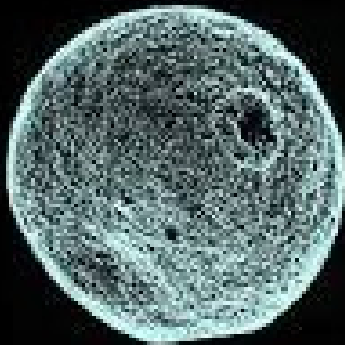


**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΠΜΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ**

**“Δυναμική του προτύπου έκφρασης και υποκυτταρικής τοποθέτησης της πρωτεΐσης Lon3 του *Arabidopsis*”**

**POLLEN**



**DEATH STAR**



**ANY QUESTIONS?**

**ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ Κ. ΚΑΝΑΛΗ**  
**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**  
**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΡΗΓΑΣ ΣΤΑΜΑΤΗΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2016**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΠΜΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ**

**“Δυναμική του προτύπου έκφρασης και υποκυτταρικής  
τοποθέτησης της πρωτεΐνης Lon3 του *Arabidopsis*”**

**ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ Κ. ΚΑΝΑΛΗ**  
**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**  
**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΡΗΓΑΣ ΣΤΑΜΑΤΗΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2016**  
**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**“Δυναμική του προτύπου έκφρασης και υποκυτταρικής  
τοποθέτησης της πρωτεΐσης Lon3 του *Arabidopsis*”**

**ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ Κ. ΚΑΝΑΛΗ**

**ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

Ρήγας Σταμάτης, Επίκουρος Καθηγητής (Επιβλέπων)

Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Επίκουρος Καθηγητής (Μέλος)

Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής (Μέλος)

*Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής έγινε με Γενική Συνέλευση του Τμήματος Βιοτεχνολογίας στις 21/10/15, κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή της διατριβής.*

# Ευχαριστίες

---

Πλησιάζοντας τόσο στο τέλος των μεταπτυχιακών μου σπουδών όσο και στο τέλος μιας πολύ σημαντικής περιόδου της ζωής μου, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που με βοήθησαν όχι μόνο να φτάσω έως εδώ, αλλά και να προχωρήσω ένα βήμα παρακάτω, ο καθένας με τον τρόπο του.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Πολυδεύκη Χατζόπουλο για την ευκαιρία να συμμετάσχω στο δυναμικό του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας, αλλά και για όλες τις εποικοδομητικές συζητήσεις που διαμόρφωσαν τον τρόπο σκέψης μου. Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθινό μου και Επίκουρο Καθηγητή Σταμάτη Ρήγα για τη διαρκή επίβλεψη, συμβουλευτική και ώθηση που μου προσέφερε, ώστε να ανταπεξέλθω και να συνεχίσω να εξελίσσομαι. Επιπλέον, ευχαριστώ τον μετα-Διδάκτορα Γεράσιμο Δάρρα και τον υποψήφιο Διδάκτορα Ντικράν Τσιτσεκιάν για τις συμβουλές και τη βοήθειά τους, αλλά και τον μετά-Διδάκτορα Αναστάσιο Αλατζά για την καταλυτική συμβολή του στις δύσκολες ώρες.

Θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στις συμφοιτήτριές μου, Μαργαρίτα Θωμοπούλου, Μυρτώ Μίχου και Φωτεινή Μπαρτζώκα, που συμπορευόμαστε από το πρώτο έτος του προπτυχιακού και συνεχίσαμε στο μεταπτυχιακό, για τις ατέλειωτες ώρες που αλληλοστηριχθήκαμε αλλά και απελπιστήκαμε παρέα. Ιδιαίτερα στη Μυρτώ οφείλω ένα ξεχωριστό ευχαριστώ, καθότι μαζί ξεκινήσαμε το πρότζεκτ Lon3 και η συμβολή της στο σχεδιασμό και τις υποκλωνοποιήσεις ήταν καταλυτική. Φυσικά, το ίδιο και μεγαλύτερο ευχαριστώ χρωστάω στην Ειρήνη Γρατσία, για την υπομονή, τη στήριξη και την ενθάρρυνση ιδιαίτερα τον τελευταίο χρόνο. Επιπλέον, ευχαριστώ τους υποψήφιους Διδάκτορες Λουκία Ρόκα και Κώστα Κουδουνά για την πολύτιμη βοήθεια τους, τη στήριξή τους και τις ώρες που περάσαμε μαζί στο εργαστήριο. Εξίσου θα ήθελα να ευχαριστήσω και την Επίκουρη Καθηγήτρια Δήμητρα Μηλιώνη και τη μετα-Διδάκτορα Δέσποινα Σαμακοβλή, για την προθυμία τους και τις εποικοδομητικές συμβουλές τους.

Θα ήθελα να πω ένα ειλικρινές ευχαριστώ σε όλα τα παιδιά που δεν αναφέρθηκαν, αλλά αποτελούν ή αποτέλεσαν μέρος του δυναμικού του εργαστηρίου και συνέβαλαν, λιγότερο ή περισσότερο, στη διεξαγωγή της παρούσας πειραματικής μελέτης κατά τη διάρκεια των τριών τελευταίων χρόνων. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω την οικογένειά μου, καθότι χωρίς τη συμβολή τους δεν θα μπορούσα να βρίσκομαι στο εργαστήριο, αλλά και όλους τους φίλους μου που με στήριξαν και με ανέχθηκαν μέχρι τέλους.

# Περίληψη

---

Η ATP-εξαρτώμενη Lon πρωτεάση είναι εξαιρετικά συντηρημένη σε όλα τα βασίλεια των ζώντων οργανισμών και κατέχει κεντρικό ρόλο στον ποιοτικό έλεγχο των πρωτεϊνών, ο οποίος εξασφαλίζει την πρωτεόσταση του κυττάρου. Η οικογένεια Lon του *Arabidopsis* αποτελείται από τέσσερα μέλη που παράγουν διακριτές πρωτεϊνικές ισομορφές και τοποθετούνται κατά περίπτωση στα διάφορα υποκυτταρικά οργανίδια. Το *AtLon3* αποτελεί το μοναδικό μέλος που δεν έχει μελετηθεί εκτενώς, καθώς θεωρούνταν μέχρι προσφάτως ψευδογονίδιο. Παρόλα αυτά, νέα δεδομένα ανάλυσης μικροσυστοιχιών υπέδειξαν υψηλά επίπεδα της έκφρασής του στα σπερματικά κύτταρα της γύρης του *Arabidopsis* και η ύπαρξη του μεταγραφήματος στη γύρη επιβεβαιώθηκε σε προηγούμενη πειραματική μελέτη.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη διερευνήθηκε η δυναμική του προτύπου έκφρασης και υποκυτταρικής τοποθέτησης του γονιδίου *AtLon3*. Βιοπληροφορική ανάλυση υπέδειξε δυαδικό σινιάλο στόχευσης σε μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες, αλλά και την ύπαρξη ενός NLS. Η παροδική έκφρασή στο ετερόλογο σύστημα *Nicotiana benthamiana* μίας σειράς κατασκευών που διαφοροποιούνται στο 5' άκρο, έδειξε ότι σε κάθε περίπτωση η *AtLon3* τοποθετείται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου, ενώ όταν αφαιρείται η αμινοτελική περιοχή παρουσιάζει δυαδική στόχευση στον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια. Η ανάλυση των μεταγραφημάτων *AtLon3* μετά από παροδική έκφραση του γονιδίου υπό τον έλεγχο του ενδογενούς υποκινητή του, έδειξε την απουσία του 1<sup>ου</sup> εξωνίου και την ύπαρξη δύο εναλλακτικών μεταγραφημάτων, το ένα εκ των οποίων αλλάζει αναγνωστικό πλαίσιο και χάνει την περιοχή του NLS.

Συνδυάζοντας τα προαναφερθέντα αποτελέσματα, διαπιστώθηκε ότι η μετάφραση της πρωτεΐνης δεν εξαρτάται από τα AUGs του υποθετικού 1<sup>ου</sup> εξωνίου, καθώς αυτό δεν αποτελεί κωδική περιοχή, ενώ παράλληλα η διαγραφή τους δεν επηρεάζει την παραγωγή και τη στόχευση της *AtLon3* στα μιτοχόνδρια. Ανέκυψαν δύο υποθέσεις για την έναρξη της πρωτεΐνης: α) η πιθανότητα εναλλακτικού κωδικονίου έναρξης (non-AUG) στην περιοχή του 2<sup>ου</sup> εξωνίου και β) η πιθανότητα η μετάφραση να ξεκινάει από το επόμενο AUG στο τέλος του 3<sup>ου</sup> εξωνίου, η περιοχή που προηγείται να αποτελεί 5'UTR και το μάτισμα του εσωνίου να συμβάλει στη σταθεροποίηση του μηνύματος. Η δυαδική στόχευση στα μιτοχόνδρια και τον πυρήνα φαίνεται να σχετίζεται με την απουσία του εκτεταμένου σε μήκος μιτοχονδριακού σινιάλου στόχευσης (N-terminal), που θα μπορούσε να επηρεάζει την αναγνώριση του NLS από τον πυρήνα. Τόσο τα εναλλακτικά μεταγραφήματα όσο και η τοποθέτηση της πρωτεΐνης στον πυρήνα δεν έχουν αποσαφηνιστεί, αλλά θα μπορούσαν να σχετίζονται με την ιδιαιτερότητα των σπερματικών κυττάρων, που αποτελούν ουσιαστικά δύο μεγάλους πυρήνες.

# Abstract

---

## **“Dynamics of the expression pattern and the subcellular localization of Lon3 protease of *Arabidopsis*”**

The ATP-dependent Lon protease is highly conserved across the kingdoms of all living organisms and holds a vital role in the protein quality control mechanism, which maintains the cell's proteostasis. The *Lon* gene family of *Arabidopsis* consists of four members that produce distinct protein isoforms localized in several organelles. *AtLon3* is the only family member that has not been extensively studied, as it was thought until recently to be a pseudogene. Nevertheless, there are new microarray data showing high expression levels of *AtLon3* in *Arabidopsis* pollen sperm cells, whereas the transcript's presence in pollen has been identified in a previous experimental study.

This Master thesis investigates the dynamics of the expression pattern and the subcellular localization of the *AtLon3* gene. Bioinformatics analysis of *AtLon3* gene predicted the presence of an ambiguous presequence for dual targeting in mitochondria and chloroplasts, as well as the presence of NLS. Transient expression of a series of constructs that differ in the 5' prime in *Nicotiana benthamiana*, showed that the AtLon3 protein is localized consistently in mitochondria except of when it misses the N-terminal, in which case it exhibits dual targeting in nucleus and mitochondria. The analysis of AtLon3 transcripts following the gene's transient expression driven by its native promoter, revealed the absence of the hypothetical 1st exon as well as the presence of two alternative transcripts, one of which is characterized by a reading frame turnover, resulting in the loss of the NLS sequence.

Through the combination of the abovementioned results, it was found that the translation of the protein is independent of the AUGs residing in the hypothetical 1st exon, since it does not belong in the coding region and, in parallel to that, the deletion of those AUGs affects neither the production nor the localization of AtLon3 in mitochondria. There are two hypotheses concerning the initiation of translation: a) the possibility of a non-AUG initiation codon residing within the 2nd exon and b) the possibility the initiation of translation to occur in the next AUG, which is located close to the end of the 3rd exon, whereas the region prior to the AUG is the gene's 5' UTR and the intron's splicing contributes to the transcript's stabilization. The dual-targeting in mitochondria and nucleus appears to be related to the absence of the long mitochondrial presequence (N-terminal), which could affect the recognition of the NLS by the nucleus. Both the presence of the alternative transcripts and the localization of the protein in the

nucleus have not been clarified through this experimental study, but could be related to the special nature of the sperm cells, meaning that they are actually two rather big nuclei.

## Πίνακας περιεχομένων

1.1	Διατήρηση της πρωτεόστασης του κυττάρου.....	6
1.1.1	<i>Η σημασία της πρωτεόστασης .....</i>	6
	<i>Εισαγωγή</i>	5
1.1.2	<i>Μηχανισμοί διατήρησης της πρωτεόστασης στα κύτταρα .....</i>	7
1.1.3	<i>Η διατήρηση της πρωτεόστασης του κυττάρου εξαρτάται από τους πρωτεολυτικούς μηχανισμούς που δρουν στα υποκυτταρικά διαμερίσματα .....</i>	8
1.1.3.1	<i>Η πρωτεόλυση στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα εξαρτάται από το μονοπάτι Ουμπικουιτίνη/26S Πρωτεάσωμα .....</i>	9
1.1.3.2	<i>Στα υποκυτταρικά οργανίδια απαντώνται ποικίλοι πρωτεολυτικοί μηχανισμοί, ενώ οι περισσότερες οργανιδιακές πρωτεάσες είναι ATP-εξαρτώμενες και κατατάσσονται στην υπεροικογένεια AAA<sup>+</sup> .....</i>	10
1.2	Οι πρωτεάσες της οικογένειας Lon συμμετέχουν στη διατήρηση του ελέγχου ποιότητας των πρωτεϊνών του φυτικού κυττάρου .....	13
1.2.1	<i>Προέλευση, δομή και λειτουργία της πρωτεάσης Lon.....</i>	13
1.2.2	<i>Η Lon δρα ως προστατευτικός μηχανισμός έναντι της οξειδωτικής καταπόνησης και της δυσλειτουργίας των οργανιδίων .....</i>	16
1.3	Οι πρωτεάσες της οικογένειας Lon του <i>Arabidopsis thaliana</i> παρουσιάζουν διακριτό πρότυπο έκφρασης, πρωτεϊνικής στόχευσης και εκλεκτικότητας.....	18
1.3.1	<i>Η δομική παραλλακτικότητα της περιοχής SSD μαρτυρά λειτουργική εκλεκτικότητα των μελών της οικογένειας Lon του Arabidopsis .....</i>	19
1.3.2	<i>Η υποκυτταρική πρωτεϊνική στόχευση των γονιδίων Lon του Arabidopsis καθορίζεται από διακριτούς μηχανισμούς και σινάλα στόχευσης.....</i>	20
1.3.3	<i>Η έκφραση των Lon γονιδίων του Arabidopsis εντοπίζεται σε διαφορετικούς ιστούς και αναπτυξιακά στάδια .....</i>	23
1.3.4	<i>Το γονίδιο Lon3 του Arabidopsis δεν αποτελεί ψευδογονίδιο και παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον.....</i>	24
1.4	Η δημιουργία του αρσενικού γαμέτη και ο μηχανισμός της διπλής γονιμοποίησης στο <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	28
1.4.1	<i>Η δημιουργία και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του αρσενικού γαμετόφυτου.....</i>	28
1.4.2	<i>Η διπλή γονιμοποίηση στο Arabidopsis .....</i>	31
1.4.3	<i>Γονιδιακή έκφραση στο αρσενικό γαμετόφυτο .....</i>	32
1.5	Σκοπός του πειράματος .....	34



Υλικά & Μέθοδοι .....	35
2.1 Φυτικό υλικό .....	36
2.2 Προετοιμασία και συνθήκες ανάπτυξης φυτικού υλικού .....	36
2.3 Πρωτόκολλο απομόνωσης και καθαρισμού ολικού RNA από φυτά <i>A. thaliana</i> και <i>N. benthamiana</i> .....	37
2.4 Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης.....	38
2.4.1 Διαδικασία παρασκευής πηκτής αγαρόζης.....	38
2.4.2 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης.....	39
2.4.2.1 Ηλεκτροφόρηση DNA μορίων .....	39
2.4.2.2 Ηλεκτροφόρηση RNA μορίων .....	40
2.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων ..	41
2.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	41
2.6.1 Απλή Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) .....	41
2.6.2 PCR αποικιών (Colonies PCR) .....	43
2.6.3 RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) .....	44
2.7 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).....	46
2.8 Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης.....	48
2.9 Ενοποίηση τμημάτων DNA με κολλώδη ή τυφλά άκρα (Ligation).....	48
2.10 Βακτηριακά κύτταρα και μετασχηματισμός.....	50
2.10.1 Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> .....	50
2.10.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> με πλασμιδιακό DNA.....	51
2.10.3 Προετοιμασία ηλεκτροδεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	52
2.10.4 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>Agrobacterium tumefaciens</i> μέσω ηλεκτροπόρωσης .....	52
2.11 Αποθήκευση μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα	53
2.12 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα.....	54
2.12.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα <i>Escherichia coli</i> με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης.....	54
2.12.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με χρήση κολώνας <i>NucleoSpin Plasmid</i> .....	55

2.12.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
55	
2.13 Πέψη νουκλεϊκών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού .....	56
2.14 Παροδικός μετασχηματισμός φύλλων καπνού <i>Nicotiana benthamiana</i> με <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Agroinfiltration) .....	57
2.15 Μικροσκοπία .....	58
2.16 Σύσταση και παρασκευή διαλυμάτων και θρεπτικών μέσων ανάπτυξης .....	59
2.16.1 Σύσταση και προετοιμασία θρεπτικού υλικού ανάπτυξης φυτών .....	59
2.16.2 Διαλύματα ανάπτυξης και επιλογής βακτηριακών κυττάρων .....	59
2.16.3 Διαλύματα απομόνωσης ριβονουκλεϊκών οξέων .....	60
2.16.4 Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης .....	60
2.16.5 Διαλύματα ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων .....	60
2.16.6 Διαλύματα προετοιμασίας δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli DH5a</i> .....	61
2.16.7 Διαλύματα παροδικού μετασχηματισμού <i>N. benthamiana</i> με <i>A. tumefaciens</i> .....	61
2.17 Προγράμματα νευρωνικών δικτύων πρόβλεψης τοποθέτησης πρωτεϊνών .....	61
2.18 Προγράμματα Βιοπληροφορικής και Βάσεις Δεδομένων .....	62
2.19 Λοιπά προγράμματα ανάλυσης αλληλουχιών .....	62
3.1 Η βιοπληροφορική ανάλυση της πρωτεΐνης AtLon3 υποδεικνύει σινιάλο δυαδικής στόχευσης σε μιτοχόνδριο/ χλωροπλάστη καθώς και σινιάλο NLS τοποθέτησης στον πυρήνα	64
Αποτελέσματα .....	63
3.1.1 Πρόβλεψη ύπαρξης μιτοχονδριακού και πιθανώς χλωροπλαστικού σινιάλου στόχευσης στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης AtLon3 .....	64
3.1.2 Η πρωτεΐνη AtLon3 αποτελεί το μοναδικό μέλος της οικογένειας Lon του <i>A. thaliana</i> που διαθέτει σινιάλο NLS στόχευσης στον πυρήνα του κυττάρου .....	66
3.2 Η υποκλωνοποίηση του γονιδίου AtLon3 σε μια σειρά κατασκευές και η παροδική έκφραση τους στο φυτό <i>N. benthamiana</i> καταδεικνύει ότι υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες η παραγόμενη πρωτεΐνη τοποθετείται στα μιτοχόνδρια και στον πυρήνα του κυττάρου .....	68
3.2.1 Στρατηγική σχεδιασμού και υποκλωνοποίησης του γονιδίου AtLon3 για τη δημιουργία των κατασκευών που τέθηκαν υπό τον έλεγχο του υποκινητή CaMV35S .....	68
3.2.2 Στρατηγική σχεδιασμού και υποκλωνοποίησης του γονιδίου AtLon3 για τη δημιουργία της κατασκευής που τέθηκε υπό τον έλεγχο του ενδογενούς υποκινητή του ( <i>pLon3</i> ) .....	76

3.2.3	Αποτύπωση της υποκυτταρικής στόχευσης της πρωτεΐνης AtLon3, μετά από παροδικό μετασχηματισμό του φυτού <i>N. benthamiana</i> με τις κατασκευές του γονιδίου AtLon3, μέσω ανίχνευσης του φθορισμού του YFP.....	82
3.3	Η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου AtLon3 υποδεικνύει ότι η παραγωγή και η τοποθέτηση της πρωτεΐνης δεν εξαρτάται από τις προτεινόμενες αρχικές μεθειονίνες, ενώ παράλληλα ανιχνεύονται δύο εναλλακτικά μεταγραφήματα .....	85
3.3.1	Το μεταγράφημα του AtLon3 που εκτείνεται μέχρι το προτεινόμενο ATG του γονιδίου είναι σπάνιο και το πλαίσιο ανάγνωσης της παραγόμενης πρωτεΐνης είναι ανοικτό από την περιοχή του δεύτερου εξωνίου και έπειτα.....	88
3.3.2	Το μεγαλύτερο σε μήκος μεταγράφημα που ανιχνεύεται μέσω του 5' SMART RACE ξεκινάει στην περιοχή του 2 <sup>ο</sup> εξωνίου και δεν περιλαμβάνει κανένα ATG κωδικόνιο έναρξης σε ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο .....	94
3.3.3	Η ανάλυση της έκφρασης του AtLon3 υποδεικνύει την ύπαρξη δύο διαφορετικών μεταγραφημάτων με εναλλακτικό μάτισμα, με την προβλεπόμενη πρωτεΐνη του ενός να χάνει το σινιάλο NLS98	
Συζήτηση 103		
4.1	Η δυαδική στόχευση της AtLon3 σε μιτοχόνδρια και πυρήνα δεν φαίνεται να σχετίζεται με την ύπαρξη δύο εναλλακτικών μεταγραφημάτων.....	104
4.2	Το πρότυπο έκφρασης και υποκυτταρικής τοποθέτησης της AtLon3 υποδεικνύει ότι το προβλεπόμενο πρώτο εξόνιο δεν αποτελεί κωδική περιοχή, καθώς και την πιθανότητα η έναρξη της μετάφρασης του γονιδίου να μην εξαρτάται απαραίτητα από κωδικόνιο AUG.	110
4.3	Η ύπαρξη ενός λειτουργικού NLS σε μια οργανιδιακή πρωτεΐση πιθανώς σχετίζεται με την ιστοειδικότητα της έκφρασης του γονιδίου AtLon3 στα σπερματικά κύτταρα της γύρης του <i>Arabidopsis</i> .....	122
Βιβλιογραφία.....		124
Παράρτημα 132		
I.	Λίστα εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πειραματική μελέτη .....	133
II.	Πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική πορεία.....	136
III.	Αναλυτικά αποτελέσματα της διαδικασίας κλωνοποίησης για τη δημιουργία των κατασκευών του γονιδίου AtLon3 .....	138
IV.	Χάρτες κλωνοποίησης των κατασκευών του γονιδίου AtLon3 .....	152
V.	Αποτελέσματα αλληλούχισης των κατασκευών του γονιδίου AtLon3.....	156
VI.	Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT PCR) για τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου AtLon3.....	160



# ***Εισαγωγή***

## 1.1 Διατήρηση της πρωτεόστασης του κυττάρου

### 1.1.1 Η σημασία της πρωτεόστασης

Τα φυτικά είδη προκειμένου να επιβιώσουν και να είναι παραγωγικά, απαιτείται να προσαρμοστούν ή να ανταποκριθούν στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Η ερευνητική βιολογία φυτών προσανατολίζεται σε δύο κύριες διεργασίες που αλληλοσυσχετίζονται και καθορίζουν την παραγωγικότητα των φυτών: την ανάπτυξη και την απόκριση στην καταπόνηση. Ο τελικός στόχος είναι ο χαρακτηρισμός των διαδικασιών, των μηχανισμών, των γονιδίων και των προϊόντων τους που καθορίζουν την αύξηση και την ανάπτυξη καθώς και την ανθεκτικότητα ή αντοχή έναντι δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη παραγωγικότερων φυτών μέσω κλασσικής αναπαραγωγής ή/και βιοτεχνολογικών προσεγγίσεων (Jorrín-Novo et al., 2015).

Η αντιμετώπιση των βιοτικών (ιοί, βακτήρια, μύκητες, έντομα, φυτοφάγα, παρασιτικά φυτά) και των αβιοτικών (θερμοκρασία, φως, νερό, αλατότητα, διαθεσιμότητα θρεπτικών) παραγόντων που προκαλούν καταπόνηση (stress) εξαρτάται από τους αρμόδιους μηχανισμούς. Ο εντοπισμός και η αντίληψη της καταπόνησης ενεργοποιεί ενδοκυτταρικές και διακυτταρικές αλυσιδωτές αντιδράσεις μετάδοσης σημάτων, οι οποίες οδηγούν σε επαναπρογραμματισμό της γονιδιακής έκφρασης καθώς και σε πρωτεϊνικές και μεταβολικές αλλαγές. Ο τρόπος με τον οποίο αυτά τα γεγονότα καταλήγουν να προκαλούν ανθεκτικότητα ή/και ανεκτικότητα έχει ιδιαίτερα μεγάλο πρακτικό ενδιαφέρον (Jorrín-Novo et al., 2015).

Όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα στηρίζονται σε συγκεκριμένους μηχανισμούς που ρυθμίζουν την ομοιόσταση των πρωτεϊνών με σκοπό να διατηρήσουν σταθερό και λειτουργικό το πρωτέωμά τους (Koga et al., 2011). Το πρωτέωμα του κυττάρου, δηλαδή το σύνολο των διαφορετικών πρωτεϊνών που εντοπίζονται στο εσωτερικό και τις πλασματικές μεμβράνες, υπόκειται σε ιδιαίτερα αυστηρά πλαίσια ρύθμισης, τα οποία εξασφαλίζουν ότι κάθε δεδομένη πρωτεΐνη συντίθεται, αναδιπλώνεται και υποδιαμερισματοποιείται με τον επιθυμητό τρόπο. Για το λόγο αυτό, υπάρχουν διάφορα κυτταρικά συστήματα που κατέχουν ενεργό ρόλο στον ποιοτικό έλεγχο των πρωτεϊνών και η κατάρρευσή τους επιφέρει δριμύτατες αρνητικές συνέπειες στην κυτταρική ομοιόσταση και λειτουργία. Τα τοξικό φαινόμενο των αλλοιωμένων πρωτεϊνών έχει αποκτήσει πλέον ειδική ορολογία και είναι γνωστό ως «πρωτεοτοξικότητα» (proteotoxicity). Τα πολύπλοκα κυτταρικά συστήματα που

συμβάλουν στη διατήρηση της ομοιόστασης των πρωτεϊνών αναφέρονται ως «δίκτυο της πρωτεόστασης» (proteostasis network) (Balch et al., 2008).

Η απόκριση των κυττάρων στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών και τις ανεπιθύμητες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που υφίστανται, διαφέρει και εξαρτάται από την τοποθεσία αυτών των δομών (κυτταρόπλασμα, οργανίδια, πυρήνας). Οι όροι «στρες του ενδοπλασματικού δικτύου» και «μιτοχονδριακό στρες» χρησιμοποιούνται πλέον για να περιγράψουν την κατάρρευση της λειτουργίας των υποφαινόμενων διαμερισμάτων, ως αποτέλεσμα της συγκέντρωσης αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών στο στρώμα τους (lumen). Η διαχείριση της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης τέτοιων αλλοιωμένων πρωτεϊνών διεξάγεται από συγκεκριμένους μηχανισμούς ποιοτικού ελέγχου των υποκυτταρικών διαμερισμάτων (Koga et al., 2011).

Τα τελευταία χρόνια, η έμφαση μετατοπίζεται από την πρόληψη της πρωτεϊνικής καταστροφής στην κατανόηση των κυτταρικών μηχανισμών ποιοτικού ελέγχου των πρωτεϊνών. Το γεγονός ότι ορισμένοι συμμετέχοντες αυτών των συστημάτων έχουν αποδειχθεί αναγκαίοι για την επέκταση της διάρκειας ζωής, καθώς και τα στοιχεία που υποστηρίζουν ότι η κατάρρευση του δικτύου της πρωτεόστασης αντιπροσωπεύει ένα πρώιμο γεγονός γήρανσης, αυξάνουν διαρκώς το ενδιαφέρον για αυτά καθαυτά τα συστήματα της πρωτεόστασης. Επιπλέον, οι μηχανισμοί της πρωτεϊνικής ομοιόστασης είναι ζωτικής σημασίας για την προσαρμοστικότητα του κυττάρου στην περιβαλλοντική καταπόνηση (Koga et al., 2011).

### ***1.1.2 Μηχανισμοί διατήρησης της πρωτεόστασης στα κύτταρα***

Το σύστημα ελέγχου ποιότητας των πρωτεϊνών συντονίζει με ακρίβεια τη συγκρότηση και την αποδιάταξη των πρωτεϊνικών συμπλόκων, διαφυλάσσοντας την κυτταρική ομοιόσταση ιδιαίτερα σε συνθήκες καταπόνησης. Ο ρόλος του είναι διφασικός, δεδομένου του ότι συγκροτείται από επιδιορθωτικούς μοριακούς συνοδούς και μηχανισμούς αποδιάταξης, που εξαρτώνται από τη διαθεσιμότητα ενέργειας του κυττάρου. Οι μοριακοί συνοδοί και οι πρωτεάσες αντιπροσωπεύουν τις δύο πλευρές του ίδιου νομίσματος, οι οποίες δρουν προς αντίθετες κατευθύνσεις με σκοπό να απομακρύνουν τις αλλοιωμένες πρωτεΐνες από τα κύτταρα (Voos, 2013). Οι μοριακοί συνοδοί διευκολύνουν την αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών στη φυσιολογική τους διαμόρφωση, αποτρέπουν τη συσσωμάτωση και βοηθούν στη συγκρότηση πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων. Από την άλλη πλευρά, οι ATP-εξαρτώμενες πρωτεάσες αποδιατάσσουν τις κατεστραμμένες πρωτεΐνες που δεν

επιδέχονται επιδιόρθωση ή εκείνες που έχουν συντεθεί εσφαλμένα (Rigas et al., 2014).

Οι ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες είναι εξαιρετικά δυναμικά μόρια που υφίστανται συχνές διαμορφωτικές αλλαγές προκειμένου να μετακινούνται διαμέσου των μεμβρανών, να συγκροτούν λειτουργικές δομές ή να ρυθμίζουν τη δική τους λειτουργία, αλλά και τη λειτουργία άλλων πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρούν (Koga et al., 2011). Κατά τη διάρκεια αυτών των διαδικασιών, ένα σύνθετο δίκτυο μοριακών συνοδών είναι αφιερωμένο στη διασφάλιση μιας σταθερά αναδιπλωμένης διαμορφωτικής κατάστασης των πρωτεϊνών, καλύπτοντας τις προσωρινά εκτεθειμένες υδρόφοβες περιοχές των πρωτεϊνών και αποτρέποντας την ανεπιθύμητη και μη-εξειδικευμένη πρόσδεση άλλων πρωτεϊνών σε αυτές. Στις περιπτώσεις που αποτυγχάνουν να αποκτήσουν σταθερή διαμόρφωση, οι ίδιοι μοριακοί συνοδοί δρουν συχνά ως μηχανισμός επιτήρησης, σημαίνοντας τις λανθασμένες πρωτεΐνες για αποδόμηση (Koga et al., 2011).

Οι πρωτεΐνες που δεν έχουν συντεθεί σωστά στέλνονται άμεσα για αποδόμηση, ενώ οι *de novo* συντιθέμενες πρωτεΐνες που τυχαία αποτυγχάνουν να αναδιπλωθούν, αναγνωρίζονται από τους μοριακούς συνοδούς και τις τσαπερονίνες αναδίπλωσης που προσπαθούν να τις οδηγήσουν σε μια σταθερή κατάσταση διαμόρφωσης. Στην περίπτωση αποτυχίας, αυτές οι πρωτεΐνες οδηγούνται στον πρωτεολυτικό μηχανισμό. Ένας παρόμοιος δυναμικός έλεγχος (αναδίπλωση/αποδόμηση) ρυθμίζει τη μοίρα των πρωτεϊνών που έχουν αναδιπλωθεί σωστά αλλά αποδιατάσσονται, είτε ως αποτέλεσμα ανεπιθύμητων μετα- μεταφραστικών τροποποιήσεων είτε ως συνέπεια της επίδρασης καταστροφικών παραγόντων. Κατά συνέπεια, τόσο οι μοριακοί συνοδοί όσο και τα ενδοκυτταρικά πρωτεολυτικά συστήματα αποτελούν τους κύριους τελεστές του μηχανισμού ελέγχου της ποιότητας των πρωτεϊνών (Koga et al., 2011).

### ***1.1.3 Η διατήρηση της πρωτεόστασης του κυττάρου εξαρτάται από τους πρωτεολυτικούς μηχανισμούς που δρουν στα υποκυτταρικά διαμερίσματα***

Η επιλεκτική ενδοκυτταρική πρωτεόλυση αποτελεί ένα σημαντικό ρυθμιστικό μηχανισμό μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, που διατηρεί τον ποιοτικό έλεγχο των πρωτεϊνών αφαιρώντας τα ελαττωματικά, κατεστραμμένα ή και βλαβερά συσσωματώματα πρωτεϊνών (Rigas et al., 2011). Υπάρχουν δεδομένα που υποδεικνύουν διακριτά μονοπάτια αποδόμησης των πρωτεϊνών για κάθε φυτικό υποκυτταρικό διαμέρισμα, τα οποία συνάδουν με την εξελικτική καταγωγή του

εκάστοτε διαμερίσματος. Έτσι, οι χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια χρησιμοποιούν μονοπάτια όμοια με εκείνα των προκαρυωτών, ενώ ο πυρήνας και το κυτταρόπλασμα έχουν μονοπάτια κοινά με τους υπόλοιπους ευκαρυώτες (Vierstra, 1996).

Στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα των ανώτερων ευκαρυωτών οι πρωτεΐνες που προορίζονται για αποδόμηση, σημαίνονται με ουμπικουιτίνη (ubiquitylated) και μεταφέρονται στο 26S πρωτεάσωμα για να αποικοδομηθούν (Hershko and Ciechanover, 1998). Το 26S πρωτεάσωμα αποτελεί την πιο περίτεχνη και περίπλοκη πρωτεάση στην κατηγορία των AAA+ πρωτεασών (ΑΤΡάσες που σχετίζονται με διακριτές κυτταρικές δραστηριότητες) και συμμετέχει στη διαμόρφωση αρκετών πτυχών της φυτικής ανάπτυξης. Εν αντιθέσει με τα δύο προαναφερθέντα υποκυτταρικά διαμερίσματα και ως κληρονομιά της ενδοσυμβιωτικής καταγωγής τους, τα ευκαρυωτικά οργανίδια διατηρούν ανεξάρτητους AAA+ μηχανισμούς πρωτεϊνικής αποδόμησης που κατηγοριοποιούνται σε συγκεκριμένες οικογένειες οργανιδιακών πρωτεασών (Adam et al., 2001).

#### **1.1.3.1 Η πρωτεόλυση στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα εξαρτάται από το μονοπάτι Ουμπικουιτίνη/26S Πρωτεάσωμα**

Το μονοπάτι ουμπικουιτίνη/26S πρωτεάσωμα αποτελεί αδιαμφισβήτητα το κυρίαρχο πρωτεολυτικό σύστημα στα φυτά, στο οποίο η ουμπικουιτίνη (Ub) λειτουργεί ως ένα επαναχρησιμοποιούμενο σινιάλο αναγνώρισης για την επιλεκτική ανακύκλωση των πρωτεϊνών (Smalle and Vierstra, 2004). Τα πολυμερή της Ub συνδέονται ομοιοπολικά με τους πρωτεϊνικούς στόχους χρησιμοποιώντας μια αλυσιδωτή αντίδραση τριών βημάτων, η οποία ανιχνεύει συγκεκριμένα σινιάλα ουμπικουιτίνωσης. Οι πρωτεΐνες-στόχοι μπορεί να βρίσκονται στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα, στην επιφάνεια των μεμβρανών που έρχεται σε επαφή με αυτά τα συστατικά του κυττάρου ή ακόμη να προέρχονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) ακολουθώντας την παλίνδρομη μεταφορά τους πίσω στο κυτταρόπλασμα. Οι πρωτεΐνες που σημαίνονται με πολυμερή ουμπικουιτίνης, αποδομούνται κατόπιν από το 26S πρωτεάσωμα με την παράλληλη απελευθέρωση των μορίων Ub που θα επαναχρησιμοποιηθούν (Smalle and Vierstra, 2004). Μέσω αυτού του κύκλου απομακρύνονται επιτυχώς οι μη-φυσιολογικές και οι περισσότερες ρυθμιστικές πρωτεΐνες, επηρεάζοντας έτσι πολλαπλές ενδοκυτταρικές λειτουργίες. Τα αναρίθμητα συστατικά του Ub/26S πρωτεασώματος που έχουν προσδιοριστεί στα φυτά (>5% του συνολικού πρωτεώματος του *Arabidopsis thaliana*) υποδεικνύουν πως αυτό το καταβολικό μονοπάτι ανταγωνίζεται τη μεταγραφή και τη φωσφορυλίωση των



πρωτεϊνών ως τους κύριους ρυθμιστές των λειτουργιών του φυτικού κυττάρου (Smalle and Vierstra, 2004).

Η πρωτεΐνη ουμπικουιτίνη (Ub) απαντάται σχεδόν παντού (ubiquitous), καθώς εντοπίζεται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς που έχουν εξεταστεί, ενώ παράλληλα αποτελεί την πιο συντηρημένη δομικά πρωτεΐνη που έχει προσδιοριστεί μέχρι σήμερα (Callis et al., 1995). Το 26S πρωτεάσωμα απαντάται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα των φυτικών κυττάρων, με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του να εντοπίζονται σε ιστούς που διαιρούνται ραγδαία. Αποτελεί ένα ATP-εξαρτώμενο πρωτεολυτικό σύμπλοκο, το οποίο αποδομεί πρωτεΐνες σημασμένες με Ub. Περιλαμβάνει 31 κύριες υπομονάδες που οργανώνονται σε δύο υποσύμπλοκα: τον πυρήνα 20S, που είναι μια ευρέως φάσματος ATP-εξαρτώμενη πρωτεάση με δράση ανεξάρτητη της Ub, και το 19S ρυθμιστικό μόριο, το οποίο συνδράμει στην αναγνώριση και την αποδιάταξη των επιθυμητών στόχων, απομακρύνοντας τις Ubs και οδηγώντας τα αποδιατεταγμένα πολυπεπτίδια στο κέντρο του συμπλόκου για αποδόμηση (Smalle and Vierstra, 2004).

Ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η αναγνώριση της πρωτεΐνης-στόχου από το μηχανισμό του πρωτεασώματος δεν έχει αποσαφηνιστεί (Smalle and Vierstra, 2004). Παρόλα αυτά, οι γενετικές αναλύσεις στο *Arabidopsis* καταδεικνύουν την παρουσία άλλων πρωτεολυτικών συστημάτων με μεγάλη ποικιλία πρωτεασών, υποδεικνύοντας πως η συνδυαστική δράση τους είναι καθοριστική για τη διατήρηση και τη ρύθμιση του πρωτεϊνικού κύκλου, που είναι απαραίτητος για την ορθή ανάπτυξη και ομοίωση του φυτικού οργανισμού.

### **1.1.3.2 Στα υποκυτταρικά οργανίδια απαντώνται ποικίλοι πρωτεολυτικοί μηχανισμοί, ενώ οι περισσότερες οργανιδιακές πρωτεάσες είναι ATP-εξαρτώμενες και κατατάσσονται στην υπερικογένεια AAA<sup>+</sup>**

Τα υποκυτταρικά οργανίδια του φυτικού κυττάρου (πλαστίδια, μιτοχόνδρια, περοξυσώματα) έχουν τα δικά τους σύνολα πρωτεϊνών, που αναφέρονται ως οργανιδιακά πρωτεώματα (van Wijk, 2015). Οι περισσότερες από αυτές τις πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια, αλλά τα πλαστίδια και τα μιτοχόνδρια περιέχουν επιπλέον ένα σύνολο περίπου ~85 και ~50 πρωτεϊνών αντιστοίχως, που κωδικοποιούνται από το οργανιδιακό γονιδίωμα. Προκειμένου να δημιουργηθούν και να διατηρηθούν πλήρως λειτουργικά τα οργανίδια, τα πρωτεώματά τους απαιτούν τη δράση πεπτιδασών επεξεργασίας, πρωτεασών και αμινοπεπτιδασών σε ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών.

Κατά τη διάρκεια της περασμένης δεκαετίας σημειώθηκε εξαιρετική πρόοδος στον εντοπισμό και τον προσδιορισμό των οργανιδιακών πρωτεασών, μέσω της μελέτης πολλών μεταλλαγμάτων που χαρακτηρίζονται από απώλεια λειτουργίας (loss-of-function) για διάφορες πρωτεάσες, κυρίως στο φυτό *Arabidopsis thaliana* αλλά και στο ρύζι και το καλαμπόκι (van Wijk, 2015). Παρόλα αυτά, η κατανόηση του ρόλου και του μηχανισμού της πρωτεόλυσης στα φυτικά οργανίδια παραμένει ακόμα περιορισμένη, αφήνοντας αναπάντητα πολλά βασικά ερωτήματα. Η ενδο-οργανιδιακή πρωτεόλυση και η συμπληρωματική αυτοφαγία των οργανιδίων συνυπολογίζονται πλέον ως βασικοί ρυθμιστές της ομοιόστασης των πρωτεϊνών (πρωτεόσταση) (van Wijk, 2015).

Είναι πιθανό οι μηχανισμοί που καθορίζουν την αναγνώριση μεταξύ πρωτεάσης και υποστρώματος να παρουσιάζουν ομοιότητες μεταξύ των οργανιδίων, κυρίως λόγω της ενδοσυμβιωτικής καταγωγής των μιτοχονδρίων και των χλωροπλάστων, που έχουν προέλθει, αντίστοιχα, από κυανοβακτήρια και  $\alpha$ -πρωτεοβακτήρια. Πράγματι, οι μηχανισμοί γονιδιακής έκφρασης, οι παράγοντες αναδίπλωσης και ωρίμανσης των πρωτεϊνών και πολλές από τις πρωτεάσες των οργανιδίων είναι προκαρυωτικής προέλευσης (van Wijk, 2015). Επιπλέον, περισσότερες από 100 πρωτεΐνες παρουσιάζουν διπλή στόχευση τόσο στους χλωροπλάστες όσο και στα μιτοχόνδρια, συμπεριλαμβανομένων πολλών πρωτεασών. Παρά το γεγονός ότι τα περοξυσώματα δεν είναι πιθανό να έχουν ενδοσυμβιωτική καταγωγή, διάφορα μέλη από τις οικογένειες πρωτεασών προκαρυωτικού τύπου που απαντώνται στα πλαστίδια και τα μιτοχόνδρια, εντοπίζονται επίσης στα περοξυσώματα. Ακόμη, πολλές πρωτεΐνες διαίρεσης των περοξυσωμάτων είναι κοινές με τα πλαστίδια ή/και τα μιτοχόνδρια, πιθανώς συνεισφέροντας στην οργάνωση της βιογένεσης μεταξύ αυτών των τριών οργανιδίων (van Wijk, 2015).

Μέχρι στιγμής, σε μια προσπάθεια συστηματικής ανάλυσης και κατανόησης των οργανιδιακών πρωτεασών, έχουν συγκεντρωθεί περισσότερες από 100 πρωτεΐνες με πειραματικά αποδεδειγμένη τοποθέτηση στα πλαστίδια (Kato and Sakamoto, 2014), στα μιτοχόνδρια (Bauwe et al., 2010) και τα περοξυσώματα (Avila-Ospina et al., 2014) που συνοδεύονται από 8 πρωτεΐνες με δυαδική στόχευση μεταξύ πλαστιδίων και μιτοχονδρίων. Οι οικογένειες πρωτεασών στα φυτά έχουν επεκταθεί σημαντικά, πιθανότατα λόγω εξειδικευμένης προσαρμογής τους στην αυτοτροφική φύση και την αδυναμία κίνησης των φυτών (van Wijk, 2015).

Ο έλεγχος ποιότητας των πρωτεϊνών στα βακτήρια και τα ευκαρυωτικά οργανίδια επιτελείται από μέλη της πρωτεϊνικής υπεροικογένειας AAA<sup>+</sup> (ATPases Associated

with diverse cellular Activities), συμπεριλαμβανομένων των μοριακών συνοδών και των πρωτεασών που αντιπροσωπεύουν δύο διαφορετικές όψεις του ίδιου νομίσματος (Sauer et al., 2004). Οι ATP-εξαρτώμενες πρωτεάσες ανακυκλώνουν τις κατεστραμμένες ή εσφαλμένα συντιθέμενες πρωτεΐνες, αποδομώντας τις σε πεπτίδια και αμινοξέα, τα οποία στη συνέχεια μεταφέρονται εκτός των υποκυτταρικών οργανιδίων, συμβάλλοντας έτσι στην παροχή ακατέργαστων υλικών για τη *de novo* σύνθεση πρωτεϊνών (Adam et al. 2001, Sinvany-Villalobo et al. 2004, Janska et al. 2010).

Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτών των πρωτεασών είναι ότι η πρωτεολυτική τους περιοχή συνοδεύεται από μια δομή ATPάσης, που ονομάζεται τμήμα AAA<sup>+</sup> και εικάζεται ότι δρα ως μοριακός συνοδός (Janska, 2005). Η γενική λειτουργία του τμήματος AAA<sup>+</sup> είναι να πυροδοτεί διαμορφωτικές αλλαγές σε ένα μεγάλο εύρος πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, συνεισφέροντας κατ' αυτόν τον τρόπο στην αποδιάταξη τους πριν την αποδόμηση, στην επαναδιάταξη των συσσωματωμάτων και την αποσυναρμολόγηση μακρομοριακών συμπλόκων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και πρωτεΐνης-DNA. Η τυπική δομική οργάνωση των πρωτεϊνών σε αυτή την υπεροικογένεια αποτελείται από μία αμινοτελική περιοχή, που εξυπηρετεί ως σημείο πρόσδεσης για πρωτεΐνες-υποδοχείς και υποστρώματα, η οποία ακολουθείται από μία ή δύο χαρακτηριστικές συντηρημένες δομές και τον βρόγχο του πόρου για την πρόσδεση του υποστρώματος (van Wijk, 2015).

Οι ATP-εξαρτώμενες πρωτεάσες τυπικά οργανώνονται σε μεγάλα, ολιγομερή σύμπλοκα μορφής δακτυλίου που αποτελούνται από πανομοιότυπες ή συγγενείς υπομονάδες (Janska et al., 2010). Τα ενεργά πρωτεολυτικά κέντρα βρίσκονται καλά προστατευμένα στο εσωτερικό αυτών των συμπλόκων και τα υποστρώματα εισέρχονται στον πρωτεολυτικό θάλαμο διαμέσου αξονικών καναλιών, που είναι υπερβολικά στενά για να επιτρέψουν την είσοδο φυσιολογικά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών. Συνεπώς, προκειμένου να αποδομηθούν τα πολυπεπτίδια, είναι αναγκαίο να έχει προηγηθεί η αποδιάταξή τους από το τμήμα AAA. Η αναγνώριση του υποστρώματος μπορεί να επιτελείται είτε από τις περιοχές ATPάσης είτε διαμέσου βοηθητικών πρωτεϊνών. Όλα τα υποστρώματα αποδομούνται με τρόπο εξαρτώμενο του ATP, χρησιμοποιώντας την ενέργεια από την υδρόλυση του ATP για την αποδιάταξη και τη μετατόπιση του πολυπεπτιδίου που υφίσταται αποδιάταξη (Janska et al., 2010).

Οι περισσότερες οργανδιακές πρωτεάσες που ανήκουν στην υπεροικογένεια των AAA<sup>+</sup> κατατάσσονται κυρίως στις οικογένειες των FtsH, Clp και Lon (Janska, 2005).

Οι FtsH πρωτεάσες έχουν μια καταλυτική περιοχή που είναι χαρακτηριστική των μεταλλοπρωτεασών, ενώ οι Clp και Lon ανήκουν στην κατηγορία των πρωτεασών σερίνης. Η οικογένεια των Lon πρωτεασών θα αναλυθεί εκτενέστερα σε επόμενη ενότητα, καθώς αποτελεί το κεντρικό αντικείμενο της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διατριβής.

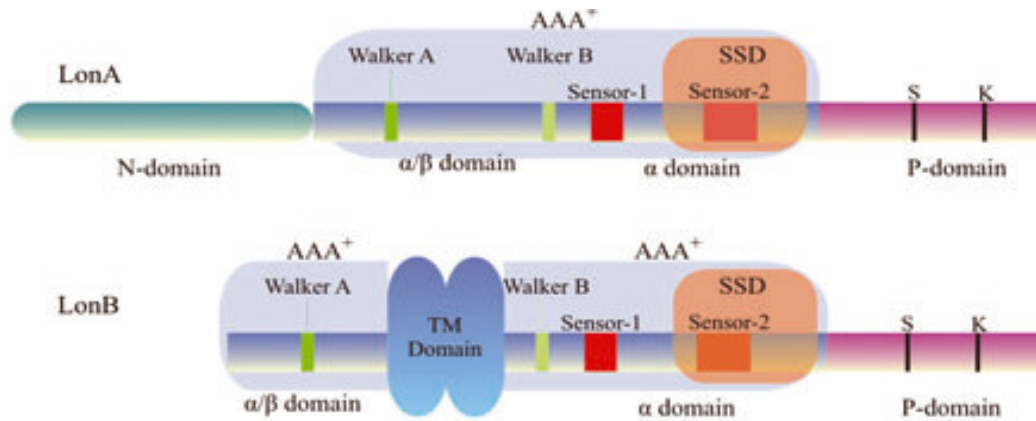
## **1.2 Οι πρωτεάσες της οικογένειας Lon συμμετέχουν στη διατήρηση του ελέγχου ποιότητας των πρωτεϊνών του φυτικού κυττάρου**

Η ATP-εξαρτώμενη Lon πρωτεάση αποτελεί μια βασική συνιστώσα του ελέγχου ποιότητας των πρωτεϊνών, που είναι υψηλά συντηρημένη σε όλα τα βασίλεια των ζωντανών οργανισμών. Συνιστά μια πρωτεολυτική μηχανή που είναι πανταχού παρούσα τόσο σε μονοκύτταρους όσο και σε πολυκύτταρους οργανισμούς. Έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στα βακτήρια και τους μη-φυτικούς οργανισμούς προκειμένου να γίνει αντιληπτός ο ρόλος της Lon στην προστασία έναντι της οξειδωσης των πρωτεϊνών, στη γήρανση και τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

### **1.2.1 Προέλευση, δομή και λειτουργία της πρωτεάσης Lon**

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

Η δομή της Lon πρωτεάσης αποτελείται από τρεις λειτουργικές περιοχές: την εκτεταμένη σε μήκος αμινοτελική περιοχή, η οποία πιθανώς σε συνδυασμό με το κεντρικό τμήμα AAA<sup>+</sup> αλληλεπιδρά εκλεκτικά με τις πρωτεΐνες-στόχους, και την καρβοξυτελική πρωτεολυτική περιοχή, που φέρει μια καταλυτική δυάδα σερίνης-λυσίνης (**Εικόνα 1.1**). Βάσει της πρωτεϊνικής δομής και προέλευσής τους, οι Lon πρωτεάσες κατατάσσονται σε δύο υποοικογένειες (Rotanova et al., 2006). Η υποοικογένεια LonA καθορίζεται από την παρουσία μεγάλου σε μήκος αμινοτελικού άκρου, ενώ η υποοικογένεια LonB στη θέση του αμινοτελικού άκρου έχει μια περιοχή που λειτουργεί ως άγκυρα σε μεμβράνες, η οποία αναδύεται μέσα από την περιοχή ATPάσης. Τα μέλη της υποοικογένειας LonB απαντώνται κυρίως στα Αρχαία, που υπολείπονται των πρωτεασών FtsH και Clp.



**Εικόνα 1.1** Τα δομικά στοιχεία των Lon πρωτεασών (Rigas et al., 2011). Σχηματική αναπαράσταση των υποοικογενειών LonA (πάνω) και LonB (κάτω). Στην περίπτωση των LonA υποδεικνύεται η αμινοτελική περιοχή (N-terminal), το κεντρικό τμήμα AAA<sup>+</sup> με την περιοχή υδρόλυσης του ATP δίπλα στην περιοχή SSD, και την καρβοξυτελική πρωτεολυτική (P) περιοχή, με την καταλυτική δυάδα των καταλοίπων σερίνης (S) και λυσίνης (K). Αντιθέτως, στην περίπτωση των LonB υπολείπεται η αμινοτελική περιοχή και το τμήμα AAA<sup>+</sup> περιέχει διαμεμβρανικές (TM) περιοχές εντοπισμού και πρόσδεσης σε μεμβράνες.

Ο δομικός πυρήνας της Lon είναι το τμήμα AAA<sup>+</sup>, το οποίο αποτελείται από δύο θεμελιώδεις περιοχές: την περιοχή νουκλεοτιδικής πρόσδεσης (α/β) που περιέχει τα συντηρημένα μοτίβα sensor-1, Walker A και Walker B, καθώς και από την περιοχή α-έλικας, η οποία περιλαμβάνει το μοτίβο sensor-2 που χαρακτηρίζεται από ένα συντηρημένο κατάλοιπο αργινίνης. Το τμήμα AAA<sup>+</sup> εμπλέκεται στην υδρόλυση του ATP και την αναδιαμόρφωση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων (Iyer et al., 2004). Πλησίον του τμήματος AAA<sup>+</sup> εντοπίζεται η περιοχή SSD (Sensor- and Substrate-Discrimination domain) που λειτουργεί ως αισθητήρας διάκρισης των υποστρωμάτων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι περιοχές SSD των βακτηριακών Clp ATPασών και της Lon πρωτεάσης που αλληλεπιδρούν με τα υποστρώματα έχουν παρόμοιες προβλεπόμενες δομές (Smith et al., 1999).

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

Η Lon είναι σε θέση να αναγνωρίσει συγκεκριμένες αλληλουχίες πλούσιες σε αρωματικά και υδρόφοβα κατάλοιπα, τα οποία είναι προσβάσιμα σε αποδιατεταγμένα πολυπεπίδια αλλά παραμένουν προστατευμένα στις περισσότερες φυσιολογικές διαμορφώσεις (Gur and Sauer, 2008). Παρόλα αυτά, έχει επίσης δειχτεί ότι αποδομεί αναδιπλωμένα αλλά μη συναρμολογημένα πολυπεπίδια που μπορεί να τοποθετούνται στο κεντρικό κανάλι πρωτεόλυσης με εκτεθειμένα στην επιφάνεια υδρόφοβα κατάλοιπα που εντοπίζονται μέσα σε ένα πολύ φορτισμένο περιβάλλον (Ondrovicová et al., 2005). Συνεπώς, η Lon συνιστά έναν εκλεπτυσμένο πρωτεολυτικό μηχανισμό, ο οποίος αποδομεί επιλεκτικά είτε μη-σημασμένα, λάθος αναδιπλωμένα υποστρώματα είτε φυσιολογικά αναδιπλωμένες αλλά μη-συναρμολογημένες υπομονάδες, με τελικό στόχο την προστασία της λειτουργικής ακεραιότητας του πρωτεώματος (Rigas et al., 2011).

Παρά το γεγονός ότι είναι ευρέως αποδεκτό πως η Lon αναγνωρίζει και αποδομεί τη συντριπτική πλειοψηφία των κατεστραμμένων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, ελάχιστα από τα πρωτεϊνικά της υποστρώματα έχουν προσδιοριστεί στους ευκαρυώτες. Αυτά περιλαμβάνουν συστατικά της αναπνευστικής αλυσίδας, του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) και των μονοπατιών βιοσύνθεσης των αμινοξέων (Bender et al, 2010). Σε πολλά συστήματα-μοντέλα έχει προσδιοριστεί η μιτοχονδριακή ακονιτάση ως το κυριότερο υπόστρωμα της πρωτεάσης Lon, δηλαδή ένα ένζυμο του κύκλου TCA που περιέχει συμπλέγματα σιδήρου/θείου και είναι επιδεκτικό στην οξειδωτική απενεργοποίηση. Υπάρχουν και άλλες μιτοχονδριακές λειτουργίες που έχουν αποδοθεί στη Lon πέραν της πρωτεόλυσης, συμπεριλαμβανομένων των ιδιοτήτων της ως μοριακός συνοδός στη συναρμολόγηση των πρωτεϊνικών συμπλόκων (Rep et al., 1996) και την εξειδικευμένη πρόσδεσή της σε αλληλουχίες μιτοχονδριακού DNA και RNA για τη διατήρηση της ακεραιότητας του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (Lu et al., 2007).

### ***1.2.2 Η Λοιπή δρα ως προστατευτικός μηχανισμός έναντι της οξειδωτικής καταπόνησης και της δυσλειτουργίας των οργανιδίων***

Η ζωή σε ένα αερόβιο περιβάλλον συνοδεύεται από το λεγόμενο «Οξειδωτικό Παράδοξο», σύμφωνα με το οποίο οι οργανισμοί δεν επιβιώνουν σε μη-οξυγονούχα περιβάλλοντα, αλλά ταυτοχρόνως το οξυγόνο είναι εκ φύσεως επικίνδυνο για την ύπαρξή τους (Davies, 1995). Το οξυγονούχο περιβάλλον συνέβαλε στην εξέλιξη αερόβιων μεταβολικών διεργασιών ζωτικής σημασίας, όπως είναι η αναπνοή και η φωτοσύνθεση, μέσω των οποίων αναπόφευκτα παράγονται μεταβολίτες μοριακού οξυγόνου που είναι γνωστοί ως ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS). Παρά το γεγονός ότι προκύπτουν συνεχώς νέα στοιχεία που υποδεικνύουν ότι τα ROS στα φυτά πιθανώς να λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια στη ρύθμιση της ανάπτυξης και της απόκρισης στην άμυνα εναντίον των παθογόνων, οι ενεργές μορφές οξυγόνου έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν οξειδωτική καταστροφή στις πρωτεΐνες, το DNA και τα λιπίδια (Apel and Hirt 2004, Møller et al. 2007).

Τα μιτοχόνδρια, οι χλωροπλάστες και τα περοξυσώματα αντιπροσωπεύουν υποκυτταρικές πηγές παραγωγής ROS και τους κύριους στόχους της οξειδωτικής καταστροφής των μακρομορίων. Ειδικότερα, η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων μεταφέρει ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας στο οξυγόνο μέσω μιας σειράς πρωτεϊνικών συμπλόκων της εσωτερικής μεμβράνης. Η διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS), που οδηγεί στην παραγωγή ενέργειας με τη μορφή ATP, χαρακτηρίζεται από διαρροή ηλεκτρονίων, καταλήγοντας στην παραγωγή ROS που προκαλούν πολύ σοβαρές καταστροφές στο κύτταρο. Το γεγονός αυτό οδήγησε το 1956 στη «θεωρία των ελεύθερων ριζών», σύμφωνα με την οποία εικάζεται ότι οι ενδογενείς ρίζες οξυγόνου δημιουργούνται στο εσωτερικό των κυττάρων και καταλήγουν σε ένα μοτίβο συσσωρευτικής καταστροφής (Harman, 1956).

Οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει εκλεπτυσμένα δίκτυα άμυνας, που ξεκινούν με τη σύνθετη δράση αποτοξινωτικών ενζύμων και μη-ενζυματικών αντιοξειδωτικών ουσιών που συνεργάζονται και ρυθμίζουν τα επίπεδα των ROS, διατηρώντας τη φυσιολογική ομοιόσταση (Friguet et al., 2008). Παρόλα αυτά, όταν προκύπτουν εξαιρετικά δυσμενείς οξειδωτικές συνθήκες, η ισορροπία μεταξύ της παραγωγής και της απομάκρυνσης των ROS διαταράσσεται, γεγονός που οδηγεί στη ραγδαία ενδοκυτταρική συσσώρευση των οξειδωτικών ουσιών. Η οξειδωτική καταπόνηση επάγει αλλαγές τόσο στο σκελετό των πολυπεπτιδίων όσο και στις αμινοξικές αλυσίδες των πρωτεϊνών.

Στα φυτά, η αβιοτική καταπόνηση λόγω έκθεσης σε σκληρές περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. υψηλός φωτισμός, ξηρασία), οδηγεί σε λανθασμένη αναδίπλωση των πρωτεϊνών, που προκαλείται συνήθως λόγω των χημικών τροποποιήσεων που δημιουργούν τα ROS (Apel and Hirt 2004, Møller et al. 2007), καθιστώντας αυτές τις πρωτεΐνες ιδιαίτερα επιδεκτικές στην οξειδωση (Dukan et al., 2000). Οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες παρουσιάζουν εκτεταμένη ή/και ολοκληρωτική απώλεια λειτουργίας και δημιουργούν τοξικά πρωτεϊνικά συσσωματώματα και έγκλειστα σωματίδια που παρεμβαίνουν στις φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες (Petrooulos and Friguet, 2006). Συνεπώς, οι μηχανισμοί ελέγχου ποιότητας των πρωτεϊνών εμπλέκονται άμεσα στην άμυνα έναντι της οξειδωτικής καταπόνησης, διασφαλίζοντας την ισορροπία μεταξύ των λειτουργικών και μη-λειτουργικών πρωτεϊνών.

Μέχρι σήμερα έχουν συσσωρευτεί αρκετά στοιχεία που υποδεικνύουν ότι η Lon πρωτεάση αποτελεί βασικό συμμετέχοντα στην διατήρηση της πρωτεόστασης κατά την οξειδωτική καταπόνηση, ιδιαίτερα στο μιτοχόνδριο (Rigas et al, 2011). Τα μεταλλάγματα της μιτοχονδριακής πρωτεάσης PIM1, που αποτελεί την ομόλογη Lon της ζύμης, χαρακτηρίζονται από αναπνευστική ανεπάρκεια, καθώς τα μεταλλαγμένα κύτταρα δεν μπορούν να συνθέσουν τις υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας, γεγονός που δημιουργεί πρόβλημα στην ανάπτυξη και οδηγεί σε «μικροσκοπικό» φαινότυπο (Suzuki et al. 1994, van Dyck et al. 1994). Παράλληλα, με μεθόδους ηλεκτρονικής μικροσκοπίας αποδείχτηκε ότι τα μιτοχόνδρια κυττάρων ζύμης (Suzuki et al., 1994) και ανθρώπου (Bota et al., 2005) που υπολείπονται της Lon παρουσιάζουν ανώμαλη μορφολογία. Όσα προαναφέρθηκαν σε συνδυασμό με επιπλέον ενδείξεις που δεν αναφέρονται στο παρόν κείμενο, υποδεικνύουν ότι η πρωτεάση Lon συμμετέχει ενεργά στη διατήρηση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών και της κυτταρικής οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης (Rigas et al., 2011).

Στα φυτά έχουν προσδιοριστεί δύο γονίδια *Lon* στο *Zea mays* (Barakat et al., 1998), που ονομάστηκαν *ZmLon1* και *ZmLon2*, και ένα γονίδιο στο *Oryza sativa*, το *OsLon1* (Su et al., 2006). Επίσης, η χρωματογραφία συγγένειας ATP που εφαρμόστηκε για την επιλογή πρωτεϊνών που προσδένονται στο DNA, οδήγησε στην ταυτοποίηση της πρωτεάσης Lon από το διαλυτό κλάσμα των μιτοχονδρίων του *Arabidopsis* (Ito et al., 2006). Η ερευνητική πρόοδος που σημειώνεται στο φυτό-μοντέλο *Arabidopsis* αποκαλύπτει το ρόλο της πρωτεάσης Lon στη διατήρηση της ομοιόστασης των φυτικών οργανιδίων και διεγείρει πιθανά σενάρια που αφορούν στην ανθεκτικότητα των φυτών έναντι των σκληρών αβιοτικών συνθηκών, που προκύπτουν από τις ασταθείς κλιματικές αλλαγές (Rigas et al., 2011). Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις και



στα φυτικά μιτοχόνδρια που υποδεικνύουν ότι η πρωτεολυτική ενεργότητα της Lon ενδέχεται να επάγεται κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες (Sweetlove et al. 2002, Lister et al. 2004).

### **1.3 Οι πρωτεάσες της οικογένειας Lon του *Arabidopsis thaliana* παρουσιάζουν διακριτό πρότυπο έκφρασης, πρωτεϊνικής στόχευσης και εκλεκτικότητας**

Το *Arabidopsis* έχει μια μικρή οικογένεια Lon γονιδίων που περιλαμβάνει τέσσερα μέλη, τα *Lon1-Lon4*, τα οποία κωδικοποιούν για πρωτεϊνικές ισομορφές με διακριτούς υποκυτταρικούς στόχους (Sinvañy-Villalobo et al. 2004, Rigas et al. 2009a, Janska et al. 2010). Η μοριακή γενετική στο *Arabidopsis* συνέβαλε στην αποσαφήνιση του εξειδικευμένου ρόλου των Lon στη διατήρηση της βιογένεσης και της λειτουργίας των οργανιδίων (Rigas et al., 2011). Από τα τέσσερα μέλη της οικογένειας, εκείνα των οποίων τα προϊόντα είναι περισσότερο μελετημένα ως προς τη λειτουργία τους στο φυτικό κύτταρο, είναι τα γονίδια *Lon1* και *Lon2*. Η απώλεια λειτουργίας είτε της *Lon1* είτε της *Lon2* οδηγεί σε παρόμοια δυσλειτουργία στη βλάστηση των σπόρων και την εγκαθίδρυση των φυταρίων του *Arabidopsis* (Rigas et al., 2011). Η λειτουργία των πρωτεασών *Lon3* και *Lon4* δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα.

Τα μεταλλαγμένα *lon1* αλληλόμορφα υπολείπονται της καρβοξυτελικής πρωτεολυτικής περιοχής και επιδεικνύουν μετα-εμβρυϊκή καθυστέρηση της ανάπτυξης, γεγονός που οδηγεί σε αργοπορημένη εγκαθίδρυση του φυταρίου, ενώ τα μιτοχόνδριά τους χαρακτηρίζονται από μειωμένη αναπνευστική ικανότητα και μειωμένη ενεργότητα των κύριων ενζύμων του κύκλου TCA (Rigas et al., 2009a). Η περοξυσωμική πρωτεάση *Lon2* σχετίζεται με το μηχανισμό εισαγωγής πρωτεϊνών στη μήτρα των περοξυσωμάτων και είναι αναγκαία κατά τη μετάβαση από το στάδιο της βλάστησης των φυταρίων στα ώριμα φυτά (Eastmond et al., 2000). Τα περοξυσώματα στους ελαιώδεις σπόρους του *Arabidopsis* καταβολίζουν τα αποθηκευμένα λιπαρά οξέα, υποστηρίζοντας την ανάπτυξη του φυταρίου μέχρι την έναρξη της φωτοσύνθεσης. Μετά τη βλάστηση, αλλάζει το περιεχόμενο των πρωτεϊνών με την εισαγωγή από το κυτταρόπλασμα των νεοσυντιθέμενων ενζύμων της φωτοαναπνοής στη μήτρα, μέσω περοξυσωμικών σινιάλων τοποθέτησης. Τα μεταλλάγματα *lon2* παρουσιάζουν καθυστερημένη ανάπτυξη και φαινότυπους που σχετίζονται με απώλεια της περοξυσωμικής λειτουργίας (Lingard and Bartel, 2009).

### ***1.3.1 Η δομική παραλλακτικότητα της περιοχής SSD μαρτυρά λειτουργική εκλεκτικότητα των μελών της οικογένειας Lon του Arabidopsis***

Μεταξύ των *Lon* γονιδίων του *Arabidopsis*, οι αμινοτελικές και οι καρβοξυτελικές περιοχές παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη συντήρηση, ενώ μόνο το πιο ετερογενές τμήμα της δομής AAA<sup>+</sup> είναι το SSD, κάτι που δεν ισχύει για την περιοχή της ΑΤΡάσης (Rigas et al., 2009b). Παρά το γεγονός ότι οι πρωτεάσες Lon1 και Lon4 είναι υψηλά συντηρημένες, πιθανότατα λόγω ενός πρόσφατου γεγονότος γονιδιακού διπλασιασμού, η μοντελοποίηση της τρισδιάστατης δομής τους καταδεικνύει μεγάλη αντίθεση του SSD μεταξύ Lon1 και Lon4, γεγονός που υποδεικνύει ότι το SSD εξειδικεύει την αναγνώριση του υποστρώματος, συνεπώς και την επιλεκτική πρωτεόλυση. Τα γεγονότα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα γονίδια *Lon* του *Arabidopsis* είναι παράλογα, που δημιουργήθηκαν μέσω γονιδιακού διπλασιασμού (Rigas et al., 2011).

Η προσαρμοστική εξέλιξη των διπλασιασμένων γονιδίων συνήθως οδηγεί σε μη-λειτουργικότητα, ένα γεγονός που περιγράφει ότι η μοίρα του γονιδιακού αντιγράφου θα το οδηγήσει στο να γίνει ψευδογονίδιο (Lynch and Conery, 2000). Το γονίδιο *Lon3* της οικογένειας είχε αρχικά χαρακτηριστεί ως ψευδογονίδιο, μια υπόθεση που βασίστηκε στην απουσία μεταγραφημάτων στα δείγματα RNA που είχαν απομονωθεί από διαφορετικούς ιστούς ή περιβαλλοντικές συνθήκες (Ostersetzer et al. 2007, Rigas et al. 2009a), καθώς και στα οριακά επίπεδα έκφρασης που είχαν ανιχνευθεί σε δεδομένα μικροσυστοιχιών της βάσης δεδομένων Genevestigator (<https://genevestigator.com/gv/>). Τα υπόλοιπα παράλογα γονίδια *Lon1*, *Lon2* και *Lon4* διατηρήθηκαν με υπο-λειτουργικότητα (Lynch and Conery, 2000), εξελίσσοντας διακριτούς μηχανισμούς οργανδιακής πρωτεϊνικής στόχευσης και υποσύνολα βιοχημικών δραστηριοτήτων εξαιτίας των ποικίλων τμημάτων SSD, τα οποία αποτελούν σημαντικά χαρακτηριστικά της λειτουργίας των φυτικών οργανιδίων. Η διαδικασία αυτή παρέχει ένα προσαρμοστικό πλεονέκτημα, καθώς δημιουργεί ένα δυναμικό μοντέλο γονιδιακής ρύθμισης ώστε κάθε πρωτεϊνική ισομορφή να επιτελεί μια συγκεκριμένη λειτουργία, με μεγαλύτερη επιλεκτικότητα απ' ότι η πρόγονη μορφή της (Rigas et al., 2011).

### ***1.3.2 Η υποκυτταρική πρωτεϊνική στόχευση των γονιδίων Lon του Arabidopsis καθορίζεται από διακριτούς μηχανισμούς και σινιάλα στόχευσης***

Οι αρχαίες εισβολές από τα ευβακτήρια οδήγησαν, μέσω της ενδοσυμβίωσης, στη δημιουργία των μιτοχονδρίων και των χλωροπλαστών που έχουν τεράστιο αντίκτυπο στη βιοενεργητική και μεταβολική ομοιόσταση των φυτών (Dyall et al., 2004). Κατά τη διάρκεια της ενδοσυμβίωσης, οι συμβιώτες έχασαν την αυτονομία τους μέσω της μαζικής μεταφοράς της γενετικής τους πληροφορίας στον πυρήνα του ξενιστή, καταλήγοντας σε γενετικό πλεονασμό. Η εξέλιξη και η εγκαθίδρυση του μηχανισμού μετακίνησης των πρωτεϊνών προκάλεσε μαζική απώλεια γονιδίων, που οδήγησε στη μείωση του οργανιδιακού γονιδιώματος. Η διαδικασία μετακίνησης συμπεριέλαβε την επέκταση του αμινοτελικού άκρου της πρόδρομης πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από τον πυρήνα και συντίθεται στα κυτταροπλασματικά ριβοσώματα.

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

Οι περισσότερες πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια, έχουν εξειδικευμένη στόχευση σε ένα οργανίδιο. Παρόλα αυτά, η δυαδική υποκυτταρική τοποθέτηση πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες απαντάται συχνά λόγω της μετα-ενδοσυμβιωτικής τους εξέλιξης (Millar et al. 2006, Baudisch et al. 2014). Στα φυτά αναφέρονται δύο διαμορφώσεις δυαδικής στόχευσης, όπου η μία χαρακτηρίζεται από δύο πρόδρομες αλληλουχίες στόχευσης (twin presequences) και η άλλη από μία ενιαία πρόδρομη αλληλουχία στόχευσης με διαφορετικά χαρακτηριστικά (ambiguous presequence) (Peeters and Small 2001, Silva-Filho 2003, Mackenzie 2005, Baudisch et al. 2014).

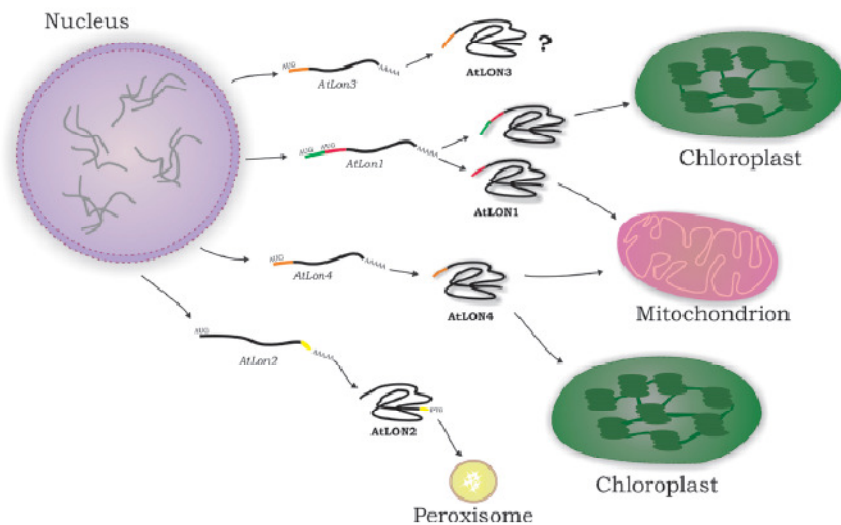
Η ενιαία πρόδρομη αλληλουχία (ambiguous presequence) δίνει γένεση σε μία μοναδική πρωτεϊνική ισομορφή, με ένα πεπτίδιο-οδηγό που αναγνωρίζεται από τον μηχανισμό εισόδου τόσο του μιτοχονδρίου όσο και του χλωροπλάστη. Παρά το γεγονός ότι αυτές οι διαμορφώσεις μπορούν να οργανωθούν σε περιοχές που καθορίζουν την επιλεκτική στόχευση σε ένα ανεξάρτητο οργανίδιο, τα σινιάλα που

είναι υπεύθυνα για την οργανιδιακή στόχευση συνήθως αλληλεπικαλύπτονται (Berglund et al., 2009a). Συνεπώς, η ενιαία πρόδρομη αλληλουχία στόχευσης δεν μπορεί να διαχωριστεί πλήρως από τα εξειδικευμένα οργανιδιακά πεπτίδια στόχευσης, ενώ η αλληλουχία της παρουσιάζει μια ενδιάμεση αμινοξική σύσταση που χρησιμοποιεί τα ίδια μονοπάτια εισόδου στα οργανίδια με τις εξειδικευμένες οργανιδιακές πρωτεΐνες. Παρά το γεγονός ότι τα χαρακτηριστικά που καθορίζουν τη δυαδική στόχευση δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως, οι φυσικοχημικές ιδιότητες της αμινοτελικής περιοχής της ενιαίας πρόδρομης αλληλουχίας, συμπεριλαμβανομένης της υδροφοβικότητας, του φορτίου των αμινοξέων και της δευτεροταγούς δομής, διαμορφώνουν τη διπλή τοποθέτηση (Berglund et al., 2009a).

