

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία

ΑΡΒΑΝΙΤΗ ΜΑΡΙΑ



Τίτλος εργασίας : Ο υποδοχέας ABA ως μοριακό εργαλείο για την αντιμετώπιση του αβιοτικού στρες στο βαμβάκι (*Gossypium hirsutum*).

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια : Σκαμνάκη Β.

Λάρισα 2025

Ο υποδοχέας ABA ως μοριακό εργαλείο για την αντιμετώπιση του αβιοτικού στρες στο βαμβάκι (*Gossypium hirsutum*).

The ABA receptor as a molecular tool against abiotic stress in cotton (*Gossypium hirsutum*).

Ο υποδοχέας ABA ως μοριακό εργαλείο για την αντιμετώπιση του αβιοτικού στρες στο βαμβάκι (*Gossypium hirsutum*).

Αρβανίτη Μαρία

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια : Σκαμνάκη Β.

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

- ΣΚΑΜΝΑΚΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ: Επίκουρος καθηγήτρια Βιοχημείας-Μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή επιστημών υγείας, Λάρισα, Ελλάδα
- ΨΑΡΡΑ ANNA-MARIA: Αναπληρώτρια καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή επιστημών υγείας, Λάρισα, Ελλάδα
- ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ: Καθηγητής Βιοχημείας , Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή επιστημών υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	6
Περίληψη	7
Abstract	7
Εισαγωγή	8
Αβιοτικό στρες.....	10
Είδη στρες.....	10
Θερμικό στρες	10
Στρες από ξηρασία.....	10
Φυτοορμόνες.....	12
Αμψισικό οξύ	12
Σηματοδότηση/Υποδοχείς.....	13
PYR-1(PYR/PYL/RCAR)	15
Gossypium Hirsutum	15
Μεθοδολογία.....	16
Βιοπληροφορικές μέθοδοι-Προγράμματα Βιοπληροφορικής	16
Μελέτες θερμικής σταθερότητας.....	23
Ανάλυση θερμικής μετατόπισης.....	23
Intrinsic Fluorescence- Ενδογενής φθορισμός.....	23
Σκοπός.....	24
Βιοφυσικές μέθοδοι	24
Υλικά-Μέθοδοι	24
Πειραματική διαδικασία	25
Αποτελέσματα θερμικής μετατόπισης.....	38
Αποτελέσματα Ενδογενούς φθορισμού	42

Αποτελέσματα-Συζήτηση	58
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	58
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	58
ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	59
Βιβλιογραφία	59

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για το ακαδημαϊκό έτος 2024-2025. Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας Δρ. Βασιλικής Σκαμνάκη, την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο ερευνητικό θέμα, καθώς και για την ανεκτίμητη υποστήριξη και καθοδήγηση που μου προσέφερε.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τη συνεισφορά τους και την βοήθεια τους κατά τη διάρκεια της εκπόνησης και συγγραφής της παρούσας εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αμέριστη στήριξη και βοήθεια όλα αυτά τα χρόνια προκειμένου να ολοκληρώσω τις σπουδές μου και να πετύχω τους στόχους μου.

Περίληψη

Το αμπισισικό οξύ συμβάλλει στην ανάπτυξη των φυτών και στη ρύθμιση πολλών διεργασιών τους. Μέσα από μονοπάτια σηματοδότησης είναι ικανό να συνδεθεί με μια οικογένεια πρωτεϊνών προκειμένου τα φυτά να αντιμετωπίσουν τις αβιοτικές καταπονήσεις όπως το αβιοτικό στρες. (Lee S.C.,2012)

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκαν μια σειρά προσδετών στον υποδοχέα του αμπισισικού οξέος στο βαμβάκι, PYR1 οι οποίοι είναι κυρίως φυσικής προελεύσεως. Η σύνδεση των προσδετών αυτών με την πρωτεΐνη είχε εντοπιστεί με τη χρήση προγραμμάτων και εργαλείων βιοπληροφορικής όπου μετέπειτα επιβεβαιώθηκε η σύνδεση τους με την πρωτεΐνη PYR1 με τη χρήση βιοφυσικών μεθόδων. Μέσω των εφαρμογών βιοπληροφορικής μελετήθηκε η δομή των συμπλόκων των υπό μελέτη ενώσεων με την PYR1. Μέσω της στοίχισης των αλληλουχιών εντοπίστηκαν ομοιότητες του υποδοχέα του αμπισισικού οξέος με άλλες πρωτεΐνες και τα αμινοξέα τα οποία είναι συντηρούμενα και μπορούν να αλληλοεπιδράσουν με τους προσδέτες. Μελέτες έδειξαν πως τα αμινοξέα τα οποία συνδέουν τους προσδέτες με την πρωτεΐνη είναι παρόμοια καθώς και οι θέσεις σύνδεσής τους. Τα πειράματα ανέδειξαν πως ορισμένοι από αυτούς τους προσδέτες μπορούν να επηρεάσουν τη σταθερότητα της πρωτεΐνης. Η σταθερότητα της πρωτεΐνης ελέγχθηκε με διάφορες αναλύσεις εξωγενούς και ενδογενούς φθορισμού τροποποιώντας ορισμένες παραμέτρους κάθε φορά. Ο κάθε προσδέτης επηρέασε την πρωτεΐνη με διαφορετικό τρόπο γεγονός που αναδείχθηκε μέσω του φθορισμού και της θερμοκρασίας τήξης της πρωτεΐνης. Η μελέτη της πρωτεΐνης PYR1 καθώς και η αλληλεπίδραση της με τους προσδέτες θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για το σχεδιασμό οικολογικών φυτοφαρμάκων.

Λέξεις-Κλειδιά

Αμπισισικό οξύ, πρωτεΐνη PYR1, αβιοτικό στρες, ανάλυση θερμικής μετατόπισης, ενδογενής φθορισμός

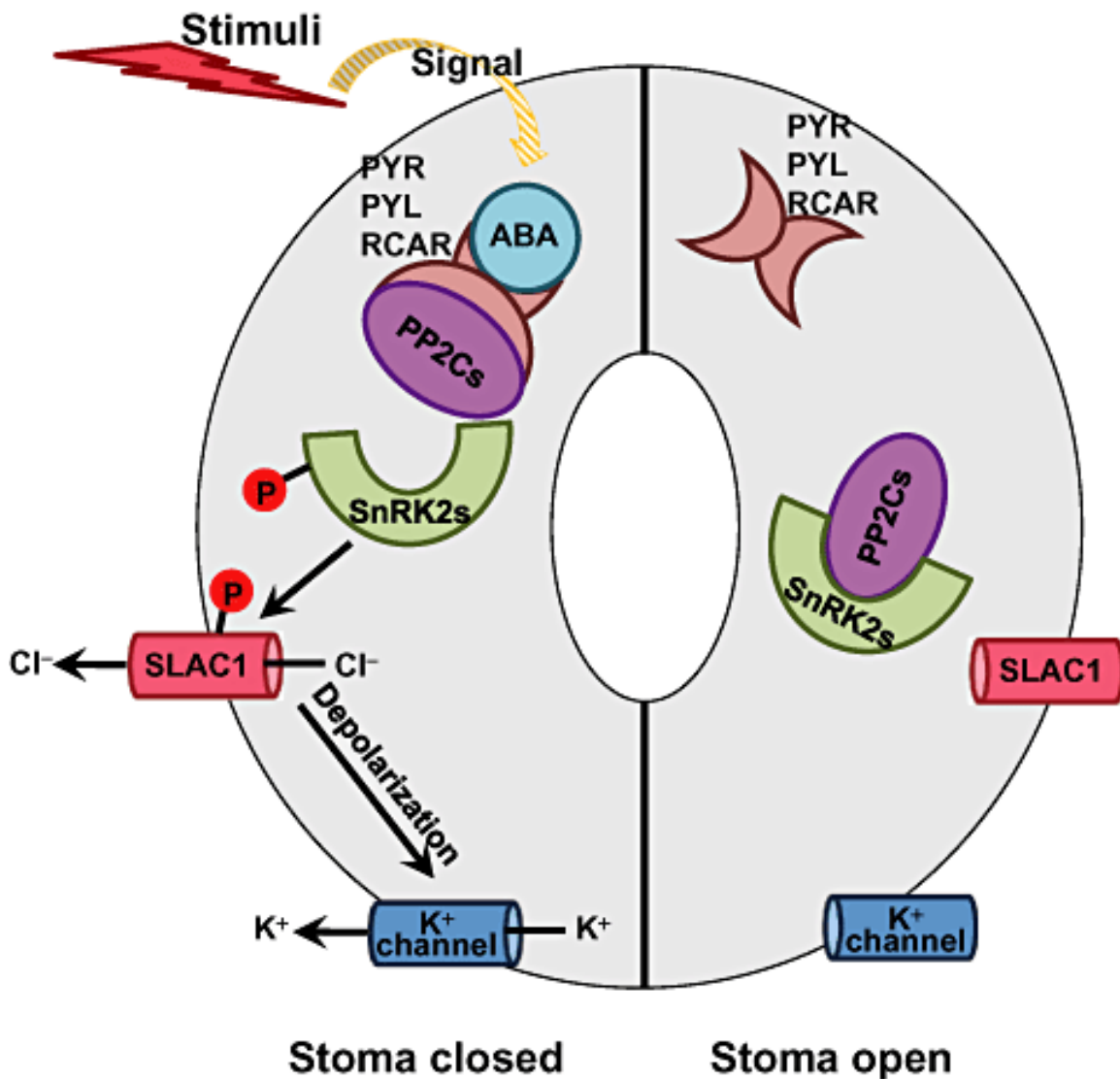
Abstract

Abscisic acid contributes to plant growth and the regulation of many of their processes. Through signaling pathways, it can bind to a family of proteins in order for plants to cope with abiotic stresses such as abiotic stress. (Lee S.C.,2012)

In this study, a series of ligands for the cotton abscisic acid receptor, which are mainly of natural origin, were evaluated. The binding of these ligands to the protein was identified using bioinformatics programs and tools, and their binding to the PYR1 protein was subsequently confirmed using biophysical methods. Through bioinformatics applications, the structure of the complexes of the compounds in consideration, with PYR1, was studied. Through sequence alignment, similarities of the abscisic acid receptor with other proteins and amino acids that are not conserved and can interact with, were identified. In addition to the structures, the interactions of ligands with the protein as well as their binding sites were also checked through specialized maps. Studies showed that the amino acids that connect the ligands to the protein are similar, as are their binding sites. Experiments have shown that some of these ligands can affect the stability of the protein. The stability of the protein was tested with various extrinsic and intrinsic fluorescence assays by modifying certain parameters each time. Each ligand affected the protein in a different way, which was revealed through the fluorescence and melting temperature of the protein. The study of the PYR1 protein and its interaction with ligands could be used for the design of eco-friendly pesticides.

Εισαγωγή

Το αμπισισικό οξύ (Abscisic acid-ABA) είναι μια φυτοορμόνη που συμβάλλει στη ρύθμιση της ανάπτυξης και της προσαρμογής των φυτών στις αβιοτικές καταπονήσεις (Lee S.C., 2012). Οι αβιοτικοί παράγοντες όπως οι ξηρασία επηρεάζουν την απόδοση των καλλιεργειών σε μεγάλο βαθμό τόσο σε ποσοτικό όσο και σε ποιοτικό επίπεδο. Τα ερεθίσματα του αβιοτικού στρες μπορεί να ανιχνευθούν πρωτίστως μέσω αισθητήρων οι οποίοι ανιχνεύουν το αβιοτικό στρες όταν αντληθούν κάποια μεταβολή στις περιβαλλοντικές συνθήκες (Lohani N., 2022). Οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν το αμπισισικό οξύ (ABA) ταξινομούνται σε διάφορες θέσεις στο κύτταρο επομένως υπάρχουν περισσότεροι από έναν υποδοχείς ABA. Το αμπισισικό οξύ συνδέεται με τους υποδοχείς της οικογένειας πρωτεϊνών PYR/PYL/RCAR. Μέσω των μονοπατιών σηματοδότησης ABA και της μεταγωγής σήματος ABA γίνεται η ρύθμιση του κλεισίματος του στόματος των φυτών ως αντίδραση στις αβιοτικές καταπονήσεις όπως είναι η ξηρασία και η εισβολή παθογόνων. Πιο αναλυτικά, όταν αυξάνονται τα επίπεδα ABA, το αμπισισικό οξύ συνδέεται με τους υποδοχείς τύπου PYR/PYL/RCAR (που αναφέρονται ως PYLs) όπου αλληλεπιδρούν και αναστέλλονται οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες τύπου 2C (PP2Cs), ενεργοποιώντας έτσι τις κινάσες τύπου SnRK2s. Στη συνέχεια, οι κινάσες αλληλεπιδρούν με το SLAC1 και άλλα κανάλια και προκαλούν φωσφορυλίωση, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των καναλιών και την εκροή των ανιόντων. Η αποπώλωση της μεμβράνης των προστατευτικών κυττάρων ενεργοποιεί τα εξωτερικά κανάλια K⁺, οδηγώντας σε μείωση των προστατευτικών κυττάρων και κλείσιμο των στομάτων. (Εικόνα 1) (Lee S.C., 2012)



Εικόνα 1: Μονοπάτια σηματοδότησης του Αμπισισικού οξέος(ABA). Ρύθμιση του κλεισίματος του στόματος μέσω της μεταγωγής σήματος ABA.

Οι πρωτεΐνες με αντοχή στην πυραβακτίνη τύπου 1(PYR/PYL/RCAR) μπορούν να αποτελέσουν σημαντικά στοιχεία στα μονοπάτια σηματοδότησης του αμπισισικού οξέος(ABA). Η οικογένεια αυτών των πρωτεϊνών παίζει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες ανάπτυξης και εξέλιξης καθώς και στην ανταπόκριση του φυτού στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Επομένως, προκειμένου να ανταποκριθεί το φυτό στο αβιοτικό στρες διαμεσολαβούν οι πρωτεΐνες PYR/PYL/RCAR για τη μεταγωγή του σήματος. Όταν το αμπισισικό οξύ συνδέεται στους υποδοχείς των πρωτεϊνών, οι βρόγχοι μετατοπίζονται οδηγώντας στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης. Η μοριακή σύνδεση που

προκύπτει αποσκοπεί στη διάταξη ενός μορίου-προσδέτη όταν αυτός συνδέεται σε έναν υποδοχέα πρωτεΐνης.(Mudasir M., 2024)

Αβιοτικό στρες

Το αβιοτικό στρες προκαλείται από αβιοτικούς παράγοντες όπως είναι η ξηρασία, οι υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες και η υψηλή αλατότητα. Αυτοί οι αβιοτικοί παράγοντες επηρεάζουν την απόδοση των καλλιεργειών σε μεγάλο βαθμό τόσο σε ποσοτικό όσο και σε ποιοτικό επίπεδο. Τα ερεθίσματα του αβιοτικού στρες μπορεί να ανιχνευθούν πρωτίστως μέσω ενός μηχανισμού, ο οποίος τα μετατρέπει σε βιολογικό σήμα. Στην περίπτωση των φυτών έχουν καθοριστεί κάποια χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στην αναγνώριση των αισθητήρων. Οι αισθητήρες ανιχνεύουν το αβιοτικό στρες όταν αντιληφθούν τις μεταβολές στις περιβαλλοντικές συνθήκες, η δομή και η δραστηριότητα του κυτταρικού συστατικού μεταβάλλονται και προσαρμόζονται στις αλλαγές κατά την έκθεση, ενώ ταυτόχρονα ενεργοποιείται μια οδός μεταγωγής σήματος. Τα πεπτίδια σηματοδότησης αποτελούνται από πεπτίδια μήκους 5-10 ή 40-100 αμινοξέων τα οποία μπορούν να ανταποκριθούν στο αβιοτικό στρες και χαρακτηρίζονται ως μόρια σηματοδότησης. Τα πεπτίδια CLAVATA3(CLV)/EMBRYO-SURROUNDING REGION RELATED (CLE) που έχουν μήκος περίπου 12-14 αμινοξέα είναι από τα κυριότερα πεπτίδια σηματοδότησης φυτών. Στο Arabidopsis τα CLE25 και CLE9 ανταποκρίνονται στο αβιοτικό στρες που προκαλείται από την ξηρασία. (Lohani, 2022)

Είδη στρες

Θερμικό στρες

Ως θερμικό στρες ορίζεται η έκθεση σε θερμοκρασίες οι οποίες είναι πάνω από το όριο και επαρκούν για να προκαλέσουν μη αναστρέψιμη βλάβη στο φυτό. Αυτό συμβαίνει καθώς επηρεάζονται τα στάδια ανάπτυξης των φυτών και τις αναπαραγωγικές διαδικασίες και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των αποδόσεων

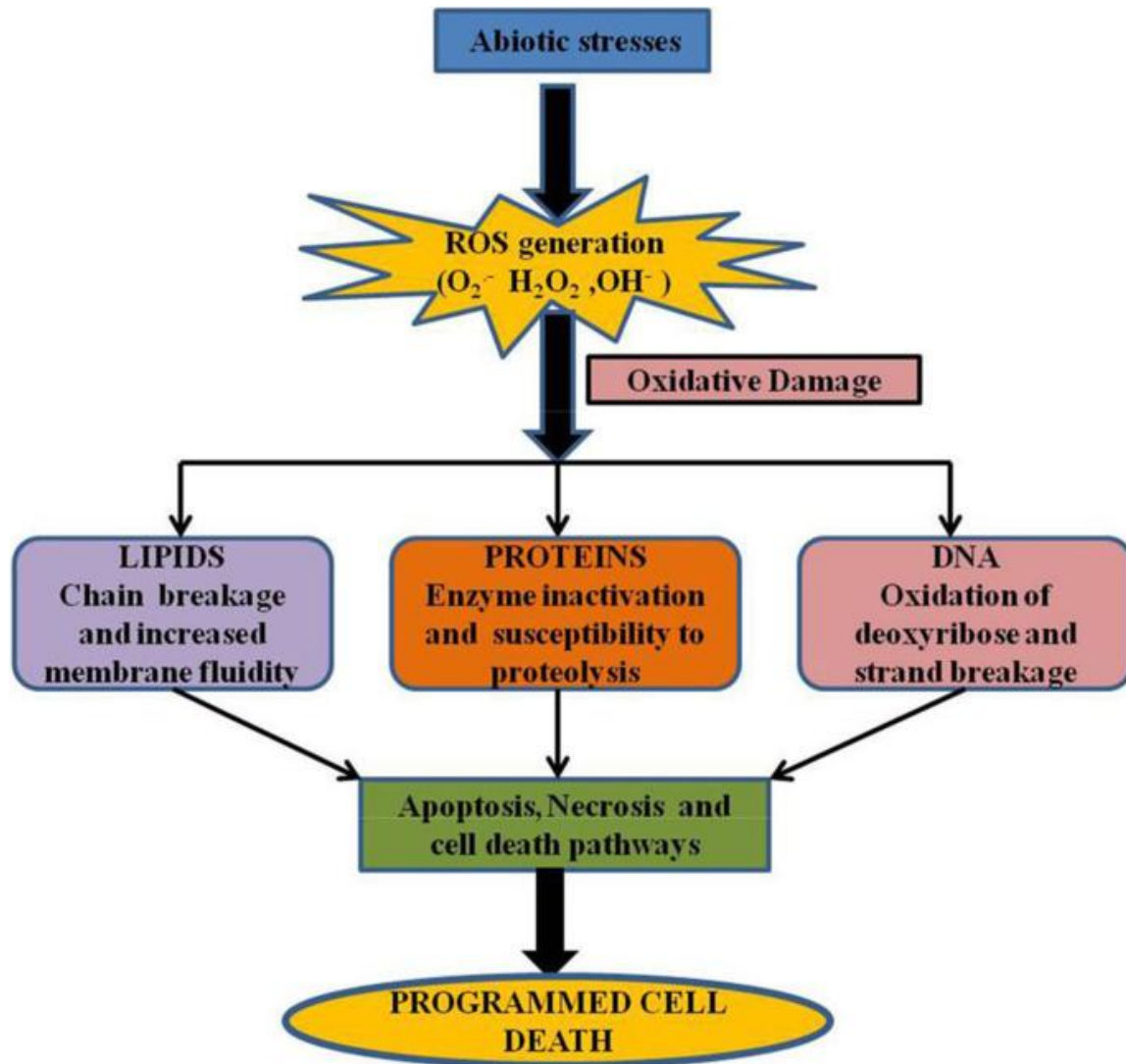
Στρες από ξηρασία

Η έλλειψη νερού έχει ως αποτέλεσμα τα φυτά επηρεάζονται από το στρες που προκαλείται από τη ξηρασία. Όπως και στις υπόλοιπες καταπονήσεις, η απώλεια της απόδοσης που προκαλείται από τη ξηρασία διαφέρει ανάλογα την ποικιλία των ειδών και την αντοχή τους στη ξηρασία. Τα στάδια ανάπτυξης του φυτού επηρεάζονται από τη ξηρασία. Τα φυτά που βρίσκονται στο στάδιο αναπαραγωγής είναι πιο ευάλωτα στη ξηρασία καθώς η έκθεση τους σε στρες από ξηρασία μειώνει την παραγωγή ανθέων και τη σύνθεση των σπόρων.

