

ddH₂O

2.3 Πρωτόκολλο απομόνωσης γενωματικού DNA από Arabidopsis CTAB DNA miniprep (Clark J.D.)

- Φρέσκο φυτικό υλικό (συνήθως ένα μικρό φύλλο ή ολόκληρο φυτό 10-12 ημερών) ομογενοποιείται με υγρό άζωτο σε κατάλληλο γουδί λειοτρίβισης
- Θερμαίνεται το ρυθμιστικό διάλυμα CTAB σε υδατόλουτρο στους 65 °C
- Προστίθεται ένας όγκος (200 μl) ζεστού CTAB και τοποθετούνται τα eppendorfs σε υδατόλουτρο στους 65 °C για 10-30 λεπτά
- Προστίθεται ίσος όγκος SEVAG και το μίγμα αναδεύεται με vortex
- Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις μέγιστες στροφές (13.000 στρ/λεπτό)
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρό eppendorf
- Προσθήκη 0,7 του όγκου (140 μl) ισοπροπανόλη, ανάδευση με το χέρι και αφήνεται σε ηρεμία για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στις μέγιστες στροφές
- Το ίζημα ξεπλένεται με 0,5 ml 70% αιθανόλη
- Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις μέγιστες στροφές
- Απομάκρυνση υπερκειμένου
- Αφού στεγνώσει το ίζημα επαναδιαλύεται σε 100 μl H₂O ή T.E.

Διαλύματα απομόνωσης γενωματικού DNA

- **CTAB DNA Ρυθμιστικό διάλυμα απομόνωσης** : 2% (w/v) CTAB, 100mM Tris pH 8.0, 20mM EDTA pH 8.0, 1.4M NaCl, 1% (w/v) PVP (πολυβινυλ-πυρρολιδόνη, M.B 40.000).
- **SEVAG** : 24:1 Χλωροφόρμιο : ισοαμυλική αλκοόλη
- **100% Ισοπροπανόλη**
- **70% παγωμένη Αιθανόλη**
- **T.E.** : 10mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA pH 8.0

2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Για την ανάλυση κλασμάτων νουκλεϊνικών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών διαμορφώσεων χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Ο διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος προς το μέγεθος των μορίων. Τα μόρια των νουκλεϊνικών οξέων γίνονται ορατά στην πηκτή αγαρόζης με τη βοήθεια μιας χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων. Η χρωστική ονομάζεται βρωμιούχο αιθίδιο και έχει την ιδιότητα να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η περιεκτικότητα της πηκτής σε αγαρόζη εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν. Συνήθως ποικίλλει από 0.8 % ως 2 % αγαρόζη w/v.

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστίθεται σε διάλυμα 1xTAE.
- Θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και το μίγμα να γίνει διαφανές.
- Προσθήκη διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0,005% v/v.
- Η πηκτή τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο συσκευής ηλεκτροφόρησης με την ανάλογη χτένα και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν προστίθενται 2 μl χρωστικής (loading dye)
- Μετά την πήξη απομακρύνεται η χτένα και προστίθεται κατάλληλος όγκος 1X TAE, που αποτελεί το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.
- Τα δείγματα τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις της πηκτής και λαμβάνει χώρα η ηλεκτροφόρηση παρουσία συνεχούς τάσης 50-120 V, η οποία ποικίλλει ανάλογα με την επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού, το μέγεθος της πηκτής και την περιεκτικότητά της σε αγαρόζη.

Διαλύματα ηλεκτροφόρησης

50 x TAE ρυθμιστικού διαλύματος : 24.2gr (w/v) Tris-base, 100ml 0.5M EDTA pH8 (Ethylene- Diamine-Tetracetic Acid disodium salt), 57ml CH₃COOH for 1lt of buffer

Βρωμιούχο αιθίδιο : 5 mg/ml σε dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε σκοτεινόχρωμο μπουκάλι σε θερμοκρασία δωματίου.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης για gel αγαρόζης : 2% v/v 1xTAE, 0.005% v/v βρωμιούχο αιθίδιο σε ddH₂O

5x (loading dye) - Διάλυμα χρωστικής για ηλεκτροφόρηση DNA : 1.25% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 1.25% w/v κυανούν του ξυλενίου σε ddH₂O. Στο 1x προστίθενται και 50% w/v σακχαρόζη

Πηκτή αγαρόζης 0.8 % : 0.8% w/v αγαρόζη, 2% v/v 1xTAE, 0.005% v/v βρωμιούχο αιθίδιο σε ddH₂O.

2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

2.5.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Ένα γενικό πρωτόκολλο για την ενίσχυση τμημάτων DNA είναι το ακόλουθο:

Συστατικά Αντίδρασης	Πυκνό Διάλυμα	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
Ρυθμιστικό Διάλυμα PCR ⁽¹⁾	10 x	5μl	1 x
dNTPs	2mM	5μl	200μM
Ευθύς εκκινητής	3μM	5μl	300nM
Ανάστροφος εκκινητής	3μM	5μl	300nM
DNA	-	2 μl	10ng gDNA
DyNAzyme™ EXT (FINNZYMES) ⁽³⁾	1unit/μl	1μl	1 unit
ddH ₂ O	-	έως τα 50μl	-
Τελικός όγκος αντίδρασης 50μl			

⁽¹⁾ Ρυθμιστικό διάλυμα PCR με συγκέντρωση 15mM MgCl₂ [10x Optimized DyNAzyme Ext Buffer (F-514)]

⁽³⁾ Η DyNAzyme™ EXT Πολυμεράση της FINNZYMES (F-512S) έχει το χαρακτηριστικό να προσθέτει αδείνη στο 3' άκρο του DNA χωρίς να έχουμε προσθέσει αδείνη ως μήτρα. Αυτό το γνώρισμα διευκολύνει την κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR σε φορείς όπως ο pGEM κ.α. Κάθε ένα από τα συστατικά της αντίδρασης τοποθετούνται σε σωλήνα χωρητικότητας 0,2ml κατάλληλο για αντιδράσεις PCR

➤ Οι θερμοκύκλοι επιλέγονται με βάση το πρότυπο που παρουσιάζεται ακολούθως:

1 x	Αποδιάταξη του DNA μήτρα για 2 λεπτά στους 94°C
20-30 x	Αποδιάταξη στους 94°C για 30''

	Υβριδισμός εκκινητών στο αντίστοιχο Tm ⁽¹⁾ για 30'' Επιμήκυνση στους 72°C για 2' έως 8' ⁽²⁾
1 x	Τελική επιμήκυνση προϊόντος στους 72°C για 10'
	Διατήρηση στους 10 °C για 5''

⁽¹⁾ Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης Tm του εκκινητή που υπολογίζεται από τον τύπο: $69,3 + 0,41 \cdot GC\% - 650/\text{αριθμό βάσεων εκκινητή}$.

⁽²⁾ Ο χρόνος επιμήκυνσης εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος DNA που ενισχύεται με βάση τις προδιαγραφές της θερμοανθεκτικής Πολυμεράσης και οι οποίες είναι 1,3kb -1.5kb/1min.

- Όταν τελειώσουν οι PCR αντιδράσεις, αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης 0,8%-3%, ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA και το διαχωρισμό που θέλουμε να επιτύχουμε.
- Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR των οποίων τα προϊόντα προορίζονται για κλωνοποιήσεις σχεδιάστηκαν με θέση αναγνώρισης ενζύμου περιορισμού στο 5' άκρο, η οποία θα μας διευκολύνει κατά την υποκλωνοποίηση του τμήματος σε άλλους φορείς. Η θέση αναγνώρισης επιλέχτηκε ώστε να είναι μοναδική τόσο μέσα στο τμήμα DNA που επιθυμούμε να κλωνοποιήσουμε όσο και σε άλλους φορείς.

2.5.2 RT-PCR

- Απομονώνεται ολικό RNA από ολόκληρα φυτά ή διάφορα φυτικά όργανα. Με την βοήθεια φασματοφωτομέτρου μετράμε την ποσότητα που περιέχεται σε κάθε δείγμα.
- Από κάθε δείγμα ολικού RNA παίρνουμε 25μg και χρησιμοποιώντας το ένζυμο DNάσηI καταστρέφουμε το DNA που περιέχεται στο δείγμα για να μην χρησιμοποιηθεί ως μήτρα στις αντιδράσεις PCR. Τα συστατικά της αντίδρασης και οι τελικές συγκεντρώσεις είναι τα ακόλουθα.

Συστατικά	Πυκνό	Όγκος	Τελική
Αντίδρασης	Διάλυμα		Συγκέντρωση
Ρυθμιστικό	10 x	6μl	1 x
Διάλυμα			
DNάσης I			
DNάση I (Promega)	2 units/ μl	7μl	14 units

Αναστολέα RNάσης (Promega)	30 units/ μl	1μl	30 units
Ολικό RNA	-	-	25μg
ddH ₂ O	-	έως τα 60μl	-

Τελικός όγκος αντίδρασης 60 μl

Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37°C για 45'.

- Μόλις ολοκληρωθεί η αντίδραση πραγματοποιείται καθαρισμός με φαινόλη και στην συνέχεια προσθέτουμε 1/10 του όγκου 3M CH₃COONa, pH 4,8 και 2 όγκους 100% αιθανόλη. Το μείγμα ανακατεύεται καλά και τοποθετείται στους -20°C για 12 ώρες.
- Το ολικό RNA ελεύθερο από DNA συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 30' στους 4°C. Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται και το ίζημα διαλύεται σε ~25μl ddH₂O. Από αυτά 2μl αναλύονται σε gel αγαρόζης για να επιβεβαιώσουμε πραγματικά ότι δεν έχει καταστραφεί το RNA αλλά μόνο το DNA και 2μl αραιώνονται με ddH₂O 1:250, η αραιώση χρησιμοποιείται για να μετρήσουμε την συγκέντρωση του RNA με την βοήθεια φασματοφωτομέτρου.
- 2μg ολικού RNA ελεύθερο από DNA μεταγράφεται ανάστροφα σε μονόκλωνο cDNA. Η διαδικασία γίνεται σε δυο βήματα.
- Στο πρώτο βήμα το ολικό RNA ελεύθερο από DNA και εξειδικευμένοι εκκινητές, αποδιατάσσονται στους 65°C για 10' και μετά τοποθετούνται στους 4°C. Τα συστατικά και οι συγκεντρώσεις σ' αυτό το βήμα δίδονται από τον ακόλουθο πίνακα.

Συστατικά Πρώτου Βήματος	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
Ολικό RNA ελεύθερο από DNA	-	2μg
Εκκινητές για ανάστροφη μεταγραφή (12,5μM)	4 μl	50pmoles
ddH ₂ O	έως τα 10μl	

Όγκος πρώτου βήματος 10μl

- Στο δεύτερο βήμα προστίθενται τα ακόλουθα συστατικά:

Συστατικά	Δευτέρου	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
-----------	----------	-------	--------------------

Βήματος

5 x Ρυθμιστικό διάλυμα ανάστροφης μεταγραφάσης	4μl	1 x
100 mM DTT	2μl	10mM
10 mM dNTPs	2μl	1mM
Αναστολέα RNάσης 30 units/ μl (Promega)	1μl	30units
Superscript-II Ανάστροφη Μεταγραφάση 50 units/ μl (Invitrogen)	1μl	50units

Όγκος δεύτερου βήματος 10μl

Τελικός όγκος αντίδρασης όγκος πρώτου και δευτέρου βήματος 20μl

- Η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιείται στους 42°C για 60'.
- Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση, διατηρείται στους 4°C. Γίνεται αραίωση 1/5 και χρησιμοποιούνται 3μl για αντίδραση PCR.

2.5.3 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν

At1g03880: CRB, CRU2, CRUCIFERIN 2, CRUCIFERIN B

Protein is tyrosine-phosphorylated and its phosphorylation state is modulated in response to ABA in Arabidopsis thaliana seeds.

At1g03880-For: 5'- CAAGCCATCACTCGGATACATTAGCA -'3 Tm: 63.24

At1g03880-Rev: 5'- CGTTCACCATTTGTATATGAGCCTTTC -'3 Tm: 61.91

At1g03880-RT: 5'- CTGCTATGGGTCAGTGTGGTCTC -'3

At3g15670: Late Embryogenesis Accumulating 75, LEA76

Late Embryogenesis Abundant Protein (LEA) family protein

At3g15670-For: 5'- ATGGCATCCAACCAACAGAGC-'3 Tm: 59.83

At3g15670-Rev: 5'- GGCAGTTTGAGATGTCTTATC -'3 Tm: 55.93

At3g15670-RT: 5'- TTTGCTGACTGGGCCGTTTCAT -'3

At3g02480: ABA-RESPONSE PROTEIN, ABR

Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein

At3g02480-For: 5'- GAGAAGGCCGGTGAATGATGGACA -'3 Tm: 66.2

At3g02480-Rev: 5'- CAAGGTGCTTGCTTAGTGGCT -'3 Tm: 59.83

At4g27150 : AT2S2, SEED STORAGE ALBUMIN 2, SESA2

Seed Storage Albumin 2

At4g27150-For: 5'- GCTCTTCTCGTCTGCGCAACTTTC -'3 Tm: 59.83

At4g27150-Rev: 5'- TCGTCTTCCAAATCGAACTCATC -'3 Tm: 55.93

At4g27150-RT: 5'- GGCAAACACAAACTGGCTCTTCCTG -'3 Tm: 64.62

At4g27160 : AT2S3, SEED STORAGE ALBUMIN 3, SESA3

Seed Storage Albumin 3

At4g27160-For: 5'- CTCTTCCTCGTCTGCGCAACTCTC -'3 Tm: 59.83

At4g27160-Rev: 5'- GGCCCTCGAAATCGAACTCATC -'3 Tm: 55.93

At4g27160-RT: 5'- GGCAAACGCAAACACTGGCTCTTCCTG -'3 Tm: 64.62

At4g28520 : CRC, CRU3, CRUCIFERIN 3, CRUCIFERIN C

Encodes a 12S seed storage protein that is tyrosine-phosphorylated and its phosphorylation state is modulated in response to ABA in Arabidopsis thaliana seeds.

At4g28520-For: 5'- CCTTGCCCATCTTGGAGTATGT -'3 Tm: 59.83

At4g28520-Rev: 5'- CTGTCCGTTGTCGTTGACCACT -'3 Tm: 55.93

At4g28520-RT: 5'- GGACTGGACAACGTATGCGAACC -'3 Tm: 64.62

At5g54740: SEED STORAGE ALBUMIN 5, SESA5

Seed Storage Albumin 5

At5g54740-For: 5'- TCGGATACGAAGCTGATGACTTTGAG -'3 Tm: 63.24

At5g54740-Rev: 5'- CATGCATTCCCTGGAATCTGAC -'3 Tm: 55.93

At5g54740-RT: 5'- TTAGGCAAGTTCTTAGCAGTCT -'3 Tm: 64.62

2.6 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικών πρωτεϊνών από ιστούς *Arabidopsis*

- Φρέσκο φυτικό υλικό ομογενοποιείται με 100-150μl protein extraction buffer σε eppendorf-tube
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις μέγιστες στροφές (13.000 στρ/λεπτό)
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρό eppendorf
- Αποθήκευση στους -20°C
- **Protein extraction buffer** : 5ml 100mM sodium phosphate pH 7.0, 2ml 10% SDS electrophoresis pure (Fluka Cat.No : 71725), 200μl 0.5M EDTA, 7μl 14.3M β-mercaptoethanol, 100μl 100x Benzamide, 333μl 30x PMSF για 10ml.

