



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Της φοιτήτριας
Παναγιώτας Πασχαλίδου
του Ευάγγελου

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ROF1/ROF2 ΣΥΝΕΡΓΑΖΟΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ
ΚΑΤΑ ΤΗ
ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ
*A. thaliana***



Λάρισα 2021

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ROF1/ROF2 ΣΥΝΕΡΓΑΖΟΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ *A. thaliana*

STUDY OF THE ROF1/ROF2 COOPERATING PROTEINS DURING THE DEVELOPMENT OF THERMOTOLERANCE IN *A. thaliana*.

Τριμελής επιτροπή :

Φαρμάκη Θεοδώρα (επιβλέπουσα) : ερευνήτρια Β' Ε.Κ.Ε.Τ.Α –ΙΝΕΒ

Παπαδοπούλου Καλλιόπη (συνεπιβλέπουσα) : Καθηγήτρια τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Αμούτζιας Γρηγόριος : Αναπληρωτής καθηγητής τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας

Περιεχόμενα

ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1. Αβιοτικές καταπονήσεις.....	9
1.1 Θερμοκρασιακές καταπονήσεις	10
2. PPIase	11
2.1 Δεσμός προλίνης	11
2.2 Πρωτεΐνες FKBP με δράση PPIase.....	13
2.3 Δράση PPIase στο <i>A. thaliana</i>	14
3. ROF1 και ROF2 πρωτεΐνες	16
3.1 Δομή και λειτουργία.....	16
4. Σκοπός.....	17
1.1 Οργανολογία	18
2. Τεχνικές.....	19
2.1 Φύτευση, ανάπτυξη φυτών και συλλογή σπόρων από μεταλλάγματα της ROF .	19
2.2 Διαδικασία Heat stress και Protein extraction	20
2.3 Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακικές συνθήκες)	20
2.4 Μονιμοποίηση gel – Coomassie Brilliant blue (SIGMA).....	23
2.5 Silver Staining.....	23
2.6 Ανοσοαποτηπωμα western blot.....	23
2.7 Υποκυτταρική κλασμάτωση – εμπλουτισμός κυτταρικών μεμβρανών.....	25
2.8 Φασματομετρία μάζας.....	26
3. Αποτελέσματα	28
3.1 Συλλογή και χαρακτηρισμός μεταλλαγμάτων ROF πρωτεΐνης στα <i>A. thaliana</i>	28
3.2 Έκφραση της 80 kDa στα μεταλλάγματα της ROF πρωτεΐνης στο <i>A. thaliana</i>	30
3.3 Χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών που δίνουν τη ζώνη των 80 kDa.	33
3.4 Mass Spec analysis και αποτελέσματα	41
ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	48
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51

ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ

ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Ac: acrylamide/ακρυλαμίδη

AgNO₃: νιτρικός άργυρος

APS: ammonium persulfate/υπερθεϊκό αμμώνιο

BSA: bovine serum album in/αλβουμίνη βόειου ορού

DTT: dithiothreitol/ 1,4-διθειοθρειτολη

SDS: sodium dodecylsulfate/ δω δεκακυκλοθεϊκό νάτριο

TEMED: Tetramethylethylenediamine/ τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη

Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane / 2-αμινο-2-(υδροξυμεθυλο)-προπανοδιόλη1,3

ΛΟΙΠΕΣ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ

AT: Acquired Thermotolerance /επίκτητη θερμοανθεκτικότητα

CaN: Καλσινευρίνη

Control: πείραμα ελέγχου

FKBS: FK506-binding proteins/ πρωτεΐνη δέσμησης FK506

Heat stress: θερμική καταπόνηση

Hsfs: heat stress transcription factors / μεταγραφικοί παράγοντες θερμικής καταπόνησης

HSP's: Heat Shock Proteins/ πρωτεΐνες θερμικού σοκ

kDa: kiloDalton

Mass spec: Mass spectrometry, φασματομετρία μάζας

Mutant: μεταλλαγμένο στέλεχος

MQ: Milli-Q water / Milli-Q νερό

N: rof1-/rof2- double knockout /μετάλλαγμα με έλλειψη ROF1 και ROF2 γονιδίων

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis/ ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης

PPIASE: peptyl-prolyl- cis trans isomerase/ cis trans ισομεράση της πεπτιδυλοπρωλίνης

ROF: rotamase

ROFB: ROF1 knockout, μετάλλαγμα με έλλειψη ROF1 γονιδίου

rof2-: ROF2 knockout, μετάλλαγμα με έλλειψη ROF2 γονιδίου

SL: silique, φασολάκι

TPR: tetratricopeptide domain

Western Blot: ανοσοαποτύπωμα τύπου Western

WT: wild type, αγρίου τύπου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διπλώματική αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εθνικό Κέντρο Ερευνάς και Τεχνολογικής ανάπτυξης (Ε.Κ.Ε.Τ.Α), στο Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών (ΙΝ.Ε.Β), το οποίο έχει ενεργή δράση στο ευρύτερο πεδίο των βιοεπιστημών και στον χώρο της έρευνας στην Ελλάδα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη της πτυχιακής εργασίας κυρία Θεοδώρα Φαρμάκη, ερευνήτρια Β', για την πολύτιμη βοήθεια της, τον χρόνο που αφιέρωσε καθώς και για όλες τις γνώσεις που μου μετέφερε και τις πολύτιμες συμβουλές που μου έδινε σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας καθώς και κατά τη διάρκεια της συγγραφής του τελικού κειμένου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη κυρία Μαρίνα Σαμιώτακη, ερευνήτρια στο Β.Σ.Ρ.Σ "Alexander Fleming" η οποία ανέλαβε τα δείγματα μου για την διαδικασία της πρωτεομικής ανάλυσης με φασματομετρία μαζών. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Καλλιόπη Παπαδοπούλου καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, η οποία ανέλαβε να είναι συνεπιβλέπουσα στην τριμελή επιτροπή και τον κύριο Γρηγόριο Αμούτζια, Αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος που δέχτηκε να είναι μέλος της τριμελούς επιτροπής και αποτέλεσε συνδετικό κρίκο για τη συνεργασία μου με την κυρία Φαρμάκη.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους αγαπημένους μου γονείς, την γιαγιά μου αλλά και τους στενούς μου φίλους οι οποίοι πίστεψαν σε εμένα, αποτέλεσαν την κινητήρια δύναμη μου και με στήριξαν καθ' όλη τη διάρκεια της ακαδημαϊκής μου προσπάθειας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε αυτή τη διπλωματική εργασία και στα πλαίσια της μελέτης της θερμικής καταπόνησης στο φυτό *A. thaliana*, πραγματοποιήθηκε απομόνωση, ταυτοποίηση και ανάλυση συνεκφραζόμενων πρωτεϊνών με απώτερο σκοπό τη μελέτη της πιθανής τους συνεργασίας με τις πρωτεΐνες συνοδούς ROF1 και ROF2, γνωστές για τον κεντρικό και καθοριστικό τους ρόλο στην αντίσταση και επιβίωση του φυτού σε υψηλές θερμοκρασίες. Παρατηρήθηκαν διαφορές ανάμεσα σε φυτά WT, ROFB, *rof2*⁻ και N ως προς την συσσώρευση των υπό μελέτη πρωτεϊνών με τα μεταλλάγματα *rof2*⁻ και N να εμφανίζουν την μεγαλύτερη συσσώρευση. Οι πρωτεΐνες αυτές συσσωρεύονται σε μία 80 kDa ζώνη και αναγνωρίζονται από πολυκλωνικό αντίσωμα ειδικευμένο ως προς την αναγνώριση των ROF1 και ROF2. Ο υποκυτταρικός εμπλουτισμός μεμβρανών που ακολούθησε επιβεβαίωσε την αρχική αυτή παρατήρηση και μάλιστα με σήμα της 80 kDa να εμφανίζεται ενισχυμένο στο συνολικό μεμβρανικό κλάσμα των *rof2*⁻ και N. Πρωτεομική ανάλυση/Mass Spec χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που εμπεριέχονται στη συγκεκριμένη ζώνη. Οι κυριότερες πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν στην υπό χαρακτηρισμό 80 kDa ζώνη ήταν η Jacalin-related lectin 34, η Heat shock protein 90-1, η Heat shock 70 kDa protein 6, η Isocitrate lyase, η TSA1-like protein, η Elongation factor G, η Jacalin-related lectin 4, και η 12S seed storage protein CRC, πολλές από τις οποίες εμπλέκονται σε μηχανισμούς αντίστασης των φυτών σε αβιοτικές καταπονήσεις. Η περεταίρω μελέτη τους ενδέχεται να αναδείξει νέους μηχανισμούς οι οποίοι αφορούν την αντοχή των φυτών στο stress.

ABSTRACT

In this thesis and in the context of researching heat stress in *A. thaliana* plants, isolation, identification and analysis of co-expressed proteins was performed, with the ultimate aim of studying their possible synergistic relationships with the protein chaperons ROF1 and ROF2, known for their central and determinant role in plant resistance and survival at high temperature. Differences were observed between WT, ROFB, *rof2*⁻ and N plants in terms of protein accumulation, with the *rof2*⁻ and N mutants showing the highest accumulation. These proteins accumulate in an 80 kDa band and are recognized by a polyclonal antibody specific for the recognition of ROF1 and ROF2. The subcellular enrichment of membranes that followed confirmed this initial observation and in fact with the signal of the 80 kDa band being enhanced in the total membrane fraction of the *rof2*⁻ and N plants. Proteomic analysis / Mass Spec were used in order to identify the proteins contained in this zone. The main proteins that were identified in the designated as 80 kDa band were the following: Jacalin-related lectin 34, Heat shock protein 90-1, Heat shock 70 kDa protein 6, Isocitrate lyase, TSA1-like protein, Elongation factor G, Jacalin-related lectin 4, 12S seed storage protein CRC, many of which are involved in plant resistance mechanisms to abiotic stress. Their further study may reveal new mechanisms related to plant resistance to stress.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Αβιοτικές καταπονήσεις

Τα φυτά αποτελούν σύνθετους οργανισμούς που εξαιτίας του περιορισμού τους στην περιοχή της αρχικής τους βλάστησης εξαναγκάζονται να έρχονται αντιμέτωποι με τις συνεχώς μεταβαλλόμενες συνθήκες που καθορίζονται από το περιβάλλον τους. Οι μεταβολές αυτές μπορεί και να είναι δυσμενείς ή συνθήκες πίεσης οι οποίες θα επηρεάσουν την αύξηση και την ανάπτυξη τους. Αυτές διακρίνονται σε βιοτικό στρες, για παράδειγμα μόλυνση από παθογόνους μικροοργανισμούς ή επίθεση από φυτοφάγα ζώα και αβιοτικό στρες, όπως η ξηρασία, το κρύο, η ζέστη, η περίσσεια αλάτων ή τοξικών μετάλλων στο έδαφος και η έλλειψη θρεπτικών συστατικών. Οι αρνητικές επιπτώσεις των αβιοτικών καταπονήσεων επιδεινώνονται από τις κλιματικές αλλαγές οι οποίες προκαλούν την αυξημένη συχνότητα ακραίων καιρικών φαινομένων. (Zhu, 2017)

Τα φυτά με στόχο την επιβίωση και ευδοκίμηση τους ανέπτυξαν πολυάριθμους και ευέλικτους μηχανισμούς, ώστε να προσαρμόζονται άμεσα. Η προσαρμογή τους χαρακτηρίζεται από γενετικές αλλαγές στο σύνολο ενός φυτικού πληθυσμού οι οποίες καθιερώνονται μέσω της φυσικής επιλογής στο πέρασμα πολλών γενεών. Αντίθετα τα μεμονωμένα άτομα από κάποιο φυτικό είδος αποκρίνονται σε περιβαλλοντικές αλλαγές με τη βοήθεια άμεσων λειτουργικών ή μορφολογικών τροποποιήσεων που τους βοηθούν να ανταπεξέλθουν άμεσα στις νέες συνθήκες. Δεν είναι αναγκαίες νέες γενετικές τροποποιήσεις και στη περίπτωση που η εκ γενετής απόκριση του φυτού προβλέπει την επιβίωση του σε δυσμενείς συνθήκες, έπειτα από επαναλαμβανόμενη έκθεση σε περιβαλλοντικές πιέσεις, τότε η προσαρμογή του φυτού θεωρείται εγκλιματισμός (acclimation). Οι αποκρίσεις αυτές μπορεί να αναφερθούν και ως φαινοτυπική πλαστικότητα (phenotypic plasticity) και αποτελούν παροδικές τροποποιήσεις στη δομή και τη λειτουργία του του μεμονωμένου ατόμου, που είναι δυνατόν να αναστραφούν εάν μεταβληθούν οι επικρατούσες συνθήκες του περιβάλλοντος. Η γενετική προσαρμογή σε συνδυασμό με τη φαινοτυπική πλαστικότητα συμβάλλουν στην συνολική ανεκτικότητα που παρουσιάζει το φυτό σε συνθήκες του αβιοτικού περιβάλλοντος.

Τα φυτά για να αναπτυχθούν χρειάζονται ενέργεια την οποία προσλαμβάνουν από το φως, νερό, άνθρακα καθώς και ανόργανα θρεπτικά συστατικά. Ως αβιοτική καταπόνηση ορίζεται η συνθήκη η οποία μειώνει την ανάπτυξη αλλά και την απόδοση κάτω από από τα βέλτιστα επίπεδα (Cramer et al.2011). Όταν οι παράγοντες αυτοί διαφέρουν από το συνηθισμένο εύρος στο οποίο κυμαίνονται συνήθως, θα προκληθούν πρωταρχικές και δευτερεύουσες φυσιολογικές και βιοχημικές μεταβολές στα φυτά σαν απόκριση. Τα φυτά που δεν είναι γενετικά προσαρμοσμένα στα διάφορα ακραία περιβάλλοντα θα ενεργοποιήσουν έναν αριθμό μηχανισμών για να αντιμετωπίσουν επιτυχώς τις επερχόμενες διαταραχές.

Οι όροι ανθεκτικότητα στην καταπόνηση (stress resistance) και ανεκτικότητα στην καταπόνηση (stress tolerance) γίνονται περισσότερο κατανοητοί ως διαφορετικοί τύποι φαινοτυπικής πλαστικότητας, δηλαδή τον τρόπο που ένα συγκεκριμένο φυτό (γονότυπος) θα ανταποκριθεί σε μια μεταβολή του αβιοτικού περιβάλλοντος του.

Συνοψίζοντας, η ικανότητα ενός φυτού να ευδοκιμεί και να επιβιώνει σε συγκεκριμένο περιβάλλον σχετίζεται άμεσα με την ισορροπία που δημιουργείται ανάμεσα στην προσαρμογή αλλά και την φαινοτυπική πλαστικότητα.

1.1 Θερμοκρασιακές καταπονήσεις

Τα περισσότερα φυτά παρουσιάζουν ένα εύρος τιμών θερμοκρασίας το οποίο αποτελεί το βέλτιστο για την ανάπτυξη τους καθώς και την αύξηση τους. Στη περίπτωση που η περιβαλλοντική θερμοκρασία κυμαίνεται εκτός των ορίων αυτών θα παρατηρηθούν διαταραχές στο φυτό. Οι επιπτώσεις που προκύπτουν θα εξαρτηθούν από το πόσο έντονη είναι και πόσο θα διαρκέσει η θερμοκρασιακή καταπόνηση. Γενικά προκαλούνται βλάβες στις μεμβράνες αλλά και στις παραγόμενες πρωτεΐνες και επηρεάζεται και η διαδικασία της φωτοσύνθεσης. Για τα περισσότερα φυτά το ανώτατο όριο ανοχής είναι η θερμοκρασία των 50-55 οC. Το όριο αυτό εξαρτάται από την υδατική κατάσταση των ιστών(Wahid A,2007).

Πιο ειδικά οι υψηλές θερμοκρασίες θα αυξήσουν τη ρευστότητα των μεμβρανικών λιπιδίων το οποίο δημιουργεί προβλήματα στην περατότητα και τις καταλυτικές τους ιδιότητες. Μειώνεται η ισχύς των δεσμών υδρογόνου αλλά και των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στις πολικές ομάδες των πρωτεϊνών της υδατικής φάσης της μεμβράνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να χαθεί η απαραίτητη για τη σωστή λειτουργία των ενζύμων και των δομικών μονάδων τρισδιάστατη δομή.

Η θερμική καταπόνηση επηρεάζει τη φωτοσύνθεση και την αναπνοή αναστέλλοντας τις διαδικασίες αυτές με την φωτοσύνθεση να αναστέλλεται σε υψηλότερο βαθμό γεγονός που προκαλεί έλλειψη ισορροπίας μεταξύ αναπνοής και φωτοσύνθεσης. Ακόμη λόγω της καταπόνησης επηρεάζουν τη διαδικασία του κλεισίματος των στομάτων που βρίσκονται στην επιφάνεια των φύλλων γεγονός το οποίο συνεπάγεται και μείωση της φωτοσυνθετικής επιφάνειας άρα και μείωση της φωτοσυνθετικής ικανότητας.