Ένας περιορισμός ανάπτυξης των φυτών λόγω της ξηρασίας είναι το κλείσιμο των στομάτων που λειτουργεί ως μηχανισμός προστασίας από την απώλεια νερού και κατά

συνέπεια τη μείωση συγκέντρωσης διοξειδίου του άνθρακα(CO₂). Η μείωση αυτή οδηγεί στην αναστολή της παραγωγικότητας της φωτοσυνθετικής διαδικασίας και στη δημιουργία ελευθέρων ριζών οξυγόνου(ROS).

Τα σήματα στρες αναγνωρίζονται από την πλασματική μεμβράνη όπου βρίσκονται οι περισσότερες πρωτεΐνες-υποδοχείς, αφού τα φυτά σε δυσμενείς συνθήκες αλλάζουν τα πρότυπα έκφρασης των πρωτεϊνών. Τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες είναι τα κύρια μέρη που παράγονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου(ROS) και το αβιοτικό στρες διαταράσσει την ισορροπία μεταξύ ROS και των δεσμευτών τους.(Kopecká,2023)



Εικόνα 2: Διάγραμμα που απεικονίζει τη συσχέτιση του αβιοτικού στρες με την παραγωγή ROS μέσω των οδών μεταγωγής σήματος και ενεργοποίησης της άμυνας (Qamer,2021).

Φυτοορμόνες

Προκειμένου να αντιμετωπιστούν οι αβιοτικές καταπονήσεις τα φυτά έχουν αναπτύξει μηχανισμούς ανίχνευσης, σηματοδότησης και απόκρισης. Ένα παράδειγμα μηχανισμού απόκρισης είναι οι φυτοορμόνες οι οποίες δρουν χημικά στα φυτά ως κυτταρικά μόρια και έχουν ως πρωταρχικό ρόλο τη ρύθμιση των αποκρίσεων των φυτών στις αβιοτικές καταπονήσεις. Μερικές από τις φυτοορμόνες είναι:

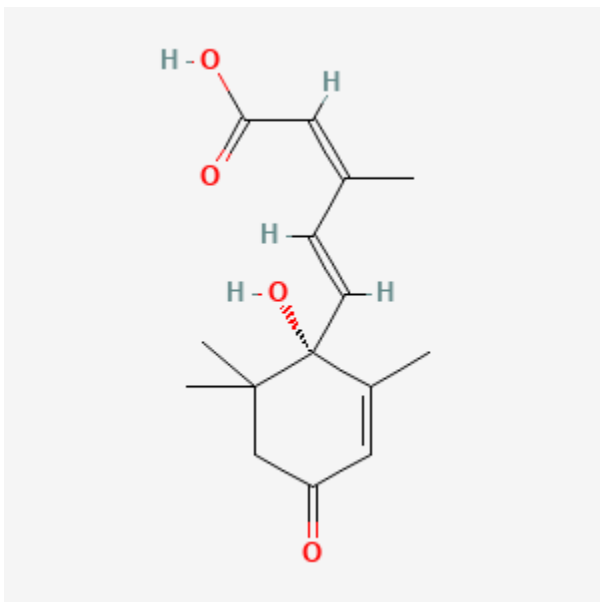
- Η αυξίνη, της πρώτης φυτοορμόνης που ανακαλύφθηκε ,
- το σαλικυλικό οξύ (SA),
- το αιθυλένιο(ET),
- οι κυτοκινίνες (CKs),
- οι γιββερελλίνες (GAs),
- τα βρασινοστεροειδή (BRs),
- το ιασμονικό οξύ (JA),
- το αμπισικό οξύ (ABA) και
- οι στριγολακτόνες (SL),
- η μελατονίνη

Μεταξύ αυτών, το αμπισικό οξύ, το αιθυλένιο και το ιασμονικό οξύ έχουν αναγνωριστεί ότι διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στις αντιδράσεις του φυτού σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις(El Sabagh,2022)

Αμπισικό οξύ

Το αμπισικό οξύ (Absciscic acid-ABA) είναι μια φυτοορμόνη που συμβάλλει στη ρύθμιση της ανάπτυξης και της προσαρμογής των φυτών σε διάφορους περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες όπως η ξηρασία. Το αμπισικό οξύ αποτελεί μια από τις σημαντικότερες φυτοορμόνες καθώς ρυθμίζει πολλές κυτταρικές διεργασίες. Σε συνθήκες αβιοτικού στρες (π.χ. ξηρασία) συσσωρεύονται μεγάλες ποσότητες ABA στα φυτά. Όταν παράγεται το ABA, προκαλεί μοριακές αποκρίσεις που συμπεριλαμβάνουν την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με το στρες και με το κλείσιμο των στομάτων των φυτών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση των επιπέδων του νερού στα φυτά σε συνθήκες ξηρασίας αλλά και το φραγμό σε περίπτωση εισβολής των παθογόνων.(Lee,2012) Ανακαλύφθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1960 καθώς διαπιστώθηκε ότι αυτή η φυτοορμόνη μπορεί να συμβάλει στη διακοπή της ανάπτυξης των σπόρων. Αργότερα διαπιστώθηκε ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών και στο τρόπο αντίδρασης και προσαρμογής των φυτών στο στρες.(El Sabagh,2022). Η συγκέντρωση του αμπισικού οξέος στους φυτικούς ιστούς μπορεί να μεταβληθεί καθώς εξαρτάται από το όργανο και τη φάση ανάπτυξης του και καθορίζεται από τη βιοσύνθεση και τον καταβολισμό του αμπισικού οξέος. Επιπλέον καθοριστικό ρόλο έχει και ο ρυθμός μεταφοράς του ABA στις θέσεις που δραστηριοποιείται. Οι αλλαγές στην περιεκτικότητα

σε ABA έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της σηματοδότησης η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από την έκφραση των γονιδίων που ελέγχονται από το ABA. Σε περίπτωση που αυξηθεί η περιεκτικότητα σε ABA, οι πρωτεΐνες-υποδοχείς αντιλαμβάνονται το σήμα μέσω της σύνδεσης με το αμπισισικό οξύ.(Fidler,2022)

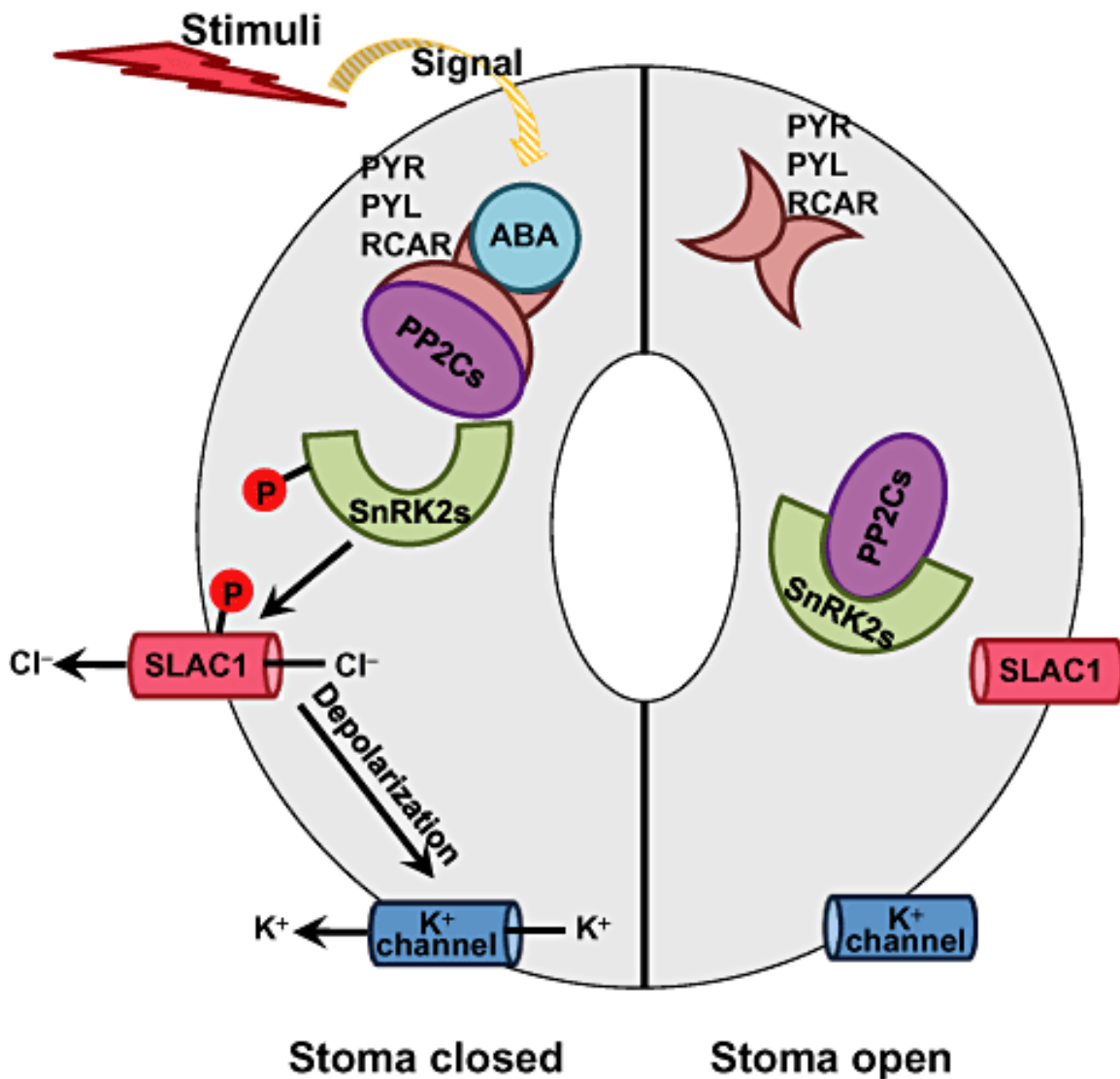


Εικόνα 3: Χημικός τύπος του αμπισισικού οξέος(Pubchem,2025)

Σηματοδότηση/Υποδοχείς

Οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν το Αμπισισικό οξύ (ABA) ταξινομούνται σε διάφορες θέσεις στο κύτταρο όπως η πλασματική μεμβράνη, ο πυρήνας και το κυτταρόπλασμα, επομένως υπάρχουν περισσότεροι από ένας υποδοχείς ABA.

Σε συνθήκες στρες τα επίπεδα ABA αυξάνονται και η εκροή ανιόντων μέσω των καναλιών προκαλεί αποπόλωση και ενεργοποίηση των εξωτερικών καναλιών. Η μειωμένη συγκέντρωση ιόντων στο κύτταρο προκαλεί εκροή νερού και μείωση του όγκου των προστατευτικών κυττάρων προκαλώντας το κλείσιμο των στομάτων. Πιο αναλυτικά, όταν αυξάνονται τα επίπεδα ABA συνδέεται με υποδοχείς τύπου PYL/RCAR όπου αλληλεπιδρούν με τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες τύπου 2C(PP2Cs), ενεργοποιώντας έτσι τις κινάσες τύπου SnRK2s. Στη συνέχεια, οι κινάσες αλληλεπιδρούν με το SLAC1 και άλλα κανάλια και προκαλούν φωσφορυλίωση, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των καναλιών και την εκροή των ανιόντων. Η αποπόλωση της μεμβράνης των προστατευτικών κυττάρων ενεργοποιεί τα εξωτερικά κανάλια K⁺, οδηγώντας σε μείωση των προστατευτικών κυττάρων και κλείσιμο των στομάτων.(Lee,2012)



Εικόνα 4: Μονοπάτια σηματοδότησης του Αμπισισικού οξέος(ABA). Ρύθμιση του κλεισίματος του στόματος μέσω της μεταγωγής σήματος ABA.(Lee, 2012)

Μετά τη σύνδεση του με τους υποδοχείς των πρωτεϊνών PYR/PYL/RCAR, το αμπισισικό οξύ τις διαμορφώνει προκειμένου να διευκολυνθεί η σύνδεση του με τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες τύπου 2C (PP2Cs). Λόγω της αναστολής των PP2C απελευθερώνονται κινάσες SnRK2s. Επιπλέον, το αμπισισικό οξύ διεγείρει στόχους όπως οι παράγοντες μεταγραφής(TF) και άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες επειδή ενεργοποιείται το SnRK2. Οι παράγοντες μεταγραφής αφού έχουν διεγερθεί εισέρχονται στον πυρήνα και αυξάνουν τα γονίδια που σχετίζονται με το στρες που προκαλεί το αμπισισικό οξύ. Επομένως, προκειμένου να γίνει η μεταγωγή της σηματοδότησης αμπισισικού οξέος είναι απαραίτητες οι PYLs, οι PP2Cs και οι SnRK2s για να επιβιώσουν τα φυτά από τις αβιοτικές καταπονήσεις.(Rani,2025)

PYR-1(PYR/PYL/RCAR)

Οι πρωτεΐνες με αντοχή στην πυραβακτίνη τύπου 1-PYR1 (PYR/PYL/RCAR) μπορούν να αποτελέσουν σημαντικά στοιχεία στα μονοπάτια σηματοδότησης του αμπισισικού οξέος(ABA). Η οικογένεια αυτών των πρωτεϊνών παίζει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες ανάπτυξης και εξέλιξης καθώς και στην ανταπόκριση του φυτού στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Επομένως, προκειμένου να ανταποκριθεί το φυτό στο αβιοτικό στρες διαμεσολαβούν οι πρωτεΐνες PYR/PYL/RCAR για τη μεταγωγή του σήματος. Όταν το αμπισισικό οξύ συνδέεται στους υποδοχείς των πρωτεϊνών, οι βρόγχοι μετατοπίζονται οδηγώντας στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης. Η μοριακή σύνδεση που προκύπτει αποσκοπεί στη διάταξη ενός μορίου-προσδέτη όταν αυτός συνδέεται σε έναν υποδοχέα πρωτεΐνης.(Mudasir,2024).

Καθώς υπάρχουν αναγνωρισμένοι υποδοχείς ABA, όπως η υπομονάδα H του υποδοχέα χηλατάσης μαγνησίου/ABA του χλωροπλάστη (ChlH/ABAR) και η πρωτεΐνη G τύπου 1/2 που συνδέεται με την πρωτεΐνη G (GTG1/GTG2), οι PYR και PYL έχουν το μεγαλύτερο μερίδιο στη δέσμευση ABA. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να συνδεθούν με μόρια φυτοορμόνης και ταυτόχρονα να ενεργοποιούν άλλα στοιχεία σηματοδότησης του αμπισισικού οξέος και τελικά στη μεταγραφή γονιδίων που εξαρτώνται από την αύξηση της συγκέντρωσης ABA. Η PYR1 αποτελείται από ένα διμερές στο οποίο μία από τις υπομονάδες είναι συνδεδεμένη με το ABA περικλείοντας το στο εσωτερικό του.(Fidler, 2022)

Το σύνολο των αμινοξέων στην PYR1 είναι 208 και το μοριακό της βάρος είναι 23089.86. Η αλληλουχία των αμινοξέων του υποδοχέα PYR1 παρουσιάζεται παρακάτω (ProtParam,2025):

```
MAVSKPAPFSSFSQTTTHHLTLPPGISHDEFHDLIPSITQLHTYSDGPGKCSSLLAKRISAPH  
DLVWSIVRRFDKPKQAYKHFIRSCAVEQGSQMVGCTRKVNVISGLPADTSTERLDILDDE  
RRVTGFSIIGGEHRLRNYSVTTVHGFNRNGKIWTLESYVVDVPEGNTEEDTRLFADTVV  
KLNQLQKLASVTEGLARDDDDNDGNS
```

Gossypium Hirsutum

Το βαμβάκι(Gossypium Hirsutum) αποτελεί το σημαντικότερο είδος φυτικής καλλιέργειας ινών στον κόσμο λόγω της ευελιξίας του. Το γένος Gossypium περιλαμβάνει 50 είδη και έχει ευρεία γεωγραφική κατανομή(Anwar,2022). Τα φυτά καλλιέργειας όπως το βαμβάκι εκτίθενται σε αρκετές αβιοτικές καταπονήσεις κατά τη διάρκεια της περιόδου καλλιέργειας. Το φυτό του βαμβακιού εμπεριέχει γονίδια τα οποία είναι ανθεκτικά στην ξηρασία και συμβάλλουν στην ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών ενζυμικών οδών, δηλαδή αντιοξειδωτικών μηχανισμών έναντι του οξειδωτικού στρες.(Qamer,2021)

Η οικονομική σημασία του βαμβακιού ως φυσική ίνα έχει αναπτύξει ιδιαίτερο ενδιαφέρον με στόχο τη βελτίωση του δυναμικού της καλλιέργειας, την ανάπτυξη ποικιλιών με υψηλότερη βιοτική και αβιοτική ανοχή και υψηλότερη απόδοση.(Anwar,2022)

Μεθοδολογία

Βιοπληροφορικές μέθοδοι-Προγράμματα Βιοπληροφορικής

Για την πρωτεϊνική μελέτη χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός προγραμμάτων και εργαλείων βιοπληροφορικής.

- **National Institutes of Health-NIH**

Basic Local Alignment Search Tool-Blast

Το Blast χρησιμοποιείται για να εντοπίσει περιοχές ομοιότητας μεταξύ αλληλουχιών. Είναι ένα εργαλείο που μπορεί να συγκρίνει αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και πρωτεϊνών σύμφωνα με τις βάσεις δεδομένων.

