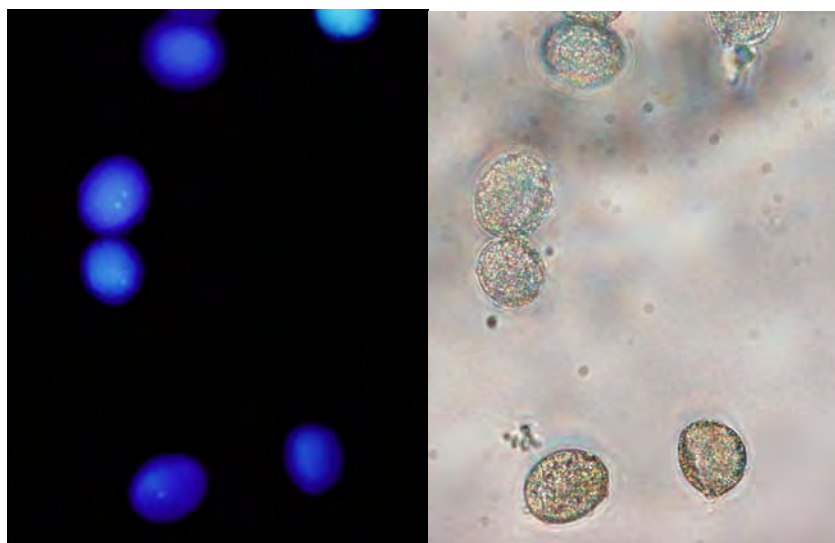


ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



Έκφραση του Γονιδίου Lon του Φυτού *Arabidopsis thaliana*
σε Διαφορετικούς Ιστούς και σε Διάφορα Αναπτυξιακά Στάδια

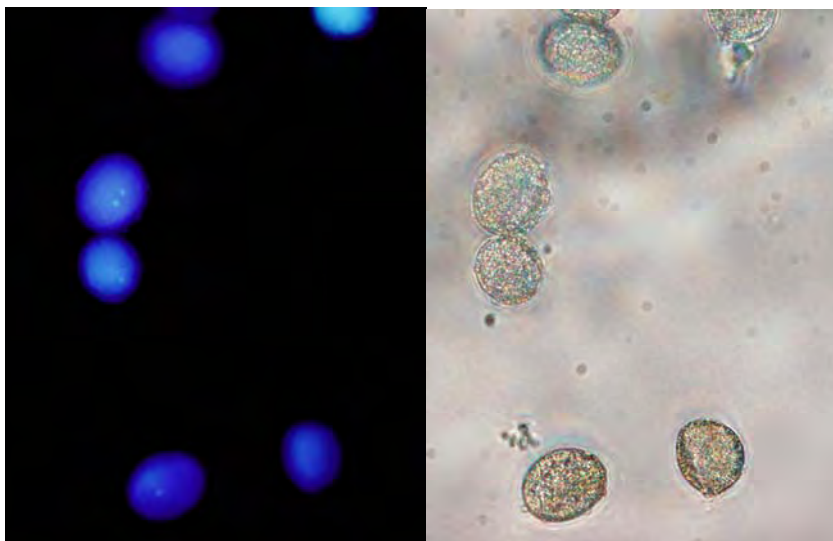
Lon Gene Expression in Different Tissues and Developmental Stages of
Arabidopsis thaliana

ΔΗΜΗΤΡΗΣ ΧΑΤΖΟΠΟΥΛΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2013

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



Έκφραση του Γονιδίου Lon του Φυτού *Arabidopsis thaliana*
σε Διαφορετικούς Ιστούς και σε Διάφορα Αναπτυξιακά Στάδια

Lon Gene Expression in Different Tissues and Developmental Stages of
Arabidopsis thaliana

ΔΗΜΗΤΡΗΣ ΧΑΤΖΟΠΟΥΛΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Τριμελής Επιτροπή:

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Πόπη Παπαδοπούλου, Επικ. Καθηγήτρια
ΤΒΒ, Παν Θεσσαλίας

Μέλος: Δήμητρα Μηλιώνη, Επικ. Καθηγήτρια, ΤΓΒ, Γεωπ. Παν
Αθηνών,

Μέλος: Δανιέλλα Τσίκου, Λεκτορας με το ΠΔ 407 ΤΒΒ, Παν
Θεσσαλίας

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2013

Τριμελής Επιτροπή:

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Πόπη Παπαδοπούλου, Επικ. Καθηγήτρια
ΤΒΒ, Παν Θεσσαλίας

Μέλος: Δήμητρα Μηλιώνη, Επικ. Καθηγήτρια, ΤΓΒ, Γεωπ. Παν
Αθηνών,

Μέλος: Δανιέλλα Τσίκου, Λεκτορας με το ΠΔ 407 ΤΒΒ, Παν
Θεσσαλίας

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2013

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανακύκλωση των πρωτεϊνών λειτουργικών ή μετουσιωμένων είναι μια ουσιαστική παράμετρος όλων των οργανισμών έτσι ώστε να διατηρείται η ομοιόσταση του κυττάρου. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται από ATP-εξαρτώμενες πρωτεάσες που βρίσκονται σχεδόν σε κάθε κυτταρικό διαμέρισμα. Στο γονιδίωμα του φυτού *Arabidopsis thaliana* υπάρχουν τέσσερα μέλη στην οικογένεια της πρωτεάσης Lon. Οι πρωτεάσες Lon1 και Lon4 τοποθετούνται στο χλωροπλάστη και στο μιτοχόνδριο, ενώ η Lon2 στο περοξύσωμα. Στη παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε ανάλυση για το γονίδιο Lon3. Αν και αρχικά θεωρήθηκε ψευδογονίδιο, το Lon3 αποτελείται από 18 εξόνια και έχει ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο που εν δυνάμει μπορούν να δώσουν ένα πολυπεπτίδιο από 924 αμινοξέα. Από τα αποτελέσματα αποδεικνύεται ότι τα γονίδια Lon έχουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης μεταξύ τους και ειδικά το Lon3 εκφράζεται σε ένα πολύ εξειδικευμένο ιστό, τους ώριμους γυρεόκοκκους και τα σπερματικά τους κύτταρα. Δηλαδή η πρωτεάση Lon3 μάλλον έχει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση των πρωτεϊνών των σπερματικών κυττάρων ρυθμίζοντας το γαμετικό κύκλο πριν τη γονιμοποίηση. Το γονίδιο Lon1 εκφράζεται αρκετά σε όλους τους ιστούς του φυτού, καθώς έχει και πιο αυξημένη έκφραση σε ταχέως αναπτυσσόμενους ιστούς όπως είναι οι κοτύλες και η πρωτογενής ρίζα του σπορόφυτου αλλά και στο έμβρυο όπως. Αντίθετα το γονίδιο Lon4 εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα, ενώ φαίνεται να αυξάνεται η έκφρασή του στα φύλλα και στους οφθαλμούς. Με την ανάλυση μεταλλαγμάτων του γονιδίου Lon3 καθώς και ανάλυση της τοποθέτησης της πρωτεΐνης μέσα στα υποκυτταρικά διαμερίσματα, μπορεί να διαλευκανθεί η λειτουργία της πρωτεάσης Lon3 στην ώριμη γύρη και να καθορισθεί περαιτέρω ο ρόλος της στο γαμετικό κύκλο και τη γονιμοποίηση.

ABSTRACT

In all organisms the functional or denatured protein cycling is a crucial parameter to sustain cellular homeostasis. This process is achieved by ATP-dependent proteases present in each cellular compartment. In the *Arabidopsis* genome there are four gene members of the Lon protease. Lon1 and Lon 4 proteases are localized in chloroplast and mitochondria while Lon2 in peroxisomes. Herein, Lon3 gene was analyzed and characterized. Even though, Lon3 was considered as a pseudogene, Lon3 consists of 18 exons and has an open reading frame resulting into a deduced polypeptide of 924 amino acids. The results verified that Lon genes have different pattern of expression and Lon3 gene is expressed specifically in mature pollen and sperm cells. Consequently Lon3 protease has a critical role in protein homeostasis within sperm cells regulating gametophytic cycle and fertilization. Lon1 gene is expressed highly in all tissues and is

induced in rapidly developing tissues such cotyledons, primary root and embryo. Lon4 is expressed in almost all tissues, nevertheless low, and is induced in young leaves and buds. Lon3 mutant analysis and specific localization determination will shed light on the function of Lon3 in mature pollen and verify the role of this protease in the gametophytic cycle and fertilization.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα καταρχήν να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν με οποιονδήποτε τρόπο στην επιτυχή εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Θα πρέπει να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια κ. Πόπη Παπαδοπούλου, Επίκ. Καθηγήτρια, και για την ευκαιρία που μου έδωσε να την εκπονήσω στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα δύο μέλη της επιτροπής κ. Δήμητρα Μηλιώνη, Επίκ. Καθηγήτρια του ΓΠΑ και τη κ. Δανιέλλα Τσίκου Λέκτορας με το ΠΔ 407, TBB, Πανεπ. Θεσσαλίας

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διδάκτορα Γεράσιμο Δάρα που με την βοήθεια, υπομονή και επιμονή του αυτή η εργασία ολοκληρώθηκε επιτυχώς.

Και τέλος να ευχαριστήσω τον πατέρα μου, που χωρίς την ανιδιοτελή βοήθεια και υποστήριξη του σε όλα τίποτα από όλα αυτά δεν θα ήταν δυνατό.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το φυτό *Arabidopsis thaliana*

Ο Johannes Thal περιέγραψε πρώτος το *Arabidopsis* τον 16ο αιώνα στα Γερμανικά βουνά Harz και το ονόμασε *Pilosella siliquosa*. Το όνομα του φυτού άλλαξε πολλές φορές μέχρι που το 1842 επικράτησε το όνομα *Arabidopsis thaliana*. Το *Arabidopsis thaliana* είναι αυτοφυές στην Ευρώπη, στη Μεσόγειο, στην Ανατολική Αφρική (σε μεγάλο υψόμετρο), στην Ανατολική και Κεντρική Ασία, από όπου και μάλλον προέρχεται. Πρόσφατα μάλιστα έχει βρεθεί στην Αμερική και στην Αυστραλία. Αναπτύσσεται κυρίως σε λιβάδια, βοσκότοπους (pastures), αλλά και σε όχθες ποταμών. Υπάρχουν διάφορα κοινά ονόματα του *Arabidopsis*, όπως thale cress (cress: κάρδαμο), Arabette des dames (Γαλλία), Bakrav (Σουηδία), Ludfu (Ουγγαρία), Mostaza Silvestre (Ισπανία).

Το φυτό *Arabidopsis thaliana* είναι ένα μικρό, μη βρώσιμο φυτό. Ανήκει στην οικογένεια *Brassicaceae* ή *Cruciferae*, αναπτύσσεται γρήγορα ολοκληρώνοντας τον βιολογικό του κύκλο σε διάστημα έξι εβδομάδων παράγοντας χιλιάδες μικρά σπέρματα. Τα άνθη του φυτού έχουν μήκος 2 mm και αποτελούνται από 4 στέπαλα, 4 πέταλα και 6 στήμονες. Οι καρποί έχουν μήκος 0,5 mm ενώ ένα ώριμο φυτό μπορεί να παράγει εκατοντάδες καρποταξίες με περισσότερους από 5000 σπόρους συνολικά. Τα φύλλα είναι καλυμμένα με μικρά μονοκύτταρα τριχίδια τα οποία έχουν καθιερωθεί για τη μελέτη της μορφογένεσης και της κυτταρικής διαφοροποίησης (Meinke et al. 1998). Η καλλιέργειά του είναι σχετικά εύκολη και οικονομική καταλαμβάνοντας πολύ μικρό χώρο. Αυτό αποτελεί μεγάλο πλεονέκτημα, καθώς, μ'αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η παράλληλη και εκτεταμένη έρευνα πολλών φυτών ταυτόχρονα, υπό ελεγχόμενες συνθήκες.

Το γονιδίωμα του *Arabidopsis* συγκριτικά με άλλα φυτά είναι μικρότερο (περίπου 1.3×10^8 ζεύγη βάσεων νουκλεοτιδίων, bp), είναι διπλοειδές και όχι ιδιαίτερα πολύπλοκο (π.χ λίγες επαναλήψεις μη κωδικού DNA). Επιπλέον, είναι το πρώτο φυτό του οποίο αποκωδικοποιήθηκε πλήρως η γονιδιωματική του ακολουθία, η οποία δημοσιεύτηκε το Δεκέμβριο του 2000 ως αποτέλεσμα της συλλογικής συνεργασίας μεταξύ ερευνητικών ομάδων *Arabidopsis Genome Initiative* (AGI 2000). Είναι πολύ εύκολη η διασταύρωση του και έτσι μπορεί να γίνει πολύ καλή γενετική ανάλυση. Ένα άλλο ουσιαστικό στοιχείο που καθιστά το *Arabidopsis* ένα σημαντικό μοντέλο στην Βιολογία είναι ο εύκολος μετασχηματισμός του, *in planta*, χωρίς τη φάση της ιστοκαλλιέργειας. Όλα αυτά, καθιστούν εύκολη την μοριακή και γενετική ανάλυση του φυτού και σε συνδυασμό με το ότι η ανάπτυξη, η αναπαραγωγή, η αντίδραση στις καταπονήσεις και τις ασθένειες δεν διαφέρει ιδιαίτερα από αυτήν των καλλιεργούμενων φυτών, καθιστούν το *Arabidopsis*, φυτό πολύ μεγάλης σημασίας για την βασική και εφαρμοσμένη έρευνα, ιδιαίτερα στο επίπεδο των Βιολογικών επιστημών.

Ο χαρακτηρισμός των γονιδίων και της λειτουργίας τους στο *Arabidopsis* και η εύρεση παράλληλα, ομόλογων γονιδίων με παρόμοιες λειτουργίες σε άλλες οικογένειες φυτών, παρέχουν πληροφορίες για την κατανόηση μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στη φυσιολογία των φυτών, με δυνατότητα βιοτεχνολογικών εφαρμογών στη γενετική βελτίωση φυτών με ιδιαίτερη οικονομική σημασία.

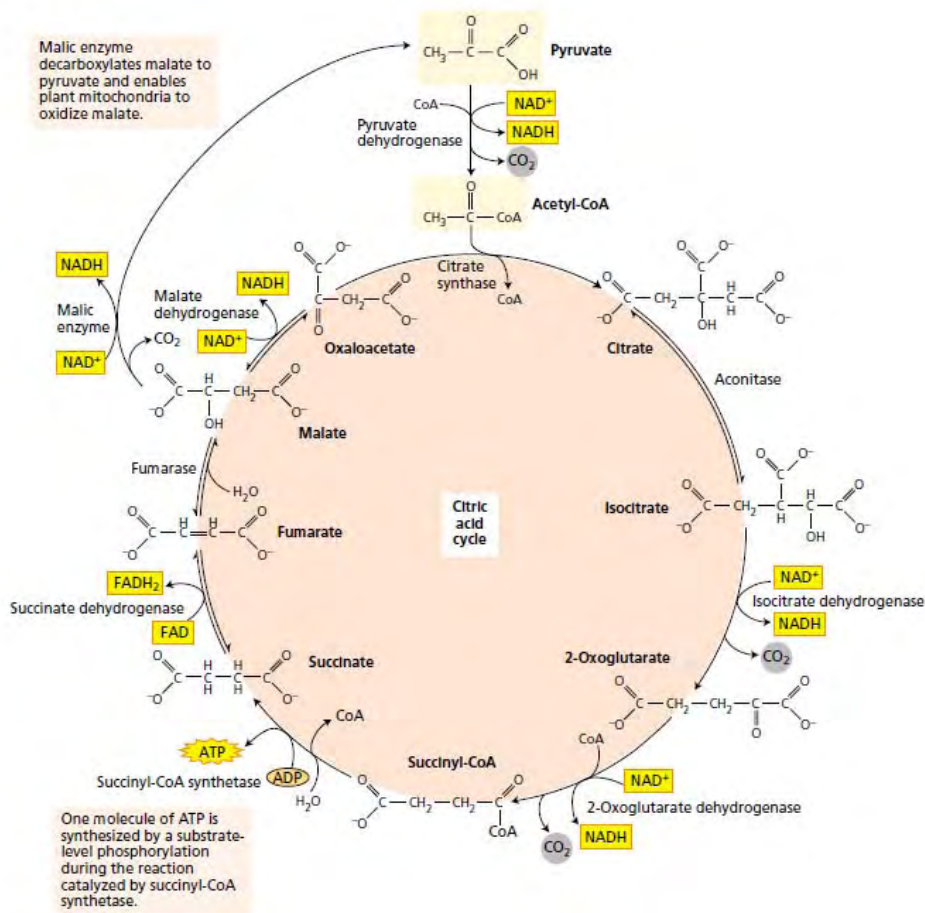
1.2 Μιτοχόνδρια και Χλωροπλάστες

Τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες είναι υποκυτταρικά οργανίδια τα οποία έχουν διπλή εξωτερική μεμβράνη, διαθέτουν το δικό τους DNA και δικό τους μηχανισμό πρωτεϊνοσύνθεσης (tRNA, ριβοσώματα). Βέβαια, το μεγαλύτερο ποσοστό των πρωτεϊνών και των ενζύμων τους κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA και εισάγονται στα οργανίδια και για αυτό το λόγο τα οργανίδια αυτά ονομάζονται ημιαυτόνομα. Η προέλευση των δύο οργανιδίων θεωρείται ότι έχει προέλθει από ενδοσυμβίωση προκαρυωτικών οργανισμών, τα οποία με τον καιρό εκφυλίστηκαν και το μεγαλύτερο ποσοστό του γονιδιώματός τους «μετανάστευσε» στον πυρήνα.

Στα δύο αυτά οργανίδια λαμβάνουν χώρα οι δύο κύριες διεργασίες του αερόβιου μεταβολισμού: Η αναπνοή και η φωτοσύνθεση. Κατά την αναπνοή η ενέργεια που παράγεται από τον μεταβολισμό των υδρογονανθράκων μετατρέπεται σε ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη). Το ATP αποθηκεύεται και στη συνέχεια χρησιμοποιείται σε βιοχημικές αντιδράσεις που χρειάζονται ενέργεια. Στα φυτά το κύριο υπόστρωμα της αναπνοής είναι η γλυκόζη, η σουκρόζη, φωσφοτριόζες, φωσφοεξόζες, φρουκτάνες, λιπίδια και σε ορισμένες περιπτώσεις ακόμα και πρωτεΐνες (Teiz & Zeiger 2010). Τα δύο αυτά οργανίδια είναι ημιαυτόνομα και για αυτό το λόγο απαιτούν επιπρόσθετους μηχανισμούς όπως μετάφραση μέσω οργανιδιακών ριβοσωμάτων, ανακύκλωση των πρωτεϊνών τους, κ.α.

1.2.1 Λειτουργικός ρόλος του μιτοχονδρίου

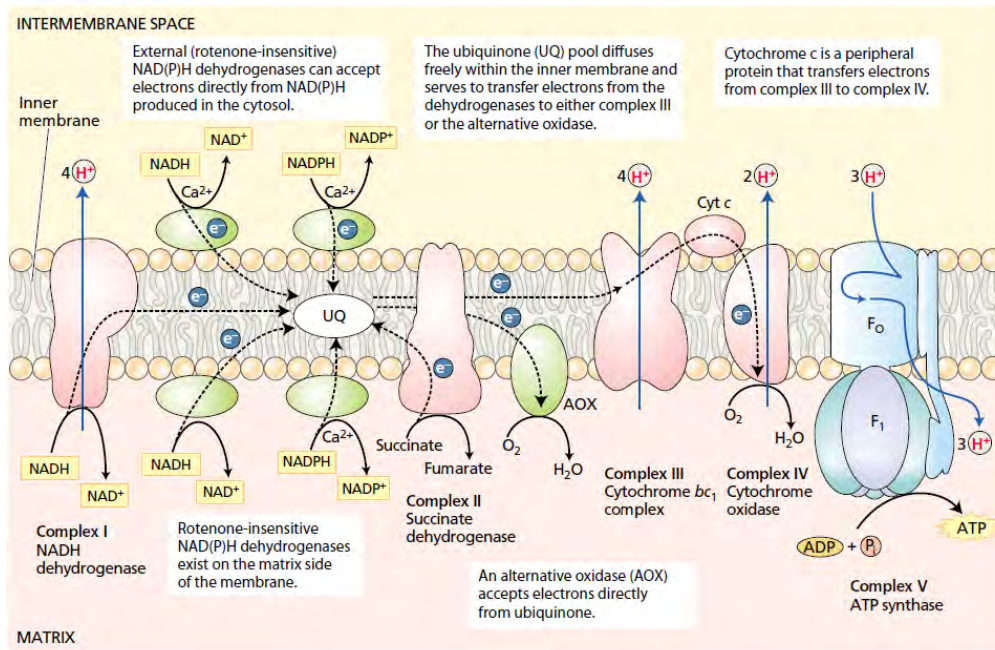
Στο μιτοχόνδριο λαμβάνουν χώρα δύο πολύ σημαντικές βιοχημικές διεργασίες: Ο **κύκλος του κιτρικού οξέος** ή **κύκλος του Krebs** ή **κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων** (Εικόνα 1) και η **συζευγμένη οξειδωτική φωσφορυλίωση** (Εικόνα 2). Η συζευγμένη οξειδωτική φωσφορυλίωση ονομάζεται συνεργιστική λειτουργία δύο επιμέρους συμπλόκων, τα οποία είναι η **αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων** (AAMH) και το **σύμπλοκο της συνθάσης του ATP**.



