

PA 17529

10-221993/1

UNIVERZITET U BEOGRADU

Biološki fakultet

BIOSINTEZA REZERVNIH PROTEINA SEMENA HELJDE



Doktorski rad

Vesna Maksimović

Beograd, 1997. god.

Ovaj rad urađen je u Laboratoriji za molekularnu biologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu. Predstavljeni rezultati su deo onih dobijenih timskim radom u kome su, osim mene, učestvovali mr Svetlana Radović i mr Erika Varkonji-Gašić. Nešto kasnije, ali sa puno entuzijazma, priključila nam se i dipl. mol. biolog Jelena Brkljačić. Mojim dragim koleginicama - Svetlani, Eriki i Jeleni, zahvaljujem se na uloženom trudu da se prevaziđu sve teškoće na koje smo nailazili, a prijateljstvo koje smo u zajedničkom radu izgradili za mene je dragocenost.

Čast mi je što su u komisiji za odbranu ove teze profesori: dr Ana Savić, dr Mirjana Nešković i dr Vladimir Glišin.

Prof.dr Ana Savić, mentor ove teze, usmerila je moj naučno-istraživački interes ka biljnoj molekularnoj biologiji, oblasti koja je u svetskoj nauci u usponu, na čemu sam joj veoma zahvalna. Kritička ocena rezultata i napisanog teksta bili su za mene važan i logičan nastavak one škole koja je počela "Osnovama molekularne biologije" na drugoj godini studija.

Prof. dr Mirjana Nešković je dala ideju da se radi na rezervnim proteinima semena heljde. Time nam je otvorila vrata model - sistema na kome ćemo moći još mnogo da radimo razvijajući kako fundamentalna, tako i primenjena istraživanja. Zahvaljujem joj se na korisnim savetima tokom eksperimentalnog rada i pisanja teksta.

U toku izrade ovog rada, imala sam veoma dobru saradnju sa Laboratorijom za fiziologiju biljaka Instituta za biloška istraživanja " Dr Siniša Stanković", posebno zahvaljujući koleginicama mr Jovanki Miljuš-Đukić, mr Slavici Ninković i mr Snežani Ivić. Heljda gajena u staklenoj bašti ovog Instituta preživljavala je zahvaljujući Nabilu Gawanagiu.

Poliklonska antitela upotrebljena u "Western"-analizama i imunoprecipitacijama, dobijena su na Vojno-medicinskoj akademiji u Beogradu u Institutu za eksperimentalnu medicinu. Dr Aleksandru - Sanji Dujiću, direktoru ovog Instituta, zahvaljujem se što nam je omogućio uslove za to i neposredno učestvovao u imunizaciji životinja.

Zahvaljujem se mojim koleginicama i kolegama, biserima rasutim po čitavom svetu, dr Marini Marjanović, mr Vladi Jurukovskom, dr Ivanu Brukneru, Mensuru Dlakiću, dr Branki Dabović i Sanji Samac, jer su mi priskakali u pomoć kad god je trebalo nabaviti literaturu, hemikalije ili uraditi kompjutersku pretragu.

Dr Dragana Stefanović, mr Dragica Radojković, mr Vesna Todorović, mr Miloš Vujanac, Snežana Kojić, Jelena Kušić, Dejan Ristić, Jelena Teodorović i Nikola Arsić, osim neposredne pomoći, činili su da moju Laboratoriju doživljavam kao svoju drugu kuću.

U kompjuterskoj obradi teksta mnogo su mi pomogli Nataša Stojićević i moj suprug, dr Miroslav Konstantinović, za ovu priliku prerušen u mog kolegu. " Rame za plakanje" i podrška se podrazumevaju.

I na kraju, iako su oni bili na početku, ovaj rad posvećujem svojim roditeljima, Debelom i Pukovniku, da se raduju još jednoj mojoj školskoj diplomu.

APSTRAKT

Rezervni proteini semena heljde su, prema do sada objavljenim podacima, veoma oskudno okarakterisani, a o načinima njihove biosinteze nema nikakvih podataka. S obzirom da se heljda svrstava u familiju Polygonaceae, kojoj pripadaju uglavnom korovske biljke, nema podataka ni na srodnim vrstama. Seme heljde sadrži 10-12% proteina koji se po aminokiselinskom sastavu svrstavaju u proteine veoma visoke biološke vrednosti, bliske vrednostima za proteine životinjskog porekla. Osim toga, regulacija ekspresije gena za rezervne proteine uopšte, u smislu obezbeđivanja tkivne specifičnosti i uključivanja ovih gena u kasnoj embriogenezi, od posebnog je interesa u fundamentalnim istraživanjima.

Rezervni proteini semena heljde predstavljeni su sa tri proteinske frakcije: 13S globulini, mc-globulini i albumini. U okviru proučavanja biosinteze ovih proteina, u ovom radu analizirani su proizvodi *in vitro* translacije poli(A)RNK izolovanih iz semena heljde u različitim fazama sazrevanja. Ovaj profil upoređivan je, zatim, sa proteinima izolovanim iz istih, odgovarajućih stadijuma u sazrevanju i sa proteinima obeleženim *in vivo*. Dobijeni rezultati pokazali su da su promene u iRNK, adekvatne promenama u sastavu proteina tokom razvića i da u srednjim fazama razvića iRNK za rezervne proteine dominiraju u ukupnom sastavu, što je konstatovano i kod drugih biljnih vrsta. Međutim, na osnovu dobijenih podataka uočeno je da se shema biosinteze 13S globulina heljde razlikuje od ostalih rezervnih proteina leguminskog tipa kojima po tipu strkture pripada. Subjedinični polipeptidi 13S globulina nisu proizvod post-translacione obrade prekursorskog molekula, konstatovane za sve do sada analizirane legumine, već su kodirani individualnim iRNK. Za mc globulin konstatovana je shema biosinteze uobičajena za rezervne proteine vicilinskog tipa.

Ekspresija gena za rezervne proteine, specifična za seme, potvrđena je poređenjem proizvoda *in vitro* translacije poli(A)RNK iz semena i drugih organa heljde - lista, cveta i hipokotila. Poli(A)RNK za rezervne proteine detektovana je samo u semenu.

Analizom proteina i poli(A)RNK semena heljde koja je rasla u kontrolisanom režimu mineralne ishrane, pokazano je da u odsustvu sulfata dolazi do izrazito smanjene sinteze albuminske frakcije rezervnih proteina i baznih subjedinic 13S globulina i da su ove promene praćene adekvatnim promenama u sastavu iRNK za ove proteine.

ABSTRACT

Buckwheat seed storage proteins have been quite scantily described in the published data, not to mention the fact that no data about the ways of their biosynthesis are available. Considering that buckwheat belongs to the Polygonaceae family, which is mostly comprised of poorly studied weeds, buckwheat has no relatives with which it can be effectively compared. What makes buckwheat interesting for research is that the buckwheat seed contains 10-12% proteins which, belonging to the proteins of high biological value according to their amino acid composition, are similar to animal proteins. Furthermore, the regulation of gene expression of storage proteins is particularly important in fundamental research, as intricate mechanisms of gene switching in late embryogenesis and tissue specificity can be studied on these particular genes.

Buckwheat seed storage proteins comprise three distinct protein fractions: 13S globulins, mc-globulins and albumins, belonging to the legumin-like, vicilin-like and 2S albumin-like storage proteins respectively. In studying the biosynthesis of these proteins, the products of *in vitro* translation of the poly(A)RNAs isolated from the buckwheat seed in different developmental stages were compared with the *in vivo* labeled proteins as well as with the proteins directly isolated from the respective developmental stages. The results obtained show that the changes in mRNAs correspond to the changes in proteins during development, and that mRNAs for storage proteins are the dominant ones in the mid-maturation stage, the finding which is common for many other plants. However, the biosynthesis of buckwheat 13S globulin differs from other legumin-like storage proteins in that the 13S subunit-polypeptides are not the products of post-translational processing but are directly encoded by individual mRNAs. The biosynthesis of mc globulins follows the usual pattern for biosynthesis of other vicilin-like proteins.

The seed specificity of storage protein gene expression was also confirmed by comparison of *in vitro* translation products of poly(A)RNAs from seed with poly(A)RNAs from leaf, flower and hypocotil.

Next, we focused our research on the analysis of the proteins and poly(A)RNAs of the buckwheat seed which was grown in a sulfur deficient medium. Under those conditions, the synthesis of the storage proteins - specifically albumins and basic subunits of the 13S globulins - was significantly reduced. These changes were closely paralleled by changes in levels of the corresponding mRNAs.

UVOD

A UVOD	1
B OPŠTI DEO	2
I BILJNA EMBRIOGENEZA	2
I1 Od zigota do semena	2
I2 Regulacija genske ekspresije u embriogenezi	4
II REZERVNI PROTEINI SEMENA	7
II1 Rezervni proteini globulinskog tipa	8
II2 2S Albumini	9
II3 Rezervni proteini prolaminskog tipa	10
III BIOSINTEZA REZERVNIH PROTEINA	11
III1 Biosinteza rezervnih proteina globulinskog tipa	11
III1.1 Mesto sinteze i kotranslacione modifikacije	11
III1.2 Sklapanje proteina i unutarćelijski transport	15
III1.3 Posttranslaciona obrada	16
III2 Biosinteza rezervnih proteina prolaminskog tipa	19
IV REGULACIJA SINTEZE REZERVNIH PROTEINA	20
IV1 Regulacija fazom razvića	20
IV2 Tkivna specifičnost	23
IV3 Uticaj faktora sredine na sastav i akumulaciju rezervnih proteina	23
V GENI ZA REZERVNE PROTEINE	25
V1 Geni za 11S rezervne proteine	25
V2 Geni za 7S rezervne proteine	28
V3 Geni za prolamine	29
V4 Analiza predvorja gena za rezervne proteine	29
C REZERVNI PROTEINI SEMENA HELJDE	34

MATERIJAL I METODE

I BILJNI MATERIJAL	35
II METODE	36
II1 Kratkotrajno <i>in vivo</i> obeležavanje proteina semena heljde	36
II2 Izolovanje proteina iz semena heljde	37
II3 Elektroforeza proteina	37
II4 Fluorografija gelova	38
II5 Dobijanje poliklonskih antitela	38

II6 "Western" analiza	38
II7 Imunoprecipitacija	40
II8 Izolovanje ukupne RNK	40
II9 Izolovanje poli(A)RNK	41
II10 Elektroforeza RNK na denaturišućem gelu od agaroze	42
II11 <i>In vitro</i> translacija u ekstraktu pšenične klice	42

REZULTATI

I ANALIZA PROTEINA SEMENA HELJDE	45
I1 Proteini semena heljde u razviću	45
I2 Proteini semena heljde u kontrolisanom režimu ishrane	50
II ANALIZA poli(A)RNK HELJDE	51
II1 Poli(A)RNK semena heljde u razviću	53
II2 Uticaj faktora mineralne ishrane na sastav poli(A)RNK semena u razviću	60
II3 Analiza poli(A)RNK različitih organa heljde	62
III <i>IN VIVO</i> OBELEŽAVANJE PROTEINA SEMENA HELJDE	63

DISKUSIJA

DISKUSIJA REZULTATA	68
PERSPEKTIVE	78
ZAKLJUČCI	80

LITERATURA

REFERENCE PO ABECEDNOM REDU	83
------------------------------------	----

A. UVOD

Interes za rezervne proteine semena heljde u našoj laboratoriji je dvojak. S jedne strane on je opredeljen visokom hranljivom vrednošću semena ove biljke i mogućnošću eventualnog transfera gena za ove proteine u druge biljne vrste koje imaju širu primenu u ishrani. S druge strane, višestepen proces ekspresije gena za ove proteine, koja je organ-specifična, regulisana vremenski u toku procesa sazrevanja semena i zavisna od mineralnog sastava hranljive podloge, predstavlja veoma dobar model - sistem u fundamentalnim istraživanjima.

U literaturi postoji veoma malo podataka o rezervnim proteinima semena heljde i oni se uglavnom odnose na analizu enzima koji učestvuju u hidrolizi ovih proteina u procesu klijanja. Karakterizaciju strukture rezervnih proteina semena heljde u našoj laboratoriji, pratila je i analiza njihove biosinteze. Težište eksperimenata u ovoj tezi predstavlja analiza sastava i nivoa iRNK za ove proteine, preko analize produkata *in vitro* translacije poli(A)RNK izolovanih iz semena u različitim fazama sazrevanja, iz različitih organa heljde i iz semena u različitom, kontrolisanom režimu ishrane. Analiza ovih rezultata trebalo je da da odgovore na nekoliko pitanja:

- u kojoj meri nivo i sastav iRNK određuju regulaciju datih procesa
- koja je od faza u sazrevanju semena pogodna za izolovanje iRNK kao matrice za sintezu cDNK u cilju daljeg kloniranja gena za ove proteine i
- da li rezervni proteini semena heljde ponavljaju biosintetsku shemu karakterističnu za rezervne proteine globulinskog tipa kod drugih biljnih vrsta.

B. OPŠTI DEO

I BILJNA EMBRIOGENEZA

I 1. Od zigota do semena

Životni ciklus viših biljaka čini smena haploidne i diploidne generacije.

Haploidna, ili gametofitna generacija, počinje u reproduktivnim organima cveta, na sporama nastalim mejotičkom deobom, koje zatim podležu mitozu i diferenciraju se u polenovo zrno (muški gametofit) ili semeni zametak (ženski gametofit). Polenovo zrno sadrži dve spermalne ćelije, dok se u semenom zametku, u sklopu višećelijskog kompleksa, nalazi jedna jajna ćelija.

Diploidna, sporofitna generacija, počinje posle oplodjenja od zigota i vodi formiranju zrele biljke sa vegetativnim organima (koren, stablo, list) i cvetovima koji sadrže reproduktivne organe (prašnici i tučak).

Oplodjenje karakterišu dva procesa. Jedna spermalna ćelija sjedinjuje se sa jajnom ćelijom, nastaje diploidni zigot i otpočinje embriogeneza. Druga spermalna ćelija sjedinjuje se sa specijalizovanom ćelijom semenog zametka, diploidnom centralnom ćelijom, čime nastaje začetak triploidnog endosperma. Semeni zametak sa začetkom endosperma i zigotom diferencira se u seme, a plodnik tučka u plod koji potpomaže raznošenje semena. Seme je zaštićeno semenjačom koja omogućava da sazreli embrion sačeka povoljne uslove za nastavljanje razvića sporofita koje otpočinje klijanjem.

Zreli biljni embrion sadrži dva primarna organska sistema: osovinu koren-stablo i kotiledone. Osovina embriona sadrži vršne meristeme korena i pupoljka (tkivo čije ćelije imaju sposobnost deljenja, uvećavanja i diferenciranja) koji će se razviti u zrelu biljku posle klijanja semena. Za razliku od embriogeneze životinja, reproduktivni organi biljke će se razviti reprogramiranjem meristema pupoljka tek u zreloj biljci. Kotiledoni su, naprotiv, završno diferencirani organ koji akumulira rezerve hrane koje će biti iskorišćene za rast i razviće klijanca pre nego što sam

postane fotosintetski aktivan. Kotiledoni venu neposredno pošto klijanac iznikne iz zemlje. Tkivo endosperma može, pošto posluži za ishranu embriona koji se diferencira, biti apsorbavano u toku razvića semena, ili ostaje sastavni deo semena sa rezervama hrane za klijanca.

Embriogeneza se može se podeliti generalno u tri faze:

1. Faza postfertilizacionog proembriona počinje asimetričnom deobom zigota na terminalnu i bazalnu ćeliju kojom se zapravo već obezbeđuje polarnost budućeg embriona. Iz terminalne ćelije će se razviti najveći deo embriona uključujući i meristem pupoljka, a iz bazalne, potpuno diferencirani specijalizovani embrionalni organ - suspensor i meristem korena. Suspensor ukotvljuje embrion za tkivo ovula i služi kao sprovodnik hrane od majčinskog sporofita do proembriona u razviću.

2. Faza prelaska sa embriona oblika globule na embrion srcastog oblika sa bilateralnom simetrijom

U toku ove faze dešavaju se dva kritična procesa. Prvo, regioni duž apikalno-bazalne ose embriona moraju da se diferenciraju i generišu embrionalne organske sisteme - osovinu embriona i kotiledone. Drugo, tri primordijalna tkivna sloja moraju da se specifikuju duž radijalne ose embriona. U ovoj fazi dolazi i do diferencijacije meristema korena.

3. Faza ekspanzije organa i sazrevanja semena

U ovoj fazi dolazi do prelaska na program pripreme mladog sporofita za mirovanje i postembrionalno razviće. Kotiledoni i osovina embriona uvećavaju se dramatično. Ćelije bazalnog meristema oba ova organa postaju visoko specijalizovane da akumuliraju veliku količinu **rezervnih proteina** i ulja koji će biti iskorišćeni kao izvor hrane za klijanca. U ovoj fazi dešava se i diferencijacija meristema pupoljka na suprotnom kraju osovine embriona u odnosu na meristem korena, čime je definitivno uspostavljen koren-pupoljak model organizacije buduće biljke.

Na kraju ove faze embrion dostiže maksimalnu veličinu, ćelije embriona i okolnih tkiva postaju dehidrirane, metabolički procesi se utišavaju i počinje period mirovanja semena.

I 2. Regulacija genske ekspresije u embriogenezi

Iako je još mnogo elemenata u regulaciji embriogeneze kod biljaka nepoznato, nekoliko eksperimentalnih pristupa omogućilo je da se poslednjih nekoliko godina u razumevanju ovih procesa jako napreduje.

Najveći deo raspoloživih podataka ukazuje da su morfogeneza embriona i događaji ćelijske specijalizacije dirigovani primarno od strane genoma zigota posle oplodjenja i da ovi embriogenetski procesi ne zahtevaju faktore koji potiču bilo od ženskog gametofita, bilo od maternalnog sporofitnog tkiva. Npr., somatske ćelije različitih vegetativnih i reproduktivnih organa mogu da se stimulišu u kulturi tako da se u procesu somatske embriogeneze formira fertilna biljka (Jong et al.,1993). Genska ekspresija izgleda da je regulisana u somatskim i zigotskim embrionima vremenski i prostorno po istom modelu (Perez-Grau & Goldberg,1989). Takođe, moguće je izvršiti oplodjenje jajne ćelije *in vitro* i tako nastali zigoti prolaze embriogenezu u kulturi i izrastaju u biljku koja ima cvet (Faure et al.1994). Ako je tačna konstatacija koju potkrepljuju prethodni podaci, da majčinski sporofit obezbeđuje samo fizičku potporu i hranu za embrion, onda se to bitno razlikuje od situacije kod velikog broja životinjskih vrsta gde je rana embriogeneza uveliko zavisna od faktora maternalnog porekla.

Tokom embriogeneze viših biljaka eksprimira se veliki broj gena. Iako nije poznato koliko je gena potrebno za morfogenetsku i tkivnu diferencijaciju, rezultati eksperimenata DNK-RNK hibridizacije sa različitim populacijama iRNK semena, ukazuju da je oko 20 000 različitih gena ekspimirano makar do nivoa iRNK u svakom datom stadijumu razvića (Goldberg et al.,1989). Mnogi od ovih gena su ekspimirani u specifičnim ćelijskim tipovima, regionima i organima embriona, što je otvorilo mogućnost razjašnjavanja molekularnih mehanizama koji regulišu kako ćelijske, tako i događaje specifične za region, za vreme biljne embriogeneze.

Različiti genski setovi moraju se aktivirati u terminalnoj i bazalnoj ćeliji posle prve asimetrične deobe zigota. Da li polarizovana organizacija jajne ćelije ili

zigota, ili i jednog i drugog, kontroliše različitu gensku ekspresiju u ranoj embriogenezi nije poznato. Prvi konkretni eksperimentalni podaci dobijeni su na stadijumu globularnog embriona. Ovi rezultati ukazuju da je biohemijska diferencijacija, koja podrazumeva regulaciju transkripcije različitih grupa gena u različitim delovima embriona, uspostavljena već na stadijumu globularnog embriona, pre morfogenetskih događaja koji će dovesti do diferencijacije kotiledona i osovine embriona na stadijumu srcastog embriona. Tako je, npr., iRNK za Kunitz-ov inhibitor tripsina (Kti3), koji se specifično eksprimira u osovini embriona, detektovana na globularnom stadijumu samo u ćelijama koje će se diferencirati u osovinu, a ni u jednom drugom delu embriona ili suspenzora (Jofuku et al., 1989). Takođe, praćenje ekspresije himernih gena (GUS-reporterski gen koji je pod promotorima gena koji se specifično ekspimiraju u određenom tkivu ili delu embriona) u embrionima transgenih biljaka, pokazalo je da je globularni embrion organizovan u odvojene, nepreklopljene, transkripciono regulisane "teritorije" (Goldberg et al., 1994). Ovo pretpostavlja da su unutar svake teritorije aktivirani specifični transkripcioni faktori koji interaguju sa specifičnim promotorskim elementima. Identifikovanje ovih proteinskih faktora je predmet tekućih intenzivnih istraživanja.

Da li se ove "teritorije" mogu razvijati nezavisno jedna od druge, jeste sledeće pitanje koje se postavlja u analizi regulacije genske ekspresije u biljnoj embriogenezi. Serija mutanata *Arabidopsis*, dobijenih hemijskom ili T-DNK mutagenezom, koji su oštećeni u nekoj od faza embriogeneze, ili u nekim segmentima embriona, dali su osnove za odgovor na ovo pitanje. Analiza ovih mutanata pokazala je da se biljni embrion formira od modula koji se razvijaju nezavisno jedan od drugog. Na primer, identifikovani su mutanti kod kojih je deletiran samo određeni region osovine embriona, a mutacija nema efekta na susedni, ili bilo koji drugi region. Poseban modul predstavljaju i meristemska tkiva, iako su ona razdvojena duž uzdužne ose embriona. Tako su identifikovani mutanti koji imaju deformacije u meristemima korena i pupoljka, a da mutacija nema efekata na diferencijaciju kotiledona ili hipokotila (Bertrand-Garsia et al., 1992).

Koji je odnos između tkivne diferencijacije i morfogeneze, odnosno, da li su procesi koji regulišu tkivnu diferencijaciju duž radijalne ose embriona vezani sa procesima koji specifikuju autonomne regione duž apikalno-bazalne ose? Kod *Arabidopsis* su identifikovani specifični markerni geni za pojedina embrionalna tkiva duž radijalne ose i ustanovljeno je da su oni regularno eksprimirani i kod mutanta čije se oštećenje sastoji u tome da embrion ne može da pređe iz globularne u srcastu formu (Goldberg et al.,1994). Tkivna diferencijacija, dakle, dešava se nezavisno od morfogeneze, ali to ne znači da se morfogeneza može odvijati bez pravilne tkivne diferencijacije. Naprotiv, mutanti *Arabidopsis* koji imaju promenjenu tkivnu specifikaciju, imaju abnormalnu i morfologiju (Mayer et al.,1991).

U kasnoj embriogenezi program sazrevanja semena obuhvata: sintezu velike količine rezervnih produkata, gubitak vode i isušivanje, sprečavanje prevremenog klijanja i uspostavljanje stanja mirovanja. Nekoliko specijalizovanih setova gena, kao što su oni koji kodiraju za **rezervne proteine** i LEA proteine (od engleskog: late embryo abundant) aktivirani su transkripciono za vreme ove faze sazrevanja i onda reprimirani neposredno pre mirovanja (Walling et al. 1986). Ovi genski setovi su mirni za vreme klijanja, kada se uključuje genski set specifičan za klijanje i postembrionalni genski set. Regulacija ekspresije gena za rezervne proteine biće razmatrana u narednom poglavlju Uvoda.

II REZERVNI PROTEINI SEMENA

Proteini semena mogu se podeliti, na osnovu funkcije koju obavljaju, u tri kategorije: prvu čine rezervni proteini i oni predstavljaju glavni deo proteinske mase semena; druga kategorija su pretežno enzimi koji su neophodni za održavanje normalnog metabolizma ćelija, dok treću grupu čine strukturni proteini (ribozomalni, proteini ER-a ili ćelijskog zida).

Osnovna funkcija rezervnih proteina semena je da obezbede izvor aminokiselina, azota i ugljenika za proces klijanja. Osim što imaju isključivo ovu funkciju, rezervni proteini semena imaju i sledeće zajedničke karakteristike:

- tkivna specifičnost: nađeni su samo u tkivima semena
- akumulacija ovih proteina počinje u kasnoj embriogenezi, a završava se u zreлом semenu; ekspresija gena za ove proteine izrazita je karakteristika ove embriogenetske faze
- imaju visok nivo amidnih aminokiselina (asparagina i glutamina) i arginina ili prolina
- uskladišteni su u specifičnim ćelijskim organelama- proteinskim telima.

Rezervni proteini semena se po rastvorljivosti dele na albumine, globuline, prolamine i gluteline. Ova podela je napravljena više iz operativnih razloga nego po srodnosti između pojedinih rezervnih proteina. Albumini su rastvorljivi u vodi, globulini u rastvorima soli, prolamine u alkoholu, a glutelini u kiselim ili baznim rastvorima. Glavni rezervni proteini semena mahunarki su globulini, dok su glavni rezervni proteini semena većine žita prolamine. Ima i puno izuzetaka, kao što je ovas, kod koga je glavni rezervni protein globulinskog tipa (Walburg & Larkins, 1983), ili pirinač, gde je glavni rezervni protein - glutelin (Yamagata, 1982). Albumini su najmanje zastupljeni među rezervnim proteinima, te se može pretpostaviti da ograničena rastvorljivost rezervnih proteina u vodi i njihova sposobnost da grade agregate visoke molekulske mase olakšavaju njihovo deponovanje u semenu i smanjuju njihovu osetljivost prema osmotskim uslovima koji osciluju tokom sazrevanja i bubrenja semena. To ipak nije opšte pravilo, s



obzirom da su kod više različitih rodova nađeni proteini sa rezervnom funkcijom, rastvorljivi u vodi i relativno male molekulske mase.

II 1. REZERVNI PROTEINI GLOBULINSKOG TIPA

Glavni rezervni proteini semena većine dikotiledonih biljaka su globulini. Oni se svrstavaju u dve dominantne klase:

1) rezervni globulini sedimentacione konstante 11-14S (u literaturi obično označeni kao 11S, rezervni proteini leguminskog tipa ili samo legumini) i

2) rezervni globulini sedimentacione konstante 6-8S (uobičajeno 7S, rezervni proteini vicilinskog tipa ili vicilini).

Semena velikog broja biljnih vrsta sadrže i 11S i 7S rezervne globuline, mada je obično jedna klasa znatno više zastupljena i predstavlja dominantnu proteinsku frakciju (Derbyshire et al., 1976). Najbolje proučeni i okarakterisani rezervni globulini su 11S i 7S globulini mahunarki, prvenstveno zbog njihovog značaja u ishrani. Ovi proteini obično imaju trivijalna imena izvedena iz latinskog imena biljne vrste. Tako se 11S globulin soje (*Glycine max*) označava kao glicinin, a 7S kao konglicinin, dok je 7S graška (*Vicia faba*) označen kao vicilin i konvicilin. 11S globulin kod većine mahunarki (leguminoza) nosi trivijalni naziv legumin.

11S globulini su heteropolimeri sastavljeni od 6 subjedinica, ukupne molekulske mase 300-400kDa. Svaka subjedinica sastoji se od dva polipeptida: većeg (obično kiselog), molekulske mase oko 40kDa i manjeg (obično baznog), molekulske mase oko 20kDa, koji su spojeni disulfidnim vezama. Kod svih do sada izučavanih 11S rezervnih proteina, dvodimenzionalnom elektroforezom je konstatovana velika heterogenost i kiselih i baznih subjedinica, što je ukazalo da 11S rezervne globuline možda kodiraju multigenske familije. Tako se kod soje sa sigurnošću može govoriti o sedam kiselih i pet baznih polipeptida, koji formiraju više 11S proteina (glicinina). Sekvenciranjem glicinina soje pokazano je da postoje dve grupe ovog proteina: glicinini grupe I koji su heksameri subjedinica od 58kDa i glicinini grupe II sa subjedinicama od 62-69kDa, pri čemu se svaka subjedinica

sastoji od dva polipeptida. Homologija na aminokiselinskom nivou je oko 90% u okviru grupe, a između grupa je 50% (Nielsen, 1985). Čak i u okviru iste subjedinice mogu da se detektuju mikrorazlike. Primer je A2B1a subjedinica glicinina u kojoj postoji devet mesta gde alteriraju dve aminokiseline i jedno gde se menjaju tri (Staswick et al., 1984).

Kod legumina boba postoji minimum 10 kiselih i četiri bazne subjedinice (Matta et al., 1981), a kod graška 22 kisele i 11 baznih subjedinica (Thomson & Schroeder, 1978). I ovi legumini se mogu podeliti u dve grupe, pri čemu je homologija u okviru i između grupa na približno istom nivou kao kod soje.

7S globulini su obično trimeri, molekulske mase između 150 i 190kDa. Odsustvom cisteina objašnjava se nepostojanje disulfidnih veza između subjedinica. Sastav subjedinica veoma varira od vrste do vrste, zavisno od posttranslacionih događaja - proteolize i glikozilacije. Na primer, subjedinice vicilina graška se prvo sintetišu kao grupa polipeptida od 47kDa i 50kDa, ali se kao produkti proteolitičke obrade i glikozilacije, finalno dobijaju subjedinične forme od 12,5kDa i 33kDa (Casey et al., 1986). S druge strane, kod 7S globulina pasulja i soje, proteoliza nije zapažena, ali je glikozilacija mnogo učestalija (Davies et al., 1981)

Karakteristično za 7S globuline je prisustvo kovalentno vezanih ugljenih hidrata, što nije uobičajeno za 11S rezervne globuline, niti za prolamine žita. Oligosaharidi vezani za rezervne proteine sadrže manozu i glukozamin, a ponekad i druge neutralne šećere, npr. fukozu (Ericson & Chrispeels, 1976).

II 2. 2S ALBUMINI

Albumini, rezervni proteini rastvorljivi u vodi, bili su definisani kao grupa na osnovu njihovog sedimentacionog koeficijenta od približno 2 (Youle & Huag, 1981). Široko su rasprostranjeni kod dikotila, ali su najviše izučavani kod Brassicaceae (npr. napini uljane repice i 2S albumini *Arabidopsis*). Najčešće su heterodimerni proteini sa subjedinicama malih molekulskih masa. Kod nekih 2S

albumina postoje međulančane disulfidne veze (Ericson et al., 1986), ali one nisu obavezan elemenat strukture kao što je to kod 11S globulina (Higgins et al., 1986). Tako je, npr., 2S albumin graška dimer bez disulfidnih veza među subjedinicama, a kod suncokreta postoje i monomerne i neobrađene dimerne forme (Kortt & Caldwell, 1990).

