

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

Μοριακός και βιοχημικός χαρακτηρισμός της
φερριτίνης στον καρπό της τομάτας.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ
ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ: ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ.
ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΒΛΕΨΗ ΤΟΥ ΚΑΘΗΓΗΤΗ κ. Π. ΚΑΤΙΝΑΚΗ

ΙΩΑΝΝΗΣ ΧΟΥΛΙΑΡΑΣ

ΑΘΗΝΑ, ΜΑΙΟΣ 2010

Η φερριτίνη στους σπόρους της τομάτας.

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Καθηγητής, Π. Κατινάκης, Επιβλέπων
Καθηγητής Δημ. Μπουράνης, Μέλος
Αν. Καθηγητής, Γ. Αϊβαλάκις, Μέλος

Η ανάθεση της παρούσας μελέτης έγινε με απόφαση της υπ' αριθ. 16 της 2/6/2009 Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την άμεση επίβλεψη του Καθηγητή κ. Π. Κατινάκη, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Τον Καθηγητή κ. Π. Κατινάκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τη μεταφορά της εμπειρίας του.

Τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής τον Καθηγητή κ. Δημ. Μπουράνη και τον Αν. Καθηγητή κ. Γ. Αϊβαλάκι για τις πολύτιμες διορθώσεις που εισηγήθηκαν διαβάζοντας αυτήν την εργασία και την ουσιαστική συμβολή τους στη διαμόρφωση του τελικού κειμένου.

Το Εργαστήριο Κηπευτικών Καλλιεργειών για την παραχώρηση του φυτικού υλικού και την άριστη συνεργασία μας με το Δρ. Ι. Καραπάνο και τη γεωπόνο Δ. Μακρογιάννη καθώς και το Δρ. Κων/νο Δελή για την παραχώρηση κανονικοποιημένων δειγμάτων cDNA .

Τους μεταπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία μας και την βοήθεια τους καθ' όλη την διάρκεια φοίτησής μου στο Εργαστήριο Βιοχημείας.

Το διδάκτορα Π. Διαμαντόπουλο για την αμέριστη συμπαράσταση και ακαδημαϊκή βοήθεια καθ' όλη την εκπόνηση της διατριβής μου και την φιλόλογο Ν. Βαντάνα για την επιμέλεια του κειμένου.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου για την ηθική συμπαράσταση, δίχως τη στήριξή τους δε θα μπορούσα να πραγματοποιήσω το στόχο μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
Καταγωγή, Βοτανικά και Μορφολογικά χαρακτηριστικά της τομάτας.....	6
Η τομάτα τύπου cherry.....	8
Η αύξηση του καρπού- Στάδια ανάπτυξης.....	10
Χημικές και φυσιολογικές μεταβολές κατά την αύξηση των καρπών.....	11
Διατητική αξία του καρπού- ποιοτικά χαρακτηριστικά.....	12
Ο σίδηρος αποτελεί συστατικό κυτοχρωμάτων και σιδηροθειοπρωτεϊνών.....	13
Φερριτίνες και αποθήκευση σιδήρου στα φυτά.....	15
Χαρακτηριστικά των φυτικών φερριτινών.....	18
Ο υποκυτταρικός εντοπισμός της φερριτίνης.....	21
Η έκφραση των γονιδίων της φερριτίνης.....	22
Η φερριτίνη ως μέσον αποθήκευσης του σιδήρου στα χυμοτόπια των σπερμάτων.....	29
Φερριτίνες και οξειδωτικό στρες στα φυτά.....	30
ΣΚΟΠΟΣ.....	34
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.	
Ανάπτυξη φυτών τομάτας, δειγματοληψία φυτικού υλικού και προετοιμασία ιστών.....	36

Ανατομική μελέτη.....	37
Μοριακή μελέτη	
Εντοπισμός σιδήρου (Pearls method for ferric iron).....	38
Απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς η όργανα.....	38
Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊνικών οξέων...38	
Χειρισμός του ολικού RNA με DNάση.....	39
RT-PCR. Ημιοσοτική μέθοδος (2 βήματα).....	40
Ποσοτικό Real-Time PCR.....	41
Χειρισμός πλασμιδίων.....	41
Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων.....	42
Μετασχηματισμός των κυττάρων E.coli.....	42
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	43
Πρωτόκολλο Miniprep (Qiagen).....	43
Μέθοδος του βρασμού (Holmes and Quigley, 1981).....	44
Πέψη DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού.....	45
Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς.....	46
Ενοποίηση των άκρων DNA με τη χρήση της DNA λιγάσης.....	46
Ηλεκτροφόρηση δεοξυριβοζονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αγαρόζης.....	46
Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης.....	47
Εκχύλιση πρωτεϊνών.....	48
SDS- PAGE GEL.....	49
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	52

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	54
Ανίχνευση σιδήρου σε σπέρματα τομάτας cherry.....	54
Διαχωρισμός πρωτεϊνών σπερμάτων τομάτας cherry σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS- PAGE).....	56
Ανάλυση IN SILICO των γονιδίων που κωδικοποιούν τη φερριτίνη στις βάσεις δεδομένων.....	57
Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων LeFer με την ημι- ποσοτική μέθοδο RT- PCR, στους διάφορους ιστούς της τομάτας.....	64
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	66
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	69
Βιβλιογραφία.....	70

Περίληψη

Ο σίδηρος είναι ουσιώδες στοιχείο για την αναπαραγωγική ικανότητα και σχετίζεται με τη θρεπτική αξία του φυτού της τομάτας. Μεγάλο μέρος του σιδήρου των φυτών αποθηκεύεται στη φερριτίνη, μια πρωτεΐνη με 24 υπομονάδες η οποία σχηματίζει δομή μέσα στην οποία εγκλωβίζεται ο σίδηρος. Στη μελέτη αυτή χαρακτηρίστηκε και ταυτοποιήθηκε κλώνος cDNA που κωδικοποιεί τη φερριτίνη στην τομάτα. Ακολούθως εξετάστηκε η έκφραση των γονιδίων της φερριτίνης με RT PCR σε καρπούς τομάτας, κατά τα τελευταία στάδια της ανάπτυξής τους, καθώς και σε βλαστικά όργανα των φυτών. Επίσης, μελετήθηκε το ηλεκτροφορητικό πρότυπο των αποθησαυριστικών πρωτεϊνών των σπερμάτων, και ο εντοπισμός του σιδήρου στους ιστούς των σπερμάτων.

Τα μεταγραφήματα της φερριτίνης ήταν αφθονότερα στους καρπούς στα στάδια του πράσινου ώριμου καρπού και μειωνόταν με την ωρίμανσή τους. Στα βλαστικά όργανα τα μεταγραφήματα ήταν πιο άφθονα στη ρίζα και λιγότερα άφθονα στα φύλλα και τα στελέχη των φυτών.

Το ότι στο περικάρπιο εκφράζονται τα γονίδια της φερριτίνης τα οποία μάλιστα μειώνονται με την ωρίμανση του καρπού, πιθανόν δείχνει την πιθανή συμμετοχή των φερριτινών στην προστασία από οξειδωτική καταπόνηση. Η ύπαρξη φερριτινών στην ρίζα, στα φύλλα και τα στελέχη των φυτών είναι δυνατόν να σχετίζεται τόσο με τη συντήρηση του σιδήρου σε μη τοξική μορφή όσο και με την αποθήκευσή του.

Ο σίδηρος εντοπίστηκε στο προκάμβιο του εμβρύου και το σήμα εντοπισμού ήταν πιο έντονο στο ακρορρίζιο. Τέλος, στα ηλεκτροφορήματα των αποθησαυριστικών πρωτεϊνών έδειξαν τέσσερις ηλεκτροφορητικές ζώνες και στις δύο ποικιλίες τομάτας που εξετάστηκαν. Το πρότυπο των ηλεκτροφορημάτων ήταν το ίδιο με τα αναφερόμενα στη βιβλιογραφία γεγονός που σημαίνει ότι οι αποθησαυριστικές πρωτεΐνες στις διάφορες ποικιλίες της τομάτας έχουν ίδια ηλεκτροφορητική συμπεριφορά, και πιθανόν άλλες ομοιότητες.

ABSTRACT

Iron is an essential element for the reproductive ability of plants, and is related to the tomato's plant nutritional value. A great amount of the plant iron is saved in the ferritin, a protein with 24 subunits, which forms a structure in which the iron is gathered. In this study, a cDNA clone which codes for a tomato ferritin, was characterized and identified. Moreover, the expression of ferritin genes was examined using RT-PCR. Tomato organs studied were fruits at the latter stages of development, as well as vegetative organs. The SDS electrophoresis pattern of the seed storage proteins and the iron localization in the seeds' tissues was also examined.

Ferritin transcripts were more abundant in the fruit pericarps at the stage of mature green and were less abundant as the fruit matured. In the vegetative organs, transcriptions were found in higher levels in the roots and less in the leaves and stems.

The fact that, in the pericarp, ferritin genes are expressed and the transcripts were reduced while the fruit is getting matured, probably points to the possible participation of the ferritins in the protection of tissue from oxidative stress. The occurrence of ferritin in the root, leaves and stems is possible to be related either to the iron preservation in non-toxic form or to iron storage.

The iron was localized in the procambium of embryos and the localization signal was more intense in root tip. Finally, the SDS electrophoresis of seed storage proteins showed four electrophoretic bands in the two tomato varieties that were examined. The SDS electrophoresis pattern was the same as the reported, a fact which means that the storage proteins in the different tomato varieties have the same electrophoretic pattern and could be similar.

Καταγωγή, Βοτανικά και Μορφολογικά χαρακτηριστικά της τομάτας.

Η τομάτα, *Solanum lycopersicum*, είναι λαχανοκομικό φυτό της οικογένειας των σολανοδών, με $2n= 24$ χρωμοσώματα. Το *Solanum lycopersicum* είναι φυτό ποώδες, ετήσιο, διετές και σπανιότερα πολυετές.

Από την Ν. Αμερική, απ' όπου κατάγεται, μεταφέρθηκε στην Ευρώπη από τους πρώτους εξερευνητές της νέας ηπείρου. Μέχρι το 16 αιώνα την καλλιεργούσαν ως καλλωπιστικό φυτό, γιατί το θεωρούσαν δηλητηριώδες φυτό. Σε διεθνή κλίμακα, η καλλιέργεια της τομάτας καταλαμβάνει την τρίτη σε έκταση θέση μετά την πατάτα και γλυκοπατάτα, ενώ στην Ελλάδα καταλαμβάνει την δεύτερη σε έκταση θέση μετά την πατάτα.

Με την γενετική βελτίωση στην τομάτα επιτεύχθηκε: α) αύξηση της παραγωγής, του μεγέθους του καρπού και του αριθμού των καρπών, β) βελτίωση της ποιότητας, του σχήματος, του χρώματος, του αρώματος και της υφής του καρπού, γ) βελτίωση του τρόπου ανάπτυξης του φυτού (σημαντικό γεγονός αποτελεί η ανακάλυψη γενετικά ελεγχόμενης ανάπτυξης), δ) βελτίωση της αντοχής του καρπού στις μεταχειρίσεις και στην αποθήκευση των καρπών αλλά και των σπόρων, ε) πρωιμότητα στην παραγωγή, στ) δυνατότητα καρπόδεσης σε αντίξοες συνθήκες, ζ) αντοχή στους εχθρούς και στις ασθένειες (Ολύμπιος, 2001).

Ευνοϊκή θερμοκρασία ανάπτυξης του φυτού είναι μεταξύ 20 °C και 35 °C. Αναπτύσσεται σε ποικίλα εδάφη, όπως αμμώδη, αμμοπηλώδη, πηλώδη, ιλυοπηλώδη, αργυροπηλώδη τα οποία πρέπει να στραγγίζονται καλά. Το ευνοϊκότερο pH για την ανάπτυξη του φυτού είναι μεταξύ 5,5 και 7,0. (Ολύμπιος, 2001).

Ο κεντρικός βλαστός φέρει τα πραγματικά φύλλα στις μασχάλες στις οποίες υπάρχουν οφθαλμοί που δίνουν πλευρικούς βλαστούς. Η τομάτα έχει την τάση να σχηματίζει πολλούς βλαστούς. Πολλές φορές οι πλευρικοί βλαστοί, που βρίσκονται κοντά στην κορυφή του φυτού, είναι αρκετά δυνατοί.

Ο βλαστός στο πρώτο στάδιο της ανάπτυξής του ή καλύτερα αμέσως κάτω από το αρχέφυτο είναι τρυφερός, ευαίσθητος, χυμώδης και μαλακός. Αργότερα, όμως, γίνεται πιο σκληρός, αποκτά μηχανική αντοχή χωρίς να ξυλοποιείται και είναι λιγότερο εύθραυστος. Ο βλαστός καθώς και τα φύλλα καλύπτονται από αδενώδεις τρίχες, οι οποίες όταν σπάσουν, απελευθερώνουν ένα ελαιώδες υγρό το οποίο προσδίδει χαρακτηριστική οσμή στο φυτό. Η ανάπτυξη του βλαστού, όσον αφορά το

μήκος, καθορίζεται από γενετικούς παράγοντες και διακρίνεται σε ποικιλίες με απεριόριστη ανάπτυξη βλαστών και σε ποικιλίες με καθορισμένο μήκος βλαστών.

Τα φύλλα της τομάτας είναι σύνθετα. Το φύλλο αποτελείται από ζεύγη φυλλαρίων και παραφυλλαρίων με μονό φυλλάριο στην άκρη. Τα φύλλα εμφανίζονται σε ελικοειδή διάταξη πάνω στο βλαστό (Ολύμπιος, 2001).

Η ρίζα της τομάτας είναι πασσαλώδης και μπορεί να φτάσει μέχρι βάθους 1m. Η τομάτα θεωρείται φυτό που μεταφυτεύεται εύκολα, γιατί γρήγορα παράγει νέες ρίζες και το τραυματισμένο ριζικό σύστημα απορροφά νερό και θρεπτικά στοιχεία που του επιτρέπουν να αναρρώσει γρήγορα από τη μεταφυτευτική διαταραχή (Ολύμπιος, 2001)

Τα άνθη της τομάτας εμφανίζονται σε ταξιανθίες από 2-3/ ταξιανθία έως και 20 ή και περισσότερα. Ένας μέσος επιθυμητός αριθμός ανθέων ανά ταξιανθία που πρόκειται να εξελιχθούν σε καρπούς είναι 6-8 άνθη. Οι ταξιανθίες εμφανίζονται επί των βλαστών του φυτού και διακλαδίζονται συμμετρικά ή ασύμμετρα ανάλογα με την ποικιλία. Στο άκρο της κάθε διακλάδωσης υπάρχει ένα άνθος.

Το άνθος φέρει πράσινο δερματώδη κάλυκα που αποτελείται από 5 ή περισσότερα σέπαλα, στεφάνη κίτρινη με 5 ή και περισσότερα ενωμένα πέταλα και 5 ή περισσότερους στήμονες ενωμένους στην βάση τους με τη στεφάνη και ενωμένους κατά μήκος μεταξύ τους, ώστε να σχηματίζουν κώνο γύρω από το στύλο που είναι συνήθως πιο κοντός, εγκλωβισμένος από τους ανθήρες (Ολύμπιος, 2001).

Ο καρπός της τομάτας είναι πολύχωρος ράγα που αποτελείται από 2-8 καρπόφυλλα. Ο καρπός έχει χρώμα κόκκινο που οφείλεται στο λυκοπένιο, πορτοκαλί που οφείλεται β-καροτένιο, ρόδινο, κίτρινο ή λευκό. Οι χρωστικές αυτές βρίσκονται συνήθως σε ολόκληρη τη μάζα του καρπού. Ο καρπός χωρίζεται συνήθως σε 4 - 10 χώρους οι οποίοι έχουν σαρκώδη τοιχώματα. Εσωτερικά των τοιχωμάτων αυτών υπάρχει ζελατινώδες παρέγχυμα το οποίο περιέχει σπέρματα. Ο καρπός διαθέτει χονδρό περικάρπιο, το οποίο περιβάλλεται από λεπτή επιδερμίδα χωρίς στομάτια. Εξωτερικά της επιδερμίδας υπάρχει κηρώδης εφυμενίδα. Το σχήμα του καρπού είναι συνήθως υποσφαιρικό, πιασμένο στους πόλους, απιοειδές ή επίμηκες. Εάν οι καρποί συγκομιστούν πριν αποκτήσουν χρώμα και τοποθετηθούν στους 32 °C και άνω, τότε αποκτούν πορτοκαλί χρώμα. Είναι επίσης δυνατό να σχηματιστεί καρπός και με χρήση αυξινών, αλλά δε θα περιέχει σπέρματα. Η εφαρμογή των ουσιών αυτών πρέπει να γίνει όταν τα περισσότερα άνθη της ταξιανθίας είναι ανοιχτά. Για να γίνει αυτή η τεχνική ωρίμανση του καρπού θα πρέπει να τοποθετηθούν οι καρποί σε

κλειστούς χώρους στους οποίους να διοχετευτεί αιθυλένιο σε αναλογία όγκων προς την ατμόσφαιρα 1:1000 έως 1:10000 Ευνοϊκή θερμοκρασία ανάπτυξης του φυτού είναι μεταξύ 20 °C και 35 °C. Αναπτύσσεται σε ποικίλα εδάφη, όπως αμμώδη, αμμοπηλώδη, πηλώδη, ιλυοπηλώδη, αργυροπηλώδη, τα οποία πρέπει να στραγγίζονται καλά. Το ευνοϊκότερο pH για την ανάπτυξη του φυτού είναι μεταξύ 5,5 και 7,0 .

Το σπέρμα είναι ωοειδές, πεπλατυσμένο, χρώματος κίτρινου- καφέ ή/ και χρυσαφένιου. Εσωτερικά το σπέρμα φέρει ένα κυρτό έμβρυο, το οποίο περιβάλλεται από ένα μικρό ενδοσπέρμιο (Ολύμπιος, 2001).

Η τομάτα τύπου cherry.

Σύμφωνα με τον Quiros (1974) υπάρχει μία φυλογενετική σειρά η οποία οδηγεί, με αφετηρία έναν πρόγονο πριν την εμφάνιση του *Solanum*, στο *S. peruvianum*, μετά στο *S. hirsutum*, ακολούθως στο *S. lycopersicon* var. *cerasiforme* και τελικά στην καλλιεργούμενη τομάτα. Τα *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmanii*, *S. penellii*, *S. minutum* (*S. chmielewskii* και *S. parviflorum*), καθώς και το *S. chilense* είναι αποκλίνοντες τύποι από αυτόν τον κύριο κορμό.

Η τομάτα τύπου cherry (*S. lycopersicon* var. *cerasiforme*) είναι σχεδόν βέβαιο ότι αποτελεί τον άμεσο πρόγονο των σύγχρονων καλλιεργουμένων τύπων τομάτας, ενώ, είναι και το μοναδικό άγριο είδος τομάτας που απαντάται και εκτός Νότιας Αμερικής (Taylor, 1986). Οι σημερινές καλλιεργούμενες ποικιλίες και υβρίδια της τομάτας τύπου cherry θεωρείται ότι εξελίχθηκαν από τον άγριο τύπο τομάτας *S. lycopersicon* var. *cerasiforme* μέσω πολύχρονης εξέλιξης (Setha, 1995). Μοναδικός ίσως διεκδικητής (πρόγονος) αυτού του τίτλου μπορεί να αποτελέσει το *S. pimpinellifolium*, αλλά είναι πιθανό να είναι μάλλον παραπροϊόν παρά μέλος της γενετικής σειράς (Ολύμπιος, 2001).

Η επιλογή μέσω πολλών γενεών, οδήγησε από την αρχέγονη μορφή της τομάτας που είναι γνωστή σήμερα ως τύπου cherry σε βαθμιαία αύξηση του μεγέθους του καρπού και στα πολλά διακριτά σχήματα και τύπους καλλιεργούμενης τομάτας (Hobson, 1988). Έτσι, όταν οι πρώτοι καρποί εισήχθησαν στην Ευρώπη (περίπου στα μέσα του 16ου αιώνα), ονομασίες και περιγραφές αυτής της εποχής, όπως το "Pomi d'oro" («χρυσό μήλο»), υπαινίσσονταν ότι το χρώμα ήταν κίτρινο. Οι κοκκινόσαρκοι τύποι τομάτας πρέπει να είχαν ακολουθήσει μετά από μικρό χρονικό διάστημα και είναι αυτοί οι οποίοι κέρδισαν την αποδοχή του κοινού.

Όλοι οι εκπρόσωποι του *S. lycopersicon* είναι αυτοσυμβατοί και κυρίως αυτογονιμοποιούμενοι. Στον άγριο πρόγονο τομάτας, *S. lycopersicon* var. *cerasiforme* (τύπος cherry) το στίγμα μπορεί να προεξέχει πέραν του κώνου των ανθών κατά την άνθηση, επιτρέποντας έτσι τη σταυρογονιμοποίηση σε έναν όμως μικρό βαθμό. Αυτό αποτελεί μία διαφορά από την καλλιεργούμενη τομάτα (*S. lycopersicon*) στην οποία η εξημέρωση και βελτίωση έχει συμπεριλάβει επιλογή για τη σταδιακή υποχώρηση του στίγματος μέσα στον κώνο των ανθών, εξασφαλίζοντας έτσι την αυτεπικονίαση (Rick, 1976). Πάντως, το *S. lycopersicon* var. *cerasiforme* (όπως και το *S. lycopersicon* και άλλοι στενοί συγγενείς) είναι γενικά αυτογονιμοποιούμενο, σε αντίθεση με άλλα είδη του γένους *Solanum* που είναι αυτοασύμβατα και επομένως, σταυρογονιμοποιούνται πλήρως με διάφορα είδη μελισσών (Ολύμπιος, 2001). Ανεξάρτητα των όποιων διαφορών τους, οι σύγχρονες ποικιλίες της καλλιεργούμενης τομάτας σχετίζονται στενά με το άγριο είδος *S. lycopersicon* var. *cerasiforme*, με αποτέλεσμα οι δύο αυτοί τύποι να μπορούν να διασταυρωθούν ελεύθερα (Taylor, 1986).



Εικόνα 1.1. Τομάτα *Solanum lycopersicum* var. *Cerasiforme* στο στάδιο ώριμου πράσινου.

Η αύξηση του καρπού - Στάδια ανάπτυξης.

Όπως συμβαίνει στα περισσότερα φυτά, έτσι και στην τομάτα η ανάπτυξη του καρπού μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις φάσεις (Gillaspy et al, 1993). Η πρώτη φάση χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη της ωθήκης, τη γονιμοποίηση και την καρπόδεση. Δύο εβδομάδες μετά την άνθηση, με το πέρας των κυτταροδιαίρέσεων, καταγράφεται ο μέγιστος αριθμός κυττάρων στον καρπό της τομάτας (Asahira and Hosoki, 1977). Ο αριθμός αυτός καθορίζεται τόσο από τον αρχικό αριθμό των κυττάρων της ωθήκης, όσο και από τον αριθμό των κυτταρικών διαίρέσεων την πρώτη εβδομάδα μετά από την άνθηση. Υπάρχουν ενδείξεις ότι ο αριθμός των κυτταρικών διαίρέσεων σχετίζεται με τα επίπεδα των ενδογενών ορμονών, όπως των αυξινών και των κυτοκινινών (Abdel-Rahman *et al* 1977; Mapelli, 1981)

Στη δεύτερη φάση, μετά τη λήξη των κυτταρικών διαίρέσεων, τα κύτταρα αρχίζουν να αυξάνουν σε όγκο για τις επόμενες 6- 7 εβδομάδες. Η αύξηση του μεγέθους του καρπού σε αυτό το στάδιο οφείλεται στην αύξηση του όγκου των κυττάρων. Η κυτταρική αύξηση επιφέρει ανάπτυξη του καρπού έως και 100 φορές στα περισσότερα φυτά (Coombe, 1976). Στην τομάτα ο όγκος των κυττάρων του πλακούντα του ζελατινωειδούς παρεγχύματος και του περικαρπίου είναι δυνατό να αυξάνεται κατά δέκα φορές. Σε αυτή τη φάση, στο έμβρυο έχουν ήδη σχηματιστεί οι κοτυληδόνες, το ριζίδιο και το βλαστίδιο. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο σε αυτό το στάδιο θεωρείται ότι παίζουν οι αυξίνες που είναι υπεύθυνες για την αύξηση του όγκου των κυττάρων (Rayle and Cleland, 1992) παρόλο που στους περισσότερους καρπούς η συγκέντρωση των αυξινών είναι μεγαλύτερη στα σπέρματα παρά στα περιβάλλοντα κύτταρα του καρπού.



Εικόνα 1.2. Τομάτα *Solanum lycopersicum* var. *Cerasiforme* στο στάδιο ώριμου καρπού.

Η διαμόρφωση του τελικού μεγέθους του καρπού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από την αύξηση μεγέθους των κυττάρων του καρπού. Τα φύλλα τροφοδοτούν με φωτοσυνθετικά προϊόντα την ωθήκη σε διάστημα μόλις 2 ημερών μετά από την επικονίαση (Archobold *et al*, 1982) και έχει αναφερθεί ότι η συγκέντρωση της ξηράς ουσίας αυξάνει με ρυθμό 30- 150 mg την ημέρα (Ho *et al*, 1983).

