

The background of the cover is a fluorescence microscopy image of Arabidopsis cells. The cells exhibit various patterns of green and red fluorescence, indicating the presence of specific proteins or markers. The green signal is more widespread, while the red signal is concentrated in certain areas, possibly representing different organelles or protein localization. The overall appearance is that of a complex biological system being studied at the cellular level.

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διδακτορική Διατριβή

**Οργανοδιακή λειτουργικότητα και Μοριακή διασταυροεπικοινωνία
(cross-talk) στη σηματοδότηση της ανάπτυξης του *Arabidopsis***

Ντικράν Χ. Τσιτσεκιάν

Αθήνα, 2016

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διδακτορική Διατριβή

**Οργανιδιακή λειτουργικότητα και Μοριακή
διασταυροεπικοινωνία (cross-talk) στη σηματοδότηση
της ανάπτυξης του *Arabidopsis***

Ντικράν Χ. Τσιτσεκιάν

Αθήνα, 2016

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

- Σταμάτης Ρήγας, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α., Τμήμα Βιοτεχνολογίας (Επιβλέπων)
- Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής Γ.Π.Α., Τμήμα Βιοτεχνολογίας
- Δήμητρα Μηλιώνη, Επίκουρη Καθηγήτρια Γ.Π.Α., Τμήμα Βιοτεχνολογίας

Επταμελής εξεταστική επιτροπή:

- Σταμάτης Ρήγας, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α (Επιβλέπων)
- Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής Γ.Π.Α
- Δήμητρα Μηλιώνη, Επίκουρη Καθηγήτρια Γ.Π.Α
- Εμμανουήλ Φλεμετάκης, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α
- Κρίτων Καλαντίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστήμιο Κρήτης
- Πόπη Συντυχάκη, Ερευνήτρια Γ' ΙΙΒΕΑΑ
- Άγγελος Κανελλής, Καθηγητής Α.Π.Θ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/1932, άρθρο 202).

Το θέμα της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής ορίστηκε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Βιοτεχνολογίας (Συνεδρία 4η/14.12.2011).

Η υλοποίηση της Διδακτορικής Διατριβής πραγματοποιήθηκε με χρηματοδότηση από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής, ολοκληρώνεται και το μεγάλο κεφάλαιο της μεταπτυχιακής μου εκπαίδευσης. Ένα ταξίδι μεγάλο, συναρπαστικό αλλά και συνάμα επίπονο και απαιτητικό.

Συνοδοιπόροι και οδηγοί μου σε αυτό το ταξίδι ήταν οι επιβλέποντες καθηγητές μου κ. Πολυδεύκης Χατζόπουλος και Σταμάτης Ρήγας, τους οποίους τους ευχαριστώ από καρδιάς για την αμέριστη υποστήριξη και καθοδήγηση καθόλη τη διάρκεια της διατριβής και όλης της προηγούμενης πορείας μου στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας.

Θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ και στον διδάκτορα Γεράσιμο Δάρα, που από την πρώτη στιγμή που ήρθα στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας ως προπτυχιακός φοιτητής με πήρε κοντά του στην ερευνητική ομάδα και με καθοδήγησε από τα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο. Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω και το άλλο μέλος της ομάδας τον διδάκτορα Αναστάσιο Αλατζά, για τις αμέτρητες συζητήσεις, επιστημονικές και μη.

Στον φίλο και συμφοιτητή μου, υποψήφιο διδάκτορα Κωνσταντίνο Κουδουνά, θέλω να ευχηθώ καλή σταδιοδρομία, καθώς και αυτός ολοκλήρωσε τη διατριβή του. Κώστα σου εύχομαι τα καλύτερα στη ζωή σου και ελπίζω να συνεχίσουμε στο μέλλον να δουλεύουμε «πλάτη-πλάτη» όπως όλα αυτά τα χρόνια!

Ευχαριστώ το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών για την υποτροφία που μου χορήγησε, η οποία μου εξασφάλισε την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να πω και ένα τεράστιο ευχαριστώ στους γονείς μου, τον αδελφό μου και την Χριστιάννα για όλη την υποστήριξη, την υπομονή και την κατανόηση που επέδειξαν όλα αυτά τα χρόνια.

Στην οικογένεια &
στους φίλους μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	10
Abstract	11
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1 Κατηγοριοποίηση των οργανισμών.....	13
1.2 Η θεωρία της ενδοσυμβίωσης και η ανάπτυξη των υποκυτταρικών διαμερισμάτων-οργανιδίων	13
1.2.1 Το μιτοχόνδριο	14
1.2.2 Ο πυρήνας.....	17
1.2.3 Τα πλαστίδια	19
1.2.4 Το περοξύσωμα	20
1.3 Μηχανισμοί υποκυτταρικής στόχευσης στα οργανίδια.....	22
1.4 Λειτουργίες των οργανιδίων	24
1.5 Οι Ενεργές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και ο μηχανισμός ελέγχου της ποιότητας των πρωτεϊνών (Protein Quality Control)	30
1.6 Μηχανισμοί πρωτεόλυσης στα ευκαρυωτικά κύτταρα.....	33
1.6.1 Το 26S πρωτεάσωμα.....	33
1.6.2 Οι ATP-εξαρτώμενες οργανιδιακές πρωτεάσες.....	34
1.7 Η πρωτεάση Lon έχει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη των οργανισμών και έναντι της οξειδωτικής καταπόνησης.....	38
1.8 Η πρωτεάση Lon στο φυτό <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
Υλικά & Μέθοδοι	42
2.1 Φυτικό υλικό - συνθήκες ανάπτυξης και καλλιέργειας.....	43
2.2 Συνθήκες καλλιέργειας <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
2.3 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA από φυτά <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
2.4 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA από σπέρματα <i>Arabidopsis thaliana</i>	44
2.5 Πρωτόκολλο απομόνωσης γονιδιωματικού DNA από <i>Arabidopsis</i>	45
2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	46
2.5.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	46
2.5.2 PCR αποικιών	48
2.5.3 RT-PCR.....	48
2.6 Ανάλυση δεσοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA)	51
2.7 Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης.....	53
2.8 Ενοποίηση τμημάτων με κολλώδη άκρα.....	53
2.9 Βακτηριακά κύτταρα και μετασχηματισμός.....	53

2.9.1 Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>Escherichia coli</i>	53
2.9.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> με πλασμιδιακό DNA	54
2.9.3 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>Agrobacterium tumefaciens</i> με ηλεκτροπόρωση	55
2.10 Αποθήκευση για μεγάλα χρονικά διαστήματα βακτηριακών κυττάρων	56
2.11 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα <i>Escherichia coli</i>	56
2.11.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης	56
2.11.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την βοήθεια κολώνας QIAGEN	57
2.12 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	57
2.13 Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού	58
2.14 Μετασχηματισμός <i>Arabidopsis thaliana</i>	58
2.14.1 Μέθοδος διείσδυσης με εφαρμογή κενού σε ολόκληρα φυτά <i>Arabidopsis</i>	58
2.14.2 Ανάπτυξη φυτών και διείσδυση με κατάλληλο στέλεχος <i>Agrobacterium</i>	59
2.14.3 Επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών της T1 γενιάς	60
2.15 Πρωτόκολλα απομόνωσης υποκυτταρικών οργανιδίων	61
2.15.1 Πρωτόκολλα απομόνωσης χλωροπλαστών	61
2.15.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης μιτοχονδρίων	64
2.16 Ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης/SDS (SDS-PAGE) και ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών	67
2.17 Προγράμματα Βιοπληροφορικής ανάλυσης	67
2.18 Χρώση για τον εντοπισμό των Ενεργών Μορφών Οξυγόνου	68
2.19 Προσδιορισμός του ποσοστού οξειδωσης των λιπαρών (TBARS assay)	68
2.19 Υδατικά διαλύματα και θρεπτικά μέσα βακτηριακών κυττάρων και φυτών	70
2.19.1 Διαλύματα ανάπτυξης βακτηρίων - σχετικά αντιδραστήρια	70
2.19.2 Διαλύματα ενζύμων και απομόνωσης πλασμιδιακού DNA	70
2.19.3 Διαλύματα απομόνωσης γονιδιωματικού DNA	71
2.19.4 Διαλύματα ηλεκτροφόρησης	71
2.19.5 Διαλύματα και θρεπτικά μέσα ιστοκαλλιέργειας και μετασχηματισμού φυτών	71
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	73
3.1 Λειτουργικός ρόλος της πρωτεάσης Lon στο φυτό <i>Arabidopsis thaliana</i>	74
3.1.1 Η πρωτεάση Lon1 έχει λειτουργικό ρόλο στους χλωροπλάστες του φυτού <i>Arabidopsis thaliana</i>	74
3.1.2 Το μετάλλαγμα <i>lon4-1</i> παρουσιάζει πρόβλημα στην βλαστικότητα των σπερμάτων του και στην αναπνευστική δραστηριότητα	80

3.2 Οι τρεις μιτοχονδριακές/χλωροπλαστικές ισομορφές της πρωτεάσης Lon στο <i>Arabidopsis</i> παρουσιάζουν διακριτά πρότυπα έκφρασης.....	84
3.3 Οι 3 ισομορφές της πρωτεάσης Lon στο <i>A. thaliana</i> έχουν προέλθει μέσω διαδοχικών διπλασιασμών και έχουν διακριτούς λειτουργικούς ρόλους.....	88
3.3.1 Οι τρεις ισομορφές της πρωτεάσης Lon του <i>Arabidopsis</i> έχουν διαφορετικούς μηχανισμούς υποκυτταρικής στόχευσης	88
3.3.2 Οι τρεις ισομορφές της πρωτεάσης Lon του <i>Arabidopsis</i> έχουν διαφορετική δομή της περιοχής SSD υποδηλώνοντας διαφορετικό λειτουργικό ρόλο για την κάθε ισομορφή.....	90
3.4 Τα ανώτερα φυτά περιέχουν πολλαπλά αντίγραφα της πρωτεάσης Lon με δυαδική στόχευση στο μιτοχόνδριο και στον χλωροπλάστη	92
3.5 Η περοξυσωμική Lon φέρει σινιάλο υποκυτταρικής τοποθέτησης PTS1	95
3.6 Η διπλή υποκυτταρική στόχευση εμφανίζεται μετά τα βρυόφυτα ενώ πολλαπλά αντίγραφα της πρωτεάσης Lon έχουν μόνο τα ανώτερα φυτά.....	96
3.7 Ο μηχανισμός των δύο πρόδρομων αλληλουχιών δυαδικής στόχευσης (twin presequences) εντοπίζεται μόνο στην οικογένεια <i>Brassicaceae</i> , κατάλοιπά του όμως υπάρχουν συντηρημένα σε όλα τα δικότυλα φυτά	98
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	100
4.1 Η πρωτεάση Lon1 έχει λειτουργικό ρόλο στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες του φυτού <i>A. thaliana</i>	101
4.2 Η έλλειψη της πρωτεάσης Lon δημιουργεί πρόβλημα στην αναπνευστική δραστηριότητα του φυτού.....	102
4.3 Οι πρωτεάσες Lon4 και Lon3 παρουσιάζουν διαφορετική εξειδίκευση ως προς τα ανθικά μέρη του φυτού.....	102
4.4 Οι τρεις ισομορφές της πρωτεάσης Lon στο φυτό <i>Arabidopsis thaliana</i> είναι αποτέλεσμα διαδοχικών γονιδιακών διπλασιασμών	103
4.5 Τα φυτά έχουν περισσότερα αντίγραφα της πρωτεάσης Lon λόγω της λειτουργικής τους πολυπλοκότητας	109
Βιβλιογραφία	113
Παράρτημα.....	129

Περίληψη

Τα υποκυτταρικά οργανίδια των ευκαρυωτικών κυττάρων κατέχουν πολύ σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του κυττάρου. Στα μιτοχόνδρια, τους χλωροπλάστες και τα περοξυσώματα λαμβάνουν χώρα η αναπνοή, η φωτοσύνθεση και ο καταβολισμός των λιπαρών, αντίστοιχα, διεργασίες απαραίτητες για την επιβίωση των οργανισμών. Λόγω της αυξημένης μεταγωγής ενέργειας κατά τη λειτουργία των οργανιδίων, παράγονται Ενεργές Μορφές Οξυγόνου (ΕΜΟ), ως παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού, οι οποίες είναι τοξικές για το κύτταρο, επιδρώντας αρνητικά στα βιομόρια του κυττάρου. Για την αντιμετώπιση των δυσμενών συνεπειών της δράσης των ΕΜΟ, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς άμυνας έναντι της δράσης τους. Ο μηχανισμός ελέγχου της ποιότητας των πρωτεϊνών (Protein Quality Control, PQC) ανήκει σε αυτούς, και μέρος αυτού είναι η πρωτεάση Lon η οποία πρωτεολύει της οξειδωμένες από τις ΕΜΟ πρωτεΐνες, εμποδίζοντας έτσι το σχηματισμό τοξικών για το κύτταρο πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων.

Η πρωτεάση Lon είναι προκαρυωτικής προέλευσης και απαντάται σε όλους τους οργανισμούς. Δυσλειτουργία της μιτοχονδριακής πρωτεάσης Lon διαταράσσει τη φυσιολογική μορφολογία και λειτουργία του οργανιδίου. Στα ζωικά μοντέλα σχετίζεται με μια πληθώρα νευροεκφυλιστικών ασθενειών και νεοπλασιών. Το φυτό *A. thaliana* έχει 4 γονίδια που κωδικοποιούν για ισομορφές της πρωτεάσης Lon. Μεταλλάγματα του γονιδίου *Lon1* παρουσιάζουν ανωμαλίες στη μορφολογία των μιτοχονδρίων τους και μειωμένη αναπνευστική δραστηριότητα. Πρόσφατα βρέθηκε ότι η πρωτεάση Lon1 παρουσιάζει διπλή υποκυτταρική στόχευση και στους χλωροπλάστες, όμως δεν υπάρχουν ακόμη στοιχεία για το λειτουργικό της ρόλο στο οργανίδιο. Η πρωτεάση Lon4 παρουσιάζει και αυτή διπλή υποκυτταρική στόχευση στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες, όμως δεν υπάρχουν δημοσιευμένα μεταλλάγματα ή άλλα δεδομένα όσον αφορά τη λειτουργία της. Η πρωτεάση Lon3, ελλείπει πειραματικών δεδομένων, θεωρείται ως ψευδογονίδιο, ενώ η Lon2 αποτελεί την περοξυσωματική ισομορφή.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου της πρωτεάσης Lon του φυτού *Arabidopsis thaliana* στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες του φυτού. Έγινε κατασκευή διαγονιδιακών κατασκευών με την πρωτεάση Lon1, όπου η αγρίου τύπου πρωτεάση οδηγήθηκε μεμονωμένα στους χλωροπλάστες ή στα μιτοχόνδρια του μεταλλάγματος *lon1-1*. Οι βιομετρικές, φυσιολογικές και μοριακές αναλύσεις των κατασκευών αυτών ανέδειξαν για πρώτη φορά το λειτουργικό ρόλο της πρωτεάσης Lon1 στο χλωροπλάστη. Επιπλέον, χαρακτηρίστηκε και αναλύθηκε το μετάλλαγμα *lon4-1*, το οποίο είναι το πρώτο που καταγράφεται για την πρωτεάση Lon4. Τα μεταλλάγματα αυτά παρουσιάζουν σημαντική υστέρηση στη βλαστικότητα των σπερμάτων τους, ενώ και η αναπνευστική δραστηριότητα των σπερμάτων τους είναι μειωμένη. Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης όλων των μιτοχονδριακών/χλωροπλαστικών γονιδίων Lon του φυτού έδειξε ότι το *Lon1* δεν παρουσιάζει κάποια ιστοειδική ή χρονική εξειδίκευση, αντίθετα με τα *Lon4* και *Lon3*. Το *Lon4* παρουσιάζει μια χρονική εξειδίκευση κατά τα στάδια της γονιμοποίησης και τα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης, ενώ παρουσιάζει και ιστοειδική εξειδίκευση στα ανθικά μέρη του φυτού αποκλειστικά στον ύπερο του άνθους. Το γονίδιο *Lon3*, για πρώτη φορά αποδεικνύεται ότι δεν αποτελεί ψευδογονίδιο, και παρουσιάζει ιστοειδική έκφραση ως προς τα αρσενικά μέρη του άνθους. Εκτενής φυλογενετική ανάλυση της πρωτεάσης Lon έδειξε ότι τα φυτά, σε αντίθεση με τα ζωικά μοντέλα που φέρουν μόνο ένα αντίγραφο, έχουν πολλαπλά αντίγραφα της μιτοχονδριακής/χλωροπλαστικής πρωτεάσης Lon στο γονιδίωμά τους. Το φαινόμενο σχετίζεται με την βιοχημική πολυπλοκότητα των φυτικών συστημάτων. Οι τρεις ισομορφές του φυτού *A. thaliana* αποτελούν προϊόντα διαδοχικών διπλασιασμών του γονιδιώματος που εξαιτίας εξελικτικής πίεσης, ανέπτυξαν διαφορετικούς και συμπληρωματικούς μηχανισμούς έκφρασης, στόχευσης και πρωτεόστασης. Οι διπλασιασμοί των μελών της οικογένειας Lon συνέβαλλαν στην βελτίωση της προσαρμοστικότητας και ελαστικότητας έναντι ακραίων περιβαλλοντικών συνθηκών.

Abstract

Subcellular organelles of eukaryotic cells play a very important role in cell metabolism. In mitochondria, chloroplasts and peroxisomes occur respiration, photosynthesis and fatty acid metabolism, respectively, processes necessary for the survival of organisms. Due to the increased electron flow in the operation of organelles Reactive Oxygen Species (ROS) are produced as byproducts of aerobic metabolism, which are toxic for the cell, adversely affecting cell biomolecules. To address the adverse effects of ROS action, cells have developed defense mechanisms to limit their harmful action. The Protein Quality Control (PQC) system belongs to this mechanism, part of which is the Lon protease, that hydrolyzes the oxidized proteins, thus preventing the formation of toxic protein aggregates in the cell.

The Lon protease is of prokaryotic origin and is found in all organisms. Dysfunction of mitochondrial Lon protease disrupts the normal morphology and function of the organelle and in animal models is associated with a variety of neurodegenerative diseases and tumors. In the model plant *A. thaliana* there is family of 4 genes encoding isoforms of the Lon protease. Mutants of *Lon1* gene show abnormal morphology of their mitochondria and reduced respiratory activity. Recent studies have shown that *Lon1* possess dual subcellular targeting also into chloroplasts, but there is still no evidence for a functional role in the organelle. *Lon4* protease also presents dual subcellular targeting to mitochondria and chloroplasts, but there are no published mutants or other data regarding its function. Due to the absence of experimental data, *Lon3* is considered as a pseudogene while *Lon2* is the peroxysomal isoform.

The aim of this study was to investigate the functional role of Lon protease in mitochondria and chloroplasts of the model plant *Arabidopsis thaliana*. Transgenic plant lines of *Lon1* protease were constructed, where the wild-type protease was driven individually into the chloroplasts or mitochondria of the mutant *lon1-1*. Biometric, physiological and molecular analyses of these transgenic lines, revealed for the first time a functional role of *Lon1* protease in the chloroplasts. Moreover, analysis of the *lon4-1* mutant has shown a significant retardation in seed germination, while the respiratory activity of the seeds was also reduced. Gene expression analysis of all the mitochondrial/chloroplastic isoforms of Lon genes of the plant revealed that *Lon1* didn't show any spatiotemporal specificity, while it was ubiquitously expressed, unlike *Lon4* and *Lon3*, where *Lon4* showed a temporal specificity against early stages of embryogenesis and fertilization and a tissue-specific expression in the flower pistil. *Lon3* exhibited a tissue specific expression in the stamens of the flower, revealing for the first time that it is not a pseudogene. Extensive phylogenetic analysis of Lon protease showed that plants carry multiple copies of the mitochondrial/chloroplastic isoform of Lon protease in their genome, in contrast to animal models that have only one gene, reflecting the biochemical complexity of plant systems. The three isoforms of *A. thaliana* have resulted from successive Whole Genome Duplication (WGD) events, which evolved different and complementary mechanisms that contributed to the increase of speciation and genetic richness of species providing adaptive advantage for colonization harsh and fickle ecosystems, maintaining the proteostasis and normal operation of the organelle.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Κατηγοριοποίηση των οργανισμών

Οι έμβιοι οργανισμοί μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες: τα βακτήρια, τα αρχαία και τους ευκαρυώτες (Woese et al., 1977, 1990). Νεότερες, πιο εναλλακτικές υποθέσεις, προτείνουν ότι δύο είναι οι κύριες μορφές ζωής, τα βακτήρια και τα αρχαία, και θεωρούν ότι οι ευκαρυώτες έχουν υβριδική προέλευση (Williams et al., 2013, 2014; McInerney et al., 2014). Ανεξάρτητα από τις παραπάνω υποθέσεις, τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαθέτουν ορισμένα χαρακτηριστικά που τα διαχωρίζουν από τα προκαρυωτικά, με σημαντικότερο την ενδοκυτταρική διαμερισματοποίηση. Η διαμερισματοποίηση αυτή οδήγησε στη δημιουργία κλειστών «θαλάμων αντίδρασης» εντός του κυτταροπλάσματος, διαχωρίζοντας με αυτόν τον τρόπο διάφορες βιολογικές και βιοχημικές διεργασίες. Εκτός από τη διαμερισματοποίηση, τα ευκαρυωτικά κύτταρα ανέπτυξαν νέες υποκυτταρικές δομές μέσω της ενσωμάτωσης προκαρυωτικών κυττάρων μέσα στο κυτταρόπλασμα τους, τα οποία στη συνέχεια μέσω της ενδοσυμβίωσης εξελίχθηκαν στα μιτοχόνδρια και στα παράγωγά τους τα υδρογενοσώματα και τα μιτοσώματα (Gray, 2012; Müller et al., 2012) όπως επίσης και στα πρωτογενή πλαστίδια των φυτών (Bolte et al., 2009; Price et al., 2012; Keeling, 2013).

1.2 Η θεωρία της ενδοσυμβίωσης και η ανάπτυξη των υποκυτταρικών διαμερισμάτων-οργανιδίων

Υπάρχουν αρκετές θεωρίες σχετικά με την ενδοσυμβίωση των οργανισμών, που οδήγησε στην εξέλιξη των ευκαρυωτικών κυττάρων και τη δημιουργία των υποκυτταρικών οργανιδίων. Οι θεωρίες αυτές μπορούν να συνοψιστούν σε δύο σχολές, οι οποίες διαφέρουν ως προς το πώς δημιουργήθηκε ο τελευταίος κοινός ευκαρυωτικός πρόγονος (Last Eukaryotic Common Ancestor, LECA). Η πρώτη σχολή υποστηρίζει ότι πρώτα εξελίχθηκε ένας ευκαρυώτης, ο οποίος δεν είχε μιτοχόνδρια, είτε μέσω της ανάπτυξης ενός πρωτο-ευκαρυωτικού κυττάρου (Sogin, 1991; Cavalier-Smith, 2009), είτε μέσω διαδοχικών κυτταρικών συγχωνεύσεων (Gupta et al., 1996; Moreira et al., 1998; Margulis et al., 2000; Lake et al., 2005) το οποίο στη συνέχεια ενσωμάτωσε ένα απρωτεοβακτήριο που στη συνέχεια εξελίχθηκε στο μιτοχόνδριο. Η δεύτερη σχολή υποστηρίζει ότι το έναυσμα για την εξέλιξη των ευκαρυωτικών κυττάρων ήταν η εγκόλπωση ενός βακτηριακού κυττάρου (προγόνου του μιτοχονδρίου) από ένα αρχαίο κύτταρο (Searcy, 1992; Martin & Muller, 1998; Vellai et al., 1998). Και οι δύο θεωρίες

συμφωνούν ότι το έναυσμα για την εξέλιξη της ευκαρυογένεσης ήταν η ενσωμάτωση του μιτοχονδρίου.

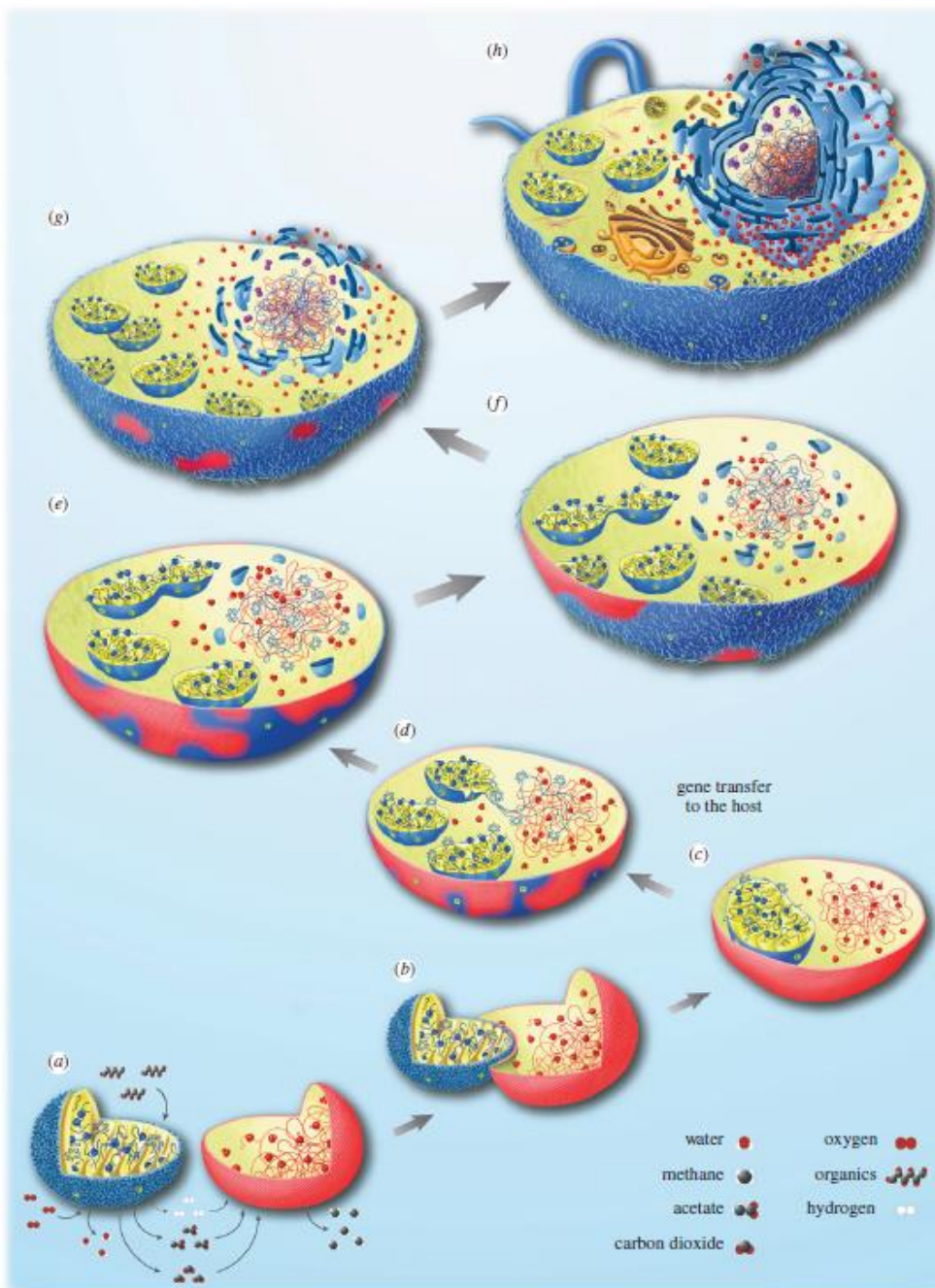
Πολλές από τις θεωρίες για την προέλευση των ευκαρυωτικών κυττάρων αντιμετωπίζουν κοινά ζητήματα στις μελέτες και τις θεωρίες τους, όμως ένα γεγονός που πολλές φορές αγνοείται εδώ και περίπου 50 χρόνια από τότε που η Lynn Margulis-Sagan αναβίωσε τη θεωρία της ενδοσυμβίωσης (Sagan, 1967; Margulis, 1970), είναι ότι οι αναρίθμητες δομές που ξεχωρίζουν τους ευκαρυωτικούς από τους προκαρυωτικούς οργανισμούς δεν έχουν προέλθει «δωρεάν». Οι καινοτομίες των ευκαρυωτικών δομών έχουν ένα ενεργειακό κόστος, το οποίο καλύπτεται από τα μιτοχόνδρια (Lane & Martin, 2010). Η διαμερισματοποίηση των βιοενεργών μεμβρανών στους ευκαρυώτες είναι που τους απελευθερώνει από τους βιοενεργητικούς περιορισμούς που έχουν οι προκαρυώτες και διαφοροποιούνται σε επίπεδο κυτταρικής οργάνωσης. Από τα τέλη της δεκαετίας του '90 ήταν γνωστό ότι όλοι οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν ή είχαν μιτοχόνδρια, όμως οι λόγοι γι' αυτό δεν ήταν ξεκάθαροι μέχρι που έγινε υπολογισμός των ενεργειακών απαιτήσεων που καλύπτουν τα μιτοχόνδρια για τις διάφορες βιοχημικές διεργασίες των ευκαρυωτικών κυττάρων (Lane & Martin, 2010) και αυτό είναι και το γεγονός που τοποθετεί την ενδοσυμβίωση των μιτοχονδρίων στην αρχή της ευκαρυογένεσης.

1.2.1 Το μιτοχόνδριο

Η θεωρία που με τα μέχρι στιγμής δεδομένα φαίνεται να είναι η επικρατέστερη για την εξέλιξη της ευκαρυογένεσης είναι η δεύτερη, η οποία λέγεται και «συμβιογένεση» ή «υπόθεση του υδρογόνου» και την συνοψίζει αναλυτικά ο Martin και οι συνεργάτες του (Martin et al., 2015). Με βάση λοιπόν αυτή τη θεωρία, ο ξενιστής είναι ένα εξαρτώμενο από το υδρογόνο αρχαίο και ο συμβιώτης ένας προαιρετικά αναερόβιος οργανισμός, ο οποίος παρουσία οξυγόνου μπορεί και αναπνέει, ενώ υπό αναερόβιες συνθήκες παράγει υδρογόνο μέσω ζύμωσης (Εικ. 1a). Αυτή είναι και η δυναμική αυτής της υπόθεσης, ότι δηλαδή ο ξενιστής έχει απόλυτη ανάγκη τον συμβιώτη (Martin & Muller, 1998). Συνεπώς η μεταφορά του υδρογόνου από τον συμβιώτη στον ξενιστή, αποτελεί και το μεταβολικό πλαίσιο στη σχέση μεταξύ τους. Αυτό λοιπόν οδηγεί σε μια κατάσταση όπως φαίνεται στην (Εικ. 1b), όπου ένας προκαρυωτικός συμβιώτης (βακτήριο) εδρεύει μέσα σε έναν προκαρυωτικό ξενιστή (αρχαίο). Η συγκεκριμένη θεωρία ήταν ιδιαίτερα επαναστατική και δέχτηκε έντονη κριτική (Cavalier-Smith, 2002) για το γεγονός ότι δεν περιελάμβανε τη

φαγοκύττωση ως τον μηχανισμό εισόδου του ενδοσυμβιώτη. Στο μεσοδιάστημα όμως υπήρξαν αναφορές και παραδείγματα όπου ένας προκαρυώτης εδραιώνεται ως σταθερός ενδοσυμβιώτης σε έναν άλλο προκαρυώτη (von Dohlen et al. 2001; Husnik et al., 2013), στα οποία δεν υπήρξε φαγοκύττωση. Συνεπώς, η φαγοκύττωση δεν αποτελεί προαπαιτούμενο για την εγκαθίδρυση της ενδοκυτταρικής συμβίωσης. Η εξαρτώμενη από το υδρογόνο φύση του ξενιστή οδηγεί σε μια περίεργη κατάσταση το σύστημα (Εικ. 1c). Ο συμβιώτης προκειμένου να παράξει το απαραίτητο για τον ξενιστή υδρογόνο χρειάζεται οργανικά υποστρώματα ούτως ώστε να μπορέσει να κάνει αναερόβια ζύμωση. Δεδομένου όμως ότι ο ξενιστής είναι αυστηρά αυτότροφος, αδυνατεί να του τα παρέχει, καθώς ο μεταβολισμός των εξαρτώμενων από το υδρογόνο αυτότροφων οργανισμών βασίζεται στα αέρια και δεν εισάγουν οργανικά υποστρώματα. Η φάση αυτή της ενδοσυμβίωσης λοιπόν είναι εντελώς ασταθής, καθώς τελικά θα καταλήξει ο συμβιώτης να «καταναλώσει» το κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Για να μπορέσει να συνεχιστεί η συμβίωση των δύο οργανισμών θα πρέπει είτε ο ξενιστής να αντιστρέψει τις τα συστήματα εισροής των οργανικών του, ούτως ώστε να μπορέσει να εισάγει τα απαραίτητα υποστρώματα για των συμβιώτη, είτε μπορεί να γίνει μεταφορά των αντίστοιχων γονιδίων του συμβιώτη στο χρωμόσωμα του ξενιστή και να εκφραστούν εκεί, με την προϋπόθεση φυσικά, τα βακτηριακά συστήματα εισροής να είναι λειτουργικά στη μεμβράνη του αρχαίου, κάτι που πράγματι συμβαίνει στα αλλοάρχαια (Nelson-Sathi et al., 2012). Η μεταφορά του γονιδιώματος από τον συμβιώτη στον ξενιστή μπορεί να περιλαμβάνει την περιστασιακή λύση κάποιου ενδοσυμβιώτη (Εικ. 1d), όπως ακριβώς συμβαίνει στην ενδοσυμβιωτική μεταφορά γονιδίων στους ευκαρυώτες σήμερα (Timmis et al., 2004), με τη μόνη διαφορά ότι στη φάση αυτή ο ξενιστής είναι ένα αρχαίο και δεν έχει πυρήνα. Η μεταφορά των συστημάτων εισροής από το βακτηριακό στο αρχαίο γονιδίωμα, δε λύνει από μόνο του το πρόβλημα, καθώς ο μεταβολισμός του αρχαίου, δεν είναι προσαρμοσμένος σε αυτές τις μορφές άνθρακα. Για να μπορέσει να λειτουργήσει το σύστημα, θα πρέπει να γίνει μεταφορά και των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τον μεταβολισμό του άνθρακα από τον συμβιώτη προς τον ξενιστή. Το αποτέλεσμα όλων αυτών είναι τελικά ότι ο ξενιστής παύει να είναι αυτότροφος και μετατρέπεται σε έναν ετερότροφο οργανισμό, με χιμαιρικά χρωμοσώματα που περιλαμβάνουν και βακτηριακά και αρχαία γονίδια, αρχαία ριβοσώματα και γλυκόλυση στο κυτταρόπλασμα. Επιπλέον, το κυτταρόπλασμα περικλείει έναν προαιρετικά αερόβιο βακτηριακό ενδοσυμβιώτη (αρχέγονο μιτοχόνδριο), που φέρει

μία αναπνευστική αλυσίδα και άρα έχει τη δυνατότητα αερόβιας (αναπνοή) και αναερόβιας (ζύμωση, παραγωγή υδρογόνου) αναπνοής (Εικ. 1e).



Εικόνα 1. Η προέλευση του μιτοχονδρίου σε έναν προκαρυωτικό ξενιστή. Στην εικόνα απεικονίζονται τα διάφορα στάδια μετάβασης, κατά τα οποία ένα υδρογονοεξαρτώμενο αρχαίο συμβιώνει με ένα προαιρετικά αναερόβιο α-πρωτεοβακτήριο και οδηγούν στη δημιουργία του πρώτου ευκαρυωτικού κυττάρου (Martin et al., 2015).

1.2.2 Ο πυρήνας

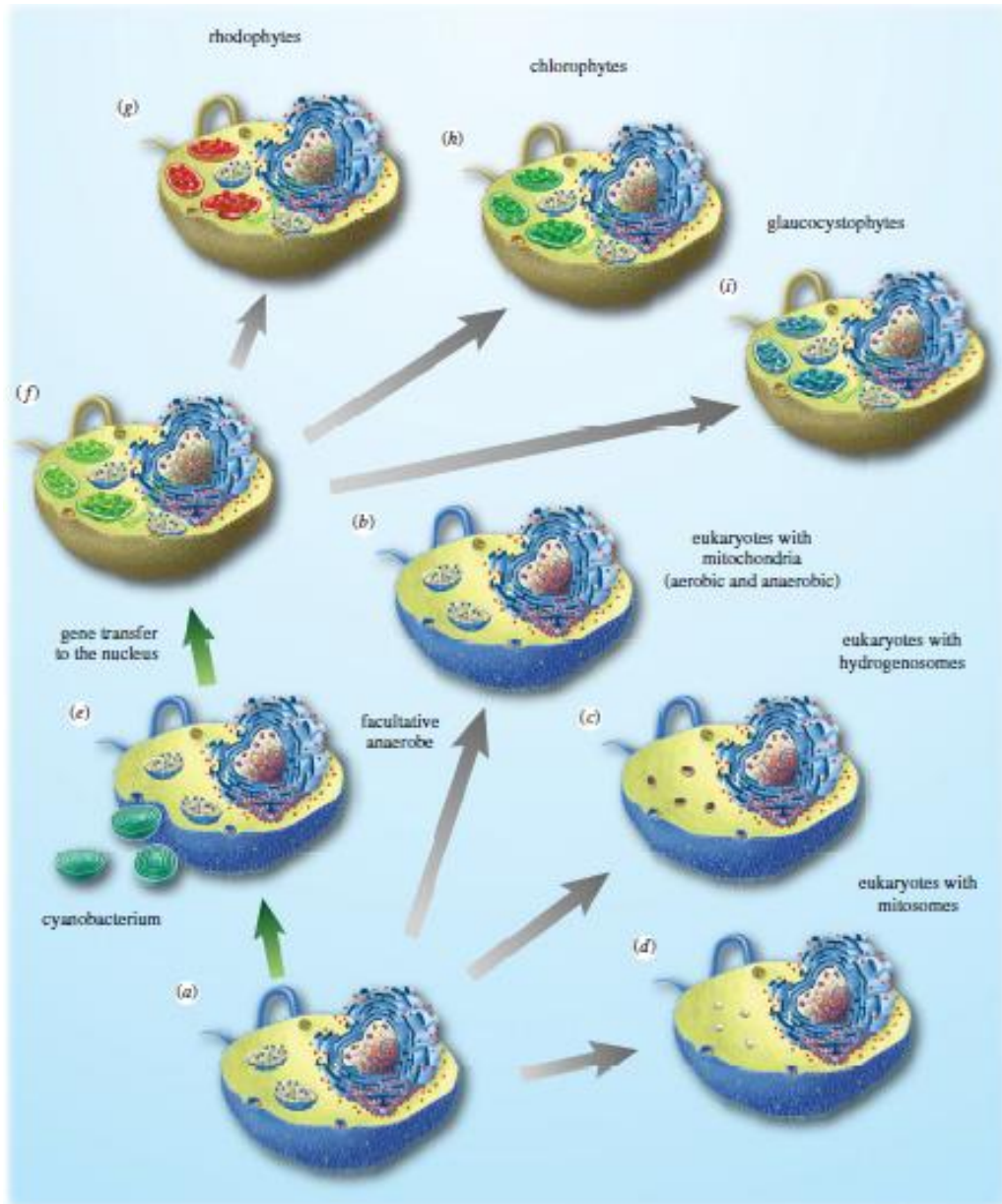
Η μεταφορά γονιδίων από τον συμβιώτη στον ξενιστή περιλαμβάνει και ένα σημαδιακό στοιχείο: τα αυτοκαταλυώμενα ιντρόνια τύπου II (Group II introns). Τα ιντρόνια αυτά είναι πολύ σημαντικά, καθώς η μετάβασή τους από ιντρόνια τύπου II σε κανονικά ευκαρυωτικά ιντρόνια, θεωρείται ότι αποτέλεσε το έναυσμα για τη δημιουργία του πυρήνα (Martin & Koonin, 2006). Τα ιντρόνια τύπου II υπάρχουν αποκλειστικά σε προκαρυωτικά γονιδιώματα (Poole et al., 1999; Lambowitz & Zimmerly, 2011), είναι μεταθετά, μπορούν να έχουν μεγάλη διασπορά σε ένα γονιδίωμα μέσω πολλών αντιγράφων (Lambowitz & Zimmerly, 2004) και αφαιρούνται μέσω αυτοκατάλυσης (Matsuura et al., 1997). Ο μηχανισμός ματίσματος είναι παρόμοιος με αυτόν του σπλισοσώματος (spliceosome) και γι'αυτό το λόγο θεωρούνται ως πρόδρομοι των ευκαρυωτικών ιντρονίων. Με βάση τη δουλειά των Martin & Koonin, 2006 η ουσία της υπόθεσης είναι η εξής: τα ιντρόνια εισήλθαν στους ευκαρυώτες μέσω μεταφοράς γονιδίων από το μιτοχόνδριο στον αρχαίο ξενιστή (Εικ. 1f). Στη συνέχεια, εξαπλώθηκαν σε πολλά σημεία πάνω στο γονιδίωμα του ξενιστή. Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι τα μισά από τα ιντρόνια στα ευκαρυωτικά γονίδια είναι παλαιά και συντηρημένα μεταξύ διαφόρων ευκαρυωτικών οικογενειών. Από την έναρξη της μετάβασής τους από ιντρόνια τύπου II σε ευκαρυωτικά ιντρόνια, προκύπτει μια αβιώσιμη κατάσταση για το κύτταρο: Το μάτισμα των ιντρονίων είναι μια αργή διαδικασία, της τάξεως των λεπτών ανά ιντρόνιο (Audibert et al., 2002), ενώ αντίθετα η μετάφραση είναι γρήγορη, της τάξης των 10 πεπτιδικών δεσμών ανά δευτερόλεπτο. Το κυτταρόπλασμα του ξενιστή εκείνη τη στιγμή είναι προκαρυωτικό, που σημαίνει ότι λαμβάνει χώρα ταυτόχρονη μεταγραφή και μετάφραση των mRNA. Για τα ιντρόνια τύπου II, αυτό δεν αποτελεί πρόβλημα, καθώς χρησιμοποιούν την ματουράση τους ώστε να μπλοκάρουν το 5' άκρο του mRNA τους μέχρι να απομακρυνθεί το ιντρόνιο και μετά να συνεχιστεί η μετάφραση. Με την έλευση του σπλισοσώματος όμως και του ευκαρυωτικού ματίσματος, τα mRNA μεταφράζονται πριν αυτά ωριμάσουν και αφαιρεθούν σωστά τα ιντρόνιά τους. Η κατάσταση αυτή δημιουργεί πρόβλημα στην έκφραση των γονιδίων και πρέπει να αντιμετωπιστεί άμεσα. Μια λύση στο πρόβλημα θα μπορούσε να είναι η αφαίρεση όλων των ιντρονίων από το γονιδίωμα, αυτό όμως δεν έχει συμβεί, καθώς οι θέσεις των ιντρονίων είναι παλαιές (Lynch & Richardson, 2002; Rogozin et al., 2003; Roy et al., 2005). Μια δεύτερη λύση θα ήταν να δημιουργήσει ένα σπλισόσωμα πολύ πιο γρήγορο από τα ριβοσώματα, αυτό όμως και πάλι είναι πολύ δύσκολο, καθώς μετά από δισεκατομμύρια

χρόνια εξέλιξης μέχρι το σημερινό σπλισόσωμα, η ακρίβεια και η πολυπλοκότητα του συμπλόκου έχει βελτιωθεί, όμως η διαδικασία δεν έχει γίνει πιο γρήγορη. Μία τρίτη λύση θα μπορούσε να είναι ο φυσικός χωροχρονικός διαχωρισμός της μεταγραφής από τη μετάφραση, ούτως ώστε να ολοκληρώνεται η μεταγραφή πριν την έναρξη της μετάφρασης. Ένας τέτοιος διαχωρισμός εντός του κυττάρου συνήθως περιλαμβάνει μεμβράνες, και το κύριο δόγμα αυτής της υπόθεσης είναι ότι η αρχική εξελικτική πίεση για την επιλογή του πυρηνικού φακέλου ήταν ο αποκλεισμός των ενεργών ριβοσωμάτων από την ενεργή χρωματίνη (Εικ. 1h), επιτρέποντας μ'αυτό τον τρόπο να ολοκληρώνεται το μάτισμα των ιντρονίων κοντά στα χρωμοσώματα, και στη συνέχεια τα ώριμα mRNA κατευθύνονται στο κυτταρόπλασμα για να μεταφραστούν (Martin & Koonin, 2006). Ο πυρηνικός πόρος ελέγχει την μετάβαση πρωτεϊνών και mRNA μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος. Μελέτες συγκριτικής γονιδιωματικής των πρωτεϊνών του συμπλόκου του πυρηνικού πόρου και των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο σχηματισμό του πυρηνίσκου έδειξαν ότι πολλές από αυτές φέρουν κοινά χαρακτηριστικά και με βακτηριακές αλλά και με αρχαϊκές πρωτεΐνες (Mans et al., 2004; Staub et al., 2004). Από αυτή τη σκοπιά, η δημιουργία του πυρήνα σηματοδοτεί και τη δημιουργία ενός νέου υποκυτταρικού διαμερίσματος (εκτός του πυρήνα), του ευκαρυωτικού κυτταροπλάσματος. Από το κυτταρόπλασμα πλέον απουσιάζει η ενεργή χρωματίνη και υπερισχύουν οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις έναντι των αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-DNA, που ρυθμίζουν τη σηματοδότηση και τη ρύθμιση των λειτουργιών του κυττάρου. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μεταξύ των πρωτεϊνών μπορούν να δημιουργήσουν νέες δομές και λειτουργίες, όπως ο κυτταροσκελετός και το σύστημα ενδομεμβρανικής διακίνησης, που ξεχωρίζουν τους ευκαρυώτες από τους προκαρυώτες. Ένα περίεργο χαρακτηριστικό αυτής της θεωρίας για την εξέλιξη του πυρήνα είναι ότι μοναδικό προαπαιτούμενο για τους ευκαρυώτες είναι να διαθέτουν τον πυρηνικό φάκελο κατά τη διάρκεια της γονιδιακής έκφρασης, το οποίο οδηγεί και σε ένα επιπλέον χαρακτηριστικό που διαχωρίζει τις δύο ομάδες: Η γονιδιακή έκφραση στους προκαρυώτες δε σταματά κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, σε αντίθεση με τους ευκαρυώτες, οι οποίοι κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων και της κυτταρικής διαίρεσης αναστέλλουν οποιαδήποτε γονιδιακή έκφραση. Κατά τον Ptashne (Ptashne, 2013) αυτό αποτελεί και έναν εξελικτικό σύνδεσμο μεταξύ του μάτισματος, της θεωρίας της εξέλιξης του πυρήνα, την προέλευση των μηχανισμών ολικής γονιδιακής αποσίωπησης, οι οποίοι συνήθως

περιλαμβάνουν χημικές τροποποιήσεις του γονιδιώματος και της καταγωγής του κυτταρικού κύκλου των ευκαρυωτικών κυττάρων. Η αλληλουχία αυτών των γεγονότων οδηγεί σε ένα διμερές κύτταρο (Εικ. 1) το οποίο: (α) χρειάζεται τον πυρήνα για να ελέγξει την γονιδιακή έκφραση, (β) έχει διατηρήσει τα αρχαϊκά ριβοσώματα στο κυτταρόπλασμα του ως κατάλοιπο του ξενιστή, (γ) ο ενεργειακός του μεταβολισμός είναι βακτηριακής προέλευσης και στο κυτταρόπλασμα και στο μιτοχόνδριο, (δ) έχει εκφυλίσει όλες τις αλυσίδες οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στην πλασματική του μεμβράνη, (ε) έχει διατηρήσει την αρχαϊκή του ΑΤΡάση, η οποία όμως πλέον δρα αντίστροφα και οξινίζει το χυμοτόπιο και (στ) διαθέτει τυπικά ευκαρυωτικά χαρακτηριστικά (Εικ. 1h).

