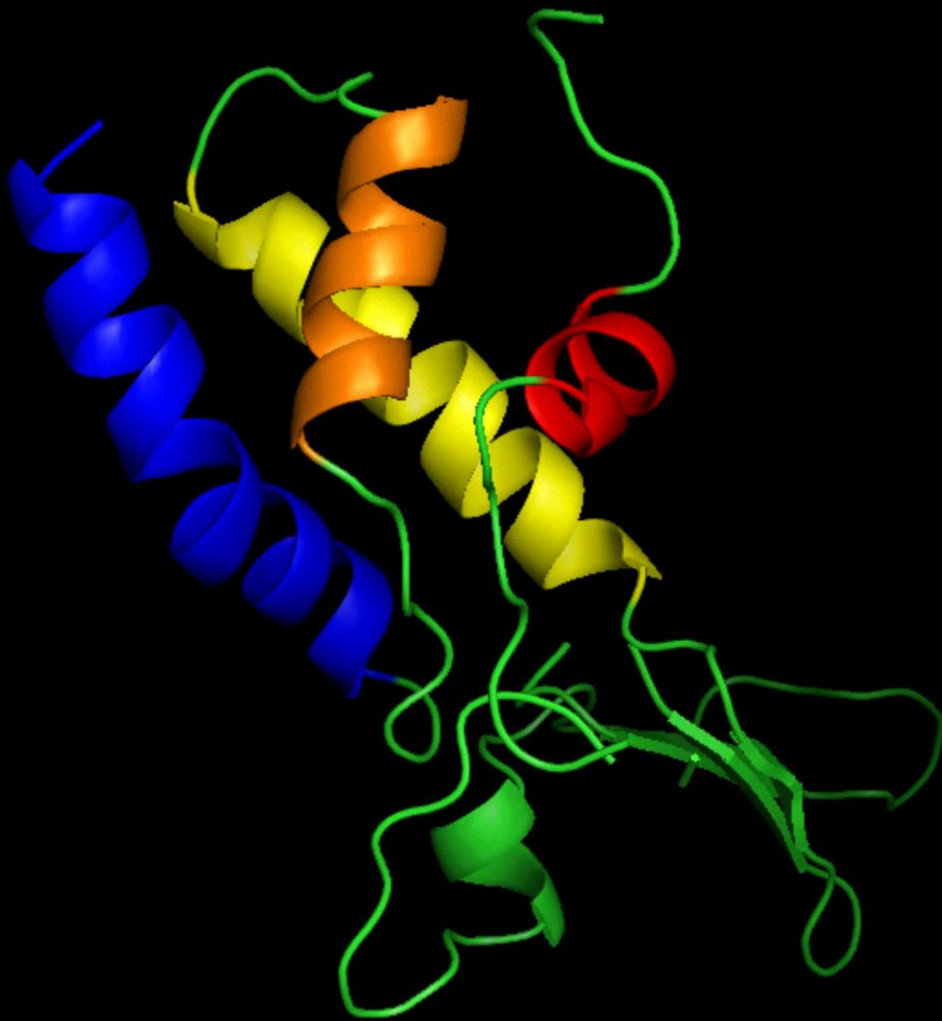


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

«Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *Lon* του φυτού
Arabidopsis thaliana»



Ντικράν Χ. Τσιτσεκιάν

Αθήνα 2011

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**«Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων Lon του φυτού
Arabidopsis thaliana»**

Ντικράν Χ. Τσιτσεκιάν

Αθήνα 2011

Η ανάθεση της παρούσας πτυχιακής μελέτης έγινε με απόφαση της 16ης ΓΣΕΣ του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας στις 19/05/2010 κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική επιτροπή της μελέτης.

Συμβουλευτική και Εξεταστική επιτροπή:

Σταμάτης Ρήγας, Λέκτορας (Επιβλέπων)

Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής (Μέλος)

Δήμητρα Μηλιώνη, Επικ. Καθηγήτρια (Μέλος)

Περιεχόμενα

| | |
|---|----|
| Περίληψη | 9 |
| Abstract | 10 |
| Εισαγωγή | 11 |
| 1.1 Το φυτό <i>Arabidopsis thaliana</i> | 12 |
| 1.2 Μιτοχόνδρια & Χλωροπλάστες | 12 |
| 1.3 Λειτουργικός ρόλος του μιτοχονδρίου..... | 13 |
| 1.4 Λειτουργικός ρόλος του χλωροπλάστη..... | 15 |
| 1.5 Οι Ενεργές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και ο μηχανισμός ελέγχου της ποιότητας των πρωτεϊνών (Protein Quality Control)..... | 16 |
| 1.6 Η ATP-εξαρτώμενη πρωτεάση Lon..... | 17 |
| 1.7 Η πρωτεάση Lon στο φυτό μοντέλο <i>Arabidopsis thaliana</i> | 18 |
| 1.8 Σκοπός – Στόχοι των πειραμάτων | 21 |
| Υλικά & Μέθοδοι..... | 24 |
| 2.1 Φυτικό υλικό - συνθήκες ανάπτυξης και καλλιέργειας..... | 25 |
| 2.2 Συνθήκες καλλιέργειας <i>Arabidopsis thaliana</i> | 25 |
| 2.3 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA από <i>Arabidopsis</i> | 25 |
| 2.4 Πρωτόκολλο απομόνωσης γονιδιωματικού DNA από <i>Arabidopsis</i> | 26 |
| 2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)..... | 26 |
| 2.5.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)..... | 26 |
| 2.5.2 PCR αποικιών..... | 27 |
| 2.5.3 RT-PCR..... | 28 |
| 2.6 Ανάλυση δεσοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA) | 30 |
| 2.7 Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης..... | 31 |
| 2.8 Ενοποίηση τμημάτων με κολλώδη άκρα..... | 31 |
| 2.9 Βακτηριακά κύτταρα και μετασχηματισμός | 32 |
| 2.9.1 Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> | 32 |
| 2.9.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> με πλασμιδιακό DNA | 32 |
| 2.9.3 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>Agrobacterium tumefaciens</i> με ηλεκτροπόρωση..... | 33 |

| | |
|---|----|
| 2.10 Αποθήκευση για μεγάλα χρονικά διαστήματα βακτηριακών κυττάρων..... | 34 |
| 2.11 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα <i>Escherichia coli</i> | 34 |
| 2.11.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης | 34 |
| 2.11.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την βοήθεια κολώνας QIAGEN..... | 34 |
| 2.12 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 35 |
| 2.13 Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού | 35 |
| 2.14 Μετασηματισμός <i>Arabidopsis thaliana</i> | 35 |
| 2.14.1 Μέθοδος διείσδυσης με εφαρμογή κενού σε ολόκληρα φυτά <i>Arabidopsis</i> | 35 |
| 2.14.2 Ανάπτυξη φυτών και διείσδυση με κατάλληλο στέλεχος <i>Agrobacterium</i> | 36 |
| 2.14.3 Επιλογή των μετασηματισμένων φυτών της T1 γενιάς..... | 36 |
| 2.15 Πολλαπλή ευθυγράμμιση ακολουθιών και φυλογενετική ανάλυση | 37 |
| 2.16 Υδατικά διαλύματα και θρεπτικά μέσα βακτηριακών κυττάρων και φυτών | 37 |
| 2.16.1 Διαλύματα ανάπτυξης βακτηρίων - σχετικά αντιδραστήρια..... | 37 |
| 2.16.2 Διαλύματα ενζύμων και απομόνωσης πλασμιδιακού DNA | 37 |
| 2.16.3 Διαλύματα απομόνωσης γονιδιωματικού DNA | 38 |
| 2.16.4 Διαλύματα ηλεκτροφόρησης..... | 38 |
| 2.16.5 Διαλύματα και θρεπτικά μέσα ιστοκαλλιέργειας και μετασηματισμού φυτών | 38 |
| <i>Αποτελέσματα</i> | 39 |
| 3.1. Διαγονιδιακές σειρές φυτών με τα γονίδια <i>Lon1</i> και <i>Lon4</i> | 40 |
| 3.2. Το γονίδιο <i>Lon1</i> όταν η έκφραση του ελέγχεται από τους προαγωγείς <i>Lon1</i> και <i>Lon4</i> συμπληρώνει το φαινότυπο των αλληλομόρφων <i>lon1</i> | 42 |
| 3.3. Η μιτοχονδριακή ισομορφία του γονιδίου <i>Lon1</i> δεν συμπληρώνει την μετάλλαξη <i>lon4-1</i> γονιδίου <i>Lon4</i> | 44 |
| 3.4. Η υπερέκφραση του γονιδίου <i>Lon1</i> συμπληρώνει τους φαινοτύπους των μεταλλαγμάτων <i>lon1</i> | 45 |
| 3.5. Η υπερέκφραση του γονιδίου <i>Lon1</i> δεν επηρέασε την ανάπτυξη των φυτών αγρίου-τύπου υπό φυσιολογικές συνθήκες | 47 |
| 3.6. Τα φυτά παρουσιάζουν σημαντική αναστολή στην πρωτογενή τους ανάπτυξη υπό συνθήκες έλλειψης οξυγόνου | 48 |
| <i>Συζήτηση</i> | 53 |

| | |
|--|----|
| 4.1 Η μιτοχονδριακή Lon1 πρωτεϊνική ισομορφή δεν συμπληρώνει το φαινότυπο της μετάλλαξης <i>lon4</i> | 54 |
| 4.2 Ο προαγωγέας του γονιδίου <i>Lon4</i> όταν καθοδηγεί το γονίδιο <i>Lon1</i> συμπληρώνει τους φαινοτύπους των μεταλλαγμάτων <i>lon1-1</i> και <i>lon1-2</i> | 55 |
| 4.3 Η συμπλήρωση των φαινοτυπικών ανωμαλιών των μεταλλαγμάτων <i>lon1-1</i> και <i>lon1-2</i> καθορίζεται από το γενετικό τους υπόβαθρο | 56 |
| 4.4 Εναλλακτική πειραματική προσέγγιση είναι αναγκαία για μελέτη των επιδράσεων της οξειδωτικής καταπόνησης..... | 59 |
| 4.5 Η υπερέκφραση του γονιδίου <i>Lon1</i> προσδίδει ανθεκτικότητα σε συνθήκες ανεπάρκειας οξυγόνου. | 60 |
| <i>Βιβλιογραφία</i> | 64 |
| <i>Παράρτημα</i> | 68 |

Στην οικογένειά μου

Θέλω να ευχαριστήσω ειλικρινά τον καθηγητή Πολυδεύκη Χατζόπουλο, τον λέκτορα Σταμάτη Ρήγα και τον διδάκτορα Γεράσιμο Δάρα για την πολύτιμη βοήθεια και συνδρομή τους στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Επιπλέον θα ήθελα να πω και ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για την υπομονή και την υποστήριξή τους όλον αυτό τον καιρό.

Περίληψη

Η φωτοσύνθεση και η αναπνοή αποτελούν δυο από τις σημαντικότερες βιολογικές διεργασίες των φυτών που σχετίζονται με την ανάπτυξη και την διατήρηση της ζωής στον πλανήτη, οι οποίες πραγματοποιούνται στους χλωροπλάστες και στα μιτοχόνδρια. Στα οργανίδια αυτά οι έντονες οξειδωαναγωγικές αντιδράσεις αυξάνουν σημαντικά τη παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) που προκαλούν βλάβες σε βιομόρια όπως οι πρωτεΐνες. Σε συνθήκες παρατεταμένης οξειδωτικής καταπόνησης τα κύτταρα πρέπει να καταστρέψουν τις οξειδωμένες πρωτεΐνες ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση τοξικών συσσωματωμάτων. Στα οργανίδια, η αποδόμηση των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών γίνεται από τη δράση των ATP-εξαρτώμενων πρωτεασών. Η πρωτεάση Lon ως μέλος αυτής της οικογένειας έχει τέσσερα πυρηνικά γονίδια στο φυτό *Arabidopsis thaliana*.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *Lon1* και *Lon4*, και η κατανόηση της λειτουργίας των πρωτεασών που κωδικοποιούν στο φυτό *Arabidopsis thaliana*. Τα μεταλλάγματα του γονιδίου *Lon1* παρουσιάζουν καθυστέρηση στην εγκατάσταση και στην ανάπτυξη, ενώ η μορφολογία των μιτοχονδρίων τους είναι προβληματική. Επιπλέον, τα σπέρματα φυτών μετάλλαξης του γονιδίου *Lon4* εμφανίζουν μηδαμινή βλαστικότητα. Σε αμινοξικό επίπεδο τα δύο γονίδια παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό ομολογίας και τα προϊόντα που κωδικοποιούν τοποθετούνται στα υποκυτταρικά οργανίδια κοινής προκαρυωτικής προέλευσης, το μιτοχόνδριο και το χλωροπλάστη. Από τα παραπάνω προέκυψαν μια σειρά από ερωτήματα προς διερεύνηση. Αρχικά εξετάστηκε εάν το ένα γονίδιο έχει την ικανότητα να συμπληρώσει τη βιοχημική λειτουργία του άλλου. Για αυτό σχηματίστηκαν μια σειρά από χιμαιρικές διαγονιδιακές κατασκευές μεταξύ των ρυθμιστικών και κωδικών περιοχών των γονιδίων *Lon1* και *Lon4*, οι οποίες εισήχθησαν στα γενετικά υπόβαθρα των δύο μεταλλάξεων. Επιπλέον, κατασκευάστηκαν σειρές φυτών που υπερεκφράζουν την *Lon1* και *Lon4* πρωτεάση με σκοπό να προσδιοριστεί εάν η συσσώρευση τους σχετίζεται με ανθεκτικότητα έναντι συνθηκών οξειδωτικής καταπόνησης. Για τα πειράματα υπερέκφρασης έγινε σχεδιασμός δύο γονιδιακών κατασκευών όπου η έκφραση των κωδικών περιοχών των γονιδίων *Lon1* και *Lon4* βρίσκονταν υπό τον έλεγχο του καθολικού προαγωγέα *CaMV35S*.

Προκαταρκτικές δοκιμές που έγιναν υποβάλλοντας τα φυτά που υπερεκφράζουν το γονίδιο *Lon1* σε συνθήκες ανοξίας αποκάλυψαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα αυτών έναντι των φυτών αγρίου τύπου. Οι ρυθμιστικές ακολουθίες των δύο γονιδίων, σε συνθήκες επάρκειας οξυγόνου, παρουσιάζουν εκφραστική συμπληρωματικότητα αφού το γονίδιο *Lon1* υπό τον έλεγχο του προαγωγέα *Lon4* κατόρθωσε να αναστρέψει τον φαινότυπο της μετάλλαξης *lon1*. Τα αποτελέσματα αυτά αποκαλύπτουν ότι η πρωτεάση Lon σχετίζεται με τη ρύθμιση της ομοιόστασης των πρωτεϊνών στο κύτταρο σε συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης. Καθώς οι περιβαλλοντικές αλλαγές αναμένεται να ενισχύσουν τους αβιοτικούς παράγοντες που προκαλούν οξειδωτική καταπόνηση στα φυτά μεγάλης καλλιέργειας, η διεξοδική κατανόηση του μοριακού μηχανισμού δράσης της πρωτεάσης Lon αναμένεται να συνεισφέρει στην διασφάλιση της πρωτογενούς παραγωγής.

Abstract

Vital processes for canonical cellular homeostasis are the repair/proper folding of non-native polypeptides and the elimination of the irreparably damaged proteins. For these tasks protein processing machines are present within the cell as a universal protein quality control mechanism. Accumulation of non-native proteins especially in organelles results in malfunction and arrest of growth. This phenomenon is severely profound in abiotic conditions causing aggregation of toxic polypeptides due to oxidative damage. Recently, organellar dysfunction by oxidative stress has been implicated in ageing, cell death and numerous human degenerative diseases. Intracellular selective proteolysis is an important post-translational regulatory mechanism maintaining protein quality control by removing defective, damaged or even deleterious protein aggregates. The ATP-dependent Lon protease is a key component of protein quality control that is highly conserved across the kingdoms of living organisms.

This project aims to shed light on the role of *Arabidopsis thaliana* ATP-dependent Lon1 and Lon4 proteases in removing short-lived regulatory proteins and preventing harmful accumulation of non-native polypeptides in plant organelles. A combinatorial experimental approach is designed to clarify Lon1 and Lon4 evolutionary divergence, biochemical specificity and/or redundancy. The relative resistance to oxidative stress of overexpression transgenic lines and the dynamics or durability of mitochondria and chloroplasts under stress conditions are also topics under assessment.

Considering that environmental changes are expected to enhance the abiotic factors that cause oxidative stress in crops, the anticipated results will provide novel insights in plant response and adaptation to such conditions and will contribute to the understanding of organellar maintenance of function protein systems to potentially avert cellular dysfunction.

Εισαγωγή

1.1 Το φυτό *Arabidopsis thaliana*

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

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

Το γονιδίωμα του *Arabidopsis* συγκριτικά με άλλα φυτά είναι μικρότερο (περίπου 1×10^8 ζεύγη βάσεων νουκλεοτιδίων), είναι διπλοειδές και όχι ιδιαίτερα πολύπλοκο (π.χ λίγες επαναλήψεις μη κωδικού DNA). Επιπλέον, είναι το πρώτο φυτό του οποίου αποκωδικοποιήθηκε πλήρως η γονιδιωματική του ακολουθία, η οποία δημοσιεύτηκε το Δεκέμβριο του 2000 ως αποτέλεσμα της συλλογικής συνεργασίας μεταξύ ερευνητικών ομάδων *Arabidopsis Genome Initiative* (AGI 2000). Όλα αυτά, καθιστούν εύκολη την μοριακή και γενετική ανάλυση του φυτού και σε συνδυασμό με το ότι η ανάπτυξη, η αναπαραγωγή, η αντίδραση στις καταπονήσεις και τις ασθένειες δεν διαφέρει ιδιαίτερα από αυτήν των καλλιεργούμενων φυτών, καθιστούν το *Arabidopsis*, φυτό πολύ μεγάλης σημασίας για την βασική και εφαρμοσμένη έρευνα, ιδιαίτερα στο επίπεδο των Βιολογικών επιστημών.

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

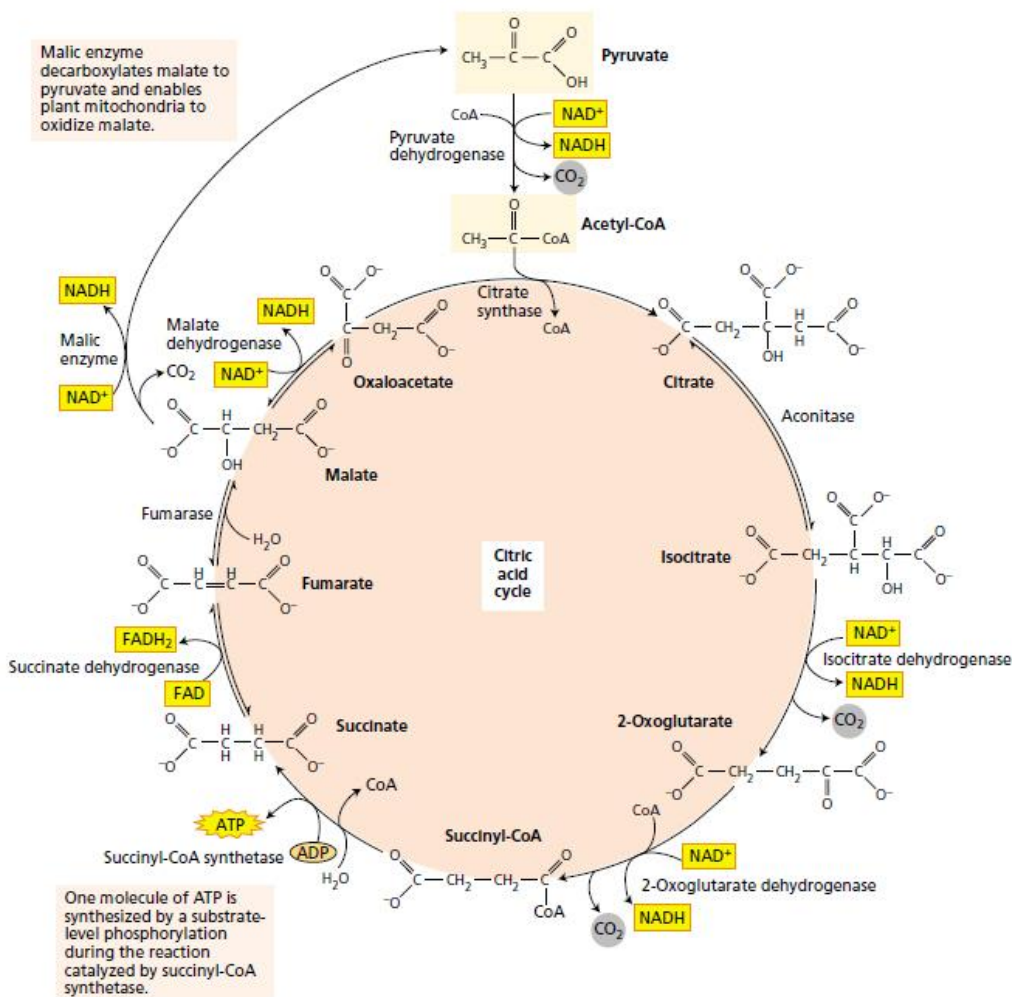
1.2 Μιτοχόνδρια & Χλωροπλάστες

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

Στα δύο αυτά οργάνδια λαμβάνουν χώρα οι δύο κύριες διεργασίες του αερόβιου μεταβολισμού: Η αναπνοή και η φωτοσύνθεση. Κατά την αναπνοή η ενέργεια που παράγεται από τον μεταβολισμό των υδρογονανθράκων μετατρέπεται σε ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη). Το ATP αποθηκεύεται και στη συνέχεια χρησιμοποιείται σε άλλες βιοχημικές αντιδράσεις που χρειάζονται ενέργεια. Στα φυτά το κύριο υπόστρωμα της αναπνοής είναι η γλυκόζη. Βέβαια υπάρχουν και άλλες πηγές άνθρακα που χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα για την αναπνοή όπως η σουκρόζη, φωσφοτριόζες, φωσφοεξόζες, φρουκτάνες, λιπίδια και σε ορισμένες περιπτώσεις ακόμα και πρωτεΐνες (Teiz & Zeiger 2010).

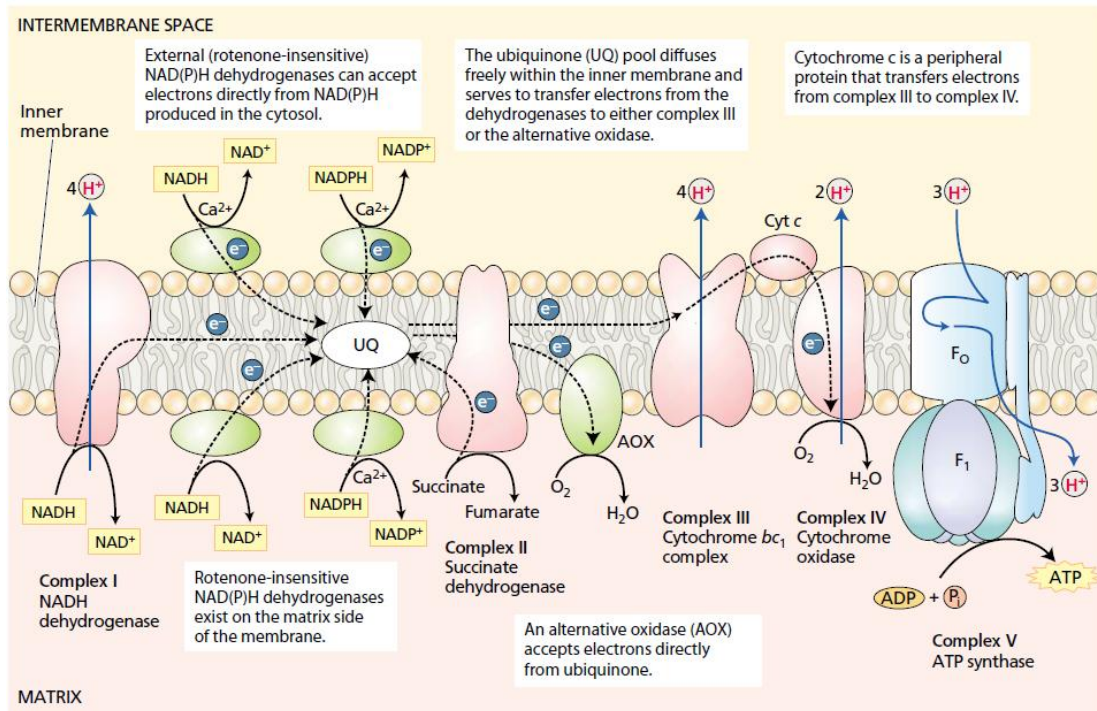
1.3 Λειτουργικός ρόλος του μιτοχονδρίου

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



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

Ο κύκλος του κιτρικού τοποθετείται στη μήτρα του μιτοχονδρίου. Κατά τη λειτουργία του συντίθενται πολλοί ενδιάμεσοι μεταβολίτες με ιδιαίτερη βιολογική σημασία, καθώς αποτελούν πρόδρομα μόρια για τη βιοσύνθεση άλλων μεταβολιτών (αμινοξέα). Κατά τη λειτουργία του κύκλου παράγονται επίσης τα συνένζυμα NADH και FADH_2 καθώς και ένα μόριο ATP . Τα NADH και FADH_2 έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των κυττάρων καθώς συμμετέχουν σε πολλές βιοχημικές αντιδράσεις ως συνένζυμα, αλλά ο σημαντικότερος ρόλος τους στο μιτοχόνδριο είναι ότι παρέχουν την απαραίτητη ενέργεια για να λειτουργήσει η **αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων**.



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

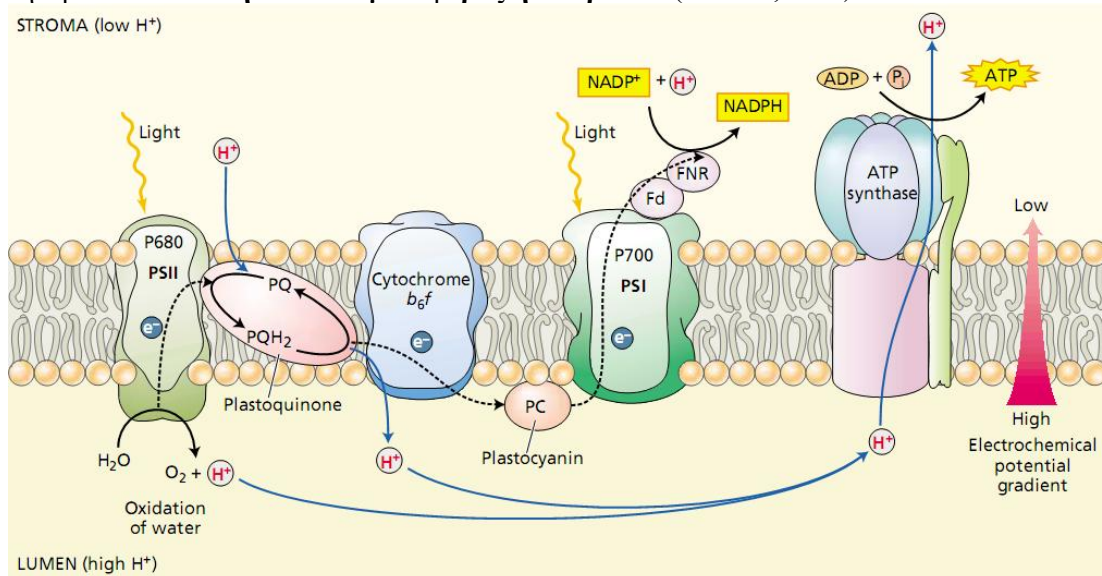
Η ΑΑΜΗ τοποθετείται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Αρχικά ένα μόριο NADH ανάγεται σε NAD⁺ (Σύμπλοκο I) απελευθερώνοντας ένα ηλεκτρόνιο και ένα πρωτόνιο. Το πρωτόνιο εξάγεται στον διαμεμβρανικό χώρο, ενώ το ηλεκτρόνιο ακολουθεί μια πορεία μέσα από τα σύμπλοκα της αλυσίδας (με μια σειρά οξειδωαναγωγικών αντιδράσεων) για να καταλήξει στον τελικό αποδέκτη που είναι το μοριακό οξυγόνο (Σύμπλοκο IV) και το οξυγόνο ανάγεται σε νερό. Όπως φαίνεται και στη σχηματική αναπαράσταση της ΑΑΜΗ (Εικ. 2) η αναγωγή του NADH σε NAD⁺ εξασφαλίζει την απαραίτητη ενέργεια για τη λειτουργία της αλυσίδας. Αποτέλεσμα της αναγωγής αυτής είναι η παραγωγή πρωτονίων, τα οποία οδηγούνται προς τον διαμεμβρανικό χώρο από τα Σύμπλοκα I, III και IV της ΑΑΜΗ. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία διαβάθμισης πρωτονίων μεταξύ της μήτρας και του διαμεμβρανικού χώρου η οποία αποτελεί την κινητήριου δύναμη για τη **συνθάση του ATP** (αναφέρεται και ως Σύμπλοκο V, αλλά δεν αποτελεί μέρος της ΑΑΜΗ). Η συνθάση του ATP αντλεί πρωτόνια από το διαμεμβρανικό χώρο προς τη μήτρα, με σκοπό να εξισοροπήσει τη διαβάθμιση που δημιουργείται από τη λειτουργία της ΑΑΜΗ με ταυτόχρονη παραγωγή ATP. Λόγω του τρόπου με τον οποίο λειτουργούν τα δύο σύμπλοκα, όλη η βιοχημική διεργασία ονομάζεται **συζευγμένη οξειδωτική φωσφορυλίωση**.

Πέραν από την παραγωγή ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, στα μιτοχόνδρια λαμβάνουν χώρα και μια σειρά από άλλες σημαντικές μεταβολικές διεργασίες όπως η βιοσύνθεση αμινοξέων, ο καταβολισμός των λιπαρών οξέων. Επίσης τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν σε άλλα ενδιάμεσα μεταβολικά μονοπάτια και εμπλέκονται στη διατήρηση της ομοιόστασης των ιόντων ασβεστίου

1.4 Λειτουργικός ρόλος του χλωροπλάστη

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

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



Εικόνα 3. Η φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων

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

1.5 Οι Ενεργές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και ο μηχανισμός ελέγχου της ποιότητας των πρωτεϊνών (Protein Quality Control)

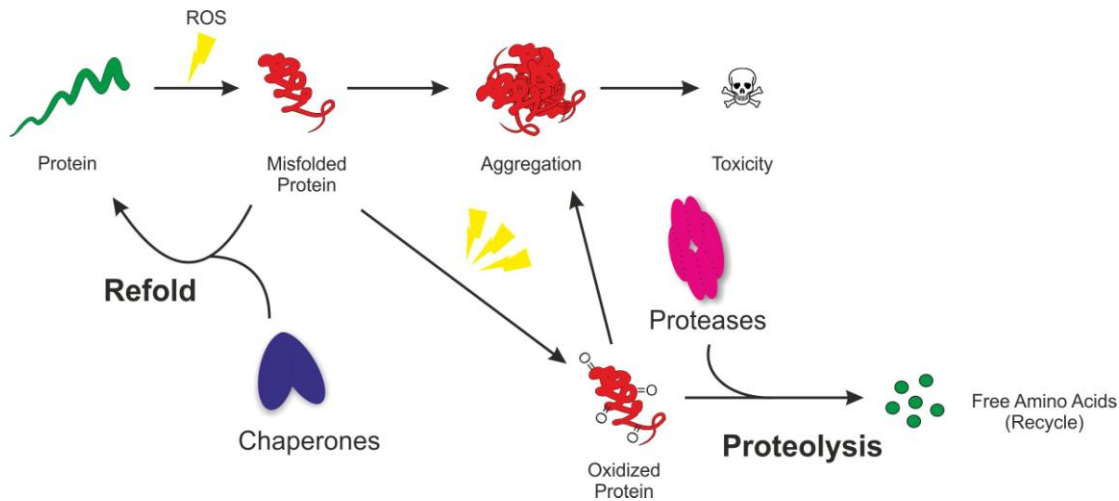
Οι ενεργές μορφές οξυγόνου αποτελούν παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού και παράγονται κυρίως στις αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων, λόγω της μεγάλης ποσότητας μεταγωγής ενέργειας. Είναι ενεργά φορτισμένα μόρια και όταν παραμένουν ελεύθερα στα κύτταρα προκαλούν βλάβες εξαιτίας οξειδωσης σε βιομόρια όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα. Πέραν των δυσμενών συνεπειών των ROS για το κύτταρο, θεωρείται ότι έχουν αμυντικό ρόλο έναντι παραγόντων βιοτικής καταπόνησης στα φυτά (Apel and Hirt 2004), ενώ επιπλέον εικάζεται ότι μπορεί να έχουν και ρόλο ως μόρια μεταγωγής σήματος/ερεθίσματος (Moller and Sweetlove 2010). Παρόλα αυτά ο περιορισμός της εξάπλωσής τους είναι αναγκαίος για τη επιβίωση του κυττάρου.