II 3. REZERVNI PROTEINI PROLAMINSKOG TIPa

Dok su 2S albumini i globulini rezervni proteini široko rasprostranjeni kod cvetnica, prolamini su karakteristični za samo jednu familiju, Poaceae.

Prolamini su tradicionalno definisani kao grupa na osnovu njihove rastvorljivosti u mešavini alkoholi/voda i visokog sadržaja glutamina i prolina. Svi prolamini, osim alfa-zeina kukuruza, su svrstani u jedinstvenu prolaminsku superfamiliju.

Prolamini *Triticeae* (ovas, pšenica, raž) koji pripadaju ovoj superfamiliji, su visoko polimorfna smeša komponenti Mw od 30kDa do 90kDa. Na osnovu aminokiselinske sekvence, podeljeni su u tri grupe: prolamini bogati sumporom, prolamini siromašni sumporom i HMW prolamini- prolamini visoke molekulske mase. Za sve tri grupe karakterističan elemenat strukture su ponovljeni nizovi kratkih peptidnih motiva sa visokom konzervisanošću same sekvence motiva, kao i položaja ovog domena u proteinu.

Alfa-zeini kukuruza klasifikovani su u dve grupe, Mw od oko 19kDa i oko 22kDa. Imaju strukturu koja se sastoji od unikalnih domena na N i C - krajevima molekula, koji ograničavaju region sa ponavljanjem sekvence (Marks et al., 1985). Ovaj region sadrži blokove od po oko 20 aminokiselina, ali je sekvenca degenerisana i nema jasan konzervisani motiv.

III BIOSINTEZA REZERVNIH PROTEINA

III 1. BIOSINTEZA REZERVNIH PROTEINA GLOBULINSKOG TIPA

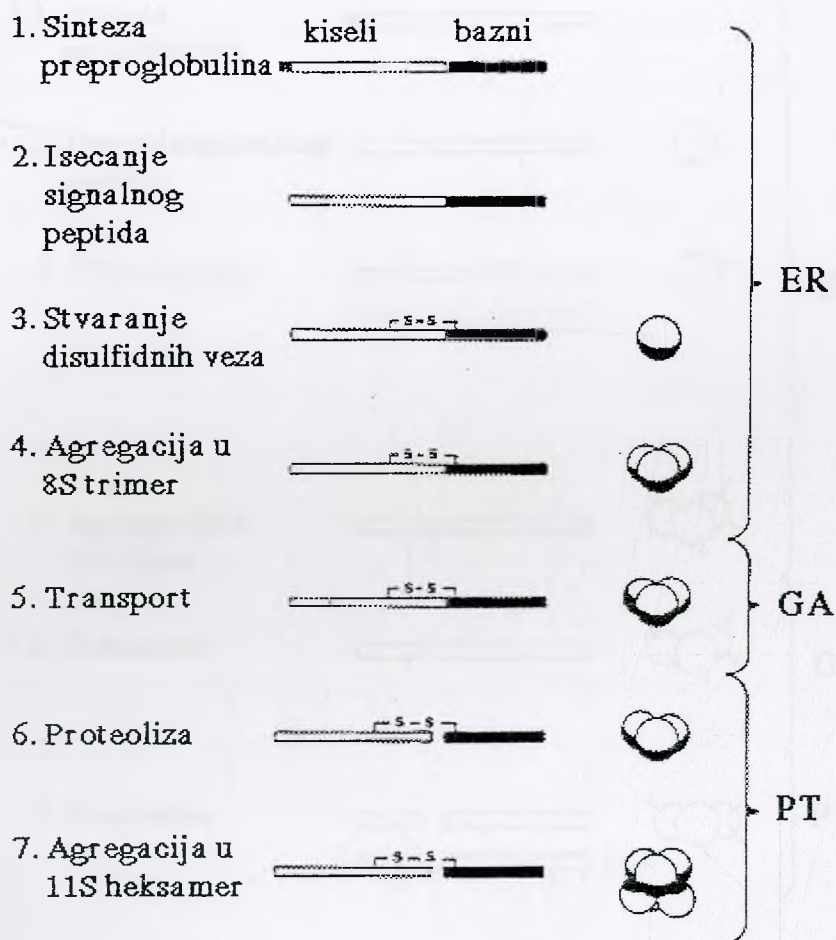
Zahvaljujući obilju eksperimentalnih podataka razvijen je generalni model sinteze i transporta rezervnih proteina globulinskog tipa od mesta sinteze do mesta uskladištenja.

Proteini se sintetišu na granuliranom endoplazmatičnom retikulumu - RER-u (od engleskog "rough endoplasmic reticulum") kao prekursorski polipeptidi sa signalnom sekvencom na N-kraju. Signalni peptid usmerava premeštanje nascentnog polipeptida u lumen RER-a, a zatim se kotranslaciono odstranjuje. Neki prekursorski polipeptidi su kotranslaciono glikozilovani dodavanjem oligosaharida koji sadrži manozu. Ubrzo po sintezi, 11S i 7S prekursori organizuju se u trimere unutar RER-a, a zatim bivaju transportovani, preko Goldžijevog aparata, do centralne vakuole. Posle deponovanja u vakuolama, 11S trimer se preseca unutar monomera na bazne i kisele polipeptide koji ostaju vezani disulfidnim mostovima. 7S prekursori takođe mogu biti izloženi proteolitičkoj obradi, ali je mesto sečenja *species*-specifično. Posle deponovanja u vakuolama i proteolitičke obrade, 11S tip trimera se sklapa u heksamere. Daljom akumulacijom rezervnih proteina, vakuola se fragmentiše i formira proteinska tela, male sferične organele sastavljene od proteinskog matriksa obujmljenog jednoslojnom membranom. Proteinska tela su mesta definitivnog uskladištenja rezervnih proteina.

III 1.1. Mesto sinteze i kotranslacione modifikacije

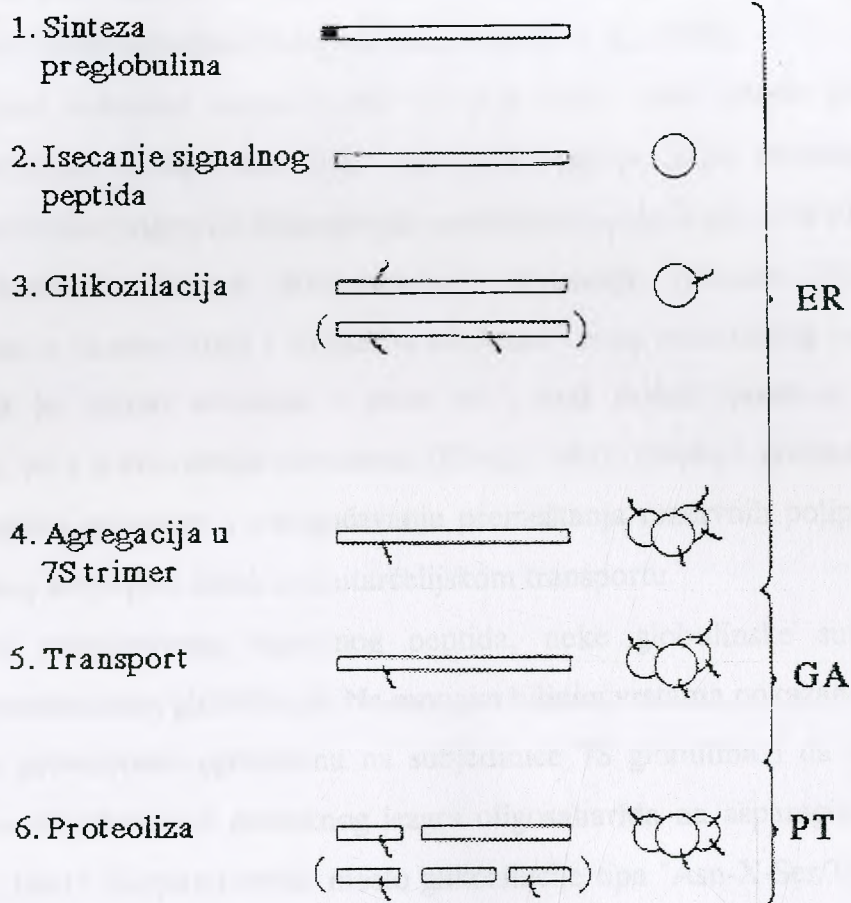
Podaci dobijeni sa elektronskih mikrofografija jasno ukazuju na RER kao na mesto sinteze rezervnih proteina globulinskog tipa (Bollini & Chrispeels.,1979; Haris.N.,1979). Postojanje signalnog peptida uočeno je prvo iz eksperimenata *in*





Shema sinteze i obrade 11S rezervnih proteina semena (prema Shotwell & Larkins, 1989)

ER - endoplazmatični retikulum
 GA - Goldžijev aparat
 PT - proteinska tela



Shema sinteze i obrade 7S rezervnih proteina semena (prema Shotwell & Larkins, 1989)

ER - endoplazmatični retikulum
 GA - Goldžijev aparat
 PT - proteinska tela

vitro translacije iRNK, gde su dobijeni produkti 1-3kDa duži nego zreli rezervni polipeptidi (Barton et al., 1982; Walburg & Larkins, 1983). Prekursori mogu biti prevedeni na korektnu dužinu dodavanjem mikrozomalnih membrana iz kotiledona graška ili psećih pankreasa (Higgins & Spenser 1981). Sekvenciranje cDNK i gena potvrdilo je da kodirajuća sekvenca za signalni peptid prethodi kodonu za prvu aminokiselinu zrelog proteina (Lycett et al., 1985).

Signalna sekvenca konstatovana je kod skoro svih dobro proučenih rezervnih proteina. U najvećem broju slučajeva duga je 20-30 aminokiselina i sadrži konzervisano jezgro od hidrofobnih aminokiselina iza koga sledi varijabilni region u kome se dešava kotranslaciono odsecanje (Nielsen., 1985). Tip aminokiselina, a shodno tome i tercijarna struktura ovog proteinskog segmenta, konzervisana je tokom evolucije i sreće se i kod drugih proteina koji se transportuju, pa i u animalnim sistemima (Kreil., 1981). Otuda i pretpostavljena funkcija signalne sekvence u omogućavanju premeštanja rezervnih polipeptida u lumen RER-a, što je prvi korak u unutarćelijskom transportu.

Pored odstranjivanja signalnog peptida, neke globulinske subjedinice podležu kotranslacionoj glikozilaciji. Na mnogim biljnim vrstama pokazano je da je glikozilacija prvenstveno ograničena na subjedinice 7S globulina i da uključuje transfer N-acetilglikozamin manoznog jezgra oligosaharida na asparagin (Davies & Delmer., 1981). Karakteristično mesto glikozilacije tipa "Asn-X-Ser/Thr" može biti ponovljeno jedan do tri puta u različitim regionima polipeptida (Doyle et al., 1986). U eksperimentima sa tunikamicinom koji inhibira glikozilaciju, pokazano je da glikozilacija ne utiče na sintezu, sklapanje ili transport proteina (Badenoch-Jones et al., 1981). Kako nisu svi 7S globulini glikozilovani, niti su to 11S globulini, fiziološki smisao glikozilacije nije jasan. Ima nekih podataka da glikozilacija na C-kraju 7S globulina može biti vezana za proteolitičku obradu (Doyle et al., 1986).

III 1.2. Sklapanje proteina i unutarćelijski transport

Sklapanje subjediničnih polipeptida u oligomere proučavano je na mnogim biljnim sistemima. Na grašku je pokazano da se formiranje 7S trimera vicilina dešava u RERu (Chrispeels et al., 1982). Sklapanje legumina, s druge strane, je dvostepeni proces. U prvom koraku formiraju se 8S trimeri u RERu, slično vicilinima, a tek posle transporta u proteinska tela dolazi do kompletnog sklapanja u 11S heksamere (Barton et al., 1982). Ova shema asocijacije, odgovara shemi disocijacije (11S - 2x7S - 6x3S), a takođe se slaže i sa podacima dobijenim iz elektronskih mikrografija (Derbyshire et al., 1976; Reichelet et al., 1980).

Proteinska tela su mesto definitivnog uskladištenja rezervnih proteina. Kod dikotila, proteinska tela su vakuolarnog porekla i to uslovljava uspostavljanje specifičnih mehanizama koji će obezbediti transport rezervnih proteina od mesta sinteze u RERu, preko Goldžijevog kompleksa, do vakuole koja će fragmentacijom dati proteinska tela. Prisustvo signalne sekvence na nascentnim polipeptidima obezbeđuje informaciju neophodnu za prebacivanje proteina u lumen RERA, ali šta određuje dalju trasu njihovog puta, još uvek je predmet spekulacija i intenzivnog istraživanja. Postoje li određena svojstva primarne ili sekundarne strukture koje prepoznaje "mašinerija za sortiranje" i koji proteini učestvuju u toj mašineriji, još uvek su pitanja bez odgovora.

Uloga Goldžijevog aparata u transportu globulina bila je definisana pomoću dva eksperimentalna pristupa. U prvom, rezervni proteini su radioaktivno obeleženi i praćena je njihova pojava u različitim subćelijskim frakcijama u određenom vremenskom periodu (Chrispeels, 1983;). Drugi eksperimentalni pristup predstavlja imunološko detektovanje i lokalizacija rezervnih proteina na tankim presecima kotiledona u razviću uz upotrebu elektronske mikroskopije (Chrispeel, 1984). Dodatni podaci o ulozi Goldžijevog kompleksa u transportu rezervnih proteina dobijeni su iz studija efekta jonofora na kretanje proteina u kotiledonima graška. Tretman kotiledona u razviću manenzinom i nigericinom, koji sprečavaju kretanje Goldžijevih vezikula, preusmeravaju transport

novosintetisanih vicilina iz centralne vakuole u plazmalemu, gde je protein onda oslobođen iz ćelije (Craig & Goodchild., 1984).

Studije deponovanja rezervnih globulina graška, upotrebom svetlosnog i elektronskog mikroskopa, pokazale su da se legumin i vicilin prvo javljaju kao male grudvice na periferiji velike centralne vakuole oko 8 dana posle cvetanja (Craig et al., 1980). U periodu od 8. do 20. dana, ukupna površina vakuola po ćeliji se uvećava za faktor 100, a količina proteina uvećava se tako da vakuole postaju potpuno obojene. Uprkos nekoliko nagoveštaja, specifične sekvence na proteinu koje bi usmeravale ove proteine ka vakuolama nisu bile identifikovane (Muntz., 1989; Chispeels., 1991; Muntz et al., 1993).

Malo se zna o tome kako su rezervni proteini organizovani unutar proteinskih tela, iako ova organizacija mora biti veoma važna za obezbeđivanje efikasnog iskorišćenja skladišnog prostora i ubrzane mobilizacije za vreme klijanja. Kod mahunarki i biljaka sa sličnim tipom rezervnih proteina, 7S i 11S globulini smešteni su u istim proteinskim telima bez prostornog odvajanja (Harris et al., 1993). Njihova struktura obezbeđuje efikasno pakovanje. U mnogim drugim dikotilama, uz globuline, u istim proteinskim telima smešteni su i 2S albumini, ali nije poznato kako su ovi različiti tipovi rezervnih proteina organizovani u proteinskim telima.

III 1.3. Posttranslaciona obrada

Posttranslaciono endoproteolitičko sečenje prekursora rezervnih proteina, prvi put opisano za legumin graška (Spencer et al., 1980), dešava se kod svih do sada analiziranih 11S proteina (Shewry et al., 1995). Eksperimenti kratkotrajnog *in vivo* obeležavanja i "hladjenja" sintetisanih proteina, pokazuju da proteoliza prekursora nastupa oko 2h po sintezi (Spencer et al., 1980). Ove analize takođe pokazuju da proteoliza dovodi do formiranja kiselih i baznih polipeptida koji ostaju vezani disulfidnim mostovima. Sekvenciranjem N-krajeva više baznih subjedinica, utvrđeno je da je glicin uvek prva aminokiselina. Kod C-krajeva

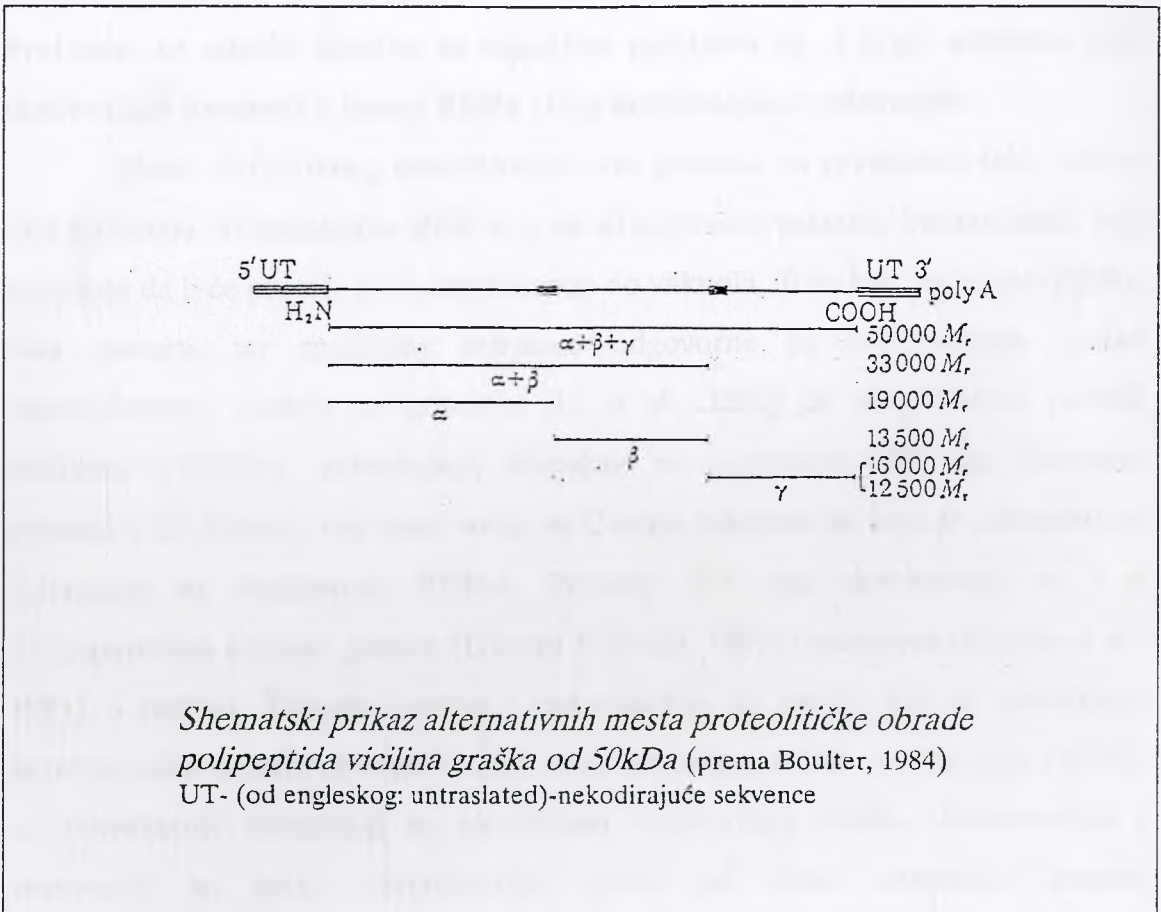
kiselih subjedinica poslednji je uvek bio asparagin. Ovim je pokazano da je asn-gly mesto proteolitičke obrade u prekursoru. Kod nekih 11S globulina, npr. legumina graska (Lycett et al., 1984), postoji jedno mesto sečenja. Kod drugih postoje - dva, tako da nastaju bazni, kiseli i kratki vezivni peptid (Nielsen., 1985), a u nekim slučajevima, npr. glicinina soje (Nielsen., 1984), nastaju dva kisela i jedan bazni polipeptid.

Postojanje prekursora za 11S proteine pokazano je i u eksperimentima *in vitro* translacije iRNK izolovanih iz semena u sazrevanju kod više biljnih vrsta. U svim analiziranim slučajevima, među produktima *in vitro* translacije nisu detektovani polipeptidi koji odgovaraju baznim i kiselim subjedinicama, što znači da u populaciji iRNK nije bilo odgovarajućih iRNK koje bi kodirale ove pojedinačne polipeptide. Glavni proizvod *in vitro* translacije kod svih do sada analiziranih 11S rezervnih proteina bili su visokomolekularni prekursori odgovarajućih bazno-kiselih parova (Walburg & Larkins., 1983; Yamogata et al., 1982; Spencer et al., 1980; Evans et al., 1979; Allen et al., 1985; Simon et al., 1985; Leal & Misra., 1993).

Skorijim radovima je pokazano da udruživanje subjedinica u 11S heksamere nije moguće bez ove specifične proteolitičke obrade (Dikinson et al., 1989; Shewry et al., 1995). Nepresečeni trimeri ne mogu da se udruže u heksamere *in vitro*, dok se ne tretiraju papainom. Ovo sečenje zapravo uzrokuje konformacionu promenu koja favorizuje udruživanje u heksamere. Iz vakuola kotiledona soje je izolovana proteaza koja specifično prepoznaje asparagin kao mesto sečenja u trimernom 11S globulinskom preproteinu (Scott et al., 1992)

Za 7S globulinske polipeptide, proteolitička obrada nije obavezan proces. Za beta konglicinin soje (Meinke et al., 1981) i fazeolin pasulja (Brown et al., 1981) nije konstatovana obrada. Za lupin *Lupinus albus* (Blagrove., et al., 1975) i vicilin graška (Spencer et al., 1983) pokazano je da predstavljaju kompleksnu smešu obrađenih i neobrađenih subjedinica. Mesta proteolize prekursorskog polipeptida su *species*-specifična. Za vicilin graška pokazano je postojanje dva alternativna mesta proteolitičke obrade, čime nastaju različite kombinacije polipeptida manjih

molekulskih masa u odnosu na masu prekursorskog molekula. I ova posttranslaciona obrada se dešava u proteinskim telima.



Posttranslaciono proteolitičko sečenje postoji i kod 2S albumina. Tako, 2S albumin repe-napin (Crouch et al., 1983), u zreom semenu ima Mw 13kDa i sastoji se od dva disulfidno vezana polipeptida mase 9kDa i 4kDa. Primarni translacioni proizvod ima Mw 21kDa i sastoji se od signalne sekvence, oba polipeptidna lanca i još dva regiona veoma bogata u hidrofилnim aminokiselinama na N-kraju. Za razliku od 11S globulina, proteolitička obrada 2S albumina nije neophodna za njihovo sklapanje.

III 2. BIOSINTEZA REZERVNIH PROTEINA PROLAMINSKOG TIPa

Mesto sinteze prolamina je granulirani endoplazmatski retikulum endosperma žita za koje je uglavnom i karakterističan ovaj tip rezervnih proteina. Prolamini se takođe sintetisu sa signalnim peptidom na N-kraju molekula koji obezbeđuje transport u lumen RERa i biva kotranslaciono odstranjen.

Mesto definitivnog uskladištenja ovih proteina su proteinska tela, ali se ona formiraju od membrana RER-a, a ne od centralne vakuole. Mehanizmi koji određuju da li će protein biti transportovan do vakuole, ili će biti zadržan u RERu nisu poznati, jer specifične sekvence odgovorne za ove procese nisu identifikovane. Postoje pretpostavke (Li et al., 1993) da su prolamini pirinča zadržani u RER-u zahvaljujući interakciji sa proteinima BiP tipa (šaperoni prisutni u ER kvasca) koji sami imaju na C-kraju sekvencu za koju je pokazano da interaguje sa strukturom RER-a. Proteini BiP tipa detektovani su i u endospermima semena pšenice (Giorini & Galili, 1991) i kukuruza (Boston et al., 1991) u razviću. Takođe, postoje i pretpostavke da motivi koji se ponavljaju, karakteristični za sekvencu prolamina, mogu biti odgovorni za zadržavanje u RER-u, zahvaljujući interakciji sa specifičnim elementima RERa. Jednostavniji i verovatniji je, ipak, pretpostavljeni model po kome interakcije između individualnih prolaminskih molekula dovode do formiranja nerastvornih agregata koji se ne transportuju lako iz lumena RERa. Takav model je podržan podacima da su iRNK prolamina pirinča segregirane u različite regione RERa, u odnosu na rezervne proteine glutelinskog tipa (Li et al., 1993). Time bi moglo da se obezbedi agregiranje prolamina u određenim delovima RER-a i spreči rasipanje.

Nasuprot situaciji u organizaciji rezervnih globulina u proteinskim telima, različiti tipovi prolamina prostorno su odvojeni u proteinskim telima endosperma žita. Ovo je posebno izraženo kod kukuruza (Lending et al., 1992) i moguće je da nastaje kao rezultat svojstva strukture samih proteina ili/i vremenski pomerenog biosintetskog modela.

Posttranslaciono proteolitičko sečenje, kao i kotranslaciona i posttranslaciona glikozilacija, procesi obrade karakteristični za 11S i 7S globuline, nisu uočeni kod prolamina.

IV REGULACIJA SINTEZE REZERVNIH PROTEINA

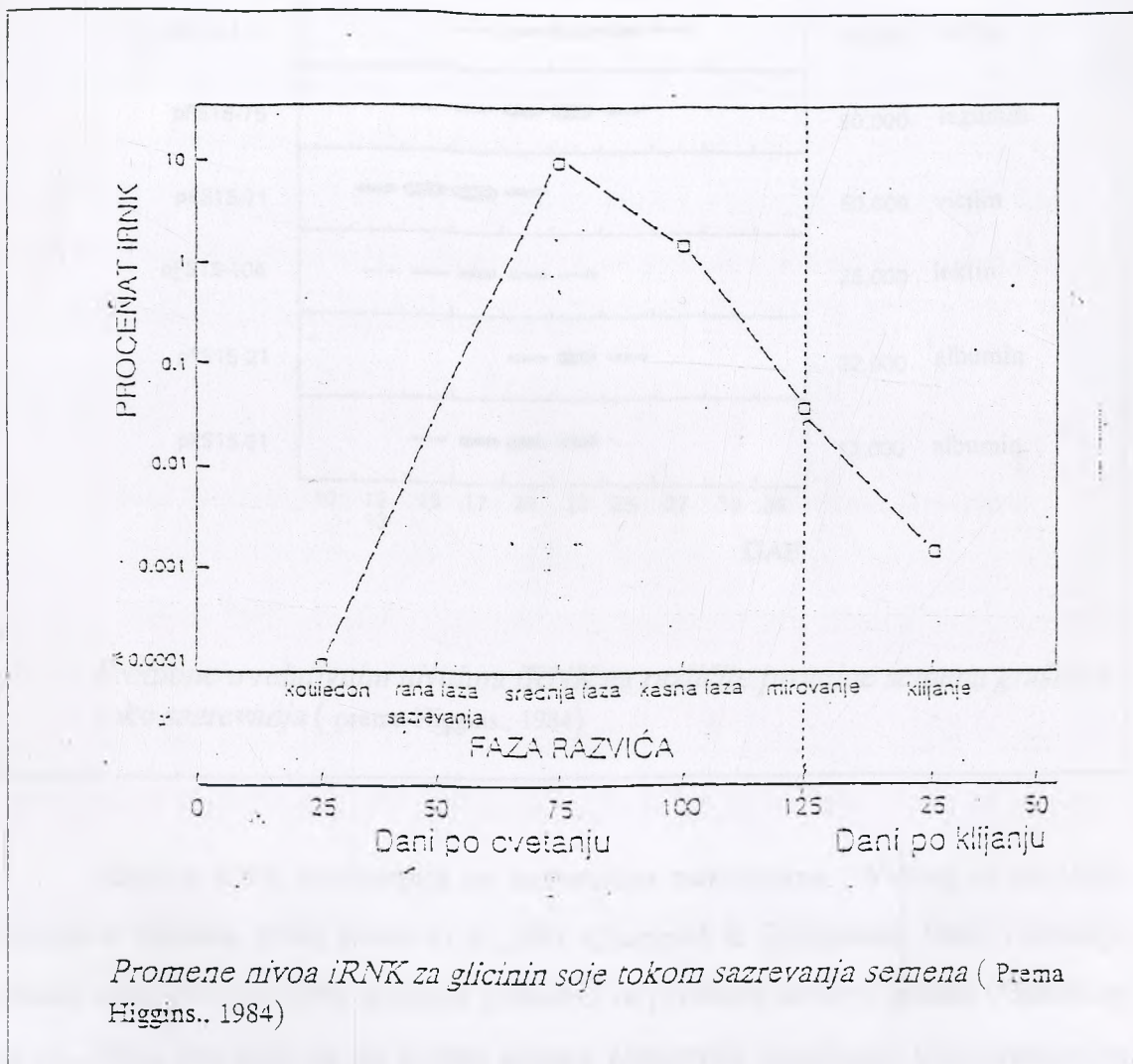
IV 1. Regulacija f a z o m r a z v i ć a

Sinteza rezervnih proteina obeležava fazu ćelijske ekspanzije i sazrevanja semena, dakle, kasnu embriogenezu. Akumulacija ovih proteina u semenu pokazuje sigmoidnu kinetiku. Tokom ranih i srednjih faza sazrevanja semena, ovi proteini se ubrzano sintetišu i nagomilavaju u semenu, da bi u zreom semenu došlo do potpunog gašenja njihove sinteze. Detaljna analiza akumulacije rezervnih proteina pokazala je da svaki rezervni protein ima različitu kinetiku sinteze za vreme razvića semena. Npr., 11S i 7S globulini akumuliraju se različitom brzinom. Štaviše, različiti članovi 7S familije imaju različitu kinetiku sinteze. Isto se odnosi i na prolamine.