1.2.3 Τα πλαστίδια

Στην ιστορία της ενδοσυμβίωσης, μετά την ενσωμάτωση των μιτοχονδρίων, υπάρχει και ένα δεύτερο σημαντικό γεγονός, όπου ένα κυανοβακτήριο ενσωματώθηκε σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο και αυτό στη συνέχεια εξελίχθηκε σε πλαστίδιο (Εικ. 2). Η προέλευση των πλαστιδίων αποτελεί κεντρικό θέμα σε πολλές πρόσφατες επιστημονικές μελέτες (Ku et al., 2014, 2015; Keeling, 2013; Zimorski et al., 2014). Με βάση τη θεωρία της ενδοσυμβίωσης, ένας προαιρετικά αναερόβιος ευκαρυώτης που ήδη είχε μιτοχόνδρια, ενσωμάτωσε ένα κυανοβακτήριο (Εικ. 2). Το πιθανό μεταβολικό πλαίσιο για αυτή την ενδοσυμβίωση μπορεί να περιελάμβανε τους υδατάνθρακες (Domman et al., 2015), το οξυγόνο (Martin & Muller, 1998), την παροχή αζώτου (Deusch et al., 2008) που παράγουν τα πλαστίδια ή συνδυασμός αυτών. Οι τελευταίες φυλογενετικές αναλύσεις υποδεικνύουν ότι το κυανοβακτήριο-πρόδρομος του πλαστιδίου είχε μεγάλο γονιδίωμα και επιπλέον είχε την ικανότητα αζωτοδέσμευσης (Dagan et al., 2013; Ku et al., 2014). Όπως και με τα μιτοχόνδρια, έτσι και σε αυτή την περίπτωση είχαμε μεταφορά πολλών γονιδίων από το γονιδίωμα του συμβιώτη στο γονιδίωμα του ξενιστή (Martin et al., 2002), με τη διαφορά εδώ, ότι το κύτταρο είχε ήδη πυρήνα (Εικ. 2). Η εξέλιξη των μηχανισμών ελέγχου εισόδου των πρωτεϊνών για τα οργανίδια έπαιξε ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο και στην περίπτωση του μιτοχονδρίου (Dolezal et al., 2006) αλλά και των πλαστιδίων (Schleiff & Becker, 2011), καθώς με αυτόν τον τρόπο μπόρεσε να γίνει γενετική ενσωμάτωση του συμβιώτη με τον ξενιστή, χωρίς παράλληλα να αλλοιωθεί η βιοχημική ταυτότητα του συμβιώτη. Όπως φαίνεται και την Εικ. 2 ο διαχωρισμός των τριών κλάσεων φυκών που φέρουν πρωτογενή πλαστίδια (πράσινα φύκη, κόκκινα φύκη και γλαυκόφυτα) έγινε νωρίς στην πορεία της εξέλιξης.



Εικόνα 2. Η εξέλιξη των αναερόβιων ευκαρυωτών και η ενσωμάτωση του πλαστιδίου. (a-d) διαφοροποίηση των αρχέγονων ευκαρυωτών που έχουν μιτοχόνδρια, σε οργανισμούς που διαθέτουν ειδικές μορφές του μιτοχονδρίου όπως το υδρογενόσωμα, το μίτοσωμα και το εξελιγμένο μιτοχόνδριο. (e-f) Προέλευση του αρχέγονου πλαστιδίου με την ενδοσυμβίωση ενός κυανοβακτηρίου με έναν προαιρετικά αναερόβιο ευκαρυωτικό οργανισμό, και μεταφορά του πλαστιδικού γονιδιώματος στον πυρήνα. (g-i) διαφοροποίηση του αρχέγονου προγόνου (που φέρει πλαστίδια) σε πράσινα φυτά, ροδόφυτα και γλαυκόφυτα (Martin et al., 2015).

1.2.4 Το περοξύσωμα

Η αρχικές εκτιμήσεις όσον αφορά την προέλευση των περοξυσωμάτων ήταν ότι αποτελούν αυτόνομα οργανίδια που πολλαπλασιάζονται μέσω ανάπτυξης και διχοτόμησης που και αυτά προήλθαν μέσω ενδοσυμβίωσης (Lazarow and Fujiki, 1985).

Στην υπόθεση αυτή συνηγορούσαν τα δεδομένα ότι οι περοξυσωμικές πρωτεΐνες φέρουν σινιάλο οδηγό για την υποκυτταρική τοποθέτηση και επιπλέον, το οργανίδιο φέρει μηχανισμό εισόδου των πρωτεϊνών. Παρόλα αυτά, σε μελέτες που έγιναν σε μεταλλάγματα ζύμης που δεν είχαν περοξυσώματα, η εισαγωγή του λειτουργικού γονιδίου ανέστρεψε τον φαινότυπο (Subramani, 1998). Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στην απόρριψη της υπόθεσης της ενδοσυμβίωσης. Η επικρατούσα άποψη ως προς την καταγωγή του οργανιδίου υποστηρίζει ότι τα περοξυσώματα παράγονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER). Η παρατήρηση αυτή είχε γίνει και παλαιότερα, καθώς είχαν παρατηρηθεί πολλές μορφολογικές ομοιότητες μεταξύ των δύο διαμερισμάτων (Novikoff and Novikoff, 1972). Πιο πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι με την προσθήκη του μιτοχονδρίου, ο μεταβολισμός του οργανισμού άλλαξε και λόγω της δράσης των αναπνευστικών αλυσίδων, αυξήθηκε σημαντικά η ενδοκυτταρική παραγωγή ενεργών μορφών οξειδίου (ROS). Εδώ πρέπει να λάβουμε υπόψιν ότι στους ευκαρυώτες (εκτός των φυτών) η β-οξειδωση λαμβάνει χώρα και στα μιτοχόνδρια και επιπλέον, τρία από τα τέσσερα βασικά ένζυμα της β-οξειδωσης έχουν α-πρωτεοβακτηριακή προέλευση (Bolte et al., 2015). Ουσιαστικά η κινητήριος δύναμη για τη δημιουργία του περοξυσώματος ήταν η αποφόρτιση του μιτοχονδρίου από τη διαδικασία της β-οξειδωσης, τοποθετώντας την σε ένα νέο υποκυτταρικό διαμέρισμα (περοξύσωμα), με επιπλέον αντι οξειδωτικές ιδιότητες, με σκοπό την εν γένει μείωση της ενδογενούς παραγωγής ενεργών μορφών οξειδίου (Bolte et al., 2015).

Συνοψίζοντας τη θεωρία της ευκαρυογένεσης και τη δημιουργία των υποκυτταρικών οργανιδίων, αρχικά είχαμε την ενσωμάτωση ενός α-πρωτεοβακτηρίου (πρόδρομο μιτοχόνδριο) με ένα αρχαίο (ξενιστής). Το βακτηριακό γονιδίωμα μεταφέρθηκε στο γονιδίωμα του ξενιστή και σταδιακά εκφυλίστηκε, ο ξενιστής διατήρησε τα δομικά του χαρακτηριστικά (ριβοσώματα, δομικές πρωτεΐνες) όμως προσαρμόσε τον μεταβολισμό του σε αυτόν του βακτηρίου, το οποίο εξελίχθηκε σε ένα νέο οργανίδιο, το μιτοχόνδριο. Η μεταφορά των ιντρονίων τύπου II από το βακτηριακό γονιδίωμα στο γονιδίωμα του ξενιστή αποτέλεσε την εξελικτική πίεση για τη δημιουργία του πυρήνα, καθώς έπρεπε να εξασφαλιστεί ο διαχωρισμός της διαδικασίας της μεταγραφής και του ματίσματος από την μετάφραση, ενώ η αλλαγή στον μεταβολισμό και η αυξημένη παραγωγή ενεργών μορφών οξειδίου, οδήγησαν στον σχηματισμό του περοξυσώματος, πιθανότατα μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου, για να μπορέσουν να ελεγχθούν τα ενδογενή επίπεδα

παραγωγής ROS. Το επόμενο γεγονός, είναι η δεύτερη ενδοσυμβίωση, όπου ένας ευκαρυωτικός οργανισμός με τα παραπάνω χαρακτηριστικά, ενσωμάτωσε ένα φωτοσυνθετικό κυανοβακτήριο και το εξέλιξε στο σημερινό πλαστίδιο. Το γεγονός αυτό ορίζει και τον διαχωρισμό του φυτικού από το ζωικό βασίλειο της εξέλιξης, ενώ η περαιτέρω διαφοροποίηση των πλαστιδίων οδήγησε στη δημιουργία των τριών βασικών φυτικών κλάσεων (πράσινα φυτά και φύκη, ροδόφυτα, γλαυκόφυτα).

1.3 Μηχανισμοί υποκυτταρικής στόχευσης στα οργανίδια

Κατά τη διάρκεια της ενδοσυμβίωσης, οι συμβιώτες έχασαν την αυτονομία τους μέσω της μαζικής μεταφοράς της γενετικής τους πληροφορίας στον πυρήνα του ξενιστή, καταλήγοντας σε γενετικό πλεονασμό. Η εξέλιξη και η εγκαθίδρυση του μηχανισμού μετακίνησης των πρωτεϊνών προκάλεσε μαζική απώλεια γονιδίων, που οδήγησε στη μείωση του οργανιδιακού γονιδιώματος. Η διαδικασία μετακίνησης συμπεριέλαβε την επέκταση του αμινοτελικού άκρου της πρόδρομης πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από τον πυρήνα και συντίθεται στα κυτταροπλασματικά ριβοσώματα (Rigas et al., 2014).

Η είσοδος των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια ή τους χλωροπλάστες είναι εξειδικευμένη για κάθε οργανίδιο και καθορίζεται από την περιοχή του πεπτιδίου στόχευσης στο αμινοτελικό άκρο της κάθε πρωτεΐνης. Η περιοχή στόχευσης αναφέρεται ως πεπτίδιο μετάβασης (transit peptide) και πρόδρομη μιτοχονδριακή αλληλουχία (mitochondrial presequence), όταν η πρόδρομη πρωτεΐνη αναγνωρίζεται αντιστοίχως από το μηχανισμό εισαγωγής του χλωροπλάστη και του μιτοχονδρίου. Η συντονισμένη εξέλιξη των μηχανισμών εισαγωγής των πρωτεϊνών από τους συμβιώτες, οδήγησε στη δυαδική στόχευση των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τον πυρήνα τόσο στα μιτοχόνδρια όσο και στους χλωροπλάστες (Millar et al., 2006).

Οι περισσότερες πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια, έχουν εξειδικευμένη στόχευση σε ένα οργανίδιο. Παρόλα αυτά, η δυαδική υποκυτταρική τοποθέτηση πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες απαντάται συχνά λόγω της μετα-ενδοσυμβιωτικής τους εξέλιξης (Millar et al. 2006, Baudisch et al. 2014). Στα φυτά αναφέρονται δύο διαμορφώσεις δυαδικής στόχευσης, όπου η μία χαρακτηρίζεται από δύο πρόδρομες αλληλουχίες στόχευσης (twin presequences) και η άλλη από μία ενιαία πρόδρομη αλληλουχία στόχευσης με διφορούμενα χαρακτηριστικά (ambiguous

presequence) (Peeters and Small 2001, Silva-Filho 2003, Mackenzie 2005, Baudisch et al. 2014).

Η ενιαία πρόδρομη αλληλουχία (ambiguous presequence) κωδικοποιεί μία πρωτεϊνική ισομορφή, με ένα πεπτίδιο-οδηγό που αναγνωρίζεται από τον μηχανισμό εισόδου τόσο του μιτοχονδρίου όσο και του χλωροπλάστη. Παρά το γεγονός ότι αυτές οι διαμορφώσεις μπορούν να οργανωθούν σε περιοχές που καθορίζουν την επιλεκτική στόχευση σε ένα ανεξάρτητο οργανίδιο, τα σινιάλα που είναι υπεύθυνα για την οργανιδιακή στόχευση συνήθως αλληλεπικαλύπτονται (Berglund et al., 2009). Συνεπώς, η ενιαία πρόδρομη αλληλουχία στόχευσης δεν μπορεί να διαχωριστεί πλήρως από τα εξειδικευμένα οργανιδιακά πεπτίδια στόχευσης, ενώ η αλληλουχία της παρουσιάζει μια ενδιάμεση αμινοξική σύσταση που χρησιμοποιεί τα ίδια μονοπάτια εισόδου στα οργανίδια με τις εξειδικευμένες οργανιδιακές πρωτεΐνες. Παρά το γεγονός ότι τα χαρακτηριστικά που καθορίζουν τη δυαδική στόχευση δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως, οι φυσικοχημικές ιδιότητες της αμινοτελικής περιοχής της ενιαίας πρόδρομης αλληλουχίας, συμπεριλαμβανομένης της υδροφοβικότητας, του φορτίου των αμινοξέων και της δευτεροταγούς δομής, διαμορφώνουν τη διπλή τοποθέτηση (Berglund et al., 2009).

Οι δυαδικές πρόδρομες αλληλουχίες στόχευσης (twin presequences) περιλαμβάνουν δύο διακριτές περιοχές στόχευσης που οργανώνονται σε διαδοχική σειρά στο αμινοτελικό άκρο. Στους ευκαρυώτες, οι δυαδικές πρόδρομες αλληλουχίες μπορούν να προσφέρουν δυαδική στόχευση σε διακριτά υποκυτταρικά οργανίδια χρησιμοποιώντας δύο εναλλακτικά κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο (Silva-Filho 2003, Carrie et al. 2009, Carrie and Small 2013). Τόσο η ενιαία όσο και οι δυαδικές πρόδρομες αλληλουχίες ενισχύουν τον αριθμό των πρωτεϊνικών ισομορφών στα υποκυτταρικά διαμερίσματα χωρίς να επηρεάζουν το μέγεθος του γονιδιώματος. Η πλειονότητα των πρωτεϊνών δυαδικής στόχευσης στα φυτά χαρακτηρίζεται από την ενιαία πρόδρομη αλληλουχία στόχευσης, επιδεικνύοντας μια γενικότερη υπεροχή έναντι των δυαδικών πρόδρομων αλληλουχιών στόχευσης (Carrie et al., 2009).

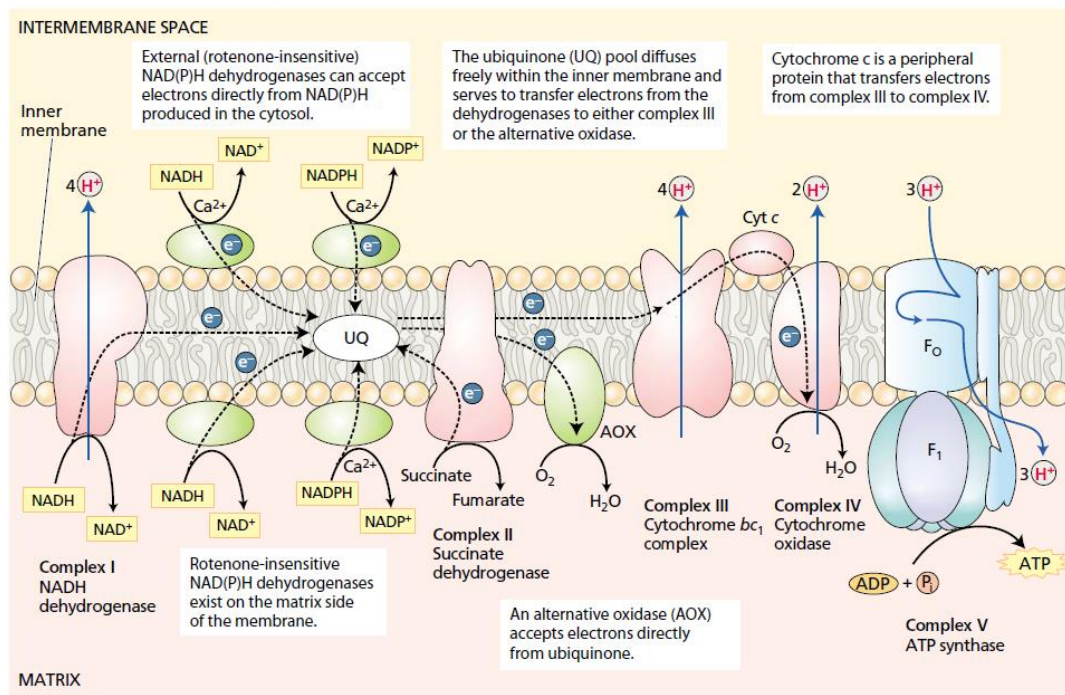
Όσον αφορά το περοξύσωμα, διαθέτει και αυτό δικό του ξεχωριστό μηχανισμό ελέγχου της εισόδου των πρωτεϊνών στη μήτρα του (Brown & Baker 2008; Girzalsky et al., 2009; Ma & Subramani 2009). Οι περισσότερες περοξυσωματικές πρωτεΐνες φέρουν ένα μικρό σινιάλο στόχευσης (Peroxisomal Targeting Signal, PTS) στο καρβόξυ άκρο τους, το

οποίο συνήθως αποτελείται από τα αμινοξέα σερίνη, λυσίνη, λευκίνη (SKL) ή συντηρημένων παραλλαγών τους, αν και θεωρείται ότι και ορισμένα ανωφορικά αμινοξικά κατάλοιπα έχουν και αυτά ρόλο ως προς την αναγνώριση (Brocard & Hartig, 2006). Το μοτίβο αυτό ονομάζεται Peroxisomal Targeting Signal 1 (PTS1). Υπάρχουν και ορισμένες πρωτεΐνες που αντί του αναφερθέντος σινιάλου PTS1, χρησιμοποιούν το εναλλακτικό PTS2 διμερές σινιάλο στο άμινο άκρο τους, το οποίο έχει το μοτίβο [RK]-[LVI]-5-[HQ]-[LA], ενώ υπάρχουν και περιπτώσεις όπου περοξυσωμικές πρωτεΐνες δεν φέρουν κανένα από τα παραπάνω σινιάλα αναγνώρισης, αλλά εισέρχονται στο οργανίδιο μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλες περοξυσωμικές πρωτεΐνες που φέρουν κάποιο σινιάλο PTS (van der Klei & Veenhuis, 2006a).

1.4 Λειτουργίες των οργανιδίων

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

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



Εικόνα 3. Η Αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων μαζί με το σύμπλοκο της ΑΤΡάσης στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Η συζευγμένη οξειδωτική φωσφορυλίωση περιλαμβάνει τις δυο αυτές διαδικασίες.

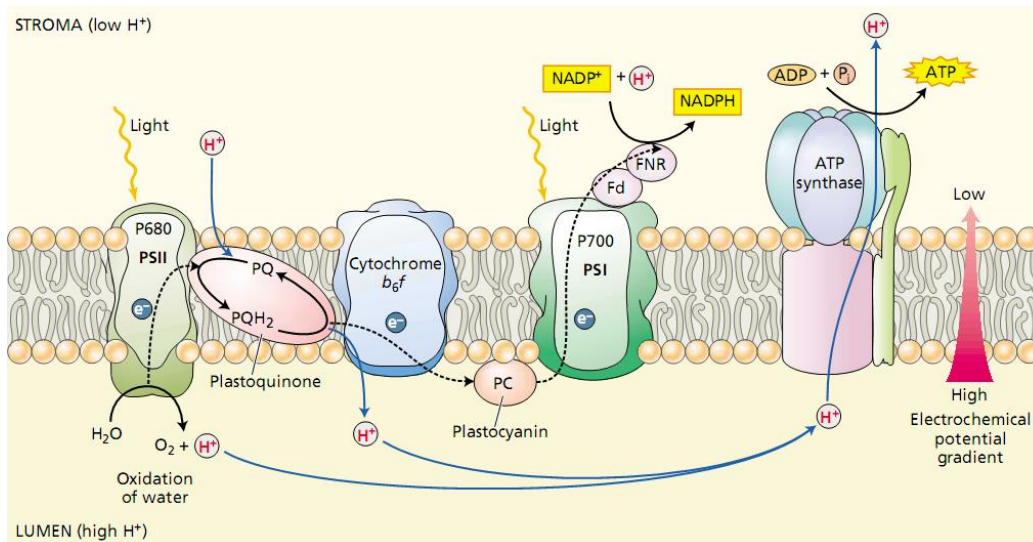
Η ΑΑΜΗ τοποθετείται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Αρχικά ένα μόριο NADH ανάγεται σε NAD⁺ (Σύμπλοκο I) απελευθερώνοντας ένα ηλεκτρόνιο και ένα πρωτόνιο. Το πρωτόνιο εξάγεται στον διαμεμβρανικό χώρο, ενώ το ηλεκτρόνιο ακολουθεί μια πορεία μέσα από τα σύμπλοκα της αλυσίδας (με μια σειρά οξειδωαναγωγικών αντιδράσεων) για να καταλήξει στον τελικό αποδέκτη του που είναι το μοριακό οξυγόνο (Σύμπλοκο IV) και το οξυγόνο ανάγεται σε νερό. Όπως φαίνεται και στη σχηματική αναπαράσταση της ΑΑΜΗ (Εικ. 3) 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 κινητήριο 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

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 (σάκχαρα). Η διαδικασία μπορεί να χωριστεί σε δύο επιμέρους κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τις αντιδράσεις φωτός, όπου γίνεται η απορρόφηση της ηλιακής ενέργειας από τις χλωροφύλλες και η φωτόλυση του νερού (ελευθερώνονται ηλεκτρόνια). Η διαδικασία αυτή γίνεται στη μεμβράνη του θυλακοειδούς και ως τελικά προϊόντα έχει το ATP και το NADPH. Οι δομικές μονάδες του μηχανισμού ονομάζονται φωτοσυστήματα (PSI και PSII) και στο ενεργό τους κέντρο έχουν μόρια χλωροφύλλης. Τα δύο φωτοσυστήματα μαζί με άλλα τρία πρωτεϊνικά σύμπλοκα συγκροτούν την φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ΦΑΜΗ, **Εικ.4**).



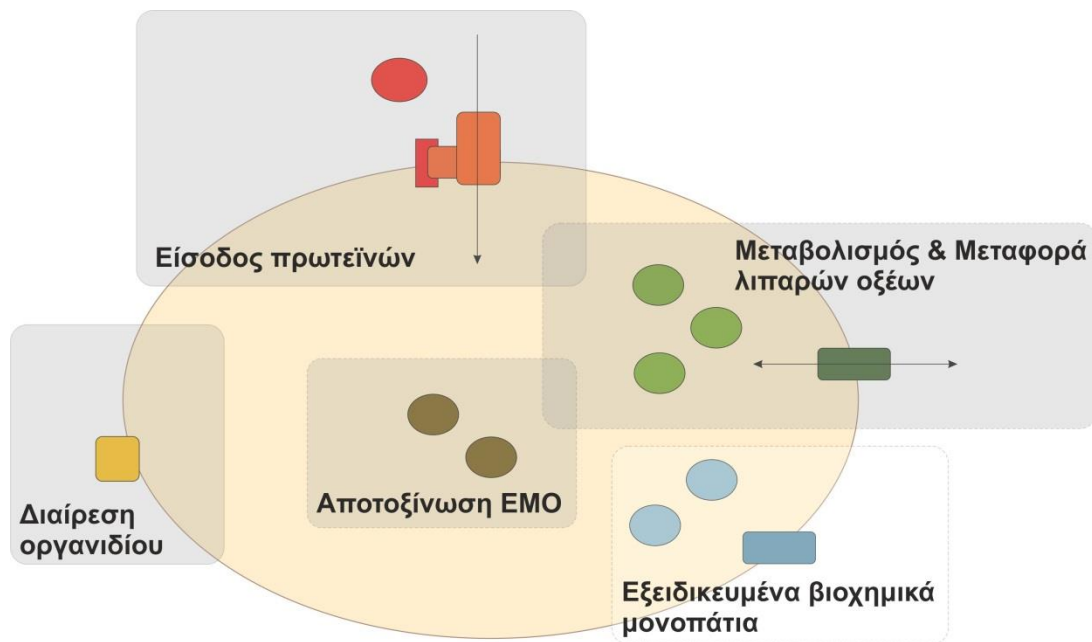
Εικόνα 4. Η φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στον χλωροπλάστη.

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

Τα περοξυσώματα αποτελούν μια τρίτη ομάδα υποκυτταρικών οργανιδίων, τα οποία διαθέτουν όλοι οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί. Η παρατήρησή τους έγινε πολύ αργότερα από τα μιτοχόνδρια και τα πλαστίδια, το 1954 από τον Rhodin ([Rhodin, 1954](#)) ο οποίος αρχικά τα είχε ονομάσει μικροσώματα. Ο αρχικός τους χαρακτηρισμός ως νέος τύπος υποκυτταρικών οργανιδίων έγινε από τον Christian de Dube το 1966, ο οποίος τα απομόνωσε για πρώτη φορά, από ηπατικά κύτταρα αρουραίων για να μελετήσει τη βιοχημεία τους ([de Dube & Baudhuin, 1966](#)). Ο de Dube και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν την ύπαρξη ενζύμων υπεύθυνων για τη δημιουργία και τον καταβολισμό του υπεροξειδίου

του υδρογόνου και για αυτό έδωσαν και το όνομα «περοψύσωμα» στο νέο υποκυτταρικό οργανίδιο. Με την απομονωση και μελέτη των οργανιδίων και από άλλους οργανισμούς και διάφορους ιστούς, παρατηρήθηκε ότι από ιστό σε ιστό και από είδος σε είδος μπορεί να υπάρχουν σημαντικές διαφορές ως προς τις μεταβολικές ιδιότητες και στο ενζυμικό περιεχόμενο του οργανιδίου (Gabaldon, 2010). Πριν περιγραφούν οι επιμέρους ειδικές ιδιότητες των περοξυσωμάτων στους διάφορους οργανισμούς ή κυτταρικούς τύπους, μια γενική περιγραφή τους είναι: περιβάλλονται από μια απλή μεμβράνη, διαθέτουν ένα σχετικά συντηρημένο μηχανισμό βιογένεσης και διατήρησης, όμως παρουσιάζουν μεγάλη παραλλακτικότητα ως προς το ενζυμικό προφίλ τους (Εικ. 5). Στο στρώμα τους εντοπίζονται ένζυμα υπεύθυνα για τον καταβολισμό των λιπαρών οξέων και την αποτοξίνωση ενεργών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), ενώ σε αντίθεση με τα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες, δεν διαθέτουν δικό τους γονιδίωμα. Συνεπώς, όλες οι πρωτεΐνες θα πρέπει να συντεθούν στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια να εισέλθουν στο οργανίδιο, μέσω ενός μηχανισμού εισόδου που αναγνωρίζει συγκεκριμένα σινιάλα (Brown & Baker, 2008; Girzalsky et al., 2009; Ma & Subramani, 2009). Στα περοξυσώματα των θηλαστικών λαμβάνουν χώρα πολλές κύριες λειτουργίες όπως η οξειδωση των λιπαρών οξέων μέσω της α-οξειδωσης, μεταβολισμός των αμινοξέων καθώς και διάφορα στάδια για τη σύνθεση πουρινών, πυριμιδινών, χοληστερόλης, αιθερολιπιδίων καθώς και χολικού οξέος (Kikuchi et al., 2004; Islinger et al., 2006). Συγκριτικές μελέτες περοξυσωμάτων από διάφορους ιστούς έδειξαν ότι μπορεί να υπάρχουν και ιστοειδικές λειτουργίες στα οργανίδια (Mi et al., 2007). Όσον αφορά τα περοξυσώματα των μυκήτων, στον μονοκύτταρο μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* οι κύριες μεταβολικές διεργασίες είναι ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων, μεταβολισμός των αμινοξέων και αποτοξίνωση των ROS που παράγονται από αυτές τις αντιδράσεις (Schafer et al., 2001; Yi et al., 2002). Άλλα είδη μυκήτων μπορεί να παρουσιάζουν εντελώς διαφορετικό μεταβολικό προφίλ στα περοξισώματά τους το οποίο να εξειδικεύεται στον μεταβολισμό μιας ασυνήθιστης μορφής άνθρακα ή οργανικού αζώτου που χρησιμοποιούν για να αναπτυχθούν (van der Klei & Veenhuis, 2006). Σε νηματοειδείς μύκητες τα περοξισώματά τους μπορεί να χρησιμοποιούνται και για τη βιοσύνθεση ειδικών μορίων, όπως για παράδειγμα στο μύκητα *Penicillium chrysogenum*, τα τελευταία βήματα για τη βιοσύνθεση του αντιβιοτικού πενικιλίνη λαμβάνουν χώρα στο περοξίσωμα (van der Klei & Veenhuis, 2006). Τα περοξυσώματα των ανώτερων φυτών παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές διεργασίες του

φυτού, όπως η βλάστηση των σπερμάτων, η γήρανση των φύλλων, η ωρίμανση των καρπών, η



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση των κύριων διεργασιών του περοξυσώματος. Όλων των τύπων τα περοξυσώματα φέρουν ένα κοινό πρωτεϊνικό δυναμικό το οποίο αποτελείται (με μικρές παραλλαγές) από έναν μηχανισμό ελέγχου για την είσοδο των πρωτεϊνών, ένα σετ πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνο για τη διαίρεση του οργανιδίου, περιλαμβάνουν την ομάδα των αποτοξινωτικών ενζύμων από ενεργές μορφές οξυγόνου (EMO) και τις πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για τον μεταβολισμό και τη μεταφορά των λιπαρών οξέων. Πέρα από αυτές τις πρωτεΐνες, ανάλογα με τον οργανισμό και τον τύπο του περοξυσώματος, μπορεί να υπάρχουν και άλλες μεγάλες ομάδες πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την εκάστοτε εξειδικευμένη δράση.

απόκριση σε παράγοντες βιοτικής και αβιοτικής καταπόνησης, η φωτομορφογένεση, η φωτοαναπνοή, η βιοσύνθεση φυτικών ορμονών και η κυτταρική σηματοδότηση έναντι ενεργών μορφών οξυγόνου ή αζώτου (Gabaldon, 2010). Πέραν των γνωστών μονοπατιών, έχει βρεθεί ότι τα φυτικά περοξυσώματα περιέχουν ένζυμα που συμμετέχουν στο μονοπάτι των φωσφοπεντοζών, στην οξείδωση των λιπαρών οξέων, στον κύκλο ασκορβικού-γλουταθειόνης, στη βιοσύνθεση του τζασμονικού οξέως και της αυξίνης και στο μεταβολισμό των ενεργών μορφών αζώτου και οξυγόνου (Reumann et al., 2007; Eubel et al., 2008; Palma et al., 2009). Τα περοξυσώματα των ανώτερων φυτών παρουσιάζουν μεγάλο ποσοστό ιστοειδικής εξειδίκευσης και έχουν καταγραφεί τουλάχιστον τέσσερις τύποι φυτικών περοξυσωμάτων: Τα αδιαφοροποίητα περοξυσώματα εμπεριέχουν κυρίως την καταλάση και την ουρικάση, τα γλυοξυσώματα είναι εμπλουτισμένα με ένζυμα υπεύθυνα για την οξείδωση των λιπαρών οξέων και του γλυοξυλυτικού κύκλου και η

δράση τους βοηθά στον καταβολισμό των αποθησαυριστικών λιπαρών οξέων και τη μετατροπή τους σε σάκχαρα, απαραίτητα κατά τη βλάστηση των σπερμάτων και την περαιτέρω ανάπτυξη του φυτού. Τα περοξυσώματα του φύλλου απαντώνται σε όλους τους φωτοσυνθετικούς ιστούς και περιέχουν αρκετά ένζυμα που συμμετέχουν στη φωτοαναπνοή. Τέλος, ένας άλλος τύπος περοξυσωμάτων έχει ανακαλυφθεί στα ριζικά φυμάτια ορισμένων ψυχανθών, όπου λαμβάνει χώρα η βιοσύνθεση της αλλαντοΐνης (Gabaldon, 2010).

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

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).

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.

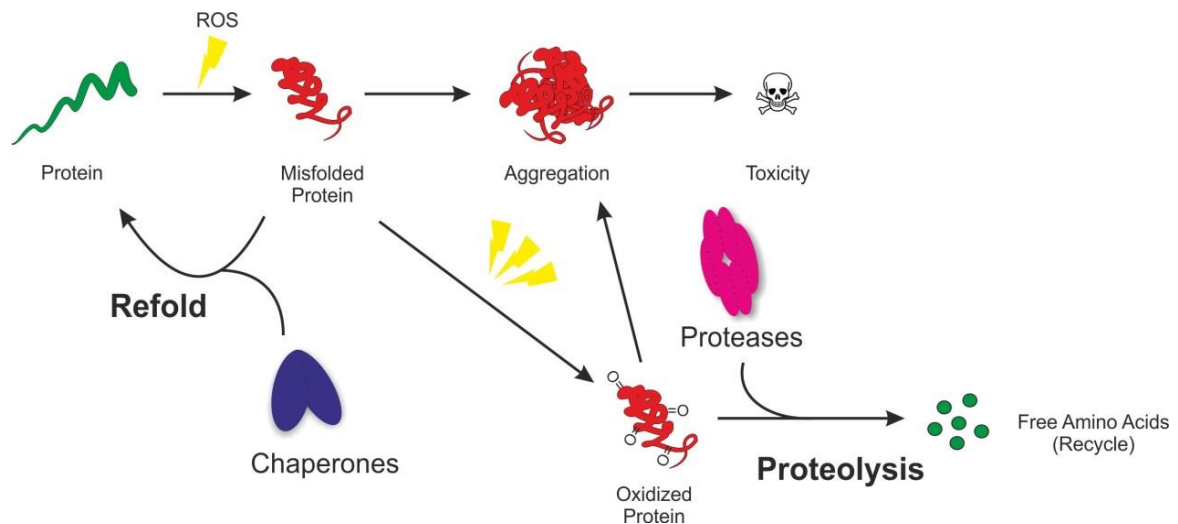
Η παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου επάγεται υπό διάφορες συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης στα φυτά, όπως για παράδειγμα σε συνθήκες υψηλού φωτισμού, σε συνθήκες ξηρασίας, σε ακραίες τιμές θερμοκρασίας ή σε συνθήκες μηχανικής καταπόνησης (Apel and Hirt 2004; Finkel and Holbrook 2000; Friguet et al. 2008). Για να αντιπάρελθουν 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 οξυφόνου 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 καρτενοειδή και το ασκορβικό οξύ. Σε πειράματα όπου έγινε μεταβολή της ποιότητας και της ποσότητας των καρτενοειδών 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. 6), 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, διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες και μεταβολικά σύνδρομα (Cassarino & Bennett, 1999; Wallace, 2005; Kwong et al. 2006), ενώ και δυσλειτουργίες στο περοξύσωμα σχετίζονται πλέον με διάφορες χρόνιες εκφυλιστικές ασθένειες όπως ο διαβήτης τύπου II και ο καρκίνος (Nordgren & Fransen, 2014), καθώς και με τη γήρανση (Perichon et al., 1998).

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 οξείδωση 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. 6), καθώς η δημιουργία συσσωματωμάτων οξειδωμένων πρωτεϊνών είναι καταστροφική για τα κύτταρα.



Εικόνα 6. Ο μηχανισμός ελέγχου και διατήρησης της ποιότητας των πρωτεϊνών (Protein Quality Control, PQC) στα υποκυτταρικά οργανίδια. Υπό συνθήκες καταπόνησης, συνήθως αυξάνεται η ποσότητα των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) εντός των κυττάρων, και ιδιαίτερα στα μεταβολικά ενεργά οργανίδια (μιτοχόνδριο, χλωροπλάστης, περοξύσωμα). Η επίδραση των ROS στις πρωτεΐνες είναι ιδιαίτερα επιβλαβερή, καθώς τείνει να τους χαλάει τη στερεοδιάταξη, καθιστώντας τις μη λειτουργικές. Στο στάδιο αυτό, και αν η καταπόνηση δεν ενταθεί περισσότερο, επεμβαίνουν οι μοριακοί συνοδοί (Chaperones), οποίοι αναδιπλώνουν την πρωτεΐνη επαναφέροντας την στη φυσιολογική της δομή. Αν η καταπόνηση όμως συνεχιστεί, οι πρωτεΐνες τείνουν να οξειδώνονται και να δημιουργούν τοξικά μη-λειτουργικά συσσωματώματα, τα οποία αν δεν ελεγχθούν προκαλούν κυτταρικό θάνατο. Σε αυτό το στάδιο επεμβαίνουν οι πρωτεάσες, οι οποίες υδρολύουν τις αποδιαταγμένες/οξειδωμένες πρωτεΐνες ανακυκλώνοντας τις σε ελεύθερα αμινοξέα, αποτρέποντας τη δημιουργία συσσωματωμάτων.

Το ρόλο αυτό στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των κυττάρων έχει ο μηχανισμός του Πρωτεασώματος 26S/ουμπικουιλίνης, 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 Μηχανισμοί πρωτεόλυσης στα ευκαρυωτικά κύτταρα

1.6.1 Το 26S πρωτεάσωμα

Το 26S πρωτεάσωμα απαντάται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα των φυτικών κυττάρων, με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του να εντοπίζονται σε ιστούς που διαιρούνται ραγδαία. Αποτελεί ένα ATP-εξαρτώμενο πρωτεολυτικό σύμπλοκο, το οποίο αποδομεί πρωτεΐνες σημασμένες με Ub. Περιλαμβάνει 31 κύριες υπομονάδες που οργανώνονται σε δύο υποσύμπλοκα: τον πυρήνα 20S, που είναι μια ευρέως φάσματος ATP-εξαρτώμενη πρωτεάση με δράση ανεξάρτητη της Ub, και το 19S ρυθμιστικό μόριο, το οποίο συνδράμει στην αναγνώριση και την αποδιάταξη των επιθυμητών στόχων, απομακρύνοντας τις Ubs και οδηγώντας τα αποδιατεταγμένα πολυπεπίδια στο κέντρο του συμπλόκου για αποδόμηση (Smalle and Vierstra, 2004).

Το μονοπάτι ουμπικουιτίνη/26S πρωτεάσωμα αποτελεί αδιαμφισβήτητα το κυρίαρχο πρωτεολυτικό σύστημα στα φυτά, στο οποίο η ουμπικουιτίνη (Ub) λειτουργεί ως ένα επαναχρησιμοποιούμενο σινιάλο αναγνώρισης για την επιλεκτική ανακύκλωση των πρωτεϊνών (Smalle and Vierstra, 2004). Τα πολυμερή της Ub συνδέονται ομοιοπολικά με τους πρωτεϊνικούς στόχους χρησιμοποιώντας μια αλυσιδωτή αντίδραση τριών βημάτων, η οποία ανιχνεύει συγκεκριμένα σινιάλα ουμπικουιτίνωσης. Οι πρωτεΐνες-στόχοι μπορεί να βρίσκονται στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα, στην επιφάνεια των μεμβρανών που έρχεται σε επαφή με αυτά τα συστατικά του κυττάρου ή ακόμη να προέρχονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) ακολουθώντας την παλίνδρομη μεταφορά τους πίσω στο κυτταρόπλασμα. Οι πρωτεΐνες που σημαίνονται με πολυμερή ουμπικουιτίνης, αποδομούνται κατόπιν από το 26S πρωτεάσωμα με την παράλληλη απελευθέρωση των μορίων Ub που θα επαναχρησιμοποιηθούν (Smalle and Vierstra, 2004).

Μέσω αυτού του κύκλου, το μονοπάτι Ub/26S πρωτεάσωμα απομακρύνει επιτυχώς τις μη-φυσιολογικές πρωτεΐνες και τις περισσότερες ρυθμιστικές πρωτεΐνες που έχουν μικρό χρόνο ζωής, επηρεάζοντας έτσι τις περισσότερες ενδοκυτταρικές λειτουργίες. Συγκεκριμένα στην περίπτωση των φυτών, τα αναρίθμητα συστατικά του μονοπατιού Ub/26S πρωτεασώματος που έχουν προσδιοριστεί (>5% του συνολικού πρωτεώματος του *Arabidopsis thaliana*) υποδεικνύουν πως αυτό το καταβολικό μονοπάτι ανταγωνίζεται τη μεταγραφή και τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών ως τους κύριους ρυθμιστές των λειτουργιών του φυτικού κυττάρου (Smalle and Vierstra, 2004).