Η τρίτη και τελευταία φάση διάρκειας δύο εβδομάδων περίπου περιλαμβάνει μικρή αύξηση του βάρους του καρπού. Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής λαμβάνει χώρα η ωρίμανση του καρπού η οποία μεταξύ των άλλων περιλαμβάνει και την αλλαγή του χρώματος (εικ. 1.2) από το στάδιο του πράσινου διαδοχικά σε κίτρινο, πορτοκάλι και κόκκινο χρώμα (Ho and Hewitt, 1986).

Χημικές και φυσιολογικές μεταβολές κατά την αύξηση των καρπών.

Οι πράσινοι καρποί της τομάτας έχουν χλωροφύλλη και μπορούν να δεσμεύσουν CO₂. Όμως, ακόμα και υπό το καθεστώς σχετικά υψηλής ακτινοβολίας (140W/m²) ο ρυθμός της καθαρής φωτοσύνθεσης είναι περίπου 30μmol CO₂/g νωπού βάρους ανά ώρα για τους πολύ νεαρούς καρπούς, ενώ για το φύλλο η αντίστοιχη τιμή είναι 650μmol CO₂/g νωπού βάρους ανά ώρα (Laval-Martin, 1977). Στους ωριμότερους πράσινους καρπούς δεν ανιχνεύεται καθαρή φωτοσύνθεση. Ο ρυθμός της αναπνοής των καρπών, εξάλλου, μειώνεται από 0,4- 0,6mg CO₂/g νωπού βάρους ανά ώρα σε καρπούς ηλικίας δύο εβδομάδων σε 0,05- 0,07mg CO₂/g στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού και μετά διπλασιάζεται στο στάδιο της αλλαγής χρώματος (Ho and Hewitt, 1986). Αναφέρεται ότι το μέρος έκλυσης του CO₂ επαναδεσμεύεται από τον καρπό (Ho, 1996).

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρπού ο ρυθμός συσσώρευσης του άμυλου αυξάνει μέχρι ένα μέγιστο 20 περίπου μέρες μετά την επικονίαση. Το άμυλο σε αυτή τη χρονική στιγμή αποτελεί το 30% της ημερήσιας εναποτιθέμενης ξηράς ουσίας του καρπού (Ho *et al*, 1983). Επειδή η καθαρή φωτοσύνθεση του καρπού είναι ελάχιστη, είναι εύλογο να υποθεθεί ότι το παραγόμενο άμυλο είναι προϊόν της εισροής των φωτοσυνθετικών προϊόντων των φύλλων. Κατά το στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού το άμυλο αποτελεί περίπου το 20% της ξηράς ουσίας του καρπού (Tanaka *et al*, 1974; Ho *et al*, 1983). Μετά από το στάδιο αυτό αρχίζει η υδρόλυση

του αμύλου μειώνοντας την συγκέντρωσή του, στο στάδιο του ώριμου κόκκινου καρπού, στο 0,6% περίπου της ξηράς ουσίας (Hobson, 1967).

Οι σαρκώδεις καρποί, όπως της τομάτας, χαρακτηρίζονται από τη συσσώρευση οργανικών οξέων και σακχάρων. Η αναλογία σακχάρων προς οξέα στον καρπό είναι σημαντικός ποιοτικός παράγοντας που καθορίζει την γεύση του ώριμου σαρκώδη καρπού (Rhodes, 1980). Η αναλογία των συστατικών αυτών εξαρτάται από τη δραστηριότητα των ενζύμων και την αλληλεπίδραση του μεταβολισμού των υδατανθράκων και των οξέων (Ruffner *et al*, 1982; Tucker *et al*, 1983). Η συγκέντρωση των οργανικών οξέων αυξάνεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρπού, δηλαδή, από την καρπόδεση μέχρι το στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού, οπότε φτάνει το 13% επί της ξηράς ουσίας του καρπού, συμβάλλοντας σημαντικά στο άρωμα του καρπού (Grierson and Kadal, 1986; Guillet *et al*, 2002). Η περιεκτικότητα των οργανικών οξέων στο ζελατινώδες παρέγχυμα είναι διπλάσια από αυτή του περικαρπίου (Laval- Martin, 1977). Επίσης, είναι γνωστό ότι στο στάδιο του μη ώριμου πράσινου καρπού η συγκέντρωση του κιτρικού οξέος είναι τετραπλάσια από αυτή του μηλικού (Davies and Hobson, 1981) και το μηλικό υποδομείται με ταχύτερους ρυθμούς κατά την ωρίμανση.

Κατά την ωρίμανση του καρπού τα επίπεδα των οργανικών οξέων, γενικά μειώνονται, ενώ παράλληλα αυξάνονται τα επίπεδα των σακχάρων. Τα σάκχαρα, η γλυκόζη και η φρουκτόζη αποτελούν το 65% των συνολικών διαλυτών στερεών του ώριμου κόκκινου καρπού. Σε χρονικό διάστημα δύο εβδομάδων από την έναρξη της αύξησης του καρπού τα αναγωγικά σάκχαρα αυξάνονται από 0,1% του νεπού βάρους σε 2% και φτάνουν στα 3.5% κατά την ωρίμανση. Η συγκέντρωση των σακχάρων είναι υψηλότερη στο περικάρπιο σε σχέση με το ζελατινώδες παρέγχυμα (Wilsor *et al*, 1976).

Διαιτητική αξία του καρπού- ποιοτικά χαρακτηριστικά.

Η τομάτα είναι πλούσια σε οργανικά οξέα και αμινοξέα και περιέχει αξιόλογες ποσότητες βιταμίνης A, C και λιγότερο B και D. Τα άλατά της, σιδήρου, καλίου, νατρίου και μαγνησίου βρίσκονται σε μια τέλεια για τη διατροφή μας ποσοτική σχέση (Anderlini, 1983).

Η τομάτα, παρόλο που δεν μπορεί να θεωρηθεί ως είδος θερμιδοπαραγωγικό ή ιστοπλαστικό, διεγείρει την όρεξη και θεωρείται δραστηριοποιητής των γαστρικών εκκρίσεων. Ο καρπός της τομάτας περιέχει ένα πολύτιμο αντιοξειδωτικό, το λυκοπένιο, το οποίο μειώνει τον κίνδυνο εκδήλωσης ασθενειών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) (Bluvanewari and Nagini, 2005). Ένα άλλο σημαντικό συστατικό του καρπού είναι το σαλικυλικό οξύ, το οποίο δρα προστατευτικά σε καρδιαγγειακές παθήσεις.

Μακροχρόνιες ιατρικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι άτομα που καταναλώνουν νωπές ή κατεργασμένες τομάτες έχουν λιγότερες πιθανότητες να προσβληθούν από καρκίνο σε σχέση με άτομα που δεν καταναλώνουν (Basu and Imrhan, 2007). Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι τροποποίηση δύο γονιδίων που ρυθμίζουν τις ανθοκύανες στην τομάτα, από το φυτό αντίρρινο, βελτίωσε σημαντικά το προσδόκιμο της ζωής σε ποντίκια που είχαν προσβληθεί από καρκίνο. (Butteli *et al*, 2008).

Ο χρωματισμός του ώριμου καρπού οφείλεται στην παρουσία δύο οργανικών χρωστικών: του λυκοπενίου και των καροτενοειδών. Η αναλογία της συμμετοχής τους καθορίζει τη διαφορετική ένταση του χρώματος του καρπού. Η κατανομή των χρωστικών διαφοροποιείται μεταξύ του περικαρπίου και της υπόλοιπης σάρκας και μπορεί να επηρεάζεται από την ένταση και την ποιότητα του φωτός. Η μέτρια σκίαση ευνοεί το σχηματισμό του λυκοπενίου, ενώ τα καροτενοειδή σχηματίζονται σε μεγαλύτερη ποσότητα αν ο καρπός εκτίθεται σε έντονο φωτισμό (Anderlini, 1983).

Ο σίδηρος αποτελεί συστατικό κυτοχρωμάτων και σιδηροθειοπρωτεϊνών.

Ο σίδηρος προσλαμβάνεται από τις ρίζες κυρίως ως δισθενές ή και δευτερευόντως ως τρισθενές ιόν. Συμμετέχει στη διαμόρφωση της δομής σιδηροπρωτεϊνών και αιμοπρωτεϊνών που συμμετέχουν στις αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά τη φωτοσύνθεση και την αναπνοή. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται μέσω των πρωτεϊνών αυτών μέσω της μεταβολής του σθένους του σιδήρου. Επίσης αποτελεί συστατικό των ενζύμων υπεροξειδάση και καταλάση τα οποία σχετίζονται με τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Στη φωτοσύνθεση μερικά βήματα του μεταβολισμού των φωτοσυνθετικών χρωστικών και της δομής της χλωροφύλλης εξαρτώνται από το σίδηρο (Briat *et al*, 1995). Πράγματι, το χαρακτηριστικό σύμπτωμα της τροφοπενίας του σιδήρου στα φυτά που είναι οι μεσονεύριες χλωρώσεις των ανώτερων φύλλων, προκαλείται από

μειωμένη συγκέντρωση της χλωροφύλλης. Επιπλέον, υπό συνθήκες έλλειψης σιδήρου μεταβάλλεται και η συνολική εικόνα των πρωτεϊνών των φυτών: η συγκέντρωση των πρωτεϊνών από τις αλυσίδες μεταφοράς των ηλεκτρονίων μειώνεται, ενώ αυξάνονται οι συγκεντρώσεις των ενζύμων που σχετίζονται με τη δέσμευση του άνθρακα (Andaluz *et al*, 2006). Η επίδραση της έλλειψης του σιδήρου στη δομή και τη λειτουργία της φωτοσυνθετικής συσκευής διαπιστώθηκε στο μονοκύτταρο πράσινο φύκος *Chlamydomonas reinhardtii* (Moseley *et al*, 2002).

Η χλώρωση προέρχεται από την πρωτεόλυση των συστατικών της φωτοσυνθετικής συσκευής και περιλαμβάνει και τα δύο φωτοσυστήματα και το σύμπλεγμα cyt b6/f. Τα συμπλέγματα των πρωτεϊνών της αντέννα επηρεάζονται διαφορετικά από την τροφοπενία σιδήρου. Το light-harvesting complex I (LHCI) μειώνεται δραστικά, ενώ το LHCI παραμένει σχετικά σταθερό. Η απώλεια του φωτοσυστήματος I σε κατάσταση έλλειψης σιδήρου μεταβάλλει τη σύσταση των πεπτιδίων του LHCI (Naumann *et al* 2005, Hippler *et al* 2005), γεγονός που επισημαίνει την παρουσία προγράμματος επαναδόμησης του συμπλόκου της αντέννας για να ξεπεραστεί η ευαισθησία των φυτών στο φως που προέρχεται από την απώλεια του PSI. Πρόσφατα, προσεγγίσεις μέσω της γενετικής μηχανικής συνέδεσαν τη βιογένεση των σιδηροθιοπρωτεϊνών με τη φωτοσύνθεση (Briat *et al*, 2007).

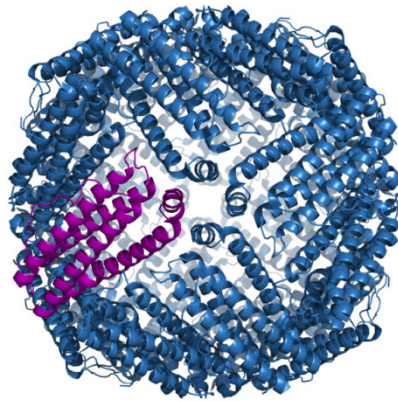
Το ότι ο σίδηρος είναι απαραίτητο θρεπτικό στοιχείο για τα φυτά φαίνεται και από το γεγονός ότι δεν είναι δυνατόν να αντικατασταθεί από άλλο σε πολλές βιοχημικές αντιδράσεις. Παράδειγμα αποτελεί η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων μέσω των κυτοχρωμάτων και των σιδηροθιοπρωτεϊνών. Οι Ohnishi *et al* (1971) έδειξαν ότι η χαμηλή συγκέντρωση του σιδήρου στο μέσο αύξησης των ζυμών είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των συσσωματωμάτων των σιδηροπρωτεϊνών. Επιπλέον, υπό συνθήκες έλλειψης σιδήρου τα μιτοχόνδρια των σκελετικών μυών παρουσίασαν μειωμένη δραστηριότητα της μιτοχονδριακής αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος και των οξειδοαναγωγασών NADH-ουμπικινόνης (Maguire *et al.*, 1982; Ackrell *et al*, 1984), γεγονός που οδήγησε σε μειωμένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα. Ομοίως, οι Cartier *et al* (1986) παρείχαν ενδείξεις για μειωμένη συγκέντρωση του Cyt c και μείωση της δραστηριότητας της κυτοχρωμικής οξειδάσης κατά 50% και της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος και των αφυδρογονασών NADH κατά 78% στους μυς που παρουσίαζαν έλλειψη σιδήρου. Όμως, οι πειραματικές ενδείξεις που αφορούν την επίδραση της έλλειψης

του σιδήρου στην αναπνοή των φυτών είναι λίγες. Οι Pascal and Douce (1993) έδειξαν ότι σε κυτταροκαλλιέργειες της μουριάς μειωμένες συγκεντρώσεις σιδήρου είχαν ως αποτέλεσμα μειωμένες ταχύτητες αύξησης και μικρές τελικές συγκεντρώσεις των κυττάρων. Η απουσία σιδήρου οδήγησε σε μείωση της κατανάλωσης οξυγόνου. Επίσης, όλα τα κυτοχρώματα και τα συσσωματώματα των σιδηρο-πρωτεϊνών της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων μειώθηκαν δραματικά. Πάντως, η μειωμένη παρουσία του σιδήρου ανιχνεύθηκε μόνο στο σύμπλοκο II, ενώ κανένα από τα σύμπλοκα I, III και IV ή το σύμπλοκο παραγωγής ATP δεν επηρεάστηκαν από την έλλειψη σιδήρου. Η επίδραση στο σύμπλοκο II είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη μείωση της ικανότητας μεταφοράς των ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων. Τελικά, η έλλειψη του σιδήρου είχε ως αποτέλεσμα και την εξάντληση των ενεργειακών μεταβολιτών που οδήγησε στο θάνατο των κυττάρων.

Οι Φερριτίνες και αποθήκευση σιδήρου στα φυτά.

Οι φερριτίνες είναι καθολικής διάδοσης πρωτεΐνες επιφορτισμένες με τη διαδικασία αποθήκευσης του σιδήρου. Έχουν τη δυνατότητα να αποθηκεύσουν μέχρι και 4500 άτομα σιδήρου στην κεντρική τους κοιλότητα, γεγονός που τις καθιστά ιδιαίτερα σημαντικές για τη διατήρηση της ομοιόστασης του σιδήρου του φυτικού σώματος (Harrison and Arosio, 1996).

Στα ζώα υπάρχουν δύο διαφορετικές υπομονάδες της φερριτίνης, οι **H** και **L**, οι οποίες κωδικοποιούνται από δύο διαφορετικά γονίδια. Η υπομονάδα τύπου **H** διαθέτει μια σειρά από συντηρημένα αμινοξέα τα οποία δίνουν υπόσταση σε μια λειτουργική περιοχή φεροξειδάσης, η οποία είναι υπεύθυνη για την ταχεία οξείδωση του Fe^{2+} σε Fe^{3+} . Η ταχεία αυτή αλλαγή που επέρχεται μέσω της διαδικασίας οξείδωσης οδηγεί στη γρήγορη απορρόφηση του σιδήρου μέσα στην πρωτεϊνική κοιλότητα του ενζυμικού συμπλόκου της φερριτίνης. Η υπομονάδα **L** δε διαθέτει την περιοχή της φεροξειδάσης. Αντίθετα διαθέτει μια περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα γλουταμινικού οξέος του οποίου οι πλευρικές αλυσίδες είναι στραμμένες προς το εσωτερικό της κεντρικής κοιλότητας του ενζυμικού συμπλόκου επιτρέποντας, έτσι, λόγω της πολικότητας που παρουσιάζει, τη συμπλοκοποίηση των ατόμων σιδήρου που συγκεντρώνονται εκεί βοηθώντας στη μακροχρόνια αποθήκευσή τους.



Εικόνα 1.3 Η δομή της φερριτίνης.

Η σχετική ισορροπία των δύο υπομονάδων της φερριτίνης στο φυσικό ενζυμικό σύμπλοκο είναι αυτή που ρυθμίζει την όλη λειτουργικότητα του ενζύμου. Ενζυμικά σύμπλοκα φερριτίνης πλούσια σε **H**-υπομονάδες επιτυγχάνουν τη γρήγορη αποτοξίνωση από τοξικές ουσίες που δημιουργούνται λόγω υπερεπάρκειας σιδήρου, ενώ ενζυμικά σύμπλοκα φερριτίνης πλούσια σε **L**-υπομονάδες οδηγούν στο μικρότερο ρυθμό απορρόφησης του σιδήρου και σε μεγαλύτερη διάρκεια αποθήκευσής του (Harrison and Arosio, 1996).

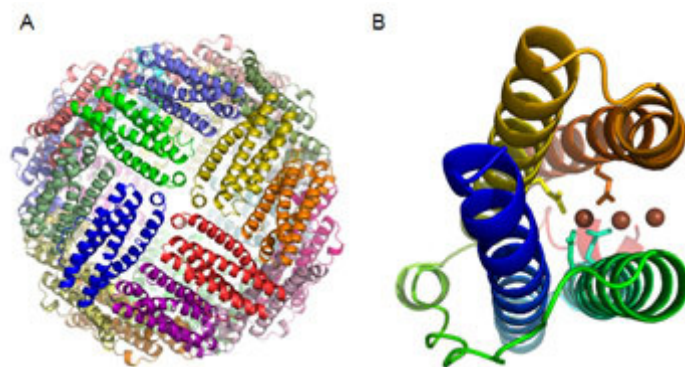
Στα φυτά οι φερριτίνες εντοπίζονται σε συγκεκριμένα οργανίδια, τα πλαστίδια αλλά όχι και στο κυτταρόπλασμα όπως συμβαίνει στα ζωικά κύτταρα (Lescure *et al* , 1991). Μέχρι στιγμής μόνο ένας τύπος υπομονάδας φυτικής φερριτίνης έχει περιγραφεί και χαρακτηριστεί. Ο τύπος αυτός διαθέτει τη χαρακτηριστική λειτουργική περιοχή φεροξειδάσης που παρουσιάζει η **H**- υπομονάδα των ζωικών φερριτινών όσο και την περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα γλουταμινικού οξέως που παρουσιάζεται στην **L**-υπομονάδα της ζωικής φερριτίνης.

Ο σίδηρος, όπως προαναφέρθηκε, στα φυτά παίζει σημαντικό ρόλο στη φωτοσύνθεση και την αναπνοή. Η φωτοσύνθεση, όμως, είναι πιθανόν να οδηγήσει σε παραγωγή H_2O_2 , το οποίο μπορεί να αντιδράσει με το σίδηρο και να παράγει δραστικές μορφές οξυγόνου. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου μπορεί τελικά να είναι επιβλαβείς για τα κύτταρα. Η ομοιοστάση του σιδήρου χρειάζεται να ελέγχεται αυστηρά για να αποφεύγονται ανεπάρκειες αλλά και τοξικότητες. Στις παραπάνω περιπτώσεις μειώνεται δραστικά η πιθανότητα ανάπτυξης και επιβίωσης του φυτού (Briat *et al*, 2009).

Η βελτίωση της περιεκτικότητας του σιδήρου στα φυτά επιτεύχθηκε με υπερέκφραση της φερριτίνης μέσω της γενετικής μηχανικής. Όμως, και ο ρόλος των πρωτεϊνών στη φυσιολογία του φυτού και των μηχανισμών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι. Η ρύθμιση των πρωτεϊνών σε γονιδιακό επίπεδο στα φυτά γίνεται στο μεταγραφικό στάδιο, όπως διαπιστώθηκε από πειράματα υπερέκφρασης, ενώ στα ζώα η ρύθμιση της έκφρασης πραγματοποιείται στο επίπεδο της μετάφρασης. Από πειράματα αντίστροφης γενετικής με τη χρήση μεταλλαγμένων φυτών βρέθηκε ότι η φερριτίνη σχετίζεται με την προστασία του φυτού από την οξειδωτική καταπόνηση.

Χαρακτηριστικά των φυτικών φερριτινών.

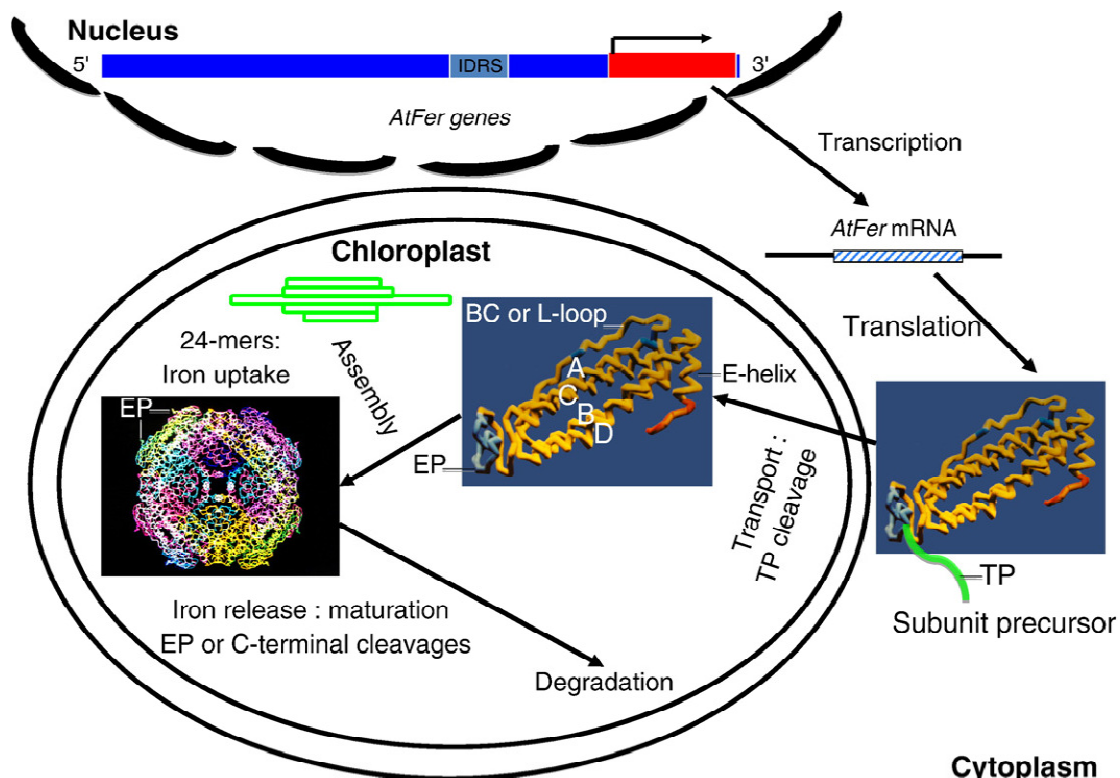
Ήταν γνωστό για περίπου 20 χρόνια ότι ζωικές και φυτικές φερριτίνες έχουν εξελιχθεί από ένα κοινό γονίδιο- πρόγονο, όπως δηλώνεται από τη σύγκριση αμινοξικών ακολουθιών των υπομονάδων των φερριτινών (Andrews *et al*, 1992). Πράγματι, οι ακολουθίες των φυτικών πρωτεϊνών παρουσιάζουν ομοιότητα 39% έως 49% με αυτή των ζωικών. Τα επτά αμινοξέα που εμπλέκονται στο κέντρο της φερροξειδάσης των φερριτινών τύπου **H** επιτρέπουν την οξειδωση και τη γρήγορη απορρόφηση του σιδήρου στο εσωτερικό των φερριτινών (Harrison 1996, Arosio 2009). Παρόλη την υψηλή ομοιότητα των φυτικών φερριτινών με αυτή των ζωικών τύπου **H**, τα καρβοξυλικά κατάλοιπα στην επιφάνεια της κοιλότητας του τύπου **L** ζωικής φερριτίνης είναι υπεύθυνα για την αποτελεσματική ενσωμάτωση του σιδήρου και μεγαλύτερη σταθερότητα του σιδήρου στον πυρήνα του συμπλόκου της πρωτεΐνης. Οι υπομονάδες της φερριτίνης συντίθενται ως μόρια των 32 KDa και περιέχουν μοναδική αμινοξική αλληλουχία που αποτελείται από δύο δομές (domains) και απουσιάζει στις ζωικές φερριτίνες. Η πρώτη δομή είναι περίπου 40-50 αμινοξικά κατάλοιπα και είναι το πεπτίδιο- οδηγός που εμπλέκεται στη μετακίνηση της πρόδρομης υπομονάδας φερριτίνης στο χλωροπλάστη ή στο μιτοχόνδριο, αντίστοιχα. Η δεύτερη δομή είναι μέρος της ώριμης πρωτεΐνης και λέγεται πεπτίδιο-επέκτασης. Η λειτουργία της μπορεί να συσχετιστεί με τη σταθερότητα της πρωτεΐνης και είναι δυνατό να αποκοπεί κατά τη διάρκεια της διαδικασίας βλάστησης των σπερμάτων πιζελιού. Τα 30 καρβοξυτελικά αμινοξέα είναι υψηλά διατηρημένα στις φυτικές φερριτίνες, αλλά αποκλίνουν από τις ομόλογες τους, των ζώων. Στις ζωικές φερριτίνες, τα συντηρημένα αμινοξέα της δεύτερης δομής ορίζουν την πέμπτη έλικα (E- έλικα), η οποία σχετίζεται με το σχηματισμό των υδροφοβικών καναλιών που εντοπίζονται στον τεταρτοταγή άξονα συμμετρίας (Briat *et al*, 2009).