Τα μιτοχόνδρια μαζί με τους χλωροπλάστες και τα περοξυσώματα αποτελούν τις κύριες πηγές παραγωγής ROS. Σύμφωνα μάλιστα και με τη θεωρία που διατύπωσε τη δεκαετία του 1950 ο Denham Harman για τη γήρανση και τις ελεύθερες ρίζες, η ενδογενής παραγωγή τοξικών ελεύθερων ριζών στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου κατά την αναπνοή οδηγεί σε σωρευτικές βλάβες στα βιομόρια του οργανιδίου (πρωτεΐνες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα) επιφέροντας τελικά τον κυτταρικό θάνατο (Harman 1957).

Η παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου επάγεται υπό διάφορες συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης στα φυτά, όπως για παράδειγμα σε συνθήκες υψηλού φωτισμού, σε συνθήκες ξηρασίας, σε ακραίες τιμές θερμοκρασίας ή σε συνθήκες μηχανικής καταπόνησης (Apel and Hirt 2004; Finkel and Holbrook 2000; Friguet et al. 2008). Για να αντιπαρέλθουν σε αυτόν τον παράγοντα καταπόνησης, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς περιορισμού της παραγωγής και της εξάπλωσης των ROS. Μια πρώτη γραμμή άμυνας έναντι της παραγωγής των ROS είναι ένζυμα που δεσμεύουν και αποτοξινώνουν τις ενεργές μορφές οξυγόνου σε μη τοξικά για τα κύτταρα μόρια, καθώς επίσης και μη ενζυμικά μόρια που και αυτά δεσμεύουν τα ROS περιορίζοντας την δυσμενή τους επίδραση. Τα κυριότερα αποτοξινωτικά ένζυμα είναι η **δεσμουτάση του σουπεροξειδίου** (SOD, superoxide dismutase), οι **καταλάσες** και οι **περοξειδάσες** ενώ από τα μη ενζυμικά μόρια τα κυριότερα **αντιοξειδωτικά** μόρια είναι τα **καροτενοειδή** και το **ασκορβικό οξύ**. Σε πειράματα όπου έγινε μεταβολή της ποιότητας και της ποσότητας των καροτενοειδών στον ασκομύκητα *Podospora anserina*, παρατηρήθηκε αύξηση έως και 30% της διάρκειας του βιολογικού κύκλου (lifespan) (Strobel et al. 2009).

Παρόλες τις προσπάθειες περιορισμού της συγκέντρωσης των ROS είτε ενισχύοντας τον μηχανισμό περιορισμού παραγωγής τους, είτε τον μηχανισμό αποτοξίνωσής τους ειδικά υπό συνθήκες καταπόνησης του οργανισμού, μια σημαντική ποσότητα ROS παραμένει ενεργή εντός του κυττάρου. Έτσι τα κύτταρα βρίσκονται συνεχώς υπό κάποια μορφή οξειδωτικής καταπόνησης, η οποία μεταφράζεται ως ζημιές στα βιομόρια και κυρίως στις **πρωτεΐνες** του. Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες τείνουν να σχηματίζουν **συσσωματώματα** εντός των κυττάρων (Εικ. 4), τα οποία προκαλούν δυσλειτουργία του οργανιδίου. Αν το φαινόμενο αυτό δεν περιοριστεί το αποτέλεσμα είναι ο κυτταρικός θάνατος. Πλέον η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων φαίνεται πως σχετίζεται άμεσα με τη γήρανση, την απόπτωση καθώς και με διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Kwong et al. 2006).

Για να αποφύγουν τις παραπάνω δυσμενείς συνέπειες, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει και έναν δεύτερο μηχανισμό άμυνας που αφορά στην προστασία των βιομορίων του. Ο μηχανισμός αυτός ονομάζεται μηχανισμός ελέγχου της ποιότητας των πρωτεϊνών (**Protein Quality Control System, PQC**). Όταν με την οξειδωση η τριτοταγής δομή μιας πρωτεΐνης μεταβληθεί, τότε αρχικά γίνεται μια προσπάθεια επαναφοράς της πρωτεΐνης στην φυσική της κατάσταση καθώς από άποψη ενέργειας είναι η λιγότερο ενεργοβόρος διαδικασία για το κύτταρο. Το ρόλο αυτό αναλαμβάνουν οι **μοριακοί συνοδοί** (molecular chaperones), οι οποίοι αναγνωρίζουν την οξειδωμένη πρωτεΐνη, την ξεδιπλώνουν και στη συνέχεια την διπλώνουν ξανά στη φυσιολογική της μορφή. Αν οι ζημιές στις πρωτεΐνες είναι εκτεταμένες και η αναδίπλωση δεν είναι εφικτή, τότε η μόνη επιλογή είναι η καταστροφή τους μέσω εκλεκτικής **πρωτεόλυσης** (Εικ.4), καθώς η δημιουργία συσσωματωμάτων οξειδωμένων πρωτεϊνών είναι καταστροφική για τα κύτταρα.

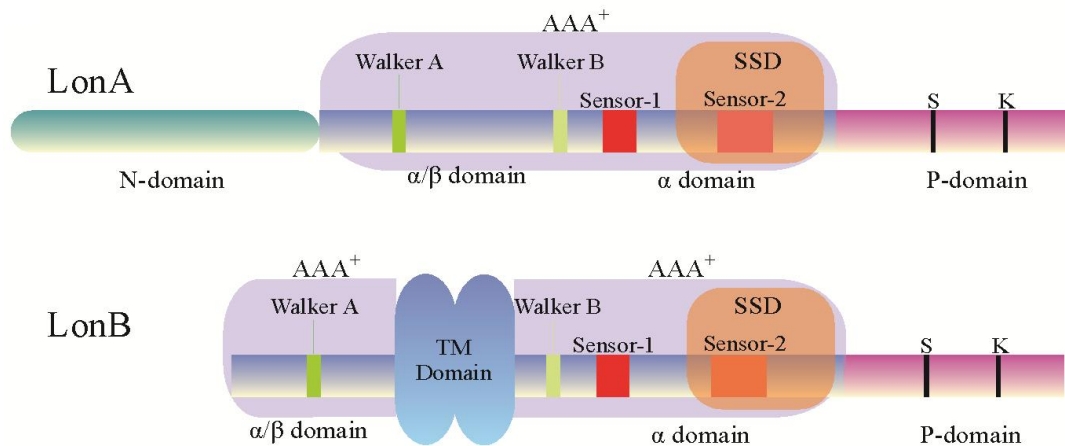


Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού ελέγχου της ποιότητας των πρωτεϊνών (Protein Quality Control, PQC) στα μιτοχόνδρια

Το ρόλο αυτό στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των κυττάρων έχει ο μηχανισμός του Πρωτεασώματος 26S/ουμπικουτίνης, ο οποίος αναγνωρίζει οξειδωμένες ή λάθος αναδιπλωμένες πρωτεΐνες και τις καταστρέφει, ανακυκλώνοντας τα αμινοξέα για σύνθεση νέων πολυπεπτιδίων. Στα οργανίδια τον αντίστοιχο ρόλο έχουν οι **ATP-εξαρτώμενες πρωτεάσες**. Η κατανομή των ATP-εξαρτώμενων πρωτεασών γίνεται σε τρεις οικογένειες: την **Clp**, την **FtsH** και την **Lon**. Όπως και το πρωτεάσωμα 26S έτσι και οι οργανιδιακές πρωτεάσες ανήκουν στην υπεροικογένεια των AAA⁺ πρωτεϊνών (ATPases associated with diverse cellular activities) (Neuwald et al. 1999; Iyer et al. 2004).

1.6 Η ATP-εξαρτώμενη πρωτεάση Lon

Η πρωτεάση Lon είναι ένας μηχανισμός που βρίσκεται σχεδόν σε όλους τους οργανισμούς. Η Lon απαντάται σε δύο τύπους: τον τύπο A (**A-Lons**) και τον τύπο B (**B-Lons**). Οι A-Lons χαρακτηρίζονται από ένα σχετικά μεγάλο άμινο-τελικό άκρο μαζί με τις περιοχές ATPάσης και την περιοχή που είναι υπεύθυνη για την πρωτεόλυση, η οποία βρίσκεται στο καρβόξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Οι B-Lons στερούνται άμινο τελικού άκρου και έχουν επιπλέον μια διαμεμβρανική περιοχή εντός της περιοχής ATPάσης. Το καρβόξυ πρωτεολυτικό άκρο είναι κοινό με των A-Lons (Εικ. 5). Οι B-Lons απαντώνται αποκλειστικά στα Archaea, από τα οποία απουσιάζουν οι πρωτεάσες των οικογενειών Clp και FtsH. Η πρωτεάση Lon ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά στο βακτήριο *Escherichia coli* και ονομάστηκε έτσι λόγω του φαινοτύπου των μεταλλαγμένων στελεχών (*long*) (Donch and Greenberg 1968) Στο *E. coli* η πρωτεάση Lon (*EcLon*) πρωτεολύει περίπου το 50% του αποδιαταγμένου ή μετουσιωμένου πρωτεώματος του βακτηρίου, αναγνωρίζοντας συγκεκριμένες αλληλουχίες πλούσιες σε αρωματικά και υδρόφοβα αμινοξέα, τα οποία βρίσκονται εκτεθειμένα όταν οι πρωτεΐνες χάνουν την φυσιολογική τους δομή, ενώ υπό φυσιολογικές συνθήκες οι περιοχές αυτές είναι «κρυμμένες» (Gur and Sauer 2009). Πέραν της πρωτεολυτικής δράσης της Lon, έχει αναφερθεί ότι διαθέτει και ιδιότητες μοριακού συνοδού (molecular chaperone) βοηθώντας στη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών (Rep et al. 1996), ενώ διαθέτει και περιοχές αναγνώρισης και πρόσδεσης με νουκλεϊκά οξέα (DNA και RNA) εξασφαλίζοντας έτσι τη διατήρηση της ακεραιότητας του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (Lu et al. 2007).



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση των A-Lons και B-Lons

Μεταλλάξεις στην πρωτεάση Lon έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ανωμαλιών στη μορφολογία των μιτοχονδρίων. Μεταλλάξεις στο ομόλογο γονίδιο της *Lon* σε κύτταρα ζύμης *PIM1* (*Saccharomyces cerevisiae*) είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια σταθερότητας του μιτοχονδριακού DNA, καθώς επίσης και ανώμαλη μορφολογία των μιτοχονδρίων, καθώς παρουσίασαν μιτοχόνδρια με εμφανώς λιγότερες αναδιπλώσεις της εσωτερικής μεμβράνης (Suzuki et al. 1994; van Dyck et al 1994). Παρόμοια μορφολογία παρουσίασαν τα μιτοχόνδρια φυτών με μετάλλαξη στο γονίδιο *Lon1*. Τα μεταλλάγματα *lon1* του φυτού *Arabidopsis thaliana* επιπρόσθετα παρουσίασαν μειωμένη δραστηριότητα ενζύμων του κύκλου του κιτρικού οξέος και συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Rigas et al, 2009a). Η έλλειψη της λειτουργίας του γονιδίου *Lon1* σε κύτταρα θηλαστικών είχε σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση οξειδωμένων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων στα μιτοχόνδρια (Lee et al, 1999, Bota & Davies 2002). Σε ασθενείς με κληρονομική σπαστική παραπληγία (Hereditary Spastic Paraplegia, SPG13), μία νευροεκφυλιστική ασθένεια στον άνθρωπο, η έκφραση της *Lon* και της πρωτεάσης *ClpP*, που εντοπίζονται στη μήτρα του μιτοχονδρίου, ήταν σε χαμηλότερα επίπεδα έναντι του φυσιολογικού (Hansen et al, 2008).

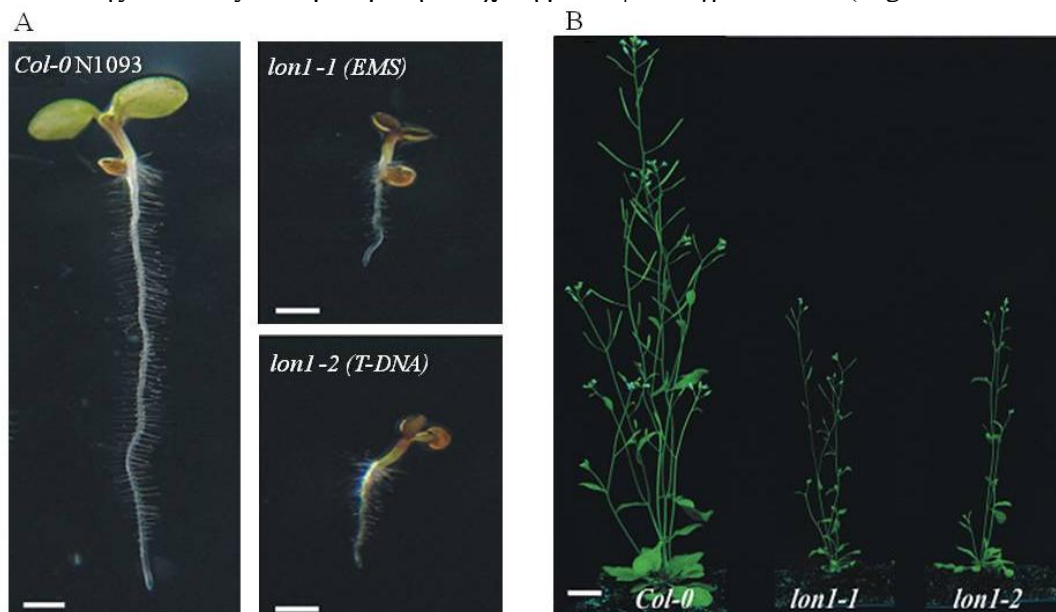
Στον αντίποδα, **υπερέκφραση** της πρωτεάσης *Lon* σε οργανισμούς οδήγησε σε ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Στον ασκομύκητα *Podospira anserina*, οργανισμό-μοντέλο για τη μελέτη της γήρανσης, τα στελέχη που υπερέφραζαν την πρωτεάση *Lon*, παρουσίασαν χαμηλότερο ποσοστό καρβονυλιωμένων και καρβοξυμεθυλιωμένων πρωτεϊνών (οι σύνηθεις μετουσιώσεις που υφίστανται οι πρωτεΐνες κατά την οξειδωτική καταπόνηση), χαμηλότερη έκλυση υπεροξειδίου του υδρογόνου, υψηλότερη ανθεκτικότητα έναντι εξωγενούς οξειδωτικής καταπόνησης και αύξηση της διάρκειας του βιολογικού τους κύκλου, χωρίς να παρουσιάζουν άλλα προβλήματα στις ζωτικές βιολογικές τους διεργασίες (αναπνοή, ανάπτυξη, γονιμότητα) (Luce and Osiewacz 2009).

Από τις παραπάνω αναφορές αναδεικνύεται η σημαντικότητα των μιτοχονδρίων για τη φυσιολογική ανάπτυξη των οργανισμών και επιπλέον φαίνεται ότι η πρωτεάση *Lon* παίζει καθοριστικό ρόλο στη βιογένεση του οργανιδίου και μετέπειτα στη σωστή λειτουργία του, καθώς μεταλλάξεις του γονιδίου σε όλους τους οργανισμούς μοντέλα οδηγούν σε σοβαρά προβλήματα στην ανάπτυξη ενώ στον αντίποδα, η υπερέκφραση της πρωτεάσης φαίνεται να λειτουργεί ευεργετικά για τον οργανισμό (*P. anserina*).

1.7 Η πρωτεάση Lon στο φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana*

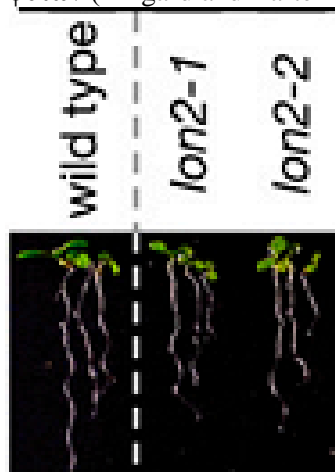
Στο φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana* υπάρχουν τέσσερα γονίδια που κωδικοποιούν για την *Lon* πρωτεάση: *AtLon1* (At5g26860) η οποία τοποθετείται στο **μιτοχόνδριο** και υπό ορισμένες συνθήκες και στον **χλωροπλάστη** (Daras et al, unpublished), *AtLon2* (At5g47040) με υποκυτταρική τοποθέτηση στο **περοξύσωμα**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

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



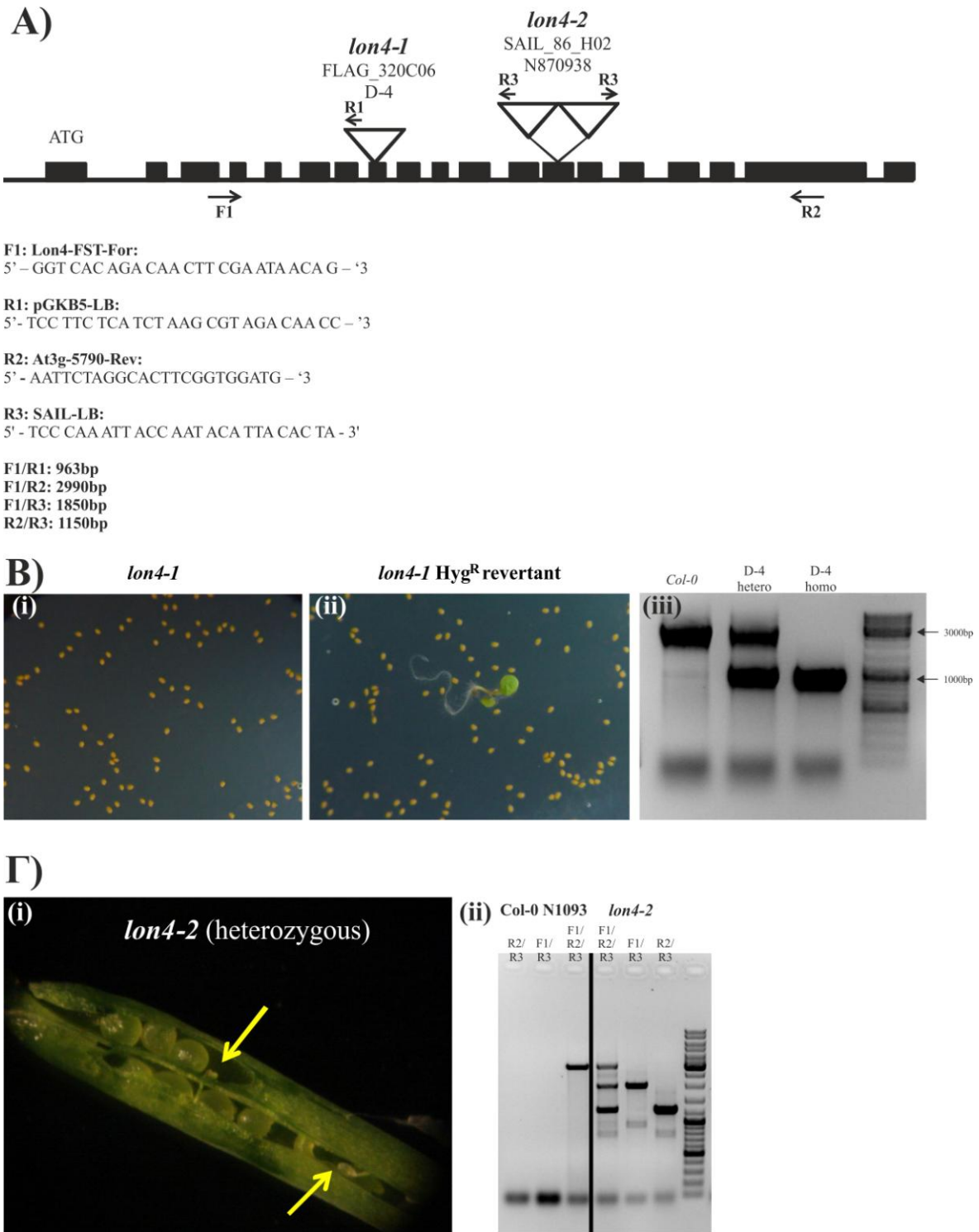
Εικόνα 6. Φυτά *Arabidopsis thaliana* αγρίου τύπου *Col-0* και των αλληλομόρφων *lon1-1*, *lon1-2* ηλικίας (A) 5 ημερών και (B) Ωριμων φυτών

Μετάλλαξη στο γονίδιο *Lon2* στο φυτό *A. thaliana* προκαλεί καθυστέρηση στην ανάπτυξη και ανωμαλίες στα περοξυσώματα των φυτών (Lingard and Bartel 2009) (Εικ. 7).



Εικόνα 7. Μεταλλάγματα *lon2-1* και *lon2-2* ηλικίας 5 ημερών

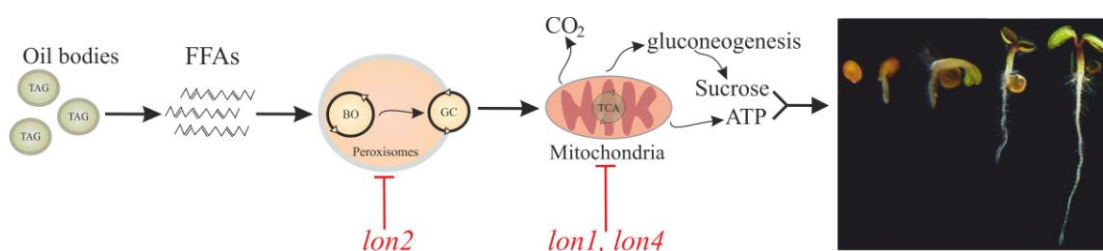
Φυτά που φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *Lon4* παρουσιάζουν πολύ σοβαρό πρόβλημα είτε στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης (*lon4-1*) είτε στην εμβρυογένεση (*lon4-2*), καθώς το ποσοστό βλαστικότητας των σπερμάτων *lon4-1* είναι πάρα πολύ χαμηλό σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (Εικόνα 8B), ενώ σε καρποταξίες ετερόζυγων για την μετάλλαξη *lon4-2* φυτών, παρατηρήθηκαν σπέρματα με μορφολογικές ανωμαλίες (Εικόνα 8Γ) και σύμφωνα με τις πρώτες μετρήσεις που έχουν γίνει, η αναλογία ατροφικών : φυσιολογικά είναι 1 : 4.



Εικόνα 8. (A) Γραφική απεικόνιση των T-DNA μεταλλάξεων *lon4-1* και *lon4-2* καθώς και των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για μοριακή ταυτοποίηση. (B) (i) Ο φαινότυπος των φυτών *lon4-1*, (ii) T1 γενιά φυτών *lon4-1* μετασηματισμένα με την γονιδιοματική ακολουθία του γονιδίου *AtLon4* σε τρυβλία με επιλογή υδρομυκίνης. Η κατασκευή συμπληρώνει το φαινότυπο *lon4-1* και (iii) Μοριακή ταυτοποίηση της T-DNA ένθεσης. (Γ) (i) καρποταξία από ετερόζυγο για την ένθεση *lon4-2* φυτό. Με κίτρινα βέλη επισημαίνονται τα ατροφικά έμβρια και (ii) Μοριακή ταυτοποίηση της T-DNA ένθεσης.

Η ενέργεια που απαιτείται για τη βλάστηση και εγκατάσταση του σπορόφυτου παρέχεται από την κινητοποίηση των αποθεμάτων του φυτού. Στα φυτά με ελαιούχα σπέρματα (όπως το *A. thaliana*), αρχικά γίνεται καταβολισμός των λιπαρών. Προϊόντα του καταβολισμού των λιπαρών (τριακυλγλυκερόλες, TGA) είναι ελεύθερα λιπαρά οξέα τα οποία εισέρχονται στο περοξύσωμα και μέσω δύο βιοχημικών διαδικασιών, την **β-οξειδωση** και τον **γλυοξυλυτικό κύκλο** μετατρέπονται σε υδατάνθρακες με τέσσερα μόρια άνθρακα. Πέρα από την κινητοποίηση των λιπαρών, ο

σχηματισμός λειτουργικών μιτοχονδρίων είναι εξίσου σημαντικός για την ομαλή βλάστηση και εγκατάσταση του σποροφύτου (Howell et al. 2006) καθώς στη συνέχεια οι υδατάνθρακες μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια όπου είτε μετατρέπονται σε μηλικό οξύ και μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα για να γίνει νεογλυκογένεση, είτε χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα για την αναπνοή (Rigas et al. unpublished). Συνεπώς στην παραγωγή ενέργειας από την κινητοποίηση των αποθεμάτων κατά τη βλάστηση των σπερμάτων συμμετέχουν τόσο τα περοξυσώματα όσο και τα μιτοχόνδρια. Πολλά μεταλλάγματα που είχαν πρόβλημα στην κινητοποίηση των λιπαρών, παρουσίασαν προβλήματα στην εγκατάσταση και καθυστέρηση στην ανάπτυξη των σποροφύτων (Penfield et al. 2005, Graham 2008), όπως τα μεταλλάγματα *lon1* (Εικ. 6), *lon2* (Εικ. 7) και *lon4* (Εικ. 8). Οι παρατηρήσεις αυτές υποστηρίζουν την υπόθεση ότι τα μέλη της οικογένειας γονιδίων *Lon* ελέγχουν την εγκαθίδρυση του βιοχημικού μονοπατιού, σε διακριτά υποκυτταρικά διαμερίσματα (μιτοχόνδριο, περοξυσώμα) που είναι υπεύθυνο για την κινητοποίηση των αποθεμάτων του κυττάρου για να εξασφαλιστεί η απαραίτητη ενέργεια για τη βλάστηση και εγκατάσταση του σποροφύτου (Εικ. 9).



Εικόνα 9. Ο ρόλος της οικογένειας *Lon* στην πρωτογενή ανάπτυξη των φυτών

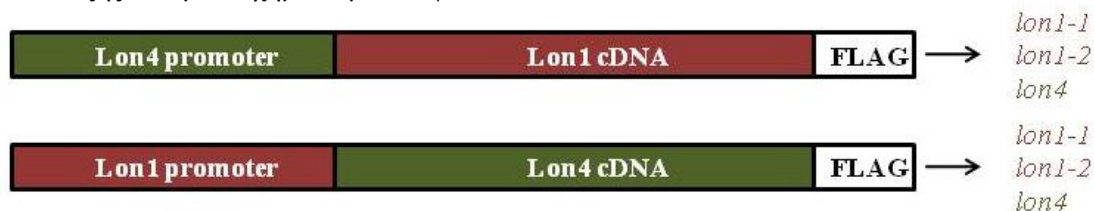
Συνοψίζοντας τα παραπάνω δεδομένα, φαίνεται ότι ο ρόλος της πρωτεάσης *Lon* είναι καθοριστικός στα αρχικά στάδια εγκατάστασης και ανάπτυξης των φυτών, ενώ στα μετέπειτα στάδια η πρωτεάση *Lon* είναι απαραίτητη για την διασφάλιση της ομαλής λειτουργίας των οργανιδίων καθώς συμβάλει στην διατήρηση της ομοιόστασης του πρωτεόματός τους. Η κατανόηση του μηχανισμού πρωτεόλυσης *Lon* στα φυτά αναμένεται να προσθέσει ένα λιθαράκι στην εξήγηση της ζωής και του μηχανισμού ανάπτυξης και διαφοροποίησης των φυτικών κυττάρων. Επιπλέον, δεδομένων των συνεχόμενων προκλήσεων που δέχονται τα φυτά από το περιβάλλον (βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες καταπόνησης), ο μοριακός μηχανισμός *Lon* θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πολύ σημαντικό εργαλείο στην αντιμετώπιση των καταπονήσεων και στη βελτίωση της φυτικής παραγωγής ως βασικό μέλος του μηχανισμού PQC.

1.8 Σκοπός – Στόχοι των πειραμάτων

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του συστήματος πρωτεόλυσης *Lon* στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες του φυτού μοντέλο *A. thaliana*. Τα γονίδια *AtLon1* (At5g26860) και *AtLon4* (At3g05790) τοποθετούνται στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες, με διαφορετικούς μηχανισμούς: Το γονίδιο *Lon1* κωδικοποιεί για δύο πεπτιδία εντός του ίδιου αναγνωστικού πλαισίου όπου το ένα (Short) έχει μιτοχονδριακή τοποθέτηση, ενώ το άλλο (Long) τοποθετείται στον χλωροπλάστη. Ο μηχανισμός ελέγχεται στο επίπεδο της μεταγραφής και στο επίπεδο της μετάφρασης. Φαίνεται ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες η *Lon1* τοποθετείται σχεδόν αποκλειστικά στα μιτοχόνδρια, ενώ μόνον υπό συνθήκες που προκαλούν καταπόνηση στον χλωροπλάστη γίνεται ανίχνευση της και στους χλωροπλάστες (Daras et al. unpublished data). Αντίθετα από το γονίδιο *Lon1*, το γονίδιο *Lon4* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη, η οποία στο άμινο τελικό της άκρο φέρει πεπτιδίο συνθήματος που την καθοδηγεί ταυτόχρονα στα δύο οργανίδια, μιτοχόνδριο και χλωροπλάστη (Ostersetzer et al. 2007). Από τους φαινοτύπους των μεταλλαγμάτων των δύο γονιδίων, μπορεί να διατυπωθεί η υποθεση ότι η *Lon4* καθίσταται απαραίτητη στα πρώτα στάδια ανάπτυξης του φυτού, τόσο ώστε όταν αυτή δεν εκφράζεται το φυτό δεν μπορεί καν να ξεκινήσει να αναπτύσσεται.

Οι πρωτεάσες *Lon1* και *Lon4* σε αμινοξικό επίπεδο παρουσιάζουν ποσοστό ομολογίας μεταξύ τους 85%. Επιπλέον, παρουσιάζουν κοινή υποκυτταρική τοποθέτηση, δεν υπάρχουν όμως πειραματικά δεδομένα για την χρονική και ιστοειδική έκφραση των δύο γονιδίων. Ο πρώτος στόχος συνεπώς είναι η ερμηνεία της χρονικής και ιστοειδικής έκφρασης των δύο γονιδίων. Ο δεύτερος στόχος αφορά στην ερμηνεία της βιοχημικής συντήρησης της λειτουργίας

μεταξύ των δύο γονιδίων, αν δηλαδή αναγνωρίζουν κοινούς στόχους, δεδομένου του υψηλού ποσοστού ομολογίας μεταξύ τους και της κοινής υποκυτταρικής τοποθέτησης. Έτσι, δημιουργήθηκαν χιμαιρικές κατασκευές (Εικ. 10), στις οποίες έγινε σύντηξη του προαγωγέα του ενός γονιδίου (π.χ *Lon1*) έτσι ώστε να καθοδηγεί την έκφραση του άλλου γονιδίου (*Lon4*, και αντίστροφα). Στο καρβόξυ τελικό άκρο των κατασκευών ενωμάτωθηκε το οκταπεπτίδιο FLAG (DYKDDDDK), το οποίο αναγνωρίζεται από μονοκλωνικό αντίσωμα ώστε να υπάρχει και η δυνατότητα ανοσοανίχνευσης των πρωτεϊνών. Οι κατασκευές αυτές με σταθερό μετασχηματισμό εισήλθαν στα μεταλλάγματα *lon1-1*, *lon1-2* και *lon4*, και συνελέγησαν οι απόγονοι μέχρι και την γενιά T₂. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν βιομετρικές αναλύσεις και καταγραφή του πρότυπου ανάπτυξης των μετασχηματισμένων φυτών.



Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση των κατασκευών με εναλλαγή των προαγωγέων στα γονίδια *Lon1* και *Lon4*

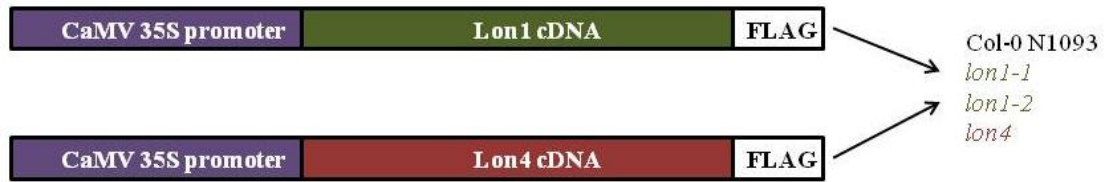
Για επιβεβαίωση ότι το FLAG επίτοπο δεν επηρεάζει τη δομή και κατά συνέπεια τη λειτουργία των κατασκευών, σχεδιάστηκαν δύο επιπλέον κατασκευές στις οποίες το κάθε γονίδιο βρίσκεται υπό τον έλεγχο του δικού του προαγωγέα και στο καρβόξυ τελικό άκρο προστέθηκε το επίτοπιο FLAG (Εικόνα 11). Στη συνέχεια έγινε μετασχηματισμός των αντίστοιχων μεταλλαγμάτων.



