ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Η επίδραση της τροποποιημένης ισομορφής της πρωτεάσης LON1 στην ανάπτυξη του Arabidopsis thaliana

Φεγγούλα Θ. Αυγέρη

Επιβλέπων Καθηγητής: Δάρας Γεράσιμος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Η επίδραση της τροποποιημένης ισομορφής της πρωτεάσης LON1 στην ανάπτυξη του Arabidopsis thaliana

"The effect of the genetically modified LON1 protease's isoform in the growth of *Arabidopsis thaliana*"

Φεγγούλα Θ. Αυγέρη

<u>Εξεταστική Επιτροπή</u>:

Γεράσιμος Δάρας, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής ΓΠΑ

Σταμάτης Ρήγας, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Η επίδραση της τροποποιημένης ισομορφής της πρωτεάσης LON1 στην ανάπτυξη του Arabidopsis thaliana

Τμήμα Βιοτεχνολογίας Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ενδοκυτταρική επιλεκτική πρωτεόλυση αποτελεί ένα σημαντικό μετα-μεταφραστικό ρυθμιστικό μηχανισμό διατήρησης της πρωτεϊνικής ομοιόστασης, μέσω της αφαίρεσης μηλειτουργικών, κατεστραμμένων ή τοξικών πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων. Η ΑΤΡεξαρτώμενη LON πρωτεάση κατέχει πρωταγωνιστικό ρόλο κατά τον ποιοτικό έλεγχο των πρωτεϊνών. Παρά όμως την υψίστης σημασίας δράση της, ιδίως στη διατήρηση της μιτοχονδριακής ομοιόστασης και την πολύχρονη μελέτη της συγκεκριμένης πρωτεάσης, πολύ λίγα είναι γνωστά για τον τρόπο λειτουργίας της και την επιλογή των υποστρωμάτων της. Η διεξαγωγή *in vivo* πειραμάτων παγίδας υποστρωμάτων-στόχων του συστήματος LON μέσω της χρήσης ανενεργών καταλυτικά LON πρωτεασών και η συγκριτική μελέτη των ανωτέρω, θα συμβάλει στην αποσαφήνιση του ειδικού ρόλου της συγκεκριμένης πρωτεάσης κατά τον ποιοτικό έλεγχο των πρωτεϊνών.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η δημιουργία διαγονιδιακής κατασκευής η οποία θα οδηγεί στην έκφραση μίας πρωτεολυτικά ανενεργής ισομορφής της πρωτάσης LON1 στο φυτό Arabidopsis thaliana. Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκε η κατασκευή pLON1::LON1^{trap}-FLAG μέσω τεχνικών μοριακής κλωνοποίησης. Το διαγονίδιο lon1^{trap} φέρει τις μεταλλάξεις S(841)A & K(884)A στην καταλυτική δυάδα του πρωτεολυτικού κέντρου της LON1 ώστε να αποτρέπεται η πρωτεόλυση των πρωτεϊνών-στόχων της. Μεταλλάγματα lon1-1 και lon1-1 με έκφραση του γονιδίου αναφοράς της πρωτεϊνής GFP στα μιτοχόνδρια, τα οποία εκφράζουν μία μη λειτουργική ισομορφή της πρωτεάσης LON1, μετασχηματίστηκαν μέσω μεθοδολογίας σταθερού μετασχηματισμού με την παραπάνω κατασκευή. Στη συνέχεια, ακολούθησαν βιομετρικές αναλύσεις μήκους πρωτογενούς ρίζας στους απογόνους της T2 γενιάς μετασχηματισμένων φυτών. Η έκφραση της LON1^{trap} επιβεβαιώθηκε στις επιλεγμένες σειρές

Ο πειραματικός σχεδιασμός περιλαμβάνει όλες τις απαραίτητες παραμέτρους για τη δημιουργία επιτυχούς συστήματος παγίδας υποστρωμάτων-στόχων της LON1 πρωτεάσης όπως, τη χρήση ενδογενούς προαγωγέα *LON1*, τη σήμανση της LON1^{trap} και το γενετικό υπόβαθρο στο οποίο η LON1 είναι μη λειτουργική. Τα αποτελέσματα των βιομετρικών αναλύσεων, φανερώνουν ότι η LON1^{trap}, ίσως να διατηρεί την ικανότητά της ως μοριακός συνοδός αναστρέφοντας κατά το ήμισυ τον επιβαρυμένο φαινότυπο των *lon1-1* φυτών. Επιπλέον, η ύπαρξη του γονιδίου αναφοράς της πρωτεΐνης GFP στο γενετικό υπόβαθρο μετασχηματισμένων φυτών, φαίνεται να επιβαρύνει περαιτέρω την ομοιόσταση των μιτοχονδρίων σε ορισμένες σειρές φυτών, οδηγώντας στο φαινόμενο της μιτοχονδριακής όρμησης. Η κατανόηση του μοριακού μηχανισμού άμυνας των φυτικών οργανισμών έναντι των περιβαλλοντικών αλλαγών με την δράση της πρωτεάσης LON, αναμένεται να συνεισφέρει στη διασφάλιση της πρωτογενούς παραγωγής. Η χρήση των *in vivo* συστημάτων παγίδας υποστρωμάτων είναι η ιδανική πειραματική στρατηγική για την κατανόηση της λειτουργίας του συστήματος Lon στις παραπάνω μοριακές διεργασίες.

Επιστημονική περιοχή: Μοριακή Βιολογία

Λέξεις κλειδιά: πρωτεόλυση, ομοιόσταση πρωτεϊνών, παγίδες υποστρωμάτων, Arabidopsis thaliana

The effect of the genetically modified LON1 protease's isoform in the growth of Arabidopsis thaliana Department of Biotechnology Laboratory of Molecular Biology

Abstract

Intracellular selective proteolysis is an important post-translational regulatory mechanism maintaining protein quality control by removing defective, damaged or even deleterious protein aggregates. ATP-dependent LON protease plays a crucial role in the protein quality control. However, despite the high importance of LON's action, especially concerning the maintenance of mitochondrial homeostasis -as well as the long-term study of this protease-there are not accurate information about how it functions and how it recognizes its substrates. Conducting in *vivo trap* experiments of LON's substrate targets using catalytically inactive LON proteases and the comparative study of the above, will help to understand the specific role of this protease in the protein quality control.

The aim of this thesis is the creation of a transgenic construct that will lead to the expression of a proteolytically inactive isoform of protease LON1 in the plant *Arabidopsis thaliana*. We create the construct *pLON1::LON1^{trap}-FLAG* through molecular cloning techniques. The *lon1^{trap}* transgene carries the mutations S(841)A & K(884)A in the catalytic dyad of LON1's proteolytic site, with the aim of preventing LON1 proteolysis. The mutants *lon1-1* and *lon1-1* expressing GFP protein in mitochondria, express a non-functional isoform of LON1. The above mutants were used as a genetic background for stable transformation with the construct carrying the transgene *lon1^{trap}*. This was followed by biometric analyzes of primary root length in the offspring of the T2 generation of transformed plants. The expression of *LON1^{trap}* was confirmed in selected plant lines by Western Blot immunoblotting technique.

The experimental design includes all the necessary parameters for the creation of a successful substrate trap. This refers to the use of an endogenous LON1 promoter, the tagging of LON1^{trap} with FLAG and the use of a genetic background in which LON1 is non-functional. The biometric analyzes results show that LON1^{trap} seems to maintain its ability to function as a chaperone by reversing in half the aggravated phenotype of *lon1-1* plants. In addition, the presence of GFP protein in the genetic background of transformed plants appears to further aggravate mitochondrial homeostasis in some plant lines, leading to the phenomenon of Mitochondrial Hormesis (Mitohormesis). The understanding of the molecular defense mechanisms in plants

via LON's action, is expected to contribute to primary production. The use of *in vivo* trapping is the ideal experimental strategy for exploring the Lon proteolysis system in the above molecular processes.

Scientific area: Molecular Biology

Key words: proteolysis, protein homeostasis, substrate traps, Arabidopsis thaliana

Θέλω ειλικρινά να ευχαριστήσω τον Επικ. Καθηγητή και Επιβλέποντα Γεράσιμο Δάρα, τον Αναπ. Καθηγητή Σταμάτη Ρήγα όσο και τον μεταδιδακτορικό φοιτητή Ντικράν Τσιτσεκιάν για την πολύτιμη βοήθεια τους για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Πολυδεύκη Χατζόπουλο, ως μέλος της εξεταστικής επιτροπής, για την πρόθυμη συμμετοχή του στην εξέτασή μου και τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε σε αυτή, καθώς επίσης και όλα τα μέλη του Εργαστηρίου για την πολύτιμη βοήθειά τους.

Η ανάθεση της παρούσας μελέτης έγινε με απόφαση της 8ης Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Βιοτεχνολογίας στις 21/12/2020 κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η τριμελής Συμβουλευτική Εξεταστική Επιτροπή της μελέτης.

Συμβουλευτική Εξεταστική Επιτροπή της μελέτης: Γεράσιμος Δάρας, Επίκουρος. Καθηγητής (Επιβλέπων) Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής (Μέλος) Σταμάτης Ρήγας, Αναπληρωτής Καθηγητής (Μέλος) Περιεχόμενα

Εισαγωγή	2
1.1 Ο μηχανισμός της πρωτεόλυσης	3
1.2 ΑΑΑ+ πρωτεάσες	4
1.2.1 Η πρωτεάση CLP	5
1.2.2 Η πρωτεάση FTSH	6
1.2.4 Η πρωτεάση LON	7
1.2.4.1 Η επιλογή υποστρωμάτων από τη LON	9
1.2.4.2 Η μετατόπιση των υποστρωμάτων στον πρωτεολυτικό χώρο της LON	11
1.2.4.3 Ο μηχανισμός πρωτεόλυσης στη LON	13
1.3 Η χρήση τεχνικών παγίδας υποστρωμάτων	14
1.3.1 Η στρατηγική στα πειράματα παγίδας υποστρωμάτων	16
1.3.1 In vivo παγίδες υποστρωμάτων	16
1.4 Ο ρόλος της LON στα μιτοχόνδρια	17
1.4.1 Η πρωτεάση LON στο <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
1.5 Σκοπός & Στόχοι πειραμάτων	22
Υλικά & Μέθοδοι	25
2.1 Φυτικό υλικό	26
2.2 Συνθήκες καλλιέργειας Arabidopsis thaliana	26
2.3 Πρωτόκολλο απομόνωσης γονιδιωματικού DNA από Arabidopsis	26
2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	27
2.4.1	27
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)-γενικό πρωτόκολλο για την ενίσχυση τμημάτ DNA:	ων 27
2.4.2 PCR αποικιών	28
2.5 Ανάλυση δεσοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA)	28
2.6 Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης	30
2 .7 Ενοποίηση τμημάτων με κολλώδη άκρα	30
2.8 Βακτηριακά κύτταρα και μετασχηματισμός	30
2.8.1 Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων Escherichia coli	30
2.8.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων Escherichia coli με πλασμιδιακό DNA	31
2.9 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων Agrobacterium tumefaciens με ηλεκτροπόρ	ωση. 32
2.10 Αποθήκευση για μεγάλα χρονικά διαστήματα βακτηριακών κυττάρων	33
2.11 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα Escherichia coli	33
2.11.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης	33
2.11.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την βοήθεια κολώνας QIAGEN	34
2.12 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από Agrobacterium tumefaciens	34

2.13 Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού	35
2.14 Μετασχηματισμός Arabidopsis thaliana	35
2.14.2 Ανάπτυξη φυτών και διείσδυση με κατάλληλο στέλεχος Agrobacterium	36
2.14.3 Επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών της Τ1 γενιάς	36
2.15 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικών πρωτεϊνών από Arabidopsis	37
2. 16 Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)	38
2.17 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών-Western Blot	40
2.17.1 Επώαση με τα αντισώματα	41
2.17.2 Εμφάνιση σε φιλμ (σε σκοτεινό δωμάτιο, με τη χρήση κόκκινου φωτός)	41
2.18 Υδατικά διαλύματα και θρεπτικά μέσα βακτηριακών κυττάρων και φυτών	42
2.18.1 Διαλύματα ανάπτυξης βακτηρίων - σχετικά αντιδραστήρια	42
2.18.2 Διαλύματα ενζύμων και απομόνωσης πλασμιδιακού DNA	42
2.18.3 Διαλύματα απομόνωσης γονιδιωματικού DNA	42
2.18.4 Διαλύματα και θρεπτικά μέσα ιστοκαλλιέργειας και μετασχηματισμού φυτών	43
2.18.5 Διαλύματα απομόνωσης ολικών πρωτεϊνών	44
2.18.6 Διαλύματα πηκτής πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)	44
Αποτελέσματα	45
3.1 Η μετάλλαξη S841A & K884A στη LON1 πρωτεάση	46
3.2 Διαγονιδιακή κατασκευή <i>pLON1::LON1^{trap}-FLAG</i>	48
3.3 Διαγονιδιακές σειρές φυτών με το γονίδιο <i>LON1^{trap}</i>	50
3.4 Η κατασκευή PLon1:Lon1 ^{trap} -Flag αναστρέφει σε διαφορετικό βαθμό ανάλογα με το υπόβαθρο το φαινότυπο του <i>lon1-1.</i>	51
3.5 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών LON1 ^{trap}	55
Συζήτηση	57
4.1 Οι σημειακές μεταλλάξεις στην καταλυτική δυάδα του πρωτεολυτικού κέντρου της LON αναστέλλουν την πρωτεολυτική της δράση	58
4. 2 Η ενσωμάτωση των απαραίτητων παραμέτρων για ένα αποτελεσματικό σύστημα παγίδαα υποστρωμάτων	60
4.3 Μιτοχονδριακή όρμηση (hormesis)	61
4.3 Συμπεράσματα και Προοπτικές	63
Βιβλιογραφία	65

Εικόνα 1 Ο βασικός μηχανισμός των ΑΑΑ+ πρωτεασών	. 5
Εικόνα 2 Η οργάγνωση της CLP στον χλωροπλάστη του Arabidopsis Thaliana	. 6
Εικόνα 3 Η απεικόνιση της FTSH πρωτεάσης στο Ε. coli	. 7
Εικόνα 4 Η οικογένεια LONA και LONB	. 8
Εικόνα 5 Το δωδεκαμερές σύμπλοκο της LON πρωτεάσης	11
Εικόνα 6 Ο μηχανισμός μετατόπισης υποστρωμάτων της LON στο Yersinia pestis	12

Εικόνα 7 Η αναδιάταξη της LON παρουσία και απουσία υποστρώματος στο Yersinia pestis 14
Εικόνα 8 Η σχηματική απεικόνιση του in vivo συστήματος παγίδευσης υποστρωμάτων
Εικόνα 9 Υποκυτταρική τοποθέτηση των ισομορφών της πρωτεάσης Lon του φυτού Arabidopsis
thaliana
Εικόνα 10 Σχηματική αναπαράσταση της κατασκευής πρωτεολυτικά ανενεργής LON1
Εικόνα 11 Πολλαπλή ευθυγράμμιση του πρωτεολυτικού τμήματος της Lon πρωτεάσης
Εικόνα 12 Η κατασκευή pLON1::LON1-FLAG στο pUC19
Εικόνα 13 Εισαγωγή του τροποποιημένου τμήματος με την μετάλλαξη S841A- K884A στο pUC19.49
Εικόνα 14 Χάρτης των μεταλλάξεων S(841)A (AGT \rightarrow GCT) και K(884)A (AAA \rightarrow GCT)50
Εικόνα 15 Χάρτης του HPT-pAnos XS με την κατασκευή pLON1:LON1 ^{trap} -FLAG
Εικόνα 16 Διαδικασία επιλογής μετασχηματισμένων φυτών
Εικόνα 17 Μετασχησμένα φυτά lon1-1 με την κατασκευή pLON1::LON1 ^{trap} -FLAG ηλικίας 5 ημερών 52
Εικόνα 18 Μετασχηματισμένα φυτά lon1-1-mito-gfp με την κατασκευή pLON1::LON1 ^{trap} -FLAG
ηλικίας 5 ημερών
Εικόνα 19 Western Blot lon1-1 φυτών που φέρουν την κατασκευή pLON1::LON1 ^{trap} -FLAG
Εικόνα 20 Western Blot lon1-1-mito-gfp φυτών που φέρουν την κατασκευή pLON1::LON1 ^{trap} -FLAG
Εικόνα 21 μιτοχονδριακή όρμηση63

Πίνακας 1 Διαγονιδιακές σειρές φυτών με το γονίδιο LON1 ^{trap}	51
Πίνακας 2 Πειράματα όπου απενεργοποιήθηκε η πρωτεολυτική ενεργότητα της LON πρωτεάσης	
μέσω της τροποποίησης της καταλυτικής δυάδας Σερίνης-Λυσίνης	58

1 Γράφημα 1 Διασπορά των μετρήσεων του μήκους πρωτογενούς ρίζας σε αρτίβλαστα 5 ημερών T2
γενιάς μετασχηματισμένων lon1-1 μεταλλάγματων με την κατασκευή pLON1::LON1 ^{trap} -FLAG 53
2 Γράφημα 2 Διασπορά των μετρήσεων του μήκους πρωτογενούς ρίζας σε αρτίβλαστα 5 ημερών Τ2
γενιάς μετασχηματισμένων lon1-1 mito-gfp μεταλλάγματων με την κατασκευή pLON1::LON1 ^{trap} -
FLAG
3 Γράφημα 3 Μέσοι όροι μήκους πρωτογενούς ρίζας σε αρτίβλαστα 5 ημερών Τ2 γενιάς
μετασχηματισμένων lon1-1 μεταλλάγματων με την κατασκευή pLON1::LON1 ^{trap} -FLAG (lines 3 και 5
πείραμα 1) και lon1-1 mito-gfp φυτών με την κατασκευή pLON1::LON1 ^{trap} -FLAG (lines 1, 2 και 4
πείραμα 2)

Εισαγωγή

1.1 Ο μηχανισμός της πρωτεόλυσης

Η πρωτεόλυση είναι η διαδικασία κατά την οποία πραγματοποιείται υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών των πρωτεϊνών οδηγώντας στη διάσπαση των τελευταίων στα βασικά συστατικά τους, τα πεπτίδια και τα αμινοξέα. Στο σύνολο τους οι βιολογικές ενδοκυτταρικές λειτουργίες βασίζονται στην ομοιόσταση και στην ανακύκλωση των πρωτεϊνών. Κατά αυτόν τον τρόπο η μοίρα των πρωτεϊνών καθορίζεται από τη ρυθμιζόμενη βιοσύνθεση νέων πολυπεπτιδίων και την εξειδικευμένη αποδόμηση των προϋπάρχοντων πρωτεϊνικών μορίων. Η πρωτεόλυση επομένως, χρησιμοποιείται από τον οργανισμό, ως μέσο ρύθμισης των κυτταρικών διεργασιών μειώνοντας τη συγκέντρωση μίας πρωτεϊνης, μετατρέποντας την στη δραστική της μορφή, είτε παρέχοντας τα απαιτούμενα αμινοξέα για τη σύνθεση μίας διαφορετικής πρωτεΐνης. Επιπλέον, μπορεί να είναι το αποτέλεσμα δυσμενών κυτταρικών συνθηκών όπως η ακραία θερμοκρασία, η οξύτητα και η αλατότητα κ.α. που διαταράσσουν τα μόρια των πεπτιδικών δεσμών και επιφέρουν τη διάσπαση τους, επομένως και την ανατροπή της ομοιόστασης των κυττάρων. Έτσι η πρωτεόλυση δρα ως μέσο ελέγχου της ομοιόστασης διασπώντας τις ανεπιθύμητες πρωτεΐνες για την πρόληψη της δυνητικά επιβλαβούς συσσώρευσης μη φυσικών πολυπεπτιδίων στο κύτταρο (Beynon & Bond 1986).

Συγκεκριμένα, οι λειτουργικές πρωτεΐνες σχηματίζονται από πολυπεπτίδια τα οποία έχουν υποστεί αρκετά βήματα αναδίπλωσης και μετα-μεταφραστικής τροποποίησης. Ως εκ τούτου, εγκυμονούν αρκετές παγίδες όπου μη-φυσιολογικά είδη πολυπεπτιδίων ή διατάξεων μπορούν να σχηματιστούν και να επηρεάσουν τις βιολογικές λειτουργίες ενός οργανισμού. Αυτές οι μη φυσιολογικές μορφές πρωτεϊνών μπορούν να προκύψουν από λάθη κατά τη διάρκεια της μετάφρασης, μη ορθής αναδίπλωσης των αναδυόμενων πολυπεπτιδίων, από βλάβες στις ενδογενείς πρωτεΐνες, από οξειδωτικά γεγονότα ή ακόμα και μη ορθή στοιχειομετρία των υπομονάδων των πρωτεϊνικών συμπλόκων (Adam, 2000; Schaller, 2004). Στο κυτταρόπλασμα αυτά τα μη φυσιολογικά μόρια απομακρύνονται κατά κύριο λόγο μέσω του μονοπατιού του **26S πρωτεασώματος**, το οποίο συμπεριλαμβάνει την ουμπικουιτινίωση ενός πρωτεϊνικού υποστρώματος και την επακόλουθη αποδόμηση του σε πεπτίδια και τέλος σε αμινοξέα τα οποία μπορούν να ανακυκλωθούν (Hershko & Ciechanover, 1998). Ωστόσο, τα κύρια μονοπάτια που εμπλέκονται στη δράση του 26S πρωτεασώματος δεν είναι άμεσα διαθέσιμα για την απομάκρυνση τέτοιου είδους εν δυνάμει επιβλαβών πρωτεϊνών στα ενδοοργανιδιακά διαμερίσματα του κυττάρου. Επομένως, τα μιτοχόνδρια, οι χλωροπλάστες (φυτά) και τα υπεροξυσώματα διαθέτουν εναλλακτικές οδούς οι οποίες καθορίζονται από

δίκτυα **μοριακών συνοδών** (chaperones) και **πρωτεασών** με σκοπό τη διατήρηση της ομοιόστασης των πρωτεϊνών.

1.2 ΑΑΑ⁺ πρωτεάσες

Οι **ΑΑΑ**⁺ **πρωτεάσες** είναι μία ειδική ομάδα **ΑΤΡ-εξαρτώμενων πρωτεασών** των οποίων η επιλογή υποστρωμάτων δεν περιλαμβάνει ουμπικουιτινίωση. Οι παραπάνω ομάδα πρωτεασών συναντάται σε ευβακτήρια όσο και στους ευκαρυώτικους οργανισμούς (Liao, 2019). Οι πρωτεΐνες της οικογένειας ΑΑΑ⁺ (ATPases που σχετίζονται με διάφορες κυτταρικές δραστηριότητες) ανήκουν σε ένα ευρύ σύνολο από ένζυμα τα οποία χαρακτηρίζονται από τον σχηματισμό ολιγομερών δακτυλίων, κυρίως **εξαμερών**. Η δομική μονάδα των ΑΑΑ⁺ πρωτεϊνών, χαρακτηρίζεται από την περιοχή ΑΑΑ⁺ που αποτελείται από 220-250 αμινοξέα με ή και χωρίς επαναλήψεις. Γενικά, η περιοχή **ΑΑΑ**⁺ καθορίζει την **επιλογή των στόχων** και τη ρύθμιση της **λειτουργίας της ΑΤΡ υδρόλυσης** (Sauer & Baker, 2011; Snider et al., 2008).