Εικόνα 1.4. Κρυσταλλική δομή και το κέντρο φερροξυδάσης A. Η 24-μερή δομή της φερριτίνης B. Μονομέρες της φερριτίνης και ο τρόπος που συλλαμβάνει τα άτομα σιδήρου (καφέ χρώμα).

Μεγάλη ομοιότητα παρατηρείται στη δευτεροταγή δομή της φερριτίνης των σπερμάτων του πιζελιού με τη δευτεροταγή δομή της φερριτίνης των θηλαστικών.

Τα αμινοξικά κατάλοιπα, από 41 έως 210, σχηματίζουν τέσσερις έλικες (A, B, C και D). Μια μη ελικοειδής περιοχή 21 καταλοίπων (θέσεις 106 με 127 της φερριτίνης των σπερμάτων του πιζελιού) δείχνει είτε συστροφή είτε β-πτυχωτή δομή που ενώνει τη B με τη C έλικα μέσω L – βρόγχου που χαρακτηρίζει τις αναδιπλώσεις των υπομονάδων των ζωικών φερριτινών. (Briat *et al*, 2009)



Cytoplasm

Εικόνα 1. Ο κύκλος της φερριτίνης στα φυτικά κύτταρα. Το γονίδιο της φερριτίνης κωδικοποιείται από πυρηνικά γονίδια που ρυθμίζονται από το σίδηρο μέσω *cis* στοιχείων όπως το IDRS. Η μετάφραση του γονιδίου της φερριτίνης οδηγεί σε πρόδρομες υπομονάδες της. Οι δύο πρόδρομες ενώσεις περιέχουν μια αμινοτελική περιοχή που αποτελείται από δύο μέρη, το πεπτίδιο επέκτασης (EP) και το πεπτίδιο οδηγό (TP) που είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση των υπομονάδων φερριτίνης. Το πεπτίδιο-οδηγός αποκολλάται κατά τη διάρκεια της μεταφοράς των πρόδρομων μορίων στο χλωροπλάστη. Η δομή της υπομονάδας των φυτικών φερριτινών συγκρίνοντάς την με την H υπομονάδα της ανθρώπινης φερριτίνης διαφέρει κατά $\pm 1\text{\AA}$. Το μεγαλύτερο μέρος αυτής της δομής σχηματίζεται από ένα σύμπλοκο τεσσάρων α -ελίκων (A, B, C, and D). Ο βρόγχος L συνδέεται με τη B και C έλικα και εμπλέκεται στο διμερισμό των υπομονάδων των φερριτινών πριν την τελική 24-μερή δομή τους. Η έλικα E σχηματίζει 60° γωνία με το σύμπλοκο A- B- C- D σχετίζεται και με το σχηματισμό καναλιών της τελικής πρωτεΐνης. Οι εξειδικευμένες αλληλουχίες των φυτικών EP σχηματίζουν μια επιπρόσθετη α -έλικα, η οποία παρατηρείται στην επιφάνεια του 24-μερούς ώριμου πρωτεϊνικού συμπλόκου. Το 24-μερές σύμπλοκο της πρωτεΐνης έχει την ικανότητα να αποθηκεύει το σίδηρο Fe(III) στην κεντρική του κοιλότητα. Η απελευθέρωση του σιδήρου από τη δομημένη πρωτεΐνη προάγει την ωρίμανση της ίδιας της φερριτίνης μέσω αποκοπών αμινο-τελικών περιοχών εντός του EP οδηγώντας στην αποδόμηση της φερριτίνης ως πρωτεϊνικό σύμπλοκο (Briat et al, 2009).

Χρησιμοποιώντας για σύγκριση την ανασυνδυασμένη ανθρώπινη φερριτίνη H-τύπου, προτάθηκε ένα μοντέλο τρισδιάστατης δομής της υπομονάδας της φερριτίνης στο σπόρο μπιζελιού. Με αυτό τον τρόπο, υπερτονίζεται η αξιοσημείωτη συντήρηση της τρισδιάστατης δομής του φυτικού τύπου, με βάση το ανθρώπινο πρότυπο των φερριτινών.

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός της φερριτίνης.

Πριν 40 χρόνια προτάθηκε ότι στα φυτά μπορεί να περιέχεται φερριτίνη και ο πρώτος χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών αυτών έγινε πριν 10 χρόνια (Mikhlin *et al*, 1953). Οι φερριτίνες έχουν βρεθεί σε όλα σχεδόν τα φυτικά είδη και έχουν εντοπιστεί σε πολλούς τύπους κυττάρων με μεθόδους ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (Hyde *et al*, 1963). Μια σημαντική διαφορά μεταξύ ζωικών και φυτικών φερριτινών αφορά στον ενδοκυττάριο εντοπισμό τους. Οι φερριτίνες είναι κυρίως διαλυτές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες στα ζωικά κύτταρα, ενώ στα φυτικά κύτταρα βρίσκονται κατά κύριο λόγο στο στρώμα πλαστιδίων. Βιοχημική επιβεβαίωση του εντοπισμού της φερριτίνης στα πλαστίδια των φυτών προήλθε από ενδείξεις που δείχνουν ότι η υπομονάδα της πρωτεΐνης, που συντίθεται στα φύλλα φασολιού ή σόγιας, μετά από παροχή σιδήρου συντίθεται ως πρόδρομο μόριο με μοριακό βάρος λίγο μεγαλύτερο από αυτό της ώριμης υπομονάδας που εντοπίζεται στους χλωροπλάστες. Επιπλέον, αυτό το πρόδρομο μόριο προσλαμβάνεται *in vitro* από απομονωμένους χλωροπλάστες (Seckback, 1982).

Στα θηλαστικά, εκτός από τα γονίδια της φερριτίνης που κωδικοποιούν τις υπομονάδες **H**- και **L**- της κυτοπλασματικής μορφής, έχει αναφερθεί και ένα άλλο γονίδιο, χωρίς εσώνιο, με μιτοχονδριακό πεπτίδιο- οδηγό. Το προϊόν του γονιδίου αυτού προσλαμβάνεται εκλεκτικά από τα μιτοχόνδρια και σχηματίζει φερριτίνη με δραστικότητα φερροξειδάσης και ενσωματώνει το σίδηρο. Η αμινοξική ακολουθία της μιτοχονδριακής φερριτίνης (FtMt) είναι υψηλά συντηρημένη μεταξύ των θηλαστικών και περιέχει τα αμινοξικά κατάλοιπα που εμπλέκονται στο ενεργό κέντρο της φεροξειδάσης. Στον άνθρωπο η FtMt έχει εντοπιστεί στους όρχεις και στα σπερματοζώαρια. Μελέτες έχουν δείξει ότι η FtMt έχει σημαντικές ομοιότητες με την κυτταροπλασματική τύπου **H**-, εκτός από το ότι παρουσιάζει μειωμένη δραστικότητα της φερροξειδάσης. Ο ρόλος της φερριτίνης στα θηλαστικά φαίνεται ότι σχετίζεται με την προστασία των μιτοχονδρίων από την τοξικότητα σιδήρου και την οξειδωτική καταπόνηση. Οι ενδείξεις για την ύπαρξη μιτοχονδριακής φερριτίνης στα φυτά είναι αρκετά ισχυρές (Spence *et al*, 1991).

Ο ρόλος των θηλαστικών φερριτινών FtMt δείχνουν ότι σχετίζεται με την προστασία των μιτοχονδρίων από την τοξικότητα του σιδήρου και την οξείδωσή του.

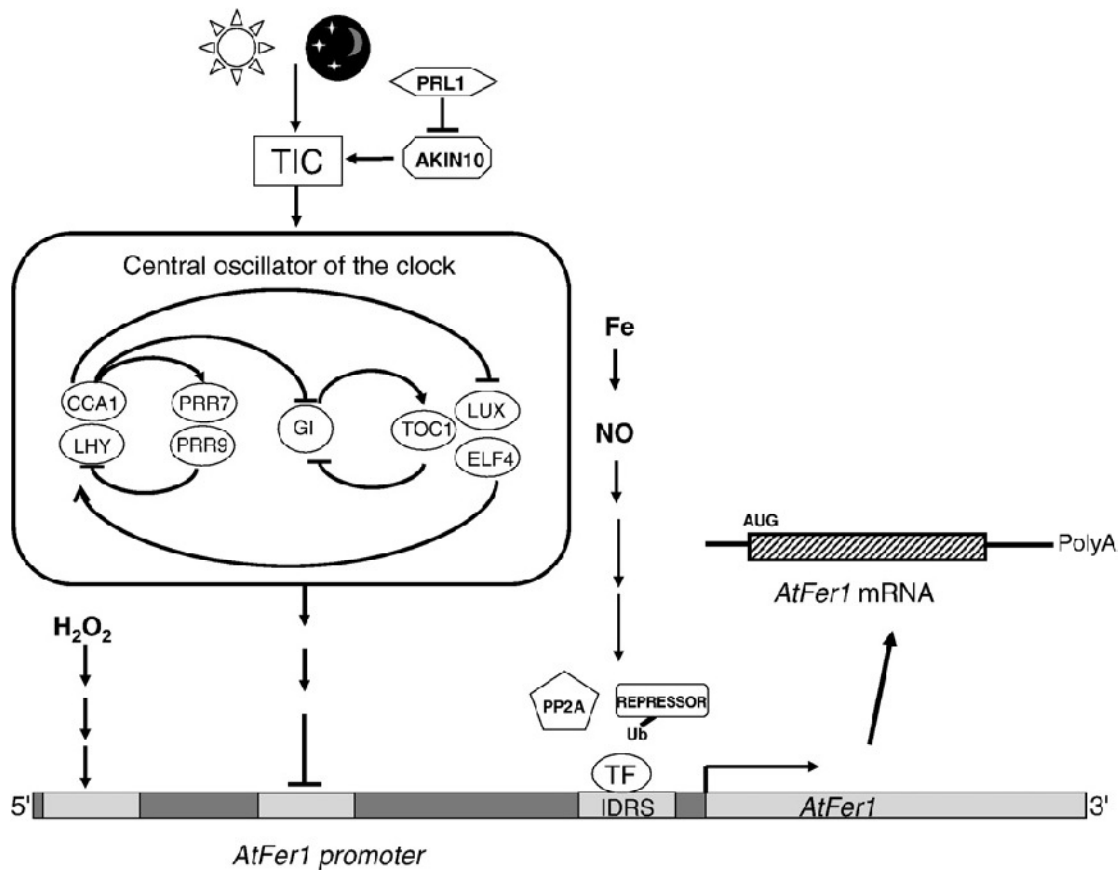
Πρόσφατα, έχει καταγραφεί εντοπισμός της φυτικής φερριτίνης σε μιτοχόνδρια, σε αντίθεση με πιο παλιές μελέτες για ύπαρξη μόνο στα πλαστίδια (M. Zancani, 2004). Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μιτοχονδρίων του πιζελιού ή του *Arabidopsis*, που καθαρίστηκαν με χρωματογραφία στήλης, περιείχαν μια πρωτεΐνη 25–26 kDa που αναγνωρίστηκε από πολυκλωνικά αντισώματα εναντίον της φερριτίνης. Καθαρισμός αυτής της διαλυτής πρωτεΐνης με ανοσοκαθίζηση και προσδιορισμός της πρωτοταγούς δομής της επιβεβαίωσε ότι είναι φερριτίνη. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύθηκαν από τον εντοπισμό της πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια του πίσου με τη χρήση αντισωμάτων με κολλοειδή χρυσό. Οι τέσσερις αμινοξικές ακολουθίες από το *A. thaliana* έχουν αμινοξικό πεπτίδιο οδηγό για πλαστίδια. Παρόλα αυτά η ανάλυση της αλληλουχίας της AtFer4 δείχνει ότι είναι πιθανόν να οδηγείται και στα μιτοχόνδρια ειδικά όταν αυτή συγκρίνεται με την αλληλουχία της AtFer1. Πάντως, μέχρι σήμερα, δεν έχουν παρασχεθεί λειτουργικά δεδομένα που θα συνηγορούσαν υπέρ του μιτοχονδριακού εντοπισμού της AtFer4. Έτσι, οι Zancani *et al.* (2004) συμπεραίνουν ότι οι φυτικές φερριτίνες θα μπορούσαν να οδηγούνται τόσο στα πλαστίδια όσο και στα μιτοχόνδρια (Briat *et al.*, 2009).

Η έκφραση των γονιδίων της φερριτίνης.

Από το γεγονός ότι οι φυτικές φερριτίνες εντοπίζονται στα πλαστίδια φαίνεται ότι στα φυτά θα πρέπει να υπάρχουν εξειδικευμένα μεταβολικά μονοπάτια, που προφανώς δεν υπάρχουν στα θηλαστικά, τα οποία εμπλέκονται τόσο στη ρύθμιση της πρωτεΐνης, όσο και στα επίπεδα των μεταγραφημάτων (Briat *et al.*, 2009). Η σιδηροπενία στα φυτά οδηγεί σε συμπτώματα χλώρωσης που προκύπτουν από έλλειψη χλωροφύλλης και ανεπαρκούς φωτοσύνθεσης. Κάτω από αυτές τις συνθήκες το φυτό αναπτύσσει μηχανισμούς πρόσληψης σιδήρου μέσω των ριζών, ώστε να εφοδιαστεί με σίδηρο στα φυσιολογικά επίπεδα. Η προσθήκη περίσσειας σιδήρου σε καλλιέργεια φυταρίων που παρουσιάζουν σιδηροπενία οδηγεί σε μεγάλη μετακίνηση του σιδήρου στο φυτό. Ο σίδηρος μεταφέρεται στα φύλλα μέσα σε τρεις ώρες, ώστε να επανέλθει η θεμελιώδης φωτοσυνθετική διαδικασία στους χλωροπλάστες (Briat *et al.*, 2008). Κατά τη διάρκεια της επανάκαμψης του φυτικού οργανισμού, η οποία διαρκεί 24 με 48 ώρες, οι φερριτίνες χρησιμοποιούνται ως ρυθμιστές της

συγκέντρωσης του σιδήρου. Επίσης, τρεις ώρες μετά την παροχή σιδήρου στο φυτό το mRNA είναι ανιχνεύσιμο στα φύλλα έκφυτων καλαμποκιού.

Αυτή η πρόσληψη του σιδήρου αγγίζει το μέγιστο της στις 6 και 24 ώρες στα φύλλα και στις ρίζες, αντίστοιχα, και έπειτα μειώνεται σταδιακά. Ανάλογα με την αύξηση των επιπέδων φερριτίνης αυξάνονται και τα επίπεδα έκφρασης του mRNA με ένα μέγιστο στις 24 ώρες μετά τη χορήγηση σιδήρου (Lobréaux *et al*,1993). Έπειτα, παρατηρείται σταδιακή μείωση του επιπέδου της φερριτίνης που σχετίζεται με το ρυθμιστικό της ρόλο. Έχει αποδειχθεί ότι η παροχή σιδήρου σε κυτταρικές καλλιέργειες έλλειψης σιδήρου επάγει την έκφραση του mRNA της φερριτίνης. Αυτό το αποτέλεσμα έχει επιβεβαιωθεί για το AtFer1 που είναι το ορθόλογο του γονιδίου ZmFer1 του Arabidopsis στο καλαμπόκι (Gaymard *et al*, 1996). Το στοιχείο IDRS (*Iron Dependent cis Regulatory Sequence*) απαιτείται για την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης των AtFer1 και ZmFer1 υπό συνθήκες έλλειψης σιδήρου. Ένα επιπρόσθετο cis στοιχείο εξαρτώμενο από το σίδηρο είναι το FRE (Fe Responsive Element) και εντοπίζεται στον προαγωγέα του γονιδίου της φερριτίνης στη σόγια. Μέχρι στιγμής δεν έχουν εντοπιστεί trans- παράγοντες που αντιδρούν με τις cis ακολουθίες. Η έκφραση της φερριτίνης στα φυτά σε αναλογία με την πρόσληψη σιδήρου ρυθμίζεται σε μεταγραφικό επίπεδο, σε αντίθεση με τη ζωική φερριτίνη, η ρύθμιση της οποίας συμβαίνει σε μεταφραστικό επίπεδο.



Εικόνα 2. Το μοντέλο της μεταγραφικής ρύθμισης του γονιδίου *AtFer1*. Αυτό το μοντέλο παρουσιάζει τους βασικούς παράγοντες που εμπλέκονται στη ρύθμιση και λειτουργία του γονιδίου *AtFer1*. Ο σίδηρος και το υπεροξειδίο του υδρογόνου ρυθμίζει θετικά τη μεταγραφή του γονιδίου *AtFer1* με δύο ανεξάρτητα και συνεργιστικά μονοπάτια. Κάτω από συνθήκες έλλειψης σιδήρου, τα ενεργά cis στοιχεία IDRS (Iron Dependent Regulatory Sequence) εμπλέκονται με την καταστολή του γονιδίου *AtFer1*. Μετά την προσθήκη σιδήρου επέρχεται η άρση της προϋπάρχουσας καταστολής της έκφρασης του γονιδίου *AtFer1*. Αυτή η άρση της καταστολής οφείλεται στην αποδόμηση του κατασταλατικού παράγοντα από ένα πρωτεόσωμα, αφού πρώτα η πρωτεΐνη που πρόκειται να αποδομηθεί έχει σημανθεί από την ουμπικουτίνη. Διαδικασίες αποφωσφορυλίωσης σχετίζονται με την ρύθμιση της έκφρασης *AtFer1* παρουσία σιδήρου. Μια φωσφατάση τύπου PP2A φέρεται να λειτουργεί ως θετικός ρυθμιστής του *AtFer1*. Μετά την προσθήκη σιδήρου στο θρεπτικό διάλυμα του φυτού εμφανίζεται μια αύξηση του NO στα πλαστίδια. Αυτή η παραγωγή του NO είναι απαραίτητη για την λειτουργία του γονιδίου *AtFer1* αφού ενισχύει τη δράση της PP2A φωσφατάσης και κατά επέκταση του κατασταλατικού παράγοντα. Επίσης, το *AtFer1* ρυθμίζεται μεταγραφικά από τον κεντρικό ταλαντωτή του κρκαρικού ρολογιού και το γονιδίο TIC. Σε μεταλλάγματα των γονιδίων που κωδικοποιούν για στοιχεία του κεντρικού ταλαντωτή του κρκαδικού ρολογιού εμφανίζουν έλλειψη της περιοδικότητας του *AtFer1* (Briat et al, 2009).

Από το γεγονός ότι οι φυτικές φερριτίνες εντοπίζονται στα πλαστίδια, φαίνεται ότι στα φυτά θα πρέπει να υπάρχουν εξειδικευμένα μεταβολικά, που δεν υπάρχουν στα θηλαστικά, μονοπάτια τα οποία εμπλέκονται τόσο στη ρύθμιση της πρωτεΐνης, όσο και στα επίπεδα των μεταγραφημάτων.

Στα ζωικά κύτταρα η μεταφραστική αυτή ρύθμιση απαιτεί την παρουσία του συστήματος IRE/IRP-ACO. Η ζωική κυτοπλασματική ακονιτάση (ACO) είναι δυνατόν να μετατραπεί σε ρυθμιστική πρωτεΐνη του σιδήρου (IRP1) που δεσμεύεται στο ρυθμιστικό του σιδήρου στοιχείο το οποίο βρίσκεται στο 5' άκρο UTR του mRNA της φερριτίνης και καταστέλλει τη μετάφρασή του σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου. Μία άλλη IRP, η (IRP2), έχει χαρακτηριστεί, αλλά δεν έχει την ικανότητα να μετατραπεί σε ακονιτάση επειδή δεν μπορεί να ενσωματώσει σύμπλοκο Fe-S. Παρόλα αυτά ρυμίζεται από το σίδηρο και αποδομείται υπό συνθήκες έλλειψης σιδήρου. Στο *A. thaliana* έχουν ταυτοποιηθεί τρεις γονιδιωματικές ακολουθίες που ονομάστηκαν ACO1-3. Για να διαπιστωθεί αν αυτές οι αλληλουχίες είναι δυνατόν να κωδικοποιούν λειτουργικές πρωτεΐνες όμοιες με την IRP1 που ρυθμίζουν και την ομοιόσταση του σιδήρου στα φυτά, έχουν δημιουργηθεί μεταλλάγματα για τα τρία αυτά γονίδια. Τα μεταλλάγματα *aco1-1* παρουσιάζουν αισθητή μείωση της δραστηριότητας της κυτοπλασματικής ACO. Όμως, κανένα από αυτά τα μεταλλάγματα δεν επηρεάζεται κάτω από την συσσώρευση των μεταγραφημάτων της φερριτίνης ή της πρωτεΐνης σε περίσσεια σιδήρου. *Cis* στοιχεία που είναι δυνατόν να δρουν με τα IRP φαίνεται ότι εντοπίζονται με πολλή μικρή συχνότητα και βρίσκονται στο 5' άκρο της UTR ή στο 3' άκρο της UTR λίγων mRNA που δε σχετίζονται με το μεταβολισμό του σιδήρου. Δε φαίνεται, λοιπόν, να σχετίζονται με τη ρύθμιση της ομοιόστασης του σιδήρου (Briat et al, 2009). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι στα φυτά, το κυτοπλασμικό ρυθμιστικό σύστημα που περιλαμβάνει τα ACO-IRP1/IRE δεν είναι συντηρημένο όσον αφορά τη ρύθμιση της ομοιόστασης του σιδήρου.

Παρά τον αυξανόμενο αριθμό των δημοσιευμάτων που σχετίζονται με την επίδραση διαφόρων συνθηκών στη βιοσύνθεση της φερριτίνης, ελάχιστα είναι γνωστά για τα ρυθμιστικά μόρια που δρουν μετά το σίδηρο και ρυθμίζουν την έκφραση της φερριτίνης. Επειδή το γονίδιο *AtFer1* χαρακτηρίστηκε ως το πιο παραγωγικό στην έκφραση της φερριτίνης σε περιπτώσεις περίσσειας σιδήρου, χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο για τη μελέτη μονοπατιών που δρουν ως σινιάλα

οδηγώντας στη ρύθμιση του σιδήρου της καλλιέργεια κυττάρων του *Arabidopsis*. Η περίσσεια σιδήρου και η οξειδωτική καταπόνηση μιμούμενα την εφαρμογή του εξωγενούς H_2O_2 , προωθούν την έκφραση του γονιδίου AtFer1 μέσω δύο ανεξάρτητων και προστιθέμενων μονοπατιών. Συνδυάζοντας φαρμακολογικές και μικροσκοπικές παρατηρήσεις σε καλλιέργειες κυττάρων του *Arabidopsis*, έχουν ταυτοποιηθεί σημαντικά στοιχεία του μονοπατιού μετάδοσης του σήματος που οδηγούν σε αύξηση του επιπέδου μεταγραφής των γονιδίων AtFer1 μέσω παροχής σιδήρου. Το NO συσσωρεύεται γρήγορα στα πλαστίδια μέσω της παροχής σιδήρου και φαίνεται ότι δρα μετά την παροχή του σιδήρου και πριν από την PPA2 φωσφατάση στην επαγωγή της αύξησης των μεταγραφημάτων του AtFer1. Έχει αποδειχθεί ότι για να κατασταλεί η μεταγραφή του γονιδίου γίνεται κάτω από συνθήκες έλλειψης σιδήρου με την παρεμβολή του cis στοιχείων IDRS που ταυτοποιούνται μέσα στην ακολουθία του προαγωγέα του AtFer1. Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η φερριτίνη συνδέεται με ουμπιουκουιτίνη και αποδομείται μετά την παροχή σιδήρου και είναι απίθανο να δρα ως trans παράγοντας ικανός να ενωθεί με IDRS κάτω από συνθήκες έλλειψης σιδήρου. Πρέπει να σημειωθεί ότι στα ζωικά κύτταρα ένας από τους trans ρυθμιστικούς παράγοντες της φερριτίνης ο οποίος ονομάζεται IRP2, εμπλέκεται στη μεταφραστική καταστολή των mRNAs που σχετίζονται με την φερριτίνη σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου (Kim,2002, 2003, 2004 Iwai *et al*, 1998). Ο IRP2 έχει δειχθεί ότι σχετίζεται με το NO και τη σύνδεση της πρωτεΐνης με την ουμπιουκουιτίνη. Μετά την προσθήκη σιδήρου ο IRP2 νιτροζυλιώνεται, συνδέεται με την ουμπιουκουιτίνη και αποδομείται από πρωτεοσώματα πράγμα που οδηγεί σε μετάφραση των mRNA φερριτίνης (Kim, Ponka 2002, Iwai *et al*, 1998). Είναι αξιοσημείωτο ότι μοριακοί παράγοντες απόκρισης σε περίσσεια σιδήρου, όπως NO, και η σύνδεση με την ουμπιουκουιτίνη είναι συντηρημένοι ανάμεσα σε μεταφραστικούς παράγοντες των ζωικών φερριτίνων και των φυτικών φερριτινών.