Εικόνα 11. Σχηματική αναπαράσταση των κατασκευών ελέγχου για το οκταμερές επίτοπιο FLAG

Το δεύτερο σκέλος των πειραμάτων αφορούσε στην πρωτεάση Lon και την οξειδωτική καταπόνηση. Τα φυτά, δεδομένης της «ακινησίας» τους στο φυσικό περιβάλλον καλούνται να αντιμετωπίσουν μια σειρά από δυσμενείς φυσικούς παράγοντες καταπόνησης όπως ξηρασία, αλατότητα, ακραίες θερμοκρασίες, υψηλή ένταση ηλιακής ακτινοβολίας, οι οποίοι προκαλούν οξειδωτική καταπόνηση (παραγωγή ROS) εντός των κυττάρων και κατά συνέπεια μειώνουν σε σοβαρό ποσοστό την φυτική παραγωγή. Η ανεύρεση μηχανισμών αντιμετώπισης αυτών των καταπονήσεων καθίσταται επιτακτική, δεδομένης της γενικότερης επιβάρυνσης του φυσικού περιβάλλοντος και της κλιματικής αλλαγής (αύξηση επιπέδων CO₂, φαινόμενο του θερμοκηπίου, υπερθέρμανση του πλανήτη, ρύπανση). Σε αναλογία των πειραμάτων υπερέκφρασης της πρωτεάσης Lon στον ασκομύκητα *Podospora anserina* και των εντυπωσιακών αποτελεσμάτων (Luce and Osiewacz 2009), ένα αντίστοιχο αποτέλεσμα σε φυτικό μοντέλο ίσως να αποτελούσε μια υποσχόμενη μελλοντική εφαρμογή για την αντιμετώπιση των περιβαλλοντικών καταπονήσεων στα φυτά.

Έτσι, φυτά *Arabidopsis* μετασχηματίστηκαν με κατασκευές που υπερεκφράζουν τις πρωτεάσες Lon1 και Lon4 (Εικόνα 12). Για τις κατασκευές αυτές έγινε σύντηξη του καθολικού προαγωγέα του ιού του μωσαϊκού του κουνουπιδιού *CaMV35S* με τα δύο γονίδια. Στο καρβόξυ τελικό άκρο των κατασκευών προστέθηκε το οκταπεπτίδιο FLAG (DYKDDDDK), το οποίο αναγνωρίζεται από μονοκλωνικό αντίσωμα, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα ανοσοανίχνευσης των πρωτεϊνών. Απομονώθηκαν άτομα της γενιάς T₂ μετασχηματισμένων φυτών, τα οποία υποβλήθηκαν σε δοκιμασίες υποξίας-ανοξίας για να καταγραφούν επιπτώσεις στην πρωτογενή τους ανάπτυξη. Οι αναλύσεις έγιναν χρησιμοποιώντας ως συστήματα αναφοράς τα φυτά αγρίου τύπου και τα μεταλλάγματα *lon1* και *lon4*.



Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση των κατασκευών υπερέκφρασης των γονιδίων *Lon1* και *Lon4*

Υλικά & Μέθοδοι

2.1 Φυτικό υλικό - συνθήκες ανάπτυξης και καλλιέργειας

Σαν υλικό για τα πειράματα της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε το φυτό *Arabidopsis thaliana* οικότυπος *Columbia* και τα μεταλλάγματα D-3 (*lon1-1*, EMS μεταλλαξιγένεση W₉₀₃ → Stop codon) N512797 (*lon1-2*, T-DNA insertion line SALK_012797) και D-4 (*lon4*, T-DNA insertion line FLAG_320C06), το οποίο ανήκει στην οικογένεια των Σταυρανθών – *Brassicaceae* και το φυτό *Nicotiana benthamiana* της οικογένειας *Solanaceae*.

2.2 Συνθήκες καλλιέργειας *Arabidopsis thaliana*

Για την ανάπτυξη φυτών κάτω από ασηπτικές συνθήκες, τα σπέρματα ενυδατώνονται για 24 ώρες στους 4°C και αποστειρώνονται σε 20% διάλυμα χλωρίνης, 0,01% Triton X-100. Στη συνέχεια μεταφέρονται 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 *Arabidopsis*

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

- Το δείγμα μεταφέρεται σε eppendorf tube των 2ml. (Για κάθε 2gr ιστού προστίθεται 1ml διαλύματος ομογενοποίησης 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 (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 (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 (24:1). Έντονη μίξη.
- Επαναλαμβάνεται η ίδια φυγοκέντρηση.
- Για την κατακρήμνιση των νουκλεϊνικών οξέων, στο υπερκείμενο προστίθεται 1/10 του όγκου 3M CH₃COONa pH 4.8 και 2.5 όγκοι παγωμένης αιθανόλης 100% και στους -20°C overnight.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C σε max speed.

- Το ιζήμα διαλύεται σε αποστειρωμένο ddH₂O (με θέρμανση στους 65°C όταν χρειάζεται)

2.4 Πρωτόκολλο απομόνωσης γονιδιωματικού DNA από Arabidopsis

CTAB DNA Miniprep (Joseph D. Clark)

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.
- Φυγοκέντρωση 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
- Φυγοκέντρωση του δείγματος για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στις μέγιστες στροφές
- Το ιζήμα που προκύπτει ξεπλένεται προσθέτωντας 0,5 ml 100% αιθανόλης και στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρωση για 2 λεπτά στις 13.000 στροφές
- Απομακρύνση του υπερκειμένου.
- Επαναιώρηση του ιζήματος σε 100μl H₂O ή T.E.

2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

2.5.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

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

| Συστατικά Αντίδρασης | Ποκνό Διάλυμα | Όγκος | Τελική Συγκέντρωση |
|---|---------------|-------|--------------------|
| Ρυθμιστικό Διάλυμα PCR ⁽¹⁾ | 10 x | 5μl | 1 x |
| dNTPs | 2mM | 5μl | 200μM |
| Ορθός εκκινητής | 3μM | 5μl | 300nM |
| Ανάστροφος εκκινητής | 3μM | 5μl | 300nM |
| DNA | - | 2 μl | 10ng gDNA |
| Phusion [®] HF DNA Polymerase [Finnzymes] ⁽³⁾ | 2unit/μl | 1μl | 1 unit |

| | | | |
|-------------------------------|---|----------------|---|
| ddH ₂ O | - | έως τα 50μl | - |
| Τελικός όγκος αντίδρασης 50μl | | | |

⁽¹⁾ Ρυθμιστικό διάλυμα PCR με συγκέντρωση 15mM MgCl₂ [2x Phusion HF Buffer (F-518)]

⁽³⁾ Η Phusion[®] HF Πολυμεράση της FINNZYMES (F-530S) έχει την ικανότητα επιδιόρθωσης λαθών κατά τον πολυμερισμό του DNA (proof-reading activity), μειώνοντας σημαντικά την πιθανότητα λάθους κατά την ενίσχυση των επιθυμητών τμημάτων.

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

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

| | |
|---------|--|
| 1 x | Αποδιάταξη του DNA μήτρα για 2 λεπτά στους 94 ⁰ C |
| 20-30 x | Αποδιάταξη στους 94 ⁰ C για 30'' Υβριδισμός εκκινητών στο αντίστοιχο Tm ⁽¹⁾ για 30'' Επιμήκυνση στους 72 ⁰ C για 2' έως 8' ⁽²⁾ |
| 1 x | Τελική επιμήκυνση προϊόντος στους 72 ⁰ C για 10' |
| | Διατήρηση στους 10 °C για 5'' |

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

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

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

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

2.5.2 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 ώστε 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 10μl ddH₂O και διατηρείτε στους 4⁰C.
- Στην αντίδραση PCR προσθέτουμε τα συστατικά που αναφέραμε προηγουμένως με την διαφορά που αντί για gDNA ως μήτρα προσθέτουμε 3μl από το τα περίπου 10μl 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 ή αγαρόζης. Για τις θετικές αποικίες μεταφέρουμε τα υπόλοιπα 7μl σε θρεπτικό μέσο LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό

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

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

| | | | |
|--------------------|---|------|---|
| ddH ₂ O | - | έως | - |
| | | τα | |
| | | 60μl | |

Τελικός όγκος αντίδρασης 60 μl

Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37⁰C για 45’.

➤ Μόλις ολοκληρωθεί η αντίδραση πραγματοποιείται καθαρισμός με φαινόλη και στην συνέχεια προσθέτουμε 1/10 του όγκου 3M CH₃COONa, pH 4,8 και 2 όγκους 100% αιθανόλη. Το μείγμα ανακατεύεται καλά και τοποθετείτε στους -20⁰C για 12 ώρες.

➤ Το ολικό RNA ελεύθερο από DNA συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 30’ στους 4⁰C. Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται και το ίζημα διαλύεται σε ~25μl ddH₂O. 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 ddH₂O 1:250, η αραιώση χρησιμοποιείται για να μετρήσουμε την συγκέντρωση του RNA με την βοήθεια φασματοφωτομέτρου.

➤ 2μg ολικού RNA ελεύθερο από DNA μεταγράφεται ανάστροφα σε μονόκλωνο cDNA. Η διαδικασία γίνεται σε δυο βήματα.

➤ Στο πρώτο βήμα το ολικό RNA ελεύθερο από DNA και εξειδικευμένοι εκκινητές, αποδιατάσσονται στους 65⁰C για 10’ και μετά τοποθετούνται στους 4⁰C. Τα συστατικά και οι συγκεντρώσεις σ’ αυτό το βήμα δίδονται από τον ακόλουθο πίνακα.

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

Όγκος πρώτου βήματος 10μl

➤ Στο δεύτερο βήμα προστίθενται τα ακόλουθα συστατικά:

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

Μεταγραφάση 50 units/ μl

(Roche)

Όγκος δεύτερου βήματος 10μl

Τελικός όγκος αντίδρασης όγκος πρώτου και δευτέρου βήματος 20μl

- Η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιείται στους 42⁰C για 60'.
- Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση, διατηρείται στους 4⁰C. Γίνεται αραιώση 1/5 και χρησιμοποιούνται 3μl για αντίδραση PCR.

2.6 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 H₂O

Τελικός όγκος 100 ml

Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης είναι η εξής:

20ml 1x TAE

70μl βρωμιούχου αιθιδίου

980 ml H₂O

Τελικός όγκος 1000 ml

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

1,25 % (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης

1,25 % (w/v) κυανολοξυλένιο

H₂O

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

2.7 Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης

- Ανάλογα με το μέγεθος του προς απομόνωση κλάσματος DNA προετοιμάζεται πηκτή αγαρόζης 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°C για 15’
- Ακολουθεί απομόνωση DNA με βάση το πρωτόκολο της QIAquick Gel Extraction Kit (Cat No 28704).

2.8 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 eppendorf 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 (1U/μl, Fermentas [#EL0016]).

Ανάμιξη του δείγματος και επώαση του στους 22⁰C για 4-12 ώρες.

2.9 Βακτηριακά κύτταρα και μετασχηματισμός

2.9.1 Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *Escherichia coli*

- Μονή αποικία κατάλληλου βακτηριακού στελέχους DH5a αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB για 12 ώρες στους 37°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°C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητά της φτάσει $O.D_{550} = 0,5$.
- Η καλλιέργεια τοποθετείται για 10 λεπτά στον πάγο και τα βακτηριακά κύτταρα κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση για 5min στις 5000 στροφές/λεπτό στους 4°C.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε μισό όγκο του αρχικού, 25mM παγωμένου $CaCl_2$.
- Επαναλαμβάνεται ο ίδιος τρόπος κατακρήμνισης
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 75mM παγωμένου $CaCl_2$, 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°C.

2.9.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli* με πλασμιδιακό DNA

Η διαδικασία μετασχηματισμού περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Σε 200μl δεκτικών κυττάρων DH5a προστίθενται 10-50 ng πλασμιδιακού DNA.
- Το μείγμα αναμειγνύεται και επώαζεται στον πάγο για 30min.
- Ακολουθεί θερμικό σοκ του δείγματος με επώαση για 2min στους 42⁰-43⁰C.
- Προσθήκη 1,3 ml θρεπτικού μέσου LB, ανάμιξη του δείγματος και επώαση για 1 ώρα στους 37⁰C.
- 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 5×10^{-3} και 50mM αντίστοιχα.

➤ Επώαση των τριβλίων για 12-16 ώρες σε θάλαμο 37°C.

2.9.3 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens* με ηλεκτροπόρωση

➤ Μονή αποικία κατάλληλου βακτηριακού στελέχους *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) αναπτύσσεται σε 2ml υγρό θρεπτικό μέσο LB για 6 ώρες στους 28°C.

➤ 0.1ml από την αρχική καλλιέργεια μεταφέρονται σε κωνική φιάλη που περιέχει 100ml θρεπτικού μέσου LB. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 28°C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητά της φτάσει $O.D_{550} = 0,5-0,7$.

➤ Η καλλιέργεια τοποθετείται για 15 λεπτά στον πάγο και τα βακτηριακά κύτταρα κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση για 10min στις 3500 στροφές/λεπτό στους 4°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 $10^{11}-10^{12}$ 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°C.

➤ Σε 45μl δεκτικών κυττάρων προστίθενται 10-50ng πλασμιδιακού DNA.

➤ Το μείγμα αναμιγνύεται καλά και επώάζεται στον πάγο για 5min.

➤ Το δείγμα μεταφέρεται σε παγωμένη κυβέτα ηλεκτρισμού, διαμέτρου 0.2cm.

➤ Εφαρμόζεται ηλεκτρικός παλμός. Οι παράμετροι για το σύστημα της BioRad® Gene PulserII είναι χωρητικότητα 25μF, αντίσταση 400Ω ή 600Ω και ηλεκτρικό πεδίο 1,8kV χρονικής διάρκειας 8-12msec.

➤ Αμέσως μετά ακολουθεί προσθήκη 1ml θρεπτικού μέσου LB, ανάμειξη του δείγματος και επώαση για 3 ώρες στους 28°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 T1, 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 Τί πλασμιδίου του στελέχους GV3101 και 50mg/L Καναμυκίνη για την επιλογή του δυαδικού φορέα.

2.10 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*.

➤ 600μl από αυτή την καλλιέργεια μεταφέρονται σε φιαλίδιο erpendorf.

➤ Προσθήκη 300μl γλυκερόλης 99%.

➤ Το δείγμα αναμειγνύεται έντονα και ψύχεται στο υγρό άζωτο.

Αποθήκευση στους -80°C. Τα βακτήρια παραμένουν ζωντανά τουλάχιστον για 10 χρόνια

2.11 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *Escherichia coli*

2.11.1 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 Eppendorf tube και φυγοκεντρείται για 1min στις 12000 στροφές/λεπτό.

➤ Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 200μl διαλύματος P1.

➤ Προσθήκη 200μl 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 200μl διαλύματος 3M/5M CH₃COOK, ανάμειξη και επώαση στον πάγο για 15min.

➤ Φυγοκέντρηση του δείγματος για 20min στις 13000 στροφές/λεπτό.

➤ Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό Eppendorf 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 40μl dH₂O.

2.11.2 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 πρωτόκολλο που παρέχει η ίδια η εταιρεία.

2.12 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. Έντονη μείξη για 1min (vortex).
- Προσθήκη 200μl διαλύματος 3M/5M CH₃COOK . 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 dH₂O. Το ¼ της ποσότητας αυτής είναι συνήθως αρκετό για τον μετέπειτα μετασχηματισμό κυττάρων *E. coli*.

2.13 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 ddH₂O, 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. Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα. Τα βέλη στις αλληλουχίες δείχνουν το σημείο τομής.

2.14 Μετασχηματισμός *Arabidopsis thaliana*

2.14.1 Μέθοδος διείσδυσης 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.

2.14.2 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 φυγοκεντρώνται 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 χώμα να ενυδατώνεται καλά πριν την διείσδυση, ώστε να απορροφά όσο το δυνατό λιγότερη καλλιέργεια *Agrobacterium*. Σε αντίθετη περίπτωση το μολυσμένο χώμα παρεμποδίζει την ανάπτυξη των φυτών.

Ο κάδος κενού κλείνεται αεροστεγώς και με τη βοήθεια μιας αντλίας λαδιού 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.

2.14.3 Επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών της T1 γενιάς

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

- Τα τρυβλία μεταφέρονται σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22⁰C, 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.

2.15 Πολλαπλή ευθυγράμμιση ακολουθιών και φυλογενετική ανάλυση

Η πολλαπλή ευθυγράμμιση των ακολουθιών των προαγωγέων των πρωτεασών Lon1 και Lon4 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.

2.16 Υδατικά διαλύματα και θρεπτικά μέσα βακτηριακών κυττάρων και φυτών

2.16.1 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 dH₂O. Κρατείται στους -20⁰ C.

➤ **X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (BRL)**

20mg/ml σε διμεθυλ-φορμαμίδιο. Αποθηκεύεται στους -20⁰ C.

2.16.2 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 CH₃COOK**

60ml 5M οξικού καλίου pH 4,8-5,2 αναμιγνύονται με 11,5ml οξικού οξέος και 28,5ml dH₂O.

➤ **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 -20⁰C.

➤ **T.E. ρυθμιστικό διάλυμα**

10mM Tris-Cl pH 7,5, 1mM EDTA pH 8,0.

2.16.3 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)

2.16.4 Διαλύματα ηλεκτροφόρησης

➤ **50 x TAE ρυθμιστικού διαλύματος**

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

➤ **Βρωμιούχο αιθίδιο**

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

2.16.5 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 Phytagel, pH 5,7.

➤ **Διάλυμα διείσδυσης (IM)**

Σε ένα λίτρο ddH₂O 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/lit BAP και 200μl Silwet L-77 (Osi Specialties).

➤ **Stock βιταμινών 1000X B5**

1000mg Ινοσιτόλη, 100mg Θειαμίνη, 10mg Νικοτινικό οξύ, 10mg Πυριδοξίνη σε 10ml ddH₂O.

Αποτελέσματα

3.1. Διαγονιδιακές σειρές φυτών με τα γονίδια *Lon1* και *Lon4*

Σπέρματα της γενιάς T₁ μετασηματισμένων φυτών, αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο με επιλογή στο αντιβιοτικό Υγρομυκίνη. Από την κάθε κατασκευή επιλέχθηκαν τα ανθεκτικά φυτά, τα οποία μεταφέρθηκαν σε νέα τρυβλία με απλό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης και από το κάθε φυτό συλλέχθηκαν μεμονωμένα οι απόγονοι της γενιάς T₂. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 (κατασκευές με το γονίδιο *Lon1*) και Πίνακα 2 (κατασκευές με το γονίδιο *Lon4*).

Πίνακας 1. Απόγονοι της γενιάς T₂ μετασηματισμένων φυτών που φέρουν τις κατασκευές του γονιδίου *Lon1* με το επιτόπιο FLAG στο καρβόξυ τελικό άκρο. Η έκφραση του διαγονιδίου ελέγχεται από τους προαγωγείς των γονιδίων *Lon1* και *Lon4*, και από τον καθολικά εκφραζόμενο προαγωγέα *CaMV35S*. Τα διαγονίδια ενσωματώθηκαν με σταθερό μετασηματισμό στα γενετικά υπόβαθρα *Col-0* N1093, *lon1-1* (D-3), *lon1-2* (N512797) και *lon4-1* (D-4).

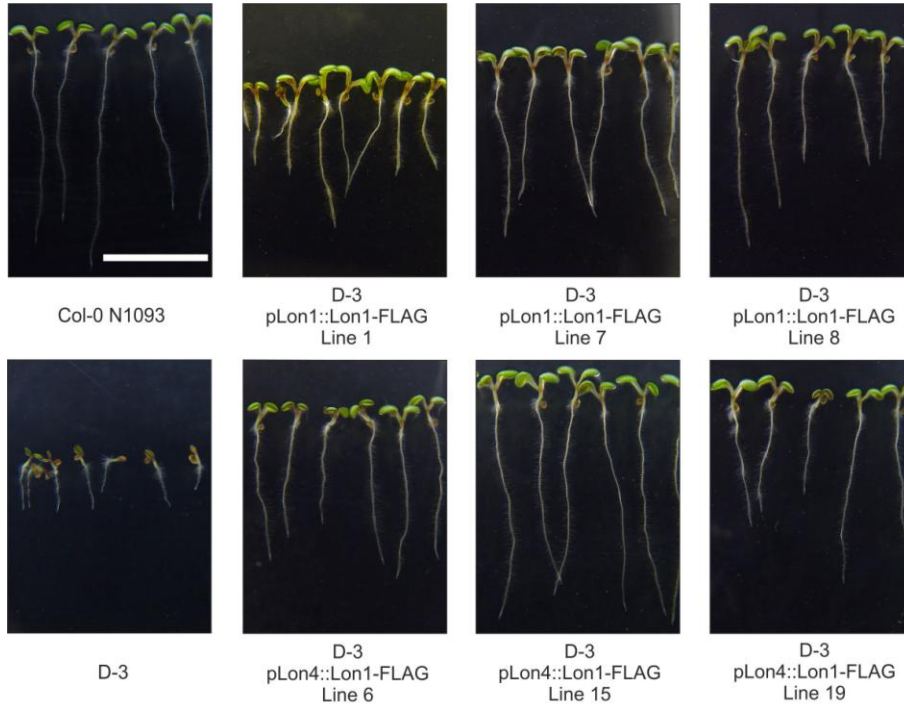
| Κατασκευές <i>Lon1</i>-FLAG | |
|--|----------|
| Υπόβαθρο: <i>Col-0</i> N1093 | |
| pLon1:: <i>Lon1</i> -FLAG | 25 lines |
| pLon4:: <i>Lon1</i> -FLAG | 45 lines |
| 35S:: <i>Lon1</i> -FLAG | 18 lines |
| Υπόβαθρο: <i>lon1-1</i> (D-3) | |
| pLon1:: <i>Lon1</i> -FLAG | 28 lines |
| pLon4:: <i>Lon1</i> -FLAG | 32 lines |
| 35S:: <i>Lon1</i> -FLAG | 31 lines |
| Υπόβαθρο: <i>lon1-2</i> (N512797) | |
| pLon1:: <i>Lon1</i> -FLAG | 42 lines |
| pLon4:: <i>Lon1</i> -FLAG | 26 lines |
| 35S:: <i>Lon1</i> -FLAG | 16 lines |
| Υπόβαθρο: <i>lon4-1</i> (D-4) | |
| pLon1:: <i>Lon1</i> -FLAG | 1 line |
| pLon4:: <i>Lon1</i> -FLAG | 7 lines |
| 35S:: <i>Lon1</i> -FLAG | 14 lines |

Πίνακας 2. Απόγονοι της γενιάς T₂ μετασηματισμένων φυτών που φέρουν τις κατασκευές του γονιδίου *Lon4* με το επιτόπιο FLAG στο καρβόξυ τελικό άκρο. Η έκφραση του διαγονιδίου ελέγχεται από τους προαγωγείς των γονιδίων *Lon1* και *Lon4*, και από τον καθολικά εκφραζόμενο προαγωγέα *CaMV35S*. Τα διαγονίδια ενσωματώθηκαν με σταθερό μετασηματισμό στα γενετικά υπόβαθρα *Col-0* N1093, *lon1-1* (D-3), *lon1-2* (N512797) και *lon4-1* (D-4).

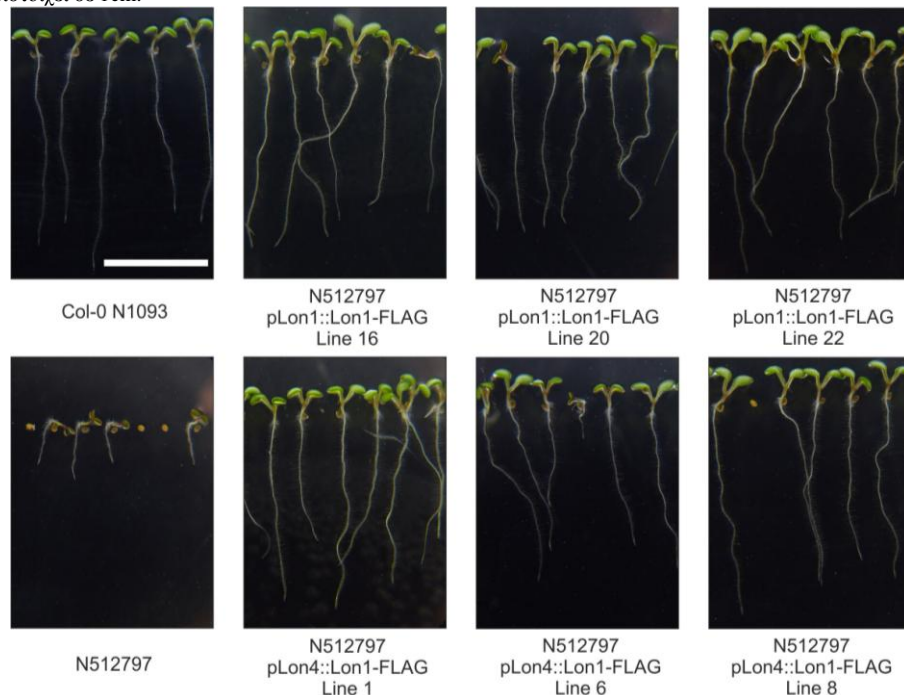
| Κατασκευές <i>Lon4</i>-FLAG | |
|--|-----------------|
| Υπόβαθρο: <i>Col-0</i> N1093 | |
| pLon1:: <i>Lon4</i> -FLAG | 19 lines |
| pLon4:: <i>Lon4</i> -FLAG | 15 lines |
| 35S:: <i>Lon4</i> -FLAG | 14 lines |
| Υπόβαθρο: <i>lon1-1</i> (D-3) | |
| pLon1:: <i>Lon4</i> -FLAG | 10 lines |
| pLon4:: <i>Lon4</i> -FLAG | 7 lines |
| 35S:: <i>Lon4</i> -FLAG | 9 lines |
| Υπόβαθρο: <i>lon1-2</i> (N512797) | |
| pLon1:: <i>Lon4</i> -FLAG | 13 lines |
| pLon4:: <i>Lon4</i> -FLAG | 3 lines |
| 35S:: <i>Lon4</i> -FLAG | 6 lines |
| Υπόβαθρο: <i>lon4-1</i> (D-4) | |
| pLon1:: <i>Lon4</i> -FLAG | 8 lines |
| pLon4:: <i>Lon4</i> -FLAG | 11 lines |
| 35S:: <i>Lon4</i> -FLAG | 16 lines |

3.2. Το γονίδιο *Lon1* όταν η έκφραση του ελέγχεται από τους προαγωγείς *Lon1* και *Lon4* συμπληρώνει το φαινότυπο των αλληλομόρφων *lon1*

Η πρώτη δοκιμή συμπληρωματικότητας έγινε στα μεταλλάγματα του γονιδίου *Lon1*, *lon1-1* (D-3) και *lon1-2* (N512797) με τις κατασκευές που φέρουν το cDNA του γονιδίου *Lon1* υπό τον έλεγχο του προαγωγέα του γονιδίου *Lon1* για να επαληθευτεί ότι το επιτόπιο FLAG δεν επηρεάζει την λειτουργικότητα της πρωτεΐσης. Από την ανάλυση των φαινοτύπων προκύπτει ότι το επιτόπιο FLAG δεν επηρεάζει τη λειτουργία της πρωτεΐσης *Lon1* καθώς η κατασκευή *pLon1::Lon1-FLAG* είναι ικανή να αναστρέψει τον φαινότυπο των μεταλλαγμάτων *lon1-1* (Εικ. 13) και *lon1-2* (Εικ. 14).

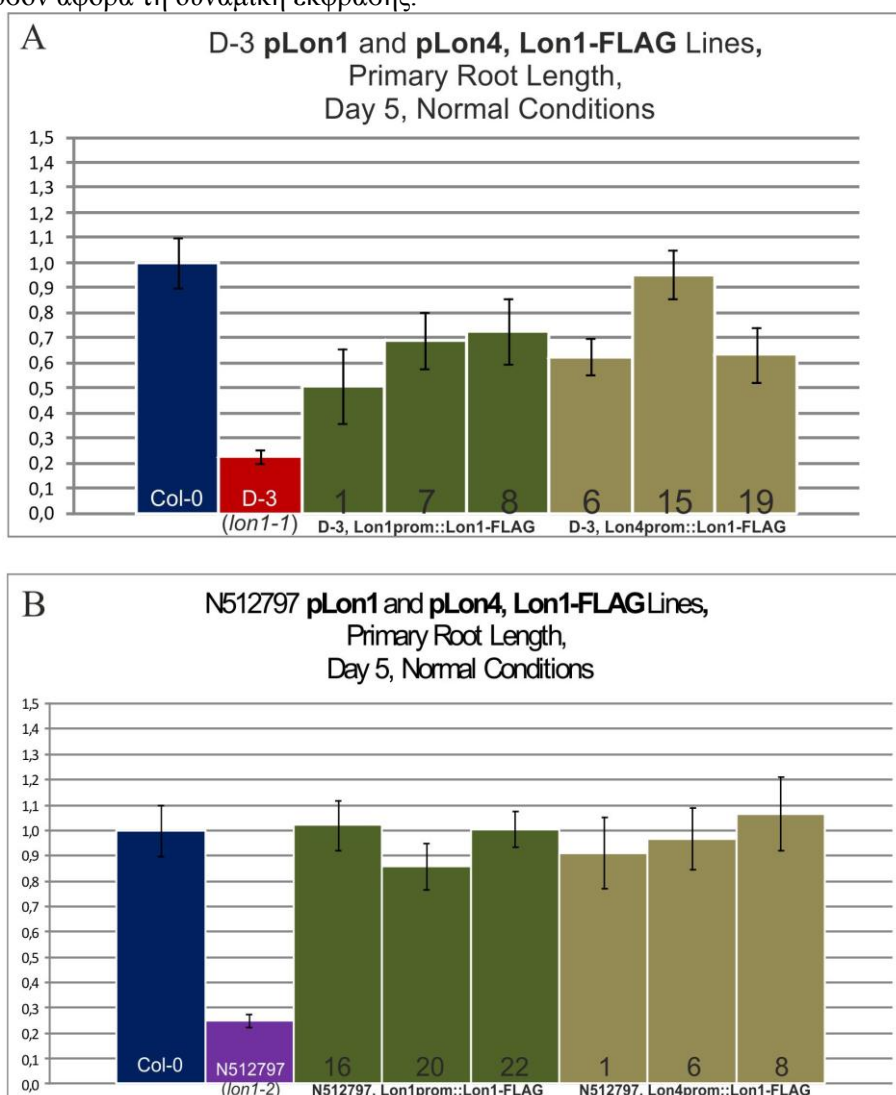


Εικόνα 13. Μετασηματισμένα φυτά *lon1-1* με τις κατασκευές *Lon1prom::Lon1-FLAG* και *Lon4prom::Lon1-FLAG* ηλικίας 5 ημερών. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 1cm.



Εικόνα 14. Μετασηματισμένα φυτά *lon1-2* με τις κατασκευές *Lon1prom::Lon1-FLAG* και *Lon4prom::Lon1-FLAG* ηλικίας 5 ημερών. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 1cm.

Ακολούθησε σύγκριση της πρωτογενούς ανάπτυξης (μέτρηση μήκους πρωτογενούς ρίζας σε αρτίβλαστα 5 ημερών) των μετασχηματισμένων φυτών *lon1-1* (D-3) και *lon1-2* (N512797) με τις κατασκευές pLon1::*Lon1*-FLAG και pLon4::*Lon1*-FLAG με σκοπό να ελεγχθεί εάν υπάρχει χρονική και ιστοειδική επικάλυψη ανάμεσα στους δύο προαγωγείς. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν φυτά αγρίου τύπου (Col-0 N1093) και τα δύο μεταλλάγματα. Στην Εικ.13 παρουσιάζονται οι φαινότυποι των δύο κατασκευών στο υπόβαθρο *lon1-1* και στην Εικ.14 οι αντίστοιχοι φαινότυποι στο υπόβαθρο *lon1-2*. Παρατηρώντας τις βιομετρικές αναλύσεις των φυτών *lon1-1* (Γράφημα 1A) και *lon1-2* (Γράφημα 1B) δεν σημειώνεται κάποια εμφανής διαφορά στην ανάπτυξη ανάμεσα στα φυτά που φέρουν τις δύο κατασκευές. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι προαγωγείς των δύο γονιδίων διαθέτουν ορισμένα κοινά στοιχεία που τους επιτρέπουν, όταν αυτοί ελέγχουν την έκφραση του γονιδίου *Lon1*, να συμπληρώνουν τους φαινοτύπους των μεταλλάξεων *lon1-1* και *lon1-2* υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης. Η ανάλυση των στοιχείων των δύο προαγωγέων καθώς και η καταγραφή των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *Lon1* και *Lon4* σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια, φυτικού ιστούς και σε συνθήκες καταπόνησης αναμένεται να αποκαλύψουν δεδομένα που σχετίζονται με τη κοινή ή διαφορετική μεταξύ τους απόκριση όσον αφορά τη δυναμική έκφρασης.