Η επίκτητη θερμοανθεκτικότητα AT είναι η ικανότητα που διαθέτουν οι φυτικοί οργανισμοί να αντιμετωπίζουν επαναλαμβανόμενες θανατηφόρες αυξήσεις της θερμοκρασίας. Οι μηχανισμοί της AT οδηγούν στη παραγωγή πρωτεϊνών τσαπερονών μοριακοί συνοδοί, FKBP, Heat shock proteins HSPs). Οι πρωτεΐνες αυτές παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες, ανεξάρτητα από το φυτικό είδος, ενώ η λειτουργία τους συνδέεται άμεσα με την ικανότητα επιβίωσης σε υψηλές θερμοκρασίες. Η σύνθεσή τους είναι ταχεία, ενώ τα υπεύθυνα mRNAs μπορεί να κάνουν την εμφάνισή τους μέσα σε 3 έως 5 λεπτά και οι HSPs μέσα σε 30 λεπτά από την εφαρμογή της θερμικής καταπόνησης. Οι περισσότερες HSPs συμπεριφέρονται

ως τσαπερόνες και ο λειτουργικός τους ρόλος αφορά τη σταθεροποίηση ευαίσθητων πρωτεϊνών ή πρωτεϊνικών συμπλόκων, την αναδίπλωση ή χαλάρωση πολυπεπτιδίων, τη προστασία πρωτεϊνών από τη θερμική καταπόνηση, αλλά και τη μεταφορά πρωτεϊνικών μορίων σε ένα συγκεκριμένο υποκυτταρικό διαμέρισμα ή τη διάθεσή τους για αποικοδόμηση

Οι Hsfs των φυτών παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην απόκριση τους σε διάφορες αβιοτικές καταπονήσεις ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων όπως οι Hsps. Στο φυτό *A. thaliana* 21 γονίδια που ανήκουν σε αυτή την οικογένεια και με την HsfA2 πρωτεΐνη να αποτελεί τον κυρίαρχο Hsf εξαιτίας της υψηλής ικανότητας ενεργοποίησης μεταγραφής γονιδίων Hsf και ισχυρής συσσώρευσης υπό συνθήκες μακροχρόνιου HS ή επαναλαμβανόμενων κύκλων HS και επανάκαμψης. Έχει βρεθεί πως ένα μέλος της οικογένειας των FKBP, η ROF1 του *Arabidopsis* συμμετέχει στην AT επηρεάζοντας τον μεταγραφικό μηχανισμό της HsfA2. Η ROF1 (FKBP62) και η ROF2 (FKBP65) δρουν ως αρνητικοί ρυθμιστές για την HSFA2 μεταγραφική δραστηριότητα.

2.ΡΡΙΑSE

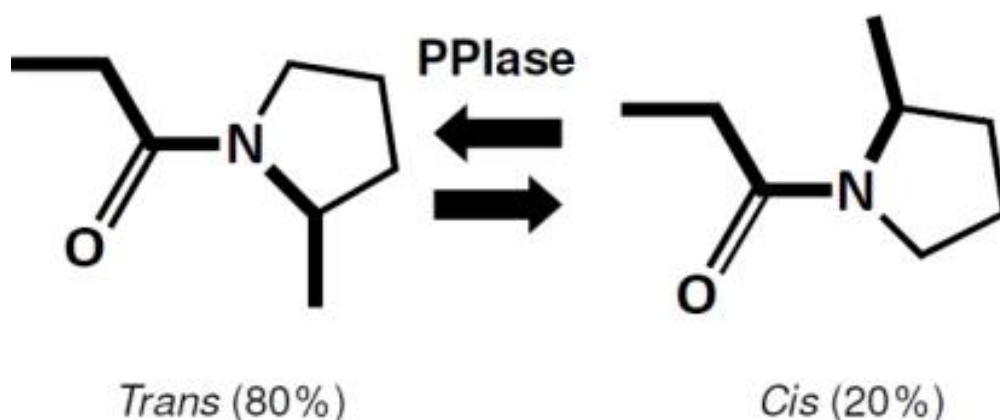
2.1 Δεσμός προλίνης

Ο πεπτιδικός δεσμός ο οποίος αναπτύσσεται μεταξύ αμινοξέων είναι επίπεδος. Αυτή η γεωμετρική προτίμηση στη φύση που έχει ο χημικός δεσμός του πεπτιδίου, ο οποίος έχει εν μέρη χαρακτηριστικά διπλού δεσμού κάτι το οποίο τον αποτρέπει από το να περιστρέφεται γύρω από τον εαυτό του. Η επίπεδη φύση του δεσμού μπορεί να εξηγηθεί από το τι ο πεπτιδικός δεσμός δεν περιστρέφεται άρα περιορίζεται ο αριθμός των στερεοδιατάξεων του πεπτιδικού δεσμού.

Για έναν πεπτιδικό δεσμό μπορούν να υπάρξουν μόνο δύο διαμορφώσεις, η cis και η trans. Στη cis διαμόρφωση οι δύο α-άνθρακες είναι στην ίδια πλευρά του πεπτιδικού δεσμού, αντίθετα στην trans βρίσκονται απέναντι. Σχεδόν όλοι οι πεπτιδικοί δεσμοί στις πρωτεΐνες έχουν διαμόρφωση trans, αυτό συμβαίνει επειδή οι αλλοστερικές αλληλεπικαλύψεις των ομάδων οι οποίες συνδέονται στα α-άτομα άνθρακα παρεμποδίζουν την διαμόρφωση cis και έτσι παραμένει ελεύθερη μόνο η trans διαμόρφωση, οδηγώντας έτσι σε μια προτίμηση για την trans. Εξαιρεση αποτελεί ο δεσμός πεπτιδυλοπρόλίνης που σχηματίζεται μεταξύ ενός αμινοξέος X και της προλίνης (X-Pro). Οι δεσμοί της προλίνης έχουν διαμόρφωση cis επειδή το άζωτο της προλίνης βρίσκεται δεσμευμένο σε δυο τρετρασθενή άτομα άνθρακα, κάτι το οποίο περιορίζει τις στερικές διαφοροποιήσεις μεταξύ cis και trans μορφών. Η στερεοδιάταξη cis θα παραμείνει ακόμη και έπειτα από την αντικατάσταση της cis- προλίνης με διαφορετικό αμινοξύ. Η προλίνη είναι ένα ιδιαίτερο αμινοξύ που μπορεί και επηρεάζει την πρωτεϊνική αρχιτεκτονική εξαιτίας του δακτυλίου της δομής της ο οποίος την καθιστά πιο άκαμπτη σε σχέση με άλλα αμινοξέα.

Για να αποκτήσουν βιολογική δράση οι πρωτεΐνες θα πρέπει να αναδιπλώθουν για να δημιουργηθεί η τρισδιάστατη δομή τους, την οποία καθορίζει η αμινοξική αλληλουχία τους. Οι μοριακοί συνοδοί (molecular chaperons) είναι πρωτεΐνες οι οποίες λειτουργούν ως καταλύτες στην σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών και στον σχηματισμό μακρομοριακών συμπλόκων. Οι μοριακοί συνοδοί παρεμποδίζουν τα υδρόφοβα τμήματα των πρωτεϊνών να έρθουν σε επαφή με άλλα υδρόφοβα μόρια και βοηθούν στην αποφυγή σχηματισμού αδιάλυτων συσσωματωμάτων. Αρχικά πολλά από αυτά τα μόρια ταυτοποιήθηκαν ως πρωτεΐνες οι οποίες επάγονται κατά την διάρκεια της έκθεσης των κυττάρων σε υψηλές θερμοκρασίες και για αυτό ονομάστηκαν πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock proteins, HSPs). Οι HSPs αναδιπλώνουν άλλες πρωτεΐνες και βοηθούν στην επαναδίπλωση τους έπειτα από μερική αποδιάταξη λόγω της έκθεσης τους σε υψηλές θερμοκρασίες. Επίσης οι μοριακοί συνοδοί συμμετέχουν και στην μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβρανικά οργανίδια και έχουν την ικανότητα να κάνουν ποιοτικό έλεγχο σε πρωτεΐνες του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ). Οι νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες μεταφέρονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, εκεί αποκτούν τις ανώτερες δομές τους με την βοήθεια από τους μοριακούς συνοδούς αλλά και άλλων παραγόντων που βοηθούν στην αναδίπλωση. Έπειτα οι πρωτεΐνες που έχουν αναδιπλωθεί σωστά θα μεταφερθούν στο σύμπλεγμα Golgi και στη συνέχεια καταλήγουν στο σωστό μεμβρανικό οργανίδιο ή στον εξωκυττάριο χώρο. Μηχανισμοί ποιοτικού ελέγχου της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης ανιχνεύουν τις πρωτεΐνες οι οποίες δεν έχουν αναδιπλωθεί σωστά και ανακατευθύνονται με διαφορετικό μηχανισμό στην ουβικουιτίνωση των λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και στην αποικοδόμηση τους από τα πρωτεασώματα.

Τα κύτταρα πέρα από τους μοριακούς συνοδούς, διαθέτουν και ένα ακόμη τύπο ενζύμου που καταλύει την αναδίπλωση πρωτεϊνών, που ονομάζεται cis-trans ισομεράση της πεπτιδυλοπρολίνης (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-PPIase). Αυτές καταλύουν τον ισομερισμό ανάμεσα στη cis και trans διαμόρφωση των πεπτιδικών δεσμών που προηγούνται των καταλοίπων της προλίνης.



Εικόνα 1: Διάγραμμα απεικόνισης της αντίδρασης cis-trans ισομερίωσης που καταλύεται από τις PPIases. Το 80% του δεσμού αυτού καταλαμβάνει trans διαμόρφωση ενώ το 20% cis.

2.2 Πρωτεΐνες FKBP με δράση PPIase

Οι πρωτεΐνες που έχουν PPIase λειτουργία ταξινομούνται σε τρεις οικογένειες ενζύμων. Αυτές είναι οι πρωτεΐνες που συνδέονται στην FK506(FKBP- FK506-binding proteins), οι παρβουλίνες και οι κυκλοφορίνες. Οι PPIase οι οποίες είναι γνωστές και ως ροταμάσες (ROF) έχουν την ικανότητα να καταλύουν τον ισομερισμό του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ μια προλίνης και ενός υπολείμματος μεγάλου όγκου. Αυτή η αντίδραση είναι αργή(10-100sec σε θερμοκρασίες δωματίου και ουδέτερο pH) και ξεκινάει μετά την πρωτεϊνική σύνθεση, κατά την οποία δημιουργούνται πεπτιδικοί δεσμοί στην αμινομάδα της προλίνης. Η αμφίδρομη μετατροπή cis-trans , που μπορεί να επιτευχθεί μέσω των PPIase είναι υψηλής σημασίας για την τελική πρωτεϊνική δομή, καθώς η cis προλίνη εισάγει καμπύλες μέσα στην πρωτεΐνη(Harrar et al., 2001).

Οι FKBP βρίσκονται σε όλες τις τάξεις των οργανισμών. Κάποιες από αυτές είναι πολύ καλά συντηρημένες, ενώ άλλες εμφανίζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση. Ο κυριότερος ρόλος τους είναι ότι δρουν ως υποδοχείς για ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες. Όμως οι πιο πολλές κυτταρικές λειτουργίες των FKBP παραμένουν άγνωστες. Χωρίζονται σε χαμηλού μοριακού βάρους (μικρές) και σε υψηλού(μεγάλες).

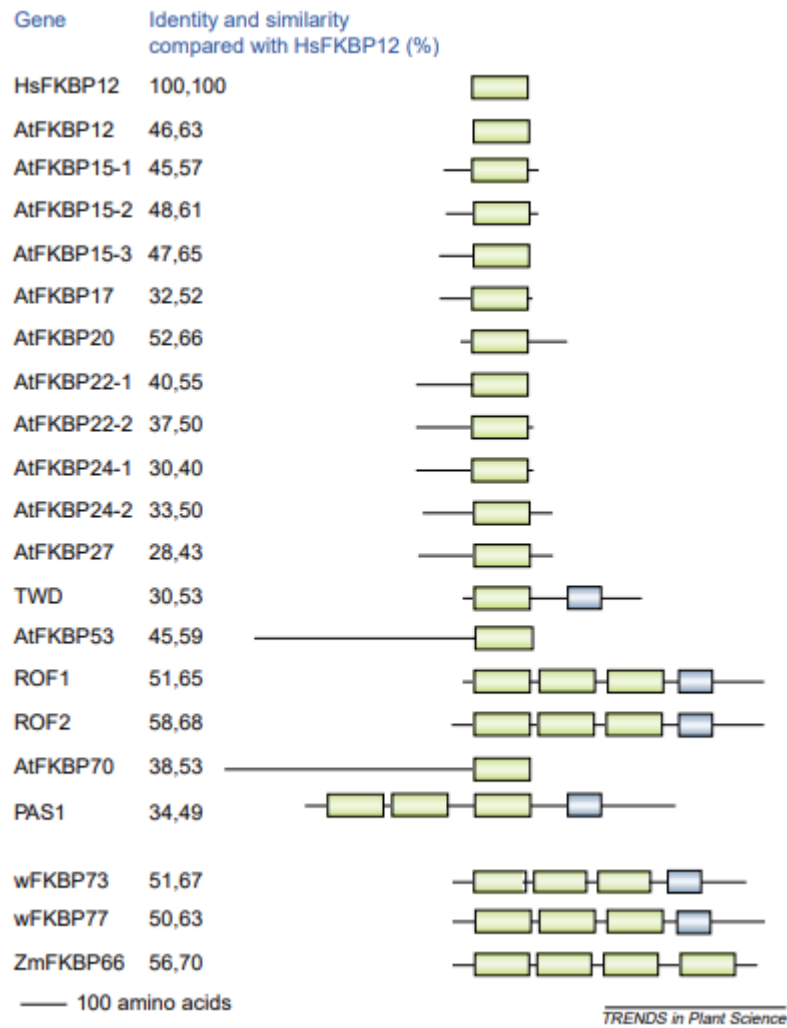
Η FKBP12 αποτελεί την ελάχιστη πεπτιδική αλληλουχία που φιλοξενεί τις ιδιότητες των FKBP. Ο πυρήνας της πρωτεΐνης είναι υδρόφοβος και σχηματίζει τον θύλακα δέσμευσης ορίζεται από δέκα αμινοξέα τα οποία είναι Υψηλά συντηρημένα ανάμεσα στις διαφορετικές ισομορφές. Παρουσία της FK506, Η FKBP12προσδένεται στην Β ρυθμιστική υπομονάδα της ασβεστο-εξαρτώμενης φωσφατάσης της καλσινευρίνης (CaN), παρεμποδίζοντας την πρόσβαση του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο της Α ρυθμιστικής υπομονάδας. Με την αναστολή της CaN προκαλείται η καταστολή της δράσης των T-λεμφοκυττάρων σε θηλαστικά (Harrar et al., 2001).

Οι FKBP που ανήκουν στις μεγάλες διαφοροποιούνται από την FKBP12 επειδή περιέχουν μια ή παραπάνω περιοχές που μοιάζουν με αυτή της FKBP12, μια περιοχή που αποτελείται από επαναλήψεις του τετρατρικοπεπτιδίου (tetraatricopeptide domain-TPR) που αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες αλλά και από ένα καρβοξυτελικό άκρο που συνήθως συνδέεται με καλμοδουλίνη. Οι FKBP51 και FKBP52 αποτελούν τις καλύτερα χαρακτηρισμένες μεγάλες FKBP στα θηλαστικά. Η TPR περιοχή τους επιτρέπει την αλληλεπίδραση με την HSP90(πρωτεΐνη θερμικού σοκ). Η FKBP52, in vitro, έχει αποδειχθεί από βιοχημικές μελέτες, πως δρα ως μοριακός συνοδός, καταστέλλει την συσσώρευση συνθάσης κιτρικού ενώ βοηθά στην συσσώρευση ενδιάμεσων αναδιπλώσεως. Επίσης βρέθηκε πως αλληλεπιδρά με την καλμοδουλίνη μέσω του καρβοξυτελικού της άκρου. (Harrar et al., 2001).

2.3 Δράση PPIase στο *A. thaliana*

Στο *A. thaliana* υπάρχουν 23 FKBP, οι 16 από αυτές αποτελούνται από μία υπομονάδα ενώ οι 7 από πολλαπλές. Οι FKBP που αποτελούνται από μία υπομονάδα έχουν σχέση με τους χλωροπλάστες και τον θυλακοειδή τους με εξαίρεση 5 από αυτές οι οποίες φυλογενετικά είναι πιο όμοιες με αυτές τις οποίες αποτελούνται από πολλές υπομονάδες. Αυτές με εξαίρεση τα μιτοχόνδρια βρίσκονται σε όλα τα διαμερίσματα του κυττάρου και οι λειτουργίες τους δεν σχετίζονται με τη φωτοσύνθεση.

Από τις FKBP αρκετές δρουν ως PPIase απ' όπου προκύπτει και το συμπέρασμα ότι έχουν σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Επίσης βρέθηκε πως παίζουν λειτουργικό ρόλο στον έλεγχο της ανάπτυξης των φυτών καθώς συμμετέχουν στη ρύθμιση μονοπατιών από φυτικές ορμόνες καθώς στρατολογούν πρωτεΐνες στόχους με την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης -πρωτεΐνης. Κάποιες από τις FKBP που έχουν δράση PPIase, για παράδειγμα οι πρωτεΐνες ROF, βρέθηκε ότι επάγονται έπειτα από τραυματισμούς και άλλους στρεσογόνους παράγοντες όπως το Heat Stress.