Σε πρόσφατες μελέτες εντοπισμού των γονιδίων με λουσιφεράση, χρησιμοποιώντας το σχετιζόμενο με σίδηρο προαγωγέα AtFer1 ως στόχο, οδήγησαν στην ταυτοποίηση ως αρνητικού ρυθμιστή στην έκφραση του γονιδίου AtFer1 στο γονίδιο TIME FOR COFFEE (TIC). Στο αντίστοιχο μετάλλαγμα το mRNA του AtFer1 υπερ-συσσωρεύεται σε σχέση με αυτό του άγριου τύπου. Γεγονός που υποδηλώνει ότι το TIC είναι ένας καταστολέας της γονιδιακής έκφρασης του AtFer1 (Duc *et al*, 2009). Το TIC είναι, όμως ως ρυθμιστής του κερκαδικού κύκλου που

εδράζεται στον πυρήνα, στο *Arabidopsis* και είναι εξειδικευμένος σε κάθε φυτό (Ding *et al.*, 2007, Hall *et al.*, 2003). Η έκφραση του γονιδίου AtFer1 δείχνει ότι ελέγχεται από το κίρκαδικό ρολόι. Η έκφραση του γονιδίου μειώνεται στα μεταλλάγματα *cca1*, *lhy* και *elf4* τα οποία παρουσιάζουν αλλαγή στην λειτουργία του κεντρικού ταλαντωτή του κίρκαδικού ρολογιού. Άλλα γονίδια που σχετίζονται με την υψηλή συγκέντρωση του σιδήρου, όπως AtFer3, AtFer4 και AtAPX1, ρυθμίζονται επίσης από το TIC και τον κίρκαδικό κύκλο ενώ, δε ρυθμίζονται τα γονίδια που αποκρίνονται στην έλλειψη του σιδήρου. Τα διαγονιδιακά TIC φυτά παρουσιάζουν ένα χλωρωτικό φαινότυπο που μετατρέπεται σε κανονικό μετά την παροχή εξωγενούς σιδήρου. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ρύθμιση της ομοιόστασης του σιδήρου στα φυτά είναι το κύριο αποτέλεσμα του TIC και των σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με τον κίρκαδικό κύκλο (Briat *et al.*, 2009). Τα *cis* στοιχεία IDRS εντοπίζονται στην αρχική περιοχή του προαγωγέα του AtFer1. Τα *cis* στοιχεία IDRS δε φαίνονται να αναμιγνύονται στο ρυθμιστικό μονοπάτι TIC. Κατά συνέπεια, η έκφραση του AtFer1 είναι κάτω από τον έλεγχο δύο ανεξάρτητων κατασταλτικών μονοπατιών, από τα οποία το ένα εμπλέκεται με τα *cis* στοιχεία IDRS και ελέγχει την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Η έκφραση του γονιδίου TIC είναι περιοδική μεταξύ των κίρκαδικών περιόδων (Ding *et al.*, 2007), αλλά η έκφραση του γονιδίου AtFer1 δεν αντικαταστέλλεται από το TIC όλες τις φορές. Το TIC δείχνει ανενεργό το ξημέρωμα όπου τα mRNA του AtFer1 φτάνουν στο αποκορύφωμα της συσσώρευσής τους.

Η έκφραση του γονιδίου TIC είναι σταθερή κατά τη διάρκεια του κίρκαδικού κύκλου, αλλά η έκφραση του γονιδίου AtFer1 δεν καταστέλλεται από την πρωτεΐνη TIC. Στη συνέχεια, επειδή η πρωτεΐνη TIC είναι ανενεργή κατά τις πρωινές ώρες, τότε παρατηρείται το μέγιστο της συγκέντρωσης των mRNA του AtFer1. Αυτό δημιουργεί το ερώτημα για το πως ρυθμίζεται η δραστηριότητα της TIC πρωτεΐνης. Η ανάλυση διάφορων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την TIC οδήγησε στην απομόνωση μιας κινάσης η οποία σχετίζεται με την πρωτεΐνη SNF1 της AKIN10. Η AKIN10 και η ομόλογη της AKIN11 έχειδειχθεί ότι αλληλεπιδρούν με το πρωτεϊνικό σύμπλοκο SKP1/ASK1 (*S-phase kinase associated protein 1/Arabidopsis SKP1-like1*). Το σύμπλοκο αυτό φαίνεται ότι ρυθμίζει τη σύνδεση μιας λιγάσης τύπου ομπικουΐτινης σε διάφορες πρωτεΐνες-στόχους. Η αλληλεπίδραση αυτή παρεμποδίζεται από το προϊόν του γονιδίου PRL1 το οποίο φαίνεται να ανταγωνίζεται την πρωτεΐνη SKP1 ως προς την πρόσδεσή της στη ρυθμιστική

περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου των AKIN10/ AKIN11. Μια πρόσφατη γενετική ανάλυση που είχε ως σκοπό την απομόνωση γονιδίων τα οποία είχαν σχέση με το μονοπάτι μεταγωγής σήματος μέσω ROS, οδήγησε στην απομόνωση ενός μεταλλαγμένου στελέχους που δεν είχε την ικανότητα να παράγει την πρωτεΐνη PRL1. Ενδιαφέρον είχε ότι στο μεταλλαγμένο αυτό στέλεχος η έκφραση των AtFer1 και AtAPX1 καταστέλλονταν συνεχώς σε σχέση με αυτό του άγριου τύπου (Briat et al, 2009). Το αποτέλεσμα αυτό δηλώνει ότι η πρωτεΐνη PRL1 είναι ένας θετικός ρυθμιστής της δραστηριότητας της TIC πρωτεΐνης. Έτσι, ένα ρυθμιστικό δίκτυο το οποίο θα εμπειρεί τις πρωτεΐνες TIC, AKN10, PRL1 θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση της ομοιόστασης του σιδήρου στο φυτό. Όταν η πρωτεΐνη TIC είναι ενεργή, θα μπορούσε να καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων AtFer και AtAPX1. Αυτή η ενεργή κατάσταση της πρωτεΐνης TIC επάγεται άμεσα ή έμμεσα από την AKIN10. Αφού η AKIN10 ρυθμίζεται αρνητικά από την PRL1 σε μεταλλαγμένα στελέχη που δεν εκφράζεται η PRL1, η AKIN10 ενεργοποιεί συνεχώς την πρωτεΐνη TIC οδηγώντας συνεπώς στην έλλειψη της καταστολής AtFer/ AtAPX1 κατά τις πρώτες πρωινές ώρες (Briat et al, 2009).

Επομένως, η πρωτεΐνη TIC εμφανίζεται ως κύριος ρυθμιστής της ομοιόστασης του σιδήρου στα φυτά. Είναι ενδιαφέρον ότι δύο γονίδια που σχετίζονται με την καταπόνηση και τη μεταγωγή σήματος, το AKIN10 και το PRL1, σχετίζονται επίσης με την TIC και με τη ρύθμιση μερικών γονιδίων σχετικών με την ομοιόσταση του σιδήρου. Ως απόκριση του φυτού στην έλλειψη ενέργειας που προέρχεται από καταστάσεις καταπόνησης, οι κινάσες τύπου SNK1 φαίνεται ότι επάγουν μια ευρεία μεταγραφική αλλαγή του γονιδιώματος του φυτού, η οποία επιτρέπει να αποκαταστήσει την ομοιόσταση του σιδήρου και να αναπτύξει μια μακροπρόθεσμη αντίδραση η οποία συμβάλλει στην προσαρμογή της ανάπτυξης του φυτού. Ρυθμιστικοί μηχανισμοί αποδείχθηκαν ότι συντονίζουν μερικούς παράγοντες, όπως είναι το φώς, το κερκαδικό ρολόι ή τα σήματα θρεπτικών στοιχείων, σε ένα πολυσύνθετο δίκτυο σημάτων. Λόγω των ουσιωδών λειτουργιών του σιδήρου και των πρωτεϊνών που περιέχουν σίδηρο σε κεντρικές μεταβολικές διαδικασίες, όπως η φωτοσύνθεση, η αναπνοή και η αφομοίωση αζώτου και θείου, οι αλληλεπιδράσεις που ρυθμίζουν την ομοιόσταση του σιδήρου θα πρέπει να διευκρινιστούν για να κατανοήσουμε το πώς τα σήματα της ενέργειας του κυττάρου έχουν ως αποτέλεσμα την προσαρμογή ολόκληρου του φυτού στη ρύθμιση της αύξησης και ανάπτυξης του (Briat et al, 2009). Είναι πολύ πιθανό οι φυτικές φερριτίνες, με τη ρύθμιση της

συγκέντρωσης του σιδήρου, να ασκούν τον κατάλληλο έλεγχο στην ποσότητα του στοιχείου που απαιτείται από τις μεταβολικές διαδικασίες. Με αυτό τον τρόπο, βοηθούν το φυτό να ανταπεξέλθει στις αντίξοες συνθήκες και τις τοξικότητες οι οποίες θα πολλαπλασιάζονταν αν δεν υπήρχε σύστημα διαχείρισης του σιδήρου.

Η φερριτίνη ως μέσον αποθήκευσης του σιδήρου στα χυμοτόπια των σπερμάτων.

Ο πρωταρχικός στόχος των ζωικών φερριτινών στο εσωτερικό των κυττάρων είναι η αποθήκευση του σιδήρου και η παροχή των μεταλλικών ιόντων σε μεταβολικά μονοπάτια όποτε χρειάζεται. Στα βακτήρια η λειτουργία των φερριτινών δείχνει να σχετίζεται με την προστασία κατά της οξείδωσης, δηλαδή αποφυγή της αντίδρασης του σιδήρου με το οξυγόνο. Στα φυτά η πιο διαπιστωμένη υπόθεση, αναφορικά με την λειτουργία των φερριτινών, βασίζεται στη συσχέτιση του εντοπισμού των πρωτεϊνών και της απόκρισης των φυτών σε περιβαλλοντικούς παράγοντες και σε αναπτυξιακά στάδια (Briat, 2008). Στα σπέρματα ο κύριος ρόλος των φερριτινών είναι η αποθήκευση του σιδήρου και η απελευθέρωση και παροχή του σε πρωτεΐνες που περιέχουν σίδηρο μετά τη βλάστηση. Οι φερριτίνες των σπερμάτων είναι απαραίτητες για τη σωστή ανάπτυξη της φωτοσυνθετικής συσκευής. Με αυτόν τον τρόπο, συμμετέχει στη στροφή από την ετερότροφη στην αυτότροφη φάση των φυτών (Lobréaux et al, 1991). Στα φύλλα η φερριτίνη θεωρείται ότι είναι μια πηγή σιδήρου στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης για τη σύνθεση σιδηρο- πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη φωτοσύνθεση.

Ενδείξεις για τη λειτουργία των φερριτινών στα φυτά έχουν καταγραφεί για τα τέσσερα γονίδια του *Arabidopsis*. Το AtFer2 είναι το μόνο που εκφράζεται στα σπέρματα, ενώ τα AtFer1, AtFer3 και AtFer4 εκφράζονται σε βλαστικούς και αναπαραγωγικούς ιστούς (Petit et al, 2001). Έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί μεταλλαγμένα φυτά μετά από εκτόπιση του γονιδίου (*Knock-out*) FER2 είτε των τριών ισοτύπων FER1, 3 και 4 (Ravet et al, 2009). Η FER2 είναι η μόνη υπομονάδα που συσσωρεύεται στα ξηρά σπέρματα και αποδομείται κατά τη διάρκεια της βλάστησης. Παρόλα αυτά, στη *fer2* η συνολική συγκέντρωση του σιδήρου στο σπέρμα δε μεταβλήθηκε σε σύγκριση με τον άγριο τύπο. Ο σίδηρος που περιέχεται

στη φερριτίνη εκτιμάται ότι είναι λιγότερο από το 5% του ολικού σιδήρου. Άρα, φαίνεται ότι η φερριτίνη δεν αποτελεί την κύρια μορφή αποθήκης σιδήρου στα σπέρματα του *Arabidopsis*. Επιπλέον, ο σίδηρος που αποθηκεύεται στη φερριτίνη δεν είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη των φυταρίων ακόμα και κάτω από συνθήκες έλλειψης σιδήρου. Η αποθηκευτική λειτουργία των φερριτινών στο *Arabidopsis* φαίνεται ότι είναι μικρή. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα *in vitro* αποτελέσματα σχετικά με τη φερριτίνη του σπέρματος πιζελιού που δείχνουν το ρόλο του pH και του ασκορβικού οξέως στην απελευθέρωση του σιδήρου από τη φερριτίνη των σπέρματος του πιζελιού (Lanquar et al, 2005). Όμως, η ποσότητα του σιδήρου που αποθηκεύεται στα σπέρματα του *Arabidopsis* είναι σχετικά χαμηλή συγκριτικά με το συνολικό σίδηρο των σπερμάτων. Ο αποθηκευμένος αυτός σίδηρος είναι πιθανό να κινητοποιείται εκ νέου. Επίσης, στα σπέρματα του *Arabidopsis* το μεγαλύτερο μέρος του σιδήρου είναι αποθηκευμένο σε χυμοτόπια με σύμπλοκα των γλοβοειδών. Αυτά τα γλοβοειδή είναι λιγότερο άφθονα στα χυμοτόπια των σπερμάτων του πιζελιού. Στα σπέρματα αυτά η σίδηρο- φερριτίνη αντιπροσωπεύει έως και το 92% του συνολικού σιδήρου στους εμβρυϊκούς άξονες (Kim et al, 2006). Υπάρχουν βασικές διαφορές μεταξύ των ειδών ως προς τον τρόπο που διαχειρίζονται το σίδηρο των σπερμάτων τους. Στο *Arabidopsis* ο σίδηρος αποθηκεύεται στον εμβρυϊκό άξονα και διαλυτοποιείται κατά τη διάρκεια της βλάστησης. Στο *Arabidopsis* η σταθερότητα της φερριτίνης στα σπέρματα εξαρτάται από τη μετακίνηση του σιδήρου από τα χυμοτόπια στα πλαστίδια, γεγονός που σημαίνει επικοινωνία μεταξύ των πλαστιδίων και των σπερμάτων (Bouis et al, 2003).

Φερριτίνες και οξειδωτικό στρες στα φυτά.

Η λειτουργία των φερριτινών στα φυτά έχει μελετηθεί με τη χρήση τρις μεταλλαγμένων φυτών *fer1-3-4* που δεν έχουν την ικανότητα σύνθεσης φερριτινών σε αυτό το όργανο. (Ravet et al, 2009). Κατά την άρδευση των φυτών, η ανάπτυξη του μάρτυρα και του *fer1-3-4* ήταν όμοια. Κατά την άρδευση με διάλυμα σιδήρου παρατηρείται αύξηση της βιομάζας των φυτών αγρίου τύπου που υποδεικνύει ότι ο σίδηρος ήταν περιοριστικός παράγοντας, αλλά όχι τοξικός. Αντίθετα, η αύξηση των *fer1-3-4* μειώθηκε, γεγονός που πιθανό να οφείλεται σε μείωση της καθήλωσης του CO₂. Στα ώριμα φύλλα η φωτοσύνθεση δεν επηρεάζεται από την απουσία των

φερριτινών. Η παρατήρηση ότι η ροή ηλεκτρονίων μέσω PSII δε διέφερε σε μεταλλαγμένα και σε μάρτυρα σε συνθήκες άρδευσης με νερό ή με διάλυμα σιδήρου δείχνει ότι η απουσία των φερριτινών στο τριπλό μετάλλαγμα δεν έχει σοβαρό αντίκτυπο στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό μεταφοράς ηλεκτρονίων. Όμως, η μείωση της καθήλωσης του CO₂ πιθανόν σημαίνει ότι η φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων χρησιμοποιείται λιγότερο αποτελεσματικά από τα ένζυμα του κύκλου του Calvin όταν απουσιάζουν οι φερριτίνες. Πλειοτροπικές ατέλειες που οδηγούν σε ισχυρή μείωση της γονιμότητας έχουν παρατηρηθεί στα άνθη των τριπλών μεταλλαγμάτων που έχουν αναπτυχθεί με άρδευση με διάλυμα σιδήρου. Αυτές οι αλλαγές συνδέθηκαν με μια αύξηση στη συνολική περιεκτικότητα του σιδήρου στο άνθος και μείωσή του στο μίσχο, γεγονός που μπορεί να σημαίνει μεταβολές της μεταφοράς του σιδήρου μεταξύ αυτών των οργάνων. Η ανάλυση των μεταγραφημάτων ενός συνόλου γονιδίων που σχετίζονται με τη διακίνηση του σιδήρου αποκαλύπτει ότι η έκφραση πολλών από αυτά τροποποιήθηκε στα τριπλά μεταλλάγματα *fer1-3-4* σε σύγκριση με του άγριου τύπου υπό συνθήκες επάρκειας σιδήρου (Briat *et al.*, 2009). Η απουσία των φερριτινών στα αναπαραγωγικά όργανα αλλάζει σε μεγάλο βαθμό την ομοιόσταση του σιδήρου και απορρυθμίζει τη μεταφορά σιδήρου μεταξύ των οργάνων. Τέλος, οδηγεί σε αλλαγές της ανάπτυξης των καρπών που πιθανώς να οφείλονται σε τοξικότητα του σιδήρου. Πράγματι, η αφθονία του FER2 στα σπέρματα οδηγεί σε μια υψηλή ευαισθησία στο μεθυλβιολογόνο, ένα προ-οξειδωτικό συστατικό που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της βλάστησης. Στα φύλλα και τα άνθη φυτών που αναπτύχθηκαν με άρδευση καθαρού νερού, η αφθονία των φερριτινών στα τριπλά μεταλλάγματα οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή ROS και αυξημένη δραστηριότητα ενζύμων που σχετίζονται με την αποτοξίνωση των ROS. Παρόλα αυτά, οι οξειδωμένες και ανηγμένες δεξαμενές του ασκορβικού και γλουταθειόνης στα μεταλλαγμένα ήταν όμοιες με εκείνες του αγρίου τύπου και οι ζημίες που σχετίζονται με τις ROS αποφεύγονται επειδή δε βρέθηκε αυξημένη υπερ-οξειδίωση των λιπών. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι κατά την άρδευση των φυτών με καθαρό νερό τα μεταλλάγματα είναι ικανά να ανταπεξέρχονται στην ασφαλή έλλειψη αποθήκευσης σιδήρου σε φερριτίνες με την αύξηση της ικανότητας των μηχανισμών που αποτοξινώνουν τα ROS. Παρόλα αυτά, όταν τα φυτά τροφοδοτούνται με υψηλές συγκεντρώσεις σιδήρου, η έλλειψη των φερριτινών στα μεταλλάγματα οδηγούν σε πλειοτροπικές ατέλειες σε αναπαραγωγικά και βλαστικά όργανα με αποτέλεσμα τη

μείωση της γονιμότητας. Φαίνεται λοιπόν ότι κάτω από συνθήκες περίσσειας σιδήρου η παραγωγή από τον ελεύθερο σίδηρο σχετιζόμενων ROS ξεπέρασε τους μηχανισμούς αποτοξίνωσης που ενεργοποιούνται στα μεταλλάγματα. Είναι, επομένως σαφές ότι η λειτουργία των φερριτινών στα φυτά είναι ουσιαστική για την απομάκρυνση σιδήρου, ώστε να αποφευχθεί το οξειδωτικό στρες (Briat *et al*, 2009). Οι καλύτερες ενδείξεις που δείχνουν τη σχέση φωτός, φωτοσύνθεσης και οξειδωτικής καταπόνησης και σύνθεσης φερριτίνης λήφθηκε από μια σειρά μελετών του *Chlamydomonas reinhardtii*. Σε αυτά τα φύκη χαρακτηρίστηκαν δύο γονίδια, FER1 και FER2, τα οποία κωδικοποιούν τις υπομονάδες φερριτίνης (Long *et al*, 2008). Οι υπομονάδες FER1 και FER2 εντοπίστηκαν στα πλαστίδια, αλλά δεν συναρμολογούνται σε ενιαία δομή. Η αναλογία της ferritin1 σε ferritin 2 είναι 70:1 σε κύτταρα υπερ- εμπλουτισμένα από σίδηρο υποδηλώνοντας έναν πιο κυρίαρχο ρόλο της ferritin1 στην ομοιόσταση του σιδήρου. Σε καταστάσεις που ο σίδηρος είναι σε χαμηλά επίπεδα, οι υπομονάδες της ferritin1 και τα ολιγομερή της ferritin1 παρουσιάζουν αφθονία ανάλογη με την αύξηση του αντίστοιχου mRNA. Εντούτοις, η περιεκτικότητα σε σίδηρο αυτού του 24- μελούς πρωτεϊνικού μορίου μειώνεται. Αυτό δείχνει ότι η αυξανόμενη έκφραση FER1 μπορεί να αυξήσει τη χωρητικότητα του μορίου στους χλωροπλάστες των κυττάρων μειωμένης περιεκτικότητας σιδήρου, υποστηρίζοντας το ρόλο για τη ferritin1 ως ρυθμιστική του σιδήρου. Έχει εδραιωθεί ότι η ανεπάρκεια σιδήρου προάγει την αποδόμηση του PSI του *Chlamydomonas reinhardtii*. Έχει παρατηρηθεί ότι η επαγωγή της σύνθεσης της φερριτίνης σχετίζεται με το βαθμό της αποδόμησης του PSI κατά τη διάρκεια ανεπάρκειας σιδήρου. Τα επίπεδα του PSI μπορούν να αποκατασταθούν στα κανονικά μέσα σε 24 ώρες μετά τη διαλυτοποίηση σιδήρου στη φερριτίνη (Busch *et al*, 2008). Στελέχη *Chlamydomonas* με μειωμένες συγκεντρώσεις φερριτίνης παρουσιάζουν κάτω από συνθήκες έλλειψης σιδήρου μειωμένη αποδόμηση του PSI και αυξημένη ευαισθησία στην καταπόνηση φωτοοξειδωσης υπό συνθήκες υψηλού φωτισμού (Long and Merchant, 2008).

Η αυξημένη ευαισθησία των κυττάρων στη φωτοοξειδωση συμβαδίζει με την παρεμπόδιση της αύξησης των κυττάρων υπό συνθήκες υψηλού φωτισμού που σχετίζονται με την αύξηση της συγκέντρωσης του σιδήρου στο θρεπτικό μέσο. Κάτω από αυτές τις συνθήκες μειώθηκαν επίσης και τα επίπεδα των μεταγραφημάτων της FER1. Η διαδικασία της απόκρισης των κυττάρων στον έντονο φωτισμό συγκρίνεται με την απόκρισή τους σε πρό- οξειδωτικούς χειρισμούς, όπως Rose Bengal ή H₂O₂

και δείχνει ότι και στις δύο περιπτώσεις είναι δυνατόν να εμπλέκονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ή H₂O₂ (Briat *et al*,2009).

Στα φυτά η έκφραση των γονιδίων της φερριτίνης τροποποιείται από πολλούς περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η έλλειψη νερού, οι χαμηλές θερμοκρασίες, η ένταση του φωτισμού και η προσβολή από παθογόνα. Κατά τη διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου τα φυτά υπόκεινται συχνά σε καταστάσεις καταπόνησης που ποικίλουν σε ένταση, θέση και διάρκεια και που οδηγούν σε παροδική αύξηση του ενδοκυτταρικού σιδήρου και σε αυξημένα επίπεδα ROS. Είναι πολύ πιθανό ότι ρυθμίζοντας το σίδηρο οι φυτικές φερριτίνες βοηθούν τα φυτά να αντιμετωπίσουν τις δυσμενείς καταστάσεις, τα επιβλαβή αποτελέσματα των οποίων θα ενισχύονταν εάν δεν είχε εξελιχθεί σύστημα δέσμευσης του ελεύθερο σιδήρου. Στα βακτήρια είναι πολύ σημαντικό εφόδιο οι διαφορετικοί ρόλοι των φερριτινών που βασίζονται σε βακτηριακά είδη (Briat *et al*,2009). Αυτή η λειτουργία των φυτοφερριτινών θυμίζει το ρόλο της βακτηριοφερριτίνης που αποτελεί μέρος του μηχανισμού προστασίας από την οξειδωτική καταπόνηση περισσότερο παρά αποθήκευση του σιδήρου για αποθηκευτικούς σκοπούς.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης αποτελεί τον εντοπισμό και τη μελέτη της φερριτίνης, μιας πρωτεΐνης με ρόλο αποθησαυριστικό και προστατευτικό στα φυτά όσο αφορά το στοιχείο σίδηρο. Ο εντοπισμός του σιδήρου γίνεται με χρώση στους σπόρους καρπού τομάτας τύπου cherry ενώ η μελέτη της πρωτεΐνης με μοριακούς μεθόδους σε διάφορα μέρη καρπών τομάτας αποσκοπεί στην έκφρασή της.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΤΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ.

Για τη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ένσπερμοι καρποί τομάτας τύπου cherry της ποικιλίας conchita και cerelino. Πρόκειται για πρώιμες ποικιλίες που συγκομίζονται με ταξικαρπία. Κάθε ταξικαρπία μπορεί να φέρει 12 με 16 καρπούς. Οι καρποί τους είναι λαμπεροί κόκκινοι με μέσο βάρος 20g. Η ανάπτυξη των φυτών και η συγκομιδή των καρπών πραγματοποιήθηκε στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου των Κηπευτικών Καλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η μεταφύτευση των νεαρών φυταρίων στο θερμοκήπιο πραγματοποιήθηκε το μήνα Νοέμβριο.