Για δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης :

- Προστίθεται κατάλληλος όγκος loading buffer στην ποσότητα του δείγματος που θα αναλυθεί στην πηκτή
- Τα δείγματα βράζονται για 5 min στους 95°C
- Φορτώνονται στις θέσεις της πηκτής αφού γίνει μια σύντομη φυγοκέντρηση
- Τα δείγματα με loading buffer μπορούν να αποθηκευτούν στους -20°C

2.6.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης

Χρησιμοποιείται το ισχυρό ανιονικό απορρυπαντικό SDS, σε συνδυασμό με έναν αναγωγικό παράγοντα, ώστε να αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες και να επικαλυφθούν από το SDS, πριν από την ανάλυσή τους στην πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης. Τα αποδιατεταγμένα πολυπεπτίδια δεσμεύουν το SDS και φορτίζονται αρνητικά, οπότε με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου μετακινούνται από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο. Επειδή η ποσότητα του δεσμευμένου SDS είναι σχεδόν πάντα αναλογική με το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου και ανεξάρτητη από την ακολουθία των αμινοξέων του, τα συμπλέγματα SDS-πολυπεπτιδίων μετακινούνται στην πηκτή ανάλογα με το μέγεθός τους. Σε κατάσταση κορεσμού, περίπου 1.4gr SDS είναι δεσμευμένο σε κάθε 1gr πολυπεπτιδίων. Χρησιμοποιώντας γνωστά μοριακά βάρη στην πηκτή, είναι δυνατή η εκτίμηση των άγνωστων μοριακών βαρών των πολυπεπτιδίων.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης πραγματοποιείται σε ένα σύστημα ασυνεχούς ρυθμιστικού διαλύματος. Το σύστημα που χρησιμοποιείται είναι μια παραλλαγή του συστήματος που αρχικά περιγράφηκε από το Laemmli το 1970. Το πρωτεϊνικό δείγμα και η πηκτή

συσσώρευσης SDS-πολυακρυλαμίδης (stacking gel) περιέχουν Tris-HCl pH 6.8, το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης περιέχει Tris-γλυκίνη pH 8.3 και η πηκτή ανάλυσης SDS-πολυακρυλαμίδης (main gel) περιέχει Tris-HCl pH 8.8. Όλα τα συστατικά του συστήματος περιέχουν 0.1% SDS. Κατά τη μετακίνηση των συμπλεγμάτων SDS-πολυπεπτιδίων στην πηκτή συσσώρευσης SDS-πολυακρυλαμίδης, το οποίο διαθέτει επιπλέον υψηλό πορώδες, σχηματίζεται ένα κινούμενο «μέτωπο», στο οποίο το άκρο που προπορεύεται δημιουργείται από ιόντα χλωρίου, που περιέχονται στο δείγμα και στην πηκτή συσσώρευσης, ενώ το απώτατο άκρο αποτελείται από μόρια γλυκίνης. Με τον τρόπο αυτό, μεταξύ του προπορευόμενου και του απώτατου «μετώπου» δημιουργείται μια ζώνη χαμηλότερης αγωγιμότητας και απότομης διαβάθμισης ηλεκτρικής τάσης (volts), η οποία κινεί τα πολυπεπτίδια του δείγματος και τα εναποθέτει στην επιφάνεια της αναλυτικής πηκτής. Εκεί, το υψηλότερο pH της πηκτής ανάλυσης ευνοεί τον ιονισμό της γλυκίνης και τα ιόντα γλυκίνης που προκύπτουν, μετακινούνται ανάμεσα από τα συσσωρευμένα πλέον πολυπεπτίδια και προχωρούν στην πηκτή ανάλυσης ακριβώς πίσω από τα ιόντα χλωρίου. Τα συμπλέγματα SDS-πολυπεπτιδίων, απελευθερωμένα πλέον από το κινούμενο «μέτωπο» μετακινούνται στην πηκτή ανάλυσης, σε μια ζώνη ενιαίου pH και ηλεκτρικής τάσης και διαχωρίζονται μέσα στους μικρότερους πόρους της πηκτής ανάλυσης ανάλογα με το μοριακό τους βάρος.

Η πηκτή πολυακρυλαμίδης αποτελείται από αλυσίδες πολυμερισμένης ακρυλαμίδης, οι οποίες διασταυρώνονται μέσω της δις-ακρυλαμίδης (N,N'-methylenebisacrylamide) και έτσι σχηματίζονται οι πόροι της πηκτής. Το μέγεθος των πόρων μειώνεται όσο η αναλογία δις-ακρυλαμίδης : ακρυλαμίδη αυξάνεται. Στη συγκεκριμένη εργασία η μοριακή αναλογία που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1:29, η οποία όπως έχει δειχθεί εμπειρικά, είναι ικανή να διαχωρίσει πολυπεπτίδια που διαφέρουν σε μέγεθος κατά 3% (Maniatis et al, 1989).

Προετοιμάζοντας το gel:

- Προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητική ανάλυση των πολυπεπτιδίων στην πηκτή απαιτείται σχολαστική καθαριότητα
- Τα τζάμια σαπουνίζονται, ξεπλένονται, ψεκάζονται με αιθανόλη και αφήνονται να στεγνώσουν
- Ενώνονται τα τζάμια και τοποθετούνται στην υποδοχή της συσκευής
- Το σύμπλεγμα αυτό δεσμεύεται στη βάση που παρέχεται, με ένα κομμάτι parafilm στον πάτο
- Τοποθετείται η χτένα και υπολογίζεται περίπου 1.0cm κάτω από τη χτένα. Το σημείο αυτό αποτελεί το όριο του main gel

- Παρασκευάζεται το main gel σε ένα ποτήρι ζέσεως και ρίχνεται μέχρι το σημείο που υπολογίστηκε. Προστίθεται στη συνέχεια dH₂O μέχρι να καλυφθεί η επιφάνεια του gel (χρειάζονται αναερόβιες συνθήκες για να πραγματοποιηθεί ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης)
- Αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου να σταθεροποιηθεί το gel για 45min περίπου. Θα εμφανιστεί η διαχωριστική γραμμή μεταξύ πηκτής και νερού
- Παρασκευάζεται το stacking gel και ρίχνεται πάνω από το main, αφού πρώτα απομακρυνθεί το νερό. Στη συνέχεια τοποθετείται η χτένα από τη μια άκρη προς την άλλη, προσεκτικά, χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες στα πηγαδάκια
- Αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20min περίπου μέχρι να σταθεροποιηθεί και το stacking gel
- Απομακρύνεται προσεκτικά η χτένα
- Παρασκευάζεται το Buffer σε συγκέντρωση 1X
- Ξεπλένονται με buffer οι θέσεις που δημιουργήθηκαν από τη χτένα για να απομακρυνθεί η τυχόν μη πολυμερισμένη ακρυλαμίδα

Διαλύματα παρασκευής πηκτής

- **30% ακρυλαμίδα** : 29% (w/v) ακρυλαμίδα (BHD, BIORAD, Cat.No : 161-0156), 1% (w/v) δις-ακρυλαμίδα σε ddH₂O
- **Ammonium Persulfate (APS) (10% w/v)** : 1g ammonium persulfate σε 10ml H₂O
- **TEMED** : Διατίθεται από τη MERCK (Cat.No : 110732)

MAIN GEL 12%

ddH ₂ O	1.6ml
Acrylamide 30%	2.0ml
1.5M Tris-HCl pH8.8	1.3ml
10% SDS	0.05ml
10% APS	0.05ml

STACKING GEL

ddH ₂ O	1.4ml
Acrylamide 30%	0.33ml
1M Tris-HCl pH6.8	0.25ml
10% SDS	0.02ml
10% APS	0.02ml

TEMED 0.002ml TEMED 0.002ml

(Ποσότητες για 5ml main gel και 2ml stacking)

Ηλεκτροφόρηση :

- Προστίθεται κατάλληλος όγκος loading buffer στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν
- Θερμαίνονται τα δείγματα στους 95°C για 5min
- Τοποθετείται προσεκτικά το gel στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται το buffer
- Τα δείγματα φορτώνονται προσεκτικά στις ειδικές θέσεις της πηκτής και λαμβάνει χώρα η ηλεκτροφόρηση σε σταθερή τάση 100-130V για 1 ½ ώρα περίπου
- Όταν η χρωστική φτάσει στο κατώτατο σημείο της πηκτής και πριν βγει από αυτό διακόπτεται η παροχή ρεύματος

Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών

- **5x Buffer ηλεκτροφόρησης :** 15.1 gr Tris, 94 gr glycine (electrophoresis grade), 25 ml 20% SDS (electrophoresis grade) για 1 λίτρο. Το pH του διαλύματος είναι 8.2
- **3x SDS loading buffer :** 150mM Tris-HCl pH6.8, 6% SDS (Electrophoresis grade), 30% glycerol, 300mM Dithiothreitol, 0.3% bromophenol blue

2.6.2 Χρώση πηκτής SDS-πολυακρυλαμίδης

Οι δύο πιο συνηθισμένοι τρόποι χρώσης των πηκτών SDS-πολυακρυλαμίδης είναι α) η Coomassie Brilliant Blue η οποία επιτρέπει ανίχνευση 100ng πρωτεϊνών και β) η χρώση με άλατα αργύρου, η οποία επιτρέπει την ανίχνευση 5ng πρωτεϊνών.

Χρώση με Coomassie Brilliant Blue:

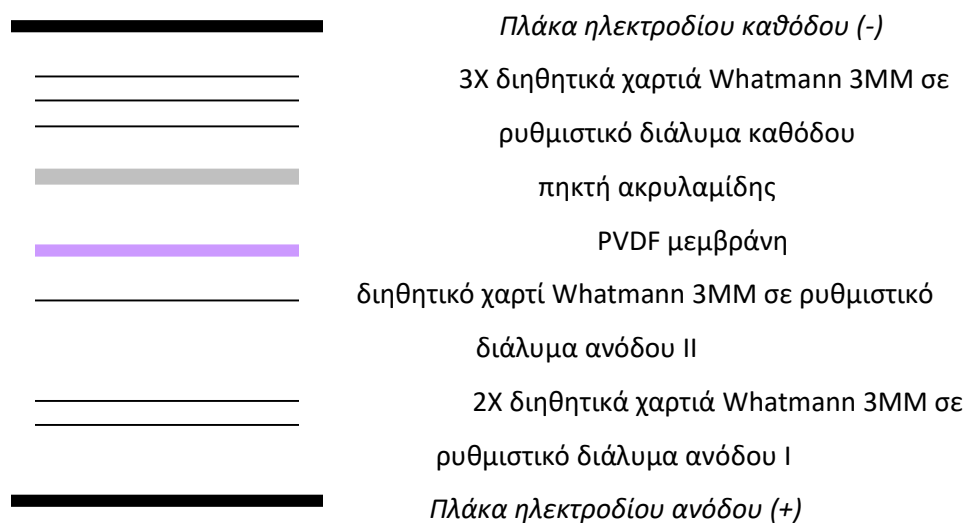
- Η πηκτή τοποθετείται σε διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G250 (SERVA, Cat.No : 17525.01) όπου παραμένει με συνεχή ελαφριά ανάδευση για 10-15 min

- Αφαιρείται το διάλυμα της χρωστικής και η πηκτή εμβαπτίζεται στο διάλυμα αποχρωματισμού (destaining), όπου σκοπό έχει να απομακρύνει τη χρωστική που υπάρχει στην υπόλοιπη πηκτή και να μείνουν βαμμένες μόνο οι πρωτεΐνες
 - Η πηκτή παραμένει στο διάλυμα αποχρωματισμού για 1h τουλάχιστον, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό συνεχή ελαφριά ανάδευση και τακτικές αλλαγές του διαλύματος. Όσο περισσότερο παραμένει η πηκτή στο διάλυμα αποχρωματισμού τόσο μικρότερη ποσότητα πρωτεΐνης μπορεί να ανιχνευτεί (24h στο διάλυμα αποχρωματισμού (destaining) κάνει ορατές ζώνες πρωτεϊνών 100ng)
- **Διάλυμα χρωστικής Coomassie** : 0.25gr Coomassie Brilliant Blue R250 σε 50ml methanol, 10ml acetic acid, 40ml ddH₂O
 - **Destaining** : 30% methanol, 10% acetic acid, 60% dH₂O

2.6.3 Μεταφορά πρωτεϊνών σε σταθερό υπόστρωμα

Με τον όρο μεταφορά εννοούμε την ακινητοποίηση των πρωτεϊνών σε στερεό υπόστρωμα, το οποίο συνήθως είναι μεμβράνες είτε πλαστικές είτε νιτροκυτταρίνης (Εικόνα 2.1). Οι ακινητοποιημένες πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται στη συνέχεια ως «στόχοι» με τη χρήση κατάλληλων κατά περίπτωση ανιχνευτών.

Μεταφορά πρωτεϊνών κατά Western, από πηκτή ακρυλαμίδης σε PVDF μεμβράνη.



Εικόνα 2.1 : Σχηματική απεικόνιση της συναρμολόγησης των επιμέρους συστατικών του «σάντουιτς» στη συσκευή μεταφοράς, για τη μεταφορά πρωτεϊνών κατά Western.

Διαδικασία :

- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή ακρυλαμίδης εξάγεται προσεκτικά από τα τζάμια και τοποθετείται για 15min στο διάλυμα καθόδου, με συνεχή χαλαρή ανάδευση
- Κόβονται τα διηθητικά χαρτιά στις διαστάσεις της πηκτής και εμβαπτίζονται στα ανάλογα διαλύματα (σύμφωνα με την εικόνα της συναρμολόγησης), με συνεχή ελαφριά ανάδευση
- Κόβεται ένα κομμάτι μεμβράνης στις διαστάσεις της πηκτής και εμβαπτίζεται σε μεθανόλη 100% για 15sec
- Ξεπλένεται η μεμβράνη με διπλά απιονισμένο νερό για 2min
- Εμβαπτίζεται η μεμβράνη στο διάλυμα ανόδου II για 10min, με συνεχή ελαφριά ανάδευση
- Στη συνέχεια συναρμολογούνται τα επιμέρους συστατικά για τη μεταφορά, σύμφωνα με την εικόνα και λαμβάνει χώρα η μεταφορά για 20 min σε σταθερή τάση 15V. [Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Trans-Blot Semi-Dry, Cat.No : 170-3940 της BIORAD].
- Μετά το τέλος της μεταφοράς, η μεμβράνη εξάγεται από το «σάντουιτς» και ξεπλένεται σε TBST

Διαλύματα Western

- **1X TBS (Tris-Buffered Saline)** : 10mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl
- **TBST** : 1X TBS, 0.05% Tween 20%
- **Anode I Buffer** : 0.3M Tris-Hcl pH 10.4, 10-20% methanol
- **Anode II Buffer** : 25mM Tris-Hcl pH 10.4, 10-20% methanol
- **Cathode Buffer** : 25mM Tris-Hcl pH 9.4, 40mM glycine, 10-20% methanol

2.6.4 Ανοσοανίχνευση πολυπεπτιδίου - στόχου

- Η μεμβράνη στην οποία είναι ακινητοποιημένες οι πρωτεΐνες βρίσκεται σε TBST
- Αφού εξαχθεί από το TBST καλύπτεται με blocking solution για 1 τουλάχιστον ώρα

- Απομάκρυνση του διαλύματος, ξέπλυμα σε TBST και προσθήκη πρωτογενούς αντισώματος διαλυμένο σε blocking solution, στην κατάλληλη αραιώση (κυμαίνεται από 1: 700 έως 1: 10.000), για τουλάχιστον 1 ώρα
- Απομακρύνση του πρωτογενούς αντισώματος (μπορεί να αποθηκευτεί στους -20°C και να ξαναχρησιμοποιηθεί)
- Η μεμβράνη ξεπλένεται με TBST για 3 x 10 min
- Προστίθεται το διάλυμα του δευτερογενούς αντισώματος (blocking solution + δευτερογενές αντίσωμα) και αφήνεται για 1 τουλάχιστον ώρα. Το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα είναι το : goat-antirabbit IgG-HRP (sc-2004) HRP conjugated (Santa Cruz Biotechnology, INC).
- Απομακρύνεται το διάλυμα του δευτερογενούς αντισώματος (μπορεί να αποθηκευτεί στους -20°C και να ξαναχρησιμοποιηθεί)
- Η μεμβράνη ξεπλένεται με TBST για 3 x 10 min
- Ακολουθεί η διαδικασία ανίχνευσης του σήματος.
- **Blocking solution** : TBST, 5% γάλα σε σκόνη

2.6.5 Ανίχνευση σήματος

Διαδικασία σύμφωνα με το πρωτόκολλο ανίχνευσης χημειο-φωτοβολίας της Santa Cruz Biotechnology:

- Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBST για 10 min
- Αναμινύονται ίσες ποσότητες από τα διαλύματα A και B του Luminol Reagent (Western blotting luminal reagent, sc-2048, Santa Cruz biotechnology,INC). Χρησιμοποιείται τελικός όγκος 0.125ml/cm² μεμβράνης (περίπου 2ml ανά μεμβράνη)
- Απομακρύνεται το TBST και προστίθεται Luminol reagent στην πρωτεϊνική πλευρά της μεμβράνης. Επώζεται για 1min σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομακρύνεται η περίσσεια του διαλύματος (σηκώνοντας τη μεμβράνη με λαβίδα)
- Ερμητικά τυλιγεται η μεμβράνη, με την πρωτεϊνική πλευρά προς τα πάνω, μέσα σε πλαστική μεμβράνη (plastic wrap) με προσοχή ώστε να μη σχηματιστούν φυσαλίδες ή ρυτίδες.
- Τοποθετείται η τυλιγμένη μεμβράνη, με την πρωτεϊνική πλευρά προς τα πάνω, στο χαρτί υποστήριξης και τοποθετείται στην κασέτα εμφάνισης φιλμ.

- Σε σκοτεινό θάλαμο, εκτίθεται η μεμβράνη για 2-10min στο φιλμ και στη συνέχεια εμφανίζεται το φιλμ σύμφωνα με πρότυπα πρωτόκολλα εμφάνισης φιλμ (developer – water : stopper – fixer solution) . Ο χρόνος έκθεσης μπορεί να αυξηθεί εάν είναι απαραίτητο.