Η μηχανική βάση της λειτουργίας πολλών μελών της οικογένειας είναι η σάρωση γραμμικών μορίων, κυρίως πολυπεπτιδίων αλλά και DNA, μέσα από έναν κεντρικό πόρο, ωθούμενη από τις ATP-εξαρτώμενες δομικές αλλαγές της ΑΑΑ περιοχής (Hanson & Whiteheart, 2005) όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 1. Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτών των πρωτεασών είναι ότι τα ενεργά τους κέντρα βρίσκονται προστατευμένα στο περιβάλλον του συμπλόκου των ολιγομερών. Το πρωτεϊνικό σύμπλοκο σχηματίζει ένα εσωτερικό θάλαμο αποικοδόμησης έτσι ώστε τα πολυπεπτίδια τα οποία εισέρχονται προς αποικοδόμηση να έχουν τη δυνατότητα εισόδου στο θάλαμο μέσω μίας ενεργής και ρυθμιζόμενης διαδικασίας μετατόπισης υποστρωμάτων (Voos & Pollecker, 2020). Ένα ακόμη σημαντικό γνώρισμα, αφορά ότι τα συγκεκριμένα συστήματα έχουν διττή λειτουργία, δρουν δηλαδή ως πρωτεολυτικά συστήματα αλλά και ως μοριακοί συνοδοί. Αυτές οι λειτουργίες είναι διαχωρισμένες δομικά, είτε ως ξεχωριστές επικράτειες μίας αμινοξικής ακολουθίας, είτε ως δύο ξεχωριστά πολυπεπτίδια που σχηματίζουν ένα συνεργαζόμενο πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Η συγκεκριμένη μηχανική ή/και λειτουργική συνεργασία μεταξύ πρωτεασών και μοριακών συνοδών αντικατοπτρίζει το ποιοτικό σύστημα ελέγχου πρωτεϊνών, το οποίο είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της ομοιόστασης τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε μη φυσιολογικές συνθήκες. Η παραπάνω συνθήκη πρωτεϊνικής ομοιόστασης αναφέρεται και με τον όρο "πρωτεόσταση" (Voos & Pollecker, 2020).



Εικόνα 1 Ο βασικός μηχανισμός των ΑΑΑ+ πρωτεασών

Μία μικρή αμινοξική ακολουθία αποτελούμενη από αρωματικά και υδρόφοβα αμινοξέα (degron) στην επιφάνεια των υποστρωμάτων ή μία σήμανση αποδόμησης σε ένα ενδογενές υπόστρωμα, αναγνωρίζεται από την εξαμερή ΑΑΑ⁺ περιοχή αναδίπλωσης. Έπειτα διαδοχικοί κύκλοι ΑΤΡ υδρόλυσης αποδιατάσουν το υπόστρωμα μετατοπίζοντάς το μέσω ενός κεντρικού πόρου μέσα στην θάλαμο αποικοδόμησης της πρωτεάσης (Sauer & Baker, 2011).

Ο μηχανισμός ποιοτικού ελέγχου των πρωτεϊνών στα ευκαρυωτικά οργανίδια, όπως είναι τα μιτοχόνδρια, τα υπεροξυσώματα και τα πλαστίδια, πραγματοποιείται από μέλη των ATPεξαρτώμενων πρωτεασών. Τα περισσότερο μελετημένα μέλη αυτής της ομάδας πρωτεασών είναι οι CLP, οι FTSH και οι LON πρωτεάσες (Adam et al., 2001; Sinvany-Villalobo et al., 2004; Sakamoto, 2006). Οι ανωτέρω AAA⁺ πρωτεάσες χρησιμοποιούν ενέργεια ATP για να 'ξεδιπλώσουν-αποδιατάξουν' και να μετατοπίσουν τα υποστρώματα στόχους τους μέσα στον πρωτεολυτικό τους θάλαμο για την περαιτέρω διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών. Αυτά τα πρωτεολυτικά συστήματα σχηματίζουν ομο-ολιγομερή ή ετερο-ολιγομερή σύμπλοκα, εξαρτώμενα από το είδος και το πρωτεολυτικό τους σύστημα (Liao et al., 2019).

1.2.1 Η πρωτεάση CLP

Ο μηχανισμός της CLP (caseinolytic protease) συναντάται σε όλους τους προκαρυώτες και τα κυτταρικά οργανίδια των ανώτερων ευκαρυωτών που προέρχονταν από την ενδοσυμβίωση, όπως τα πλαστίδια και τα μιτοχόνδρια των ευκαρυωτών (Nishimura & Wijk, 2015; Baker & Sauer, 2012; Wang & Liu, 1997). Ο μηχανισμός αυτός συμπεριλαμβάνει αρκετά διαφορετικά στοιχεία όπως πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς, πρωτεάσες και πρωτεΐνες σύνδεσης (Nishimura & Wijk, 2015; Baker & Sauer, 2012; Chien et al., 2007). Οι πρωτεΐνες σύνδεσης αναγνωρίζουν συγκεκριμένα τμήματα πρωτεΐνών (π.χ. μικρές ακολουθίες αμινοξέων) και παραδίδουν τις σημασμένες πρωτεΐνες στο πρωτεολυτικό σύστημα (Liao & Wijk, 2019).

Οι πρωτεάσες CLP έχουν πολύπλοκη τρισδιάστατη δομή (Εικόνα 2) και αποτελούνται από

πολλαπλές υπομονάδες με διαφορετικές λειτουργίες. Ο πρωτεολυτικός πυρήνας της Clp εμπεριέχει δύο επταμερικούς δακτυλίους τοποθετημένους παράλληλα ο ένας στον άλλον σχηματίζοντας ένα στενό πόρο (Wang et al., 1998; Gribun et al., 2005). Στα βακτήρια και τα μιτοχόνδρια, οι περισσότεροι από τους πυρήνες των CLP είναι ομο-ολιγομερή, αποτελούμενοι από 14 ίδια μονομερή CLP (Wang et al., 1998; Peltier et al., 2004; Wang, 1997). Ο πρωτεολυτικός πυρήνας CLPR στον χλωροπλάστη του φυτού *Arabidopsis thaliana* αποτελεί ένα σύμπλοκο ~350 kDa, που αποτελείται από 5 διαφορετικά ισομερή CLPP (P1, P3-6) και 4 διαφορετικές μη πρωτεολυτικές υπομονάδες CLPR (R1-4) (Peltier et al., 2001). Αυτές οι υπομονάδες CLPP/R σχηματίζουν δύο επταήμερή δακτυλίους: τον Ρ-δακτύλιο (P3: P4: P5: P6= 1: 2: 3: 1) και τον R-δακτύλιο (P1: R1: R2: R3: R4= 3: 1: 1: 1) (Olinares et al., 2011).



Εικόνα 2 Η οργάγνωση της CLP στον χλωροπλάστη του *Arabidopsis Thaliana* Γενική εικόνα τη δομής της CLP στον χλωροπλάστη. (Nishimura & van Wijk, 2015). Β. Ο μηχανισμός αναγνώρισης των υποστρωμάτων της CLP πρωτεάσης. (<u>Baker & Sauer, 2012</u>).

1.2.2 Η πρωτεάση FTSH

Η πρωτεάση FtsH (ATP-dependent zinc metalloprotease) βρίσκεται ενσωματωμένη στις εσωτερικές μεμβράνες των οργανιδίων σε αντίθεση με τις πρωτεάσες LON και CLP που δεν αποτελούν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (Tomoyasu et al., 1995). Σε αντίθεση επίσης με τη πρωτεάση CLP, που αποτελείται από πολλαπλές υπομονάδες με διαφορετικές λειτουργίες, η πρωτεάση FTSH έχει τα τμήματα ΑΤΡάσης και πρωτεόλυσης στο ίδιο πολυπεπτίδιο. Το αμινο-τελικό άκρο της πρωτεάσης αναγνωρίζει τις πρωτεΐνες-στόχους, ενώ το καρβοξυ-τελικό άκρο της διαθέτει πρωτεολυτική δράση (Tomoyasu et al., 1993; Suno et al., 2006).

Το γονιδίωμα του Arabidopsis thaliana περιέχει 12 γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεάσες FTSH (Garcia-Lorenzo et al., 2006). Εκτός από τις 12 FTSH πρωτεάσες, το Arabidopsis thaliana

περιέχει επιπλέον 5 ομόλογες πρωτεΐνες, οι οποίες δεν έχουν μοτίβο πρόσδεσης ψευδαργύρου (zinc-binding motif) και άρα είναι μη λειτουργικές όσον αφορά την πρωτεόλυση (Sokolenko et al. 2002; Wagner et al. 2011a). Αυτές οι πρωτεΐνες καλούνται FTSHi. Οχτώ εκ των 12 FTSHs (FTSH 1, 2, 5-9, και 12) και οι πέντε μη ενεργές FTSHis στοχεύουν αποκλειστικά τους χλωροπλάστες (Adam et al. 2006; Ferro et al. 2010). Στα μιτοχόνδρια τοποθετούνται τρείς FTSHs πρωτεάσες (FtsH 3, 4, και 10) (Janska et al. 2010), ενώ η FTSH11 έχει διπλή στόχευση και στα δύο οργανίδια (Urantowka et al. 2005).



Εικόνα 3 Η απεικόνιση της FTSH πρωτεάσης στο E. coli

Η απεικόνιση της FTSH πρωτεάσης στο *E. coli*. με ένα υποσύνολο των μεμβρανικών και κυτταροπλασματικών της υποστρωμάτων (Krzywda et al., 2002).

1.2.4 Η πρωτεάση LON

Η δομή της πρωτεάσης LON αποτελείται από: την εκτεταμένη σε μήκος αμινοτελική περιοχή (N-domain), η οποία πιθανώς σε συνδυασμό με κεντρική περιοχή AAA⁺ που είναι η περιοχή της ATPάσης αλληλεπιδρά εκλεκτικά με τις πρωτεΐνες-στόχους, και την καρβοξυτελική πρωτεολυτική περιοχή (C-terminal), που φέρει μια καταλυτική δυάδα Σερίνης-Λυσίνης. Βάσει της πρωτεΐνικής δομής και προέλευσής τους, οι πρωτεάσες LON κατατάσσονται σε δύο υποοικογένειες τη LONA και τη LONB (Rotanova et al., 2006; Rigas et al., 2012). Η υποοικογένεια LONA καθορίζεται από την παρουσία μεγάλου σε μήκος αμινοτελικού άκρου, το οποίο εμπεριέχει πεπτίδια οδηγούς για την υποκυτταρική τοποθέτηση τους (Εικόνα 4). Αντίθετα στην υποοικογένεια LONB στη θέση του αμινμοτελικού άκρου τοποθετείται μία διαμεμβρανική περιοχή που διευκολύνει τις πρωτεάσες αυτές να δεσμεύονται πάνω στις

μεμβράνες, η οποία και αναδύεται μέσα από την περιοχή της ΑΤΡάσης. Τα μέλη της υποοικογένειας LONB απαντώνται κυρίως στα Αρχαία, στα οποία δεν εντοπίζονται οι FTSH και οι CLP πρωτεάσες, ενώ η υποοικογένεια LONA απαντάται στα βακτήρια και σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

Το τμήμα ΑΑΑ+ αποτελείται από 2 δομικές περιοχές: την περιοχή πρόσδεσης του νουκλεοτιδίου (α/β) και την περιοχή της έλικας (α). Η περιοχή α/β περιέχει συντηρημένα μοτίβα, τα sensor-1, Walker Α και Β που συμμετέχουν στην πρόσδεση και στην υδρόλυσή του ATP, καθώς και στη ρύθμιση της πρωτεολυτικής δράσης κατά τη διάρκεια των μοριακών αλληλεπιδράσεων (Neuwald et al., 1999). Η περιοχή (α) περιέχει τουλάχιστον ένα συντηρημένο μοτίβο, το sensor-2 που χαρακτηρίζεται από συντήρηση του αμινοξέως Αργινίνη (Arg), που συμμετέχει στην υδρόλυση του ΑΤΡ και στην αναδιάταξη της πρωτεΐνης κατά τις αλληλεπιδράσεις (Neuwald et al., 1999; Iyer et al., 2004). Πλησίον του τμήματος ΑΑΑ⁺ εντοπίζεται η περιοχή SSD (Sensor and Substrate Discrimination domain), η οποία λειτουργεί ως αισθητήρας αναγνώρισης των υποστρωμάτων (Εικόνα 4). Το τμήμα SSD είναι μέρος της περιοχής (α) και πιθανώς επεκτείνεται μέχρι το μοτίβο sensor-2 του τμήματος ΑΑΑ⁺. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι περιοχές SSD των βακτηριακών CLP ATP πρωτεασών και της πρωτεάσης LON που αλληλεπιδρούν με τα υποστρώματα έχουν παρόμοιες προβλεπόμενες δομές (Smith et al., 1999). Η ορθή αναγνώριση του υποστρώματος είναι κρίσιμη διαδικασία για την ολοκληρωμένη λειτουργική δράση της LON, που μπορεί να σχετίζεται είτε με τη πρωτεόλυση, είτε με την αναδίπλωση πρωτεϊνικών μορίων.



Εικόνα 4 Η οικογένεια LONA και LONB

Σχηματική αναπαράσταση της οικογένειας LONA, απεικονίζεται το Ν-τμήμα, το κεντρικό τμήμα AAA+ και το τμήμα SSD. Στο καρβόξυ-τελικό άκρο βρίσκεται το πρωτεολυτικό τμήμα με τα συντηρημένα αμινοξέα Σερίνης

(S) και Λυσίνης (K). Στην οικογένεια LONB το τμήμα ΑΑΑ+ διακόπτεται από διαμεμβρανικές περιοχές υπεύθυνες για την τοποθέτηση στη μεμβράνη, ενώ δεν υπάρχει το Ν-τμήμα.

Η εξαιρετικά συντηρημένη ΑΑΑ⁺ πρωτεάση LON είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση της πρωτεόστασης σε διαφορετικά υποκυτταρικά περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένου του βακτηριακού κυτταροπλάσματος και της μήτρας των μιτοχονδρίων στους ευκαρυώτες (Baker & Tatsuta et al., 2011; Lee & Suzuki et al., 2008; Pinti et al., 2016; Quiros et al., 2015; Lee et al., 2006). Η LON σχηματίζει ένα ομο-εξαμερές σε σχήμα βαρελιού, με το πρωτεολυτικό τμήμα της να βρίσκεται απομονωμένο στον εσωτερικό του σώματος της πρωτεάσης. Με αυτόν τον τρόπο το πρωτεολυτικό τμήμα είναι κατά μεγάλο βαθμό μη προσβάσιμο στις ορθάαναδιπλωμένες πρωτεΐνες, προς αποφυγή της αποικοδόμησης λειτουργικών πρωτεΐνών που δεν αποτελούν υποστρώματα της LON. Αφού τα υποστρώματα δεσμευτούν από τη LON, η πρωτεΐνη αυτή χρησιμοποιεί την ενέργεια υδρόλυσης του ΑΤΡ σε συνεργασία με αλλαγές στη διαμόρφωσή της για να 'ξεδιπλώσει-αποδιατάξει' τα υποστρώματά της (εφόσον είναι αποικοδόμησης (Sauer & Baker, 2011; Gur at al., 2012).

1.2.4.1 Η επιλογή υποστρωμάτων από τη LON

Η πρωτεάση LON συχνά αναγνωρίζει κατεστραμμένα ή μετουσιωμένα πολυπεπτίδια μέσω μικρών αλληλουχιών πεπτιδίων, τα οποία είναι πλούσια σε αρωματικά και υδρόφοβα αμινοξέα (degrons) και βρίσκονται στην επιφάνεια της προβληματκής πρωτεΐνης, ενώ στη λειτουργική μορφή της είναι μη προσβάσιμα. Το πεπτίδιο β-20, που έχει απομονωθεί από τη μετουσιωμένη β-γαλακτοζιδάση, αποτελεί παράδειγμα τέτοιων ειδών πεπτιδίων (Gur & Sauer, 2008). Η LON επίσης αποδομεί πολυάριθμες κλάσεις υποστρωμάτων. Σε πολλές περιπτώσεις, αναγνωρίζει και αποδομεί αναδιπλωμένες αλλά μη-συναρμολογημένες πρωτεΐνες μέσω αδόμητων μικρών ακολουθιών πεπτιδίων, τα οποία είναι εκτεθειμένα στην επιφάνεια των πρωτεϊνών, όπως αυτά σε μία εκτεθειμένη λούπα ή όσα βρίσκονται κοντά στο άκρο της πρωτεΐνης. Για παράδειγμα, η LON αναγνωρίζει εξειδικευμένα τα τελευταία 20 αμινοξέα ενός κατασταλτικού παράγοντα κυτταρικής διαίρεσης, του SulA, και τα 21 πρώτα κατάλοιπα της ρυθμιστικής πρωτεΐνης SoxS της υπεροξειδικής απόκρισης στο E. coli (Ishii et al., 2000; Shah & Wolf, 2006). Έχει επίσης βρεθεί ότι η LON αναγνωρίζει συγκεκριμένες περιοχές αναδιπλωμένων πρωτεϊνών χωρίς την παρουσία κάποιας αναγνωρίσιμης ακολουθίας πεπτιδίων. Αυτού του είδους τα υποστρώματα αντιπροσωπεύονται από τις περιοχές α-κρυσταλίνης (α-crystallin domains) μικρών πρωτεϊνών θερμικού σοκ (heat shock

proteins) (sHSPs, IbpA, και IbpB στα βακτήρια) (Bissonnette et a., 2010). Συνεπώς, η LON συνιστά έναν εκλεπτυσμένο πρωτεολυτικό μηχανισμό, ο οποίος αποδομεί επιλεκτικά μησημασμένα και λάθος αναδιπλωμένα υποστρώματα, ή φυσιολογικά αναδιπλωμένες αλλά με μη-συναρμολογημένες πρωτεϊνικές υπομονάδες υποστρώματα, με τελικό στόχο την προστασία της λειτουργικής ακεραιότητας του πρωτεώματος (Rigas et al., 2012).

Η περιοχή της ΑΤΡάσης και της πρωτεόλυσης αποτελούν τις περισσότερο συντηρημένες περιοχές της LON. Παρόλα αυτά, ~300 κατάλοιπα του Ν-τμήματος παρουσιάζουν υψηλή παραλλακτικότητα μεταξύ των ομόλογων της LON και η λειτουργία τους δεν έχει κατανοηθεί πλήρως (Roudiak & Shrader, 1998). Πολυάριθμα ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν τον ρόλο του Ν-τμήματος στη διαμεσολάβηση της αναγνώρισης και της επεξεργασίας συγκεκριμένων υποστρωμάτων της LON (Ebel et al., 1999; lyer et al., 2004; Wohlever et al., 2013; Wohlever et al., 2014). Ωστόσο, το ακριβές σημείο διεπαφής που πραγματοποιείται η δέσμευση του υποστρώματος και οι μοριακές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες αποτελούν τη βάση της αναγνώρισης των περισσότερων υποστρωμάτων της Lon παραμένουν άγνωστες. Επιπλέον, έχει φανεί πως η διαγραφή τμημάτων του Ν-τμήματος μπορεί να αλλάξει ή να αφαιρέσει τόσο την ATP όσο και την πρωτεολυτική ενεργότητα της LON (Roudiak & Shrader 1998; Cheng et al., 2012).

Επιπλέον, έχει γίνει αναφορά ότι στο βακτήριο *Ε. coli* τα εξαμερή σύμπλοκα της πρωτεάσης μπορούν να αλληλεπιδρούν ανά δύο σχηματίζοντας ένα δωδεκαμερές σύμπλοκο (Εικόνα 5), όπως φάνηκε σε μελέτες κρυογονικής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (cryo-EM) (Vieux et al., 2013; Brown et al., 2018, Botos et al., 2019). Τόσο στον μάρτυρα όσο και στα στελέχη της LON με τροποποιημένο το πρωτεολυτικό τους κέντρο (σημειακή μετάλλαξη στο αμινοξύ Σερίνη (S679A) της καταλυτικής δυάδας), σχηματίζονταν εξαμερή και δωδεκαμερή σύμπλοκα LON. Η μοντελοποίηση των μεμονωμένων δομικών περιοχών υπέδειξε ότι για τις εν λόγω συνδέσεις μεσολαβούν ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των Ν-τμημάτων δύο εξαμερών LON (Vieux et al., 2013; Brown et al., 2018, Botos et al., 2018, Botos et al., 2019). Έχει επίσης φανεί ότι, η τροποποιημένη ισομορφή *LON^{V217A}/^{Q2204}* (*LONVQ*), η οποία περιέχει μεταλλάξεις στο Ν-τελικό τμήμα της LON, σχηματίζει κατά προτίμηση δωδεκαμερή. Βιοχημικές μελέτες και *in vivo* πειράματα έκφρασης υποστηρίζουν ότι το δωδεκαμερές αποτελεί ενεργή μορφή πρωτεάσης, συμπληρώνοντας πολλές από τις σημαντικές ρυθμιστικές λειτουργίες της LON σε LON⁻ στελέχη, εμφανίζοντας όμως μετατροπές στην επιλογή υποστρώματος και/ή στην

στην καλύτερη διαχείριση του ποιοτικού ελέγχου των πρωτεϊνών σε συνθήκες UV, θερμότητας και οξειδωτικής καταπόνησης εφόσον κάτω από τέτοιου είδους στρεσογόνες συνθήκες ο σχηματισμός δωδεκαμερών ήταν άφθονος, τονίζοντας τον ρόλο του Ν-τμήματος στην επιλογή υποστρωμάτων (Brown et al., 2018). Ωστόσο, δεν υπάρχουν σαφή δεδομένα και αρκετές επιστημονικές αναφορές για τον ρόλο των παραπάνω συμπλόκων και τη συμβολή τους στην πρωτεόλυση LON.