Η συγκομιδή των καρπών στα υπό μελέτη στάδια ανάπτυξης πραγματοποιήθηκε από τη δεύτερη ταξικαρπία των φυτών. Οι καρποί συγκομίστηκαν σε τρία διαφορετικά στάδια τα οποία σχετίζονται με την ωρίμανσή τους: ώριμοι πράσινοι, καρποί στην αλλαγή του χρώματος και ώριμοι κόκκινοι. Η δειγματοληψία έγινε την ενδέκατη πρωινή ώρα. Η μεταφορά τους από το θερμοκήπιο στο εργαστήριο γινόταν σε δοχείο με θρυμματισμένο πάγο. Τα σπέρματα αφαιρέθηκαν από τους καρπούς και αφού απομακρύνθηκε το ζελατινώδες παρέγχυμα που τους περιέβαλε, αποθηκεύτηκαν σε κατάλληλο ψυκτικό χώρο στους -80°C για να χρησιμοποιηθούν αργότερα.

ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Εντοπισμός σιδήρου με τη μέθοδο του Pearls (Pearse, 1953)

Παρασκευάστηκε διάλυμα 2% potassium ferrocyanide σε 2% HCl. Το διάλυμα μέχρι τη χρήση του καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο λόγω φωτοευαισθησίας. Ακολούθως, έγιναν εγκάρσιες τομές σε σπέρματα τομάτας οι οποίες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους με σταγόνες του υγρού αντίχενωσης του σιδήρου. Οι τομές χρωματίστηκαν για ένα έως τρία λεπτά, ξεπλύθηκαν με νερό και φωτογραφήθηκαν μέσω στερεοσκοπίου.

ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς ή όργανα

Για την απομόνωση του ολικού RNA ακολουθήθηκε η διαδικασία που προτείνεται από τους Brusslan and Tobin (1992). Σύμφωνα με αυτήν:

- ◆ 0.2 g νωπού φυτικού ιστού ομογενοποιούνται σε γουδί λειοτριβήσεως με υγρό άζωτο.
- ◆ Το δείγμα μεταφέρεται σε φυγοκεντρικό σωλήνα (*eppendorf*) στον οποίο προστίθενται 300 μl διαλύματος εκχύλισης RNA (Extraction Buffer) και 300 μl μίγματος φαινόλη/ χλωροφόρμιο 1:1, pH: 8.3.
- ◆ Ακολουθεί καλή ανάδευση με χρήση μηχανικού αναδευτήρα (*vortex*) για 30 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος στις 15000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- ◆ Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα *eppendorf* και επαναλαμβάνεται η εκχύλιση με 300 μl μίγματος φαινόλη/ χλωροφόρμιο 1:1, pH: 8.3.
- ◆ Γίνεται εκ νέου ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

- ◆ Το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέο *eppendorf* και γίνεται προσθήκη 1/10 όγκου 3M CH₃COONa pH: 5.2 και ενός όγκου ισοπροπανόλης για την κατακρήμνιση των νουκλεϊνικών οξέων.
- ◆ Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 15000 σ.α.λ. για 15 λεπτά στους 4°C.
- ◆ Το ίζημα των νουκλεϊνικών οξέων επαναδιαλύεται σε 1125 μl διαλύματος 10T/10E και το RNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη 375 μl διαλύματος 8M LiCl και το συνολικό διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία στους 4°C, για τουλάχιστον 12 ώρες.
- ◆ Το ολικό RNA συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 15000 σ.α.λ. για 15 λεπτά στους 4°C.
- ◆ Το ίζημα ξεπλένεται με 70% (v/v) αιθανόλη, αφήνεται να στεγνώσει και επαναδιαλύεται σε 20 μl όγκο διαλύματος 10T/1E.

Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊνικών οξέων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊνικών οξέων σε υδατικό διάλυμα γίνεται με τη μέθοδο της φωτομετρίας. Η ποσοτική φωτομετρική ανάλυση στηρίζεται στο νόμο των Lambert και Beer. Με το νόμο αυτό συσχετίζεται η απορρόφηση του φωτός από ένα διάλυμα με τη συγκέντρωση της ουσίας και το μήκος της διαδρομής του φωτός μέσα από αυτό.

- 3 μl δείγματος τοποθετήθηκαν σε ειδική κυβέτα χαλαζία, που περιείχε 600 μl dH₂O και προσδιορίστηκε η απορρόφηση του διαλύματος σε μήκος κύματος 260 nm.
- Η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων, χωρίς την παρουσία άλλων προσμίξεων, όπως πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, δίνεται από τον τύπο:

$$C = O.D_{260} * D * \text{συντελεστής αραίωσης}$$

Όπου:

O.D. : η απορρόφηση του δείγματος στα 260nm.

D : σταθερά που εξαρτάται από το είδος του νουκλεϊνικού οξέος

Σε καθαρά διαλύματα DNA, η σταθερά D ισούται με 50 mg/ml, στην περίπτωση διαλύματος RNA ισούται με 40 mg/ml και σε διάλυμα ολιγονουκλεοτιδίων ισούται με 30 mg/ml. Προκειμένου να εκτιμηθεί η καθαρότητα ενός δείγματος νουκλεϊκών οξέων υπολογίζεται ο λόγος $O.D_{260}/O.D_{280}$ και $O.D_{240}/O.D_{260}$ και όταν οι τιμές του πρώτου λόγου βρίσκονται μεταξύ 1.8 και 2.0 και του δεύτερου περί το 0.5, τότε το δείγμα θεωρείται ικανοποιητικής καθαρότητας.

Χειρισμός του ολικού RNA με DNάση

Με τη μέθοδο αυτή απομακρύνεται το γενωματικό DNA, που συνυπάρχει με το RNA, και απομονώνεται από τον ιστό. Για το σκοπό αυτό ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- ◆ Λαμβάνεται δείγμα 10 mg RNA και μεταφέρεται σε σωλήνα *ependorf* στον οποίο έχουν προστεθεί:
 - 5 μ l 10X ρυθμιστικό διάλυμα DNάσης.
 - 1U/ μ g RNA DNάση ελεύθερης από RNάσες.
 - ddH₂O μέχρις όγκου 50 μ l.
- ◆ Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 45 λεπτά.
- ◆ Προστίθενται 250 μ l ddH₂O και γίνεται ανάμιξη με ίσο όγκο (300 μ l) φαινόλης, ακολουθεί φυγοκέντρηση και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα *ependorf*. Η ίδια διαδικασία γίνεται και κατά την ανάμιξη με φαινόλη/χλωροφόρμιο σε αναλογία 1:1 και σε ανάμιξη με ίσο όγκο χλωροφόρμιο.
- ◆ Η κατακρήμνιση του RNA γίνεται με προσθήκη 1/10 του όγκου του διαλύματος με 3M CH₃COONa pH: 5.3 και προσθήκη 2.5 όγκων αιθανόλης και το δείγμα διατηρείται στους -20°C για τουλάχιστον 12 ώρες.
- ◆ Επιπλέον, κατακρημνίζεται το RNA με διατήρηση του δείγματος στους -80°C για 30 λεπτά.
- ◆ Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14000 σ.α.λ. για 30 λεπτά στους 4°C.
- ◆ Το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη, αφήνεται να στεγνώσει και τέλος, επαναδιαλύεται σε 15 μ l ddH₂O.

RT-PCR. ημιποσοτική μέθοδος (2 βήματα)

Κατά το πρώτο βήμα γίνεται η σύνθεση του cDNA:

Σε συνολικό όγκο 20 μ l μπορούν να χρησιμοποιηθούν 1ng-5 μ g ολικού RNA ή 1-500 ng mRNA.

1. Σε ένα σωλήνα *epENDORF* τοποθετούνται τα παρακάτω συστατικά:
 - 1.5 μ l oligo(dT)₁₂₋₁₈ (500 μ g/ml), ή 50-250 ng τυχαίους εκκινητές
 - 1 ng-5 μ g ολικού RNA ή 1-500ng mRNA
 - 1 μ l 10mM μίγμα dNTPs (10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP σε pH: 7)
 - αποστειρωμένο,δισ απεσταγμένο νερό μέχρις όγκου 12 μ l.
2. Το παραπάνω μίγμα θερμαίνεται στους 65°C για 5 λεπτά και αμέσως μετά τοποθετείται στον πάγο.

Ακολουθεί μια γρήγορη φυγοκέντρηση και προστίθενται:

- 4 μ l 5x διάλυμα σύνθεσης πρώτης αλυσίδας
 - 2 μ l 0,1M DTT
 - 1 μ l Rnase OUT- που είναι παρεμποδιστής ανασυνδυασμένης ριβονουκλεάσης (40 units/ μ l)
3. Αναμιγνύονται τα παραπάνω συστατικά και επωάζονται στους 42°C για 2 λεπτά.
 4. Ακολουθεί προσθήκη 1 μ l (200 units) του ενζύμου SuperScript II RT και ελαφρά ανάμιξη με πιπέτα.
 5. Επωάζονται στους 42°C για 50 λεπτά.
 6. Η αντίδραση διακόπτεται με θέμανση στους 70°C για 15 λεπτά.

Το δείγμα αραιώνεται 1:4

Κατά το δεύτερο βήμα γίνεται η αντίδραση PCR

Σε σωλήνα φυγοκέντρησης 0.5 ml προστίθενται τα παρακάτω σε τελικό όγκο 50 μ l: (FINNZYMES)

- α) 40.5 μ l αποστειρωμένο ddH₂O
- β) 5 μ l 10X ρυθμιστικό διάλυμα DNAzyme
- γ) 1 μ l μίγμα των 10 mM dNTPs
- δ) 1 μ l εκκινητής έμπροσθεν
- ε) 1 μ l εκκινητής ανάστροφος

στ) 0.5 μl DNA πολυμεράση (2U/ μl)

Το μίγμα αναμιγνύεται καλά και εκτελείται το παρακάτω πρόγραμμα PCR.

Πίνακας 2. 2: Το πρόγραμμα θερμοκρασιών, χρόνων και κύκλων κατά το ημι-

	Θερμοκρασία	Χρόνος	αρ.κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	94°C	4 λεπτά	1
Αποδιάταξη των αλυσ.DNA	94°C	1 λεπτό	
Υβριδισμός εκκινητών	56-58°C	1 λεπτό	25-35
Σύνθεση νέων αλυσίδων DNA	72°C	1 λεπτό	
Τελική επιμήκυνση	72°C	20 λεπτά	1

ποσοτικό

Πίνακας 2. 3. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το RT-PCR

LeFER- F	5'- CCAAGTTTTTCAAGGAATC-3' (8/19)
LeFER- R	5'- TCATTTGTCAACTTCTCC-3' (7/18)
Actin- F	5'- CCACAACCACCTCAGCAGAAT-3'
Actin- R	5'- GACAACCTGCTGTGGAGGCATT-3'

Ποσοτικό Real-Time PCR

Στη συνέχεια της σύνθεσης των cDNA των ιστών οι οποίοι μελετήθηκαν, πραγματοποιήθηκε PCR με εκκινητές που αναγράφονται στον Πιν. 2.3 και σχεδιάστηκαν από τη μεταγραφόμενη περιοχή του κάθε ιστού ξεχωριστά με το πρόγραμμα Primer Excess 1.5 (Applied Biosystems, Darmstadt, DE). Οι ποσοτικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στο σύστημα ανίχνευσης αλληλουχίας ABI PRISM 7900 HT χρησιμοποιώντας το μείγμα SYBR Green (Applied Biosystems), τους εκκινητές σε συγκέντρωση 0.2 μM ο καθένας και 1 μl cDNA ως μήτρα. Η πρώτη αντίδραση πολυμερισμού ορίστηκε στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα και 60°C για 1 λεπτό. Η εξειδίκευση των εκκινητών και ο σχηματισμός διμερών παρατηρήθηκαν με ανάλυση της καμπύλης διαχωρισμού σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αгарόζης 4%. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της φερριτίνης ανιχνεύτηκαν χρησιμοποιώντας τους εκκινητές του Πιν. 2.3 οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερικά πρότυπα για την κανονικοποίηση των cDNA δειγμάτων. Για τη σχετική ποσοτική έκφραση των γονιδίων μεταξύ διαφορετικών ιστών εφαρμόστηκε η εξής μέθοδος. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου-στόχου (X) υπολογίστηκαν ως αναλογία του γονιδίου της ακτίνης (U), ως $(1+E)^{-\Delta C_t}$, όπου ΔC_t είναι $(C_t^x - C_t^u)$. Η αποτελεσματικότητα του

PCR (E) για κάθε αμπλικόνιο υπολογίστηκε με βάση την ανάλυση παλινδρόμησης σε λογάριθμική κλίμακα ανά κύκλο με τη χρήση του LineRegPCR προγράμματος (Ramakers *et al*, 2003).

Χειρισμός πλασμιδίων

Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων

Τα στελέχη *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία ικανών προς μετασχηματισμό κυττάρων ήταν τα XL1 Blue. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- ◆ 200 ml θρεπτικού διαλύματος LB εμβολιάζονται με 2 ml υγρής καλλιέργειας του στελέχους.
- ◆ Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37°C με συνεχή ανακίνηση μέχρι η οπτική πυκνότητα του αιωρήματος να φτάσει την τιμή $O.D._{600} = 0.2-0.3$.
- ◆ Τα βακτηριακά κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6000 σ.α.λ. για 10 λεπτά στους 4°C.
- ◆ Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 50 ml διαλύματος 0.1M παγωμένου $MgCl_2$.
- ◆ Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 6000 σ.α.λ. για 10 λεπτά στους 4°C.
- ◆ Τα κύτταρα επαναδιασπείρονται σε 25 ml διαλύματος 0.1M $CaCl_2$ και αφήνονται στον πάγο για 20 λεπτά.
- ◆ Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6000 σ.α.λ. για 10 λεπτά στους 4°C και επαναδιασπείρονται σε 10 ml διαλύματος 0.1M $CaCl_2$, το οποίο βρίσκεται πάντα στον πάγο.
- ◆ Η αποθήκευση των δεκτικών κυττάρων γίνεται στους -70°C με την προσθήκη 20% γλυκερόλης.

Μετασχηματισμός των κυττάρων *E.coli*

- Μεταφέρονται 10-100 ng πλασμιδίου σε σωλήνα *eppendorf* που περιέχει 100 μl δεκτικά κύτταρα από το στέλεχος XL-1 Blue .
- Το δείγμα παραμένει στον πάγο για 30 λεπτά.

- Υποβάλλουμε τα κύτταρα σε θερμική καταπόνηση στους 42°C για 1-2 λεπτά, ώστε να διευκολυνθεί η εισαγωγή του πλασμιδίου.
- Προστίθεται 200 μl υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB και τοποθετούνται για 40-50 λεπτά στο υδατόλουτρο στους 37°C.
- Τα κύτταρα στρωματώνονται σε τρυβλία, που περιέχουν αμπικιλίνη και γίνεται επώαση στους 37°C για όλο το βράδυ.
- Φύλαξη των τρυβλίων στο ψυγείο στους 4°C.

Για την επιλογή των αποικιών που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, προσθέτουμε στα κύτταρα, προτού απλωθούν σε τρυβλίο 10 μl 100 mM IPTG και 50 μl 2% X-Gal. Μετά την επώαση, θα επιλεγθούν οι άσπρες και όχι οι μπλε αποικίες, στις οποίες το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης δεν διακόπηκε και επομένως το πλασμίδιο δεν ήταν ανασυνδυασμένο.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Πρωτόκολλο Miniprep (Qiagen)

- Μετά από φυγοκέντρηση 1.5 ml υγρής καλλιέργειας τα βακτηριακά κύτταρα επαναδιασπείρονται σε 250 μl ρυθμιστικό διάλυμα P1, που περιέχει RNάση A.
- Προστίθενται 250 μl ρυθμιστικό διάλυμα P2 και γίνεται ελαφρά ανακίνηση του φυγοκεντρικού σωλήνα (erpendorf).
- Προστίθενται επιπλέον 350 μl ρυθμιστικό διάλυμα N3 και αμέσως αναποδογυρίζεται το erpendorf 4-6 φορές. Το εναιώρημα θολώνει.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα, με αποτέλεσμα να σχηματιστεί ένα άσπρο ίζημα.
- Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται με πιπέτα σε μια στήλη Qiaprep.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30-60 δευτερόλεπτα και απορρίπτεται το διερχόμενο από το φίλτρο υγρό.
- Η στήλη ξεπλένεται με 0.75 ml ρυθμιστικό διάλυμα PE και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30-60 δευτερόλεπτα.

- Το διερχόμενο από το φίλτρο υγρό απορρίπτεται και επαναφυγοκεντρείται για 1 λεπτό μέχρι να απαλειφθεί το υπολειπόμενο διάλυμα ξεπλύματος. Εάν παραμείνει αιθανόλη από το διάλυμα PE, μπορεί να παρεμποδιστούν περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.
- Τοποθετείται η στήλη Qiaprep σε ένα καθαρό φυγοκεντρικό σωλήνα 1.5 ml. Για να ληφθεί το DNA προστίθεται διάλυμα 50 μl EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) ή νερό. Το διάλυμα έκλουσης αφήνεται για ένα λεπτό και τέλος φυγοκεντρείται για 1 λεπτό, οπότε λαμβάνεται καθαρό πλασμιδιακό DNA.

Μέθοδος του βρασμού (Boiling method) (Holmes and Quigley, 1981)

- ◆ Τρία ml υγρής καλλιέργειας LB που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό εμβολιάζονται με μια μεμονωμένη αποικία κυττάρων *E.coli*. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37°C με συνεχή ανακίνηση για 12-16 ώρες.
- ◆ Από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται 1.5 ml σε σωλήνα eppendorf και φυγοκεντρούνται στις 13000 σ.α.λ. για 3 λεπτά.
- ◆ Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται από όσο το δυνατό περισσότερο υγρό. Το ίζημα πρέπει να παραμείνει, όσο το δυνατό, στεγνό.
- ◆ Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 150 μl διαλύματος STEL και προστίθεται 1 μl λυσοζύμη (50 mg/ml).
- ◆ Ακολουθεί επώαση στους 100°C για 45 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρωση στις 13000 σ.α.λ. για 20 λεπτά.
- ◆ Το ίζημα, που αποτελείται από βακτηριακά υπολείμματα, απομακρύνεται με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα.
- ◆ Για την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA προστίθεται 180 μl ισοπροπανόλης, ακολουθεί καλή ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 13000 σ.α.λ. για 5 λεπτά.
- ◆ Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα ξεπλένεται με 70% (v/v) αιθανόλη.
- ◆ Αφού στεγνώσει το ίζημα, επαναδιαλύεται σε 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE.

Πέψη DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Οι πέψεις δειγμάτων DNA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες γίνονται σε όγκους που κυμαίνονται μεταξύ 20 μl και 100 μl, γεγονός που εξαρτάται από την ποσότητα DNA, που πρόκειται να υδρολυθεί. Μια συνήθης αντίδραση πέψης σε τελικό όγκο 30 μl περιέχει:

-Δείγμα DNA: 1-5 μl

-Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου: 3 μl

-RNάση A (2.5mg/ml): 1 μl

-dH₂O μέχρις όγκου: 29 μl

και προστίθεται 1 μl ενζύμου περιοριστικής ενδονουκλεάσης. Συνήθως χρησιμοποιείται μια μονάδα ενζύμου (1 unit) ανά μικρογραμμάριο δείγματος DNA.

- Το διάλυμα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται για 2 ώρες στους 37°C (η θερμοκρασία εξαρτάται από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες, που χρησιμοποιούνται).
- Στο τέλος της αντίδρασης τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω (Πιν. 4) περιοριστικές ενδονουκλεάσες (π.ε.):

<u>Π.Ε.Αλληλουχία αναγνώρισης</u> <u>Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου</u>		
EcoRI	G↓AATTC	37°C
XhoI	C↓TCGAG	37°C

Πίνακας 4: Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, οι αλληλουχίες αναγνώρισης και η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου.

Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς

Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν το πλασμίδιο pGEM[®]-T Easy (Promega). Σημαντικά χαρακτηριστικά αυτού του φορέα είναι ο υψηλός αριθμός αντιγράφων ανά κύτταρο, το γονίδιο *amp^r* που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, οι προαγωγείς που αναγνωρίζονται από τις SP6 και T7 RNA πολυμεράσες. Επιπλέον, περιέχουν τμήμα του γονιδίου *lacZ* που κωδικοποιεί για τα πρώτα 146 αμινοξέα του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης και χρησιμοποιείται για την επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων, μέσω του μηχανισμού της α-συμπληρωμα-τικότητας. Ο φορέας αυτός είναι κατάλληλος για υποκλωνοποίηση προϊόντων PCR, εφόσον διαθέτουν άκρα πολυA, τα οποία υβριδίζουν με τα άκρα πολυT του πλασμιδιακού φορέα.

Ενοποίηση των άκρων DNA με τη χρήση της DNA λιγάσης

Η αντίδραση της DNA λιγάσης παραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10 μ l και περιέχει τα εξής συστατικά:

- 10X ρυθμιστικό διάλυμα : 1 μ l
- T4 DNA λιγάση (1unit/ μ l): 1 μ l
- pGEM T-Easy φορέα: 1 μ l
- ένθετο DNA: 1 μ l
- ddH₂O : 6 μ l
- Προκειμένου να αυξηθεί η πιθανότητα δημιουργίας ανασυνδυασμένων πλασμιδίων η αναλογία άκρων φορέα προς ένθετο DNA θα πρέπει να είναι 1:3.
- Το δείγμα επωάζεται για 3 ώρες στους 25°C ή στους 4°C για 14-16 ώρες.

Ηλεκτροφόρηση δεοξυριβοζονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αгарόζης

Ο διαχωρισμός των δεοξυριβοζονουκλεϊνικών οξέων γίνεται με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωση τους σε πηκτή αгарόζης με ηλεκτροφόρηση. Σχετικά με το διαχωρισμό γραμμικών δίκλωνων μορίων, η σχέση που συνδέει την κινητικότητα των μορίων με το μέγεθος τους είναι ημιλογαριθμική. Η κινητικότητα μη γραμμικών μορίων DNA εντός ηλεκτρικού πεδίου, μέσα στην πηκτή, δεν είναι άμεση συνάρτηση

του μεγέθους, αλλά εξαρτάται και από τη διαμόρφωση του μορίου στο χώρο. Ο διαχωρισμός των μορίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πηκτής. Για παράδειγμα, μεγαλύτερη συγκέντρωση πηκτής έχει ως αποτέλεσμα καλύτερο διαχωρισμό μικρών μορίων και αντιστρόφως, μεγαλύτερα μόρια διαχωρίζονται καλύτερα σε μικρότερης συγκέντρωσης πηκτές.

Τα μόρια του DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός.

Η προετοιμασία της πηκτής γίνεται ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία:

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης (συνήθως 1%) προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X TAE και θερμαίνεται στο φούρνο μικροκυμάτων μέχρι το μίγμα να ομογενοποιηθεί.
- Κατόπιν προστίθεται 0.001% (v/v) διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr).
- Το υγρό μίγμα χύνεται σε καλούπι σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και αφήνεται για 30 λεπτά μέχρι να στερεοποιηθεί.
- Μόλις στερεοποιηθεί η πηκτή απομακρύνεται η «κτένα», η οποία τοποθετείται για να δημιουργηθούν οι θέσεις στις οποίες τοποθετούνται τα δείγματα DNA. Στη συσκευή συμπληρώνεται ρυθμιστικό διάλυμα 1X TAE.
- Στα δείγματα DNA που πρόκειται να αναλυθούν, προστίθεται 1/10 όγκου διαλύματος χρωστικής DLB.
- Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως έως 5V/ cm.

Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης

- Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, απομονώνεται από την πηκτή η ταινία του DNA που μας ενδιαφέρει με ένα ξυραφάκι.
- Ζυγίζεται το κομμάτι της πηκτής σε ένα *ependorf* και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα QG σε αναλογία 3:1.
- Ακολουθεί επώαση στους 50°C για 10 λεπτά ώστε η πηκτή να λιώσει πλήρως. Γι' αυτό συνιστάται η ανάδευση με χρήση μηχανικού αναδευτήρα (*vortex*) ανά 2-3 λεπτά κατά τη διάρκεια της επώασης. Στο τέλος της επώασης το χρώμα του μίγματος είναι κίτρινο.
- Προστίθεται ίσος όγκος με την πηκτή ισοπροπανόλη και αναδύεται καλά.

- Προσαρμόζεται η στήλη, που διατίθεται από το *kit*, στο *eppendorf*, ώστε να συλλεχθεί το DNA και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό.
- Απομακρύνεται το διάλυμα που συλλέχτηκε στο *eppendorf* και αυτό ξαναπροσαρμόζεται στη στήλη.
- Προστίθενται 500 μl DNA ρυθμιστικού διαλύματος QG και η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται.
- Προκειμένου το DNA να ξεπλυθεί, προστίθενται 0.75 ml ρυθμιστικού διαλύματος PE και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό.
- Απομακρύνεται το διάλυμα που συλλέχθηκε στο *eppendorf* και φυγοκεντρείται και πάλι για 1 λεπτό στις 13000 σ.α.λ.
- Προσαρμόζεται η στήλη σε νέο *eppendorf*.
- Προκειμένου να συλλεχθεί το DNA προστίθενται 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος EB και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 15000 σ.α.λ.

