



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της φοιτήτριας
Λέφα Παρασκευής

***Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ROF PRase ΣΤΗΝ
ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ***



ΛΑΡΙΣΑ 2019

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ROF PPIase ΣΤΗΝ ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

THE ROLE OF ROF PPIases IN PLANT THERMOTOLERANCE

Τριμελής επιτροπή:

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

Παπαδοπούλου Καλλιόπη (συνεπιβλέπουσα): αναπληρώτρια καθηγήτρια τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Αμούτζιας Γρηγόριος: επίκουρος καθηγητής τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	6
Περίληψη	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1. Αβιοτικές καταπονήσεις	9
1.1 Θερμοκρασιακές καταπονήσεις.....	11
2. ΡΡΙΑSE και ο ρόλος τους	12
2.1 Δεσμός προλίνης.....	12
2.2 Πρωτεΐνες με λειτουργία ΡΡΙΑSE	14
2.3 Δράση ΡΡΙΑse στην Arabidopsis	17
3. ROF1 και ROF2.....	18
3.1 Δομή και λειτουργία πρωτεϊνών	18
4. Σκοπός	21
1. Οργανολογία.....	22
2. Τεχνικές	23
2.1 Απολύμανση σπόρων	23
2.2 Ηλεκτροφόρηση/SDS-PAGE	24
2.3 Μονιμοποίηση gel	27
2.4 Ανοσοαποτύπωμα Western blot.....	27
2.5 Φασματομετρία μάζας	28
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	31
1. Πείραμα θερμικής καταπόνησης σε βλαστίδια.....	31
1.1 Αποτελέσματα πειράματος heat stress σε βλαστίδια.....	32
2. Πείραμα φασματομετρίας μάζας σε βλαστίδια	37
2.1 Αποτελέσματα πρωτεϊνικών προφιλ έπειτα από μονιμοποίη του gel και χρώση με Coomassie Brilliant Blue.....	37
2.2 Αποτελέσματα MasSpec	40
ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	47
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51

ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ

Χημικά αντιδραστήρια:

Ac: acrylamide/ακρυλαμίδη

AgNO₃: νιτρικός άργυρος

APS: ammonium persulfate/υπερθειικό αμμώνιο

BSA: bovine serum albumin/αλβουμίνη βόειου ορού

DTT: dithiothreitol/ 1,4-διθειοθρεϊτόλη

EtOH: ethanol/αιθανόλη

SDS: sodium dodecylsulfate/ δωδεκακυκλοθειικό νάτριο

TEMED: N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine/ τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη

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

Λοιπές συντομεύσεις:

AT: Acquired Thermotolerance/ επίκτητη θερμοανθεκτικότητα

CaM-Bds: calmodulin-binding domains/ περιοχές πρόσδεσης της καλμοδουλίνης

Control: πείραμα ελέγχου (22 °C)

CyPs: cyclophilins/κυκλοφιλίνες

DAG: diacylglycerol / διακυλογλυκερόλη

N: rof1-/rof2-double knockout / απουσία των γονιδίων ROF1 και ROF2

FK506: ανοσοκατασταλτικό φάρμακο

FKBP: FK506 binding protein / πρωτεΐνες πρόσδεσης στο FK506

Heat stress: θερμική καταπόνηση

HSFs: Heat Shock Factors / μεταγραφικοί παράγοντες θερμικού σοκ

HSPs: Heat Shock Proteins/πρωτεΐνες θερμικού σοκ

kDa: kiloDalton

MAPK: mitogen-activated protein kinase/ πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα

Mass Spec: Mass Spectrometry/ φασματομετρία μάζας

Mutant: μεταλλαγμένο στέλεχος

MQ: Milli-Q water/Milli-Q νερό (υψηλής καθαρότητας)

N: rof1-/rof2- double knockout

OE: ROF1 overexpression/ υπερέκφραση του γονιδίου της ROF1

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis/ ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης

PPIase: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase/ cis-trans ισομεράση της πεπτιδυλοπρολίνης

ROF: rotamase

rof1: ROF1 knockout/ απουσία γονιδίου ROF1

rof2: ROF2 knockout/ απουσία γονιδίου ROF2

RyR: υποδοχέας ρυανοδίνης

Seedling: βλαστίδια

SUMO: small ubiquitin-like modifier/ μικρός τροποποιητής με δράση τύπου ουβικουιτίνης

TPR: tetratricopeptide domain/ επανάληψη τετρατρικοπεπτιδίου

Western Blot: ανοσοαποτύπωμα τύπου Western

WT: wild type/ αγρίου τύπου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (Ε.Κ.Ε.Τ.Α), στο Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών (ΙΝ.Ε.Β), το οποίο δραστηριοποιείται ενεργά στο ευρύ πεδίο των βιοεπιστημών και στην αναβάθμιση της έρευνας στην Ελλάδα. Υπεύθυνη της πτυχιακής εργασίας ήταν η κυρία Θεοδώρα Φαρμάκη, ερευνήτρια Β', την οποία ευχαριστώ ιδιαίτερα για την πολύτιμη βοήθεια της, το χρόνο που μου αφιέρωσε, την κατανόηση που μου παρείχε και τις γνώσεις που φρόντιζε να μου μεταφέρει καθ'όλη τη διάρκεια της εργασίας μου από τα πρώτα πειράματα έως την τελική συγγραφή του κειμένου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Μαρτίνα Σαμιωτάκη, ερευνήτρια στο Β.Σ.Ρ.Σ. "Alexander Fleming", καθώς ανέλαβε τα δείγματά μου για πρωτεομική ανάλυση με φασματομετρία μαζών. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην κυρία Καλλιόπη Παπαδοπούλου, αναπληρώτρια καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, που δέχτηκε να είναι συνεπιβλέπουσα στην τριμελή επιτροπή και τον κύριο Γρηγόριο Αμούτζια, επίκουρο καθηγητή του τμήματος, για την προτροπή και καθοδήγησή του στην συνεργασία μου με την κυρία Φαρμάκη.

Ακόμα, θέλω να ευχαριστήσω την αγαπημένη μου οικογένεια και τον φίλο μου Ε. Πάντσιο, οι οποίοι βρίσκονται πάντα στο πλάι μου, με βοηθούν και με στηρίζουν ανεξαρτήτως περιστάσεων. Τέλος, δε θα μπορούσα να ξεχάσω τον παππού και την γιαγιά μου χωρίς την πολύτιμη συμβολή των οποίων δεν θα μπορούσα ποτέ να πραγματοποιήσω την ακαδημαϊκή μου προσπάθεια και για τον λόγο αυτό τους είμαι ευγνώμων.

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία διεξήχθη διαφορική σύγκριση κατόπιν θερμικής καταπόνησης στο φυτό *A. thaliana*, των μεταλλαγμάτων της ROF, τόσο μεταξύ τους όσο και με φυτά WT, με τη χρήση φασματομετρίας μάζας, και τα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν για να μελετηθεί η επίδραση των ROF PPIase κατά τη διάρκεια της απόκτησης θερμοανθεκτικότητας στα φυτά. Τα δεδομένα μας τονίζουν τον κεντρικό ρόλο που διαδραματίζουν αυτές οι δύο πρωτεΐνες με δράση PPIase στη θερμική καταπόνηση και δείχνουν την άμεση επίδρασή που έχουν στην συσσώρευση άλλων ενζύμων που συμμετέχουν σε κυτταρικές λειτουργίες όπως η κυτταρική διαίρεση και ο σχηματισμός της κυτταρικής πλάκας του φυτού. Ειδικότερα δείχνουμε ότι τόσο η ROF1 όσο και η ROF2 επηρεάζουν τη συσσώρευση του SEC14 ομόλογου, Patellin 1 και άλλων ισομορφών του που εντοπίζονται στην *A.thaliana*, δηλαδή των Patellin 2, 3 και 4. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν πως και οι δύο, ROF1 και ROF2, μπορούν να τερματίσουν τη συσσώρευση των Patellin 1 και να καταστείλουν αυτή των υπόλοιπων ισομορφών σε διαφορετικά επίπεδα. Καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως παρότι και οι δύο, ROF1 και ROF2, απαιτούνται για την πλήρη καταστολή της Patellin-1, η ROF2 έχει πιο δυσμενή επίδραση στην έκφρασή / συσσώρευση της

Abstract

In the present study, a differential screening following heat stress was performed in *A. thaliana* plants in WT and ROF mutants, using mass spectrometry, and the results were used in order to study the effect of the ROF PPlases during thermotolerance acquisition in plants. Our data highlight the central role of these two PPlases in heat stress and point to their direct effect on the accumulation of other enzymes participating in cellular functions such as cell division and cell plate formation. In particular we show that both ROF1 and ROF2 affect the accumulation of the SEC14 homologue, Patellin 1 and its other Arabidopsis isoforms i.e. Patellin 2, 3 and 4. Our results suggest the both ROF1 and ROF2 may abolish the accumulation of Patellin 1 and suppress the accumulation of the other isoforms at different levels. We conclude that although both ROF1 and ROF2 are required for the complete suppression of Patellin-1, ROF2 has a more adverse effect on its expression/accumulation.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Αβιοτικές καταπονήσεις

Τα φυτά είναι σύνθετοι οργανισμοί οι οποίοι, λόγω του περιορισμού τους στην περιοχή της αρχικής τους βλάστησης, τους επιβάλλεται να αντιμετωπίζουν συνεχώς μεταβαλλόμενες συνθήκες, οι οποίες καθορίζονται από το περιβάλλον τους. Οι μεταβολές αυτές δεν λειτουργούν πάντοτε υπέρ των φυτών. Συχνά δημιουργούνται δυσμενείς ή συνθήκες περιβαλλοντικής πίεσης που επηρεάζουν την αύξηση και την ανάπτυξή τους. Οι δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες διακρίνονται σε βιοτικό στρες, όπως η μόλυνση από παθογόνα και η επίθεση από φυτοφάγα ζώα και αβιοτικό, όπως η ξηρασία, η ζέστη, το κρύο, η έλλειψη θρεπτικών συστατικών και η περίσσεια αλάτων ή τοξικών μετάλλων στο έδαφος. Οι ανεπιθύμητες επιπτώσεις αυτών των αβιοτικών πιέσεων επιδεινώνονται από επερχόμενες κλιματικές αλλαγές, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη συχνότητα ακραίων καιρικών φαινομένων (Zhu, 2017).

Για να μπορέσουν να επιβιώσουν και να ευδοκιμήσουν στο σύνθετο περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται, τα φυτά έχουν αναπτύξει πολυάριθμους και ευέλικτους μηχανισμούς, ώστε να προσαρμόζονται με αμεσότητα. Η προσαρμογή (*adaptation*) αυτή χαρακτηρίζεται από γενετικές αλλαγές στο σύνολο του φυτικού πληθυσμού, οι οποίες έχουν παγιωθεί μέσω της φυσικής επιλογής κατά τη διάρκεια πολλών γενεών. Σε αντίθεση, τα μεμονωμένα άτομα ενός φυτικού είδους αποκρίνονται σε αλλαγές του περιβάλλοντος μέσω άμεσων μορφολογικών ή λειτουργικών αλλαγών που τους επιτρέπουν να αντεπεξέλθουν άμεσα στις νέες συνθήκες. Δεν απαιτούνται νέες γενετικές τροποποιήσεις και εάν η εκ γενετής απόκριση του φυτού προβλέπει την επιβίωσή του σε αντίξοες συνθήκες, μετά από επαναλαμβανόμενη έκθεση στις νέες περιβαλλοντικές πιέσεις, τότε η προσαρμογή του φυτού θεωρείται εγκλιματισμός (*acclimation*). Οι αποκρίσεις αυτές αναφέρονται και ως φαινοτυπική πλαστικότητα (*phenotypic plasticity*) και αντιπροσωπεύουν παροδικές τροποποιήσεις στη δομή και λειτουργία του μεμονωμένου ατόμου, οι οποίες μπορούν να αναστραφούν εάν μεταβληθούν οι κυρίαρχες συνθήκες του περιβάλλοντος. Η γενετική προσαρμογή και η φαινοτυπική πλαστικότητα συμβάλλουν από κοινού στην συνολική ανεκτικότητα του φυτού σε ακραίες συνθήκες του αβιοτικού περιβάλλοντος.

Τα φυτά για την ανάπτυξη τους απαιτούν ενέργεια (φως), νερό, άνθρακα και ανόργανα θρεπτικά συστατικά. Ως αβιοτική καταπόνηση ορίζεται η συνθήκη που μειώνει την ανάπτυξη και την απόδοση κάτω από τα βέλτιστα επίπεδα (Cramer et al. 2011). Όταν οι παράγοντες αυτοί αποκλίνουν από το σύνηθες εύρος των διακυμάνσεων τους, προκαλού-

νται πρωταρχικές και δευτερεύουσες φυσιολογικές και βιοχημικές αλλαγές στα φυτά ως απόκριση. Τα φυτά τα οποία δεν είναι γενετικά προσαρμοσμένα σε αυτά τα ακραία περιβάλλοντα (π.χ υψηλές θερμοκρασίες) ενεργοποιούν έναν αριθμό μηχανισμών μέσω των οποίων αντιμετωπίζουν τις επερχόμενες διαταραχές. Οι αποκρίσεις αυτές διεγείρονται από τους ποικίλους περιβαλλοντικούς παράγοντες οι οποίοι αναφέρθηκαν παραπάνω. Οι ευρέως χρησιμοποιούμενοι όροι ανθεκτικότητα στην καταπόνηση (*stress resistance*) και ανεκτικότητα στην καταπόνηση (*stress tolerance*) γίνονται περισσότερο κατανοητοί ως διαφορετικές εκφράσεις φαινοτυπικής πλαστικότητας, δηλαδή ο τρόπος με τον οποίο ένα δεδομένο φυτό (γονότυπος) ανταποκρίνεται σε μια αλλαγή του αβιοτικού περιβάλλοντος.

Συμπερασματικά, η ικανότητα ενός φυτού να επιβιώνει και να ευδοκιμεί σε δεδομένο περιβάλλον σχετίζεται με την ισορροπία που διαμορφώνεται μεταξύ προσαρμογής και φαινοτυπικής πλαστικότητας.

1.1 Θερμοκρασιακές καταπονήσεις

Τα φυτά εμφανίζουν στενό βέλτιστο εύρος τιμών θερμοκρασίας για την αύξηση και την ανάπτυξη τους. Τα μεσόφυτα, για παράδειγμα, που είναι μια κατηγορία χερσαίων φυτών προσαρμοσμένα σε εύκρατα περιβάλλοντα, εμφανίζουν στενή κλίμακα βέλτιστης θερμοκρασίας, περίπου 10 °C. Αν η περιβαλλοντική θερμοκρασία βρίσκεται εκτός ορίων, τότε μπορούν να προκληθούν βλάβες στο φυτό. Η ένταση και η διάρκεια της θερμοκρασιακής διακύμανσης μπορεί να προκαλέσει διαταραχές διαφορετικού μεγέθους. Η θερμοκρασιακή καταπόνηση προκαλεί βλάβες σε μεμβράνες και πρωτεΐνες.

Οι υψηλές θερμοκρασίες αυξάνουν τη ρευστότητα των μεμβρανικών λιπιδίων και μειώνουν την ισχύ των δεσμών υδρογόνου και των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πολικών ομάδων πρωτεϊνών που εντοπίζονται στην υδατική φάση της μεμβράνης. Έτσι χάνεται η τρισδιάστατη δομή που απαιτείται για τη σωστή λειτουργία των ενζύμων ή των δομικών συστατικών, που προκαλεί την απώλεια της κατάλληλης λειτουργικής δομής και της δραστηριότητας των ενζύμων. Οι αποδιαταγμένες πρωτεΐνες συνήθως σχηματίζουν συσσωματώματα και κατακρημνίζονται, δημιουργώντας σοβαρά προβλήματα μέσα στο κύτταρο. Η φωτοσύνθεση όσο και η αναπνοή αναστέλλονται από την θερμική καταπόνηση. Κατά κανόνα, οι υψηλές θερμοκρασίες αναστέλλουν το τάχος της φωτοσύνθεσης σε μεγαλύτερο βαθμό έναντι του τάχους της αναπνοής. Η απώλεια της ισορροπίας μεταξύ φωτοσύνθεσης και αναπνοής αποτελεί την κυριότερη αιτία των καταστροφικών επιδράσεων των υψηλών θερμοκρασιών. Σε επίπεδο μεμονωμένου φυτού, τα φύλλα που αναπτύσσονται στη σκιά διαθέτουν χαμηλότερο σημείο αντιστάθμισης έναντι των φύλλων

που αναπτύσσονται στο άπλετο ηλιακό φως, τα οποία θερμαίνονται περισσότερο. Η μειωμένη φωτοσυνθετική παραγωγικότητα μπορεί επίσης να είναι το αποτέλεσμα του κλεισίματος των στομάτων λόγω της καταπόνησης, της μείωσης της φωτοσυνθετικής επιφάνειας και μεταβολών στην κατανομή των φωτοσυνθετικών προϊόντων.

