

Το θέμα της παρούσας διδακτορικής διατριβής ορίστηκε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας στη Συνεδρία 14<sup>η</sup>/18.04.2008.

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής Γ.Π.Α (Μέλος τριμελούς Συμβουλευτικής επιτροπής)
2. Νικόλαος Πανόπουλος, Ομ. Καθηγητής Παν. Κρήτης (Μέλος τριμελούς Συμβουλευτικής επιτροπής)
3. Δήμητρα Μηλιώνη, Επίκουρη Καθηγήτρια Γ.Π.Α (Μέλος τριμελούς Συμβουλευτικής επιτροπής)
4. Άγγελος Κανελλής, Καθηγητής Α.Π.Θ
5. Αντώνης Μακρής, Ερευνητής Α' ΙΝΑ, ΕΚΕΤΑ
6. Νεκτάριος Ταβερναράκης, Ερευνητής Α' Ι.Τ.Ε
7. Σταμάτης Ρήγας, Λέκτορας Γ.Π.Α



Θα ήθελα να ευχαριστήσω ειλικρινά τον Πολυδεύκη Χατζόπουλο, τον Σταμάτη Ρήγα και τον Ντικράν Τσιτσεκιάν.

Επίσης ευχαριστώ την οικογένειά μου και την Ιωάννα για την υπομονή και την υποστήριξή τους κατά τη διάρκεια ολοκλήρωσης της διατριβής,

Η πραγματοποίηση της διδακτορικής διατριβής διευκολύνθηκε με τη χορήγηση υποτροφίας από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών.





## "The Secret Life Of Plants"

I can't conceive the **nucleus** of all  
Begins inside a **tiny seed**  
And what we think as insignificant  
Provides the purest air we breathe

But who am I to doubt or question the inevitable being  
For these are but a **few discoveries**  
We find inside the Secret Life of Plants

A species smaller than the eye can see  
Or larger than most living things  
And yet we take from it without consent  
Our shelter, food, habiliment

But who am I to doubt or question the inevitable being  
For these are but a few discoveries  
We find inside the Secret Life of Plants

But far too many give them in return  
A stomp, cut, drown, or burn  
As is they're nothing  
But if you ask yourself where would you be  
Without them you will find you would not

And some believe antennas are their **leaves**  
That spans beyond our galaxy  
They've been, they are and probably will be  
Who are the mediocrity

But who am I to doubt or question the inevitable being  
For these are but a few discoveries  
We find inside the Secret Life of Plants  
For these are but a few discoveries  
We find inside the Secret Life of Plants

"Stevie Wonder"



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διατριβή αποδεικνύει ότι το πυρηνικό γονίδιο AtLon1 περιέχει δύο ενάρξεις της μετάφρασης στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο κωδικοποιώντας για δύο ισόμορφα. Το πλαστιδιακό ισόμορφο Lon1L που ξεκινά στην πρώτη Μεθειονίνη και το μιτοχονδριακό ισόμορφο Lon1S το οποίο ξεκινά στη Μεθειονίνη 46. In vivo μικροσκοπία φθορισμού του AtLon1 γονιδίου σε σύντηξη με το YFP έδειξε ότι συμβαίνει ολίσθηση του μηχανισμού σάρωσης του ριβοσώματος στην περιοχή του πρώτου AUG, οδηγώντας σε εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης στο δεύτερο κωδικόνιο έναρξης. Επίσης παρουσιάζεται ρύθμιση και σε μεταγραφικό επίπεδο αφού υπάρχει και εναλλακτική έναρξη της μεταγραφής σε συνδυασμό με την ανάπτυξη ή περιβαλλοντικές συνθήκες. Το γονίδιο AtLon1 επιτυχώς συμπλήρωσε το φαινότυπο του μεταλλάγματος Pim1 στη ζύμη ανεξάρτητα του πεπτιδίου οδηγού. Ακόμη, το πεππίδιο οδηγός του AtLon1 είναι αρκετά συντηρημένο και σε άλλους φυτικούς οργανισμούς.

Οι πρωτεΐνες που περιέχουν το τμήμα PORR (Plant Organelle RNA Recognition) εμπλέκονται στο μάπισμα των πλαστιδιακών γονιδίων της ομάδας II. Το γονίδιο Leukothea1 περιέχει το τμήμα PORR και είναι αναγκαίο την ανάπτυξη του εμβρύου. Το μετάλλαγμα leuko1-1 εμφανίζει λευκές κοτυληδόνες, ενώ η ολική έλλειψη της πρωτεΐνης οδηγεί στη θνησιμότητα του εμβρύου, όπως εμφανίζεται στο μετάλλαγμα leuko1-2. Η πρωτεΐνη Leuko1 έχει πεππίδιο οδηγό για τον χλωροπλάστη, αλλά και σινιάλα εισόδου και εξόδου από τον πυρήνα, τα NLS και NES αντίστοιχα. Μικροσκοπική ανάλυση των κατασκευών του γονιδίου με YFP έδειξε ότι η πρωτεΐνη μπορεί να τοποθετείται στον πυρήνα, αλλά και στον χλωροπλάστη και μάλιστα διακινούμενη από τον πυρήνα στον χλωροπλάστη. Ο φαινότυπος του μεταλλάγματος leuko1-1 οφείλεται στην έλλειψη της πρωτεΐνης από τον πυρήνα. Για αυτό το λόγο, η αποκλειστική τοποθέτηση της πρωτεΐνης Leuko1 στον πυρήνα συμπλήρωσε το φαινότυπο του μεταλλάγματος leuko1-1.

Η παρούσα διατριβή παρέχει πληροφορίες και αποτελέσματα που έχουν να κάνουν με τους μηχανισμούς τοποθέτησης και λειτουργίας των γονιδίων Lon1 και Leukothea αναφορικά της ανάπτυξης του φυτικού σώματος. Η πολλαπλή επανοτοποθέτηση των παραπάνω πρωτεϊνών παρέχει ένα εξελιγμένο δίκτυο σηματοδότησης μέσα στο φυτό έναντι της ανάπτυξης ή και των περιβαλλοντικών συνθηκών που επικρατούν.

## ABSTRACT

Cellular homeostasis and survival relies on components of protein quality control mechanism including chaperones for proper folding of non-native polypeptides and proteases to eliminate the irreparably damaged proteins. In bacteria and eukaryotic organelles the ATP-dependent Lon protease plays a critical role in the removal of oxidised proteins and hence prevents cumulative damage by deleterious degradation-resistant aggregates. This report demonstrates that nuclear *AtLon1* gene contains two in-frame translation initiation codons encoding for a long plastidial isoform (Lon1L) starting at Met1 and a short mitochondrial targeted isoform (Lon1S) starting at Met46. *In vivo* fluorescence microscopy of *AtLon1* N-terminal deletion variants fused to YFP revealed leaky ribosome scanning around the first AUG, which deviates extensively from the optimum Kozak consensus, leading to alternative translation initiation at the second initiation codon. Additional complexity results from differential selection of transcription start sites (TSS) depending on tissue specificity and stress-response. The TSS for Lon1S devoid of the first AUG context is predominant, whereas the upstream TSS containing the two in-frame AUGs is highly expressed only in leaves and under shortage of light. The twin N-terminal presequences of *AtLon1* are highly conserved among various plant species. Interestingly, *AtLon1* successfully complemented the mitochondrial mutant phenotype of the yeast *PIM1* gene homolog through an AUG context-dependent but N-terminal targeting domain independent mechanism. In line with the widely-held theory that dual-targeted condition is a gain-of-function derived from gene duplication, the *AtLon1* twin presequences may represent an intermediate in the evolution of dual-targeting affecting post-germinative growth.

Recent studies have shown that proteins containing the PORR (Plant Organelle RNA Recognition) domain are implicated in group II intron splicing mechanism of chloroplast encoded genes. *Leukothea1* gene that contains the PORR domain is necessary for embryo development. The *leuko1-1* mutant allele caused by single nucleotide change of G to A resulting in amino acid substitution of Glycine 373 to Aspartic acid. The *leuko1-1* seedlings have typical white-cotyledon phenotype. The total loss of *Leukothea1* function in *leuko1-2* mutant alleles results in embryo arrest upon transition from the globular to the heart-stage embryo. *In silico* analysis has shown that Leuko1 protein has a putative transit peptide for chloroplast targeting and signals for nuclear localization NLS and export NES. Microscopic analysis of *Leuko1* gene constructs fused to YFP confirmed the dual targeting properties of Leuko1 to both chloroplasts and the nucleus. Furthermore, the Leuko1 roadmap to the nucleus and back to the cytoplasm from the nucleus depends on the Importin1 $\alpha$  and Exportin1 mechanisms, respectively. The *leuko1-1* phenotype results from the disturbed equilibrium of the protein in the nucleus due to enhanced protein export. Therefore, the truncated version of Leuko1 protein missing the transit peptide at the N-terminus complements the *leuko1-1* phenotype, highlighting the crucial role of Leuko1 in the nucleus. Leuko1 protein targeting to the nucleus is associated with the mRNA processing and splicing of nuclear-encoded genes targeted to the chloroplasts.

This study provides information regarding the mechanisms of two nuclear-encoded proteins translocation to distinct subcellular compartments. Plant organelles originate for endosymbiosis of bacteria in the primitive eukaryotic cell. During the course of evolution organellar targeting proteins encoded by the nuclear genome involved in fundamental biological processes including mRNA processing/splicing (*Leukothea1*) or protein processing (*Lon1*) mechanisms, attained dual-targeting properties. These features for multi sub-cellular localization provide a sophisticated network for plant signaling response to environmental or developmental cues.

<b>Περιεχόμενα</b>	
ABSTRACT.....	7

Περιεχόμενα .....	9
1.Εισαγωγή .....	16
1.1 Ο ρόλος της βιογένεσης των οργανιδίων στους μοριακούς μηχανισμούς ανάπτυξης των φυτών .....	16
1.2.1 Μηχανισμοί πρωτεόλυσης στα φυτά.....	17
1.2.1.a Πρωτεάσωμα και πρωτεάσες που τοποθετούνται στα οργανίδια των φυτών .....	17
1.2.1.b Σύστημα πρωτεόλυσης Clp.....	18
1.2.1.c Σύστημα πρωτεόλυσης FtsH.....	18
1.2.1.d Σύστημα πρωτεόλυσης Lon.....	19
1.2.2 Η πρωτεάση Lon στα φυτά.....	22
1.2.3 Τα μεταλλάγματα <i>lon1</i> .....	22
1.2.3.a Τα μιτοχόνδρια των μεταλλαγμάτων <i>lon1</i> παρουσιάζουν ανώμαλη μορφολογία.....	23
1.2.3.b Η πρωτεάση <i>AtLon1</i> ανήκει στην υπεροικογένεια AAA <sup>+</sup> .....	25
1.3.1 Εμβρυογένεση στο φυτό <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	26
1.3.2 Τα βασικά χαρακτηριστικά ενός ώριμου φυτού καθιερώνονται κατά τη διάρκεια της Εμβρυογένεσης.....	28
1.3.3 Τα Κύτταρα Αποκτούν Ταυτότητες Ιστών ως Αποτέλεσμα Εξειδικευμένης Γονιδιακής Έκφρασης.....	29
1.3.4 Πρωτεΐνες του φωτοσυνθετικού μηχανισμού .....	30
1.3.4.a Πρωτεΐνες του φωτοσυνθετικού μηχανισμού που κωδικοποιούνται από το πλαστιδιακό DNA.....	30
1.3.4.b Πρωτεΐνες του φωτοσυνθετικού μηχανισμού που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA.....	31
1.3.5 Πρωτεΐνες πολλαπλής τοποθέτησης μέσα στο κύτταρο.....	32
1.3.6 Δυαδική τοποθέτηση <i>de novo</i> σύνθεσης πρωτεϊνών .....	33
1.3.7 Οι πρωτεΐνες διπλής τοποθέτησης σε οργανίδια και πυρήνα συμμετέχουν στη σταθερότητα του DNA και την έκφραση γονιδίων .....	35
1.4.1 Η μετάλλαξη <i>leukothea1</i> .....	37
1.4.1.a Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του μεταλλάγματος <i>leukothea1-1</i> .....	37
1.4.1.b Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του αλληλόμορφου <i>leukothea1-2</i> .....	41

1.4.2 Η πρωτεΐνη LEUKO1 περιέχει το τμήμα DUF860 ή PORR.....	44
1.4.3 Το τμήμα PORR εντοπίζεται μόνο σε γονίδια φυτικών οργανισμών .....	44
1.5.1 Σκοπός της ερευνητικής μελέτης.....	47
2. Υλικά & Μέθοδοι .....	50
2.1 Φυτικό υλικό.....	50
2.2 Συνθήκες καλλιέργειας <i>Arabidopsis thaliana</i> και <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	50
2.3 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA από σπορόφυτα <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	50
2.4 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA από έμβρυα <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	51
2.5 Πρωτόκολλο απομόνωσης γονιδιωματικού DNA από <i>Arabidopsis</i> .....	51
2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) .....	52
2.6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) .....	52
2.6.2 PCR αποικιών.....	53
2.6.3 RT-PCR.....	53
2.7 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).....	55
2.8 Ανάλυση δεσοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA) .....	55
2.9 Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης.....	56
2.10 Ενοποίηση τμημάτων με κολλώδη άκρα.....	57
2.11 Βακτηριακά κύτταρα και μετασχηματισμός.....	57
2.11.1 Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> .....	57
2.11.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> με πλασμιδιακό DNA. ....	58
2.11.3 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>Agrobacterium tumefaciens</i> με ηλεκτροπόρωση.....	58
2.12 Αποθήκευση για μεγάλα χρονικά διαστήματα βακτηριακών κυττάρων .....	59
2.13 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα <i>Escherichia coli</i> .....	59
2.13.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης. ....	59
2.13.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την βοήθεια κολώνας QIAGEN. ....	59
2.14 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	60
2.15 Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού.....	60
2.16 Μετασχηματισμός <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	60

2.16.1 Μέθοδος διείσδυσης με εφαρμογή κενού σε ολόκληρα φυτά Arabidopsis. ....	60
2.16.2 Ανάπτυξη φυτών και διείσδυση με κατάλληλο στέλεχος Agrobacterium.....	61
2.16.3 Επιλογή των μετασηματισμένων φυτών της T1 γενιάς.....	61
2.17 YFP Απεικόνιση .....	62
2.18 Πολλαπλή ευθυγράμμιση ακολουθιών και φυλογενετική ανάλυση.....	62
2.19 Χειρισμός κυττάρων ζύμης.....	63
2.19.1 Μετασηματισμός κυττάρων ζύμης.....	63
2.19.2 Επιλογή και δοκιμή των μετασηματισμένων κυττάρων.....	63
2.19.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα ζύμης.....	63
2.19.4 Παροδική έκφραση σε φύλλα καπνού.....	64
2.20 Αποσιώπηση των γονιδίων <i>Importin α1/α2</i> στον καπνό μέσω VIGS (Virus Induced Gene Silencing).....	65
2.21 Απομόνωση πρωτοπλαστών .....	65
2.22 Χειρισμός μετασηματισμένων πρωτοπλαστών με Λεπτομυκίνη Β (Leptomycin B, LMB) .....	66
2.23 Υδατικά διαλύματα και θρεπτικά μέσα βακτηριακών κυττάρων και φυτών. ....	66
2.23.1 Διαλύματα ανάπτυξης βακτηρίων - σχετικά αντιδραστήρια. ....	66
2.23.2 Διαλύματα ενζύμων και απομόνωσης πλασμιδιακού DNA. ....	66
2.23.3 Διαλύματα απομόνωσης γονιδιωματικού DNA .....	67
2.23.4 Διαλύματα ηλεκτροφόρησης .....	67
2.23.5 Διαλύματα και θρεπτικά μέσα ιστοκαλλιέργειας και μετασηματισμού φυτών...67	
2.23.6 Διαλύματα παροδικής έκφρασης στα φύλλα καπνού .....	67
2.23.7 Διαλύματα απομόνωσης πρωτοπλαστών .....	67
2.24 Κατασκευές και Κλωνοποιήσεις .....	68
2.25 Προγράμματα νευρωνικών δικτύων πρόβλεψης τοποθέτησης πρωτεϊνών .....	71
2.25 Προγράμματα Βιοπληροφορικής .....	71
3. Αποτελέσματα .....	74



3.a Η πολυπλοκότητα της AtLon1 πρωτεάσης στη δυαδική τοποθέτησή της στους χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια με τη διαφορεική χρήση δύο κωδικονίων έναρξης της μετάφρασης στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο .....	74
3.a.1 Το γονίδιο <i>AtLon1</i> παρουσιάζει εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης εξαιτίας δύο κωδικονίων έναρξης της μετάφρασης στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο.....	74
3.a.2 Διαφορική επιλογή θέσεων έναρξης της μεταγραφής.....	81
3.a.3 Η N-τελική περιοχή του γονιδίου <i>Lon1</i> διατηρείται εξελικτικά μεταξύ των φυτικών οργανισμών.....	85
3.a.4 Η νουκλεοτιδική ακολουθία στην περιοχή του δεύτερου AUG είναι λειτουργική στη ζύμη.....	88
3.b Μελέτη των μηχανισμών υποκυτταρικής τοποθέτησης και λειτουργίας της πρωτεΐνης <i>Leuko1</i> στην ανάπτυξη του φυτού <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	89
3.b.1 Η αμινοξική ακολουθία της πρωτεΐνης <i>Leuko1</i> και τα σινιάλα υποκυτταρικής τοποθέτησης .....	90
3.b.2 Τα γονίδια του φυτού <i>Arabidopsis thaliana</i> που φέρουν το τμήμα PORR αποτελούν μια υπεριοικογένεια .....	93
3.b.3 Η πρωτεΐνη <i>Leuko1</i> τοποθετείται στα νουκλεοειδή του χλωροπλάστη και στον πυρήνα του κυττάρου .....	95
3.b.4 Η τοποθέτηση της πρωτεΐνης <i>Leuko1</i> στον πυρήνα καθορίζεται από σινιάλα NLS μέσω του συστήματος της ιμπορτίνης-α .....	96
3.b.5 Η μετάλλαξη <i>leuko1</i> ενισχύει την έξοδο της πρωτεΐνης από τον πυρήνα .....	98
3.b.6 Η έξοδος της πρωτεΐνης <i>Leuko1</i> από τον πυρήνα αναστέλλεται από τη λεπτομυκίνη B .....	101
3.b.7 Η αποκλειστική τοποθέτηση της πρωτεΐνης <i>Leuko1</i> στον πυρήνα συμπληρώνει το φαινότυπο της μετάλλαξης <i>leuko1-1</i> .....	103
3.b.8 Το επίπεδα έκφρασης των χλωροπλαστικών γονιδίων <i>PsbB</i> , <i>PetB</i> και <i>PetD</i> είναι χαμηλό στο μετάλλαγμα <i>leuko1-1</i> .....	104
3.b.9 Το μάτισμα γονιδίων του πυρήνα στο μετάλλαγμα <i>leuko1-2</i> δεν είναι λειτουργικό.106	
4. Συζήτηση .....	110
4.a.1 Η πρωτεάση <i>Lon1</i> τοποθετείται στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες εξαιτίας μερικής ολίσθησης ριβοσωμάτων κατά τη σάρωση του μεταγραφήματος .....	110
4.a.2 Η δυαδική τοποθέτηση της πρωτεΐνης <i>Lon1</i> καθορίζεται από ένα δυναμικό σύστημα απόκρισης .....	112

4.a.3 Η δυαδική ακολουθία οδηγών-συνθήματος της πρωτεΐνης Lon1 πιθανώς σχετίζεται με ένα μεταβατικό εξελικτικό στάδιο .....	113
4.b.1 Το γονίδιο <i>Leukothea1</i> ανήκει στην οικογένεια των γονιδίων που περιέχουν το τμήμα PORR .....	115
4.b.2 Η πρωτεΐνη LEUKO1 τοποθετείται στο χλωροπλάστη αλλά μετακινείται εντός και εκτός του πυρήνα .....	115
4.b.3 Η αποκλειστική τοποθέτηση της πρωτεΐνης Leuko1 στον πυρήνα συμπληρώνει το φαινότυπο της μετάλλαξης <i>leuko1-1</i> .....	116
4.b.4 Πιθανός ρόλος της πρωτεΐνης Leuko1 .....	116
5. Βιβλιογραφία.....	119



# Εισαγωγή



“Συστήματα μοριακών μηχανισμών  
ανάπτυξης στα φυτά”

ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ ΔΑΡΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝ. ΑΘΗΝΩΝ  
2011

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 χλωροπλαστών εξαρτώνται κυρίως από πρωτεΐνες που συντίθενται στο κυτταρόπλασμα και κωδικοποιούνται από τον πυρήνα. Έχει υπολογισθεί ότι το πρωτόμα των μιτοχονδρίων και των χλωροπλαστών αποτελείται από 2000 και 2700 πρωτεΐνες, αντίστοιχα (Millar *et al.*, 2006). Τα φυτικά κύτταρα έχουν διαχωρίσει τη φωτοσύνθεση, την οξειδωτική 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 ομοίωση 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.

Στην παρούσα μελέτη αναλύονται διεξοδικά οι μηχανισμοί που διέπουν τη σύνθεση, τοποθέτηση και λειτουργία δύο πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο, αναφορικά της ανάπτυξης του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Η πρώτη είναι η Lon πρωτεάση, η οποία κωδικοποιείται στον πυρήνα και τοποθετείται στα οργανίδια. Ο ρόλος της είναι η πρωτεόλυση των μη φυσιολογικών πρωτεϊνών μέσα στα οργανίδια κάτω από ιδιαίτερες περιβαλλοντικές και αναπτυξιακές συνθήκες. Η δεύτερη πρωτεΐνη που μελετήθηκε, είναι η Leukothea η οποία περιέχει τμήμα αναγνώρισης και πρόσδεσης σε οργανιδιακό RNA. Η πρωτεΐνη Leukothea είναι ζωτικής σημασίας στην εμβρυογένεση του φυτού και υπάρχουν ενδείξεις ότι συμμετέχει στο μάτισμα των οργανιδιακών ιντρονίων, ενώ παράλληλα έχει τη δυνατότητα να τοποθετείται και στον πυρήνα του κυττάρου.

## 1.2.1 Μηχανισμοί πρωτεόλυσης στα φυτά

### 1.2.1.a Πρωτεάσωμα και πρωτεάσες που τοποθετούνται στα οργανίδια των φυτών

Στο σύνολο τους οι βιολογικές ενδοκυτταρικές λειτουργίες βασίζονται στην ομοίωση και στην ανακύκλωση των πρωτεϊνών. Η μοίρα των πρωτεϊνών καθορίζεται από τη ρυθμιζόμενη βιοσύνθεση νέων πολυπεπτιδίων και την εξειδικευμένη αποδόμηση των προϋπάρχοντων πρωτεϊνικών μορίων. Το 26S πρωτεάσωμα παίζει σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση των πρωτεϊνών, απαλείφοντας ένζυμα που δεν χρειάζονται και αποσυναρμολογώντας ρυθμιστικά δίκτυα που προϋπάρχουν (Hershko and Ciechanover, 1998). Αυτός ο πρωτεολυτικός μηχανισμός ρυθμίζει και συντονίζει την ανάπτυξη των φυτών επηρεάζοντας την εμβρυογένεση, τη φωτομορφογένεση, την ανάπτυξη του άνθους, τον

κιρκαδικό ρυθμό, τη γήρανση και την απόκριση από ορμονικά σήματα (Smalle and Vierstra, 2004). Παρόλα αυτά, οι πρωτεΐνες-στόχοι του συστήματος ουμπικουϊνίνης/ 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; Janska, 2005; Sakamoto, 2006). Αυτές οι πρωτεάσες, όπως και το 26S πρωτεάσωμα, ανήκουν στην υπεροικογένεια των AAA<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> πρωτεϊνών, χαρακτηρίζεται από το AAA<sup>+</sup> τμήμα που αποτελείται από 220-250 αμινοξέα με ή και χωρίς επαναλήψεις. Γενικά, το τμήμα AAA<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> πρωτεϊνικές υπομονάδες όπως είναι οι Clp, ή από πρωτεολυτικά κέντρα που εδράζονται στο ίδιο πολυπεπτίδιο, όπως είναι οι FtsH και οι Lon.

#### 1.2.1.b Σύστημα πρωτεόλυσης Clp

Η πρωτεάση Clp είναι ένα έζυμο 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<sup>+</sup> ή πολλαπλά, αντίστοιχα) και συνδέεται εξωτερικά του συμπλέγματος που διενεργεί την πρωτεόλυση. Οι ClpA, ClpX δημιουργούν ανεξάρτητα ένα ομοεξαμερές δακτύλιο χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών AAA<sup>+</sup>, ο οποίος έχει τη δράση μοριακού συνοδού. Πρωτεάσες ομόλογες της Clp από το *E.coli* έχουν βρεθεί και χαρακτηρησθεί 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 thaliana* υπάρχουν 14 γονίδια που κωδικοποιούν υπομονάδες Clp. Μόνο η ClpP1 κωδικοποιείται στο χλωροπλαστικό γονιδίωμα, ενώ όλα τα άλλα γονίδια είναι πυρηνικά. 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).

#### 1.2.1.c 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 ομο-

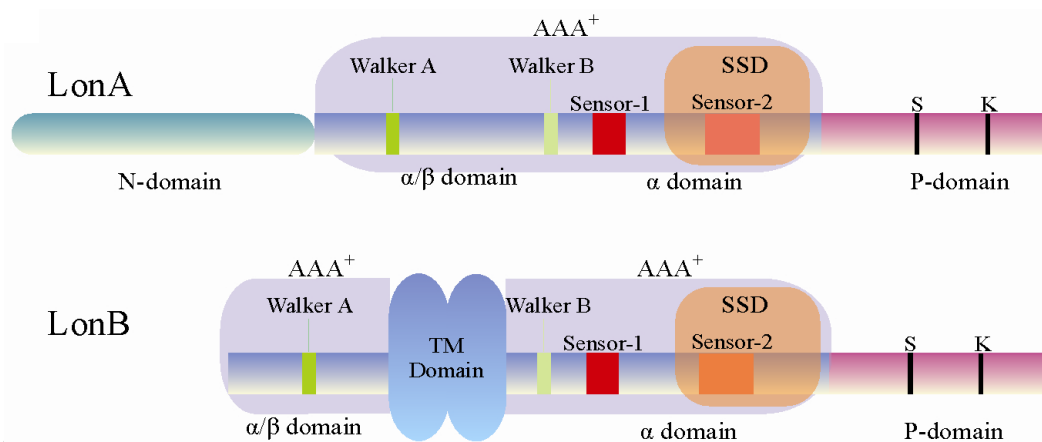
ολιγομερή σύμπλοκα. Τα ομόλογα της πρωτεάσης FtsH στη ζύμη, Yta10-12p, έχουν χαρακτηριστεί λεπτομερώς ότι τοποθετούνται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Langer *et al.*, 2000). Έπειτα από κρυσταλλογραφική ανάλυση με ακτίνες Χ, το τμήμα ATPάσης από FtsH του *E.coli* δημιουργεί ένα εξαμερές δακτύλιο που περιέχει συντηρημένα αρωματικά αμινοξέα. Επίσης η πρωτεάση FtsH του *E.coli* έχει δύο διαμεμβρανικά τμήματα στο άμινο άκρο, τα οποία πιθανότατα προσδένονται στην πλασματική μεμβράνη, ενώ το τμήμα υπεύθυνο για την πρωτεόλυση βρίσκεται στο καρβόξυ άκρο και αντικρίζει το κυτταρόπλασμα (Ito *et al.*, 2005). 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 (Lindhahl *et al.*, 1996, 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* και άλλα τέσσερα ομόλογα των *FtsH*, τα οποία όμως δεν έχουν το μοτίβο πρόσδεσης ψευδαργύρου (zinc-binding motif) και άρα είναι μη λειτουργικά όσον αφορά στην πρωτεόλυση. 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). Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι πρωτεάσες *FtsH* έχουν πολλαπλούς ρόλους και λειτουργίες στους χλωροπλάστες και για αυτό το λόγο θεωρούνται εξαιρετικά σημαντικές (Sakamoto *et al.*, 2006).

#### 1.2.1.d 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<sup>+</sup> 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 άμινο-τελικό 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 1). Το τμήμα AAA<sup>+</sup> 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 υδρόλυση του ATP, καθώς και στη ρύθμιση της πρωτεολυτικής δράσης κατά τη διάρκεια των μοριακών αλληλεπιδράσεων (Neuwald *et al.*, 1999; Εικόνα. 1). 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<sup>+</sup> 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) 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 ( $\alpha$ ) και πιθανώς επεκτείνεται μέχρι το μοτίβο sensor-2 του τμήματος AAA<sup>+</sup>.



**Εικόνα 1. Δομικά χαρακτηριστικά των Lon πρωτεϊνών**

Σχηματική αναπαράσταση της οικογένειας LonA, απεικονίζεται το N-τμήμα, το κεντρικό τμήμα AAA<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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* (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 της πρωτεάσης Lon, 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 ή RNA 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 του και η ανθεκτικότητά του μιτοχονδρίου έναντι συνθηκών οξειδωτικής καταπόνησης.

Η πρωτεάση Lon από το *E. Coli* και τη ζύμη έχει διερευνηθεί ενδελεχώς. Στο *Escherichia 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 πολυπεπτιδία, τα οποία όμως δεν είναι εκτεθειμένα όταν η πρωτεΐνη είναι σωστά αναδιπλωμένη (Gur and Sauer, 2008). Το ομόλογο γονίδιο *PIM1* (proteolysis in mitochondria, πρωτεόλυση στα μιτοχόνδρια) της ζύμης ελέγχει τη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών στη μήτρα (matrix) των μιτοχονδρίων (Suzuki *et al.*, 1994; van Dyck *et al.*, 1994). 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). Η πρωτεάση PIM1 είναι απαραίτητη για την κανονική έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα (van Dyck *et al.*, 1998). Κύτταρα ζύμης που φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *PIM1* είναι ανίκανα να διατηρήσουν σταθερή την οργάνωση του μιτοχονδριακού γονιδιωματός (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. Επιπρόσθετα, όπως αποκαλύπτουν φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, τα μιτοχόνδρια *pim1* έχουν ανώμαλο σχήμα και συσσωρεύουν συσσωματώματα πολυπεπτιδίων στη μήτρα (Suzuki *et al.*, 1994).

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). Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι οι πρωτεάσες Lon εμπλέκονται στην απαλοιφή των οξειδωμένων μορφών ορισμένων πρωτεϊνών, προστατεύοντας έτσι το σχηματισμό καρβονυλιωμένων συσσωματωμάτων μεγάλου μοριακού βάρους μέσα στη μήτρα του οργανιδίου (Bota and Davies, 2002). 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 οξειδωση και συσσωμάτωση των πρωτεϊνών (Nyström, 2005).

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 μεταξύ προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών ομολόγων. Επίσης, έχει αναφερθεί και μια διττή λειτουργία των Lon πρωτεασών (Rep *et al.*, 1996a). Ανεξάρτητα της πρωτεόλυσης, οι πρωτεάσες Lon λειτουργούν ως μοριακοί συνοδοί καθορίζοντας την συναρμολόγηση πρωτεϊνικών συμπλόκων. Επιπρόσθετο λειτουργικό χαρακτηριστικό γνώρισμα είναι ότι μπορούν να συνδεθούν με περιοχές του DNA πλουσίες σε GT ιδιότητα που υποδηλώνει την άμεση συμμετοχή τους στη διατήρηση της οργάνωσης του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) (Fu *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004). Ειδικότερα, στα θηλαστικά οι πρωτεάσες Lon συνδέονται με μονόκλωνο DNA, ενώ στα βακτήρια με δίκλωνες δομές.

### 1.2.2 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 ισομερή. Υπάρχουν ενδείξεις ότι, όπως στα βακτήρια και στα ευκαρυωτικά ομόλογα, οι φυτικής 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 (Janska, 2005; 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; Janska, 2005).

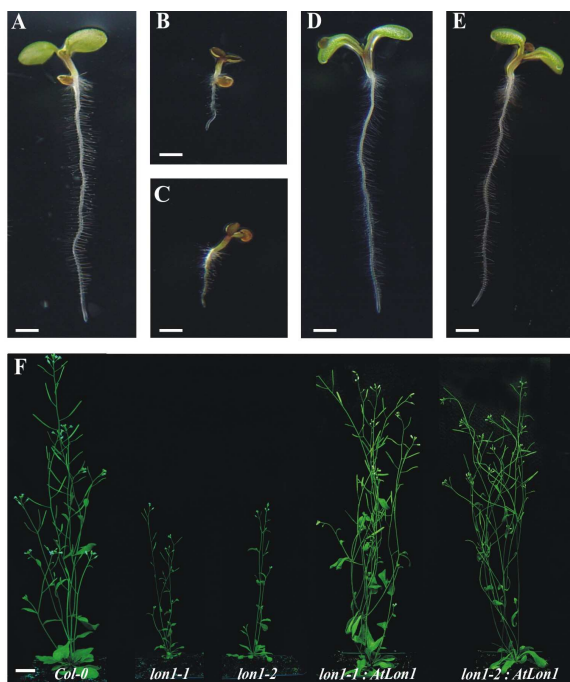
Όπως στα βακτήρια και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, υπάρχουν ενδείξεις ότι τα φυτικά μιτοχόνδρια σε συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης χρησιμοποιούν το πρωτεολυτικό σύστημα Lon για να ανταπεξέλθουν (Sweetlove *et al.*, 2002; Lister *et al.*, 2004). Έχει δειχθεί σε φυτά φασολιάς ότι η πρωτεάση Lon αποικοδομεί ένα μιτοχονδριακό πεπτιδίο 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. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι η πρωτεάση Lon συμβάλλει στην αποικοδόμηση των οξειδωμένων και προβληματικών πρωτεϊνών (Sweetlove *et al.*, 2002).

Τα παραπάνω υποδεικνύουν τη συμμετοχή των πρωτεασών Lon στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών ή και τη λειτουργία τους ως μοριακοί συνοδοί στα μιτοχόνδρια (Lister *et al.*, 2004). Τα ισόμορφα της πρωτεάσης Lon στα φυτά, κωδικοποιούνται από οικογένειες πυρηνικών γονιδίων και έχουν πεπτιδία 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 ομοίωση των οργανιδίων και συνεπώς του κυττάρου. Με βάση την πρωτεϊνική ομολογία, έχουν αναγνωρισθεί τέσσερα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεάσες Lon στο *Arabidopsis thaliana*, τα οποία ανήκουν στην υπεροικογένεια LonA (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, πιθανώς εξαιτίας μίας N-τελικής ακολουθίας-οδηγού (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).

### 1.2.3 Τα μεταλλάγματα *lon1*

Προκειμένου να ταυτοποιηθούν μεταλλάγματα με ανωμαλία στην ανάπτυξη της ρίζας, πραγματοποιήθηκε σάρωση φυτών *Arabidopsis thaliana* μεταλλαγμένων με το χημικό μεταλλαξιογόνο EMS. Απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε το μέταλλαγμα *lon1-1* που εμφανίζει προβληματική ανάπτυξη στη ρίζα (Rigas *et al.*, 2009a) (Εικόνα 2). Λεπτομερής φαινοτυπική ανάλυση έδειξε ότι δεν επηρεάζεται μόνο η επιμήκυνση της πρωτογενούς ρίζας,

αλλά ολόκληρη η μεταεμβρυακή ανάπτυξη του φυτού. Η πρωτογενής ρίζα του μεταλλάγματος είναι εμφανώς καθυστερημένη σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου *Col-0*, με αποτέλεσμα η ανάπτυξη του σποροφύτου να καθυστερεί αμέσως μετά τη βλάστηση του σπέρματος (Εικόνα 2B). Αυτή η καθυστέρηση διατηρείται καθόλη τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου του μεταλλάγματος *lon1-1*. Ως αποτέλεσμα, το μέγεθος του ώριμου *lon1-1* φυτού είναι σημαντικά μειωμένο σε σχέση με του αγρίου τύπου φυτού (Εικόνα 2F). Επίσης χαρακτηρίστηκε το αλληλόμορφο μετάλλαγμα του γονιδίου *Lon1*, το *lon1-2* που οφείλεται σε ένθεση T-DNA (Rigas *et al.*, 2009a). Το *lon1-2*, όπως και το *lon1-1*, παρουσιάζει καθυστερημένη ανάπτυξη (Εικόνα 2C). Παρόλα αυτά το *lon1-2* έχει πιο ήπιο φαινότυπο σε σχέση με το *lon1-1* (Rigas *et al.*, 2009b). Για παράδειγμα, το μήκος των βλαστών, η φυλλική επιφάνεια και το μήκος των καρποταξιών των φυτών *lon1-2* σε σχέση με το αντίστοιχο μήκος στα φυτά *lon1-1* δεν είναι τόσο μειωμένο παρόλο που η διαφορά μεταξύ τους και σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου είναι σημαντική (Rigas *et al.*, 2009a, b). Αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ των δύο μεταλλαγμάτων είναι το ποσοστό βλαστικότητας σε συνθήκες ήπιας θερμικής καταπόνησης. Σε φυσιολογικές συνθήκες το ποσοστό βλαστικότητας ανάμεσα στα δύο μεταλλάγματα *lon1* είναι περίπου ίδιο με αυτό που εμφανίζουν τα φυτά αγρίου τύπου *Col-0*. Ωστόσο η βλαστικότητα των σπερμάτων *lon1-1* περιορίζεται δραματικά σε συνθήκες ήπιας θερμικής καταπόνησης 32°C (Rigas *et al.*, 2009a). Η μειωμένη βλαστικότητα αποτελεί εξειδικευμένο φαινοτυπικό δείκτη, αφού δεν παρατηρείται σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης. Η παρατήρηση αυτή επισημαίνει το σημαντικό ρόλο της πρωτεΐσης Lon1 κατά τη βλάστηση των σπερμάτων.



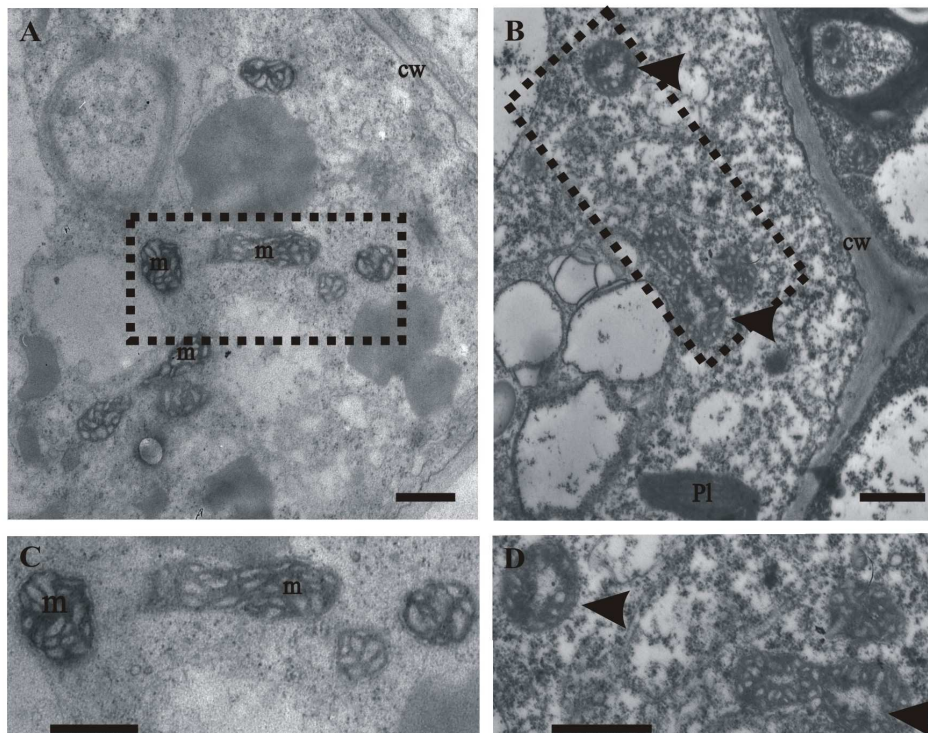
**Εικόνα 2. Καθυστερημένη ανάπτυξη των μεταλλαγμάτων *lon1* αμέσως μετά τη βλάστηση**

Φαινότυπος σποροφύτων 5 ημερών *Col-0* (A), EMS μεταλλάγματος *lon1-1* (B), T-DNA μεταλλάγματος *lon2-1* (C). Διαγονιδιακά σπορόφυτα *lon1-1* (D) και *lon2-1* (E) σταθερώς μετασηματισμένα με το γονίδιο *At5g26860*. Αντίστοιχα φυτά σε ώριμη ηλικία (F). Κλίμακα στην απεικόνιση σποροφύτων =1mm, ώριμων φυτών =1cm.

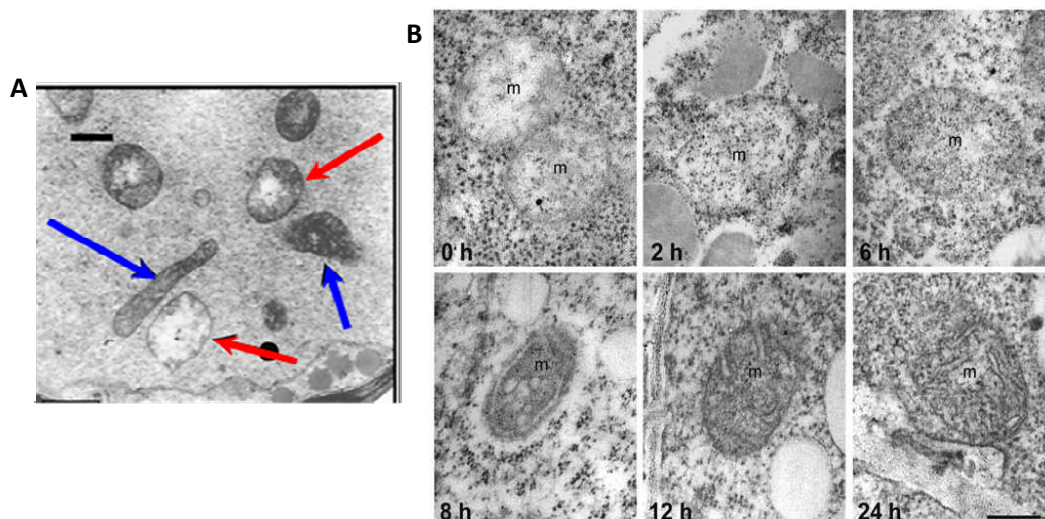
### 1.2.3.a Τα μιτοχόνδρια των μεταλλαγμάτων *lon1* παρουσιάζουν ανώμαλη μορφολογία

Μορφολογική εξέταση των μιτοχονδρίων από κύτταρα ζύμης *rim1*, αποκάλυψε ότι παρουσιάζουν ανώμαλη μορφολογία (Suzuki *et al.*, 1994). Το σχήμα των μιτοχονδρίων δεν

ήταν φυσιολογικό, ενώ εμφανίζονται συσσωματώματα μιτοχονδριακών πρωτεϊνών στη μήτρα των μιτοχονδρίων. Εξετάστηκε η μορφολογία των μιτοχονδρίων σε κύτταρα υποκοτυλίου από το μετάλλαγμα *lon1-1* εφαρμόζοντας ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM, Transmission Electron Microscopy) (Rigas *et al.*, 2009a). Τα μιτοχόνδρια παρουσιάζονταν διογκωμένα χωρίς τη φυσιολογική τους δικτύωση με ελάχιστα ανεπτυγμένο εσωτερικό μεμβρανικό σύστημα, όπου με δυσκολία διεκρίνονταν τα *cristae* (Εικόνα 3B και 3D). Σε αντίθεση με τα μιτοχόνδρια του μεταλλάγματος, τα μιτοχόνδρια από υποκοτύλια φυτών αγρίου τύπου παρουσίαζαν κανονική ανάπτυξη και σχήμα, καθώς και φυσιολογικά *cristae* (Εικόνα 3A και 3C). Επίσης, θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα παραπάνω χαρακτηριστικά των μιτοχονδρίων των μεταλλαγμάτων παρουσιάζουν ομοιότητες με τα χαρακτηριστικά των προμιτοχονδρίων από σπέρματα καλαμποκιού (Logan *et al.*, 2001) και ρυζιού (Howell *et al.*, 2006) (Εικόνα 4). Συνεπώς είναι φανερός ο ρόλος της πρωτεΐσης Lon1 του *Arabidopsis* στη βιογένεση των μιτοχονδρίων κατά τη διάρκεια της βλάστησης του σπέρματος.



**Εικ.** κύτταρα υποκοτυλίου φυτών ηλικίας 5 ημερών (A και C) Αγρίου τύπου, (B και D) μεταλλάγματος *lon1-1*. Τα ώριμα μιτοχόνδρια των φυτών αγρίου τύπου είναι σημειωμένα με m, ενώ τα προμιτοχόνδρια στο μετάλλαγμα *lon1-1* εμφανίζονται με βέλη. Pl, πλαστίδιο; Cw, Κυτταρικό τοίχωμα. Κλίμακα = 1  $\mu$ m

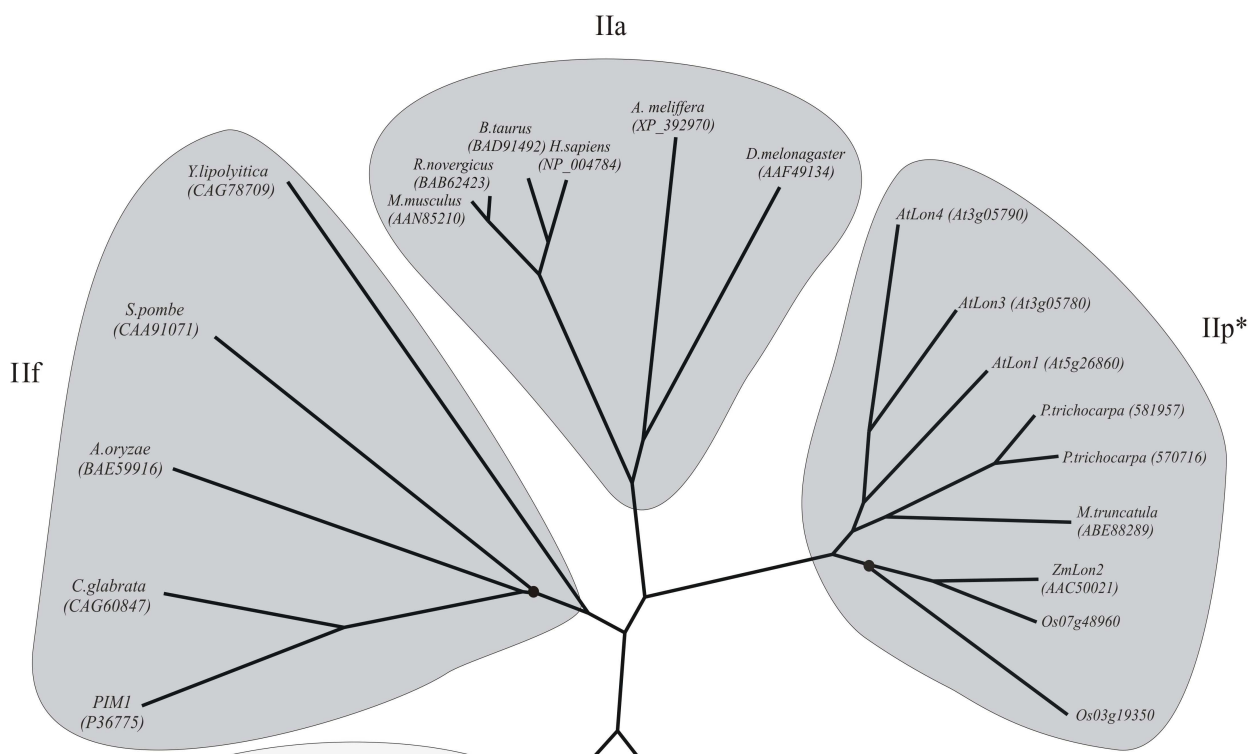


#### Εικόνα 4. Φωτογραφία από Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης τομής εμβρύων

(A) Αποξηραμένο σπέρμα αραβοσίτου (Logan *et al.*, 2001). Κλάσμα μιτοχονδρίων όπου με κόκκινο βέλος εμφανίζονται τα προμιτοχόνδρια και με μπλε βέλος τα φυσιολογικά μιτοχόνδρια. (B) αποξηραμένο σπέρμα ρυζιού (Howell *et al.*, 2006). Η δυναμική διαφοροποίησης των μιτοχονδρίων σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια μετά την ενυδάτωση του σπέρματος. Κλάσμα μιτοχονδρίων όπου με κόκκινο βέλος εμφανίζονται τα προμιτοχόνδρια και με μπλε βέλος τα φυσιολογικά μιτοχόνδρια.

#### 1.2.3.b Η πρωτεάση AtLon1 ανήκει στην υπεροικογένεια AAA<sup>+</sup>

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 5A). 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. Επιπρόσθετα, τα μέλη από τις δύο μεγάλες ομάδες ευκαρυωτικών στους κλάδους I και II διαχωρίζονται σε υποκλάδους σύμφωνα με την προέλευση τους. Συνεπώς, ο κλάδος I χωρίζεται σε δυο υποομάδες. Στον κλάδο Ia περιέχονται πρωτεάσες Lon -που οδηγούνται στο υπεροξύσωμα- από ζωικά γένη, ενώ στον κλάδο Ip 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 ορθόλογα 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 ATP-εξαρτώμενων πρωτεασών της υπεροικογένειας LonA. Κάθε έλλειψη αντιπροσωπεύει διαφορετικούς εξελικτικούς κλάδους. Ο κλάδος I και II περιέχει πρωτεάσες που τοποθετούνται στο υπεροξύσωμα και στο μιτοχόνδριο από ζωικούς (α), φυτικούς οργανισμούς (ρ) και μύκητες (ψ). Ο αστερίσκος στον κλάδο IIρ\* σημαίνει ότι οι πρωτεάσες Lon των φυτών ενδεχομένως να παρουσιάζουν διπλή τοποθέτηση στα μιτοχόνδρια και στα πλαστίδια. Ο κλάδος III περιέχει πρωτεάσες Lon βακτηριακής προέλευσης. 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.

**1.3.1 Εμβρυογένεση στο φυτό *Arabidopsis thaliana***

Ως εμβρυογένεση μπορεί να ορισθεί το μέρος της φυτικής ανάπτυξης που λαμβάνει χώρα στον εμβρυόσακκο της σπερματικής βλάστης ή στο ανώριμο σπέρμα. Κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης καθιερώνονται αρκετά βασικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα του πρωτογενούς φυτικού σώματος σε υποτυπώδη μορφή. Αυτή η διαδικασία συμβαίνει σε καλά προσδιορισμένα στάδια, που προκύπτουν από ειδικά πρότυπα της κυτταρικής διαίρεσης. Η

πρώτη περιγραφή της εμβρυογένεσης έγινε το 1870 από τον Hanstein, για το φυτό *Capsella bursa-pastoris*.

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

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

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

Ο άξονας κορυφής-βάσης του σποροφύτου διαιρείται σε 5 ζώνες (Εικόνα 6):

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

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

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

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

•**Στάδιο της οκτάδας.** Το κορυφαίο κύτταρο υφίσταται μια σειρά υψηλώς διατεταγμένων, στερεοτυπικών διαιρέσεων με αποτέλεσμα ένα οκτακύτταρο γλοβοειδές έμβρυο 30 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Το έμβρυο αυτό αποτελείται από ανώτερη και τη κατώτερη σειρά

κυττάρων και η κάθε μια αποτελείται από τέσσερα κύτταρα. Οι δυο αυτές σειρές κυττάρων του σταδίου αυτού διαφοροποιούν και διαιρούν το έμβρυο σε δύο μισά, σε εκείνο της κορυφής και στο αντίστοιχο της βάσης, αντανάκλωντας το αξονικό πρότυπο που επιβάλλεται στο έμβρυο κατά την πρώτη διαίρεση του ζυγωτού.

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

•**Στάδιο της καρδιάς** (heart-stage embryo). Στο στάδιο αυτό, η ανώτερη σιβάδα των τεσσάρων 4 κυττάρων σχηματίζει τις καταβολές των κοτυληδόνων και του βλαστίδιου. Η κεντρική περιοχή, που προέρχεται από τα κατώτερα τέσσερα κύτταρα, υποδιαιρείται σε δύο επιμέρ

τρεις α  
ρυφαίς  
και η π  
•Στάδι  
διαμόρ  
και της

λους τι  
κορυφι  
δημιου  
Οι κοι  
αυξάνε  
συνολι

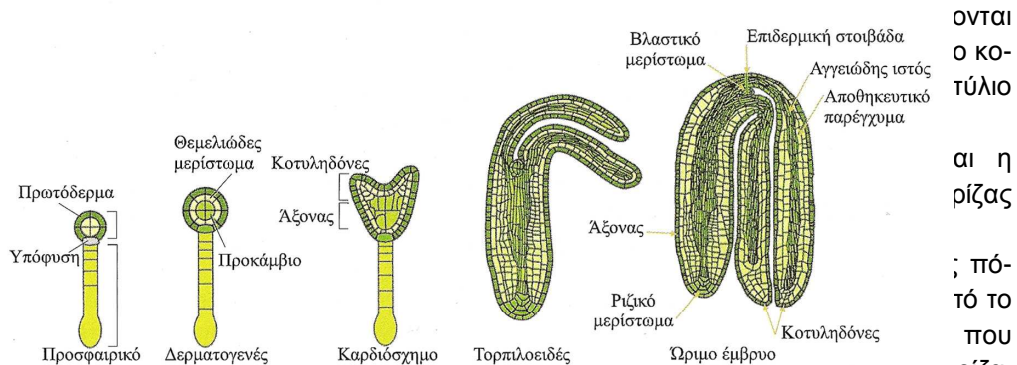
σε πολ  
αποθη  
βλάστι  
που αι  
τυληδέ

### 1.3.2 1 της Εμ

σώμα,  
πό τις

διαμέσου της δραστηριότητας των μεριστωμάτων. Ωστόσο, η εμβρυογένεση καθιερώνει τρία θεμελιώδη αναπτυξιακά πρότυπα που παραμένουν σταθερά και αμετάβλητα στο ηλικιωμένο φυτό:

1. Το ακτινωτό πρότυπο των ιστών που απαντώνται στα φυτικά όργανα 2. το αξονικό αναπτυξιακό πρότυπο κορυφής - βάσης και 3. τα πρωτογενή μεριστώματα που θα παράγουν το μεγαλύτερο μέρος του φυτικού σώματος κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης μετά από τη βλάστηση. Το ακτινωτό και το αξονικό πρότυπο

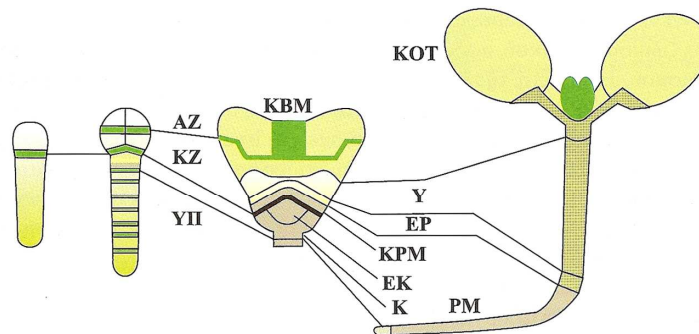


ΟΝΤΑΙ  
Ο ΚΟ-  
ΤΥΛΙΟ

αι η  
ρίζας

; πό-  
τό το  
που  
ρίζα.  
ίλης,  
ό της

τικών  
ν και  
της  
ρόλο  
ν ΚΟ-



ΚΕΙΑ

ΥΤΙΚΟ

ές α-

νεση

KBM = Κορυφαίο βλαστικό μερίστωμα  
Y = Υποκοτύλιο  
KPM = Κορυφαίο ριζικό μερίστωμα  
EK = Εφησυχάζον κέντρο  
KOT = Κοτυληδόνες  
EP = Εμβρυική ρίζα

PM = Ριζικό μερίστωμα  
K = Καλύπτρα  
AZ = Ανώτερη ζώνη  
KZ = Κατώτερη ζώνη  
YΠ = Υπόφυση



καθιερώνονται κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και μπορούν εύκολα να εντοπιστούν στο ώριμο φυτό. Σχεδόν όλα τα φυτά παρουσιάζουν ένα αξονικό πρότυπο, στο οποίο η ρίζα και ο βλαστός είναι στα αντίθετα άκρα ενός γραμμικού άξονα. Οποιοδήποτε μεμονωμένο τμήμα είτε της ρίζας ή του βλαστού εμφανίζει άκρα κορυφής και βάσης με διαφορετικές διακριτές φυσιολογικές και δομικές ιδιότητες. Το ακτινωτό πρότυπο των ιστών μπορεί να παρατηρηθεί όταν εξετασθεί η διάταξη των ιστών που εκτείνονται από το εξωτερικό ενός βλαστού ή μιας ρίζας προς το κέντρο τους.

**Εικόνα 6.** Η εμβρυογένεση του φυτού *Arabidopsis thaliana* χαρακτηρίζεται από ένα ακριβές πρότυπο κυτταρικής διαιρέσεως.

Αναπαριστώνται διαδοχικά στάδια της εμβρυογένεσης. Πάνω : Στάδια ανάπτυξης εμβρύου στο *Arabidopsis*. Κάτω : Αντιστοιχία περιοχής του εμβρύου και φυτικών οργάνων.