Εκχύλιση πρωτεϊνών

- 30 σπέρματα λειοτριβήθηκαν σε ιγδίο με υγρό άζωτο.
- Οι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες εκχυλίστηκαν δύο φορές με 1 ml H₂O.
- Φυγοκεντρήθηκαν στα 13000 xg για 10 min στους 4 °C.
- Το αδιάλυτο υλικό επαναδιαλύθηκε σε:
 - 1 ml, 1M Tris, pH 8.0 με 1 M NaCl
- Το διάλυμα επωάζεται για 10 min
- Φυγοκεντρήθηκαν στα 13000 xg για 10 min στους 4 °C.
- Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα και προστέθηκαν 3 όγκοι 10% τρίγλωρο οξικό οξύ.
- Οι πρωτεΐνες κατακρημνίστηκαν για 1h στους -20 °C.
- Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στα 13000 xg για 10 min στους 4 °C.
- Το εναπομένον ίζημα ξεπλύθηκε δύο φορές με 80% ακετόνη.
- Το τελικό ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

SDS GEL

Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών γίνεται με βάση το μοριακό τους βάρος με κάθετη ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες τις οποίες επιβάλλει η παρουσία θειικού δωδεκυλικού νατρίου (SDS) (Laemmli 1970). Οι πρωτεΐνες κατά την έκθεσή του στο αρνητικά φορτισμένο απορρυπαντικό SDS αποκτούν αρνητικό φορτίο, καθώς σε κάθε αμινοξύ δεσμεύεται ένα περίπου μόριο SDS. Συνεπώς, κατά την ηλεκτροφόρηση μετακινούνται προς τον θετικό πόλο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς το μέγεθός τους.

Κατά τη μέθοδο της κάθετης ηλεκτροφόρησης οι πρωτεΐνες τοποθετούνται αρχικά σε πηκτή επιστοιβάξης, η οποία χαρακτηρίζεται από χαμηλή περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδα και μεγάλο μέγεθος πόρων. Τα πρωτεϊνικά μόρια διαπερνούν γρήγορα την πηκτή αυτή και συσσωρεύονται σε μια λεπτή στοιβάδα. Ακολούθως, περνούν σε πηκτή υψηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδα, με μικρότερο μέγεθος πόρων, την πηκτή διαχωρισμού, όπου και γίνεται ο διαχωρισμός τους βάσει του μοριακού του βάρους.

Η καταγραφή των αντιδραστηρίων και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της πηκτής επιστοιβάξης και της πηκτής διαχωρισμού παρουσιάζονται παρακάτω.

Resolving gel 15% T, 2,7% C

Acryl amide stock solution (30%, 2,7%)	15ml
1% Bis- Acryl amide	2.6ml
3M Tris pH 8,8	3.75ml
1M Tris pH 6,8	-
Water (dd H- OH)	8.14ml
10% SDS	0.3ml
APS 10%	0.15ml
TEMED	0.015ml

Stacking gel 3% T, 2,7% C

Acryl amide stock solution (30%, 2,7%)	1.3ml
1% Bis- Acryl amide	1ml
3M Tris pH 8,8	-
1M Tris pH 6,8	1.25ml
Water (dd H- OH)	6.24ml
10% SDS	0.1ml
APS 10%	0.15ml
TEMED	0.015ml

Για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού αναμειγνύονται τα διαλύματα Acryl amide 30%, Bis- Acryl amide 1%, 3M Tris pH 8,8, 10% SDS και dd H- OH και στην συνέχεια προστίθενται τα διαλύματα TEMED και 10% APS. Το μίγμα αναδεύεται ελαφρώς και εισάγεται αμέσως στο γυάλινο κάθετο καλούπι όπου αφήνεται να πολυμεριστεί για περίπου μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός, εισάγεται η πηκτή επιστοιβάξης, η οποία παρασκευάζεται με τον ίδιο τρόπο αλλά με την διαφορά ότι περιέχει το διάλυμα 1M Tris pH 6,8 αντί 10% APS. Το μίγμα αναδεύεται ελαφρώς και εισάγεται στο γυάλινο κάθετο καλούπι. Πριν ξεκινήσει ο πολυμερισμός, στην κορυφή της πηκτής εισάγεται κατάλληλος υποδοχέας (κτένα) ώστε να δημιουργηθούν τα κανάλια-θέσεις εισαγωγής των δειγμάτων. Ο πολυμερισμός ολοκληρώνεται σε περίπου 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τον πολυμερισμό και της πηκτής επιστοιβάσης η πηκτή τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Προς ηλεκτροφόρηση δείγματα αναμειγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης που περιέχει SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη και θερμαίνονται στους 100°C για πέντε λεπτά. Οι συνθήκες αυτές είναι αποδιατακτικές για τις πρωτεΐνες, αφού ο βρασμός παρουσία SDS έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των ασθενών δεσμών (υδρογόνου, ιοντικών, υδρόφοβων και Van der Waals αλληλεπιδράσεων) ενώ η β-μερκαπτοαιθανόλη, ως αναγωγικό μέσο, προκαλεί αναγωγή των ομοιοπολικών δισουλφιδικών δεσμών. Το ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης περιέχει και τη χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας της εξέλιξης της ηλεκτροφόρησης. Τα δείγματα ακολούθως, φυγοκεντρώνται στις 13000 rpm για

πέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και τέλος φορτώνονται στα πηγάδια της πηκτής.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

- **Διαλύματα απομόνωσης RNA**

Extraction Buffer: 50 mM Tris-HCl pH:8.3, 150mM NaCl, 10mM EDTA, 1% lauryl sacrosine

10T 10E: 10 mM Tris-HCl pH:8.3, 10mM EDTA

10T 1E: 10 mM Tris-HCl pH:8.3, 1mM EDTA

- Διαλύματα ηλεκτροφόρησης νουκλεϊνικών οξέων

TAE: 1X TAE: 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA

Βρωμιούχο αιθίδιο: παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0.5 mg/ ml σε απιονισμένο νερό και διατηρείται στους 4°C. Η τελική συγκέντρωση του βρωμιούχου αιθιδίου στην πηκτή είναι 0.5 µg/ ml.

10X DLB: 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανό του ξυλενίου, 30% γλυκερόλη

- **Διαλύματα μεταφοράς νουκλεϊνικών οξέων**

Διάλυμα αποδιάταξης: 0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl

Διάλυμα ουδετεροποίησης: 0.5 M Tris-HCl pH:7.5, 1.5 M NaCl

20X SSC: Για την παρασκευή διαλύματος 1 λίτρου χρησιμοποιήθηκαν 175.3 g NaCl, 88.2 g κιτρικού νατρίου.

- **Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδίων**

Buffer N3: Υδροχλωρική γουανιδίνη, οξεϊκό οξύ.

Buffer P2: NaOH

Buffer PB: Υδροχλωρική γουανιδίνη, ισοπροπανόλη

STET buffer: 8% Σακχαρόζη, 5% Triton X 100, 50 mM Tris-HCl pH: 8.0, 50 mM EDTA

100 mM IPTG: 23.8g IPTG (ισοπρόπυλο-β-D-θειογαλακτοπυρανοσίδη, Boehringer Mannheim) διαλύονται σε 1ml dH₂O. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φιλτράρισμα (0.22 μm Millipore) και φυλάσσεται στους -20°C.

2% X-Gal: 0.02 gr X-Gal (5-βρώμο-4-χλώρο-3-ινοδυλο-β-D-γαλακτοσιδάση, Boehringer-Mannheim) προστίθενται σε 1 ml διμέθυλοφορμαμίδιο.

- **Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης κυττάρων**

LB: Για την παρασκευή 1 λίτρου διαλύματος προστίθενται: 10g Bactotryptone, 10g yeast extract και 5g NaCl.

Για την παρασκευή τρυβλίων προστίθενται 15g άγαρ. Το θρεπτικό διάλυμα αποστειρώνεται και φυλάσσεται στους 4°C.

- **Χρήσεις αντιβιοτικών**

Αμπικιλίνη: Μητρικό διάλυμα: 50 mg/ml σε απιονισμένο νερό. Τελική συγκέντρωση: 50 μg/ ml θρεπτικού διαλύματος

Τετρακυκλίνη: Η συγκέντρωση που συνιστάται για διαλύματα LB είναι 12,5 μg/ ml ενώ το μητρικό διάλυμα είναι 12,5 mg/ ml.

- **Διαλύματα σήμανσης και υβριδισμού νουκλεϊνικών οξέων**

5X διάλυμα Klenow: 250 Tris-HCl pH: 7.5 50 mM MgCl₂, 5 mM DTT

Buffer 1: 150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH: 7.5

Buffer 2: 1% αντιδραστήριο μπλοκαρίσματος (Boehringer-Mannheim) στο ρυθμιστικό διάλυμα 1 (Buffer 1)

Buffer 3: 100 mM NaCl, 50mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl pH: 9.2

Διάλυμα χρωματικής αντίδρασης: Σε διάλυμα ανίχνευσης Buffer 3 διαλύονται

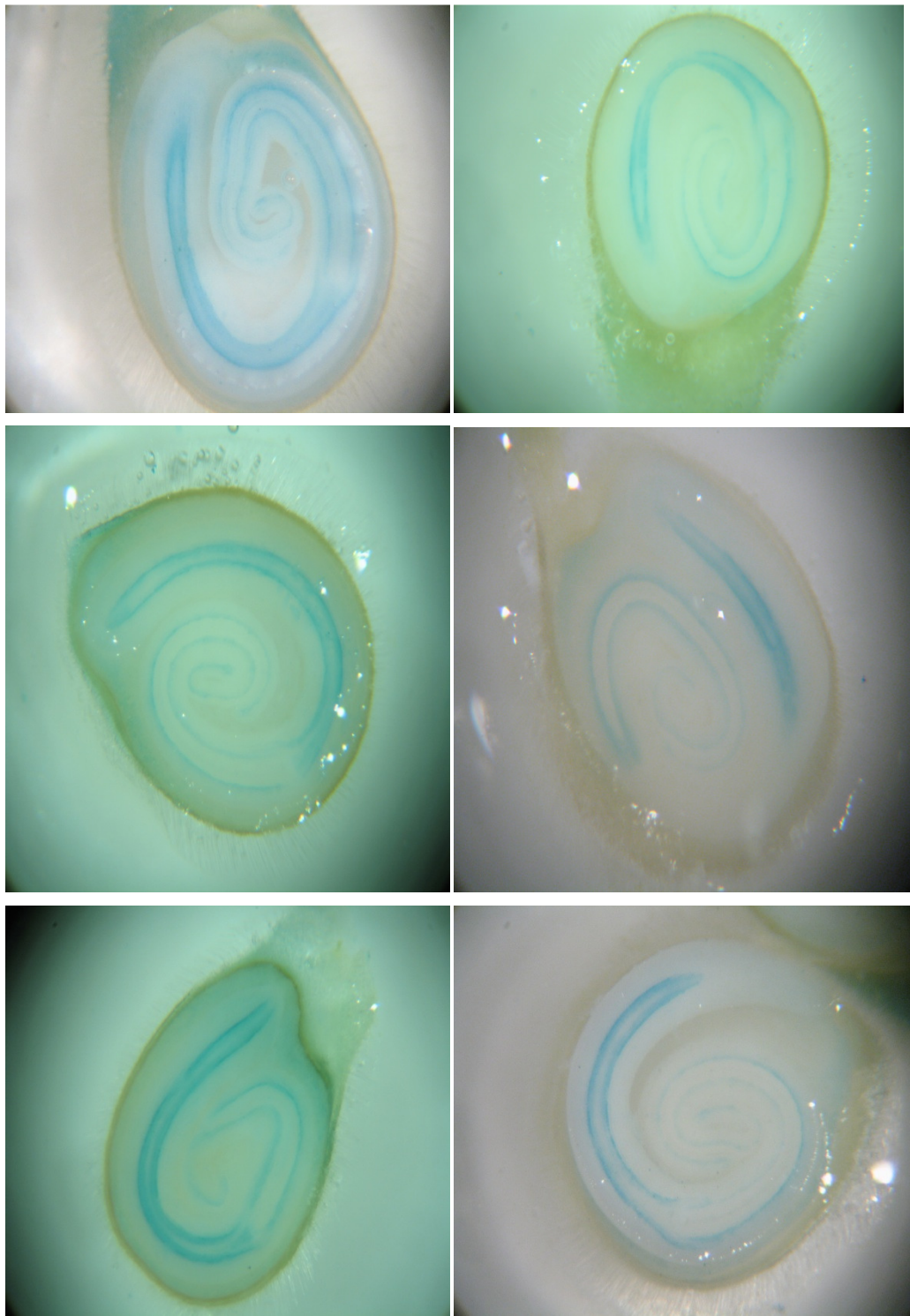
0,34g/ ml NBT 0,175 mg/ml BCIP.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε ο εντοπισμός του σιδήρου και ο ηλεκτροφορητικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης που σχετίζεται με το σίδηρο. Επιπλέον έγινε *in silico* ανάλυση των γονιδίων της τομάτας, η σύγκρισή τους με όμοια γονίδια άλλων φυτών και η μελέτη της έκφρασής τους (LeFer1 και LeFer2) με μέθοδο της ποσοτικής RT-PCR.

Ανίχνευση σιδήρου σε σπέρματα της κερασόμορφης τομάτας.

Ο εντοπισμός του σιδήρου έγινε με τη μέθοδο Pearls. Οι τομές έγιναν με ξυραφάκια. Ο σίδηρος εντοπίστηκε στα σπέρματα τομάτας δύο ποικιλιών κερασόμορφης τομάτας (conchita/cerolino) κατά τα τρία στάδια ανάπτυξης του καρπού: ώριμου πράσινου καρπού (MG), στάδιο αλλαγής χρώματος (BR), ώριμου κόκκινου καρπού (RR). Στα σπέρματα του ώριμου πράσινου καρπού ο σίδηρος εντοπίστηκε περίπου σε ένα λεπτό, ενώ στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού σε δύο λεπτά. Δε διαπιστώθηκε διαφορά μεταξύ των ποικιλιών στον εντοπισμό του σιδήρου.

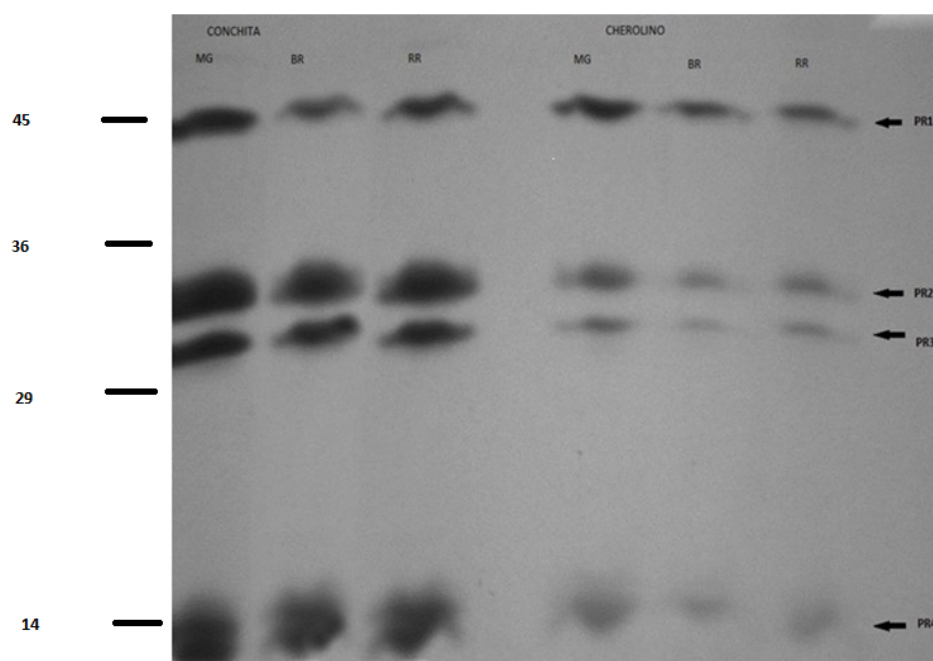


Εικόνα 3.1: Ο εντοπισμός του σιδήρου στα σπέρματα που προέρχονται από διάφορα στάδια ανάπτυξης του καρπού των ποικιλιών *conchita cerelino*. Οι φωτογραφίες αριστερά προέρχονται από σπέρματα της ποικιλίας *conchita* και οι δεξιά της *cerelino*. Από επάνω προς τα κάτω: σπέρματα ώριμου πράσινου καρπού (MG), στάδιο αλλαγής χρώματος (BR), ώριμου κόκκινου καρπού (RR).

Όπως φαίνεται από την **Εικ. 3.1** ο σίδηρος εντοπίζεται στο προκάμβιο του εμβρύου σε όλα τα σπέρματα.

Διαχωρισμός πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS- PAGE).

Μετά την εκχύλιση των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών από τα σπέρματα των ποικιλιών conchita και cerelino οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS PAGE. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικ. 3.2**. Πιθανώς, η ηλεκτροφόρηση να δείχνει ηλεκτροφορητικές ζώνες αποθησαυριστικών πρωτεϊνών στα σπέρματα της τομάτας. Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με χρώση Coomassie Brilliant Blue. Στα εκχυλίσματα των πρωτεϊνών μετά την ηλεκτροφόρηση διακρίνονται τέσσερις πρωτεϊνικές ζώνες στις δύο ποικιλίες τομάτας (conchita/ cerolino) και στα τρία (3) στάδια ανάπτυξης των σπερματικών βλαστών (MG: ώριμο πράσινο, BR: στάδιο αλλαγής χρώματος, RR: κόκκινος καρπός).



Εικόνα 3.2: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (15% w/v πολυακρυλαμίδη)

Το ηλεκτρογράφημα των πρωτεϊνών δείχνει ότι οι ηλεκτροφορητικές ζώνες και στα τρία στάδια ανάπτυξης του καρπού και στις δύο ποικιλίες είναι οι ίδιες.

Ανάλυση in silico των γονιδίων που κωδικοποιούν τη φερριτίνη στις βάσεις δεδομένων.

Προκειμένου να εντοπιστούν οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν γονίδια της φερριτίνης στην τομάτα, πραγματοποιήθηκε έρευνα στις δημόσιες βάσεις δεδομένων. Αυτές οι βάσεις δεδομένων περιλαμβάνουν τη μερική νουκλεοτιδική αλληλουχία των mRNA, που απαντώνται στους διάφορους ιστούς και αναπτυξιακά στάδια των σπερματικών βλαστών των φυτών (ESTs). Η έρευνα περιελάμβανε τα 299800 ESTs (Expressed Sequences Tags) που έχουν δημοσιευτεί για την τομάτα (Απρίλιος 2010). Από την έρευνα αυτή εντοπίστηκαν οι κλώνοι που πιθανώς κωδικοποιούν φερριτίνες. Ο κλώνος που αποκτήθηκε, προσδιορίστηκε η πλήρη νουκλεοτιδική ακολουθία του. Ο κλώνος cLEG63D15 είναι από βιβλιοθήκη cDNA και είναι καταχωρημένος στην NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ως EST587819 και αφορά το στάδιο αλλαγής χρώματος του καρπού στο *Solanum lycopersicum*. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία φαίνεται παρακάτω.

EST587819 tomato breaker fruit *Solanum lycopersicum* cDNA clone cLEG63D15 , mRNA sequence

```
CAATTTCTGCATAATTTTGGAGTATTCATCATCATGCTTCTGAAAGTGGCACCTGCGTTTTG
CGTTATTGAACACCCATGAGGAAAATTTGAGTTCGGTGATATCATTTTCTTCACATGGAT
CTGCTTTGAAGAATTTTTTCGGCAAAAAACGGAAATGGATTGGTTGTATGTGCTTCAAAGG
GTTTCGAACAGTAAACCGTTGACGGGTGTTGTTTTTCGAACCTTTTGAAGAGGTGAAGAAAAG
AGCTTATGCTTGTACCTACTGTTCTCCTCAAGCTTCTCTTGCTAGACAGAAGTTTACTGATC
AATCTGAAGCTGCTCTTAAATGAACAGATCAATGTTCGAATACAATGTTTCGTATGTTTACC
ATGCTATGTATGCCTATTTTCGACAGAGACAATGTTGCTCTCAAGGGACTTGCCAAGTTTT
TCAAGGAATCAAGTGAAGAGGAAAGGGAACATGCTGAGAAGTTCATGGAGTATCAGAACA
AGCGTGGTGGGAAAGTGAAGCTGCAGTCTATTTTAAATGCCATTATCCGAATTTGATCATG
CTGAGAAGGGGGATGCATTGTATGCAATGGAGCTTGCACCTTTCTTTGGAGAAAGTGACAA
ATGAGAAGCTCTTAAACTTGCATGCTGTAG
```

Εικόνα 3.3: Η νουκλεοτιδική αλληλουχία της φερριτίνης του σταδίου αλλαγής χρώματος (breaker) του καρπού.

Η φερριτίνη του σταδίου αλλαγής χρώματος του καρπού αποτελείται από ένα αναγνωστικό πλαίσιο 258 νουκλεοτιδίων που κωδικοποιεί για ένα πολυπεπτίδιο μεγέθους 29,06 kDa.

Στη δημόσια τράπεζα δεδομένων TIGR (<http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=tomato>) βρέθηκε και άλλος ένας ισότυπος που πιθανόν κωδικοποιεί φερριτίνη στην τομάτα. Με την τελευταία έρευνα, οι ισότυποι που πιθανόν κωδικοποιούν την φερριτίνη στην τομάτα είναι οι εξής:

>TC191963

```
CGATCATCAGTCATCACCACACACTGAATTTTCTCCCCTGTTTATTTCATAACCCTAATTTTCCATCATGCTTCTCAAGGT
TGCTCCAGCTTTTGTCTCTATTGAACACACCTAAGTCTACAAATGGGGAAAAATCTGTTAACCCACAAGAGTTTTTCTGCTA
AAAGTGAAATGGGTTTCATGGTTTGTGCTTCAAAGGGGACAAACCATAAGCCCTTGACAGGGGTTGTGTTTGTGACCTTTT
GAGGAGTTGAAGAAAGAGTTTATGCTTGTCCCTTCTCTTCCACAAGCCTCTCTTGCCCGACAGAAATACTGCGATGAATC
TGAAGCTGCTATTAAATGAACAGATCAATGTGGAATACAATGTTTCTTACGTTTATCATGCTATGTACGCTATTTTGTATC
GAGACAACGTTGCTCTCAAGGGTCTAGCCAAGTTTTTCAAGGAATCTAGTGCAGAGGAAAGGGAACATGCTGAGAAATTT
ATGGAATACCAGAACAAAGCGTGGTGGGAAGGTGAAGCTGCAGTCTATGTTGATGCCACTTACTGAGTTTGTATCATGTTGA
GAAGGGGGATGCATTGTATGCGATGGAGCTTGCCTGTCTCTGGAGAAGTTGACAAATGAAAACTTCTAAACGTCCTATG
CTGTAGCCTCACGAAACAATGATGTGCAATTTGGCTGATTTTGTGAAAGCGAGTTCTTGGGTGAACAGGTGGAAGCTATC
AAGAAGATCTCTGAATATGTTGCTCAGCTGAGAAGAGTTGGCCAAGGACATGGTGTCTGGCATTTCGATCAGATGTTGCT
GCAAGAGGGAGCTGCTGCTGAAGGAGAAGATAGAATTTGCTTACCATTGATTTTTTCCACTGTTGTCTGGGTAATTT
TGGATATTAGAATGGGCTAATCTGAGAGTATGAGCTTCTCTTATTAATAGATTATAGCAAGTGCATACAAGAGTGTATC
TAGTAGATTGATCTAGTCAGTTGTGCTAGTTTTTCCAAAGTACTTTGGAGTTTGATTACTTACCATCTATGCTATCATCTAT
CATGCTTGAACCTGAAATGCACCAGTGAAGCAGCATTCTATCAAATTTCTAGTAAATTTCTTTTGTTCATCTCTAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAA
```

>TC199385

```
GTTTCAATTTCTGCATAATTTTGAGIATTCATCATCATGCTTCTGAAAGTGGCACCTGCGTTTGGCATTATGAACACCCA
TGAGGAAAAATTTGAGTTCCTGATATCATTTTCTTCACATGGATCTGCTTTGAAGAATTTTTCGGCAAAAACGGAAATG
GATTGGTTGTATGTGCTTCAAAGGGTTCGAACAGTAAACCGTTGACGGGTGTTGTTTTCGAACCTTTTGAAGAGGTGAAG
AAAGAGCTTATGCTTGTACCTACTGTTCTCAAGCTTCTCTTGCTAGACAGAAGTTTACTGATCAATCTGAAGCTGCTCT
TAATGAACAGATCAATGTGCAATACAATGTTTTCGTATGTTTACCATGCTATGATGCTTATTTTCGACAGAGACAATGTTG
CTCTCAAGGGACTTGCCAAGTTTTTCAAGGAATCAAGTGAAGAGGAAAGGGAACATGCTGAGAAGTTCATGGAGTATCAG
AACAAAGCGTGGTGGGAAAGTGAAGCTGCAGTCTATTTTAAATGCCATATCCGAATTTGATCATGCTGAGAAGGGGGATGC
ATTGTATGCAATGGAGCTTGCCTTTCTTTGGAGAAGTTGACAAATGAGAAGCTCTTAAACTTGCATGCTGTAGCCACAC
GAAACAATGATGTGCGATTGGCTGATTTTGTAGAAAACGAGTACTTGCAAGAACAGGTGGAAGCAATCAAGAAGATCTCG
GAATATGTAGCTCAGCTGAGAAGAGTGGACAAAGTTCATGGTGTCTGGCACTTTGATCAAATGCTCCTGCACGAGGCGGA
AGCTCTTGCATGATGGAGGAGATAGACTTTGAACTTTCTACGAGTAGTCTTCTTTTGGAGGATGTTGTCTGGGTATATTT
TGGCATTAGCCTTTTCTATGAGATAGATATGTAAGGCGTTTGGTGATGGAAGTCCCAGTGTGATATATAGACCCAAA
TAGATGTAGTAATTTGTGCTACTTATTAGTACCCTCCTGGTGTTCAAATCAGCTTTAATTTACCTCATGGTTTGTAGTT
GTAGCTTGGAAATGAAGGTACCCAGTGAAGTCAAATGTAAGTGAAGTTGATAGTTTTGTTTTAGTTGGATGTTGACT
CATCTGGAGAAATAATAAATAATCGGAATTTAGCTC
```

Εικόνα 3.4: Τα TC (αλληλουχίες σύγκλισης) που πιθανόν κωδικοποιούν τη φερριτίνη .