Η επίκτητη θερμοανθεκτικότητα (*Acquired Thermotolerance* -AT) είναι η ικανότητα των φυτών να αντιμετωπίζουν επαναλαμβανόμενες θερμικές διεγέρσεις. Επάγονται και συντίθενται μοριακοί συνοδοί (*molecular chaperones*) και πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSP's – *Heat Shock Proteins*) (περισσότερες λεπτομέρειες για τη δράση αυτών των πρωτεϊνών αναφέρονται παρακάτω). Η AT επάγεται με μη θανατηφόρο θερμική επεξεργασία των φυτών, η οποία φθίνει με το πέρασμα του χρόνου καθώς μειώνονται οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών θερμικού σοκ. Κεντρικό ρόλο έχουν οι μικρές πρωτεΐνες θερμικού σοκ (sHSPs), που ως μοριακοί συνοδοί προστατεύουν από το στρες, αναδιπλώνουν πρωτεΐνες, τις οποίες κατανέμουν ενδοκυτταρικά ή τις αποδιατάσσουν. Κεντρικοί ρυθμιστές της AT είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες θερμικού στρες (Hsfs) που είναι υπεύθυνοι για την έκφραση των γονιδίων που ανταποκρίνονται στη θερμότητα, των HSP's και των επιπρόσθετων μοριακών συνοδών. (*Meiri et al., 2010*).

Η οικογένεια των Hsfs στο *Arabidopsis thaliana* έχει 21 μέλη, από τα οποία η HsfA2 είναι μία πρωτεΐνη η οποία επάγεται ισχυρά από το θερμικό σοκ. Έχει προστατευτικό ρόλο σε επαναλαμβανόμενους κύκλους θερμικής καταπόνησης. Ένα μέλος της οικογένειας FKBP (FK506 binding-protein / πρωτεΐνη δέσμησης FK506), η *Arabidopsis* ROF1 (FKBP62), εμπλέκεται στην AT επηρεάζοντας τη μεταγραφική μηχανή του HsfA2 (*Meiri et al., 2010*).

2. PPIASE και ο ρόλος τους

2.1 Δεσμός προλίνης

Ο πεπτιδικός δεσμός που αναπτύσσεται μεταξύ αμινοξέων είναι επίπεδος. Αυτή η γεωμετρική προτίμηση οφείλεται στη φύση του χημικού δεσμού του πεπτιδίου, ο οποίος έχει, εν μέρει, χαρακτήρα διπλού δεσμού κάτι που του αποτρέπει να περιστρέφεται γύρω από τον εαυτό του. Η επίπεδη φύση του δεσμού εξηγείται από το ότι ο πεπτιδικός δεσμός δεν περιστρέφεται και έτσι περιορίζεται ο αριθμός των στερεοδιατάξεων του πεπτιδικού κορμού.

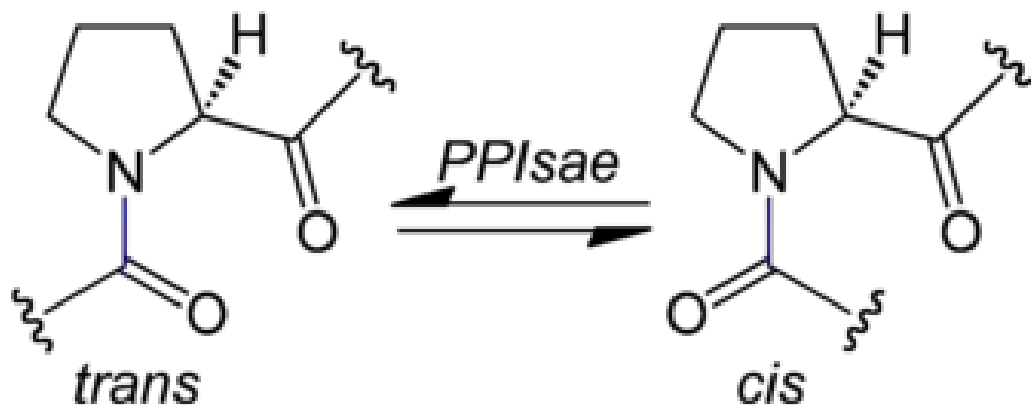
Μπορούν να υπάρξουν μόνο δύο διαμορφώσεις για έναν πεπτιδικό δεσμό, *cis* και *trans*. Στη *cis* διαμόρφωση οι δύο α-άνθρακες βρίσκονται στην ίδια πλευρά του πεπτιδικού δεσμού, ενώ στην *trans* διαμόρφωση βρίσκονται απέναντι. Όλοι σχεδόν οι πεπτιδικοί δε-

σμοί των πρωτεϊνών έχουν διαμόρφωση *trans*, καθώς οι αλλοστερικές αλληλεπικαλύψεις των ομάδων που συνδέονται στα άτομα α-άνθρακα παρεμποδίζουν την διαμόρφωση *cis* και αφήνουν ελεύθερη μόνο την *trans*, δημιουργώντας έτσι μια προτίμηση στη δεύτερη. Ο δεσμός πεπτιδυλοπρωλίνης που σχηματίζεται ανάμεσα σε ένα αμινοξύ X και την προλίνη (X-Pro) αποτελεί εξαίρεση. Οι δεσμοί της προλίνης έχουν διαμόρφωση *cis* αντί *trans* διότι το άζωτο της προλίνης είναι δεσμευμένο σε δύο τετρασθενή άτομα άνθρακα, γεγονός που περιορίζει ουσιαστικά τις στερικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των *trans* και *cis* μορφών. Η *cis* στερεοδιάταξη παραμένει ακόμα και έπειτα από την αντικατάσταση της *cis*-πρωλίνης με κάποιο άλλο αμινοξύ. Η προλίνη αποτελεί ένα ιδιαίτερο αμινοξύ, το οποίο επηρεάζει την πρωτεϊνική αρχιτεκτονική καθώς ο δακτύλιος της δομής της την κάνει πιο άκαμπτη από ότι άλλα αμινοξέα.

Οι πρωτεΐνες, για να αποκτήσουν τη βιολογική τους δράση, πρέπει να αναδιπλωθούν προκειμένου να δημιουργηθεί η τρισδιάστατη δομή τους, η οποία καθορίζεται πάντα από την αμινοξική αλληλουχία της εκάστοτε πρωτεΐνης. Οι πρωτεΐνες που λειτουργούν ως καταλύτες στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών και στο σχηματισμό μακρομοριακών συμπλόκων ονομάζονται μοριακοί συνοδοί (*molecular chaperones*). Οι πρωτεΐνες αυτές εμποδίζουν τα υδρόφοβα τμήματα των πρωτεϊνών να έρθουν σε επαφή με άλλα υδρόφοβα μόρια και συμβάλλουν στην αποφυγή του σχηματισμού αδιάλυτων συσσωματωμάτων. Πολλά από αυτά τα μόρια ταυτοποιήθηκαν αρχικά ως πρωτεΐνες που επάγονται κατά την έκθεση των κυττάρων σε υψηλές θερμοκρασίες, και για τον λόγο αυτό ονομάστηκαν πρωτεΐνες θερμικού σοκ (*Heat Shock Proteins* - HSPs). Οι HSPs σταθεροποιούν άλλες πρωτεΐνες και διευκολύνουν την επαναδίπλωση τους μετά τη μερική αποδιάταξη που υφίστανται λόγω έκθεσής τους σε υψηλές θερμοκρασίες. Οι μοριακοί συνοδοί εμπλέκονται στην μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβρανικά οργανίδια και έχουν τη δυνατότητα να πραγματοποιούν ποιοτικό έλεγχο των πρωτεϊνών του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ). Πολλές νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες μεταφέρονται στο ΕΔ όπου και αποκτούν τις ανώτερες δομές τους με τη βοήθεια πρωτεϊνών συνοδών ή άλλων παραγόντων που προάγουν την αναδίπλωση. Οι σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες μεταφέρονται κατόπιν στη συσκευή Golgi και στη συνέχεια κατευθύνονται στο σωστό μεμβρανικό οργανίδιο ή στον εξωκυττάριο χώρο. Πρωτεΐνες που δεν έχουν αναδιπλωθεί σωστά ανιχνεύονται από τους μηχανισμούς ποιοτικού ελέγχου της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης και ανακατευθύνονται με διαφορετικό μηχανισμό στην ουβικουίνωση των λάθος αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και στην αποικοδόμησή τους από τα πρωτεασώματα.

Εκτός των μοριακών συνοδών, τα κύτταρα διαθέτουν και έναν άλλο τύπο ενζύμου που καταλύει την αναδίπλωση πρωτεϊνών, την *cis-trans* ισομεράση της πεπτιδυλοπρωλ-

ίνης (*Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase* – PPIase). Οι PPIase καταλύουν τον ισομερισμό ανάμεσα στη *cis* και *trans* διαμόρφωση των πεπτιδικών δεσμών που προηγούνται των καταλοίπων προλίνης (**Εικόνα 1**).



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση των *cis* και *trans* διαμορφώσεων του πεπτιδικού δεσμού που σχηματίζει η προλίνη με άλλο αμινοξύ.

2.2 Πρωτεΐνες με λειτουργία PPIASE

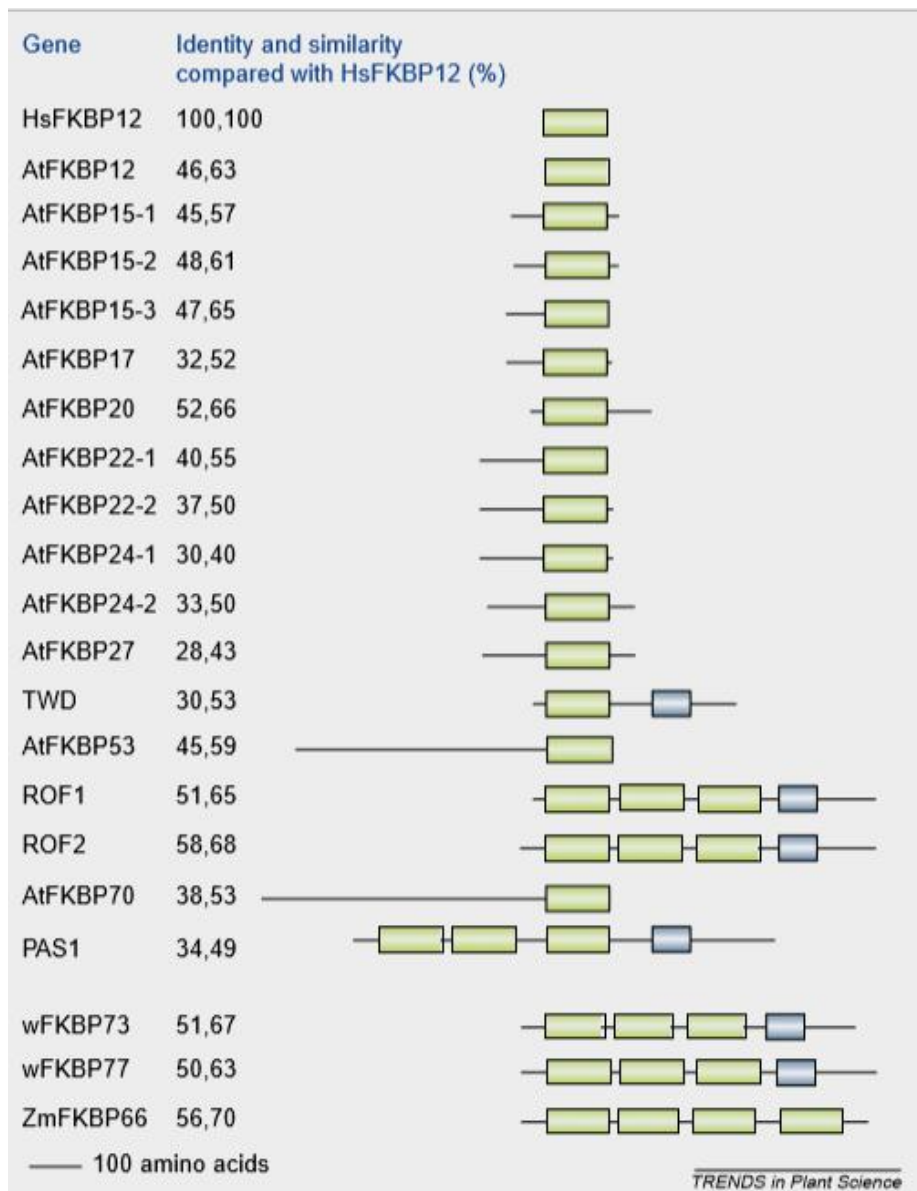
Υπάρχουν τρεις ενζυμικές οικογένειες οι οποίες διαθέτουν PPIase λειτουργία. Οι πρωτεΐνες που συνδέονται στην FK506 (*FK506-binding proteins* - FKBP), οι κυκλοφιλίνες και οι παρβουλίνες. Οι PPIase (γνωστές και ως ροταμάσες- ROF) καταλύουν τον ισομερισμό του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ μιας προλίνης και ενός γενικά ογκώδους υπολείμματος. Αυτή, η φυσικά αργή αντίδραση (10-100 s σε θερμοκρασία δωματίου και ουδέτερο pH), συμβαίνει μετά την πρωτεϊνική σύνθεση, η οποία δημιουργεί πεπτιδικούς δεσμούς στην αμινομάδα της προλίνης. Η αλληλομετατροπή *cis-trans*, η οποία μπορεί να επιταχυνθεί μέσω της δράσης των PPIase, είναι σημαντική για την τελική πρωτεϊνική δομή, επειδή η *cis* προλίνη εισάγει καμπύλες μέσα στην πρωτεΐνη (Harrar et al., 2001).

Οι FKBP βρίσκονται σε όλες τις τάξεις των οργανισμών. Έχουν απομονωθεί από φυτά, μύκητες και μερικά από αυτά παρουσιάζουν υψηλή ομοιότητα αλληλουχίας με τις FKBP θηλαστικών. Μερικές είναι εξαιρετικά συντηρημένες, ενώ άλλες εμφανίζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση. Ο πιο γνωστός ρόλος τους στα κύτταρα είναι ως υποδοχείς για ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες. Ωστόσο, οι περισσότερες κυτταρικές λειτουργίες των διαφορε-

τικών FKBP ακόμη είναι άγνωστες (*Harrar et al., 2001*). Διακρίνονται σε μικρές (χαμηλό μοριακό βάρος) και μεγάλες (υψηλό μοριακό βάρος).

Η FKBP12 αντιπροσωπεύει την ελάχιστη πεπτιδική αλληλουχία που φιλοξενεί τις δύο ιδιότητες των FKBP (δραστικότητα ΡΡ1άσης και υποδοχέας δέσμησης ουσιών). Ο υδρόφοβος πυρήνας της πρωτεΐνης που σχηματίζει τον θύλακα δέσμησης ορίζεται από δέκα αμινοξέα τα οποία είναι εξαιρετικά συντηρημένα μεταξύ των διάφορων ισομορφών του ενζύμου. Παρουσία της FK506, η FKBP12 προσδένεται στην Β ρυθμιστική υπομονάδα της ασβεστο-εξαρτώμενης φωσφατάσης καλσινευρίνης (CaN), παρεμποδίζοντας την πρόσβαση του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο της Α ρυθμιστικής υπομονάδας. Η αναστολή της CaN προκαλεί την καταστολή της δράσης των Τ-λεμφοκυττάρων στα θηλαστικά (*Harrar et al., 2001*).