Μέσω του National Institutes of Health και του εργαλείου Blast βρέθηκε η αλληλουχία FASTA του υποδοχέα PYR1 του Αμπσιδικού οξέος στο *Gossypium hirsutum*. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας την αλληλουχία FASTA και το εργαλείο Protein blast βρίσκεται σε ποσοστό η ομοιότητα της πρωτεΐνης με πρωτεΐνες από το ίδιο ή διαφορετικό είδος. Μέσα από αυτή την ταξινόμηση επιλέχθηκαν οι αλληλουχίες FASTA των πρωτεϊνών που είχαν ομοιότητα με το PYR1 σε ποσοστό πάνω από 70%. Οι πρωτεΐνες αυτές ανήκαν στο είδος *Gossypium* αλλά και σε άλλα είδη.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
hypothetical protein ES319_D12G234900v1 [Gossypium barbadense]	Gossypium barbadense	428	428	100%	7e-151	99.05%	210	KAB2000479.1
abscisic acid receptor PYR1 [Gossypium hirsutum]	Gossypium hirsutum	427	427	100%	8e-151	99.05%	210	XP_016736786.1
abscisic acid receptor PYR1 [Gossypium raimondii]	Gossypium raimondii	426	426	100%	3e-150	98.57%	210	XP_012439330.1
hypothetical protein [Gossypium turneri]	Gossypium turneri	423	423	100%	4e-149	98.10%	210	MFQ6668500.1
hypothetical protein E1A91_D12G239800v1 [Gossypium mustelinum]	Gossypium mustelinum	422	422	100%	9e-149	98.10%	210	TYI52328.1
hypothetical protein [Gossypium lobatum]	Gossypium lobatum	422	422	100%	1e-148	97.62%	210	MBA0575225.1
hypothetical protein J1N35_027238 [Gossypium stocksii]	Gossypium stocksii	422	422	100%	2e-148	97.62%	210	KAH1074910.1
hypothetical protein [Gossypium davidsonii]	Gossypium davidsonii	422	422	100%	2e-148	97.62%	210	MBA0621504.1
hypothetical protein [Gossypium laxum]	Gossypium laxum	421	421	100%	3e-148	98.10%	210	MBA0718564.1
hypothetical protein [Gossypium schwendimani]	Gossypium schwendimani	421	421	100%	4e-148	98.10%	219	MBA0861987.1
abscisic acid receptor PYR1 [Gossypium hirsutum]	Gossypium hirsutum	420	420	100%	1e-147	97.14%	210	XP_016736689.1
hypothetical protein ES319_A12G218500v1 [Gossypium barbadense]	Gossypium barbadense	419	419	100%	3e-147	96.67%	210	KAB2053907.1
abscisic acid receptor PYR1-like [Gossypium arboreum]	Gossypium arboreum	417	417	100%	2e-146	96.67%	210	XP_017636671.1
abscisic acid receptor PYR1-like [Gossypium australe]	Gossypium australe	414	414	100%	2e-145	96.19%	210	KAA3463225.1
hypothetical protein ES288_D12G248500v1 [Gossypium darwinii]	Gossypium darwinii	372	372	100%	4e-129	88.57%	189	TYG42343.1
hypothetical protein GOBAR_DD35789 [Gossypium barbadense]	Gossypium barbadense	363	363	85%	1e-125	98.88%	186	PPD67336.1
abscisic acid receptor PYR1-like [Durio zibethinus]	Durio zibethinus	343	343	94%	2e-117	82.74%	215	XP_022738631.1
hypothetical protein [Gossypium armourianum]	Gossypium armourianum	341	341	81%	4e-117	97.65%	170	MBA0835029.1
regulatory component of ABA receptor 11_PYRABACTIN RESISTANCE 1 [Hibiscus trionum]	Hibiscus trionum	341	341	100%	1e-116	81.43%	200	GMIJ06040.1
abscisic acid receptor PYR1-like [Hibiscus syriacus]	Hibiscus syriacus	340	340	94%	2e-116	84.85%	199	XP_039012672.1
hypothetical protein GQ457_17G020080 [Hibiscus cannabinus]	Hibiscus cannabinus	339	339	94%	5e-116	82.83%	199	KAL4347591.1

Εικόνα 5: Ταξινόμηση πρωτεϊνών που έχουν ομοιότητα με την PYR1 σύμφωνα με το εργαλείο Blast.(NIH, 2025)

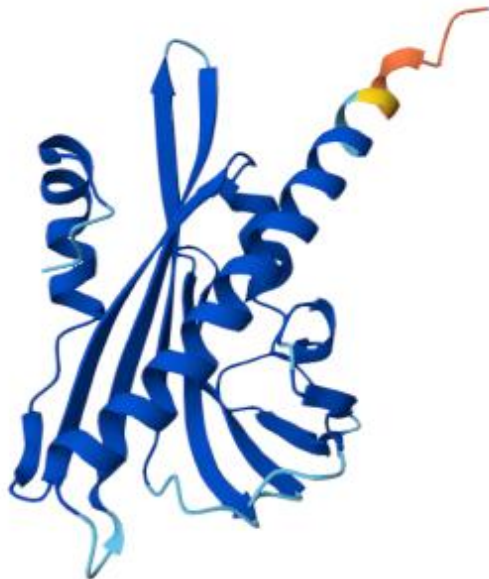
- **Protein Data Bank-PDB**

Το Protein Data Bank παρέχει πρόσβαση σε τρισδιάστατες δομές βιολογικών μακρομορίων που βρίσκονται στους οργανισμούς. Η δομή της πρωτεΐνης σε μορφή 3D εμφανίζει το πολυμερές, τα αμινοξέα και τη θέση που συνδέεται ο προσδέτης μέσα σε αυτό.

Η αλληλουχία FASTA του PYR1 του *Gossypium Hirsutum* χρησιμοποιήθηκε στο Protein Data Bank προκειμένου να βρεθούν οι προβλεπόμενες πρωτεΐνες που είχαν ομοιότητα με το PYR1. Στη συνέχεια, μέσω της δομής και των αλληλουχιών βρέθηκε η αλληλεπίδραση του αμπισισικού οξέος με τα αμινοξέα της προβλεπόμενης πρωτεΐνης καθώς και η αλληλεπίδραση με τα αμινοξέα του PYR1.

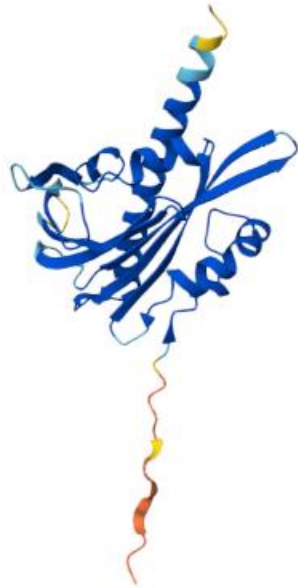
- **Alpha Fold**

Μέσω του Alpha Fold μπορούν να μελετηθούν και να προβλεφθούν οι δομές των πρωτεϊνών και τα δεδομένα συνδέονται με το Protein Data Bank(PDB) και με το Uniprot. Στο Alpha Fold βρέθηκε η δομή του PYR1 τόσο στο *Arabidopsis thaliana* όσο και στο *Gossypium Hirsutum* όπου μπόρεσαν να ανιχνευθούν τα αμινοξέα που βρίσκονται γύρω από τη σύνδεση του Αμπισισικού με την πρωτεΐνη. Οι χρωματισμοί στις δομές υποδηλώνουν την αξιοπιστία της πρωτεΐνης.

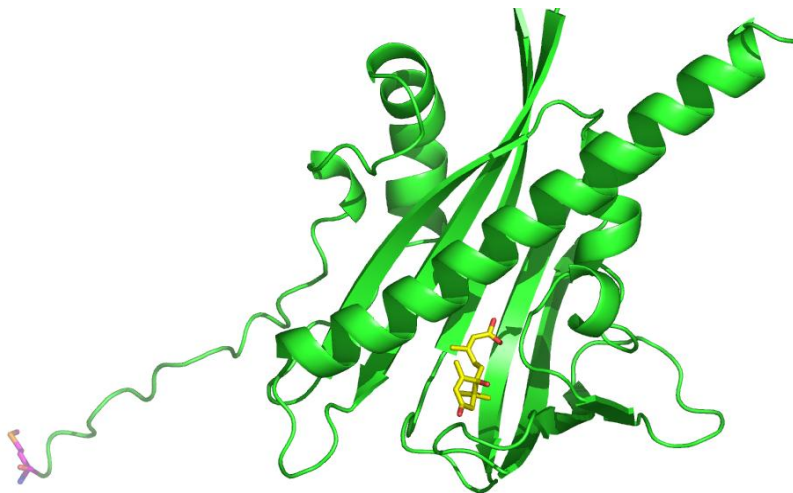


Εικόνα 6: Υποδοχέας PYR1 του αμπισισικού οξέος στο *Arabidopsis Thaliana* (Alpha Fold, 2025)

Η PYR1 από το AlphaFold σχηματίζει 6 αντιπαράλληλες πτυχωτές επιφάνειες που συνδέονται με 2 α-έλικες. Στην αμινοτελική περιοχή υπάρχουν περίπου 17 αμινοξέα τα οποία δε φαίνεται να σχηματίζουν δευτεροταγή δομή (Εικόνα 7- πορτοκαλί περιοχή)



Εικόνα 7: Υποδοχέας PYR1 του αμπισισικού οξέος στο *Gossypium Hirsutum* (Alpha Fold, 2025)



Εικόνα 7α: Το αμπισισικό οξύ (ABA) με τον υποδοχέα PYR1

Το κέντρο σύνδεσης του ABA εντοπίζεται μεταξύ της α -έλικας και του εύκαμπτου βρόχου και βρίσκεται στην περιοχή που περιβάλλεται από τα αμινοξέα Phe82, Phe180, Val144, Glu162, Asn188, Leu108, Leu117.

- **Clustal Omega**

Το Clustal Omega είναι ένα πρόγραμμα το οποίο μπορεί να συγκρίνει πολλαπλές αλληλουχίες χρησιμοποιώντας αλληλουχίες DNA, RNA και πρωτεϊνών. Μέσω του Clustal συγκεντρώθηκαν οι αλληλουχίες FASTA από τις προβλεπόμενες πρωτεΐνες από το PDB και δόθηκαν οι διαφορές στις αλληλουχίες και στα αμινοξέα μεταξύ των προβλεπόμενων πρωτεϊνών και του PYR1. Από την ταξινόμηση των αλληλουχιών παρατηρήθηκαν αρκετές ομοιότητες μεταξύ των αλληλουχιών της πρωτεΐνης PYR1 και των προβλεπόμενων πρωτεϊνών από το PDB

Neurosnap, το rank 1 θεωρείται η πιο ισχυρή και αξιόπιστη αλληλεπίδραση. Επομένως, επιλέχθηκαν τα rank1 από όλες τις ενώσεις για να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια.

File Name	File Size
rank14_confidence-0.04.sdf	4.83 KB
rank15_confidence-0.05.sdf	4.83 KB
rank16_confidence-0.05.sdf	4.83 KB
rank17_confidence-0.05.sdf	4.83 KB
rank18_confidence-0.05.sdf	4.83 KB
rank19_confidence-0.06.sdf	4.83 KB
rank1_confidence0.30.sdf	4.83 KB
rank20_confidence-0.06.sdf	4.83 KB
rank21_confidence-0.06.sdf	4.83 KB

Εικόνα 9: Κατάταξη των πιο αξιόπιστων αλληλεπιδράσεων σύμφωνα με το Neurosnap (Neurosnap, 2025)

- **Crystallographic Object-Oriented Toolkit-Coot**

Το Coot χρησιμοποιείται για την κατασκευή μοντέλων μακρομορίων και ιδιαίτερα πρωτεϊνών μέσω της απεικόνισης σε χάρτες από κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ. Είναι δυνατή η απεικόνιση, η δημιουργία, η επεξεργασία καθώς και η προσαρμογή του μοντέλου. Χρησιμοποιώντας το Coot γίνεται συγχώνευση των μορίων των rank1 των ενώσεων και του PYR1.

- **Protein-Ligand Interaction Profiler-PLIP**

Μέσω του PLIP (Protein Ligand Interaction Profiler) εντοπίζονται οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ βιολογικών μακρομορίων και παρέχονται πληροφορίες σχετικά με τα χαρακτηριστικά σύνδεσης καθώς και απεικονίσεις που προβάλλουν τη δομή και τους δεσμούς που αναπτύσσονται.

Στη συνέχεια μέσω του Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) βρέθηκαν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις καθώς και οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της κάθε ένωσης και του PYR1. Στους δεσμούς υδρογόνου εμφανίζονται και τα αμινοξέα με τα οποία γίνεται η σύνδεση.

▪ **I-Tasser**

Το I-Tasser αποτελεί ένα εργαλείο για την πρόβλεψη της δομής των πρωτεϊνών αλλά και των λειτουργιών των πρωτεϊνών που βασίζονται στη δομή. Παρέχει προβλέψεις για τις πιο αξιόπιστες δομές για την αλληλουχία FASTA που του έχει δοθεί. Επιπλέον, μπορεί να συνδυάσει και πρωτεΐνες από το PDB ταξινομώντας τις σύμφωνα με την αξιοπιστία και τις λειτουργίες τους.

▪ **Collaborative Computational Project No.4-CCP4**

Μέσω του προγράμματος CCP4 είναι δυνατό να γίνει η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του μορίου και του προσδέτη καθώς γίνεται μέτρηση των αποστάσεων που σχηματίζουν τα δύο μόρια. Οι δεσμοί που μελετήθηκαν ήταν δεσμοί υδρογόνου και δεσμοί Van der Waals. Στο CCP4 χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Contact με όριο απόστασης το 3.2 Å.

Υπάρχουν κάποιες ενώσεις, κάποιες από τις οποίες είναι φυσικής προελεύσεως, που δημιούργησαν τόσο υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις όσο και δεσμούς υδρογόνου με την PYR1 του αμπισισικού οξέος. Οι ενώσεις αυτές είναι:

- Κυανιδίνη
- Επιγαλλοκατεχίνη
- Γαλλική επιγαλλοκατεχίνη
- Ελλαγικό οξύ
- Πελαργονιδίνη
- Κερσετίνη
- Γαλλικό οξύ
- Φλορετίνη
- Φλοριζίνη

Μελέτες θερμικής σταθερότητας

Ανάλυση θερμικής μετατόπισης-Thermal Shift Assay(TSA)-Differential Scanning Fluorimetry(DSF)

Η ανάλυση θερμικής μετατόπισης(TSA) χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση της σταθερότητας των πρωτεϊνών. Αποτελεί μια βιοχημική μέθοδο η οποία έχει ως βάση μια χρωστική φθορισμού προκειμένου να προσδιοριστεί το σημείο τήξης μιας πρωτεΐνης. Η χρωστική αυτή προστίθεται σε ένα διάλυμα πρωτεΐνης που θερμαίνεται σταδιακά και γίνεται έντονα φθορίζουσα σε οργανικούς διαλύτες ή σε υδρόφοβους θύλακες πρωτεϊνών. Όταν γίνει η μετουσίωση της πρωτεΐνης, εκτίθενται τα υδρόφοβα μέρη της πρωτεΐνης και γίνεται η αλληλεπίδραση της χρωστικής με την πρωτεΐνη αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο τον φθορισμό. Ο φθορισμός που εντοπίζεται δίνεται ως συνάρτηση της θερμοκρασίας και δημιουργείται η καμπύλη τήξης της πρωτεΐνης (Elgert, 2020). Η σταθερότητα της πρωτεΐνης επηρεάζεται από το pH του ρυθμιστικού διαλύματος, την περιεκτικότητα σε αλάτι καθώς και από την παρουσία διαφόρων παραγόντων στο περιβάλλον μιας πρωτεΐνης(ρυθμιστικό διάλυμα, προσδέτες) .

Η ανάλυση της θερμικής μετατόπισης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και προσδετών . Όταν ένας προσδέτης συνδέεται με την πρωτεΐνη στην αρχική της μορφή, την σταθεροποιεί και η θερμοκρασία τήξης(T_m) του συμπλόκου είναι υψηλότερη από τη θερμοκρασία της μη δεσμευμένης πρωτεΐνης. Μετρώντας τη μετατόπιση της θερμοκρασίας τήξης γίνεται αντιληπτή η σύνδεση της πρωτεΐνης και του προσδέτη παρέχοντας ποσοτικά δεδομένα. Σε αυτή την ανάλυση το υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης υφίσταται σταδιακή θερμική μετουσίωση και ανιχνεύονται δομικές αλλαγές τόσο με παρουσία όσο και με απουσία προσδετών.(Petrauskas, 2024)

Σε γενικότερο πλαίσιο, τα πειράματα φθορισμού πραγματοποιούνται είτε με τη χρήση χρωστικής(SyPRO Orange) είτε χωρίς τη χρήση χρωστικής(ενδογενής φθορισμός). Οι τεχνικές αυτές πραγματοποιούνται με διαφορετικές συνθήκες δειγματοληψίας και συγκεντρώσεων προκειμένου να μελετηθεί η σταθερότητα της πρωτεΐνης παρουσία επιφανειοδραστικών ουσιών και προσδετών.(Cohrs,2025)

Intrinsic Fluorescence- Ενδογενής φθορισμός

Η φασματοσκοπία φθορισμού εφαρμόζεται ευρέως στις μελέτες των πρωτεϊνών, της διαμόρφωσής τους και των διαμοριακών επαφών τους όπως είναι οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-προσδέτη. Μέσω του ενδογενούς φθορισμού μελετώνται οι αλλαγές των πρωτεϊνών και των αλληλεπιδράσεων τους καθώς και οι αλλαγές στις εντάσεις και στις μετατοπίσεις του σήματος του φθορισμού. Μέσω του φθορισμού η πρωτεΐνη εκπέμπει

φως όταν εκτίθεται σε ακτινοβολία και το μήκος κύματος του φωτός είναι μεγαλύτερο από την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Ο φθορισμός προέρχεται από τις μεταβάσεις των αρωματικών αμινοξέων όπως η τρυπτοφάνη, η φαινυλαλανίνη και η τυροσίνη.(dos Santos Rodrigues,2023)

Στην περίπτωση του ενδογενούς φθορισμού, ο φθορισμός των αρωματικών αμινοξέων(κυρίως της τρυπτοφάνης) γίνεται ως συνάρτηση της θερμοκρασίας καθώς μια από τις ιδιότητες αυτού του αμινοξέος είναι η ευαισθησία στο μικροπεριβάλλον όταν ανιχνεύονται αλλαγές στη δομή(π.χ ξεδίπλωμα) στις πρωτεΐνες που περιέχουν τρυπτοφάνη.(Cohrs,2025)Στην περίπτωση της PYR1 εντοπίζονται στη δομή της 2 τρυπτοφάνες.(Alpha Fold,2025)

Σκοπός

Το θέμα της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί τμήμα της ερευνητικής δραστηριότητας του εργαστηρίου Λειτουργικής και Δομικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Κύριος στόχος της έρευνας αυτής είναι η μελέτη των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών με διάφορους προσδέτες κυρίως φυσικής προελεύσεως. Πιο συγκεκριμένα για τη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία είχε προηγηθεί η απομόνωση και ο καθαρισμός της πρωτεΐνης και στη συνέχεια έγινε η προσθήκη προσδετών προκειμένου να εντοπιστούν τυχόν αλληλεπιδράσεις. Απώτερος στόχος της εργασίας ήταν η διερεύνηση των προσδετών τόσο με μεθόδους βιοπληροφορικής όσο και με βιοφυσικές μεθόδους στο εργαστήριο προκειμένου να χρησιμοποιηθεί το αμπισικό οξύ ως μοριακό εργαλείο για την αντιμετώπιση του αβιοτικού στρες στο βαμβάκι(Gossypium Hirsutum). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας παρέχουν σημαντικές πληροφορίες οι οποίες θα μπορούσαν να βοηθήσουν στο μέλλον για την ανάπτυξη περαιτέρω μοριακών εργαλείων για την αντιμετώπιση του αβιοτικού στρες στα φυτά καθώς και στην ανάπτυξη φυτοφαρμάκων φιλικά προς το περιβάλλον.