Εικόνα 5 Το δωδεκαμερές σύμπλοκο της LON πρωτεάσης

Οι πιθανοί ρόλοι του εξαμερούς και του δωδεκαμερούς της LON στην ενδοκυτταρική αποδόμηση πρωτεϊνών στο *E. coli*. Υποστηρίζεται ότι κάτω από συνθήκες έντονου στρες στα κύτταρα συσσωρεύονται υπό μεγάλες συγκεντρώσεις μη ορθά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες σχηματίζοντας μεγάλα συσσωματώματα. Αυτά τα μεγάλα συσσωματώματα πιθανώς δυσχεραίνουν την ικανότητα του ενζύμου να αποδομεί συγκεκριμένες ρυθμιστικές πρωτεΐνες και επομένως παρεμποδίζεται και η ανάκαμψη των κυττάρων από το στρες. Ο σχηματισμός δωδεκαμερών μπορεί να στοχεύει στην παρεμπόδιση της εισόδου μεγάλων συσσωματωμάτων στον πρωτεϊνών όπως φαίνεται στην εικόνα. Η ταυτόχρονη παρουσία εξαμερών, ίσως εξειδικεύεται στην αποδόμηση των μεγάλων συσσωματωμάτων. Με αυτόν τον εκλεκτικό τρόπο αποδόμησης υποστρωμάτων η πρωτεάση LON ίσως να μπορεί να αποφεύγει το 'μπλοκάρισμα' του ενζύμου κατά την πρωτεόλυση υπό συνθήκες έντονου στρες (Vieux et al., 2013.)

1.2.4.2 Η μετατόπιση των υποστρωμάτων στον πρωτεολυτικό χώρο της LON

Όπως προαναφέρθηκε οι ΑΑΑ⁺ πρωτεάσες δρουν μετατοπίζοντας ('φιλτράρωντας') τα υποστρώματα-στόχους τους μέσα από ένα στενό κεντρικό πόρο, ο οποίος σχηματίζεται στο κέντρο των δακτυλίων τους, αναγκάζοντας με αυτό τον τρόπο τις πρωτεΐνες να ξεδιπλωθούναποδιαταχτούν.

Πολυάριθμες βιοφυσικές προσεγγίσεις έχουν διεξαχθεί για να αποσαφηνίσουν τον μηχανισμό επιλογής των υποστρωμάτων της LON όσο και τον μηχανισμό μετατόπισής τους (Pinti et al., 2016; Quiros et al., 2015; Lee et al., 2006; Botos et al., 2004; Gur & Sauer, 2009;Park et al., 2006;Vieux et al., 2013). Πρόσφατα, μία έρευνα πάνω στη LON στο Yersinia pestis προσδιόρισε την cryo-EM δομή της πρωτεΐνης παρουσία και απουσία υποστρώματος (Shin et al., 2020). Κατά την απουσία υποστρώματος το ένζυμο φάνηκε να παγιδεύεται σε μία αριστερόστροφη 'ανοιχτή' ελικοειδή οργάνωση η οποία είναι πρωτεολυτικά ανενεργή ενώ όταν δεσμεύει ένα υπόστρωμα, η ΑΑΑ⁺ περιοχή αποκτά μία δεξιόστροφη 'κλειστή' ελικοειδή διαμόρφωση γύρω από το μετατοπιζόμενο πολυπεπτίδιο, με ενεργή πρωτεόλυση (Shin et al., 2020). Μετά τη δέσμευση του υποστρώματος, η πρωτεάση LON χρησιμοποιεί ένα 'handover-hand' μοντέλο για την μετατόπιση των υποστρωμάτων (Shin et al., 2019). Πολυάριθμες δομικές αναδιατάξεις προκύπτουν ταυτόχρονα ή με κοντινή διαδοχή ώστε να εξυπηρετηθεί ο μηχανισμός μετατόπισης. Η ΑΤΡ δέσμευση δημιουργεί αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων οδηγώντας σε περιστροφική κίνηση του μισού εξαμερούς ΑΤΡάσης, όπως φαίνεται στη εικόνα 6. Τα κατάλοιπα της λούπας του κεντρικού πόρου τοποθετούνται προς αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα και η μετατόπιση συμβαίνει με κατεύθυνση προς τον πρωτεολυτικό θάλαμο (Shin et al., 2019).



Εικόνα 6 Ο μηχανισμός μετατόπισης υποστρωμάτων της LON στο Yersinia pestis.

Η αριστερόστροφη γύρω από τον δακτύλιο ATP υδρόλυση ωθεί τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του υποστρώματος και των κατάλοιπων της λούπας του κεντρικού πόρου μέσα στις τρεις ATP-δεσμευτικές AAA⁺ περιοχές. Οι πλευρικές κινήσεις των τριών ανώτερων ATP υπομονάδων οδηγούν στη μετατόπιση αμινοξέων και προετοιμάζουν την πρωτεολυτική υπομονάδα (κόκκινη) για ATP υδρόλυση (Shin et al., 2019).

1.2.4.3 Ο μηχανισμός πρωτεόλυσης στη LON

Η LON χρησιμοποιεί την καταλυτική δυάδα Σερίνης-Λυσίνης, η οποία τοποθετείται στο Cτελικό τμήμα της, για να πρωτεολύσει τα πεπτίδια των υποστρωμάτων. Πολυάριθμα μοντέλα για τη δέσμευση υποστρωμάτων και τη διαδικασία της υδρόλυσης στη LON έχουν προταθεί με σκοπό να ερμηνεύσουν τη δομική βάση της πρωτεολυτικής δράσης της (Botos et al., 2004; Lin et al., 2010; Rotanova et al., 2006; Su et al., 2016).

Η πρόσφατη μελέτη πάνω στην cryo-EM δομή της πρωτεολυτικά ενεργής LON^{ENZ} (παρουσία υποστρώματος) στο Yersinia pestis έδειξε ότι η Σερίνη και η Λυσίνη του προτεολυτικού τμήματος της πρωτεάσης, τοποθετούνται κάθετα η μία στην άλλη μέσα σε μία μορφή κοιλότητας του ενζύμου (Shin et al., 2020). Με βάση τη σύγκριση μεταξύ των περιοχών των ενζύμων LON^{ENZ} (παρουσία υποστρώματος) και LON^{OFF} (απουσία υποστρώματος) αναφέρεται το πρότυπο του μηχανισμού με τον οποίο η LON θα μπορούσε να ρυθμίζει την πρωτεολυτική της ενεργότητα στο Yersinia pestis (Shin et al., 2020). Συγκεκριμένα στη LONOFF η περιοχή (βρόγχος) της Σερίνης υποστηρίζεται ότι αναδιπλώνεται δημιουργώντας μία έλικα η οποία τοποθετείται σε πολύ κοντινή απόσταση από το ενεργό τμήμα του ενζύμου, μπλοκάροντας την πρόσβαση των υποστρωμάτων στην καταλυτική δυάδα. Μετά τη δέσμευση του υποστρώματος και τη μετάβαση στην πρωτεολυτικά ενεργή μορφή, ο συμμετρισμός των περιοχών της πρωτεάσης θεωρείται ότι επιβάλλει στην έλικα να ξεδιπλωθεί, όπως φαίνεται και στην εικόνα 7 (Shin et al., 2020). Συνολικά, έχει προταθεί ότι η πρωτεολυτική ενεργότητα της LON αυτοκαταστέλεται απουσία υποστρώματος και ATP για να αποφεύγεται η μη-ειδική πρωτεόλυση, όπως έχει προβλεφθεί από προηγούμενες βιοχημικές μελέτες (Puri & Karzai, 2017; Gur et al., 2009). Παρά τα παραπάνω δεδομένα δεν υπάρχουν επαρκή και αξιόπιστα στοιχεία γύρω από τη λειτουργία της LON κατά την αναγνώριση, δέσμευση και μετατόπιση των υποστρωμάτων της, ιδιαίτερα όσο αφορά τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η έλλειψη ενός καθολικού μηχανισμού λειτουργίας της παραπάνω πρωτεάσης καθιστά την ανάγκη επιπλέον πειραματικών μελετών επιτακτική, καθώς παρά την πολύχρονη μελέτη της, τα επιστημονικά δεδομένα που υπάρχουν είναι αμφιλεγόμενα.



Εικόνα 7 Η αναδιάταξη της LON παρουσία και απουσία υποστρώματος στο Yersinia pestis

Η αναδιάταξη του ενζύμου παρουσία υποστρώματος LON^{ENZ} και απουσία υποστρώματος LON^{OFF} στο Yersinia pestis. Παρουσία υποστρώματος η περιοχή της καταλυτικής δυάδας παραμένει ανοιχτή για να δεχτεί το υπόστρωμα προς πρωτεόλυση, ενώ απουσία υποστρώματος η είσοδος στην πρωτεολυτική δυάδα μπλοκάρεται με μία αναδιπλωση της περιοχής της Σερίνης (Shin et al., 2020).

1.3 Η χρήση τεχνικών παγίδας υποστρωμάτων

Τα κυτταρικά πρωτεώματα διατηρούν την πρωτεϊνική ομοιόσταση (πρωτεόσταση) μέσω του ελέγχου της πρωτεϊνικής σύνθεσης, ωρίμανσης και αποδόμησης (Labbadia & Morimoto, 2015). Η κύρια πρόκληση όμως στην έρευνα για την κατανόηση της κυτταρικής πρωτεόστασης είναι ο προσδιορισμός του τρόπου με τον οποίο τα υποστρώματα αναγνωρίζονται από τις πρωτεάσες, καθώς και ο τρόπος ρύθμισης της ενεργότητας των πρωτεασών. Επιπλέον, η αποδόμηση των πρωτεϊνών συχνά εμπεριέχει τη δράση παραπάνω από μίας πρωτεάσης, δρώντας κατά σειρά, είτε παράλληλα (Liao & Wijk 2019). Επομένως τέτοιου είδους ιεραρχίες μεταξύ των πρωτεασών δεν έχουν ακόμη κατανοηθεί και χαίρουν περαιτέρω μελέτης.

Οι ΑΑΑ⁺ πρωτεάσες βασίζονται είτε σε ένα ξεχωριστό είτε σε ένα ενσωματωμένο σύστημα πρωτεάσης/μοριακού συνοδού αλληλεπιδρώντας, ξεδιπλώνοντας και μετατοπίζοντας τα υποστρώματα στόχους τους προς προτεόλυση. Πολλές φορές υποβοηθούνται από τις πρωτεΐνες σύνδεσης, πολλές εκ των οποίων επιλέγουν συγκεκριμένες κλάσεις υποστρωμάτων και τα οδηγούν στο σύμπλοκο πρωτεάσης-μοριακού συνοδού (Kuhlmann & Chien, 2017). Η φύση της επεξεργασίας αυτών των πρωτεασών και η έλλειψη γνώσης των μοτίβων των τμημάτων που πραγματοποιείται η λύση των πεπτιδικών δεσμών καθιστούν

δύσκολη την πρόβλεψη και την πειραματική αναγνώριση των υποστρωμάτων τους (Liao & Wijk 2019).

Επιπλέον, οι ΑΑΑ⁺ πρωτεάσες στους ευκαρυώτες συχνά αντιπροσωπεύονται από οικογένειες γονιδίων και η λειτουργική ποικιλομορφία μέσα σε αυτές τις οικογένειες δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητή. Για παράδειγμα, το γονιδίωμα του *Arabidopsis thaliana* κωδικοποιεί 12 FTSH/FTSH-like πρωτεΐνες και 8 LON/LON-like πρωτεΐνες, οι οποίες τοποθετούνται κυρίως στους χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια, ενώ το μιτοχονδριακό και χλωροπλαστικό CLPPp σύστημα αποτελείται από 18 διαφορετικές πρωτεΐνικες υπομονάδες (6 x CLPP, 4 x CLPR, 2 x CLPC, CLPD, 3 x ILPX, CLPS1, και CLPF) (Nishimura & van Wijk, 2015; Wijk, 2015).

Προσπάθεια γίνεται ώστε να αποσαφηνιστούν οι παραπάνω προβληματισμοί που αφορούν τα συστήματα πρωτεασών και τη λειτουργία τους. Γι' αυτό τον λόγο γίνεται η χρήση διαγονιδιακά τροποποιημένων πρωτεασών με ανενεργή πρωτεόλυση, επιτρέποντας όμως τη δέσμευση των υποστρωμάτων και την μετατόπιση τους στον πρωτεολυτικό θάλαμο της πρωτεάσης. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται συστήματα παγίδας πρωτεϊνικών υποστρωμάτων τα οποία στη συνέχεια μπορούν να ανακτηθούν από το σύμπλοκο της πρωτεάσης και να προσδιοριστούν μέσω πρωτεομικών τεχνικών. Μέχρι σήμερα έχουν δημοσιευτεί μελέτες παγίδευσης υποστρωμάτων μέσω πρωτεολυτικά ανενεργών πρωτεασών για τα συστήματα CLPP στο E. coli (Flynn et al., 2003; Flynn et al., 2004; Neher et al., 2006), στο S. aureus (Feng et al., 2013), στο C. crescentus (Bhat et al., 2013), στο P. anserina (Fischer et al., 2015) στο ποντίκι (Szczepanowska et al., 2016), στο B. Subtilis (Trentini et al., 2016) και για τα CLPP3 και CLPP5 στο Arabidopsis thaliana (Liao et al., 2018). Όσον αφορά το σύστημα των FTSH πρωτεασών συστήματα παγίδας έχουν εφαρμοστεί στο *E. coli* (Westphal et al., 2012; Arends et al., 2016) και στο Arabidopsis thaliana (Opalinska et al., 2017) ενώ για την πρωτεάση LON υπάρχει αναφορά μόνο για το E. coli (Arends et al., 2018). Η μιτοχονδριακή LON συγκεκριμένα, έχει φανεί να είναι υπεύθυνη για πληθώρα φυσιολογικών διαδικασιών σε ένα μεγάλο εύρος οργανισμών, όπως θα αναφερθεί στις επόμενες ενότητες. Ειδικότερα η απουσία λειτουργικής LON1 στον οργανισμό μοντέλο Arabidopsis thaliana απέδωσε ισχυρό αναπτυξιακό φαινότυπο (Rigas et al., 2009a). Παρά όμως τον πρωταρχικό ρόλο της πρωτεάσης LON στο μηχανισμό του πρωτεϊνικού ελέγχου, δεν υπάρχουν περαιτέρω μελέτες που αφορούν τον προσδιορισμό των υποστρωμάτων της.

1.3.1 Η στρατηγική στα πειράματα παγίδας υποστρωμάτων

Γενικά, δύο διαφορετικές πειραματικές στρατηγικές χρησιμοποιούνται συνήθως για την αναγνώριση νέων υποστρωμάτων. Η πρώτη αφορά *in vivo* συστήματα παγίδευσης, τα οποία βασίζονται σε ισομορφές πρωτεασών με ανενεργή πρωτεόλυση, αλλά με ικανότητα επιλογής και μετατόπισης υποστρωμάτων στο σύμπλοκο της πρωτεάσης, όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα. Η δεύτερη στρατηγική εμπεριέχει *in vitro* πειράματα, τα οποία βασίζονται στη σύγκριση του πρωτεώματος λειτουργικών και μη λειτουργικών ισομορφών της πρωτεάσης. Αυτή η στρατηγική μπορεί να προσφέρει πληροφορίες για υποψήφια υποστρώματα αλλά στοχεύει κυρίως στην πληροφόρηση γύρω από το αποτέλεσμα της μη ορθής λειτουργίας της πρωτεάσης και τον γενικό της αντίκτυπο στον οργανισμό. Στη παρούσα μελέτη θα επικεντρωθούμε στη *in vivo* τεχνική παγίδευσης υποστρωμάτων.

1.3.1 In vivo παγίδες υποστρωμάτων

Η λογική πίσω από τα *in vivo* συστήματα παγίδευσης υποστρωμάτων είναι η παγίδευση υποστρωμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης τους με τα δομικά στοιχεία της πρωτεάσης με παράλληλη αποτροπή της αποδόμησής τους και σταθεροποιώντας αυτή την αλληλεπίδραση. Στη συνέχεια ακολουθούν τεχνικές ενίσχυσης συγγένειας του σημασμένου δομικού στοιχείου της πρωτεάσης με το υπόστρωμα που αλληλεπιδρά και ο προσδιορισμός του μέσω τεχνικών φασματομετρίας μάζας (mass spectrometry-MS). Ωστόσο, υπάρχουν προϋποθέσεις για την ανίχνευση υποστρωμάτων με τη χρήση *in vivo* παγιδών όπως ότι: α) η πρωτεόλυση πρέπει να αποτρέπεται ή να καθυστερείται σθεναρά στα υποστρώματα στόχους, β) οι φυσικές αλληλεπιδράσεις των παγιδευμένων υποστρωμάτων και του πρωτεολυτικού μηχανισμού πρέπει είναι ικανοποιητικά σταθερές για να επιτρέπουν τον συν-καθαρισμό του συμπλέγματος, και επίσης γ) ένα παράλληλο σύστημα ελέγχου που θα εκφράζει το φυσιολογικό γονίδιο της πρωτεάσης είναι απαραίτητο για να αναγνωρίζονται η μη-ειδικές αλληλεπιδράσεις με την πρωτεάσης

Για τη δημιουργία *in vivo* παγίδων υποστρωμάτων, εφαρμόζονται σημειακές κατευθυνόμενες μετάλλαξεις στο πρωτεολυτικό κέντρο των πρωτεασών. Συγκεκριμένα, στόχος είναι πρωτεολυτική απενεργοποίηση των πρωτεασών μέσω της τροποποίησης ενός ή περισσότερων αμινοξικών κατάλοιπων της καταλυτικής δυάδας ή τριάδας τους (ανάλογα το σύστημα πρωτεόλυσης). Κατά αυτόν τον τρόπο, τα υποστρώματα παγιδεύονται μέσα στο πρωτεολυτικό σώμα της πρωτεάσης εμποδίζοντας παράλληλα την πρωτεόλυση τους όπως φαίνεται και στην εικόνα 8 (Liao et al., 2019). Η συγκεκριμένη πειραματική προσέγγιση

εφαρμόστηκε αρχικά στη CLPP στο *E. coli*, όπου αντικαταστάθηκε η καταλυτική Σερίνη με ένα αμινοξύ Αλανίνης (Flynn et al., 2003; Flynn et al., 2004; Neher et al., 2006; Arends et al., 2018). Αυτή η σημειακή μετάλλαξη (S98A) αφαιρεί την πρωτεολυτική ικανότητα του CLPP συμπλόκου παγιδεύοντας ταυτόχρονα τα υποστρώματα του. Όσον αφορά τα συστήματα FTSH και LON, η πρωτεολυτική ενεργότητα μπορεί να απαλειφθεί μέσω μίας σημειακής μετάλλαξης στο Zn²⁺-δεσμευτικό τμήμα της FTSH (Westphal et al., 2012; Arends et al., 2016; Opalinska et al., 2017) ή στην καταλυτική Σερίνη της LON (Arends et al., 2018).



Εικόνα 8 Η σχηματική απεικόνιση του *in vivo* συστήματος παγίδευσης υποστρωμάτων Απεικόνιση του μάρτυρα (wild-type) και της πρωτεάσης-παγίδας (τροποποιημένο πρωτεολυτικό άκρο). Σε αντίθεση με τον μάρτυρα, οι παγίδες των υποστρωμάτων εγκλωβίζουν/παγηδεύουν υποστρώματα μέσα στον πρωτεολυτικό τους σώμα χωρίς αυτά να υπόκεινται σε πρωτεόλυση. Ως εκ τούτου τα υποστρώματα δεν μπορούν να απελευθερωθούν από το σύμλποκο της πρωτεάσης επιτρέποντας την ταυτοποίηση τους (Liao et al., 2019).

1.4 Ο ρόλος της LON στα μιτοχόνδρια

Ο ρόλος της πρωτεάσης LON στην αποικοδόμηση των οξειδωμένων πρωτεϊνών που παράγονται στα μιτοχόνδρια έχει αναλυθεί διεξοδικά στους μη φυτικούς οργανισμούς. Τα μιτοχόνδρια κατέχουν σημαντικό ρόλο στην παροχή ενέργειας στο κύτταρο και συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των αμινοξέων, στην οξείδωση των λιπαρών οξέων καθώς και σε πλήθος άλλων μεταβολικών διεργασιών. Παρόλα αυτά, τα μιτοχόνδρια αποτελούν τις κύριες θέσεις παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου, ενώ ταυτόχρονα αποτελούν βασικούς στόχους οξειδωτικής καταστροφής. Κύτταρα ζύμης με μετάλλαξη στο γονίδιο *PIM1* (proteolysis in

mitochondria, πρωτεόλυση στα μιτοχόνδρια, ομόλογο του *LON*) παρουσιάζουν προβλήματα στην αναπνοή εξαιτίας συσσώρευσης βλαβών στην ακεραιότητα του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (Suzuki et al., 1994; van Dyck et al., 1994). Επιπρόσθετα, μελέτες στο μύκητα *Podospora anserine* έδειξαν ότι η υπερέκφραση της πρωτεάσης LON, μειώνει τις καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες, αυξάνει την ανθεκτικότητα έναντι εξωγενούς οξειδωτικού στρες και παράλληλα επιμηκύνει τη διάρκεια ζωής του μικροοργανισμού (Luce and Osiewacz, 2009). Εκτός της πρωτεολυτικής λειτουργίας, έχει αναφερθεί ότι η LON παρουσιάζει και ιδιότητες μοριακού συνοδού συμμετέχοντας στη συναρμολόγηση πρωτεϊνικών συμπλόκων (Rep et al., 1996), αλλά συνδέεται και με συγκεκριμένες ακολουθίες μιτοχονδριακού DNA για να διατηρηθεί η σταθερή οργάνωση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (Lu et al., 2007). Τα παραπάνω αναδεικνύουν τη σημαντική λειτουργική δράση του μοριακού μηχανισμού LON ως σύστημα πρωτεόλυσης ή/και μοριακού συνοδού προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόσταση, η δομή και η ανθεκτικότητά του μιτοχονδρίου έναντι συνθηκών οξειδωτικής καταπόνησης.

Στο *E. coli*, η πρωτεάση EcLON αποικοδομεί περίπου το 50% των πρωτεϊνών που έχουν λανθασμένη αναδίπλωση. Πρωτεΐνες που δεν παρουσιάζουν τη σωστή αναδίπλωση, συσσωρεύονται στη μήτρα των μιτοχονδρίων και διασπώνται από την πρωτεάση PIM1 σε συνεργασία με το μοριακό συνοδό Hsp70 (Wagner et al., 1994). Κύτταρα ζύμης που φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *PIM1* είναι ανίκανα να διατηρήσουν σταθερή την οργάνωση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (mtDNA) (Suzuki et al., 1994; van Dyck et al., 1994). Από τη στιγμή που σημαντικά συστατικά της αναπνευστικής αλυσίδας κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, τα μεταλλάγματα *pim1* της ζύμης έχουν πρόβλημα στην αναπνοή και δεν έχουν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν σε θρεπτικά υποστρώματα χωρίς επεξεργασμένες (non fermentable) πηγές άνθρακα.