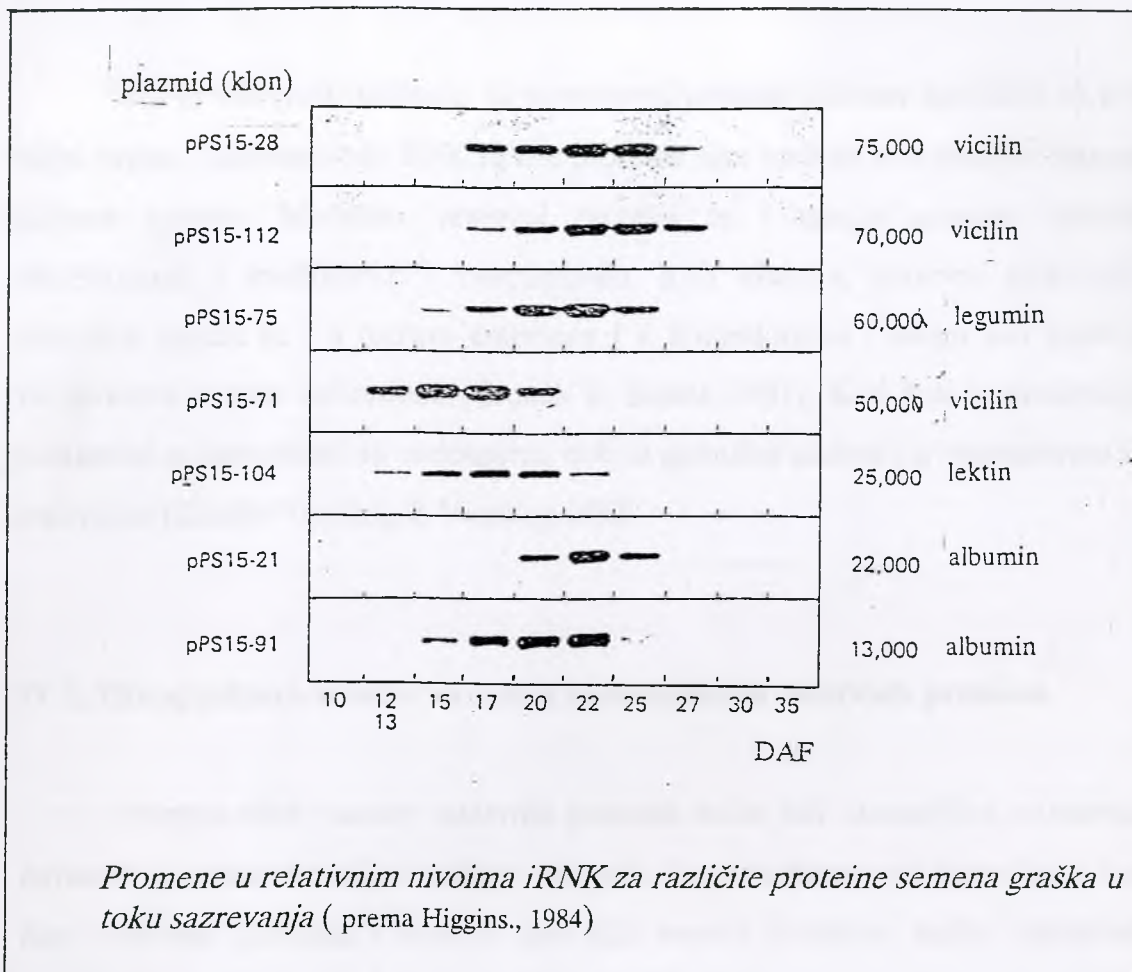
Kako su rezervni proteini stabilni za vreme deponovanja u proteinska tela (sve do bubrenja i klijanja), brzina akumulacije u najvećoj meri je određena brzinom njihove sinteze. Glavni faktor koji ovo reguliše je nivo iRNK. Nivoi iRNK za vreme razvića semena određivani su analizom translacije iRNK *in vitro* (Dure., 1981; Higgins & Spencer., 1981) i hibridizacijom iRNK sa cDNK specifičnom za svaku familiju iRNK za rezervne proteine (Higgins., 1984; Goldberg et al., 1981; Gatehouse et al., 1982; Chandler et al., 1983)

Kod soje se prve količine iRNK za glicinin primećuju tek po formiranju kotiledona, zatim kroz rane faze sazrevanja semena nivo iRNK raste, da bi dostigao maksimum tokom srednjih faza sazrevanja. Tada, u jednoj ćeliji može da se nađe do 30 000 molekula iRNK za glicinin (Goldberg et al 1981), što čini 10% od ukupne iRNK. Tokom tih srednjih faza sazrevanja, iRNK za ukupne rezervne

proteine zastupljene su sa 50% u ukupnim raspoloživim iRNK. Kroz dalje faze sazrevanja, nivo iRNK opada, a skoro potpuno nestaje u periodima mirovanja semena. Istovetna kinetika sinteze karakteristična je i za legumin i vicilin graška.



Na sledećoj slici prikazane su promene u relativnim nivoima iRNK za različite rezervne proteine graška za vreme razvića semena, dobijene na osnovu eksperimenata hibridizacije sa specifičnim cDNK. Iako svaka iRNK ima karakterističan period dostizanja maksimuma i pada sinteze, ti se periodi preklapaju i maksimumi se poklapaju sa periodom intenzivne akumulacije proteina. Dakle, postoji jasna korelacija između nivoa iRNK i brzine sinteze ovih polipeptida (Chandler et al., 1983; Higgins., 1984).



Analize RNK sintetisanih na izolovanim nukleusima (Walling et al.,1986; Camai & Harada, 1990; Evans et al.,1984, Chappell & Chrispeels, 1986) i titracija steady-state jedarne RNK genskim probama za proteine semena graška (Goldberg et al.,1981), pokazali su da je ova genska ekspresija regulisana transkripcionim procesima, tj. nivoi iRNK određeni su efikasnošću transkripcije.

Posttranskripcioni događaji takođe mogu igrati ulogu u regulaciji. Tako je npr. primećeno da se iRNK za α' i β subjedinicu beta konglicinina soje akumuliraju i raspadaju u različito vreme embriogeneze, mada su njihovi odgovarajući geni aktivirani i reprimovani u istom periodu.(Meinke et al.,1981; Naito et al.,1988).

IV 2. Tkivna specifičnost

Već je više puta istaknuto da su rezervni proteini semena specifični za ovaj biljni organ. Informacione RNK za ove proteine nisu nađene ni u jednom drugom biljnom organu. Međutim, rezervni proteini su i unutar semena različito distribuirani, i kvalitativno i kvantitativno. Kod dikotila, rezervni globulini i albumini nalaze se i u osovini embriona i u kotiledonima i mogu biti različito raspoređeni unutar kotiledona (Crouch & Sussex, 1981). Kod žita (monokotila), prolamini su ograničeni na endosperm, dok su globulini nađeni i u endospermu i u embrionu (Dierks-Ventling & Ventling, 1982).

IV 3. Uticaj faktora sredine na sastav i akumulaciju rezervnih proteina

Ukupan nivo i sastav rezervnih proteina može biti dramatično promenjen zavisno od sastava hranljive podloge. Moguće da se heterogenost subjedinica koje čine rezervne proteine i koja je kod njih veoma izražena, može "opravdati" adaptivnom sposobnošću koju imaju biljke prema promenjenim uslovima sredine.

Posebno je ilustrativan efekat nedostatka sulfata u mineralnoj ishrani. Kod graška je pokazano da ovaj nedostatak dovodi do smanjenja ukupnog nivoa proteina u semenu za 20%, pri čemu je ovo smanjenje najočitije na onim proteinima koji su bogati sumporom. Tako je legumin na granici mogućnosti detektovanja, a nivo albumina je redukovano za 35%. Nasuprot tome, nivo vicilina, proteina siromašnog sumporom, je uvećan za oko 40% (Chandler et al., 1983; Higgins et al. 1986). Efekat je reverzibilan, pošto uspostavljanje optimalnog nivoa sulfata vraća odnos proteina na normalu. Rezultati ukazuju da je redukovani nivo leguminske, odnosno 2S albuminske iRNK, glavni faktor odgovoran za redukovanu akumulaciju legumina, tj. albumina. Relativno visok nivo vicilina objašnjava se kontinuiranim prisustvom ovih iRNK, za razliku od normalnog razvića gde nivo iRNK za vicilin dramatično opada u vreme kada nivo iRNK za legumine dostize maksimum. Šta određuje taj nivo - regulacija transkripcije, obrade transkripta u

jedru, ili pak regulacija brzine degradovanja iRNK u citoplazmi - jos uvek nema jednoznačnog odgovora.

Osim sulfata, metionin, cistein, glutation i merkaptoetanol takođe utiču na povećanje leguminske sinteze u semenima koja su bila pod režimom ishrane sa smanjenim sulfatima, pa je postojala pretpostavka da se efekat sulfata ostvaruje preko nivoa raspoloživih aminokiselina bogatih sumporom. Medjutim, eksperimenti u kojima je meren nivo aminokiselina u pulu aminoacil-tRNK, ukazuju da nema razlike u relativnim količinama cisteina i metionina kod semena koja su bila pod normalnim režimom ishrane i onih koja su gajena uz redukovanje sulfata (Macnicol et al., 1983)

Kod soje, akumulacija tri glavna subjedinična polipeptida za 7S, α , α' i β takodje je pod uticajem metabolizma sulfata. U kulturi kotiledona, koja je obogaćena metioninom, β subjedinica nije detektovana (Holowach et al., 1984). β subjedinica ne sadrži metionin i jedina je čija je akumulacija suprimirana egzogenim metioninom. Ova supresija je potpuno reverzibilna. I u ovom slučaju je pokazano da je inhibicija akumulacije izazvana metioninom, regulisana na nivou transkripcije. Eksperimentima translacije iRNK u *in vitro* sistemu, pokazano je da funkcionalna iRNK za β subjedinicu nije prisutna u tkivima gde je konstatovano odsustvo akumulacije ovog proteina, a eventualna iRNK, koja ne bi bila sposobna za prevođenje, nije detektovana "Northern"- hibridizacijom (Holowach et al., 1986).

V GENI ZA REZERVNE PROTEINE

V 1. Geni za 11S rezervne proteine

Korišćenjem klasičnih genetičkih metoda dokazano je postojanje više lokusa za gene koji kodiraju legumine. Najviše je radeno na grašku, jer je njegov genom dobrim delom mapiran. Tako su identifikovane tri subfamilije gena. Dve se nalaze na hromozomu 7 i geni su im zbijeni. Treća se nalazi na hromozomu 1 i geni su više razdvojeni nego kod prethodne dve familije (Domoney et al, 1985).

Potpunije informacije o organizaciji i strukturi leguminskih gena dobijene su tek kloniranjem i sekvenciranjem cDNK, a zatim i kompletnih gena iz genomskih biblioteka. U kloniranju i identifikovanju cDNK za rezervne proteine, olakšavajuću okolnost predstavljale su dve činjenice: prvo, u definisanoj fazi sazrevanja semena, iRNK za rezervne proteine dominiraju u ukupnoj smeši iRNK, i drugo, ekspresija ovih gena je specifična za seme. Biblioteka klonova cDNK konstruisana je, dakle, na matrici iRNK izolovanih iz semena u određenoj fazi sazrevanja. U prvim kloniranjima na grašku (Croy et al., 1982) i soji (Tumer et al., 1981), za identifikovanje klonova cDNK za rezervne polipeptide korišćena je metoda tzv. "hibridne selekcije" iRNK, vezivanjem iRNK iz smeše ukupnih iRNK za komplementarni klon cDNK fiksiran na nitroceluloznom filtru. Translacijom ovako selektovane iRNK *in vitro*, dati klon cDNK bio je povezan sa odgovarajućim translacionim proizvodom.

Identifikacija cDNK za rezervne proteine, analiza nukleotidne sekvence i njeno poređenje sa aminokiselinskom sekvencom, poslužili su za potvrđivanje pretpostavki o načinima biosinteze i organizaciji samih proteina. Tako je sekvenciranjem leguminske cDNK graška koji kodira prekursor od 60kDa dobijen apsolutni dokaz zajedničkog postojanja α i β subjedinice u jednom prekursorskom molekulu (Croy et al., 1982). Ovo je objasnilo specifičnost α - β sparivanja, kao i zapažanja iz genetičkih eksperimenata da je nasleđivanje određenih α - β parova povezano. Postojanje prekursora dokazano je analizom cDNK i kod drugih biljnih

vrsta koje imaju rezervne proteine 11S tipa : soje (Turner et al., 1981), repe (Simon et al., 1985), ovasa (Walburg & Larkins, 1986) i *Arabidopsis* (Pang et al., 1988).

Na više biljnih vrsta ustanovljeno je da pojedine grupe prekursora kodira čitava klasa iRNK. Kod graška, jedna klasa kodira leguminski prekursor od 60kDa, druga prekursore od 63-65kDa, a treća polipeptide od 80kDa (Domoney & Casey, 1985). Molekuli cDNK sintetisani na ovim iRNK hibridizovali su sa različitim fragmentima genomske DNK, što je govorilo o postojanju tri klase gena. Kod soje je za glicinine grupe I nađena jedna klasa, a za glicinine grupe II dve klase cDNK molekula. Glicinine grupe I kodiraju iRNK od oko 1950 baza, a grupu II iRNK od 2150-2900 baza (Scallon et al., 1985). Definisanje dužine iRNK koje kodiraju prekursore omogućilo je još jedan od pristupa u kloniranju koji je obogaćivao matricu za sintezu cDNK informacionim RNK za rezervne proteine - frakcionisanje iRNK po dužini, korišćeno u većini prethodno navedenih kloniranja.

Analiza nukleotidnih sekvenci cDNK datih klasa prekursora pokazala je da je homologija u okviru klasa 85-90%, a između klasa oko 50% (Scallon et al., 1985). Upoređivanjem sekvenci cDNK ili gena osam različitih 11S rezervnih globulina iz osam različitih biljnih vrsta koje su predstavnici pet familija, zaključeno je da svi ovi geni vode poreklo od zajedničkog predačkog gena koji je postojao i kod prvih skrivenosemenica pre 100-150 miliona godina (Borroto & Dure, 1987). Noviji podaci ukazuju na postojanje rezervnih proteina 11S tipa i kod golosemenica, čije su cDNK u velikoj meri homologne onima iz skrivenosemenica (Leal & Misra, 1993; Arahira & Fukazawa, 1994). Zajedničko sa 11S rezervnim globulinima skrivenosemenica je i slična struktura subjedinica, kao i postojanje prekursorskog molekula koji se posttranslaciono obradjuje. Na osnovu toga može se pretpostaviti da je nastanak predačkog gena prethodio nastanku skrivenosemenica tokom evolucije. Visok stepen homologije konstatovan za 11S globuline omogućio je upotrebu homolognih i heterolognih proba u identifikovanju cDNK i genomskih klonova iz odgovarajućih biblioteka.

Osim postojanja prekursorskog molekula, analiza cDNK potvrdila je još neke elemente strukture i načina biosinteze 11S rezervnih proteina. Poređenjem

aminokiselinske i nukleotidne sekvence iRNK glicinina soje utvrđeno je da u proteinu nedostaju 4 aminokiseline i to između baznog i kiselog polipeptida. Ova sekvenca je nazvana vezivni polipeptid. Nađena je još kod nekih prekursora, ali je varirala po dužini (Marco et al.,1984). Takođe, na isti način je bilo pokazano i postojanje signalnog peptida na N- kraju prekursorskog molekula.

Postojanje cDNK za određene 11S prekursore omogućilo je određivanje broja kopija gena za ove proteine. Korišćenjem samo jednog klona cDNK koji kodira prekursor legumina graška od 60kDa, detektovano je 5 kopija gena. Hibridizacijom genomske DNK sa cDNK za prekursore od 63-65kDa otkrivena su nova 3 gena. Poslednji rezultati pokazuju da je ukupan broj leguminskih gena najmanje 10, od kojih je jedan pseudogen (Casey et al.,1986). Veliki broj otkrivenih gena još uvek je u neskladu sa heterogenošću utvrđenoj na proteinskom nivou (22 kisela i 11 baznih polipeptida kod graška). I kod soje se pojavila ista slika : broj otkrivenih gena bio je manji od broja detektovanih proizvoda. Proteini 11S nisu glikozilovani i glavne razlike su na unutrašnjim pozicijama polipeptida, što isključuje postojanje posttranslacionih modifikacija i ukazuje na veći broj gena ili na preradu iRNK za ove proteine.

Svi geni za 11S rezervne proteine koji su do sada izučavni sadrže introne čija veličina varira, ali je organizacija uglavnom konzervisana. Uobičajena shema gena za 11S rezervne proteine je postojanje 4 egzona i 3 introna, pri čemu prva dva egzona kodiraju kiseli, a treći egzon bazni polipeptid. Veličina introna se kreće od ispod 100 baznih parova kod graška, do 600 baznih parova kod soje (Shotwell & Larkins, 1989).

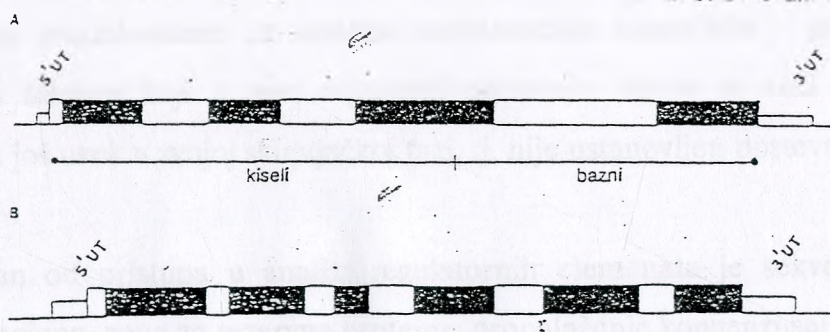
V 2. Geni za 7S rezervne proteine

Klasičnim metodama geni za 7S globuline graška mapirani su na 6 različitih lokusa. Geni za konvicilin su ograničeni na jedan lokus na hromozomu 2. Za vicilin je mapirano 5 različitih lokusa sa više kopija gena. Tri vicilinska lokusa su na hromozomu 7 u blizini leguminskih.

Analiza cDNK koje kodiraju vicilin graška potvrdila je postojanje prekursorske forme ovih rezervnih proteina. Klonirano je više klasa prekursorskih molekula. Jedna klasa kodira prekursore od 47kDa, a druga od 50kDa, kod kojih postoji više alternativnih posttranslacionih proteolitickih mogućnosti. Homologija na nukleotidnom nivou između njih je oko 85%.

Kao i u slučaju 11S rezervnih proteina, za 7S proteine pokazano je da ih kodiraju multigenске familije sa po 20 pa i više članova. Tako konglicinine soje kodira 15-20 gena (Ladin et al.,1984), viciline graška 11 gena (Domoney & Casey, 1985), a fazeoline pasulja 7 gena (Talbot et al.,1984)

Uobičajena struktura gena za 7S globuline je postojanje šest egzona koji su razdvojeni sa pet introna veličine 100-200bp. Poredjenjem sekvenci kodirajućeg dela gena različitih 7S proteina iz graška, soje, pasulja (familija Fabaceae) i pamuka (familija Malvaceae) utvrđeno je postojanje homolognih regiona, na osnovu čega je pretpostavljeno postojanje predačkog gena i za ovu grupu rezervnih proteina (Borrito & Dure, 1987). Nivo homologije je nešto niži nego kod leguminskih rezervnih proteina. Takođe, ova familija gena je izgubljena tokom evolucije mnogih skrivenosemenica. Rezervni proteini vicilinskog tipa nisu nađeni u familiji Brassicaceae (repica, *Arabidopsis*), ni u familiji Asteraceae (suncokret), iako u semenima ovih biljaka postoje rezervni proteini leguminskog tipa. Ovi proteini do sada nisu detektovani ni kod monokotiledonih biljaka.



Shematski prikaz organizacije gena za rezervne proteine semena leguminoza. (A) gen za 11S globulin; (B) gen za 7S globulin. (prema Shotwell & Larkins.,1989)
 UT- (od engleskog untranslated)- nekodirajuće sekvence; tamni blokovi- egzoni, svetli blokovi-introni

V 3. Geni za prolamine

Prolamine, kao i globuline, kodiraju multigenske familije. Kod pšenice su geni za prolamine smešteni na 2 kompleksna lokusa hromozoma 1. Hordein, rezervni protein ječma, kodiraju 3 lokusa sa hromozoma 5. Kako je hromozom 5 ječma analogan hromozomu 1 pšenice i kako su rastojanja između gena za rezervne proteine slična, izvodi se zaključak da su današnji lokusi evoluirali iz jednog predačkog. Geni za zeine kukuruza mapirani su na hromozomima 4, 6, 7, i 10.

Osnovna karakteristika strukture gena za prolamine je odsustvo introna (Kreis & Shewry, 1989). Ovo je iznenadjujuće, s obzirom na pretpostavljene moguće načine nastanka novih gena ove familije u evoluciji- inserciju između elemenata visoke konzervisanosti i duplikaciju.

V 4. Analiza predvorja gena za rezervne proteine

Poslednjih godina kloniranje novih gena za rezervne proteine i kompletiranje ovih multigenskih familija, ustupilo je mesto interesu istraživača za analizu regulacije ekspresije ovih gena. Ekspresija gena za rezervne proteine koja je specifična za seme i ograničena na definisani period u toku sazrevanja semena, pogodan je model-sistem za analizu regulatornih elemenata gena, kao i proteinskih faktora koji u ovoj regulaciji učestvuju. Može se reći da su ova istraživanja još uvek u svojoj skupljačkoj fazi, tj. nije ustanovljen opštevažeći model regulacije.

Jedan od pristupa u analizi regulatornih elemenata je sekvenciranje 5' uzvodnih regiona gena za rezervne proteine, pronalaženje konzensusnih sekvenci i kompjuterska analiza mogućih alternativnih struktura. Tako je u velikom broju gena koji se specifično ekspimiraju samo u semenu, identifikovana sekvenca CATGCATG, nazvana RY element (Craig et al., 1988). Ova sekvenca može biti ponovljena i više puta.

RY element konstatovan je i u sklopu sekvence koja je označena kao leguminski blok. Leguminski blok je detektovan u okviru 80bp uzvodno od cap mesta većine gena za 11S globuline i sastoji se od 28bp od kojih je 25bp, u svim do sada analiziranim genima, nepromenljivo (Baumlein et al., 1986)

U 5' regionu leg C gena, jednog od gena za legumin graška, nađen je region od 82bp koji je dva puta ponovljen, a svaki ponovak sadrži par invertovanih ponovaka od 21bp. U tom regionu mogu da se formiraju dve alternativne petlje, od kojih je jedna duža (42bp) i stabilnija. Pretpostavljeno je da se kontrola ekspresije ovog gena odvija "uključivanjem" i "isključivanjem" ove dve strukture (Lycett et al., 1985).

Drugi pristup u analizi regulatornih elemenata je delecija ili uvođenje specifičnih mutacija u promotorske regione gena za rezervne proteine i praćenje njihove ekspresije u transgenim biljkama. Takođe su analizirani i proteinski faktori koji prepoznaju ove specifične sekvence.

Ovakav eksperimentalni pristup primenjen je u analizi α subjedinice β konglicinina, 7S rezervnog proteina soje. U cilju identifikovanja kontrolnih elemenata, urađena je serija delecija u 5' uzvodnom regionu ovog gena i ekspresija gena je praćena u transgenim petunijama i duvanu (Fujiwara & Beachy., 1994). Analiza je pokazala da je sekvenca -259/-69 bitna za pravilnu ekspresiju ovog gena. Unutar ovog regiona konstatovana su dva RY ponovka : CATGCAT (-57/-51) i CATGCAC (-245/-239) koji su specifični za gene koji se eksprimiraju u semenu. Mutacije u RY elementima imaju nekoliko efekata na ekspresiju gena koji su pod kontrolom regulatornih elemenata ovog gena: kada je jezgro promotora zamenjeno jezgrom CaMV 35 promotora, mutacija u RY dovodi do ekspresije u listu i, osim toga, eliminisana je stimulatorska aktivnost regulatornog fragmenta originalnog promotora specifična za seme. Ovo ukazuje da je RY element bitan faktor u ekspresiji ovog gena specifičnoj za seme, ali da od promotorskog konteksta u kome se on nalazi, zavisi raznovrsnost efekata koji se konstatuju po mutaciji RY elementa.

Za gen LeB4 legumina soje (Baumlein et al., 1993) pokazano je da RY element sam za sebe nije odgovoran za regulaciju genske ekspresije specifičnu za seme. Serija delecija u 1200bp dugom 5' uzvodnom regionu (koji inače obezbeđuje potpunu i regularno regulisanu ekspresiju u transgenim biljkama) dovodi do smanjenja ekspresije ovog gena čak i ako RY elementi ostanu intaktni. Isto tako, kratki promotorski konstrukt od 69 nukleotida koji sadrži CATGCAT sekvence nema nikakvu aktivnost.

U potrazi za proteinskim faktorima koji kontrolišu ekspresiju specifičnu za seme, činjenica da je DNA - vezivna aktivnost detektovana samo u ekstraktima semena, ukazivala je da moraju postojati elementi pozitivne kontrole. Među identifikovanim proteinskim faktorima iz semena soje (homologni sistem) i duvana (heterologni sistem) za faktore SEF3 i SEF4 pokazano je da se vezuju za nukleotidne sekvence u regionu -257/-79, upravo one koje sadrže RY elemente. Vezivanje SEF3 je specifično za ovaj region, a SEF4 se vezuje i za druge regione promotora. Akumulacija SEF3 i SEF4 u semenu u razviću vremenski prati biosintetski tok α' i β subjedinica konglicinina (Lessard et al., 1991), što takođe podržava hipotezu da su ovi faktori uključeni u ekspresiju specifičnu za seme. S druge strane, podatak da prekidanje RY elementa utiče na ekspresiju sa himernog promotora u listu, navodi na mogućnost da u listu (dakle tkivu gde ekspresije normalno nema) postoje "negativni" regulatori koji prepoznaju RY elemente. I u ovom slučaju, s obzirom da je za ekspresiju u listu potrebno i jezgro CaMV 35 promotora, moguće je pretpostaviti združeni efekat više proteinskih faktora.

Deleciona analiza 5' regiona gena za β fazeolin u transgenom duvanu pokazala je postojanje nekoliko elemenata bitnih u regulaciji ekspresije ovog gena u -782 regionu (Kawagoe et al., 1994). Definisane su sekvence odgovorne za ekspresiju specifičnu za seme kada je gen vezan za CaMV35 promotor (Bustos et al., 1991), sekvence odgovorne za ekspresiju u kasnoj embriogenezi, minimalni promotor za razviće u semenu, negativni element koji sprečava ekspresiju u stablu i listu. Preciznijom analizom promotorskog regiona nadjena su tri CANNTG motiva : CACGTG(-248/-243) nazvan G-blok, CACCTG(-163/158) i CATATG(-100/-95). Pokazano je da je G-blok glavni aktivator transkripcije, ali da sam nije

dovoljan da, bez sadejstva sa druga dva motiva, pokrije punu aktivnost promotora, što je sinergistički efekat uobičajen kod eukariota (Herschlag & Johnson, 1993). Za CATATG motiv je pokazano da je element negativne regulacije, s obzirom da se njegovom mutacijom nivo ekspresije povećava za 58%.

Studija mogućih proteinskih faktora ukazala je na najmanje četiri jedarna proteina koji se vezuju za 5' uzvodni region β fazeolina: protein označen kao CAN koji se vezuje za sva tri motiva CANNTG, TATA vezivni protein, zatim CA-1 koji interaguje sa 2 CA bogate sekvence i, AG-1 koji se vezuje za AT bogate sekvence. CAN i AG-1 su transkripcioni faktori, ali da li će taj efekat biti pozitivan ili negativan zavisi od pozicije motiva DNK za koji se vežu (Lessard et al., 1991). Za motiv CACGTG, ili G-blok, pokazano je da se nalazi u promotorskom regionu preko 70 biljnih gena (Williams et al., 1992) i da se za ovaj motiv vezuje dva tipa proteinskih faktora: bZip (leucin-ziper) i bHLH (Helix-loop-helix) proteini. Ostaje otvoreno pitanje, međutim, kako za G-box vezivni protein u datom tkivu aktivira ciljani, a ne i sve druge gene koji imaju potencijalno vezivno mesto.

C. REZERVNI PROTEINI SEMENA HELJDE

Heljda je dikotiledona biljka koja spada u familiju Polygonaceae. Seme heljde sadrži 11-12 % proteina, među kojima dominiraju globulini, slede albumini i glutelini, a prolaminska frakcija gotovo potpuno odsustvuje (Belozerskiy & Emceva, 1970). Analizom aminokiselinskog sastava 10 uzoraka različitog porekla (Pomeranz & Robbins, 1972) nađen je visok procenat lizina (prosečno 6.1%), znatno viši nego kod žita. Takav aminokiselinski sastav čini seme heljde izvorom proteina sa visokom biološkom vrednošću u biljnom svetu, koji su uporedivi sa proteinima iz namirnica životinjskog porekla. Zbog ove osobine preporučuje se korišćenje heljde u ljudskoj ishrani.

Dominantna proteinska frakcija semena heljde su rezervni proteini globulinskog tipa. Metodom analitičkog ultracentrifugiranja određena je sedimentaciona konstanta glavnog rezervnog proteina i on je označen kao 13S globulin. Na isti način određen je i manji 1,1S glutelin, označen kao fagopirinin, molekulske mase od 14 kDa (Belozerskiy & Emceva, 1970), za koji međutim nije dokazano da funkcioniše kao rezervni protein.

Kvaternarna struktura 13S globulina ispitivana je putem merenja sedimentacionih konstanti proteina pri različitim vrednostima pH (Belozerskiy, 1975). Snižavanjem vrednosti pH sa 7,5 na 4,0, 13S globulin podleže disocijaciji na subjedinice koeficijenta sedimentacije 7S. Daljim zakišeljavanjem rastvora do pH 3 dobijaju se 2,7S subjedinice. Dakle, 13S globulin podleže shemi disocijacije koja je pokazana za leguminsku klasu rezervnih proteina i stoga je svrstan u tu kategoriju rezervnih proteina semena (Derbyshire et al., 1976).

Razdvajanje globulina semena heljde, na saharoznom gustinskom gradijentu (Radović et al., 1996), potvrdilo je da je 13S globulin glavni rezervni protein semena heljde, ali je ukazalo na postojanje još dve klase rezervnih proteina: mc globulin (od minor class) i frakciju polipeptida malih molekulskih masa za koju je konstatovano da polipeptidi od 8-16 kDa odgovaraju 2S albuminima (Maksimović et al u pripremi). Zastupljenost ovih frakcija rezervnih

proteina razlikuje se od one objavljene u radovima ruskih autora. Tako na 13S globulin otpada oko 70% ukupnih rezervnih proteina (43% kod ruskih autora), na mc globulin 10% , albumine 15% i gluteline preostalih 5%.

Dvodimenzionalne elektroforeze pokazale su da 13S globulin ponavlja strukturu karakterističnu za proteine leguminskog tipa, tj. da se sastoji od 6 neidentičnih subjedinica. Svaka od subjedinica je zapravo par većeg , kiselog (32-43kDa) i manjeg , baznog polipeptida (23-25kDa) međusobno vezanih disulfidnim vezama (Radović et al., 1996)

Za mc globulin pokazano je da je najverovatnije trimer sastavljen od tipske subjedinice molekulske mase od oko 57kDa i da po tipu organizacije odgovara vicilinskom tipu rezervnih proteina.

2S albumini predstavljeni su grupom polipeptida od 8-16 kDa između kojih nisu konstatovane disulfidne veze.