Βιοφυσικές μέθοδοι

Υλικά-Μέθοδοι

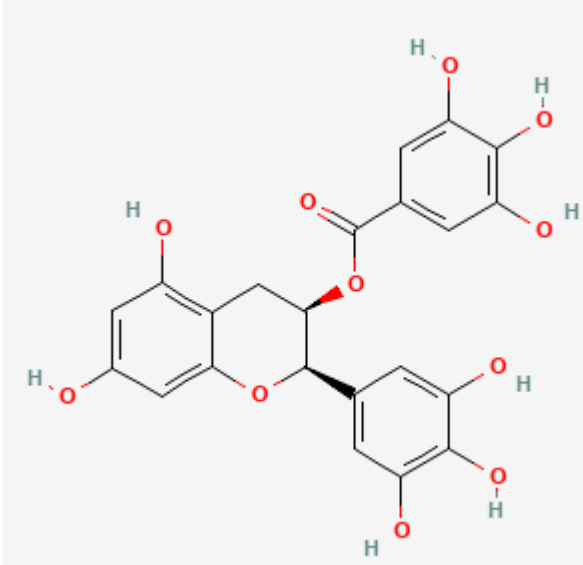
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Dimethyl sulfoxide(DMSO)	Panreac
EGCG(Epigallocatechin Gallate)	
EGC(Epigallocatechin)	
GST(Glutathione S-Transferase)	
SYPRO Orange protein gel stain	Invitrogen
Pelargonidin 3 Glucoside	

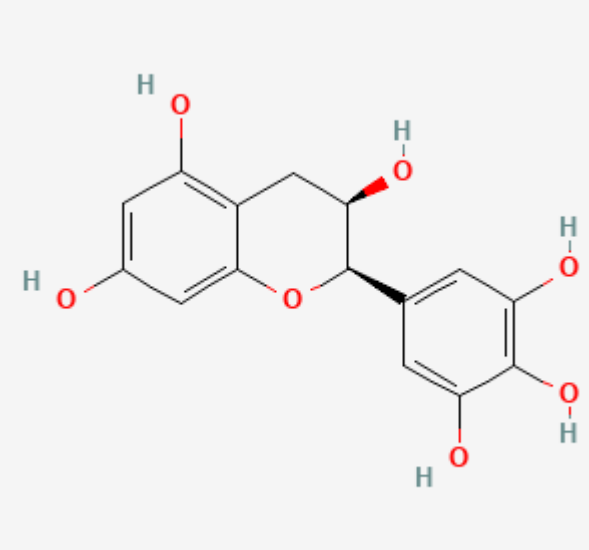
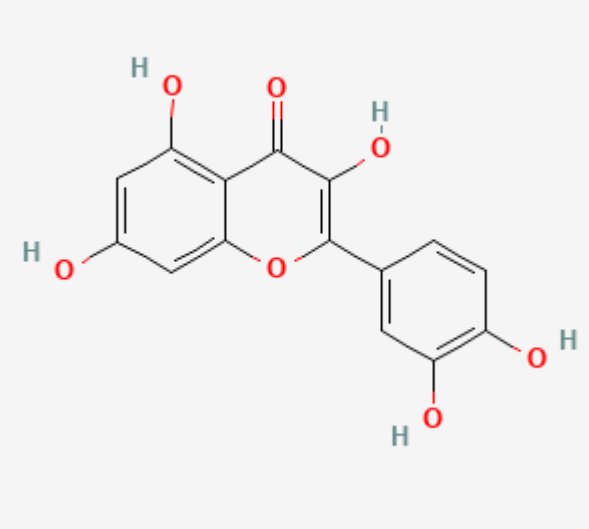
Phloridzin	Sigma-Aldrich
Phloretin	Sigma-Aldrich
Gallic acid	Sigma-Aldrich
Quercetin	

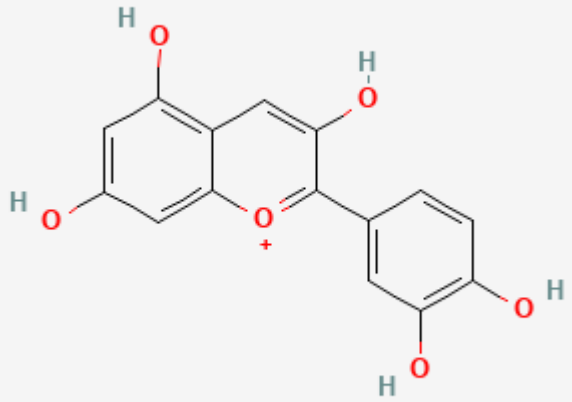
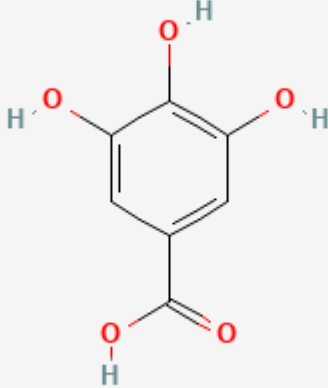
ΟΡΓΑΝΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
StepOnePlus Real-Time PCR System	Applied biosystems be Thermo Fiscer Scientific
EnSpire Multilabel Plate Reader	PerkinElmer

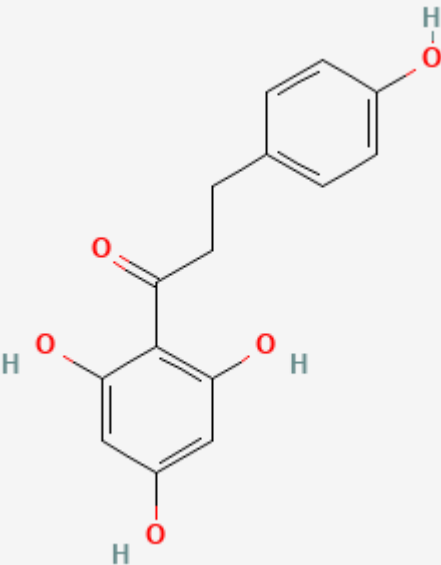
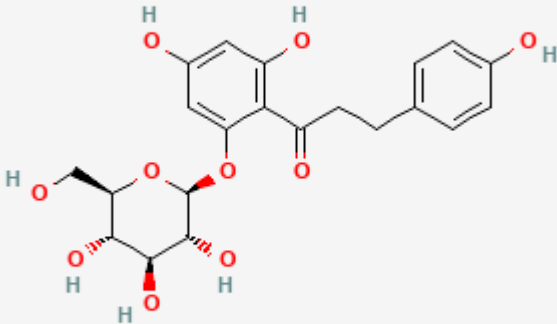
Πειραματική διαδικασία

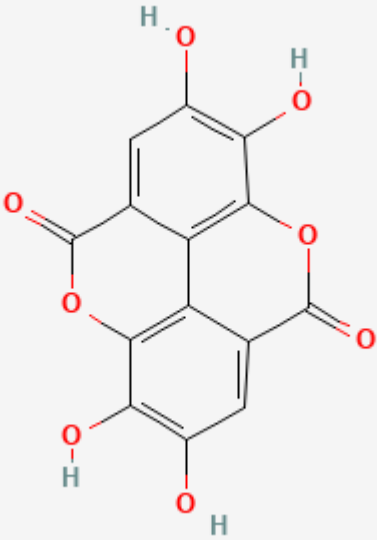
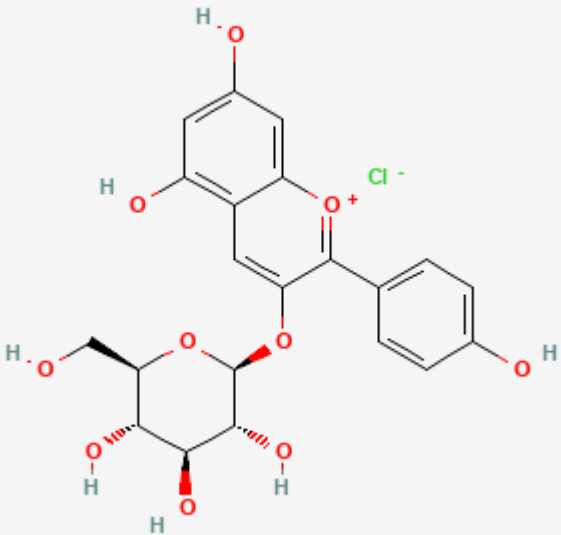
Όσον αφορά το πειραματικό κομμάτι τα δείγματα μελετήθηκαν με βάση την ανάλυση της θερμικής μετατόπισης και του ενδογενούς φθορισμού. Τα δείγματα αυτά περιείχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις τόσο της πρωτεΐνης όσο και των αντίστοιχων προσδετών. Οι προσδέτες αφορούσαν ενώσεις κυρίως φυσικής προελεύσεως οι οποίες αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

ΧΗΜΙΚΗ ΕΝΩΣΗ	ΧΗΜΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ
Epigallocatechin Gallate	

Epigallocatechin	 The chemical structure of Epigallocatechin (EGCg) is a flavan-3-ol. It consists of a chromane core. The A-ring (left) has hydroxyl groups at positions 2 and 6. The C-ring (middle) has a hydroxyl group at position 4 and is linked at position 3 to the D-ring (right). The D-ring is a catechol unit with hydroxyl groups at positions 2 and 3. Stereochemistry is indicated with a wedge bond at C-3 and a dash bond at C-4. <chem>Oc1cc(O)c2c(c1)oc3c2c(O)c(O)c3</chem>
Quercetin	 The chemical structure of Quercetin is a flavonoid. It features a chromone core. The A-ring (left) has hydroxyl groups at positions 2 and 6. The C-ring (middle) has a ketone group at position 4 and is linked at position 3 to the D-ring (right). The D-ring is a catechol unit with hydroxyl groups at positions 2 and 3. <chem>O=C1C(=C2C(=C1)C(=C3C2=CC(=C3)O)O)C4=CC(=CC=C4O)O</chem>

Cyanidin	 The chemical structure of Cyanidin is a flavylium cation. It consists of a central pyrylium ring (a six-membered ring with an oxygen atom and a positive charge) fused to a benzene ring on the left and substituted with a phenyl group on the right. The left benzene ring has two hydroxyl groups (-OH) at the 5 and 7 positions. The right phenyl ring has three hydroxyl groups (-OH) at the 2, 4, and 6 positions. The central oxygen atom has a positive charge (+).
Gallic acid	 The chemical structure of Gallic acid is a benzene ring substituted with three hydroxyl groups (-OH) at the 2, 4, and 6 positions and a carboxylic acid group (-COOH) at the 1 position. The carboxylic acid group is shown with a carbonyl oxygen (=O) and a hydroxyl group (-OH).

Phloretin	 The chemical structure of Phloretin consists of a central benzene ring with three hydroxyl groups at the 3, 5, and 7 positions. A propiophenone side chain is attached at the 4-position, which is further substituted with a 4-hydroxyphenyl group at its terminal end.
Phlorizin	 The chemical structure of Phlorizin is a glycoside. It features a glucose molecule in its pyranose form, linked via an oxygen atom to a phloretin aglycone. The phloretin aglycone is identical to the one in Phloretin, consisting of a 3,5,7-trihydroxyphenyl ring attached to a propiophenone chain with a 4-hydroxyphenyl group at the end.

Ellagic acid	
Pelargonidin 3-Glucoside	

Εικόνα 10: Δομή των ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν ως προσδέτες.(PubChem,2025)

Epigallocatechin Gallate

Η γαλλική επιγαλλοκατεχίνη είναι μια πολυφαινόλη η οποία βρίσκεται στα φύλλα του πράσινου τσαγιού(*Camellia sinensis*) και είναι γνωστή τόσο για τις αντικαρκινικές όσο και για τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες. Ως φλαβονοειδές δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες και αναστέλλει ορισμένα ένζυμα τα οποία είναι υπεύθυνα για τον ενδοκυτταρικό σχηματισμό ελευθέρων ριζών(ROS).(Bakun,2023)

Epigallocatechin

Μαζί με τη γαλλική επιγαλλοκατεχίνη συμπεριλαμβάνεται στις κατεχίνες του τσαγιού και στη δομή της υπάρχουν 6 υδροξυλομάδες με αποτέλεσμα να είναι αρκετά υδρόφιλη. Βρίσκεται σε μικρότερη ποσότητα στο πράσινο τσάι από τη γαλλική επιγαλλοκατεχίνη και έχει υψηλή αντιοξειδωτική δράση.(Ambigaipalan,2020)

Quercetin

Η κερσετίνη είναι μια πολυφαινόλη που δρα ως φυσικό αντιοξειδωτικό και έχει ευεργετικές επιδράσεις. Βρίσκεται σε φυτικές πηγές σε διαφορετικές ποσότητες και τύπους. Είναι μια φλαβονοειδής ουσία και στη δομή της μπορεί να διαφέρει στον αριθμό και στη θέση σύνδεσης των υδροξυλομάδων. Τα φλαβονοειδή μπορούν να βρεθούν στη φύση ως γλυκοζίτες οι οποίοι έχουν μια ομάδα σακχάρου που συνδέεται σε μία από τις υδροξυλομάδες με αποτέλεσμα να αυξάνεται η διαλυτότητα τους στο νερό.(Kandemir,2022)

Cyanidin

Όπως και η κερσετίνη, η κυανιδίνη ανήκει στην κατηγορία των φλαβονοειδών σε διαφορετική όμως υποκατηγορία καθώς ανήκει στην ομάδα των ανθοκυανινών. Οι ανθοκυανίνες είναι υδατοδιαλυτές χημικές ουσίες οι οποίες λειτουργούν ως χρωστικές ουσίες και βρίσκονται σε ένα ευρύ φάσμα φυσικών πηγών. Συμβάλλουν σημαντικά στην προστασία των φυτών και έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες.(Liang,2021)

Gallic acid

Σε αντίθεση με τις προηγούμενες ενώσεις το γαλλικό οξύ ανήκει στα φαινολικά οξέα μια υποκατηγορία πολυφαινολών. Υπάρχει σε διάφορες φυσικές πηγές όπως στα φρούτα και τα φυτά και προκαλεί αύξηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων παρέχοντας προστατευτική δράση. (Bhuiya,2023)

Phloretin

Η φλορετίνη αποτελεί μια φυσική διυδροχαλκόνη, μια υποκατηγορία των πολυφαινολών. Η λιπόφιλη αυτή πολυφαινόλη έχει σημαντικές αντικαρκινικές ιδιότητες λόγω της ανασταλτικής της δράσης όμως λόγω των δομικών ιδιαιτεροτήτων της δεν ανήκει στις κύριες κατηγορίες των φλαβονοειδών αλλά στους δευτερεύοντες τύπους.(Tuli,2022)

Phlorizin

Η φλοριζίνη ανήκει στις διυδροχαλκόνες και κατανέμεται κυρίως στα φτά και σε ορισμένα τρόφιμα. Βρίσκεται συνήθως συνδυαστικά με τη φλορετίνη καθώς είναι ένας γλυκοζίτης της φλορετίνης και έχει θεραπευτικές ιδιότητες λόγω της αντυπεργλυκαιμικής και αντιοξειδωτικής δράσης με υψηλή υδατοδιαλυτότητα.(Tian,2021)

Pelargonidin 3-Glucoside

Η πελαργονιδίνη είναι μια υδατοδιαλυτή ουσία η οποία ανήκει στις ανθοκυανίνες και βρίσκεται ως κύρια ανθοκυανίνη στις φράουλες. Συμβάλλει σε πολλές βιολογικές δραστηριότητες και βοηθά στη μείωση της υπερβολικής συσσώρευσης λιπιδίων και του οξειδωτικού στρες.(Han,2025)

Έπειτα από βιοπληροφορική ανάλυση και την ένωση των δυο μορίων στο coot, το σύμπλοκο εφαρμόστηκε και στον εργαλείο PLIP όπου εντοπίστηκαν οι παρακάτω δεσμοί υδρογόνου μεταξύ δότη και αμινοξέος.

Πίνακας 1: Δεσμοί υδρογόνου και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυανιδίνης και PYR1.(PLIP)

Δεσμός Υδρογόνου	Θέση	Αμινοξύ	Απόσταση Δ-Α
1	80B	LYS	2.22 Å
2	162B	GLU	2.97 Å
3	141B	TYR	2.43 Å

Υδρόφοβη αλληλεπίδραση	Θέση	Αμινοξύ	Απόσταση
1	110B	ALA	2.68 Å
2	141B	TYR	3.65 Å
3	184B	VAL	3.53 Å
4	185B	VAL	3.94 Å

Πίνακας 2: Δεσμοί υδρογόνου και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται μεταξύ Γαλλικής Επιγαλλοκατεχίνης και PYR1. (PLIP)

Δεσμός υδρογόνου	Θέση	Αμινοξύ	Απόσταση Δ-Α
1	141B	TYR	3.09 Å
2	80B	LYS	2.28 Å
3	80B	LYS	2.88 Å
4	100B	ARG	2.89 Å
5	115B	GLU	2.41 Å

6	115B	GLU	2.31 Å
7	188B	ASN	3.19 Å

Υδρόφοβη αλληλεπίδραση	Θέση	Αμινοξύ	Απόσταση
1	102B	VAL	3.62 Å
2	104B	VAL	2.96 Å
3	108B	LEU	3.57 Å
4	110B	ALA	3.68 Å
5	129B	PHE	3.43 Å
6	138B	LEU	3.15 Å
7	180B	PHE	3.30 Å

Salt bridges	Θέση	Αμινοξύ	Απόσταση
1	136B	HIS	4.91 Å

Πίνακας 3: Δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ Ελλαγικού οξέος και PYR1. (PLIP)

Δεσμός Υδρογόνου	Θέση	Αμινοξύ	Απόσταση Δ-Α
1	80B	LYS	2.75 Å
2	80B	LYS	2.92 Å
3	115B	GLU	3.19 Å

Υδρόφοβη αλληλεπίδραση	Θέση	Αμινοξύ	Απόσταση
1	104B	VAL	3.61 Å
2	110B	ALA	3.98 Å
3	184B	VAL	3.63 Å

Πίνακας 4: Δεσμοί υδρογόνου και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται μεταξύ Επιγαλλοκατεχίνης και PYR1. (PLIP)

Δεσμός υδρογόνου	Θέση	Αμινοξύ	Απόσταση Δ-Α
1	80B	LYS	2.42 Å
2	162B	GLU	3.01 Å
3	115B	GLU	3.20 Å
4	115B	GLU	3.11 Å

Υδρόφοβη αλληλεπίδραση	Θέση	Αμινοξύ	Απόσταση
1	80B	LYS	3.49
2	129B	PHE	3.05
3	138B	LEU	3.57
4	184B	VAL	3.94

Πίνακας 5: Δεσμοί υδρογόνου και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται μεταξύ Πελαργονιδίνης και PYR1. (PLIP)

Δεσμός υδρογόνου	Θέση	Αμινοξύ	Απόσταση Δ-Α
1	136B	HIS	2.60 Å
2	136B	HIS	2.99 Å
3	188B	ASN	2.85 Å
4	115B	GLU	3.12 Å

Υδρόφοβη αλληλεπίδραση	Θέση	Αμινοξύ	Απόσταση
1	82B	PHE	3.55 Å
2	110B	ALA	3.36 Å
3	136B	HIS	2.85 Å
4	180B	PHE	3.34 Å
5	184B	VAL	3.23 Å
6	184B	VAL	3.45 Å

Πίνακας 6: Δεσμοί υδρογόνου και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται μεταξύ Κερσετίνης και PYR1. (PLIP)

Δεσμός υδρογόνου	Θέση	Αμινοξύ	Απόσταση Δ-Α
1	162B	GLU	2.33 Å
2	162B	GLU	3.17 Å
3	80B	LYS	1.96 Å
4	115B	GLU	3.13 Å
5	141B	TYR	2.80 Å

Υδρόφοβη	Θέση	Αμινοξύ	Απόσταση
----------	------	---------	----------

αλληλεπίδραση			
1	104B	VAL	3.91 Å
2	110B	ALA	2.57 Å
3	129B	PHE	3.86 Å
4	136B	HIS	3.76 Å
5	138B	LEU	3.52 Å
6	180B	PHE	3.91 Å
7	184B	VAL	3.53 Å
8	185B	VAL	3.08 Å

Πίνακας 7: Δεσμοί υδρογόνου και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται μεταξύ γαλλικού οξέος και PYR1. (PLIP)

Δεσμός υδρογόνου	Θέση	Αμινοξύ	Απόσταση Δ-Α
1	115B	GLU	3.17 Å
2	80B	LYS	2.50 Å
3	141B	TYR	3.19 Å

Υδρόφοβη αλληλεπίδραση	Θέση	Αμινοξύ	Απόσταση
1	184B	VAL	3.68 Å

Salt Bridges	Θέση	Αμινοξύ	Απόσταση
1	80B	LYS	3.17 Å

Πίνακας 8: Δεσμοί υδρογόνου και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται μεταξύ φλορετίνης και PYR1. (PLIP)

Δεσμός υδρογόνου	Θέση	Αμινοξύ	Απόσταση Δ-Α
1	162B	GLU	2.84 Å
2	141B	TYR	2.64 Å

Υδρόφοβη αλληλεπίδραση	Θέση	Αμινοξύ	Απόσταση
1	80B	LYS	3.89 Å

2	104B	VAL	3.70 Å
3	104B	VAL	3.73 Å
4	108B	LEU	3.80 Å
5	131B	ILE	3.70 Å
6	136B	HIS	3.58 Å

Πίνακας 9: Δεσμοί υδρογόνου και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται μεταξύ φλοριζίνης και PYR1. (PLIP)