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

Οι πρωτεϊνικές ισομορφές που κωδικοποιούνται από τα πυρηνικά γονίδια *Lon* στο *Arabidopsis* είναι διαμοιρασμένες στα οργανίδια του φυτικού κυττάρου που εμπλέκονται κυρίως στο μεταβολισμό της ενέργειας (**Εικόνα 1.2**), χρησιμοποιώντας διαφορετικούς μηχανισμούς πρωτεϊνικής τοποθέτησης (Rigas et al., 2014). Η πρωτεάση Lon4 παρουσιάζει δυαδική στόχευση στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες, χρησιμοποιώντας ενιαία (ambiguous) πρόδρομη αλληλουχία στόχευσης και για τα δύο οργανίδια (Sakamoto 2006, Ostersetzer et al. 2007). Το καρβοξυλικό άκρο της πρωτεάσης Lon2 φέρει ένα περοξυσωματικό σινιάλο στόχευσης τύπου 1 (PTS1), το οποίο οδηγεί την τοποθέτησή της στα περοξυσώματα (Lingar and Bartel, 2009). Η βιοπληροφορική ανάλυση του αμινοτελικού άκρου της πρωτεάσης Lon3 υπέδειξε μια πιθανή ενιαία πρόδρομη αλληλουχία δυαδικής υποκυτταρικής τοποθέτησης στους χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια. Η πρωτεάση Lon1

παρουσιάζει δυαδική στόχευση που ρυθμίζεται τόσο στο επίπεδο της μεταγραφής όσο και στο επίπεδο της μετάφρασης (Daras et al., 2014).



Εικόνα 1. 2 Οι πρωτεϊνικές Lon isoμορφές του *Arabidopsis* είναι παρούσες στα υποκυτταρικά οργανίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της ενέργειας (Rigas et al., 2014). Η πλειονότητα των οργανιδιακών πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τον πυρήνα, μεταφράζονται στα κυτταροπλασματικά ριβοσώματα και στη συνέχεια τοποθετούνται στα οργανίδια μέσω σινιάλων στόχευσης. Οι πρωτεάσες Lon1 και Lon4 παρουσιάζουν δυαδική στόχευση στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες, μέσω δυαδικού και ενιαίου πρόδρομου σινιάλου στόχευσης, αντιστοίχως, στο αμινοτελικό άκρο της παραγόμενης πρωτεϊνικής isoμορφής. Η Lon2 εισάγεται στα περοξυσώματα μέσω του περοξυσωμικού σινιάλου στόχευσης τύπου 1 στο καρβοξυτελικό της άκρο. Η υποκυτταρική στόχευση της Lon3 δεν έχει αποσαφηνιστεί μέχρι στιγμής.

Τα χαρακτηριστικά των παράλογων γονιδίων *Lon1* και *Lon4* υποστηρίζουν την ύπαρξη ενός αρχαϊκού *Lon* γονιδίου, το οποίο κατάγεται από το πρώτο βακτηριακό γεγονός ενδοσυμβίωσης και όταν διπλασιάστηκε οδήγησε στα προγονικά γονίδια *Lon1* και *Lon4*, τα οποία έφεραν δομές δυαδικών πρόδρομων αλληλουχιών στόχευσης για διπλή υποκυτταρική τοποθέτηση (Rigas et al., 2014). Και τα δύο προγονικά γονίδια ανέπτυξαν μέσω προσαρμοστικής εξέλιξης διακριτά τμήματα SSD, συνεπώς και εξειδικευμένους ρόλους στην ανάπτυξη φυτών και την απόκριση στην καταπόνηση. Επιπλέον, το προγονικό *Lon4* γονίδιο εξέλιξε την πρόδρομη μιτοχονδριακή αλληλουχία στόχευσης σε ενιαία πρόδρομη αλληλουχία και για τα δύο οργανίδια. Αυτό το εξελικτικό γεγονός χαρακτηρίζεται από τη μοναδιαία εισαγωγή μιας θυμίνης, που διαταράσσει το αναγνωστικό πλαίσιο του *Lon4* και οδηγεί στη δημιουργία κωδικονίου λήξης της μετάφρασης TGA, με σκοπό να αποτρέψει τη σύνθεση του χλωροπλαστικού πεπτιδικού σινιάλου.

Αυτή η εξελικτική διαδικασία μετατοπίζει το βάρος του μηχανισμού δυαδικής στόχευσης από τις δυαδικές πρόδρομες αλληλουχίες στην ενιαία πρόδρομη αλληλουχία στόχευσης (Rigas et al., 2014). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, πιθανότατα συνέβησαν επιπλέον γεγονότα διπλασιασμού του αρχαϊκού ή των προγονικών *Lon* γονιδίων, που οδήγησαν στη δημιουργία του σημερινού *Lon3* γονιδίου, το οποίο είναι

τοποθετημένο πάνω στο γονιδίωμα ακριβώς μετά το γονίδιο *Lon4* σε κατεύθυνση head-to-tail, καθώς και στη δημιουργία του *Lon2*. Κατά τη διάρκεια που το *Lon2* απέκτησε περοξυσωμικό σινιάλο στόχευσης, η πρόδρομη μιτοχονδριακή αλληλουχία σταδιακά αλλοιώθηκε. Αυτή η σειρά των γεγονότων διπλασιασμού δεν αποκλείει άλλα εξελικτικά μονοπάτια που μπορεί να οδήγησαν στον τετραπλό αριθμό Lon στο γονιδίωμα του *Arabidopsis*. Παρόλα αυτά, τα χαρακτηριστικά τους που καθορίζουν τη μετακίνηση των πρωτεϊνικών ισομορφών στα φυτικά οργανίδια σε συνδυασμό με τη δομή των τμημάτων SSD, υποστηρίζουν το συγκεκριμένο προτεινόμενο μοντέλο (Rigas et al., 2014).

### ***1.3.3 Η έκφραση των Lon γονιδίων του Arabidopsis εντοπίζεται σε διαφορετικούς ιστούς και αναπτυξιακά στάδια***

Τα δεδομένα μικροσυστοιχιών που παρέχονται δημόσια από τη βάση δεδομένων Genevestigator αλλά και δεδομένα από επιστημονικές έρευνες δείχνουν ότι τα γονίδια *Lon* του *Arabidopsis* εκφράζονται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους και ιστούς (Rigas et al., 2009a). Παρόλα αυτά, χαρακτηρίζονται από διαφορετικά προφίλ έκφρασης.

Η έκφραση του γονιδίου *Lon1* (At5g26860) είναι πολύ υψηλή σε όργανα εμβρυονικής προέλευσης που αναπτύσσονται ραγδαία και σε ιστούς που εξαρτώνται από μεγάλα ποσά ενέργειας, που έχουν αυξημένο αριθμό μιτοχονδρίων ανά κύτταρο ώστε να ικανοποιούν τις αυξημένες απαιτήσεις τους σε ενέργεια. Το *Lon1* εκφράζεται κατά κύριο λόγο κατά τη βλάστηση των σπόρων, σε εμβρυονικά όργανα, συμπεριλαμβανομένων των κοτυληδόνων και των πρωτογενών ριζών, και σε όργανα με μεγάλους ρυθμούς ανάπτυξης, όπως οι αναπτυσσόμενες ταξιανθίες, ενώ σχεδόν δεν ανιχνεύεται σε ώριμες ρίζες ή μεριστώματα των ενήλικων φυτών (Rigas et al., 2009a).

Το πυρηνικό γονίδιο *Lon1* περιλαμβάνει δύο κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο, συνεπώς μέσω εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης ενός μοναδιαίου μεταγραφήματος, κωδικοποιεί για μια μεγάλη (long) πλαστιδιακή ισομορφή και για μια μικρότερη (short) μιτοχονδριακή ισομορφή (Daras et al., 2014). Στην περιοχή της αλληλουχίας που πλαισιώνει το πρώτο AUG και έχει χαρακτηριστεί ως «ασθενής», καθώς απέχει πολύ από το βέλτιστο ισχυρό Kozak, παρατηρείται διαρρέουσα σάρωση από το ριβόσωμα, η οποία οδηγεί σε εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης από το δεύτερο AUG. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι

διαφορική επιλογή του σημείου έναρξης της μεταγραφής (TSS), που εξαρτάται από την ιστοειδικότητα και τις περιβαλλοντικές συνθήκες, οδηγεί σε δύο μεταγραφήματα *Lon1*. Το μεγάλο μεταγράφημα, που περιέχει και τα δύο σημεία έναρξης της μετάφρασης, εκφράζεται υπό όρους στα φύλλα σε συνθήκες έλλειψης φωτός. Αντιθέτως, το μικρό μεταγράφημα της *Lon1* που υπολείπεται του πρώτου AUG, είναι το κυρίαρχο υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, αν και η έκφρασή του αυξάνεται σημαντικά σε συνθήκες υποξίας, υποδεικνύοντας υψηλή απαίτηση της πρωτεάσης *Lon1* στα μιτοχόνδρια.

Συγκριτικά με το *Lon1*, το γονίδιο *Lon4* (At3g05790) παρουσιάζει τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης, αν και η απόκριση του είναι ποιοτικά όμοια με του *Lon1* (Rigas et al., 2009a). Ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας, το *Lon2* χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλά επίπεδα έκφρασης, ενώ σε γενικές γραμμές η έκφραση αυτή παραμένει συνεχής μεταξύ των κυτταρικών τύπων και ιστών που έχουν εξεταστεί, χωρίς σημαντικές διακυμάνσεις.

#### ***1.3.4 Το γονίδιο Lon3 του Arabidopsis δεν αποτελεί ψευδογονίδιο και παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον***

Το γονίδιο *Lon3* (At3g05780) βρίσκεται τοποθετημένο σε κατεύθυνση head-to-tail με το γονίδιο *Lon4* (At3g05790) πάνω στο τρίτο χρωμόσωμα του φυτού *Arabidopsis thaliana* και έχει διατηρήσει ανοιχτό το αναγνωστικό του πλαίσιο. Το πιθανό cDNA του *Lon3* έχει προβλεφθεί μόνο μέσω *in silico* ανάλυσης και είναι κατά ένα εξόνιο μικρότερο συγκριτικά με το αντίστοιχο του *Lon4*. Το εν δυνάμει *Lon3* πολυπεπτίδιο που παράγεται από το προβλεπόμενο cDNA έχει προβλεφθεί να φέρει στο αμινοτελικό άκρο του μια ενιαία πρόδρομη αλληλουχία στόχευσης (ambiguous), όπως η *Lon4*. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του γονιδίου *Lon3*, που το διαφοροποιεί σημαντικά από τα υπόλοιπα *Lon* του *Arabidopsis*, είναι πως αποτελεί το μοναδικό μέλος της οικογένειας που φέρει ένα πιθανό σινιάλο NLS (Nuclear Localization Signal) για τοποθέτηση στον πυρήνα του κυττάρου (Rigas et al., 2011).

Μέχρι σήμερα, οι μοναδικές δημοσιευμένες πληροφορίες που είναι διαθέσιμες για το γονίδιο *Lon3* προέρχονται από μελέτες ανάλυσης μεγάλου όγκου δεδομένων που κυρίως αφορούν μεταγραφομική, πρωτεομική και φυλογενετική ανάλυση. Οι García-Lorenzo et al. (2006) πραγματοποίησαν συγκριτική ανάλυση των οικογενειών γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεάσες στα αλληλουχημένα γονιδιώματα των δικοτυλήδων φυτών *Arabidopsis* και *Populus trichocarpa*, δίνοντας ιδιαίτερη

έμφαση στις πρωτεάσες με πιθανό ρόλο στη γήρανση. Η φυλογενετική ανάλυση των προβλεπόμενων Lon πρωτεασών του *Arabidopsis*, όπως αυτές έχουν καταχωρηθεί στη βάση δεδομένων MEROPS (<https://merops.sanger.ac.uk/>) έδειξε ότι η AtLon3 δημιουργεί μια υποκατηγορία μαζί με τις AtLon1 και AtLon4, ενώ παρουσιάζεται στενά συνδεδεμένη με την AtLon4 και μαζί αποτελούν τις μοναδικές δύο πρωτεάσες της οικογένειας που δεν φαίνεται να έχουν ορθόλογες στο *Populus* (García-Lorenzo et al., 2006). Την ίδια χρονιά, οι Tripathi και Sowdhamini (2006) πραγματοποίησαν γονιδιωματική σύγκριση μεταξύ των πρωτεασών σερίνης του *Arabidopsis* και του *Oryza sativa*. Η ανάλυση των Lon αλληλουχιών οδήγησε επίσης στο συμπέρασμα ότι η AtLon3 ομαδοποιείται με τις AtLon1 και AtLon4 βάσει της ομολογίας τους, ενώ ταυτόχρονα η AtLon3 προβλέπεται να έχει μιτοχονδριακή τοποθέτηση (Tripathi and Sowdhamini, 2006).

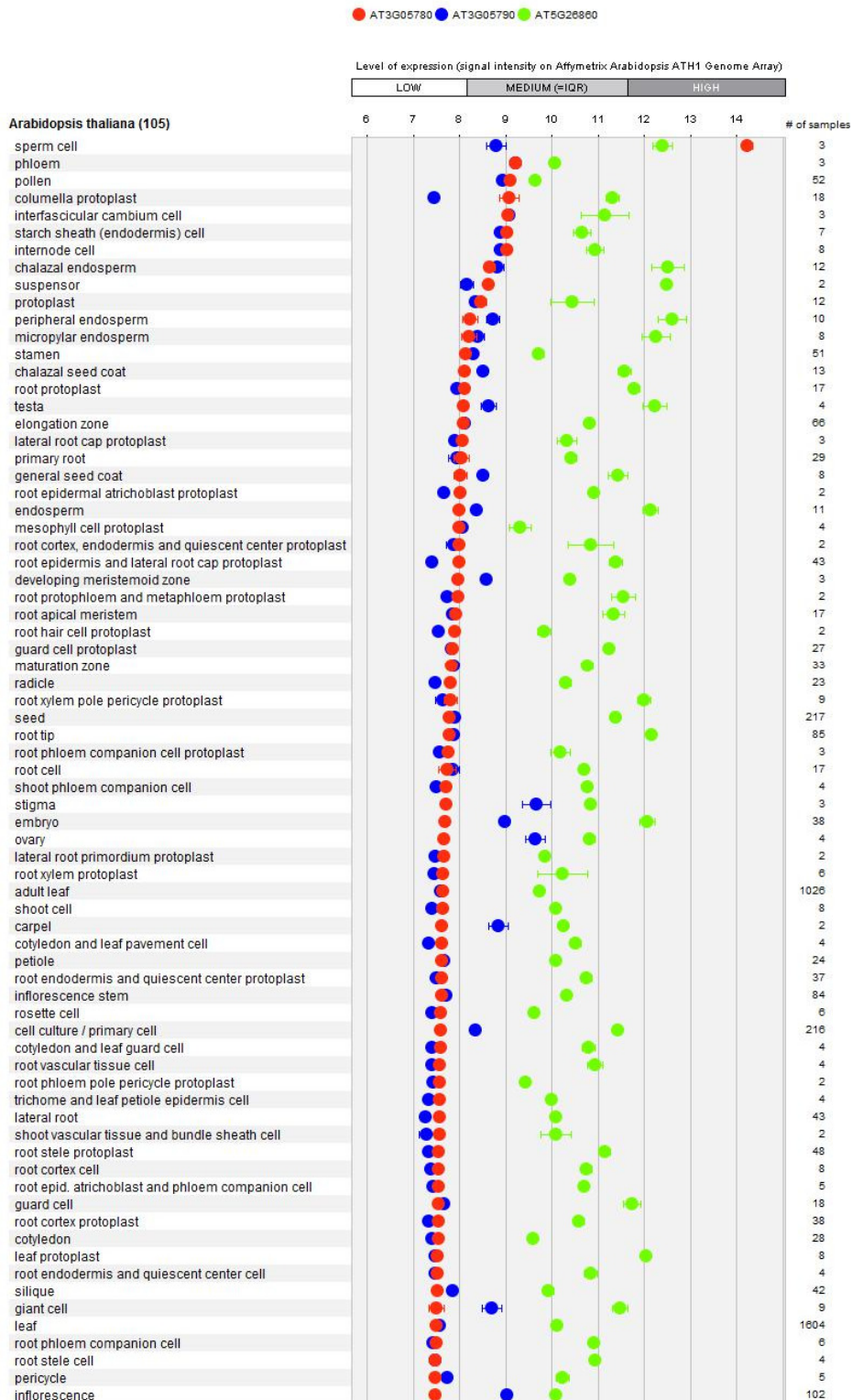
Η πρώτη σημαντική αναφορά για το γονίδιο *AtLon3* ήρθε το 2008 από τους Borges et al., οι οποίοι κατάφεραν να απομονώσουν, να αναλύσουν και να συγκρίνουν το μεταγράφομα των σπερματικών κυττάρων του *Arabidopsis* με εκείνο της γύρης και άλλων αντιπροσωπευτικών σποροφυτικών ιστών. Η συγκριτική ανάλυση κατέδειξε πως τα σπερματικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από διακριτό και ποικιλόμορφο μεταγραφικό προφίλ, συμπεριλαμβάνοντας μεταγραφήματα υψηλής έκφρασης που σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA, την πρωτεόλυση μέσω ουμπικουϊνής και τον κυτταρικό κύκλο. Το μεταγράφημα του γονιδίου *AtLon3* (At3g05780) εντοπίστηκε και αναγνωρίστηκε στην ανάλυση μικροσυστοιχιών από ανιχνευτή με ενεργότητα υδρολάσης, μεταξύ των υπόλοιπων μεταγραφημάτων που εκφράζονται επιλεκτικά (preferentially expressed) στα σπερματικά κύτταρα της γύρης (Borges et al., 2008).

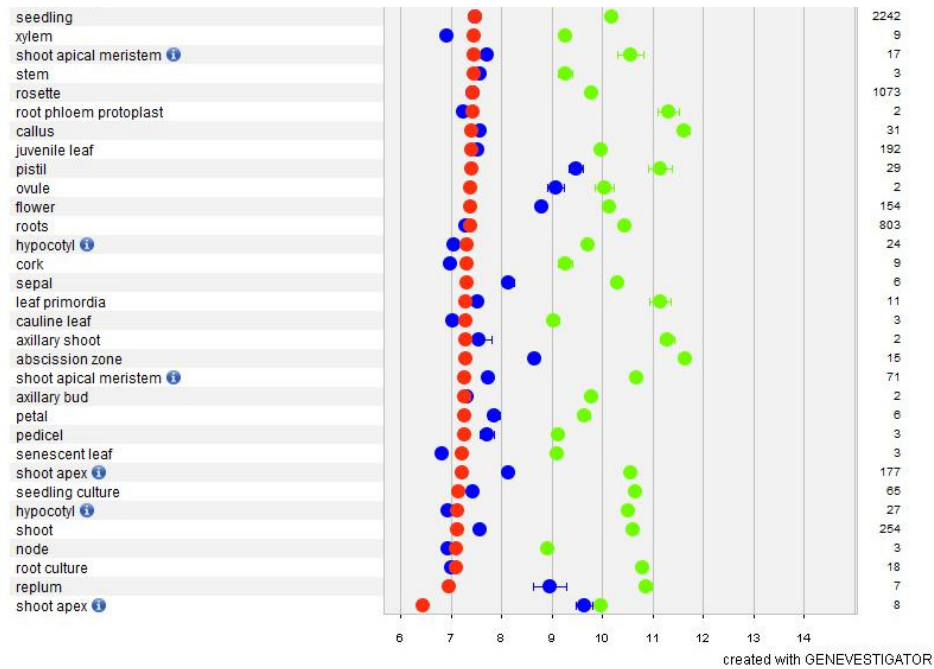
Η πιο πρόσφατη ερευνητική αναφορά έρχεται σε αντίθεση με τα δεδομένα μεταγραφομικής των Borges et al. (2008) καθώς και με τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών της βάσης δεδομένων Genevestigator (**Εικόνα 1.3**), που θέλουν το *AtLon3* να εκφράζεται στα σπερματικά κύτταρα της γύρης. Η μελέτη των Ma et al. (2015) αφορά τον προσδιορισμό γονιδίων με εξειδικευμένη έκφραση στον τάπητα (tapetum) του ανθήρα, μέσω της σύγκρισης της γονιδιακής έκφρασης τεσσάρων σειρών του φυτού *Brassica oleracea*, οι οποίες εμφανίζουν αρρενοστεριότητα σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Η δυνατότητα υβριδισμού των μικροσυστοιχιών του *Arabidopsis* με τα μεταγραφήματα στενά συγγενικών ειδών με μεγαλύτερους ανθήρες, όπως είναι τα είδη *Brassica*, αποτελεί μια καλή τεχνική για τη μελέτη των γονιδίων του *Arabidopsis* με εξειδικευμένη έκφραση στους ανθήρες. Καθώς η



απομόνωση γυρεόκοκκων είναι σχετικά απλή υπόθεση, υπάρχουν ήδη διάφορες αναφορές για το μεταγράφομα της γύρης του *Arabidopsis* (Becker et al. 2003, Honys and Twell 2003, 2004, Pina et al. 2005).

Dataset: 105 anatomical parts (sample selection: AT\_AFFY\_ATH1-1)  
3 genes (gene selection: AT\_AFFY\_ATH1-1)





**Εικόνα 1. 3 Συγκριτική ανάλυση μικροσυστοιχιών για την ιστοειδική έκφραση των γονιδίων *AtLon1* (At5g26860), *AtLon3* (At3g05780) και *AtLon4* (At3g05790), τα οποία συμβολίζονται αντίστοιχα με λαχανί, πορτοκαλί και μπλε χρώμα. Τα επίπεδα έκφρασης παρουσιάζονται σε λογαριθμική κλίμακα. Στην πρώτη σειρά αποτυπώνονται τα επίπεδα έκφρασης των τριών γονιδίων στα σπερματικά κύτταρα του φυτού, όπου είναι εμφανές ότι η έκφραση του *AtLon3* ανιχνεύεται σε πολύ υψηλά επίπεδα. Αντιθέτως, σε όλα τα υπόλοιπα φυτικά όργανα η έκφρασή του ανιχνεύεται οριακά, σε αντίθεση με το γονίδιο *AtLon1*. Τα δεδομένα αυτά ανακτήθηκαν μέσω της πλατφόρμας GENEVESTIGATOR.**

Στη μελέτη αυτή προσδιορίστηκαν 104 γονίδια που χαρακτηρίστηκαν ως μη-εκφραζόμενα στη γύρη (Non-Pollen expressed Genes, NPGs), τα περισσότερα εκ των οποίων είναι εξειδικευμένα ως προς τον τάπητα (Ma et al., 2015). Ως NPGs ορίζονται τα γονίδια που απομένουν, όταν εξαιρεθούν εκείνα που εκφράζονται στη γύρη από τα συνολικά γονίδια που εκφράζονται στους ανθήρες. Το γονίδιο *AtLon3* συμπεριλαμβάνεται στη λίστα των 104 γονιδίων που ανιχνεύτηκαν ως NPGs, μάλιστα ανήκει στην πρώτη (A) κατηγορία, όπου η έκφραση των γονιδίων μειώνεται απότομα όταν η αρρενοστεριότητα εμφανίζεται στα αρχικά στάδια της δημιουργίας του αρσενικού γαμέτη, δηλαδή στο στάδιο της σπορογένεσης (Ma et al., 2015). Παρόλα αυτά, οι ερευνητές δεν αποκλείουν την πιθανότητα κάποια από τα NPGs που ανιχνεύτηκαν να προέρχονται από έκφραση σε άλλους ιστούς, παρότι διευκρινίζουν ότι είναι εξαιρετικά χαμηλή.

Συνοψίζοντας, η απουσία πειραματικών δεδομένων που να αποδεικνύουν την παρουσία μεταγραφημάτων του γονιδίου *Lon3* (At3g05780) είχε οδηγήσει στην πεποίθηση ότι πρόκειται για ψευδογονίδιο (Ostersetzer et al. 2007, Rigas et al. 2009a). Παρόλα αυτά, πρόσφατα δεδομένα μικροσυστοιχιών στη βάση δεδομένων Genevestigator υποστηρίζουν ισχυρά ότι η έκφραση του *Lon3* κυριαρχεί στα

σπερματικά κύτταρα της γύρης του *Arabidopsis*. Εξαιρουμένων των σπερματικών κυττάρων, το οριακό επίπεδο έκφρασης του γονιδίου που ανιχνεύεται στους υπόλοιπους ιστούς πιθανότατα αποτελεί πειραματικό θόρυβο που δεν μπορεί να φιλτραριστεί, δεδομένου του ότι τα γονίδια *Lon3* και *Lon4* είναι σχεδόν πανομοιότυπα. Αυτό το εξειδικευμένο προφίλ έκφρασης του γονιδίου υπονοεί έναν πιθανό ρόλο του *Lon3* στην αναπαραγωγή του φυτού, και ειδικότερα στην ωρίμανση του αρσενικού γαμέτη και τη διπλή γονιμοποίηση (Rigas et al., 2014).

#### **1.4 Η δημιουργία του αρσενικού γαμέτη και ο μηχανισμός της διπλής γονιμοποίησης στο *Arabidopsis thaliana***

Η αναπαραγωγή είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των ζωντανών οργανισμών, το οποίο διασφαλίζει τη διατήρηση της ζωής στη γη διαμέσου μιας σειράς διαδοχικών γενεών (Hafidh et al., 2016). Τα ανώτερα φυτά έχουν πολύπλοκο κύκλο ζωής, ο οποίος εναλλάσσεται μεταξύ της ανάπτυξης ενός διπλοειδούς σποροφυτικού οργανισμού και μιας εξαιρετικά περιορισμένης απλοειδούς γαμετοφυτικής μορφής (Borg et al., 2009).

Η έναρξη της ανάπτυξης του σπόρου στα αγγειόσπερμα πυροδοτείται από τη διαδικασία της διπλής γονιμοποίησης, κατά την οποία οι δύο αρσενικοί γαμέτες (σπερματικά κύτταρα) ενώνονται με τους δύο θηλυκούς γαμέτες για να δημιουργήσουν τα πρόδρομα κύτταρα των δύο κύριων συστατικών του σπόρου: του εμβρύου και του εμβρυόσακου, αντιστοίχως (Bleckmann et al., 2014). Τα σπερματικά κύτταρα δεν έχουν δυνατότητα κίνησης, συνεπώς μετακινούνται μέσω του αναπτυσσόμενου γυρεοσωλήνα προς την κατεύθυνση της ωοθήκης, όπου φιλοξενείται το θηλυκό γαμετόφυτο, βάσει εξειδικευμένων μηχανισμών καθοδήγησης και προσέλκυσης του γυρεοσωλήνα.

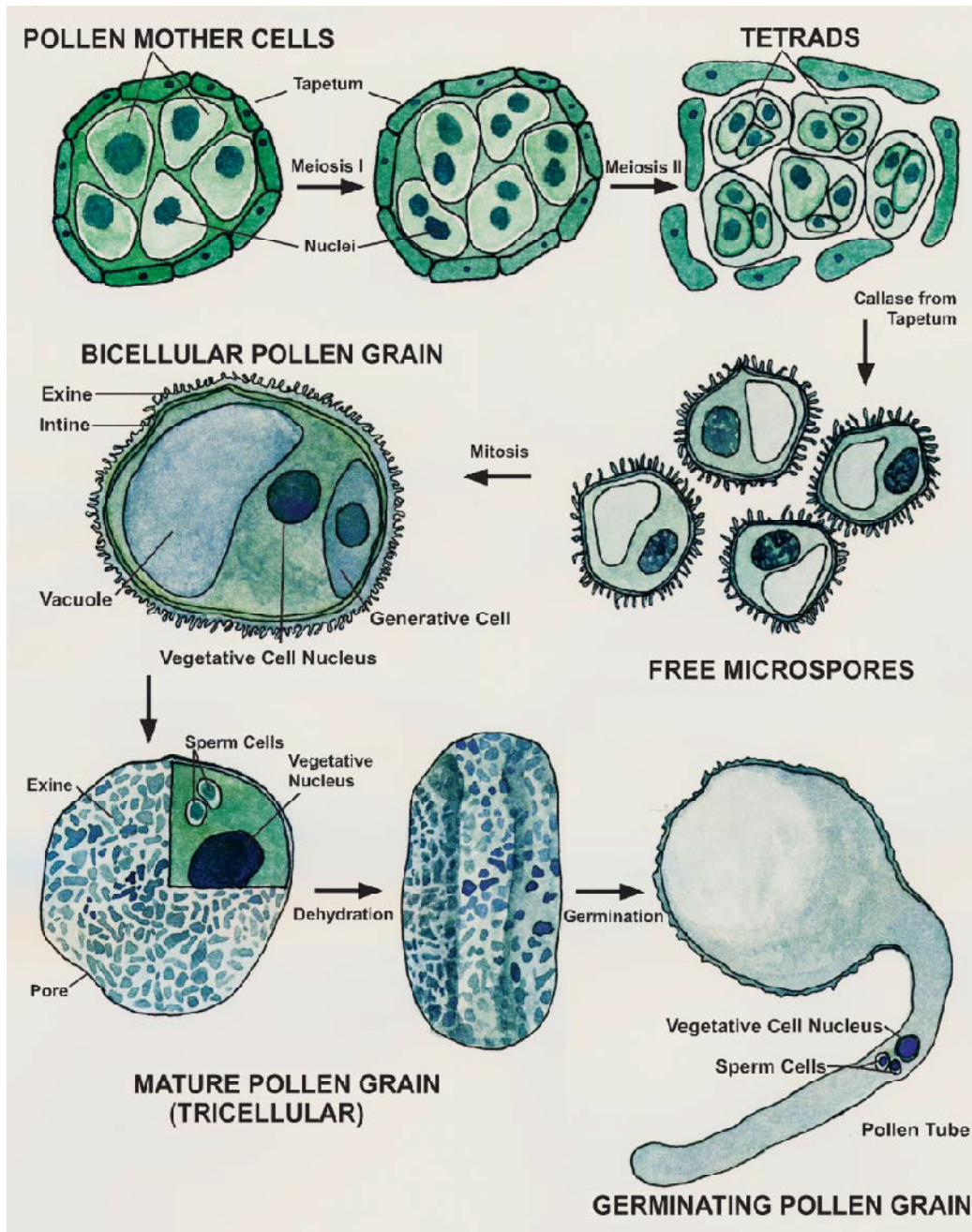
##### **1.4.1 Η δημιουργία και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του αρσενικού γαμετόφυτου**

Στα ανθοφόρα φυτά, το αρσενικό γαμετόφυτο (γυρεόκοκκοι) είναι ζωτικής σημασίας για τη γονιμότητα του φυτού και τη φυτική παραγωγή (Borg et al., 2009). Η δημιουργία του απλοειδούς αρσενικού γαμετόφυτου (γυρεόκοκκος) γίνεται μέσα σε εξειδικευμένα ανδρικά αναπαραγωγικά όργανα, τους στήμονες, και χαρακτηρίζεται από δύο διακριτές διαδοχικές φάσεις, τη μικροσπορογένεση και τη

μικρογαμετογένεση. Η αρσενική αναπαραγωγική μονάδα (Male Germ Unit, MGU) αποτελείται από το βλαστικό κύτταρο και τα δύο σπερματικά κύτταρα, που περικλείονται εξολοκλήρου από το βλαστικό κύτταρο και είναι συνδεδεμένα με τον πυρήνα του μέσω της κυτταρικής μεμβράνης του αναπαραγωγικού κυττάρου (Bleckmann et al., 2014). Η δημιουργία της MGU διασφαλίζει την ταυτόχρονη μεταφορά και των δύο γαμετών στην ωοθήκη. Ο κύριος σκοπός του βλαστικού κυττάρου είναι να μεταφέρει τα σπερματικά κύτταρα, διαμέσου των μητρικών ιστών του στύλου και της ωοθήκης, σε μια μη-γονιμοποιημένη σπερματική βλάστη.

Η μικροσπορογένεση (**Εικόνα 1.4**) ξεκινά με τη μιτωτική διαίρεση ενός διπλοειδούς σποροφυτικού κυττάρου, που δίνει γένεση στο αρχικό κύτταρο του τάπητα (tapetum) και στο αρχικό σπορογόνο κύτταρο, που είναι γνωστό και ως μητρικό κύτταρο της γύρης (McCormick, 1993). Το μητρικό σπορογόνο κύτταρο υφίσταται μειωτική διαίρεση, η οποία οδηγεί σε μία τετράδα ανεξάρτητων απλοειδών κυττάρων και ταυτόχρονα ξεκινά η σύνθεση τοιχωμάτων καλλόζης ανάμεσά τους (Hafidh et al., 2016). Μετά την ολοκλήρωση της μείωσης, ξεκινά η σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος της γύρης (McCormick 1993, Hafidh et al. 2016). Το τοίχωμα της ώριμης γύρης αποτελείται από δύο στιβάδες, την εξωτερική στιβάδα (exine) και την εσωτερική στιβάδα (intine). Το εσωτερικό τοίχωμα είναι κυρίως πηκτοκυτταρίνη, ενώ το εξωτερικό αποτελείται από σποροπολενίνη. Η σποροπολενίνη είναι μια σύνθετη ουσία λιπαρών οξέων και φαινυλοπροπανοειδών, που κατατάσσεται ανάμεσα στα ανθεκτικότερα πολυμερή και ο ρόλος της είναι η προστασία του εσωτερικού περιβάλλοντος της γύρης μετά την απομάκρυνσή από τους ανθήρες (Hafidh et al., 2016). Ο τάπητας του ανθήρα είναι κυρίως υπεύθυνος για τη σύνθεση και εναπόθεση της σποροπολενίνης και των υπόλοιπων υλικών στο αναπτυσσόμενο εξωτερικό τοίχωμα.

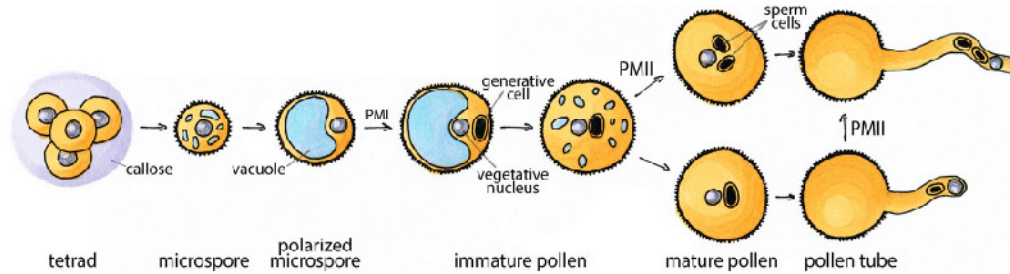
Τα κύτταρα της τετράδας απελευθερώνονται ως μικροσπόρια από τη δράση ενός ενζυμικού μίγματος, που παράγεται και εκκρίνεται από τον τάπητα του ανθήρα και περιέχει ως κύριο συστατικό την καλλάση ( $\beta$ -1,3-γλουκανάση), η οποία αποδομεί την καλλόζη (Hafidh et al., 2016). Στη συνέχεια, τα μονοπύρηνα μικροσπόρια μεγεθύνονται ραγδαία, ενώ ταυτόχρονα πολλαπλά μικρά χυμοτόπια ενώνονται και σχηματίζουν ένα μεγάλο χυμοτόπιο, το οποίο μετακινεί τον πυρήνα του μικροσπορίου από την κεντρική του θέση στην περιφέρεια του κυττάρου.



Εικόνα 1. 4 Σχηματική αναπαράσταση της μικροσπορογένεσης στο *Arabidopsis thaliana* (McCormick, 2004).

Η μικρογαμετογένεση (Εικόνα 1.5) ξεκινά όταν τα πολωμένα μικροσπόρια υφίστανται μια ασύμμετρη μιτωτική διαίρεση, που θεωρείται καθοριστική καθώς τα θυγατρικά κύτταρα αποκτούν διακριτή κυτταρική μοίρα (McCormick 1993, Borg et al. 2009). Ως αποτέλεσμα δημιουργείται ένας γυρέοκοκκος, αποτελούμενος από δύο κύτταρα: ένα μεγάλο βλαστικό (vegetative) κύτταρο και ένα μικρότερο αναπαραγωγικό (generative) κύτταρο. Το αναπαραγωγικό κύτταρο έχει συμπυκνωμένο πυρήνα, μειωμένη ποσότητα κυτταροπλάσματος συγκριτικά με το βλαστικό κύτταρο και πρέπει να υποστεί άλλη μία μιτωτική διαίρεση, ώστε να

δημιουργηθούν τα σπερματικά κύτταρα (McCormick 1993, Hafidh et al. 2016). Αντιθέτως, ο πυρήνας του βλαστικού κυττάρου δεν υφίσταται άλλη μιτωτική διαίρεση και παραμένει σε στενή φυσική επαφή με τα σπερματικά κύτταρα, καθώς είναι ζωτικής σημασίας ο ρόλος του στη μεταφορά τους στην ωοθήκη. Η δεύτερη μειωτική διαίρεση μπορεί να γίνει είτε πριν είτε μετά την ωρίμανση της γύρης, συνεπώς η ώριμη γύρη μπορεί να απελευθερωθεί είτε ως δικυτταρική είτε ως τρικυτταρική, όπως στο *Arabidopsis*.



**Εικόνα 1. 5** Σχηματική αναπαράσταση της ανάπτυξης της γύρης μέσω της διαδικασίας της μικρογαμετογένεσης. Παρουσιάζεται τόσο η περίπτωση του τρι-κυτταρικού όσο και του δι-κυτταρικού ώριμου γυρεόκοκκου (Hafidh et al., 2016).

#### 1.4.2 Η διπλή γονιμοποίηση στο *Arabidopsis*

Μετά τη δημιουργία και την ωρίμανση του αρσενικού γαμέτη, η γύρη απελευθερώνεται από τους ανθήρες και εναποτίθεται στο στίγμα του άνθους. Οι ώριμοι γυρεόκοκκοι έχουν αφυδατωμένο κυτταρόπλασμα, όμως όταν έρχονται σε επαφή με τα θηλοειδή κύτταρα του στίγματος, ενυδατώνονται και ενεργοποιούνται (Hafidh et al., 2016). Μετά τη βλάστηση της γύρης, το βλαστικό κύτταρο σχηματίζει τον γυρεοσωλήνα, που αναπτύσσεται κατά μήκος των θηλοειδών κυττάρων του στίγματος στο εσωτερικό του στύλου προς την κατεύθυνση του σωλήνα μεταφοράς (Bleckmann et al., 2014). Μέσα στο σωλήνα μεταφοράς, οι γυρεοσωλήνες κατευθύνονται προς τις ωοθήκες μέσω μηχανικών και χημειοτακτικών σιγιάλων, που περιλαμβάνουν πολλές αλληλεπιδράσεις με τους σποροφυτικούς ιστούς του στύλου.

Στο τελευταίο στάδιο της διπλής γονιμοποίησης, ο γυρεοσωλήνας εισέρχεται από τη μικροπύλη και αναπτύσσεται προς τα δύο συνεργιστικά κύτταρα, όπου εκρήγνυται και απελευθερώνει τα σπερματικά κύτταρα (Bleckmann et al., 2014). Ακολούθως, και τα δύο σπερματικά κύτταρα φθάνουν στο σημείο σύντηξης των γαμετών και γονιμοποιούν το ωάριο και το κεντρικό κύτταρο. Το γονιμοποιημένο κεντρικό κύτταρο σχηματίζει το ενδοσπέρμιο, ενώ το γονιμοποιημένο ωάριο (ο ζυγώτης) θα σχηματίσει το έμβρυο.

### **1.4.3 Γονιδιακή έκφραση στο αρσενικό γαμετόφυτο**

Η διαφορά μεταξύ των σταδίων ανάπτυξης του αρσενικού γαμετόφυτου αντανακλάται συχνά στο μεταγραφομικό προφίλ τους (Borg et al., 2009), συνεπώς ένα κεντρικό ερώτημα που ανακύπτει αφορά στο ρόλο των mRNAs που εντοπίζονται στη γύρη (McCormick, 2004). Κατά το χρονικό διάστημα από την πρώτη μιτωτική διαίρεση μέχρι την ωρίμανση, η γύρη αποθηκεύει τόσο mRNAs όσο και πρωτεΐνες. Η ώριμη γύρη που δεν έχει βλαστήσει περιέχει πρωτεΐνες που έχουν συντεθεί κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, καθώς και μια αποθήκη από mRNAs που έχουν ήδη μεταγραφεί αλλά μεταφράζονται κατά τη διάρκεια της βλάστησης της γύρης (Mascarenhas, 1989).

Τα δεδομένα που προκύπτουν από τα πειράματα μεταγραφομικής ανάλυσης του αρσενικού γαμετόφυτου (Affymetrix 23K ATH1 array) υποδεικνύουν ότι τα γονίδια που εκφράζονται εξειδικευμένα στο αρσενικό γαμετόφυτο χαρακτηρίζονται συχνά από πολύ υψηλά επίπεδα έκφρασης (Honys and Twell 2004, Pina et al. 2005). Πολλά από αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες με λειτουργίες που προβλέπεται ότι σχετίζονται με τη βλάστηση της γύρης ή την ανάπτυξη του γυρεοσωλήνα. Τα περισσότερα mRNAs έχουν ήδη συντεθεί πριν την ωρίμανση της γύρης, συνεπώς είναι περίεργο ότι ορισμένες μόνο μελέτες έχουν εξετάσει την πιθανότητα για μετα-μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης κατά την ανάπτυξη της γύρης, γεγονός που έχει ήδη δείξει για τα μητρικά μηνύματα στα ζωικά ωοκύτταρα. Οι Ylstra και McCormick (1999) εξέτασαν τη μακροχρόνια υπόθεση ότι τα mRNAs της γύρης έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής και επιβεβαίωσαν ότι ο μέσος χρόνος ζωής για 10 μηνύματα ήταν πολύ μεγάλος.

Το βλαστικό κύτταρο της ανώριμης γύρης περιέχει συμπυκνωμένο κυτταρόπλασμα με πολλαπλά οργανίδια και ο πυρήνας του περιέχει μη-συμπυκνωμένη χρωματίνη (Borges et al., 2008). Αντιθέτως, το αναπαραγωγικό κύτταρο κληρονομεί από το μικροσπόριο πολύ μικρή ποσότητα κυτταροπλάσματος και οργανιδίων, με αποτέλεσμα τα θυγατρικά σπερματικά κύτταρα να περιέχουν ορισμένα μιτοχόνδρια και σποραδικό ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ ταυτόχρονα χαρακτηρίζονται από πολύ συμπυκνωμένη χρωματίνη. Αυτά τα χαρακτηριστικά σε συνδυασμό με τη μειωμένη πυκνότητα πυρηνικών πόρων υποδεικνύουν ότι οι πυρήνες των σπερματικών κυττάρων είναι λιγότερο μεταγραφικά ενεργοί συγκριτικά με τον πυρήνα του βλαστικού κυττάρου (Borges et al., 2008).

Μέχρι πρόσφατα, ο προσδιορισμός κι ο χαρακτηρισμός των γονιδίων που εκφράζονται στην αρσενική αναπαραγωγική σειρά ήταν δύσκολος, λόγω της δυσκολίας πρόσβασης και του μικρού μεγέθους των σπερματικών κυττάρων μέσα στο βλαστικό κύτταρο. Δεδομένου του γεγονότος ότι το RNA του βλαστικού κυττάρου καταλαμβάνει τη συντριπτική πλειοψηφία του ολικού RNA που απομονώνεται από τη γύρη, υπάρχει η πιθανότητα τα σημαντικά γονίδια που είναι εξειδικευμένα στα σπερματικά κύτταρα να χάνονται στις αναλύσεις του ολικού μεταγραφώματος της γύρης (Borg et al., 2009). Το γεγονός αυτό ώθησε τη δημιουργία τεχνικών απομόνωσης και καθαρισμού των σπερματικών κυττάρων από το βλαστικό κύτταρο, όπως είναι η φυγοκέντρηση διαβάθμισης πυκνότητας, ο μικροχειρισμός και η ενεργοποιούμενη μέσω φθορισμού διαλογή κυττάρων (Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS), που βασίζεται στη χρώση του DNA.

Οι αρχικές μελέτες των απομονωμένων σπερματικών κυττάρων εστίαστηκαν στον προσδιορισμό των μεταγραφημάτων με εξειδικευμένη έκφραση στην αναπαραγωγική σειρά. Οι κατηγορίες με τη μεγαλύτερη εκπροσώπηση μεταγραφημάτων περιλαμβάνουν γονίδια που σχετίζονται με το μεταβολισμό, την κυτταρική οργάνωση, τη σύνθεση DNA, τη δομή της χρωματίνης και την αποδόμηση των πρωτεϊνών (Borg et al., 2009). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στα σπερματικά κύτταρα ανιχνεύονται σε υψηλά επίπεδα πρωτεΐνες που σχετίζονται με το πρωτεολυτικό μονοπάτι της ουμπικουιτίνης. Έχει διαπιστωθεί ότι το μεταγράφομα των σπερματικών κυττάρων είναι πολύπλοκο και ένας σημαντικός αριθμός γονιδίων (11% του μεταγραφώματος) φαίνεται να είναι εξειδικευμένα συγκεκριμένα ως προς τα σπερματικά κύτταρα (Borges et al., 2008).

Δεδομένου ότι το αναπαραγωγικό κύτταρο και τα σπερματικά κύτταρα θεωρούνται σχετικά αδρανή σε μεταγραφικό επίπεδο, δεν είναι ξεκάθαρη η αιτία για την οποία έχουν διακριτά mRNAs (Engel et al., 2003). Είναι πιθανόν ότι κάποια από αυτά τα mRNAs δεν μεταφράζονται μέχρι να παραδοθούν στο κεντρικό κύτταρο ή το ωάριο. Έχει γίνει αντιληπτό ότι τα σπερματικά κύτταρα μεταφέρουν παράγοντες, οι οποίοι ενεργοποιούν τους θηλυκούς γαμέτες μετά τη σύντηξη (Bayer et al., 2009). Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί ο παράγοντας Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase (IRAK)/Pelle-like kinase gene SHORT SUSPENSOR (SSP), το μεταγράφημα του οποίου μεταφέρεται από τα σπερματικά κύτταρα, μεταφράζεται στο ζυγώτη και δρα στο μονοπάτι YODA(YDA) MAPK κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης του ζυγώτη.



## 1.5 Σκοπός του πειράματος

Η οικογένεια των *Lon* γονιδίων στο *Arabidopsis thaliana* αποτελείται από τέσσερα πυρηνικά γονίδια, που κωδικοποιούν για ATP-εξαρτώμενες οργανοδιακές πρωτεάσες. Το γονίδιο *AtLon3* αποτελεί το μοναδικό μέλος της οικογένειας που δεν έχει μελετηθεί, καθώς επικρατούσε η άποψη ότι αποτελεί ψευδογονίδιο. Το γεγονός ότι το φέρει ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο σε συνδυασμό με το γεγονός ότι σε πρόσφατα πειράματα μικροσυστοιχιών ανιχνεύεται υψηλή έκφρασή του στα σπερματικά κύτταρα της γύρης του *A. thaliana*, οδήγησαν στην αμφισβήτηση της υπόθεσης του ψευδογονιδίου. Σε προηγούμενη πειραματική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο επιβεβαιώθηκε η έκφραση του γονιδίου *AtLon3* στη γύρη. Το χαρακτηριστικό που προσδίδει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στο *AtLon3*, είναι ότι αποτελεί το μοναδικό μέλος της οικογένειας στο *Arabidopsis* που φέρει σινιάλο NLS (Nuclear Localization Signal) για τοποθέτηση στον πυρήνα, εκτός από το μιτοχονδριακό πεπτίδιο στόχευσης. Παράλληλα, είναι το μοναδικό μέλος της οικογένειας με ιστοειδική έκφραση και πιθανό ρόλο στην ανάπτυξη του αρσενικού γαμετόφυτου και τη διπλή γονιμοποίηση.

Σκοπό της παρούσας πειραματικής μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση της έκφρασης και της υποκυτταρικής τοποθέτησης του γονιδίου *AtLon3*. Η διερεύνηση αυτή ήταν δύσκολο να πραγματοποιηθεί στο *Arabidopsis*, δεδομένου του μικρού μεγέθους των σπερματικών κυττάρων και του σκληρού τοιχώματος της γύρης. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε παροδική έκφραση του γονιδίου στο ετερόλογο σύστημα του *Nicotiana benthamiana*, προκειμένου να διερευνηθεί τόσο το μήκος του 5' άκρου του γονιδίου, το οποίο καθορίζει την υποκυτταρική τοποθέτησή του, αλλά και το είδος και ο αριθμός των μεταγραφημάτων που προκύπτουν από την έκφρασή του. Αποσαφηνίζοντας τόσο τα μεταγραφήματα όσο και την πρωτεϊνική στόχευση του *AtLon3*, οδηγούμαστε στον προσδιορισμό του υποκυτταρικού διαμερίσματος που δρα, συνεπώς μπορούμε να διερευνήσουμε ποια είναι η λειτουργία του. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η τοποθέτηση του *AtLon3* στον πυρήνα καταδεικνύει ότι πρέπει να επιτελεί κάποια λειτουργία εκεί, ενώ μέχρι στιγμής δεν έχει ανιχνευθεί λειτουργία κάποιας ATP-εξαρτώμενης πρωτεάσης σε ένα διαμέρισμα όπου κατεξοχήν δρα το πρωτεάσωμα.



*Υλικά & Μέθοδοι*

## 2.1 Φυτικό υλικό

Για τη διεξαγωγή της παρούσας πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν φυτά *Arabidopsis thaliana* αγρίου τύπου, οικότυπου Columbia (Col-0 N1093) της οικογένειας *Brassicaceae* και φυτά *Nicotiana benthamiana* της οικογένειας *Solanaceae*.

## 2.2 Προετοιμασία και συνθήκες ανάπτυξης φυτικού υλικού

Πραγματοποιείται ενυδάτωση των σπερμάτων σε διάρκεια 24 ωρών και θερμοκρασία 4°C με σκοπό να διακοπεί ο λήθαργος. Η διαδικασία τοποθέτησης των σπερμάτων στο θρεπτικό υλικό διεξάγεται σε θάλαμο νηματικής ροής, υπό ασηπτικές συνθήκες, ως εξής:

- ℵ Τα σπόρια απολυμαίνονται σε διάλυμα 20% χλωρίνη – 0,01% Triton X-10, 2 φορές επί 3 λεπτά maximum.
- ℵ Ακολουθούν 5 ξεπλύματα με αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O, ώστε να αραιωθεί και να απομακρυνθεί σταδιακά πλήρως η χλωρίνη.
- ℵ Τα σπόρια τοποθετούνται σε σειρά στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού με χρήση πιπέτας Gilson, διατηρώντας κατάλληλες αποστάσεις που να επιτρέπουν τη σωστή ανάπτυξη των φυτών.
- ℵ Τα τρυβλία ασφαλιζονται με parafilm και τοποθετούνται είτε σε όρθια θέση (*Arabidopsis thaliana*) είτε σε οριζόντια θέση (*Nicotiana benthamiana*) σε θάλαμο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22°C, φωτοπερίοδος 16 ώρες φως/ 8 ώρες σκοτάδι και σχετική υγρασία ~50%).

Τόσο τα σπέρματα του *A. thaliana* όσο και του *N. benthamiana* βλαστάνουν μετά την πάροδο 3 ημερών περίπου σε ελεγχόμενες συνθήκες βλάστησης. Αρχικά εμφανίζεται η εμβρυακή ρίζα και στη συνέχεια ακολουθεί η έκπτυξη των κοτυληδόνων του φυτού. Σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης τα φυτά αναπτύσσονται στα τρυβλία για διάστημα δύο εβδομάδων και στη συνέχεια μεταφυτεύονται σε γλαστράκια με χώμα, όπου συνεχίζεται η ανάπτυξη μέχρι τη δημιουργία απογόνων και το τέλος του βιολογικού τους κύκλου.

### 2.3 Πρωτόκολλο απομόνωσης και καθαρισμού ολικού RNA από φυτά *A. thaliana* και *N. benthamiana*

Αρχικά συλλέγεται φρέσκο φυτικό υλικό (ολόκληρα φυτάρια, όργανα ή ιστοί *A. thaliana*, φύλλα *N. benthamiana*) και ομογενοποιείται παρουσία υγρού αζώτου με κατάλληλο γουδί λειοτρίβησης. Η διαδικασία που ακολουθεί έχει ως εξής:

- ℵ Ο ομογενοποιημένος ιστός μεταφέρεται σε erpendorf tube των 1,5 ml.
- ℵ Για κάθε 1gr ιστού προστίθενται 0,5 ml διαλύματος ομογενοποίησης και 0,5 ml φαινόλης ( αναλογία 1:1 RNA extraction buffer:Phenol). Έντονη ανάμιξη του δείγματος για 1-2 min.
- ℵ Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm (max speed) για 5-10 min.
- ℵ Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο (υδατική φάση) μεταφέρεται πολύ προσεκτικά σε νέο erpendorf tube, αποφεύγοντας επιμόλυνση από την οργανική φάση. Προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης-χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοόλης [1:1 Phenol-SEVAG (25:24:1)]. Ακολουθεί έντονη μίξη του δείγματος για 1-2 min.
- ℵ Φυγοκέντρηση (max speed) για 5-10 min.
- ℵ Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf tube και προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης-χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοόλης [1:1 Phenol-SEVAG (25:24:1)]. Ακολουθεί έντονη μίξη του δείγματος για 1-2 min.
- ℵ Φυγοκέντρηση (max speed) για 5-10 min.
- ℵ Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf tube χωρίς να διαταραχθεί η ενδιάμεση φάση και προστίθεται ίσος όγκος χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοόλης ( SEVAG, 24:1). Ακολουθεί έντονη μίξη του δείγματος για 1-2 min.
- ℵ Φυγοκέντρηση (max speed) για 5-10 min.
- ℵ Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf tube πολύ προσεκτικά (δεν ακολουθεί άλλος καθαρισμός). Η κατακρήμνιση (precipitation) των νουκλεϊνικών οξέων γίνεται με την προσθήκη 1/10 του όγκου 3M CH<sub>3</sub>COONa pH=4.8 και 2.5 όγκων παγωμένης αιθανόλης 100%. Ακολουθεί απαλή ανάδευση του δείγματος για 15-20 φορές. Η κατακρήμνιση γίνεται στους -20°C overnight.
- ℵ Την επόμενη μέρα ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C σε max speed για 30-45 min.
- ℵ Μετά τη φυγοκέντρηση, αποχύνεται η αιθανόλη και ακολουθεί short spin. Η περίσσεια αιθανόλης αφαιρείται με πιπέτα και το ίζημα αφήνεται έως ότου εξατμιστούν τα υπολείμματα της αιθανόλης.

- Ν Το ίζημα επαναδιαλύεται σε αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O αποκλειστικής χρήσης σε RNA (ο όγκος κρίνεται από το ίζημα) και το δείγμα μεταφέρεται αμέσως στον πάγο.
- Ν Το RNA αποθηκεύεται σε βαθιά κατάψυξη (-80°C).

## **2.4 Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης**

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης αποτελεί μια μέθοδο για το διαχωρισμό, ταυτοποίηση και απομόνωση νουκλεϊνικών οξέων (DNA, RNA) με βάση το μέγεθος, το ηλεκτρικό φορτίο και άλλες φυσικές ιδιότητες των μορίων. Τα νουκλεϊνικά οξέα είναι αρνητικά φορτισμένα μόρια, συνεπώς όταν βρεθούν εντός ηλεκτρικού πεδίου μετακινούνται προς τον θετικό πόλο, με ταχύτητα ανάλογη του δυναμικού του ηλεκτρικού πεδίου και αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογαρίθμου του μοριακού μεγέθους τους.

Η πηκτή αγαρόζης μέσα στην οποία αναλύονται τα νουκλεϊνικά οξέα αποτελείται από πολυμερή αγαρόζης, που σχηματίζουν ένα τρισδιάστατο πλέγμα πόρων. Το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από τη συγκέντρωση (%) της αγαρόζης και τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιείται για την παρασκευή της πηκτής. Το μέγεθος των νουκλεϊνικών οξέων προς ανάλυση καθορίζει τη συγκέντρωση, καθώς όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος των πόρων, τόσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος των μορίων που μπορούν να διαχωριστούν. Συνήθως, χρησιμοποιείται πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης από 0.8-4% w/v.

Τα κλάσματα των νουκλεϊνικών οξέων καθίστανται ορατά κατά τη διάρκεια της ανάλυσής τους σε πηκτή αγαρόζης με χρήση του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), μια χρωστική που έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Η διακριτική ικανότητα του βρωμιούχου αιθιδίου είναι της τάξεως των 5ng DNA ανά ζώνη.

### **2.4.1 Διαδικασία παρασκευής πηκτής αγαρόζης**

- Ν Η επιθυμητή ποσότητα αγαρόζης ζυγίζεται σε ζυγό ακριβείας και τοποθετείται σε φιάλη που περιέχει τον κατάλληλο όγκο ddH<sub>2</sub>O.
- Ν Το μίγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων με ενδιάμεση τακτική ανάδευση, μέχρις ότου ομογενοποιηθεί.

- ℵ Το ομογενοποιημένο μίγμα αφήνεται να κρυώσει και στη συνέχεια προστίθεται κατάλληλη ποσότητα 50X TAE (2 mL ανά 100 mL πηκτής) ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1X TAE.
- ℵ Προστίθεται στο μίγμα ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου κατάλληλη ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0.005% v/v (5μl ανά 100 mL).
- ℵ Το μίγμα αναδεύεται καλά, αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια τοποθετείται σε ειδικό δοχείο ηλεκτροφόρησης.
- ℵ Τοποθετούνται στο δοχείο οι χτένες, ώστε να δημιουργηθούν τα πηγάδια μέσα στα οποία θα προστεθούν τα δείγματα νουκλεϊνικών οξέων που θα αναλυθούν στην πηκτή και το μίγμα αφήνεται να στερεοποιηθεί.
- ℵ Αφού στερεοποιηθεί η πηκτή, αφαιρούνται προσεκτικά οι χτένες και το δοχείο με την πηκτή τοποθετείται μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης σύστασης 1X TAE και 0.005% βρωμιούχου αιθιδίου.

#### **2.4.2 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης**

- ℵ Μια ποσότητα από τα προς ανάλυση δείγματα αναμιγνύεται με 1/10 από πυκνό διάλυμα μπλε χρωστικής (loading dye, 6X).
- ℵ Τα δείγματα τοποθετούνται με πιπέτα μέσα στα πηγάδια της πηκτής αγαρόζης.
- ℵ Με τροφοδοτικό μηχάνημα εφαρμόζεται στην πηκτή τάση της τάξεως 50-120 V, η οποία εξαρτάται από το μέγεθος της συσκευής ηλεκτροφόρησης και το δείγμα.
- ℵ Τα νουκλεϊνικά οξέα μετά την εφαρμογή τάσης κινούνται ερπετοειδώς διαμέσου των πόρων της αγαρόζης και αναλύονται ανάλογα με το μέγεθός τους.
- ℵ Η απεικόνιση της ανάλυσης των νουκλεϊνικών πραγματοποιείται σε ειδικό θάλαμο που περιέχει τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) και η αποτύπωση της εικόνας της πηκτής γίνεται με φωτογραφική μηχανή, που είναι προσαρμοσμένη στον θάλαμο και συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή.

##### **2.4.2.1 Ηλεκτροφόρηση DNA μορίων**

Η αξιολόγηση των μοριακών μεγεθών των δειγμάτων DNA γίνεται μέσω της σύγκρισης του μετώπου ανάλυσης των δειγμάτων με το μέτωπο ανάλυσης ενός κλιμακούμενου δείκτη γνωστών μοριακών μεγεθών. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης GeneRuler™ DNA Ladder Mix (#SM0331) της εταιρείας

Thermo Scientific, που είναι σχεδιασμένος για την αποσαφήνιση του μοριακού μεγέθους και την ποσοτικοποίηση ευρέως φάσματος δίκλωνου DNA σε πηκτή αγαρόζης. Η κλίμακα του δείκτη αποτελείται από 21 θραύσματα DNA γνωστού μοριακού μεγέθους, τρία εκ των οποίων αποτελούν θραύσματα αναφοράς (στα 500, 1000 και 3000 ζ.β.) για εύκολο προσανατολισμό.

#### **2.4.2.2 Ηλεκτροφόρηση RNA μορίων**

Η ανάλυσή των RNA μορίων ακολουθεί το ίδιο πρότυπο με το DNA, με μερικές ουσιώδεις διαφοροποιήσεις. Αρχικά, τόσο η πηκτή όσο και το ρυθμιστικό διάλυμα πρέπει να είναι φρέσκα και να μην έχουν χρησιμοποιηθεί ξανά για ανάλυση. Το ίδιο ισχύει και για όλα τα υλικά που έρχονται σε επαφή με το RNA, καθώς αποτελεί ένα πολύ ευαίσθητο μόριο που αποδομείται πολύ εύκολα από RNA νουκλεάσες που βρίσκονται στον περιβάλλοντα χώρο. Για τον ίδιο λόγο, η τάση που χρησιμοποιείται για την ανάλυση του RNA είναι πάντα πολύ υψηλή (110-120 V).

Από τη συνολική ποσότητα RNA που απομονώνεται από ένα κύτταρο, το 80-85% αποτελεί το ριβοσωμικό RNA (rRNA), το 15-20% αποτελεί ένα εύρος RNA χαμηλού μοριακού βάρους (tRNA, snRNAs) ενώ μόλις το 1-5% αποτελεί το mRNA. Ειδικότερα, στα φυτικά κύτταρα συναντώνται και οι τρεις διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι rRNA, καθώς περιέχουν γονίδια που κωδικοποιούν και για τα οργανιδιακά rRNAs των ριβοσωμάτων των χλωροπλαστών και των μιτοχονδρίων. Η διαφορά μεταξύ τους έγκειται στην ευκαρυωτικής προέλευση των κυτταροπλασματικών ριβοσωμάτων, που αποτελούνται από 18S rRNA (μικρής υπομονάδας) και 28S, 5.8S, 5S rRNA (μεγάλης υπομονάδας), ενώ τα οργανιδιακά ριβοσώματα είναι προκαρυωτικής προέλευσης και αποτελούνται αντίστοιχα από 16S rRNA και 23S, 5S rRNA. Τα μόρια των 3 ειδών rRNAs έχουν διαφορετικά μοριακά βάρη, συνεπώς μπορούν να διαχωριστούν και να προσδιοριστούν μέσω της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης.

Το ποσοστό του mRNA συγκριτικά με το ολικό RNA που απομονώνεται είναι τέτοιο που δεν επιτρέπει την παρατήρησή του στην πηκτή, συνεπώς η επιτυχία της απομόνωσης κρίνεται βάσει της εικόνας των rRNAs. Μετά την ανάλυση, στην εικόνα της πηκτής αγαρόζης πρέπει να είναι εμφανείς τουλάχιστον 3 ζώνες: η 28S και η 18S των κυτταροπλασματικών rRNAs και μία ζώνη χαμηλότερα, που αποτελεί ένα μίγμα tRNA, 5.8S rRNA και 5S rRNA. Σε μία επιτυχημένη απομόνωση, η ζώνη 28S rRNA πρέπει να έχει τουλάχιστον τη διπλάσια ένταση από την 18S rRNA. Επίσης, σε

εκτεταμένη ανάλυση η εμφάνιση περισσότερων ζωνών υποδεικνύει την επιτυχία της απομόνωσης, καθώς γίνονται ορατές και οι ζώνες του rRNA των οργανιδίων. Το mRNA μπορεί να παρατηρηθεί μόνο ως smear πίσω από τις ζώνες του rRNA.

## **2.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων**

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα των νουκλεϊνικών οξέων προσδιορίστηκε είτε με χρήση φασματοφωτόμετρου είτε με τη χρήση nanodrop. Οι πουρίνες και οι πυριμιδίνες που αποτελούν τις αζωτούχες βάσεις των νουκλεϊνικών οξέων απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία (UV light) και το φάσμα απορρόφησής τους γίνεται μέγιστο στα 260nm. Η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων στο δείγμα υπολογίζεται από το OD<sub>260</sub> (optical density) μέσω του νόμου των Beer Lambert. Σύμφωνα με αυτόν, το OD<sub>260</sub>= 1 αντιστοιχεί σε ~50μg/ml δίκλωνου DNA, 40μg/ml μονόκλωνου DNA ή RNA και σε ~33μg/ml μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων.

Εκτός από την απορρόφηση στα 260nm, μετρούνται επίσης οι απορροφήσεις στα 280nm και στα 230nm. Η απορρόφηση στα 280nm υποδεικνύει την ύπαρξη πρωτεϊνών στο δείγμα, κυρίως γιατί σε αυτό το μήκος κύματος απορροφούν τα αρωματικά αμινοξέα. Η απορρόφηση στα 230nm υποδεικνύει την επιμόλυνση του δείγματος από φαινολικά παράγωγα και άλλες οργανικές ενώσεις. Οι λόγοι OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> και OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> υποδεικνύουν την καθαρότητα των νουκλεϊνικών οξέων ως προς τις πρωτεΐνες και τα φαινολικά αντίστοιχα. Ο ιδανικός λόγος OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> για το DNA είναι 1.8 και για το RNA είναι 2.0, ενώ ο λόγος OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 1.9.

## **2.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)**

### **2.6.1 Απλή Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)**

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) είναι μια κλασική τεχνική της μοριακής βιολογίας, η οποία προσομοιάζει *in vitro* τη διαδικασία της αντιγραφής του DNA που λαμβάνει χώρα στα κύτταρα όλων των ζωντανών οργανισμών, παράγοντας μεγάλο αριθμό αντιγράφων του ενισχυόμενου τμήματος DNA. Καθένα από τα συστατικά της αντίδρασης τοποθετείται μέσα σε ειδικά PCR tubes χωρητικότητας 0,2 ml. Η αντίδραση πραγματοποιείται μέσα σε θερμοκυκλοποιητή (thermocycler), ο



οποίος έχει την ικανότητα να ανεβάζει και να κατεβάζει θερμοκρασίες με μεγάλη ταχύτητα, ακολουθώντας συγκεκριμένα και προγραμματισμένα βήματα.

Ένα γενικό πρωτόκολλο PCR παρουσιάζεται στον **Πίνακα 2.1**:

Reaction Components	Stock Solution	Volume	Final Concentration
<b>Template</b> <sup>(1)</sup>	-	x μl	x ng
<b>Enzyme Buffer</b> <sup>(2)</sup>	10X	5μl	1X
<b>dNTPs</b>	2mM	5μl	200μM
<b>Forward Primer</b>	3μM	5μl	300nM
<b>Reverse Primer</b>	3μM	5μl	300nM
<b>DNA Polymerase</b> <sup>(3)</sup>	x units/μl	x μl	x units
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	-	Up to 50 μl	-
<b>Total Reaction Volume</b>	50 μl		

**Πίνακας 2. 1 Μια τυπική αντίδραση PCR.**

<sup>(1)</sup> Η ποσότητα της μήτρας (template) εξαρτάται από το είδος και το μήκος του ενισχυόμενου τμήματος DNA, καθώς κι από το είδος της πολυμεράσης. Γενικά, για DNA χαμηλής πολυπλοκότητας (πλασμιδιακό, λάμδα φάγου ή BAC DNA) χρησιμοποιείται ποσότητα εύρους 1pg-10ng σε αντίδραση όγκου 50μl. Για DNA μεγαλύτερης πολυπλοκότητας, όπως είναι το γονιδιωματικό (gDNA), η ποσότητα της μήτρας είναι ~50-500 ng ανά αντίδραση των 50μl. Όταν χρησιμοποιείται προϊόν RT κατευθείαν ως μήτρα, δεν πρέπει να ξεπερνά το 10% του συνολικού όγκου της αντίδρασης.

<sup>(2)</sup> Ρυθμιστικό διάλυμα της PCR, το οποίο περιέχει 15mM MgCl<sub>2</sub> [10X Optimized DyNAzyme EXT Buffer, 5X Phusion HF Buffer].

<sup>(3)</sup> DNA πολυμεράση: στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν – κατά περίπτωση – η Phusion<sup>®</sup> HF Polymerase (F-530S) και η DyNAzyme<sup>™</sup> EXT DNA Polymerase (F-505L) της Thermo Scientific, καθώς και η KAPA HiFi DNA Polymerase (KK2101) της KAPABIOSYSTEMS. Η Phusion<sup>®</sup> HF έχει την ικανότητα επιδιόρθωσης λαθών κατά τον πολυμερισμό του DNA (proof-reading activity), μειώνοντας σημαντικά την πιθανότητα λάθους κατά την ενίσχυση των επιθυμητών τμημάτων. Η DyNAzyme<sup>™</sup> EXT είναι κατάλληλη για την ενίσχυση δύσκολων templates καθώς και για την ενίσχυση τμημάτων DNA μεγάλου μεγέθους. Η KAPA HiFi παρέχει σημαντική βελτίωση της ποσότητας του προϊόντος, της ταχύτητας πολυμερισμού και της ικανότητας επιδιόρθωσης λαθών (proof-reading) κατά την PCR.

Τα βήματα της αντίδρασης PCR ορίζονται βάσει των χαρακτηριστικών του ενισχυόμενου τμήματος και της πολυμεράσης που χρησιμοποιείται. Ένα γενικό πρότυπο παρουσιάζεται ακολούθως στον **Πίνακα 2.2**:

Step	Procedure
1	Denaturation in 94°C for 2 min
2	Denaturation in 94 °C for 30 sec
3	Annealing in x°C [Tm] <sup>(1)</sup> for 30 sec
4	Extension in 72°C for x <sup>(2)</sup> sec
5 <sup>(*)</sup>	Go to step 2, x times
6	Final extension in 72°C for 10 min
7	12°C for 5 min
8	End

**Πίνακας 2. 2 Ένα τυπικό πρόγραμμα θερμοκύκλων της PCR.**

<sup>(\*)</sup> Το βήμα 5 ορίζει τον αριθμό των θερμοκύκλων, δηλαδή το πόσες φορές επαναλαμβάνονται τα βήματα 2-4 στην αντίδραση. Ο αριθμός των κύκλων ορίζεται βάσει της επιθυμητής ποσότητας αντιγράφων και του επιπέδου πολυπλοκότητας του DNA. Συνήθως οι κύκλοι κυμαίνονται μεταξύ 25-35.

<sup>(1)</sup> Η θερμοκρασία υβριδισμού (annealing) εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης (melting temperature, Tm) των εκκινητών. Το Tm του κάθε εκκινητή υπολογίζεται από τον τύπο:  $69.3 + 0.41 \cdot (GC\%) - (650/l)$ , όπου l= αριθμός βάσεων εκκινητή. Συνήθως η θερμοκρασία annealing ορίζεται 2-3 βαθμούς χαμηλότερα από το μικρότερο Tm.

<sup>(2)</sup> Ο χρόνος της επιμήκυνσης (extension) εξαρτάται από την ταχύτητα πολυμερισμού της DNA πολυμεράσης που χρησιμοποιείται και από το μέγεθος του ενισχυόμενου τμήματος DNA.

### **2.6.2 PCR αποικιών (Colonies PCR)**

Κατά τη διαδικασία κλωνοποίησης ενός τμήματος DNA σε έναν πλασμιδιακό φορέα και τον μετασχηματισμό δεκτικών βακτηριακών κυττάρων, υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί η δοκιμή της α-συμπληρωματικότητας της β-γαλακτοσιδάσης (Xgal-IPTG) για την επιλογή των μετασχηματισμένων αποικιών που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Οι περιπτώσεις αυτές προκύπτουν όταν ο φορέας φέρει ήδη ένα πρόσθετο τμήμα DNA μέσα από προηγούμενη κλωνοποίηση (έχει ήδη διακοπεί το lacZα) ή όταν ο φορέας δεν φέρει το lacZα (δυαδικοί φορείς). Σε αυτές τις περιπτώσεις για την επιλογή των ανασυνδυασμένων αποικιών χρησιμοποιείται η διαδικασία της PCR αποικιών. Εφόσον είναι γνωστή η ένθεση, σχεδιάζονται εκκινητές ώστε να ταυτοποιούν την ύπαρξή της στον φορέα αλλά και την κατεύθυνση εισαγωγής. Χρησιμοποιώντας μέρος της αποικίας απευθείας ως

μήτρα για την αντίδραση PCR, εξασφαλίζουμε ταχύτατα αποτελέσματα για τους ανασυνδυασμένους κλώνους ενώ ταυτόχρονα έχουμε τη δυνατότητα να ελέγξουμε ταυτόχρονα μεγάλο αριθμό αποικιών σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Ν Επιλέγονται 50-100 μονές αποικίες. Καθεμία συλλέγεται με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα και διαλύεται σε 15μl αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O σε tube των 0,2 ml.
- Ν Σε νέο tube ενώνουμε 5 (ή περισσότερες) αποικίες, προσθέτοντας 3μl από το εναιώρημα των 15μl κάθε μονής αποικίας. Έτσι, ελέγχουμε 5 αποικίες ανά αντίδραση PCR.
- Ν Χρησιμοποιούνται 3μl από το μίγμα της πεντάδας ως μήτρα για αντίδραση PCR τελικού όγκου 30μl, σε 20-25 θερμοκύκλους λόγω χαμηλής πολυπλοκότητας του πλασμιδίου. Τα προϊόντα ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης.
- Ν Οι μεμονωμένες αποικίες που αντιστοιχούν στην κάθε πεντάδα που δίνει προϊόν στην PCR, μολύνονται σε υγρή καλλιέργεια LB με χρήση του αντιβιοτικού ανθεκτικότητας του πλασμιδίου. Σε κάθε θετική πεντάδα υπάρχει τουλάχιστον ένας θετικός κλώνος από τον οποίο προήλθε το προϊόν της PCR.
- Ν Την επόμενη μέρα απομονώνεται πλασμιδιακό DNA από τις υποψήφιες καλλιέργειες και πραγματοποιούνται πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες για να ταυτοποιηθούν οι θετικές αποικίες.

### 2.6.3 RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction)

Μετά την απομόνωση του ολικού RNA από το φυτικό υλικό και την αντίδραση της DNase I για την απομάκρυνση του DNA από το δείγμα, πραγματοποιείται η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription, RT) του mRNA σε μονόκλωνο cDNA (First Strand Synthesis). Για τη διαδικασία του RT χρησιμοποιήθηκαν 5μg ολικού RNA ελεύθερου από DNA και η αντίδραση πραγματοποιείται μέσα στον θερμοκυκλοποιητή της PCR, σε 2 διακριτά στάδια:

- ✓ **1<sup>ο</sup> στάδιο:** το RNA και οι εξειδικευμένοι εκκινητές της αντίδρασης τοποθετούνται σε tube των 0.2 ml και αποδιατάσσονται στους 65°C για 5 min. Μετά το πέρας των 5 min τα tubes τοποθετούνται απευθείας στον πάγο, για να παραμείνουν τα συστατικά σε μονόκλωνη διαμόρφωση. Το 1<sup>ο</sup> στάδιο της αντίδρασης παρουσιάζεται στον **Πίνακα 2.3**:

MIX I Components	Stock	Volume	Final
------------------	-------	--------	-------

	<b>solution</b>		<b>concentration</b>
<b>RNA (DNA-free)</b>	-	x $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{g}$
<b>Gene Specific Primer (Reverse)</b>	12.5 $\mu\text{M}$	4 $\mu\text{L}$	2.5 $\mu\text{M}$
<b>Smart Oligo Primer (Forward)</b>	12.5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{L}$	0.625 $\mu\text{M}$
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	-	Up to 10 $\mu\text{l}$	-
<b>Total Volume of MIX I</b>	10 $\mu\text{l}$		

Πίνακας 2. 3 Συστατικά του 1<sup>ου</sup> σταδίου της αντίδρασης RT-PCR.

- ✓ **2<sup>ο</sup> στάδιο:** τα υπόλοιπα συστατικά της αντίδρασης (τελικός όγκος 20 $\mu\text{l}$ ) προστίθενται όσο το αποδιατεταγμένο RNA και οι εκκινητές βρίσκονται στον πάγο (Πίνακας 2.4).

<b>MIX II Components</b>	<b>Stock solution</b>	<b>Volume</b>	<b>Final concentration</b>
<b>First Strand Buffer</b>	5X	4 $\mu\text{l}$	1X
<b>DTT</b>	100 mM	2 $\mu\text{l}$	10 mM
<b>dNTPs</b>	10 mM	2 $\mu\text{l}$	1 mM
<b>RNaseOUT™ (Invitrogen)</b>	40 U/ $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	40 U
<b>SuperScript™ II RT (Invitrogen)</b>	200 U/ $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	200 U
<b>Total Volume of MIX II</b>	10 $\mu\text{l}$		

Πίνακας 2. 4 Συστατικά του 2<sup>ου</sup> σταδίου της αντίδρασης RT-PCR.