Oskudnost podataka koji u literaturi postoje o strukturi i biosintezi rezervnih proteina semena heljde, uslovljena je prvenstvenim interesom grupa koje se bave heljdom za hidrolitičke enzime koji učestvuju u procesu klijanja.

MATERIJAL I METODE

I 1. Biljni materijal

Heljda (*Fagopyrum esculentum* Moench, cv. Darja) uzgajana je u Botaničkoj bašti Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Seme je dobijeno od Biotehničkog fakulteta u Ljubljani. Za eksperimente su korišćena semena, klijanci, cvetovi i listovi heljde.

Period od pojave cveta do zrelog semena kod heljde traje oko 30 dana. **Seme** u razviću klasifikovano je prema morfološkim karakteristikama: veličina i masa svežeg semena, boja semenjače, veličina kotiledona i konzistencija endosperma. Faze u sazrevanju označene su kao 9, 11, 14, 17, 19, 21 i 23 i 25DAF (od engleskog "day after flowering"), kao što je uobičajeno u literaturi. Cvetanje je uzeto kao početni momenat u embriogenezi, umesto oprašivanja koje nije moglo biti kontrolisano. Semena u ranim fazama sazrevanja (9 - 11DAF) odlikuju se jako svetlom semenjačom i sitnim embrionom (oko 1-1,5mm) na kome se uočavaju začeci kotiledona i osovina embriona, a endosperm se ne može uočiti. Pod semenima u "srednjoj fazi sazrevanja" podrazumevaju se semena od 14. do 23. dana po cvetanju. Seme u fazi 14DAF ima svetlozelenu semenjaču, tečni endosperm i embrion sa razvijenim kotiledonima. Veličina embriona je oko 2-2,5mm. Postoji prazan prostor između semenjače i embriona. Semena u fazi 17DAF imaju zelenu semenjaču, a endosperm je mlečan. Semena u fazi 19DAF su pune veličine, ali sa još uvek zelenom semenjačom. Imaju embrion veličine oko 4mm i endosperm koji je mlečno-brašnjav. Faza 21-23DAF se razlikuje od faze 19DAF po količini endosperma. Semena u kasnoj fazi sazrevanja (25-28DAF) karakterišu se početkom pigmentacije semenjače i potpuno brašnjavim endospermom.

Semena u odgovarajućoj fazi sazrevanja su ili odmah korišćena, ili su zamrzavana za kasniju upotrebu. Zrela semena nisu zamrzavana. Čuvana su na suvom mestu na sobnoj temperaturi.

Za dobijanje **klijanaca** zrela semena su sterilisana u 0,4% rastvoru Na-hipohlorita, postavljana su na filter papir u vlažnoj komori na 25°C u mraku u toku tri dana. Odsecani su delovi van semenjače, uzimani su **hipokotili** i korišćeni za izolovanje i analizu RNK.

U eksperimentima su korišćeni celi, sveže ubrani ili zamrzavani **cvetovi** i **listovi**.

Osim semena koja su sakupljana sa biljaka koje su rasle u polju, u eksperimentima su korišćena i semena biljaka koje su rasle na podlozi pesak-perlit u kontrolisanom režimu ishrane. Kontrola je postizana zalivanjem zasejane inertne podloge definisanim rastvorima. Kontrolne biljke su zalivane rastvorom po Gamborgu (25mMKNO₃, 1mM(NH₄)₂SO₄, 1mMNaH₂PO₄×H₂O, 1mM CaCl₄×2H₂O, 1mMMgSO₄×7H₂O, 48μMH₃BO₃, 59μMMnSO₄×H₂O, 0,1μMCoCl₂×H₂O, 0,1μMCuSO₄×5H₂O, 6,9μMZnSO₄×7H₂O, 1μMNa₂MoO₄, 4,5μMKJ, 0,1mMNa₂EDTA×2H₂O, 0,1mMFeSO₄×7H₂O), a biljke kod kojih je praćen efekat nedostatka sulfata u ishrani, zalivane su istim rastvorom u kome je do momenta pojave cvetova koncentracija MgSO₄ smanjena na 0,05mM. Od momenta cvetanja, kroz sve faze sazrevanja semena, MgSO₄ je bio potpuno izostavljen i zamenjen sa 1mM MgCl₂.

II 1. Kratkotrajno *in vivo* obeležavanje proteina semena heljde

Po jedan ili dva embriona semena heljde u srednjim fazama sazrevanja potapani su u 50μl 76mM K-fosfatnog pufera pH 7,2, koji je sadržavao ³⁵S-metionin (L- [³⁵S]-Methionine, SJ1015 Amersham, ≥ 1000Ci/mmol), 5μCi/embrionu, ili u smešu ¹⁴C-aminokiselina (L-[U-¹⁴C] aminoacid mixture, CFB.104, Amersham, 50μCi/ml), 1μCi/embrionu, i inkubirani 1h na 28°C uz blago mućkanje. Embrioni su zatim kratko ispirani destilovanom vodom, da bi se odstranio radioaktivni pufer, a zatim se pristupalo ekstrakciji proteina.

Određeni broj semena je posle kratkotrajnog *in vivo* obeležavanja ispiran u vodi i inkubiran u hranljivom medijumu (rastvor po Gamborgu) sa smešom neobebeženih aminokiselina, ili u trajanju od 4 h, ili preko noći. Ovaj proces nazivamo "hladenjem". Proteini su ekstrahovani i iz ovih uzoraka.

II 2. Izolovanje proteina iz semena heljde

Seme heljde ili embrioni posle *in vivo* obeležavanja su zamrzavani u tečnom azotu i mleveni u fini prah. Globulinska frakcija ekstrahovana je sa 5-10 volumena pufera A (0,035M K-fosfatni pufer pH 7,6; 0,4M NaCl; 0,02% NaN₃) 1h na sobnoj temperaturi uz povremeno mešanje. Dobijena suspenzija centrifugirana je 15min na 10 000 g. Tako dobijeni supernatant je ili odmah korišćen, ili je precipitiran sa dva volumena hladnog acetona. Koncentracija izolovanih proteina određivana je metodom Lowrya (Lowry et al., 1951).

II 3. Elektroforeza proteina

Proteini izolovani iz semena, *in vivo* obebeženih embriona heljde, kao i alikvoti *in vitro* translacionih smeša, analizirani su elektroforezom na 12-15% SDS-poliakrilamidnom gelu u pločama (18×16cm) po metodi koju je opisao Laemmli, 1970. Pored akrilamida, gel za razdvajanje je sadržavao 0,375M Tris-HCl pH8,8 i 0,1% SDS. Gel za koncentrovanje sadržavao je 5,1% akrilamid, 0,125M Tris-HCl, pH 6,8 i 0,1% SDS. Proteinski uzorci rastvarani su u puferu za uzorak čiji je sastav 50mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 0,1% BPB; 10% glicerol i 2% β-merkaptioetanol koji je dodavan da bi se raskinule disulfidne veze između pojedinačnih polipeptida proteinskih subjedinica. Elektroforeza je vršena u TGB puferu (25mM Tris; 250mM glicin pH8,3; 0,1% SDS), u uslovima konstantne struje jačine 20 mA.

Proteini u gelovima su fiksirani i bojeni rastvorom 0,25% Coomassie brilliant blue R-250 u 45% metanolu i 10% sirćetnoj kiselini, a odbojavanje je vršeno difuzijom u 45% metanolu i 10% sirćetnoj kiselini (Sambrook et al., 1989).

II 4. Fluorografija gelova

Gelovi sa radioaktivnim polipeptidima su fiksirani u rastvoru 25% izopropanola i 10% sirćetne kiseline 15-30 min, a zatim inkubirani 30 min u rastvoru AmplifyTM (Amersham), koji pojačava signal inače slabog β emitera kao što je ^{35}S ili ^{14}C . Gelovi su sušeni i eksponirani prislanjanjem rentgen filma (X-ray, Kodak XR-2).

II 5. Dobijanje poliklonskih antitela

Za dobijanje poliklonskih antitela korišćeni su serumi kunića imunizovanih polipeptidima od interesa. Za imunizaciju je upotrebljeno po 100 μg polipeptida od 57kD (mc globulin heljde) i grupe polipeptida od 23-25kDa (bazni polipeptidi 13S globulina heljde), u dva navrata, sa razmakom od nedelju dana. Dati polipeptidi izdvajani su iz ukupnog proteinskog ekstrakta razdvajanjem na SDS-PAA gelu, a zatim je traka odgovarajuće molekulske mase isecana sa gela i elektroeluirana. Serumi su sakupljani 2 nedelje po drugoj imunizaciji.

II 6. "Western"- analiza

Imunološka identifikacija polipeptida, razdvojenih elektroforezom, vršena je "Western"-analizom uz upotrebu poliklonskih antitela na odgovarajuće polipeptide. U svim "Western"- analizama korišćena su sekundarna anti IgG antitela za koja je kovalentno vezana alkalna fosfataza, tako da je kompleks antigen- antitelo - sekundarno antitelo detektovan enzimskom bojenom reakcijom. Ovoj detekciji prethodi elektroforetski transfer proteina, razdvojenih SDS-PAA elektroforezom, na odgovarajuće najlonske, PVDF membrane.

Transfer proteina izveden je korišćenjem aparature Transpher (TE 42), Hoefer Scientific Instruments, 2 h, pri naponu od 40V, na sobnoj temperaturi.

Transfer je vršen u standardnom TGB puferu u kom je tekla i elektroforeza (Motsudaira, 1987).

Pre transfera gelovi su potapani 5min u puferu za elektroforezu, a membrane nekoliko sekundi u 100% metanolu, a zatim u istom elektroforetskom puferu. Membrana se mora, do uspostavljanja "sendviča" za transfer, održavati u vlažnom stanju. "Sendvič" za transfer od anode ka katodi je: sundjer - filtar 3MM - PVDF membrana - gel - filtar 3MM - sundjer.

Proteini preneti na PVDF membrane mogu se bojiti u rastvoru za bojenje: 0,1% Coomassie blue R-250 u 40% metanolu i 10% sirćetnoj kiselini. Membrane koje će se bojiti, prethodno je potrebno zasititi 100% metanolom nekoliko sekundi.

Neobojene membrane, koje su odmah posle elektroforetskog transfera spremne su za "Western"-analizu (membrane se inače mogu čuvati na +4C°, vlažne, zatopljene u polivinilske kesice), prvo su inkubirane u puferu za blokiranje: 1% BSA u TBST-u (10mM TRIS-Cl, pH 8,0, 150mM NaCl, 0,05% Tween 20), 30min na sobnoj temperaturi.

Membrane su zatim inkubirane sa primarnim poliklonskim antitelima razblaženim 1:200 u TBST-u, 30 min na sobnoj temperaturi.

Posle ovog inkubiranja, membrane su prane tri puta po 5-10 min u TBST-u, a onda prenošene u rastvor sekundarnih antitela konjugovanih sa alkalnom fosfatazom (u razblaženju 1:7500 u TBST-u) u trajanju od 30 min.

Membrane su zatim ispirane tri puta u TBST-u, pa je urađena bojena enzimska reakcija. Supstrati za alkalnu fosfatazu korišćeni u ovim eksperimentima su: NBT(nitro blue tetrazolium)(6,6 μ l/ml) i BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfat)(3,3 μ l/ml). Pufer za alkalnu fosfatazu je: 100mM Tris-Cl, pH 9,5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂. Inkubiranjem membrane u prisustvu ovih supstrata dobija se bojeni precipitat na mestima gde se nalazi vezano sekundarno antitelo. Ova reakcija se odvija 5-15 min na sobnoj temperaturi u mraku. Reakcija se zaustavlja ispiranjem membrane u vodi, nakon čega se membrana može osušiti na vazduhu.

II7. Imunoprecipitacija

Identifikacija polipeptida dobijenih *in vitro* translacijom iRNK izolovanih iz različitih faza u sazrevanju heljde vršena je imunoprecipitacijom (Maniatis et al., 1990) sa poliklonskim antitelima na polipeptide od 57kDa i poliklonskim antitelima na grupu polipeptida od 23-25kDa dobijenim na prethodno opisani način.

Protein A-Sefaroza (Protein A-Sepharose, Pharmacia), koja je u reakciji upotrebljena za vezivanje antitela, prethodno je nabubrena u vodi u koncentraciji od 10%. Radna koncentracija ove Sefaroze je 2%. Smeša: 1/5 *in vitro* translacione smeše, 10 μ l seruma i proteinA- Sefaroza u 500 μ l pufera RIPA (50mM Tris-Cl, pH 7,5, 150mM NaCl, 1% Nonident P-40, 0,5% Na-deoksiholat, 0,1% SDS) inkubirana je 1 h na ledu uz povremeno blago mućkanje.

Kompleks ProteinA-Sefaroza/antigen/antitelo sakupljan je centrifugiranjem na 12 000g, 20sec, na 4C°. Supernatant je odstranjivan, a talog pran blagim resuspendovanjem u puferu RIPA tri puta.

Spiranje antigena sa Sefaroze vršeno je u puferu: 50mM Tris-Cl, pH 6,8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0,1% Brom phenol blue, 10% glicerol, kuvanjem 3min na 100°C. Sefaroza je odvajana centrifugiranjem 20sec na 12 000g, a denaturisani proteini u supernatantu analizirani su elektroforezom na SDS-PAA gelu.

II 8. Izolovanje ukupne RNK

Ukupna RNK izolovana je iz 1-5 g tkiva heljde po metodi Taylor & Powel, 1982. Svi rastvori su pre upotrebe sterilisani 40min, pod pritiskom od 2 bara, a sudovi na 180°C preko noći.

Tkivo je zamrzavano u tečnom azotu ili suvom ledu i mleveno u fini prah. Dodavana su dva volumena ključalog 2X ekstrakcionog pufera (2% CTAB; 100 mM Tris-HCl pH 8; 20mM EDTA; 1,4M NaCl; 2% β -merkaptetoetanol), i smeša je ostavljena u vodenom kupatilu na 55°C dok temperatura smeše ne dostigne 50°C. Zatim je dodavan isti volumen hloroform:izoamilalkohola (24:1) i blago je mućkano da bi se izmešale organska i vodena faza. Centrifugirano je 10 minuta na

9000 obrt/min u SS34 rotoru na sobnoj temperaturi. U vodenu fazu dodavano je 1/10volumena 10% CTAB i ponavljana je ekstrakcija hloroform/izoamilalkoholom. Opet je odvajana vodena faza iz koje su nukleinske kiseline taložene 30min na sobnoj temperaturi, dodavanjem oko tri volumena precipitacionog pufera (1% CTAB; 50mM Tris-HCl pH 8; 10mM EDTA; 1% β -merkaptioetanol), posle čega je centrifugirano 5 min na 9000 obrt/min u SS34 rotoru. Talog je rastvaran u 3 ml 1M CsCl, što je naslojavano na 2 ml 5,7M CsCl u polipropilenskim epruветama za SW 50.1 rotor i centrifugirano 20 h na 35 000 obrt/min pri temperaturi od 20°C. Tokom centrifugiranja RNK pada kao talog na dno epruветe.

Prečišćavanje RNK od CsCl rađeno je po protokolu iz laboratorijskog priručnika Sambrook et al., 1989. Talog RNK pran je u 70% etanolu i sušen na sobnoj temperaturi, a zatim rastvaran u 100 μ l TE pufera pH 7,6 (10mM Tris-HCl pH 7,6; 1mM EDTA) koji sadrži 0,1% SDS. Dodavano je još 200 μ l TE pufera pH 7,6 i precipitirano sa 1/10 volumena 3M Na₃COOH pH 7,2 i tri volumena hladnog apsolutnog etanola, 30 minuta na ledu. Smeša je centrifugirana 15 minuta na 12000 g, a talog je pran 70% etanolom i sušen na sobnoj temperaturi. RNK je rastvarana u vodi, a koncentracija je određivana spektrofotometrijski, merenjem apsorbancije na 260 nm, pri čemu jedna optička jedinica odgovara koncentraciji RNK od 40 μ g/ml. Prinos RNK po gramu tkiva iznosio je 160-290 μ g za semena različitih faza sazrevanja, oko 60 μ g za cvet, 55 μ g za list i 160 μ g za tkivo klijanaca.

Kvalitet izolovane RNK proveravan je elektroforezom na gelu od agaroze na osnovu pokretljivosti i odnosa intenziteta traka ribozomalnih RNK, kao što će biti obrazloženo u Rezultatima.

II 9. Izolovanje poli(A) RNK

Poli(A)RNK je izolovana iz ukupne RNK uz pomoć komercijalnog kita za izolovanje iRNK firme Dynol (kataloški broj 610.01) po uputstvu proizvođača. Izolovanje je vršeno iz 100 μ g ukupne RNK, rastvorene u koncentraciji 1 μ g/ μ l. RNK je denaturisana 2 min na 65°C i mešana sa suspenzijom oligo-dT kuglica u 2X puferu za vezivanje, pri čemu dolazi do vezivanja iRNK preko poli(A) kraja za

oligo-dT, dok ostatak RNK ostaje slobodan u supernatantu i odbacuje se. Puferom za pranje ispira se sve što je nespecifično vezano za oligo-dT kuglice, da bi se puferom za eluciju posle 2 minuta zagrevanja na 65°C eluirala poli(A) RNK tj. iRNK. Sva tri korišćena pufera su iz kita, a proizvođač u uputstvu daje sastav pufera:

- 2X pufer za vezivanje: 20mM Tris-HCl pH 7,5; 1M LiCl; 2mM EDTA; 0,4-1% SDS

- Pufer za pranje: 10mM Tris-HCl pH 7,5; 0,15M LiCl; 1mM EDTA; 0,1-3 % SDS

- Pufer za spiranje: 2mM EDTA pH 7,5

Izolovana poli(A)RNK je korišćena odmah, ili čuvana na -70°C do upotrebe.

II 10. Elektroforeza RNK na denaturišućem gelu od agaroze

Zbog sekundarne strukture RNK koja utiče na njenu pokretljivost, elektroforeza se mora vršiti u denaturišućim uslovima i uz punu predostrožnost i zaštitu od enzima RNK-aze. Sastav gela je: 1% agarosa, 1X MOPS pufer, 15,5% formamid, 0,5µg/ml etidijum bromid. Elektroforeza je vršena u 1X MOPS puferu (200mM MOPS, 10mM EDTA, 5mM NaAc pH7). Uzorak za elektroforezu dobijan je mešanjem RNK resuspendovane u vodi, pufera za uzorak i boje BPB(brom phenol blue) u odnosu 1:3:0,3. Pufer za uzorak sastojao se od formamida, 10X MOPS pufera i formaldehida u odnosu 10:2:3. Boja BPB pravljena je po uputstvu iz Sambrook et al. (0,25% BPB i 40% saharoza u vodi). Pre nanošenja na gel uzorak je zagrevan 2 min na 65°C.

II 11. *In vitro* translacija u ekstraktu pšenične klice

In vitro sinteza proteina je vršena pomoću kita za *in vitro* translaciju u ekstraktu pšenične klice proizvođača Promega (kataloški broj L-4330) po uputstvu. Ekstrakt sadrži sve komponente ćelije neophodne za sintezu proteina: tRNK, rRNK, inicijacione, elongacione i terminacione faktore. Takođe, u ekstrakt su

dodati fosfokreatin kinaza i fosfokreatin kao izvor energije, zatim spermidin čija je funkcija da poveća efikasnost elongacije i spreči preranu terminaciju sinteze, kao i magnezijum acetat u koncentracijod 2,5mM koja se preporučuje za translaciju većine iRNK iz različitih izvora. Ekstrakt je obrađen mikrokokalnom nukleazom da bi se eliminisala endogena RNK i time sprečila nespecifična translacija. Ovaj postupak efikasno eliminiše endogene iRNK, ali ne deluje na rRNK koje su neophodna komponenta za *in vitro* translaciju. Kalijum acetat je dodavan u koncentraciji koja se preporučuje za kontrolne RNK (135 mM). U svaku reakcionu smešu dodavan je inhibitor RNK-aze proizvođača Promega (RNazin^R).

U eksperimentima *in vitro* translacije upotrebljavan je eluat dobijen prečišćavanjem 100µg ukupne RNK. Na osnovu podataka iz sličnih sistema očekuje se da iRNK predstavlja 1-5% ukupne RNK, pa je pretpostavljeno da je u svaku reakcionu smešu stavljeno između 1 i 5µg poli(A)RNK.

Svi reagensi iz kita, kao i iRNK, čuvani su na -70°C i otapani su polako, na ledu. Pre dodavanja u reakcionu smešu, iRNK je denaturisana inkubacijom od 10 min na 67°C, posle čega je odmah stavljana na led. Ova inkubacija povećava efikasnost translacije, posebno iRNK sa većom zastupljenošću GC parova koji učestvuju u formiranju sekundarnih struktura. Standardna reakciona smeša je sastavljena na sledeći način i navedenim redosledom:

ekstrakt pšenične klice	25 µl
RNazin (inhibitor RNKaze) u konc. 25 U/µl	2 µl
1 mM smeša aminokiselina bez metionina ili bez leucina	4 µl
K ₃ COOH	3,75 µl
* ³⁵ S-metionin ili ¹⁴ C-leucin	1,5 µl metionina ili 3µl leucina

* L- [³⁵S]-Methionine, SJ1015 Amersham, ≥ 1000Ci/mmol

L-[U-¹⁴C] leucine, 299mCi/mmol, 50µCi/ml

U reakcionu smešu dodavana je poli(A)RNK, smeša je dopunjavana vodom do zapremine od 50 µl i inkubirana 2 h na 25°C.

U kontrolne reakcije dodavano je po 1 μ g kontrolne RNK. Korišćena je RNK virusa BMV koja daje četiri glavna proteinska produkta od 109kDa, 97kDa, 35kDa i 20kDa. Kontrola endogene aktivnosti sistema sadržavala je sve komponente osim RNK.

Produkti *in vitro* translacije analizirani su pomoću SDS-PAGE.

REZULTATI

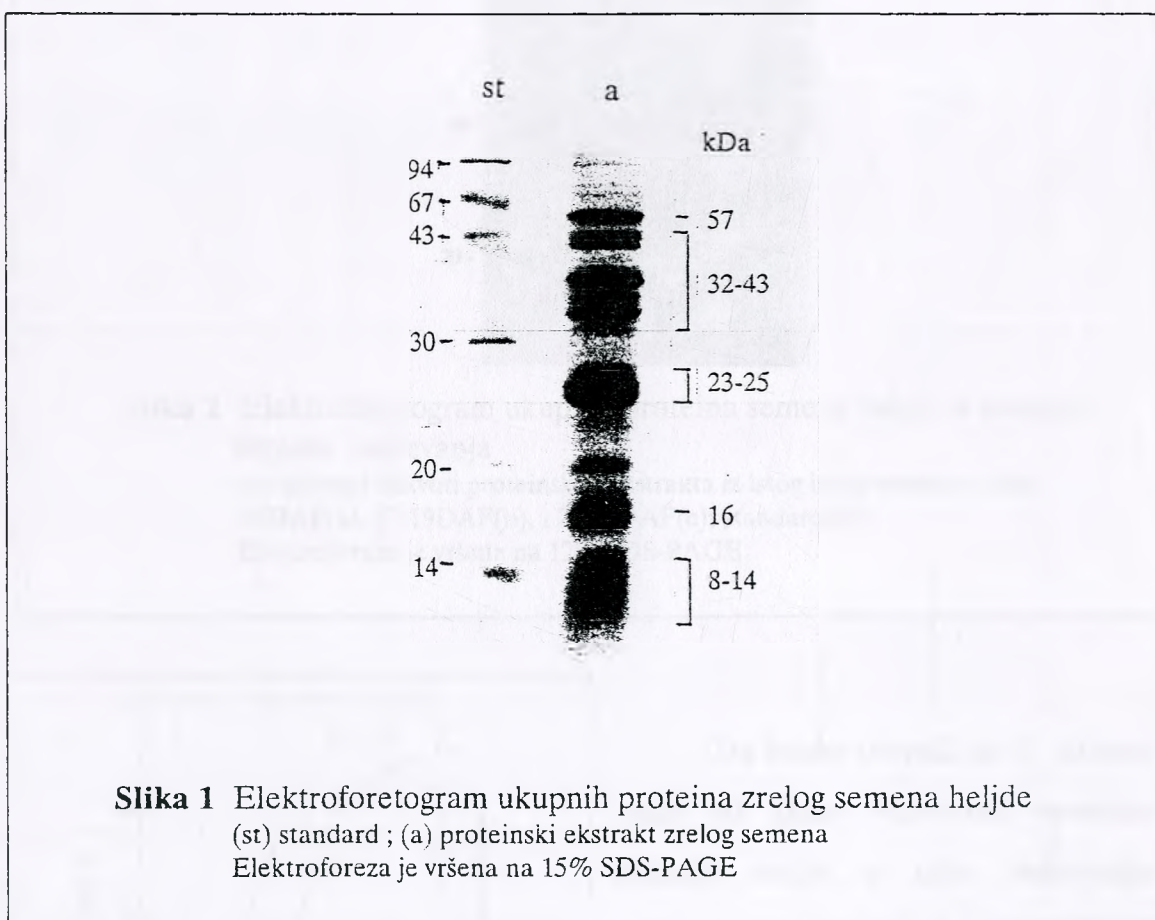
I ANALIZA PROTEINA SEMENA HELJDE

I 1. Proteini semena heljde u razviću

Proces embriogeneze, od pojave cveta heljde do zrelog semena, u našim eksperimentalnim uslovima trajao je prosečno 30 dana. Uobičajeno je da se pojava cveta uzima kao početak embriogeneze, s obzirom da početni događaji oplodjenja i ranih embriogenetskih faza nisu morfološki vidljivi. Semena su sakupljana i klasifikovana prema kriterijumima uočenim za datu fazu razvića (Materijal i metode), koja je onda označavana "danom posle cvetanja" (DAF-days after flowering) kao stadijum 9-11DAF, 14DAF, 17DAF, 19DAF, 23DAF, 28DAF i zrelo seme (zs). Ono što ćemo definisati kao "rana faza sazrevanja semena" (stadijum 9-11DAF), zapravo je početak kasne embriogenetske faze, faze za koju je karakteristična akumulacija rezervi (Uvod). U stadijumu 9-11DAF osovina embriona i kotiledoni su već morfološki definisani. "Srednja faza sazrevanja" obuhvata stadijume od 14DAF do 23DAF. Od stadijuma 28DAF počinje gubljenje vode i završna faza pripreme semena za mirovanje.

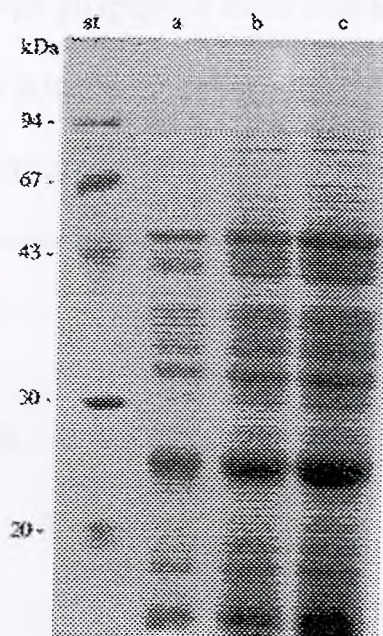
Iz semena u svakoj od naznačenih faza sazrevanja proteini su izolovani ekstrakcijom u puferu koji je sadržavao 0,4M NaCl. Opređenje za ekstrakcioni pufer vršen je na osnovu prethodnih podataka (Belozerski et al., 1975; Radović et al., 1996), da su glavni rezervni proteini heljde - globulini. Proteini su zatim analizirani elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u prisustvu SDSa u denatirujućim i redukujućim uslovima (+ β -merkaptoetanol).

Na Slici 1 prikazan je elektroforetogram ukupnih proteina zrelog semena heljde. Uočava se spektar polipeptida u rasponu od 57kDa do 8kDa. Na osnovu objavljenih podataka (Radović et al.,1996), polipeptid od 57kDa pripada minornoj globulinskoj klasi rezervnih proteina, polipeptidi od 32-43kDa kiselim subjediničnim polipeptidima 13S globulina, polipeptidi od 23-25kDa baznim subjediničnim polipeptidima 13S globulina, a polipeptidi od 8-16kDa albuminskoj frakciji rezervnih proteina. U proteinskom sastavu zrelog semena evidentna je, dakle, izrazita zastupljenost rezervnih proteina, kao što je u literaturi već objavljeno.



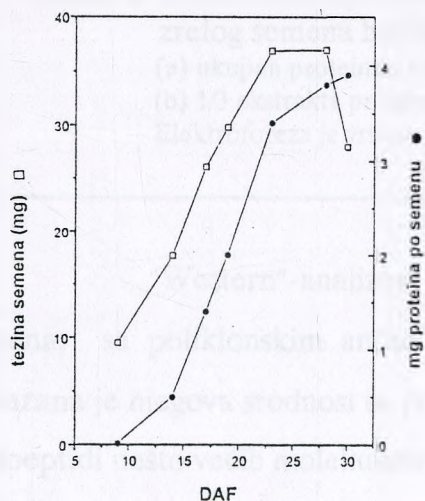
Analiza ukupnih proteina, izolovanih iz semena heljde u različitim stadijumima u sazrevanju (Sl.2), pokazala je da se u srednjim fazama sazrevanja (14DAF-23DAF) javlja isti spektar polipeptida kao u zreloom semenu, samo se količina proteina po semenu povećava od oko 0,5 mg u fazi 14DAF, do oko 3,4 mg u fazi 23DAF (Sl.3). Prema tome, rezervni proteini počinju da dominiraju u ukupnom proteinskom sastavu semena već na stadijumu 14DAF (Sl. 2). Od tog

stadijuma, kroz faze sazrevanja semena, dolazi do dalje progresivne akumulacije ovih proteina, čija količina dostiže maksimum pred samo sazrevanje (Sl.3). Na osnovu Slike 2, ova akumulacija je sinhronizovana za sve tri klase rezervnih proteina od stadijuma 14DAF do zrelog semena.