Δεσμός υδρογόνου	Θέση	Αμινοξύ	Απόσταση Δ-Α
1	137B	ARG	2.87 Å

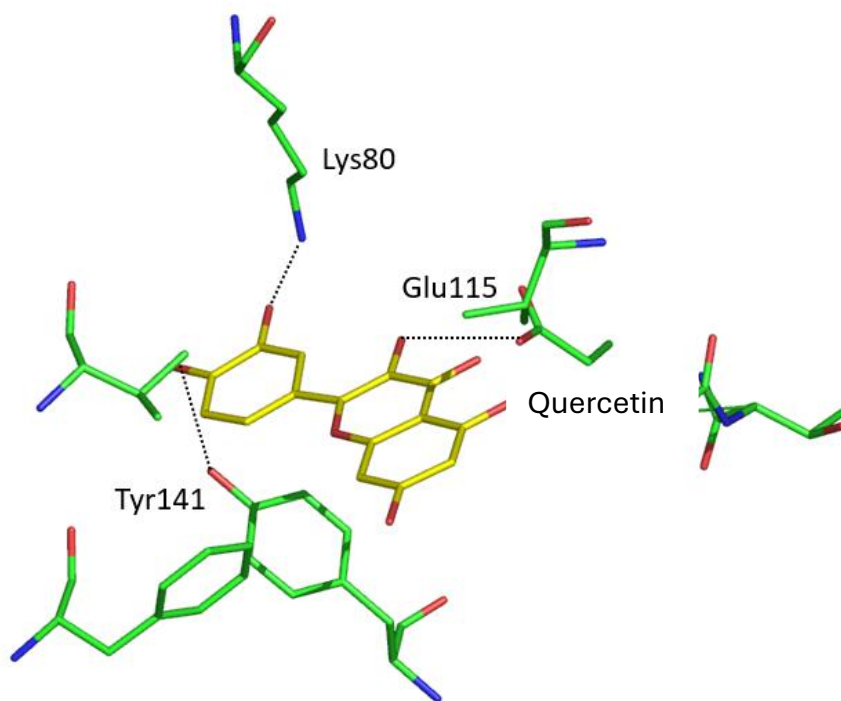
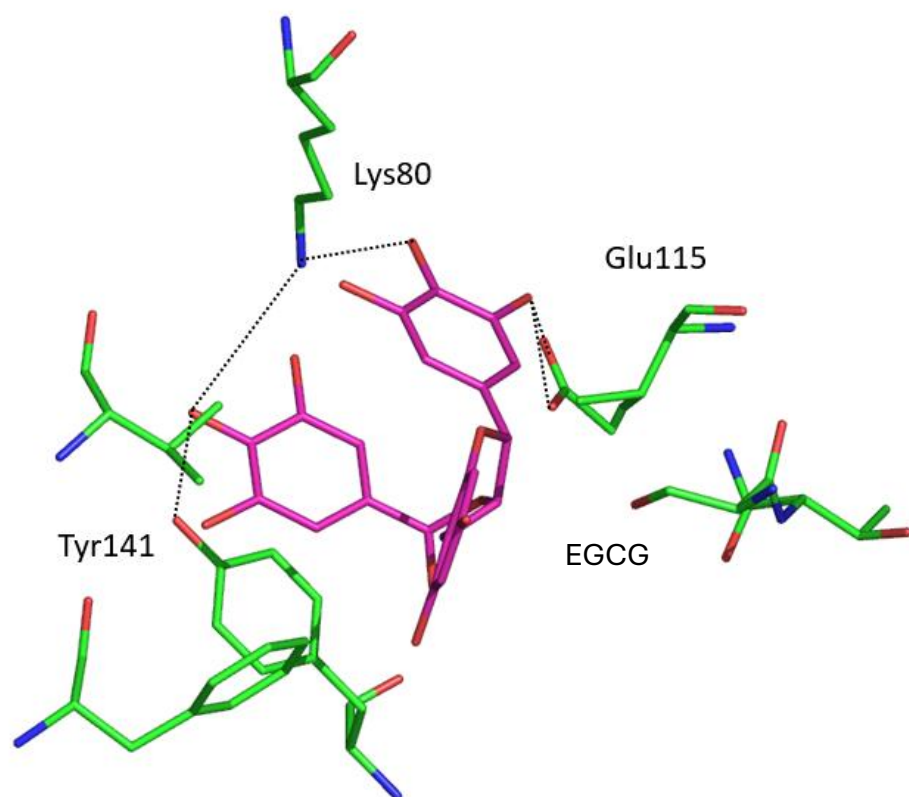
Υδρόφοβη αλληλεπίδραση	Θέση	Αμινοξύ	Απόσταση
1	108B	LEU	2.12 Å
2	110B	ALA	3.51 Å
3	138B	LEU	2.87 Å
4	180B	PHE	3.92 Å
5	180B	PHE	3.31 Å
6	184B	VAL	3.07 Å

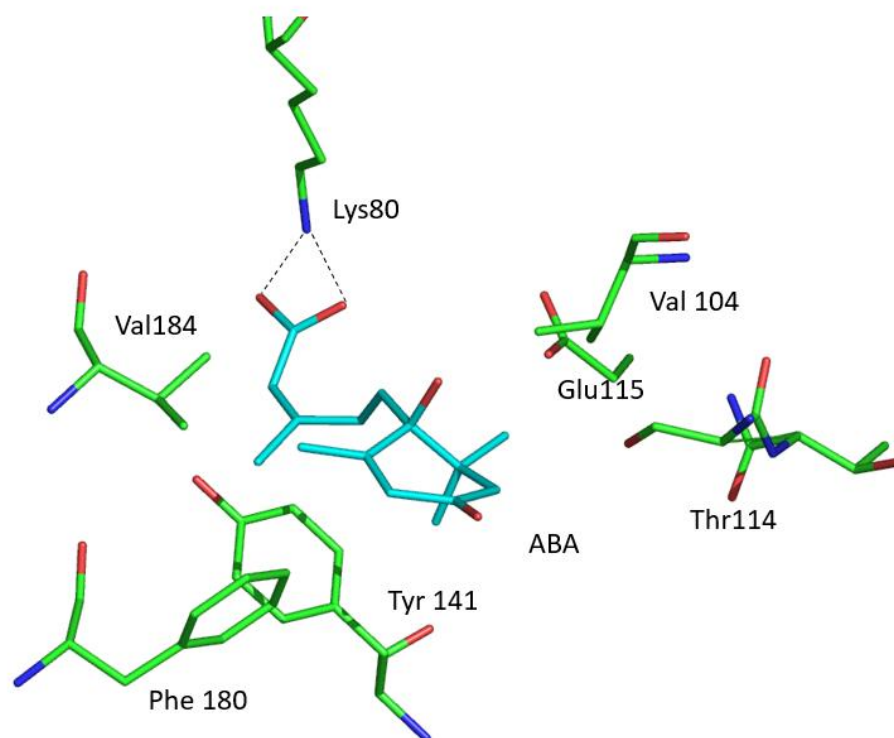
Πίνακας 10: Δεσμοί υδρογόνου και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται μεταξύ αμπισισικού οξέος και PYR1. (PLIP)

Δεσμός υδρογόνου	Θέση	Αμινοξύ	Απόσταση Δ-Α
1	80B	LYS	2.20 Å
2	80B	LYS	3.12 Å

Υδρόφοβη αλληλεπίδραση	Θέση	Αμινοξύ	Απόσταση
1	110B	ALA	3.21 Å
2	131B	ILE	3.82 Å
3	136B	HIS	3.68 Å
4	180B	PHE	3.95 Å
5	180B	PHE	3.47 Å
6	184B	VAL	3.32 Å

Οι παραπάνω δεσμοί υδρογόνου επιβεβαιώθηκαν και μέσω του CCP4 από το εργαλείο Contact όπου σαν δεδομένο δόθηκε η απόσταση των δεσμών να είναι μικρότερη από 3.2Å. Με τον ίδιο τρόπο, έγινε οπτικοποίηση των δεσμών μέσω του προγράμματος Coot με την εμφάνιση των χαρτών των δύο μορίων και των δεσμών υδρογόνου.





Εικόνα 11: Η σύνδεση των αναστολέων ABA, EGCG και Quercetin μέσω δεσμών υδρογόνου

Με βάση τους δεσμούς υδρογόνου που δημιουργήθηκαν, το κέντρο σύνδεσης του ABA στην PYR1 περιλαμβάνει αμινοξέα τα οποία είναι κοινά με τους προσδέτες EGCG και Quercetin και σχηματίζουν την περιοχή δέσμευσης. Ακόμη, παρατηρούνται δυνάμεις Van der Waals μεταξύ των αναστολέων και της πρωτεΐνης.

Αποτελέσματα θερμικής μετατόπισης

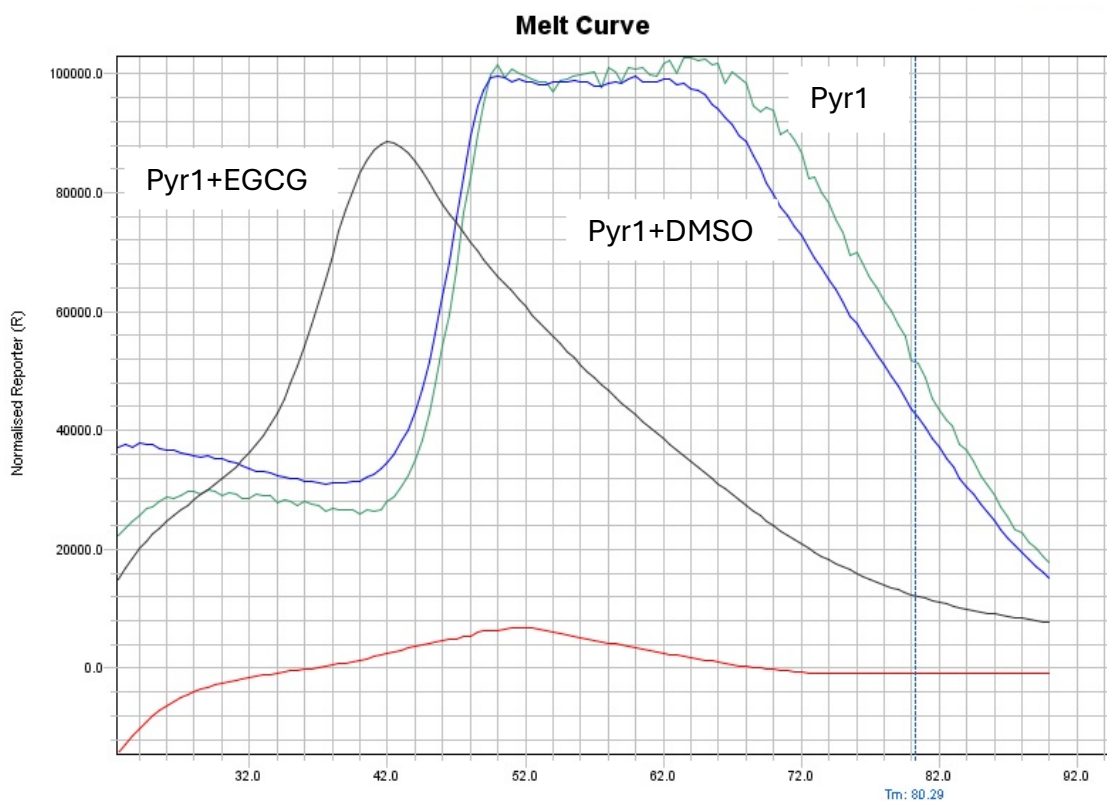
Το γονίδιο που χρησιμοποιήθηκε αναγνωρίστηκε από τη βάση δεδομένων Cottongen, συντέθηκε και βελτιστοποίησε το φορέα έκφρασης pGEX-6P-1 από E.coli και φέρει ετικέτα της Τρανσφεράσης της Γλουταθειόνης(GST). Εφαρμόστηκε χρωματογραφία συγγένειας και μοριακής διήθησης και η τελική συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν 0.84 mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα A Hepes 20 mM, EDTA 1mM και NaCl 50 mM.

Χρησιμοποιήθηκε δείγμα της PYR1 συγκέντρωσης 0.84 mg/ml προτού γίνει καθαρισμός και αραίωση της, DMSO 1% v/v και EGCG συγκέντρωσης 1 mM. Το κάθε δείγμα ήταν 70 μl όπου από αυτά επιλέχθηκαν 50 μl για τα βοθρία. Οι αναλύσεις εκτελέστηκαν από το όργανο StepOnePlus Real-Time PCR System και η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Sypro Orange.

Αφού πραγματοποιήθηκε αραίωση του δείγματος, χρησιμοποιήθηκε δείγμα της πρωτεΐνης με συγκέντρωση 0.60 mg/ml. Επομένως η ποσότητα της PYR1:

$$0,6 \text{ mg/ml} \times x = 0,5 \text{ mg/ml} \times 70 \text{ } \mu\text{l} \quad x = 58,3 \text{ } \mu\text{l PYR1}$$

Δείγμα	BUFFER A	PYR1	DMSO	EGCG	SYPRO
1	69.72 μl	--	--	--	0.28 μl
2	11.42 μl	58.3 μl	--	--	0.28 μl
3	10.72 μl	58.3 μl	0.7 μl	--	0.28 μl
4	10.72 μl	58.3 μl	--	0.7 μl	0.28 μl



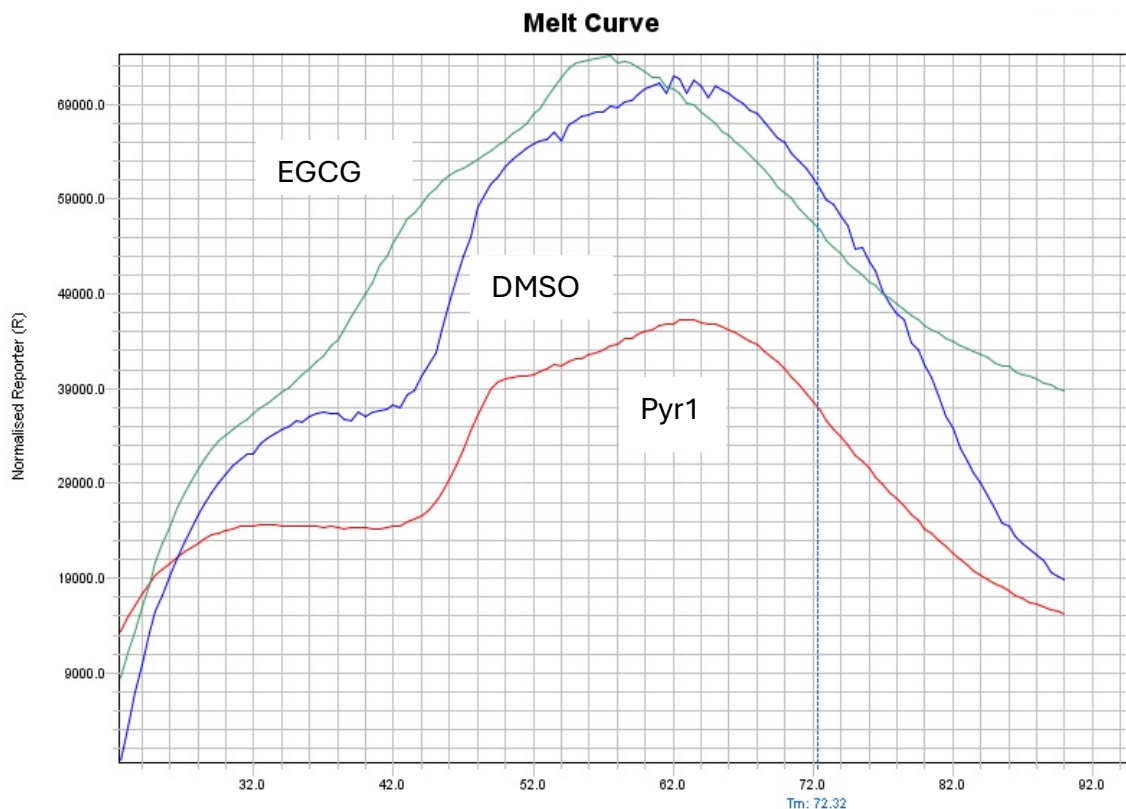
Εικόνα 12: Ανάλυση θερμικής μετατόπισης δείγματος της πρωτεΐνης έπειτα από αραίωση με την παρουσία και χωρίς την παρουσία DMSO και EGCG. Με πράσινο χρώμα παρουσιάζεται η πρωτεΐνη χωρίς DMSO και προσδότη ενώ με μπλε και

μαύρο χρώμα παρουσιάζεται η πρωτεΐνη με παρουσία DMSO και EGCG αντίστοιχα. Το T_m σε αυτή την περίπτωση είναι 46 °C.

Από την εικόνα γίνεται αντιληπτό πως το 1% v/v DMSO δεν επηρεάζει την πρωτεΐνη ενώ με το EGCG μειώνεται το σήμα του φθορισμού και το T_m από τους 46 °C μειώνεται στους 36 °C. Οι μεταβολές αυτές υποδεικνύουν πιθανή αλληλεπίδραση του EGCG με τη χρωστική ή μείωση της σταθερότητας της πρωτεΐνης. Κατά συνέπεια η μέθοδος δεν είναι κατάλληλη για τη μελέτη της πρόσδεσης του EGCG.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μοριακή διήθηση της PYR1 και η τελική συγκέντρωση ήταν 0,40 mg/ml. Χρησιμοποιήθηκε δείγμα PYR1 , DMSO 5% v/v και EGCG συγκέντρωσης 5 mM. Το κάθε δείγμα ήταν 50 µl.

Δείγμα	Buffer A	PYR1	DMSO	EGCG	SYPRO
1	2 µl	48 µl	--	--	0.02 µl
2	--	48 µl	2 µl	--	0.02 µl
3	--	48 µl	--	2 µl	0.02 µl



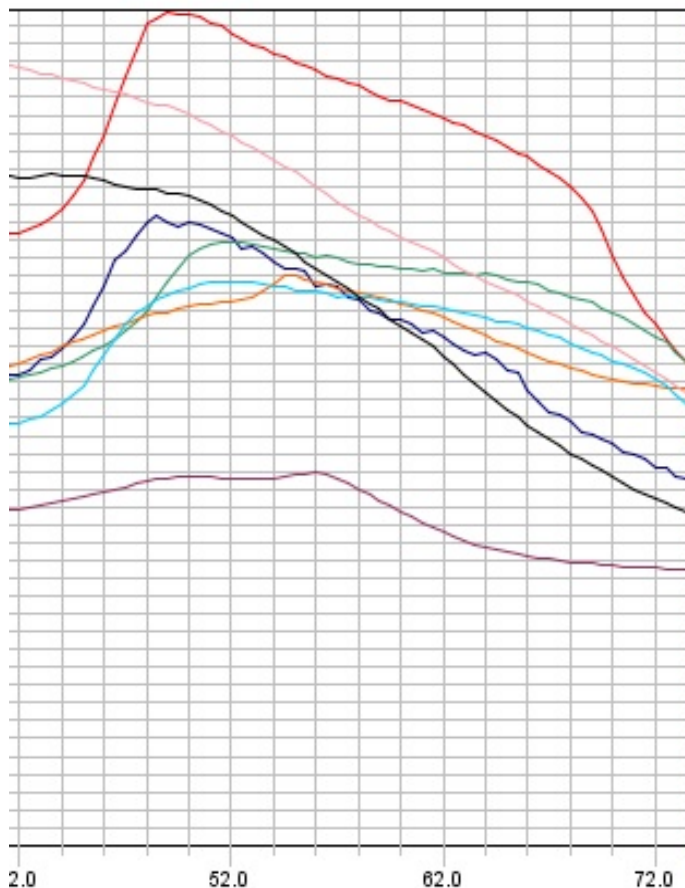
Εικόνα 13: Ανάλυση θερμικής μετατόπισης δείγματος της πρωτεΐνης έπειτα από αραίωση με την παρουσία και χωρίς την παρουσία DMSO και EGCG. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζεται η πρωτεΐνη χωρίς DMSO και προσδέτη ενώ με μπλε και πράσινο χρώμα παρουσιάζεται η πρωτεΐνη με παρουσία DMSO και EGCG αντίστοιχα. Το T_m σε αυτή την περίπτωση είναι 46 °C.

Η προσθήκη 5 % v/v DMSO μειώνει την τιμή του T_m στους 42 °C , επηρεάζει αρνητικά τη σταθερότητα της πρωτεΐνης υποδηλώνοντας ότι 5% v/v αντενδείκνυται για μελέτες προσδετών.

Τέλος, πέρα από την EGCG προστέθηκαν Φλορετίνη, Φλοριζίνη και Γαλλικό οξύ προκειμένου να εντοπιστούν οι αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη.

