

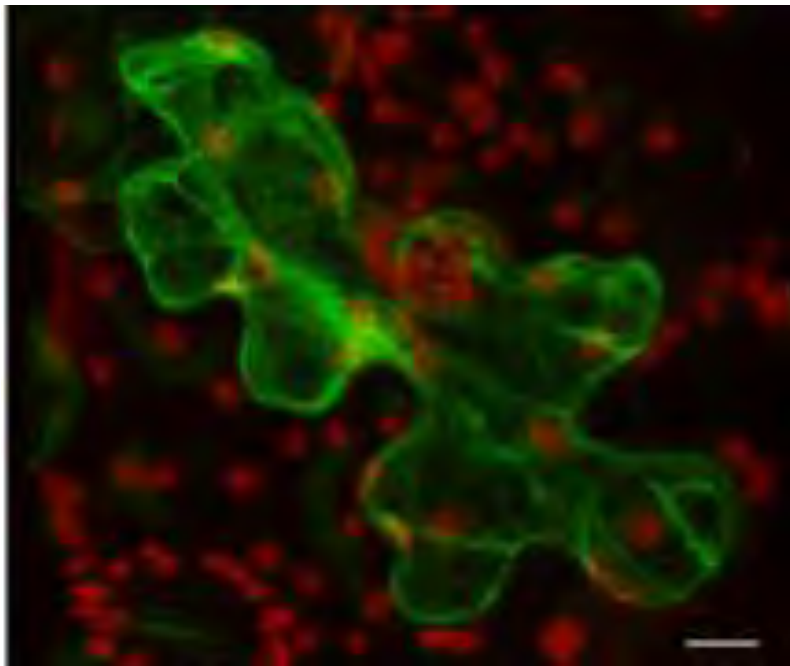


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ROFRPase ΣΤΗΝ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΕ  
ΑΒΙΟΤΙΚΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΕΙΣ



Αλεξανδρίδου Ειρήνη Αλεξάνδρα

ΛΑΡΙΣΑ 2019

## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ROFPPIase ΣΤΗΝ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΕ  
ΑΒΙΟΤΙΚΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΕΙΣ

THE ROLE OF ROF PPIase DURING ABIOTIC STRESS RESPONSES

### **Τριμελής επιτροπή:**

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

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

Αμούτζιας Γρηγόριος : επίκουρος καθηγητής τμήματος  
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Συνοπτεύσεις.....	6
Ευχαριστίες.....	8
Περίληψη.....	9
Abstract.....	10

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Αβιοτικές καταπονήσεις	
1.1. Θερμοκρασιακή καταπόνηση.....	12
1.2. Υδατική ανεπάρκεια.....	13
2. Ο ρόλος των PPIase στα φυτά	
2.1. Δεσμός της προλίνης.....	14
2.2. Ανοσοφιλίνες και κυκλοφιλίνες.....	16
2.3. Ρόλος των FKBPσ στα ζώα.....	17
2.4. Ρόλος των FKBPσ στα φυτά.....	19
3. ROF1 και ROF2	
3.1. Δομή και λειτουργία.....	20
3.2. Πρωτεΐνες μοριακοί συνοδοί και HSPs.....	23
3.3. Θερμοκρασιακή καταπόνηση και HSPs.....	24
3.4. Αβιοτικό στρες αλατότητας – οσμωτικό στρες.....	28
4. Σκοπός.....	31

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Οργανολογία.....	32
---------------------	----

2. Τεχνικές	
2.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών/ SDS-PAGE.....	33
2.2. Μονιμοποίηση του gel.....	37
2.3. Ανοσοαποτύπωση Western Blot	
2.4. Φασματομετρία Μάζας	
3. Πειράματα	
3.1. Φασματομετρία μάζας σε μεταλλαγμένους σπόρους.....	41
3.2. Πείραμα θερμοκρασιακής καταπόνησης σε βλαστίδια.....	42
3.3. Πείραμα στρες ξηρασίας και πλημμυρίσματος σε σπόρους και άνθη.....	42
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	43
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	60
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	62