2.7 Gene Ontology Analysis

2.7.1 PANTHER

Το σύστημα ταξινόμησης PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) σχεδιάστηκε για να ταξινομεί τις πρωτεΐνες (και τα γονίδιά τους) προκειμένου να διευκολύνει την ανάλυση υψηλής απόδοσης. Οι πρωτεΐνες έχουν ταξινομηθεί σύμφωνα με:

- Οικογένεια και υποοικογένεια: Οι οικογένειες είναι ομάδες εξελικτικά συγγενών πρωτεϊνών. Οι υποοικογένειες είναι σχετικές πρωτεΐνες που έχουν επίσης την ίδια λειτουργία
- Μοριακή λειτουργία: η λειτουργία της πρωτεΐνης από μόνη της ή με άμεσα αλληλεπιδρώντες πρωτεΐνες σε βιοχημικό επίπεδο, π.χ. Μια πρωτεϊνική κινάση
- Βιολογική διαδικασία: η λειτουργία της πρωτεΐνης στο πλαίσιο ενός μεγαλύτερου δικτύου πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν για την επίτευξη μιας διαδικασίας στο επίπεδο του κυττάρου ή του οργανισμού, π.χ. μίτωση.
- Οδός: παρόμοια με τη βιολογική διαδικασία, αλλά μια οδός επίσης καθορίζει ρητά τις σχέσεις μεταξύ των αλληλεπιδρώντων μορίων.
- Οι ταξινομήσεις PANTHER είναι το αποτέλεσμα της ανθρώπινης επιμέλειας καθώς και περίπλοκων αλγορίθμων βιοπληροφορικής.

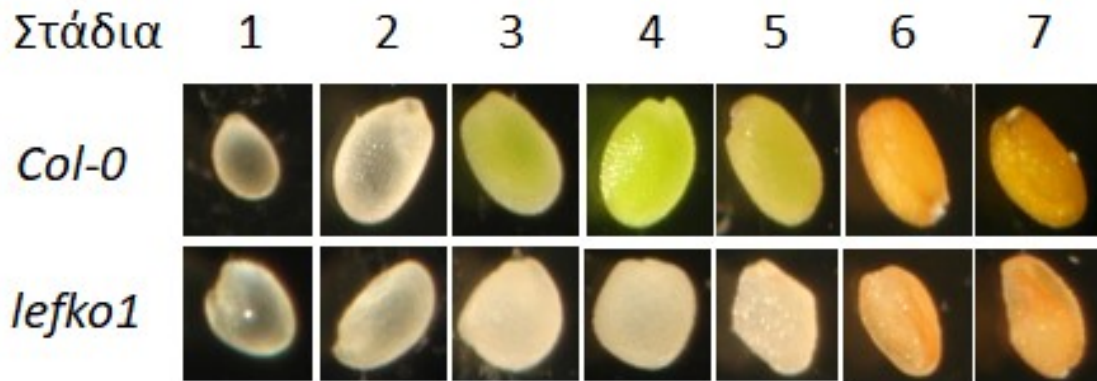
2.7.2 Gorilla

Το GOrilla είναι μια διαδικτυακή εφαρμογή που προσδιορίζει τους εμπλουτισμένους όρους GO σε καταταγμένες λίστες γονιδίων, χωρίς να απαιτείται από τον χρήστη να παρέχει σαφή σύνολα στόχων και φόντου. Το GOrilla χρησιμοποιεί μια ευέλικτη στατιστική προσέγγιση κατώτατου ορίου για να ανακαλύψει τους όρους GO που εμπλουτίζονται σημαντικά στην κορυφή μιας κατάταξης γονιδίων. Βασισμένη σε έναν πλήρη θεωρητικό χαρακτηρισμό της υποκείμενης κατανομής, που ονομάζεται mHG, η GOrilla υπολογίζει μια ακριβή τιμή P για τον παρατηρούμενο εμπλουτισμό λαμβάνοντας υπόψη τις πολλαπλές δοκιμές κατωφλίου χωρίς να χρειάζονται προσομοιώσεις. Αυτό επιτρέπει την αυστηρή στατιστική ανάλυση χιλιάδων γονιδίων και χιλιάδων όρων GO σε δευτερολέπτων. Το

αποτέλεσμα της ανάλυσης εμπλουτισμού παρουσιάζεται με μια ιεραρχική δομή, παρέχοντας μια σαφή εικόνα των σχέσεων μεταξύ των εμπλουτισμένων όρων GO.

3. Αποτελέσματα

3.1 Ο φαινότυπος του *lefko1* στην ανάπτυξη του σπέρματος



Εικόνα 3.1 Φαινότυποι εμβρύων των τύπων *Col-0*, *lefko1* και *lefko2* σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια.

Σειρά 1: Εμβρυα αγρίου τύπου *Col-0*, Σειρά 2: Εμβρυα της μετάλλαξης *lefko1*

Στην πρώτη σειρά φαίνονται τα σπέρματα από τον άγριο τύπο του φυτού *Col-0* από το ανώριμο μέχρι το ώριμο στάδιο τους. Ξεκινάνε από μικρό μέγεθος με λευκό χρώμα, στη συνέχεια μεγαλώνουν σε μέγεθος και αποκτούν χρώμα πράσινο και τέλος στο ώριμο στάδιο γίνονται τα οποία είναι ομοζωγτά ως προς την ένθεση T-DNA στο γονίδιο *LEFKO1* στα αντίστοιχα στάδια με αυτά του *Col-0*. Ενώ στα πρώτα στάδια του σπέρματος δεν παρατηρούνται διαφορές, βλέπουμε ότι τα σπέρματα τύπου *lefko1* αδυνατούν να αποκτήσουν πράσινο χρώμα, παραμένουν μικρότερα σε μέγεθος και τέλος στο ώριμο στάδιο διαμορφώνουν ένα παραμορφωμένο σχήμα διαφορετικό και συρρικνωμένο από αυτό του άγριου τύπου. Αυτά τα συρρικνωμένα σπέρματα δεν βλαστάνουν και είναι θνησιγόνα.

Συλλέχθηκε ιστός από το στάδιο 3 το οποίο αντιπροσωπεύει το στάδιο του heart-stage στο οποίο αναστέλλεται η ανάπτυξη του μεταλλάγματος. Από το στάδιο 3 συλλέχθηκε και ιστός από το *Col-0* για να χρησιμοποιηθεί στα πειράματα ελέγχου (control).

3.2 RNA Sequencing και παρατήρηση δεδομένων


Διεξήχθη RNA sequencing στο ολικό RNA των φυτών τύπου *Col-0* και *lefko1*. Τα αποτελέσματα έδειξαν μεγάλες αλλαγές στην έκφραση πολλών γονιδίων. 4196 γονίδια είχαν υψηλότερη έκφραση από


το Col-0 με \log_2 ratio (RPKM lefko/ RPKM Col-0) (**R**eads **P**er **K**ilobase **M**illion) να είναι μεγαλύτερο του >1. Στη συνέχεια στα γονίδια αυτά εφαρμόστηκε enrichment GO analysis με βάση τη βιολογική διαδικασία που αφορούν από 2 βάσεις δεδομένων (GORilla και PANTHER).

Displaying only results with P<0.05; [click here to display all results](#)

	Arabidopsis thaliana (REF)	upload_1 (▼_Hierarchy_ NEW! ?)				
GO biological process complete	#	#	expected	Fold Enrichment	+/-	P value
lipid storage	15	12	2.28	5.26	+	1.10E-02
↳ biological regulation	4251	788	646.45	1.22	+	4.33E-06
response to wounding	179	53	27.22	1.95	+	1.56E-02
↳ response to stimulus	4604	834	700.13	1.19	+	6.86E-05
secondary metabolite biosynthetic process	241	71	36.65	1.94	+	6.00E-04
↳ secondary metabolic process	374	109	56.87	1.92	+	8.46E-07
response to water deprivation	232	65	35.28	1.84	+	9.21E-03
↳ response to water	240	67	36.50	1.84	+	7.43E-03
↳ response to acid chemical	882	221	134.13	1.65	+	3.50E-09
↳ response to chemical	2091	426	317.98	1.34	+	2.13E-06
↳ response to abiotic stimulus	1492	290	226.89	1.28	+	4.11E-02
↳ response to oxygen-containing compound	1139	264	173.21	1.52	+	6.73E-08
response to abscisic acid	406	104	61.74	1.68	+	1.02E-03
↳ response to alcohol	410	104	62.35	1.67	+	1.57E-03
↳ response to organic substance	1466	299	222.93	1.34	+	7.25E-04
↳ response to hormone	1202	250	182.79	1.37	+	1.69E-03
↳ response to endogenous stimulus	1209	251	183.85	1.37	+	1.83E-03
↳ response to lipid	559	139	85.01	1.64	+	7.39E-05

Εικόνα 3.2 Αποτελέσματα της αναζήτησης όλων των γονιδίων που υπερεκφράζονται στο Panther Gene Ontology. Ενδεικτικά η πρώτη κατηγορία είναι τα γονίδια που σχετίζονται με Lipid Storage με Fold Enrichment 5.26 και P-value 1.10E-02


GENEONTOLOGY
 Unifying Biology


PANTHER
 Classification System

[LOGIN](#) [REGISTER](#) [CONTACT US](#)

[Home](#) [About](#) [PANTHER Data](#) [PANTHER Tools](#) [Workspace](#) [Downloads](#) [Help/Tutorial](#)

PANTHER™ Version 12.0 (released 2017-07-10). [View release notes here.](#)

PANTHER GENE LIST [Customize Gene list](#)

Convert List to: Send list to:

Display: items per page [Refine Search](#)

Hits 1-12 of 12 [page: (1)] Number of mapped ids found 12

<input type="button" value="clr"/>	<input type="button" value="all"/>	Gene ID	Mapped IDs	Gene Name Gene Symbol Ortholog	PANTHER Family/Subfamily	<input checked="" type="checkbox"/> PANTHER Protein Class	<input checked="" type="checkbox"/> Species
<input type="checkbox"/>		1. ARATH TAIR=AT3G01570 UniProtKB=Q9SS98	AT3G01570	Oleosin 5 At3g01570 ortholog	Oleosin 20.3 kDa-related (PTHR33203:SF16)	-	Arabidopsis thaliana
<input type="checkbox"/>		2. ARATH TAIR=AT3G27660 UniProtKB=Q42431	AT3G27660	Oleosin 20.3 kDa OL2 ortholog	Oleosin 20.3 kDa-related (PTHR33203:SF16)	-	Arabidopsis thaliana
<input type="checkbox"/>		3. ARATH TAIR=AT5G40420 UniProtKB=Q39165	AT5G40420	Oleosin 21.2 kDa At5g40420 ortholog	Oleosin 20.3 kDa-related (PTHR33203:SF16)	-	Arabidopsis thaliana
<input type="checkbox"/>		4. ARATH TAIR=AT5G61610 UniProtKB=F4K3K4	AT5G61610	Oleosin At5g61610 ortholog	Glycine-rich protein-related (PTHR33203:SF7)	-	Arabidopsis thaliana
<input type="checkbox"/>		5. ARATH TAIR=AT4G25140 UniProtKB=P29525	AT4G25140	Oleosin 18.5 kDa At4g25140 ortholog	Glycine-rich protein-related (PTHR33203:SF7)	-	Arabidopsis thaliana
<input type="checkbox"/>		6. ARATH TAIR=AT2G25890 UniProtKB=Q494N8	AT2G25890	Oleosin At2g25890 ortholog	Oleosin (PTHR33203:SF3)	-	Arabidopsis thaliana
<input type="checkbox"/>		7. ARATH TAIR=AT5G56100 UniProtKB=Q9FKT7	AT5G56100	Glycine-rich protein / - oleosin At5g56100 ortholog	-	-	Arabidopsis thaliana
<input type="checkbox"/>		8. ARATH TAIR=AT2G18250 UniProtKB=Q9ZPV8	AT2G18250	Phosphopantetheine adenyltransferase COAD ortholog	Phosphopantetheine adenyltransferase (PTHR44996:SF2)	-	Arabidopsis thaliana
<input type="checkbox"/>		9. ARATH TAIR=AT3G18570 UniProtKB=Q9LII2	AT3G18570	Oleosin family protein At3g18570 ortholog	F27J15.22-related (PTHR33203:SF4)	-	Arabidopsis thaliana
<input type="checkbox"/>		10. ARATH TAIR=AT1G48990 UniProtKB=Q9M9A1	AT1G48990	F27J15.22 At1g48990 ortholog	F27J15.22-related (PTHR33203:SF4)	-	Arabidopsis thaliana
<input type="checkbox"/>		11. ARATH TAIR=AT5G07530 UniProtKB=Q9LY09	AT5G07530	Oleosin GRP-17 GRP17 ortholog	Glycine-rich protein-related (PTHR33203:SF7)	-	Arabidopsis thaliana
<input type="checkbox"/>		12. ARATH TAIR=AT5G51210 UniProtKB=Q43284	AT5G51210	Oleosin 14.9 kDa OL3 ortholog	Glycine-rich protein-related (PTHR33203:SF7)	-	Arabidopsis thaliana

Εικόνα 3.3 Αναλυτικά τα γονίδια που σχετίζονται με Lipid Storage από το Panther Gene Ontology.

GO term	Description	P-value	FDR q-value	Enrichment (N, B, n, b)	
GO:0009790	embryo development	1.81E-6	3.11E-3	3.49 (2476,21,540,16)	[-] Hide genes AT2G42560 - late embryogenesis abundant domain-conna AT4G16600 - late embryogenesis abundant (lea) protein AT1G52890 - late embryogenesis abundant protein (lea) f AT1G71100 - late embryogenesis abundant domain-conna AT4G01360 - bypass-1-related protein AT4G21100 - late embryogenesis abundant protein (lea) f AT2G18340 - late embryogenesis abundant domain-conna AT2G58320 - late embryogenesis abundant protein (lea) f AT3G48740 - bidirectional sugar transporter svswt1 AT3G24900 - seed maturation protein AT3G17320 - late embryogenesis abundant protein (lea) f AT3G25260 - late embryogenesis abundant protein, group AT3G53940 - putative late embryogenesis abundant prote AT2G44310 - late embryogenesis abundant protein family AT1G05510 - hypothetical protein AT3G15870 - late embryogenesis abundant protein (lea) f
GO:0009793	embryo development ending in seed dormancy	1.81E-6	1.55E-3	3.49 (2476,21,540,16)	[-] Hide genes AT2G42560 - late embryogenesis abundant domain-conna AT4G16600 - late embryogenesis abundant (lea) protein AT1G52890 - late embryogenesis abundant protein (lea) f AT1G71100 - late embryogenesis abundant domain-conna AT4G01360 - bypass-1-related protein AT4G21100 - late embryogenesis abundant protein (lea) f AT2G18340 - late embryogenesis abundant domain-conna AT2G58320 - late embryogenesis abundant protein (lea) f AT3G48740 - bidirectional sugar transporter svswt1 AT3G24900 - seed maturation protein AT3G09550 - late embryogenesis abundant protein (lea) f AT3G17320 - late embryogenesis abundant protein (lea) f AT1G52560 - late embryogenesis abundant protein, group AT1G05510 - hypothetical protein AT2G44310 - late embryogenesis abundant protein family AT3G53940 - putative late embryogenesis abundant prote AT3G15870 - late embryogenesis abundant protein (lea) f
GO:0003006	developmental process involved in reproduction	7.06E-5	4.03E-2	1.90 (2476,65,742,37)	[-] Hide genes AT5G02600 - hdel-tailed cytosine endopeptidase cep1 AT4G16600 - late embryogenesis abundant (lea) protein AT4G34600 - hypothetical protein AT1G52890 - late embryogenesis abundant protein (lea) f AT4G12680 - hypothetical protein AT1G71100 - late embryogenesis abundant domain-conna AT4G01360 - bypass-1-related protein AT2G44010 - hypothetical protein AT4G21100 - late embryogenesis abundant protein (lea) f AT3G48350 - zinc manganese superoxide dismutase fami AT1G65530 - hypothetical protein AT1G64110 - p-loop containing nucleoside triphosphate h AT3G48740 - bidirectional sugar transporter svswt1 AT3G24900 - seed maturation protein AT2G16460 - putative adipose-regulatory protein (atrup) AT1G62060 - hypothetical protein AT1G08320 - hsp transcription factor family protein AT3G17320 - late embryogenesis abundant protein (lea) f AT1G62060 - hypothetical protein AT2G42560 - late embryogenesis abundant domain-conna AT1G42080 - hypothetical protein AT5G65350 - zinc efflux family protein AT1G62220 - hypothetical protein AT1G01070 - nodulin ntm21 -samo-like transporter fami AT4G11040 - putative protein phosphatase 2c-24 AT2G18340 - late embryogenesis abundant domain-conna AT1G15330 - cystathionine beta-synthase (cbs) protein AT2G03850 - late embryogenesis abundant protein (lea) f AT5G26720 - hypothetical protein AT1G08390 - 12s seed storage protein cnd AT1G32560 - late embryogenesis abundant protein, group AT4G21050 - def toxic flange protein dof4 AT2G16230 - acyl-[acyl]-carrier-protein] desaturase AT1G05510 - hypothetical protein AT2G44310 - late embryogenesis abundant protein family AT3G53940 - putative late embryogenesis abundant prote AT3G15870 - late embryogenesis abundant protein (lea) f

Εικόνα 3.2 Αποτελέσματα της ανάλυσης των γονιδίων που υπερεκφράζονται στο *lefko1* από το *Gorilla Gene ontology analysis*.