Δείγμα	Buffer A	PYR1	DMSO	Phloretin	Phloridzin	Gallic acid
1	2 μl	48 μl	--	---	--	--
2	--	48 μl	2 μl	--	--	--
3	--	48 μl	--	2 μl	--	--
4	--	48 μl	--	10 μl	--	--
5	--	48 μl	--	--	2 μl	--
6	--	48 μl	--	--	10 μl	--
7	--	48 μl	--	--	--	2 μl
8	--	48 μl	--	--	--	10 μl

Melt Curve



Εικόνα 14: Ανάλυση θερμικής μετατόπισης δείγματος της πρωτεΐνης έπειτα από αραίωση με την παρουσία και χωρίς την παρουσία DMSO και EGCG, EGC και Pelargonidin 3 Glucoside .Με μπλε σκούρο και κόκκινο χρώμα παρουσιάζεται η πρωτεΐνη με και χωρίς DMSO. Με πράσινο και πορτοκαλί χρώμα είναι η πρωτεΐνη με φλορετίνη. Με γαλάζιο και μωβ χρώμα είναι η πρωτεΐνη μαζί με τη φλοριζίνη. Με μαύρο και ροζ χρώμα απεικονίζεται η πρωτεΐνη με το γαλλικό οξύ. Οι προσδέτες στη συγκεκριμένη

περίπτωση προστέθηκαν σε δύο διαφορετικές ποσότητες, 2 μl και 10 μl.

Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζεται η πρωτεΐνη χωρίς DMSO και προσδέτη όπου φαίνεται να παρουσιάζει μεγαλύτερη καμπύλη σε σχέση με την παρουσία άλλων προσδετών που κατά κάποιο τρόπο επηρεάζουν την πρωτεΐνη.

Από το σχήμα γίνεται αντιληπτό πως η προσθήκη διάφορων προσδετών μπορεί να επηρεάσει τη θερμοκρασία τήξης επομένως και τη σταθερότητα της πρωτεΐνης. Για παράδειγμα η φλορετίνη και η φλοριζίνη(πράσινο και γαλάζιο χρώμα αντίστοιχα) αυξάνουν τη θερμοκρασία τήξης από τους 46 °C , στους 48 °C , επομένως σταθεροποιούν την πρωτεΐνη.

Επομένως, το σήμα φθορισμού μειώνεται και ενδέχεται οι αναστολές να επηρεάζουν την πρόσδεση της χρωστικής. Κατά συνέπεια η μέθοδος αυτή δεν κρίνεται αποτελεσματική για τη μελέτη πρόσδεσης των παραπάνω αναστολέων και πραγματοποιήθηκαν μελέτες ενδογενούς φθορισμού.

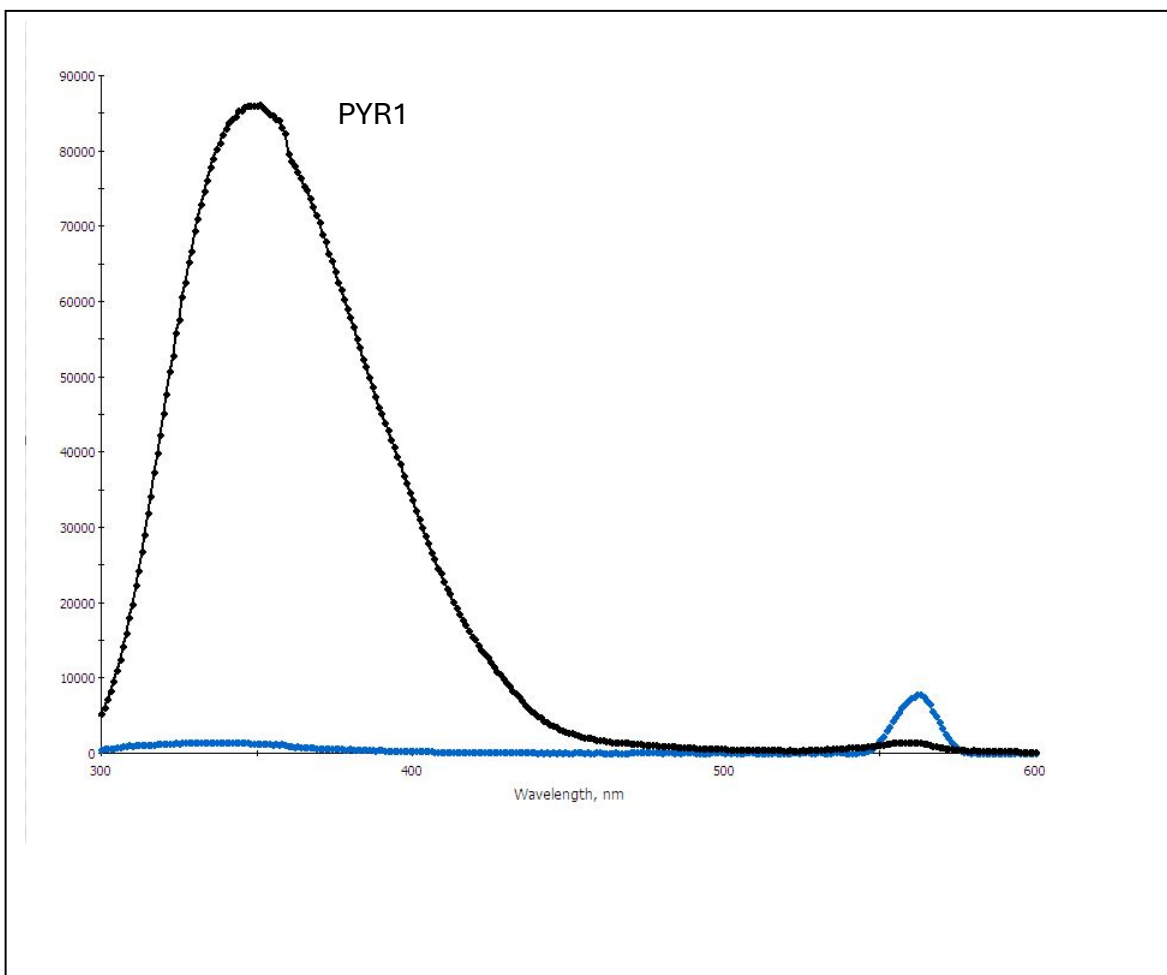
Αποτελέσματα Ενδογενούς φθορισμού

Προκειμένου να ερευνηθεί η σταθερότητα της πρωτεΐνης, μελετήθηκε η πρωτεΐνη μέσω του ενδογενή φθορισμού. Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία βοθρίων στα οποία προστέθηκαν 60 μl πρωτεϊνικού διαλύματος. Αρχικά, μελετήθηκαν 60 μl από την πρωτεΐνη συγκέντρωσης 0,3 mg/ml και το buffer ξεχωριστά προκειμένου να εντοπιστεί ο φθορισμός που έχει το καθένα από αυτά. Μέσω του EnSpire Multilabel Plate Reader και με τη βοήθεια του προγράμματος EnSpire Manager, ρυθμίστηκαν ορισμένες παράμετροι όπως **το excitation και το emission**. Επομένως τα δεδομένα για το συγκεκριμένο πείραμα είναι τα εξής:

Excitation: 300-500

Emission: 520

	ΠΟΣΟΤΗΤΑ	ΜΗΚΟΣ ΚΥΜΑΤΟΣ	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ
PYR1	60 μl	351 nm	86.202
BUFFER A	60 μl	562 nm	7.832

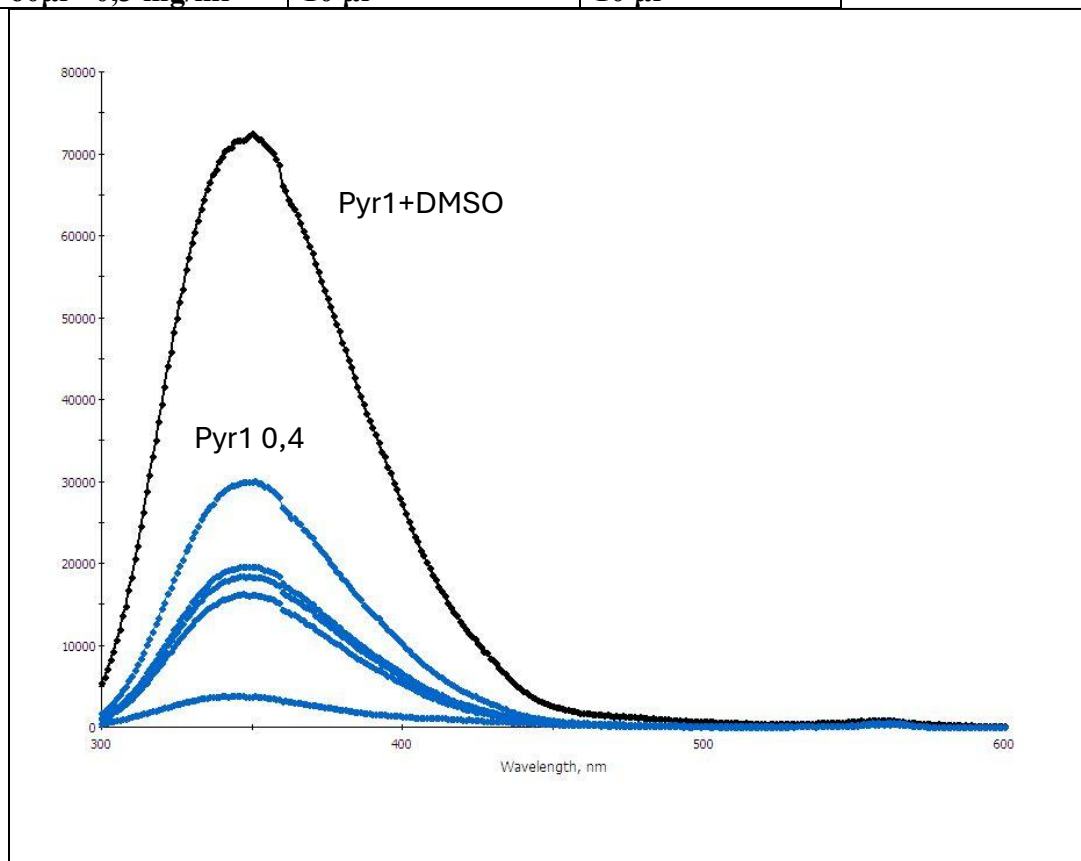


Εικόνα 15: Ενδογενής φθορισμός της πρωτεΐνης και του Buffer μεμονωμένα

Ο φθορισμός της πρωτεΐνης μεμονωμένα είναι 86.202.

Στο παρακάτω σχήμα εντοπίζεται ο φθορισμός της πρωτεΐνης όταν εκείνη βρίσκεται σε διαφορετικές ποσότητες και συγκεντρώσεις και με παρουσία ή όχι του DMSO.

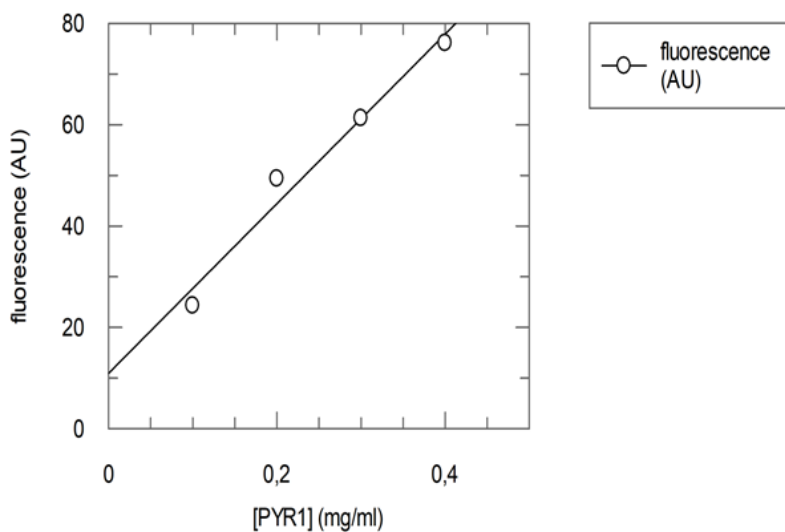
PYR1	BUFFER A	DMSO
20μl= 0,1 mg/ml	60 μl	--
40μl=0,2 mg/ml	40 μl	--
60μl= 0,3 mg/ml	20 μl	--
80μl=0,4 mg/ml	--	--
60μl= 0,3 mg/ml	10 μl	10 μl



Εικόνα 16: Διαφορετικές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης με διαφορετικές συγκεντρώσεις Buffer

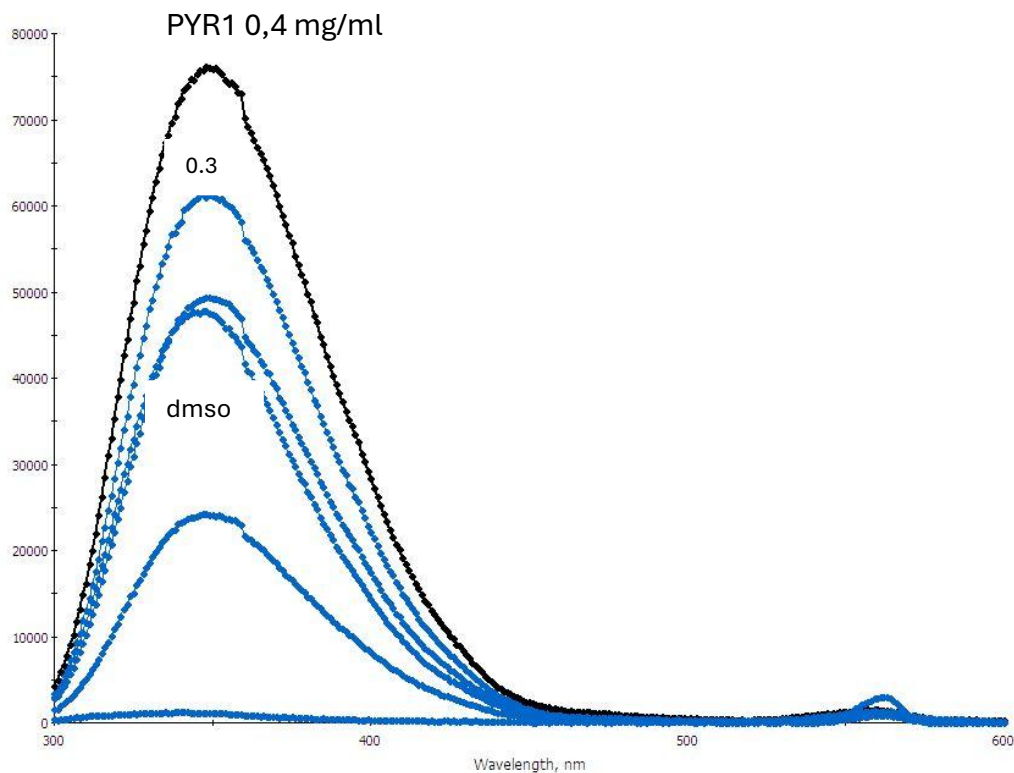
PYR1	ΜΗΚΟΣ ΚΥΜΑΤΟΣ	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ
20 μl	346 nm	18.441
40 μl	347 nm	16.273
60 μl	349 nm	19.609
80 μl	351 nm	30.051
60 μl/ DMSO	350 nm	72.452

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται ο φθορισμός της πρωτεΐνης, ο οποίος αυξάνεται σταδιακά όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Στον άξονα x είναι οι συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης σε mg/ml ενώ στον άξονα y ο φθορισμός.



Εικόνα 17:Ο φθορισμός της πρωτεΐνης PYR1

Στη συνέχεια, εξετάστηκε το DMSO προκειμένου να ελεγχθεί ο φθορισμός που προκαλεί αν βρίσκεται μόνο του. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παραπάνω σχήμα όπου φαίνεται ότι ο φθορισμός του DMSO είναι μειωμένος σε σχέση με το όταν υπάρχει παρουσία πρωτεΐνης.



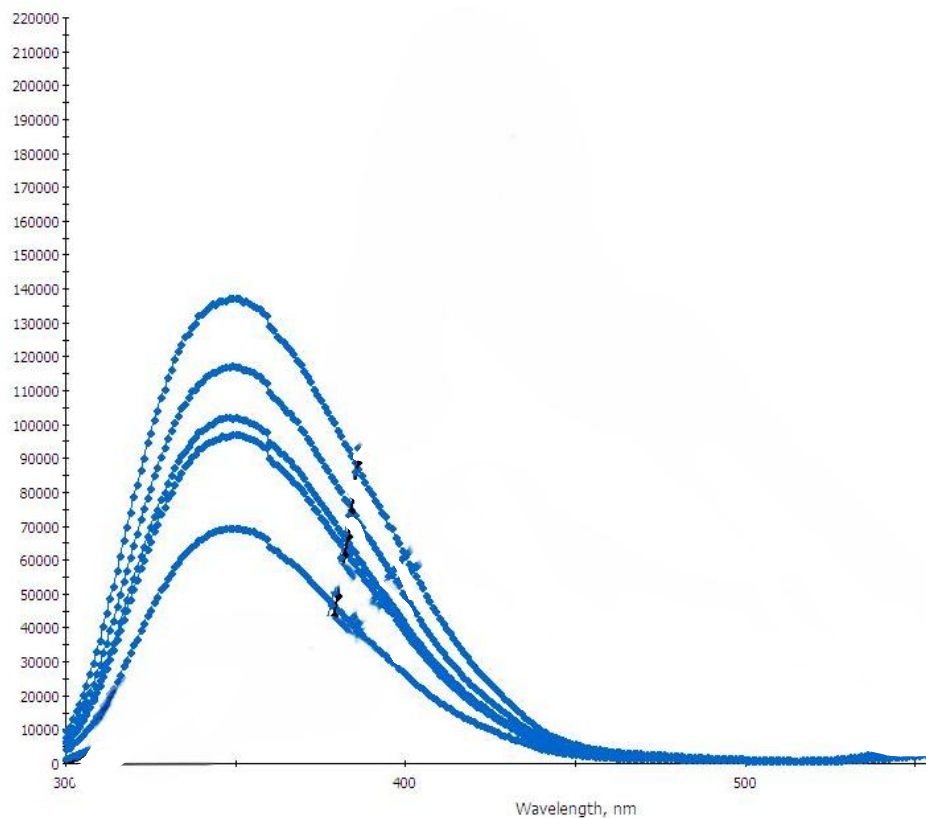
Εικόνα 18: Ενδογενής φθορισμός της πρωτεΐνης με διαφορετικές συγκεντρώσεις Buffer και DMSO.

Αναλυτικά το μήκος κύματος και ο φθορισμός:

PYR1	BUFFER A	DMSO	ΜΗΚΟΣ ΚΥΜΑΤΟΣ	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ
20 µl	60 µl	--	347 nm	24.292
40 µl	40 µl	--	348 nm	49.375
60 µl	20 µl	--	347 nm	61.289
80 µl	--	--	348 nm	76.114
50 µl	--	10 µl	348 nm	47.787
--	50 µl	10 µl	561 nm	3.036

Στη συνέχεια προστέθηκαν στα δείγματα διαφορετικές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης και του Buffer μαζί με τις εξής ποσότητες και τα αντίστοιχα αποτελέσματα του ενδογενή φθορισμού.