Γράφημα 1. Μήκος πρωτογενούς ρίζας μετασχηματισμένων φυτών με τις κατασκευές Lon1prom::*Lon1*-FLAG και Lon4prom::*Lon1*-FLAG ηλικίας 5 ημερών στα υπόβαθρα *lon1-1* (A) και *lon1-2* (B)

Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει η παρατήρηση ότι στα πειράματα δοκιμής συμπλήρωσης του φαινότυπου των μεταλλαγμάτων *lon1*, όταν χρησιμοποιείται ως γενετικό υπόβαθρο τα φυτά *lon1-2* (N512797) τότε παρατηρείται πλήρης αναστροφή του φαινοτύπου (Γράφημα 1B). Σε αντίθεση με τα μεταλλάγματα *lon1-2* (N512797), όταν το γενετικό υπόβαθρο της δοκιμής είναι *lon1-1* (D-3) τότε ναι μεν παρατηρείται αναστροφή του φαινοτύπου, αλλά αυτή δεν είναι πλήρης (Γράφημα

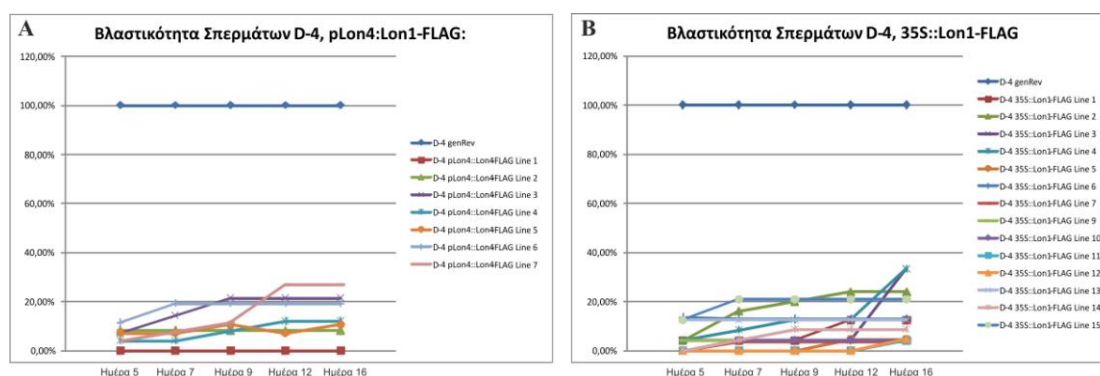
1A). Οι διαφορές στην ανάπτυξη που αποτυπώνεται ως προς το ποσοστό συμπληρωματικότητας, οφείλεται στο γενετικό υπόβαθρο των φυτών *lon1-1* και *lon1-2* (βλ. Συζήτηση).

3.3. Η μιτοχονδριακή ισομορφή του γονιδίου *Lon1* δεν συμπληρώνει την μετάλλαξη *lon4-1* γονιδίου *Lon4*

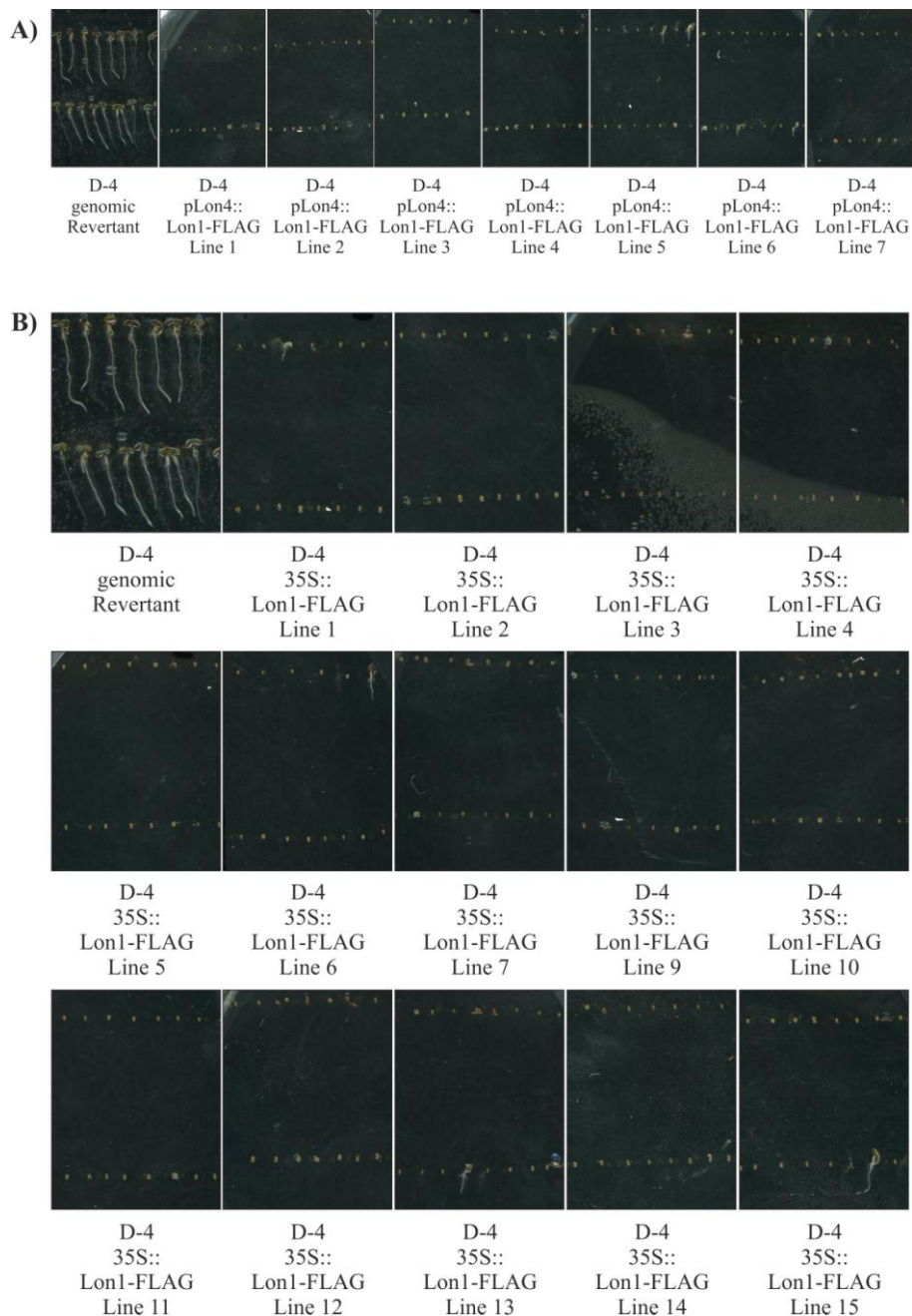
Χαρακτηριστικό γνώρισμα των φυτών της μετάλλαξης *lon4-1* (D-4) είναι η εξαιρετικά χαμηλή βλαστικότητα των σπερμάτων. Το βέλτιστο ποσοστό βλαστικότητας που έχει καταγραφεί σε συνθήκες εργαστηρίου είναι 60% έπειτα από 20 ημέρες. Για να εξεταστεί εάν υπάρχει λειτουργική συμπληρωματικότητα μεταξύ των δύο γονιδίων *Lon1* και *Lon4*, φυτά *lon4-1* μετασηματίστηκαν με τη διαγονιδιακή κατασκευή έκφρασης της μιτοχονδριακής ισομορφής της πρωτεΐσης Lon1, υπό τον έλεγχο των προαγωγέων *Lon4* και *CaMV35S*. Ως θετικός μάτυρας χρησιμοποιήθηκαν φυτά με γενετικό υπόβαθρο *lon4-1*, τα οποία έχουν μετασηματιστεί με την διαγονιδιακή κατασκευή της γονιδιωματικής ακολουθίας του γονιδίου *Lon4*, η οποία συμπληρώνει επιτυχώς το φαινότυπο της χαμηλής βλαστικότητας των σπερμάτων *lon4-1*.

Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι η διαγονιδιακή κατασκευή έκφρασης της μιτοχονδριακής ισομορφής της πρωτεΐσης Lon1 δεν συμπληρώνει τον φαινότυπο *lon4-1* ούτε υπό τον έλεγχο του προαγωγέα του γονιδίου *Lon4* (Εικόνα 15A), ούτε υπό τον έλεγχο του καθολικού προαγωγέα *CaMV35S* (Εικόνα 15B). Στις διαγονιδιακές σειρές των κατασκευών pLon4::*Lon1*-FLAG και 35S::*Lon1*-FLAG που αναλύθηκαν δεν παρατηρήθηκε αναστροφή του φαινοτύπου καθώς το ποσοστό βλαστικότητας των σπερμάτων δεν βελτιώθηκε και παρέμεινε εξαιρετικά χαμηλό σε ανάλογα επίπεδα με αυτό των μεταλλαγμάτων *lon4-1* (Γράφημα 2).

Η συγκεκριμένη δοκιμή έγινε ειδικά με την μιτοχονδριακή ισομορφή της Lon1 παρόλο που οι πρωτεΐσες Lon1 και Lon4 παρουσιάζουν διπλή υποκυτταρική τοποθέτηση στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες. Συνεπώς, αξίζει να διερευνηθεί αν η αδυναμία αναστροφής του φαινοτύπου των μεταλλαγμάτων *lon4-1* οφείλεται σε έλλειμμα της Lon1 στους χλωροπλάστες ή εάν οι δύο πρωτεΐσες έχουν διακριτούς μεταξύ τους στόχους και υποστρώματα.



Γράφημα 2. Ποσοστό βλαστικότητας των σπερμάτων *lon4-1* μετασηματισμένα με τις κατασκευές Lon4prom::*Lon1*-Short-FLAG (A) και *CaMV 35S::Lon1*-Short-FLAG (B).



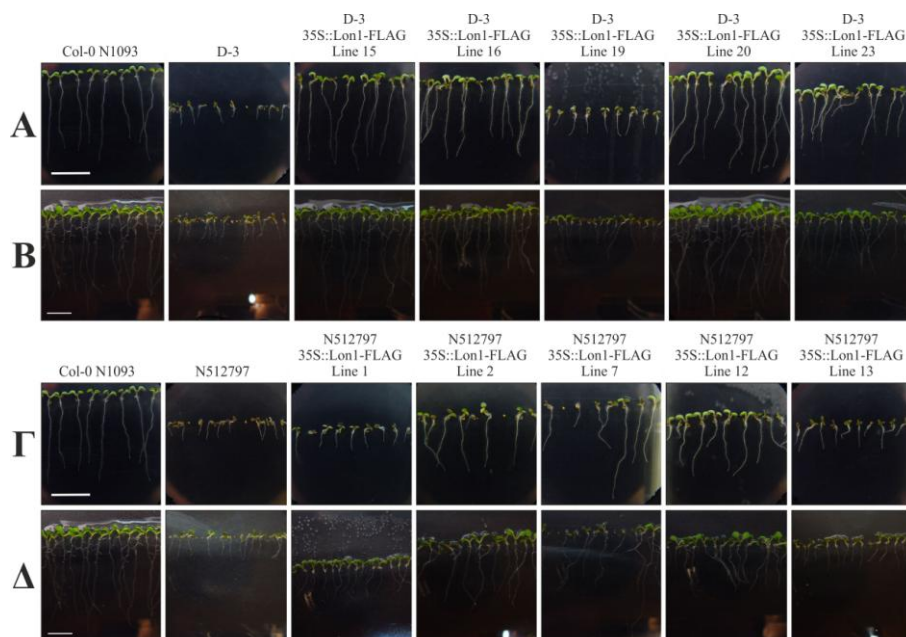
Εικόνα 15. Φυτά *lon4-1* μετασηματισμένα με τις κατασκευές *Lon4prom::Lon1-Short-FLAG* (A) και *CaMV 35S::Lon1-Short-FLAG* (B) ηλικίας 5 ημερών. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν φυτά *lon4-1* τα οποία έχουν μετασηματιστεί με την γονιδιωματική περιοχή που περιέχει το γονίδιο *Lon4* και αναστρέφουν τον φαινότυπο.

3.4. Η υπερέκφραση του γονιδίου *Lon1* συμπληρώνει τους φαινοτύπους των μεταλλαγμάτων *lon1*

Σε αναλογία με προηγούμενα πειράματα υπερέκφρασης της πρωτεάσης Lon σε μύκητες (Luce and Osiewacz 2009), δημιουργήθηκαν διαγονιδιακά φυτά *Col-0* με κατασκευή υπερέκφρασης της πρωτεάσης Lon1 για να ελεγχθεί εάν επηρεάζεται η ανάπτυξη ή εάν προσδίδεται κάποιο πλεονέκτημα έναντι παραγόντων οξειδωτικής καταπόνησης. Αρχικά, για να πιστοποιηθεί ότι η κατασκευή *35S::Lon1-FLAG* είναι λειτουργική έγινε μετασηματισμός των αλληλομόρφων *lon1-1* και *lon1-2*. Στην συνέχεια επιλέχθηκαν τυχαία 5 διαγονιακές σειρές φυτών *lon1-1* και *lon1-2* της γενιάς T₂ και καταγράφηκε το πρότυπο ανάπτυξης της πρωτογενούς ρίζας την πέμπτη και την

έβδομη ημέρα. Στις μετρήσεις ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν φυτά αγρίου τύπου *Col-0*, ενώ ως αρνητικοί μάρτυρες επιλέχθηκαν φυτά των μεταλλάξεων *lon1-1* και *lon1-2*.

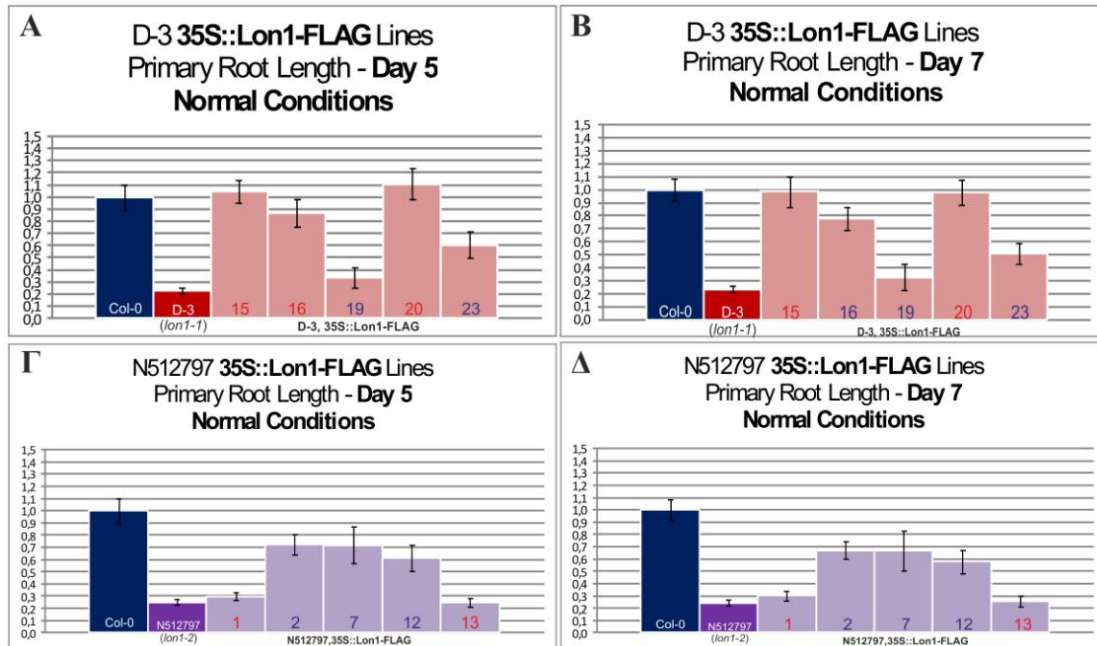
Τα αποτελέσματα των αναλύσεων έδειξαν ορισμένες ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις. Και στα δύο γενετικά υπόβαθρα παρατηρήθηκε μια κλιμάκωση σχετικά με το ποσοστό κατά το οποίο συμπληρώνονταν ο φαινότυπος των μεταλλάξεων. Πιο συγκεκριμένα, στο υπόβαθρο *lon1-1* (D-3) τρεις σειρές μετασχηματισμένων φυτών (#15, #16 και #20) αναστρέφουν επιτυχώς τον φαινότυπο (Εικόνα 16Α και 16Β). Οι σειρές #19 και #23 όμως διαφέρουν από τις προηγούμενες (Εικόνα 16Α και 16Β). Η σειρά #23 έχει φαινότυπο ενδιάμεσο μεταξύ του μεταλλάγματος *lon1-1* και των φυτών αγρίου τύπου, αλλά σίγουρα διαφορετικό από τις σειρές #15, #16 και #20 (Γράφημα 3Α και 3Β). Σε αντίθεση με τις προηγούμενες σειρές, η σειρά #19 παρουσιάζει τόσο την 5^η ημέρα (Γράφημα 3Α) όσο και την 7^η ημέρα (Γράφημα 3Β) φαινότυπο που αποκλίνει ουσιαστικά από τα φυτά αγρίου τύπου που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες παρόλο που ως εικόνα και μετρήσεις είναι αναπτυξιακά καλύτερο από τα φυτά *lon1-1*.



Εικόνα 16. Φυτά *lon1-1* που υπερεκφράζουν την μιτοχονδριακή ισομορφή της πρωτεάσης Lon1 (Lon1-Short) ηλικίας 5 (Α) και 7 ημερών (Β) και τα αντίστοιχα φυτά *lon1-2* ηλικίας 5 (Γ) και 7 ημερών (Δ). Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 1cm.

Σε αντίθεση με το γενετικό υπόβαθρο *lon1-1*, στο γενετικό υπόβαθρο *lon1-2* οι σειρές #2, #7, και #12 συμπλήρωσαν επιτυχώς το φαινότυπο (Εικόνα 16Γ και 16Δ), με ποσοστό που κυμαίνεται περίπου στο 70% του μήκους της ρίζας των φυτών αγρίου τύπου (Γράφημα 3Γ και 3Δ). Όπως στις δοκιμές με γενετικό υπόβαθρο τα φυτά *lon1-1*, έτσι και στην περίπτωση των φυτών *lon1-2* καταγράφηκαν οι σειρές #1 και #13 που δεν συμπληρώνουν το φαινότυπο (Εικόνα 16Γ και 16Δ), αφού δεν διέφεραν από το μετάλλαγμα *lon1-2* (Γράφημα 3Γ και 3Δ).

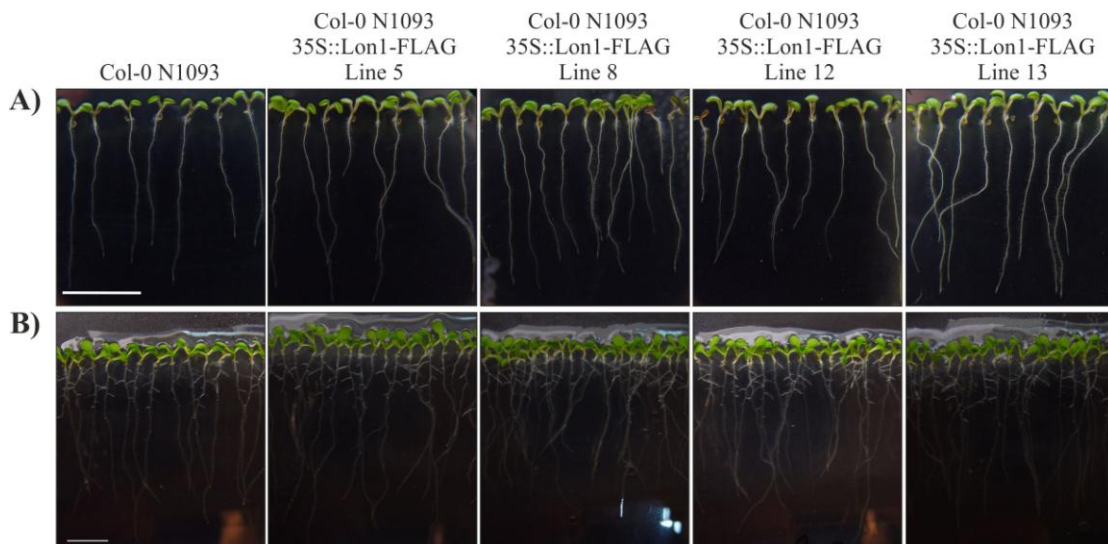
Τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν φαινοτυπική παραλλακτικότητα στις δοκιμές συμπλήρωσης των φαινοτύπων *lon1-1* και *lon1-2* από την υπερέκφραση του γονιδίου *Lon1*. Όπως στην περίπτωση των κατασκευών pLon1::*Lon1*-FLAG και pLon4::*Lon1*-FLAG έτσι και στην κατασκευή 35S::*Lon1*-FLAG οι διαφορές που εντοπίζονται μεταξύ των διαγονιδιακών σειρών που αναλύθηκαν ενδεχομένως να σχετίζονται με το γενετικό υποβάθρο των φυτών *lon1-1* και *lon1-2* και της ποσοτικής έκφρασης των διαγονιδιακών κατασκευών εντός της κάθε σειράς (βλ. Συζήτηση).



Γράφημα 3. Μήκος πρωτογενούς ρίζας των μεταλλαγμάτων *lon1-1* (D-3) και *lon1-2* (N512797) που υπερέκφραζουν την μιτοχονδριακή ισομορφή της πρωτεΐσης Lon1 (Lon1-Short). (A) και (B): *lon1-1* ηλικίας 5 και 7 ημερών αντίστοιχα. (Γ) και (Δ): *lon1-2* ηλικίας 5 και 7 ημερών αντίστοιχα. Το μήκος της ρίζας για κάθε σειρά μετασηματισμένων φυτών καταγράφεται ως ποσοστό έναντι του μήκους της ρίζας των φυτών αγρίου τύπου *Col-0* N1093.

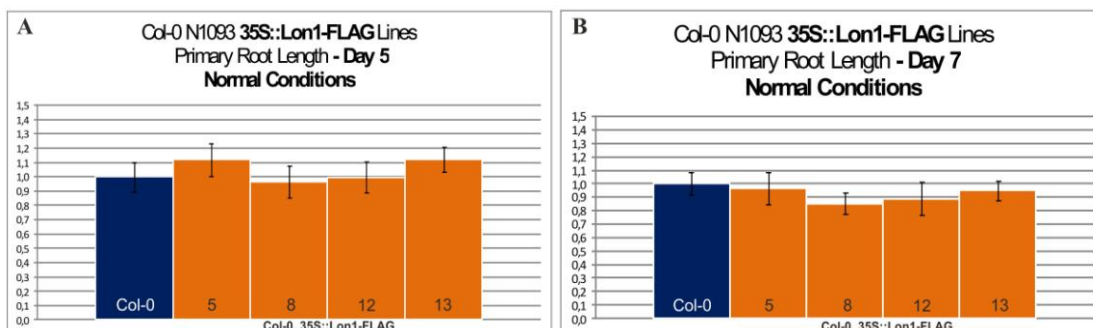
3.5. Η υπερέκφραση του γονιδίου *Lon1* δεν επηρέασε την ανάπτυξη των φυτών αγρίου-τύπου υπό φυσιολογικές συνθήκες

Τα προηγούμενα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι η υπερέκφραση της μιτοχονδριακής ισομορφής της πρωτεΐσης Lon1 συμπληρώνει επιτυχώς το φαινότυπο των αλληλομόρφων *lon1* με καλύτερα αποτελέσματα όταν ως γενετικό υπόβαθρο χρησιμοποιηθούν τα φυτά *lon1-1* σε σύγκριση με τα φυτά *lon1-2*. Στη συνέχεια η κατασκευή 35S::Lon1-FLAG ενσωματώθηκε σε φυτά αγρίου τύπου *Col-0*, για να εξεταστεί εάν η υπερέκφραση της κατασκευής *Lon1* που κωδικοποιεί τη μιτοχονδριακή ισομορφή ενδέχεται να επηρεάσει δυσμενώς την ανάπτυξη των φυτών.



Εικόνα 17. Φυτά *Col-0* τα οποία υπερέκφραζουν την μιτοχονδριακή ισομορφή της πρωτεΐσης Lon1 (Lon1-Short) ηλικίας 5 (A) και 7 ημερών (B). Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 1cm.

Η ανάλυση τεσσάρων διαγονιδιακών σειρών φυτών *Col-0 N1093* #5, #8, #12 και #13 της γενιάς T₂ που επιλέχθηκαν τυχαία αποκάλυψε ότι τα φυτά αναπτύσσονται φυσιολογικά (Εικόνα 17A και 17B). Επιπρόσθετα, βιομετρικές αναλύσεις της πρωτογενούς ρίζας (Γράφημα 4A και 4B) έδειξαν πως η ανάπτυξη είναι ίδια με αυτή των φυτών αγρίου-τύπου που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Φαίνεται λοιπόν ότι η υπερέκφραση της μιτοχονδριακής ισομορφής της πρωτεάσης Lon1 δεν επηρεάζει την πρωτογενή ανάπτυξη των φυτών υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, καθώς δεν παρατηρήθηκαν διαφορές έναντι των φυτών αγρίου τύπου.



Γράφημα 4. Μήκος πρωτογενούς ρίζας φυτών *Col-0* που υπερεκφράζουν την μιτοχονδριακή ισομορφή της πρωτεάσης Lon1 (*Lon1-Short*) ηλικίας 5 (A) και 7 ημερών (B). Το μήκος της ρίζας για κάθε σειρά μετασηματισμένων φυτών καταγράφεται ως ποσοστό έναντι του μήκους της ρίζας των φυτών αγρίου τύπου *Col-0* N1093.

3.6. Τα φυτά παρουσιάζουν σημαντική αναστολή στην πρωτογενή τους ανάπτυξη υπό συνθήκες έλλειψης οξυγόνου

Υπό συνθήκες έλλειψης οξυγόνου για το φυτό (υποξία ή ανοξία), δημιουργούνται συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης στα μιτοχόνδρια καθώς τα ηλεκτρόνια της αναπνοής απουσία του τελικού αποδέκτη τους, οξειδώνουν άλλα μόρια και πρωτεΐνες του μιτοχονδρίου μετουσιώνοντάς τα. Η πρωτεάση Lon1 τοποθετείται στη μήτρα του μιτοχονδρίου και ρόλος της είναι να καταστρέφει πρωτεΐνες που έχουν χάσει την σωστή τριτοταγή τους δομή, αποτρέποντας έτσι την δημιουργία συσσωματωμάτων μετουσιωμένων πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο που τελικά προκαλούν μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, τα φυτά που υπερεκφράζουν την πρωτεάση Lon1 δεν παρουσίασαν ανωμαλίες στην ανάπτυξη σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου. Επομένως, αποτελούν ένα καλό πειραματικό υλικό για να μελετηθεί η εφαρμογή συνθηκών έλλειψης οξυγόνου και κατά επέκταση οξειδωτικής καταπόνησης, στην ανάπτυξη των φυτών και στην εύρυθμη λειτουργία του μιτοχονδρίου.

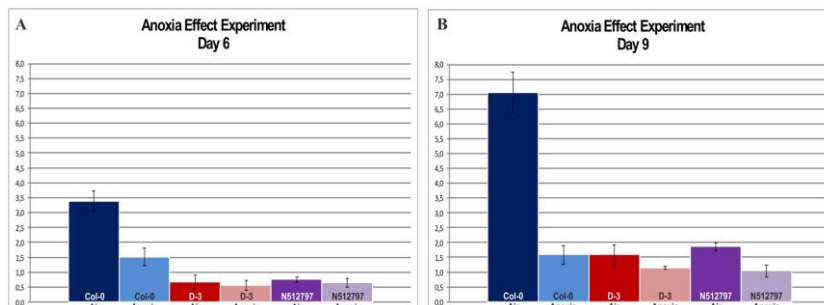
Σε πρώτη φάση προσδιορίστηκε η μεθοδολογία με την οποία θα μπορούσε να αφαιρεθεί το οξυγόνο για να μελετηθεί η επίδραση της έλλειψης του στην ανάπτυξη των φυτών. Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε στηρίζεται στην ανάπτυξη των φυτών *Col-0*, *lon1-1* και *lon1-2* σε γυάλινα φυαλίδια με θρεπτικό μέσο ανάπτυξης Murashige and Skoog, στο οποίο όμως είχε προστεθεί αгарόζη σε συγκέντρωση 0,1% w/v (Εικόνα 18). Η προσθήκη αгарόζης σε αυτή τη συγκέντρωση προσέδωσε στο θρεπτικό μέσο μια μορφή παχύρευστου υγρού στο οποίο όμως τα σπέρματα μπορούσαν να παραμείνουν σταθερά σε ένα ορισμένο βάθος, χωρίς να κατακρυσμνίζονται στον πυθμένα.



Εικόνα 18. Γυάλινα φυαλίδια με θρεπτικό μέσο στη μορφή παχύρρευστου υγρού (0,1% Αγαρόζη) για προσομοίωση συνθηκών έλλειψης οξυγόνου.

Τα σπέρματα τοποθετήθηκαν περίπου 1cm κάτω από την επιφάνεια του θρεπτικού. Έτσι, τα σπέρματα βρίσκονται αρχικά σε ένα περιβάλλον χαμηλής περιεκτικότητας σε οξυγόνο, υποξία. Με το πέρασμα του χρόνου καθώς το σπέρμα βλαστάνει και το νεαρό σπορόφυτο αναπτύσσεται τότε τα χαμηλά αποθέματα οξυγόνου εξαντλούνται με αποτέλεσμα το φυτό να αναπτύσσεται σε συνθήκες ανοξίας. Το φαινόμενο της έλλειψης οξυγόνου καθορίζεται από το βάθος στο οποίο εμβολιάζονται τα σπέρματα στο ημίρρευστο μέσο. Δηλαδή όσο μεγαλύτερο το βάθος τόσο και χαμηλότερη η αρχική περιεκτικότητα σε οξυγόνο. Ως μάρτυρες της δοκιμής χρησιμοποιήθηκαν φυτά που αναπτύχθηκαν στο ίδιο θρεπτικό μέσο σε τρυβλία για επάρκεια οξυγόνου.

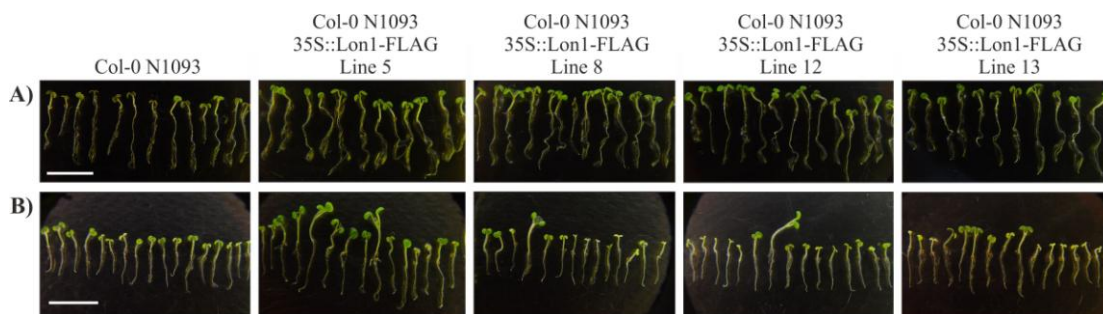
Τα αποτελέσματα των βιομετρικών αναλύσεων της 6^{ης} και την 9^{ης} ημέρα παρουσιάζονται στο Γράφημα 5. Είναι φανερό ότι υπό συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης τα φυτά αγρίου τύπου (*Col-0*) παρουσιάζουν μικρή υστέρηση της ανάπτυξης την 6^η ημέρα (Γράφημα 5A), αλλά σημαντική καθυστέρηση την 9^η ημέρα (Γράφημα 5B). Συγκεκριμένα την 6^η ημέρα η ανάπτυξη της πρωτογενούς ρίζας των φυτών της δοκιμής περιορίζεται στο περίπου 50% σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες. Την 9^η όμως ημέρα το μήκος της πρωτογενούς ρίζας στα φυτά της δοκιμής ήταν περίπου 25% σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει ότι με την πάροδο του χρόνου η δοκιμή γίνεται πιο επίπονη καθώς εξαντλείται πλήρως το οξυγόνο στο μέσο ανάπτυξης και από κατάσταση υποξίας το σύστημα μεταβαίνει σε κατάσταση ανοξίας. Οι αλληλόμορφοι του γονιδίου *Lon1* φαίνεται ότι αρχικά την 6^η ημέρα δεν επηρεάζονται σημαντικά από την καταπόνηση (Γράφημα 5A). Την 9^η όμως ημέρα η ανάπτυξη της πρωτογενούς ρίζας των αλληλομόρφων *lon1-1* και *lon1-2* σε σύγκριση με τα μεταλλαγμένα φυτά μάρτυρες που αναπτύσσονται σε επάρκεια οξυγόνου παρουσιάζουν ποσοστό υστέρησης (Γράφημα 5B). Η υστέρηση όμως είναι μικρότερη σε σχέση με αυτήν που παρουσιάζουν τα φυτά αγρίου τύπου. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει πως εάν η πρωτεύουσα *Lon1* σχετίζεται με ανθεκτικότητα σε συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης τότε θα πρέπει να είναι λειτουργική σε κατάσταση υποξίας. Σε κατάσταση ανοξίας η όποια ανθεκτικότητα των φυτών θα πρέπει να οφείλεται σε μοριακούς μηχανισμούς που δεν σχετίζονται με τη πρωτεύουσα *Lon1*.



Γράφημα 5. Μέτρηση μήκους πρωτογενούς ρίζας υπό δοκιμή υποξίας σε φυτά αγρίου τύπου *Col-0*, *lon1-1* (D-3) και *lon1-2* (N512797) την 6^η (A) και την 9^η ημέρα (B) ανάπτυξης.