1.6.2 Οι ATP-εξαρτώμενες οργανιδιακές πρωτεάσες

1.6.2.1 Η οικογένεια Clp

Η πρωτεάση Clp είναι ένα ένζυμο που αποτελείται από εξειδικευμένες υπομονάδες. Η καταλυτική περιοχή πρωτεόλυσης και η περιοχή ATPάσης βρίσκονται σε διαφορετικές υπομονάδες του ενζύμου. Στο *Escherichia coli*, η υπομονάδα της πρωτεάσης ClpP δημιουργεί ένα επταμερές δακτύλιο με στενό κεντρικό πόρο. Δύο τέτοιοι δακτύλιοι αλληλεπιδρούν μεταξύ τους δημιουργώντας μια μεγαλύτερη και πιο πολύπλοκη δομή. Ένα άλλο σύμπλεγμα είναι αυτό που αποτελείται από υπομονάδες περιοχών ATPάσης, τη ClpA ή ClpX (όταν πρόκειται για ένα τμήμα AAA⁺ ή πολλαπλά, αντίστοιχα) και συνδέεται εξωτερικά του συμπλέγματος που διενεργεί την πρωτεόλυση. Οι ClpA, ClpX δημιουργούν ανεξάρτητα ένα ομοεξαμερές δακτύλιο χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών AAA⁺, ο οποίος έχει τη δράση μοριακού συνοδού. Πρωτεάσες ομόλογες της Clp από το *E.coli* έχουν βρεθεί και χαρακτηριστεί στους ανώτερους ευκαρυώτες, αλλά δεν υπάρχουν στους κατώτερους ευκαρυώτες, όπως είναι η ζύμη. Παρ' όλα αυτά, παρόμοιες πρωτεΐνες με τις Clp (Clp-like), αλλά χωρίς πρωτεολυτική δράση έχουν βρεθεί στα μιτοχόνδρια κυττάρων ζύμης (Van Dyck et al., 1994).

Στο *Arabidopsis thaliana* υπάρχουν 14 γονίδια που κωδικοποιούν υπομονάδες Clp. Μόνο η ClpP1 κωδικοποιείται στο χλωροπλαστικό γονιδίωμα, ενώ όλα τα άλλα γονίδια είναι πυρηνικά. Πρόσφατα βρέθηκε ότι ένα μέρος του ολοενζύμου Clp τοποθετείται στο στρώμα του χλωροπλάστη και αποτελείται από έξι ισομερή Clp (ClpP1, ClpP2, ClpP3, ClpP4, ClpP5, ClpP6), τέσσερις μη πρωτεολυτικές υπομονάδες (ClpR1-ClpR4) και δύο εξειδικευμένες για τα φυτά υπομονάδες, τις ClpS1, ClpS2 (Peltier et al., 2004).

1.6.2.2 Η οικογένεια FtsH

Η πρωτεάση FtsH αρχικά χαρακτηρίστηκε στο *E.coli* ότι αποικοδομεί πρωτεΐνες μικρής διάρκειας ζωής (short lived). Σε αντίθεση με τη πρωτεάση Clp, που αποτελείται από πολλαπλές υπομονάδες με διαφορετικές λειτουργίες, η πρωτεάση FtsH έχει τα τμήματα ATPάσης και πρωτεόλυσης στο ίδιο πολυπεπίδιο και από αυτό δημιουργούνται ομοολιγομερή σύμπλοκα. Τα ομόλογα της πρωτεάσης FtsH στη ζύμη, Yta10-12p, έχουν χαρακτηριστεί λεπτομερώς ότι τοποθετούνται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Langer et al., 2000). Έπειτα από κρυσταλλογραφική ανάλυση με ακτίνες X, το τμήμα ATPάσης από FtsH του *E.coli* δημιουργεί ένα εξαμερές δακτύλιο που περιέχει

συντηρημένα αρωματικά αμινοξέα. Επίσης η πρωτεάση FtsH του *E. coli* έχει δύο διαμεμβρανικά τμήματα στο άμινο άκρο, τα οποία πιθανότατα προσδένονται στην πλασματική μεμβράνη, ενώ το τμήμα υπεύθυνο για την πρωτεόλυση βρίσκεται στο καρβόξυ άκρο και αντικρίζει το κυτταρόπλασμα (Ito & Akiyama, 2005). Στους χλωροπλάστες των φυτικών κυττάρων τα ομόλογα των FtsH τοποθετούνται στις μεμβράνες των θυλακοειδών στους χλωροπλάστες έτσι, ώστε το τμήμα της πρωτεάσης να αντικρίζει το στρώμα (Lindahl et al., 1996, Chen et al., 2000, Sakamoto et al 2003). Πρόσφατα, στα κύτταρα ζύμης οι πρωτεάσες FtsH εντοπίστηκαν και στα μιτοχόνδρια (Komenda et al., 2006).

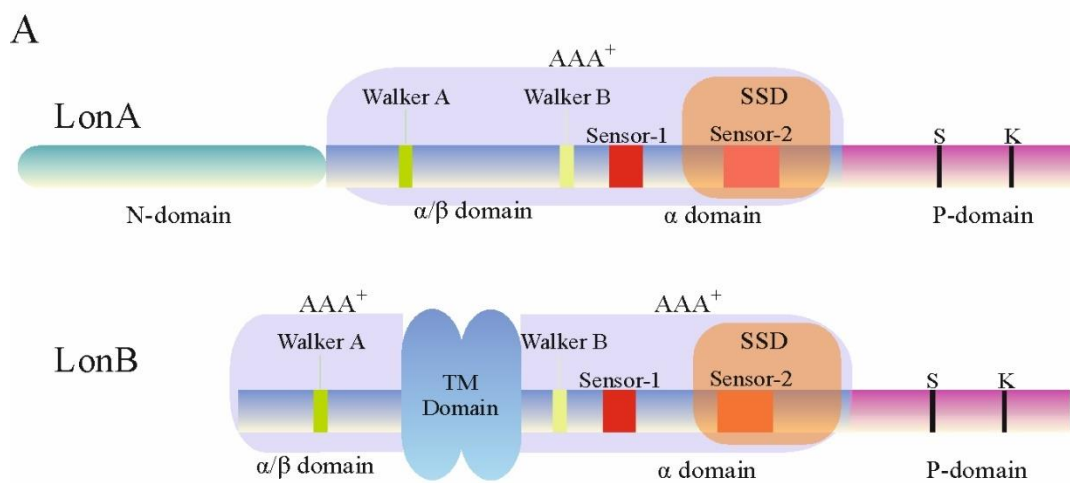
Το φυτό *Arabidopsis thaliana* έχει δώδεκα γονίδια *FtsH* και άλλα τέσσερα ομόλογα, τα οποία όμως δεν έχουν το μοτίβο πρόσδεσης ψευδαργύρου (zinc-binding motif) και άρα είναι μη λειτουργικά όσον αφορά στην πρωτεόλυση. Εννιά από τις δώδεκα *FtsH* πρωτεάσες τοποθετούνται στον χλωροπλάστη, ενώ οι υπόλοιπες τρεις (*FtsH*3, 4, 10) στα μιτοχόνδρια (Adam et al., 2001). Οι πρωτεάσες *FtsH* παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία των χλωροπλάστων επειδή αποικοδομούν τη φώτο-οξειδωμένη και «κατεστραμμένη» πρωτεΐνη D1, καθώς και άλλες πρωτεΐνες του φωτοσυστήματος II (PSII). Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι πρωτεάσες *FtsH* έχουν πολλαπλούς ρόλους και λειτουργίες στους χλωροπλάστες και για αυτό το λόγο θεωρούνται εξαιρετικά σημαντικές (Sakamoto, 2006).

1.6.2.3 Η οικογένεια Lon

Η πρωτεάση Lon οφείλει το όνομά της στον μακρύ νηματοειδή φαινότυπο (long filament phenotype) των μεταλλαγμένων K-12 κυττάρων του βακτηρίου *Escherichia coli* (Donch and Greenberg, 1968). Στο *E. coli* είναι γνωστή ως πρωτεάση La, κωδικοποιείται από το ομόλογο γονίδιο *Lon* του βακτηρίου και αποτελεί την πρώτη AAA⁺ πρωτεάση που ανακαλύφθηκε (Chung and Goldberg, 1981). Η “La” είναι η έκτη μουσική νότα στο σύστημα solfège και το όνομα αυτό δόθηκε στην πρωτεάση με σκοπό να περιγράψει τη σειρά έκλουσης της κατά τη χρωματογραφική ανάλυση των διαλυτών πρωτεολυτικών ενζύμων του *E. coli* (Swamy and Goldberg, 1981).

Η δομή της πρωτεάσης Lon αποτελείται από τρεις λειτουργικές περιοχές: την εκτεταμένη σε μήκος αμινοτελική περιοχή, η οποία πιθανώς σε συνδυασμό με το κεντρικό τμήμα AAA⁺ αλληλεπιδρά εκλεκτικά με τις πρωτεΐνες-στόχους, και την καρβοξυτελική

πρωτεολυτική περιοχή, που φέρει μια καταλυτική δυάδα σερίνης-λυσίνης (Εικ. 7). Βάσει της πρωτεϊνικής δομής και προέλευσής τους, οι πρωτεάσες Lon κατατάσσονται σε δύο υποοικογένειες (Rotanova et al., 2006; Rigas et al., 2012). Η υποοικογένεια LonA καθορίζεται από την παρουσία μεγάλου σε μήκος αμινοτελικού άκρου, ενώ η υποοικογένεια LonB στη θέση του αμινοτελικού άκρου έχει μια περιοχή που λειτουργεί ως άγκυρα σε μεμβράνες, η οποία αναδύεται μέσα από την περιοχή ATPάσης (Εικ. 7). Τα μέλη της υποοικογένειας LonB απαντώνται κυρίως στα Αρχαία, που υπολείπονται των πρωτεασών FtsH και Clp.



Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση των δομικών και λειτουργικών περιοχών της πρωτεάσης Lon.

Μέχρι στιγμής είναι γνωστοί δύο τύποι της πρωτεάσης Lon: η LonA, η οποία απαντάται στα βακτήρια και σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και η LonB, η οποία απαντάται στα αρχαία. Η βασική διαφορά μεταξύ των δύο μορφών είναι ότι οι LonA διαθέτουν ένα εκτεταμένο άμινο άκρο, το οποίο εμπεριέχει τα πεπτίδια οδηγούς για την υποκυτταρική τοποθέτηση (στους ευκαρυώτες), ενώ η περιοχή αυτή απουσιάζει από τις LonB και αντί αυτής διαθέτουν μια διαμεμβρανική περιοχή, που τις βοηθά να δεσμεύονται πάνω στην μεμβράνη. Επιπλέον, οι Lon διαθέτουν την κεντρική περιοχή AAA⁺ με συντηρημένα μοτίβα που είναι η περιοχή της ATPάσης, και στο τέλος της περιοχής, πριν το καρβόξυ άκρο βρίσκεται η περιοχή SSD (Sensor and Substrate Discrimination domain) η οποία είναι η υπεύθυνη περιοχή για την αναγνώριση των υποστρωμάτων. Η περιοχή αυτή παρουσιάζει και τη μεγαλύτερη παραλλακτικότητα μεταξύ των διάφορων ισομορφών. Τέλος στο καρβόξυ άκρο, βρίσκεται το ενεργό κέντρο της πρωτεάσης, όπου υπάρχει συντηρημένη μια δυάδα σερίνης (S) λυσίνης (K).

Ο δομικός πυρήνας της Lon είναι το τμήμα AAA⁺, το οποίο αποτελείται από δύο θεμελιώδεις περιοχές: την περιοχή νουκλεοτιδικής πρόσδεσης (α/β) που περιέχει τα συντηρημένα μοτίβα sensor-1, Walker A και Walker B, καθώς και από την περιοχή α-έλικας,

η οποία περιλαμβάνει το μοτίβο sensor-2 που χαρακτηρίζεται από ένα συντηρημένο κατάλοιπο αργινίνης (Εικ. 7). Το τμήμα AAA⁺ εμπλέκεται στην υδρόλυση του ATP και την αναδιαμόρφωση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων (Iyer et al., 2004). Πλησίον του τμήματος AAA⁺ εντοπίζεται η περιοχή SSD (Sensor- and Substrate-Discrimination domain) που λειτουργεί ως αισθητήρας διάκρισης των υποστρωμάτων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι περιοχές SSD των βακτηριακών Clp ATPασών και της πρωτεάσης Lon που αλληλεπιδρούν με τα υποστρώματα έχουν παρόμοιες προβλεπόμενες δομές (Smith et al., 1999).

Η εκλεκτικότητα των υποστρωμάτων της πρωτεάσης Lon πιθανότατα εξαρτάται από τα εγγενή χαρακτηριστικά του πολυπεπτιδίου που πρόκειται να αποδομηθεί, παρά από εξειδικευμένα συστήματα σήμανσης, όπως της ουμπικουιλίνης για το σύστημα του 26S πρωτεάσωματος. Ειδικότερα, λόγω περιορισμένης ικανότητας αποδιάταξης, η Lon επιλεκτικά αποδομεί εξ' ολοκλήρου τα κατεστραμμένα ή λάθος αναδιπλωμένα πολυπεπίδια, τα οποία έχουν ένα εκτεθειμένο πρωτεϊνικό τμήμα με επικίνδυνη διαμορφωτική κατάσταση που ξεπερνά ένα καθορισμένο όριο μεγέθους (von Janowsky et al., 2005).

Η Lon είναι σε θέση να αναγνωρίσει συγκεκριμένες αλληλουχίες πλούσιες σε αρωματικά και υδρόφοβα κατάλοιπα, τα οποία είναι προσβάσιμα σε αποδιατεταγμένα πολυπεπίδια αλλά παραμένουν προστατευμένα στις περισσότερες φυσιολογικές διαμορφώσεις (Gur and Sauer, 2008). Παρόλα αυτά, έχει επίσης δείχτεί ότι αποδομεί αναδιπλωμένα αλλά μη συναρμολογημένα πολυπεπίδια που μπορεί να τοποθετούνται στο κεντρικό κανάλι πρωτεόλυσης με εκτεθειμένα στην επιφάνεια υδρόφοβα κατάλοιπα που εντοπίζονται μέσα σε ένα πολύ φορτισμένο περιβάλλον (Ondrovicová et al., 2005). Συνεπώς, η Lon συνιστά έναν εκλεπτυσμένο πρωτεολυτικό μηχανισμό, ο οποίος αποδομεί επιλεκτικά είτε μη-σημασμένα, λάθος αναδιπλωμένα υποστρώματα είτε φυσιολογικά αναδιπλωμένες αλλά μη-συναρμολογημένες υπομονάδες, με τελικό στόχο την προστασία της λειτουργικής ακεραιότητας του πρωτεώματος (Rigas et al., 2012).

Παρά το γεγονός ότι είναι ευρέως αποδεκτό πως η Lon αναγνωρίζει και αποδομεί τη συντριπτική πλειοψηφία των κατεστραμμένων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, ελάχιστα από τα πρωτεϊνικά της υποστρώματα έχουν προσδιοριστεί στους ευκαρυώτες. Αυτά περιλαμβάνουν συστατικά της αναπνευστικής αλυσίδας, του κύκλου του τρικαρβοξυλικού

οξέος (TCA) και των μονοπατιών βιοσύνθεσης των αμινοξέων (Bender et al, 2010). Σε πολλά συστήματα-μοντέλα έχει προσδιοριστεί η μιτοχονδριακή ακονιτάση ως το κυριότερο υπόστρωμα της πρωτεάσης Lon, δηλαδή ένα ένζυμο του κύκλου TCA που περιέχει συμπλέγματα σιδήρου/θείου και είναι επιδεκτικό στην οξειδωτική απενεργοποίηση. Υπάρχουν και άλλες μιτοχονδριακές λειτουργίες που έχουν αποδωθεί στη Lon πέραν της πρωτεόλυσης, συμπεριλαμβανομένων των ιδιοτήτων της ως μοριακός συνοδός στη συναρμολόγηση των πρωτεϊνικών συμπλόκων (Rep et al., 1996) και την εξειδικευμένη πρόσδεσή της σε αλληλουχίες μιτοχονδριακού DNA και RNA για τη διατήρηση της ακεραιότητας του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (Lu et al., 2007).

1.7 Η πρωτεάση Lon έχει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη των οργανισμών και έναντι της οξειδωτικής καταπόνησης

Μέχρι σήμερα έχουν συσσωρευτεί αρκετά στοιχεία που υποδεικνύουν ότι η Lon πρωτεάση αποτελεί βασικό συμμετέχοντα στην διατήρηση της πρωτεόστασης κατά την οξειδωτική καταπόνηση, ιδιαίτερα στο μιτοχόνδριο (Rigas et al, 2012). Τα μεταλλάγματα της μιτοχονδριακής πρωτεάσης PIM1, που αποτελεί την ομόλογη Lon της ζύμης, χαρακτηρίζονται από αναπνευστική ανεπάρκεια, καθώς τα μεταλλαγμένα κύτταρα δεν μπορούν να συνθέσουν τις υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας, γεγονός που δημιουργεί πρόβλημα στην ανάπτυξη και οδηγεί σε «μικροσκοπικό» φαινότυπο (Suzuki et al. 1994, van Dyck et al. 1994). Παράλληλα, με μεθόδους ηλεκτρονικής μικροσκοπίας αποδείχτηκε ότι τα μιτοχόνδρια κυττάρων ζύμης (Suzuki et al., 1994), ανθρώπου (Bota et al., 2005) καθώς και στο φυτό *Arabidopsis thaliana* (Rigas et al., 2009a) που υπολείπονται της Lon παρουσιάζουν ανώμαλη μορφολογία. Η έλλειψη της λειτουργίας του γονιδίου *Lon* 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). Αντίθετα, υπερέκφραση της πρωτεάσης Lon στον ασκομύκητα *Podospora anserina*, οργανισμό-μοντέλο για τη μελέτη της γήρανσης, οδήγησε σε χαμηλότερο ποσοστό καρβονυλιωμένων και καρβοξυμεθυλιωμένων πρωτεϊνών (οι σύνθετες 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). Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις και στα φυτικά μιτοχόνδρια που υποδεικνύουν ότι η πρωτεολυτική ενεργότητα της Lon ενδέχεται να επάγεται κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής καταπόνησης (Sweetlove et al. 2002, Lister et al. 2004).

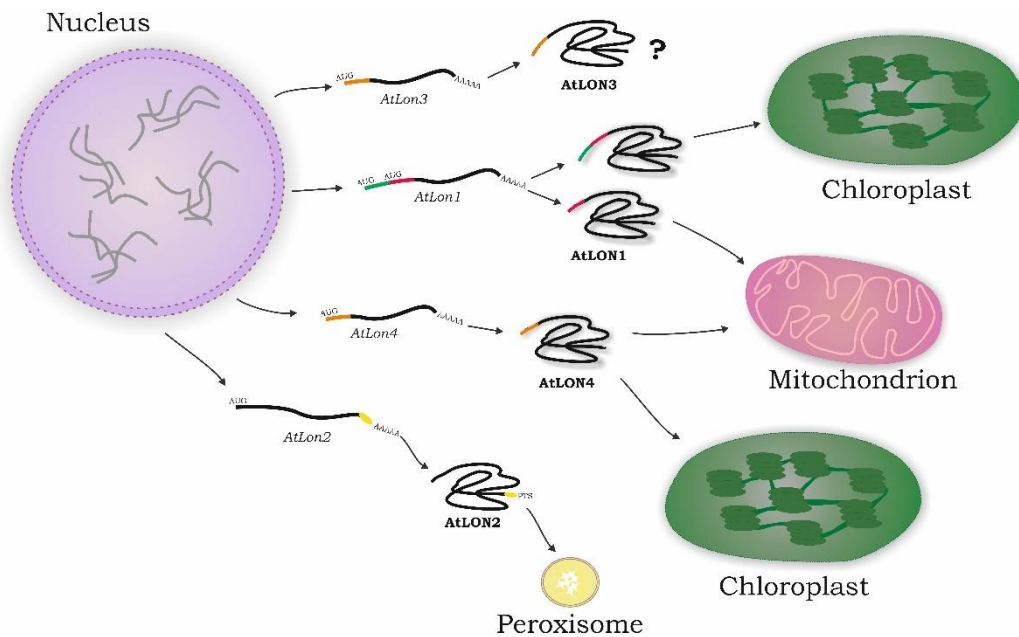
1.8 Η πρωτεάση Lon στο φυτό *Arabidopsis thaliana*

Το *Arabidopsis* έχει μια μικρή οικογένεια Lon γονιδίων που περιλαμβάνει τέσσερα μέλη, τα *Lon1-4*, τα οποία κωδικοποιούν για πρωτεϊνικές ισομορφές με διακριτούς υποκυτταρικούς στόχους (Sinvan-Villalobo et al. 2004, Rigas et al. 2009a, Janska et al. 2010).

Οι πρωτεϊνικές ισομορφές που κωδικοποιούνται από τα πυρηνικά γονίδια Lon στο *Arabidopsis* είναι διαμοιρασμένες στα οργανίδια του φυτικού κυττάρου που εμπλέκονται κυρίως στο μεταβολισμό της ενέργειας, χρησιμοποιώντας διαφορετικούς μηχανισμούς πρωτεϊνικής τοποθέτησης (Rigas et al., 2014).

Η πρωτεάση Lon1 παρουσιάζει δυαδική στόχευση στους χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια, μέσω του μηχανισμού των δυαδικών ακολουθιών στόχευσης, όπου έπειτα από μεταγραφική και μεταφραστική ρύθμιση, κωδικοποιεί δύο πολυπεπίδια, όπου το ένα τοποθετείται στον χλωροπλάστη και το άλλο στο μιτοχόνδριο (Daras et al., 2014). Η πρωτεάση Lon4 παρουσιάζει δυαδική στόχευση στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες, χρησιμοποιώντας ενιαία (ambiguous) πρόδρομη αλληλουχία στόχευσης και για τα δύο οργανίδια (Sakamoto, 2006; Ostersetzer et al. 2007). Το καρβοξυλικό άκρο της πρωτεάσης Lon2 φέρει ένα περοξυσωμικό σινιάλο στόχευσης τύπου 1 (PTS1), το οποίο οδηγεί την τοποθέτηση της στα περοξυσώματα (Lingard and Bartel, 2009). Η βιοπληροφορική ανάλυση του αμινοτελικού άκρου της πρωτεάσης Lon3 υπέδειξε μια πιθανή ενιαία πρόδρομη αλληλουχία δυαδικής υποκυτταρικής τοποθέτησης στους χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια, ενώ είναι η μόνη που φέρει και σινιάλο πυρηνικής στόχευσης (Nuclear

Localization Signal, NLS). Παρόλα αυτά, ακόμη δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα για την τοποθέτηση της πρωτεάσης Lon3. Τα παραπάνω συνοψίζονται στην **Εικ. 8**.



Εικόνα 8. Υποκυτταρική τοποθέτηση των ισομορφών της πρωτεάσης Lon του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Οι ισομορφές Lon1 και Lon4 παρουσιάζουν διπλή υποκυτταρική στόχευση στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες του φυτού, με διαφορετικούς μηχανισμούς στόχευσης. Η Lon1 διαθέτει μηχανισμό δυαδικών ακολουθιών στόχευσης (twin presequences) ενώ η Lon4 έχει ένα ενιαίο πεπτίδιο οδηγό που αναγνωρίζεται και από τα δύο οργάνια (ambiguous presequence). Η ισομορφή Lon2 διαθέτει ένα τυπικό σινιάλο PTS1 στο καρβόξυ άκρο του, το οποίο το οδηγεί στο περοξύσωμα, ενώ για το γονίδιο Lon3 δεν υπάρχουν γνωστά πειραματικά δεδομένα.

Η ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας έχει ασχοληθεί εκτενώς με την πρωτεάση Lon στο φυτό *Arabidopsis thaliana* και ιδιαίτερα με την πρωτεάση Lon1 (Rigas et al., 2009a, 2009b, 2012, 2014; Daras et al., 2014). Μεταλλάγματα της πρωτεάσης Lon1, παρουσιάζουν καθυστέρηση στην εγκατάσταση και την ανάπτυξη του σποροφύτου, καθ' όλη τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου, τα μιτοχόνδρια των φυτών παρουσιάζουν ανώμαλη μορφολογία, ένζυμα του κύκλου του Krebs και της AAMH παρουσιάζουν μειωμένη δραστηριότητα (Rigas et al., 2009a, 2009b) ενώ πρόσφατα βρέθηκε ότι μέσω ενός εκλεπτυσμένου μηχανισμού ρύθμισης της μεταγραφής και της μετάφρασης, η πρωτεάση Lon1 παρουσιάζει διπλή υποκυτταρική στόχευση εκτός από τα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες του φυτού (Daras et al., 2014). Όσον αφορά τον λειτουργικό ρόλο της πρωτεάσης Lon1 στους χλωροπλάστες, δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής δεδομένα. Όσον αφορά τις πρωτεάσεις Lon3 και Lon4, για τη Lon4 μέχρι σήμερα το μόνο γνωστό δεδομένο

είναι η διπλή υποκυτταρική στόχευση στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες, με διαφορετικό όμως μηχανισμό από του Lon1 (Sakamoto 2006, Ostersetzer et al. 2007), ενώ για τη Lon3 δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής πειραματικά δεδομένα ούτε δεδομένα σχετικά με την υποκυτταρική της τοποθέτηση. Επιπλέον, όσον αφορά την πρωτεάση Lon ως οικογένεια γονιδίων στο *Arabidopsis*, υπάρχουν σημεία που παραμένουν άγνωστα, όπως το πρότυπο χρονικής και ιστοειδικής έκφρασης των γονιδίων, η εξέλιξη των τεσσάρων μελών, τα χαρακτηριστικά που διαφοροποιούν την μια ισομορφή από την άλλη. Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποσκοπεί με γενετικές αναλύσεις, γονιδιακή έκφραση και εκτεταμένη βιοπληροφορική και φυλογενετική ανάλυση να δώσει απαντήσεις φωτίζοντας άγνωστα μέχρι στιγμής στοιχεία σχετικά με τις πρωτεάσες Lon.

Υλικά & Μέθοδοι

2.1 Φυτικό υλικό - συνθήκες ανάπτυξης και καλλιέργειας

Σαν υλικό για τα πειράματα της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν οι αγρίου τύπου οικότυποι *Columbia* (Col-0) και *Wassilevskia* (Ws-0) του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Για τις διαγονιδιακές κατασκευές της πρωτεάσης Lon1, χρησιμοποιήθηκε το EMS μετάλλαγμα D-3 (*lon1-1*) που έχει υπόβαθρο Col-0, ενώ αναλύθηκε και το μετάλλαγμα D-4 του γονιδίου *Lon4* (*lon4-1*) που οφείλεται σε T-DNA ένθεση στο 8^ο εξώνιο του γονιδίου, σε υπόβαθρο Ws.

2.2 Συνθήκες καλλιέργειας *Arabidopsis thaliana*

Πριν την ανάπτυξη τα σπέρματα ενυδατώνονται για 24 ώρες στους 4°C για να σπάσει ο λήθαργος και να γίνει συγχρονισμένη η βλάστηση του πληθυσμού. Η προετοιμασία για την απολύμανση και την ανάπτυξη των φυτών γίνεται σε θάλαμο νηματικής ροής, ούτως ώστε να εξασφαλιστούν ασηπτικές συνθήκες. Αρχικά, τα σπέρματα αποστειρώνονται σε 20% διάλυμα χλωρίνης, 0,01% Triton X-100 για 4 λεπτά. Με διαδοχικές εκπλύσεις με αποστειρωμένο νερό απομακρύνεται το διάλυμα της χλωρίνης και στη συνέχεια, τα σπέρματα μεταφέρονται 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.

Για την παραγωγή αρκετής βιομάζας για την απομόνωση υποκυτταρικών οργανιδίων (χλωροπλαστών & μιτοχονδρίων), τα φυτά αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες για 14 ημέρες. Η καλλιέργειες έγιναν σε γυάλινες φλάσκες των 250mL με 80mL υγρό θρεπτικό ½ MS σε κάθε μία, και περίπου 100mg σπέρματα από κάθε κατασκευή. Η φωτοπερίοδος ρυθμίστηκε σε 16ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι, όμως 2 ημέρες πριν την απομόνωση, οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε απόλυτο σκοτάδι, ούτως ώστε να καταβολιστεί όλο το άμυλο από τους χλωροπλάστες και να μην δημιουργηθούν προβλήματα κατά την απομόνωση.

2.3 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA από φυτά *Arabidopsis thaliana*

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

- Το δείγμα μεταφέρεται σε eppendorf tube. (Για κάθε 100mg ιστού προστίθενται 400μl διαλύματος ομογενοποίησης και 400μl φαινόλης). Ακολουθεί έντονη ανάμιξη του δείγματος.
- Φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 10min.
- Το υπερκείμενο (υδάτινη φάση) μεταφέρεται σε νέο eppendorf tube και ακολουθεί καθαρισμός του δείγματος με ίσο όγκο φαινόλης.
- Επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση κάτω από τις ίδιες συνθήκες.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα 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.
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρό eppendorf tube.
- Για την κατακρήμνιση των νουκλεϊνικών οξέων, στο υπερκείμενο προστίθεται 1/10 του όγκου 3M CH₃COONa pH 4.8 και 2.5 όγκοι παγωμένης αιθανόλης 100% και επωάζεται στους -20°C overnight.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C στις 13000rpm.
- Το ίζημα διαλύεται σε αποστειρωμένο ddH₂O (με θέρμανση στους 65°C όταν χρειάζεται)

2.4 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA από σπέρματα *Arabidopsis thaliana*

Το πρωτόκολλο που ακολουθεί αποτελεί τροποποίηση του πρωτοκόλλου από την αναφορά των [Onate-Sanchez et al., 2008](#).

- Τα σπέρματα συλλέγονται μετά τον χειρισμό και ομογενοποιούνται σε γουδί με τη βοήθεια υγρού αζώτου

- Σε 150μl διάλυμα ομογενοποίησης (έμβρυα και διάλυμα απομόνωσης) προστίθενται 150μl χλωροφόρμιο και ακολουθεί ισχυρή ανακίνηση για 30''
- Φυγοκέντρηση για 5'
- Μεταφέρεται το υπερκείμενο σε νέο erpendorf tube και προστίθενται 300μl φαινόλης, ακολουθεί ισχυρή ανακίνηση για 1'. Στη συνέχεια προστίθενται 150μl χλωροφόρμιο κα ισχυρή ανακίνηση για 3'.
- Φυγοκέντρηση για 5'
- Μεταφέρεται το υπερκείμενο σε νέο erpendorf tube (~250μl) και προστίθεται 1/3 του όγκου 8M LiCl (83μl). Ακολουθεί ελαφριά ανακίνηση. Το δείγμα αφήνεται στους -20oC για 1h
- Φυγοκέντρηση για 30' στους 4oC
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε 30μl ddH2O
- Ακολουθεί αντίδραση DNase (στα 60μl) όπως αναφέρεται παρακάτω
- Μετά την αντίδραση DNase προστίθενται στο δείγμα 440μl ddH2O, 7μl 3M NaAc pH:5.2 (Sodium Acetate) και 250μl 100% αιθανόλης
- Φυγοκέντρηση για 10' στους 4oC. (Με αυτόν τον τρόπο απομακρύνονται τα συστατικά της αντίδρασης DNase και όλοι οι πολυσακχαρίτες)
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf tube και εκεί προστίθενται 43μl 3M NaAc pH:5.2 και 750μl 100% αιθανόλης. Ανακινείται ελαφρά και αφήνεται ο/η στους -20 oC
- Φυγοκέντρηση για 30' στους 4oC
- Απομακρύνεται προσεχτικά το υπερκείμενο, ακολουθεί μια γρήγορη φυγοκέντρηση για να απομακρυνθεί τυχόν υπερκείμενο που έχει μείνει και το ίζημα επαναιωρείται στα 20-25μl με ddH2O

2.5 Πρωτόκολλο απομόνωσης γονιδιωματικού DNA από Arabidopsis

CTAB DNA Miniprep (Joseph D. Clark)

Πριν ξεκινήσει η απομόνωση, προθερμαίνουμε το ρυθμιστικό διάλυμα CTAB στους 65°C.

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

- Προσθέτουμε έναν όγκο (200μl) ζεστού CTAB και τοποθετούμε τα eppendorf σε υδατόλουτρο στους 65°C για 30 λεπτά
- Προστίθεται ίσος όγκος SEVAG [χλωροφόρμιου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1)] και το μίγμα αναμιφνύεται καλά.
- Φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις μέγιστες στροφές (13.000 στρ/λεπτό)
- Μεταφορά του υπερκλειμένου σε καθαρό eppendorf tube.
- Προσθέτουμε 0,7 του όγκου (140μl) ισοπροπανόλης, αναδεύουμε με το χέρι και το αφήνουμε σε ηρεμία για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρηση του δείγματος για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στις μέγιστες στροφές
- Το ίζημα που προκύπτει ξεπλένεται προσθέτωντας 0,5 ml 100% αιθανόλης και στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 13.000 στροφές
- Απομακρύνση του υπερκλειμένου.
- Επαναιώρηση του ιζήματος σε 50μl H₂O

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

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

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

- Όταν τελειώσουν οι PCR αντιδράσεις, αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης 0,8%-3%, ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA και το διαχωρισμό που θέλουμε να επιτύχουμε.
- Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR των οποίων τα προϊόντα προορίζονται για κλωνοποιήσεις σχεδιάστηκαν με θέση αναγνώρισης ενζύμου περιορισμού στο 5' άκρο, η οποία θα μας διευκολύνει κατά την υποκλωνοποίηση του τμήματος σε άλλους φορείς. Η θέση αναγνώρισης επιλέχτηκε ώστε να είναι μοναδική τόσο μέσα στο τμήμα DNA που επιθυμούμε να κλωνοποιήσουμε όσο και σε άλλους φορείς.

2.5.2 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 4°C.
- Στην αντίδραση PCR προσθέτουμε τα συστατικά που αναφέραμε προηγουμένως με την διαφορά που αντί για gDNA ως μήτρα προσθέτουμε 3μl από το τα περίπου 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	10 x	6μl	1 x
Διάλυμα			
DNάσης I			
DNάση I	2 units/ μl	7μl	14 units
(Promega)			
Αναστολέα	30 units/	1μl	30 units
RNάσης	μl		
(Promega)			
Ολικό RNA	-	-	25μg
ddH ₂ O	-	έως	-
		τα	
		60μl	
Τελικός όγκος αντίδρασης 60 μl			

Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37°C για 60'.

- 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 -20°C για 12 ώρες.
- Το ολικό RNA ελεύθερο από DNA συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 30' στους 4°C. Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται και το ίζημα διαλύεται σε ~25μl ddH₂O. Από αυτά 2μl αναλύονται σε gel αγαρόζης για να επιβεβαιώσουμε πραγματικά ότι δεν έχει καταστραφεί το RNA αλλά μόνο το DNA και 2μl αραιώνονται με ddH₂O 1:250, η αραιώση χρησιμοποιείται για να μετρήσουμε την συγκέντρωση του RNA με την βοήθεια φασματοφωτομέτρου.
- 2μg ολικού RNA ελεύθερο από DNA μεταγράφεται ανάστροφα σε μονόκλωνο cDNA. Η διαδικασία γίνεται σε δυο βήματα.

- Στο πρώτο βήμα το ολικό RNA ελεύθερο από DNA και εξειδικευμένοι εκκινητές, αποδιατάσσονται στους 65°C για 10' και μετά τοποθετούνται στους 4°C. Τα συστατικά και οι συγκεντρώσεις σ' αυτό το βήμα δίδονται από τον ακόλουθο πίνακα.

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

- Στο δεύτερο βήμα προστίθενται τα ακόλουθα συστατικά:

Συστατικά Βήματος	Δευτέρου	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
5 x Ρυθμιστικό διάλυμα ανάστροφης μεταγραφάσης		4μl	1 x
100 mM DTT		2μl	10mM
10 mM dNTPs		2μl	1mM
Αναστολέα RNάσης 30 units/ μl (Invitrogen)		1μl	30units
SuperScript II™ Ανάστροφη Μεταγραφάση 100 units/ μl (Invitrogen)		1μl	50units
Όγκος δεύτερου βήματος 10μl			
Τελικός όγκος αντίδρασης όγκος πρώτου και δευτέρου βήματος 20μl			

- Η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιείται στους 42°C για 60'.

- Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση, διατηρείται στους 4°C. Γίνεται αραιώση 1/5 και χρησιμοποιούνται 3μl για αντίδραση PCR.

Πίνακας 1. Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης.

Γονίδιο	AGI	Ορθός	Ανάστροφος	Tm
<i>GAPDH</i>	At3g04120	5'GCCAAGAAGGTTGTTATCTCTGCC-3'	5'GCTCGACCTGTTGTCGCCAAC G-3'	57
<i>Lon1</i>	At5g26860	5'GGAGAGGCCATGCTGGTGACCC-3'	5'GTTCAGGCTTGACACCACAAT CTCC-3'	57
<i>Lon4</i>	At3g05790	5'ATCTCGATGTTCTATTGACTTATC-3'	5'AATCTAGGCACTTCGGTGGGA TG-3'	54
<i>Lon3</i>	At3g05780	5'ACCCGGGCCACCATGACGCAGTGACGG TGTC-3'	5'TTCTTTTCTTTTTGGTTCCCT TTGACTTTAAACTT-3'	56

Τα μεγέθη των προϊόντων, καθώς και οι κύκλοι ενίσχυσης που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο, αναγράφονται στις φωτογραφίες δίπλα από τις ηλεκτροφορήσεις.

2.6 Ανάλυση δεσοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA)

Για την ανάλυση κλασμάτων νουκλεϊνικών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών διαμορφώσεων χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης. Ο διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος προς το μέγεθος των μορίων. Τα μόρια των νουκλεϊνικών οξέων γίνονται ορατά στην πηκτή αγαρόζης 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 αγαρόζη εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν. Συνήθως ποικίλλει από 0,8% ως 4% αγαρόζη w/v.

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστίθεται σε διάλυμα 1xTAE.
- Θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρις ότου να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη 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 2ml 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

7ml βρωμιούχου αιθιδίου

98 ml H₂O

Τελικός όγκος 100 ml

Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης είναι η εξής:

20ml 1x TAE

70ml βρωμιούχου αιθιδίου

980 ml H₂O

Τελικός όγκος 1000 ml

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

1,25 % (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης

1,25 % (w/v) κυανολοξυλένιο

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 πρωτόκολλο 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 22°C 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 $\Delta(\text{lacZ})\text{M15}$ 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 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli* με πλασμιδιακό DNA

Η διαδικασία μετασηματισμού περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Σε 200μl δεκτικών κυττάρων DH5α προστίθενται 10-50 ng πλασμιδιακού DNA.
- Το μείγμα αναμιγνύεται και επώαζεται στον πάγο για 30min.
- Ακολουθεί θερμικό σοκ του δείγματος με επώαση για 2min στους 42^o-43°C.
- Προσθήκη 1,3 ml θρεπτικού μέσου LB, ανάμιξη του δείγματος και επώαση για 1 ώρα στους 37°C.
- Φυγοκέντρηση του δείγματος για 30'' στις 13000 στροφές/λεπτό.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναιώρηση του ιζήματος σε 100-200μl LB.

- Επίστρωση του δείγματος σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο LB, που περιέχει ως μέσο επιλογής αντιβιοτικό (αμπικιλίνη ή καναμυκίνη). Σε περίπτωση χρήσης πλασμιδιακού φορέα που φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης υπάρχει δυνατότητα επιλογής μπλε/άσπρων αποικιών. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη στο θρεπτικό μέσο του χρωμοφόρου υποστρώματος X-gal και του παράγοντα IPTG που δρα σαν επαγωγέας του υποκινητή του lacZ γονιδίου, σε τελικές συγκεντρώσεις 5×10^{-3} και 50mM αντίστοιχα.
- Επώαση των τρυβλίων 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 επώαζεται 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 Ti, 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 Ti 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 επώαζεται 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 πρωτόκολο 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.*, 1998). 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.

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 φυγοκεντρούνται 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 υγρομυκίνη (30μg/mL) και σεφοταξίμη (50μg/mL).
- Τα τρυβλία μεταφέρονται σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22°C, υγρασία 40% και με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι).
- Τα τρυβλία επάζονται 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 Πρωτόκολλα απομόνωσης υποκυτταρικών οργανιδίων

2.15.1 Πρωτόκολλα απομόνωσης χλωροπλαστών

Πρωτόκολλο #1

Το παρόν πρωτόκολλο είναι πολύ γρήγορο και εύκολο για απομόνωση χλωροπλαστικού κλάσματος χωρίς τη χρήση υπερφυγοκέντρου και στρωμάτωσης σε διαβαθμίσεις Percoll όπως περιγράφεται στην εργασία ([Grabsztunowicz & Jackowski, 2012](#)).

1. Νωπός φυτικός ιστός ζυγίστηκε και προστέθηκε παγωμένο Chloroplast Isolation Buffer (CIB) σε αναλογία 30mL διαλύματος για κάθε 12g ιστού.
2. Ο ιστός ομογενοποιήθηκε με τη χρήση ομογενοποιητή (SilentCrusher M, # 595-06000-00, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Germany). Έγιναν 5 bursts των 5" στη μέγιστη ένταση του οργάνου, με διακοπές των 15" ενδιάμεσα για να μην υπερθερμανθεί το δείγμα.
3. Στη συνέχεια έγινε διήθηση του δείγματος με 4 φύλλα μουσελίνας/1 φύλλο baby cloth, για να απομακρυνθούν τα στερεά υπολείμματα (Πριν τη διήθηση, έγινε καλή διαβροχή των φύλλων με παγωμένο CIB).
4. Το διήθημα τοποθετήθηκε σε έναν πλαστικό σωλήνα Nalgene (#3118-0050 Oak Ridge centrifuge tube 50mL, Thermo Scientific/Nalgene, NY, USA) και έγινε φυγοκέντρωση στα 1000g για 7min, με την swing out κεφαλή HB-4 στη φυγόκεντρο Sorvall 5C+ (Thermo Fisher Scientific, MA, USA).
5. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 2,3mL παγωμένου CIB, με τη βοήθεια πινέλου (απαλές κυκλικές κινήσεις γύρω από το ίζημα, μέχρι να διαλυθεί όλο).
6. Επαναλήφθηκε η φυγοκέντρωση του βήματος 4 (προσοχή στα rpm, καθώς ο όγκος του δείγματος αλλάζει, οπότε πρέπει να γίνει υπολογισμός).
7. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα των χλωροπλαστών επαναδιαλύθηκε σε 600μL παγωμένου CIB, ξανά με πινέλο, όπως στο βήμα 5. Κάθε δείγμα μοιράστηκε σε 3 aliquots των 200μL και αποθηκεύτηκαν στους -80oC.

Chloroplast Isolation buffer:

- 0.3 M sucrose
- 50 mM Tricine/NaOH (pH 7.8)
- 10 mM NaCl
- 5 mM MgCl₂
- 0.2% BSA freshly added

Πρωτόκολλο #2

Το πρωτόκολλο απομόνωσης περιγράφεται στην εργασία της [Kunst, 1998](#):

Προετοιμασία διαλυμάτων διαβάθμισης Percoll για την απομόνωση χλωροπλαστικού κλάσματος από υγρή καλλιέργεια *Arabidopsis thaliana*.

Έγινε μίξη ίσου όγκου (15mL) 100% διαλύματος Percoll® (P1644-1LT, Sigma-Aldrich, MO, USA) και 2x Resuspension Buffer (RB) σε πλαστικό σωλήνα Nalgene (#3118-0050 Oak Ridge centrifuge tube 50mL, Thermo Scientific/Nalgene, NY, USA). Ακολούθησε φυγοκέντρηση του μείγματος στα 38400g (19500rpm στην κεφαλή SS-34 με την φυγόκεντρο Sorvall 5C+) για 70min. Τα διαλύματα μπορούν να φυλαχθούν στους 4oC για 1-2 ημέρες μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Η προετοιμασία συνήθως γινόταν το προηγούμενο απόγευμα από την ημέρα της απομόνωσης.

1. Το θρεπτικό απομακρύνθηκε με απόχυση από τις καλλιέργειες και ο ιστός στραγγίστηκε σε απορροφητικό χαρτί. Αμέσως, τοποθετήθηκε σε πλαστικό ποτήρι ζέσης των 250mL και προστέθηκε παγωμένο διάλυμα HB (Homogenization Buffer). Το ποτήρι τοποθετήθηκε στον πάγο και επώαστηκε για 30min.
2. Απομακρύνθηκε το διάλυμα και προστέθηκαν άλλα 200mL παγωμένου HB και ο ιστός ομογενοποιήθηκε με τη βοήθεια ομογενοποιητή (SilentCrusher M, # 595-06000-00, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Germany). Έγιναν 5 bursts των 5" στη μέγιστη ένταση του οργάνου, με διακοπές των 15" ενδιάμεσα για να μην υπερθερμανθεί το δείγμα.
3. Στη συνέχεια έγινε διπλή διήθηση του δείγματος με 4 φύλλα μουσελίνας/1 φύλλο baby cloth, για να απομακρυνθούν τα στερεά υπολείμματα (Πριν τη διήθηση, έγινε καλή διαβροχή των φύλλων με παγωμένο CIB).
4. Το διήθημα τοποθετήθηκε σε ειδικά πλαστικά δοχεία των 300mL για την κεφαλή GSA της φυγόκεντρος Sorvall 5C+ (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) και έγινε φυγοκέντρηση στα 2000g (4500rpm) για 2min.