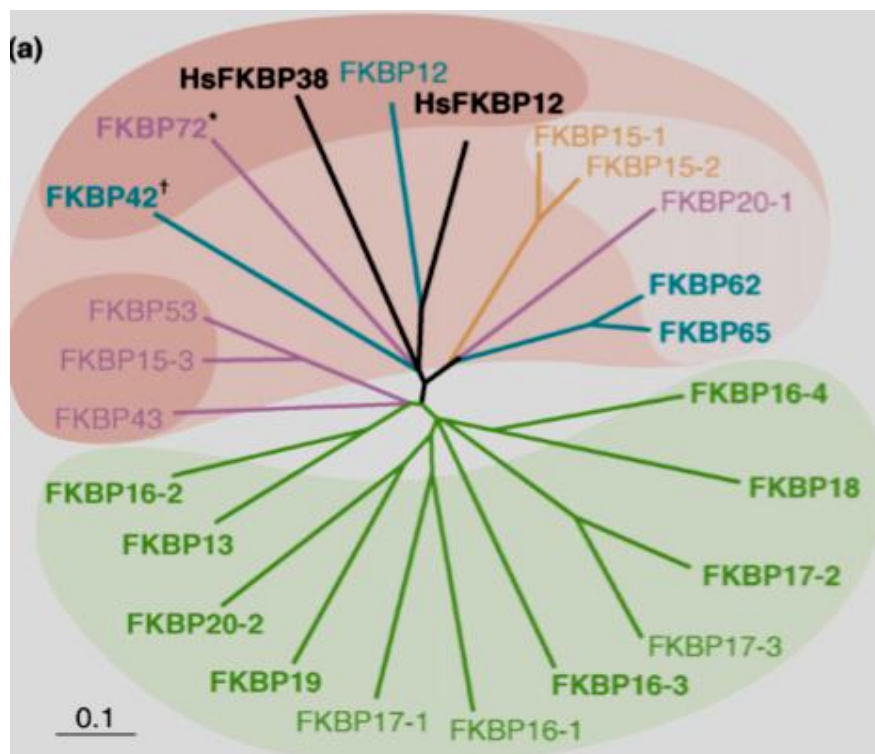
Οι FKBP υψηλού μοριακού βάρους διαφέρουν από την FKBP12 στο ότι περιέχουν μία ή περισσότερες περιοχές που μοιάζουν με FKBP12, μία περιοχή με επανάληψη τετρατρικοπεπτιδίου (*tetratricopeptide domain - TPR*) που αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες και ένα καρβοξυτελικό άκρο που στις περισσότερες περιπτώσεις συνδέεται με καλμοδουλίνη (*calmodulin-binding domains -CaM-Bds*). Αυτές οι περιοχές είναι πολύ σημαντικές για την αλληλεπίδραση των FKBP με άλλες πρωτεΐνες. Οι FKBP51 και FKBP52 είναι οι καλύτερα χαρακτηρισμένες FKBP υψηλού μοριακού βάρους στα θηλαστικά. Μέσω τη TPR περιοχής τους μπορούν να αλληλεπιδρούν με την HSP90, μία πρωτεΐνη θερμικού σοκ. Βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι η FKBP52, *in vitro*, λειτουργεί ως μοριακός συνοδός, ενώ καταστέλλει τη συσσώρευση συνθάσης κιτρικού και συμβάλλει στη συσσώρευση ενδιάμεσων αναδίπλωσης. Η FKBP52 βρέθηκε επίσης να αλληλεπιδρά με την καλμοδουλίνη μέσω του καρβοξυτελικού της άκρου. (*Harrar et al., 2001*)



Εικόνα 2: Διαφορές των FKBP στα φυτά. Σύγκριση FKBP από *Arabidopsis* με την ανθρώπινη FKBP12 (HsFKBP12). FKBP από σιτάρι (wFKBP73/77) και από καλαμπόκι (ZmFKBP66). Όμοιες περιοχές (πράσινο). FKBP12: ελάχιστη πεπτιδική αλληλουχία που φιλοξενεί τις δύο ιδιότητες των FKBP (δραστηκότητα PPIάσης και δέσμευση φαρμάκου). Συμβολίζεται το ποσοστό αναλογίας και ομοιότητας με την HsFKBP12. TPR περιοχές (tetraatricopeptide domain) (μπλε), καβοξυτελικό άκρο με περιοχές πρόσδεσης με καλμοδουλίνη (calmodulin-binding domains CaM-BDs) (Harrar et al., 2001)

2.3 Δράση PPIase στην Arabidopsis

Η *A. thaliana* διαθέτει 23 FKBP από τις οποίες οι 16 αποτελούνται από μία μόνο υπομονάδα και οι υπόλοιπες 7 από πολλαπλές υπομονάδες. Φυλογενετικές αναλύσεις έδειξαν ότι από τις FKBP με μία υπομονάδα, οι 11 ανήκουν στην ίδια οικογένεια και συσχετίζονται με τον θυλακοειδή των χλωροπλαστών. Οι υπόλοιπες 5 δεν έχουν κάποια σχέση με τον χλωροπλάστη. Αντίθετα φαίνεται να είναι πιο κοντά φυλογενετικά με τις FKBP με πολλαπλές υπομονάδες. Βρίσκονται σε όλα τα κυτταρικά διαμερίσματα (εκτός από τα μιτοχόνδρια) και φαίνεται να έχουν λειτουργίες που δεν σχετίζονται με τη φωτοσύνθεση (Εικόνα 3) (Geisler, 2007).



Εικόνα 3: Φυλογενετική σύγκριση των FKBP του Arabidopsis. FKBP με μία υπομονάδα που βρίσκονται στους χλωροπλάστες. (πράσινο). FKBP με μία ή περισσότερες υπομονάδες, έχουν διαφορετικές λειτουργίες και θέσεις στο κύτταρο. (κόκκινο) (Geisler, 2007)

Πολλές FKBP έχουν λειτουργία PPIase και γι' αυτό υπάρχει η εντύπωση ότι παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Η ανάλυση των δομών και των αλληλεπιδράσεων των μεγάλων φυτικών FKBP έδειξε ότι έχουν λειτουργικό ρόλο στον έλεγχο της ανάπτυξης των φυτών, πέρα από αυτόν της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Αυτές οι FKBP ρυθμίζουν μονοπάτια φυτικών ορμονών, στρατολογώντας πρωτεΐνες-στόχους μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Μερικές FKBP φυτών, όπως η ROF1 και ROF2 που έχουν λειτουργία PPIase, φαίνεται να επάγονται μετά από τραυματισμό ή άλλους παράγοντες που προκαλούν στρες στο φυτό όπως η θερμική καταπόνηση.

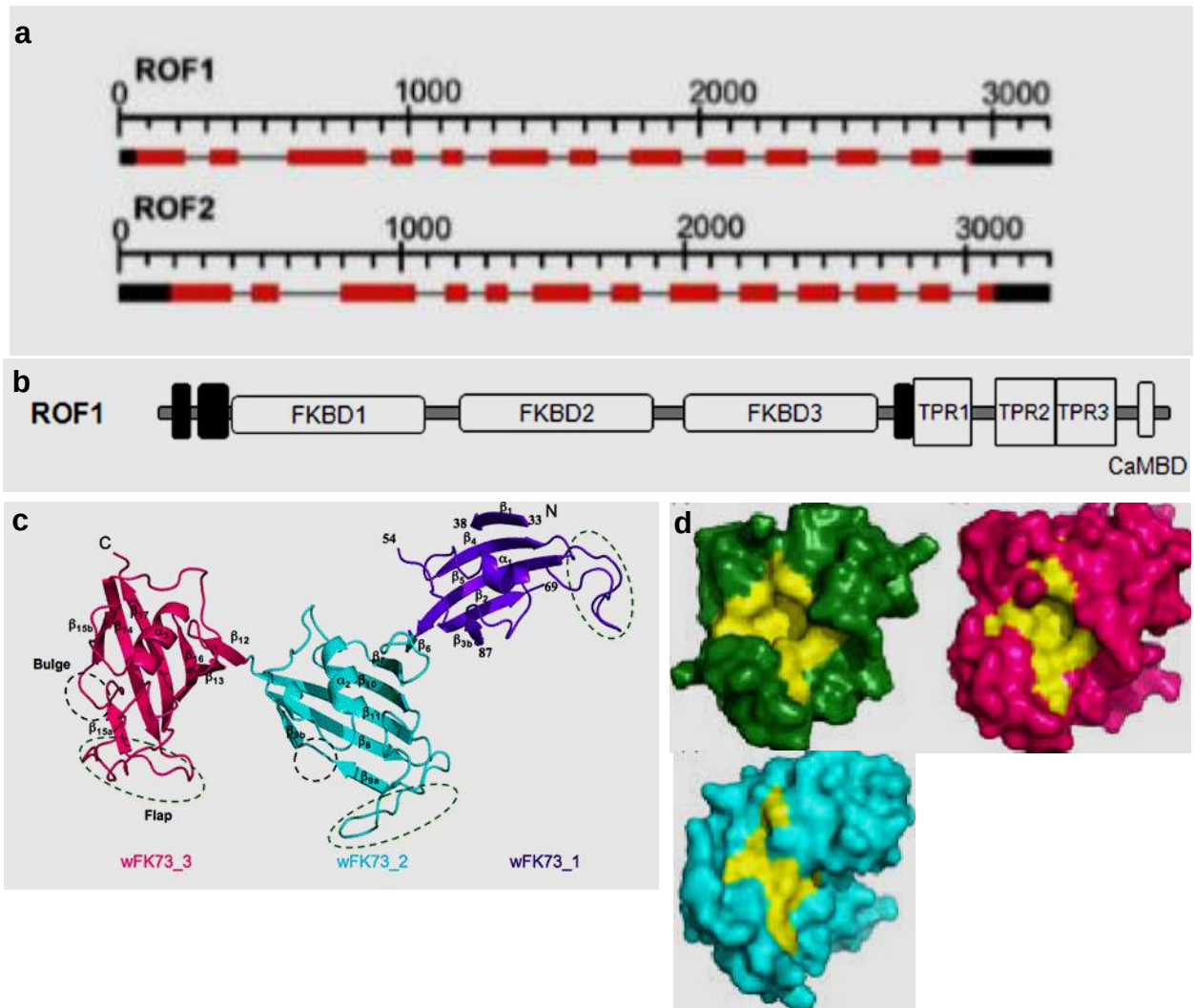
3. ROF1 και ROF2

3.1 Δομή και λειτουργία πρωτεϊνών

Οι FKBP62/ROF1 και FKBP65/ROF2 είναι δύο στενά συσχετιζόμενες πρωτεΐνες του *A. thaliana*. Διαθέτουν διακριτές λειτουργίες, ως μοριακοί βοηθοί/ακόλουθοι (chaperons) ή ως PPIase. Σε αντίθεση με τις ομόλογες τους στα θηλαστικά, διαθέτουν τρεις FKBD (*FK506-binding domain*), η τρίτη εκ των οποίων έχει άγνωστη ακόμα λειτουργία. Η έκφραση τους επηρεάζεται από διάφορα είδη στρες, όπως ο τραυματισμός του φυτού ή η υψηλή αλατότητα (Karali et al., 2012; Oxley et al., 2013). Η θερμική καταπόνηση φαίνεται να επάγει την έκφραση της ROF2 αλλά όχι της ROF1, όμως προτείνεται πως η ROF1 είναι αυτή που αλληλεπιδρά με HSP και όχι η ROF2 (Geisler, 2007).

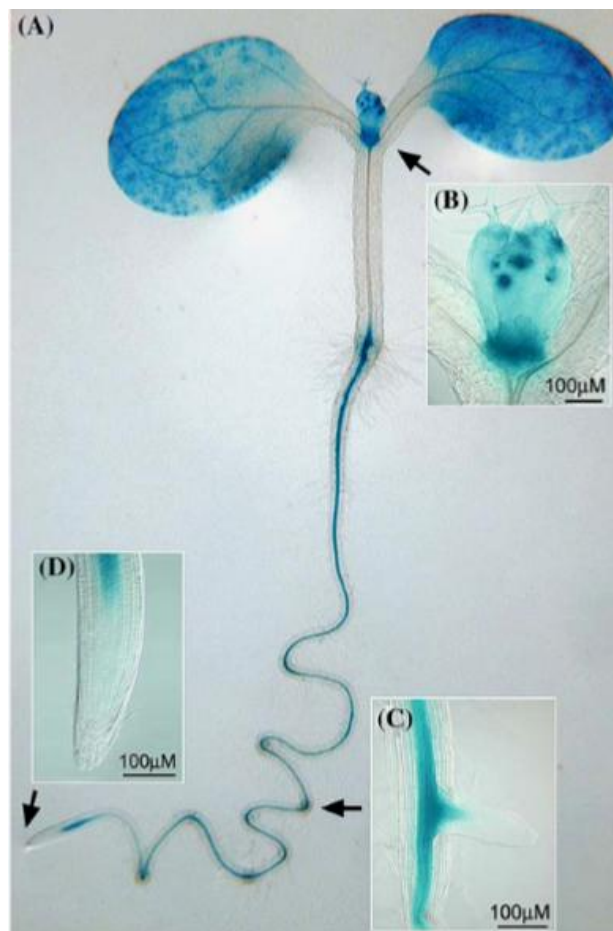
Η ROF1 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3, ενώ η ROF2 στο χρωμόσωμα 5. Η σύγκριση μεταξύ των γονιδιωματικών δομών τους αποκαλύπτει την ομολογία τους καθώς παρατηρείται μεγάλη ομοιότητα στην οργάνωση των εξονίων και των ιντρονίων (Aveizer-Hagai et al., 2007). Τα δύο γονίδια περιέχουν 13 εξόνια, που έχουν ίδιο περίπου μήκος και ίδια απόσταση μεταξύ των ιντρονίων. Οι διαφορές τους εντοπίζονται στο πρώτο και στο τελευταίο εξόνιο, με το 5'-UTR άκρο της ROF1 να είναι πιο μικρό, ενώ το 3'-UTR άκρο της είναι πιο μεγάλο από τα αντίστοιχά τους στην ROF2. Διαθέτουν τρεις περιοχές τύπου FKBP12 με λειτουργία PPIase, μία περιοχή TPR (υπεύθυνη για τη δέσμευση της HSP90) και μία περιοχή δέσμευσης καλμοδουλίνης (*calmodulin-binding domain* - CaM-BD). Η πρώτη περιοχή PPIάσης έχει δραστηριότητα PPIase και περιέχει τη θέση σύνδεσης της FK506. Οι δύο επιπλέον περιοχές PPIάσης διατηρούν μερική ταυτότητα του λειτουργικού τους τομέα. Η ROF1 διαθέτει τρεις TPR επαναλήψεις (Meiri et al., 2010). Τα αμινοξέα που είναι απαραίτητα για την πρόσδεση στην HSP90 στα θηλαστικά είναι συντηρημένα και στις ROF1, ROF2 (Εικόνα 4). Η υψηλή ομοιότητα μεταξύ των ROF1 και ROF2 φαίνεται να οφείλεται

σε γονιδιακό διπλασιασμό.



Εικόνα 4: Δομή και γονιδιωματική οργάνωση και ευθυγράμμιση ROF1, ROF2 πρωτεϊνών. a: Σχηματική αναπαράσταση γονιδίων ROF1 και ROF2. Η κόκκινη γραμμή καθορίζει τα εξόνια, η μαύρη γραμμή σηματοδοτεί το 5' / 3' -UTR και η λεπτή μαύρη γραμμή, την περιοχή ιντρονίου (Aviezer-Hagai et al., 2007) **b:** Οργάνωση δομικών περιοχών της ROF1: τρεις FKBD περιοχές, τρεις TPR επαναλήψεις, μία περιοχή δέσμησης καλμοδοουλίνης (Karali et al., 2012) **c:** Οργάνωση FKBP περιοχών στην ομόλογη της ROF1 στο σιτάρι (wFKBP73) μετά από κρυσταλλική ανάλυση και μοντελοποίηση (Unger et al., 2010) **d:** Επιφανειακή αναπαράσταση FKBP περιοχών που συγκρίνει το μέγεθος των υδρόφοβων κοιλοτήτων τους (κίτρινο) (Unger et al., 2010)

Με τη βοήθεια διαγονιδιακών φυτών *A. thaliana*, που εκφράζουν το γονίδιο β-γλυκορονιδάσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή της ROF1 (1.848 bp ανοδικά του κωδικόνιου ATG), παρατηρήθηκε το μοντέλο έκφρασης της πρωτεΐνης. Η δραστηριότητα του προβλεπόμενου υποκινητή-GUS αναλύθηκε κατά τη διάρκεια των αναπτυξιακών σταδίων. Σε φυτά 7 ημερών, παρατηρήθηκε έντονη έκφραση στις κοτυληδόνες, κυρίως στο αγγειακό σύστημα και στα στοματικά κύτταρα. (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Ιστοχημικός εντοπισμός της έκφρασης του προαγωγέα ROF1-GUS σε φυτά 7 ημερών. Αντιπροσωπευτικά πρότυπα έκφρασης του προαγωγέα ROF1 σε **A)** ολόκληρο βλαστίδιο, **B)** κορυφαίο μερίστωμα βλαστού, **C)** πλευρικό ρίζωμα **D)** κύρια ρίζα. (Aviezer-Hagai et al., 2007)

Η ROF1 αποδείχθηκε ότι αλληλεπιδρά με την HSP90 στο κυτταρόπλασμα, με την έκθεση σε θερμικό στρες να οδηγεί στην εμφάνιση του συμπλέγματος ROF1-HSP90 στον πυρήνα. Τα προφίλ έκφρασης των ROF δείχνουν ότι η έκφρασή τους ρυθμίζεται τόσο από

το αναπτυξιακό στάδιο όσο και από τις συνθήκες αβιοτικού στρες. Σε κατάσταση θερμικής καταπόνησης, οι ROF1 και ROF2 αποδείχθηκαν αυξημένες, με την ROF2 να ανιχνεύεται μόνο μετά από έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία (> 35 °C).

Σε θερμοκρασία 22 °C εκφράζεται μόνο η ROF1, η οποία και είναι δραστική μετά από έκθεση σε θερμική καταπόνηση. Αντίθετα, η έκφραση της ROF2 στους 22 °C είναι πολύ χαμηλή για να μπορέσει να ανιχνευθεί. Στους 37 °C εκφράζεται ως απόκριση στην σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας (μέγιστη συσσώρευση μετά από 3-7 ώρες) και μπορεί να εντοπιστεί σε όλους τους ιστούς ενώ διατηρείται συσσωρευμένη ακόμα και μετά από επαναφορά στους 22 °C. Σε μεταλλάγματα της HsfA2H παρατηρείται μείωση της έκφρασης της ROF2, που μπορεί να υποδηλώνει πιθανή ρύθμιση της ROF2 από την HsfA2H. Η επώαση των φυτών απευθείας στους 42 °C (θερμικό shock) έχει σαν αποτέλεσμα την έκφραση μόνο της ROF1, ενώ η ROF2 απουσιάζει και δεν εμφανίζεται ακόμα και μετά από μακρά επώαση στην εν λόγω θερμοκρασία (Aviezer-Hagai et al 2007). Έτσι η ρύθμιση της έκφρασης των δύο αυτών πρωτεϊνών είναι πολύ διαφορετική, παρόλο που εμφανίζουν μεγάλη ομολογία σε επίπεδο γονιδιώματος.