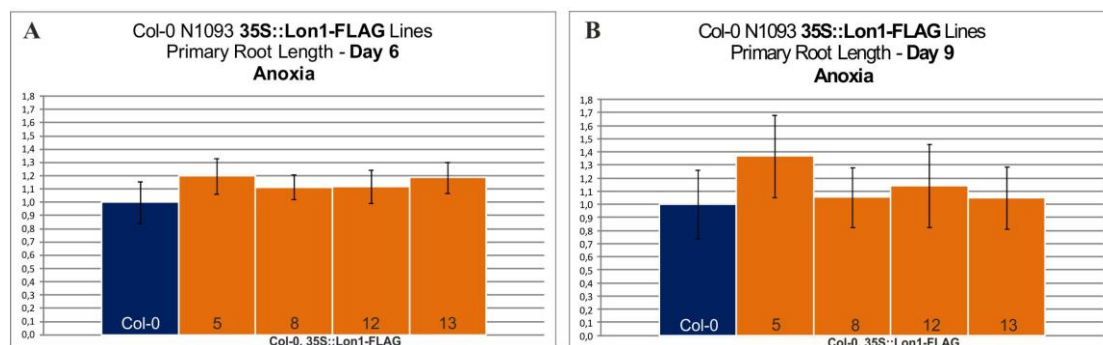
3.7. Ενδείξεις ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *Lon1* προσδίδει ανθεκτικότητα σε συνθήκες ανεπάρκειας οξυγόνου

Σε συνέχεια των προηγούμενων ενθαρρυντικών παρατηρήσεων για να διευκρινιστεί εάν η υπερέκφραση του γονιδίου *Lon1* σχετίζεται με ανθεκτικότητα φυτών σε συνθήκες ανεπάρκειας οξυγόνου έγινε η ακόλουθη δοκιμή. Διαγονιδιακές σειρές φυτών αγρίου-τύπου *Col-0* N1093 που υπερεκφράζουν το γονίδιο *Lon1*, 35S::*Lon1*-FLAG, αναπτύχθηκαν σε φιαλίδια ημίρρευστου θερπτικού μέσου. Το πρότυπο ανάπτυξης της ρίζας των σειρών αυτών συγκρίθηκε με μη-διαγονιδικά φυτά αγρίου-τύπου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα φυτά των διαγονιδιακών σειρών #5 και #12 από την 6^η κιόλας ημέρα (Εικόνα 19A) σημείωσαν βελτιωμένη ανάπτυξη σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες. Οπτικά η διαφορά στο πρότυπο ανάπτυξης των σειρών #5 και #12 είναι φανερή την 9^η ημέρα (Εικόνα 19B) σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες.



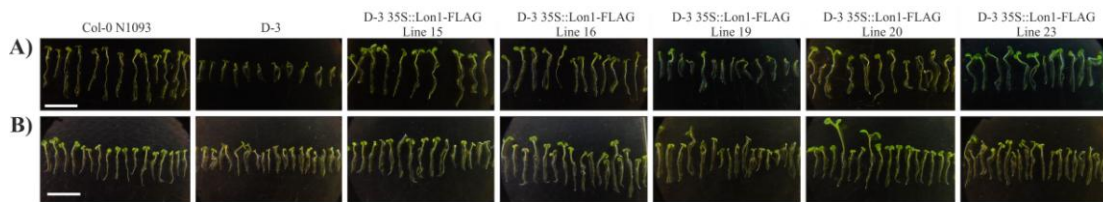
Εικόνα 19. Φυτά *Col-0* τα οποία υπερεκφράζουν την μιτοχονδριακή ισομορφή της πρωτεάσης Lon1 (*Lon1*-Short) υπό συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης την 6^η (A) και την 9^η (B) ημέρα. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 1cm.

Σε αντίθεση με τις σειρές #5 και #12, οι σειρές #8 και #13 δεν εμφάνισαν οπτικά κάποια διαφορά σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες. Οι βιομετρικές μελέτες επιβεβαίωσαν ότι την 6^η ημέρα η ανάπτυξη των σειρών #5 και #12 είναι καλύτερη κατά 10%-20% σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες (Γράφημα 6A), ενώ τα ποσοστά βελτιώνονται σημαντικά την 9^η ημέρα με τη σειρά #5 να είναι περίπου 35% καλύτερα αναπτυγμένη και η σειρά #12 περίπου 15% με τα φυτά μάρτυρες (Γράφημα 6B).



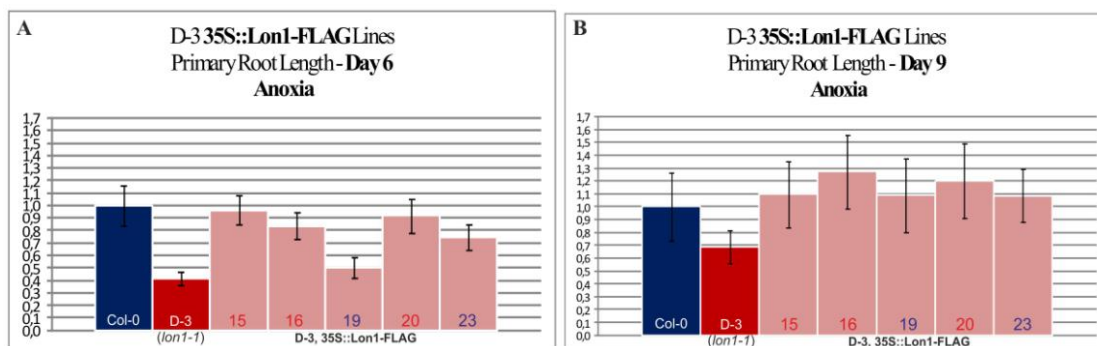
Γράφημα 6. Μήκος πρωτογενούς ρίζας φυτών *Col-0* που υπερεκφράζουν την μιτοχονδριακή ισομορφή της πρωτεάσης Lon1 (*Lon1*-Short) υπό συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης ηλικίας 6 (A) και 9 ημερών (B). Το μήκος της ρίζας για κάθε σειρά μετασηματισμένων φυτών καταγράφεται ως ποσοστό έναντι του μήκους της ρίζας των φυτών αγρίου τύπου *Col-0* N1093.

Για να διερευνηθεί εάν σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου η υπερέκφραση του γονιδίου *Lon1* επηρεάζει το πρότυπο ανάπτυξης των αλληλόμορφων *lon1-1* και *lon1-2*, οι διαγονιδιακές σειρές της κατασκευής 35S::*Lon1*-FLAG δοκιμάστηκαν σε συνθήκες υποξίας και ανοξίας. Στο γενετικό υπόβαθρο *lon1-1* τα αποτελέσματα ανάπτυξης για 6 ημέρες σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου (Εικόνα 20A) έδειξαν ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *Lon1* συμπληρώνει την μετάλλαξη *lon1-1* με παρόμοιο πρότυπο ανάπτυξης με αυτό που παρατηρείται με επάρκεια αέρα (Εικόνα 16A και 16B). Συγκεκριμένα οι βιομετρικές αναλύσεις με βάση την ανάπτυξη της πρωτογενούς ρίζας αποκάλυψαν ότι την 6^η ημέρα στις σειρές #15, #16 και #20 ο φαινότυπος είναι παρόμοιος με των φυτών αγρίου τύπου (Γράφημα 7A). Όμως στις σειρές #19 και #23 δεν υπάρχει αναστροφή του φαινοτύπου. Η σειρά #23 αντιστοιχεί στο 70% των φυτών αγρίου τύπου που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες, ενώ η σειρά #19 μοιάζει πολύ με το γενετικό υπόβαθρο *lon1-1*.



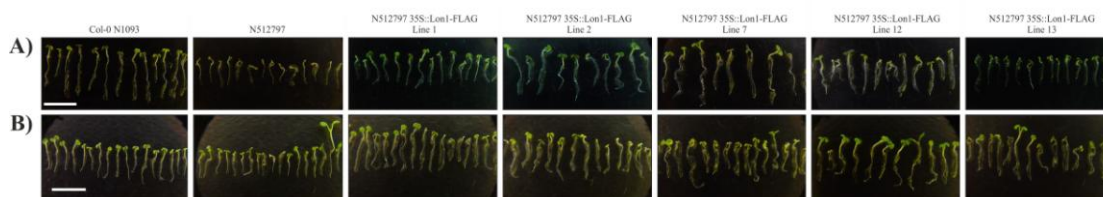
Εικόνα 20. Φυτά *lon1-1* ηλικίας 6 (A) και 9 ημερών (B) τα οποία υπερεκφράζουν την μιτοχονδριακή ισομορφή της πρωτεάσης Lon1 (Lon1-Short) υπό συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 1cm.

Το πρότυπο όμως αλλάζει ολοκληρωτικά την 9-ημέρα (Γράφημα 7B) και διαφοροποιείται από το πρότυπο ανάπτυξης των σειρών στην επάρκεια οξυγόνου (Εικόνα 16A και 16B). Συγκεκριμένα οι βιομετρικές αναλύσεις αποκάλυψαν ότι όλες οι σειρές, συμπεριλαμβανομένων των #19 και #23, έχουν φαινότυπο φυτών αγρίου τύπου (Γράφημα 7B). Επιπρόσθετα, οι σειρές #15, #16 και #20 παρουσιάζουν εμφανή ανθεκτικότητα στη παρατεταμένη έλλειψη οξυγόνου. Η παρατήρηση ότι στις σειρές #19 και #23 που υπερεκφράζουν το γονίδιο Lon1 σημειώνεται αναστροφή του φαινότυπου είναι μοναδική και εξειδικευμένη μόνο για τις 9 ημέρες στις συνθήκες καταπόνησης.



Γράφημα 7. Μήκος πρωτογενούς ρίζας των μεταλλαγμάτων *lon1-1* (D-3) που υπερεκφράζουν την μιτοχονδριακή ισομορφή της πρωτεάσης Lon1 (Lon1-Short) ηλικίας 6 (A) και 9 ημερών (B) υπό συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης. Το μήκος της ρίζας για κάθε σειρά μετασηματισμένων φυτών καταγράφεται ως ποσοστό έναντι του μήκους της ρίζας των φυτών αγρίου τύπου *Col-0* N1093.

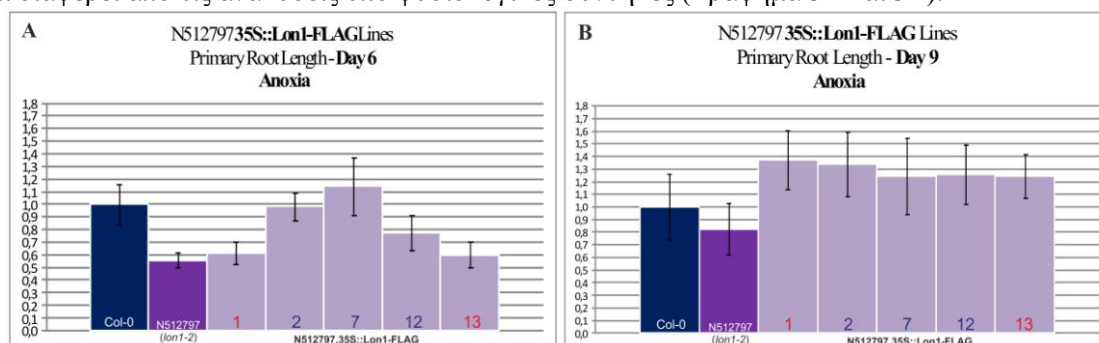
Σε αντιστοιχία με τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν στο γενετικό υπόβαθρο *lon1-1*, το πρότυπο ανάπτυξης σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου των διαγονιδιακών σειρών υπερέκφρασης 35S::Lon1-FLAG με γενετικό υπόβαθρο *lon1-2* διαφέρει μεταξύ 6 και 9 ημερών. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα ανάπτυξης για 6-ημέρες σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου (Εικόνα 21A) έδειξαν ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *Lon1* συμπληρώνει την μετάλλαξη *lon1-2* με παρόμοιο πρότυπο ανάπτυξης με αυτό που παρατηρείται με επάρκεια αέρα (Εικόνα 16Γ και 16Δ).



Εικόνα 21. Φυτά *lon1-2* ηλικίας 6 (A) και 9 ημερών (B) τα οποία υπερεκφράζουν την μιτοχονδριακή ισομορφή της πρωτεάσης Lon1 (Lon1-Short) υπό συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 1cm.

Οι βιομετρικές αναλύσεις με βάση την ανάπτυξη της πρωτογενούς ρίζας σε συνθήκες ανεπάρκειας οξυγόνου την 6^η ημέρα (Γράφημα 8A) αποκάλυψαν ότι στις σειρές #2, #7 και #12 σε αντίθεση με τις σειρές #1 και #13 συμπληρώνεται το πρότυπο της μετάλλαξης *lon1-2*. Το πρότυπο αυτό συμφωνεί με την επάρκεια οξυγόνου (Γραφήμα 3Γ και 3Δ) με τη διαφορά #2, #7 και #12 στις συνθήκες ανεπάρκειας οξυγόνου προσεγγίζουν πολύ την ανάπτυξη των φυτών-αγρίου τύπου. Το πρότυπο ανάπτυξης των σειρών αλλάζει σημαντικά την 9^η ημέρα σε συνθήκες ανεπάρκειας οξυγόνου (Εικόνα 21B). Οι βιομετρικές αναλύσεις αποκάλυψαν ότι την 9^η ημέρα η ανάπτυξη της ρίζας φυτών από τις σειρές #1 και #13 είναι παρόμοιες με των φυτών αγρίου τύπου (Γράφημα 8B).

Το πρότυπο αυτό παρατηρείται για πρώτη φορά αποκλειστικά σε συνθήκες ανεπάρκειας οξυγόνου και διαφέρει από τις αναλύσεις υπό φυσιολογικές συνθήκες (Γράφημα 3Γ και 3Δ).



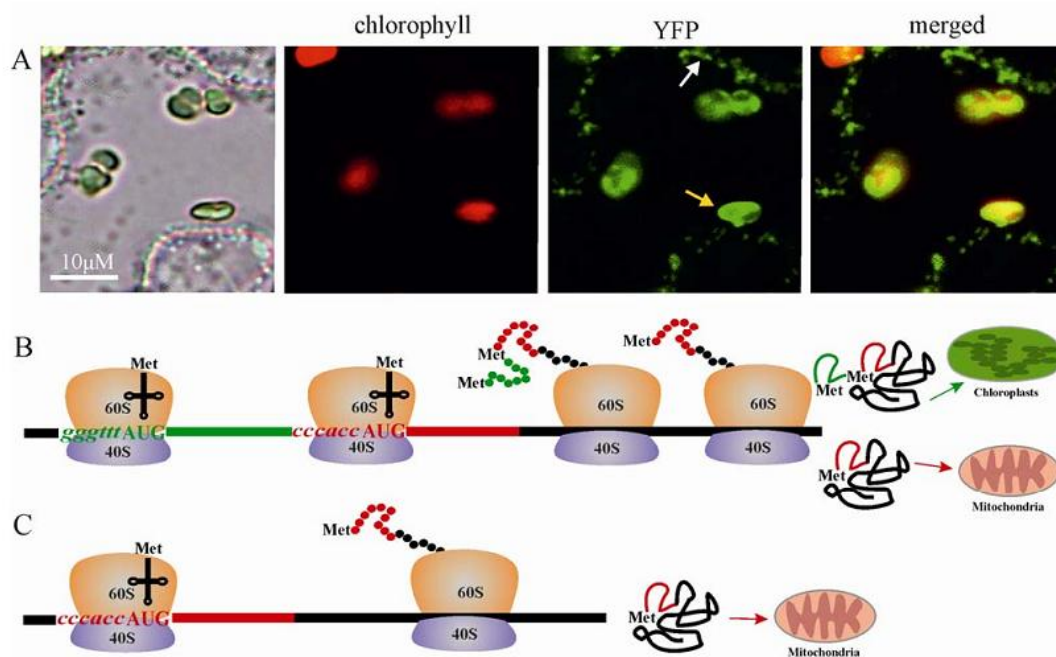
Γράφημα 8. Μήκος πρωτογενούς ρίζας των μεταλλαγμάτων *lon1-2* (N512797) που υπερεκφράζουν την μιτοχονδριακή ισομορφή της πρωτεΐνης Lon1 (Lon1-Short) ηλικίας 6 (A) και 9 ημερών (B) υπό συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης. Το μήκος της ρίζας για κάθε σειρά μετασηματισμένων φυτών καταγράφεται ως ποσοστό έναντι του μήκους της ρίζας των φυτών αγρίου τύπου *Col-0* N1093.

Συμπερασματικά φαίνεται πως υπάρχει μια ισχυρή ένδειξη ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Lon1 στα μιτοχόνδρια προσδίδει ένα πλεονέκτημα στα φυτά υπό συνθήκες ανεπάρκειας οξυγόνου και κατά επέκταση οξειδωτικής καταπόνησης, καθώς ανεξαρτήτως γενετικού υποβάθρου, καταγράφηκαν φυτά με καλύτερη ανάπτυξη έναντι των φυτών *Col-0*. Η πλήρης αποκωδικοποίηση του μηχανισμού πρωτεόλυσης Lon όσον αφορά τα υποστρώματα, την χρονική και την ιστοειδική έκφρασή της θα αποτελέσουν μελλοντικές προκλήσεις στην έρευνα της βιολογίας των φυτών, καθώς ως συστατικό του μηχανισμού ελέγχου της ποιότητας των πρωτεϊνών των οργανιδίων θα αποτελέσουν σημαντικά όπλα στην αντιμετώπιση των δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών και στη βελτίωση της φυτικής παραγωγής.

Συζήτηση

4.1 Η μιτοχondριακή Lon1 πρωτεϊνική ισομορφή δεν συμπληρώνει το φαινότυπο της μετάλλαξης *lon4*.

Οι πρωτεάσες Lon1 και Lon4 παρουσιάζουν δυαδική υποκυτταρική τοποθέτηση στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες (Ostersetzer et al. 2007, Daras et al. unpublished) με διαφορετικούς όμως μηχανισμούς. Το γονίδιο *Lon4* κωδικοποιεί ένα πολυπεπίδιο το οποίο στο άμινο τελικό άκρο του φέρει ακολουθία οδηγό που **αναγνωρίζεται από τα δύο οργανίδια** (ambiguous presequence). Αντίθετα, το γονίδιο *Lon1*, κωδικοποιεί από το ίδιο μεταγράφημα που έχει δυο κωδικόνια έναρξης της μεταγραφής στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο, **δύο πολυπεπίδια**. Το ένα ξεκινά από το πρώτο κωδικόνιο έναρξης και οδηγείται στον χλωροπλάστη (Long), ενώ το άλλο ξεκινά από το δεύτερο κωδικόνιο έναρξης και οδηγείται στο μιτοχόνδριο (Short) (Twin presequences) (Εικόνα 22).



Εικόνα 22. Ο μηχανισμός ρύθμισης της υποκυτταρικής τοποθέτησης της πρωτεάσης Lon1 στα φυτικά οργανίδια. **(A)** Κατασκευή σύντηξης του γονιδίου *Lon1* με την πρωτεΐνη μάρτυρα YFP (Yellow Fluorescent Protein) σε παροδική έκφραση σε επιδερμικά κύτταρα φύλλων καπνού (*Nicotiana benthamiana*). Με λευκό βέλος επισημαίνονται τα μιτοχόνδρια και με κίτρινο οι χλωροπλάστες. Ο μηχανισμός ρυθμίζεται αρχικά στο επίπεδο της μεταγραφής. **(B)** Στα φύλλα και σε συνθήκες έλλειψης φωτός εκφράζεται το mRNA με τα δυο κωδικόνια στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με αποτέλεσμα τη σύνθεση της μεγάλης (Lon1L) ισομορφής με τοποθέτηση στους χλωροπλάστες και της μικρής (Lon1S) ισομορφής με τοποθέτηση στα μιτοχόνδρια. **(C)** Σε συνθήκες που προσομοιάζουν υποξία εκφράζεται το μεταγράφημα *Lon1S* με αποτέλεσμα την αποκλειστική σύνθεση της μιτοχondριακής ισομορφής.

Συνεπώς, ο μηχανισμός υποκυτταρικής τοποθέτησης ελέγχεται στο επίπεδο της μεταγραφής και της μετάφρασης.

Ο κύριος λειτουργικός ρόλος της πρωτεάσης Lon1 είναι στα μιτοχόνδρια και μόνον υπό συγκεκριμένες συνθήκες καταπόνησης των χλωροπλαστών παρουσιάζει δυαδική τοποθέτηση και στα δύο οργανίδια. Η πρωτεάση Lon4, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένα, κωδικοποιεί ένα πολυπεπίδιο του οποίου το πεπτιδιο οδηγός αναγνωρίζεται και από τα δύο οργανίδια. Η δομή του μηχανισμού υποκυτταρικής τοποθέτησης της πρωτεάσης Lon4 εξασφαλίζει την συνεχή δυαδική τοποθέτηση της ανεξάρτητα από άλλους παράγοντες και υποδηλώνει ότι μάλλον η Lon4 έχει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια ανάπτυξης του φυτού στα πλαστίδια που όταν αυτή εκλείπει (μετάλλαγμα *lon4-1*) η βλαστικότητα των σπερμάτων περιορίζεται σημαντικά.

Το γεγονός ότι η μιτοχondριακή ισομορφή Lon1 δεν κατάφερε να αναστρέψει τον φαινότυπο των μεταλλαγμάτων *lon4-1* είτε υπό τον έλεγχο του ενδογενούς προαγωγέα *Lon4*, είτε υπό τον έλεγχο του καθολικά εκφραζόμενου προαγωγέα *CaMV35S* (Εικόνα 15A και 15B), υποδηλώνει τα εξής. (i) Εάν η πρωτεάση Lon4 είναι σημαντική για τη λειτουργία και τη βιογένεση των πλαστιδίων κατά τη βλάστηση των σπερμάτων, τότε η χλωροπλαστική Lon1 ισομορφή στην περίπτωση που είναι λειτουργικά συμπληρωματική με τη Lon4 θα ήταν ικανή να αναστρέψει τη *lon4-1* φαινοτυπική ανωμαλία, κάτι που είναι αδύνατον να γίνει από τη μιτοχondριακή Lon1

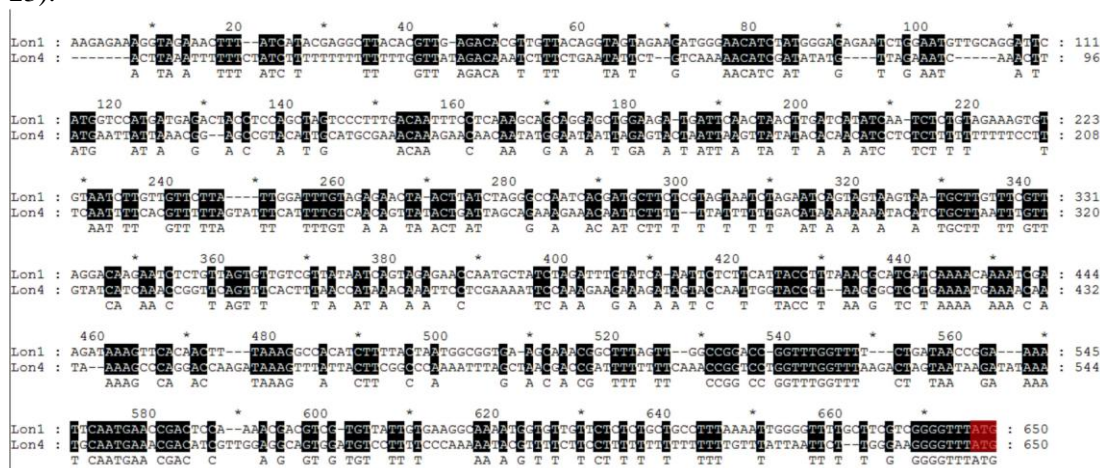
ισομορφή και (ii) Εάν οι λειτουργίες των δύο πρωτεασών Lon1 και Lon4 διαχωρίστηκαν στην πορεία της εξέλιξης τότε αδυνατεί η μια να αναγνωρίσει τα υποστρώματα της άλλης, και κατά συνέπεια η Lon1 δεν συμπληρώνει τον φαινότυπο των μεταλλάξεων *lon4-1*. Η υπόθεση αυτή δεν σχετίζεται μόνο με την υποκυτταρική τοποθέτηση, αλλά και με την εκλεκτικότητα της κάθε πρωτεάσης ως προς τα υποστρώματά της.

Σε κάθε περίπτωση, είναι απαραίτητο να δοκιμαστεί ολόκληρη η πρωτεάση Lon1 που παρουσιάζει δυαδική τοποθέτηση. Συμπλήρωση της μετάλλαξης με αυτή την κατασκευή θα επιβεβαιώσει την πρώτη υπόθεση, ότι ο ρόλος της Lon4 είναι καθοριστικός στα προπλαστίδια και η Lon1, όταν οδηγηθεί εκεί (χρονικά και ιστοειδικά) είναι ικανή να συμπληρώσει την λειτουργία της Lon4 και άρα οι δύο πρωτεάσες έχουν λειτουργική συμπληρωματικότητα. Η αντίθετη περίπτωση, μη αναστροφής του φαινοτύπου οδηγεί στο δεύτερο συμπέρασμα, ότι οι δύο πρωτεάσες έχουν διακριτούς ρόλους.

Κατά αντιστοιχία η αντίστροφη δοκιμή (Lon1prom::*Lon4*-FLAG και *CaMV* 35S::*Lon4*-FLAG στα μεταλλάγματα *lon1-1* και *lon1-2*) θα ολοκληρώσει τη σειρά των δοκιμών που αφορούν στη λειτουργική συμπληρωματικότητα των δύο γονιδίων.

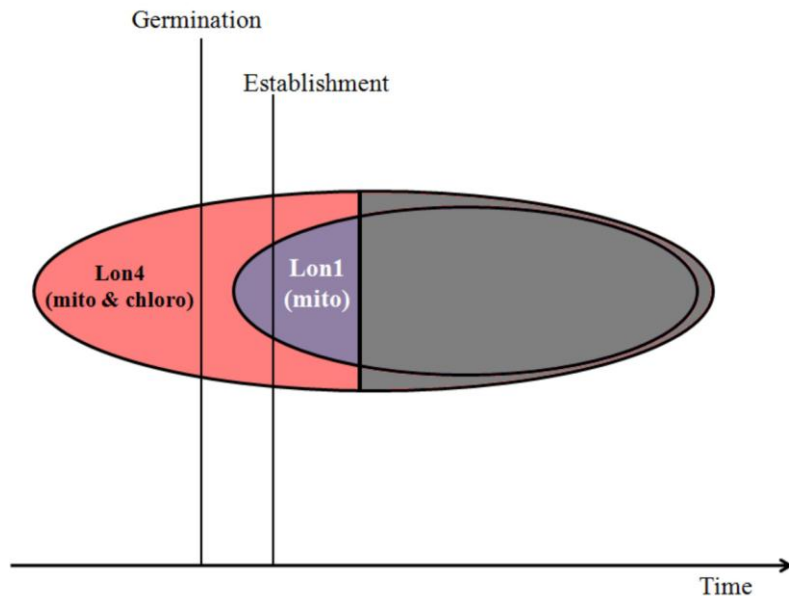
4.2 Ο προαγωγέας του γονιδίου *Lon4* όταν καθοδηγεί το γονίδιο *Lon1* συμπληρώνει τους φαινοτύπους των μεταλλάξεων *lon1-1* και *lon1-2*.

Πολλαπλή στοίχιση των νουκλεοτιδικών ακολουθιών των προαγωγέων των δύο γονιδίων, Lon1 και Lon4, έδειξε ότι οι προαγωγοί παρουσιάζουν ένα ποσοστό συντήρησης 47% (Εικόνα 23).



Εικόνα 23. Πολλαπλή στοίχιση των νουκλεοτιδικών ακολουθιών των προαγωγέων των γονιδίων *Lon1* και *Lon4*. Το ποσοστό ομολογίας των δύο προαγωγέων είναι 47%. Με κόκκινο επισημαίνονται τα κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης των δύο γονιδίων.

Το ποσοστό αυτό, όπως αποτυπώνεται και στις βιομετρικές αναλύσεις των φυτών *lon1-1* και *lon1-2* που έχουν μετασηματιστεί με τις κατασκευές Lon4prom::*Lon1*-FLAG και Lon1prom::*Lon1*-FLAG [Μάρτυρας] (Γράφημα 1), καθιστά ικανό τον προαγωγέα του γονιδίου *Lon4* όταν καθοδηγεί το γονίδιο *Lon1* να συμπληρώνει τις μεταλλάξεις *lon1-1* και *lon1-2* υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, οπότε χρονική και ιστοειδική έκφραση των δύο γονιδίων φαίνεται να συγκλίνουν. Επιπρόσθετα, εάν ληφθούν υπόψιν οι φαινότυποι των μεταλλάξεων των δύο γονιδίων, φαίνεται να προηγείται η έκφραση του γονιδίου *Lon4* χρονικά έναντι του *Lon1*. Προσθέτοντας στην εξίσωση και την ικανότητα συμπλήρωσης των μεταλλάξεων *lon1* όταν ο προαγωγέας του γονιδίου *Lon4* καθοδηγεί την έκφραση του γονιδίου *Lon1*, η εικόνα που διαμορφώνεται μέχρι στιγμής όσον αφορά στην έκφραση των δύο γονιδίων σε σχέση με το χρόνο αποτυπώνεται στην Εικ. 24.



Εικόνα 24. Σχηματική απεικόνιση της χρονικής επικάλυψης της έκφρασης των γονιδίων *AtLon1* και *AtLon4* με βάση τους φαινοτύπους των μεταλλάξεων και τα αποτελέσματα συμπληρωματικότητας των χιμαιρικών κατασκευών στα μεταλλάγματα. Η μιτοχονδριακή πρωτεϊνική ισομορφή Lon1 δεν είναι ικανή να συμπληρώσει το φαινότυπο των μεταλλάξεων *lon4-1* επειδή ενδέχεται να λειτουργεί μεταγενέστερα, οπότε διατηρείται το λειτουργικό κενό της πρωτεΐσης Lon4 που εμφανίζεται ως αδυναμία βλάστησης των *lon4-1* σπερμάτων. Αντίθετα ο προαγωγέας του γονιδίου *Lon4* όταν ελέγχει την έκφραση του γονιδίου *Lon1* συμπληρώνει τις μεταλλάξεις *lon1-1* και *lon1-2*, επειδή ενδέχεται να ενεργοποιεί την έκφραση του γονιδίου *Lon1* προγενέστερα συμπληρώνοντας επιτυχώς το λειτουργικό έλλειμα της πρωτεΐσης Lon4. Πειραματικά δεδομένα είναι απαραίτητα για τη εξηγηθεί ο λειτουργικός ρόλος των γονιδίων *Lon1* και *Lon4* στη περιοχή του γραφήματος με γκρι απόχρωση.

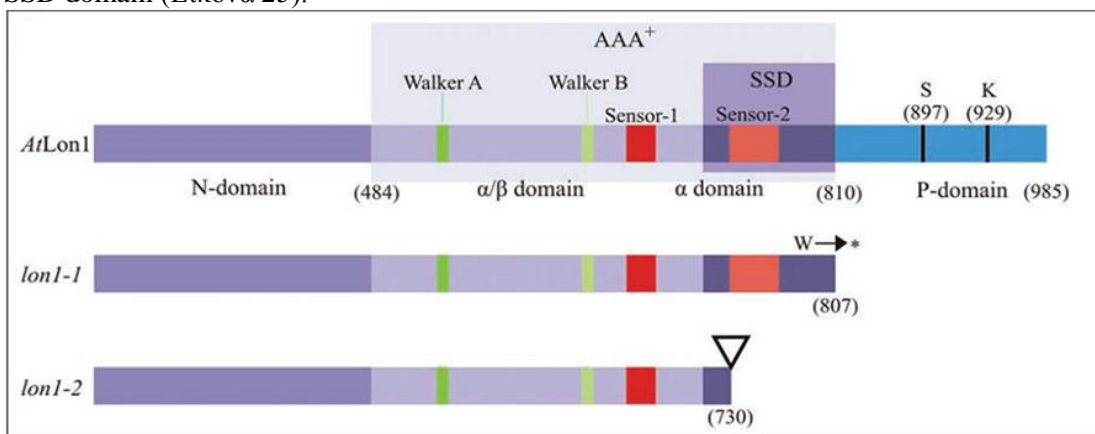
Η καταγραφή της ανάπτυξης της κατασκευής *Lon1prom::Lon4-FLAG* στο μέταλλαγμα *lon4-1* είναι αναγκαία για να συμπληρώσει την εικόνα έκφρασης στο χρόνο των δύο γονιδίων. Με βάση τους φαινοτύπους των μεταλλάξεων, το γονίδιο *Lon1* φαίνεται πως συμμετέχει στην ανάπτυξη του σπορόφυτου μετά το στάδιο της βλάστησης των σπερμάτων, καθώς τα μεταλλάγματα του γονιδίου *Lon1* παρουσιάζουν καθυστέρηση στην μεταεμβρυακή εγκατάσταση και ανάπτυξη του σποροφύτου, αλλά όχι στο χρόνο βλάστησης των σπερμάτων, αντίθετα με τα μεταλλάγματα *lon4-1* όπου παρατηρείται σημαντική καθυστέρηση στη βλάστηση των σπερμάτων. Αν η παραπάνω κατασκευή συμπληρώσει τον φαινότυπο των μεταλλάξεων *lon4-1*, τότε απορρίπτεται η χρονική παράμετρος και εισέρχεται ξανά η παράμετρος της διακριτής λειτουργίας του κάθε γονιδίου όσον αφορά τα υποστρώματα και τον μηχανισμό υποκυτταρικής τοποθέτησης. Δηλαδή τα δύο γονίδια συνεκφράζονται χρονικά, αλλά λειτουργικά αποκλίνουν.