Στα θηλαστικά κατά τη διάρκεια της γήρανσης, έχει βρεθεί ότι περιορίζεται η έκφραση του γονιδίου *LON*, κάτι το οποίο συσχετίζεται με τη συσσώρευση οξειδωμένων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (Lee et al., 1999). Επιπλέον, η μιτοχονδριακή ακονιτάση, δηλαδή το ένζυμο του κύκλου Krebs που περιέχει συμπλέγματα σιδήρου/θείου και είναι επιδεκτικό στην οξειδωτική απενεργοποίηση, όταν οξειδωθεί εξαιτίας της υδροφοβικής της μορφής αναγνωρίζεται επιλεκτικά από τη πρωτεάση LON και αποικοδομείται (Bota & Davies, 2002). Η πρωτεϊνική καρβονυλίωση προκαλείται από ασθένειες και αποτελεί ένδειξη έντονης οξειδωτικής βλάβης και δυσλειτουργίας ενζυμικών συστημάτων. Για αυτούς τους λόγους, οι

πρωτεάσες LON αποτελούν σημαντικά συστατικά του μηχανισμού της κυτταρικής άμυνας έναντι της οξειδωτικής καταπόνησης προστατεύοντας από την κυτταροτοξική οξείδωση και συσσωμάτωση των πρωτεϊνών. Παρά όμως 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. Επιπλέον, η διατήρηση ενός κοινού λειτουργικού ρόλου από τους προκαρυώτες μέχρι και τους ευκαρυώτες υποδηλώνει και τον σημαντικό ρόλο των πρωτεασών LON στην προστασία των κυττάρων (Teichmann et al., 1996).

1.4.1 Η πρωτεάση LON στο Arabidopsis thaliana

Το φυτό Arabidopsis thaliana έχει μία μικρή οικογένεια γονιδίων LON που περιλαμβάνει τέσσερα μέλη, τα LON1- 4, τα οποία κωδικοποιούν για πρωτεϊνικές ισομορφές με διακριτούς υποκυτταρικούς στόχους (Sinvany-Villalobo et al., 2004; Rigas et al., 2009a; Janska et al., 2010). Αυτές οι ισομορφές κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια LON και τοποθετούνται στα οργανίδια του φυτικού κυττάρου που εμπλέκονται κυρίως στο μεταβολισμό της ενέργειας, χρησιμοποιώντας διαφορετικούς μηχανισμούς στόχευσης (Rigas et al., 2014).

Η πρωτεάση LON1 παρουσιάζει δυαδική στόχευση στους χλωροπλάστες και στα μιτοχόνδρια, μέσω του μηχανισμού των δυαδικών ακολουθιών στόχευσης, όπου έπειτα από τη μεταγραφική και μεταφραστική ρύθμιση, κωδικοποιεί δύο πολυπεπτίδια, όπου το ένα τοποθετείται στον χλωροπλάστη και το άλλο στο μιτοχόνδριο (Daras et al., 2014) (εικόνα 9). 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; Janska et al., 2010). Το καρβοξυλικό άκρο της πρωτεάσης LON2 φέρει ένα υπεροξυσωμικό σήμα στόχευσης τύπου 1 (PTS1), το οποίο οδηγεί την τοποθέτηση της στα υπεροξυσωμικά ματα (Lingard & Bartel, 2009). Η βιοπληροφορική ανάλυση του αμινοτελικού άκρου της πρωτεάσης LON3 υπέδειξε μία πιθανή ενιαία πρόδρομη αλληλουχία δυαδικής υποκυτταρικής τοποθέτησης στους χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια, ενώ είναι η μόνη που φέρει και σήμα πυρηνικής στόχευσης (Nuclear Localization Signal, NLS).



Εικόνα 9 Υποκυτταρική τοποθέτηση των ισομορφών της πρωτεάσης Lon του φυτού Arabidopsis thaliana. Οι πρωτεάσες 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 οργανίδια (ambiguous presequence). Η LON2 LoLn2 διαθέτει ένα τυπικό σήμα PTS1 στο καρβοξύ άκρο της, το οποίο την οδηγεί στο περοξύσωμα, ενώ για το γονίδιο LON3 δεν υπάρχουν γνωστά πειραματικά δεδομένα.

Μεταλλάγματα της πρωτεάσης LON1, παρουσιάζουν καθυστέρηση στην εγκατάσταση και την ανάπτυξη του σπορόφυτου καθ' όλη τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου, τα μιτοχόνδρια των φυτών παρουσιάζουν ανώμαλη μορφολογία, ενώ παράλληλα και ένζυμα του κύκλου του Krebs και της κύριας αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων παρουσιάζουν μειωμένη δραστικότητα (Rigas et al., 2009a; 2009b; Solheim et al., 2012;Daras et al., 2014). Πρόσφατα, μία μελέτη έδειξε και τον πολύπλευρο ρόλο της LON1 στην πρωτεϊνική ομοιόσταση στα μιτοχόνδρια, ως μοριακό συνοδό ο οποίος διευκολύνει τη σωστή αναδίπλωση και σταθεροποίηση των νέων συντιθέμενων/εισαγόμενων πρωτεϊνών και ως πρωτεάση η οποία αποδομεί πρωτεϊνικά συσσωματώματα στο *Arabidopsis thaliana* (Li et al., 2017). Όσον αφορά τον λειτουργικό ρόλο της πρωτεάσης LON1 στους χλωροπλάστες, δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής δεδομένα.

Μεταλλάγματα της LON2 πρωτεάσης έδειξαν καθυστέρηση στην ανάπτυξη και ήταν προβληματικά ως προς την υπεροξεισωμική λειτουργία, συμπεριλαμβανομένης της μεγέθυνσης των υπεροξεισωμάτων κατά την μετάβαση από σπορόφυτα σε ώριμα φυτά στο *Arabidopsis thaliana* (Lingard and Bartel, 2009). Επίσης, η *LON2* φάνηκε να έχει στόχευση στα υπεροξεισώματα, διευκολύνοντας την εισαγωγή πρωτεϊνών μέσα στη μήτρα (matrix) και

ρυθμίζοντας την αυτοφαγία των περοξισωμάτων (pexophagy) η οποία και επάγεται όταν η λειτουργία της LON2 είναι ανεπαρκής. (Farmer et al., 2013; Bartel et al., 2014;Young and Bartel, 2016). Ενώ η στόχευση της LON3 παραμένει άγνωστη, πιθανότατα εκφράζεται στα σπερματικά κύτταρα (Borges et al., 2008; Rigas et al. 2014). Για τη LON4 είναι μόνο γνωστό ότι έχει διπλή υποκυτταρική στόχευση στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες, με διαφορετικό όμως μηχανισμό από της LON1 (Sakamoto, 2006; Ostersetzer et al., 2007; Rigas et al., 2014). Επιπλέον, όπως έχει προβλεφθεί από τη μοριακή μοντελοποίηση αυτών των πρωτεασών, η αρχιτεκτονική της δομής του πυρήνα της LON1 έχει διαφορετική εσωτερική γεωμετρία σε σύγκριση με τη LON4. Ο εσωτερικός βρόγχος του τμήματος/της επικράτειας SSD της LON4 παρουσιάζει μία δεξιόστροφη επέκταση, ενώ αυτή η περιοχή στη LON1 είναι αριστερόστροφη.

Η συγκριτική μελέτη ολόκληρου του γονιδιώματος για τον προσδιορισμό της εξελικτικής ιστορίας των LON πρωτεασών αποκάλυψε ανεξάρτητα γεγονότα διπλασιασμού γονιδίων για τις LON πρωτεάσες στα φυτά (Tsitsekian et al., 2019). Οι προκαρυωτικοί και οι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί διατηρούν ένα μόνο αντίγραφο της *LON*, ενώ οι πολυκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν αποκτήσει ένα υπεροξεισωμικό αντίγραφο επιπρόσθετα του μιτοχονδριακού γονιδίου, για τη διατήρηση της εξελικτικά ανώτερης δομής των οργάνων τους (Tsitsekian et al., 2019).

Τα χερσαία φυτά ανέπτυξαν μικρές οικογένειες γονιδίων LON. Στο Arabidopsis thaliana με εξαίρεση το υπεροξεισωμικό παράλογο LON2, τα γονίδια LON τριπλασιάστηκαν στη γενεαλογία μέσω διαδοχικών εξελικτικών γεγονότων, συμπεριλαμβανομένων εν σειρά διπλασιασμών και διπλασιασμών ολόκληρου του γονιδιώματος. Το γονίδιο LON1 έχει ευρεία έκφραση στους φυτικούς ιστούς ενώ τα LON3 και LON4 εκφράζονται αποκλειστικά στους αρσενικούς και θηλυκούς αναπαραγωγικούς ιστούς, αντίστοιχα. Η διατήρηση των τριών αντιγράφων των LON1, LON4, και LON3, σχετίζεται με τα διαφορετικά μοτίβα έκφρασής τους, τους διακριτούς τους υποκυτταρικούς μηχανισμούς στόχευσης και τη λειτουργική διαφοροποίησή τους. Επίσης, η πρωτεάση LON1 πιθανώς να αποτελεί την πιο αρχέγονη μορφή LON καθώς φέρει ομοιότητες με τη προ-διπλασιασμού αρχέγονη γονιδιακή μονάδα. Σε αντίθεση οι διπλασιασμοί των γονιδίων LON3 και LON4 αποτελούν πρόσφατα εξελικτικά γεγονότα (Tsitsekian et al., 2019). Συμπερασματικά αποκαλύπτεται η εξελικτική τάση μεταξύ των φυτών για την απόκτηση αντιγράφων της Lon με ενιαία (ambiguous) πρόδρομη αλληλουχία στόχευσης και για διπλή στόχευση και στομιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες,

όπως και μία περιοχή αναγνώρισης υποστρωμάτων (Tsitsekian et al., 2019). Υποδεικνύοντας την λειτουργική πολυπλοκότητα της οικογένειας των γονιδίων *Lon* και τον σημαντικό ρόλου τους για τους φυτικούς οργανισμούς.

1.5 Σκοπός & Στόχοι πειραμάτων

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του συστήματος πρωτεόλυσης LON1 στο φυτό μοντέλο Arabidopsis thaliana. Η πρωτεΐνη ATLON1 (At5g26860) τοποθετείται τόσο στα μιτοχόνδρια, όσο και στους χλωροπλάστες του φυτού Arabidopsis thaliana, με την μιτοχονδριακή ισομορφή να έχει και τη μεγαλύτερη επίδραση στην ομαλή μεταβλαστική εγκατάσταση του σπορόφυτου (Daras et al., 2014). Το μετάλλαγμα lon1-1 που προκλήθηκε με σημειακή EMS μεταλλαξιγένεση (W903→κωδικόνιο λήξης), παρουσιάζει επιβαρυμένο φαινότυπο στην εγκατάσταση και στην ανάπτυξη του σπορόφυτου καθ' όλη τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου, με τα ένζυμα του κύκλου του Krebs και της κύριας αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων να παρουσιάζουν μειωμένη δραστικότητα, καθώς και με τα μιτοχόνδρια των φυτών να εμφανίζουν ανώμαλη μορφολογία. Επιπλέον, έχει αναδειχθεί ο πολύπλευρος ρόλος της LON1 ως πρωτεάση ή/και μοριακός συνοδός κατά την πρωτεϊνική ομοιόσταση των μιτοχονδρίων στο Arabidopsis thaliana (Li et al., 2017). Η πρωτεάση LON με μιτοχονδριακή τοποθέτηση έχει μελετηθεί εκτενώς σε ένα μεγάλο εύρος οργανισμών. Παρόλα αυτά, τα δεδομένα για το είδος των υποστρωμάτων-στόχων της LON πρωτεάσης ή για τους μηχανισμούς αναγνώρισης, αποικοδόμησης ή/και συναρμολόγησης τους τόσο στο Arabidopsis thaliana, όσο και σε άλλους οργανισμούς παραμένουν περιορισμένα.

Στόχος της παρούσα μελέτης είναι η δημιουργία και ο χαρακτηρισμός διαγονιδιακών σειρών φυτών με τροποποιημένο το πρωτεολυτικό κέντρο της πρωτεάσης LON1 του φυτού *Arabidopsis thaliana.* Είναι γνωστό ότι, το καταλυτικό κέντρο της πρωτεάσης LON αντιπροσωπεύεται από μία δυάδα Σερίνης-Λυσίνης (Rotanova et al., 2003) και η τροποποίηση των παραπάνω αμινοξικών κατάλοιπων έχει φανεί να στερεί την πρωτεολυτική ενεργότητα της πρωτεάσης διατηρώντας παράλληλα την ATP ενεργότητα του ενζύμου (Rotanova et al., 2003;Starkova et al., 1998;Melderent & Gottesman, 1999;Fischer & Glockshuber, 1993;Arends et al., 2018). Επομένως, με βάση τα μέχρι σήμερα πειραματικά δεδομένα για τη LON πρωτεάση και τα αποτελέσματα της πολλαπλής ευθυγράμμισης των πρωτεϊνών LON, μεταξύ καλά μελετημένων προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών, δημιουργήθηκε η διαγονιδιακή κατασκευή *pLON1::LON1^{trap}-FLAG*, στην οποία τα αμινοξέα

Σερίνης (S841)/Λυσίνης (K884) του γονιδίου *LON1* αντικαταστάθηκαν από αμινοξέα Αλανίνης (εικόνα 10).

Με την παραπάνω κατασκευή μετασχηματίστηκαν μεταλλάγματα *lon1-1* μέσω σταθερού μετασχηματισμού φυτών, καθώς το μετάλλαγμα *lon1-1* αποτελεί το ιδανικό γενετικό εργαλείο για τη παρακολούθηση της λειτουργικότητας των διαγονιδίων *lon1* εξαιτίας του χαρακτηριστικού φαινοτύπου της αναπτυξιακής καθυστέρησης. Τα αναπτυξιακά αυτά χαρακτηριστικά μπορούν εύκολα να βιομετρηθούν, σε διάστημα μικρότερο των επτά ημερών, με αποτέλεσμα τον αποτελεσματικό και γρήγορο χαρακτηρισμό των σταθερών διαγονιδιακών σειρών. Επίσης, για τον σκοπό των πειραμάτων, έγινε χρήση *lon1-1* μεταλλάγματων τα οποία εκφράζουν το γονίδιο αναφοράς *GFP* το οποίο από το πεπτίδιο σήματος της ATP συνθετάσης τοποθετεί τη πρωτεΐνη στα μιτοχόνδρια (Logan et al., 2000). Οι διαγονιδιακές αυτές σειρές φυτών με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP να τοποθετείται στα μιτοχόνδρια των φυτικών ιστών, δίνουν το πλεονέκτημα της παρατήρησης της λειτουργικής κατάστασης της ισομορφής *LON1* στα μιτοχόνδρια σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε καταστάσεις καταπόνησης.

Στον πειραματικό σχεδιασμό έχουν ενσωματωθεί και οι βασικοί παράμετροι για να διασφαλιστεί η λειτουργική αποτελεσματικότητα παγίδευσης υποστρωμάτων τα οποία αποτελούν τους στόχους του συστήματος πρωτεάσης/μοριακού συνοδού LON1 στο φυτό *Arabidopsis thaliana*. Συγκεκριμένα η ισομορφή έχει σημανθεί στο C-τελικό άκρο με το επιτόπιο FLAG ώστε να είναι δυνατή η ανοσοανίχνευση του και η ανοσοκατακρήμνιση των πρεωτεινικών συμπλόκων, ενώ χρησιμοποιείται ο ενδογενής προαγωγέας/υποκινητής του γονιδίου *LON1* ώστε να διατηρηθεί η ομοιόσταση του πρωτεόματος στα οργανίδια. Επιπλέον, η χρήση του μεταλλάγματος *lon1-1* ως γενετικό υπόβαθρο της διαγονιδιακής κατασκευής, θα οδηγήσει σε καθαρές παγίδες υποστρωμάτων χωρίς την ανάμιξη ενεργών και ανενεργών καταλυτικά, πρωτεασών LON1 στα μιτοχόνδρια των φυτικών κυττάρων. Το παραπάνω αποτελεί πλεονέκτημα του φυτού *Arabidopsis thaliana* έναντι άλλων οργανισμών, λόγω του θνησιγενούς φαινότυπου της μη λειτουργική LON πρωτεάσης σε άλλους καλά μελετημένους οργανισμούς όπως το *E. coli*.

Τέλος, οι παγίδες με τα πρωτεϊνικά υποστρώματα όσο και οι μάρτυρες που θα δημιουργηθούν (LON1 φυσιολογικές πρωτεάσες σε υπόθαθρο *lon1-1*) θα έχουν τη δυνατότητα να ανακτηθούν άθικτες από τα μιτοχόνδρια των διαγονιδιακών φυτών και οι παγιδευμένες πρωτεΐνες θα μπορούν να αναγνωριστούν και να συγκριθούν εφαρμόζοντας

τη μεθοδολογία φασματομετρίας μάζας (MS/MS). Η μεθοδολογία αυτή μπορεί να εφαρμοστεί και σε καταστάσεις καταπόνησης που ενδέχεται να επηρεάζουν την ομοιόσταση των πρωτεινών στα οργανίδια χωρίς όμως να ενεργοποιούν το μηχανισμό μιτοφαγίας.

Μέχρι σήμερα, δεν έχουν δημοσιευτεί επιστημονικές μελέτες όπου γίνεται εφαρμογή τεχνικών παγίδευσης υποστρωμάτων για τη LON πρωτεάση στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, παρά την αποδεδειγμένη σημασία της στους φυτικούς οργανισμούς. Η γνώση πάνω στους μηχανισμούς λειτουργίας της Lon όσο και στον εντοπισμό και επιλογή των υποστρωμάτων της, θα αποτελέσει σπουδαίο βιοτεχνολογικό εργαλείο με εφαρμογές στη βελτίωση των φυτών αλλά και θα συμβάλει στην κατανόηση χρόνιων επιστημονικών προβληματισμών γύρω από την λειτουργία της πρωτεόστασης στα οργανίδια του κυττάρου.



Εικόνα 10 Σχηματική αναπαράσταση της κατασκευής πρωτεολυτικά ανενεργής LON1

Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεολυτικά ανενεργής LON1 για την παγίδευση υποστρωμάτων μεσω της αντικατάστασης των αμινοξέων Σερίνης (S841)/Λυσίνης (K884) σε αμινοξέα Αλανίνης.

Υλικά & Μέθοδοι

2.1 Φυτικό υλικό

Σαν υλικό για τα πειράματα της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε το φυτό Arabidopsis thaliana (οικότυπος Columbia) και το μετάλλαγμα lon1-1 (D-3, EMS μεταλλαξιγένεση W₉₀₃→Stop codon), το οποίο ανήκει στην οικογένεια των Σταυρανθών – Brassicaceae.

2.2 Συνθήκες καλλιέργειας Arabidopsis thaliana

Για την ανάπτυξη φυτών κάτω από ασηπτικές συνθήκες, τα σπέρματα τοποθετούνται σε ddH₂O για 24 ώρες στους 4⁰C και απολυμαίνονται σε 20% διάλυμα χλωρίνης, o.o1% Triton-X. Στη συνέχεια τοποθετούνται κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε τρυβλία, παρουσία κατάλληλου θρεπτικού μέσου (βλέπε επιμέρους πρωτόκολλα). Τα τρυβλία τοποθετούνται σε θάλαμο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22⁰C και φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι). Μετά από 2 εβδομάδες τα φυτά μεταφυτεύονται στο χώμα και τοποθετούνται στον ίδιο θάλαμο ανάπτυξης φυτών.

2.3 Πρωτόκολλο απομόνωσης γονιδιωματικού DNA από Arabidopsis

CTAB DNA Miniprep (Josheph D. Clark)

- Φρέσκο φυτικό υλικό ομογενοποιείται παρουσία υγρού αζώτου σε κατάλληλο γουδί λειοτρίβισης ή μέσα σε eppendorf tube με μικρογουδί.
- Το ρυθμιστικού διάλυμα CTAB τοποθετείται στο υδατόλουτρο στους 65°C.
- Προσθέτουμε έναν όγκο (200 μl) ζεστού CTAB και τοποθετούμε τα eppendorf σε υδατόλουτρο στους 65 °C για 10-30 λεπτά.
- Προστίθεται ίσος όγκος SEVAG [χλωροφόρμιου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1)] και το μίγμα αναδεύεται ελαφρά.
- Φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις μέγιστες στροφές (13.000 στροφές/λεπτό).
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρό eppendorf tube.
- Προσθέτουμε 0,7 του όγκου (140 μl) ισοπροπανόλης, αναδεύουμε με το χέρι και το αφήνουμε σε ηρεμία για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση του δείγματος για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στις μέγιστες στροφές.
- Το ίζημα που προκύπτει ξεπλένεται προσθέτοντας 0,5 ml 100% αιθανόλης και στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 13.000 στροφές.
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου.
Επαναιώρηση του ιζήματος σε 100 μl H₂0 ή Τ.Ε.

2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Ρυθμιστικό PCR(1)	Διάλυμα	10 x	5µl	1 x
dNTPs		2 mM	5 µl	200 µM
Ευθύς εκκινητής		3 μΜ	5 µl	300 nM
Ανάστροφος εκκινητής		3 μΜ	5 µl	300 nM
DNA		-	2 µl	10 ng gDNA
Taq A polymerase KapaBiosystem	S	1 unit/µl	1 µl	1 unit
ddH2O		-	έως τα	-
			50 µl	

Τελικός όγκος αντίδρασης 50 μl

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)-γενικό πρωτόκολλο για την ενίσχυση τμημάτων DNA:

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

⁽¹⁾ Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης Tm του εκκινητή που υπολογίζεται από τον τύπο: 69,3 + 0,41·GC% - 650/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 1,3 kb -1.5 kb/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.

2.4.2 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 μία απλή αντίδραση PCR μέρους της μικροβιακής αποικίας (colonies PCR). Συγκεγκριμένα, όταν είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία του τμήματος DNA που μας ενδιαφέρει να έχει υποκλωνοποιηθεί στον κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα, μπορούμε να σχεδιάσουμε εκκινητές και μια απλή αντίδραση PCR 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 eppendorf tube που έχει 15μl ddH₂O και διατηρείται στους 4⁰C.
- Στην αντίδραση PCR προσθέτουμε τα συστατικά που αναφέραμε προηγουμένως με την διαφορά που αντί για gDNA ως μήτρα προσθέτουμε 3 μl από το τα περίπου ~15μl αιώρημα βακτηριακών κυττάρων.
- Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από τους εκκινητές που χρησιμοποιούμε και ο χρόνος επιμήκυνσης από το μέγεθος του τμήματος DNA που αναμένεται. Ο αριθμός των θερμοκύκλων είναι 20-25.
- Μόλις οι αντιδράσεις ολοκληρωθούν τα αποτελέσματα αναλύονται σε gel αγαρόζης. Για τις θετικές αποικίες μεταφέρουμε τα υπόλοιπα 7 μl σε θρεπτικό μέσο LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό.