Slika 2 Elektroforetogram ukupnih proteina semena heljde u srednjim fazama sazrevanja

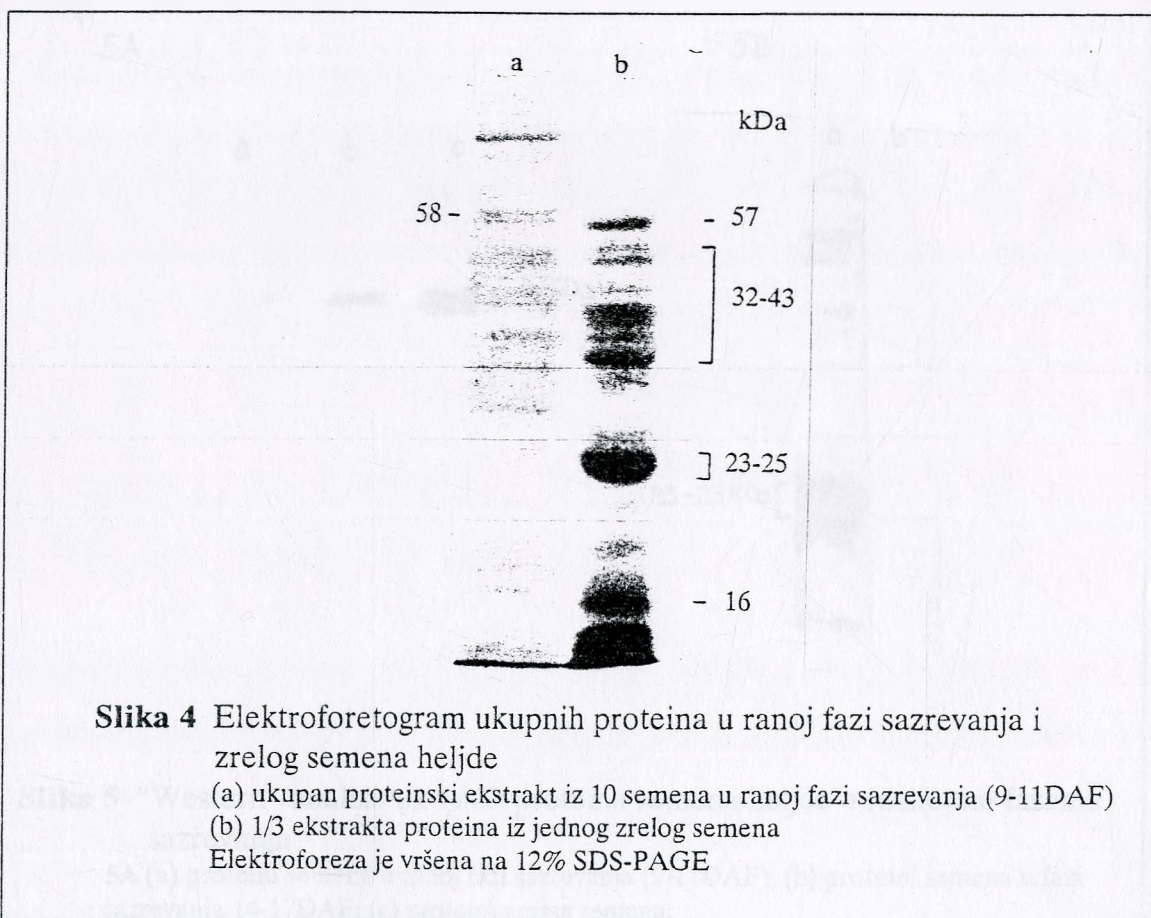
a-c: jednaki alikvoti proteinskog ekstrakta iz istog broja semena u fazi 14DAF(a), 17-19DAF(b), i 21-23DAF(c); standard(st)
Elektroforeza je vršena na 12% SDS-PAGE



Slika 3 Porast količine proteina i težine semena u toku sazrevanja

Da bismo utvrdili da li sinteza neke od klasa rezervnih proteina počinje ranije u toku sazrevanja semena, elektroforetski su analizirani proteini izolovani iz semena u fazi 9-11DAF. Količina proteina po semenu u ovoj fazi je i do 200 puta manja nego u zreлом semenu (Sl. 3).

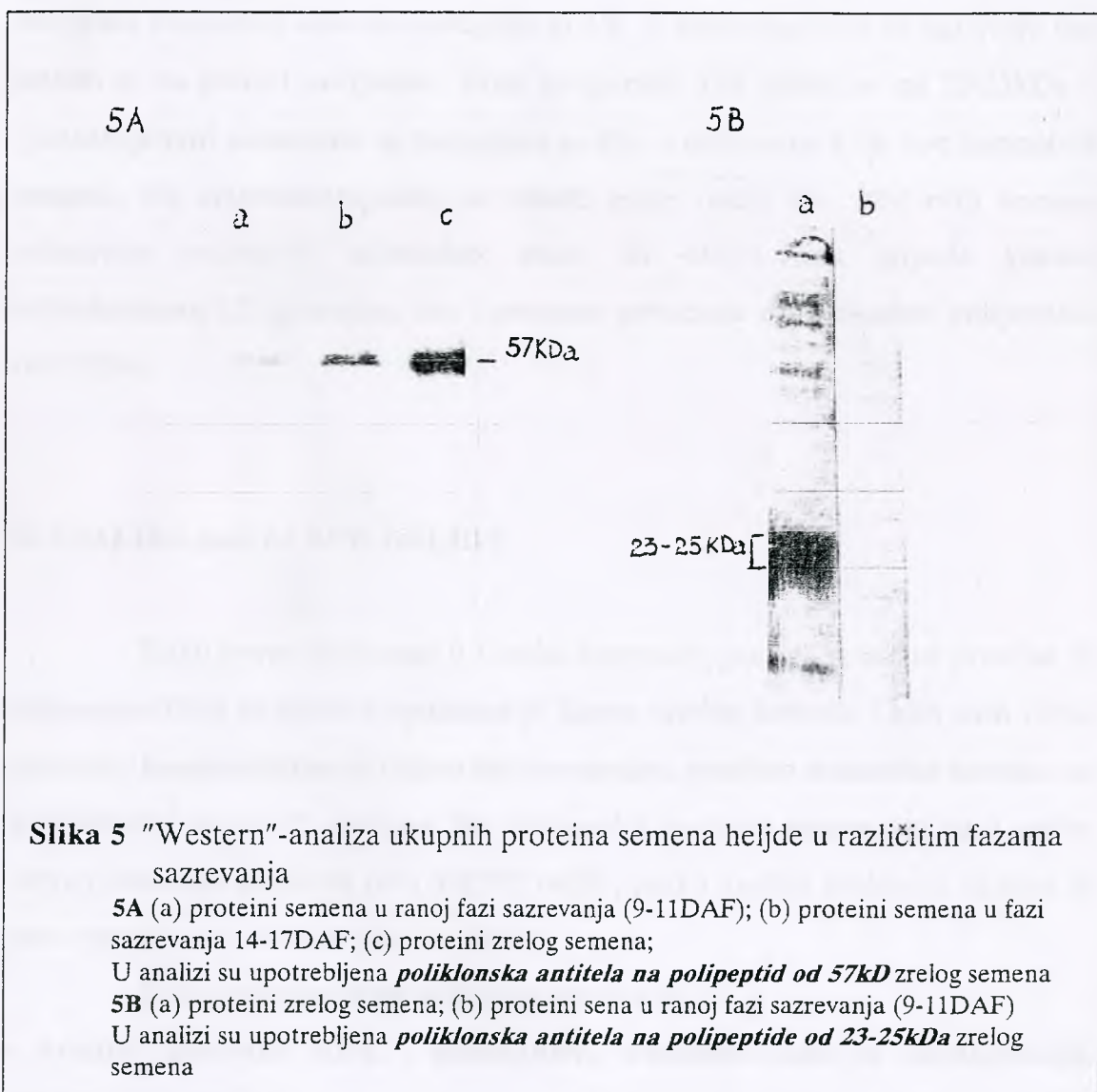
Na Slici 4 vidi se da je u ovoj fazi prisutan različit set polipeptida u odnosu na zrelo seme i seme u srednjim fazama sazrevanja. U proteinskom sastavu semena ove faze uočava se polipeptid od oko 90kDa, par polipeptida od 57-58kDa, grupa polipeptida od 43-30kDa i grupa polipeptida male molekulske mase od 8-18kDa. Polipeptidi od 23-25kDa, koji pripadaju baznim subjediničnim polipeptidima 13S globulina, nisu uočeni među proteinima rane faze sazrevanje semena.



"Western"-analizom proteina izolovanih iz rane faze sazrevanja semena, sa poliklonskim antitelima na "zreli" polipeptid od 57kDa (Sl. 5A), pokazana je njegova srodnost sa polipeptidima od 57-58 kDa rane faze, iako su ovi polipeptidi nešto većih molekulske masa.

"Western"-analiza, upotrebom antitela na bazne subjedinične polipeptide 13S globulina od 23-25kDa (Sl.5B), pokazala je da ova antitela ne reaguju ni sa jednim polipeptidom rane faze sazrevanja semena.

U ranoj fazi sazrevanja prisutan je i proteinski set od 8-16kDa koji odgovara rezervnim albuminima, uz napomenu da je njihova identifikacija izvršena samo na osnovu elektroforetske pokretljivosti, a nije dokazana imunološkim metodama.



Slika 5 "Western"-analiza ukupnih proteina semena heljde u različitim fazama sazrevanja

5A (a) proteini semena u ranoj fazi sazrevanja (9-11DAF); (b) proteini semena u fazi sazrevanja 14-17DAF; (c) proteini zrelog semena;

U analizi su upotrebljena **poliklonska antitela na polipeptid od 57kD** zrelog semena

5B (a) proteini zrelog semena; (b) proteini semena u ranoj fazi sazrevanja (9-11DAF)

U analizi su upotrebljena **poliklonska antitela na polipeptide od 23-25kDa** zrelog semena

Primećuje se promena u zastupljenosti pojedinih polipeptidnih klasa u odnosu na kontrolna semena heljde koja je rasla u prisustvu sulfata, ili na prirodnoj podlozi. Ovaj efekat je posebno uočljiv kod polipeptida od 16kDa (albuminska frakcija rezervnih polipeptida) i polipeptidnoj grupi od 23-25kDa (bazni polipeptidi 13S globulina). Proporcija ovih polipeptida u ukupnom proteinskom sastavu je bitno smanjena. Albuminski polipeptid od 16kDa, koji je u ukupnom proteinskom ekstraktu kontrolnih semena zastupljen sa 6%, u semenima koja su sazrevala bez sulfata je na granici uočljivosti. Bazni polipeptidi 13S globulina od 23-25kDa u "pothranjenim" semenima su zastupljeni sa 6%, u odnosu na 11% kod kontrolnih semena. Na elektroforetogramu se takođe može uočiti da kod ovih semena odsustvuje polipeptid molekulske mase od 43kDa koji pripada kiselim subjedinicama 13S globulina, kao i umereno povećanje zastupljenosti polipeptida od 57kDa.

II ANALIZA poli(A) RNK HELJDE

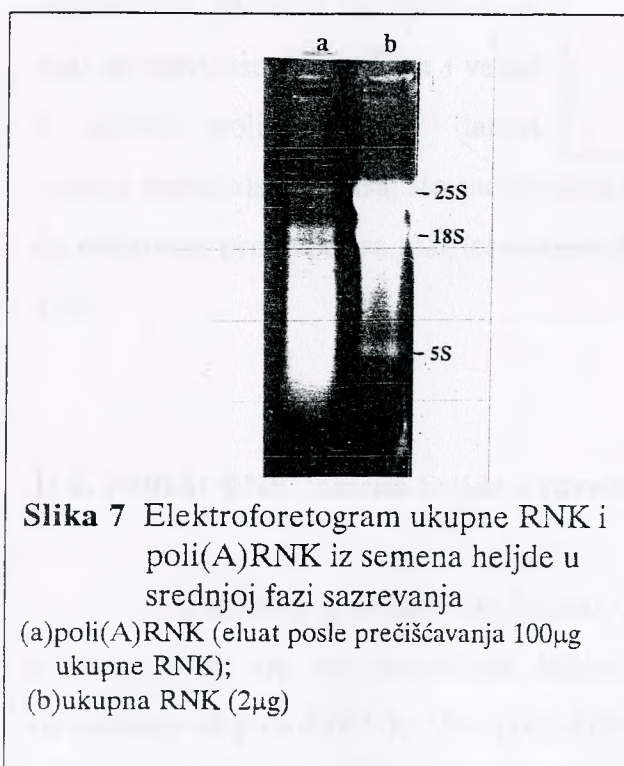
Kako je već definisano u Uvodu, ekspresija gena za rezervne proteine je organ-specifična za seme i regulisana je fazom razvića semena. Osim ovih nivoa kontrole, karakterističan je i uticaj faktora sredine, posebno mineralne ishrane, na kompoziciju rezervnih proteina. Svi ovi aspekti kontrole razmatrani su u našim eksperimentima analizom poli(A)RNK heljde, preko analize proizvoda njihove *in vitro* translacije u sistemu pšenične klice.

Preliminarnim eksperimentima utvrđen je:

- kvalitet izolovane RNK i poli(A)RNK, elektroforezom na denaturišućim agaroznim gelovima i
- efikasnost i vernost *in vitro* sinteze u ekstraktu pšenične klice, upotrebom standardnih iRNK definisanih dužina .

Izolovanje ukupne RNK i poli(A)RNK može biti kritična tačka u eksperimentima zbog mogućnosti kontaminacije RNK-azom i dobijanja delimično

degradovane RNK kao matrice u *in vitro* translaciji, što bi dalo artefaktne rezultate. Da bi se izbegla ova opasnost, svi izolovani uzorci RNK su pre *in vitro* translacije analizirani elektroforezom na agaroznom gelu u denaturišućim uslovima i uz prethodno zagrevanje 10 min na 65°C. Na Slici 7 prikazano je elektroforetsko razdvajanje ukupne RNK izolovane iz semena heljde u srednjoj fazi sazrevanja i poli(A)RNK koja je dobijena njenim prečišćavanjem na magnetnim kuglicama sa oligo(dT). Uobičajeni kriterijumi za kvalitet ukupne RNK - da jasno budu definisane trake 25S i 18S ribozomalnih RNK i da njihov odnos bude 2:1, u našim eksperimentima je zadovoljen. Što se tiče poli(A)RNK, može se uočiti da se u okviru spektra molekulskih masa, javlja niz diskretnih traka koje su rezultat



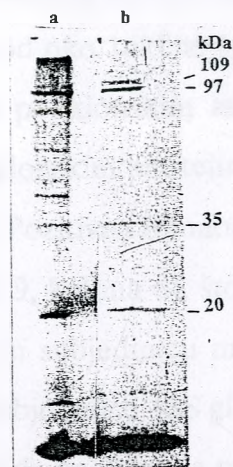
Slika 7 Elektroforetogram ukupne RNK i poli(A)RNK iz semena heljde u srednjoj fazi sazrevanja
 (a) poli(A)RNK (eluat posle prečišćavanja 100 μ g ukupne RNK);
 (b) ukupna RNK (2 μ g)

visoke zastupljenosti određenih klasa poli(A)RNK. Ovakva situacija je karakteristična samo za ona tkiva kod kojih postoji specifična ekspresija određenih grupa gena, kakvo je i seme u razviću. Na osnovu pokretljivosti ribozomalnih RNK, izračunate su dimenzije ovih traka i one iznose oko 1540bp, 1100bp, 870bp i 670bp. Trake od 1900bp i 4200bp odgovaraju pozicijama 18S i 25S rRNK i uobičajeno se javljaju kao kontaminacija poli(A)RNK koja se dobija prečišćavanjem na

kolonicama sa oligo(dT).

Efikasnost i vernost ekstrakta pšenične klice, kao sistema za *in vitro* translaciju, testirana je analizom translacionih proizvoda standardnih RNK.

U našim eksperimentima upotrebljena je RNK virusa BMV (bromo mosaik virus) sa četiri translaciona proizvoda od 109kDa, 97kDa, 35kDa i 20kDa. Slika 8 prikazuje fluorografiju ovih translacionih proizvoda obeleženih ^{35}S -metioninom i ^{14}C -leucinom. Molekulske mase *in vitro* sintetisanih proizvoda odgovaraju očekivanim. Može se zaključiti da je dati *in vitro* sistem efikasan i veran u sintezi polipeptida u datom



Slika 8 Fluorografija elektroforetograma proizvoda *in vitro* translacije RNK virusa BMV obeleženih
(a) ^{35}S -metioninom
(b) ^{14}C -leucinom

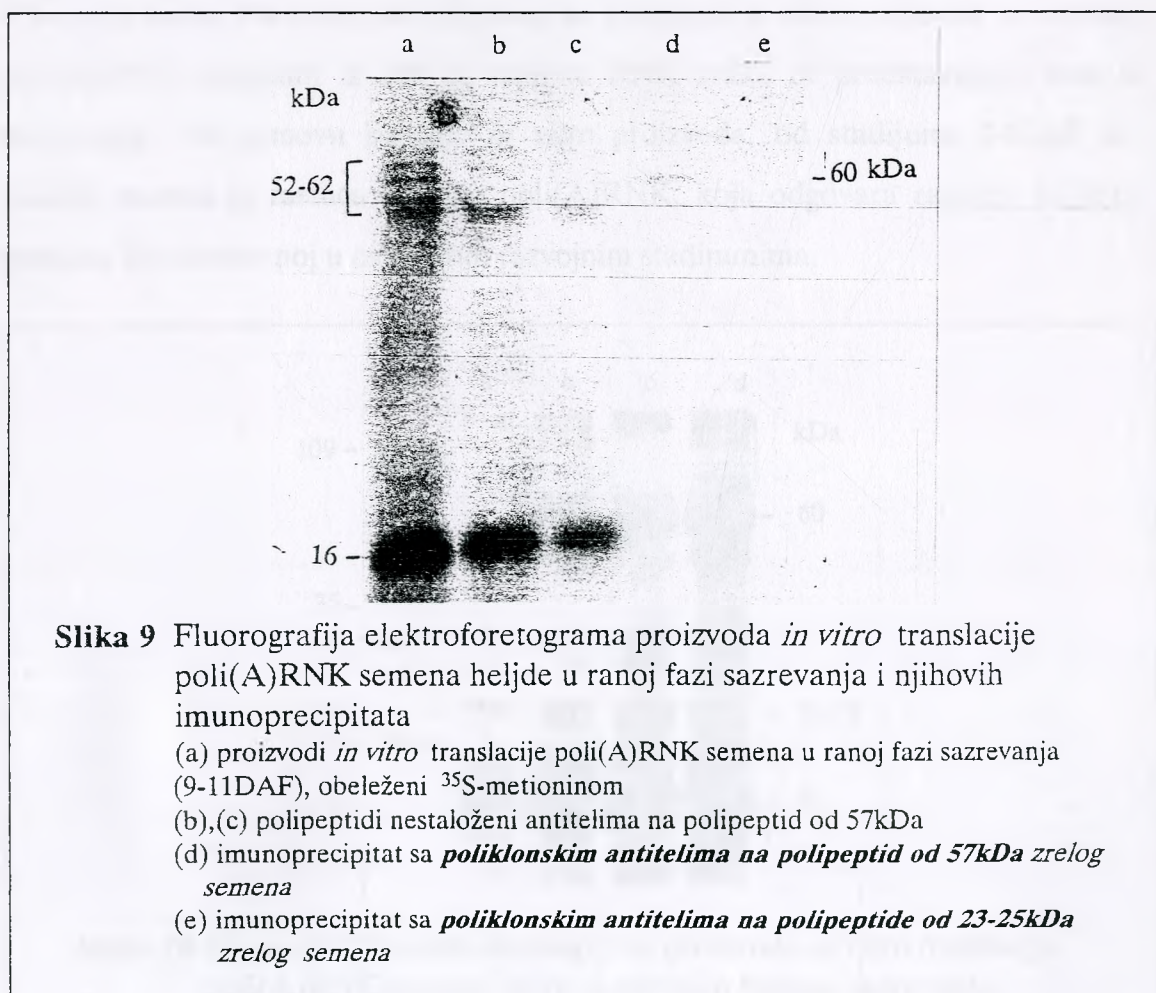
opsegu molekulskih masa, što zadovoljava potrebe naših eksperimenata, s obzirom da očekivani proizvodi sa matrica poli(A)RNK iz semena heljde ne prelaze 60-70 kDa.

II 1. Poli(A) RNK semena heljde u razviću

Iz semena u definisanim fazama u sazrevanju izolovana je ukupna RNK, a zatim je iz nje, na specifičnim kolonicama sa oligo(dT), izdvojena frakcija obogaćena sa poli(A)RNK. Ova poli(A)RNK analizirana je u eksperimentima *in vitro* translacije u ekstraktu pšenične klice. Cilj ovih analiza je bio da se proteinski sastav uporedi sa sastavom iRNK koje su raspoložive u semenu u datoj fazi razvića. Ovo poređenje trebalo je da pruži elemente za odgovor na pitanje da li je sastav proteina semena u razviću definisan u prvom redu sastavom i nivoom iRNK za pojedine polipeptide, ili postoje drugi elementi kontrole.

Na Slici 9 pokazana je fluorografija elektroforetski razdvojenih produkata *in vitro* translacije poli(A)RNK izolovanih iz semena u ranoj fazi sazrevanja (9-11DAF) obeleženih ^{35}S -metioninom. Proizvodi *in vitro* translacije

iRNK rane faze sazrevanja (Sl. 9, kolona a) su četiri polipeptida u rasponu od 52-62 kDa i grupa polipeptida bliskih molekulskih masa od oko 16kDa. Identifikacija ovih polipeptida urađena je imunoprecipitacijom sa poliklonskim antitelima na polipeptid od 57kDa (subjedinica mc globulina) i poliklonskim antitelima na bazne polipeptide (23-25kDa) 13S globulina zrelog semena. Pozitivna imunoprecipitacija dobijena je sa antitelima na polipeptid od 57 kDa (Sl. 9, kolona d), što znači da *in vitro* proizvod od 60kDa, odgovara poli(A)RNK za tu subjedinicu mc globulina. Odsustvo imunoprecipitacije sa antitelima na bazne subjedinice 13S globulina (23-25kDa), znači da nijedan od dobijenih *in vitro* proizvoda ne pripada prekursorima ovih subjediničnih polipeptida 13S globulina.

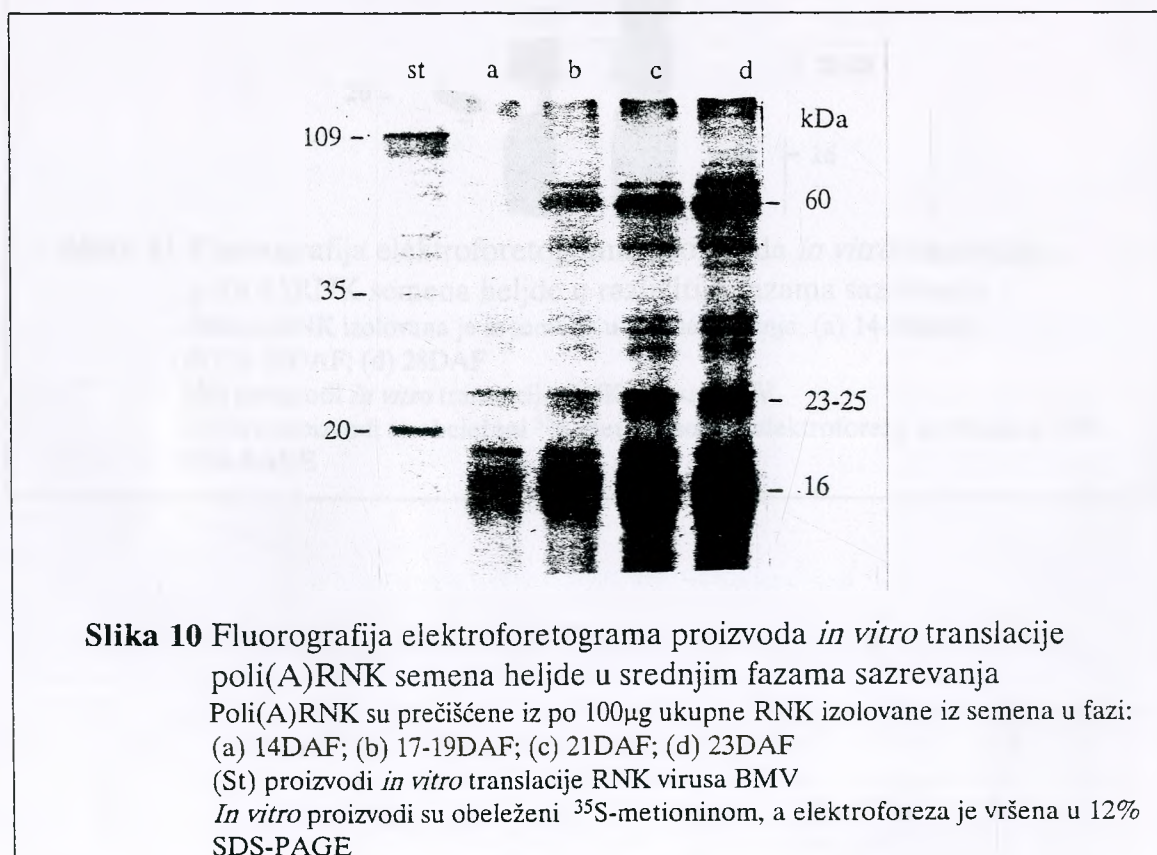


Odsustvo *in vitro* translacionih proizvoda koji odgovaraju bilo individualnim baznim polipeptidima 13S globulina od 23-25kDa, bilo njihovim

prekursorskim formama, konstatovano za poli(A)RNK rane faze sazrevanja, odgovara proteinskom sastavu date faze na bojenom gelu, gde ovi polipeptidi takođe nisu uočeni (Sl.4)

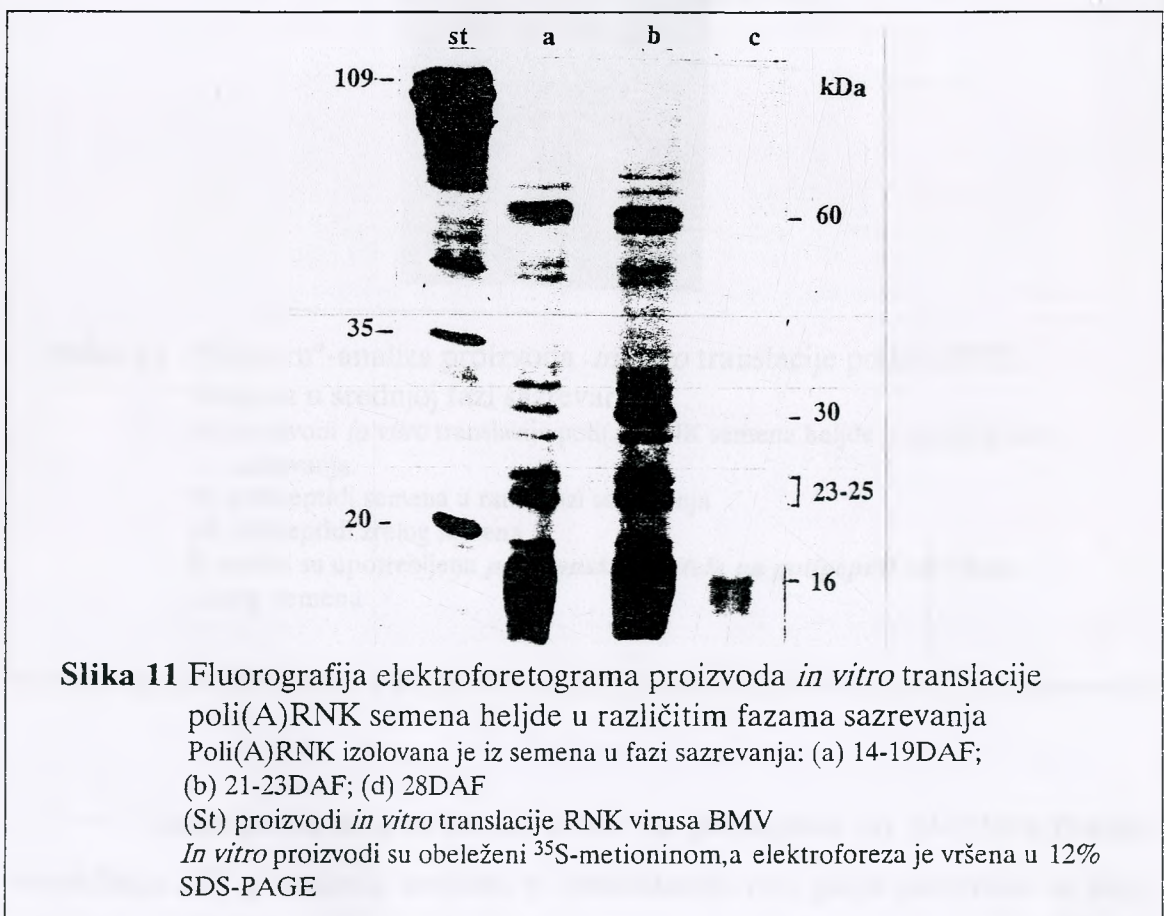
In vitro proizvodi od oko 16kDa, po pokretljivosti odgovaraju albuminskoj frakciji rezervnih proteina, ali je njihova zastupljenost među *in vitro* proizvodima daleko veća, u odnosu na zastupljenost ovih proteina na bojenim gelovima.

Analiza proteina pokazala je da do progresivne akumulacije rezervnih proteina dolazi u srednjoj fazi sazrevanja semena. Na Slici 10 prikazana je fluorografija elektroforetski razdvojenih produkata *in vitro* translacije poli(A)RNK izolovanih iz semena heljde u toj srednjoj fazi sazrevanja (14-23DAF), obeleženih ³⁵S-metioninom. Na elektroforetogramu su prikazani *in vitro* proizvodi sa matrica poli(A)RNK dobijenih iz 100 µg ukupne RNK svake of predstavljenih faza u sazrevanju. Na osnovu količine *in vitro* proizvoda, od stadijuma 14DAF do 23DAF uočena je rastuća količina poli(A)RNK, koja odgovara rastućoj količini proteina konstatovanoj u ovim istim razvojnim stadijumima.