### 1.3.3 Τα Κύτταρα Αποκτούν Ταυτότητες Ιστών ως Αποτέλεσμα Εξειδικευμένης Γονιδιακής Έκφρασης

Επιπρόσθετα γονίδια έχουν ταυτοποιηθεί ότι λειτουργούν στην καθιέρωση του ακτινικού προτύπου των ιστών στη ρίζα και το υποκοτύλιο κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και είναι σημαντικά για τη διατήρηση αυτού του προτύπου κατά τη διάρκεια της μετεμβρυακής ανάπτυξης. Για να ταυτοποιηθούν αυτά τα γονίδια, ερευνητές απομόνωσαν μεταλλάγματα *Arabidopsis*, στα οποία οι ρίζες αυξάνονταν πιο αργά απ' ό τι στον άγριο τύπο. Ανάλυση αυτών των μεταλλαγμάτων, ταυτοποίησε αρκετά γονίδια με μεταλλάξεις, που προκαλούν ατέλειες στο ακτινικό πρότυπο των ιστών. Αυτές οι μεταλλάξεις επηρεάζουν την οργάνωση των ιστών και την κυτταρική διαφοροποίηση, όχι μόνο στο έμβρυο, αλλά επίσης στην πρωτογενή και δευτερογενή ρίζα και στο υποκοτύλιο. Παρόλο που

είναι απαραίτητη η εκτεταμένη ερευνητική εργασία πριν κατανοηθεί πως καθιερώνεται το ακτινικό πρότυπο των ιστών, πιθανόν αυτό συμβαίνει διαμέσου της εξαρτημένης από τη θέση έκφρασης ταυτόσημων γονιδίων των κυττάρων ή των ιστών. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν παράγοντες μεταγραφής και ελέγχουν την έκφραση άλλων γονιδίων, των οποίων τα προϊόντα είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και λειτουργία αυτών των τύπων ιστών ή κυττάρων.

### **1.3.4 Πρωτεΐνες του φωτοσυνθετικού μηχανισμού**

#### 1.3.4.a Πρωτεΐνες του φωτοσυνθετικού μηχανισμού που κωδικοποιούνται από το πλαστιδιακό DNA

Η βιοσύνθεση των πρωτεϊνών στο χλωροπλάστη γίνεται σε ελεύθερα (στο στρώμα) και σε προσδεμένα στη μεμβράνη των θυλακοειδών ριβοσώματα (προκαρυωτικού τύπου, 70S). Η πρόσδεση των τελευταίων ενεργοποιείται από το φως και την αύξηση του pH του στρώματος, ως αποτέλεσμα της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας. Μembranικά πολυπεπτίδια, όπως είναι η D1 και οι πρωτεΐνες του φωτοσυνθετικού κέντρου αντίδρασης PS I, καθώς και η υπομονάδα III της ATPάσης, συντίθενται σε ριβοσώματα προσδεμένα στα θυλακοειδή, ενώ η υπομονάδα LSU της Rubisco συντίθεται τόσο σε προσδεμένα, όσο και σε ελεύθερα ριβοσώματα του στρώματος. Στον πίνακα 1.1, φαίνονται τα γονίδια του χλωροπλαστικού DNA που συμμετέχουν στο σχηματισμό του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Η ρύθμιση των γονιδίων αυτών γίνεται σε μεταγραφικό επίπεδο κυρίως από το φως χωρίς να απουσιάζει βέβαια και ο μεταφραστικός έλεγχος της έκφρασής τους.

Φωτοσυνθετικά σύμπλοκα	Ονομασία γονιδίου	Πρωτεϊνικά παράγωγα
Φωτοσύνστημα II	<i>psbA</i>	D1 (32 kD)
	<i>psbB</i>	CP47
	<i>psbC</i>	44 kD
	<i>psbD</i>	34 kD
	<i>psbE</i>	9 kD (cyt $b_{559}$ )
	<i>psbF</i>	4 kD (cyt $b_{559}$ )
	<i>psbG</i>	24 kD
	<i>psbH</i>	10 kD
	<i>PsbI</i>	4,8 kD
	<i>psbK</i>	2,4 kD
	<i>psbL</i>	5 kD
	Φωτοσύνστημα I	<i>psaA</i>
<i>psaB</i>		P <sub>700</sub>
<i>psaC</i>		8 kD
<i>psaJ</i>		4,9 kD
<i>psaI</i>		4 kD
ATP-συνθάση	<i>atpA</i>	α-υπομονάδα CF <sub>1</sub>
	<i>atpB</i>	β-υπομονάδα CF <sub>1</sub>
	<i>atpE</i>	ε-υπομονάδα CF <sub>1</sub>
	<i>atpF</i>	υπομονάδα III CF <sub>0</sub>
	<i>atpH</i>	υπομονάδα IV CF <sub>0</sub>
	<i>atpI</i>	υπομονάδα IV CF <sub>0</sub>
Φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων	<i>petA</i>	cyt f
	<i>petB</i>	cyt $b_6$
	<i>petD</i>	Υπομονάδα IV του cyt $b_6/f$
Rubisco	<i>rbcl</i>	Μεγάλη υπομονάδα

**Πίνακας 1.1** Γονίδια του χλωροπλαστικού DNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του φωτοσυνθετικού μηχανισμού

#### 1.3.4.b Πρωτεΐνες του φωτοσυνθετικού μηχανισμού που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA

Στον πίνακα 1.2 φαίνονται οι πρωτεΐνες του φωτοσυνθετικού μηχανισμού που κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια. Η ρύθμιση της έκφρασης των πυρηνικών γονιδίων γίνεται στο επίπεδο της μεταγραφής συνήθως από το φως. Έχει βρεθεί ότι η φωτορύθμισή τους επιτυγχάνεται μέσω *cis*-ρυθμιστικών, μη μεταγραφόμενων αλληλουχιών στο DNA, οι οποίες βρίσκονται σε περιοχές του υποκινητή και του ενισχυτή. Υπάρχουν θέσεις πρόσδεσης για διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι δρουν είτε θετικά είτε αρνητικά,

επιτρέποντας έτσι έναν αυστηρό έλεγχο της μεταγραφής. Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στο πυρήνα μπορεί να γίνει και σε επίπεδο μετάφρασης ή και μετα-μεταφραστικά.

Φωτοσυνθετικά σύμπλοκα	Ονομασία γονιδίου	Πρωτεϊνικά παράγωγα
Φωτοσύνστημα II	<i>psbO</i>	33 kD
	<i>psbP</i>	24 kD
	<i>psbQ</i>	18 kD
	<i>psbR</i>	10 kD
Φωτοσύνστημα I	<i>psaD</i>	18 kD
	<i>psaF</i>	17 kD
	<i>psaE</i>	9,2 kD
	<i>psaG</i>	10,8 kD
	<i>psaH</i>	10,4 kD
Σύμπλοκο συλλογής φωτός (LHC II)	<i>cab</i>	Πρωτεΐνες του LHC II
ATP-συνθάση	<i>atpC</i>	γ-υπομονάδα CF <sub>1</sub>
	<i>atpD</i>	δ-υπομονάδα CF <sub>1</sub>
	<i>atpG</i>	II-υπομονάδα CF <sub>0</sub>
Φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων	<i>petC</i>	Πρωτεΐνη του Rieske
	<i>petE</i>	Πλαστοκυανίνη
	<i>petF</i>	Οξειδοαναγωγή της φερρεδοξίνης
Rubisco	<i>rbcS</i>	μικρή υπομονάδα
Οξειδοαναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου	<i>pcr</i>	PoR , 36 kD

**Πίνακας 1.2 Γονίδια πυρηνικού γονιδιώματος που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του φωτοσυνθετικού μηχανισμού**

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, η δομή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού είναι αποτέλεσμα της συνεργασίας μεταξύ του χλωροπλάστη και του πυρήνα. Οι ρυθμιστικοί παράγοντες συγκρότησής του, εντοπίζονται κυρίως στη φωτονιακή διέγερση της βιοσύνθεσης πρωτεϊνών (φωτοϋποδοχείς και αλυσίδες μεταφοράς σήματος), στη βιοσύνθεση πρωτεϊνών (γονιδιακή μεταγραφή και μετάφραση), στη μεταφορά τους από το κυτταρόπλασμα στο πλαστίδιο και στα θυλακοειδή, αλλά και στη σύνδεση των επιμέρους πρωτεϊνών σε μια λειτουργική φωτοσυνθετική μονάδα.

### 1.3.5 Πρωτεΐνες πολλαπλής τοποθέτησης μέσα στο κύτταρο

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, πολλές κυτταρικές λειτουργίες διπλασιάστηκαν εξαιτίας της εξέλιξης και αυτό είχε ως αποτέλεσμα να πραγματοποιούνται παρόμοιες λειτουργίες σε

διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα και από διαφορετικές ισομορφές ενζύμων (Krause and Krupinska, 2009). Για μεγάλο χρονικό διάστημα, υποστηριζόταν ο κανόνας ότι ένα γονίδιο, αντιστοιχούσε σε μια πρωτεΐνη και μια πρωτεΐνη σε ένα υποκυτταρικό διαμέρισμα μέσα στο κύτταρο. Όμως η ανακάλυψη πρωτεϊνών με διπλή τοποθέτηση σε δύο διαμερίσματα του κυττάρου ανέτρεψε τον παραπάνω ισχυρισμό (Natsoulis *et al.*, 1986). Στα φυτικά κύτταρα, η πρώτη πρωτεΐνη διπλής τοποθέτησης που ανακαλύφθηκε, ήταν η ρεδοουκτάση της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase) στο *Pisum sativum* και βρέθηκε ότι τοποθετείται στα μιτοχόνδρια αλλά και στους χλωροπλάστες (Creissen *et al.*, 1995). Από τότε, ο αριθμός των πρωτεϊνών με αποδεδειγμένη διπλή ή πολλαπλή τοποθέτηση αυξάνεται σταθερά (Karniely *et al.*, 2005) παρέχοντας συμπληρωματικές γνώσεις στη ρύθμιση αυτής της λειτουργίας.

Έχουν χαρακτηριστεί δύο βασικοί μηχανισμοί διπλής τοποθέτησης των πρωτεϊνών στα οργανίδια (Peeters and Small, 2001; Mackenzie, 2005). Ο πρώτος μηχανισμός (twin presequences) στηρίζεται στην ύπαρξη δυο διαδοχικών σε σειρά πεπτιδίων συνθήματος που αναγνωρίζονται εκλεκτικά από το σύστημα υποδοχέων του κάθε οργανιδίου στο οποίο πρόκειται να τοποθετηθεί το πολυπεπτιδίο που συντέθηκε στο κυτταρόπλασμα. Απαραίτητη προϋπόθεση στο μηχανισμό αυτό είναι ότι πρέπει να κωδικοποιηθούν δυο ανεξάρτητες ισομορφές της πρωτεΐνης ώστε η κάθε μια να φέρει στο N-τελικό άκρο ένα από τα πεπτιδία συνθήματος. Ο δεύτερος μηχανισμός (ambiguous presequence) εξασφαλίζει την είσοδο του πολυπεπτιδίου σε δυο οργανίδια, εξαιτίας της ιδιότητας του μοναδικού πεπτιδίου συνθήματος που εντοπίζεται στο N-τελικό άκρο, να αναγνωρίζεται από τους υποδοχείς του συστήματος εισόδου και των δυο οργανιδίων. Οι δυο αυτοί μηχανισμοί φαίνεται ότι καθορίζουν την ταυτόχρονη είσοδο μιας πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες που έχουν κοινή εξελικτική καταγωγή. Στα οργανίδια αυτά η είσοδος πρωτεϊνικών μορίων καθορίζεται κυρίως από τη παρουσία πεπτιδίων συνθήματος στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης.

Πρόσφατα όμως υπάρχουν αναφορές ύπαρξης παραλλαγών αυτού του μοντέλου. Για παράδειγμα η τοποθέτηση του πεπτιδίου στο χλωροπλάστη να καθορίζεται από την ύπαρξη πεπτιδίου συνθήματος στο N-τελικό άκρο, αλλά η ταυτόχρονη τοποθέτηση στον πυρήνα να εξασφαλίζεται από την παρουσία σιναλού αναγνώρισης για το σύστημα εισόδου στον πυρηνικό φάκελο (**N**uclear **L**ocalization **S**ignal, NLS), το οποίο και εντοπίζεται διάσπαρτο στη πρωτεϊνική ακολουθία (Krause and Krupinska, 2009).

Ο έλεγχος στη διαφορετική διανομή των πρωτεϊνών που παρουσιάζουν δυαδική τοποθέτηση συμμετέχοντας στο μεταβολισμό των νουκλεϊνικών οξέων μπορεί να είναι ένα μέσο για τη διασφάλιση της επικοινωνίας μεταξύ των διαμερισμάτων του κυττάρου που έχουν γενετικό υλικό.

### 1.3.6 Δυαδική τοποθέτηση de novo σύνθεσης πρωτεϊνών

Ένας κοινός μηχανισμός για την παραγωγή πολλαπλών πρωτεϊνών από ένα γονίδιο είναι η χρησιμοποίηση διαφορετικής αρχής της μεταγραφής ή της μετάφρασης ή η χρησιμοποίηση διαφορετικών εξωνίων από εναλλακτικό μάτισμα (Πίνακας 2). Ένα παράδειγμα διαφορετικής έναρξης της μεταγραφής και της μετάφρασης, με αποτέλεσμα τη δυαδική τοποθέτηση στον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια στο *Arabidopsis thaliana* αποτελεί η πρωτεΐνη DNA ligase 1 (Sunderland *et al.*, 2006). Αυτή η πρωτεΐνη εμφανίζει δυαδική τοποθέτηση και είναι χαρακτηριστικό παράδειγμα της κυριαρχίας του μιτοχονδριακού

πεπτιδίου συνθήματος έναντι του πυρηνικού σινιάλου τοποθέτησης (NLS, Nuclear Localization Signal) (Sunderland *et al.*, 2006). Χαρακτηριστικό επίσης παράδειγμα τοποθέτησης στον πυρήνα και στους χλωροπλάστες αποτελεί η πρωτεΐνη cp31 η οποία εξαιτίας διαφορετικών κωδικονίων έναρξης που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα, σχηματίζει εναλλακτικές πρωτεϊνικές ισομορφές που συνδέονται με RNA.

Η μετά-μεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα η φωσφορυλίωση, αποτελεί εναλλακτικό ρυθμιστικό μηχανισμό ελέγχου υποκυτταρικής τοποθέτησης πρωτεϊνών με δυαδικά μοτίβα στόχευσης (Karniely *et al.*, 2005). Πρόσφατα, περιγράφηκε ένας νέος τύπος τροποποίησης ο οποίος ελέγχει τη διανομή της πρωτεΐνης phosphateisopentenyl-transferase του φυτού *Arabidopsis thaliana* (AtIPT3) στα πλαστίδια και τον πυρήνα. Αυτή η πρωτεΐνη περιέχει ένα μοτίβο μετά-μεταφραστικής τροποποίησης τύπου “farsenylation” δηλαδή σύνδεσης ενός ισοπρενοξειδίου με μια κυστεΐνη στο καρβόξυ τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Πειράματα παροδικού μετασχηματισμού επιδερμικών κυττάρων κρεμμυδιού (*Allium cepa*) αποκάλυψαν ότι η μεταφραστική σύντηξη της πρωτεΐνης με το γονίδιο *GFP* οδηγεί το πολυπεπτίδιο που κωδικοποιείται στον πυρήνα. Αντίθετα όταν η πρωτεΐνη δεν υποστεί την τροποποίηση τύπου “farsenylation” τοποθετείται στα πλαστίδια (Galichet *et al.*, 2008). Εκτός από τις παραπάνω μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις, η τοποθέτηση των πρωτεϊνών επηρεάζεται και από την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες (Πίνακας 2). Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο του καπνού *Tobacco Stress-Induced*

Plant protein	Localization methods <sup>a</sup>	Function in organelles	Function in nucleus
DHFR	P-gold N-gold M-act	Dihydrofolate reductase-thymidylate synthase	Dihydrofolate reductase-thymidylate synthase
MFP1	P-gold N-gold P-gfp	Localization at stroma side of thylakoids and co-purifying with nucleoids	MAR-binding filament-like protein 1, component of nuclear matrix
SEBF	P-blot N-blot	RNA binding?	Transcriptional repressor of the <i>PR10a</i> gene
STEP1, cp31	P-act N-gfp	RNA-binding protein	Telomere-binding protein
Whirly1	P-gfp P-blot-gold N-blot-gold	RNA-binding factor involved in splicing factor	Transcription factor; telomere binding
AtCDT1	P-gfp N-gfp	Division, interaction with ARC6	Replication
LEM1	P-gfp N-gfp	Ribosomal protein (PRPS9)	Required for embryogenesis
AtLig1	M-gfp N-gfp	DNA ligase	DNA ligase
NtWin4	P-blot P-gfp N-gfp	Unknown regulatory function	Transcriptional repressor
ATXR5	P-gfp N-gfp	Unknown	Cell cycle and DNA replication interaction with PCNA
At2g44940	P-gfp N-gfp	Unknown	AP2/EREBP transcription factor
AtIPT3	Farnesylated: N-gfp Nonfarnesylated: P-gfp	Cytokinin biosynthesis	Unknown
APL (At1g79430)	N-gfp M-gfp	Unknown	Transcription factor

## Πίνακας 2. Πρωτεΐνες με δυαδική τοποθέτηση στον πυρήνα και στα φυτικά οργανίδια (Krause and Krupinska, 2009)

Παρουσιάζονται πρωτεΐνες με δυαδική τοποθέτηση στον πυρήνα και στα φυτικά οργανίδια, η μέθοδος μελέτης της τοποθέτησής τους και η λειτουργία τους στο χλωροπλάστη και τον πυρήνα.

### 1.3.7 Οι πρωτεΐνες διπλής τοποθέτησης σε οργανίδια και πυρήνα συμμετέχουν στη σταθερότητα του DNA και την έκφραση γονιδίων

Παρόλο που το σενάριο διπλής υποκυτταρικής τοποθέτησης πρωτεΐνης αρχικά είχε παραβλεφθεί, ο Ian Small και οι συνεργάτες του από το 1998 είχε θεωρήσει πιθανό το γεγονός η ίδια πρωτεΐνη να βρίσκονται ταυτόχρονα σε δύο υποκυτταρικά διαμερίσματα που περιέχουν DNA προκειμένου να συμμετέχει στο μεταβολισμό του DNA ή και του RNA (Small *et al.*, 1998). Αν και η πληθώρα κοινών δραστηριοτήτων που σχετίζεται με τη σταθερότητα του γονιδιώματος και την έκφραση των γονιδίων, επιβάλλει την ύπαρξη πρωτεϊνών ταυτόχρονα στον πυρήνα ή σε υποκυτταρικά οργανίδια όπως τα πλαστίδια και τα μιτοχόνδρια, οι πρώτες αναφορές περιέγραφαν αποκλειστικά τη δυαδική τοποθέτηση πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες (Silva-Filho *et al.*, 2003). Αντίθετα, οι πρωτεΐνες που τοποθετούνται στο πυρήνα και ταυτόχρονα σε ένα ή και στα δύο φυτικά οργανίδια δεν έχουν μέχρι στιγμής μελετηθεί διεξοδικά. Στις περισσότερες των περιπτώσεων, οι πρωτεΐνες διπλής τοποθέτησης, είχαν αρχικά περιγραφεί ότι τοποθετούνται μόνο σε ένα υποκυτταρικό διαμέρισμα και αργότερα χαρακτηρίστηκε η δυαδική τοποθέτησή τους σε οργανίδιο που περιέχει DNA επιβεβαιώνοντας την αρχική υπόθεση των Small *et al.* (Πίνακας 2).

Για παράδειγμα η πρωτεΐνη MFP1 (MAR-binding filament-like protein 1) είχε αρχικά θεωρηθεί λανθασμένα ότι τοποθετείται αποκλειστικά στον πυρήνα. Η πρωτεΐνη MFP1 εντοπίζεται μόνο στα φυτά και εμφανίζει μη ειδική δέσμευση με το DNA. Με τη κατασκευή MFP1-GFP εντοπίστηκαν στίγματα στη περιφέρεια του πυρήνα των κυττάρων φυτών καπνού, *Nicotiana benthamiana*, και εξαιτίας αυτού του προτύπου υποκυτταρικής τοποθέτησης η πρωτεΐνη χαρακτηρίστηκε ως συστατικό μέρος του πυρήνα (Gindullis *et al.*, 1999). Παρόλα αυτά, πιο λεπτομερής ανάλυση αποκάλυψε ότι η πρωτεΐνη MFP1 τοποθετείται και στους χλωροπλάστες, όπου συνδέεται με τα θυλακοειδή του στρώματος του χλωροπλάστη και απομονώνεται μαζί με τα νουκλεοειδή του χλωροπλάστη (Jeong *et al.*, 2003). Οι ανοσολογικές αναλύσεις με ειδικό αντίσωμα επιβεβαίωσαν ότι η πρωτεΐνη βρίσκεται σε αφθονία στους χλωροπλάστες, αλλά και στο πυρήνα των κυττάρων (Samaniego *et al.*, 2008). Με βάση τα χαρακτηριστικά υποκυτταρικής τοποθέτησης, αυτή η πρωτεΐνη φαίνεται μάλλον ότι σχετίζεται με τη δομική οργάνωση του DNA στον πυρήνα και στα πλαστίδια.

Ένα άλλο παράδειγμα πρωτεΐνης με όμοιες λειτουργίες στον πυρήνα και σε οργανίδια που περιέχουν DNA, είναι αυτό της DNA-λιγάσης-1 του φυτού *Arabidopsis thaliana* (Sunderland *et al.*, 2006) (Πίνακας 3). Η έναρξη της μετάφρασης από το πρώτο κωδικόνιο έναρξης παράγει μια μιτοχονδριακή ισομορφή, ενώ η έναρξη της μετάφρασης από το δεύτερο κωδικόνιο έναρξης οδηγεί στη σύνθεση ισομορφής που τοποθετείται στον πυρήνα (Sunderland *et al.*, 2006). Επειδή το φυτό *Arabidopsis* έχει μόνο μία λιγάση, φαίνεται ότι η πρωτεΐνη αυτή έχει παρόμοιους ρόλους στον πυρήνα και στα οργανίδια.

Μία ειδική κατηγορία πρωτεϊνών με δυαδική τοποθέτηση στα οργανίδια και τον πυρήνα είναι οι πρωτεΐνες που δεσμεύονται στα τελομερή. Αυτές οι πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη δομή και τη σταθερότητα του γονιδιώματος μέσω της σύνδεσης με μονόκλωνο ή δίκλωνο DNA στα τελομερή. Ορισμένες από αυτές τις πρωτεΐνες έχουν χαρακτηριστεί ως πλαστιδιακές και δεσμεύουν RNA (Kwon *et al.*, 2004) όπως οι cp31 και cp33 (Ohta *et al.*, 1995). Η μεταφραστική σύντηξη με GFP συντημένης μορφής της πρωτεΐνης cp31, που ονομάζεται STEP1 (single-stranded telomere-binding protein 1), τοποθετείται στον πυρήνα κυττάρων του φυτού *Solanum tuberosum*. Επίσης, η πρωτεΐνη

SEBF (silencing element binding factor) που απομονώθηκε ως πρωτεΐνη δέσμησης μονόκλωνου DNA και είναι ομόλογη της cp31 ή PR10a (pathogenesis-related 10a) ανιχνεύθηκε ανοσολογικά ταυτόχρονα στο πυρήνα και στον χλωροπλάστη (Boyle *et al.*, 2001). Προτείνεται λοιπόν ότι η SEBF είναι ένας πυρηνικός ρυθμιστής που αποθηκεύεται στο χλωροπλάστη μέχρι να επέλθουν συγκεκριμένες συνθήκες οπότε θα απελευθερωθεί εκτός του χλωροπλάστη. Άλλη πρωτεΐνη με τα παρόμοια χαρακτηριστικά δέσμησης στα τελομερή η οποία όμως διαθέτει και πεπτιδίο συνθήματος για στόχευση στον χλωροπλάστη είναι η Whirly1 (Krause *et al.*, 2005; Yoo *et al.*, 2007).

Οι μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούν σημαντική ομάδα πρωτεϊνών με πιθανή δυαδική τοποθέτηση στον πυρήνα και στα οργανίδια. *In silico* ανάλυση γονιδίων του *Arabidopsis* που κωδικοποιούν για μεταγραφικούς παράγοντες, αποκάλυψε ότι 48 πρωτεΐνες πιθανώς να τοποθετούνται στα πλαστίδια (Wagner *et al.*, 2006). Μία διαφορετική προσέγγιση *in silico* ανάλυσης προέβλεψε ότι 78 μεταγραφικοί παράγοντες πιθανώς τοποθετούνται στα πλαστίδια ενώ 12 στα μιτοχόνδρια (Schwacke *et al.*, 2007). Από την ομάδα των μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων, η πρωτεΐνη APL (altered phloem development-like) μέσω σύντηξης με GFP πρόσφατα αποδείχθηκε πειραματικά ότι τοποθετείται εκτός του πυρήνα και στα μιτοχόνδρια (Carrie *et al.*, 2008).

Το πιο χαρακτηριστικό και μελετημένο παράδειγμα διπλής τοποθέτησης μεταγραφικού παράγοντα είναι η πρωτεΐνη Whirly1. Η Whirly1 ανήκει σε μια μικρή οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που συνήθως αποτελείται από μόνο 2 μέλη στα περισσότερα αγγειόσπερμα (Desveaux *et al.*, 2005). Αρχικά μελετήθηκε η λειτουργία της στον πυρήνα όπου δεσμεύει μονόκλωνο DNA συμμετέχοντας στη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου *PR10a* (Desveaux *et al.*, 2000) και στην ομοίωση του μήκους των τελομερών (Yoo *et al.*, 2007; Kwon *et al.*, 2004). Παρόλα αυτά, η σύντηξη με GFP σε μετασηματισμένους πρωτοπλάστες μεσόφυλλου του φυτού της πατάτας, αποκάλυψε υποκυτταρική τοποθέτηση στους χλωροπλάστες, εγείροντας ζήτημα ταυτόχρονης δυαδικής τοποθέτησης της πρωτεΐνης *in vivo* στον πυρήνα αλλά και στους χλωροπλάστες. Παράλληλα, πειράματα ανοσολογικής ανίχνευσης έδειξαν καθαρά ότι η φυσιολογική μορφή της πρωτεΐνης Whirly1 τοποθετείται στον πυρήνα και τους χλωροπλάστες του ίδιου κυττάρου σε φύλλα του φυτού *Hordeum vulgare* (Grabowski *et al.*, 2008). Συνεπώς η Whirly1 αποτελεί μέχρι στιγμής τη μοναδική φυτική προέλευσης πρωτεΐνη που τοποθετείται στον πυρήνα και τους χλωροπλάστες του ίδιου κυττάρου. Η πρωτεΐνη Whirly1 του *Zea mays* έχει παρατηρηθεί ότι συνδέεται *in vitro* με πλαστιδιακό DNA (Prikyl *et al.*, 2008). Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα της ανάλυσης του μεταλλάγματος *why1* θέτουν υπό αμφισβήτηση τη συμμετοχή της πρωτεΐνης στην αντιγραφή του DNA ή τη επιδιόρθωσή του, αφού ουσιαστικά δεν μεταβάλλονται τα επίπεδα του πλαστιδιακού DNA (Prikyl *et al.*, 2008). Όμως στα μεταλλάγματα *why1*

παρατηρήθηκε ασυνήθιστα υψηλή συγκέντρωση ριβοσωμάτων, η οποία οδήγησε σε φαινότυπο λεύκανσης (Prikyl *et al.*, 2008). Το *Arabidopsis thaliana* έχει 2 πρωτεΐνες Whirly (Whirly1 και Whirly3), που διαφέρουν ως προς την τοποθέτησή τους στο χλωροπλάστη. Η διαγονιδιακή κατασκευή *Whirly1-GFP* αποκάλυψε τη τοποθέτηση της πρωτεΐνης στον χλωροπλάστη σε δομές που εμφανίζουν στίγματα, ενώ η κατασκευή *Whirly3-GFP* εμφανίζει στον χλωροπλάστη διάχυτο πρότυπο (Krause *et al.*, 2005). Με βάση αυτά τα δεδομένα φαίνεται ότι τα ομόλογα γονίδια *Whirly* που τοποθετούνται στα πλαστίδια έχουν διαφορετικές μεταξύ τους λειτουργίες. Στο καλαμπόκι η μεγαλύτερη ποσότητα της πλαστιδιακής Whirly ανιχνεύθηκε ως διαλυτή πρωτεΐνη στο στρώμα των χλωροπλάστων ενώ ένα μικρό μέρος εντοπίστηκε σε μεμβρανικό κλάσμα των θυλακοειδών (Prikyl *et al.*, 2008). Η υπόθεση που



διαμορφώνεται είναι πως ότι η πρωτεΐνη τοποθετείται στα πλαστίδια και υπό συγκεκριμένες συνθήκες απελευθερώνεται για να τοποθετηθεί στον πυρήνα όπου δρα ως μεταγραφικός παράγοντας. Βέβαια δεν μπορεί να αποκληθεί επιπρόσθετη λειτουργία της πρωτεΐνης στα πλαστίδια.

Μία άλλη πρωτεΐνη που θα μπορούσε να βρίσκεται στα πλαστίδια πριν πραγματοποιήσει το ρόλο της στην ενεργοποίηση της έκφρασης πυρηνικών γονιδίων, είναι η ATXR5 (*Arabidopsis trithorax related protein 5*) στο *Arabidopsis* (Raynaud *et al.*, 2006). Η ATXR5 ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών που περιέχει το τμήμα SET και σχετίζεται με τον επιγενετικό έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης (Kouzarides *et al.*, 2002; Lachner *et al.*, 2002). Η αποθήκευση της στα πλαστίδια και η μετέπειτα απελευθέρωσή της, χρήζει πειραματικής επιβεβαίωσης, για παράδειγμα μέσω μελέτης της λειτουργίας της όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται είτε μόνο στον πυρήνα ή είτε στα πλαστίδια. Αυτό θα μπορούσε να επιτευχθεί μέσω λειτουργικής συμπληρωματικότητας σε γενετικό υπόβαθρο μεταλλαγμάτων στα οποία δεν υπάρχει η πρωτεΐνη, όπου μια ανασυνδυασμένη μορφή της πρωτεΐνης τοποθετείται αποκλειστικά στον πυρήνα ή στα πλαστίδια, αλλά όχι ταυτόχρονα και στα δύο υποκυτταρικά

Strategy	Target organelle	Protein and organism
<b>I. Formation of multiple proteins</b>		
A. Multiple transcription starts	M, N	DNA ligase 1, <i>Arabidopsis</i>
B. Multiple translation starts	M, N	DNA ligase 1, <i>Arabidopsis</i>
C. Alternative splicing	P, N	cp31, <i>Arabidopsis</i>
<b>II. Post-translational modification of single protein</b>		
A. Farnesylation	P, N	AtIPT3, <i>Arabidopsis</i>
B. Protein-protein interaction	M, N	Apn1, <i>Saccharomyces</i>
	M, N	HMG-CoA synthase interacting with PPAR $\alpha$ , humans
<b>III. Organelle-nucleus shuttle</b>		
A. Release from organelle surface	P, N	pBrp, <i>Arabidopsis</i>
	P, N	Tsip1, Tobacco
B. Membrane transporters	M, N	MDDX28?, human
C. Vesicle-mediated release	M, Cyt	Hsp60, mHsp70, Humans
D. Protein shuttle via membrane contact sites	M, N	?

### Πίνακας 3. Μηχανισμοί υποκυτταρικής τοποθέτησης μίας πρωτεΐνης στα οργανίδια και τον πυρήνα (Krause and Krupinska, 2009)

Με βάση μελετημένες πρωτεΐνες, παρουσιάζονται προτεινόμενοι μηχανισμοί τοποθέτησης στον πυρήνα και στους χλωροπλάστες ή στα μιτοχόνδρια.

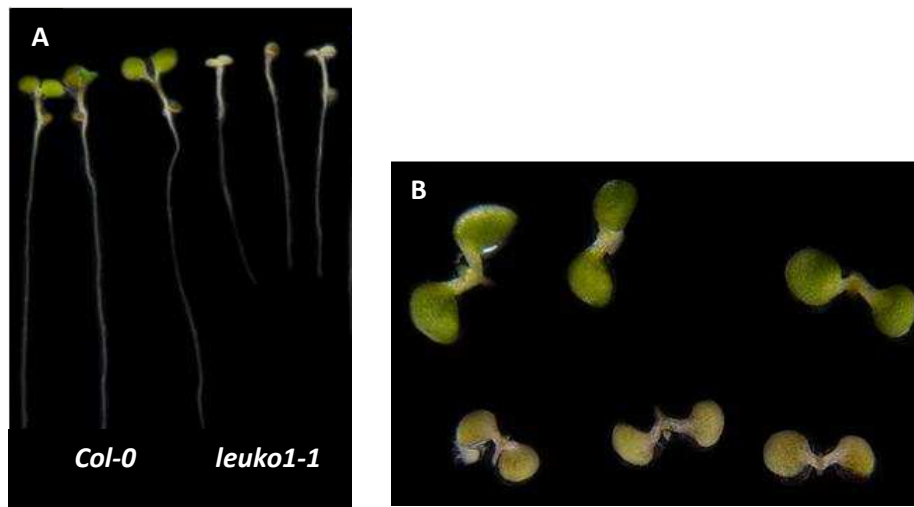
#### 1.4.1 Η μετάλλαξη *leukothea1*

##### 1.4.1.a Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του μεταλλάγματος *leukothea1-1*

Από σάρωση μεταλλαγμάτων που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας η μετάλλαξη *leukothea1* επιλέχθηκε μεταξύ άλλων μεταλλαγμάτων εξαιτίας του ιδιαίτερου φαινοτύπου που σχετίζεται με αποκλειστική λεύκανση των κοτυληδόνων (Εικόνα 7). Ο χαρακτηριστικός αυτός φαινότυπος αποτέλεσε το κίνητρο επιλογής του ονόματος “Λευκοθέα” που σύμφωνα με τη μυθολογία αποτελεί μία από τις λευκές νηρηίδες της θάλασσας.

Το μεταλλάγμα *leukothea1-1* (*leuko1-1*) προέρχεται από χημική μεταλλαξογένεση με EMS (Ethane M $\ddot{u}$ thane Sulfonate). Στο *leuko1-1* η μετάλλαξη χαρτογραφήθηκε στο γονίδιο

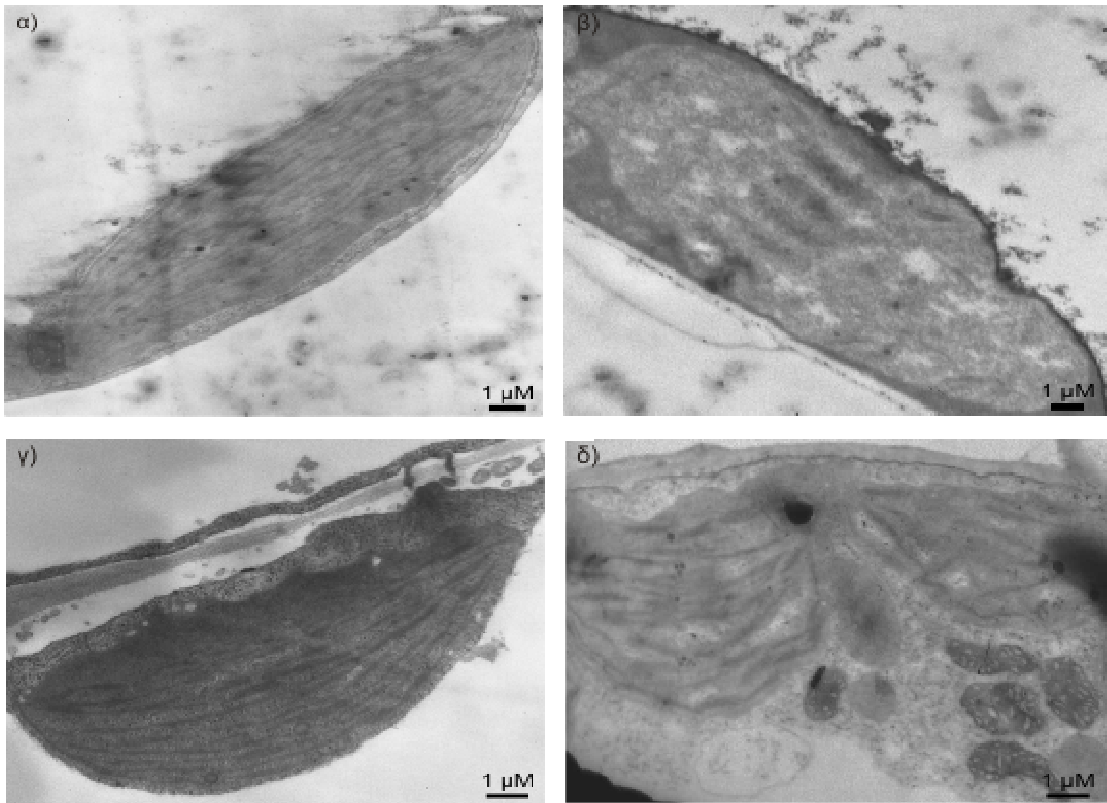
At5g62990, το οποίο έχει μία αμινοξική υποκατάσταση της Γλυκίνης (373) σε Ασπαρτικό οξύ ( $G_{373} \rightarrow D$ ), εξαιτίας της αλλαγής της βάσης G στη θέση 1188bp σε A, αναφορικά του κωδικονίου έναρξης της μετάφρασης (Αθανασιάδη, 2008).



**Εικόνα 7. Χαρακτηριστικές φαινοτυπικές ανωμαλίες του μεταλλάγματος *leuko1-1***

A) Φαινότυπος σποροφύτων και B) Χαρακτηριστική χλώρωση *leuko1-1* κοτυληδόνων φυτών ηλικίας 5 ημερών.

Σε αντίθεση με τις κοτυληδόνες τα φύλλα του μεταλλάγματος *leuko1-1* είναι πράσινα. Βιομετρικές αναλύσεις αποκάλυψαν ότι η ανάπτυξη του μεταλλάγματος υστερεί εμφανώς στα πρώτα στάδια μετά τη βλαστικότητα των σπερμάτων συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου *Col-0*. Επειδή η χαρακτηριστική φαινοτυπική ανωμαλία της μετάλλαξης *leuko1-1* είναι οι λευκές κοτυληδόνες, χρησιμοποιώντας τεχνικές ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διερευνήθηκαν πιθανές μορφολογικές αλλοιώσεις των χλωροπλαστών (Εικόνα 8 και 9). Η παρατήρηση έγινε σε κύτταρα από κοτυληδόνες και πρώτα φύλλα φυτών *Col-0* και *leuko1-1* που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο με 1 % σακχαρόζη στους 22°C με φωτοπερίοδο 16h φως και 8h σκοτάδι.

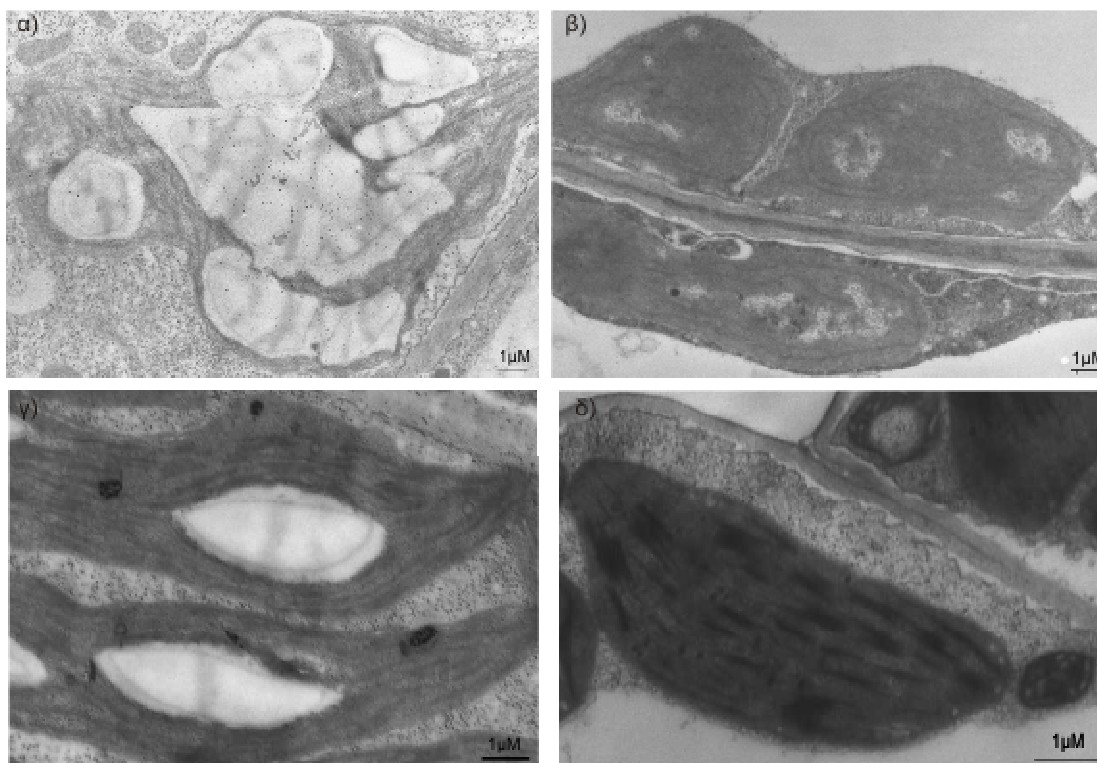


**Εικόνα 8.** Παρατήρηση της μορφολογίας των χλωροπλαστών του μεταλλάγματος *leuko1-1* και των φυτών *Col-0*.

α) Χλωροπλάστης από κύτταρα κοτυληδόνας φυτού *Col-0* ηλικίας 5 ημερών, β) Χλωροπλάστης από κύτταρα κοτυληδόνας φυτού *leuko1-1* ηλικίας 7 ημερών, γ) Χλωροπλάστης από κύτταρα πρώτων φύλλων φυτών *Col-0* ηλικίας 14 ημερών, δ) Χλωροπλάστης από κύτταρα πρώτων φύλλων φυτών *leuko1-1* ηλικίας 14 ημερών.

Οι εικόνες έδειξαν ότι ο φακοειδής σχηματισμός και η οργανωμένη δομή των θυλακοειδών και των grana στους χλωροπλάστες των φυτών αγρίου τύπου δεν παρατηρείται στα φυτά της μετάλλαξης *leuko1-1*. Συγκεκριμένα οι χλωροπλάστες είναι μικρότεροι και δεν είναι άρτια σχηματισμένοι με προβληματική οργάνωση των θυλακοειδών. Εντούτοις, η μορφολογία του χλωροπλάστη στα πρώτα φύλλα του μεταλλάγματος *leuko1-1* είναι βελτιωμένη συγκριτικά με τις κοτυληδόνες του χωρίς όμως και πάλι να φτάνει την αρτιότητα των χλωροπλαστών που εμφανίζουν τα φυτά αγρίου τύπου (Εικόνα 8). Προκειμένου να εξεταστεί αν οι φαινοτυπικές αυτές ανωμαλίες θα μπορούσαν να εξαλειφθούν εάν συμπληρωνόταν εξωγενώς πηγή άνθρακα, τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 3% σακχαρόζη. Για την παρατήρηση της μορφολογίας των χλωροπλαστών σε κύτταρα των κοτυληδόνων τα φυτά αναπτύχθηκαν στο σκοτάδι εξαιτίας πιθανού εκφυλισμού των φωτοσυνθετικών χρωστικών στο φως. Για την αντίστοιχη παρατήρηση στα πρώτα φύλλα, τα φυτά αναπτύχθηκαν σε φυσιολογικό κύκλο φωτοπεριόδου, 16h φως και 8h σκοτάδι.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μορφολογία των χλωροπλαστών σε κύτταρα *leuko1-1* κοτυληδόνων που αναπτύχθηκαν στο σκοτάδι είναι προβληματική (Εικόνα 9). Οι χλωροπλάστες δεν έχουν την τυπική οργάνωση των grana και δεν συσσωρεύουν άμυλο όπως οι χλωροπλάστες των φυτών αγρίου τύπου (Εικόνα 9α). Η αύξηση της σακχαρόζης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, βελτιώνει την εικόνα των χλωροπλαστών στα πρώτα φύλλα του μεταλλάγματος *leuko1-1* που εμφανίζουν βελτιωμένο πρότυπο οργάνωσης των θυλακοειδών (Εικόνα 9δ). Στις ίδιες συνθήκες στους χλωροπλάστες των πρώτων φύλλων των φυτών αγρίου τύπου παρατηρούνται αμυλόκοκκοι. Οι αμυλόκοκκοι αποτελούν αποθησαυριστικές δομές και αντιπροσωπεύουν το καθαρό κέρδος σε ενέργεια και σκελετούς άνθρακα από τη λειτουργία της φωτοσύνθεσης. Επομένως, η χαρακτηριστική αλλοίωση της μορφολογίας των χλωροπλαστών του φυτού *leuko1-1*, δε φαίνεται να είναι συνέπεια φωτοαναστολής -περίσσειας φωτός, αφού η εικόνα των κοτυληδόνων του δε βελτιώνεται στο σκοτάδι. Από την άλλη, φαίνεται να υπάρχει πρόβλημα θρεπτικής ανεπάρκειας εξαιτίας πιθανής κακής λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, αφού οι χλωροπλάστες εκμεταλλεύονται το συμπλήρωμα σακχαρόζης για να οργανώσουν καλύτερα τη λεπτή τους δομή. Στις αντίστοιχες συνθήκες οι χλωροπλάστες των φυτών αγρίου τύπου αποταμιεύουν την περίσσεια της σακχαρόζης με τη μορφή αμυλοκόκκων (Εικόνα 9γ).



**Εικόνα 9. Μορφολογία χλωροπλαστών μεταλλάγματος *Col-0* και *leuko1-1* φυτών**

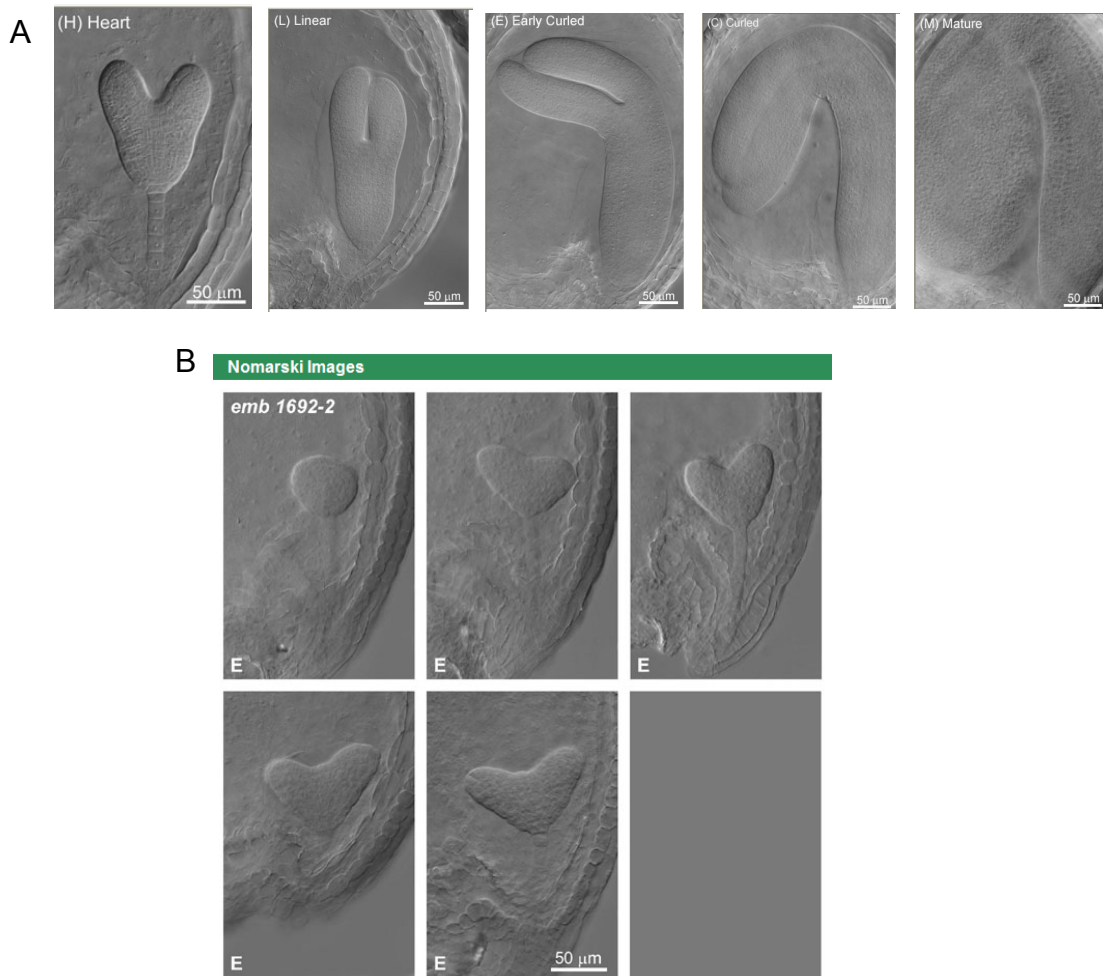
α) χλωροπλάστης από κύτταρα κοτυληδόνων φυτών *Col-0* ηλικίας 5 ημερών που αναπτύχθηκαν στο σκοτάδι, β) χλωροπλάστης από κύτταρα κοτυληδόνων φυτών *leuko1-1* ηλικίας 7 ημερών που αναπτύχθηκαν στο σκοτάδι, γ) Χλωροπλάστες από κύτταρα πρώτων φύλλων φυτών *Col-0* ηλικίας 14 ημερών σε θρεπτικό μέσο με 3 % σακχαρόζη και δ) Χλωροπλάστες από κύτταρα πρώτων φύλλων φυτών *leuko1-1* 0 ηλικίας 14 ημερών σε θρεπτικό μέσο με 3 % σακχαρόζη.

Η ποσοτικοποίηση των φωτοσυνθετικών χρωστικών ταυτίστηκε με το φαινότυπο της λεύκανσης των κοτυληδόνων του φυτού *leuko1-1* και τη σταδιακή αναστροφή του φαινοτύπου που παρατηρείται στα πρώτα φύλλα. Μετρήσεις των φωτοσυνθετικών χρωστικών, χλωροφύλλης α και β (Chl α και β) και των καροτενοειδών που αποτελούν χρωστικές προστασίας των κεραιών των φωτοσυστημάτων πραγματοποιήθηκαν στις κοτυληδόνες και στα πρώτα φύλλα φυτών *Col-0* και *leuko1-1*. Οι μετρήσεις αποκάλυψαν δραματική μείωση των χρωστικών της φωτοσύνθεσης, όσο και των καροτενοειδών στις κοτυληδόνες του μεταλλάγματος *leuko1-1*, σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου. Όσον αφορά στα φύλλα του *leuko1-1* η περιεκτικότητα των χρωστικών είναι ελαφρά μειωμένη σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου.

Η μορφολογία των χλωροπλαστών βελτιώνεται στα πρώτα φύλλα σε σχέση με τις κοτυληδόνες, φαινόμενο που επιβεβαιώνεται και με τη ποσοτική ανάλυση των χρωστικών της φωτοσύνθεσης. Το παραπάνω γεγονός υποδεικνύει ότι η μετάλλαξη *leuko1-1* επηρεάζει τη μορφογένεση ιστών με εμβρυακές καταβολές, όπως είναι οι κοτυληδόνες. Οπότε η πρωτεΐνη *Leuko1* φαίνεται να έχει κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη του εμβρύου, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται και από τη μελέτη του μεταλλάγματος *leukothea1-2*.

#### 1.4.1.b Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του αλληλόμορφου *leukothea1-2*

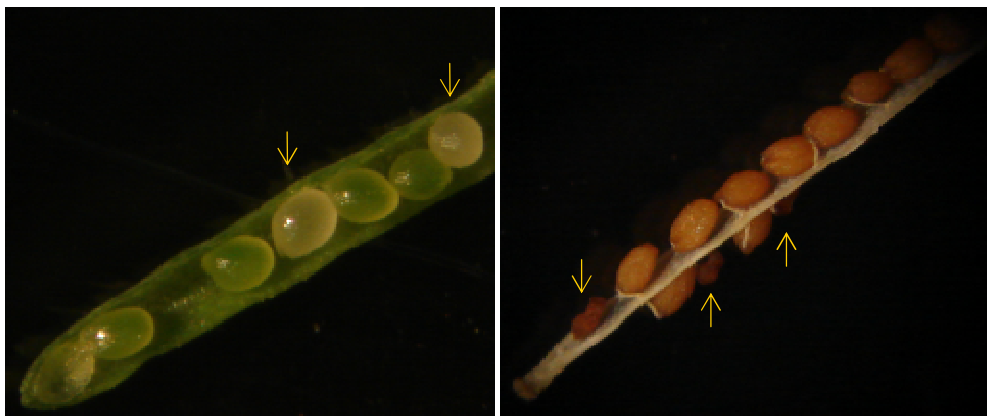
Βιοπληροφορική αναζήτηση και άλλων αλληλομόρφων μεταλλαγμάτων οδήγησε στον εντοπισμό του αλληλόμορφου *leukothea1-2*, που οφείλεται σε T-DNA ένθεση στο γονίδιο *At5g62990* (Εικόνα 13), ανωφερικά 30bp από το κωδικόνιο έναρξης. Η ίδια σειρά T-DNA είχε προηγουμένα μελετηθεί (Tzafirir, 2003; Tzafirir, 2004) και χαρακτηρισθεί ως *emb1692*. Η σειρά αυτή διατίθεται από τον ερευνητή Meinke, ο οποίος την εντόπισε στα πλαίσια μιας γενικότερης έρευνας για μεταλλάγματα που εμπλέκονται στη εμβρυογένεση. Έχει μελετηθεί η μορφολογία των εμβρύων της σειράς με μικροσκοπία *Nomarski* και παρουσιάζεται στη βάση δεδομένων [www.seedgenes.org](http://www.seedgenes.org) (Εικόνα 10). Περαιτέρω παρατήρηση των καρποταξιών του T-DNA αλληλομόρφου *leuko1-2* επιβεβαίωσαν τη Μενδελιανή διάσχιση του θνησιγόνου φαινοτύπου σε κατάσταση ομοζυγωτίας (Εικόνα11).



**Εικόνα 10.** Εικόνες μικροσκοπίας Nomarski από τη βάση δεδομένων [www.seedgenes.org](http://www.seedgenes.org)

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

B. Εικόνες από την εμβρυακή ανάπτυξη του μεταλλάγματος *emb1692/leuko1-2*. Η ανάπτυξη του μεταλλάγματος σταματάει στο στάδιο της καρδιάς



**Εικόνα 11.** Καρποταξίες ετερόζυγων ως προς την ένθεση φυτών *leuko1-2*. Παρατηρείται ανομοιομορφία των αναπτυσσόμενων σπερμάτων



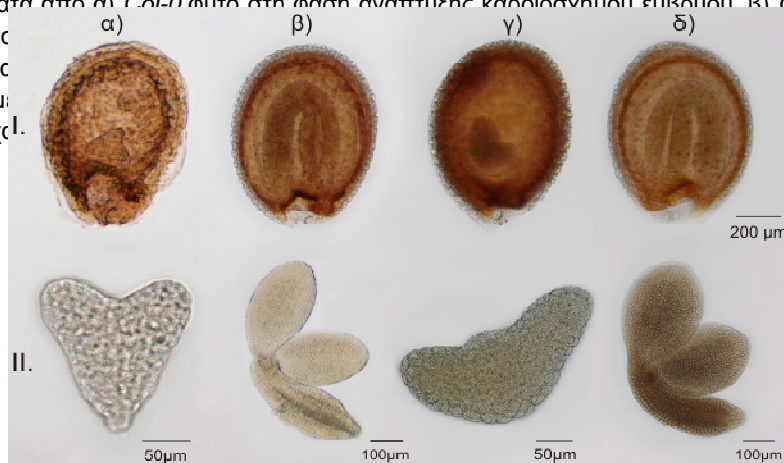
Με αστεράκια και βέλη σημειώνονται τα μη φυσιολογικά σπέρματα. Κάτω δεξιά, φαίνονται σπέρματα από ετερόζυγη για την ένθεση, ώριμη καρποταξία, ανάμεσα στα οποία διακρίνονται 3 συρρικνωμένα (ομόζυγα για την T-DNA ένθεση)

Τα ώριμα σπέρματα εξετάστηκαν περισσότερο για να ελεγχθεί αν παρουσιάζουν κάποια ανωμαλία στη δομή ή στην ανάπτυξη των εμβρύων που εμπεριέχουν, σαν κι αυτές που παρουσιάζουν άλλα μεταλλάγματα όπως τα *sco 1-2*, *sco 1-3* (Ruppel and Hangarter, 2007) και το *raspberry3* (Arya, 2002). Η επεξεργασία ώριμων σπερμάτων ετερόζυγων ως προς την ένθεση φυτών *leuko1-2* με NaOH έδειξε πως το ¼ των εμβρύων, που αντιστοιχούν στα ομόζυγα ως προς την ένθεση σπέρματα, έφτανε ως το καρδιάσχημο στάδιο ανάπτυξης (Εικόνα 12γ), ενώ τα υπόλοιπα ¾ (Εικόνα 12δ) ολοκλήρωναν την ανάπτυξή τους φυσιολογικά, σχηματίζοντας κοτυληδόνες και ριζίδιο. Μολονότι η ανάπτυξη των ομόζυγων ως προς την ένθεση εμβρύων σταματά στο καρδιάσχημο στάδιο, το έμβρυο ακόμη και στη φάση αυτή, δεν έχει την οργανωμένη και συνεκτική δομή που παρουσιάζει το αντίστοιχης ηλικίας *Col-0* έμβρυο (Εικόνα 12α). Στο τελικό, όμως, στάδιο ανάπτυξης των εμβρύων, η εικόνα που παρουσιάζουν τα *Col-0* έμβρυα (Εικόνα 12β) είναι όμοια με τα έμβρυα που φέρουν την ένθεση σε ετεροζυγική κατάσταση (Εικόνα 12).