2.5 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 μοριών. Τα μόρια των νουκλεϊνικών οξέων γίνονται ορατά στην πηκτή αγαρόζης με τη βοήθεια χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων. Η χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο 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 αιθίδιου 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 2 μl χρωστικής (loading dye)
- Μετά την πήξη απομακρύνεται η χτένα και προστίθεται κατάλληλος όγκος 1Χ ΤΑΕ, που αποτελεί το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.
- Τα δείγματα τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις της πηκτής και λαμβάνει χώρα η ηλεκτροφόρηση παρουσία συνεχούς τάσης 50-120 V, που ποικίλλει ανάλογα με την επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού, το μέγεθος της συσκευής και την περιεκτικότητά της σε αγαρόζη.

Η σύσταση της πηκτής αγαρόζης 0.8% είναι η εξής:

0.8g αγαρόζης 2ml 1x TAE 5μl βρωμιούχου αιθίδιου 98 ml H2O

Τελικός όγκος 100 ml

Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης είναι η εξής:

20ml 1x TAE

50μΙ βρωμιούχου αιθίδιου

980 ml H2O

Τελικός όγκος 1000 ml

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

1,25 % (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης

1,25 % (w/v) κυανολοξυλένιο

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

2.6 Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης

Ανάλογα με το μέγεθος του προς απομόνωση κλάσματος DNA προετοιμάζεται πηκτή αγαρόζης με συγκέντρωση 0,8% w/v.

- Το δείγμα αναλύεται ηλεκτροφορητικά. Εφόσον ο διαχωρισμός του κλάσματος, που πρόκειται να απομονωθεί από τα υπόλοιπα είναι ικανοποιητικός, αφαιρείται η ζώνη που το περικλείει με τη βοήθεια κοπιδιού.
- Το κομμάτι της πηκτής τοποθετείται σε φιαλίδιο Eppendorf 1,5ml.
- Εν συνεχεία τοποθετείται στους -80 °C για 15΄.
- Ακολουθεί απομόνωση DNA με βάση το πρωτόκολο της Macherey-Nagel NucleoSpin gel.

2.7 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 2 μΙ 10Χ ρυθμιστικού διαλύματος Τ4 της αντίδρασης.
- Προσθήκη 1 μl DNA Τ4 λιγάσης (0,1U/μl, NEBiolabs).
- Ανάμιξη του δείγματος και επώαση του στους 16 °C για 4-12 ώρες.

2.8 Βακτηριακά κύτταρα και μετασχηματισμός

2.8.1 Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων Escherichia coli

Μονή αποικία κατάλληλου βακτηριακού στελέχους DH5a αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB για 12 ώρες στους 37⁰C. Το βακτηριακό αυτό στέλεχος χρησιμοποιείται συνήθως για την κλωνοποίηση πλασμιδίων έχοντας υψηλή ικανότητα μετασχηματισμού (>1x106

transformants/μg pUC19 DNA). Ο γενότυπος χαρακτηρίζεται από την έλλειψη Δ(lacZ)M15 που εκφράζει το καρβόξυ τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης επιτρέποντας έτσι την ασυμπληρωματικότητα με το lac α τμήμα που κωδικοποείται από πολλούς πλασμιδιακούς φορείς. Έτσι είναι δυνατή η επιλογή μπλέ/άσπρων αποικιών.

- 2 ml από την αρχική καλλιέργεια μεταφέρονται σε κωνική φιάλη που περιέχει 200ml θρεπτικού μέσου LB. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37 ⁰C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητά της φτάσει O.D550 =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, 25 mM παγωμένου CaCl₂.
- Επαναλαμβάνεται ο ίδιος τρόπος κατακρήμνισης
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 75mM παγωμένου CaCl₂, 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.

2.8.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων Escherichia coli με πλασμιδιακό DNA

Η διαδικασία μετασχηματισμού περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Σε 200 μΙ δεκτικών κυττάρων DH5α προστίθενται 10-50 ng πλασμιδιακού DNA.
- Το μείγμα αναμιγνύεται και επωάζεται στον πάγο για 30min.
- Ακολουθεί θερμικό σοκ του δείγματος με επώαση για 2min στους 42°-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 5x10⁻³ και 50 mM αντίστοιχα.
- Επώαση των τρυβλίων για 12-16 ώρες σε θάλαμο 37°C.

2.9 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 ⁰C.

0.1ml από την αρχική καλλιέργεια μεταφέρονται σε κωνική φιάλη που περιέχει 100ml θρεπτικού μέσου LB. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 28 ⁰C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητά της φτάσει Ο.D550 =0,5-0,7.

- Η καλλιέργεια τοποθετείται για 15 λεπτά στον πάγο και τα βακτηριακά κύτταρα κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση για 10 min στις 3500 στροφές/λεπτό στους 40C.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 100 ml διαλύματος γλυκερόλης (10%v/v) και φυγοκεντρείται κατά τον ίδιο τρόπο.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 50 ml διαλύματος γλυκερόλης (10% v/v) και φυγοκεντρείται κατά τον ίδιο τρόπο.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 2 ml διαλύματος γλυκερόλης (10% v/v) και φυγοκεντρείται κατά τον ίδιο τρόπο. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 1 ml διαλύματος γλυκερόλης (10% v/v) (πυκνότητα 1011-1012 βακτήρια/ml). Δείγματα των 45 μl μοιράζονται σε φιαλίδια Eppendorf και καταψύχονται αμέσως με τη βοήθεια υγρού αζώτου. Μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα στους –80°C.
- Σε 45 μΙ δεκτικών κυττάρων προστίθενται 10-50 ng πλασμιδιακού DNA.
- Το μείγμα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται στον πάγο για 5 min.
- > Το δείγμα μεταφέρεται σε παγωμένη κυβέτα ηλεκτροπόρωσης, διαμέτρου 0.2 cm.

- Εφαρμόζεται ηλεκτρικός παλμός. Οι παράμετροι για το σύστημα της BioRad[®]Gene PulserII είναι χωρητικότητα 25 μF, αντίσταση 400 Ω (min) και 600 Ω (max) και ηλεκτρικό πεδίο 1,8 kV χρονικήs διάρκειας 8-12 msec.
- Αμέσως μετά ακολουθεί προσθήκη 1ml θρεπτικού μέσου LB, ανάμειξη του δείγματος και επώαση για 3 ώρες στους 28 °C.
- Φυγοκέντρηση του δείγματος για 1 min στις 10000 στροφές/λεπτό και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 100 μl 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 50 mg/L Ριφαμπικίνη για την επιλογή των κυττάρων του Agrobacterium, 50 mg/L Τζενταμυκίνη για την επιλογή του Τi πλασμιδίου του στελέχους GV3101και 50 mg/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 37ºC για 12 ώρες όσον αφορά το E.coli και στους 28 ºC για 24 ώρες όσον αφορά το Agrobacterium tumefaciens.

- > 600 μl από αυτή την καλλιέργεια μεταφέρονται σε φιαλίδιο eppendorf.
- Προσθήκη 300 μl γλυκερόλης 99%.
- Το δείγμα αναμειγνύεται έντονα και ψύχεται στο υγρό άζωτο.
- Αποθήκευση στους -80 °C.

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 370C για 12 ώρες.

Από αυτή την καλλιέργεια 1.5 ml μεταφέρεται σε Eppendorf tube και φυγοκεντρείται για 1 min στις 12000 στροφές/λεπτό.

- Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 200 μl διαλύματος P1.
- Προσθήκη 200μΙ από το διάλυμα λύσης Ρ2. Ακολουθεί πολύ ελαφριά ανακίνηση μέχρι το δείγμα να γίνει διαυγές..
- Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για το πολύ 3 λεπτά.
- Προσθήκη 200 μΙ διαλύματος 3M/5M CH3COOK, ανάμειξη και επώαση στον πάγο για
 15 min.
- Φυγοκέντρηση του δείγματος για 20 min στις 13000 στροφές/λεπτό.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό Eppendorf tube. Προστίθεται διπλάσιος όγκος αιθανόλης. Ανάμιξη 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 ddH₂O.

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 Macherey Nagel (Nucleospin plasmid) 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.
- > 1.5 ml της καλλιέργειας μεταφέρεται σε Eppendorf tube και φυγοκεντρείται για 2 min.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 200 μΙ Ρ1.
- Προσθήκη 20 μl από διάλυμα λυσοζύμης 20 mg/ml.
- Έντονη μίξη για 20 sec και τοποθέτηση στους 37 °C για 15 λεπτά.
- Προσθήκη 200 μΙ διαλύματος λύσης Ρ2.
- Έντονη μίξη για 20 sec και προσθήκη 50μl φαινόλης. Εντονη μείξη για 1 min (vortex).
- Προσθήκη 200 μΙ διαλύματος 3M/5M CH3COOK . Ακολουθεί έντονη μείξη.
- > Φυγοκέντρηση του δείγματος για 5 min 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 ddH₂O. 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 20-50 μl.

Σε eppendorf tube προστίθενται κατάλληλος όγκος ddH2O, 1/10 του όγκου 10x του κατάλληλου κατά περίσταση ρυθμιστικού διαλύματος, το DNA και τέλος το ένζυμο περιορισμού:

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

2.14 Μετασχηματισμός Arabidopsis thaliana

2.14.1 Μέθοδος διείσδυσης με εφαρμογή κενού σε ολόκληρα φυτά Arabidopsis.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου που περιγράφεται από τους Bechtold et al. (1993). Είναι προσαρμοσμένη για τη χρησιμοποίηση οικότυπων *Columbia* και *Landsberg erecta*. Με επιμέρους όμως τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου, η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για το σταθερό μετασχηματισμό άλλων οικότυπων Arabidopsis thaliana. Το ποσοστό επιτυχίας σταθερού μετασχηματισμού ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος και το αναπτυξιακό στάδιο των φυτών. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες που καθορίζουν τον αριθμό μετασχηματισμένων φυτών που θα δημιουργηθούν είναι η πυκνότητα της καλλιέργειας και το στέλεχος του Agrobacterium, η καλή εφαρμογή του κενού, και οι συνθήκες ανάπτυξης των φυτών μετά το μετασχηματισμένα σπέρματα. Το ποσοστό των

2.14.2 Ανάπτυξη φυτών και διείσδυση με κατάλληλο στέλεχος Agrobacterium.

Όταν τα φυτά φτάσουν ένα ύψος 20-25 cm 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.
- Iml αυτής της καλλιέργειας μεταφέρεται σε 500 ml θρεπτικό μέσο LB και αναπτύσσεται στους 28 °C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα φτάσει OD600=2.0.
- Τα βακτηριακά κύτταρα φυγοκεντρούνται για 5min στις 4500 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 500 ml και όλο το δοχείο τοποθετείται σε έναν κάδο κενού. Ενα 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 κενού εφαρμόζεται κενό 400 mm Hg, για 5-10 λεπτά.
- Μεταφορά των φυτών σε θάλαμο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασίας 22°C, υγρασία 40% και με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/ 8 ώρες σκοτάδι), μέχρι να κλείσουν τον κύκλο ζωής τους.
- Μόλις τα φυτά αφυδατωθούν, γίνεται συγκομιδή των σπερμάτων τους.

2.14.3 Επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών της Τ1 γενιάς

Σπέρματα Τ1 γενιάς αποστειρώνονται και επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο επιλογής MS. Το θρεπτικό μέσο είναι εμπλουτισμένο με κατάλληλα αντιβιοτικ που θα βοηθήσουν για την ορθή επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν το αντιβιοτικό υγρομυκίνη και σεφοταξίμη.

- Τα τρυβλία μεταφέρονται σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22°C υγρασία 40% και με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι).
- Τα τρυβλία επωάζονται σε αυτές τις συνθήκες για περίπου 14 ημέρες.
- Μετά από 5-7 ημέρες τα μετασχηματισμένα σπέρματα αναπτύσσονται σε σκούρο 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 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικών πρωτεϊνών από Arabidopsis

Για την απομόνωση ή την ταυτοποίηση μιας ενδοκυττάριας πρωτεΐνης πρέπει να αναπτυχθεί μια αποτελεσματική μέθοδος λύσης του κυττάρου, η οποία να απελευθερώνει την πρωτεΐνη σε διαλυτή μορφή από το κύτταρο χωρίς να την καταστρέφει.

υλικό

			+β Denature heat 1ml
		100Mm Sodium	100 µl
+ /	. ,	Phosphate pH 7.0 (final	
Φρεσκο	φυτικο	50mM)	
		10% SDS electrophoresis	200 µl
		pure (final 2%)	
		0.5M EDTA (final 10mM)	20 µl
		14.3 M	1 μΙ
		B-mercaptoethanol (final	
		10mM)	
		x100 Benzamidine (final	10 μl
		x1)	
		x30 PMSF	33,3 μl
		ddH ₂ O	635,7
		Τελικός όγκος	1 ml

Διάλυμα απομόνωσης πρωτεϊνών

ομογενοποιείται μέσα σε eppendorf tube με μικρο γουδί.

- Προσθέτουμε 100 μΙ από το διάλυμα απομόνωσης πρωτεϊνών και ακολουθεί ομογενοποίηση.
- Θερμαίνουμε τα eppendorf στους 90 °C για 5 λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά/13.000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καινούριο eppendorf tube.
- Ακολουθεί η προετοιμασία των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE).

2. 16 Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης αποτελεί ευρύτατα διαδεδομένη μέθοδο για τον διαχωρισμό διαφορετικών πρωτεϊνών που συνυπάρχουν σε ένα δείγμα και επίσης για τον έλεγχο της καθαρότητας πρωτεϊνικών δειγμάτων και την ανίχνευση ανεπιθύμητων προσμίξεων. Επιπλέον, η διαδικασία αποτελεί ουσιαστικό προπαρασκευαστικό στάδιο για την ενδελεχέστερη μελέτη των πρωτεϊνών, όπως κατά την ανοσοχημική τους ταυτοποίηση με την εφαρμογή της ανοσοαποτύπωσης. Αρχή λειτουργίας της μεθόδου αποτελεί ο διαχωρισμός των μορίων ανάλογα με το μέγεθος ή το φορτίο τους ή συνδυασμό των παραμέτρων, κατά τη μετακίνησή τους εντός ομογενούς ηλεκτρικού πεδίου. Η περισσότερο διαδεδομένη παραλλαγή της μεθόδου είναι με τη χρήση του δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS) σε αποδιατακτικές συνθήκες, όπου είναι επιπλέον δυνατός και ο προσδιορισμός των μοριακών μαζών των πρωτεϊνικών υπομονάδων. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με βάση τη μοριακή τους μάζα. Η πηκτή βαθμίδωσης ακρυλαμιδίου πλεονεκτεί έναντι της ομοιογενούς πηκτής, καθώς επιτρέπει τον διαχωρισμό πρωτεϊνών ευρύτερης κλίμακας μοριακών μαζών.

Διάλυμα για τη παρασκευή του Resolving gel 5ml					
Βαθμός gel	6%	8% (ml)	10% (ml)	12% (ml)	15% (ml)
	(ml)				
ddH ₂ O	2,6	2,3	1,9	1,6	1,1
30% acrylamide	1	1,3	1,7	2,0	2,5
(4°C)					
1.5M Tris pH 8,8	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
10% SDS	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
10% ammonium	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
persulfate APS					
TEMED (4°C)	0,004	0,003	0,002	0,002	0,002

Τροποποιημένο από Harlow E. & Lane D (1988)

Διάλυμα 5% Stacking gel 1ml	
ddH ₂ O	0,68 ml

30% acrylamide (4oC)	0,17 ml
1.5M Tris pH 6,8	0,13 ml
10% SDS	0,01 ml
10% ammonium persulfate APS	0,01 ml
TEMED (4oC)	0,001 ml

Τροποποιημένο από Harlow E. & Lane D (1988)

- Πρώτα γίνεται η προετοιμασία ενός διαλύματος 'foot gel' (ddH₂O,30% acrylamide (4 °C) 10% ammonium persulfate APS, TEMED (4°C)) που η χρήση του αποσκοπεί στο να μην υπάρχουν διαρροές κατά την κατασκευή των δύο στρώσεων gel. Η ποσότητα του εξαρτάται από το μέγεθος της βάσης της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Θέλουμε ένα λεπτό στρώμα να καλύπτει τον πάτο που δημιουργείται στο κενό μεταξύ του μικρού και του μεγαλύτερου γυαλιού της βάσης της συσκευής.
- Εφόσον έχει πολυμεριστεί το foot gel κατασκευάζουμε το resolving gel (TEMED πάντα στο τέλος) και φορτώνουμε το διάλυμα ως το επιθυμητό σημείο. Αναμένουμε 30 λεπτά έως το gel να πολυμεριστεί.
- Με τον ίδιο τρόπο γίνεται η τοποθέτηση του διαλύματος του stacking gel αυτή τη φορά έως να καλυφθεί πλήρως ο εναπομείναντας κενός χώρος μεταξύ των δύο γυαλιών της συσκευής ενώ έχουν τοποθετηθεί και οι κατάλληλες χτένες. Αναμένουμε περίπου άλλα 30 λεπτά.
- Τοποθετούμε κατάλληλα τη κατασκευή με τα γυαλία και το gel στη συσκευή ηλεκτροφόρησης ενώ έχουμε αφαιρέσει τις ειδικές χτένες και γεμίζουμε με 1x διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

5x διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1L)		
Tris	19,1 gr	
Glycine	94 gr	
0,1%SDS	2,5 gr	
ddH ₂ O	1000 ml	

Στη συνέχεια γίνεται η προετοιμασία του 1xSDS-διάλυμα φόρτωσης και φορτώνουμε στα πηγάδια μίγμα από 4 μl 1xSDS-διάλυμα φόρτωσης και 16μl δείγματος απομόνωσης πρωτεϊνών. Κρατάμε ένα πηγάδι για τον ειδικό Ladder (Blue Star Protein Marker-MWP03 Nippon Genetics).

1xSDS- διάλυμα φόρτωσης		
	x3	5ml
50mM Tris-Cl pH 6,8	150 mM	750 μl
100mM dithiothreitol DTT ⁽¹⁾	300 mM	100 μl

2% (w/v) SDS electrophoresis grade	6%	3ml
0,1% bromophenol blue	0,3%	15 mg
10% (v/v) glycerol	30%	1,5 ml

Διατηρείστε το 1xSDS-διάλυμα φόρτωσης χωρίς DDT σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέστε DDT από ένα στοκ 1Μ ακριβώς πριν την χρήση του διαλύματος.

Ρυθμίζουμε τη συσκευή στα 20 mA και 200V για 1 ώρα και 30 λεπτά.

2.17 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών-Western Blot

- Μετά την ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμίδης κόβουμε ένα κομμάτι PDVF μεμβράνης (Immobilon-P CAT. NO IPVH00010, millipore) σύμφωνα με τις διαστάσεις του gel μας.
- Με τον ίδιο τρόπο κόβουμε και 6 κομμάτια από απορροφητικό χαρτί Whattman 3M.
- Η μεμβράνη εμβαπτίζεται μέσα σε 100% μεθανόλη για 30" και μετά εμβαπτίζεται σε 1x διάλυμα μεταφοράς για 15 λεπτά. Τα 6 κομμάτια από το 3M χαρτί εμβαπτίζονται επίσης σε 1x διάλυμα μεταφοράς έως ότου εμποτιστούν καθ΄ όλη την επιφάνεια τους.

1x διάλυμα μεταφοράς (1L)	
48 mM Tris base	5,76 gr
39 mM Glycine	2,95 gr
10% SDS	3,75 ml
20 % methanol	200 ml
ddH ₂ O	Ως το 1L

Στη συνέχεια γίνεται η λεγόμενη τοποθέτηση 'sandwich' (όπως στην εικόνα) μέσα στην ειδική συσκευή, όπου τα ηλεκτρόδια της τοποθετημένα στο πάνω και το κάτω μέρος της με φορά από τα αρνητικά (πάνω) προς τα θετικά (κάτω).



Η συσκευή ρυθμίζεται στα 80mA και 14V για 1 ώρα.

2.17.1 Επώαση με τα αντισώματα

- Αφαιρούμε προσεκτικά την PVDF μεμβράνη από τη συσκευή και την εμβαπτίζουμε σε 1xTBST διάλυμα.
- Στη συνέχεια η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε 1xTBST 0.05% Tween-20 διάλυμα με 5% σκόνη γάλακτος για 1 ώρα.

10xTBS
100mM Tris-HCl pH 8,0
1,5M NaCl

- Το διάλυμα TBST/γάλα αφαιρείται και η με μεμβράνη ξεπλένεται με 1xTBST για 30 λεπτά (3x10λεπτά).
- Προστίθεται το 1° αντίσωμα (octA-Probe (H-5) sc-166355 Santa Cruz) με αραίωση σε διάλυμα TBST/γάλα 1:500 ή το αντίσωμα AS153037 Agrisera FLAG rabbit 1:1.000 και αφήνεται υπό ελαφρά ανάδευση στους 4°C για μία νύχτα.
- Την επομένη, το πρωτογενές αντίσωμα αφαιρείται και φυλάσσεται στους -20°C διότι μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί.
- Η μεμβράνη ξεπλένεται με 1xTBST για 30 λεπτά (3x10λεπτά).
- Προστίθεται το 2° αντίσωμα (goat anti mouse IgG-HRP sc2005 Santa Cruz) με αραίωση 1:6000 σε διάλυμα TBST/γάλα ή το αντίσωμα AS09602 Agrisera HRP Goat-anti-rabbit IgG 1:10.000 και αφήνεται υπό ελαφρά ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και 30 λεπτά.
- Το δεύτερο αντίσωμα αφαιρείται και φυλάσσεται όπως προαναφέρθηκε.
- Η μεμβράνη ξεπλένεται με 1xTBST για 30 λεπτά (3x10λεπτά) και ένα ακόμα ξέπλυμα με 1xTBS για 10 λεπτά.
- 2.17.2 Εμφάνιση σε φιλμ (σε σκοτεινό δωμάτιο, με τη χρήση κόκκινου φωτός)
 - Αφαιρούμε το TBS από τη μεμβράνη και προσθέτουμε 2ml Western Blotting Luminol Reagent (Immobilon Crescendo Western HRP substrate) στην επιφάνεια της μεμβράνης και επωάζουμε για 1 λεπτό.
 - Η μεμβράνη τοποθετείται σε μία νάιλον κόλλα στην κασέτα εμφάνισης με ένα κομμένο στις διαστάσεις της φιλμ (KODAK Biomax Film, chemiluminescence, CAT#1788207) από πάνω.
 - Μία ενισχυτική επιφάνεια τοποθετείτε πάνω από το φίλμ και η κασέτα κλείνεται για
 2 λεπτά.