*Θα ήθελα να αφιερώσω αυτή  
την εργασία στην μητέρα μου, με πολύ αγάπη.*

## ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ

### Χημικά αντιδραστήρια:

Ac: acrylamide/ ακρυλαμίδη

AgNO<sub>3</sub>: νιτρικός άργυρος

APS: ammoniumpersulfate/ υπερθειϊκόαμμώνιο

BSA: bovineserumalbumin/ αλβουμίνηβόειουορού

DTT: dithiothreitol/ 1,4-διθειοθρεϊτόλη

EtOH: ethanol/αιθανόλη

SDS: sodiumdodecylsulfate/ δωδεκακυκλοθειϊκόνάτριο

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

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

### Λοιπές συντομεύσεις:

AT: AcquiredThermotolerance/ανεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες

Bads: άνθη του A. Thaliana

CaM-BDs : calmodulin-binding domains/ περιοχές πρόσδεσης με καλμοδουλίνη

CyPs: cyclophilins/κυκλοφιλίνες

DAG: diacylglycerol/ διακυλογλυκερόλη

DM: *rof1*<sup>-</sup>/*rof2*<sup>-</sup> double knock out/ απουσία των γονιδίων ROF1 και ROF2

FKBP: FK506 binding protein

Heatstress: θερμοκρασιακό στρες

HSFs: Heat Shock Factors/μεταγραφικοί παράγοντες θερμικού σοκ

HSPs: Heat Shock Proteins/πρωτεΐνες θερμικού σοκ

Imbibition: εμποτισμός, απορρόφηση νερού

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)

OE: ROF1 overexpression/ υπερέκφραση του γονιδίου της ROF1

PAGE: polyacrylamidegelelectrophoresis/ ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης

PAS1: PASTICCINO1 (*pas1*)/FKBPπρωτεΐνηAtFKBP72

PPIase: Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase/ *cis-trans* ισομεράση της πεπτιδυλοπρόλης

ROF: rotamase

Rof1<sup>-</sup>: ROF1 knockout/ απουσία γονιδίου ROF1

Rof2<sup>-</sup>: ROF2 knockout/ απουσία γονιδίου ROF2

RyR: υποδοχέας ρυανοδίνης

Seedling: εκβλαστημένος σπόρος

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

TDW1: twisted dwarf1 (*twd1*)/ knockout της AtFKBP42

Western Blot: ανοσοαποτύπωμα τύπου Western

WT: wild type/ αγρίου τύπου

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διπλωματική αυτή εργασία εκπονήθηκε στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (Ε.Κ.Ε.Τ.Α), στο Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών (ΙΝ.Ε.Β), το οποίο κινείται ενεργά για την αναβάθμιση της έρευνας που διεξάγεται στην Ελλάδα, στο ευρύ πεδίο των βιοεπιστημών. Υπεύθυνη για την πτυχιακή μου εργασία ήταν η κυρία Θεοδώρα Φαρμάκη, ερευνήτρια Β', προς την οποία εκφράζω ιδιαίτερες ευχαριστίες για την πολύτιμη βοήθειά της στον σχεδιασμό και την διεκπεραίωση της ερευνητικής αυτής εργασίας. Η επιστημονική γνώση, η υπομονή, η εμπιστοσύνη και η καθοδήγηση που μου προσέφερε, αποτέλεσαν βασικό παράγοντα για την ομαλή ολοκλήρωση της μελέτης αυτής.

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 που, με τις πολύτιμες γνώσεις και συμβουλές της, συνέβαλε στη συγγραφή της εργασίας αυτής.

Επιπλέον, θερμά ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στον κύριο Γρηγόριο Αμούτζια, επίκουρο καθηγητή του τμήματος, για την προτροπή και καθοδήγησή του στην συνεργασία μου με την κυρία Φαρμάκη και στη στήριξή του κατά την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας.