Σύμφωνα με τα παραπάνω και επειδή η μοριακή ανάλυση του μεταλλάγματος *leuko1-2* δεν καθίσταται εύκολη λόγω της θνησιμότητας του εμβρύου, ο αλληλόμορφος *leuko1-1* αποτελεί το πλέον κατάλληλο γενετικό υπόβαθρο για τη διεξοδική μελέτη της λειτουργίας αφού ναι μεν η αμινοξική υποκατάσταση ( $G_{373} \rightarrow D$ ) ευθύνεται για σημαντικές φαινοτυπικές ανωμαλίες, τα φυτά όμως μπορούν να αναπτυχθούν, γονιμοποιούνται και δίνουν απογόνους

**Εικόνα 12. Μορφολογία σπερμάτων και εμβρύων από το αγρίου τύπου φυτό *Col-0* και το αλληλόμορφο μετάλλαγμα *leuko1-2***

I. Σπέρματα από α) *Col-0* φυτό στη φάση ανάπτυξης καρδιάσχημο εμβρύου. β) *Col-0* φυτό στη φάση ώριμου σπέρματος. γ) *Col-0* φυτό στη φάση ανάπτυξης καρδιάσχημο εμβρύου. δ) *Col-0* φυτό στη φάση ανάπτυξης καρδιάσχημο εμβρύου. Στο γ) φαίνεται πέρμα που περιέχει έμβρυο με αντιστοιχία. Παρουσιάζονται τα



### 1.4.2 Η πρωτεΐνη LEUKO1 περιέχει το τμήμα DUF860 ή PORR

Σε πρωτεϊνικό επίπεδο, το γονίδιο *Leuko1* (At5g62990) αποτελείται από τρεις κύριες δομές. Το N-τελικό άκρο που περιλαμβάνει το πεπτιδίο συνθήματος για τοποθέτηση στον χλωροπλάστη, το οποίο εκτείνεται από το πρώτο έως το 60ο αμινοξύ), το τμήμα DUF 860 (*Domain of Unknown Function 860*) μεγέθους 319aa (61 – 380) και το C-τελικό άκρο μεγέθους 114aa (381–494aa) (Εικόνα 13). Το τμήμα DUF860 παρουσιάζεται αποκλειστικά σε γονίδια φυτικών οργανισμών.



**Εικόνα 13.** Σχηματική απεικόνιση των δομών του γονιδίου *LEUKO1* και η θέση των μεταλλάξεων

Το γονίδιο *LEUKO1* αποτελείται από το N-άκρο, το τμήμα DUF860/PORR και το C-άκρο. Η μετάλλαξη *leuko1-1* βρίσκεται στο τμήμα DUF860/PORR. Η μετάλλαξη *leuko1-2* είναι η ένθεση T-DNA 30bp ανωφορικά του κωδικονίου έναρξης του γονιδίου και απεικονίζεται με το ανεστραμμένο τρίγωνο.

Πρόσφατα, για πρώτη φορά στο φυτό *Zea mays* αναγνωρίστηκε και μελετήθηκε πρωτεΐνη που περιέχει το τμήμα DUF860 (*domain of unknown function*) (Kroeger *et al.*, 2009). Η πρωτεΐνη WTF1 (**W**hat's **t**his **f**actor 1) εντοπίστηκε να ανοσοκαθιζάνει με τα ιντρόνια χλωροπλαστικών RNA της ομάδας II (splicing intron group II). Σχηματίζει ομοδιμερές σύμπλοκο με την πρωτεΐνη RNC1 (RNase III-domain protein) και φαίνεται ότι είναι απαραίτητη για την ομαλή λειτουργία του ματίσματος των χλωροπλαστικών ιντρονίων (Kroeger *et al.*, 2009). Πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι το τμήμα DUF860 έχει ένα μέχρι τώρα άγνωστο μοτίβο *in vitro* σύνδεσης με το RNA (Kroeger *et al.*, 2009). Συνεπώς το DUF860 μετονομάστηκε σε PORR (**P**lant **O**rganelle **R**NA **R**ecognition motif). Το *Arabidopsis thaliana* έχει 15 ομόλογα γονίδια που φέρουν το τμήμα DUF860, μεταξύ των οποίων είναι το γονίδιο *Leuko1* (At5g62990) και το ορθόλογο At4g01037 του *Zea mays* WTF1 στο *Arabidopsis*. Τα περισσότερα μέλη της οικογένειας DUF860 φαίνεται να στοχεύουν στους χλωροπλάστες ή στα μιτοχόνδρια, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι πρωτεΐνες με αυτό το τμήμα πιθανόν να έχουν πολλαπλούς ρόλους στο μεταβολισμό του RNA και στα δύο οργανίδια. Παρόλα αυτά, από βιοπληροφορικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν, υπάρχουν ενδείξεις ότι παράλληλα τοποθετούνται και στον πυρήνα των κυττάρων και έτσι προκύπτουν σημαντικές ερωτήσεις σε σχέση με τη λειτουργία τους, την εξέλιξη των μηχανισμών επικοινωνίας μεταξύ οργανιδίων και πυρήνα σε συνάρτηση με την ανάπτυξη του φυτού.

### 1.4.3 Το τμήμα PORR εντοπίζεται μόνο σε γονίδια φυτικών οργανισμών

Ερευνώντας για άλλες πρωτεΐνες *Leuko1* εκτός του *Arabidopsis thaliana* μέσω του προγράμματος BlastP (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI), βρέθηκε ότι μόνο στους φυτικούς οργανισμούς υπάρχουν ομόλογες πρωτεΐνες με το τμήμα PORR (Εικόνες 14 και 15). Στις βάσεις δεδομένων και ιδιαίτερα στο TAIR ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) και NCBI, το PORR είχε προηγουμένως χαρακτηριστεί ως DUF860 (**D**omain of **U**nknown **F**unction) ή



λανθασμένα ως υδρολάση του καρβόξυ-άκρου της συμπικουϊνίνης. Πρόσφατη αναφορά ανέτρεψε αυτό τον χαρακτηρισμό, αφού παρουσιάστηκε ότι το τμήμα PORR συνδέεται με οργανιδιακό RNA και συμμετέχει στο μάτισμα των οργανιδιακών ιντρονίων κατηγορίας II, ενώ παράλληλα η ομολογία σε αμινοξικό επίπεδο με τις υδρολάσεις του καρβόξυ-άκρου της συμπικουϊνίνης είναι ελάχιστη (Kroeger *et al.*, 2009). Τα περισσότερα μέλη της οικογένειας PORR/DUF860 προβλέπεται ότι τοποθετούνται στα μιτοχόνδρια ή στους χλωροπλάστες, είτε στον πυρήνα, οπότε η λειτουργία τους μάλλον θα πρέπει να σχετίζεται με βασικές διεργασίες μεταβολισμού του RNA στα υποκυτταρικά αυτά διαμερίσματα που περιέχουν νουκλεϊνικά οξέα.

Στο φυλογενετικό δένδρο που δημιουργήθηκε από την πολλαπλή ευθυγράμμιση των ορθόλογων αμινοξικών ακολουθιών διακρίνονται τρεις κύριοι κλάδοι (Εικόνα 15). Ο πρώτος (I) περιέχει πρωτεΐνες ορθόλογες της Leuko1 από δικοτυλήδονα φυτά, όπως το *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* και *Arabidopsis lyrata*), το *Mimulus gattatus*, τη Μηδική (*Medicago sativa*), τη λεύκα (*Populus trichocarpa*), τη ρετινολαδιά (*Ricinus communis*) και το αμπέλι (*Vitis vinifera*). Ο δεύτερος κλάδος αποτελείται από ορθόλογες πρωτεΐνες που προέρχονται από μονοκοτυλήδονα φυτά, όπως το κριθάρι (*Hordeum vulgare*), το γλυκό σόργο (*Sorghum bicolor*) και το ρύζι (*Oryza sativa*). Ο τρίτος κλάδος περιλαμβάνει ορθόλογες πρωτεΐνες από τα αρχέγονα βρυόφυτα *Selaginella moellendorffii* και *Physcomitrella patens*. Συνεπώς στο βασίλειο των φυτών οι ορθόλογες πρωτεΐνες ομαδοποιούνται ανάλογα με την εξελικτική τους διαδικασία. Αξιοσημείωτο είναι ότι οι ορθόλογες πρωτεΐνες Leuko1 από μονοκοτυλήδονα και δικοτυλήδονα φυτά σε αντίθεση με τα αρχέγονα βρυόφυτα *Selaginella moellendorffii* και *Physcomitrella patens* διατηρούν συντηρημένη τη Γλυκίνη-373, γεγονός που υποδηλώνει το σημαντικό λειτουργικό ρόλο του συγκεκριμένου αμινοξέως (Εικόνα 14).

Oryza sativa a : -----MEMATAAVGLGSGE--EADVVRGVGAAGAAAATMPDGRGRWRPREKEAVLPPPLTTSFLSVSHLHGRR : 70  
Oryza sativa b : -----MATTASSS--SLSFLL--PQPIHP--RRVRLPN--PPPTAAPTPTAVRCPA : 47  
Hordeum vulgare : -----VILSGKKNLFIHSAFAP--SLSVFL--APPITLPH--RRLRHQT-----ADPARTNQPPTLAVRCA : 60  
Sorghum bicolor : -----MNVVAPS--ACSFLL-----AHPSGP--ARPRPH-----PMNSTAKPLSHLTLRCA : 46  
Arabidopsis lyrata : -----MALTQLVPS--SPDK-LF-----FSSFFLPSIPLERTSNL : 34  
Arabidopsis thaliana : -----MMALTQLVPS--SPEK-LF-----CFSSFFLPSIPLERTSNL : 36  
Vitis vinifera : -----MALSIPVSS--CKKHIT-----FLNSNFLPLNCPWIPYIN : 35  
Populus trichocarpa : -----MAYLSSPS--CTGCFL-----KYTFLPSSPTSELHAN : 31  
Ricinus communis : -----MQLLSLSP--QNNCFLL-----KSSFLPSAPRIL---- : 30  
Medicago sativa : -----MACHPFLV--TNNGPVT-----SLNSTFLRGTPSSFYVN : 34  
Mimulus gutatus : -----MSIAAPLISTET--HIDAPEV-----LLESRLRPLPKHFFSIS : 38  
Physcomitrella patens : MAMALRSMVGGFRFSSDRSLSNFVSAP-----GAAASVLAGQLFLGCTQ : 48  
Selaginella moellendorffii : -----MAVALPLESTIFLNS-----KKQRLRASSSTFFSGAGG : 35

Oryza sativa a : KGRHRERRASAGDGGG--GLEGETROWQDERPRERAPNRLRARKILVLLSKPRLPFRVFRGRHRVIGLPPHRR : 148  
Oryza sativa b : PAAAP--SAASAASARS--IPPPKLVRCPALDRQAA--ANRLRARKILVLLSKPRLPFRVFRGRHRVIGLPPHRR : 121  
Hordeum vulgare : K-----AASFAPAP--LPPPKLVRCPALDRQAA--ASRLRARKILVLLSKPRLPFRVFRGRHRVIGLPPHRR : 126  
Sorghum bicolor : TTAAGRGPFPFKLPGFPPLPFPKLVRCPALDRQAA--ASRLRARKILVLLSKPRLPFRVFRGRHRVIGLPPHRR : 122  
Arabidopsis lyrata : STRTSSKKLGSLSLN--ISCSAHRIVRSPSLDRHVVM--QNRVRFVCKDKILLSKPRLPFRVFRGRHRVIGLPPHRR : 107  
Arabidopsis thaliana : TTKTSSKKLGSLSLN--ISCSAHRIVRSPSLDRHVVM--QNRVRFVCKDKILLSKPRLPFRVFRGRHRVIGLPPHRR : 109  
Vitis vinifera : RNDSKNRKPNLSIS--VSCSLKIVRSPSLDRHVVM--QNKLEFVCKDKILLSKPRLPFRVFRGRHRVIGLPPHRR : 108  
Populus trichocarpa : --FSLTCKRFPYKLS--ISCSAHRIVRSPSLDRHVVM--QNRVRFVCKDKILLSKPRLPFRVFRGRHRVIGLPPHRR : 103  
Ricinus communis : --LNSKRSRHSVLS--ISCSAHRIVRSPSLDRHVVM--QNRVRFVCKDKILLSKPRLPFRVFRGRHRVIGLPPHRR : 100  
Medicago sativa : --RKLKTCNLKRVSVS--ISCSAHRIVRSPSLDRHVVM--QNRVRFVCKDKILLSKPRLPFRVFRGRHRVIGLPPHRR : 106  
Mimulus gutatus : --DNTRKLAGAFVITCSSSSPHVLRDRDLRHHVM--QNKLEFVCKDKILLSKPRLPFRVFRGRHRVIGLPPHRR : 110  
Physcomitrella patens : SLRCFVPPNCRSVFNKRLTLTAVLKEQKDYKLDVQLGQEKKLRVCKIKILVRCQGVMSRDLGKFRCHGID--G : 125  
Selaginella moellendorffii : NRRNFIAIPSTRHRVQRLPVVTAIKRFDYVLDKVEREKKVKNVKNLVRQEGKVMSSRDLGKFRCHGID--G : 112

Oryza sativa a : RRFVLPVRYRPFLEFQAHTS-HLSFNP--LSTAVATPAREALADLAAFGSSEAPRPAAMHRIILLAFGRS : 224  
Oryza sativa b : RRFVLPVRYRPFLEFQAHTS-HLSFNP--LSTAVATPAREALADLAAFGSSEAPRPAAMHRIILLAFGRS : 197  
Hordeum vulgare : RRFVLPVRYRPFLEFQAHTS-HLSFNP--LSTAVATPAREALADLAAFGSSEAPRPAAMHRIILLAFGRS : 201  
Sorghum bicolor : RRFVLPVRYRPFLEFQAHTS-HLSFNP--LSTAVATPAREALADLAAFGSSEAPRPAAMHRIILLAFGRS : 198  
Arabidopsis lyrata : FVALSIRRYPIELFPTTTPHLENNAKPLSQICRMTSAASSMCELNLRSS--ESDQATIKIQLLMISS-HRR : 184  
Arabidopsis thaliana : PLALSIRRYPIELFPTTTPHLENNAKPLSQICRMTSAASSMCELNLRSS--ESDQATIKIQLLMISS-HRR : 186  
Vitis vinifera : FCSLRSIRRYPIELFPTTTPHLENNAKPLSQICRMTSAASSMCELNLRSS--ESDQATIKIQLLMISS-HRR : 185  
Populus trichocarpa : PCSLRSIRRYPIELFPTTTPHLENNAKPLSQICRMTSAASSMCELNLRSS--ESDQATIKIQLLMISS-HRR : 180  
Ricinus communis : RFSLRSIRRYPIELFPTTTPHLENNAKPLSQICRMTSAASSMCELNLRSS--ESDQATIKIQLLMISS-HRR : 177  
Medicago sativa : FRSLSIRRYPIELFPTTTPHLENNAKPLSQICRMTSAASSMCELNLRSS--ESDQATIKIQLLMISS-HRR : 183  
Mimulus gutatus : FRSLSIRRYPIELFPTTTPHLENNAKPLSQICRMTSAASSMCELNLRSS--ESDQATIKIQLLMISS-HRR : 188  
Physcomitrella patens : KRKVIALLRKFPAVEVVEEGCTAKYFRF-----FVAKKQYREARLRK--EVEDVAVTRKLLMMSV-DRS : 191  
Selaginella moellendorffii : KRKVIALLRKFPAVEVVEEGCTAKYFRF-----FVAKKQYREARLRK--EVEDVAVTRKLLMMSV-DRS : 136

Oryza sativa a : LLVSKIAHLAPDLGAMDFR-ATLGPQHPDLFTVNTSHGHALCLDPPPPPPPELP-----F : 282  
Oryza sativa b : LLVSKIAHLAPDLGAMDFR-ATLGPQHPDLFTVNTSHGHALCLDPPPPPPPELP-----F : 255  
Hordeum vulgare : LLVSKIAHLAPDLGAMDFR-ATLGPQHPDLFTVNTSHGHALCLDPPPPPPPELP-----L : 260  
Sorghum bicolor : LLVSKIAHLAPDLGAMDFR-ATLGPQHPDLFTVNTSHGHALCLDPPPPPPPELP-----L : 256  
Arabidopsis lyrata : LLLSKLVHIAPELGFPPNFR-SRLGNDYDPRKIVDTSYGRALVSWDPELANCMS--P : 242  
Arabidopsis thaliana : LLLSKLVHIAPELGFPPNFR-SRLGNDYDPRKIVDTSYGRALVSWDPELANCMS--P : 244  
Vitis vinifera : LLLSKLVHIAPELGFPPNFR-SRLGNDYDPRKIVDTSYGRALVSWDPELANCMS--P : 243  
Populus trichocarpa : LVLKLVHIAPELGFPPNFR-SRLGNDYDPRKIVDTSYGRALVSWDPELANCMS--P : 237  
Ricinus communis : LLLSKLVHIAPELGFPPNFR-SRLGNDYDPRKIVDTSYGRALVSWDPELANCMS--P : 234  
Medicago sativa : LLLSKLVHIAPELGFPPNFR-SRLGNDYDPRKIVDTSYGRALVSWDPELANCMS--P : 241  
Mimulus gutatus : LLLSKLVHIAPELGFPPNFR-SRLGNDYDPRKIVDTSYGRALVSWDPELANCMS--P : 246  
Physcomitrella patens : LLLSKLVHIAPELGFPPNFR-SRLGNDYDPRKIVDTSYGRALVSWDPELANCMS--P : 271  
Selaginella moellendorffii : LLLSKLVHIAPELGFPPNFR-SRLGNDYDPRKIVDTSYGRALVSWDPELANCMS--P : 159

Oryza sativa a : RPAAPSDRLDRRFRPH--FLLRRCNLNLRARDVLLRHSLEPVSPEFLDEGASLE--MMERRACAVVREVLAMV : 357  
Oryza sativa b : RPAAPSDRLDRRFRPH--FLLRRCNLNLRARDVLLRHSLEPVSPEFLDEGASLE--MMERRACAVVREVLAMV : 330  
Hordeum vulgare : RPAAPSDRLDRRFRPH--FLLRRCNLNLRARDVLLRHSLEPVSPEFLDEGASLE--MMERRACAVVREVLAMV : 335  
Sorghum bicolor : RPAAPSDRLDRRFRPH--FLLRRCNLNLRARDVLLRHSLEPVSPEFLDEGASLE--MMERRACAVVREVLAMV : 331  
Arabidopsis lyrata : EV-VDRGLIVDRLEKRR--FLLRRCNLNLRARDVLLRHSLEPVSPEFLDEGASLE--MMERRACAVVREVLAMV : 318  
Arabidopsis thaliana : EV-VDRGLIVDRLEKRR--FLLRRCNLNLRARDVLLRHSLEPVSPEFLDEGASLE--MMERRACAVVREVLAMV : 319  
Vitis vinifera : EV-VDRGLIVDRLEKRR--FLLRRCNLNLRARDVLLRHSLEPVSPEFLDEGASLE--MMERRACAVVREVLAMV : 319  
Populus trichocarpa : EV-VDRGLIVDRLEKRR--FLLRRCNLNLRARDVLLRHSLEPVSPEFLDEGASLE--MMERRACAVVREVLAMV : 313  
Ricinus communis : EV-VDRGLIVDRLEKRR--FLLRRCNLNLRARDVLLRHSLEPVSPEFLDEGASLE--MMERRACAVVREVLAMV : 310  
Medicago sativa : EV-VDRGLIVDRLEKRR--FLLRRCNLNLRARDVLLRHSLEPVSPEFLDEGASLE--MMERRACAVVREVLAMV : 317  
Mimulus gutatus : EV-VDRGLIVDRLEKRR--FLLRRCNLNLRARDVLLRHSLEPVSPEFLDEGASLE--MMERRACAVVREVLAMV : 323  
Physcomitrella patens : EV-VDRGLIVDRLEKRR--FLLRRCNLNLRARDVLLRHSLEPVSPEFLDEGASLE--MMERRACAVVREVLAMV : 350  
Selaginella moellendorffii : EV-VDRGLIVDRLEKRR--FLLRRCNLNLRARDVLLRHSLEPVSPEFLDEGASLE--MMERRACAVVREVLAMV : 235

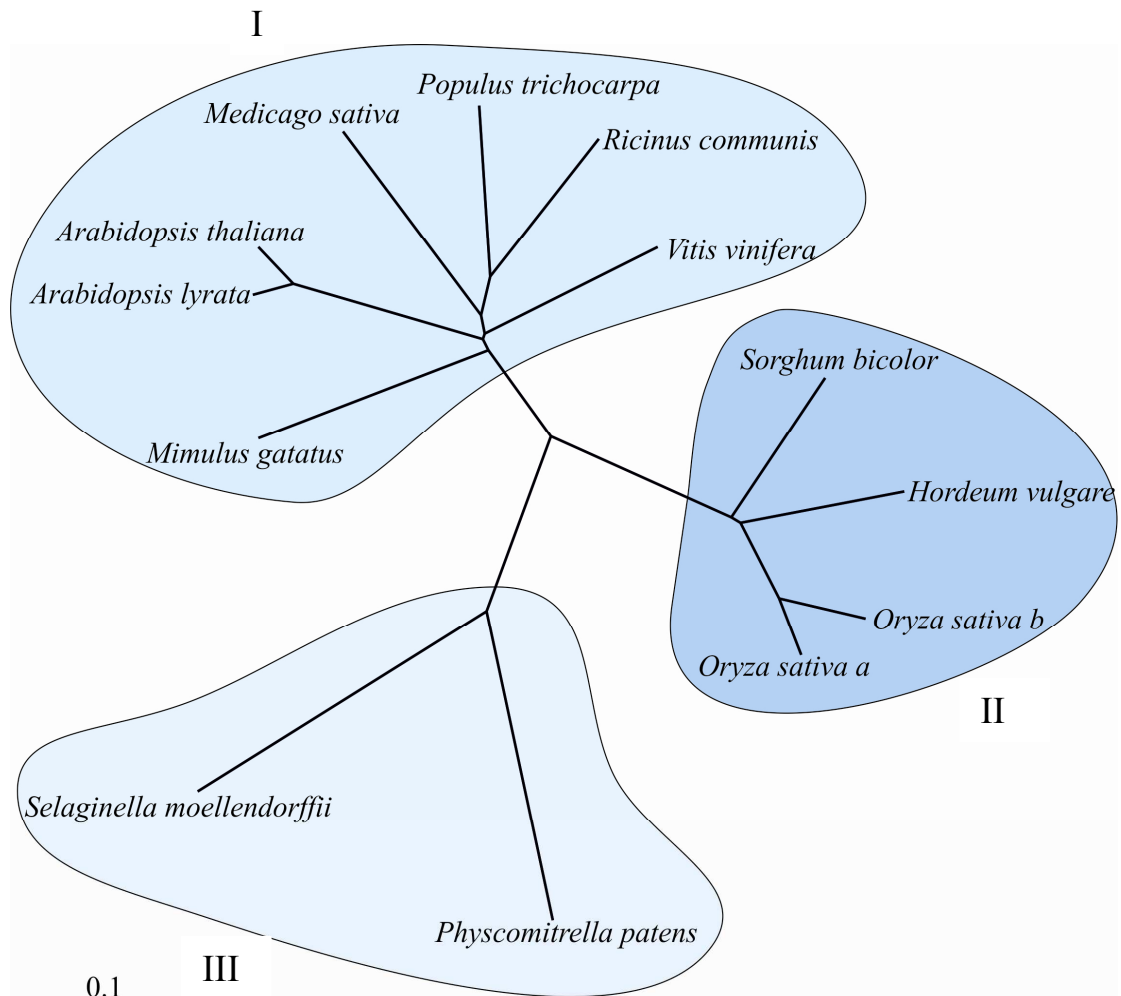
Oryza sativa a : EKRLVLDHLDHFRFRDGLNRLRALMLVRHPELFYVSKGRHSVILVEAFDDGRLVEEDMLVARDRVEELVRECKRMR : 437  
Oryza sativa b : EKRLVLDHLDHFRFRDGLNRLRALMLVRHPELFYVSKGRHSVILVEAFDDGRLVEEDMLVARDRVEELVRECKRMR : 410  
Hordeum vulgare : EKRLVLDHLDHFRFRDGLNRLRALMLVRHPELFYVSKGRHSVILVEAFDDGRLVEEDMLVARDRVEELVRECKRMR : 415  
Sorghum bicolor : EKRLVLDHLDHFRFRDGLNRLRALMLVRHPELFYVSKGRHSVILVEAFDDGRLVEEDMLVARDRVEELVRECKRMR : 411  
Arabidopsis lyrata : EKRLVLDHLDHFRFRDGLNRLRALMLVRHPELFYVSKGRHSVILVEAFDDGRLVEEDMLVARDRVEELVRECKRMR : 398  
Arabidopsis thaliana : EKRLVLDHLDHFRFRDGLNRLRALMLVRHPELFYVSKGRHSVILVEAFDDGRLVEEDMLVARDRVEELVRECKRMR : 399  
Vitis vinifera : EKRLVLDHLDHFRFRDGLNRLRALMLVRHPELFYVSKGRHSVILVEAFDDGRLVEEDMLVARDRVEELVRECKRMR : 399  
Populus trichocarpa : EKRLVLDHLDHFRFRDGLNRLRALMLVRHPELFYVSKGRHSVILVEAFDDGRLVEEDMLVARDRVEELVRECKRMR : 393  
Ricinus communis : EKRLVLDHLDHFRFRDGLNRLRALMLVRHPELFYVSKGRHSVILVEAFDDGRLVEEDMLVARDRVEELVRECKRMR : 390  
Medicago sativa : EKRLVLDHLDHFRFRDGLNRLRALMLVRHPELFYVSKGRHSVILVEAFDDGRLVEEDMLVARDRVEELVRECKRMR : 397  
Mimulus gutatus : EKRLVLDHLDHFRFRDGLNRLRALMLVRHPELFYVSKGRHSVILVEAFDDGRLVEEDMLVARDRVEELVRECKRMR : 403  
Physcomitrella patens : EKRLVLDHLDHFRFRDGLNRLRALMLVRHPELFYVSKGRHSVILVEAFDDGRLVEEDMLVARDRVEELVRECKRMR : 429  
Selaginella moellendorffii : EKRLVLDHLDHFRFRDGLNRLRALMLVRHPELFYVSKGRHSVILVEAFDDGRLVEEDMLVARDRVEELVRECKRMR : 315

Oryza sativa a : FARRKGL--LLALAD-DSDEDEDEEEDGEEQDSVQVDGESWLLLEDGIG-EDWEEVG-----DLG--EGSDDADAELDAL : 506  
Oryza sativa b : FARRKGL--LLALAD-DSDEDEDEEEDGEEQDSVQVDGESWLLLEDGIG-EDWEEVG-----DLG--EGSDDADAELDAL : 479  
Hordeum vulgare : FARRKGL--VFPVDDGSDDEDEEDNVAEGSSVDGDFGLFEEF--SVAGEDNEVG-----DGGIEGDDGDDPESDAM : 488  
Sorghum bicolor : FARRKGL--LITFDG-DSDEDEDEEAEAGLEVDDEFGFLFEEF--IIG-EDWEEVG-----DGGI--SEAYEYDAELGET : 481  
Arabidopsis lyrata : FARRKGL--GDRKVEEYNGNDRDETIDYDSDLLDYEYDGFENLFDSEDSG--VEYHFDEEED--DEARVNGGS : 467  
Arabidopsis thaliana : FARRKGL--GDRKVEEYNGNDRDETIDYDSDLLDYEYDGFENLFDSEDSG--VEYHFDEEED--DEARVNGGS : 469  
Vitis vinifera : FARRKGL--SINVEYGG--YDITDIDH--IDGTRDGFDSLLDFEDIDGDFDGSDEEED--DEYDLSRVG : 463  
Populus trichocarpa : FARRKGL--GKYG-NDTGSDNDVDEND--ELLDA--DYDGFENVFESEDSG--FVDFDIDDDKYNDFGCGEN : 460  
Ricinus communis : FARRKGL--IVMNTDIRSD--DASD--DFEDID--DYDGFENVFESEDSG--FVDFDIDDDKYNDFGCGEN : 456  
Medicago sativa : FARRKGL--RIKEYVNGVQNFQVHQLVDEYCEDEGDDDDDFQVDDAS-----FEAEDYDLGNDLFDN--KI : 468  
Mimulus gutatus : FARRKGL--DDDEVDGDDNWDDEDDDDDDN-----SKDDVDVDDDESEDE L : 457  
Physcomitrella patens : FARRKGL--DDDEVDGDDNWDDEDDDDDDN-----SKDDVDVDDDESEDE L : 457  
Selaginella moellendorffii : FARRKGL--ESSGDEDDGSDSDDEDDMSPTREFLERRRRRVMIALRKPVEPCCGPTFFAANKAASLLTAAATYTL : 391

Oryza sativa a : EEFVVKRAVAEGLVDTGSEL--DAM----- : 529  
Oryza sativa b : EEFVVKRAVAEGLVDTGSEL--DAM----- : 502  
Hordeum vulgare : EEFVVKRAVAEGLVDTGSEL--DAM----- : 511  
Sorghum bicolor : EEFVVKRAVAEGLVDTGSEL--DAM----- : 504  
Arabidopsis lyrata : EEFVVKRAVAEGLVDTGSEL--DAM----- : 492  
Arabidopsis thaliana : EEFVVKRAVAEGLVDTGSEL--DAM----- : 494  
Vitis vinifera : EEFVVKRAVAEGLVDTGSEL--DAM----- : 485  
Populus trichocarpa : EEFVVKRAVAEGLVDTGSEL--DAM----- : 483  
Ricinus communis : EEFVVKRAVAEGLVDTGSEL--DAM----- : 475  
Medicago sativa : EEFVVKRAVAEGLVDTGSEL--DAM----- : 491  
Mimulus gutatus : EEFVVKRAVAEGLVDTGSEL--DAM----- : 474  
Physcomitrella patens : EEFVVKRAVAEGLVDTGSEL--DAM----- : 474  
Selaginella moellendorffii : EEFVVKRAVAEGLVDTGSEL--DAM----- : 470

Εικόνα 74. Πολλαπλή ευθυγράμμιση αμινοξικών ακολουθιών των ορθολογών πρωτεϊνών Λευκοί από φυτικούς οργανισμούς.

Ο κόκκινος αστερίσκος δείχνει το συντηρημένο αμινοξύ Γλυκίνη-373, που στη μετάλλαξη *leuko1-1* έχει αντικατασταθεί από το Ασπαρτικό οξύ ( $G_{373} \rightarrow D$ )



**Εικόνα 15.** Φυλογενετικό δένδρο Neighbor-Joining χωρίς ρίζα (Unrooted) υπολογισμένο με βάση τη πολλαπλή ευθυγράμμιση μεταξύ των ορθόλογων πρωτεϊνών Leuko1 από διάφορους φυτικούς οργανισμούς

Unrooted Neighbor-Joining εξελικτικό δένδρο όπως προέρχεται από τη πολλαπλή ευθυγράμμιση των αμινοξικών ακολουθιών πρωτεϊνών Leuko1 από διάφορους φυτικούς οργανισμούς. Κάθε έλλειψη αντιπροσωπεύει διαφορετικούς εξελικτικούς κλάδους. Ο κλάδος (I) περιέχει πρωτεΐνες ορθόλογες της Leuko1 από δικοτυλήδονα φυτά, όπως το *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* και *Arabidopsis lyrata*), το *Mimulus gattatus*, τη Μηδική (*Medicago sativa*), τη λεύκα (*Populus trichocarpa*), τη ρεσινολαδιά (*Ricinus communis*) και το αμπέλι (*Vitis vinifera*). Ο κλάδος II αποτελείται από ορθόλογες πρωτεΐνες που προέρχονται από μονοκοτυλήδονα φυτά, όπως το κριθάρι (*Hordeum vulgare*), το γλυκό σόργο (*Sorghum bicolor*) και το ρύζι (*Oryza sativa*). Ο κλάδος III περιλαμβάνει ορθόλογες πρωτεΐνες από τα αρχέγονα βρυόφυτα *Selaginella moellendorffii* και *Physcomitrella patens*.

### 1.5.1 Σκοπός της ερευνητικής μελέτης

Το μιτοχόνδριο και ο χλωροπλάστης διαθέτουν γενετικό υλικό παρόλο τον εκφυλισμό που έχουν υποστεί κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Η διατήρηση της ομοιότητας

των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα οργανιδιακά γονιδιώματα ή κωδικοποιούνται από γονίδια που εδράζουν στο πυρηνικό γονιδίωμα και στην συνέχεια εισέρχονται στα οργανίδια, αποτελεί σημαντική διεργασία για τη διατήρηση της σωστής λειτουργίας των οργανιδίων, σε συνάρτηση με την ανάπτυξη του φυτού. Για να διατηρηθεί η κυτταρική ομοιόσταση, ένα δίκτυο επικοινωνίας μεταξύ του πυρήνα και των οργανιδίων έχει αναπτυχθεί με σκοπό τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων και τη διατήρηση της σωστής λειτουργίας των οργανιδιακών πρωτεωμάτων. Σκοπός αυτής της ερευνητικής εργασίας είναι η μελέτη του ρόλου δυο γονιδίων που εδράζουν στον πυρήνα, αλλά τα προϊόντα που κωδικοποιούν εντοπίζονται στα φυτικά οργανίδια και θεωρούνται κρίσιμα στην εμβρυακή και μετα-εμβρυακή ανάπτυξη του φυτού. Το πρώτο είναι το γονίδιο *Lon* το οποίο εξαιτίας εκλεκτικής μεταγραφικής και μεταφραστικής ρύθμισης υπό συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης κωδικοποιεί ταυτόχρονα μια μικρή ισομορφή που στοχεύει στο μιτοχόνδριο και τη μεγάλη ισομορφή που τοποθετείται στο χλωροπλάστη για τον έλεγχο της ποιότητας των οργανιδιακών πρωτεωμάτων. Το δεύτερο είναι το γονίδιο *leukothea* που φαίνεται ότι επηρεάζει τη σταθερότητα και ωρίμανση των μεταγραφημάτων γονιδίων του χλωροπλάστη αλλά και πυρηνικών γονιδίων των οποίων τα πρωτεϊνικά προϊόντα τοποθετούνται στο χλωροπλάστη.



# Υλικά & Μέθοδοι



“Συστήματα μοριακών μηχανισμών  
ανάπτυξης στα φυτά”

ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ ΔΑΡΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝ. ΑΘΗΝΩΝ  
2011

## 2. Υλικά & Μέθοδοι

### 2.1 Φυτικό υλικό

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*.

### 2.2 Συνθήκες καλλιέργειας *Arabidopsis thaliana* και *Nicotiana benthamiana*

Για την ανάπτυξη φυτών κάτω από ασηπτικές συνθήκες, τα σπέρματα ενυδατώνονται για 24 ώρες στους 4°C και απολυμαίνονται σε 25% διάλυμα χλωρίνης, ο.ο1% 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.

### 2.3 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA από σπορόφυτα *Arabidopsis thaliana*

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

➤ Το δείγμα μεταφέρεται σε erpendorf tube των 2ml. (Για κάθε 2gr ιστού προστίθεται 1ml διαλύματος απομόνωσης και 1ml φαινόλης). Έντονη ανάμιξη του δείγματος.

➤ Φυγοκέντρηση (max speed) για 10min.

➤ 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.

➤ 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 την κατακρήμιση των νουκλεϊνικών οξέων, στο υπερκείμενο προστίθεται 1/10 του όγκου 3M CH<sub>3</sub>COONa pH 4.8 και 2.5 όγκοι παγωμένης αιθανόλης 100% και στους -20°C overnight.

➤ Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C σε max speed.

➤ Το ίζημα διαλύεται σε αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O (με θέρμανση στους 65°C όταν χρειάζεται)

#### 2.4 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA από έμβρυα *Arabidopsis thaliana*

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

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

- Στα έμβρυα προστίθεται το διάλυμα απομόνωσης (όσο το δυνατό λιγότερο όγκος, μέχρι 150μl). Μέσα στο διάλυμα τα έμβρυα μπορούν να αποθηκευτούν και στους -80°C
- Με μικρογουδί ομογενοποιούνται στα έμβρυα
- Σε 150μl διάλυμα ομογενοποίησης (έμβρυα και διάλυμα απομόνωσης) προστίθενται 150μl χλωροφόρμιο και ακολουθεί ισχυρή ανακίνηση για 30".
- Φυγοκέντρηση για 5'
- Μεταφέρεται το υπερκείμενο σε νέο erpendorf tube και προστίθενται 300μl φαινόλης, ακολουθεί ισχυρή ανακίνηση για 1'. Στη συνέχεια προστίθενται 150μl χλωροφόρμιο κα ισχυρή ανακίνηση για 3'.
- Φυγοκέντρηση για 5'
- Μεταφέρεται το υπερκείμενο σε νέο erpendorf tube (~250μl) και προστίθεται 1/3 του όγκου 8M LiCl (83μl). Ακολουθεί ελαφριά ανακίνηση. Το δείγμα αφήνεται στους -20°C για 1h
- Φυγοκέντρηση για 30' στους 4°C
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε 30μl ddH<sub>2</sub>O
- Ακολουθεί αντίδραση DNase (στα 60μl) όπως αναφέρεται παρακάτω
- Μετά την αντίδραση DNase προστίθενται στο δείγμα 440μl ddH<sub>2</sub>O, 7μl 3M NaAc pH:5.2 (Sodium Acetate) και 250μl 100% αιθανόλης
- Φυγοκέντρηση για 10' στους 4°C. (Με αυτόν τον τρόπο απομακρύνονται τα συστατικά της αντίδρασης DNase και όλοι οι πολυσακχαρίτες)
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf tube και εκεί προστίθενται 43μl 3M NaAc pH:5.2 και 750μl 100% αιθανόλης. Ανακινείται ελαφρά και αφήνεται ο/η στους -20 °C
- Φυγοκέντρηση για 30' στους 4°C
- Απομακρύνεται προσεχτικά το υπερκείμενο, ακολουθεί μια γρήγορη φυγοκέντρηση για να απομακρυνθεί τυχόν υπερκείμενο που έχει μείνει και το ίζημα επαναιωρείται στα 20-25μl με ddH<sub>2</sub>O

#### 2.5 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 του δείγματος για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στις μέγιστες στροφές
- Το ίζημα που προκύπτει ξεπλένεται προσθέτοντας 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 H<sub>2</sub>O ή T.E.

## 2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

### 2.6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

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

Συστατικά Αντίδρασης	Πυκνό Διάλυμα	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
Ρυθμιστικό Διάλυμα PCR <sup>(1)</sup>	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) <sup>(3)</sup>	1unit/μl	1μl	1 unit
ddH <sub>2</sub> O	-	έως τα 50μl	-

Τελικός όγκος αντίδρασης 50μl

<sup>(1)</sup> Ρυθμιστικό διάλυμα PCR με συγκέντρωση 15mM MgCl<sub>2</sub> [10x Optimized DyNAzyme Ext Buffer (F-514)]

<sup>(3)</sup> Η DyNAzyme™ EXT Πολυμεράση της FINNZYMES (F-512S) έχει το χαρακτηριστικό να προσθέτει αδενίνη στο 3' άκρο του DNA χωρίς να έχουμε προσθέσει αδενίνη ως μήτρα. Αυτό το γνώρισμα διευκολύνει την κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR σε φορείς όπως ο ρGEM 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 <sup>0</sup> C
20-30 x	Αποδιάταξη στους 94 <sup>0</sup> C για 30'' Υβριδισμός εκκινητών στο αντίστοιχο T <sub>m</sub> <sup>(1)</sup> για 30'' Επιμήκυνση στους 72 <sup>0</sup> C για 2' έως 8' <sup>(2)</sup>
1 x	Τελική επιμήκυνση προϊόντος στους 72 <sup>0</sup> C για 10'
	Διατήρηση στους 10 °C για 5''

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

<sup>(2)</sup> 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.

#### 2.6.2 PCR αποικιών.

Ο εντοπισμός αποικιών βακτηρίων (*Escherichia coli* ή *Agrobacterium tumefaciens*), που έχουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο χωρίς όμως να είναι δυνατή η δοκιμή της β-γαλακτοσιδάσης και κατά συνέπεια η επιλογή μπλέ / άσπρων αποικιών, μπορεί να γίνει με μια απλή αντίδραση PCR μέρους της μικροβιακής αποικίας (colonies PCR). Συγκεκριμένα, όταν είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία του τμήματος DNA που μας ενδιαφέρει να έχει υποκλωνοποιηθεί στον κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα και να περιέχεται στον εκάστοτε μικροοργανισμό, μπορούμε να σχεδιάσουμε εκκινητές, οπότε με μια απλή αντίδραση PCR colony να πιστοποιήσουμε την ένθεση ή όχι. Χρησιμοποιώντας την τεχνική αυτή η πιστοποίηση γίνεται σύντομα ενώ σε σύντομο χρονικό διάστημα από την στιγμή που αναλυθούν τα αποτελέσματα του PCR μπορούμε να έχουμε καλλιέργεια του μικροοργανισμού που φέρει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

- Χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα συλλέγουμε και μεταφέρουμε την βακτηριακή αποικία από το στερεό θρεπτικό μέσο σε erpendorf tube που έχει 15μl ddH<sub>2</sub>O και διατηρείται στους 4<sup>0</sup>C.
- Στην αντίδραση PCR προσθέτουμε τα συστατικά που αναφέραμε προηγουμένως με την διαφορά που αντί για gDNA ως μήτρα προσθέτουμε 3μl από το τα περίπου 15μl αιώρημα βακτηριακών κυττάρων.
- Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από τους εκκινητές που χρησιμοποιούμε και ο χρόνος επιμήκυνσης από το μέγεθος του τμήματος DNA που αναμένεται. Ο αριθμός των θερμοκύκλων είναι 20-25.
- Μόλις οι αντιδράσεις ολοκληρωθούν τα αποτελέσματα αναλύονται σε gel αγαρόζης. Για τις θετικές αποικίες μεταφέρουμε τα υπόλοιπα 7μl σε θρεπτικό μέσο LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό

#### 2.6.3 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.

<b>Συστατικά Αντίδρασης</b>	<b>Πυκνό Διάλυμα</b>	<b>Όγκος</b>	<b>Τελική Συγκέντρωση</b>
Ρυθμιστικό Διάλυμα	10 x	6μl	1 x

DNάσης I				
DNάση (Promega)	I	2 units/ μl	7μl	14 units
Αναστολέα RNάσης (Promega)		30 units/ μl	1μl	30 units
Ολικό RNA		-	-	25μg
ddH <sub>2</sub> O		-	έως τα 60μl	-

---

Τελικός όγκος αντίδρασης 60 μl

---

Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37<sup>0</sup>C για 45'.

➤ Μόλις ολοκληρωθεί η αντίδραση πραγματοποιείται καθαρισμός με φαινόλη και στην συνέχεια προσθέτουμε 1/10 του όγκου 3M CH<sub>3</sub>COONa, pH 4,8 και 2 όγκους 100% αιθανόλη. Το μείγμα ανακατεύεται καλά και τοποθετείται στους -20<sup>0</sup>C για 12 ώρες.

➤ Το ολικό RNA ελεύθερο από DNA συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 30' στους 4<sup>0</sup>C. Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται και το ίζημα διαλύεται σε ~25μl ddH<sub>2</sub>O. Από αυτά 2μl αναλύονται σε gel αгарόζης για να επιβεβαιώσουμε πραγματικά ότι δεν έχει καταστραφεί το RNA αλλά μόνο το DNA και 2μl αραιώνονται με ddH<sub>2</sub>O 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<sup>0</sup>C για 10' και μετά τοποθετούνται στους 4<sup>0</sup>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 <sub>2</sub> 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 Μεταγραφάση (Invitrogen)	Ανάστροφη 50 units/ μl	1μl	50units

---

Όγκος δεύτερου βήματος 10μl

---

Τελικός όγκος αντίδρασης όγκος πρώτου και δευτέρου βήματος 20μl

---

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

### 2.7 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Σε 2μg ολικό RNA σποροφύτων *Arabidopsis thaliana*, που έχουν αναπτυχθεί στις προαναφερθείσες συνθήκες, πραγματοποιήθηκε αντίδραση ανάστροφης μεταγραφής (RT, **R**everse **T**ranscriptase). Για την αντίδραση RT χρησιμοποιήθηκε εξειδικευμένος εκκινητής, ο οποίος αναφέρεται στο παράρτημα. Τα 20μl της αντίδρασης RT μεταφέρονται σε νέο eppendorf tube και εκεί προστίθενται 80μl διαλύματος 2.5M Ammonium acetate και 2.5mM EDTA (Komura and Riggs, 1998). Προστίθενται επίσης 200μl 100% αιθανόλης και το δείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30'. Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30' στους 4<sup>o</sup>C. Υπάρχει η δυνατότητα να γίνουν πολλαπλές αντιδράσεις RT και όλες μαζί να ενωθούν πριν γίνει ο καθαρισμός με Ammonium acetate. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται μεγάλη συμπύκνωση του δείγματος, όταν η έκφραση του γονιδίου είναι πολύ χαμηλή.

Το ένζυμο Superscript-II είναι ανάστροφη μεταγραφή τύπου MMLV οπότε προσθέτει στο τέλος της αντίδρασης βάσεις Cs (Κυτοσίνες). Για αυτό στην αντίδραση PCR που ακολουθεί ο πρόσθιος εκκινητής είναι ο Smart: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG - '3 από το SMART RACE cDNA Amplification kit (Clontech, Mountain View, CA, USA) και ανάστροφοι εκκινητές οι 5'-ATCAAAGCCCTTCATAAACCC-3' and 5'-GAAGAAAGCACGATGACCCAACGAAGTAG-3', για το *Lon1L* and *Lon1S* μεταγράφημα αντίστοιχα.

Αν χρειαστεί πραγματοποιείται και 2<sup>o</sup> ή και 3<sup>o</sup> συνεχόμενο PCR με εξειδικευμένο ανάστροφο εκκινητή εσωτερικά του προϊόντος που έχει ήδη ενισχυθεί (nested PCR), και με πρόσθιο εκκινητή τον 5'-Primer: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT- '3. Σε αυτήν την περίπτωση γίνονται αραιώσεις 1/100 ή 1/1000 του προηγούμενου προϊόντος PCR, προκειμένου αυτό να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για το επόμενο PCR. Όταν βρεθεί η επιθυμητή ζώνη από την αντίδραση PCR, αυτή απομονώνεται, κλωνοποιείται σε φορέα και ακολουθεί αλληλούχηση του φορέα στην κατάλληλη περιοχή.

### 2.8 Ανάλυση δεσοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA)

Για την ανάλυση κλασμάτων νουκλεϊνικών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών διαμορφώσεων χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης. Ο διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος προς το μέγεθος των μορίων. Τα μόρια των νουκλεϊνικών οξέων γίνονται ορατά στην πηκτή αгарόζης με τη βοήθεια μίας χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων. Η χρωστική ονομάζεται βρωμιούχο αιθίδιο και έχει την ιδιότητα να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η περιεκτικότητα της πηκτής σε αгарόζη εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν. Συνήθως ποικίλλει από 0,8% ως 4% αгарόζη w/v.

- Κατάλληλη ποσότητα αгарόζης προστίθεται σε διάλυμα 1xTAE.

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

Η σύσταση της πηκτής αгарόζης 0.8% είναι η εξής:

0.8g αгарόζης

2ml 1x TAE

7μl βρωμιούχου αιθιδίου

98 ml H<sub>2</sub>O

Τελικός όγκος 100 ml

Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης είναι η εξής:

20ml 1x TAE

70μl βρωμιούχου αιθιδίου

980 ml H<sub>2</sub>O

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

H<sub>2</sub>O

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

## 2.9 Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αгарόζης

- Ανάλογα με το μέγεθος του προς απομόνωση κλάσματος DNA προετοιμάζεται πηκτή αгарόζης με συγκέντρωση 0,8% w/v.
- Το δείγμα αναλύεται ηλεκτροφορητικά. Εφόσον ο διαχωρισμός του κλάσματος, που πρόκειται να απομονωθεί από τα υπόλοιπα είναι ικανοποιητικός, αφαιρείται η ζώνη που το περικλείει με τη βοήθεια κοπιδιού.
- Το κομμάτι της πηκτής τοποθετείται σε φιαλίδιο Eppendorf 1,5ml.

- Εν συνεχεία τοποθετείται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για 15΄
- Ακολουθεί απομόνωση DNA με βάση το πρωτόκολλο της QIAquick Gel Extraction Kit (Cat No 28704).

## 2.10 Ενοποίηση τμημάτων με κολλώδη άκρα

Ο πλασμιδιακός φορέας καθώς και το κλάσμα DNA, του οποίου η κλωνοποίηση επιδιώκεται απομονώνονται και καθαρίζονται από gel αγαρόζης όπως περιγράφηκε στην παράγραφο “Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από gel αγαρόζης”. Ο τελικός όγκος στον οποίο λαμβάνει χώρα η αντίδραση είναι συνήθως 20μl.

- Σε erpendorf tube που βρίσκεται στον πάγο προστίθεται κατάλληλη ποσότητα DNA από τον πλασμιδιακό φορέα και από το ένθετο. Ο όγκος αυτών των δύο δεν πρέπει να ξεπερνά το 50% του όγκου της αντίδρασης.
  - Προσθήκη 2μl 10X ρυθμιστικού διαλύματος T4 της αντίδρασης.
  - Προσθήκη 1μl DNA T4 λιγάσης (0,1U/μl, NEBiolabs).
- Ανάμιξη του δείγματος και επώαση του στους  $16^{\circ}\text{C}$  για 4-12 ώρες.

## 2.11 Βακτηριακά κύτταρα και μετασχηματισμός

### 2.11.1 Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *Escherichia coli*.

- Μονή αποικία κατάλληλου βακτηριακού στελέχους DH5a αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB για 12 ώρες στους  $37^{\circ}\text{C}$ . Το βακτηριακό αυτό στέλεχος χρησιμοποιείται συνήθως για την κλωνοποίηση πλασμιδίων έχοντας υψηλή ικανότητα μετασχηματισμού ( $>1 \times 10^6$  transformants/μg pUC19 DNA). Ο γενότυπος χαρακτηρίζεται από την έλλειψη Δ(lacZ)M15 που εκφράζει το καρβόξυ τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης επιτρέποντας έτσι την α-συμπληρωματικότητα με το *lac* α τμήμα που κωδικοποιείται από πολλούς πλασμιδιακούς φορείς. Έτσι είναι δυνατή η επιλογή μπλέ/άσπρων αποικιών.
- 2ml από την αρχική καλλιέργεια μεταφέρονται σε κωνική φιάλη που περιέχει 200ml θρεπτικού μέσου LB. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους  $37^{\circ}\text{C}$  μέχρις ότου η οπτική πυκνότητά της φτάσει  $\text{O.D}_{550} = 0,5$ .
- Η καλλιέργεια τοποθετείται για 10 λεπτά στον πάγο και τα βακτηριακά κύτταρα κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση για 5min στις 5000 στροφές/λεπτό στους  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε μισό όγκο του αρχικού, 25mM παγωμένου  $\text{CaCl}_2$ .
- Επαναλαμβάνεται ο ίδιος τρόπος κατακρήμνισης
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 75mM παγωμένου  $\text{CaCl}_2$ , σε όγκο διαλύματος που ισούται με το 1/15 του αρχικού της βακτηριακής καλλιέργειας.
- Προστίθεται αποστειρωμένη γλυκερόλη ώστε η τελική της συγκέντρωση να είναι ίση με 15% v/v.
- Το δείγμα, αφού αναμειχθεί πολύ καλά, μοιράζεται σε Eppendorf tube και καταψύχεται αμέσως με τη βοήθεια υγρού αζώτου.
- Η διατήρηση των “δεκτικών” πλέον βακτηριακών κυττάρων, για μακρά χρονικά διαστήματα είναι δυνατή με την αποθήκευσή τους στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.11.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli* με πλασμιδιακό DNA.

Η διαδικασία μετασχηματισμού περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Σε 200μl δεκτικών κυττάρων DH5α προστίθενται 10-50 ng πλασμιδιακού DNA.
- Το μείγμα αναμιγνύεται και επωάζεται στον πάγο για 30min.
- Ακολουθεί θερμικό σοκ του δείγματος με επώαση για 2min στους 42<sup>0</sup>-43<sup>0</sup>C.
- Προσθήκη 1,3 ml θρεπτικού μέσου LB, ανάμιξη του δείγματος και επώαση για 1 ώρα στους 37<sup>0</sup>C.
- Φυγοκέντρηση του δείγματος για 30'' στις 13000 στροφές/λεπτό.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναιώρηση του ιζήματος σε 100-200μl LB.
- Επίστρωση του δείγματος σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο LB, που περιέχει ως μέσο επιλογής αντιβιοτικό (αμπικιλίνη ή καναμυκίνη). Σε περίπτωση χρήσης πλασμιδιακού φορέα που φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης υπάρχει δυνατότητα επιλογής μπλε/άσπρων αποικιών. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη στο θρεπτικό μέσο του χρωμοφόρου υποστρώματος X-gal και του παράγοντα IPTG που δρα σαν επαγωγέας του υποκινητή του lacZ γονιδίου, σε τελικές συγκεντρώσεις 5x10<sup>-3</sup> και 50mM αντίστοιχα.
- Επώαση των τριβλίων για 12-16 ώρες σε θάλαμο 37<sup>0</sup>C.

### 2.11.3 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens*

με ηλεκτροπώρωση.

- Μονή αποικία κατάλληλου βακτηριακού στελέχους *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) αναπτύσσεται σε 2ml υγρό θρεπτικό μέσο LB για 6 ώρες στους 28<sup>0</sup>C.
- 0.1ml από την αρχική καλλιέργεια μεταφέρονται σε κωνική φιάλη που περιέχει 100ml θρεπτικού μέσου LB. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 28<sup>0</sup>C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητά της φτάσει O.D<sub>550</sub> =0,5-0,7.
- Η καλλιέργεια τοποθετείται για 15 λεπτά στον πάγο και τα βακτηριακά κύτταρα κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση για 10min στις 3500 στροφές/λεπτό στους 4<sup>0</sup>C.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 100ml διαλύματος γλυκερόλης (10%v/v) και φυγοκεντρείται κατά τον ίδιο τρόπο.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 50ml διαλύματος γλυκερόλης (10%v/v) και φυγοκεντρείται κατά τον ίδιο τρόπο.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 2ml διαλύματος γλυκερόλης (10%v/v) και φυγοκεντρείται κατά τον ίδιο τρόπο. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 1ml διαλύματος γλυκερόλης (10%v/v) (πυκνότητα 10<sup>11</sup>-10<sup>12</sup> βακτήρια/ml). Δείγματα των 45μl μοιράζονται σε φιαλίδια Eppendorf και καταψύχονται αμέσως με τη βοήθεια υγρού αζώτου. Μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα στους -80<sup>0</sup>C.
- Σε 45μl δεκτικών κυττάρων προστίθενται 10-50ng πλασμιδιακού DNA.
- Το μείγμα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται στον πάγο για 5min.
- Το δείγμα μεταφέρεται σε παγωμένη κυβέτα ηλεκτροπώρωσης, διαμέτρου 0.2cm.
- Εφαρμόζεται ηλεκτρικός παλμός. Οι παράμετροι για το σύστημα της BioRad® Gene PulserII είναι χωρητικότητα 25μF, αντίσταση 400Ω (min) και 600Ω (max) και ηλεκτρικό πεδίο 1,8kV χρονικής διάρκειας 8-12msec.
- Αμέσως μετά ακολουθεί προσθήκη 1ml θρεπτικού μέσου LB, ανάμιξη του δείγματος και επώαση για 3 ώρες στους 28<sup>0</sup>C.
- Φυγοκέντρηση του δείγματος για 1min στις 10000 στροφές/λεπτό και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 100μl θρεπτικού μέσου LB.

- Όλη η ποσότητα του δείγματος επιστρώνεται σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο LB, που περιέχει ως μέσο επιλογής κατάλληλα αντιβιοτικά για την επιλογή τόσο του *Agrobacterium* και του πλασμιδίου T<sub>i</sub>, όσο και του δυαδικού πλασμιδιακού φορέα.
- Επώαση των τριβλίων για 36-48 ώρες σε θάλαμο 28°C.

Για να επιλέξουμε τα μετασχηματισμένα κύτταρα *Agrobacterium* με τον κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα εφαρμόζουμε την συνδυασμένη δράση τριών αντιβιοτικών. Η επιλογή γίνεται σε στερεά τρυβλία με LB που περιέχουν 50mg/L Ριφαμπικίνη για την επιλογή των κυττάρων του *Agrobacterium*, 50mg/L Τζενταμυκίνη για την επιλογή του T<sub>i</sub> πλασμιδίου του στελέχους GV3101 και 50mg/L Καναμυκίνη για την επιλογή του δυαδικού φορέα.

### 2.12 Αποθήκευση για μεγάλα χρονικά διαστήματα βακτηριακών κυττάρων

- Μονή αποικία βακτηριακού στελέχους, το οποίο πρόκειται να αποθηκευθεί, αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB (παρουσία των κατάλληλων αντιβιοτικών) στους 37°C για 12 ώρες όσον αφορά το *E.coli* και στους 28°C για 24 ώρες όσον αφορά το *Agrobacterium tumefaciens*.
  - 600ml από αυτή την καλλιέργεια μεταφέρονται σε φιαλίδιο errendorf.
  - Προσθήκη 300ml γλυκερόλης 99%.
  - Το δείγμα αναμειγνύεται έντονα και ψύχεται στο υγρό άζωτο.
- Αποθήκευση στους -80°C. Τα βακτήρια παραμένουν ζωντανά τουλάχιστον για 10 χρόνια

### 2.13 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *Escherichia coli*

#### 2.13.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης.

- Μονή βακτηριακή αποικία, που περιέχει το προς απομόνωση πλασμίδιο, καλλιεργείται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB στους 37°C για 12 ώρες.
- Από αυτή την καλλιέργεια 1.5ml μεταφέρεται σε Errendorf tube και φυγοκεντρείται για 1min στις 12000 στροφές/λεπτό.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 200ml διαλύματος P1.
- Προσθήκη 200ml από το διάλυμα λύσης P2. Ακολουθεί πολύ ελαφριά ανακίνηση μέχρι το δείγμα να γίνει διαυγές..
- Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για το πολύ 3 λεπτά.
- Προσθήκη 200ml διαλύματος 3M/5M CH<sub>3</sub>COOK, ανάμειξη και επώαση στον πάγο για 15min.
- Φυγοκέντρηση του δείγματος για 20min στις 13000 στροφές/λεπτό.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό Errendorf tube. Προστίθεται διπλάσιος όγκος αιθανόλης. Ανάμειξη και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στις 13000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και αφού στεγνώσει το ίζημα προστίθενται 40ml dH<sub>2</sub>O.

#### 2.13.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την βοήθεια κολώνας QIAGEN.

Όταν απαιτείται το πλασμιδιακό DNA να είναι υψηλής καθαρότητας, όπως όταν

επιθυμούμε να μετασχηματίσουμε κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens*, η απομόνωση πραγματοποιείται με την βοήθεια κολώνας QIAGEN [QIAprep Spin Miniprep Kit (Cat No 27104)] και στηριζόμενοι στο πρωτόκολο που παρέχει η ίδια η εταιρεία.