Ο κλώνος αποκτήθηκε και προσδιορίστηκε η πλήρης νουκλεοτιδική ακολουθία του. Οι προκύπτουσες ακολουθίες σύγκλισης (TC1, TC2) κατέδειξαν ότι το ποσοστό ομολογίας των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια- ORFs είναι 84.5%.

```

XG-----XXXXXXXXAGT Majority
      10      20      30      40
1  A CAATAGGACTASGSGGTGGCGGCCCTCAGAACTAGT ferritin_consensus.seq
1  C G-----ATCACTAGT TC191963.seq
1  G-----TC199385.seq

XXXXXXXXXXCTGXXXXXXTTTTTTCATTTCTGCATAA Majority
      50      60      70      80
41 GGATMYCCGGGCTGAGGTTTTCATTTCTGCATAA ferritin_consensus.seq
12 CAATACCAACACTGATTTTCCTCCCTGTTTTCATAA TC191963.seq
2  -----TTTCAATTTCTGCATAA TC199385.seq

TTTTGAGTATTCATCATCATGCTTCTGAAAAGTGGCACCTG Majority
      90     100     110     120
81 TTTGAGTATTCATCATCATGCTTCTGAAAAGTGGCACCTG ferritin_consensus.seq
52 CCGTAA--TTTCATCATCATGCTTCTGAAAAGTGGCACCTG TC191963.seq
19 TTTGAGTATTCATCATCATGCTTCTGAAAAGTGGCACCTG TC199385.seq

CGTTTGGCTTATTGAAACACCCATGAGGAAAATTTGAGTTC Majority
      130     140     150     160
121 CGTTTGGCTTATTGAAACACCCATGAGGAAAATTTGAGTTC ferritin_consensus.seq
125 CCGTTTGGCTTATTGAAACACCCATGAGGAAAATTTGAGTTC TC191963.seq
59 CCGTTTGGCTTATTGAAACACCCATGAGGAAAATTTGAGTTC TC199385.seq

CGTGATATCAITTTCTTCACTGGATCTGCTTTGAAGAAI Majority
      170     180     190     200
161 CGTGATATCAITTTCTTCACTGGATCTGCTTTGAAGAAI ferritin_consensus.seq
151 GCGAATATGTTAACCACAC-----AGAGT TC191963.seq
99 CGTGATATCAITTTCTTCACTGGATCTGCTTTGAAGAAI TC199385.seq

TTTTCGGCAAAAACGGAAAATGGATTGGTTGATGCTT Majority
      210     220     230     240
201 TTTTCGGCAAAAAACGGAAAATGGATTGGTTGATGCTT ferritin_consensus.seq
151 TTTTCGGCAAAAAACGGAAAATGGATTGGTTGATGCTT TC191963.seq
139 TTTTCGGCAAAAAACGGAAAATGGATTGGTTGATGCTT TC199385.seq

CAAAGGGTTCGAACAGTAAACCCTTGACGGGTGTTGTTT Majority
      250     260     270     280
241 CAAAGGGTTCGAACAGTAAACCCTTGACGGGTGTTGTTT ferritin_consensus.seq

CAAAGGGGCAAAACCAATAACCCCTTGAACAGGCGTTGCTTC TC191963.seq
179 CAAAGGGTTCGAACAGTAAACCCTTGAACAGGCGTTGTTGTC TC199385.seq

CGAACCTTTTGAAGAGGTGAAGAAAAGAGCTTATGCTTGTIA Majority
      290     300     310     320
281 CGAACCTTTTGAAGAGGTGAAGAAAAGAGCTTATGCTTGTIA ferritin_consensus.seq
231 TGAACCTTTTGAAGAGGTGAAGAAAAGAGCTTATGCTTGTIA TC191963.seq
219 CGAACCTTTTGAAGAGGTGAAGAAAAGAGCTTATGCTTGTIA TC199385.seq

CTTACTGTTCCCAAGCTTCTCTTGGCTAGACAGAAAGTTIA Majority
      330     340     350     360
321 CTTACTGTTCCCAAGCTTCTCTTGGCTAGACAGAAAGTTIA ferritin_consensus.seq
271 CTTACTGTTCCCAAGCTTCTCTTGGCTAGACAGAAAGTTIA TC191963.seq
259 CTTACTGTTCCCAAGCTTCTCTTGGCTAGACAGAAAGTTIA TC199385.seq

TGATCAATCTGAAGCTGCTCTTAAATGAACAGATCAATGT Majority
      370     380     390     400
361 TGATCAATCTGAAGCTGCTCTTAAATGAACAGATCAATGT ferritin_consensus.seq
311 GCGATCAATCTGAAGCTGCTCTTAAATGAACAGATCAATGT TC191963.seq
299 TGATCAATCTGAAGCTGCTCTTAAATGAACAGATCAATGT TC199385.seq

CGAATACAAATGTTTCGTTATGTTTACCAATGCTATGTAATGCC Majority
      410     420     430     440
401 CGAATACAAATGTTTCGTTATGTTTACCAATGCTATGTAATGCC ferritin_consensus.seq
351 GGAATACAAATGTTTCGTTATGTTTACCAATGCTATGTAATGCC TC191963.seq
339 CGAATACAAATGTTTCGTTATGTTTACCAATGCTATGTAATGCC TC199385.seq

TATTTCCGACAGAGCAAAATGTTGCTCTCAAGGGACTTGCCA Majority
      450     460     470     480
441 TATTTCCGACAGAGCAAAATGTTGCTCTCAAGGGACTTGCCA ferritin_consensus.seq
391 TATTTCCGACAGAGCAAAATGTTGCTCTCAAGGGACTTGCCA TC191963.seq
379 TATTTCCGACAGAGCAAAATGTTGCTCTCAAGGGACTTGCCA TC199385.seq

AGTTTTTCAAGGAATCAAGTGAAGAGGAAAAGGAAACATGC Majority
      490     500     510     520
481 AGTTTTTCAAGGAATCAAGTGAAGAGGAAAAGGAAACATGC ferritin_consensus.seq
431 AGTTTTTCAAGGAATCAAGTGAAGAGGAAAAGGAAACATGC TC191963.seq
419 AGTTTTTCAAGGAATCAAGTGAAGAGGAAAAGGAAACATGC TC199385.seq

```

```

761 GGAAGCAATCAAGAAGATCTCGGAATATGTAGCTCAGCTG ferritin_consensus.seq
711 GGAAGCAATCAAGAAGATCTCGGAATATGTAGCTCAGCTG TC191963.seq
699 GGAAGCAATCAAGAAGATCTCGGAATATGTAGCTCAGCTG TC199385.seq

      810      820      830      840
AGAAGAGTGGACAAAGGTCATGGTGTCTGGCACITTTGATC Majority
      850      860      870      880
AAATGCTCCTGACCGAGGCGGAAAGCTCTTGCATGATGGAG Majority
841 AAATGCTCCTGACCGAGGCGGAAAGCTCTTGCATGATGGAG ferritin_consensus.seq
791 AATGCTCCTGACCGAGGCGGAAAGCTCTTGCATGATGGAG TC191963.seq
739 AAATGCTCCTGACCGAGGCGGAAAGCTCTTGCATGATGGAG TC199385.seq

      890      900      910      920
GAGATAGACTTTGAACITTTCTACGAGTAGTCTTCTTTTGG Majority
881 GAGATAGACTTTGAACITTTCTACGAGTAGTCTTCTTTTGG ferritin_consensus.seq
828 AAGATAGAAATTTCCGCTTACCAATTTGTAATTTTC----- TC191963.seq
819 GAGATAGACTTTGAACITTTCTACGAGTAGTCTTCTTTTGG TC199385.seq

      930      940      950      960
AGGATGTTGCTCTGGGTATATTTTGGCAITTAGCCTTTTCTA Majority
921 AGGATGTTGCTCTGGGTATATTTTGGCAITTAGCCTTTTCTA ferritin_consensus.seq
862 --ACTGTTGCTCTGGGTATATTTTGGCAITTAGCCTTTTCTA TC191963.seq
859 AGGATGTTGCTCTGGGTATATTTTGGCAITTAGCCTTTTCTA TC199385.seq

      970      980      990     1000
TGAGATAGATATGTAAGGCGTTTGGTGTATGGAAGTCCCGC Majority
961 TGAGATAGATATGTAAGGCGTTTGGTGTATGGAAGTCCCGC ferritin_consensus.seq
900 ATCTGAGAGTATGTAAGGCGTTTGGTGTATGGAAGTCCCGC TC191963.seq
899 TGAGATAGATATGTAAGGCGTTTGGTGTATGGAAGTCCCGC TC199385.seq

      1010      1020      1030      1040
AGTGCTGTATATATAGACCAAATAGATGTAGTAATTTGTG Majority
1001 AGTGCTGTATATATAGACCAAATAGATGTAGTAATTTGTG ferritin_consensus.seq
937 ---TGGCAAGCGCAATACAGAGTGTAGTAATTTGTG TC191963.seq
939 AGTGCTGTATATATAGACCAAATAGATGTAGTAATTTGTG TC199385.seq

      1050      1060      1070      1080
TGGAAGCTTCTATGGAAGGGAATGCAATTTGATGCAATGGAGCT Majority
521 TGGAAGCTTCTATGGAAGGGAATGCAATTTGATGCAATGGAGC ferritin_consensus.seq
471 TGGAAGCTTCTATGGAAGGGAATGCAATTTGATGCAATGGAGC TC191963.seq
459 TGGAAGCTTCTATGGAAGGGAATGCAATTTGATGCAATGGAGC TC199385.seq

      1090      1100      1110      1120
GTGAAGCTGCACTCTATTTTAAATGCCATTTATCCGAATTTG Majority
561 GTGAAGCTGCACTCTATTTTAAATGCCATTTATCCGAATTTG ferritin_consensus.seq
511 GTGAAGCTGCACTCTATTTTAAATGCCATTTATCCGAATTTG TC191963.seq
499 GTGAAGCTGCACTCTATTTTAAATGCCATTTATCCGAATTTG TC199385.seq

      1130      1140      1150      1160
ATCATGCTGAGAAAGGGGGAATGCAATTTGATGCAATGGAGCT Majority
601 ATCATGCTGAGAAAGGGGGAATGCAATTTGATGCAATGGAGC ferritin_consensus.seq
551 ATCATGCTGAGAAAGGGGGAATGCAATTTGATGCAATGGAGC TC191963.seq
539 ATCATGCTGAGAAAGGGGGAATGCAATTTGATGCAATGGAGC TC199385.seq

      1170      1180      1190      1200
TGCACITTTCTTTGGAGAAAGTTGACAAAATGGAAGCTCTTAA Majority
641 TGCACITTTCTTTGGAGAAAGTTGACAAAATGGAAGCTCTTAA ferritin_consensus.seq
591 TGCACITTTCTTTGGAGAAAGTTGACAAAATGGAAGCTCTTAA TC191963.seq
579 TGCACITTTCTTTGGAGAAAGTTGACAAAATGGAAGCTCTTAA TC199385.seq

      1210      1220      1230      1240
AACTTGCATGCTGTAGCCACACGAAACAATGATGTGCAAGT Majority
681 AACTTGCATGCTGTAGCCACACGAAACAATGATGTGCAAGT ferritin_consensus.seq
631 AACTTGCATGCTGTAGCCACACGAAACAATGATGTGCAAGT TC191963.seq
619 AACTTGCATGCTGTAGCCACACGAAACAATGATGTGCAAGT TC199385.seq

      1250      1260      1270      1280
TGGCTGATTTTGTAGAAAACGAGTACTTGGCAAGAACAGGT Majority
721 TGGCTGATTTTGTAGAAAACGAGTACTTGGCAAGAACAGGT ferritin_consensus.seq
671 TGGCTGATTTTGTAGAAAACGAGTACTTGGCAAGAACAGGT TC191963.seq
659 TGGCTGATTTTGTAGAAAACGAGTACTTGGCAAGAACAGGT TC199385.seq

      1290      1300      1310      1320
GGAAGCAATCAAGAAGATCTCGGAATATGTAGCTCAGCTG Majority
761 GGAAGCAATCAAGAAGATCTCGGAATATGTAGCTCAGCTG ferritin_consensus.seq
711 GGAAGCAATCAAGAAGATCTCGGAATATGTAGCTCAGCTG TC191963.seq
699 GGAAGCAATCAAGAAGATCTCGGAATATGTAGCTCAGCTG TC199385.seq

```

Εικόνα 3.5: Ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών της πιθανής φερριτίνης της τομάτας.

Η αλληλουχία αποτελείται από 1241 νουκλεοτίδια και περιέχει ένα ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο που κωδικοποιεί 258 αμινοξέα.

Μετά από τη διαδικασία ExPASy >[Tools](#) >[DNA -> Protein](#) στον κλώνο EST587819 έχουμε την εξής πρωτεϊνική ακολουθία:

MLLXVAPAFALLNTHEENLSSVISFSSHGSALKNFSAKNGNGLVVCASKGSNS
KPLTGVVVFEPFEEVKKELMLVPTVPQASLARQKFTDQSEAALNEQINVEYNV
SYVYHAMYAYFDRDNVALKGLAKFFKESSEEEEREHAEEKFMEYQNKRRGGKV
KLQSILMPLSEFDHAEKGDALYAMELALSLEKLTNEKLLNLHAVATRNDV
QLADFVENEYLQEQVEAIKKISEYVAQLRRVDKGGHGVWHFDQMLLHEAEAL
A.

Η πρωτεϊνική ακολουθία που προκύπτει από τον κλώνο cLEG63D15 συγκρίθηκε με δημοσιευμένες φερριτίνες και βρέθηκε ότι υπάρχει σημαντική ομολογία με γονίδια που κωδικοποιούν φερριτίνες από τα φυτά *Solanum tuberosum* (ABU49726.1), *Jatropha curcas* (ACS32300.1) και *Avicennia Marina* (AAZ04239.1).

```

MLLKAAPAFALLNTHGENLSSVISFSSHGSSLLKXFSAK-- Majority
      10          20          30          40
1  MLLVVPAPAFALLNTHGENLSSVISFSSHGSAALKNFSAK-- ferritin_1.pro
1  MLLKVPAPAFALLNTHGENLSSVISFSSHGSLRNFSAK-- solanum tuberosum.pro
1  MLLKAAPAFSLLNTHGDNLEFL--FSPVSSFNTLRGN-- jathropa curcus.pro
1  MLLKAAPAYGLNLSRGENLSAL--FSPAASSASSPAKNF avicennia marina.pro

---SGNGLVVCASKGNSKPLTGVVFEFPEEVKKELMLVLP Majority
      50          60          70          80
39 ---NGNGLVVCASKGNSKPLTGVVFEFPEEVKKELMLVLP ferritin_1.pro
39 ---SGNGLVVCASKSNSKPLTGVVFEFPEEVKKELMLVLP solanum tuberosum.pro
37 ---SVEGFVVCASKGNSKPLTGVVFEFPEEVKKELMLVLP jathropa curcus.pro
39 EGRNGNAFVVFARAKQTSKRALTGVVFEFPEEVKKELMLVLP avicennia marina.pro

IVPQASLARQKFTDQSEAAALNEQINVEYNVSYVYHAMFAY Majority
      90          100         110         120
76 IVPQASLARQKFTDQSEAAALNEQINVEYNVSYVYHAMFAY ferritin_1.pro
76 IAPHASLARQKFTDQSEAAALNEQINVEYNVSYVYHAMFAY solanum tuberosum.pro
74 IVPQVSTARQKFTDSEAAALNEQINVEYNVSYVYHAMFAY jathropa curcus.pro
79 IVPQASLARHRYADDCAAALNEQINVEYNVSYVYHAMFAY avicennia marina.pro

FDRDNVALKGLAKFFKESSEEEEREHAEKLEMEYQNKRRGGKV Majority
      130         140         150         160
116 FDRDNVALKGLAKFFKESSEEEEREHAEKLEMEYQNKRRGGKV ferritin_1.pro
116 FDRDNVALKGLAKFFKESSEEEEREHAEKLEMEYQNKRRGGKV solanum tuberosum.pro
114 FDRDNVALKGLAKFFKESSEEEEREHAEKLEMEYQNKRRGGKV jathropa curcus.pro
119 FDRDNVALKGLAKFFKESSEEEEREHAEKLEMEYQNKRRGGKV avicennia marina.pro

KLQSIILMPLSEFDHAEKGDALYAMELALSLEKLTNEKLLN Majority
      170         180         190         200
156 KLQSIILMPLSEFDHAEKGDALYAMELALSLEKLTNEKLLN ferritin_1.pro
156 KLQSIILMPLSEFDHAEKGDALYAMELALSLEKLTNEKLLN solanum tuberosum.pro
154 KLQSIILMPLSEFDHAEKGDALYAMELALSLEKLTNEKLLN jathropa curcus.pro
159 KLQSIILMPLSEFDHAEKGDALYAMELALSLEKLTNEKLLN avicennia marina.pro

LHAVASRNNDVQLADDFVENEYLAEQVEAIKKISEYVAQLR Majority
      210         220         230         240
196 LHAVASRNNDVQLADDFVENEYLAEQVEAIKKISEYVAQLR ferritin_1.pro
196 LHAVASRNNDVQLADDFVENEYLAEQVEAIKKISEYVAQLR solanum tuberosum.pro
194 LHSVASRNNDVQLADDFVENEYLAEQVEAIKKISEYVAQLR jathropa curcus.pro

199 LHAVASRNNDVQLADDFVENEYLAEQVEAIKKISEYVAQLR avicennia marina.pro

RVGKGGHGVWHFDQMLLHEAEAV---A-
      250         260
236 RVGKGGHGVWHFDQMLLHEAEAL---A- ferritin_1.pro
236 RVGKGGHGVWHFDQMLLHEAGSSCWNGETR solanum tuberosum.pro
234 RVGKGGHGVWHFDQMLLHEAEAV---A- jathropa curcus.pro
239 RVGKGGHGVWHFDQMLLREAEAV---A- avicennia marina.pro

```

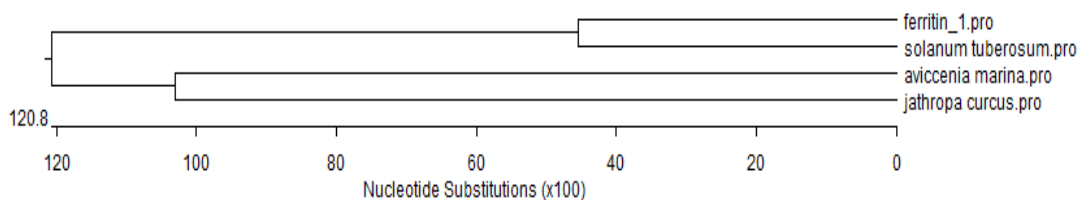
Εικόνα 3.6: Ευθυγράμμιση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών της πιθανής φερριτίνης της τομάτας.

Στον Πίν. 3.1 αναφέρεται η επί τοις εκατό ομολογία της πρωτεϊνικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης Fer1 της τομάτας με λοιπές αλληλουχίες που κωδικοποιούν την Fer σε άλλα φυτά. Όπως φαίνεται στον πίνακα, η φερριτίνη της τομάτας (ferritin_1) παρουσιάζει περίπου 93.5% ομολογία με τον κλώνο από το φυτό *Solanum tuberosum* και 80.2% ομολογία με τον κλώνο του φυτού *Jatropha curcas*. Επίσης, με την πρωτεϊνική αλληλουχία του φυτού *Avicennia marina* παρουσιάζεται ομολογία 80.5% με αυτή της τομάτας.

		Percent Identity					
		1	2	3	4		
Divergence	1		93.5	80.2	80.5	1	ferritin_1.pro
	2	6.9		78.2	78.6	2	solanum tuberosum.pro
	3	23.1	25.8		78.6	3	jathropa curcus.pro
	4	22.6	25.3	25.3		4	aviccenia marina.pro
		1	2	3	4		

Πίνακας 3.1 Το (%) ποσοστό ομολογίας σε επίπεδο πρωτεϊνικής αλληλουχίας μεταξύ φερριτίνης σε διάφορα φυτά.

Από την εικόνα 3.5 φαίνεται η πρωτεϊνική αλληλουχία Fer1 της τομάτας να μοιάζει περισσότερο με αυτή του φυτού *Solanum tuberosum* και επιβεβαιώνεται από το φυλογενετικό δενδρόγραμμα. Επίσης, προκύπτει ότι η πρωτεϊνική αλληλουχία Fer1 τοποθετείται εξελικτικά στον ίδιο κλάδο με την πρωτεϊνική αλληλουχία της πατάτας.



Εικόνα 3.6 Φυλογενετικό δενδρόγραμμα με βάση την πρωτεϊνική αλληλουχία που κωδικοποιούν την cLEG63D15

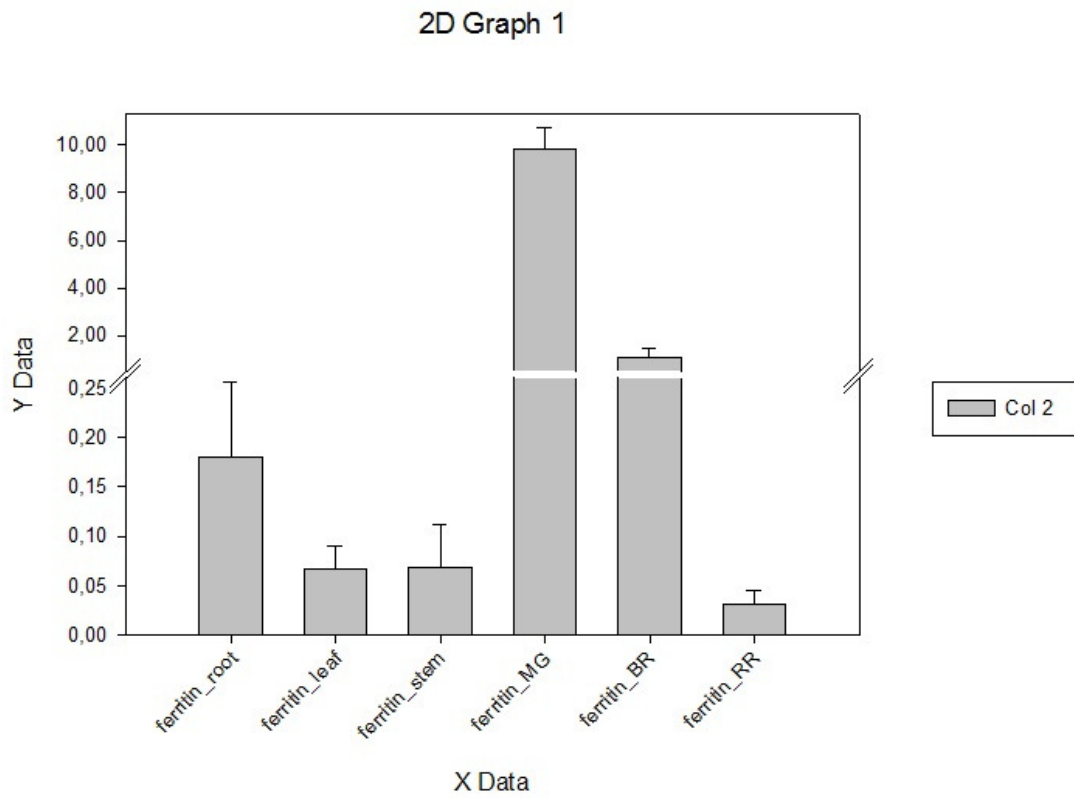
Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων LeFer1KAI LeFer2 με την ποσοτική μέθοδο RT- PCR στους διάφορους ιστούς της τομάτας.

Η απομόνωση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε από τους εξής ιστούς ή όργανα τομάτας: περικόριο καρπών στα στάδια ώριμου πράσινου, στάδιου αλλαγής του χρώματος και ώριμου κόκκινου καρπού, φύλλο, ρίζα και στελέχη των φυτών.