- Το φιλμ στη συνέχεια εμβαπτίζεται διαδοχικά σε διαλύματα: 5 λεπτά σε διάλυμα Developer (KODAK), γρήγορο ξέπλυμα με νερό βρύσης, 2 λεπρά και 30'' σε διάλυμα FIXER(KODAK).
- 2.18 Υδατικά διαλύματα και θρεπτικά μέσα βακτηριακών κυττάρων και φυτών.
- 2.18.1 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.

IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)

200mg/ml σε dH2O. Κρατείται στους -200 C.

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

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

2.18.2 Διαλύματα ενζύμων και απομόνωσης πλασμιδιακού DNA.

Ρ1 ρυθμιστικό διάλυμα επαναδιάλυσης

50 mM Tris-Cl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0 και 100 μg/ ml RΝάσης.

Ρ2 ρυθμιστικό διάλυμα λύσης

0,2 N NaOH, 1% (w/v) SDS

ЗМ/5М СНЗСООК

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

ddH₂O.

Τ.Ε. ρυθμιστικό διάλυμα

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

Διαλύματα απομόνωσης ολικού RNA

2.18.3 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 (πολυβινυλπυρρολιδόνη, M.B 40.000), 2% (w/v) CTAB.

Sevag

(24:1) (Χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη)

2.18.4 Διαλύματα ηλεκτροφόρησης

10 x TBE διάλυμα ηλεκτροφόρησης

9,3gr/lt EDTA, 5,5gr/lt Boric acid, 108gr/lt Tris-Cl.

50 x TAE ρυθμιστικού διάλυματος

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

Βρωμιούχο αιθίδιο

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

Διάλυμα νουκλεοτιδίων

2,5 mM dATP, 2,5 mM dGTP, 2,5mM dTTP σε ddH2O.

(10% w/v) Ammonium Persulfate (APS)

1 g ammonium persulafate σε 10 ml H2O

30:0,8% διάλυμα ακρυλαμίδη:δισ-ακρυλαμίδη

30 g ακρυλαμίδη και 1 g δισ-ακρυλαμίδη

TEMED

Διατίθεται από την SIGMA

2.18.4 Διαλύματα και θρεπτικά μέσα ιστοκαλλιέργειας και μετασχηματισμού φυτών

Θρεπτικό μέσο ½ MS

¹/₂ x MS Θρεπτικό μέσο που αποτελείται από MS άλατα και βιταμίνες (4,3g/l ICN), 2% Σακχαρόζη, 0,5 g/l MES, 3g/l Phytagel, pH 5,7.

Διάλυμα διείσδυσης (IM)

Σε ένα λίτρο ddH2O διαλύουμε 2.2g MS θρεπτικό διάλυμα αλάτων, 1x B5 βιταμίνες (από 1000x), 50g σακχαρόζη, 0,5g MES, 8g/l Difco Bacto άγαρ, pH 5,7. Μετά την αποστείρωση προσθέτουμε 0,01 mg/lt BAP και 200μl Silwet L-77 (Osi Specialties).

Stock βιταμινών 1000Χ B5

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

Διαλύματα εμφάνισης φιλμ

• Developer (KODAK)

217ml από το διάλυμα Developer (KODAK) #1900943 σε νερό βρύσης ως το 1λίτο.

• Fixer (KODAK)

220ml από το διάλυμα Fixer (KODAK) #1901875 σε νερό βρύσης ως το 1λίτο.

2.18.5 Διαλύματα απομόνωσης ολικών πρωτεϊνών

• x30 PMSF (x100 actual)

17,43 mg σε 1 ml ισοπροπανόλης

• x100 βενζαμυδίνη (stock 330Mm-working 3,2mM)

50 mg σε 1 ml 1:1 αιθανόλης: ddH2O

• Sodium phosphate pH 7,0

57,7 μl Nα2HPO4 και 42,3 μl NaH2PO4 έως το 1 ml με ddH₂O

2.18.6 Διαλύματα πηκτής πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

• 1,5M Tris-HCl pH 8,8 και 1M Tris-HCl pH 6,8

Στα 50 ml προσθέτουμε 6,057 gr Tris και το pH ρυθμίζεται με HCl στο 6,8

Στα 50 ml προσθέτουμε 9,08 gr Tris και το pH ρυθμίζεται με HCl στο 8,8

Αποτελέσματα

3.1 Η μετάλλαξη S841A & K884A στη LON1 πρωτεάση

Με στόχο την κατασκευή πρωτεολυτικά ανενεργών πρωτεασών LON1 εστιάσαμε στην τροποποίηση του πρωτεολυτικού κέντρου της πρωτεάσης. Είναι γνωστό ότι το καταλυτικό κέντρο της πρωτεάσης LON αντιπροσωπεύεται από μία δυάδα Σερίνης-Λυσίνης (Rotanova et al., 2003) και η τροποποίηση των παραπάνω αμινοξικών κατάλοιπων έχει φανεί να στερεί την πρωτεολυτική ενεργότητα της πρωτεάσης διατηρώντας παράλληλα την ATP ενεργότητα του ενζύμου. Συγκεκριμένα με την αντικατάσταση του κατάλλοιπου Λυσίνης σε Γλουταμίνη (L722G) (Rotanova et al., 2003) είτε του κατάλλοιπου Σερίνης (S679A) σε Αλλανίνη στο *E. coli* (Starkova et al., 1998; Melderent & Gottesman, 1999; Fischer & Glockshuber, 1993) έχει αποδειχθεί η πλήρης απενεργοποίηση της πρωτεολυτικής δραστηριότητας της LON. Επιπλέον, σε πρόσφατη μελέτη έγινε επιτυχής χρήση του μεταλλάγματος *S679A lon* στο *E. coli* ως σύστημα παγίδας υποστρωμάτων (Arends et al., 2018). Το μετάλλαγμα διατηρούσε την ικανότητα δέσμευσης των υποστρωμάτων της LON αλλά στερούνταν πρωτεολυτικής δράσης. Καθιστώντας έτσι τα υποστρώματα που αλληλεπιδρούσαν με το πρωτεολυτικό σύστημα της LON, ικανά προς ταυτοποίηση μέσω τεχνικών υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας LC-MS/MS.

Η πολλαπλή ευθυγράμμιση του πρωτεολυτικού τμήματος των πρωτεϊνών LON μεταξύ ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών οργανισμών, όπως φαίνεται στην εικόνα 11, υποδεικνύει την ισχυρά συντηρημένη καταλυτική δυάδα Σερίνης-Λυσίνης μεταξύ ενός μεγάλου εύρους διαφορετικών οργανισμών. Για τις ανάγκες του πειράματος και με βάση τα παραπάνω δεδομένα της πολλαπλής ευθυγράμμισης των πρωτεϊνών LON όσο και των μέχρι σήμερα πειραματικών δεδομένων, δημιουργήθηκε διαγονιδιακή κατασκευή για το *Arabidopsis thaliana* η οποία φέρει το γονίδιο της *LON1* έπειτα από την αντικατάσταση των αμινοξέων Σερίνη-Λυσίνη με αμινοξέα Αλανίνης (S841A και K884A). Με την παραπάνω κατασκευή, στοχεύουμε στη δημιουργία διαγονιδιακών σειρών φυτών στις οποίες η LON1 δεν θα έχει τη δυνατότητα πρωτεόλυσης υποστρωμάτων. Επιτρέποντας παράλληλα την παρατήρηση της επίδρασης της απενεργοποίησης της LON1 πρωτεόλυσης κυρίως στα μιτοχόνδρια, αλλά και στους χλωροπλάστες του φυτικού οργανισμού, όσο και την μετέπειτα χρήση αυτής της κατασκευής ως παγίδα υποστρωμάτων. Είναι σημαντικό να αναφερθεί επιπλέον ότι δεν

υπάρχουν αντίστοιχες μελέτες που αφορούν την πρωτεολυτική απενεργοποίηση, καμίας από τις τέσσερις ισομορφές LON στο Arabidopsis thaliana έως σήμερα.



Εικόνα 11 Πολλαπλή ευθυγράμμιση του πρωτεολυτικού τμήματος της Lon πρωτεάσης

Πολλαπλή ευθυγράμμιση μεταξύ των αμινοξικών ακολουθιών του πρωτεολυτικού τμήματος της LON πρωτεάσης του *Escherichia Coli* 06:H1 (Uniprot Accsession P0A9M1), του *Escherichia coli* στέλεχος K12 (LON E.coli/Uniprot Accsession P0A9M0), της LON1 του *Bacillus subtilis* στέλεχος 168 (Uniprot Accsession P37945), των 4 LON (LON1-LON4) του *Arabidopsis thaliana* (Uniprot Accsession P93655, O64948, Q9M9L8 and Q9M9L7), της PIM1 του *Saccharomyces cerevisiae* (Uniprot Accsession P36775), των LONP1 και LONP2 του *Mus musculus* (Uniprot Accsession Q8CGK3 and Q9DBN5) και των LONP1 και LONP2 του ανθρώπου-*Homo sapiens* (Uniprot Accsession P36776 and Q86WA8). Σε κόκκινο πλαίσιο φαίνονται τα συντηρημένα κατάλοιπα των αμινοξέων σερίνης (S) και λυσίνης (K) μεταξύ των διαφορετικών ειδών προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών. Η πολλαπλή ευθυγράμμιση των πρωτεολυτικών τμημάτων των παράπανω πρωτεϊνών διεξάχθηκε μέσω Protein BLAST (<u>https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</u>) και τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν μέσω του λογισμικού GeneDoc 2.7.

3.2 Διαγονιδιακή κατασκευή *pLON1::LON1^{trap}-FLAG*

Η κατασκευή που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία πρωτεολυτικά ανενεργών πρωτεασών LON1, με αντικατάσταση των αμινοξέων Σερίνη-Λυσίνη της καταλυτικής δυάδας της πρωτάσης με αμινοξέα Αλανίνης (S841A-K884A), σημάνθηκε με επίτοπο *FLAG* (DYKDDDDK) στο καρβοξυτελικό άκρο της τροποποιημένης πρωτεάσης. 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 τις κατασκευές, σχεδιάστηκε με τέτοιο τρόπο ώστε στο καρβοξύ άκρο της πρωτεΐνης να προστίθεται το FLAG πεπτίδιο 1.5 φορές (DYKDDDDKDYKD). Η επιλογή της τοποθέτησης του επίτοπου FLAG στη συγκεκριμένη περιοχή της LON έγινε με γνώμονα ότι η LON1 πρωτεάση στο *Arabidopsis thaliana* έχει δυαδική στόχευση (μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες) μέσω της παρουσίας δύο κωδικονίων έναρξης στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο της νουκλεοτιδικής αμινοτελικής περιοχής του γονιδίου της. Επομένως, προς αποφυγή αλληλεπίδραδης με την διαδικασία της κατάταξης της πρωτεΐνης το επίτοπο τοποθετήθηκε στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεάσης έναντι του αμινοτελικού άκρου.

Με τους εκκινητές [For At5g26860/Lon1-FLAG-Rev] ενισχύθηκε με PCR (Annealing 58°C, Extension 72°C 5min, 21 cycles) το τμήμα του γονιδίου *LON1* με τον ενδογενή προαγωγέα/υποκινητή, από το BAC F2P16 (αραίωση 1/1000). Το προϊόν PCR κλωνοποιήθηκε στη θέση Smal του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pUC19 (εικόνα 12).



Εικόνα 12 Η κατασκευή *pLON1::LON1-FLAG* στο pUC19

Έπειτα από ενίσχυση και πέψη του *LON1*-pUC19 με την ενδονουκλεάση περιορισμού Sbfl, πραγματοποιήθηκε η αφαίρεση τμήματος 447bp μεταξύ των δύο θέσεων Sbfl του πρωτεολυτικού άκρου της LON1 όπου εδράζεται η καταλυτική δυάδα Σερίνης-Λυσίνης της πρωτεάσης. Στη συνέχεια το *LON1*-pUC19 κλωνοποιήθηκε με το τροποποιημένο τμήμα 447bp το οποίο φέρει την τροποποιημένη καταλυτική δυάδα Σερίνης-Λυσίνης προς Αλανίνη-Αλανίνη (SK→AA) (εικόνα 13).



pLON1::LON1^{trap}-FLAG

Εικόνα 13 Εισαγωγή του τροποποιημένου τμήματος με την μετάλλαξη S841A- K884A στο pUC19

Επιπρόσθετα, στο πλέον τροποποιημένο πρωτεολυτικό τμήμα του καρβοξυ τελικού τμήματος της πρωτεάσης εισάχθηκε και μία θέση αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης

Kpnl με σκοπό την διάκριση του γονιδίου που φέρει τη μετάλλαξη από το φυσιολογικό γονίδιο (μάρτυρα).

Ο φορέας στάλθηκε για αλληλούχιση DNA για να πιστοποιηθεί ότι δεν έχει γίνει κάποιο λάθος κατά την ενίσχυση του τμήματος με PCR και ότι είχαν προκύψει οι σημειακές μετάλλαξεις S(841)A (AGT→ GCT) και K(884)A (AAA→GCT) (εικόνα14).



Εικόνα 14 Χάρτης των μεταλλάξεων S(841)A (AGT \rightarrow GCT) και K(884)A (AAA \rightarrow GCT)

Ολόκληρη η κατασκευή απομονώθηκε από το Puc19 με το ένζυμο περιορισμού Sall και κλωνοποιήθηκε στη Sall θέση του δυαδικού φορέα HPT-pAnos XS (εικόνα 15).

pLon1::Lon1^{trap}-Flag in HPT-pAnos



Εικόνα 15 Χάρτης του ΗΡΤ-pAnos XS με την κατασκευή pLON1:LON1^{trap}-FLAG

3.3 Διαγονιδιακές σειρές φυτών με το γονίδιο LON1^{trap}

Σπέρματα της γενιάς Τ1 μετασχηματισμένων φυτών, αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο με επιλογή στο αντιβιοτικό Υγρομυκίνη. Από κάθε κατασκευή με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο επιλέχθηκαν τα ανθεκτικά φυτά, τα οποία μεταφέρθηκαν σε νέα τρυβλία με απλό

θρεπτικό μέσο ανάπτυξης και από κάθε φυτό συλλέχθηκαν μεμονωμένα οι απόγονοι της γενιάς T2 (πίνακας 1), η διαδικασία επιλογής απεικονίζεται στην εικόνα 16.



Εικόνα 16 Διαδικασία επιλογής μετασχηματισμένων φυτών

Διαγονιδιακές σειρές φυτών με το γονίδιο lon1^{trap}

Υπόβαθρο	Κατασκευή	Lines
lon1-1 (D-3)	pLON1::LON1 ^{trap} -FLAG	2
lon1-1-mito-gfp (D-3 mito-gfp)	pLON1:: <i>LON1</i> ^{trap} -FLAG	25

Πίνακας 1 Διαγονιδιακές σειρές φυτών με το γονίδιο LON1^{trap} Απόγονοι της γενιάς T2 μετασχηματισμένων φυτών που φέρουν την κατασκευή pLON1::LON1^{trap}-FLAG του. Η έκφραση του διαγονιδίου ελέγχεται από τους προαγωγείς του γονιδίου LON1. Τα διαγονίδια ενσωματώθηκαν με σταθερό μετασχηματισμό στα γενετικά υπόβαθρα lon1-1 (D3) και lon1-1 mito-gfp (D3 mito-gfp).

3.4 Η κατασκευή PLon1:Lon1^{trap}-Flag αναστρέφει σε διαφορετικό βαθμό ανάλογα με το υπόβαθρο το φαινότυπο του *lon1-1*.

Η δοκιμή συμπληρωματικότητας έγινε πρώτα στο μεταλλάγμα του γονιδίου LON1, lon1-1(D-3) και στη συνέχεια στο μεταλλάγματα lon1-1 με το γονίδιο αναφοράς GFP (mito-gfp) το οποίο από το πεπτίδιο σήματος της ATP συνθετάσης τοποθετεί τη πρωτεΐνη στα μιτοχόνδρια (Logan et al., 2000). Από την ανάλυση των φαινοτύπων προκύπτει ότι τα η κατασκευή pLON1::LON1^{trap}-FLAG μπορεί να αναστρέψει τον φαινότυπο των μεταλλαγμάτων lon1-1 σε διαφορετικό ποσοστό ανάλογα με την ύπαρξη (Εικόνα 17) ή όχι (Εικόνα 18) του γονιδίου mito-gfp στο υπόβαθρο lon1-1.



COL-0 N1093



lon1-1



pLON1::LON1 -*FLAG* Υπόβαθρο *lon1-1* line 3



pLON1::LON1 - FLAG Yπόβαθρο *lon1-1* line 5

Εικόνα 17 Μετασχησμένα φυτά *lon1-1* με την κατασκευή *pLON1::LON1^{trop}-FLAG* ηλικίας 5 ημερών



Εικόνα 18 Μετασχηματισμένα φυτά *lon1-1-mito-gfp* με την κατασκευή *pLON1::LON1^{trap}-FLAG* ηλικίας 5 ημερών.

Συγκεκριμένα, ακολούθησε σύγκριση της πρωτογενούς ανάπτυξης (μετρήσεις μήκους πρωτογενούς ρίζας σε αρτίβλαστα 5 ημερών) των διαγονιδιακών φυτών *lon1-1* με την κατασκευή *pLON1::LON1^{trap}-FLAG* (T2 γενιά) με μάρτυρες φυτά αγρίου τύπου *COL-0* και φυτά *lon1-1*, με σκοπό να ελεγχθεί εάν η εισαγωγή του γονιδίου *LON1* με τροποποιημένο πρωτεολυτικό κέντρο της πρωτεάσης σε υπόβαθρο *lon1-1* προκαλεί σε κάποιο βαθμό την αναστροφή του φαινότυπου *lon1-1* (γράφημα 1). Η ίδια πειραματική προσέγγιση εφαρμόστηκε στα διαγονιδιακά φυτά *lon1-1 mito-gfp* με την κατασκευή *pLON1::LON1^{trap}-FLAG* (T2 γενιά) με μάρτυρες φυτά αγρίου τύπου 20.

Από τις βιομετρικές αναλύσεις δύο απογόνων T2 γενιάς φυτών με υπόβαθρο *lon1-1* παρατηρείται ότι οι δύο σειρές φυτών ονομαζόμενες, 3 και 5, αποκλίνουν από τον προβληματικό φαινότυπο *lon1-1* αναστρέφοντάς τον κατά περίπου 50% (γράφημα 1, εικόνα 17). Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι, η βιομετρική ανάλυση των φυτών με υπόβαθρο *lon1-1 mito-gfp*, έδειξε ισχυρή (40-45%) έως και πλήρη (100%) αναστροφή του φαινοτύπου *lon1-1 mito-gfp* στις T2 σειρές διαγονιδιακών φυτών (γράφημα 2, εικόνα 18). Ωστόσο, οι τιμές του μήκους ρίζας έδειξαν μεγάλη διακύμανση εντός κάθε σειράς διαγονιδιακών φυτών επιδεικνύοντας την υψηλή ανομοιογένεια κατά την ανάπτυξη των αρτίβλαστων της γενιάς T2 σε υπόβαθρο *lon1-1 mito-gfp* (γράφημα 2, εικόνα 19).



Διασπορά τιμών μήκους πρωτογενούς ρίζας 5 ημερών φυτά Τ2 γενιά

1 **Γράφημα 1** Διασπορά των μετρήσεων του μήκους πρωτογενούς ρίζας σε αρτίβλαστα 5 ημερών T2 γενιάς μετασχηματισμένων *lon1-1* μεταλλάγματων με την κατασκευή *pLON1::LON1^{trap}-FLAG*



2 **Γράφημα 2** Διασπορά των μετρήσεων του μήκους πρωτογενούς ρίζας σε αρτίβλαστα 5 ημερών T2 γενιάς μετασχηματισμένων *lon1-1 mito-gfp* μεταλλάγματων με την κατασκευή *pLON1::LON1*^{trap}-FLAG.



Εικόνα 19: Η ανομοιομορφία των μετασχηματισμένων *lon1-1 mito-GFP* μεταλλάγματων με την κατασκευή *pLON1::LON1^{trap}-FLAG* σε σχέση με τον μάρτυρα *COL-0*.

Το γράφημα 3, απεικονίζει το μέσο όρο μήκους πρωτογενών ριζών των δύο σειρών διαγονιδιακών φυτών του πειραμάτος 1 (lines 3 και 5) με υπόβαθρο *lon1-1* και επιλεγμένων σειρών διαγονιδιακών φυτών του πειράματος 2 (lines 1, 2, 4,5 και 6) με το υπόβαθρο *lon1-1 mito-gfp*. Όλες οι μετρήσεις μήκους πρωτογενών ριζών αφορούσαν αρτίβλαστα 5 ημερών T2 γενιάς μετασχηματισμένων φυτών όπου αναπτύσσονταν σε θρεπτικό μέσω MS½. Παρατηρείται ότι και στα δύο πειράματα εμφανίζονται διαγονιδιακά φυτά όπου υπάρχει 40-50% αναστροφή του φαινοτύπου *lon1-1* όμως στο υπόβαθρο *lon1-1 mito-gfp* υπήρχαν σειρές διαγονιδιακών φυτών, όπου η κατασκευή *pLON1::LON1^{trap}-FLAG* μπόρεσε να αναστρέψει πλήρως το φαινότυπο *lon1-1* (σειρές 4 και 5). Επιπλέον, μεταξύ των μαρτύρων *lon1-1* και *lon1-1 mito-gfp* δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς την πρωτογενή ανάπτυξη ριζών καθώς και τα δύο μεταλλάγματα παρουσίασαν μικρή και επιβραδυμένη βλαστικότητα. Παρόλα αυτά, οι μορφομετρικές μετρήσεις με το κάθε γενετικό υπόβαθρο διεξάχθηκαν ως ανεξάρτητα πειράματα όπου ενδέχεται οι συνθήκες ανάπτυξης να διαφέρουν ελαφρώς, όπως αποκαλύπτει και ο λόγος των μέσω όρων των οικότυπων *COL-0* για τα παραπάνω πειράματα, M.O. *COL-0*^{πείραμα 1}/ M.O. *COL-0*^{πείραμα 2} = 0,51.



Μήκος πρωτογενών ριζών φυτων Τ2 γενιάς 5 ημερών

*result is significant at p < 0.05, p-value is < 0.00001 compared with *Col-0* *result is significant at p < 0.05, p-value is < 0.00001 compared with *Col-0*

3 **Γράφημα 3** Μέσοι όροι μήκους πρωτογενούς ρίζας σε αρτίβλαστα 5 ημερών T2 γενιάς μετασχηματισμένων *lon1-1* μεταλλάγματων με την κατασκευή *pLON1::LON1^{trap}-FLAG* (lines 3 και 5 πείραμα 1) και *lon1-1 mito-gfp* φυτών με την κατασκευή *pLON1::LON1^{trap}-FLAG* (lines 1, 2 και 4 πείραμα 2).