Εικόνα 2: Διαφορές των FKBP's στα φυτά. Σύγκριση δομικών περιοχών ανάμεσα στις FKBP's της *A. thaliana*, του ανθρώπου (HsFKBP12), του σιταριού (wFKBP73, wFKBP77) και καλαμποκιού (ZmFKBP66). Οι όμοιες περιοχές (παρουσιάζονται με πράσινο). FKBP12: ελάχιστη πεπτιδική αλληλουχία που περιέχει και τις δυο χαρακτηριστικές ιδιότητες των FKBP's (δέσμευση φαρμάκου και δραστικότητα ΡΡ1άσης). Παρουσιάζεται το ποσοστό ομοιότητας με την ανθρώπινη (HsFKBP12). Οι TRP περιοχές (συμβολίζονται με μπλε) (Harrar et al., 2001)

3. ROF1 και ROF2 πρωτεΐνες

3.1 Δομή και λειτουργία

Οι FKBP62/ROF1 και FKBP65/ROF2 είναι δύο πρωτεΐνες του *A. thaliana* που σχετίζονται στενά μεταξύ τους. Οι λειτουργίες τους είναι διακριτές, ως μοριακοί βοηθοί/συνοδοί (chaperons) ή ως PPIase. Αντίθετα με τις ομόλογες τους που υπάρχουν στα θηλαστικά, έχουν 3 FKBD(FK506-binding domains), με την τρίτη από αυτές να παραμένει άγνωστη η λειτουργία της. Παράγοντες που θα επηρεάσουν την έκφραση τους είναι διάφορα είδη στρες, όπως η υψηλή αλατότητα ή ο τραυματισμός του φυτού (Karali et al.,2012 and Oxley et al.,2013). Η ROF2 φαίνεται να είναι αυτή που η έκφραση της επάγεται από τις θερμικές καταπονήσεις, ενώ έχει προταθεί πως η ROF1 είναι αυτή που αλληλεπιδρά με HSP και όχι η ROF2 (Geisler,2007).

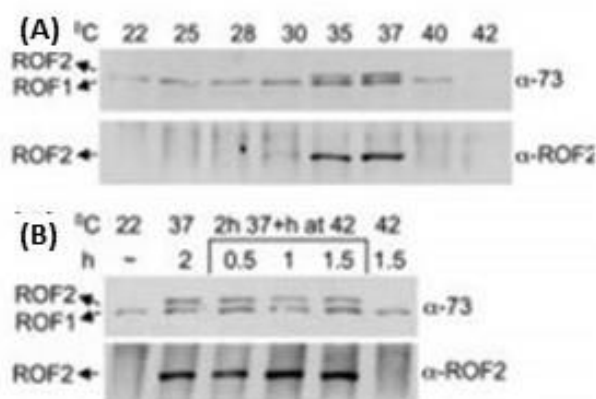
Η ROF2 πρωτεΐνη του *A. thaliana* είναι ομόλογη της ROF1 και τα γονίδια τους μοιράζονται περίπου το 85% της αλληλουχίας–ταυτότητας τους καθώς και παρόμοιες δομικές περιοχές.

Και οι δυο πρωτεΐνες αποτελούνται από αρκετές λειτουργικές επικράτειες. Πιο συγκεκριμένα 3 PPIase επικράτειες, μια επικράτεια TPR και μια για τη σύνδεση του μορίου της καλμοδουλίνης. Η πρώτη επικράτεια PPIase που αναφέραμε έχει δράση πεπτιδυλο-προπυλο cis-trans ισομεράσης και θέση σύνδεσης για τη FK506 ενώ οι άλλες δυο περιοχές PPIase διατηρούν μόνο μερική ταυτότητα του λειτουργικού τους τομέα.(Meiri et al., 2010)

Οι πρωτεΐνες ROF1 και ROF2 του *A. thaliana* λειτουργούν ως μοριακοί βοηθοί (chaperons) ή ως PPIase. Και οι δυο πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται από ιστοειδικότητα και παροδική έκφραση τα οποία ελέγχονται αναπτυξιακά. Η ROF1 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3 και η ROF2 στο 5. Η έκφραση τους ως απάντηση σε θερμική καταπόνηση είναι διαφορετικά ρυθμιζόμενη παρόλο που η οι δυο αυτές πρωτεΐνες μοιράζονται το 85% της γονιδιακής ταυτότητας τους. Το μεγάλο ποσοστό της ομοιότητας αυτών φαίνεται να προκύπτει λόγω γονιδιακού αναδιπλασιασμού.

Η ROF1 αποδείχθηκε πως αλληλεπιδρά με την HSP90 στη περιοχή του κυτταροπλάσματος, μετά από την έκθεση σε θερμική καταπόνηση εμφανίζεται το σύμπλεγμα ROF1-HSP90 στον πυρήνα. Τα γενετικά προφίλ έκφρασης των ROF1 και ROF2 δείχνουν πως η έκφραση τους ρυθμίζεται από το αναπτυξιακό στάδιο και από παράγοντες αβιοτικού στρες. Παρόλο που τα επίπεδα και των δύο πρωτεϊνών αυξάνονται κατά τη διάρκεια Heat Stress μόνο η ROF2 εντοπίζεται μόνο μετά από έκθεση σε θερμότητα. Άρα κοινό χαρακτηριστικό είναι ότι τα δυο γονίδια επάγονται σε φυτά τα οποία έχουν εκτεθεί σε θερμοκρασία 37C αλλά μόνο η ROF2 είναι πραγματική πρωτεΐνη θερμικής καταπόνησης που δεν παρατηρείται η έκφραση της σε φυτά τα οποία μεγαλώνουν στους 22C. Αυτό προκύπτει από τη παρατήρηση ότι η ROF1 εκφράζεται σε όλους τους ιστούς που απομονωθήκαν από φυτά που αναπτυχθήκαν στους 22 C και μετά από έκθεση τους στους 37C ενώ

μεταγραφήματα ROF2 δεν βρέθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Ακόμη έχει βρεθεί πως σε βλαστίδια τα οποία έχουν εκτεθεί σε θερμική καταπόνηση σε θερμοκρασίες μεταξύ των 22-42 °C η ROF1 εκφράζεται σε όλες τις θερμοκρασίες εκτός από αυτή των 42 βαθμών ενώ η ROF2 είναι ανιχνεύσιμη μόνο στο πλαίσιο των 35-37 °C. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ROF2 επάγεται μόνο σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης και σε ένα αυστηρό πλαίσιο θερμοκρασιών. Όταν τα βλαστίδια εκτεθήκαν απευθείας στη θερμοκρασία των 42°C δεν ανιχνεύθηκε καθόλου η ROF2, ενώ όταν έγινε μετάβαση πρώτα στους 37°C και έπειτα στους 42°C η ROF2 που εμφανίστηκε 37°C στους παρέμεινε σταθερή για μιάμιση ώρα στους 42°C. Οδηγήθηκαν έτσι στο συμπέρασμα πως η ROF2 απουσιάζει στους 42 °C επειδή σταματάει να παράγεται και όχι λόγω αστάθειας της πρωτεΐνης σε αυτή τη θερμοκρασία. (Aviezer-Hagai et al., 2007)



Εικόνα 3: Έκφραση των πρωτεϊνών ROF1 και ROF2 σε βλαστίδια (14 ημερών) που έχουν υποστεί θερμική καταπόνηση. **A)** Εξαρτώμενη από τη θερμοκρασία έκφραση της ROF1 και ROF2 σε βλαστίδια που έχουν εκτεθεί σε 25°C-42 °C για τρεις ώρες. **B)** Βλαστίδια που επώαστηκαν στους 37 °C για 2 ώρες, και ακολούθησε επώαση μισής με μιάμισης ώρας στους 42 °C και βλαστίδια που είχαν εκτεθεί απευθείας στους 42 °C για μιάμιση ώρα. Σε όλες τις περιπτώσεις τα δείγματα Control ήταν βλαστίδια που επώαστηκαν στους 22 °C (Aviezer-Hagai et al., 2007)

4. Σκοπός

Έχοντας στην διάθεση μας σπόρους *A. thaliana* αγρίου τύπου (WT) αλλά και από διάφορα μεταλλάγματα τις ROF1 και ROF2 (*rof2*⁻, ROFB και N) μελετήσαμε την επιρροή του Heat stress (37°C) στο *A. thaliana* και πιο συγκεκριμένα στην έκφραση πρωτεϊνών και μορίων συνοδών που σχετίζονται με την θερμοανθεκτικότητα (HSPs, ROF1/ROF2). Επίσης έγινε μελέτη ζώνης η οποία εμφανίζεται στα 80 kDa, στα μεταλλάγματα της ROF έπειτα από Heat stress. Τα πειράματα έγιναν κάτω από συνθήκες Heat stress σε θερμοκρασίες των 37°C και άνω και οι αναλύσεις σε εκχυλίσματα από βλαστίδια του *A. thaliana* έπειτα από extractions, Western Blotting και φασματομετρία μάζας.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 Οργανολογία

Συσκευή ηλεκτροφόρησης : AmershamBiosciences/SerialNo. 20134676

Electrophoresis Power Supply : AmershamBiosciences EPS 3501 XL

Multiple Gel Caster : Amersham Biosciences

Glass plates: Amersham Biosciences

Spacers : Amersham Biosciences

Συσκευή Transfer : BIO-RAD /Serial No.42S/0454

Πιπέτες: Amersham Biosciences

Vortex: Scientific Industries

Magnetic Stirrer – hot plate : BIO line scientific c / Serial No.200304-002

Ζυγαριά: Adventurer Pro /AV812

Ζυγαριά υψηλής ευαισθησίας: KERN /ALJ 220-4

Φυγόκεντρος: centrifuge 5424/Eppendorf Ag

Heat Block: KLEINFELD/MBD 250

Συσκευή εμφάνισης Western: GENE GNOME –SYNGENE BIO IMAGING

Walk in chamber (θάλαμος ανάπτυξης): CRW Walk In 32 CMP2/THC/45KT/CDR

Για την βιοπληροφορική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε:

- Το πρόγραμμα Perseus
- Οι ιστοσελίδες <https://www.uniprot.org/>, <http://ppdb.tc.cornell.edu/>, <http://pfam.xfam.org/>

2. Τεχνικές

2.1 Φύτευση, ανάπτυξη φυτών και συλλογή σπόρων από μεταλλάγματα της ROF

Επιλέχθηκαν σπόροι από μεταλλάγματα του *A. thaliana* για τη ROF από την συλλογή που υπήρχε στο εργαστήριο. Πιο συγκεκριμένα για την διαδικασία αναπαραγωγής χρησιμοποιήσαμε σπόρους ROFB red, σπόρους *rof2*⁻ RNA silenced, *rof2*⁻ T-DNA και *rof2*⁻ από ήδη χαρακτηρισμένα μεταλλάγματα. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε γλάστρες οι οποίες ήταν ομαδοποιημένες σε διαφορετικό δίσκο για το κάθε τύπο μεταλλάγματος ώστε να αποφευχθεί κάποια επιμόλυνση μεταξύ τους. Οι σπόροι μεταφέρθηκαν σε ειδικό θάλαμο ανάπτυξης. Ο θάλαμος διατηρούσε σταθερές και ελεγχόμενες τις συνθήκες θερμοκρασίας (22 °C), της υγρασίας αλλά και της φωτοπεριόδου (16/8 d/n). Τα φυτά ποτίζονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα τα οποία διαφοροποιούνταν σύμφωνα με τις ανάγκες του φυτού σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Κατά το διάστημα της ανθοφορίας των φυτών και λόγω της αύξησης τους σε ύψος χρησιμοποιήθηκαν στηρίγματα στα οποία στηρίχτηκαν τα φυτά. Υστέρα από τη πάροδο του απαραίτητου χρόνου για την ωρίμανση των σπόρων, αυτοί συλλέχθηκαν από τα καλλιεργούμενα φυτά και δημιουργήθηκε μια βιβλιοθήκη μεταλλαγμάτων της ROF και αποθηκεύτηκε στο εργαστήριο.

2.2 Διαδικασία Heat stress και Protein extraction

Για να πραγματοποιήσουμε εκχύλιση πρωτεΐνης (protein extraction) χρησιμοποιήσαμε βλαστίδια των φυτών που θέλαμε να μελετήσουμε, τα οποία παίρναμε μετά από επώαση των σπόρων για 5 ημέρες σε κύστες που περιείχαν ειδικό χαρτί Whatman και ήταν οριακά εμποτισμένοι με απεσταγμένο νερό. Επίσης οι κύστες ήταν καλυμμένες με γυάλινο σκέπαστρο ώστε να διατηρείται η υγρασία. Επίσης εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν και σε άνθη φυτού (flower buds) του *A. thaliana*.

Τα δείγματα μας πριν προχωρήσουμε στην εκχύλιση υπέστησαν heat stress σε thermoblock. Τα δείγματα μέσα στις κύστες τοποθετούνταν επάνω στο thermoblock, σκεπάζονταν με το γυάλινο κάλυμμα και κάτω από το κάλυμμα τοποθετούνταν ένα θερμόμετρο ώστε να ελέγχεται ακριβώς η θερμοκρασία στην οποία είχαμε τα φυτά μας. Για τη διαδικασία του θερμικού σοκ τα φυτά μας επώαστηκαν στους 37°C στη θερμική πλάκα για δυο ώρες, έπειτα αυξήσαμε τη θερμοκρασία στους 37.5 °C για περίπου μιάμιση ώρα και εν τέλει αφήσαμε τα δείγματα στους 38 °C για άλλη μιάμιση ώρα.

Μετά πραγματοποιήσαμε πρωτεϊνική εκχύλιση στα φυτά μας χρησιμοποιώντας polytron με κατάλληλο αντάπτορα για Eppendorf tubes. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε ισάριθμη ποσότητα φυτών (περίπου 50 φυτάκια). Η ποσότητα του ρυθμιστικού διαλύματος (sample buffer) που χρησιμοποιήσαμε καθορίστηκε με βάση τη ποσότητα του δείγματος που είχαμε αλλά σε γενικές γραμμές κυμάνθηκε ανάμεσα στα 150 μl με 300 μl SB με τα περισσότερα δείγματα να χρειάζονται 200 μl SB.

2.3 Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακικές συνθήκες)

Κατά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου και κινούνται μέσω των πόρων που υπάρχουν στη πηκτής γέλης. Η ταχύτητα (U) με την οποία θα μετακινηθεί η κάθε πρωτεΐνη καθορίζεται από τον κανόνα $U = E \cdot Z / f$. Με το E να συμβολίζει την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, το Z να αποτελεί το καθαρό φορτίο του πρωτεϊνικού μορίου και τέλος το f το οποίο είναι ο συντελεστής τριβής.

Η κίνηση των πρωτεϊνών εξαρτάται από το ηλεκτρικό φορτίο και το μοριακό τους βάρος. Πιο συγκεκριμένα η κατεύθυνση της κίνησης της πρωτεΐνης εξαρτάται από το ηλεκτρικό της φορτίο ενώ η ταχύτητα της από το μοριακό της βάρος. Τα μόρια που είναι μικρότερα σε σχέση με τους πόρους της πηκτής μετακινούνται με ευκολία μέσω του πηκτώματος σε αντίθεση με τα μεγαλύτερα μόρια τα οποία δεν κινούνται σχεδόν καθόλου.

Ακολουθήσαμε το ασυνεχές σύστημα ηλεκτροφόρησης στο οποίο γίνεται χρήση δυο πηκτωμάτων με διαφορετική σύσταση. Το πρώτο από αυτά αποτελεί

ένα πήκτωμα με μεγάλους πόρους και ονομάζεται πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel) και βρίσκεται πάνω από το δεύτερο πήκτωμα. Το δεύτερο πήκτωμα είναι αυτό του διαχωρισμού (separating gel) και είναι πιο πυκνό σε σχέση με το πήκτωμα συσσώρευσης και έχει πιο μικρούς πόρους.

Πιο συγκεκριμένα το πήκτωμα συσσώρευσης έχει ως στόχο τα δείγματα να συσσωρεύονται σε στενές ζώνες με μεγάλη C και να συμπυκνώνονται, ενώ ο σκοπός του separating gel είναι ο διαχωρισμός τους εξαιτίας της διαφορετικής κινητικότητας που έχει η κάθε πρωτεΐνη. Σε αυτά οδηγούμαστε λόγω της σύστασης, του PH αλλά και το μέγεθος των πόρων του κάθε gel. Έτσι πετυχαίνουμε τον καλύτερο διαχωρισμό των πρωτεϊνών και ανάλυση των αποτελεσμάτων σε σχέση με το συνεχές σύστημα ηλεκτροφόρησης.

Για να επιτευχθούν οι αποδιατακτικές συνθήκες γίνεται χρήση θειικού άλατος νατρίου (SDS), το οποίο είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό και έχει την ικανότητα να δεσμεύεται στην πολυπεπτιδική αλυσίδα μέσω υδρόφοβων δεσμών. Η σύνδεση είναι αρκετά εξειδικευμένη με αποτέλεσμα την διάσπαση όλων μη ομοιοπολικών δεσμών της πρωτεΐνης, η πρωτεΐνη αποδιατάσσεται και δημιουργείται ένα επίμηκες σύμπλοκο του SDS με την πολυπεπτιδική αλυσίδα, το οποίο έχει καθαρό αρνητικό φορτίο. Τέλος ο λόγος φορτίου αν μονάδα μάζας του πολυπεπτιδίου είναι σχεδόν σταθερό.

Αξίζει να σημειωθεί πως οι ποσότητες που φορτώνουμε στα πηγαδάκια του gel αгарόζης είναι στανταρισμένες ποσότητες με την διαδικασία SDS-PAGE και διαδοχικές αραιώσεις Coomassie staining και με εκτίμηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης Rubisco.