Τα γονίδια που σχετίζονται με ανάπτυξη του εμβρύου αποτελούν τις LEA Proteins με P-value 1.81E-6 και Fold enrichment 3,49.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα παρατηρήσαμε ότι συγκεκριμένες ομάδες γονιδίων είναι πολύ υψηλά εκφραζόμενες. Συγκεκριμένα οι :

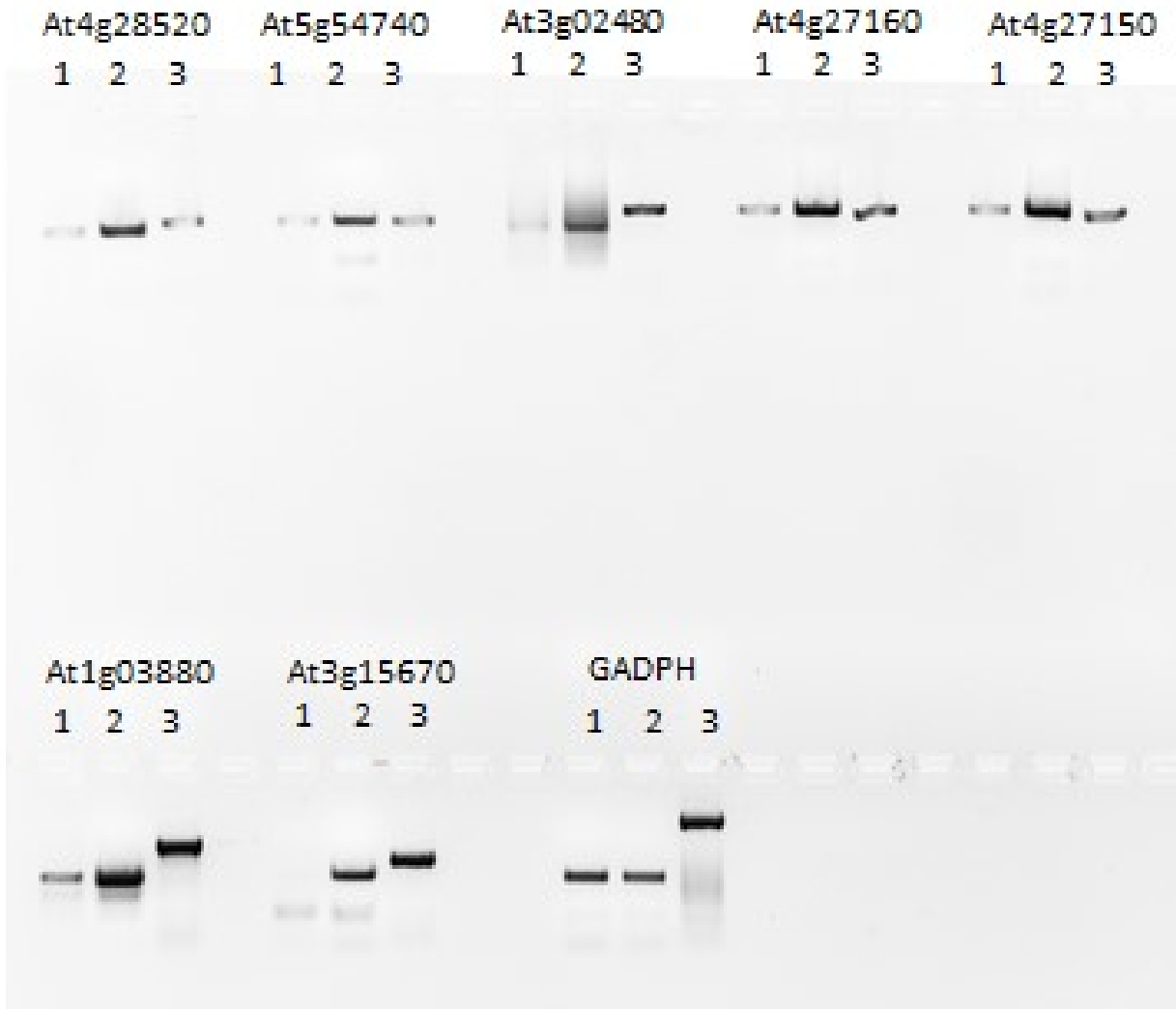
- 1) **Seed Storage Proteins**
- 2) **Oleosins**
- 3) **Late Embryogenesis Abundant Proteins (LEA)**
- 4) **Glycine Rich Proteins**

3.3 Ανάλυση RNA

Προκειμένου να γίνει επαλήθευση των αποτελεσμάτων της ολιστικής προσέγγισης της αλληλούχισης του μεταγραφώματος, επιλέχθηκαν συγκεκριμένα τα παρακάτω γονίδια για να μελετηθεί η έκφραση τους με semi-quantitative RT-PCR

GeneID	Gene Length (bp)	Log2Ratio	Description
At4g27160 (AT2S3, SEED STORAGE ALBUMIN 3, SESA3)	768	8.395602	seed storage albumin 3
At1g03880 (CRB, CRU2, CRUCIFERIN 2, CRUCIFERIN B)	1633	8.414615	Protein is tyrosine-phosphorylated and its phosphorylation state is modulated in response to ABA in Arabidopsis thaliana seeds.
At5g54740 (SEED STORAGE ALBUMIN 5, SESA5)	830	8.789214	seed storage albumin 5
At4g28520 (Cruciferin 3)	1794	8.865595	Encodes a 12S seed storage protein that is tyrosine-phosphorylated and its phosphorylation state is modulated in response to ABA in Arabidopsis thaliana seeds.

At4g27150 (AT2S2, SEED STORAGE ALBUMIN 2, SESA2)	735	8.459495	seed storage albumin 2
At3g02480 (ABA-RESPONSE PROTEIN, ABR)	449	11.65965	Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein
At3g15670 (LATE EMBRYOGENESIS ACCUMULATING 76, LEA76)	1020	11.49754	Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein



Εικόνα 3.2 Μοριακή ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων των επιλεγμένων πρωτεϊνών σε γενετικά υπόβαθρα.

- 1) cDNA φυτών αγρίου τύπου *Col-0* 2) cDNA φυτών μεταλλάγματος *lefko1* 3) Genomic DNA προϊόν αντίδρασης PCR με μήτρα γονιδιωματικό DNA

Για να μελετηθεί το πρότυπο της έκφρασης των παραπάνω γονιδίων στο αναπτυξιακό στάδιο του καρδιοσχήματος απομονώθηκε RNA από φυτά τύπου *Col-0* και *lefko1* στο συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο (stage 3-Εικόνα 3.1).

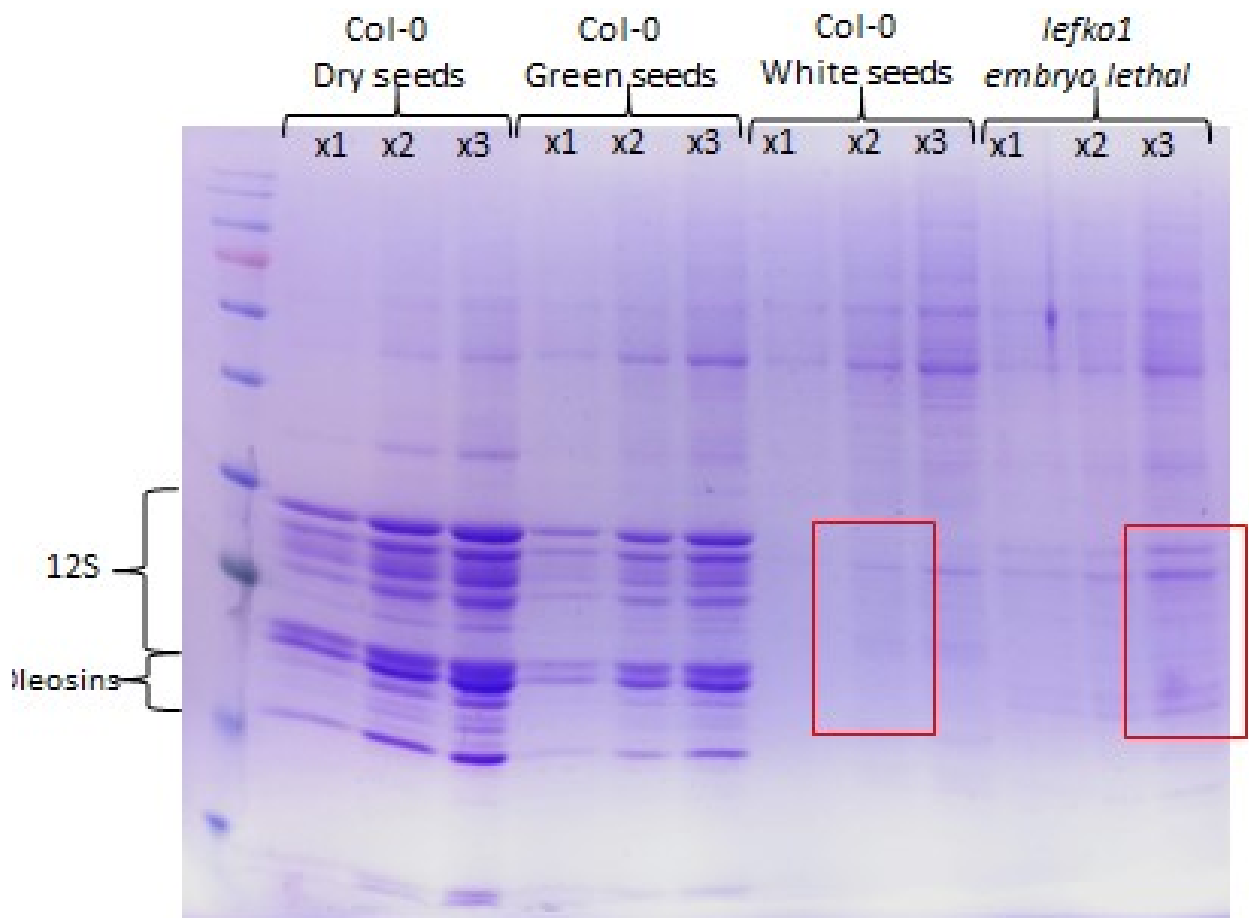
Ως γονίδιο αναφοράς-ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο GAPDH (At3g04120 - με εκκινητές τους 04120F και 04120R) που κωδικοποιεί την αφυδρογονάση της γλυκεριναλδεϋδης-3P που συμμετέχει στο μονοπάτι της γλυκόλυσης και της νεογλυκογένεσης. Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν σε gel αγαρόζης 2,5%.

Το 1-2-3 αντιστοιχεί στον τύπο φυτού που αντιπροσωπεύει το cDNA. Στο 1 έχουμε τον άγριο τύπο *Col-0*, στο 2 το μετάλλαγμα *lefko1* και στο 3 το γονιδιωματικό DNA που χρησιμοποιήθηκε σαν

control. Παρατηρούμε ότι για κάθε γονίδιο που μελετήθηκε επιβεβαιώνεται η ανάλυση του RNA sequencing, δηλαδή η υπερέκφραση των γονιδίων του τύπου *lefko1* έναντι του *Col-0* εφόσον το προϊόν που παίρνουμε είναι πολύ πιο άφθονο στο μετάλλαγμα *lefko1*. (Εικόνα 3.2) Οπότε επιβεβαιώνεται με αυτό το δείγμα των γονιδίων ότι πράγματι η έκφραση των At4g27160, At1g03880, At5g54740, At4g28520, At4g27150, At3g02480 και At3g15670 είναι υψηλότερη στο θνησιγόνο μετάλλαγμα στη φάση της εμβρυογένεσης. Να σημειωθεί πως το προϊόν της αντίδρασης PCR με μήτρα γονιδιωματικό DNA έχει διαφορετικό μέγεθος εξαιτίας του ιντρονίου που βρίσκεται ανάμεσα στους εκκινήτες, το οποίο δεν υπάρχει στα cDNAs.

3.4 Πρωτεομική Ανάλυση

Απομονώθηκε ολική πρωτεΐνη από τα σπέρματα των φυτών *Col-0* και *lefko1* και αναλύθηκε σε πήκτη πολυακρυλαμίδης με Coomassie staining.



Εικόνα 3.5 Μοριακή ανάλυση της έκφρασης των πρωτεϊνών σε 3 αναπτυξιακά στάδια σε γενετικά υπόβαθρα
 Πρωτεΐνες από φυτά τύπου *Col-0* σε συγκεντρώσεις x1, x2 και x3 στα στάδια Dry seeds και Green seeds

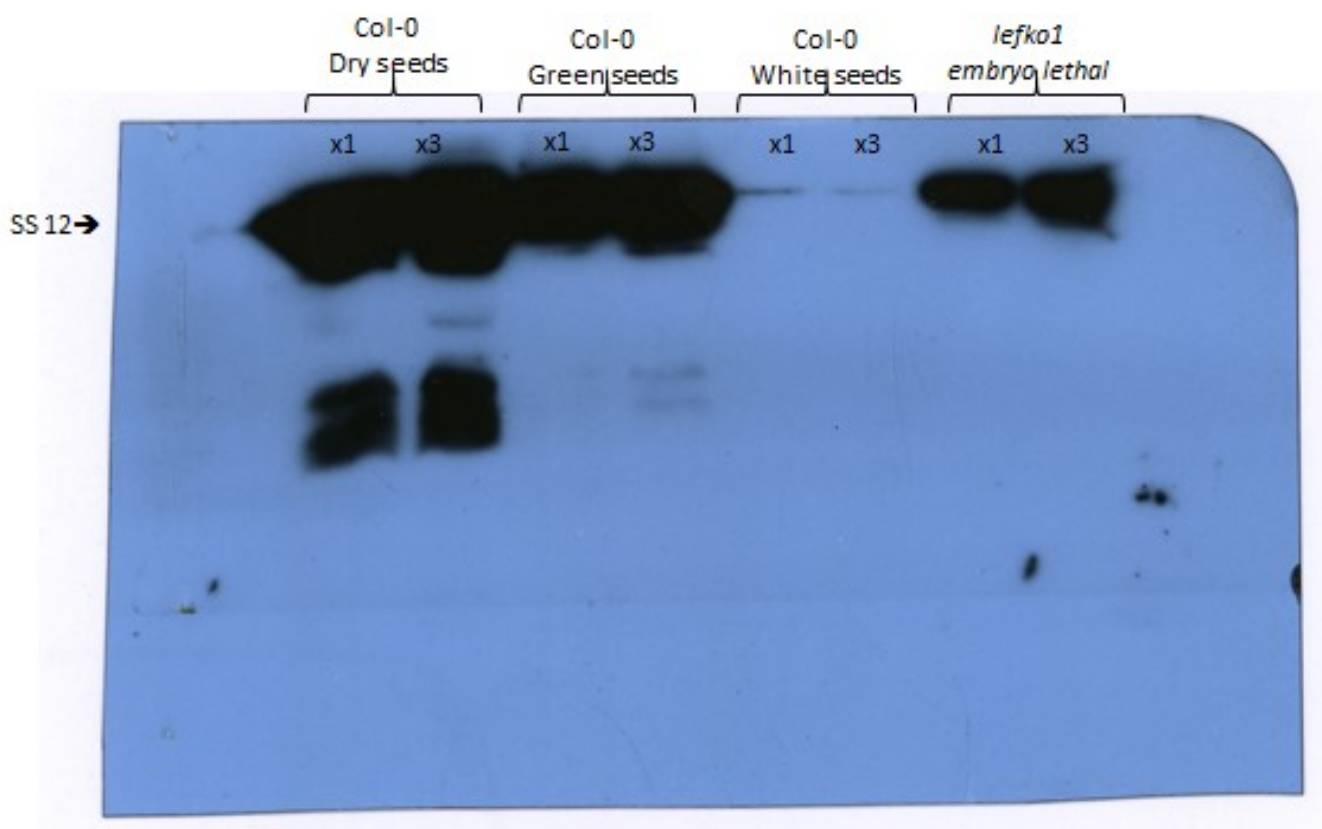
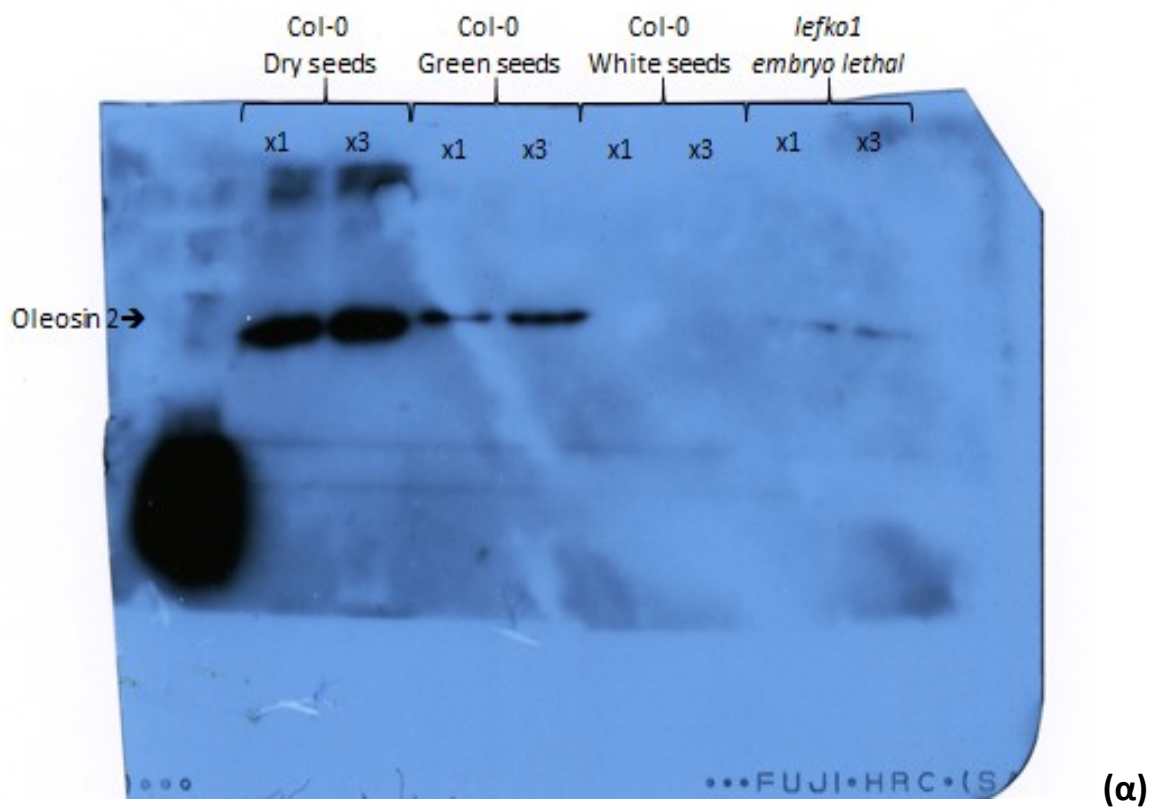
Πρωτεΐνες απο φυτά τύπου *Col-0* και *lefko1* σε συγκεντρώσεις x1 , x2 και x3 στο στάδιο white seeds (καρδιόσχημα). Οι πρωτεΐνες έχουν αναλυθεί σε gradient gel 8,20%.