- ✓ Το τελικό μίγμα ανακατεύεται 10-20 φορές με πιπέτα και τοποθετείται στο μηχανήμα της PCR για 1h και 30 min στους 42°C.
- ✓ Ακολουθεί μίξη των προϊόντων RT ανά συνθήκη και κατακρήμνιση με 4 όγκους διαλύματος σύστασης Ammonium Acetate(2.5mM)-EDTA(2.5mM) και 12.5 όγκους αιθανόλης 100%, σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min..
- ✓ Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 min στις 13.000 rpm. Αποχύνεται το υπερκείμενο και το υπόλοιπο αφαιρείται με πιπέτα μετά από short spin.
- ✓ Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει και στη συνέχεια διαλύεται σε 20  $\mu\text{l}$  αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O.

- ✓ Το RT χωρίζεται σε 2 aliquots των 10μl. Το ένα φυλάσσεται σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) και το άλλο φυλάσσεται στους 4°C για να χρησιμοποιηθεί άμεσα για PCR.

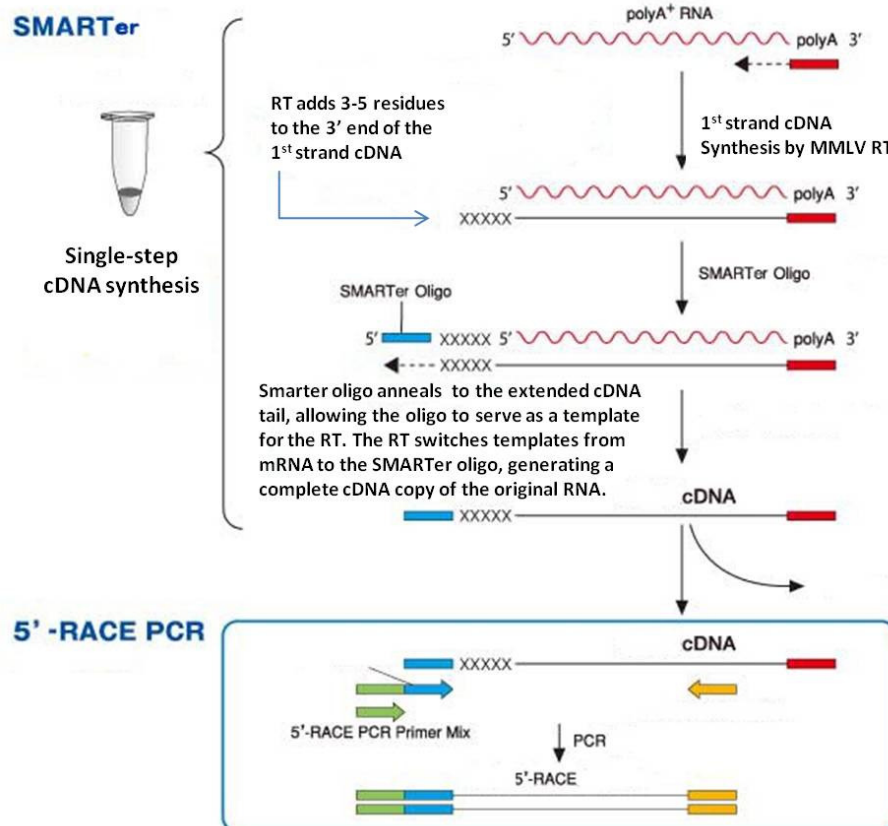
## 2.7 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Για την αποσαφήνιση της αλληλουχίας του 5' άκρου του γονιδίου AtLon3 (AT3G05780) ακολουθήθηκε η τεχνική του 5' RACE PCR. Το RACE PCR είναι χρήσιμο τόσο για τη γρήγορη απόκτηση πλήρους μήκους cDNAs από mRNAs, των οποίων η αλληλουχία είναι μόνο μερικώς γνωστή, όσο και για την αποσαφήνιση εναλλακτικών 5' ή 3' άκρων πλήρως αλληλουχημένων γονιδίων. Η μέθοδος στηρίζεται στη χρήση της PCR για την ενίσχυση της περιοχής μεταξύ της γνωστής αλληλουχίας και των επιτόπων που προσαρτώνται στα άκρα των cDNAs ενός γονιδίου. Ενώ στην περίπτωση του 3' άκρου η πολύ-A ουρά παρέχει φυσικά ένα τέτοιο επίτοπο στο τέλος του mRNA, στο 5' άκρο το επίτοπο αυτό πρέπει να προστεθεί με τεχνητό τρόπο (Scotto-Lavino et al., 2006).

Έχουν προταθεί πολλοί τρόποι για την προσθήκη ενός τέτοιου επιτόπου στο 5' άκρο του υπό διερεύνηση cDNA. Στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε η προσέγγιση του 5' SMART RACE (**Εικόνα 2.1**). Η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο SuperScript™ II RT (Invitrogen), το οποίο είναι αντίστροφη μεταγραφάση τύπου MMLV και προσθέτει στο τέλος της συντιθέμενης αλυσίδας cDNA επιπλέον κυτοσίνες (Cs). Στην περίπτωση του 5' SMART RACE, στην αντίδραση του RT χρησιμοποιούνται δύο εκκινητές για τη σύνθεση της πρώτης αλυσίδας του cDNA: ως ανάστροφος χρησιμοποιήθηκε ένας εξειδικευμένος ως προς την ακολουθία του Lon3 εκκινητής (βλ. Παράρτημα) και ως ορθός εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ο SMART oligo (βλ. Παράρτημα) από το SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, Mountain View, CA, USA). Ο SMART εκκινητής έχει τη δυνατότητα να υβριδίζει στις επιπλέον κυτοσίνες που προστίθενται στο τέλος του cDNA, επεκτείνοντας έτσι το 5' άκρο του mRNA και παρέχοντας στην αντίστροφη μεταγραφάση επιπλέον μήτρα για να συνεχίσει τη σύνθεση της πρώτης αλυσίδας του cDNA. Κατ' αυτόν τον τρόπο, εξασφαλίζεται η ανάκτηση των μεταγραφημάτων με όλα τα πιθανά 5' άκρα, τα οποία φέρουν τη συμπληρωματική ακολουθία του SMART.

Στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη πραγματοποιήθηκαν τρεις αντιδράσεις RT ανά συνθήκη (5μg ολικού RNA ανά αντίδραση), τα RT ενώθηκαν ανά συνθήκη,

καθαρίστηκαν και συμπυκνώθηκαν με Ammonium acetate, όπως ήδη περιγράφηκε, ώστε να αυξηθεί η συγκέντρωση των μεταγραφμάτων που θα χρησιμοποιηθούν ως μήτρα για την αντίδραση PCR που ακολουθεί. Ακολουθήθηκαν παράλληλα δύο διαφορετικές προσεγγίσεις 5' RACE PCR: στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ως ορθός εκκινητής ο SMART και στη δεύτερη ο 5' PCR (5' άκρο του SMART oligo), με ανάστροφο τον εξειδικευμένο εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε για να γίνει το RT (βλ. Παράρτημα).



**Εικόνα 2. 1 Σχηματική αναπαράσταση αντίδρασης 5' SMART RACE (SMARTer<sup>®</sup> RACE 5'/3' Kit, TaKaRa-Clontech).**

Και στις δύο περιπτώσεις χρειάστηκε να ακολουθήσουν 2 ή 3 συνεχόμενα PCR, με ορθό εκκινητή τον 5' PCR και ανάστροφους τους αμέσως επόμενους εξειδικευμένους εκκινητές (βλ. Παράρτημα) εσωτερικά του προϊόντος που έχει ήδη ενισχυθεί (nested PCR). Το nested PCR χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις εκείνες που κρίνεται απαραίτητη η αύξηση της ευαισθησίας και/ή της εξειδίκευσης της αντίδρασης PCR, όπως όταν ενισχύεται το cDNA από ένα σπάνιο ή χαμηλής έκφρασης mRNA. Το προϊόν της πρώτης PCR που ενισχύεται με τους εξωτερικούς εκκινητές, αραιώνεται συνήθως 1/100 και 1/1000 και χρησιμοποιείται ως μήτρα για το πρώτο nested PCR,

το οποίο πραγματοποιείται με τον εκκινητή 5' PCR και τον αμέσως επόμενο εξειδικευμένο ανάστροφο εκκινητή, που βρίσκεται εσωτερικά στην ακολουθία που έχει ήδη ενισχυθεί.

Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται όσες φορές χρειαστεί, κρατώντας σταθερό τον ορθό και αλλάζοντας κάθε φορά τον ανάστροφο εκκινητή, κινούμενοι ολοένα και πιο κοντά στο 5' άκρο του γονιδίου. Κατ' αυτόν τον τρόπο, μετά το τελευταίο nested PCR αναμένεται μεγαλύτερη εξειδίκευση και ποσότητα του επιθυμητού προϊόντος. Το προϊόν απομονώνεται και κλωνοποιείται σε κατάλληλο φορέα κλωνοποίησης, ώστε να σταλθεί για αλληλούχιση και να αποσαφηνιστεί το 5' άκρο του γονιδίου.

## **2.8 Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης**

- Ν Προετοιμάζεται πηκτή αγαρόζης επιθυμητής συγκέντρωσης.
- Ν Το δείγμα DNA αναλύεται με ηλεκτροφόρηση μέχρις ότου το επιθυμητό τμήμα διαχωριστεί επαρκώς από τα υπόλοιπα του δείγματος. Εφαρμόζεται τάση πολύ χαμηλής ισχύος, προκειμένου όλα τα θραύσματα DNA να διαχωριστούν όσο το δυνατόν καλύτερα ανάλογα με το μέγεθός τους.
- Ν Όταν παρατηρηθεί ο επιθυμητός διαχωρισμός, η πηκτή αγαρόζης μεταφέρεται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Το επιθυμητό τμήμα DNA αποκόπτεται με νυστέρι, τοποθετείται σε eppendorf tube και στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για  $\frac{1}{2}$  h ή O/N.
- Ν Ακολουθεί απομόνωση και καθαρισμός του επιθυμητού κλάσματος DNA από το κομμάτι της πηκτής χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο του NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up Kit της εταιρείας Macherey-Nagel.
- Ν Το επιθυμητό κλάσμα DNA μετά τον καθαρισμό εκλούεται σε 15-30μL ddH<sub>2</sub>O. Ο όγκος του νερού εξαρτάται από την ένταση της μπάντας που αποκόπηκε από την πηκτή και από το πόσο συγκεντρωμένη επιθυμούμε να την έχουμε. Η μπάντα αποθηκεύεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **2.9 Ενοποίηση τμημάτων DNA με κολλώδη ή τυφλά άκρα (Ligation)**

Κατά την κλωνοποίηση ενός τμήματος DNA σε έναν πλασμιδιακό φορέα, είναι απαραίτητη η διαδικασία της ενοποίησης του φορέα με το επιθυμητό τμήμα DNA. Η

διαδικασία αυτή ονομάζεται λιγοποίηση (ligation) και καταλύεται από το ένζυμο T4 DNA λιγάση, που έχει απομονωθεί από τον T4 βακτηριοφάγο. Η T4 DNA λιγάση καταλύει τη δημιουργία του φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ του 3'-OH και του 5'-P για την ένωση δύο αλυσίδων DNA. Το ένζυμο έχει την ικανότητα να ενώνει τόσο κολλώδη (cohesive) όσο και τυφλά άκρα (blunt ends).

Οι πλασμιδιακοί φορείς αρχικά υφίστανται πέψη με κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, προκειμένου να γίνουν γραμμικοί και να αποκτήσουν τα κατάλληλα άκρα (κολλώδη ή τυφλά) για να ενωθούν με το εισερχόμενο τμήμα DNA. Αντιστοίχως, το τμήμα DNA προς κλωνοποίηση έχει είτε ενισχυθεί μέσω PCR με DNA πολυμεράση που δημιουργεί κατάλληλα άκρα για κλωνοποίηση είτε έχει κοπεί με τις ίδιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες όπως ο φορέας. Τόσο οι φορείς όσο και τα εισερχόμενα τμήματα DNA πριν την ενοποίηση έχουν απομονωθεί και καθαριστεί από πηκτή αγαρόζης, με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην αντίστοιχη ενότητα.

Μια τυπική αντίδραση λιγοποίησης άκρων DNA περιγράφεται ακολούθως στον

**Πίνακα 2.5:**

Ingredients	Stock solution	Volume	Final concentration
Plasmid Vector <sup>(1)</sup>	-	x μL	20-100 ng
Insert DNA <sup>(2)</sup>	-	x μL	1:1 to 5:1 molar ratio over vector
T4 Ligase Buffer <sup>(3)</sup>	10X	2 μL	1X
PEG 4000 <sup>(4)</sup>	50%	2 μL	5%
T4 Ligase <sup>(5)</sup>	X Weiss U/μl	x μL	1-5 Weiss U
ddH <sub>2</sub> O	-	Up to 20μL	-
<b>Total</b>	<b>20 μL</b>		

**Πίνακας 2. 5 Μία τυπική αντίδραση λιγοποίησης τμημάτων DNA.**

<sup>(1), (2)</sup> Πρέπει να υπολογιστεί σωστά η αναλογία των άκρων του εισερχόμενου DNA προς τα άκρα του πλασμιδιακού φορέα, καθώς η λιγάση αναγνωρίζει άκρα και όχι ποσότητα DNA. Συνηθέστερα χρησιμοποιείται αναλογία μορίων insert(3):(1) plasmid vector. Η ποσότητα σε ng που χρησιμοποιείται από το κάθε τμήμα DNA υπολογίζεται βάσει του παρακάτω τύπου:

$$\frac{\text{ng of vector} \times \text{size of insert (kb)}}{\text{size of vector (kb)}} \times (\text{insert: vector}) \text{ molar ratio} = \text{ng of insert}$$

Ο συνολικός όγκος του DNA δεν πρέπει να ξεπερνά το 50% του τελικού όγκου της αντίδρασης, δηλαδή τα 10μl.

<sup>(3)</sup> Η αρχική συγκέντρωση εξαρτάται από την εταιρεία που προμηθεύει το ένζυμο, συνηθέστερα είναι 10X ή 2X. Το buffer παρέχει στη λιγάση το απαραίτητο ATP για να καταλύσει την αντίδραση.



<sup>4)</sup>Το PEG αυξάνει την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης, ειδικά στη λιγοποίηση τυφλών άκρων (blunt-end ligation), καθώς φέρνει τα άκρα των τμημάτων πιο κοντά επιτρέποντας στη λιγάση να τα ενώσει ευκολότερα.

<sup>6)</sup>Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένα εύρος T4 λιγασών:

T4 DNA Ligase (5 Weiss U/μl) της εταιρείας Thermo Fisher Scientific, #EL0014

T4 DNA Ligase (400 cohesive end U/μl) της εταιρείας NEB, #M0202S

T4 DNA Ligase (350 U/μl) της εταιρείας TaKaRa Clontech, #2011A

T4 DNA Ligase (3 Weiss U/μl) της εταιρείας Promega, #M180A

Ως μονάδα μέτρησης του ενζύμου χρησιμοποιήθηκαν τα Weiss Units, συνεπώς κάθε λιγάση βαθμονομήθηκε αναλόγως.

1 Weiss unit αντιστοιχεί σε ~200 cohesive end units

1 Unit της εταιρείας TaKaRa αντιστοιχεί σε 0.008 Weiss units.

Η ποσότητα της λιγάσης που χρησιμοποιήθηκε κατά περίπτωση εξαρτάται από το ένζυμο και από τις οδηγίες της εταιρείας. Σε γενικές γραμμές, για λιγοποίηση με κολλώδη άκρα χρησιμοποιήθηκαν από 1-3 Weiss units ανά αντίδραση, ενώ για λιγοποίηση με τυφλά άκρα χρησιμοποιήθηκαν 5 Weiss units ανά αντίδραση.

Ν Τα συστατικά του **Πίνακα 2.5** προστίθενται σε tube (1.5 mL) κατά φθίνοντα όγκο, ενώ η λιγάση προστίθεται πάντα τελευταία στο μίγμα.

Ν Το μίγμα λιγοποίησης ανακατεύεται με πιπέτα ~20-30 φορές, έως ότου επιτευχθεί πλήρης ομογενοποίηση.

Ν Η αντίδραση πραγματοποιείται κατά περίπτωση σε θερμοκρασία 16-22°C, είτε O/D (4h) είτε O/N (16h).

## 2.10 Βακτηριακά κύτταρα και μετασχηματισμός

### 2.10.1 Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *Escherichia coli*

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση των πλασμιδίων είναι το *E. coli* DH5a. Το βακτηριακό αυτό στέλεχος χρησιμοποιείται συνήθων λόγω της υψηλής ικανότητας μετασχηματισμού που επιδεικνύει ( $>1 \cdot 10^6$  transformants/μg pUC19 DNA). Ο γενότυπος χαρακτηρίζεται από την έλλειψη Δ(lacZ)M15, που εκφράζει το καρβόξυ τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης, επιτρέποντας έτσι την ασυμπληρωματικότητα με το *lac a* τμήμα που κωδικοποιείται από πολλούς πλασμιδιακούς φορείς (επιλογή μπλε/άσπρων αποικιών). Τα δεκτικά κύτταρα προετοιμάζονται με την ακόλουθη διαδικασία:

Ν Μονή αποικία βακτηριακού στελέχους DH5a αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB για 12 ώρες στους 37°C.

- ℵ Από την αρχική καλλιέργεια συλλέγονται 2mL και μεταφέρονται σε κωνική φιάλη που περιέχει 200mL θρεπτικού μέσου LB. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37°C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητά της φτάσει  $O.D_{550} = 0.5$ .
- ℵ Η καλλιέργεια τοποθετείται για 10 λεπτά στον πάγο.
- ℵ Ακολουθώς τα βακτηριακά κύτταρα κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση στη Sorval για 5min στις 5000 στροφές/λεπτό στους 4°C.
- ℵ Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται στον μισό όγκο της αρχικής καλλιέργειας με παγωμένο διάλυμα 25mM  $CaCl_2$ .
- ℵ Επαναλαμβάνεται ο ίδιος τρόπος κατακρήμνισης.
- ℵ Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε παγωμένο διάλυμα 75mM  $CaCl_2$ , σε όγκο που ισούται με το 1/5 της αρχικής καλλιέργειας.
- ℵ Προστίθεται αποστειρωμένη γλυκερόλη, τόση ώστε η τελική της συγκέντρωση να είναι ίση με 15% v/v και το μίγμα αναμειγνύεται πολύ καλά.
- ℵ Το μίγμα των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων μοιράζεται σε PCR tubes (200μl/tube) και καταψύχεται απευθείας με χρήση υγρού αζώτου.
- ℵ Η διατήρηση των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων για μακρά χρονικά διαστήματα πραγματοποιείται σε βαθιά κατάψυξη (-80°C).

### **2.10.2 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli* με πλασμιδιακό DNA**

- ℵ Σε 200μl δεκτικών βακτηριακών κυττάρων DH5a, τα οποία έχουν αφεθεί στον πάγο να ξεπαγώσουν, προστίθενται 10-50ng πλασμιδιακού DNA ή το μίγμα της λιγοποίησης.
- ℵ Το μίγμα αναμειγνύεται καλά και επωάζεται στον πάγο για 30 λεπτά.
- ℵ Ακολουθεί θερμικό σοκ του δείγματος για 2.5 λεπτά στους 42°C.
- ℵ Προστίθενται 1.3ml θρεπτικού μέσου LB (37°C) αυστηρά μετά το πέρας των 2.5 λεπτών του θερμικού σοκ και στη συνέχεια ακολουθεί επώαση του μίγματος στους 37°C για 1 ώρα.
- ℵ Ανά 20 λεπτά (χρόνος διπλασιασμού *E. coli*) το μίγμα των κυττάρων αναδεύεται για να ανανεώνεται η διαθεσιμότητα του αέρα στα κύτταρα.
- ℵ Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 30-60 sec. Αποχύνεται το υπερκείμενο, αλλά κρατούνται ~400μl LB για την επαναδιάλυση των κυττάρων.
- ℵ Το δείγμα επιστρώνεται σε στερεό θρεπτικό μέσο LB με κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής του πλασμιδιακού φορέα, κατά περίπτωση. Σε περίπτωση χρήσης φορέα

που φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης υπάρχει δυνατότητα επιλογής μπλε/άσπρων αποικιών. Αυτό επιτυγχάνεται με την επίστρωση πάνω στο θρεπτικό μέσο του χρωμοφόρου υποστρώματος X-gal και του παράγοντα IPTG που δρα σαν επαγωγέας του υποκινητή του lacZ γονιδίου, γεγονός το οποίο προηγείται της επίστρωσης των κυττάρων.

ℵ Τα τρυβλία επωάζονται για 12-16 ώρες σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 37°C.

### **2.10.3 Προετοιμασία ηλεκτροδεκτικών βακτηριακών κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens***

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

ℵ 0.1ml από την αρχική καλλιέργεια μεταφέρονται σε κωνική φιάλη που περιέχει 100ml θρεπτικού μέσου LB. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 28°C μέχρι η οπτική πυκνότητά της φτάσει  $O.D_{550} = 0.5-0.7$

ℵ Τα βακτηριακά κύτταρα φυγοκεντρώνονται για 10 λεπτά στις 3500 rpm στους 4°C.

ℵ Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 100ml διαλύματος γλυκερόλης (10%v/v σε κρύο αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O) και φυγοκεντρείται κατά τον ίδιο τρόπο.

ℵ Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 50ml διαλύματος γλυκερόλης (10%v/v) και φυγοκεντρείται κατά τον ίδιο τρόπο.

ℵ Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 2ml διαλύματος γλυκερόλης (10%v/v) και φυγοκεντρείται κατά τον ίδιο τρόπο. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται.

ℵ Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 1ml διαλύματος γλυκερόλης (10%v/v) (πυκνότητα 1011-1012 βακτήρια/ml). Δείγματα των 45μl μοιράζονται σε φιαλίδια erpendorf και καταψύχονται αμέσως με τη βοήθεια υγρού αζώτου.

ℵ Τα δεκτικά βακτηριακά κύτταρα διατηρούνται για μακρά χρονικά διαστήματα με αποθήκευσή στους -80°C.

### **2.10.4 Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens* μέσω ηλεκτροπόρωσης**

ℵ Σε 40μl δεκτικών κυττάρων προστίθενται 10-50 ng πλασμιδιακού DNA. Το μίγμα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται στον πάγο για 5 λεπτά.

ℵ Το δείγμα μεταφέρεται σε παγωμένη κυβέττα διαμέτρου 0.2cm και τοποθετείται στο μηχανήμα της BioRad Gene PulserII.

- Ν Πραγματοποιείται εφαρμογή ηλεκτρικού παλμού. Οι παράμετροι για το συγκεκριμένο σύστημα είναι : χωρητικότητα 25μF, αντίσταση 400Ω ή 600Ω και ηλεκτρικό πεδίο 1.8 kV χρονικής διάρκειας 8-12msec.
  - Ν Αμέσως μετά ακολουθεί προσθήκη 1ml θρεπτικού μέσου LB, ανάμιξη και επώαση για 2-3h στους 28°C σε φιαλίδιο erpendorf, με ανακίνηση ανά 30 min.
  - Ν Το δείγμα φυγοκεντρείται για 1min στις 10000 rpm και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 50-100μl LB.
  - Ν Όλο το δείγμα επιστρώνεται σε τρυβλίο LB με αντιβιοτικά για την επιλογή του *Agrobacterium*, του πλασμιδίου Ti και του δυαδικού πλασμιδιακού φορέα.
  - Ν Τέλος, πραγματοποιείται επώαση των τρυβλίων για 36-48 ώρες σε θάλαμο 28°C.
- Η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens* που φέρουν τον επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα πραγματοποιείται μέσω της ταυτόχρονης δράσης τριών διαφορετικών αντιβιοτικών. Η επιλογή γίνεται σε στερεά τρυβλία LB που περιέχουν 50mg/L ριφαμπικίνη, 50mg/L τζενταμυκίνη και 50mg/L καναμυκίνη. Η ριφαμπικίνη χρησιμοποιείται για την επιλογή του *A. tumefaciens*, η τζενταμικίνη για την επιλογή του πλασμιδίου Ti του στελέχους GV3101 (απαιτείται για τη μεταφορά του T-DNA) και η καναμυκίνη για την επιλογή του δυαδικού φορέα που φέρει την επιθυμητή κατασκευή που θα περαστεί στα φυτά.

## **2.11 Αποθήκευση μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα**

- Ν Μονή αποικία βακτηριακού στελέχους προς αποθήκευση αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό LB (με ανάλογα αντιβιοτικά), 12h στους 37°C για το *E. coli* και 36-48h στους 28°C για το *Agrobacterium tumefaciens*.
- Ν Σε φιαλίδιο erpendorf μεταφέρονται 650μl από την επιθυμητή καλλιέργεια και προστίθενται 350μl αποστειρωμένης γλυκερόλης 99%. Το δείγμα αναμειγνύεται έντονα μέχρι να ομογενοποιηθούν οι δύο φάσεις.
- Ν Το μίγμα κυττάρων-γλυκερόλης αποθηκεύεται στους -80°C.

## 2.12 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα

### 2.12.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *Escherichia coli* με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης

- Ν Μονή βακτηριακή αποικία με το επιθυμητό πλασμίδιο, καλλιεργείται σε υγρό LB στους 37°C για 12h με το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής.
- Ν Από την καλλιέργεια 1.5ml μεταφέρεται σε φιαλίδιο erpendorf και φυγοκεντρείται για 1 min στις 13000 rpm. Το υπερκείμενο LB αποχύνεται.
- Ν Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 200μl διαλύματος ομογενοποίησης P1.
- Ν Ακολούθως προστίθενται 200μl από το διάλυμα λύσης P2. Ακολουθεί πολύ ελαφριά μίξη με προσεκτική ανακίνηση του tube και το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου γίνει διαυγές (3' maximum).
- Ν Προστίθενται 200μl διαλύματος 3M/5M CH<sub>3</sub>COOK και το δείγμα αναμιγνύεται λίγο πιο έντονα, μέχρι να εμφανιστεί ένα εναιώρημα από λευκά κομμάτια (κυτταρικές μεμβράνες κι άλλα παραπροϊόντα της λύσης). Τοποθετείται στον πάγο για 15 λεπτά.
- Ν Το δείγμα φυγοκεντρείται για 30min στις 13000 rpm (θερμοκρασία δωματίου). Το υπερκείμενο ανακτάται με πιπέτα προσεκτικά για να μην περιέχει κομμάτια από το ίζημα και μεταφέρεται σε καθαρό φιαλίδιο erpendorf.
- Ν Προστίθεται διπλάσιος όγκος αιθανόλης (μέχρι το χείλος) και ακολουθεί καλή ανάμιξη και επώαση για 10 λεπτά (minimum) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ν Το δείγμα φυγοκεντρείται για 15min στις 13000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ν Το υπερκείμενο αποχύνεται, ακολουθεί short spin και το υπόλοιπο αφαιρείται με πιπέτα. Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει από την αιθανόλη και προστίθεται αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O (40μl για high-copy και 20μl για low-copy plasmids).
- Ν Το δείγμα τοποθετείται στον πάγο μέχρι να ενυδατωθεί το ίζημα και ενδιάμεσα χτυπάμε με το χέρι τον πάτο του erpendorf για να επαναδιαλυθεί.
- Ν Τέλος, πραγματοποιείται ένα ελαφρύ vortex και ένα short spin και το erpendorf με το πλασμιδιακό DNA τοποθετείται για φύλαξη στους -20°C.

### **2.12.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με χρήση κολώνας NucleoSpin Plasmid**

Υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες απαιτείται η χρήση πλασμιδιακού DNA υψηλής καθαρότητας, όπως όταν αυτό θα χρησιμοποιηθεί για αντίδραση αλληλούχισης (sequencing) ή για μετασχηματισμό κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens* με τη μέθοδο της ηλεκτροπόρωσης. Σε αυτές τις περιπτώσεις η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του NucleoSpin® Plasmid (DNA Purification Kit, Cat No: 740588.50) ή του NucleoSpin® Plasmid EasyPure (DNA Purification Kit, Cat No: 740727.50) της εταιρείας Macherey-Nagel. Η τελική έκλυση του πλασμιδιακού DNA από την κολώνα γίνεται σε αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O και η ποσότητα εξαρτάται από τη διαδικασία στην οποία θα χρησιμοποιηθεί.

### **2.12.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens***

Μετά το μετασχηματισμό του *Agrobacterium tumefaciens* με το πλασμίδιο που φέρει την επιθυμητή κατασκευή, επιβάλλεται ο έλεγχος του επιλεγμένου κλώνου για την παρουσία του πλασμιδίου και την ορθή επιβεβαίωσή του. Για το λόγο αυτό, το πλασμίδιο ανακτάται από το *A. tumefaciens* με την ακόλουθη μέθοδο:

- Ν Μονή αποικία στελέχους *A. tumefaciens* αναπτύσσεται σε 5mL υγρού μέσου LB, παρουσία τριπλής επιλογής αντιβιοτικών Rif-Gen-Kan, για 36-48h στους 28°C.
- Ν 1.5mL καλλιέργειας μεταφέρεται σε tube και φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 2 min. Το υπερκείμενο LB αποχύνεται.
- Ν Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 200μl διαλύματος ομογενοποίησης P1.
- Ν Στο εναιώρημα των βακτηριακών κυττάρων προστίθενται 20μl διαλύματος λυσοζύμης συγκέντρωσης 20mg/ml, ακολουθεί έντονη μίξη για 20 sec και το μίγμα τοποθετείται στους 37°C για 15 min.
- Ν Προστίθενται 200μl διαλύματος λύσης P2. Έντονη μίξη για 20 sec.
- Ν Προστίθενται 50μl φαινόλης. Έντονη μίξη για 1 min (vortex).
- Ν Προσθήκη 200μl διαλύματος 3M/5M CH<sub>3</sub>COOK. Ακολουθεί έντονη μίξη.
- Ν Το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 min στις 12.000 rpm.
- Ν Το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά και μεταφέρεται σε καθαρό eppendorf tube. Προσθήκη 2 όγκων EtOH. Ανάμιξη και επώαση για 10 min στον πάγο.
- Ν Το δείγμα φυγοκεντρείται για 10 min στις 12.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.

- ℵ Το υπερκείμενο αποχύνεται, ακολουθεί short spin και το υπόλοιπο αφαιρείται με πιπέτα. Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει καλά και επαναδιαλύεται σε 25μl αποστειρωμένου ddH<sub>2</sub>O.
- ℵ Το ¼ της ποσότητας του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε συνήθως επαρκεί για τον μετέπειτα μετασχηματισμό κυττάρων *E. coli*. Για τον έλεγχο του πλασμιδίου στην πορεία ακολουθείται η διαδικασία απομόνωσης από *E. coli* με αλκαλική λύση. Η κατασκευή κατόπιν επιβεβαιώνεται με τις ίδιες πέψεις περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν κατά την τελική επιβεβαίωση πριν την εισαγωγή του πλασμιδίου στο *Agrobacterium tumefaciens*.

### 2.13 Πέψη νουκλεϊκών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Κατά την υποκλωνοποίηση ενός τμήματος DNA προκύπτει η ανάγκη επιβεβαίωσης της φοράς εισαγωγής του τμήματος στον πλασμιδιακό φορέα, της ταυτοποίησης μιας συγκεκριμένης ακολουθίας μεταξύ των πολλών που μπορεί να έχουν εισαχθεί αλλά και της μεταφοράς του τμήματος από έναν πλασμιδιακό φορέα σε έναν άλλον. Οι διαδικασίες αυτές διεξάγονται μέσω των περιοριστικών ενδονουκλεασών τύπου II ή ενζύμων περιορισμού, όπως είναι ευρύτερα γνωστά. Η πλειονότητα των ενζύμων αυτών αναγνωρίζει μια παλίνδρομη ακολουθία-στόχο μήκους 4-8 νουκλεοτιδίων στο DNA, όπου διακόπτουν τη συνέχειά του δημιουργώντας 5' ή 3' προεξέχοντα άκρα ή τυφλά άκρα (οι αλυσίδες κόβονται στο ίδιο σημείο). Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκαν ένζυμα από τις εταιρείες NEB (New England BioLabs® Inc.) και TaKaRa Clontech®. Μια τυπική αντίδραση πέψης βάσει των οδηγιών της NEB παρουσιάζεται στον **Πίνακα 2.6**:

Ingredients	Stock Solution	Volume	Final Concentration
Plasmid DNA	-	x μl	1 μg
Enzyme Buffer <sup>(1)</sup>	10X	4 μl	1X
BSA <sup>(2)</sup>	10X	4 μl	1X
Restriction Enzyme <sup>(3)</sup>	x U/μl	0.8 – 1 μl	10 units are sufficient
ddH <sub>2</sub> O	-	Up to 40μl	-
<b>Total<sup>(4)</sup></b>		40 μl	

## Πίνακας 2. 6 Τα συστατικά μίας τυπικής αντίδρασης πέψης νουκλεϊνικών οξέων.

<sup>(1)</sup>Κάθε ένζυμο περιορισμού έχει διαφορετικές απαιτήσεις σε buffer για να δράσει. Κάθε εταιρεία παρέχει δικά της buffer μαζί με τα ένζυμα και χρησιμοποιεί ελαφρώς διαφορετικό σύστημα κατάταξης. Η NEB παρέχει τα buffer 1, 2, 3 & 4 τα οποία πλέον έχουν βελτιωθεί και μετονομαστεί αντίστοιχα σε 1.1, 2.1, 3.1 & CutSmart. Η TaKaRa παρέχει τα buffer L, M, H, K & T.

<sup>(2)</sup>Αλβουμίνη ορού μόσχου: προστίθεται προαιρετικά όταν είναι απαραίτητο για τη δράση του ενζύμου. Τα νέα Buffers της NEB περιέχουν BSA ενώ τα παλιά όχι.

<sup>(3)</sup>Ορισμός του Unit: 1 Unit ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την πέψη 1μg λ DNA σε 1 ώρα στην κατάλληλη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου και σε τελικό όγκο 50μl.

<sup>(4)</sup>Τα πρωτόκολλα των ενζύμων προτείνουν η αντίδραση να γίνεται σε τελικό όγκο 50μL, όμως ο όγκος καθορίζεται κατά περίπτωση από τις ανάγκες του πειράματος.

- ℵ Τα συστατικά της πέψης προστίθενται σε erpendorf (1.5ml). Το DNA και το ένζυμο προστίθενται τελευταία και το erpendorf κατόπιν φυλάσσεται στον πάγο.
- ℵ Μετά την προσθήκη του ενζύμου, το μίγμα ανακατεύεται καλά (vortex), ακολουθεί spin και στη συνέχεια τοποθετείται σε επωαστήρα που είναι ρυθμισμένος στην κατάλληλη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου (εξαρτάται από τον οργανισμό που απομονώθηκε). Τα περισσότερα δρουν σε θερμοκρασία 37°C, υπάρχουν όμως και εξαιρέσεις που δρουν σε διαφορετικές θερμοκρασίες.
- ℵ Το μίγμα της πέψης αφήνεται στον επωαστήρα για 1-2 ώρες. Έπειτα, τοποθετείται στον πάγο ώστε να ελαττωθεί σημαντικά η δράση του ενζύμου.

## 2.14 Παροδικός μετασχηματισμός φύλλων καπνού *Nicotiana benthamiana* με *Agrobacterium tumefaciens* (Agroinfiltration)

- ℵ Χρησιμοποιείται στέλεχος του *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, που έχει μετασχηματιστεί μέσω ηλεκτροπόρωσης με την επιθυμητή κατασκευή.
- ℵ Τα βακτήρια αναπτύσσονται σε στερεό θρεπτικό LB/RGK για 3 ημέρες.
- ℵ Επιλέγεται μονή αποικία και καλλιεργείται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB/RGK για 1-2 ημέρες. Παράλληλα καλλιεργείται το στέλεχος με την κατασκευή P19.
- ℵ 1.5ml καλλιέργειας τοποθετούνται σε erpendorf tube και φυγοκεντρώνται για 10 min στις 3.600 rpm, ώστε να αποφευχθεί η καταστροφή των κυττάρων.
- ℵ Το υπερκείμενο απομακρύνεται, το ίζημα ξεπλένεται με 600-800μl Dilution Buffer προσεκτικά και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 200μl Dilution Buffer, με λεπτούς χειρισμούς ώστε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες.
- ℵ Μετά την επαναιώρηση, τα κύτταρα ενώνονται ανά κατασκευή.



- Ν Πραγματοποιείται αραιώση 1:50 (20μl/1000μl dilution buffer) από την αρχική καλλιέργεια για φωτομέτρηση στα 600nm. Για την παρασκευή του μίγματος, οι τιμές της απορρόφησης ανάγονται στα 50.
- Ν Το μίγμα της αγροέγχυσης παρασκευάζεται ώστε η οπτική πυκνότητα του p19 να ισούται με 1 και η οπτική πυκνότητα του κλώνου να ισούται με 0.7. Οι ποσότητες υπολογίζονται αρχικά για 1ml μίγματος αγροέγχυσης και η υπόλοιπη ποσότητα συμπληρώνεται με dilution buffer.
- Ν Στο μίγμα τοποθετείται ακετοσυρινγκόνη (τελική συγκέντρωση 150μM), η οποία εξυπηρετεί το μετασχηματισμό ενισχύοντας την έκφραση των *vir* γονιδίων.
- Ν Υπολογίζονται οι ποσότητες για τον επιθυμητό όγκο μίγματος αγροέγχυσης.
- Ν Το μίγμα επωάζεται στους 28°C για 3h με ανακινήσεις ανά 30 λεπτά.
- Ν Μετά το πέρας 3h, πραγματοποιείται ένεση με σύριγγα ινσουλίνης (χωρίς βελόνα) στην κάτω επιφάνεια φύλλων νεαρών καπνών *Nicotiana benthamiana*. Τα μετασχηματισμένα φυτά αφήνονται να αναπτυχθούν στο θάλαμο για 3 ημέρες.
- Ν Μετά το πέρας 3 ημερών, αφαιρείται η επιδερμίδα της κάτω επιφάνειας των μετασχηματισμένων φύλλων με χρήση λαβίδας (peeling).
- Ν Οι τομές τοποθετούνται άμεσα σε αντικειμενοφόρο πλάκα που φέρει ddH<sub>2</sub>O, βυθίζονται μέσα στο νερό και καλύπτονται με καλυπτρίδα, ώστε να παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο φθορισμού.

## 2.15 Μικροσκοπία

Η παρατήρηση των παροδικά μετασχηματισμένων επιδερμικών κυττάρων φύλλων καπνού *Nicotiana benthamiana* πραγματοποιήθηκε με το μικροσκόπιο Olympus BX-50 (Tokyo, Japan), το οποίο διαθέτει UV λάμπα φθορισμού και ποικιλία φίλτρων για την υπεριώδη ακτινοβολία. Ο φθορισμός της πρωτεΐνης-μάρτυρα YFP, εντοπίστηκε με το filter #41017, Endow GFP Bandpass Emission Filter (Chroma Technology Corp., Battleboro, USA). Ο φθορισμός της χλωροφύλλης των χλωροπλαστών των επιδερμικών κυττάρων παρατηρήθηκε με χρήση του φίλτρου ροδαμίνης U-MSWG (Olympus, Tokyo, Japan). Επίσης χρησιμοποιήθηκε και το οπτικό φίλτρο για τη φωτογράφιση των δειγμάτων σε πραγματικές συνθήκες. Οι φωτογραφίες λήφθηκαν με την κάμερα Olympus DP71 και αποθηκεύτηκα με τη βοήθεια του προγράμματος Cell<sup>^</sup>A (Olympus Soft Imaging Solutions, Germany). Η επεξεργασία των φωτογραφιών έγινε με το πρόγραμμα Adobe Photoshop CS4 (version 11.0).

## 2.16 Σύσταση και παρασκευή διαλυμάτων και θρεπτικών μέσων ανάπτυξης

### 2.16.1 Σύσταση και προετοιμασία θρεπτικού υλικού ανάπτυξης φυτών

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα πειραματική μελέτη προετοιμάζεται και αναπτύσσεται στο εργαστήριο υπό συγκεκριμένες ασηπτικές συνθήκες. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των φυτών είναι ½ X MS (Murashige & Skoog, 1962, Duchefa Biochemie B.V.) σε τρυβλία petri, η σύνθεση του οποίου περιγράφεται ακολούθως στον **Πίνακα 2.7**:

Ingredients	Quantities (g per 100mL)
MS (including vitamins, DUCHEFA)	0,22
D - Sucrose	1
MES - monohydrate	0,05
Agarose/Phytigel	0,6/ 0,3
ddH <sub>2</sub> O	Up to 100mL

Πίνακας 2. 7 Σύσταση του θρεπτικού μέσου ½ MS ανάπτυξης φυτών.

- ✓ MS: αποτελεί μίγμα μικροστοιχείων, μακροστοιχείων και βιταμινών απαραίτητων στην ανάπτυξη των φυτών.
- ✓ Σουκρόζη: συνιστά την πηγή των απαραίτητων υδατανθράκων.
- ✓ MES: χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση του pH του θρεπτικού διαλύματος.
- ✓ Αγαρόζη/ Phytigel: αποτελεί το σταθεροποιητικό μέσο του υποστρώματος.

Η τελική ρύθμιση της τιμής του pH= 5,7 του υποστρώματος πραγματοποιείται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος KOH 1N και μέτρηση με pHμετρο, μετά την ομογενοποίηση των υπόλοιπων συστατικών, εξαιρουμένου του στεροποιητικού μέσου. Το θρεπτικό αποστειρώνεται σε θερμοκρασία 120°C και πίεση 1,5 atm για περίπου 20 λεπτά. Στη συνέχεια αφήνεται να πέσει η θερμοκρασία του, τοποθετείται σε τρυβλία petri με χρήση απαγωγού νηματικής ροής, όπου επικρατούν ασηπτικές συνθήκες, και φυλάσσεται στους 4°C.

### 2.16.2 Διαλύματα ανάπτυξης και επιλογής βακτηριακών κυττάρων

Σύσταση θρεπτικού μέσου ανάπτυξης βακτηρίων LB (*Lysogeny broth*)

Ingredients	Quantities (w/v)
-------------	------------------

<b>Yeast extract</b>	0.5 g
<b>Peptone</b>	1 g
<b>NaCl</b>	1 g
<b>Agar bacteriological (only for petri dishes)</b>	1.4 g
<b>Total Volume</b>	Up to 100 mL

Πίνακας 2. 8 Σύσταση θρεπτικού μέσου LB ανάπτυξης βακτηρίων.

*Αντιβιοτικά και διαλύματα επιλογής μετασχηματισμένων βακτηρίων*

- ∞ X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside): 20 mg/ml σε DMFO.
- ∞ IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside): 200 mg/ml IPTG σε H<sub>2</sub>O.
- ∞ Ampicillin (αμπικιλίνη): 100mg/ml σε ddH<sub>2</sub>O.
- ∞ Kanamycin (καναμυκίνη): 50mg/ml σε ddH<sub>2</sub>O.
- ∞ Gentamicin (τζενταμυκίνη): 25mg/ml σε ddH<sub>2</sub>O.
- ∞ Rifampicin (ριφαμπικίνη): 25mg/ml σε μεθανόλη.

Φυλάσσονται όλα στους -20°C.

### **2.16.3 Διαλύματα απομόνωσης ριβονοκλεϊκών οξέων**

- ∞ **RNA extraction Buffer:** 100 mM Tris-HCL (pH = 9.5), 0.5% SDS w/v
- ∞ **Sevag:** (24 : 1 χλωροφόρμιο – ισοαμυλική αλκοόλη)
- ∞ **Φαινόλη** (pH 8.0)

### **2.16.4 Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης**

- ∞ P1 ρυθμιστικό διάλυμα επαναιώρησης: 50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0 και 100μg/ml RNάση.
- ∞ P2 ρυθμιστικό διάλυμα λύσης: 0.2M NaOH, SDS 1% (w/v).
- ∞ 3M/5M CH<sub>3</sub>COOK: 60ml 5M οξικού καλίου pH 4.8-5.2 αναμιγνύονται με 11,5ml οξικού οξέος και 28,5ml ddH<sub>2</sub>O.
- ∞ RNάση : Διάλυμα RNάσης 10mg/ml σε 10mM Tris-HCl pH7.4, 15mM NaCl.

### **2.16.5 Διαλύματα ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων**

#### **Σύσταση πηκτής αγαρόζης X% (στα 100ml)**

- ℵ Xg Αγαρόζης
- ℵ 2ml 1xTAE
- ℵ 5μl βρωμιούχου αιθιδίου
- ℵ 98ml ddH<sub>2</sub>O

**Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (στα 1000 mL)**

- ℵ 20ml 1xTAE
- ℵ 50μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr)
- ℵ 980ml ddH<sub>2</sub>O

**TAE (50x) 1000mL :** 100ml EDTA(0.5M, pH=8), 57ml CH<sub>3</sub>COOH, 242gr Tris base

**EtBr :** 10mg/ml (φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο δοχείο)

**Loading dye 6x:** 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 40% sucrose

***2.16.6 Διαλύματα προετοιμασίας δεκτικών βακτηριακών κυττάρων E. coli DH5a***

- ℵ 25mM CaCl<sub>2</sub> σε 10mM Tris-HCl pH8.0
- ℵ 75mM CaCl<sub>2</sub> σε 10mM Tris-HCl pH8.0 και 15% Glycerol
- ℵ LB υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης
- ℵ LB στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης

***2.16.7 Διαλύματα παροδικού μετασχηματισμού N. benthamiana με A. tumefaciens***

- ℵ Dilution buffer: 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MES, pH: 5.6.
- ℵ Ακετοσυριγκόνη: το πυκνό διάλυμα ακετοσυριγκόνης έχει συγκέντρωση 100 mM και φυλάσσεται στους -20°C.

**2.17 Προγράμματα νευρωνικών δικτύων πρόβλεψης τοποθέτησης πρωτεϊνών**

- ℵ WoLF PSORT II: <http://www.genscript.com/wolf-psort.html>
- ℵ PREDOTAR: <https://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>
- ℵ TargetP 1.1: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>
- ℵ ChloroP 1.1: <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>
- ℵ MITOPROT: <https://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>
- ℵ cNLS Mapper: [http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS\\_Mapper\\_form.cgi](http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi)

- ⌘ NucPred: <https://www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/>
- ⌘ NLStradamus: <http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>

## **2.18 Προγράμματα Βιοπληροφορικής και Βάσεις Δεδομένων**

- ⌘ TAIR: <https://www.arabidopsis.org/>
- ⌘ NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- ⌘ BLAST: <http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- ⌘ ExPASy: <http://www.expasy.org/>
- ⌘ GENEVESTIGATOR: <https://genevestigator.com/gv/index.jsp>
- ⌘ GENSCAN: <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>
- ⌘ NetGene2 Server: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>
- ⌘ AUGUSTUS <http://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/>

## **2.19 Λοιπά προγράμματα ανάλυσης αλληλουχιών**

Ο γονιδιωματικός χάρτης του AtLon3 (AT3G05780) δημιουργήθηκε με τα προγράμματα EditSeq 7.0.0 και MapDraw 3.08b. Για τον έλεγχο όλων των αλληλουχιών των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα PrimerSelect. Τα προαναφερθέντα προγράμματα ανήκουν στο πακέτο DNASTar Lasergene 7.0.0. Η πολλαπλή ευθυγράμμιση τόσο των νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών, που χρησιμοποιήθηκαν στην βιοπληροφορική ανάλυση, αλλά και των αποτελεσμάτων αλληλούχισης πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα CLUSTALX 1.83. Τα αποτελέσματα ανακτήθηκαν σε μορφή GCG/MSF και αναλύθηκαν με το πρόγραμμα GeneDoc MFC Application version 2.6.0.



*Αποτελέσματα*

### 3.1 Η βιοπληροφορική ανάλυση της πρωτεάσης AtLon3 υποδεικνύει σινιάλο δισυαδικής στόχευσης σε μιτοχόνδριο/χλωροπλάστη καθώς και σινιάλο NLS τοποθέτησης στον πυρήνα

Όπως προαναφέρθηκε, η πρωτεάση Lon3 αποτελεί το μοναδικό μέλος της οικογένειας Lon του *Arabidopsis thaliana*, το οποίο μέχρι πρότινος δεν είχε μελετηθεί πειραματικά. Παρά το γεγονός ότι το γονιδίωμα του *A. thaliana* έχει αλληλουχηθεί και είναι προσβάσιμο από την επιστημονική κοινότητα, η πλήρης απουσία δημοσιευμένων πειραματικών δεδομένων όσον αφορά στα προϊόντα του γονιδίου AtLon3 (mRNA και πρωτεΐνη) δυσκολεύει την ασφαλή διεξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την τοποθέτηση και τη λειτουργία του. Παρόλα αυτά, για τις ανάγκες της συγκεκριμένης πειραματικής μελέτης χρησιμοποιήθηκαν οι *in silico* προβλεπόμενες ακολουθίες του AtLon3 από το TAIR και το NCBI, οι οποίες έχουν προκύψει βάσει υπολογιστικών μεθόδων ή χειροκίνητης επιμέλειας της σχολιασμένης (annotated) γονιδιωματικής αλληλουχίας.

#### 3.1.1 Πρόβλεψη ύπαρξης μιτοχονδριακού και πιθανώς χλωροπλαστικού σινιάλου στόχευσης στο N-τελικό άκρο της πρωτεάσης AtLon3

Για την πρόβλεψη της υποκυτταρικής τοποθέτησης της πρωτεάσης AtLon3 χρησιμοποιήθηκαν τα πρώτα 150 αμινοξέα της προβλεπόμενης πρωτεΐνης, όπως αυτή διατίθεται στο TAIR και στο NCBI. Προκειμένου να οριοθετηθούν τα προβλεπόμενα πεπτίδια στόχευσης στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, οι προβλέψεις στα προγράμματα νευρωνικών δικτύων που χρησιμοποιήθηκαν διεξήχθησαν αφαιρώντας προοδευτικά από 10 αμινοξέα, με κατεύθυνση από την αρχή της πρωτεΐνης προς το κέντρο της. Τα αποτελέσματα των προβλέψεων στόχευσης συγκεντρώνονται κάτωθι, στον Πίνακα 3.1. Η αμινοξική ακολουθία του N-τελικού άκρου της πρωτεΐνης παρουσιάζεται ακολούθως.

**N-τελικό άκρο AtLon3:** mmpkrfntsg fdttlrlpsy ygflhltqsl tlnsrvfya rhvtppairi  
gsnpvqslll fraptqltgw nrssrdllgr rvsfsdrsdg vdlssspil stnplddsl tvialplphk  
plipgfympi hvkdpkvlaa lqestrqqsp

Amino acids	Targeting Prediction Programs				
	Predotar	MitoProt	TargetP	Wolf Pshort	Chloro P
<b>1-150 aa</b>	0.28 M	0.7861 M	0.587 mTP 0.045 cTP	M: 7.5, Ch/M: 6 Ch: 3.5, N: 3	0.524 cTP
<b>11-150 aa</b>	0.04 M	0.9617 M	0.531 mTP 0.077 cTP	M: 5.5, Ch/M: 6 Ch: 5.5, N: 3	0.533 cTP
<b>21-150 aa</b>	0.48 M 0.48 P	0.9541 M	0.739 mTP 0.254 cTP	M: 6.5, Ch/M: 6 Ch: 4.5, N: 3	0.540 cTP
<b>31-150 aa</b>	0.35 M 0.07 P	0.9884 M	0.580 mTP 0.352 cTP	M: 7, Ch/M: 5.8 Ch: 3.5, N: 3	0.548 cTP
<b>41-150 aa</b>	0.27 M 0.03 P	0.9621 M	0.762 mTP 0.569 cTP	M: -, Ch/M: 6.5 Ch: 11.5, N: 1	0.535 cTP
<b>51-150 aa</b>	0.04 M 0.58 P	0.7248 M	0.550 mTP 0.549 cTP	M: -, Ch/M: - Ch: 10, N: 2	0.525 cTP
<b>61-150 aa</b>	0.30 M 0.07 P	0.7081 M	0.784 mTP 0.307 cTP	M: 6, Ch/M: - Ch: 2, N: 4.5	0.478 cTP
<b>71-150 aa</b>	0.08 M	0.8220 M	0.449 mTP 0.196 cTP	M: 6.5, Ch/M: 5 Ch: 2.5, N: 3.5	0.455 cTP
<b>81-150 aa</b>	0.01 M	0.1542 M	0.085 mTP 0.257 cTP	M: 1.5, Ch/M: 3 Ch: 3.5, N: 5	0.439 cTP
<b>91-150 aa</b>	0.01 M 0.04 P	0.1241 M	0.118 mTP 0.245 cTP	M: -, Ch/M: - Ch: 2, N: 4.5	0.450 cTP
<b>100-150aa</b>	0.01M	0.0052 M	0.091 mTP 0.159 cTP	M: -, Ch/M: - Ch: -, N: 7	0.436 cTP

Πίνακας 3. 1 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα πρόβλεψης της υποκυτταρικής τοποθέτησης της πρωτεΐνης του γονιδίου AtLon3 (AT3G05780). Με «M» συμβολίζονται οι τιμές του μιτοχονδρίου, με «P» οι τιμές των πλαστιδίων, με «Ch» οι τιμές του χλωροπλάστη, με «Ch/M» οι τιμές της διπλής στόχευσης σε μιτοχόνδριο/χλωροπλάστη και με «N» οι τιμές του πυρήνα. Ως «cTP» και «mTP» συμβολίζονται οι τιμές πρόβλεψης για ύπαρξη χλωροπλαστικού και μιτοχονδριακού σινιάλου, αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα των προβλέψεων στόχευσης υποδεικνύουν ξεκάθαρα την ύπαρξη μιτοχονδριακού σινιάλου τοποθέτησης (mTP) στο N-τελικό άκρο της υπό εξέταση πρωτεΐνης, ενώ ταυτόχρονα είναι ενθαρρυντικές οι τιμές ύπαρξης χλωροπλαστικού σινιάλου τοποθέτησης (cTP) καθώς και σινιάλου τοποθέτησης της πρωτεΐνης στον πυρήνα του κυττάρου (NLS). Αναλυτικότερα, αξιολογώντας τα αποτελέσματα της στόχευσης προκύπτει ότι:



- ∑ το τμήμα της αμινοξικής ακολουθίας με τη μεγαλύτερη δυνατότητα να αποτελεί μιτοχονδριακό σινιάλο στόχευσης, βρίσκεται στην περιοχή των αμινοξέων 1-80, με τις υψηλότερες τιμές να αντιστοιχούν στα αμινοξέα 10-50.
- ∑ το σινιάλο δυαδικής στόχευσης σε μιτοχόνδριο/χλωροπλάστη φαίνεται να υπάρχει στην περιοχή των αμινοξέων 1-90, με τις υψηλότερες τιμές να αντιστοιχούν στα αμινοξέα 1-50.
- ∑ το χλωροπλαστικό σινιάλο στόχευσης φαίνεται να υπάρχει κυρίως στην περιοχή των αμινοξέων 20-60.
- ∑ το σινιάλο τοποθέτησης στον πυρήνα φαίνεται να υπάρχει μετά τα 70-80 πρώτα αμινοξέα της πρωτεΐνης.

### ***3.1.2 Η πρωτεάση AtLon3 αποτελεί το μοναδικό μέλος της οικογένειας Lon του A. thaliana που διαθέτει σινιάλο NLS στόχευσης στον πυρήνα του κυττάρου***

Τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης της πιθανής υποκυτταρικής τοποθέτησης της πρωτεάσης AtLon3, υποδεικνύουν ότι το γονίδιο συν τοις άλλους φέρει σινιάλο τοποθέτησης στον πυρήνα του κυττάρου (NLS). Η παρατήρηση αυτή αυτομάτως διαφοροποιεί τη Lon3 από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας, καθώς κανένα άλλο δεν διαθέτει NLS. Προκειμένου να ενισχυθούν τα αποτελέσματα των προβλέψεων στόχευσης, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω βιοπληροφορική ανάλυση με προγράμματα νευρωνικών δικτύων που προβλέπουν την παρουσία NLS στην υπό εξέταση αμινοξική ακολουθία και υποδεικνύουν τα πιθανά αμινοξέα που αποτελούν το NLS. Τα προγράμματα νευρωνικών δικτύων που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα cNLS Mapper, NucPred και NLStradamus και τα αποτελέσματά τους παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.1**. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ολόκληρη η προτεινόμενη αμινοξική ακολουθία της πρωτεάσης AtLon3 όπως αυτή δίνεται στο TAIR και στο NCBI.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τα προγράμματα πρόβλεψης NLS, προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- ∑ Τα τρία προγράμματα συμφωνούν για την ύπαρξη ενός σινιάλου NLS στο N-τελικό άκρο της πρωτεάσης AtLon3.
- ∑ Η προβλεπόμενη περιοχή που πιθανώς αποτελεί το σινιάλο NLS βρίσκεται μεταξύ των αμινοξέων 178 έως 196 και είναι η ακόλουθη:

**KFKVKGKPKKKRRKELLNR**

Με έντονη γραφή σημειώνονται τα αμινοξέα εκείνα που είναι κοινά και στις τρεις προβλεπόμενες αλληλουχίες.

## A. NucPred

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

```

1  MMPKRFNTSGFDITLRLPSYYGFLHLTQSLTLNSRVFYGARHVTPPAIRI 50
51  GSNPVQSLLLFRAPTQLTGMNRSRDLLGRRVSFSDRSQDGLLSSSPIL 100
101 STNPNLDDSLTVIALPLPHKPLIPGFYMPIHVKDPKVLAAEQESTRQQSP 150
151 YVGAFLLKDCASTDSSSRSETEDNVVEKFKVKGKPKKKRRKELLNRIHQV 200
201 GTLAQISSIQGEQVILVGRRRLLIEEMVSEDP LTVRV D H L K D K P Y D K D N A 250
251 VIKASYVEVISTLREVLKTNLSLRDQD I G D F S Y Q H L A D F G A G I S G A N K H K 300
301 NQGVLTLDVHKRLELTELKVKQVEINIKIKETDQDSSLSAKIRVRIDTK 350
351 RDKIPKHVIKVMEEFETKLEMLNLEENYSDFDLTYNYLHMLTVLPKGNFSYE 400
401 NFDVLRRAKILDEEDHYGLSDVKERLLEFIAVGRRLRGTSGQKIIICLSGPPG 450
451 VGKTSIGRSIARALDRKFRFVSGGLSDVAEIKGHCQTYVYVAMPKGMVQC 500
501 LKSVGTANPLILFDEIDKLGRCHTGDPASALLEVMDFEQNAKFLDHF LNV 550
551 TIDLKVLVCTANVIEMIPGPLDRMEVIDLSGYVTDEKMHIAARDYLK 600
601 KTCRDCGKPEHVDLSAALLSLEIENYCREAGVRNLQKQIEKIRKVALE 650
651 LVRQGAVSFDVTDTKDTSKAKTDS EVKRMK VADIMKIL ESATGDSTESK 700
701 TKQSGLVAKTFEKVMIDESNLADYVGGKPVFQEEKYEQTPVGVVWGLAWT 750
751 SMGGSTLYIETTFVEEGLGKGLHITGQLGDMKESQAIAHTVARRIMFE 800
801 KEPENLFFANSKLLHVPPEGATPKDGPAGCTMITSFLSAMKCLVRKDL 850
851 AMTGEVLTGRILPIGGVKEKTAARRSQIKTIIIFPEANRRDFEELAEAN 900
901 KEGLDVHFVDEYEKIFDLAFNYDH 924
    
```

Predicted monopartite NLS		
Pos.	Sequence	Score
183	GKPKKKRRKE	10.5
183	GKPKKKRRKEL	9.5
184	KPKKKRRKEL	9
185	PKKKRRKELL	12

## B2. cNLS Mapper

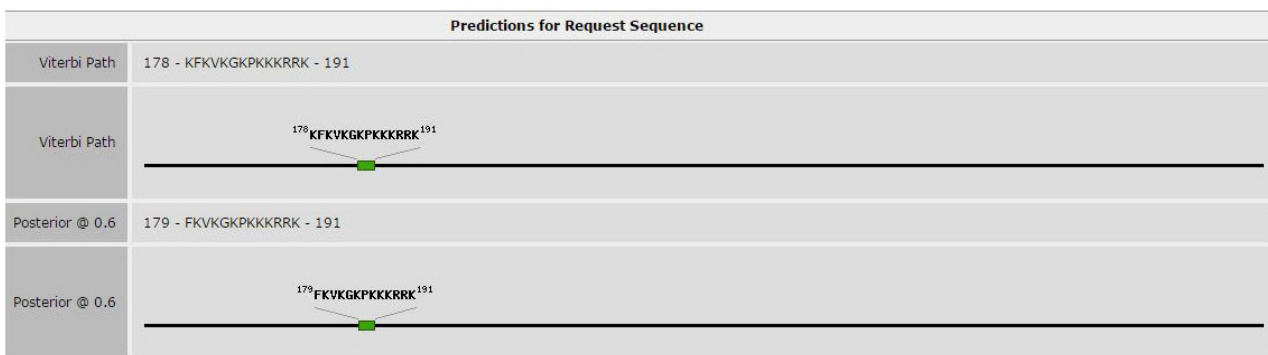
## B1. cNLS Mapper

Predicted NLSs in query sequence	
MMPKRFNTSGFDITLRLPSYYGFLHLTQSLTLNSRVFYGARHVTPPAIRI	50
GSNPVQSLLLFRAPTQLTGMNRSRDLLGRRVSFSDRSQDGLLSSSPIL	100
STNPNLDDSLTVIALPLPHKPLIPGFYMPIHVKDPKVLAAEQESTRQQSP	150
YVGAFLLKDCASTDSSSRSETEDNVVEKFKVKGKPKKKRRKELLNRIHQV	200
GTLAQISSIQGEQVILVGRRRLLIEEMVSEDP LTVRV D H L K D K P Y D K D N A	250
VIKASYVEVISTLREVLKTNLSLRDQD I G D F S Y Q H L A D F G A G I S G A N K H K	300
NQGVLTLDVHKRLELTELKVKQVEINIKIKETDQDSSLSAKIRVRIDTK	350
RDKIPKHVIKVMEEFETKLEMLNLEENYSDFDLTYNYLHMLTVLPKGNFSYE	400
NFDVLRRAKILDEEDHYGLSDVKERLLEFIAVGRRLRGTSGQKIIICLSGPPG	450
VGKTSIGRSIARALDRKFRFVSGGLSDVAEIKGHCQTYVYVAMPKGMVQC	500
LKSVGTANPLILFDEIDKLGRCHTGDPASALLEVMDFEQNAKFLDHF LNV	550
TIDLKVLVCTANVIEMIPGPLDRMEVIDLSGYVTDEKMHIAARDYLK	600
KTCRDCGKPEHVDLSAALLSLEIENYCREAGVRNLQKQIEKIRKVALE	650
LVRQGAVSFDVTDTKDTSKAKTDS EVKRMK VADIMKIL ESATGDSTESK	700
TKQSGLVAKTFEKVMIDESNLADYVGGKPVFQEEKYEQTPVGVVWGLAWT	750
SMGGSTLYIETTFVEEGLGKGLHITGQLGDMKESQAIAHTVARRIMFE	800
KEPENLFFANSKLLHVPPEGATPKDGPAGCTMITSFLSAMKCLVRKDL	850
AMTGEVLTGRILPIGGVKEKTAARRSQIKTIIIFPEANRRDFEELAEAN	900
KEGLDVHFVDEYEKIFDLAFNYDH	924

Positively and negatively influencing subsequences are coloured according to the following scale:

(non-nuclear) negative ||||| positive (nuclear)

## C. NLStradamus



Εικόνα 3. 1 Στην εικόνα συνοψίζονται τα αποτελέσματα της πρόβλεψης ύπαρξης και προσδιορισμού ενός σινιάλου NLS στην αμινοξική ακολουθία της πρωτεάσης AtLon3.

(A) Πρόγραμμα NucPred. Το προβλεπόμενο σινιάλο NLS υποδεικνύεται με υπογράμμιση πάνω στην αμινοξική ακολουθία. Τα χρώματα των αμινοξέων ερμηνεύονται από το αντίστοιχο διάγραμμα στο κάτω μέρος της αμινοξικής ακολουθίας, ξεκινώντας από τα αρνητικά (δεν αντιστοιχούν σε πυρήνα) προς τα θετικά (αντιστοιχούν σε πυρήνα).

(B1) & (B2) Πρόγραμμα cNLS Mapper. Στην εικόνα B1 υποδεικνύεται με κόκκινο χρώμα η προτεινόμενη αμινοξική ακολουθία του NLS, ενώ στην εικόνα B2 παρουσιάζεται μια λίστα με την πιθανή αμινοξική σύσταση της ακολουθίας και την πιθανότητα να αποτελεί NLS.

(C) Πρόγραμμα NLStradamus. Η ακολουθία του προβλεπόμενου σινιάλου NLS τοποθετείται σχηματικά πάνω στον χάρτη της πρωτεΐνης.

Την υπόθεση ότι η πρωτεάση AtLon3 διαθέτει σινιάλο NLS που εντοπίζεται στην προαναφερθείσα αλληλουχία, ενισχύει επίσης το γεγονός ότι η πολλαπλή στοίχιση των αμινοξικών ακολουθιών της οικογένειας Lon του *A. thaliana* παρουσιάζει κενό στο συγκεκριμένο σημείο, όπως υποδεικνύεται στην Εικόνα 3.2. Η παρατήρηση αυτή δείχνει πως η συγκεκριμένη ακολουθία αποτελεί ένα γνώρισμα που χαρακτηρίζει μόνο την πρωτεάση AtLon3 μεταξύ των υπόλοιπων μελών της οικογένειας. Συνεπώς,

όλα τα στοιχεία συγκλίνουν στο ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη έχει καλή πιθανότητα στόχευσης στον πυρήνα.

```
At3g05780 : AALQESTRQCSPYVGAFLKLCASIDSSSRSETEEDNVVEKFKVKGKPKKRSKELLNRIHQVGTLAQISSIQGEQVILVGRRRR  
At3g05790 : AALQESFRQQAPYAGAFLLKDIASSDSSSSSETEI-ILEKIKGK-----ELINRIHEVGTLAQISSIQGEQVILIGHRQ  
At5g26860 : AALQESFRQQAPYAGAFLLKDISSADSSSSIDAEK-NINELKGG-----ELLNRLHEVGTLAQISSIQGEQVILVGRRRR  
At4g47040 : VGTDDAQKSDIKDQDLQWHTRG---VAARALHLSRQVEKPSGR-----VTYVVVVEGLSRFNVQELGKRRGI  
aalges 4 gapy gafilkd s dsss e 6ek kg4 el nr h Vgt6aq6ss6gq qVil6G R
```

Εικόνα 3. 2 Πολλαπλή στοίχιση των αμινοξικών ακολουθιών της οικογένειας Lon του *A. thaliana*. Η περιοχή της προτεινόμενης ακολουθίας του σινιάλου NLS της πρωτεΐνης AtLon3 (At3g05780) έχει σκιαστεί με κόκκινο χρώμα. Είναι φανερό ότι αυτή η αλληλουχία υπάρχει μόνο στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη καθώς όλες οι άλλες δημιουργούν κενό στο υποφαινόμενο σημείο.

### 3.2 Η υποκλωνοποίηση του γονιδίου *AtLon3* σε μια σειρά κατασκευές και η παροδική έκφραση τους στο φυτό *N. benthamiana* καταδεικνύει ότι υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες η παραγόμενη πρωτεΐνη τοποθετείται στα μιτοχόνδρια και στον πυρήνα του κυττάρου

Για την αποσαφήνιση της υποκυτταρικής τοποθέτησης της πρωτεΐνης AtLon3, σχεδιάστηκε μια σειρά κατασκευών, με βασικό κορμό τη γονιδιοματική ακολουθία του γονιδίου *AtLon3* σε σύντηξη με το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη φθορίζουσα πρωτεΐνη YFP (Yellow Fluorescence Protein) και το επιτόπιο FLAG. Οι κατασκευές αυτές διαφοροποιούνται στο 5' άκρο του γονιδίου βάσει της βιοπληροφορικής ανάλυσης, αλλά και στον υποκινητή που χρησιμοποιείται για να ελέγξει την έκφρασή τους.

#### 3.2.1 Στρατηγική σχεδιασμού και υποκλωνοποίησης του γονιδίου *AtLon3* για τη δημιουργία των κατασκευών που τέθηκαν υπό τον έλεγχο του υποκινητή *CaMV35S*

Όπως προαναφέρθηκε, τα παραγόμενα προϊόντα του γονιδίου *AtLon3* δεν είναι πειραματικώς αποδεδειγμένα. Αυτό ισχύει και για το 5' άκρο του γονιδίου που εσωκλείει το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης και την ακολουθία που το περικλείει και αναγνωρίζεται από το ριβόσωμα (context of translation initiation). Η κατάσταση αυτή δημιούργησε την ανάγκη εκτός από την υποκυτταρική τοποθέτηση της παραγόμενης πρωτεΐνης, που είναι ενδεικτική της λειτουργίας της, να αποσαφηνιστεί ταυτόχρονα ότι το προτεινόμενο κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης είναι το πραγματικό. Για το λόγο αυτό σχεδιάστηκαν τρεις κατασκευές του γονιδίου

*AtLon3* σε σύντηξη με το YFP και το FLAG, οι οποίες τέθηκαν υπό τον έλεγχο του καθολικά εκφραζόμενου υποκινητή CaMV35S και είχαν σκοπό να απαντήσουν τα ερωτήματα σχετικά με την τοποθέτηση της πρωτεΐνης και να δώσουν μια ένδειξη όσον αφορά το εναρκτήριο κωδικόνιο. Η λίστα με τις ακολουθίες των εκκινητών, η αναλυτική πορεία των κλωνοποιήσεων και τα αποτελέσματα των αλληλουχίσεων (sequencing) που επιβεβαιώνουν την ορθότητα των κατασκευών αναφέρονται αναλυτικά στο Παράρτημα.

✓ ***Κατασκευή 35S::Lon3:YFP:FLAG-MM***

Η πρώτη κατασκευή που σχεδιάστηκε αποτελείται από ολόκληρη τη γονιδιωματική αλληλουχία του *AtLon3*, όπως αυτή δίνεται στο TAIR, ξεκινώντας από την αλληλουχία που περιβάλλει τις δύο συνεχόμενες τριπλέτες ATG, η πρώτη εκ των οποίων αποτελεί την προτεινόμενη έναρξη του γονιδίου *AtLon3*. Σχεδιάστηκαν εκκινητές κατάλληλοι για την ενίσχυση ολόκληρης της γονιδιωματικής περιοχής και τη μετέπειτα κλωνοποίησή της:

Ορθός εκκινητής [**Lon3-Met-For**] → δημιουργεί τεχνητά μια θέση αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης SmaI ακριβώς πριν το context του ATG.

Ανάστροφος εκκινητής [**Lon3-Rev-FLAG**] → αλλάζει το υπάρχον κωδικόνιο λήξης του γονιδίου, δημιουργεί τεχνητά μια θέση αναγνώρισης της MluI, εισάγει το επιτόπιο FLAG και δημιουργεί ένα νέο κωδικόνιο λήξης στο τέλος της αλληλουχίας του γονιδίου.

Το αναμενόμενο μέγεθος του ενισχυόμενου τμήματος είναι 4718 ζ.β.

✓ ***Κατασκευή 35S::Lon3:YFP:FLAG-ΔMM***

Η κατασκευή αυτή σχεδιάστηκε έτσι ώστε να προκληθεί τεχνητή αλλαγή των δύο συνεχόμενων κωδικονίων ATG που εντοπίζονται στο 5' άκρο του γονιδίου, το πρώτο εκ των οποίων αποτελεί το προτεινόμενο κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης. Ο σκοπός αυτής της αλλαγής ήταν να διερευνηθεί εάν κάποιο από αυτά τα δύο ATG αποτελεί όντως το εναρκτήριο κωδικόνιο. Κατ' αυτόν τον τρόπο μπορεί να ελεγχθεί εάν το γονίδιο εκφράζεται κανονικά ή όχι, μέσω της ανίχνευσης ή μη ανίχνευσης του φθορισμού της πρωτεΐνης YFP, που έχει συντηχθεί με το γονίδιο και εκφράζεται μόνο όταν εκφράζεται αυτό. Σχεδιάστηκαν εκκινητές κατάλληλοι για την ενίσχυση ολόκληρης της γονιδιωματικής περιοχής και τη μετέπειτα κλωνοποίησή της:

Ορθός εκκινητής [**Lon3-w/o-Met-For**] → δημιουργεί τεχνητά μια θέση αναγνώρισης της SmaI ακριβώς πριν το context του ATG και ταυτόχρονα αλλάζει τα δύο ATG σε AAAAAA.

Ανάστροφος εκκινητής [**Lon3-Rev-FLAG**] → όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Το αναμενόμενο μέγεθος του ενισχυόμενου τμήματος είναι 4718 ζ.β.

✓ **Κατασκευή 35S::Lon3:YFP:FLAG-ΔTP**

Η κατασκευή αυτή σχεδιάστηκε με σκοπό να αφαιρεθεί το μιτοχονδριακό σινιάλο από την ακολουθία του γονιδίου, ώστε να φανεί αν το προβλεπόμενο σινιάλο NLS οδηγεί όντως την παραγόμενη πρωτεΐνη στον πυρήνα του κυττάρου. Το μέγεθος του 5' άκρου του γονιδίου *AtLon3* που έπρεπε να αφαιρεθεί, ώστε να χαθεί κατά το δυνατόν το μιτοχονδριακό σινιάλο, υπολογίστηκε βάσει της βιοπληροφορικής ανάλυσης στόχευσης που είχε ήδη πραγματοποιηθεί για το N-τελικό άκρο της προβλεπόμενης πρωτεΐνης. Όπως παρουσιάστηκε και ανωτέρω (**Ενότητα 3.1.1, Πίνακας 3.1**), τα αποτελέσματα της ανάλυσης του N-τελικού άκρου έδειξαν ότι οι τιμές πρόβλεψης του μιτοχονδριακού σινιάλου παρουσιάζουν αξιοσημείωτη πτώση όταν λείπει η περιοχή των 80 πρώτων αμινοξέων, ενώ ταυτόχρονα αρχίζει και αυξάνεται η τιμή πρόβλεψης τοποθέτησης στον πυρήνα. Συνεπώς, η κατασκευή σχεδιάστηκε έτσι ώστε το γονίδιο να υπολείπεται των πρώτων 390 νουκλεοτιδίων, που αντιστοιχούν στα 85 πρώτα αμινοξέα της προβλεπόμενης παραγόμενης πρωτεΐνης. Προκειμένου να ξεκινήσει κανονικά η έναρξη της μετάφρασης, η τριπλέτα GAT που κωδικοποιεί για το αμινοξύ D<sub>86</sub> μετατράπηκε τεχνητά σε ATG. Παράλληλα, προστέθηκε τεχνητά το ισχυρό kozak consensus των ευκαρυωτών, CCACC, πριν το τεχνητό ATG, ώστε να διασφαλιστεί η πρόσδεση του ριβοσώματος. Σχεδιάστηκαν εκκινητές κατάλληλοι για την ενίσχυση ολόκληρης της γονιδιωματικής περιοχής και τη μετέπειτα κλωνοποίησή της:

Ορθός εκκινητής [**Lon3-For-w/o-TP**] → δημιουργεί τεχνητά μια θέση αναγνώρισης της SmaI και προσθέτει το context CCACC και το ATG στη θέση της τριπλέτας GAT<sub>256-8</sub>.

Ανάστροφος εκκινητής [**Lon3-Rev-FLAG**] → όπως περιγράφηκε παραπάνω.