5. Απομακρυνθηκε το υπερκείμενο προσεκτικά με απόχυση και προστέθηκαν 1,5mL διαλύματος RB. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε με τη βοήθεια πινέλου. Μετά την επαναδιάλυση, προστέθηκαν άλλα 0,5mL RB στο πινέλο, ούτως ώστε να «ξεπλυθεί» το επιπλέον ίζημα.
6. Στη συνέχεια, με πιπέτα Gilson με κομμένο tip, τοποθετήθηκαν τα 2mL των επαναδιαλυμένων χλωροπλαστών στην κορυφή του διαλύματος διαβάθμισης Percoll και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 13000g (12000rpm με την κεφαλή SS-34) για 12min. Μετά τη φυγοκέντρηση, οι χλωροπλάστες έχουν αναλυθεί σε 2 ζώνες μέσα στη διαβάθμιση του Percoll, όπου στην πάνω βρίσκονται οι λυμένοι και στην κάτω οι άθικτοι χλωροπλάστες.
7. Προσεκτικά, με μια γυάλινη πιπέτα αφαιρέθηκε το διάλυμα διαβάθμισης Percoll από το σωλήνα, και συλλέχθηκε το χλωροπλαστικό κλάσμα (με γυάλινη πιπέτα, με αργή ροή) το οποίο τοποθετήθηκε σε νέο καθαρό σωλήνα.
8. Στο κλάσμα προστέθηκαν 5 όγκοι διαλύματος RB και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 2200g (5000rpm με την κεφαλή SS-34) για 2min.
9. Αφαιρείται το υπερκείμενο και το χλωροπλαστικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 2x Protein Extraction Buffer (100-150μL). Για να διευκολυνθεί η λύση των οργανιδίων, τα δείγματα μπορούν να θερμανθούν για 5-10min στους 65oC. Το δείγμα μπορεί να φυλαχθεί στους -80oC αν δεν χρησιμοποιηθεί απευθείας για ηλεκτροφόρηση ή άλλες αναλύσεις.

Homogenization buffer (HB):	Prepare 200mL solution per subfractionation
0.45M sorbitol,	16,398 gr/ 200mL
20 mM Tricine-KOH, pH 8.4,	717 mg/ 200mL
10 mM EDTA,	4 mL of 0,5 M stock solution
10 mM NaHCO ₃ ,	168 mg/ 200mL
0.1% Bovine Serum Albumin (BSA, fatty acid-free, Sigma)	0,2 gr/ 200mL
Adjust the pH at pH 8.4 with KOH	

2x Resuspension buffer (RB): Prepare 100mL solution per subfractionation

0.6 M Sorbitol,	10,932 gr/ 100mL
40 mM Tricine-KOH, pH 7.6,	717 mg/ 100mL
10 mM MgCl ₂ , solution	203 mg/ 100mL or 1 mL of 1M stock
5 mM EDTA	1 mL of 0,5 M stock solution
Adjust the pH at pH 7.6 with KOH	

Percoll Gradient Mix (PGM):

50% Percoll ([v/v,] Pharmacia, Uppsala, Sweden) in RB Mix equal volumes (15 mL each) of 100% Percoll and cold 2X RB

Prepare 100mL: 50 ml of 100% Percoll
 50 ml of cold 2X RB

Split the 100 mL to prepare 4 x 25 mL each Percoll gradients in COREX tubes

2.15.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης μιτοχονδρίων

Το πρωτόκολλο αυτό περιγράφεται στην εργασία των [Day et al., 1985](#).

1. Ο φυτικός ιστός (υγρές καλλιέργειες Arabidopsis 14 ημερών, βλ. χλωροπλάστες), συλλέχθηκε σε ποτήρι ζέσης όπου προστέθηκε παγωμένο Grinding Buffer (GB). Ο ιστός επώαστηκε για 20min στον πάγο.
2. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε το GB και προστέθηκαν εκ νέου 200mL GB (η βιομάζα ήταν από τρεις φλάσκες, περίπου 75g) και ακολούθησε ομογενοποίηση του ιστού με ομογενοποιητή (SilentCrusher M, # 595-06000-00, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Germany). Έγιναν 5 bursts των 5" στη μέγιστη ένταση του οργάνου, με διακοπές των 15" ενδιάμεσα για να μην υπερθερμανθεί το δείγμα.
3. Ακολούθησε διπλή διήθηση του δείγματος με 8 φύλλα μουσελίνας/1 φύλλο baby cloth, για να απομακρυνθούν τα στερεά υπολείματα. Το διήθημα τοποθετήθηκε σε ειδικά πλαστικά δοχεία των 300mL για την κεφαλή GSA της φυγόκεντρου Sorvall 5C+ (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) και έγινε φυγοκέντρηση στα 1100g (3500rpm με την κεφαλή GSA της Sorvall) για 5min.
4. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό δοχείο και επαναλήφθηκε η ίδια φυγοκέντρηση.

5. Το υπερκείμενο μοιράστηκε σε 8 διάφανα δοχεία των 50mL (#3118-0050 Oak Ridge centrifuge tube 50mL, Thermo Scientific/Nalgene, NY, USA) και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 18000g (14500rpm με την κεφαλή SS-34της Sorvall) για 20min.
6. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το οργανιδιακό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 5mL διαλύματος 1x Washing Buffer (WB). Τα 8 δοχεία συμπιχήθηκαν σε 4, με 10mL διαλύματος στο καθένα και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 1500g (4300rpm με την κεφαλή HB-4 της Sorvall) για 5min ούτως ώστε να κατακρημνιστούν οι άθικτοι χλωροπλάστες.
7. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε 4 νέα δοχεία (τα 4 δοχεία από το προηγούμενο βήμα έχουν ξεπλυθεί με 1x WB και ξαναχρησιμοποιούνται εδώ) και φυγοκεντρήθηκε ξανά στα 18000g (14500rpm με την κεφαλή HB-4 της Sorvall) για 20min.
8. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 750μL 1x WB με τη βοήθεια πινέλου.
9. Τα επαναδιαλυμένα μιτοχόνδρια τοποθετούνται προσεκτικά (1,5-2mL) πάνω στο διάλυμα διαβάθμισης Percoll/PVP [32mL] (βλ. παρακάτω για την παρασκευή του διαλύματος) και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 36600g (19500rpm με την κεφαλή SS-34 της Sorvall) για 60min. Τα μιτοχόνδρια φαίνονται σαν μια λευκή ζώνη, κοντά στον πυθμένα του δοχείου, ενώ τα θυλακοειδή παραμένουν ψηλά στο δοχείο.
10. Το μιτοχονδριακό κλάσμα συλλέχθηκε προσεκτικά με γυάλινη πιπέτα σε ένα δοχείο (ενώθηκαν τα επιμέρους δοχεία από τα προηγούμενα βήματα), αραιώθηκε 5 φορές (25mL) με 1x WB και φυγοκεντρήθηκε ξανά στα 23700g (16000rpm στην κεφαλή SS-34 της Sorvall).
11. Προαιρετικά μπορεί να επαναληφθεί το βήμα 9.
12. Αφαιρείται το υπερκείμενο προσεκτικά με μια γυάλινη πιπέτα και το μιτοχονδριακό ίζημα επαναδιαλύεται στον ελάχιστο δυνατό όγκο (150μL) σε 2x Protein Extraction Buffer και αποθηκεύεται στους -80oC.

Grinding Buffer (GB)

	Prepare 400mL
0.3 M Sucrose	41,04g/ 400mL
25 mM Na ₄ P ₂ O ₇	2,659g/ 400mL
2 mM EDTA 400mL	1,6mL of 0,5M stock solution/
10 mM KH ₂ PO ₄	544mg/ 400mL

1 % (w/v) Bovine Serum Albumin 4g/ 400mL

1 % (w/v) PVP-40 4g/ 400mL

Add always fresh before use:

5 mM Cysteine 351mg/ 400mL

20mM Ascorbic acid 1,6g/ 400mL

Adjusted to pH7.6 with KOH and supplemented immediately before use with

2 x Washing Buffer (WB) Prepare 200mL

0.6 M Sucrose 41,076g/ 200mL

20 mM TES 917mg/ 200mL

0.2% BSA* 0,4g/ 200mL

Adjusted to pH7.5 with KOH

*BSA should be included only in the grinding buffer when protein analysis is to be performed

Heavy Gradient Solution (4.4% PVP-40/ first chamber with tubing outlet)

To Prepare 100mL

2 x Washing Buffer 50mL/ 100mL

28% Percoll 28mL/ 100mL

4.4% PVP-40 4,4g/ 100mL

Add H₂O up to 100mL

Light Gradient Solution (0% PVP-40/ second chamber with tubing outlet)

To Prepare 100mL

2 x Washing Buffer 50mL/ 100mL

28% Percoll 28mL/ 100mL

Add H₂O up to 100mL

2.16 Ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης/SDS (SDS-PAGE) και ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών

Για την ηλεκτροφόρηση των υποκυτταρικών πρωτεϊνών, προστέθηκε στα δείγματα ίσος όγκος από διάλυμα 2x Laemmli sample buffer το οποίο περιείχε και Urea σε συγκέντρωση 4M. Τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 70°C για 7 min και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 8% πολυακρυλαμίδης-SDS. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη PVDF (Immun-Blot® PVDF Membrane, BioRad, Hercules, USA) με τη μέθοδο της ημί-ξηρης μεταφοράς (semi-dry transfer system, Bio-Rad, Hercules, USA). Μετά τη μεταφορά, οι μεμβράνες μπλοκαρίστηκαν με 5% γάλα σκόνη (χωρίς λιπαρά) διαλυμένο σε 1x TBST για 60min. Στη συνέχεια, για την ανοσοανίχνευση της πρωτεΐνης Lon1 που ήταν σημασμένη με το επίτοπο FLAG (DYKDDDDK), χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα OctA-Probe (D-8, Santa Cruz Biotechnology, California, USA) που αναγνωρίζει τον επίτοπο, σε αραιώση 1:100. Για την ανίχνευση των υποκυτταρικών δεικτών IDH και CYTB6, χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα πολυκλωνικά αντισώματα σε συγκεντρώσεις 1:5000 και 1:3000 αντίστοιχα. Το αντίσωμα IDH αγοράστηκε από την εταιρεία Agrisera (Agrisera, Vannas, Sweden), ενώ το CYTB6 παραχωρήθηκε από τον Δρ. Reinhold Herrmann, University of Munich. Οι αραιώσεις των αντισωμάτων έγιναν στο διάλυμα μπλοκαρίσματος (5% γάλα σε 1x TBST) και η επώαση για όλα τα πρωτογενή ήταν για 12 ώρες στους 40°C. Μετά την επώαση, οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν τρεις φορές με 1x TBST (3x 5min) και στη συνέχεια επώαστηκαν με το δευτερογενές αντίσωμα goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) αραιωμένο 1:10000 για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε ανίχνευση κατά Western με αντίδραση χημειοφωταύγειας με το αντιδραστήριο Luminol (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) και έκθεση της μεμβράνης σε φωτογραφικό φιλμ (UltraCruz blue autoradiography film, Santa Cruz Biotechnology, California, USA).

2.17 Προγράμματα Βιοπληροφορικής ανάλυσης

Η πολλαπλή ευθυγράμμιση των ακολουθιών 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.

Η κατασκευή του εξελικτικού φυλογεντικού δέντρου έγινε με το πρόγραμμα MEGA7, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Maximum-Likelihood Tree (με τον αλγόριθμο Jukes-Cantor) με τιμή bootstrap 500.

Για την κατασκευή των εικόνων των δέντρων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα FigTree v1.4.2 και η διαδικτυακή έκδοση του προγράμματος Interactive Tree of Life (iTOL v3, <http://itol.embl.de/>).

Για την κατασκευή των τρισδιάστατων δομών των περιοχών SSD, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων PHYRE2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). Η στοίχιση και η κατασκευή των εικόνων έγινε με το πρόγραμμα PyMol v1.1.

Η κατασκευή όλων των εικόνων της διατριβής έγινε με το πρόγραμμα Corel Draw X7.

2.18 Χρώση για τον εντοπισμό των Ενεργών Μορφών Οξυγόνου

Για τον ιστοειδικό εντοπισμό των ενεργών μορφών οξυγόνου, χρησιμοποιήθηκαν φυτά 7 ημερών που είχαν μεγαλώσει υπό φυσιολογικές συνθήκες στο θάλαμο ανάπτυξης. Για τις χρώσεις ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται από του [He et al., 2012](#). Συνοπτικά, για τον εντοπισμό του σουπεροξειδικού ανιόντος, έγινε χρώση των φυτών για 20 λεπτά σε καλυμένο δοχείο, στο σκοτάδι, με διάλυμα που περιείχε nitroblue tetrazolium (NBT), σε συγκέντρωση 2mM, διαλυμένο σε υδατικό διάλυμα που περιείχε επιπλέον 20mM φωσφορικό Κάλιο (pH: 6.1) και 0.1M NaCl.

Για τον εντοπισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂), έγινε χρώση με διάλυμα 3,3'-Diaminobenzidine (DAB), σε συγκεντρωση 1mg/mL, σε νερό. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στο 3.8, με την χρήση 1N KOH. Η χρώση έγινε για περίπου 8 ώρες, σε καλυμένο δοχείο, στο σκοτάδι.

Μετά το τέλος των χρώσεων, τα φυτά μονιμοποιήθηκαν με τη χρήση διαλύματος 3:1 αιθανόλης/γλυκερόλης και στη συνέχεια φωτογραφήθηκαν στο μικροσκόπιο.

2.19 Προσδιορισμός του ποσοστού οξείδωσης των λιπαρών (TBARS assay)

Για τον προσδιορισμό του ποσοστού της οξείδωσης των λιπαρών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που περιγράφεται στην εργασία των [Hodges et al., 1999](#).

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

Extraction buffer: Ethanol/water (80/20 v/v)

Ενδιάμεσα διαλύματα:

1% BHT, 50mg σε 5mL Methanol

2,5% TBA, 375mg σε 15mL 1M NaOH

-TBA assay buffer Για 100mL

20% TCA (Trichloroacetic acid): 20g σκόνη

0,001% BHT (Butylated hydroxytoluene): 100μL από 1%

+TBA assay buffer

20% TCA (Trichloroacetic acid)

0,001% BHT (Butylated hydroxytoluene)

0,65% TBA (Thiobarbituric acid)

Παρασκευή 50mL: 37mL –TBA assay buffer

13mL TBA 2,5%

Διαδικασία:

Εκχύλιση

- 1) Για κάθε σειρά φυτών έγιναν 3 επαναλήψεις.
- 2) Συλλέχθηκε ο ιστός από φυτά 7 ημερών σε δοκιμαστικό σωλήνα erpedorf και προσδιορίστηκε το νωπό του βάρος.
- 3) Αμέσως μετά, τα δείγματα καταψύχθηκαν με τη βοήθεια υγρού αζώτου.
- 4) Προστέθηκε διάλυμα εκχύλισης σε αναλογία 25mL ανά 1g ιστού και ομογενοποιήθηκε ο ιστός πολύ καλά με τη βοήθεια ειδικών γουδιών και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 3000 στρ/min σε θερμοκρασία δωματίου και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό σωλήνα erpedorf.
- 5) Από κάθε δείγμα φτιάχτηκαν αραιώσεις 1:4 (250μL εκχύλισμα + 750μL EtOH 80%) με τις οποίες έγινε και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης.
- 6) 450μL από κάθε δείγμα αναμείχθηκαν σε νέο erpedorf tybe με 450μL +TBA διάλυμα και άλλα 450μL αναμείχθηκαν με –TBA διάλυμα.

- 7) Οι σωλίνες με τα μείγματα (+TBA και -TBA), επωάστηκαν στους 95°C για 30 λεπτά, στη συνέχεια ψύχθηκαν και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 3000 στρ/μίν σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρό eppendorf.
- 8) Στη συνέχεια μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση για όλα τα δείγματα στα 440, 532 και 600nm.
- 9) Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του MDA σε κάθε δείγμα έγινε με τον τύπο:

$$A = (A532 - A600) + TBA - (A532 - A600) - TBA$$

$$B = [(A440 - A600) + TBA] \times 0,0571$$

$$MDA \text{ (nmol/mL)} = [(A-B) / 157000] \times 10^6$$

και μετά έγινε αναγωγή σε nmol MDA/g νωπού βάρους.

2.19 Υδατικά διαλύματα και θρεπτικά μέσα βακτηριακών κυττάρων και φυτών

2.19.1 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 -20° C.

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

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

2.19.2 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 -20°C.

➤ **T.E. ρυθμιστικό διάλυμα**

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

2.19.3 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)

2.19.4 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

2.19.5 Διαλύματα και θρεπτικά μέσα ιστοκαλλιέργειας και μετασχηματισμού φυτών

➤ **Θρεπτικό μέσο ½ MS**

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

➤ **Διάλυμα 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/l BAP και 200μl Silwet L-77 (Osi Specialties).

➤ **Stock βιταμινών 1000X B5**

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

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

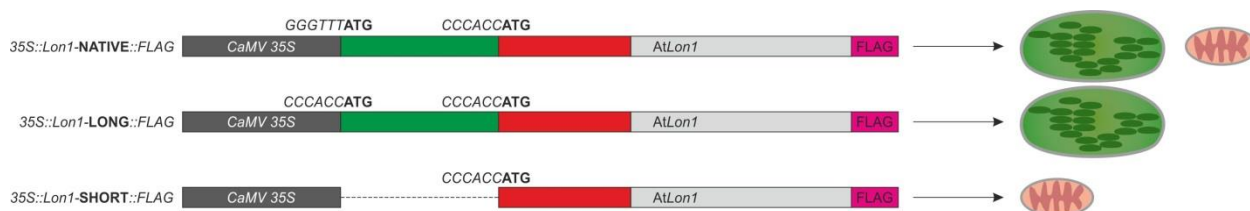
3.1 Λειτουργικός ρόλος της πρωτεάσης Lon στο φυτό *Arabidopsis thaliana*

3.1.1 Η πρωτεάση Lon1 έχει λειτουργικό ρόλο στους χλωροπλάστες του φυτού *Arabidopsis thaliana*

Το *A. thaliana* φέρει τρεις ισομορφές της μιτοχονδριακής/χλωροπλαστικής πρωτεάσης Lon, τις: Lon1, Lon4 και Lon3.

Τα μεταλλάγματα *lon1*, ο μηχανισμός της διπλής υποκυτταρικής στόχευσης και ο λειτουργικός της ρόλος στο μιτοχόνδριο έχουν αναλυθεί εκτενώς (Rigas et al., 2009a,2009b; Solheim et al., 2012; Daras et al., 2014). Ωστόσο, δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα σε σχέση με τον λειτουργικό της ρόλο στους χλωροπλάστες.

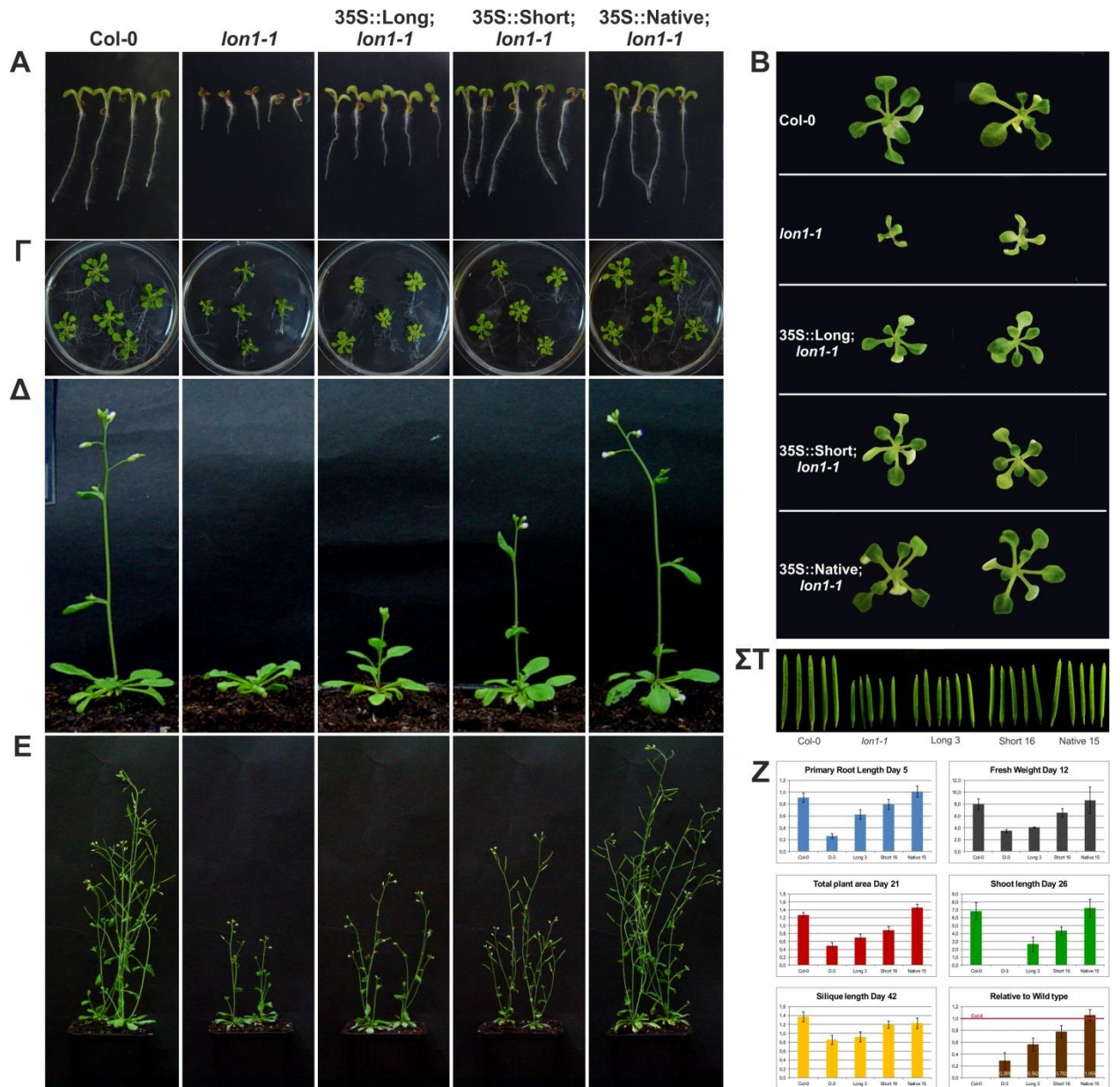
Για να μελετηθεί ο λειτουργικός ρόλος της πρωτεάσης Lon1 στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες του φυτού *A. thaliana*, καθώς και η σημασία της δυασικής στόχευσης της πρωτεάσης Lon1 σχεδιάστηκαν διαγονιδιακές κατασκευές με βάση την δομή των κατασκευών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση του μηχανισμού στόχευσης (Εικ. 9 ,Daras et al., 2014), όπου η αγρίου τύπου πρωτεάση Lon1 υπό τον έλεγχο του καθολικά εκφραζόμενου προαγωγέα *CaMV 35S*, οδηγήθηκε αποκλειστικά στους χλωροπλάστες (Long), αποκλειστικά στα μιτοχόνδρια (Short) ή και στα δύο οργανίδια (Native), στο μετάλλαγμα *lon1-1* (Rigas et al., 2009a) του *Arabidopsis thaliana*.



Εικόνα 9. Διάγραμμα των διαγονιδιακών κατασκευών που σχεδιάστηκαν για τη μελέτη του λειτουργικού ρόλου της πρωτεάσης Lon1 στους χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια του φυτού *A. thaliana*. Η κατασκευή Native παρουσιάζει διπλή υποκυτταρική τοποθέτηση στους χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια του φυτού, η κατασκευή Long παρουσιάζει τοποθέτηση μόνο στους χλωροπλάστες, ενώ η κατασκευή Short παρουσιάζει τοποθέτηση μόνο στους χλωροπλάστες του φυτού. Και οι τρεις κατασκευές σχεδιάστηκαν με μεταφραστική σύντηξη με το πεπτίδιο FLAG, καθιστώντας δυνατή την πρωτεομική ανάλυση.

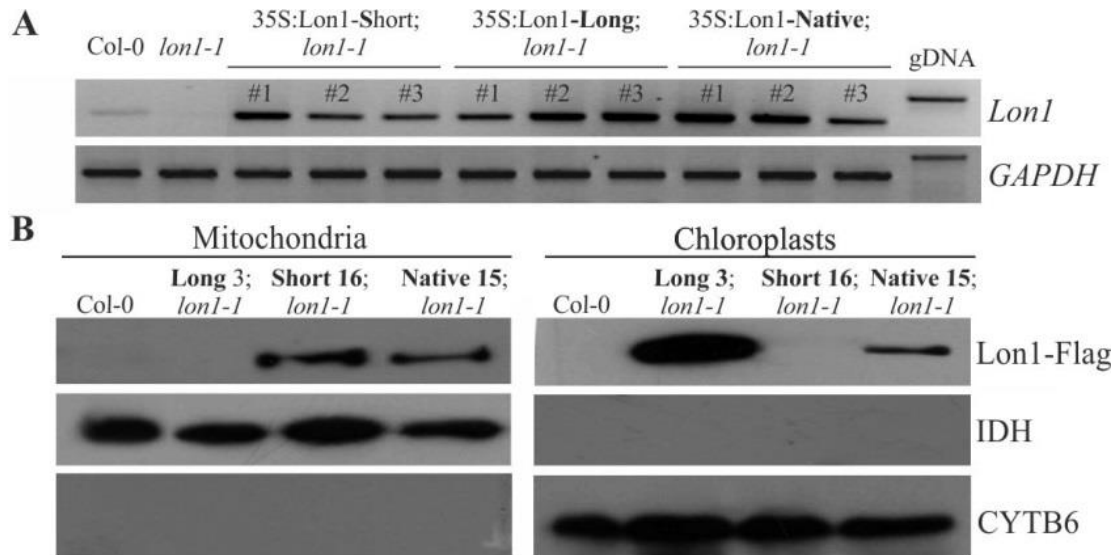
Φαινοτυπική ανάλυση των διαγονιδιακών κατασκευών έδειξε ότι και οι τρεις διαγονιδιακές κατασκευές συμπληρώνουν τον φαινότυπο της καθυστερημένης ανάπτυξης

που παρουσιάζει το μετάλλαγμα *lon1-1*, σε διαφορετικό όμως βαθμό η κάθε μία. Πιο συγκεκριμένα, βάζοντας τα φυτά σε μια κατάταξη μεταξύ των φυτών αγρίου τύπου (φυσιολογική ανάπτυξη) και του μεταλλάγματος (καθυστερημένη ανάπτυξη), η κατασκευή που παρουσιάζει διπλή υποκυτταρική τοποθέτηση (Native) συμπληρώνει πλήρως τον φαινότυπο και μετά ακολουθούν η κατασκευή Short (μιτοχονδριακή τοποθέτηση) που παρουσιάζει μια μικρή υστέρηση σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου και η κατασκευή Long (χλωροπλαστική τοποθέτηση) η οποία παρουσιάζει μεγαλύτερη υστέρηση από τα φυτά Short, (Εικ. 10). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η διπλή υποκυτταρική στόχευση της πρωτεΐνης Lon1 είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική ανάπτυξη του φυτού, καθώς οι διαγονιδιακές σειρές που φέρουν μόνο τη μία από τις δύο ισομορφές, δεν κατάφεραν να αναστρέψουν εντελώς τον φαινότυπο, σε αντίθεση με την κατασκευή που παρουσιάζει διπλή υποκυτταρική στόχευση (Εικ. 10). Επιπλέον, φαίνεται ότι ο λειτουργικός ρόλος της πρωτεΐνης Lon1 είναι σημαντικότερος στο μιτοχόνδριο, καθώς τα φυτά που εκφράζουν μόνο την μιτοχονδριακή ισομορφή (Short) παρουσιάζουν φαινότυπο πιο κοντά στα φυτά αγρίου τύπου σε σχέση με τα φυτά που εκφράζουν μόνο την χλωροπλαστική ισομορφή (Long), τα οποία αναστρέφουν μεν τον φαινότυπο της μετάλλαξης, αλλά υστερούν σημαντικά σε σχέση με τα αγρίου τύπου σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του φυτού (Εικ. 10Z).



Εικόνα 10. Βιομετρική ανάλυση των διαγονιδιακών κατασκευών που εκφράζουν τις δύο ισομορφές της πρωτεάσης στο μετάλλαγμα *lon1-1*. (A) αρτίβλαστα 5 ημερών, **(B)** ροζέττες φυτών 12 ημερών, **(Γ)** φυτά 21 ημερών, **(Δ)** φυτά 26 ημερών στην αρχή της αναπαραγωγικής φάσης, **(E)** ώριμα φυτά 42 ημερών και **(ΣΤ)** καρποταξίες από τα φυτά 42 ημερών. Στο (Z) παρουσιάζονται οι βιομετρικές μετρήσεις από κάθε στάδιο όπου στο μπλε γράφημα παρουσιάζεται το μήκος της πρωτογενούς ρίζας από το (A), στο γκρι γράφημα παρουσιάζεται το νωπό βάρος των φυτών στο (B), στο κόκκινο γράφημα παρουσιάζεται η επιφάνεια των φύλλων από τα φυτά στο (Γ), στο πράσινο γράφημα παρουσιάζεται το μήκος του βλαστού των φυτών από το (Δ), στο κίτρινο γράφημα παρουσιάζεται το μήκος από τις καρποταξίες από τα φυτά 42 ημερών (E, ΣΤ). Στο καφέ γράφημα παρουσιάζεται ένας μέσος όρος όλων των βιομετρικών χαρακτηριστικών του μεταλλάγματος *lon1-1* και των τριών διαγονιδιακών κατασκευών, ως ποσοστό των φυτών αγρίου τύπου (*Col-0*). Το *Col-0* θεωρείται ως μονάδα και επισημαίνεται στο γράφημα με τη ροζ γραμμή.

Για να βεβαιωθούμε ότι οι διαγονιδιακές κατασκευές εκφράζουν τις διαγονιδιακές κατασκευές και ότι η τοποθέτηση των ισομορφών είναι σωστή, έγινε ανάλυση της έκφρασης του διαγονιδίου *Lon1* σε τρεις διαφορετικές σειρές μετασχηματισμένων φυτών για κάθε κατασκευή, η οποία επιβεβαίωσε την εκτοπική έκφραση του διαγονιδίου στις διάφορες σειρές (Εικ. 11A).

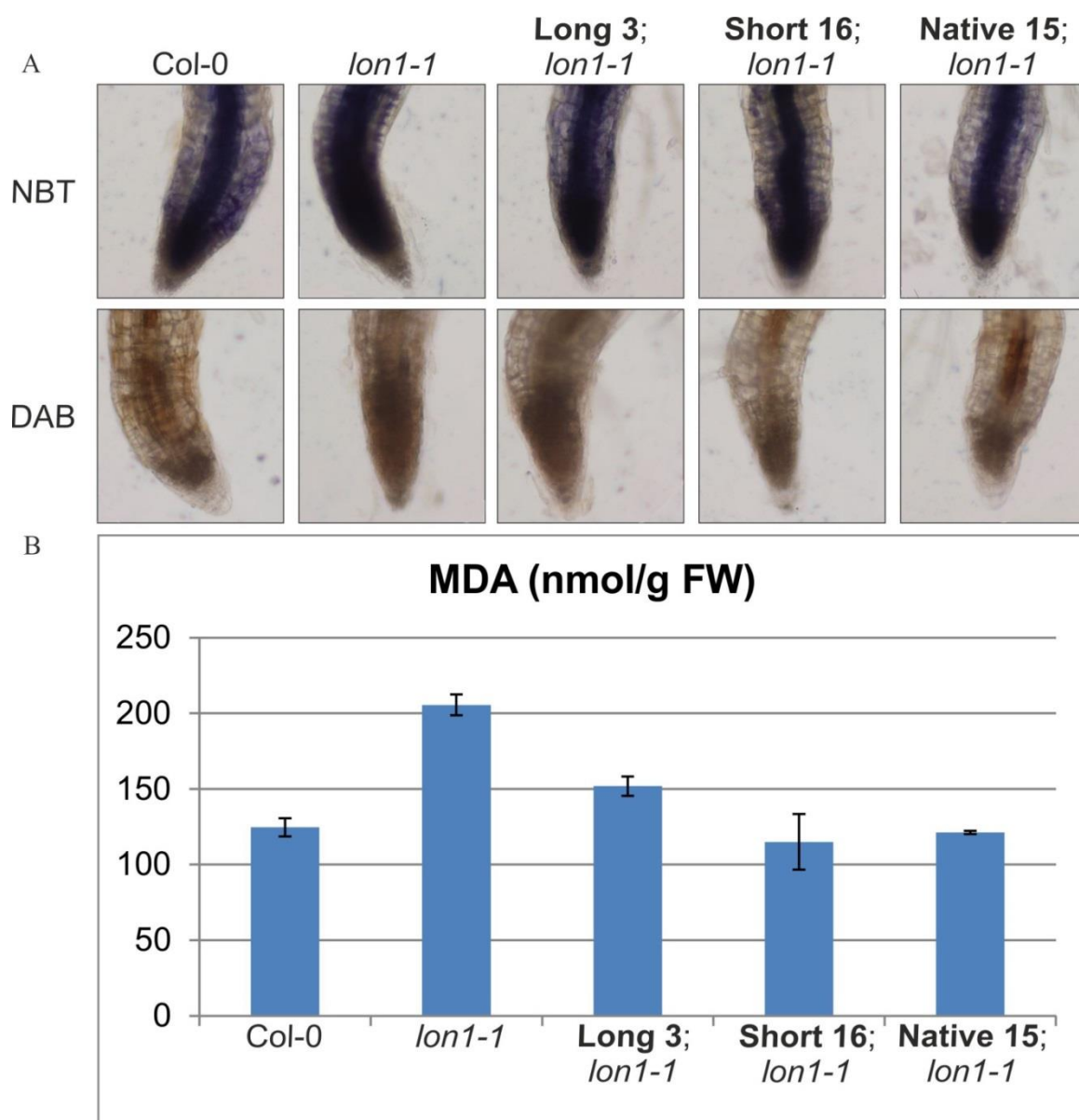


Εικόνα 11. Μοριακή ταυτοποίηση των διαγονιδιακών κατασκευών και επιβεβαίωση της υποκυτταρικής τοποθέτησης. (A) Από τρεις σειρές μετασχηματισμένων φυτών για την κάθε διαγονιδιακή κατασκευή, απομονώθηκε ολικό RNA και με ημιποσοτικό RT-PCR επιβεβαιώθηκε η έκφραση των διαγονιδίων, υπό τον έλεγχο του προαγωγέα *CaMV 35S*. **(B)** Υποκυτταρική τοποθέτηση της πρωτεΐδας Lon1, στις διαγονιδιακές κατασκευές. Από τις διαγονιδιακές σειρές που παρουσιάζονται στην Εικ. 9, απομονώθηκαν κλάσμα μιτοχονδρίων και χλωροπλάστων για να απομονωθούν οργανιδιακές πρωτεΐνες. Η πρωτεΐδα Lon1 εντοπίστηκε με ανοσοανίχνευση με το αντίσωμα anti-FLAG. Η εικόνα δείχνει ότι η διαγονιδιακή κατασκευή Lon1L τοποθετείται αποκλειστικά στους χλωροπλάστες, ενώ η Lon1S αποκλειστικά στα μιτοχόνδρια. Σε αντίθεση η κατασκευή Lon1N παρουσιάζει διπλή υποκυτταρική τοποθέτηση και στα δύο οργανίδια. Τα αντισώματα IDH (μιτοχόνδριο) και CYTB6 (χλωροπλάστης) χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για την επιβεβαίωση ότι τα οργανιδιακά κλάσματα δεν περιείχαν επιμόλυνση από το άλλο οργανίδιο.

Επιπλέον, για να βεβαιωθεί ότι οι φαινότυποι των κατασκευών οφείλονται στην αποκλειστική υποκυτταρική τοποθέτηση στα αντίστοιχα οργανίδια, και δεν υπάρχει κάποια «διαρροή» κατά την υπερέκφραση των κατασκευών, απομονώθηκαν μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες από τα φυτά που φέρουν τις κατασκευές και ακολούθησε ανοσοανίχνευση της πρωτεΐδας Lon1 με το anti-FLAG αντίσωμα. Όπως φαίνεται και στην Εικ. 11B, η τοποθέτηση της Lon1 είναι διακριτή για κάθε κατασκευή. Συνεπώς οι

φαινότυποι της ημι-συμπλήρωσης των φαινοτύπων που παρουσιάζουν οι διαγονιδιακές κατασκευές Long και Short, οφείλονται στην έλλειψη της πρωτεάσης Lon1 από το ένα οργανίδιο, ενώ η κατασκευή Native που φέρει και τις δύο ισομορφές παρουσιάζει πλήρη αναστροφή του φαινοτύπου.

Η πρωτεάση Lon παίζει σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό προστασίας των πρωτεϊνών (PQC) στα υποκυτταρικά οργανίδια. Η σωστή λειτουργία της πρωτεάσης στα δύο οργανίδια, εξασφαλίζει τη φυσιολογική λειτουργία των δύο οργανιδίων και κατ'έπекταση την ανάπτυξη του φυτού. Τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες, λόγω της λειτουργίας των δύο αλυσίδων μεταφοράς ηλεκτρονίων που λειτουργούν σε αυτά, αποτελούν πηγές παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου. Σε περιπτώσεις έντονης αναπνευστικής ή φωτοσυνθετικής δραστηριότητας ή όταν τα οργανίδια είναι δυσλειτουργικά, αυξάνεται η παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου, με δυσμενείς για το φυτό συνέπειες. Είναι ήδη γνωστό ότι τα μιτοχόνδρια του μεταλλάγματος *lon1-1* παρουσιάζουν ανώμαλη μορφολογία και μειωμένη δραστικότητα του κύκλου του Krebs και της αναπνευστικής αλυσίδας (Rigas et al., 2009a). Για να ελεγχθεί πώς αυτή η δυσλειτουργία επηρεάζει τα ενδογενή επίπεδα των ενεργών μορφών οξυγόνου και τον τρόπο με τον οποίο συμβάλλει το κάθε οργανίδιο σε αυτό, έγινε ειδική χρώση των διαγονιδιακών φυτών, που εντοπίζουν συγκεκριμένα το σουπεροξειδικό ανιόν (NBT) και το υπεροξειδίο του υδρογόνου (DAB). Τα αποτελέσματα της χρώσης έδειξαν ότι στο μετάλλαγμα *lon1-1*, τα ενδογενή επίπεδα των ενεργών μορφών οξυγόνου, είναι πράγματι αυξημένα (Εικ. 12A). Όταν επανέρχεται η δυαδική υποκυτταρική στόχευση (Native), τα επίπεδα επανέρχονται σε φυσιολογικά επίπεδα, καθώς η χρώσεις μεταξύ των διαγονιδίων Native και αγρίου τύπου, είναι πανομοιότυπες (Εικ. 12A). Στην περίπτωση όπου εκφράζεται μόνο η χλωροπλαστική ισομορφή (Long), τα επίπεδα των ενεργών μορφών οξυγόνου είναι εμφανώς αυξημένα σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου, όμως είναι λιγότερα απότι στα μεταλλάγματα *lon1-1*, ενώ όταν εκφράζεται μόνο η μιτοχονδριακή ισομορφή (Short), αυτά επανέρχονται σχεδόν στα κανονικά επίπεδα όπως και στα φυτά αγρίου τύπου (Εικ. 12A).



Εικόνα 12. Προσδιορισμός των ενδογενών επιπέδων ενεργών μορφών οξυγόνου και της οξείδωσης των λιπαρών στις διαγονιδιακές σειρές *Lon1*. (A) Σε αρτίβλαστα 7 ημερών έγινε χρώση με τις χρωστικές nitroblue tetrazolium (NBT) και 3,3'-Diaminobenzidine (DAB), οι οποίες βάφουν το σουπεροξειδικό ανιόν και το υπεροξείδιο του υδρογόνου, αντίστοιχα. (B) Προσδιορισμός της οξείδωσης των λιπαρών οξέων, ως αποτέλεσμα της επίδρασης των ενεργών μορφών οξυγόνου στις διαγονιδιακές κατασκευές. Ο προσδιορισμός έγινε με την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του μορίου Malondialdehyde (MDA), το οποίο αποτελεί δείκτη του ποσοστού οξείδωσης των λιπαρών (Lv et al., 2011).

Τα αυξημένα επίπεδα των ενδογενών ενεργών μορφών οξυγόνου, έχουν άμεση επίδραση στην οξείδωση των λιπαρών (Lv et al., 2011). Μέτρηση της οξείδωσης των λιπαρών στις διαγονιδιακές σειρές (Εικ. 10) έδειξε ότι, σε συμφωνία με τα επίπεδα των ενεργών μορφών οξυγόνου, το μετάλλαγμα είχε αυξημένα επίπεδα οξείδωσης (Εικ. 12B),

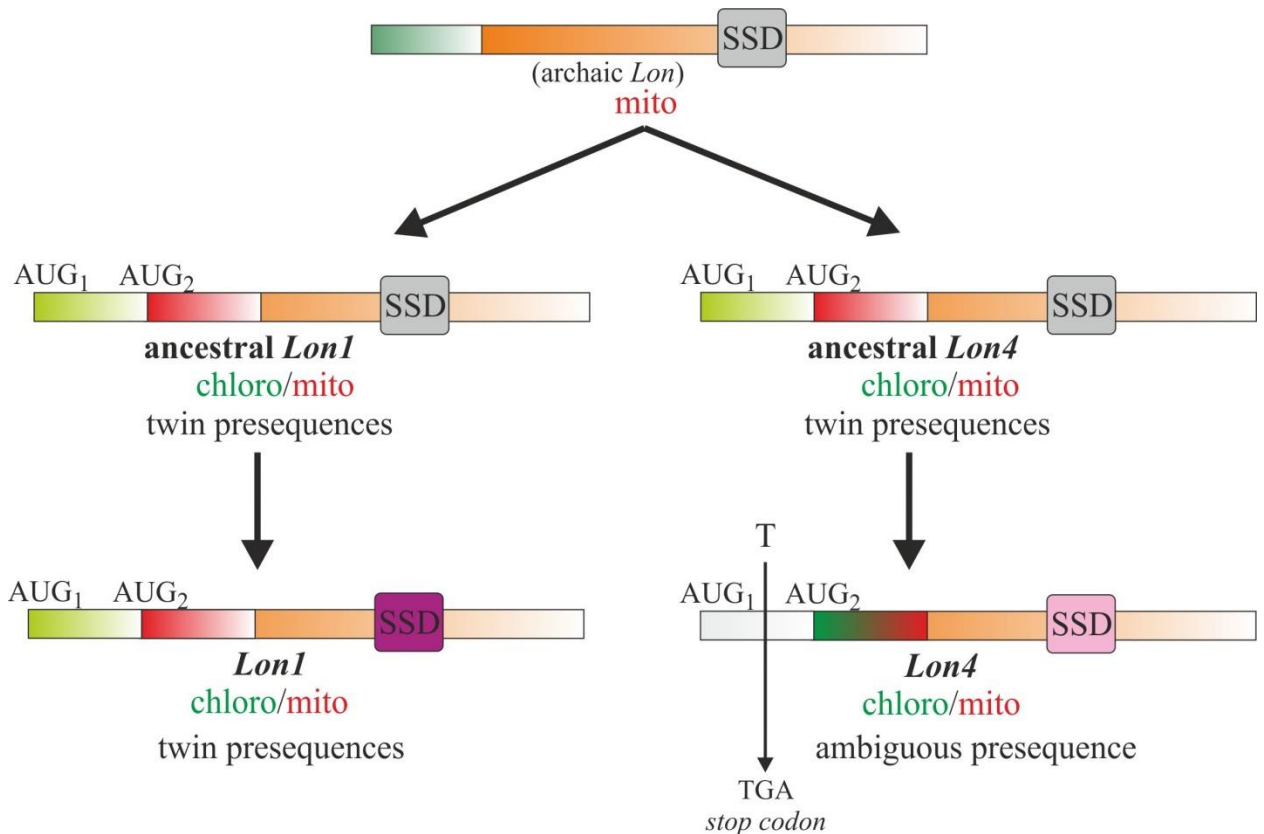
ενώ οι διαγονιδιακές σειρές που εκφράζουν μόνο την χλωροπλαστική ισομορφή (Long), παρουσιάζουν μικρότερα επίπεδα οξειδωσης των λιπαρών τους σε σχέση με τα μεταλλάγματα *lon1-1*, υψηλότερα όμως απο τα φυτά αγρίου τύπου. Οι άλλες δύο διαγονιδιακές σειρές (Short και Native) παρουσίασαν ίδια επίπεδα οξειδωσης με τα φυτά αγρίου τύπου. Στην περίπτωση αυτή, τα διαγονίδια που εκφράζουν μόνο την μιτοχονδριακή ισομορφή δεν παρουσιάζουν πρόβλημα στην οξειδωση των λιπαρών, υποδηλώνοντας ότι ενώ μπορεί να παράγουν λίγο περισσότερες ενεργές μορφές οξυγόνου, εντούτοις αυτό δεν έχει αντίκτυπο στην οξειδωση των λιπαρών. Συνεπώς τα ενδογενή επίπεδα παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου είναι σε αντιστοιχία με τους φαινότυπους των διαγονιδιακών σειρών, καθώς το ποσοστό παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου και οι βλάβες που προκαλούνται είναι ανάλογα της καθυστέρησης που παρουσιάζουν τα φυτά στην ανάπτυξη τους, αναδεικνύοντας ξανά τη σημασία της παρουσίας της Lon1 και στα δύο οργανίδια.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα από την ανάλυση των διαγονιδιακών κατασκευών της Lon1, η πρωτεάση έχει λειτουργικό ρόλο και στα δύο οργανίδια, με κυριότερο όμως στα μιτοχόνδρια, καθώς οι φαινότυποι από τις βιομετρικές αναλύσεις όπως και τα ενδογενή επίπεδα των ενεργών μορφών οξυγόνου στα διαγονίδια που έφεραν μόνο την μιτοχονδριακή ισομορφή, ήταν πιο κοντά με εκείνο των φυτών του μάρτυρα σε σχέση με αυτά που εκφράζουν μόνο την χλωροπλαστική ισομορφή (Εικ. 10 και 12).