Για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων LeFer σε όργανα και ιστούς της τομάτας εφαρμόστηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης με μήτρα μόρια mRNA (RT- PCR). Η μέθοδος RT- PCR αποτελεί μια υψηλής ευαισθησίας μέθοδο η οποία προσδιορίστηκε ημι-ποσοτικά με μεταγραφήματα των γονιδίων. Με τον τρόπο αυτό γίνεται μια σύγκριση της αφθονίας των μεταγραφημάτων του εκάστοτε γονιδίου στους διαφορετικούς ιστούς.

Για την πραγμάτωση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης RT- PCR επιλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε καθολικός εκκινητής. Για να αποκλειστεί η πιθανότητα παραγωγής προϊόντος που θα προερχόταν από την ενίσχυση γενωματικού DNA όλα τα δείγματα RNA που χρησιμοποιήθηκαν, υπέστησαν πέψη με DNase. Επιπλέον για να διασφαλιστεί πλήρως ότι το προϊόν της αντίδρασης δεν οφείλεται σε ενίσχυση υπολειμμάτων γενωματικού DNA, όλες οι αντιδράσεις επαναλήφθηκαν μετά την πέψη δειγμάτων RNA με RNase, οπότε δεν παράχθηκε κανένα προϊόν ενίσχυσης.

Τα υψηλότερα επίπεδα mRNA εμφανίζονται στον καρπό στα στάδια του ώριμου πράσινου καρπού, αλλαγής χρώματος, και στη ρίζα. Μικρότερα επίπεδα έκφρασης κατά φθίνουσα σειρά παρατηρούνται στο στέλεχος και τα φύλλα. Τέλος, η μικρότερη έκφραση παρατηρείται στον ώριμο κόκκινο καρπό.



Εικόνα 3.7: Η έκφραση του γονιδίου LeFer στα όργανα της τομάτας.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκε καταρχήν το χρωματογραφικό πρότυπο των αποθησαυριστικών πρωτεϊνών των σπερμάτων από τις δύο ποικιλίες τομάτας τύπου cherry. Επίσης, διερευνήθηκε κατά κύριο λόγο, η ύπαρξη γονιδίων που κωδικοποιούν τη φερριτίνη σε διαφορετικούς ιστούς τομάτας καθώς και η έκφρασή τους.

Στα ηλεκτροφορήματα των πρωτεϊνών από τις δύο ποικιλίες της τομάτας τύπου cherry ανιχνεύθηκαν τέσσερις διαφορετικές ηλεκτροφορητικές ζώνες. Διαφορές στα ηλεκτροφορητικά πρότυπα μεταξύ των δύο ποικιλιών δεν ανιχνεύθηκαν. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται από προγενέστερες έρευνες των Berry and Bewley (1991). Οι ερευνητές αυτοί μελέτησαν τις αποθησαυριστικές πρωτεΐνες των σπερμάτων της τομάτας κατά την ανάπτυξή τους. Αναφέρουν την ύπαρξη τεσσάρων ομάδων πρωτεϊνών SP 1,2,3,4 με μοριακά βάρη 45, 34, 23, 20 kDa αντίστοιχα, οι οποίες ταξινομούνται ως πρωτεΐνες αποθήκευσης. Ίδιου περίπου μοριακού βάρους πρωτεΐνες ανιχνεύθηκαν και στα δικά μας δείγματα (Εικ. 3.2). Οι αποθηκευτικές αυτές πρωτεΐνες παράγονται κατά μεγάλες ποσότητες στα τελευταία στάδια της ανάπτυξης και εμφανίζουν κινητικότητα 120 ώρες μετά την ενυδάτωση των σπερμάτων (Berry and Bewley, 1991). Οι ίδιες αποθησαυριστικές πρωτεΐνες εντοπίστηκαν τόσο στο ενδοσπέρμιο, όσο και σε όλους τους ιστούς του εμβρύου κατά την ανάπτυξη των σπερμάτων περίπου 20 μέρες μετά τη γονιμοποίηση (Berry & Bewley, 1991). Όμοιο ηλεκτροφορητικό πρότυπο αποθησαυριστικών πρωτεϊνών έχει αναφερθεί και σε ώριμα σπέρματα διαφορετικών ποικιλιών τομάτας και σε μεταλλάγματα που δεν παράγουν αμψισικό οξύ (Groot et al, 1991).

Η έκφραση της φερριτίνης LeFer ανιχνεύτηκε σε όλα τα μέρη του φυτού που εξετάστηκαν, όπως οι καρποί, τα φύλλα, το στέλεχος, και η ρίζα, αλλά και σε διαφορετικά επίπεδα. Τα μεταγραφήματα της φερριτίνης ήταν υψηλότερα κυρίως στο ώριμο πράσινο των καρπών, στο στάδιο αλλαγής χρώματος και στη ρίζα. Μικρότερα επίπεδα έκφρασης κατά φθίνουσα σειρά παρατηρούνται στο στέλεχος και τα φύλλα. Τέλος, η μικρότερη έκφραση παρατηρείται στον ώριμο καρπό (Εικ. 3.7).

Μελέτες έκφρασης των γονιδίων της φερριτίνης στα διάφορα φυτικά όργανα δεν εντοπίστηκαν αρκετές στη διεθνή βιβλιογραφία. Οι Wardrop et al. (1999) αναφέρουν ότι από τους τέσσερις ισότυπους του γονιδίου που μελέτησαν τα τρία εκφράζονταν περίπου σε ίδια περίπου επίπεδα στα αναπτυσσόμενα φύλλα και τη

ρίζα. Από αυτά, μόνο ένας ισότυπος εξακολουθούσε να εκφράζεται σημαντικά και μετά την ωρίμανση των φύλλων, ενώ η έκφραση των δύο άλλων μειώθηκε σημαντικά. Επίσης, η έκφραση των ισοτύπων ήταν διαφορετική στα αναπτυσσόμενα φύλλα και στις ρίζες.

Στο γονιδίωμα του *Zea mays* υπάρχουν δύο γονίδια φερριτίνης (ZmFer1 και ZmFer2), τα οποία ρυθμίζονται διαφορετικά (Fobis-Loisy et al, 1995). Τα δύο αυτά γονίδια μεταγράφονται υπό συνθήκες περίσσειας σιδήρου, αλλά μέσω διαφορετικών μεταβολικών μονοπατιών. Το γονίδιο ZmFer2 ρυθμίζεται μέσω του μεταβολικού μονοπατιού ABA, ενώ η ρύθμιση του ZmFer1 γίνεται μεν μέσω του μονοπατιού ABA, αλλά απαιτεί και το στοιχείο IDRS. Επίσης, η έκφραση του ZmFer1 επάγεται με μεταχείριση H₂O₂ χωρίς να υπάρχει το IDRS (Petit et al, 2001). Στο *Arabidopsis thaliana* η περίσσεια σιδήρου και η οξειδωτική καταπόνηση μέσω της εφαρμογή του εξωγενούς H₂O₂, προάγει την έκφραση του γονιδίου AtFer1 μέσω δύο ανεξάρτητων και προσθετικών μονοπατιών (Briat et al, 2009).

Η αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων που αφορούν στην τομάτα, απέδωσαν δύο πιθανά γονίδια που κωδικοποιούν τη φερριτίνη. Όπως αναφέρεται όμως από τον Briat et al (1999), στο γονιδίωμα του *Arabidopsis thaliana*, το οποίο έχει πλήρως αλληλουχηθεί, υπάρχουν τέσσερα γονίδια φερριτίνης (AtFer1–4) τα οποία φέρουν πεπτίδιο οδηγό για τα πλαστίδια. Το γεγονός ότι στο *Arabidopsis* οι φερριτίνες οδηγούνται στα πλαστίδια, έχει επίσης επιβεβαιωθεί με ανοσοβιολογικές τεχνικές. Σε πρωτεϊνικό επίπεδο, έχει επιτευχθεί η ανοσολογική ανίχνευση των υπομονάδων των φερριτινών με western blot και στα εκχυλίσματα πρωτεϊνών από φύλλα και σπέρματα μεταλλαγμένων φυτών στα οποία έχει σιγηθεί τα γονίδια της φερριτίνης.

Επιπρόσθετα, στα φύλλα του *Arabidopsis* ανιχνεύτηκε μια ώριμη υπομονάδα FER1 των 28-kDa η οποία είναι η πιο άφθονη. Ακόμα, ανιχνεύθηκαν οι FER3 και FER4, με μαριακό βάρος 26.5 kDa. Τέλος, η μόνη φερριτίνη που απαντάται στα σπέρματα είναι μια υπομονάδα των 26.5kDa που κωδικοποιείται από το γονίδιο AtFer2. Είναι επίσης ενδιαφέρον να τονιστεί ότι στις υπομονάδες του *Arabidopsis thaliana*, του πιζελιού και της σόγιας υπάρχουν δύο πολυπεπίδια διαφορετικού μοριακού βάρους.

Στα σπέρματα της σόγιας και του πιζελιού έχουν ταυτοποιηθεί επίσης φερριτίνες. Οι φερριτίνες αυτές έχουν υπομονάδες H-1 και H-2. Η υπομονάδα H-1 χαρακτηρίζεται ως πρόδρομη με μέγεθος 28-kDa (Briat et al, 2009). Η έκφραση των ισοτύπων της φερριτίνης στην τομάτα ήταν μέγιστη στο περικάρπιο του ώριμου

πράσινου καρπού (Εικ. 3.6). Αυτό σημαίνει ότι, εκτός από το σπέρμα στο οποίο ανιχνεύτηκε ιστοχημικά (Εικ. 3.1), ο σίδηρος είναι δυνατόν να συσσωρεύεται και στο περικάρπιο. Το ότι στο περικάρπιο εκφράζονται τα γονίδια της φερριτίνης τα οποία μάλιστα μειώνονται με την ωρίμανση του καρπού, πιθανόν δείχνει την πιθανή συμμετοχή των φερριτινών στη προστασία από οξειδωτική καταπόνηση, όπως έχει αναλυθεί στην εισαγωγή. Ο σίδηρος των φερριτινών έχει διαπιστωθεί ότι επανακινητοποιείται κατά τη βλάστηση των σπερμάτων. Σχετικά αποτελέσματα με τη φερριτίνη του σπέρματος πιζελιού δείχνουν ότι δεσμευμένος στη φερριτίνη σίδηρος απελευθερώνεται από την φερριτίνη του σπέρματος του πιζελιού (Lanquar et al, 2005).

Η ύπαρξη φερριτινών στη ρίζα, στα φύλλα και το στέλεχος των φυτών είναι δυνατόν να σχετίζεται τόσο με τη συντήρηση του σιδήρου σε μη τοξική μορφή, όσο και με την αποθήκευσή του. Η συντήρηση σε μη τοξική μορφή του σιδήρου επιτυγχάνεται με την οξείδωση εντός των κυττάρων του φυτικού σώματος ($Fe^{2+} \leftrightarrow Fe^{3+}$). Παράλληλα, η φερριτίνη ρυθμίζει τις ποσότητες του μετάλλου σιδήρου που απαιτείται για τους σκοπούς του μεταβολισμού βοηθώντας, το φυτό σε καταστάσεις αντίξοων συνθηκών (Briat et al, 2009).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Τα γονιδια της φερριτίνης εκφράζονται περισσότερο στο περικάρπιο της τομάτας στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού και λιγότερο στα επόμενα στάδια. Το πρότυπο της έκφρασης των γονιδίων παραπέμπει στη συμμετοχή της φερριτίνης στην προστασία από οξειδωτική καταπόνηση.
2. Στα σπέρματα ο σίδηρος εντοπίζεται στο προκάμβιο του εμβρύου και το ακρορρίζιο.
3. Τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα των αποθησαυριστικών πρωτεϊνών των σπερμάτων δεν έδειξαν ποιοτικές διαφορές μεταξύ των δύο ποικιλιών της τομάτας που εξετάστηκαν.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ackrell BAC, Maguire JJ/ Dallman PR, Kearney EB** (1984) Effects of iron deficiency on succinate- and NADH-ubiquinone oxidoreductases in skeletal muscle mitochondria. *Biol Chem* **259**: 10053-10059
- Andrews SC, Arosio P, Bottke W, Briat JF, von Darl M, Harrison M, Lahlere JP, Levi S, Lobréaux S, Yewdall SG**, (1992): Structure, function and evolution of ferritins, *Inorg. Biochem.* **47**: 161–174
- Abdel- Rahman M.** (1977) Patterns of hormones, respiration and ripening enzymes during development, maturation and ripening of cherry tomato fruits. *Physiol. Plant.* **39**: 115-118
- Anderlini R.** (1983) Η τομάτα – Τεχνική καλλιέργειας και φυτοπροστασία σελ. 1-15. Εκδοτική Αγροτεχνική – Αθήνα
- Archbold D.D., Denis F.G., FLore J.A.** (1982) Accumulation of ¹⁴C-labelled material from foliar-applied ¹⁴C-sucrose by tomato ovaries during fruit set and initial development. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **107**: 19-23
- Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P** (2009) Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim Biophys Acta.* **1790**:589-99
- Asahira T., Hosoki T.** (1977) *In vitro* studies of controlling tomato puffiness by growth regulators. *Sci. Hort.* **7**: 319-328.
- Andaluz S, Lopez-Millan AF, De Las Rivas J, Aro EM, Abadia J, Abadia A** (2006): Proteomic profiles of thylakoid membranes and changes in response to iron deficiency. *Photosynth Res*, **89**:141-155.
- Basu A., Imrah V.** (2007) Tomatoes versus lycopene in oxidative stress and carcinogenesis: conclusions from clinical trials. *Eur. J. Clin. Nutr.* **61**: 295-303
- Briat J-F, Curie C, Gaymard F** (2007) Iron utilization and metabolism in plants. *Cur. Opin Plant Biol.* **10**: 276-282.
- Briat JF, Fobis-Loisy I, Grignon N, Lobre´aux S, Pascal N, Savino G, Thoiron S, von Wire`n N, Van Wuytswinkel O** (1995): Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. *Biol Cell*, **84**:69-81.
- Berry T, Bewley D** (1991) Seed of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) which develop in a fully hydrated environment in the fruit switch from a developmental to germinative mode without a requirement for desiccation. *Planta* **186**: 27-34

- Bhuvaneswari V, Nagini S** (2005) Lycopene: a review of its potential as an anticancer agent. *Curr. Med. Chem. Anticanc. Agents* **5**: 627-635
- Briat JF , Duc C, Ravet K, Gaymard Fr** (2009) Ferritins and iron storage in plants. *Biochim. Biophys. Acta* **26817** pages: 9
- Butelli E, Titta L, Giorgio M, Mock HP, Matros A, Peterek S, Schijlen EG, Hall RD, Bovy AG, Luo J, Martin C.** (2008) Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nat. Biotechnol.* **26**: 1301 - 1308
- Cartier LJ, Ohira Y, Chen M, Cuddihee RW, Holloszy JO** (1986): Perturbation of mitochondrial composition in muscle by iron deficiency. *Biol Chem* **261**: 13827-13832
- Coombe, B** (1976). The development of fleshy fruits in sink organs in relation to sink strength. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **27**: 507-528
- Davies JN, Hobson GE** (1981) The constituents of tomato fruit-the influence of environment nutrition and genotype. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **15**: 205-280
- Ding Z, Millar AJ, Davis AM, Davis SJ** (2007) TIME FOR COFFEE encodes a nuclear regulator in the Arabidopsis thaliana circadian clock, *Plant Cell* **19**:1522-36.
- Duc C, Cellier F, Lobréaux S, Briat JF, Gaymard F** (2009) Regulation of iron homeostasis in Arabidopsis thaliana by the clock regulator time for coffee. *J Biol Chem.* **284**:36271-81
- Gaymard F** (2009) Post-Translational Regulation of AtFER2 Ferritin in Response to Intracellular Iron Trafficking during Fruit Development in Arabidopsis. *Molecular Plant*, **2**:1095-1106
- Gaymard F, Boucherez J, Briat JF** (1996) Characterization of a ferritin mRNA from Arabidopsis thaliana accumulated in response to iron through an oxidative pathway independent of abscisic acid. *Biochem.* **318**: 67-73
- Gillaspy G., Ben-David H., Gruissem W.** (1993) Fruits: A developmental perspective. *The Plant Cell* **5**: 1439-1451
- Grierson D, Kader AA** (1986) Fruit ripening and quality. In: *The Tomato Crop.* (ed. Atherton JG & Rudich J). Chapman and Hall Publication Company. pp. 241-275.
- Guillet C, Just D, Benard N, Destrac-Irvine A, Baldet P, Hernould M, Causse M, Raymond P, Rothan C** (2002) A fruit-specific phosphoenolpyruvate carboxylase is related to rapid growth of tomato fruit. *Planta* **214**: 717-726

- Hall A, Bastow RM, Davis JS, Hanano S, McWatters HG, Hibberd V, Doyle MR, Sung S, Halliday KJ, Amasino RM, Millar AJ** (2003) The TIME FOR COFFEE gene maintains the amplitude and timing of *Arabidopsis thaliana* circadian clock. *Plant Cell*, **15**: 2719-2729
- Bouis HE, (2003)**:Micronutrient fortification of plants through plant breeding: can it improve nutrition in man at low cost, *Proc. Nutr. Soc.* **62**: 403–411.
- Busch A, Rimbault B, Naumann B, Rensch S, Hippler M(2008)**, Ferritin is required for rapid remodeling of the photosynthetic apparatus and minimizes photo-oxidative stress in response to iron availability in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant J.* **55**:201–211.
- Hentze MW, Rouault TA, Harford JB, Klausner RD** (1989) Oxidation-reduction and the molecular mechanism of a regulatory RNA–protein interaction. *Science*, **244**, 357-359
- Ho LC, Hewitt JD** (1986) Fruit development. In JG Atherton, J Rudich, eds, *The Tomato Crop. A Scientific Basis for Improvement*. Chapman and Hall, London, 201-239
- Hippler M, Klein J, Fink A, Allinger T, Hoerth P**: Towards functional proteomics of membrane protein complexes (2001): analysis of thylakoid membranes from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J*, **28**:595-606.
- Ho LC, Sjut V, Hoat GV** (1983) The effect of assimilate supply in fruit growth and hormone level in tomato plants. *Plant Growth Regulation* **1**: 155-171
- Hyde BB, Hodge AJ, Kahn A., Birnstiel ML**, (1963): Studies of phytoferritin. I. Identification and localization, *Ultrastruct. Res.* **9**: 248–258.
- Ohnishi T, Asakura T, Yonetani T, Chance B** (1971): Electron paramagnetic resonance studies at temperatures below 77 K on iron-sulfur proteins of yeast and bovine heart submitochondrial particles. *Biol Chem* **246**:5960-5964
- Iwai K, Drake SK, Wehr NB, Weissman AM, LaVaute T, Minato N., Klausner RD, Levine RL, Rouault TA** (1998) Iron-dependent oxidation, ubiquitination, and degradation of iron regulatory protein 2: implications for degradation of oxidized proteins. *PNAS* **95**: 4924-4928

- Kim S, Ponka P** (2003) Role of nitric oxide in cellular iron metabolism. *BioMetals* **16**: 125-135
- Kim S, Ponka P**, (2002) Nitrogen monoxide-mediated control of ferritin synthesis: implications for macrophage iron homeostasis, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **17** 12214–12219
- Kim S, Wing SS, Ponka P** (2004) S-nitrosylation of IRP2 regulates its stability via the ubiquitin-proteasome pathway, *Mol. Cell Biol.* **24**: 330–337.
- Laval Martin D., Farineau J., Diamond J.** (1977) Light versus dark carbon metabolism in cherry tomato fruits I. occurrence of photosynthesis. Study of the intermediates. *Plant Physiol*, **60**: 872-876
- Lescure AM, Proudhon D, Pesey H, Ragland M, Theil C, Briat JF** (1991):Ferritin gene transcription is regulated by iron in soybean cell cultures, *Proc. Natl. Acad. Sci* **88**:8222–8226.
- Lobreaux S, Briat JF** (1991) Ferritin accumulation and degradation in different organs of pea (*Pisum sativum*) during development, *Biochem*, **274**: 601–606.
- Lanquar V, Lelievre F, Bolte S, Hames C, Alcon C, Neumann D., Vansuyt G, Curie C, Schroder A, Kramer U, Barbier-Brygoo H, Thomine S.** (2005): Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron, *EMBO*, **24** 4041–4051.
- Long JC, Merchant SS**, (2008): Photo-oxidative stress impacts the expression of genes encoding iron metabolism components in *Chlamydomonas*, *Photochem. Photobiol.* **84**:1395–1403.
- Seckback JJ, Ferreting out the secret of plant ferritin** (1982), *Plant Nutr.* **5** 369–394.
- Lobréaux S, Massenet O, Briat JF** (1992) Iron induces ferritin synthesis in maize, *EMBO*, **12**: 651–657
- Lobreaux S, Yewdall S, Briat JF , Harrison PM** (1992) Amino-acid sequence and predicted three-dimensional structure of pea seed (*Pisum sativum*) ferritin. *Biochem J*; **288**: 931–939.
- Maguire JJ, Davies KJA, Dallman PR, Packer L** (1982): Effects of dietary iron deficiency on iron-sulfur proteins and bioenergetic functions of skeletal muscle mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **679**: 210-220
- Mikhlin DM, Pshenova KV**, (1953):Compounds of copper and iron in plants, *Dauklady Akad. Nauk. S.S.S.R.* **90**:433–435.

- Mapelli S. (1981)** Changes in cytokinin in the fruits of parthenocarpic and normal tomatoes. *Plant Sci. Lett.* **22**: 227-233
- Micali F, Vianello A, Macri F (2004)** Evidence for the presence of ferritin in plant mitochondria, *EJB*, **271**: 3657- 3664.
- Moseley JL, Allinger T, Herzog S, Hoerth P, Wehinger E, Merchant S, Hippler M (2002)**: Adaptation to Fe-deficiency requires remodeling of the photosynthetic apparatus. *EMBO J*, **21**:6709-6720
- Naumann B, Stauber EJ, Busch A, Sommer F, Hippler M (2005)**: Nterminal processing of Lhca3 is a key step in remodeling of the photosystem I-light-harvesting complex under iron deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biol Chem*, **280**:20431-20441.
- Spence MJ, Henzl MT, Lammers PJ, (1991)**: The structure of a *Phaseolus vulgaris* cDNA encoding the iron storage protein ferritin, *Plant Mol. Biol.* **17**: 499–504
- Pascal N and Douce R (1993)**: Effect of Iron Deficiency on the Respiration of Sycamore(*Acer pseudoplatanus* L) Cells. *Plant Physiol*, **103**: 1329- 1338
- Pearse AGE (1953)**, Histochemistry, Churchill Ltd, London, p. 483
- Petit JM, Briat JF, Lobreaux S (2001)** Structure and differential expression of the four members of the *Arabidopsis thaliana* ferritin gene family. *Biochem.* **359**: 575–582.
- Proudhon D, Wei J, Briat JF, Theil EC (1996)** Ferritin gene organization: differences between plants and animals suggest possible kingdom-specific selective constraints. *Journal of Molecular Evolution*, **42**: 325-336
- Quiros CF (1974)**. Αναφορά από **Warnock SJ (1988)** A review of taxonomy and phylogeny of the genus *Lycopersicon*. *Hortscience* **23**: 669-673
- Rick CM (1976)**. Αναφορά από **Tucker G, Walley P, Seymour G (2007)** **Rick CM (1978)** The tomato. *Sci Amer* **239**: 77-87
- Rayle D., Cleland R. (1992)** The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.* **99**: 1271-1274
- Rhodes MJC (1980)** The maturation and ripening of fruits. In KV Thimann, ed, Senescence in Plants. CRC Press, Boca Raton, FL, 157-205
- Ruffner H.P. (1982)** Metabolism of tartaric and malic acid in *Vitis*: a review–Part B. *Vitis* **21**: 346–358

- Taylor IB** (1986) Biosystematics of the tomato. In: *The Tomato Crop*. (ed. Atherton JG & Rudich J). Chapman and Hall Publication Company, London. pp. 1–34
- Tucker G.A.** (1993) Introduction. In: Seymour G.B. Taylor J.E., Tucker G.A. *eds.* *Biochemistry of food ripening*. London *Chapman & Hall*, 1-51
- Van Wuytswinkel O, Briat JF** (1995) Conformational changes and in vitro core-formation modifications induced by site-directed mutagenesis of the specific N-terminus of pea seed ferritin. *Biochem.* **305**:253-61.
- Wade VJ, Treffry A, Laulhère JP, Bauminger ER, Cleton MI, Mann S, Briat JF, Harrison PM** (1993) Structure and composition of ferritin cores from pea seed (*Pisum sativum*). *Biochim. Biophys. Acta* **1161**: 91-96
- Walden WE, Selezneva AI, Dupuy J, Volbeda A, Fontecilla-Camps JC, Theil EC, Volz K** (2006) Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA. *Science*, **314**:1903-8.
- Winsor G.W.** (1976) Some factors affecting the composition, flavor and firmness of tomatoes. *Scient. Hort.* **18**: 27-35
- Young TF, Terry N** (1982) Transport of iron into leaves following iron resupply to ironstressed sugar beet plants. *Protoplasma*, **114**, 85-92.
- Zancani M, Peresson C, Biroccio A, Federici G, Urbani A, Murgia I, Soave C F** (2004), Evidence for the presence of ferritin in plant mitochondria, *Eur. J. Biochem.* **271**: 3657–3664.
- Καραμπουρνιώτης Γ., Φασσέας Κ, Αϊβαλάκης Γ,** Γενική Βοτανική Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα 2005
- Κατινάκης Π,** Βιοχημεία, Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα 2004.