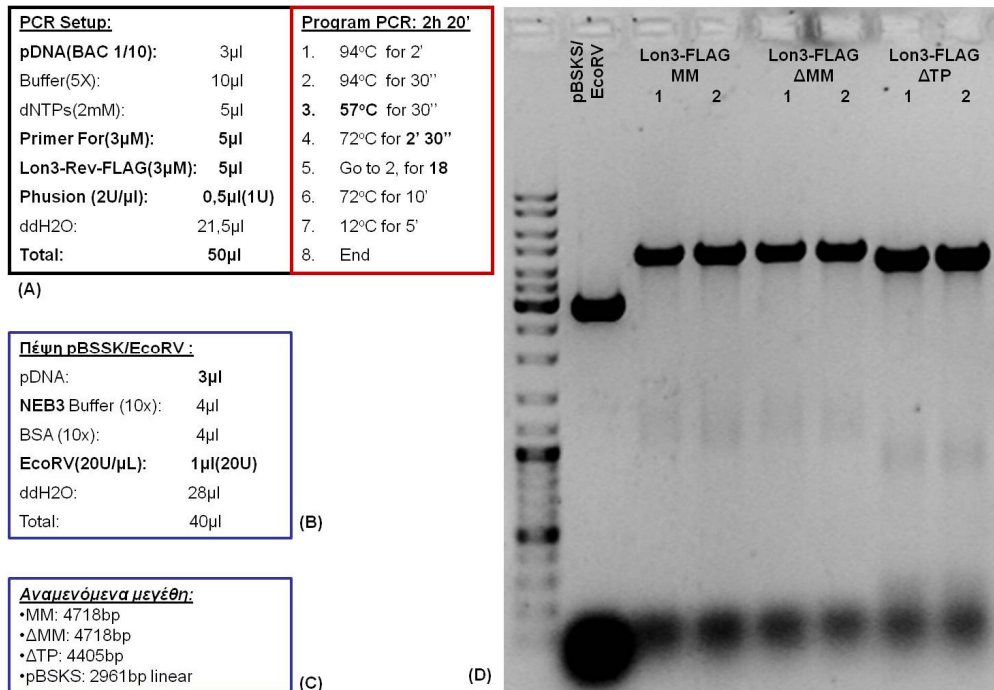
Το αναμενόμενο μέγεθος του ενισχυόμενου τμήματος είναι 4405 ζ.β.

Η στρατηγική υποκλωνοποίησης του γονιδίου *AtLon3* που ακολουθήθηκε για τη δημιουργία των προαναφερθέντων κατασκευών, ήταν κοινή και για τις τρεις:

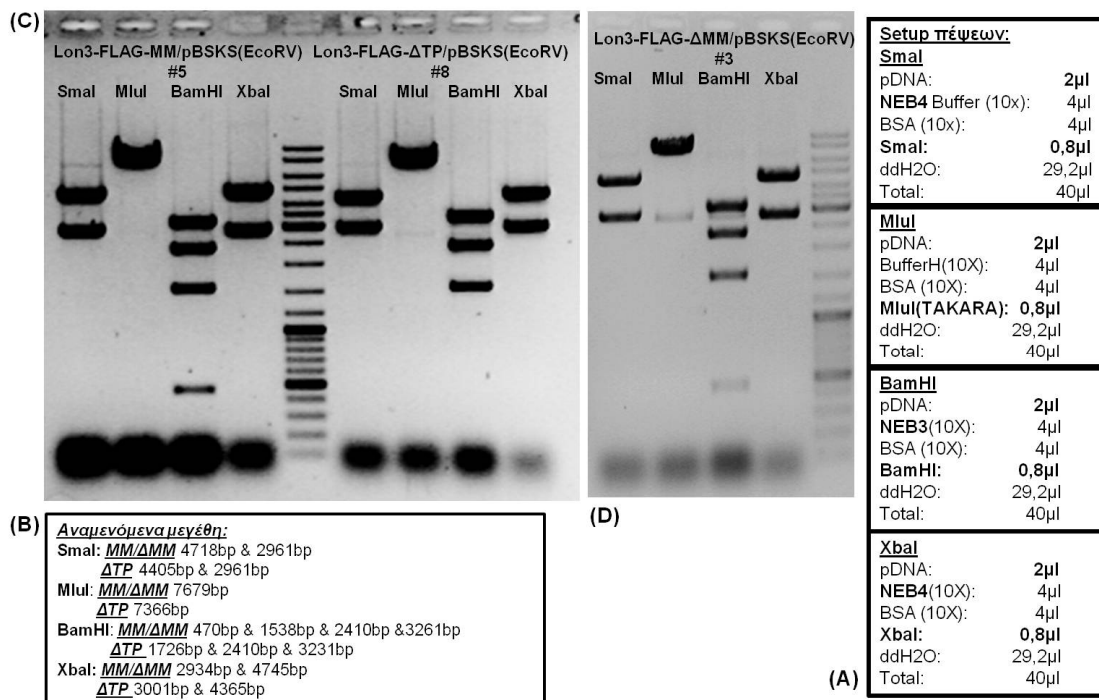
Η επιθυμητή περιοχή του γονιδίου ενισχύθηκε με PCR (**Εικόνα 3.3**) από το εκάστοτε ζεύγος εκκινητών (όπως αυτοί περιγράφηκαν παραπάνω) από τον κλώνο **BAC F10A16** που περιέχει μέσα την περιοχή του χρωμοσώματος III του *A. thaliana*, στην οποία υπάρχει και η γονιδιωματική ακολουθία του γονιδίου *AtLon3* (F10A16.7). Η PCR πραγματοποιήθηκε με χρήση της Phusion<sup>®</sup> HF Polymerase, η οποία δημιουργεί στο παραγόμενο προϊόν τυφλά άκρα. Η ικανότητα αυτή της πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε ώστε τα ενισχυόμενα τμήματα DNA να εισαχθούν σε πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης pBlueScript II KS (Agilent Technologies, former Stratagene), ο οποίος είχε προηγουμένως κοπεί με το ένζυμο EcoRV(NEB) που δημιουργεί επίσης τυφλά άκρα (**Εικόνα 3.3**). Οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι επιλέχθηκαν με την επιλογή της α-συμπληρωματικότητας και η επιθυμητή φορά εισαγωγής του γονιδίου μέσα στον φορέα ταυτοποιήθηκε με πέψη με XbaI (NEB). Έπειτα, επιλέχθηκαν τρεις κλώνοι για την κάθε κατασκευή, ένας εκ των οποίων υποβλήθηκε σε επιβεβαιωτικές πέψεις με τα ένζυμα SmaI, BamHI (NEB) και MluI (TaKaRa) (**Εικόνα 3.4**). Οι κλώνοι που επιλέχθηκαν να σταλθούν για αλληλούχιση, φυλάχθηκαν σε στοκ γλυκερόλης στους -80°C και είναι οι ακόλουθοι:

- ✓ **Lon3:FLAG-MM/pBSKS(EcoRV) #5**
- ✓ **Lon3:FLAG-ΔMM/pBSKS(EcoRV) #3**
- ✓ **Lon3:FLAG-ΔTP/pBSKS(EcoRV) #8**

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης (Παράρτημα) έδειξαν ότι μέσω των εκκινητών επετεύχθησαν οι επιθυμητές αλλαγές που προαναφέρθηκαν για την κάθε κατασκευή. Επίσης, έδειξαν ότι η αντίδραση της PCR ήταν απόλυτα επιτυχής και δεν προκλήθηκε κάποια αλλαγή βάσης που θα μπορούσε να επηρεάσει το παραγόμενο προϊόν. Βάσει αυτού, ακολούθησε η προσθήκη του YFP στους κλώνους.



**Εικόνα 3. 3** Αποτελέσματα ενίσχυσης μέσω PCR του γονιδίου *AtLon3* για τις κατασκευές MM, ΔMM, ΔTP. (A) Σχεδιασμός αντίδρασης PCR και προγράμματος θερμοκύκλων. (B) Σχεδιασμός πέψης του πλασμιδιακού φορέα pBSSK με EcoRV για την υποκλωνοποίηση των προϊόντων της PCR. (C) Αναμενόμενα μεγέθη των αντιδράσεων. (D) Αποτύπωση της ανάλυσης των προϊόντων των αντιδράσεων σε ηλεκτρική αгарόζης 0.8%.

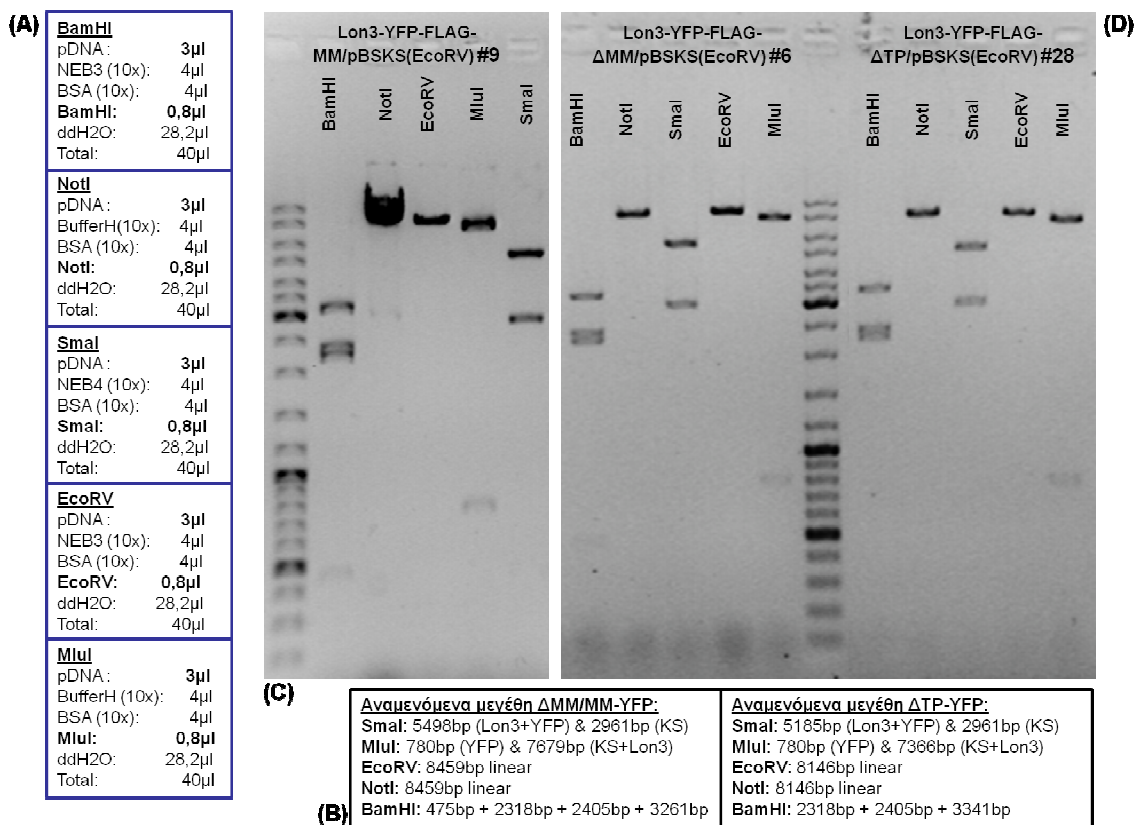


**Εικόνα 3. 4** Αποτελέσματα επιβεβαιωτικών πέψεων των επιλεγμένων κλώνων των κατασκευών MM, ΔMM, ΔTP στον φορέα pBSSK. (A) Σχεδιασμός αντιδράσεων πέψης με τα ένζυμα SmaI, MluI, BamHI, XbaI. (B) Αναμενόμενα μεγέθη πέψεων. (C) και (D) Αποτύπωση της ανάλυσης των προϊόντων των πέψεων σε ηλεκτρική αгарόζης 0.8%.

Το YFP αποκόπηκε από τον φορέα pUC19 που είναι κλωνοποιημένο, με το ένζυμο MluI (TaKaRa), η θέση αναγνώρισης του οποίου έχει προστεθεί τεχνητά στα άκρα

του. Το ένζυμο MluI χρησιμοποιήθηκε και για την πέψη καθεμίας εκ των κατασκευών που προαναφέρθηκαν. Ακολούθησε αντίδραση λιγοποίησης ώστε να εισαχθεί το YFP στη θέση MluI της κάθε κατασκευής. Η ταυτοποίηση της παρουσίας και της επιθυμητής φοράς της ένθεσης του YFP στους μετασχηματισμένους κλώνους πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία της PCR αποικιών και στη συνέχεια ακολούθησαν διαγνωστικές πέψεις με NotI και BamHI (NEB) (Παράρτημα). Επιλέχθηκαν δύο κλώνοι για την κάθε κατασκευή, ο ένας εκ των οποίων υποβλήθηκε σε επιβεβαιωτικές πέψεις με τα ένζυμα SmaI, EcoRV και MluI (Εικόνα 3.5). Οι ορθοί κλώνοι που επιλέχθηκαν για να συνεχιστεί η κλωνοποίηση στον δυαδικό φορέα και φυλάχθηκαν ως στοκ γλυκερόλης στους  $-80^{\circ}\text{C}$  είναι οι ακόλουθοι:

- ✓ **Lon3:YFP:FLAG-MM/pBSKS(EcoRV) #9**
- ✓ **Lon3:YFP:FLAG-ΔMM/pBSKS(EcoRV) #6**
- ✓ **Lon3:YFP:FLAG-ΔTP/pBSKS(EcoRV) #28**



**Εικόνα 3. 5** Αποτελέσματα επιβεβαιωτικών πέσεων της ορθής ένθεσης του YFP στους επιλεγμένους κλώνους των κατασκευών MM, ΔMM, ΔTP/pBSKS. (A) Σχεδιασμός αντιδράσεων πέψης. (B) Αναμενόμενα μεγέθη πέσεων. (C) και (D) Αποτύπωση της ανάλυσης των προϊόντων των πέσεων σε πηκτή αгарόζης 0.8%.

Μετά την επιτυχή εισαγωγή του YFP στους κλώνους που φέρουν τις 3 διαφορετικές κατασκευές του γονιδίου *AtLon3*, ήταν απαραίτητο να απομονωθεί ολόκληρο το



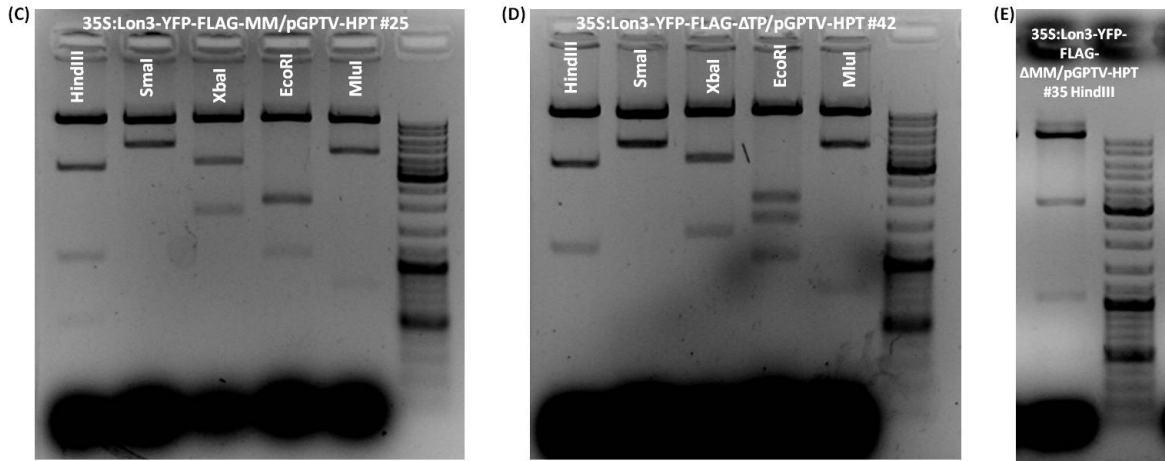
κομμάτι Lon3:YFP:FLAG από τον φορέα κλωνοποίησης pBSKS και να εισαχθεί στο δυαδικό φορέα 35S/pGPTV-HPT. Ο φορέας αυτός φέρει τον υποκινητή 35S CaMV, την ακολουθία pApos, που αποτελεί το σινιάλο τερματισμού της έκφρασης του γονιδίου της συνθάσης της νοπαλίνης, καθώς και το δεξί (RB) και το αριστερό συνοριακό (LB) του T-DNA, που περικλείουν και σηματοδοτούν το τμήμα του DNA που θα μεταφερθεί στο φυτό μετά τον μετασχηματισμό. Τόσο ο δυαδικός φορέας όσο και οι κλώνοι με τις κατασκευές κόπηκαν με το ένζυμο SmaI. Στις κατασκευές η SmaI έχει εισαχθεί τεχνητά στην αρχή του γονιδίου με τον ορθό εκκινητή ενώ ταυτόχρονα αξιοποιείται η αντίστοιχη θέση αναγνώρισης του pBSKS, που εντοπίζεται μετά το τέλος του γονιδίου. Ακολουθεί αντίδραση λιγοποίησης για την εισαγωγή του τμήματος Lon3:YFP:FLAG στη θέση SmaI του δυαδικού φορέα. Η ταυτοποίηση της παρουσίας και της επιθυμητής φοράς της εκάστοτε ένθεσης στους μετασχηματισμένους κλώνους πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία της PCR αποικιών και στη συνέχεια ακολούθησε διαγνωστική πέψη με HindIII (NEB) (Παράρτημα). Επιλέχθηκε ένας κλώνος για την κάθε κατασκευή, ο οποίος υποβλήθηκε σε επιβεβαιωτικές πέψεις με τα ένζυμα SmaI, MluI, XbaI και EcoRI (Εικόνα 3.6). Οι κλώνοι που επιλέχθηκαν για να εισαχθούν στο *Agrobacterium tumefaciens* και φυλάχθηκαν ως στοκ γλυκερόλης στους -80°C είναι οι ακόλουθοι:

- ✓ **35S::Lon3:YFP:FLAG-MM/pGPTV-HPT(SmaI) #25 (DH5a)**
- ✓ **35S::Lon3:YFP:FLAG-ΔMM/pGPTV-HPT(SmaI) #35 (DH5a)**
- ✓ **35S::Lon3:YFP:FLAG-ΔTP/pGPTV-HPT(SmaI) #42 (DH5a)**

Οι δυαδικοί φορείς με τις τελικές κατασκευές του γονιδίου *AtLon3* χρησιμοποιήθηκαν για να μετασχηματιστούν μέσω ηλεκτροπόρωσης στελέχη GV3101 του *Agrobacterium tumefaciens*. Επιλέχθηκαν δύο κλώνοι για την κάθε κατασκευή και φυλάχθηκαν ως στοκ γλυκερόλης στους -80°C:

- ✓ **35S::Lon3:YFP:FLAG-MM/pGPTV-HPT #A & #B (GV3101)**
- ✓ **35S::Lon3:YFP:FLAG-ΔMM/pGPTV-HPT #A & #B (GV3101)**
- ✓ **35S::Lon3:YFP:FLAG-ΔTP/pGPTV-HPT #A & #B (GV3101)**

Σχηματική αναπαράσταση των εν λόγω κατασκευών παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.7**.



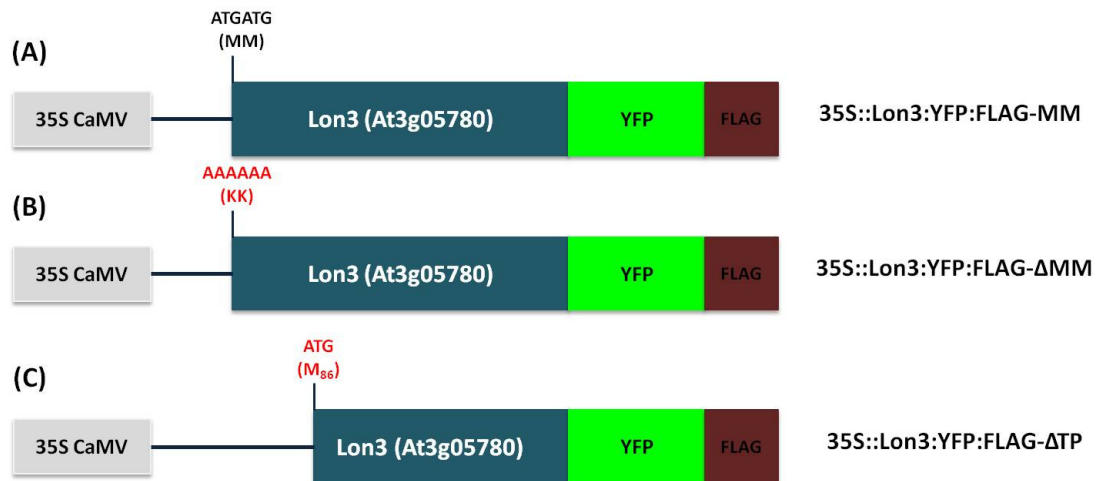
(A)

<u>HindIII</u>	<u>SmaI</u>	<u>MluI</u>	<u>XbaI</u>	<u>EcoRI</u>
pDNA: 3μl	pDNA: 3μl	pDNA: 3μl	pDNA: 3μl	pDNA: 3μl
NEB2 Buffer (10x): 4μl	NEB4 Buffer (10x): 4μl	BufferH(10X): 4μl	NEB4(10X): 4μl	RI Buffer(10X): 4μl
BSA (10x): 4μl	BSA (10x): 4μl	BSA (10X): 4μl	BSA (10X): 4μl	BSA (10X): 4μl
HindIII: 0,8μl	SmaI: 0,8μl	MluI: 0,8μl	XbaI: 0,8μl	EcoRI: 0,8μl
ddH <sub>2</sub> O: 28,2μl	ddH <sub>2</sub> O: 28,2μl	ddH <sub>2</sub> O: 29,2μl	ddH <sub>2</sub> O: 28,2μl	ddH <sub>2</sub> O: 28,2μl
Total: 40μl	Total: 40μl	Total: 40μl	Total: 40μl	Total: 40μl

(B)

<u>Αναμενόμενα μεγέθη MM/ΔMM:</u>	<u>Αναμενόμενα μεγέθη ΔTP:</u>
HindIII: 95bp & 520bp & 1085bp & 3490bp & 13293bp	HindIII: 95bp & 1200bp & 3490bp & 13293bp
SmaI: 5483bp & 13.000 bp	SmaI: 5088bp & 13000bp
XbaI: 1830bp & 3653bp & 13000 bp	XbaI: 1435bp & 3653bp & 13000bp
EcoRI: 155bp & 300bp & 1093bp & 2090 bp & 2145bp & 12700bp	EcoRI: 155bp & 300bp & 1093bp & 1695bp & 2145bp & 12700bp
MluI: 780bp & 17703bp	MluI: 780bp & 17308bp

Εικόνα 3. 6 Αποτέλεσμα των επιβεβαιωτικών πέσεων των τελικών κατασκευών Lon3:YFP:FLAG-MM/ΔMM/ΔTP στο δυαδικό φορέα 35S/pGPTV-HPT. (A) Σχεδιασμός αντιδράσεων πέσης. (B) Αναμενόμενα μεγέθη πέσεων. (C), (D) και (E) Αποτύπωση της ανάλυσης των προϊόντων των πέσεων για την κάθε κατασκευή σε πηκτική αгарόζης 0.8%. Στον κλώνο 35S::Lon3:YFP:FLAG-ΔMM/pGPTV-HPT παρουσιάζεται μόνο η διαγνωστική πέση με HindIII.



Εικόνα 3. 7 Σχηματική αναπαράσταση των τριών κατασκευών του γονιδίου AtLon3 σε σύντηξη με το γονίδιο YFP και το επιτόπιο FLAG, υπό την καθοδήγηση του καθολικού υποκινητή CaMV 35S για τη διερεύνηση της υποκυτταρικής τοποθέτησης της πρωτεΐνης AtLON3. (A) Κατασκευή 35S::Lon3:YFP:FLAG-MM (B) Κατασκευή 35S::Lon3:YFP:FLAG-ΔMM (C) Κατασκευή 35S::Lon3:YFP:FLAG-ΔTP. Στην αρχή του γονιδίου στην κάθε κατασκευή αναγράφεται η νουκλεοτιδική ακολουθία και τα αμινοξέα που κωδικοποιεί, συμβολίζοντας με κόκκινο χρώμα τις αλλαγές που έχουν πραγματοποιηθεί τεχνητά στο 5' άκρο του γονιδίου κατά την κλωνοποίηση.

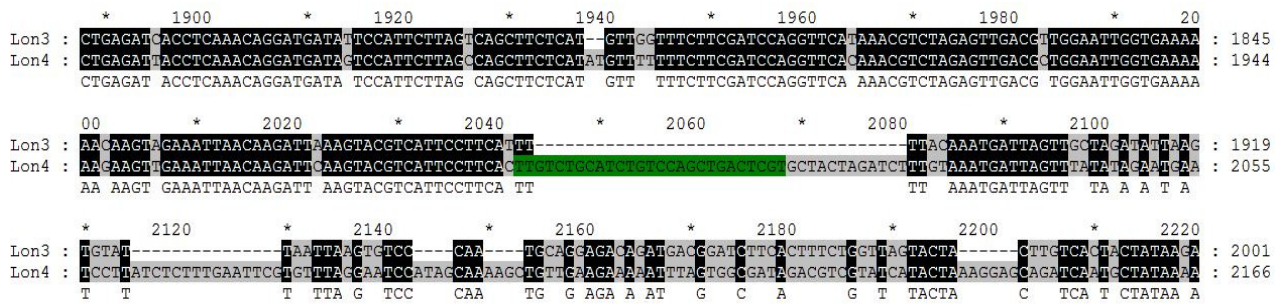
### 3.2.2 Στρατηγική σχεδιασμού και υποκλωνοποίησης του γονιδίου *AtLon3* για τη δημιουργία της κατασκευής που τέθηκε υπό τον έλεγχο του ενδογενούς υποκινητή του (*pLon3*)

Εκτός από τις κατασκευές που προαναφέρθηκαν, προέκυψε η ανάγκη να σχεδιαστεί μια κατασκευή του γονιδίου *AtLon3* σε σύντηξη με το YFP και το FLAG, η οποία να τεθεί υπό τον έλεγχο του ενδογενούς υποκινητή του *AtLon3*. Ο υποκινητής 35S CaMV χρησιμοποιείται ευρέως στα φυτά σε μελέτες που αφορούν τη διερεύνηση της υποκυτταρικής στόχευσης μέσω ετερόλογου παροδικού μετασχηματισμού του *Nicotiana benthamiana*, διότι είναι συνεχώς και καθολικά εκφραζόμενος. Αυτό σημαίνει ότι δεν υπάγεται σε ρύθμιση, αλλά προκαλεί τη συνεχή έκφραση του γονιδίου που καθοδηγεί, στα περισσότερα όργανα και ιστούς του φυτού. Παρόλα αυτά, εκτός από την υποκυτταρική τοποθέτηση της παραγόμενης πρωτεΐνης, είναι αναγκαίο να μελετηθεί επίσης η ιστοειδική και χρονική έκφρασή στο *A. thaliana*. Καθώς τα πειράματα μικροσυστοιχιών υποδεικνύουν ότι το γονίδιο *AtLon3* εκφράζεται στη γύρη του φυτού – και ειδικότερα στα σπερματικά κύτταρα της γύρης – καθίσταται αναγκαίο να επιβεβαιωθεί η τοποθέτησή του, ώστε διερευνηθεί η λειτουργία του στον συγκεκριμένο ιστό και/ή αναπτυξιακό στάδιο.

Σε αντίθεση με την καθολική και συνεχή έκφραση ενός γονιδίου, η ιστοειδική έκφρασή του είναι αποτέλεσμα πολλών επιπέδων της γονιδιακής ρύθμισης που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Ο υποκινητής ενός γονιδίου είναι μια ακολουθία DNA που εντοπίζεται άνωθεν ή ακριβώς στο 5' άκρο του σημείου έναρξης της μετάφρασης και καθορίζει το σημείο στο οποίο θα ξεκινήσει η μεταγραφή του γονιδίου από την RNA πολυμεράση και τους μεταγραφικούς παράγοντες. Αποτελεί ένα πολύ κρίσιμο στοιχείο, το οποίο συνεργατικά με άλλα ρυθμιστικά στοιχεία έχει την ικανότητα να κατευθύνει τα επίπεδα *AtLon3* έκφρασης ενός γονιδίου. Οι υποκινητές των ευκαρυωτικών γονιδίων δεν είναι εύκολο να χαρακτηριστούν και να κατηγοριοποιηθούν και το μέγεθός τους ποικίλει από 100-1000 ζεύγη βάσεων.

Στην περίπτωση του (*At3g05780*) υπήρξε εξ αρχής το πρόβλημα ότι το γονίδιο είναι τοποθετημένο πάνω στο χρωμόσωμα III του *Arabidopsis* σε κατεύθυνση head-to-tail με το γονίδιο *AtLon4* (*At3g05790*). Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι ο υποκινητής της *AtLon3* επικαλύπτεται με το 3' άκρο της γονιδιωματικής περιοχής της *AtLon4*. Επιπρόσθετα, αυτά τα δύο μέλη της οικογένειας του *Arabidopsis* παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη νουκλεοτιδική και αμινοξική ακολουθία από όλα τα υπόλοιπα (Παράρτημα). Είναι σχεδόν ταυτόσημα, εξαιρουμένου του 5' άκρου που παρουσιάζει αξιοσημείωτη διαφορά. Για να ενισχυθεί η περιοχή που πιθανώς περιέχει τον

υποκινητή του *AtLon3*, έπρεπε ο ορθός εκκινητής να σχεδιαστεί μέσα στο 3' άκρο του *AtLon4*. Μετά από εκτεταμένη ανάλυση της επιθυμητής περιοχής προέκυψε το συμπέρασμα ότι δεν ήταν δυνατόν να σχεδιαστεί κατάλληλος εξειδικευμένος εκκινητής χωρίς τον κίνδυνο κατά την PCR να υβριδίζει και στο 3' άκρο του *AtLon3*, λόγω της υψηλής νουκλεοτιδικής ομολογίας. Για το λόγο αυτό, ο εκκινητής δεν σχεδιάστηκε 1000-1500 βάσεις άνωθεν του υποθετικού σημείου έναρξης της μετάφρασης ως είθισται, αλλά προτιμήθηκε να σχεδιαστεί ~3500 ζ.β. άνωθεν του *AtLon3*. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.8**, στο σημείο εκείνο υπάρχει ένα κενό στην ακολουθία του *AtLon3* συγκριτικά με την ακολουθία του *AtLon4*, η οποία παράλληλα ελέγχθηκε με το πρόγραμμα Primer Select για την περίπτωση να δημιουργεί διμερή με τον ανάστροφο εκκινητή Lon3-Rev-FLAG.



**Εικόνα 3. 8** Τμήμα της αποτύπωσης της στοίχιση των νουκλεοτιδικών γονιδιωματικών αλληλουχιών των γονιδίων *AtLon3* [At3g05780] και *AtLon4* [At3g05790]. Με πράσινη σκίαση παρουσιάζεται το σημείο της *AtLon4* που επιλέχθηκε να σχεδιαστεί ο ορθός εκκινητής Lon3-Com-For για την ενίσχυση της περιοχής που περιέχει τον υποκινητή της *AtLon3*. Η περιοχή επιλέχθηκε βάσει της έλλειψης αυτής της ακολουθίας από τη γονιδιωματική περιοχή της *AtLon3*, δεδομένου του γεγονότος ότι τα δύο γονίδια παρουσιάζουν σχεδόν απόλυτη ταύτιση που δυσκολεύει τον σχεδιασμό εξειδικευμένων εκκινητών ως προς το ένα ή το άλλο.

Ο εκκινητής αυτός σχεδιάστηκε με σκοπό να χρησιμοποιηθεί μαζί με τον ανάστροφο εκκινητή Lon3-Rev-FLAG για να ενισχύσει ολόκληρη τη γονιδιωματική περιοχή του πιθανού υποκινητή και του ίδιου του γονιδίου *AtLon3* σε μία ενιαία αντίδραση PCR. Το τμήμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία δύο ίδιων κατασκευών του γονιδίου, το ένα σε σύντηξη και με το YFP και με το FLAG [pLon3::Lon3:YFP:FLAG], ενώ το άλλο φέροντας μόνο το FLAG [pLon3::Lon3:FLAG]. Στην παρούσα πειραματική μελέτη παρουσιάζεται η κλωνοποίηση μόνο της κατασκευής που φέρει το YFP, καθώς αυτή χρησιμοποιήθηκε τόσο για τα πειράματα διερεύνησης της υποκυτταρικής στόχευσης της πρωτεΐνης *AtLon3* όσο και για τα πειράματα αποσαφήνισης του 5' άκρου του γονιδίου και της σύστασης του ώριμου mRNA που παράγεται από αυτό (**Ενότητα 3.3**). Η άλλη κατασκευή η υπολείπεται του γονιδίου-μάρτυρα YFP, σχεδιάστηκε για μελλοντική

χρήση σε πειράματα αναστροφής του φαινοτύπου φυτών που υπολείπονται του γονιδίου *AtLon3* που δεν συμπεριλαμβάνονται στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της γονιδιωματικής περιοχής του υποκινητή και του γονιδίου *AtLon3* καθώς και η στρατηγική υποκλωνοποίησής τους για τη δημιουργία της κατασκευής **pLon3::Lon3:YFP:FLAG** παρουσιάζονται συνοπτικά ακολούθως. Η πλήρης στρατηγική κλωνοποίησης, οι ακολουθίες των εκκινητών και οι χάρτες που συνοδεύουν την πειραματική διαδικασία παρουσιάζονται αναλυτικά στο Παράρτημα.

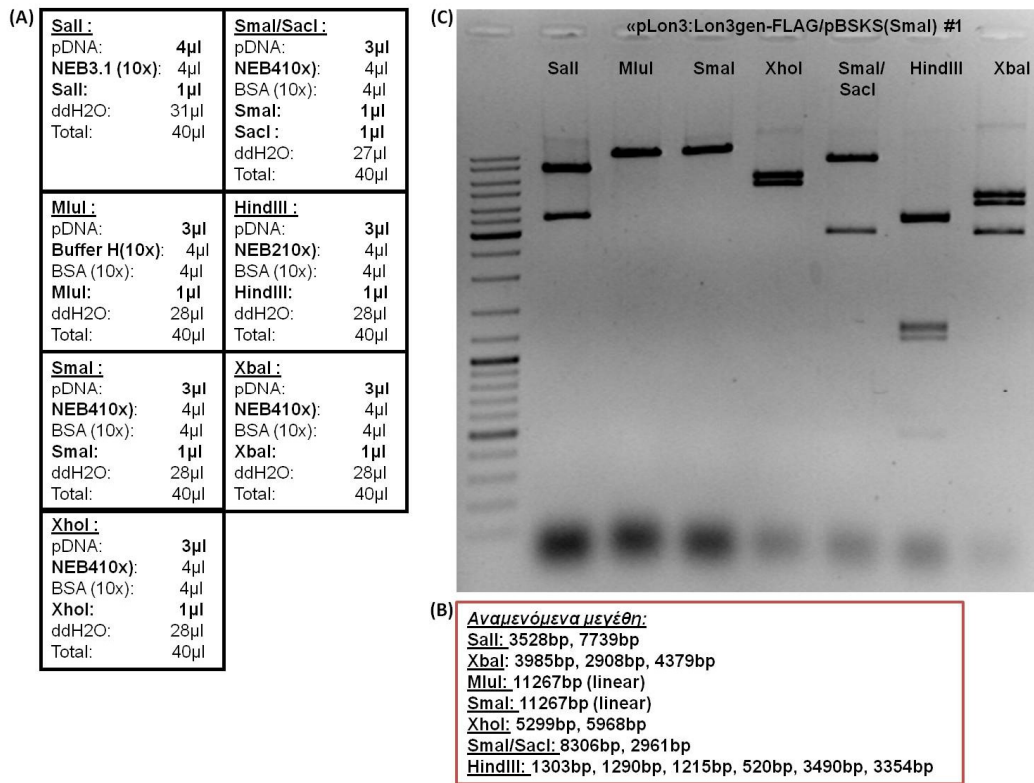
Ορθός εκκινητής [**Lon3-Com-For**] → δημιουργεί τεχνητά μια θέση αναγνώρισης της *SmaI* στα ~3587 ζ.β άνωθεν του γονιδίου *AtLon3*, μέσα στη γονιδιωματική περιοχή του γονιδίου *AtLon4*.

Ανάστροφος εκκινητής [**Lon3-Rev-FLAG**] → όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Το αναμενόμενο μέγεθος του ενισχυόμενου τμήματος είναι 8306 ζ.β.

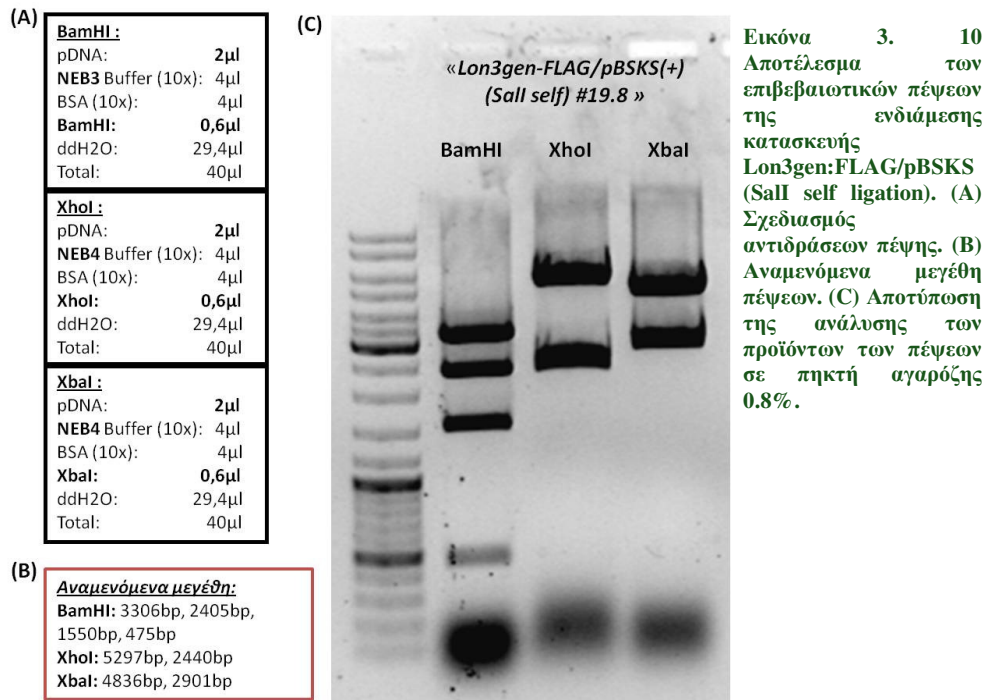
Η επιθυμητή περιοχή ενισχύθηκε με PCR με το προαναφερθέν ζεύγος εκκινητών από τον κλώνο **BAC F10A16** που περιέχει μέσα τόσο τη γονιδιωματική ακολουθία του γονιδίου *AtLon3* (F10A16.7) όσο και του *AtLon4* (F10A16.8). Η PCR πραγματοποιήθηκε με χρήση της Phusion<sup>®</sup> HF Polymerase, η οποία δημιουργεί στο παραγόμενο προϊόν τυφλά άκρα για να εισαχθεί σε πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης pBlueScript II KS (Agilent Technologies, former Stratagene), ο οποίος είχε προηγουμένως κοπεί με το ένζυμο *SmaI*(NEB) που δημιουργεί επίσης τυφλά άκρα. Οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι επιλέχθηκαν με την επιλογή της α-συμπληρωματικότητας και η επιθυμητή φορά εισαγωγής του γονιδίου μέσα στον φορέα ταυτοποιήθηκε με πέψη με *EcoRV*(NEB). Έπειτα, επιλέχθηκαν δύο κλώνοι, ένας εκ των οποίων υποβλήθηκε σε επιβεβαιωτικές πέψεις με τα ένζυμα *SaII*, *MluI*, *SmaI*, *XhoI*, *SmaI/SacI*, *HindIII* και *XbaI* (**Εικόνα 3.9**). Ο κλώνος που επιλέχθηκε να σταλθεί για αλληλούχηση, φυλάχθηκε σε στοκ γλυκερόλης στους -80°C και είναι ο εξής:

✓ **pLon3::Lon3:FLAG/pBSKS(*SmaI*) #1**



Εικόνα 3. 9 Αποτέλεσμα των επιβεβαιωτικών πέσεων της κατασκευής pLon3::Lon3:FLAG στον φορέα κλωνοποίησης pBSKS. (A) Σχεδιασμός αντιδράσεων πέσης. (B) Αναμενόμενα μεγέθη πέσεων. (C) Αποτύπωση της ανάλυσης των προϊόντων των πέσεων σε πηκτή αгарόζης 0.8%.

Κατά την πρώτη προσπάθεια για αλληλούχιση της ένθεσης pLon3::Lon3:FLAG, τα διαβάσματα έδειξαν πως οι εκκινητές που επιλέχθηκαν δεν είναι αρκετά εξειδικευμένοι ως προς την ακολουθία του *AtLon3*, με αποτέλεσμα να υβριδίζουν ταυτόχρονα στην περιοχή του υποκινητή (3' άκρο *AtLon4*) και να αποδίδουν διπλές κορυφές κατά το διάβασμα του κλώνου, αφού αλληλουχούνταν ταυτόχρονα ο υποκινητής και το γονίδιο. Το πρόβλημα παρακάμφθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο SalI, το οποίο τυχαίνει να απαντά μόνο σε δύο θέσεις στον κλώνο: μία στον πολυσυνδέτη (MCS) του φορέα, πριν την αρχή της ένθεσης κι άλλη μία στο τέλος του υποκινητή, πριν από την αρχή του γονιδίου. Το SalI χρησιμοποιήθηκε για να αποκοπεί εξολοκλήρου η περιοχή του υποκινητή από τον κλώνο #19, δημιουργώντας

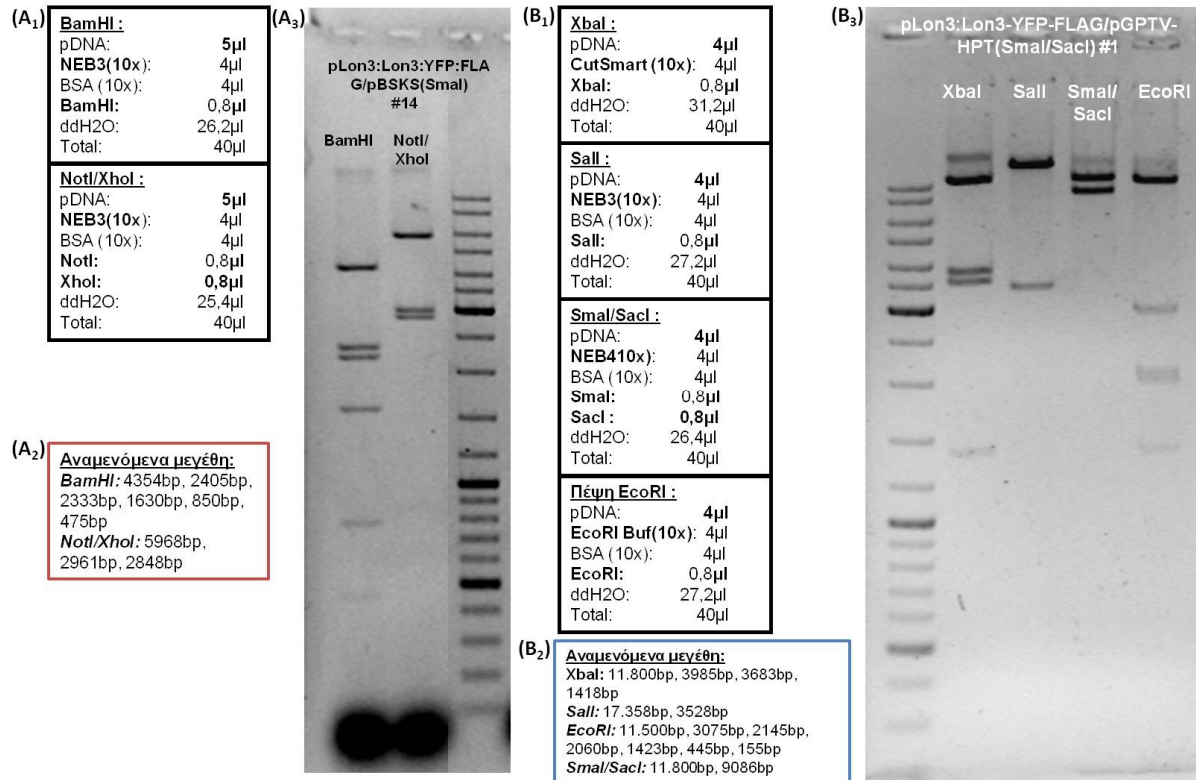


έναν νέο ενδιάμεσο κλώνο (με self-ligation) που χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση αλληλούχισης της ένθεσης. Επιλέχθηκαν οκτώ κλώνοι και η πρώτη διαγνωστική πέψη έγινε με BamHI. Στη συνέχεια επιλέχθηκε ένας κλώνος, ο οποίος κόπηκε επίσης με τα ένζυμα XhoI και XbaI για επιβεβαίωση (Εικόνα 3.10). Ο κλώνος αυτός, ο οποίος φυλάχθηκε στους -80°C και στάλθηκε για αλληλούχιση, είναι ο ακόλουθος:

#### ✓ Lon3gen:FLAG/pBSKS (SalI self) #19.8

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης (Παράρτημα) έδειξαν πως η γονιδιοματική περιοχή του *AtLon3* στη συγκεκριμένη κατασκευή είναι απόλυτα σωστή, συνεπώς η κλωνοποίηση συνεχίστηκε για την εισαγωγή του YFP στον επιλεγμένο κλώνο. Το YFP αποκόπηκε με το ένζυμο MluI από τον φορέα pUC19 που είναι κλωνοποιημένο και με το ίδιο ένζυμο κόπηκε η κατασκευή pLon3::Lon3:FLAG/pBSKS(SmaI) #19. Ακολούθησε αντίδραση λιγοποίησης ώστε να εισαχθεί το YFP στη θέση MluI της κατασκευής. Η ταυτοποίηση της παρουσίας και της επιθυμητής φοράς της ένθεσης του YFP στους μετασχηματισμένους κλώνους πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία της PCR αποικιών και στη συνέχεια ακολούθησαν διαγνωστικές πέψεις με BamHI (Παράρτημα). Επιλέχθηκαν δύο κλώνοι, ο ένας εκ των οποίων υποβλήθηκε σε επιβεβαιωτική διπλή πέψη με NotI/XhoI (Εικόνα 3.11, A). Ο κλώνος που επιλέχθηκε για να συνεχιστεί η κλωνοποίηση στον δυαδικό φορέα και φυλάχθηκε ως στοκ γλυκερόλης στους -80°C είναι ο ακόλουθος:

#### ✓ pLon3::Lon3:YFP:FLAG/pBSKS(SmaI) #14



Εικόνα 3. 11 (A) Αποτέλεσμα των επιβεβαιωτικών πέψεων της ένθεσης του YFP στην κατασκευή pLon3::Lon3:FLAG/pBSKS(SmaI). (A<sub>1</sub>) Σχεδιασμός αντιδράσεων πέψης. (A<sub>2</sub>) Αναμενόμενα μεγέθη πέψεων. (A<sub>3</sub>) Αποτύπωση της ανάλυσης των προϊόντων των πέψεων σε πηκτική αгарόζης 0.8%. (B) Αποτέλεσμα των επιβεβαιωτικών πέψεων της ένθεσης της κατασκευής pLon3::Lon3:YFP:FLAG στο δυαδικό φορέα pGPTV-HPT. (B<sub>1</sub>) Σχεδιασμός αντιδράσεων πέψης. (B<sub>2</sub>) Αναμενόμενα μεγέθη πέψεων. (B<sub>3</sub>) Αποτύπωση της ανάλυσης των προϊόντων των πέψεων σε πηκτική αгарόζης 0.8%.

Μετά την επιτυχή εισαγωγή του YFP στον κλώνο, ήταν απαραίτητο να απομονωθεί ολόκληρο το κομμάτι pLon3::Lon3:YFP:FLAG από τον φορέα κλωνοποίησης pBSKS και να εισαχθεί στο δυαδικό φορέα pGPTV-HPT. Ο φορέας αυτός από κατασκευής φέρει το γονίδιο uidA, που κωδικοποιεί για τη β-γλουκουρονιδάση (GUS) του *E. coli*, την ακολουθία pNos, που αποτελεί το σινιάλο τερματισμού της έκφρασης του γονιδίου της συνθάσης της νοπαλίνης, καθώς και το δεξί (RB) και το αριστερό συνοριακό (LB) του T-DNA, που περικλείουν και σηματοδοτούν το τμήμα του DNA που θα μεταφερθεί στο φυτό μετά τον μετασχηματισμό. Τόσο ο δυαδικός φορέας όσο η κατασκευή κόπηκαν με τα ένζυμα SmaI/SacI. Η διπλή αυτή πέψη αφαιρεί το γονίδιο uidA από τον δυαδικό φορέα, επιτρέποντας την κλωνοποίηση του pLon3::Lon3:YFP:FLAG στην ίδια θέση, με συγκεκριμένη κατεύθυνση. Στις κατασκευές η SmaI έχει εισαχθεί τεχνητά στην αρχή του γονιδίου με τον ορθό εκκινητή ενώ ταυτόχρονα αξιοποιείται η θέση αναγνώρισης SacI του pBSKS, που εντοπίζεται μετά το τέλος του γονιδίου. Η ταυτοποίηση της παρουσίας και της



επιθυμητής φοράς της εκάστοτε ένθεσης στους μετασχηματισμένους κλώνους πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία της PCR αποικιών και στη συνέχεια ακολούθησε διαγνωστική πέψη με XbaI (NEB) (Παράρτημα). Επιλέχθηκαν τρεις κλώνοι, ο ένας εκ των οποίων υποβλήθηκε σε επιβεβαιωτικές πέψεις με τα ένζυμα SalI, SmaI/SacI και EcoRI (**Εικόνα 3.11, Β**). Ο κλώνος που επιλέχθηκε για να εισαχθεί στο *Agrobacterium tumefaciens* και φυλάχθηκε ως στοκ γλυκερόλης στους -80°C είναι ο ακόλουθος:

✓ **pLon3::Lon3:YFP:FLAG/pGPTV-HPT (SmaI/SacI) #1 (DH5a)**

Ο δυαδικός φορέας με την τελική κατασκευή του υποκινητή και του γονιδίου *AtLon3* χρησιμοποιήθηκε για να μετασχηματιστεί μέσω ηλεκτροπόρωσης στέλεχος GV3101 του *Agrobacterium tumefaciens*. Επιλέχθηκαν δύο κλώνοι και φυλάχθηκαν ως στοκ γλυκερόλης στους -80°C:

✓ **pLon3::Lon3:YFP:FLAG/pGPTV-HPT #C και #D (GV3101)**

Η σχηματική αναπαράσταση της κατασκευής παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.12**.



**Εικόνα 3. 12** Σχηματική αναπαράσταση της κατασκευής pLon3::Lon3:YFP:FLAG, στην οποία το γονίδιο *AtLon3* τίθεται υπό την καθοδήγηση του ενδογενούς υποκινητή του.

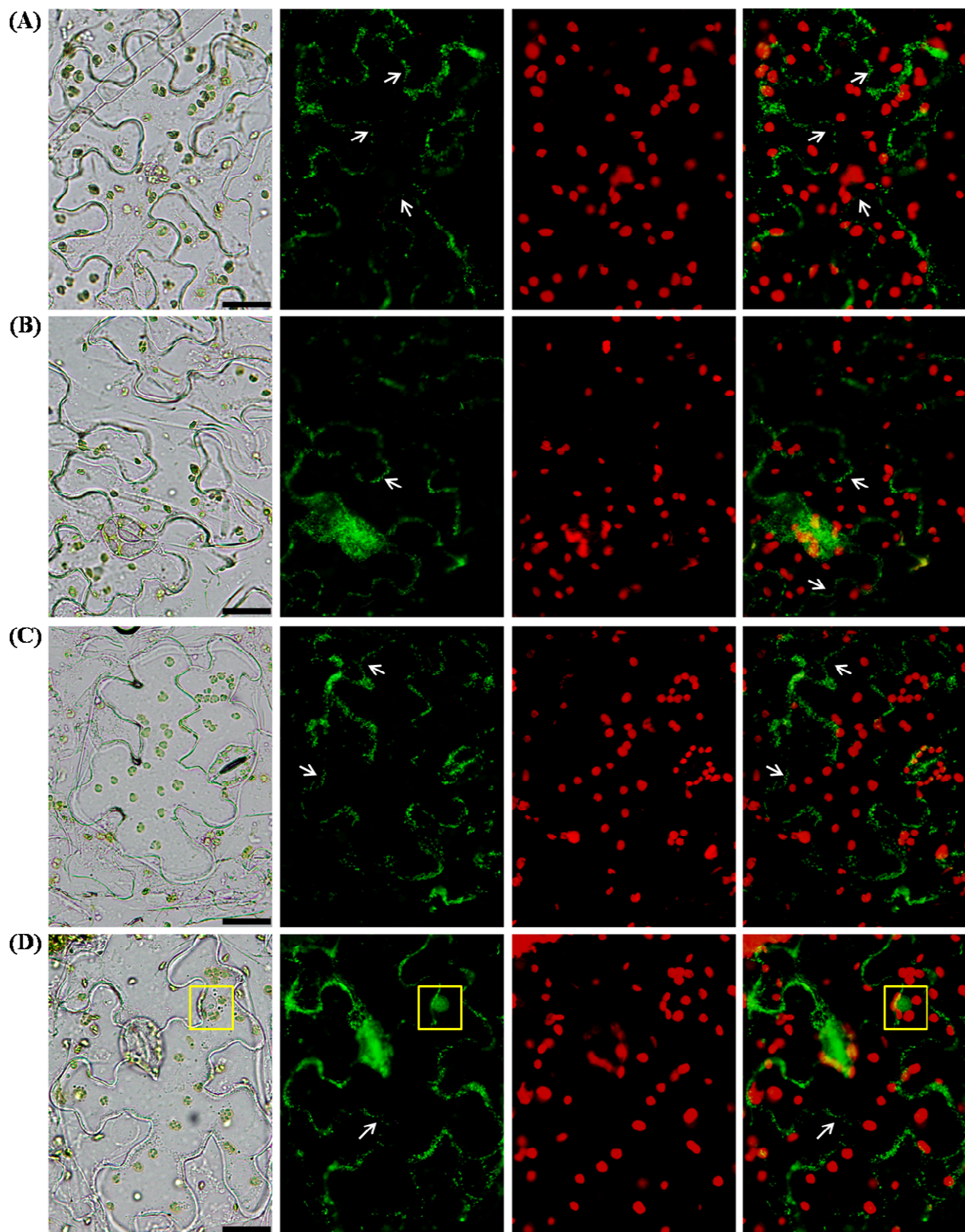
### **3.2.3 Αποτύπωση της υποκυτταρικής στόχευσης της πρωτεΐνης *AtLon3*, μετά από παροδικό μετασχηματισμό του φυτού *N. benthamiana* με τις κατασκευές του γονιδίου *AtLon3*, μέσω ανίχνευσης του φθορισμού του *YFP***

Μετά την ολοκλήρωση της δημιουργίας των κατασκευών, αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τον παροδικό μετασχηματισμό των επιδερμικών κυττάρων φύλλων του φυτού *N. benthamiana*. Η ετερόλογη έκφραση των κατασκευών στον καπνό πραγματοποιήθηκε, προκειμένου να προσδιοριστεί σε πόσες και ποιες εξ' αυτών παρατηρείται η παραγωγή της πρωτεΐνης *AtLon3*, καθώς και για να αποσαφηνιστεί η υποκυτταρική της τοποθέτηση, μέσω της ανίχνευσης της φθορίζουσας πρωτεΐνης *YFP* που έχει συντηχθεί στο καρβοξυλικό της άκρο. Ακολούθησε το πρωτόκολλο της αgroεγχυσης και μετά την πάροδο τριών ημερών, αφαιρέθηκε η επιδερμίδα της

κάτω πλευράς των μετασχηματισμένων φύλλων και παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο φθορισμού.

Τα αποτελέσματα της αποτύπωσης του φθορισμού για την κάθε κατασκευή παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.13**. Υπάρχουν ορισμένες ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις σχετικά με το πρότυπο του φθορισμού που αντιστοιχεί στην έκφραση της κάθε κατασκευής. Η πρώτη παρατήρηση είναι πως σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν ανιχνεύεται φθορισμός του YFP, γεγονός που αποδεικνύει την επιτυχή έκφραση της πρωτεΐνης AtLon3. Επιπλέον, σε κάθε μία από αυτές τις περιπτώσεις ο φθορισμός ανιχνεύεται σε στικτές δομές που θυμίζουν μιτοχόνδρια και εντοπίζονται στο περίγραμμα των επιδερμικών κυττάρων του φύλλου, αλλά και στα στομάτια της επιδερμίδας του καπνού. Το γεγονός ότι ο φθορισμός ανιχνεύεται σε όλες τις κατασκευές, παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την παραγόμενη πρωτεΐνη.

Αρχικά, παρά το γεγονός ότι το *N. benthamiana* είναι ετερόλογο σύστημα έκφρασης και το γονίδιο *AtLon3* έχει χαρακτηριστεί ιστοειδικό στα σπερματικά κύτταρα του *Arabidopsis*, παρατηρούμε φθορισμό μετά την έκφραση της κατασκευής ***pLon3::Lon3:YFP:FLAG*** (**Εικόνα 3.13, σειρά A**), όπου η έκφραση του γονιδίου καθοδηγείται από τον ενδογενή υποκινητή του κι όχι από έναν καθολικά εκφραζόμενο υποκινητή, όπως είναι ο 35SCaMV. Έπειτα, παρατηρούμε πως φθορισμός ανιχνεύεται και στην περίπτωση της κατασκευής ***35S::Lon3:YFP:FLAG-ΔMM*** (**Εικόνα 3.13, σειρά C**), όπου οι προτεινόμενες εναρκτήριες Met έχουν διαγραφεί τεχνητά. Μάλιστα, το πρότυπο και η ένταση του φθορισμού δεν διαφέρει καθόλου από εκείνο της κατασκευής ***35S::Lon3:YFP:FLAG-MM*** (**Εικόνα 3.13, σειρά B**), που φέρει κανονικά τις δύο Met όπως προτείνουν οι βάσεις δεδομένων. Το γεγονός αυτό αποτελεί την πρώτη ένδειξη ότι η έκφραση της πρωτεΐνης AtLon3 δεν εξαρτάται από τα συγκεκριμένα κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης, αφού η πρωτεΐνη παράγεται και τοποθετείται στα μιτοχόνδρια παρά την απουσία τους.



Εικόνα 3. 13 Αποτύπωση της υποκυτταρικής τοποθέτησης της πρωτεΐνης AtLon3 σε επιδερμικά κύτταρα του φύλλου του φυτού *N. benthamiana*, μετά από παροδική έκφραση των τεσσάρων διαφορετικών κατασκευών του γονιδίου. Η ανίχνευση της στόχευσης της AtLon3 ταυτοποιείται μέσω του φθορισμού της πρωτεΐνης αναφοράς YFP, με χρήση μικροσκοπίας φθορισμού. Κάθε στήλη αποτυπώνει τη φωτογραφία του εκάστοτε επιδερμικού κυττάρου με την εξής σειρά: οπτικό φίλτρο, φίλτρο πράσινου φθορισμού για ανίχνευση της YFP, φίλτρο ροδαμίνης που καταγράφει τον αυτοφθορισμό της χλωροφύλλης και τέλος, αποτέλεσμα της επικάλυψης του φίλτρου YFP με το φίλτρο ροδαμίνης. Κάθε σειρά φωτογραφιών

παρουσιάζει το αποτέλεσμα της υποκυτταρικής στόχευσης διαφορετικής κατασκευής, όπου (A) κατασκευή *pLon3::Lon3:YFP:FLAG*, (B) κατασκευή *35S::Lon3:YFP:FLAG-MM*, (C) κατασκευή *35S::Lon3:YFP:FLAG-ΔMM* και (D) κατασκευή *35S::Lon3:YFP:FLAG-ΔTP*. Με λευκά βέλη υποδεικνύεται ο στικτός φθορισμός των μιτοχονδρίων, που εντοπίζεται σε όλες τις περιπτώσεις. Στη σειρά (D) υποδεικνύεται με κίτρινο περίγραμμα ο φθορισμός στον πυρήνα του κυττάρου, που δεν εντοπίζεται σε καμία άλλη κατασκευή.

Κατά την παροδική έκφραση της κατασκευής *35S::Lon3:YFP:FLAG-ΔTP* παρατηρείται για πρώτη φορά δυαδική στόχευση της πρωτεΐνης AtLon3 στα μιτοχόνδρια και στον πυρήνα των μετασχηματισμένων επιδερμικών κυττάρων καπνού (Εικόνα 3.13, σειρά D). Σε αυτή την κατασκευή έχει αφαιρεθεί η προβλεπόμενη πρόδρομη μιτοχονδριακή αλληλουχία στόχευσης, συνεπώς αναμενόταν ότι το σήμα του φθορισμού θα προερχόταν είτε από τον πυρήνα λόγω του NLS είτε από το κυτταρόπλασμα, λόγω αδυναμίας αναγνώρισης της παραγόμενης πρωτεΐνης από το μηχανισμό εισαγωγής του μιτοχονδρίου. Το σήμα της πρωτεΐνης όντως ανιχνεύεται στον πυρήνα, γεγονός που υποδεικνύει ότι το NLS είναι λειτουργικό και η πρωτεΐνη αναγνωρίζεται από τον πυρήνα. Παρόλα αυτά, εξακολουθεί να ανιχνεύεται και στα μιτοχόνδρια, υποδεικνύοντας ότι πιθανότατα δεν έχει αφαιρεθεί εξ' ολοκλήρου το μιτοχονδριακό σινιάλο στόχευσης, με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να κατανέμεται μεταξύ του πυρήνα και των μιτοχονδρίων.

### **3.3 Η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *AtLon3* υποδεικνύει ότι η παραγωγή και η τοποθέτηση της πρωτεΐνης δεν εξαρτάται από τις προτεινόμενες αρχικές μεθειονίνες, ενώ παράλληλα ανιχνεύονται δύο εναλλακτικά μεταγραφήματα**

Αναφέρθηκε ήδη στην Εισαγωγή (Ενότητα 1.) πως υπάρχουν δεδομένα από πειράματα μικροσυστοιχιών που καταδεικνύουν ότι το γονίδιο *AtLon3* εκφράζεται στη γύρη του φυτού *A. thaliana* και συγκεκριμένα στα σπερματικά κύτταρα της γύρης. Επιπλέον αναφέρθηκε ότι στα πλαίσια προηγούμενης πειραματικής μελέτης για το πρότυπο της έκφρασης του γονιδίου *AtLon3* σε διάφορους ιστούς και αναπτυξιακά στάδια του *A. thaliana*, διαπιστώθηκε ότι η έκφρασή του στις δεδομένες συνθήκες ανιχνεύτηκε μόνο στη γύρη (Χατζόπουλος Δ., 2013). Παρόλα αυτά, η διερεύνηση του μήκους και της αλληλουχίας του 5' άκρου του παραγόμενου mRNA για την εύρεση του κωδικονίου έναρξης της μετάφρασης και την αποσαφήνιση του πεπτιδίου στόχευσης της παραγόμενης πρωτεΐνης, είναι δύσκολο να επιτευχθεί στη γύρη του *Arabidopsis*.

Το πρόβλημα αυτό προκύπτει αρχικά λόγω του γεγονότος ότι η απομόνωση ικανοποιητικής ποσότητας γύρης από το συγκεκριμένο φυτό είναι χρονοβόρα διαδικασία, ενώ παράλληλα η απομόνωση RNA είναι δύσκολη λόγω του διπλού τοιχώματος της γύρης: ο εσωτερικός μανδύας (ενδοσπόριο) αποτελείται από ένα λεπτό στρώμα κυτταρίνης ενώ ο εξωτερικός μανδύας (εξωσπόριο) αποτελείται από ένα πολύπλοκο και εξαιρετικά ανθεκτικό πολυμερές (sporopollenin), που περιλαμβάνει λιπαρά οξέα, φαινυλοπροπανοειδή, φαινολικά και καροτενοειδή. Το εξωτερικό τοίχωμα διαπερνάται με δυσκολία, συνεπώς η απομόνωση νουκλεϊνικών οξέων καθίσταται περίπλοκη διαδικασία. Ένα επιπλέον πρόβλημα που προστίθεται είναι ότι στη γύρη εκφράζονται άλλα δύο γονίδια της οικογένειας Lon, το *AtLon1* και το *AtLon4*. Στο ίδιο πείραμα που κατέδειξε την έκφραση του *AtLon3* στη γύρη (Χατζόπουλος Δ., 2013), ερευνήθηκαν και τα επίπεδα έκφρασης αυτών των δύο γονιδίων. Αποδείχτηκε ότι το *AtLon1* εκφράζεται σε χαμηλότερα ποσοστά ενώ η έκφραση του *AtLon4* δεν ανιχνεύεται, παρά το γεγονός ότι στα πειράματα μικροσυστοιχιών η έκφρασή του στη γύρη φαίνεται να είναι πολύ χαμηλή. Η μεγάλη νουκλεοτιδική ομολογία μεταξύ των μελών της Lon οικογένειας, και ιδιαίτερα η ομολογία μεταξύ της *AtLon4* και *AtLon3*, περιπλέκει την κατάσταση καθώς η ανάλυση απαιτείται να γίνει με πολύ εξειδικευμένους εκκινητές ως προς το *AtLon3*, για την αποφυγή της ενίσχυσης μεταγραφημάτων που προέρχονται από τα άλλα δύο μέλη της οικογένειας.

Για τους λόγους που μόλις παρατέθηκαν, η ανάλυση των μεταγραφημάτων του *AtLon3* πραγματοποιήθηκε με απομόνωση ολικού RNA μετά από παροδική έκφραση της κατασκευής pLon3::Lon3:YFP:FLAG #C [GV3101] σε φυτά *Nicotiana benthamiana*, όπου η έκφραση του γονιδίου *AtLon3* έχει πιστοποιηθεί πρώτα από την ανίχνευση του YFP στο μικροσκόπιο. Εφόσον παρατηρείται ο φθορισμός, υπάρχει η παραγόμενη πρωτεΐνη γεγονός που προϋποθέτει την παραγωγή του mRNA του γονιδίου. Επίσης, ο καπνός είναι ένα ετερόλογο φυτικό σύστημα έκφρασης, συνεπώς οι διαδικασίες της μεταγραφής, της μετάφρασης και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις αναμένεται να είναι παραπλήσιες με του *Arabidopsis*.

Για τον προσδιορισμό του 5' άκρου του γονιδίου *AtLon3* ακολουθήθηκε η διαδικασία του 5' SMART RACE. Ολικό RNA απομονώθηκε από φύλλα *N. benthamiana* που είχαν ενεθεί με την κατασκευή pLon3::Lon3:YFP:FLAG #C [GV3101], τρεις μέρες μετά την αροεγγυση, καθώς και από φύλλα τα οποία δεν είχαν ενεθεί (Control). Ακολούθησε αντίδραση DNάσης για την καταστροφή του DNA και στη συνέχεια αντίδραση ανάστροφης μεταγραφής (RT) για τη δημιουργία της πρώτης αλυσίδας του

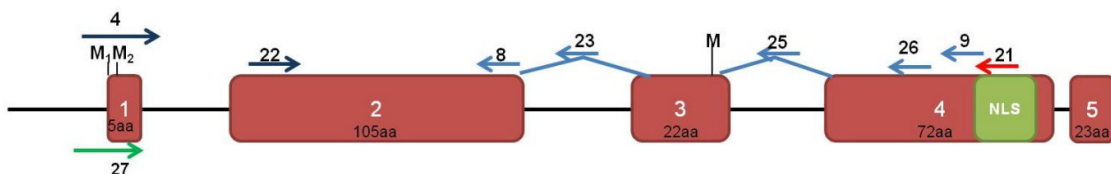
cDNA. Η αντίδραση RT-PCR πραγματοποιήθηκε σε κάθε περίπτωση με τον ανάστροφο εκκινητή [Lon3-NLS-RT] και τον εκκινητή [SMART oligo], ο οποίος λειτουργεί ως επέκταση της μήτρας του mRNA όταν η αντίστροφη μεταγραφάση φτάσει στο τέλος του 5' άκρου του mRNA και της επιτρέπει να συνεχίσει τη σύνθεση του cDNA, έτσι ώστε η αντίδραση να παράξει πλήρους μήκους cDNA (full-length).

Ο ανάστροφος εκκινητής [Lon3-NLS-RT] σχεδιάστηκε ακριβώς πάνω στο σινιάλο NLS του *AtLon3*, έτσι ώστε να προσφέρει εξειδίκευση ως προς τα υπόλοιπα γονίδια της οικογένειας που υπολείπονται του NLS όταν χρησιμοποιηθεί για RT στο *A. thaliana*. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, όλες οι αντιδράσεις έγιναν ταυτόχρονα και στο RNA του μη-μετασηματισμένου φύλλου (untreated), ώστε να διακριθούν τα αποτελέσματα που προέρχονται όντως από τα μεταγραφήματα του *AtLon3* από εκείνα που προέρχονται από μη εξειδικευμένη πρόσδεση στα mRNAs του *N. benthamiana*.

Πριν από τις αντιδράσεις PCR που αφορούν καθαρά στο 5' SMART RACE, οι πρώτες PCR αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν στο προϊόν του RT σχεδιάστηκαν με ζευγάρια εκκινητών εξειδικευμένων ως προς το *AtLon3*. Οι αντιδράσεις αυτές είχαν τους εξής στόχους:

- να αποδείξουν ότι η αντίδραση RT ήταν επιτυχής και έχει παραχθεί cDNA.
- να αποδείξουν ότι το ενισχυόμενο τμήμα προέρχεται από cDNA και όχι από τυχόν εναπομείναν gDNA.
- να διερευνήσουν πόσο κοντά στο προβλεπόμενο 5' άκρο του γονιδίου πλησιάζει το cDNA που παράχθηκε από την RT.

Η όλη διαδικασία της μελέτης των μεταγραφημάτων του γονιδίου *AtLon3* πραγματοποιήθηκε σε 4 ανεξάρτητα πειράματα. Παρόλα αυτά, δεν ήταν όλες οι προσπάθειες επιτυχημένες. Ακολούθως παρουσιάζονται τα πιο ξεκάθαρα αποτελέσματα που προέκυψαν από το σύνολο των πειραμάτων. Όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων αναφέρονται με αριθμούς που εξηγούνται αναλυτικά στο Παράρτημα (Πίνακας Π.1 και Π.2) και μια σχηματική αναπαράσταση των τμημάτων που ενισχύονται παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.14**.



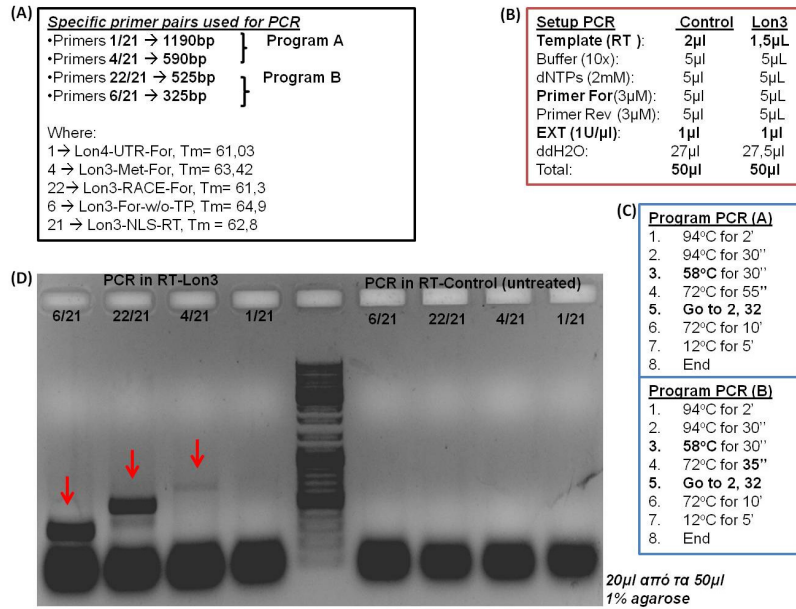
**Εικόνα 3. 14** Σχηματική αναπαράσταση του 5' άκρου του γονιδίου *AtLon3*, σύμφωνα με το TAIR. Με ορθογώνια αναπαριστώνται τα υποθετικά εξώνια 1-5 του γονιδίου ενώ η μεταξύ τους μαύρη γραμμή αναπαριστά τα εσώνια. Τα βέλη αναπαριστούν τη φορά του κάθε εκκινητή ενώ οι αριθμοί που τοποθετούνται από πάνω αντιστοιχούν στον εκκινητή, τα στοιχεία του οποίου αναγράφονται στον Πίνακα

**Π.1 του Παραρτήματος.** Οι γαλάζιες γραμμές μεταξύ των εξωνίων 2-3 και 3-4 υποδεικνύουν ότι οι αντίστοιχοι εκκινητές είναι σχεδιασμένοι πάνω στην περιοχή που ενώνονται τα δύο εξόνια μετά το μάτισμα. Το πράσινο ορθογώνιο στο εξόνιο 4 συμβολίζει την περιοχή που τοποθετείται το σινιάλο NLS του γονιδίου, στην οποία έχει σχεδιαστεί ο εξειδικευμένος ως προς το *AtLon3* εκκινητής 21 με τον οποίο πραγματοποιείται η αντίστροφη μεταγραφή (RT).

### ***3.3.1 Το μεταγράφημα του *AtLon3* που εκτείνεται μέχρι το προτεινόμενο ATG του γονιδίου είναι σπάνιο και το πλαίσιο ανάγνωσης της παραγόμενης πρωτεΐνης είναι ανοικτό από την περιοχή του δεύτερου εξωνίου και έπειτα***

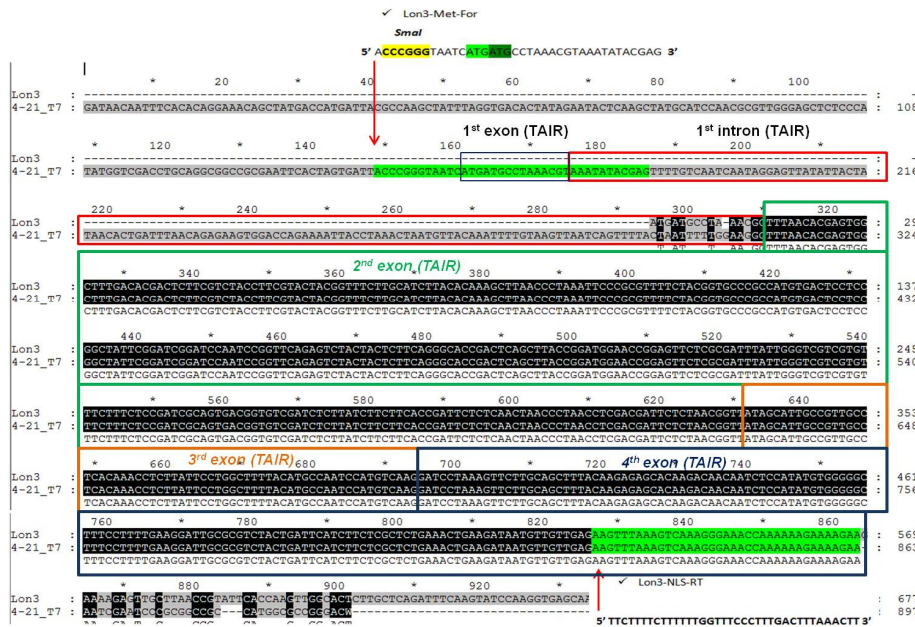
Σε μια πρώτη απόπειρα διερεύνησης του μήκους του 5' άκρου του cDNA του γονιδίου *AtLon3*, πραγματοποιήθηκαν στο προϊόν του RT (Παράρτημα) τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις PCR με σταθερό τον ανάστροφο εκκινητή [Lon3-NLS-RT], με τον οποίο έγινε η αντίστροφη μεταγραφή, και 4 διαφορετικούς ορθούς εκκινητές, εκ των οποίων ο καθένας εκτίνεται σε άλλη απόσταση στο 5' άκρο του γονιδίου. Τα αποτελέσματα των PCR (**Εικόνα 3.15**) έδειξαν ότι οι δύο εκκινητές #6 και #22 που τοποθετούνται μετά την υποτιθέμενη αρχή του γονιδίου δίνουν τα αναμενόμενα προϊόντα σε μεγάλη ποσότητα. Ο εκκινητής #1 που βρίσκεται σε μεγάλη απόσταση άνωθεν της αρχής δεν δίνει κανένα αποτέλεσμα. Αντιθέτως, ο εκκινητής #4 που βρίσκεται ακριβώς πάνω στην υποτιθέμενη αρχή δίνει μεγαλύτερο προϊόν από το αναμενόμενο (~750 ζ.β. έναντι 590 ζ.β.), η ποσότητα του οποίου ανιχνεύεται με δυσκολία στην εικόνα της πηκτής.