Εικόνα 1. Ο κύκλος του Krebs ή των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA) ή του κιτρικού οξέος

Ο κύκλος του κιτρικού τοποθετείται στη μήτρα του μιτοχονδρίου. Κατά τη λειτουργία του, συντίθενται πολλοί ενδιάμεσοι μεταβολίτες με ιδιαίτερη βιολογική σημασία, καθώς αποτελούν πρόδρομα μόρια για τη βιοσύνθεση άλλων μεταβολιτών (αμινοξέα). Κατά τη λειτουργία του κύκλου παράγονται επίσης τα συνένζυμα NADH και FADH₂ καθώς και ένα μόριο ATP. Τα NADH και FADH₂ έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των κυττάρων καθώς συμμετέχουν σε πολλές βιοχημικές αντιδράσεις ως συνένζυμα, αλλά ο σημαντικότερος ρόλος τους στο μιτοχόνδριο είναι ότι παρέχουν την απαραίτητη ενέργεια για να λειτουργήσει η **αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων**.

Η AAMH τοποθετείται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Αρχικά ένα μόριο NADH ανάγεται σε NAD⁺ (Σύμπλοκο I) απελευθερώνοντας ένα ηλεκτρόνιο και ένα πρωτόνιο. Το πρωτόνιο εξάγεται στον διαμεμβρανικό χώρο, ενώ το ηλεκτρόνιο ακολουθεί μια πορεία μέσα από τα σύμπλοκα της αλυσίδας (με μια σειρά οξειδωαναγωγικών αντιδράσεων) για να καταλήξει στον τελικό αποδέκτη του που είναι το μοριακό οξυγόνο (Σύμπλοκο IV) και το οξυγόνο ανάγεται σε νερό.



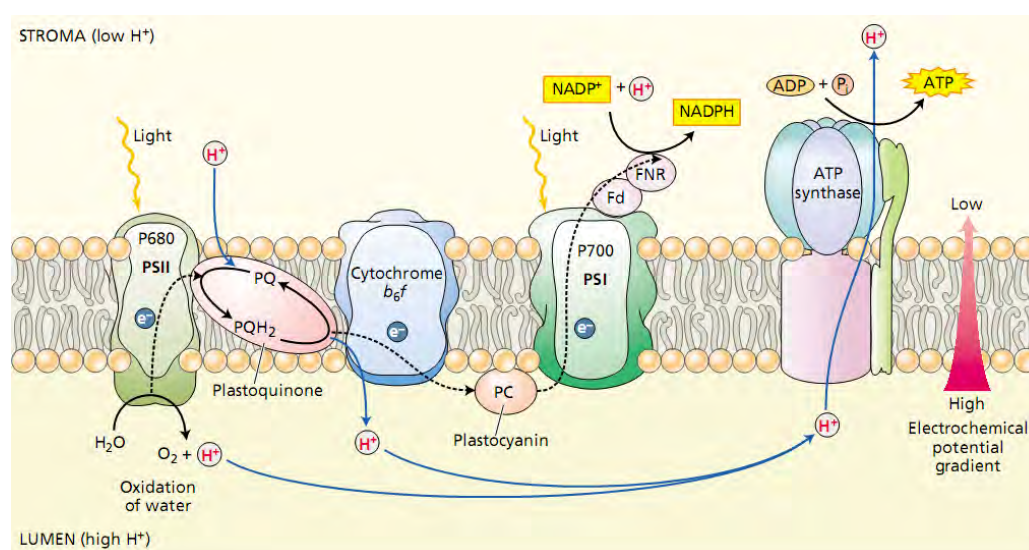
Εικόνα 2. η συζευγμένη οξειδωτική φωσφορυλίωση περιλαμβάνει την αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και το σύμπλοκο της συνθάσης του ATP

Όπως φαίνεται και στη σχηματική αναπαράσταση της AAMH (Εικόνα 2) η αναγωγή του NADH σε NAD⁺ εξασφαλίζει την απαραίτητη ενέργεια για τη λειτουργία της αλυσίδας. Αποτέλεσμα της αναγωγής αυτής είναι η παραγωγή πρωτονίων, τα οποία οδηγούνται προς τον διαμεμβρανικό χώρο από τα Σύμπλοκα I, III και IV της AAMH. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία διαβάθμισης πρωτονίων μεταξύ της μήτρας και του διαμεμβρανικού χώρου η οποία αποτελεί την κινητήριου δύναμη για τη **συνθάση του ATP** (αναφέρεται και ως Σύμπλοκο V, αλλά δεν αποτελεί μέρος της AAMH). Η συνθάση του ATP αντλεί πρωτόνια από το διαμεμβρανικό χώρο προς τη μήτρα, με σκοπό να εξισοροπήσει τη διαβάθμιση που δημιουργείται από τη λειτουργία της AAMH με ταυτόχρονη παραγωγή ATP. Λόγω του τρόπου με τον οποίο λειτουργούν τα δύο σύμπλοκα, όλη η βιοχημική διεργασία ονομάζεται **συζευγμένη οξειδωτική φωσφορυλίωση**. Πέραν από την παραγωγή ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, στα μιτοχόνδρια λαμβάνουν χώρα και μια σειρά από άλλες σημαντικές μεταβολικές διεργασίες όπως η βιοσύνθεση αμινοξέων, ο καταβολισμός των λιπαρών οξέων.

1.2.2 Λειτουργικός ρόλος του χλωροπλάστη

Η σημαντικότερη διεργασία που λαμβάνει χώρα στους χλωροπλάστες είναι η **φωτοσύνθεση**. Συνοπτικά, φωτοσύνθεση ονομάζεται η διαδικασία κατά την οποία γίνεται δέσμευση της ηλιακής ενέργειας και μετατρέπεται σε χημική υπό τη μορφή αλυσίδων άνθρακα. Η φωτοσύνθεση γίνεται κυρίως στους χλωροπλάστες των κυττάρων

του **μεσοφύλλου** των φύλλων. Η απορρόφηση της ηλιακής ενέργειας γίνεται από ειδικές χρωστικές οι οποίες ονομάζονται **χλωροφύλλες**. Κατά τη φωτοσύνθεση αρχικά γίνεται οξείδωση του νερού από την ηλιακή ενέργεια και παράγεται μοριακό οξυγόνο (φωτόλυση του νερού) και αναγωγή του διοξειδίου του άνθρακα για να σχηματιστούν αλυσίδες άνθρακα (σάκχαρα). Η διαδικασία μπορεί να χωριστεί σε δύο επιμέρους κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τις αντιδράσεις φωτός, όπου γίνεται η απορρόφηση της ηλιακής ενέργειας από τις χλωροφύλλες και η φωτόλυση του νερού (ελευθερώνονται ηλεκτρόνια). Η διαδικασία αυτή γίνεται στη μεμβράνη του θυλακοειδούς και ως τελικά προϊόντα έχει το ATP και το NADPH. Οι δομικές μονάδες του μηχανισμού ονομάζονται **φωτοσυστήματα (PSI και PSII)** και στο ενεργό τους κέντρο έχουν μόρια χλωροφύλλης. Τα δύο φωτοσυστήματα μαζί με άλλα τρία πρωτεϊνικά σύμπλοκα συγκροτούν την **φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ΦΑΜΗ, Εικόνα 3)**.



Εικόνα 3. Η φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων

Η ηλιακή ακτινοβολία διεγείρει τη χλωροφύλλη στο φωτοσύστημα II (PSII). Η φορτισμένη από την ακτινοβολία χλωροφύλλη δίνει ηλεκτρόνια στην πλαστοκινόνη και αποφορτίζεται, ενώ ροή ηλεκτρονίων προς την πλαστοκινόνη υπάρχει και από το σύμπλοκο της φωτόλυσης του νερού. Τα ηλεκτρόνια, με μια πορεία οξειδωαναγωγικών αντιδράσεων καταλήγουν στο φωτοσύστημα I και στη φερρεδοξίνη. Τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων είναι το NADP^+ το οποίο ανάγεται σε NADPH. Τα πρωτόνια που παράγονται από την φωτόλυση του νερού, αξιοποιούνται από τη συνθάση του ATP, η οποία διατηρεί την ομοιόσταση των πρωτονίων μεταξύ lumen και στρώματος και ταυτόχρονα παράγει και ATP. Το NADPH και το ATP που παράγονται χρησιμοποιούνται στο δεύτερο στάδιο της φωτοσύνθεσης ως ενέργεια για την αναγωγή του διοξειδίου του άνθρακα και την παραγωγή υδρογονανθράκων (κύκλος του Calvin).

1.3 Ο ρόλος της βιογένεσης των οργανιδίων στους μοριακούς μηχανισμούς ανάπτυξης των φυτών

Εξαιτίας της ενδοσυμβίωσης με τα α-πρωτεοβακτήρια και τα κυανοβακτήρια, τα ευκαρυωτικά κύτταρα απέκτησαν τα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες, με αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση των βιοενεργειακών και βιοσυνθετικών μηχανισμών οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την ομαλή λειτουργία των κυττάρων (Dyall *et al.*, 2004). Στη διάρκεια της εξέλιξης, οι ενδοσυμβιώτες έχασαν μεγάλο μέρος του γονιδιώματός τους, το οποίο μεταφέρθηκε στον πυρήνα του κυττάρου, χάνοντας έτσι την αυτονομία τους με αποτέλεσμα να διαφοροποιηθούν στα οργανίδια έχοντας πλέον διακριτούς ρόλους στη φυσιολογία του κυττάρου (Dyall *et al.*, 2004).

Οι λειτουργίες των μιτοχονδρίων και των χλωροπλάστων εξαρτώνται κυρίως από πρωτεΐνες που συντίθενται στο κυτταρόπλασμα και κωδικοποιούνται από τον πυρήνα. Έχει υπολογισθεί ότι το πρωτέομα των μιτοχονδρίων και των χλωροπλάστων αποτελείται από 2000 και 2700 πρωτεΐνες, αντίστοιχα (Millar *et al.*, 2006). Τα φυτικά κύτταρα έχουν διαχωρίσει τη φωτοσύνθεση, την οξειδωτική φωσφορυλίωση και γενικότερα ένα μεγάλο αριθμό άλλων πρωτογενών βιοχημικών μονοπατιών ανάμεσα στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες. Αυτός ο διαχωρισμός είναι κρίσιμος για τη διατήρηση όλων των φυσιολογικών και βιοχημικών ιδιοτήτων του κυττάρου, προκειμένου τα κύτταρα να βρίσκονται σε ομοιόσταση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτικών ιστών. Γίνεται εύκολα αντιληπτό, ότι οι πρωτεΐνες πρέπει να κωδικοποιούνται και να τοποθετούνται στα οργανίδια υπό τον έλεγχο πολύπλοκων μηχανισμών οι οποίοι καθορίζονται από φυσιολογικούς, περιβαλλοντικούς και αναπτυξιακούς παράγοντες. Μέρος αυτών των μηχανισμών είναι και η επικοινωνία μεταξύ πυρήνα και οργανιδίων η οποία είναι πολύ κρίσιμη ώστε να επέλθει η άμεση απόκριση στα περιβαλλοντικά και αναπτυξιακά ερεθίσματα.

Η μελέτη των μηχανισμών διακίνησης των πρωτεϊνών ανάμεσα στα οργανίδια και τον πυρήνα, παράλληλα με την ανάλυση των περιβαλλοντικών και αναπτυξιακών παραγόντων, καθίσταται εξαιρετικά σημαντική προκειμένου να κατανοηθεί ο ρόλος της βιογένεσης και λειτουργίας των οργανιδίων στην ανάπτυξη των φυτών.

1.4 Μηχανισμοί πρωτεόλυσης στα φυτά

1.4.1 Πρωτεάσωμα και πρωτέασες που τοποθετούνται στα οργανίδια

Στο σύνολο τους οι βιολογικές ενδοκυτταρικές λειτουργίες βασίζονται στην ομοιόσταση και στην ανακύκλωση των πρωτεϊνών. Η μοίρα των πρωτεϊνών καθορίζεται από τη ρυθμιζόμενη βιοσύνθεση νέων πολυπεπτιδίων και την εξειδικευμένη αποδόμηση των

προυπάρχοντων πρωτεϊνικών μορίων. Το 26S πρωτεάσωμα παίζει σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση των πρωτεϊνών, απαλείφοντας ένζυμα που δεν χρειάζονται και αποσυναρμολογώντας ρυθμιστικά δίκτυα που προυπάρχουν (Hershko and Ciechanover, 1998). Αυτός ο πρωτεολυτικός μηχανισμός ρυθμίζει και συντονίζει την ανάπτυξη των φυτών επηρεάζοντας την εμβρυογένεση, τη φωτομορφογένεση, την ανάπτυξη του άνθους, τη γήρανση και την απόκριση από ορμονικά σήματα (Smalle and Vierstra, 2004). Παρόλα αυτά, οι πρωτεΐνες-στόχοι του συστήματος ουμπικουιλίνης/26S πρωτεασώματος περιορίζονται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των κυττάρων.

Στα φυτικά οργανίδια υπάρχει ένας ευκρινής μηχανισμός ελέγχου, που επιλεκτικά αφαιρεί μη συναρμολογημένα ή σταθερά πολυπεπτίδια προστατεύοντας από δυνητικά επικίνδυνα συσσωματώματα πρωτεϊνικών μορίων. Ο μηχανισμός ποιοτικού ελέγχου των πρωτεϊνών στα ευκαρυωτικά οργανίδια, όπως είναι τα μιτοχόνδρια, τα υπεροξυσώματα και τα πλαστίδια, πραγματοποιείται από μέλη των ATP-εξαρτώμενων πρωτεϊνών, που είναι οι Clp, FtsH και οι Lon (Adam *et al.*, 2001; Sinvany-Villalobo *et al.*, 2004; Sakamoto, 2006). Αυτές οι πρωτεάσες, όπως και το 26S πρωτεάσωμα, ανήκουν στην υπεροικογένεια των AAA⁺ πρωτεϊνών (ATPases associated with diverse cellular activities, ATPάσες που σχετίζονται με διάφορες κυτταρικές λειτουργίες) (Neuwald *et al.*, 1999; Iyer *et al.*, 2004). Η δομική μονάδα των AAA⁺ πρωτεϊνών, χαρακτηρίζεται από το AAA⁺ τμήμα που αποτελείται από 220-250 αμινοξέα με ή και χωρίς επαναλήψεις. Γενικά, το τμήμα AAA⁺ καθορίζει την επιλογή των στόχων και τη ρύθμιση της λειτουργίας της πρωτεάσης. Μέχρι σήμερα, έχει πραγματοποιηθεί σημαντική πρόοδος στην έρευνα των εξαρτώμενων από το ATP πρωτεασών που συναρμολογούνται από ανεξάρτητα εκφραζόμενες AAA⁺ πρωτεϊνικές υπομονάδες όπως είναι οι Clp, ή από πρωτεολυτικά κέντρα που εδράζονται στο ίδιο πολυπεπτίδιο, όπως είναι οι FtsH και οι Lon.

1.4.2. Σύστημα πρωτεόλυσης Clp

Η πρωτεάση Clp είναι ένα ένζυμο που αποτελείται από εξειδικευμένες υπομονάδες. Η καταλυτική περιοχή πρωτεόλυσης και η περιοχή ATPάσης βρίσκονται σε διαφορετικές υπομονάδες του ενζύμου. Στο *E.coli*, η υπομονάδα της πρωτεάσης ClpP δημιουργεί ένα επταμερές δακτύλιο με στενό κεντρικό πόρο. Δύο τέτοιοι δακτύλιοι αλληλεπιδρούν μεταξύ τους δημιουργώντας μια μεγαλύτερη και πιο πολύπλοκη δομή. Ένα άλλο σύμπλεγμα είναι αυτό που αποτελείται από υπομονάδες περιοχών ATPάσης, τη ClpA ή ClpX (όταν πρόκειται για ένα τμήμα AAA⁺ ή πολλαπλά, αντίστοιχα) και συνδέεται εξωτερικά του συμπλέγματος που διενεργεί την πρωτεόλυση. Οι ClpA, ClpX δημιουργούν ανεξάρτητα ένα ομοεξαμερές δακτύλιο χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών AAA⁺, ο οποίος έχει τη δράση μοριακού συνοδού. Πρωτεάσες ομόλογες της Clp από το

E.coli έχουν βρεθεί και χαρακτηρισθεί στους ανώτερους ευκαρυώτες, αλλά δεν υπάρχουν στους κατώτερους ευκαρυώτες, όπως είναι η ζύμη. Παρ' όλα αυτά, παρόμοιες πρωτεΐνες με τις Clp (Clp-like), αλλά χωρίς πρωτεολυτική δράση έχουν βρεθεί στα μιτοχόνδρια κυττάρων ζύμης (Van Dyck *et al.*, 1998). Στο *Arabidopsis* υπάρχουν 14 γονίδια που κωδικοποιούν υπομονάδες Clp. Πρόσφατα βρέθηκε ότι ένα μέρος του ολοενζύμου Clp τοποθετείται στο στρώμα του χλωροπλάστη και αποτελείται από έξι ισομερή Clp (ClpP1, ClpP2, ClpP3, ClpP4, ClpP5, ClpP6), τέσσερις μη πρωτεολυτικές υπομονάδες (ClpR1-ClpR4) και δύο εξειδικευμένες για τα φυτά υπομονάδες, τις ClpS1, ClpS2 (Peltier *et al.*, 2004).

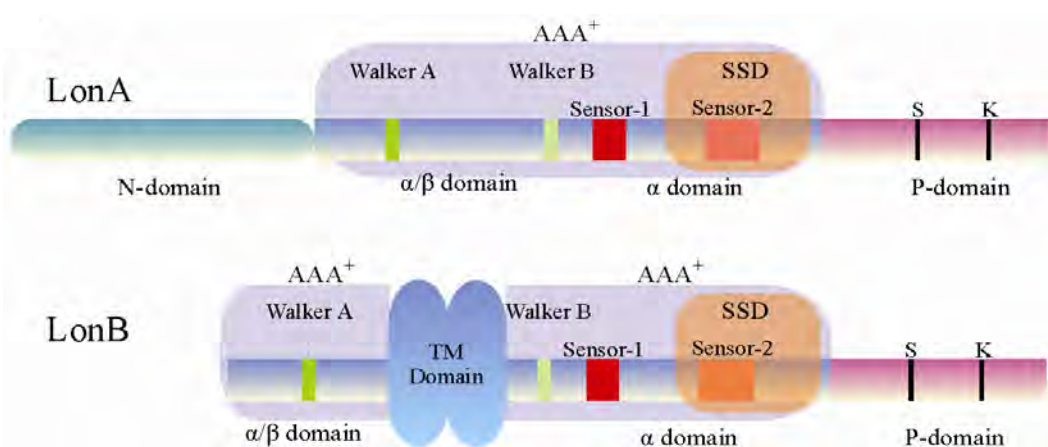
1.4.3 Σύστημα πρωτεόλυσης FtsH

Η πρωτεάση FtsH αρχικά χαρακτηρίστηκε στο *E.coli* ότι αποικοδομεί πρωτεΐνες μικρής διάρκειας ζωής (short lived). Σε αντίθεση με τη πρωτεάση Clp, που αποτελείται από πολλαπλές υπομονάδες με διαφορετικές λειτουργίες, η πρωτεάση FtsH έχει τα τμήματα ATPάσης και πρωτεόλυσης στο ίδιο πολυπεπτίδιο και από αυτό δημιουργούνται ομοολιγομερή σύμπλοκα. Τα ομόλογα της πρωτεάσης FtsH στη ζύμη, Yta10-12p, έχουν χαρακτηρισθεί λεπτομερώς ότι τοποθετούνται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Langer 2000). Έπειτα από κρυσταλλογραφική ανάλυση με ακτίνες X, το τμήμα ATPάσης από FtsH του *E.coli* δημιουργεί ένα εξαμερές δακτύλιο που περιέχει συντηρημένα αρωματικά αμινοξέα. Στους χλωροπλάστες των φυτικών κυττάρων τα ομόλογα των FtsH τοποθετούνται στις μεμβράνες των θυλακοειδών στους χλωροπλάστες έτσι, ώστε το τμήμα της πρωτεάσης να αντικρίζει το στρώμα (Chen *et al.*, 2000, Sakamoto *et al.* 2003). Πρόσφατα, στα κύτταρα ζύμης οι πρωτεάσες FtsH εντοπίστηκαν και στα μιτοχόνδρια (Komenda *et al.*, 2006). Το φυτό *Arabidopsis thaliana* έχει δώδεκα γονίδια *FtsH*. Εννιά από τα δώδεκα τοποθετούνται στον χλωροπλάστη, ενώ τα υπόλοιπα τρία (FtsH3, 4, 10) στα μιτοχόνδρια (Adam *et al.*, 2001). Οι πρωτεάσες FtsH παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία των χλωροπλάστων επειδή αποικοδομούν τη φώτο-οξειδωμένη και «κατεστραμμένη» πρωτεΐνη D1, καθώς και άλλες πρωτεΐνες του φωτοσυστήματος II (PSII) (Sakamoto *et al.*, 2006).