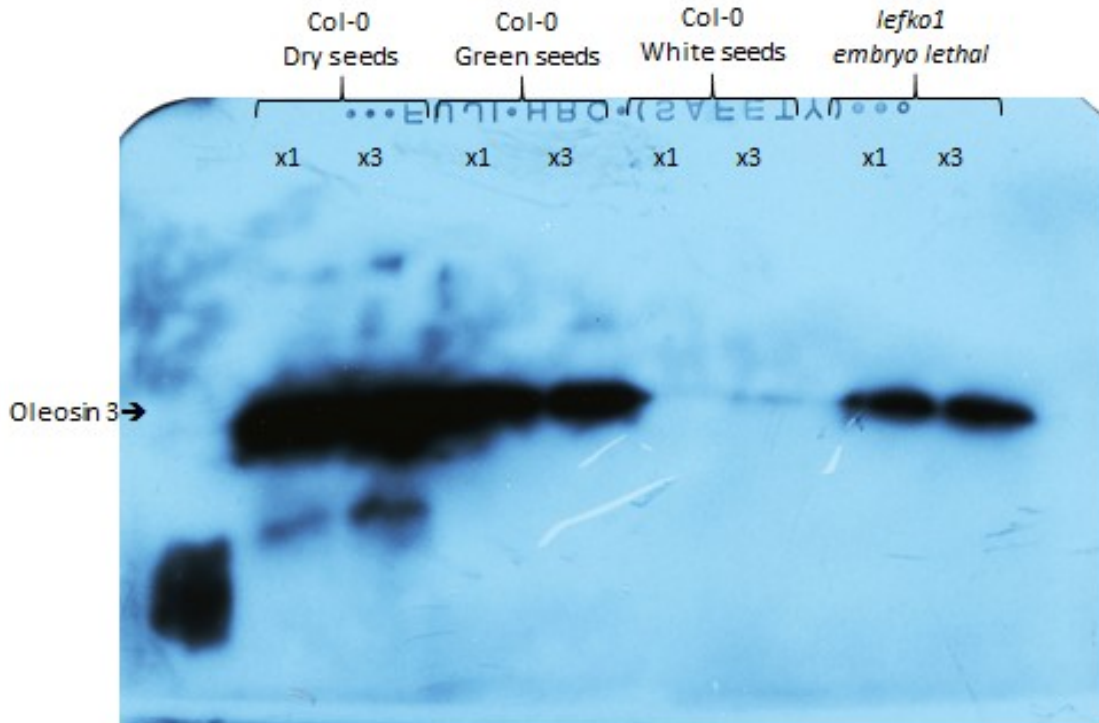
Αναλύσαμε ολική πρωτεΐνη από τον τύπο *Col-0* σε 3 αναπτυξιακά στάδια : Ωριμα (dry-stage-stage 7) , Πράσινα (green –stage number 4) και (white – stage number 2) Λευκά σπέρματα και φορτώσαμε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις για το καθένα όπως φαίνεται στην εικόνα 3.5.

Αρχικά παρατηρούμε στα ώριμα σπέρματα ότι παρουσιάζεται μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης 12S A και 12S B (Seed Storage Protein), όπως και αναμένεται αφού οι SSPs βρίσκονται σε μεγάλη αφθονία στα ξερά σπέρματα. Ομοίως και στο δείγμα απο τα πράσινα έμβρυα παρατηρείται μεγαλύτερη ποσότητα από τις πρωτεΐνες, λιγότερο όμως από τα ώριμα. Τέλος έχουμε τη σύγκριση των δειγμάτων από το ίδιο αναπτυξιακό στάδιο των λευκών σπερμάτων *Col-0* και των *lefko1* όπου φαίνεται ξεκάθαρα η διαφορά στην έκφραση των πρωτεΐνων στις συγκεντρωσεις x2 και x3. Το αναπτυξιακό ισοδύναμο του θνησιγόνου μεταλλάγματος είναι τα λευκα/white seeds stage 2.

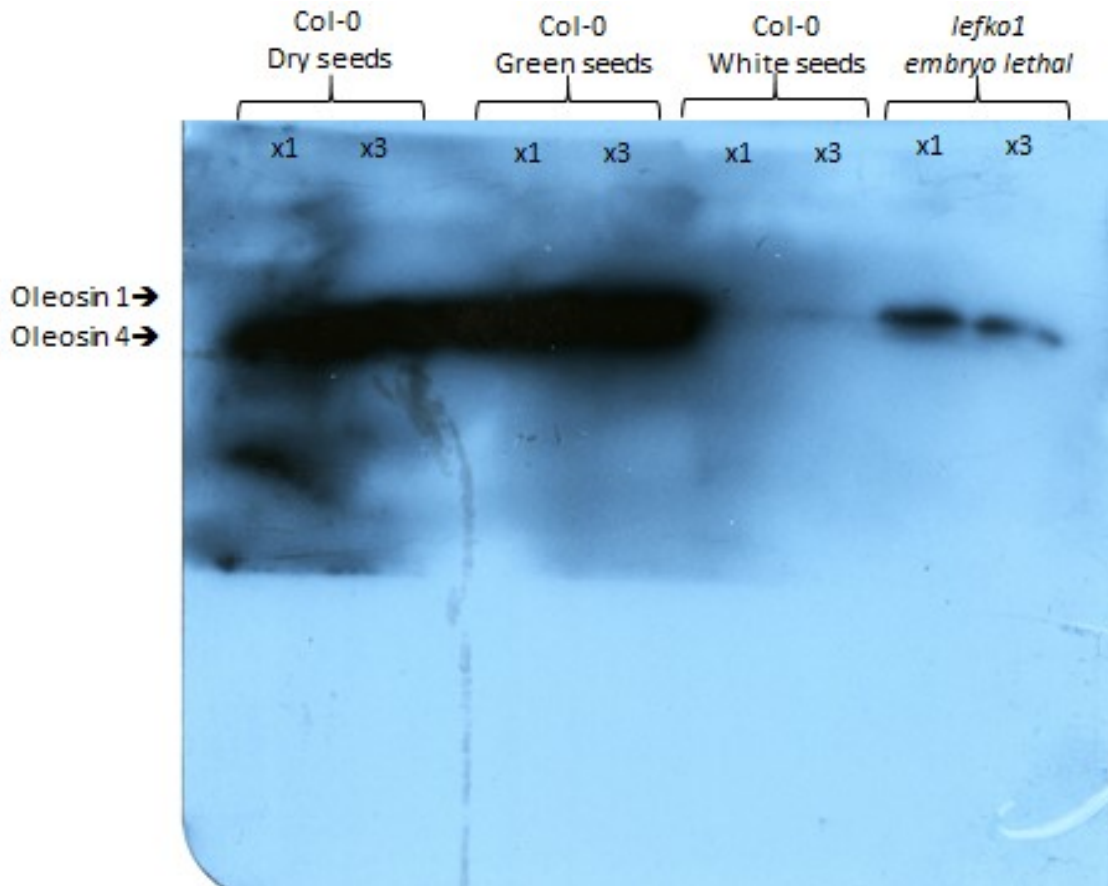
Για συμπληρωματικό έλεγχο για την υπερέκφραση των παραπάνω πρωτεϊνών πραγματοποιήσαμε ανοσοανίχνευση με αντισώματα ειδικά για τις 12s Seed Storage Protein και τις Oleosins 1,2,3 και 4

Η ανοσοανίχνευση κατά Western έδειξε τα παρακάτω αποτελέσματα:





(γ)



(δ)

Εικόνα 3.6 Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοανίχνευση western των μελετούμενων πρωτεϊνών σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια σε γενετικά υπόβαθρα

Και στις 4 εικόνες έχουμε πρωτεΐνες από φυτά τύπου *Col-0* σε συγκεντρώσεις x1 , x2 και x3 στα στάδια Dry seeds και Green seeds και πρωτεΐνες από φυτά τύπου *Col-0* και *lefko1* σε συγκεντρώσεις x1 , x2 και x3 στο στάδιο white seeds (καρδιόσχημα). Α) Αντίσωμα για εντοπισμό Ολεοσίνης 2 Β) Αντίσωμα για εντοπισμό Seed Storage 12 Γ) Αντίσωμα για εντοπισμό Ολεοσίνης 3 Δ) Αντισώματα για εντοπισμό Ολεοσίνης 1 και 4

Αρχικά, από την απομόνωση ολικής φυτικής πρωτεΐνης από τα σπέρματα σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια : Dry seeds , Green seeds και White seeds φυτών *Col-0* και White seeds φυτών *lefko1*. Τα παραπάνω αναπτυξιακά στάδια επιλέχθηκαν προκειμένου να συγκριθούν τα επίπεδα των μελετούμενων πρωτεϊνών στο στάδιο της καρδιάς (White seeds) μεταξύ του mutant και αυτού του αγρίου τύπου. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες από τους παραπάνω ιστούς αναλύθηκαν σε πήκτη SDS – ακρυλαμίδης 12 % και ήρθαν σε ισοποσότητες. Έπειτα μεταφέρθηκαν κατά Western σε μεμβράνη PVDF και έγινε ανοσοανίχνευση με αντισώματα πρωτεϊνών. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για τις πρωτεΐνες 12S (σε αραιώση 1:5000) και Oleosins 1-4 (σε αραιώση 1:4000).

Παρατηρούμε την έντονη έκφραση των Oleosins και των Seed Storage στα δείγματα από τα ώριμα σπέρματα και τα πράσινα. Επιβεβαιώνεται η ανάλυση μας διότι είναι εμφανής πάλι η διαφορά στην έκφραση όλων των ολεοσίνων και της 12S στο στάδιο της καρδιάς στους 2 συγκρινόμενους τύπους *Col-0* και *lefko1-1* όπου στον άγριο τύπο παίρνουμε μηδαμινό σήμα λόγω της ελάχιστης έκφρασης τους ενώ στο mutant παρουσιάζεται έντονο σήμα που αντιστοιχεί στην υπερέκφραση των γονιδίων αυτών. (Εικόνα 3.6)

4. Συζήτηση

4.1 Μεταγραφικοί παράγοντες που ελέγχουν την έκφραση πρωτεϊνών κατά την ωρίμανση του εμβρύου και του σπόρου

Τα ρυθμιστικά cis-στοιχεία που εμπλέκονται στον ενεργοποίηση του προαγωγέα κατά τη διάρκεια της φάσης πλήρωσης σπόρου έχουν ερευνηθεί. Διεξήχθησαν εκτεταμένες αναλύσεις στους προαγωγείς *narinA* από *Brassica napus* και στον *legumin B4* από την *Vicia faba* (Baume et al., 1992, Stacellberg et al. 1996, Ezcurra et al. 1999). Σύγκριση αλληλουχιών των SSP προαγωγών σε συνδυασμό με δοκιμασίες σύνδεσης DNA-πρωτεΐνης, αποκάλυψαν δύο σημαντικές συντηρημένες θέσεις δέσμευσης για κάποιον παράγοντα, το μοτίβο RY / G και το B-box, τα οποία δρουν σε συνέργεια.

Τα RY / G μοτίβα αποτελούνται από δύο στοιχεία RY (CATGCA), που αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες μέσω του τομέα τους B3 (Baumlein et al., 1986, Reidt et al. 2000, Ezcurra et al. 2000) και ένα G-box (CACGTG), που δεσμεύει ένα βασικό zipper (bZIP) ή βασική έλικα- Βρόγχος-έλικα (bHLH) TFs (de Pater et al., 1993, Kawagoe και Mura 1996) και είναι υπεύθυνο για την απόκριση του μοτίβου στο ABA (Chandrasekharan κ.ά., 2003). Το B-box αποτελείται από τα στοιχεία DistB (GCCACTTGTC) και ProxB (CAAACACC) και μεσολαβεί σε ισχυρή απόκριση στο ABA στους σπόρους (Ezcurra et al., 1999). Το B-box αποτελεί μια περιοχή απόκρισης στο ABA (ABRE) (Ezcurra et al., 1999), που τα στοιχεία αλληλεπιδρούν με διάφορους παράγοντες όπως το bZIP ή MYB (Pla et al., 1993, Hobo et al., 1999, Ezcurra et al. 2000). In vitro προσδιορισμοί σύνδεσης έχουν δείξει ότι εξιδείκευση στους σπόρους παρέχεται μέσω της συνδυαστικής αλληλεπίδρασης μεταξύ αυτών των πλαισίων (Ezcurra et al., 1999). Επιπλέον μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε από αυτά τα στοιχεία μειώνουν σημαντικά τη δράση του προαγωγέα (Kawagoe et al., 1994, Ezcurra et al. 1999, Reidt et al. 2000, Chandrasekharan et al. 2003). Με τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση σε 10 διατηρημένα μοτίβα εντός 295 bp του προαγωγέα *phas*, Chandrasekharan et al. (2003) προσδιόρισθηκαν ορισμένα μοτίβα RY που συμβάλλουν στη δραστηριότητα του προαγωγού σε συγκεκριμένες περιοχές του εμβρύου, τη ρίζα ή το υποκοτύλιο.

4.1.1 Πριν από την σύνθεση της πρωτεΐνης αποθήκευσης των σπόρων

Οι Chern et al. (1996α) ταυτοποίησαν ένα bZIP ειδικό για το έμβρυο, τον παράγοντα ROM1, ο οποίος αλληλεπιδρά με το μοτίβο RY-G στο G-Box. Το mRNA του ROM1 υπάρχει κατά την πρώιμη εμβρυογένεση, αλλά ρυθμίζεται αρνητικά στην αρχή της πλήρωσης των σπόρων, πράγμα που

υποδηλώνει τον πιθανό του ρόλο ως καταστολέας για τη μετάφραση του γονιδίου και είναι αποτελεσματικός μέχρι την έκφραση ενός σήματος πλήρωσης σε έμβρυα (Εικόνα 4.1).

4.1.2 Εισαγωγή στην πλήρωση των σπόρων

Για την ταυτοποίηση γονιδίων που εμπλέκονται στην πλήρωση σπόρων, αναλύθηκαν φυτά ελαττωματικά στη συσσώρευση πρωτεϊνών αποθήκευσης, στην απόκτηση ανθεκτικότητας και στην ανοχή αποξήρανσης με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση του ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 (**ABI3**) και FUSCA3 (**FUS3**). Αυτά τα γονίδια, τα οποία ανήκουν στην ομάδα μεταγραφικών παραγόντων με τον τομέα B3 εκφράζονται ειδικά στους σπόρους κατά τη διάρκεια της φάσης της πλήρωσης. Ο ABI3 είναι ορθόλογο του *Zea mays VIVIPAROUS1 (NP1)* (Mc Carty et al, 1991, Giraudat et al., 1992, ParcyEt al. 1994, Bobb et al. 1995), βασικός παράγοντας στον ρύθμιση της πλήρωσης του πυρήνα του αραβοσίτου, η οποία εξαρτάται από το ABA. Το Fus3 προκαλεί συσσώρευση ανθοκυανίνης στο αναπτυσσόμενο έμβρυο (Baumlein et al., 1994, Castle et al.)