Τα προϊόντα των PCR 22/21 και 4/21 από το RT του *Lon3* αποκόπηκαν από την πηκτή, καθαρίστηκαν και κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα pGEM<sup>®</sup> T-easy (PROMEGA). Οι ενθέσεις ελέγχθηκαν για την πιθανότητα να είναι *AtLon3* cDNA με πέψεις (Παράρτημα). Οι επιλεγμένοι κλώνοι στάλθηκαν και αλληλούχισι και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.16** και **Εικόνα 3.17**.



Εικόνα 3. 15 Αποτελέσματα PCR με ζευγάρια εξειδικευμένων εκκινητών ως προς το *AtLon3*, με μήτρα του RT στα μετασηματισμένα με *Lon3* φύλλα καπνού και το RT στα μη-μετασηματισμένα (untreated). (A) Ζευγάρια εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν και τα μεγέθη cDNA που αναμένεται να ενισχύσουν βάσει του προβλεπόμενου. (B) Σχεδιασμός αντίδρασης PCR για την κάθε συνθήκη. (C) Προγράμματα θερμοκύκλων. (D) Αποτύπωση της ανάλυσης των προϊόντων PCR σε πηκτή αгарόζης. Αριστερά με κόκκινα βέλη σημαίνονται τα προϊόντα ενώ δεξιά όπως είναι αναμενόμενο δεν ανιχνεύονται προϊόντα.

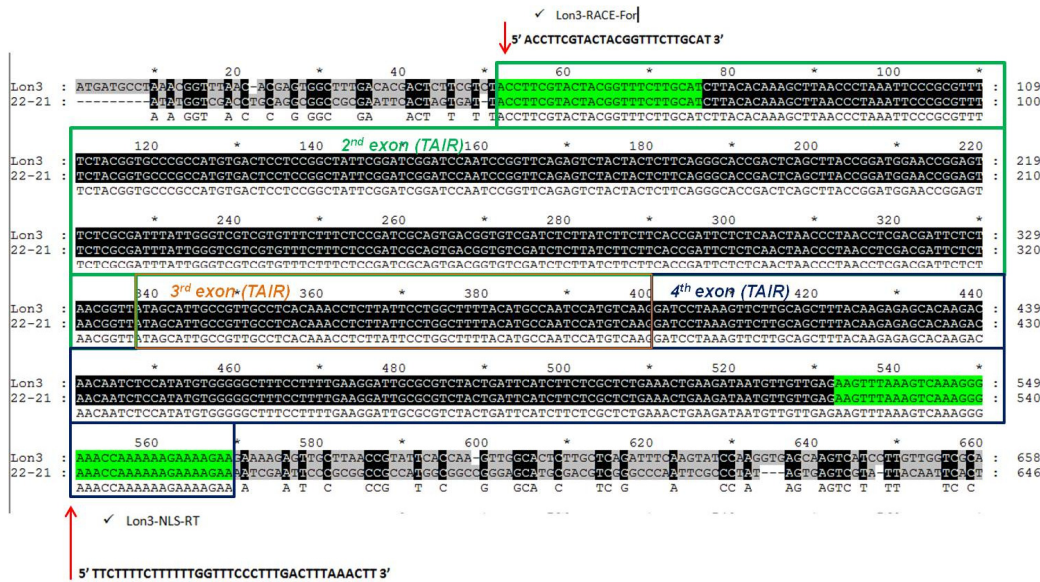
4/21 PCR product in RT-Lon3 sequencing with T7 promoter primer in pGEM-Teasy:



Εικόνα 3. 16 Νουκλεοτιδική στοίχιση της αλληλούχησης του προϊόντος PCR 4/21 (RT-Lon3) με το προτεινόμενο cDNA *AtLon3*. Με λαχανί υπογράμμιση δηλώνονται οι εκκινητές 4 και 21. Τα εξώνια περικλείονται με ορθογώνια όπου το μαύρο αντιστοιχεί στο 1ο, το πράσινο στο 2ο, το πορτοκαλί στο 3ο και το μπλε στο 4ο. Με κόκκινο δηλώνεται η παρουσία του 1<sup>ου</sup> εσωνίου μέσα στο ενισχυόμενο τμήμα.



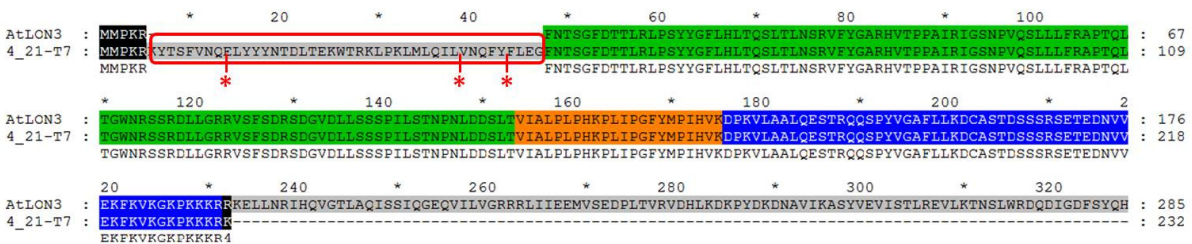
22/21 PCR product in RT-Lon3 sequencing with SP6 promoter primer in pGEM-Teasy:



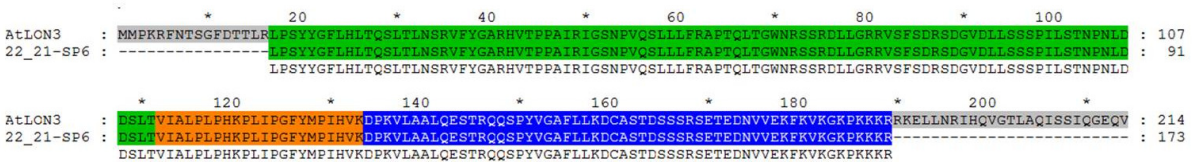
Εικόνα 3. 17 Νουκλεοτιδική στοίχιση της αλληλούχισης του προϊόντος PCR 22/21 (RT-Lon3) με το προτεινόμενο cDNA *AtLon3*. Με λαχάνι υπογράμμιση δηλώνονται οι εκκινητές 22 και 21. Τα εξώνια περικλείονται με ορθογώνια όπου το πράσινο αντιστοιχεί στο 2<sup>ο</sup>, το πορτοκαλί στο 3<sup>ο</sup> και το μπλε στο 4<sup>ο</sup> εξώνιο.

Η μετάφραση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης υποδεικνύει το αναγνωστικό πλαίσιο και τα αμινοξέα της πρωτεΐνης που μπορεί να προκύψει από καθένα εκ των συγκεκριμένων μεταγραφημάτων (Εικόνα 3.18).

(A)



(B)



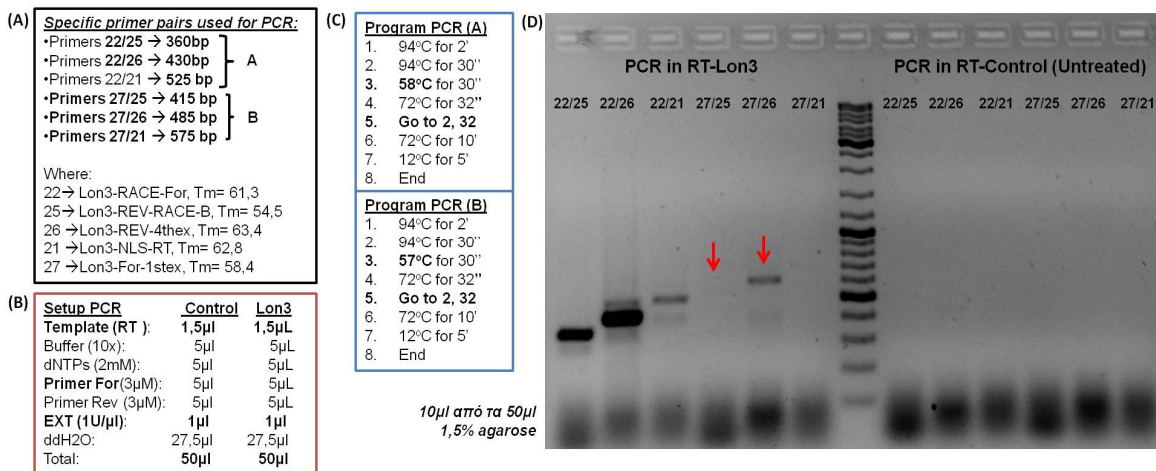
Εικόνα 3. 18 Αμινοξική στοίχιση των ακολουθιών που προκύπτουν από τη μετάφραση των μεταγραφημάτων του *AtLon3* με την υποθετική πρωτεΐνη *AtLon3* (TAIR). (A) Μετάφραση της ακολουθίας της αλληλούχισης του PCR 4/21 σε RT-Lon3 (B) Μετάφραση της ακολουθίας της αλληλούχισης του PCR 22/21 σε RT-Lon3. Τα χρώματα υπογράμμισης αντιστοιχίζουν τα αμινοξέα με τα εξώνια που τα παράγουν: 1<sup>ο</sup> εξώνιο με μαύρο, 2<sup>ο</sup> εξώνιο με πράσινο, 3<sup>ο</sup> εξώνιο με πορτοκαλί, 4<sup>ο</sup> εξώνιο με μπλε. Το κόκκινο ορθογώνιο συμβολίζει την παρουσία του 1<sup>ου</sup> εσωνίου στο προϊόν και οι αστερίσκοι τα κωδικόνια λήξης που δεν μεταφράζονται σε αμινοξέα.

Η νουκλεοτιδική στοίχιση των αλληλουχιών που προέκυψαν από την αλληλούχιση των PCR 4/21 και 22/21 στο RT-Lon3 με την υποθετική ακολουθία (TAIR) του

*AtLon3* cDNA, έδειξε ότι το προβλεπόμενο cDNA συμπίπτει απόλυτα με τα ενισχυόμενα τμήματα στην περιοχή από το 2<sup>ο</sup> εξώνιο μέχρι το NLS (4<sup>ο</sup> εξώνιο) όπου και ξεκινάει η αντίστροφη μεταγραφή (**Εικόνες 3.16 και 3.17**). Αυτό αποδεικνύει ότι το μάτισμα μεταξύ των εξωνίων 2-3 και 3-4 συμπίπτει με το προβλεπόμενο. Η μετάφραση του τμήματος 22/21 υποδεικνύει ότι το μοναδικό ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο είναι εκείνο που συμπίπτει με της προβλεπόμενης πρωτεΐνης (**Εικόνα 3.18 B**). Στην περίπτωση του τμήματος 4/21 παρατηρούμε πως ενώ το μάτισμα ανιχνεύεται από το 2<sup>ο</sup> εξώνιο και μετά, δεν παρατηρείται μάτισμα μεταξύ του 1<sup>ου</sup> υποθετικού εξωνίου και του 2<sup>ου</sup>, αλλά ανιχνεύεται ολόκληρη η ακολουθία του 1<sup>ου</sup> εσωνίου (**Εικόνα 3.16**). Η μετάφραση του τμήματος 4/21 υποδεικνύει ότι το πλαίσιο ανάγνωσης είναι ανοιχτό μόνο από το 2<sup>ο</sup> εξώνιο και μετά, καθώς στην περιοχή του 1<sup>ου</sup> εσωνίου ανιχνεύονται 3 κωδικόνια λήξης (**Εικόνα 3.18 A**).

Επειδή ο εκκινητής #4 είναι σχεδιασμένος πάνω στη γονιδιωματική ακολουθία του *AtLon3* και το 3' άκρο του υβριδίζει πάνω στην περιοχή του 1<sup>ου</sup> εσωνίου, εξετάστηκε το ενδεχόμενο το μεταγράφημα που ενισχύθηκε να αποτελεί ένα σπάνιο μεταγράφημα στο οποίο δεν είχε πραγματοποιηθεί τη δεδομένη στιγμή το μάτισμα μεταξύ 1<sup>ου</sup> και 2<sup>ου</sup> εξωνίου. Για το λόγο αυτό σχεδιάστηκε ο εκκινητής #27 (Παράρτημα, **Πίνακας Π.1**), το 3' άκρο του οποίου υβριδίζει πάνω στο υποθετικό 1<sup>ο</sup> εξώνιο και το 5' άκρο του πρέπει να υβριδίζει πάνω στην προβλεπόμενη 5' UTR, που προηγείται του 1<sup>ου</sup> εξωνίου. Ο εκκινητής αυτός στόχο είχε να ενισχύσει μόνο τα πιθανά μεταγραφήματα τα οποία έχουν υποστεί μάτισμα μεταξύ του 1<sup>ου</sup> και του 2<sup>ου</sup> εξωνίου.

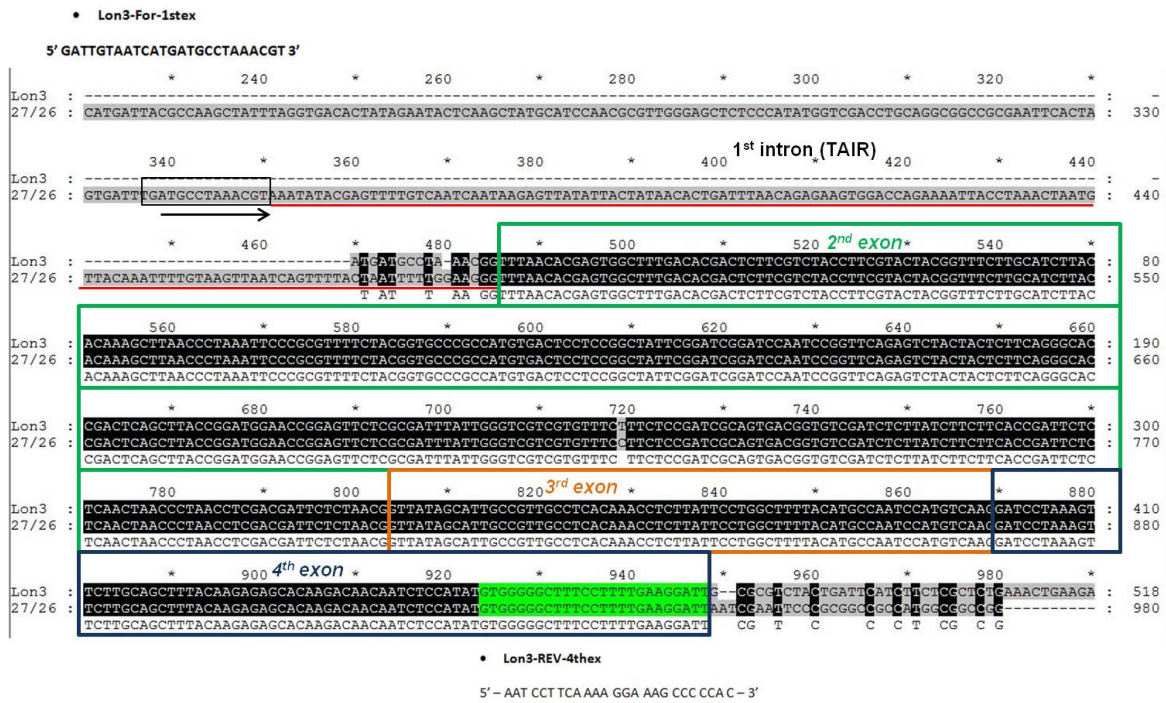
Το πείραμα επαναλήφθηκε, χρησιμοποιώντας 3 εξειδικευμένα ζευγάρια εκκινητών, με πιστοποιημένο αποτέλεσμα στην PCR σε RT-*Lon3*, και 3 ζευγάρια με ορθό εκκινητή τον #27 και ανάστροφους εκείνους των γνωστών ζευγαριών (**Εικόνα 3.19**). Τα γνωστά ζεύγη έδωσαν τα αναμενόμενα μεγέθη σε καλή ποσότητα. Αντιθέτως, ο εκκινητής #27 έδωσε προϊόν μόνο στο PCR 27/26 σε μικρή ποσότητα και στο 27/25, όπου σχεδόν δεν διακρίνεται, ενώ στο 27/21 δεν έδωσε καθόλου προϊόν (**Εικόνα 3.19 D**). Τα ίδια ζευγάρια ελέγχθηκαν σε γονιδιωματικό DNA του *A. thaliana* και αποδείχθηκε ότι λειτουργούν σωστά όλα εκτός του 27/21. Το πρόγραμμα PrimerSelect υπέδειξε πως οι εκκινητές στο ζευγάρι 27/21 δημιουργούν περίπου 16 διαφορετικές ισχυρές μορφές διμερών μεταξύ τους, γεγονός που εξηγεί γιατί δεν παράγουν προϊόν.



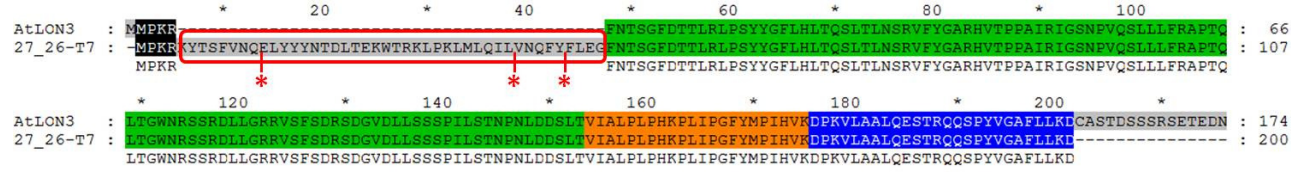
**Εικόνα 3. 19** Αποτελέσματα PCR με ζευγάρια εξειδικευμένων εκκινητών ως προς το *AtLon3*, με μήτρα το RT στα μετασηματισμένα με Lon3 φύλλα καπνού και το RT στα μη-μετασηματισμένα (untreated). (A) Ζευγάρια εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν και τα μεγέθη cDNA που αναμένεται να ενισχύσουν βάσει του προβλεπόμενου. (B) Σχεδιασμός αντίδρασης PCR για την κάθε συνθήκη. (C) Προγράμματα θερμοκύκλων. (D) Αποτύπωση της ανάλυσης των προϊόντων PCR σε πηκτή αгарόζης. Αριστερά με κόκκινα βέλη σημαίνονται τα μοναδικά προϊόντα που ανιχνεύονται με τον εκκινητή #27, ενώ δεξιά όπως είναι αναμενόμενο δεν ανιχνεύονται προϊόντα.

Το προϊόν του PCR 27/26 είναι χαμηλό σε ποσότητα, συγκριτικά με τα υπόλοιπα προϊόντα, παρόλο που στις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε η ίδια ποσότητα μήτρας. Επιπλέον, το μέγεθος του προϊόντος είναι ~600 ζ.β. έναντι των 485 ζ.β. που είναι το μέγεθος του προβλεπόμενου cDNA που πρέπει να ενισχυθεί από το συγκεκριμένο ζευγάρι. Το προϊόν αυτό απομονώθηκε, καθαρίστηκε και κλωνοποιήθηκε σε φορέα pGEM<sup>®</sup> T-easy (PROMEGA). Η ένθεση ελέγχθηκε για την πιθανότητα να είναι *AtLon3* cDNA με πέψεις (Παράρτημα). Ο επιλεγμένος κλώνος στάλθηκε για αλληλούχιση και το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.20**. Η μετάφραση του αποτελέσματος της αλληλούχισης υποδεικνύει το αναγνωστικό πλαίσιο και τα αμινοξέα της πρωτεΐνης που μπορεί να προκύψει από το συγκεκριμένο μεταγράφημα και παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.21**.

**PCR 27/26 (600bp) in RT-Lon3 sequencing with T7 promoter primer**



**Εικόνα 3. 20** Νουκλεοτιδική στοίχιση της αλληλούχισης του προϊόντος PCR 27/26 (RT-Lon3) με το προτεινόμενο cDNA *AtLon3*. Με λαχανί υπογράμμιση δηλώνεται ο εκκινητής 26 και με μαύρο ορθογώνιο τα 14/25 νουκλεοτίδια (3' άκρο) του εκκινητή 27. Τα εξόνια περικλείονται με ορθογώνια όπου το πράσινο στο 2ο, το πορτοκαλί στο 3ο και το μπλε στο 4ο. Με κόκκινο δηλώνεται η παρουσία του 1<sup>ου</sup> εσωνίου μέσα στο ενισχυόμενο τμήμα.



**Εικόνα 3. 21** Αμινοξική στοίχιση της ακολουθίας που προκύπτει από τη μετάφραση της ακολουθίας της αλληλούχισης του PCR 4/21 σε RT-Lon3 με την υποθετική πρωτεΐνη *AtLon3* (TAIR). Τα χρώματα υπογράμμισης αντιστοιχίζουν τα αμινοξέα με τα εξόνια που τα παράγουν: 1<sup>ο</sup> εξόνιο με μαύρο, 2<sup>ο</sup> εξόνιο με πράσινο, 3<sup>ο</sup> εξόνιο με πορτοκαλί, 4<sup>ο</sup> εξόνιο με μπλε. Το κόκκινο ορθογώνιο συμβολίζει την παρουσία του 1<sup>ου</sup> εσωνίου στο προϊόν και οι αστερίσκοι τα κωδικόνια λήξης που δεν μεταφράζονται σε αμινοξέα.

Το αποτέλεσμα της αλληλούχισης του PCR 27/26 (RT-Lon3) συμπίπτει με το αποτέλεσμα της αλληλούχισης του PCR 4/21, με τη διαφορά ότι στο πρώτο δεν εντοπίζεται καν ολόκληρη η αλληλουχία του εκκινητή #27 στο διάβασμα, όπως υποδεικνύεται στην **Εικόνα 3.20**, γεγονός που υποδεικνύει ότι το συγκεκριμένο μεταγράφημα που ενισχύθηκε δεν φτάνει καν σε μήκος το προτεινόμενο ως κωδικόνιο έναρξης ATG του γονιδίου *AtLon3*. Επιπλέον, όπως και στην περίπτωση του PCR 4/21, το ενισχυόμενο τμήμα περιέχει και το 1<sup>ο</sup> εσώνιο.

Το αποτέλεσμα αυτό αποδεικνύει ότι η ύπαρξη της αλληλουχίας του φερόμενου ως 1<sup>ου</sup> εσωνίου του γονιδίου *AtLon3* στα ενισχυόμενα μεταγραφώματα δεν εξαρτάται από

το γεγονός ότι ο εκκινητής #4 υβριδίζει και στην αρχή του εσωνίου. Το γεγονός ότι δεν παρατηρείται το αναμενόμενο μάτισμα μεταξύ των φερόμενων ως 1<sup>ου</sup> και 2<sup>ου</sup> εξωνίου σε συνδυασμό με το αποτέλεσμα του PCR 4/21, αλλά και με το γεγονός ότι και στα τρία προϊόντα που αλληλουχήθηκαν η μετάφραση δίνει αναγνωστικό πλαίσιο ανοικτό από το δεύτερο εξώνιο κι έπειτα, υποδεικνύει ότι μάλλον η νουκλεοτιδική περιοχή που αντιστοιχεί στο 1<sup>ο</sup> εξώνιο δεν είναι κωδική περιοχή του γονιδίου *AtLon3*. Την υπόθεση αυτή ενισχύει και το γεγονός ότι ενώ όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στις ίδιες συνθήκες, τα προϊόντα των 4/21 στη μία περίπτωση και 27/26 στην άλλη περίπτωση αποδίδουν πολύ λιγότερη ποσότητα συγκριτικά με τα υπόλοιπα, αποτέλεσμα το οποίο πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι αυτά τα εκτεταμένα σε μήκος μεταγραφήματα είναι σπάνια μεταξύ των κύριων μεταγραφημάτων του γονιδίου *AtLon3*.

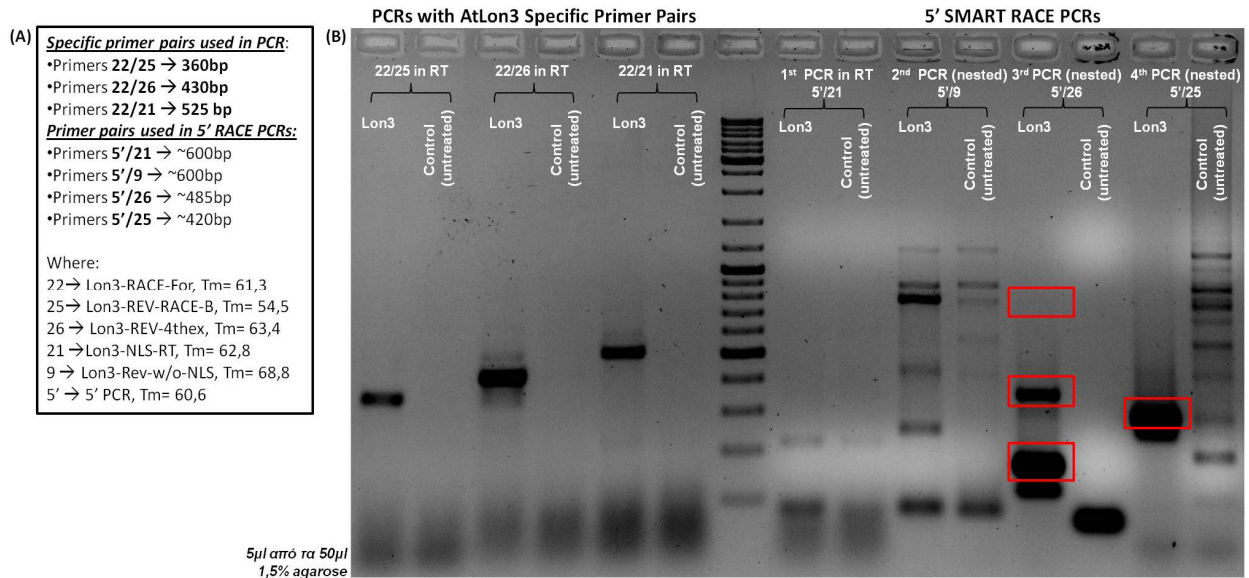
### ***3.3.2 Το μεγαλύτερο σε μήκος μεταγράφημα που ανιχνεύεται μέσω του 5' SMART RACE ξεκινάει στην περιοχή του 2<sup>ο</sup> εξωνίου και δεν περιλαμβάνει κανένα ATG κωδικόνιο έναρξης σε ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο***

Τα αποτελέσματα των PCR με τα ζευγάρια εξειδικευμένων εκκινητών στο cDNA του γονιδίου *AtLon3* (RT-*Lon3*) έδωσαν ορισμένες πληροφορίες αναφορικά με το μήκος των μεταγραφημάτων, συγκριτικά με το αναμενόμενο cDNA που παρέχουν οι βάσεις δεδομένων. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα αυτά δεν αποκαλύπτουν ποιο είναι το πραγματικό μήκος του mRNA που παράγεται από τη μεταγραφή του γονιδίου *AtLon3*, καθώς αποτελούν κατευθυνόμενες αντιδράσεις. Για το λόγο αυτό, το RT σε κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκε με τον εξειδικευμένο ανάστροφο εκκινητή [*Lon3*-NLS-RT] και τον [SMART oligo]. Η αντίστροφη μεταγραφάση πραγματοποιεί τη δημιουργία της πρώτης αλυσίδας του cDNA ξεκινώντας από τον εξειδικευμένο ανάστροφο εκκινητή και προχωρώντας προς το 5' άκρο του γονιδίου. Εάν τα μεταγραφήματα παραμένουν άθικτα κατά την πορεία της αντίστροφης μεταγραφής, απουσία ενζύμων που καταστρέφουν το RNA, τότε η αντίστροφη μεταγραφάση συνεχίζει τη σύνθεση του cDNA συμπεριλαμβάνοντας την 5' UTR. Στο τέλος του 5' άκρου της πρώτης αλυσίδας του cDNA προσθέτει ορισμένες βάσεις C. Ο SMART oligo υβριδίζει σε αυτές τις βάσεις επεκτείνοντας ουσιαστικά το mRNA και επιτρέποντας στην RT να συνεχίσει τη σύνθεση της πρώτης αλυσίδας, εξασφαλίζοντας full-length cDNAs και παρέχοντας τη συμπληρωματική ακολουθία του SMART oligo στα 5' άκρα όλων των παραγόμενων cDNAs, ώστε να μπορούν να ενισχυθούν με PCR μέσω της διαδικασίας του 5' SMART RACE PCR.

Βάσει όσων προαναφέρθηκαν, για να επιβεβαιωθεί το πραγματικό μήκος του 5' άκρου πραγματοποιήθηκε 5' SMART RACE με μια σειρά επικαλυπτόμενων (nested) PCR, με ορθό εκκινητή τον [SMART oligo] ή τον [5' PCR] και διάφορους εξειδικευμένους αναστροφους εκκινητές του *AtLon3*. Η διαδικασία του RT επαναλήφθηκε όπως στην **Ενότητα 3.3.1**, καθώς και τα πρώτα PCR με τα γνωστά ζευγάρια εκκινητών, προκειμένου να διαπιστωθεί η λειτουργικότητα του cDNA αλλά και η σταθερή επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.

Αναλυτικότερα, η διαδικασία που ακολούθησε ξεκίνησε με την ενίσχυση της πρώτης αλυσίδας του cDNA με το ζευγάρι εκκινητών 5'/21 (**Πίνακες Π.1 και Π.2, Παράρτημα**), όπου ο 5' PCR έχει την ακολουθία του 5' άκρου του εκκινητή SMART oligo και ο #21 είναι ο αναστροφος εκκινητής με τον οποίο πραγματοποιήθηκε η αντίδραση RT. Η ανάλυση του προϊόντος δεν έδειξε κάποια αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ των δύο συνθηκών (*Lon3-treated/untreated*), συνεπώς το προϊόν αραιώθηκε σε 3 δεκαδικές αραιώσεις (1/10, 1/100, 1/1000) και χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για το επόμενο PCR (nested) με το ζευγάρι 5'/9. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για άλλα δύο ζευγάρια εκκινητών, των 5'/26 και 5'/25, προκειμένου να επιτευχθεί η μεγαλύτερη δυνατή εξειδίκευση ως προς το *Lon3* cDNA και η καλύτερη ενίσχυση ποσοτικά.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στην **Εικόνα 3.22**. Παρατηρούμε πως στο PCR 5'/9 αρχίζουν να ξεχωρίζουν δύο ζώνες DNA στο *Lon3*, η μία στα ~250 ζ.β. και η άλλη στα ~450 ζ.β., οι οποίες δεν εντοπίζονται στη συνθήκη *untreated*, και άλλη μία ζώνη στα 800 ζ.β., η οποία παρόλο που εντοπίζεται στο *untreated*, απαντάται σε πολύ μεγαλύτερη ποσότητα στο *Lon3*. Στο PCR 5'/26 παρατηρούμε πως εντοπίζονται ξανά δύο ζώνες στο *Lon3*, η μία στα ~150-200 ζ.β. και η άλλη στα ~350 ζ.β., ενώ εντοπίζεται και μία αχνή ζώνη στα ~750 ζ.β. Αντιθέτως, στο *untreated* δεν εντοπίζεται καμία ζώνη. Στο τελευταίο nested PCR 5'/25 παρατηρούμε κυρίως μία ζώνη στα ~250-300 ζ.β. στο *Lon3*, ενώ στο *untreated* παρατηρούμε ένα μεγάλο εύρος ζωνών από τα 100 έως τα 1000 ζ.β.

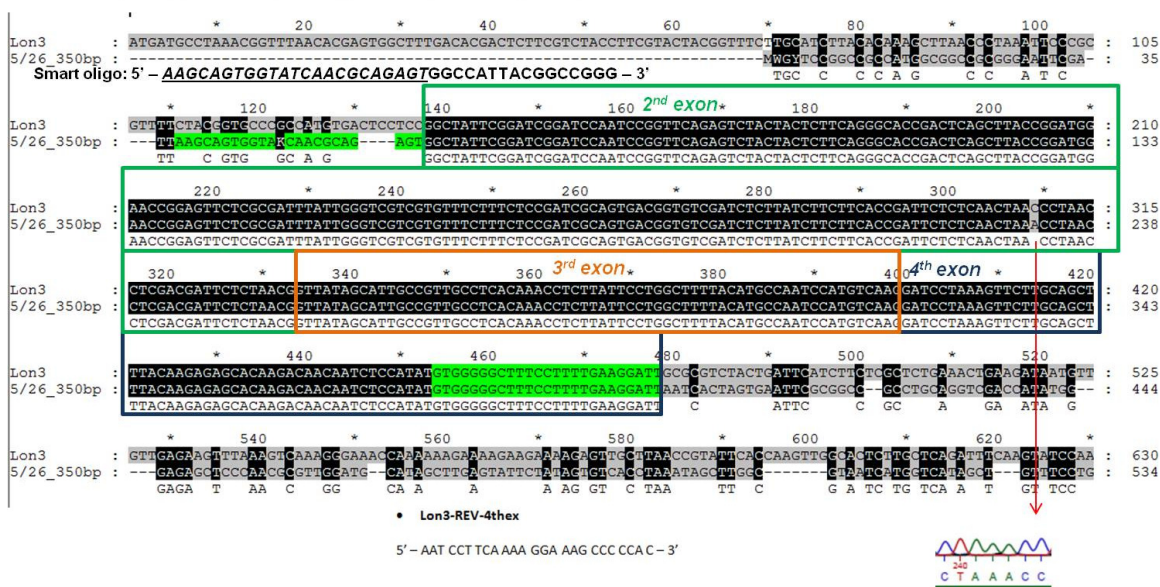


**Εικόνα 3.22** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των PCR που πραγματοποιήθηκαν με εξειδικευμένα ζευγάρια εκκινητών για το *AtLon3* (αριστερά) και των επικαλυπτόμενων (nested) PCR του 5' SMART RACE. (A) Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και αναμενόμενα μεγέθη ανά ζευγάρι. Στην περίπτωση των ζευγαριών των 5' RACE, τα αναμενόμενα μεγέθη αποτελούν το ελάχιστο προσδοκώμενο μέγεθος cDNA βάσει του TAIR. (B) Ανάλυση των προϊόντων των PCR σε πηκτική αгарόζη. Για κάθε ζευγάρι εκκινητών παρουσιάζεται πρώτα το αποτέλεσμα στη συνθήκη Lon3 και ακολούθως το αποτέλεσμα στη συνθήκη Control (untreated). Με κόκκινο ορθογώνιο σημαίνονται οι ζώνες DNA που θεωρείται πιθανό να αποτελούν Lon3 cDNA και στάλθηκαν για αλληλούχιση.

Όσα περιγράφηκαν μόλις υποδεικνύουν ότι η πιο πιθανή ζώνη για να αποτελεί *Lon3* cDNA είναι εκείνη που ξεκινά κοντά στα ~450 ζ.β. στο 5'/9 PCR, συνεχίζει στα ~350 ζ.β. στο 5'/26 PCR και καταλήγει μία μοναδική ζώνη στα ~250-300 ζ.β. στο 5'/25 PCR. Το συμπέρασμα αυτό συνάγεται αφενός διότι το μέγεθος του προϊόντος μειώνεται από τη μία αντίδραση στην επόμενη, που είναι λογικό δεδομένου ότι ο κάθε αναστροφος εκκινητής που χρησιμοποιείται υβριδίζει εσωτερικά του προηγούμενου. Έπειτα, η ποσότητα του προϊόντος αυξάνεται από το πρώτο PCR μέχρι το τελευταίο, γεγονός που οφείλεται στο ότι το προϊόν ενισχύεται εξειδικευμένα ολοένα και περισσότερο. Για τους λόγους που μόλις αναφέρθηκαν, οι άλλες ζώνες δεν θεωρείται πιθανόν να αποτελούν *Lon3* cDNA, καθώς φαίνεται ότι χάνονται μέχρι το τελευταίο PCR.

Στην **Εικόνα 3.22** με κόκκινο ορθογώνιο υποδεικνύονται οι ζώνες που επιλέχθηκαν να κλωνοποιηθούν σε πλασμιδιακό φορέα pGEM<sup>®</sup> T-easy (PROMEGA) για να σταλθούν για αλληλούχιση. Επιλέχθηκαν τόσο οι πιθανές ως *Lon3* ζώνες όσο και οι μη πιθανές, για να ελεγχθούν. Όπως ήταν αναμενόμενο, οι ζώνες στα ~150-200 ζ.β. και στα ~750 ζ.β. του PCR 5'/26 έδειξαν στην αλληλούχιση ότι δεν είναι προϊόντα της έκφρασης του γονιδίου *AtLon3*. Η ανάλυση του αποτελέσματος της αλληλούχισης της ζώνης ~350 ζ.β. του PCR 5'/26 παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.23** και της ζώνης ~250-300 ζ.β. του PCR 5'/25 παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.24**.

PCR 5'/26 (350bp) Lon3 sequencing with T7 promoter primer

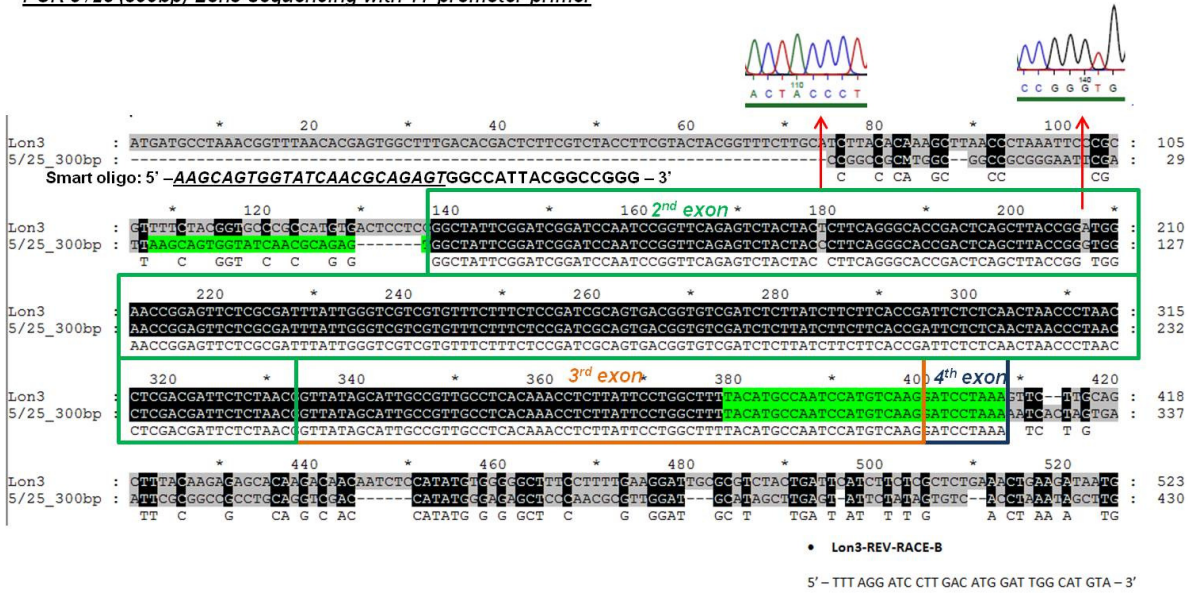


**Εικόνα 3. 23** Νουκλεοτιδική στοίχιση της αλληλούχισης του προϊόντος PCR 5'/26 (350bp) της συνθήκης Lon3 με το προτεινόμενο cDNA *AtLon3*. Με λαχανί υπογράμμιση δηλώνεται ο εκκινητής 26 και το 5' άκρο του εκκινητή SMART oligo. Τα εξώνια περικλείονται με ορθογώνια όπου το πράσινο στο 2ο, το πορτοκαλί στο 3ο και το μπλε στο 4ο.

Το αποτέλεσμα των δύο αλληλουχίσεων επιβεβαιώνει πως τα προϊόντα προέρχονται όντως από μεταγράφημα του γονιδίου *AtLon3*, καθώς και ότι πιθανότατα πρόκειται για το ίδιο μεταγράφημα, αφού και τα δύο προϊόντα ξεκινάνε από το ίδιο σημείο και η μόνη διαφορά τους έγκειται στο γεγονός ότι ο εκκινητής #25 υβριδίζει εσωτερικά του τμήματος που ενισχύει ο εκκινητής #26, άρα το προϊόν είναι μικρότερο στο 3' άκρο του. Στην **Εικόνα 3.25** παρουσιάζεται η αμινοξική στοίχιση της μετάφρασης των ακολουθιών που προέκυψαν από την αλληλούχιση με τη προβλεπόμενη πρωτεΐνη *AtLon3*. Τόσο η νουκλεοτιδική όσο και η αμινοξική στοίχιση των αποτελεσμάτων του 5' RACE με τις προβλεπόμενες ακολουθίες του γονιδίου *AtLon3* υποδεικνύουν ότι το ενισχυόμενο μεταγράφημα ξεκινά περίπου στα μέσα του φερόμενου ως 2<sup>ο</sup> εξωνίου του γονιδίου, το μάτισμα συμφωνεί με το προβλεπόμενο μεταξύ των εξωνίων, το πλαίσιο ανάγνωσης της παραγόμενης πρωτεΐνης είναι ανοικτό ενώ παράλληλα δεν ανιχνεύεται κανένα ATG κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης στο 5' άκρο του μεταγραφήματος.

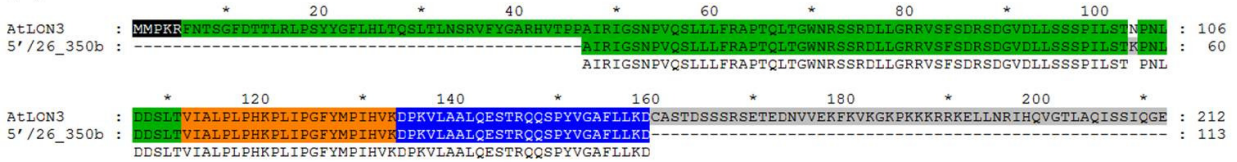


PCR 5'/25 (300bp) Lon3 sequencing with T7 promoter primer

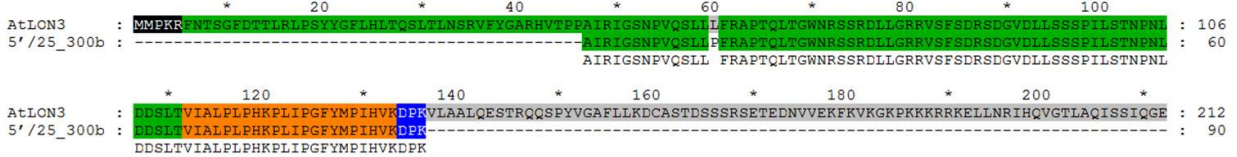


Εικόνα 3. 24 Νουκλεοτιδική στοίχιση της αλληλούχισης του προϊόντος PCR 5'/25 (300bp) της συνθήκης Lon3 με το προτεινόμενο cDNA *AtLon3*. Με λαχάνι υπογράμμιση δηλώνεται ο εκκινητής 25 και το 5' άκρο του εκκινητή SMART oligo. Τα εξώνια περικλείονται με ορθογώνια όπου το πράσινο στο 2ο, το πορτοκαλί στο 3ο και το μπλε στο 4ο.

(A)



(B)

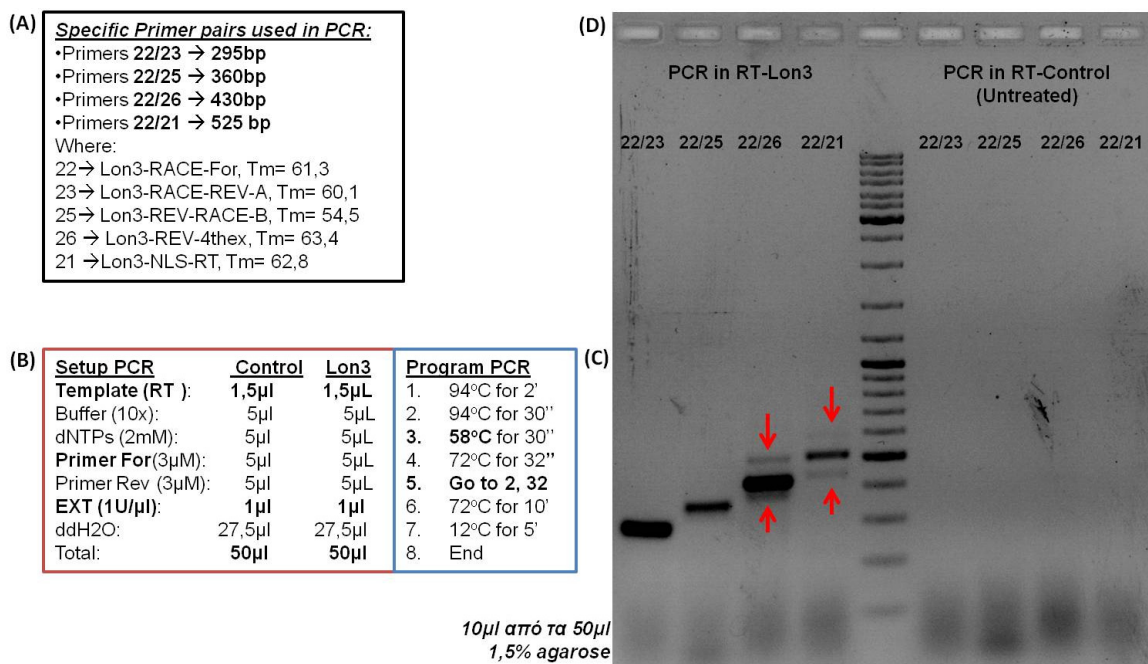


Εικόνα 3. 25 Αμινοξική στοίχιση των ακολουθιών που προκύπτουν από τη μετάφραση των μεταγραφημάτων του *AtLon3* με την υποθετική πρωτεΐνη *AtLon3* (TAIR). (A) Μετάφραση της ακολουθίας της αλληλούχισης του PCR 5'/26 (350 ζ.β.) (B) Μετάφραση της ακολουθίας της αλληλούχισης του PCR 5'/25 (300 ζ.β.). Τα χρώματα υπογράμμισης αντιστοιχίζουν τα αμινοξέα με τα εξώνια που τα παράγουν: 1<sup>ο</sup> εξώνιο με μαύρο, 2<sup>ο</sup> εξώνιο με πράσινο, 3<sup>ο</sup> εξώνιο με πορτοκαλί, 4<sup>ο</sup> εξώνιο με μπλε.

### 3.3.3 Η ανάλυση της έκφρασης του *AtLon3* υποδεικνύει την ύπαρξη δύο διαφορετικών μεταγραφημάτων με εναλλακτικό μάτισμα, με την προβλεπόμενη πρωτεΐνη του ενός να χάνει το σινιάλο NLS

Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη Υποενότητα, κάθε φορά που πραγματοποιούταν η αντίδραση RT και για τις δύο συνθήκες (*Lon3*-treated/untreated) το πρώτο βήμα ήταν ο έλεγχος του παραγόμενου cDNA με συγκεκριμένα ζευγάρια εξειδικευμένων εκκινητών. Αυτές οι αντιδράσεις PCR έδειξαν ότι κάποια από αυτά

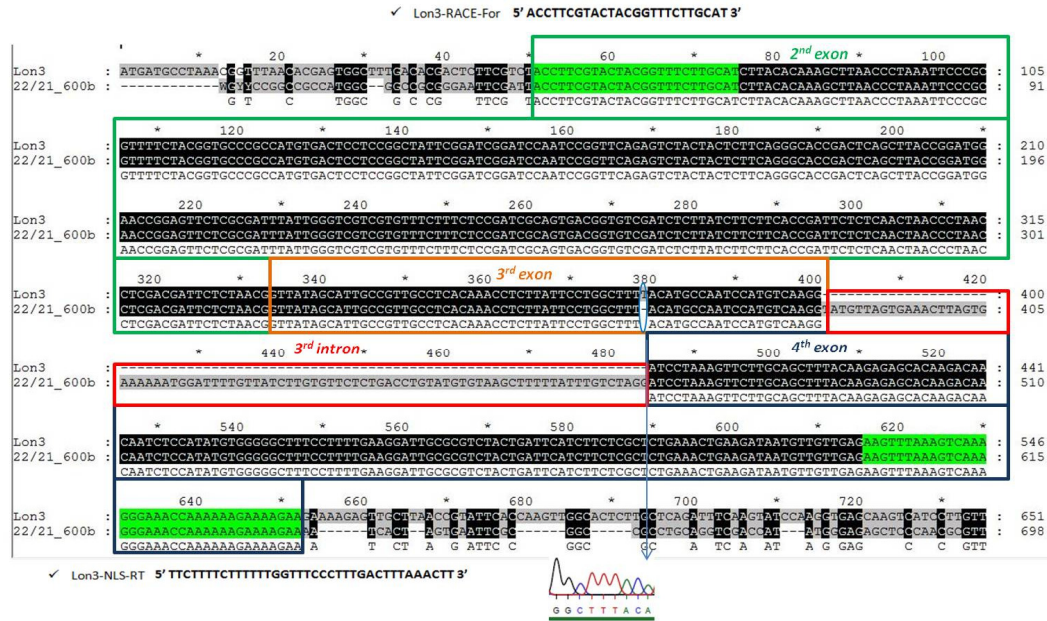
τα ζευγάρια εξειδικευμένων εκκινητών παρουσιάζουν ένα σταθερό πρότυπο ενίσχυσης του cDNA σε κάθε βιολογική και τεχνική επανάληψη που πραγματοποιήθηκε. Το πρότυπο αυτό υποδεικνύει πως εκτός από το κύριο προϊόν της αντίδρασης, που είναι και το αναμενόμενο, τα ζευγάρια αυτά παράγουν άλλα δύο προϊόντα σε πολύ χαμηλότερη ποσότητα, το ένα μικρότερου μεγέθους και το άλλο μεγαλύτερου μεγέθους από το κύριο προϊόν. Στην **Εικόνα 3.26** παρουσιάζονται αναλυτικότερα τα αποτελέσματα της ενίσχυσης του RT-Lon3 πριν το 5' SMART RACE PCR (που αναλύθηκε στην προηγούμενη Υποενότητα) με τα ζευγάρια εξειδικευμένων εκκινητών του γονιδίου, όπου υποδεικνύεται με κόκκινα βέλη το εν λόγω πρότυπο.



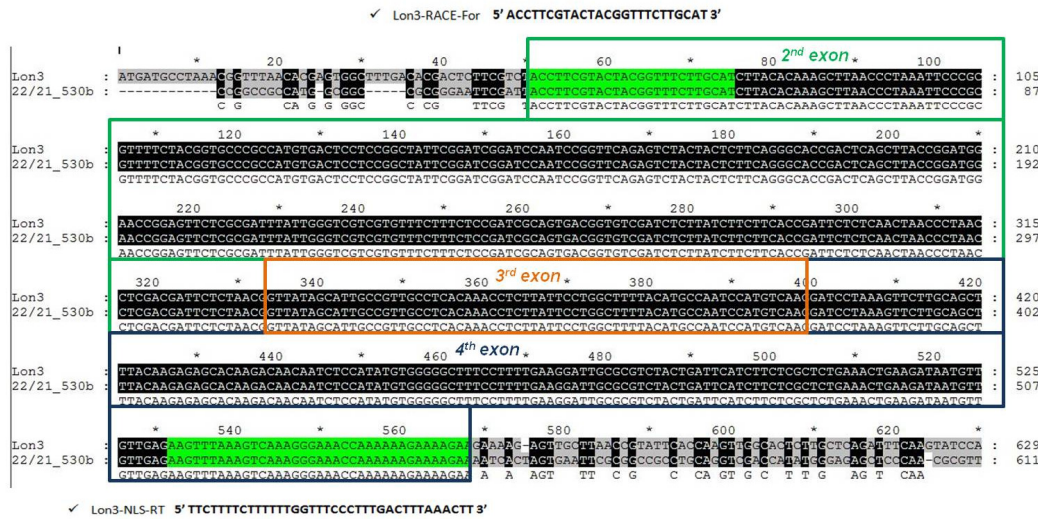
**Εικόνα 3. 26 Αποτελέσματα PCR με ζευγάρια εξειδικευμένων εκκινητών ως προς το AtLon3 στις συνθήκες RT-Lon3 και RT-Control (Untreated).** (A) Ζευγάρια εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν και αναμενόμενα μεγέθη cDNA. (B) Σχεδιασμός αντίδρασης PCR για την κάθε συνθήκη. (C) Πρόγραμμα θερμοκύκλων. (D) Αποτύπωση της ανάλυσης των προϊόντων PCR σε πηκτή αραρόζης. Αριστερά με κόκκινα βέλη σημαίνονται οι επιπλέον ζώνες που προκύπτουν από κάθε ζευγάρι εκκινητών, εκτός της κύριας ζώνης.

Τα προϊόντα του PCR 22/21 στο RT-Lon3 αποτελούνται από 3 ζώνες DNA, την κύρια ζώνη στα 525 ζ.β. (αναμενόμενο μέγεθος) και τις ζώνες στα ~450 ζ.β. (χαμηλή ζώνη) και στα ~600 ζ.β. (υψηλή ζώνη). Οι ζώνες αυτές αποκόπηκαν από την πηκτή, καθαρίστηκαν και κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα pGEM<sup>®</sup> T-easy (PROMEGA) για να σταλθούν για αλληλούχηση. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.27** και στην **Εικόνα 3.28**.

(A) PCR 22/21 600bp Lon3 in pGEM-T-easy #1 sequencing with T7 promoter primer

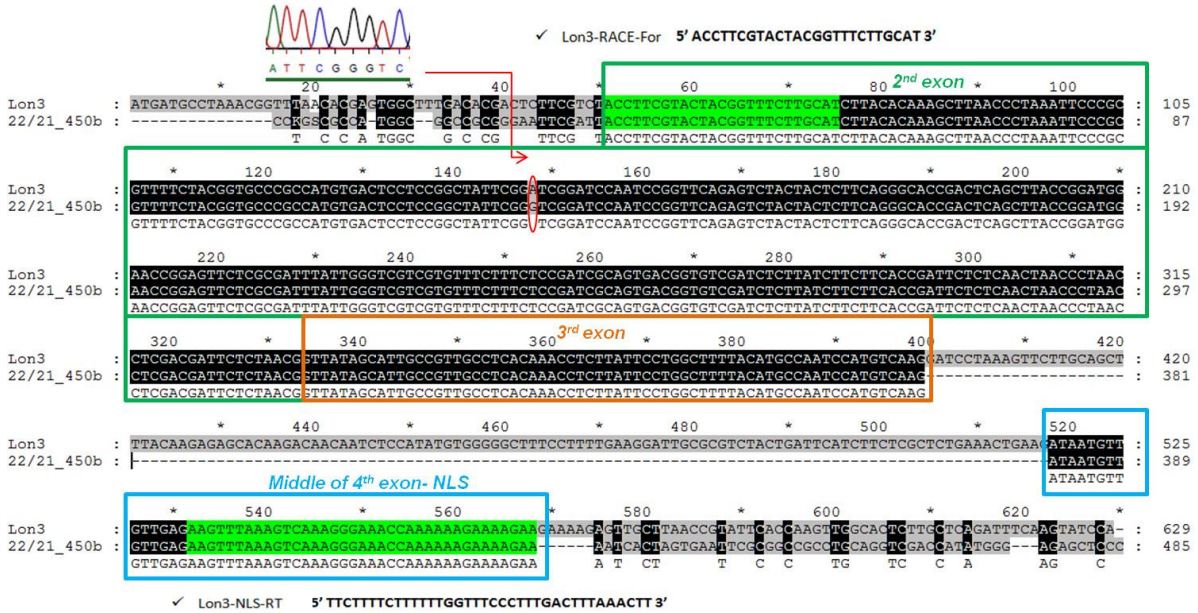


(B) PCR 22/21 (530bp) in RT-Lon3 sequencing with T7 promoter primer



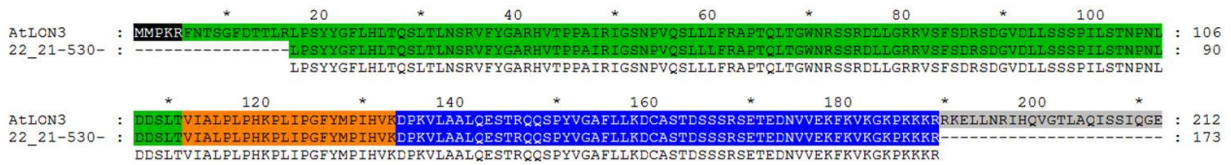
Εικόνα 3. 27 Νουκλεοτιδική στοίχιση της αλληλούχισης των προϊόντων 600 ζ.β. (Α) και 530 ζ.β. (Β) του PCR 22/21 (RT-Lon3) με το προτεινόμενο cDNA *AtLon3*. Με λαχάνι υπογράμμιση δηλώνονται οι εκκλιητές 22 και 21. Τα εξόνια περικλείονται με ορθογώνια όπου το πράσινο αντιστοιχεί στο 2<sup>ο</sup>, το πορτοκαλί στο 3<sup>ο</sup> και το μπλε στο 4<sup>ο</sup>. Με κόκκινο δηλώνεται η παρουσία του 3<sup>ου</sup> εσωνίου μέσα στο ενισχυόμενο τμήμα.

PCR 22/21 (450bp) in RT-Lon3 sequencing with T7 promoter primer

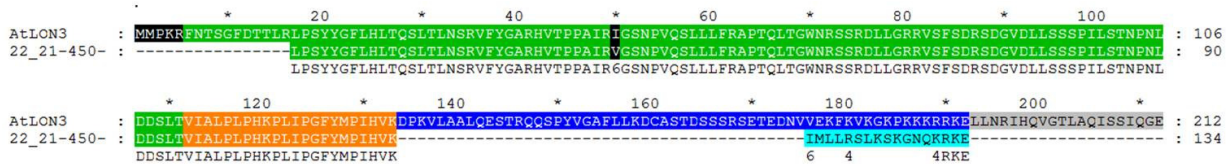


Εικόνα 3. 28 Νουκλεοτιδική στοίχιση της αλληλούχησης του προϊόντος 450 ζ.β. του PCR 22/21 (RT-Lon3) με το προτεινόμενο cDNA *AtLon3*. Με λαχάνι υπογράμμιση δηλώνονται οι εκκινητές 22 και 21. Τα εξώνια περικλείονται με ορθογώνια όπου το πράσινο αντιστοιχεί στο 2<sup>ο</sup>, το πορτοκαλί στο 3<sup>ο</sup> και το γαλάζιο στο τμήμα του 4<sup>ου</sup> εξωνίου που περιλαμβάνει το NLS.

(A)



(B)



Εικόνα 3. 29 Αμινοξική στοίχιση των ακολουθιών που προκύπτουν από τη μετάφραση των μεταγραφημάτων του *AtLon3* με την υποθετική πρωτεΐνη *AtLon3* (TAIR). (A) Μετάφραση της ακολουθίας της αλληλούχησης του PCR 22/21 (530 ζ.β.). (B) Μετάφραση της ακολουθίας της αλληλούχησης του PCR 22/21 (450 ζ.β.). Τα χρώματα υπογράμμισης αντιστοιχίζουν τα αμινοξέα με τα εξώνια που τα παράγουν: 1<sup>ο</sup> εξώνιο με μαύρο, 2<sup>ο</sup> εξώνιο με πράσινο, 3<sup>ο</sup> εξώνιο με πορτοκαλί, 4<sup>ο</sup> εξώνιο με μπλε. Με γαλάζια υπογράμμιση σημαίνεται ένα διαφορετικό αναγνωστικό πλαίσιο στην περιοχή του 4<sup>ου</sup> εξωνίου που ανιχνεύεται στη χαμηλή ζώνη (450 ζ.β.) του PCR 22/21.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.27 (A), το μεγάλο προϊόν του PCR 22/21 (~600 ζ.β.) αποτελεί μια μορφή του κύριου μεταγραφημάτων Lon3 στην οποία δεν έχει συμβεί το μάτισμα του 3<sup>ου</sup> εσωνίου, με αποτέλεσμα να ανιχνεύεται η παρουσία του μέσα στο μεταγράφημα. Στην Εικόνα 3.27 (B) παρατηρούμε ότι το κύριο προϊόν του PCR

22/21 (530 ζ.β.) συμπίπτει απόλυτα με το αναμενόμενο cDNA και η παραγόμενη πρωτεΐνη έχει ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο σε όλο το μήκος της ακολουθίας που αλληλουχγήθηκε (**Εικόνα 3.29 A**).

Εν αντιθέσει με τις άλλες δύο ζώνες, η αλληλούχιση της μικρότερης ζώνης του PCR 22/21 (~450 ζ.β.) έδειξε ότι ενώ η ακολουθία που ενισχύθηκε ξεκινάει κανονικά από το 2<sup>ο</sup> εξώνιο και συνεχίζει μέχρι το τέλος του 3<sup>ου</sup> εξωνίου συμπίπτοντας απόλυτα με το προβλεπόμενο cDNA, στην πορεία συνεχίζει κατευθείαν στη μέση του 4<sup>ου</sup> εξωνίου, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.28**. Αναλυτικότερα, το μάτισμα μεταξύ 3<sup>ου</sup> και 4<sup>ου</sup> εξωνίου φαίνεται να επεκτείνεται στο συγκεκριμένο μεταγράφημα, αφαιρώντας όλο το 3<sup>ο</sup> εσώνιο και περίπου το μισό 4<sup>ο</sup> εξώνιο. Η μετάφραση της ακολουθίας που προέκυψε από την αλληλούχιση αυτού του προϊόντος υποδεικνύει ότι μετά τα αμινοξέα του 3<sup>ου</sup> εξωνίου, το πλαίσιο ανάγνωσης εξακολουθεί να είναι ανοικτό, αλλά δεν συμπίπτει πλέον με το προβλεπόμενο από τις βάσεις δεδομένων (**Εικόνα 3.29 B**). Το εναλλακτικό μάτισμα μεταξύ 3<sup>ου</sup> και 4<sup>ου</sup> εξωνίου φαίνεται ότι προκαλεί την αλλαγή αναγνωστικού πλαισίου στην παραγόμενη πρωτεΐνη ακριβώς στο σημείο που κανονικά τοποθετούνται τα αμινοξέα του σινιάλου NLS, οδηγώντας την πρωτεΐνη στην απώλεια του NLS.

Το εναλλακτικό αναγνωστικό πλαίσιο παραμένει ανοικτό για αρκετά μεγάλο μήκος της αλληλουχίας. Δυστυχώς το RT, για να εξασφαλιστεί η μεγαλύτερη δυνατή εξειδίκευση, πραγματοποιείται με τον ανάστροφο εκκινητή που είναι ακριβώς πάνω στην ακολουθία του NLS. Κατά συνέπεια, δεν μπορεί να εξακριβωθεί από το συγκεκριμένο πείραμα τι συμβαίνει με την υπόλοιπη ακολουθία του 4<sup>ου</sup> εξωνίου και αν το μάτισμα από εκεί και κάτω πραγματοποιείται βάσει του προβλεπόμενου ή διαφορετικά. Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι το γονίδιο *AtLon3* στις συγκεκριμένες συνθήκες έκφρασης παράγει τουλάχιστον δύο μεταγραφήματα, η διαφορά των οποίων έγκειται στο εναλλακτικό μάτισμα που πραγματοποιείται μεταξύ 3<sup>ου</sup> και 4<sup>ου</sup> εξωνίου προκαλώντας αλλαγή του αναγνωστικού πλαισίου της παραγόμενης πρωτεΐνης.



*Συζήτηση*

Παρά το γεγονός ότι για πολλά χρόνια η απουσία δημοσιευμένων πειραματικών δεδομένων για το *AtLon3* είχε οδηγήσει στον χαρακτηρισμό του ως ψευδογονίδιο, η πρόσφατη ανάλυση μικροσυστοιχιών της αρσενικής αναπαραγωγικής σειράς του *A. thaliana* έδειξε ότι η έκφρασή του ανιχνεύεται σε υψηλά επίπεδα στα σπερματικά κύτταρα της γύρης. Η έκφραση του *AtLon3* επιβεβαιώθηκε μέσω RT-PCR σε ένα εύρος ιστών του *Arabidopsis*, όπου το μεταγράφημα του γονιδίου ανιχνεύθηκε μόνο στη γύρη (Χατζόπουλος Δ., 2013). Τα γεγονότα αυτά έρχονται σε αντίθεση με την υπόθεση του ψευδογονιδίου και εγείρουν το ενδιαφέρον ως προς τη λειτουργία του *AtLon3* στην αρσενική αναπαραγωγική σειρά και το ρόλο του στη διπλή γονιμοποίηση.

Για το λόγο αυτό, στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε μια προσπάθεια διερεύνησης του προτύπου της έκφρασης και της υποκυτταρικής τοποθέτησης της πρωτεΐνης *AtLon3*, με χρήση του ετερόλογου συστήματος έκφρασης του φυτού *Nicotiana benthamiana*. Τα αποτελέσματα της διπλής αυτής προσέγγισης των χαρακτηριστικών του *AtLon3* παρουσιάστηκαν αναλυτικά στην προηγούμενη Ενότητα. Ακολούθως παρατίθεται ο σχολιασμός των αποτελεσμάτων, τα συμπεράσματα που συνάγονται, καθώς και μια πιθανή μελλοντική προσέγγιση για περαιτέρω ανάλυση της λειτουργίας του γονιδίου.

#### **4.1 Η δυαδική στόχευση της *AtLon3* σε μιτοχόνδρια και πυρήνα δεν φαίνεται να σχετίζεται με την ύπαρξη δύο εναλλακτικών μεταγραφημάτων**

Η βιοπληροφορική ανάλυση της αμινοτελικής περιοχής της προβλεπόμενης πρωτεΐνης *AtLon3* υπέδειξε την ύπαρξη ενιαίας (ambiguous) πρόδρομης αλληλουχίας δυαδικής στόχευσης για το μιτοχόνδριο και το χλωροπλάστη στην περιοχή των αμινοξέων 1-90, με τις υψηλότερες τιμές να ανιχνεύονται στα 1-50 aa. Παράλληλα, υπέδειξε την ύπαρξη σινιάλου NLS (Nuclear Localization Signal) στη θέση 178-196 aa, καθιστώντας την *AtLon3* το μοναδικό μέλος της οικογένειας *Lon* του *Arabidopsis* με πιθανότητα τοποθέτησης στον πυρήνα του κυττάρου. Η διερεύνηση της πρωτεϊνικής στόχευσης ενός γονιδίου μπορεί να παράσχει σημαντικές πληροφορίες για την αποσαφήνιση της λειτουργίας του, αναλόγως με το υποκυτταρικό διαμέρισμα στο οποίο τοποθετείται.

Στην περίπτωση του *AtLon3*, οι αλληλουχίες του μεταγραφήματος και της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί και παρέχονται στις βάσεις δεδομένων, έχουν προκύψει μόνο από ανάλυση *in silico* και δεν έχουν επιβεβαιωθεί πειραματικά. Για το λόγο αυτό και προκειμένου να αποσαφηνιστεί το πρότυπο της υποκυτταρικής τοποθέτησης της παραγόμενης πρωτεΐνης, δημιουργήθηκαν τέσσερις διακριτές κατασκευές της γονιδιωματικής *AtLon3* αλληλουχίας σε σύντηξη με το γονίδιο αναφοράς YFP και το επιτόπιο FLAG. Οι Τρεις εξ' αυτών διαφοροποιούνται τεχνητά στο 5' άκρο του γονιδίου και καθοδηγούνται από τον καθολικό υποκινητή 35SCaMV, ενώ η τέταρτη καθοδηγείται από τον ενδογενή υποκινητή του γονιδίου (*pLon3*).

Οι τρεις κατασκευές του *AtLon3* που καθοδηγούνται από τον 35SCaMV, διαφοροποιούνται στο 5' άκρο, προκειμένου η στόχευσή τους στο κύτταρο να χαράξει μια κατεύθυνση προς την αποσαφήνιση της αλληλουχίας του, και έχουν υποστεί τις εξής τεχνητές τροποποιήσεις: η πρώτη δεν φέρει αλλαγές (**35S::Lon3:YFP:FLAG-MM**), στη δεύτερη έχουν αλλαχθεί τεχνητά τα δύο πρώτα κωδικόνια ATG (**35S::Lon3:YFP:FLAG-ΔMM**) με σκοπό να ελεγχθεί αν ένα εκ των δύο είναι το εναρκτήριο κωδικόνιο της μετάφρασης, ενώ στην τρίτη κατασκευή έχει αφαιρεθεί η προβλεπόμενη πρόδρομη μιτοχονδριακή αλληλουχία στόχευσης (**35S::Lon3:YFP:FLAG-ATP**), προκειμένου να ελεγχθεί εάν η παραγόμενη πρωτεΐνη θα τοποθετείται πλέον στον πυρήνα του κυττάρου λόγω της ύπαρξης του NLS. Η κατασκευή ***pLon3::Lon3:YFP:FLAG*** χρησιμοποιήθηκε τόσο για τη διερεύνηση της υποκυτταρικής στόχευσης της πρωτεΐνης υπό τον έλεγχο του ενδογενούς υποκινητή του *AtLon3*, όσο και για την ανάλυση των μεταγραφημάτων που παράγονται κατά την έκφρασή της, εφόσον προσομοιώνει το γονιδιακό τόπο του *AtLon3* στην ενδογενή του μορφή.

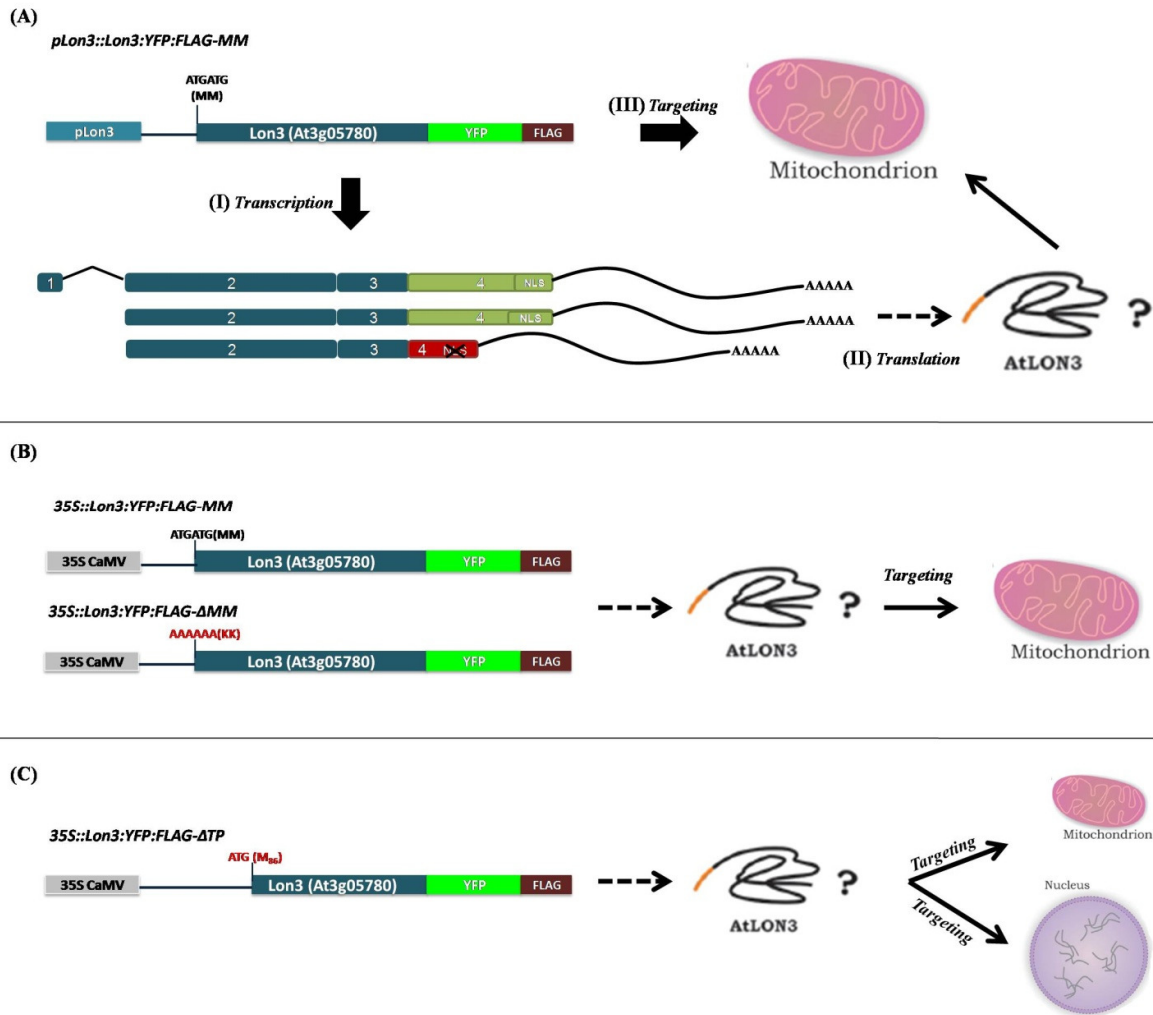
Τόσο η ανάλυση της πρωτεϊνικής στόχευσης όσο και η ανάλυση των μεταγραφημάτων του *AtLon3*, παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για αυτόν τον γονιδιακό τόπο και συνοψίζονται στην **Εικόνα 4.1**. Η παροδική έκφραση των κατασκευών *AtLon3* στην επιδερμίδα φύλλων του *N. benthamiana*, έδειξε ένα σταθερό πρότυπο φθορισμού, ο οποίος εντοπίζεται πάγια στα μιτοχόνδρια υπό τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες, επιβεβαιώνοντας την πρόβλεψη για το μιτοχονδριακό σινιάλο στόχευσης, αλλά όχι για το χλωροπλαστικό. Η κατασκευή ***pLon3::Lon3:YFP:FLAG***, παρά το γεγονός ότι πρόκειται για ετερόλογη έκφραση, εκφράζεται και τοποθετείται στο μιτοχόνδριο, όπως απέδειξε ο φθορισμός του YFP. Η ανάλυση των μεταγραφημάτων που οδηγούν στην παραγωγή αυτής της πρωτεΐνης έδειξε ότι ανιχνεύονται τουλάχιστον 3 διαφορετικά μεταγραφήματα του γονιδίου στις



παρούσες συνθήκες έκφρασης: τα δύο παρουσιάζουν το ίδιο μάτισμα, διαφέρουν στο μήκος του 5' άκρου και στα επίπεδα έκφρασης, καθότι το μεγαλύτερο σε μήκος μεταγράφημα φαίνεται να είναι σπάνιο και η έκφρασή του ανιχνεύεται οριακά. Επίσης, αυτό το μεταγράφημα είναι το μόνο που περιλαμβάνει το προβλεπόμενο 1<sup>ο</sup> εξώνιο, αλλά όχι ως κωδική περιοχή, καθότι δεν ανιχνεύεται μάτισμα μεταξύ του 1<sup>ου</sup> και του 2<sup>ου</sup> εξωνίου. Το τρίτο μεταγράφημα χαρακτηρίζεται από εναλλακτικό μάτισμα στο 4<sup>ο</sup> εξώνιο, προκαλώντας αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης και συνεπώς απώλεια της αμινοξικής αλληλουχίας που χαρακτηρίζει το σινιάλο NLS.