Πρωτόκολλο για παρασκευή 5 midi gel ακρυλαμίδης 10 %

Για το running gel (τελικός όγκος 40ml)

Acr: 13.3 ml APS:0.24ml
BuffA: 11.84 ml TEMED:0.024 ml
H2O: 14.8 ml

Για το stacking gel (τελικός όγκος 20ml)

Acr: 3ml APS:0.15ml
BuffB: 5ml TEMED: 10λ
H2O:12 ml

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης - Running buffer(2.5L)

Γλυκίνη:45g

Trizma:7g

SDS:12ml

Τέλος συμπληρώνουμε με νερό MQ μέχρι τον τελικό όγκο

Αντιδραστήρια της SDS-PAGE

- A) ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗ:** Θα πολυμεριστεί και θα δώσει το πολυακρυλαμίδιο. Η συγκέντρωση του στα gel μας είναι 10%. Έχει ως ρόλο τον σχηματισμό γεφυρών μεταξύ των γειτονικών αλυσίδων ακρυλαμιδίου ρυθμίζοντας έτσι το πορώδες της πηκτής. Ο πολυμερισμός του είναι αποτέλεσμα της παρουσίας ελευθέρων ριζών στο διάλυμα, οι οποίες παράγονται από το APS παρουσία Temed. Μικρές συγκεντρώσεις ακρυλαμιδίου δίνουν τζελ με μεγαλύτερους πόρους κατάλληλα για τον διαχωρισμό μορίων μεγάλου μεγέθους.
- B) APS(υπερθεικό αμμώνιο):** Πηγή ελευθέρων ριζών που επιταχύνουν το ρυθμό με τον οποίο πολυμερίζεται η ακρυλαμίδη.
- C) TEMED (Τετραμεθυλαιθυλενο - Διαμίνη):** Σταθεροποιεί τις ελεύθερες ρίζες οι οποίες παράγονται από το APS και ενισχύει τον πολυμερισμό. Το ποσοστό των ελευθέρων ριζών που υπάρχουν θα καθορίσουν έως έναν μεγάλο βαθμό την ταχύτητα του πολυμερισμού και κάποιες ιδιότητες του gel.
- D) Sample Buffer:** Χρησιμοποιείται πριν την ηλεκτροφόρηση και αναμιγνύουμε τις πρωτεΐνες μας με αυτό. Περιέχει Tris-HCl pH=6,8 και συμβάλλει στη διατήρηση του pH σε όμοιο επίπεδο με το pH του stacking gel. Επίσης περιέχει SDS το οποίο προσδίδει αρνητικό φορτίο στις πρωτεΐνες. Ακόμη προσθέτουμε DTT (dithiotheitol) το οποίο θα λειτουργήσει σαν αναγωγικό μέσο που ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς που σχηματίζονται μεταξύ κατάλοιπων κυστεΐνης και οδηγεί σε μετουσίωση. Περιέχει και κυανών της βρωμοφαινόλης το οποίο λειτουργεί ως οπτικό βοήθημα για τη φόρτωση των δειγμάτων μας και την παρακολούθηση της ηλεκτροφορητικής προόδου. Τέλος βάζουμε γλυκερόλη η οποία αυξάνει την πυκνότητα του δείγματος μας και έτσι διευκολύνει τη φόρτωση στο gel και την σταθεροποίηση του στα πηγαδάκια. Επωάζουμε το δείγμα μας με το Sample Buffer για 3 λεπτά στους 97 °C.
- E) SDS (SodiumDodecylSulphate):** Έχει εξειδικευμένη σύνδεση και αντιστοιχεί σταθερό ποσό του SDS για κάθε μονάδα της πρωτεΐνης με αναλογία 1,4g SDS ανά 1g της πρωτεΐνης. Ρόλος του είναι η διάσπαση των μη ομοιοπολικών δεσμών άρα και η αποδιάταξη της πρωτεΐνης. Επιπλέον θα δημιουργηθεί

ένα επίμηκες σύμπλοκο του SDS με την πολυπεπτιδική αλυσίδα με καθαρό αρνητικό φορτίο.

Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης είχαμε τις εξής συνθήκες:

- Για τα πρώτα 30 λεπτά της ηλεκτροφόρησης κρατούσαμε την τάση σταθερή στα 100 V.
- Στη συνέχεια αυξάναμε την τάση στα 200V και τρέχαμε το gel για περίπου μιάμιση με δυο ώρες.

2.4 Μονιμοποίηση gel – Coomassie Brilliant blue (SIGMA)

Αυτή η τεχνική αποτελεί τη πιο συχνή χρωστική πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα είναι ανιονική χρωστική και η σύνδεση της είναι μη ειδική για τις πρωτεΐνες. Είναι μια μη αντιστρέψιμη διαδικασία η οποία μονιμοποιεί χημικά τις πρωτεΐνες στόχους. Η χρωστική Coomassie προσδένεται στις πρωτεΐνες μέσω ιοντικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ ομάδων σουλφονικών οξέων και θετικά φορτισμένων αμινομάδων των πρωτεϊνών με δεσμούς Van der Waals. Μόλις τελειώσουμε την ηλεκτροφόρηση του Gel μας, γίνεται χρήση οξικού οξέος ώστε να μονιμοποιηθούν οι πρωτεΐνες και στη συνέχεια θα βαφτούν από τη χρωστική. Τέλος η περίσσεια της χρωστικής ξεπλένεται με οξικό οξύ. Όταν τελειώσει η διαδικασία της χρώσης οι πρωτεΐνες του Gel ανιχνεύονται με τη μορφή μπλε ζώνης, όμως για να μπορέσει να ανιχνευθεί μια πρωτεΐνη με την τεχνική αυτή χρειάζεται η συγκέντρωση της να ξεπερνάει το όριο ευαισθησίας της τεχνικής το οποίο είναι 10ng πρωτεΐνης.

2.5 Silver Staining

Η τεχνική Silver Staining χρησιμοποιείται έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμίδης. Τα βήματα της τεχνικής είναι τα εξής: Αρχικά γίνεται η μονιμοποίηση των πρωτεϊνών με ένα διάλυμα το οποίο περιέχει 30% αιθανόλη και 10% ακετικό οξύ στο οποίο αφήνουμε να επωαστεί συνήθως ολόκληρο το βράδυ. Το επόμενο βήμα είναι η επώαση σε διάλυμα αιθανόλης για 30 λεπτά σε δυο γύρους. Ακολουθούν πλύσεις με απιονισμένο νερό για δέκα λεπτά η καθεμία. Έπειτα γίνεται επώαση για μια ώρα σε διάλυμα AgNO_3 0,2% πιο συγκεκριμένα διαλύουμε 0,2g AgNO_3 σε 100 ml H_2O . Τέλος πραγματοποιείται επώαση σε διάλυμα sodium carbonate 2.5% και φορμαλδεΐδης. Τα ιόντα σιδήρου προσκολλώνται στις αρνητικά φορτισμένες πλευρές των αλυσίδων των πρωτεϊνών.

2.6 Ανοσοαποτηπωμα western blot

Ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική στη μοριακή βιολογία η οποία χρησιμοποιείται με σκοπό την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε δείγματα ιστού η εκχυλίσματος. Για να επιτύχουμε τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα μας

στη μεμβράνη ακολουθείται μια διαδικασία που ονομάζεται αποτύπωμα με τη βοήθεια ηλεκτροφόρησης. Σύμφωνα με το PH του ρυθμιστικού διαλύματος επιλογής θα επιτευχθεί ο ορθός προσανατολισμός των ηλεκτροδίων για την επαφή του πηκτώματος/gel μας με την μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Για την παρασκευή του διαλύματος μεταφοράς χρησιμοποιούμε 98g Tris, 8g γλυκίνης και μεθανόλη συγκέντρωσης 20% σε τελικό όγκο 600 ml. Η γλυκίνη προστίθεται στο διάλυμα μεταφοράς έτσι ώστε αυξηθεί η ικανότητα πρόσδεσης των πρωτεϊνών στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ταυτόχρονα όμως δυσχεραίνει την απομάκρυνση τους από το πήκτωμα.

Περιγραφή πειραματικής διαδικασίας

- Το πρώτο βήμα είναι η επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης για περίπου μια ώρα με 15 ml BSA έτσι οι θέσεις πρόσδεσης της μεμβράνης καλύπτονται με αυτή τη πρωτεΐνη και καταφέρνουμε την ελαχιστοποίηση της μη ειδικής σύνδεσης του αντισώματος .
- Στη συνέχεια επωάζουμε τη μεμβράνη με το πρώτο αντίσωμα σε αναλογία 1 προς 1500 για μια ώρα. Το πρώτο αντίσωμα αναγνωρίζει ειδικά και συνδέεται με τη πρωτεΐνη στόχο
- Ακολουθούν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με TBS ώστε να απομακρυνθεί το πρώτο αντίσωμα.
- Επωάζουμε την μεμβράνη με το δεύτερο αντίσωμα το οποίο βρίσκεται σε αναλογία 1 προς 10000 για μια ώρα. Το δεύτερο αντίσωμα που χρησιμοποιούμε είναι κατασκευασμένο για να αναγνωρίζει άλλα αντισώματα και συνδέεται με το πρώτο αντίσωμα μας και είναι συζευγμένο με κάποιο ένζυμο όπως αλκαλική φωσφατάση ή υπεροξειδάση.
- Πραγματοποιούνται 3 πλύσεις των 5 λεπτών με TBS για την απομάκρυνση και του δεύτερου αντισώματος.
- Τελικό βήμα είναι η εμφάνιση με προσθήκη υποστρώματος S και παραγωγή προϊόντος P το οποίο θα δώσει σήμα στην αντίδραση (συνήθως με φως)με αποτέλεσμα τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης στόχου.

Παρασκευή TBS buffer για πλύσεις

50 mM Trizma 1M 50 ml
150 mM NaCl 5M 30ml
1ml Tween

Όσον αφορά τη διαδικασία της εμφάνισης παρασκευάζουμε δυο διαλύματα με τελικό όγκο 10ml

Διάλυμα Α περιέχει :

Λουμινόλη : 100 μl
Κουμαρικό οξύ : 44 μl
Tris : 1ml με Ph 8,5
MQ νερό: 8,86 ml

Διάλυμα Β περιέχει :

Υπεροξειδίο : 6,1 μl
Tris: 1 ml με pH
MQ νερό: 9 ml

2.7 Υποκυτταρική κλασμάτωση – εμπλουτισμός κυτταρικών μεμβρανών

Η κλασμάτωση του κυττάρου αποτελεί μέθοδο για τη μελέτη των οργανιδίων του και άλλων συστατικών του. Τα οργανίδια ενός κυττάρου διαφέρουν σε μέγεθος και πυκνότητα. Ο πυρήνας έχει το μεγαλύτερο μέγεθος και ακολουθούν τα μιτοχόνδρια, τα λυσοσώματα, τα υπεροξεισώματα, ενώ τα ριβοσώματα και οι πυρινίσκοι είναι μικρότερα και πυκνότερα.

Για την κλασμάτωση του κυττάρου πρώτο βήμα είναι το να σπάσουμε την πλασματική μεμβράνη του ώστε να ελευθερωθεί το περιεχόμενο του στο διάλυμα. Για τον σκοπό αυτό γίνεται ομογενοποίηση του ιστού, στο συγκεκριμένο πείρα με την βοήθεια polytron. Ο διαχωρισμός των συστατικών έπειτα από την ομογενοποίηση του ιστού γίνεται με διαφορική φυγοκέντρηση. Στη διαφορική φυγοκέντρηση το διάλυμα μας φυγοκεντρείται επαναληπτικά , κάθε φορά με μεγαλύτερη επιτάχυνση (g). Στο πείραμα μας έγινε χρήση ψυχόμενης φυγοκέντρου (2 °C) και χρησιμοποιήσαμε το HEDSP buffer, του οποίου το πρωτόκολλο παρατίθεται παρακάτω.

Πρωτόκολλο HEDSP buffer

- **Hepes:** θέλουμε $C_{\text{τελ}}= 50 \text{ mM}$ χρησιμοποιείται για να ελέγξουμε το pH του διαλύματος
- **Sorvitol:** θέλουμε $C_{\text{τελ}}=330 \text{ mM}$ χρήση για πύκνωση του διαλύματος μας
- **EDTA:** θέλουμε $C_{\text{τελ}}=3 \text{ mM}$ και λειτουργεί ως συντηρητικό
- **DTT:** θέλουμε $C_{\text{τελ}}=2 \text{ Mm (Mr=154)}$ με σκοπό τη μείωση των δισουλφιδικών δεσμών (ενδομοριακών και διαμοριακών) των πρωτεϊνών
- **PMSF stock: Mr=174 $C_{\text{τελ}}=100\text{mM}$** και $\text{PMSF}_{\text{final}}=2\text{Mm}$
Είναι ανασταλτικός παράγοντας για τις πρωτεάσες σερίνης

- **BSA:0.5 g/lt** Είναι παρεμποδιστής και δεσμεύεται σε μη ειδικές θέσεις δέσμευσης με αποτέλεσμα τα αντισώματα μας να συνδέονται κυρίως στα αντιγόνα που μας ενδιαφέρουν.
- Τέλος προσθέτουμε κάποιο είδους απορρυπαντικό. Κάναμε δοκιμές με NP40 και Triton(1%). Καταλήξαμε σε χρήση του Triton(1%).

2.8 Φασματομετρία μάζας

Η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, Ms) αποτελεί ένα αναλυτικό εργαλείο το οποίο χρησιμεύει για την μέτρηση της αναλογίας μάζας προς το φορτίο (m/z) για ένα ή περισσότερα μόρια τα οποία βρίσκονται στο δείγμα μας. Τα μόρια έχουν μετατραπεί σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα. Η φασματομετρία μαζών είναι από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές ανάλυσης με ευρεία εφαρμογή σε πολλούς τομείς τεχνολογίας αλλά και έρευνας. Οι επιστήμες ζωής, τροφίμων, περιβαλλοντικές επιστήμες αλλά και τεχνολογίες optics αποτελούν το κύριο πεδίο εφαρμογής της.

Οι μετρήσεις αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να υπολογιστεί το ακριβές μοριακό βάρος των συστατικών του δείγματος.

Η φασματομετρία μαζών δίνει πληροφορίες για την ποιοτική και ποσοτική σύσταση δειγμάτων, τη χημική δομή ενός μεγάλου αριθμού ενώσεων, για το αν υπάρχουν και το ποσοστό των ισotόπων τους και τέλος για τη δομή και σύσταση επιφανειών. Κάθε όργανο μέτρησης της φασματομετρίας της μάζας αποτελείται τουλάχιστον από τα εξής τρία συστατικά: Μια πηγή ιονισμού, έναν αναλυτή μάζας, και τέλος ένα σύστημα ανίχνευσης ιόντων.

Πριν φορτωθούν τα δείγματα πραγματοποιείται protein assay, με σκοπό η ποσότητα της πρωτεΐνης να είναι ισότιμη ανάμεσα τους. Γίνεται επεξεργασία των δειγμάτων σύμφωνα με το πρωτόκολλο FASP, κάνοντας χρήση του συστήματος φιλτραρίσματος 10 kDa cutoff (Sartorius), η οποία ακολουθείται από πέψη πρωτεϊνών (πέψη με αλκυλιώση και τρυψίνη). Τα προϊόντα των πεπτιδίων που προκύπτουν αναλύονται με nano-LC-MS/MS με χρήση LTQ Orbitrap XL massspectrometer το οποίο είναι συνδεδεμένο σε nano-LCHPLC.

Για να αναλυθούν τα δεδομένα μας έγινε χρήση MaxQuant με τη βοήθεια του πλήρους Uniprot συστήματος του *A. thaliana* και ενός συστήματος αναφοράς από το σύστημα αναζήτησης Andromeda search engine, με σκοπό την απομάκρυνση πιθανών επιμολύνσεων. Ως αναφορά το σφάλμα ανεύρεσης FDR τέθηκε στο 1% τόσο για τις πρωτεΐνες όπως και για τα πεπτίδια. Πραγματοποιήθηκε εξομάλυνση LFQ και υπολογίστηκε η αφθονία της πρωτεΐνης βάσει φάσματος. Το LFQ καθορίστηκε με ένα ελάχιστο κλάσμα μέτρησης 2. Τέλος απορρίφθηκαν πρωτεΐνες που βρέθηκαν ως επιμολύνση και όσες αποτελούνταν από λιγότερα από δύο πεπτίδια. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Perseus. Το Perseus είναι ένα πρόγραμμα το οποίο επιτρέπει σε

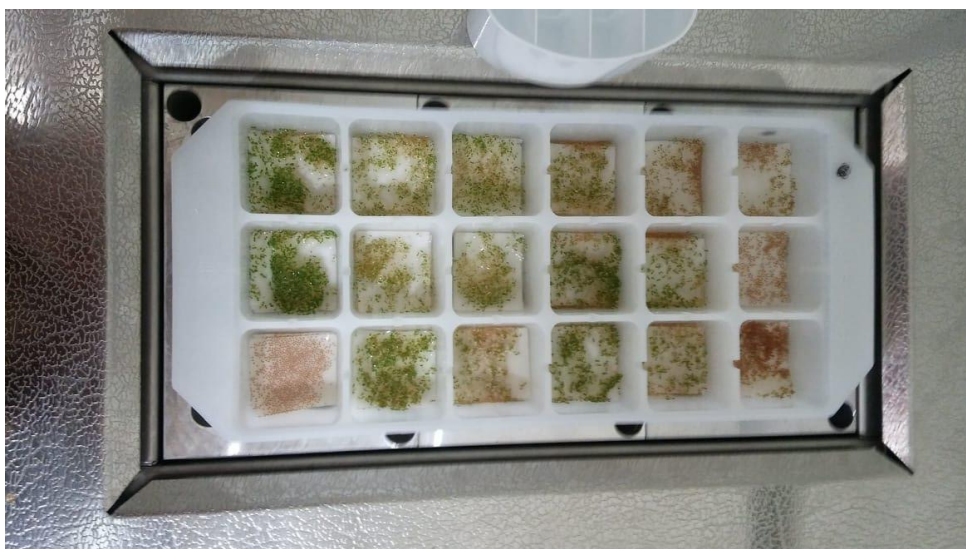
ερευνητές την ερμηνεία της ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών, της αλληλεπίδρασης και των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων δεδομένων τροποποίησης.