3.1.2 Το μετάλλαγμα *lon4-1* παρουσιάζει πρόβλημα στην βλαστικότητα των σπερμάτων του και στην αναπνευστική δραστηριότητα

Η εξέλιξη του μηχανισμού υποκυτταρικής στόχευσης των ισομορφών Lon1 και Lon4 του *A. thaliana* μελετήθηκε πρόσφατα (Daras et al., 2014; Rigas et al., 2014). Τα δεδομένα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι οι δύο ισομορφές προήλθαν από μία αρχέγονη ισομορφή της πρωτεάσης Lon, η οποία είχε μιτοχονδριακή υποκυτταρική τοποθέτηση (Εικ. 12). Στην πορεία της εξέλιξης, το γονίδιο αυτό διπλασιάστηκε με αποτέλεσμα την δημιουργία δύο αρχέγονων τύπων των ισομορφών Lon1 και Lon4 με διπλή υποκυτταρική στόχευση στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες μέσω του μηχανισμού δυαδικών πρόδρομων αλληλουχιών στόχευσης (twin presequences). Στη συνέχεια, οι δύο αυτές ισομορφές συνεξελίχθηκαν, με την Lon1 να διατηρεί τον μηχανισμό στόχευσης και να διαφοροποιεί την περιοχή SSD του στη σημερινή μορφή, ενώ η Lon4, με την είσοδο μίας θυμίνης ανάμεσα στα δύο κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης, δέκοψε τον μηχανισμό των

δυναμικών πρόδρομων ακολουθιών στόχευσης, εξελίσσοντας όμως το πολυπεπτίδιο του ως ενιαία πρόδρομη αλληλουχία (ambiguous presequence) με διπλή υποκυτταρική στόχευση και διαφορετική περιοχή SSD (Εικ. 13). Με αυτήν την εξελικτική διαδικασία το φυτό *Arabidopsis* απέκτησε δύο παράλογα της πρωτεάσης Lon, με πιθανά διαφοροποιημένη λειτουργία και διακριτό μηχανισμό υποκυτταρικής στόχευσης.

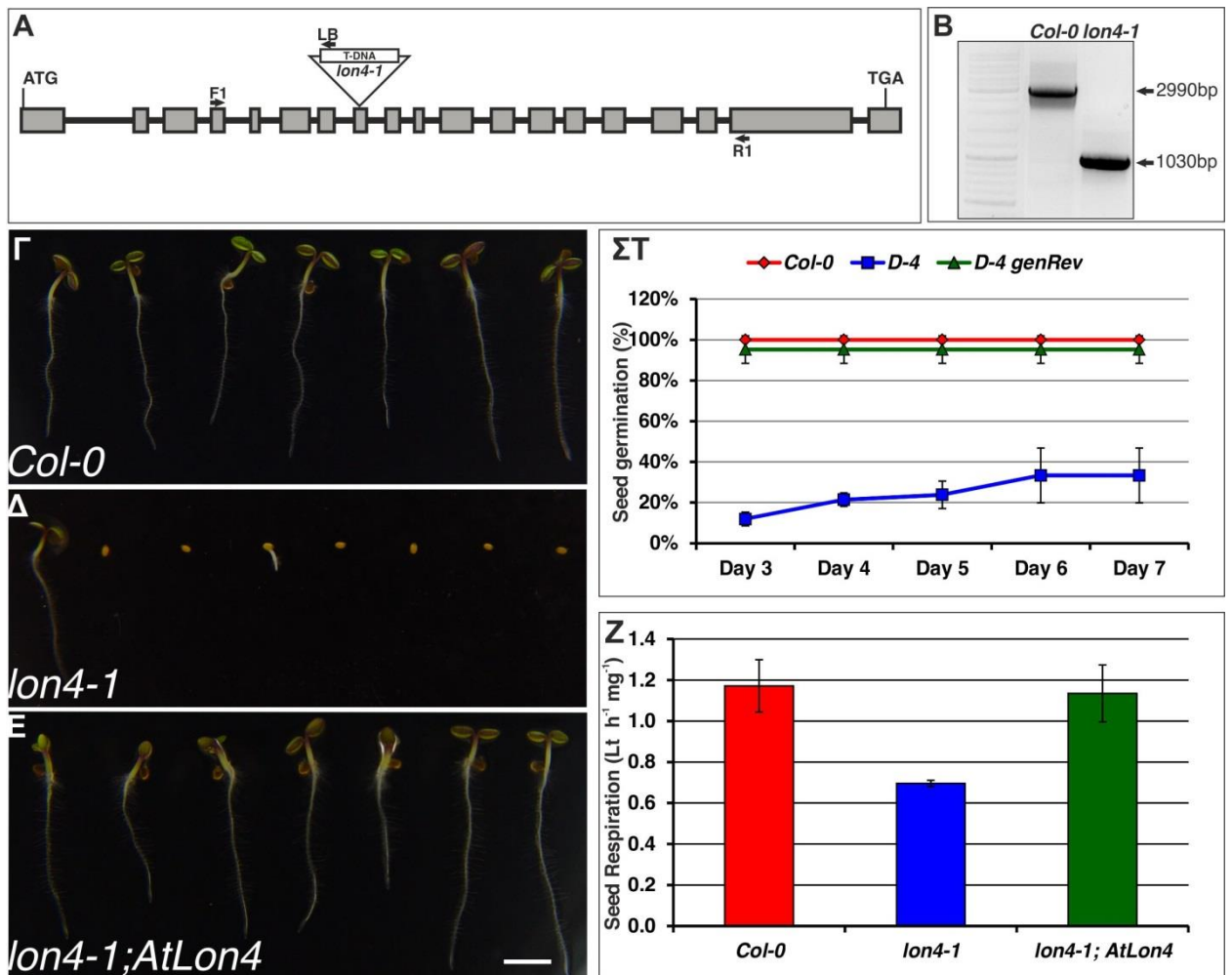


Εικόνα 13. Η εξέλιξη των ισομορφών Lon1 και Lon4 στο φυτό *Arabidopsis thaliana*. Η πρωτεάση Lon μετά την ενδοσυμβίωση του α-πρωτεοβακτηρίου, εξέλιξε μηχανισμό υποκυτταρικής στόχευσης στο μιτοχόνδριο. Η προγονική αυτή μορφή διπλασιάστηκε και έδωσε τις πρωτόγονες δομές των Lon1 και Lon4, οι οποίες αρχικά διατήρησαν τον μηχανισμό των διττών ακολουθιών στόχευσης (twin presequences) για διπλή υποκυτταρική στόχευση στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες. Στη συνέχεια οι δυο ισομορφές διαφοροποιήθηκαν περαιτέρω, αναπτύσσοντας διαφορετικούς μηχανισμούς υποκυτταρικής στόχευσης και διαφορετική δομή SSD. Το Lon4, με την εισαγωγή μιας θυμίνης διέκοψε την χλωροπλαστική ισομορφή και εξέλιξε το άλλο πεπτίδιο οδηγό ως ενιαία πρόδρομη ακολουθία διπλής υποκυτταρικής στόχευσης (ambiguous presequence).

Για τις πρωτεάσες Lon4 και Lon3, τα πειραματικά δεδομένα που είναι μέχρι στιγμής είναι γνωστή μόνο η υποκυτταρική τοποθέτηση της Lon4 στους χλωροπλάστες και στα

μιτοχόνδρια (Sakamoto, 2006, Ostersetzer et al. 2007), όμως ούτε δημοσιευμένα μεταλλάγματα υπάρχουν, ούτε άλλα δεδομένα. Η Lon3, λόγω έλλειψης πειραματικών δεδομένων και μεταλλαγμάτων, θεωρείται ψευδογονίδιο, παρόλο που το πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου παραμένει ανοιχτό, κάτι που στα ψευδογονίδια δεν είναι σύνηθες.

Για τη μελέτη του λειτουργικού ρόλου των ισομορφών Lon4 και Lon3, έγινε αναζήτηση μεταλλαγμάτων για τα δύο γονίδια, στη βάση δεδομένων T-DNA express (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). Από την αναζήτηση, δεν βρέθηκε κανένα μετάλλαγμα για το γονίδιο Lon3 (At3g05780). Για το γονίδιο Lon4 (At3g05790) βρέθηκε η σειρά FLAG_320C06 η οποία φέρει μια T-DNA ένθεση στο 8^ο εξώνιο του γονιδίου (Εικ. 14A). Ακολούθησε μοριακός χαρακτηρισμός της ένθεσης με PCR (Εικ. 14B) από την οποία προκύπτει ότι η ένθεση είναι πράγματι στο 8^ο εξώνιο και επιπλέον είναι σε ομόζυγη κατάσταση. Τα φυτά που φέρουν την μετάλλαξη έχουν πρόβλημα κατά τη βλάστηση των σπερμάτων, όπου το ποσοστό βλαστικότητας παραμένει εξαιρετικά χαμηλό (Εικ. 14Γ, Δ, ΣΤ).



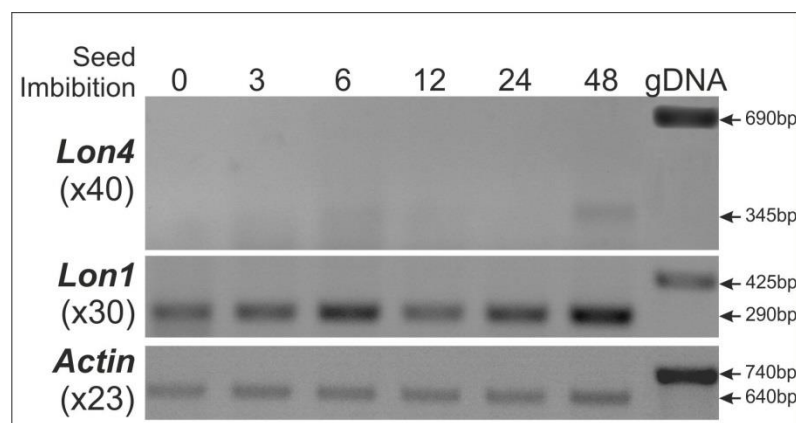
Εικόνα 14. Χαρακτηρισμός του μεταλλάγματος *lon4-1* στο φυτό *Arabidopsis thaliana*. (A) Η T-DNA ένθεση βρίσκεται στο 8ο εξώνιο του γονιδίου At3g05790 (*AtLon4*). Στην εικόνα φαίνονται και οι τρεις εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το μοριακό χαρακτηρισμό της ένθεσης. (B) Μοριακός χαρακτηρισμός της ένθεσης, επιβεβαιώνει ότι αυτή βρίσκεται στο 8ο εξώνιο και επιπλέον, βρίσκεται σε ομόζυγη κατάσταση, καθώς από την αντίδραση PCR παίρνουμε μόνο το προϊόν που ενισχύεται από τον ορθό εκκινητή και από τον εκκινητή της ένθεσης. (Γ, Δ, Ε) Το μετάλλαγμα *lon4-1* παρουσιάζει πρόβλημα βλαστικότητας των σπερμάτων, το οποίο αναστρέφεται όταν επανεισάγεται το αγρίου τύπου γονίδιο *AtLon4* (Ε). (ΣΤ) Καταγραφή της βλαστικότητας των σπερμάτων *lon4-1* σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου και τα φυτά που αναστρέφουν τον φαινότυπο. (Ζ) Η αναπνευστική δραστικότητα των σπερμάτων της μετάλλαξης *lon4-1* υστερεί σημαντικά σε σχέση με τα σπέρματα των φυτών αγρίου τύπου και των φυτών που αναστρέφουν την μετάλλαξη.

Για την οριστική επιβεβαίωση του μεταλλάγματος, έγινε μετασχηματισμός των φυτών που φέρουν τη μετάλλαξη, με την γονιδιωματική περιοχή που φέρει την κανονική ακολουθία του γονιδίου At3g05790 (*AtLon4*). Τα φυτά αυτά αναστρέφουν πλήρως τον φαινότυπο της μετάλλαξης και παρουσιάζουν ποσοστό βλαστικότητας ίδιο με τα φυτά αγρίου τύπου (Εικ. 14Ε, ΣΤ). Έτσι, όντας το πρώτο κατά σειρά χαρακτηρισμένο μετάλλαγμα

για την πρωτεάση Lon4 του *A. thaliana*, το μετάλλαγμα αυτό ονομάστηκε *lon4-1* (Εικ. 14Δ). Μέτρηση της αναπνοής των σπερμάτων κατά τη διάρκεια της διακοπής του ληθάργου, έδειξε ότι η αναπνευστική δραστηριότητα των σπερμάτων του μεταλλάγματος *lon4-1* είναι μειωμένη περίπου στο μισό σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου, ενώ με την εισαγωγή του φυσιολογικού γονιδίου, ο φαινότυπος αναστρέφεται πλήρως (Εικ. 14Ζ). Η μειωμένη αναπνευστική δραστηριότητα των σπερμάτων *lon4-1* σε συνδυασμό με τη μειωμένη δραστικότητα των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας των μεταλλαγμάτων του γονιδίου *Lon1* υποδεικνύει ότι η πρωτεάση Lon παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία των μιτοχονδρίων, μέσω της διατήρησης της ομοιόστασης του οργανιδιακού πρωτεόματος, και όταν διαταράσσεται η σωστή λειτουργία της, τα φυτά παρουσιάζουν σημαντικό πρόβλημα στην αναπνοή τους.

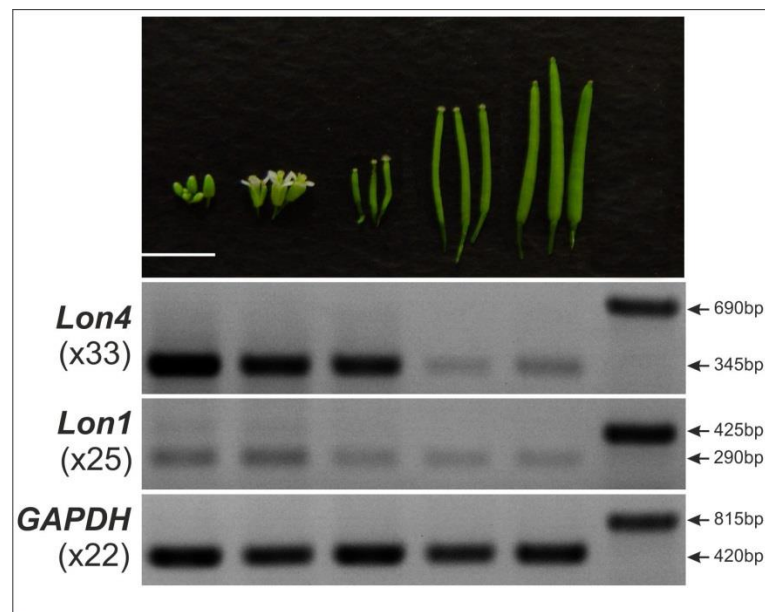
3.2 Οι τρεις μιτοχονδριακές/χλωροπλαστικές ισομορφές της πρωτεάσης Lon στο *Arabidopsis* παρουσιάζουν διακριτά πρότυπα έκφρασης

Για να εξετάσουμε εάν τα γονιδια *Lon1* και *Lon4* που αποτελεί διαπλασιασμένη μορφή του πρώτου, έχουν μεταξύ τους διαφορές σε μεταγραφομικό επίπεδο μελετήθηκε η έκφραση τους στα στάδια ενυδάτωσης των σπερμάτων και της διακοπής του ληθάργου. Η επιλογή των σταδίων αυτών έγινε λόγω του φαινότυπου του μεταλλάγματος *lon4-1* που παρουσιάζει χαμηλό ποσοστό βλαστικότητας σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου, θεωρώντας ότι ο φαινότυπος αυτός οφείλεται σε έλλειμα της έκφρασης του γονιδίου σε εκείνο το στάδιο. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση παρουσιάζονται στην Εικ. 16, όπου με έκπληξη φαίνεται ότι το γονίδιο *Lon4* δεν εκφράζεται σε κανένα στάδιο κατά την ενυδάτωση των σπερμάτων, παρά μόνο αρχίζει και φαίνεται ένα πολύ μικρό ποσοστό έκφρασης του στις 48 ώρες ενυδάτωσης. Αντίθετα, το *Lon1*, εκφράζεται συνεχώς, και παρουσιάζει μέγιστα στις 6 και στις 48 ώρες ενυδάτωσης (Εικ. 15).



Εικόνα 15. Το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *Lon4* και *Lon1* κατά τη διαδικασία της διακοπής του ληθάργου των σπερμάτων. Σπέρματα αγρίου τύπου *A. thaliana* ενυδατώθηκαν και επωάστηκαν στους 4οC για 48 ώρες για να διακοπεί ο λήθαργος. Δειγματοληψίες έγιναν στις 0, 3, 6, 12, 24 και 48 ώρες από τη στιγμή της ενυδάτωσης. Στις παρενθέσεις καταγράφονται οι κύκλοι που έγιναν κατά την ενίσχυση με PCR και δεξιά καταγράφονται τα μεγέθη των προϊόντων σε ζεύγη βάσεων. Το γονίδιο της ακτίνης χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για να επιβεβαιωθεί ότι σε κάθε στάδιο χρησιμοποιείται η ίδια ποσότητα RNA, ενώ το γονιδιωματικό DNA χρησιμοποιείται ως μάρτυρας ότι δεν υπάρχει επιμόλυνση από DNA κατά την απομόνωση.

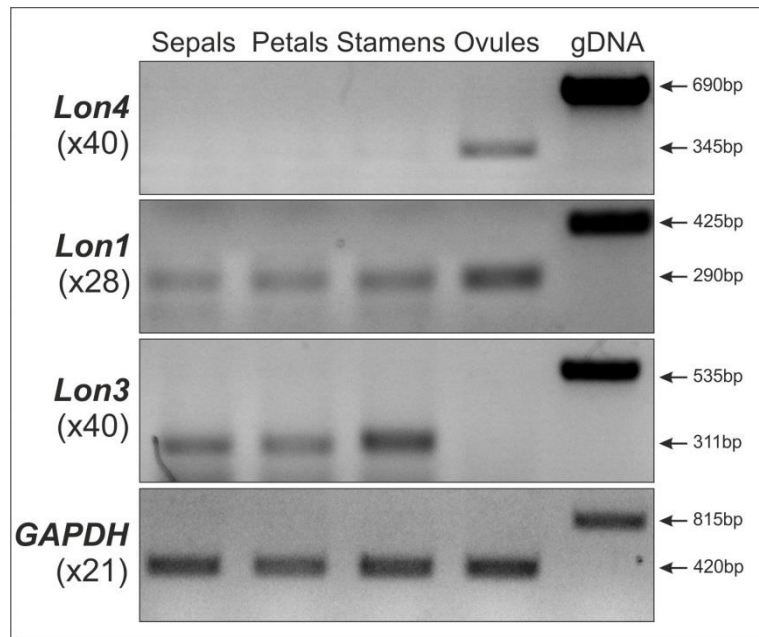
Λαμβάνοντας υπόψη τον φαινότυπο της μετάλλαξης θα ήταν αναμενόμενο το γονίδιο *Lon4* να εκφράζεται σε αυτά τα στάδια, ωστόσο, υπάρχει η πιθανότητα, η έκφραση του γονιδίου να προηγείται πολύ της βλάστησης και να σχετίζεται με την σωστή ανάπτυξη του άνθους ή του εμβρύου. Συνεπώς, η χαμηλή βλαστικότητα των σπερμάτων μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη της *Lon4* πρωτεάσης κατά τα στάδια της εμβρυογένεσης. Για να επιβεβαιωθεί η υπόθεση, έγινε απομόνωση mRNA από ιστούς που αντιπροσωπεύουν όργανα στα αρχικά και τελικά στάδια της άνθισης και εμβρυογένεσης. Συγκεκριμένα ως βιολογικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν κλειστά άνθη, ανοιχτά άνθη και καρποταξίες τριών διαδοχικών σταδίων (Εικ. 16). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης του προτύπου έκφρασης των γονιδίων *Lon4* και *Lon1* στα στάδια της ανθοφορίας και της εμβρυογένεσης έδειξαν ότι το γονίδιο *Lon1* εκφράζεται σταθερά σε όλα τα στάδια σε αντίθεση με το γονίδιο *Lon4*, το οποίο παρουσιάζει υψηλή έκφραση κυρίως στα κλειστά και ανοιχτά άνθη, καθώς και στις μικρές καρποταξίες (Εικ. 17). Η έκφραση του γονιδίου *Lon4* μειώνεται δραματικά καθώς η ωρίμανση των καρποταξιών προχωρά (Εικ. 16).



Εικόνα 16. Το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *Lon4* και *Lon1* κατά τη διαδικασία της άνθησης και της εμβρυογένεσης. Απομονώθηκε ολικό RNA από κλειστά και ανοιχτά άνθη και καρποταξίες από τρία στάδια από φυτά αγρίου τύπου *A. thaliana* και έγινε ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων *Lon4* και *Lon1* με ημιποσοτικό RT-PCR. Στις παρενθέσεις καταγράφονται οι κύκλοι που έγιναν κατά την ενίσχυση με PCR και δεξιά καταγράφονται τα μεγέθη των προϊόντων σε ζεύγη βάσεων. Το γονίδιο της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (*GAPDH*) χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για να επιβεβαιωθεί ότι σε κάθε στάδιο χρησιμοποιήθηκε η ίδια ποσότητα RNA, ενώ το γονιδιωματικό DNA χρησιμοποιείται ως μάρτυρας ότι δεν υπάρχει επιμόλυνση από DNA κατά την απομόνωση.

Το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *Lon4*, υποδηλώνει το σημαντικό ρόλο κατά τη φάση της γονιμοποίησης ή/και στα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η προβληματική βλαστικότητα των σπερμάτων του μετάλλαγματος *lon4-1* προέρχεται από κάποια παρεκτροπή που συμβαίνει νωρίς στην εμβρυογένεση. Το γεγονός ότι τελικά κάποια σπέρματα βλαστάνουν πιθανώς να οφείλεται στη συμπλήρωση της λειτουργίας της *Lon4*, από κάποια άλλη πρωτεάση ή σε διαφυγή της μετάλλαξης εξαιτίας ειδικών συνθηκών που πιθανόν να επικρατούν στα κρίσιμα αρχικά στάδια της καρπόδεσης και εμβρυογένεσης.

Για να γίνει ακόμη πιο αναλυτική η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *Lon4*, έγινε ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων *Lon* σε μεμονωμένα ανθικά μέρη του φυτού. Στην ανάλυση αυτή συμπεριλήφθηκε και το γονίδιο *Lon3*, για να διερευνηθεί αρχικά αν εκφράζεται σε κάποιον ανθικό ιστό και στη συνέχεια, αν παρουσιάζει κάποιο διαφορετικό πρότυπο έκφρασης σε σχέση με τα άλλα δύο γονίδια. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στην **Εικ. 17**. Παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον το γεγονός ότι το γονίδιο *Lon4* εκφράζεται αποκλειστικά στον ύπερο του άνθους, ενώ για πρώτη φορά εντοπίζεται έκφραση του γονιδίου *Lon3*, το οποίο παρουσιάζει και ένα πολύ ενδιαφέρον πρότυπο καθώς δεν εκφράζεται καθόλου στον ύπερο, εκφράζεται στα πέταλα και τα σέπαλα, αλλά το μέγιστο της έκφρασης παρατηρείται στους στήμονες, όπου ωριμάζει και η γύρη του άνθους (**Εικ. 17**). Το γονίδιο *Lon1*, όπως και στις προηγούμενες αναλύσεις έκφρασης των γονιδίων, δεν παρουσιάζει κάποια εξειδίκευση ως προς την έκφρασή του, καθώς εντοπίστηκαν μεταγραφήματά του σε όλους τους ιστούς που εξετάστηκαν (**Εικ. 17**).



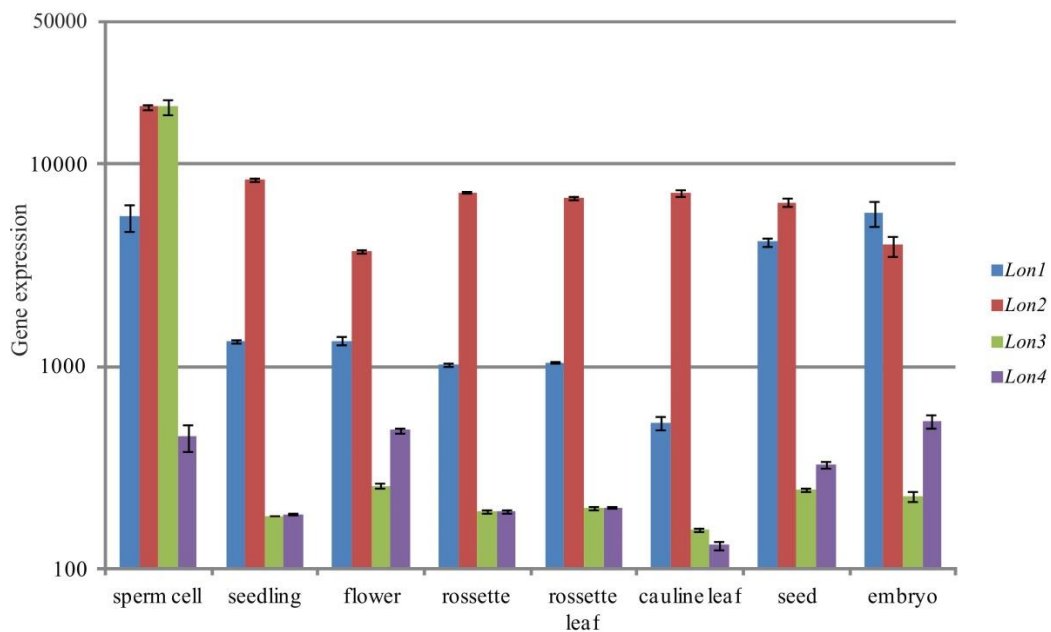
Εικόνα 17. Το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *Lon1*, *Lon3*, και *Lon4* στα ανθικά μέρη του *Arabidopsis*.

Απομονώθηκε ολικό RNA από σέπαλα, πέταλα, στήμονες και ύπεροι φυτῶν *Arabidopsis thaliana* και έγινε ανάλυση της έκφρασης με ημιποσοτικό RT-PCR των γονιδίων *Lon1*, *Lon3* και *Lon4*. Στις παρενθέσεις καταγράφονται οι κύκλοι που έγιναν κατά την ενίσχυση με PCR και δεξιά τα μεγέθη των προϊόντων σε ζεύγη βάσεων. Το γονίδιο της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (*GAPDH*) χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για να επιβεβαιωθεί ότι σε κάθε στάδιο χρησιμοποιήθηκε η ίδια ποσότητα RNA, ενώ το γονιδιωματικό DNA χρησιμοποιείται ως μάρτυρας ότι δεν υπάρχει επιμόλυνση από DNA κατά την απομόνωση.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα το γονίδιο *Lon1* εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα από τα άλλα δύο, σε όλους τους ιστούς που μελετήθηκαν. Το γονίδιο *Lon4* φαίνεται να παρουσιάζει εξειδίκευση προς την έκφρασή του στα ανθικά μέρη και συγκεκριμένα στον ύπερο του άνθους, ενώ η υπόθεση γίνεται ακόμη πιο ενδιαφέρουσα με το πρότυπο έκφρασης του *Lon3*, το οποίο, πέραν του γεγονότος ότι για πρώτη φορά αποδεικνύεται ότι δεν αποτελεί ψευδογονίδιο, παρουσιάζει εξειδίκευση στην έκφρασή της ως προς τα αρσενικά μέρη του άνθους.

Τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα εναρμονίζονται με τα δεδομένα από δημόσιες βάσεις δεδομένων μικροσυστοιχιών (Εικ. 18). Η έκφραση των γονιδίων *Lon1* και *Lon2* φαίνεται να είναι υψηλή, σε αρκετούς ιστούς αλλά ειδικά στα όργανα εμβρυονικής προέλευσης, όπως τα έμβρυα, τα σπέρματα και τα αρτίβλαστα. Σε αντίθεση, η έκφραση των γονιδίων *Lon3* και *Lon4*, φαίνεται πως είναι ειδική. Το γονίδιο *Lon3* εκφράζεται στα

σπερματικά κύτταρα της γύρης, ενώ το *Lon4* εκφράζεται κυρίως στα άνθη και στα έμβρυα (Εικ. 18), κάτι που επιβεβαιώνεται και από τα δικά μας αποτελέσματα.

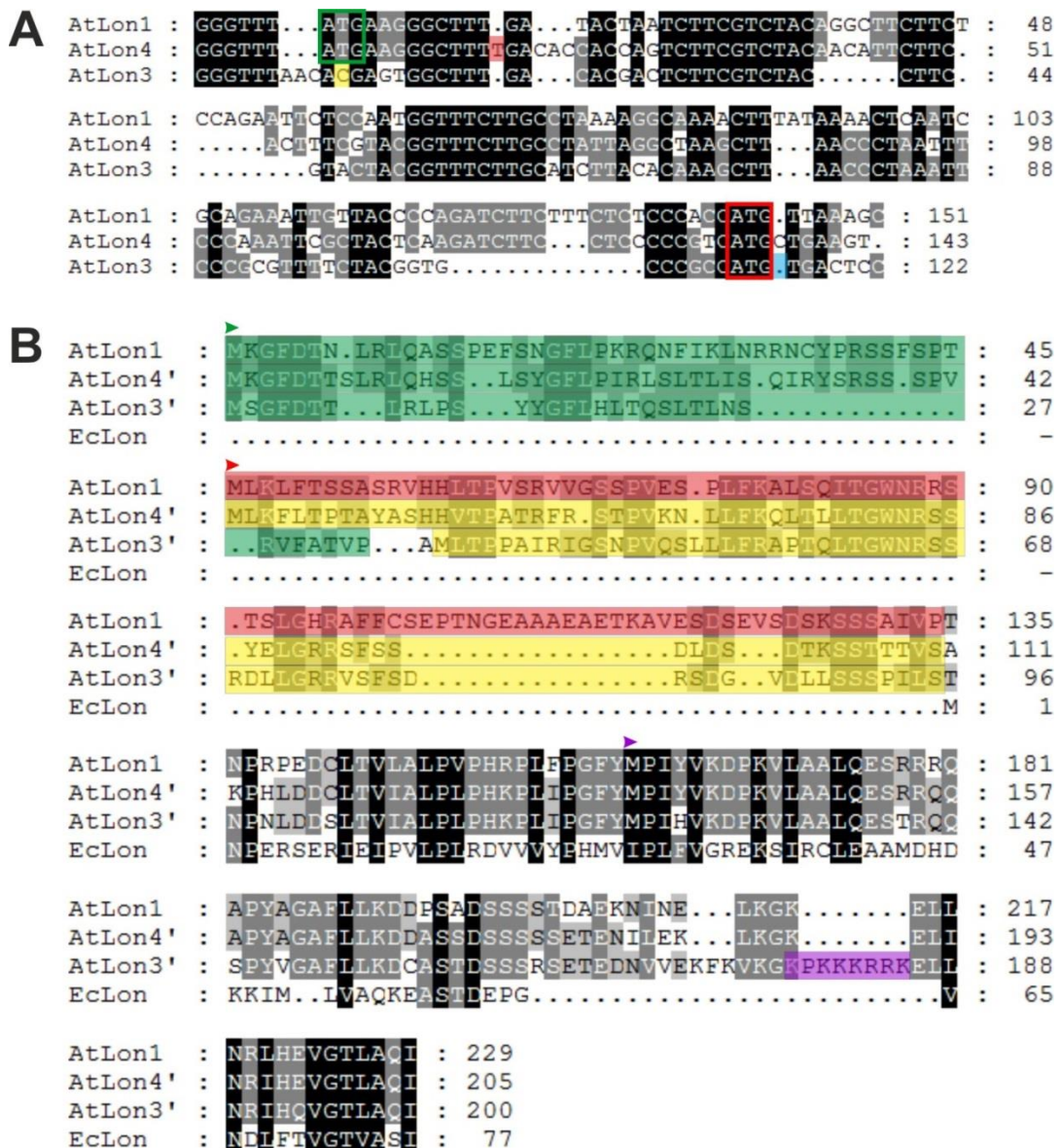


Εικόνα 18. Ιστοειδικό πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *Lon* του *Arabidopsis thaliana*. Όπως προκύπτει από τα δεδομένα της βάσης δεδομένων μικροσυστοιχιών Genevestigator, οι τέσσερις ισομορφές της πρωτεάσης Lon του *Arabidopsis* παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης.

3.3 Οι 3 ισομορφές της πρωτεάσης Lon στο *A. thaliana* έχουν προέλθει μέσω διαδοχικών διπλασιασμών και έχουν διακριτούς λειτουργικούς ρόλους

3.3.1 Οι τρεις ισομορφές της πρωτεάσης Lon του *Arabidopsis* έχουν διαφορετικούς μηχανισμούς υποκυτταρικής στόχευσης

Σε συνέχεια του μοντέλου της εξέλιξης των Lon1 και Lon4 (Εικ. 13) έγινε ανάλυση των γονιδιωματικών ακολουθιών και των τριών ισομορφών από την οποία προκύπτει ότι η Lon3, έχει εκφυλίσει εντελώς το πρώτο κωδικόνιο έναρξης, διατηρώντας όμως κατάλοιπα των ρυθμιστικών περιοχών, ενώ αμέσως μετά το δεύτερο κωδικόνιο έναρξης, αφαιρείται ένα κατάλοιπο κυτοσίνης σε σχέση με το Lon4, με αποτέλεσμα να διακόπτεται και το δεύτερο αναγνωστικό πλαίσιο (Εικ. 19A). Το επόμενο κωδικόνιο έναρξης της Lon3 βρίσκεται στο τέλος σχεδόν της άμινο τελικής περιοχής, όπου συμπίπτει με την αρχή του πολυπεπτιδίου της ισομορφής του *E. coli* (το οποίο ως προκαρυώτης δεν φέρει πεπτιδιο οδηγό). Επιπλέον, το Lon3 φέρει ένα νέο στοιχείο που δεν φέρουν οι δύο άλλες ισομορφές: σινιάλο πυρηνικής τοποθέτησης (Nuclear Localization Signal, NLS) (Εικ. 19B).



Εικόνα 19. Πολλαπλή στοίχιση (ευθυγράμμιση) των ακολουθιών των ισομορφών Lon1, Lon4 και Lon3 του *Arabidopsis thaliana*.

(A) Σε νουκλεοτιδικό επίπεδο, οι τρεις ισομορφές παρουσιάζουν μεγάλο ποσοστό συντήρησης, φέρουν όμως συγκεκριμένες μεταλλάξεις που διαφοροποιούν τις ιδότητες των πρωτεϊνών. Σε σχέση με τη Lon1, η Lon4 έχει μια εισαγωγή μιας βάσης θυμίνης (T, κόκκινη επισήμανση) ανάμεσα στα δύο κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης (πράσινο και κόκκινο παραλληλόγραμμα) η οποία δημιουργεί ένα κωδικόνιο λήξης, με αποτέλεσμα η Lon4 να χάνει την χλωροπλαστική ισομορφή και να εξελίσει την μιτοχονδριακή ισομορφή σε ακολουθία διπλής αναγνώρισης. Η Lon3, η οποία φαίνεται να είναι αποτέλεσμα διπλασιασμού της ισομορφής Lon4, έχει εκφυλίσει εντελώς το πρώτο κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης (κίτρινη επισήμανση), ενώ με την αφαίρεση μιας βάσης κυτοσίνης (C, μπλέ επισήμανση) διακόπτει και την δεύτερη διττή ισομορφή. Αποτέλεσμα αυτών των αλλαγών είναι το πιθανό αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου Lon3 να ξεκινά από μεταγενέστερο συντηρημένο κωδικόνιο έναρξης (μωβ βέλος στο **B**), με αποτέλεσμα η έναρξη της Lon3 να συμπίπτει με την έναρξη της πρωτεάσης Lon του *E. coli*, το οποίο δεν φέρει πεπτικό οδηγό. **(B)** Αποκατάσταση των μεταλλάξεων στις πρωτεάσες Lon4 με την αφαίρεση της

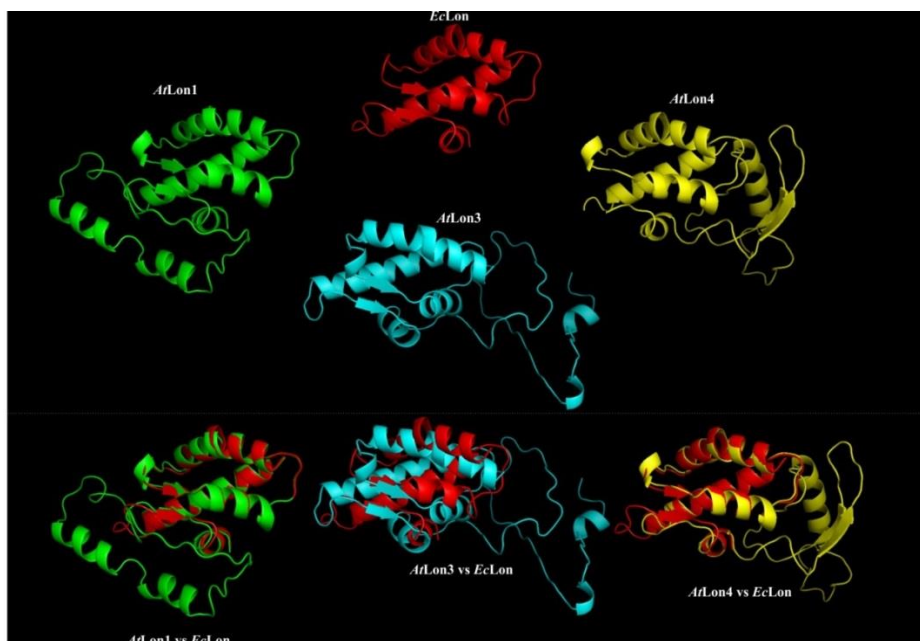
θυμίνης και του Lon3 με αποκατάσταση του πρώτου κωδικονίου έναρξης και προσθήκη της κυτοσίνης μετά το δεύτερο κωδικόνιο ανοίγει το αναγνωστικό πλαίσιο για τη κωδικοποίηση δυο πολυπεπτιδίων. Το πρώτο Lon3 και Lon4 πολυπετίδιο παρουσιάζει χλωροπλαστική στόχευση (πράσινη επισήμανση, με πράσινο βελάκι επισημαίνεται η αρχή της μετάφρασης), όπως και τη πρωτεάση Lon1. Το δεύτερο Lon3 πολυπετίδιο (κόκκινο βελάκι) κωδικοποιεί ισομορφή με διπλή υποκυτταρική στόχευση στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες (κίτρινη επισήμανση). Με κόκκινο επισημαίνεται η μιτοχονδριακή ισομορφή της Lon1, η οποία έχει την ίδια θέση έναρξης. Με μωβ επισημαίνεται το πεπτίδιο πυρηνικής τοποθέτησης (NLS) της Lon3, η οποία απουσιάζει από τις Lon1 και Lon4.

Αποκατάσταση των παραπάνω μεταλλάξεων στις ισομορφές Lon4 και Lon3 επαναφέρουν το 5' ακρο των γονιδίων στη δομή του γονιδίου Lon1 κωδικοποιώντας ένα πολυπεπίδιο με χλωροπλαστική υποκυτταρική στόχευση από το πρώτο κωδικόνιο έναρξης (πράσινη επισήμανση) και ένα δεύτερο πολυπεπίδιο με διπλή υποκυτταρική στόχευση στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες από το δεύτερο κωδικόνιο (κίτρινη επισήμανση, **Εικ. 19B**). Τα αποτελέσματα από αυτή την ανάλυση υποδεικνύουν ότι η πιο αρχέγονη ισομορφή του *A. thaliana* είναι η πρωτεάση Lon1. Στη συνέχεια, μετά από διαδοχικούς διπλασιασμούς και συσσώρευση στοχευμένων μεταλλάξεων, προκύπτουν οι ισομορφές Lon4 και Lon3, οι οποίες όμως έχουν εξελίξει εξελίσσοντας διαφορετικούς μηχανισμούς υποκυτταρικής στόχευσης.

3.3.2 Οι τρεις ισομορφές της πρωτεάσης Lon του *Arabidopsis* έχουν διαφορετική δομή της περιοχής SSD υποδηλώνοντας διαφορετικό λειτουργικό ρόλο για την κάθε ισομορφή

Συνοψίζοντας τα προηγούμενα αποτελέσματα, το *Arabidopsis thaliana* έχει τρεις ισομορφές της πρωτεάσης Lon (Lon1, Lon4 και Lon3) οι οποίες παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης, διαφορετικό μηχανισμό υποκυτταρικής τοποθέτησης και τα μεταλλάγματά τους παρουσιάζουν διαφορετικούς φαινότυπους (για τα δύο γονίδια *Lon1* και *Lon4*). Τα δεδομένα αυτά οδηγούν στην υπόθεση ότι οι πρωτεάσες Lon του *Arabidopsis* έχουν προκύψει μέσω γεγονότων υπο-λειτουργικότητας (subfunctionalization), όπου μετά από έναν διπλασιασμό ενός γονιδίου, τα δύο αντίγραφα εξελίσσουν διαφορετικές και συμπληρωματικές μεταξύ τους λειτουργίες δίδοντας μεγαλύτερη ποικιλομορφία λειτουργιών σε σχέση με το πρόγονο γονίδιο. Όπως αναφέρεται και στην Εισαγωγή, η περιοχή που είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και την εκλεκτικότητα των υποστρωμάτων της πρωτεάσης Lon, είναι η περιοχή SSD. Για να εξεταστεί η υπόθεση της υπο-λειτουργικότητας στις ισομορφές της πρωτεάσης Lon, έγινε μοριακή μοντελοποίηση της SSD περιοχής των ισομορφών Lon του *A. thaliana* από την

οποία προκύπτει ότι οι πρωτεάσες Lon1, Lon3 και Lon4 παρουσιάζουν διαφορετική τρισδιάστατη δομή (Rigas et al., 2014, Εικ. 20). Επιπλέον, στοίχιση (ευθυγράμμιση) των δομών των ισομορφών του *Arabidopsis* με την EcLon (την ισομορφή του βακτηρίου *E. coli*), έδειξε ότι όλες οι φυτικές ισομορφές φέρουν μια κοινή κεντρική δομή, η οποία είναι ταυτόσημη με αυτή του *E. coli* και διαφοροποιούνται ως προς την στερεοδιάταξη του υπόλοιπου μορίου (Εικ. 20), υποδηλώνοντας έναν διαφορετικό λειτουργικό ρόλο για την κάθε ισομορφή. Το συμπέρασμα που προκύπτει από αυτή την ανάλυση είναι ότι η πρόγονη δομή (*E. coli*) αντιπροσωπεύει μια πιο «γενική» μορφή της πρωτεάσης (με λιγότερη ενδεχομένως εξειδίκευση ως προς τα υποστρώματα της) η οποία διατηρείται μεν σε όλες τις φυτικές ισομορφές, όμως διαφοροποιείται σύμφωνα με τις λειτουργικές ανάγκες της κάθε φυτικής ισομορφής, προσδίδοντας με αυτό τον τρόπο την απαραίτητη λειτουργική εξειδίκευση και εκλεκτικότητα που χρειάζεται για τον κάθε ιστό/ χρόνο/ υποκυτταρικό διαμέρισμα που εκφράζεται η κάθε ισομορφή.