Στη συνέχεια παρουσιάστηκε ότι το FUS3 είναι αναγκαίο για τον προσδιορισμό της ταυτότητας της κοτυληδόνας και αποδείχθηκε ότι ρυθμίζει θετικά τα γονίδια για την πλήρωση και αρνητικά τα TRANSPARENT TESTA GLABRA 1 (TTG1), που Προσδιορίζει τα επιδερμικά χαρακτηριστικά του κοτυληδόνου (Tsuchiya Et αϊ. 2004). Τόσο το FUS3 όσο και οι πρωτεΐνες ABI3 είναι σε θέση να αλληλεπιδράσουν με το μοτίβο RY στους προαγωγούς χάρη στους B3 τομείς τους.

Οι (Lara et αϊ. (2003) εντοπίσαν δύο bZIPs, το AtbZIP10 και το AtbZIP25, τα οποία συν-εκφράζονται κατά την πλήρωση των σπόρων με τα SSP του *Arabidopsis*, αλλά εκφράζονται επίσης σε υψηλότερα επίπεδα στους βλαστικούς ιστούς. Αυτά τα bZIP δεσμεύονται στο G-box, και αμφότερα αλληλεπιδρούν με τον τομέα B2 του ABI3. Οι αναλύσεις παροδικής έκφρασης έδειξαν τη συνεργιστική επίδραση αυτών των bZIPs με ABI3 στο γονίδιο SSP (Lara et αϊ., 2003). Έτσι, ενώ το FUS3 δεσμεύεται απευθείας στα μοτίβα RY, το ABI3 μπορεί να χρειαστεί τα συνδυαστική δράση των δύο δεσμών bZIPs που δεσμεύονται στο γειτονικό G-box έτσι ώστε να ενισχύθει η ενεργοποίηση του. Προς στήριξη αυτής υπόθεσης έχει αποδειχθεί ότι ένας παράγοντας bZIP, ο TRAB1, μεσολαβεί στην επαγόμενη από ABA μεταγραφή στο ABREs μέσω αλληλεπίδρασης με τον VP1, έναν παράγοντα τύπου ABI3 του ρυζιού, σε φυτικά κύτταρα (Hobo et αϊ., 1999). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ABRE και των παραγόντων ABI3 έχουν επίσης παρουσιαστεί στο *B. napus* στο DistB μοτίβο του B-Box του προαγωγέα ναπίνης (Ezcurra et αϊ, 2000), υποδηλώνοντας την παρόμοια δράση του με έναν παράγοντα bZIP. Δύο bZIP παράγοντες έχουν προσδιοριστεί κατά τη διάρκεια της φάσης πλήρωσης, **ABI5** και EEL. Το ABI5 εκφράζεται αργά στη φάση πλήρωσης και είναι σε θέση να δεσμευτεί στο μοτίβο ABRE

ενεργοποιώντας την ABA-μεσολαβούμενη μεταγραφή (Nakamura et al., 2001). Αλληλεπιδρά φυσικά με το ABI3 (Nakamura et al., 2001). Το EEL εκφράζεται στα μέσα της φάσης πλήρωσης και ρυθμίζει την ενεργοποίηση με τη μεσολάβηση του ABI5, διότι το ανταγωνίζεται για τις ίδιες θέσεις δέσμησης και το καταστέλλει (Bensmihen et al., 2002).

Τα μεταλλαγμένα *Arabidopsis Leafy cotyledon 1 (lec1)* και *Leafy cotyledon 2(lec2)* κωδικοποιούν περαιτέρω TFs που απαιτούνται για τον προσδιορισμό της ταυτότητας της κοτυλιδόνας καθ' όλη τη γέμιση των σπόρων και για την ολοκλήρωση της φάσης ωρίμανσης. Το LEC1 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με ομοία αλληλουχία με την υπομονάδα HAP3 των παραγόντων σύνδεσης CCAAT (CBF ή NF-Y Παραγόντων · Edwards et al. 1998, Maity και De Crombrughe 1998).

Η έκτοπη έκφραση του **LEC1** προκαλεί έκφραση των **FUS3**, **ABI3** και **LEC2**, που υποδηλώνουν μια ιεραρχική βάση ρύθμισης των γονιδίων (Kagaya et al., 2005a). Το **LEC2** είναι μέλος της οικογένειας TF που περιέχει την τομέα B3, στενά συνδεδεμένο με τα FUS3 και ABI3. Μπορεί επίσης να τα ενεργοποιήσει και να δεσμευτεί άμεσα στα μοτίβα RY για να ενεργοποιήσει τα SSP γονίδια (Kroj et al., 2003, Moinke et al. 2004, Braybrook et al. 2006). Επιπλέον, τα γονίδια **LEC1** και **LEC2** ρυθμίζουν θετικά τους εαυτούς τους και το ένα το άλλο, σχηματίζοντας ένα ρυθμιστικό ανατροφοδοτικό στοιχείο που είναι απαραίτητο για την υποστήριξή τους και την έκφραση τους σε συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου (To et al., 2006)(Εικόνα 4.1).

Στο μετάλλαγμα *lefko1* η ανάλυση της αλληλουχίας του μεταγραφώματος έδειξε ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες **FUS3**, **ABI3** και **LEC2** είναι επίσης υψηλά εκφραζόμενοι. Οι παραπάνω μεταγραφικοί παράγοντες ελέγχουν την έκφραση των SSPs, LEA και των ολεοσινών οι οποίες είναι θετικά ρυθμισμένες στο μετάλλαγμα.

GeneID	Gene Length (bp)	Log2Ratio	Description
AT3G26790 (FUS3, FUSCA3)	1380	4.269886	Full length FUS3 protein binds to the highly conserved RY motif [DNA motif CATGCA(TG)], present in many seed-specific promoters, and the B3 domains of this transcription factor is necessary for the specific interaction with the RY element
AT3G24650 (ABA INSENSITIVE 3, ABI3, ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3, ATABI3, SIS10, SUGAR INSENSITIVE 10)	2987	2.881143	Full length ABI3 protein binds to the highly conserved RY motif [DNA motif CATGCA(TG)], present in many seed-specific promoters, and the B3 domains of this transcription factor is necessary for the specific interaction with the RY element.
AT4G02640 (ARABIDOPSIS THALIANA BASIC LEUCINE ZIPPER 10)	1523	0.653174	Encodes a basic leucine zipper (bZIP) transcription factor AtbZIP10. AtbZIP10 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. It binds consensus G- and C-box DNA sequences.
AT3G54670 (ATSMC1, SMC1, STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOMES 1, TITAN8, TTN8)	4308	0.628683	Encodes a member of the Arabidopsis cohesin complex that is essential for viability and sister chromatid alignment.
AT1G21970 (ATLEC1, EMB 212, EMB212, EMBRYO DEFECTIVE 212, LEAFY COTYLEDON 1, LEC1,)	936	-0.76704	Transcriptional activator of genes required for both embryo maturation and cellular differentiation.

AT1G28300 (ATLEC2, LEAFY COTYLEDON 2, LEC2)	1317	0.632675	Transcription factor that contains a B3 domain, a DNA-binding motif unique to plants and characteristic of several transcription factors. Plays critical roles both early and late during embryo development.
AT2G36720	3629	0.585882	Acyl-CoA N-acyltransferase with RING/FYVE/PHD-type zinc finger domain-containing protein

4.1.3 Η διακοπή σύνθεσης πρωτεϊνών αποθήκευσης του σπόρου

Το τέλος της πλήρωσης των σπόρων επισημαίνεται με την αρνητική ρύθμιση των μεταφράφων της ωρίμανσης, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που κωδικοποιούν TF. Υπάρχουν ενδείξεις για δύο μηχανισμούς αρνητικής ρύθμισης, οι πρώτοι που εμπλέκουν παράγοντες που καταστέλλουν άμεσα τα συγκεκριμένα γονίδια ωρίμανσης και οι δεύτεροι παράγοντες εμπλοκής που καταστέλλουν τα γονίδια (LEC).

Πρώτον, η έκφραση ενός παράγοντας bZIP, που ονομάζεται ROM2, κορυφώνεται μετά από έκφραση γονιδίου πρωτεΐνης SSP σε *Phaseolus* (Chern et al., 1996b). Το ROM2 συνδέεται ειδικά με το G-box in vitro και καταστέλλει τον προαγωγέα in vivo. Η αύξηση στη δραστηριότητα δέσμευσης στο DNA από τη ROM2 συσχετίστηκε με την ειδική καταστολή γονιδίων ωρίμανσης, και την αποξήρανση των σπόρων. Ένας δεύτερος μηχανισμός καθοδικής ρύθμισης των γονιδίων πλήρωσης σπόρων μπορεί να είναι μέσω της καταστολής της δράσης των βασικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών όπως LEC1 ή LEC2. Έχει ταυτοποιηθεί μια ομάδα τριών TFs με τον τομέα B3, τα γονίδια τύπου VP1 / ABI3 (γονίδια VAL), τα οποία μπορεί να στοχεύουν υποκινητές που περιέχουν Sph / RY για καταστολή στο δίκτυο μεταγραφής LEC1-B3 (Suzuki et al., 2007) . Το VAL1 είναι ταυτόσημο με το HSI2, αναγνωρισμένο ως μεταγραφικός καταστολέας προαγωγέα επαγόμενο από ζάχαρη της σποραμίνης στην γλυκοπα (Tsukagoshi et al., 2005, Tsukagoshi et al., 2007). Ένας συντελεστής αναδιαμόρφωσης χρωματίνης κατηγορίας SWI / SNF, κωδικοποιημένος από το PICKLE (PKL), έχει επίσης χαρακτηριστεί ως καταστολέας της έκφρασης LEC1 κατά την βλάστηση (εικόνα 4.1).

4.1.4 Ρόλοι που παίζονται από φυτικές ορμόνες

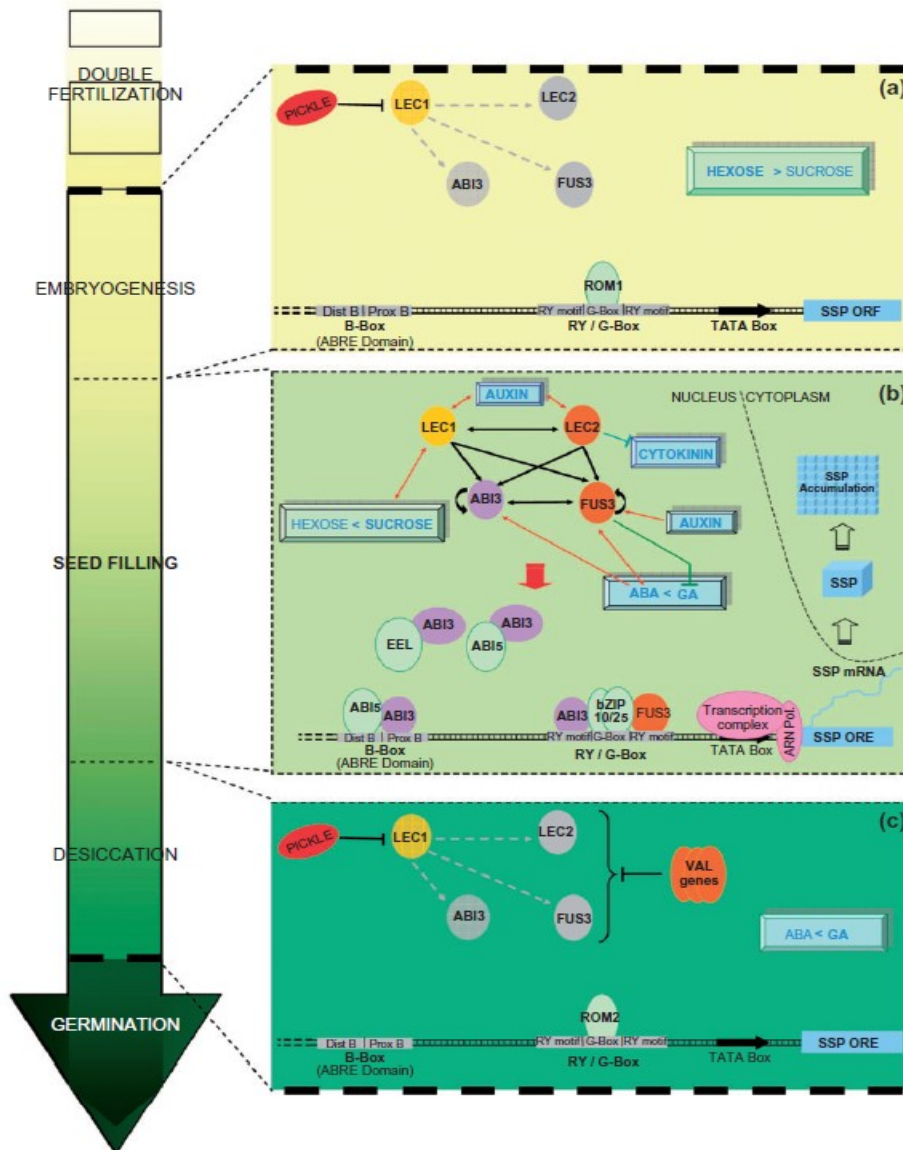
Το ABA είναι μια βασική ορμόνη κατά την ωρίμανση των σπόρων (Finkelstein et al., 2002, Kushiro et al., 2003, Nambara και Marion-Poll 2003), που απαιτείται για την απόκτηση ανοχής στην αποξήρανση και είσοδο στην κατασταση λήθαργου. Η δράση του, σε αυτές τις διεργασίες ρυθμίζεται από τις ανταγωνιστικές επιδράσεις μιας δεύτερης ορμόνης, του γιβερελικού οξέος. Ο κεντρικός ρόλος της σηματοδότησης του ABA αντικατοπτρίζεται στις αλληλεπιδράσεις της με τα κύρια γονίδια ρυθμιστές της ανάπτυξης των σπόρων (ABI3, FUS3, LEC2 και LEC1). Για παράδειγμα, τα επίπεδα ABA συσχετίζονται θετικά με τη δραστηριότητα FUS3 (Gazzarini et al., 2004) και η γονιδιακή ενεργοποίηση από τα FUS3 και ABI3 ενισχύονται σημαντικά από το ABA (Parcy κ.ά., 1994, Kagaya κ.ά., 2005b). Ωστόσο, η πλήρωση των σπόρων συνδυάζει πολύπλοκους ορμονικούς ελέγχους. Για παράδειγμα, η εκτοπική έκφραση LEC2 επάγει τα βιοσυνθετικά ένζυμα αυξίνης και τη δραστηριότητα γονιδίων που αποκρίνονται στην αυξίνη (Stone et al., 2008), υποδηλώνοντας ότι η δράση του (LEC2) εν μέρει προκαλείται από σύνθεση αυξίνης. Παράλληλα, η επαγωγή του προκαλεί αρνητική ρύθμιση ενός υποκινητή που αποκρίνεται στην κυτοκίνη (Stone et al., 2008). Το LEC1 δρα επίσης σε συνεννόηση με την αυξίνη για την προώθηση της εμβρυϊκής διαφοροποίησης (Casson et al., 2006). Η έκφραση του FUS3 ρυθμίζεται προς θετικά από την αυξίνη και η πρωτεΐνη FUS3 δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της βιοσύνθεσης του γιβερελικού οξέος (Gazzarini et al., 2004).

4.1.5 Ο ρόλος που διαδραματίζει η μεταβολική ρύθμιση

Ένας άλλος παράγοντας που καθορίζει την πορεία πλήρωσης των σπόρων είναι η συγκέντρωση ορισμένων μεταβολιτών. Μεταξύ αυτών των μεταβολιτών, η ζάχαρη, και συγκεκριμένα η αναλογία σακχαρόζης / εξόζης, παρέχει σήματα για την έναρξη της φάσης πλήρωσης (Weber et al., 2005). Τα σήματα σακχαρόζης ελέγχουν διαδικασίες αποθήκευσης και διαφοροποίησης μέσω της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης και δραστηριότητας (Gibson 2005, Rolland et al., 2006). Για παράδειγμα, (Ohto et al. (2005)) έδειξαν ότι οι μεταλλάξεις *aretala2*, που επηρεάζονται στη μάζα των σπόρων τους και χαρακτηρίζονται από αύξηση του μεγέθους και του αριθμού των κυττάρων των σπόρων έχουν αυξημένη αναλογία εξόζης / σακχαρόζης που έχει ως αποτέλεσμα την επέκταση της περιόδου κυτταρικής διαίρεσης. Casson et al. (2006) έχουν επίσης αποδείξει ότι το LEC1 εν μέρει προωθεί την εμβρυϊκή διαφοροποίηση μέσω επιδράσεων στα επίπεδα ζάχαρης.

Αλλα μεταβολικά σήματα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πλήρωση σπόρων όπως τα επίπεδα ATP και οξυγόνου που συσχετίζονται με τις διαδικασίες αποθήκευσης (Vigeolas et al., 2003, et al., 2005, Rolletschek et al., 2005a, Weber et al. Το άζωτο που παρέχεται από το phloem είναι

περιορίζει την σύνθεση πρωτεϊνών αποθήκευσης (Rolletschek et al., 2005b) πιθανώς μέσω του ελέγχου της περιεκτικότητας σε ασπαραγίνη στα αναπτυσσόμενα κοτυληδόνια (Hernandez-Sebastia et al., 2005).