Είναι φανερό πως το εναλλακτικό μεταγράφημα δεν μπορεί να τοποθετείται στον πυρήνα, εφόσον δεν έχει το σινιάλο NLS. Παρά το γεγονός ότι τα άλλα δύο μεταγραφήματα φέρουν το σινιάλο NLS, αυτό δεν φαίνεται στις παρούσες συνθήκες να επηρεάζει τη στόχευσή τους, αφού ο φθορισμός ανιχνεύεται μόνο στο μιτοχόνδριο. Η διαφορά μεταξύ των επιπέδων έκφρασης που ανιχνεύονται για κάθε μεταγράφημα υποδεικνύει πως κατά πάσα πιθανότητα η πρωτεΐνη που ανιχνεύεται στα μιτοχόνδρια προέρχεται, κατά κύριο λόγο, από τη μετάφραση του πιο άφθονου μεταγραφήματος, που παρουσιάζει το αναμενόμενο μάτισμα αλλά δεν είναι γνωστή η έκταση του 5' άκρου του.

Ο φθορισμός στα μιτοχόνδρια που εντοπίζεται τόσο στην κατασκευή *Lon3*-ΔMM δε διαφέρει ούτε σε πρότυπο ούτε σε ένταση από εκείνον που ανιχνεύεται στην κατασκευή *Lon3*-MM, υποδεικνύοντας ότι η έκφραση του *AtLon3* δεν εξαρτάται από κανένα εκ των δύο AUG του προβλεπόμενου πρώτου εξωνίου. Η έκφραση της κατασκευής *Lon3*-ΔTP παρουσιάζει ενδιαφέρον, καθώς είναι η πρώτη φορά που ανιχνεύεται δυαδική στόχευση της πρωτεΐνης *AtLon3* στα μιτοχόνδρια και τον πυρήνα του κυττάρου. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πρώτον ότι η προβλεπόμενη αλληλουχία NLS είναι λειτουργική και οδηγεί στην αναγνώριση της παραγόμενης πρωτεΐνης από τον πυρήνα και δεύτερον, ότι η πρόδρομη μιτοχονδριακή αλληλουχία στόχευσης δεν έχει απομακρυνθεί εξ' ολοκλήρου.



Εικόνα 4. 1 Σχηματική αποτύπωση του προτύπου έκφρασης και υποκυτταρικής τοποθέτησης της πρωτεΐνης AtLon3 στο ετερόλογο σύστημα έκφρασης του *N. benthamiana*.

(A) Η ανάλυση της παροδικής έκφρασης της κατασκευής **pLon3::Lon3:YFP:FLAG** έχει ως αποτέλεσμα: (I) την ανίχνευση τουλάχιστον 3 διαφορετικών μεταγραφημάτων, εκ των οποίων τα δύο παρουσιάζουν το ίδιο μάτισμα, περιέχουν το σινιάλο NLS αλλά διαφέρουν στο μήκος του 5' άκρου, ενώ το τρίτο παρουσιάζει εναλλακτικό μάτισμα στο 4<sup>ο</sup> εξόνιο, αλλάζοντας αναγνωστικό πλαίσιο και χάνοντας την αλληλουχία NLS, (II) μεταφραστική αποτυχία. Το ενδιάμεσο στάδιο (II) της μετάφρασης των μεταγραφημάτων που ανιχνεύονται και οι πρωτεϊνικές ισομορφές που παράγονται δεν έχουν αποσαφηνιστεί, αλλά η αλληλουχία των μεγαλύτερων σε μήκος μεταγραφημάτων έδειξε ότι το 1<sup>ο</sup> εξόνιο μάλλον δεν αποτελεί κωδική περιοχή.

(B) Η παροδική έκφραση των κατασκευών **35S::Lon3:YFP:FLAG-MM** και **35S::Lon3:YFP:FLAG-ΔMM** χαρακτηρίζεται και στις δύο περιπτώσεις από μιτοχondριακή πρωτεϊνική στόχευση. Το στάδιο της μετάφρασης της πρωτεΐνης δεν έχει αποσαφηνιστεί, αλλά το αποτέλεσμα υποδεικνύει πως η παραγωγή της AtLon3 δεν εξαρτάται από κανένα εκ των δύο AUG του προβλεπόμενου 1<sup>ου</sup> εξωνίου του γονιδίου.

(C) Η παροδική έκφραση της κατασκευής **35S::Lon3:YFP:FLAG-ΔTP** παρουσιάζει δυαδική στόχευση σε μιτοχόνδριο και πυρήνα, υποδεικνύοντας ότι το σινιάλο NLS είναι λειτουργικό και οδηγεί στην αναγνώριση της παραγόμενης πρωτεΐνης από το μηχανισμό εισαγωγής του πυρήνα. Παρόλα αυτά, υποδεικνύει επίσης ότι το σινιάλο μιτοχondριακής τοποθέτησης (mP) μάλλον δεν έχει αφαιρεθεί εντελώς.

Τα δεδομένα αυτά έδειξαν ότι η δυαδική στόχευση της πρωτεΐνης AtLon3 στα μιτοχόνδρια και τον πυρήνα των επιδερμικών κυττάρων του καπνού ανιχνεύεται μόνο στην περίπτωση που αφαιρείται ένα μεγάλο μέρος του μιτοχondριακού σινιάλου στόχευσης. Είναι ήδη γνωστό, όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή, ότι τα προϊόντα

των γονιδίων *AtLon1* και *AtLon4* της οικογένειας Lon του *Arabidopsis* παρουσιάζουν δυαδική στόχευση στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες, χρησιμοποιώντας διακριτούς μηχανισμούς που ρυθμίζονται σε διαφορετικά επίπεδα και υπό διαφορετικές αναπτυξιακές συνθήκες. Παρόλα αυτά, το *AtLon3* είναι το μοναδικό γονίδιο της οικογένειας που φαίνεται να στοχεύει και στον πυρήνα και ο τρόπος με τον οποίο ρυθμίζεται αυτή η δυαδική στόχευση δεν είναι ξεκάθαρος.

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί διάφοροι μηχανισμοί που ρυθμίζουν τη δυαδική στόχευση των πρωτεϊνικών ισομορφών που παράγονται από ένα μόνο γονίδιο. Ένας κοινός μηχανισμός για την παραγωγή πολλαπλών πρωτεϊνικών ισομορφών από ένα γονίδιο είναι ο μεταγραφικός έλεγχος, που στηρίζεται στην παραγωγή πολλαπλών μεταγραφημάτων είτε μέσω πολλαπλών σημείων έναρξης της μεταγραφής στο 5' άκρο είτε με χρήση εναλλακτικών εξωνίων που προκύπτουν από διαφορετικό μάτισμα (Silva-Filho, 2003). Επιπλέον, οι μετα-μεταγραφικοί μηχανισμοί, ιδιαίτερα η εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης από ένα μονό μεταγράφημα με τη χρήση δύο πιθανών κωδικονίων έναρξης στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο, μπορεί να είναι κρίσιμοι για τον προσδιορισμό της τελικής τοποθέτησης των προϊόντων που προέρχονται από ένα γονίδιο.

Έχει δειχθεί ότι η δυαδική στόχευση της πρωτεΐνης *AtLon1* ρυθμίζεται τόσο με εναλλακτική έναρξη της μεταγραφής όσο και της μετάφρασης, χρησιμοποιώντας δύο κωδικόνια AUG στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο και το μηχανισμό της διαρρέουσας σάρωσης του ριβοσώματος για την αναγνώριση του πλαισίου έναρξης της μετάφρασης (consensus sequence context). Ένα άλλο παράδειγμα διαφορεικής μεταγραφής και μετάφρασης στο *Arabidopsis*, που καταλήγει στη δημιουργία δύο διακριτών ισομορφών που τοποθετούνται στον πυρήνα και το μιτοχόνδριο, είναι η DNA λιγάση 1 του *Arabidopsis* (Sunderland et al., 2006). Αυτή η πρωτεΐνη ακολουθεί το μηχανισμό δυαδικής στόχευσης και παράλληλα αποτελεί ένα εξαιρετικό παράδειγμα ιεραρχικής κυριαρχίας της πρόδρομης μιτοχονδριακής αλληλουχίας στόχευσης (mP) έναντι του σινιάλου πυρηνικής τοποθέτησης (NLS). Αντιθέτως, η χρήση εναλλακτικών πρώτων εξωνίων μέσω διαφορετικού ματίσματος αποτελεί την πιθανότερη αιτία για τις χλωροπλαστικές και πυρηνικές ισομορφές της φυτικής πρωτεΐνης cp31 που προσδένει RNA (Ohta et al., 1995).

Οι πρωτεΐνες που τοποθετούνται στον πυρήνα και σε ένα εκ των δύο οργανιδίων, όπως η DNA λιγάση 1 του *Arabidopsis*, παρέμειναν για πολύ καιρό στην αφάνεια (Sunderland et al., 2006). Παρόλα αυτά, στα φυτά ολοένα και αυξανόμενα δεδομένα υποδεικνύουν την ύπαρξη πυρηνικών πρωτεϊνών, οι οποίες τοποθετούνται επίσης και

στα μιτοχόνδρια (όπως στη ζύμη και τα θηλαστικά) ή στα πλαστίδια (Krause and Krupinska, 2009). Οι Small et al. δήλωσαν το 1998, παρά την έλλειψη αποδείξεων, ότι θα ήταν αναμενόμενη η ύπαρξη πρωτεϊνών με ταυτόχρονη στόχευση και στα τρία υποκυτταρικά διαμερίσματα που περιέχουν DNA, οι οποίες θα εμπλέκονται στο μεταβολισμό του DNA και του RNA.

Στην περίπτωση της πρωτεΐνης AtLon3 και σύμφωνα με όσα προαναφέρθηκαν, είναι δύσκολο να διεξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα ως προς τον μηχανισμό με τον οποίο ρυθμίζεται η δυαδική τοποθέτησή της στα μιτοχόνδρια και τον πυρήνα. Παρόλα αυτά, ούτε το εναλλακτικό μάτισμα που ανιχνεύθηκε φαίνεται να επηρεάζει την υποκυτταρική τοποθέτηση της πρωτεΐνης, ούτε ανέκυσαν στοιχεία που να υποστηρίζουν εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης της πρωτεΐνης στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη. Αντιθέτως, φαίνεται ότι η πρωτεΐνη AtLon3 ανιχνεύεται στον πυρήνα μόνο όταν λείπει μεγάλο μέρος του μιτοχονδριακού σινιάλου στόχευσης. Το γεγονός αυτό ίσως υποδεικνύει ότι το σινιάλο αυτό εμποδίζει την αλληλεπίδραση του NLS με τους πυρηνικούς υποδοχείς των συμπλόκων των πυρηνικών πόρων (Merkle, 2001), που αναγνωρίζουν και επιτρέπουν την είσοδο μιας πρωτεΐνης από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα.

Πολλές πρωτεΐνες φέρουν δύο σινιάλα στόχευσης, που οδηγούν στην κατανομή τους είτε ανάμεσα στα μιτοχόνδρια, τα περοξυσώματα και το ενδοπλασματικό δίκτυο είτε σε ένα από αυτά τα οργανίδια και τον πυρήνα. Όταν δύο σινιάλα βρίσκονται στο ίδιο πολυπεπίδιο, το ερώτημα είναι πώς επιτυγχάνεται η σχετική κατανομή του κάθε σινιάλου. Η διαφορική κατανομή της πρωτεΐνης μπορεί να επιτευχθεί εάν πριν την εισαγωγή της στο υποκυτταρικό διαμέρισμα, το σινιάλο στόχευσης σε έναν υποπληθυσμό της πρωτεΐνης γίνει μη-προσβάσιμο για τον υποδοχέα που προορίζεται. Η προσβασιμότητα του σινιάλου στόχευσης μπορεί να ελέγχεται μέσω αναδίπλωσης της πρωτεΐνης, απόκρυψης λόγω αλληλεπίδρασης με άλλη πρωτεΐνη ή μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Σε αυτές τις περιπτώσεις η πρόδρομη πρωτεΐνη μπορεί είτε να παραμείνει στο κυτταρόπλασμα είτε να τοποθετηθεί σε ένα άλλο οργανίδιο μέσω του δεύτερου σινιάλου στόχευσης (Karniely and Pines, 2005).

Οι μηχανισμοί της δυαδικής στόχευσης σε ορισμένες περιπτώσεις αποσκοπούν σε ιστοειδική στόχευση της πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη τοποθετείται σε ένα υποκυτταρικό διαμέρισμα, αλλά αυτό διαφέρει από ιστό σε ιστό. Για παράδειγμα, το ένζυμο της συνθετάσης της γλουταμίνης σε οργανισμούς όπως το σκυλόψαρο, τοποθετείται σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα αναλόγως με τον ιστό και τη λειτουργία. Παρά το γεγονός ότι η πρωτεΐνη κωδικοποιείται από ένα γονίδιο, η ιστοειδική

δυσιακή έκφρασή του επιτελείται από διαφορετικούς μηχανισμούς. Στο σκυώτι του σκυλώπαρου τοποθετείται ένα μεταγράφημα που περιέχει ένα εναλλακτικό εξώνιο που δεν εντοπίζεται στους νευρωνικούς ιστούς, το οποίο έχει άνωθεν ένα επιπλέον κωδικόνιο έναρξης σε ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο που οδηγεί στη δημιουργία πρόδρομου μιτοχονδριακού σινιάλου στόχευσης (Yogev and Pines, 2011).

Σύμφωνα με τα δεδομένα των Yogev και Pines (2011), το εναλλακτικό μάτισμα στα μεταγραφήματα του *AtLon3* που ανιχνεύθηκαν μπορεί να μη φαίνεται ότι επηρεάζει τη στόχευση στο ετερόλογο σύστημα του καπνού, ενδέχεται όμως να σχετίζεται με την ιστοειδικότητα της πρωτεΐνης. Η έκφραση των μεταγραφημάτων *AtLon3* σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, ανιχνεύεται στα σπερματικά κύτταρα της γύρης του *Arabidopsis*, σύμφωνα με τα δεδομένα μικροσυστοιχιών του Genevestigator. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν δεδομένα για την έκφραση του γονιδίου σε συνθήκες απόκρισης του φυτού σε περιβαλλοντική καταπόνηση (π.χ. οξειδωτικό στρες), που θα μπορούσε να προκαλέσει την ανάγκη έκφρασης της *AtLon3* σε διαφορετικό ιστό.

#### **4.2 Το πρότυπο έκφρασης και υποκυτταρικής τοποθέτησης της *AtLon3* υποδεικνύει ότι το προβλεπόμενο πρώτο εξώνιο δεν αποτελεί κωδική περιοχή, καθώς και την πιθανότητα η έναρξη της μετάφρασης του γονιδίου να μην εξαρτάται απαραίτητα από κωδικόνιο AUG**

Όπως προαναφέρθηκε, η χρήση του 5' SMART RACE για την ανάλυση των μεταγραφημάτων του *AtLon3*, μετά από παροδική έκφραση της κατασκευής *pLon3::Lon3:YFP:FLAG* στο ετερόλογο σύστημα *N. benthamiana*, οδήγησε σε νέα δεδομένα σχετικά με το πρότυπο της έκφρασης και τη δομή της αλληλουχίας του γονιδίου. Η ενίσχυση του 5' άκρου του cDNA με ένα εύρος εξειδικευμένων εκκινητών ως προς το *AtLon3* φανερώνει την ύπαρξη μεταγραφημάτων διαφορετικού μεγέθους, εκ των οποίων μόνο το αναμενόμενο μεταγράφημα ανιχνεύεται σε αφθονία. Η αλληλούχιση αυτών των μεταγραφημάτων υποδεικνύει ότι μάλλον το φερόμενο ως πρώτο εξώνιο του γονιδίου δεν αποτελεί κωδική περιοχή, καθώς η αλληλουχία του ανιχνεύεται μόνο σε μεταγραφήματα που φέρουν και το πρώτο εσώνιο. Τα μεταγραφήματα αυτά είναι τα μεγαλύτερα σε μήκος που ανιχνεύτηκαν και πιθανότατα είναι σπάνια μεταξύ των *AtLon3* μεταγραφημάτων, κρίνοντας από την οριακή ενίσχυσή τους. Η ενίσχυση με εξειδικευμένους εκκινητές δεν αποκαλύπτει

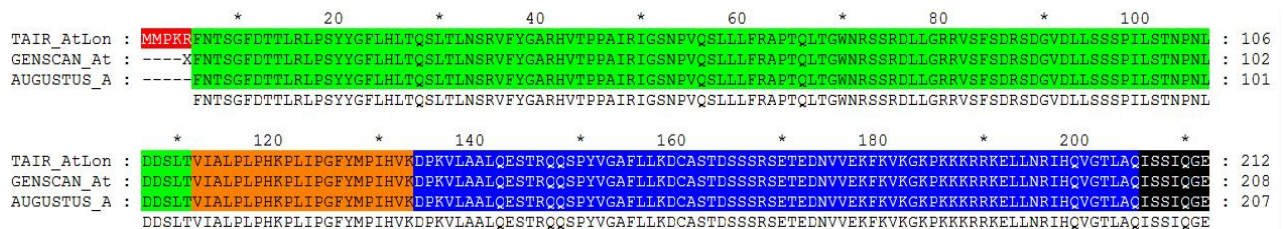
φυσικά το πραγματικό μήκος του μεταγραφήματος *AtLon3*. Παρόλα αυτά, στο κύριο μεταγράφημα που ανιχνεύεται απέδειξε ότι το μάτισμα από την περιοχή του δεύτερου εξωνίου και έπειτα, συμπίπτει με το προβλεπόμενο στις βάσεις δεδομένων. Επιπλέον, η ανάλυση της αλληλουχίας του μικρότερου μεταγραφήματος *AtLon3* αποκάλυψε ότι έχει υποστεί εναλλακτικό μάτισμα, καθώς μαζί με το 3<sup>ο</sup> εσώνιο έχει αποκοπεί και ένα μεγάλο μέρος του 4<sup>ου</sup> εξωνίου. Η μετάφραση αυτού του μεταγραφήματος δείχνει ότι η παραγόμενη πρωτεΐνη έχει ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο, το οποίο όμως αλλάζει λόγω του εναλλακτικού ματίσματος, με αποτέλεσμα αυτή η πρωτεϊνική ισομορφή να μην έχει το σινιάλο NLS που φυσιολογικά βρίσκεται στη μέση του 4<sup>ου</sup> εξωνίου. Συνεπώς, ανιχνεύονται τουλάχιστον δύο εναλλακτικά μεταγραφήματα για το γονίδιο *AtLon3* στις δεδομένες συνθήκες έκφρασης.

Η τεχνική του 5' SMART RACE μέσω της χρήσης του εκκινητή SMART oligo και μιας σειράς εξειδικευμένων ανάστροφων εκκινητών, για την αποσαφήνιση του πραγματικού μήκους του 5' άκρου των μεταγραφημάτων *AtLon3*, αλλά και της εύρεσης του πραγματικού κωδικονίου έναρξης της μετάφρασης, δεν ανέδειξε μεταγραφήματα που να εκτείνονται μέχρι το προβλεπόμενο πρώτο εξώνιο του γονιδίου. Το μεγαλύτερο σε μήκος μεταγράφημα που ανιχνεύεται μέσω του 5' SMART RACE ξεκινάει στην περιοχή του 2<sup>ου</sup> εξωνίου και δεν περιλαμβάνει κανένα ATG κωδικόνιο έναρξης σε ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο. Τα δεδομένα της αλληλούχησης των μεταγραφημάτων που ενισχύθηκαν με την τεχνική του 5' SMART RACE αποτελούν μια επιπλέον επιβεβαίωση ότι το μάτισμα μετά το 2<sup>ο</sup> εξώνιο πραγματοποιείται σύμφωνα με την *in silico* ανάλυση, αλλά σε αυτή την περίπτωση δεν ανιχνεύεται το εναλλακτικό μεταγράφημα που εντοπίστηκε μετά την ενίσχυση του cDNA με τους εξειδικευμένους εκκινητές.

Τόσο τα αποτελέσματα της στόχευσης της πρωτεΐνης όσο και η ανάλυση των μεταγραφημάτων του *AtLon3*, έρχονται σε αντίθεση με τα δεδομένα για το προβλεπόμενο cDNA και την παραγόμενη πρωτεΐνη που λαμβάνουμε από τη βάση δεδομένων TAIR και το NCBI. Το φερόμενο ως πρώτο εξώνιο του μεταγραφήματος δεν φαίνεται να αποτελεί κωδική περιοχή, αφού δεν ανιχνεύεται παρά μόνο στα μεταγραφήματα που δεν έχουν υποστεί μάτισμα μεταξύ του 1<sup>ου</sup> και του 2<sup>ου</sup> εξωνίου. Αντιθέτως, κάτωθι του 2<sup>ο</sup> εξωνίου το μάτισμα του γονιδίου *AtLon3* στα αναμενόμενα μεταγραφήματα συμφωνεί με το προβλεπόμενο. Μία επιπλέον επιβεβαίωση των πειραματικών αποτελεσμάτων αποτελεί η βιοπληροφορική ανάλυση της νουκλεοτιδικής περιοχής που περιλαμβάνει την προβλεπόμενη 5' UTR και το γονίδιο *AtLon3*, μέσω της χρήσης τριών διαφορετικών προγραμμάτων αναγνώρισης των

μοτίβων ματίσματος των ευκαρυωτικών πρώιμων mRNAs. Το πρόγραμμα NetGene2 Server χρησιμοποιεί νευρωνικά δίκτυα για την πρόβλεψη των προβλεπόμενων σημείων ματίσματος (Hebsgaard et al., 1996), το πρόγραμμα GENSCAN χρησιμοποιεί ένα γενικό μοντέλο πιθανοτήτων για τον προσδιορισμό της δομής εξωνίων/εσωνίων στο γονιδιωματικό DNA (Burge and Karlin, 1997) και τέλος, το πρόγραμμα AUGUSTUS χρησιμοποιεί τα υπάρχοντα ESTs του οργανισμού και μεταγραφήματα από χαρακτηρισμένους συγγενείς οργανισμούς, για την πρόβλεψη τόσο της ύπαρξης γονιδίων στην αλληλουχία που αναλύεται όσο και για τα πιθανά μεταγραφήματα που μπορούν να προκύψουν (Stanke et al., 2008).

Τα προγράμματα GENSCAN και AUGUSTUS παρέχουν τόσο τις προβλεπόμενες κωδικές αλληλουχίες (CDS) όσο και τις αμινοξικές αλληλουχίες που προκύπτουν, ενώ το πρόγραμμα NetGene2 Server παρέχει μόνο τα πιθανά σημεία ματίσματος. Όλα τα προγράμματα έδειξαν πως δεν ανιχνεύεται πιθανό σημείο ματίσματος στην περιοχή μεταξύ του προβλεπόμενου 1<sup>ου</sup> και του 2<sup>ου</sup> εξωνίου, συνεπώς το 1<sup>ο</sup> εξόνιο δεν ανιχνεύεται καν ως κωδική περιοχή. Στην Εικόνα 4. Παρουσιάζεται η πολλαπλή στοίχιση των αμινοτελικών περιοχών των προβλεπόμενων αμινοξικών αλληλουχιών με την αλληλουχία της AtLon3 από το TAIR, όπου είναι εμφανής η απουσία των αμινοξέων που κωδικοποιεί το 1<sup>ο</sup> εξόνιο.



**Εικόνα 4. 2 Η πολλαπλή στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών που προκύπτουν από τα προβλεπόμενα mRNAs του AtLon3, μέσω των προγραμμάτων GENSCAN και AUGUSTUS, με την αμινοξική αλληλουχία που παρέχει το TAIR. Με πράσινη, πορτοκαλί και μπλε υπογράμμιση υποδεικνύονται τα αμινοξέα που αντιστοιχούν στο 2<sup>ο</sup>, 3<sup>ο</sup> και 4<sup>ο</sup> εξόνιο. Με κόκκινη υπογράμμιση υπογραμμίζεται το φερόμενο ως 1<sup>ο</sup> εξόνιο, όπως υποδεικνύει το TAIR. Είναι φανερό ότι τα προγράμματα συμφωνούν στο μάτισμα του γονιδίου AtLon3 μετά το 2<sup>ο</sup> εξόνιο, αλλά δεν ανιχνεύουν μάτισμα μεταξύ του 1<sup>ου</sup> και του 2<sup>ου</sup> εξωνίου, υποδεικνύοντας ότι το 1<sup>ο</sup> εξόνιο δεν αποτελεί κωδική περιοχή.**

Η απουσία του προβλεπόμενου 1<sup>ου</sup> εξωνίου από τα μεταγραφήματα που ανιχνεύτηκαν σε συνδυασμό με την ανίχνευση της πρωτεΐνης στην κατασκευή **35S::Lon3:YFP:FLAG-AMM**, στην οποία έχουν μεταλλαχθεί τα δύο AUG κωδικόνια που περιλαμβάνονται στο 1<sup>ο</sup> εξόνιο και θεωρούνται υπεύθυνα για την έναρξη της μετάφρασης της πρωτεΐνης AtLon3, υποδεικνύει ότι πιθανότατα η μετάφραση της AtLon3 δεν εξαρτάται από αυτά. Η γονιδιωματική αλληλουχία του

*AtLon3* που χρησιμοποιήθηκε στην κατασκευή *ΔMM*, ξεκινάει από την αλληλουχία (kozak) που περιβάλλει το πρώτο κωδικόνιο AUG, συνεπώς η μετάφραση δεν μπορεί να ξεκινάει άνωθεν αυτής της αλληλουχίας εφόσον ανιχνεύεται η πρωτεΐνη και έχει το ίδιο πρότυπο έκφρασης με την κατασκευή *MM*, που περιέχει τα δύο AUG. Έτσι, υποθέσαμε πως το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης βρίσκεται κάτωθι των δύο πρώτων AUG.

Η πρώτη υπόθεση που δημιουργήθηκε σχετικά με το εναρκτήριο κωδικόνιο του γονιδίου στηρίζεται στο γεγονός ότι το μάτισμα μεταξύ του 2<sup>ου</sup> και του 3<sup>ου</sup> εξωνίου ανιχνεύεται κανονικά σε όλα τα μεταγραφήματα που προσδιορίστηκαν στην παρούσα πειραματική μελέτη και υποστηρίζει την πιθανότητα το εναρκτήριο κωδικόνιο να βρίσκεται στη νουκλεοτιδική περιοχή μετά το 1<sup>ο</sup> εξώνιο και πριν το τέλος του 2<sup>ου</sup> εξωνίου. Επίσης, το γεγονός ότι η πρωτεΐνη *AtLon3* φαίνεται να τοποθετείται κυρίως στα μιτοχόνδρια, υποδεικνύει ότι το εναρκτήριο κωδικόνιο πιθανώς προηγείται μιας αλληλουχίας που κωδικοποιεί για ένα ισχυρό σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης. Παρόλα αυτά, σαρώνοντας τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του 5' άκρου του *AtLon3*, παρατηρήθηκε ότι δεν εντοπίζεται AUG κωδικόνιο έναρξης που να ανιχνεύεται ταυτόχρονα στην ενδεικνυόμενη περιοχή και να ακολουθεί το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο των μεταγραφημάτων *AtLon3* που προσδιορίστηκαν. Το μόνο AUG με αυτά τα χαρακτηριστικά ανιχνεύεται στο τέλος του 3<sup>ου</sup> εξωνίου, αλλά βάσει της βιοπληροφορικής ανάλυσης δεν περιλαμβάνει μιτοχονδριακό σινιάλο στόχευσης. Λαμβάνοντας υπόψη όσα προαναφέρθηκαν, αναρωτηθήκαμε για το ενδεχόμενο η πρωτεΐνη να μην ξεκινάει από AUG αλλά από κάποιο εναλλακτικό κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης (non-AUG start codon).

Σήμερα είναι γνωστό, σε γενικά πλαίσια, πως η αναγνώριση του κωδικονίου έναρξης της μετάφρασης από τα ευκαρυωτικά ριβοσώματα επιτελείται από έναν μηχανισμό σάρωσης, στον οποίο η μεγάλη 40S ριβοσωμική υπομονάδα μετακινείται κατά μήκος του 5' άκρου του mRNA μορίου και σταματάει στην πρώτη τριπλέτα AUG που περιβάλλεται από ένα ευνοϊκό νουκλεοτιδικό πλαίσιο για έναρξη της μετάφρασης (Kozak 1978, 1989, 1994). Το κωδικόνιο AUG αποτελεί το εναρκτήριο σημείο της μετάφρασης για τη συντριπτική πλειοψηφία των ευκαρυωτικών γονιδίων. Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια συσσωρεύονται ολοένα και αυξανόμενα στοιχεία που υποδεικνύουν ότι η μετάφραση αρκετών ζωικών και ιικών mRNAs ξεκινάει σε κωδικόνιο που διαφέρουν από το AUG κατά μία βάση, όπως είναι τα CUG, ACG και GUG (Kozak 1989, Hann 1994). Στους ευκαρυώτες, η έναρξη της μετάφρασης από



non-AUG κωδικόνια είναι σπάνια αλλά σχετίζεται συνήθως με γονίδια που υπόκεινται σε υψηλά επίπεδα ρύθμισης (van der Velden and Thomas, 1999).

Αυτά τα εναλλακτικά εναρκτήρια κωδικόνια μπορούν να σχηματίζουν μόνο δύο αντί για τρία ζεύγη βάσεων, με το αντικωδικόνιο του Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>, με αποτέλεσμα το εναρκτήριο αμινοξύ στα πολυπεπίδια που παράγονται από αυτά τα αντι-κανονικά γεγονότα μετάφρασης να είναι κυρίως – αλλά όχι κατά κανόνα – μεθειονίνη. Παρόλα αυτά, η αποδυναμωμένη αλληλεπίδραση μεταξύ κωδικονίου-αντικωδικονίου αντισταθμίζεται από την επαφή με τα περιβάλλοντα νουκλεοτίδια, δεδομένου του γεγονότος ότι η έναρξη της μετάφρασης σε non-AUG κωδικόνια απαιτεί αυτά να βρίσκονται σε ένα βέλτιστο ή ευνοϊκό νουκλεοτιδικό πλαίσιο (Kozak 1989, 1997). Η έναρξη της μετάφρασης από κωδικόνια non-AUG έχει περιγραφεί για αρκετά mRNAs ζωικών ιών, καθώς και κυττάρων θηλαστικών και *Drosophila*, όπου η αναγνώριση των non-AUGs εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ύπαρξη ενός βέλτιστου πλαισίου kozak (kozak consensus) γύρω από αυτά (Riechmann et al., 1999).

Οι περισσότερες περιπτώσεις που έχουν περιγραφεί μέχρι στιγμής για non-AUG σημεία έναρξης της μετάφρασης σε ευκαρυωτικά mRNAs, είναι ανάλογες της μετάφρασης μέσω διαρρέουσας σάρωσης, όπου παράγονται δύο διαφορετικές πρωτεϊνικές ισομορφές: η σύνθεση της μίας ισομορφής ξεκινάει από το non-AUG κωδικόνιο, ενώ η σύνθεση μιας άλλης ισομορφής ξεκινά από ένα κωδικόνιο AUG στο ίδιο ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο, κάτωθι του non-AUG (Kozak, 1989). Το προϊόν που παράγεται από το non-AUG αποτελεί συχνά το χαμηλότερο σε αφθονία εκ των δύο. Η εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης σε non-AUG κωδικόνια αναφέρεται σε διάφορους ιούς, βακτήρια, στη ζύμη και σε φυτά. Έχουν προσδιορισθεί πρωτεϊνικές ισομορφές με διαφορετικά αμινοτελικά άκρα που παρουσιάζουν διαφορετικές λειτουργίες ή/και διαφορετικές υποκυτταρικές τοποθετήσεις. Σε κάποιες περιπτώσεις, τα εναλλακτικά προϊόντα μετάφρασης των non-AUGs, όπως ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών του ποντικίου (FGF-3 ή int-2), ο ανθρώπινος FGF-2, καθώς και τα προϊόντα Hck ή Bag-1 των θηλαστικών, έχει δειχθεί ότι έχουν τροποποιημένες λειτουργίες, π.χ. διαφορετική υποκυτταρική τοποθέτηση (Acland et al. 1990, Bugler et al. 1991, Lock et al. 1991, Packham et al. 1997).

Οι Christensen et al. (2005), διερευνώντας τη ρύθμιση της δυαδικής στόχευσης των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από γονίδια του πυρήνα αλλά τοποθετούνται στα οργανίδια του κυττάρου, εξέτασαν δύο γονίδια που κωδικοποιούν για οργανιδιακές DNA πολυμεράσες (*POLγ1* και *POLγ2*) στο *Arabidopsis thaliana*. Στην περίπτωση

του *POLy2*, η πρωτεϊνική στόχευση άλλαξε από πλαστιδιακή σε δυαδική, απουσία και παρουσία της 5' UTR αντίστοιχα. Η αποκάλυψη ότι η περιοχή αυτή μεταφράζεται και επηρεάζει την ικανότητα στόχευσης της παραγόμενης πρωτεΐνης, σε συνδυασμό με την απουσία AUG τριπλέτας σε αυτήν, υπέδειξε ότι η μετάφραση ξεκινάει από ένα non-AUG σημείο έναρξης. Αρχικά, προσδιορίστηκε ένα κωδικόνιο CUG με ευνοϊκό νουκλεοτιδικό πλαίσιο, συναφές με τα κριτήρια της αλληλουχίας Kozak (A στη θέση -3 και G στη θέση +4) (Kozak, 1986), που πιθανότατα προκαλεί αυτή την έναρξη (Christensen et al., 2005). Αργότερα, αποδείχθηκε ότι η μετάφραση στο γονίδιο *POLy2* ξεκινάει σε τέσσερα διακριτά σημεία, δύο εκ των οποίων είναι non-AUGs, για να παράξει διακριτές πλαστιδιακές και μιτοχονδριακές ισομορφές της πρωτεΐνης. Στην περίπτωση αυτού του γονιδίου υποδεικνύεται ότι η επιλογή του σημείου έναρξης της μετάφρασης εξαρτάται από τουλάχιστον έναν trans-παράγοντα, η εξειδικευμένη πρόσδεση του οποίου στο πλαίσιο του κωδικονίου έναρξης επηρεάζει την αναγνώριση από το μηχανισμό σάρωσης του ριβοσώματος (Wamboldt et al., 2009).

Έχει δειχθεί ότι πολλές πρωτεΐνες ξεκινούν αποκλειστικά από non-AUG κωδικόνια έναρξης, όπως τα προϊόντα του γονιδίου της συνθετάσης του γλυκυλο-tRNA στη ζύμη (Chang and Wang, 2004), του γονιδίου *AGAMOUS* του *Arabidopsis* (Riechmann et al., 1999) και δύο γονιδίων *RpoT* του καπνού (Hedtke et al. 2002, Kobayashi et al. 2002). Η αποτελεσματικότητα της έναρξης της μετάφρασης από τέτοια κωδικόνια εξαρτάται τόσο από τη σύσταση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που τα περιβάλλει (consensus sequence context ή kozak consensus) όσο και από τη δευτεροταγή δομή του μεταγραφώματος γύρω από αυτά (Kozak, 1990). Έχουν προταθεί πολλές αλληλουχίες ως βέλτιστες για την έναρξη της μετάφρασης και παρά τις διαφορές μεταξύ τους, όλες συγκλίνουν στο ότι η παρουσία μιας πουρίνης (A, G) στις θέσεις -3 και +4 γύρω από το κωδικόνιο έναρξης φαίνεται να είναι καθοριστικής σημασίας για την αποτελεσματικότητα της έναρξης της μετάφρασης τόσο στα ζώα όσο και στα φυτά (Depeiges et al., 2006).

Στο *Arabidopsis thaliana*, το *AGAMOUS* (*AG*) είναι ένα ομοιοτικό γονίδιο που ανήκει στα MADS box και λειτουργεί στην αποσαφήνιση της ταυτότητας των αναπαραγωγικών οργάνων του άνθους (στήμονες και καρπόφυλλα), στην καταστολή της ακαθόριστης ανάπτυξης του ανθικού μεριστώματος και στη διατήρηση της ανθικής του ταυτότητας (Riechmann et al., 1999). Τόσο το σημείο έναρξης της μετάφρασης όσο και το αμινοτελικό άκρο της παραγόμενης πρωτεΐνης, δεν είχαν αποσαφηνιστεί. Τα mRNAs που προσδιορίστηκαν, δεν περιείχαν κανένα AUG

κωδικόνιο έναρξης άνωθεν της υψηλά συντηρημένης κωδικής αλληλουχίας των MADS box, ενώ παράλληλα το προβλεπόμενο ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο του AG εκτεινόταν μέχρι τα 5' άκρα τους. Η ανάλυση του AG μέσω της τεχνικής του 5' RACE δεν έδειξε νέα αποτελέσματα, συνεπώς εξετάστηκε η πιθανότητα η μετάφραση να ξεκινάει από ένα κωδικόνιο non-AUG. Ανιχνεύτηκαν επτά κωδικόνια που διαφέρουν κατά μία βάση από το AUG στο 5' άκρο και στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με το μοτίβο MADS box, δύο εκ των οποίων (CUG, ACG) θεωρήθηκαν πιθανά για κωδικόνια έναρξης, καθότι στους ευκαρυώτες έχουν ανιχνευθεί κυρίως ως non-AUGs οι τριπλέτες CUG, ACG και GUG (Boeck et al. 1994, Hann 1994).

Τα αποτελέσματα για το mRNA του γονιδίου AG του *Arabidopsis*, δείχνουν ότι η πρωτεΐνη AGAMOUS μεταφράζεται αποκλειστικά από ένα κωδικόνιο ACG, η αποτελεσματικότητα του οποίου πιθανώς επιτυγχάνεται λόγω των δύο ακόλουθων χαρακτηριστικών: πρώτον, το κωδικόνιο ACG βρίσκεται σε βέλτιστο νουκλεοτιδικό πλαίσιο έναρξης της μετάφρασης (Joshi et al. 1997, Kozak 1987, 1997) και δεύτερον, το mRNA του AG είναι πιθανόν να λαμβάνει δευτεροταγή δομή κάτωθι του ACG, όπου περιλαμβάνονται ανάστροφες επαναλήψεις, γεγονός που μπορεί να υποβοηθά την αναγνώρισή του. Έχει δειχθεί ότι η αναγνώριση από τα ριβοσώματα των θηλαστικών ενός AUG με υποδεέστερο νουκλεοτιδικό πλαίσιο, όπως και non-AUG κωδικονίων γενικότερα, ενισχύεται από την παρουσία μιας δομής φουρκέτας στο mRNA, κάτωθι αυτών κωδικονίων (Kozak, 1990).

Στην περίπτωση του AG, φαίνεται ότι το εναρκτήριο ACG έχει προκύψει από μετάλλαξη του AUG κωδικονίου του αντίστοιχου αρχέγονου γονιδίου, καθώς τα ομόλογα γονιδιά του σε συγγενή φυτικά είδη φέρουν ένα κωδικόνιο AUG ακριβώς στο ίδιο σημείο που το AGAMOUS έχει το ACG (Riechmann et al., 1999). Η παρατήρηση ότι μια non-AUG τριπλέτα μπορεί να δράσει ως το μοναδικό λειτουργικό κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης σε ένα mRNA του *Arabidopsis*, προσθέτει ένα ακόμη επίπεδο πολυπλοκότητας στο σωστό χαρακτηρισμό της αλληλουχίας του γονιδιώματος του φυτού. Για την ακρίβεια, ο γονιδιακός τόπος του AG βρισκόταν ήδη μεταξύ των αλληλουχιών που είχαν προσδιοριστεί και χαρακτηριστεί από το AGI (*Arabidopsis* Genome Initiative), αλλά το σημείο έναρξης της μετάφρασης δεν είχε προβλεφθεί σωστά. Η περίπτωση αυτή υποδεικνύει πως η αναζήτηση non-AUG κωδικονίων είναι μια απαραίτητη ανάλυση που πρέπει να γίνει, παρά την αλληλούχιση του γονιδιώματος του *Arabidopsis*.

Οι Simpson et al. (2010) μελέτησαν την πρωτεΐνη FCA, που ρυθμίζει την ανθική μετάβαση και επηρεάζει την εναλλακτική πολυαδενυλίωση πολλών

μεταγραφημάτων, συμπεριλαμβανομένων των RNAs αντινοήματος του καταστολέα της άνθισης *FLC*. Τα διακριτά επίπεδα ρύθμισης της FCA περιλαμβάνουν αλληλουχίες στην 5' περιοχή, που ρυθμίζουν τη μη-κανονική έναρξη της μετάφρασης και αλλάζουν το προφίλ της έκφρασης. Η μετάφραση της FCA *in vivo* πραγματοποιείται αποκλειστικά από ένα CUG κωδικόνιο, άνωθεν του πρώτου AUG που εντοπίζεται σε ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο. Η ανάλυση της 5' UTR του FCA έδειξε ότι περιέχει τουλάχιστον δύο *cis* στοιχεία που απαιτούνται για την αποτελεσματική έναρξη της μετάφρασης στο κωδικόνιο CUG σε συνδυασμό με ένα ευνοϊκό πλαίσιο kozak, υποδεικνύοντας έναν τρόπο αναγνώρισης του εναλλακτικού εναρκτήριου κωδικονίου που διαφέρει από το πρότυπο της διαρρέουσας σάρωσης του ριβοσώματος. Η απουσία εναλλακτικών πρωτεϊνικών ισομορφών της FCA υποδεικνύει πως τα εναλλακτικά κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης δεν χρησιμοποιούνται πάντα για τη στόχευση των προϊόντων ενός γονιδίου σε διαφορετικά υποκυτταρικά οργανίδια (Simpson et al., 2010).

Σε μια πρόσφατη ανάλυση των αλληλουχιών mRNAs της βάσης δεδομένων RefSeq, αποκαλύφθηκε ότι περίπου το 0,1% των συνολικών mRNAs, ξεκινούν με ένα κωδικόνιο non-AUG (Tikole and Sankararamakrishnan, 2006). Η πλειοψηφία των πρωτεϊνικών προϊόντων τους φαίνεται να εμπλέκεται σε ρυθμιστικούς ρόλους ή/και σηματοδοτικούς μηχανισμούς. Επιπλέον, τα αποτελέσματα συμφωνούν με τα ήδη υπάρχοντα κριτήρια για το νουκλεοτιδικό πλαίσιο που περιβάλλει αυτά τα non-AUGs, καθότι ανιχνεύουν ισχυρή συντήρηση της παρουσίας μιας πουρίνης στη θέση -3 και/ή μιας G στη θέση +4, ενώ τα αντίστοιχα γονίδια παράγουν εναλλακτικά μεταγραφήματα ή/και πολλαπλές ισομορφές. Οι μελέτες μεταλλαξογένεσης των βάσεων σε αυτές τις θέσεις, αποδεικνύουν πόσο σημαντικές είναι για την αναγνώριση των κωδικονίων έναρξης της μετάφρασης από το ριβόσωμα.

Μία μελέτη που έγινε σε κύτταρα ποντικού για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας έκφρασης του κάθε non-AUG κωδικονίου εκ των 9 που διαφέρουν από το AUG κατά μία βάση, έδειξε ότι τα πιο πιθανά είναι τα ACG και CUG (84% και 82%, αντίστοιχα), τα λιγότερο πιθανά είναι τα AGG και AAG (17% και 14%), ενώ τα AUU, AUA, AUC, GUG και UUG δίνουν ενδιάμεσες τιμές έναρξης. Αντίστοιχες μελέτες στα φυτά έδειξαν ότι τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα συγκριτικά με το AUG τη δίνει το κωδικόνιο CUG (30%), ακολουθούν τα GUG και ACG (15%), τα AUA, AUU, UUG και AUC έχουν χαμηλή ενεργότητα (2-5%), ενώ τα AAG και AGG δεν δίνουν μετάφραση (Gordon et al. 1992, Depeiges et al. 2006). Τα δεδομένα αυτά στο *Arabidopsis* έρχονται σε αντίθεση με τα ζωικά κύτταρα, όπου κυριαρχεί η

προτίμηση του ACG, και δείχνουν ότι τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών που ξεκινούν από non-AUGs είναι χαμηλά συγκριτικά με το αν ξεκινούσαν από AUG, γεγονός που υποδεικνύει ότι η αλλαγή ενός νουκλεοτιδίου μπορεί να χρησιμοποιείται ως ένας εναλλακτικός τρόπος ελέγχου των πρωτεϊνικών επιπέδων.

Όλα όσα προαναφέρθηκαν ενισχύουν την άποψη ότι η έναρξη της μετάφρασης από non-AUG κωδικόνια δεν είναι τόσο σπάνια στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, καθώς και ότι αυτά τα εναλλακτικά κωδικόνια έναρξης αξιοποιούνται από τον εκάστοτε οργανισμό για να ρυθμίζουν τα επίπεδα, την τοποθέτηση ή/και τη λειτουργία των παραγόμενων πρωτεϊνών. Επιπλέον, παρά τη γενικότερη παραλλακτικότητα των περιπτώσεων που προαναφέρθηκαν, υπάρχουν συγκεκριμένα κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ των γονιδίων που έχουν non-AUG κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης, τα οποία συνοψίζονται ακολούθως:

- ✓ Τα πιο πιθανά ως non-AUG κωδικόνια έναρξης είναι, με σειρά προτίμησης, τα **CUG, ACG** και **GUG**.
- ✓ Για να αναγνωριστεί ένα non-AUG από το ριβόσωμα ως εναρκτήριο κωδικόνιο πρέπει να περιβάλλεται από ένα **βέλτιστο ή ευνοϊκό νουκλεοτιδικό πλαίσιο έναρξης της μετάφρασης** (consensus sequence context ή kozak consensus).
- ✓ Η αναγνώριση των non-AUGs από το ριβόσωμα ενισχύεται από τη δευτεροταγή δομή φουρκέτας του μεταγραφήματος στην περιοχή κάτωθι του non-AUG.
- ✓ Συνήθως τα non-AUG κωδικόνια εντοπίζονται άνωθεν του χαρακτηρισμένου (annotated) AUG της πρωτεΐνης, σε ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο.

Λαμβάνοντας υπόψη αυτά τα χαρακτηριστικά σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της παρούσας πειραματικής μελέτης, που υποδεικνύουν την πιθανότητα η μετάφραση του mRNA του γονιδίου *AiLon3* να ξεκινάει από non-AUG κωδικόνιο, αναλύσαμε το 5' άκρο του μεγαλύτερου σε μήκους μεταγραφήματος που ανιχνεύτηκε. Αρχικά, προσδιορίστηκαν και καταγράφηκαν όλα τα πιθανά AUGs και non-AUGs κωδικόνια του γονιδίου που εντοπίζονται στο 5' άκρο, από την αρχή του έως και το τέλος του 2<sup>ου</sup> εξωνίου, όπου ανιχνεύεται το πρώτο γεγονός ματίσματος. Τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης του συνόλου των κωδικονίων παρουσιάζονται στον **Πίνακα Π.3** του Παραρτήματος. Έπειτα, τέθηκαν ορισμένα κριτήρια, ώστε γίνει σωστά η επιλογή των πιο πιθανών υποψήφιων non-AUGs, μεταξύ των εναλλακτικών κωδικονίων που εντοπίστηκαν. Τα κριτήρια αυτά είναι:

- ❖ Κατά προτίμηση, να ανήκουν στα non-AUGs με τις μεγαλύτερες πιθανότητες να προκαλούν έναρξη της μετάφρασης (**CUG, ACG** και **GUG**).
- ❖ Το νουκλεοτιδικό πλαίσιο που τα περιβάλλει να είναι το βέλτιστο ή ευνοϊκό πλαίσιο μετάφρασης, δηλαδή να περιλαμβάνει πουρίνες (A, G) στις θέσεις -3 και +4.
- ❖ Η αμινοξική αλληλουχία της οποίας ηγείται να στοχεύει στο μιτοχόνδριο με τιμές μεγαλύτερες από εκείνες που δίνει το χαρακτηρισμένο AUG του γονιδίου, καθώς και από εκείνες που δίνει η κατασκευή *35S::Lon3:YFP:FLAG-ATP*, στην οποία έχει προστεθεί τεχνητά ένα AUG κωδικόνιο καθώς και το βέλτιστο νουκλεοτιδικό πλαίσιο μετάφρασης στο σημείο αποκοπής της μιτοχονδριακής πρόδρομης αλληλουχίας (mP).
- ❖ Να βρίσκεται στο ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο της πρωτεΐνης AtLon3, όπως αυτό υποδεικνύεται από τη μετάφραση των μεταγραφημάτων που ανιχνεύθηκαν στην παρούσα πειραματική μελέτη.

Τα αποτελέσματα της επιλογής των non-AUGs του 5' άκρου του γονιδίου *AtLon3* που πληρούσαν κάποιες ή όλες αυτές τις προϋποθέσεις παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4.1**. Από το σύνολο των 53 κωδικονίων που διαφέρουν κατά μία βάση από το AUG και των 6 κωδικονίων AUG που εντοπίστηκαν στο 5' άκρο του μεγαλύτερου μεταγραφήματος του *AtLon3* (**Πίνακας Π.3**), μόνο 19 πληρούν τα κριτήρια στόχευσης (**Πίνακας 4.1**), εκ των οποίων τα δύο είναι τα προβλεπόμενα AUG κωδικόνια του 1<sup>ου</sup> εξωνίου, που δεν αποτελεί κωδική περιοχή του *AtLon3*, αλλά χρησιμοποιούνται ως μέτρο σύγκρισης για την ανάλυση των υπολοίπων. Για 6 από αυτά συγκλίνουν όλες οι μηχανές αναζήτησης σε ξεκάθαρη μιτοχονδριακή στόχευση, ενώ μόνο 8/19 βρίσκονται στο επιθυμητό αναγνωστικό πλαίσιο και 5/19 έχουν πουρίνες στις θέσεις -3 και +4.

Συνδυάζοντας όλα τα κριτήρια επιλογής, εντοπίζεται κυρίως ένα non-AUG που να ανταποκρίνεται πλήρως: το κωδικόνιο ACG<sub>172</sub> (Thr), στην αρχή της κωδικής περιοχής του 2<sup>ου</sup> εξωνίου. Το κωδικόνιο αυτό θα μπορούσε να αποτελεί το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης του γονιδίου *AtLon3*. Παρόλα αυτά, δεν αποκλείεται η περίπτωση κάποιο άλλο από τα non-AUGs που ανιχνεύθηκαν να επιτελεί αυτό το

Potential start codon	Position (by TAIR)	Position (nt)	Consensus	Potential mitochondrial presequence	Targeting analysis				Potential targeting
					WoLF PSORT	Target-P	MitoProt II	Predotar	
ATG (AUG) = Met	2nd exon		CCACCA <b>ATGC</b>	M RSDGV D L L S S P I L S T N P N L D D S L T V I A L P L P H K P L I P G F Y M P H V K D P	N: 6, Cy: 4, M: 1, chl: 1	cTP: 0.274, mTP: 0.068, other: 0.708	0.0130	mito: 0.01	nucleus
ATG (AUG) = Met	1st exon	1	GAT T G T T A T C A T G A T	M M P K R F N T S G F D T T L R L P S Y Y G F L H L T Q S L T L N S R V F Y G A R H V T P P A I R I	N: 2.5, Cy: 3.5, M: 5, chl: 2	cTP: 0.027, mTP: 0.842, other: 0.237	0.3974	mito: 0.28	mitochondrion
ATG (AUG) = Met	1st exon	4	T G T A A T C A T G A T G C C	M P K R F N T S G F D T T L R L P S Y Y G F L H L T Q S L T L N S R V F Y G A R H V T P P A I R I G	N: 2.5, Cy: 3.5, M: 5, chl: 2	cTP: 0.022, mTP: 0.866, other: 0.229	0.4800	mito: 0.27	mitochondrion
CTG (CUG) = Leu	1st intron	62	T A C T A T A A C A C T G A T	L I F N T S G F D T T L R L P S Y Y G F L H L T Q S L T L N S R V F Y G A R H V T P P A I R I G S N	N: 2.5, Cy: 2.5, M: 2, chl: 2	cTP: 0.030, mTP: 0.558, other: 0.369	0.2968	mito: 0.01	possibly mitochondrion
GTG (GUG) = Val	2nd exon	161	T T T A A C A C G A G T G G C	V A L T R L F V Y L R T T V S C I L H K A L L R L F G S D P I R F V Y Y S S G H R L S L P D G T G	N: 3.5, Cy: 3.5, M: 3.5, chl: 3.5	cTP: 0.007, mTP: 0.883, other: 0.018	0.1640	mito: 0.45	mitochondrion
				V A L T R L F V Y L R T T V S C I L H K A T L N S R V F Y G A R H V T P P A I R I G S N P V Q S L L	N: -, Cy: 6, M: 3, chl: 4	cTP: 0.007, mTP: 0.900, other: 0.016	0.5574	mito: 0.53	mitochondrion
GTG (GUG) = Val	2nd exon	262	T G C C C G C C A T G T G A C	V T P P A I R I G S N P V Q S L L F R A P T Q L T G W N R S R D L L G R R V S F S D R S D G V D	N: 1, Cy: -, M: -, chl: 12	cTP: 0.460, mTP: 0.472, other: 0.037	0.5448	mito: 0.16	chloroplast/mitochondrion
ACG = Thr	1st intron	22	A C G T A A A T A T A C G A G	T S E V N Q E L Y Y N T D L T E K W T R K L P K L M L Q I L F N T S G F D T T L R L P S Y Y G F L	N: 5, Cy: 2, M: 1-, chl: 1	cTP: 0.172, mTP: 0.237, other: 0.670	0.0075	mito: 0.01	nucleus
				T S F V N Q F N T S G F D T T L R L P S Y Y G F L H L T Q S L T L N S R V F Y G A R H V T P P A I R	N: 5, Cy: -, M: 3, chl: 3	cTP: 0.088, mTP: 0.486, other: 0.345	0.3309	mito: 0.02	possibly mitochondrion
ACG = Thr	2nd exon	172	T G G C T T T G A C A C G A C	T T L R L P S Y Y G F L H L T Q S L T L N S R V F Y G A R H V T P P A I R I G S N P V Q S L L F R	N: 5.5, Cy: -, M: 2, chl: 4	cTP: 0.024, mTP: 0.914, other: 0.046	0.4829	mito: 0.53	mitochondrion
ACG = Thr	2nd exon	197	C C T T C G T A C T A C G G T	T V S C I L H K A T L N S R V F Y G A R H V T P P A I R I G S N P V Q S L L F R A P T Q L T G W N	N: 2, Cy: 2, M: 5.5, chl: 4	cTP: 0.149, mTP: 0.723, other: 0.043	0.8005	mito: 0.51	mitochondrion
ATA (AUA) = Ile	1st intron	39	T T G T C A A T C A A T A A G	I R V I L L F N T S G F D T T L R L P S Y Y G F L H L T Q S L T L N S R V F Y G A R H V T P P A I R	N: -, Cy: 3.5, M: 1.5, chl: 6.5	cTP: 0.039, mTP: 0.713, other: 0.243	0.1663	mito: 0.05	possibly mitochondrion
ATA (AUA) = Ile	1st intron	48	A A T A A G A G T T A T A T T	I L L F N T S G F D T T L R L P S Y Y G F L H L T Q S L T L N S R V F Y G A R H V T P P A I R I G S	N: 4.5, Cy: 2, M: 1, chl: 4	cTP: 0.027, mTP: 0.689, other: 0.282	0.2973	mito: 0.17	possibly mitochondrion
ATA (AUA) = Ile	1st intron	56	T T A T A T A C T A T A A C	I T L I F N T S G F D T T L R L P S Y Y G F L H L T Q S L T L N S R V F Y G A R H V T P P A I R I G	N: 3, Cy: 3, M: 3, chl: 2	cTP: 0.042, mTP: 0.545, other: 0.410	0.1908	mito: 0.02	possibly mitochondrion
TTG (UUG) = Leu	2nd exon	205	C T A C G G T T C T T G C A	L H L T Q S L T L N S R V F Y G A R H V T P P A I R I G S N P V Q S L L F R A P T Q L T G W N R S	N: 6.5, Cy: -, M: 4, chl: 1	cTP: 0.168, mTP: 0.787, other: 0.057	0.6326	mito: 0.26	mitochondrion
ATT (AUU) = Ile	1st intron	90	G G A C C A G A A A A T T A C	I T F N T S G F D T T L R L P S Y Y G F L H L T Q S L T L N S R V F Y G A R H V T P P A I R I G S N	N: 3.5, Cy: 2, M: 1.5, chl: 4.5	cTP: 0.030, mTP: 0.604, other: 0.378	0.3105	mito: 0.01	possibly mitochondrion
ATT (AUU) = Ile	1st intron	112	A A T G T T A C A A A T T T	I L F N T S G F D T T L R L P S Y Y G F L H L T Q S L T L N S R V F Y G A R H V T P P A I R I G S N	N: 4.5, Cy: 2, M: 1, chl: 4	cTP: 0.026, mTP: 0.660, other: 0.296	0.3142	mito: 0.02	possibly mitochondrion
ATT (AUU) = Ile	2nd exon	277	T C T C C G G C T A T T C G	I R I G S N P V Q S L L F R A P T Q L T G W N R S R D L L G R R V S F S D R S D G V D L L S S S	N: 1, Cy: -, M: -, chl: 12	cTP: 0.337, mTP: 0.765, other: 0.019	0.4020	mito: 0.16	Chloroplast/Mitochondrion
ATC (AUC) = Ile	1st intron	125	T T G T A A G T T A A T C A G	I S F T N F W K L T R V A L T R L F V Y L R R T T V S C I L H K A	N: 2, Cy: 8, M: -, chl: 3	cTP: 0.033, mTP: 0.842, other: 0.076	0.8157	mito: -	possibly mitochondrion
ATC (AUC) = Ile	2nd exon	283	G G C T A T T C G G A T C G G	I G S N P V Q S L L F R A P T Q L T G W N R S R D L L G R R V S F S D R S D G V D L L S S S P I	N: 1, Cy: -, M: -, chl: 12	cTP: 0.490, mTP: 0.610, other: 0.034	0.2162	mito: 0.04	Chloroplast/Mitochondrion
AGG = Arg (R)	2nd exon	319	A C T A C T C T T C A G G G C	R A P T Q L T G W N R S R D L L G R R V S F S D R S D G V D L L S S S P I L S T N P N L D D S L T	N: 4, Cy: 8, M: -, chl: 1	cTP: 0.197, mTP: 0.767, other: 0.132	0.3526	mito: 0.11	possibly mitochondrion
AAG = Lys (K)	1st intron	76	T T T A A C A G A G A A G T G	K W T R K L P K L M L Q I L F N T S G F D T T L R L P S Y Y G F L H L T Q S L T L N S R V F Y G A R	N: 3, Cy: -, M: 2, chl: 5	cTP: 0.008, mTP: 0.671, other: 0.043	0.3235	mito: 0.43	mitochondrion

Πίνακας 4. 1 Στον πίνακα παρουσιάζονται τα επικρατέστερα εναλλακτικά κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης του γονιδίου *AtLon3*. Η επιλογή έγινε με βάση συγκεκριμένα κριτήρια, μετά από βιοπληροφορική ανάλυση του 5' άκρου του μεγαλύτερου σε μήκος μεταγραφήματος *AtLon3*, που ανιχνεύθηκε στα πλαίσια της παρούσας πειραματικής μελέτης, με σκοπό τον προσδιορισμό και τον χαρακτηρισμό των πιθανών non-AUG κωδικονίων έναρξης της μετάφρασης της παραγόμενης πρωτεΐνης. Τα διαφορετικά εναλλακτικά κωδικόνια σημαίνονται με διαφορετικά χρώματα. Τα αποτελέσματα της στόχευσης σημαίνονται με διαφορετικές αποχρώσεις του πράσινου, αναλογικά με το μέγεθος των τιμών πρόβλεψης για στόχευση στο μιτοχόνδριο. Με κόκκινη γραμμή στην κορυφή του πίνακα σημαίνεται η ανάλυση της αλληλουχίας του τεχνητού AUG που έχει προστεθεί στην κατασκευή 35S::*Lon3:YFP:FLAG-ATP*, το οποίο χρησιμοποιείται ως αρνητικό κατώφλι τιμών.

ρόλο και η αναγνώρισή του να ρυθμίζεται από διαφορετικό μηχανισμό, που δεν εξαρτάται από τα κριτήρια που τέθηκαν στην παρούσα βιοπληροφορική ανάλυση.

Παρόλα αυτά, εκτός από την πιθανότητα το εναρκτήριο κωδικόνιο του γονιδίου *AtLon3* να αποτελεί non-AUG, σχηματίζεται και μια δεύτερη υπόθεση που περιλαμβάνει την πιθανότητα η έναρξη του γονιδίου να πραγματοποιείται στο AUG κωδικόνιο που εντοπίζεται στο τέλος του 3<sup>ου</sup> εξωνίου του γονιδίου. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, η παραγόμενη πρωτεΐνη θα πρέπει να υπολείπεται της εκτεταμένης και ετερογενούς αμινοτελικής περιοχής, η οποία χαρακτηρίζει την οικογένεια των Lon πρωτεϊνών του *Arabidopsis* και κατευθύνει την υποκυτταρική τοποθέτηση των *AtLon1* και *AtLon4* στα υποκυτταρικά διαμερίσματα του μιτοχονδρίου και του χλωροπλάστη. Αναλυτικότερα, στην περίπτωση της παραγόμενης *AtLon3* πρωτεΐνης, η πιθανή έναρξη από το κωδικόνιο AUG<sub>518</sub> θα υπολείπεται της πρόδρομης μιτοχονδριακής αλληλουχίας, γεγονός που υποστηρίζεται και από τη βιοπληροφορική ανάλυση στόχευσης της συγκεκριμένης Met<sub>128</sub> (Πίνακας Π.3, Παράρτημα). Συνεπώς, το γεγονός αυτό αποτελεί μία ένδειξη για την εξελικτική διαφοροποίηση της πρωτεάσης *AtLon3* από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας, καθώς αν η έναρξή της πραγματοποιείται όντως από το AUG<sub>518</sub>, τότε χάνει τον οργανιδιακό της χαρακτήρα. Παράλληλα, στην περίπτωση αυτή ενισχύεται η περίπτωση της τοποθέτησής της στον πυρήνα των κυττάρων, καθότι το μοναδικό σινιάλο στόχευσης που ανιχνεύεται κάτωθι της Met<sub>128</sub> είναι το NLS.

Εξετάζοντας την υπόθεση το εναρκτήριο κωδικόνιο να είναι το AUG<sub>518</sub>, δημιουργείται ένα ερώτημα όσον αφορά στο γεγονός ότι στα μεταγραφήματα που ανιχνεύτηκαν στην παρούσα πειραματική μελέτη, παρατηρείται μάτισμα μεταξύ του προβλεπόμενου 2<sup>ου</sup> και 3<sup>ου</sup> εξωνίου, το οποίο προηγείται του AUG<sub>518</sub>. Το εν λόγω μάτισμα μπορεί να εξηγηθεί, λαμβάνοντας υπόψη ότι ένα μικρό αλλά σημαντικό ποσοστό εσώνων ανιχνεύεται στις 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές (UTRs) των μεταγραφημάτων των γονιδίων, παρά το γεγονός ότι η πλειονότητά τους ανιχνεύεται στις κωδικές περιοχές (CDSs). Η πολλαπλή στοίχιση όλου του γονιδιώματος και των ESTs (Expressed Sequence Tags) του *Arabidopsis*, υπέδειξε εσώνια που εντοπίζονται τόσο στις κωδικές, όσο και στις μη-κωδικές περιοχές του γονιδιώματος του φυτού (Chung et al., 2006). Μάλιστα, η βιοπληροφορική ανάλυση που διεξήχθη αποκάλυψε ότι τα εσώνια αυτά είναι μεγαλύτερα και πιο συχνά απαντώμενα στην 5' UTR, εντοπίζονται κατά προτίμηση κοντά στο εναρκτήριο AUG, ενώ χαρακτηρίζονται και από διαφορετική νουκλεοτιδική σύνθεση σε σχέση με τα εσώνια της 3' UTR. Επιπλέον, η ανάλυση αυτή υπέδειξε ότι το εσώνιο στην 5' UTR του γονιδίου EFla-



A3 του *Arabidopsis* επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση, καθώς και ότι το μέγεθος του εσωνίου της 5' UTR επηρεάζει τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης. Στην περίπτωση του EFla-A3, η παρουσία ενός μεγάλου εσωνίου στην 5' UTR είναι επαρκής για να ενισχύσει τη γονιδιακή έκφραση στα φυτά. Συνεπώς, το μάτισμα μεταξύ των προβλεπόμενων εξωνίων 2 και 3 στα μεταγραφήματα του *AtLon3*, θα μπορούσε εναλλακτικά να υποδεικνύει ότι η περιοχή αυτή αποτελεί την 5' UTR του γονιδίου κι ότι το μάτισμα του εν λόγω εσωνίου συμβάλει στη σταθερότητα του μηνύματος και στον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου.

Σε κάθε περίπτωση, η ανάλυση των μεταγραφημάτων υποδεικνύει την ιδιαιτερότητα και την πολυπλοκότητα του 5' άκρου του γονιδίου *AtLon3* και δεν αποσαφηνίζει, υπό τις παρούσες πειραματικές συνθήκες, την αρχή έναρξης της μεταγραφής και την αρχή έναρξης της μετάφρασης του γονιδίου. Παρόλα αυτά, παρέχει σημαντικές πληροφορίες που οδηγούν σε συγκεκριμένες υποθέσεις για τη μετέπειτα πειραματική ανάλυση τόσο του μηνύματος όσο και της πρωτεΐνης *AtLon3*.

#### **4.3 Η ύπαρξη ενός λειτουργικού NLS σε μια οργανιδιακή πρωτεάση πιθανώς σχετίζεται με την ιστοειδικότητα της έκφρασης του γονιδίου *AtLon3* στα σπερματικά κύτταρα της γύρης του *Arabidopsis***

Τα αποτελέσματα της υποκυτταρικής στόχευσης της *AtLon3* έδειξαν πως το NLS είναι λειτουργικό, καθώς η πρωτεΐνη τοποθετείται και στον πυρήνα του κυττάρου όταν αφαιρεθεί μεγάλο μέρος της πρόδρομης μιτοχονδριακής αλληλουχίας στόχευσης. Η *AtLon3* όμως, ανήκει στην οικογένεια των οργανιδιακών πρωτεασών Lon, που μέχρι στιγμής φαίνεται να δρα στα μιτοχόνδρια, τους χλωροπλάστες και τα περοξυσώματα. Επίσης, το μόνο γνωστό σύστημα πρωτεόλυσης για τον πυρήνα είναι το σύστημα ουμπικουιτίνη/26S πρωτεάσωμα. Το γεγονός ότι μια οργανιδιακή πρωτεάση έχει δυνατότητα τοποθέτησης στον πυρήνα του κυττάρου, υποδεικνύει ότι είναι αναγκαία για να επιτελέσει κάποια συγκεκριμένη λειτουργία.

Όπως προαναφέρθηκε, φαίνεται ότι η έκφραση της *AtLon3* είναι ιστοειδική, καθώς τα υψηλότερα επίπεδα mRNAs του γονιδίου *AtLon3* ανιχνεύονται στα σπερματικά κύτταρα της γύρης. Τα σπερματικά κύτταρα, όπως περιγράφηκε ήδη στην Εισαγωγή, αποτελούν τους αρσενικούς γαμέτες του φυτού, έχουν πολύ συμπυκνωμένη χρωματίνη και χαρακτηρίζονται από πολύ χαμηλό μεταβολισμό. Επιπλέον, περιέχουν ελάχιστα μιτοχόνδρια, πιθανώς λόγω των χαμηλών ενεργειακών απαιτήσεών τους. Το

μεγαλύτερο μέρος τους καταλαμβάνεται από τον πυρήνα τους. Για το λόγο αυτό, δεν έχει ξεκαθαριστεί ακόμη και σήμερα αν πρέπει να ονομάζονται κύτταρα ή πυρήνες, με αποτέλεσμα στη βιβλιογραφία η αναφορά τους να απαντάται και με τους δύο τρόπους (sperm cells και sperm nuclei).

Η ύπαρξη του NLS στην AtLon3 θα μπορούσε να σχετίζεται με το γεγονός ότι τα σπερματικά κύτταρα αποτελούν ουσιαστικά δύο μεγάλους πυρήνες του αρσενικού γαμετόφυτου. Στον παροδικό μετασχηματισμό του *N. benthamiana* βλέπουμε σταθερή και υψηλή έκφραση και τοποθέτηση της πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια, ενώ στον πυρήνα τοποθετείται μόνο απουσία του μιτοχονδριακού σινιάλου στόχευσης. Το γεγονός ότι η πρωτεολυτική δράση της Lon εντοπίζεται κυρίως στα μιτοχόνδρια και είναι ιδιαίτερα ενισχυμένη στις περιπτώσεις οξειδωτικής καταπόνησης, σε συνδυασμό με την ύπαρξη ελάχιστων μιτοχονδρίων στα σπερματικά κύτταρα, θα μπορούσε να υποδεικνύει αναγκαιότητα της έκφρασης της AtLon3 σε υψηλά επίπεδα για τη διατήρηση της πρωτεόστασης των μιτοχονδρίων, άρα και τη διαφύλαξη της παραγωγής ενέργειας των γαμετών.

Παρόλα αυτά, η στόχευση της AtLon3 στον πυρήνα θα μπορούσε υπό συνθήκες να δρα συνεργιστικά με το πρωτεάσωμα. Καθώς οι γαμέτες είναι επιφορτισμένοι με τη μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας στην επόμενη γενεά, η διασφάλιση της ομοιόστασής τους αποτελεί άμεση προτεραιότητα του φυτού. Το γεγονός ότι το 26S πρωτεάσωμα είναι ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο με πολλές υπομονάδες, σε συνδυασμό με τη χαμηλή μεταγραφική δραστηριότητα των σπερματικών κυττάρων υποδεικνύει ότι ο οργανισμός θα μπορούσε να έχει εξελίξει ένα επιπλέον σύστημα πρωτεόλυσης, που να συμπληρώνει ή να δρα συνεργιστικά με το πρωτεάσωμα για τη διασφάλιση της πρωτεόστασης των σπερματικών κυττάρων.



# *Βιβλιογραφία*

- Acland P., Dixon M., Peters G., Dickson C. (1990). *Subcellular fate of the Int-2 oncoprotein is determined by choice of initiation codon*. *Nature* 343:662–665.
- Adam Z., Adamska I., Nakabayashi K., Ostersetzer O., Haussuhl K., Manuell A. et al. (2001). Chloroplast and mitochondrial proteases in Arabidopsis. A proposed nomenclature. *Plant Physiology* 125:1912–1918.
- Apel K., Hirt H., (2004). *Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction*. *Annual Review of Plant Biology* 55:373–399.
- Avila-Ospina L., Moison M., Yoshimoto K., Masclaux-Daubresse C., (2014). *Autophagy, plant senescence and nutrient recycling*. *Journal of Experimental Botany* 65:3799–811.
- Balch W.E., Morimoto R.I., Dillin A., Kelly J.W. (2008). *Adapting proteostasis for disease intervention*. *Science* 319, 916–919.
- Barakat S., Pearce D. A., Sherman F., Rapp W. D., (1998). *Maize contains a Lon protease gene that can partially complement a yeast pim1-deletion mutant*. *Plant Molecular Biology* 37: 141–154.
- Baudisch B., Langner U., Garz I., Klösgen R. B., (2014). *The exception proves the rule? Dual targeting of nuclear-encoded proteins into endosymbiotic organelles*. *New Phytologist* 201: 80–90.
- Bauwe H., Hagemann M., Fernie A.R., (2010). *Photorespiration: players, partners and origin*. *Trends in Plant Science* 15:330–36.
- Bayer M., Nawy T., Giglione C., Galli M., Meinel T., Lukowitz W. (2009). *Paternal control of embryonic patterning in Arabidopsis thaliana*. *Science* 323:1485–1488.
- Becker J. D., Boavida L. C., Carneiro J., Haury M., Feijo J. A. (2003). *Transcriptional profiling of Arabidopsis tissues reveals the unique characteristics of the pollen transcriptome*. *Plant Physiology* 133:713–725.
- Bender T., Leidhold C., Ruppert T., Franken S., Voos W., (2010). *The role of protein quality control in mitochondrial protein homeostasis under oxidative stress*. *Proteomics* 10: 1426–1443.
- Berglund A. K., Pujol C., Duchene A. M., Glaser E. (2009a). *Defining the determinants for dual targeting of aminoacyl-tRNA synthetases to mitochondria and chloroplasts*. *Journal of Molecular Biology* 393:803–814.
- Bleckmann A., Alter S., Dresselhaus T. (2014). *The beginning of a seed: regulatory mechanisms of double fertilization*. *Frontiers in Plant Science* 5:452.
- Boeck R., Kolakofsky D. (1994). *Positions 15 and 16 can be major determinants of the efficiency of non-AUG initiation codons for protein synthesis*. *EMBO Journal* 13:3608–3617.
- Borg M., Brownfield L., Twell D. (2009). *Male gametophyte development: a molecular perspective*. *Journal of Experimental Botany* 60(5):1465-78.
- 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(2): 1168–1181.
- 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 Radical Biology and Medicine* 8:665–677.
- Bugler B. F., Amalric F., Prats H. (1991). *Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor*. *Molecular and Cellular Biology* 11:573–577.
- Burge C., Karlin S. (1997). *Prediction of complete gene structures in human genomic DNA*. *Journal of Molecular Biology* 268(1):78-94.

- Callis J., Carpenter T., Sun C. W., Vierstra R. D., (1995). *Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in Arabidopsis thaliana ecotype Columbia*. *Genetics* 139:921–39.
- Carrie C., Giraud E., Whelan J. (2009). *Protein transport in organelles: dual targeting of proteins to mitochondria and chloroplasts*. *FEBS Journal* 276:1187–1195.
- Carrie C., Small I. (2013). *A reevaluation of dual-targeting of proteins to mitochondria and chloroplasts*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1833:253–259.
- Chang K. J., Wang C. C. (2004). *Translation initiation from a naturally occurring non-AUG codon in Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 279:13778–13785.
- Christensen A. C., Lyznik A., Mohammed S., Elowsky C. G., Elo A., Yule R., Mackenzie S. A. (2005). *Dual-Domain, Dual-Targeting Organellar Protein Presequences in Arabidopsis Can Use Non-AUG Start Codons*. *The Plant Cell* 17(10):2805–2816.
- Chung C. H., Goldberg A. L., (1981). *The product of the lon (capR) gene in Escherichia coli is the ATP-dependent protease, protease La*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. (PNAS)* 78:4931–4935.
- Claros G. M. and Canovas M. F. (1999). *RNA isolation from plant tissues: a practical experience for biological undergraduates*. *Biochemical Education* 27 (1999) 110-113.
- Daras G., Rigas S., Tsitsekian D., Zur H., Tuller T., Hatzopoulos P. (2014). *Alternative transcription initiation and the AUG context configuration control dual organellar targeting and functional competence of Arabidopsis Lon1 protease*. *Molecular Plant* 7:989–1005.
- Davies K. J., (1995). *Oxidative stress: the paradox of aerobic life*. *Biochemical Society Symposium* 61:1–31.
- Depeiges A., Degroote F., Espagnol M. C., Picard G. (2006). *Translation initiation by non-AUG codons in Arabidopsis thaliana transgenic plants*. *Plant Cell Reports* 25(1):55-61.
- Donch J., Greenberg J., (1968). *Genetic analysis of lon mutants of strain K-12 of Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics* 103: 105–115.
- Dukan S., Farewell A., Ballesteros M., Taddei F., Radman M., Nyström T., (2000). *Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. (PNAS)* 97:5746–5749.
- Dyall S. D., Brown M. T., Johnson P. J., (2004). *Ancient invasions: from endosymbionts to organelles*. *Science* 304:253–257.
- Eastmond P. J., Germain V., Lange P. R., Bryce J. H., Smith S. M., Graham I. A., (2000). *Postgerminative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. (PNAS)* 97: 5669–5674.
- Engel M., Chaboud A., Dumas C., McCormick S. (2003). *Sperm cells of Zea mays have a complex complement of mRNAs*. *Plant Journal* 34:697–707.
- Friguet B., Bulteau A. L., Petropoulos I., (2008). *Mitochondrial protein quality control: implications in ageing*. *Biotechnology Journal* 3:757–764.
- Fukuda R., Zhang H., Kim J. W., Shimoda L., Dang C. V., Semenza G. L., (2007). *HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells*. *Cell* 129: 111–122.
- García-Lorenzo M., Sjödin A., Jansson S., Funk C. (2006). *Protease gene families in Populus and Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* 20:6-30.