#### 2.14 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από *Agrobacterium tumefaciens*

Μετά το μετασχηματισμό του στελέχους *Agrobacterium tumefaciens*, επιβάλλεται ο έλεγχος της παρουσίας του πλασμιδίου μέσα στο *Agrobacterium*.

- Μονή αποικία βακτηριακού στελέχους *Agrobacterium* αναπτύσσεται σε 5ml υγρό θρεπτικό μέσο LB, παρουσία αντίστοιχου αντιβιοτικού, για 36 ώρες στους 28°C.
- 1.5ml της καλλιέργειας μεταφέρεται σε Eppendorf tube και φυγοκεντρείται για 2min.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 200μl P1.
- Προσθήκη 20μl από διάλυμα λυσοζύμης 20mg/ml.
- Έντονη μίξη για 20sec και τοποθέτηση στους 37°C για 15 λεπτά.
- Προσθήκη 200μl διαλύματος λύσης P2.
- Έντονη μίξη για 20sec και προσθήκη 50μl φαινόλης. Εντονη μείξη για 1min (vortex).
- Προσθήκη 200μl διαλύματος 3M/5M CH<sub>3</sub>COOK . Ακολουθεί έντονη μείξη.
- Φυγοκέντρηση του δείγματος για 5min στις 12000 στροφές/λεπτό.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό Eppendorf tube. Προστίθεται διπλάσιος όγκος αιθανόλης σε σχέση με τον όγκο του δείγματος. Ανάμειξη και επώαση για 10λεπτά στον πάγο.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 12000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.

Το υπερκείμενο απομακρύνεται και αφού στεγνώσει το ίζημα διαλύεται σε 25μl dH<sub>2</sub>O. Το ¼ της ποσότητας αυτής είναι συνήθως αρκετό για τον μετέπειτα μετασχηματισμό κυττάρων *E. coli*.

#### 2.15 Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Συνήθως οι πέψεις δειγμάτων DNA από ενδονουκλεάσες περιορισμού λαμβάνουν χώρα σε σχετικά μικρούς όγκους από 20-50μl.

- Σε eppendorf tube προστίθενται κατάλληλος όγκος ddH<sub>2</sub>O, 1/10 του όγκου 10x του κατάλληλου κατά περίπτωση ρυθμιστικού διαλύματος, το DNA και τέλος το ένζυμο περιορισμού:

Ανάμειξη του δείγματος και επώαση από 1-12 ώρες στους 37°C. Η άριστη θερμοκρασία δράσης διαφέρει μεταξύ των ενζύμων περιορισμού. Η πλειονότητα όμως λειτουργεί άριστα στους 37°C.

#### 2.16 Μετασχηματισμός *Arabidopsis thaliana*

##### 2.16.1 Μέθοδος δειξιδυσης με εφαρμογή κενού σε ολόκληρα φυτά *Arabidopsis*.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου που περιγράφεται από τους Bechtold *et al.* (1993). Είναι προσαρμοσμένη για τη χρησιμοποίηση οικότυπων *Columbia* και *Landsberg erecta*. Με επιμέρους όμως τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου, η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για το



σταθερό μετασχηματισμό άλλων οικότυπων *Arabidopsis thaliana*. Το ποσοστό επιτυχίας σταθερού μετασχηματισμού ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος και το αναπτυξιακό στάδιο των φυτών. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες που καθορίζουν τον αριθμό μετασχηματισμένων φυτών που θα δημιουργηθούν είναι η πυκνότητα της καλλιέργειας και το στέλεχος του *Agrobacterium*, η καλή εφαρμογή του κενού, και οι συνθήκες ανάπτυξης των φυτών μετά το μετασχηματισμό. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο αυτή, 95% περίπου των φυτών δίνουν μετασχηματισμένα σπέρματα. Το ποσοστό των μετασχηματισμένων σπερμάτων για κάθε φυτό μπορεί να φτάσει το 1 ανά 25 σπέρματα.

### 2.16.2 Ανάπτυξη φυτών και διείσδυση με κατάλληλο στέλεχος *Agrobacterium*.

➤ Όταν τα φυτά φτάσουν ένα ύψος 20-25cm και τα πρώτα άνθη έχουν σχηματιστεί, είναι έτοιμα να χρησιμοποιηθούν.

➤ Αναπτύσσουμε μία καλλιέργεια με το κατάλληλο στέλεχος *Agrobacterium* (που φέρει την επιθυμητή κατασκευή του δυαδικού φορέα) σε 5ml θρεπτικό μέσο LB για 16 ώρες στους 28°C.

1ml αυτής της καλλιέργειας μεταφέρεται σε 500 ml θρεπτικό μέσο LB και αναπτύσσεται στους 28°C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα φτάσει  $OD_{600}=2.0$ .

Τα βακτηριακά κύτταρα φυγοκεντρώνονται για 5min στις 5000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύονται σε 750 ml διαλύματος διείσδυσης (IM). Η καλλιέργεια αφήνεται να αναπτυχθεί για άλλες 2 ώρες.

Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε ένα δοχείο ζέσεως χωρητικότητας 500ml και όλο το δοχείο τοποθετείται σε έναν κάδο κενού. Ένα δοχείο που περιέχει 4 ανεπτυγμένα φυτά αναποδογυρίζεται και τα φυτά εμβαπτίζονται μέσα στην καλλιέργεια του *Agrobacterium*. Προσέχουμε τα φυτά να είναι βυθισμένα ολόκληρα μέσα στην καλλιέργεια, συμπεριλαμβανομένης της ροζέτας και των δευτερογενών βλαστών που αρχίζουν να εμφανίζονται στη βάση της ροζέτας. Συνίσταται το χρώμα να ενυδατώνεται καλά πριν την διείσδυση, ώστε να απορροφά όσο το δυνατό λιγότερη καλλιέργεια *Agrobacterium*. Σε αντίθετη περίπτωση το μολυσμένο χρώμα παρεμποδίζει την ανάπτυξη των φυτών.

Ο κάδος κενού κλείνεται αεροστεγώς και με τη βοήθεια μιας αντλίας κενού εφαρμόζεται κενό 400 mm Hg, για 5-10 λεπτά.

Μεταφορά των φυτών σε θάλαμο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασίας 22°C, υγρασία 40% και με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/ 8 ώρες σκοτάδι), μέχρι να κλείσουν τον κύκλο ζωής τους.

Μόλις τα φυτά αφυδατωθούν, γίνεται συγκομιδή των σπερμάτων τους.

### 2.16.3 Επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών της T1 γενιάς.

➤ Σπέρματα T1 γενιάς αποστειρώνονται και επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο επιλογής MS. Το θρεπτικό μέσο είναι εμπλουτισμένο με κατάλληλα αντιβιοτικά που θα βοηθήσουν για την ορθή επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν το αντιβιοτικό καναμυκίνη και σεφοθαξίμη.

➤ Τα τρυβλία μεταφέρονται σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22°C, υγρασία 40% και με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι).

➤ Τα τρυβλία επωάζονται σε αυτές τις συνθήκες για περίπου 14 ημέρες.

➤ Μετά από 5-7 ημέρες τα μετασχηματισμένα σπέρματα αναπτύσσονται σε σκούρα πράσινα φυτά και έχουν φυσιολογικό φαινότυπο. Η ρίζα τους είναι κοντή αλλά

φυσιολογική. Τα μη μετασχηματισμένα σπέρματα αναπτύσσουν πολύ κοντό ριζικό σύστημα και έχουν ανοιχτές πράσινες ή υποκίτρινες κοτυληδόνες. Μετά τη δέκατη ημέρα ο διαχωρισμός των μετασχηματισμένων φυτών από τα μη μετασχηματισμένα είναι πλέον εμφανής. Τα μετασχηματισμένα φυτά αναπτύσσουν σχεδόν φυσιολογική ρίζα και δεύτερο ζευγάρι φύλλων, ενώ η ανάπτυξη των μη μετασχηματισμένων επιβραδύνεται και τελικά νεκρώνονται.

➤ Μετά την επιλογή, τα μετασχηματισμένα φυτά μεταφέρονται σε άλλα τρυβλία με θρεπτικό μέσο 1xMS, χωρίς αντιβιοτικό προκειμένου να αναπτυχθούν όσο το δυνατό καλύτερα μέχρι το στάδιο της ροζέτας και τότε μεταφέρονται στο χώμα για να συνεχιστεί η ανάπτυξή τους στις ίδιες συνθήκες φωτοπεριόδου και θερμοκρασίας.

### 2.17 YFP Απεικόνιση

Τα διαγονιδιακά φυτά της T2 και T3 γενιάς, τα οποία μετασχηματίστηκαν με τις Lon κατασκευές, αναπτύχθηκαν κάθετα και έγινε σε αυτά χρώση με την ειδική για τα μιτοχόνδρια χρωστική MitoTracker® Orange CMTMRos (Invitrogen, Paisley, UK). Ολόκληρα φυτά ηλικίας τεσσάρων ημερών εμβαπτίστηκαν για 30 λεπτά σε υγρό 0.5x MS θρεπτικό διάλυμα στο οποίο είχε προστεθεί 10nM MitoTracker®. Στη συνέχεια ξεπλύθηκαν αρκετές φορές με σκέτο 0.5x MS θρεπτικό διάλυμα προκειμένου να φύγει η χρωστική ουσία.

Από τα παροδικώς μετασχηματισμένα φύλλα καπνού απομονώθηκε η επιδερμίδα, η οποία στη συνέχεια εμβαπτίστηκε για 3 λεπτά σε 5μM DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), το οποίο εξειδικευμένα δεσμεύεται με τα νουκλεϊνικά οξέα.

Οι ρίζες, τα υποκοτύλια των φυτών, καθώς και τα μετασχηματισμένα επιδερμικά κύτταρα καπνού, τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα και πάνω από αυτά τοποθετήθηκε σταγόνα νερού και καλυπτρίδα. Τα κύτταρα εξετάστηκαν με το οπτικό μικροσκόπιο Olympus BX-50 (Tokyo, Japan) εξοπλισμένο με φθορισμό. Ο φθορισμός του YFP παρατηρήθηκε με το φίλτρο filter #41017, Endow GFP Bandpass Emission Filter (Chroma Technology Corp., Brattleboro, USA), ενώ ο φθορισμός της χρώσης με το φίλτρο ροδαμίνης U-MSWG (Olympus, Tokyo, Japan). Οι φωτογραφίες τραβήχθηκαν με την κάμερα Olympus DP71, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Cell^A (Olympus Soft Imaging Solutions, Germany). Η ένωση των φωτογραφιών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Adobe Photoshop CS3 (version 9.01).

### 2.18 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 αλγόριθμους. 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.

## 2.19 Χειρισμός κυττάρων ζύμης

### 2.19.1 Μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης.

Η δημιουργία δεκτικών κυττάρων ζύμης και ο μετασχηματισμός τους βασίζεται στην χρήση  $\text{CH}_3\text{COOLi}$ . Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου που περιγράφεται από τους Ito et al. (1983).

➤ Από κύτταρα ζύμης που αναπτύσσονται στους  $30^\circ\text{C}$  σε τρυβλίο με YPD χρησιμοποιώντας την μικροβιολογική λούπα συλλέγουμε 50ml μόλυσμα. Η καλλιέργεια θα πρέπει να είναι φρέσκια και προσέχουμε τα κύτταρα που θα απομονωθούν να βρίσκονται στην άκρη μιας αναπτυσσόμενης αποικίας ώστε να είναι νέα και υγιή. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε 1ml αποστειρωμένο νερό.

➤ Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 5000rpm για 5".

➤ Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρούνται σε διάλυμα 100mM  $\text{CH}_3\text{COOLi}$  και όγκου 1ml. Ακολουθεί επώαση στους  $30^\circ\text{C}$  για 5 λεπτά.

➤ Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 5000rpm για 5". Απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιώντας μικροπιπέτα.

➤ Στο ίζημα των κυττάρων ζύμης προστίθενται με την σειρά :

240ml PEG από διάλυμα 50%w/v

36ml 1 M  $\text{CH}_3\text{COOLi}$

25ml carrier DNA

5ml πλασμιδιακό DNA ώστε η τελική συγκέντρωση στο μείγμα να είναι 100ng-5μg

45ml αποστειρωμένο νερό

➤ Το ίζημα των κυττάρων ζύμης αιωρείται στο μείγμα μετασχηματισμού και ακολουθεί θερμική καταπόνηση στους  $42^\circ\text{C}$  για 20 λεπτά.

➤ Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 5000rpm για 10". Απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιώντας μικροπιπέτα.

➤ Το ίζημα των κυττάρων ζύμης αιωρείται σε 200-400ml αποστειρωμένο νερό και στρώνεται σε τριβλία ώστε να γίνει η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων.

### 2.19.2 Επιλογή και δοκιμή των μετασχηματισμένων κυττάρων.

Οι κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην YFP απεικόνιση, αλλά χωρίς το YFP, δηλαδή οι cDNA κλώνοι At-shortLon1 και At-longLon1 εισήχθησαν τον φορέα PVT-100U. Ο παραπάνω φορέας περιέχει το σταθερά εκφραζόμενο σύστημα του γονιδίου της αλκοολικής αφυδρογονάσης (*ADH1*) με τον προαγωγέα και τη ληκτική ακολουθία, καθώς και το τροποποιημένο γονίδιο *URA3* για την επιλογή. Ο μετασχηματισμός της ζύμης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο lithium acetate. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα ζύμης επιλέχθηκαν σε συνθετικό θρεπτικό μέσο χωρίς URA που περιείχε 2% γλυκόζη. Η ετερόλογη λειτουργική συμπληρωματικότητα έγινε όπως προηγούμενα (van Dyck et al., 1998).

### 2.19.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα ζύμης.

Η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε περιγράφηκε από τους Hoffman and Winston (1987).

➤ Κύτταρα ζύμης αναπτύσσονται σε 10ml θρεπτικό μέσο LSM για 1 έως 2 μέρες στους  $30^\circ\text{C}$ .

➤ Τα κύτταρα συλλέγονται σε σωλήνα errendorf με φυγοκέντρηση στις 5000rpm για 2'. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 0,5ml  $\text{dH}_2\text{O}$ .

Συλλέγονται ξανά με φυγοκέντρηση στις 5000rpm για 2'.

➤ Το ίζημα κυττάρων επαναιωρείται σε 200μl Διαλύματος λύσης και σε 200μl φαινόλη : χλωροφόρμιο : ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1). Επιπλέον προσθέτουμε 0,3g γυάλινα σφαιρίδια διαμέτρου 425-600 μm.

➤ Ο σωλήνας που περιέχει τα κύτταρα ανακινείται δυνατά για 3-4 λεπτά για να λυθούν τελείως.

➤ Τα υπολείμματα των κυττάρων συγκεντρώνονται στο άκρο του σωλήνα με φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 5'. Το υπερκείμενο υγρό που περιέχει το πλασμιδιακό DNA συλλέγεται και μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf στον οποίο προσθέτουμε 1ml 100% αιθανόλη για την κατακρήμνιση των νουκλεϊνικών οξέων. Ανακινούμε τον σωλήνα και τον αφήνουμε ακίνητο για 10 λεπτά.

➤ Το πλασμιδιακό DNA που κατακρημνίστηκε συλλέγεται στο άκρο του σωλήνα με φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 5'. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και διαλύουμε το DNA σε 400μl dH<sub>2</sub>O, στην συνέχεια προσθέτουμε 3μl RNάσης. Το μείγμα επωάζεται για 5' στους 37<sup>0</sup>C. Προσθέτουμε 1/10 του όγκου 3M CH<sub>3</sub>COONa, pH 4,8 και 2 όγκους 100% αιθανόλη. Το μείγμα αναμιγνύεται καλά.

➤ Το πλασμιδιακό DNA που κατακρημνίστηκε συλλέγεται στο άκρο του σωλήνα με φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 5'. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και διαλύουμε το DNA σε 50μl dH<sub>2</sub>O από τα οποία παίρνουμε 20μl για μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *E. coli*.

#### 2.19.4 Παροδική έκφραση σε φύλλα καπνού.

➤ Χρησιμοποιείται στέλεχος του *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, μετασχηματισμένο με πλασμιδιακό φορέα. Ο μετασχηματισμός πραγματοποιείται με ηλεκτροπόρωση.

➤ Μετά την ηλεκτροπόρωση, τα βακτήρια αφήνονται να αναπτυχθούν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB, με τριπλή επιλογή (ριφαμπικίνη Rif, τζενταμικίνη Gen και καναμικίνη Kan). Τα αγροβακτήρια αναπτύσσονται στους 28<sup>0</sup>C και η ανάπτυξή τους διαρκεί έως και τρεις ημέρες.

➤ Επιλογή μονής αποικίας και καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB (5ml), με τριπλή επιλογή (ριφαμπικίνη Rif- προαιρετικό, τζενταμικίνη Gen και καναμικίνη Kan). Ανάπτυξη για 1-2 ημέρες, έως ότου θολώσει καλά. Για ταχύτερη ανάπτυξη τοποθετούνται σε 3ml θρεπτικού μέσου.

➤ Ακολουθεί επανακαλλιέργεια σε 3ml θρεπτικό μέσο με διπλή επιλογή (τζενταμικίνη Gen και καναμικίνη Kan, 50μg/ml) O/N.

➤ Φωτομετρούνται οι καλλιέργειες σε OD<sub>600</sub> (είναι καλό να μην ξεπερνά το 2). Τοποθετούνται σε erpendorfs (ανά 1ml).

➤ Φυγοκέντρηση στις 3.500rpm για 10'

➤ Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το βακτηριακό ίζημα ξεπλένεται με 1ml dilution buffer (όσος ο όγκος της αρχικής καλλιέργειας στο erpendorf tube). Χρειάζεται πολλή προσοχή διότι το βακτηριακό ίζημα μπορεί εύκολα να αποκολληθεί και να χαθεί σημαντικός αριθμός βακτηρίων.

➤ Απομακρύνεται το dilution buffer και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 1ml induction buffer (όσος ο όγκος της αρχικής καλλιέργειας στο erpendorf tube ), όπου αφήνεται για 3h σε RT.

➤ Ακολούθως φωτομετρούνται ξανά τα βακτηριακά διαλύματα και αραιώνονται, έτσι ώστε να έχουν τελικά την επιθυμητή οπτική πυκνότητα για το infiltration.

- Χρησιμοποιώντας ένεση με μικρή διάμετρο και χωρίς τη βελόνα, στο κάτω μέρος του φύλλου καπνού, πραγματοποιείται διήθηση των *Agrobacterium tumefaciens* σε όλο το έλασμα του φύλλου.

### 2.20 Αποσιώπηση των γονιδίων *Importin α1/α2* στον καπνό μέσω VIGS (Virus Induced Gene Silencing)

Προκειμένου να εξετασθεί ο ρόλος της ιμπορτίνης α στη μετακίνηση της πρωτεΐνης LEUKO1 στον πυρήνα, αποσιωπήθηκε η έκφραση των γονιδίων *importin α1/α2* στο καπνό *Nicotiana benthamiana* (Kanneganti *et al.* 2007) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο TRV-VIGS (Liu *et al.* 2002, Ratcliff *et al.* 2001). Τα γονίδια *importin α1* και *α2* είναι κλωνοποιημένα στο φορέα pTV00, ο οποίος επιτρέπει την παραγωγή του RNA2 από το γονιδίωμα του ιού TRV (Kanneganti *et al.* 2007, Ratcliff *et al.* 2001). Οι κλώνοι ονομάζονται pTV00:*NbImpa1* και pTV00:*NbImpa2*, αντίστοιχα. Σε φύλλα καπνού έγινε διήθηση ταυτόχρονα με κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens* που έφεραν τις κατασκευές pTV00 και με κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens* που έφεραν την κατασκευή pBINTRA6. Η κατασκευή pBINTRA6 επιτρέπει την παραγωγή του RNA1 του γονιδιώματος του ιού TRV (Ratcliff *et al.* 2001).

Η κατασκευή pTV00:PDS χρησιμοποιήθηκε στο θετικό πείραμα ελέγχου, αφού μέσω αυτού τα φυτά χλωρώνουν εξαιτίας της αποσιώπησης του γονιδίου *PDS* (Phytoene Desaturase Gene). Ο άδειος φορέας pTV00 χρησιμοποιήθηκε στο αρνητικό πείραμα ελέγχου, για να ελεγχθεί η επίδραση από τη μόλυνση του TRV. Ύστερα από 3 εβδομάδες περίπου, και όταν τα φυτά που μολύνθηκαν με την κατασκευή pTV00:PDS έχουν χλωρώσει, γίνεται διήθηση κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens* που φέρουν τις επιθυμητές κατασκευές στα φύλλα καπνού, όπου έχουν αποσιωπηθεί τα γονίδια της ιμπορτίνης *α1* και *α2*.

Μετά από 48h-72h, απομονώνεται η επιδερμίδα των φύλλων καπνού που μολύνθηκαν με τις επιθυμητές κατασκευές και εξετάζονται με μικροσκοπία φθορισμού.

### 2.21 Απομόνωση πρωτοπλάστων

- Φύλλα καπνού *Nicotiana benthamiana* με τη βοήθεια νυστεριού και λαβίδας κόβονται σε μικρά κομμάτια του 1cm x 1cm τοποθετούνται σε άδειο τρυβλίο παρουσία 0.5M μαννιτόλης
- Τα μικρά κομμάτια φύλλων πλασμολύονται σε 0.5M μαννιτόλης για 1-2 ώρες. Η πλασμόλυση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου και απουσία φωτός
- Αφαιρούμε το διάλυμα μαννιτόλης και προσθέτουμε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος ενζύμων-κυτταρινασών (Διάλυμα ενζύμων)
- Κλείνουμε τα τριβλία με parafilm και τα επωάζουμε στο σκοτάδι στους 25<sup>0</sup>C περίπου για 8-10 ώρες.
- Αναδεύουμε προσεχτικά το τρυβλίο 2-3 φορές κατά τη διάρκεια των 10 ωρών, αλλά όχι προς το τέλος και δεν συνίσταται η συνεχής ανάδευση του τρυβλίου
- Αφαιρείται το διάλυμα ενζύμων και προστίθεται το διάλυμα MCa.
- Από το πάτο του τρυβλίου συλλέγονται οι πρωτοπλάστες με πιπέτα Pasteur (Αντί για τρυβλία Petri μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε και μικρά titer plate των 9 θέσεων. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται εξοικονόμηση ποσότητας διαλυμάτων)

## 2.22 Χειρισμός μετασχηματισμένων πρωτοπλαστών με Λεπτομυκίνη Β (Leptomycin B, LMB)

- Από μετασχηματισμένα φύλλα καπνού απομονώνονται πρωτοπλάστες όπως αναφέρεται προηγούμενα στην παράγραφο 2.21.
- Συλλέγουμε προσεχτικά και με αργές κινήσεις τους πρωτοπλάστες, χρησιμοποιώντας πιπέτα Pasteur. Τους τοποθετούμε σε titer plate των 9 θέσεων μαζί με το διάλυμα MCa.
- Προστίθεται η Leptomycin B (Enzo Life Sciences, Alexis Biochemicals, ALX-380-100, Nottingham, UK) σε τελική συγκέντρωση 2μM, η οποία είναι διαλυμένη σε 100% αιθανόλη. Γίνεται ενδιάμεσο stock 66μM ή 165μM, ώστε στα 200μl δείγματος να προστίθεται ικανή ποσότητα δείγματος, άλλα όχι και πολύ μεγάλη, γιατί η αιθανόλη επηρεάζει δραματικά τους πρωτοπλάστες. (Αρχική ποσότητα LMB 0.2mg/ml. 540.07MW, 200mgr)
- Γίνεται πολύ ελαφρά ανάδευση για 1h
- Συλλέγονται οι πρωτοπλάστες προσεχτικά και με αργές κινήσεις με πιπέτα Pasteur
- Σε αντικειμενοφόρο τοποθετούνται με γλυκερόλη δύο καλυπτρίδες με 5mm κενό ανάμεσά τους. Στο «κενό» εισάγεται το δείγμα, και από πάνω άλλη καλυπτρίδα.

## 2.23 Υδατικά διαλύματα και θρεπτικά μέσα βακτηριακών κυττάρων και φυτών.

### 2.23.1 Διαλύματα ανάπτυξης βακτηρίων - σχετικά αντιδραστήρια.

- **LB υγρό θρεπτικό μέσο**  
0,5% (w/v) Εκχύλισμα ζύμης, 1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Πεπτόνη. Στην περίπτωση στερεού θρεπτικού μέσου προστίθεται 1,4% (w/v) άγαρ.
- **TY υγρό θρεπτικό μέσο**  
1,6% (w/v) Πεπτόνη, 1,6% (w/v) Εκχύλισμα ζύμης, 0,5% (w/v) NaCl
- **IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)**  
200mg/ml σε dH<sub>2</sub>O. Κρατείται στους -20° C.
- **X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (BRL)**  
20mg/ml σε διμεθυλ-φορμαμίδιο. Αποθηκεύεται στους -20° C.

### 2.23.2 Διαλύματα ενζύμων και απομόνωσης πλασμιδιακού DNA.

- **P1 ρυθμιστικό διάλυμα επαναδιάλυσης**  
50mM Tris-Cl pH 8,0, 10mM EDTA pH 8,0 και 100μg/ ml RNάσης.
- **P2 ρυθμιστικό διάλυμα λύσης**  
0,2N NaOH, 1% (w/v) SDS
- **3M/5M CH<sub>3</sub>COOK**  
60ml 5M οξικού καλίου pH 4,8-5,2 αναμιγνύονται με 11,5ml οξικού οξέος και 28,5ml dH<sub>2</sub>O.
- **RNάση**  
Διάλυμα RNάσης A 10mg/ml σε 10mM Tris-HCl pH7,4, 15mM NaCl. Βρασμός του διαλύματος για 15min. Διακοπή για 20min και επανάληψη βρασμού, έτσι καταστρέφονται υπολείμματα DNάσης. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.
- **T.E. ρυθμιστικό διάλυμα**  
10mM Tris-Cl pH 7,5, 1mM EDTA pH 8,0.
- Διαλύματα απομόνωσης ολικού RNA
- **Sevag**  
(24:1) (Χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη)

2.23.3 Διαλύματα απομόνωσης γονιδιωματικού DNA

- **CTAB DNA Ρυθμιστικό διάλυμα απομόνωσης**  
2% (w/v) CTAB, 100mM Tris pH 8,0, 20mM EDTA pH 8,0, 1,4M NaCl, 1% (w/v) PVP (πολυβινυλ-πυρρολιδόνη, M.B 40.000), 2% (w/v) CTAB.
- **Sevag**  
(24:1) (Χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη)

2.23.4 Διαλύματα ηλεκτροφόρησης

- **10 x TBE διάλυμα ηλεκτροφόρησης**  
9,3gr/l EDTA, 5,5gr/l Boric acid, 108gr/l Tris-Cl.
- **50 x TAE ρυθμιστικού διαλύματος**  
24,2gr (w/v) Tris-base, 100ml/l 0,5M EDTA pH 8,0, 57,1ml/l CH<sub>3</sub>COOH
- **Βρωμιούχο αιθίδιο**  
5mg/ml σε dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα διατηρείται σε σκοτεινόχρωμο μπουκάλι σε θερμοκρασία δωματίου
- **Διάλυμα νουκλεοτιδίων**  
2,5mM dATP, 2,5mM dGTP, 2,5mM dTTP σε dH<sub>2</sub>O.
- **(10% w/v) Ammonium Persulfate (APS)**  
1g ammonium persulfate σε 10ml H<sub>2</sub>O
- **30:0,8% διάλυμα ακρυλαμίδη:δισ-ακρυλαμίδη**  
30g ακρυλαμίδη και 1g δισ-ακρυλαμίδη
- **TEMED**  
Διατίθεται από την SIGMA

2.23.5 Διαλύματα και θρεπτικά μέσα ιστοκαλλιέργειας και μετασχηματισμού φυτών

- **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.
- **Διάλυμα διεσόδουσης (IM)**  
Σε ένα λίτρο ddH<sub>2</sub>O διαλύουμε 2.2g MS θρεπτικό διάλυμα αλάτων, 1x B5 βιταμίνες (από 1000x), 50g σακχαρόζη, 0,5g MES, 8g/l Difco Bacto άγαρ, pH 5,7. Μετά την αποστείρωση προσθέτουμε 0,01 mg/l BAP και 200μl Silwet L-77 (Osi Specialties).
- **Stock βιταμινών 1000X B5**  
1000mg Ινοσιτόλη, 100mg Θειαμίνη, 10mg Νικοτινικό οξύ, 10mg Πυριδοξίνη σε 10ml ddH<sub>2</sub>O.

2.23.6 Διαλύματα παροδικής έκφρασης στα φύλλα καπνού

- **Induction Buffer**  
10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MES pH=5.6, 150μM acetosyringone.
- **Dilution Buffer**  
To induction buffer χωρίς acetosyringone.

2.23.7 Διαλύματα απομόνωσης πρωτοπλαστών

- **Διάλυμα ενζύμων**

1% Cellulase Onozuka R-10, 0.25% Macerozyme R-10, 8mM CaCl<sub>2</sub>, 0.4M μαννιτόλη, pH 5.5 (KOH).

- **Διάλυμα MCa**  
30 ml 0.5M μαννιτόλη, 60 ml 0.2M CaCl<sub>2</sub>

## 2.24 Κατασκευές και Κλωνοποιήσεις

### **35S::YFP**

- Με τους εκκινητές [Met-YFP-For-B] / [YFP-Lon-Rev] και μήτρα το Citrine-YFP (Tian et al., 2004; Griesbeck et al., 2001) ενισχύθηκε το YFP και κλωνοποιήθηκε στη θέση Smal στο pUC19/Smal, όπου και αλληλουχικήθηκε. Κλώνος: Met-YFP/pUC19 (3)
- Στη συνέχεια, πέψη με EcoRI/HindIII και κλωνοποίηση το Met-YFP στο pBluescript SK-/EcoRI/HindIII. Κλώνος: Met-YFP/SK-
- Πέψη XbaI και κλωνοποίηση στην XbaI θέση του pGPTV 35S w/o GUS. Έλεγχος κατεύθυνσης με πέψεις. Κλώνος: Met-YFP/pGPTV 35 w/o GUS

### **35S::Leuko1<sub>1-173</sub>:YFP**

- Με τους εκκινητές [Alba-For] / [Alb-Rev (L)] και μήτρα το BAC MJH22 ενισχύθηκε το Leuko1<sub>1-173</sub> και κλωνοποιήθηκε στη θέση Smal στο pBluescript KS+/Smal(\*), όπου και αλληλουχικήθηκε. Κλώνος: 1,2 KS+ [1]
- Στη θέση MluI του κλώνου 1,2-YFP KS+ [57], κλωνοποιήθηκε το YFP/MluI το οποίο κόπηκε από τον κλώνο YFP/pUC19. Κλώνος: 1,2-YFP KS+ [57]
- Πέψη του κλώνου 1,2-YFP KS+ [57] με EcoRV/SacI και κλωνοποίηση στο pbi121/Smal/SacI. Κλώνος: 1,2-YFP pbi121 [1]

### **35S::Leuko1<sub>1-173</sub>:YFP:Leuko1<sub>174-494</sub>**

- Με του εκκινητές [Alba-For-L] / [Alb-Rev] και μήτρα το BAC MJH22 ενισχύθηκε το Leuko1<sub>174-494</sub> και κλωνοποιήθηκε στη θέση Smal στο pUC19/Smal, όπου και αλληλουχικήθηκε. Κλώνος: 3,4 pUC19 [1]
- Πέψη του κλώνου 3,4 pUC19 [1] με MluI/NotI και κλωνοποίηση στη θέση MluI/NotI του κλώνου 1,2 KS+ [1]. Κλώνος: 1,4 KS+ [2]
- Στη θέση MluI του κλώνου 1,4 KS+ [2] κλωνοποιήθηκε το YFP/MluI το οποίο κόπηκε από τον κλώνο YFP/pUC19 [2]. Κλώνος: 1,4-YFP KS+ [64]
- Πέψη του κλώνου 1,4-YFP KS+ [64] με EcoRV/SacI και κλωνοποίηση στο pbi121/Smal/SacI. Κλώνος: 1,4-YFP pbi121 [1]

### **35S::YFP:Leuko1<sub>1-494</sub>**

- Με του εκκινητές [Alba-For-L2] / [Alb-Rev] και μήτρα το BAC MJH22 ενισχύθηκε το Leuko1<sub>1-494</sub> και κλωνοποιήθηκε στη θέση Smal στο pBluescript SK-/Smal, όπου και αλληλουχικήθηκε. Κλώνος: M SK- [5]
- Στη θέση MluI του κλώνου M SK- [5] κλωνοποιήθηκε το Met-YFP/MluI το οποίο κόπηκε από τον κλώνο Met-YFP/pUC19 (3). Κλώνος: M-YFP SK- [3]
- Πέψη του κλώνου M-YFP SK- [3] με EcoRV/SacI και κλωνοποίηση στο pbi121/Smal/SacI. Κλώνος: M-YFP pbi121 [1]

### **35S::YFP:Leuko1<sub>1-494</sub>:Δ(NLS)**



- Με του εκκινητές [Met-YFP-For-B] / [NLS-Kpn-Rev] και μήτρα τον κλώνο *M-YFP SK*- [3] ενισχύθηκε το 5'-mNLS και κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEM. Κλώνος: 5'-mNLS pGEM [1]
- Με του εκκινητές [NLS-Kpn-For] / [Alba-Rev] και μήτρα το BAC MJH22 ενισχύθηκε το 3'-mNLS και κλωνοποιήθηκε στον φορέα pUC18/SmaI\*. Κλώνος: 3'-mNLS pUC18 [4]
- Στη θέση KpnI του κλώνου 5'-mNLS pGEM [1] κλωνοποιήθηκε το 3'-mNLS το οποίο κόπηκε με KpnI από τον κλώνο 3'-mNLS pUC18 [4]. Κλώνος: 5-3 mNLS pGEM [5]
- Πέψη του κλώνου 5-3 mNLS pGEM [5] με EcoRI και κλωνοποίηση του 5-3 mNLS στον φορέα pBluescript SK-/EcoRI. Έλεγχος κατεύθυνσης. Κλώνος: 5-3 SK- [12]
- Πέψη του κλώνου 5-3 mNLS SK- [12] EcoRV/SacI και κλωνοποίηση στο pbi121/SmaI/SacI. Κλώνος: 5-3 pbi121 [5]

### **35S::YFP:Leuko1<sub>1-494</sub>:(G373→D)**

- Με του εκκινητές [Alba-For-L] / [Alba-Rev] και μήτρα γονιδιωματικό DNA από το μετάλλαγμα *leuko1-1* ενισχύθηκε το Leuko1<sub>174-494</sub>:(G373→D) και κλωνοποιήθηκε στη θέση SmaI στο pUC19/SmaI, όπου και αλληλουχήθηκε. Κλώνος: 3,4-Albino pUC19 [2]
- Πέψη του κλώνου 3,4-Albino pUC19 [2] με BamHI και κλωνοποίηση στον κλώνο *M SK*- [5] όπου κόπηκε και αυτός με BamHI. Κλώνος: *Alb-M G→D SK*- [29]
- Στη θέση MluI του κλώνου *Alb-M G→D SK*- [29] κλωνοποιήθηκε το Met-YFP/MluI το οποίο κόπηκε από τον κλώνο *Met-YFP/pUC19* (3). Κλώνος: *Alb-MYFP G→D SK*- [9]
- Πέψη του κλώνου *Alb-M-MYFP G→D SK*- [9] με EcoRV/SacI και κλωνοποίηση στο pbi121/SmaI/SacI. Κλώνος: *Alb-MYFP G→D pbi121* [4]

### **35S::YFP:Leuko1<sub>1-494</sub>:(G<sub>373</sub>→D):Δ(NLS)**

- Πέψη του κλώνου 5-3 SK- [12] με XbaI και κλωνοποίηση του τμήματος που περιέχει το μεταλλαγμένο NLS στον κλώνο *Alb-MYFP G→D SK*- [9] κομμένο με XbaI. Κλώνος: 5-3 mNLS G→D SK [3]
- Πέψη του κλώνου 5-3 mNLS G→D SK [3] με EcoRV/SacI και κλωνοποίηση στο pbi121/SmaI/SacI. Κλώνος: 5-3 mNLS G→D *pbi121* [1]

### **35S::Leuko1<sub>70-494</sub>:Δ(Leuko1<sub>1-69</sub>)**

- Με του εκκινητές [Alb-trunc-XhoI] / [Alba-Rev] και μήτρα το BAC MJH22 ενισχύθηκε το *n* και κλωνοποιήθηκε στη θέση SmaI στο pBluescript SK-/SmaI, όπου και αλληλουχήθηκε. Κλώνος: *n SK*-
- Πέψη του κλώνου *n SK*- με EcoRV/SacI και κλωνοποίηση στο pbi121/SmaI/SacI. Κλώνος: *n pbi121* [1]

### **Lon1S-YFP**

- Με του εκκινητές [U19013-For] / [LoncDNA-Rev] και μήτρα τον κλώνο U19013 (ABRC/NASC) ενισχύθηκε το Lon1S και κλωνοποιήθηκε στη θέση SmaI στο pUC19/SmaI, όπου και αλληλουχήθηκε. Κλώνος: *Short pUC19* [36]
- Πέψη του κλώνου *Short pUC19* [36] με XbaI και κλωνοποίηση στο pVT-100U/XbaI. Κλώνος: *ShortcDNA pVT100U* [9]
- Στη θέση MluI του κλώνου *ShortcDNA pVT100U* [9] κλωνοποιήθηκε το YFP/MluI το οποίο κόπηκε από τον κλώνο *YFP/pUC19* [2]. Κλώνος: *ShortcDNA-YFP pVT100U* [28]
- Πέψη του κλώνου *ShortcDNA-YFP pVT100U* [28] με XbaI και κλωνοποίηση στον φορέα pGPTV 35S w/o GUS. Κλώνος: *ShortcDNA-YFP pGPTV 35S w/o GUS*

**Lon1SS-YFP**

- Με του εκκινητές [[LoncDNA-For](#)] / [[LoncDNA-In-Rev](#)] και μήτρα το BAC F2P16 ενισχύθηκε το τμήμα F2P16-Short.
- Με του εκκινητές [[LoncDNA-For](#)] / [[LoncDNA-Rev](#)] και μήτρα τα Lon1S (PCR product) και F2P16-Short (PCR product) (double template PCR) ενισχύθηκε το Lon1L και κλωνοποιήθηκε στη θέση SmaI στο pUC19/SmaI, όπου και αλληλουχήθηκε. Κλώνος: *Long pUC19* [58]
- Πέψη του κλώνου *Long pUC19* [58] με XbaI και κλωνοποίηση στο pVT-100U/XbaI. Κλώνος: *LongcDNA pVT100U* [38]
- Στη θέση MluI του κλώνου *LongcDNA pVT100U* [38] κλωνοποιήθηκε το YFP/MluI το οποίο κόπηκε από τον κλώνο *YFP/pUC19* [2]. Κλώνος: *LongcDNA-YFP pVT100U* [53]
- Πέψη του κλώνου *LongcDNA-YFP pVT100U* [53] με XbaI και κλωνοποίηση στον φορέα pGPTV 35S w/o GUS. Κλώνος: *LongcDNA-YFP pGPTV 35S w/o GUS*

**Lon1LS-YFP**

- Με του εκκινητές [[LonWT-For](#)] / [[LoncDNA-Rev](#)] και μήτρα τον κλώνο *Long pUC19* [58] ενισχύθηκε το τμήμα Lon1LS και κλωνοποιήθηκε στη θέση SmaI στο pUC19/SmaI, όπου και αλληλουχήθηκε. Κλώνος: *LongWT pUC19* [2]
- Πέψη του κλώνου *LongWT pUC19* [2] με XbaI και κλωνοποίηση στο pVT-100U/XbaI. Κλώνος: *LongWTcDNA pVT100U* [31]
- Στη θέση MluI του κλώνου *LongWTcDNA pVT100U* [31] κλωνοποιήθηκε το YFP/MluI το οποίο κόπηκε από τον κλώνο *YFP/pUC19* [2]. Κλώνος: *LongWTcDNA-YFP pVT100U* [37]
- Πέψη του κλώνου *LongWTcDNA-YFP pVT100U* [37] με XbaI και κλωνοποίηση στον φορέα pGPTV 35S w/o GUS. Κλώνος: *LongWTcDNA-YFP pGPTV 35S w/o GUS*

**Lon1[ΔL]S-YFP**

- Με του εκκινητές [[Lon1withG-For](#)] / [[LoncDNA-Rev](#)] και μήτρα τον κλώνο *LongWTcDNA-YFP pVT100U* [37] ενισχύθηκε το τμήμα Lon1[ΔL]S-YFP και κλωνοποιήθηκε στο φορέα pGEM. Κλώνος: *Lon1withG pGEM* [5]
- Πέψη του κλώνου *Lon1-withG pGEM* [5] με SmaI/SacI και κλωνοποίηση στο pGPTV 35S. Κλώνος: *Lon1-withG Pgptv*

**Εκκινητές:**

- [Met-YFP-For-B]: 5' – AA ACGCGT CCACC ATGGGAGGTGGAGCTGTG – '3 73.46 (53.3)
- [YFP-Lon-Rev]: 5' - A ACGCGT GGCCCCAGCGGCCGCAGCAGC - '3 78.29
- [Alba-For]: 5' - CCACCATGATGATGGCGCTTACTCAAC – '3 66.5 (55.8)
- [Alb-Rev (L)]: 5' –A ACGCGT AGCCAATTTATCAGAGATCTC – '3 62.1 (53.96)
- [Alba-For-L]: 5' –A ACGCGT AAGCTCCAGAAGCTACTAATG – '3 65.1 (55.91)
- [Alba-For-L2]: 5' – AA ACGCGT ATGATGATGGCGCTTACT – '3 62.22 (51.41)
- [Alb-Rev]: 5' – A GCGGCCGCATCACTCTTACTACCAGGA– '3 69.49 (55.25)
- [NLS-Kpn-For]: 5' – A GGTACC GCTGGAGGCCACACTTGGTGAT – '3 73.46 (58.24)
- [NLS-Kpn-Rev]: 5' – A GGTACC TCCAGCTCCAATTCTCTTTCCTTCTTGAAT – '3 69.46 (50.06)
- [Alb-trunc-XhoI]: 5' – CCTCGAGAAAACAATGGTACTGAAGCAGAACAGAGTTC – '3 69.46 (50.06)
- [U19013-For]: 5' - AA TCTAGA CCACCATGTTAAAGCTCTTCACTTC - '3 65.75 (61.64)
- [LoncDNA-For]: 5' - A TCTAGA CCACC ATGAAGGGCTTTGATACTAATC - 3' 67.07 (54.38)

[LoncDNA-In-Rev]: 5' - GAAGAAAGCACGATGACCCAACGAAGTAG - '3 66.67

[LonWT-For]: 5' - A TCTAGA GGGTTT ATGAAGGGCTTTGATACTAATC - '3 66.4

[Lon1withG-For]: 5' - A CCCGGG AAG AAG GGC TTT GAT ACT AAT CT - '3 55.3

[LoncDNA-Rev]: 5' - GACAAAAGGTCAACGTGGCAATACACA - '3 63.44

## 2.25 Προγράμματα νευρωνικών δικτύων πρόβλεψης τοποθέτησης πρωτεϊνών

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

Predotar: <http://urgi.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>

BaCello: <http://gpcr.biocomp.unibo.it/bacello/>

SubLoc: [www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/](http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/)

Cello: <http://cello.life.nctu.edu.tw/>

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

NUC-PLoc: <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Nuc-PLoc/>

Y-Loc: <http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/YLoc/webloc.cgi>

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

## 2.25 Προγράμματα Βιοπληροφορικής

<http://www.oxfordjournals.org/nar/database/c>

<http://www.seedgenes.org>

<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://jsp.weigelworld.org/expviz/expviz.jsp>

<http://atted.jp/>

<http://www.ebi.ac.uk/microarray-as/ae/>

<http://aranet.mpimp-golm.mpg.de/>

<http://www.jgi.doe.gov/>

<http://www.1001genomes.org>

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

<http://mpss.udel.edu>

<http://www.plantgdb.org/AtGDB>

<http://mips.helmholtz-muenchen.de/plant/genomes.jsp>

<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/>

<http://mfold.burnet.edu.au/>



# Αποτελέσματα



“Συστήματα μοριακών μηχανισμών  
ανάπτυξης στα φυτά”

ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ ΔΑΡΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝ. ΑΘΗΝΩΝ  
2011

### 3. Αποτελέσματα

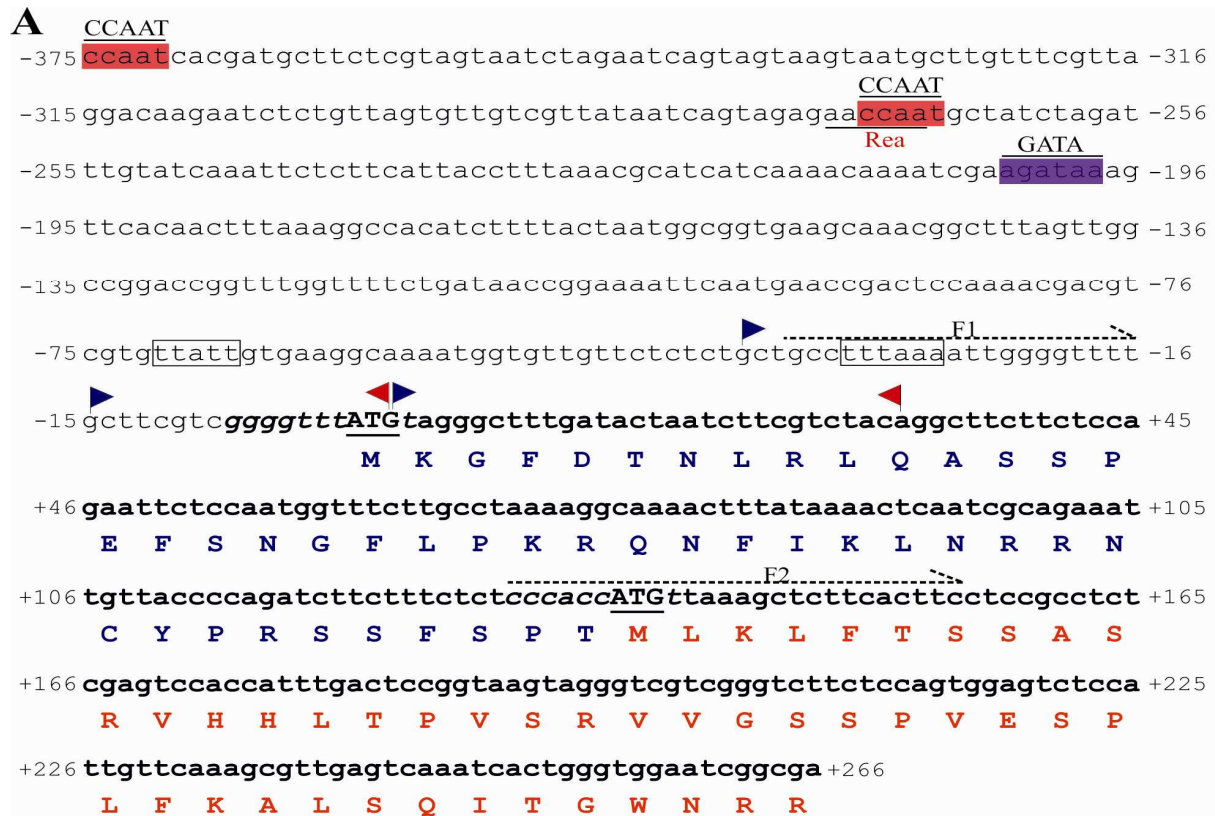
**3.a Η πολυπλοκότητα της *AtLon1* πρωτεΐσης στη δυαδική τοποθέτησή της στους χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια με τη διαφορική χρήση δύο κωδικονίων έναρξης της μετάφρασης στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο**

**3.a.1 Το γονίδιο *AtLon1* παρουσιάζει εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης εξαιτίας δύο κωδικονίων έναρξης της μετάφρασης στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο**

Η εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης εξαιτίας δύο κωδικονίων έναρξης στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο έχει αναφερθεί ως σημαντικός μηχανισμός μετά-μεταγραφικής ρύθμισης στους ευκαρυώτες, προκειμένου να δημιουργηθούν πρωτεϊνικές ισομορφές οι οποίες τοποθετούνται σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα παρόλο που κωδικοποιούνται από το ίδιο μεταγράφημα (Danpure, 1995; Silva-Filho, 2003; Carrie *et al.*, 2009a).

Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής N-τελικής περιοχής του γονιδίου *Lon1* αποκάλυψε την παρουσία δύο κωδικονίων έναρξης στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο (Εικόνα 1A). Βιοπληροφορική ανάλυση που βασίστηκε στην εφαρμογή προγραμμάτων νευρωνικών δικτύων προέβλεψε ότι το *Lon1* έχει δύο πεπτίδια-συνθήματος διαδοχικά τοποθετημένα. Το πρώτο πεπτίδιο-συνθήματος αποτελείται από 45 αμινοξέα και οδηγεί την πρωτεΐνη στο χλωροπλάστη, ενώ το δεύτερο πεπτίδιο-συνθήματος περιέχει αμινοξική ακολουθία το οποίο οδηγεί την πρωτεΐνη στο μιτοχόνδριο (Εικόνα 1B). Η παραπάνω διαμόρφωση κατά την οποία δύο ξεχωριστά πεπτίδια-συνθήματος, στη συγκεκριμένη περίπτωση το πρώτο για το χλωροπλάστη και το δεύτερο για το μιτοχόνδριο, βρίσκονται τοποθετημένα στη σειρά στην N-τελική περιοχή μιας πρωτεΐνης χαρακτηρίζεται ως δυαδική ακολουθία οδηγών-συνθήματος (*twinn presequences*) και συμβάλλουν στη σύνθεση δύο ανεξάρτητων ισομορφών με εκλεκτική τοποθέτηση το καθένα σε ένα υποκυτταρικό διαμέρισμα (Peeters and Small, 2001; Mackenzie, 2005).

Προκειμένου να εξεταστούν οι παραπάνω προβλέψεις βιοπληροφορικής ανάλυσης, δημιουργήθηκαν μια σειρά κατασκευών με παραλλαγές του N-τελικού άκρου του γονιδίου *AtLon1* σε σύντηξη με το γονίδιο φθορισμού *YFP* (*Yellow Fluorescent Protein*). Οι κατασκευές αυτές αναλύθηκαν *in vivo* μέσω μικροσκοπίας φθορισμού (Εικόνα 1C). Γενικότερα το γονίδιο *YFP* συνηθίζεται να χρησιμοποιείται ως δείκτης σε πειράματα υποκυτταρικής τοποθέτησης, αφού δίδει ικανοποιητικά και αποδεκτά αποτελέσματα απεικόνισης της τοποθέτησης της πρωτεΐνης που μελετάται, με πολύ ελάχιστες περιπτώσεις λάθους σε σύγκριση με άλλες πειραματικές μεθόδους (Kojak, 2005; Mackenzie, 2005), όπως είναι η *in vitro* μεταγραφή-μετάφραση και εισαγωγή σε οργανίδια (*in vitro transcription-translation and organellar import assays*).



**B**

a.a	Chloroplast	Mitochondrion	Prediction Program
[1-45]	8	—	PSORT
	0.01	—	PREDOTAR
	0.401	0.285	TARGETP
	0.497		ChloroP
		0.0184	MitoProt
[46-90]	2	3	PSORT
	—	0.70	PREDOTAR
	0.245	0.684	TARGETP
	0.503		ChloroP
		0.4890	MitoProt

**C**



**Εικόνα 1. Το γονίδιο του φυτού *Arabidopsis* που κωδικοποιεί τη πρωτεάση Lon1 έχει δύο κωδικόνια έναρξης στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο**

(A) Η νουκλεοτιδική ακολουθία του N-τελικού τμήματος που περιέχει τα κωδικόνια έναρξης παρουσιάζεται με πλάγια γράμματα (*italics*), τα κωδικόνια AUGs είναι υπογραμμισμένα. Οι δυαδικές ακολουθίες για το χλωροπλάστη και το μιτοχόνδριο έχουν χρωματισθεί με μπλέ και κόκκινο χρώμα αντίστοιχα. Τα στοιχεία TATA εσωκλείονται σε κουτιά, ενώ οι *cis*-ακολουθίες μεταγραφικής ρύθμισης CCAAT, REa και GATA είναι υπογραμμισμένες. Οι κόκκινες σημαίες αντιπροσωπεύουν τους κλώνους EST, ενώ οι μπλε σημαίες απεικονίζουν τα 5'-άκρα του *Lon1* cDNA που βρέθηκαν πειραματικά. Τα F1 και F2 υποδεικνύουν τη θέση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση της έκφρασης.

(B) Αποτελέσματα πρόβλεψης υποκυτταρικής τοποθέτησης της πρωτεΐνης Lon1 με βάση βιοπληροφορική ανάλυση. Τα πρώτα 45 αμινοξέα αποτελούν το πεπτίδιο-συνθήματος για στόχευση στο χλωροπλάστη, ενώ τα αμινοξέα 46-90 αντιστοιχούν στο πεπτίδιο-συνθήματος για στόχευση στα μιτοχόνδρια.

(C) Σχηματική περιγραφή των κατασκευών του γονιδίου *Lon1* σε σύντηξη με το γονίδιο αναφοράς *YFP* που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα *in vivo* κυτταρικής απεικόνισης. Στα κουτιά εσωκλείονται οι νουκλεοτιδικές τροποποιήσεις κάθε κατασκευής.

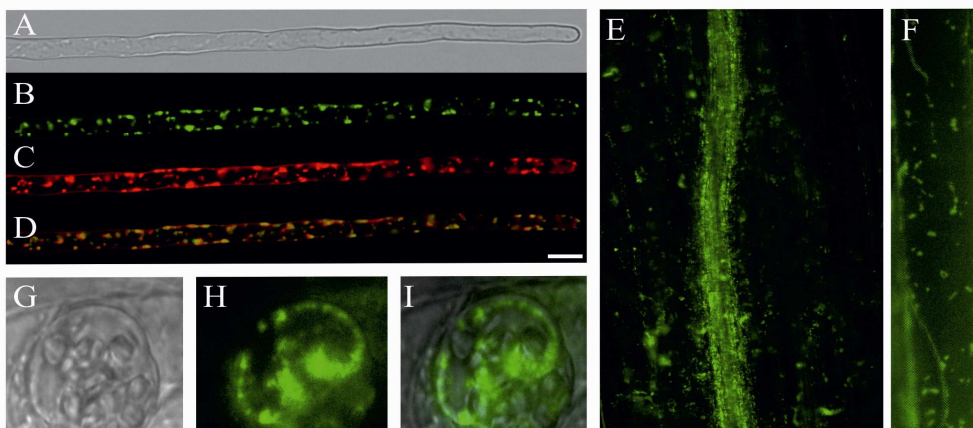
Με βάση αυτό τον πειραματικό σχεδιασμό πραγματοποιήθηκε σύντηξη του *YFP* πριν την AAA<sup>+</sup> περιοχή του *Lon1* cDNA. Οι παραλλαγές του 5'-άκρου του *Lon1* που σχεδιάστηκαν περιγράφονται στην συνέχεια. Η κατασκευή **Lon1S-YFP** αντιστοιχεί σε έλλειψη των πρώτων 45 αμινοξέων με αποτέλεσμα να διατηρείται μόνο η περιοχή που περιλαμβάνει το δεύτερο κωδικόνιο έναρξης AUG. Στην κατασκευή **Lon1LS-YFP** περιλαμβάνεται ολόκληρη η ακολουθία οδηγός χωρίς καμιά μεταβολή. Η κατασκευή **Lon1SS-YFP** περιέχει όλη την ακολουθία του γονιδίου *Lon1* με τη διαφορά ότι η νουκλεοτιδική ακολουθία στο πρώτο κωδικόνιο έναρξης έχει αλλάξει και έχει αντικατασταθεί με αυτή του δεύτερου κωδικονίου έναρξης. Η κατασκευή **Lon1[ΔL]S-YFP** περιέχει την N-τελική ακολουθία, με τη διαφορά ότι η θυμίνη και η γουανίνη του 1<sup>ο</sup> AUG έχουν τροποποιηθεί σχηματίζοντας τα νουκλεοτίδια AAA, τα οποία δεν αποτελούν κωδικόνιο έναρξης. Ο έλεγχος της έκφρασης των παραπάνω κατασκευών πραγματοποιήθηκε από τον καθολικά εκφραζόμενο προαγωγέα *CaMV35S* (35S **C**auliflower **M**osaic **V**irus).

Προκειμένου να μην υπάρξουν παραπλανητικά αποτελέσματα εξαιτίας της εφαρμογής της τεχνολογίας μικροσκοπίας φθορισμού, εφαρμόστηκαν επιπρόσθετοι τεχνικοί παράμετροι (Carrie *et al.*, 2009b). Η *in vivo* απεικονιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε όχι σε έναν αλλά σε διάφορους ιστούς ή κυτταρικούς τύπους περιλαμβάνοντας κύτταρα ριζικών τριχιδίων, στόματα, κύτταρα υποκοτυλίων που έχουν αναπτυχθεί στο σκοτάδι και επιδερμικά κύτταρα φύλλων. Η ανάλυση έγινε τόσο σε σταθερά μετασχηματισμένα φυτά *Arabidopsis thaliana*, καθώς και με πειράματα *in planta* παροδικής έκφρασης σε επιδερμικά κύτταρα φύλλων καπνού (*Nicotiana benthamiana*). Η εφαρμογή των παραπάνω παραμέτρων εξαλείφει τη πιθανότητα εξαγωγής λανθασμένων συμπερασμάτων.