Θα ήθελα, ακόμη, να ευχαριστήσω και όλα τα μέλη του Ινστιτούτου Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών για την οποιαδήποτε βοήθειά τους για την προσαρμογή και ένταξή μου στο εργαστηριακό περιβάλλον, κατά τη διάρκεια της διεκπεραίωσης της διπλωματικής μου στο Ε.Κ.Ε.Τ.Α.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Μαρτίνα Σαμιωτάκη, ερευνήτρια στο Β.Σ.Ρ.Σ. "Alexander Fleming", για την πολύτιμη βοήθειά της στην εξέλιξη της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς ανέλαβε τα δείγματά μου για πρωτεομική ανάλυση με φασματομετρία μαζών.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία εξετάζεται ο ρόλος των ROF1 και ROF2 FKBP[(πρωτεΐνες πρόσδεσης στο FK506) με δράση PPIase (*cis-trans* ισομεράση της πεπτιδυλοπρόλινης)], ο οποίος διερευνήθηκε κάτω από κανονικές συνθήκες, συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών, ξηρασίας και υγρασίας (πλημμυρίσματος) στο φυτό-μοντέλο της Αραβίδοψης (*A. thaliana*) και στο σιτάρι (*triticum aestivum*). Ευρύτερος σκοπός αυτής της εργασίας είναι η κατανόηση της συμμετοχής των δύο αυτών ισομερασών του πεπτιδικού δεσμού της πρόλινης σε σηματοδοτικούς μηχανισμούς ανταπόκρισης των φυτών σε αβιοτικές καταπονήσεις όπως η ξηρασία, το πλημμύρισμα και οι υψηλές θερμοκρασίες. Ειδικότερα, η μελέτη αυτή αποσκοπεί στον εντοπισμό και χαρακτηρισμό νέων πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε μηχανισμούς σηματοδότησης σχετικούς με τον ποιοτικό έλεγχο των πρωτεϊνών κατά την ανταπόκριση στα προαναφερθέντα αβιοτικά στρες. Ο ρόλος των ROF1 και ROF2 της *A. thaliana* διερευνήθηκε κάτω από τις προαναφερθείσες αβιοτικές συνθήκες, με μοριακές και βιοχημικές τεχνικές. Η μελέτη εκπονήθηκε σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια και σε διαφορετικά μεταλλαγμένα στελέχη του φυτού *A. thaliana* (wt, *rof1*<sup>-</sup>, *rof2*<sup>-</sup>, *rof1*<sup>-</sup>/*rof2*<sup>-</sup> double knockout και ROF1OE). Επιπλέον, για να εμβαθύνουμε ακόμη περισσότερο στις παρατηρήσεις μας, ελέγχθηκαν δείγματα wt και μεταλλαγμένων σπόρων με φασματομετρία μάζας. Η μελέτη μας έδειξε διαφορεική έκφραση πρωτεϊνών εξαρτώμενη της παρουσίας ή απουσίας των συγκεκριμένων γονιδίων, όπως και διαφορετικά επίπεδα συσσώρευσης της ROF2 κάτω από διαφορετικές συνθήκες στρες σε *A. thaliana* και σιτάρι.

## ABSTRACT

The present thesis focuses on the role of ROF1 and ROF2 FKBP (FK506 binding proteins) with PPIase (Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase) activity, which was studied under high temperature, drought and humidity stress in the model plant *A. thaliana* and wheat (*Triticum aestivum*). The broader purpose of this study is to understand the impact of these two PPIases in plant signal response mechanisms to abiotic stress. Specifically, the study aims at the identification and characterization of novel proteins involved in pathways related to protein quality control during abiotic stress responses. The role of ROF1 and ROF2 was studied in both *A. thaliana* and wheat under the abiotic stress conditions mentioned above, using molecular and biochemical assays. This research was conducted using specific developmental stages of different *A. thaliana* mutants (wt, *rof1*<sup>-</sup>, *rof2*<sup>-</sup>, *rof1*<sup>-</sup> / *rof2*<sup>-</sup> double knockout and ROF1OE). To further investigate our observations, samples of wt and mutated seeds were analyzed using Mass Spectrometry. Following data analysis, differential protein expression depending on the presence or absence of ROF1 and ROF2 genes was observed as well as different levels of ROF2 accumulation under different conditions in *A. thaliana* and wheat.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1. ΑΒΙΟΤΙΚΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΕΙΣ

Τα φυτά αναπτύσσονται και αναπαράγονται σε ένα σύνθετο περιβάλλον που διαμορφώνεται από μια πληθώρα βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων, οι οποίοι παρουσιάζουν τόσο χρονικές όσο και χωρικές διακυμάνσεις. Στους παράγοντες αυτούς περιλαμβάνονται η ποιότητα και η κίνηση (άνεμος) της ατμόσφαιρας, η ποιότητα και η ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας, η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα νερού, οι συγκεντρώσεις θρεπτικών στοιχείων και ιχνοστοιχείων, η αλατότητα και το χημικό περιβάλλον του εδάφους (pH και οξειδοαναγωγικό δυναμικό). Στην παρούσα εργασία θα εστιάσουμε στην θερμοκρασία, στο πλημμύρισμα και την ξηρασία. Οι σημαντικές αποκλίσεις των παραγόντων αυτών, από το σύνηθες εύρος, σε ότι αφορά την ανοχή τους από τους ζωντανούς οργανισμούς, μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις στη λειτουργία τους. [1]

Τα φυτά διαθέτουν, λόγω της ακινησία τους (sessility), πολυάριθμους μηχανισμούς που τους επιτρέπουν όχι μόνο να επιβιώνουν, αλλά και να ευδοκιμούν στο σύνθετο περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται. Η προσαρμογή (adaptation) στο περιβάλλον χαρακτηρίζεται από γενετικές αλλαγές στο σύνολο του πληθυσμού οι οποίες έχουν παγιωθεί (σταθεροποιηθεί) μέσω της φυσικής επιλογής κατά τη διάρκεια πολλών γενεών. Σε αντιδιαστολή, τα μεμονωμένα άτομα του είδους μπορούν επίσης να ανταποκρίνονται σε αλλαγές του περιβάλλοντος, μέσω άμεσων μορφολογικών ή λειτουργικών αλλαγών οι οποίες τους επιτρέπουν να ανταπεξέλθουν πιο αποτελεσματικά στο νέο περιβάλλον. Οι αλλαγές αυτές δεν απαιτούν 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 συνθήκες ή κατόπιν μίας περιόδου προσαρμογής, τότε η αλλαγή θεωρείται ως εγκλιματισμός (acclimation). Οι αποκρίσεις αυτές συνήθως αναφέρονται ως φαινοτυπική πλαστικότητα 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 μπορούν

από κοινού να συμβάλλουν στη συνολική ανεκτικότητα του φυτού σε ακραίες συνθήκες του αβιοτικού περιβάλλοντος. Οι **αποκρίσεις καταπόνησης (stress responses)** μπορούν να διεγερθούν από ποικίλους αβιοτικούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα, υψηλές θερμοκρασίες. Οι ευρέως χρησιμοποιούμενοι όροι ανθεκτικότητα στην καταπόνηση (stressresistance) και ανεκτικότητα στην καταπόνηση (stresstolerance) 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]