4. Σκοπός

Έχοντας στη διάθεση μας σπόρους *A. thaliana* αγρίου τύπου (*wild type*-WT), *knockout* μεταλλάγματα για τις ROF1 (*rof1* και ROFB), ROF2 (*rof2*), ROF1/ROF2 (N) και *overexpression* μεταλλάγματα ROF1/ROF2 (OE) μελετήσαμε τον ρόλο των ROF1 και ROF2 κατά τη διάρκεια ανάπτυξης θερμοανθεκτικότητας (37°C) σε βλαστίδια της *Arabidopsis*. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν κάτω από κανονικές συνθήκες (22 °C) και συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και οι αναλύσεις έγιναν στα εκχυλίσματα από τα βλαστίδια μετά από φασματομετρία μάζας και μελέτη των διαφορετικών πρωτεϊνικών προφίλ που προέκυψαν.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Οργανολογία

Συσκευή ηλεκτροφόρησης: AmershamBiosciences/SerialNo. 20134676

Electrophoresis Power Supply: Amersham Biosciences/EPS 3501 XL

Multiple Gel Caster: Amersham Biosciences

Glass plates: Amersham Biosciences/ Reference No. SE252P-5

Spacers: Amersham Biosciences

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

Πιπέτες: Amersham Biosciences

Vortex: Scientific Industries

Stirrer Magnetic – Hot Plate: BIO Line® scientific/ Serial No.200304-002

Ζυγαριά: Adventurer™ Pro/ AV812

Ζυγαριά υψηλής ευαισθησίας: KERN/ ALJ 220-4

Φυγόκεντρος: Centrifuge 5424/Eppendorf AG

Heat Block: KLEINFELD/MBT 250

Συσκευή εμφάνισης Western: GENE GNOME – SYNGENE BIO IMAGING

2. Τεχνικές

2.1 Απολύμανση σπόρων

Για να χρησιμοποιηθούν οι σπόροι που υπάρχουν στο εργαστήριο έγινε διεξοδική απολύμανσή τους ώστε να απομακρυνθούν τυχόν μύκητες, και μικροοργανισμοί που μπορεί να δημιουργήσουν πρόβλημα στην ανάπτυξη τους.

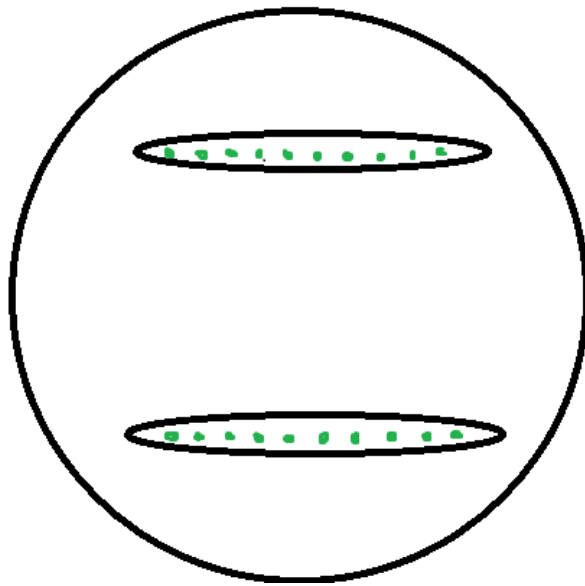
Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Ανάδευση σπόρων για 2' αυστηρά σε *erpendorf tubes* μαζί με 70% *EtOH*
2. Αφαίρεση 70% *EtOH*. Προσθήκη 10% Na^+ *hyrochloride* ώστε να ξεπλυθεί η αιθανόλη. Αφαίρεση του πρώτου 10% Na^+ *hyrochloride* και προσθήκη καινούριου και ανάδευση σπόρων για 5'.
3. Στο *hood*, αφαίρεση 10% Na^+ *hyrochloride* και ξέπλυμα σπόρων με απιονισμένο νερό. Τουλάχιστον 5 φορές ξέπλυμα των σπόρων με νερό.

Μετά την απολύμανση των σπόρων, μεταφέρονται με τη βοήθεια πιπέτας σε τριβλία που περιέχουν *media*. Οι σπόροι τοποθετούνται στο τριβλίο σύμφωνα με τη διάταξη που εμφανίζεται στην **Σχεδίαση 2.1**. Στη συνέχεια, τα τριβλία μένουν στους 4°C *overnight* και την επόμενη μέρα βγαίνουν από την ψύξη και μένουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 3 μέρες. Την 4η μέρα είναι πλέον στο επιθυμητό μέγεθος για τη διεξαγωγή του πειράματος.

Media (τελικός όγκος 500ml)

- Άγαρ 4gr
- MS 2.2gr
- pH 6,5 – προσθήκη NaOH για να φτάσει το διάλυμα στο σωστό pH



Σχεδίαση 1: Σχεδιαγραμματική απεικόνιση τοποθέτησης των σπόρων στα τριβλία για την καλλιέργειά τους.

2.2 Ηλεκτροφόρηση/SDS-PAGE

Για να διαπιστωθεί αν η πρωτεΐνη έχει εκφραστεί υπό διαλυτή μορφή, απαιτείται να γίνει ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτική πολυακρυλαμίδης σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Κατά την ηλεκτροφόρηση, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται, υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου, κινούμενες μέσω των πόρων της πήκτης.

Η ταχύτητα μετακίνησής τους (U) εξαρτάται από τη σχέση: $U = E \cdot Z / f$,

όπου E : ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, Z : καθαρό φορτίο του μορίου, f : συντελεστή τριβής. Ο f εξαρτάται: α) από τη μάζα και σχήμα του μορίου που μετακινείται β) από το ιξώδες του πηκτώματος. Τα μικρότερα σε σχέση με τους πόρους της πήκτης μόρια μετακινούνται εύκολα διαμέσου του πηκτώματος, ενώ τα μεγάλα μόρια μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Τα μόρια ενδιαμέσου μεγέθους μετακινούνται μέσω των πόρων της πήκτης με διαφορετικές ταχύτητες. Το πήκτωμα που χρησιμοποιείται για τις πρωτεΐνες είναι ακρυλαμίδη, που είναι χημικά αδρανής, διάφανη, σταθερή σε μεγάλο εύρος pH, θερμοκρασίας και ιοντικής ισχύος.

Ασυνεχές σύστημα ηλεκτροφόρησης: χρήση δύο πηκτωμάτων διαφορετικής σύστασης

1ο: μη περιοριστικό πήκτωμα με μεγάλους πόρους, ονομάζεται πήκτωμα συσσώρευσης (*stacking gel*), είναι τοποθετημένο πάνω από το δεύτερο πήκτωμα

2ο: πήκτωμα διαχωρισμού (*running ή separating gel*), είναι πιο πυκνό σε πολυακρυλαμίδη από το πρώτο, έχει μικρότερους πόρους.

Η σύσταση, το pH και το μέγεθος των πόρων των δύο πηκτών είναι δηλαδή τέτοια, ώστε στην πηκτή συσσώρευσης, τα δείγματα να συμπυκνώνονται και οι πρωτεΐνες να συσσωρεύονται σε στενές ζώνες μεγάλης συγκέντρωσης, ενώ στην πηκτή διαχωρισμού επιτελείται ο διαχωρισμός τους, λόγω της διαφορετικής κινητικότητας κάθε πρωτεΐνης. Κατ' αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται πολύ καλύτερα ο διαχωρισμός τους και η καλύτερη ανάλυση αποτελεσμάτων, σε σύγκριση με το συνεχές σύστημα ηλεκτροφόρησης.

Για την ηλεκτροφόρηση κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες χρησιμοποιείται θειϊκό άλας νατρίου +(SDS), ένα ανιονικό απορρυπαντικό, το οποίο δεσμεύεται στην πολυπεπτιδική αλυσίδα με υδρόφοβους δεσμούς. Συνδέεται αρκετά εξειδικευμένα και έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση όλων των μη ομοιοπολικών δεσμών στο μόριο της πρωτεΐνης, την αποδιάταξή της και τη δημιουργία ενός επιμήκους συμπλόκου SDS-πολυπεπτιδικής αλυσίδας με καθαρό αρνητικό φορτίο και περίπου σταθερό λόγο φορτίου ανά μονάδα μάζας πολυπεπτιδίου.

Αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην SDS-PAGE :

1. Ακρυλαμίδη

Πολυμερίζεται και δίνει το πολυακρυλαμίδιο. Σε υδατικό διάλυμα παρατηρείται αργός αυτοπολυμερισμός με τα μόρια να ενώνονται σχηματίζοντας αλυσίδες πολυακρυλαμίδης. Η παρουσία συστήματος ενεργών ριζών επιταχύνει τη διαδικασία. Για την κατασκευή του gel έγινε χρήση 10% ακρυλαμίδης, ενώ για το πείραμα με τη χρώση coomassie 12.5%.

2. SDS (SodiumDodecylSulphate)

Συνδέεται εξειδικευμένα, με σταθερό ποσό SDS ανά μονάδα πρωτεΐνης (1,4g SDS ανά 1g πρωτεΐνης). Προκαλεί τη διάσπαση όλων των μη-ομοιοπολικών δεσμών της πρωτεΐνης και οδηγεί στην αποδιάταξη της. Δημιουργείται ένα επιμήκεις σύμπλοκο του SDS με την πολυπεπτιδική αλυσίδα το οποίο έχει καθαρό αρνητικό φορτίο και περίπου σταθερό λόγο φορτίου ανά μονάδα μάζας πολυπεπτιδίου.

3.APS (Ammonium Persulfate)

Πηγή ελευθέρων ριζών απαραίτητων για την επιτάχυνση του πολυμερισμού της ακρυλαμίδης

Για την παρασκευή των gel χρησιμοποιήθηκε APS 10%.

Παρασκευή: διάλυση 100mg APS σε 1ml ddH₂O.

Αποθήκευση: σε κατάψυξη στους -20°C και κατά τη διάρκεια χρήσης του παραμένει τοποθετημένο σε πάγο (4 °C).

4. TEMED (TEtraMethylEthyleneDiamine)

Σταθεροποιητής των ελεύθερων ριζών που παράγονται από το APS και ενισχυτής του πολυμερισμού. Η συγκέντρωση των ελεύθερων ριζών καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την ταχύτητα του πολυμερισμού και τις ιδιότητες του τζελ.

Παρασκευή: χρησιμοποιείται όπως παραλαμβάνεται (χωρίς αραίωση)

Αποθήκευση: στους 4°C.

5. Sample/Loading buffer

Ανάμιξη δείγματος με loading buffer, το οποίο περιέχει ουσίες που αυξάνουν την πυκνότητα του. Αυτές οι ουσίες πρέπει να είναι μη ιονικές και να μην αντιδρούν με τις πρωτεΐνες του δείγματος. Το sample buffer περιέχει την χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης, καθώς οι πρωτεΐνες είναι άχρωμες και η πρόοδός τους μέσω του τζελ είναι δύσκολο να ανιχνευθεί. Το μπλε της βρωμοφαινόλης είναι ανιονική χρωστική σε ουδέτερα και αλκαλικά pH και μικρή σε μέγεθος, επομένως κινείται μπροστά από το πρωτεϊνικό δείγμα και είναι το σήμα για να σταματήσει η ηλεκτροφόρηση. Για 10ml Samplebuffer: 2X, 2ml γλυκερόλη, 1% SDS(τελικό), 0,25 mg μπλε βρωμοφαινόλης, 2,5ml stacking gel buffer 4X, 100 mM DTT (τελικό), pH 7,4. Ακολουθεί βρασμός 5-7 λεπτά.

Running Buffer (τελικός όγκος 2,5l):

- Γλυκίνη 45g (SIGMA)
- Trizma 7g(SIGMA)
- SDS 12ml
- Προσθέτουμε MQ νερό μέχρι τον τελικό όγκο

Για 5 midigels:

Running gel 10% (τελικός όγκος 40ml)

- 10% APS: 0,24ml
- TEMED: 24μl (MERCCK)
- Buffer A: 11,84ml
- Acr: 11,3ml (AppliChem)
- H₂O: 14,8ml

Stacking gel 4,5% (τελικός όγκος 20ml)

- 10% APS: 0,15ml
- TEMED: 10μl
- Buffer B: 5ml
- Acr: 3ml
- H₂O: 12ml

2.3 Μονιμοποίηση gel

Coomassie Brilliant Blue(R-250) (SIGMA)

Είναι η συχνότερη χρωστική πρωτεϊνών. Είναι ανιονική και προσδένεται μη ειδικά σε πρωτεΐνες. Έχει μη πολική δομή και χρησιμοποιείται για διαλύματα που έχουν οξικό οξύ. Αφού τρέξει το τζελ, οι πρωτεΐνες μονιμοποιούνται από το οξικό οξύ και έπειτα βάφονται από τη χρωστική. Ακολουθεί ξέπλυμα της περίσσειας χρωστικής με οξικό. Μετά τη χρώση, οι πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνευθούν ως μπλε μπάντες. Τα όρια ευαισθησίας της τεχνικής αυτής φθάνουν τα 10ng πρωτεΐνης.

2.4 Ανοσοαποτύπωμα Western blot

Η διαδικασία μεταφοράς των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη καλείται «αποτύπωμα» ή «στύπωμα» και επιτυγχάνεται είτε με απλή ροή του διαλύτη είτε με ηλεκτροφόρηση, καθώς έτσι πραγματοποιείται πιο γρήγορα. Η μεταφορά ακολουθεί την ίδια βασική αρχή με την ηλεκτροφόρηση όμως το ρεύμα εφαρμόζεται σε γωνία 90° ως προς το πήκτωμα ώστε οι πρωτεΐνες να μεταναστεύσουν από το πήκτωμα στη μεμβράνη. Το πλεονέκτημα είναι ότι οι πρωτεΐνες είναι πιο προσβάσιμες στα αντισώματα όταν βρίσκονται στην επιφάνεια του φίλτρου παρά στο πήκτωμα. Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος επιλογής (*transfer buffer*) καθορίζει το σωστό προσανατολισμό των ηλεκτροδίων για την επαφή πηκτώματος/νιτροκυτταρίνης. Όταν αποτυπώνονται πηκτώματα SDS-PAGE, συνήθως σε ουδέτερα ή ελαφρώς αλκαλικά ρυθμιστικά διαλύματα μεταφοράς, τα πολυπεπτίδια συμπεριφέρονται ως ανιόντα και η νιτροκυτταρίνη μεταφοράς πρέπει να βρίσκεται στην ανοδική πλευρά του πηκτώματος. Το διάλυμα μεταφοράς περιέχει Tris 98g, γλυκίνη 8g και 20% μεθανόλη σε τελικό όγκο 600ml. Η μεθανόλη χρησιμοποιείται γιατί ελαχιστοποιεί το φούσκωμα του πηκτώματος κατά τη διάρκεια του αποτυπώματος και αυξάνει την ικανότητα πρόσδεσης των πρωτεϊνών στη νιτροκυτταρίνη, αλλά δυσκολεύει την απομάκρυνση των πρωτεϊνών από το πήκτωμα.

Βήματα:

1. Όλες οι θέσεις πρόσδεσης της μεμβράνης καλύπτονται με πρωτεΐνη (συνήθως BSA), περιορισμός μη-ειδικής σύνδεσης (το αντίσωμα «πιάνει» σε μη-ειδικές πρωτεΐνες-θέσεις)
2. Πρώτο αντίσωμα, αναγνωρίζει ειδικά την πρωτεΐνη-στόχο προσδένεται σε αυτή (anti-ROF1 αντίσωμα)
3 πλύσεις των 5' με TBS για απομάκρυνση πρώτου αντισώματος.
3. Δεύτερο αντίσωμα που έχει αναπτυχθεί ώστε να αναγνωρίζει άλλα αντισώματα προσδένεται στο πρώτο. Είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο (συνήθως αλκαλική

φωσφατάση, ή υπεροξειδάση) (anti-rabbit IgG horse radish peroxidase affinity purified antibody – CHEMICON).

3 πλύσεις 5' με TBS για απομάκρυνση δεύτερου αντισώματος.

4. Προσθήκη υποστρώματος (S) και παραγωγή προϊόντος (P) που δίνει σήμα στην αντίδραση (π.χ. φως) για να γίνει ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης-στόχου.

Για τις πλύσεις χρησιμοποιήθηκε TBS buffer:

- 50 mM Trizma: 50ml (1M)
- 150 mM NaCl: 30 ml (5M)
- 1ml Tween – 20

Για την εμφάνιση της μεμβράνης: Δύο διαλύματα (homemade ECL system), τελικού όγκου 10ml:

Διάλυμα I :

- Λουμινόλη: 100μl (FLUKA)
- Κουμαρικό οξύ: 44 μl (SIGMA)
- Tris: 1ml, pH 8,5
- MQ νερό: 8,86 ml

Διάλυμα II :

- Υπεροξειδίο: 6,1 μl (Scharlau)
- Tris: 1ml, pH 8,5
- MQ νερό: 9 ml

2.5 Φασματομετρία μάζας

Φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS): αναλυτική τεχνική κατά την οποία μόρια ενός δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα και διαχωρίζονται σε σχέση με το λόγο της μάζας τους προς το φορτίο (m/z). Η φασματομετρία μαζών είναι από τις πλέον διαδεδομένες τεχνικές ανάλυσης και εφαρμόζεται, ευρέως, σε πολλούς τομείς τεχνολογίας και έρευνας. Κύριο πεδίο εφαρμογής είναι οι επιστήμες ζωής, τροφίμων, οι περιβαλλοντικές επιστήμες και οι τεχνολογίες omics. Η τεχνική προσφέρει πληροφορίες για την ποιοτική και ποσοτική σύσταση αγνώστων μιγμάτων, για τη χημική δομή πολύ μεγάλου αριθμού ενώσεων, για την παρουσία και το ποσοστό ισοτόπων, για τη δομή και σύσταση επιφανειών με μορφή απεικόνισης (MS Imaging).