Οι προαγωγείς των δυο γονιδίων πέραν της σημαντικής ομοιότητας παρουσιάζουν και ένα αξιοσημείωτο ποσοστό διαφορετικότητας που ενδεχομένως να υποδηλώνει ότι σε ειδικές συνθήκες ανάπτυξης όπως οι αβιοτικές καταπονήσεις ή σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια μπορεί να διαφέρει το ρυθμιστικό πρότυπο έκφρασης των γονιδίων που ελέγχουν. Η υπόθεση αυτή θα πρέπει να διερευνηθεί πειραματικά αναλύοντας το πρότυπο έκφρασης των ρυθμιστικών ακολουθιών με την ενεργοποίηση της έκφρασης ενός γονιδίου αναφοράς, όπως το γονίδιο της β-γλουκουρονιδάσης *GUS*. Σημαντική συνεισφορά στην αποκωδικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων *Lon1* και *Lon4* αναμένεται να έχει η *in silico* ταυτοποίηση ρυθμιστικών *cis* στοιχείων των δυο προαγωγέων που αναμένεται να αποκαλύψουν πληροφορίες σχετικά με το αναπτυξιακό πρότυπο έκφρασης των γονιδίων και την απόκριση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Τα αποτελέσματα από αυτές τις καταγραφές σε συνδυασμό με τα προηγούμενα αποτελέσματα θα συνθέσουν μια ολοκληρωμένη εικόνα για τη δυναμική της έκφρασης των δύο γονιδίων.

4.3 Η συμπλήρωση των φαινοτυπικών ανωμαλιών των μεταλλάξεων *lon1-1* και *lon1-2* καθορίζεται από το γενετικό τους υπόβαθρο

Οι αλληλόμορφοι *lon1-1* και *lon1-2* (Εικόνα 25) του γονιδίου *Lon1* παρουσιάζουν διαφορές στην ανάπτυξή τους. Ο αλληλόμορφος *lon1-1* έχει ισχυρότερο φαινότυπο από τον *lon1-2* (Rigas et al, 2009b). Η μετάλλαξη *lon1-1* έχει προέλθει από EMS μεταλλαξιογένεση η οποία έχει δημιουργήσει πρόωρο κωδικόνιο λήξης στο τέλος της επικράτειας SSD (Sensor- and Substrate

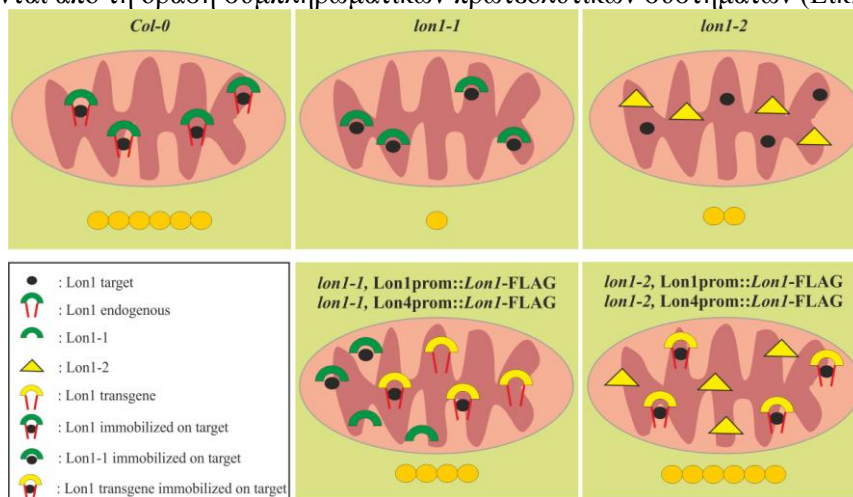
Discrimination domain), ενώ ο αλληλόμορφος *lon1-2* οφείλεται σε ένθεση T-DNA στην αρχή του SSD domain (Εικόνα 25).



Εικόνα 25. Σχηματική αναπαράσταση των μεταλλάξεων των δύο αλληλομόρφων του γονιδίου *Lon1*. Απεικονίζονται οι επικράτειες ολόκληρης της πρωτεΐνης Lon1, **N-terminal**: Το άμινο άκρο της πρωτεΐνης που φέρει τα πεπτιδία οδηγούς για υποκυτταρική τοποθέτηση, **AAA+**: Περιλαμβάνει την περιοχή ATPάσης, όπου γίνεται η υδρόλυση του ATP, καθώς και το **SSD domain** (Sensor and Substrate Discrimination) που είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση του υποστρώματος από την πρωτεΐνη. Το **P-domain** είναι στο καρβόξυ τελικό άκρο της πρωτεΐνης και φέρει δύο συντηρημένα κατάλοιπα Σερίνης (S₈₉₇) – Λυσίνης (K₉₂₉) που αποτελούν την περιοχή υπεύθυνη για την πρωτεόλυση.

Ο αστερίσκος στην μεταλλαγμένη ισομορφή *lon1-1* συμβολίζει την υποκατάσταση της τρυπτοφάνης στη θέση 807 (W₈₀₇) με ένα πρόωρο κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης, που προέκυψε από σημειακή μετάλλαξη στον αλληλόμορφο *lon1-1*, ενώ το αναστραμμένο τρίγωνο στην ισομορφή *lon1-2*, απεικονίζει τη θέση της ένθεσης του T-DNA στον αλληλόμορφο *lon1-2* της μετάλλαξης *lon1*.

Η επικράτεια SSD της πρωτεΐνης φαίνεται πως είναι η υπεύθυνη για την αναγνώριση και πρόσδεση του υποστρώματος προς πρωτεόλυση στόχου (Smith et al, 1999; Rigas et al, 2009b). Στο μετάλλαγμα *lon1-1* υπάρχει ολόκληρη η επικράτεια SSD, ενώ λείπει το καρβόξυ τελικό-άκρο της πρωτεΐνης που περιέχει την περιοχή πρωτεόλυσης. Έτσι, στα μεταλλάγματα *lon1-1*, η πρωτεΐνη αναγνωρίζει τους στόχους της και δεσμεύεται σε αυτούς, αλλά δεν μπορεί να τους πρωτεολύσει, καθώς απουσιάζει η πρωτεολυτική περιοχή της πρωτεΐνης. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία συσσωματωμάτων εντός του μιτοχονδρίου που προκαλούν σημαντικά προβλήματα στη φυσιολογική λειτουργία του οργανιδίου και κατά συνέπεια στην ανάπτυξη του φυτού. Ο αλληλόμορφος *lon1-2*, στερείται τόσο την επικράτεια SSD όσο τη πρωτεολυτική περιοχή. Ενώ η απουσία της λειτουργικής Lon1 έχει σημαντικές επιπτώσεις στη φυσιολογική ανάπτυξη του φυτού, ο φαινότυπος του αλληλομόρφου *lon1-2* είναι ήπιος σε σχέση με το φαινότυπο των φυτών *lon1-1*, εξαιτίας της αδυναμίας συσσώρευσης αποδιαταγμένων πολυπεπτιδίων επειδή αυτά ενδέχεται να απομακρύνονται από τη δράση συμπληρωματικών πρωτεολυτικών συστημάτων (Εικ. 26).

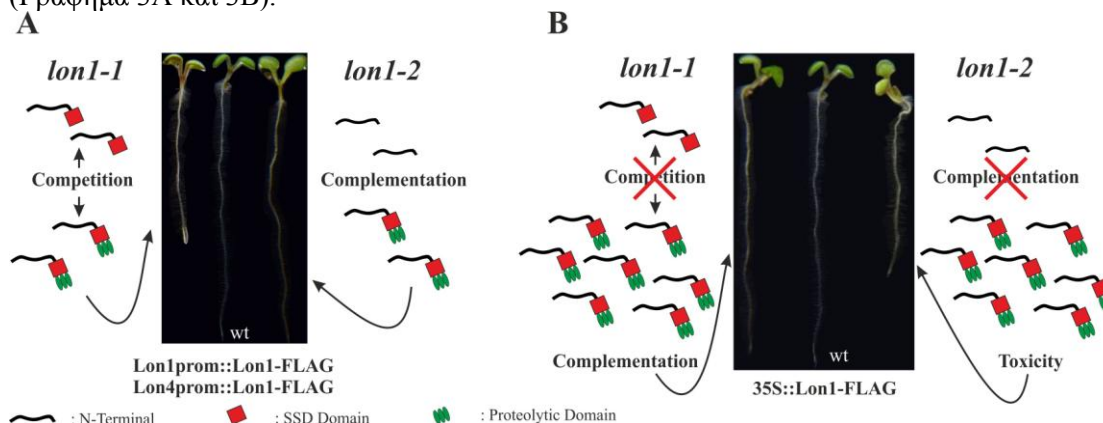


Εικόνα 26. Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεϊνικής ομοιοστάσης στα μιτοχόνδρια των αλληλομόρφων της μετάλλαξης *lon1*. Στα φυτά αγρίου τύπου *Col-0* η πρωτεΐνη Lon1 αναγνωρίζει τον στόχο της, δεσμεύεται με αυτόν και τον πρωτεολύει. Στο μετάλλαγμα *lon1-1* απουσιάζει η πρωτεολυτική περιοχή της πρωτεΐνης, όμως η επικράτεια SSD επιτρέπει στην πρωτεΐνη να αναγνωρίσει και να συνδεθεί με τον στόχο χωρίς όμως να τον καταστρέψει. Συνεπώς στη μήτρα του μιτοχονδρίου δημιουργούνται δηλητηριώδη συσσωματώματα. Στο μετάλλαγμα *lon1-2* εκτός από τη πρωτεολυτική περιοχή απουσιάζει και η επικράτεια SSD, με αποτέλεσμα η έλλειψη της λειτουργικής Lon1 να προκαλεί αναπτυξιακή υστέρηση αλλά τα πρωτεϊνικά συσσωματώματα είναι ελεύθερα να αποδομηθούν από τη δράση συμπληρωματικών πρωτεολυτικών συστημάτων του οργανιδίου. . Στα διαγονιδιακά φυτά των γενετικών υποβάρθρων *lon1* που φέρουν τις κατασκευές έκφρασης της πρωτεΐνης Lon1 υπό τον έλεγχο των ενδογενών προαγωγέων των γονιδίων *Lon1* και *Lon4*, στο μετάλλαγμα *lon1-1* η ενδογενής μεταλλαγμένη ισομορφή Lon1 ανταγωνίζεται την λειτουργική πρωτεΐνη που

συντίθεται από την έκφραση της διαγονιδιακής κατασκευής, με αποτέλεσμα τα φυτά να αναστρέφουν εν μέρει τον φαινότυπο, αλλά όχι πλήρως. Στο μετάλλαγμα *lon1-2* επειδή δεν υπάρχει ανταγωνισμός με την ενδογενή ισομορφή, η λειτουργική πρωτεάση που συντίθεται από την έκφραση της διαγονιδιακής κατασκευής αναγνωρίζει και πρωτεολύει τους στόχους της με αποτέλεσμα την πλήρη αναστροφή του φαινοτύπου.

Η υπόθεση αυτή εξηγεί επίσης τις διαφορές που παρατηρήθηκαν στην ανάπτυξη των διαγονιδιακών σειρών *Lon1prom::Lon1-FLAG* και *Lon4prom::Lon1-FLAG* μεταξύ των δύο γενετικών υποβάθρων (βλ. Αποτελέσματα Γραφ. 1A και 1B). Στο υπόβαθρο *lon1-1* οι κατασκευές συμπληρώνουν τη μετάλλαξη αλλά όχι πλήρως, σε αντίθεση με το υπόβαθρο *lon1-2* όπου τα μεταλλαγμένα φυτά παρουσιάζουν ίδια ανάπτυξη με τα φυτά αγρίου τύπου. Η διαφορά αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι στο υπόβαθρο *lon1-1* (D-3), η ενδογενής μη λειτουργική *Lon1* που φέρει την επικράτεια *SSD* ανταγωνίζεται την λειτουργική πρωτεάση που κωδικοποιεί η διαγονιδιακή κατασκευή ως προς τη δέσμευση στα υποστρώματα. Σε αντίθεση με το υπόβαθρο *lon1-1* (D-3), στον αλληλόμορφο *lon1-2* (N512797) δεν υπάρχει ανταγωνισμός, με αποτέλεσμα να αναστρέφεται πλήρως ο φαινότυπος (Εικόνα 27A).

Η υπόθεση του ανταγωνισμού του λειτουργικού διαγονιδίου με την ενδογενή μη λειτουργική πρωτεάση εξηγεί και τα αποτελέσματα των βιομετρικών αναλύσεων υπό φυσιολογικές συνθήκες των κατασκευών υπερέκφρασης της πρωτεάσης *Lon1* στα δύο υπόβαθρα. Όσον αφορά το υπόβαθρο *lon1-1*, η υπερέκφραση έχει ως αποτέλεσμα η εξωγενής λειτουργική πρωτεάση να υπερσιχθεί ποσοτικά της ενδογενούς, με αποτέλεσμα να εξαλείφεται το φαινόμενο του ανταγωνισμού και τελικά να παρατηρείται πλήρης αναστροφή του φαινοτύπου (Εικόνα 20). Έτσι, οι μετασηματισμένες σειρές 15, 16 και 20 που αναστρέφουν εντελώς τον φαινότυπο θα πρέπει να εκφράζουν πολύ την λειτουργική *Lon1*, σε αντίθεση με τις σειρές 19 και 23, οι οποίες την εκφράζουν σε μικρότερο βαθμό και τελικά δεν καταφέρνουν να υπερκεράσουν τον ενδογενή ανταγωνισμό παρουσιάζοντας μικρότερο ποσοστό συμπλήρωσης του φαινοτύπου *lon1-1* (Γράφημα 3A και 3B).



Εικόνα 27. Α) Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου ανταγωνισμού μεταξύ της ενδογενούς μεταλλαγμένης ισομορφής με τη λειτουργική ισομορφή *Lon1* σε φυτά με γενετικό υπόβαθρο *lon1-1*. Το μοντέλο εξηγεί την αδυναμία πλήρους αναστροφής του φαινοτύπου *lon1-1*, σε σχέση με τον αλληλόμορφο *lon1-2*. Μαύρο: άμινο άκρο και περιοχή AAA+, Κόκκινο τετράγωνο: SSD domain, Πράσινο: πρωτεολυτική περιοχή. Β) Υπερέκφραση της πρωτεάσης *Lon1* έχει διαφορετικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη των γενετικών υποβάθρων *lon1-1* και *lon1-2*. Στο μετάλλαγμα *lon1-1* η υπερέκφραση υπερσιχθεί τον ενδογενή ανταγωνισμό και αναστρέφει πλήρως τον φαινότυπο, ενώ στο *lon1-2* η υπερέκφραση επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη.

Έκπληξη προκάλεσαν τα αποτελέσματα των βιομετρικών αναλύσεων των κατασκευών υπερέκφρασης της πρωτεάσης *Lon1* στο υπόβαθρο *lon1-2*. Από τις πέντε σειρές μετασηματισμένων φυτών οι σειρές 2, 7 και 12 αναστρέφουν μερικώς τον φαινότυπο χωρίς όμως ποτέ η αναστροφή να είναι ίδια με τα φυτά αγρίου τύπου, ενώ ο φαινότυπος των σειρών 1 και 13 δεν διαφέρει σχεδόν καθόλου από τον φαινότυπο των μεταλλαγμάτων *lon1-2* (Γραφ. 3Γ και 3Δ). Στο υπόβαθρο *lon1-2* δεν υφίσταται ενδογενής ανταγωνισμός και η υπερέκφραση της λειτουργικής *Lon1* έχει αρνητικό αποτέλεσμα για τα φυτά καθώς φαίνεται να προκαλεί τοξικότητα στα κύτταρα. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στην απουσία του ανταγωνισμού που υπάρχει στο υπόβαθρο *lon1-1* (δηλαδή ο ανταγωνισμός είναι ο ρυθμιστικός παράγοντας που αντισταθμίζει το φαινόμενο της τοξικότητας και λόγω αυτού δεν έχουν παρόμοιους φαινοτύπους οι κατασκευές στο υπόβαθρο *lon1-1*), είτε κάποια ενδοκυτταρική αλληλεπίδραση της μεταλλαγμένης ισομορφής *lon1-2* με την λειτουργική πρωτεάση *Lon1* προκαλεί πρόβλημα στα οργανίδια το οποίο ενισχύεται με την υπερέκφραση (Εικόνα 27B). Έτσι, οι σειρές 1 και 13 που παρουσιάζουν τον χειρότερο φαινότυπο από τις συνολικά 5 σειρές, θα πρέπει να εκφράζουν ισχυρά τη κατασκευή *35S::Lon1-FLAG*, ενώ οι

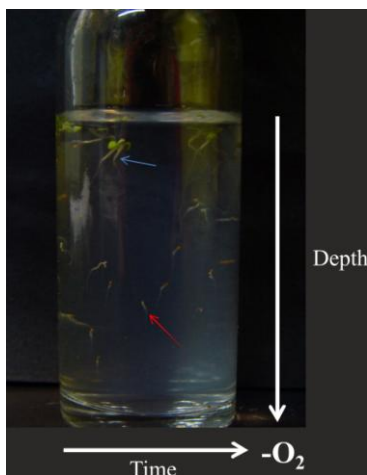
σειρές 2, 7 και 12 που καταφέρνουν και συμπληρώνουν τον φαινότυπο της μετάλλαξης *lon1-2*, εκφράζουν την κατασκευή ασθενέστερα. Η υπόθεση θα πρέπει να τεκμηριωθεί σε μοριακό επίπεδο, ελέγχοντας τα επίπεδα έκφρασης της κατασκευής και τα επίπεδα επάρκειας της πρωτεΐνης εντός κάθε σειράς μετασηματισμένων φυτών και στα δύο γενετικά υπόβαθρα. Επιπλέον, η υπερέκφραση των μεταλλαγμένων ισομορφών *Lon1-1* και *Lon1-2* σε φυτά αγρίου τύπου και στη συνέχεια η βιομετρική καταγραφή της ανάπτυξης των διαγονιδιακών σειρών αναμένεται να αποκαλύψουν στοιχεία απαραίτητα για την τεκμηρίωση της υπόθεσης του ενδογενούς ανταγωνισμού και των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης της λειτουργικής *Lon1* με τις δύο μεταλλαγμένες ισομορφές της.

4.4 Εναλλακτική πειραματική προσέγγιση είναι αναγκαία για μελέτη των επιδράσεων της οξειδωτικής καταπόνησης.

Παρόλο που η δοκιμή υποξίας στα γυάλινα φιαλίδια με ημίρευστο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης αποκάλυψε σημαντικές ενδείξεις για το ρόλο της πρωτεάσης *Lon1*, παρουσίασε συγκεκριμένες τεχνικές δυσκολίες:

α) Τα αποτελέσματα δεν είναι συγκρίσιμα με αυτά των φυτών που αναπτύσσονται σε φυσιολογικές συνθήκες αερισμού σε στερεά μέσα (τρυβλίο). Η πιο σημαντική διαφορά είναι ότι τα φυτά στο ημίρευστο μέσο δέχονται μηχανικές πιέσεις συνεργιστικά με το περιορισμό της διαθεσιμότητας οξυγόνου που ενδέχεται να παρεμβαίνουν στο πρότυπο ανάπτυξης των φυτών.

β) Το μέγεθος της οξειδωτικής καταπόνησης διαφέρει σημαντικά ακόμα και εντός του ιδίου φιαλιδίου. Η ανεπάρκεια του οξυγόνου ενισχύεται καθώς το βάθος τοποθέτησης του σπέρματος από την επιφάνεια μεγαλώνει (Εικόνα 28). Επιπλέον, η επίδραση δεν είναι σταθερή επειδή μεταβάλλεται η επάρκεια του οξυγόνου με την πάροδο του χρόνου καθώς το σπέρμα βλαστάνει και αναπτύσσεται.



Εικόνα 28. Πείραμα οξειδωτικής καταπόνησης σε αρτίβλαστα *Arabidopsis thaliana*. Η επίδραση της οξειδωτικής καταπόνησης που συνδέεται με την ενίσχυση της ανεπάρκειας οξυγόνου γίνεται σταδιακά εντονότερη με την πάροδο του χρόνου και με την αύξηση της απόστασης των φυτών από την επιφάνεια του θρεπτικού.

γ) Έπειτα από κάθε μέτρηση, τα φυτά αναγκαστικά καταστρέφονται με αποτέλεσμα να είναι αδύνατη η καταγραφή ολόκληρου του προτύπου ανάπτυξης των φυτών από την αρχή της εφαρμογής μέχρι το τέλος του πειράματος.

δ) Οι βιομετρικές καταγραφές μεταξύ τεχνικών επαναλήψεων παρουσιάζουν έντονες διακυμάνσεις.

Λαμβάνοντας υπόψιν τους παραπάνω παράγοντες είναι δυνατόν να γίνει εφαρμογή ζιζανιοκτόνων ή βιοδραστικών μορίων, όπως η Ροτενόνη, η Μεναδιόνη, το Paraquat κ.α που έχουν χαρακτηριστεί ότι επηρεάζουν την Αναπνευστική Αλυσίδα Μεταφοράς Ηλεκτρονίων ή/και την Φωτοσυνθετική Αλυσίδα Μεταφοράς Ηλεκτρονίων, δημιουργώντας ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) και προκαλώντας οξειδωτική καταπόνηση στα φυτά. Επομένως, θεωρείται σκόπιμο να γίνει δοκιμή της επίδρασης των χημικών αυτών μορίων στην ανάπτυξη των διαγονιδιακών σειρών, όπου οι συνθήκες θα είναι απόλυτα ελεγχόμενες (ο μεταβλητός παράγοντας θα είναι μονάχα η

συγκέντρωση της δραστικής ουσίας) και η βιοδοκιμή θα είναι άμεση χωρίς να καταστρέφεται το βιολογικό υλικό.

4.5 Η υπερέκφραση του γονιδίου *Lon1* προσδίδει ανθεκτικότητα σε συνθήκες ανεπάρκειας οξυγόνου.

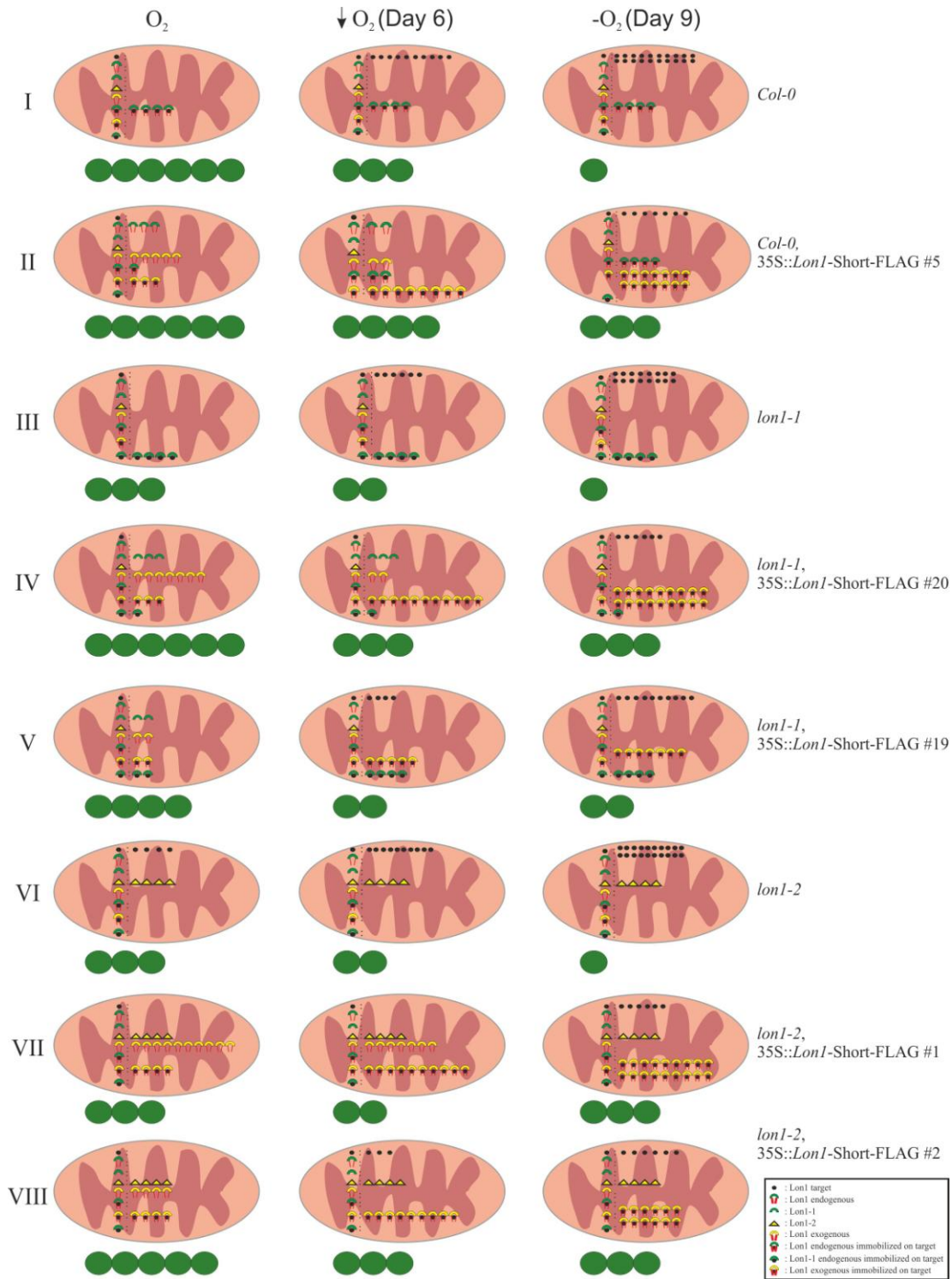
Συνολικά από τα αποτελέσματα και στα τρία γενετικά υπόβαθρα *Col-0*, *lon1-1* και *lon1-2*, προκύπτει ότι η ευρωστία του φυτού σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών (στόχων της *Lon1*) η οποία αυξάνεται όσο εντονότερη γίνεται η καταπόνηση. Λαμβάνοντας υπόψιν τους φαινοτύπους των μεταλλαγμάτων *lon1-1* και *lon1-2*, τον ενδογενή ανταγωνισμό της λειτουργικής *Lon1* με την μεταλλαγμένη *Lon1-1*, την πιθανή αρνητική αλληλεπίδραση της *Lon1* με την μεταλλαγμένη *Lon1-2* και την αύξηση των επιπέδων συσσωμάτωσης των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών λόγω οξειδωτικής καταπόνησης, όλα τα αποτελέσματα των μετρήσεων συνοψίζονται στην Εικ.31.

Στα φυτά *Col-0*, υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, όπου το επίπεδο των μετουσιωμένων πρωτεϊνών είναι χαμηλό, η πρωτεάση *Lon1* εκπληρώνει τον βιολογικό της ρόλο καταβολίζοντάς τες και τα φυτά μεγαλώνουν κανονικά (Εικόνα 31, Γραμμή I, Στήλη 1). Τα φυτά *Col-0* που υπερεκφράζουν την πρωτεάση *Lon1*, δεν παρουσίασαν υπό φυσιολογικές συνθήκες διαφορές στην πρωτογενή τους ανάπτυξη σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (Γράφημα 4). Υπό συνθήκες ανεπάρκειας οξυγόνου όμως, η συχνότητα εμφάνισης βλαβών στις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες αυξάνεται, με αποτέλεσμα η ενδογενής πρωτεάση *Lon1* να μην επαρκεί για να τις υδρολύσει όλες και όσο αυξάνει η διάρκεια της καταπόνησης, τόσο εντονότερο γίνεται το stress για τα φυτά (Εικ.31 Γραμμή I). Αντίθετα, οι διαγονιδιακές σειρές #5, #8, #12 και #13 που αναλύθηκαν παρουσίασαν ανθεκτικότητα έναντι της ανεπάρκειας οξυγόνου την 6^η ημέρα ανάπτυξης (Γραφ. 6A) (προσομοίωση υποξίας), ενώ η σειρά #5 που καταγράφηκε και ως η ισχυρότερη, παρουσίασε ανθεκτικότητα και και την 9^η ημέρα (προσομοίωση ανοξίας) (Γράφημα 6B), λόγω της υπερέκφρασης της πρωτεάσης *Lon1* που κατά συνέπεια οδηγεί σε επάρκεια της λειτουργικής πρωτεάσης (Εικ.31 Γραμμή II).

Στα δύο μεταλλάγματα, που απουσιάζει η λειτουργική *Lon1*, οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες δεν μπορούν να καταβολιστούν με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται και να προκαλούν πρόβλημα στην ανάπτυξη των φυτών (Εικ. 31, Γραμμές III και VI, Στήλη 1). Οι διαφορές μεταξύ φυσιολογικών συνθηκών και συνθηκών ανεπάρκειας οξυγόνου δεν είναι τόσο έντονες αφού ούτως ή άλλως λόγω απουσίας λειτουργικής *Lon1*, δεν υπάρχει μηχανισμός καταβολισμού των μετουσιωμένων πρωτεϊνών. Μάλιστα ο φαινότυπος των φυτών *Col-0* υπό συνθήκες προσομοίωσης υποξίας (6^η ημέρα) μοιάζει αρκετά με τους φαινοτύπους των μεταλλαγμάτων *lon1* υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης.

Στις διαγονιδιακές σειρές στα δύο μεταλλάγματα του *Lon1* το πρότυπο ανάπτυξης την 6^η ημέρα υπό συνθήκες ανεπάρκειας οξυγόνου (Γραφ. 7A και 8A) δεν διέφερε από το πρότυπο ανάπτυξης τους υπό φυσιολογικές συνθήκες (Γραφ. 3A-3B και 3Γ-3Δ). Η μόνη αξιοσημείωτη διαφορά είναι ότι οι σειρές 2 και 7 του γενετικού υποβάθρου *lon1-2*, που υπό φυσιολογικές συνθήκες συμπλήρωναν μερικώς τον φαινότυπο *lon1-2* (Γραφ. 3Γ και 3Δ), υπό συνθήκες προσομοίωσης υποξίας είχαν ίδιο μήκος ρίζας με τα φυτά αγρίου τύπου *Col-0* (Γραφ. 8A). Η εντυπωσιακότερη παρατήρηση έγινε την 9^η ημέρα ανάπτυξης υπό συνθήκες ανεπάρκειας οξυγόνου, όπου όλες οι διαγονιδιακές σειρές και στα δύο υπόβαθρα παρουσιάστηκαν στην χειρότερη περίπτωση να έχουν ίδιο πρότυπο με τα φυτά αγρίου τύπου (Γραφ. 7B και 8B) ενώ καταγράφηκαν και σειρές που είχαν παρόμοιο πρότυπο με αυτό της διαγονιδιακής σειράς #5 του γενετικού υποβάθρου *Col-0*, *35S::Lon1-FLAG* που ήταν περίπου 40% μεγαλύτερα από τα φυτά αγρίου τύπου. (Γραφ. 7B διαγονιδιακή σειρά #16, Γραφ. 8B διαγονιδιακές σειρές #1 και #2). Η δυναμική των μιτοχονδρίων των διαγονιδιακών σειρών #1 και #2 του γενετικού υποβάθρου *lon1-2* που υπερεκφράζουν την πρωτεάση *Lon1*, υπό φυσιολογικές συνθήκες και υπό συνθήκες έλλειψης οξυγόνου, αποτυπώνονται στην Εικ.31 στις γραμμές VII και VIII, αντίστοιχα. Υπο φυσιολογικές συνθήκες ο αριθμός των οξειδωμένων πρωτεϊνών (στόχων της *Lon1*) είναι χαμηλός (Εικ. 31, στήλη 1). Η διαγονιδιακή σειρά #1, η οποία εκφράζει ισχυρά το διαγονίδιο *Lon1*, πρωτεολύει τους στόχους της *Lon1*, αλλά διαθέτει και ένα πλεόνασμα της πρωτεάσης *Lon1* εντός των οργανιδίων, το οποίο προκαλεί πρόβλημα στην ανάπτυξη των φυτών (Εικ. 31, Στήλη 1, Γραμμή VII) πιθανώς

λόγω αλληλεπίδρασης με την ενδογενή μεταλλαγμένη ισομορφή. Υπό συνθήκες ανεπάρκειας οξυγόνου, ο αριθμός των μετουσιωμένων πρωτεϊνών στόχων της Lon1 αυξάνεται, το πλεόνασμα των ελεύθερων μορίων Lon1 μειώνεται καθώς αξιοποιούνται τα μόρια για να καταβολίσουν τους μετουσιωμένους στόχους, όμως ένας σημαντικός αριθμός μορίων παραμένει ελεύθερος εντός του οργανιδίου και προκαλεί προβλήματα (σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου, δεν παρατηρείται κάποιο πλεονέκτημα έναντι της καταπόνησης, Εικ. 31, στήλη 2, Γραμμές VII και I). Όταν η καταπόνηση γίνεται πολύ έντονη (Εικ. 31, στήλη 3), τα φυτά της σειράς #1, αποκτούν πλεονέκτημα έναντι των φυτών του αγρίου τύπου, καθώς το πλεόνασμα της πρωτεάσης Lon1 που στα προηγούμενα στάδια δημιουργούσε πρόβλημα στα φυτά, αξιοποιείται για να καταβολίσει τις πολλές πλέον οξειδωμένες πρωτεΐνες. Η διαγονιδιακή σειρά #2, η οποία εκφράζει ασθενέστερα την διαγονιδιακή Lon1, παρουσιάζει ηπιότερο φαινότυπο από την σειρά #1, πίο κοντά προς τον φαινότυπο των φυτών αγρίου τύπου. Αυτό συμβαίνει επειδή στα μιτοχόνδρια των φυτών της διαγονιδιακής σειράς, υπάρχει λιγότερο πλεόνασμα της πρωτεάσης Lon1 (Εικ.31, Γραμμή VIII). Υπό συνθήκες ανεπάρκειας οξυγόνου, όπως και με τη σειρά #1, τα φυτά αξιοποιούν το πλεόνασμα της Lon1 που έχουν για να προστατέψουν τα μιτοχόνδρια τους από την οξειδωτική καταπόνηση, και επειδή όπως αναφέρθηκε και προηγούμενα, η υπερέκφραση δεν είναι τόσο έντονη εντός της σειράς, ο φαινότυπος των φυτών είναι παρόμοιος με των φυτών αγρίου τύπου (Εικ. 31, στήλη 2, Γραμμές VIII και I). Την 9η ημέρα υπό ανεπάρκεια οξυγόνου, τα φυτά παρουσιάζουν σαφές πλεονέκτημα έναντι των φυτών αγρίου τύπου (όπως και η σειρά #1) καθώς το πλεόνασμα της πρωτεάσης Lon1 στα μιτοχόνδρια προστατεύει το πρωτέωμα του οργανιδίου καταβολίζοντας τις μετουσιωμένες πρωτεΐνες (Εικ. 31, στήλη 3, Γραμμές VIII, VII και I).