3.Αποτελέσματα

3.1 Συλλογή και χαρακτηρισμός μεταλλαγμάτων ROF πρωτεΐνης στα *A. thaliana*

Η πειραματική διαδικασία ξεκίνησε με την καλλιέργεια WT και μεταλλαγμένων φυτών *A. thaliana* για τις πρωτεΐνες ROF1 και ROF2. Πιο συγκεκριμένα φυτέψαμε σπόρους ROFBred, σπόρους *rof2*⁻ RNA silenced, *rof2*⁻ T-DNA και *rof2*⁻ με σκοπό τη συλλογή γενετικού υλικού για τη μελέτη των μεταλλαγμάτων υπό συνθήκες θερμικής καταπόνησης. Τα φυτά αυτά αναπτύχθηκαν στον ειδικό θάλαμο (walk in chamber) με ελεγχόμενη φωτοπερίοδο, θερμοκρασία και υγρασία. Στο κατάλληλο στάδιο της ανάπτυξης έγινε συλλογή των σπόρων. Στη συνέχεια έγινε επώαση των σπόρων σε κύστες με ειδικό χαρτί Whatman, η οποία διήρκησε 5 ημέρες (Εικόνα 4). Αφού ολοκληρώθηκε η επώαση τα δείγματα υπέστησαν διαδικασία heat stress σε heat block [περισσότερες λεπτομέρειες στις τεχνικές-heat stress and protein extraction].

ΒΛΑΣΤΙΔΙΑ *A. thaliana*



Εικόνα 4: Στάδιο επώασης των σπόρων του *A. thaliana* στο οποίο πραγματοποιούμε τη θερμική καταπόνηση

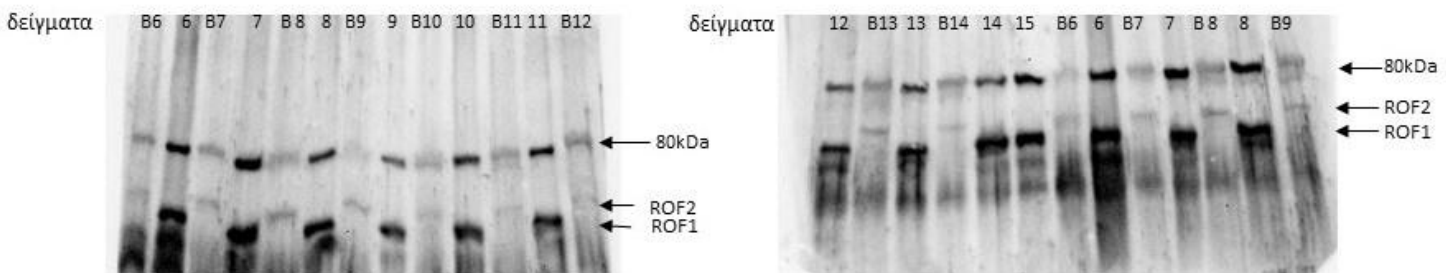
Για τη διαδικασία του θερμικού σοκ χρησιμοποιήσαμε τη θερμική πλάκα στους 37°C με τα δείγματα να βρίσκονται στο heat block για δυο ώρες, έπειτα αυξήσαμε τη

θερμοκρασία στους 37.5 °C για περίπου μιάμιση ώρα και εν τέλει αφήσαμε τα δείγματα στους 38 °C για άλλη μιάμιση ώρα. Ακολούθησε protein extraction του δείγματος.

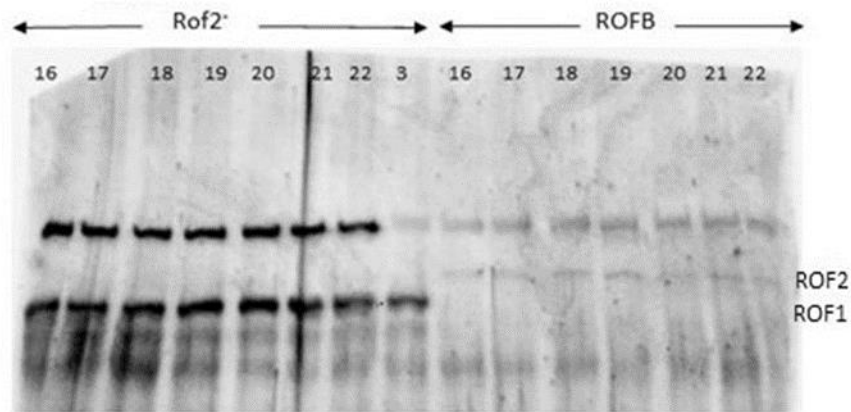
Τέλος με σκοπό τον χαρακτηρισμό και την επιβεβαίωση του δείγματος καταφύγαμε στην τεχνική της SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και συνεχίσαμε με Western Blot με αντίσωμα anti-rof .

Στις επόμενες δυο εικόνες παρουσιάζονται τα Western Blot από δείγματα *rof2⁻* και ROFB βλαστίδια τα οποία καλλιεργήσαμε και συλλέξαμε στο εργαστήριο [2.1 Φύτεμα, ανάπτυξη φυτών και συλλογή σπόρων από μεταλλάγματα της ROF]. Τα φυτά προήλθαν από χαρακτηρισμένους σπόρους που υπήρχαν στο stock του εργαστηρίου. Τα western blotting πραγματοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση της νέας συλλογής σπόρων για αποφυγή επιμόλυνσης. Εφαρμόστηκαν συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (37°C) γιατί η ROF2 εμφανίζεται αποκλειστικά μετά από θερμική καταπόνηση.

ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ



Εικόνα 5α και 5β: Αποτύπωμα Western Blotting σε εκχυλίσματα (σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης) *rof2⁻* και ROFB νεαρών βλαστιδίων (5 ημερών) που καλλιεργήθηκαν στο εργαστήριο



Εικόνα 5γ: Αποτύπωμα Western Blotting σε εκχυλίσματα (σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης 37°C) *rof2*⁻ και ROFB από βλαστίδια φυτών που καλλιεργήθηκαν στο εργαστήριο

- B6: ROFB6 , 6: *rof2*⁻ 6 , B7: ROFB7, 7 *rof2*⁻7, B8: ROFB8, 8: *rof2*⁻ 8, B9: ROFB9, 9: *rof2*⁻ 9, B10: ROFB10, 10: *rof2*⁻ 10, B11: ROFB11, 11: *rof2*⁻ 11, B12: ROFB12
- 12: *rof2*⁻ 12, B13: ROFB13 ,13: *rof2*⁻ 13, B14: ROFB14, 14: *rof2*⁻ 14, 15: *rof2*⁻ 15, B6: ROFB6, 6: *rof2*⁻ 6, B7: ROFB7, 7: *rof2*⁻ 7, B8: ROFB8, 8: *rof2*⁻ 8, B9: ROFB9
- 16: *rof2*⁻-RED, 17: *rof2*⁻ 17, 18: *rof2*⁻ 18, 19: *rof2*⁻ 19, 20: *rof2*⁻ 20, 21: *rof2*⁻ 21, 22: *rof2*⁻ 22, 3: *rof2*⁻ blue3, B16: ROFB16, B17:ROFB17, B18: ROFB18, B19: ROFB19, B20: ROFB20, B21:ROFB21, B22:ROFB22

Η ζώνη της πρωτεΐνης ROF1 παρουσιάζεται στα 62 kDa ενώ της ROF2 στα 65 kDa. Τα δείγματα των φυτών *rof2*⁻ δεν εμφανίζουν την ζώνη της πρωτεΐνης ROF2 ενώ αυτά των ROFB δεν περιέχουν την ROF1. Αυτό επιβεβαιώνει την ταυτότητα των φυτών μας. Επίσης σε όλα τα δείγματα εμφανίζεται μια ζώνη στα 80 kDa (Εικόνες 5α, 5β, 5γ).

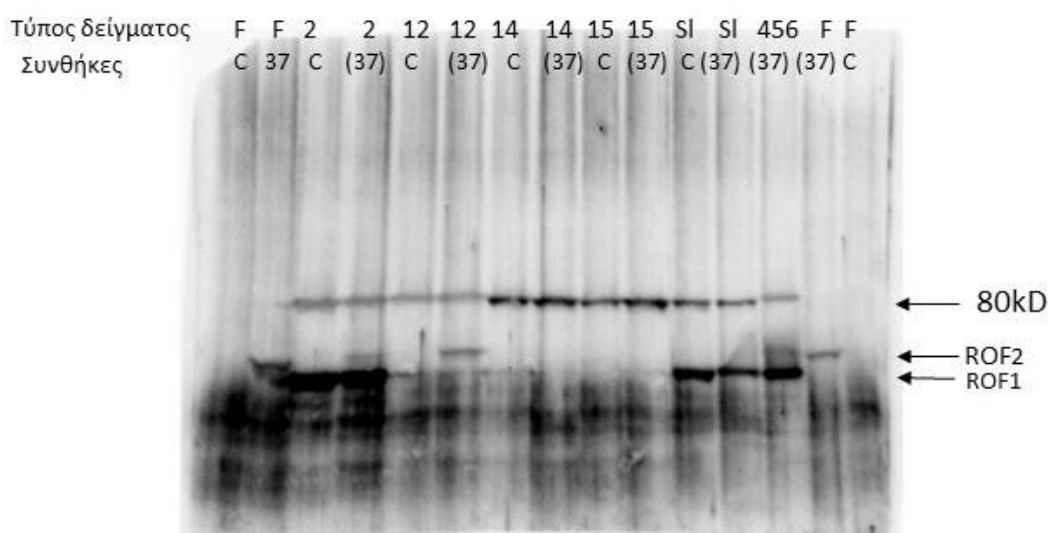
3.2 Έκφραση της 80 kDa στα μεταλλάγματα της ROF πρωτεΐνης στο *A. thaliana*

Για την μελέτη της ζώνης των 80 kDa χρησιμοποιήσαμε δείγματα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος βλαστιδίων (seedlings) του *A. thaliana* (ROFB, *rof2*⁻, N) όπως και άνθη

(flower buds) του φυτού. Σπόροι WT και διπλών μεταλλαγμάτων της ROF1 και της ROF2 (N) χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία από προηγούμενες συλλογές του εργαστηρίου, επίσης χρησιμοποιήθηκαν σπόροι ROFB και *rof2*⁻ και άνθη ROFB από την αναπαραγωγή φυτών που πραγματοποιήσαμε στο εργαστήριο.

Με τη χρήση αντισωμάτων anti-rof (Karali et al.,2012 and Oxley et al.,2013) σε Western Blotting παρατηρήσαμε διαφορές στην εμφάνιση και την ένταση της ζώνης των 80 kDa. Αυτές οι διαφορές ήταν κυρίως ποσοτικής φύσεως σε ότι αφορά τα διαφορετικά μεταλλάγματα των βλαστιδίων.

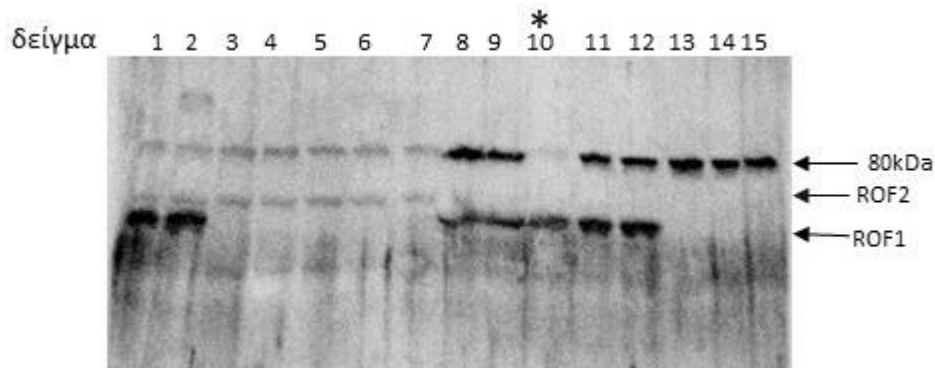
Εντοπισμός της 80 kDa ζώνης σε δείγματα *A. thaliana*



Εικόνα 6α: Western Blotting σε εκχυλίσματα από WT,N και ROFB σπόρια και ROFB άνθη του *A. thaliana* σε συνθήκες control (22°C) και συνθήκες θερμικής καταπόνησης (heat stress, 37°C)

Fc: Άνθη από ROFB φυτά (22°C), **F₍₃₇₎:** Άνθη από ROFB φυτά (37°C),
2c: WT βλαστίδια (22°C), **2₍₃₇₎:** WT βλαστίδια (37°C), **12c:** ROFB βλαστίδια (22°C)
12₍₃₇₎: ROFB βλαστίδια (37°C), **14c:** N₈ βλαστίδια (22°C), **14₍₃₇₎:** N₈ βλαστίδια (37°C),
15c: N₇ βλαστίδια (22°C), **15₍₃₇₎:** N₇ βλαστίδια (37°C), **Slc:** siliques (καρπός) control,
Sl₍₃₇₎: siliques (καρπός) 37°C , **456₍₃₇₎:** WT (37°C)

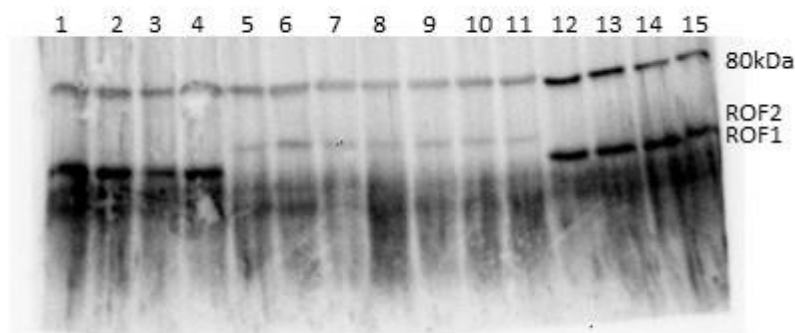
Σύγκριση μεταλλαγμάτων βλαστιδίων *A. thaliana* ως προς την εμφάνιση και ένταση της 80 kDa



φ

Εικόνα 7α: Western blotting ανοσοαποτύπωμα σε δείγματα WT, ROFB, *rof2*- και N τα οποία έχουν υποστεί Heat Stress

- 1: WT1, 2: WT2, 3: ROFB1, 4: ROFB2, 5: ROFB3, 6: ROFB4, 7: ROFB5
8: *rof2*⁻1, 9: *rof2*⁻2, 10: *rof2*⁻3, 11: *rof2*⁻4, 12: *rof2*⁻5, 13: N1 14: N3, 15: N4



Εικόνα 7β: Western Blotting σε δείγματα WT, ROFB, *rof2*⁻ από σπόρια *A. thaliana*

- 1: WT col-1, 2: WT col-2, 3: WT col-3, 4: WT col-4, 5: ROFB23, 6: ROFB24, 7: ROFB25, 8: ROFB26, 9: ROFB27, 10: ROFB28, 11: ROFB29, 12: *rof2*⁻23, 13: *rof2*⁻2, 14: *rof2*⁻25, 15: *rof2*⁻26

Η ζώνη των 80 kDa αναγνωρίζεται από το αντίσωμα της ROF, έτσι προκύπτει το ερώτημα για το εάν η ζώνη αυτή είναι κάποια μορφή ή τροποποίηση (modification) της ROF. Η υπόθεση αυτή απορρίπτεται από τη στιγμή που παίρνουμε σήμα σε

Western blotting για την 80 kDa από μεταλλάγματα N τα οποία δεν έχουν καθόλου ROF πρωτεΐνες (Εικόνα 6α & 7α)

Αρχικά από την Εικόνα 6α, στην οποία έχουμε το Western blotting με anti-rof αντίσωμα σε εκχυλίσματα από ROFB άνθη του *A. thaliana* και WT, ROFB και N βλαστίδια, αλλά και από την Εικόνα 6β μπορούμε να αντλήσουμε αρκετές πληροφορίες για την ζώνη των 80 kDa. Στα δείγματα από άνθη δεν εμφανίζεται σήμα ούτε από την πρωτεΐνη ROF2 ούτε από την ζώνη των 80 kDa. Άρα τα εκχυλίσματα από άνθη αποτελούν τα ιδανικά negative control γιατί είναι τα μόνα τα οποία δεν εμφανίζουν καθόλου την ζώνη αυτή ενώ όλα τα υπόλοιπα δείγματα όπως τα WT εμφανίζουν έστω και αχνή συσσώρευση της ζώνης των 80 kDa. Επίσης στην Εικόνα 6α στην οποία υπάρχουν δείγματα που έχουν υποστεί θερμική καταπόνηση (37°C) αλλά και δείγματα control (22°C) παρατηρούμε πως δεν υπάρχει διαφορά στην συσσώρευση της πρωτεΐνης στη ζώνη των 80 kDa μεταξύ control (22°C) και φυτού που έχει υποστεί θερμική καταπόνηση.