1.4.5 Σύστημα πρωτεόλυσης Lon

Το όνομα Lon δόθηκε εξαιτίας του φαινοτύπου των μεταλλαγμένων κυττάρων *Escherichia coli* K-12 *long* (Donch and Greenberg, 1968) και ήταν η πρώτη πρωτεάση με το τμήμα AAA⁺ που ανακαλύφθηκε (Chung and Goldberg, 1981). Η πρωτεάση Lon αντιστοιχεί σε έναν καθολικό πρωτεολυτικό μηχανισμό, ο οποίος εντοπίζεται σε όλους

τους οργανισμούς, μονοκύτταρους και πολυκύτταρους. Τα ορθόλογα της Lon χωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες (Rotanova *et al.*, 2006). Ο τύπος των LonA έχει ένα μακρύ άμινοτελικό τμήμα (N-domain) μαζί με την κεντρική δομή ATPάσης και το καρβόξυ-τελικό τμήμα (C-terminal) στο οποίο περιέχεται η καταλυτική πρωτεολυτική δυάδα Σερίνης-Λυσίνης. Τα δύο αυτά αμινοξέα είναι συντηρημένα σε συγκεκριμένες θέσεις. Αντίθετα, η υποκατηγορία των πρωτεασών LonB εντοπίζεται κυρίως στα Αρχαιοβακτήρια που δεν έχουν τις πρωτεάσες Clp και FtsH (Εικόνα 4). Το τμήμα AAA⁺ αποτελείται από 2 δομικές περιοχές: την περιοχή πρόσδεσης του νουκλεοτιδίου (α/β) και την περιοχή της έλικας (α). Η περιοχή α/β περιέχει συντηρημένα μοτίβα, τα sensor-1, Walker A και B που συμμετέχουν στην πρόσδεση και στην υδρόλυσή του ATP, καθώς και στη ρύθμιση της πρωτεολυτικής δράσης κατά τη διάρκεια των μοριακών αλληλεπιδράσεων (Neuwald *et al.*, 1999; Εικόνα. 4). Η περιοχή (α) περιέχει τουλάχιστον ένα συντηρημένο μοτίβο, το sensor-2 που χαρακτηρίζεται από συντήρηση του αμινοξέως Αργινίνη (Arg), που συμμετέχει στην υδρόλυση του ATP και στην αναδιάταξη της πρωτεΐνης κατά τις αλληλεπιδράσεις (Neuwald *et al.*, 1999; Iyer *et al.*, 2004). Αντίθετα με το τμήμα AAA⁺ που είναι υψηλά συντηρημένο σε όλα τα ορθόλογα των πρωτεασών Lon, το επακόλουθο τμήμα SSD είναι σημαντικά διαφορετικό και καθόλου συντηρημένο μεταξύ των ορθολόγων. Το τμήμα SSD (Sensor and Substrate Discrimination domain επικράτεια διαφοροποίησης αισθητήρα και υποστρώματος) παίζει σημαντικότερο ρόλο στην αναγνώριση και πρόσδεση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων (Smith *et al.*, 1999). Η ορθή αναγνώριση του υποστρώματος είναι κρίσιμη διαδικασία για την ολοκληρωμένη λειτουργική δράση της Lon, που μπορεί να σχετίζεται είτε με τη πρωτεόλυση, είτε με την αναδίπλωση πρωτεϊνικών μορίων. Το τμήμα SSD είναι μέρος της περιοχής (α) και πιθανώς επεκτείνεται μέχρι το μοτίβο sensor-2 του τμήματος AAA⁺.



Εικόνα 4. Δομικά χαρακτηριστικά των Lon πρωτεασών. Σχηματική αναπαράσταση της οικογένειας LonA, απεικονίζεται το N-τμήμα, το κεντρικό τμήμα AAA⁺ και το τμήμα SSD. Στο καρβόξυ τελικό-άκρο βρίσκεται το πρωτεολυτικό τμήμα με τα συντηρημένα αμινοξέα Σερίνης (S)

και Λυσίνης (K). Στην οικογένεια LonB το τμήμα AAA⁺ διακόπτεται από διαμεμβρανικές περιοχές υπεύθυνες για την τοποθέτηση στη μεμβράνη, ενώ δεν υπάρχει το N-τμήμα.

Ο ρόλος της πρωτεάσης Lon στην αποικοδόμηση των οξειδωμένων πρωτεϊνών που παράγονται στα μιτοχόνδρια έχει αναλυθεί διεξοδικά στους μη φυτικούς οργανισμούς. Τα μιτοχόνδρια κατέχουν σημαντικό ρόλο στην παροχή ενέργειας στο κύτταρο και συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των αμινοξέων, στην οξείδωση των λιπαρών οξέων καθώς και σε πλήθος άλλων μεταβολικών διεργασιών. Παρόλα αυτά, τα μιτοχόνδρια αποτελούν τις κύριες θέσεις παραγωγής οξειδωτικών μορίων ενώ ταυτόχρονα αποτελούν βασικούς στόχους οξειδωτικής καταστροφής. Κύτταρα ζύμης με μετάλλαξη στο γονίδιο *PIM1* (*proteolysis in mitochondria*, πρωτεόλυση στα μιτοχόνδρια, ομόλογο του *Lon*) παρουσιάζουν προβλήματα στην αναπνοή εξαιτίας συσσώρευσης βλαβών στην ακεραιότητα του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (Suzuki *et al.*, 1994; van Dyck *et al.*, 1994). Επιπρόσθετα, μελέτες στο μύκητα *Podospora anserina* έδειξαν ότι η υπερέκφραση της πρωτεάσης Lon, μειώνει τις καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες, αυξάνει την ανθεκτικότητα έναντι εξωγενούς οξειδωτικού στρες και παράλληλα επιμηκύνει τη διάρκεια ζωής του μικροοργανισμού (Luce and Osiewacz, 2009). Εκτός της πρωτεολυτικής λειτουργίας, έχει αναφερθεί ότι η Lon παρουσιάζει και ιδιότητες μοριακού συνοδού συμμετέχοντας στη συναρμολόγηση πρωτεϊνικών συμπλόκων (Rep *et al.*, 1996), αλλά συνδέεται και με συγκεκριμένες ακολουθίες μιτοχονδριακού DNA για να διατηρηθεί η σταθερή οργάνωση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (Lu *et al.*, 2007). Τα παραπάνω αναδεικνύουν τη σημαντική λειτουργική δράση του μοριακού μηχανισμού Lon ως σύστημα πρωτεόλυσης ή/και μοριακού συνοδού προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόσταση, η δομή και η ανθεκτικότητά του μιτοχονδρίου έναντι συνθηκών οξειδωτικής καταπόνησης.

Στο *E. coli*, η πρωτεάση EcLon αποικοδομεί περίπου το 50% των πρωτεϊνών που έχουν λανθασμένη αναδίπλωση, αναγνωρίζοντας αρωματικά και υδρόφοβα αμινοξέα τα οποία είναι προσβάσιμα μόνο σε μη αναδιπλωμένα πολυπεπτίδια, τα οποία όμως δεν είναι εκτεθειμένα όταν η πρωτεΐνη είναι σωστά αναδιπλωμένη (Gur and Sauer, 2008). Πρωτεΐνες που δεν παρουσιάζουν τη σωστή αναδίπλωση, συσσωρεύονται στη μήτρα και διασπώνται από την πρωτεάση PIM1 σε συνεργασία με το μοριακό συνοδό Hsp70 (Wagner *et al.*, 1994). Κύτταρα ζύμης που φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *PIM1* είναι ανίκανα να διατηρήσουν σταθερή την οργάνωση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (mtDNA) (Suzuki *et al.*, 1994; van Dyck *et al.*, 1994). Από τη στιγμή που σημαντικά συστατικά της αναπνευστικής αλυσίδας κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, τα μεταλλάγματα *pim1* της ζύμης έχουν πρόβλημα στην αναπνοή και δεν

έχουν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν σε θρεπτικά υποστρώματα χωρίς επεξεργασμένες (non fermentable) πηγές άνθρακα.

Στα θηλαστικά κατά τη διάρκεια της γήρανσης, έχει βρεθεί ότι περιορίζεται η έκφραση του γονιδίου *Lon*, κάτι το οποίο συσχετίζεται με τη συσσώρευση οξειδωμένων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (Lee *et al.*, 1999). Η μιτοχονδριακή ακονιτάση όταν οξειδωθεί εξαιτίας της υδροφοβικής της μορφής αναγνωρίζεται επιλεκτικά από τη πρωτεάση Lon και αποικοδομείται (Bota and Davies, 2002), με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και τον κυτταρικό θάνατο (Bota *et al.*, 2005). Η πρωτεϊνική καρβονυλίωση προκαλείται από ασθένειες και αποτελεί ένδειξη έντονης οξειδωτικής βλάβης και δυσλειτουργίας ενζυμικών συστημάτων. Για αυτούς τους λόγους, οι πρωτεάσες Lon αποτελούν σημαντικά συστατικά του μηχανισμού της κυτταρικής άμυνας έναντι της οξειδωτικής καταπόνησης προστατεύοντας από την κυτταροτοξική οξείδωση και συσσωμάτωση των πρωτεϊνών.

Η διατήρηση ενός κοινού λειτουργικού ρόλου από τους προκαρυώτες μέχρι και τους ευκαρυώτες υποδηλώνει τον σημαντικό ρόλο των πρωτεασών Lon στην προστασία των κυττάρων (Teichmann *et al.*, 1996). Σε κύτταρα ζύμης στα οποία υπάρχει έλλειψη της PIM1, η Lon πρωτεάση από το *E.coli* μπορεί να αποδομήσει τις προβληματικά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, αποδεικνύοντας με αυτό τον τρόπο την ισοδυναμία της πρωτεολυτικής δράσης. Επίσης, έχει αναφερθεί και μια διπλή λειτουργία των Lon πρωτεασών (Rep *et al.*, 1996a).

1.5 Η πρωτεάση Lon στα φυτά

Οι πληροφορίες για την υποκυτταρική τοποθέτηση, βιοχημική λειτουργία και το φυσιολογικό ρόλο των πρωτεασών Lon στα φυτά είναι περιορισμένες. Αντίθετα με το *E. coli* και το *Saccharomyces cerevisiae* που περιέχουν μόνο ένα *Lon* αντίγραφο, στα φυτά υπάρχουν πολλαπλά *Lon*. Υπάρχουν ενδείξεις ότι, όπως στα βακτήρια και στα ευκαρυωτικά ομόλογα, οι φυτικές προέλευσης πρωτεάσες Lon συνδυάζουν την πρωτεολυτική δράση με λειτουργίες που σχετίζονται με την συναρμολόγηση πρωτεϊνικών μορίων, προκειμένου να δομηθεί το σύστημα ποιοτικού και ποσοτικού ελέγχου των πρωτεϊνών στα φυτικά οργανίδια (Sakamoto, 2006). Τα ισομερή των πρωτεασών Lon τοποθετούνται υποκυτταρικά σε διάφορα οργανίδια, όπως τα μιτοχόνδρια, οι χλωροπλάστες και τα υπεροξυσώματα (Sarría *et al.*, 1998; Adam *et al.*, 2001).

Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα φυτικά μιτοχόνδρια σε συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης χρησιμοποιούν το πρωτεολυτικό σύστημα Lon για να ανταπεξέλθουν (Sweetlove *et al.*,

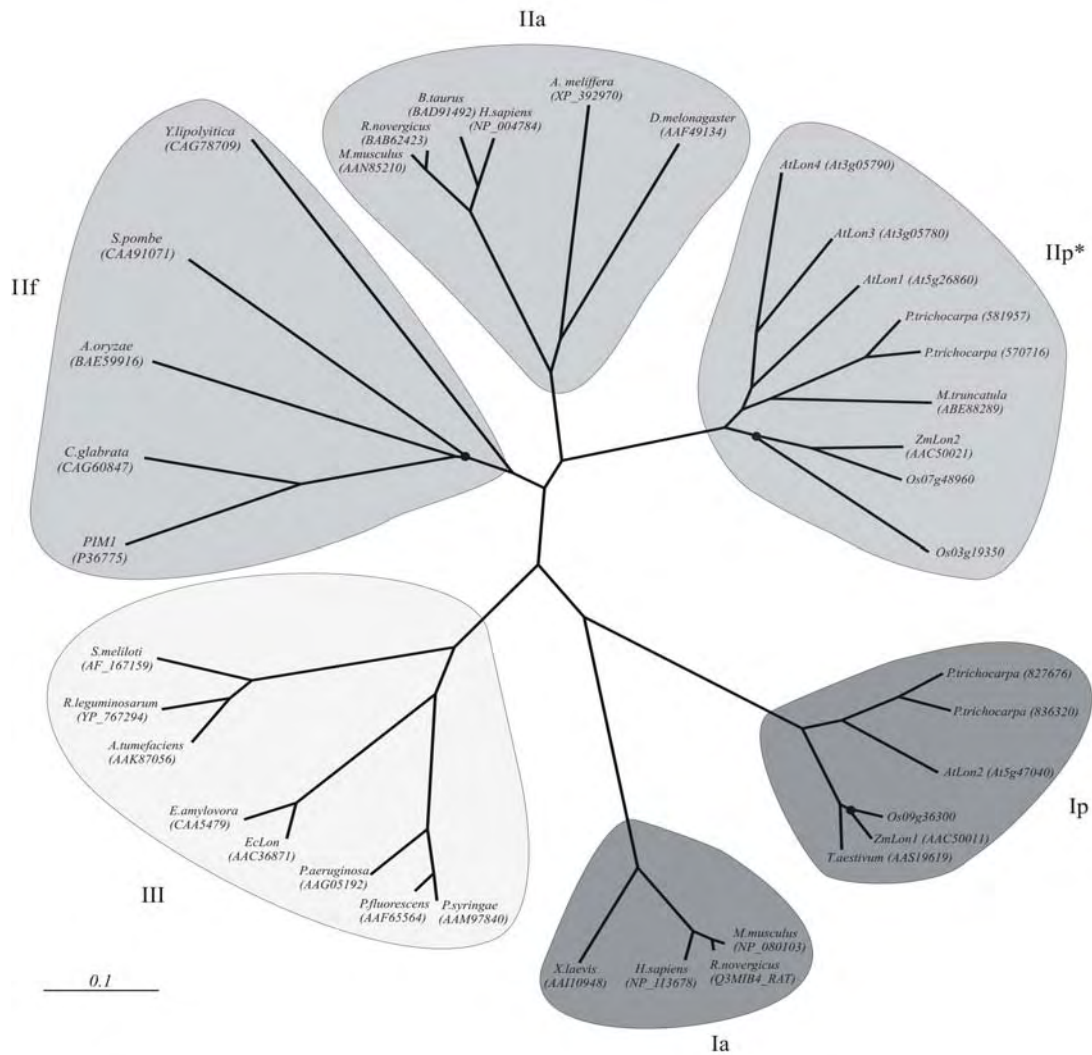
2002; Lister *et al.*, 2004). Έχει δειχθεί σε φυτά φασολιάς ότι η πρωτεάση Lon αποικοδομεί ένα μιτοχονδριακό πεππίδιο που σχετίζεται με την κυτταροπλασματική αρρενοστεριότητα (cytoplasmic male sterility) (Sarría *et al.*, 1998). Επιπρόσθετα, σε φυτικά μιτοχόνδρια τα οποία είχαν υποστεί οξειδωτικό στρες βρέθηκε ότι η εξαρτώμενη από ATP πρωτεάση Lon παρουσιάζει υψηλά επίπεδα ενεργότητας και άρα η πρωτεάση Lon συμβάλλει στην αποικοδόμηση των οξειδωμένων και προβληματικών πρωτεϊνών (Sweetlove *et al.*, 2002).

Τα ισόμορφα της πρωτεάσης Lon στα φυτά, κωδικοποιούνται από οικογένειες πυρηνικών γονιδίων και έχουν πεππίδια οδηγούς για διάφορα οργανίδια. Αυτή η διαφορετική υποκυτταρική τοποθέτηση μάλλον προέρχεται από τη μετά-ενδοσυμβιωτική συνεξέλιξη μεταξύ των φυτικών οργανιδίων και υποδεικνύει το ρόλο της πρωτεάσης Lon στη σταθερότητα και στην ομοιόσταση των οργανιδίων και συνεπώς του κυττάρου. Με βάση την πρωτεϊνική ομολογία, έχουν αναγνωρισθεί τέσσερα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεάσες Lon στο *Arabidopsis thaliana* (Sinvañy-Villalobo *et al.*, 2004; Janska *et al.*, 2010). Γενετική ανάλυση των μεταλλαγμάτων *lon1* έδειξε ότι η πρωτεΐνη AtLon1 συμμετέχει στη βιογένεση του μιτοχονδρίου και στη διατήρηση της λειτουργίας του, που είναι απαραίτητη για τη μετά-εμβρυακή ανάπτυξη και εγκαθίδρυση του φυτού (Rigas *et al.*, 2009a, b). Η πρωτεΐνη AtLon4 τοποθετείται ταυτόχρονα στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες (Sakamoto, 2006; Ostersetzer *et al.*, 2007). Αντίθετα, η πρωτεΐνη AtLon2 τοποθετείται στα υπεροξυσώματα και συμμετέχει στην είσοδο των πρωτεϊνών στη μήτρα, (Lingard και Bartel, 2009), ενώ το γονίδιο *AtLon3* πιθανότατα είναι ψευδογονίδιο αφού πειραματικές αναλύσεις έδειξαν ότι δεν εκφράζεται (Ostersetzer *et al.*, 2007; Rigas *et al.*, 2009a).

1.5.1 Η πρωτεάση AtLon1 ανήκει στην υπεροικογένεια AAA⁺

Ένας μεγάλος αριθμός ορθόλογων πρωτεασών Lon που ανήκουν στην υποοικογένεια LonA εντοπίστηκαν μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης. Έτσι η φυλογενετική σύγκριση των οικογενειών Lon πρωτεασών από διάφορα βιολογικά μοντέλα αποκάλυψε ότι μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις μεγάλες ομάδες σύμφωνα με την υποκυτταρική τους τοποθέτηση (Εικόνα 5). Οι κλάδοι I και II στοιχειοθετούνται λόγω υποκυτταρικής τοποθέτησης στα υπεροξυσώματα και στα μιτοχόνδρια στους ευκαρυώτες, ενώ ο κλάδος III περιέχει μόνο τα βακτηριακά ορθόλογα. Τα μέλη από τις δύο μεγάλες ομάδες ευκαρυωτικών στους κλάδους I και II διαχωρίζονται σε υποκλάδους σύμφωνα με την προέλευση τους. Ο κλάδος I χωρίζεται σε δυο υποομάδες, Ia περιέχονται πρωτεάσες Lon -που οδηγούνται στο υπεροξύσωμα- από ζώα, ενώ στον κλάδο Ib πρωτεάσες Lon από τα φυτά. Παρόμοια, ο κλάδος II χωρίζεται σε 3 υποομάδες. Τα ορθόλογα των Lon

πρωτεασών που οδηγούνται στα μιτοχόνδρια από ζωικούς οργανισμούς ομαδοποιούνται στον κλάδο IIa, ενώ ο κλάδος IIf περιέχει Lon ορθόλογα μυκήτων. Ο κλάδος IIp περιέχει μόνο Lon από φυτά, ταξινόμηση που συμφωνεί με τις προβλέψεις βιοπληροφορικής ανάλυσης και με τις βάσεις δεδομένων. Δεν αποκλείεται όμως μέλη του κλάδου να παρουσιάζουν δυαδική τοποθέτηση στα μιτοχόνδρια



και στα πλαστίδια (Janska, 2005; Sakamoto, 2006).