Εικόνα 4.1 Σύνοψη συμβάντων που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της ειδικής γονιδιακής ρύθμισης της μεταγραφής των Seed Storage Protein. Η ανάπτυξη των σπόρων αποτελείται από τρία στάδια που αντιστοιχούν σε (α) εμβρυογένεση, (β) πλήρωση σπόρων και (γ) αποξήρανση. Γενετικές και μοριακές αλληλεπιδράσεις στο ρυθμιστικό δίκτυο ελέγχου των Seed Storage Protein κατά τη διάρκεια αυτών των τριών σταδίων. Τα βέλη και οι ράβδοι τις αντανακλούν, αντιστοίχως σε θετική ή αρνητική ρύθμιση. Τα τέσσερα ρυθμιστικά γονίδια (LEC1, LEC2, ABI3 και FUS3) αντιπροσωπεύονται σε κάθε μία με μαύρα βέλη και μαύρες ράβδους όταν είναι ενεργά και με γκριζα βέλη διακεκομμένες όταν δεν εκφράζονται λόγω καταστολής του LEC1.

4.2 ABA

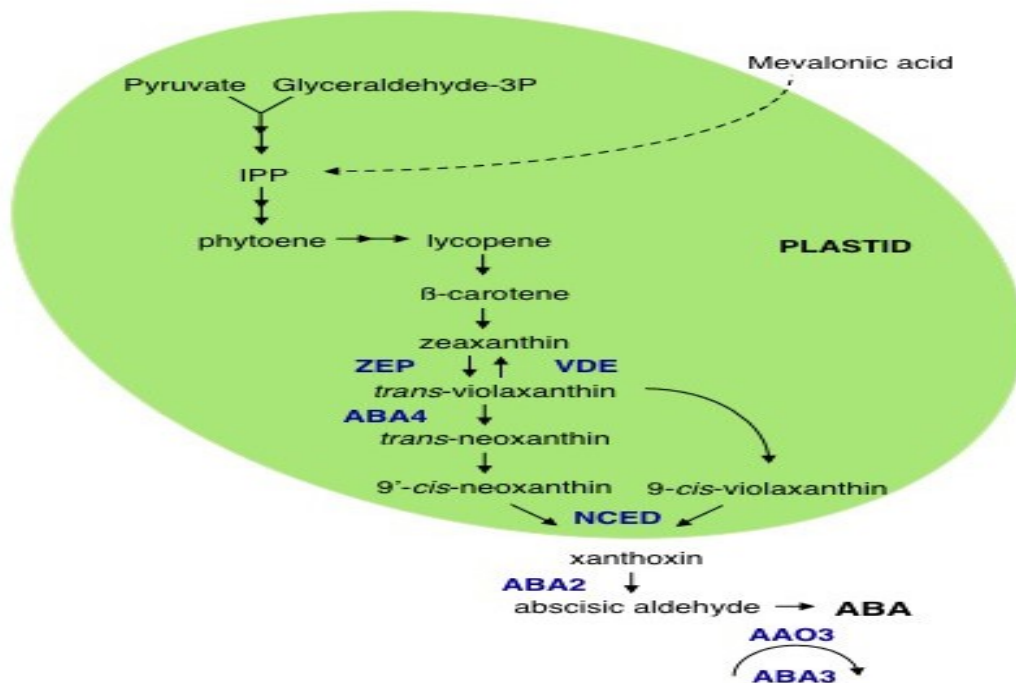
4.2.1 Εισαγωγικά

Το αμπισισικό οξύ (ABA) είναι ένα οπτικώς ενεργό αδύναμο οξύ 15-C ,αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του 1960 ως αναστολέας ανάπτυξης που συσσωρεύεται στην abscissin II και στα φύλλα των δέντρων από συκάριο που είχαν αδρανοποιηθεί φωτοπεριοδικά (Nambara and Marion-Poll, 2005; Wasilewska et al., 2008; Cutler et al., 2010). Έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει πολλές πτυχές της ανάπτυξης των φυτών, συμπεριλαμβανομένης της ωρίμανσης των εμβρύων, της αδρανοποίησης των σπόρων, της βλάστησης, της κυτταρικής διαίρεσης και της επιμήκυνσης και των απαντήσεων σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις όπως η ξηρασία, η αλατότητα, το κρύωμα, η προσβολή από παθογόνα και η ακτινοβολία UV και Giraudat, Ωστόσο, παρά το όνομα, δεν φαίνεται να ελέγχει άμεσα την απόσπαση · Με την παρουσία του ABA στα αψιδωτά όργανα επάγεται η διεργασία της γήρανσης και της αντιδράσης στο στρες, διεργασίες που προηγούνται της απόληξης. Αν και ο ABA έχει θεωρηθεί σαν αναστολέας ανάπτυξης, οι νεαροί ιστοί έχουν υψηλά επίπεδα ABA και τα μεταλλαγμένα φυτά με έλλειψη ABA είναι σοβαρά ακινητοποιημένα επειδή μειώνεται η ικανότητά τους να μειώνουν τη διαπνοή και να καθιερώνουν περιστροφή. Η εξωγενής θεραπεία με ABA των μεταλλαγμάτων αποκαθιστά την κανονική ανάπτυξη των κυττάρων.

Το ABA παρουσιάζεται σε κατώτερα και ανώτερα φυτά. Παράγεται επίσης από ορισμένους φυτοπαθογόνους μύκητες και έχει βρεθεί ακόμη και σε εγκεφαλικό ιστό θηλαστικού. Ως σεσκιτερπένιο, θεωρήθηκε ότι συντίθεται απ 'ευθείας από το πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο, όπως στους μύκητες Ωστόσο, στην πραγματικότητα συντίθεται έμμεσα από τα καρτενοειδή. Ως ασθενές οξύ (pKa = 4.8), το ABA είναι κυρίως μη φορτισμένο όταν υπάρχει στο σχετικά όξινο αποπλαστικό διαμέρισμα φυτού και μπορεί εύκολα να εισέλθει σε κύτταρα μέσω της πλασματικής μεμβράνης. Ο βασικός έλεγχος της κατανομής ABA μεταξύ των διαμερισμάτων των φυτικών κυττάρων ακολουθεί την έννοια της παγίδας ανιόντων: η διαχωρισμένη (ανιόν) μορφή αυτού του ασθενούς οξέος συσσωρεύεται σε αλκαλικά διαμερίσματα (π.χ. φωτισμένοι χλωροπλάστες) και μπορεί να ανακαταμεμηθεί σύμφωνα με τη βαθμίδα μεταβολής pH στις μεμβράνες. Εκτός από το διαχωρισμό σύμφωνα με το σχετικό pH των διαμερισμάτων, ειδικοί φορείς πρόσληψης συμβάλλουν στη διατήρηση μιας χαμηλής αποπλαστικής συγκέντρωσης ABA σε ασυμπύεστα φυτά.

4.2.2 Βιοσύνθεση

Τα μεταλλάγματα με έλλειψη ABA έχουν συμβάλει στην αποκάλυψη της οδού της βιοσύνθεσης ABA. Λόγω της πρώιμης βλάστησης των σπόρων και της αδύναμης εμφάνισης των φυτών, μεταλλάγματα ελαττωματικά στην βιοσύνθεση του ABA απομονώθηκαν από ένα αριθμό φυτικών ειδών συμπεριλαμβανομένου του αραβοσίτου (*Zea mays*), της τομάτας (*Lycopersicon esculentum*), του καπνού (*Nicotiana tabacum*), της πατάτας *Solanum tuberosum*), κριθάρι (*Hordeum vulgare*) και *Arabidopsis*. Πριν γίνουν γνωστές οι μοριακές ταυτότητες των προσβεβλημένων γονιδίων, αποκαλύφθηκε μια κύρια οδός για τη βιοσύνθεση ABA με τη διαμόρφωση των βιοσυνθετικών ενδιάμεσων ABA σε συνδυασμό με δοκιμασίες διατροφής χρησιμοποιώντας αυτά τα μεταλλάγματα. Αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι το ABA σε ανώτερα φυτά συντίθεται από μια "έμμεση" διαδρομή μέσω της διάσπασης ενός πρόδρομου καροτενοειδούς C40, ακολουθούμενη από μια μετατροπή δύο σταδίων της ενδιάμεσης ξανθοξίνης σε ABA μέσω ABA-αλδεΐδης (Taylor et al., 2000; Finkelstein and Rock, 2002; Seo and Koshiba, 2002; Schwartz et al., 2003). Μέχρι τώρα οι μεταλλάξεις, γονίδια και ένζυμα με έλλειψη ABA έχουν ταυτοποιηθεί στο *Arabidopsis* (Schwartz et al., 2003). Οι πληροφορίες από το *Arabidopsis* ισχύουν και για άλλα είδη φυτών, διότι η οδός και τα αντίστοιχα γονίδια είναι εξαιρετικά διατηρημένα στα αγγειόσπερμα.



Εικόνα 4.2 Βιοσυνθετική οδός ABA. Το πρόδρομο ABA, διφωσφορικός ισοπεντενυλεστέρας (IPP) παράγεται σε πλαστίδια. Στο κυτταρόπλασμα, το διακεκομμένο βέλος υποδεικνύει ότι η IPP μπορεί να μετατοπιστεί από το κυτοσόλιο στο πλαστίδιο. Η μετατροπή της ζεαξανθίνης σε τρανς-βιλαξαξανίνη καταλύεται από την εποξειδάση ζεαξανθίνης (ZEP). Υπό υψηλό φως, εμφανίζεται αντίστροφη αντίδραση σε χλωροπλάστες που καταλύεται από την απο-εποξειδάση βιλαξανθίνης (VDE). Η πρωτεΐνη ABA4 εμπλέκεται στον σχηματισμό νεοξανθίνης. Η διάσπαση του καροτενοειδούς καταλύεται από μια οικογένεια 9-cis-εποξυκαρρονοειδικών διοξυγενασών (NCED) για να σχηματίσει ξανθοξίνη. Η ξανθοξίνη μετακινείται στο κυτοσόλιο με έναν άγνωστο μηχανισμό και μετατρέπεται σε αψιδική αλδεΐδη.

Η βιοσύνθεση του ABA αρχίζει στους χλωροπλάστες και τα υπόλοιπα πλαστοΐδια μέσω της οδού που απεικονίζεται στο σχημα(Εικόνα 4.2)

4.2.3 Αναπτυξιακή ρύθμιση βιοσύνθεσης του ABA

Η ωρίμανση των σπόρων και η βλάστηση εκθέτουν το νεαρό έμβρυο σε δραματικές οσμωτικές καταπονήσεις. Ο ABA είναι ο βασικός παράγοντας που απαιτείται για να συνοδεύσει το έμβρυο κατά την είσοδο και έξοδο από την κατάσταση ηρεμίας του. Το ABA στην ανάπτυξη σπόρων μπορεί είτε να προέρχεται από μητρικούς ιστούς είτε να συντίθεται *de novo* στο έμβρυο. Μελέτες στο *Arabidopsis* υποδηλώνουν ότι κατά την ανάπτυξη των σπόρων φαίνεται να υπάρχουν δύο κορυφές συσσώρευσης ABA (για ανασκόπηση, βλ. Bentsink και Koornneef, 2002, Finkelstein et al., 2002). Το πρώτο συμβαίνει περίπου στα μισά στάδια κατά την ανάπτυξη του σπόρου (περίπου 10 ημέρες μετά την επικονίαση). Αυτό το ABA είναι πιθανό να προέρχεται από μητρικούς ιστούς επειδή σε αμοιβαίες διασταυρώσεις, η κορυφή εμφανίστηκε μόνο όταν χρησιμοποιήθηκαν μεταλλαγμένα άγριου τύπου αλλά όχι ABA ως θηλυκά. Το ABA σε αυτό το στάδιο προάγει τη σύνθεση πρωτεϊνών αποθήκευσης. Τα έμβρυα από φυτά που εκφράζουν αντισώματα ABA είτε δεν συσσωρεύουν ούτε συσσωρεύουν πολύ χαμηλότερο επίπεδο πρωτεϊνών αποθήκευσης σε σχέση με τα έμβρυα άγριου τύπου (Phillips et al., 1997). Η δεύτερη κορυφή με λιγότερο σημαντική συσσώρευση ABA (περίπου το ένα τρίτο της πρώτης κορυφής) προέρχεται από βιοσύνθεση στο έμβρυο και μπορεί να ενεργοποιήσει τη σύνθεση πρωτεϊνών LEA που προετοιμάζουν το έμβρυο για αποξήρανση. Αυτή η αιχμή του ABA προκαλεί επίσης την αδρανοποίηση του σπόρου. Τα επίπεδα ABA πέφτουν γρήγορα στο μεταγενέστερο στάδιο της ωρίμανσης των σπόρων και είναι πολύ χαμηλά σε ξηρούς σπόρους. Κατά τη διάρκεια της απορρόφησης των σπόρων, η βιοσύνθεση *de novo* ABA στο έμβρυο είναι καθοριστικός παράγοντας της ηρεμίας σπόρων (Bentsink and Koornneef, 2002, Finkelstein et al., 2002). Το ABA σε αυτό το στάδιο διατηρεί επίσης, σε ένα στενό χρονικό παράθυρο, το εμβολιασμένο έμβρυο σε μια αναστρέψιμη κατάσταση μεταξύ της νάρκης και της βλάστησης ρυθμίζοντας τον βασικό παράγοντα μεταγραφής *Leu Zip ABI5* (Lopez-Molina et al.,

2001). Αυτοί οι σημαντικοί ρόλοι της ABA και η δυναμική της συσσώρευσης στο έμβρυο υποδεικνύουν ότι η βιοσύνθεση ABA βρίσκεται υπό αυστηρή αναπτυξιακή ρύθμιση στο έμβρυο. Μετάγραφα για όλα τα βιοσυνθετικά γονίδια ABA ανιχνεύονται σε έμβρυα / αναπτυσσόμενους σπόρους, αν και δεν έχει αναφερθεί λεπτομερέστερη ανάλυση της έκφρασης μεμονωμένων γονιδίων κατά την ανάπτυξη σπόρων εκτός από το AtZEP.

REFERENCES

Αθανασιάδη, 2008 Ταυτοποίηση του γονιδίου της μετάλλαξης *albino* του *Arabidopsis*

Apuya N.,¹ Yadegari R.,² Fischer R., Harada J., and Goldberg R 2002 *RASPBERRY3* Gene Encodes a Novel Protein Important for Embryo Development

Baumlein, H., Misera, S., Luerksen, H., Kolle, K., Horstmann, C., Wobus, U. and Müller, A. (1994) The FUS3 gene of *Arabidopsis thaliana* is a regulator of gene expression during late embryogenesis. *Plant J.* 6: 367–387.

Baumlein, H., Nagy, I., Villarroel, R., Inzé, D. and Wobus, U. (1992) Cis-analysis of a seed protein gene promoter: the conservative RY repeat CATGCATG within the legumin box is essential for tissue-specific expression of a legumin gene. *Plant J.* 2: 233–239.

Baumlein, H., Wobus, U., Pustell, J. and Kafatos, F.C. (1986) The legumin gene family: structure of a B type gene of *Vicia faba* and a possible egumin gene specific regulatory element. *Nucleic Acids Res.* 14: 2707–2720.

Bensmihen, S., Rippa, S., Lambert, G., Jublot, D., Pautot, V., Granier, F., Giraudat, J. and Parcy, F. (2002) The homologous ABI5 and EEL transcription factors function antagonistically to fine-tune gene expression during late embryogenesis. *Plant Cell* 14: 1391–1403.

Bentsink L, Koornneef M (2002) Seed dormancy and germination. *In* CR Somerville, EM Meyerowitz, The *Arabidopsis* Book. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp 1-17

Bobb, A.J., Eiben, H.G. and Bustos, M.M. (1995) PvAlf, an embryospecific acidic transcriptional activator enhances gene expression from phaseolin and phytohemagglutinin promoters. *Plant J.* 8: 331–343.

Borisjuk, L., Nguyen, T.H., Neuberger, T., Rutten, T., Tschiersch, H. et al. (2005) Gradients of lipid storage, photosynthesis and plastid differentiation in developing soybean seeds. *New Phytol.* 167: 761–776.

Boyle B and Brisson N. 2001. Repression of the defense gene PR-10a by the single-stranded DNA binding protein SEBF. *Plant Cell* **13**, 2525–2537

Bittner F, Oreb M, Mendel RR (2001) ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **276**: 40381-40384

Braybrook, S.A., Stone, S.L., Park, S., Bui, A.Q., Le, B.H., Fischer, R.L., Goldberg, R.B. and Harada, J.J. (2006) Genes directly regulated by LEAFY COTYLEDON2 provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**: 3468–3473.

Carrie C, Giraud E, Whelan J. 2009a. Protein transport in organelles: Dual targeting of proteins to mitochondria and chloroplasts. *FEBS Journal* **276**, 1187-1195

Casson, S.A. and Lindsey, K. (2006) The turnip mutant of *Arabidopsis* reveals that LEAFY COTYLEDON1 expression mediates the effects of auxin and sugars to promote embryonic cell identity. *Plant Physiol.* **142**: 526–541.