Πριν τη φόρτωση των δειγμάτων στο MasSpec έγινε protein assay, ώστε να υπάρχει ισοτιμία στην ποσότητα της πρωτεΐνης μεταξύ τους. Έγινε επεξεργασία των δειγμάτων με το πρωτόκολλο FASP, χρησιμοποιώντας σύστημα φιλτραρίσματος 10kDa cutoff (Sarto-

rius, VN01H02). Ακολούθησε πέψη των πρωτεϊνών (alkylation και trypsin digestion) (1μg trypsin/ LysC mix mass spec grade, Promega). Τα προϊόντα πεπτιδίων που προέκυψαν αναλύθηκαν με nano-LC–MS/MS χρησιμοποιώντας LTQ Orbitrap XL massspectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) συνδεδεμένο σε nano-LCHPLC (RSLCnano, Thermo Scientific).

Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με MaxQuant (1.5.3.30) χρησιμοποιώντας το πλήρες Uniprot σύστημα του *A.thaliana* και ένα κοινό σύστημα αναφοράς από τη μηχανή αναζήτησης Andromeda search engine, ώστε να αφαιρεθεί πιθανή επιμόλυνση. Το σφάλμα ανεύρεσης FDR τέθηκε στο 1% τόσο για τις πρωτεΐνες όσο και για τα πεπτίδια, με ένα ελάχιστο μήκος επτά αμινοξέων, το οποίο καθορίστηκε μετά από διερεύνηση αντίστροφης βάσης δεδομένων. Η αφθονία της πρωτεΐνης υπολογίστηκε βάσει ενός φάσματος κατόπιν εξομάλυνση (LFQ intensity). Το LFQ καθορίστηκε με ένα ελάχιστο κλάσμα μέτρησης 2. Η στατιστική ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας Perseus (version 1.6.2.1) (**Εικόνα 6**). Οι πρωτεΐνες οι οποίες εντοπίστηκαν ως επιμόλυνση και αυτές που εμπεριείχαν λιγότερο από δύο πεπτίδια απορρίφθηκαν.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Πείραμα θερμικής καταπόνησης σε βλαστίδια

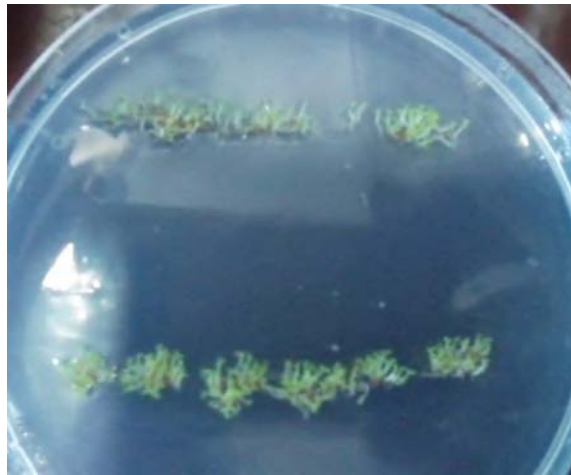
Από το *stock* των μεταλλαγμένων σπόρων που υπάρχουν στο εργαστήριο επιλέχθηκαν 3-4 ρέπλικες για το καθένα (WT, *rof1-*, ROFB, *rof2-*, *rof1-/rof2-* double knockout (N), ROF1OE), τους έγινε απολύμανση και τοποθετήθηκαν σε τριβλία μέχρι να φτάσουν στο στάδιο του βλαστιδίου (3 ημερών) για να χρησιμοποιηθούν στα πειράματα.

Σε κάθε ρέπλικα χρησιμοποιήθηκαν περίπου 70 βλαστίδια *A.thaliana*. Επιλέχθηκαν τα βλαστίδια με την καλύτερη ανάπτυξη, τα οποία παρουσίαζαν ομοιογένεια και προσέχοντας να μην παρασυρθούν τυχόντες σπόροι που δεν είχαν βλαστήσει. Η μία σειρά από το ίδιο τριβλίο χρησιμοποιήθηκε για τη θερμική καταπόνηση (*heat stress* - 37 °C) και η άλλη ως *control* (22 °C), αφού πρώτα απομονώθηκε από το τριβλίο πριν το *heat stress*.

Για το θερμικό σοκ (*heat shock*) η θερμική πλάκα (*heat block*) θερμάνθηκε στους 37 °C. Πάνω του τοποθετήθηκε το τριβλίο με τη σειρά δείγματος προοριζόμενο για θερμικό σοκ, αφού το υπόστρωμα μαζί με τη δεύτερη σειρά του δείγματος είχε απομακρυνθεί προοριζόμενο για *control* (C). Η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος στους 37 °C (συνεχής έλεγχος με θερμόμετρο). Οι συνθήκες για το *heat stress* διατηρήθηκαν για 4.5 ώρες.

Για την εξαγωγή (*extraction*) των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε 200 μl *sample buffer*. Η ποσότητα των *extracts* χωρίστηκε στη μέση. Η μισή ποσότητα χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση του δείγματος (π.χ. επαγωγή της ROF2, μη ύπαρξη των ROF1 και ROF2 στα αντίστοιχα Knock out κλπ.) με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης για το Western blot. Η υπόλοιπη μισή στάλθηκε για MassSpec.

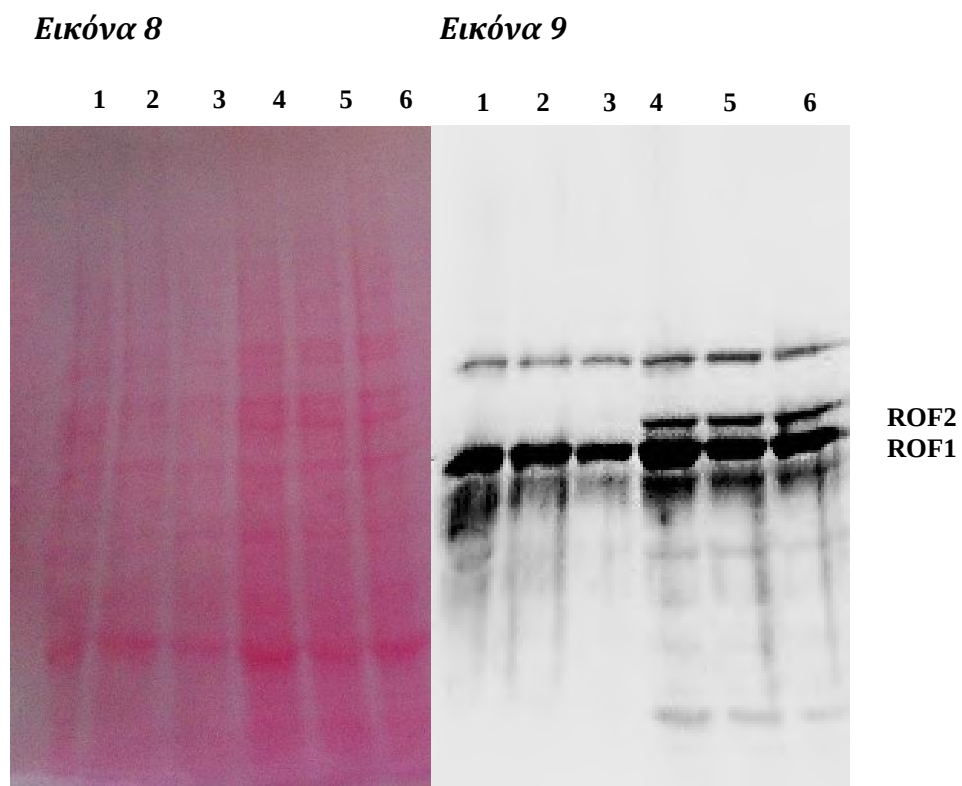
Τα δείγματα *control* σημειώνονται με "C" , ενώ αυτά που έχουν υποστεί θερμική καταπόνηση με "37". Στα πειράματα οι ROF1 και ROF2 παίζουν ρόλο ως πρωτεΐνες αναφοράς.



Εικόνα 7: Μέγεθος βλαστιδίων πριν το πείραμα θερμικής καταπόνησης. Η μία σειρά έμεινε εκτός τριβλίου ως control και η άλλη τοποθετήθηκε στο heat block.

1.1 Αποτελέσματα πειράματος *heat stress* σε βλαστίδια

Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης Western blotting με anti-ROF1 αντίσωμα σε εκχυλίσματα των WT (C και 37)



Εικόνα 8: Χρώση PONCEAU σε δείγματα control και 37 °C

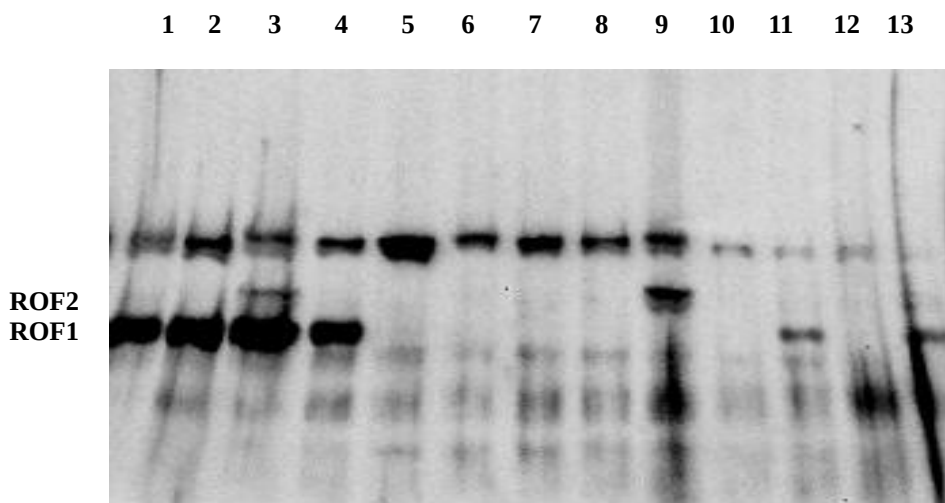
Εικόνα 9: Ανοσοαποτύπωση τύπου Western σε δείγματα control και 37 °C

Συνέχεια **Εικόνα 8** και **Εικόνα 9**.

- | | |
|----------------|-----------------|
| 1. <i>WT C</i> | 4. <i>WT 37</i> |
| 2. <i>WT C</i> | 5. <i>WT 37</i> |
| 3. <i>WT C</i> | 6. <i>WT 37</i> |

Η ROF1 εμφανίζεται στα 62 kDa (θεωρητικό μοριακό βάρος σύμφωνα με ExPASy 61,452 kDa) και η ROF2 στα 65 kDa (σύμφωνα με ExPASy 65,223 kDa). Παρατηρούμε ότι υπάρχει ξεκάθαρη επαγωγή της ROF2 στα βλαστίδια σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης.

Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης Western blotting με anti-ROF1 αντίσωμα σε εκχυλίσματα των *WT*, *rof1*⁻, *rof2*⁻, *N*, *OE* (*C* και *37*)

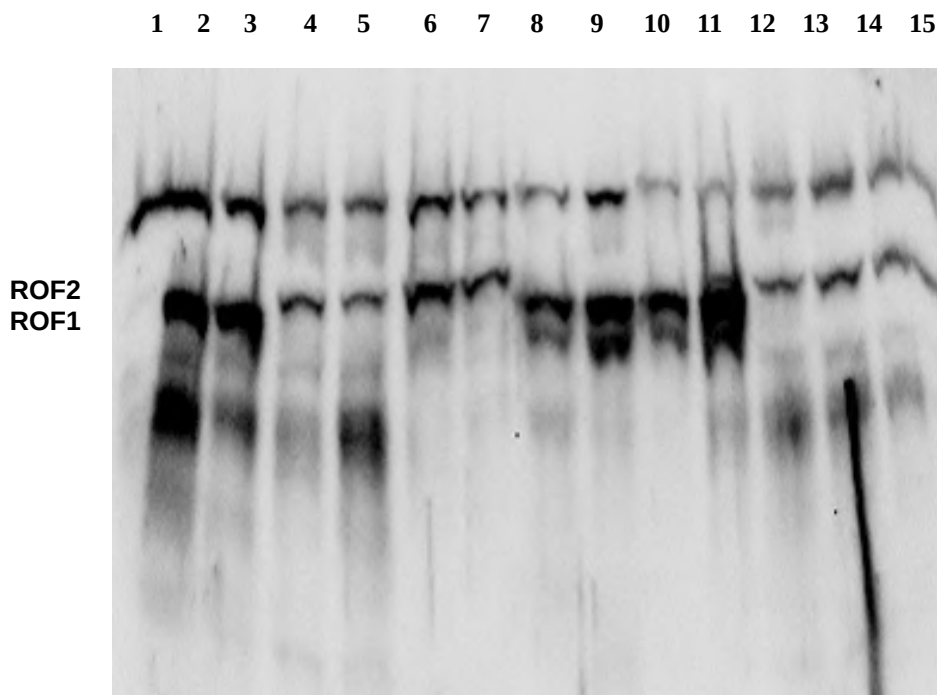


Εικόνα 10: Ανοσοαποτύπωση τύπου Western σε δείγματα *control* και 37 °C

- | | | |
|---------------------------------------|-------------------|------------------|
| 1. <i>WT C</i> | 6. <i>N C</i> | 11. <i>OE C</i> |
| 2. <i>rof2</i> ⁻ <i>C</i> | 7. <i>N 37</i> | 12. <i>N 37</i> |
| 3. <i>WT 37</i> | 8. <i>N 37</i> | 13. <i>OE 37</i> |
| 4. <i>rof2</i> ⁻ <i>37</i> | 9. <i>ROFB 37</i> | |
| 5. <i>N C</i> | 10. <i>N C</i> | |

Η ROF1 εμφανίζεται στα 62 kDa και η ROF2 στα 65 kDa. Η σύγκριση WTC, WT37 (1 και 3) επιβεβαιώνει την επαγωγή της ROF2 σε θερμική καταπόνηση. Στα rof2⁻C, rof2⁻ 37 η ROF1 είναι εμφανής, ενώ η ROF2 απουσιάζει (2 και 4). Στα ROFB όπως και στα rof1⁻ μεταλλάγματα απουσιάζει η ROF1 από C και 37 (5,6,7,8 και 9). Στα rof1⁻37 δεν εμφανίζεται επαγωγή της ROF2 (7 και 8). Στο ROFB37 (9) παρατηρούμε ότι η ROF2 επάγεται, ενώ η ROF1 απουσιάζει. Στα N (C και 37) δεν παρατηρείται έκφραση της ROF1 ούτε επαγωγή της ROF2 στα N37 (10 και 12). Στα OEC η έκφραση της ROF1 είναι μικρότερη σε σύγκριση με τα WTC, WT37 (σύγκριση δειγμάτων 1 με 10 και 3 με 13) και στο OE37 δεν παρατηρείται επαγωγή της ROF2 (13).

Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης Western blotting με anti-ROF1 σε εκχυλίσματα WT, rof1⁻, rof2⁻, ROFB (C και 37)



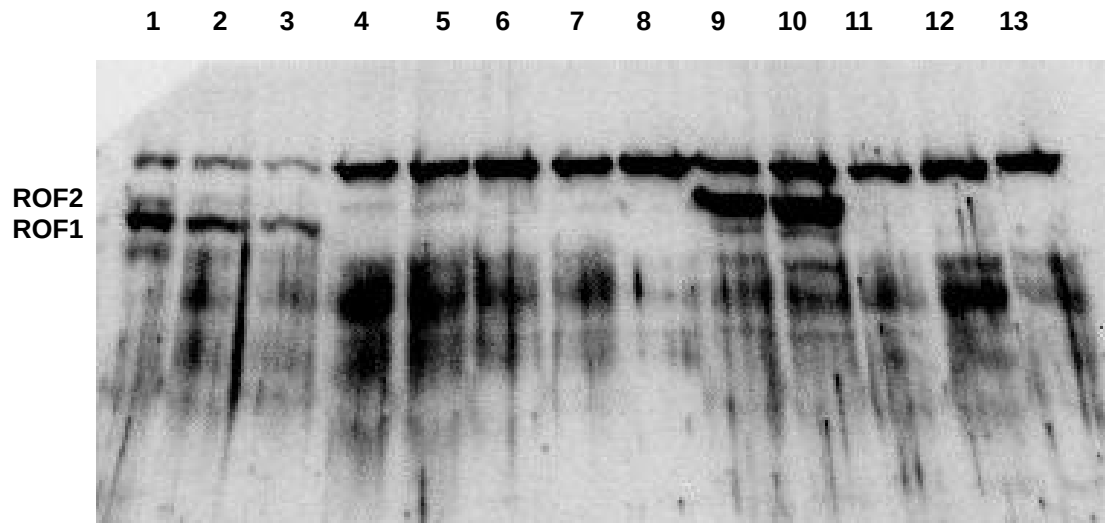
Εικόνα 11: Ανοσοαποτύπωμα τύπου Western σε δείγματα control και 37 °C

Συνέχεια **Εικόνα 11**

1. <i>rof1-C</i>	6. <i>rof1-37</i>	11. <i>WT 37</i>
2. <i>rof2-C</i>	7. <i>rof1-37</i>	12. <i>ROFB 37</i>
3. <i>rof2-C</i>	8. <i>rof2-37</i>	13. <i>ROFB 37</i>
4. <i>ROFB 37</i>	9. <i>rof2-37</i>	14. <i>ROFB 37</i>
5. <i>ROFB 37</i>	10. <i>WT C</i>	15. <i>ROFB 37</i>

Η ROF1 εμφανίζεται στα 62 kDa και η ROF2 στα 65 kDa. Υπάρχει ξεκάθαρη επαγωγή της ROF2 στα δείγματα, όταν έχουν εφαρμοστεί συνθήκες θερμικής καταπόνησης. Με σύγκριση των WTC, WT37 επιβεβαιώνεται η επαγωγή της ROF2 σε θερμική καταπόνηση (10 και 11). Στα *rof1-C* (δείγμα 1) δεν παρατηρείται μπάντα για τη ROF1, ενώ βλέπουμε ξεκάθαρη επαγωγή της ROF2 στα *rof1-37* και *ROFB37*. Στα *rof2-C* εμφανίζεται μόνο η μπάντα της ROF1 (2 και 3) και δεν παρατηρείται επαγωγή της ROF2 *rof2-37* (8 και 9).

Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης Western blotting με anti-ROF1 σε εκχυλίσματα WTC, rof1-C, N (C και 37)



Εικόνα 12: Ανοσοαποτύπωμα τύπου Western σε δείγματα control και 37°C

1. WT 37	4. WT 37	7. N C	10. rof1-37	13. N 37
2. WT 37	5. rof1-C	8. N C	11. rof1-37	14. N 37
3. WT C	6. rof1-C	9. N C	12. N 37	

Η ROF1 εμφανίζεται στα 62 kDa και η ROF2 στα 65 kDa. Υπάρχει ξεκάθαρη επαγωγή της ROF2 στα δείγματα, όταν έχουν εφαρμοστεί συνθήκες θερμικής καταπόνησης. Με σύγκριση των WT37 με τα WTC επιβεβαιώνεται η επαγωγή της ROF2 σε θερμική καταπόνηση. Στα rof1-C (5 και 6) δεν παρατηρείται μάλιστα για τη ROF1, ενώ βλέπουμε ξεκάθαρη επαγωγή της ROF2 στα rof1- (C και 37) (10 και 11). Στα N (C και 37) δεν παρατηρείται έκφραση της ROF1 ούτε επαγωγή της ROF2 (7,8,9 και 12,13,14).

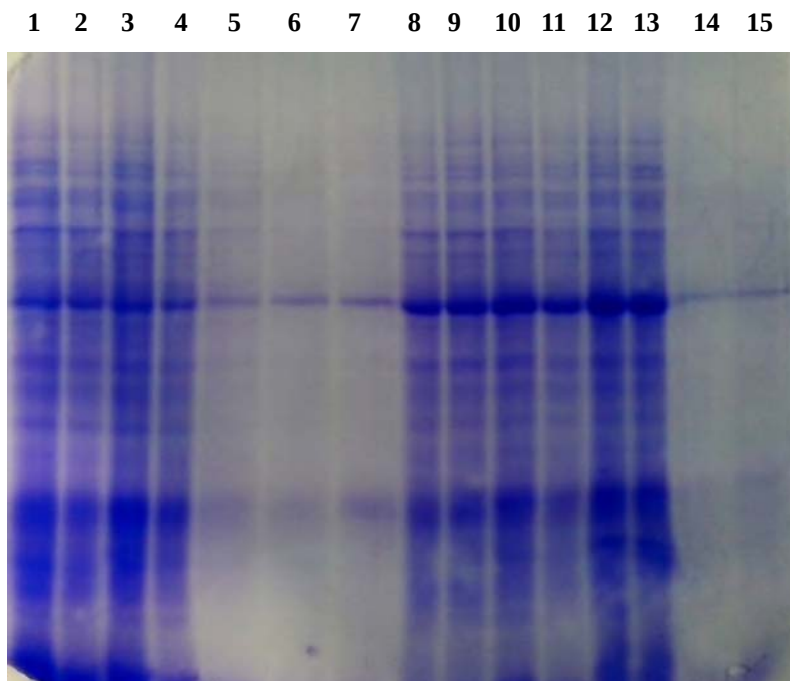
2. Πείραμα φασματομετρίας μάζας σε βλαστίδια

Διατηρήθηκαν ρέπλικες από το πρώτο πείραμα θερμοκρασιακής καταπόνησης στα οποία κατόπιν εκχύλισης με 200 μl sample buffer, πραγματοποιήθηκε SDS-PAGE, σύμφωνα με το προαναφερόμενο πρωτόκολλο. Τα δείγματα εστάλησαν στο “Alexander Fleming” B.S.R.C. για φασματομετρία μάζας.

Έγινε μια αρχική αξιολόγηση της κατάστασης των πρωτεϊνών στο εργαστήριο, όπου τρέξαμε τα δείγματα σε gel για να δούμε τη σχετική ποσότητα της πρωτεΐνης στο gel και αν υπάρχει αποδόμηση της με Coomassie Brilliant Blue. Η τελική φωτομέτρηση έγινε μετά το φιλτράρισμα των δειγμάτων και πριν φορτωθούν για τη φασματομετρία.

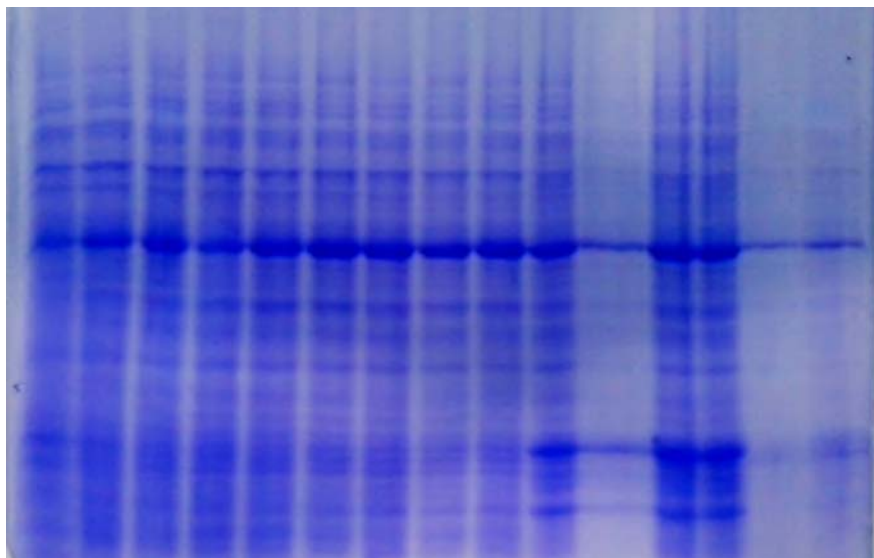
2.1 Αποτελέσματα πρωτεϊνικών προφιλ έπειτα από μονιμοποίηση του gel και χρώση με Coomassie Brilliant Blue

Εικόνα 13 α



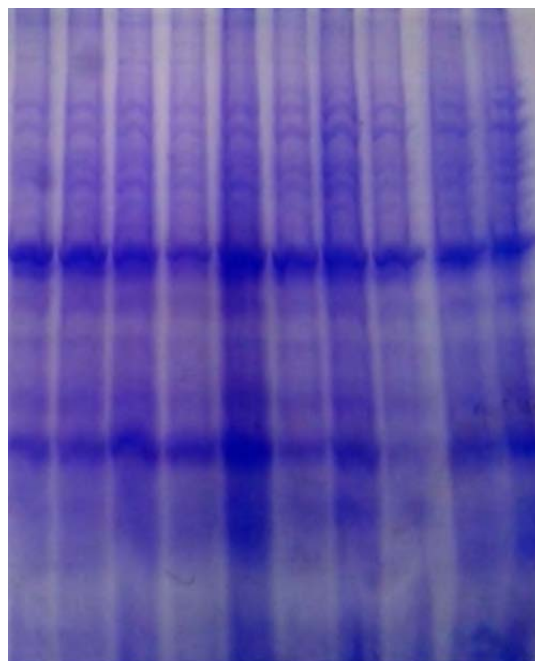
Εικόνα 13 β

16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30



Εικόνα 13 γ

31 32 33 34 35 36 37 38 39 40



Εικόνα 13 α, β, γ.

Χρώση Coomassie σε gel πρωτεϊνών δείγματα των οποίων χρησιμοποιήθηκαν σε φασματομετρία μάζας.

1. WT 37	8. WT C	15. rof2-37	22. ROFB 37	29. ROFB C
2. WT C	9. WT 37	16. WT C	23. ROFB C	30. ROFB 37
3. WT 37	10. rof2-C	17. ROFB C	24. ROFB 37	31. rof1- C
4. WT C	11. rof2-37	18. ROFB 37	25. rof1- C	32. rof1- C
5. WT 37	12. rof2-C	19. ROFB C	26. rof1- 37	33. N C
6. WT C	13. rof2-37	20. ROFB 37	27. rof1- C	34. N C
7. WT 37	14. rof2-C	21. ROFB C	28. rof1- 37	35. N C
36. rof1-37				
37. rof1-37				
38. N 37				
39. N 37				
40. N 37				

Πίνακας 1: Πίνακας αρίθμησης των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα φασματομετρίας μάζας.			
Control		Heat stress (37°C)	
2	WT	1	WT
4		3	
3		9	
10	rof2 ⁻	11	rof2 ⁻
12		13	
14		15	
19	ROFB	18	ROFB
21		20	
23		22	
25	rof1 ⁻	26	rof1 ⁻
31	N	38	N
32		39	
33		40	

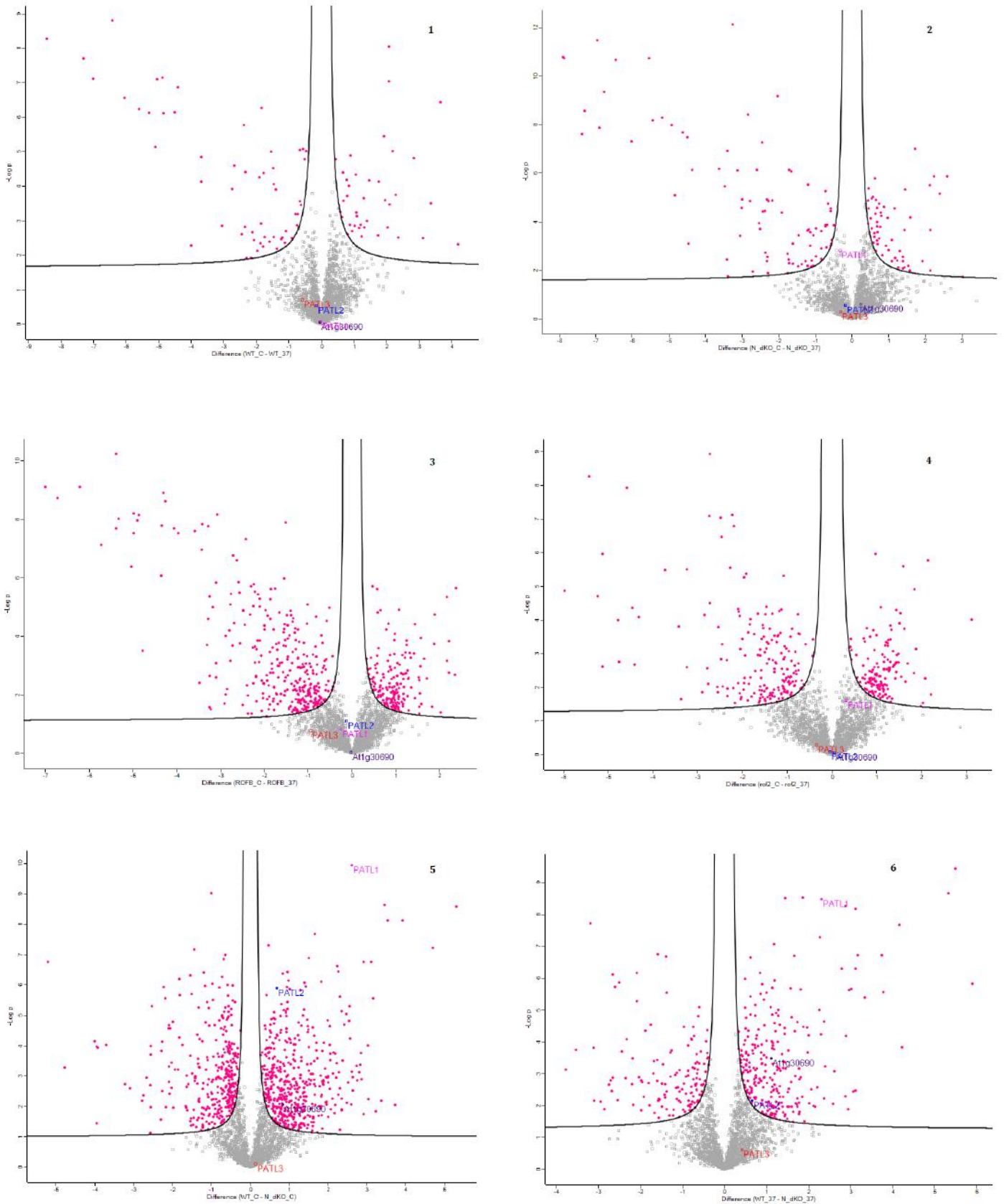
2.2 Αποτελέσματα MasSpec

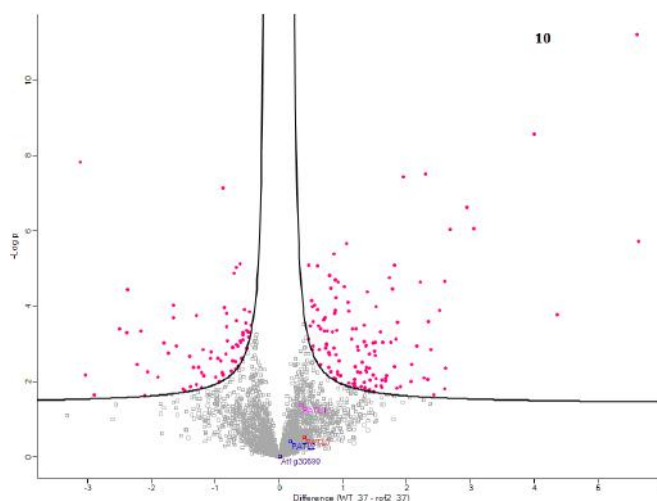
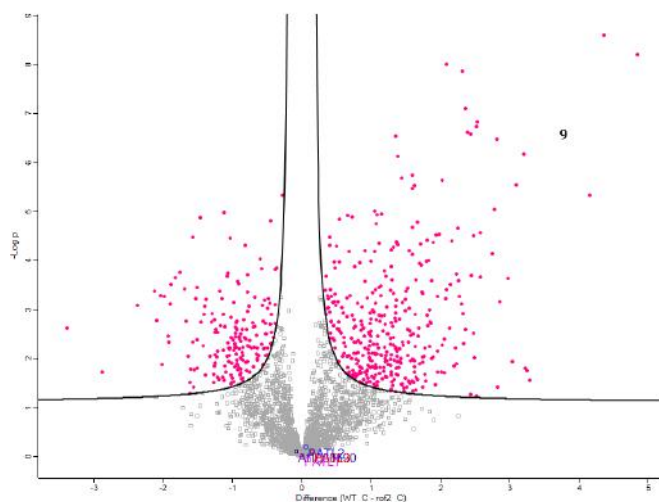
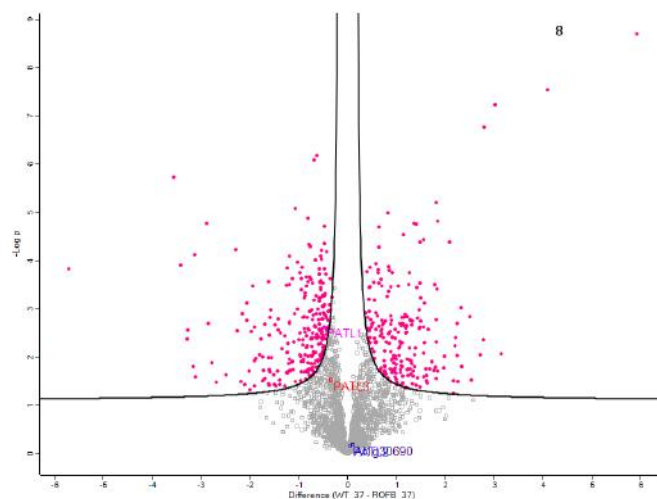
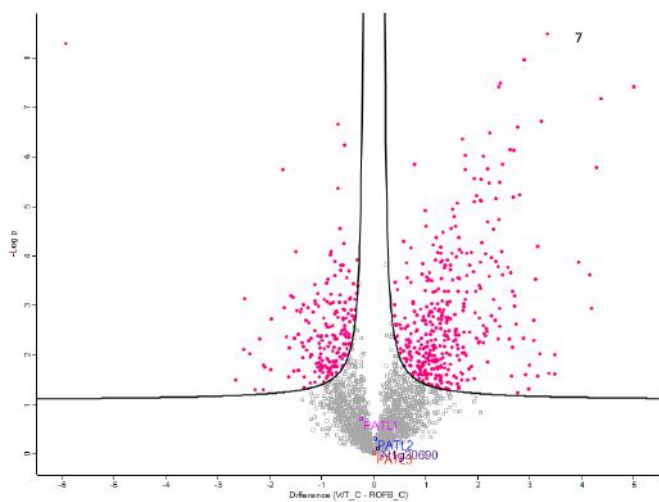
Τα αποτελέσματα από το MasSpec αναλύθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Perseus (1.6.2.1), ένα πρόγραμμα το οποίο αναπτύχθηκε για την ανάλυση δεδομένων που προκύπτουν από την φασματοκοπία μάζας. Χρησιμοποιείται για την ερμηνεία δεδομένων ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών, αλληλεπίδρασης και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Περιέχει ένα ολοκληρωμένο χαρτοφυλάκιο με στατιστικά εργαλεία για την ανάλυση των δεδομένων μεγάλης διαστάσεως που καλύπτει την ομαλοποίηση, την αναγνώριση προτύπων, την ανάλυση χρονοσειρών, τις διασταυρούμενες ομοιότητες και τις δοκιμές πολλαπλής ισορροπίας.