Εικόνα 5. Βιοϋπολογιστική ανάλυση των πρωτεασών Lon σε διάφορους οργανισμούς μοντέλα. Unrooted Neighbor-Joining εξελικτικό δένδρο όπως προέρχεται από τη πολλαπλή ευθυγράμμιση των αμινοξικών ακολουθιών πρωτεασών της υπεροικογένειας LonA. Ο αστερίσκος στον κλάδο IIp* σημαίνει ότι οι πρωτεάσες Lon των φυτών ενδεχομένως να παρουσιάζουν διπλή τοποθέτηση στα μιτοχόνδρια και στα πλαστίδια. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις αντιστοιχούν στους κωδικούς αριθμούς καταχώρησης των ακολουθιών (Πίνακας A1, Παράρτημα). Με τελείες εμφανίζονται οι τιμές bootstrap μεταξύ 60-80%, ενώ οι υπόλοιπες κυμαίνονται από 80% και άνω.

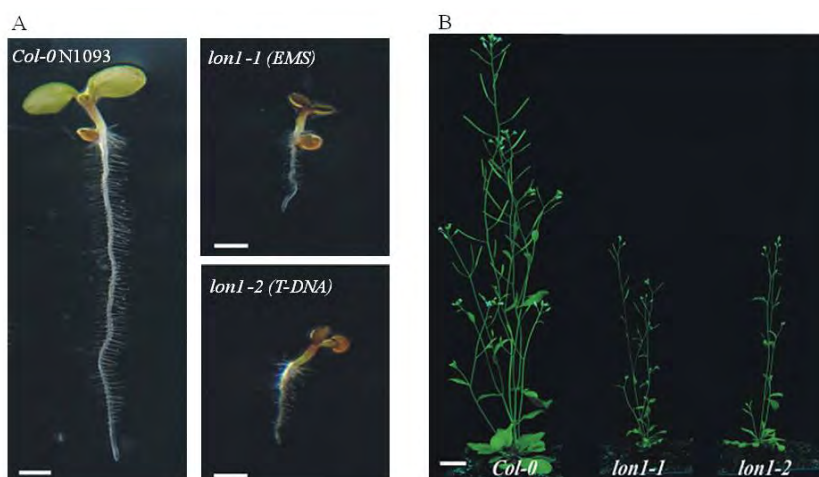
1.5.2 Η ATP-εξαρτώμενη πρωτεάση Lon

Η μορφολογία των μιτοχονδρίων είναι ανώμαλη σε φυτά με μετάλλαξη στο γονίδιο *Lon1*. Τα μεταλλάγματα *lon1* του φυτού *Arabidopsis thaliana* επιπρόσθετα παρουσίασαν μειωμένη δραστηριότητα ενζύμων του κύκλου του κιτρικού οξέος και συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Rigas et al, 2009a). Σε ασθενείς με κληρονομική σπαστική παραπληγία (Hereditary Spastic Paraplegia, SPG13), μία νευροεκφυλιστική ασθένεια στον άνθρωπο, η έκφραση της *Lon* και της πρωτεάσης *CipP*, που εντοπίζονται στη μήτρα του μιτοχονδρίου, ήταν σε χαμηλότερα επίπεδα έναντι του φυσιολογικού (Hansen et al, 2008).

Από τις παραπάνω αναφορές αναδεικνύεται η σημαντικότητα των μιτοχονδρίων για τη φυσιολογική ανάπτυξη των οργανισμών και επιπλέον φαίνεται ότι η πρωτεάση Lon παίζει καθοριστικό ρόλο στη βιογένεση του οργανιδίου και μετέπειτα στη σωστή λειτουργία του, καθώς μεταλλάξεις του γονιδίου σε όλους τους οργανισμούς μοντέλα οδηγούν σε σοβαρά προβλήματα στην ανάπτυξη.

1.5.3 Η πρωτεάση Lon στο φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana*

Στο φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana* υπάρχουν τέσσερα γονίδια που κωδικοποιούν για την Lon πρωτεάση: *AtLon1* (At5g26860) η οποία τοποθετείται στο **μιτοχόνδριο** και υπό ορισμένες συνθήκες και στον **χλωροπλάστη** (Daras et al, unpublished), *AtLon2* (At5g47040) με υποκυτταρική τοποθέτηση στο **περοξύσωμα** (Lingard and Bartel 2009), *AtLon3* (At3g05780) αναφέρεται ως ψευδογονίδιο (Ostersetzer et al. 2007; Rigas et al. 2009a) και *AtLon4* (At3g05790) με υποκυτταρική τοποθέτηση στο **μιτοχόνδριο** και τον **χλωροπλάστη**. (Ostersetzer et al. 2007).

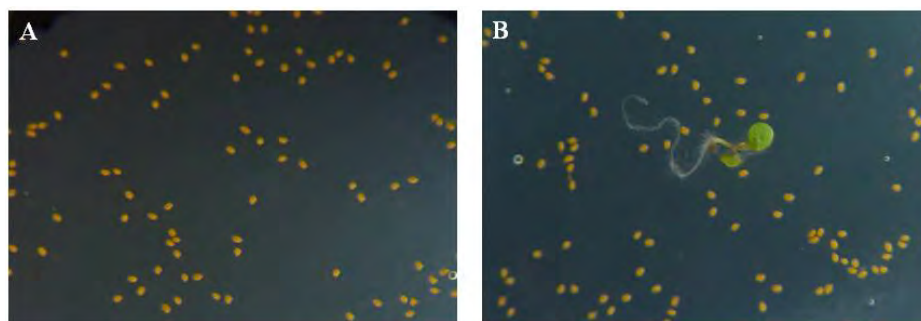


Εικόνα 6. Φυτά *Arabidopsis thaliana* αγρίου τύπου *Col-0* και των αλληλομόρφων *lon1-1*, *lon1-2* ηλικίας (A) 5 ημερών και (B) Ωριμων φυτών

Η πρωτεάση Lon φαίνεται να παίζει ιδιαίτερα καθοριστικό ρόλο στα πολύ αρχικά στάδια ανάπτυξης του φυτού, καθώς τα μεταλλάγματα παρουσιάζουν πρόβλημα στη βλάστηση και στην εγκατάσταση του σποροφύτου. Μεταλλάγματα του γονιδίου *Lon1* παρουσιάζουν σημαντική καθυστέρηση σε όλα τα στάδια της ανάπτυξής τους, έναντι των φυτών αγρίου τύπου (Εικόνα 6). Επιπλέον παρουσιάζουν ανωμαλίες στη μορφολογία των μιτοχονδρίων τους, ενώ η ενζυμική δραστικότητα σημαντικών ενζύμων του κύκλου του Krebs και της αναπνευστικής αλυσίδας είναι μειωμένη σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (Rigas et al, 2009a).

Μετάλλαξη στο γονίδιο *Lon2* στο φυτό *A. thaliana* προκαλεί καθυστέρηση στην ανάπτυξη και ανωμαλίες στα περοξυσώματα των φυτών (Lingard and Bartel 2009).

Φυτά που φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *Lon4* παρουσιάζουν πολύ σοβαρό πρόβλημα στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης, καθώς το ποσοστό βλαστικότητας των σπερμάτων είναι πάρα πολύ χαμηλό σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. (A) Τα σπέρματα των μεταλλαγμάτων *lon4* παρουσιάζουν σημαντικά περιορισμένη βλαστικότητα και (B) Φυτά γενετικού υπόβαθρου *lon4* γενιάς T1 μετασχηματισμένα με την γονιδιωματική ακολουθία του γονιδίου *Lon4* σε τρυβλία με επιλογή υγρομυκίνης. Η κατασκευή συμπληρώνει το φαινότυπο *lon4*

Η ενέργεια που απαιτείται για τη βλάστηση και εγκατάσταση του σποροφύτου παρέχεται από την κινητοποίηση των αποθεμάτων του φυτού. Στα φυτά με ελαιούχα σπέρματα (όπως το *A. thaliana*), αρχικά γίνεται καταβολισμός των λιπαρών. Πέρα από την κινητοποίηση των λιπαρών, ο σχηματισμός λειτουργικών μιτοχονδρίων είναι εξίσου σημαντικός για την ομαλή βλάστηση και εγκατάσταση του σποροφύτου (Howell et al. 2006) καθώς στη συνέχεια οι υδατάνθρακες μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια και στο κυτταρόπλασμα για να γίνει νεογλυκογένεση, είτε χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα για την αναπνοή. Συνεπώς στην παραγωγή ενέργειας από την κινητοποίηση των αποθεμάτων κατά τη βλάστηση των σπερμάτων συμμετέχουν τόσο τα περοξυσώματα όσο και τα μιτοχόνδρια. Οι παρατηρήσεις αυτές υποστηρίζουν την υπόθεση ότι τα μέλη της οικογένειας γονιδίων *Lon* ελέγχουν την εγκαθίδρυση του βιοχημικού μονοπατιού, σε διακριτά υποκυτταρικά διαμερίσματα (μιτοχόνδριο, περοξύσωμα) που υπεύθυνα για την

κινητοποίηση των αποθεμάτων του κυττάρου για να εξασφαλιστεί η απαραίτητη ενέργεια για τη βλάστηση.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω δεδομένα, φαίνεται ότι ο ρόλος της πρωτεάσης Lon είναι καθοριστικός στα αρχικά στάδια εγκατάστασης και ανάπτυξης των φυτών, ενώ στα μετέπειτα στάδια η πρωτεάση Lon είναι απαραίτητη για την διασφάλιση της ομαλής λειτουργίας των οργανιδίων καθώς συμβάλει στην διατήρηση της ομοιόστασης του πρωτεόματος τους. Η κατανόηση του μηχανισμού πρωτεόλυσης Lon στα φυτά αναμένεται να εξηγήσει το μηχανισμό ανάπτυξης των φυτικών κυττάρων.

1.6 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Υπάρχουν τέσσερα (4) μέλη της οικογένειας των γονιδίων Lon στο φυτό *Arabidopsis*. Ο λειτουργικός ρόλος των γονιδίων Lon1, Lon4 και Lon2 έχει βρεθεί με γενετική ανάλυση και μελέτες βιολογίας ανάπτυξης. Επειδή όμως το Lon3 μετάγραφο σε αντίθεση τα υπόλοιπα τρία μέλη της οικογένειας, δεν είχε ταυτοποιηθεί στις διάφορες μελέτες, είχε θεωρηθεί ότι το μέλος αυτό είναι ένα ψευδογονίδιο. Ένας από τους βασικούς κανόνες για να θεωρηθεί ένα γονίδιο ψευδογονίδιο είναι να έχει συσσωρεύσει μεταλλάξεις, ιδιαίτερα μεταλλάξεις “χωρίς νόημα” που οδηγούν στην πρόωρη λήξη της μετάφρασης (κωδικόνια λήξης-τερματισμού).

Οι αναπτυξιακές μελέτες και η ιστοειδική μεταγραφική δυναμική των υπολοίπων τριών μελών της οικογένειας των γονιδίων Lon μας προέτρεψε να προσεγγίσουμε το θέμα από μια άλλη σκοπιά. Να εξετάσουμε την πιθανότητα της εύρεσης του μετάγραφου σε πολύ συγκεκριμένους ιστούς ή όργανα που σαν πρότυπο έχουν την έκπτυξη τους όπως ακριβώς συμβαίνει και στην έκπτυξη της πρωτογενούς ρίζας. Για το λόγο αυτό συγκεντρωθήκαμε και στο άνθος και ιδιαίτερα στο γυρεόκκοκο και στην έκπτυξη του γυρεοσωλήνα. Είναι κατανοητό ότι η απόδειξη ότι το γονίδιο Lon3 δεν είναι ψευδογονίδιο θα προέλθει μετά από γενετική ανάλυση μεταλλάξεων για το Lon3.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτικό υλικό και Συνθήκες καλλιέργειας *Arabidopsis thaliana*

Σαν υλικό για τα πειράματα της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε το φυτό *Arabidopsis thaliana* (οικότυπος *Columbia*), το οποίο ανήκει στην οικογένεια των Σταυρανθών – *Brassicaceae* και το φυτό *Nicotiana benthamiana* της οικογένειας *Solanaceae*.

Για την ανάπτυξη φυτών κάτω από ασηπτικές συνθήκες, τα σπέρματα ενυδατώνονται για 24 ώρες στους 4°C και απολυμαίνονται σε 25% διάλυμα χλωρίνης, 0.01% Triton-X. Στη συνέχεια τοποθετούνται κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε τρυβλία, παρουσία κατάλληλου θρεπτικού μέσου (βλέπε επιμέρους πρωτόκολλα). Τα τρυβλία τοποθετούνται σε θάλαμο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22°C και φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι). Μετά από 2 εβδομάδες τα φυτά μεταφυτεύονται στο χώμα και τοποθετούνται στον ίδιο θάλαμο ανάπτυξης φυτών.

2.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης γύρης από φυτά *Arabidopsis thaliana*

Για την απομόνωση απο ώριμη γύρη, άνθη πάνω απο 500 φυτά χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκομιδή σε ένα μεγάλο δοχείο Erlenmeyer flask, όπου προστέθηκαν 300 mL παγωμένης mannitol 0.3M, και στη συνέχεια έγινε ζωηρη ανακίνηση για 1 λεπτό. Το εναιώρημα της γύρης διαδοχικά φιλτραρήστηκε μέσα απο 100- και 53µm nylon mesh. Οι γυρεοκοκκοί συμπηκνώθηκαν με επαναλαμβανόμενες φυγοκεντρήσεις (50-mL Falcon tubes, 450g, 5min, 4°C), και η τελική γύρη αποθηκεύτηκε στους -80°C. Η καθαρότητα της απομονωμένης γύρης ελεγχθηκε στο μικροσκοπιο.

2.3 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA από σπορόφυτα, όργανα ή ιστούς του φυτού *Arabidopsis thaliana*

Φρέσκο φυτικό υλικό (ολόκληρα φυτά *Arabidopsis* ή διάφορα όργανά του) ομογενοποιείται παρουσία υγρού αζώτου με κατάλληλο γουδί λειοτρίβησης.

- Το δείγμα μεταφέρεται σε eppendorf tube των 1,5ml. (Η αναλογία είναι: για κάθε 2gr ιστού προστίθεται 1ml διαλύματος απομόνωσης και 1ml φαινόλης). Έντονη ανάμιξη του δείγματος.
- Φυγοκέντρηση (max speed) για 5min.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο tube και ακολουθεί καθαρισμός του δείγματος με ίσο όγκο φαινόλης.

- Επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση κάτω από τις ίδιες συνθήκες.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο tube και ακολουθεί προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης-χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1). Έντονη μίξη.
- Επαναλαμβάνεται η ίδια φυγοκέντρηση για 4 min.
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο tube χωρίς να διαταραχθεί η ενδιάμεση φάση και προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης-χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1). Έντονη μίξη.
- Επαναλαμβάνεται η ίδια φυγοκέντρηση.
- Ξανά μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο tube χωρίς να διαταραχθεί η ενδιάμεση φάση και προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1). Έντονη μίξη.
- Επαναλαμβάνεται η ίδια φυγοκέντρηση για 2 min.
- Για την κατακρήμνιση των νουκλεϊνικών οξέων, στο υπερκείμενο προστίθεται 1/10 του όγκου 3M CH₃COONa pH 4.8 και 2.5 όγκοι παγωμένης αιθανόλης 100% και επωάζεται το διάλυμα στους -20°C για τουλάχιστον 12 ώρες. Εναλλακτικά η επώαση μπορεί να γίνει στους -80 °C για 30 min.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C σε max speed για 30 min.
- Το ίζημα διαλύεται σε αποστειρωμένο ddH₂O (με θέρμανση στους 65°C όταν χρειάζεται).

2.4 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA από έμβρυα *Arabidopsis thaliana*

(Onate-Sanchez *et al.*, 2008)

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

- Στα έμβρυα προστίθεται το διάλυμα απομόνωσης (όσο το δυνατό λιγότερο όγκος, μέχρι 150μl). Μέσα στο διάλυμα τα έμβρυα μπορούν να αποθηκευτούν και στους -80°C
- Με μικρογουδί ομογενοποιούνται στα έμβρυα
- Σε 150μl διάλυμα ομογενοποίησης (έμβρυα και διάλυμα απομόνωσης) προστίθενται 150μl χλωροφόρμιο και ακολουθεί ισχυρή ανακίνηση για 30".
- Φυγοκέντρηση για 5'
- Μεταφέρεται το υπερκείμενο σε νέο erpendorf tube και προστίθενται 300μl φαινόλης, ακολουθεί ισχυρή ανακίνηση για 1'. Στη συνέχεια προστίθενται 150μl χλωροφόρμιο κα ισχυρή ανακίνηση για 3'.
- Φυγοκέντρηση για 5'

- Μεταφέρεται το υπερκείμενο σε νέο erppendorf tube (~250μl) και προστίθεται 1/3 του όγκου 8M LiCl (83μl). Ακολουθεί ελαφριά ανακίνηση. Το δείγμα αφήνεται στους -20°C για 1h
- Φυγοκέντρηση για 30' στους 4°C
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε 30μl ddH₂O
- Ακολουθεί αντίδραση DNAse (στα 60μl) όπως αναφέρεται παρακάτω
- Μετά την αντίδραση DNAse προστίθενται στο δείγμα 440μl ddH₂O, 7μl 3M NaAc pH:5.2 (Sodium Acetate) και 250μl 100% αιθανόλης
- Φυγοκέντρηση για 10' στους 4°C. (Με αυτόν τον τρόπο απομακρύνονται τα συστατικά της αντίδρασης DNAse και όλοι οι πολυσακχαρίτες)
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erppendorf και εκεί προστίθενται 43μl 3M NaAc pH:5.2 και 750μl 100% αιθανόλης. Ανακινείται ελαφρά και αφήνεται ο/η στους -20 °C
- Φυγοκέντρηση για 30' στους 4°C
- Απομακρύνεται προσεχτικά το υπερκείμενο, ακολουθεί μια γρήγορη φυγοκέντρηση για να απομακρυνθεί τυχόν υπερκείμενο που έχει μείνει και το ίζημα επαναιωρείται στα 20-25μl με ddH₂O

2.5 Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων σε αгарόζη

2.5.1 Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αгарόζης

Ηλεκτροφόρηση είναι η τεχνική εκείνη, κατά την οποία μόρια εξαναγκάζονται να κινηθούν διαμέσου ενός πορώδους υλικού, με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Επιθυμητή ποσότητα αгарόζης τοποθετείται σε κατάλληλο όγκο νερού (w/v) και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για μερικά λεπτά (έως την πλήρη διάλυση της αгарόζης. Ακολουθώς προστίθεται ποσότητα πυκνού TAE, ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1x και αναδεύεται. Τελευταία προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0.5μg/ml

Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει λίγο και έπειτα τοποθετείται σε καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης, στο οποίο έχουν προσαρτηθεί τα αντίστοιχα χτενάκια για τη δημιουργία θέσεων προσθήκης διαλύματος νουκλεϊκών οξέων (πηγαδάκια). Μετά τη στερεοποίηση του πηκτώματος αгарόζης, αφαιρούνται τα χτενάκια και τοποθετείται το δοχείο-καλούπι στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία πληρείται με ρυθμιστικό διάλυμα.

Εφαρμόζεται συνεχής τάση 50-120V. Το πήκτωμα αгарόζης εξετάζεται σε υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογραφίζεται.