- Gordon K., Futterer J., Hohn T. (1992). *Efficient initiation of translation at non-AUG triplets in plant cells*. *Plant Journal* 2:809–813.
- Gur E., Sauer R. T., (2008). *Recognition of misfolded proteins by Lon, a AAA+ protease*. *Genes & Development* 22: 2267–2277.
- Hafidh S., Fíla J, Honys D. (2016). *Male gametophyte development and function in angiosperms: a general concept*. *Plant Reproduction* [Epub ahead of print].
- Hann S. R. (1994). *Regulation and function of non-AUG-initiated protooncogenes*. *Biochimie* 76:880–886.
- Harman D., (1956). *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. *Journal of Gerontology* 11:298–300.
- Hebsgaard S. M., Korning P. G., Tolstrup N., Engelbrecht J., Rouzé P., Brunak S. (1996). *Splice site prediction in Arabidopsis thaliana pre-mRNA by combining local and global sequence information*. *Nucleic Acids Research* 24(17):3439–3452.
- Hedtke B., Legen J., Weihe A., Herrmann R. G., Borner T. (2002). *Six active phage-type RNA polymerase genes in Nicotiana tabacum*. *Plant Journal* 30:625–637.
- Hershko A., Ciechanover A., (1998). *The ubiquitin system*. *Annual Reviews in Biochemistry* 67: 425–479.
- Honys D., Twell D. (2003). *Comparative analysis of the Arabidopsis pollen transcriptome*. *Plant Physiology* 132:640–652.
- Honys D., Twell D. (2004). *Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in Arabidopsis*. *Genome Biology* 5:1–13.
- Ito J., Heazlewood J. L., Millar A.H., (2006). *Analysis of the soluble ATP-binding proteome of plant mitochondria identifies new proteins and nucleotide triphosphate interactions within the matrix*. *Journal of Proteome Research* 5:3459–3469.
- Iyer L. M., Leipe D. D., Koonin E. V., Aravind L., (2004). *Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases*. *Journal of Structural Biology* 146: 11–31.
- Janska H., (2005). *ATP-dependent proteases in plant mitochondria: what do we know about them today?* *Physiologia Plantarum* 123:399–405.
- Janska H., Kwasniak M., Szczepanowska J., (2012). *Protein quality control in organelles - AAA/FtsH story*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1833:381–87.
- Janska H., Piechota J., Kwasniak M., (2010). *ATP-dependent proteases in biogenesis and maintenance of plant mitochondria*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797:1071–75.
- Jorrín-Novo J.V., Pascual J., Sánchez-Lucas R., Romero-Rodríguez M.C., Rodríguez-Ortega M.J., Lenz C., Valledor L. (2015). *Fourteen years of plant proteomics reflected in Proteomics: Moving from model species and 2DE-based approaches to orphan species and gel-free platforms*. *Proteomics* 2015 Mar;15(5-6):1089-112.
- Joshi C. P., Zhou H., Huang X., Chiang V. L. (1997). *Context sequences of translation initiation codon in plants*. *Plant Molecular Biology* 35:993–1001.
- Karniely S., Pines O. (2005). *Single translation-dual destination: mechanisms of dual protein targeting in eukaryotes*. *EMBO Reports* 6(5):420–425.
- Kato Y., Sakamoto W., (2014). *Phosphorylation of photosystem II core proteins prevents undesirable cleavage of D1 and contributes to the fine-tuned repair of photosystem II*. *Plant Journal* 79:312–21.

- Kobayashi Y., Dokiya Y., Kumazawa Y., Sugita M. (2002). *Non-AUG translation initiation of mRNA encoding plastid-targeted phage-type RNA polymerase in Nicotiana glauca*. Biochemical and Biophysical Research Communications 299:57–61.
- Koga H., Kaushik S., Cuervo A.M. (2011). *Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control*. Ageing Research Reviews 10 (2011) 205-15.
- Kozak M. (1978). *How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA?* Cell 15:1109–1123.
- Kozak M. (1987). *An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs*. Nucleic Acids Research 15:8125–8148.
- Kozak M. (1989). *Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation systems*. Molecular and Cellular Biology 9:5073–5080.
- Kozak M. (1989). *The scanning model for translation: an update*. The Journal of Cell Biology 108:229–241.
- Kozak M. (1990). *Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes*. PNAS USA 87:8301–8305.
- Kozak M. (1994). *Determinants of translational fidelity and efficiency in vertebrate mRNAs*. Biochimie 76:815–821.
- Kozak M. (1997). *Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position 14 but is not generally affected by the nucleotides in positions 15 and 16*. EMBO Journal 16:2482–2492.
- Krause K., Krupinska K. (2009). *Nuclear regulators with a second home in organelles*. Trends in Plant Science 14(4):194-9.
- Lingard M. J., Bartel B., (2009). *Arabidopsis LON2 is necessary for peroxisomal function and sustained matrix protein import*. Plant Physiology 151: 1354–1365.
- Lister R., Chew O., Lee M. N., Heazlewood J. L., Clifton R., Parker K. L., Millar A. H., Whelan J., (2004). *A transcriptomic and proteomic characterization of Arabidopsis mitochondrial protein import apparatus and its response to mitochondrial dysfunction*. Plant Physiology 134:777–789.
- Lock P., Ralph S., Stanley E., Boulet I., Ramsay R., Dunn A. (1991). *Two isoforms of murine hck, generated by utilization of alternative translation initiation codons, exhibit different patterns of subcellular localization*. Molecular and Cellular Biology 11:4363–4370.
- Lu B., Yadav S., Shah P. G., Liu T., Tian B., Puksza S., Villaluna N., Kutejová E., Newlon C. S., Santos J. H., Suzuki C. K., (2007). *Roles for the human ATP-dependent Lon protease in mitochondrial DNA maintenance*. The Journal of Biological Chemistry 282: 17363–17374.
- Lynch M., Conery J. S. (2000). *The evolutionary fate and consequences of duplicate genes*. Science 290:1151–1155.
- Ma Y., Kang J., Wu J., Zhu Y., Wang X. (2015). *Identification of tapetum-specific genes by comparing global gene expression of four different male sterile lines in Brassica oleracea*. Plant Molecular Biology 87(6): 541–554.
- Mackenzie S. A., (2005). *Plant organellar protein targeting: a traffic plan still under construction*. Trends in Cell Biology 15:548–554.
- Mascarenhas J. P. (1989). *The male gametophyte of flowering plants*. Plant Cell 1:657-664.
- McCormick S. (1993). *Male Gametophyte Development*. The Plant Cell 5(10):1265–1275.

- McCormick S. (2004). *Control of male gametophyte development*. The Plant Cell 16(Suppl): S142–S153.
- Merkle T. (2001). *Nuclear import and export of proteins in plants: a tool for the regulation of signalling*. Planta 213:499-517.
- Millar A. H., Whelan J., Small I., (2006). *Recent surprises in protein targeting to mitochondria and plastids*. Current Opinion in Plant Biology 9:610–615.
- Møller I. M., Jensen P. E., Hansson A., (2007). *Oxidative modifications to cellular components in plants*. Annual Review of Plant Biology 58:459–481.
- Ohta M., Sugita M., Sugiura M. (1995). *Three types of nuclear genes encoding chloroplast RNA-binding proteins (cp29, cp31 and cp33) are present in Arabidopsis thaliana: presence of cp31 in chloroplasts and its homologue in nuclei/cytoplasm*. Plant Molecular Biology 27:529–539.
- Olinares P. D., Kim J., van Wijk K. J., (2011). *The Clp protease system; a central component of the chloroplast protease network*. Biochimica et Biophysica Acta 1807:999–1011.
- Ondrovicová G., Liu T., Singh K., Tian B., Li H., Gakh O., Perecko D., Janata J., Granot Z., Orly J., Kutejová E., Suzuki C. K., (2005). *Cleavage site selection within a folded substrate by the ATP-dependent Lon protease*. The Journal of Biological Chemistry 280: 25103–25110.
- Ostersetzer O., Kato Y., Adam Z., Sakamoto W., (2007). *Multiple intracellular locations of Lon protease in Arabidopsis: evidence for the localization of AtLon4 to chloroplasts*. Plant Cell Physiology 48: 881–885.
- Packham G., Brimmel M., Cleveland J. L. (1997). *Mammalian cells express two differently localized Bag-1 isoforms generated by alternative translation initiation*. Biochemistry Journal 328:807–813.
- Peeters N., Small I., (2001). *Dual targeting to mitochondria and chloroplasts*. Biochimica et Biophysica Acta 1541:54–63.
- Petropoulos I., Friguet B., (2006). *Maintenance of proteins and aging: the role of oxidized protein repair*. Free Radical Research 40:1269–1276.
- Pina C., Pinto F., Feijo J. A., Becker J. D. (2005). *Gene family analysis of the Arabidopsis pollen transcriptome reveals biological implications for cell growth, division control, and gene expression regulation*. Plant Physiology 138:744–756.
- Rawlings N.D., Waller M., Barrett A.J., Bateman A., (2014). *MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors*. Nucleic Acids Research 42:D503–9.
- Rep M., van Dijl M., Suda K., Schatz G., Grivell L. A., Suzuki C. K. (1996). *Promotion of mitochondrial membrane complex assembly by a proteolytically inactive yeast Lon*. Science 274: 103–106.
- Riechmann J. L., Ito T., Meyerowitz E. M. (1999). *Non-AUG Initiation of AGAMOUS mRNA Translation in Arabidopsis thaliana*. Molecular and Cellular Biology 19(12):8505–8512.
- Rigas S., Daras G., Laxa M., Marathias N., Fasseas C., Sweetlove L. J., Hatzopoulos P., (2009a). *The role of Lon1 protease in post-germinative growth and maintenance of mitochondrial function in Arabidopsis thaliana*. New Phytologist 181: 588–600.
- Rigas S., Daras G., Sweetlove L. J., Hatzopoulos P., (2009b). *Mitochondria biogenesis via Lon1 selective proteolysis: who dares to live for ever?*. Plant Signaling and Behaviour 4:221–224.
- Rigas S., Daras G., Tsitsekian D., Alatzas A., Hatzopoulos P., (2014). *Evolution and significance of the Lon gene family in Arabidopsis organelle biogenesis and energy metabolism*. Frontiers in Plant Science 5:145.



- Rigas S., Daras G., Tsitseki D., Hatzopoulos P., (2011). The multifaceted role of Lon proteolysis in seedling establishment and maintenance of plant organelle function: living from protein destruction. *Physiologia Plantarum* 2012 145(1):215-23.
- 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* 15:1815–1828.
- Russel W. D. and Sambrook J. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3<sup>rd</sup> edition)*. © 2001 by Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sakamoto W. (2006). *Protein degradation machineries in plastids*. *Annual Review in Plant Biology* 57:599–621.
- Sauer R. T., Bolon D. N., Burton B. M., Burton R. E., Flynn J. M., Grant R. A., Hersch G. L., Joshi S. A., Kenniston J. A., Levchenko I., Neher S. B., Oakes E. S., Siddiqui S. M., Wah D. A., Baker T. A., (2004). *Sculpting the proteome with AAA+ proteases and disassembly machines*. *Cell* 119:9–18.
- Scotto-Lavino E., Du G., Frohman M. A. (2006). *5' end cDNA amplification using classic RACE*. *Nature Protocols* 10.1038/nprot.2006.480
- Silva-Filho M. C., (2003). *One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations*. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 589–595.
- Silva-Filho M.C. (2003). One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations. *Current Opinion in Plant Biology* 6:589–595.
- Simpson G. G., Laurie R. E., Dijkwel P. P., Quesada V., Stockwell P. A., Dean C., Macknight R. C. (2010). *Noncanonical Translation Initiation of the Arabidopsis Flowering Time and Alternative Polyadenylation Regulator FCA*. *The Plant Cell* 22(11):3764–3777.
- Sinvany-Villalobo G., Davydov O., Ben-Ari G., Zaltsman A., Raskind A., Adam Z., (2004). *Expression in multigene families. Analysis of chloroplast and mitochondrial proteases*. *Plant Physiology* 135: 1336–1345.
- Small I., Wintz H., Akashi K., Mireau H. (1998). Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments. *Plant Molecular Biology* 38:265–277.
- Smalle J., Vierstra R. D., (2004). *The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway*. *Annual Reviews in Plant Biology* 55:555–590.
- Smith C. K., Baker T. A., Sauer R. T., (1999). *Lon and Clp family proteases and chaperones share homologous substrate-recognition domains*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. (PNAS)* 96: 6678–6682.
- Stanke M., Diekhans M., Baertsch R., Haussler D. (2008). *Using native and syntenically mapped cDNA alignments to improve de novo gene finding*. *Bioinformatics* 24: 637-644.
- Su W., Lin C., Wu J., Li K., He G., Qian X., Wei C., Yang J., (2006). *Molecular cloning and expression of a cDNA encoding Lon protease from rice (Oryza sativa)*. *Biotechnology Letters* 28: 923–927.
- Sunderland P. A., West C. E., Waterworth W. M., Bray C. M. (2006). *An evolutionarily conserved translation initiation mechanism regulates nuclear or mitochondrial targeting of DNA ligase I in Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 47:356–367.
- Suzuki C. K., Suda K., Wang N., Schatz G., (1994). *Requirement for the yeast gene LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration*. *Science* 264:273–276.
- Swamy K. H., Goldberg A. L., (1981). *E. coli contains eight soluble proteolytic activities, one being ATP-dependent*. *Nature* 292:652–654.

Sweetlove L. J., Heazlewood J. L., Herald V., Holtzapffel R. H., Day D. A., Leaver C. J., Millar A. H., (2002). *The impact of oxidative stress on Arabidopsis mitochondria*. Plant Journal 32:891–904.

Tikole S., Sankararamakrishnan R. (2006). *A Survey of mRNA Sequences with a Non-AUG Start Codon in RefSeq Database*. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics 24:1, 33–41.

Tripathi L. P., Sowdhamini R. (2006). Cross genome comparisons of serine proteases in Arabidopsis and rice. BMC Genomics 7:200.

van der Velden A.W., Thomas A.A. (1999). *The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 31:87–106.

van Dyck L., Pearce D. A., Sherman F., (1994). *PIM1 encodes a mitochondrial ATP-dependent protease that is required for mitochondrial function in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Biological Chemistry 269: 238–242.

van Wijk K. J., (2015). *Protein maturation and proteolysis in plant plastids, mitochondria, and peroxisomes*. Annual Review of Plant Biology 66: 75–111.

Vierstra R. D., (1996). *Proteolysis in plants: mechanisms and functions*. Plant Molecular Biology 32:275–302.

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

Voos W., (2013). Chaperone-protease networks in mitochondrial protein homeostasis. Biochim. Biophys. Acta 1833, 388–399.

Wamboldt Y., Mohammed S., Elowsky C., Wittgren C., de Paula W. B. M., Mackenzie S. A. (2009). *Participation of Leaky Ribosome Scanning in Protein Dual Targeting by Alternative Translation Initiation in Higher Plants*. The Plant Cell, 21(1):157–167.

Ylstra B., McCormick S. (1999). *Analysis of mRNA stabilities during pollen development and in BY2 cells*. Plant Journal 20:101–108.

Yogev O., Pines O. (2011). *Dual targeting of mitochondrial proteins: mechanism, regulation and function*. Biochimica et Biophysica Acta 1808(3):1012–20.

[http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure\\_Bio/Protocols/DNA%20clean-up/UM\\_PCRcleanup\\_Gelex\\_NSGelPCR.pdf](http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/DNA%20clean-up/UM_PCRcleanup_Gelex_NSGelPCR.pdf)

[http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure\\_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM\\_pDNA\\_NS.pdf](http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM_pDNA_NS.pdf)

[http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure\\_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM\\_pDNA\\_NS\\_EP.pdf](http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM_pDNA_NS_EP.pdf)



*Παράρτημα*

## I. Λίστα εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πειραματική μελέτη

Στον Πίνακα Π.1 παρουσιάζονται όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και αναφέρονται στο παρόν κείμενο. Οι εκκινητές είναι αριθμημένοι βάσει της τοποθέτησής τους πάνω στον χάρτη του γονιδίου και της χρονικής σειράς με την οποία σχεδιάστηκαν (για συντομία στο κείμενο χρησιμοποιούνται κυρίως οι αριθμοί). Σε κάθε εκκινητή με έντονη γραφή σημειώνονται οι τεχνητές αλληλουχίες (overhangs) που αυτός προσθέτει στο ενισχυόμενο τμήμα DNA κατά την PCR, ενώ με υπογράμμιση σημειώνεται το κομμάτι του εκκινητή που είναι ακριβώς συμπληρωματικό προς τη μήτρα DNA και υβριδίζει απόλυτα σ' αυτήν. Η θερμοκρασία τήξης ( $T_m$  real) του κάθε εκκινητή που αναγράφεται επίσης στον πίνακα, αναφέρεται στο τμήμα του εκκινητή που υβριδίζει απόλυτα στο DNA (real length). Τέλος, η θέση του κάθε εκκινητή πάνω στο γονίδιο μετρήθηκε σε ζεύγη βάσεων γονιδιωματικού DNA (όχι cDNA) και η αρχή της μέτρησης γίνεται αναφορικά με το ATG που ορίζεται ως αρχή του γονιδίου AtLon3 (At3g05780) στις βάσεις δεδομένων TAIR και NCBI. Η αδενίνη του ATG αριθμείται με 1 και τα πρόσημα (+) και (-) υποδεικνύουν αν ο εκκινητής βρίσκεται πριν ή μετά την προτεινόμενη αρχή του γονιδίου. Όλα τα stock διαλύματα των εκκινητών έχουν συγκέντρωση 100μM.

<b>Primers list of AtLon3 gene</b>				
<b>Forward Primers</b>				
<b>Map Number</b>	<b>Primer Name</b>	<b>Primer sequence</b>	<b><math>T_m</math> (real)</b>	<b>Position (bp)</b>
-	Lon3-com-For	5' <b>TCCCGGG</b> <u>TTGTCTGCATCTGTCCAGCTGACTCGT</u> 3'	67,01	-3587
4	Lon3-Met-For	5' <b>ACCCGGG</b> <u>TAATCATGATGCCTAAACGTAAATATACGAG</u> 3'	63,42	-5
5	Lon3-w/o-Met-For	5' <b>ACCCGGG</b> <u>TAATC</u> <b>AAAAAA</b> <u>CCTAAACGTAAATATACGAG</u> 3'	60,8	-5
22	Lon3-RACE-For	5' <u>ACCTTCGTA</u> <u>CTACTACGGTTTCTTGCAT</u> 3'	61,3	+185
6	Lon3-For-	5' <b>ACCCGGG</b> <u>ccacc</u> <b>ATG</b> <u>CGCAGTGACGGTGTCTGATCTCTT</u> 3'	64,9	+390

	w/o-TP			
10	Lon3-For-w/o-NLS	5' <b>AGGTACC</b> GAGTTGCTTAACCGTATTCACCAAGTTGGC 3'	67,24	+931
11	Lon3-For-10thex	5' <u>CAGATGACGGATCTTCACTTTCTGGTTAG</u> 3'	65,7	+1950
13	Lon3-For	5' <u>AAAGCGCACAGATTGCTCACACAGTC</u> 3'	65,3	+4190
19	Lon3-For-seq-12thex	5' <u>AGATTCTTGACGAGGATCATTACGGATT</u> 3'	62,58	+2500
27	Lon3-For-1stex	5' <u>GATTGTAATCATGATGCCTAAACGT</u> 3'	58,42	-10
<b>Reverse Primers</b>				
Map Number	Primer Name	Primer sequence	Tm (real)	Position (nt)
8	Lon3-Rev-2ndex	5' <u>GTCGAGGTTAGGGTTAGTTGAGAGAAT</u> 3'	63,89	+455
9	Lon3-Rev-w/o-NLS	5' <b>TGGTACC</b> TTTGACTTTAAACTTCTCAACAACATTATC 3'	68,84	+905
21	Lon3-NLS-RT	5' <u>TTCTTTTCTTTTTTGGTTTCCCTTTGACTTTAAACTT</u> 3'	62,8	+925
12	Lon3-Rev-12thex	5' <u>GTGAAGTGCCTCTAAGTCTTCCCACAGCAA</u> 3'	68,7	+2590
20	Lon3-Rev-seq-17thex	5' <u>CTTTCATCACATCCCCAAGCTGACCCGT</u> 3'	68,59	+4250
17	Lon3-Rev-FLAG	5' A <b>CTA</b> ATCCTTGTAGTCCTTGTATCGTCATCCTT <b>GTAGTCA</b> <b>CGCGT</b> ATGGTCATAATTGAATGCTAGATC 3'	59,23	+4770
23	Lon3-RACE-REV-A	5' <u>GCAATGCTATAACCGTTAGAGAATC</u> 3'	60,1	+620
25	Lon3-REV-RACE-B	5' <u>TTTAGGATCCTTGACATGGATTGGCATGTA</u> 3'	64,5	+765
26	Lon3-REV-4thex	5' <u>AATCCTTCAAAAGGAAAGCCCCAC</u> 3'	63,4	+835

Πίνακας Π. 1 Η λίστα με τους εκκινητές του γονιδίου *AtLon3* που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας πειραματικής μελέτης. Αναφέρεται η ακολουθία του κάθε εκκινητή, το όνομά του, η αρίθμηση του στον χάρτη του γονιδίου, η θέση του πάνω στη γονιδιοματική αλληλουχία του γονιδίου και η θερμοκρασία τήξης (Tm).

**CCCGGG** → Θέση αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση *SmaI*

**GGTACC** → Θέση αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση *KpnI*

**ACGCGT** → Θέση αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση *MluI*

**ATCCTTGTAGTCCTTGTGCATCGTCATCCTTGTAGTC** → Αλληλουχία επιτόπου **FLAG** (ανάστροφη και συμπληρωματική)

**CTA** → εισάγει το κωδικόνιο λήξης TAG

**AAAAAA** → προκαλεί αλλαγή των ATGATG στην αρχή του γονιδίου

ccacc**ATG** → εισάγει τεχνητά ένα ισχυρό kozak consensus και ένα ATG

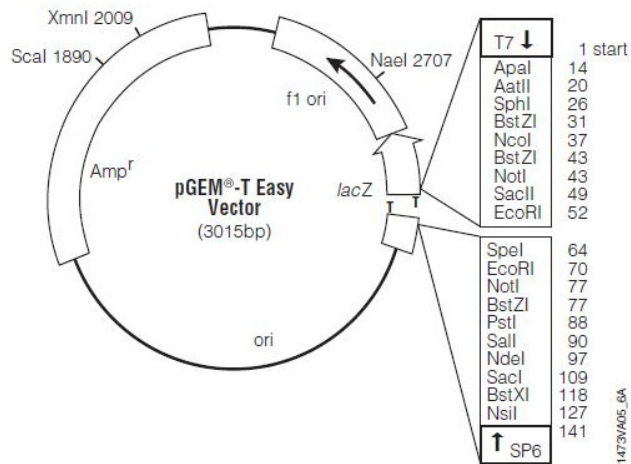
Εκτός από τους εκκινητές του γονιδίου *AtLon3*, χρησιμοποιήθηκε ένα εύρος επιπλέον εκκινητών σε διάφορες πειραματικές διαδικασίες. Οι εκκινητές αυτοί και τα χαρακτηριστικά τους παρατίθενται στον **Πίνακα Π.2** ακολούθως:

List of General Primers			
Primer Name	Primer sequence	Tm (real)	Position
YFP-Lon-Rev	5' <b>aacgct</b> GGCCCCAGCGGCCGCAGCAGC 3'	55	YFP 3' prime
YFP-Lon-For	5' AA <b>ACGCGT</b> GGAGGTGGAGGTGGAGCTG 3'	67,6	YFP 5' prime
nosR	5' gacaccgcgcgcgataatttatcc 3'	64,9	pAnos
T7 promoter	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'	47	Universal primer
T3 promoter	5' ATTAACCCTCACTAAAGGGA 3'	50	Universal primer
SP6	5' TATTTAGGTGACACTATAG 3'	42	Universal primer
SMART oligo	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT GGCATTACGGCCGGG 3'	76,82	
5' PCR	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT 3'	60,6	

Πίνακας Π. 2 Λίστα εκκινητών εκτός του γονιδίου *AtLon3* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

## II. Πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική πορεία

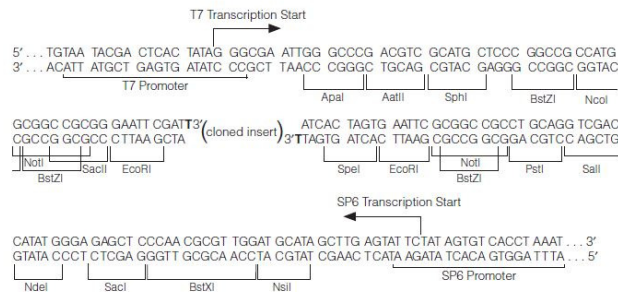
### 5.D. pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Map and Sequence Reference Points



### 5.C. Sequence and Multi-Cloning Site of the pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector

The sequence of the pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector is available at: [www.promega.com/vectors/](http://www.promega.com/vectors/)

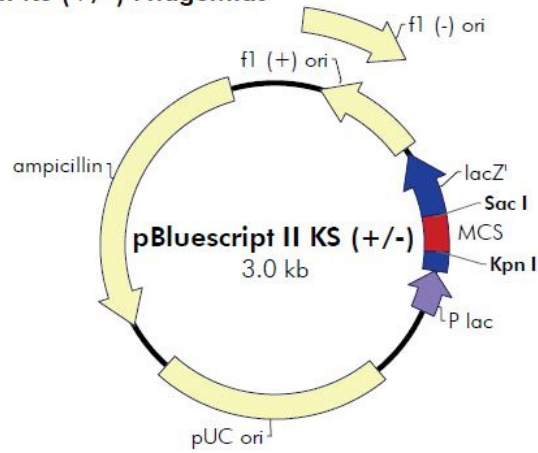
The pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector has been linearized at base 60 with EcoRV and a T added to both 3'-ends. The EcoRV site will not be recovered upon ligation of the vector and insert.



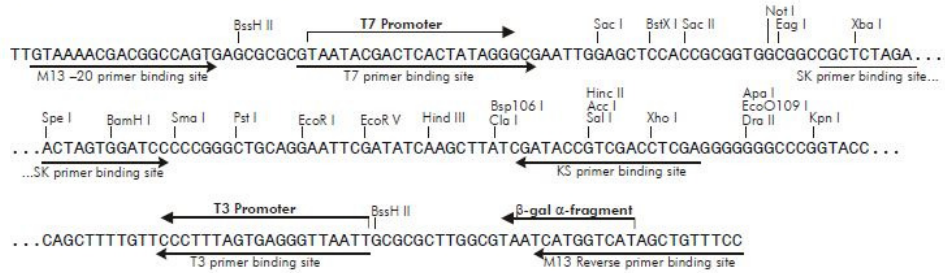
**Figure 2. The promoter and multiple cloning sequence of the pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector.** The top strand shown corresponds to the RNA synthesized by T7 RNA polymerase. The bottom strand corresponds to the RNA synthesized by SP6 RNA polymerase.

**Εικόνα II. 1 Ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pGEM<sup>®</sup>-T Easy (PROMEGA) και η περιοχή του πολυσυνδέτη του (MSC) μαζί με τα περιοριστικά ένζυμα που διαθέτει.**

### pBluescript II KS (+/-) Phagemids

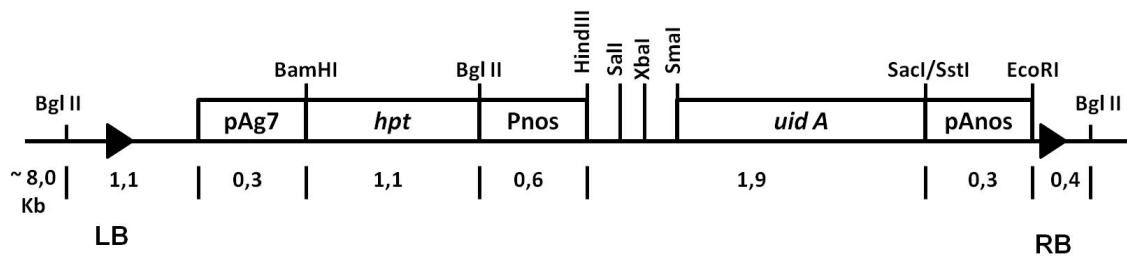


### pBluescript II KS (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598-826)



Εικόνα Π. 2 Ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pBluescript II KS (+/-) μαζί με την περιοχή του πολυσυνδέτη (MCS) και των περιοριστικών ενζύμων που διαθέτει (Agilent Technologies).

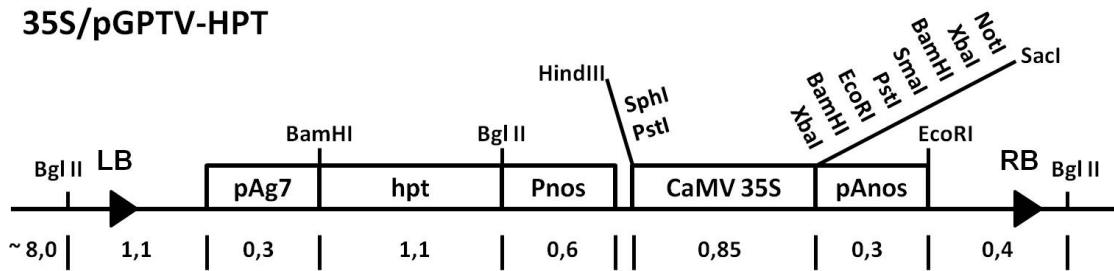
### pGPTV-HPT



Εικόνα Π. 3 Σχηματική αναπαράσταση του δυαδικού φορέα pGPTV-HPT (uidA).



## 35S/pGPTV-HPT



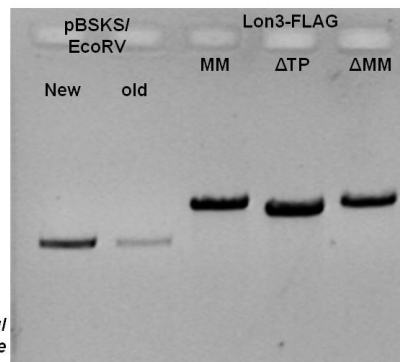
Εικόνα Π. 4 Σχηματική αναπαράσταση του δισαδικού φορέα 35S/pGPTV-HPT.

### III. Αναλυτικά αποτελέσματα της διαδικασίας κλωνοποίησης για τη δημιουργία των κατασκευών του γονιδίου *AtLon3*

*Παρατίθενται τα ενδιάμεσα τμήματα της διαδικασίας κλωνοποίησης του AtLon3 για την δημιουργία των κατασκευών 35S::Lon3:YFP:FLAG-MM/ΔMM/ΔTP, που πραγματοποιήθηκαν παράλληλα, τα οποία δεν αναφέρθηκαν στην Ενότητα 3 (Αποτελέσματα).*

Μετά την PCR και την πέψη του φορέα με EcoRV, ακολούθησε ανάλυσή τους σε πηκτή αгарόζης, κόψιμο της πηκτής και απομόνωση των τμημάτων DNA από την πηκτή με το πρωτόκολλο του Gel extraction. Τα αποτελέσματα του καθαρισμού αποτυπώνονται στην **Εικόνα Π.5**, καθώς και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν από το κάθε κλάσμα DNA για την αντίδραση της λιγοποίησης των άκρων του φορέα με το εκάστοτε προϊόν της PCR.

Ligation setup:	MM	ΔMM	ΔTP
pBSKS (EcoRV):	2μl	2μl	2μl
Insert (PCR):	5μl	5μl	5μl
T4 Buffer (10x):	2,5μl	2,5μl	2,5μl
PEG 50% (10X):	2,5μl	2,5μl	2,5μl
T4 DNA Ligase (5U/μl):	1μl	1μl	1μl
ddH <sub>2</sub> O:	12μl	12μl	12μl
Total:	25μl	25μl	25μl

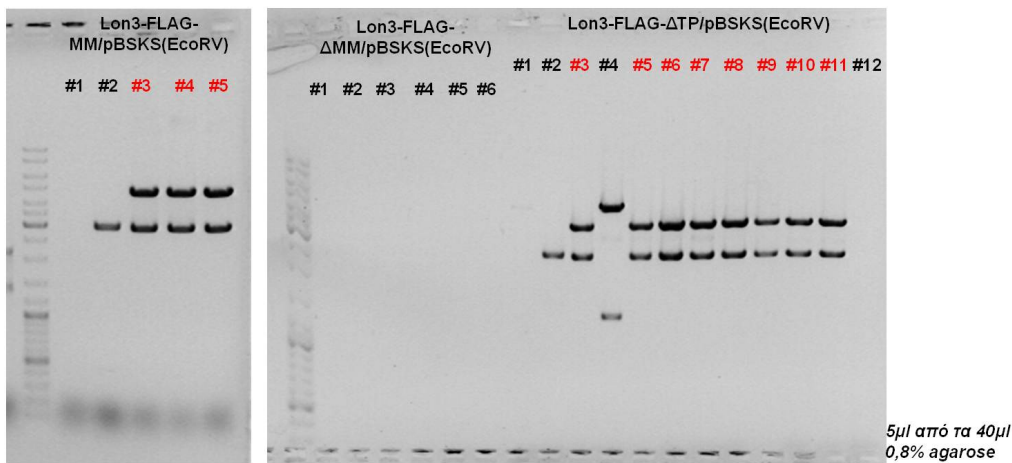


3μl από τα 35μl  
0,8% agarose

Εικόνα Π. 5 (Δεξιά) Αποτύπωση της εικόνας του φορέα pBSKS(EcoRV) και των προϊόντων Lon3:FLAG-MM/ΔMM/ΔTP της PCR μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό. (Αριστερά) Σχεδιασμός αντίδρασης λιγοποίησης του φορέα με την κάθε κατασκευή.

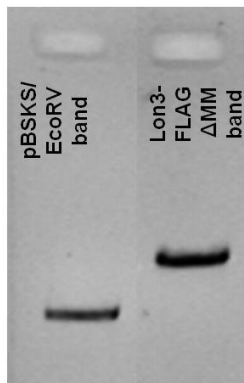
Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε O/N στους 16°C. Την επόμενη μέρα ακολούθησε μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* DH5a, τα οποία αναπτύχθηκαν μετά O/N στους 37°C σε τρυβλία LB/Amp με Xgal/IPTG. Την επόμενη ημέρα επιλέχθηκαν λευκές αποικίες από κάθε κατασκευή για μόλυνση σε υγρό LB/Amp. Το πλασμιδιακό DNA απομονώθηκε από την κάθε καλλιέργεια και η πρώτη διαγνωστική πέψη έγινε με XbaI. Τα αποτελέσματα της πέψης, ο σχεδιασμός της αντίδρασης και τα αναμενόμενα μεγέθη παρουσιάζονται στην **Εικόνα Π.6**.

Πέψη pBSSK/EcoRV:	X5,5 MIX	X19 MIX	Αναμενόμενα μινέθη:
pDNA:	2μl	(-)	(-)
NEB4 Buffer (10x):	4μl	26μl	76μl
BSA (10x):	4μl	26μl	76μl
XbaI:	0,8μl	6,5μl	15,2μl
ddH2O:	29,2μl	182μl	554,8μl
Total:	40μl	220μl	760μl
			•MM & ΔMM: <u>ορθά</u> 2934bp (ένθεση) & 4745bp (KS+ένθεση) <u>ανάποδα</u> 1856bp (ένθεση) & 5823bp (KS+ένθεση)
			•ΔTP: <u>ορθά</u> 3001bp (ένθεση) & 4365bp (KS+ένθεση) <u>ανάποδα</u> 1476bp (ένθεση) & 5890bp (KS + ένθεση)



**Εικόνα Π. 6** Αποτελέσματα πρώτης διαγνωστικής πέψης με XbaI για την εύρεση των κλώνων Lon3:FLAG/pBSSK(EcoRV)-MM/ΔMM/ΔTP. Με κόκκινο χρώμα σημαίνονται οι κλώνοι της κάθε κατασκευής με την επιθυμητή (ορθή) φορά της ένθεσης.

Η διαδικασία επαναλήφθηκε για το τμήμα Lon3:FLAG-ΔMM, καθότι δεν ανιχνεύθηκαν ανασυνδυασμένοι κλώνοι και παρουσιάζεται στην **Εικόνα Π.7**.

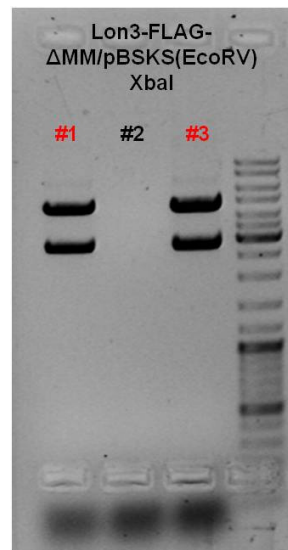


3μl από τα 35μl  
0,8% agarose

Ligation setup:	ΔMM
pBSKS/EcoRV:	2μl
Insert (PCR):	5μl
T4 Buffer (10x):	2μl
PEG 50% (10X):	2μl
T4 DNA Ligase (5U/μl):	1μl
ddH <sub>2</sub> O:	8μl
Total:	20μl

Πέψη XbaI:	X3,5 MIX
pDNA:	2μl (-)
NEB4 Buffer (10x):	4μl 14μl
BSA (10x):	4μl 14μl
XbaI:	0,8μl 2,8μl
ddH <sub>2</sub> O:	29,2μl 102,2μl
Total:	40μl 140μl

5μl από τα 40μl  
0,8% agarose

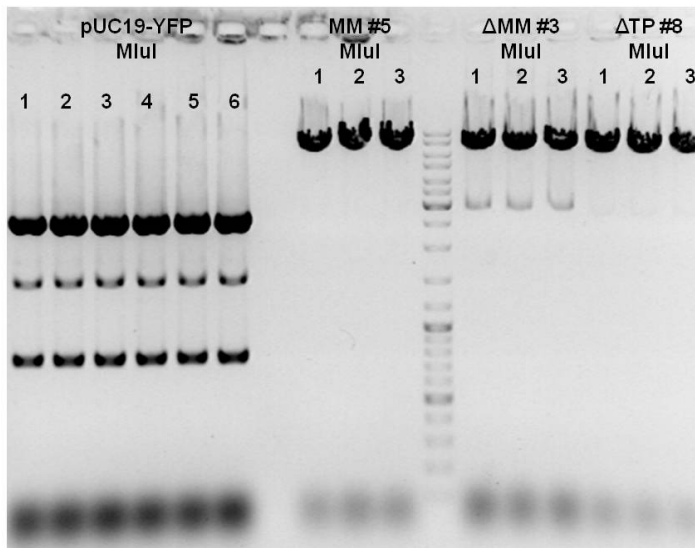


**Αναμενόμενα μεγέθη:**  
 ΔMM: ορθά 2934bp (ένθεση) & 4745bp (KS+ένθεση)  
ανάποδα 1856bp (ένθεση) & 5823bp (KS+ ένθεση)

**Εικόνα Π. 7 Αντίδραση λιγοποίησης για την κατασκευή Lon3:FLAG/pBSKS (EcoRV) -ΔMM. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της πρώτης διαγνωστικής πέψης με XbaI. Οι κλώνοι με την επιθυμητή (ορθή) φορά ένθεσης του γονιδίου σημαίνονται με κόκκινο.**

Setup πέψεων:	X10 MIX	MM #5
pUC19-YFP:	4μl (-)	4μl
pDNA:	4μl	4μl
BufferH (10x):	40μl	4μl
BSA (10x):	40μl	4μl
Mlul:	10μl	1μl
ddH <sub>2</sub> O:	270μl	27μl
Total:	400μl	40μl

Setup πέψεων:	X6,5 MIX
ΔMM #3/ΔTP #8:	4μl (-)
pDNA:	4μl
BufferH (10x):	4μl 26μl
BSA (10x):	4μl 26μl
Mlul:	1μl 6,5μl
ddH <sub>2</sub> O:	27μl 175,5μl
Total:	40μl 260μl

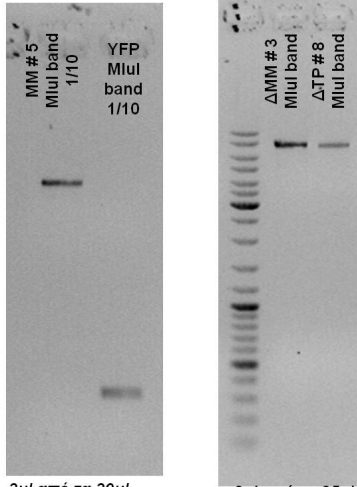


**Αναμενόμενα μεγέθη:**  
 pUC19-YFP (Mlul): 2686bp (pUC19) & 780bp (YFP)  
 MM #5 (Mlul): linear 7679bp  
 ΔMM #3 (Mlul): linear 7679bp  
 ΔTP #8 (Mlul): linear 7366bp

5μl από τα 40μl  
1% agarose

**Εικόνα Π. 8 Πέψη των κατασκευών Lon3:FLAG/pBSKS(EcoRV)-MM/ΔMM/ΔTP και του pUC19-YFP με Mlul.**

Ligation setup:	MM #5	ΔMM	ΔTP
	1/10	#3	#8
Construct band (MluI):	3μl	3μl	3μl
YFP (MluI) 1/10:	7μl	7μl	7μl
T4 Buffer (10x):	2μl	2μl	2μl
PEG 50% (10X):	2μl	2μl	2μl
T4 DNA Ligase (5U/μl):	1μl	1μl	1μl
ddH <sub>2</sub> O:	5μl	5μl	5μl
Total:	20μl	20μl	20μl



3μl από τα 30μl  
0,8% agarose

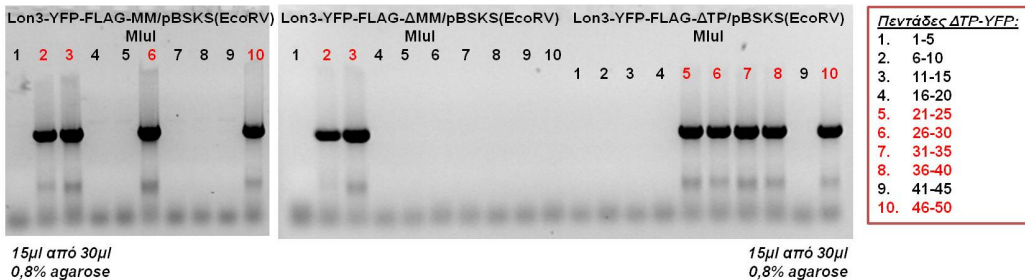
3μl από τα 35μl  
0,8% agarose

**Εικόνα Π. 9** Ανάλυση του YFP και των κατασκευών Lon3:FLAG/pBSKS(EcoRV) που κόπηκαν με MluI μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό.

Οι επιλεγμένοι κλώνοι Lon3:FLAG/pBSKS(EcoRV)-MM #5/ΔMM #3/ΔTP #8 αντίστοιχα υποβλήθηκαν σε επιβεβαιωτικές πέψεις, οι οποίες παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.5 (Αποτελέσματα). Στη συνέχεια κόπηκαν με MluI, όπως και το YFP από τον φορέα pUC19 (Εικόνα Π.8). Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού από την πηκτή, τα αποτελέσματα του οποίου παρουσιάζονται στην Εικόνα Π.9. Η αντίδραση λιγοποίησης μεταξύ των επιλεγμένων κλώνων και του YFP παρουσιάζεται επίσης στην Εικόνα Π.9. Μετά τον μετασχηματισμό των βακτηριακών κυττάρων με τα προϊόντα της λιγοποίησης και την ανάπτυξη των αποικιών, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR αποικιών για την επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων με την επιθυμητή φορά

της ένθεσης του YFP. Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές [Lon3-For] και [YFP-Lon-Rev] (βλ. Πίνακα Π.2). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα Π.10.

Setup PCR	MM-YFPx11	ΔMM/ΔTP-YFP	Program PCR	Πεντάδες MM-YFP:	Πεντάδες ΔMM-YFP:
colonies:	3μl	-	1. 94°C for 2'	1. 1-5	1. 1-5
Buffer (10x):	3μl	33μl	2. 94°C for 30"	2. 6-10	2. 6-10
dNTPs (2mM):	3μl	33μl	3. 57°C for 30"	3. 11-15	3. 11-15
Lon3 For (3μM):	3μl	33μl	4. 72°C for 1'	4. 16-20	4. 16-20
YFP-Lon-Rev (3μM):	3μl	33μl	5. Go to 2, 27	5. 21-25	5. 21-25
EXT(1U/μl):	0,8μl (1U)	8,8μl	6. 72°C for 10'	6. 26-30	6. 26-30
ddH <sub>2</sub> O:	14,2μl	156,2μl	7. 12°C for 5'	7. 31-35	7. 31-35
Total:	30μl	330μl	8. End	8. 36-40	8. 36-40
				9. 41-45	9. 41-45
				10. 46-50	10. 46-50



15μl από 30μl  
0,8% agarose

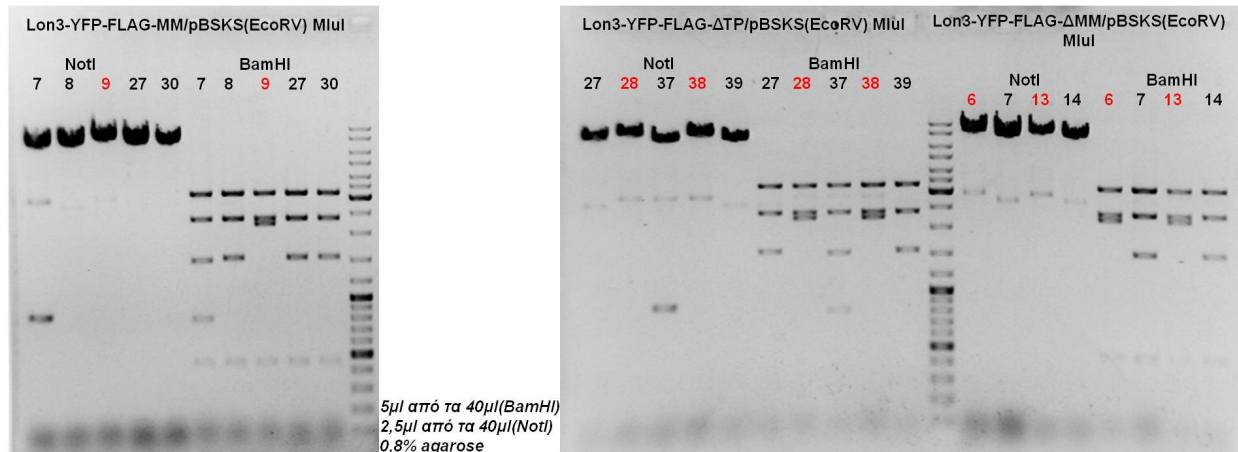
15μl από 30μl  
0,8% agarose

**Εικόνα Π. 10** Αποτελέσματα Colonies PCR στις κατασκευές Lon3:YFP:FLAG/pBSKS(EcoRV)-MM/ΔMM/ΔTP. Με κόκκινο σημαίνονται οι 5αδες που περιέχουν τουλάχιστον μία ανασυνδυασμένη αποικία όπου το YFP έχει εισαχθεί με την επιθυμητή (ορθή) κατεύθυνση.

Βάσει των αποτελεσμάτων του colonies PCR επιλέχθηκαν οι ακόλουθες πεντάδες αποικιών, για να αναλυθούν οι μονές αποικίες που τις αποτελούν και να βρεθεί ποια ή ποιες έδωσε το προϊόν της PCR. Επιλέχθηκαν:

- ✓ **Lon3-YFP-FLAG-MM/pBSKS(EcoRV) MluI: #6-10 & #26-30**
- ✓ **Lon3-YFP-FLAG-ΔMM/pBSKS(EcoRV) MluI: #6-10 & #11-15**
- ✓ **Lon3-YFP-FLAG-MM/pBSKS(EcoRV) MluI: #26-30 & #36-40**

Απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA από τις καλλιέργειες των μεμονωμένων αποικιών και πραγματοποιήθηκε πρώτη διαγνωστική πέψη με NotI. Επειδή τα αποτελέσματα δεν ήταν ξεκάθαρα, επιλέχθηκαν οι πιθανοί ορθοί κλώνοι και πραγματοποιήθηκε και διαγνωστική πέψη με BamHI. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα Π.11**.



<b>Setup πέψων:</b>		<b>Setup πέψων:</b>		<b>Χ15 MIX</b>
<b>Lon3-YFP-FLAG:</b>				
pDNA:	2μl	pDNA 1/10:	3μl	(-)
BufferH (10x):	4μl	NEB3 (10x):	4μl	60μl
BSA (10x):	4μl	BSA (10x):	4μl	60μl
NotI:	0,8μl	BamHI:	0,8μl	12μl
ddH2O:	29,2μl	ddH2O:	28,2μl	423μl
Total:	40μl	Total:	40μl	600μl

<b>Αναμενόμενα μεγέθη MM/ΔMM:</b>		<b>Αναμενόμενα μεγέθη ΔΤΡ:</b>	
<b>NotI</b>			
Ορθό:	475bp + 2318bp + 2405bp + 3261bp	Ορθό:	2318bp + 2405bp + 3341bp
Ανάποδο:	475bp + 780bp + 1538bp + 2405bp + 3261bp	Ανάποδο:	780bp + 1538bp + 2405bp + 3341bp
Άδειο:	475bp + 1538bp + 2405bp + 3261bp	Άδειο:	1538bp + 2405bp + 3341bp
<b>BamHI</b>			
Ορθό:	8459bp linear	Ορθό:	8146bp linear
Ανάποδο:	7679bp + 780bp(YFP)	Ανάποδο:	7366bp + 780bp (YFP)
Άδειο:	7679bp linear	Άδειο:	7366bp linear

**Εικόνα Π. 11** Αποτελέσματα πρώτης διαγνωστικής πέψης με NotI και BamHI για την επιλογή των κλώνων με την επιθυμητή (ορθή) ένθεση του YFP στις κατασκευές Lon3:YFP:FLAG/pBSKS(EcoRV)-MM/ΔMM/ΔΤΡ. Με κόκκινο χρώμα σημαίνονται οι κλώνοι που φέρουν την ορθή ένθεση.

Επιλέχθηκαν οι κλώνοι Lon3:YFP:FLAG/pBSKS(EcoRV)-MM #9/ ΔMM #6/ ΔΤΡ #28 για επιβεβαιωτικές πέψεις, οι οποίες παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.6** (Αποτελέσματα). Στη συνέχεια τόσο οι κλώνοι όσο και ο φορέας 35S/pGPTV-HPT κόπηκαν με SmaI, αναλύθηκαν σε πηκτή, αποκόπηκαν τα επιθυμητά κλάσματα DNA και καθαρίστηκαν με Gel extraction. Τα αποτελέσματα του καθαρισμού όπως και η αντίδραση λιγοποίησης των τμημάτων Lon3:YFP:FLAG(SmaI)-MM/ΔMM/ΔΤΡ με το δυαδικό φορέα παρουσιάζονται στην **Εικόνα Π.12**.

<b>SmaI</b>		<b>SmaI</b>	
<b>ΔMM /ΔTP/MM:</b>		<b>35S/pGPTV-HPT:</b>	
pDNA:	4μl	pDNA:	5μl
NEB4 (10x):	4μl	NEB4 (10x):	4μl
BSA (10x):	4μl	BSA (10x):	4μl
<b>SmaI:</b>	<b>1μl</b>	<b>SmaI:</b>	<b>1μl</b>
ddH2O:	27μl	ddH2O:	26μl
Total:	40μl	Total:	40μl

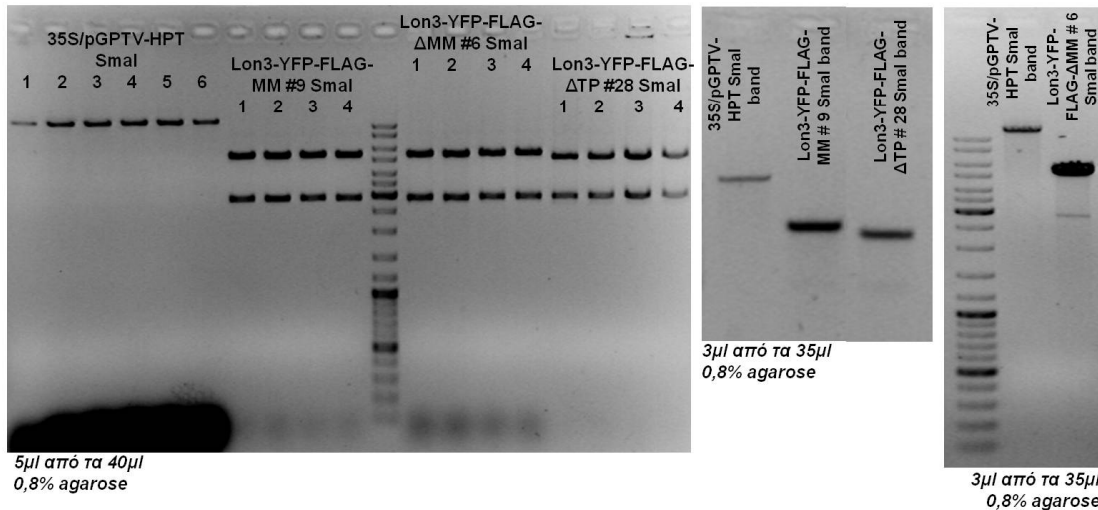
<b>Ligation setup:</b>	<b>MM</b>	<b>ΔMM</b>	<b>ΔTP</b>
	<b>#9</b>	<b>#6</b>	<b>#28</b>
Construct band (SmaI):	6μl	2μl	6μl
35S/pGPTV-HPT band (SmaI):	6μl	3μl	6μl
T4 Buffer (10x):	2μl	2μl	2μl
PEG 50% (10X):	2μl	2μl	2μl
<b>T4 Ligase TAKARA:</b>	<b>1,8μl (5U)</b>		
ddH2O:	2,2μl	9,2μl	2,2μl
Total:	20μl	20μl	20μl

**Αναμενόμενα μεγέθη:**

**MM/ΔMM:** 5.483bp (ένθεση) & 2.961bp (pBSKS)

**ΔTP:** 5.088bp (ένθεση) & 2.961bp (pBSKS)

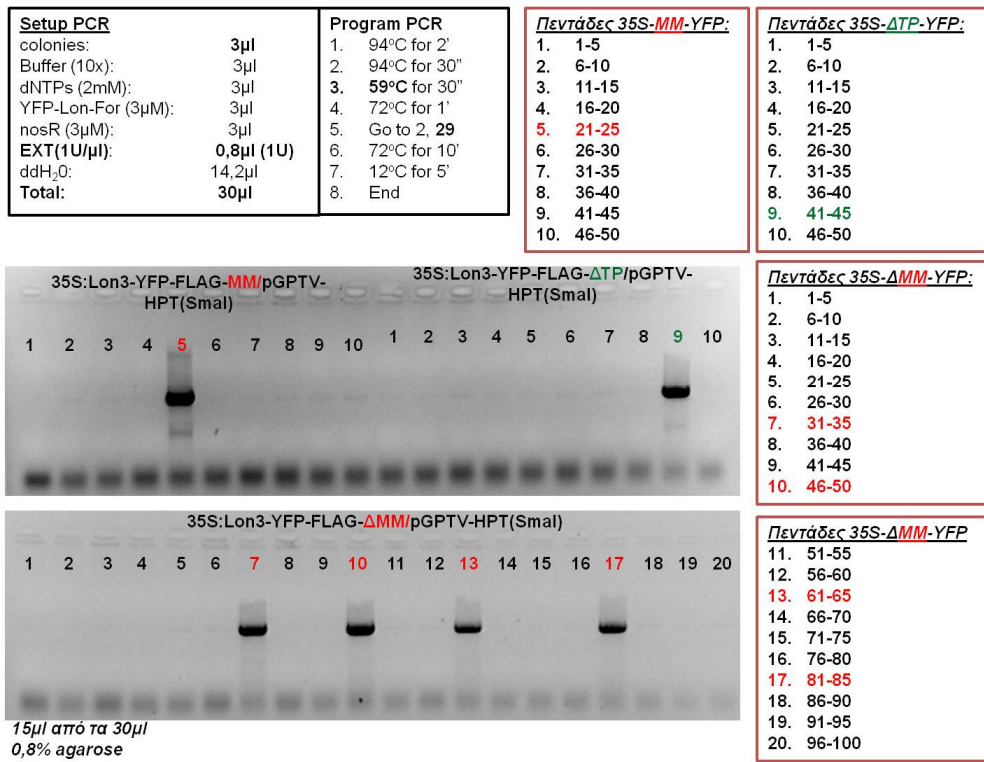
**35S/pGPTV-HPT:** ~13,000 bp (linear)



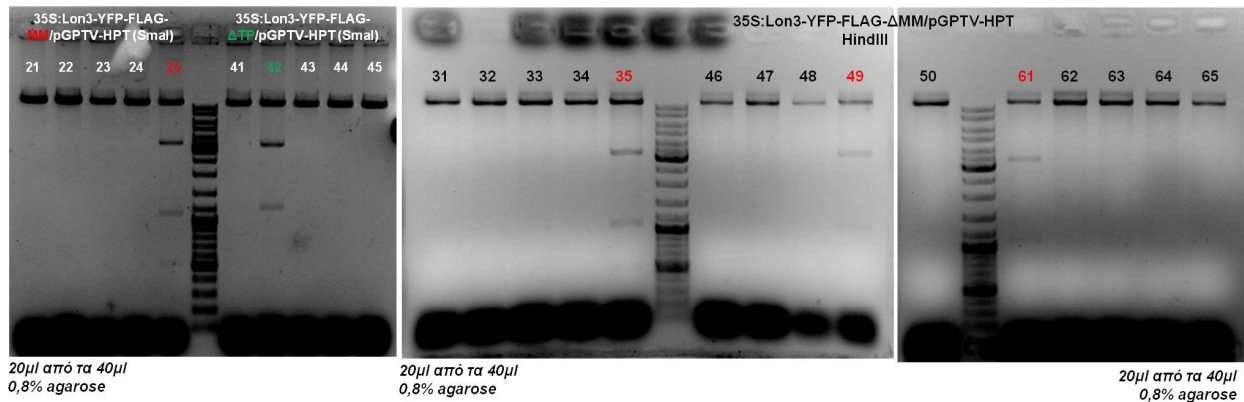
**Εικόνα Π. 12 (Αριστερά)** Αποτελέσματα πέψης του δυαδικού φορέα 35S/pGPTV-HPT και των κατασκευών Lon3:YFP:FLAG/pBSKS(EcoRV)-MM/ΔMM/ΔTP με SmaI. **(Δεξιά)** Ανάλυση των προϊόντων της πέψης μετά τον καθαρισμό και αντίδραση λιγοποίησης της κάθε κατασκευής στο δυαδικό φορέα.

Μετά τον μετασχηματισμό των βακτηριακών κυττάρων με τα προϊόντα της λιγοποίησης και την ανάπτυξη των αποικιών, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR αποικιών για την επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων με την επιθυμητή φορά της ένθεσης του εκάστοτε τμήματος Lon3:YFP:FLAG-MM/ΔMM/ΔTP στο δυαδικό φορέα. Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές [YFP-Lon-For] και [nosR] (βλ. Πίνακα Π.2). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα Π.13**. Βάσει των αποτελεσμάτων του colonies PCR επιλέχθηκαν οι ακόλουθες πεντάδες αποικιών, για να αναλυθούν οι μονές αποικίες που τις αποτελούν και να βρεθεί ποια ή ποιες έδωσε το προϊόν της PCR. Επιλέχθηκαν:

- ✓ **35S:Lon3-YFP-FLAG-MM/pGPTV-HPT (SmaI): #21-25**
- ✓ **35S:Lon3-YFP-FLAG-ΔTP/pGPTV-HPT (SmaI): #41-45**
- ✓ **35S:Lon3-YFP-FLAG-ΔMM/pGPTV-HPT (SmaI): #31-35, #46-50, #61-65**



**Εικόνα Π. 13** Αποτελέσματα αντίδρασης Colonies PCR στις κατασκευές 35S::Lon3:YFP:FLAG/pGPTV-HPT(SmaI)-MM/ΔMM/ΔTP για την επιλογή των πεντάδων αποικιών που περιέχουν έστω μία επιθυμητή αποικία, οι οποίες συμβολίζονται με κόκκινο και πράσινο.



Αναμενόμενα μεγέθη 35S:MM/ΔMM-YFP:	
Ορθό:	95bp & 520bp & 1085bp & 3490bp & 13293bp
Ανάποδο:	95bp & 520bp & 1993bp & 3490bp & 12385bp
Άδειο:	13.000bp (linear)
35S:ΔTP-YFP:	
Ορθό:	95bp & 1200bp & 3490bp & 13293bp
Ανάποδο:	95bp & 1993bp & 1490bp & 12500bp
Άδειο:	13.000bp linear

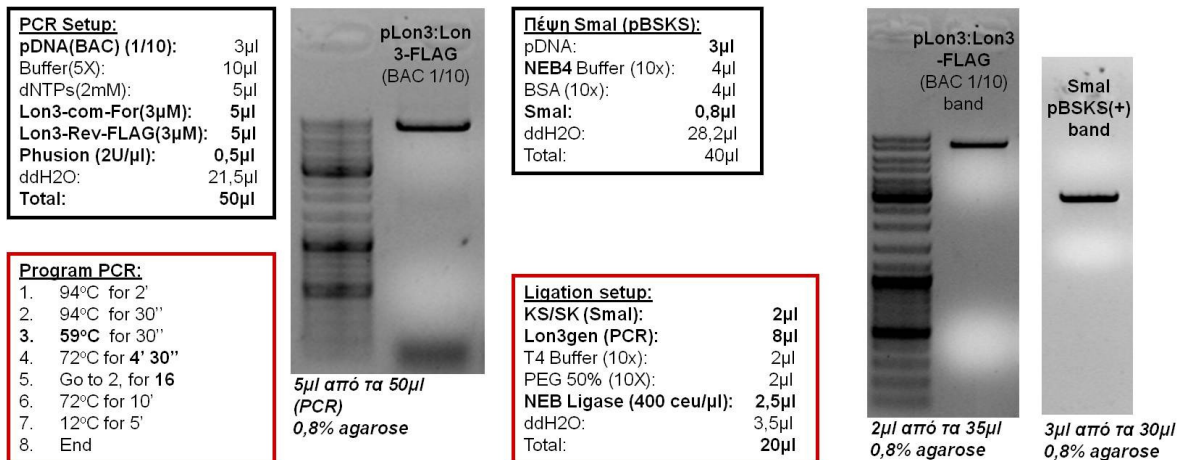
**Εικόνα Π. 14** Διαγνωστική πέψη με HindIII στους κλώνους 35S::Lon3:YFP:FLAG/pGPTV-HPT(SmaI)-MM/ΔMM/ΔTP.

Απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA από τις καλλιέργειες των μεμονωμένων αποικιών και πραγματοποιήθηκε πρώτη διαγνωστική πέψη με HindIII. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα Π.14**. Επιλέχθηκαν οι κλώνοι

35S::Lon3:YFP:FLAG/pGPTV-HPT(SmaI)- MM #25/ ΔMM #35/ ΔTP #42 για επιβεβαιωτικές πέψεις, τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.7** (Αποτελέσματα).

*Ακολουθως παρατίθενται τα ενδιάμεσα τμήματα της διαδικασίας κλωνοποίησης του AtLon3 για την δημιουργία της κατασκευής pLon3::Lon3:YFP:FLAG, τα οποία δεν αναφέρθηκαν στην Ενότητα 3 (Αποτελέσματα).*

Η αντίδραση PCR με την οποία ενισχύθηκε το τμήμα pLon3::Lon3:FLAG από το DNA BAC F10A16 καθώς και το αποτέλεσμα της PCR παρουσιάζονται στην **Εικόνα Π.15**, καθώς και η πέψη του pBSKS II με SmaI. Ακολούθησε ανάλυσή τους σε πηκτή αгарόζης, αποκοπή των επιθυμητών τμημάτων και καθαρισμός με Gel extraction. Τα αποτελέσματα του καθαρισμού καθώς και η αντίδραση λιγοποίησης μεταξύ του φορέα pBSKS II(SmaI) και του τμήματος pLon3::Lon3:FLAG παρουσιάζονται επίσης στην **Εικόνα Π.15**.

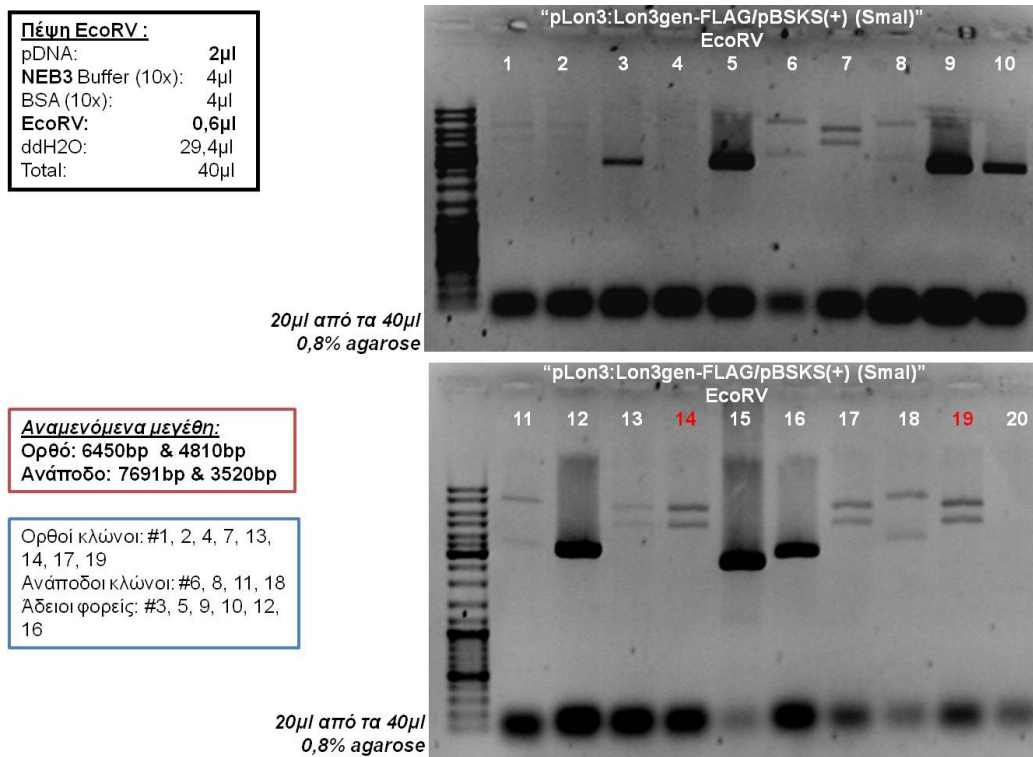


**Εικόνα Π. 15** (Αριστερά) Σχεδιασμός αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του τμήματος pLon3::Lon3:FLAG από BAC F10A16 και ανάλυση του αποτελέσματος σε πηκτή αгарόζης. (Δεξιά) Σχεδιασμός πέψης SmaI για το κόμμο του φορέα pBSKS II, ανάλυση του PCR και του φορέα μετά το gel extraction και σχεδιασμός της μεταξύ τους αντίδρασης λιγοποίησης.

Μετά το πέρας της αντίδρασης λιγοποίησης, ακολούθησε μετασχηματισμός κυττάρων DH5a. Τα βακτηριακά κύτταρα στρώθηκαν σε LB/Amp και η επιλογή των ανασυνδυασμένων αποικιών έγινε με Xgal/IPTG. Επιλέχθηκαν 20 λευκές αποικίες, αναπτύχθηκαν σε υγρό LB/Amp, απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA και ακολούθησε



πρώτη διαγνωστική πέψη με EcoRV (**Εικόνα Π.16**) για την επιλογή των κλώνων που φέρουν την ένθεση με την επιθυμητή(ορθή) κατεύθυνση. Επιλέχθηκαν οι κλώνοι pLon3::Lon3:FLAG/pBSKS(SmaI) #14 & #19 για αποθήκευση σε βαθιά κατάψυξη και για επιβεβαιωτικές πέψεις. Παρόλα αυτά, όταν ο κλώνος #19 στρώθηκε σε LB/Amp για να απομονωθεί εκ νέου πλασμιδιακό DNA για τις επιβεβαιωτικές πέψεις και τη συνέχιση της κλωνοποίησης, τα κύτταρα δεν αναπτύσσονταν. Για το λόγο αυτό, από το εναπομείναν pDNA που απομονώθηκε την πρώτη φορά, έγινε κατευθείαν μετασχηματισμός σε DH5a και από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν επιλέχθηκαν δύο νέοι κλώνοι #1 και #2. Ο κλώνος pLon3::Lon3:FLAG/pBSKS(SmaI)#1 υποβλήθηκε σε επιβεβαιωτικές πέψεις (**Εικόνα 3.9, Αποτελέσματα**) και επιλέχθηκε για τη συνέχεια της κλωνοποίησης.



**Εικόνα Π. 16** Πρώτη διαγνωστική πέψη με EcoRV για την επιλογή των κλώνων pLon3::Lon3:FLAG/pBSKS(SmaI) που φέρουν την ένθεση με την επιθυμητή (ορθή) φορά. Με κόκκινο χρώμα σημειώνονται οι ορθοί κλώνοι που επιλέχθηκαν.

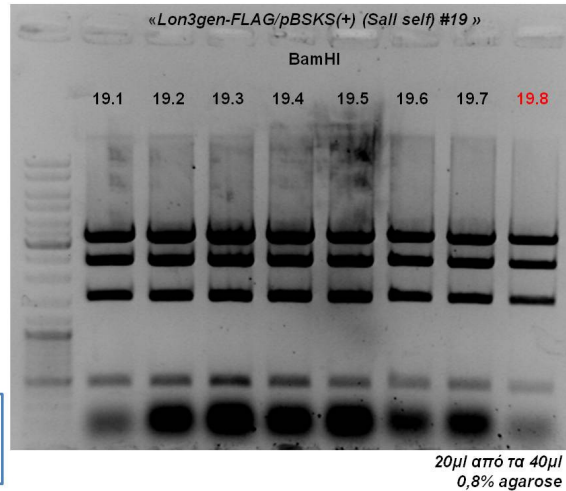
Πριν την εισαγωγή του YFP, προκειμένου να σταλθεί ο κλώνος για αλληλούχηση υποβλήθηκε σε πέψη με SalI για να διαχωριστεί ο υποκινητής (pLon3) από το υπόλοιπο γονίδιο και τον φορέα, το οποίο απομονώθηκε, καθαρίστηκε και χρησιμοποιήθηκε για αντίδραση self-ligation και μετασχηματισμό κυττάρων DH5a. Επιλέχθηκαν 8 κλώνοι και υποβλήθηκαν σε διαγνωστική πέψη με BamHI για να διαπιστωθεί ότι όντως ο υποκινητής έχει αφαιρεθεί. Η αντίδραση λιγοποίησης και τα

αποτελέσματα των πέψεων παρουσιάζονται στην **Εικόνα Π.17**. Επιλέχθηκε ο κλώνος Lon3::FLAG/pBSKS(SalI self) #19.8 για αλληλούχιση.

<u>Self-Ligation setup:</u>	
Lon3gen-FLAG/KS (SalI):	4μl
T4 Buffer (10x):	2μl
PEG 50% (10X):	2μl
NEB Ligase (400 ceu/μl):	2,5μl
ddH2O:	9,5μl
Total:	20μl

<u>Πέψη BamHI:</u>	
pDNA:	2μl
NEB3 Buffer (10x):	4μl
BSA (10x):	4μl
BamHI:	0,6μl
ddH2O:	29,4μl
Total:	40μl

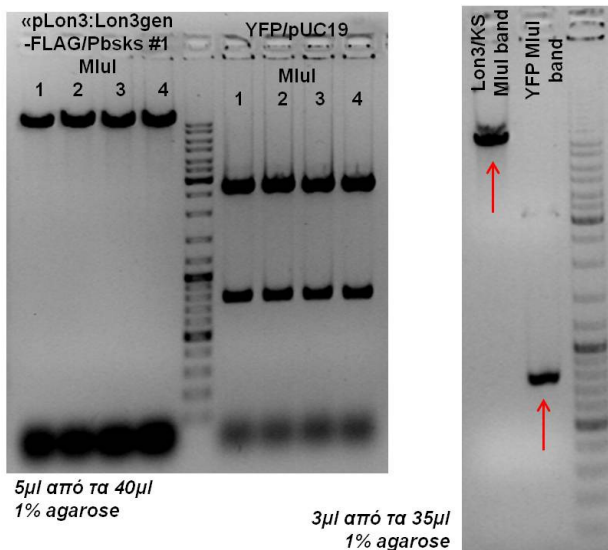
<u>Αναμενόμενα μεγέθη:</u>	
BamHI:	3306bp, 2405bp, 1550bp, 475bp



**Εικόνα Π. 17** Σχεδιασμός αντίδρασης self-ligation της κατασκευής Lon3:FLAG/pBSKS(SalI self) μετά την αποκοπή του υποκινητή pLon3 με Sal. Διαγνωστικές πέψεις με BamHI για την επιβεβαίωση ότι οι επιλεγμένοι κλώνοι υπολείπονται του υποκινητή.

<u>Πέψη MluI:</u>	
pDNA:	6μl
Buffer H (10x):	4μl
BSA (10x):	4μl
MluI:	1μl
ddH2O:	25μl
Total:	40μl

<u>Ligation setup:</u>	
Vector (Lon3/KS):	(22,5ng)1μl
Insert (YFP):	(25,5ng)3μl
T4 Buffer (10x):	2μl
PEG 50% (10X):	2μl
NEB Ligase (400 ceu/μl):	2,5μl
ddH2O:	10μl
Total:	20μl

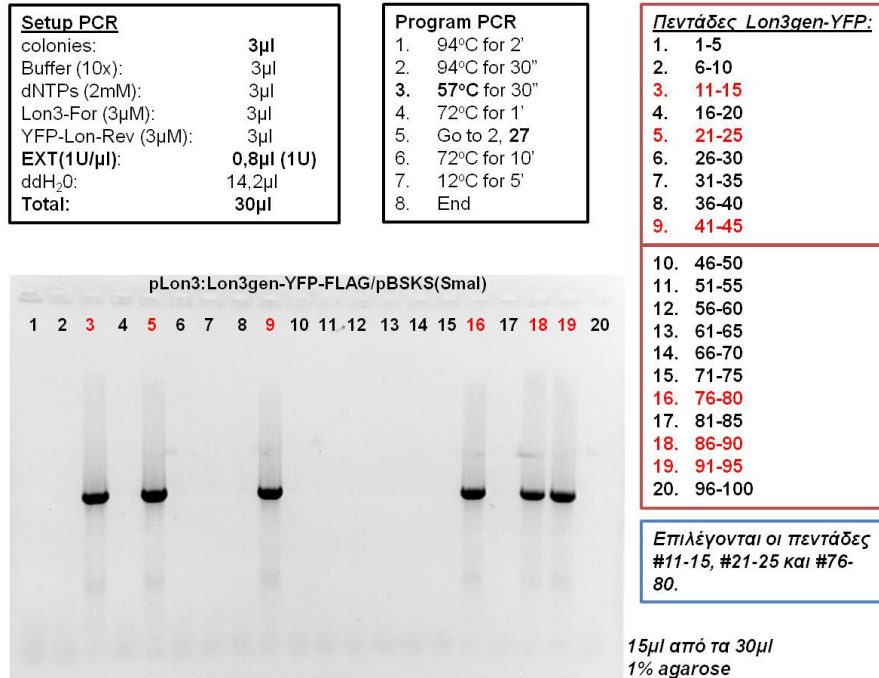


**Εικόνα Π. 18** (Αριστερά) Σχεδιασμός και αποτελέσματα πέψης με MluI του pLon3::Lon3:FLAG/pBSKS(SmaI)#1 και του YFP/pUC19. (Δεξιά) Αποτελέσματα καθαρισμού των τμημάτων και σχεδιασμός αντίδρασης λιγοποίησης.