Σε συμφωνία με τα δεδομένα που προέκυψαν από την *in silico* ανάλυση, η έκφραση της γονιδιακής κατασκευής **Lon1S-YFP** έδειξε τοποθέτηση της πρωτεΐνης Lon1 στα μιτοχόνδρια (Εικόνα 2). Η έκφραση της κατασκευής **Lon1LS-YFP** έδειξε ότι η πρωτεΐνη τοποθετείται ταυτόχρονα στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες (Εικόνα 3). Αυτή η διπλή στόχευση της πρωτεΐνης, υποδηλώνει ότι δύο διαφορετικές isoμορφές της ίδιας πρωτεΐνης προκύπτουν από εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης, εξαιτίας της παρουσίας δύο λειτουργικών κωδικονίων έναρξης στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου *Lon1*. Έτσι, η

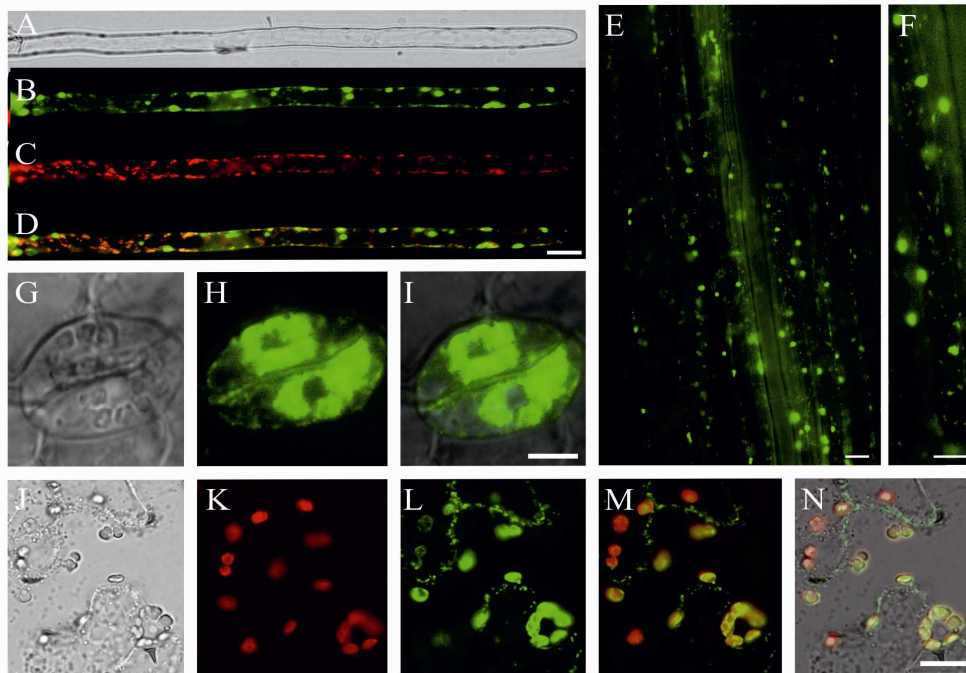


μεγαλύτερη ισομορφή της πρωτεΐνης *Lon1* τοποθετείται στον χλωροπλάστη, χαρακτηρίζεται ως *Lon1L* (Long) και ξεκινά από το πρώτο AUG (1<sup>st</sup> Met). Η μικρότερη ισομορφή που χαρακτηρίζεται ως *Lon1S* (Short) τοποθετείται στο μιτοχόνδριο και η σύνθεση της ξεκινά από το δεύτερο AUG στο αμινοξύ +46. Επίσης, η αλλαγή της νουκλεοτιδικής ακολουθίας στη περιοχή του πρώτου AUG από την νουκλεοτιδική ακολουθία του δεύτερου AUG στην κατασκευή **Lon1SS-YFP**, οδήγησε την πρωτεΐνη όχι στα μιτοχόνδρια αλλά στους χλωροπλάστες στα πράσινα τμήματα του φυτού και στα πλαστίδια στη ρίζα (Εικόνα 4). Το πρότυπο αυτό της υποκυτταρικής τοποθέτησης υποδεικνύει ότι η περιοχή που περικλείει το πρώτο AUG, έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης, μέσω του μηχανισμού ολίσθησης του ριβοσώματος κατά τη σάρωση του μεταγραφώματος (leaky ribosome scanning mechanism). Επιπρόσθετα, η κατασκευή **Lon1SS-YFP** υποστηρίζει την εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης στα δύο κωδικόνια έναρξης του ίδιου αναγνωστικού πλαισίου από το ίδιο *Lon1* μεταγράφημα. Η κατασκευή **Lon1[ΔL]S-YFP** έγινε για να εξεταστεί το ενδεχόμενο εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης από μη τυπικό κωδικόνιο έναρξης, όπως είναι τα κωδικόνια CUG, ACG ή GUG τα οποία έχουν πιστοποιηθεί ότι μπορούν να προκαλέσουν έναρξη της μετάφρασης ιδιαίτερα σε γονίδια προκαρυωτικής προέλευσης (Kojak, 2005). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πρωτεΐνη τοποθετείται εκλεκτικά στα μιτοχόνδρια γεγονός που αποκλείει την έναρξη σύνθεσης της ισομορφής που στοχεύει στον χλωροπλάστη από άλλο κωδικόνιο έναρξης εκτός του πρώτου AUG (Εικόνα 5). Ερμηνεύοντας τα παραπάνω αποτελέσματα καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η νουκλεοτιδική ακολουθία της περιοχής που περιλαμβάνει το πρώτο κωδικόνιο έναρξης AUG είναι σημαντική για την εναλλακτική έναρξης της μετάφρασης έτσι, ώστε να παραχθεί η ισομορφή *Lon1L* που στοχεύει στον χλωροπλάστη ταυτόχρονα με την ισομορφή *Lon1S* που στοχεύει στο μιτοχόνδριο από το ίδιο *Lon1* mRNA.



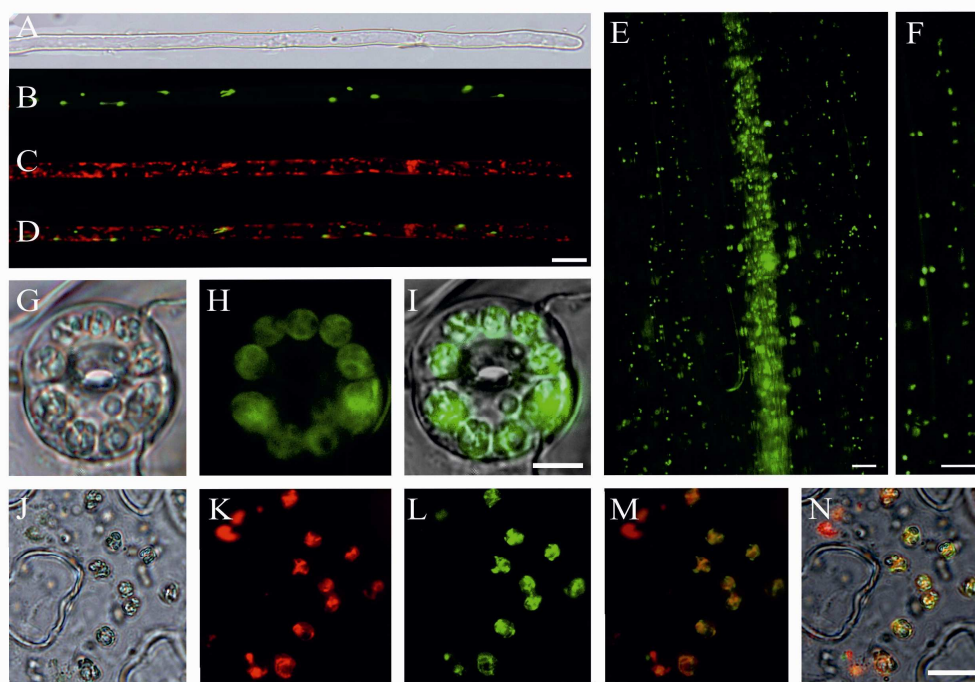
**Εικόνα 2. Η τοποθέτηση στα μιτοχόνδρια οφείλεται στη περιοχή του N-τελικού άκρου της κατασκευής Lon1S-YFP**

Απεικόνιση ριζικών τριχιδίων (A-D), κυττάρων υποκοτυλίου φυτών που αναπτύχθηκαν στο σκοτάδι (E-F) και κυττάρων από στομάτια (G-I) από σταθερώς μετασχηματισμένα φυτά *Arabidopsis thaliana*. Οι εικόνες (J-N) απεικονίζουν την *in planta* παροδική έκφραση σε επιδερμικά κύτταρα φύλλου καπνού. Οι φωτογραφίες (A, G και J) είναι από φακό οπτικού τύπου Nomarsky, οι φωτογραφίες (B, E, F, H και L) πάρθηκαν με φίλτρο για καταγραφή της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης, στη φωτογραφία (C) απεικονίζεται η εξειδικευμένη χρώση των μιτοχονδρίων με τη φθορίζουσα χρωστική MitoTracker και στη (D) ο αυτοφθορισμός της χλωροφύλλης στο φίλτρο ροδαμίνης. Οι εικόνες (D) και (M) είναι από τη μίξη του πράσινου και κόκκινου φθορισμού για τα ριζικά και επιδερμικά κύτταρα καπνού αντίστοιχα. Οι εικόνες (I) και (N) προέρχονται από τη μίξη των εικόνων (G, H) και (J, M), αντίστοιχα. Κλίμακα: 10μm.



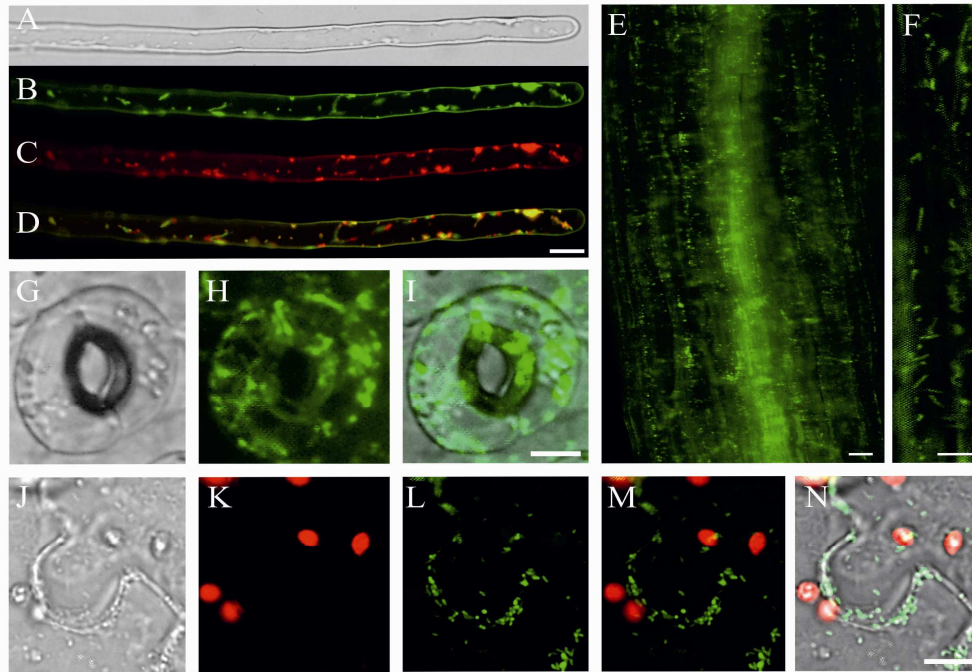
**Εικόνα 3. Η κατασκευή Lon1LS-YFP τοποθετείται ταυτόχρονα στα μιτοχόνδρια και τα πλαστίδια**

Απεικόνιση ριζικών τριχιδίων (A-D), κυττάρων υποκοτυλίου φυτών που αναπτύχθηκαν στο σκοτάδι (E-F) και κυττάρων από στομάτια (G-I) από σταθερώς μετασηματισμένα φυτά *Arabidopsis thaliana*. Οι εικόνες (J-N) απεικονίζουν την *in planta* παροδική έκφραση σε επιδερμικά κύτταρα φύλλου καπνού. Οι φωτογραφίες (A, G και J) είναι από φακό οπτικού τύπου Nomarsky, οι φωτογραφίες (B, E, F, H και L) πάρθηκαν με φίλτρο για καταγραφή της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης, στη φωτογραφία (C) απεικονίζεται η εξειδικευμένη χρώση των μιτοχονδρίων με τη φθορίζουσα χρωστική MitoTracker και στη (D) ο αυτοφθορισμός της χλωροφύλλης στο φίλτρο ροδαμίνης. Οι εικόνες (D) και (M) είναι από τη μίξη του πράσινου και κόκκινου φθορισμού για τα ριζικά και επιδερμικά κύτταρα καπνού αντίστοιχα. Οι εικόνες (I) και (N) προέρχονται από τη μίξη των εικόνων (G, H) και (J, M), αντίστοιχα. Κλίμακα: 10μm.



**Εικόνα 4.** Η νουκλεοτιδική ακολουθία που περικλείει το δεύτερο AUG συνθέτει το ισχυρό κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης με αποτέλεσμα την αποκλειστική τοποθέτηση της κατασκευής Lon1SS-YFP στα πλαστίδια

Απεικόνιση ριζικών τριχιδίων (A-D), κυττάρων υποκοτυλίου φυτών που αναπτύχθηκαν στο σκοτάδι (E-F) και κυττάρων από στομάτια (G-I) από σταθερώς μετασχηματισμένα φυτά *Arabidopsis thaliana*. Οι εικόνες (J-N) απεικονίζουν την *in planta* παροδική έκφραση σε επιδερμικά κύτταρα φύλλου καπνού. Οι φωτογραφίες (A, G και J) είναι από φακό οπτικού τύπου Nomarsky, οι φωτογραφίες (B, E, F, H και L) πάρθηκαν με φίλτρο για καταγραφή της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης, στη φωτογραφία (C) απεικονίζεται η εξειδικευμένη χρώση των μιτοχονδρίων με τη φθορίζουσα χρωστική MitoTracker και στη (D) ο αυτοφθορισμός της χλωροφύλλης στο φίλτρο ροδαμίνης. Οι εικόνες (D) και (M) είναι από τη μίξη του πράσινου και κόκκινου φθορισμού για τα ριζικά και επιδερμικά κύτταρα καπνού αντίστοιχα. Οι εικόνες (I) και (N) προέρχονται από τη μίξη των εικόνων (G, H) και (J, M), αντίστοιχα. Κλίμακα: 10μm.



**Εικόνα 5.** Η κατασκευή Lon1[ΔL]S-YFP αποδεικνύει ότι η τοποθέτηση στα πλαστίδια οφείλεται αποκλειστικά στο πρώτο κωδικόνιο AUG και όχι σε κωδικόνια τύπου μη-AUG που εντοπίζονται στα πρώτα 45 αμινοξέα του N-τελικού τμήματος της πρωτεΐνης

Απεικόνιση ριζικών τριχιδίων (A-D), κυττάρων υποκοτυλίου φυτών που αναπτύχθηκαν στο σκοτάδι (E-F) και κυττάρων από στομάτια (G-I) από σταθερώς μετασηματισμένα φυτά *Arabidopsis thaliana*. Οι εικόνες (J-N) απεικονίζουν την *in planta* παροδική έκφραση σε επιδερμικά κύτταρα φύλλου καπνού. Οι φωτογραφίες (A, G και J) είναι από φακό οπτικού τύπου Nomarsky, οι φωτογραφίες (B, E, F, H και L) πάρθηκαν με φίλτρο για καταγραφή της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης, στη φωτογραφία (C) απεικονίζεται η εξειδικευμένη χρώση των μιτοχονδρίων με τη φθορίζουσα χρωστική MitoTracker και στη (D) ο αυτοφθορισμός της χλωροφύλλης στο φίλτρο ροδαμίνης. Οι εικόνες (D) και (M) είναι από τη μίξη του πράσινου και κόκκινου φθορισμού για τα ριζικά και επιδερμικά κύτταρα καπνού αντίστοιχα. Οι εικόνες (I) και (N) προέρχονται από τη μίξη των εικόνων (G, H) και (J, M), αντίστοιχα. Κλίμακα: 10μm.

### 3.a.2 Διαφορική επιλογή θέσεων έναρξης της μεταγραφής

Η διπλή στόχευση της Lon1 πρωτεΐνης στους χλωροπλάστες και στα μιτοχόνδρια, εξαιτίας της εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης, βασίζεται στην παρουσία δύο

κωδικονίων έναρξης στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου. Συνεπώς, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η μεταγραφή του γονιδίου *Lon1* να οδηγεί σε μεταγράφημα που θα περιλαμβάνει τα δύο αυτά κωδικόνια έναρξης στη σειρά. Αρχικά πραγματοποιήθηκε αναζήτηση σε βάσεις κατοχύρωσης πειραματικών δεδομένων του φυτού *Arabidopsis thaliana* για cDNA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; <http://www.arabidopsis.org/>). Η αναζήτηση αποκάλυψε την ύπαρξη τουλάχιστον τριών ESTs (Expressed Sequences Tags) (Εικόνα 1Α). Δύο από αυτούς τους κλώνους, οι BP813894 και BP826885, με αριθμούς καταχώρησης no.RAFL22-34-A02 και no.RAFL22-73-L03 αντίστοιχα, έχουν το πιο επεκτεινόμενο 5'-άκρο στη θέση +3 αναφορικά του πρώτου κωδικονίου έναρξης AUG, ενώ ο τρίτος κλώνος BP561906 με αριθμό RAFL09-31-C19 φθάνει μέχρι τη θέση +32. Ωστόσο, κατά την αναζήτηση δεν βρέθηκε κλώνος που να περιλαμβάνει 5'-μη μεταφραζόμενη περιοχή, η οποία να περιέχει τα δύο κωδικόνια έναρξης.

Η έλλειψη καταχώρησης ακολουθιών ESTs θα μπορούσε να αποδοθεί στην πολύ χαμηλή έκφραση του γονιδίου ή και στην ισχυρή δευτεροταγή δομή του *Lon1* mRNA που ενδεχομένως δημιουργείται στο 5'-άκρο, η οποία αποτελεί περιοριστικό παράγοντα της σύνθεσης sscDNA που αντιστοιχεί σε ολόκληρο το μήκος του μεταγραφήματος. Για τους λόγους αυτούς εφαρμόστηκε η τεχνική σύνθεσης sscDNA και 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) εφαρμόζοντας την τεχνολογία SMART RACE ενίσχυσης cDNA (βλέπε ενότητα Υλικά και Μέθοδοι).

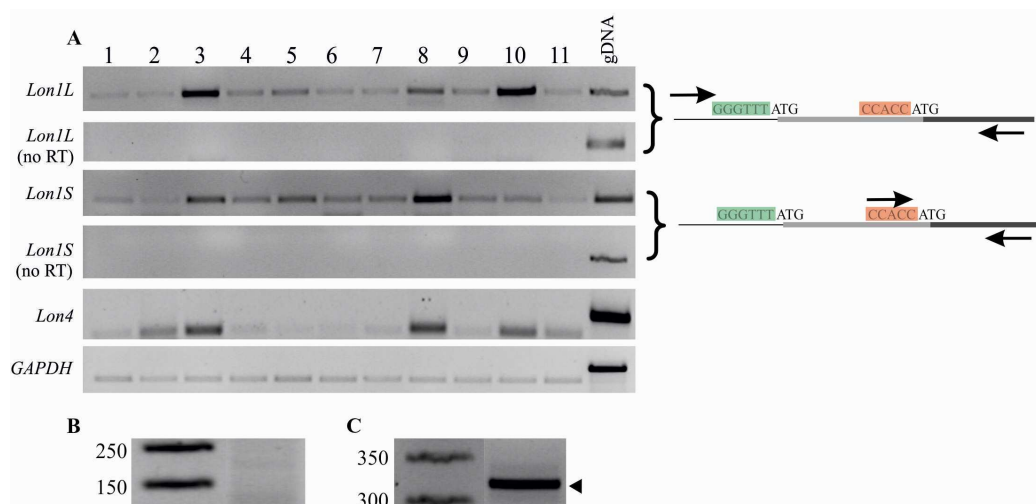
Αρχικά ολικό RNA απομονώθηκε από διάφορα αναπτυξιακά στάδια και φυτικά όργανα του φυτού καθώς και από σπορόφυτα που αναπτύχθηκαν σε διάφορες συνθήκες καταπόνησης προκειμένου να αυξηθεί η αντιπροσώπευση στο δείγμα των σπάνιων μεταγραφημάτων του γονιδίου *Lon1* για να γίνει στη συνέχεια δυνατή η απομόνωσή τους. Σκοπός ήταν να πραγματοποιηθεί συγκριτική μελέτη μεταξύ της έκφρασης του μεταγραφήματος *Lon1L* σε σχέση με το μεταγράφημα *Lon1S*. Παρόλο που στην ανάλυση κάθε δείγματος ο ανάστροφος εκκινητής ήταν κοινός, σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί πρόσθιοι εκκινητές ενίσχυσης για κάθε περίπτωση. Για τη μελέτη του μεταγραφήματος *Lon1L* επιδέχθηκε ο πρόσθιος εκκινητής F1 που υβριδίζει στην 5'-μη μεταφραζόμενη περιοχή πριν το 1<sup>ο</sup> AUG, ενώ για τη μελέτη του μεταγραφήματος *Lon1S* χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής F2 που υβριδίζει εκλεκτικά στην νουκλεοτιδική περιοχή του 2<sup>ου</sup> AUG (Εικόνα 6Α, Πίνακας Α2-Παράρτημα). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης που παρουσιάζονται στην Εικόνα 6Α έδειξαν ότι το μεταγράφημα *Lon1L* ανιχνεύεται σε δείγματα RNA που απομονώθηκαν από συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο και ειδικές συνθήκες καταπόνησης. Συγκεκριμένα, το μεταγράφημα *Lon1L* εντοπίζεται σε υψηλά επίπεδα έκφρασης στα φύλλα και σε νεαρά σπορόφυτα που αρχικά βλάστησαν στο φως αλλά στη συνέχεια αναπτύχθηκαν για 3 ημέρες στο σκοτάδι.

Συνεπώς, σε αυτές τις συνθήκες φαίνεται ότι η πρωτεΐνη *Lon1* τοποθετείται ταυτόχρονα στους χλωροπλάστες και στα μιτοχόνδρια εξαιτίας της ύπαρξης στο μεταγράφημα *Lon1L* των δύο κωδικονίων που καθορίζουν εναλλακτική έναρξη της μεταγραφής. Σε αντίθεση με το *Lon1L*, το μεταγράφημα *Lon1S*, που κωδικοποιεί τη μιτοχονδριακή ισομορφή, εμφανίζεται να είναι κυρίαρχο σε σειρά συνδυασμένων συνθηκών καταπόνησης που προσομοιάζουν συνθήκες υποξίας. Συγκεκριμένα, το μεταγράφημα *Lon1S* υπερτερεί όταν νεαρά σπορόφυτα αναπτυχθούν σε υγρή καλλιέργεια, χωρίς ανάδευση και σε συνθήκες θερμοκαταπόνησης 37°C. Εκτός από την ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου *Lon1*, εξετάστηκε και η έκφραση του γονιδίου *Lon4* στις ίδιες συνθήκες. Σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές (Sinvan-Villalobo *et al.*, 2004), αλλά και με τις βάσεις δεδομένων



μικροσυστοιχιών, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Lon4* είναι πολύ χαμηλότερα συγκριτικά με αυτά του γονιδίου *Lon1*.

Έκπληξη προκάλεσε όμως η παρατήρηση ότι το πρότυπο επαγωγής της έκφρασης του γονιδίου *Lon4* σε συγκεκριμένες συνθήκες ταυτίζεται με εκείνο που προκύπτει όταν αθροιστεί η έκφραση των *Lon1S* και *Lon1L* μαζί. Αυτή η παρατήρηση αποτελεί ένδειξη ότι η απόκριση της έκφρασης των γονιδίων *Lon1* και *Lon4* είναι κοινή στις ίδιες συνθήκες που σχετίζονται με περιβαλλοντική καταπόνηση ή το αναπτυξιακό στάδιο ενός ιστού. Αξίζει στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η πρωτεΐνη Lon4 παρουσιάζει δυαδική τοποθέτηση στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες εξαιτίας N-τελικού πεπτιδίου-συνθήματος που αναγνωρίζεται από τους υποδοχείς του μηχανισμού εισόδου πρωτεϊνών και των δυο οργανιδίων (ambiguous presequence; Sakamoto, 2006; Ostersetzer *et al.*, 2007). Συνεπώς, τα παραπάνω αποτελέσματα συνηγορούν στο ότι υπάρχει ένα πολύπλοκος και εξελιγμένος μηχανισμός, που ορίζει την επιλογή θέσης έναρξης της μεταγραφής για το γονίδιο *Lon1* ώστε στη συνέχεια με εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης να κωδικοποιηθούν δυο ισομορφές με διαφορεική στόχευση στα φυτικά οργανίδια. Επιπλέον, φαίνεται ότι τα γονίδια *Lon1* και *Lon4* προέκυψαν από πρόσφατο γεγονός διπλασιασμού αλλά κατά τη διάρκεια της εξέλιξης ανέπτυξαν διαφορετικούς μηχανισμούς δυαδικής στόχευσης στα φυτικά οργανίδια.



**Εικόνα 6. Η εναλλακτική επιλογή της αρχής της μεταγραφής του *AtLon1* γονιδίου καθορίζεται από τον τύπο του ιστού και την απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης**

(A) Συγκριτική ανάλυση της έκφρασης των μεταγραφημάτων *Lon1L*, *Lon1S* και *Lon4* μέσω ημιποσοτικού RT-PCR με εξειδικευμένους εκκινητές που αναφέρονται στον Πίνακα A2-Παράρτημα. Τα δείγματα RNA απομονώθηκαν από:

(1) 7-ημερών σπορόφυτα, (2) βλαστούς, (3) φύλλα ροζέτας, (4) άνθη, (5) κοτυληδόνες, (6) πρωτογενείς ρίζες, (7) σπορόφυτα που αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια στους 22°C χωρίς ανάδευση για 2 ημέρες, (8) σπορόφυτα που αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια στους 37°C χωρίς ανάδευση στο σκοτάδι, (9) σπορόφυτα που αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια στους 22°C με 10μg/ml χλωραμφενικόλη, (10) σπορόφυτα που αναπτύχθηκαν στους 22°C στο σκοτάδι και, (11) σπορόφυτα που αναπτύχθηκαν σε στερεή καλλιέργεια στους 22°C και ακτινοβολήθηκαν με UV. Το γονίδιο GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των δειγμάτων, ενώ το προϊόν PCR από ενίσχυση γονιδιωματικού DNA υποδεικνύεται ως gDNA. Προκειμένου να εξεταστεί το ενδεχόμενο επιμόλυνσης από γονιδιωματικό DNA πραγματοποιήθηκε ενίσχυση PCR χωρίς το δείγμα RNA να έχει μεταγραφθεί. Επίσης παρουσιάζονται ως βέλη οι θέσεις των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση PCR για το κάθε μεταγράφημα.

Τα προϊόντα των 5'-άκρων του *Lon1L* (B) και *Lon1S* (C) αναλύθηκαν σε πηκτή 3% αγαρόζης. Για την ανάλυση του *Lon1L*, απομονώθηκε RNA από σπορόφυτα που αναπτύχθηκαν πρώτα σε κανονική φωτοπερίοδο 16h/8h και στη συνέχεια στο απόλυτο σκοτάδι για 2 ημέρες, ενώ για την ανάλυση του *Lon1S* απομονώθηκε RNA από σπορόφυτα που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες προσομοίωσης υποξίας. Τα βέλη υποδεικνύουν τις ζώνες που κατόπιν αλληλούχισης, αντιστοιχούν στα 5'-άκρα των *Lon1L* και *Lon1S*.

Με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα προκειμένου να προσδιορισθεί η αρχή έναρξης της μεταγραφής για τη σύνθεση του μεταγραφήματος *Lon1L* ολικό RNA απομονώθηκε από σπορόφυτα που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες έλλειψης φωτός. Η εφαρμογή της μεθόδου 5'-RACE (**R**apid **A**mplification of **c**DNA **e**nds) βάση της τεχνολογίας SMART είχε ως αποτέλεσμα να ενισχυθούν με αντίδραση PCR τρία κύρια προϊόντα μεγέθους περίπου 75, 85 και 100bp (Εικόνα 6B). Η αλληλούχισή τους αποκάλυψε ότι δυο



προϊόντα εκτείνονται πριν του πρώτου κωδικονίου έναρξης της μετάφρασης. Συγκεκριμένα, το προϊόν 100bp αντιστοιχεί στη θέση -38 από το 1<sup>ο</sup> AUG, ενώ το προϊόν των 75bp στη θέση -13 (Εικόνα 1Α). Σε αντίθεση με τα προηγούμενα προϊόντα η αλληλούχηση του προϊόντος μεγέθους 85bp έδειξε ότι το προϊόν αυτό προέκυψε από υβριδισμό του ανάστροφου εκκινήτη R1 στη θέση 197bp από το πρώτο AUG εξαιτίας της υψηλής ομολογίας των βάσεων DNA του ολιγονουκλεοτιδίου με την νουκλεοτιδική ακολουθία αυτής της περιοχής. Η ίδια πειραματική διαδικασία εφαρμόστηκε για την εύρεση του 5'-άκρου του μεταγραφήματος *Lon1S* με τη διαφορά ότι ολικό RNA για την ανάλυση, απομονώθηκε από φυτά που αναπτύχθηκαν στη συνθήκη που παρομοιάζει κατάσταση υποξίας. Στην περίπτωση αυτή, η αλληλούχηση του προϊόντος ενίσχυσης PCR μεγέθους 320bp αποκάλυψε ότι το μεταγράφημα ξεκινά από τη θέση +3 ως προς τη θέση του πρώτου κωδικονίου έναρξης. Σε συμφωνία με αυτό το αποτέλεσμα ίδια θέση έναρξης της μεταγραφής εντοπίστηκε σε κλώνους ESTs BP813894 και BP826885 του γονιδίου *Lon1* που έχουν κατοχυρωθεί στις βάσεις δεδομένων (Εικόνα 1Α). Περαιτέρω *in silico* ανάλυση οδήγησε στον εντοπισμό τμημάτων TATA 30bp ανωφορικά των δυο θέσεων έναρξης της μεταγραφής (TSS, Transcription Start Site) που εντοπίστηκαν πειραματικά (Εικόνα 1Α). Τα μοτίβα TATA βρίσκονται σε περιοχές πλούσιες σε Αδενίνη (A) και Θυμίνη (T) σε συμφωνία με το γενικό κανόνα που ορίζει ότι τα ρυθμιστικά μοτίβα TATA βρίσκονται κοντά στη θέση έναρξης της μεταγραφής σε περιοχές με υψηλό A/T περιεχόμενο.

### 3.a.3 Η Ν-τελική περιοχή του γονιδίου *Lon1* διατηρείται εξελικτικά μεταξύ των φυτικών οργανισμών

Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* η πρωτεΐνη *Lon1* τοποθετείται υποκυτταρικά ταυτόχρονα σε δυο οργανίδια, στο χλωροπλάστη και στο μιτοχόνδριο. Η υποκυτταρική αυτή τοποθέτηση οφείλεται στην εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης στα δυο κωδικόνια AUG που βρίσκονται στο Ν-τελικό άκρο κωδικοποιώντας για δυο ισομορφές. Η μεγάλη ισομορφή *Lon1L* περιλαμβάνει και τα δυο κωδικόνια και στοχεύει στον χλωροπλάστη, ενώ η μικρότερη ισομορφή *Lon1S* που φέρει αποκλειστικά το δεύτερο κωδικόνιο έναρξης στοχεύει στο μιτοχόνδριο. Η εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης βασίζεται στην νουκλεοτιδική ακολουθία που περιβάλλει το πρώτο AUG, η οποία επιτρέπει σε ορισμένες μικρές ριβοσωμικές υπομονάδες 40S που σαρώνουν το μεταγράφημα να ολισθήσουν για να αναγνωρίσουν στη συνέχεια το δεύτερο AUG, εξασφαλίζοντας με αυτόν το μηχανισμό τη σύνθεση των δυο ισομορφών. Φαίνεται ότι η διάταξη αυτή των νουκλεοτιδικών περιοχών των δυο κωδικονίων έναρξης, θα πρέπει να έχει διατηρηθεί κατά την εξέλιξη για να είναι δυνατή η δυαδική τοποθέτηση της πρωτεΐνης. Για αυτό πραγματοποιήθηκε αναζήτηση ακολουθιών στις βάσεις δεδομένων, προκειμένου να διευκρινιστεί η διευθέτηση στοιχείων που καθορίζουν την έναρξη της μετάφρασης στο Ν-τελικό άκρο γονιδίων *Lon* από διάφορους φυτικούς οργανισμούς.

Με βάση τη πολλαπλή ευθυγράμμιση ακολουθιών οι ομόλογες *Lon* πρωτεΐνες από διάφορους φυτικούς ταξινομήθηκαν σε τρεις κατηγορίες (Εικόνα 7Α, Πίνακας Α3-Παράρτημα). Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τις ομόλογες πρωτεΐνες των οποίων το Ν-τελικό άκρο φέρει δυο κωδικόνια έναρξης της μεταγραφής στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο όπως το γονίδιο *Lon1* του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Τα μέλη της κατηγορίας αυτής προέρχονται από τους οργανισμούς *Arabidopsis lyrata*, παπάγια (*Carica papaya*), λεύκα (*Populus trichocarpa*) και καφεόδενδρο (*Theobroma cacao*). Βιοπληροφορική ανάλυση των παραπάνω προέβλεψε ότι οι συγκεκριμένες ομόλογες πρωτεΐνες φέρουν δυο πεπτιδία-συνθήματος σε σειρά. Όπως στην περίπτωση της AtLon1 πρωτεΐνης, το πρώτο πεπτιδίο-

συνθήματος φαίνεται ότι σχετίζεται με την τοποθέτηση της πρωτεΐνης στο χλωροπλάστη και το δεύτερο στη σειρά στο μιτοχόνδριο. Στη δεύτερη κατηγορία ταξινομούνται τα ομόλογα *Lon* γονίδια που έχουν ένα πεπτιδίο-συνθήματος και ευθυγραμμίζονται με την N-τελική ακολουθία της πρωτεΐνης *Lon4* του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Τα μέλη της κατηγορίας αυτής εντοπίζονται στους οργανισμούς *Arabidopsis lyrata*, καλαμπόκι (*Zea mays*), βρώμη (*Brachypodium distachyon*) και ρύζι (*Oryza sativa*). Η τρίτη κατηγορία περιλαμβάνει τα ομόλογα των *Lon* πρωτεϊνών με μακρύ N-τελικό άκρο παρόμοιο σε μήκος με εκείνο των μελών της πρώτης κατηγορίας όμως με τη διαφορά ότι υπάρχει ελάχιστη ομολογία μεταξύ τους. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν ομόλογες *Lon* από τα διάτομα (*Thalassiosira pseudonana*), το ζυμομύκητα (*Saccharomyces cerevisiae*) και τα βρυόφυτα (*Selaginella*). Στο συγκεκριμένο μοντέλο ευθυγράμμισης επιλέχθηκε η πρωτεΐνη *Lon* του βακτηρίου *Escherichia coli* (*EcLon*), προκειμένου να οριοθετηθεί τη θέση των ακολουθιών του πεπτιδίου-συνθήματος των ομολόγων από ευκαρυωτικούς οργανισμούς, αφού ως προκαρυωτική πρωτεΐνη δεν διαθέτει τέτοια αμινοξική ακολουθία.

Επιπλέον, η πολλαπλή ευθυγράμμιση αποκάλυψε ότι σε συγκεκριμένους οργανισμούς εντοπίζονται δύο αντίγραφα γονιδίων *Lon* που πιθανόν να παρουσιάζουν δυαδική υποκυτταρική τοποθέτηση με τάση διαφορικής εξέλιξης μεταξύ τους όσον αφορά στον μηχανισμό της υποκυτταρικής στόχευσης. Συγκεκριμένα, φυτικοί οργανισμοί όπως το *Arabidopsis thaliana*, το *Arabidopsis lyrata* και η λεύκα *Populus trichocarpa* διαθέτουν δυο γονίδια *Lon* που αποτελούν παραλλαγές των γονιδίων *Lon1* και *Lon4* του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Έτσι, οι πρωτεΐνες *Lon* των οργανισμών αυτών στοχεύουν ταυτόχρονα στο χλωροπλάστη και το μιτοχόνδριο είτε (i) με βάση ενός μηχανισμού αντίστοιχου του *AtLon1*, δηλαδή με τη διάταξη σε σειρά δυο διακριτών πεπτιδίων-συνθήματος και κωδικοποιώντας δυο ισομορφές μια για κάθε οργανίδιο, είτε (ii) με βάση ενός μηχανισμού αντίστοιχου του *AtLon4*, κωδικοποιώντας για ένα πολυπεπτιδίο, το οποίο στο N-τελικό άκρο φέρει ένα πεπτιδίο-σύνθηματος που αναγνωρίζεται ταυτόχρονα από τους υποδοχείς των μηχανισμών ελέγχου-εισόδου πρωτεϊνών των δυο οργανιδίων.

Επιπρόσθετα, έκπληξη προκαλεί η ύπαρξη μίας βάσης, θυμίνης, στη θέση +13 του γονιδίου *Lon4* τόσο στο φυτό *Arabidopsis thaliana* όσο και στο φυτό *Arabidopsis lyrata*, η οποία συντελεί στη δημιουργία κωδικονίου λήξης (Εικόνα A1-Παράρτημα). Η αφαίρεση της συγκεκριμένης βάσης έχει σαν αποτέλεσμα το αναγνωστικό πλαίσιο μεταξύ των δυο διαδοχικών κωδικονίων έναρξης που βρίσκονται στο N-τελικό άκρο των γονιδίων *AtLon4* (*Arabidopsis thaliana Lon4*) και *AlLon4* (*Arabidopsis lyrata Lon4*) να γίνει πλέον ανοικτό. Οι συγκεκριμένες παραλλαγές των γονιδίων *AtLon4* και *AlLon4* μετονομάζονται σε *AtLon4/1* και *AlLon4/1* επειδή με ανοικτό το αναγνωστικό πλαίσιο τα γονίδια *AtLon4* και *AlLon4* αποκτούν N-τελικό άκρο όμοιο με αυτό των γονιδίων *AtLon1* και *AlLon1* (Εικόνα 7A). Για να ταυτοποιηθούν περαιτέρω οι ομοιότητες και οι διαφορές στη περιοχή του N-τελικού άκρου μεταξύ των γονιδίων *Lon1* και *Lon4* αναλύθηκε η ομολογία σε νουκλεοτιδικό και σε αμινοξικό επίπεδο τριών τμημάτων των γονιδίων. Το πρώτο (I) τμήμα εκτείνεται ανωφορικά του πρώτου κωδικονίου έναρξης, το δεύτερο τμήμα (II) περιλαμβάνει την περιοχή μεταξύ των δυο κωδικονίων έναρξης και τέλος το τρίτο (III) τμήμα εκτείνεται κατωφορικά του δεύτερου κωδικονίου έναρξης (Εικόνα A1-Παράρτημα). Τα αποτελέσματα της σύγκρισης σε νουκλεοτιδικό επίπεδο έδειξαν υψηλή παραλλακτικότητα στο τμήμα I των δυο γονιδίων που εξηγείται επειδή αποτελεί τη 5'-μεταγραφόμενη μη-μεταφραζόμενη περιοχή (Εικόνα 7B). Παραδόξως όμως η νουκλεοτιδική ομολογία στο τμήμα II είναι υψηλότερη από το τμήμα III, μολονότι το τμήμα III και στα δυο γονίδια βρίσκεται σε κωδική περιοχή. Κατά αντιστοιχία η ομολογία σε αμινοξικό επίπεδο του τμήματος II σε σχέση με το τμήμα III μεταξύ των γονιδίων

Lon1 και των παραλλαγών Lon4/1 είναι υψηλή (Εικόνα 7B). Οι παραπάνω παρατηρήσεις στο σύνολό τους υποστηρίζουν το ενδεχόμενο τα γονίδια Lon1 και Lon4 να προέκυψαν από γεγονός διπλασιασμού αλλά στη συνέχεια ακολούθησαν διαφορετική εξελικτική πορεία όσον αφορά στο μηχανισμό δυαδικής υποκυτταρικής τοποθέτησης.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένα και σε συμφωνία με σχετικές βιβλιογραφικές αναφορές η νουκλεοτιδική ακολουθία που περιβάλλει το πρώτο κωδικόνιο έναρξης AUG είναι σημαντική για την ολίσθηση της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας 40S κατά τη σάρωση του μεταγραφήματος με αποτέλεσμα τη εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης και της κωδικοποίησης ισομορφών που τοποθετούνται σε διαφορετικά διαμερίσματα του κυττάρου (Joshi *et al.*, 1997; Kojak, 2005). Η ευθυγράμμιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που περικλείουν τα δυο κωδικόνια έναρξης μεταξύ των ομόλογων του γονιδίου *AtLon1* που ανήκουν στην κατηγορία I αποκάλυψε ότι υπάρχει υψηλή συντήρηση στην περιοχή του πρώτου κωδικονίου έναρξης σε αντίθεση με το δεύτερο κωδικόνιο έναρξης (Εικόνα 7C). Παρόλα αυτά, οι νουκλεοτιδικές παραλλαγές της περιοχής του δεύτερου κωδικονίου έναρξης AUG συμφωνούν με αυτές που χαρακτηρίζουν μια λειτουργική ακολουθία έναρξης της μετάφρασης τύπου Kozak στα αγγειόσπερμα (Joshi *et al.*, 1997; Kojak, 2005). Σε αντίθεση με το δεύτερο κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης το πρώτο είναι ισχυρά συντηρημένο και αποκλίνει σημαντικά από το μοτίβο Kozak. Αυτή η εντυπωσιακή νουκλεοτιδική ομοιότητα στην περιοχή του πρώτου AUG μεταξύ των ομολόγων της πρωτεΐνης Lon στην κατηγορία I υποδηλώνει ότι η περιοχή αυτή είναι απαραίτητη για να επιτρέψει τη παροδική ολίσθηση μικρών ριβοσωμικών υπομονάδων ώστε να ξεκινά εναλλακτικά η μετάφραση και από τη δεύτερη χαρακτηριστική ακολουθία Kozak. Για το λόγο αυτό η νουκλεοτιδική ακολουθία εκατέρωθεν του πρώτου κωδικονίου διατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Συνεπώς, μέσω του μηχανισμού ολίσθησης του ριβοσώματος από ένα mRNA παράγονται με εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης δύο ισομορφές της ίδιας πρωτεΐνης που τοποθετούνται ξεχωριστά σε δυο οργάνδια, στα πλαστίδια και στα μιτοχόνδρια.

**A**

OsLonB	1	:	-----MIFAAAAAA-VFPSRFAAAPAVA-----	:	23
ZmLon	1	:	-----MIFAAAAAA-IFPARFAAAPAVA-----	:	23
BradiLon	1	:	-----MIFAAAAAA-AFPVRFAPAAFLVAP-----	:	24
OsLonA	1	:	-----MIFAAAAATAGFLPPRLAETAFAPARVVA-----	:	29
Allon4	1	:	-----MIFLLTPT-----ASHHVTPAIR-----	:	18
Allon4/1	1	:	-----MKGFDT-SHR--LRSSLS-YGFLPIR---LSTLNSQICYPRSS-----SPVMHLLTPT-----ASHHVTPAIR-----	:	58
AtLon4	1	:	-----MIFLTPPAY-----ASHHVTPATR-----	:	20
AtLon4/1	1	:	-----MKGFDT-TSLRLQHSLS-YGFLPIR---LSTLNSQITRYSRSS-----SPVMHLLTPTAY-----ASHHVTPATR-----	:	62
Allon1	1	:	-----MKGFDTNLRQCASSRELS-NGFLHQRNFNLNLRNRCYPRSSF-----SPTMHLLTSSAS--RVCHLTPAIR-----	:	66
AtLon1	1	:	-----MKGFDTNLRQCASSPEFS-NGFLPKRQNFILNRRNRCY-PRSSF-----SPTMHLLTSSAS--RVHHLTPVSRV-----	:	66
Theobroma	1	:	-----MVCPLKSEISLVDFLPPQEWLQPTNFKTYNSGASPASSLTK-----RRHKRFKFLPSSFMHLLSSSSS--RVHCLPTATPS-----	:	79
Carica	1	:	-----MQGFTPQLHKTSSPNFFN-GASLSPKLG-LSRTVNYPPCPSSLCC-----CSKN-----SLEMHLLSSAA-SYRTRCLS-FVPR-----	:	73
PtrLon1	1	:	-----MEHHTQGFMCQFASCETPKRSITFSSSSSSNGDSKLIKNNKKPTLFRFCSLLP-----SNSQC-----HKTMHLLSSTSR-QIHTHTLS-FCLR-----	:	85
PtrLon4	1	:	-----MIFLSSSTSR-QIHTHTLS-FCLR-----	:	22
Selaginella	1	:	MLAAIVSSALRDSPLRRLSIRPATWFAGARAFWGSMLARSFDGTRHTFCSGSGGGKGGSDGSSKNGSNSSSKESSEADSSSTEEAAIPDKVSVSSKSEGGKGGEGGKTEGKGEK	:	120
PIM1	1	:	-----MLRTRTTKTLSTVARTTRAIQYYSIAKTAAVSQRRFASTLTVRDVENIKPFSHIKSPTWQEFCHQLKDPFYVHEHFAQLDAQFARHFMTNSGKS-----	:	95
Thalassiosira	1	:	-----MFRLSLRLCPSGGRSYSTTCHLQRFFSKATTHLSPLLPFFPR-----DIHSIQCTYSGGGVFFNQYRCFFFGSGSD-----	:	74
Eclon	1	:	-----	:	-
OsLonB	24	:	-----AVEEVR-SPLLRFVIGALRIGR---VSTLGRVRFCSNSAGSDSE-----AAA--AEAKAEDAVAAEAGEADGKA--SALIPTVLREELQISVIALPLPHRHLPPGFYMEINV	:	122
ZmLon	24	:	-----AAEELR-SPLLRFVIGALRDRG---SVLLGRVRFCSNSASDTE-----AAVAEAERKAEDASAAEAGEADSKA--SALIPPTSTNIDQISVIALPLPHRHLPPGFYMEINV	:	125
BradiLon	25	:	-----AAAEVR-SPLLRFVIGALRIGR---SVLGRVRFCSNSAGSDSE-----AAAAAEAKAEDAVAAEAGEAGNE--SALIPATFRRELQISVIALPLPHRHLPPGFYMEINV	:	125
OsLonA	30	:	-----AAGAEVRSPLLRAVGVPRGAGI---GSATPGRVRFVAGSDSDSGS-----AADSSEASSAAGAGEESEGNSR--SVAWAPAIIRRELQISVIALPLPHRHLPPGFYMEINV	:	134
Allon4	19	:	-----FRSTFVKSLLFKQITLLTWNRT---SYELGRVAFSS-----ELDS--DARSSATITSTKPHLIDQISVIALPLPHRHLPPGFYMEINV	:	98
Allon4/1	59	:	-----FRSTFVKSLLFKQITLLTWNRT---SYELGRVAFSS-----ELDS--DARSSATITSTKPHLIDQISVIALPLPHRHLPPGFYMEINV	:	138
AtLon4	21	:	-----FRSTFVKNLILFKQITLLTWNRS---SYELGRVSESS-----DLDS--ETRS-SITTSKPHLIDQISVIALPLPHRHLPPGFYMEINV	:	99
Allon4/1	63	:	-----FRSTFVKNLILFKQITLLTWNRS---SYELGRVSESS-----DLDS--ETRS-SITTSKPHLIDQISVIALPLPHRHLPPGFYMEINV	:	141
AtLon1	67	:	-----VCSDFVKSILFKQITLLTWNRS---SYELGRVSESS-----DLDS--ETRS-SITTSKPHLIDQISVIALPLPHRHLPPGFYMEINV	:	145

**Εικόνα 7. Το N-τελικό τμήμα των ομόλογων πρωτεϊνών Lon είναι συντηρημένο μεταξύ διαφορετικών φυτικών ειδών**

(A) Πολλαπλή ευθύγραμμιση του N-τελικού τμήματος των ομόλογων πρωτεϊνών Lon. Με έντονα γράμματα απεικονίζονται οι ομόλογες πρωτεΐνες της κατηγορίας I, που μοιάζουν με τις δυαδικές N-τελικές ακολουθίες υποκυτταρικής τοποθέτησης του *AtLon1*.

(B) Ποσοστά ομολογίας σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και αμινοξέων των τμημάτων I-III μεταξύ των γονιδίων *Lon1* και *Lon4* από τα φυτά *Arabidopsis thaliana* και το *Arabidopsis lyrata*. Πληροφορίες για τις συντεταγμένες του κάθε τμήματος δίνονται στην Εικόνα A1 του Παραρτήματος.

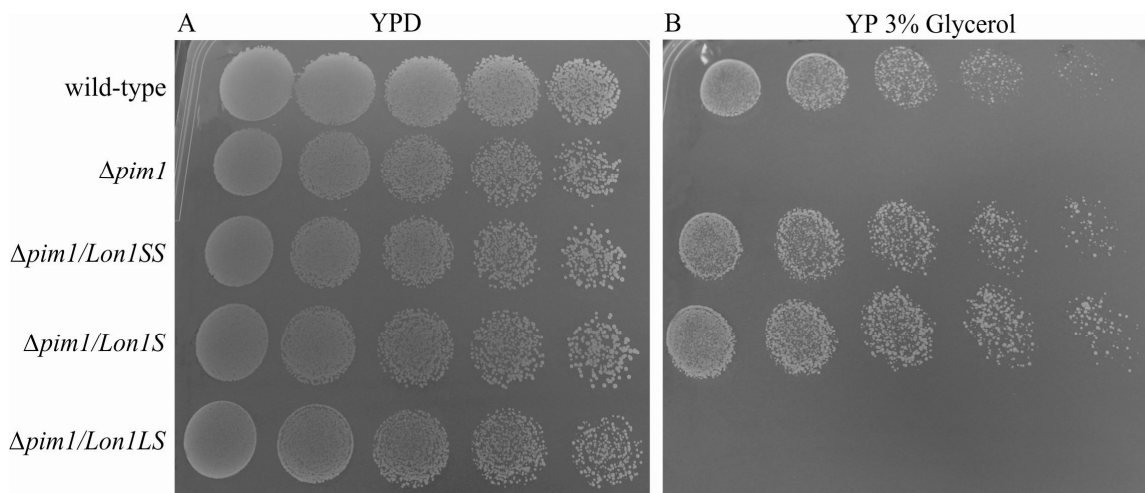
(C) Πολλαπλή ευθυγράμμιση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας που περικλείει το πρώτο και το δεύτερο κωδικόνιο έναρξης AUG των ομόλογων πρωτεϊνών Lon της κατηγορίας I.

**3.a.4 Η νουκλεοτιδική ακολουθία στην περιοχή του δεύτερου AUG είναι λειτουργική στη ζύμη**

Παρόλο που η ομόλογη πρωτεΐνη PIM1 στη ζύμη φαίνεται να μην έχει τα συντηρημένα αμινοξέα Μεθειονίνη-Λευκίνη-Λυσίνη (MLK), διαθέτει N-τελικό τμήμα παρόμοιο σε μέγεθος με εκείνο των πρωτεϊνών που μοιάζουν στην πρωτεάση Lon1 του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Επίσης, τα κύτταρα ζύμης με μετάλλαξη στο γονίδιο *PIM1* (*Δpim1*) χαρακτηρίζονται από αναπνευστική ανεπάρκεια και αδυνατούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό μέσο χωρίς πηγή άνθρακα που να μπορεί να μεταβολισθεί εύκολα. Εξαιτίας αυτών των χαρακτηριστικών αποτελούν άριστο μοντέλο για πειράματα ετερόλογης λειτουργικής έκφρασης του φυτικού γονιδίου *AtLon1*. Μέσω της πειραματικής αυτής διαδικασίας μπορεί να εξεταστεί εάν τα πεπτιδία-συνθήματος του γονιδίου φυτικής προέλευσης μπορούν να είναι λειτουργικά στα κύτταρα ζύμης. Στα πειράματα λειτουργικής συμπληρωματικότητας χρησιμοποιήθηκε γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα που δεν μπορεί εύκολα να μεταβολισθεί και

δοκιμάστηκαν οι κατασκευές *AtLon1SS*, *AtLon1S* και *AtLon1LS*. Στην Εικόνα 8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που δείχνουν ότι οι κατασκευές *AtLon1S* και *AtLon1SS* με επιτυχία συμπληρώνουν το φαινότυπο αναπνευστικής ανεπάρκειας των κυττάρων ζύμης  $\Delta pim1$ . Αντίθετα, η κατασκευή *AtLon1LS* που αντιστοιχεί στο N-τελικό άκρο του γονιδίου *Lon1* από το φυτό *Arabidopsis thaliana* αδυνατεί λειτουργικά να συμπληρώσει την αδυναμία των κυττάρων  $\Delta pim1$ . Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η νουκλεοτιδική ακολουθία στην περιοχή του δεύτερου κωδικονίου έναρξης του γονιδίου *AtLon1* είναι πολύ κρίσιμη για την έναρξη της μετάφρασης στο ετερόλογο σύστημα της ζύμης. Αυτή η περιοχή-πλαίσιο αντιστοιχεί στη χαρακτηριστική ακολουθία Kozak **CCACCAUG** σε αντίθεση με τη περιοχή του πρώτου AUG του *AtLon1* που είτε δεν είναι συμβατή με το μηχανισμό ολίσθησης του ριβοσώματος στη ζύμη, είτε προκαλεί απόρριψη της σάρωσης του μεταγραφήματος από τη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα στη ζύμη.

Κατά συνέπεια, η ανικανότητα της κατασκευής *AtLon1LS* να συμπληρώσει το φαινότυπό της ζύμης  $\Delta pim1$ , οφείλεται στο ότι η ριβοσωμική υπομονάδα 40S δεν προσδένεται στο μεταγράφημα στη περιοχή του πρώτου AUG ή/και δεν σαρώνει το *AtLon1* mRNA προκειμένου να ξεκινήσει η μετάφραση. Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι όχι μόνο το πεπτιδίο-συνθήματος για στόχευση στα μιτοχόνδρια, αλλά και το πεπτιδίο-συνθήματος για στόχευση στα πλαστίδια είναι λειτουργικό και ικανό να συμπληρώσει το μεταλλαγμένο φαινότυπο ζύμης με τη μόνη προϋπόθεση η έναρξη της μετάφρασης να καθορίζεται από τη τυπική ακολουθία Kozak.



**Εικόνα 8.** Στα κύτταρα ζύμης *pim1*, ανεξάρτητα εάν το πεπτιδίο-συνθήματος στο φυτό *Arabidopsis thaliana* κατευθύνει τη πρωτεΐνη Lon1 στον χλωροπλάστη ή στο μιτοχόνδριο, το γονίδιο *AtLon1* συμπληρώνει την αναπνευστική ανεπάρκεια των μιτοχονδρίων με την προϋπόθεση ότι η μετάφραση ξεκινά από το ισχυρό AUG που περιέχει την τυπική ακολουθία Kozak.

Σειριακές πενταδικές αραιώσεις κυττάρων ζύμης στρώθηκαν σε θρεπτικό μέσο με 2% Σουκρόζη (YPD) και σε θρεπτικό μέσο με 3% Γλυκερόλη (YP 3% Γλυκερόλη) και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν στους 30°C για 7 και 10 ημέρες αντίστοιχα.

### 3.b Μελέτη των μηχανισμών υποκυτταρικής τοποθέτησης και λειτουργίας της πρωτεΐνης Leuko1 στην ανάπτυξη του φυτού *Arabidopsis thaliana*

### 3.b.1 Η αμινοξική ακολουθία της πρωτεΐνης Leuko1 και τα σινιάλα υποκυτταρικής τοποθέτησης

Η πρωτεΐνη Leuko1 αποτελείται από 494 αμινοξέα. Το πρόγραμμα ChloroP προβλέπει ότι τα πρώτα 69 αμινοξέα συνιστούν το πεπτιδιο-συνθήματος για τους χλωροπλάστες το οποίο κατά την είσοδο αποκόπτεται. Βιοπληροφορική ανάλυση με νευρωνικά δίκτυα πρόβλεψης και βάσεις δεδομένων προβλέπουν ότι η πρωτεΐνη εκτός του χλωροπλάστη φέρει πληροφορίες υποκυτταρικής τοποθέτησης στον πυρήνα (Πίνακας 1). Πιο λεπτομερής ανάλυση της αμινοξικής ακολουθίας της πρωτεΐνης με εφαρμογή εξειδικευμένων προγραμμάτων βιοπληροφορικής για τον εντοπισμό σινιάλων τοποθέτησης στον πυρήνα, όπως τα NucPred, PredictNLS και NetNES, αποκάλυψε την παρουσία σινιάλου εισόδου στον πυρήνα NLS (Nuclear Localization Signal) του κυττάρου, καθώς και σινιάλο εξόδου NES (Nuclear Export Signal) από τον πυρήνα (Πίνακας 1 και Εικόνα 9).