2.5.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊνικών οξέων

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊνικών οξέων έγινε με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (Optical Density, OD) χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο U-1100 της Hitachi. Τα νουκλεϊνικά οξέα απορροφούν σε μήκος κύματος 260nm και η συγκέντρωσή τους υπολογίζεται από τον τύπο των Beer-Lambert. Σε μήκος κύματος 280nm απορροφούν οι πρωτεΐνες εξαιτίας κυρίως της περιέχουσας τρυπτοφάνης, ενώ στα 240nm απορροφούν τα φαινορικά παράγωγα. Επομένως ο λόγος OD260/OD280 αντιπροσωπεύει την καθαρότητα του διαλύματος των νουκλεϊνικών οξέων ως προς τις πρωτεΐνες. Ο ιδανικός λόγος ισούται με 1.8 για DNA και 2 για RNA.

Η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων υπολογίζεται από τον τύπο των Beer-Lambert:

$$c = OD_{260} \times a \times DF$$

Όπου α ορίζεται ως η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων που παρατηρείται όταν O.D.260=1 και συγκεκριμένα για δείγμα DNA, α=50 μg/ml ενώ για RNA, α=40μg/ml, D.F. είναι ο συντελεστής αραίωσης και ισούται με την αραίωση που έχει πραγματοποιηθεί για να γίνει η φωτομέτρηση.

2.6 Πρωτόκολλο απομόνωσης γονιδιωματικού DNA από Arabidopsis

Φρέσκο φυτικό υλικό ομογενοποιείται παρουσία υγρού αζώτου σε κατάλληλο γουδί λειοτρίβισης ή μέσα σε erpendorf tube με μικρογουδί.

- Το ρυθμιστικό διάλυμα CTAB τοποθετείται στο υδατόλουτρο στους 65°C
- Προσθέτουμε έναν όγκο (200μl) ζεστού CTAB και τοποθετούμε τα erpendorf σε υδατόλουτρο στους 65°C για 10-30 λεπτά
- Προστίθεται ίσος όγκος SEVAG [χλωροφόρμιου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1)] και το μίγμα αναδεύεται ελαφρά.
- Φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις μέγιστες στροφές (13.000 στρ/λεπτό)
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρό erpendorf tube.
- Προσθέτουμε 0,7 του όγκου (140μl) ισοπροπανόλης, αναδεύουμε με το χέρι και το αφήνουμε σε ηρεμία για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρηση για 15' σε θερμοκρασία δωματίου στις μέγιστες στροφές

- Το ίζημα που προκύπτει ξεπλένεται προσθέτωντας 0,5 ml 100% αιθανόλης και στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 13.000 στροφές
- Απομακρύνση του υπερκείμενου.
- Επαναιώρηση του ιζήματος σε 100μl H₂O ή T.E.

2.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

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

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

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

⁽³⁾ Η DyNAzyme™ EXT Πολυμεράση της FINNZYMES (F-512S) έχει το χαρακτηριστικό να προσθέτει αδερίνη στο 3' άκρο του DNA χωρίς να έχουμε προσθέσει αδερίνη ως μήτρα. Αυτό το γνώρισμα διευκολύνει την κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR σε φορείς όπως ο pGEM κ.α.

Κάθε ένα από τα συστατικά της αντίδρασης τοποθετούνται σε σωλήνα χωρητικότητας 0,2ml κατάλληλο για αντιδράσεις PCR

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

1 x	Αποδιάταξη του DNA μήτρα για 2 λεπτά στους 94 ⁰ C
-----	--

20-30 x	Αποδιάταξη στους 94°C για 30'' Υβριδισμός εκκινητών στο αντίστοιχο Tm ⁽¹⁾ για 30'' Επιμήκυνση στους 72°C για 2' έως 8' ⁽²⁾
1 x	Τελική επιμήκυνση προϊόντος στους 72°C για 10'
	Διατήρηση στους 10 °C για 5''

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

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

➤ Όταν τελειώσουν οι PCR αντιδράσεις, αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης 0,8%-3%, ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA και το διαχωρισμό που θέλουμε να επιτύχουμε.

➤ Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR των οποίων τα προϊόντα προορίζονται για κλωνοποιήσεις σχεδιάστηκαν με θέση αναγνώρισης ενζύμου περιορισμού στο 5' άκρο, η οποία θα μας διευκολύνει κατά την υποκλωνοποίηση του τμήματος σε άλλους φορείς. Η θέση αναγνώρισης επιλέχτηκε ώστε να είναι μοναδική τόσο μέσα στο τμήμα DNA που επιθυμούμε να κλωνοποιήσουμε όσο και σε άλλους φορείς.

2.8 RT-PCR

➤ Απομονώνεται ολικό RNA από ολόκληρα φυτά ή διάφορα φυτικά όργανα. Με την βοήθεια φασματοφωτομέτρου μετράμε την ποσότητα που περιέχεται σε κάθε δείγμα.

➤ Από κάθε δείγμα ολικού RNA παίρνουμε 25μg και χρησιμοποιώντας το ένζυμο DNάσηI καταστρέφουμε το DNA που περιέχεται στο δείγμα για να μην χρησιμοποιηθεί ως μήτρα στις αντιδράσεις PCR. Τα συστατικά της αντίδρασης και οι τελικές συγκεντρώσεις είναι τα ακόλουθα.

Συστατικά	Πυκνό	Όγκος	Τελική
Αντίδρασης	Διάλυμα		Συγκέντρωση
Ρυθμιστικό	10 x	6μl	1 x
Διάλυμα			
DNάσης I			
DNάση I (Promega)	2 units/ μl	7μl	14 units
Αναστολέα	30 units/	1μl	30 units
RNάσης (Promega)	μl		
Ολικό RNA	-	-	25μg
ddH ₂ O	-	έως 60μl	-

Τελικός όγκος αντίδρασης 60 μl

Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37°C για 45'.

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

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

Όγκος πρώτου βήματος 10μl

- Στο δεύτερο βήμα προστίθενται τα ακόλουθα συστατικά:

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

Όγκος δεύτερου βήματος 10μl

Τελικός όγκος αντίδρασης όγκος πρώτου και δευτέρου βήματος 20μl

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

2.9 Ανάλυση δεσοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA)

Για την ανάλυση κλασμάτων νουκλεϊνικών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών διαμορφώσεων χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης. Ο διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος προς το μέγεθος των μορίων. Τα μόρια των νουκλεϊνικών οξέων γίνονται ορατά στην

πηκτική αгарόζης με τη βοήθεια μίας χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων . Στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν προστίθενται 2ml χρωστικής (loading dye)

➤ Τα δείγματα τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις της πηκτής και λαμβάνει χώρα η ηλεκτροφόρηση παρουσία συνεχούς τάσης 50-120V.

Η σύσταση της πηκτικής αгарόζης 0.8% είναι η εξής:

0.8g αгарόζης

2ml 1x TAE

7ml βρωμιούχου αιθιδίου

98 ml H₂O

Τελικός όγκος 100 ml

Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης είναι η εξής:

20ml 1x TAE

70ml βρωμιούχου αιθιδίου

980 ml H₂O

Τελικός όγκος 1000 ml

Η σύσταση του μητρικού διαλύματος χρωστικών 5x (loading dye) είναι η εξής:

1,25 % (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης

1,25 % (w/v) κυανολοξυλένιο

Στη τελική σύσταση του 1x διαλύματος χρωστικών προστίθεται και 50 % (w/v) σουκρόζης.

2.10 Πολλαπλή ευθυγράμμιση ακολουθιών και φυλογενετική ανάλυση

Η πολλαπλή ευθυγράμμιση των ακολουθιών των Lon πρωτεασών έγινε με το πρόγραμμα CLUSTALX 1.83 με τους προκαθορισμένους από το πρόγραμμα

αλγορίθμους. Τα αποτελέσματα εξάχθηκαν σε μορφή GCG/MSF και αναλύθηκαν με το πρόγραμμα GeneDoc MFC Application version 2.6.0.2. Το φυλογενετικό δένδρο Neighbor-Joining εξάχθηκε από την πολλαπλή ευθυγράμμιση των ακολουθιών χρησιμοποιώντας 1000 bootstraps, προκειμένου να αποκτηθούν τιμές βαθμολόγησης για κάθε εσωτερικό κλάδο. Στη συνέχεια το δένδρο αναλύθηκε στο πρόγραμμα PHYLIP (Phylogeny Inference Package) 3.65. Η απεικόνιση του δένδρου έγινε με τη μορφή Tagged Image File Format (TIFF), όπως εξάχθηκε από το πρόγραμμα PHYLIP.

2.11 Υδατικά διαλύματα και θρεπτικά μέσα βακτηριακών κυττάρων και φυτών.

➤ **Sevag**

(24:1) (Χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη)

➤ **CTAB DNA Ρυθμιστικό διάλυμα απομόνωσης**

2% (w/v) CTAB, 100mM Tris pH 8,0, 20mM EDTA pH 8,0, 1,4M NaCl, 1% (w/v) PVP (πολυβινυλ-πυρρολιδόνη, M.B 40.000), 2% (w/v) CTAB.

➤ **50 x TAE ρυθμιστικού διαλύματος**

24,2gr (w/v) Tris-base, 100ml/lit 0,5M EDTA pH 8,0, 57,1ml/lit CH₃COOH

➤ **Βρωμιούχο αιθίδιο**

5mg/ml σε dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε σκοτεινόχρωμο μπουκάλι σε

θερμοκρασία δωματίου

➤ **Διάλυμα νουκλεοτιδίων**

2,5mM dATP, 2,5mM dGTP, 2,5mM dTTP σε dH₂O.

➤ **Θρεπτικό μέσο ½ MS**

½ x MS Θρεπτικό μέσο που αποτελείται από MS άλατα και βιταμίνες (4,3g/l ICN), 2% Σακχαρόζη, 0,5 g/l MES, 3g/l Phytigel, pH 5,7.

2.12 Προγράμματα νευρωνικών δικτύων πρόβλεψης τοποθέτησης πρωτεϊνών

PSORT: <http://wolfsort.org/>

Predotar: <http://urqi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>

TargetP: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>

ChloroP: <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>

MitoProt: <http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>

SubLoc: www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/

Nucleo: <http://pprowler.itee.uq.edu.au/Nucleo-Release-1.0/>

2.13 Προγράμματα Βιοπληροφορικής

<http://www.arabidopsis.org>

<http://www.softberry.ru>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://au.expasy.org/>

<http://affymetrix.arabidopsis.info>

<https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>

<http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>

<http://atted.jp/>

<http://bar.utoronto.ca/eplant/>

2.14 Εκκινητες και συνθηκες αντιδρασης PCR

Οι Εκκινητες και οι συνθηκες αντιδρασης PCR καθως και τα αναμενομενα μεγεθη των προιοντων PCR φαινονται στον παρακατω πινακα:

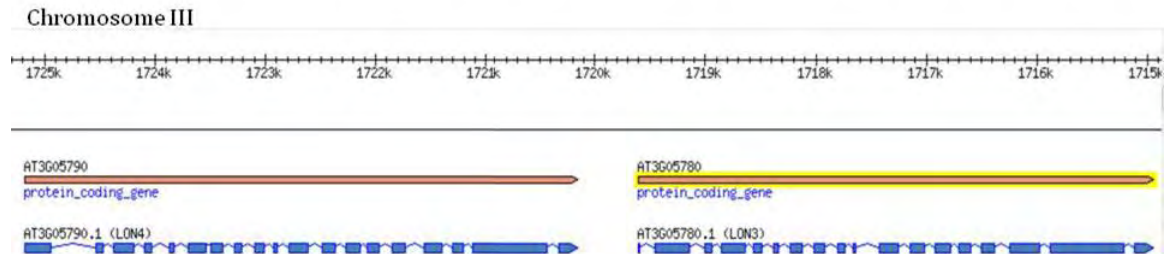
Gene name	AGI	Primer For	Primer Rev	Dilution (stock)	Primer Forward	Primer Reverse	Tm	Extension (*)	Cycles	genomic	cDNA
GAPDH	At3g04120	04120-For	04120-Rev	100μM	5' GCCAAGAAGTTGTTATCTCTGCCC'3	5' GCTCGACCTGTTGCGCCAACG'3	54-57	35sec	40	811bp	547bp
LON1	At5g26860	26860-For	26860-Rev	100μM	5' GGAGAGGCCATGCTGGTGACCC'3	5' GTTCAGGCITGACACCACAATCTCC'3	57	35sec	40	417bp	275bp
LON3	At3g05780	5780-For	5780-Rev	200μM	5' TTGAGAAAGAACCGGAGAACCCTC'3	5' CTCACITGGGATCTCCTCTATTG'3	54	35sec	40	520bp	420bp
LON4	At3g05790	5790-For	5790-Rev	200μM	5' ATCTCGATGTTCTATTGACTTATC'3	5' AATTCTAGGCACCTCGGTGGATG'3	54	35sec	40	690bp	350bp

(*) Polymerase: *EXT FINNZYME 1.3kb 1min*

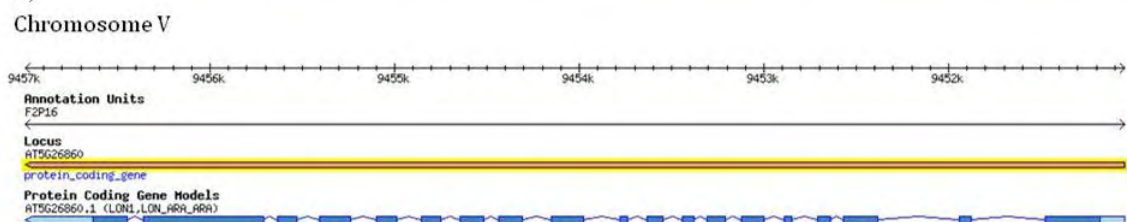
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η οικογένεια των γονιδίων Lon στο φυτό *Arabidopsis* αποτελείται από 4 μέλη: Lon1, Lon2, Lon3 και Lon4. όλα τα γονίδια εδράζουν στο πυρηνικό DNA παρ' όλο που τα ώριμα πολυπεπτίδια τοποθετούνται στα οργανίδια του κυττάρου. Δεδομένα δείχνουν ότι το Lon2 εδράζεται στο υπεροξύσωμα (Lingard και Bartel, 2009), ενώ τα Lon1 και Lon4 εδράζουν στο μιτοχόνδριο και στο χλωροπλάστη (Rigas *et al.*, 2009a; Ostersetzer *et al.*, 2007). Το Lon3 θεωρείτο ψευδογονίδιο. Η Εικόνα 8 δείχνει τη χρωμοσωμική τοποθέτηση καθώς και τη δομή των γονιδίων (εξώνια/ιντρόνια). Είναι γνωστό ότι οι οικογένειες γονιδίων έχουν προκύψει μετά από διπλασιασμούς από ένα αρχέγονο γονίδιο (Genes XIII, Lewis). Συνήθως ο πρώτος διπλασιασμός του αρχέγονου γονιδίου συμβαίνει σε κοντινή απόσταση μέσα στο ίδιο χρωμόσωμα. Ενώ αν υπάρξει ένας δεύτερος διπλασιασμός αυτό μπορεί να συμβεί σε αρκετά μεγάλη απόσταση από το αρχέγονο γονίδιο ενδεχομένως και να συμβεί σε ένα άλλο χρωμόσωμα. Μετά την ανάλυση του DNA του γονιδιώματος του *Arabidopsis* ότι τα γονίδια Lon3 και Lon4 βρίσκονται πολύ κοντά στο ίδιο χρωμόσωμα III. Επίσης η φορά της μεταγραφής είναι ίδια (head-to-tail). Η διαγονιδιακή περιοχή ανάμεσα στο Lon3 και στο Lon4 είναι περίπου 600bp (Εικόνα 8).

A)



B)



Γ)



Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση των γονιδίων Lon στα χρωμοσώματα. Με ορθογώνια φαίνονται τα εξώνια, με διακεκομμένες γραμμές τα ιντρόνια. Α) Τα γονίδια Lon3 και Lon4 στο χρωμόσωμα III. Β) Το γονίδιο Lon1 στο χρωμόσωμα I. Γ) Μεγέθυνση της αναπαράστασης του γονιδίου Lon3, στην οποία φαίνεται η περιοχή που τοποθετούνται οι εκκινήτες, που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση RT-PCR.

Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι ενδεχομένως οι ρυθμιστικές περιχές του υποκινητή και τα στοιχεία που ρυμίζουν την έκφραση του γονιδίου Lon3 να τοποθετούνται μέσα στη κωδική περιοχή Lon4. Το γονίδιο Lon1 είναι απομακρυσμένο από την περιχή των γονιδίων Lon3/4 του χρωμοσώματος III. Βρίσκεται στο χρωμόσωμα V, υποδηλώνοντας ότι το γονίδιο αυτό αποτελεί ένα μεταγενέστερο διπλασιασμό σε ένα άλλο μέρος του γονιδιώματος. Οι δομές των γονιδίων είναι παραπλήσιες (Εικόνα 8). Το Lon1 αποτελείται από 19 εξόνια και 18 ιντρόνια, όπως ακριβώς και το Lon4, ενώ το Lon3 αποτελείται από 18 εξόνια και 17 ιντρόνια. Έτσι φαίνεται να διατηρείται η δομή του γονιδίου Lon3 ακόμη και αν θεωρήσουμε ότι αποτελεί ένα ψευδογονίδιο.

Μια άλλη ουσιαστική ιδιότητα των ψευδογονιδίων είναι συσσώρευση μεταλλάξεων που συνήθως οδηγούν στη δημιουργία μεταλλάξεων «χωρίς νόημα» (non sense). Στις περιπτώσεις αυτές συνήθως δημιουργούνται αλλαγές στα κωδικόνια που αντιπροσωπεύουν αμινοξέα σε κωδικόνια τερματισμού και πρόωρης λήξης της πρωτεϊνοσύνθεσης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός της μη-επιλεκτικής πίεσης που υφίστανται τα ψευδογονίδια. Η Εικόνα 9 δείχνει την προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία του γονιδίου Lon3 και αναπαρίσταται με κώδικα ενός γράμματος. Φαίνεται ότι το γονίδιο, η κωδική περιοχή των εξωνίων του γονιδίου αποδίδει μια πρωτεΐνη που αποτελείται από 924 αμινοξέα ή 924 κωδικόνια. Γεγονός που μαρτυρεί ότι αν δεν υπήρχε επιλεκτική πίεση τότε θα ήταν σχεδόν σίγουρο ότι θα είχε συσσωρευτεί τουλάχιστον μια μετάλλαξη που να οδηγεί σε κωδικόνιο τερματισμού μέσα στην αμινοξική περιοχή. Τα υπόλοιπα δύο γονίδια έχουν παραπλήσιο αριθμό αμινοξέων. Το Lon1 απαρτίζεται από 985 αμινοξέα και το Lon4 από 942.

Το γεγονός της υπάρξης πολλαπλών ιντρονίων επίσης δημιουργεί μια προϋπόθεση για τη μη ύπαρξη ψευδογονιδίου όταν σε αυτό μπορεί να υπάρξει αποτελεσματική συρραφή των εξωνίων για τη δημιουργία ενός ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου όπως ήδη έχει αναφερθεί για το Lon3. Υπάρχει πολύ καλή διατήρηση του κανόνα 5' GT.... AG 3' των αλληλουχιών που υπάρχουν στα συνοριακά (5' και 3') των ιντρονίων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, τουλάχιστον σε *in silico* επίπεδο, να διατηρεί την κανονική συρραφή των εξωνίων σε ένα ενιαίο ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο.

Έχει ήδη αναφερθεί ότι οι πρωτεΐνες Lon1 και Lon4 τοποθετούνται μέσα στα οργανίδια: χλωροπλάστη και μιτοχόνδριο. Για να βρεθεί *in silico* η τοποθέτηση του Lon3 πολυπετιδίου χρησιμοποιήθηκαν διάφορα νευρωνικά δύκτια και βρέθηκε ότι το πολυπετιδίδιο με διαφορετικούς αλγόριθμους είτε μπορεί να εδράζει στο χλωροπλάστη είτε στο μιτοχόνδριο (Εικόνα 9). Πέρα όμως από τις ενδείξεις μέσω των προγραμμάτων της ύπαρξης «πεπτιδίου χλωροπλαστικής τοποθέτησης» (transit peptide) ή «προ-

μιτοχονδριακής αλληλουχίας» (pro-mitochondrial sequences), η «διπής αλληλουχίας στόχευσης [και για τα δύο οργανίδια]» (dual targeting sequences) στο 5' άκρο του μη-ώριμου πολυπεπτιδίου και που συνήθως αποκώπτεται βρέθηκε μέσα στην αμινοξική αλληλουχία του Lon3 και ένα προβλεπόμενο μοτίβο «σινιάλο πυρηνικής τοποθέτησης» NLS (**N**uclear **L**ocalization **S**ignal) (Εικόνα 9). Τέτοια μοτίβα δεν βρέθηκαν μέσα στις αμινοξικές ακολουθίες των πολυπεπτιδίων Lon3 και Lon4.