Εικόνα 29. Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεϊνικής ομοιοστάσης στα μιτοχόνδρια διαγονιδιακών σειρών φυτών που υπερεκφράζουν την πρωτεάση Lon1 υπό φυσιολογικές συνθήκες επάρκειας O_2 (Αριστερή Στήλη), υπό συνθήκες υποξίας που παρατηρούνται την 6 ημέρα ανάπτυξης σε ημίρρευστο μέσο (Μεσαία Στήλη) και υπό συνθήκες ανοξίας που παρατηρούνται την 9 ημέρα ανάπτυξης σε ημίρρευστο μέσο (Δεξιά Στήλη). Στην εικόνα αναπαρίστανται **Γραμμή I:** φυτά αγρίου τύπου *Col-0*, **Γραμμή II:** η διαγονιδιακή σειρά #5 από τα μετασχηματισμένα φυτά *Col-0* με την κατασκευή 35S::Lon1-FLAG που έδειξε και την μεγαλύτερη ανθεκτικότητα έναντι των συνθηκών καταπόνησης, **Γραμμή III:** το μετάλλαγμα *lon1-1*, **Γραμμή IV:** οι διαγονιδιακή σειρά #20 και **Γραμμή V:** η διαγονιδιακή σειρά #19 στο γενετικό υπόβαθρο *lon1-1* που υπερεκφράζει την πρωτεάση Lon1(#20 ισχυρή έκφραση και η #19 ασθενής έκφραση), **Γραμμή VI:** το μετάλλαγμα *lon1-2* και διαγονιδιακές σειρές γενετικού υπόβαθρου *lon1-2* που υπερεκφράζουν την πρωτεάση Lon1; **Γραμμή VII:** Διαγονιδιακή σειρά #1 (ισχυρή έκφραση) και **Γραμμή VIII:** Διαγονιδιακή σειρά #2 (ασθενής έκφραση). Σε κάθε περίπτωση αναπαρίστανται με σύμβολα εντός των μιτοχονδρίων τα υποστρωμάτων της πρωτεάσης Lon1, οι υπομονάδες (λειτουργικές ή μη) της ενδογενούς Lon1, οι υπομονάδες Lon1 που συντίθενται από τις διαγονιδιακές κατασκευές και των συμπλόκων Lon1/υποστρωμάτων (βλέπε υπόμνημα εικόνας). Οι πράσινες σφαίρες κάτω από κάθε μιτοχόνδριο αποδίδουν την κατάσταση των φυτών σε κάθε συνθήκη (με βάση την βιομετρική ανάλυση).

Στο υπόβαθρο *lon1-1*, η σειρά #20 που είναι ισχυρά εκφράζουσα διαγονιδιακή σειρά, έχει περισσότερα λειτουργικά από ότι ενδογενή μεταλλαγμένα μόρια της πρωτεάσης. Αποτέλεσμα αυτού είναι ότι τα φυτά καταφέρνουν και ξεπερνούν τον ανταγωνισμό ως προς την πρόσδεση στο υπόστρωμα της ενδογενούς μεταλλαγμένης πρωτεάσης *Lon1* με την λειτουργική πρωτεάση που έχει εισαχθεί με το διαγονίδιο, καθώς αυτή υπερέχει κατά πολύ αριθμητικά. Έτσι, αποτρέπεται η δημιουργία πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων που οφείλονται στην πρόσδεση της μεταλλαγμένης *Lon1-1* στο υπόστρωμα, ενώ φυσικά, καταβολίζονται και οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες από τα λειτουργικά μόρια *Lon1* (Εικ. 31, Γραμμή IV). Αντίθετα, η διαγονιδιακή σειρά #19 η οποία εκφράζει ασθενέστερα το διαγονίδιο, δεν καταφέρει να ξεπεράσει τον ανταγωνισμό, με αποτέλεσμα να παραμένουν πρωτεϊνικά συσσωματώματα εντός των μιτοχονδρίων των φυτών και τελικά τα φυτά παρουσιάζουν χειρότερο φαινότυπο από ότι τα φυτά της σειράς #20 (Εικ. 31, Γραμμή V). Την 6^η ημέρα ανεπάρκειας οξυγόνου που η καταπόνηση είναι σχετικά ήπια, δεν σημειώθηκαν διαφορές από το πρότυπο ανάπτυξης υπό φυσιολογικές συνθήκες ούτε στη σειρά #20 ούτε στη σειρά #19, έναντι των φυτών αγρίου τύπου (βλ. παρ. 3). Την 9^η ημέρα υπό συνθήκες ανεπάρκειας οξυγόνου όπου το ποσοστό των συσσωματωμένων πρωτεϊνών αυξάνει πάρα πολύ, η διαγονιδιακή σειρά #20 παρουσιάζει σαφές πλεονέκτημα έναντι των φυτών αγρίου τύπου, ενώ και η σειρά #19, παρουσιάζει και αυτή ένα μικρό πλεονέκτημα έναντι των φυτών *Col-0*, αλλά σε μικρότερο βαθμό από ότι η σειρά #20, καθώς η σειρά #19 εκφράζει το διαγονίδιο ασθενέστερα (Εικ. 31, Σειρές V, IV και I).

Συνοψίζοντας, όλη αυτή η σειρά των κατασκευών και των πειραμάτων έγινε με σκοπό την μελέτη του ρόλου της πρωτεάσης *Lon* στην ανάπτυξη του φυτού και στην διατήρηση της ομοιόστασης και φυσιολογικής λειτουργίας των δύο υποκυτταρικών οργανιδίων του φυτού, τα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες. Τα πρώτα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά καθώς απαντούν μια σειρά ερωτήσεων που αφορούν στο λειτουργικό ρόλο της πρωτεάσης *Lon* στα μιτοχόνδρια ενώ επισημαίνουν και νέες κατευθύνσεις για το σχεδιασμό πειραμάτων για την ολοκλήρωση της μελέτης στα μιτοχόνδρια και στην εκκίνηση των πειραμάτων στους χλωροπλάστες.

Οι ακραίες περιβαλλοντικές θερμοκρασίες, η υψηλής ενέργειας ηλιακή ακτινοβολία, η ξηρασία, η αύξηση της αλατότητας των εδαφών και του αρδεύσιμου νερού έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή εντός του φυτού ενεργών μορφών οξυγόνου οι οποίες είναι καταστροφικές για τα βιομόρια. Η οξειδωτική καταπόνηση θα αποτελέσει εμμέσως ένα από κυριότερα προβλήματα για την πρωτογενή αγροτική παραγωγή ενώ η επίτευξη υψηλής απόδοσης φυτικής παραγωγής υπό συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης θα αποτελέσει μία από τις κυριότερες βιοτεχνολογικές προκλήσεις στο άμεσο μέλλον. Η κατανόηση του λειτουργικού ρόλου των *Lon* στα φυτά θα παρέχει εντυπωσιακά δεδομένα για τη διατήρηση της ομοιόστασης των οργανιδίων, τη λειτουργική ακεραιότητα και την αντοχή των φυτών υπό αυτό το νέο πρίσμα περιβαλλοντικών συνθηκών.

Βιβλιογραφία

Βιβλιογραφία

Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373-99

Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796–805

Becker ., Kemper E, Schell J and Masterson R (1992) New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Molecular Biology* 20:1195-1197

Bota DA, Davies KJ (2002) Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. *Nat Cell Biol* 4:674–680

Donch J, Greenberg J (1968) Genetic analysis of lon mutants of strain K-12 of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 103: 105-115

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

Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239-247

Friguet B, Bulteau AL, Petropoulos I (2008) Mitochondrial protein quality control: implications in ageing. *Biotechnol J* 3:757-764

Graham IA (2008) Seed storage oil mobilization. *Annu Rev Plant Biol* 59: 115-142

Gur E, Sauer RT (2009) Degrons in protein substrates program the speed and operating efficiency of the AAA+ Lon proteolytic machine. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:18503-1858

Hansen J, Corydon TJ, Palmfeldt J, Durr A, Fontaine B, Nielsen MN, Christensen JH, Gregersen N, Bross P (2008) Decreased expression of the mitochondrial matrix proteases Lon and ClpP in cells from a patient with hereditary spastic paraplegia (SPG13). *Neuroscience* 153: 474-482

Harman D (1957) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 2: 298-300

Howell KA, Millar AH, Whelan J (2006) Ordered assembly of mitochondria during rice germination begins with pro-mitochondrial structures rich in components of the protein import apparatus. *Plant Mol Biol* 60: 201-223

Iyer LM, Leipe DD, Koonin EV, Aravind L (2004) Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *Journal of Structural Biology* 146:11–31

Kwong JQ, Beal MF, Manfredi G (2006) The role of mitochondria in inherited neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 97:1659–1675

- Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, Prolla TA (1999) Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* 285: 1390–1393
- Lingard MJ, Bartel B (2009) Arabidopsis LON2 is necessary for peroxisomal function and sustained matrix protein import. *Plant Physiol* 151: 1354-1365
- Lu B, Yadav S, Shah PG, Liu T, Tian B, Puksza S, Villaluna N, Kutejová E, Newlon CS, Santos JH, Suzuki CK (2007) Roles for the human ATP-dependent Lon protease in mitochondrial DNA maintenance. *Journal of Biological Chemistry* 282:17363-17374
- Luce K, Osiewacz HD (2009) Increasing organismal healthspan by enhancing mitochondrial protein quality control. *Nat Cell Biol* 11: 852-858
- Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koorneef M, (1998) Arabidopsis thaliana : A model plant for genome analysis. *Science* 282:662-682
- Moller IM, Sweetlove LJ (2010) ROS signaling - specificity is required. *Trends Plant Sci* 15:370-374
- Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV (1999) AAA+ : a class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Research* 9:27–43
- Ostersetzer O, Kato Y, Adam Z, Sakamoto W (2007) Multiple intracellular locations of Lon protease in Arabidopsis: evidence for the localization of AtLon4 to chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 48:881-885
- Penfield S, Graham S, Graham IA (2005) Storage reserve mobilization in germinating oilseeds: Arabidopsis as a model system. *Biochem Soc Trans* 33:380-383
- Rep M, van Dijl M, Suda K, Schatz G, Grivell LA, Suzuki CK (1996) Promotion of mitochondrial membrane complex assembly by a proteolytically inactive yeast Lon. *Science* 274:103–106
- Rigas S, Daras G, Laxa M, Marathias N, Fasseas C, Sweetlove LJ, Hatzopoulos P (2009a) The role of Lon1 protease in post-germinative growth and maintenance of mitochondrial function in Arabidopsis thaliana. *New Phytol* 181:588-600
- Rigas S, Daras G, Sweetlove LJ, Hatzopoulos P (2009b) Mitochondria biogenesis via Lon1 selective proteolysis: who dares to live for ever? *Plant Signal Behav* 4:221-224
- Strobel I, Breitenbach J, Scheckhuber CQ, Osiewacz HD, Sandmann G (2009) Carotenoids and carotenogenic genes in *Podospora anserina*: engineering of the carotenoid composition extends the life span of the mycelium. *Curr Genet* 55:175-184
- 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
- Taiz L, Zeiger E (2010) Plant Physiology, 5th edition, Sinauer Publishers, Stanford, Connecticut, USA. ISBN: 978-0-87893-507-9

Χατζόπουλος Π, (2001). Βιοτεχνολογία Φυτών, Αθήνα, Εκδόσεις ΕΜΒΡΥΟ.

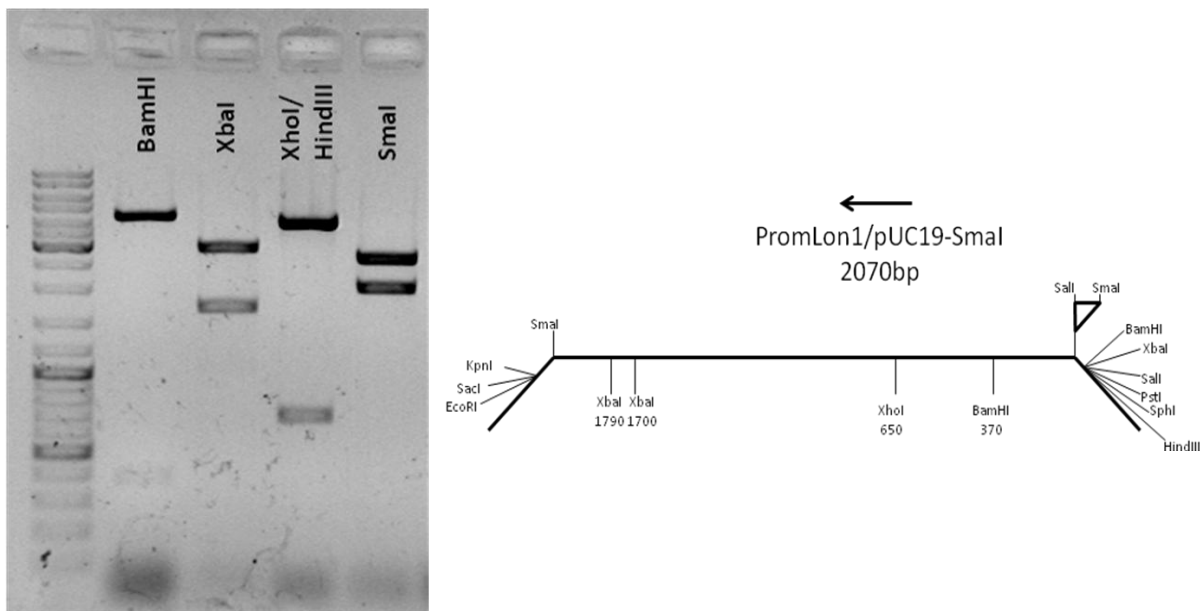
Παράρτημα

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. Στρατηγική κλωνοποίησης των κατασκευών που χρησιμοποιήθηκαν

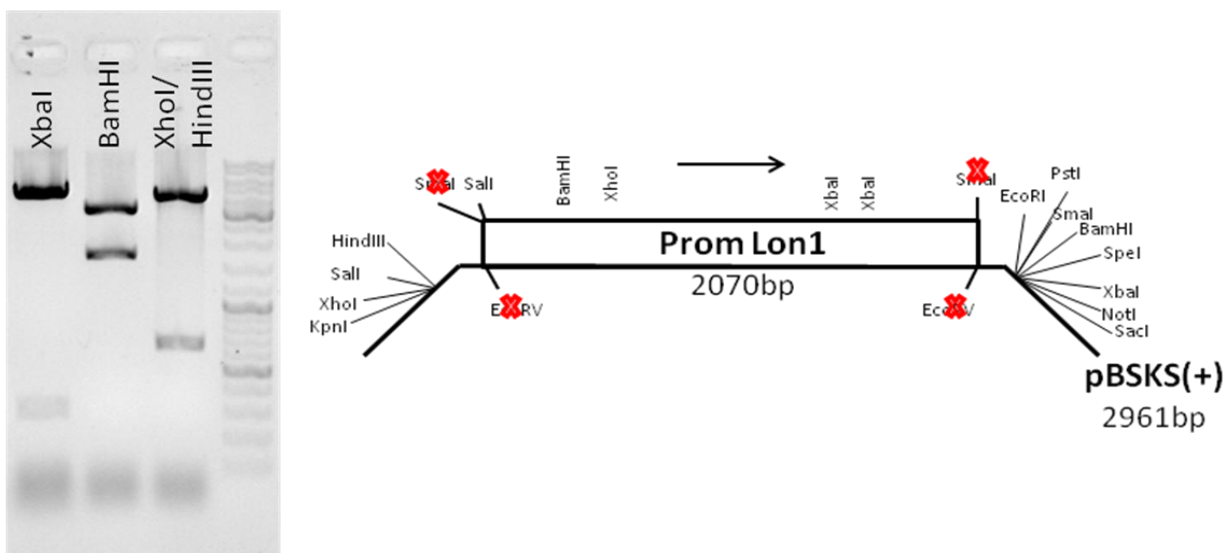
Lon1Prom:Lon1-FLAG

Με τους εκκινητές [For-26860/Lon1-prom-Rev] ενισχύθηκε ο προαγωγέας του γονιδίου Lon1 από το BAC F21P16. Το προϊόν PCR κλωνοποιήθηκε στη θέση SmaI του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pUC19.



Εικόνα Π1. Χαρτογράφηση και χάρτης του κλώνου promLon1/pUC19.

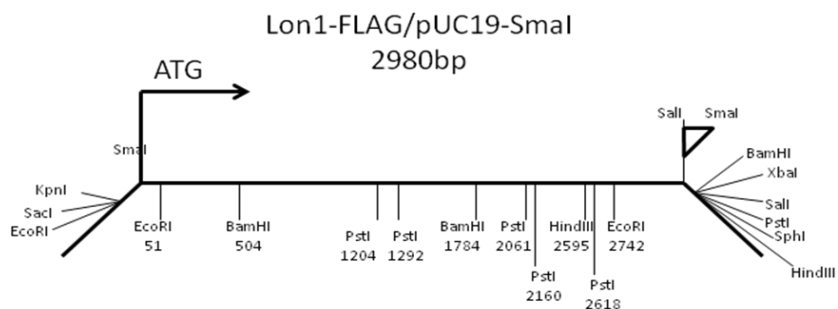
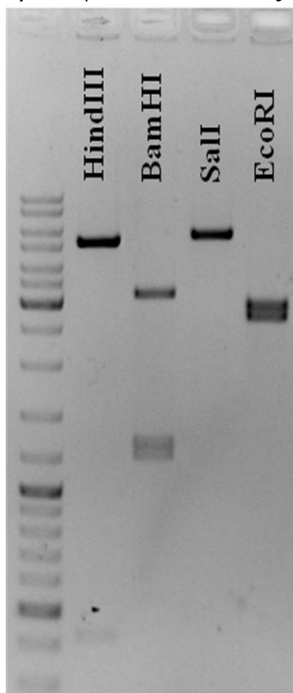
Στη συνέχεια, απομονώθηκε ο προαγωγέας Lon1 με πέψη, με το ένζυμο SmaI και κλωνοποιήθηκε στην EcoRV θέση του φορέα κλωνοποίησης pBluescriptII KS [+]. Οι θέσεις SmaI και EcoRV δίνουν μόρια DNA με τυφλά άκρα. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να γίνει κλωνοποίηση χρησιμοποιώντας τα 2 ένζυμα.



Εικόνα Π2. Χαρτογράφηση και χάρτης του κλώνου Lon1prom/pBSKS(+).

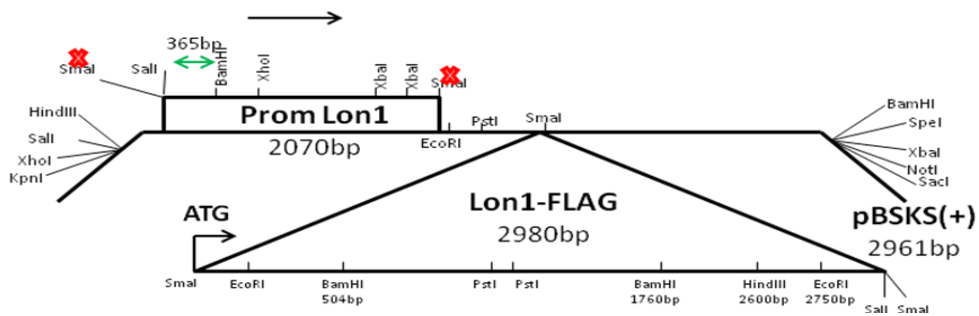
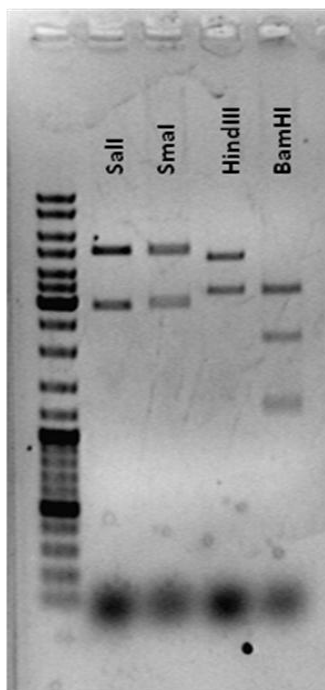
Το γονίδιο Lon1 σε σύντηξη με το επίτοπο FLAG, απομονώθηκε με PCR με τους εκκινητές Lon1 w/o strand και Lon1-FLAG-Rev και το προϊόν της αντίδρασης κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό

φορέα κλωνοποίησης pUC19. Ο κλώνος εστάλη για αλληλούχιση για να πιστοποιηθεί ότι δεν έχει προκύψει κάποιο λάθος κατά την αντίδραση PCR.



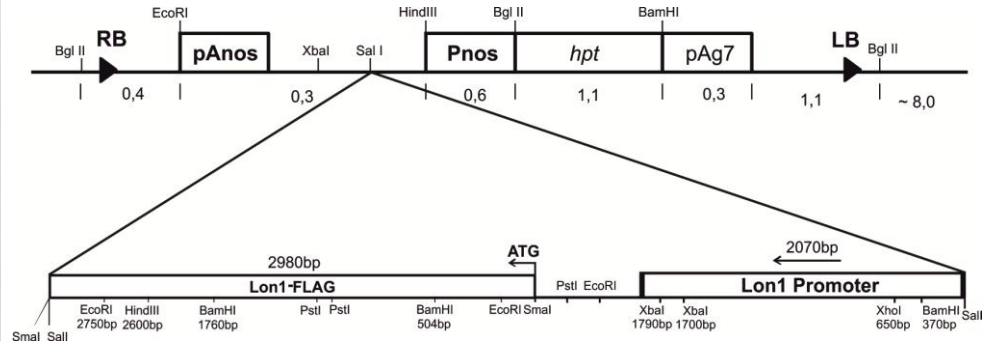
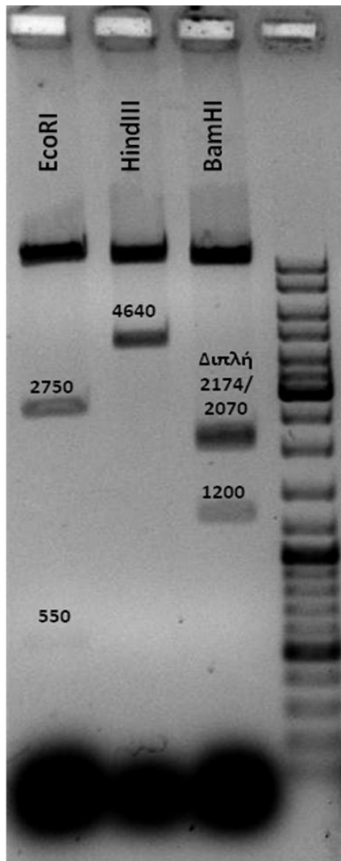
Εικόνα Π3. Χαρτογράφηση και χάρτης του κλώνου Lon1-FLAG/pUC19.

Στη συνέχεια με πέψη με το ένζυμο SmaI απομονώθηκε το γονίδιο Lon1-FLAG και κλωνοποιήθηκε στη SmaI θέση του κλώνου Lon1prom/pBSKS(+).



Εικόνα Π4. Χαρτογράφηση και χάρτης του κλώνου promLon1::Lon1-FLAG/pBSKS(+).

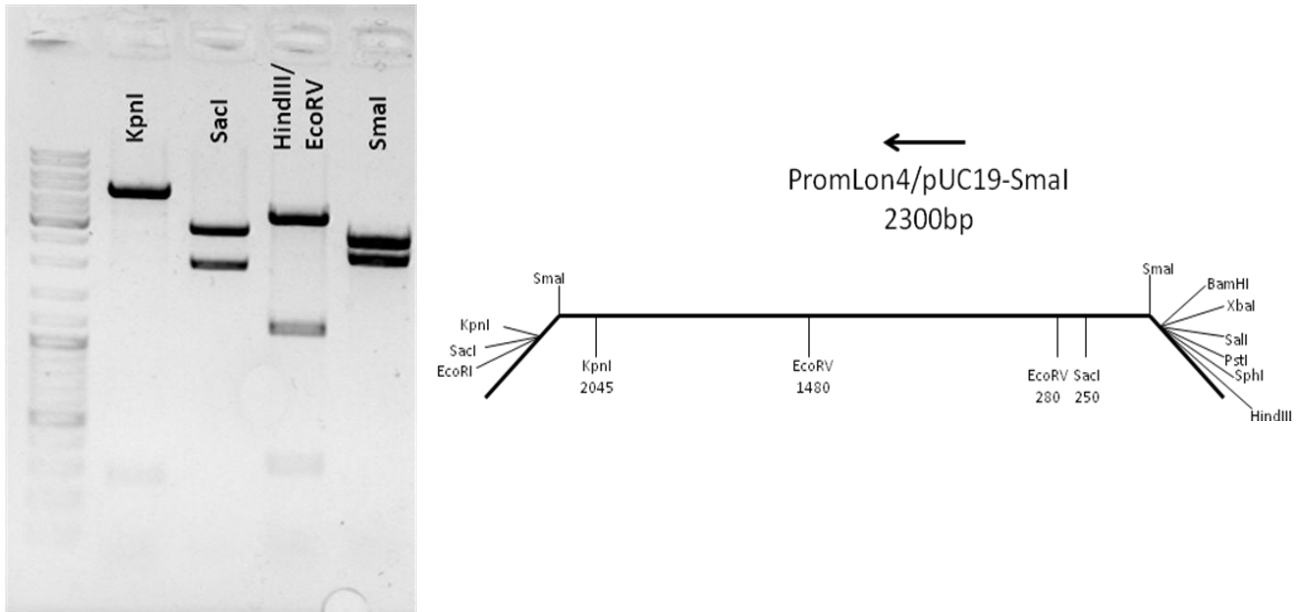
Τελικά, ολόκληρη η κατασκευή (προαγωγέας και γονίδιο) απομονώθηκε από τον pBluescript με το ένζυμο περιορισμού SalI και κλωνοποιήθηκε στη SalI θέση του δυαδικού φορέα HPT-pAnos XS.



Εικόνα Π5. Χαρτογράφηση και χάρτης του κλώνου *promLon1::Lon1-FLAG/HPT-pAnos XS*.

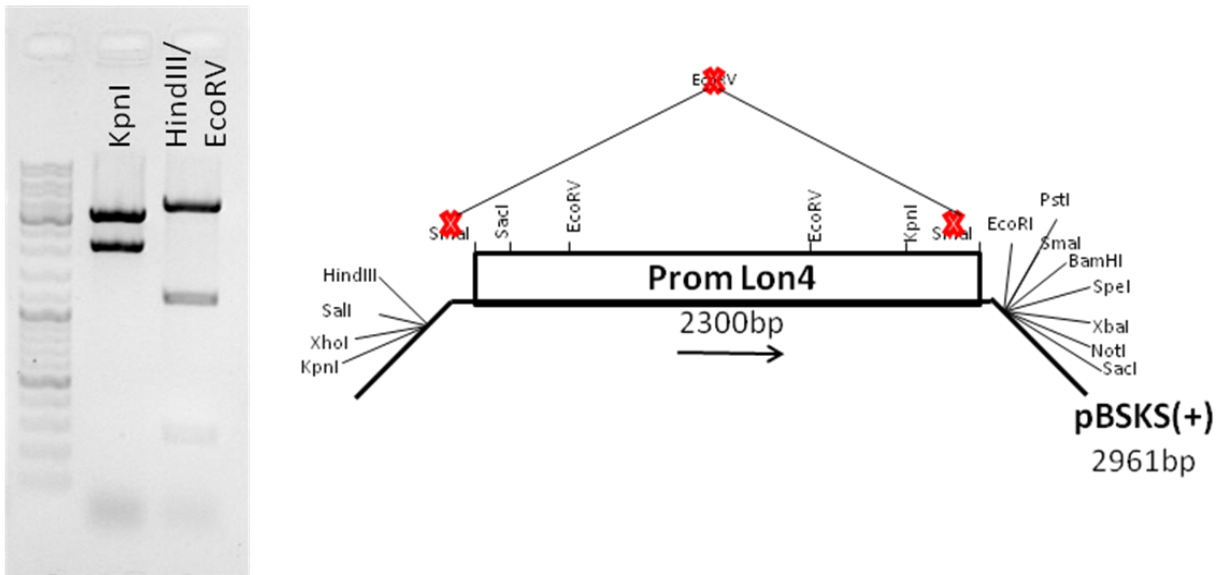
Lon4Prom:Lon1-FLAG

Με χρήση των εκκινητών [Lon4-com-For/ Lon4-prom-Rev] ενισχύθηκε ο προαγωγέας του γονιδίου *Lon4* από το BAC F10A16. Το προϊόν της αντίδρασης PCR, κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης pUC19.



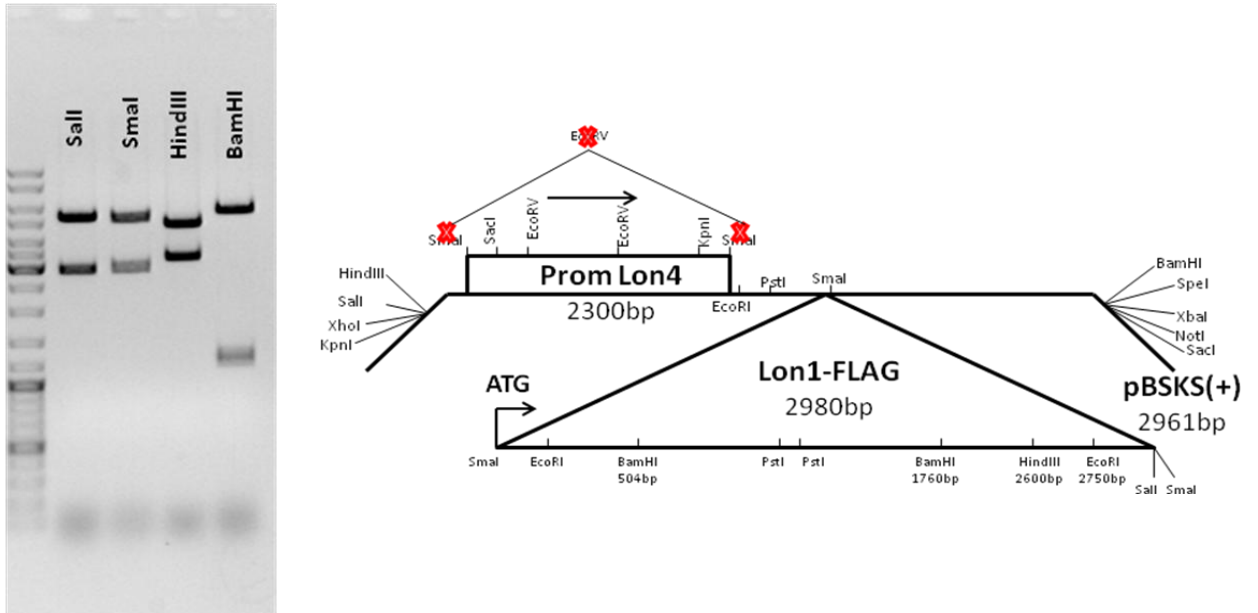
Εικόνα Π6. Χαρτογράφηση και χάρτης του κλώνου *promLon4/pUC19*.

Ο προαγωγέας του γονιδίου *Lon4* απομονώθηκε από τον φορέα pUC19 με πέψη με το ένζυμο περιορισμού *SmaI* και κλωνοποιήθηκε στην *EcoRV* θέση του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης pBluescript II KS [+].