3.5 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών LON1^{trap}

Για την απόδειξη της έκφρασης της πρωτεολυτικά τροποποιημένης πρωτεάσης LON1 με τις σημειακές μεταλλάξεις S841A και K884A έγινε χρήση της διαδικασία ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών ή διαφορετικά Western Blot. Η πρωτεάση LON1 (γονίδιο At5g26860) στο φυτό *Arabidopsis thaliana* είναι ένα πολυπεπτίδιο 985 αμινοξέων και μοριακού βάρους 109kDA (σύντηξη με επίτοπο FLAG ≈112 kDA). Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα η έκφραση της πρωτεΐνης LON1^{trap} αποτυπώθηκε σε όλες τις επιλεγμένες σειρές διαγονιδιακών φυτών τα οποία έφερα την κατασκευή *pLON1::LON1^{trap}-FLAG* και στα δύο υπόβαθρα, *lon1-1* και *lon1-1 mito-gfp*.



Εικόνα 19 Western Blot lon1-1 φυτών που φέρουν την κατασκευή pLON1::LON1^{trap}-FLAG

Οι ολικές πρωτεϊνες απομονώθηκαν από αρτίβλαστα 5 ημερών των lines 3 και 5 με αρνητικό και θετικό μάρτυρα αρτύβλαστα *COL-O* και αρτύβλαστα με έκφραση της κατασκευής *35S::LON1-SHORT::FLAG* (Daras et al., 2014), αντίστοιχα. Η ανοσοαποτύπωση της πρωτεάσης LON1^{S841A/K884A} σε σύντηξη με το επίτοπο FLAG πραγματοποιήθηκε με το πρωτογενές αντίσωμα octA-Probe (H-5) (sc-166355 Santa Cruz) αραίωση 1:500 και το δευτερογενές αντίσωμα goat anti mouse IgG-HRP (sc2005 Santa Cruz) με αραίωση 1:6000, πηκτή πολυακρυλαμίδης 0,6%, Η PDVF μεμβράνη εμφανίζεται ύστερα από χρώση 1% Ponceau S. με 5% Acetic Acid.



Εικόνα 20 Western Blot lon1-1-mito-gfp φυτών που φέρουν την κατασκευή pLON1::LON1^{trap}-FLAG

Οι ολικές πρωτεΐνες απομονώθηκαν από αρτίβλαστα 5 ημερών των lines 1,2,4 και 6 όσο και του line 3 με υπόβαθρο *lon1-1*, με αρνητικό και θετικό μάρτυρα αρτύβλαστα COL-0 και αρτύβλαστα με έκφραση της κατασκευής *35S::LON1-SHORT::FLAG* (Daras et al., 2014), αντίστοιχα. Η ανοσοαποτύπωση της πρωτεάσης LON1^{S841A/K884A} σε σύντηξη με το επίτοπο FLAG πραγματοποιήθηκε με το πρωτογενές αντίσωμα AS153037 Agrisera FLAG rabbit αραίωση1:1000 και το δευτερογενές αντίσωμα AS09602 Agrisera HRP Goat-anti-rabbit IgG με αραίωση 1:10.000, πηκτή πολυακρυλαμίδης 0,8%, Η PDVF μεμβράνη εμφανίζεται ύστερα από χρώση 1% Ponceau S. με 5% Acetic Acid, To gel απεικονίζεται με χρώση Coomassie 0,2% Brilliant blue R-250.

Συζήτηση

4.1 Οι σημειακές μεταλλάξεις στην καταλυτική δυάδα του πρωτεολυτικού κέντρου της LON αναστέλλουν την πρωτεολυτική της δράση

Η πολλαπλή ευθυγράμμιση των πρωτεολυτικών κέντρων των LON πρωτεασών, μεταξύ ενός πλήθους καλά μελετημένων προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών (εικόνα 11) φανερώνει ότι η καταλυτική δυάδα Σερίνης-Λυσίνης είναι ισχυρά συντηρημένη ανάμεσα στα διαφορετικά είδη. Επιπλέον, υπάρχουν αρκετές μελέτες οι οποίες αποδεικνύουν ότι μέσω κατευθυνόμενης σημειακής μετάλλαξης στο αμινοξύ Σερίνη της καταλυτικής δυάδας της LON, πραγματοποιείται η ολική απενεργοποίηση της πρωτεολυτικής δραστηριότητας του ενζύμου, ενώ παράλληλα η ATP ενεργότητα του ενζύμου παραμένει ανεπηρέαστη τουλάχιστον στο *Ε. coli.* Οι παραπάνω μελέτες συγκαταλέγονται στο πίνακα 2, αποδεικνύοντας και πειραματικά το γεγονός ότι η καταλυτική δυάδα Σερίνης λόγω της ισχυρής της συντήρησης, έχει παρόμοια λειτουργία από τους προκαρυώτες μέχρι τους ευκαρυώτες και η τροποποίηση των παραπάνω αμινοξικών κατάλοιπων είναι ικανή να επιφέρει την πρωτεολυτική απενεργοποίηση της πρωτεάσης LON.

Οργανισμός	Πρωτεϊνη UniProt	Σερίνη	Λυσίνη	Απενεργοποίησ η πρωτεόλυσης	Ενεργότητα ΑΤΡ	Αναφορά
E. coli	P0A9M0	S679A	-	✓	~	Starkova et al., 1998
E. coli	P0A9M0	-	K722Q	~	80% ενεργότητα	Rotanova et al., 2002
E. coli	POA9MO	S679A	-	~	√	Fischer & Glockshuber, 1993
E. coli	P0A9M0	S679A	-	✓	~	Starkova et al., 1998
E. coli	P0A9M0	S679A	-	✓	~	Liao et al., 2018
Human	P36776	S855A	-	✓	Х	Liu et al., 2004
Human	Q86WA8	S743A	-	✓	-	Okumoto et al., 2011
S. cerevisiae	P36775	S1015A	-	✓	-	Wagner et al., 1997

Πίνακας 2 Πειράματα όπου απενεργοποιήθηκε η πρωτεολυτική ενεργότητα της LON πρωτεάσης μέσω της τροποποίησης της καταλυτικής δυάδας Σερίνης-Λυσίνης.

Με βάση τα παραπάνω πειραματικά στοιχεία, επιλέξαμε για το Arabidopsis thaliana, στο οποίο δεν υπάρχουν ακόμη αντίστοιχα δεδομένα, να αντικαταστήσουμε την καταλυτική δυάδα Σερίνης-Λυσίνης με αμινοξέα Αλανίνης, στοχεύοντας στην ισχυρή πρωτεολυτική απενεργοποίηση της LON1 πρωτεάσης.

Η κατασκευή *pLON1::LON1^{trap}-FLAG* φάνηκε να αναστρέφει κατά 50% τον προβληματικό φαινότυπο της κοντής πρωτογενούς ρίζας του *lon1-1* μεταλάγματος, το οποίο προέρχεται από σημειακή EMS μεταλλαξιγένεση (W903→κωδικόνιο λήξης) δημιουργώντας ένα πρώιμο κωδικόνιο λήξης στο SSD τμήμα του γονιδίου και οδηγώντας στην έκφραση μίας μη λειτουργικής LON1 πρωτεάσης. Η αναστροφή του φαινότυπου κατά το ήμισυ με την παραπάνω κατασκευή που φέρει την ανενεργή πρωτεολυτικά LON1 σε γενετικό υπόβαθρο *lon1-1* όπου δεν υφίσταται η λειτουργία της πρωτεάσης αυτής, μπορεί να ερμηνευτεί αν ληφθεί υπόψη και η δράση της LON1 ως μοριακός συνοδός.

Συγκεκριμένα, όπως προαναφέρθηκε, αρκετές έρευνες έχουν δείξει ότι η τροποποίηση ενός από τα δύο αμινοξέα της καταλυτικής δυάδας της LON πρωτεάσης οδηγεί στην πλήρη απενεργοποίηση της πρωτεόλυσής της σε κυτταρικές σειρές ανθρώπου, στη ζύμη και στο *E. coli* (πίνακας 2). Επιπλέον, η πολλαπλή ευθυγράμμιση των πρωτεϊνών LON έδειξε ότι η καταλυτική δυάδα της πρωτεάσης είναι ισχυρά συντηρημένη από τους προκαρυώτες ως τους ευκαρυώτες. Στην κατασκευή *pLON1::LON1^{trap}-FLAG* έχουν τροποποιηθεί και τα δύο αμινοξέα της καταλυτικής δυάδας της LON1, με σκοπό την ισχυρή απενεργοποίηση της πρωτεόλυσης της πρωτεάσης. Επομένως, εφόσον όλα τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η LON πρωτεάση με τροποιημένη την καταλυτική δυάδα της δεν έχει την ικανότητα πρωτεόλυσης υποστρωμάτων, η αναστροφή του φαινότυπου της μετάλλαξης *lon1-1* κατά το ήμισυ στις σειρές φυτών στα 3 και 5 (γράφημα 1) της κατασκευής pLON1::*LON1^{trap}*-FLAG σε υπόβαθρο *lon1-1* και των σειρών 1 και 6 (γράφημα 2) της ίδιας κατασκευής σε υπόβαθρο *lon1-1 mitogfp*, μπορεί να αναδεικνύει τη λειτουργία της LON1 ως μοριακό συνοδό.

Η ύπαρξη μη λειτουργικής πρωτεάσης LON1 στο γενετικό υπόβαθρο των διαγονιδιακών φυτών και η εισαγωγή, μέσω της κατασκευής *pLON1::LON1^{trap}-FLAG*, της LON1^{trap}πρωτεάσης οδηγεί στην έκφραση της πρωτεολυτικά ανενεργής LON1 η οποία όμως διατηρεί τη λειτουργία της ως μοριακός συνοδός. Κάτω από τις συνθήκες έλλειψης LON1 πρωτεόλυσης, η LON1^{trap} με λειτουργία μοριακού συνοδού φαίνεται να μετριάζει τις αρνητικές επιδράσεις της πρωτεολυτικής της απενεργοποίησης μέσω της αναδίπλωσης των μη ορθά αναδιπλωμένων πρωτεϊνικών μορίων στο μιτοχονδριακό περιβάλλον. Με αυτό τον τρόπο αναδεικνύεται η διττή της λειτουργία της LON1 ως πρωτεάση αλλά και ως μοριακού συνοδού, εμποδίζοντας τη συσσώρευση επιβλαβών πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων στα μιτοχόνδρια του κυττάρου μέσω της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Παρά αυτή την πιθανή βιολογική ερμηνεία της μερικής αναστροφής του φαινοτύπου *lon1-1* όσο αφορά την

ανάπτυξη των πρωτογενών ριζών, χρειάζεται επιπλέον έρευνα για να αποσαφηνιστεί η συμβολή της LON1 ως μοριακός συνοδός μέσω της χρήσης της κατασκευής *pLON1::LON1^{trap}-FLAG.*

4. 2 Η ενσωμάτωση των απαραίτητων παραμέτρων για ένα αποτελεσματικό σύστημα παγίδας υποστρωμάτων

Στον πειραματικό σχεδιασμό έχουν ενσωματωθεί και οι βασικοί παράμετροι για να διασφαλιστεί η λειτουργική αποτελεσματικότητας παγίδευσης των υποστρωμάτων που αποτελούν του πρωτεολυτικούς στόχους της πρωτάσης LON1. Όσον αφορά τη σήμανση της κατασκευής *pLON1::LON1^{trap}-FLAG* έγινε χρήση του επίτοπου FLAG στο C-τελικό άκρο της πρωτεάσης ώστε να είναι δυνατή η ανοσοανίχνευση του και η ανοσοκατακρήμνιση των πρεωτεινικών συμπλόκων. Διαφορετικού είδους σήμανση έχει χρησιμοποιηθεί στις μελέτες παγίδευσης υποστρωμάτων. Στην περίπτωση πρωτεϊνών όπου έχουν μία N-τελική (αποσπώμενη') ακολουθία σήματος (π.χ. για στόχευση στα μιτοχόνδρια ή στους χλωροπλάστες), η σήμανση τοποθετείται στο C-τελικό άκρο ώστε να μην αλληλεπιδρά με την διαδικασία της υποκυτταρικής τοποθέτησης όπως στην περίπτωση της LON1. Επίσης, η CLPP στο *E. coli* (και πιθανώς και σε άλλα είδη) (Maurizi et al., 1990) η LON πρωτεάση PIM1 στα μιτοχόνδρια του *S. cerevisiae* (Wagner et al., 1997) και μέλη των FTSH στα μιτοχόνδρια (κορο των πρωτεασών.

Η επιλογή του ενδογενή πρωαγωγέας του γονιδίου *LON1* έγινε με σκοπό τη διατήρηση της ομοιόστασης του πρωτεώματος στα οργανίδια του φυτικού κυττάρου. Ειδικότερα, οι πρωτεάσες ή στοιχεία των πρωτεολυτικών συστημάτων, όπως οι μοριακοί συνοδοί ή πρωτεΐνες σύνδεσης, μπορεί να εκφράζονται σε συγκεκριμένες κυτταρικές καταστάσεις ή μόνο ως απόκριση συγκεκριμένων περιβαλλοντολογικών συνθηκών. Επομένως, κάτω από αυτές τις συνθήκες οι ενδογενείς (γενωμικά) υποκινητές ίσως αποφέρουν τα περισσότερο συναφή αποτελέσματα όσον αφορά την φυσιολογία του οργανισμού.

Επιπλέον, η ισομορφή LON1 τοποθετείται και στους χλωροπλάστες του Arabidopsis thaliana πέρα από τα μιτοχόνδρια του φυτού και άρα θα αποτελέσει σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη της λειτουργίας του LON πρωτεολυτικού μηχανισμού και στα πλαστίδια. Η χρήση του μεταλλάγματος *lon1-1* ως γενετικό υπόβαθρο της διαγονιδιακής κατασκευής, θα επιτρέψει να πραγματοποιηθούν βιομετρικές αναλύσεις για την καλύτερη ταυτοποίηση των

διαγονιδιακών φυτών εξαιτίας του χαρακτηριστικού φαινοτύπου της αναπτυξιακής καθυστέρησης και της κοντής πρωτογενούς ρίζας του. Τα αναπτυξιακά αυτά χαρακτηριστικά μπορούν εύκολα να βιομετρηθούν, σε διάστημα μικρότερο των επτά ημερών, με αποτέλεσμα τον αποτελεσματικό και γρήγορο χαρακτηρισμό των σταθερών διαγονιδιακών σειρών παγίδας υποστρωμάτων. Επιπρόσθετα, η χρήση του μεταλλάγματος *lon1-1* ως γενετικό υπόβαθρο της διαγονιδιακής κατασκευής, θα οδηγήσει σε καθαρές παγίδες υποστρωμάτων χωρίς την ανάμιξη ενεργών και μη ενεργών πρωτεασών LON1 στα μιτοχόνδρια των φυτικών κυττάρων, κάτι που δεν ήταν εφικτό σε προηγούμενα μοντέλα οργανισμών λόγω του θνησιγενούς φαινότυπου της μη λειτουργικής Lon πρωτεάσης. Τέλος, το γενετικό υπόβαθρο *lon1-1 mito-gfp* (Logan et al., 2000) θα προσφέρει την ευχέρεια παρατήρησης της λειτουργικής κατάστασης του συστήματος παγίδευσης LON1 στα μιτοχόνδρια σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε καταστάσεις καταπόνησης.

4.3 Μιτοχονδριακή όρμηση (hormesis)

Η μιτοχονδριακή όρμηση είναι η διαδικασία κατά την οποία οι ενεργές μορφές οξυγόνου οι οποίες παράγονται από τα μιτοχόνδρια σε χαμηλές συγκεντρώσεις, δρουν ως μόρια σήματος για την έναρξη διαδοχικών κυτταρικών γεγονότων τα οποία τελικά αποσκοπούν στην προστασία των κυττάρων έναντι των επιβλαβών επιδράσεων.

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν πολύ σημαντικά κυτταρικά οργανίδια, καθώς στα οργανίδια αυτά πραγματοποιείται η παραγωγή ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφοφρυλίωσης και λαμβάνουν χώρα μεταβολικές διεργασίες όπως η βιοσύνθεση αμινοξέων και ο καταβολισμός των λιπαρών οξέων. Κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση τα μιτοχόνδρια παράγουν ενεργές μορφές οξυγόνου ως υποπροϊόντα. Αρχικά, οι ενεργές μορφές οξυγόνου, θεωρούνταν ότι έχουν μόνο επιβλαβή δράση, όπως την επαγωγή οξειδωτικών βλαβών στα κυτταρικά συστατικά. Ωστόσο, επιστημονικά δεδομένα έχουν υποδείξει ότι οι ενεργές μορφές οξυγόνου μπορεί να είναι και ωφέλιμες για τα κύτταρα (Yun & Finkel, 2014; Ristow & Schmeisser, 2014). Συγκεκριμένα, κατά την απόκριση σε ένα μετρίου επιπέδου στρες, τα μιτοχόνδρια παράγουν χαμηλά επίπεδα ενεργών μορφών οξυγόνου, προκαλώντας το έναυσμα μίας προσαρμοστικής αντίδρασης από μεριάς του κυττάρου. Αυτή η διαδικασία η οποία αναφέρεται και ως όρμηση μπορεί να αποτελεί και τη βιολογική βάση για την ερμηνεία της αυξημένης ανάπτυξης των πρωτογενών ριζών των σειρών 2, 4 και 5 με υπόβαθρο *lon1-1 mito-gfp* έναντι του *lon1-1* υπόβαθρου (εικόνα 18, γράφημα 2, 3).

Εφόσον, και τα δύο μεταλλάγματα έχουν σταθερά μετασχηματιστεί με την ίδια γονιδιακή κατασκευή είναι εύλογο οι αισθητές διαφορές στην ανάπτυξη των διαγονιδιακών φυτών να οφείλονται στο γενετικό υπόβαθρο των φυτών και όχι στην διαγονιδιακή κατασκευή. Το γονίδιο αναφοράς της πρωτεΐνης GFP το οποίο από το πεπτίδιο σήματος της ATP συνθετάσης τοποθετεί τη πρωτεΐνη στα μιτοχόνδρια (Logan et al., 2000) φαίνεται να επιβαρύνει περαιτέρω την ομοιόσταση των μιτοχονδρίων και σε συνδυασμό με την πρωτεολυτική απενεργοποίηση της LON1 και των ήδη προβληματικών μιτοχονδρίων του lon1-1 μεταλάγματος, μπορεί να ξεπερνά ένα κατώφλι κυτταρικής επιβάρυνσης, οδηγώντας πιθανώς σε περισσότερο αισθητές συγκεντρώσεις ενεργών μορφών οξυγόνου στα μιτοχόνδρια των φυτών. Κάτω, από τις ανωτέρω συνθήκες πιθανώς ενεργοποιείται ο κυτταρικός μηχανισμός άμυνας, επάγοντας παράλληλα το μηχανισμό ποιοτικού ελέγχου των πρωτεϊνών. Η επαγωγή του παραπάνω μηχανισμού πρωτεϊνικού ελέγχου συνεπάγεται με την αυξημένη δράση επιπλέον πρωτεασών πέρα από τη LON όσο και συστήματα μοριακών συνοδών και πρωτεϊνών σύνδεσης. Η αυξημένη 'υπεράσπιση' της μιτοχονδριακής ομοιόστασης είναι πιθανό να οδηγεί στην ολική αντιστροφή του φαινοτύπου lon1-1 και τη βέλτιστη ανάπτυξη των φυτών (εικόνα 22).

Η ύπαρξη σειρών φυτών με 40-50% ή έως και 100% αναστροφής του φαινότυπου *lon1-1 mito-gfp* με τη χρήση της κατασκευής *pLON1::LON1*^{trap}-*FLAG* προκαλεί βιολογικό ενδιαφέρον και γεννά ερωτήματα. Ίσως η ύπαρξη δυο διακριτών αναπτυξιακών φαινοτύπων διαγονιδιακών σειρών φυτών να καθιστά ακόμη πιο αποτελεσματικά τα συγκεκριμένα συστήματα παγίδευσης διότι μπορεί να προκύπτει και αντίστοιχη ανομοιογένεια στα πρωτεϊνικά τους υποστρώματα. Με βάση αυτόν το συλλογισμό θα δημιουργηθούν καθαρές και διακριτές παγίδες υποστρωμάτων όπου μέσω του προσδιορισμού των τελευταίων θα υπάρξει η περαιτέρω κατανόηση του συστήματος πρωτεόλυσης LON στο φυτό *Arabidopsis thaliana* και αποσαφήνιση της ύπαρξης των ανωτέρω διαφορετικών φαινοτύπων.


Εικόνα 21 μιτοχονδριακή όρμηση

Η ύπαρξη σειρών φυτών με 40-50% ή έως και 100% αναστροφής του φαινότυπου lon1-1 mito-gfp με τη χρήση της κατασκευής *pLON1::LON1^{trap}-FLAG* μπορεί να οφείλεται στο φαινόμενο της μιτοχονδριακής όρμησης. Η αυξημένη επαγωγή του μηχανισμού πρωτεϊνικού ελέγχου λόγω της παρουσίας της GFP στα μιτοχόνδρια των διαγονιδιακών φυτών, μπορεί να συνεπάγεται με την αυξημένη δράση επιπλέον πρωτεασών πέρα από τη LON όσο και συστήματα μοριακών συνοδών και πρωτεϊνών σύνδεσης. Η αυξημένη 'υπεράσπιση' της μιτοχονδριακής ομοιόστασης είναι πιθανό να οδηγεί στην ολική αντιστροφή του φαινοτύπου *lon1-1* και τη βέλτιστη ανάπτυξη των φυτών.

4.3 Συμπεράσματα και Προοπτικές

Στην παρούσα εργασία έχουν χαρακτηριστεί και εξεταστεί διαγονιδιακές σειρές φυτών *Arabidopsis thaliana* όπου φέρουν την κατασκεή *pLON1::LON1^{trap}-FLAG* σε γενετικό υπόβαθρο μεταλλάγματων *lon1-1* και *lon1-1 mito-gfp*. Η παραπάνω διαγονιδιακή κατασκευή τηρεί τις προϋποθέσεις για παγίδευση υποστρωμάτων και παράλληλα με τη χρήση ενός μάρτυρα ο οποίος θα εκφράζει τη φυσιολογική πρωτεάση θα είναι εφικτή η εξέταση της πρωτεολυτικής απενεργοποίησης του μεταλλάγματος *lon1^{S(841)A/K(884)A*.}

Τα φυτά αυτά στη συνέχεια μπορούν να αναπτυχθούν σε συνθήκες που επιβαρύνουν την ομοιόσταση του μιτοχονδριακού κυρίως πρωτεώματος, χωρίς όμως να ενεργοποιούν τη μιτοφαγία, δημιουργώντας ένα μοριακό περιβάλλον στο κύτταρο όπου η LON θα έχει πρωταγωνιστικό ρόλο για την ανακύκλωση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών-στόχων. Στη συνέχεια οι παγίδες με τα πρωτεϊνικά υποστρώματα μπορούν να ανακτηθούν άθικτες από τα μιτοχόνδρια των διαγονιδιακών φυτών και οι παγιδευμένες πρωτεΐνες να αναγνωριστούν εφαρμόζοντας τη μεθοδολογία φασματομετρίας μάζας (MS/MS). Τα χαρακτηριστικά, κύριων πρωτεϊνικών υποστρωμάτων μπορούν να αναλυθούν εφαρμόζοντας μοντέλα προσομοίωσης δομής ώστε να προσδιοριστεί ο μηχανισμός αναγνώρισης τους από τη LON. Τέλος, τα υποστρώματα με τις ιδιότητες τους θα μπορέσουν να συγκριθούν μεταξύ τους με σκοπό να συντεθούν τεχνητά υποστρώματα δοκιμών για προσομοίωση του μηχανισμού αναγνώρισης υποστρωμάτων από το σύστημα πρωτεόλυσης LON.