At5g26860	Nucleus	Chloroplast	Prediction Program
484 a.a.	3	7	<b>PSORT</b>
	N.D.	0.49	<b>PREDOTAR</b>
	N.D.	0.687	<b>TARGETP</b>
	N.D.	0.553	<b>CHLOROP</b>
	N.D.	0.576	<b>SLP-Local</b>
	N.D.	1.0	<b>BACELLO</b>
	5.0	N.D.	<b>SUBLOC</b>
	0.925	N.D.	<b>CELLO</b>
	0.74	N.D.	<b>NUCLEO</b>
	1.0	N.D.	<b>NUC-PLOC</b>
	0.69	N.D.	<b>YLOC</b>

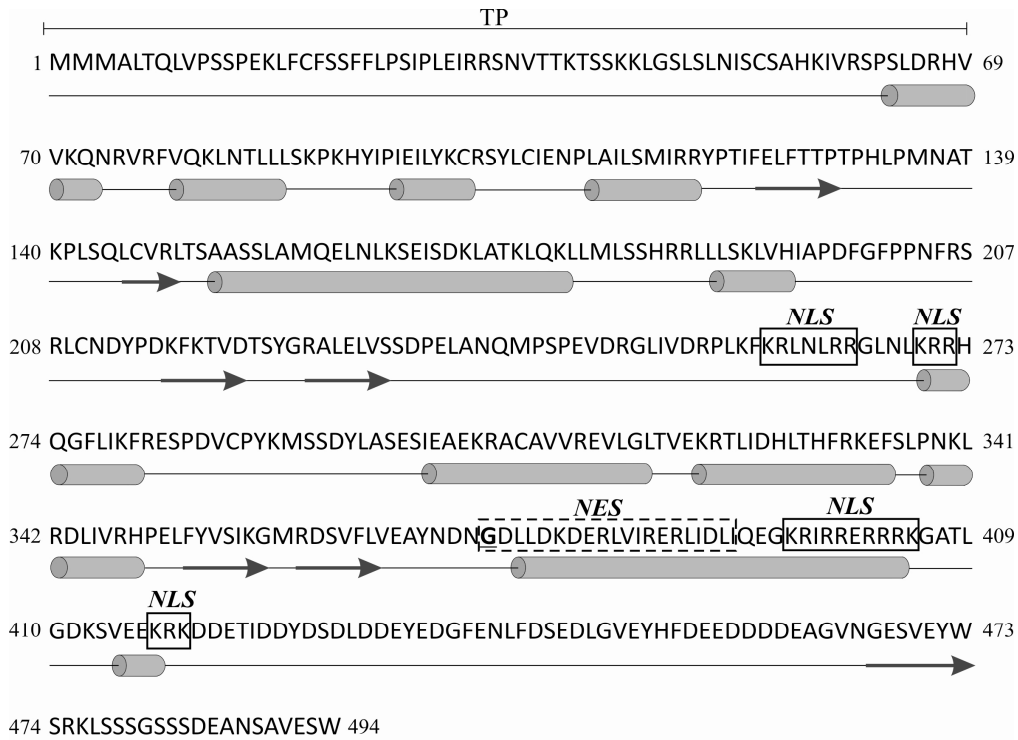
**Πίνακας 1. Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης με νευρωνικά δίκτυα και βάσεις δεδομένων πρόβλεψης της υποκυτταρικής τοποθέτησης της πρωτεΐνης Leuko1**

Όπου N.D.: Not determined. Οι ηλεκτρονικές διευθύνσεις των πακέτων βιοπληροφορικής που εφαρμόστηκαν online παρέχονται στα Υλικά και Μέθοδοι.

Ειδικότερα, στην πρωτεϊνική ακολουθία εντοπίστηκαν χαρακτηριστικά μονομερή και διμερή σινιάλα πυρηνικής τοποθέτησης NLS (Εικόνα 9) (Kosugi *et al.* 1998; Macara *et al.*, 2001; IMai *et al.* 2010). Το πιο τυπικό μονομερές σινιάλο που φαίνεται να ευθύνεται για την τοποθέτηση της πρωτεΐνης στον πυρήνα είναι το "KRIRRERRK" (αμινοξική θέση 396 έως 405), το οποίο περιέχει αμινοξέα Λυσίνης (K) και Αργινίνης (R) που είναι χαρακτηριστικά σινιάλων τοποθέτησης της πρωτεΐνης στον πυρήνα (Boulikas *et al.*, 1994). Τα πιο χαρακτηριστικά διμερή σινιάλα πυρηνικής τοποθέτησης είναι η ακολουθία KR(X)<sub>9</sub>KRR στη θέση 259 έως 272 και η ακολουθία RK(X)<sub>11</sub>KRK στη θέση 404 έως 419. Αυτά τα διμερή σινιάλα ταιριάζουν απόλυτα με αυτά που έχουν παλαιότερα αναφερθεί (Kosugi *et al.*, 1998). Επιπρόσθετα, τα πρότυπα των παραπάνω ακολουθιών, μονομερών και διμερών, φαίνεται ότι μπορούν να προσδεθούν στις ειδικές θέσεις του μηχανισμού εισαγωγής της Ιμπορτίνης-α (Importin-α) που ελέγχει την είσοδο πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα (Kosugi *et al.* 1998).

Γενικά, τα ευρέως αποδεχόμενα σινιάλα εξόδου NES από τον πυρήνα ακολουθούν το πρότυπο L(X)<sub>2-3</sub>L(X)<sub>1-2</sub>L (L:Λευκίνη, X:οποιοδήποτε αμινοξύ) (Bogerd *et al.*, 1996; la Cour *et al.*, 2004). Το πρότυπο αυτό συνήθως διαθέτει αμινοξέα Λευκίνης (L) ή κάποιον από τα υδρόφοβα αμινοξέα Ισολευκίνης (I), Βαλίνης (V), Φαινυλαλανίνης (F) ή Μεθειονίνης (M). Δεν θεωρείται απολύτως απαραίτητο όμως μια ακολουθία να ταιριάζει

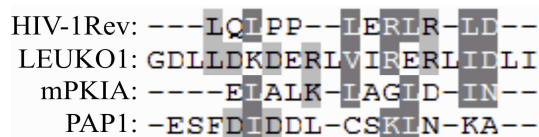
απόλυτα με το συγκεκριμένο πρότυπο για να λειτουργήσει ως NES, αφού αρκετές πειραματικά χαρακτηρισμένες ακολουθίες ως NES αποκλίνουν σημαντικά από το πρότυπο. Παρόλα αυτά, ένα πεπτιδίο για να αποτελεί NES θα πρέπει επιπλέον να πληρεί και άλλες προϋποθέσεις όπως να έχει δευτεροταγή δομή α-έλικας, να περιλαμβάνει σε μεγάλο ποσοστό τα αμινοξέα Γλουταμινικό οξύ (E), Ασπαρτικό οξύ (D) και Σερίνη (S) και να είναι αρνητικά φορτισμένο για να βρίσκεται εκτεθειμένο από την υπόλοιπη δομή της πρωτεΐνης (la Cour *et al.*, 2004). Η πρωτεΐνη Leuko1 περιέχει ένα τέτοιο σινιάλο στη θέση 373 έως 392, που αντιστοιχεί στην ακολουθία "GDLLDKDERLVIRERLIDL", η οποία συμφωνεί αρκετά με το πρότυπο L(X)<sub>2-3</sub>L(X)<sub>1-2</sub>L (Εικόνα 9). Επιπλέον η συγκεκριμένη ακολουθία έχει δευτεροταγή δομή β-πτυχωτής επιφάνειας, είναι αρνητικά φορτισμένη και περιέχει πλήθος αμινοξέων Ασπαρτικού (D) και Γλουταμινικού (E) οξέως (Εικόνα 9).



**Εικόνα 9.** Τα δομικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης Leuko1.

Όπου TP το πεπτιδίο-συνθήματος για στόχευση στον χλωροπλάστη, NLS το σινιάλο εισόδου στον πυρήνα και NES το σινιάλο εξόδου από τον πυρήνα. Οι κύλινδροι αντιπροσωπεύουν τις α-έλικες, ενώ τα βέλη τις β-πτυχωτές επιφάνειες.

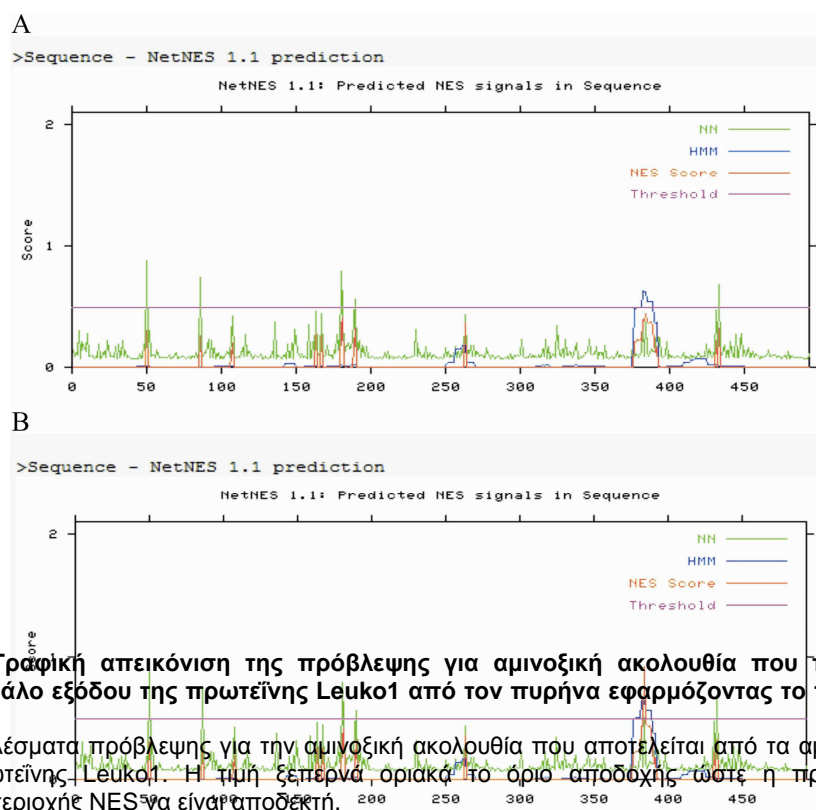
Πολλαπλή ευθυγράμμιση του συγκεκριμένου σινιάλου NES της πρωτεΐνης Leuko1 με NES των πρωτεϊνών HIV-1Rev (Malim *et al.*, 1991), mPK1a (Wen *et al.*, 1995) και Pap1 (Kudo *et al.*, 1999) που είναι πειραματικώς χαρακτηρισμένα αποκάλυψε τη μεγάλη ομολογία και συντήρηση μεταξύ των αμινοξικών ακολουθιών (Εικόνα 10). Συνεπώς, η συγκεκριμένη ακολουθία του πεπτιδίου της πρωτεΐνης Leuko1 πληρεί τις αναγκαίες προϋποθέσεις ενός λειτουργικού σινιάλου εξόδου NES από τον πυρήνα και επιπλέον παρουσιάζει σημαντική ομολογία με ήδη χαρακτηρισμένες ακολουθίες NES από πρωτεΐνες φυτικών και μη οργανισμών. Σε συμφωνία με τα προηγούμενα χαρακτηριστικά γνωρίσματα το πεπτιδίο "GDLLDKDERLVIRERLIDL" της πρωτεΐνης Leuko1 εφαρμόζοντας το πρόγραμμα NetNES δίνει υψηλή τιμή πρόβλεψης για NES.





**Εικόνα 10. Πολλαπλή ευθυγράμμιση της ακολουθίας NES της πρωτεΐνης Leuko1 με τις ακολουθίες NES πρωτεϊνών που είναι γνωστό ότι εξέρχονται από τον πυρήνα**  
 HIV-1REV: Replication of human immunodeficiency virus type 1 (Malim *et al.*, 1991)  
 mPKIA: heat stable inhibitor (PKI) of cAMP-dependent protein kinase (Wen *et al.*, 1995)  
 Pap1: fission yeast AP-1-like transcription factor (Kudo *et al.*, 1999)

Έκπληξη προκάλεσε η παρατήρηση ότι στη μετάλλαξη *leuko1-1* όπου το αμινοξύ Γλυκίνη-373 έχει μετατραπεί σε Ασπαρτικό οξύ στη θέση 373 ( $G_{373} \rightarrow D$ ) η τιμή της πιθανότητας για λειτουργικό σινιάλο εξαγωγής από τον πυρήνα NES αυξάνεται σημαντικά σε σχέση με τιμή που προκύπτει όταν στην θέση βρίσκεται το αμινοξύ Γλυκίνη (Εικόνα 11). Συνεπώς η βιοπληροφορική υποδηλώνει ότι η μεταλλαγμένη μορφή ( $G_{373} \rightarrow D$ ) της πρωτεΐνης Leuko1 έχει μεγαλύτερη δυναμική να εξέρχεται από τον πυρήνα του φυτικού κυττάρου σε σύγκριση με τη φυσιολογική πρωτεΐνη.



**Εικόνα 11. Γραφική απεικόνιση της πρόβλεψης για αμινοξική ακολουθία που πιθανόν να αποτελεί σινιάλο εξόδου της πρωτεΐνης Leuko1 από τον πυρήνα εφαρμόζοντας το πρόγραμμα NetNES v1.1**

(A) Τα αποτελέσματα πρόβλεψης για την αμινοξική ακολουθία που αποτελείται από τα αμινοξέα 370-380 της πρωτεΐνης Leuko1. Η τιμή ξεπερνά οριακά το όριο αποδοχής, ώστε η πρόβλεψη για αναγνώριση περιοχής NES να είναι αποδεκτή.

(B) Η τιμή όμως της πρόβλεψης που προκύπτει με την αμινοξική υποκατάσταση ( $G_{373} \rightarrow D$ ) της ίδιας περιοχής της πρωτεΐνης Leuko1 αυξάνεται εντυπωσιακά. Όπου NES score η πιθανότητα μια ακολουθία να συνιστά λειτουργικό NES, Threshold η οριακή τιμή της πιθανότητας για αποδοχή της πρόβλεψης,



NN η τιμή της πιθανότητας που προκύπτει με βάση την εφαρμογή του νευρωνικού δικτύου και HMM η τιμή που προκύπτει από την εφαρμογή του μοντέλου Hidden Markov.

### 3.b.2 Τα γονίδια του φυτού *Arabidopsis thaliana* που φέρουν το τμήμα PORR αποτελούν μια υπεροικογένεια

Η αναζήτηση ομόλογων γονιδίων του *Leuko1* στο *Arabidopsis thaliana* είχε ως αποτέλεσμα να εντοπιστούν επιπλέον 14 γονίδια που έχουν το τμήμα PORR (Plant Organelle RNA Recognition motif). Τα 15 μέλη της υπεροικογένειας παρόλο που έχουν σημαντική ομολογία μεταξύ τους είναι φανερό ότι ταυτόχρονα είναι αρκετά διαφορετικά όπως φαίνεται άλλωστε από την πολλαπλή ευθυγράμμιση (Εικόνα 12) και το φυλογενετικό δένδρο (Εικόνα 13). Η σκιαγραφημένη περιοχή αντιστοιχεί στο υψηλά συντηρημένο τμήμα PORR, τα υπόλοιπα όμως τμήματα της πρωτεΐνης στο άμινο και καρβόξυ-τελικό άκρο είναι ελάχιστα συντηρημένα (Εικόνα 12). Η ευθυγράμμιση επιπλέον αποκαλύπτει ότι (i) η Γλυκίνη στη θέση 373 που στο μετάλλαγμα *leuko1-1* έχει τροποποιηθεί σε Ασπαρτικό οξύ (G<sub>373</sub>→D), διατηρείται σε αρκετά μέλη της υπεροικογένειας και (ii) ενώ το σινιάλο NES στη θέση 373-392 της πρωτεΐνης *Leuko1* είναι συντηρημένο μεταξύ των ομόλογων γονιδίων, αντίθετα το μονομερές NLS της πρωτεΐνης *Leuko1* στη θέση 396 έως 405 δεν φαίνεται να είναι συντηρημένο μεταξύ των ομόλογων γονιδίων.

Στο φυλογενετικό δένδρο παρατηρείται ότι το γονίδιο *Leuko1* (*At5g62990*) εντάσσεται σε έναν κλάδο 4 γονιδίων μαζί με το γονίδιο *At4g01037* ορθόλογο του γονιδίου *WTF1* (*What's This Factor?*) από το καλαμπόκι (*Zea mays*) που έχει το χαρακτηρισμένο τμήμα PORR. Το μετάλλαγμα *wtf1* στο καλαμπόκι έχει φαινοτυπικά χαρακτηριστικά παρόμοια της μετάλλαξης *leuko1-1* και συγκεκριμένα τα φύλλα είναι υποκίτρινα έως πλήρως χλωρωτικά. Το τμήμα PORR της πρωτεΐνης *WTF1* έχει αναφερθεί ότι αποτελεί συστατικό των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων που συμμετέχουν στο μάτισμα των ιντρονίων κατηγορίας II (group II intron splicing) που έχουν ορισμένα γονίδια του χλωροπλάστη (Kroeger *et al.*, 2009). Το γονίδιο *RPD1* (*ROOT PRIMORDIUM DEFECTIVE 1; At4g33495*) αποτελεί επίσης μέλος της υπεροικογένειας με το τμήμα PORR. Οι αλληλόμορφοι *rdp1-1* και *rdp1-2* που έχουν προέλθει από αμινοξικές υποκαταστάσεις εξαιτίας μεταλλαξογένεσης EMS παρουσιάζουν ευαισθησία στη θερμοκρασία και παρουσιάζουν ανωμαλίες στον σχηματισμό επιγενετικών ριζών (adventitious roots), ενώ συνολικά φαίνεται να επηρεάζεται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων (Konishi και Sugiyama, 2006). Στον αλληλόμορφο *rdp1-3* που έχει προκύψει από ένθεση T-DNA έχει διακοπεί η έκφραση του γονιδίου επομένως αναστέλλεται η ανάπτυξη στο σφαιρικό στάδιο του εμβρύου (globular stage) (Konishi και Sugiyama, 2006).

```

At1g71850 : -----MKSIFRSISIRRHSG-----HRTFADTSA--VEDTYKF : 31
At4g24320 : -----MAAATTKLARALQQ-----RRTFVN-----ARVKW : 25
At3g58520 : -----MFVKSQSFLFSVSKLPHQ-----HQQWRGMGA-MTKVRLK : 35
At5g48040 : -----MHWLLQRRVSLSTSLCKRCR-----FDFFYQQRCLGVNVLK : 39
At5g45790 : -----MPTLLQSTKRVKACRF-----STN : 20
At1g06440 : -----MRFLLMRSLLVHPCGG-----SIINVRSTTTSAQVVASR : 34
At4g33495 : -----MKLFLRNAFKTLNPKRKLATLILPSINL-----ILVKPFSSQSTIIPKQDR : 46
At4g01037 : -----MEPKLLLSAHKPLFVSCNSPFNEKTKLSVKSGLPMTIRAARSQFMGEGILGNKYGFNSTRKTRVVVEPVRAAVKR : 78
At5g62990 : -----MMMALTLQVPSSEPKLFCFSSFFLPSIPLIERR-----SNVTTKTSKKLGLSLNLNISCASHKI : 59
At2g39120 : -----MLSIRRHAKTVASSCTN-----LTQKRTYVDVYMKK : 31
At5g21970 : -----MGGLRCWLQFYRNGNAHVFAIMPERNVLYGESS-----FRVWVRFMTSSKRVQDRS : 53
At2g31290 : -----MAMTRELYRILGTYKAP-----LLIRRFSLW : 26
At4g08940 : MAWLRFPSRTLKSLPQISSSSPNPNFNFTSPFSTSLITKTP-----DKLKKRKKKPEASARTKSLQH : 63
At3g63090 : -----MVLRLNTISYELIKSLKH-----AKEHSLGIQIRWISSLW : 36
At1g79120 : -----MSKPLLRYRSSFVSVILRHKLRETESVFLPFG-----SSSRLQWTFVQVRHKSGGGGWRPKQ : 60

At1g71850 : VRDRGLD--HA--EREKNLRPLLSKDLRSEAKSFEVTSQKDSR-VPLRPIE--IIRSEISQEFPLPGG-----IGIHPHIS : 109
At4g24320 : VSDHYLD--EA--QREKNLKVVISKDRVSSSKSFEVSSLLKPLN-LHITAAA--EFCQEPSVETTFQPS-----PSHFLHVR : 102
At3g58520 : VKNRNLD--HV--DTETDLKAACIKDAHKRS--TGF--TAKS--ADWQKLG--LTVFVLR--DPRKPELSEHEEPHAR-----YA--SLPC : 111
At5g48040 : VKDRELD--AV--VREKHLRAVCMVSVISAS--DLR--F--FK--LPHRGG--G--LPQELKLSA--DPRKPELSEHEEYHDW--SAGTSVPC : 119
At5g45790 : -----KL--SRWKNLVG-----LNVNVAAG--G--EHP--EITHP-----FSKNL : 59
At1g06440 : SRDPVFE--KL--DKYKNNLKVIA--QDDETLAN--TADPPSIS--EFLSRLSCKLHLNNGAAS--DRKYPH--EHLVLYDP-----VKAEPF : 112
At4g33495 : VRDHGYD--NY--EVEKIRKVVVFHSL--LSQ--NHT--A--SL--DGLTARR--GLGFKQHEPFGA--DKRPHV--EIEYEHF-----VQRILY : 124
At4g01037 : RKELTFD--SV--QRDKKLVNLRKTLV--VSC--DRM--SR--G--GKYRRD--G--LKKRRRFIAL--DKRPHV--EIEVEEG-----AYSRL : 154
At5g62990 : VRSPSLD--RH--VKQNRVRFVQKNTL--LSK--RHY--F--EII--YKCRSY--C--IENPLAILSM--RRVY--EIELEF--TTPHLPMNATKLSQIC : 146
At2g39120 : KRDPYFBNIEH--LRSSQLKSVSV--KNC--VQ--NRC--P--SA--SKKTRQFD--V--VSTKIAH--DRKPE--EIEE--VQ--G--EYNLV : 108
At5g21970 : REKRVQLEIATEKWKIASKVI--F--MEV--KGERDMIT--V--RSF--EQYRR--C--N--LPKPKIS--DRKPE--EIEE--VQ--G--EYLVKDG : 131
At2g31290 : STKKDPLESAL--SRNKRWIVNSR--K--N--LRC--NQVAS--K--F--Q--K--F--K--D--L--Q--G--K--A--L--N--K--E--C--C--H--V--L--E--N--D : 101
At4g08940 : ESTKLPHELSL--SRDAHFRFLIRSKEL--SKQ--ERIR--R--DDAGKLYRE--G--F--PRGRKVT--R--E--K--H--E--L--E--C--T--Y--R--H--S--D : 141
At3g63090 : VWKKTDLDEAL--EQDKRYKLCAR--V--K--E--V--L--N--E--G--Q--V--P--R--Y--E--K--R--R--E--R--R--L--T--F--K--A--K--S--E--M--N--S--E--E--I--Y--D--R--I--K : 117
At1g79120 : VYHRVHLDKAL--DLNKKPSLITC--R--S--H--Q--A--Q--K--H--G--S--L--R--D--E--K--H--V--G--F--H--H--K--W--N--L--M--A--A--E--K--E--L--E--Y--V--G--G--G--H : 135

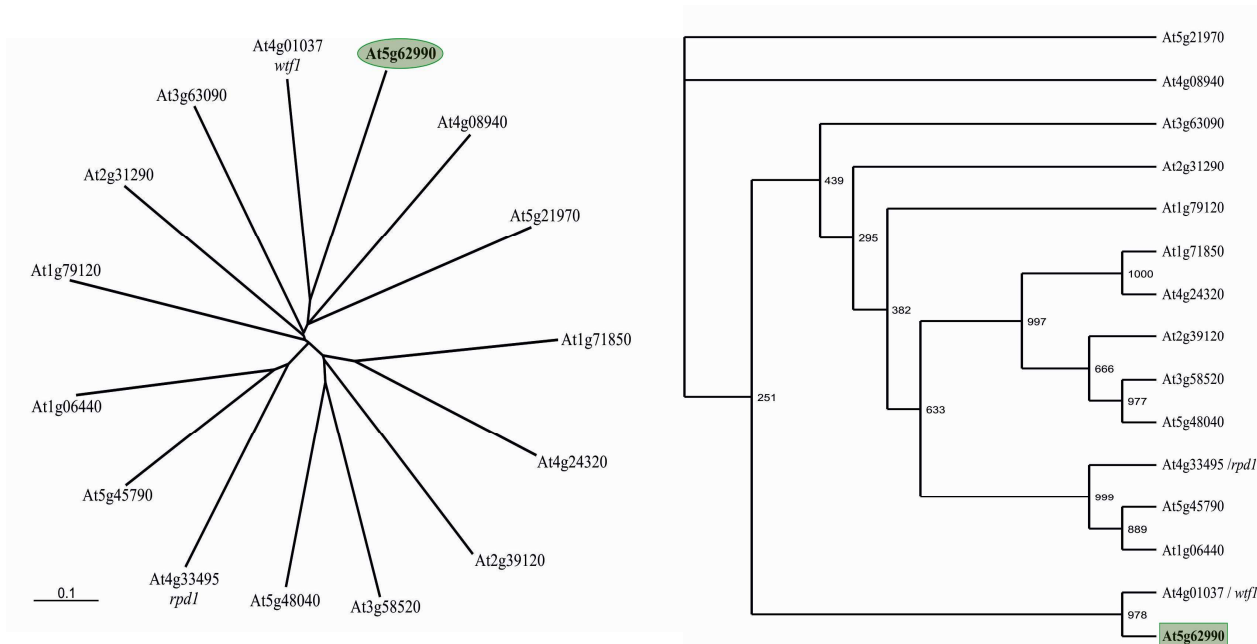
At1g71850 : LTPEILNHDADE--LVYGSEYTKQGLADRL--K--L--K--L--M--I--N--R--I--N--K--P--E--L--L--D--L--L--W--D--H--G--L--P--K--O--V--E--T--V--V--E--F--P--D--Y--E--R--V--K--S--K--L--R--G--C--S--G--E--E--L : 196
At4g24320 : LTPQALTLHKEB--ETIHLSPQNRNVT--V--Q--L--V--E--L--M--D--G--A--G--S--L--P--Y--V--L--D--R--F--P--D--G--L--P--R--O--V--T--S--I--G--D--Y--E--Y--E--V--E--I--K--D--R--L--T--G--E--K--T--L--A--L--T : 192
At3g58520 : FKL--D--T--A--L--M--L--D--S--E--E--I--I--H--Q--S--H--E--A--D--T--V--E--L--C--V--L--M--M--R--S--K--T--V--S--R--L--H--S--L--F--D--I--G--L--P--D--N--E--K--T--I--V--M--K--Y--P--D--H--E--C--F--V--K--A--S--N--G--N--N--P--C--R--L : 196
At5g48040 : FGL--R--E--T--I--D--L--Y--E--V--D--V--S--R--V--N--E--R--D--V--L--V--L--C--L--M--L--C--E--R--T--S--H--S--I--D--H--L--W--D--H--G--L--P--Y--O--V--R--D--S--I--T--K--H--D--L--S--V--K--L--S--S--D--L--D--G--L--R : 204
At5g45790 : CKL--E--K--F--K--V--L--I--D--E--E--N--V--R--E--C--E--V--D--A--V--K--V--K--L--L--L--K--H--G--V--L--R--V--H--A--L--R--L--I--K--E--L--G--L--P--E--D--R--D--S--L--A--K--Y--S--S--E--R--Y--D--L--E--T--L--E : 140

```

**Εικόνα 12. Πολλαπλή ευθυγράμμιση αμινοξικών ακολουθιών των μελών της υπεροικογένειας του φυτού *Arabidopsis thaliana*, τα οποία έχουν το συντηρημένο τμήμα PORR**

Με το κόκκινο βέλος διακρίνεται η Γλυκίνη-373, η οποία στη μετάλλαξη *leuko1-1* έχει αντικατασταθεί από το αμινοξύ Ασπαρτικό οξύ (G<sub>373</sub>→D). Το συγκεκριμένο αμινοξύ φαίνεται να διατηρείται στη ίδια θέση σε αρκετά από τα μέλη της υπεροικογένειας.

Σκιαγραφημένο με γκρι χρώμα είναι το τμήμα PORR, με πράσινο χρώμα το σινιάλα εξόδου από τον πυρήνα NES και με κόκκινο χρώμα το σινιάλα πυρηνικής τοποθέτησης NLS της πρωτεΐνης Leuko1 με τον αριθμό At5g62990.



**Εικόνα 13. Φυλογενετικό δένδρο Neighbor-Joining χωρίς ρίζα (Unrooted) και με ρίζα (Rooted) των ομόλογων πρωτεϊνών Leuko1 του φυτού *Arabidopsis thaliana***

Η σκιαγράφηση με πράσινο χρώμα αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη Leuko1 με κωδικό At5g62990 και η πρωτεΐνη At4g01037 είναι ορθόλογη της *wfl* από το ρύζι. Στο δένδρο με ρίζα στα τμήματα των διακλαδώσεων παρουσιάζονται οι τιμές της μεθόδου bootstrap.

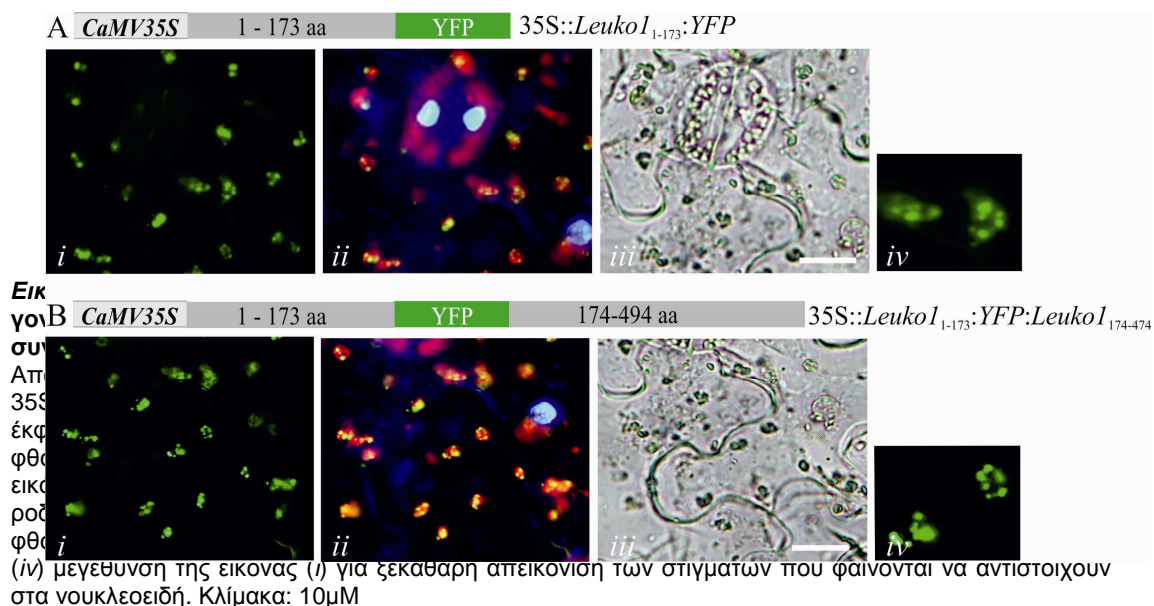
### 3.b.3 Η πρωτεΐνη Leuko1 τοποθετείται στα νουκλεοειδή του χλωροπλάστη και στον πυρήνα του κυττάρου

Για να εξεταστούν πειραματικά οι προβλέψεις για υποκυτταρική τοποθέτηση της πρωτεΐνης *Leuko1* δημιουργήθηκαν οι ακόλουθες κατασκευές πρωτεϊνικής σύντηξης με το γονίδιο αναφοράς *YFP* (*Yellow Fluorescence Protein*). Στην κατασκευή 35S::*Leuko1*<sub>1-173</sub>::*YFP* το γονίδιο αναφοράς κλωνοποιήθηκε σε ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο μετά τα πρώτα 173 αμινοξέα του N-τελικού άκρου. Η συγκεκριμένη κατασκευή περιλαμβάνει το πεπτιδίο συνθήματος με πρόβλεψη στόχευσης της πρωτεΐνης στον χλωροπλάστη, αλλά στερείται τα στοιχεία ελέγχου εισόδου και εξόδου στον πυρήνα (Εικόνα 14A). Η κατασκευή 35S::*Leuko1*<sub>1-173</sub>::*YFP*::*Leuko1*<sub>174-494</sub> περιλαμβάνει ολόκληρη την κωδική περιοχή του γονιδίου *Leuko1* με παρεμβολή του γονιδίου αναφοράς σε ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο στην θέση 174 (Εικόνα 14B). Επιπρόσθετα, σχεδιάστηκε η κατασκευή 35S::*YFP*::*Leuko1*<sub>1-494</sub>, στην οποία το γονίδιο *YFP* βρίσκεται στο N-τελικό άκρο του γονιδίου (Εικόνα 15A). Με αυτήν την κατασκευή, το πεπτιδίο συνθήματος για το χλωροπλάστη που είναι λειτουργικό όταν βρίσκεται στο N-τελικό άκρο μιας πρωτεΐνης ουσιαστικά καταργείται τεχνητά, με αποτέλεσμα η υποκυτταρική τοποθέτηση στο συγκεκριμένο διαγονίδιο να καθορίζεται από τα στοιχεία ελέγχου εισόδου και εξόδου στον πυρήνα που φαίνεται ότι βρίσκονται διάσπαρτα μέσα στην πρωτεϊνική ακολουθία. Η έκφραση στις κατασκευές αυτές ελέγχεται από τον καθολικά εκφραζόμενο υποκινητή *CaMV35S*. Οι κατασκευές αυτές εισήχθησαν με ηλεκτροπόρωση σε δεχτικά κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens* που χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για να πραγματοποιηθούν πειράματα *in planta* παροδική έκφρασης των διαγονιδιακών κατασκευών σε επιδερμικά κύτταρα φύλλων καπνού *Nicotiana benthamiana*.

Όπως ήταν αναμενόμενο από τις προβλέψεις της βιοπληροφορικής ανάλυσης οι 35S::*Leuko1*<sub>1-173</sub>::*YFP* και 35S::*Leuko1*<sub>1-173</sub>::*YFP*::*Leuko1*<sub>174-494</sub> οδήγησαν την πρωτεΐνη στο

χλωροπλάστη (Εικόνα 14). Ο φθορισμός εμφανίζεται σε στίγματα (Εικόνες 14Aiv και 14Biv) που μοιάζουν πολύ στα νουκλεοειδή των πλαστιδίων στα οποία βρίσκεται DNA, RNA και πρωτεΐνες των οργανιδίων (Sato *et al.* 1998; Terasawa και Sato, 2008). Οι δυο αυτές κατασκευές επιβεβαίωσαν πειραματικά ότι η αμινοξική ακολουθία της πρωτεΐνης Leuko1 μέχρι τη θέση 173 διαθέτει την απαραίτητη πληροφορία αναγνώρισης από τους υποδοχείς του μηχανισμού εισόδου στον χλωροπλάστη. Έτσι, η πρωτεΐνη εισέρχεται στον χλωροπλάστη όπου φαίνεται ότι συσσωρεύεται στα νουκλεοειδή.

Σε αντίθεση με τις προηγούμενες κατασκευές, στην κατασκευή 35S::YFP:Leuko1<sub>1-494</sub> η πρωτεΐνη τοποθετήθηκε αποκλειστικά στον πυρήνα του κυττάρου (Εικόνα 15Ai-iii). Μάλιστα τις περισσότερες φορές ο φθορισμός παρόλο που στον πυρήνα ήταν διάχυτος, στίγματα που μάλλον αποτελούν πυρηνικά σωμάτια (nuclear bodies) ήταν ιδιαίτερα εμφανή (Εικόνα 15Ai-iii) (Εικόνα B1-Παράρτημα). Η επιβεβαίωση ότι το σήμα φθορισμού εντοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου πραγματοποιήθηκε με χρώση DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), η οποία δεσμεύεται εξειδικευμένα στα νουκλεϊνικά οξέα. Το πρότυπο στόχευσης της πρωτεΐνης στον πυρήνα επιβεβαιώνει την παρουσία λειτουργικών σιναλών εισόδου στον πυρήνα NLS.

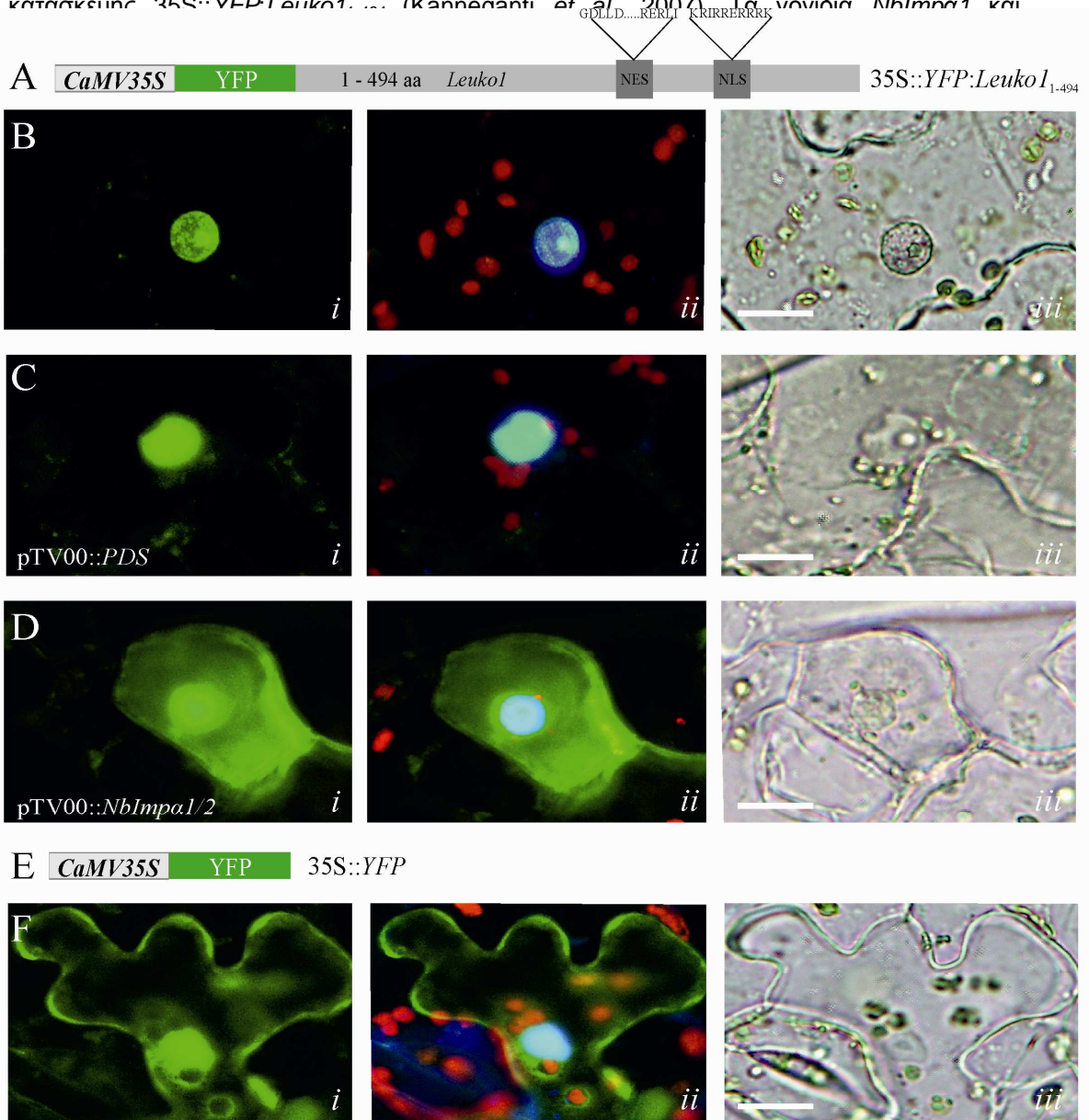


### 3.b.4 Η τοποθέτηση της πρωτεΐνης Leuko1 στον πυρήνα καθορίζεται από σινιάλα NLS μέσω του συστήματος της ιμπορτίνης-α

Το μεγαλύτερο ποσοστό των πρωτεϊνών που συντίθενται στο κυτταρόπλασμα εισέρχονται στον πυρήνα του κυττάρου μέσω του συστήματος της ιμπορτίνης-α (Kanneganti *et al.*, 2007). Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν στην περίπτωση της πρωτεΐνης Leuko1 η



εισαγωγή εξαρτάται από την ιμπορτίνη-α, εφαρμόστηκε η τεχνική VIGS (Virus Induced Gene Silencing), ώστε να απενεργοποιηθεί το σύστημα της ιμπορτίνης-α που εντοπίζεται στον πυρηνικό φάκελο και τότε να προσδιοριστεί το πρότυπο υποκυτταρικής τοποθέτησης της κατασκευής 35S::YFP:Leuko1... (Kanneganti *et al.* 2007). Τα νουκίδια *NbImpa1* και



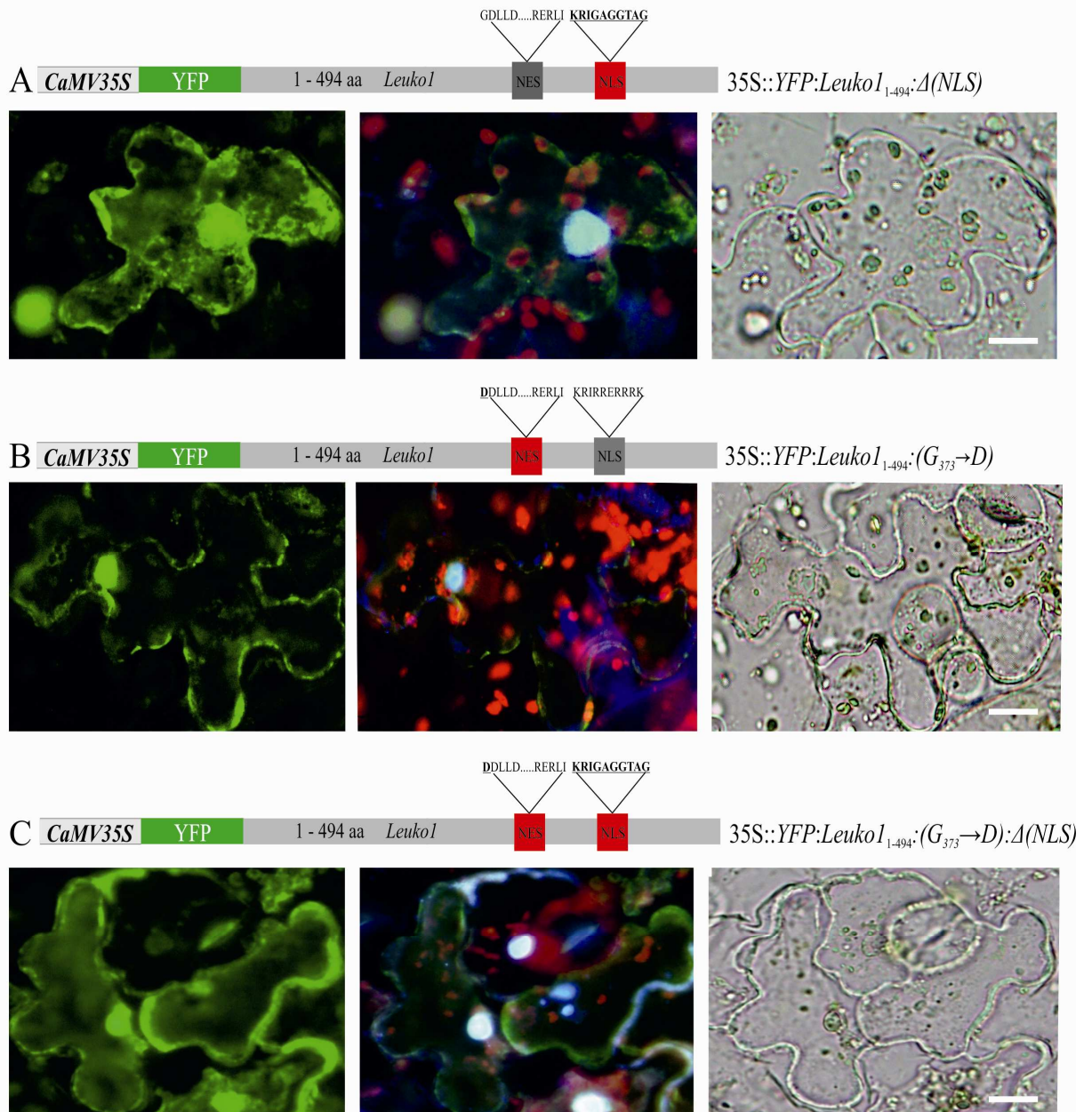
τα παραπάνω αποτελέσματα σε συμφωνία με τη ρισοπληροφορική ανάλυση αποδεικνύουν ότι το πεπτίδιο "KRIRRRERRK" της πρωτεΐνης Leuko1 αποτελεί ένα λειτουργικό σινιάλο εισόδου NLS το οποίο αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς τοποθέτησης της πρωτεΐνης στον πυρήνα.

**Εικόνα 15.** Υποκυτταρική τοποθέτηση της κατασκευής σύντηξης 35S::YFP:Leuko1<sup>1-494</sup> με το γονίδιο αναφοράς YFP στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης Leuko1 για την κατάργηση του πεπτιδίου συνθήματος στον χλωροπλάστη.

(A) Σχηματική απεικόνιση της κατασκευής 35S::YFP:Leuko1<sup>1-494</sup>. Πειράματα *in planta* παροδικής έκφρασης σε επιδερμικά κύτταρα φύλλων καπνού *Nicotiana benthamiana* της κατασκευής 35S::YFP:Leuko1<sup>1-494</sup> (B) με στόχευση στον πυρήνα, (C) με στόχευση στον πυρήνα παρόλο που τα φύλλα καπνού βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο χλώρωσης εξαιτίας της αποσιώπησης του γονιδίου *PDS* και (D) με απώλεια της αποκλειστικής στόχευσης στον πυρήνα εξαιτίας της παροδικής αποσιώπησης των γονιδίων της ιμπορτίνης-α, *Nblmpa1* και *Nblmpa2*, με αποτέλεσμα τον αποκλεισμό μέρους της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα. (E) Σχηματική απεικόνιση και (F) υποκυτταρική τοποθέτηση της κατασκευής 35S::YFP που χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης στόχευσης στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα. Όπου (i) φίλτρο πράσινου φθορισμού για ανίχνευση της πρωτεΐνης αναφοράς YFP, (ii) φωτογραφία από πολλαπλή επικάλυψη εικόνων από το φίλτρο για την ανίχνευση του πράσινου φθορισμού από την YFP, από το φίλτρο της ροδαμίνης που καταγράφει τον αυτοφθορισμό της χλωροφύλλης και το φίλτρο που καταγράφει το μπλε φθορισμό από τη χρώση DAPI του πυρήνα, και (iii) φωτογραφία από φακό οπτικού τύπου Nomarsky. Κλίμακα: 10Μμ

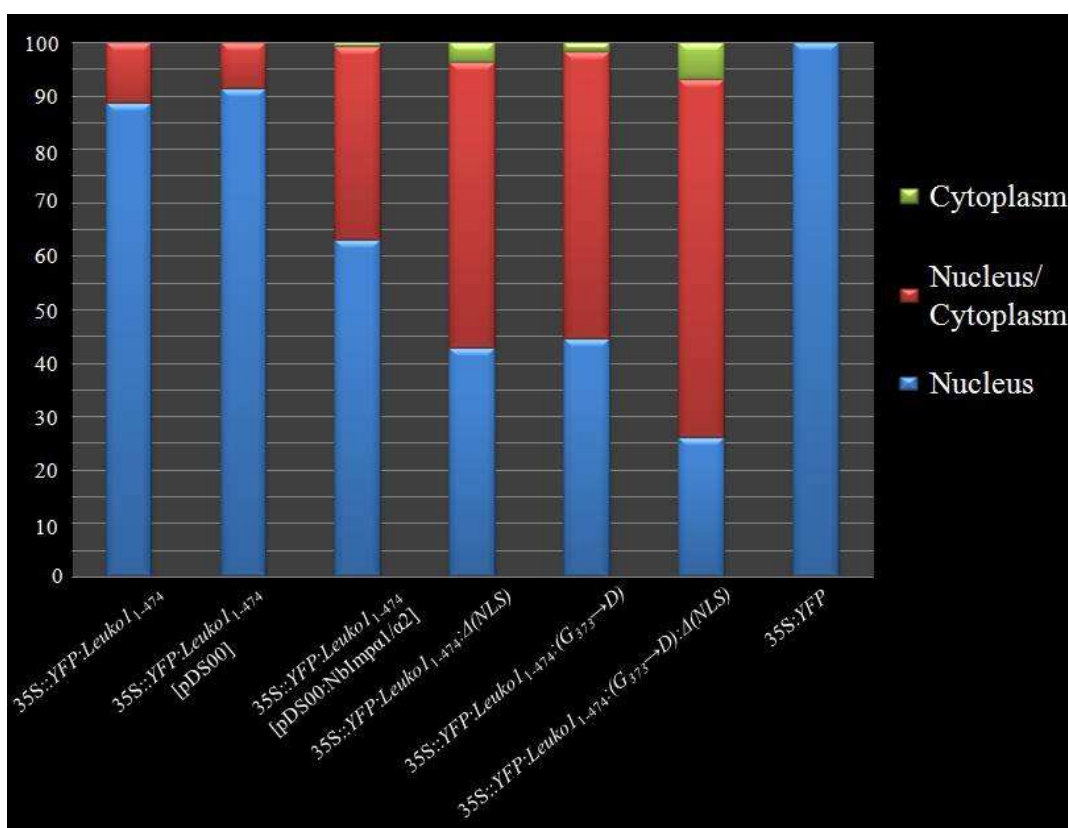
### 3.b.5 Η μετάλλαξη *leuko1* ενισχύει την έξοδο της πρωτεΐνης από τον πυρήνα

Στη μετάλλαξη *leuko1* η αμινοξική υποκατάσταση του αμινοξέως της Γλυκίνης στη θέση 373 σε Ασπαρτικό οξύ εντοπίζεται σε πιθανό σινιάλο εξόδου NES (Nuclear Export Signal) της πρωτεΐνης από τον πυρήνα (Εικόνα 9). Με βάση την βιοπληροφορική ανάλυση η τροποποίηση αυτή φαίνεται να ενισχύει την εκροή της πρωτεΐνης Leuko1 από τον πυρήνα



**Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση και υποκυτταρική τοποθέτηση των κατασκευών σύντηξης του γονιδίου *Leuko1* με γονίδιο αναφοράς *YFP* με τροποποιημένα σιινάλα εισόδου *NLS* και εξόδου *NES* της πρωτεΐνης στον και από τον πυρήνα.**

Αποτελέσματα στόχευσης (A) της κατασκευής  $35S::YFP:Leuko1_{1-494}:\Delta(NLS)$ , (B) της κατασκευής  $35S::YFP:Leuko1_{1-494}:(G373\rightarrow D)$  και (C) της κατασκευής  $35S::YFP:Leuko1_{1-494}:(G373\rightarrow D):\Delta(NLS)$  εκτός από τον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα. Οι χειρισμοί έγιναν με πειράματα *in planta* παροδική έκφρασης σε επιδερμικά κύτταρα φύλλων καπνού *Nicotiana benthamiana*. Όπου (i) φίλτρο πράσινου φθορισμού για ανίχνευση της πρωτεΐνης αναφοράς *YFP*, (ii) φωτογραφία από πολλαπλή επικάλυψη εικόνων από το φίλτρο για την ανίχνευση του πράσινου φθορισμού από την *YFP*, από το φίλτρο της ροδαμίνης που καταγράφει τον αυτοφθορισμό της χλωροφύλλης και το φίλτρο που καταγράφει το μπλε φθορισμό από τη χρώση *DAPI* του πυρήνα και (iii) φωτογραφία από φακό οπτικού τύπου *Nomarsky*. Κλίμακα: 10μM





**Πίνακας 2. Στατιστική καταγραφή των κυττάρων με σήμα φθορισμού στην επιφάνεια του ελάσματος του φύλλου φυτών καπνού *Nicotiana benthamiana* με βάση το πρότυπο υποκυτταρικής τοποθέτησης.**

Η κλίμακα με μπλε χρώμα αντιστοιχεί σε υποκυτταρική στόχευση στον πυρήνα, με κόκκινο σε ταυτόχρονη στόχευση στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα και με πράσινο αντιστοιχία σε περιορισμό της στόχευσης στο κυτταρόπλασμα. Οι μετρήσεις έγιναν 72 ώρες μετά την προσβολή των επιδερμικών κυττάρων του φύλλου. Αναλύθηκε δείγμα τουλάχιστον 40 κύτταρα σε σύνολο τεσσάρων βιολογικών επαναλήψεων.

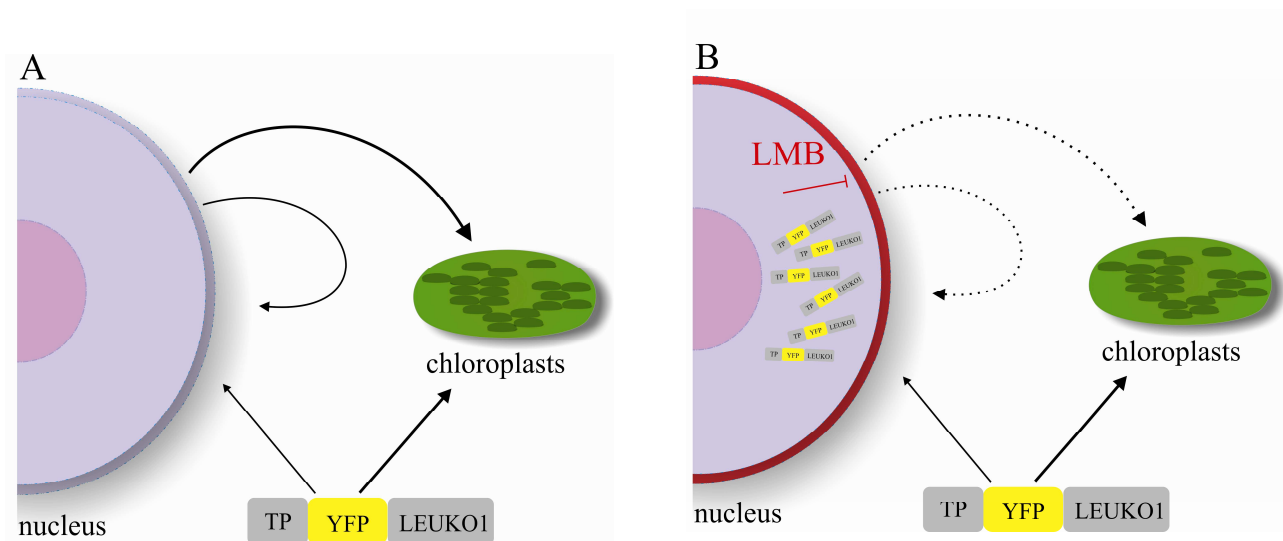
**3.b.6 Η έξοδος της πρωτεΐνης Leuko1 από τον πυρήνα αναστέλλεται από τη λεπτομυκίνη B**

Σε κύτταρα φύλλων καπνού μετασηματισμένα με την κατασκευή 35S::Leuko1<sub>1-173</sub>:YFP:Leuko1<sub>174-494</sub> παρόλο που τα προηγούμενα πειράματα αποδεικνύουν την παρουσία σινιάλου τοποθέτησης στον πυρήνα NLS, η πρωτεΐνη εξαιτίας του πεπτιδίου συνθήματος τοποθετείται αποκλειστικά στον χλωροπλάστη (Εικόνα 14B). Αυτό μάλλον γίνεται, γιατί με το γονίδιο αναφοράς YFP παρατηρείται συνολικά το τελικό αποτέλεσμα της τοποθέτησης της πρωτεΐνης. Αρχικά δηλαδή η πρωτεΐνη εισέρχεται ταυτόχρονα στον πυρήνα και τους χλωροπλάστες. Με την είσοδο της όμως στον πυρήνα εξέρχεται εξαιτίας του σινιάλου NES και μετακινείται στο κυτταρόπλασμα όπου εκ νέου κατανέμεται μεταξύ πυρήνα και χλωροπλάστη. Με αυτή τη διαδρομή ενδοκυτταρικής μετακίνησης της πρωτεΐνης είναι φανερό ότι αθροιστικά αυτή συσσωρεύεται στον χλωροπλάστη, με αποτέλεσμα το δυναμικό πρότυπο τοποθέτησης της στον πυρήνα να μην είναι διακριτό (Εικόνα 17A). Εάν ισχύει αυτή η υπόθεση τότε θα πρέπει η εφαρμογή Λεπτομυκίνης B (LMB, Leptomycin B) να παγώσει τη διαδικασία διακίνησης αποκαλύπτοντας την τοποθέτηση της Leuko1 εκτός από τον χλωροπλάστη και στον πυρήνα (Εικόνα 17B).

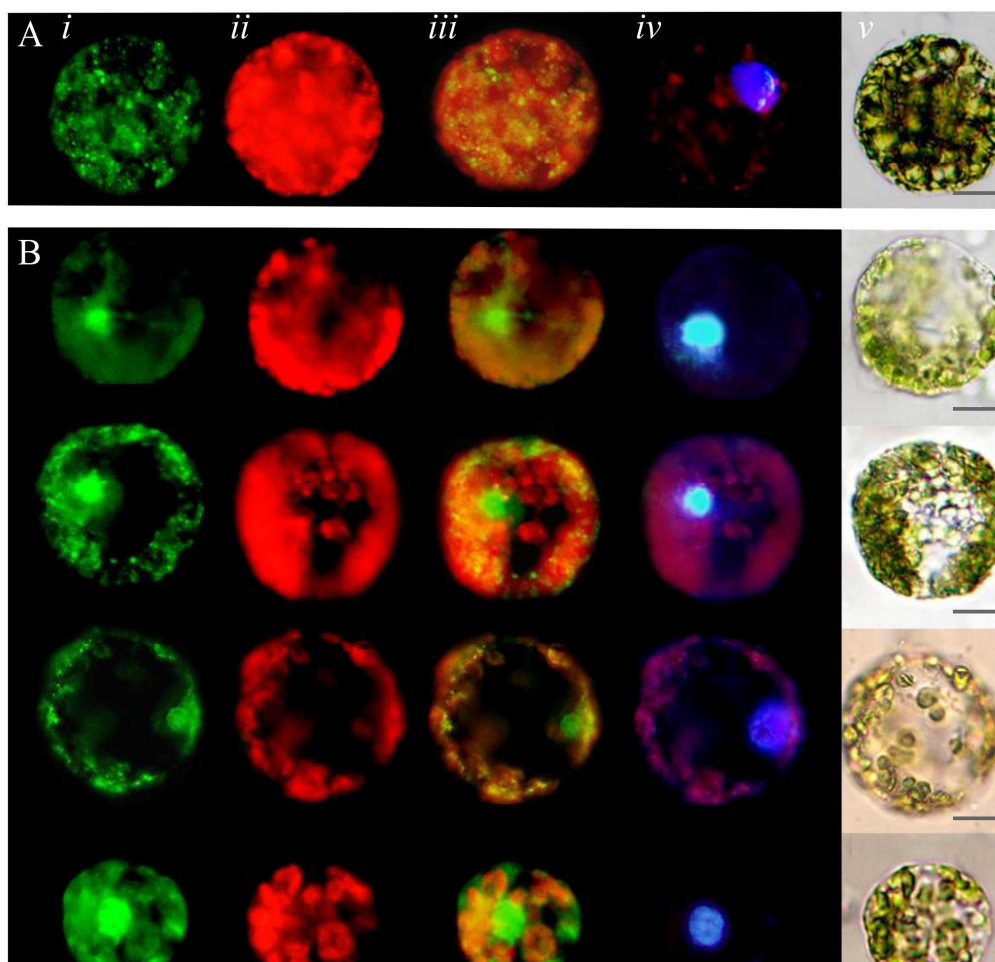
Η LMB είναι ένας ισχυρός αναστολέας της εξόδου των πρωτεϊνών από τον πυρήνα (Nishi *et al.*, 1994, Kudo *et al.* 1998, Kudo *et al.* 1999). Έχει χαρακτηριστεί ότι αναστέλλει την λειτουργία της πρωτεΐνης CRM1/exportin 1, η οποία αναγνωρίζει τις πρωτεΐνες που έχουν NES (Nuclear Export Signal) και είναι υπεύθυνη για την έξοδό τους από τον πυρήνα (Fornerod *et al.*, 1997, Fukuda *et al.*, 1997, Ossareh-Nazari *et al.*, 1997). Παρόλο που η εφαρμογή της LMB σε πειράματα με φυτικά κύτταρα είναι αρκετά περιορισμένη και έχει πραγματοποιηθεί σε λίγες μόνο περιπτώσεις, έχει αποδειχθεί ότι η ομόλογη πρωτεΐνη του *Arabidopsis* CRM1/exportin1 περιέχει τη συντηρημένη Κυστεΐνη που αλκυλιώνεται από τη LMB (Kudo *et al.*, 1999).