Η *volcano plot* ανάλυση παρουσιάζει τη διαφορική σύγκριση των συσσωρευμένων πρωτεϊνών στα υπό ανάλυση WT, ROF1, ROF2, ROF1/ROF2 μεταλλάγματα σε φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες θερμικής καταπόνησης. Η ανάλυση έγινε με student t-test P: 0.05 και difference :0.1.

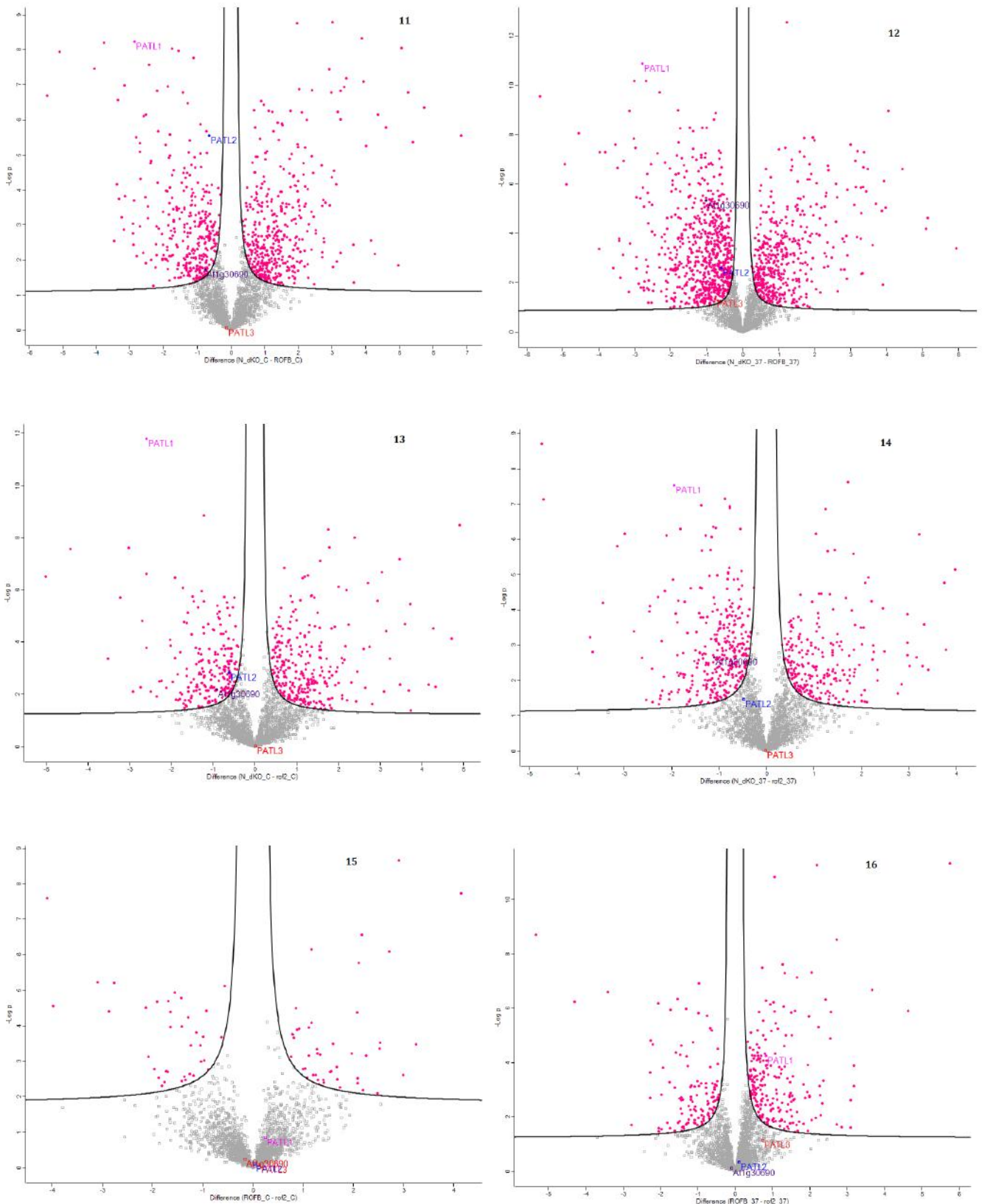
Τα δείγματα *control* σημειώνονται με “C” , ενώ αυτά που έχουν υποστεί θερμική καταπόνηση με “37”. Στα πειράματα οι ROF1 και ROF2 παίζουν ρόλο ως πρωτεΐνες αναφοράς.

Εικόνα 14 (1-22): Διαφορική σύγκριση με διαγράμματα “Volcano” συσσωρευμένων πρωτεϊνών σε φυτά WT, ROF1 και ROF2 μεταλλάγματα κάτω από φυσιολογικές (22 οC) συνθήκες και συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (37 οC). Σημειώνονται οι διαφορετικές ισομορφές της Patellin. P 0.05 και S0 (difference): 0.1.

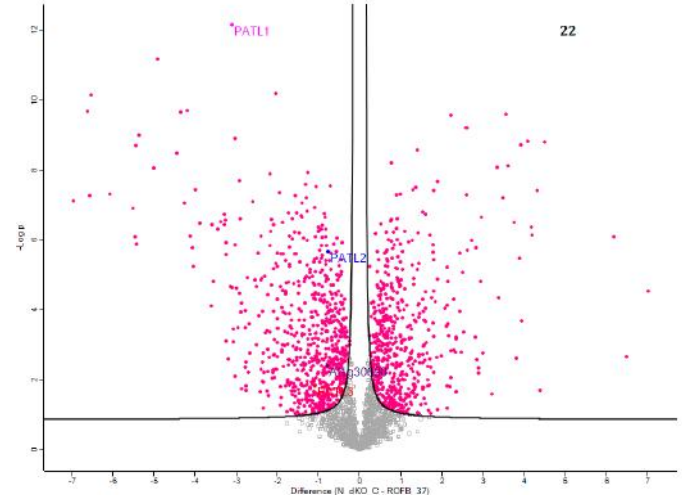
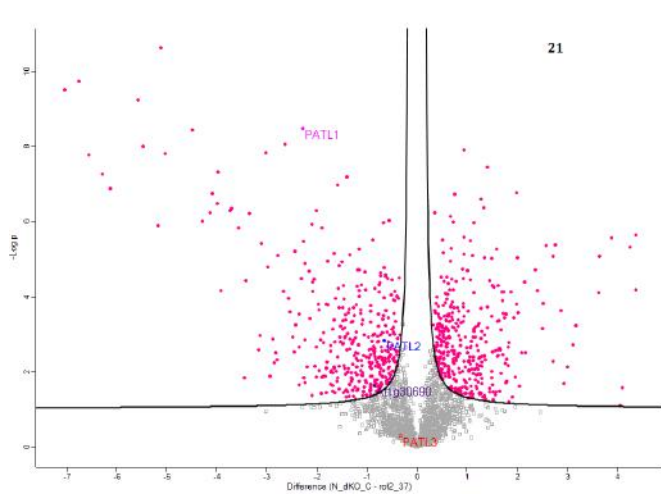
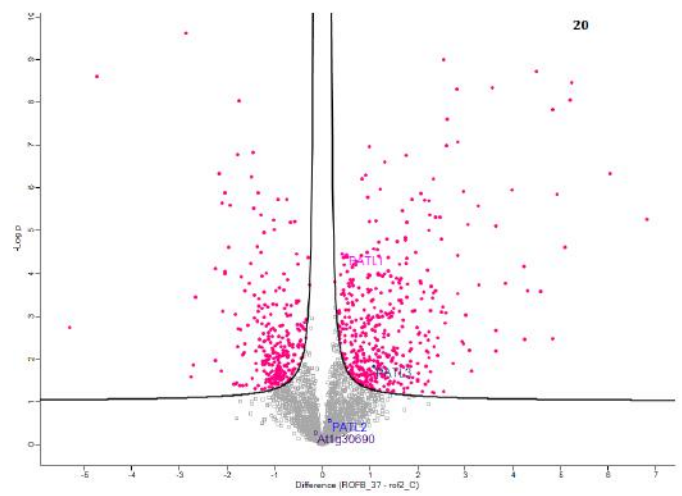
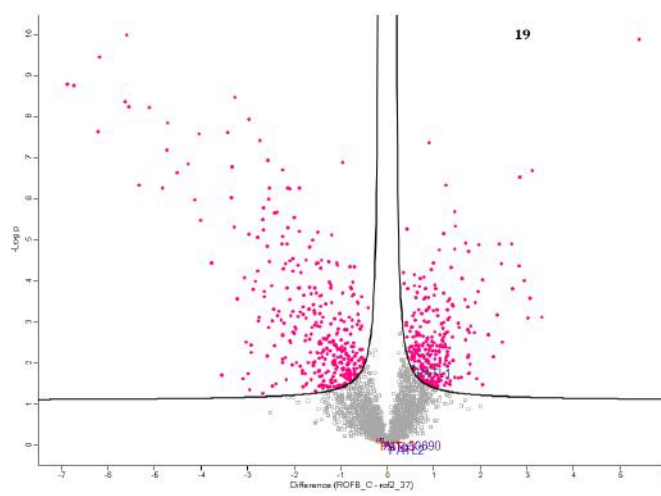
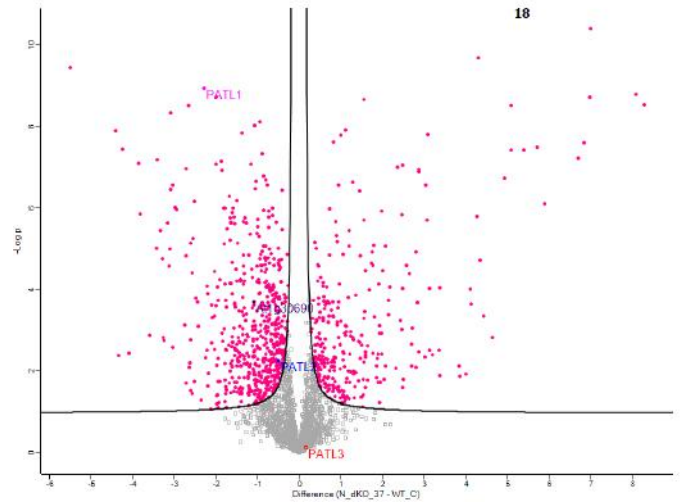
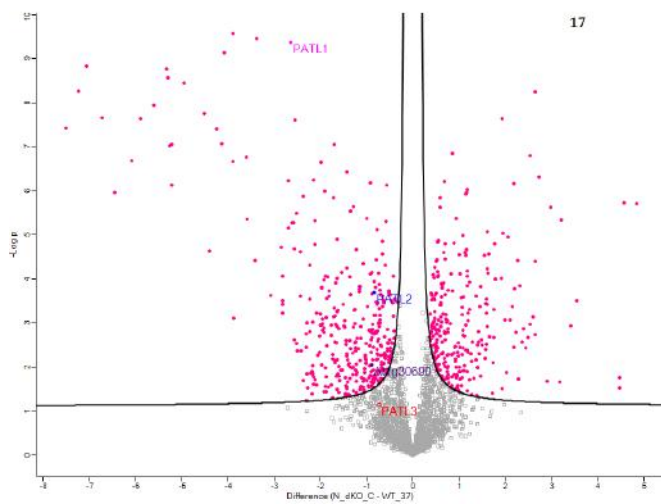




Οι ROF1 και ROF2 είναι οι πρωτεΐνες αναφοράς του πειράματος. Η ROF2 συσσωρεύεται στα WT37 (**raw data/πίνακας 2**). Η συσσώρευση των Patellin δεν έχει σημαντικές διαφορές κατά τη σύγκριση των WTC, NC, ROFBC και rof2·C με τα αντίστοιχα WT37, N37, ROFB37, rof2·37 (**Εικόνα 14.1, 14.2, 14.3, 14.4**). Οι Patellin καταστέλλονται στα NC και N37 (**Εικόνα 14.5, 14.6**) σε σύγκριση με τα αντίστοιχα WT. Η συσσώρευση των Patellin είναι *insignificant*, όταν συγκρίνονται WT (C και 37) με ROFB και rof2· (C και 37 αντίστοιχα) με εξαίρεση την PATL1 η οποία έχει διαφορά στη συσσώρευση της στα ROFB37 σε σχέση με τα WT37 (**Εικόνα 14.7, 14.8, 14.9, 14.10**). Δεν παρατηρείται μεγάλη διαφορά στην συσσώρευση της ROF1 παρά μόνο στα WT37 όταν συγκρίνονται με τα N37 και ROFB37 (**raw data/ πίνακας 2**). Η ROF2 εμφανίζει διαφορά στα WT37 σε σχέση με τα N37 και rof237 (**raw data/ πίνακας 2**). Οι διαφορές αυτές οφείλονται στην απουσία των ROF1 και ROF2 στα αντίστοιχα μεταλλάγματα. Η συσσώρευση των PATL1, 2, 4 είναι υψηλότερη στα ROFBC, rof2·C και ROFB37, rof2·37 σε σχέση με τα NC και N37 αντίστοιχα (**Εικόνα 14.11, 14.12, 14.13, 14.14**).



Στα rof2-37 παρατηρείται υψηλή διαφορά στις PATL1, 4 συγκρίνοντάς τα με τα N (C και 37) **(Εικόνα 14.14)**. Η συσσώρευση της ROF2 εμφανίζει διαφορά στη σύγκριση των N37 και ROFB37 **(Εικόνα 14.12, 14.14)**. Από τη σύγκριση των ROFB με τη rof2⁻ (C και 37) μόνο η PATL1 έχει διαφορά στη συσσώρευση της στο ROFB37 σε σύγκριση με το rof2⁻ 37 **(Εικόνα 14.15, 14.16)**.



Η σύγκριση NC / WT37 και N37 / WTC δείχνει την καταστολή των Patellin στα N μεταλλάγματα (Εικόνα 14.17, 14.18). Από τις συγκρίσεις ROFB_C / rof2-37 και ROFB37 / rof2:C διαφορά εμφανίζει η συσσώρευση της PTL1 στα ROFB37 (Εικόνα 14.19, 14.20) και από τις συγκρίσεις NC / rof2-37 και NC / ROFB37 φαίνεται η καταστολή των PTL1, 2 και 4 στα N μεταλλάγματα (Εικόνα 14.21, 14.22).

Πίνακας 2: Σχετική χρωματική απεικόνιση της διαφορικής σύγκρισης της συσσώρευσης πρωτεϊνών σε WT, ROF1 και ROF2 μεταλλάγματα κάτω από φυσιολογικές (22 οC) συνθήκες και συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (37 οC) (τιμές από τα raw data). Λευκό : μηδενική διαφορά, Γαλάζιο: *insignificant* τιμές (P value 0.05) , Κίτρινο: *significant* με διαφορά <0.1 Πορτοκαλί: μικρή διαφορά στην έκφραση, Κόκκινο : υψηλή διαφορά στην έκφραση, Βαθύ κόκκινο : πολύ υψηλή διαφορά στην έκφραση

Συγκρινόμενα δείγματα		Συσσώρευση πρωτεϊνών					
		ROF1	ROF2	PATL1	PATL2	PATL3	PATL4
WTC/ WT37	WTC						
	WT37	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Blue
NC/N37	NC						Blue
	N37		Yellow	Blue	Blue	Blue	Black
ROFBC/ ROFB37	ROFBC						
	ROFB37		Red	Blue	Blue	Blue	
rof2C/ rof237	rof2C	Black		Yellow			
	rof237	Blue				Blue	
WTC/NC	WTC	Red		Red	Light Red		Light Red
	NC						
WTC/ ROFBC	WTC	Red					
	ROFBC	Black	Blue	Blue			
WTC/ rof2C	WTC	Blue					
	rof2C						
WT37/ N37	WT37	Red	Red	Red	Light Red	Blue	Light Red
	N37						
WT37/ ROFB37	WT37	Red	Blue				
	ROFB37	Black	Black	Light Red		Yellow	
WT37/ rof237	WT37	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	
	rof237						
NC/ ROFBC	NC						
	ROFBC	Blue	Blue	Red	Light Red		Light Red

	Συγκρι νόμενα δείγμα τα	Συσσώρευση πρωτεϊνών					
		ROF1	ROF2	PATL1	PATL2	PATL3	PATL4
NC/ rof2C	NC						
	rof2C	Red	Black	Dark Red	Light Red	White	Light Red
N37/ ROFB37	N37						
	ROFB37		Red	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Red
N37/ rof237	N37						
	rof237	Red	Cyan	Red	Yellow	White	Light Red
ROFBC/ rof2C	ROFBC		Cyan	Cyan			
	rof2C	Red					
ROFB37 / rof237	ROFB37		Red	Light Red	Cyan	Cyan	Cyan
	rof237	Red					
NC/ WT37	NC						
	WT37	Red	Red	Red	Light Red	Cyan	Light Red
N37/ WTC	N37		Cyan				
	WTC	Red	Black	Red	Light Red	White	Light Red
ROFB37 / rof2C	ROFB37		Red	Light Red	Cyan	Light Red	Black
	rof2C	Red					White
ROFBC/ rof237	ROFBC		White	Light Red			
	rof237	Red					
NC/ rof237	NC						
	rof237	Red	White	Red	Light Red	Cyan	Light Red
NC/ ROFB37	NC						
	ROFB37		Red	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Red