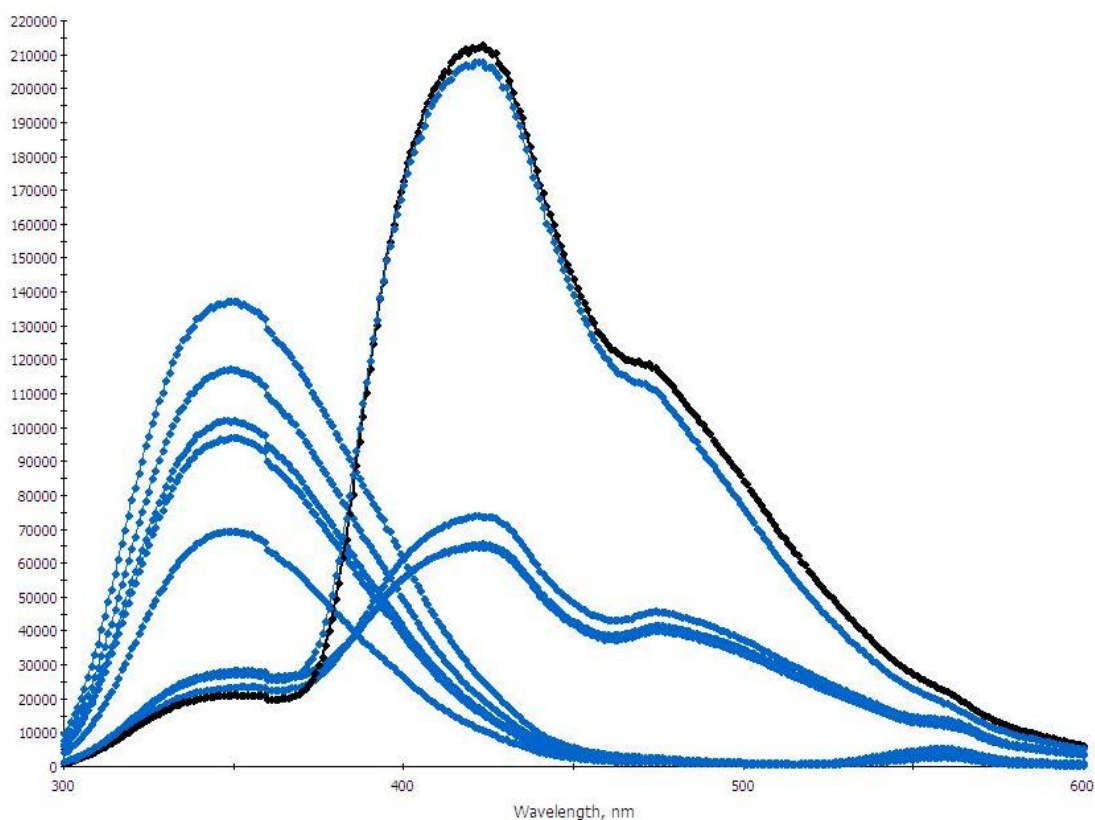
PYR1	BUFFER A	ΜΗΚΟΣ ΚΥΜΑΤΟΣ	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ
20 µl	60 µl	349 nm	69.518
30 µl	50 µl	349 nm	9.7116
40 µl	40 µl	350 nm	102.326
60 µl	20 µl	349 nm	117.222
70 µl	10 µl	348 nm	137.405



Εικόνα 19: Διαφορετικές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης με Buffer A

Στις ίδιες συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης προστέθηκαν στη συνέχεια 10 μl NPN για να μελετηθεί συνδυαστικά η σταθερότητα της πρωτεΐνης με την παρουσία και μη της NPN. Πιο αναλυτικά:

PYR	BUFFER A	NPN	ΜΗΚΟΣ ΚΗΜΑΤΟΣ	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ
20 μl	50 μl	10 μl	421 nm	64.970
30 μl	40 μl	10 μl	423 nm	65.824
40 μl	30 μl	10 μl	422 nm	74.051
60 μl	10 μl	10 μl	423 nm	212.911
70 μl	-	10 μl	422 nm	208.063



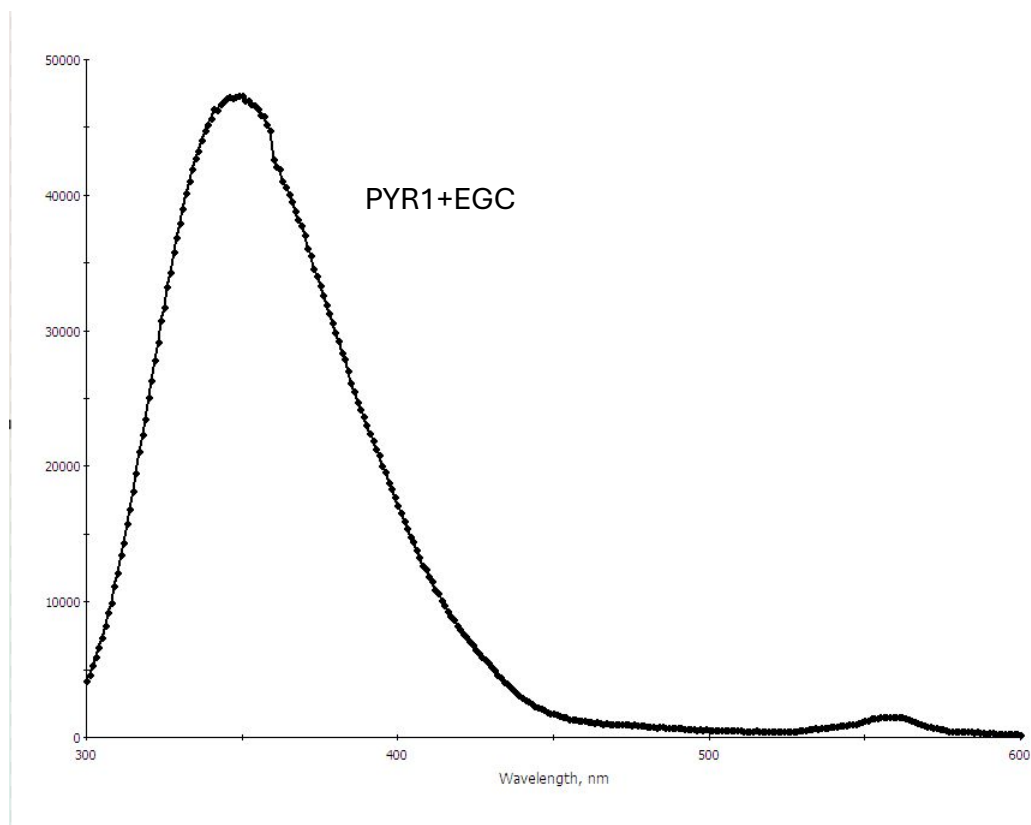
Εικόνα 20: Διαφορετικές συγκεντρώσεις του Buffer σε συνδυασμό με την NPN.

Στην αριστερή πλευρά του διαγράμματος εντοπίζονται τα δείγματα της πρωτεΐνης δίχως την παρουσία της NPN με τον φθορισμό να αυξάνεται σταδιακά όσο αυξάνεται και η

ποσότητα της πρωτεΐνης. Στην δεξιά πλευρά του διαγράμματος είναι τα δείγματα της πρωτεΐνης σε συνδυασμό με την NPN με τον φθορισμό να είναι υψηλότερος στα 60 μl πρωτεΐνης.

Από το διάγραμμα συμπεραίνουμε ότι η αύξηση της ποσότητας της πρωτεΐνης αυξάνει σταδιακά τον φθορισμό και με την παρουσία της NPN αυξάνεται τόσο ο φθορισμός όσο και το μήκος κύματος καθώς η καμπύλη μετατοπίζεται προς τα δεξιά.

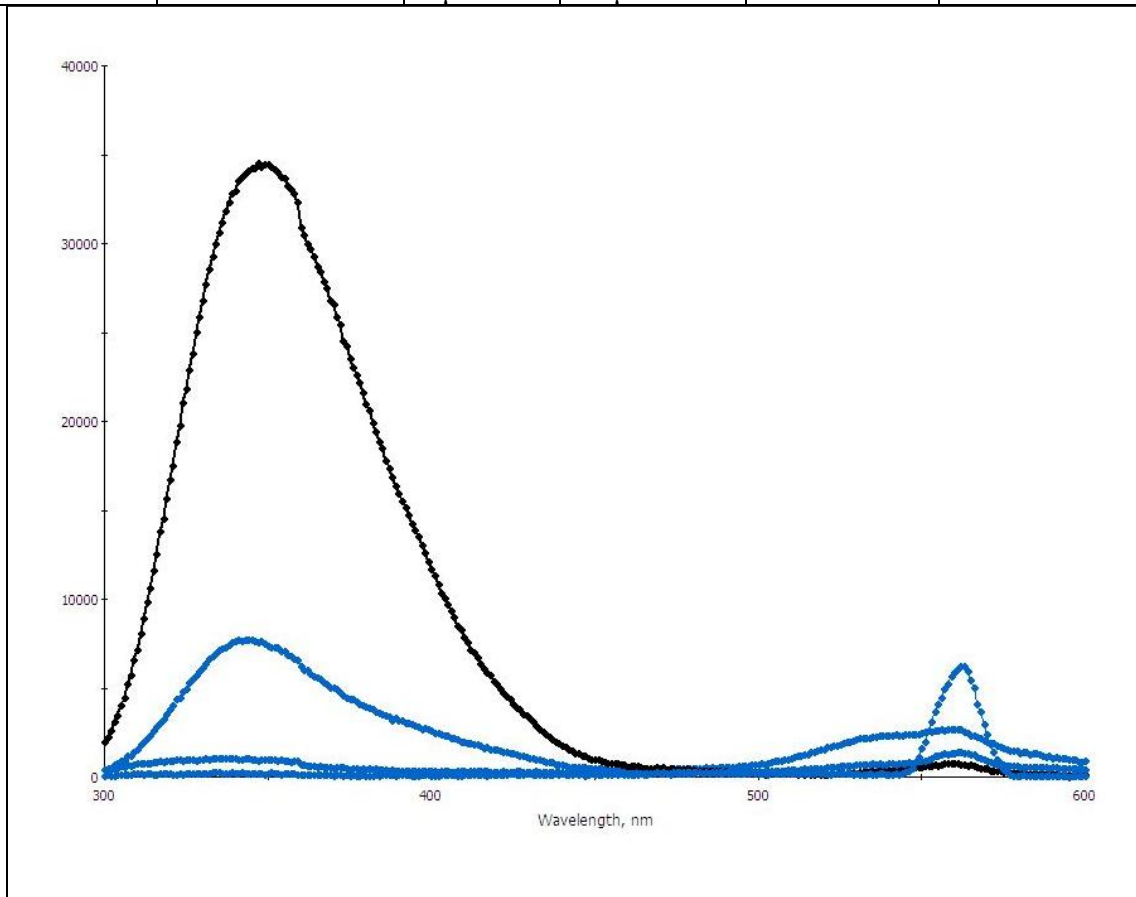
Έπειτα προστέθηκαν **10 μl EGC** συγκέντρωσης 48 mM σε **60 μl PYR1** και 10 μl Buffer. Το μήκος κύματος αυτής της αλληλεπίδρασης ήταν **350 nm** και ο φθορισμός **47.305** και αποτυπώνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 21: Ενδογενής φθορισμός της PYR1 με EGC.

Αφότου παρατηρήθηκε ο ενδογενής φθορισμός της πρωτεΐνης σε συνδυασμό με την EGC και την NPN δημιουργήθηκαν στη συνέχεια δείγματα τα οποία περιείχαν Quercetin συγκέντρωσης 50 mM και EGC συγκέντρωσης 7,5 mM. Πιο συγκεκριμένα:

PYR1	QUERCETIN 50 mM	EGC 7,5 mM	BUFFER A	ΜΗΚΟΣ ΚΥΜΑΤΟΣ	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ
60 µl	2 µl	--	18 µl	343 nm	7.756
60 µl	--	2 µl	18 µl	347 nm	34.509
-	2 µl	--	78 µl	561 nm	1.439
-	--	2 µl	78 µl	562 nm	6.218



Εικόνα 22: Ενδογενής φθορισμός της πρωτεΐνης με Κερσετίνη και EGC

Σε αυτό το διάγραμμα παρατηρείται ότι ο φθορισμός αυξάνεται όταν προστεθούν 2 µl EGC συγκέντρωσης 7,5 mM στην PYR1. Αντίθετα, όταν προστεθούν 2 µl Quercetin ο φθορισμός παραμένει χαμηλός σε σχέση με το αν προστεθεί η πρωτεΐνη. Επιπλέον, δεν υπάρχει ιδιαίτερη διαφορά στη μετατόπιση της καμπύλης του μήκους κύματος.

Προχωρώντας στην πειραματική διαδικασία αναλύθηκαν τα μοριακά βάρη και οι συγκεντρώσεις ορισμένων ουσιών προκειμένου να διαλυθούν σε 1 ml DMSO 1% v/v και να προστεθούν στα δείγματα της πρωτεΐνης. Πιο αναλυτικά:

Μοριακό βάρος **γαλλικού οξέος**: 188,13 g/mol

Μοριακό βάρος **φλορετίνης**: 274,27 g/mol

Μοριακό βάρος **φλοριζίνης**: 472,44 g/mol

Συγκέντρωση **γαλλικού οξέος**: 43 mg /220mM

Συγκέντρωση **φλορετίνης**: 80 mg /160 mM

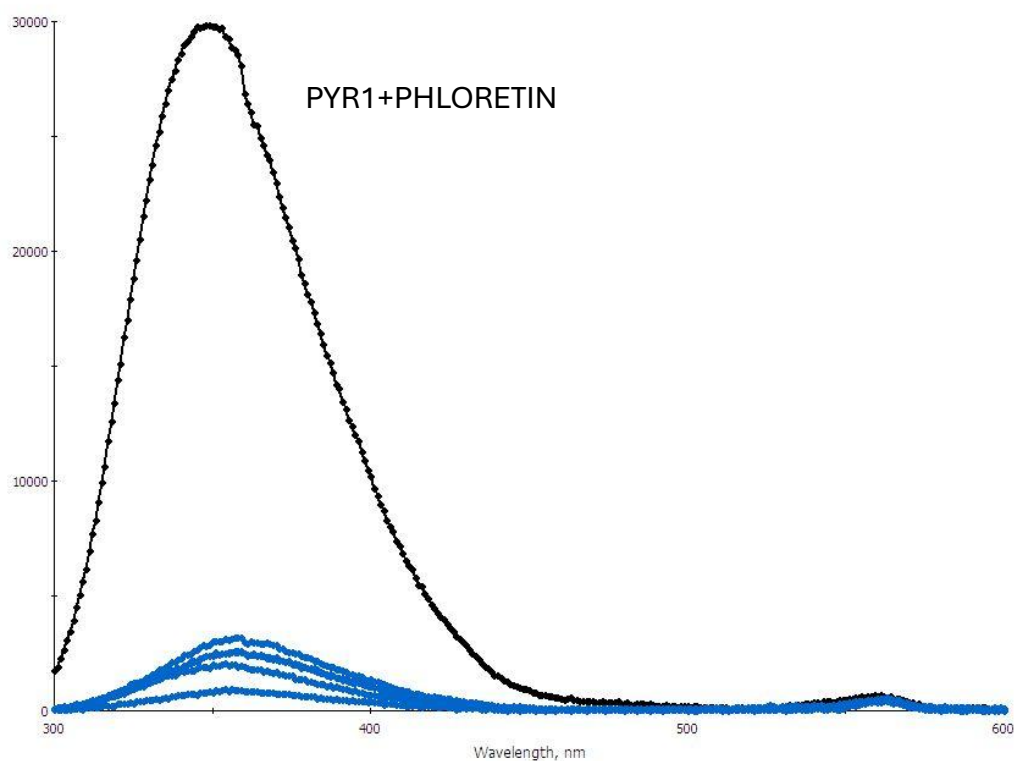
Συγκέντρωση **φλοριζίνης**: 17 mg/ 60 mM

Έπειτα από την αραίωση αυτών των ουσιών προστέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε 60 µl πρωτεΐνης.

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται οι συγκεντρώσεις της φλορετίνης σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη, buffer και DMSO

PYR1	PHLORETIN	BUFFER A	DMSO
60 µl	--	20 µl	10 µl
60 µl	2 µl	18 µl	10 µl
60 µl	4 µl	16 µl	10 µl
60 µl	6 µl	14 µl	10 µl
60 µl	8 µl	12 µl	10 µl
60 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται ο ενδογενής φθορισμός και η αλληλεπίδραση της PYR1 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της φλορετίνης.



Εικόνα 23: Ενδογενής φθορισμός της πρωτεΐνης με διαφορετικές συγκεντρώσεις φλορετίνης

Η μεγάλη καμπύλη αντιστοιχεί στον φθορισμό της πρωτεΐνης χωρίς κάποια ουσία-προσδέτη. Επομένως, γίνεται αντιληπτό πως η φλορετίνη επηρεάζει την πρωτεΐνη καθώς ο φθορισμός έχει μειωθεί και υπάρχει μετατόπιση στην καμπύλη του μήκους κύματος.

Αναλυτικά το μήκος κύματος και ο φθορισμός:

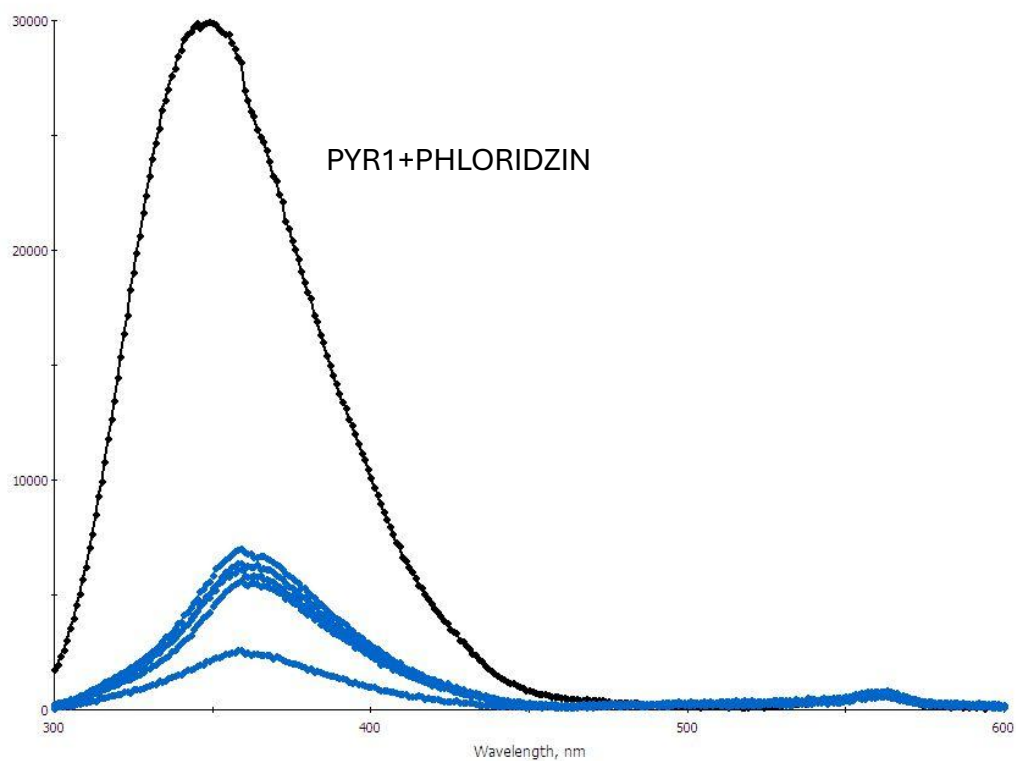
PHLORETIN	ΜΗΚΟΣ ΚΥΜΑΤΟΣ	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ
0 μ l	349 nm	29.824
2 μ l	354 nm	2.051
4 μ l	359 nm	3.198
6 μ l	358 nm	2.581
8 μ l	359 nm	2.622
10 μ l	356 nm	954

Με τον ίδιο τρόπο αναλύθηκαν η φλοριζίνη και το γαλλικό οξύ.

Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τη φλοριζίνη αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

PYR1	PHLORIDZIN	BUFFER A	DMSO
60 μ l	--	20 μ l	10 μ l
60 μ l	2 μ l	18 μ l	10 μ l
60 μ l	4 μ l	16 μ l	10 μ l
60 μ l	6 μ l	14 μ l	10 μ l
60 μ l	8 μ l	12 μ l	10 μ l
60 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται ο ενδογενής φθορισμός και η αλληλεπίδραση της PYR1 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της φλοριζίνης.

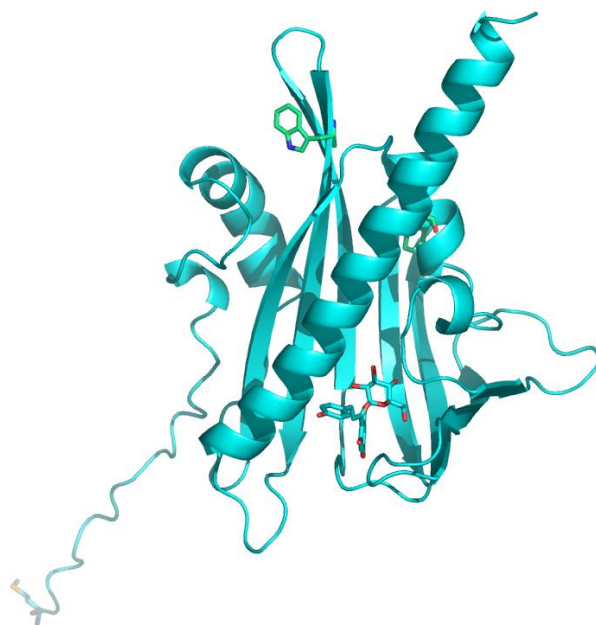


Εικόνα 24: Ενδογενής φθορισμός της πρωτεΐνης με διαφορετικές συγκεντρώσεις φλοριζίνης

Η μεγάλη καμπύλη αντιστοιχεί στον φθορισμό της πρωτεΐνης χωρίς κάποια ουσια-
προσδέτη. Επομένως, γίνεται αντιληπτό πως η φλοριζίνη επηρεάζει την πρωτεΐνη καθώς
ο φθορισμός είναι μειωμένος και υπάρχει μετατόπιση στην καμπύλη.