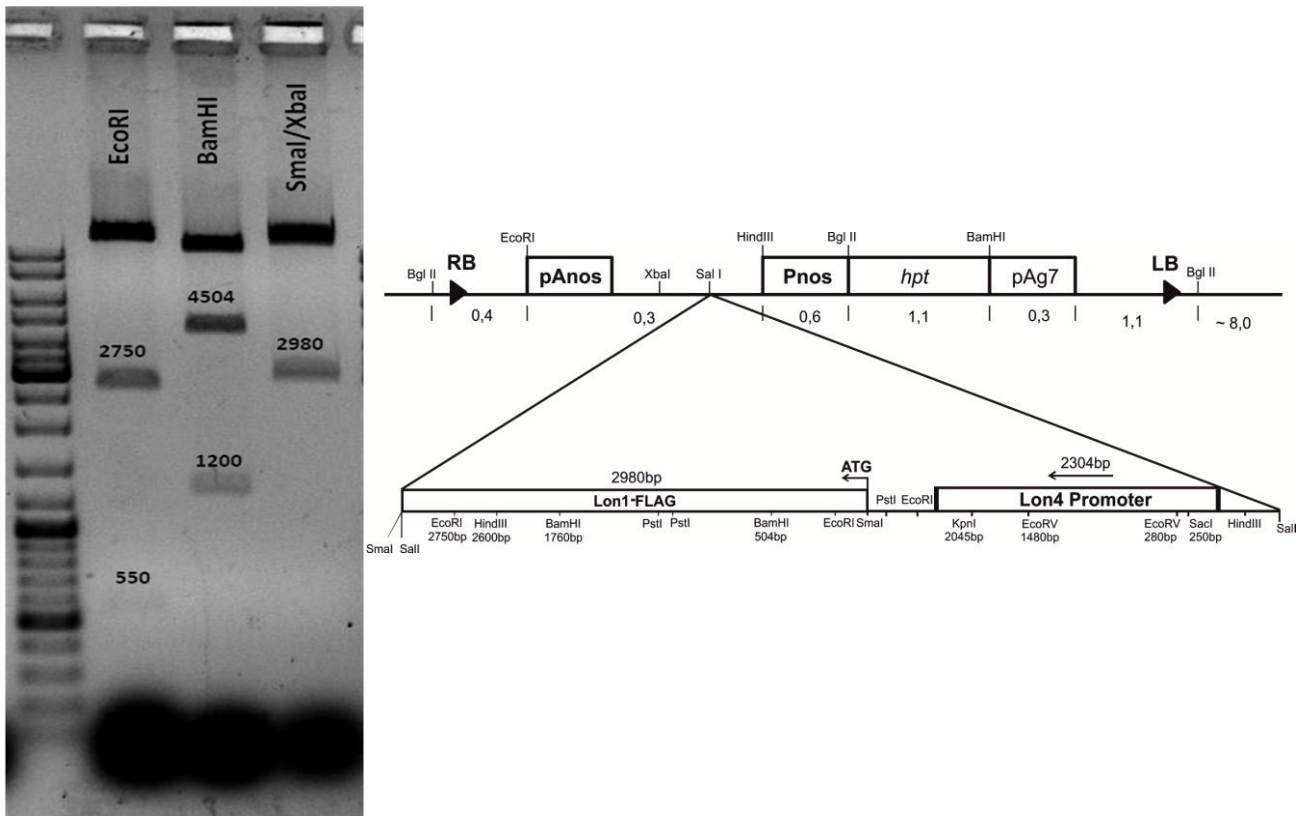
Εικόνα Π7. Χαρτογράφηση και χάρτης του κλώνου *Lon4prom/pBSKS(+)*.

Στη συνέχεια το γονίδιο *Lon1* με το επίτοπο FLAG (βλ. Εικ. Π3), κλωνοποιήθηκε στη θέση *SmaI* του κλώνου *promLon4/pBSKS(+)*.



Εικόνα Π8. Χαρτογράφηση και χάρτης του κλώνου *promLon1::Lon1-FLAG/pBSKS(+)*.

Τέλος, ολόκληρη η κατασκευή απομονώθηκε με το ένζυμο περιορισμού *SalI* και κλωνοποιήθηκε στη θέση *SalI* του δυαδικού φορέα HPT-pAnos XS.



Εικόνα Π9. Χαρτογράφηση και χάρτης του κλώνου *promLon4::Lon1-FLAG/HPT-pAnos XS*.

CaMV 35S::Lon1-FLAG

Ο καθολικά εκφραζόμενος προαγωγέας CaMV 35S απομονώθηκε από τον δυαδικό φορέα έκφρασης pBI221 (Clontech Laboratories, Inc. CA, USA) με πέψη, με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού HindIII και SmaI (Εικ. Π10).

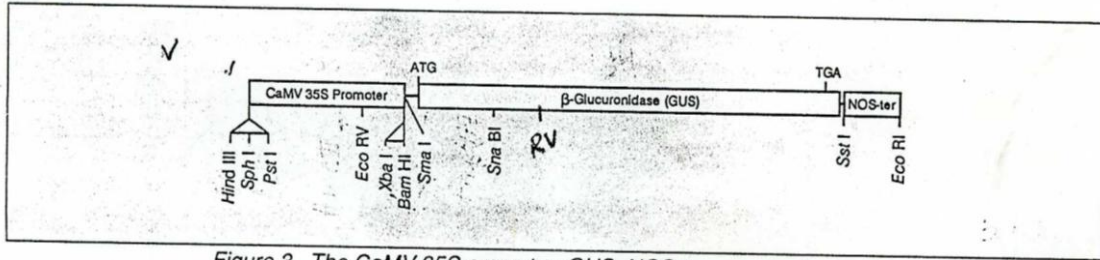
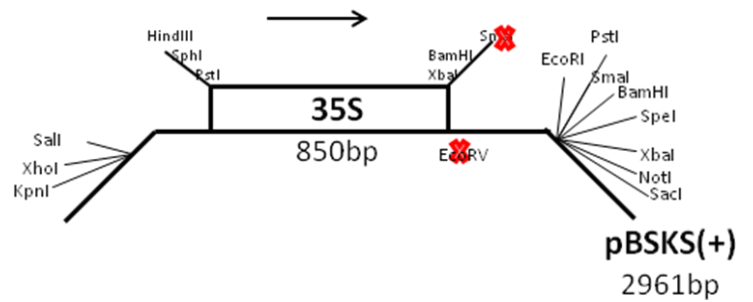
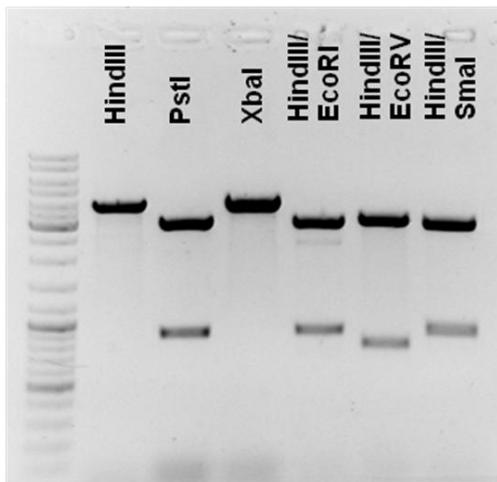


Figure 2. The CaMV 35S promoter-GUS construct.

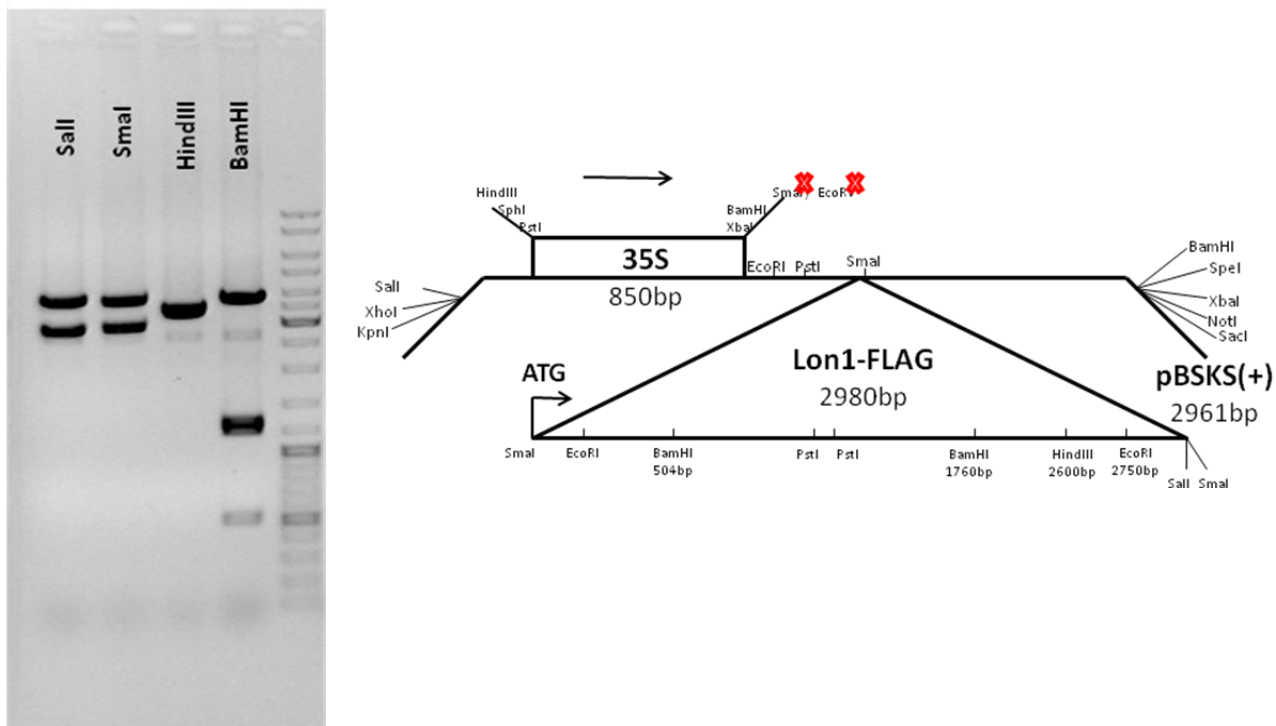
Εικόνα Π10. Χάρτης του δυαδικού φορέα pBI221 (Clontech Laboratories, Inc. CA, USA).

Στη συνέχεια ο προαγωγέας κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης pBluescript II KS [+] στις θέσεις HindIII/EcoRV (Εικ. Π11).



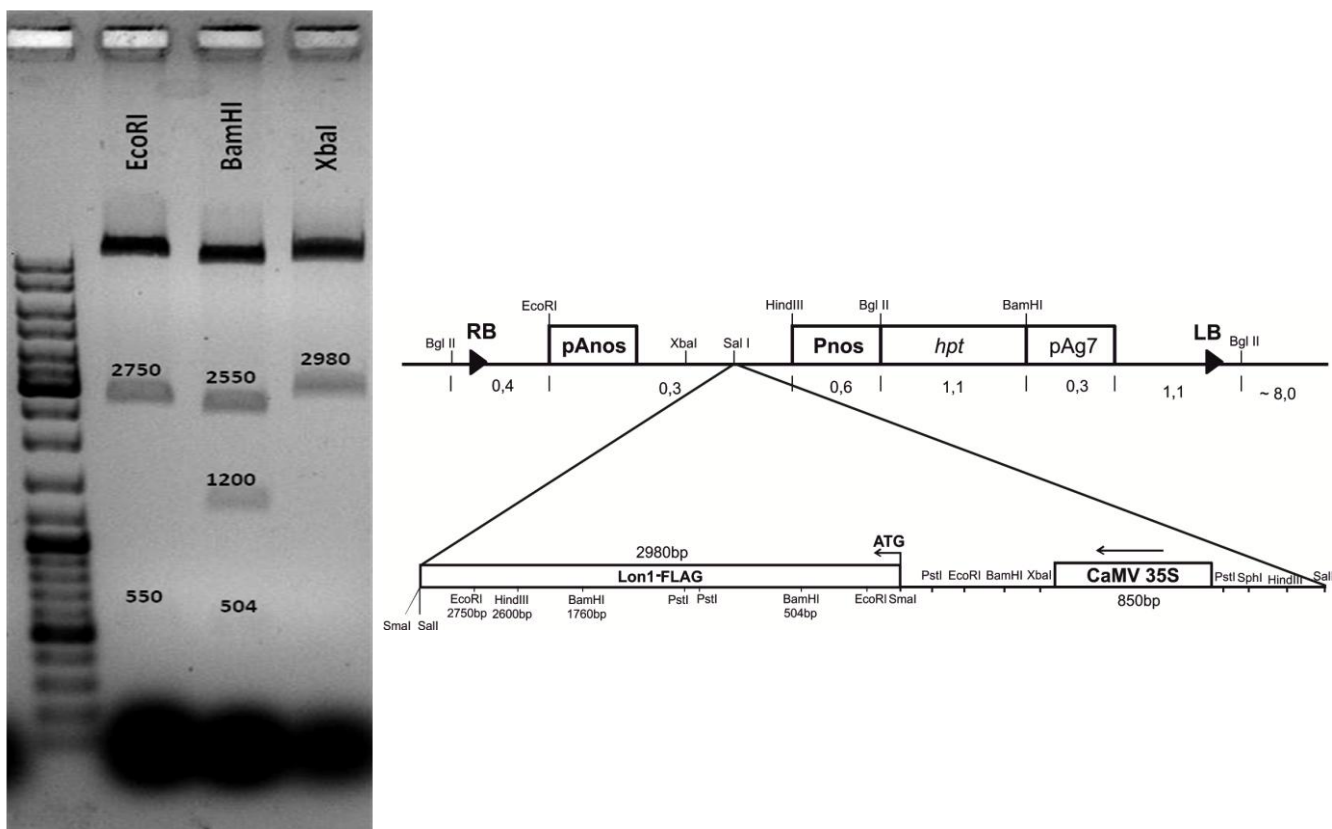
Εικόνα Π11. Χαρτογράφηση και χάρτης του κλώνου 35S/pBSKS(+).

Το γονίδιο Lon1 με το επίτοπο FLAG κλωνοποιήθηκε στη θέση SmaI του κλώνου 35S/pBSKS(+).



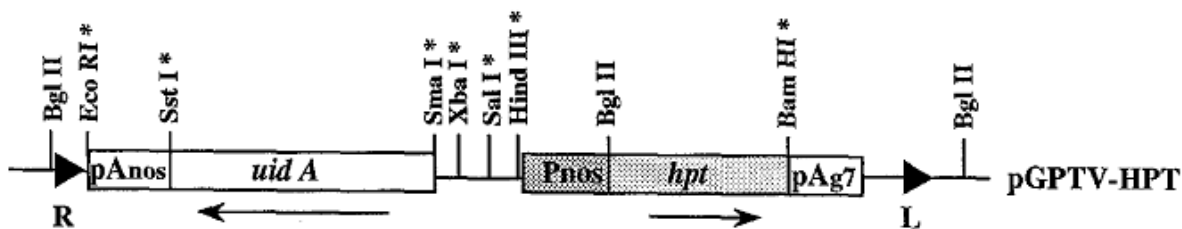
Εικόνα Π12. Χαρτογράφηση και χάρτης του κλώνου 35S::Lon1-FLAG/pBSKS(+).

Ολόκληρη η κατασκευή (35S::Lon1-FLAG), απομονώθηκε με πέψη με το ένζυμο περιορισμού SalI και κλωνοποιήθηκε στη SalI θέση του δυαδικού φορέα HPT-pAnos XS.

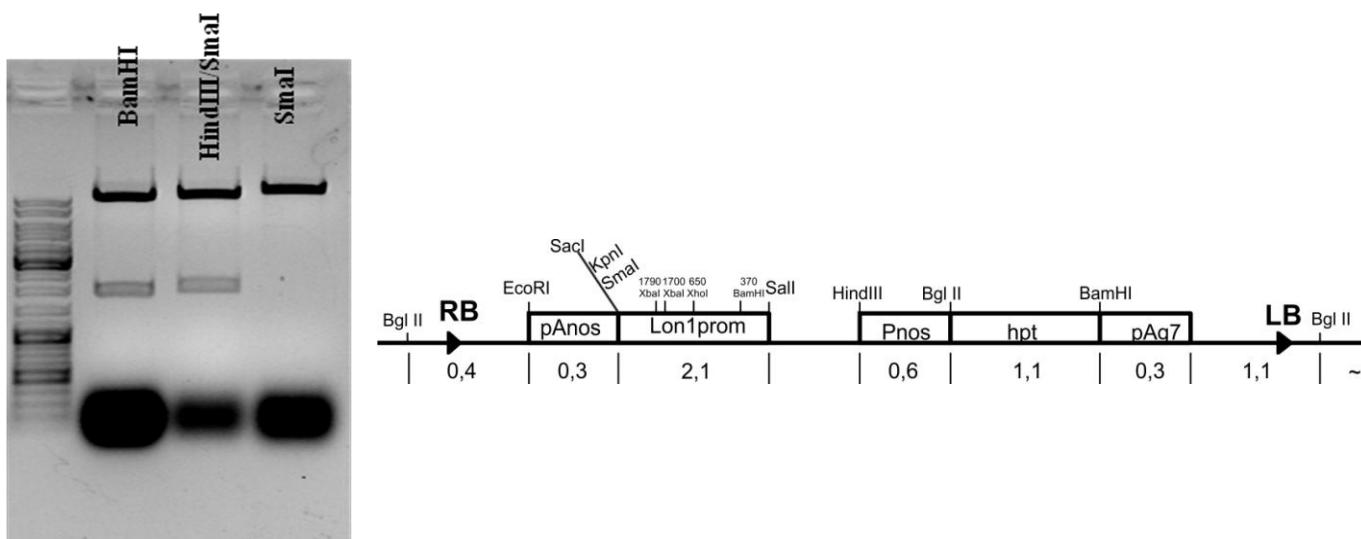


Εικόνα Π13. Χαρτογράφηση και χάρτης του κλώνου CaMV 35S::Lon1-FLAG/HPT-pAnos XS.

Στη συνέχεια απομονώθηκε ο προαγωγέας του γονιδίου Lon1 από τον κλώνο Lon1prom/pUC19 (Εικ. Π1) με τα ένζυμα περιορισμού SacI και SalI. Από τον δυαδικό φορέα pGPTV-HPT (Εικ. Π16) αφαιρέθηκε το γονίδιο *uidA* με πέψη με τα ένζυμα περιορισμού SacI (SstI και SacI αναγνωρίζουν την ίδια αλληλουχία DNA) και SalI και στη θέση του κλωνοποιήθηκε ο προαγωγέας του γονιδίου Lon1 που είχε απομονωθεί πριν (Εικ Π17).

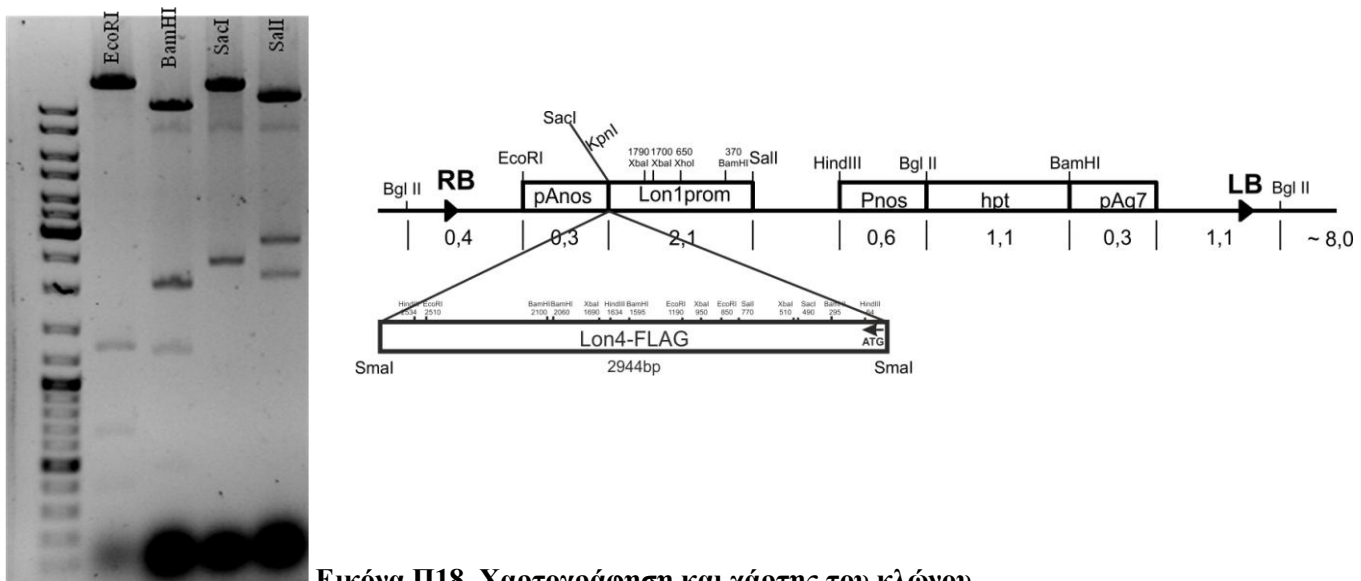


Εικόνα Π16. Χάρτης του δυαδικού φορέα pGPTV-HPT (Becker et al. 1992).



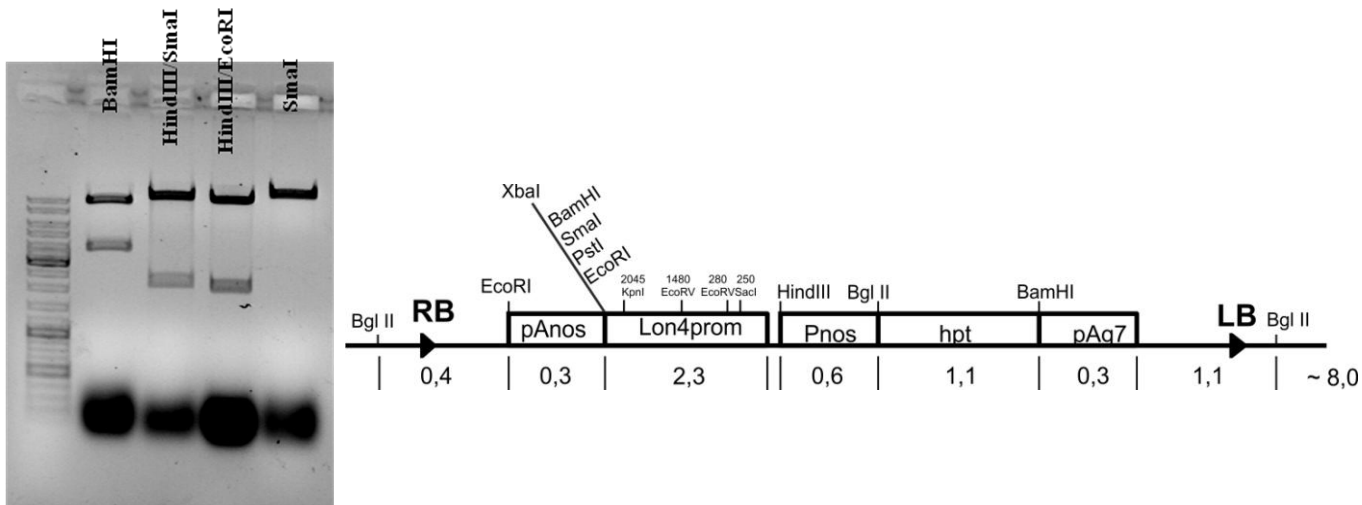
Εικόνα Π17. Χαρτογράφηση και χάρτης του κλώνου Lon1prom/pGPTV-HPT.

Το γονίδιο Lon4 με το επίτοπο FLAG απομονώθηκε από τον κλώνο Lon4-FLAG/pUC19 με πέψη με το ένζυμο περιορισμού SmaI και κλωνοποιήθηκε στη SmaI θέση του κλώνου Lon1prom/pGPTV-HPT (Εικ. Π18).



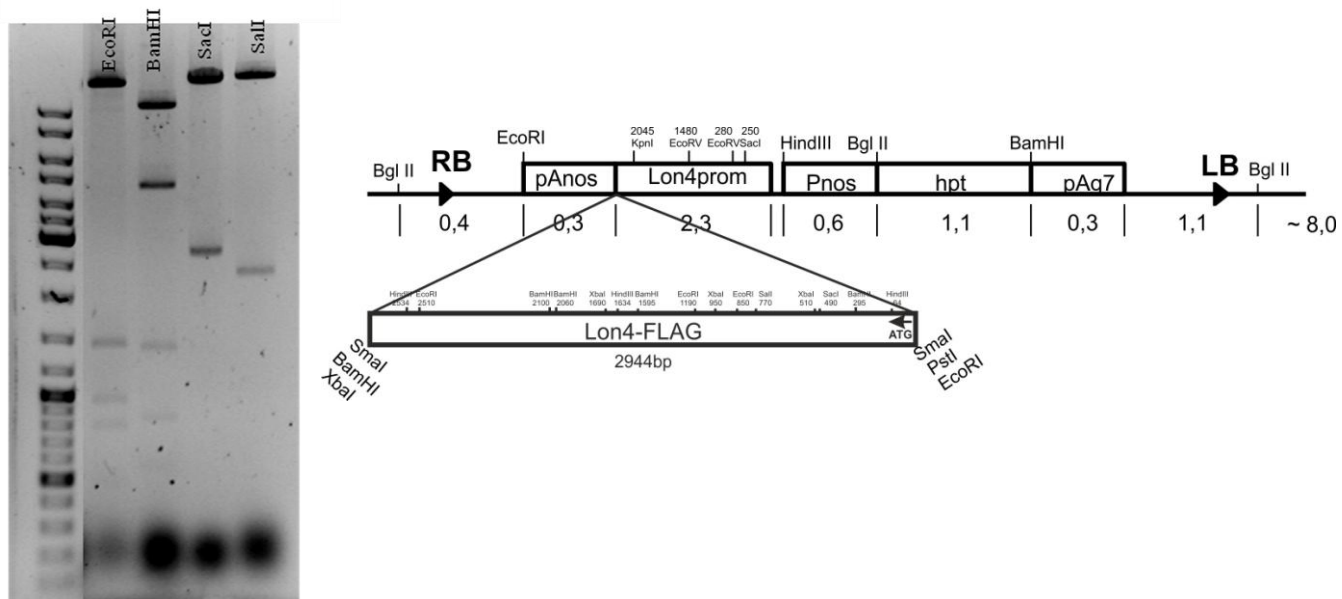
Εικόνα Π18. Χαρτογράφηση και χάρτης του κλώνου Lon1prom::Lon4-FLAG/pGPTV-HPT.
Lon4prom::Lon4-FLAG

Ο προαγωγέας του γονιδίου *Lon4* απομονώθηκε από τον κλώνο Lon4prom/pBSKS(+) (Εικ. Π17) με διπλή πέψη, χρησιμοποιώντας τα ένζυμα HindIII και XbaI. Ο δυαδικός φορέας HPT-pAnos XS (Εικ. Π14) κόπηκε με τα ένζυμα HindIII και XbaI και ο Lon4prom κλωνοποιήθηκε σε αυτές τις θέσεις (Εικ. Π19).



Εικόνα Π19. Χαρτογράφηση και χάρτης του κλώνου Lon4prom/ HPT-pAnos.

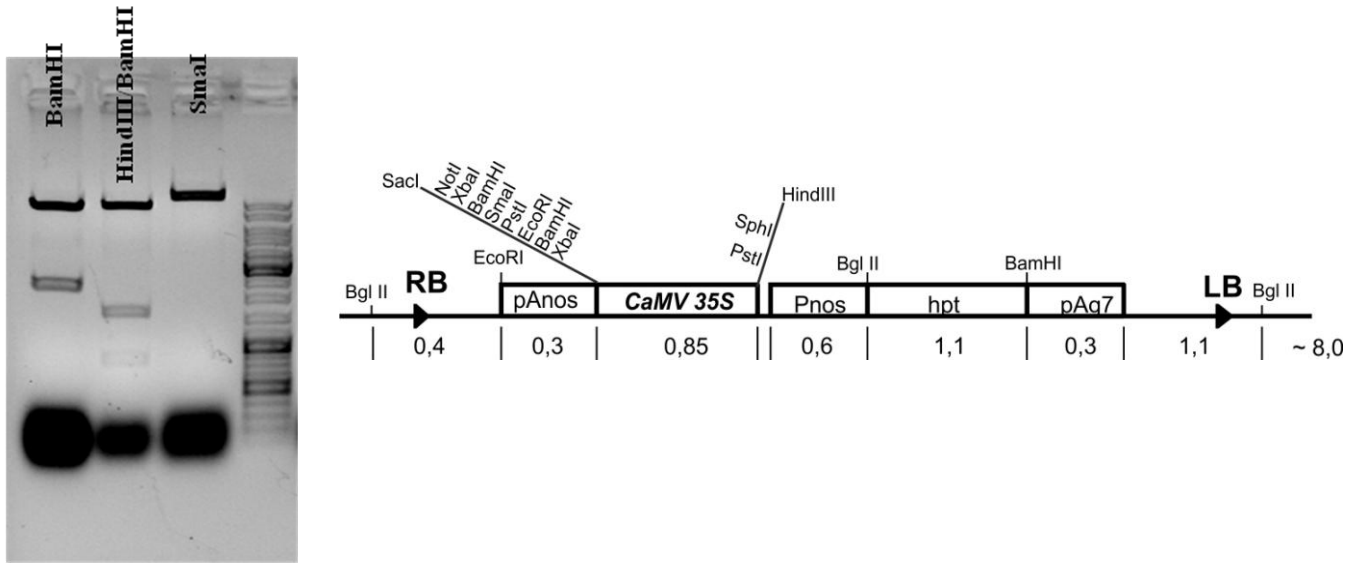
Η τελική κατασκευή Lon4prom::*Lon4*-FLAG/HPT-pAnos έγινε με κλωνοποίηση του γονιδίου *Lon4* στη SmaI θέση του κλώνου Lon4prom/HPT-pAnos (όπως ακριβώς και στην κατασκευή Lon1prom::*Lon4*-FLAG/pGPTV-HPT).



Εικόνα Π20. Χαρτογράφηση και χάρτης του κλώνου Lon4prom::*Lon4*-FLAG/HPT-pAnos.

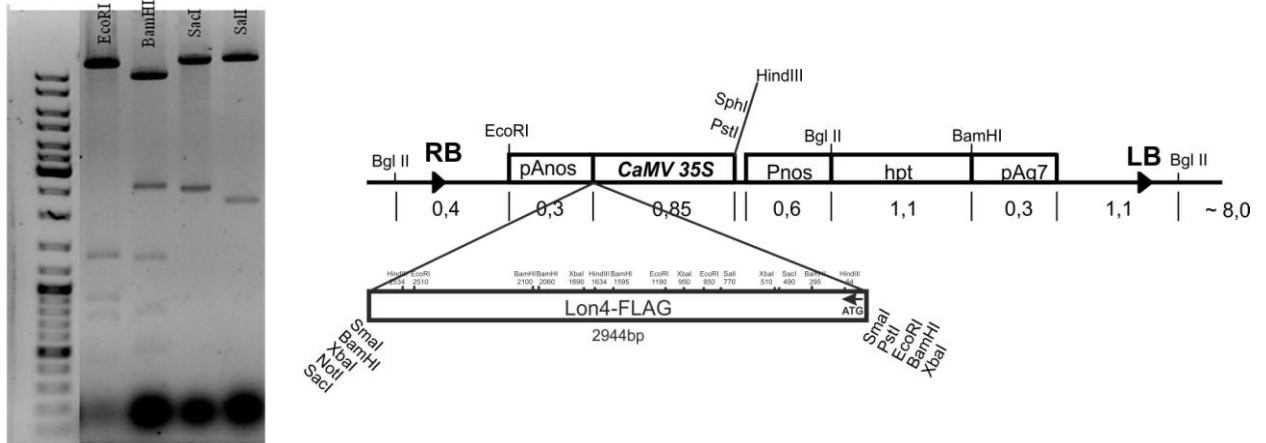
CaMV 35S::*Lon4*-FLAG

Ο προαγωγέας *CaMV 35S* απομονώθηκε με διπλή πέψη με τα ένζυμα *HindIII/SacI* από τον κλώνο 35S/pBSKS(+) και κλωνοποιήθηκε στον δυαδικό φορέα pGPTV-HPT (Εικ. Π16) αφού πρώτα του αφαιρέθηκε το γονίδιο *uidA* με την ίδια πέψη (*HindIII/SacI*).



Εικόνα Π21. Χαρτογράφηση και χάρτης του κλώνου 35S/pGPTV-HPT.

Στο τελευταίο βήμα (όπως και με τις προηγούμενες δύο κατασκευές) έγινε κλωνοποίηση του γονιδίου *Lon4* με το επιτόπιο FLAG στη *SmaI* θέση του κλώνου 35S/pGPTV-HPT (Εικ. Π22).



Εικόνα Π22. Χαρτογράφηση και χάρτης του κλώνου 35S::*Lon4*-FLAG/pGPTV-HPT.

2. Εκκινητές

[For-26860]: 5' - CCCCGGGTCGACCTTGTGTTGTCGAGCCTTCCA - 3' 75,23 (57,8)

[Lon1-prom-Rev]: 5' - ACCCGGGATCAAAGCCCTTCATAAACCCCGACGA - 3' 73,65 (64,96)

[Lon1 w/o strand]: 5' - ACCCGGGACTAATCTTCGTCTACAGGCTTCTTC - 3' 71,23 (56,42)

[Lon1-FLAG-Rev]: 5' -
ACCCGGGTCGACTAATCCTTGTAGTCCTTGTGCATCGTCATCCTTG
TAGTCTTCTTGTGTTGTCATAGCCAAAG - 3' 79,5 (57,96)

[Lon4-com-For]: 5' - CCC GG G G G GAGCGAAAACTCTTTGTCCTCTT - 3' 71,43 (61,01)

[Lon4-prom-Rev]: 5' - ACCCGGGAAAAGCCCTTCATAAACCCCTTCC - 3' 71,36 (61,46)

[Lon4-RT]: 5' -TTTCAATTCACGGAAGCCAGTTACA - '3 (59,7)

[Lon4-For]: 5' - ACCCGGGACACCACCAGTCTTCGTCTACAACA - '3 65,3 (64,8)

[Lon4-FLAG-Rev]: ACCCGG GTCGACTAATCCTTGTAGTCCTTGTGCATCGTCATCCTTGT
AGTCATGGTCATAGCCAAAGGCTAGCTC - '3 81,51 (63,21)