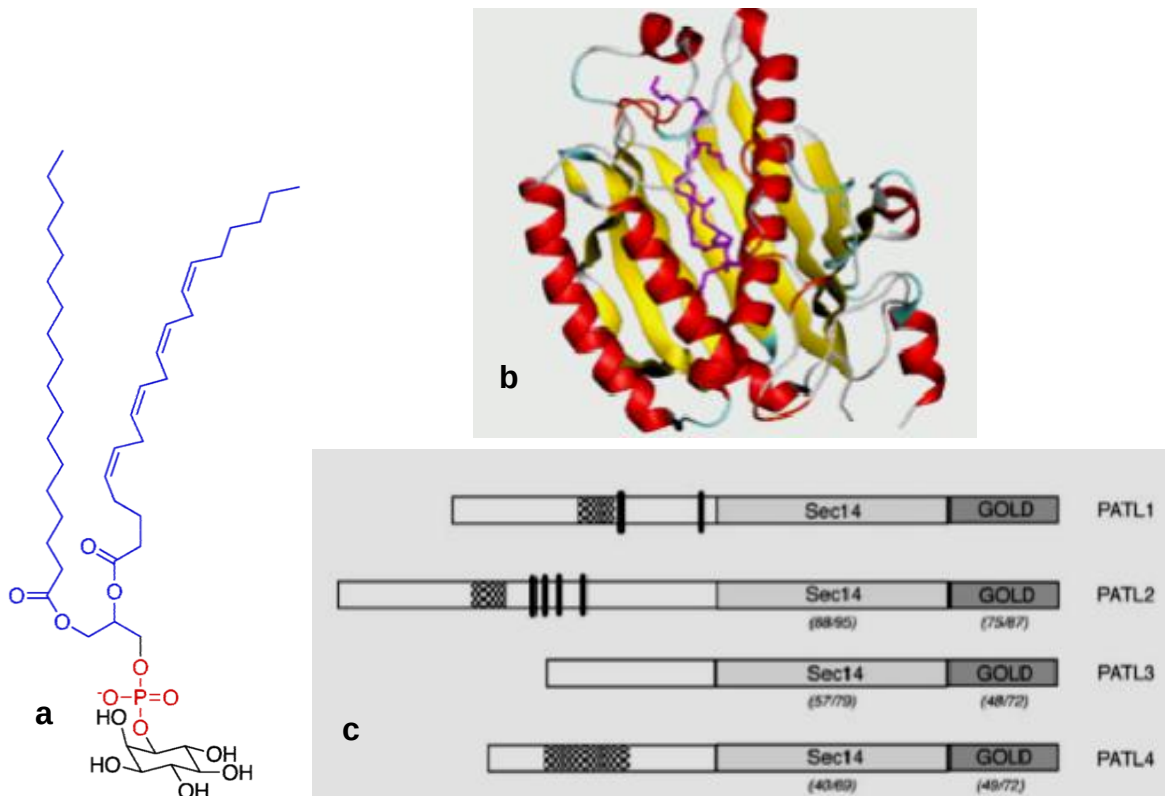
ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι ROF1 και ROF2 είναι πρωτεΐνες με λειτουργία PPIase που παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης. Η ROF1 εκφράζεται σε φυσιολογικές συνθήκες, όμως η λειτουργία της ενεργοποιείται κατά τη διάρκεια θερμικής καταπόνησης. Η ROF2 θεωρείται μία αξιόπιστη πρωτεΐνη ενδεικτική της θερμικής καταπόνησης (*bona-fide heat-stress protein*).

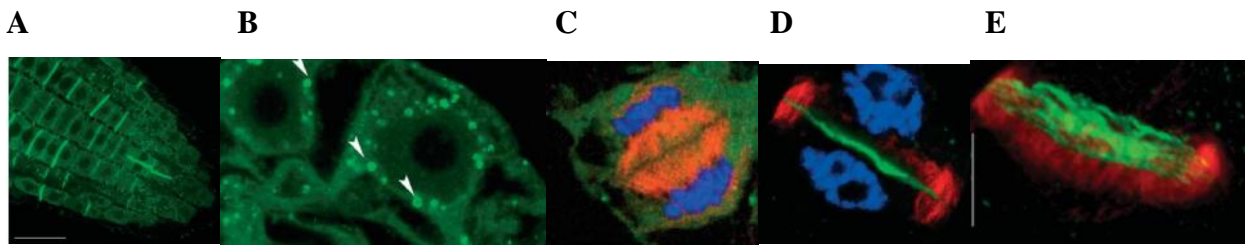
Εκτός από το ενδιαφέρον μας για τη μελέτη αυτών των πρωτεϊνών στο μηχανισμό ανάπτυξης θερμοανθεκτικότητας των φυτών, τόσο η ROF1 όσο και η ROF2 χρησιμοποιήθηκαν ως αξιόπιστοι δείκτες οι οποίοι επιβεβαιώνουν τη λειτουργία αυτού του μηχανισμού (επαγωγή της ROF2 μόνο κατά την ανταπόκριση σε ανερχόμενες θερμοκρασίες). Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα WT, ROFB, *rof2* και N σε φυσιολογικές συνθήκες (*control*) και σε συνθήκες θερμοκρασιακής καταπόνησης (*heat stress 37°C*) για ανάλυση τους με φασματομετρία μάζας (MasSpec). Στα πρωτεϊνικά προφίλ που προέκυψαν έγινε διαφορική σύγκριση χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Perseus 1.6.2.1 και αναπαράσταση με διαγράμματα Volcano (*volcano plots*). Από τα αποτελέσματα της φασματομετρίας είναι ξεκάθαρο πως οι ROF1 και ROF2 αποτελούν κομβικές πρωτεΐνες κατά τη διάρκεια ανάπτυξης θερμοαντοχής στο *heat stress*, μαζί με τις πρωτεΐνες Heat shock (HSP's). Στην εργασία επικεντρωθήκαμε κυρίως στην ανάλυση του τρόπου έκφρασης των διάφορων ισομορφών της Patellin, οι οποίες παρατηρήθηκε ότι συσσωρεύονται διαφορεικά στα μεταλλάγματα της ROF και σε διαφορετικές συνθήκες.

Σε προηγούμενα πειράματα οι πρωτεΐνες Patellin εντοπίστηκαν στο ίδιο τμήμα gel στο οποίο βρέθηκε και η ROF1 όταν έγινε η αρχική της απομόνωση με χρωματογραφία αγχιστείας (*phosphoinositide affinity chromatography*) (Karali, et al., 2012 και Oxley et al., 2013). Οι πρωτεΐνες Patellin των φυτών (PATL), αποτελούν μια οικογένεια έξι πρωτεϊνών, είναι πρωτεΐνες μεταφοράς φωσφατιδυλινοσιτόλης (PITPs) και μοιάζουν με τις Sec14 των ζυμομυκήτων. Μεταφέρουν λιπίδια κατά το σχηματισμό της κυτταρικής πλάκας (*cell plate*) σε ενεργά διαιρούμενα φυτικά κύτταρα. Η *patellin 1* (PATL-1) δεν συμμετέχει στη βιογένεση του *cell plate*, αλλά φαίνεται να στρατολογείται για την επέκταση του στη μέτα-τελόφαση πιθανώς από γεγονότα ενδοκυττάρωσης που εξαρτώνται από την κλαθρίνη βοηθώντας στην ολοκλήρωση του σχηματισμού του. Είναι μία πρωτεΐνη δέσμευσης φωσφοϊνοσιτίδης με κάποια εξειδίκευση ως προς τη δέσμευση, που φαίνεται ότι ενισχύει την τοπική (στο *cell plate*) σύνθεση και οργάνωση της φωσφοϊνοσιτίδης, διοχετεύοντάς την σε στοιχεία του ενδοκυτταρικού μηχανισμού της κλαθρίνης τα οποία ρυθμίζονται από λιπίδια (Huang, Ghosh, Bankaitis, & Medicine, 2017). Η φωσφοϊνοσιτίδη σχηματίζεται με τη δράση κινασών και

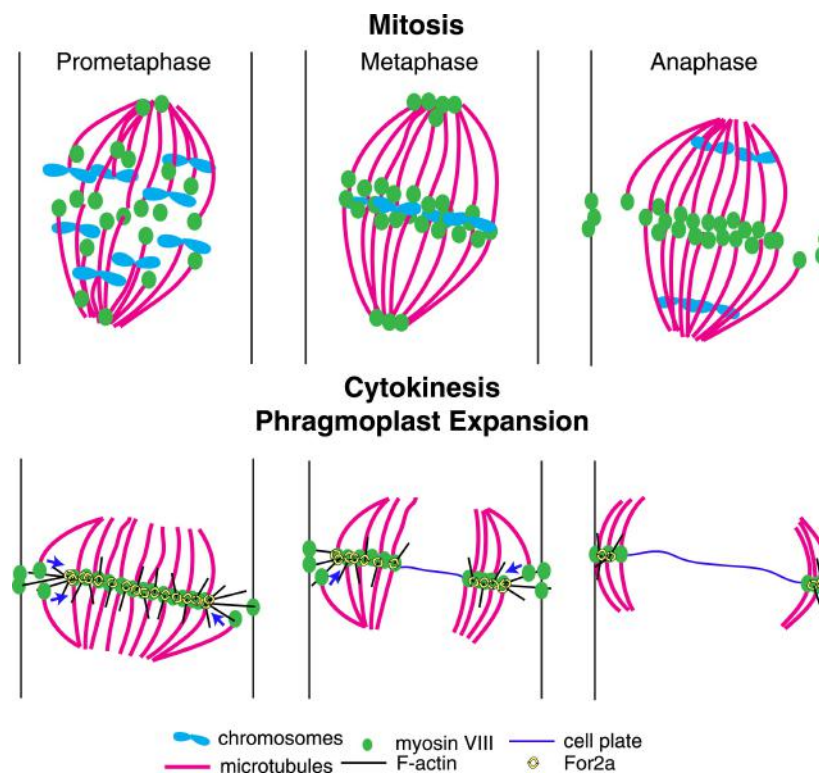
φωσφατασών σε μεμβρανικά λιπίδια, τα οποία φωσφορυλιώνουν τη φωφατιδυλοϊνοσιτόλη. Η λειτουργία της φωσφοϊνοσιτίδης αφορά την άμεση ρύθμιση των πρωτεϊνών-στόχων της ή την στρατολόγηση και συναρμολόγηση πρωτεϊνικών συμπλόκων σε περιοχές της λιπιδιακής διπλοστιβάδας. Οι περιοχές δέσμευσης φωσφοϊνοσιτίδης της PATL1 πιθανώς να είναι υπεύθυνες για τη στρατολόγηση της στο *cell plate*. Με τη σειρά της ενδεχομένως προσελκύει και άλλες πρωτεΐνες ή δημιουργεί, με τη ρύθμιση της σύνθεσης της φωσφοϊνοσιτίδης, μικροστοιχεία φωσφοϊνοσιτίδης, τα οποία είναι απαραίτητα για το σχημασμό λιπιδιακών κυστιδίων στα τελευταία στάδια της κυτταροκίνησης. Αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω του ότι και οι ROF1 και ROF2 είχαν απομονωθεί με χρωματογραφία αγκιστείας ινοσιτιδίων και είχε αποδειχθεί η άμεση αλληλεπίδρασή τους με αυτά με dot blotting (Karali, et al., 2012 και Oxley et al., 2013).



Εικόνα 15: **a:** Δομή φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης. Φωσφορυλίωση γιο-ινοσιτόλης (μάυρο) και σχηματισμός φωσφοϊνοσιτίδης. **b:** Κρυσταλλογραφική ανάλυση πρωτεΐνης μεταφορέα φωσφοϊνοσιτίδης **c:** Δομή και οργάνωση κυρίαρχων πρωτεϊνικών περιοχών των διαφορετικών ισομορφών της Patellin στην *Arabidopsis*. Sec14: περιοχή τύπου Sec14, περιοχή αλληλεπίδρασης με λιπίδια. GOLD: εμπλέκεται στη λειτουργία του Golgi και στη μεταφορά λιπιδίων. (Peterman et al., 2004)



Εικόνα 16: Ανοσοεντοπισμός σε ρίζες *Arabidopsis* και κύτταρα καπνού BY2 του PATL1 (πράσινο), τουμπουλίνη (κόκκινο) και DNA (μπλε). A: χρώση PATL1 σε κυτταρικές πλάκες και B σε κυτταροπλασματικές δομές (Golgi). C: Κύτταρα πρώιμης και μετα-τελοφάσης (D και E) παρουσιάζουν χρώση PATL1 της αναπτυσσόμενης κυτταρικής πλάκας. (Peterman et al., 2004)



Εικόνα 17: Επέκταση της κυτταρικής πλάκας κατά τη διάρκεια της κυτταροκίνησης (Wu & Bezanilla, 2014)

Από τα διαφορικά διαγράμματα «Volcano» παρατηρείται ότι οι PATL1, PATL2, PATL4 καταστέλλονται στα N (*control* και 37 °C) σε σχέση με το WT. Πιθανότατα η απουσία και των δύο ROF στα διπλά μεταλλάγματα καταστέλλει την έκφραση των Patellin. Η PATL3 δεν επηρεάζεται (**Εικόνα 14.5, 14.6**). Η έκφραση των PATL1, PATL2, PATL4 στα ROFB37 μεταλλάγματα είναι υψηλότερη σε σύγκριση με τα N37 (**Εικόνα 14.12**). Προτείνεται ότι η έκφραση των Patellin επηρεάζεται περισσότερο από την ROF2 σε σχέση με την ROF1. Στη σύγκριση των WT37 και ROFB37 εμφανίζεται υψηλή έκφραση της PATL1 (**Εικόνα 14.8**). Στα ROFB37 η έκφραση της ROF2 είναι υψηλότερη από την αντίστοιχη στα WT37, πιθανώς λόγω έλλειψης της ROF1 (**raw data/ πίνακας 2**). Τόσο η παρατήρηση αυτή όσο και η υψηλή έκφραση των PATL1, PATL2, PATL4 στα ROFBC σε σύγκριση με τα NC (**Εικόνα 14.11**), που πιθανώς να οφείλεται σε υπολειμματική δραστηριότητα (*residual activity*) της ROF2, στηρίζουν την πρόταση πως η έκφραση των Patellin, ειδικότερα της PATL1, επηρεάζεται από την έκφραση ή μη έκφραση της ROF2. Ακόμα οι PATL1 και η PATL4 στα rof2-37 βρίσκονται υψηλότερα απ' ότι στα N, πιθανότατα λόγω της έκφρασης της ROF1 (**Εικόνα 14.14, 14.21**). Προτείνεται ότι η έκφραση των Patellin δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα από την απουσία μίας εκ των δύο ROF (**Εικόνα 14.8, 14.10**), όπως συμβαίνει στα N, όπου η απουσία και των δύο έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη καταστολή τους (εικόνες 5, 6). Γίνεται αντιληπτό από όλες τις συγκρίσεις ότι η καταστολή της ROF2 έχει μεγαλύτερη επίδραση στην έκφραση των Patellin από αυτή της ROF1 (**Εικόνα 14.15, 14.16, 14.13, 14.14, 14.17, 14.18, 14.19, 14.20, 14.21**).

Συμπερασματικά οι ROF1 και ROF2 αποτελούν κομβικές πρωτείνες που σχετίζονται με την απόκριση σε υψηλές θερμοκρασίες και παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση άλλων πρωτεϊνών που σχετίζονται με σημαντικούς κυτταρικούς μηχανισμούς.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Zhu, J., (2017). Abiotic stress signaling and responses in plants, *167*(2), 313–324.
- Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., & Shinozaki, K. (2011). Effects of abiotic stress on plants: A systems biology perspective. *BMC Plant Biology*, *11*(1), 163.
- Lincoln Taiz, Eduardo Zeiger, Ian M. Møller, and Angus Murphy, "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.
- Berg M.J., Tymoczko L.J., Stryer L., ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ (ενιαίος τόμος), Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης (2013)
- Harrar, Y., Bellini, C., & Faure, J. (2001). FKBP s : at the crossroads of folding and transduction, *6*(9), 426–431.
- Geisler, M. (2007). $\hat{t}e$: the function of FKBP s in *Te* plant development, *12*(10).
- 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) P 2 and Affects Germination under Osmotic Stress, *7*(11).
- Oxley, D., Ktistakis, N., & Farmaki, T. (2013). ScienceDirect Differential isolation and identification of PI (3) P and PI (3, 5) P 2 binding proteins from Arabidopsis thaliana using an agarose-phosphatidylinositol-phosphate affinity chromatography. *Journal of Proteomics*, *91*(3), 580–594.
- Unger, T., Dym, O., & Albeck, S. (2010). Crystal structure of the three FK506 binding protein domains of wheat FKBP73 : Evidence for a unique wFK73-2 domain Crystal structure of the three FK506 binding protein domains of wheat FKBP73 : evidence for a unique wFK73 _ 2 domain, (May 2014).
- Huang, J., Ghosh, R., Bankaitis, V. A., & Medicine, C. (2017). Sec14-like Phosphatidylinositol Transfer Proteins and the Biological Landscape of Phosphoinositide Signaling in Plants, *1861*, 1352–1364.
- Peterman, T. K., Ohol, Y. M., McCreynolds, L. J., Luna, E. J., Sciences, B., College, W., & Massachusetts, T. K. P. (2004). Patellin1 , a Novel Sec14-Like Protein , Localizes to the Cell Plate and Binds Phosphoinositides 1, *136*(October), 3080–3094.

Wu, S., & Bezanilla, M. (2014). Myosin VIII associates with microtubule ends and together with actin plays a role in guiding plant cell division, 1–20.