Στη Εικόνα 7α βλέπουμε τη διαφορά στην συσσώρευση της πρωτεΐνης που παίρνουμε για την ζώνη των 80 kDa από εκχυλίσματα φυτών WT, ROFB, *rof2*⁻ και N. Παρατηρούμε ότι η συσσώρευση πρωτεΐνης στη ζώνη είναι πολύ πιο έντονη στα *rof2*⁻ και N μεταλλάγματα - με την εξαίρεση του δείγματος στη θέση 10 (*rof2*⁻3blue) (πιθανό μετάλλαγμα),- σε σχέση με τη το σήμα από τα WT και ROFB φυτά το οποίο φαίνεται αρκετά αδύναμο και αχνό. Οι διαφορές στη συσσώρευση πρωτεΐνης της ζώνης των 80 kDa ανάμεσα σε WT και ROFB φαίνεται να είναι αμελητέα.

Τέλος στην Εικόνα 7β συγκρίνουμε ξανά δείγματα WT, ROFB και *rof2*⁻, όπου και επιβεβαιώνονται ξανά οι παρατηρήσεις που έχουμε κάνει σχετικά με την συσσώρευση της πρωτεΐνης της ζώνης που παίρνουμε από τα μεταλλάγματα.

Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα αποφασίσαμε ότι για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό της ζώνης των 80 kDa ίσως είναι προτιμότερο να γίνει χρήση δειγμάτων από εκχυλίσματα φυτών N και *rof2*⁻ στα οποία η συσσώρευση της πρωτεΐνης που ψάχνουμε είναι υψηλότερη.

3.3 Χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών που δίνουν τη ζώνη των 80 kDa.

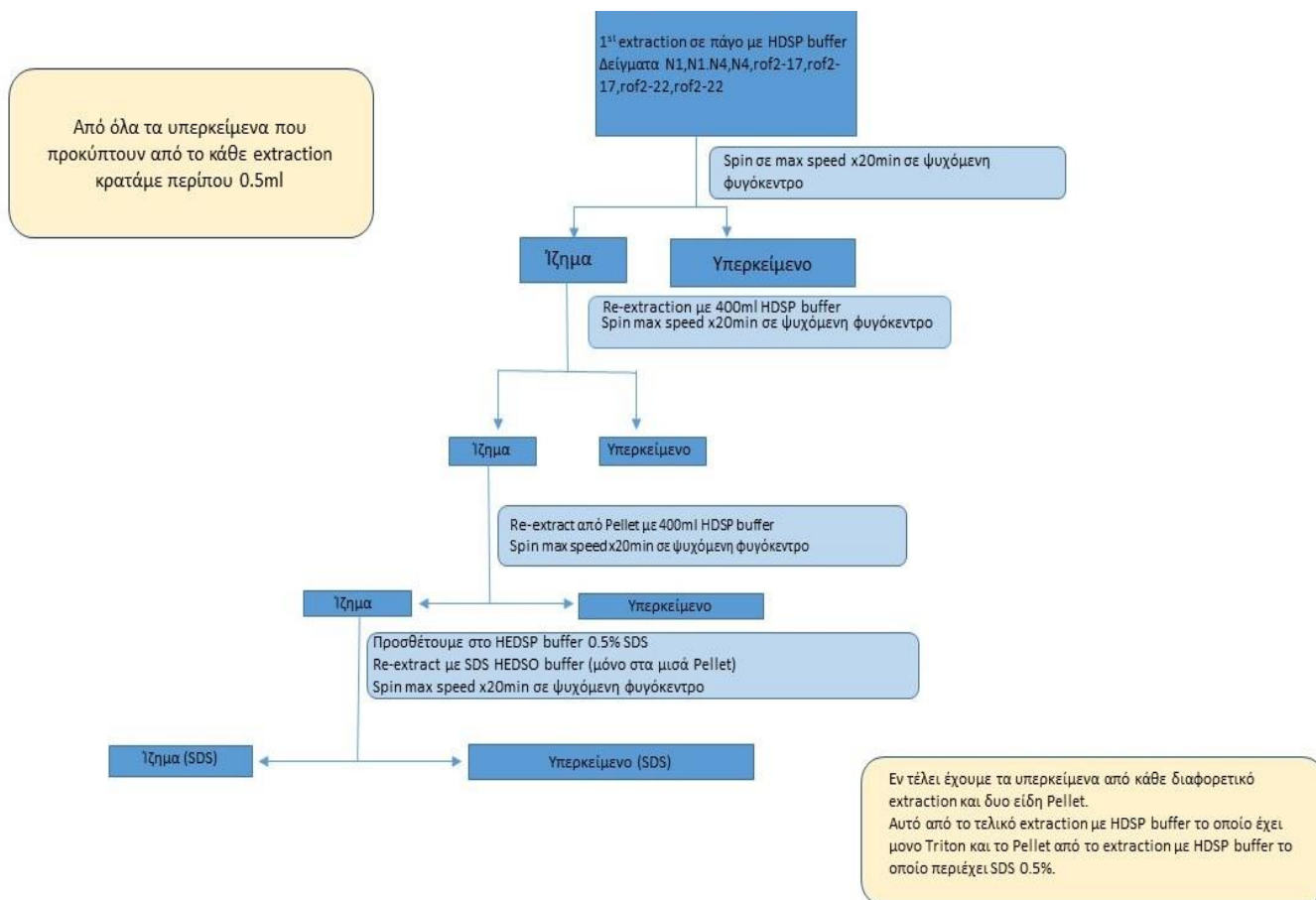
Με βάση τα δεδομένα που συλλέχθηκαν στα προηγούμενα δυο πειραματικά κομμάτια προχωρήσαμε σε χαρακτηρισμό της ζώνης των 80 kDa. Για να γίνει αυτό, συνεχίσαμε με μεμβρανικό εμπλουτισμό της ζώνης .

Ο μεμβρανικός εμπλουτισμός έγινε με βάση τη φύση της ζώνης των 80 kDa δηλαδή για το αν πρόκειται για μια μεμβρανική πρωτεΐνη ή μια πυρηνική πρωτεΐνη ή κάποια πρωτεΐνη του κυτταροπλάσματος. Αυτό το καταφέραμε με συνεχή extractions σε βλαστίδια από τα μεταλλάγματα του *A. thaliana* και χρήση απορρυπαντικών όπως το NP40, Triton και SDS. Καταλήξαμε στη παρασκευή και χρήση του HEDSP buffer για τον αποτελεσματικότερο μεμβρανικό εμπλουτισμό των εκχυλισμάτων μας.

Ο εμπλουτισμός αρχίζει με την φυγοκέντρηση ενός ομογενοποιημένου. Σε κάθε φάση φυγοκεντρείται το υπερκείμενο από την προηγούμενη φυγοκέντρηση. Αυτή η μέθοδος ονομάζεται διαφορική φυγοκέντρηση και δίνει κλάσματα ελαττωμένης πυκνότητας. Αρχικά καθιζάνει το πυρηνικό κλάσμα, έπειτα το μιτοχονδριακό και τέλος το μικρωσωμικό. Το υπερκείμενο της τελικής φυγοκέντρησης λέγεται κυτοσόλιο και περιέχει διαλυτές πρωτεΐνες.

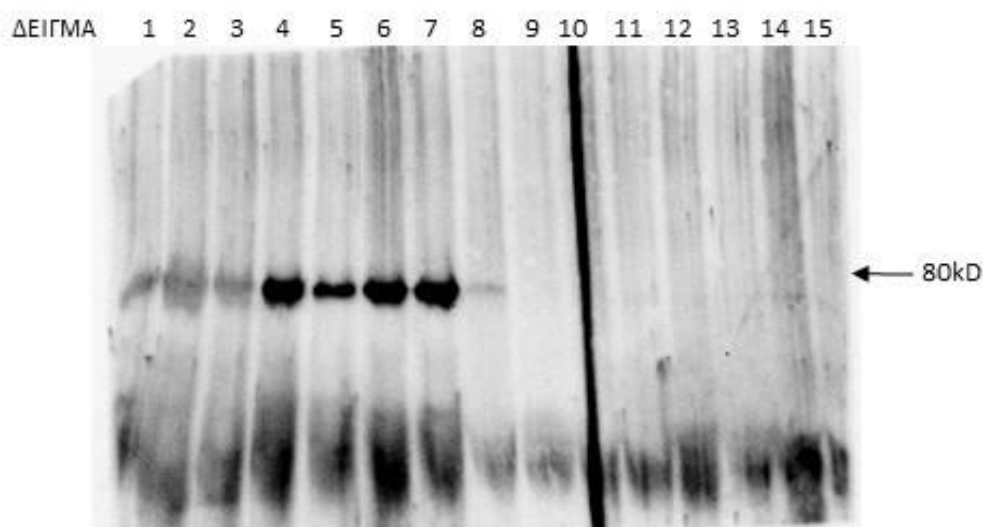
Η γενική παρατήρηση με τα αποτελέσματα από αυτό το κομμάτι του πειράματος μας είναι ότι η συσσώρευση της πρωτεΐνης της ζώνης των 80 kDa μετά από τον μεμβρανικό εμπλουτισμό της παραμένει στα δείγματα του pellet.

Υποκυτταρική κλασμάτωση δειγμάτων *A. Thaliana*



Εικόνα8: Σχεδιάγραμμα διαδικασίας κλασμάτωσης που ακολουθήθηκε για τον εμπλουτισμό των κυτταρικών μεμβανών της ζώνης των 80 kDa σε δείγματα *rof2*- και N

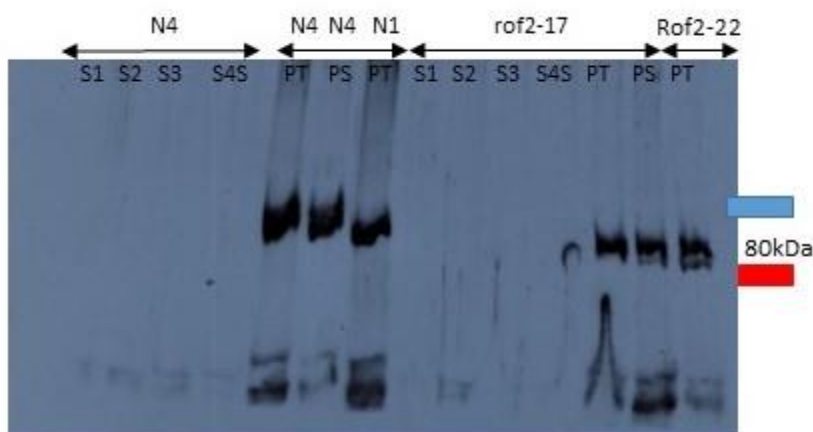
Υποκυτταρικός εντοπισμός της 80 kDa ζώνης



Εικόνα 9α : Wester Blotting δείγματα από υπερκείμενα και pellet WT, N, ROFB και *rof2*- έπειτα από μεμβρανικό εμπλουτισμό με 2% NP40

- 1: Pellet από extraction με NP40 2% σε WT βλαστίδια
- 2: Pellet από extraction με NP40 2% σε ROFB16 βλαστίδια
- 3: Pellet από extraction με NP40 2% σε ROFB24 βλαστίδια
- 4: Pellet από extraction με NP40 2% σε *rof2*⁻ 19 βλαστίδια
- 5: Pellet από extraction με NP40 2% σε *rof2*⁻ 25 βλαστίδια
- 6: Pellet από extraction με NP40 2% σε N₁ βλαστίδια
- 7: Pellet από extraction με NP40 2% σε N₂ βλαστίδια
- 8: Λιπιδιάκο στρώμα (Lipid phase) από extraction με NP40 2% σε ROFB βλαστίδια
- 9: Υπερκείμενο από extraction με NP40 2% σε WT βλαστίδια
- 10: Υπερκείμενο από extraction με NP40 2% σε ROFB16 βλαστίδια
- 11: Υπερκείμενο από extraction με NP40 2% σε ROFB24 βλαστίδια
- 12: Υπερκείμενο από extraction με NP40 2% σε *rof2*⁻ 19 βλαστίδια
- 13: Υπερκείμενο από extraction με NP40 2% σε *rof2*⁻ 25 βλαστίδια
- 14: Υπερκείμενο από extraction με NP40 2% σε N₁ βλαστίδια
- 15: Υπερκείμενο από extraction με NP40 2% σε N₂ βλαστίδια

Υποκυτταρικός εντοπισμός της 80 kDa ζώνης



Εικόνα 9β : Wester Blotting δείγματα N, *rof2*- από τα διάφορα στάδια καθαρισμού που πραγματοποιήσαμε

N₄S₁: Υπερκείμενο μετά από το 1^ο extraction του δείγματος N₄ με HDSP buffer MONO με TRITON.

N₄S₂: Υπερκείμενο μετά από το δεύτερο extraction του δείγματος N₄ (pellet 1^{ου} extraction) με HDSP buffer MONO με TRITON.

N₄S₃: Υπερκείμενο μετά το τρίτο extraction του δείγματος N₄ (pellet 2^{ου} extraction) με HDSP buffer MONO με TRITON.

N₄S_{4S}: Υπερκείμενο μετά το 4^ο extraction του δείγματος N₄(pellet του 3^{ου} extraction) με HDSP buffer στο οποίο έχουμε προσθέσει SDS 0.5%.

N₄PT: Pellet που προκύπτει από το 3^ο extraction του δείγματος N₄ με HDSP buffer το οποίο περιέχει μόνο το απορρυπαντικό TRITON.

N₄PS: Pellet που προκύπτει από το 4^ο extraction του δείγματος N₄ με HDSP buffer το οποίο περιέχει και SDS 0.5%.

N₁PT: Pellet που προκύπτει από το 3^ο extraction του δείγματος N₁ με HDSP buffer το οποίο περιέχει μόνο το απορρυπαντικό TRITON.

rof2⁻¹⁷S₁: Υπερκείμενο μετά από το 1^ο extraction του δείγματος *rof2*⁻¹⁷ με HDSP buffer MONO με TRITON.

rof2⁻¹⁷S₂: Υπερκείμενο μετά από το δεύτερο extraction του δείγματος *rof2*⁻¹⁷ (pellet 1^{ου} extraction) με HDSP buffer MONO με TRITON.

rof2⁻¹⁷S₃: Υπερκείμενο μετά το τρίτο extraction του δείγματος *rof2⁻¹⁷* (pellet 2^{ου} extraction) με HDSP buffer MONO με TRITON.

rof2⁻¹⁷S₄S: Υπερκείμενο μετά το 4^ο extraction του δείγματος *rof2⁻¹⁷* (pellet του 3^{ου} extraction) με HDSP buffer στο οποίο έχουμε προσθέσει SDS 0.5%.

rof2⁻¹⁷PT: Pellet που προκύπτει από το 3^ο extraction του δείγματος *rof2⁻¹⁷* με HDSP buffer το οποίο περιέχει μόνο το απορρυπαντικό TRITON.

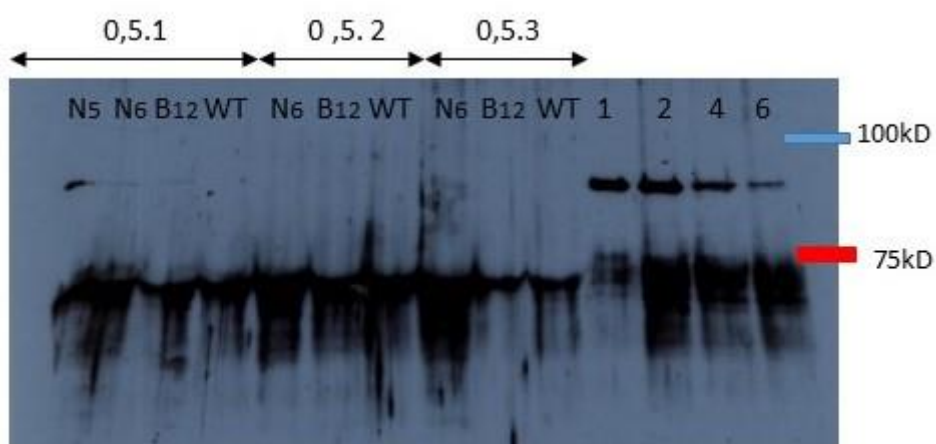
rof2⁻¹⁷PS: Pellet που προκύπτει από το 4^ο extraction του δείγματος *rof2⁻¹⁷* με HDSP buffer το οποίο περιέχει και SDS 0.5%.

rof2⁻²²PT: Pellet που προκύπτει από το 3^ο extraction του δείγματος *rof2⁻²²* με HDSP buffer το οποίο περιέχει μόνο το απορρυπαντικό TRITON.