Παρατήρηση της υποκυτταρικής τοποθέτησης της κατασκευής 35S::Leuko1<sub>1-173</sub>:YFP:Leuko1<sub>174-494</sub> εφαρμόζοντας LMB σε πρωτοπλάστες κυττάρων του φυλλικού παρεγχύματος επιβεβαίωσε την υπόθεση αυτή. Με την παρεμπόδιση της εξόδου της πρωτεΐνης από τον πυρήνα εξαιτίας της εφαρμογής της LMB, το σήμα φθορισμού δεν εντοπίζεται μόνο στους χλωροπλάστες, όπως φαίνεται στον χειρισμό του μάρτυρα (Εικόνα 18A), αλλά και στον πυρήνα (Εικόνα 18B). Επιπλέον, τα αποτελέσματα στην Εικόνα 18 αποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη Leuko1 διαθέτει λειτουργικό σινιάλο NES, αφού η αναστολή

της πρωτεΐνης CRM1/exportin 1 που αναγνωρίζουν πυρηνικές πρωτεΐνες με NES από τη LMB, έχει σαν αποτέλεσμα συσσώρευση της Leuko1 στον πυρήνα.



**Εικόνα 17.** Τρόπος τοποθέτησης της κατασκευής 35S::(*TP*)LEUKO1-YFP με τη δράση της LMB. Τελικός αποδέκτης είναι ο χλωροπλάστης, αλλά η LMB μπλοκάρει την εξαγωγή της κατασκευής 35S::Leuko<sub>1-173</sub>:YFP:Leuko<sub>174-494</sub>, ενώ αυτή μεταφέρεται από και προς τον πυρήνα.



**Εικόνα 18.** Η εφαρμογή LMB σε πρωτοπλάστες κυττάρων καπνού έχει σαν αποτέλεσμα την τοποθέτηση της κατασκευής  $35S::Leuko1_{1-173}:YFP:Leuko1_{174-494}$  στον πυρήνα εκτός από τους χλωροπλάστες.

Η κατασκευή  $35S::Leuko1_{1-173}:YFP:Leuko1_{174-494}$  τοποθετείται (Α) στους χλωροπλάστες χωρίς την εφαρμογή LMB και (Β) στους χλωροπλάστες αλλά και στον πυρήνα με εφαρμογή 2μM LMB. (Γ) Πρωτοπλάστης που δεν έχει μετασχηματισθεί, χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας. Στην στήλη (i) οι εικόνες έχουν αποτυπωθεί με φίλτρο πράσινου φθορισμού για ανίχνευση της πρωτεΐνης αναφοράς YFP, (ii) με το φίλτρο της ροδαμίνης που καταγράφει τον αυτοφθορισμό της χλωροφύλλης, (iii) φωτογραφίες από επικάλυψη εικόνων από το φίλτρο για την ανίχνευση του πράσινου φθορισμού και του αυτοφθορισμού της χλωροφύλλης, (iv) φωτογραφίες από το φίλτρο που καταγράφει το μπλε φθορισμό από τη χρώση DAPI του πυρήνα και (v) φωτογραφίες από φακό οπτικού τύπου Nomarsky. Κλίμακα: 5Μμ

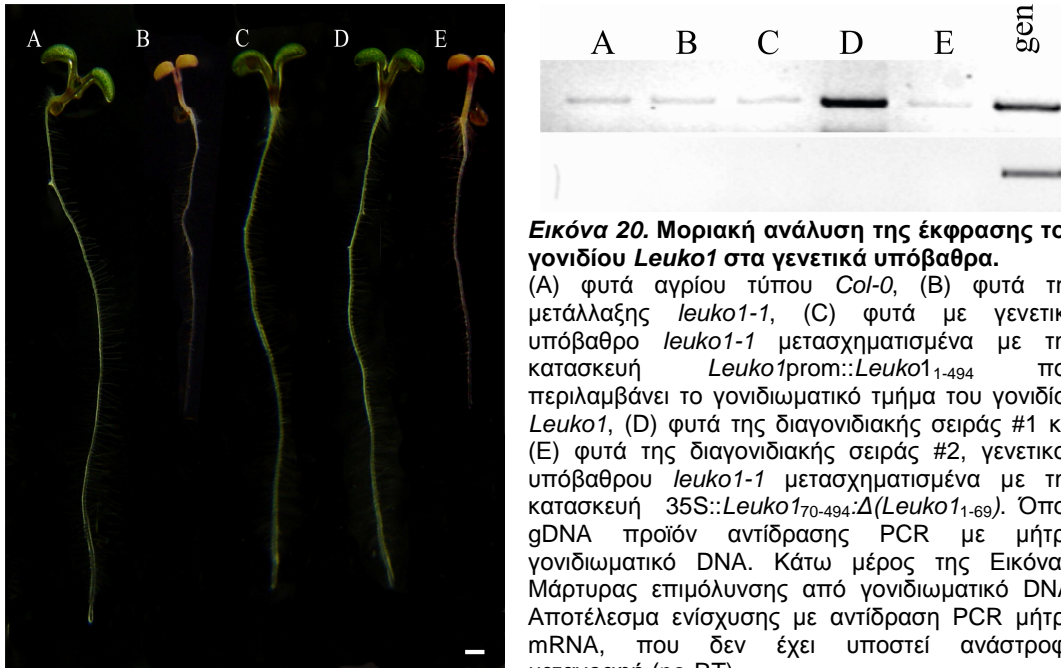
### 3.b.7 Η αποκλειστική τοποθέτηση της πρωτεΐνης Leuko1 στον πυρήνα συμπληρώνει το φαινότυπο της μετάλλαξης *leuko1-1*

Από τα αποτελέσματα υπάρχουν ενδείξεις ότι το έλλειμμα της πρωτεΐνης Leuko1 στον πυρήνα, το οποίο δημιουργείται εξαιτίας της ισχυροποίησης του σινιάλου εξόδου (NES) από την αμινοξική υποκατάσταση  $G_{373} \rightarrow D$ , φαίνεται να ευθύνεται για το φαινότυπο του μεταλλάγματος *leuko1-1*. Έτσι, δημιουργήθηκε η κατασκευή  $35S::Leuko1_{70-494}:\Delta(Leuko1_{1-69})$  από την οποία έχουν αφαιρεθεί τα πρώτα 69 αμινοξέα που φαίνεται ότι κωδικοποιούν το πεπτιδίο συνθήματος για το χλωροπλάστη και τροποποίηση του αμινοξέως Βαλίνη στη Θέση 69 σε Μεθειονίνη.

Έτσι, με τα μέχρι στιγμής πειραματικά αποτελέσματα η συγκεκριμένη κατασκευή αναμένεται να οδηγήσει την πρωτεΐνη αποκλειστικά στον πυρήνα και όχι στο χλωροπλάστη. Με αυτήν την κατασκευή μετασχηματίστηκαν μεταλλάγματα *leuko1-1* και το αποτέλεσμα ήταν η συμπλήρωση του φαινοτύπου. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 19D η διαγονιδιακή σειρά #1 σε αντίθεση με τη σειρά #2 (Εικόνα 19Ε) που έχουν μετασχηματιστεί με την κατασκευή  $35S::Leuko1_{70-494}:\Delta(Leuko1_{1-69})$  αποκτά φαινότυπο φυτών αγρίου τύπου (Εικόνα 19Α). Επομένως, όταν η πρωτεΐνη Leuko1 με την αφαίρεση του πεπτιδίου συνθήματος για τον χλωροπλάστη, τοποθετηθεί αποκλειστικά στον πυρήνα εξαιτίας των λειτουργικών σινιάλων NLS, τότε το έλλειμμα των φυτών της μετάλλαξης *leuko1-1* εξαιτίας της ενίσχυσης του σινιάλου NES από την υποκατάσταση  $G_{373} \rightarrow D$  αποκαθίστανται. Τα φυτά της σειράς #1

εξαιτίας της διαγονιδιακής αυτής κατασκευής αποκτούν πράσινες κοτυληδόνες και είναι όμοια με τα φυτά αγρίου τύπου.

Η μοριακή πιστοποίηση της έκφρασης του γονιδίου *Leuko1* που οδηγείται από τον υποκινητή *CaMV35S* έγινε με ημιποσοτικό RT-PCR. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι πραγματικά στην διαγονιδιακή σειρά #1 σε αντίθεση με τη σειρά #2 το γονίδιο *Leuko1* υπερεκφράζεται (Εικόνα 20). Η έκφραση του γονιδίου στα φυτά της σειράς #2 είναι πολύ χαμηλή παρόλο που η έκφραση οδηγείται από τον υποκινητή *CaMV35S* γεγονός που υποδηλώνει ότι η θέση ένθεσης του διαγονιδίου δεν υποστηρίζει τη σωστή λειτουργικότητα της κασέτας *CaMV35S*. Έτσι τα φυτά της σειράς #2 εξακολουθούν να παρουσιάζουν έλλειμμα πρωτεΐνης στον πυρήνα και συνεπώς να έχουν χλωρωτικές κοτυληδόνες (Εικόνα 19).



**Εικόνα 20. Μοριακή ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου *Leuko1* στα γενετικά υπόβαθρα.**

(A) φυτά αγρίου τύπου *Col-0*, (B) φυτά της μετάλλαξης *leuko1-1*, (C) φυτά με γενετικό υπόβαθρο *leuko1-1* μετασχηματισμένα με την κατασκευή *Leuko1prom::Leuko1<sub>1-494</sub>* που περιλαμβάνει το γονιδιωματικό τμήμα του γονιδίου *Leuko1*, (D) φυτά της διαγονιδιακής σειράς #1 και (E) φυτά της διαγονιδιακής σειράς #2, γενετικού υπόβαθρου *leuko1-1* μετασχηματισμένα με την κατασκευή *35S::Leuko1<sub>70-494</sub>:Δ(Leuko1<sub>1-69</sub>)*. Όπου gDNA προϊόν αντίδρασης PCR με μήτρα γονιδιωματικό DNA. Κάτω μέρος της Εικόνας: Μάρτυρας επιμόλυνσης από γονιδιωματικό DNA. Αποτέλεσμα ενίσχυσης με αντίδραση PCR μήτρα mRNA, που δεν έχει υποστεί ανάστροφη μεταγραφή (no-RT).

**Εικόνα 19. Φαινότυπος των σποροφύτων ηλικίας 6-ημερών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της έκφρασης χλωροπλαστικών γονιδίων.**

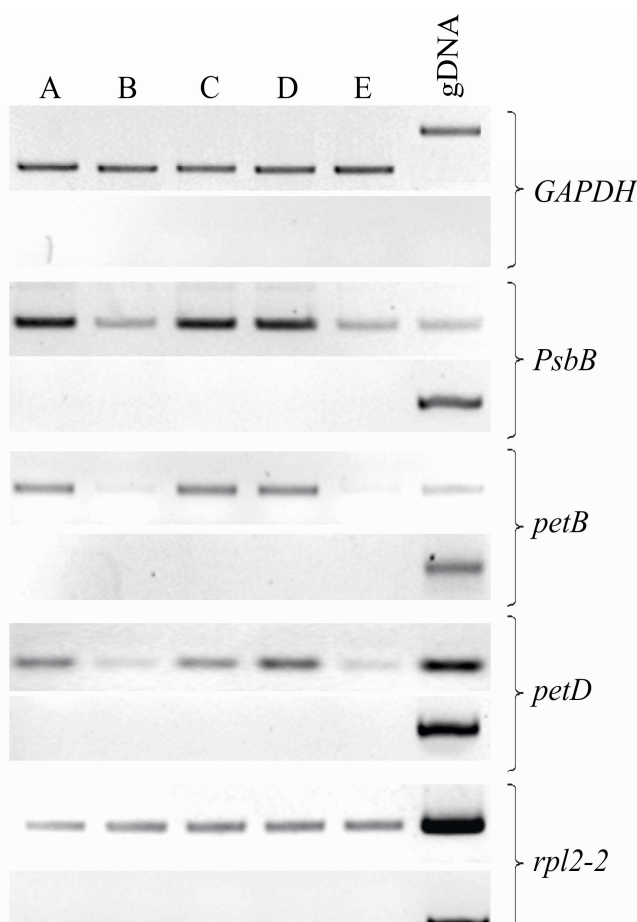
(A) φυτά αγρίου τύπου *Col-0*, (B) φυτά της μετάλλαξης *leuko1-1*, (C) φυτά με γενετικό υπόβαθρο *leuko1-1* μετασχηματισμένα με την κατασκευή *Leuko1prom::Leuko1<sub>1-494</sub>* που περιλαμβάνει το γονιδιωματικό τμήμα του γονιδίου *Leuko1*, (D) φυτά της διαγονιδιακής σειράς #1 και (E) φυτά της διαγονιδιακής σειράς #2, γενετικού υπόβαθρου *leuko1-1* μετασχηματισμένα με την κατασκευή *35S::Leuko1<sub>70-494</sub>:Δ(Leuko1<sub>1-69</sub>)*. Κλίμακα: 1mm.

### 3.b.8 Το επίπεδα έκφρασης των χλωροπλαστικών γονιδίων *PsbB*, *PetB* και *PetD* είναι χαμηλό στο μετάλλαγμα *leuko1-1*

Το πολυκιστρονικό μεταγράφημα του οπερονίου *psbB* κωδικοποιεί τρία γονίδια *PsbB*, *PsbT* και *PsbH* του φωτοσυστήματος II και δύο γονίδια *petB* και *petD* του συμπλέγματος *b6f* του κυτοχρώματος (Monod *et al.*, 1994, Barkan, 1988; Westhoff και Herrmann, 1988). Το μεταγράφημα αυτό συναρμολογείται σε πολυσώματα και λειτουργεί ως mRNA (Barkan, 1988). Επειδή στη μετάλλαξη του καλαμποκιού *wtf1* (*What's This Factor?*) που έχει χαρακτηρισμένο τμήμα PORR και εμφανίζει χλωρωτικά φύλλα, τα γονίδια του συγκεκριμένου οπερονίου παρουσιάζουν πρόβλημα έκφρασης (Kroeger *et al.*, 2009),

πραγματοποιήθηκε έλεγχος της έκφρασης τους στο μετάλλαγμα *leuko1-1* με ημιποσοτικό RT-PCR. Για τα πειράματα ολικό RNA απομονώθηκε από κοτυληδόνες φυτών αγρίου τύπου *Col-0*, του μεταλλάγματος *leuko1-1*, αλλά και από φυτά *leuko1-1* μετασχηματισμένα με την κατασκευή  $35S::Leuko1_{70-494}:\Delta(Leuko1_{1-69})$  ή την κατασκευή  $Leuko1prom::Leuko1_{1-494}$ . Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PsbB*, *petB* και *petD* είναι μειωμένα στις κοτυληδόνες των μεταλλαγμάτων *leuko1-1* και στα φυτά της διαγονιδιακής σειράς #2 με γενετικό υπόβαθρο *leuko1-1* μετασχηματισμένα με την κατασκευή  $35S::Leuko1_{70-494}:\Delta(Leuko1_{1-69})$  (Εικόνα 21). Τα φυτά αυτά, όπως φαίνεται στην Εικόνα 19, έχουν χλωρωτικές κοτυληδόνες. Σε αντίθεση στα φυτά όπου οι κοτυληδόνες είναι φυσιολογικά πράσινες, όπως τα φυτά αγρίου τύπου και τα μετασχηματισμένα φυτά *leuko1-1* με την κατασκευή  $35S::Leuko1_{70-494}:\Delta(Leuko1_{1-69})$  διαγονιδιακή σειρά #1, και την κατασκευή  $Leuko1prom::Leuko1_{1-494}$  (Εικόνα 19), η έκφραση των γονιδίων *PsbB*, *petB* και *petD* δεν παρουσιάζει πρόβλημα (Εικόνα 21). Ενδιαφέρον συγκεντρώνει η παρατήρηση ότι η έκφραση του γονιδίου *rpl2-2* (ribosomal protein L20) στα χλωρωτικά φυτά με διαταραγμένα τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων του οπερονίου *psbB* δεν φαίνεται να μεταβάλλεται (Εικόνα 21).

Συμπερασματικά, η έκφραση του χλωροπλαστικού γονιδίου *rpl2-2*, σε αντίθεση με τα γονίδια *psb*, *petB* και *petD* δεν αλλάζει σε φυτά με γενετικό υπόβαθρο *leuko1-1* όπου δεν συμπληρώνεται η λειτουργία. Συνεπώς, ο φαινότυπος των χλωρωτικών κοτυληδόνων στα φυτά με γενετικό υπόβαθρο *leuko1-1* φαίνεται ότι σχετίζεται άμεσα με τα μειωμένα επίπεδα μεταγραφημάτων χλωροπλαστικών γονιδίων που συσχετίζονται με βασικές λειτουργίες του χλωροπλάστη, όπως είναι η φωτοσύνθεση.



**Εικόνα 21. Μοριακή ανάλυση της έκφρασης χλωροπλαστικών γονιδίων σε γενετικά υπόβαθρα**

(A) φυτά αγρίου τύπου *Col-0*, (B) φυτά της μετάλλαξης *leuko1-1*, (C) φυτά με γενετικό υπόβαθρο *leuko1-1* μετασχηματισμένα με την κατασκευή  $Leuko1prom::Leuko1_{1-494}$  που περιλαμβάνει το γονιδιωματικό τμήμα του γονιδίου *Leuko1*, (D) φυτά της διαγονιδιακής σειράς #1 και (E) φυτά της διαγονιδιακής σειράς #2, γενετικού υπόβαθρου *leuko1-1* μετασχηματισμένα με την κατασκευή  $35S::Leuko1_{70-494}:\Delta(Leuko1_{1-69})$ . Όπου gDNA προϊόν

αντίδρασης PCR με μήτρα γονιδιωματικό DNA. Κάτω μέρος κάθε επιμέρους τμήματος ανάλυσης έκφρασης γονιδίου: Μάρτυρας επιμόλυνσης από γονιδιωματικό DNA. Αποτέλεσμα ενίσχυσης με αντίδραση PCR μήτρα mRNA, που δεν έχει υποστεί ανάστροφη μεταγραφή (no-RT).

### 3.b.9 Το μάτισμα γονιδίων του πυρήνα στο μετάλλαγμα *leuko1-2* δεν είναι λειτουργικό

Συνοπτικά, τα μέχρι στιγμή αποτελέσματα με βάση την ανάλυση του αλληλομόρφου *leuko1-1* με χλωρωτικές κοτυληδόνες αποδεικνύουν ότι η μεταβολή G<sub>373</sub>→D ενισχύει το σινιάλου εξόδου NES της πρωτεΐνης *Leuko1* από τον πυρήνα. Συνεπώς, η διαταραχή αυτή της ομοιόστασης στον πυρήνα φαίνεται να ευθύνεται για το φαινότυπο *leuko1-1*. Η μοριακή ανάλυση της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούνται από το χλωροπλαστικό γονιδίωμα αποκάλυψε ότι σημαντικά γονίδια των φωτοσυστημάτων και κατά επέκταση της φωτοσύνθεσης παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης, μολονότι δεν φαίνεται να υπάρχει έλλειμμα της πρωτεΐνης στον χλωροπλάστη. Οι ανωμαλίες αυτές στον χλωροπλάστη φαίνεται λοιπόν να συνδέονται με το έλλειμμα πρωτεΐνης στον πυρήνα, παρατήρηση που αναδεικνύει τη συμμετοχή της πρωτεΐνης *Leuko1* στην ωρίμανση των μνηυμάτων γονιδίων του πυρήνα που τοποθετούνται στον χλωροπλάστη επηρεάζοντας την λειτουργία του οργανιδίου.

Ένα καλό βιολογικό σύστημα για να διερευνηθεί η προτεινόμενη υπόθεση είναι ο αλληλόμορφος *leuko1-2*. Η ανάπτυξη του μεταλλάγματος *leuko1-2* σταματά στην εμβρυογένεση, εξαιτίας T-DNA ένθεσης στον υποκινητή του γονιδίου At5g62990 με αποτέλεσμα το γονίδιο να μην εκφράζεται. Το γεγονός αυτό αναδεικνύει το σημαντικό ρόλο της πρωτεΐνης στην ανάπτυξη του εμβρύου και κατά επέκταση στην εγκατάσταση και ανάπτυξη του φυτού. Αξιοσημείωτη είναι επίσης η αναφορά ότι η πρωτεΐνη WTF1 του φυτού *Zea mays* που περιέχει το τμήμα PORR (Plant Organelle Rna Recognition motif) συμμετέχει στο μάτισμα των ιντρονίων κατηγορίας II χλωροπλαστικών γονιδίων (Kroeger *et al.*, 2009). Όπως η πρωτεΐνη WTF1 του καλαμποκιού, έτσι και η πρωτεΐνη *Leuko1* του *Arabidopsis* περιέχει το τμήμα PORR, τοποθετείται στον χλωροπλάστη αλλά και στον πυρήνα. Έτσι, κρίθηκε σκόπιμο να εξεταστεί το μάτισμα πυρηνικών γονιδίων στο μετάλλαγμα *leuko1-2* απομονώνοντας ομοζυγωτά έμβρυα από ετεροζυγωτά φυτά *leuko1-2*.

Η επιλογή των γονιδίων που εξετάστηκαν έγινε εφαρμόζοντας τα εξής κριτήρια: (i) να εκφράζονται στο ίδιο περίπου αναπτυξιακό στάδιο με το γονίδιο *Leuko1*, (ii) οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν να έχουν διακριτό πεπτιδίο συνθήματος στο N-τελικό άκρο για στόχευση στους χλωροπλάστες και (iii) τα ιντρόνια τους να έχουν χαρακτηριστικά παρόμοια με τα ιντρόνια κατηγορίας II των χλωροπλαστικών γονιδίων, όπως μεγάλο μέγεθος ιντρονίου ως προϋπόθεση για χαρακτηριστική δευτεροταγή δομή. Πράγματι τα γονίδια που επιλέχθηκαν μεταξύ άλλων είναι τα At1g03160 και At1g67660, τα οποία συνεκφράζονται σε υψηλό ποσοστό με το γονίδιο *Leuko1*, οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν τοποθετούνται στο χλωροπλάστη και έχουν ασυνήθιστα μεγάλα ιντρόνια μολονότι εδράζουν στο πυρηνικό γονιδίωμα. Το γονίδιο At1g03160 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη FZO-like GTPase (*fuzzy onions gene*), που τοποθετείται στο χλωροπλάστη και έχει αναφερθεί ότι συμμετέχει στη βιογένεση των θυλακοειδών του χλωροπλάστη (Gao *et al.*, 2006). Το γονίδιο At1g67660 κωδικοποιεί

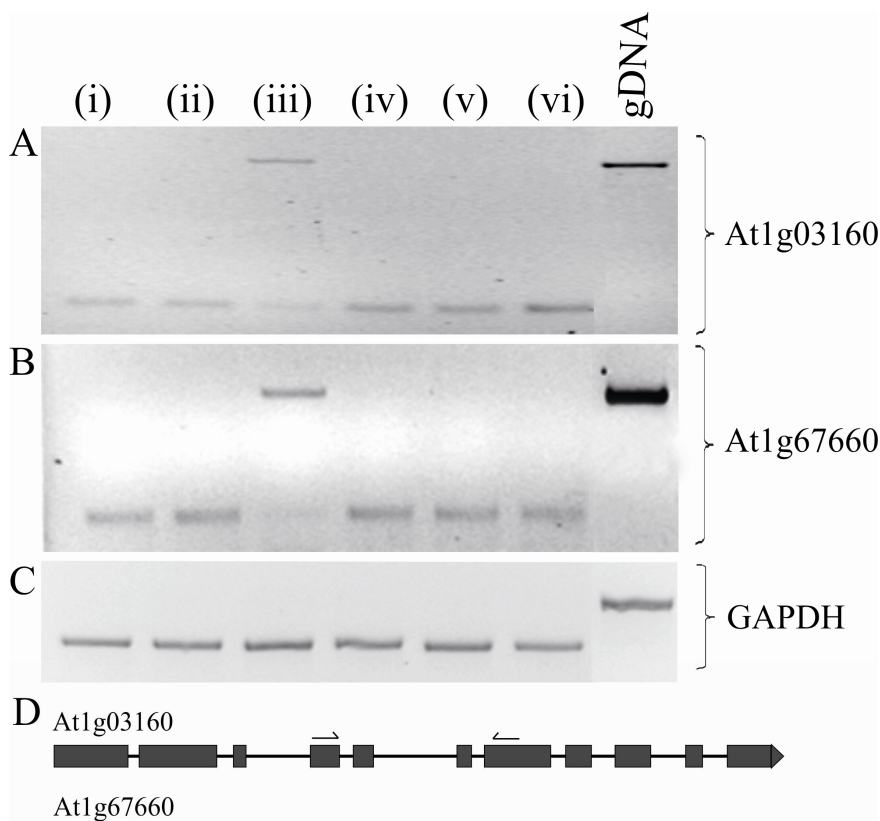


την πρωτεΐνη ενδονουκλεάση περιορισμού τύπου-II (*Restriction endonuclease, type II-like*), η οποία τοποθετείται στα πλαστίδια όπως προβλέπουν οι βάσεις δεδομένων.

Ο έλεγχος της διαδικασίας μάτισματος των γονιδίων *At1g03160* και *At1g67660* ώστε να πιστοποιηθεί η παρουσία ή όχι ώριμων μεταγραφημάτων με ιντρόνια πραγματοποιήθηκε με ημιποσοτικό RT-PCR σε ολικό RNA που απομονώθηκε από ομοζυγωτά *leuko1-2* θνησιγενή έμβρυα. Η ίδια τεχνική εφαρμόστηκε σε δείγματα από έμβρυα του ίδιου αναπτυξιακού σταδίου φυτών αγρίου τύπου *Col-0*, φυτών της μετάλλαξης *leuko1-1*, φυτών γενετικού υπόβαθρου *leuko1-1* μετασχηματισμένα με την κατασκευή *Leuko1prom::Leuko1<sub>1-494</sub>* που περιλαμβάνει το γονιδιωματικό τμήμα του γονιδίου *Leuko1*, και φυτών της διαγονιδιακής σειράς #1 και σειράς #2 με γενετικό υπόβαθρο *leuko1-1* μετασχηματισμένα με την κατασκευή *35S::Leuko1<sub>70-494</sub>:Δ(L<sub>1-69</sub>)* (Εικόνα 22). Οι εκκινητές που επιλέχθηκαν για την ανάλυση υβριδίζουν εκατέρωθεν του κάθε ιντρονίου των δύο γονιδίων (Εικόνα 22D). Συγκεκριμένα, για το γονίδιο *At1g03160* το ζευγάρι των εκκινητών υβριδίζει στο 4<sup>ο</sup> και στο 7<sup>ο</sup> εξώνιο, με αποτέλεσμα εάν το μάτισμα έχει πρόβλημα το προϊόν ενίσχυσης του μεταγραφήματος με τα ιντρόνια 4-6 να έχει μέγεθος. Στην περίπτωση όμως που το μάτισμα γίνεται κανονικά το αναμενόμενο προϊόν έχει μέγεθος 270bp. Για το γονίδιο *At1g67660* το ζευγάρι των εκκινητών υβριδίζει στο 1<sup>ο</sup> και στο 2<sup>ο</sup> εξώνιο, με αποτέλεσμα εάν το μάτισμα έχει πρόβλημα το προϊόν ενίσχυσης του μεταγραφήματος με το μοναδικό ιντρόνιο να έχει μέγεθος 690bp. Στην περίπτωση όμως που το μάτισμα γίνεται κανονικά το αναμενόμενο προϊόν έχει μέγεθος 280bp. Με αυτόν τον πειραματικό σχεδιασμό μπορεί να ελεγχθεί η παρουσία ιντρονίου στο μεταγράφημα των γονιδίων εάν υπάρχει πρόβλημα ωρίμανσης του μηνύματος.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα δείγματα των θνησιγενών εμβρύων *leuko1-2*, το μάτισμα των γονιδίων είναι προβληματικό, αφού ξεκάθαρα διακρίνεται η παρουσία μεταγραφήματος με ιντρόνια (Εικόνες 22A και 22B). Αντίθετα, στα υπόλοιπα γενετικά υπόβαθρα το μάτισμα πραγματοποιείται κανονικά, αφού δεν διακρίνεται το συγκεκριμένο προϊόν εξαιτίας της απουσίας ιντρονίου. Ο έλεγχος πιθανής επιμόλυνσης από γονιδιωματικό DNA έδωσε αρνητικά αποτελέσματα με βάση την ενίσχυση με αντίδραση PCR μήτρας mRNA, που δεν έχει υποστεί ανάστροφη μεταγραφή (no-RT).

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα πυρηνικά γονίδια *At1g03160* και *At1g67660*, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που στοχεύουν στο χλωροπλάστη, δεν επιδέχονται σωστό μάτισμα με αποτέλεσμα τα ιντρόνια να μην αποκόπτονται και το μεταγράφημα να μην είναι ώριμο και συνεπώς μη λειτουργικό. Αυτή η σημαντική πληροφορία αποκαλύπτει για πρώτη φορά τη συμμετοχή μιας πρωτεΐνης με δομή PORR και συγκεκριμένα της πρωτεΐνης *Leuko1*, στη διαδικασία μάτισματος ιντρονίων γονιδίων του πυρήνα που μοιάζουν με τα ιντρόνια κατηγορίας II των χλωροπλαστικών γονιδίων στο δικοτυλήδονο φυτό *Arabidopsis thaliana*.



**Εικόνα 22. Έλεγχος της διαδικασίας ωρίμανσης των γονιδίων At1g03160 και At1g67660**

(A) At1g03160 και At1g67660 (B) σε δείγμα ολικού RNA που απομονώθηκε από έμβρυα (i) φυτών αγρίου τύπου *Col-0*, (ii) φυτών της μετάλλαξης *leuko1-1*, (iii) φυτών της μετάλλαξης *leuko1-2*, (iv) φυτά με γενετικό υπόβαθρο *leuko1-1* μετασχηματισμένα με την κατασκευή *Leuko1prom::Leuko1<sub>1-494</sub>* που περιλαμβάνει το γονιδιωματικό τμήμα του γονιδίου *Leuko1*, (v) φυτά της διαγονιδιακής σειράς #1 και (vi) φυτά της διαγονιδιακής σειράς #2, γενετικού υπόβαθρου *leuko1-1* μετασχηματισμένα με την κατασκευή *35S::Leuko1<sub>70-494</sub>:Δ(Leuko1<sub>1-69</sub>)*. Όπου gDNA προϊόν αντίδρασης PCR με μήτρα γονιδιωματικό DNA. (C) Το *GAPDH* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς. (D) Σχηματική απεικόνιση των θέσεων που υβριδίζουν το ζευγάρι των εκκινητών για την ανάλυση των γονιδίων At1g03160 και At1g67660.



# Συζήτηση



“Συστήματα μοριακών μηχανισμών  
ανάπτυξης στα φυτά”

ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ ΔΑΡΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝ. ΑΘΗΝΩΝ  
2011

#### 4. Συζήτηση

##### 4.a.1 Η πρωτεάση Lon1 τοποθετείται στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες εξαιτίας μερικής ολίσθησης ριβοσωμάτων κατά τη σάρωση του μεταγραφήματος

Με βάση πειραματικά δεδομένα και αναλύσεις βιοπληροφορικής, εκτιμάται ότι το πρωτόμα στα μιτοχόνδρια αποτελείται από 2000 πρωτεΐνες περίπου, ενώ στα πλαστίδια από 2700 πρωτεΐνες (Millar *et al.*, 2006). Παρόλα αυτά, πρόσφατα πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν ότι οι αριθμοί αυτοί αναμένεται να αυξηθούν εξαιτίας του φαινομένου της διπλής τοποθέτησης μιας πρωτεΐνης στα δυο οργανίδια. Εξαιτίας της θεωρίας της ενδοσυμβιωτικής εξέλιξης, η δυαδική τοποθέτηση ισομορφών μιας πρωτεΐνης, οι οποίες κωδικοποιούνται από ένα γονίδιο, στα μιτοχόνδρια και τα πλαστίδια είναι συχνό φαινόμενο. Εάν και συνεχώς αποδεικνύεται πειραματικά ότι πρωτεΐνες τοποθετούνται ταυτόχρονα στα δύο οργανίδια, ελάχιστες πληροφορίες υπάρχουν για το μηχανισμό που ελέγχει τη δυαδική τοποθέτηση. Επιπλέον, παρόλο που διάφορες τεχνικές μπορούν να εφαρμοστούν για τον έλεγχο τοποθέτησης των ισομορφών μιας πρωτεΐνης στα δυο οργανίδια, αρκετές επιστημονικές εργασίες αναφέρουν ότι η τεχνική της *in vitro* εισόδου πρωτεϊνών στα οργανίδια ενδέχεται να οδηγήσει σε εσφαλμένα συμπεράσματα (Kojak, 2005; Mackenzie, 2005). Αντίθετα, η σύντηξη του γονιδίου που εξετάζεται στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με τη πρωτεΐνη φθορισμού και στη συνέχεια η *in vivo* μικροσκοπική παρατήρηση ζωντανών κυττάρων, φαίνεται να είναι η πλέον αξιόπιστη μεθοδολογία για την έρευνα και τον έλεγχο της υποκυτταρικής τοποθέτησης μιας πρωτεΐνης. Με βάση αυτή τη πειραματική προσέγγιση, παρουσιάζονται στοιχεία ότι το γονίδιο *AtLon1* κωδικοποιεί δυο πρωτεϊνικές ισομορφές με δυαδική τοποθέτηση στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες, εξαιτίας της εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης. Το πρότυπο αυτό υποκυτταρικής τοποθέτησης καθορίζεται από την επίδραση αβιοτικών συνθηκών καταπόνησης και από τον τύπο του φυτικού οργάνου.

Η μετάφραση στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς ξεκινά γενικά με τη γραμμική σάρωση του μεταγραφήματος από τα ριβοσώματα (Kojak, 2005). Σύμφωνα με αυτόν τον μηχανισμό, η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα 40S αναγνωρίζει το 5'-άκρο του mRNA και σαρώνει το μεταγράφημα ξεκινώντας από τη 5'-μη-μεταφραζόμενη περιοχή (5'-UTR) μέχρι να εντοπίσει το πρώτο κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης. Στο σημείο αυτό, η μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος συνδέεται με τη μικρή και ξεκινά η μετάφραση. Η αποτελεσματικότητα και η πιστότητα της έναρξης της μετάφρασης από το πρώτο AUG καθορίζεται από την περιοχή που περιβάλλει το κωδικόνιο έναρξης. Εάν η νουκλεοτιδική αυτή ακολουθία συμφωνεί έστω και μερικώς με την ακολουθία Kojak GCCRCCAUGG (Kojak, 2005) τότε η σάρωση του μεταγραφήματος σταματά και ξεκινά η μετάφραση από κωδικόνιο έναρξης AUG της περιοχής. Μία Πουρίνη, κατά προτίμηση Αδενίνη στη θέση -3 και μια Γουανίνη στη θέση +4, είναι οι πιο συντηρημένες βάσεις της ακολουθίας Kojak, παρόλο που στα φυτά αυτή η συντήρηση δεν είναι τόσο ισχυρή σε σχέση με τους ζωικούς οργανισμούς (Joshi *et al.*, 1997). Όταν η ακολουθία Kojak παρεκκλίνει από το συντηρημένο μοτίβο, τότε κάποια ριβοσώματα θα ξεκινήσουν την μετάφραση από το πρώτο AUG, ενώ άλλα θα συνεχίσουν τη σάρωση μέχρι τη θέση του δεύτερου AUG. Ο μηχανισμός αυτός της μερικής ολίσθησης του ριβοσώματος εξαιτίας της νουκλεοτιδικής ακολουθίας που περιβάλλει το πρώτο AUG (leaky ribosome scanning mechanism) δύναται να οδηγήσει στην παραγωγή δύο πρωτεϊνικών ισομορφών όταν δύο κωδικόνια έναρξης βρίσκονται στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο. Οι δυο αυτές πρωτεϊνικές ισομορφές τοποθετούνται τελικά σε δυο ξεχωριστά διαμερίσματα μέσα στα κύτταρο (Souciet *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 2001; Carrie *et al.*, 2009a). Σε συμφωνία με αυτό το μοντέλο, το *Lon1* mRNA περιέχει στο ίδιο αναγνωστικό

πλαίσιο δύο κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης και παράγει εξαιτίας της εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης δύο ισομορφές, τη μεγαλύτερη ισομορφή Lon1L που τοποθετείται στα πλαστίδια, και τη μικρότερη ισομορφή Lon1S που τοποθετείται στα μιτοχόνδρια. Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής περιοχής στη περιοχή των δύο κωδικονίων έναρξης αποκάλυψε ότι η ακολουθία στο δεύτερο AUG “CCCACCAUGT” είναι αρκετά όμοια με την τυπική ακολουθία Kozak, διατηρώντας μάλιστα και τη συντηρημένη πουρίνη στη θέση -3 αδενίνη. Αντίθετα, η ακολουθία που περιέχει το πρώτο AUG “GGGTTTAUGA” αποκλίνει σημαντικά από τη τυπική ακολουθία Kozak. Αυτή η διαφορά στη σύνθεση των νουκλεοτιδίων που περιέχουν τα δύο κωδικόνια έναρξης έχει σαν αποτέλεσμα ορισμένα ριβοσώματα να προσπερνούν το πρώτο AUG και να αναγνωρίζουν στη συνέχεια το αμέσως επόμενο AUG που διαθέτει τη τυπική ακολουθία Kozak. Αυτή η διάταξη των κωδικονίων έναρξης αναδεικνύει ότι η μιτοχονδριακή ισομορφή Lon1S είναι σημαντική και αναγκαία για την εύρυθμη λειτουργία του κυττάρου.

Εκτός όμως από την ακολουθία που περιέχει τα κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης, ο μηχανισμός ολίσθησης των ριβοσωμάτων κατά τη σάρωση του μεταγραφήματος καθορίζεται και από τα δομικά χαρακτηριστικά των mRNA. Για παράδειγμα, η ολίσθηση των ριβοσωμάτων κατά τη σάρωση συμβαίνει και όταν το 5'-άκρο του μεταγραφήματος είναι μικρό και κοντά στο πρώτο AUG (Kozak, 2005). Η αρχή έναρξης της μεταγραφής TSS (Transcription Start Site) του *Lon1* βρέθηκε 38 νουκλεοτίδια πριν το πρώτο AUG, σε απόσταση τέτοια ώστε να μπορεί να προσδεθεί η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα αλλά να ενισχύεται η ολίσθηση της. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η ύπαρξη δευτεροταγούς δομής σε mRNA αμέσως μετά το κωδικόνιο έναρξης AUG όταν αυτό περιέχεται σε νουκλεοτιδική ακολουθία που αποκλίνει από το τυπικό μοτίβο Kozak μπορεί να προκαλέσει έναρξη της μεταγραφής από το συγκεκριμένο AUG (Kozak, 2005). Η πιο λογική ερμηνεία είναι ότι μια τέτοια δομή ενδεχομένως να επιβραδύνει τη διαδικασία σάρωσης του μεταγραφήματος και ενδεχομένως να βελτιώνεται η ικανότητα αναγνώρισης του κωδικονίου έναρξης από τη μικρή ριβοσωμική 40S υπομονάδα. Παρόλα αυτά, η πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής του *Lon1* mRNA έδειξε ότι δεν υπάρχουν σταθερές δομές τύπου βρόγχου μετά το πρώτο AUG, τέτοιες που θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ενισχυτικά της έναρξης της μετάφρασης στο πρώτο κωδικόνιο έναρξης περιορίζοντας έτσι την ολίσθηση του ριβοσώματος (Εικόνα A2-Παράρτημα). Επίσης, η *ab initio* ανάλυση της δομής του μεταγραφήματος *Lon1* αποκάλυψε ότι τα δύο κωδικόνια έναρξης βρίσκονται σε περιοχές χαλαρής δευτεροταγούς δομής και μάλιστα η δευτεροταγής δομή του δεύτερου AUG είναι πιο χαλαρή, μάλλον επειδή αυτή η δομή είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική έναρξη της μετάφρασης στο συγκεκριμένο AUG.

Επιπρόσθετα, μερική ολίσθηση ριβοσωμάτων κατά τη σάρωση του μεταγραφήματος συμβαίνει όταν η έναρξη της μετάφρασης πραγματοποιηθεί από τα εναλλακτικά κωδικόνια CUG, ACG ή GUG (Kozak, 2005; Wamboldt *et al.*, 2009). Τα συγκεκριμένα κωδικόνια είναι ασθενή ακόμα και όταν περιέχονται σε τυπική νουκλεοτιδική ακολουθία Kozak. Ωστόσο, η αφαίρεση του πρώτου κωδικονίου έναρξης στο γονίδιο *Lon1*, είχε ως αποτέλεσμα την έναρξη της μετάφρασης στο ισχυρό και δεύτερο στη σειρά κωδικόνιο AUG, τοποθετώντας την πρωτεΐνη Lon1 στα μιτοχόνδρια. Συνεπώς, η ολίσθηση του ριβοσώματος στο μεταγράφημα *Lon1* συμβαίνει στην περιοχή του πρώτου κωδικονίου AUG και δεν οφείλεται στην παρουσία εναλλακτικού κωδικονίου έναρξης.

#### **4.a.2 Η δυαδική τοποθέτηση της πρωτεΐνης Lon1 καθορίζεται από ένα δυναμικό σύστημα απόκρισης**

Τα πλαστίδια και τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια που προέρχονται από την ενδοσυμβίωση και έτσι μοιράζονται αλληλεπικαλυπτόμενες λειτουργίες. Μάλιστα, η τοποθέτηση μιας πρωτεΐνης και στα δύο οργανίδια, ενισχύει σημαντικά την ποικιλομορφία του πρωτεόματος των δύο οργανιδίων. Η σύνθεση των πρωτεϊνικών ισομόρφων που έχουν διπλή τοποθέτηση πρέπει να γίνεται με υψηλή ακρίβεια, η οποία καθορίζεται από την αναπτυξιακή κατάσταση του φυτού και την επίδραση περιβαλλοντικών συνθηκών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ζύμη, όπου σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών στοιχείων δραματικές μεταβολές συμβαίνουν σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο των γονιδίων (Ingolia *et al.*, 2009). Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* έχει αναφερθεί ότι το γονίδιο *GSTF8* ρυθμίζεται μέσω πολλαπλών σημείων έναρξης της μεταγραφής ανάλογα με τον τύπο του ιστού και της περιβαλλοντικής καταπόνησης, οδηγώντας στην σύνθεση πρωτεϊνικών ισομορφών που τοποθετούνται σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα (Thatcher *et al.*, 2007). Στο γονίδιο *Lon1* επιπρόσθετα συμβαίνει ρύθμιση στο μεταγραφικό επίπεδο που προηγείται της εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης (Εικόνα 1). Συγκεκριμένα, με εναλλακτική έναρξη καθορίζεται η μεταγραφή του γονιδίου *Lon1* με βάση το αναπτυξιακό στάδιο και την απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης. Το μεταγράφημα *Lon1L* που περιλαμβάνει στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο τα δυο κωδικόνια έναρξης της μεταγραφής, εκφράζεται ισχυρά στα φύλλα ή σε συνθήκες έλλειψης φωτός. Σε αυτές τις συνθήκες από το μεταγράφημα *Lon1L* παράγονται δυο ισομορφές της πρωτεΐνης με εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης. Η πρώτη και μεγαλύτερη σε μήκος τοποθετείται στους χλωροπλάστες, ενώ η δεύτερη ισομορφή τοποθετείται στα μιτοχόνδρια. Ωστόσο, το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *Lon1* αλλάζει όταν τα φυτά αναπτύσσονται σε συνθήκες που φαίνεται ότι προκαλούν καταστάσεις υποξίας. Σε αυτές τις συνθήκες το μεταγράφημα *Lon1S* είναι το κυρίαρχο που κωδικοποιεί την ισομορφή που τοποθετείται στο μιτοχόνδριο. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ο ρόλος της πρωτεΐνης Lon1 στο μιτοχόνδριο είναι ουσιαστικός για τη φυσιολογική ανάπτυξη των φυτών, αφού ανεξάρτητα της μεταγραφικής ή μεταφραστικής ρύθμισης η τοποθέτηση της πρωτεΐνης Lon1 στα μιτοχόνδρια είναι διασφαλισμένη.

Σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα, *in silico* ανάλυση του υποκινητή του γονιδίου *Lon1* αποκάλυψε την ύπαρξη συγκεκριμένων *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων που ενδεχομένως συσχετίζονται με τη μεταγραφική του ρύθμιση. Συγκεκριμένα, δύο CCAAT στοιχεία εντοπίζονται στις θέσεις -375 και -271 από το πρώτο AUG. Το ετεροτριμερές σύμπλεγμα Har, είναι συντηρημένο στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, και συνδέεται σε αυτές τις ακολουθίες του τύπου "CCAAT". Πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν ότι ο ρόλος αυτού του συμπλέγματος σχετίζεται άμεσα με την έκφραση γονιδίων σε συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης (Thöni *et al.*, 2010). Υπό συνθήκες ανοξίας οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στην καρβονυλίωση που προκύπτει από τα υψηλά επίπεδα των ενεργών μορφών οξυγόνου ROS (**R**eactive **O**xygen **S**pecies). Στον υποκινητή, οι ακολουθίες "CCAAT" μάλλον ενισχύουν την έκφραση του κυρίαρχου μεταγραφήματος *Lon1S* που κωδικοποιεί αποκλειστικά τη μιτοχονδριακή πρωτεϊνική ισομορφή προκειμένου να εξουδετερωθούν οι βλαβερές συνέπειες της υποξίας. Δύο ακόμα στοιχεία 6 βάσεων προσδιορίστηκαν στον υποκινητή, που σχετίζονται με την καταστολή της μεταγραφικής λειτουργίας σε συνθήκες έλλειψης φωτός (Degenhardt and Tobin, 1996). Στις θέσεις -273 έως -278 και στις θέσεις -203 έως -208 υπάρχουν αντίστοιχα το στοιχείο REa που αντιστοιχεί στην ακολουθία "AACCAA" και το στοιχείο GATA με το συντηρημένο μοτίβο "AGATAA". Αυτά τα στοιχεία πιθανώς λειτουργούν καταστέλλοντας την έκφραση του *Lon1S* mRNA όταν

αλλάζει η κατάσταση του φωτισμού σε σκοτάδι. Συνεπώς όταν τα φυτά αναπτύσσονται στο σκοτάδι, ένα ρυθμιστικό σύμπλεγμα φυτοχρώματος και πρωτεϊνών, που συνδέονται στα στοιχεία Rea και GATA, δυνητικά ενεργοποιεί τη μεταγραφική λειτουργία του υποκινητή για την έκφραση του μεταγραφήματος *Lon1L*. Ιδιαίτερα, το στοιχείο Rea επικαλύπτει το στοιχείο CCAAT στη θέση -271, αναδεικνύοντας έτσι ένα ανταγωνιστικό τρόπο λειτουργίας. Η λειτουργία αυτή εξασφαλίζει τη διαθεσιμότητα του στοιχείου CCAAT σε φυσιολογικές συνθήκες φωτισμού για τη μεταγραφή του *Lon1S*, ενώ αυτή καταστέλλεται στο σκοτάδι, δεδομένου ότι το ρυθμιστικό σύμπλεγμα REa επικρατεί. Ωστόσο, ο ρόλος αυτών των ρυθμιστικών στοιχείων πρέπει να εκτιμηθεί πειραματικά προκειμένου να προσδιοριστεί ενδελεχώς η μεταγραφική απόκριση του υποκινητή *Lon1* σε συνθήκες καταπτόνησης.

#### **4.a.3 Η δυαδική ακολουθία οδηγών-συνθήματος της πρωτεΐνης Lon1 πιθανώς σχετίζεται με ένα μεταβατικό εξελικτικό στάδιο**

Σημαντικές αλλαγές στην ομοιόσταση των ευκαρυωτικών κυττάρων προέκυψαν εξαιτίας της ενδοσυμβίωσης των μιτοχονδρίων και των πλαστιδίων (Dyall *et al.*, 2004). Πρώτα ενσωματώθηκαν τα μιτοχόνδρια από την ενδοσυμβίωση με  $\alpha$ -πρωτεοβακτήρια. Μια δεύτερη ενδοσυμβίωση με τα κυανοβακτήρια είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία των πλαστιδίων που είναι ικανά για φωτοσύνθεση. Κατά τη διάρκεια αυτών των διαδικασιών οι μικροοργανισμοί που ενσωματώθηκαν έχασαν την αυτονομία τους. Αυτό το φαινόμενο αποδίδεται στο γεγονός ότι υπήρξε μεταφορά γενετικής πληροφορίας από τους οργανισμούς της ενδοσυμβίωσης στον πυρήνα των κυττάρων ξενιστών με αποτέλεσμα το γονιδίωμα των οργανιδίων να μειωθεί δραματικά. Όμως οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα για να οδηγηθούν στα οργανίδια απέκτησαν σταδιακά πεπτιδία συνθήματος στο N-άκρο τους, τα οποία αλληλεπιδρούν με τους μηχανισμούς εισαγωγής του κάθε οργανιδίου. Γενικά τα χαρακτηριστικά των πεπτιδίων συνθήματος που σχετίζονται με την παραπάνω αλληλεπίδραση είναι αρκετά συντηρημένα. Για παράδειγμα, ένα πεπτιδίο συνθήματος για τα μιτοχόνδρια πρωτεΐνης ζύμης μπορεί να οδηγήσει μια φυτικής προέλευσης πρωτεΐνη στα μιτοχόνδρια, αλλά και στα πλαστίδια των φυτικών κυττάρων (Huang *et al.*, 1990).

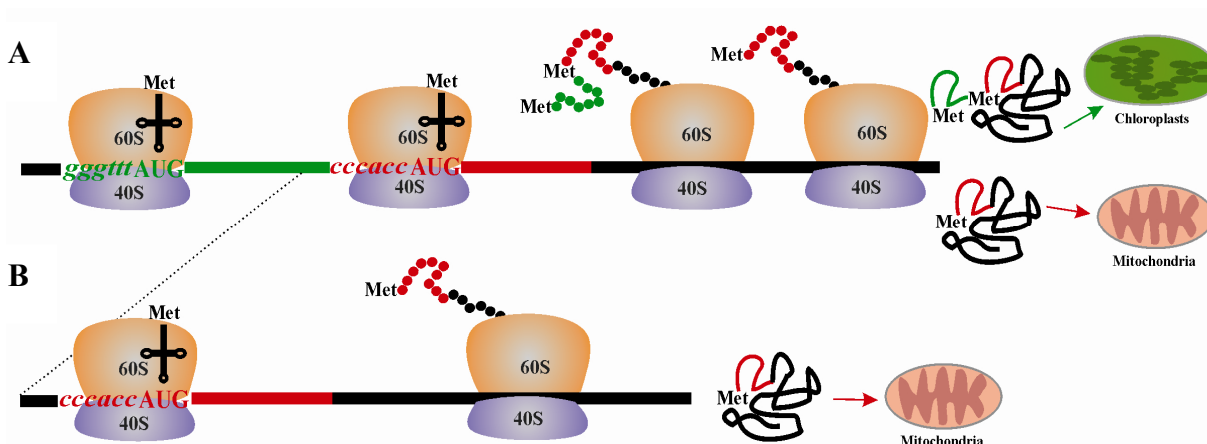
Προκειμένου να μελετηθεί η συντήρηση κατά την εξέλιξη της οργανοδιακής τοποθέτησης της πρωτεάσης Lon1, εξετάστηκε εάν είναι δυνατή η συμπλήρωση του φαινοτύπου *Δrim1* κυττάρων ζύμης, χρησιμοποιώντας τις N-τελικές ακολουθίες του γονιδίου *AtLon1* με τα αντίστοιχα πεπτιδία συνθήματος. Το αποτέλεσμα ήταν ότι το γονίδιο *AtLon1* μπορούσε να συμπληρώσει το φαινότυπο, ανεξάρτητα του πεπτιδίου συνθήματος που είχε στο N-άκρο, είτε ήταν για τα μιτοχόνδρια, είτε για τα πλαστίδια. Παρόλα αυτά όμως, η συμπλήρωση του φαινοτύπου ήταν πετυχημένη μόνο όταν η έναρξη της μετάφρασης καθοριζόταν από τη τυπική ακολουθία Kozak του δεύτερου κωδικονίου.

Με την παράλληλη εξέλιξη των οργανιδίων και τα κοινά χαρακτηριστικά τους, δημιουργήθηκαν μηχανισμοί διπλής τοποθέτησης των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από γονίδια που εδράζουν στον πυρήνα. Δύο τύποι ακολουθιών διπλής τοποθέτησης έχουν χαρακτηρησθεί στα φυτά, οι δυαδικές και οι μονομερείς ακολουθίες (Peeters and Small, 2001; Mackenzie, 2005). Οι δυαδικές ακολουθίες περιέχουν δύο διακριτά πεπτιδία συνθήματος ένα για κάθε οργανίδιο, τα οποία βρίσκονται σε σειρά στο N-άκρο του γονιδίου. Οι μονομερείς ακολουθίες αποτελούνται από ένα μόνο πεπτιδίο συνθήματος που αναγνωρίζεται και από τα δύο οργανίδια.

Η Lon1 πρωτεάση τοποθετείται παράλληλα στα μιτοχόνδρια και τα πλαστίδια εξαιτίας των δυαδικών ακολουθιών που περιέχονται στο ίδιο μεταγράφημα του γονιδίου

κωδικοποιώντας δυο πρωτεϊνικές ισομορφές. Σε αντίθεση με την πρωτεάση Lon1, η πρωτεάση Lon4 έχει μια μονομερή ακολουθία που την οδηγεί και στα δύο οργανίδια, από ένα όμως μεταγράφημα και πολυπεπτιδίο (Sakamoto, 2006; Ostersetzer *et al.*, 2007). Ωστόσο και τα δύο γονίδια φαίνεται να προέρχονται από διπλασιασμό. Πρώτον, γιατί η ομοιότητα της αμινοξικής ακολουθίας μεταξύ των δύο είναι ιδιαίτερα υψηλή (Rigas *et al.*, 2009b) και δεύτερον εξαιτίας της υψηλής ομολογίας που παρουσιάζεται στο N-άκρο της Lon4 πριν τη μονομερή ακολουθία οδηγό, με το πεπτιδίο οδηγό της Lon1, που ευθύνεται για την τοποθέτηση στα πλαστίδια. Όμως, σε αυτή την περιοχή του γονιδίου *Lon4* το αναγνωστικό πλαίσιο δεν είναι ανοιχτό. Επιπρόσθετα, πειραματικά δεδομένα αναφέρουν ότι οι περιπτώσεις διπλής τοποθέτησης πρωτεϊνών με μονομερείς ακολουθίες είναι πολύ περισσότερες από ότι αυτών με τις δυαδικές ακολουθίες (Carrie *et al.*, 2009a). Συνολικά, τα παραπάνω αποτελέσματα αναδεικνύουν τη δυναμική εξέλιξη των πρωτεασών Lon ως προς την τοποθέτησή τους μέσα στο κύτταρο και φαίνεται ότι η πρωτεάση Lon1 βρίσκεται σε ενδιάμεσο στάδιο της εξέλιξης που αφορά τη διπλή τοποθέτηση στα φυτικά οργανίδια.

Τα πλαστίδια αλλάζουν τη μορφολογία τους ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν, αλλά και το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο βρίσκονται τα κύτταρα. Αρκετές πρωτεάσες έχει αναφερθεί ότι συμμετάσχουν στη διατήρηση της ομοιόστασης των πρωτεϊνών των πλαστιδίων, με πολύ σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια μετάβασης του ενός πλαστιδιακού τύπου στον άλλο. Παρόλο που ο ρόλος της πρωτεάσης Lon1 έχει αρκετά αποσαφηνισθεί όσον αφορά στη βιογένεση των μιτοχονδρίων, στη μετα-εμβρυακή ανάπτυξη και στην εγκαθίδρυση του σποροφύτου (Rigas *et al.*, 2009a, b), χρειάζονται επιπλέον πειραματικές παρατηρήσεις προκειμένου να διευκρινιστεί ο λειτουργικός της ρόλος στα πλαστίδια και στην ανάπτυξη των φυτών.



**Εικόνα 1.** Σχηματική απεικόνιση της υποκυτταρικής τοποθέτησης της πρωτεάσης Lon1 που εξαρτάται από την εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης και καθορίζεται από την επιλογή δυο σημείων έναρξης της μεταγραφής.

(A) μεταγράφημα *Lon* με δυο κωδικόνια έναρξης στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο, το οποίο λόγω εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης κωδικοποιεί τη μεγάλη πρωτεϊνική ισομορφή Lon1L, με τοποθέτηση στους χλωροπλάστες και τη μικρή ισομορφή Lon1S, με τοποθέτηση στα μιτοχόνδρια.