NucPred

The NucPred score for your sequence is 0.45 (see [score help](#) below)

A

```

1  MMPKRFNTSGFDITLRLPSYYGFLHLTQSLTLNSRVFYGARHVTTPPAIRI    50
51  GSNPVQSLLLFRAPTQLTGWNRSSRDLLGRRVSFSDRSDEVDLLSSSPIIL    100
101 STNPNLDDSLTVIALPLPHKPLIPGFYMPIHVKDPKVLAALQESTRQQSP      150
151 YVGAFLLKDCASTDSSSRSETEDNVVEKFKVKGKPKKKRRKELLNRITHQV    200
201 GTLAQISSIQGEQVILVGRRLIIEEMVSEDPLTVRVDHLKDKPYDKDNA      250
251 VIKASYVEVISTLREVLKTNLSLWRDQDIGDFSYQHLADFGAGISGANKHK     300
301 NQGVLTTELDVHKRELELTLELVKKQVEINKIKETDDGSSLSAKIRVRIDTK   350
351 RDKIPKHVIKVMEEEFKLEMLEENYSDFDLTYNYLHWLTVLPWGNFSYE     400
401 NFDVLRAKKILDEDDHYGLSDVKERILEFIAVGRLRGTSQGGKIICLSGPPG   450
451 VGKTSIGRSIARALDRKFFRFVSGGLSDVAEIKGHCQTYVGAMPGKMNVC     500
501 LKSVGATANPLILFDEIDKLGRCHTGDPASALLEVMDPEQNAKFLDHFNLNV   550
551 TIDLKVLFCVTANVIEMIPGPLLDRMEVIDLSGYVTDEKMHIARDYLVK     600
601 KTCRDCGIKPEHVDLSDAALLSLIENYCREAGVRNLQKQIEKIYRKVALE    650
651 LVRQGAVSFDVTDTKDTSKLAKTSEVKRMKVADIMKILESATGDSTESK     700
701 TKQSGLVAKTFEKVMI DESNLADYVGKPVFQEEKIYEQTPVGVVMGLAWT    750
751 SMGGSTLYIETTFVEEGLGKGGHLITGQLGDVMKESAQIAHTVARRIMFE    800
801 KEPENLFFANSKLHLHVPEGATPKDGPSAGCTMITSFSLAMKKLVKRDLE    850
851 AMTGEVTLTGRILPIGGVKEKTAARRSQIKTIIFPEANRRDFEELAENM     900
901 KEGLDVHVFVDEYEKIFDLAFNYDH                                924

```

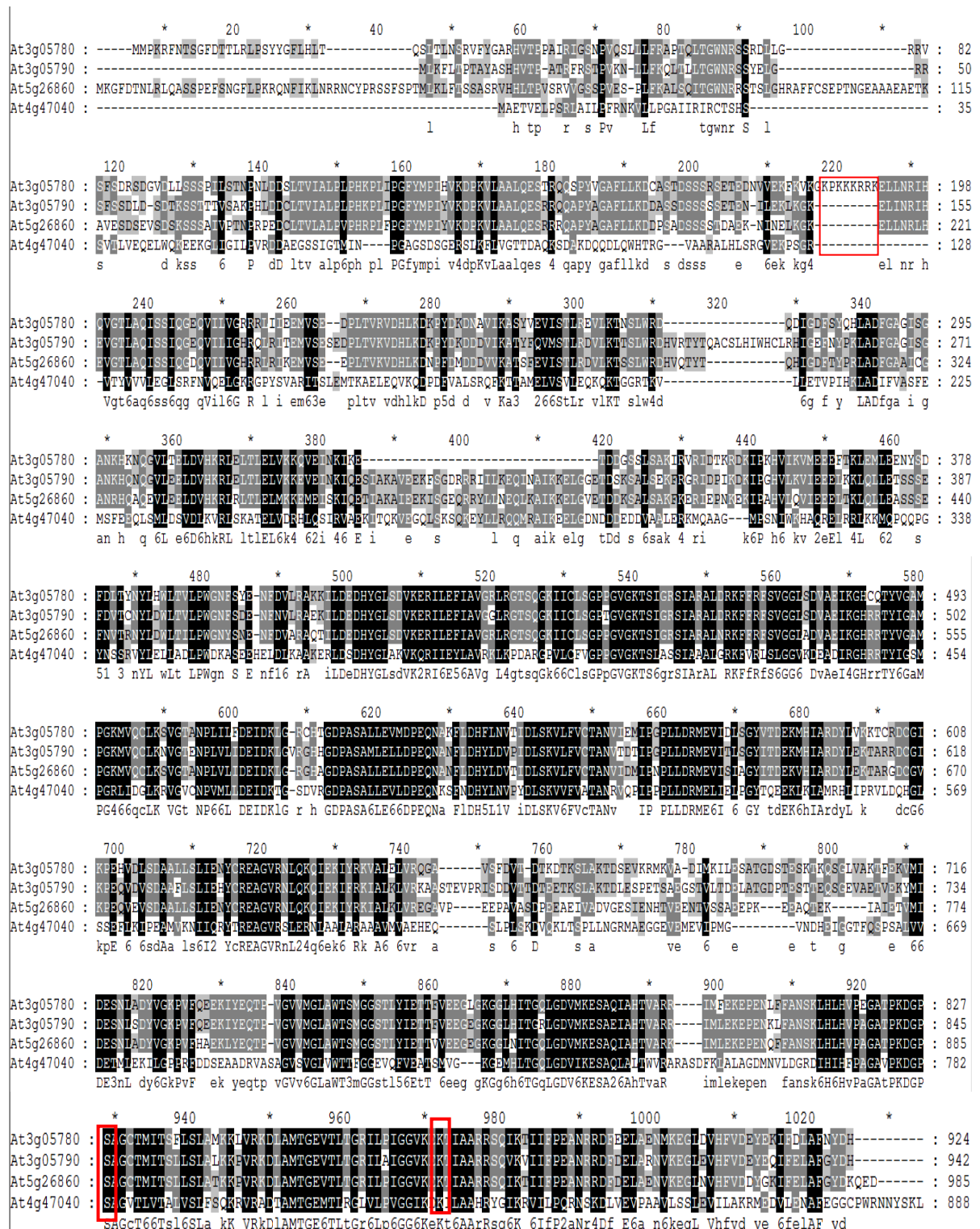
B

Program	Mito	Chloro
PSORT	_	13
TargetP	0,587	0,045
Predotar	0,28	0,01
Mitoprot	0,911	x
ChloroP	x	0,524

Εικόνα 9. Βιοϋπολογιστική ανάλυση της Lon3 πρωτεΐσης του *Arabidopsis thaliana* για την πρόβλεψη υποκυτταρικής τοποθέτησης. Αναφέρονται οι τιμές και τα προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν για την κάθε πρόβλεψη. Α) Πρόγραμμα πρόβλεψης υποκυτταρικής τοποθέτησης στον πυρήνα. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται η προβλεπόμενη NLS (**N**uclear **L**ocalization **S**ignal) ακολουθία. Β) Προγράμματα πρόβλεψης για μιτοχόνδριο και χλωροπλάστη.

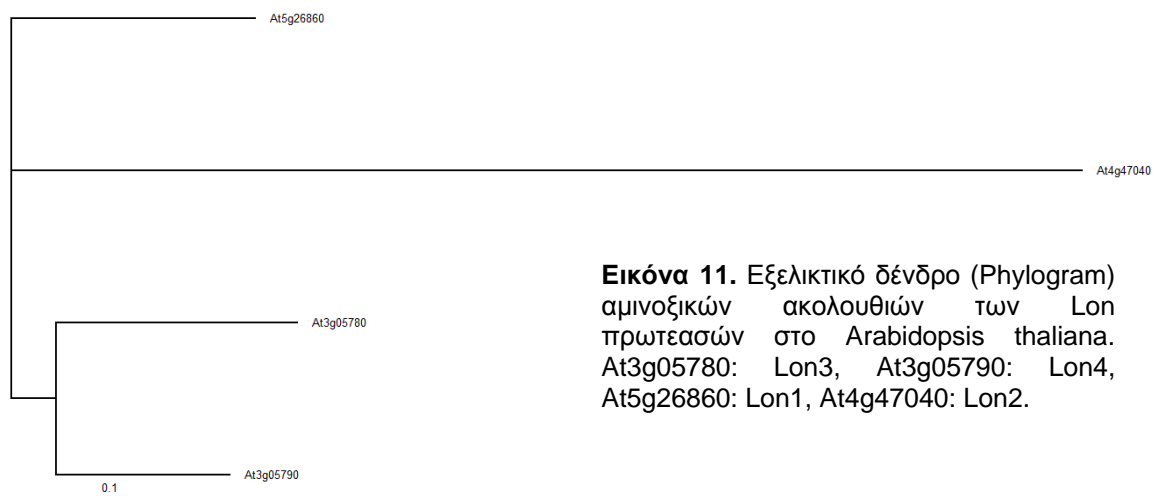
Η πολλαπλή ευθυγράμμιση των πρωτεϊνών είναι μια παράμετρος που βοηθάει να κατανοήσουμε την ομολογία που δυνατόν μπορεί να υπάρξει μεταξύ των πρωτεϊνών. Έτσι η πολλαπλή ευθυγράμμιση των πρωτεϊνών Lon φανερώνει μια αρκετά μεγάλη ομολογία (Εικόνα 10). Όπως φαίνεται από την ανάλυση το άμινο άκρο των πρωτεϊνών, εκεί δηλαδή που υπάρχει το πεπτιδίο οδηγός που οδηγεί το πολυπεπτιδίο στα διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα. Δεν είναι καθόλου συντηρημένο. Η συντήρηση των πολυπεπτιδίων Lon εμφανίζεται στην επικράτεια AAA+ που λειτουργεί σαν μια ATPάση περίπου στο κέντρο. Ακολουθώς και προς το καρβόξυ τελικό άκρο η συντήρηση και

πάλι χάνεται. Είναι εύλογο στην περιοχή/επικράτεια αυτή να υπάρχει διαφορετικότητα. Η επικράτεια αυτή είναι η SSD, είναι η περιοχή αναγνώρισης με τα διάφορα πρωτεϊνικά υποστρώματα. Στο καρβόξυ τελικό άκρο υπάρχει αρκετά μεγάλη συντήρηση των αμινοξικών ακολουθιών των πολυπεπτιδίων Lon. Στη περιοχή αυτή βρίσκεται και η λειτουργική επικράτεια της πρωτεάσης δηλαδή της υδρόλυσης των υποστρωμάτων. Και είναι λογικό να υπάρχει μια αρκετά μεγάλη συντήρηση λόγω της πίεσης της επιλογής για σταθερότητα της δομής-λειτουργίας των πρωτεϊνών Lon.



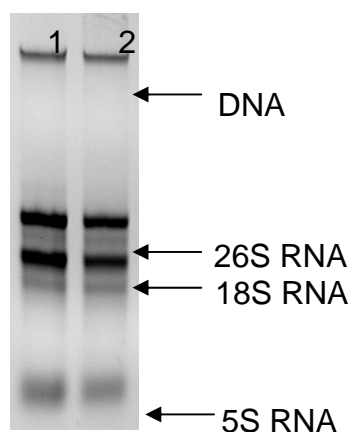
Εικόνα 10. Πολλαπλή ευθυγράμμιση των αμινοξικών ακολουθιών των Lon πρωτεασών στο *Arabidopsis thaliana*. At3g05780: Lon3, At3g05790: Lon4, At5g26860: Lon1, At4g47040: Lon2. Σε κόκκινο πλαίσιο τα συντηρημένα κατάλοιπα των αμινοξέων σερίνης (S) και λυσίνης (K), και το NLS.

Η φυλογενετική ανάλυση είναι μια προσέγγιση της σχέσης που μπορεί να υπάρξει σε μια ομάδα γονιδίων, πρωτεϊνών, οργανισμών. Η ανάλυση αυτή εμφανίζεται σαν δενδρόγραμμα και έδειξε ότι υπάρχει μια σχέση ανάμεσα στα γονίδια Lon (Εικόνα 11). Ας αναφερθεί ότι το Lon2 βρίσκεται στο χρωμόσωμα II και ότι απ' ό,τι φαίνεται από το δενδρόγραμμα είναι το πιο απομακρυσμένο (φυλογενετικά) μέλος της οικογένειας των γονιδίων Lon.



Εικόνα 11. Εξελικτικό δένδρο (Phylogram) αμινοξικών ακολουθιών των Lon πρωτεασών στο *Arabidopsis thaliana*. At3g05780: Lon3, At3g05790: Lon4, At5g26860: Lon1, At4g47040: Lon2.

Ενδεχομένως να αποτέλεσε ένα διπλασιασμό κατά το παρελθόν όπου ήταν δυνατό να συσσωρευτεί ένας μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων έτσι ώστε να μπορεί να μεταφέρεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Για τα υπόλοιπα τρία μέλη είναι φανερό ότι έχουν μια μεγαλύτερη φυλογενετική σχέση μεταξύ τους (Εικόνα 11). Επίσης φαίνεται ότι το γονίδιο Lon3 είναι συγγενέστερο προς το Lon4 και ότι το Lon4 έχει μια μεγαλύτερη συγγένεια προς το Lon1 από ότι το Lon3 προς το Lon1.



Εικόνα 12. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% τυπικών δειγμάτων (γραμμή 1 και 2) RNA απομονωμένων όπως αναφέρεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Διακρίνονται (με βέλη) το DNA το 26S και 18S rRNA και το 5S RNA.

Για να δείξουμε την έκφραση του γονιδίου Lon3 απομονώθηκε ολικό RNA από διαφορετικά μέρη (ιστούς και όργανα) του φυτού Arabidopsis με βάση το πρωτόκολλο που αναφέρεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Ένα μικρό ποσό περίπου 200 μg ελέχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη. Η Εικόνα 12 δείχνει δύο τυπικά δείγματα της απομόνωσης. Το δείγμα περιέχει στην ουσία νουκλεϊνικά οξέα. Η Εικόνα 12 επίσης δείχνει ότι η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε είναι η ενδεδειγμένη και ότι το RNA είναι ακέραιο.

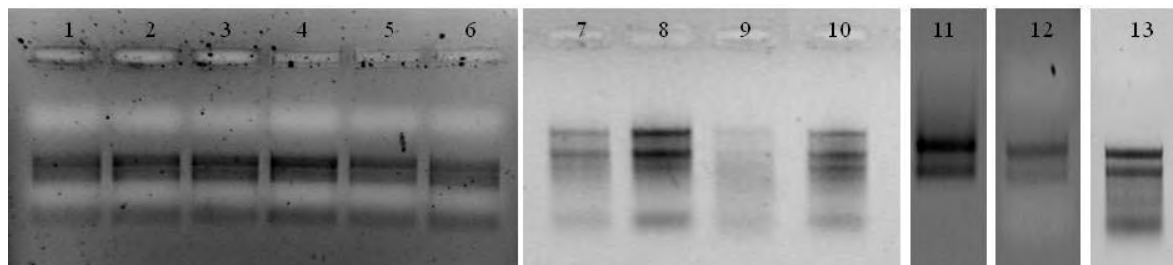
Πριν από Dnase	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	μg/ml	Ολική C μg/μl	Μετά από Dnase	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	μg/ml	Ολική C μg/μl
Νεαρα φύλλα a	0,025	0,012	2,08	1	0,4	Νεαρα φύλλα	0,047	0,02	2,2	1,88	0,188
Νεαρα φύλλα b	0,022	0,012	1,83	0,88	0,352						
Νεαρα φύλλα c	0,03	0,015	2	1,2	0,48						
Νεαρα φύλλα d	0,029	0,013	2,2	1,16	0,464						
Οφθαλμοί a	0,27	0,169	1,6	9,6	0,96	Οφθαλμοί	0,093	0,047	1,97	3,72	0,372
Οφθαλμοί b	0,2	0,135	1,4	8	0,8						
Άνθη a	0,155	0,111	1,39	6,9	0,69	Άνθη	0,067	0,043	1,55	2,68	0,268
Άνθη b	0,157	0,115	1,36	6,28	0,62						
Υπεροι a	0,268	0,146	1,8	10,72	1,072	Υπεροι	0,047	0,025	1,88	1,88	0,188
Υπεροι b	0,14	0,071	1,97	5,6	0,56						
Γονιμοποιημένοι Υπεροι a	0,292	0,151	1,93	11,68	1,168	Γονιμοποιημένοι Υπεροι	0,054	0,026	2,07	2,16	0,216
Γονιμοποιημένοι Υπεροι b	0,331	0,168	1,97	13,24	1,324						
Σποροφύτο	0,043	0,026	1,65	1,72	0,172	Σποροφύτο	0,109	0,056	1,94	4,36	0,436
Βλαστός	0,068	0,036	1,89	2,72	0,272	Βλαστός	0,064	0,03	2,1	2,56	0,256
Στήμονες	0,034	0,018	1,89	1,36	0,136	Στήμονες	0,07	0,031	2,2	2,8	0,28
Κοτυληδόνες	0,063	0,033	1,91	2,52	0,252	Κοτυληδόνες	0,058	0,029	2	2,32	0,232
Ρίζα	0,034	0,016	2,1	1,36	0,136	Ρίζα	0,016	0,008	2	6,4	0,64
						Εμβρυα (heart-stage)	0,024	0,017	1,41	0,96	0,096
						Εμβρυα (mature)	0,058	0,032	1,81	2,32	0,232

Εικόνα 13. Τιμές απορρόφησης οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων ολικού RNA πριν και μετά την αντίδραση DNάσης. Απορρόφηση στα 260, 280, ο λόγος 260/280 και η αρχική ολική συγκέντρωση του δείγματος.

Εφ' όσον η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση του RNA ήταν η ενδεδειγμένη, ακολούθησε απομόνωση RNA από: νεαρά φύλλα, οφθαλμούς, άνθη, μη γονιμοποιημένους ύπερους, γονιμοποιημένους ύπερους, σπορόφυτα, βλαστούς, στήμονες κοτυληδόνες, ρίζες, γύρη καθώς και από έμβρυα σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Ήταν αναγκαία να απομονωθεί RNA όσο το δυνατό από περισσότερους διαφορετικούς ιστούς έτσι ώστε αν το γονίδιο Lon3 εκφραζόταν ιστοειδικά ή αναπτυξιακά και σε χαμηλά επίπεδα θα ήταν δυνατή η ταυτοποίηση του δηλαδή η απόδειξη της έκφρασης του. Η μεγαλύτερη ποσότητα που απομονώθηκε βρέθηκε στους γονιμοποιημένους ύπερους (b), ενώ η μικρότερη στους στήμονες και στη ρίζα. Βάση του λόγου απορρόφησης A₂₆₀/A₂₈₀ ο οποίος έχει μέσο όρο κοντά στο 1,8 φαίνεται ότι τα δείγματα μας είναι καθαρά από πρωτεΐνες (Εικόνα 13).