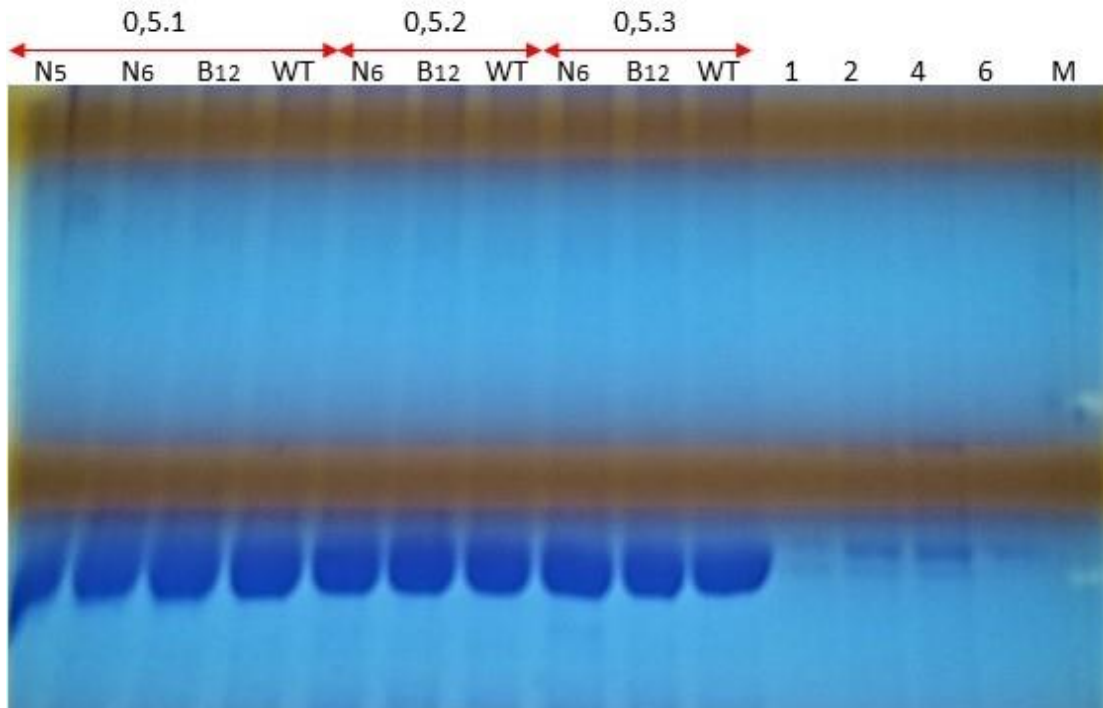
■ = Μπλε γραμμή του Marker

■ = Κόκκινη γραμμή του Marker

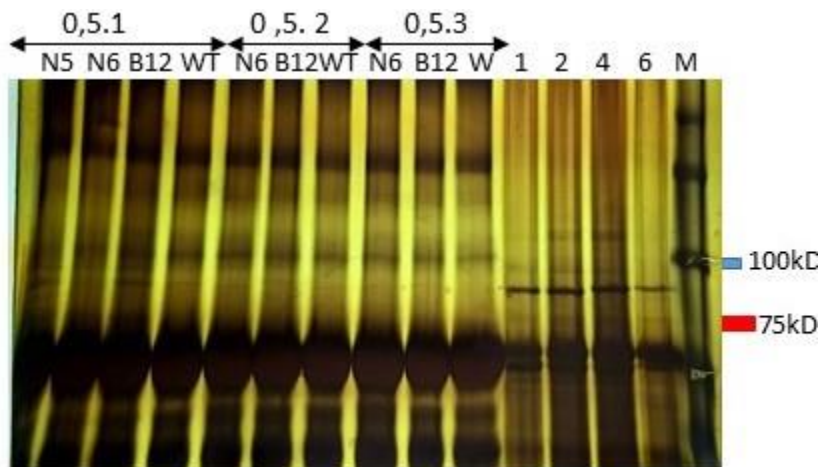
Υποκυτταρικός εντοπισμός της 80 kDa ζώνης



Εικόνα 9γ : Western Blotting σε δείγματα από διάφορα στάδια καθαρισμού που πραγματοποιήσαμε σε δείγματα από N, WT, και ROFB φυτά που έχουν υποστεί HS



Εικόνα 9δ : Χρώση Coomassie. Χρήση της rubisco ως πρωτεΐνη αναφοράς για τον εντοπισμό της ζώνης των 80 kDa. Επιβεβαίωση αποκλεισμού της rubisco ώστε να αποφευχθεί ανεπιθύμητο background στο Mass Spec



Εικόνα 9ε: Silver Staining σε gel πρωτεϊνών με δείγματα από διάφορα στάδια καθαρισμού που πραγματοποιήσαμε σε δείγματα από φυτά N, WT και ROFB

N5 05.1: Υπερκεείμενο από 4^η συνεχόμενη εκχύλιση (extraction) του δείγματος N5 με 400μl HEDSP ρυθμιστικού με 0,5% SDS (υπερθέρμανση κατά τη διάρκεια του extraction)

N6 05.1: Υπερκεείμενο από 4^ο συνεχόμενο εκχύλιση του δείγματος N6 με 400μl HEDSP buffer και αφού προσθέσαμε 0,5% SDS

B12 05.1: Υπερκείμενο από 4^ο συνεχόμενο extraction του δείγματος ROFB12 με 400μl HEDSP buffer και αφού προσθέσαμε 0,5% SDS

WT 05.1: Υπερκείμενο από 4^ο συνεχόμενο extraction του δείγματος WT με 400μl HEDSP buffer και αφού προσθέσαμε 0,5% SDS

N6 05.2: Υπερκείμενο από 5^ο συνεχόμενο extraction (πραγματοποιήθηκε με σύριγγα) του δείγματος N6 με 1,5 ml HEDSP buffer και αφού προσθέσαμε 0,5% SDS

B12 05.2: Υπερκείμενο από 5^ο συνεχόμενο extraction (πραγματοποιήθηκε με σύριγγα) του δείγματος ROFB12 με 1,5 ml HEDSP buffer και αφού προσθέσαμε 0,5% SDS

WT 05.2: Υπερκείμενο από 5^ο συνεχόμενο extraction (πραγματοποιήθηκε με σύριγγα) του δείγματος WT με 1,5 ml HEDSP buffer και αφού προσθέσαμε 0,5% SDS

N6 05.3: Υπερκείμενο από 6^ο συνεχόμενο extraction (πραγματοποιήθηκε με σύριγγα) του δείγματος N6 με 200 μl HEDSP buffer και αφού προσθέσαμε 0,5% SDS

B12 05.3: Υπερκείμενο από 6^ο συνεχόμενο extraction (πραγματοποιήθηκε με σύριγγα) του δείγματος ROFB12 με 200 μl HEDSP buffer και αφού προσθέσαμε 0,5% SDS

WT 05.3: Υπερκείμενο από 6^ο συνεχόμενο extraction (πραγματοποιήθηκε με σύριγγα) του δείγματος WT με 200 μl HEDSP buffer και αφού προσθέσαμε 0,5% SDS

1. δείγμα pellet που προκύπτει από το έκτο extraction με HEDSP buffer (0.5% SDS) δείγματος N5 και N8 (προστέθηκαν 100 μl sample buffer)

2. δείγμα pellet που προκύπτει από το έκτο extraction με HEDSP buffer (0.5% SDS) δείγματος N6 (προστέθηκαν 400 μl sample buffer)

4. δείγμα pellet που προκύπτει από το έκτο extraction με HEDSP buffer (0.5% SDS) δείγματος ROB12(προστέθηκαν 400μl sample buffer)

6. δείγμα pellet που προκύπτει από το έκτο extraction με HEDSP buffer (0.5% SDS) δείγματος WT(προστέθηκαν 300μl sample buffer)

- Από όλα τα extractions κρατήσαμε 60 μl υπερκειμένου για κάθε δείγμα
- Οι φυγοκεντρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο σε max speed (21000 g) και διήρκεσε για 10 ή 20 λεπτά η καθεμία

Στις εικόνες αυτές παρατηρούμε ότι μόνος σε περιπτώσεις από δείγμα Pellet εμφανίζεται η ζώνη των 80 kDa. Αρχικά παρατηρείται πως οι διαφορές που εμφανίζονται στη συσσώρευση της ζώνης στα μεταλλάγματα συνεχίζει και υπάρχει και μετά το μεμβρανικό εμπλουτισμό. Μάλιστα φαίνεται πως η συσσώρευση είναι

ενισχυμένη στα δείγματα από N και *rof2*⁻ μεταλλάγματα ενώ εξασθενεί στα WT φυτά και τα μεταλλάγματα ROFB. Στην Εικόνα βλέπουμε εμφάνιση 80 kDa μόνο στα δείγματα PT και PS (Pellet) ενώ δεν εμφανίζεται στα δείγματα S (υπερκείμενο). Το ίδιο ισχύει και για την Εικόνα στα δείγματα 1,2,4,6 (pellet). Αυτό ισχύει και για τα δείγματα Pellet στα οποία πραγματοποιήθηκε protein extraction με HEDSP buffer που περιείχε μόνο Triton ως απορρυπαντικό αλλά και σε εκείνα τα οποία προσθέσαμε SDS 0.5% στο HEDSP buffer πριν το extraction. Εμφάνιση της ζώνης έχουμε και στα δείγματα από N φυτά αλλά και από αυτά των *rof2*⁻. Το σήμα της ζώνης φαίνεται να είναι πιο έντονο στα δείγματα N σε σχέση με το σήμα στα *rof2*⁻ αλλά όχι σε μεγάλο βαθμό.

Τέλος επιβεβαιώνουμε το γεγονός ότι η ζώνη αυτή εμφανίζει μεγαλύτερη συσσώρευση σε φυτά N και *rof2*⁻. Αυτό για παράδειγμα φαίνεται στην Εικόνα όπου τα δείγματα 1 και 2 (N δείγματα) εμφανίζουν πολύ πιο έντονη την ζώνη των 80 kDa σε σχέση με αυτό της εικόνας των δειγμάτων 4 και 6 (ROFB και WT αντίστοιχα).

3.4 Mass Spec analysis και αποτελέσματα

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων του Mass Spec χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα Perseus (1.6.2.1), του οποίου ένας σκοπός και χρήση είναι η ανάλυση των δεδομένων που προκύπτουν από τη φασματομετρία μάζας. Γίνεται χρήση του για την ερμηνεία δεδομένων ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών, αλληλεπίδρασης αλλά και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Περιέχει ένα ολοκληρωμένο χαρτοφυλάκιο που περιέχει στατιστικά εργαλεία για την ανάλυση των δεδομένων που καλύπτουν την ομαλοποίηση, την ανάλυση χρονοσειρών, την αναγνώριση προτύπων, τις διασταυρούμενες ομοιότητες αλλά και τις δοκιμές πολλαπλής ισορροπίας.

Στην ανάλυση volcano plot παρουσιάζεται η διαφορική σύγκριση των πρωτεϊνών σε N, WT μεταλλάγματα από βλαστίδια αλλά και άνθη του *A. thaliana* υπό συνθήκες θερμικής καταπόνησης. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με student t-test P: 0.05 και difference: 0.1 .

Αρχικά πριν κόψουμε το gel με τα δείγματα τα οποία θα στέλναμε για Mass Spec, κάναμε Western Blotting σε gel το οποίο περιείχε στα δείγματα που σχεδιάζαμε να απομονώσουμε από το gel και να στείλουμε για ανάλυση (**Εικόνα 6α**).

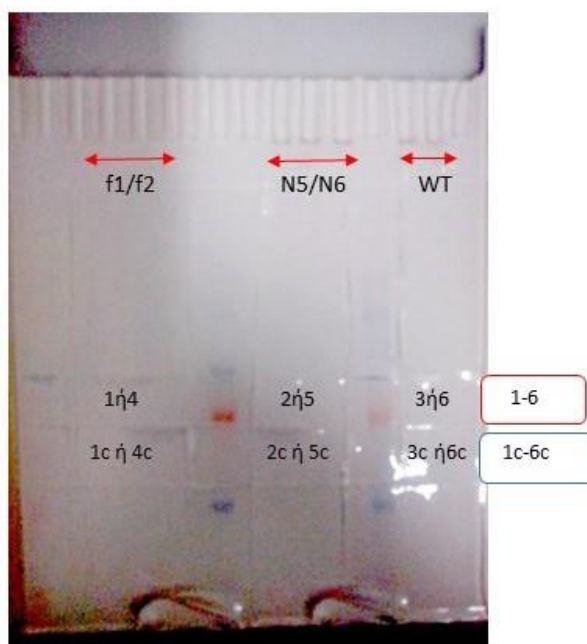
Τα δείγματα που στάλθηκαν για το Mass spec analysis απομονώθηκαν από 2 midi gel τα οποία είχαν στις ίδιες θέσεις τα αντίστοιχα δείγματα και η SDS-Page ηλεκτροφόρηση έγινε ταυτόχρονα. Απομονώσαμε 4 δείγματα από κάθε gel κόβοντας στο gel ακριβώς κάτω από τη μπλε γραμμή (100 kDa) και ακριβώς πάνω από το κόκκινο σημάδι (75 kDa) του marker μας. Τα δείγματα F1/F2 (άνθη από φυτά ROFB) είναι τα negative control μας ενώ τα βλαστίδια WT και N₅/N₆ double knockout (ROF1/ROF2) είναι δείγματα positive. Επίσης έγινε Mass Spec σε δείγματα control (για την ζώνη της ROF) τα οποία κόψαμε στις ίδιες θέσεις από 63 μέχρι 75

kDa από το κάθε gel. Η σειρά με την οποία τρέξαμε τα δείγματα μας και ο τρόπος με το οποίο κόψαμε τα gel φαίνονται αναλυτικά στις ακόλουθες εικόνες (10α, 10β).

Γελ από το οποίο απομονώθηκε η ζώνη των 80 kDa



Εικόνα 10α : Σειρά φόρτωσης δειγμάτων για πρωτεομική ανάλυση



Εικόνα 10β: Gel μετά από ηλεκτροφόρηση SDS-Page, προς απομόνωση δειγμάτων για την πρωτεομική ανάλυση. Τα σημεία 1-6 είναι μεταξύ των 75-100 kDa, ενώ τα 1c-6c βρίσκονται μεταξύ των 63-75 kDa. Διακρίνεται το αποτύπωμα της ζώνης προς αφαίρεση.

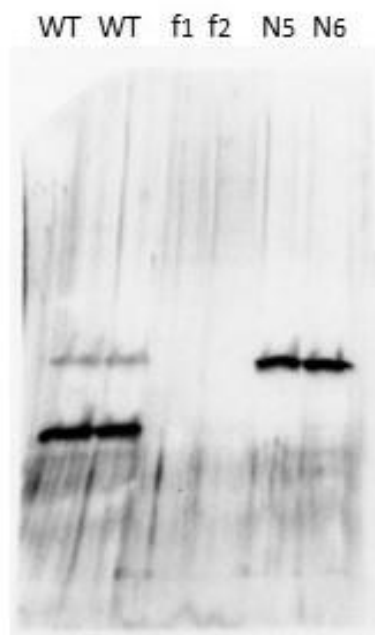
Δείγματα Mass Spec

Δείγμα	kD	Τύπος δείγματος	Negative or positive	Δείγματα Mass Spec
1	75-100	f1 εκχύλισμα άνθους	Negative	1.1 & 1.2
1c	63-75	f1 εκχύλισμα άνθους	Negative	1c
2	75-100	N5 εκχύλισμα από βλαστίδια	Positive	2.1 & 2.2
2c	63-75	N5 εκχύλισμα από βλαστίδια	Positive	2c
3	75-100	WTC εκχύλισμα από βλαστίδια	Positive	3.1
3c	63-75	WTC εκχύλισμα από βλαστίδια	Positive	3c, 3c2
4	75-100	f2 εκχύλισμα άνθους	Negative	4.1
4c	63-75	f2 εκχύλισμα άνθους	Negative	4c
5	75-100	N6 εκχύλισμα από βλαστίδια	Positive	-
5c	63-75	N6 εκχύλισμα από βλαστίδια	Positive	-
6	75-100	WTC εκχύλισμα από βλαστίδια	Positive	6.1
6c	63-75	WTC εκχύλισμα από βλαστίδια	Positive	-

Εικόνα11 : Σχεδιάγραμμα που απεικονίζει τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για Mass Spec.

Στον παραπάνω πίνακα απεικονίζονται αναλυτικά τα δείγματα που κόψαμε και ο εντοπισμός τους στο gel, αυτά που επιλέχθηκαν για Mass Spec, και ο χαρακτηρισμός τους (negative ή positive control).

ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (MASS SPEC)



Εικόνα 12: Western blotting σε δείγματα από ROFB flower buds, WT seedlings και N (double knockout) seedlings τα οποία έχουν υποστεί HS.

- **WT:** WT βλαστίδια, **f₁:** άνθη από φυτά ROFB, **N₅:** διπλό μετάλλαγμα ROFB1/ROFB2 από βλαστίδια, **N₆:** διπλό μετάλλαγμα ROFB1/ROFB2 από βλαστίδια

Στο Western Blotting που κάναμε για να επιβεβαιώσουμε την ταυτότητα των δειγμάτων που στείλαμε για Mass Spec (Εικόνα 12) έχουμε χρησιμοποιήσει τα ίδια εκχυλίσματα τα οποία χρησιμοποιήσαμε και στα gel από τα οποία απομονώσαμε τη ζώνη μας (Εικόνα 10α και 10β). Τα δείγματα συμπεριφέρονται με τον αναμενόμενο τρόπο, δηλαδή τα δείγματα f (ROFB άνθη) αποτελούν negative control και δεν εμφανίζουν καθόλου τη ζώνη 80 kDa, τα δείγματα WT εμφανίζουν μικρή συσσώρευση πρωτεϊνών στη ζώνη μας και τέλος τα δείγματα N εμφανίζουν το πιο έντονη συσσώρευση στα 80 kDa.