### 1.1. Θερμοκρασιακή καταπόνηση

Η αύξηση και η ανάπτυξη των μεσοφύτων (χερσαίων φυτών προσαρμοσμένων σε εύκρατα περιβάλλοντα, ούτε υπερβολικά υγρά ούτε υπερβολικά ξηρά) παρουσιάζει βέλτιστο εύρος τιμών σε μια σχετικά στενή κλίμακα θερμοκρασιών, περίπου 10° C. Εκτός των ορίων της κλίμακας αυτής εμφανίζονται βλάβες, το μέγεθος των οποίων εξαρτάται από την ένταση και τη διάρκεια θερμοκρασιακών διακυμάνσεων. Η θερμική καταπόνηση μπορεί να προκαλέσει βλάβες σε μεμβράνες και ένζυμα. Η φυτική μεμβράνη αποτελείται από μια διπλοστιβάδα λιπιδίων που διαπερνάται από στερόλες και πρωτεΐνες και κάθε παράγοντας που μεταβάλλει τις ιδιότητες της μεμβράνης μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς τις κυτταρικές διαδικασίες. Οι *υψηλές θερμοκρασίες* προκαλούν αύξηση της ρευστότητας των μεμβρανικών λιπιδίων και ελάττωση της ισχύος των υδρογονικών δεσμών και των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ πολικών ομάδων πρωτεϊνών που εντοπίζονται στην υδατική φάση της μεμβράνης. Επομένως, οι υψηλές θερμοκρασίες τροποποιούν τη σύσταση και τη δομή των μεμβρανών και προκαλούν διαρροή ιόντων. Οι υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια της τρισδιάστατης δομής που απαιτείται για τη σωστή λειτουργία των ενζύμων ή των δομικών συστατικών και τελικά 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. Τόσο 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. Παρόλο που ορισμένα ένζυμα των χλωροπλαστών, όπως η rubisco, η ενεργάση της rubisco, η NADP-αφυδρογονάση της G3P και η καρβοξυλάση του PEP, γίνονται ασταθή σε υψηλές θερμοκρασίες, η μετουσίωση και η απώλεια δραστηριότητας των ενζύμων αυτών παρατηρείται σε σαφώς μεγαλύτερες θερμοκρασίες έναντι αυτών που προκαλούν μείωση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη ότι η αρχική ζημιόγόνος δράση των υψηλών θερμοκρασιών σχετίζεται κυρίως με τις μεταβολές στις ιδιότητες των μεμβρανών και την αποσύζευξη των μηχανισμών μεταφοράς ενέργειας στους χλωροπλάστες. 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. [1]

### 1.2. Υδατική ανεπάρκεια

Το 97% περίπου του νερού που προσλαμβάνεται από τα φυτά χάνεται στην ατμόσφαιρα, κυρίως μέσω της διαπνοής. Το 2% περίπου χρησιμοποιείται για αύξηση του όγκου ή για επέκταση των κυττάρων και το 1% για μεταβολικές διεργασίες, κυρίως τη φωτοσύνθεση. Έλλειψη νερού (ανεπαρκής διαθεσιμότητα νερού) επικρατεί στα περισσότερα φυσικά περιβάλλοντα και στις καλλιέργειες, λόγω απρόβλεπτων ή συνεχών περιόδων ανομβρίας. Η *ξηρασία (drought)*, ως μετεωρολογικός όρος, αναφέρεται σε μία περίοδο ανεπαρκούς βροχόπτωσης που επιφέρει έλλειψη νερού στα φυτά. Όταν το έδαφος ξηραίνεται, η υδραυλική αγωγιμότητα του φυτού μειώνεται δραματικά, ιδιαίτερα πλησίον του σημείου μαρασμού, που δηλώνει την τιμή της εδαφικής υγρασίας στην οποία τα φυτά δεν επανακτούν την πίεση σπαργής, ακόμα και αν ενυδατωθούν. Όταν τα κύτταρα

χάνουν νερό, συρρικνώνονται, κυρίως λόγω της κατάρρευσης των κυτταρικών τοιχωμάτων, φαινόμενο που ονομάζεται *κυτόρρυση*. Όταν συρρικνώνονται οι ρίζες, απομακρύνονται από τα σωματίδια του εδάφους που συγκρατούν νερό και τα ευαίσθητα ριζικά τριχίδια, τα οποία απορροφούν νερό, καταστρέφονται. Η καταστροφή των ριζικών τριχιδίων ελαττώνει την πρόσληψη νερού. Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που αυξάνει την αντίσταση στην ροή του νερού εντός των φυτών είναι οι *εμβολές*, δηλαδή η διακοπή της στήλης νερού που βρίσκεται υπό τάση (αρνητική πίεση) στα αγγεία του ξύλου καθώς, όπως είναι γνωστό, η διαπνοή από τα φύλλα «ρουφά» το νερό δια μέσου του φυτού, αναπτύσσοντας τάση στη στήλη νερού. [1]