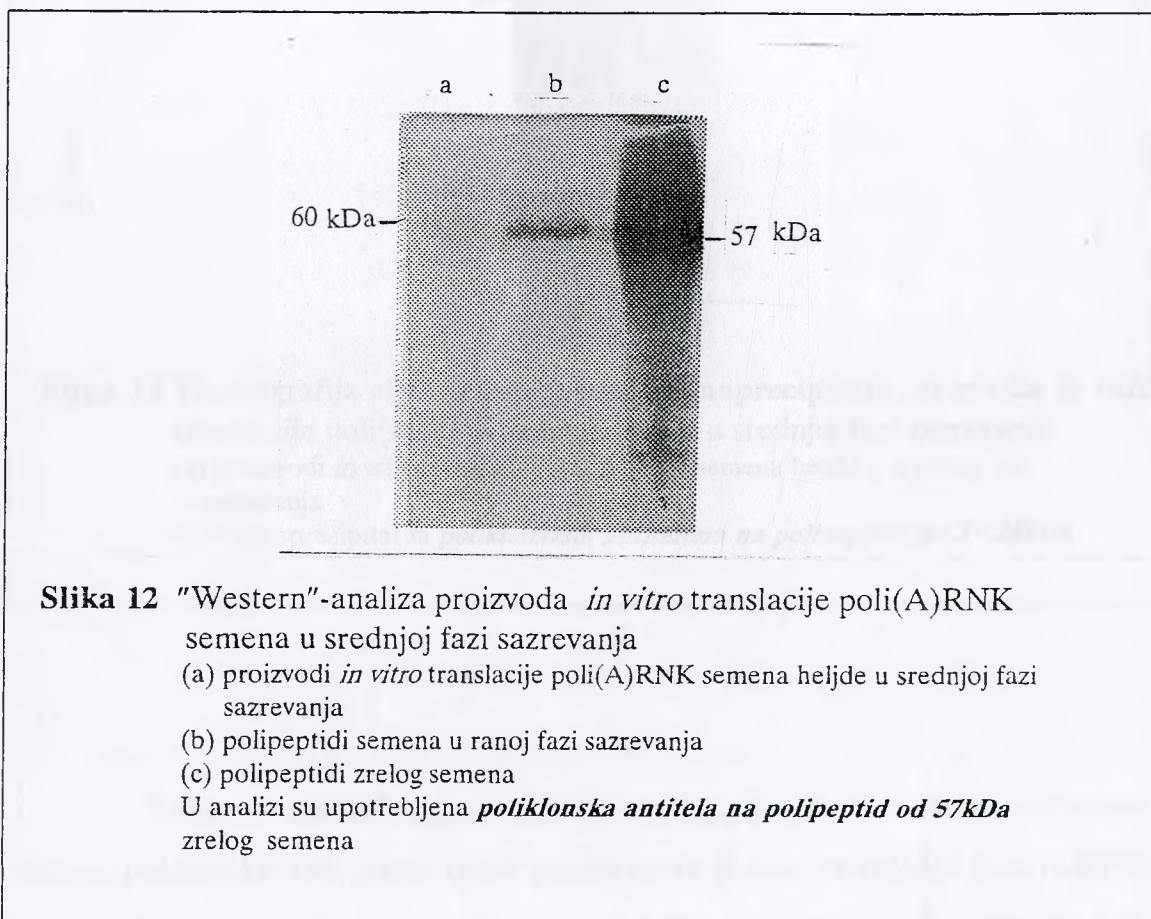


U semenima pred sazrevanje (stadijum 28DAF), konstatovan je dramatičan pad na ovaj način detektovane količine poli(A)RNK (Sl. 11), što je u skladu sa uočenom dinamikom proteinske sinteze pred sazrevanje semena (Sl. 3).

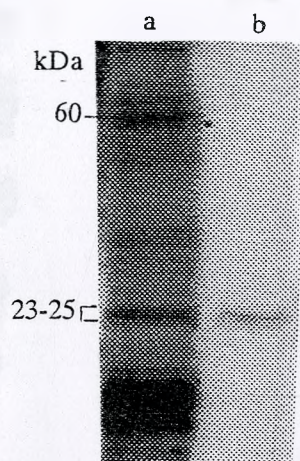
Sudeći po pokretljivosti proizvoda *in vitro* translacije, u srednjim fazama sazrevanja mogu se konstatovati polipeptidi molekulske masa bliskih subjedinicama rezervnih proteina: *in vitro* proizvodi od oko 60kDa, od oko 23-25kDa, kao i polipeptidi od oko 16kDa (sl.10 i 11). Identifikovanje proizvoda *in vitro* translacije vršeno je upotrebom poliklonskih antitela.



"Western"-analizom (sl.12) pokazano je da proizvod *in vitro* translacije od oko 60kDa reaguje sa antitelima na polipeptid od 57kDa (subjedinica me globulina). Po molekulskoj masi ovaj *in vitro* proizvod odgovara proizvodu dobijenom *in vitro* translacijom poli(A)RNK rane faze sazrevanja koji je imunoprecipitirao sa istim antitelima(sl.9).

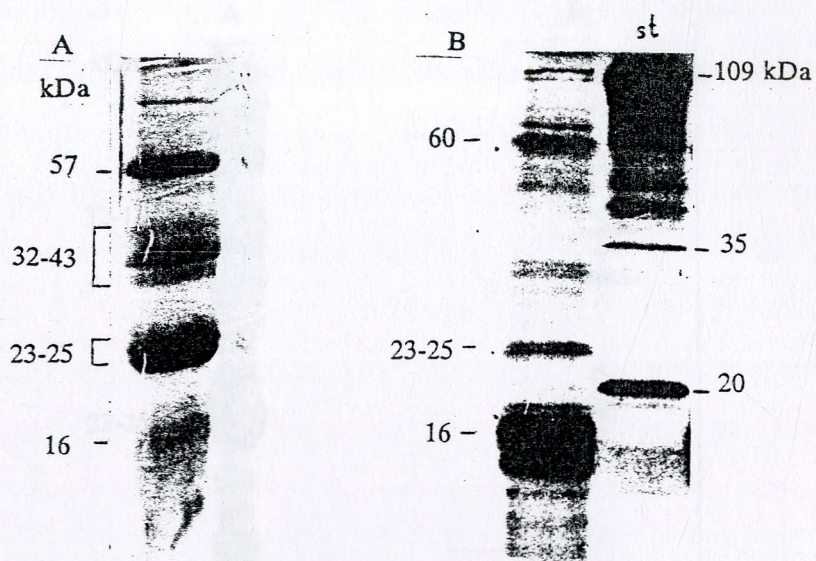


Imunoprecipitacijom sa antitelima na polipeptide od 23-25kDa (bazne subjedinice 13S globulina), izvršena je identifikacija ove grupe proizvoda *in vitro* translacije koji odgovaraju proizvodima sa individualnih iRNK za date bazne polipeptide (sl.13). Ova antitela nisu reagovala ni sa jednim od polipeptida većih molekulskih masa koji bi odgovarali eventualnim prekursorskim molekulima.



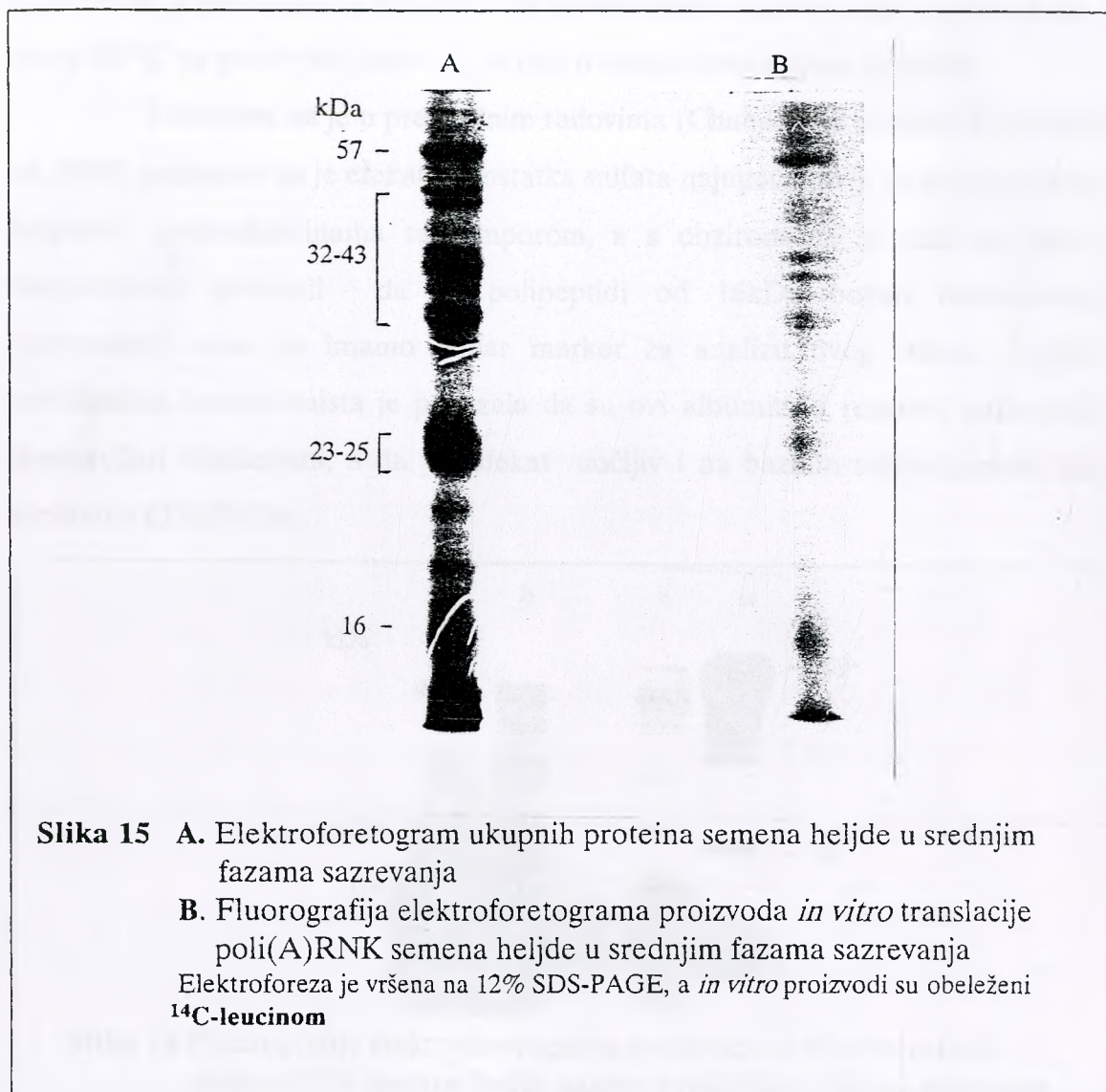
Slika 13 Fluorografija elektroforetograma **imunoprecipitata** proizvoda *in vitro* translacije poli(A)RNK semena heljde u srednjoj fazi sazrevanja
 (a) proizvodi *in vitro* translacije poli(A)RNK semena heljde u srednjoj fazi sazrevanja
 (b) imunoprecipitat sa **poliklonskim antitelima na polipeptide od 23-25kDa**

Jedina subjedinična grupa koja odsustvuje, ili nije zastupljena adekvatno sastavu polipeptida ove grupe, među proizvodima *in vitro* translacije poli(A)RNK srednje faze sazrevanja semena, je grupa kiselih polipeptida 13S globulina (32-43kDa). Osim ovoga, zastupljenost polipeptida koji odgovaraju albuminskim od oko 16kDa i manjih Mw, među *in vitro* proizvodima je značajno veća u poredjenju sa zastupljenošću ove frakcije u proteinskom profilu date faze ili zrelog semena (sl. 14). Ista situacija je uočena i među *in vitro* proizvodima rane faze (sl.9). Oba ova podatka - odsustvo kiselih polipeptida 13S globulina i prezastupljenost albumina, ukazivali su na mogućnost da su dobijeni rezultati posledica sadržaja metionina u ovim polipeptidima.



Slika 14 A. Elektroforetogram ukupnih proteina semena heljde u srednjim fazama sazrevanja
 B. Fluorografija elektroforetograma proizvoda *in vitro* translacije poli(A)RNK semena heljde u srednjim fazama sazrevanja
 Elektroforeza je vršena na 15% SDS-PAGE, a *in vitro* proizvodi su obeleženi ³⁵S-metioninom; (st) proizvodi *in vitro* translacije RNA virusa BMV

Zbog toga je poli(A)RNK iz semena u srednjoj fazi sazrevanja analizirana u *in vitro* sistemu, u kome je umesto ³⁵S-metionina, upotrebljen ¹⁴C-leucin. Na Slici 15 pokazano je da je u ovom slučaju sastav proizvoda *in vitro* translacije adekvatan proteinskom sastavu date faze i da je među proizvodima sa poli(A)RNK srednje faze sazrevanja prisutan kompletan set polipeptida koji pripadaju svim trima klasama rezervnih proteina: 13S globulinima (23-25kDa i 32-43 kDa), mc-globulinima(60 kDa) i albuminima(8-16kDa). Posebno treba uočiti podatak da su svi polipeptidi reprezentovani individualnim iRNK, tj da se ne mogu uočiti, kao dominirajući, proizvodi sa eventualnih prekursorskih iRNK.

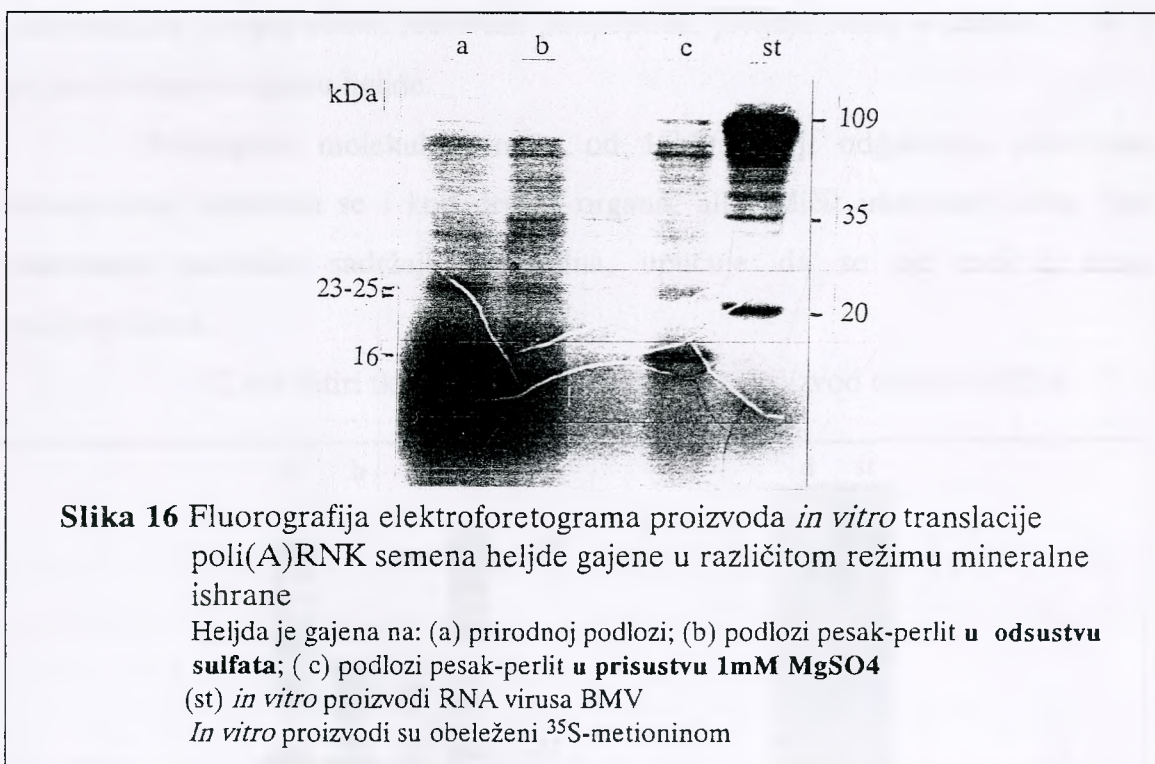


II 2. Uticaj faktora mineralne ishrane na sastav poli(A)RNK semena u razviću

Poli(A)RNK izolovana je iz semena heljde u srednjoj fazi sazrevanja koja je gajena u specifičnom režimu ishrane u kome su, od momenta cvetanja, sulfati bili potpuno isključeni (Materijal i metode), a zatim je urađena njena *in vitro* translacija. Ova analiza je urađena da bi se promena koja je uočena u proteinskom sastavu kod ovih semena (Sl.6), uporedila sa sastavom poli(A)RNK,

tj. da bi se dobio odgovor na pitanje da li nedostatak sulfata utiče preko nivoa i vrsta iRNK na proteinski sastav, ili se radi o drugim elementima kontrole.

S obzirom da je u prethodnim radovima (Chandler et al.,1983; Higgins et al.,1986) pokazano da je efekat nedostatka sulfata najupečatljiviji na polipeptidima bogatim aminokiselinama sa sumporom, a s obzirom da su naši prethodni eksperimenti pokazali da su polipeptidi od 16kDa bogati metioninom, pretpostavili smo da imamo dobar marker za analizu ovog efekta. Analiza proteinskog sastava zaista je pokazala da su ovi albuminski rezervni polipeptidi dramatično redukovani, a da je efekat uočljiv i na baznim subjedinicama 13S globulina (23-25kDa).



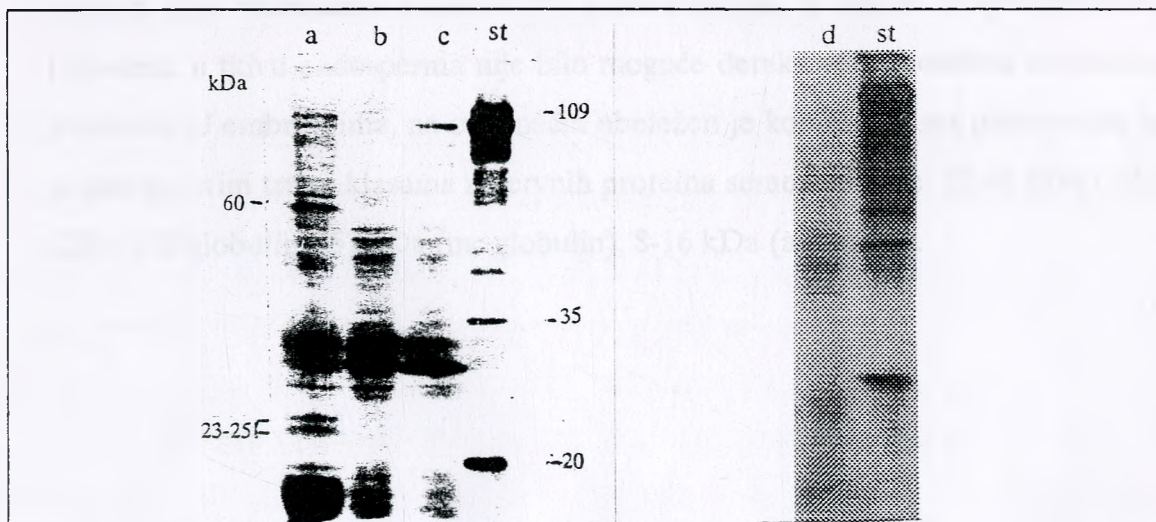
Na Slici 16 pokazana je fluorografija elektroforetskog razdvajanja proizvoda *in vitro* translacije poli(A)RNK izolovane iz semena heljde koja je gajena bez sulfata u poređenju sa kontrolnim semenima (u prisustvu sulfata) i semenima heljde koja je gajena na prirodnim podlogama. Uočljivo je da je dramatično smanjenje sadržaja polipeptida od 16kDa i smanjenje sadržaja baznih polipeptida 13S globulina (23-25kDa), praćeno adekvatnim promenama u sastavu iRNK. Proizvodi *in vitro* translacije u oblasti ovih molekulskih masa su značajno redukovani.

II 3. Analiza poli(A)RNK različitih organa heljde

Jedna od karakteristika regulacije ekspresije gena za rezervne proteine semena je obezbeđivanje ekspresije samo u tkivima semena, a ne i u drugim biljnim organima. Da bi se ustanovilo da li se ova regulacija odvija preko sastava iRNK, izolovali smo poli(A)RNK iz različitih organa heljde: cveta, lista, hipokotila i semena, a zatim smo analizirali proizvode njihove *in vitro* translacije. Na Slici 17 prikazana je fluorografija elektroforetskog razdvajanja proizvoda *in vitro* translacije poli(A)RNK izolovanih iz cveta, hipokotila, semena i lista. Može se uočiti da se polipeptidi od 60kDa i par polipeptida od 23-25kDa, koji odgovaraju subjediničim polipeptidima rezervnih polipeptida, javljaju samo u semenu, a ni u jednom drugom organu heljde.

Polipeptidi molekulske mase od 16kDa, koji odgovaraju rezervnim albuminima, uočavaju se i kod drugih organa, ali različit intenzitet traka, kao verovatna posledica sadržaja metionina, upućuje da se ne radi o istim polipeptidima.

U sva četiri tkiva primećuje se *in vitro* proizvod od oko 30kDa.

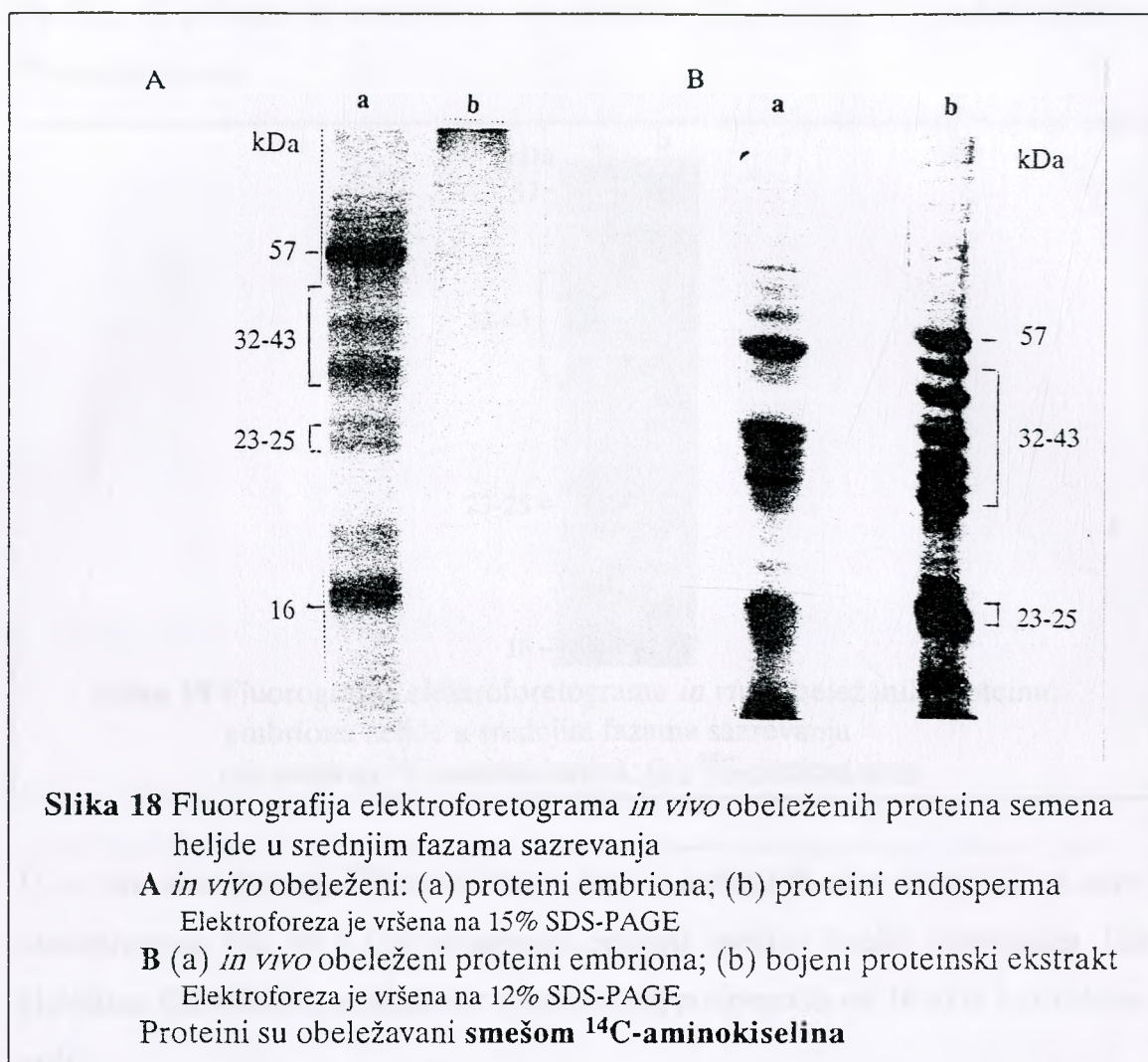


Slika 17 Fluorografija elektroforetograma proizvoda *in vitro* translacije poli(A)RNK različitih organa heljde (a) seme u srednjim fazama sazrevanja; (b) hipokotil; (c) cvet; (d) list (st) *in vitro* proizvodi RNA virusa BMV *In vitro* proizvodi su obeleženi ³⁵S-metioninom

III *IN VIVO* OBELEŽAVANJE PROTEINA SEMENA HELJDE

S obzirom da rezultati *in vitro* translacije daju podatke samo o iRNK raspoloživim u datim fazama sazrevanja semena, da bi se dobili dodatni podaci o mehanizmima u biosintezi rezervnih proteina na nivou regulacije translacije i eventualne posttranslacione obrade, urađeno je kratkotrajno *in vivo* obeležavanje proteina upotrebom ^{35}S -metionina i ^{14}C -smeše aminokiselina, a zatim je sudbina obeleženih polipeptida praćena u eksperimentima "hlađenja", tj. posle prebacivanja u neradioaktivni medijum u trajanju od 4h i preko noći.

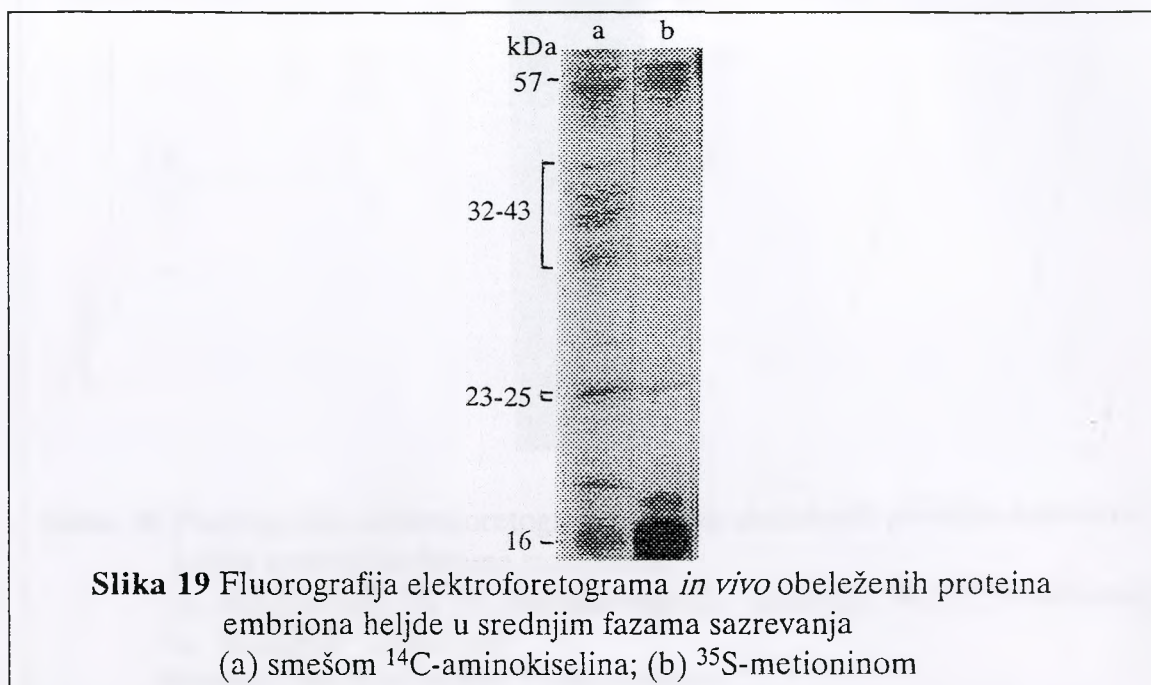
Pošto smo želeli da vidimo da li se sinteza rezervnih polipeptida odvija samo u embrionu ili i u tkivu endosperma, ova dva semenska elementa su razdvojena i *in vivo* obeležavanje je urađeno sa svakim od njih. Na Slici 18 prikazani su proizvodi *in vivo* obeležavanja embriona i endosperma semena srednje faze sazrevanja smešom ^{14}C -aminokiselina. U našim eksperimentalnim uslovima, u tkivu endosperma nije bilo moguće detektovati obeleženi translacioni proizvod. U embrionima, na ovaj način obeležen je kompletan set polipeptida koji pripadaju svim trima klasama rezervnih proteina semena heljde: 32-43 kDa i 23-25 kDa (13S globulin), 57 kDa (mc globulin), 8-16 kDa (albumini).



Dobijeni spektar odgovara onom dobijenom u *in vitro* translaciji kada je upotrebljen ^{14}C -leucin (Sl. 15). U oba slučaja, *in vitro* i *in vivo*, rezervni proteini dominiraju u potpunom polipeptidnom sastavu koji odgovara slici dobijenoj bojenjem izolovanih proteina iz semena date faze sazrevanja. Osim ovoga, bitno je uočiti da prisustvo prekursorskih formi većih molekulskih masa nije uočeno posle kratkotrajnog *in vivo* obeležavanja, što je u saglasju sa rezultatima dobijenim *in vitro*.

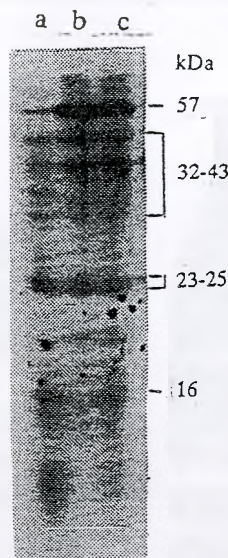
Pretpostavka da je odsustvo kiselih polipeptidnih subjedinica 13S globulina (32-43kDa) i prezastupljenost albuminskih među *in vitro* proizvodima obeleženih ^{35}S -metioninom, posledica sadržaja ove aminokiseline, potvrđeno je i obeležavanjima *in vivo*.

Na Slici 19 prikazan je rezultat *in vivo* obeležavanja smešom ^{14}C -aminokiselina i ^{35}S -metioninom.