Castle, L.A. and Meinke, D.W. (1994) A FUSCA gene of *Arabidopsis* encodes a novel protein essential for plant development. *Plant Cell* **6**: 25–41.

Chandrasekharan, M.B., Bishop, K.J. and Hall, T.C. (2003) Modulespecific regulation of the beta-phaseolin promoter during embryogenesis. *Plant J.* **33**: 853–866.

Cheng WH, Endo A, Zhou L, Penney J, Chen HC, Arroyo A, Leon P, Nambara E, Asami T, Seo M et al. (2002) A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell* **14**: 2723-2743

Chern, M.S., Bobb, A.J. and Bustos, M.M. (1996b) The regulator of MAT2 (ROM2) protein binds to early maturation promoters and represses PvALF-activated transcription. *Plant Cell* **8**: 305–321.

Creissen G, Reynolds H, Xue Y, Mullineaux P. 1995. Simultaneous targeting of pea glutathione reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplasts and mitochondria in transgenic tobacco. *Plant Journal* **8**, 167–175

Cutler A, Krochko J (1999) Formation and breakdown of ABA. *Trends Plant Sci* **4**: 472-478

Cutler S.R., Rodriguez P.L., Finkelstein R.R., Abrams S.R. Abscisic acid: Emergence of a core signaling network. *Ann. Rev. Plant Biol.* 2010;61:651–679

Desveaux D, Després C, Joyeux A, Subramaniam R and Brisson N. 2000. PBF-2 is a novel single-stranded DNA binding factor implicated in PR-10a gene activation in potato. *The Plant Cell* **12**, 1477–1489

Desveaux D, Maréchal A, Brisson N. 2005. Whirly transcription factors: defense gene regulation and beyond. *Trends in Plant Science* **10**, 95–102

Edwards, D., Murray, J.A. and Smith, A.G. (1998) Multiple genes encoding the conserved CCAAT-box transcription factor complex are expressed in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **117**: 1015–1022.

Ezcurra, I., Ellerstroöm, M., Wycliffe, P., Staö lberg, K. and Rask, L. (1999) Interaction between composite elements in the napA promoter: both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression. *Plant Mol Biol.* **40**: 699–709.

Ezcurra, I., Wycliffe, P., Nehlin, L., Ellerstroöm, M. and Rask, L. (2000) Transactivation of the Brassica napus napin promoter by ABI3 requires interaction of the conserved B2 and B3 domains of ABI3 with different cis-elements: B2 mediates activation through an ABRE, whereas B3 interacts with an RY/G-box. *Plant J.* **24**: 57–66.

Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* **14**: S15-S45

Finkelstein, R.R. and Gibson, S.I. (2002) ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 26–32.

Finkelstein RR, Rock CD (2002) Abscisic acid biosynthesis and response. *In* CR Somerville, EM Meyerowitz, eds, *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp 1-52.

Galichet A, Hoyerová K, Kamínek M and Grissem W. 2008. Farnesylation directs AtIPT3 subcellular localization and modulates cytokinin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* **146**, 1155–1164

Gazzarrini, S., Tsuchiya, Y., Luma, S., Okamoto, M. and McCourt, P. (2004) The transcription factor FUSCA3 controls developmental timing in Arabidopsis through the hormones gibberellin and abscisic acid. *Dev. Cell* **7**: 373–385.

Gibson, S.I. (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 93–102.

Gindullis F and Meier I. 1999. Matrix attachment region binding protein MFP1 is localized in discrete domains at the nuclear envelope. *Plant Cell* **11**, 1117–1128

Giraudat, J., Hauge, B.M., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F. and Goodman, H.M. (1992) Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell* **4**: 1251–1261.

Gonzalez-Guzman M, Apostolova N, Belles JM, Barrero JM, Piqueras P, Ponce MR, Micol JL, Serrano R, Rodriguez PL (2002) The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *Plant Cell* **14**: 1833-1846

Grabowski E, Miao Y, Mulisch M and Krupinska K. 2008. Single-stranded DNA-binding protein Whirly1 in barley leaves is located in plastids and the nucleus of the same cell. *Plant Physiology*. **147**, 1800–1804

Ham BK, Park JM, Lee SB, Kim MJ, Lee IJ, Kim KJ, Kwon CS, and Paek KH. 2006. Tobacco Tsip1, a DnaJ-type Zn finger protein, is recruited to and potentiates T si1-Mediated Transcriptional Activation. *The Plant Cell* **18(8)**: 2005–2020

Herna´ndez-Sebastia´n, C., Marsolais, F., Saravitz, C., Israel, D., Dewey, R.E.

and Huber, S.C. (2005) Free amino acid profiles suggest a possible role for asparagine in the control of storage-product accumulation in developing seeds of low- and high-protein soybean lines. *J. Exp. Bot.* 56: 1951–1963.

Hobo, T., Kowiyama, Y. and Hattori, T. (1999) A bZIP factor, TRAB1, interacts with VP1 and mediates abscisic acid-induced transcription. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96: 15348–15353.

Jeong SY, Rose A and Meier I. 2003. MFP1 is a thylakoid-associated, nucleoid binding protein with a coiled-coil structure. *Nucleic Acids Research* **31**, 5175–5185

Kagaya, Y., Toyoshima, R., Okuda, R., Usui, H., Yamamoto, A. and Hattori, T. (2005a) LEAFY COTYLEDON1 controls seed storage protein genes through its regulation of FUSCA3 and ABSCISIC ACID INSENSITIVE3. *Plant Cell Physiol.* 46: 399–406

Karniely S and Pines O. 2005. Single translation – dual destination: mechanisms of dual protein targeting in eukaryotes. *EMBO Reports* **6**, 420–425

Kawagoe, Y., Campbell, B.R. and Murai, N. (1994) Synergism between CACGTG (G-box) and CACCTG cis-elements is required for activation of the bean seed storage protein beta-phaseolin gene. *Plant J.* 5: 885–890.

Keith, K., Kraml, M., Dengler, N.G. and McCourt, P. (1994) *fusca3*: a heterochronic mutation affecting late embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6: 589–600.

Kouzarides, T. 2002. Histone methylation in transcriptional control. *Current Opinion in Genetics & Development* **12**, 198–209

Krause K, Kilbienski I, Mulisch M, Rödiger A, Schäfer A and Krupinska K. 2005. DNA-binding proteins of the Whirly family in *Arabidopsis thaliana* are targeted to the organelles. *FEBS Letters* **579**, 3707–3712

Krause K and Krupinska K. 2009. Nuclear regulators with a second home in organelles. *Trends in Plant Science* **14**:11,194-99

Kroeger T, Watkins K, Friso G, J. van Wijk K and Barkan A. 2009. A plant-specific RNA-binding domain revealed through analysis of chloroplast group II intron splicing. *Proceedings of National Academy of Science USA* **106**:11, 4537-4542

Kroj, T., Savino, G., Valon, C., Giraudat, J. and Parcy, F. (2003) Regulation of storage protein gene expression in Arabidopsis. *Development* **130**: 6065–6073.

Kushiro, T., Nambara, E. and McCourt, P. (2003) Hormone evolution: the key to signalling. *Nature* **422**: 122.

Kwon C, and Chung IK. 2004. Interaction of an Arabidopsis RNA binding protein with plant single-stranded telomeric DNA modulates telomerase activity. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 12812–12818

Lachner M. and Jenuwein T. 2002. The many faces of histone lysine methylation. *Current Opinion in Cell Biology* **14**, 286–298

Lara, P., Ontate-Sánchez, L., Abraham, Z., Ferrández, C., Díaz, I., Carbonero, P. and Vicente-Carbajosa, J. (2003) Synergistic activation of seed storage protein gene expression in Arabidopsis by ABI3 and two bZIPs related to OPAQUE2. *J. Biol. Chem.* **278**: 21003–21011

Lopez-Molina L, Mongrand S, Chua NH (2001) A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 4782-4787

Marin E, Nussaume L, Quesada A, Gonneau M, Sotta B, Hugueney P, Frey A, Marion-Poll A(1996) Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*.

Maity, S.N. and De Crombrughe, B. (1998) Role of the CCAAT-binding protein CBF/NF-Y in transcription. *Trends Biochem. Sci.* 23: 174–178.

McCarty, D.R., Hattori, T., Carson, C.B., Vasil, V., Lazar, M. and Vasil, I.K. (1991) The Viviparous-1 developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator. *Cell* 66: 895–905.

Millar AH, Whelan J, Small I. 2006. Recent surprises in protein targeting to mitochondria and plastids. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 610–615

Mo" nke, G., Altschmied, L., Tewes, A., Reidt, W., Mock, H.P., Ba" umlein, H. and Conrad, U. (2004) Seed-specific transcription factors ABI3 and FUS3: molecular interaction with DNA. *Planta* 219: 158–166.

Nakamura, S., Lynch, T.J. and Finkelstein, R.R. (2001) Physical interactions between ABA response loci of Arabidopsis. *Plant J.* 26: 627–635.

Nambara, E. and Marion-Poll, A. (2003) ABA action and interactions in seeds. *Trends Plant Sci.* 8: 213–217.

Nambara E., Marion-Poll A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Ann. Rev. Plant Biol.* 2005;56:165–185.

Natsoulis G, Hilger F, Fink GR. 1986. The HTS1 gene encodes both the cytoplasmic and mitochondrial histidine tRNA synthetases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 46, 235–243

Ohta K¹, Mizutani A, Kawakami A, Murakami Y, Kasuya Y, Takagi S, Tanaka H, Fujisawa H. 1995. Plexin: a novel neuronal cell surface molecule that mediates cell adhesion via a homophilic binding mechanism in the presence of calcium ions.

Parcy, F., Valon, C., Raynal, M., Gaubier-Comella, P., Delseny, M. and Giraudat, J. (1994) Regulation of gene expression programs during 1270 Gene regulation of seed storage proteins Arabidopsis seed development: roles of the ABI3 locus and of endogenous abscisic acid. *Plant Cell* 6: 1567–1582.

de Pater, S., Pham, K., Chua, N.H., Memelink, J. and Kijne, J. (1993) A 22- bp fragment of the pea lectin promoter containing essential TGAC-like motifs confers seed-specific gene expression. *Plant Cell* 5: 877–886.

Peeters N, Small I. 2001. Dual targeting to mitochondria and chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* **1541**, 54–63

Phillips J, Artsaenko O, Fiedler U, Horstmann C, Mock H-P, Muntz K, Conrad U (1997) Seed-specific immunomodulation of abscisic acid activity induces a developmental switch. *EMBO J* 16:4489-4496

Qin X, Zeevaart JAD (2002) Overexpression of a 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana glauca* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant Physiol* 128: 544-551

Raynaud C, Sozzani R, Glab N, Domenichini S, Perennes C, Cella R, Kondorosi E, Bergounioux C. 2006. Two cell-cycle regulated SET-domain proteins interact with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **47**, 395–407

Reidt, W., Wohlfarth, T., Ellerstro" m, M., Czihal, A., Tewes, A., Ezcurra, I., Rask, L. and Baumlein, H. (2000) Gene regulation during late embryogenesis: the RY motif of maturation-specific gene promoters is a direct target of the FUS3 gene product. *Plant J.* 21: 401–408.

Rolland, F., Baena-Gonzalez, E. and Sheen, J. (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 675–709.

Rolletschek, H., Hosein, F., Miranda, M., Heim, U., Go" tz, K.P., Schlereth, A., Borisjuk, L., Saalbach, I., Wobus, U. and Weber, H. (2005b) Ectopic expression of an amino acid transporter (VfAAP1) in seeds of *Vicia narbonensis* and pea increases storage proteins. *Plant Physiol.* 137: 1236–1249.

Rolletschek, H., Koch, K., Wobus, U. and Borisjuk, L. (2005a) Positional cues for the starch/lipid balance in maize kernels and resource partitioning to the embryo. *Plant J.* 42: 69–83.

Rook F, Corke F, Card R, Munz G, Smith C, Bevan MW (2001) Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signaling. *Plant J* 26: 421-433

Ruppel N., Hangarter R. 2007. Mutations in a plastid – localized elongation factor G alter early stages of plastid development in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 7 :37

Samaniego R, de la Torre C and Díaz de la Espina SM. 2008. Characterization, expression and subcellular distribution of a novel MFP1 (matrix attachment regionbinding filament-like protein 1) in onion. *Protoplasma* 233, 31–38

Schwacke R, Fischer K, Ketelsen B, Krupinska K and Krause K. 2007. Comparative survey of plastid and mitochondrial targeting properties of transcription factors in *Arabidopsis* and rice. *Molecular Genetics & Genomics* 277, 631–646

Schwartz SH, Tan BC, Gage DA, Zeevaart JAD, McCarty DR (1997) Specific oxidative cleavage of carotenoid by VP14 of maize. *Science* 276: 1872-1874

Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JAD (2003) Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant Physiol* 131: 1591-1601

Seo M, Koshiba T (2002) Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* 7:41-48

Seo M, Peeters AJM, Koiwai H, Oritani T, Marion-Poll A, Zeevaart JAD, Koorneef M, Kamiya Y, Koshiba T (2000b) The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (*AAO3*) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 12908-12913

Silva-Filho MC. 2003. One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 589–595

Small I, Wintz H, Akashi K, Mireau H. 1998. Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments. *Plant Molecular Biology* 38, 265–277

Stalberg, K., Ellerstrom, M., Ezcurra, I., Ablov, S. and Rask, L. (1996) Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the napA storage-protein promoter in transgenic *Brassica napus* seeds. *Planta* 199: 515–519.

Stone, S.L., Braybrook, S.A., Paula, S.L., Kwong, L.W., Meuser, J., Pelletier, J., Hsieh, T.F., Fischer, R.L., Goldberg, R.B. and Harada, J.J. (2008) Arabidopsis LEAFY COTYLEDON2 induces maturation traits and auxin activity: implications for somatic embryogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 105: 3151–3156.

Suzuki, M., Wang, H.H. and McCarty, D.R. (2007) Repression of the LEAFY COTYLEDON 1/B3 regulatory network in plant embryo development by VP1/ABSCISIC ACID

Sunderland PA, West CE, Waterworth WM, Bray CM. 2006. An evolutionarily conserved translation initiation mechanism regulates nuclear or mitochondrial targeting of DNA ligase 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **47**, 356–367

Tan BC, Schwartz SH, Zeevaart JAD, McCarty DR (1997) Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12235-12240

Taylor IB, Burbidge A, Thompson AJ (2000) Control of abscisic acid synthesis. *J Exp Bot* 51:1563-1574

To, A., Valon, C., Savino, G., Guilleminot, J., Devic, M., Giraudat, J. and Parcy, F. (2006) A network of local and redundant gene regulation governs *Arabidopsis* seed maturation. *Plant Cell* 18: 1642–1651.

Tsuchiya, Y., Nambara, E., Naito, S. and McCourt, P. (2004) The FUS3 transcription factor functions through the epidermal regulator TTG1 during embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 37: 73–81.

Tsukagoshi, H., Morikami, A. and Nakamura, K. (2007) Two B3 domain transcriptional repressors prevent sugar-inducible expression of seed maturation genes in *Arabidopsis* seedlings. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104: 2543–2547.

Tsukagoshi, H., Saijo, T., Shibata, D., Morikami, A. and Nakamura, K. (2005) Analysis of a sugar response mutant of Arabidopsis identified a novel B3 domain protein that functions as an active transcriptional repressor. *Plant Physiol.* 138: 675–685.

Tzafrir I., Dickerman A., Brazhnik O., Nguyen Q., McElver J., Frye C., Patton D., Meinke D. 2003. The Arabidopsis SeedGenes project. *Nucleic Acids Res* **31**(1) : 90 – 93

Tzafrir I., Pena-Muralla R., Dickerman A., Berg M., Rogers R., Hutchens S., Sweeney T.C., McElver J., Aux G., Patton D., Meinke D. 2004. Identification of genes required for embryo development in Arabidopsis. *Plant Physiology* **135** : 1206 – 1220

Uknes SJ, Ho THD (1984) Mode of action of abscisic acid in barley aleurone layers. Abscisic acid induces its own conversion to phaseic acid. *Plant Physiol* 75: 1126-1132

Vigeolas, H., Van Dongen, J.T., Waldeck, P., Huhn, D. and Geigenberger, P. (2003) Lipid storage metabolism is limited by the prevailing low oxygen concentrations within developing seeds of oilseed rape. *Plant Physiol.* 133: 2048–2060

Wagner R and Pfannschmidt T. 2006. Eukaryotic transcription factors in plastids – bioinformatic assessment and implications for the evolution of gene expression machineries in plants. *Gene* **381**, 62–70

Wasilewska A., Vlad F., Sirichandra C., Redko Y., Jammes F., Valon C., Frey N.F.D., Leung J. An update on abscisic acid signaling in plants and more. Vol. 1. *Molecular Plant*; 2008. pp. 198–217

Weber, H., Borisjuk, L. and Wobus, U. (2005) Molecular physiology of legume seed development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 253–279.

Xiong L, Ishitani M, Lee H, Zhu JK (2001b) The Arabidopsis *LOS5/ABA3* locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell* 13: 2063-2083