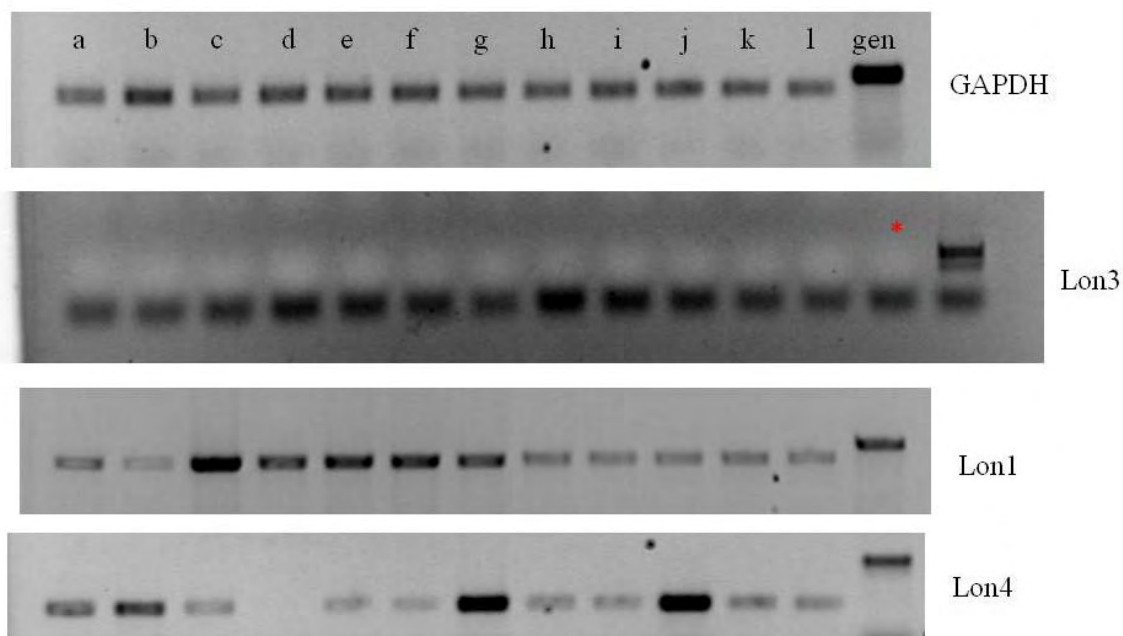
Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για τη ταυτοποίηση του mRNA του Lon3 ήταν η ανάλυση με RT-PCR. Για το σκοπό αυτό έπρεπε από το δείγμα να αφαιρεθεί το DNA. Αυτό έγινε με τη χρήση DNάσης I ελεύθερης από RNάσες. Μετά την επώαση με DNάση

Ι, απομονώθηκαν εκ νέου τα νουκλειικά. Η Εικόνα 13 δείχνει ότι ο λόγος της απορρόφησης στα A260/A280 έχει μια μέση τιμή τουλάχιστον 1,8, τιμή που και πάλι δείχνει ότι τα νουκλειικά είναι ελεύθερα πρωτεϊνών. σε σχέση με αυτή στα 280



Εικόνα 14. Δείγματα ολικού RNA από διάφορα αναπτυξιακά στάδια σε gel αγαρόζης πυκνότητας 0.8%. 1. σπορόφυτα, 2. βλαστός, 3. κοτυληδόνες, 4. ρίζα, 5. νεαρά φύλλα, 6. ύπεροι, 7. γονιμοποιημένοι ύπεροι, 8. οφθαλμοί, 9. στήμονες, 10. άνθη, 11. έμβρυα (καρδιάσχημα), 12. έμβρυα (ώριμα), 13. γύρη

Για να πιστοποιηθεί ότι πραγματοποιήθηκε η καταστροφή του DNA, το δείγμα μετά την επώαση με DNάση ηλεκτροθορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 0.8%. Η Εικόνα 14 δείχνει ότι από όλα τα δείγματα αφαιρέθηκε το DNA, η ακεραιότητα του RNA παρέμεινε ως είχε στα περισσότερα δείγματα καθώς οι 3 βασικές ριβοσωμικές ζώνες του RNA παρέμειναν. Η απομάκρυνση του DNA είναι αναγκαστική έτσι ώστε το σήμα που θα λειφθεί στο RT-PCR να προέρχεται από το RNA μόνο και όχι από το DNA που πιθανόν να επιμολύνει

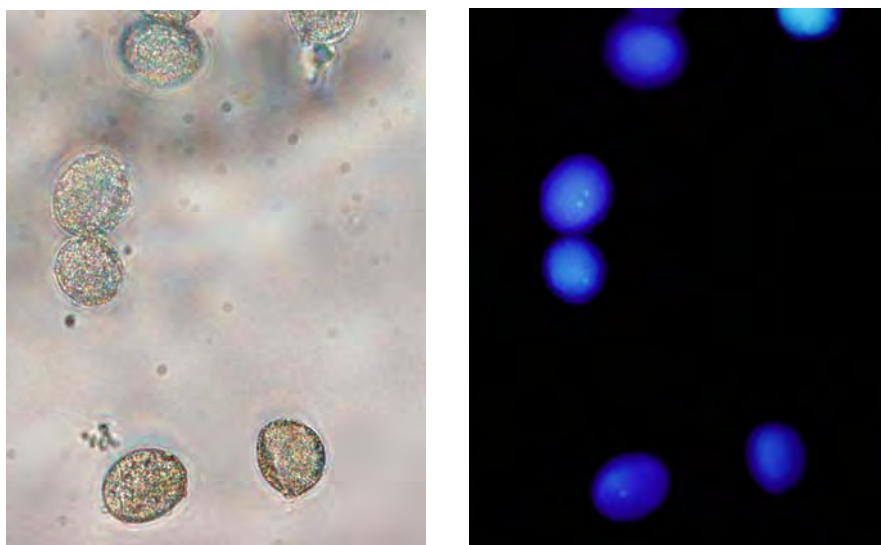


την αντίδραση.

Εικόνα 15. RT-PCRs από διάφορα αναπτυξιακά στάδια για τα γονίδια Lon1, Lon3, Lon4 με ενδογενές γονίδιο ελέγχου το GAPDH. a) σπορόφυτο, b) βλαστός, c) κοτυληδόνες, d) ρίζα, e) έμβρυα (καρδιάσχημα), f) έμβρυα (ώριμα), g) νεαρά φύλλα, h) ύπεροι γονιμοποιημένοι, i) ύπεροι,

j) οφθαλμοί, κ) στήμονες, λ) άνθη, gen: γονιδιωματικό DNA. Η κόκκινη βούλα είναι από RNA γύρης.

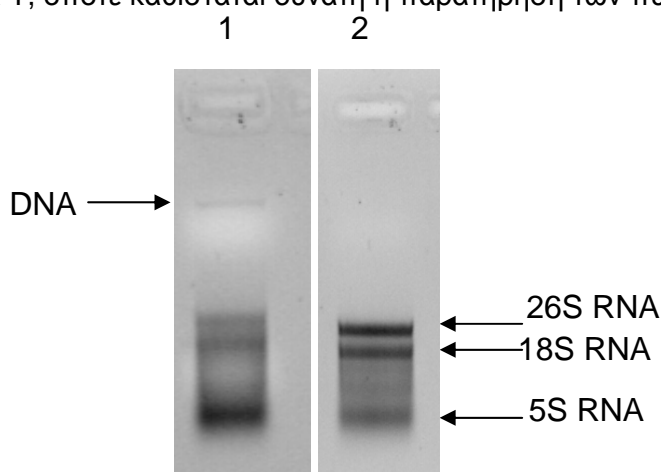
Ένας επιπλέον τρόπος αποφυγής ψεύτικου θετικού σήματος είναι η χρήση εκκινήτων που βρίσκονται σε εξώνια ένθεν και ένθεν ιντρονίου. Επιπλέον των εκκινήτων που σχεδιάστηκαν για το γονίδιο Lon3, χρησιμοποιήθηκαν και οι εκκινήτες που έχουν χρησιμοποιηθεί για το Lon1 και το Lon4 (Rigas *et al.*, 2009a). Για να δειχθεί ότι χρησιμοποιήθηκαν ισόποσο RNA για την αντίδραση RT-PCR, αξιοποιήθηκε το γονίδιο GAPDH, το οποίο εκφράζεται συστατικά σε όλους σχεδόν τους ιστούς και όργανα καθώς και αναπτυξιακά στάδια. Τα αποτελέσματα της Εικόνας 15 δείχνουν από το σήμα του RT-PCR για το γονίδιο GAPDH ότι χρησιμοποιήθηκαν ισόποσα RNA. Επίσης φαίνεται ότι δεν υπάρχει επιμόλυνση από DNA, όπως αυτό αναπαρίσταται από το μέγεθος του RT (μικρότερο σε μέγεθος) σε σχέση με το PCR με μήτρα το DNA για τα γονίδια Lon1 και Lon4. Τα εκφραστικά πρότυπα των γονιδίων Lon1 και Lon4 επαληθεύουν τα πρότυπα που ήδη έχουν αναφερθεί (Rigas *et al.*, 2009a) με μεγαλύτερη έκφραση για το γονίδιο Lon1 στις κοτύλες και αυτή του Lon4 στα νεαρά φύλλα και στους οφθαλμούς (Εικόνα 15). Το mRNA του γονιδίου Lon3 δεν εντοπίστηκε σε κανένα από τους ιστούς ή τα αναπτυξιακά στάδια (Εικόνα 15).



Εικόνα 16. Παρατήρηση απομονωμένων γυρεόκοκκων του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Στο ορατό φίλτρο φαίνεται ότι έχει απομονωθεί μόνο ώριμη γύρη, ενώ ύστερα από χρώση με DAPI για 5min διακρίνονται με μικροσκοπία φθορισμού οι δύο σπερματικοί πυρήνες των ώριμων γυρεόκοκκων.

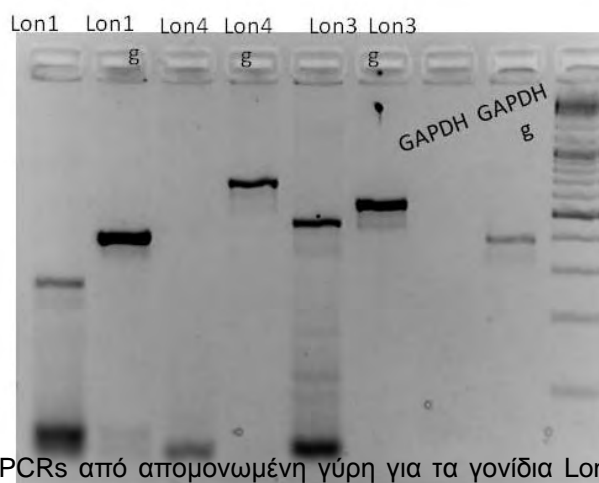
Προκειμένου να ελεγχθεί η έκφραση των Lon γονιδίων στη γύρη των φυτών *Arabidopsis thaliana*, απομονώθηκαν γυρεόκοκκοι σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Honys and Twell, 2003. Συνοπτικά, για την απομόνωση ώριμων γυρεόκοκκων, άνθη πάνω από 500 φυτά χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκομιδή σε

Erlenmeyer flask, όπου προστέθηκαν 300 mL παγωμένης mannitol 0.3M και στη συνέχεια έγινε ζυγή ανακίνηση για 1 λεπτό. Το εναιώρημα της γύρης διαδοχικά φιλτραρίστηκε μέσα από nylon meshes και οι γυρεόκοκκοι συμπυκνώθηκαν με επαναλαμβανόμενες φυγοκεντρήσεις. Η καθαρότητα της απομονωμένης γύρης ελέγχθηκε στο μικροσκόπιο στο ορατό, αλλά και με UV, με χρώση DAPI (4',6'-diamino-2-phenylindone) για να γίνει παρατήρηση των δύο σπερματικών πυρήνων που βρίσκονται στους ώριμους γυρεόκοκκους (Εικόνα 16). Η χρωστική DAPI είναι μια φθορίζουσα χρωστική που συνδέεται ισχυρά με DNA και ειδικά σε περιοχές πλούσιες με A-T, οπότε καθίσταται δυνατή η παρατήρηση των πυρήνων των κυττάρων.



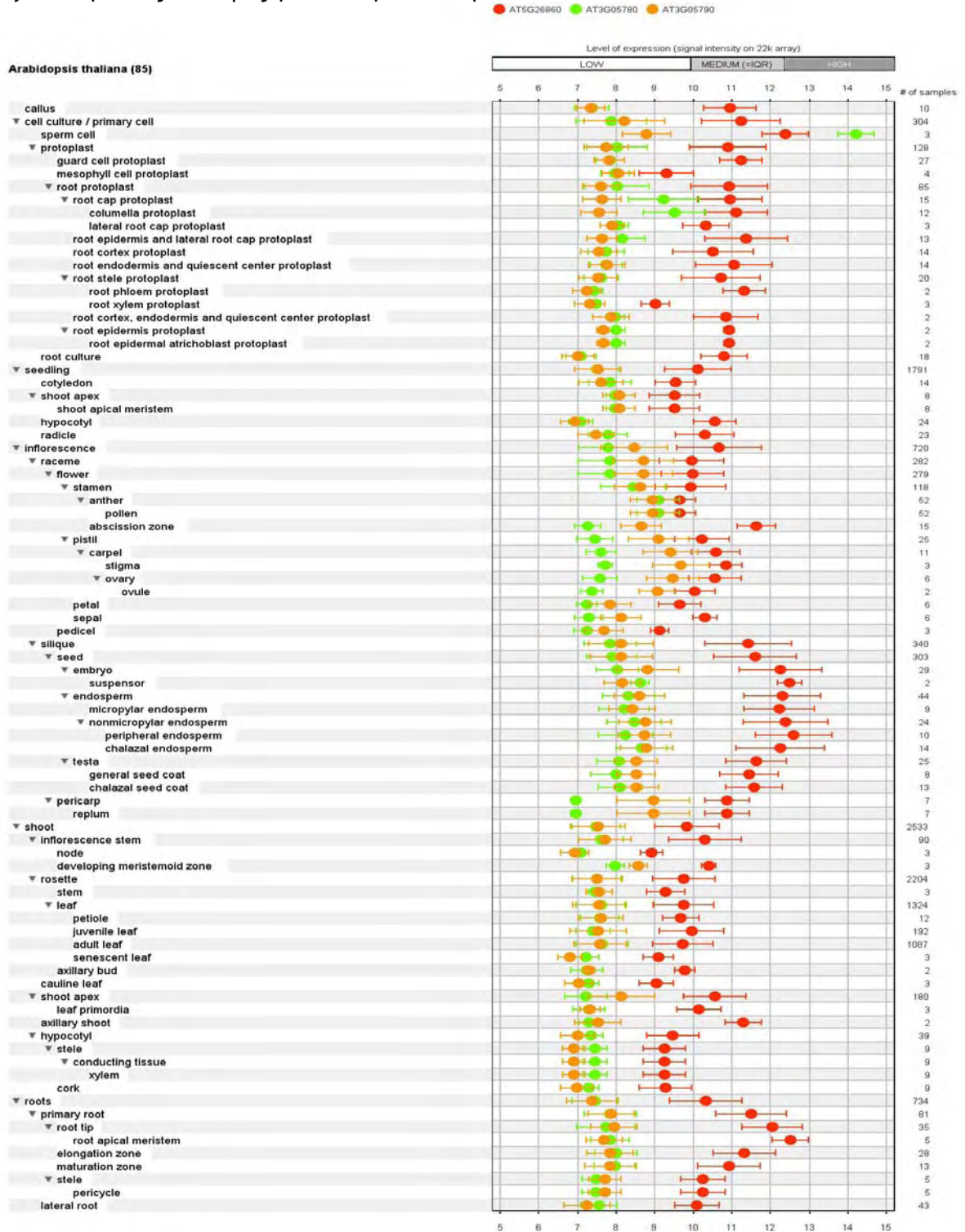
Εικόνα 17. Ολικό RNA απομονωμένο από γύρη πριν (γραμμή 1) και μετά (γραμμή 2) από DNάση. Διακρίνονται (με βέλη) το DNA το 26S και 18S rRNA και το 5S RNA.

Από τη γύρη απομονώθηκε ολικό RNA ώστε να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση με RT-PCR. Η ανάλυση σε πηκτική αгарόζης έδειξε ότι το RNA ήταν ακέραιο καθώς και την ύπαρξη DNA (Εικόνα 17). Ακολούθησε αντίδραση με DNάση όπου φαίνεται η απομάκρυνση του DNA από το δείγμα (Εικόνα 17). Η συγκέντρωση του RNA μετά τη δράση της RNάσης ήταν 7,5μg/ml και ο λόγος A260/A280 ίσος με 1,61.



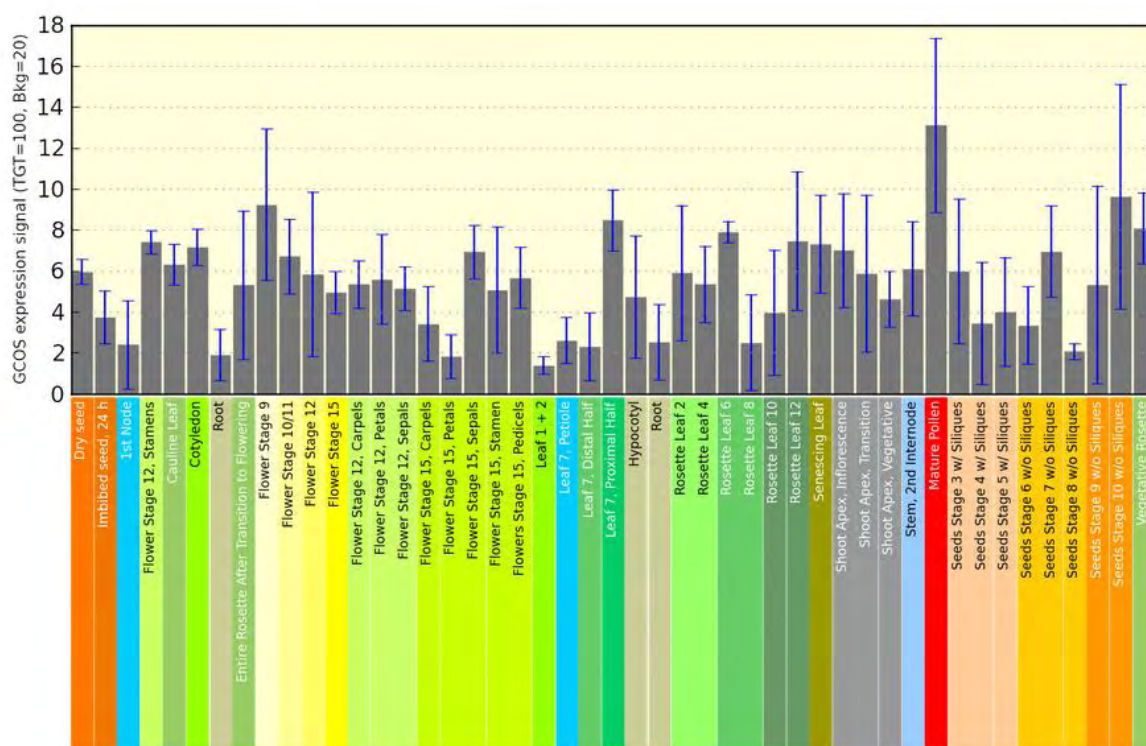
Εικόνα 18. RT-PCRs από απομονωμένη γύρη για τα γονίδια Lon1, Lon3, Lon4 με ενδογενές γονίδιο ελέγχου το GAPDH. g: γονιδιωματικό DNA.

Πραγματοποιήθηκε αντίδραση ανάστροφης μεταγραφής (RT: **R**everse **T**ranscription) με 2μg ολικού RNA από απομονωμένη ώριμη γύρη χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές για το κάθε γονίδιο Lon1, Lon3, Lon4 και GAPDH. Στη συνέχεια από το προϊόν της αντίδρασης έγινε αραίωση και πραγματοποιήθηκε PCR αντίδραση με εξειδικευμένους εκκινητές για τα παραπάνω γονίδια.



Εικόνα 19. Συγκριτική απεικόνιση της έκφρασης, από δεδομένα μικροσυστοιχιών (Geneinvestigator), των γονιδίων Lon1, Lon3, Lon4. Αναφέρονται τα αναπτυξιακά στάδια από τα οποία έγινε η δειγματοληψία και ο αριθμός των επαναλήψεων.

Το gel ηλεκτροφόρησης στο οποίο φορτώθηκαν τα προϊόντα της αντίδρασης PCR έδειξε ότι το Lon1 και Lon3 εκφράζονται, ενώ τα Lon4 και GAPDH δεν εκφράζονται καθόλου. Για τον έλεγχο παρουσίας γονιδιωματικού DNA στα δείγματα RNA, έγινε αντίδραση PCR και σε γονιδιωματικό DNA για να φανεί η διαφορά του μεγέθους λόγω του ιντρονίου που δεν υπάρχει στα cDNAs. Τα αποτελέσματα της εικόνας για πρώτη φορά δείχνουν την ύπαρξη mRNA από το γονίδιο Lon3.



Εικόνα 20. Απεικόνιση της έκφρασης, από δεδομένα μικροσυστοιχιών (eFP Browser) του γονιδίου Lon3. Αναφέρονται τα αναπτυξιακά στάδια από τα οποία έγινε η δειγματοληψία.