Εικόνα 20. Μοριακή μοντελοποίηση της τρισδιάστατης δομής της περιοχής SSD των AtLon1, AtLon3, AtLon4 και EcLon. Η EcLon έχει μια βασική δομή η οποία απαντάται σε όλες τις ισομορφές του *Arabidopsis*, όπως φαίνεται και στην υπέρθεση των δομών. Πέραν της κεντρικής δομής, οι πρωτεΐνες του *Arabidopsis* φαίνεται ότι έχουν εξελίξει διαφορετικά τις περιοχές τους.

Συμπερασματικά, το φυτό *A. thaliana* διαθέτει τρία παράλογα γονίδια της πρωτεάσης Lon στο γονιδίωμά του, με συμπληρωματικές μεταξύ τους λειτουργίες ενισχύοντας την καλύτερη ομοιοστάση των πρωτεϊνών στα οργανίδια σε συνθήκες

περιβαλλοντικών καταπονήσεων. Οι πρωτεάσες Lon1 και Lon4 παρουσιάζουν διπλή υποκυτταρική στόχευση στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες των φυτών, έχοντας όμως εξελίξει διαφορετικούς μηχανισμούς υποκυτταρικής στόχευσης, ενώ από τη Lon3 φαίνεται να απουσιάζουν από το άμινο άκρο τα πεπτίδια οδηγού, διαθέτει όμως σινιάλο πυρηνικής τοποθέτησης.

3.4 Τα ανώτερα φυτά περιέχουν πολλαπλά αντίγραφα της πρωτεάσης Lon με δυαδική στόχευση στο μιτοχόνδριο και στον χλωροπλάστη

Για να διερευνηθεί αν η εξελικτική πορεία της οικογένειας των Lon γονιδίων του *Arabidopsis thaliana* υπάρχει και σε άλλους οργανισμούς, πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση της οικογένειας της πρωτεάσης Lon χρησιμοποιώντας οργανισμούς των οποίων το γονιδίωμα έχει αποκωδικοποιηθεί. Για να είναι όσο το δυνατόν πληρέστερη η ανάλυση συμπεριλήφθηκαν προκαρυωτικοί, φυτικοί και ζωικοί οργανισμοί.

Έπειτα από βιοπληροφορική αναζήτηση, βρέθηκαν οι ομόλογες πρωτεΐνες Lon, από 89 διαφορετικούς οργανισμούς, από όλα τα βασίλεια (Πίν. 2). Τα δεδομένα δείχνουν ότι οι προκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν μία μόνο ισομορφή, τύπου A τα βακτήρια και τύπου B τα αρχαία (Εικ. 7). Όσον αφορά τους ευκαρυώτες, οι μονοκύτταρες ζύμες και φύκη έχουν και αυτοί από μία μιτοχονδριακή ισομορφή. Η περοξυσωμική ισομορφή της πρωτεάσης Lon εμφανίζεται για πρώτη φορά στους νηματοειδείς (πολυκύτταρους) μύκητες και φύκη (βλ. *Aspergillus nidulans* και *Klebsormidium flaccidum* στον Πίν. 2). Από κει και έπειτα, όλοι οι οργανισμοί έχουν μία περοξυσωμική ισομορφή και τουλάχιστον μία μιτοχονδριακή, ενώ μόνο στα φυτά παρατηρούνται πολλαπλά αντίγραφα της μιτοχονδριακής ισομορφής (βλ. *Arabidopsis*).

Πίνακας 2. Ταξινόμηση των ισομορφών της πρωτεάσης Lon στους διάφορους οργανισμούς

	Βασίλειο	Κλάση	Οργανισμός	Προκαρυωτική	Περοξυσωμική	Μιτοχονδριακή/ Χλωροπλαστική
1	Bacteria	γ-proteobacteria	<i>Escherichia coli</i>	1	-	-
2	Bacteria	γ-proteobacteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	-	-
3	Bacteria	β-proteobacteria	<i>Neisseria meningitidis</i>	1	-	-
4	Bacteria	Bacilli	<i>Bacillus anthracis</i>	1	-	-

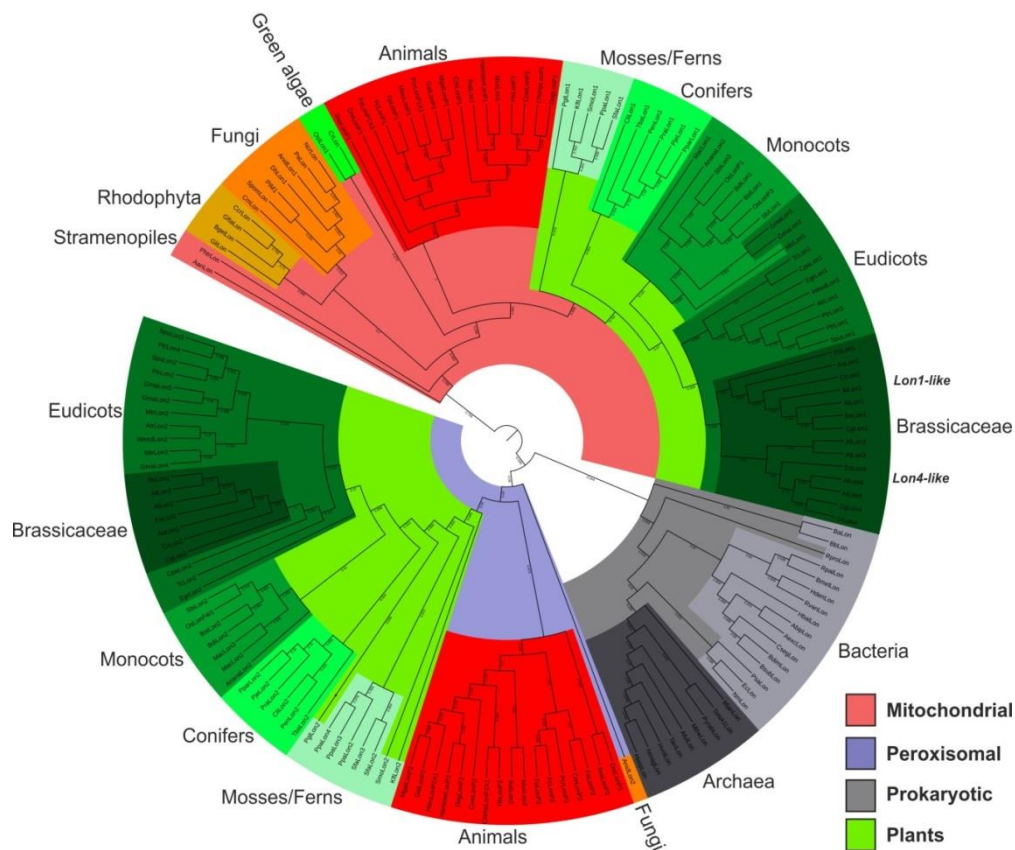
5	Bacteria	Bacilli	<i>Brevibacillus brevis</i>	1	-	-
6	Bacteria	α-proteobacteria	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009	1	-	-
7	Bacteria	α-proteobacteria	<i>Brucella melitensis</i>	1	-	-
8	Bacteria	α-proteobacteria	<i>Rickettsia prowazekii</i>	1	-	-
9	Bacteria	α-proteobacteria	<i>Asticcacaulis biprosthecum</i> C19	1	-	-
10	Bacteria	α-proteobacteria	<i>Asticcacaulis excentricus</i> CB 48	1	-	-
11	Bacteria	α-proteobacteria	<i>Brevundimonas diminuta</i> ATCC 11568	1	-	-
12	Bacteria	α-proteobacteria	<i>Brevundimonas subvibrioides</i> ATCC 15264	1	-	-
13	Bacteria	α-proteobacteria	<i>Caulobacter segnis</i> ATCC 21756	1	-	-
14	Bacteria	α-proteobacteria	<i>Hirschia baltica</i> ATCC 49814	1	-	-
15	Bacteria	α-proteobacteria	<i>Hyphomicrobium denitrificans</i> ATCC 51888	1	-	-
16	Bacteria	α-proteobacteria	<i>Rhodomicrobium vannielii</i> ATCC 17100	1	-	-
17	Archaea	Thermoplasmata	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	1	-	-
18	Archaea	Archaeoglobi	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	1	-	-
19	Archaea	Euryarchaeota	<i>Thermococcus onnurineus</i> NA1	1	-	-
20	Archaea	Thermococci	<i>Pyrococcus abyssi</i> GE5	1	-	-
21	Archaea	Halobacteria	<i>Natrialba magadii</i> ATCC 43099	1	-	-
22	Archaea	Halobacteria	<i>Haloferax volcanii</i> DS2	1	-	-
23	Archaea	Halobacteria	<i>Halobacterium</i> sp. NRC-1	1	-	-
24	Archaea	Methanobacteria	<i>Methanothermobacter</i> <i>thermautotrophicus</i> str. Delta H	1	-	-
25	Fungi	Saccharomycetes	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	1
26	Fungi	Saccharomycetes	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	1	1
27	Fungi	Schizosaccharomyces	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	-	-	1
28	Fungi	Sordariomycetes	<i>Podospira anserina</i>	-	-	1
29	Fungi	Sordariomycetes	<i>Neurospora crassa</i>	-	-	1
30	Fungi	Eurotiomycetes	<i>Aspergillus nidulans</i>	-	1	1
31	Plantae	Chlorophyceae	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	-	-	1
32	Plantae	Prasinophyceae	<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	-	-	1
33	Plantae	Rhodophyta	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	-	-	1
34	Plantae	Rhodophyta	<i>Betaphycus gelatinae</i>	-	-	1
35	Plantae	Rhodophyta	<i>Gymnogongrus ftabelliformis</i>	-	-	1
36	Plantae	Rhodophyta	<i>Grateloupia livida</i>	-	-	1
37	Plantae	Rhodophyta	<i>Chondrus crispus</i>	-	-	1
38	Chromalveolates	Stramenopiles	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	-	-	1
39	Chromalveolates	Stramenopiles	<i>Aureococcus anophagefferens</i>	-	-	1
40	Plantae	Klebsormidiophyceae	<i>Klebsormidium flaccidum</i>	-	1	1
41	Plantae	Bryophyta	<i>Physcomitrella patens</i>	-	3	1
42	Plantae	Bryophyta	<i>Sphagnum fallax</i>	-	2	1
43	Plantae	Lycopodiophyta	<i>Selaginella moellendorffii</i>	-	1	1
44	Plantae	Pteridophyta	<i>Polypodium glycyrrhiza</i>	-	1	1
45	Plantae	Pinophyta	<i>Pinus radiata</i>	-	1	1
46	Plantae	Pinophyta	<i>Taxus baccata</i>	-	1	1
47	Plantae	Pinophyta	<i>Cedrus libani</i>	-	1	1
48	Plantae	Pinophyta	<i>Picea engelmannii</i>	-	1	1
49	Plantae	Pinophyta	<i>Pinus parviflora</i>	-	1	1
50	Plantae	Pinophyta	<i>Pinus jeffreyi</i>	-	1	1

51	Plantae	Amborellales	<i>Amborella trichopoda</i>	-	1	1
52	Plantae	Poales	<i>Brachypodium distachyon</i>	-	1	1
53	Plantae	Poales	<i>Brachypodium stacei</i>	-	1	1
54	Plantae	Poales	<i>Oryza sativa</i>	-	1	2
55	Plantae	Poales	<i>Sorghum bicolor</i>	-	1	2
56	Plantae	Poales	<i>Ananas comosus</i>	-	1	1
57	Plantae	Zingiberales	<i>Musa acuminata</i>	-	2	1
58	Plantae	Malvales	<i>Theobroma cacao</i>	-	1	1
59	Plantae	Malpighiales	<i>Populus trichocarpa</i>	-	2	2
60	Plantae	Malpighiales	<i>Salix purpurea</i>	-	2	1
61	Plantae	Rosales	<i>Cannabis sativa</i>	-	1	1
62	Plantae	Fabales	<i>Glycine max</i>	-	3	2
63	Plantae	Fabales	<i>Medicago truncatula</i>	-	2	1
64	Plantae	Myrtales	<i>Eucalyptus grandis</i>	-	1	1
65	Plantae	Brassicales	<i>Carica papaya</i>	-	1	1
66	Plantae	Brassicales	<i>Arabis alpina</i>	-	1	1
67	Plantae	Brassicales	<i>Arabidopsis lyrata</i>	-	1	3
68	Plantae	Brassicales	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1	3
69	Plantae	Brassicales	<i>Boechera stricta</i>	-	1	1
70	Plantae	Brassicales	<i>Capsella grandiflora</i>	-	1	2
71	Plantae	Brassicales	<i>Capsella rubella</i>	-	1	2
72	Plantae	Brassicales	<i>Eutrema salsugineum</i>	-	1	2
73	Animalia	Primates	<i>Homo sapiens</i>	-	1	1
74	Animalia	Primates	<i>Pan troglodytes</i>	-	1	1
75	Animalia	Rodentia	<i>Mus musculus</i>	-	1	1
76	Animalia	Rodentia	<i>Rattus norvegicus</i>	-	1	1
77	Animalia	Rodentia	<i>Cavia porcellus</i>	-	1	1
78	Animalia	Cetartiodactyla	<i>Bos taurus</i>	-	1	1
79	Animalia	Carnivora	<i>Canis lupus familiaris</i>	-	1	1
80	Animalia	Aves	<i>Ficedula albicollis</i>	-	1	1
81	Animalia	Aves	<i>Falco cherrug</i>	-	1	1
82	Animalia	Aves	<i>Falco peregrinus</i>	-	1	1
83	Animalia	Aves	<i>Gallus gallus</i>	-	1	1
84	Animalia	Aves	<i>Haliaeetus leucocephalus</i>	-	1	1
85	Animalia	Aves	<i>Meleagris gallopavo</i>	-	1	1
86	Animalia	Aves	<i>Pelecanus crispus</i>	-	1	1
87	Animalia	Actinopterygii	<i>Danio rerio</i>	-	1	1
88	Animalia	Actinopterygii	<i>Salmo salar</i>	-	1	1
89	Animalia	Chondrichthyes	<i>Callorhynchus milii</i>	-	1	1

Φυλογενετική ανάλυση των ισομορφών έδειξε ότι οι πρωτεάσες χωρίζονται σε τρεις μεγάλες ομάδες: τις προκαρυωτικές (βακτήρια και αρχαία), τις περοξυσωμικές και τις μιτοχονδριακές/χλωροπλαστικές (Εικ. 21). Από την ανάλυση φαίνεται ότι οι περοξυσωμικές έρχονται πιο κοντά με τις προκαρυωτικές ισομορφές. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι οι περοξυσωμικές, όπως και οι προκαρυωτικές ισομορφές, έχουν μικρότερο άμινο τελικό άκρο σε σχέση με τις μιτοχονδριακές/χλωροπλαστικές, καθώς το πεπτίδιο οδηγός για περοξυσωμική τοποθέτηση βρίσκεται στο καρβόξυ άκρο της πρωτεΐνης (σε

αντίθεση με τις μιτοχονδριακές/χλωροπλαστικές όπου ο οδηγός βρίσκεται στο άμινο άκρο).

Η δεύτερη παρατήρηση από τη φυλογενετική ανάλυση είναι ότι και στις περοξυσωμικές και στις μιτοχονδριακές ισομορφές, υπάρχει ξεκάθαρος διαχωρισμός μεταξύ των φυτικών και ζωικών ισομορφών (Εικ. 21), ενώ εντός του φυτικού βασιλείου, υπάρχει διαχωρισμός μεταξύ των διάφορων φυτικών υποκατηγοριών.

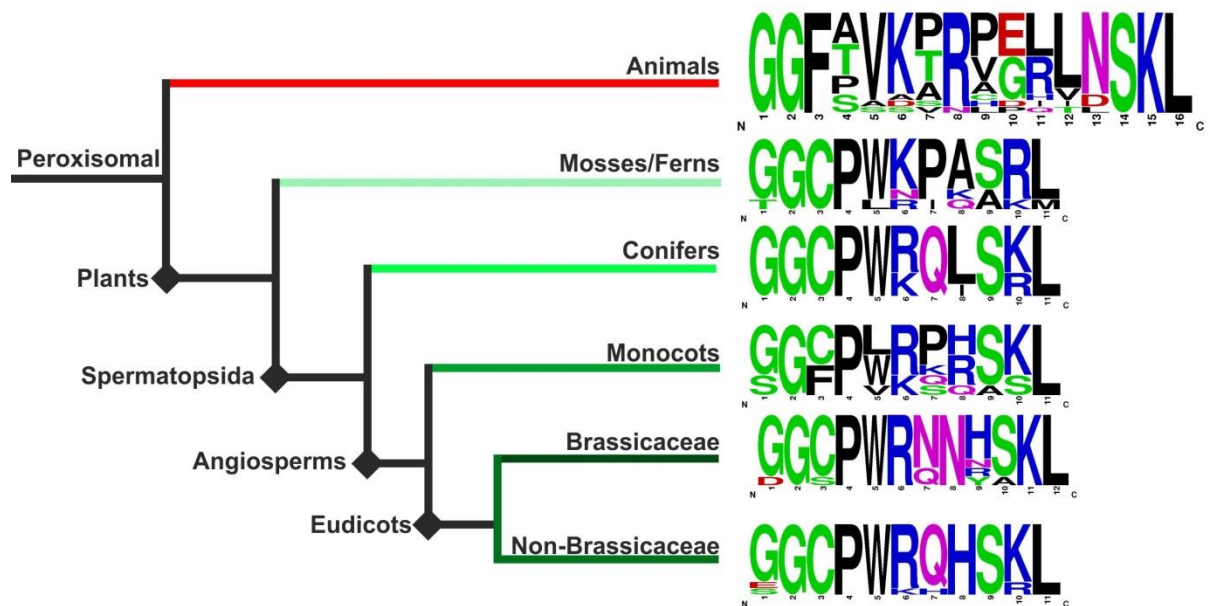


Εικόνα 21. Φυλογενετική ανάλυση όλων των ομόλογων της πρωτεάσης Lon. Η ανάλυση ξεχωρίζει τις πρωτεΐνες σε τρεις μεγάλες ομάδες: Προκαρυωτικές (γκρι), μιτοχονδριακές ή/και χλωροπλαστικές ισομορφές (ροζ) και περοξυσωμικές ισομορφές (γαλάζιο). Οι ευκαρυωτικές ισομορφές ομαδοποιούνται περαιτέρω ανάλογα με το βασίλειο (μύκητες- πορτοκαλί, ζώα- κόκκινο, φυτά- λαχανί) αλλά και ανά κλάσεις εντός των βασιλείων.

3.5 Η περοξυσωμική Lon φέρει σινιάλο υποκυτταρικής τοποθέτησης PTS1

Οι περοξυσωμικές Lon όλων των βασιλείων, φέρουν στο καρβόξυτελικό άκρο τυπικό περοξυσωμικό σινιάλο τύπου PTS1 (Εικ. 22). Στα ανωφορικά αμινοξέα από το σινιάλο οδηγό, παρατηρείται μια διαφοροποίηση κυρίως μεταξύ των ζωικών και των φυτικών ισομορφών, η οποία μπορεί να αντικατοπτρίζει τις φυσιολογικές και μεταβολικές διαφορές

που υπάρχουν μεταξύ των περοξυσωμάτων των δύο βασιλείων (Brocard & Hartig, 2006) και αυτή αντικατοπτρίζεται και στον μηχανισμό εισόδου του οργανιδίου.



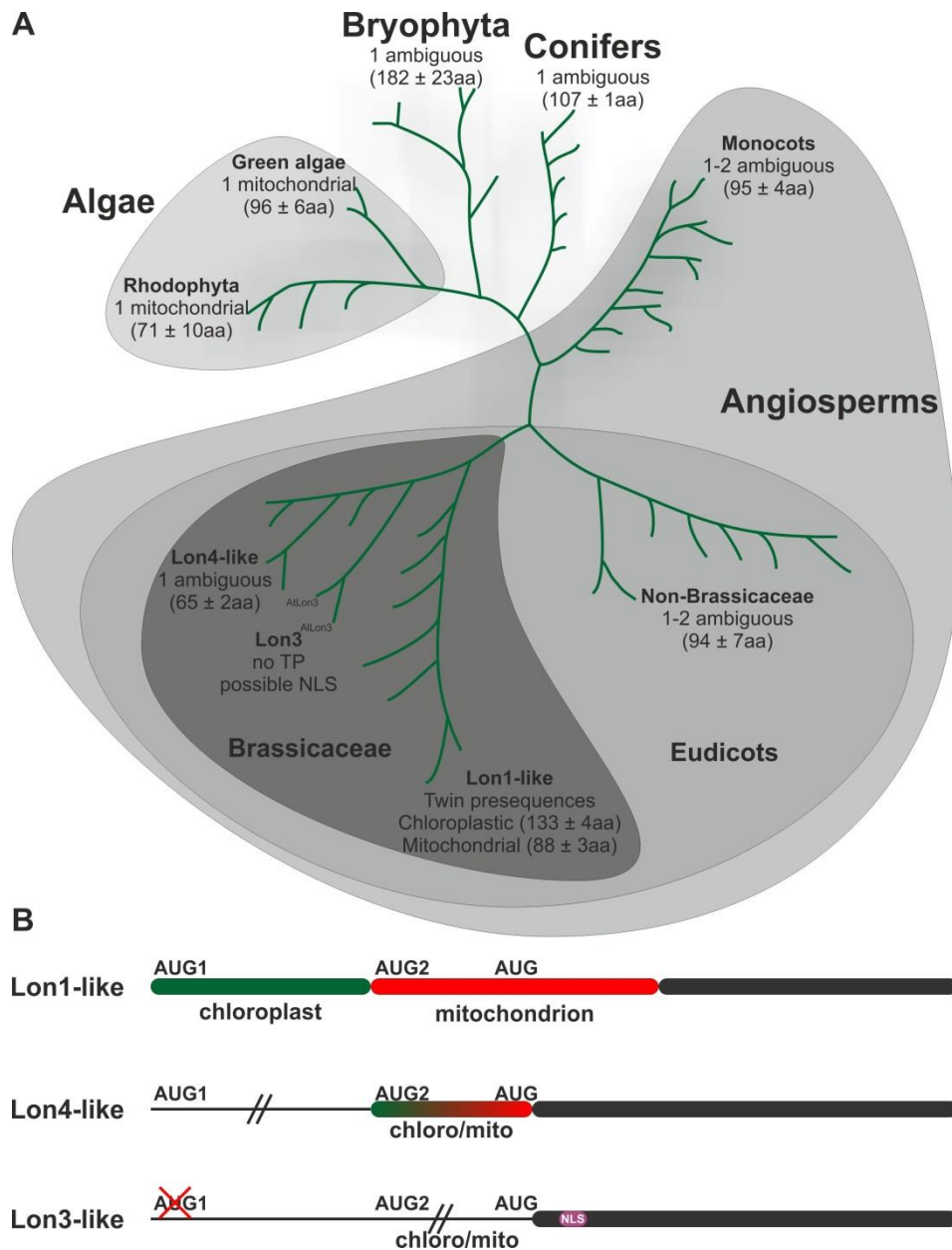
Εικόνα 22. Αναπαράσταση του καρβόξυ άκρου των περοξυσωμικών ισομορφών της πρωτεάσης Lon.

Όλες οι πρωτεΐνες φέρουν τυπικό PTS1 (SKL) στο τέλος του καρβόξυ άκρου τους. Επιπλέον, φαίνεται πως κάθε υποκατηγορία φέρει διαφορές στα υπόλοιπα αμινοξέα, με κάθε κλάση να δημιουργεί και ένα επιπλέον μοτίβο, και εδώ μπορεί να αντικατοπτρίζονται και οι διαφορές στον μεταβολισμό και τη φυσιολογία του οργανιδίου σε κάθε κλάση, που αυτή με τη σειρά της αντικατοπτρίζεται στον μηχανισμό ελέγχου εισόδου του οργανιδίου.

3.6 Η διπλή υποκυτταρική στόχευση εμφανίζεται μετά τα βρυόφυτα ενώ πολλαπλά αντίγραφα της πρωτεάσης Lon έχουν μόνο τα ανώτερα φυτά

Αναλύοντας περαιτέρω τις μιτοχονδριακές/χλωροπλαστικές ισομορφές της πρωτεάσης Lon των φυτικών οργανισμών, παρατηρείται ότι η διπλή υποκυτταρική στόχευση στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες εμφανίζεται από την κλάση των βρυόφυτων και μετά (Εικ. 23A). Ανάλυση με νευρωνικά δίκτυα πρόβλεψης της στόχευσης των πρωτεϊνών έδειξε ότι τα φύκη (πράσινα και κόκκινα), παρουσιάζουν τοποθέτηση μόνο στα μιτοχόνδρια. Επιπλέον, από την αναλυση προκύπτει ότι καθώς ανεβαίνουμε σε πολυπλοκότητα στην πορεία της εξέλιξης, το πεπτίδιο οδηγός τείνει να έχει μικρότερο μήκος σε αμινοξέα (Εικ. 23A). Δύο αντίγραφα της πρωτεάσης παρατηρούμε μόνο στα ανώτερα φυτά (μονοκότυλα και δικότυλα). Ο μηχανισμός των δυαδικών πρόδρομων αλληλουχιών στόχευσης (twin presequences) υπάρχει μόνο στην οικογένεια *Brassicaceae*, και επιπλέον, είναι η μόνη οικογένεια που τα μέλη της διαθέτουν τις Lon1 και Lon4 με τους αντίστοιχους μηχανισμούς στόχευσης (Εικ. 23B). Η ομόλογη Lon3 ισομορφή εμφανίζεται

αποκλειστικά στο γένος *Arabidopsis*, που είναι και το μόνο από τους οργανισμούς που αναλύθηκαν που διαθέτει 3 ισομορφές.

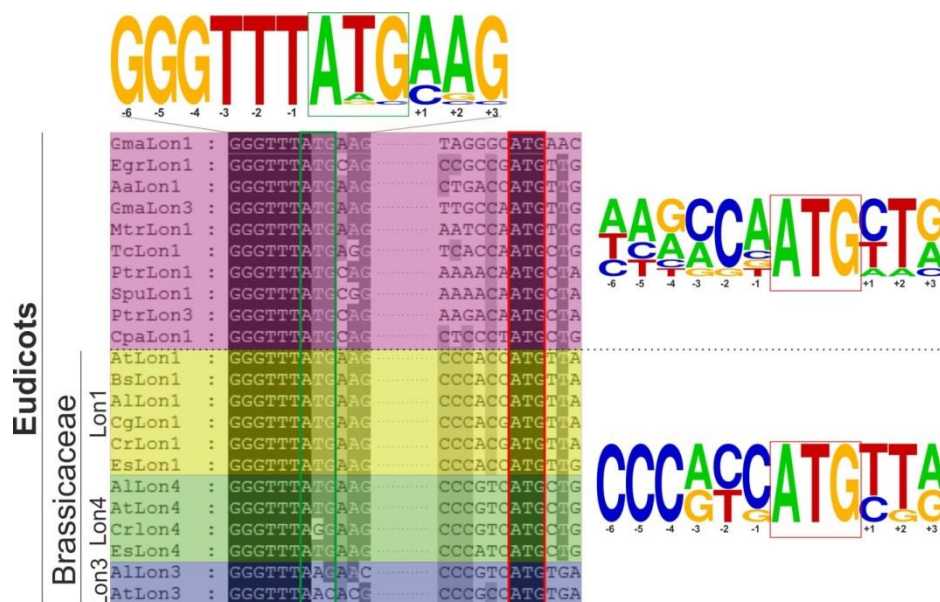


Εικόνα 23. Φυλογενετική ταξινόμηση και περιγραφή του μηχανισμού υποκυτταρικής στόχευσης των μιτοχονδριακών/χλωροπλαστικών ισομορφών της πρωτεάσης Lon στο φυτικό βασίλειο. (A) Οι ισομορφές ταξινομούνται σύμφωνα με την κλάση των οργανισμών. Στα φύκη (Green algae), η στόχευση της πρωτεάσης είναι μιτοχονδριακή, ενώ η μιτοχονδριακή ισομορφή στα ροδόφυτα (Rhodophyta) έχουν εμφανώς μικρότερο πεπτίδιο οδηγό. Από τα βρυόφυτα (Bryophyta) και μετά παρατηρείται διπλή υποκυτταρική στόχευση, ενώ επιπλέον, όσο προχωράει η εξέλιξη, τόσο το πετίδιο οδηγός μικραίνει. Τα *Brassicaceae* είναι η μόνη οικογένεια που διατηρεί τις Lon1 και Lon4, οι οποίες δημιουργούν δύο διακριτές ομάδες. Επιπλέον, στο γένος *Arabidopsis* υπάρχει και η ισομορφή Lon3, η οποία φέρει πεπτίδιο πυρηνικής

τοποθέτησης (NLS) (B) Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών υποκυτταρικής στόχευσης των ισομορφών Lon1, Lon4 και Lon3 του *Arabidopsis*.

3.7 Ο μηχανισμός των δύο πρόδρομων αλληλουχιών δυαδικής στόχευσης (twin presequences) εντοπίζεται μόνο στην οικογένεια *Brassicaceae*, κατάλοιπά του όμως υπάρχουν συντηρημένα σε όλα τα δικότυλα φυτά

Ανάλυση της γονιδιωματικής ακολουθίας της πρωτεάσης Lon από όλα τα δικοτυλήδονα φυτά έδειξε ότι όλες φέρουν και δεύτερο κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης ανωφορικά του καταχωρημένου στις βάσεις δεδομένων (όπως και τα Lon1/Lon4 του *A. thaliana*) με την ρυθμιστική περιοχή Kozak να είναι απόλυτα συντηρημένη (Εικ. 24). Η ρυθμιστική περιοχή του δεύτερου κωδικονίου δεν παρουσιάζει τόσο μεγάλο ποσοστό συντήρησης μεταξύ των ειδών, όμως ακολουθούν τον κανόνα του βέλτιστου φυτικού μοτίβου AACAAUGGC (Kozak, 1987; Lütcke et al., 1987; Kim et al., 2014). Το πλαίσιο μεταξύ των δύο κωδικονίων είναι ανοιχτό μόνο στις Lon1 ισομορφές των *Brassicaceae*, που είναι οι μόνες που διαθέτουν τον μηχανισμό των twin presequences. Τα υπόλοιπα είδη που φέρουν δυο αντίγραφα της πρωτεάσης Lon, δεν διαθέτουν αυτό τον μηχανισμό, αλλά υπερισχύει ο μηχανισμός του Lon4 (ενιαία πρόδρομη ακολουθία). Επιπλέον, η ισομορφή Lon3 εντοπίζεται μόνο στα *A. thaliana* και *A. lyrata* (Εικ. 24).



Εικόνα 24. Πολλαπλή στοίχιση των νουκλεοτιδικών ακολουθιών της πρωτεάσης Lon από τα δικότυλα φυτά. Ανωφορικά του καταχωρημένου κωδικονίου έναρξης της μετάφρασης (κόκκινο πλαίσιο), όλες οι ισομορφές διαθέτουν και ένα επιπλέον κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης (πράσινο πλαίσιο). Το πλαίσιο γύρω από το πρώτο κωδικόνιο έναρξης είναι απόλυτα συντηρημένο σε όλους τους οργανισμούς (GGGTTTATG). Το πλαίσιο γύρω από το καταχωρημένο δεύτερο κωδικόνιο δεν παρουσιάζει υψηλή

συντήρηση μεταξύ των ισομορφών, όμως εναρμονίζεται με παραλλαγές του βέλτιστου Kozak μοτίβου για έναρξη της μετάφρασης (AACAA**AT**GGC). Τα μέλη της οικογένειας *Brassicaceae* διαθέτουν τις δύο ισομορφές (Lon1 και Lon4) της πρωτεΐνης Lon, ενώ τα είδη του γένους *Arabidopsis* διαθέτουν επιπλέον την τρίτη ισομορφή Lon3.

Συμπερασματικά, ο διπλασιασμός και η συνεξέλιξη των γονιδίων *Lon1* και *Lon4* υπάρχει μόνο στην οικογένεια *Brassicaceae*, η οποία είναι και η μόνη από τα είδη που αναλύθηκαν η οποία διατηρεί τον μηχανισμό στόχευσης του Lon1, με τις διπλές αλληλουχίες στόχευσης. Επιπλέον, το γένος *Arabidopsis* είναι το μόνο που διαθέτει και την ισομορφή Lon3 μέσω ενός τρίτου γεγονότος διπλασιασμού. Ο μηχανισμός του Lon4 με μία ενιαία αλληλουχία δυαδικής στόχευσης φαίνεται ότι είναι ο μηχανισμός που υπερισχύει σε όλα τα υπόλοιπα φυτικά είδη για διπλή υποκυτταρική τοποθέτηση, από τα βρυόφυτα μέχρι και τα ανώτερα φυτά. Συνεπώς φαίνεται ότι υπήρξε εξελικτική πίεση στην οικογένεια *Brassicaceae* η οποία οδήγησε στο διπλασιασμό και την διατήρηση των ισομορφών Lon1 και Lon4 (πέραν της περοξυσωμικής Lon2) με τους μηχανισμούς που έχουν περιγραφεί παραπάνω, ενώ στο γένος *Arabidopsis* συναντούμε για πρώτη φορά την ισομορφή Lon3 η οποία φαίνεται ότι σχετίζεται αποκλειστικά με το άνθος και συγκεκριμένα με τα αρσενικά ανθικά μέρη. Στα άλλα είδη που διαθέτουν είτε μία μόνο ισομορφή είτε δύο ισομορφές με τον μηχανισμό της ενιαίας ακολουθίας διπλής υποκυτταρικής στόχευσης οι εξελικτικές πιέσεις ήταν τέτοιες που δεν οδήγησαν σε διπλασιασμό ή μετά τον διπλασιασμό διατήρησαν μονάχα την ισομορφή με τον μηχανισμό στόχευσης τύπου Lon4 η οποία διέθετε τον πιο εξελιγμένο μηχανισμό δυαδικής υποκυτταρικής στόχευσης.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Η πρωτεάση Lon1 έχει λειτουργικό ρόλο στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες του φυτού *A. thaliana*

Τα αποτελέσματα της βιομετρικής ανάλυσης και της ανίχνευσης των ενδογενών επιπέδων των ενεργών μορφών οξυγόνου καθώς και των συνεπειών τους στην οξειδωση των λιπαρών, έδειξαν ότι η πρωτεάση Lon1 έχει λειτουργικό ρόλο και στα δύο οργανίδια, καθώς οι διαγονιδιακές κατασκευές που εκφράζουν μόνο τη μία από τις δύο ισομορφές αδυνατούν να συμπληρώσουν πλήρως τους φαινότυπους της μετάλλαξης *lon1-1*, ενώ τα επίπεδα παραγωγής ΕΜΟ είναι αυξημένη σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου, ιδιαίτερα στα διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν μόνο την χλωροπλαστική ισομορφή. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η πρωτεάση Lon1 έχει σημαντικότερο λειτουργικό ρόλο στα μιτοχόνδρια, ο οποίος έχει μελετηθεί εκτενέστερα (Rigas et al., 2009a, 2009b; Daras et al., 2014), εντούτοις, για πρώτη φορά ανοίγουν ένα παράθυρο στη διερεύνηση του συμπληρωματικού λειτουργικού της ρόλου στους χλωροπλάστες. Τα δεδομένα υποστηρίζονται από μια πρόσφατη μελέτη όπου σε μεταλλάγματα της πρωτεάσης Lon1, τα επίπεδα της πρωτεΐνης DXS (deoxyxylulose 5-phosphate synthase) στον χλωροπλάστη βρέθηκαν μειωμένα. Η πρωτεΐνη DXS ρυθμίζει το μονοπάτι MEP (methylerythritol 4-phosphate), το οποίο είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση απαραίτητων μεταβολιτών της φωτοσύνθεσης, όπως τα καροτενοειδή, οι πλευρικές αλυσίδες των χλωροφυλλών, οι τοκοφερόλες, οι πλαστοκινόνη και οι φυλλοκινόνες (Pulido et al., 2016). Μελλοντικές ολιστικές/ομικές (πρωτεομική, τρανσκριπτομική, μεταβολομική) αναλύσεις των διαγονιδιακών αυτών σειρών θα δώσουν πολύτιμες πληροφορίες για την πλήρη αποσαφήνιση του λειτουργικού ρόλου της πρωτεάσης Lon1 και στα δύο οργανίδια. Συνανοσοκαθίζηση (Co-IP) και πρωτεομική ανάλυση των οργανιδίων των διαγονιδιακών σειρών θα έδινε σημαντικές πληροφορίες όσον αφορά τους πιθανούς στόχων της πρωτεάσης (υπό φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες περιβαλλοντικής καταπόνησης) σε κάθε υποκυτταρικό διαμέρισμα. Επιπλέον, μια συνδυαστική τρανσκριπτομική και μεταβολομική ανάλυση των διαγονιδιακών σειρών, και ιδιαίτερα των σειρών που εκφράζουν μόνο τη μία ισομορφή (Long και Short) θα έδιναν εξίσου σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τα μεταβολικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται ή απενεργοποιούνται παρουσία ή απουσία της πρωτεάσης Lon1 από το κάθε ένα οργανίδιο, δίνοντας έτσι περαιτέρω πληροφορίες και για την ενδοκυτταρική επικοινωνία (cross-talk) μεταξύ των δύο υποκυτταρικών διαμερισμάτων.

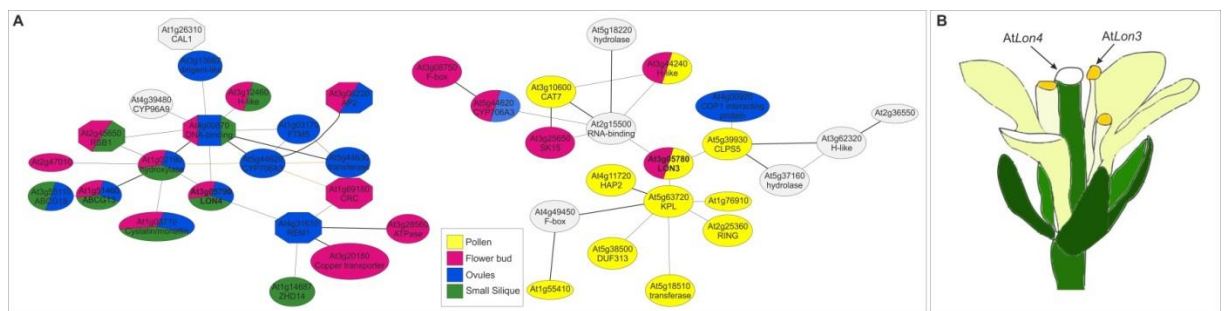
4.2 Η έλλειψη της πρωτεάσης Lon δημιουργεί πρόβλημα στην αναπνευστική δραστηριότητα του φυτού

Όπως και στην περίπτωση των μεταλλάξεων του γονιδίου *Lon1* τα οποία παρουσιάζουν μειωμένη δραστικότητα των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας (Rigas et al., 2009a), έτσι και το μετάλλαγμα *lon4-1* παρουσιάζει πρόβλημα στην αναπνοή των σπερμάτων του (Εικ. 14Δ). Τα μεταλλάγματα του γονιδίου *Lon1* παρουσιάζουν καθυστέρηση στην εγκατάσταση του σπορόφυτου και την μετέπειτα ανάπτυξή τους, ενώ το μετάλλαγμα *lon4-1*, παρουσιάζει πρόβλημα στη βλάστηση των σπερμάτων, μετά τη βλάστηση όμως, δεν έχει παρατηρηθεί κάποια άλλη υστέρηση ή φαινότυπος σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά, σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης. Συμπερασματικά, προκύπτει ότι αφενός η πρωτεάση Lon έχει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των μιτοχονδρίων και συγκεκριμένα στην αναπνοή και αφετέρου, τα μεταλλάγματα των 2 ισομορφών της πρωτεάσης Lon τα οποία παρουσιάζουν διαφορετικούς αναπτυξιακούς φαινοτύπους, υποδηλώνει είτε διαφορετική εκλεκτικότητα ως προς τα υποστρώματά τους στο μιτοχόνδριο, είτε διαφοροποιούνται ως προς την χρονική ή ιστοειδική τους έκφραση, επιτελώντας εμμέσως ξανά διαφορετικό λειτουργικό ρόλο στο οργανίδιο, όπου το έλλειμα της εκάστοτε λειτουργίας προκαλεί ανωμαλίες στη φυσιολογική λειτουργία του οργανιδίου.

4.3 Οι πρωτεάσες Lon4 και Lon3 παρουσιάζουν διαφορετική εξειδίκευση ως προς τα ανθικά μέρη του φυτού

Το πρότυπο της έκφρασης της πρωτεάσης Lon4 ταυτίζεται με τις φαινοτυπικές ανωμαλίες του *lon4* μεταλλάγματος, καθώς εκφράζεται αποκλειστικά στα άνθη και κυρίως στον ύπερο του άνθους αλλά και στις μικρές καρποταξίες. Εκεί ξεκινά η εμβρυογένεση, με αποτέλεσμα τη χαμηλή βλαστικότητα των *lon4-1* σπερμάτων. Τα πειραματικά αποτελέσματα συμφωνούν με τα δεδομένα γονιδικής έκφρασης από τις βάσεις δεδομένων ATTED II (<http://atted.jp/>) και eFP-browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Η βάση δεδομένων ATTED II παρέχει πληροφορίες σχετικά με το ποιά γονίδια συνεκφράζονται μαζί με το γονίδιο προς διερεύνηση ενώ το efp-browser παρέχει πληροφορίες σχετικά με την ιστοειδική έκφραση των γονιδίων (από δεδομένα μικροσυστοιχιών). Ανάλυση των συνεκφραζόμενων με τα *Lon4* και *Lon3* γονιδίων, έδειξε ότι η έκφραση των μεν εντοπίζεται κυρίως στις ανθικές καταβολές, τις μικρές καρποταξίες

και τον ύπερο του άνθους, ενώ τα συνεκφραζόμενα με το *Lon3* γονίδια εκφράζονται στη γύρη των φυτών (Εικ. 25A).



Εικόνα 25. Ανάλυση της ιστοειδικής έκφρασης των συνεκφραζόμενων με τις πρωτεάσες *Lon3* και *Lon4* γονιδίων. Αριστερά φαίνονται τα αποτελέσματα για το γονίδιο *Lon3* και δεξιά για το *Lon4*. Τα γονίδια που σημαίνονται με οκτάγωνο είναι μεταγραφικοί παράγοντες. Από την ανάλυση φαίνεται ότι τα συνεκφραζόμενα με το *Lon3* γονίδια, παρουσιάζουν εξειδικευμένη έκφραση στη γύρη (κίτρινο ενώ η έκφραση των αλληλεπιδρόντων γονιδίων με το *Lon4*, εντοπίζεται κυρίως στα άνθη, στον ύπερο καθώς και στις μικρές καρποταξίες. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε απόλυτη συμφωνία με τα πειραματικά αποτελέσματα έκφρασης των γονιδίων *Lon3* και *Lon4* (Εικ. 22 και 23). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων ATTED II (<http://atted.jp/>) και eFP-browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>).