(B) Σε συνθήκες ανοξίας επικρατεί το μεταγράφημα *Lon1* που έχει μόνο το δεύτερο κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης, με αποτέλεσμα την αποκλειστική σύνθεση της ισομορφής που τοποθετείται στα μιτοχόνδρια.

#### 4.b.1 Το γονίδιο *Leukothea1* ανήκει στην οικογένεια των γονιδίων που περιέχουν το τμήμα PORR

Σε πρωτεϊνικό επίπεδο, το γονίδιο *Leuko1* (At5g62990) αποτελείται από τρεις κύριες δομές. Το N-τελικό άκρο που περιλαμβάνει το πεπτιδίο συνθήματος για τοποθέτηση στον χλωροπλάστη, το οποίο εκτείνεται από το πρώτο έως το 60ο αμινοξύ), το τμήμα DUF 860 (*Domain of Unknown Function 860*) μεγέθους 319aa (61 –380) και το C-τελικό άκρο μεγέθους 114aa (381–494aa). Το τμήμα DUF860 παρουσιάζεται αποκλειστικά σε γονίδια φυτικών οργανισμών και πρόσφατα αποτελέσματα έδειξαν ότι έχει ένα μέχρι τώρα άγνωστο μοτίβο *in vitro* σύνδεσης με το RNA (Kroeger *et al.*, 2009). Συνεπώς το DUF860 μετονομάστηκε σε PORR (**P**lant **O**rganelle **R**NA **R**ecognition motif). Στο *Arabidopsis thaliana* υπάρχουν 15 ομόλογα γονίδια που περιέχουν αυτό το τμήμα PORR που ευθύνεται για την πρόσδεση της πρωτεΐνης σε οργανιδιακό RNA (Kroeger *et al.*, 2009). Η πρωτεΐνη WTF1 του φυτού *Zea mays* που περιέχει το τμήμα PORR έχει αναφερθεί πως συμμετέχει στο μάτισμα των ιντρονίων της κατηγορίας II των χλωροπλαστικών γονιδίων (group II intron splicing) (Kroeger *et al.*, 2009). Οι πρωτεΐνες που περιέχουν το συγκεκριμένο τμήμα υπάρχουν αποκλειστικά στους φυτικούς οργανισμούς, ακόμα και στα πλέον αρχέγονα φυτά όπως είναι το βρυόφυτο *Physcomitrella patens*. Επειδή οι πρωτεΐνες αυτές παρουσιάζονται μόνο στα φυτά, είναι δεδομένο ότι και η λειτουργία τους ή η δράση τους συμμετέχουν σε μηχανισμούς εξειδικευμένους για τα φυτά.

#### 4.b.2 Η πρωτεΐνη LEUKO1 τοποθετείται στο χλωροπλάστη αλλά μετακινείται εντός και εκτός του πυρήνα

Πειραματικά αποτελέσματα από τη σύντηξη της πρωτεΐνης με YFP και μικροσκοπική παρατήρηση έδειξαν ότι η πρωτεΐνη *Leuko1* τοποθετείται στους χλωροπλάστες εξαιτίας της παρουσίας πεπτιδίου συνθήματος στο N-τελικό άκρο για το χλωροπλάστη. Η ύπαρξη πεπτιδίου συνθήματος επιβεβαιώνεται και από τα βιοϋπολογιστικά προγράμματα πρόβλεψης υποκυτταρικής τοποθέτησης των πρωτεϊνών. Επίσης, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ο φθορισμός στο χλωροπλάστη εμφανίζει πρότυπο σε στίγματα που μοιάζουν με νουκλεοειδή των οργανιδίων τα οποία περιέχουν DNA, RNA και πρωτεΐνες (Sato *et al.* 1998; Terasawa and Sato, 2008). Οπότε πιθανώς η πρωτεΐνη *Leuko1* να συμμετέχει σε σύμπλοκα πρωτεϊνών που συνδέονται με νουκλεϊνικά οξέα. Η πρωτεΐνη *Leuko1* εκτός του πεπτιδίου οδηγού για το χλωροπλάστη, έχει και σινιάλα εισόδου (Nuclear Localization Signal, NLS) και εξόδου (Nuclear Export Signal, NES) από τον πυρήνα του κυττάρου. Οι πρωτεΐνες που τοποθετούνται ταυτόχρονα στους χλωροπλάστες και τους πυρήνες έχουν ελάχιστα μελετηθεί, ενώ σχετικά πρόσφατα υπήρξαν αναφορές ανάλυσης πρωτεϊνών τέτοιου τύπου (Krause και Krupinska, 2009; Hammani *et al.*, 2010)

Όταν η πρωτεΐνη YFP βρίσκεται στο N-άκρο της πρωτεΐνης *Leuko1* απενεργοποιείται το πεπτιδίο συνθήματος και τότε η πρωτεΐνη *Leuko1* εξαιτίας των τυπικών μονομερών και διμερών NLS που περιέχει, τοποθετείται στον πυρήνα του κυττάρου και τις περισσότερες φορές ο φθορισμός εμφανίζεται σε στίγματα. Το μοτίβο των NLS που περιέχονται δεσμεύεται από την Ιμπορτίνη-α (Kosugi *et al.* 1998). Ο μηχανισμός εισόδου της πρωτεΐνης *Leuko1* μέσω του μηχανισμού της Ιμπορτίνης-α επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι όταν η Ιμπορτίνη-α1/α2 αποσιωπείται μέσω VIGS, τότε σε μεγάλο ποσοστό η πρωτεΐνη *Leuko1* δεν τοποθετείται στον πυρήνα. Επιπρόσθετα, στην πρωτεΐνη *Leuko1* υπάρχει και η χαρακτηριστική ακολουθία σινιάλου εξόδου NES (**N**uclear **E**xport **S**ignal) από τον πυρήνα.

Το σινιάλο NES συμφωνεί απόλυτα με το τυπικό μοτίβο των NES και εμφανίζει μεγάλη ομολογία με τα πειραματικώς αποδεδειγμένα σινιάλα εξόδου, όπως είναι τα HIV-1Rev (Malim *et al.*, 1991), mPK1a (Wen *et al.*, 1995) και το NES από την πρωτεΐνη Pap1 (Kudo *et al.*, 1999). Το σινιάλο NES της πρωτεΐνης Leuko1 έχει μεγάλη περιεκτικότητα στα αμινοξέα Ασπαρτικό και Γλουταμινικό οξύ που είναι αρνητικά φορτισμένα και συνήθως σχηματίζουν  $\alpha$ -έλικα, η οποία είναι απαραίτητη προϋπόθεση για να είναι λειτουργικό το σινιάλο NES. Η λεπτομυκίνη B είναι ένας ισχυρός αναστολέας της εξόδου των πρωτεϊνών από τον πυρήνα (Nishi *et al.*, 1994, Kudo *et al.* 1998, Kudo *et al.* 1999). Η λεπτομυκίνη B προκαλεί αναστολή της πρωτεΐνης CRM1/exportin 1, η οποία είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση πρωτεϊνών με NES και για την έξοδό τους από τον πυρήνα (Fornierod *et al.*, 1997, Fukuda *et al.*, 1997, Ossareh-Nazari *et al.*, 1997). Ενώ η κατασκευή 35S::Leuko1<sub>173</sub>:YFP:Leuko1<sub>174-494</sub> τοποθετείται στους χλωροπλάστες, η εφαρμογή λεπτομυκίνης B είχε σαν αποτέλεσμα τη τοποθέτηση της πρωτεΐνης Leuko1 ταυτόχρονα στον πυρήνα και τους χλωροπλάστες. Συνεπώς, η πρωτεΐνη Leuko1 έχει την πληροφορία να εισέρχεται και να εξέρχεται από τον πυρήνα, καθώς και το πεπτιδίο συνθήματος για την τοποθέτησή της στους χλωροπλάστες (Εικόνα 2).

#### 4.b.3 Η αποκλειστική τοποθέτηση της πρωτεΐνης Leuko1 στον πυρήνα συμπληρώνει το φαινότυπο της μετάλλαξης *leuko1-1*

Το έλλειμμα της πρωτεΐνης Leuko1 στον πυρήνα, το οποίο δημιουργείται εξαιτίας της ισχυροποίησης του σινιάλου εξόδου (NES) από την αμινοξική υποκατάσταση G<sub>373</sub>→D, φαίνεται να ευθύνεται για το φαινότυπο του μεταλλάγματος *leuko1-1*. Δημιουργώντας την κατάλληλη κατασκευή, δηλαδή αφαιρώντας το πεπτιδίο-συνθήματος για το χλωροπλάστη, και μετασχηματίζοντας τα μεταλλάγματα *leuko1-1* έγινε εφικτή η αποκλειστική τοποθέτηση της πρωτεΐνης Leuko1 στον πυρήνα των κυττάρων. Το αποτέλεσμα ήταν η συμπλήρωση του φαινοτύπου του μεταλλάγματος *leuko1-1*, το οποίο επιβεβαιώνει τη θεωρία ότι η έλλειψη της πρωτεΐνης από τον πυρήνα δημιουργεί το μορφολογικό πρόβλημα στον εμβρυακής καταγωγής ιστό, που είναι οι κοτυληδόνες.

Το παραπάνω αποτέλεσμα, η αποδεδειγμένη είσοδος και έξοδος της πρωτεΐνης Leuko1 στον πυρήνα, καθώς και η παρουσία μη-ώριμων πυρηνικών mRNA στο θνησιγόνο μετάλλαγμα *leuko1-2*, αναδεικνύουν τον κρίσιμο ρόλο της πρωτεΐνης στο μηχανισμό επεξεργασίας συγκεκριμένων mRNA στον πυρήνα.

#### 4.b.4 Πιθανός ρόλος της πρωτεΐνης Leuko1

Οι χλωροπλάστες έχουν προέλθει από τα κυανοβακτήρια εξαιτίας της ενδοσυμβίωσης. Στην πορεία της εξέλιξης όμως, πραγματοποιήθηκε μεταφορά γενετικής πληροφορίας από τα οργανίδια στον πυρήνα (Dyall *et al.*, 2004). Η πρωτεΐνη Leuko1 πιθανώς να είναι αποτέλεσμα αυτής της μεταφοράς και για αυτό το λόγο φαίνεται να έχει ένα διπλό ρόλο στον πυρήνα και το χλωροπλάστη. Μάλιστα, ο ρόλος της πρωτεΐνης στον πυρήνα ενδέχεται να συσχετίζεται με λειτουργικούς μηχανισμούς που αφορούν το χλωροπλάστη. Η πρωτεΐνη Leuko1 περιέχει το τμήμα PORR (Plant Organelle RNA Recognition) το οποίο συμμετέχει στο μάτισμα των ιντρονίων της ομάδας II των χλωροπλαστικών γονιδίων (group II intron splicing) (Kroeger *et al.*, 2009). Οπότε ο λειτουργικός της ρόλος στο χλωροπλάστη μάλλον είναι επεξεργασία των οργανιδιακών μεταγραφμάτων, όπως είναι και το μάτισμα των ιντρονίων. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στο



μετάλλαγμα *leuko1-2* ενισχύουν την παραπάνω υπόθεση. Στο μετάλλαγμα *leuko1-2* (T-DNA ένθεση) η πρωτεΐνη *Leuko1* απουσιάζει εντελώς. Τα γονίδια *At1g03160* και *At5g67660* συνεκφράζονται με το γονίδιο *Leuko1*, διαθέτουν πεπτιδίο συνθήματος στο N-τελικό άκρο για τοποθέτηση στον χλωροπλάστη και τα ιντρόνια τους παρουσιάζουν χαρακτηριστικά παρόμοια με τα ιντρόνια της ομάδας II χλωροπλαστικών γονιδίων, κοινώς πληρούν τις απαραίτητες προϋποθέσεις για να θεωρηθούν πιθανά υποστρώματα της *Leuko1*. Τα μεταγραφήματα των δύο γονιδίων στο μετάλλαγμα *leuko1-2* έχουν ιντρόνια τα οποία δεν έχουν αποκοπεί σε αντίθεση με τα φυτά αγρίου τύπου και το μετάλλαγμα *leuko1-1*(EMS). Δηλαδή το μάτισμα των mRNA των παραπάνω γονιδίων δεν είναι λειτουργικό όταν δεν υπάρχει η πρωτεΐνη *Leuko1*. Τα γονίδια αυτά συνεκφράζονται με το γονίδιο *Leuko1*, διαθέτουν πεπτιδίο συνθήματος στο N-τελικό άκρο για τοποθέτηση στον χλωροπλάστη και τα ιντρόνια τους παρουσιάζουν χαρακτηριστικά παρόμοια με τα ιντρόνια της ομάδας II χλωροπλαστικών γονιδίων.

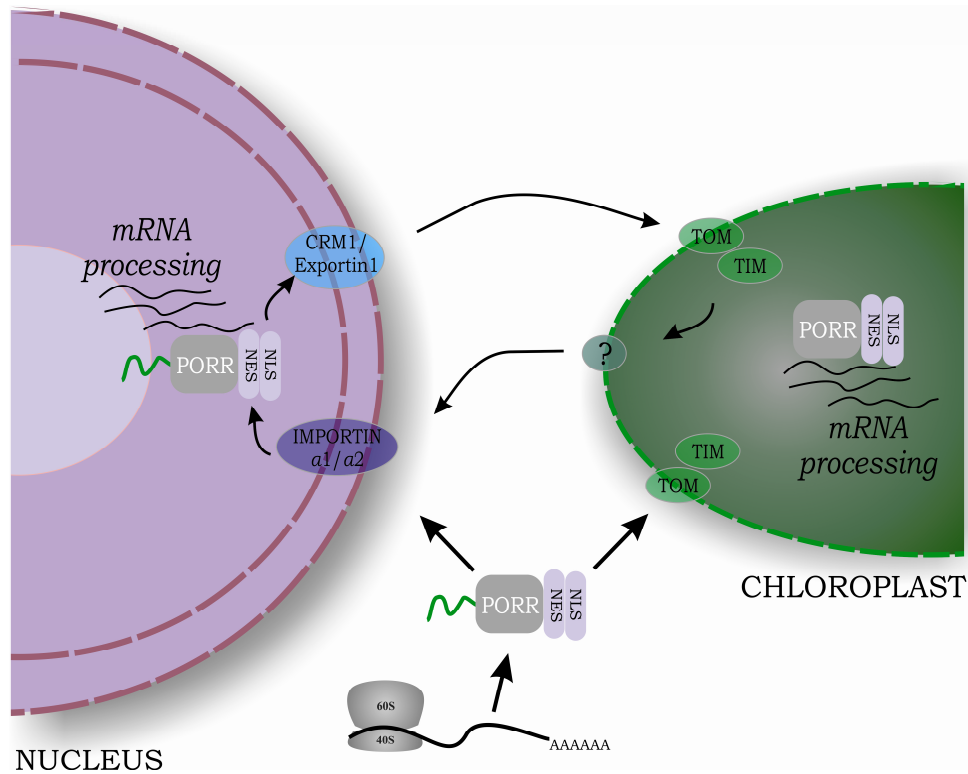
Αρχικά το μάτισμα ιντρονίων της ομάδας II χλωροπλαστικών γονιδίων είχε χαρακτηριστεί ως αυτοκαταλυτικό σύστημα χωρίς τη συμμετοχή ενζυμικών συμπλόκων. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι είναι αναγκαία η συμμετοχή πρωτεϊνικών συμπλόκων προκειμένου να πραγματοποιηθεί (Longevialle *et al.*, 2010). Ο μηχανισμός ματίσματος των ιντρονίων της ομάδας II παρουσιάζεται στα βακτήρια, στα αρχαία και στα ευκαρυωτικά οργανίδια (Chalamcharla *et al.*, 2010) και είναι αρκετά όμοιος με το μηχανισμό ματίσματος των προ-mRNA του πυρήνα. Για αυτό το λόγο, προτείνεται ότι ο μηχανισμός ματίσματος των ιντρονίων της κατηγορίας II είναι εξελικτικά ο πρόγονος του μηχανισμού ματίσματος που συμβαίνει στον πυρήνα (Cech, 1986; Cavalier-Smith, 1991; Sharp, 1991; Lynch και Kewalramani, 2003; Martin and Koonin 2006; Roy and Gilbert 2006). Μάλιστα, έχει δείχθει ότι το κατηγορίας II ιντρόνιο του γονιδίου *Ll.LtrB* από το βακτήριο *Lactococcus lactis* έχει τη δυνατότητα να υποστεί μάτισμα από το μηχανισμό των προ-mRNA του πυρήνα στον ευκαρυώτη *Saccharomyces cerevisiae* (Chalamcharla *et al.*, 2010).

Συνεπώς, είναι πιθανό η πρωτεΐνη *Leuko1* να συμμετέχει ταυτόχρονα σε δύο απομακρυσμένους μηχανισμούς επεξεργασίας των mRNA οι οποίοι όμως έχουν κοινά χαρακτηριστικά και συνδέονται εξελικτικά. Ο ένας είναι ο μηχανισμός ματίσματος των ιντρονίων της κατηγορίας II στους χλωροπλάστες και ο δεύτερος που εδράζεται στον πυρήνα, μάλλον είναι ένας διαφορετικός μηχανισμός ματίσματος από το μηχανισμό των προ-mRNA, ο οποίος φαίνεται να έχει παρόμοια χαρακτηριστικά με το μηχανισμό ματίσματος των ιντρονίων της κατηγορίας II. Λόγω της ενδοσυμβίωσης και της μεταφοράς γενετικού υλικού από τους ενδοσυμβιώτες στον πυρήνα του κυττάρου, προτείνεται ότι μεταφέρθηκαν παράλληλα και μηχανισμοί επεξεργασίας των mRNA, συστατικό των οποίων αποτελεί η πρωτεΐνη *Leuko1*.

Έτσι, η πρωτεΐνη *Leuko1* υπό συνθήκες μπορεί να τοποθετηθεί ταυτόχρονα στον πυρήνα και στο χλωροπλάστη. Η λειτουργία της στον πυρήνα συσχετίζεται με την επεξεργασία mRNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται άμεσα με το χλωροπλάστη. Εναλλακτικά, δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο η πρωτεΐνη *Leuko1* να εξέρχεται από το χλωροπλάστη, ώστε στην συνέχεια να οδηγηθεί στον πυρήνα, αφού δεν έχει πλέον το πεπτιδίο συνθήματος (Εικόνα 2). Σε αυτή την περίπτωση υπάρχει επικοινωνία πυρήνα-χλωροπλάστη, πιθανώς για τη συντονισμένη επεξεργασία των mRNA στα δύο διαμερίσματα.

Είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν επιπλέον πειράματα για να αποσαφηνιστεί ο ρόλος της πρωτεΐνης *Leuko1* και η σχέση της με τη προγραμματισμένη ανάπτυξη του φυτού στο εμβρυακό στάδιο. Τα πειράματα αυτά θα αφορούν τη μετακίνηση της πρωτεΐνης

ανάμεσα στον πυρήνα και στον χλωροπλάστη, καθώς και ποιοι είναι οι πρωτεϊνικοί παράγοντες που συνδέονται με την πρωτεΐνη Leuko1 προκειμένου να επιτευχθεί η λειτουργία της. Μία άλλη πειραματική προσέγγιση που χρειάζεται, είναι να ερευνηθούν ποιοι είναι οι στόχοι mRNA της Leuko1 στον πυρήνα και το χλωροπλάστη και πως πραγματοποιείται η επεξεργασία αυτών των mRNA. Όλα τα παραπάνω θα φωτίσουν το ρόλο της Leuko1 και θα συμπληρώσουν τα κενά που υπάρχουν στην εξέλιξη των μηχανισμών ματίσματος και πως αυτοί καθορίζουν την πρόδρομη ανάπτυξη του φυτικού οργανισμού.



## Εικόνα 2. Μοντέλο ενδοκυτταρικής μετακίνησης της πρωτεΐνης Leuko1.

Η πρωτεΐνη Leuko1 μπορεί να τοποθετηθεί ταυτόχρονα στον πυρήνα και το χλωροπλάστη. Η πρωτεΐνη Leuko1 εισάγεται στον πυρήνα εξαιτίας της αναγνώρισης των μονομερών και διμερών σινιάλων NLS από το σύστημα Ιμφορτίνης- $\alpha$ 1/2 του πυρηνικού φακέλου. Από τον πυρήνα η πρωτεΐνη Leuko1 εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα εξαιτίας της αναγνώρισης του σινιάλου NES από το μηχανισμό CRM1/Exportin1. Γενικά, η πρωτεΐνη Leuko1 που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα είτε από τη *de novo* σύνθεση της, είτε λόγω της εξόδου της από τον πυρήνα, εξαιτίας της αναγνώρισης του πεπτιδίου συνθήματος στο N-τελικό άκρο από τους μηχανισμούς εισαγωγής του χλωροπλάστη TOM/TIM εισέρχεται στο οργανίδιο. Υπάρχει και η πιθανότητα υπό ιδιαίτερες συνθήκες η πρωτεΐνη Leuko1 να εξέρχεται από το χλωροπλάστη, χωρίς το πεπτιδίιο οδηγό το οποίο έχει προηγουμένως αποκοπεί, και στη συνέχεια να εισέρχεται στον πυρήνα.

# Βιβλιογραφία



“Συστήματα μοριακών μηχανισμών  
ανάπτυξης στα φυτά”

ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ ΔΑΡΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝ. ΑΘΗΝΩΝ  
2011

**Adam Z, Adamska I, Nakabayashi K, Ostersetzer O, Haussuhl K, Manuell A, Zheng B, Vallon O, Rodermeil SR, Shinozaki K, et al.** 2001. Chloroplast and mitochondrial proteases in Arabidopsis. A proposed nomenclature. *Plant Physiology* **125**, 1912-1918

**Barkan, A.** 1988. Proteins encoded by a complex chloroplast transcription unit are each translated from both monocistronic and polycistronic mRNAs. *EMBO Journal* **7**, 263-2644

**Bogerd HP, Fridell RA, Benson RE, Hua J and Cullen BR.** 1996. A nuclear role for the Fragile X mental retardation protein. *Molecular Cellular Biology* **16**: 4207–4214

**Bota DA, Davies KJ.** 2002. Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. *Nature Cell Biology* **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 Radical Biology and Medicine* **38**, 665-677

**Boulikas T.** 1994. Putative Nuclear Localization Signals (NLS) in Protein Transcription Factors. *Journal of Cellular Biochemistry* **55**:32-58

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

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

**Carrie C, Kühn K, Murcha MW, Duncan O, Small ID, O'Toole N, Whelan J.** 2009b. Approaches to defining dual-targeted proteins in Arabidopsis. *The Plant Journal* **57**, 1128-1139

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

**Danpure CJ.** 1995. How can the products of a single gene be localized to more than one intracellular compartment? *Trends in Cell Biology* **5**, 230-238

**Degenhardt J, Tobin EM.** 1996. A DNA binding activity for one of two closely defined phytochrome regulatory elements in an Lhcb promoter is more abundant in etiolated than in green plants. *The Plant Cell* **8**, 31-41

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

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

- Dukan S, Farewell A, Ballesteros M, Taddei F, Radman M, Nyström T.** 2000. Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97**, 5746-5749
- 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*. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 238–242
- Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, and Mattaj IW.** 1997. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90**, 1051–1060
- Fukuda M, Asano S, Nakamura T, Adachi M, Yoshida M, Yanagida M and Nishida E.** 1997. CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal *Nature* **390**, 308–311
- Galichet A, Hoyerová K, Kamínek M and Gruissem W.** 2008. Farnesylation directs AtIPT3 subcellular localization and modulates cytokinin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* **146**, 1155–1164
- Gao H, Sage TL, Osteryoung KW.** 2006. FZL, an FZO-like protein in plants, is a determinant of thylakoid and chloroplast morphology. *Proceedings of National Academy of Science USA* **103**:17, 6759-6764
- Grabowski E, Miao Y, Mulisch M and Krupinska K.** 2008. Single-stranded DNA-binding protein Whirly1 in barley leaves is located in plastids and the nucleus of the same cell. *Plant Physiology*. **147**, 1800–1804
- Gindullis F and Meier I.** 1999. Matrix attachment region binding protein MFP1 is localized in discrete domains at the nuclear envelope. *Plant Cell* **11**, 1117–1128
- Gur E, Sauer RT.** 2008 Recognition of misfolded proteins by Lon, a AAA<sup>+</sup> protease. *Genes and Development* **22**, 2267-2277
- Gur E, Sauer RT.** 2009 Degrons in protein substrates program the speed and operating efficiency of the AAA<sup>+</sup> Lon proteolytic machine. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **106**, 18503-18508
- Ham BK, Park JM, Lee SB, Kim MJ, Lee IJ, Kim KJ, Kwon CS, and Paek KH.** 2006. Tobacco Tsi1, a DnaJ-type Zn finger protein, is recruited to and potentiates T si1-Mediated Transcriptional Activation. *The Plant Cell* **18(8)**: 2005–2020
- Hammani K, Gobert A, Hleibieh K, Choulier L, Small I, Giege P.** 2011. An Arabidopsis dual-localized pentatricopeptide repeat protein interacts with nuclear proteins involved in gene expression regulation. *The Plant Cell*

- Huang J, Hack E, Thornburg RW, Myers AM.** 1990. A yeast mitochondrial leader peptide functions in vivo as a dual targeting signal for both chloroplasts and mitochondria. *The Plant Cell* **2**, 1249-1260
- Imai K and Nakai K.** 2010. Prediction of subcellular locations of proteins: Where to proceed?. *Proteomics* **10**: 3970-3983
- Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JR, Weissman JS.** 2009. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* **324**, 218-223
- Iyer LM, Leipe DD, Koonin EV, Aravind L.** 2004. Evolutionary history and higher order classification of AAA<sup>+</sup> ATPases. *Journal of Structural Biology* **146**, 11-31
- Jana Prikryl J, Watkins KP, Friso G, J. van Wijk K and Barkan A.** 2008. A member of the Whirly family is a multifunctional RNA- and DNA-binding protein that is essential for chloroplast biogenesis. *Nucleic Acids Research* **36**, 5152–5165
- Janska H, Piechota J, Kwasniak M.** 2010. ATP-dependent proteases in biogenesis and maintenance of plant mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* **1797**, 1071-1075
- Jeong SY, Rose A and Meier I.** 2003. MFP1 is a thylakoid-associated, nucleoid binding protein with a coiled-coil structure. *Nucleic Acids Research* **31**, 5175–5185
- Joshi CP, Zhou H, Huang X, Chiang VL.** 1997. Context sequences of translation initiation codon in plants. *Plant Molecular Biology* **35**, 993-1001
- Kanneganti T, Bai X, Tsai CW, Win J, Meulia T, Goodin M, Kamoun S and Hogenhout S.** 2007. A functional genetic assay for nuclear trafficking in plants. *Plant Journal* **50**: 149-158
- Karniely S and Pines O.** 2005. Single translation – dual destination: mechanisms of dual protein targeting in eukaryotes. *EMBO Reports* **6**, 420–425
- Kozak M.** 2005. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* **361**, 13-37
- Komura J and Riggs AD.** 1998. Terminal transferase-dependent PCR: A versatile and sensitive method for *in vivo* footprinting and detection of DNA adducts. *Nucleic Acids Research* **26(7)**: 1807-1811
- Konishi M, Sugiyama M.** 2006. A novel protein plant – specific family gene, ROOT PRIMORDIUM DEFECTIVE 1, is required for the maintenance of active cell proliferation. *Plant Physiology* **140**: 591 – 602
- Kouzarides, T.** 2002. Histone methylation in transcriptional control. *Current Opinion in Genetics & Development* **12**, 198–209

- Kosugi S, Hasebe M, Matsumura N, Takashima H, Miyamoto-Sato E, Tomita M. and Yanagawa H.** 2009. Six Classes of Nuclear Localization Signals Specific to different binding grooves of Importin  $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry* **284**, 478-485
- Krause K, Kilbiński I, Mulisch M, Rödiger A, Schäfer A and Krupinska K.** 2005. DNA-binding proteins of the Whirly family in *Arabidopsis thaliana* are targeted to the organelles. *FEBS Letters* **579**, 3707–3712
- Krause K and Krupinska K.** 2009. Nuclear regulators with a second home in organelles. *Trends in Plant Science* **14**:11,194-99
- Kroeger T, Watkins K, Friso G, J. van Wijk K and Barkan A.** 2009. A plant-specific RNA-binding domain revealed through analysis of chloroplast group II intron splicing. *Proceedings of National Academy of Science USA* **106**:11, 4537-4542
- Kudo N, Wolff B, Sekimoto T, Schreiner EP, Yoneda Y, Yanagida M, Horinouchi S, and Yoshida M.** 1998. Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Experimental Cell Research* **242**, 540–547.
- Kudo N, Matsumori N, Taoka H, Fujiwara D, Schreiner EP, Wolff B, Yoshida M, and Horinouchi S.** 1999. Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proceedings of National Academy of Science USA* **96**, 9112–9117
- Kudo N, Taoka H, Toda T, Yoshida M and Horinouchi S.** 1999. A novel nuclear export signal sensitive to oxidative stress in the fission yeast transcription factor Pap1. *Journal Biological Chemistry* **274**: 15151–15158
- Kwon C, and Chung IK.** 2004. Interaction of an *Arabidopsis* RNA binding protein with plant single-stranded telomeric DNA modulates telomerase activity. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 12812–12818
- Lachner M. and Jenuwein T.** 2002. The many faces of histone lysine methylation. *Current Opinion in Cell Biology* **14**, 286–298
- Lister R, Chew O, Lee MN, Heazlewood JL, Clifton R, Parker KL, Millar AH, Whelan J.** 2004. A transcriptomic and proteomic characterization of *Arabidopsis* mitochondrial protein import apparatus and its response to mitochondrial dysfunction. *Plant Physiology* **134**, 777-789
- Lingard MJ, Bartel B.** 2009. *Arabidopsis* LON2 is necessary for peroxisomal function and sustained matrix protein import. *Plant Physiology* **151**, 1354-1365
- Lu B, Yadav S, Shah PG, Liu T, Tian B, Pukszta 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. *Nature Cell Biology* **11**, 852-858
- Macara I.** 2001. Transport into and out of the Nucleus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **65**, 570-594
- Mackenzie SA.** 2005. Plant organellar protein targeting: a traffic plan still under construction. *Trends in Cell Biology* **15**, 548-554
- Malim MH, McCarn DF, Tiley LS and Cullen BR.** 1991. Mutational definition of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain. *Journal of Virology* **65**: 4248-4254
- Meier I, Phelan T, Gruissem W, Spiker S and Schneider D.** 1996. MFP1, a novel plant filament-like protein with affinity for matrix attachment region DNA. *Plant Cell* **8**, 2105-2115
- Millar AH, Whelan J, Small I.** 2006. Recent surprises in protein targeting to mitochondria and plastids. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 610-615
- Monod C, Takahashi Y, Goldschmidt-Clermont M, and Rochaix JD.** 1994. The chloroplast *ycf8* open reading frame encodes a photosystem I1 polypeptide which maintains photosynthetic activity under adverse growth conditions. *EMBO Journal* **13**, 2747-2754.
- Natsoulis G, Hilger F, Fink GR.** 1986. The HTS1 gene encodes both the cytoplasmic and mitochondrial histidine tRNA synthetases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **46**, 235-243
- Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV.** 1999. AAA<sup>+</sup>: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation and disassembly of protein complexes. *Genome Research* **9**, 27-43
- Nishi K, Yoshida M, Fujiwara D, Nishikawa M, Horinouchi S, and Beppu T.** 1994. Leptomycin B targets a regulatory cascade of crm1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 6320-6324
- Onate-Sanchez L.** 2008. DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. *BMC Research Notes* **1**:93
- 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 and Cell Physiology* **48**, 881-885
- Peeters N, Small I.** 2001. Dual targeting to mitochondria and chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* **1541**, 54-63
- Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC.** 2001. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant Journal* **(25)2**: 237-245



- Raynaud C, Sozzani R, Glab N, Domenichini S, Perennes C, Cella R, Kondorosi E, Bergounioux C.** 2006. Two cell-cycle regulated SET-domain proteins interact with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **47**, 395–407
- 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 Phytologist* **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 Signaling and Behavior* **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 Science* **15**, 1815-1828
- Ruppel N., Hangarter R.** 2007. Mutations in a plastid – localized elongation factor G alter early stages of plastid development in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* **7** :37
- Ossareh-Nazari B, Bachelerie F and Dargemont C.** 1997. Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export. *Science* **278**, 141–144
- Sakamoto W.** 2006. Protein degradation machineries in plastids. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 599–621
- Samaniego R, Jeong SY, Meier I and Díaz de la Espina SM.** 2006. Dual location of MAR-binding, filament-like protein 1 in *Arabidopsis*, tobacco, and tomato. *Planta* **223**, 1201–1206
- Samaniego R, de la Torre C and Díaz de la Espina SM.** 2008. Characterization, expression and subcellular distribution of a novel MFP1 (matrix attachment regionbinding filament-like protein 1) in onion. *Protoplasma* **233**, 31–38
- Sarria R, Lyznik A, Vallejos CE, Mackenzie SA.** 1998. A cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial peptide in common bean is post-translationally regulated. *The Plant Cell* **10**, 1217–1228
- Sato N, Ohshima K, Watanabe A, Ohta N, Nishiyama Y, Joyard J and Douce R.** 1998. Molecular Characterization of the PEND Protein, a Novel bZIP Protein Present in the Envelope Membrane That Is the Site of Nucleoid Replication in Developing Plastids. *The Plant Cell* **10**: 859-872
- Sauer RT, Bolon DN, Burton BM, Burton RE, Flynn JM, Grant RA, Hersch GL, Joshi SA, Kenniston JA, Levchenko I, Neher SB, Oakes ES, Siddiqui SM, Wah DA, Baker TA.**

2004. Sculpting the proteome with AAA<sup>+</sup> proteases and disassembly machines. *Cell* **119**, 9-18

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

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

**Sinvany-Villalobo G, Davydov O, Ben-Ari G, Zaltsman A, Raskind A, Adam Z.** 2004. Expression in multigene families. Analysis of chloroplast and mitochondrial proteases. *Plant Physiology* **135**, 1336–1345

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

**Souciet G, Menand B, Ovesna J, Cosset A, Dietrich A, Wintz H.** 1999. Characterization of two bifunctional Arabidopsis thaliana genes coding for mitochondrial and cytosolic forms of valyl-tRNA synthetase and threonyl-tRNA synthetase by alternative use of two in-frame AUGs. *European Journal of Biochemistry* **266**, 848-854

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

**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

**Sweetlove LJ, Heazlewood JL, Herald V, Holtzapffel RH, Day DA, Leaver CJ, Millar AH.** 2002. The impact of oxidative stress on Arabidopsis mitochondria. *The Plant Journal* **32**, 891–904

**Terasawa K and Sato N.** 2005. Visualization of Plastid Nucleoids In situ Using the PEND–GFP Fusion Protein. *Plant Cell and Physiology* **46(4)**: 649-660

**Thatcher LF, Carrie C, Andersson CR, Sivasithamparam K, Whelan J, Singh KB.** 2007. Differential gene expression and subcellular targeting of Arabidopsis glutathione S-transferase F8 is achieved through alternative transcription start sites. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 28915-28928

**Thön M, Al Abdallah Q, Hortschansky P, Scharf DH, Eisendle M, Haas H, Brakhage AA.** 2010. The CCAAT-binding complex coordinates the oxidative stress response in eukaryotes. *Nucleic Acids Research* **38**, 1098-1113

**Tillich M, Hardel SL, Kupsch C, Armbruster U, Delannoy E, Gualberto JM, Pascal L, Leister D, Small I and Schmitz-Linneweber C.** 1995. Three types of nuclear genes

encoding chloroplast RNA-binding proteins (cp29, cp31 and cp33) are present in *Arabidopsis thaliana*: presence of cp31 in chloroplasts and its homologue in nuclei/cytoplasms. *Plant Molecular Biology* **27**, 529–539

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

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

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

**Wamboldt Y, Mohammed S, Elowsky C, Wittgren C, de Paula WB, Mackenzie SA.** 2009. Participation of leaky ribosome scanning in protein dual targeting by alternative translation initiation in higher plants. *The Plant Cell* **21**, 157-167

**Watanabe N, Che F-S, Iwano M, Takayama S, Yoshida S, Isogai A.** 2001. Dual targeting of spinach protoporphyrinogen oxidase II to mitochondria and chloroplasts by alternative use of two in-frame initiation codons. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 20474-20481

**Wen W, Meinkoth JL, Tsien RY and Taylor SS.** 1995 Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* **82**: 463–473



# Παράρτημα



“Συστήματα μοριακών μηχανισμών  
ανάπτυξης στα φυτά”

ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ ΔΑΡΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝ. ΑΘΗΝΩΝ  
2011

Organism	Gene	Accession Number	Database	Prediction <sup>a</sup>	AAA <sup>b</sup>	SSD <sup>c</sup>
<b>Bacteria</b>						
<i>Escherichia coli</i>	<i>EdLon</i>	AAC36871	NCBI		310 - 584	496 - 606
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Atu1261</i>	AAK87056	NCBI		312 - 585	498 - 607
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	n.a.	AF167159	NCBI		313 - 586	499 - 608
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	n.a.	YP_767294	NCBI		312 - 585	498 - 607
<i>Pseudomonas syringae</i>	n.a.	AAM97840	NCBI		306 - 579	492 - 601
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	n.a.	AAF65564	NCBI		306 - 579	492 - 601
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	n.a.	AAG05192	NCBI		306 - 579	492 - 601
<b>Fungi</b>						
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>PIM1</i>	P36775	NCBI	mitochondrion	586 - 915	774 - 937
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	n.a.	CAA91071	NCBI	mitochondrion	532 - 846	719 - 868
<i>Yarrowia lipolytica</i>	n.a.	CAG78709	NCBI	mitochondrion	611 - 956	799 - 978
<i>Candida glabrata</i>	n.a.	CAG60847	NCBI	mitochondrion	451 - 807	639 - 829
<i>Aspergillus oryzae</i>	n.a.	BAE59916	NCBI	mitochondrion	563 - 890	750 - 912
<i>Erwinia amylovora</i>	n.a.	CAA54779	NCBI	mitochondrion	310 - 584	496 - 606
<b>Plants</b>						
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtLon1</i>	At5g26860 / NP_568490	NCBI	mitochondrion	418 - 743	605 - 765
	<i>AtLon2</i>	At5g47040 / NP_568675	NCBI	peroxisome	631 - 683	549 - 706
	<i>AtLon3</i>	At3g05780 / NP_566258	NCBI	mitochondrion	401 - 730	588 - 752
	<i>AtLon4</i>	At3g05790 / NP_566259	NCBI	mitochondrion	410 - 748	598 - 770
<i>Zea mays</i>	<i>ZmLon1</i>	AAC50011	NCBI	peroxisome	362 - 681	550 - 704
	<i>ZmLon2</i>	AAC50021	NCBI	mitochondrion	409 - 765	596 - 787
<i>Triticum aestivum</i>	<i>Lon1</i>	AAS19619	NCBI	peroxisome	363 - 682	551 - 705
<i>Medicago truncatula</i>	n.a.	ABE88289	NCBI	mitochondrion	589 - 946	776 - 968
<i>Oryza sativa</i>	LOC_Os03g19350	LOC_Os03g19350	TIGR	mitochondrion	360 - 749	547 - 771
	LOC_Os07g48960	LOC_Os07g48960	TIGR	mitochondrion	422 - 777	609 - 799
	LOC_Os09g36300	LOC_Os09g36300	TIGR	peroxisome	361 - 680	549 - 703
<i>Populus trichocarpa</i>	eugene3.00130080	eugene3.00130080	JGI	mitochondrion	433 - 800	620 - 822
	eugene3.01330113	eugene3.01330113	JGI	mitochondrion	433 - 800	620 - 822

	n.a.	Poptr1_1:827676	JGI	peroxisome	367 - 689	555 - 712
	n.a.	Poptr1_1:836320	JGI	peroxisome	367 - 689	555 - 712
<b>Animals</b>						
<i>Apis mellifera</i>	n.a.	XP_392970	NCBI	mitochondrion	495 - 769	682 - 771
<i>Drosophila melanogaster</i>	CG8798	AAF49134	NCBI	mitochondrion	500 - 774	687 - 796
<i>Homo sapiens</i>	Lon1	NP_004784	NCBI	mitochondrion	477 - 751	664 - 773
	Lon2	NP_113678	NCBI	peroxisome	329 - 643	516 - 665
<i>Bos taurus</i>	n.a.	BAD91492	NCBI	mitochondrion	478 - 752	665 - 774
<i>Xenopus laevis</i>	n.a.	AAI10948	NCBI	peroxisome	333 - 647	520 - 669
<i>Mus musculus</i>	n.a.	AAN85210	NCBI	mitochondrion	466 - 740	635 - 762
	n.a.	NP_080103	NCBI	peroxisome	329 - 643	516 - 665
	n.a.	Q3MIB4_RAT	ENSEMBL	peroxisome	329 - 643	516 - 665
n.a. not available						
<sup>a</sup> Prediction of protein subcellular localization						
<sup>b</sup> The coordinates of the AAA module were defined based on <i>EcLon</i> (Rotanova et al., 2006).						
<sup>c</sup> The SSD domain was defined as previously described (Smith et al., 1999).						
<i>Rattus norvegicus</i>	n.a.	BAB62423	NCBI	mitochondrion	467 - 741	654 - 763

**Πίνακας A1.** Ομόλογα της Lon πρωτεΐσης σε μικρόβια, φυτικά και ζωικά είδη.

#### Συντμήσεις:

NCBI (National Center for Biotechnology Information)

TIGR (The Institute for Genomic Research)

JGI (DOE Joint Genome Institute)

[psf.org/programs/plants/index.jsf](http://psf.org/programs/plants/index.jsf)

ENSEMBL (WTSI / EBI)

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

<http://www.tigr.org/>

<http://genome.igj->

<http://www.ensembl.org/index.html>

**Πίνακας A2.** Οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη της έκφρασης των *Lon* μεταγραφημάτων.

Gene	AGI	Primer Sequence		Tm	Cycles <sup>a</sup>	gDNA <sup>b</sup>	cDNA <sup>b</sup>
		Forward	Reverse				
<i>GAPDH</i>	At3g04120	5'- GCCAAGAAGGTTGTTATCTCTGCCC- 3'	5'-GCTCGACCTGTTGTCGCCAACG-3'	57	21	811	547
<i>AtLon1L</i>	At5g26860	[F1]: 5'- GCCTTTAAAATTGGGGTTTTGC-3'	5'- GAAGAAAGCACGATGACCCAACGAAGTAG- 3'	56	25	333	333
<i>AtLon1S</i>	At5g26860	[F2]: 5'- CCACCATGTTAAAGCTCTTCACTTC- 3'		56	21	167	167
<i>AtLon4</i>	At3g05790	5'- ATCTCGATGTTCCCTATTGACTTATC- 3'	5'-AATTCTAGGCACTTCGGTGGATG-3'	54	33	690	350

<sup>a</sup> Number of cycles corresponding to the logarithmic phase of amplification for each transcript

<sup>b</sup> PCR product size in bp



Πίνακας A3. Lon1 και Lon4 πρωτεάσες φυτικών οργανισμών.

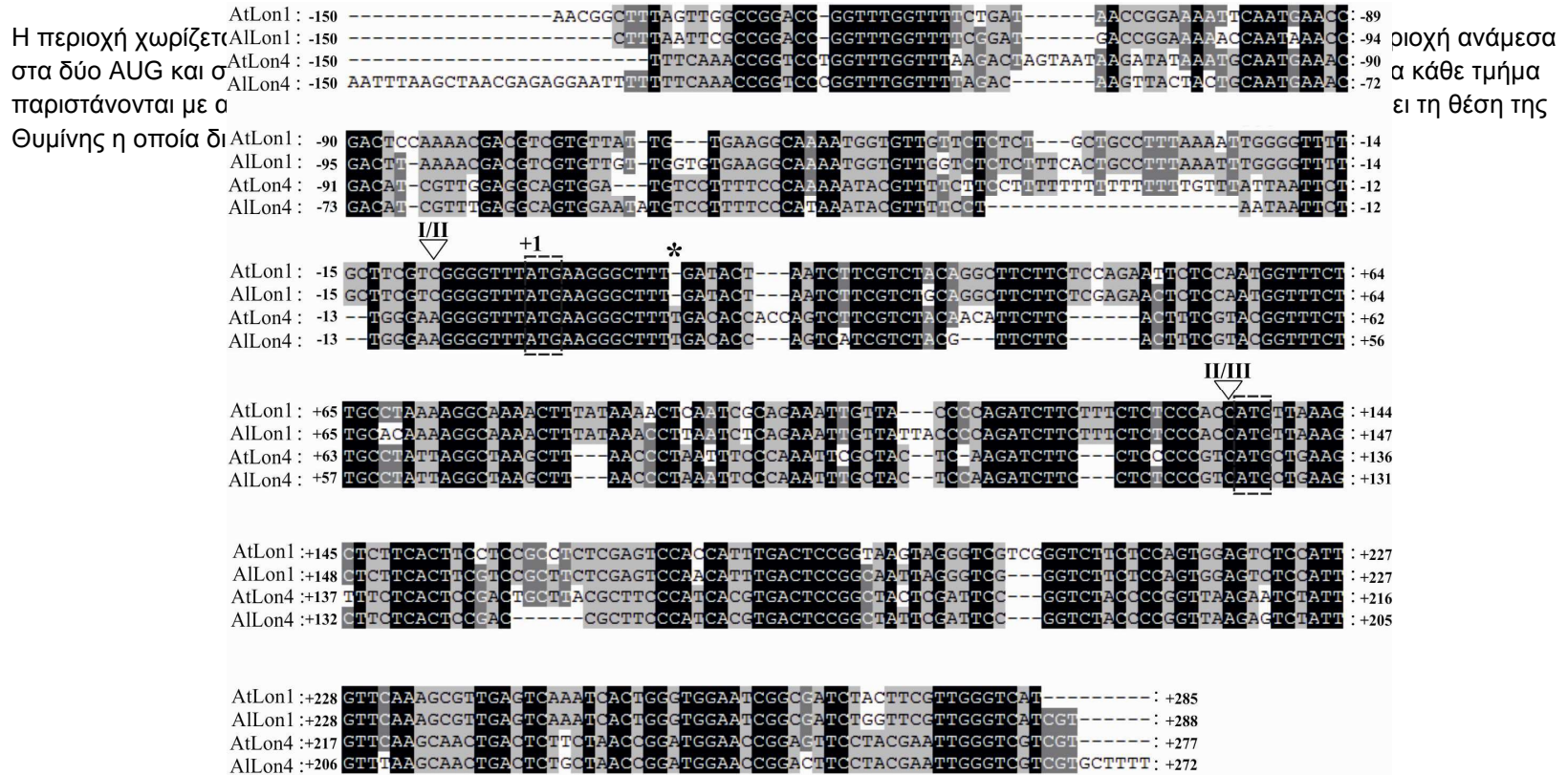
Organism	Gene	Annotation Number	Database	a.a length
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtLon1	At5g26860	NCBI	985
	AtLon4	At3g05790	NCBI	942
<i>Arabidopsis lyrata</i>	AlLon1	ARALYDRAFT_489519	NCBI	991
	AlLon4	ARALYDRAFT_477873	NCBI	940
<i>Populus trichocarpa</i>	PtrLon1	POPTR_0005s01760	JGI	1013
	PtrLon4	POPTR_0013s01030	JGI	968
<i>Carica papaya</i>	CrpLon1	gene evm.TU.supercontig_48.159	JGI	930
<i>Theobroma cacao</i>	ThcLon1	CGD0022449	JGI	1042
<i>Oryza sativa</i>	OsLonA	Os03g19350	NCBI	948
	OsLonB	Os07g48960	NCBI	976
<i>Zea mays</i>	ZmLon	GRMZM2G113056	JGI	980
<i>Brachypodium distachyon</i>	BradiLon	Bradi1g17070	JGI	994
<i>Selaginella moellendorffii</i>	SelmLon	SELMODRAFT_30426	JGI	1114
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pim1	P36775	NCBI	1133
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	ThasLon	CCMP1335	NCBI	985
<i>Escherichia coli</i>	EcLon	AAC36871	NCBI	784

**Συντμήσεις:**

NCBI (National Center for Biotechnology Information)  
JGI (DOE Joint Genome Institute)  
[psf.org/programs/plants/index.jsf](http://psf.org/programs/plants/index.jsf)

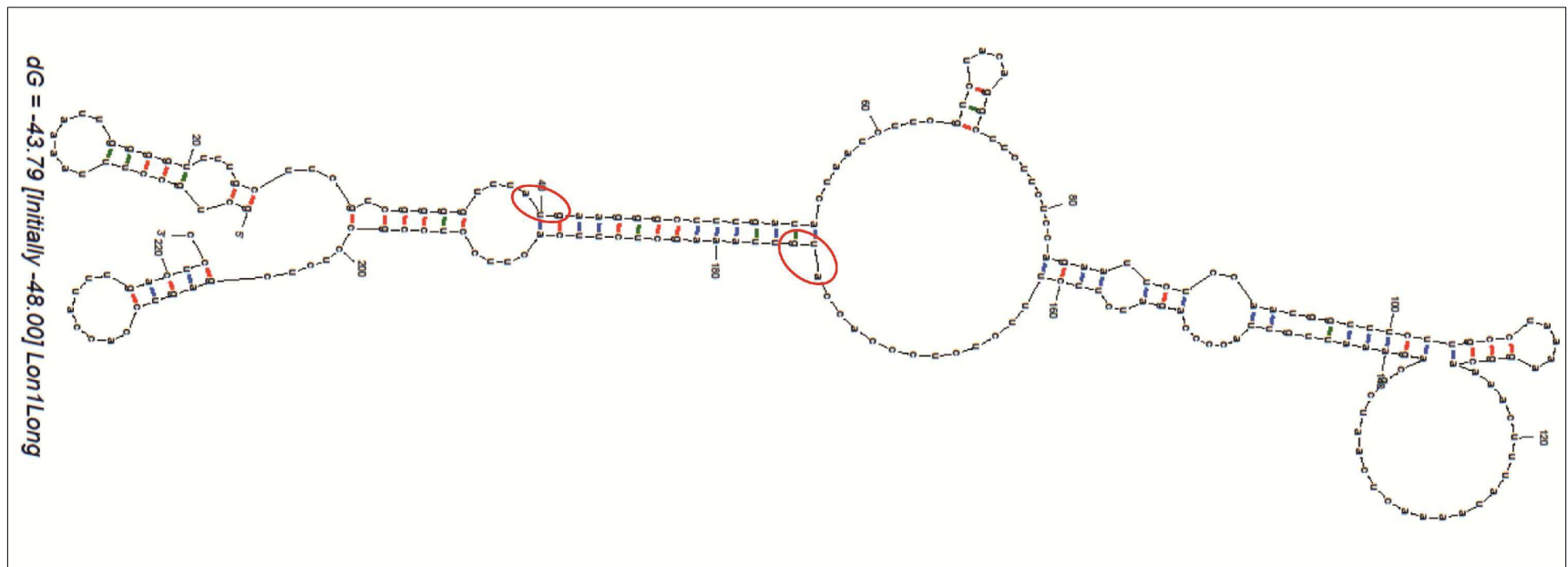
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>  
<http://genome.jgi->

**Εικόνα A1. Πολλαπλή ευθυγράμμιση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων Lon1 και Lon4 των *Arabidopsis thaliana* και *Arabidopsis lyrata*.**



**Εικόνα A2. Δευτεροταγής δομή του 5'-άμινου τελικού άκρου του *Arabidopsis thaliana* Lon1 mRNA.**

Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Mfold στα πρώτα 223 νουκλεοτίδια αρχίζοντας από το 38nt ανωφορικά του πρώτου AUG το οποίο αντιστοιχεί στην θέση έναρξης της μεταγραφής. Η περιοχή περιλαμβάνει τα δύο AUG στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο (εκλείψεις). Φανερή είναι η “χαλαρή” δομή στην περιοχή των κωδικονίων έναρξης της μετάφρασης.





**Πίνακας Β1.** Ορθόλογα της πρωτεΐνης Leukothea στα διάφορα φυτικά είδη.

Organism	Annotation number	Database	a.a. length
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g62990	NCBI	494
<i>Arabidopsis lyrata</i>	XP_002864830.1	NCBI	492
<i>Mimulus gatus</i>	mgv1a026990m.g	JGI	518
<i>Medicago truncatula</i>	Medtr3g105870	JGI	491
<i>Populus trichocarpa</i>	XP_002302898.1	NCBI	483
<i>Ricinus communis</i>	XP_002523214.1	NCBI	475
<i>Vitis vinifera</i>	XP_002265738.1	NCBI	485
<i>Sorghum bicolor</i>	XP_002463681.1	NCBI	504
<i>Hordeum vulgare</i>	BAJ92503	NCBI	511
<i>Oryza sativa a</i>	NP_001052443.1	NCBI	502
<i>Oryza sativa b</i>	EAZ30183	NCBI	529
<i>Selaginella moellendorffii</i>	438174	JGI	480
<i>Physcomitrella patens</i>	Pp1s33_98V6	JGI	481

**Πίνακας Β2.** Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη της έκφρασης

Gene	AGI	Primer Sequence		Tm	Cycles <sup>a</sup>	gDNA <sup>b</sup>	cDNA <sup>b</sup>
		Forward	Reverse				
<i>Leuko1</i>	At5g62990	5'- AACGCGTAAGCTCCAGAAGCTACTAATG -3'	5'-AGAATAGCTCTGGATGTCTC-3'	56	29	535	535
<i>PetB</i>	AtCG00720	5'- TTCGAAGAACGTCTTGAGATTGAG -3'	5'-AAAAGCTTCAGTAACGGTTGGAC-3'	56	20	178	178
<i>PetD</i>	AtCG00730	5'- TTAGCTAAAGGTATGGGTCACA-3'	5'-CCAAAGGAGTTGCAAAAAGGAT-3'	56	20	169	169
<i>Rpl2-2</i>	AtCG01310	5'- GGCCATACATAATATAGAAATCACACT-3'	5'-AACATTTCCCCTTGTCCGACTGT-3'	56	20	145	145
<i>PsbB</i>	AtCG00680	5'- GTGTTTTCTGGTTTGTGCTTCTTG -3'	5'- GTTGTACCTTTCCGGTTAGTCC-3'	56	20	238	238
<i>FZO-like GTPase</i>	At1g03160	5'- TCACGTTTCTGTGCTACTCTGACTT -3'	5'- TTTTCCACTGCTGTGTGTACCG -3'	55	40	910	270
<i>At1g67660</i>	<i>At1g67660</i>	5'- GAT-GAT-GAT-GAG-GCT-AGT-TCA-AGT -3'	5'- GAGTGATGAGTGATAAAGCAGTAGA-3'	55	40	690	280

<sup>a</sup> Number of cycles corresponding to the logarithmic phase of amplification for each transcript

<sup>b</sup> PCR product size in bp

---

Η αντίδραση RT πραγματοποιήθηκε με τους παρακάτω εκκινητές:

*Leuko1-RT (GUSTGAR)*: 5'- AAGTCGACCCATGATTCCACAGCACTATTTGC -3'

*PetB-RT*: 5'- AATACCTTGCTTACGTATCATTAGG -3'

*PetD-RT*: 5'- TGTTGCTCCAATACCTAACCACAG -3'

*Rpl2-2-RT*: 5'- TCTTCTTCCAAGTGCAGGATAACC -3'

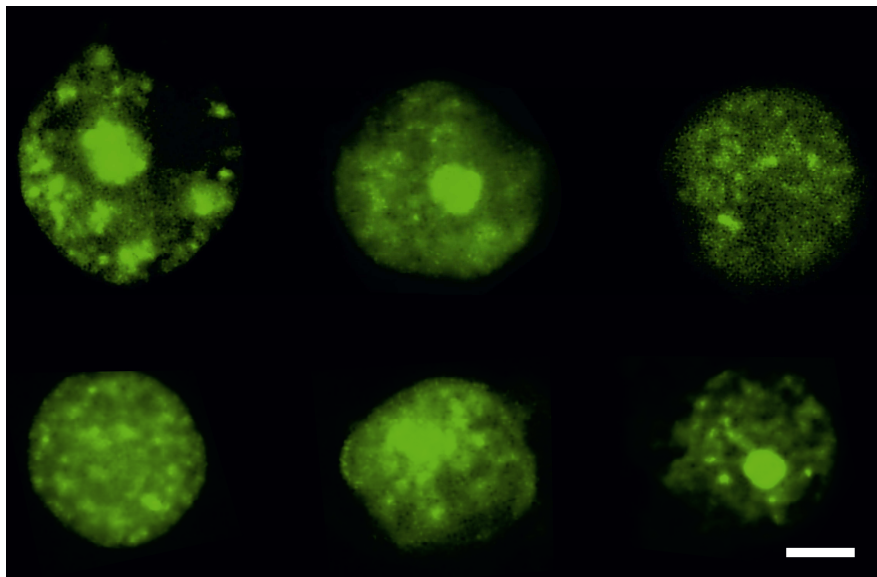
*PsbB-RT*: 5'- GCGGACGAACACTAAGATGGAA -3'

*FZO-like GTPase-RT*: 5'- CTG-TAT-TAA-GCA-ACT-TCC-GTG-T -3'

*At1g67660-RT*: 5'- GGG-ATG-AGC-AAA-TGG-TGA-AAT-GG -3'

**Εικόνα B1.** Υποκυτταρική τοποθέτηση της κατασκευής σύντηξης 35S::YFP:Leuko1<sub>1-494</sub> σε πυρήνες κυττάρων.

Η τοποθέτηση της κατασκευής 35S::YFP:Leuko1<sub>1-494</sub> εμφανίζεται με διακριτά στίγματα μέσα στον πυρήνα τα οποία πιθανώς αποτελούν πυρηγικά σωμάτια (nuclear bodies). Κλίμακα: 2μm



**Εικόνα B1.** Μετασχηματισμένα φύλλα καπνού στα οποία έχουν αποσιωπηθεί τα γονίδια (A) Ιμπορτίνη α1/α2 και (B) *PDS* (*Phytoene Desaturase Gene*).

Τα φύλλα εξαιτίας της αποσιώπησης του γονιδίου *PDS* που ελέγχει τη βιοσύνθεση των χλωροφυλλών, εμφανίζονται χλωρωτικά.