Ο κλώνος #1 κόπηκε με MluI καθώς και το YFP από τον pUC19. Τα επιθυμητά τμήματα DNA αναλύθηκαν σε πηκτή, αποκόπηκαν και καθαρίστηκαν με gel extraction. Τα αποτελέσματα του καθαρισμού καθώς και ο σχεδιασμός της αντίδρασης λιγοποίησης μεταξύ του pLon3::Lon3:FLAG/pBSKS-MluI και του YFP(MluI) παρουσιάζονται στην **Εικόνα Π.18**. Ακολούθησε μετασχηματισμός κυττάρων DH5α, τα οποία στρώθηκαν σε LB/Amp. Η επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων που

φέρουν την ένθεση του YFP με την επιθυμητή(ορθή) φορά έγινε με colonies PCR, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές [Lon3-For] και [YFP-Lon-Rev] (Πίνακας Π.2). Τα

αποτελέσματα της αντίδρασης παρουσιάζονται στην **Εικόνα Π.19**. Οι μονές αποικίες από τις επιλεγμένες πεντάδες αναπτύχθηκαν σε LB/Amp, απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA και πραγματοποιήθηκε διαγνωστική πέψη με BamHI για την εύρεση των επιθυμητών κλώνων που έδωσαν το αποτέλεσμα στην PCR (**Εικόνα Π.20**). Επιλέχθηκαν οι κλώνοι pLon3::Lon3:YFP:FLAG/pBSKS(SmaI) #14 & #78. Ο κλώνος #14 υποβλήθηκε σε επιβεβαιωτικές πέψεις (**Εικόνα 3.11, Αποτελέσματα**), αποθηκεύτηκε και χρησιμοποιήθηκε για τη συνέχιση της κλωνοποίησης.

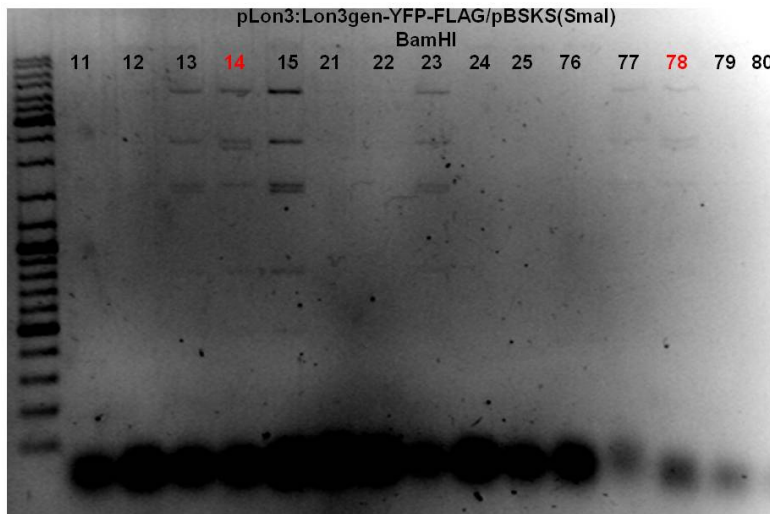


**Εικόνα Π. 19** Σχεδιασμός και αποτελέσματα αντίδρασης Colonies PCR για την επιλογή των ανασυνδυασμένων αποικιών που φέρουν την ένθεση του YFP στην επιθυμητή (ορθή) φορά στην κατασκευή pLon3::Lon3:YFP:FLAG/pBSKS(SmaI).

Ο κλώνος #14 κόπηκε με διπλή πέψη SmaI/SacI για να απομονωθεί το τμήμα pLon3::Lon3:YFP:FLAG και να εισαχθεί στο δυαδικό φορέα pGPTV-HPT, ο οποίος έχει υποστεί την ίδια πέψη για να αφαιρεθεί το γονίδιο uidA και να αντικατασταθεί με την κατασκευή. Τα προϊόντα της πέψης αναλύθηκαν σε πηκτή, αποκόπηκαν και καθαρίστηκαν με gel extraction. Το αποτέλεσμα του καθαρισμού και η μεταξύ τους αντίδραση λιγοποίησης παρουσιάζονται στην **Εικόνα Π.21**.

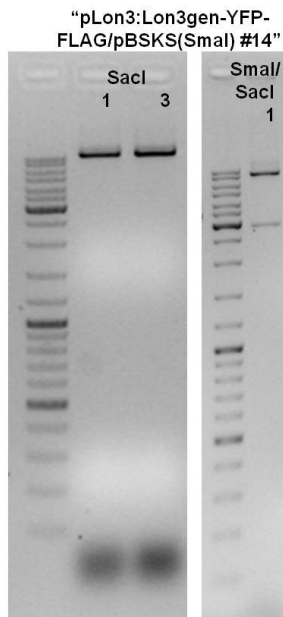
<u>Πέψη BamHI :</u>	
pDNA:	4μl
NEB3(10x):	4μl
BSA (10x):	4μl
BamHI:	0,8μl
ddH2O:	27,2μl
Total:	40μl

<u>Αναμενόμενα μεγέθη</u>	
<b>Ορθό:</b>	4354bp, 2405bp, 2333bp, 1630bp, 850bp, 475bp
<b>Ανάποδο :</b>	4354bp, 2405bp, 1630bp, 1553bp, 850bp, 780bp, 475bp
<b>Άδειο:</b>	4354bp, 2405bp, 1630bp, 1553bp, 850bp, 475bp



20μl από τα 40μl  
1% agarose

Εικόνα Π. 20 Πρώτη διαγνωστική πέψη με BamHI στην κατασκευή pLon3::Lon3:YFP:FLAG/pBSKS(SmaI) για την εύρεση των αποικιών που έδωσαν το επιθυμητό αποτέλεσμα στο Colonies PCR, άρα φέρουν το YFP με την επιθυμητή φορά. Με κόκκινο σημαίνονται οι ορθοί κλώνοι.

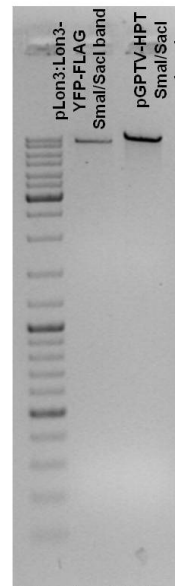


10μl από τα 40μl  
1% agarose

<u>Πέψη SmaI/SacI :</u>	
pDNA:	5μl
CutSmart(10x):	4μl
SmaI:	1μl
SacI:	1μl
ddH2O:	29μl
Total:	40μl

<u>Αναμενόμενα μεγέθη:</u>	
<b>SacI:</b>	linear στις 12047bp
<b>SmaI/SacI:</b>	9086bp, 2961bp

<u>Ligation setup:</u>	
Vector (pGPTV-HPT):	(~27ng)2μl
Insert (Lon3-YFP):	(~24ng)8μl
T4 Buffer (10x):	2μl
PEG 50% (10X):	2μl
NEB Ligase (400 ceu/μl):	2,5μl
ddH2O:	3,5μl
Total:	20μl

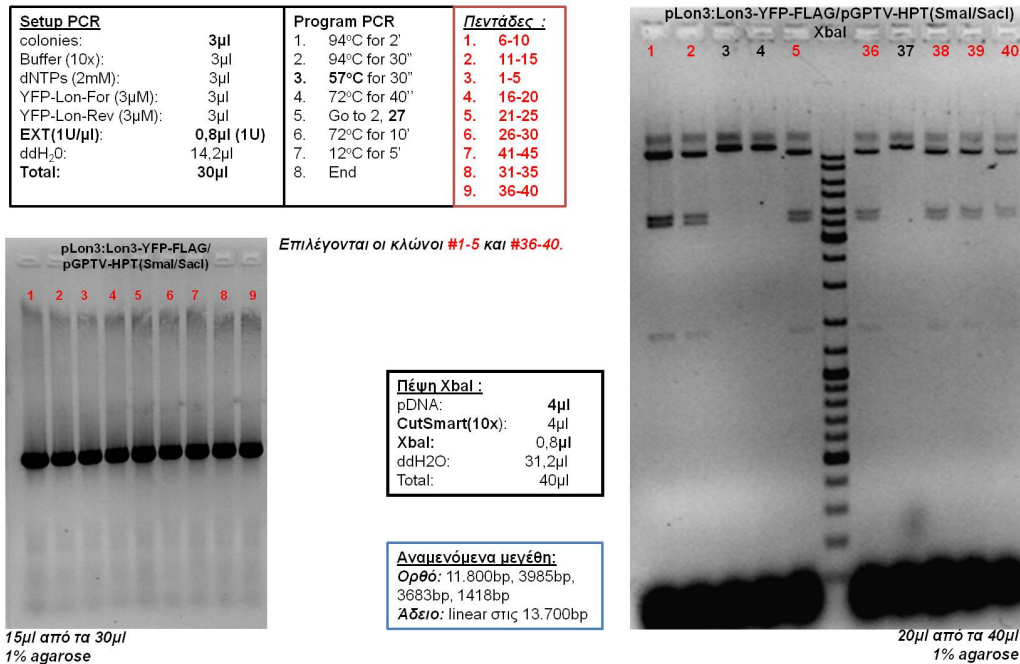


3μl από τα 35μl  
1% agarose

Εικόνα Π. 21 (Αριστερά) Αντίδραση πέψης SmaI/SacI στην κατασκευή pLon3::Lon3:YFP:FLAG/pBSKS(SmaI). (Δεξιά) Αποτελέσματα καθαρισμού του δυαδικού φορέα και της ένθεσης pLon3::Lon3:YFP:FLAG και σχεδιασμός της μεταξύ τους αντίδραση λιγοποίησης.

Μετά τη λιγοποίηση, μετασηματίστηκαν κύτταρα DH5a τα οποία στρώθηκαν σε LB/Kan. Για την επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων που φέρουν την ένθεση πραγματοποιήθηκε αντίδραση colonies PCR, τα αποτελέσματα της οποίας

παρουσιάζονται στην **Εικόνα Π.22**. Ακολούθως απομονώθηκε pDNA από τις μονές αποικίες των πεντάδων που επιλέχθηκαν ως θετικές και πραγματοποιήθηκε διαγνωστική πέψη με XbaI για την επιλογή των κλώνων που έδωσαν το αποτέλεσμα στην PCR (**Εικόνα Π.22**). Ο κλώνος pLon3::Lon3:YFP:FLAG/pGPTV-HPT(SmaI/SacI) #1 επιλέχθηκε για επιβεβαιωτικές πέψεις (**Εικόνα 3.11, Αποτελέσματα**), για αποθήκευση και για το μετασχηματισμό *Agrobacterium*.

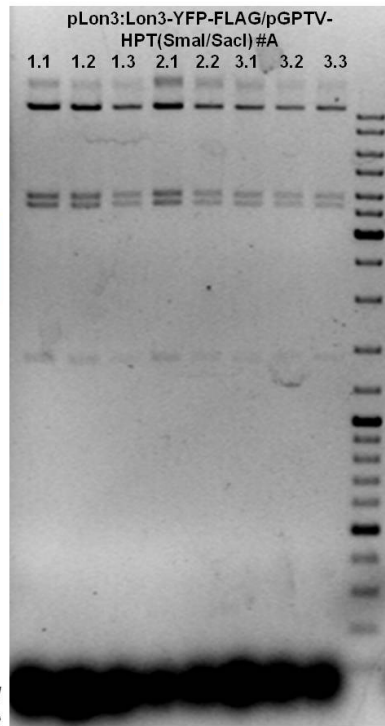


**Εικόνα Π. 22** (Αριστερά) Σχεδιασμός και αποτελέσματα αντίδρασης Colonies PCR για την επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων pLon3::Lon3:YFP:FLAG/pGPTV-HPT(SmaI/SacI). (Αριστερά) Διαγνωστική πέψη με XbaI στις μονές αποικίες που επιλέχθηκαν από το Colonies PCR για εύρεση των ανασυνδυασμένων κλώνων. Με κόκκινο σημειώνονται οι επιθυμητοί κλώνοι.

Μετά την εισαγωγή στο *Agrobacterium*, απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA από τον κλώνο **pLon3::Lon3:YFP:FLAG/pGPTV-HPT #A GV3101**, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό *E. coli* DH5a. Η απομόνωση έγινε από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες που προήλθαν από 3 μονές αποικίες του κλώνου #A. Μετά τον μετασχηματισμό, επιλέχθηκαν 3 αποικίες από το κάθε τρυβλίο που προήλθε από το pDNA των αρχικών μονών αποικιών, οι οποίες αναπτύχθηκαν σε καλλιέργεια και στη συνέχεια απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA τους. Ακολούθησε διαγνωστική πέψη με XbaI για την επιβεβαίωση ότι ο κλώνος που μετασχημάτισε το *Agrobacterium* είναι σωστός. Τα αποτελέσματα της πέψης παρουσιάζονται στην **Εικόνα Π.23**.

<u>Πέψη XbaI :</u>	
pDNA:	4μl
CutSmart(10x):	4μl
BSA(10X):	4μl
XbaI:	0,8μl
ddH2O:	27,2μl
Total:	40μl

Αναμενόμενα μεγέθη XbaI  
 11.800bp, 3985bp, 3683bp,  
 1418bp



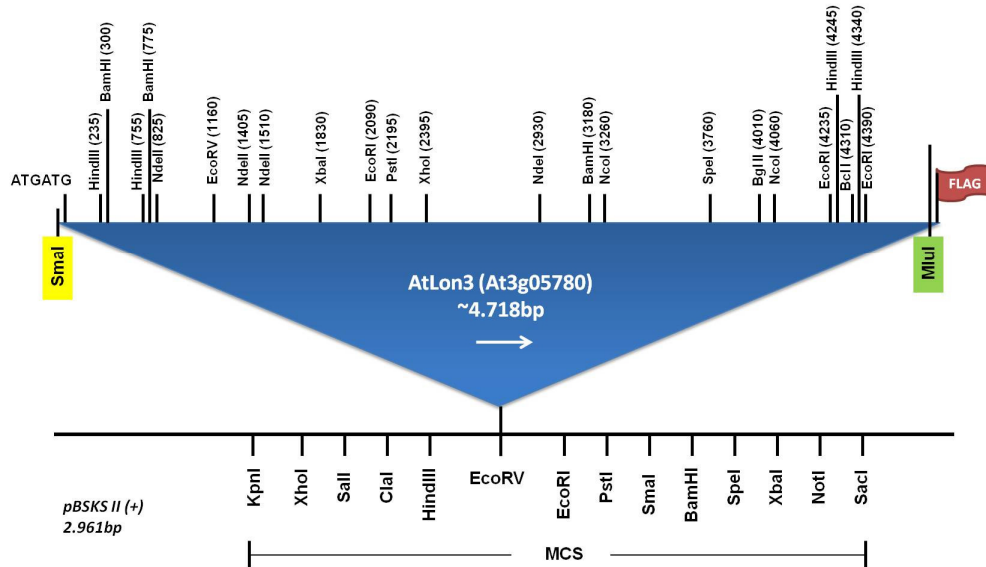
**Εικόνα Π. 23** Αποτελέσματα πέψης με XbaI του κλώνου pLon3::Lon3:YFP:FLAG/pGPTV-HPT #A, μετά την απομόνωση από GV3101 και την επανεισαγωγή του σε DH5a.

Όλοι οι χάρτες κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της δημιουργίας των κατασκευών, παρουσιάζονται ακολούθως στην **Ενότητα IV**.

#### IV. Χάρτες κλωνοποίησης των κατασκευών του γονιδίου AtLon3

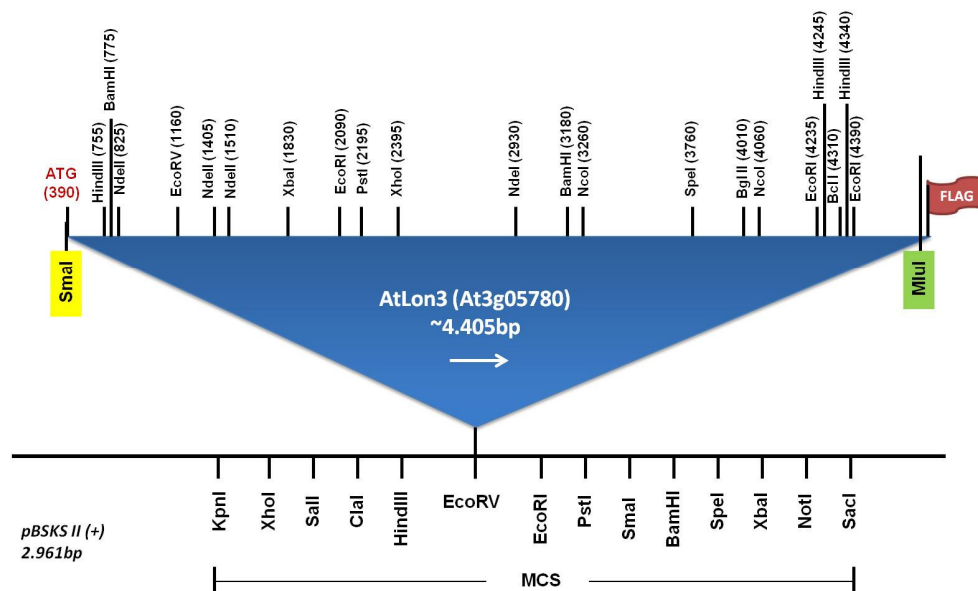
Σε αυτή την ενότητα παρατίθενται οι σχηματικοί χάρτες κλωνοποίησης που περιλαμβάνουν τη διεύθυνση των κατασκευών που προαναφέρθηκαν μέσα στους πλασμιδιακούς φορείς και τη λεπτομερή θέση των ενζύμων περιορισμού που εντοπίζονται στην κατασκευή για την αξιολόγηση των πέψεων.

Χάρτης κλωνοποίησης κατασκευών Lon3:FLAG/pBSKS(EcoRV)-MM/ΔMM



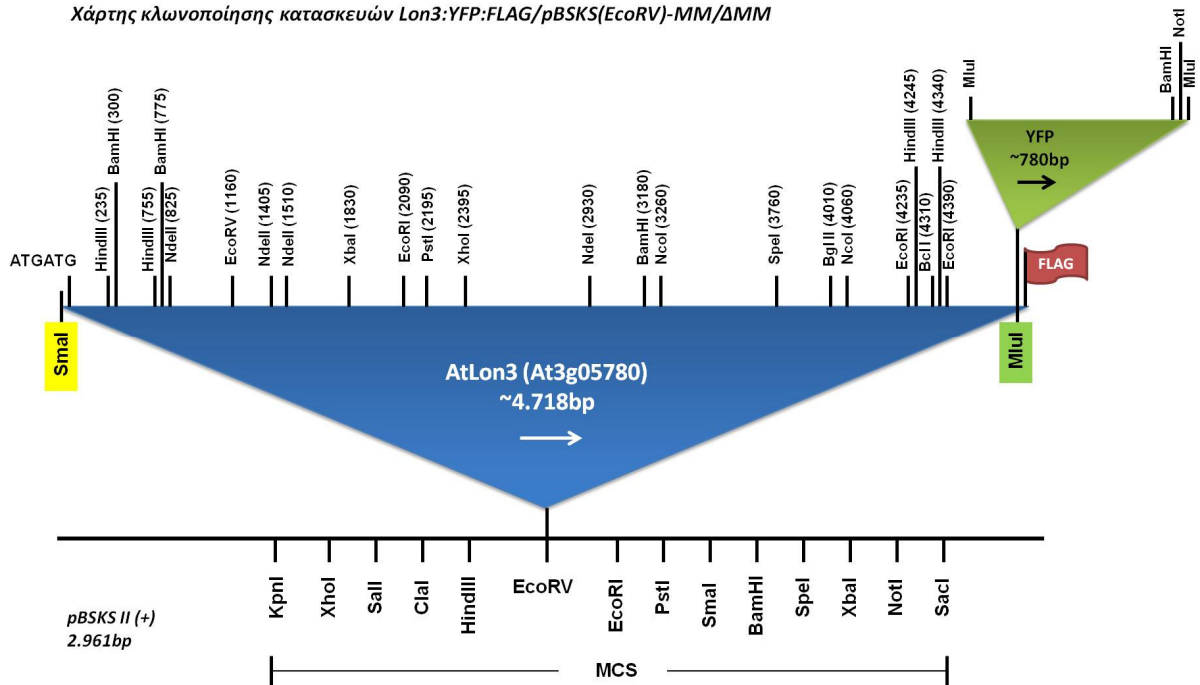
Εικόνα Π. 24 Χάρτης κατασκευών Lon3:FLAG/pBSKS(EcoRV)-MM/ΔMM. Ο χάρτης αναφέρεται και στις δύο κατασκευές, καθώς η μόνη διαφορά τους έγκειται στο ότι η πρώτη περιλαμβάνει τα εναρκτήρια ATG (MM) ενώ στη δεύτερη έχουν μετατραπεί σε AAA (ΔMM).

Χάρτης κλωνοποίησης κατασκευής Lon3:FLAG/pBSKS(EcoRV)-ΔTP



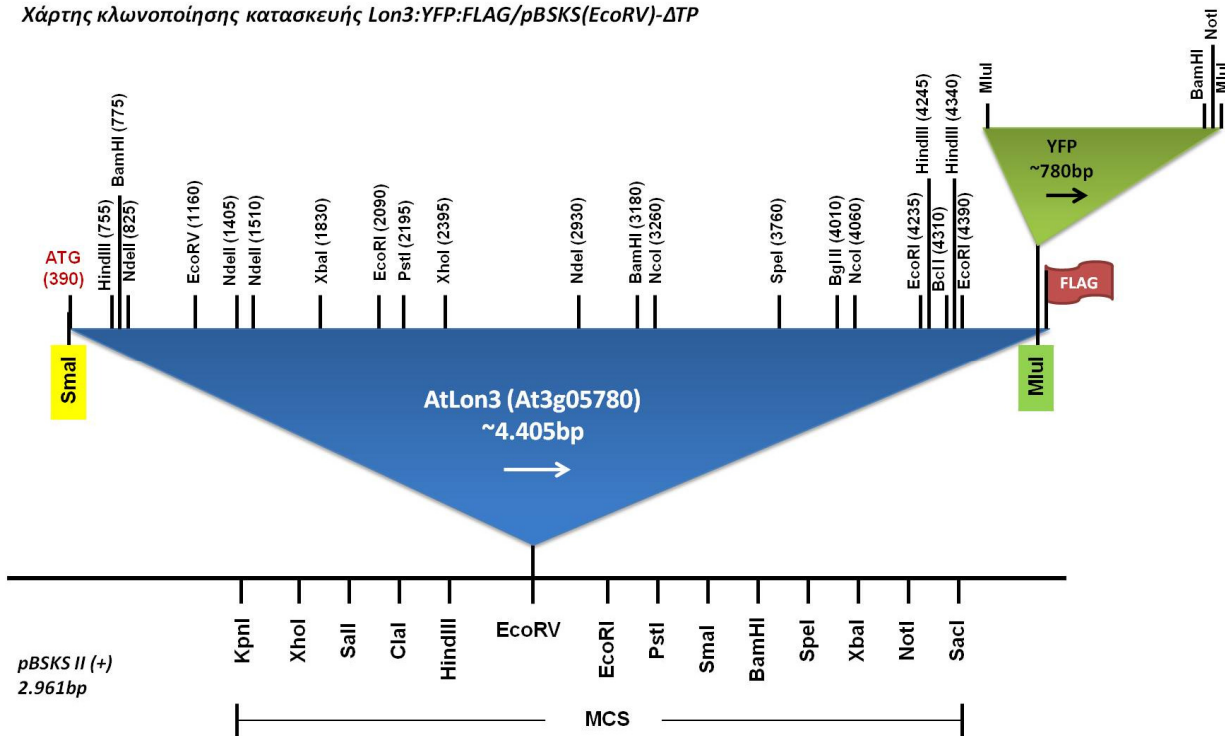
Εικόνα Π. 25 Χάρτης κατασκευής Lon3:FLAG/pBSKS(EcoRV)-ΔTP.

Χάρτης κλωνοποίησης κατασκευών Lon3:YFP:FLAG/pBSKS(EcoRV)-MM/ΔMM



Εικόνα Π. 26 Χάρτης κατασκευών Lon3:YFP:FLAG/pBSKS(EcoRV)-MM/ΔMM.

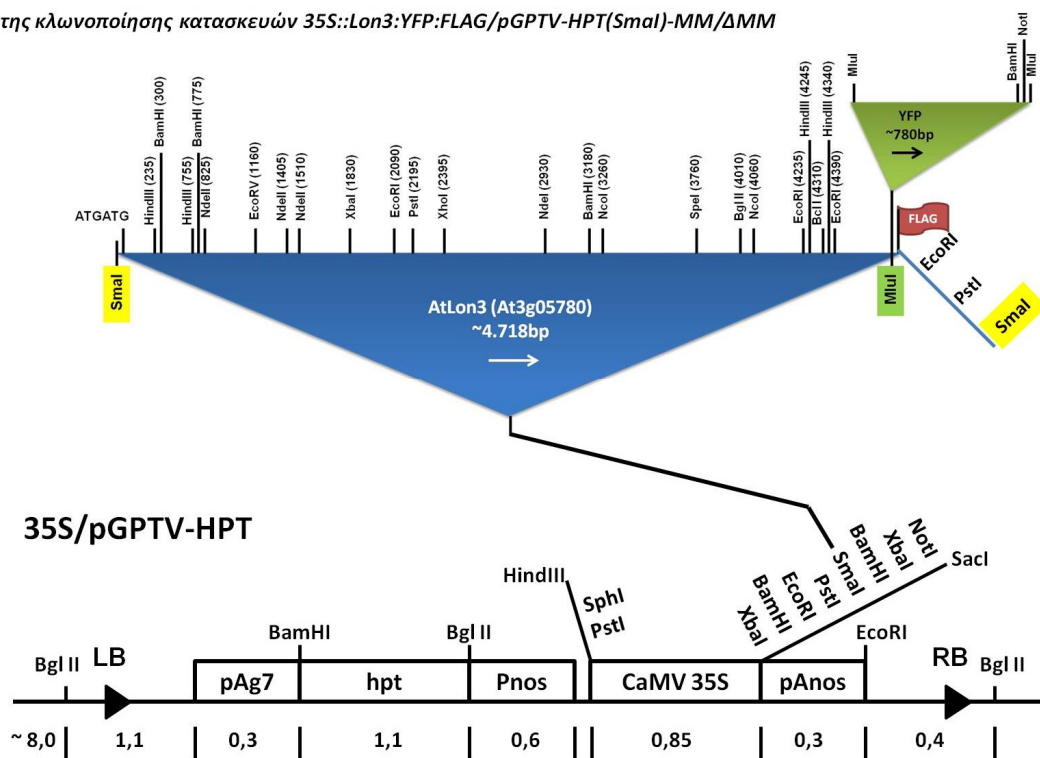
Χάρτης κλωνοποίησης κατασκευής Lon3:YFP:FLAG/pBSKS(EcoRV)-ΔTP



Εικόνα Π. 27 Χάρτης κατασκευής Lon3:YFP:FLAG/pBSKS(EcoRV)-ΔTP.

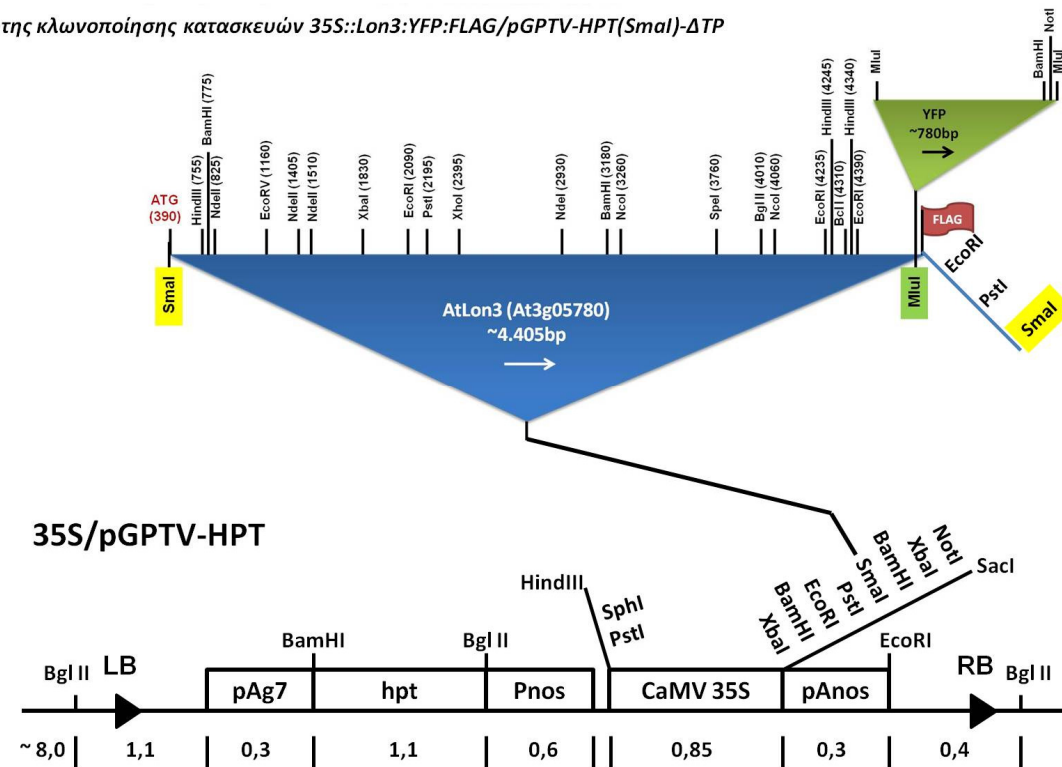


Χάρτης κλωνοποίησης κατασκευών 35S::Lon3:YFP:FLAG/pGPTV-HPT(SmaI)-MM/ΔMM



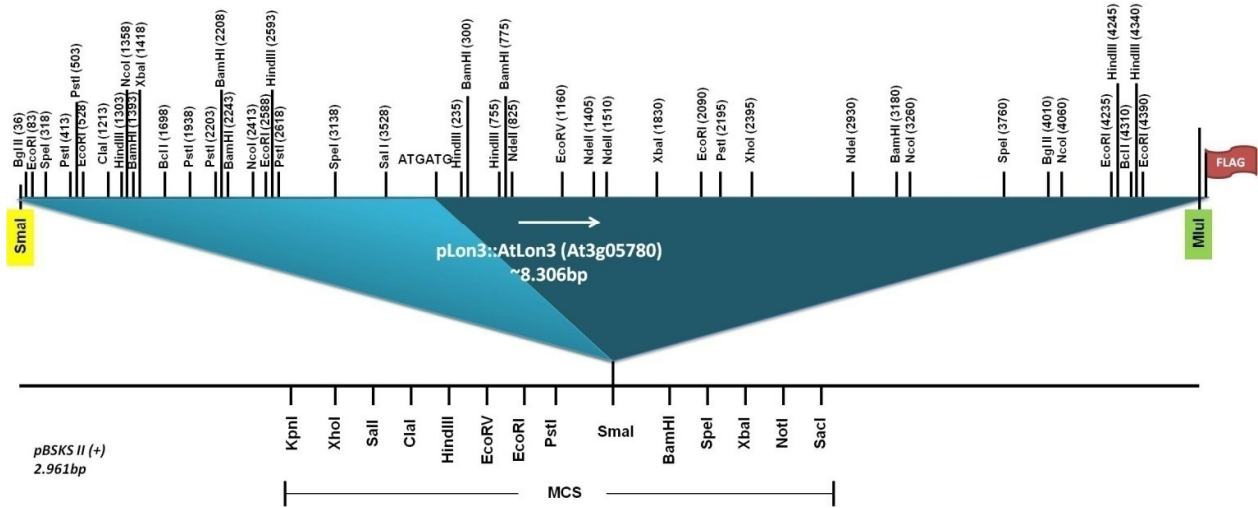
Εικόνα Π. 28 Χάρτης κατασκευών 35S::Lon3:YFP:FLAG/pGPTV-HPT(SmaI)-MM/ΔMM.

Χάρτης κλωνοποίησης κατασκευών 35S::Lon3:YFP:FLAG/pGPTV-HPT(SmaI)-ΔTP



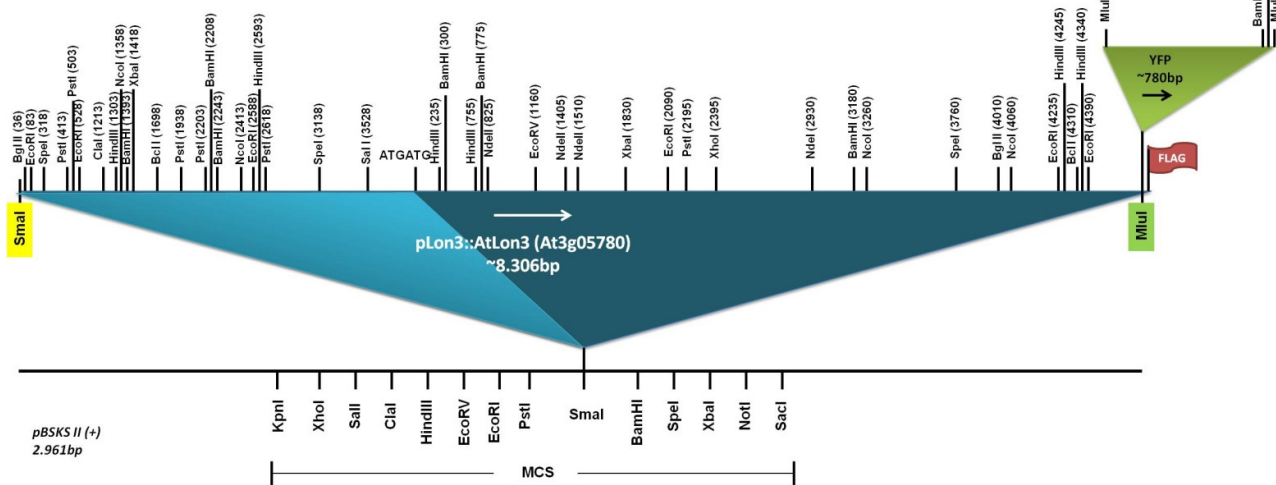
Εικόνα Π. 29 Χάρτης κατασκευής 35S::Lon3:YFP:FLAG/pGPTV-HPT(SmaI)-ΔTP.

Χάρτης κλωνοποίησης κατασκευής *pLon3::Lon3:FLAG/pBSKS(SmaI)*



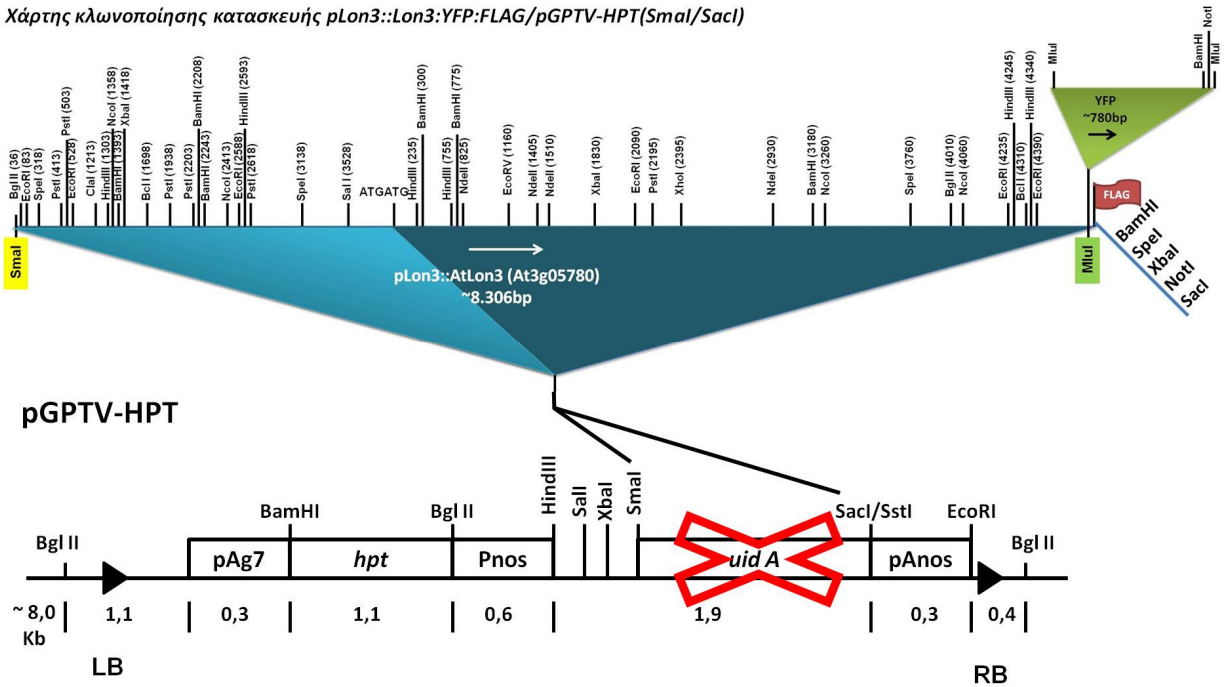
Εικόνα Π. 30 Χάρτης κατασκευής *pLon3::Lon3:FLAG/pBSKS(SmaI)*.

Χάρτης κλωνοποίησης κατασκευής *pLon3::Lon3:YFP:FLAG/pBSKS(SmaI)*



Εικόνα Π. 31 Χάρτης κατασκευής *pLon3::Lon3:YFP:FLAG/pBSKS(SmaI)*.

Χάρτης κλωνοποίησης κατασκευής *pLon3::Lon3:YFP:FLAG/pGPTV-HPT(SmaI/SacI)*



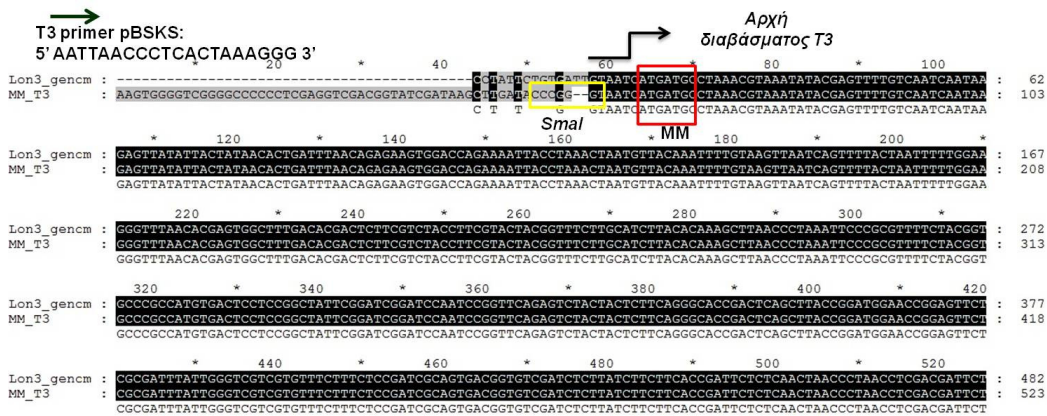
Εικόνα Π. 32 Χάρτης κατασκευής *pLon3::Lon3:YFP:FLAG/pGPTV-HPT(SmaI/SacI)*.

**V. Αποτελέσματα αλληλούχισης των κατασκευών του γονιδίου *AtLon3***

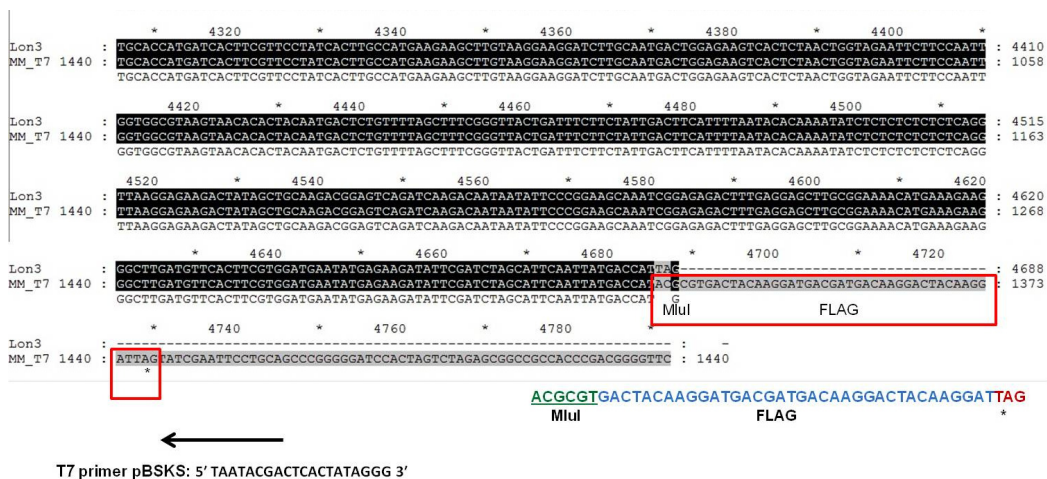
Δεδομένου του γεγονότος ότι οι κατασκευές του γονιδίου *AtLon3* που παρουσιάζονται στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη είναι τέσσερις, δεν γίνεται να συμπεριληφθούν τα αποτελέσματα της αλληλούχισης ολόκληρου του μήκους και των τεσσάρων. Για το λόγο αυτό, παρουσιάζονται εδώ συνοπτικά τα αποτελέσματα αλληλούχισης του 5' και του 3' άκρου της κάθε κατασκευής, ως απόδειξη για τις αλλαγές που εισάγονται από τους εκκινητές κατά την αρχική ενίσχυση των τμημάτων DNA για την κάθε κλωνοποίηση.

*Κατασκευή 35S::Lon3:YFP:FLAG-MM*

Αποτελέσματα αλληλούχισης του κλώνου *Lon3:FLAG/pBSKS(EcoRV)-MM #5*. Για το 5' άκρο χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής T3 και για το 3' άκρο ο εκκινητής T7 του *pBSKS II (+)* (Πίνακας Π.2).



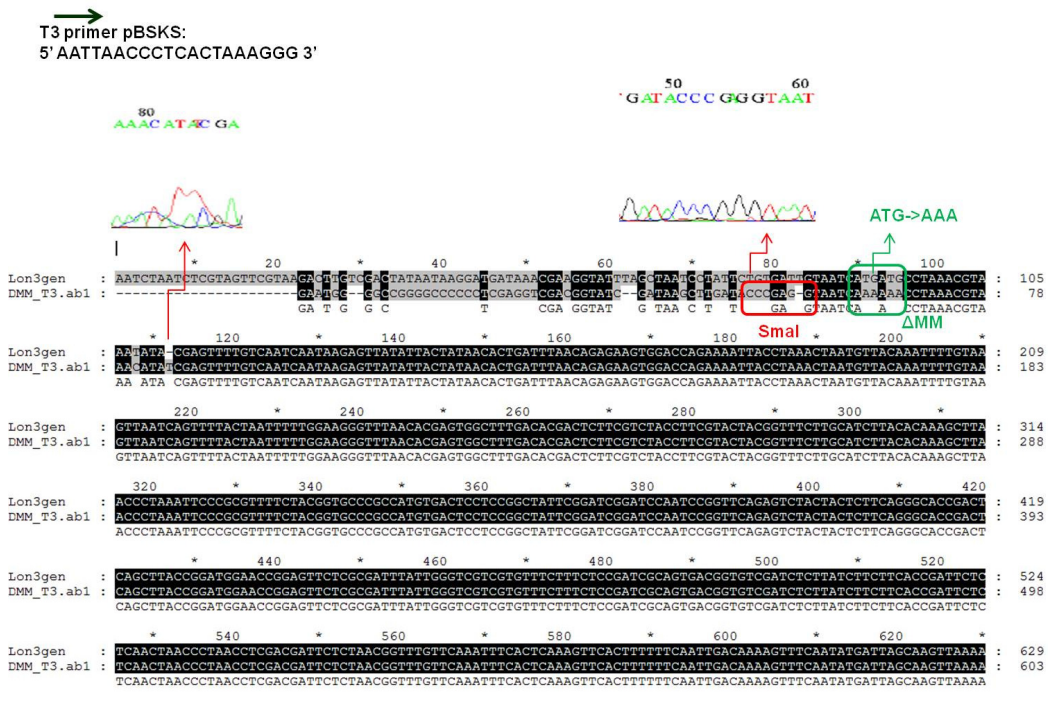
**Εικόνα Π. 33** Αποτελέσματα αλληλούχισης του 5' άκρου της κατασκευής Lon3:FLAG/pBSKS(EcoRV)-MM #5 με τον εκκινητή T3 του φορέα. Με κίτρινο περίβλημα σημαίνεται η προσθήκη της θέσης SmaI από τον ορθό εκκινητή.



**Εικόνα Π. 34** Αποτελέσματα αλληλούχισης του 3' άκρου της κατασκευής Lon3:FLAG/pBSKS(EcoRV)-MM #5 με τον εκκινητή T7 του φορέα. Με κόκκινο περίβλημα σημαίνεται η προσθήκη της θέσης MluI, της ακολουθίας του επιτόπου FLAG και του κωδικονίου λήξης TAG (\*) από τον ανάστροφο εκκινητή.

### Κατασκευή 35S::Lon3:YFP:FLAG-ΔMM

Αποτελέσματα αλληλούχισης του κλώνου Lon3:FLAG/pBSKS(EcoRV)-ΔMM #3. Για το 5' άκρο χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής T3 και για το 3' άκρο ο εκκινητής T7 του pBSKS II (+) (Πίνακας Π.2).



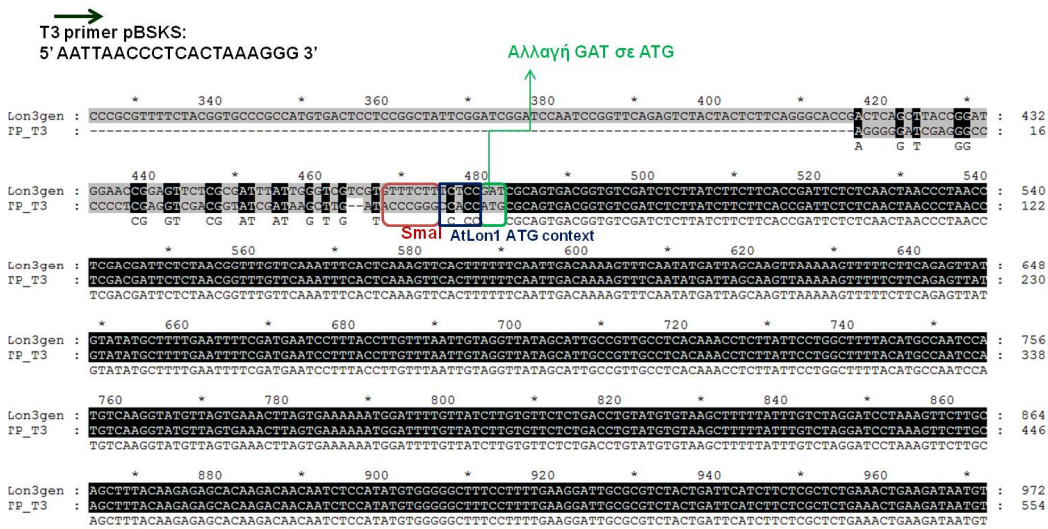
Εικόνα Π. 35 Αποτελέσματα αλληλούχισης του 5' άκρου της κατασκευής Lon3:FLAG/pBSKS(EcoRV)-ΔMM #3 με τον εκκινητή T3 του φορέα. Με κόκκινο περίβλημα σημαίνεται η προσθήκη της θέσης SmaI και με πράσινο η αλλαγή των ATG σε AAA από τον ορθό εκκινητή.



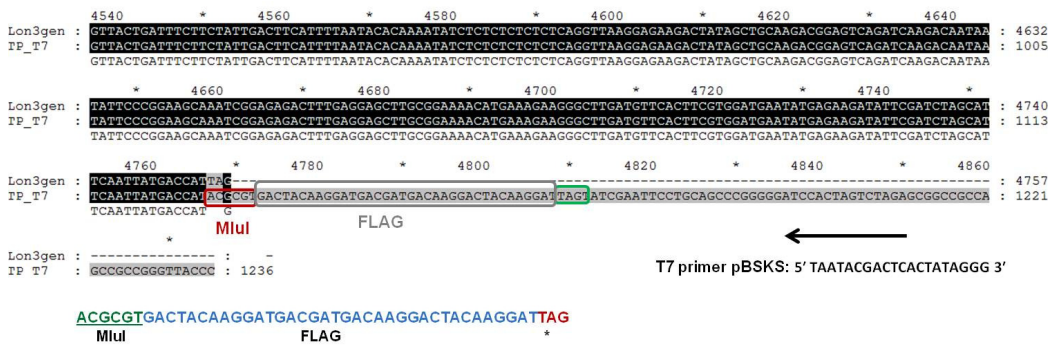
Εικόνα Π. 36 Αποτελέσματα αλληλούχισης του 3' άκρου της κατασκευής Lon3:FLAG/pBSKS(EcoRV)-ΔMM #3 με τον εκκινητή T7 του φορέα. Με κόκκινο περίβλημα σημαίνεται η προσθήκη της θέσης MluI, με γκρι της ακολουθίας του επιτόπου FLAG και με πράσινο του κωδικονίου λήξης TAG (\*) από τον ανίστροφο εκκινητή.

Κατασκευή 35S::Lon3:YFP:FLAG-ΔTP

Αποτελέσματα αλληλούχισης του κλώνου Lon3:FLAG/pBSKS(EcoRV)-ΔTP #8. Για το 5' άκρο χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής T3 και για το 3' άκρο ο εκκινητής T7 του pBSKS II (+) (Πίνακας Π.2).



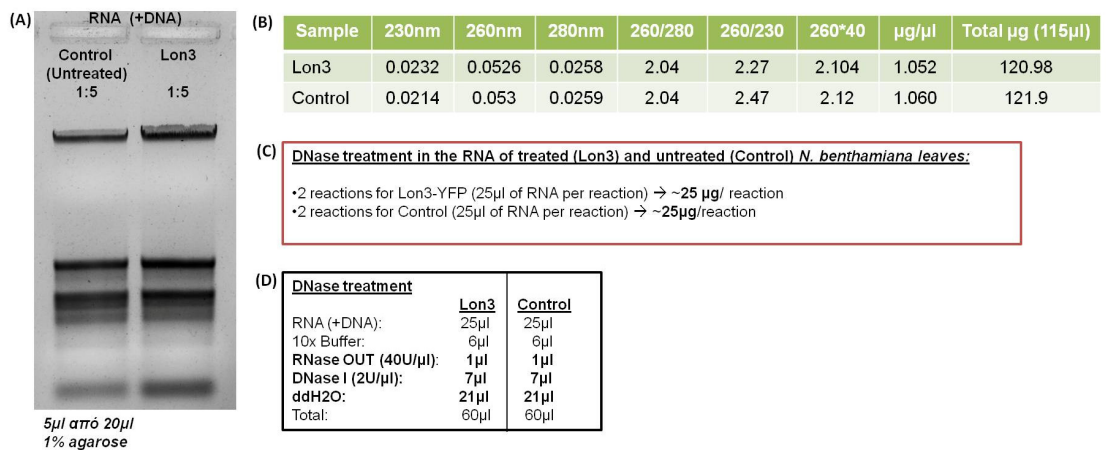
Εικόνα Π. 37 Αποτελέσματα αλληλούχισης του 5' άκρου της κατασκευής Lon3:FLAG/pBSKS(EcoRV)-ΔTP #8 με τον εκκινητή T3 του φορέα. Με κόκκινο περίβλημα σημαίνεται η προσθήκη της θέσης Smal, με μπλε η προσθήκη του ισχυρού ATG context της AtLon1 και με πράσινο η αλλαγή του GAT σε ATG από τον ορθό εκκινητή, στο σημείο που κόβεται το μιτοχondριακό σινιάλο στόχευσης.



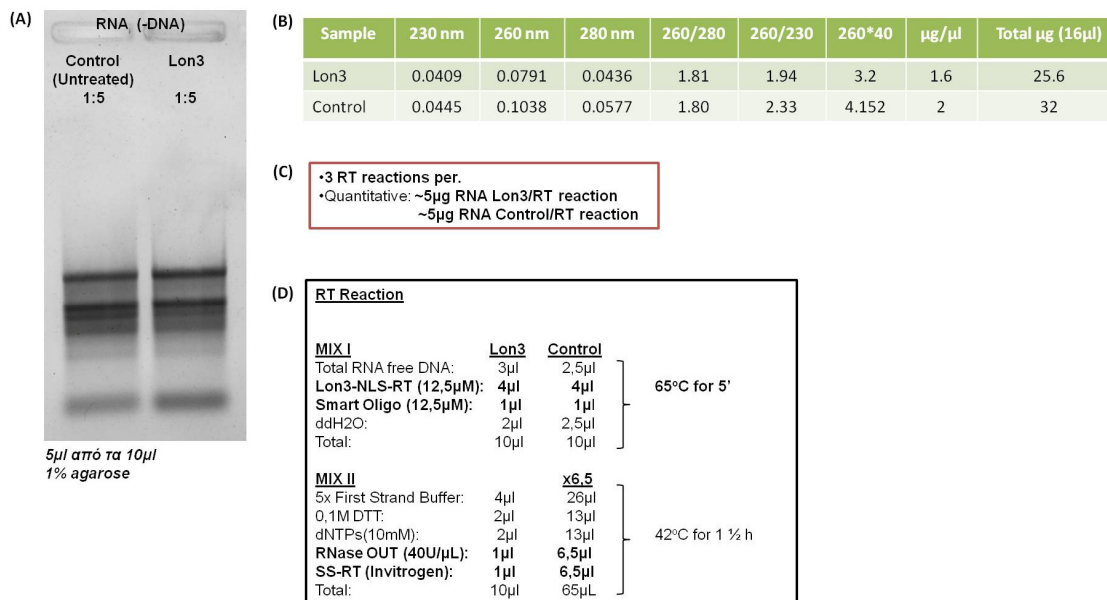
Εικόνα Π. 38 Αποτελέσματα αλληλούχισης του 3' άκρου της κατασκευής Lon3:FLAG/pBSKS(EcoRV)-ΔTP #8 με τον εκκινητή T7 του φορέα. Με κόκκινο περίβλημα σημαίνεται η προσθήκη της θέσης MluI, με γκρι της ακολουθίας του επιτόπου FLAG και με πράσινο του κωδικονίου λήξης TAG (\*) από τον ανάστροφο εκκινητή.

## VI. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT PCR) για τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *AtLon3*

Στην ενότητα αυτή του παραρτήματος παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα της προετοιμασίας της πρώτης αλυσίδας του cDNA (RT) για τη διεξαγωγή των πειραμάτων μελέτης της έκφρασης του *AtLon3* και αποσαφήνισης του 5' άκρου του (5' SMART RACE).



**Εικόνα Π. 39 Αντίδραση DNaseI στο RNA που απομονώθηκε από την κάθε συνθήκη για την καταστροφή του DNA που υπάρχει στο δείγμα. (A) Ανάλυση του RNA σε πηκτή αгарόζης: το DNA τρέχει ψηλά και πιο χαμηλά αναλύονται οι ζώνες από τις ριβοσωμικές υπομονάδες του κυττάρου και των οργανιδίων. (B) Ανάλυση της ποιότητας και της ποσότητας των νουκλεϊνικών (RNA + DNA) σε φασματοφωτόμετρο. (C) Ποσότητα νουκλεϊνικών που χρησιμοποιήθηκε ανά αντίδραση. (D) Σχεδιασμός αντίδρασης DNase I.**



**Εικόνα Π. 40 Αντίδραση RT στο RNA μετά την απομάκρυνση του DNA για την παραγωγή της πρώτης αλυσίδας του cDNA του *AtLon3*.(A) Ανάλυση του RNA σε πηκτή αгарόζης: δεν ανιχνεύεται DNA και αναλύονται οι ζώνες από τις ριβοσωμικές υπομονάδες του κυττάρου και των οργανιδίων. (B) Ανάλυση της ποιότητας και της ποσότητας του RNA σε φασματοφωτόμετρο. (C) Ποσότητα RNA που χρησιμοποιήθηκε ανά αντίδραση. (D) Σχεδιασμός αντίδρασης RT.**

Potential start codon	Position (by TAIR)	Position (nt)	Consensus	Potential mitochondrial presequence	Targeting analysis				Potential targeting
					WoLF PSORT	Target-P	MitoProt II	Predotar	
ATG (AUG) = Met	1st exon	1	TTATCATGA	MMPKRFNTSGFDITLRLPSYYGFLHLTQSLTLNSRVFYGARHVTPPAIRI	N: 2.5, Cy: 3.5, M: 5, chl: 2	cTP: 0.027, mTP: 0.842, other: 0.237	0.3974	mito: 0.28	mitochondrion
ATG (AUG) = Met	1st exon	4	TCATGATGC	MPKRFNTSGFDITLRLPSYYGFLHLTQSLTLNSRVFYGARHVTPPAIRIG	N: 2.5, Cy: 3.5, M: 5, chl: 2	cTP: 0.022, mTP: 0.866, other: 0.229	0.4800	mito: 0.27	mitochondrion
ATG (AUG) = Met	1st intron	103	AACTAATGT	MLQILFLEGFNTSGFDITLRLPSYYGFLHLTQSLTLNSRVFYGARHVTPP	N: 8, Cy: 2.5, M: -, chl: -	cTP: 0.129, mTP: 0.328, other: 0.408	0.0200	mito: 0.01	nucleus
				MLQILFNTSGFDITLRLPSYYGFLHLTQSLTLNSRVFYGARHVTPPAIRI	N: -, Cy: 3, M: -, chl: 6	cTP: 0.274, mTP: 0.068, other: 0.705	0.0127	mito: 0.02	chloroplast
ATG (AUG) = Met	2nd exon	260	CCGCCATGT						
ATG (AUG) = Met	2nd exon	342	ACCGGATGT	MEPEFSRFVIGSSFFLRSQVIALPLPHKPLIPGYMPIHVDPKVLAAALQ	N: 4, Cy: 4.5, M: -, chl: 1	cTP: 0.059, mTP: 0.190, other: 0.273	0.0609	mito: 0.01	unknown
ATG (AUG) = Met	2nd exon		CCACCATGC	MRSIDGVDLLSSPILSTNPNLDDSLVIALPLPHKPLIPGYMPIHVDPK	N: 6, Cy: 4, M: 1, chl: 1	cTP: 0.274, mTP: 0.068, other: 0.708	0.0130	mito: 0.01	nucleus
ATG (AUG) = Met	3rd exon	518	TTTACATGC	MPIHVDPKVLAAALQESTRQSPYVGAFLKDCASTDSSSRSETEDNVVE	N: -, Cy: -, M: -, chl: 14	cTP: 0.098, mTP: 0.201, other: 0.477	0.0035	mito: 0.01	chloroplast
CTG (CUG) = Leu	1st intron	62	TAA CA CTGA	LIFNTSGFDITLRLPSYYGFLHLTQSLTLNSRVFYGARHVTPPAIRIGSN	N: 2.5, Cy: 2.5, M: 2, chl: 2	cTP: 0.030, mTP: 0.558, other: 0.369	0.2968	mito: 0.01	possibly mitochondrion
GTG (GUG) = Val	1st intron	78	GAGAA GTGG	VDQKITFNTSGFDITLRLPSYYGFLHLTQSLTLNSRVFYGARHVTPPAIR	N: 6.5, Cy: 3.5, M: -, chl: 1	cTP: 0.078, mTP: 0.299, other: 0.680	0.0478	mito: 0.01	nucleus
GTG (GUG) = Val	2nd exon	161	CACGATGG	VALTRIFVYLRRTTVCILHKAALLRFGSDPIRFVYSSGHRLLSDPDGEG	N: 3.5, Cy: 3.5, M: 3.5, chl: 3.5	cTP: 0.007, mTP: 0.883, other: 0.018	0.1640	mito: 0.45	mitochondrion
				VALTRIFVYLRRTTVCILHKAALLRFGSDPIRFVYSSGHRLLSDPDGEG	N: -, Cy: 6, M: 3, chl: 4	cTP: 0.007, mTP: 0.900, other: 0.016	0.5574	mito: 0.53	mitochondrion
GTG (GUG) = Val	2nd exon	251	CTACGGTGC	VPAMILRFGSDPIRFVYSSGHRLLSDPDGEGVLAIVVVVFLSPIAVI	N: 1.5, Cy: 6.5, M: 2, chl: 2	cTP: 0.032, mTP: 0.935, other: 0.132	0.0074	mito: 0.25	mitochondrion/cytoplasm
GTG (GUG) = Val	2nd exon	262	GC CATGTGA	VTPPAIRIGSNPVQSLLLFRAPTQLTGWNRSSRDLLGRRVFSFSDRS DGD	N: 1, Cy: -, M: -, chl: 12	cTP: 0.460, mTP: 0.472, other: 0.037	0.5448	mito: 0.16	chloroplast/mitochondrion
GTG (GUG) = Val	2nd exon	377	TCGTCTGT	VFLSPIAVTVSISYLLHRESQLTLTSTILVIALPLPHKPLIPGYMPIHV	N: 2.5, Cy: 4.5, M: 2, chl: 2	cTP: 0.067, mTP: 0.093, other: 0.020	0.0699	mito: 0.06	unknown
GTG (GUG) = Val	2nd exon	398	TCGCAGTGA	VTVSISYLLHRESQLTLTSTILVIALPLPHKPLIPGYMPIHVDPKVLAA	N: -, Cy: 3, M: 2, chl: 4	cTP: 0.022, mTP: 0.260, other: 0.123	0.0339	mito: 0.12	unknown
GTG (GUG) = Val	2nd exon	404	TGACGGTGT	VVISYLLHRESQLTLTSTILVIALPLPHKPLIPGYMPIHVDPKVLAAALQ	N: -, Cy: 1, M: 2, chl: 3	cTP: 0.017, mTP: 0.263, other: 0.148	0.0220	mito: 0.16	unknown
ACG = Thr	1st exon	12	CCTAAACGT						
ACG = Thr	1st intron	22	AA TATACGA	TSFVNOELYYNITDLTEKWRTRKPKLMLQILFNTSGFDITLRLPSYYGFL	N: 5, Cy: 2, M: 1-, chl: 1	cTP: 0.172, mTP: 0.237, other: 0.670	0.0075	mito: 0.01	nucleus
				TSFVNOQFNTSGFDITLRLPSYYGFLHLTQSLTLNSRVFYGARHVTPPAIR	N: 5, Cy: -, M: 3, chl: 3	cTP: 0.088, mTP: 0.486, other: 0.345	0.3309	mito: 0.02	possibly mitochondrion
ACG = Thr	2nd exon	157	TTAACACGA	TSGFDITLRLPSYYGFLHLTQSLTLNSRVFYGARHVTPPAIRIGSNPVQS	N: 6.5, Cy: -, M: 1.5, chl: 3.5	cTP: 0.020, mTP: 0.746, other: 0.180	0.1869	mito: 0.03	?
ACG = Thr	2nd exon	172	TTGACACGA	ITLRLPSYYGFLHLTQSLTLNSRVFYGARHVTPPAIRIGSNPVQSLLFR	N: 5.5, Cy: -, M: 2, chl: 4	cTP: 0.024, mTP: 0.914, other: 0.046	0.4829	mito: 0.53	mitochondrion
ACG = Thr	2nd exon	197	GTA CTACGG	TVSILHKA TLNSRVFYGARHVTPPAIRIGSNPVQSLLFRAPTQLTGW	N: 2, Cy: 2, M: 5.5, chl: 4	cTP: 0.149, mTP: 0.723, other: 0.043	0.8005	mito: 0.51	mitochondrion
ACG = Thr	2nd exon	248	TTTCTACGG						
ACG = Thr	2nd exon	401	CAGTGACGG	TVSISYLLHRESQLTLTSTILVIALPLPHKPLIPGYMPIHVDPKVLAAAL	N: -, Cy: 3, M: 2, chl: 4	cTP: 0.022, mTP: 0.275, other: 0.101	0.0117	mito: 0.29	unknown
ACG = Thr	2nd exon	455	CC TCGACGA	IILVIALPLPHKPLIPGYMPIHVDPKVLAAALQESTRQSPYVGAFLK	N: 2.5, Cy: 6, M: -, chl: 2	cTP: 0.096, mTP: 0.228, other: 0.474	0.0072	mito: 0.07	cytoplasm
ACG = Thr	2nd exon	466	CTCTACGG	TVIALPLPHKPLIPGYMPIHVDPKVLAAALQESTRQSPYVGAFLKDC	N: 1, Cy: 8.5, M: 1, chl: 2	cTP: 0.111, mTP: 0.258, other: 0.517	0.0121	mito: 0.03	cytoplasm
ATA (AUA) = Ile	1st exon-1st intron	18	CGTAAATA T	IRVLSINKSYITILFNTSGFDITLRLPSYYGFLHLTQSLTLNSRVFYG	N: 3, Cy: -, M: -, chl: 6	cTP: 0.039, mTP: 0.220, other: 0.160	0.0313	mito: 0.17	unknown
ATA (AUA) = Ile	1st intron	39	AA TCAATA A	IRVILLFNTSGFDITLRLPSYYGFLHLTQSLTLNSRVFYGARHVTPPAIR	N: -, Cy: 3.5, M: 1.5, chl: 6.5	cTP: 0.039, mTP: 0.713, other: 0.243	0.1663	mito: 0.05	possibly mitochondrion
ATA (AUA) = Ile	1st intron	48	GAG TTATA T	IILFNTSGFDITLRLPSYYGFLHLTQSLTLNSRVFYGARHVTPPAIRIGS	N: 4.5, Cy: 2, M: 1, chl: 4	cTP: 0.027, mTP: 0.689, other: 0.282	0.2973	mito: 0.17	possibly mitochondrion
ATA (AUA) = Ile	1st intron	56	TTA CTATA A	ITILFNTSGFDITLRLPSYYGFLHLTQSLTLNSRVFYGARHVTPPAIRIG	N: 3, Cy: 3, M: 3, chl: 2	cTP: 0.042, mTP: 0.545, other: 0.410	0.1908	mito: 0.02	possibly mitochondrion
TTG (UUG) = Leu	1st intron	29	GAG TT TGT	LSINKSYITILFNTSGFDITLRLPSYYGFLHLTQSLTLNSRVFYGARH	N: -, Cy: -, M: 1, chl: 7	cTP: 0.064, mTP: 0.077, other: 0.219	0.0510	mito: 0.01	unknown
TTG (UUG) = Leu	1st intron	115	AAA TT TGT						
TTG (UUG) = Leu	1st intron	142	AA TTT TGT G	LEGFNTSGFDITLRLPSYYGFLHLTQSLTLNSRVFYGARHVTPPAIRIGS	N: 4, Cy: 2.5, M: 2, chl: 1	cTP: 0.045, mTP: 0.497, other: 0.573	0.0141	mito: 0.01	unknown
TTG (UUG) = Leu	2nd exon	167	TGGCT TGA	LTRLFVYLRRTTVCILHKA					
TTG (UUG) = Leu	2nd exon	205	GT TCT TGC	LHLTQSLTLNSRVFYGARHVTPPAIRIGSNPVQSLLFRAPTQLTGWNR	N: 6.5, Cy: -, M: 4, chl: 1	cTP: 0.168, mTP: 0.787, other: 0.057	0.6326	mito: 0.26	mitochondrion
TTG (UUG) = Leu	2nd exon	367	ATTTA T TGG	LGRVFSFSDRS DGDVLLSSPILSTNPNLDDSLVIALPLPHKPLIPGY	N: 4, Cy: 5, M: 4, chl: -	cTP: 0.109, mTP: 0.288, other: 0.573	0.0541	mito: 0.01	cytoplasm



ATT (AUU) = Ile	1st intron	50	<i>GTATATTA</i>	<u>IIITLIFNTSGFDITLRLPSYYGFLHLTQSLTLNSRVFYGARHVTPPAIR</u>	N: 3, Cy: 3, M: 2 chl: 2	eTP: 0.071, mTP: 0.346, other: 0.517	0.0569	mito: 0.01	unknown
ATT (AUU) = Ile	1st intron	65	<i>CACTGATT</i>						
ATT (AUU) = Ile	1st intron	90	<i>AGA AAATTA</i>	<u>IIFNTSGFDITLRLPSYYGFLHLTQSLTLNSRVFYGARHVTPPAIRIGSN</u>	N: 3.5, Cy: 2, M: 1.5, chl: 4.5	eTP: 0.030, mTP: 0.604, other: 0.378	0.3105	mito: 0.01	possibly mitochondrion
ATT (AUU) = Ile	1st intron	112	<i>TACAAATT</i>	<u>IIFNTSGFDITLRLPSYYGFLHLTQSLTLNSRVFYGARHVTPPAIRIGSN</u>	N: 4.5, Cy: 2, M: 1, chl: 4	eTP: 0.026, mTP: 0.660, other: 0.296	0.3142	mito: 0.02	possibly mitochondrion
ATT (AUU) = Ile	1st intron	138	<i>TACTAATT</i>	<u>IEGRV</u>					
ATT (AUU) = Ile	2nd exon	233	<i>CTAAATTC</i>	<u>IPAFSTVPAM</u>					
ATT (AUU) = Ile	2nd exon	277	<i>CGGCTATTC</i>	<u>IRIGSNPVQSLLLFRAPTQLTGWNRSSRDLLGRRVFSFSDRSQVGLSS</u>	N: 1, Cy: -, M: -, chl: 12	eTP: 0.337, mTP: 0.765, other: 0.019	0.4020	mito: 0.16	Chloroplast/Mitochondrion
ATT (AUU) = Ile	2nd exon	362	<i>TCGCGATT</i>	<u>IYWVVVFLSPIAVTYSISYLLHRESQLTLTSTILVIALPLPHKPLIPGFY</u>	N: 2, Cy: 2, M: -, chl: 5	eTP: 0.015, mTP: 0.250, other: 0.017	0.0448	mito: 0.02	unknown
ATT (AUU) = Ile	2nd exon	366	<i>GATTTATTG</i>	<u>IGSSCFELRSQVIALPLPHKPLIPGFYMPIHVKDPKVLAAALQESTRQOSP</u>	N: 2, Cy: -, M: 2, chl: 7	eTP: 0.089, mTP: 0.293, other: 0.128	0.0509	mito: 0.01	unknown
ATT (AUU) = Ile	2nd exon	430	<i>CACCGATTC</i>	<u>ILSTNPNLDDSLVIALPLPHKPLIPGFYMPIHVKDPKVLAAALQESTRQ</u>	N: 4, Cy: 4.5, M: -, chl: 1	eTP: 0.138, mTP: 0.089, other: 0.629	0.0037	mito: 0.01	unknown
ATT (AUU) = Ile	2nd exon	458	<i>CGACGATTC</i>	<u>ILVIALPLPHKPLIPGFYMPIHVKDPKVLAAALQESTRQOSPVGAFLLKD</u>	N: 2, Cy: 7.5, M: 2, chl: 2	eTP: 0.100, mTP: 0.259, other: 0.443	0.0064	mito: 0.02	cytoplasm
ATC (AUC) = Ile	1st intron	35	<i>TGTCATCA</i>	<u>INKSYITLIFNTSGFDITLRLPSYYGFLHLTQSLTLNSRVFYGARHVT</u>	N: -, Cy: -, M: 1, chl: 7	eTP: 0.071, mTP: 0.129, other: 0.246	0.1096	mito: 0.01	unknown
ATC (AUC) = Ile	1st intron	125	<i>AGTTAATCA</i>	<u>ISFTNFWKGLTRVALTRLEFVYLRRTTVSCILHKA</u>	N: 2, Cy: 8, M: -, chl: 3	eTP: 0.033, mTP: 0.842, other: 0.076	0.8157	mito: -	possibly mitochondrion
ATC (AUC) = Ile	2nd exon	209	<i>CTGCATCT</i>	<u>ILHKA</u>					
ATC (AUC) = Ile	2nd exon	283	<i>TCGCGATCG</i>	<u>IGSNPVQSLLLFRAPTQLTGWNRSSRDLLGRRVFSFSDRSQVGLSSSPI</u>	N: 1, Cy: -, M: -, chl: 12	eTP: 0.490, mTP: 0.610, other: 0.034	0.2162	mito: 0.04	Chloroplast/Mitochondrion
ATC (AUC) = Ile	2nd exon	288	<i>ATCGGATCC</i>	<u>IQSGESTTLOGTDSAYRMEPEFSRFIGSSCFELRSQVIALPLPHKPLIP</u>	N: 7.5, Cy: 3.5, M: -, chl: -	eTP: 0.472, mTP: 0.155, other: 0.600	0.0048	mito: 0.01	unknown
ATC (AUC) = Ile	2nd exon	293	<i>ATCCAATCC</i>	<u>IRFRVYSSGHRSLPLDGTGLAIYWVVVFLSPIAVTYSISYLLHRESQL</u>	N: -, Cy: 3.5, M: -, chl: 1	eTP: 0.020, mTP: 0.866, other: 0.159	0.0038	mito: 0.26	?
ATC (AUC) = Ile	2nd exon	392	<i>CTCCGATCG</i>	<u>IAVTYSISYLLHRESQLTLTSTILVIALPLPHKPLIPGFYMPIHVKDPKV</u>	N: 3, Cy: 6, M: 2, chl: -	eTP: 0.033, mTP: 0.236, other: 0.087	0.0322	mito: 0.10	unknown
ATC (AUC) = Ile	2nd exon	410	<i>TGTGCATCT</i>	<u>ISYLLHRESQLTLTSTILVIALPLPHKPLIPGFYMPIHVKDPKVLAAALQE</u>	N: -, Cy: 3, M: 2 chl: 1	eTP: 0.012, mTP: 0.301, other: 0.107	0.0343	mito: 0.42	?
ATC (AUC) = Ile	2nd exon	417	<i>CTCTTATCT</i>	<u>IEFTDSL</u>					
<b>AAG = Arg [R]</b>	1st intron	147	<i>TTGGAAGG</i>	<u>RV</u>					
AAG = Lys (K)	1st intron	41	<i>TCAATAAGA</i>	<u>KSYITLIFNTSGFDITLRLPSYYGFLHLTQSLTLNSRVFYGARHVTP</u>	N: -, Cy: 3, M: 1, chl: 5	eTP: 0.101, mTP: 0.212, other: 0.359	0.1069	mito: 0.01	unknown
AAG = Lys (K)	1st intron	76	<i>CAGAGAAGT</i>	<u>KWTRKPKMLLOILFNTSGFDITLRLPSYYGFLHLTQSLTLNSRVFYGAR</u>	N: 3, Cy: -, M: 2, chl: 5	eTP: 0.008, mTP: 0.671, other: 0.043	0.3235	mito: 0.43	mitochondrion
AAG = Lys (K)	1st intron	119	<i>TTTGTAAGT</i>	<u>KLISFTNFWKGLTRVALTRLEFVYLRRTTVSCILHKA</u>	N: 2, Cy: 10, M: -, chl: 1	eTP: 0.019, mTP: 0.732, other: 0.059	0.3750	mito: -	?
AAG = Lys (K)	1st intron	146	<i>TTTGAAGG</i>	<u>KGLTRVALTRLEFVYLRRTTVSCILHKA</u>					
AAG = Lys (K)	2nd exon	219	<i>ACACAAGC</i>	<u>KA</u>					

**Πίνακας Π. 3 Προσδιορισμός, καταγραφή και βιοπληροφορική ανάλυση όλων των πιθανών AUG και non-AUG κωδικονίων έναρξης της μετάφρασης στο 5' άκρο του μεγαλύτερου μεταγραφήματος *AtLon3* που ανιχνεύθηκε.**