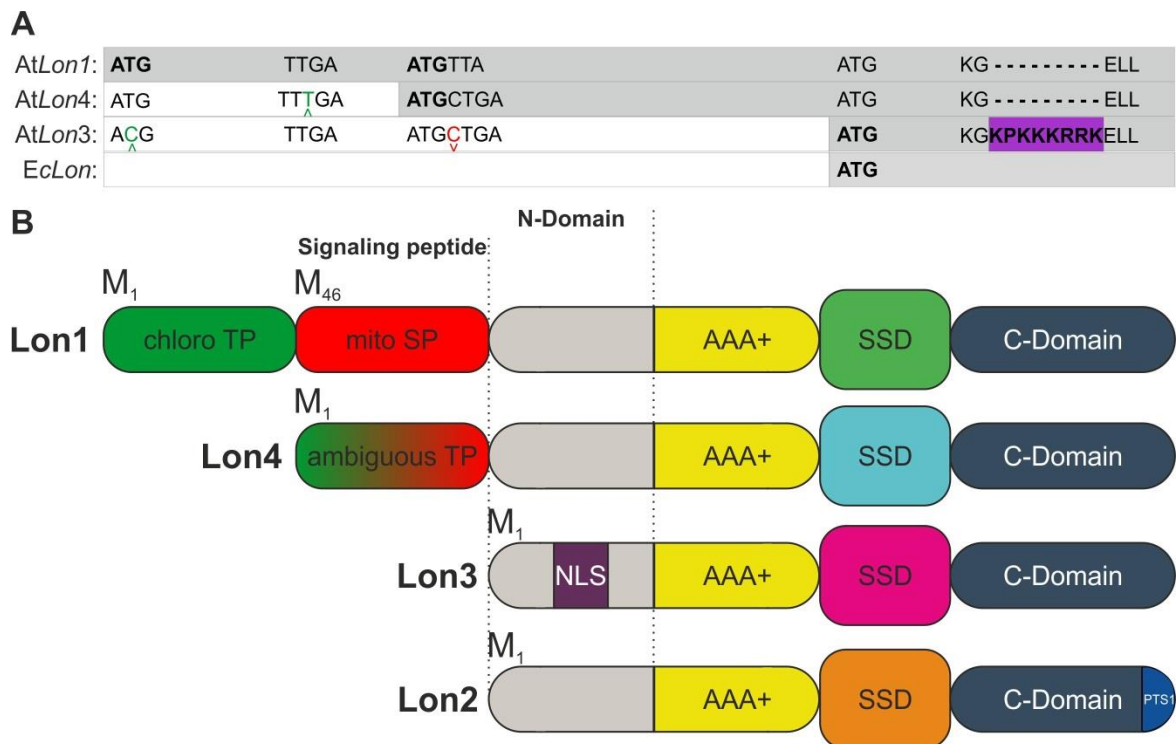
Η βιοπληροφορική ανάλυση των δύο γονιδίων είναι σε απόλυτη συμφωνία με τα πειραματικά αποτελέσματα της έκφρασης των *Lon4* και *Lon3* και υποστηρίζουν το μοντέλο της (Εικ. 25B) όπου οι δύο ισομορφές της πρωτεάσης παρουσιάζουν εξειδικευμένη ιστοειδική έκφραση, η *Lon4* όσον αφορά τους θηλυκούς γαμέτες, ενώ η *Lon3* στους αρσενικούς γαμέτες προσδίδοντας έναν επιπλέον λειτουργικό ρόλο στην πρωτεάση Lon, πέραν του μηχανισμού PQC, στον έλεγχο της αναπαραγωγής του φυτού.

4.4 Οι τρεις ισομορφές της πρωτεάσης Lon στο φυτό *Arabidopsis thaliana* είναι αποτέλεσμα διαδοχικών γονιδιακών διπλασιασμών

Η οικογένεια Brassicaceae είναι η μόνη από τα ανώτερα φυτά της οποίας τα μέλη, πέραν της περοξυσωμικής ισομορφής *Lon2*, φέρουν δυο επιπλέον γονιδιακά αντίγραφα (*Lon1* και *Lon4*) της πρωτεάσης *Lon* με δυαδική στόχευση στο μιτοχόνδριο και στον χλωροπλάστη. Τα δυο μέλη του γένους *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* και *Arabidopsis lyrata*) διαθέτουν επιπλέον την ισομορφή *Lon3* από την οποία εκλείπουν τα πεπτίδια οδηγιοί στο άμινο άκρο της και φέρει πιθανό σινιάλο πυρηνικής τοποθέτησης (NLS). Οι ισομορφές *Lon1*, *Lon4* και *Lon3* φέρουν διαφορετικούς μηχανισμούς υποκυτταρικής στόχευσης, διαφορετική δομή στην περιοχή SSD (Εικ. 20) που είναι η υπεύθυνη περιοχή

ως προς την εκλεκτικότητα της πρωτεάσης για τα υποστρώματά της, ενώ παρουσιάζουν και διαφορετικό πρότυπο έκφρασης (Εικ. 15, 16, 17). Από τα δεδομένα προκύπτει ότι η πιο αρχέγονη μορφή είναι η Lon1, καθώς διαθέτει τον πιο πρωτόγονο μηχανισμό διπλής υποκυτταρικής στόχευσης στους χλωροπλάστες και στα μιτοχόνδρια, μέσω του μηχανισμού των δυαδικών πρόδρομων αλληλουχιών στόχευσης (twin presequences). Επιπλέον, στην κλάση των *Brassicales*, το φυτό *Carica papaya*, διαθέτει μόνο μία ισομορφή της πρωτεάσης Lon (πέραν της περοξυσωμικής) η οποία είναι ταυτόσημη με την Lon1 του *Arabidopsis* (και των υπόλοιπων *Brassicaceae*) ως προς τον μηχανισμό διπλής υποκυτταρικής στόχευσης και της δομής της περιοχής SSD. Οι ισομορφές Lon4 και Lon3 μετά από διαδοχικούς πολλαπλασιασμούς και στοχευμένες μεταλλάξεις στην γονιδιωματική τους ακολουθία, εξέλιξαν διαφορετικά τον μηχανισμό στόχευσής τους και διαφοροποίησαν και την περιοχή SSD τους (Εικ. χ και ψ αντίστοιχα).

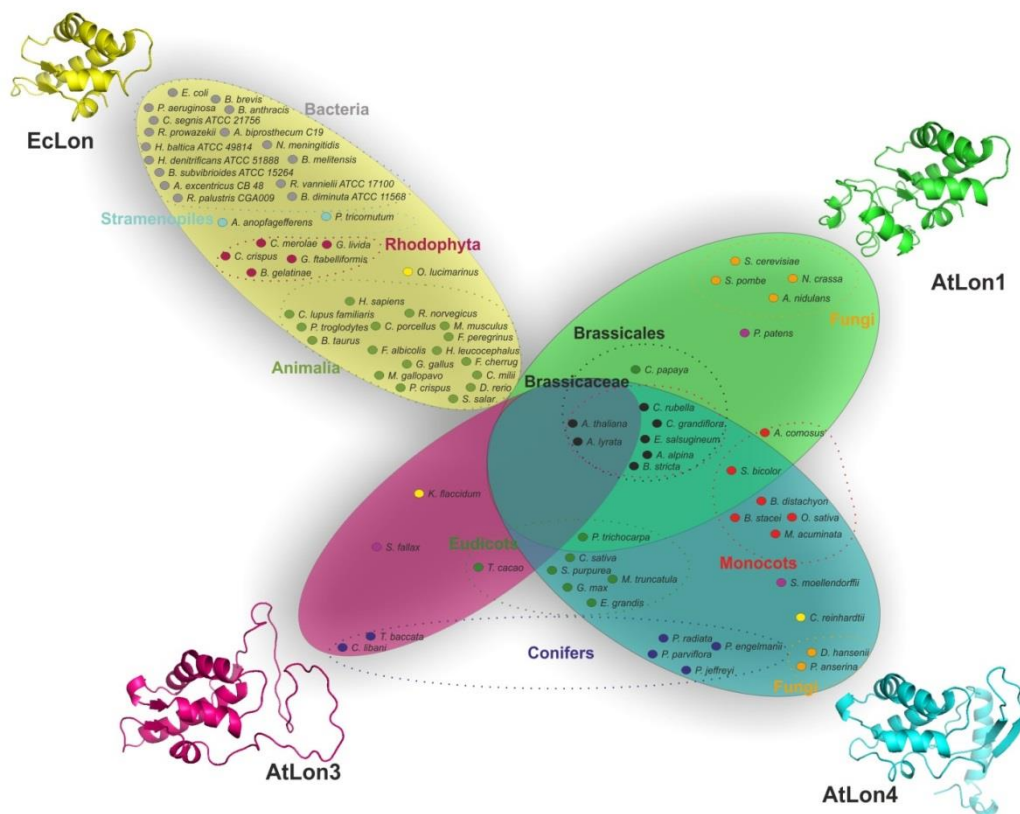
Μετά τον διπλασιασμό του γονιδίου *Lon1*, στο αντίγραφο πρόδρομο *Lon4* γονίδιο με προσθήκη μιας θυμίνης διακόπηκε το αναγνωστικό πλαίσιο μεταξύ του πρώτου και του δεύτερου κωδικονίου έναρξης της μετάφρασης. Παράλληλα το γονίδιο *Lon4* διαφοροποιήθηκε εξελίσσοντας το mitochondrial presequence σε διττή ακολουθία στόχευσης (ambiguous presequence, Εικ. 26A). Η πορεία της εξέλιξης υποδηλώνει ότι το γονίδιο *Lon3* προέκυψε από το διπλασιασμό του γονιδίου *Lon4*. Στην ισομορφή Lon3 έχει εκφυλιστεί πλήρως το πρώτο κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης, ενώ η έλλειψη μιας κυτοσίνης διακόπτει την διττή ακολουθία υποκυτταρικής στόχευσης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας ισομορφής με κοντότερο άμινο άκρο, έχοντας αποκτήσει μία νέα ιδιότητα σε σχέση με τις δύο παλαιότερες ισομορφές της, η οποία είναι το πεπτίδιο πυρηνικής τοποθέτησης (NLS, Εικ. 26A).



Εικόνα 26. Το γένος *Arabidopsis* (*A. thaliana* και *A. lyrata*) διαθέτει τρεις ισομορφές της πρωτεάσης Lon με διαφορετικές λειτουργίες και διαφορετικούς μηχανισμούς υποκυτταρικής τοποθέτησης. (A) Οι ισομορφές Lon4 και Lon3 με τη συσσώρευση στοχευμένων μεταλλάξεων, εξέλιξαν διαφορετικούς μηχανισμούς στόχευσης. (B) Το *Arabidopsis* διαθέτει 4 μέλη της πρωτεάσης Lon με διαφορετικούς μηχανισμούς στόχευσης και περιοχή SSD. Η Lon1 παρουσιάζει διπλή υποκυτταρική στόχευση στους χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια μέσω του μηχανισμού των διπλών ακολουθιών στόχευσης, η Lon4 παρουσιάζει και αυτή διπλή υποκυτταρική στόχευση μέσω όμως ενός ενιαίου πεπτιδίου διπλής υποκυτταρικής στόχευσης, η Lon3 φέρει πιθανό σινιάλο πυρηνικής στόχευσης (NLS) και η Lon2 αποτελεί την περοξυσωμική ισομορφή η οποία φέρει σινιάλο περοξυσωμικής στόχευσης στο καρβόξυ-τελικό άκρο της (PTS1).

Αναλύσεις του γονιδιώματος του *Arabidopsis thaliana* υποστηρίζουν ότι το είδος έχει υποστεί τρεις ολικούς διπλασιασμούς του γονιδιώματός του (Whole Genome Duplications, WGD) (Franzke et al., 2011). Το παλαιότερο από τα τρία γεγονότα ολικού διπλασιασμού του γονιδιώματος, θεωρείται ότι συνδέεται με τη διαφοροποίηση των δικότυλων και ενδεχομένως όλων των αγγειόσπερμων φυτών (De Bodt et al., 2005; Soltis et al., 2009), το δεύτερο συνδέεται με τον διαχωρισμό μεταξύ των οικογενειών *Caricaceae* και *Brassicaceae* (Ming et al., 2008; Tang et al., 2008). Ο τρίτος διπλασιασμός αφορά αποκλειστικά την οικογένεια *Brassicaceae* και την διαφοροποίηση των ειδών εντός της οικογένειας (Fawcett et al., 2009).

Το γεγονός ότι το *Arabidopsis thaliana* έχει υποστεί τρεις ολικούς διπλασιασμούς του γονιδιώματός του, εξηγεί και το λόγο που το φυτό διαθέτει τέσσερις ισομορφές της πρωτεάσης Lon (Εικ. 26B). Ο πρώτος διπλασιασμός οδήγησε στη δημιουργία της περοξυσωμικής ισομορφής Lon2. Το δεύτερο γεγονός διπλασιασμού συντέλεσε στη δημιουργία της ισομορφής Lon4 των Brassicaceae. Ο διαχωρισμός των οικογενειών Caricaceae – Brassicaceae αποτυπώνεται απόλυτα στην πρωτεάση Lon, καθώς το φυτό *Carica papaya* (Brassicales, Caricaceae) διαθέτει μόνο την ισομορφή Lon1, με τον ίδιο μηχανισμό υποκουτταρικής στόχευσης (twin presequences) και ίδια δομή SSD σε σχέση με το *Arabidopsis thaliana* και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας Brassicaceae (Εικ. 27). Ο τρίτος διπλασιασμός οδήγησε στη δημιουργία της ισομορφής Lon3, που απαντάται αποκλειστικά στα είδη του γένους *Arabidopsis* (*A. thaliana* και *A. lyrata*) και έχει διαφοροποιήσει το γένος *Arabidopsis* ως προς την υπόλοιπη οικογένεια Brassicaceae.

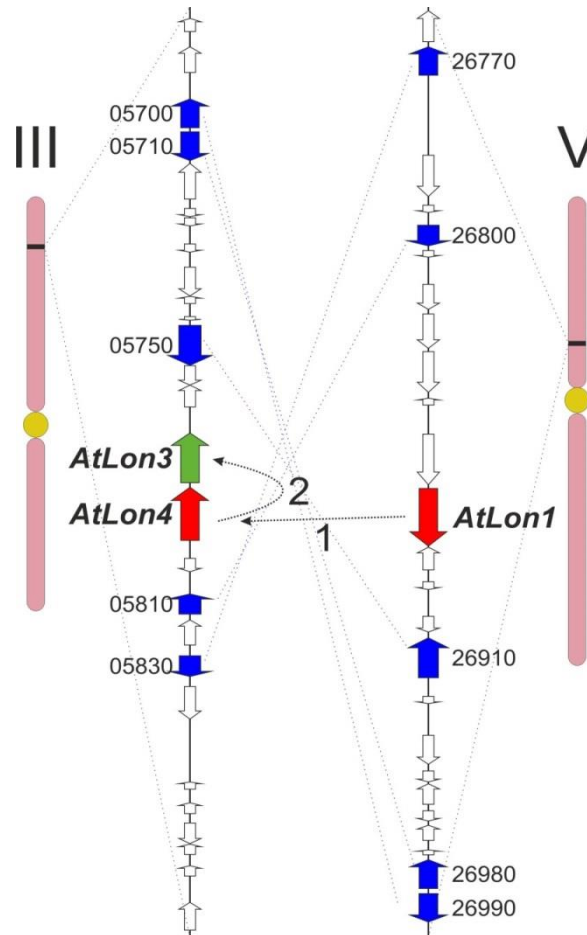


Εικόνα 27. Ταξινόμηση των αλληλόμορφων της μιτοχονδριακής πρωτεάσης Lon με βάση την δομή της περιοχής SSD. Η σύγκριση και η ταξινόμηση των πρωτεϊνών έγινε με βάση τη δομή των τριών ισομορφών του *Arabidopsis* και αυτήν του *E. coli*. Παρατηρούμε ότι οι βακτηριακές ισομορφές (γκρι κουκκίδες), μαζί με τα ροδόφυτα (μπορντώ κουκκίδες), τα γλαυκόφυτα (γαλάζιες κουκκίδες) και τα ζώα (χακί κουκκίδες), διαθέτουν μία πρωτεάση Lon, και η δομή της περιοχής SSD παραμένει ίδια με αυτή των

βακτηρίων. Οι μύκητες (πορτοκαλί κουκκίδες) διαθέτουν επίσης ένα αντίγραφο της μιτοχονδριακής Lon πρωτεάσης, όμως η δομή της περιοχής SSD είναι πιο εξειδικευμένη, ομοιάζοντας είτε αυτή της Lon1 είτε της Lon4. Στα πράσινα φύκη (κίτρινες κουκκίδες) επίσης παρατηρείται ένα αντίγραφο στο γονιδίωμα, υπάρχει όμως παραλλακτικότητα ως προς τη δομή όπου, βρέθηκαν οι δομές του *E. coli*, του Lon3 και του Lon4. Τα γυμνόσπερμα (μωβ κουκκίδες) επίσης διαθέτουν μόνο ένα αντίγραφο της πρωτεάσης Lon και οι δομές της SSD περιοχής τους ταξινομούνται ανάμεσα στην Lon3 και την Lon4. Τα ανώτερα φυτά (μονοκότυλα: κόκκινες κουκκίδες και δικότυλα: πράσινες κουκκίδες) εμφανίζουν πολλαπλά αντίγραφα της πρωτεάσης Lon.

Τα γεγονότα διπλασιασμού του γονιδιώματος προκαλούν πολυπλοϊδία με αποτέλεσμα τη γενετική παραλλακτικότητα τα οποία αποτελούν και το έναυσμα για την εξάπλωση των ειδών σε πολλές από τις οικογένειες των αγγειόσπερμων (De Bodt et al., 2005; Fawcett et al., 2009; Soltis et al., 2009; Van de Peer et al., 2009). Η πολυπλοϊδία παρέχει το απαραίτητο γενετικό υλικό για γεγονότα νεολειτουργικότητας και υπολειτουργικότητας (neo and subfunctionalization), αυξάνει την ελαστικότητα έναντι της συσσώρευσης επιβλαβών μεταλλάξεων, αυξάνει το ποσοστό ειδογένεσης και τον γενετικό πλούτο των ειδών (Soltis et al., 2009) και παρέχει το προσαρμοστικό πλεονέκτημα για την αποίκιση σκληρών και άστατων οικοσυστημάτων (Fawcett & Van de Peer, 2010). Σημαντικά γονίδια (π.χ μεταγραφικοί παράγοντες) υπερσυντηρούνται, ενώ άλλα αντίγραφα γονιδίων, κατά περίπτωση χάνονται μετά από γεγονότα ολικού διπλασιασμού (Edger & Pires, 2009; Birchler & Veitia, 2010). Η υπερσυντήρηση γονιδίων, η νεολειτουργικότητα και η απώλεια γονιδίων πιθανότατα αποτελούν ερεθίσματα για αυξημένη μορφολογική παραλλακτικότητα και βιοποικιλότητα μεταξύ των ειδών, μετά τον διπλασιασμό (Edger & Pires, 2009). Για παράδειγμα, η αμοιβαία απώλεια παράλογων γονιδίων σε δύο κοντινά εξελικτικά είδη, μπορεί να εξασφαλίσει την αναπαραγωγική απομόνωση και να βοηθά την ειδογένεση (Edger & Pires, 2009). Αυτό μπορεί να εξηγήσει γιατί δεν απαντώνται και οι τρεις (Lon1, Lon3 και Lon4) ή και οι δύο ισομορφές (Lon1, Lon4) της πρωτεάσης Lon, σε όλους τους φυτικούς οργανισμούς. Ανάλογα με τις περιβαλλοντικές πιέσεις που έχουν δεχθεί τα διάφορα φυτικά είδη κατά την πορεία της εξέλιξης, πίεσαν είτε προς την κατεύθυνση της εξέλιξης των δύο ή και τριών παράλογων γονιδίων της οικογένειας στο είδος (υπο-λειτουργικότητα, βλ. *Arabidopsis* και οικογένεια *Brassicaceae*), είτε στην απώλεια του ενός από τα δύο αλληλόμορφα και εξέλιξη νέων χαρακτηριστικών στο δεύτερο αλληλόμορφο, με νέες λειτουργίες (νεο-λειτουργικότητα, βλ. υπόλοιπα αγγειόσπερμα, όπου επικρατεί ο μηχανισμός της διπλής υποκυτταρικής στόχευσης μέσω όμως του μηχανισμού του ενιαίου πεπτιδίου διπλής αναγνώρισης, όπως

και στο Lon4 του *Arabidopsis*). Στην **Εικ. 28** παρουσιάζεται η εξέλιξη των τριών ισομορφών της πρωτεάσης Lon στο *A. thaliana*, μέσω των διαδοχικών αντιγραφών του γονιδιώματος.



Εικόνα 28. Οι χρωμοσωμικές θέσεις των *Lon1*, *Lon3* και *Lon4* στο φυτό *A. thaliana* και οι εξελικτικές σχέσεις μεταξύ τους. Στην εικόνα παρουσιάζεται η συνταινική σχέση μεταξύ των χρωμοσωμάτων V και III που περιέχουν τα γονίδια των Lon πρωτεασών.

Το αρχέγονο γονίδιο της οικογένειας *Lon1*, βρίσκεται στον πάνω βραχίονα του χρωμοσώματος V. Με το δεύτερο γεγονός ολικού διπλασιασμού του γονιδιώματος (WGD), το *Lon1* δημιούργησε το *Lon4*, στον άνω βραχίονα του χρωμοσώματος III (**Εικ. 28**). Όπως φαίνεται και από την ανάλυση συνταινίας μεταξύ των χρωμοσωμικών περιοχών, εντοπίζεται ευρύτερος διπλασιασμός της περιοχής ανάμεσα στα δύο χρωμοσώματα όπως αναφέρθηκε από τη γονιδιωματική ανάλυση του *Arabidopsis* το 2000 ([Arabidopsis Genome Initiative, 2000](#)). Στην πορεία της εξέλιξης, ακολούθησε το τρίτο γεγονός WGD, όπου το *Lon4* διπλασιάστηκε δημιουργώντας στη δίπλανή χρωμοσωμική θέση το *Lon3* με κατεύθυνση head to tail. Αναφορές υποστηρίζουν ότι παράλογα γονίδια μιας οικογένειας

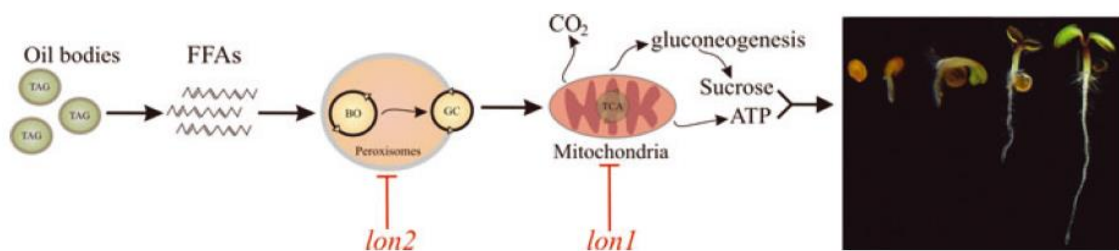
είναι δυνατόν να προκύψουν με τέτοιο διπλασιασμό (Zhang et al., 2000; Boddu et al., 2006). Στη περίπτωση λοιπόν του γονιδιώματος του *Arabidopsis* δημιουργήθηκαν τρία αντίγραφα των γονιδίων Lon με σειρά *Lon1-Lon4-Lon3*, εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο την κάλυψη διαφορετικών λειτουργικών ρόλων του.

4.5 Τα φυτά έχουν περισσότερα αντίγραφα της πρωτεάσης Lon λόγω της λειτουργικής τους πολυπλοκότητας

Στο φυτικό βασίλειο, όσο αυξάνεται η πολυπλοκότητα του οργανισμού αυξάνονται και τα αντίγραφα της πρωτεάσης Lon, με τα δικοτυλήδονα φυτά και πιο συγκεκριμένα την οικογένεια *Brassicaceae* να διαθέτουν τα περισσότερα αντίγραφα. Εάν εξαιρέσουμε το φυτό *Arabidopsis* και τα είδη της οικογένειας *Brassicaceae* (που έχουν 3 και 2 αντίγραφα, αντίστοιχα), τα υπόλοιπα φυτικά είδη έχουν κατά κανόνα ένα αντίγραφο της πρωτεάσης Lon, με διπλή υποκυτταρική τοποθέτηση (όλα τα ανώτερα φυτά και τα βρυόφυτα), με ορισμένα είδη ανώτερων φυτών να διαθέτουν δύο ισομορφές. Ο μηχανισμός στόχευσης τύπου Lon1 παραμένει συντηρημένος μόνο στα ομόλογα *Lon1* γονίδια της κλάσης Brassicales, υποδηλώνοντας μια πιθανή εξελικτική πίεση που έχει οδηγήσει στη διατήρησή της σε όλα τα μέλη της κλάσης. Αντίθετα από τα φυτά, οι ζωικοί οργανισμοί διαθέτουν ένα αντίγραφο της μιτοχονδριακής πρωτεάσης Lon, η οποία έχει πανομοιότυπο SSD με τις βακτηριακές ομόλογες πρωτεΐνες (Εικ. 27). Η παρατήρηση αυτή μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι οι βιοχημικές λειτουργίες των φυτών είναι πολύπλοκες σε σχέση με τα ζώα. Συγκεκριμένα λόγω της στατικής τους φύσης οι ανάγκες των φυτών για προστασία έναντι των περιβαλλοντικών καταπονήσεων, είναι αυξημένες. Τα φυτά επιπλέον, διαθέτουν και ένα πρόσθετο οργανίδιο, τον χλωροπλάστη, σε σχέση με τα ζώα, όπου η πρωτεάση Lon παρουσιάζει λειτουργικό ρόλο. Συνεπώς, η ύπαρξη δύο ή και περισσότερων ισομορφών μιας οργανιδιακής πρωτεάσης με περισσότερη εξειδίκευση ως προς την αναγνώριση των υποστρωμάτων (δομή SSD) είναι απαραίτητη για να εξασφαλιστεί η προσαρμογή και η επιβίωση των φυτικών οργανισμών. Η παρατήρηση των περισσότερων αντιγράφων της πρωτεάσης Lon στα ανώτερα φυτά σε σχέση με τα φύκη και τα βρυόφυτα αποτυπώνει την πολυπλοκότητα, την ανάπτυξη, πολυκύτταρων δομών και νέων οργάνων όπως το άνθος στα ανώτερα φυτά.

Συνοψίζοντας, οι εξελικτικές πιέσεις οδήγησαν το φυτό *Arabidopsis thaliana* να δημιουργήσει τέσσερις ισομορφές της πρωτεάσης Lon στο γονιδίωμά του: την

περοξυσωμική Lon2 και τις Lon1, Lon4 και Lon3. Η πρωτεάση Lon1, παρουσιάζει ένα πρότυπο έκφρασης που δεν δείχνει συγκεκριμένη εξειδίκευση σε κάποιο ιστό ή στάδιο, αλλά εκφράζεται σε όλους τους ιστούς που μελετήθηκαν, με μικρές διακυμάνσεις. Τα δεδομένα έκφρασης από τις βάσεις δεδομένων δείχνουν ότι η έκφραση του Lon2 παρουσιάζει παρόμοιο πρότυπο με αυτό του Lon1 (Εικ. 18). Μεταλλάγματα της περοξυσωμικής Lon2 παρουσιάζουν επίσης παρόμοια καθυστέρηση στην ανάπτυξή τους όπως και τα μεταλλάγματα του γονιδίου *Lon1* (Lingard and Bartel, 2009). Το μοντέλο που παρουσιάζεται στη Εικ. 29 εξηγεί την ομοιότητα των μεταλλαγμάτων των γονιδίων *Lon1* και *Lon2*.



Εικόνα 29. Οι πρωτεάσες Lon1 και Lon2 παίζουν σημαντικό ρόλο στην κινητοποίηση των λιπαρών οξέων κατά τη βλάστηση των σπερμάτων. Τα μεταλλάγματα και των δύο γονιδίων παρουσιάζουν παρόμοιους φαινοτύπους καθυστέρησης στην ανάπτυξή τους, καθώς η δυσλειτουργία είτε του ενός είτε του άλλου οργανιδίου προκαλεί πρόβλημα στην κινητοποίηση των λιπαρών οξέων, με αποτέλεσμα το φυτό να μην διαθέτει την απαραίτητη ενέργεια που χρειάζεται για να βλαστήσει.

Τα φυτά που παράγουν ελαιούχα σπέρματα (όπως το *Arabidopsis thaliana*) κατά την έναρξη της βλάστησης κινητοποιούν τα λιπαρά τους (τα οποία έχουν αποθηκευμένα ως αποθέματα ενέργειας) για να παράξουν την απαραίτητη ενέργεια που χρειάζονται. Αρχικά τα λιποσώματα καταβολίζονται σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFAs, Εικ. 29) τα οποία εισέρχονται στο περοξύσωμα και μέσω της β-οξειδωσης και του γλυολυτικού κύκλου καταβολίζονται και παράγουν οργανικές ενώσεις (ακέτυλο συνένζυμο Α) τα οποία στη συνέχεια εισέρχονται στα μιτοχόνδρια και μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος και της αναπνευστικής αλυσίδας, μετατρέπονται σε ενέργεια υπό τη μορφή ATP. Τα μεταλλάγματα των δύο γονιδίων της πρωτεάσης Lon παρουσιάζουν παρόμοιο φαινότυπο, ακριβώς επειδή είτε το δυσλειτουργικό περοξύσωμα είτε το δυσλειτουργικό μιτοχόνδριο κατά τη διάρκεια της βλάστησης, προκαλούν πρόβλημα στο μονοπάτι του καταβολισμού των λιπαρών και ως συνέπεια, το φυτό δεν διαθέτει την απαραίτητη ενέργεια που

χρειάζεται για να αναπτυχθεί φυσιολογικά. Επιπλέον, υπάρχουν πρόσφατες αναφορές όπου δυσλειτουργία των περοξυσωμάτων και σε ζωικά μοντέλα προκαλούν φαινότυπους που ομοιάζουν με μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες λόγω βλάβης στη μιτοχονδριακή Lon πρωτεάση (Pomatto et al., 2016). Η χαμηλή βλαστικότητα των σπερμάτων της μετάλλαξης *lon4-1*, λαμβάνοντας υπόψιν και το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου, φαίνεται ότι είναι αποτέλεσμα προβλήματος που δημιουργείται σε νωρίτερο στάδιο από αυτό της βλάστησης, είτε κατά την γονιμοποίηση είτε κατά την εμβρυογένεση, καθώς παρά το χαμηλό ποσοστό βλαστικότητας, και της μειωμένης αναπνοής των σπερμάτων, τα φυτά, μετά την βλάστηση δεν παρουσιάζουν κάποια άλλη καθυστέρηση στην ανάπτυξή τους, όπως οι άλλες δύο μεταλλάξεις (υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης). Σε συνδυασμό με το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *Lon3*, οι δύο πιο πρόσφατες ισομορφές της πρωτεάσης Lon του *Arabidopsis* (*Lon4* και *Lon3*) παρουσιάζουν μια εξειδίκευση ως προς τα ανθικά μέρη, όπου κρίνοντας και από τον φαινότυπο του μεταλλάγματος *lon4-1*, ο λειτουργικός τους ρόλος είναι σημαντικός για την φυσιολογική ανάπτυξη του φυτού. Με βάση την θεωρία της εξέλιξης των υποκυτταρικών οργανιδίων και όπως έδειξε και η φυλογενετική ανάλυση, η πιο αρχέγονη μορφή είναι η μιτοχονδριακή Lon (*Lon1* για το *Arabidopsis*) η οποία εισήλθε στους ευκαρυώτες από τον ενδοσυμβιώτη-πρόγονο του μιτοχονδρίου. Στη συνέχεια με τη δημιουργία του περοξυσώματος, του οποίου η καταγωγή είναι από το ενδοπλασματικό δίκτυο, μετά την ενδοσυμβίωση του μιτοχονδρίου, το κύτταρο εξέλιξε το περοξυσωματικό γονίδιο (*Lon2* για το *Arabidopsis*). Για το φυτικό βασίλειο, μετά την ενδοσυμβίωση και του χλωροπλάστη, η μιτοχονδριακή πρωτεάση Lon, εξέλιξε τον μηχανισμό της δυαδικής υποκυτταρικής τοποθέτησης, πιθανώς με τον μηχανισμό των δυαδικών ακολουθιών υποκυτταρικής στόχευσης, ο οποίος περιέργως φαίνεται να έχει συντηρηθεί μόνο στην κλάση *Brassicales*. Η πρόοδος της εξέλιξης των φυτών και η πολυπλοκότητα της οργάνωσής τους με νέες δομές (βλαστός, σπέρματα, άνθος) οδήγησε σε ολικούς διπλασιασμούς των γονιδιωμάτων με αποτέλεσμα τη δημιουργία περισσότερων αντιγράφων της πρωτεάσης Lon, με νέες λειτουργίες και χαρακτηριστικά. Οι *Lon4* και *Lon3* αποτελούν αυτό το παράδειγμα και είναι οι πιο πρόσφατες στην εξέλιξη ισομορφές της πρωτεάσης Lon στο φυτό *Arabidopsis*. Το πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης των δύο γονιδίων δείχνει ότι υπάρχει μια ιστοειδική εξειδίκευση ως προς το άνθος και ενδεχομένως να σχετίζονται και με την γαμετογένεση ή/και την αναπαραγωγή του φυτού, καθώς το ένα παρουσιάζει εξειδίκευση ως προς τον

θηλυκό γαμέτη (*Lon4*), ενώ το άλλο ως προς τον αρσενικό (*Lon3*). Φαίνεται λοιπόν ότι τα τρία γεγονότα ολικού γονιδωματικού διπλασιασμού που έχει υποστεί το *Arabidopsis*, του εξασφάλισε την ύπαρξη των τριών γονιδίων της πρωτεάσης Lon τα οποία και το φυτό προσαρμόσε στις ανάγκες του καταφέροντας να αποκτήσει εξελικτικό πλεονέκτημα στον μηχανισμό αναπαραγωγής. Με τον τρόπο αυτό το φυτό έχοντας εξασφάλιση την φυσιολογική του εγκατάσταση και ανάπτυξη (*Lon1* και *Lon2*) βελτίωσε και την σημαντικότερη βιολογική του λειτουργία, την αναπαραγωγή, εξασφαλίζοντας έτσι τη διαιώνιση και την περαιτέρω εξέλιξη του είδους.

Βιβλιογραφία

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

Apel K, Hirt H, (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**:373–399.

Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815

Audibert A, Weil D, Dautry F. (2002). In vivo kinetics of mRNA splicing and transport in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology* **22**: 6706–6718.

Baudisch B, Langner U, Garz I, Klösigen RB. (2014). The exception proves the rule? Dual targeting of nuclear-encoded proteins into endosymbiotic organelles. *New Phytologist* **201**: 80–90.

Bechtold N, Pelletier G. (1998) In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods in Molecular Biology* **82**: 259-266.

Bender T, Leidhold C, Ruppert T, Franken S, Voos W. (2010). The role of protein quality control in mitochondrial protein homeostasis under oxidative stress. *Proteomics* **10**: 1426–1443.

Berglund AK, Pujol C, Duchene AM, Glaser E. (2009). Defining the determinants for dual targeting of aminoacyl-tRNA synthetases to mitochondria and chloroplasts. *Journal of Molecular Biology* **393**: 803–814.

Birchler JA, Veitia RA. (2010). The gene balance hypothesis: implications for gene regulation, quantitative traits and evolution. *New Phytologist* **186**: 54–62.

Boddu J, Jiang C, Sangar V, Olson T, Peterson T, Chopra S. (2006). Comparative structural and functional characterization of sorghum and maize duplications containing

orthologous myb transcription regulators of 3-deoxyflavonoid biosynthesis. *Plant Molecular Biology* **60**: 185-199.

Bolte K, Bullmann L, Hempel F, Bozarth A, Zauner S, Maier UG. 2009. Protein targeting into secondary plastids. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **56**: 9-15.

Bolte K, Rensing SA, Maier UG. (2015). The evolution of eukaryotic cells from the perspective of peroxisomes. *Bioessays* **37**: 195-203.

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

Bota DA, Ngo JK, Davies KJ. (2005). Downregulation of the human Lon protease impairs mitochondrial structure and function and causes cell death. *Free Radical Biology and Medicine* **8**: 665-677.

Brocard C, Hartig A. (2006). Peroxisome targeting signal 1: is it really a simple tripeptide? *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**: 1565-73.

Brown LA, Baker A. (2008). Shuttles and cycles: transport of proteins into the peroxisome matrix. *Molecular Membrane Biology* **25**: 363-375.

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

Carrie C, Small I. (2013). A reevaluation of dual-targeting of proteins to mitochondria and chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* **1833**: 253-259.

Cassarino DS, Bennett JP Jr. (1999). An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Research Reviews* **29**: 1-25.

Cavalier-Smith T. (2002). The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of protozoa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 297-354.

Cavalier-Smith T. (2009). Predation and eukaryote cell origins: a coevolutionary perspective. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **41**: 307–22.

Chen M, Choi Y, Voytas DF, Rodermel S. (2000). Mutations in the Arabidopsis VAR2 locus cause leaf variegation due to the loss of a chloroplast FtsH protease. *The Plant Journal* **22**: 303–13.

Chung CH, Goldberg AL. (1981). The product of the *lon* (*capR*) gene in *Escherichia coli* is the ATP-dependent protease, protease La. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **78**: 4931–4935.

Dagan T, Roettger M, Stucken K, Landan G, Koch R, Major P, Gould SB, Goremykin VV, Rippka R, Tandeau de Marsac N, Gugger M, Lockhart PJ, Allen JF, Brune I, Maus I, Pühler A, Martin WF. (2013). Genomes of stigonematalean cyanobacteria (Subsection V) and the evolution of oxygenic photosynthesis from prokaryotes to plastids. *Genome Biology and Evolution* **5**: 31–44.

Daras G, Rigas S, Tsitsekian D, Zur H, Tuller T, Hatzopoulos P. (2014). Alternative transcription initiation and the AUG context configuration control dual organellar targeting and functional competence of Arabidopsis Lon1 protease. *Molecular Plant* **7**: 989–1005.

Day DA, Neuburger M, Douce R. (1985). Biochemical characterization of Chlorophyll-free mitochondria from pea leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* **12**: 219–228

De Bodt S, Maere S, Van de Peer Y. (2005). Genome duplication and the origin of angiosperms. *Trends in Ecology & Evolution* **20**: 591–597

de Duve C, Baudhuin, P. (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiological Reviews* **46**: 323–357.

Deusch O, Landan G, Roettger M, Gruenheit N, Kowallik KV, Allen JF, Martin W, Dagan T. (2008). Genes of cyanobacterial origin in plant nuclear genomes point to a heterocyst-forming plastid ancestor. *Molecular Biology and Evolution* **25**: 748–761.

Dolezal P, Likic V, Tachezy J, Lithgow T. (2006) Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science* **313**: 314–318.

Domman D, Horn M, Embley TM, Williams TA. (2015). Plastid establishment did not require a chlamydial partner. *Nature Communications* **6**: 6421.

Donch J, Greenberg J. (1968). Genetic analysis of lon mutants of strain K-12 of *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics* **103**: 105–115.

Edger PP, Pires JC. (2009). Gene and genome duplications: the impact of dosage-sensitivity on the fate of nuclear genes. *Chromosome Research* **17**: 699–717.

Eubel H, Meyer EH, Taylor NL, Bussell JD, O'Toole N, Heazlewood JL, Castleden I, Small ID, Smith SM, Millar AH. (2008). Novel proteins, putative membrane transporters, and an integrated metabolic network are revealed by quantitative proteomic analysis of Arabidopsis cell culture peroxisomes. *Plant Physiology* **148**: 1809–1829.

Fawcett JA, Maere S, Van de Peer Y. (2009). Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous–Tertiary extinction event. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **106**: 5737–5742.

Fawcett JA, Van de Peer Y. (2010). Angiosperm polyploids and their road to evolutionary success. *Trends in Evolutionary Biology* **2**: 16–21.

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

Franzke A, Lysak MA, Al-Shehbaz IA, Koch MA, Mummenhoff K. (2011). Cabbage family affairs: the evolutionary history of Brassicaceae. *Trends in Plant Science* **16**: 108–116.

Friguet B, Bulteau AL., Petropoulos I. (2008). Mitochondrial protein quality control: implications in ageing. *Biotechnology Journal* **3**: 757–764.

Gabaldon T. (2010). Peroxisome diversity and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **365**: 765–773

Girzalsky W, Platta HW, Erdmann R. (2009). Protein transport across the peroxisomal membrane. *Biological Chemistry* **390**: 745–751.

Grabzstunowicz M, Jackowski G. (2004). Isolation of intact and pure chloroplasts from leaves of *Arabidopsis thaliana* plants acclimated to low irradiance for studies on Rubisco regulation. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **82**: 91-95.

Gray MW. (2012). Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**: a011403.

Gupta RS, Golding GB. (1996). The origin of the eukaryotic cell. *Trends in Biochemical Sciences* **21**: 166–71.

Gur E, Sauer RT. (2008). Recognition of misfolded proteins by Lon, a AAA+ protease. *Genes & Development* **22**: 2267–2277.

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. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology* **11**: 298–300.

He J, Duan Y, Hua D, Fan G, Wang L, Liu Y, Chen Z, Han L, Qu LJ, Gong Z. (2012). DEXH box RNA helicase-mediated mitochondrial reactive oxygen species production in *Arabidopsis* mediates crosstalk between abscisic acid and auxin signaling. *The Plant Cell* **24**: 1815-1833.

Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* **207**: 604-611.

Husnik F, Nikoh N, Koga R, Ross L, Duncan RP, Fujie M, Tanaka M, Satoh N, Bachtrog D, Wilson AC, von Dohlen CD, Fukatsu T, McCutcheon JP. (2013). Horizontal gene transfer from diverse bacteria to an insect genome enables a tripartite nested mealybug symbiosis. *Cell* **153**: 1567–1578.

Islinger M, Luers GH, Zischka H, Ueffing M, Volkl A. (2006). Insights into the membrane proteome of rat liver peroxisomes: microsomal glutathione-S-transferase is shared by both subcellular compartments. *Proteomics* **6**: 804–816.

Ito K, Akiyama Y. (2005). Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annual Review of Microbiology*. **59**: 211-31

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.

Janska H, Piechota J, Kwasniak M. (2010). ATP-dependent proteases in biogenesis and maintenance of plant mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* **1797**: 1071–75.

Keeling PJ. (2013). The number, speed, and impact of plastid endosymbiosis in eukaryotic evolution. *Annual Review of Plant Biology* **64**: 583–607.

Kikuchi M, Hatano N, Yokota S, Shimozawa N, Imanaka T, Taniguchi H. (2004). Proteomic analysis of rat liver peroxisome: presence of peroxisome-specific isozyme of Lon protease. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 421–428.

Kim Y, Lee G, Jeon E, Sohn EJ, Lee Y, Kang H, Lee DW, Kim DH, Hwang I. (2014). The immediate upstream region of the 5'-UTR from the AUG start codon has a pronounced effect on the translational efficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* **42**: 485-498.

Komenda J, Barker M, Kuviková S, de Vries R, Mullineaux CW, Tichy M, Nixon PJ. (2006). The FtsH protease slr0228 is important for quality control of photosystem II in the thylakoid membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 1145-51.

Kozak M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Research* **15**: 8125-8148.

Ku C, Nelson-Sathi S, Roettger M, Garg S, Hazkani-Covo E, Martin WF. (2015). Endosymbiotic gene transfer from prokaryotic pangenomes: Inherited chimaerism in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **112**: 10139-46

- Ku C, Roettger M, Zimorski V, Nelson-Sathi S, Sousa FL, Martin WF.** (2014). Plastid origin: who, when and why? *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **83**: 281–289.
- Kunst L.** (1998). Preparation of physiologically active chloroplasts from Arabidopsis. *Methods in Molecular Biology* **82**: 43–48.
- Kwong JQ, Beal MF, Manfredi G.** (2006). The role of mitochondria in inherited neurodegenerative diseases. *Journal of Neurochemistry* **97**: 1659–1675
- Lake JA, Moore JE, Simonson AB, Rivera MC.** (2005). Fulfilling Darwin's dream. In Sapp J, ed; *Microbial phylogeny and evolution*. New York: Oxford University Press. p. 184–206.
- Lambowitz AM, Zimmerly S.** (2004). Mobile group II introns. *Annual Review of Genetics* **38**: 1–35.
- Lambowitz AM, Zimmerly S.** (2011). Group II introns: Mobile ribozymes that invade DNA. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**: a003616.
- Lane N, Martin W.** (2010). The energetics of genome complexity. *Nature* **467**: 929–934.
- Langer T.** (2000). AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **25**: 247–51.
- Lazarow PB, Fujiki Y.** (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **1**: 489–530.
- Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, Prolla TA.** (1999). Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* **285**: 1390–1393.
- Lindahl M, Tabak S, Cseke L, Pichersky E, Andersson B, Adam Z.** (1996). Identification, characterization, and molecular cloning of a homologue of the bacterial FtsH protease in chloroplasts of higher plants. *The Journal of Biological Chemistry* **271**: 29329–34.
- Lingard MJ, Bartel B.** (2009). Arabidopsis LON2 is necessary for peroxisomal function and sustained matrix protein import. *Plant Physiology* **151**: 1354–1365.
- Lister R, Chew O, Lee MN, Heazlewood JL, Clifton R, Parker KL, Millar AH, Whelan J.** (2004). A transcriptomic and proteomic characterization of Arabidopsis mitochondrial

protein import apparatus and its response to mitochondrial dysfunction. *Plant Physiology* **134**: 777–789.