Στη βάση δεδομένων GeneInvestigator (<http://www.geneinvestigator.com>) περιέχονται πληροφορίες έκφρασης σχεδόν όλων των γονιδίων του φυτού *Arabidopsis thaliana* σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια και ιστούς του βιολογικού κύκλου του φυτού. Οι πληροφορίες έκφρασης προέρχονται από αποτελέσματα πειραματικών διαδικασιών χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες γονιδίων. Ύστερα από αναζήτηση αποτελεσμάτων της έκφρασης των γονιδίων Lon1, Lon3, Lon4, δημιουργήθηκε από τη βιοπληροφορική ανάλυση της βάσης GeneInvestigator το διάγραμμα της Εικόνας 19. Εκεί φαίνεται

καθαρά ότι το γονίδιο Lon3 εκφράζεται ελάχιστα στους ιστούς και τα στάδια της ανάπτυξης του φυτού, εκτός μόνο από τους σπερματικούς πυρήνες όπου παρουσιάζεται πολύ υψηλή έκφραση του γονιδίου. Το παραπάνω αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται και από τους Borges *et al.*, 2008, όπου με τη μέθοδο FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) απομόνωσαν σπερματικούς πυρήνες και πραγματοποίησαν σε αυτόν τον ιστό μικροσυστοιχίες γονιδίων προκειμένου να ελέγξουν την έκφραση των γονιδίων του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Επίσης, παρατηρείται ότι το γονίδιο Lon1 εκφράζεται αρκετά σε όλους τους ιστούς του φυτού αλλά με πιο υψηλή έκφραση στο σπέρμα και στη ρίζα. Αντίθετα το γονίδιο Lon4 εκφράζεται πολύ λιγότερο σε όλο το βιολογικό κύκλο του φυτού, σε τιμές παρόμοιες με αυτές του Lon3. Το Lon4 φαίνεται μόνο να έχει λίγο πιο υψηλή έκφραση στο θηλυκό αναπαραγωγικό όργανο του φυτού.

Μια άλλη βάση δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε είναι η Arabidopsis eFP Browser

'**E**lectronic **F**luorescent **P**ictographic' από BAR: The Bio-Array Resource for Plant Biology (<http://bar.utoronto.ca/>). Και αυτή η βάση δεδομένων χρησιμοποιεί αποτελέσματα από πειράματα μικροσυστοιχιών από τις δημοσιεύσεις των Schmid *et al.*, 2005 και Kilian *et al.*, 2007. Το αποτέλεσμα της αναζήτησης της έκφρασης σε αυτή τη βάση δεδομένων απεικονίζεται με διάγραμμα στην Εικόνα 20. Ενώ σε όλους τους ιστούς η έκφραση του γονιδίου Lon3 είναι σημαντικά χαμηλή, φαίνεται να υπάρχει μια τάση αυξημένης έκφρασης στην ώριμη γύρη.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αδημοσίευτα αποτελέσματα έχουν δείξει ότι ενώ μια T-DNA ένθεση προς την εγγύς περιοχή του 5' άκρου στο γονίδιο Lon4 δημιουργεί μια ελαττωμένη φυτρωτικότητα μια διαφορετική T-DNA ένθεση προς το 3' άκρο του γονιδίου Lon4 δημιουργεί θνησιμότητα. Το αποτέλεσμα αυτό συνηγορεί ότι μέσα στη κωδική περιοχή του Lon4 υπάρχουν οι αλληλουχίες που ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου Lon3 και οι οποίες αποδιοργανώνονται με τη ένθεση του T-DNA και έτσι υπάρχει καταστολή της έκφρασης του γονιδίου Lon3. Επιπλέον συνηγορούν προς το γεγονός για τη λειτουργικότητα του γονιδίου Lon3 απορρίπτοντας την έννοια του ψευδογονιδίου.

Γενικά υπάρχει μια σύγχυση όσο αφορά την ορολογία των sperm cells στο Arabidopsis. Ενώ αρχικά αναφερόταν για τα φυτά και κατά συνέπεια και για το Arabidopsis σαν sperm nuclei, αργότερα άρχισαν να αναφέρονται σαν sperm cells. Έτσι η ύπαρξη των NLS μέσα στην αμινοξική ακολουθία του Lon3 μπορεί να το οδηγεί όχι μόνο μέσα σε ένα υποκυτταρικό οργανίδιο όπως είναι ο χλωροπλάστης ή το μιτοχόνδριο, που ούτως ή άλλως αν υπάρχουν θα είναι πολύ μικρά σε μέγεθος και ενδεχομένως αρχικά μη λειτουργικά, και να είναι πολύ λίγα σε αριθμό αλλά και στον πυρήνα. Η ύπαρξη αυτή δημιουργεί επιπρόσθετες απόψεις για την πρωτεάση Lon3. Ενδεχομένως να αντικατοπτρίζει τις αρχέγονες λειτουργίες ενός συστήματος ελέγχου των πρωτεϊνών (όπως αυτό της πρωτεάσης) πριν τη δημιουργία του πρωτεασώματος 26S που λειτουργεί στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα. Ή ακόμη να αποτελεί το αρχέγονο συστατικό πρωτεασών για τον έλεγχο της ποιότητας των πρωτεϊνών, ή να αποτελεί μια ιδιαίτερη ομάδα πρωτεασών που απαιτούνται για την αποδόμηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια. Είναι εύλογο να δεχθούμε ότι μια τέτοια λειτουργία θα μπορούσε να δημιουργήσει γονιδιακή απο-καταστολή σε περιπτώσεις όπου συγκεκριμένες πρωτεΐνες-καταστολείς αναστέλουν την γονιδιακή λειτουργία μέσα στα sperm cells. Δεν μπορεί να αποκλειστεί και η ύπαρξη επικοινωνίας μεταξύ του πυρήνα και του μιτοχονδρίου ή του πυρήνα και του χλωροπλάστη για την κανονική ανάπτυξη του γυρεοσωλήνα και τη γονιμοποίηση του ωαρίου με ένα από τους δύο sperm cells/sperm nuclei.

Η φυλογενετική ανάλυση δείχνει ότι το Lon3 έχει μεγαλύτερη συγγένεια προς το Lon4 και ότι το Lon4 έχει μεγαλύτερη συγγένεια με το Lon1 από ότι το Lon3 προς το Lon1. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι αν το αρχέγονο γονίδιο έμοιαζε με το Lon3, ο πρώτος διπλασιασμός επέφερε ένα αρχέγονο Lon4 το οποίο με τη σειρά του διπλασιάστηκε σε ένα άλλο αρχέγονο Lon1. Τα αρχέγονα Lon1, Lon3 και Lon4 εξελίχτηκαν στα σημερινά Lon1, Lon3 και Lon4. Επίσης υποδεικνύει ότι το πιο πρόσφατο εξελικτικά γεγονός διπλασιασμού ήταν το γεγονός που οδήγησε στη δημιουργία του Lon1. Φαίνεται επίσης ότι ένα παραπλήσιο γεγονός οδήγησε στη δημιουργία του γονιδίου Lon2.

Το γεγονός της διαφορετικότητας και της απόκλισης των αμινοξικών αλληλουχιών στην επικράτεια SSD υποδηλώνει ότι είτε η κάθε μια πρωτεάση Lon έχει διαφορετικό υπόστρωμα (διαφορετική πρωτεΐνη) είτε η κάθε μια Lon έχει διαφορετική συγγένεια (και άρα κινητική σύνδεσης) με το ίδιο υπόστρωμα (πρωτεΐνη). Αν δεχθούμε ότι οι πρωτεάσες Lon στην ουσία αποδωθούν εν δυνάμει μετουσιωμένες πρωτεΐνες, τότε είναι εύλογο να δεχθούμε ότι στη ουσία, πέραν των άλλων λειτουργιών που μπορεί να έχουν –δηλαδή μοριακού τσαπερονίου-, αναγνωρίζουν μετουσιωμένες περιοχές πρωτεϊνών. Έτσι η διαφορετικότητα αυτή στην επικράτεια SSD μάλλον θα πρέπει να έχει διαφορετική κινητική συγγένειας προς τις μετουσιωμένες περιοχές πρωτεϊνών.

Ο μη εντοπισμός του mRNA του γονιδίου Lon3 στους ιστούς: σπορόφυτο, βλαστός, κοτυληδόνες, ρίζα, έμβρυα (καρδιόσχημο), έμβρυα (ώριμα), νεαρά φύλλα, ύπεροι γονιμοποιημένοι, ύπεροι, οφθαλμοί, στήμονες και άνθη δεν οφείλεται στη μη ύπαρξη RNA όπως αυτό αποδεικνύεται από την ύπαρξη των μεταγράφων για τα γονίδια Lon1 και Lon4 και υποδηλώνει ότι το γονίδιο Lon3 είτε δεν εκφράζεται στους συγκεκριμένους ιστούς, όργανα ή αναπτυξιακά στάδια, είτε εκφράζεται σε πάρα πολύ χαμηλά επίπεδα που σχεδόν είναι αδύνατος ο εντοπισμός των mRNA κάτω από τις συγκεκριμένες διαδικασίες του πειράματος.

Η προσπάθεια μας εστιάστηκε σε συγκεκριμένους ιστούς (γύρη) με βάση την εξελικτική διαδικασία των διπλασιασμών των γονιδίων Lon. Μετά από ανάλυση με RT-PCR και χρήση μήτρας από ολικό RNA (2μg) που απομονώθηκε από γύρη φάνηκε ότι το γονίδιο Lon3 εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα αλλά εξειδικευμένα στη γύρη του φυτού, υποδεικνύοντας ότι δεν είναι ψευδογονίδιο. Με γενετική ανάλυση θα αποδειχθεί ότι το γονίο Lon3 έχει ουσιαστική λειτουργία στο φυτό ιδιαίτερα στην ανάπτυξη του γυρεοσωλήνα απαραίτητης διαδικασίας για τη γονιμοποίηση.

Ύστερα από βιοπληροφορική αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων που έχουν αναλυθεί και καταχωρηθεί για την έκφραση γονιδίων από μικροσυστοιχίες (GeneInvestigator, eFP Browser), επιβεβαιώθηκε ότι το γονίδιο Lon3 εκφράζεται εξειδικευμένα μόνο στους ώριμους γυρεόκοκκους. Ενώ υπήρχαν αναφορές ότι το Lon3 μάλλον αποτελούσε ένα ψευδογονίδιο (Ostersetzer et al. 2007, Rigas et al. 2009a), είναι πλέον δεδομένο ότι εκφράζεται σε μια πολύ εξειδικευμένη φάση του κύκλου ζωής του φυτού κατά το γαμετικό κύκλο και έτσι δεν θα μπορούσε να αποτελεί ψευδογονίδιο. Σε αυτό βέβαια συνηγορεί και το ότι έχει ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο και παρόμοια γονιδιακή δομή με τα άλλα Lon σε επίπεδο εξωνίων-ιντρονίων. Επίσης, τα αποτελέσματα από τις μικροσυστοιχίες της βάσης δεδομένων GeneInvestigator δείχνουν ότι το Lon3 εκφράζεται στα σπερματικά κύτταρα των ώριμων γυρεόκοκκων, κάτι τι οποίο συμφωνεί

με την αναφορά των Borges et al., 2008, όπου με τη μέθοδο FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) απομόνωσαν σπερματικούς πυρήνες και πραγματοποίησαν σε αυτόν τον ιστό μικροσυστοιχίες γονιδίων προκειμένου να ελέγξουν την έκφραση των γονιδίων του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Σύμφωνα με τη βιοπληροφορική ανάλυση το γονίδιο Lon1 εκφράζεται αρκετά σε όλους τους ιστούς του φυτού, καθώς έχει και πιο αυξημένη έκφραση σε ταχέως αναπτυσσόμενους ιστούς όπως είναι οι κοτύλες και η πρωτογενής ρίζα του σπορόφυτου αλλά και στο έμβρυο όπως επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης,. Αντίθετα το γονίδιο Lon4 εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα, ενώ φαίνεται να αυξάνεται η έκφρασή του στα φύλλα και στους οφθαλμούς.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύεται ότι τα Lon γονίδια έχουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης μεταξύ τους και ειδικά το Lon3 εκφράζεται σε ένα πολύ εξειδικευμένο ιστό, τους ώριμους γυρεόκοκκους και τα σπερματικά τους κύτταρα. Δηλαδή η πρωτεάση Lon3 μάλλον έχει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση των πρωτεϊνών των σπερματικών κυττάρων ρυθμίζοντας το γαμετικό κύκλο πριν τη γονιμοποίηση. Με την ανάλυση T-DNA μεταλλαγμάτων του γονιδίου Lon3 καθώς και ανάλυση της τοποθέτησης της πρωτεΐνης μέσα στο υποκυτταρικά διαμερίσματα (μιτοχόνδρια ή/και πυρήνες), μπορεί να διαλευκανθεί η λειτουργία της πρωτεάσης Lon3 στην ώριμη γύρη και να καθορισθεί περαιτέρω ο ρόλος της στο γαμετικό κύκλο και τη γονιμοποίηση.

Βιβλιογραφία

- Adam Z, Adamska I, Nakabayashi K, Ostersetzer O, Haussuhl K, Manuell A, Zheng B, Vallon O, Rodermel SR, Shinozaki K, Clarke AK (2001) Chloroplast and mitochondrial proteases in Arabidopsis. A proposed nomenclature. *Plant Physiol.* 125:1912-1918.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* 408:796–805
- Bota DA, Davies KJ (2002) Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. *Nat Cell Biol* 4:674–680
- Bota DA, Ngo JK, Davies KJ (2005) Downregulation of the human Lon protease impairs mitochondrial structure and function and causes cell death. *Free Radic Biol Med* 38: 665–677
- Chen M, Choi Y, Voytas DF, Rodermel S. (2000) Mutations in the Arabidopsis VAR2 locus cause leaf variegation due to the loss of a chloroplast FtsH protease. *Plant J.* 22(4):303-13.
- Chung CH, Goldberg AL. (1981) The product of the lon (capR) gene in Escherichia coli is the ATP-dependent protease, protease La. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug;78(8):4931-5.
- Donch J, Greenberg J (1968) Genetic analysis of lon mutants of strain K-12 of Escherichia coli. *Mol Gen Genet* 103: 105-115
- Dyall SD, Brown MT, Johnson PJ. (2004) Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science.* 304:253-257.
- van Dyck L, Pearce DA, Sherman F. (1994) PIM1 encodes a mitochondrial ATP-dependent protease that is required for mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269:238–242
- Van Dyck L, Pearce DA, Sherman F. (1998) PIM1 encodes a mitochondrial ATP-dependent protease that is required for mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 269:238-42.
- Gur E, Sauer RT (2009) Degrons in protein substrates program the speed and operating efficiency of the AAA+ Lon proteolytic machine. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:18503-1858
- Hansen J, Corydon TJ, Palmfeldt J, Durr A, Fontaine B, Nielsen MN, Christensen JH, Gregersen N, Bross P (2008) Decreased expression of the mitochondrial matrix proteases Lon and ClpP in cells from a patient with hereditary spastic paraplegia (SPG13). *Neuroscience* 153: 474-482
- Hershko A, Ciechanover A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 67:425-479.
- Howell KA, Millar AH, Whelan J (2006) Ordered assembly of mitochondria during rice germination begins with pro-mitochondrial structures rich in components of the protein import apparatus. *Plant Mol Biol* 60: 201-223
- Iyer LM, Leipe DD, Koonin EV, Aravind L (2004) Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *Journal of Structural Biology* 146:11–31
- Kilian J, Whitehead D, Horak J, Wanke D, Weini S, Batistic O, D'Angelo C, Bornberg-Bauer E, Kudla J, Harter K. *Plant J.* (2007) The AtGenExpress global stress expression

data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Apr*;50(2):347-63. Epub 2007 Mar 21.

Komenda J, Barker M, Kuviková S, de Vries R, Mullineaux CW, Tichy M, Nixon PJ.(2006). The FtsH protease slr0228 is important for quality control of photosystem II in the thylakoid membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem*. 2006 Jan 13;281(2):1145-51. Epub 2005 Nov 14

Langer T. (2000) AAA proteases—cellular machines for degrading membrane proteins. *Trends Biochem Sci*. 25:207–256.

Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, Prolla TA (1999) Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* 285: 1390–1393

Lingard MJ, Bartel B (2009) Arabidopsis LON2 is necessary for peroxisomal function and sustained matrix protein import. *Plant Physiol* 151: 1354-1365

Lister R, Chew O, Lee MN, Heazlewood JL, Clifton R, Parker KL, et al. (2004) A transcriptomic and proteomic characterization of Arabidopsis mitochondrial protein import apparatus and its response to mitochondrial dysfunction. *Plant Physiol* 134:777-89.

Lu B, Yadav S, Shah PG, Liu T, Tian B, Puksza S, Villaluna N, Kutejová E, Newlon CS, Santos JH, Suzuki CK (2007) Roles for the human ATP-dependent Lon protease in mitochondrial DNA maintenance. *Journal of Biological Chemistry* 282:17363-17374

Luce K, Osiewacz HD (2009) Increasing organismal healthspan by enhancing mitochondrial protein quality control. *Nat Cell Biol* 11: 852-858

Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koorneef M, (1998) Arabidopsis thaliana : A model plant for genome analysis. *Science* 282:662-682

Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV (1999) AAA+ : a class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Research* 9:27–43

Ostersetzer O, Kato Y, Adam Z, Sakamoto W (2007) Multiple intracellular locations of Lon protease in Arabidopsis: evidence for the localization of AtLon4 to chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 48:881-885

Peltier JB, Ripoll DR, Friso G, Rudella A, Cai Y, Ytterberg J, Giacomelli L, Pillardy J, van Wijk KJ.(2004) Clp protease complexes from photosynthetic and non-photosynthetic plastids and mitochondria of plants, their predicted three-dimensional structures, and functional implications *J Biol Chem*. Feb 6;279 :4768-81. Epub 2003 Oct 30.

Rep M, van Dijl M, Suda K, Schatz G, Grivell LA, Suzuki CK (1996) Promotion of mitochondrial membrane complex assembly by a proteolytically inactive yeast Lon. *Science* 274:103–106

Rigas S, Daras G, Laxa M, Marathias N, Fasseas C, Sweetlove LJ, Hatzopoulos P (2009a) The role of Lon1 protease in post-germinative growth and maintenance of mitochondrial function in Arabidopsis thaliana. *New Phytol* 181:588-600

Rigas S, Daras G, Sweetlove LJ, Hatzopoulos P (2009b) Mitochondria biogenesis via Lon1 selective proteolysis: who dares to live for ever? *Plant Signal Behav* 4:221-224

Rotanova TV, Botos I, Melnikov EE, Rasulova F, Gustchina A, Maurizi MR, Wlodawer A (2006) Slicing a protease: structural features of the ATP-dependent Lon proteases gleaned from investigations of isolated domains. *Protein Sci* 15: 1815–1828

Sakamoto W, Zaltsman A, Adam Z, Takahashi Y. (2003) Coordinated regulation and complex formation of yellow variegated1 and yellow variegated2, chloroplastic FtsH metalloproteases involved in the repair cycle of photosystem II in Arabidopsis thylakoid membranes. *Plant Cell*. 2843-55. *Epub* 2003 Nov 20.

Sakamoto W. (2006) Protein degradation machineries in plastids. *Annu Rev Plant Biol*. 57:599-621.

Sarria R, Lyznik A, Vallejos CE, Mackenzie SA. (1998) A cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial peptide in common bean is post-translationally regulated. *Plant Cell* 10:1217-28.

Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Schölkopf B, Weigel D, Lohmann JU. (2005) A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. *Nat Genet*. 37:501-506.

Sinvany-Villalobo G, Davydov O, Be-Ari G, Zaltsman A, Raskind A, Adam Z. (2004) Expression in multigene families. Analysis of chloroplast and mitochondrial proteases. *Plant Physiol*. 135 :1336-1345

Smalle J, Vierstra RD. (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway *Annu Rev Plant Biol*. 255:555-590.

Smith CK, Baker TA, Sauer RT (1999) Lon and Clp family proteases and chaperones share homologous substrate-recognition domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6678–6682

Suzuki CK, Suda K, Wang N, Schatz G (1994) Requirement for the yeast gene LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration. *Science* 264:273-276

Teichmann U, van Dyck L, Guiard B, Fischer H, Glockshuber R, Neupert W, Langer T. (1996) Substitution of PIM1 protease in mitochondria by Escherichia coli Lon protease. *J Biol Chem*. Apr 26;271(17):10137-42.

Wagner I, Arlt H, van Dyck L, Langer T, Neupert W. (1994) Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. *EMBO J*. 13:5135-45.

Honys and Twell, Comparative Analysis of the Arabidopsis Pollen Transcriptome, *Plant Phys* – 2003

Borges *et al.*, Comparative Transcriptomics of Arabidopsis sperm cells, *Plant Phys* - 2008