Αναλυτικά το μήκος κύματος και ο φθορισμός:

PHLORIDZIN	ΜΗΚΟΣ ΚΥΜΑΤΟΣ	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ
0 μ l	349	29.964
2 μ l	358	6.133
4 μ l	359	7.032
6 μ l	359	6.401
8 μ l	359	5.618
10 μ l	358	2.601



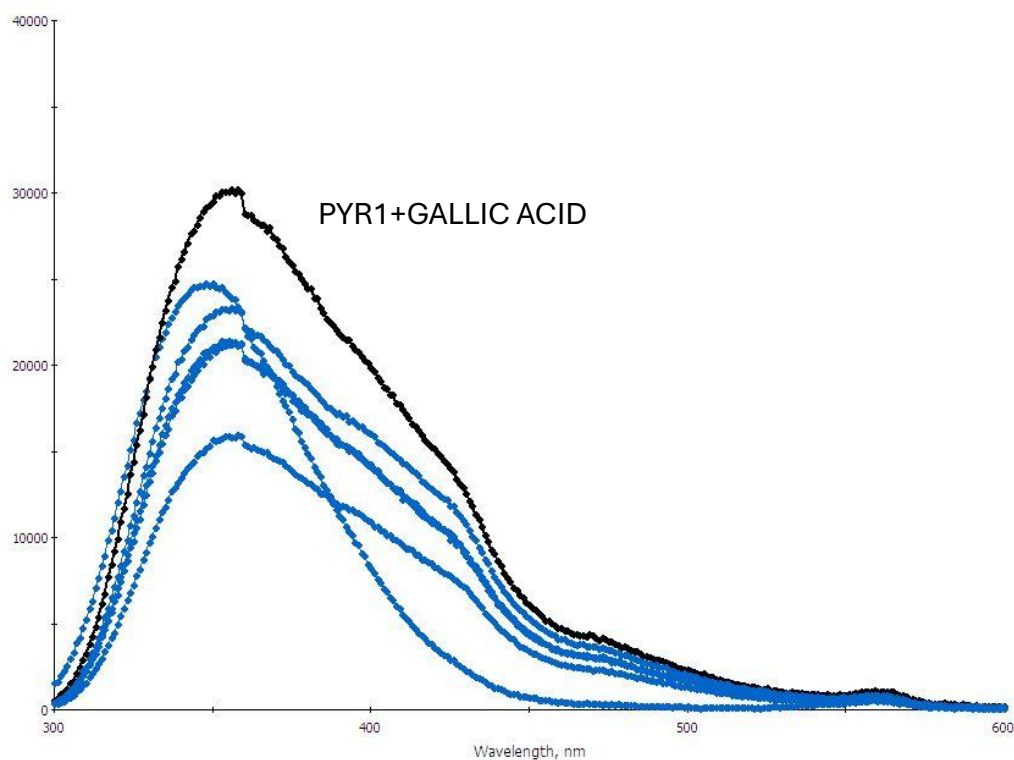
Εικόνα 25: Η φλοριζίνη σε σχέση με την PylR1 και τις 2 τρυπτοφάνες

Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για το γαλλικό οξύ αναφέρονται στον
παρακάτω πίνακα.

PylR1	GALLIC ACID	BUFFER A	DMSO
60 μ l	--	20 μ l	10 μ l
60 μ l	2 μ l	18 μ l	10 μ l

60 μ l	4 μ l	16 μ l	10 μ l
60 μ l	6 μ l	14 μ l	10 μ l
60 μ l	8 μ l	12 μ l	10 μ l
60 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η αλληλεπίδραση της PYR1 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος



Εικόνα 26: Ενδογενής φθορισμός της πρωτεΐνης με διαφορετικές συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος

Από το διάγραμμα συμπεραίνουμε ότι ο φθορισμός είναι αυξημένος σε σχέση με τη φλορετίνη και τη φλοριζίνη και υπάρχει μετατόπιση στην καμπύλη. Επομένως το γαλλικό οξύ αυξάνει τον φθορισμό της πρωτεΐνης συγκριτικά με την φλορετίνη και τη φλοριζίνη και ως αποτέλεσμα την επηρεάζει.

Αναλυτικά το μήκος κύματος και ο φθορισμός:

GALLIC ACID	ΜΗΚΟΣ ΚΥΜΑΤΟΣ	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ
0 μ l	350 nm	24.748
2 μ l	358 nm	15.959

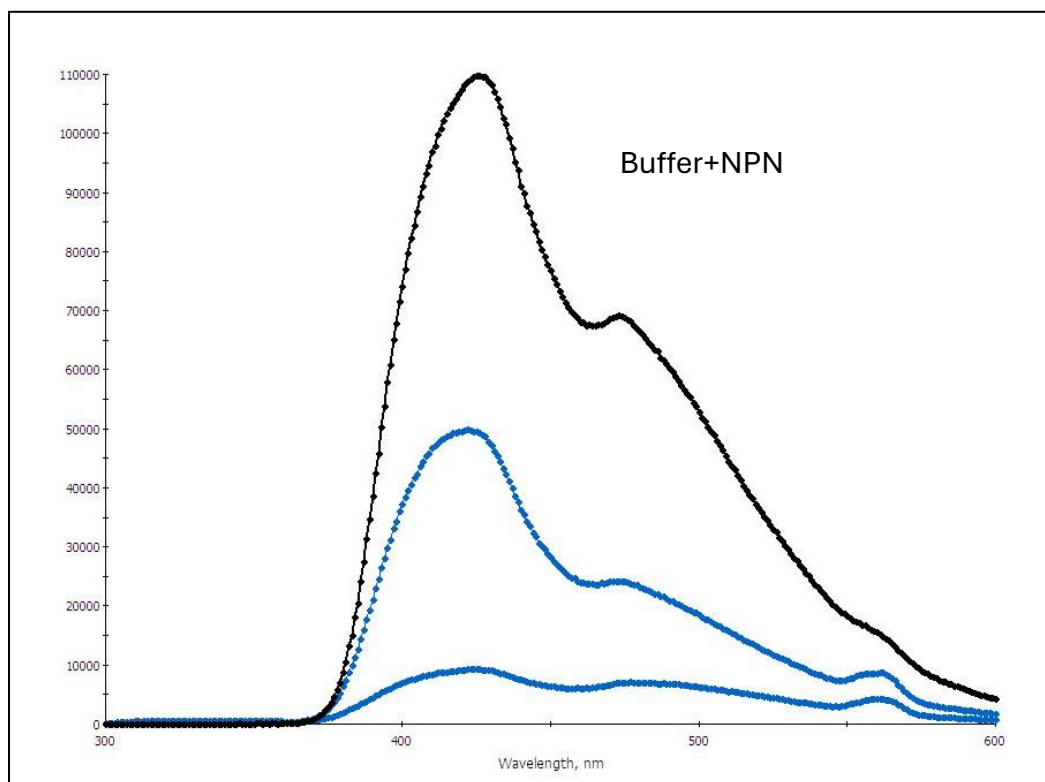
4 μ l	357 nm	21.362
6 μ l	356 nm	30.220
8 μ l	355 nm	21.445
10 μ l	356 nm	23.325

Στη συνέχεια, δίχως να υπάρξουν αλλαγές στις παραμέτρους, προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις τόσο της πρωτεΐνης όσο και του buffer σε συνδυασμό με την NPN. Έγινε αραίωση της NPN σε 100% v/v DMSO δηλαδή 10 μ l NPN και 90 μ l DMSO.

Excitation:230-500

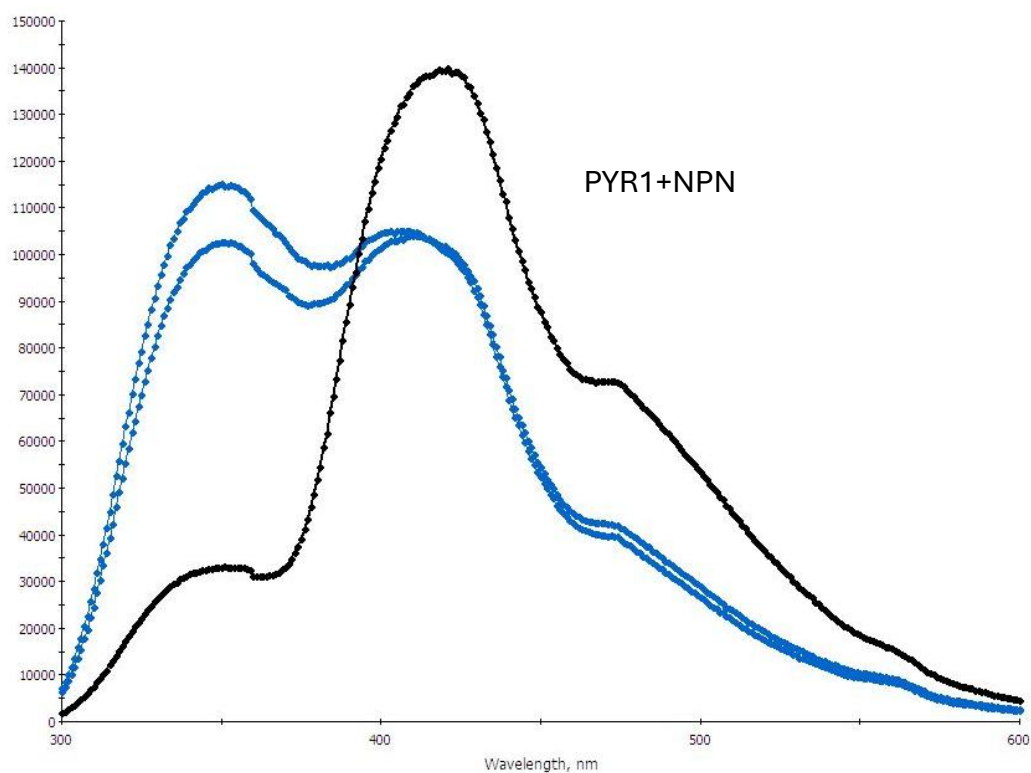
Emission:520

ΠΟΣΟΤΗΤΑ		ΜΗΚΟΣ ΚΥΜΑΤΟΣ	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ
78 μ l Buffer	2 μ l NPN	426 nm	9.350
75 μ l Buffer	5 μ l NPN	422 nm	49.837
70 μl Buffer	10 μl NPN	425 nm	109.800



Εικόνα 27:Διαφορετικές συγκεντρώσεις του Buffer σε συνδυασμό με την NPN.

ΠΟΣΟΤΗΤΑ		ΜΗΚΟΣ ΚΥΜΑΤΟΣ	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ
78 μ l PYR1	2 μ l NPN	426 nm	104.059
75 μ l PYR1	5 μ l NPN	422 nm	115.094
70 μl PYR1	10 μl NPN	425 nm	140.004



Εικόνα 28: Διαφορετικές συγκεντρώσεις της PYR1 σε συνδυασμό με την NPN.

Από τα διαγράμματα παρατηρείται ότι ο υψηλότερος φθορισμός υπάρχει στη μέγιστη ποσότητα της NPN και στα 70 μl της πρωτεΐνης και του Buffer. Επομένως, ο φθορισμός αυξάνεται με την αύξηση της ποσότητας της NPN.

Αποτελέσματα-Συζήτηση

Στην παρούσα διπλωματική πραγματοποιήθηκαν μελέτες στην πρωτεΐνη PYR1 που ανήκει σε μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών κρίνεται σημαντική καθώς συμβάλει στα μονοπάτια σηματοδότησης του ABA, το οποίο μπορεί να αποτελέσει μοριακό εργαλείο για την αντιμετώπιση του αβιοτικού στρες στο βαμβάκι.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα δύο μεθόδων, της ανάλυσης θερμικής μετατόπισης και του ενδογενούς φθορισμού με στόχο την ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου για τη μελέτη σύνδεσης προσδετών στον υποδοχέα. Απώτερος στόχος είναι η χρήση του πρωτοκόλλου για τη διερεύνηση μικρών μορίων(μαζική σάρωση) για την ανακάλυψη νέων ενώσεων κυρίως φυσικής προέλευσης που θα μπορούσαν να συνδεθούν στον υποδοχέα PYR1. Μέσω της ανάλυσης θερμικής μετατόπισης προσδιορίστηκε το T_m της πρωτεΐνης και επιβεβαιώθηκε ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη αναστολέων που είναι υδατοδιαλυτοί ή μπορούν να διαλυθούν σε 1% DMSO καθώς αν χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερη συγκέντρωση αλληλοεπιδρούν και επομένως η συγκεκριμένη ανάλυση δεν ενδείκνυται. Οι μελέτες φθορισμού έδειξαν πως η βέλτιστη συγκέντρωση πρωτεΐνης κατά την οποία λαμβάνεται το βέλτιστο σήμα φθορισμού είναι 0,3 mg/ml ενώ με την παρουσία προσδετών το σήμα ενδογενούς φθορισμού της PYR1 μειώνεται γεγονός που υποδηλώνει πως η μέθοδος αυτή θα μπορούσε να αξιοποιηθεί περαιτέρω για τη μελέτη σύνδεσης μικρών μορίων στην PYR1.

Τέλος, εξετάστηκε η δυνατότητα χρήσης της N-Φαινυλ-1-Ναφθυλαμίνη(NPN) η οποία δίνει ισχυρό σήμα φθορισμού και χρειάζεται περαιτέρω μελέτη βελτιστοποίησης των πειραματικών συνθηκών προκειμένου να επιτραπεί η σύνδεση στην πρωτεΐνη PYR1.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ABA	Αμπισισικό οξύ
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
EGC	Επιγαλλοκατεχίνη
EGCG	Γαλλική Επιγαλλοκατεχίνη
P3G	Πελαργονιδίνη
NPN	N-Φαινυλ-1-Ναφθυλαμίνη
T_m	Θερμοκρασία τήξης

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Ρυθμιστικό διάλυμα A Hepes 20mM, EDTA 1mM, NaCl 50 mM

Hepes m=2,383 g

EDTA 5 ml από Stock 100 mM

NaCl m=1,461 g

Βιβλιογραφία

1. Lohani N, Singh M.B., Bhalla P.L. Biological Parts for Engineering Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Biodes Res.* 2022 Jan 21;2022:9819314. doi: 10.34133/2022/9819314. PMID: 37850130; PMCID: PMC10521667.
2. Kopecká, R., Kameniarová, M., Černý, M., Brzobohatý, B., & Novák, J. (2023). Abiotic Stress in Crop Production. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6603. <https://doi.org/10.3390/ijms24076603>
3. Lee SC, Luan S. ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant Cell Environ.* 2012 Jan;35(1):53-60. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02426.x. Epub 2011 Oct 31. PMID: 21923759.
4. Liang C, Liu Y, Li Y, Meng Z, Yan R, Zhu T, Wang Y, Kang S, Ali Abid M, Malik W, Sun G, Guo S, Zhang R. Activation of ABA Receptors Gene *GhPYL9-11A* Is Positively Correlated with Cotton Drought Tolerance in Transgenic *Arabidopsis*. *Front Plant Sci.* 2017 Aug 23;8:1453. doi: 10.3389/fpls.2017.01453. PMID: 28878793; PMCID: PMC5572150.
5. EL Sabagh, A., Islam, M. S., Hossain, A., Iqbal, M. A., Mubeen, M., Waleed, M., ... & Abdelhamid, M. T. (2022). Phytohormones as growth regulators during abiotic stress tolerance in plants. *Frontiers in Agronomy*, 4, 765068.
6. Mudasir, M., Baig, M. M. A., Sultan, Y., & Baig, A. (2024). Structural and functional characterization of pyrabactin resistance 1-like (PYL) proteins and

- molecular docking analysis provides insight into stress tolerance in *Sorghum bicolor*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1-17.
7. Fidler J, Graska J, Gietler M, Nykiel M, Prabucka B, Rybarczyk-Płońska A, Muszyńska E, Morkunas I, Labudda M. PYR/PYL/RCAR Receptors Play a Vital Role in the Absciscic-Acid-Dependent Responses of Plants to External or Internal Stimuli. *Cells*. 2022 Apr 15;11(8):1352. doi: 10.3390/cells11081352. PMID: 35456031; PMCID: PMC9028234.
 8. Rani V, Maharajan T, Singh S, Joshi DC, Gupta R, Yadav D. Elucidating the role of pyrabactin-like receptors of finger millet under drought and salinity stress: an insight into *in silico*, machine learning and molecular approaches. *Front Genet*. 2025 May 29;16:1598523. doi: 10.3389/fgene.2025.1598523. PMID: 40510809; PMCID: PMC12159037.
 9. Wang, Y., Zhang, G., Zhou, H. *et al.* GhPYL9-5D and GhPYR1-3 A positively regulate Arabidopsis and cotton responses to ABA, drought, high salinity and osmotic stress. *BMC Plant Biol* 23, 310 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04330-8>
 10. Bakun, P., Mlynarczyk, D. T., Koczorowski, T., Cerbin-Koczorowska, M., Piwowarczyk, L., Kolasiński, E., ... & Goslinski, T. (2023). Tea-break with epigallocatechin gallate derivatives—powerful polyphenols of great potential for medicine. *European journal of medicinal chemistry*, 261, 115820.
 11. Ambigaipalan, P., Oh, W. Y., & Shahidi, F. (2020). Epigallocatechin (EGC) esters as potential sources of antioxidants. *Food Chemistry*, 309, 125609.
 12. Kandemir, K., Tomas, M., McClements, D. J., & Capanoglu, E. (2022). Recent advances on the improvement of quercetin bioavailability. *Trends in Food Science & Technology*, 119, 192-200.
 13. Liang, Z., Liang, H., Guo, Y., & Yang, D. (2021). Cyanidin 3-O-galactoside: A natural compound with multiple health benefits. *International journal of molecular sciences*, 22(5), 2261.
 14. Bhuia, M. S., Rahaman, M. M., Islam, T., Bappi, M. H., Sikder, M. I., Hossain, K. N., ... & Sharifi-Rad, J. (2023). Neurobiological effects of gallic acid: Current perspectives. *Chinese medicine*, 18(1), 27.
 15. Tuli, H. S., Rath, P., Chauhan, A., Ramniwas, S., Vashishth, K., Varol, M., ... & Sak, K. (2022). Phloretin, as a potent anticancer compound: from chemistry to cellular interactions. *Molecules*, 27(24), 8819.

16. Tian, L., Cao, J., Zhao, T., Liu, Y., Khan, A., & Cheng, G. (2021). The bioavailability, extraction, biosynthesis and distribution of natural dihydrochalcone: Phloridzin. *International journal of molecular sciences*, 22(2), 962.
17. Han, X., Chen, X., Zheng, X., & Yan, F. (2025). Strawberry anthocyanin pelargonidin-3-glucoside attenuated OA-induced neurotoxicity by activating UPR mt. *Food & Function*, 16(4), 1330-1346.
18. dos Santos Rodrigues, F. H., Delgado, G. G., da Costa, T. S., & Tasic, L. (2023). Applications of fluorescence spectroscopy in protein conformational changes and intermolecular contacts. *BBA advances*, 3, 100091.
19. Anwar, M., Iqbal, M. Z., Abro, A. A., Memon, S., Bhutto, L. A., Memon, S. A., & Peng, Y. (2022). Inter-specific hybridization in cotton (*Gossypium hirsutum*) for crop improvement. *Agronomy*, 12(12), 3158.
20. Qamer, Z., Chaudhary, M. T., Du, X., Hinze, L., & Azhar, M. T. (2021). Review of oxidative stress and antioxidative defense mechanisms in *Gossypium hirsutum* L. in response to extreme abiotic conditions. *Journal of Cotton Research*, 4(1), 9.