Η LON είναι η πρώτη από τις πρωτεάσες που χαρακτηρίστηκε στους προκαρυώτες, και ο ρόλος της κατά τον ποιοτικό έλεγχο των πρωτεϊνών είναι αδιαμφησβήτητος. Παρά όμως την πολύχρονη μελέτης της παραπάνω πρωτεάσης σε ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών ειδών, πολύ λίγα είναι γνωστά για το μηχανισμό λειτουργίας της. Επομένως, ο προσδιορισμός των υποστρωμάτων-στόχων της LON θα αποσαφηνίσει τη συμβολή της στην διατήρηση της ποιότητα του οργανιδιακού πρωτεόματος όσο και τον μηχανισμό αναγνώρισης και επιλογής αυτών των πρωτεϊνών. Το φυτό *Arabidopsis thaliana* αποτελεί έναν οργανισμό μοντέλο στον οποίον για πρώτη φορά υπάρχει η δυνατότητα εφαρμογής συστημάτων παγίδευσης υποστρώματων της Lon πρωτεάσης, χωρίς την ύπαρξη της λειτουργικής ισομορφής της LON στο γενετικό υπόβαθρο των σειρών παγίδευσης. Παρέχοντας ένα ανυπέρβλητο πλεονέκτημα έναντι άλλον ερευνητικών μελετών του συστήματος πρωτεόλυσης Lon.

Βιβλιογραφία

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

Adam, Z., Rudella, A. and van Wijk, K.J. .2006 Recent advances in the study of Clp, FtsH and other proteases located in chloroplasts. Current opinion in plant biology, 9, 234-240.

Arends, J., Thomanek, N., Kuhlmann, K., Marcus, K., Narberhaus, F. 2016. In vivo trapping of FtsH substrates by label-free quantitative proteomics. Proteomics 16, 3161–3172

Arends, J., Griego, M., Thomanek, N., Lindemann, C., Kutscher, B., Meyer, H.E., Narberhaus, F. 2018. An integrated proteomic approach uncovers novel substrates and functions of the Lon protease in Escherichia coli. Proteomics 18, e1800080.

Baker, T. A., Sauer, R. T. 2012. ClpXP, an ATP-powered unfolding and protein degradation machine. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics 1823:15-28.

Bartel, B., Farmer, L.M., Rinaldi, M.A., Young, P.G., Danan, C.H., Burkhart, S.E. 2014. Mutation of the Arabidopsis LON2 peroxisomal protease enhances pexophagy. Autophagy 10: 518–519

Beynon, R.J. & Bond, J.S. 1986. Catabolism of intracellular protein: molecular aspects. Am. J. Physiol. 251: C141–C152.

Bhat, N.H., Vass, R.H., Stoddard, P.R., Shin, D.K. 2013 Identification of ClpP substrates in Caulobacter crescentus reveals a role for regulated proteolysis in bacterial development. Mol. Microbiol. 88:1083–1092

Bissonnette, S.A., Rivera-Rivera, I., Sauer, R.T., Baker, T.A. 2010. The IbpA and IbpB small heat-shock proteins are substrates of the AAA+ Lon protease. Mol Microbiol 75: 1539–1549.

Borges, F., Gomes, G., Gardner, R., Moreno, N., McCormick, S., Feijó, J.A., Becker, J.D. 2008. Comparative transcriptomics of Arabidopsis sperm cells. Plant Physiology 148:1168–1181.

Botos, I., Melnikov, E. E., Cherry, S., Tropea, J. E., Khalatova, A. G., Rasulova, F., Dauter, Z., Maurizi, M. R., Rotanova, T. V., Wlodawer, A., Gustchina, A. 2004. The catalytic domain of Escherichia coli Lon protease has a unique fold and a Ser-Lys dyad in the active site. J. Biol. Chem. 279:8140–8148.

Botos, I., Loutos, G. T., Wu, W., Cherry, S., Ghirlando, R., Kudhaev, A. M., Tropea, J. E., Gustchina, A., Wlodawer, A. 2019. Cryo-EM structure of substrate-free E. coli Lon protease provides insights into the dynamics of Lon machinery. Curr. Res. Struct. Biol. 1: 13–20.

Bota, D.A., Davies, K.J. 2002. Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. Nat Cell Biol, 4:674–680

Bota, D.A., Ngo, J.K., Davies, K.J. 2005. Downregulation of the human Lon protease impairs mitochondrial structure and function and causes cell death. Free Radic Biol Med 38: 665–677

Brown, B.L., Vieux, E.F., Kalastavadi, T., Kim, S., Chen, J.Z., Baker, T.A., 2018. N domain of the Lon AAAb protease controls assembly and substrate choice. Protein Sci. https://doi.org/10.1002/pro.3553.

Cheng, I., Mikita, N., Fishovitz, J., Frase, H., Wintrode, P., Lee, I. 2012. Identification of a region in the N-terminus of Escherichia coli Lon that affects ATPase, substrate translocation and proteolytic activity. J Mol Biol 418: 208–225.

Chien, P., Perchuk, B. S., Laub, M. T., Sauer, R. T., Baker, T. A. (2007). Direct and adaptor-mediated substrate recognition by an essential AAA+ protease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, 6590-6595.

van Dyck L., Pearce, D.A., Sherman, F. 1994 PIM1 encodes a mitochondrial ATPdependent protease that is required for mitochondrial function in the yeast Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 269:238–242

Ebel, W., Skinner, M.M., Dierksen, K.P., Scott, J.M., Trempy, J.E. 1999. A conserved domain in Escherichia coli Lon protease is involved in substrate discriminator activity. J Bacteriol 181:2236–2243.

Davies, K.J. 2001. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. Biochimie 83: 301–310.

Farmer LM, Rinaldi MA, Young PG, Danan CH, Burkhart SE, Bartel B. 2013. Disrupting autophagy restores peroxisome function to an Arabidopsis lon2 mutant and reveals a role for the LON2 protease in peroxisomal matrix protein degradation. The Plant Cell 25, 4085–4100.

Feng, J. et al. (2013) Trapping and proteomic identification of cellular substrates of the ClpP protease in Staphylococcus aureus. J. Proteome Res. 12, 547–558

Ferro, M., Brugiere, S., Salvi, D., Seigneurin-Berny, D., Court, M., Moyet, L., Ramus, C., Miras, S., Mellal, M., Le Gall, S., Kieffer-Jaquinod, S., Bruley, C., Garin, J., Joyard, J., Masselon, C. and Rolland, N. (2010) AT_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. Molecular & cellular proteomics : MCP, 9, 1063-1084.

Flynn, J.M. et al. (2003) Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. Mol. Cell 11, 671–683.

Flynn, J.M. et al. (2004) Modulating substrate choice: the SspB adaptor delivers a regulator of the extracytoplasmic-stress response to the AAA+ protease ClpXP for degradation. Genes Dev. 18, 2292–2301

Fischer, H. & Glockshuber, R. 1993. ATP Hydrolysis Is Not Stoichiometrically Linked with Proteolysis in the ATP-dependent Protease La from Escherichia coli. THE JOLRNAL. OF BIoLoClca CHEMISTRY. 268:22502-22507

Garcia-Lorenzo, M., Sjodin, A., Jansson, S. and Funk, C. 2006. Protease gene families in Populus and Arabidopsis. BMC plant biology. 6:30.

Gribun, A. et al. 2005. The ClpP double ring tetradecameric protease exhibits plastic ring-ring interactions, and the N termini of its subunits form flexible loops that are essential for ClpXP and ClpAP complex formation. Journal of Biological Chemistry 280: 16185-16196.

Gur, E. & Sauer, R. T. 2009. Degrons in protein substrates program the speed and operating efficiency of the AAA+ Lon proteolytic machine. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106: 18503–18508.

Gur, E., Sauer, R.T. 2008. Recognition of misfolded proteins by Lon, a AAA(+) protease. Genes Dev 22: 2267–2277.

Gur, E., Vishkautzan, M., Sauer R.T. 2012 Protein unfolding and degradation by the AAA+ Lon protease. Protein Sci 21:268–278.

Hanson, P.I. & Whiteheart, S.W. 2005. AAA+ proteins: Have engine, will work. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6: 519–529.

Hershko, A. & Ciechanover, A. 1998. The ubiquitin system. Annu Rev Biochem 67: 425–479.

Janska, H., Piechota, J. and Kwasniak, M. 2010. ATP-dependent proteases in biogenesis and maintenance of plant mitochondria. Biochimica et biophysica acta, 1797: 1071-1075.

Iyer, L.M., Leipe, D.D., Koonin, E.V., Aravind, L. 2004. Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. J. Struct. Biol. 146: 11–31.

Ishii, Y., Sonezaki, S., Iwasaki, Y., Miyata, Y., Akita, K., Kato, Y., Amano, F. 2000. Regulatory role of Cterminal residues of SulA in its degradation by Lon protease in Escherichia coli. J Biochem 127:837– 844.

Janska, H., Piechota, J., Kwasniak, M. 2010. ATP-dependent proteases in biogenesis and maintenance of plant mitochondria. Biochimica et Biophysica Acta 1797:1071-1075

Koppen, M. et al. 2009. Autocatalytic processing of m-AAA protease subunits in mitochondria. Mol. Biol. Cell 20: 4216–4224

Kuhlmann, N.J. and Chien, P. 2017. Selective adaptor dependent protein degradation in bacteria. Curr. Opin. Microbiol. 36:118–127

Labbadia, J. & Morimoto, R.I. 2015. The biology of proteostasis in aging and disease. Annu. Rev. Biochem. 84:35–464.

Lee, C.K., Klopp, R.G., Weindruch, R., Prolla, T.A. 1999 Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. Science 285: 1390–1393.

Lee, I., Berdis, A. J., Suzuki, C. K. 2006. Recent developments in the mechanistic enzymology of the ATPdependent Lon protease from Escherichia coli: Highlights from kinetic studies. Mol. Biosyst. 2:477– 483.

Liao, J.-Y.R. et al. 2018 Consequences of the loss of catalytic triads in chloroplast CLPPR protease core complexes in vivo. PlantDirect 2, e00086

Liao, J.-Y.R. & van Wijk, K. J. 2019. Discovery of AAA+ Protease Substrates through Trapping Approaches. Trends in Biochemical Sciences. 44: 528-545

Li, L., Nelson, C., Fenske, R., Trösch, J., Pružinská, A., Millar, A.H., Huang, S. 2017. Changes in specific protein degradation rates in Arabidopsis thaliana reveal multiple roles of Lon1 in mitochondrial protein homeostasis. The Plant Journal 89, 458–471.

Lingard, M.J., Bartel, B. 2009. Arabidopsis LON2 is necessary for peroxisomal function and sustained matrix protein import. Plant Physiology 151, 1354-1365

Lin, C. C., Su, S. C., Su, M. Y., Liang, P. H., Feng, C. C., Wu, S. H., Chang, C. I. 2016. Structural insights into the allosteric operation of the Lon AAA+ protease. Structure 24: 667–675.

Luce, K., & Osiewacz, H.D. 2009. Increasing organismal healthspan by enhancing mitochondrial protein quality control. Nat Cell Biol. 11: 852-858

Lu, B. et al. 2007. Roles for the human ATP-dependent Lon protease in mitochondrial DNA maintenance. J Biol Chem 282:17363-17374.

Liu, T., Lu, B., Lee, I., Ondrovic^{*}ova, G., Kutejova, E. and Suzuki, C. K. 2004. DNA and RNA Binding by the Mitochondrial Lon Protease Is Regulated by Nucleotide and Protein Substrate. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 279:13902–13910.

Maurizi, M.R. et al. 1990. Clp P represents a unique family of serine proteases. J. Biol. Chem. 265:12546–12552.

Neher, S.B. et al. 2006. Proteomic profiling of ClpXP substrates after DNA damage reveals extensive instability within SOS regulon. Mol. Cell 22:193–204

Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L., Koonin, E.V. 1999. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation and disassembly of protein complexes. Genome Research 9:27-43

Nishimura, K. & van Wijk, K. J. 2015, Organization, function and substrates of the essential Clp protease system in plastids. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1847:915-930.

Olinares, P. D., Kim, J., Davis, J. I., van Wijk, K. J. 2011. Subunit stoichiometry, evolution, and functional implications of an asymmetric plant plastid ClpP/R protease complex in Arabidopsis. Plant Cell 23:2348-2361.

Opalinska, M. et al. 2017. Identification of physiological substrates and binding partners of the plant mitochondrial protease FTSH4 by the trapping approach. Int. J. Mol. Sci. 18

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

Park, S. C., Jia, B., Yang, J. K., Van, D. L., Shao, Y. G., Han, S. W., Jeon, Y. J., Chung, C. H., Cheong, G. W. 2006. Oligomeric structure of the ATP-dependent protease La (Lon) of Escherichia coli. Mol. Cells 21:129–134.

Peltier, J. B., Ytterberg, J., Liberles, D. A., Roepstorff, P., van Wijk, K. J. 2001, Identification of a 350-kDa ClpP protease complex with 10 different Clp isoforms in chloroplasts of Arabidopsis thaliana. Journal of Biological Chemistry 276:16318-16327.

Peltier, J. B. et al. 2004. Clp protease complexes from photosynthetic and nonphotosynthetic plastids and mitochondria of plants, their predicted threedimensional structures, and functional implications. Journal of Biological Chemistry 279:4768-4781.

Pinti, M.. Gibellini, L., Nasi, M., De Biasi, S., Bortolotti, C. A., Iannone, A., Cossarizza, A. 2016. Emerging role of Lon protease as a master regulator of mitochondrial functions. Biochim. Biophys. Acta 1857:1300–1306.

Puri, N. & Karzai, A. W. 2017. HspQ functions as a unique specificity-enhancing factor for the AAA+ Lon protease. Mol. Cell. 66, 672–683.e74.

Rep, M. et al. 1996. Promotion of mitochondrial membrane complex assembly by a proteolytically inactive yeast Lon. Science 274:103–106.

Ripstein, Z. A., Huang, R., Augustyniak, R., Kay, L. E., Rubinstein, J. L. 2017, Structure of a AAA+ unfoldase in the process of unfolding substrate. eLife 6, e25754.

Rigas, S., Daras, G., Laxa, M., Marathias, N., Fasseas, C. Sweetlove, L.J., Hatzopoulos, P. 2009a. 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, L.J., Hatzopoulos, P. 2009b. Mitochondria biogenesis via Lon1 selective proteolysis: who dares to live for ever? Plant Signaling and Behavior 4:221–224.

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.

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. 5:45.

Schaller, A. 2004. A cut above the rest: the regulatory function of plant protea.

Rotanova, T.V., Melnikov, E.E. and Tsirulnikov, K.B. 2002. A Catalytic Ser–Lys Dyad in the Active Site of the ATP-Dependent Lon Protease from Escherichia coli. Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 29": 97–99

Rotanova, T.V., Botos, I., Melnikov, E.E., Rasulova, F., Gustchina, A., Maurizi, M.R., Wlodawer, A. 2006. Slicing a protease: structural features of the ATP-dependent Lon proteases gleaned from investigations of isolated domains. Protein Science 15, 1815-1828ses. Planta 220: 183–197.

Roudiak, S.G. & Shrader, T.E. 1998. Functional role of the N-terminal region of the Lon protease from Mycobacterium smegmatis. Biochemistry 37:11255–11263.

Ristow, M. & Schmeisser, K. 2014. Mitohormesis: Promoting Health and Lifespan by Increased Levels of Reactive Oxygen Species (ROS). Dose Response. 12: 288–341.

Sakamoto, W. 2006. Protein degradation machineries in plastids. Annual Review of Plant Biology 57, 599–621.

Sauer, R.T., & Baker, T.A. 2011. AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction. Annu Rev Biochem 80: 587–612.

Shah, I.M. & Wolf, R.E. Jr, 2006. Sequence requirements for Lon-dependent degradation of the Escherichia coli transcription activator SoxS: identification of the SoxS residues critical to proteolysis and specific inhibition of in vitro degradation by a peptide comprised of the Nterminal 21 amino acid residues. J Mol Biol. 357:718–731

Shin, M., Asmita, A., Puchades, C., Adjei, E., Wiseman, R.L., Karzai, A.W., Lander, G.C., 2019. Distinct structural features of the lon protease drive conserved hand-over-hand substrate translocation. BioRxiv 1–21. https://doi.org/10.1101/61715.

Shin, M., Puchades, C., Asmita, A., Puri, N., Adjei, E., Wiseman, R. L., Karzai, A. W., Lander, G. C. 2020. Structural basis for distinct operational modes and protease activation in AAA+ protease Lon. Sci. Adv. 6, eaba8404.

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

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.

Sokolenko, A., Pojidaeva, E., Zinchenko, V., Panichkin, V., Glaser, V.M., Herrmann, R.G. and Shestakov, S.V. 2002. The gene complement for proteolysis in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803 and Arabidopsis thaliana chloroplasts. Current genetics, 41, 291-310.

Solheim, C., Li, L., Hatzopoulos, P., Millar, A.H. 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.

Smith, C.K., Baker, T.A. and Sauer, R.T. 1999. Lon and Clp family proteases and chaperones share homologous substrate-recognition domains. Proc Natl Acad Sci USA. 96: 6678–6682

Snider, J., Thibault, G., & Houry, W. A. 2008. The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins. Genome biology, 9(4), 216. https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-4-216.

Starkova, N.N., Koroleva, E.P., Rumsh, L.D., Ginodman, L.M., and Rotanova, T.V., 1998. Mutations in the proteolytic domain of Escherichia coli protease Lon impair the ATPase activity of the enzyme. FEBS Lett. 422: 218–220.

Suno, R., Niwa, H., Tsuchiya, D., Zhang, X., Yoshida, M., Morikawa, K. 2006 Structure of the whole cytosolic region of ATP-dependent protease FtsH. Mol Cell. 22:575-585.

Su, S. C., Lin, C. C., Tai, H. C., Chang, M. Y., Ho, M. R., Babu, C. S., Liao, J. H., Wu, S. H., Chang, Y. C., Lim, C., Chang, C. I. 2016. Structural basis for the magnesium-dependent activation and hexamerization of the Lon AAA+ protease. Structure. 24:676–686.

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

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

Tomoyasu, T., Yamanaka, K., Murata, K., Suzaki, T., Bouloc, P., Kato, A., Niki, H., Hiraga, S., Ogura, T. 1993. Topology and subcellular localization of FtsH protein in Escherichia coli. J Bacteriol. 175:1352-1357.

Tomoyasu, T., Gamer, J., Bukau, B., Kanemori, M., Mori, H., Rutman, A.J., Oppenheim, A.B., Yura, T., Yamanaka, K., Niki, H. 1995. Escherichia coli FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor σ 32, EMBO J. 14: 2551–2560.

Trentini, D.B. et al. 2016, Arginine phosphorylation marks proteins for degradation by a Clp protease. Nature. 539:48–53

Urantowka, A., Knorpp, C., Olczak, T., Kolodziejczak, M. and Janska, H. 2005. Plant mitochondria contain at least two i-AAA-like complexes. Plant molecular biology. 59:239-252.

Vieux, E.F., Wohlever, M.L., Chen, J.Z., Sauer, R.T., Baker, T.A. 2013. Distinct quaternary structures of the AAA+ Lon protease control substrate degradation. Proc Natl Acad Sci USA 110:E2002–E2008

Wang, J., Hartling, J.A., Flanagan, J.M. 1997. The structure of ClpP at 2.3 A resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis, Cell. 91:447–456.

Wang, S. L. & Liu, X. Q. 1997. Identification of an unusual intein in chloroplast ClpP protease of Chlamydomonas eugametos. Journal of Biological Chemistry 272, 11869-11873.

Wang, J., Hartling, J. A., Flanagan, J. M. 1998. Crystal structure determination of Escherichia coli ClpP starting from an EM-derived mask. Journal of Structural Biology 124, 151-163.

Wagner, R., Aigner, H. and Funk, C. 2011a. FtsH proteases located in the plant chloroplast. Physiologia plantarum. 145:203-14.

Wagner, I. et al. 1997. Autocatalytic processing of the ATPdependent PIM1 protease: crucial function of a pro-region for sorting to mitochondria. EMBO J. 16, 7317–7325

Westphal, K. et al. (2012) A trapping approach reveals novel substrates and physiological functions of the essential protease FtsH in Escherichia coli. J. Biol. Chem. 287, 42962–42971

van Wijk, K.J. 2015. Protein maturation and proteolysis in plant plastids, mitochondria, and peroxisomes. Annu. Rev. Plant Biol. 66: 75–111.

Wohlever ML, Baker TA, Sauer RT (2013) A mutation in the N domain of Escherichia coli lon stabilizes dodecamers and selectively alters degradation of model substrates. J Bacteriol 195:5622–5628.

Wohlever, M.L., Baker, T.A., Sauer, R.T. 2014. Roles of the N domain of the AAA+ Lon protease in substrate recognition, allosteric regulation and chaperone activity. Mol Microbiol 91:66–78.

Young, P.G. & Bartel, B. 2016. Pexophagy and peroxisomal protein turnover in plants. Biochimica et Biophysica Acta. 1863:999–1005.

Yun & Finkel. 2014. Mitohormesis. Cell Metabolism. 19: 757-766

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

[RT860-For]	5'-TGAGGATGATGCAGCGCTTCTTTCCTTGATAGAAAATTACTGCAG	TM 63,22
	AGAAGCAGGTGTTAGGAATCTCCAGAAACAGATCGAGAAGATTTAC	
	CGTAAG-3'	
[Lon1-Flag-Rev]	5'-CTTTGGCTATGACAAACAAGAAGACTACAAGGATGACGATGA	TM 83,30
	CAAGGACTACAAGGATTAG-3'	
[ForAt5g26860]	5'-CTTGTTGTTCGAGCCTTCCA-3'	TM 37,01

 Η θερμοκρασία του υβριδισμού εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης Tm του εκκινητή που υπολογίζεται από τον τύπο: 69,3 + 0,41-GC% - 650/αριθμό βάσεων εκκινητή