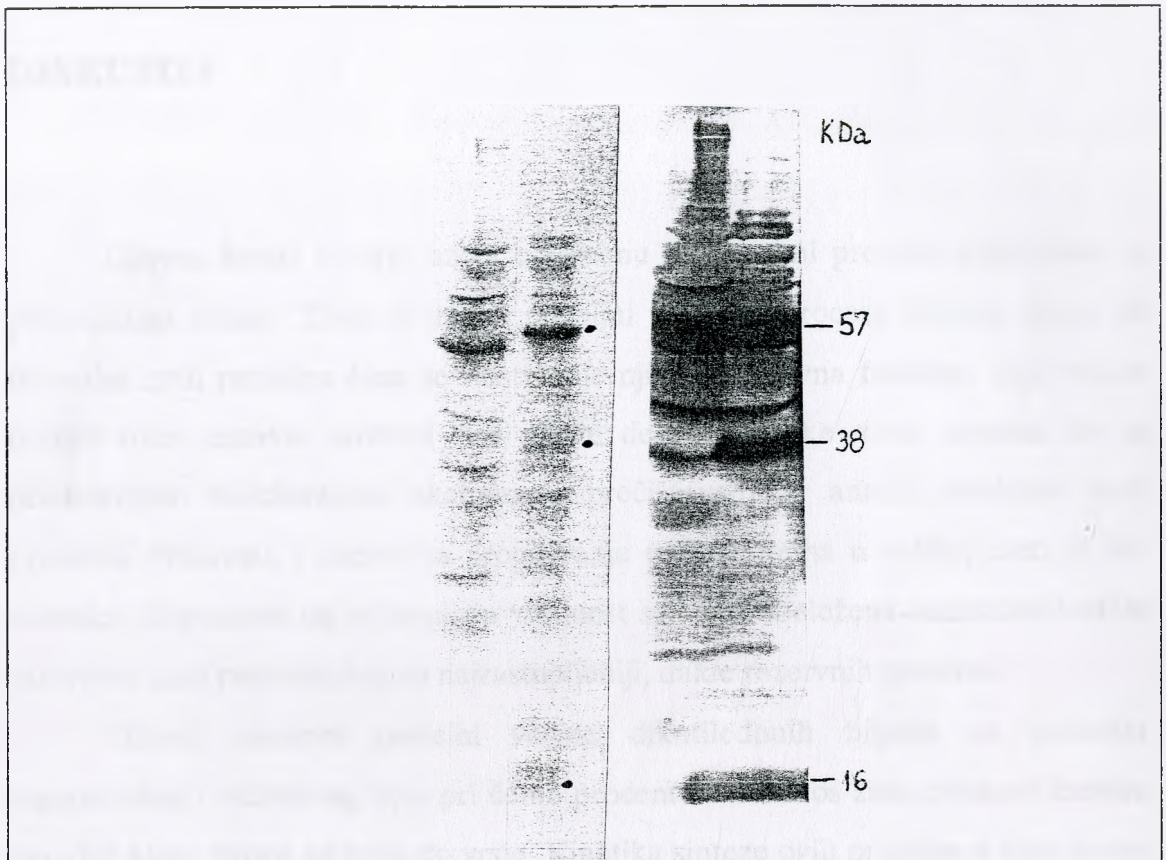
U *in vivo* obeležavanju ^{35}S -metioninom, kao i u slučaju *in vitro* translacije sa istim obeleživačem (Sl. 10 i 11), odsustvuje potpuni spektar kiselih subjedinica 13S globulina (32-43kDa), a intenzitet albuminskog polipeptida od 16 kDa je značajno veći.

Odsustvo prekursorskih translacionih proizvoda, uočeno u našim *in vivo* obeležavanjima, inače karakterističnih za rezervne proteine leguminskog tipa (Uvod), potvrđeno je u eksperimentima "hlađenja" u kojima su semena posle obeležavanja inkubirana u hranljivom medijumu sa smešom neradioaktivnih aminokiselina u trajanju od 4 h i preko noći (slika20). Ako se izuzme delimično variranje u zastupljenosti pojedinih obeleženih polipeptida (koje se može smatrati posledicom prirodne varijabilnosti među konkretnim semenima na kojima su rađeni eksperimenti), generalne proteinske slike "obeleženog semena" spram "obeleženog pa hladenog", nemaju značajnijih razlika. I u jednom i u drugom slučaju prisutne su obe subjedinične grupe koje pripadaju 13S globulinu.



Slika 20 Fluorografija elektroforetograma *in vivo* obeleženih proteina embriona heljde u srednjim fazama sazrevanja (a) obeležavanje 1h; (b) obeležavanje 1h, "hlađenje" 4h; (c) obeležavanje 1h, "hlađenje" preko noći
Proteini su obeleženi smešom ^{14}C -aminokiselina

Što se tiče mc globulina, koji je po svemu sudeći vicilinskog tipa (Radović et al., 1996.), proizvodi posttranslacione obrade mogu biti sakriveni među polipeptidima sličnih molekularnih masa koji pripadaju 13S globulinu ili albuminsoj frakciji. Da bi se ispitala ta mogućnost, urađena je "Western"- analiza *in vivo* obeleženih proteina i onih posle "hlađenja", sa antitelima na polipeptid od 57kDa (subjedinica mc globulina) (Sl.21). Vezivanje ovih antitela za polipeptide od oko 38kDa i oko 16kDa, pored vezivanja za polipeptid od 57kDa, koje se poklapa sa povećanjem intenziteta traka na fluorogramu posle hlađenja, ukazalo je na mogućnost posttranslacionog sečenja na dva mesta u subjedinici mc globulina.



Slika 21 A. Fluorografija elektroforetograma *in vivo* obeleženih proteina embriona heljde
 (a) proteinski ekstrakt embriona posle obeležavanja
 (b) proteinski ekstrakt embriona posle obeležavanja i "hlađenja" ON
 B. "Western"-analiza istih uzoraka antitelima na polipeptid od 57kDa zrelog semena

DISKUSIJA

Glavna forma rezerve azota u semenu su rezervni proteini uskladišteni u proteinskim telima. Kada se steknu povoljni uslovi, u procesu klijanja dolazi do hidrolize ovih proteina čime se i ostvaruje njihova osnovna funkcija. Kod većine biljnih vrsta rezervni proteini čine glavni deo proteinske mase semena, što je predstavljalo olakšavajuću okolnost u prečišćavanju i analizi strukture ovih proteina. Naravno, i interes za proučavanje ovih proteina u velikoj meri je bio određen činjenicom da je hranljiva vrednost semena obeležena aminokiselinskim sastavom onih proteina koji su najzastupljeniji, dakle rezervnih proteina.

Glavni rezervni proteini većine dikotiledonih biljaka su globulini leguminskog i vicilinskog tipa, pri čemu procentualni odnos zastupljenosti između ove dve klase varira od vrste do vrste. Kinetika sinteze ovih proteina u toku kasne embriogeneze specifična je za svaku klasu rezervnih proteina, ali je sinteza generalno najintenzivnija u srednjoj fazi sazrevanja semena.

U svemu navedenom, seme heljde nije izuzetak. Kao što je prikazano na Slici 1, analiza proteinskog sastava semena heljde, SDS-PAA elektroforezom, pokazala je da rezervni proteini dominiraju u ukupnom proteinskom sastavu zrelog semena. Predstavljeni su sa tri proteinske klase: 13S globulinima, mc-globulinima i albuminskom frakcijom, pri čemu su 13S globulini najzastupljeniji, čineći 70% ukupne proteinske mase, kao što je u literaturi već objavljeno (Radović et al., 1996.)

Analiza proteinskog sastava semena heljde u različitim fazama u sazrevanju (Sl.2), pokazala je da rezervni proteini počinju da dominiraju u ukupnom proteinskom sastavu semena već na stadijumu 14DAF, a da od tada, kroz dalje faze sazrevanja, dolazi do njihove progresivne akumulacije. Ova akumulacija sinhronizovana je u srednjoj fazi sazrevanja semena (14-23 DAF) za sve tri klase rezervnih proteina - 13S globuline, mc globuline i albuminsku frakciju. Porast u proteinskom sadržaju u ovoj fazi, prati porast ukupne mase semena. Pred

sazrevanje semena (28 DAF), akumulacija proteina se usporava, a seme, gubeći vodu u pripremi za stanje mirovanja, gubi u težini (Sl.3).

Količina proteina u ranoj fazi sazrevanja (9-11 DAF) je oko 200 puta manja nego u zreloom semenu. Elektroforetsko razdvajanje proteina semena heljde u ranoj fazi sazrevanja pokazala je da sinteza polipeptida koji pripadaju mc globulinima (vicilinski tip proteina) počinje već u ovoj fazi (Sl. 4). Iako su uočeni polipeptidi nešto veće molekulske mase (58kDa), u odnosu na polipeptid od 57kDa (subjedinica mc globulina) zrelog semena, "Western" - analizom je potvrđena njihova srodnost (Sl. 5A). Uočena razlika u Mw polipeptida rane faze i zrelog semena može se možda objasniti posttranslacionom glikozilacijom koja se dešava u proteinskim telima, koja menja pokretljivost ovih proteina na SDS-PAA elektrofotezi, nesrazmerno molekulskej masi, a koja nastaje tek po nakupljanju ovog proteina u proteinskim telima u daljem toku razvića.

Sinteza polipeptida male molekulske mase od 8-16kDa, koji pripadaju albuminskoj frakciji rezervnih proteina, izgleda da takođe počinje u ranoj fazi sazrevanja. Mora se ipak napomenuti da imunološka identifikacija ovih polipeptida nije izvršena.

Što se tiče 13S globulina, bazni subjedinični polipeptidi nisu konstatovani u ranoj fazi ni na bojenom gelu, ni imunološkim tehnikama (Sl.5B), što se slaže sa podatkom da u ovoj fazi nije moguće izolovati kompletan 13S globulin na saharoznom gradijentu (Radović et al., 1994). Ostaje otvoreno pitanje da li sinteza kiselih subjediničnih polipeptida počinje u ovoj fazi, s obzirom da su uočeni polipeptidi molekulske masa koji odgovaraju nekim polipeptidima ove grupe. Sinteza kiselih polipeptida koja prethodi baznim, s obzirom da su oni u 13S proteinu vezani u odgovarajuće bazno-kisele parove, podrazumevala bi postojanje depoa "čekajućih" polipeptida. Verovatnija je ipak pretpostavka da dati polipeptidi pripadaju nekim drugim proteinima čija se sinteza intenzivira u ovoj embriogenetskoj fazi-.

Analiza strukture rezervnih proteina semena heljde (Radović et al., 1996) i analiza dinamike nakupljanja ovih proteina u toku sazrevanja, izložena u ovom radu, pokazuju da se rezervni proteini semena heljde s pravom svrstavaju u grupu

rezervnih proteina globulinskog tipa, karakterističnog za većinu dikotiledonih biljaka. Zbog toga nas je u sledećem koraku interesovalo da osvetlimo neke elemente u biosintezi ovih proteina i da vidimo da li rezervni proteini semena heljde, tipa legumina (13S globulin) i tipa vicilina (mc-globulin), ponavljaju shemu biosinteze uobičajenu za ove proteine.

Analiza biosinteze rezervnih proteina globulinskog tipa obuhvata u literaturi nekoliko aspekata: analizu regulatornih delova gena i njihove interakcije sa proteinskim faktorima koji učestvuju u regulaciji ekspresije ovih gena u smislu obezbeđivanja njene tkivne i u razviću determinisane specifičnosti; analizu sastava, kompleksnosti i nivoa iRNK za ove proteine kao posledicu transkripcionih i posttranskripcionih događaja u ćeliji; analizu regulacije translacije i posttranslacionih događaja koji vode formiranju složenih oligomernih proteina i, na kraju, analizu unutarćelijskog transporta proteina od mesta sinteze do mesta uskladištenja u proteinskim telima. Jasno je, dakle, da je put od gena do funkcionalnog proteina, u slučaju rezervnih proteina, nasuprot relativno jednostavnoj funkciji koju ovi proteini obavljaju, veoma složen i da predstavlja odličan model-sistem u fundamentalnim istraživanjima.

Težište eksperimenata u izloženom radu bila je analiza sastava iRNK semena heljde, analizom proizvoda *in vitro* translacije odgovarajućih poli(A) RNK, i to: u različitim fazama u sazrevanju semena, u različitim organima heljde i u semenu heljde koja je rasla u promenjenom režimu mineralne ishrane, razmatrajući tako sva tri elementa kontrole, karakteristična za rezervne proteine: vremenski kontrolisanu ekspresiju u toku sazrevanja semena, ekspresiju specifičnu za seme, i ekspresiju zavisnu od faktora mineralne ishrane. U ovakvim analizama poli(A)RNK u principu treba imati u vidu da će nivo poli(A)RNK zavisiti ne samo od brzine transkripcije, već i od postranskripcionih događaja, a pogotovo od stabilnosti određenih iRNK u citoplazmi.

Kao i kod analize rezervnih proteina u ukupnom proteinskom sastavu, olakšavajuću okolnost u analizi iRNK predstavljala je činjenica da iRNK za rezervne proteine pripadaju klasi superzastupljenih iRNK, čineći u srednjoj fazi sazrevanja 50% ukupne mase iRNK (Goldberg et al., 1989). Klasa

superzastupljenih iRNK predstavlja manje od 1% strukturnog genskog seta biljne ćelije (Okamuro & Goldberg, 1989) i, osim iRNK za rezervne proteine, u ovu kategoriju spadaju još i iRNK za ribulozo-bisfosfat karboksilazu (gen čija je ekspresija u listu indukovana svetlom) i leghemoglobin (u čvorićima korena mahunarki koje žive u simbiozi sa azotofiksirajućim bakterijama). Prisutni su u usko specijalizovanim ćelijskim tipovima, a kako je navedeno u literaturi, date iRNK predstavljene su sa najmanje oko 5000 molekula po ćeliji, po svakoj pojedinačnoj sekvenci, a u toj meri su visokozastupljene u ukupnom sastavu iRNK da se mogu uočiti kao diskretne trake na agaroznom gelu bojenom etidijumbromidom.

Razdvajanje poli(A)RNK semena heljde u srednjim fazama sazrevanja, elektroforezom u agaroznom denaturišućem gelu (Sl. 7), potvrdila je ovaj podatak: na gelu bojenom etidijumbromidom, uočava se serija diskretnih traka, čije dimenzije iznose približno 1540bp, 1100bp, 870bp i 670bp. Pretpostavljene izračunate Mw polipeptida koji bi bili kodirani ovim iRNK, kreću se u opsegu molekulskih masa određenih za polipeptide rezervnih globulina heljde na proteinskim elektroforezama. Ovaj podatak nam je bio važan i zbog toga što je on potvrda da se u sistem za *in vitro* translaciju u našim eksperimentima ulazilo sa kvalitetnom, nedegradovanom poli(A)RNK.

Analiza poli(A)RNK izolovanih iz semena u različitim fazama sazrevanja trebalo je da da odgovore na dva pitanja: da li je polipeptidni sastav konstatovan u različitim fazama sazrevanja semena, praćen i prvenstveno određen sastavom i količinom iRNK za ove polipeptide, i drugo: da li se u slučaju 13S globulina heljde kao dominantani *in vitro* translacioni proizvodi javljaju visokomolekularni prekursori odgovarajućih bazno - kiselih polipeptidnih parova, ili su ovi subjedinični polipeptidi predstavljeni individualnim iRNK. Drugim rečima, da li 13S globulin heljde ponavlja biosintetsku shemu uobičajenu za legumine za koje je karakteristična sinteza prekursorsog molekula koji se obrađuje tek posttranslaciono.

Informacione RNK semena heljde u različitim fazama sazrevanja korišćene su kao matrice za sintezu proteina u ekstraktu pšenične klice uz dodavanje ³⁵S-

metionina ili ^{14}C -leucina, a dobijeni radioaktivno obeleženi polipeptidi su razdvajani pomoću SDS-PAGE u redukujućim uslovima i detektovani fluorografijom.

Kada je kao obeleživač upotrebljen ^{35}S -metionin, iRNK izolovana iz nekoliko srednjih faza sazrevanja semena heljde daje *in vitro* sintezom niz polipeptida različitih molekulskih masa sa izraženim grupama u oblasti Mw od 60kDa, oko 40kDa, oko 30kDa, 23-25kDa i 16kDa (Slike 10,11,14)(Maksimović et al.,1996). Dobijeni profil *in vitro* translacionih produkata potvrđen je ponavljanjem eksperimenta, korišćenjem kita za *in vitro* sintezu proteina drugog proizvođača, kao i sa iRNK iz semena u srednjoj fazi sazrevanja, koja je prečišćena iz ukupne RNK pomoću drugog sistema za izolovanje poli(A)RNK. Time je pokazano da dobijeni profil nije rezultat specifičnosti jednog sistema za *in vitro* translaciju, niti kontaminacije oligo dT-suspenzija za izolovanje poli(A) RNK.

Identifikovanje proizvoda *in vitro* translacije izvršeno je imunološkim metodama. Tako je pokazano, reakcijom sa odgovarajućim antitelima, da *in vitro* translacioni proizvod od 60kDa odgovara subjediničnim polipeptidima mc-globulina (Sl. 12), a *in vitro* proizvodi od 23-25kDa, baznim polipeptidima 13S globulina (Slika13). Postojanje iRNK za kisele polipeptide 13S globulina (32-43kDa) pokazano je među proizvodima *in vitro* translacije kada je kao obeleživač upotrebljen ^{14}C -leucin (Sl. 15). Sa ovim obeleživačem konstatovan je kompletan set polipeptida koji odgovaraju svim trima klasama rezervnih proteina. Odsustvo kiselih subjediničnih polipeptida među *in vitro* proizvodima obeleženim ^{35}S metioninom može se smatrati posledicom niskog sadržaja ove aminokiseline u tim polipeptidima. Kada bi se 13S globulin sintetisao sa prekursorske iRNK, očekivalo bi se da glavni produkti *in vitro* translacije budu polipeptidi koji bi odgovarali zbiru molekulskih masa većih, kiselih (32-43 kDa) i manjih,baznih (23-25 kDa) polipeptida. Dakle, očekivani prekursori imali bi dimenzije između 55 i 68 kDa. Istovremeno, ne bi se očekivala pojava *in vitro* sintetisanih polipeptida odgovarajućih po dimenziji bilo baznim, bilo kiselim, subjediničnim polipeptidima 13S globulina. Kako ekstrakt pšenične klice nema sposobnost posttranslacione obrade prekursorskih molekula, naši rezultati pokazuju da su bazni i kiseli

polipeptidi 13S globulina i mc globulina heljde sintetisani sa individualnih iRNK, što je unikatno u grupi rezervnih proteina leguminskog tipa.

Poređenjem zastupljenosti i raspodele tih polipeptida tokom srednjih i kasnih faza sazrevanja semena heljde, pokazano je da je isti set iRNK prisutan u semenima od 14. dana po cvetanju, pa do kraja procesa sazrevanja semena. Postoji razlika u količini *in vitro* sintetisanih polipeptida u različitim fazama sazrevanja, koja ukazuje da intenzitet sinteze polipeptida proteina semena nije konstantan tokom procesa sazrevanja, odnosno da postoji različita količina raspoloživih iRNK kao matrica za sintezu proteina. Količina iRNK za polipeptide semena se povećava od 14. dana po cvetanju, dostiže maksimum 23. dana po cvetanju, a smanjuje se u kasnijim fazama sazrevanja, u periodu kada se seme priprema za mirovanje (Sl. 10 i 11). Takav profil produkata *in vitro* translacije, tj. prisustvo istog seta iRNK tokom srednjih faza sazrevanja semena, je u potpunoj saglasnosti sa istovetnim profilom proteina semena u tim fazama (Sl. 2).

Što se tiče rane faze sazrevanja, među proizvodima *in vitro* translacije poli(A)RNK semena te faze, imunološkim metodama pokazano je prisustvo iRNK za subjedinične polipeptide mc globulina, kao i odsustvo iRNK za bazne polipeptide 13S globulina (Sl. 9). Oba podatka su u saglasnosti sa proteinskim sastavom semena ove faze (Sl.4).

I u semenima u ranoj fazi sazrevanja i u onima srednje faze, *in vitro* translacioni proizvod koji odgovara subjediničnim polipeptidima mc globulina od 57kDa, imao je Mw 60 kDa. Konstatovana razlika u veličini može se pripisati postojanju sekvence koja kodira signalni peptid odgovoran za prebacivanje sintetisanih polipeptida u lumen RER-a, koji se odstranjuje kotranslaciono, a koji je uobičajeno konstatovan kod polipeptida koji se transportuju, pa i kod rezervnih proteina. Ovakvo značajno povećanje Mw nije međutim konstatovano kod subjediničnih polipeptida 13S globulina. Ostaje otvoreno pitanje: da li prisustvo signalne sekvence nije moglo biti konstatovano jer je zamaskirano nekim drugim modifikacijama koje se na polipeptidu dešavaju posttranslaciono i tako vraćaju Mw na dimenziju početnog polipeptida sa signalnom sekvencom; ili je moguće pretpostaviti neke posebne mehanizme u transportu koji su u heljdi razvijeni, s

obzirom na uočenu specifičnost nepostojanja prekursorske iRNK i time potrebe pronalaženja odgovarajućih parova posttranslaciono.

Jos jedno pitanje takode traži odgovor: čemu pripadaju *in vitro* translacioni proizvodi od oko 30kDa, čija proporcija u ukupnim *in vitro* proizvodima srednje faze sazrevanja, obeleženih ³⁵S metioninom, nije zanemarljiva (Sl.11). Sudeći po podacima na soji, osim rezervnih proteina, u srednjim fazama sazrevanja dolazi do intenziviranja sinteze jos nekih proteina kao što je Kti3-Kunitzov inhibitor tripsina, čija funkcija nije sasvim jasna. Dimenzije ovog proteina u soji od 30 kDa (Jofuku & Goldberg, 1989), odgovaraju neidentifikovanim proizvodima *in vitro* translacije konstatovane u srednjim fazama sazrevanja semena heljde. *In vitro* proizvodi od oko 30kDa konstatovani su i u analizi translacije poli(A)RNK drugih organa heljde (Sl.17), a kako je za Kti3 pokazano da se eksprimira i u drugim biljnim tkivima (Jofuku & Goldberg, 1989), moguće da se u semenu zaista radi o ovom polipeptidu.

Što se tiče albuminske frakcije, svi zaključci su izvođeni samo na osnovu detektovane elektroforetske pokretljivosti. Uz tu ogradu, može se reći da iRNK za ove polipeptide prate promene u proteinskom profilu ove frakcije kroz sve faze sazrevanja, kad se govori o prisustvu ovih polipeptida već u ranim fazama sazrevanja i akumulaciji u daljim. Ono što je odudaralo u čitavoj analizi je, međutim, izrazita zastupljenost ovih polipeptida među *in vitro* proizvodima obeleženim ³⁵S- metioninom, koja nije odgovarala zastupljenosti ovih polipeptida u proteinskom profilu (Sl. 14). S obzirom da je uz upotrebu ¹⁴C-leucina, taj odnos sinhronizovan (Sl. 15), mi smo zaključili da je izrazito visok sadržaj metionina u albuminskim polipeptidima objašnjenje za uočeni fenomen. Ovaj podatak poslužiće nam i u analizi efekta nedostatka sulfata u mineralnoj ishrani o kome će nešto kasnije u diskusiji biti reči.

Osim poli(A)RNK izolovane iz semena heljde u različitim fazama sazrevanja, u sistemu pšenične klice za *in vitro* sintezu analizirane su i poli(A) RNK izolovane iz različitih organa heljde: cveta, hipokotila i lista. Uočeno je (Sl. 17) da se *in vitro* translacioni proizvodi od 60kDa i 23-25kDa, za koje je imunološkim metodama pokazano da odgovaraju subjedinicama rezervnih

proteina semena, javljaju samo kod semena, što je u skladu sa ekspresijom gena specifičnom za organ, koja se smatra bitnom karakteristikom rezervnih proteina.

Analiza poli(A)RNK semena heljde iz različitih faza u sazrevanju, na osnovu proizvoda njihove *in vitro* translacije, ukazala je, dakle, na mogućnost da je biosinteza 13S globulina, koji po strukturi odgovara leguminskom tipu rezervnih proteina, odvija različito od sheme biosinteze pokazane za sve do sada analizirane proteine ove grupe u širokom spektru biljnih vrsta (Walburg & Larkins.,1983; Yamogata et al.,1982; Spencer et al., 1980; Evans et al., 1979; Allen et al.,1985; Simon et al., 1985; Chlan,A.C., et al., 1986; Leal& Misra., 1993).

Da bi se prevazisla ograničenost zaključivanja koju *in vitro* sistem nosi, pretpostavljena osobenost dalje je analizirana *in vivo* obeležavanjem proteina, a zatim praćenjem sudbine obeleženih polipeptida prebacivanjem u medijum bez obeleživača, tzv. -"hladjenjem".

S obzirom da je u *in vitro* eksperimentima pokazano da ³⁵S-metionin nije dobro izabran obeleživač i da kompozicija obeleženih polipeptida zavisi od zastupljenosti ove aminokiseline, u *in vivo* obeležavanjima upotrebljena je smeša ¹⁴C-aminokiselina. Dužina inkubiranja u radioaktivnom medijumu nije prelazila 1h, što je dovoljno kratko da se ne može pretpostaviti da već u toku procesa obeležavanja dođe do postranslacione obrade. U literaturi je objavljeno da do ove obrade dolazi tek 2h po sintezi (Spencer & Higgins, 1980; Shotwel & Larkins, 1989). Analiza *in vivo* obeleženih polipeptida, elektroforezom na SDS-PAA gelu u denaturišućim uslovima (Sl. 18.), pokazala je da spektar *in vivo* obeleženih polipeptida odgovara polipeptidnom sastavu proteina semena heljde na bojenim gelovima, tj. dominiraju bazni (23-25kDa) i kiseli (32-43kDa) subjedinični polipeptidi 13S globulina, subjedinica mc globulina (57kDa) i albuminski polipeptidi (8-16kDa). Kao i u slučaju proizvoda *in vitro* translacije, nije uočeno prisustvo polipeptida većih molekulskih masa koji bi predstavljali prekursore odgovarajućih bazno-kiselih parova 13S globulina. Eksperimenti hlađenja (Sl. 20), potvrdili su pretpostavku da u slučaju 13S globulina heljde, prekursorska forma nije primarni translacioni proizvod koji bi se obrađivao tek posttranslaciono, dajući bazne i kisele polipeptide vezane u zreлом proteinu disulfidnim mostovima. I *in*

vivo i *in vitro* eksperimenti ukazuju da se u slučaju 13S globulina semena heljde, koji po strukturi odgovara rezervnim proteinima leguminskog tipa, radi o specifičnoj, unikatnoj biosintetskoj shemi, tj. da se subjedinični polipeptidi sintetišu sa individualnih iRNK.

Što se tiče mc globulina, biosinteza po svoj prilici uključuje posttranslacionu obradu kao mogući proces. Među proizvodima *in vivo* obeležavanja, posle hlađenja od 20h, imunološkim metodama konstatovani su, pored glavnog subjediničnog polipeptida od 57kDa, dva polipeptida manjih molekulskih masa od oko 38kDa i 16kDa (Sl. 21), verovatno kao rezultat posttranslacione obrade. Vreme od 20h posle koga se fenomen konstatuje, kao i činjenica da ovaj proces nije sve ili ništa, već da mc globulin može predstavljati smešu obrađenih i neobrađenih polipeptida, slaže se sa podacima objavljenim i za druge rezervne proteine vicilinskog tipa (Shewry et al., 1995). Po svemu navedenom, a to znači po tipu strukture, različitoj dinamici sinteze u odnosu na 13S globulin, kao i pretpostavljenoj biosintetskoj shemi, mc globulin heljde odgovara vicilinskom tipu rezervnih polipeptida.

Analiza proteina semena heljde u kontrolisanom režimu ishrane

Sastav mineralne ishrane smatra se bitnim faktorom u regulisanju proteinskog sastava semena. U literaturi najviše podataka se odnosi na efekat nedostatka sulfata na nivo i sastav rezervnih proteina. Tako je kod graška (Chandler et al. 1983, 1984), lupina (Blagrove et al., 1976), gliadina pšenice (Wrygley, 1980) i hordeina ovasa (Shewry et al., 1983) pokazano da je kod semena biljki koje su rasle u kontrolisanom režimu ishrane, bez sulfata, došlo do značajnog redukovanja rezervnih polipeptida koji su bogati sumporom. Osim ovoga postoje podaci o efektu kalijuma i fosfora (Randal, P.J., et al., 1979), a uzeti zajedno, ovi podaci govore o širokom spektru odgovora koje je sposobno da da seme u razviću prilagodavajući se na promenjene uslove sredine. Varijabilnost konstatovana unutar pojedinih subjediničnih grupa rezervnih proteina, verovatno ima svoje biološko opravdanje u mogućnosti semena (biljke) da se prilagođava, u cilju

obezbeđivanja rezervi koje će se mobilisati u klijanju i omogućiti dalje razviće biljke.

Analiza proteina semena heljde koja je rasla od momenta cvetanja u kontrolisanom režimu ishrane - bez sulfata, SDS-PAA elektroforezom, pokazala je da je došlo do značajnih promena u sastavu rezervnih proteina (Slika 6.). Efekat je najupečatljiviji na albuminskoj frakciji od 16kDa i baznim polipeptidima 13S globulina (23-25kDa). Albuminska fackija od zastupljenosti od 6% u ukupnom proteinskom profilu kod kontrolnih biljaka, u eksperimentalnim biljkama je na granici mogućnosti detektovanja. Sadržaj baznih polipeptida 13S globulina se smanjuje za 50%. Za date poipeptide, uočene promene u zastupljenosti u ukupnom proteinskom sastavu se mogu smatrati relevantnim, s obzirom da se za njih u semenima heljde koja raste u prirodnim uslovima ne uočava varijabilnost od grupe do grupe semena ili zavisno od sezonskih promena. Ovo se ne bi moglo reći za grupu kiselih polipeptida 13S globulina koji i inače pokazuju veliku varijabilnost i koji onda nisu pogodni za praćenje ovog efekta. Tako se uočeno odsustvo polipeptidne trake od oko 43kDa kod eksperimentalnih semena ne može sa sigurnošću smatrati posledicom faktora ishrane.

U literaturi je pokazano (Higgins et al.,1986) da je efekat nedostatka sulfata u mineralnoj ishrani, koji za posledicu ima smanjenje sadržaja onih polipeptida koji su bogati aminokiselinama sa sumporom, uzrokovano prvenstveno promenama u nivou odgovarajućih iRNK. Da bi se utvrdilo da li je ovo situacija i kod semena heljde, urađena je *in vitro* translacija poli(A)RNK semena heljde koja je od momenta cvetanja rasla bez sulfata, a zatim je sastav proizvoda *in vitro* translacije upoređivan sa polipeptidnim sastavom semena. Uočeno je da je smanjenje procenta baznih polipeptida 13S globulina i dramatično sniženje frakcije albumina od 16kDa, praćeno adekvatnim promenama u satavu iRNK (Sl.16)

Predstavljeni eksperimenti ne mogu, međutim, da razluče između nekoliko mogućnosti koje mogu dovesti do sniženja nivoa iRNK: nivo transkripcije, posttranskripcioni događaji , ili stabilnost iRNK, ali je iz podataka u literaturi evidentno (Macnicol,P.K.,1983; Chandler.P.M., et al, 1984) da nivo iRNK nije

posledica preferencijalne degradacije onih iRNK koje su translatovane u manjem obimu zbog nedostatka aminokiselina sa sumporom.