Υποψήφιες πρωτεΐνες για την ζώνη των 80 kDa από Mass Spec

Protein	Gene name	Code
Jacalin-related lectin 34	JAL 34	O04310
Isocitrate lyase	ICL	P28297
TSA1-like protein	NAI2	Q9LSB4
Nitrile-specifier protein 4	NSP4	O04316
Heat shock protein 90-1	HSP90-1	P27323
Peroxisomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein MFP2	MFP2	Q9ZPI5
12S seed storage protein CRC	CRC	Q96318
12S seed storage protein CRA1	CRA1	P15455
Heat shock 70 kDa protein 6	HSP70-6	Q9STW6
Elongation factor G	CPEFG	Q9SI75
Jacalin-related lectin 4	JAL4	Q9LQ31
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) 1	PCK1	Q9T074
Sucrose synthase 4	SUS4	Q9LXL5
Sucrose synthase 3	SUS3	Q9M111
Protein PLASTID TRANSCRIPTIONALLY ACTIVE 10	PTAC10	F4JF21
MAR-binding filament-like protein 1	MFP1	Q9LW85

Εικόνα 14: Υποψήφιες πρωτεΐνες για την ζώνη των 80 kDa που προέκυψαν έπειτα από πρωτεομική ανάλυση/Mass Spec σε δείγματα WT και N από βλαστίδια και από ROFB άνθη (negative control)

Στη συνέχεια παρατίθενται περαιτέρω πληροφορίες για ορισμένες από τις στατιστικά σημαντικές πρωτεΐνες που προέκυψαν από το Mass Spec.

- **Jacalin-related lectin 34**
Βιολογική λειτουργία: Απόκριση στο κρύο
Μοριακή λειτουργία: Δέσμευση ιόντων χαλκού, δέσμευση υδατανθράκων
Υποκυτταρική θέση: Κυτοσόλιο και πυρήνας
- **Heat shock protein 90-1**
Λειτουργία: Δρα ως πρωτεΐνη συνοδός (chaperon) και σταθεροποιεί τα ενδιάμεσα παράγωγα της αναδιπλούμενης πρωτεΐνης και τα απελευθερώνει ταχέως τη στιγμή που ελαττώνονται οι συνθήκες του stress
Υποκυτταρική θέση: Κυτοσόλιο, πλασματική μεμβράνη
- **Isocitrate lyase**
Λειτουργία : Εμπλέκεται στην κινητοποίηση αποθηκευμένων λιπιδίων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης βλαστιδίων από φυτά μεγάλου ύψους
Μοριακή λειτουργία: Δέσμευση ιόντων μετάλλου, δράση ισοκιτρικής λυάσης
Βιολογικές διαδικασίες: κύκλος γλυκοξυλικού, κύκλος τρικαρβοξυλικού οξέος
Υποκυτταρική θέση: Περοξισώματα
- **Elongation factor G**
Μοριακή λειτουργία: Δέσμευση ATP , δράση GTPάσης, δέσμευση GTP, δέσμευση mRNA, δράση παράγοντα επιλογής της μετάφρασης
Βιολογικές διαδικασίες: Οργάνωση του χλωροπλάστη, μετάφραση στα μιτοχόνδρια, μετά-εμβρυική ανάπτυξη, βλάστηση σπόρων
Υποκυτταρική θέση: Χλωροπλάστες
- **Nitrile-specifier protein 4**
Μοριακή λειτουργία: Δέσμευση υδρογονανθράκων, δράση ρυθμιστή ενζύμων
Βιολογικές διαδικασίες: Καταβολική διεργασία γλυκοσινολατης, βιοσυνθετική διαδικασία νιτριλίου
Υποκυτταρική θέση: κυτοσόλιο, πυρήνας

ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν πιθανοί παράγοντες οι οποίοι ενδέχεται να εμπλέκονται στον μηχανισμό της θερμοανθεκτικότητας του φυτού *A. thaliana*, και οι οποίοι σχετίζονται με τις πρωτεΐνες συνοδούς (FKBP chaperones) ROF1 και ROF2, πρωτεΐνες που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην θερμοανθεκτικότητα και στην ανταπόκριση των φυτών σε ένα εύρος περιβαλλοντικών καταπονήσεων όπως η ξηρασία, η αλατότητα και το ωσμωτικό στρες (Aviezer-Hagai et al., 2007). Συγκεκριμένα, μελετήθηκε μία ζώνη η οποία βρίσκεται στα 80 kDa και αναγνωρίζεται από το αντίσωμα της ROF (Karali et al., 2012 and Oxley et al., 2013).

Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από σπόρους WT, και μεταλλάγματα των ROF, δηλαδή ROFB, *rof2*⁻ και N του *A. thaliana* αλλά και άνθη ROFB για την μελέτη της αρτιότητας της ζώνης των 80 kDa. Τα δείγματα από τα ROFB άνθη αποτελούν ιδανικό control καθώς δεν εμφανίζουν ποτέ την ζώνη που μελετάμε (Εικόνα 6α και 12) σε αντίθεση με τα υπόλοιπα δείγματα από βλαστίδια 5 ημερών τα οποία εμφανίζουν πάντα την ζώνη υπό μελέτη με διαφορές στην ένταση της (Εικόνα 6β). Έτσι, όσον αφορά τις διαφορές στη συσσώρευση της πρωτεΐνης στη ζώνη των 80 kDa, η πιο έντονη συσσώρευση παρατηρείται στα δείγματα των *rof2*⁻ και N βλαστίδιων. Μεταξύ των τελευταίων η ένταση της εμφάνιση της ζώνης παρουσιάζει αμελητέες διαφοροποιήσεις (Εικόνα 7α και 7β). Στα δείγματα από WT και ROFB βλαστίδια η ένταση της εμφάνισης της 80 kDa είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με αυτή των φυτών *rof2*⁻ και N (Εικόνα 7α και 7β). Από αυτά τα αποτελέσματα οδηγούμαστε στο συμπέρασμα πως η παρουσία της ROF2 πρωτεΐνης είναι αυτή που ενδεχομένως έχει καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση της 80 kDa ζώνης. Επίσης η ζώνη αυτή δεν μπορεί να αποτελεί τροποποίηση των ιδίων των ROF πρωτεϊνών, παρότι αναγνωρίζεται από το ίδιο αντίσωμα, δεδομένου της διαφορετικής της εμφάνισης μεταξύ δειγμάτων και της ύπαρξής της στα διπλά μεταλλάγματα από τα οποία απουσιάζουν πλήρως και οι δύο ROF. Παρά ταύτα η ταυτότητά της διερευνήθηκε περεταίρω με φασματομετρία μάζας η οποία και απέδειξε την αρχική αυτή υπόθεση, δηλαδή ότι δεν πρόκειται για τροποποίηση των ιδίων των ROF πρωτεϊνών. Κατά συνέπεια πιθανολογήθηκε συνεργασία της ROF2 πρωτεΐνης με την ή τις πρωτεΐνες της ζώνης αυτής. Επίσης κατά τη διάρκεια της μελέτης αυτής βρέθηκε ένα μετάλλαγμα της πρωτεΐνης ROF2⁻ και συγκεκριμένα το *rof2*⁻ 3blue για το οποίο η ένταση της συσσώρευσης της ζώνης εμφανίζεται επανειλημμένα να είναι σε μεγάλο βαθμό χαμηλότερη από αυτή των υπολοίπων δειγμάτων *rof2*⁻ αλλά και σε σύγκριση με την ένταση σε όλα τα υπόλοιπα μεταλλάγματα (Εικόνα 5γ και 7α). Το συγκεκριμένο δείγμα συμπεριφέρεται με τον αναμενόμενο τρόπο όσο αφορά την έκφραση της ROF1 δηλαδή την εκφράζει και εμφανίζεται με την ίδια ένταση που εμφανίζεται και στα υπόλοιπα *rof2*⁻. Αυτή η παρατήρηση παρουσιάζει ενδιαφέρον καθώς το *rof2*⁻ 3blue μπορεί να αποτελεί πιθανό μετάλλαγμα για την πρωτεΐνη της ζώνης 80 kDa και θα μελετηθεί περεταίρω μελλοντικά.

Ακολούθησε περαιτέρω χαρακτηρισμός της ζώνης των 80 kDa αφού προηγήθηκε υποκυτταρική κλασμάτωση με σκοπό τον εμπλουτισμό της και συνεπώς εν μέρη καθαρισμό της. Αυτό επιτεύχθηκε με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις εκχυλισμάτων των βλαστίδιων τόσο σε WT όσο και των μεταλλαγμάτων των ROF πρωτεϊνών. Για τις διαδοχικές εκχυλίσεις χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα HEDSP στο οποίο προστέθηκαν και απορρυπαντικά με διαδοχική σειρά NP40, Triton και SDS ως το πιο ισχυρό. Μετά από τον προαναφερθέντα εμπλουτισμό προκύπτει πως η ζώνη των 80 kDa εμφανίζεται μόνο στο Pellet (μεμβρανικό κλάσμα) και όχι στο υπερκείμενο (διαλυτό κλάσμα/κυτταρόπλασμα) (εικόνες 9α, 9β και 9γ). Το γεγονός ότι η ζώνη εμφανίζεται μόνο στο Pellet υποδεικνύει πως πρόκειται για μεμβρανικές, ή ισχυρά συσχετιζόμενες με μεμβράνες, πυρήνα ή και ριβοσώματα όπως και άλλων μεμβρανικών τμημάτων, πρωτεΐνες. Παρά ταύτα ο εντοπισμός αυτός δεν αποκλείει την ύπαρξη τους σε άλλα υποκυτταρικά τμήματα, τα οποία όμως δεν εμπλουτίζονται όπως τα μεμβρανικά κατά την κλασμάτωση, όπως είναι το κυτταρόπλασμα στο διαλυτό τμήμα/υπερκείμενο. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να επιβεβαιωθεί μόνο με ηλεκτρονική μικροσκοπία και στερεομετρική ανάλυση.

Η προσθήκη ισχυρού απορρυπαντικού όπως το SDS στο ρυθμιστικό διάλυμα HEDSP οδηγεί σε αύξηση της καθαρότητας της ζώνης χωρίς όμως να χαθεί ποσότητα πρωτεΐνης από αυτή στο υπερκείμενο. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι στο Western Blotting που πραγματοποιήθηκε σε δείγματα από pellet (positive control) και υπερκείμενα (negative control) από φυτά WT και μεταλλαγμάτων των ROF, δηλαδή ROFB, *rof2*⁻ και N, παρατηρήθηκε αύξηση στην διαφορά της έντασης της συσσώρευσης της ζώνης μεταξύ των δειγμάτων από μεταλλάγματα *rof2* και N σε σύγκριση με αυτά των ROFB μεταλλαγμάτων αλλά και των WT φυτών (Εικόνα 9α). Δηλαδή, παρατηρήθηκε αύξηση της έντασης της ζώνης στα δείγματα από μεταλλάγματα *rof2* και N σε σχέση με το ένταση που παρατηρείται στο ολικό εκχύλισμα (whole extract) τους, ενώ αντίθετα η ένταση της ζώνης για τα μεταλλάγματα ROFB και τα WT φαίνεται να εξασθενεί ακόμη περισσότερο σε σχέση με το ολικό εκχύλισμα (Εικόνα 9α, 7α και 7β). Από τα προαναφερθέντα συνεπάγεται ο επιτυχής εμπλουτισμός και εντοπισμός των πρωτεϊνών που εμπεριέχονται στη ζώνη 80 kDa.

Τέλος έγινε πρωτεομική ανάλυση και Mass Spec σε εκχυλίσματα από άνθη ROFB μεταλλαγμάτων του *A.thaliana* αλλά και εκχυλίσματα από βλαστίδια WT και του μεταλλάγματος N (Εικόνα 10α, 10β και 12. Τα αποτελέσματα της πρωτεομικής αναλύθηκαν στο πρόγραμμα Perseus(1.6.2.1). Από τη διαφορική σύγκριση με το διάγραμμα “Volcano” που δημιουργήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Perseus (Εικόνα 13) ταυτοποιήθηκαν υποψήφιος πρωτεΐνες που εμπεριέχονται στη ζώνη των 80 kDa. Μεταξύ αυτών βρέθηκαν δυο πρωτεΐνες που εμπλέκονται στις θερμικές καταπονήσεις και συμβάλουν στην θερμοανθεκτικότητα του φυτού (HSP90-1 και HSP70-6). Επίσης ανάμεσα στις σημαντικές πρωτεΐνες βρέθηκαν αποθηκευτικές πρωτεΐνες σπόρων (seed storage proteins) όπως η CRA1 (12S seed storage protein CRA1) και CRC (12S seed storage protein CRC) οι οποίες

συσσωρεύονται στο αναπτυσσόμενο σπόρο και η κύρια λειτουργία τους είναι η αποθήκευση περίσσιου άνθρακα, αζώτου και θείου . Ακόμη στη διαφορική ανάλυση φαίνεται να ήταν αρκετά σημαντική η Jal34 (Jalalin-related lectin 34) η οποία μάλιστα παίζει ρόλο στην απόκριση του φυτού στο κρύο. Άρα επιβεβαιώθηκε η αρχική υπόθεση στην οποία αναμενόταν η ύπαρξη πρωτεϊνών οι οποίες συμμετέχουν στην αντοχή και επιβίωση των φυτών σε αβιοτικές καταπονήσεις. Φυσικά δεν αποκλείεται η εμφάνιση της συγκεκριμένης ζώνης να οφείλεται σε πρωτεΐνες/η λιγότερο σημαντικές (significant) σύμφωνα με το volcano plot, οι οποίες όμως έχουν μεγαλύτερη αντιγονικότητα για το αντίσωμα των ROF. Κάτι τέτοιο θα μελετηθεί με περαιτέρω βιοπληροφορική και πειραματική ανάλυση.

Από τις παρατηρήσεις αυτές ανοίγει ο δρόμος για περαιτέρω μελέτης της ζώνης αυτής. Με σκοπό την εύρεση παραπάνω πληροφοριών για τη ζώνη των 80 kDa και ίσως για την μελλοντική ταυτοποίηση της δημιουργήθηκε ένα πειραματικό σχέδιο το οποίο περιλαμβάνει Mass Spec και πρωτεομική ανάλυση σε υποκυτταρικά κλάσματα, βιοπληροφορική ανάλυση των πρωτεϊνών διαφορικής έκφρασης με σκοπό τον εντοπισμό εκείνων των οποίων πιθανώς αναγνωρίζονται από το αντίσωμα της ROF και τέλος μελέτη της διαφορικής έκφρασης της ζώνης σε φυτά τα οποία εκτίθενται απευθείας και χωρίς εγκλιματισμό σε θερμοκρασία των 42°C όπου έχει βρεθεί πως δεν παράγεται η ROF2 πρωτεΐνη (Aviezer-Hagai et al., 2007).

Συμπερασματικά φαίνεται πως στις πρωτεΐνες που βρίσκονται συσσωρευμένες στην ζώνη των 80 kDa , η συσσώρευση τους αυτή επηρεάζεται από την ύπαρξη της ROF2 πρωτεΐνης, αποτελούν πρωτεΐνες με υψηλή συγκέντρωση σε μεμβρανικά τμήματα και υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να σχετίζονται με την θερμοανθεκτικότητα αλλά και την επιβίωση των φυτών σε διαφορετικές αβιοτικές καταπονήσεις όπως την αυξημένη αλατότητα, την ξηρασία και το ωσμωτικό στρες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- A.WahidaS,GelaniaM,AshrafaM.R.Fooladb, Heat tolerance in plants: An overview, Environmental and Experimental Botany (2007)
- Berg M.J., Tymoczko L.J., Stryer L., ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ (ενιαίος τόμος), Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης (2013)
- Blakesley, R.W.; Boezi, J.A."A new Staining Technique for Proteins in Polyacrylamide Gels Using Coomassie Brilliant Blue G250," Anal Biochem 1977, 82 (2), 580-582
- David Meiri and Adina Breiman. Arabidopsis ROF1 (FKBP62) modulates thermotolerance by interacting with HSP90.1 and affecting the accumulation of HsfA2-regulated sHSPs. The Plant Journal (2009)
- Markus Geisler and Aure'lien Bailly.Te^te-a`-te^te: the function of FKBP in plant development. (2007)
- Harrar, Y., Bellini, C., & Faure, J. (2001). FKBP: at the crossroads of folding and transduction, 6(9), 426–431.
- H.B. Krishnan, E.H. CoeJr, in Encyclopedia of Genetics (2001)
- Karali, D., Oxley, D., Runions, J., Ktistakis, N., & Farmaki, T. (2012). The Arabidopsis thaliana Immunophilin ROF1 Directly Interacts with PI (3) P and PI (3, 5) P2 and Affects Germination under Osmotic Stress, 7(11).
- Keren Aviezer-Hagai, Julia Skovorodnikova,Mario Galigniana ,Odelia Farchi-Pisanty,Erez Maayan,Shmuel Bocovza,Yael Efrat, Pascal von Koskull-Do`ring, Nir Ohad, Adina Breiman. Arabidopsis immunophilins ROF1 (AtFKBP62) and ROF2 (AtFKBP65) exhibit tissue specificity, are heat-stress induced,and bind HSP90. Plant Mol Biol (2007)
- Lincoln Taiz, EduardoZeiger, IanM. Møller, and AngusMurphy, "Plant Physiology", Sinauer, Associates Inc., 5th Edition (2010), επιμέλεια μετάφρασης: Κωνσταντίνος Θάνος, τρέχουσα έκδοση: 2013
- Meiri, D., Tazat, K., Avni, A., Breiman, A., Fk, I. Á., & Tpr, Á. H. S. P. Á. (2010). Involvement of Arabidopsis ROF2 (FKBP65) in thermotolerance, 2, 191–203.
- Meng Guo¹, Jin-Hong Liu¹, Xiao Ma¹, De-Xu Luo², Zhen-Hui Gong^{1*} and Ming-Hui Lu^{1*}The Plant Heat Stress Transcription Factors (HSFs): Structure, Regulation, and Function in Response to Abiotic Stresses .(2016)
- Yaël Harrar, Catherine Bellini and Jean-Denis Faure. FKBP: at the crossroads of folding and transduction. Plant science. (2001)
- Zhu, J., (2017). Abiotic stress signalingand responses in plants,167(2),313-324, Cell