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. *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 17363–17374.

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

Lütcke HA, Chow KC, Mickel FS, Moss KA, Kern HF, Scheele GA. (1987). Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *The EMBO Journal* **6**: 43-48.

Lv WT, Lin B, Zhang M, Hua XJ. (2011). Proline Accumulation Is Inhibitory to Arabidopsis Seedlings during Heat Stress. *Plant Physiology* **156**: 1921-1933

Lynch M, Richardson AO. (2002). The evolution of spliceosomal introns. *Current Opinion in Genetics & Development* **12**: 701–710.

Ma C, Subramani S. (2009). Peroxisome matrix and membrane protein biogenesis. *IUBMB Life* **61**: 713–722.

Mackenzie SA. (2005). Plant organellar protein targeting: a traffic plan still under construction. *Trends in Cell Biology* **15**:548–554.

Mans BJ, Anantharaman V, Aravind L, Koonin EV. (2004). Comparative genomics, evolution and origins of the nuclear envelope and nuclear pore complex. *Cell Cycle* **3**: 1612–1637.

Margulis L, Dolan MF, Guerrero R. (2000). The chimeric eukaryote: origin of the nucleus from the karyomastigont in amitochondriate protists. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**: 6954–9.

Margulis L. (1970) Origin of eukaryotic cells. New Haven, CT: Yale University Press.

Martin W, Koonin EV. (2006). Introns and the origin of nucleus–cytosol compartmentalization. *Nature* **440**: 41–45.

Martin W, Müller M. (1998). The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* **392**: 37–41.

Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M, Penny D. (2002). Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99**: 12246–12251.

Martin WF, Garg S, Zimorski V. (2015). Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **370**: 20140330.

Matsuura M, Saldanha R, Ma H, Wank H, Yang J, Mohr G, Cavanagh S, Dunny GM, Belfort M, Lambowitz AM. (1997). A bacterial group II intron encoding reverse transcriptase, maturase, and DNA endonuclease activities: biochemical demonstration of maturase activity and insertion of new genetic information within the intron. *Genes & Development* **11**: 2910–2924.

McInerney JO, O'Connell MJ, Pisani D. (2014). The hybrid nature of the Eukaryota and a consilient view of life on Earth. *Nature Reviews Microbiology* **12**: 449–55.

Mi J, Kirchner E, Cristobal S. (2007). Quantitative proteomic comparison of mouse peroxisomes from liver and kidney. *Proteomics* **7**: 1916–1928.

Millar AH, Whelan J, Small I. (2006). Recent surprises in protein targeting to mitochondria and plastids. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 610–615.

Ming R, Hou S, Feng Y, Yu Q, Dionne-Laporte A, Saw JH, Senin P, Wang W, Ly BV, Lewis KL, Salzberg SL, Feng L, Jones MR, Skelton RL, Murray JE, Chen C, Qian W, Shen J, Du P, Eustice M, Tong E, Tang H, Lyons E, Paull RE, Michael TP, Wall K, Rice DW, Albert H, Wang ML, Zhu YJ, Schatz M, Nagarajan N, Acob RA, Guan P, Blas A, Wai CM, Ackerman CM, *et al.* (2008). The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* L.). *Nature* **452**: 991–996.

Moller IM, Sweetlove LJ. (2010). ROS signaling - specificity is required. *Trends in Plant Science* **15**:370-374.

Moreira D, Lopez-Garcia P. (1998). Symbiosis between methanogenic archaea and delta-proteobacteria as the origin of eukaryotes: the syntrophic hypothesis. *Journal of Molecular Evolution* **47**: 517–30.

Müller M, Mentel M, van Hellemond JJ, Henze K, Woehle C, Gould SB, Yu RY, van der Giezen M, Tielens AG, Martin WF. (2012). Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **76**: 444–95.

Nelson-Sathi S, Dagan T, Landan G, Janssen A, Steel M, McInerney JO, Deppenmeier U, Martin WF. (2012). Acquisition of 1,000 eubacterial genes physiologically transformed a methanogen at the origin of Haloarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **109**: 20537–20542.

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

Nordgren M, Fransen M. (2014). Peroxisomal metabolism and oxidative stress. *Biochimie* **98**: 56–62.

Novikoff PM, Novikoff AB. (1972). Peroxisomes in absorptive cells of mammalian small intestine. *The Journal of Cell Biology* **53**: 532-560.

Ondrovicová G, Liu T, Singh K, Tian B, Li H, Gakh O, Perecko D, Janata J, Granot Z, Orly J, Kutejová E, Suzuki CK. (2005). Cleavage site selection within a folded substrate by the ATP-dependent Lon protease. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 25103–25110.

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 Physiology* **48**: 881–885.

Palma JM, Corpas FJ, del Rio LA. (2009). Proteome of plant peroxisomes: new perspectives on the role of these organelles in cell biology. *Proteomics* **9**: 2301–2312.

Peeters N, Small I. (2001). Dual targeting to mitochondria and chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* **1541**: 54–63.

Peltier JB, Ripoll DR, Friso G, Rudella A, Cai Y, Ytterberg J, Giacomelli L, Pillardy J, van Wijk KJ. (2004). Clp protease complexes from photosynthetic and non-photosynthetic plastids and mitochondria of plants, their predicted three-dimensional structures, and functional implications. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 4768-81.

Perichon R, Bourre J, Kelly J Roth G. (1998). The role of peroxisomes in aging. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **54**: 641–652.

Pomatto LC, Raynes R, Davies KJ. (2016). The peroxisomal Lon protease LonP2 in aging and disease: functions and comparisons with mitochondrial Lon protease LonP1. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. doi: 10.1111/brv.12253.

Poole A, Jeffares D, Penny D. (1999). Early evolution: prokaryotes, the new kids on the block. *Bioessays* **21**: 880–889.

Price DC, Chan CX, Yoon HS, Yang EC, Qiu H, Weber AP, Schwacke R, Gross J, Blouin NA, Lane C, Reyes-Prieto A, Durnford DG, Neilson JA, Lang BF, Burger G, Steiner JM, Löffelhardt W, Meuser JE, Posewitz MC, Ball S, Arias MC, Henrissat B, Coutinho PM, Rensing SA, Symeonidi A, Doddapaneni H, Green BR, Rajah VD, Boore J, Bhattacharya D. (2012). Cyanophora paradoxa genome elucidates origin of photosynthesis in algae and plants. *Science* **335**: 843–7.

Ptashne M. (2013). Epigenetics: core misconception. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **110**: 7101–7103.

Pulido P, Llamas E, Llorente B, Ventura S, Wright LP, Rodríguez-Concepción M. (2016). Specific Hsp100 Chaperones Determine the Fate of the First Enzyme of the Plastidial Isoprenoid Pathway for Either Refolding or Degradation by the Stromal Clp Protease in Arabidopsis. *PLoS Genetics* **12**(1):e1005824.

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.

Reumann S, Babujee L, Ma C, Wienkoop S, Siemsen T, Antonicelli GE, Rasche N, Lüder F, Weckwerth W, Jahn O. (2007). Proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes

reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms. *The Plant Cell* **19**: 3170–3193.

Rhodin, J. (1954). Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal tubule cells of the mouse kidney. Stockholm, Sweden: Karolinska Institutet.

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

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

Rigas S, Daras G, Tsitsekian D, Alatzas A, Hatzopoulos P. (2014). Evolution and significance of the Lon gene family in *Arabidopsis* organelle biogenesis and energy metabolism. *Frontiers in Plant Science* **5**:145.

Rigas S, Daras G, Tsitsekian D, Hatzopoulos P. (2012). The multifaceted role of Lon proteolysis in seedling establishment and maintenance of plant organelle function: living from protein destruction. *Physiologia Plantarum* **145**: 215-223.

Rogozin IB, Wolf YI, Sorokin AV, Mirkin BG, Koonin EV. (2003). Remarkable interkingdom conservation of intron positions and massive, lineage-specific intron loss and gain in eukaryotic evolution. *Current Biology* **13**: 1512–1517.

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

Roy SW, Gilbert W. (2005). Rates of intron loss and gain: implications for early eukaryotic evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **102**: 5773–5778.

Sagan L. (1967) On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology* **14**: 225–274.

Sakamoto W, Zaltsman A, Adam Z, Takahashi Y. (2003). Coordinated regulation and complex formation of yellow variegated1 and yellow variegated2, chloroplastic FtsH metalloproteases involved in the repair cycle of photosystem II in Arabidopsis thylakoid membranes. *The Plant Cell* **15**: 2843-55.

Sakamoto W. (2006). Protein degradation machineries in plastids. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 599–621.

Schafer H, Nau K, Sickmann A., Erdmann R, Meyer HE. (2001). Identification of peroxisomal membrane proteins of *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Electrophoresis* **22**: 2955–2968.

Schleiff EE, Becker TT. (2011). Common ground for protein translocation: Access control for mitochondria and chloroplasts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**: 48–59.

Searcy DG. (1992). Origins of mitochondria and chloroplasts from sulphurbased symbioses. In Hartmann H, Matsuno H, eds; *The Origin and Evolution of the Cell*. Singapore: World Scientific. p. 47–78.

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

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

Smalle J, Vierstra RD. (2004).The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annual Reviews in Plant Biology* **55**: 555–590.

Smith CK, Baker TA, Sauer RT. (1999). Lon and Clp family proteases and chaperones share homologous substrate-recognition domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **96**: 6678–6682.

Sogin ML. (1991). Early evolution and the origin of eukaryotes. *Current Opinion in Genetics & Development* **1**: 457–63.

Solheim C, Li L, Hatzopoulos P, Millar AH. (2012). Loss of Lon1 in Arabidopsis changes the mitochondrial proteome leading to altered metabolite profiles and growth retardation without an accumulation of oxidative damage. *Plant Physiology* **160**: 1187-1203.

Soltis DE, Albert VA, Leebens-Mack J, Bell CD, Paterson AH, Zheng C, Sankoff D, Depamphilis CW, Wall PK, Soltis PS. (2009). Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany* **96**: 336–348

Staub E, Fiziev P, Rosenthal A, Hinzmann B. (2004). Insights into the evolution of the nucleolus by an analysis of its protein domain repertoire. *Bioessays* **26**: 567–581.

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. *Current Genetics* **55**: 175-184.

Subramani S. (1998). Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover, and movement. *Physiological Reviews* **78**: 171-188.

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.

Swamy KH, Goldberg AL. (1981). E. coli contains eight soluble proteolytic activities, one being ATP-dependent. *Nature* **292**: 652–654.

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

Tang et al., 2008

Tang H, Bowers JE, Wang X, Ming R, Alam M, Paterson AH. (2008). Synteny and collinearity in plant genomes. *Science* **320**: 486–488.

Timmis JN, Ayliffe MA, Huang CY, Martin W. (2004). Endosymbiotic gene transfer: Organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nature Reviews Genetics*. **5**: 123–135.

Van de Peer Y, Fawcett JA, Proost S, Sterck L, Vandepoele K. (2009). The flowering world: a tale of duplications. *Trends in Plant Science* **14**: 680–688.

van der Klei IJ, Veenhuis M. (2006). Yeast and filamentous fungi as model organisms in microbody research. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**: 1364–1373.

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*. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 238–242.

Vellai T, Takacs K, Vida G. (1998). A new aspect to the origin and evolution of eukaryotes. *Journal of Molecular Evolution* **46**: 499–507.

von Dohlen CD, Kohler S, Alsop ST, McManus WR. (2001). Mealybug b-proteobacterial endosymbionts contain g-proteobacterial symbionts. *Nature* **412**: 433–436.

von Janowsky B, Knapp K, Major T, Krayl M, Guiard B, Voos W. (2005). Structural properties of substrate proteins determine their proteolysis by the mitochondrial AAA+ protease Pim1. *Biological Chemistry* **386**: 1307–1317.

Wallace DC. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annual Review of Genetics* **39**: 359.

Williams TA, Embley TM. (2014). Archaeal “dark matter” and the origin of eukaryotes. *Genome Biology and Evolution* **6**: 474–81.

Williams TA, Foster PG, Cox CJ, Embley TM. (2013). An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life. *Nature* **504**: 231–236.

Woese CR, Fox GE. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **74**: 5088–90.

Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **87**: 4576–9.

Yi EC, Marelli M, Lee H, Purvine SO, Aebersold R, Aitchison JD, Goodlett DR. (2002). Approaching complete peroxisome characterization by gas-phase fractionation. *Electrophoresis* **23**: 3205–3216.

Zhang P, Chopra S, Peterson T. (2000). A Segmental Gene Duplication Generated Differentially Expressed myb Homologous Genes in Maize. *The Plant Cell* **12**: 2311–2322

Zimorski V, Ku C, Martin WF, Gould SB. (2014). Endosymbiotic theory for organelle origins. *Current Opinion in Microbiology* **22**: 38–48.

Παράρτημα

Όλες οι κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου της πρωτεάσης Lon1, σημάνθηκαν με το επίτοπο FLAG (DYKDKKKD) στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεάσης Lon1. Το FLAG είναι ένα οκταπεπτίδιο, που αναγνωρίζεται από το αντίσωμα anti-FLAG, είναι συμβατό με τα φυτά, καθώς παρουσιάζει ελάχιστο ποσοστό μη-ειδικού υβριδισμού με άλλες φυτικές πρωτεΐνες και επιπλέον, λόγω του μικρού μεγέθους του, δεν επηρεάζει τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης που έρχεται σε σύντηξη. Το επίτοπο προστέθηκε κατά την ενίσχυση του γονιδίου με PCR, όπου ο ανάστροφος εκκινητής για κάθε κατασκευή, σχεδιάστηκε με τέτοιο τρόπο ώστε στο καρβόξυ άκρο της πρωτεΐνης να προστίθεται το FLAG πεπτίδιο 1,5 φορά (DYKDKKKDYKD, βλ. Πίν. Π1).

Κατασκευή των διαγονιδιακών σειρών της πρωτεάσης Lon1

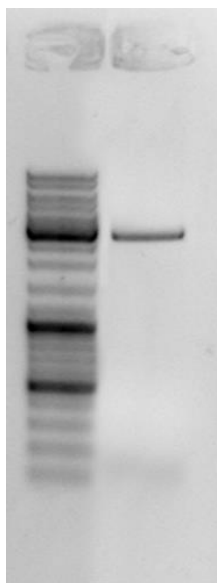
1) **35S::Lon1-Short::FLAG** (Μιτοχονδριακή)

Εκκινητές: Forward: Lon1-w/o-strand

Reverse: Lon1-FLAG-Rev

PCR conditions

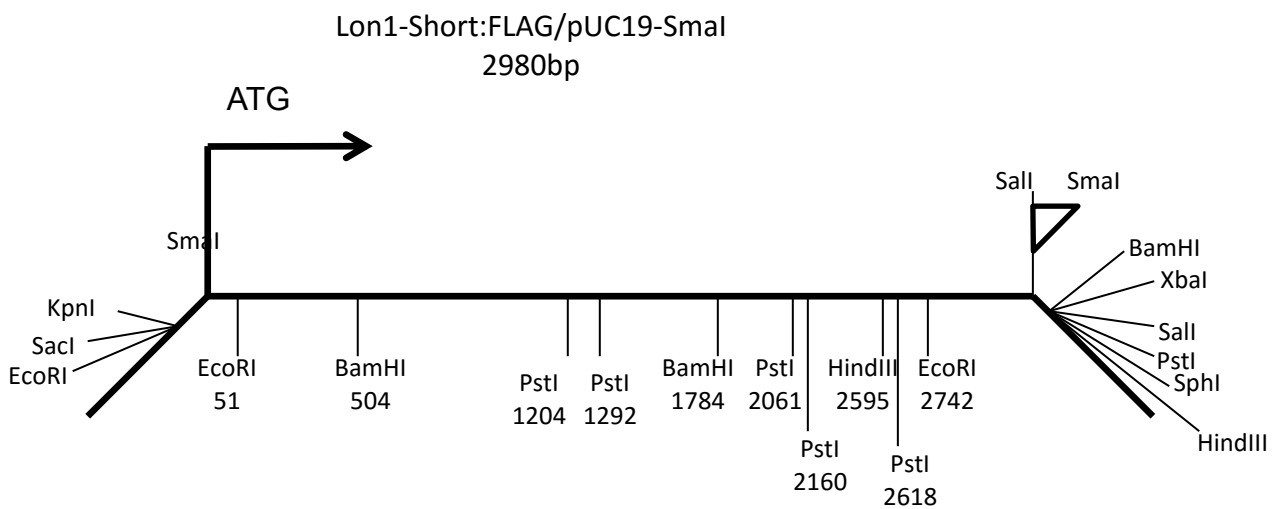
DNA (Lon1cDNA/pUC19):	5μL
Phusion HF Buffer, 5x:	10μL
Forward Primer (3μM):	5μL
Reverse Primer (3μM):	5μL
dNTPs (2mM):	5μL
Phusion DNA pol. (2u/μL):	1μL
ddH ₂ O:	19μL
Total reaction volume:	50μL

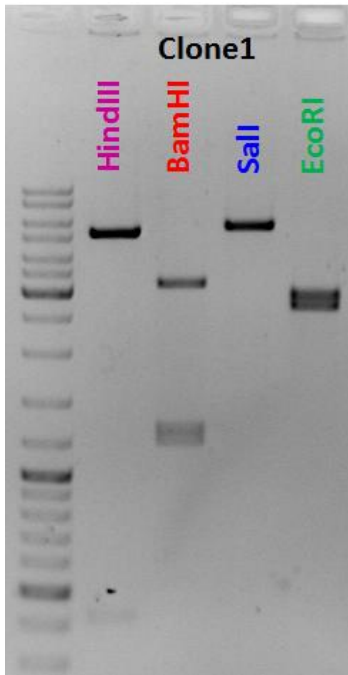


PCR program

1. 94°C for 2min
2. 94°C for 30sec
3. 54°C for 30sec
4. 72°C for 1min 45sec
5. Go to 2, 19 times
6. 72°C for 10min
7. 10°C forever
8. end.

Το προϊόν PCR κλωνοποιήθηκε στη SmaI θέση του φορέα κλωνοποίησης pUC19.

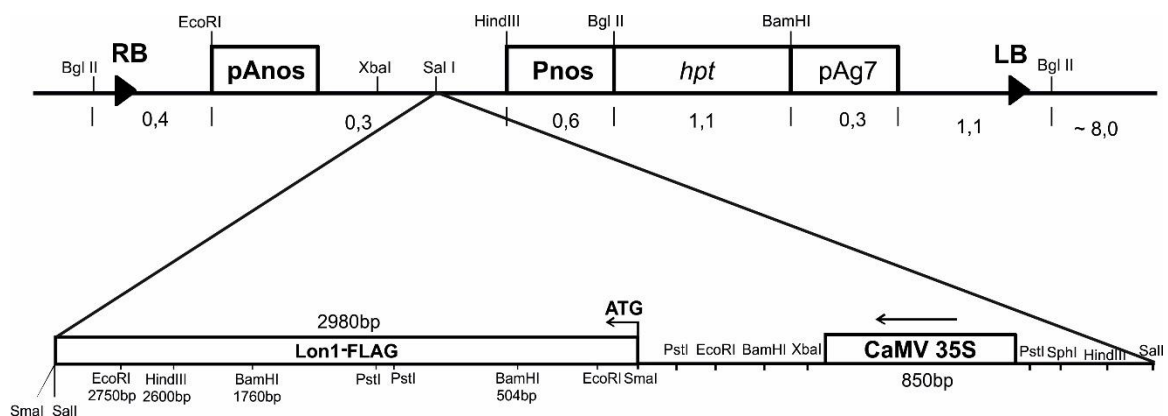


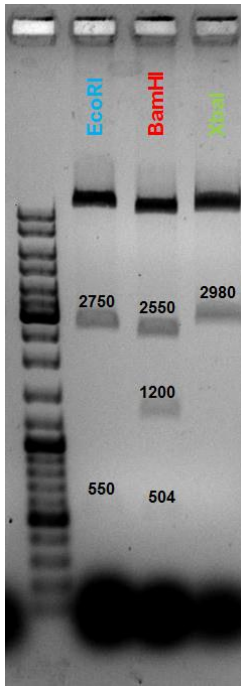


Ο φορέας στάλθηκε για αλληλούχιση DNA για να πιστοποιηθεί ότι δεν έχει γίνει κάποιο λάθος κατά την ενίσχυση του τμήματος με PCR.

Αφού πιστοποιήθηκε ότι ο κλώνος δεν έχει λάθη, απομονώθηκε το τμήμα Lon1-Short::FLAG από τον pUC19 με πέψη με το ένχυμο SalI και κλωνοποιήθηκε στη SalI θέση του φορέα HYG35S w/o GUS. Ο χάρτης καθώς και οι διαγνωστικές πέψεις φαίνονται παρακάτω.

Χάρτης τελικής κατασκευής στον δυαδικό φορέα pGPTV-HPT





2) **35S::Lon1-Long::FLAG** (Χλωροπλαστική)

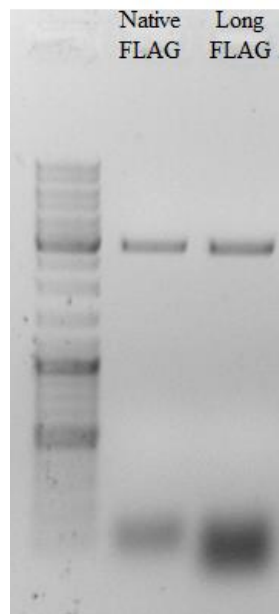
Με τροποποίηση του πρόσθιου εκκινητή, αλλάζει η περιοχή Kozak στο πρώτο κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης, όπου το ασθενές Kozak **GGGTTTATG** αλλάζει με την ακολουθία του δεύτερου κωδικονίου έκφρασης **CCCACCATG**. Η ακολουθία αυτή δεν επιτρέπει την ολίσθηση της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας από το πρώτο κωδικόνιο έναρξης, εξασφαλίζοντας με αυτό τον τρόπο την μετάφραση μόνο της χλωροπλαστικής ισομορφής ([Daras et al., 2014](#)).

Εκκινητές: Forward: LoncDNA-For Tm = 61,64

Reverse: Lon1-FLAG-Rev Tm= 54,7

PCR conditions

DNA (Lon1cDNA/pUC19):	5μL
Phusion HF Buffer, 5x:	10μL
Forward Primer (3μM):	5μL
Reverse Primer (3μM):	5μL
dNTPs (2mM):	5μL



Phusion DNA pol. (2u/μL): 1μL
ddH₂O: 19μL
Total reaction volume: 50μL

PCR program

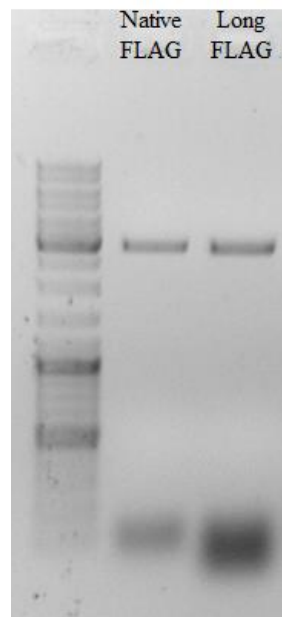
1. 94°C for 2min
 2. 94°C for 30sec
 3. 54°C for 30sec
 4. 72°C for 1min 45sec
 5. Go to 2, 16 times
 6. 72°C for 10min
 7. 10°C forever
 8. end.
- 3) **35S::Lon1-Native::FLAG** (Δυαδική στόχευση)

Εκκινητές: Forward: LongWT-For T_m = 61,64

Reverse: Lon1-FLAG-Rev T_m = 54,7

PCR conditions

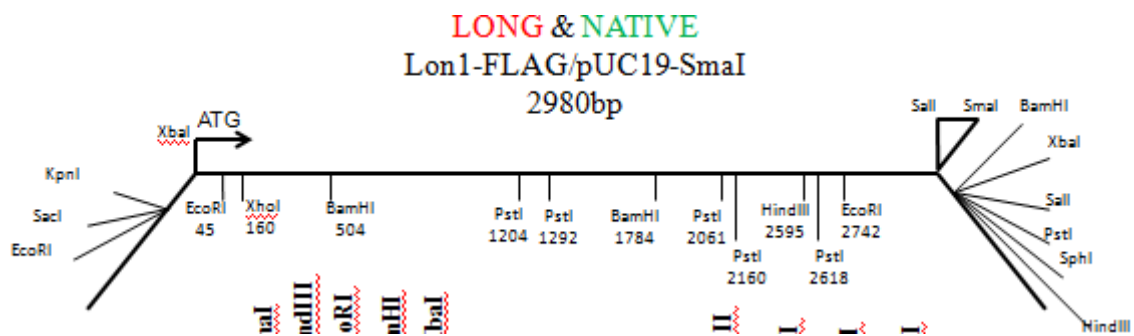
DNA (Lon1cDNA/pUC19): 5μL
Phusion HF Buffer, 5x: 10μL
Forward Primer (3μM): 5μL
Reverse Primer (3μM): 5μL
dNTPs (2mM): 5μL
Phusion DNA pol. (2u/μL): 1μL
ddH₂O: 19μL
Total reaction volume: 50μL



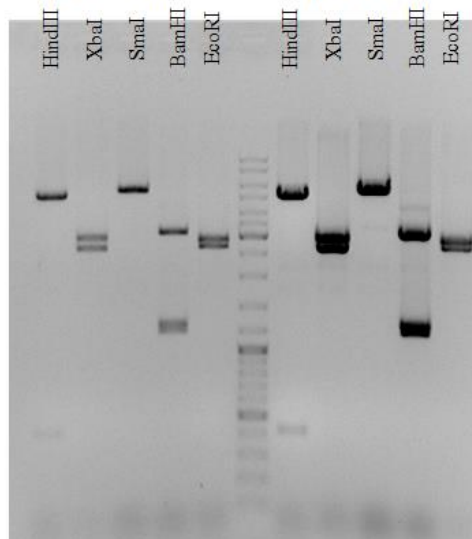
PCR program

1. 94°C for 2min
2. 94°C for 30sec
3. 54°C for 30sec
4. 72°C for 1min 45sec
5. Go to 2, 16 times
6. 72°C for 10min
7. 10°C forever
8. end.

Τα προϊόντα PCR κλωνοποιήθηκαν στη SmaI θέση του φορέα κλωνοποίησης pUC19.

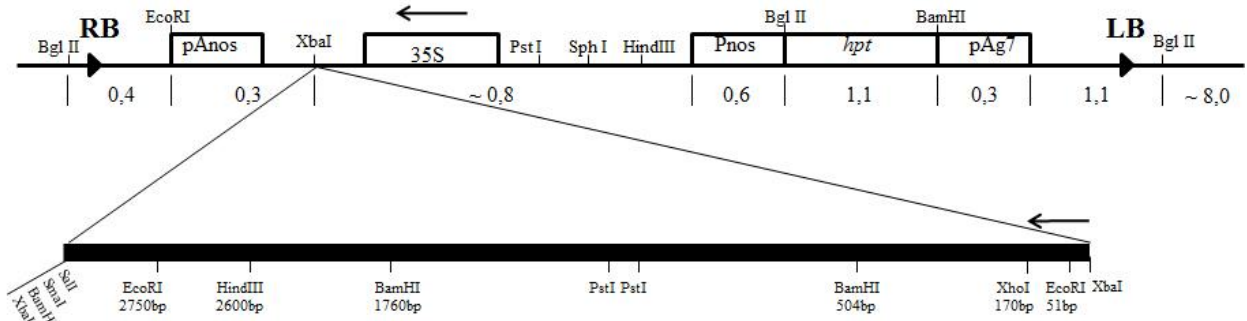


**Native Lon1-FLAG/ Long Lon1-FLAG/
pUC19 #3 pUC19 #1**



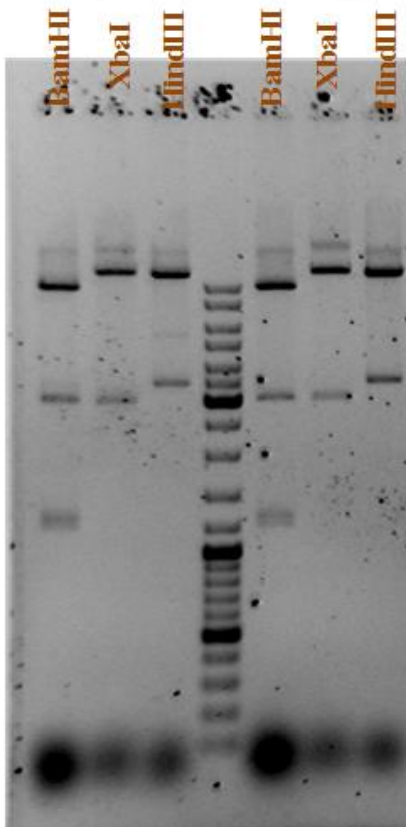
Οι κλώνοι στάλθηκαν για αλληλούχιση DNA για να πιστοποιηθεί ότι δεν έχει γίνει κάποιο λάθος κατά την ενίσχυση του τμήματος με PCR.

Αφού πιστοποιήθηκε ότι οι κλώνοι δεν έχουν λάθη, απομονώθηκαν τα τμήματα Lon1-Long::FLAG και Lon1-Native::FLAG από τον pUC19 με πέψη με το ένχυμο XbaI και κλωνοποιήθηκε στην XbaI θέση του φορέα HYG35S w/o GUS. Ο χάρτης καθώς και οι διαγνωστικές πέψεις φαίνονται παρακάτω.



**LONG/NATIVE
Lon1-FLAG
2980bp**

**NATIVE Lon1-FLAG/
HYG35S w/o GUS
#42** **LONG Lon1-FLAG/
HYG35S w/o GUS
#7**



Πίνακας Π1. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις κατασκευές

Κατασκευή	Ορθός εκκινητής	Ανάστροφος εκκινητής
35S::Lon1-Short::FLAG	5'- AATCTAG ACCACC ATGTTAAAGCTCTTCACT TC-3	5'- ACCCGG GTCGACTAATCCTTGTAGTCCTTGTGCATCGTCATCCTTGTA GTCTTCTTGTTTGCATA GCCAAAG -3
35S::Lon1-Long::FLAG	5'- ATCTAG ACCACC ATGAAGGGCTTTGATACTA ATC -3'	5'- ACCCGG GTCGACTAATCCTTGTAGTCCTTGTGCATCGTCATCCTTGTA GTCTTCTTGTTTGCATA GCCAAAG -3
35S::Lon1-Native::FLAG	5'- ATCTAG AGGGTTT ATGAAGGGCTTTGATACT AATC -3'	5'- ACCCGG GTCGACTAATCCTTGTAGTCCTTGTGCATCGTCATCCTTGTA GTCTTCTTGTTTGCATA GCCAAAG -3

Στον ορθό εκκινητή επισημαίνεται η ακολουθία Kozak για κάθε κατασκευή, η οποία διαφοροποιεί τις κατασκευές Long και Native.

Πίνακας Π2. Οι ομόλογες πρωτεάσες Lon και οι ταυτότητες (Accession numbers) τους στις βάσεις δεδομένων, που χρησιμοποιήθηκαν στη φυλογενετική ανάλυση

	Organism	Protein	Accession number/GI	Database
1	<i>Escherichia coli</i>	EcLon	L20572.1	GenBank
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PsaLon	CEI19979.1	GenBank
3	<i>Neisseria meningitidis</i>	NmLon	AKM91016.1	GenBank
4	<i>Bacillus anthracis</i>	BaLon	BAR74666.1	GenBank
5	<i>Brevibacillus brevis</i>	BbLon	BAA00737.1	GenBank
6	<i>Rhodopseudomonas palustris CGA009</i>	RpalLon	CAE28400.1	GenBank
7	<i>Brucella melitensis</i>	BmelLon	WP_006258312.1	GenBank
8	<i>Rickettsia prowazekii</i>	RproLon	WP_004599482.1	GenBank
9	<i>Asticcacaulis biprosthecum C19</i>	AbipLon	EGF90619.1	GenBank
10	<i>Asticcacaulis excentricus CB 48</i>	AexcLon	ADU14435.1	GenBank
11	<i>Brevundimonas diminuta ATCC 11568</i>	BdimLon	EGF94186.1	GenBank
12	<i>Brevundimonas subvibrioides ATCC 15264</i>	BsubLon	ADL01060.1	GenBank
13	<i>Caulobacter segnis ATCC 21756</i>	CsegLon	ADG10710.1	GenBank
14	<i>Hirschia baltica ATCC 49814</i>	HbalLon	ACT59486.1	GenBank
15	<i>Hyphomicrobium</i>	HdenLon	ADJ23757.1	GenBank

	<i>denitrificans</i> ATCC 51888			
16	<i>Rhodomicrobium vannielii</i> ATCC 17100	RvanLon	ADP69623.1	GenBank
17	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	TaciLon	CAC12209.1	GenBank
18	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AfulLon	WP_048094921.1	GenBank
19	<i>Thermococcus onnurineus</i> NA1	ToNA1Lon	ACJ16016.1	GenBank
20	<i>Pyrococcus abyssi</i> GE5	PyrabLon	CCE71040.1	GenBank
21	<i>Natrialba magadii</i> ATCC 43099	NmagLon	ACR43883.1	GenBank
22	<i>Haloferax volcanii</i> DS2	HvolLon	ADE03261.1	GenBank
23	<i>Halobacterium</i> sp. NRC-1	HaspLon	Q9HSC3.1	GenBank
24	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> str. Delta H	MtheLon	AAB85287.1	GenBank
25	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PIM1	NP_009531.1	GenBank
26	<i>Debaryomyces</i>	DhLon1	XM_461277.1	GenBank
27	<i>hansenii</i>	DhLon2	XM_461623.1	GenBank
28	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	SpomLon	NM_001018434.2	GenBank
29	<i>Podospira anserina</i>	PaLon	XM_001909167.1	GenBank
30	<i>Neurospora crassa</i>	NcrLon	XM_956733.2	GenBank
31	<i>Aspergillus nidulans</i>	AnidLon1	XM_658705.1	GenBank
32		AnidLon2	XM_652634.1	GenBank
33	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CrLon	Cre06.g281350	Phytozome v11
34	<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	OstLon1	52138	Phytozome v11
35	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	CmLon	XM_005537991.1	GenBank
36	<i>Betaphycus gelatinae</i>	BgellLon	scaffold-BWVJ-2023720	
37	<i>Gymnogongrus ftabelliformis</i>	GftaLon	scaffold-CKXF-2021577	
38	<i>Grateloupia livida</i>	GliLon	scaffold-IKIZ-2014010	
39	<i>Chondrus crispus</i>	CcrLon	scaffold-UGPM-2025311	
40	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	PhtrLon	XP_002177685.1	GenBank
41	<i>Aureococcus anophagefferens</i>	AanLon	XP_009036322.1	GenBank
42	<i>Klebsormidium flaccidum</i>	KflLon1	GAQ85015.1	
43		KflLon2	GAQ80864.1	
44	<i>Physcomitrella patens</i>	PpaLon1	Ppa013G045800.1	Phytozome v11
45		PpaLon2	Ppa009G052300.1	Phytozome v11
46		PpaLon3	Ppa014G027500.1	Phytozome v11
47		PpaLon4	Ppa010G035500.1	Phytozome v11
48	<i>Sphagnum fallax</i>	SfaLon1	Sphfalx0000s0309	Phytozome v11
49		SfaLon2	Sphfalx0028s0086	Phytozome v11
50		SfaLon3	Sphfalx0067s0036	Phytozome v11
51	<i>Selaginella moellendorffii</i>	SmoLon1	30423	Phytozome v11
52		SmoLon2	141788	Phytozome v11
53	<i>Polypodium</i>	PglLon1	scaffold-CJNT-2015764	BLAST4OneKP

54	<i>glycyrrhiza</i>	PglLon2	scaffold-CJNT-2015550	BLAST4OneKP
55	<i>Pinus radiata</i>	PraLon1	scaffold-DZQM-2010487	BLAST4OneKP
56		PraLon2	scaffold-DZQM-2011601	BLAST4OneKP
57	<i>Taxus baccata</i>	TbaLon1	scaffold-WWSS-2045478	BLAST4OneKP
58		TbaLon2	scaffold-WWSS-2009981	BLAST4OneKP
59	<i>Cedrus libani</i>	CliLon1	scaffold-GGEA-2015614	BLAST4OneKP
60		CliLon2	scaffold-GGEA-2014019	BLAST4OneKP
61	<i>Picea engelmannii</i>	PenLon1	scaffold-AWQB-2011310	BLAST4OneKP
62		PenLon2	scaffold-AWQB-2057042	BLAST4OneKP
63	<i>Pinus parviflora</i>	PparLon1	scaffold-IIOL-2015937	BLAST4OneKP
64		PparLon2	scaffold-IIOL-2080175	BLAST4OneKP
65	<i>Pinus jeffreyi</i>	PjeLon1	scaffold-MFTM-2017946	BLAST4OneKP
66		PjeLon2	scaffold-MFTM-2017463	BLAST4OneKP
67	<i>Amborella trichopoda</i>	AtrLon1	evm_27.model.AmTr_v1.0_scaffold00045.207	Phytozome v11
68		AtrLon2	evm_27.model.AmTr_v1.0_scaffold00048.1	Phytozome v11
69	<i>Brachypodium distachyon</i>	BdiLon1	Bradi1g17070.1	Phytozome v11
70		BdiLon2	Bradi4g36160.1	Phytozome v11
71	<i>Brachypodium stacei</i>	BstLon1	Brast06G000600.1	Phytozome v11
72		BstLon2	Brast05G192600.1	Phytozome v11
73	<i>Oryza sativa</i>	OsLonP3	LOC_Os07g48960.1	Phytozome v11
74		OsLonP1	LOC_Os03g19350.1	Phytozome v11
75		OsLonP4I1	LOC_Os09g36300.1	Phytozome v11
76	<i>Sorghum bicolor</i>	SbiLon1	Sobic.002G426400	Phytozome v11
77		SbiLon3	Sobic.002G276100	Phytozome v11
78		SbiLon2	Sobic.001G396500	Phytozome v11
79	<i>Ananas comosus</i>	AnanaLon1	Aco001786.1	Phytozome v11
80		AnanaLon2	Aco013116.1	Phytozome v11
81	<i>Musa acuminata</i>	MacLon1	GSMUA_Achr7T05610_001	Phytozome v11
82		MacLon2	GSMUA_Achr2T03430_001	Phytozome v11
83		MacLon3	GSMUA_Achr1T07700_001	Phytozome v11
84	<i>Theobroma cacao</i>	TcLon1	Thecc1EG026762t1	Phytozome v11
85		TcLon2	Thecc1EG015805t1	Phytozome v11
86	<i>Populus trichocarpa</i>	PtrLon1	Potri.013G008900	Phytozome v11
87		PtrLon3	Potri.005G017600	Phytozome v11
88		PtrLon2	Potri.003G086000	Phytozome v11
89		PtrLon4	Potri.001G148400	Phytozome v11
90	<i>Salix purpurea</i>	SpuLon1	SapurV1A.0088s0360	Phytozome v11
91		SpuLon2	SapurV1A.0241s0060	Phytozome v11
92		SpuLon3	SapurV1A.0132s0230	Phytozome v11
93	<i>Cannabis sativa</i>	WeedLon1	scaffold-PMRP-2042825	Phytozome v11
94		WeedLon2	scaffold-PMRP-2000042	Phytozome v11
95	<i>Glycine max</i>	GmaLon1	Glyma.20G097700	Phytozome v11
96		GmaLon3	Glyma.10G147200	Phytozome v11
97		GmaLon2	Glyma.17G151100	Phytozome v11
98		GmaLon4	Glyma.01G203100	Phytozome v11
99		GmaLon5	Glyma.05G068600	Phytozome v11
100	<i>Medicago truncatula</i>	MtrLon1	Medtr1g084020	Phytozome v11
101		MtrLon2	Medtr4g099020	Phytozome v11
102		MtrLon3	Medtr5g013790	Phytozome v11
103	<i>Eucalyptus grandis</i>	EgrLon1	Eucgr.L00266	Phytozome v11
104		EgrLon2	Eucgr.E00326	Phytozome v11
105	<i>Carica papaya</i>	CpaLon1	evm.model.supercontig_48.159	Phytozome v11
106		CpaLon2	evm.model.supercontig_76.10	Phytozome v11
107	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AaLon1	scaffold-TZWR-2047165-	BLAST4OneKP

108		AaLon4	KFK37994.1	BLAST4OneKP
109		AaLon2	scaffold-TZWR-2003683	BLAST4OneKP
110	<i>Arabidopsis lyrata</i>	AllLon1	489519	Phytozome v11
111		AllLon2	494276	Phytozome v11
112		AllLon3	903431	Phytozome v11
113		AllLon4	477873	Phytozome v11
114	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtLon1	At5g26860	Phytozome v11
115		AtLon2	At5g47040	Phytozome v11
116		AtLon3	At3g05780	Phytozome v11
117		AtLon4	At3g05790	Phytozome v11
118	<i>Capsella grandiflora</i>	CgLon1	Cagra.0418s0008.1	Phytozome v11
119		CgLon4	Cagra.7786s0005.1	Phytozome v11
120		CgLon2	Cagra.3060s0001.1	Phytozome v11
121	<i>Capsella rubella</i>	CrLon1	Carubv10003733m	Phytozome v11
122		CrLon4	Carubv10012917m	Phytozome v11
123		CrLon2	Carubv10025858m	Phytozome v11
124	<i>Eutrema salsugineum</i>	EsLon1	Thhalv10003617m	Phytozome v11
125		EsLon4	Thhalv10022093m	Phytozome v11
126		EsLon2	Thhalv10000767m	Phytozome v11
127	<i>Homo sapiens</i>	HsLonP1	NP_004784.2	GenBank
128		HsLonP2	NP_113678.2	GenBank
129	<i>Pan troglodytes</i>	ChimpLonP1	XP_001143873.1	GenBank
130		ChimpLonP2	XP_520624.3	GenBank
131	<i>Mus musculus</i>	MusLon1	NP_083058.2	GenBank
132		MusLon2	NP_080103.1	GenBank
133	<i>Rattus norvegicus</i>	RatLon1	NP_596895.1	GenBank
134		RatLon2	XP_006255300.1	GenBank
135	<i>Cavia porcellus</i>	HamsterLonP1	XP_003460978.3	GenBank
136		HamsterLonP2	XP_003469479.1	GenBank
137	<i>Bos taurus</i>	CowLonP1	NP_001015569.2	GenBank
138		CowLonP2	NP_001029895.1	GenBank
139	<i>Canis lupus familiaris</i>	DogLonP1	XP_854391.3	GenBank
140		DogLonP2	XP_003638980.1	GenBank
141	<i>Ficedula albicollis</i>	FaLonP1X3	XM_005059949.1	GenBank
142		FaLonP2	XM_005052701.1	GenBank
143	<i>Falco cherrug</i>	FcLonP1	XM_005444300.2	GenBank
144		FcLonP2	XM_005444608.1	GenBank
145	<i>Falco peregrinus</i>	FpLonP1	XM_005234991.2	GenBank
146		FpLonP2	XM_005233841.2	GenBank
147	<i>Gallus gallus</i>	GalLonP1	XM_001232111.3	GenBank
148		GalLonP2	NM_001199220.1	GenBank
149	<i>Haliaeetus leucocephalus</i>	HleuLonP1	XM_010580684.1	GenBank
150		HleuLonP2	XM_010585031.1	GenBank
151	<i>Meleagris gallopavo</i>	MgalLonP1	XM_010726488.1	GenBank
152		MgalLonP2	XM_010717787.1	GenBank
153	<i>Pelecanus crispus</i>	PcrLonP1X1	XM_009487939.1	GenBank
154		PcrLonP2	XM_009479588.1	GenBank
155	<i>Danio rerio</i>	DreLonP1	XP_691712.4	GenBank
156		DreLonP2	NP_001008573.1	GenBank
157	<i>Salmo salar</i>	SsaLonP1	BT059241.1	GenBank
158		SsaLonP2	NM_001173599.1	GenBank
159	<i>Callorhynchus milii</i>	CmLonP1	XM_007908297	GenBank
160		CmLonP2	XM_007889424.1	GenBank