Perspektive

Analiza poli(A)RNK semena heljde u različitim fazama sazrevanja semena, elektroforezom njihovih *in vitro* translacionih proizvoda, kao i identifikacija ovih proizvoda upotrebom poliklonskih antitela na subjedinične polipeptide mc i 13S globulina, pokazala je da u srednjim fazama sazrevanja (14-23 DAF), iRNK za rezervne polipeptide dominiraju u ukupnom sastavu, dostižući maksimum u fazi 23DAF (Sl.10). To znači da je seme u fazi 23DAF idealno za izolovanje poli(A)RNK koje će poslužiti kao matrica za sintezu cDNK za rezervne polipeptide. Biblioteka cDNK, konstruisana od populacije značajno obogaćene onim cDNK koje odgovaraju iRNK za rezervne polipeptide, trebalo bi da bude ona specijalizovana biblioteka u kojoj će zastupljenost klonova koji sadrže sekvence cDNK za rezervne polipeptide biti veoma velika. Metodom hibridne selekcije bilo bi moguće pojedinačni klon cDNK povezati sa odgovarajućom iRNK iz smeše ukupnih iRNK semena, a zatim *in vitro* translacijom tako selektovane iRNK, identifikovati polipeptidni proizvod koji odgovara datom cDNK klonu. Identifikvanje cDNK za pojedine rezervne polipeptide otvara niz mogućnosti za istraživača.

Analiza sekvenci ovih cDNK i njihovo poređenje sa aminokiselinskom sekvencom rezervnih polipeptida, dalo bi dodatne informacije o strukturi i biosintezi rezervnih proteina. Ovim poređenjem bi se definitivno potvrdilo postojanje individualnih iRNK za pojedinačne subjedinične polipeptide 13S globulina heljde, pretpostavljeno na osnovu naših *in vitro* i *in vivo* eksperimenata; Takođe, potvrdilo bi se i postojanje signalne sekvence na N-kraju subjediničnog polipeptida mc globulina i odgovorilo na pitanje da li ova sekvenca postoji i kod subjedinic 13S globulina. Osim ovoga, poređenjem sekvenci cDNK za rezervne

polipeptide semena heljde i drugih biljnih vrsta bilo bi moguće, na osnovu stepena homologije, svrstati heljdu u evolutivnu lestvicu dikotiledonih biljaka .

Posebna grupa informacija dobila bi se upotrebom cDNK kao "probe" i to dvojako: u titraciji iRNK u različitim fiziološkim procesima i u izolovanju kompletnih gena iz genomskih biblioteka.

Prema podacima u literaturi (Uvod), regulacija vremenski determinisane sinteze rezervnih proteina u toku kasne embriogeneze, kao i regulacija odgovora biljke na promenjeni režim mineralne ishrane - promenjenim sastavom rezervnih polipeptida, regulisani su nivoom iRNK za ove proteine. Postojanje specifičnih proba cDNK omogućilo bi, metodom DNK-RNK hibridizacije, titraciju iRNK za različite rezervne polipeptide u ovim procesima i to kako poli(A)RNK u citoplazmi, tako i primarnih transkripata u jedru.

Izvlačenje kompletnih gena iz genomskih biblioteka i analiza njihove sekvence, dala bi novu seriju informacija. Geni iz genomskih biblioteka, uključuju i one regulatorne sekvence koje su, u interakciji sa proteinskim faktorima, odgovorne za organ-specifičnu i vremenski regulisanu ekspresiju ovih gena. Analiza i poređenje ovih regulatornih sekvenci i proteinskih faktora bitni su u formulisanju opšteg modela regulacije ovih procesa u fundamentalnim istraživanjima.

I, na kraju, postojanje kloniranih cDNK i/ili gena za rezervne proteine, omogućilo bi transfer ovih gena u druge biljne vrste u cilju poboljšanja hranljive vrednosti. Geni za albumine, bogate metioninom, i za globuline bogate lizinom, bili bi kandidatni geni za tu svrhu.

ZAKLJUČCI

1. Progresivna akumulacija sve tri klase rezervnih proteina semena heljde: 13S globulina, mc globulina i albumina, odvija se u toku srednje faze sazrevanja semena od 14. do 23. dana posle cvetanja. U ovoj fazi rezervni proteini dominiraju u ukupnom proteinskom sastavu semena

2. Sinteza mc globulina i albumina počinje pre sinteze 13S globulina; subjedinični polipeptidi ovih rezervnih proteina uočavaju se već 9. dana posle cvetanja.

3. Analiza proizvoda *in vitro* translacije pokazala je da su promene u sastavu i nivou poli(A)RNK semena u različitim fazama sazrevanja adekvatne promenama u proteinskom sastavu u istim razvojnim stadijumima i to:

- porast proteinskog sadržaja u srednjim fazama sazrevanja praćen je porastom nivoa iRNK, a u semenima pred sazrevanje, gde je akumulacija proteina usporena, konstatovan je izrazit pad količine odgovarajućih iRNK

- u srednjim fazama sazrevanja iRNK za rezervne proteine dominiraju u ukupnom sastavu, a u ranim fazama sazrevanja detektovani su samo proizvodi *in vitro* translacije iRNK za mc globulin i za albuminsku frakciju rezervnih proteina.

- nivo iRNK za rezervne proteine dostiže maksimum 23.dana posle cvetanja, pa je seme u ovoj fazi sazrevanja pogodno za izolovanje poli(A)RNK koja bi poslužila kao matrica za sintezu cDNK i konstruisanje cDNK biblioteke obogaćene klonovima za rezervne polipeptide.

4. Reakcijom sa odgovarajućim antitelima i na osnovu pokretljivosti proizvoda *in vitro* translacije na SDS-PAGE, konstatovano je da su bazni i kiseli subjedinični polipeptidi 13S globulina reprezentovani individualnim iRNK. Za razliku od do sada analiziranih rezervnih proteina leguminskog tipa, među proizvodima *in vitro*

translacije nije konstatovano prisustvo prekursora odgovarajućih parova baznih i kiselih sujediničnih polipeptida koji bi bili kodirani zajedničkom iRNK

5. *In vitro* proizvodi koji imunološki reaguju sa antitelima na subjedinični polipeptid mc globulina od 57kDa, po pokretljivosti na SDS-PAGE, imaju Mw 60kDa. Razlika u Mw može se pripisati postojanju signalne sekvence koja omogućuje prebacivanje proteina u lumen RER-a i koja se uobičajeno konstatuje kod rezervnih polipeptida.

6. Sastav proizvoda *in vitro* translacije poli(A)RNK semena heljde karakterističan je u poređenju sa proizvodima *in vitro* translacije poli(A)RNK cveta, lista i hipokotila heljde. *In vitro* proizvodi koji odgovaraju iRNK za rezervne proteine - 60kDa za mc globulin i 23-25kDa za 13S globulin , javljaju se samo u semenu, što je u skladu sa ekspresijom rezervnih proteina specifičnom za seme.

7. Promenjeni režim mineralne ishrane dovodi do promene u zastupljenosti određenih rezervnih polipeptida u ukupnom proteinskom sastavu. U semenima heljde gajene na podlozi deficitarnoj u sulfatima, nivo albuminske frakcije rezervnih proteina od 16kDa je dramatično redukovan, a nivo baznih subjediničnih polipeptida 13S globulina je redukovan za 50%.

8. Uočene promene u proteinskom sastavu u semenima heljde gajene na podlozi deficitarnoj u sulfatima, praćene su adekvatnim promenama u sastavu poli(A)RNK za ove polipeptide.

9. *In vivo* obeležavanje proteina semena heljde i praćenje sudbine obeleženih polipeptida u eksperimentima "hlađenja", potvrdilo je pretpostavku o postojanju individualnih iRNK za subjedinične polipeptide 13S globulina. Među *in vivo* obeleženim polipeptidima nije konstatovano prisustvo prekursora odgovarajućih parova baznih i kiselih subjediničnih polipeptida koji bi se obradjivao post - translaciono.

10. Posttranslaciono proteolitičko sečenje konstatovano je u slučaju mc globulina heljde, pri čemu ono nije obavezan proces, već mc globulin predstavlja smešu obrađenih i neobrađenih polipeptida, kao što je uobičajeno za rezervne proteine vicilinskog tipa .

LITERATURA

Allen,R.D., Nessler,C.L., Thomas,T.L. 1985. Developmental expression of sunflower 11S storage protein genes. *Plant Mol. Biol.* 5: 165-173

Arahira,M., Fukazawa,C. 1994. Ginkgo 11S seed storage protein family mRNAs: unusual Asn-Asn linkage as post-translational cleavage site. *Plant Mol. Biol.* 25: 597-605

Badenoch-Jones,J., Spencer,D., Higgins,T.J.V., Millerd,A. 1981. The role of glycosylation in storage-protein synthesis in developing pea seeds. *Planta* 153: 201-209

Barton,K.A., Thompson,J.F., Rosenthal,R., Beachy,R.N., 1982. The biosynthesis and processing of high molecular weight precursors of soybean glycinin subunits , *J. Biol. Chem.* 257: 6089-6095

Baumlein,H., Wobus,U., Pustell,J., Kafatos,F.C. 1986. The legumin gene family: structure of the B type gene of *Vicia faba* and a possible legumin gene specific regulatory element. *NAR* 14: 2707-2720

Baumlein,H., Fiedler,M., Weschke,W., Wobus,U. 1993. Important cis-regulatory elements involved in the regulation of genes expressed in developing seed. In *Seed Storage compounds* , eds., P.W.Shewry & A.K.Skobart

Beach, L.R., 1985. Transcriptional and post-transcriptional regulation of storage protein gene expression in sulfur deficient pea seeds *NAR* 13: 999-1013

Beachy, R.N. 1980. *In vitro* synthesis of the α and α subunits of the 7S storage proteins (conglycinin) of soybean seeds. *Plant Physiol.* 65: 990-994

Белозерский, М.А., Емцева, И.Б. 1970. Сравнительное исследование белков семян диплоидной и тетраплоидной гречихи. *Биохимия* 35: 152-157

Белозерский, М. А. 1975. Выделение и свойства 13С глобулина семян гречихи. В кн.: Растительные белки и их биосинтез. М: Наука, с. 152-156

Белозерский, М.А., Дунаевский, Е. 1983. Начальные превращения главного запасного белка в прорастающих семенах гречихи. *Биохимия*, 48: 508-511

Blagrove, R.J., & Gillespie, J.M., 1975. Storage globulins of *Lupinus angustifolius* *Aust.J.Plant Physiol.*, 2: 13-27

Blagrove, R.J., Gillespie, J.M., Randal, P.J., 1976. Effect of sulfur supply on the seed globulin composition of *Lupinus angustifolius*. *Aust.J.Plant Physiol.*, 3: 173-184

Bolini, R., Chrispeels, M.J., 1979. The rough endoplasmic reticulum is the site of reserve protein synthesis in developing *Phaseolus vulgaris* cotyledons. *Planta*, 146: 487-501

B - C

Bollini, R., Vitale, A., Chrispeels, M. J. 1983. *In vivo* and *in vitro* processing of seed reserve protein in the endoplasmatic reticulum: evidence for two glycosylation steps. *J. Cell Biol.*, 96: 999-1007

Borroto, K., Dure III, L. 1987. The globulin seed storage proteins of flowering plants are derived from two ancestral genes. *Plant Mol. Biol.*, 8: 113-131

Boston, R.S., Fontes, E.B.P., Shank, B.B., and Wrabel, R.L., 1991. Increased expression of the maize immunoglobulin binding protein homolog b-70 in three zein regulatory mutants. *Plant Cell*, 3: 497-505

Bustos, M. M., Begum, D., Kalkan, F.A., Battraw, M.J., Hall, T.C. 1991. Positive and negative cis-acting DNA domains are required for spatial and temporal regulation of gene expression by a seed storage protein promoter. *EMBO J.*, 10: 1469-1479

Camai, L., Harada, J.J., 1990. Transcriptional activities in dry seed nuclei indicate the timing of the transition from embryogeny to germination, *PNAS*, 87: 2671 - 2678

Casey, R., Domoney, C., Elis, N. 1986. Legume storage proteins and their genes. *Oxford Surv. Plant Mol. Cell. Biol.*, 3: 1-95

Castle, L.A., Errampalli, D., Adherton, T.L., Franzmann, L.H., Yoon, E.S., Meinke, D.W. 1993. Genetic and molecular characterisation of embryonic mutants identified following seed transformation in *Arabidopsis* *Mol. Gen. Genet.*, 241: 5

C

Chandler,P.M., Higgins,T.J.V., Randall,P.J., Spencer,D., 1983. Regulation of legumin levels in developing pea seeds under conditions of sulfur deficiency: rates of legumin synthesis and levels of legumin mRNA. *Plant Physiol.*, 71: 47-54

Chappel,J. & Chrispeel,M.J., 1986. Transcriptional and post-transcriptional control of phaseolin and phytohemagglutinin gene expression in developing cotyledons of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.*, 81: 50-54

Chlan,A.C., Pyle,J.B., Legocki,A.B., Dure,L. 1986. Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination XVIII. cDNA and amino acid sequences of members of the storage protein families. *Plant Mol. Biol.*, 7: 475-489

Chrispeels,M.J., Higgins,T.J.V., Spencer,D., 1982. Assembly of storage protein oligomers in the endoplasmic reticulum and processing of the polypeptides in the protein bodies of developing cotyledons. *J.Cell Biol.*, 93: 306-313

Chrispeels,M.J., 1985. The role of Golgi apparatus in the transport and post-translational modifications of vacuolar proteins. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology* , 2: 43-68

Chrispeels, M.J., 1991. Sorting of proteins in the secretory system. *Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.*, 42: 21-53

Craig,S., Goodchild,D.J., Miller,C., 1980. Structural aspects of protein accumulation in developing pea cotyledons , *Aust. J. Plant Physiology*, 6: 81-89

Craig,S., Goodchild,D.J., 1984. Golgi mediated vicilin accumulation in pea cotyledom cells is redirected by monensin and nigericin. *Protoplasma* , 122: 91-97

Craig,D., Dickinson,R., Evans,P., Nielsen,N.C., 1988. RY repeats are conserved in the 5'- flanking region of legume seed protein genes. *NAR*, 16: 371-372

Crouch,M.L., Sussex,I.M., 1981. Development and storage protein synthesis in *Brassica napus* I. embryos *in vivo* and *in vitro*. *Planta* , 153: 64-75

Crouch,M.L., Tenbarga,K.M., Simon,A.E., Ferl,R., 1983. cDNA clones for *Brassica napus* seed storage proteins: evidence from nucleotide sequence analysis that both subunits of napin are cleaved from a precursor polypeptide. *J.Mol.Appl.Genet.*, 2: 273-283

Croy,R.R.D., Lycett,G.W., Gatehouse,J.A., Yarwood,J.N., Boulter,D. 1982. Cloning and analysis of cDNAs encoding plant storage protein precursors. *Nature* 295: 76-79

Danielsson, C. E. 1949. Seed globulins of the Gramineae and Leguminosae. *Biochem. J.* 44:387-400

Derbyshire, E., Wright, D. J., Boulter, D. 1976. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry* 15: 3-24

- Dickinson,C.D., Hussein,E.H.A., Nielsen,N.C. 1989. Role of post-translational cleavage in glycinin assembly. *Plant Cell* 1: 459-469
- Dierks-Ventling,C., Ventling,D. 1982. Tissue-specific immunofluorescent localization of zein and globulin in *Zea mays* seeds. *FEBS Lett.* 144: 167-172
- Domoney, C., Casey, R. 1985. Measurement of gene number for seed storage proteins in *P. sativum*. *NAR* 13: 697-699
- Doyle,J., Schuler,M.A., Beachy, R.N., Slightom,J.L. 1986. The glycosylated seed storage proteins of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*. Structural homologies of genes and proteins. *J.Biol.Chem.*, 261: 9228-9238
- Дунаевский,Е., Белозерский,М.А., Елпидина,Е.Н. 1983. Протеиназа семенах гречихи, гидролизующая главный запасной белок этих семян. *Биохимия* 48:572-576
- Dunaevsky, Y. E., Belozersky, M. A. 1989. The role of cysteine proteinase and carboxypeptidase in the breakdown of storage proteins in buckwheat seeds. *Planta* 179:316-322
- Dure,L. Greenway,S.C., Galou,G.A. 1981. Developmental biochemisry of cotton seed embryogenesis and germination. *Biochemistry*, 20: 4162-4168
- Dure,L., 1985. Embryogenesis and gene expresion during seed formation, *Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol.*, 2: 179-197

E-F-G

Ericson, M.C., Chrispeels, M.J. 1976. The carbohydrate moiety of mung bean vicilin.

Aust. J. Plant Physiol. 3: 763-769

Ericson, M.L., Rodin, J., Leman, M., Glimelius, K., Josefsson, L.G., 1986. Structure of the grapeseed 1.7S storage protein, napin, and its precursor. *J. Biol. Chem.*, 261:

14576-14581

Evans, I.M., Croy, R.R.D., Hutchinson, P., Boulter, D. 1979. Cell free synthesis of some storage protein subunits by polyribosomes and RNA isolated from developing seeds of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 144: 455-462

Evans, I.M., Gatehouse, J.A., Croy, R.R.D., Boulter, D. 1984. Regulation of the transcription of storage protein mRNA in nuclei isolated from developing pea cotyledons. *Planta*, 160: 559-563

Faure, J.E., Digannet, C., Dumas, C., 1994. An *in vitro* system for adhesion and fusion of maize gametis. *Science*, 263: 1598-1600

Fujiwara, T., Beachy, R. 1994. Tissue-specific and temporal regulation of a β -conglycinin gene: roles of the RY repeat and the other *cis*-acting elements. *Plant Mol. Biol.*, 24: 261-272

Gatehouse, J.A., Evans, I.M., Bown, D., Croy, R.R.D., Boulter, D. 1982. Control of storage proteins during seed development of pea. *Biochem. J.*, 208: 119-121

Giorini,S., Galili,G. 1991. Characterization of HSP-70 cognate proteins from wheat. *Theor.Appl.Genet.*, 82: 615-620

Goldberg,R.B., Hoschek,G., Ditta,G.G., Breidenbach,R.W. 1981. Developmental regulation of cloned superabundant embryo mRNAs in soybean. *Dev. Biol.* 83:218-231

Goldberg,R.B., Barker,S.J., Perez-Grau,L. 1989. Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell*, 56: 149-160

Goldberg,R.B., Paiva,G., Yadegari,R. 1994. Plant Embryogenesis: zygote to seed *Science*, 266: 605-614

Harris,N., 1979. Endoplasmic reticulum in developing seeds of *Vicia faba*. A high voltage electron microscope study. *Planta*, 146: 63-69

Harris,N., Henderson,J., Abbot,S.J., Mulcrone,J., Davies,J.T., 1993. Seed development and structure in Seed storage compounds. (Oxford : Oxford scientific publications) Vol. 35: 3-21

Herschlag,D. and Johnson,F.B. 1993. Synergism in transcriptional activation: a kinetic view. *Gene Devel.*,7: 173-179

Higgins,T.J.V., Spencer,D. 1981. Precursor forms of pea vicilin subunits: modification by microsomal membranes during cell free translation. *Plant Physiol.*, 67: 205-211

Higgins,T.J.V., Chandler,P.M., Randall,J.P., Spencer,D., 1986. Gene structure, protein structure and regulation of the synthesis of a sulphur-rich protein in pea seeds. *J.of Biol.Chem.*, 261: 11124-11130

Higgins,T.J.V. 1984. Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35: 191-221

Holowach,L.P., Thompson,J.F., Madison,J.T. 1984. Storage protein composition of soybean cotyledons grown *in vitro* in media of various sulfate concentrations in the presence of exogenous L-methionine. *Plant Physiol.*, 74: 584-589

Holowach,L.P., Madison,J.T., Thompson,J.F. 1986. Studies on the mechanism of regulation of the mRNA level for a soybean storage protein subunit by exogenous L-methionine. *Plant Physiol.*, 80: 561-567

Javornik,B., Eggum,B.O., Kreft,I. 1981. Studies on protein fractions and protein quality of buckwheat. *Genetika*, 13: 115-121

Jofuku,K.D., Schipper,R.D., Goldberg,R.B., 1989. Kunitz trypsin inhibitor genes are differentially expressed during the soybean life cycle and in transformed tobacco plants. *Plant Cell*, 1: 427-430

deJong,A.J., Schmidt,E.G., Vries,S.C., 1993. Early events in higher plant embryogenesis. *Plant Mol.Biol.*, 22: 367-377

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

Kortt,A.A., Caldwell,J.B. 1990. Low molecular weight albumins from sunflower seed: identification of a methionine-rich albumin. *Phytochemistry*, 29: 2805-2810

Kreil,G. 1981. Transfer of proteins across membranes. *Ann.Rev.Biochem.*, 50: 317-348

Kreis,M., Shewry,P.R., Forde,B.G., Forde,J., Miflin,B.J. 1985, Structure and evolution of seed storage proteins and their genes. In Oxford Surveys of Plant Cell and Molecular Biology, 2: (Oxford: Oxford University Press) 253-317

Kreis,M., Shewry,P.R., 1989. Unusual Features of Cereal Seed Protein Structure and Evolution. *BioEssays*, 10: 201-207

Ladin,B.F., Doyle,J.J. and Beachy,R.N., 1984. Molecular characterization of a deletion mutation affecting the alpha-subunit of beta conglycinin of soybean, *J.Mol.Appl.Genet.*, 2: 372-380

Laemmli,U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685

L

Layne,E. 1957. in: S.R. Colowick and N. O. Kaplan (ed) *Methods in Enzymology*, Vol. 3, p. 447. Academic Press, New York

Leal,I., Misra,S. 1993. Molecular cloning and characterization of a legumin-like storage protein cDNA of Douglas fir seeds. *Plant Mol. Biol.*, 21: 709-715

Lending,C.R., Chesnut,R.S., Show,K.L., Larkins,B.A. 1992. Synthesis of zeins and their potential for aminoacid modification, in *Plant protein engineering* P.R.Shewry and S.Gutteridge eds. (Cambridge: Cambridge University Press) 209-218

Lessard,P.A., Allen,R.D., Bernier,F., Beachy,R.M., 1991. Multiple nuclear factors interact with upstream sequence of differentially regulated β -conglycinin genes. *Plant Mol. Biol.*, 16: 397-413

Li,X., Wu,Y., Zhang,D., Gillikin,J.W., Boston,R.S., Franceschi,V.R., Okita,T.W. 1993(a). Rice prolamine protein body biogenesis: a BiP mediated process. *Science*, 262: 1054-1056

Li,X., Franceschi,V.R., Okita,T.W. 1993. Segregation of storage protein mRNAs on the rough endoplasmic reticulum membranes of rice endosperm cells. *Cell*, 72: 869-879

Lowry,O.M., Rosebrough,N.J., Farr,A.L., Randall,R.J. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275

Lycett,G.W., Croy,R.R., Shirsat,A.H., Boulter,D., Lycett,G.W., Croy,R.R.D., Shirsot,A.H., Boulter,D. 1984. The complete nucleotide sequence of a legumin gene from pea (*Pisum sativum* L.). *NAR*, 12: 4493-4506

Lycett,G.W., Croy,R.R.D., Shirsat,A.H., Richards,D.M., Boulter,D. 1985. The 5' - flanking regions of three pea legumin genes: comparison of the DNA sequences. *NAR* 13: 6733-6743

Macnicol,P.K., 1983. Differential effect of sulfur deficiency of the composition of aminoacyl-tRNA and free aminoacid pools of the developing. *FEBS Lett.*, 156:55-57

Maksimović,R.V., Varkonji-Gasić,I.E., Radović,R.S., Savić,P.A., 1996. The biosynthesis of 13S buckwheat seed storage protein. *J.Plant Physiol.*, 147: 759-761

Marks,M.D., Lindell,J.S., Larkins,B.A., 1985. Nucleotide sequence analysis of zein mRNAs from maize endosperm. *J.Biol.Chem.*, 260: 16451-16453

Matta,N.K., Gatehouse,J.A., Boulter,D. 1981. The structure of legumin of *Vicia faba* L.-a reappraisal. *J. Exp. Bot*, 32: 183-197

Mayer,U., Torres-Ruiz,T., Berloth,S., Misero,G., Jurgens,T. 1991. Mutations affecting body organization in the *Arabidopsis* embryo. *Nature*, 353: 402

Matsudaira,P. 1987. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J.Biol.Chem.*, 262, 10035-10038

M-N-O

- Meinke, D.W., Chen, J., Beachy, R.N. 1981. Expression of storage-protein genes during soybean seed development. *Planta*, 153: 130-139
- Muntz, K. 1989. Intercellular protein sorting and formation of protein reserves in storage tissues cells of plan seeds *Biochem. Physiol. Pflazen.*, 185: 315-335
- Muntz, K., Jung, R., Salbach, G., 1993. Synthesis, processing and targeting of legume seed proteins: in seed storage compounds, biosynthesis, interactions and manipulations. Shewry, P.R. and Stobart, A.K.
- Naito, S., Dube, P.H. and Beachy, R.M., 1988. Differential expression of conglycinin α and β subunits in transgenic plants. *Plant. Mol. Biol.*, 11: 109
- Nielsen, N. C. 1984. The chemistry of legume storage proteins. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 304: 287-296
- Nielsen, N. C. 1985. The structure and complexity of 11S polypeptides in soy beans . *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 62:1680-1686
- Okamuro, J. K., Goldberg, R. B. 1989. Regulation of Plant Gene Expression: General Principles. In: Marcus A (ed) *The Biochemistry of Plants, Vol. 15: Molecular Biology*, pp.1-82. Academic Press, New York

Pang,P.P., Pruitt,R.P., Meyerowitz,E.M. 1988. Molecular cloning, genomic organization, expression and evolution of 12S seed storage protein genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, 11: 805-820

Perez-Grau,L., and Goldberg,R.B., 1989. Soybean seed protein genes are regulated partially during embryogenesis. *Plant Cell*, 1: 1095-1109

Pomeranz,Y., Robbins,G.S. 1972. Amino acid composition of buckwheat. *J. Agric. Food Chem.*, 20: 270-274

Radović, S., Maksimović, V., Savić, A. 1994. Karakterizacija 13S globulina semena heljde. Prvi kongres genetičara Srbije, Vrnjačka Banja.

Radović,S., Maksimović,V., Varkonji-Gasić,E., 1996. Characterisation of buckwheat seed storage proteins. *J.Agric. Food Chem.*, 44: 972-974

Randal,P.J., Thompson,J.A., Schroeder,H.E. 1979. Cotyledonary storage proteins in *P. sativum* V. Effects of sulphur, phosphorus, potassium and magnesium deficiency. *Aust. J. Plant Physiol.*, 6: 11-24

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual (second edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Scallon,B., Thanh,V.H., Floeuer,L.A., Nielsen,N.C., 1985. Identification and characterization of DNA clones encoding grup-II glycinin subunits. *Theor.Appl.Genet.*, 70: 510-519

S

Scott,M.P., Jung,R., Muntz,K., Nielsen,N.C. 1992. A protease responsible for posttranslational cleavage of conserved Asn-Gly linkage in glycinin, the major seed storage protein of soybean. *PNAS*, 89: 658-666

Shewry,R.P., Franklin,J., Parmar,S.J., Smith,S., Miflin,J., 1983. The effect of sulfur starvation on the amino acid and protein composition of barley grain. *J.Cereal.Sci.*, 1: 21-31

Shewry,R.P., Napier,J.A., Tatham,S.A. 1995. Seed storage proteins: structures and biosynthesis *The Plant Cell* 7, 945-956

Shotwell,M.A., Larkins,B.A. 1989. The Biochemistry and Molecular Biology of Seed Storage Proteins. In: Marcus A (ed) *The Biochemistry of Plants*, Vol. 15: Molecular Biology, pp. 297-345. Academic Press, New York

Simon,A.E., Tenbarge,K.M., Scofield,S.R., Finkelstein,R.R., Crouch,M.L. 1985. Nucleotide sequence of a cDNA clone of *Brassica napus* 12S storage protein shows homology with legumin from *Pisum sativum*. *Plant Mol. Biol.*,5: 191-201

Spencer,D., Higgins,T.J.V., Button,S.C., Davey,R.A. 1980. Pulse-labeling studies on protein synthesis in developing pea seeds and evidence of a precursor form of legumin small subunit. *Plant Physiol.*,66: 510-515

Spencer,D., Chandler,P.M., Higgins,T.J.V., Inglis,A., Rubira,M. 1983. Sequence interrelationships between the subunits of vicilin from pea seeds. *Plant Mol. Biol.*,2: 259-267

Staswick,P.E., Hermodson,H.A., Nielsen,N.C. 1984. The amino acid sequence of the A2B1a subunit of glycinin. *J. Biol. Chem.*, 259: 13424-13430

Sung,Z.R., Belachew,A., Shunong,B., Bertrand-Garcia,R., 1992. EMF, an *Arabidopsis* gene required for vegetative shoot development". *Science* , 258:1645-47

Talbot,D.R., Adang,M.J., Slightam,J.L., Hall,T.C., 1984. *Mol.Gen.Genet.*, 98: 42-49

Taylor,B., Powel,A. 1982. Isolation of plant DNA and RNA. *Focus* 4: 4-6

Thomson,J.A., Schroeder,H.E. 1978. Cotyledonary storage proteins in *P. sativum*. II Hereditary variation in components of the legumin and vicilin fraction. *Aust. J. Pl. Physiol.*, 5: 281-294

Tumer,N.E., Thanh,V.H., Nielsen,N.C. 1981. Purification and characterization of mRNAs from soybean seeds: identification of glycinin and β -conglycinin precursors. *J. Biol. Chem.*, 256: 8756-8760

Walburg,G., Larkins,B.A. 1983. Oat seed globulin: subunit characterization and demonstration of its synthesis as a precursor. *Plant Physiol.*, 72: 161-165

Walburg,G., Larkins,B.A. 1986. Isolation and characterization of cDNAs encoding oat 12S globulin mRNAs. *Plant Mol. Biol.*, 6: 161-169

Williams,M.E., Foster,R. and Chua, N.-H. 1992. Sequences flanking the hexameric G-box core CACGTG affect the specificity of protein binding *Plant Cell* 4, 485-496

Walling,L., Drews,G.N., Goldberg,R.B., 1986. Transcriptional and post-transcriptional regulation of soybean seed protein mRNA levels. *PNAS*, 83: 2123-2127

Wringley,C.W., DuCros,D.L., Archer,M.J., Roxburg,C.M., 1980. The sulfur content of wheat endosperm proteins and its relevance to grain quality. *Aust. J. Plant Physiol.*, 7: 755-766

Yamagata,H., Sugimoto,T., Tanaka,K., Kasai,Z. 1982. Biosynthesis of storage proteins in developing rice seeds. *Plant Physiol.*, 70: 1094-1100

Youle,R.J., Huang,A.H.C. 1981. Accurrence of low molecular weight and high cysteine containing albumin storage proteins in oil seeds of diverse species *Am.J.Bot.*, 68: 44-48