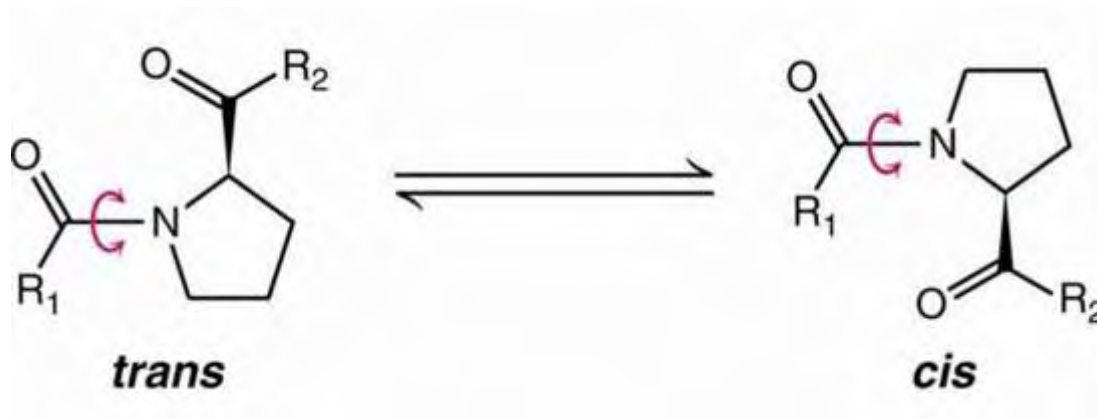
## **2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΡΙΑΣΕ ΣΤΑ ΦΥΤΑ**

### 2.1. Δεσμός της προλίνης

Ο πεπτιδικός δεσμός είναι βασικά επίπεδος. Έτσι, για κάθε ζεύγος αμινοξέων τα οποία συνδέονται με πεπτιδικό δεσμό υπάρχουν έξι άτομα που βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο: το άτομο α-άνθρακα και η ομάδα CO του πρώτου αμινοξέος καθώς και η NH ομάδα και το άτομο α-άνθρακα του δεύτερου αμινοξέος. Η εξήγηση αυτής της γεωμετρικής προτίμησης βρίσκεται στη φύση του χημικού δεσμού του πεπτιδίου. Ο πεπτιδικός δεσμός έχει, εν μέρει, χαρακτήρα διπλού δεσμού ο οποίος αποτρέπει την περιστροφή γύρω από τον εαυτό του. Το γεγονός ότι ο πεπτιδικός δεσμός δεν περιστρέφεται περιορίζει τις στερεοδιατάξεις του πεπτιδικού κορμού και εξηγεί την επίπεδη φύση του δεσμού. Υπάρχουν δύο δυνατές διαμορφώσεις για έναν πεπτιδικό δεσμό. Στη διαμόρφωση *trans* τα δύο άτομα α-άνθρακα βρίσκονται απέναντι, ενώ στη διαμόρφωση *cis* βρίσκονται στην ίδια πλευρά του πεπτιδικού δεσμού. Όλοι σχεδόν οι πεπτιδικοί δεσμοί των πρωτεϊνών είναι σε διαμόρφωση *trans*. Αυτή η προτίμηση της διαμόρφωσης *trans*, σε σχέση με τη *cis*, εξηγείται από το γεγονός ότι οι αλλοστερικές αλληλεπικαλύψεις των ομάδων που συνδέονται στα άτομα α-άνθρακα παρεμποδίζουν την διαμόρφωση *cis* και αφήνουν ελεύθερη την *trans*. Οι πιο κοινές περιπτώσεις δεσμών *cis* αφορούν ένα αμινοξύ X και την προλίνη (X-Pro). Οι δεσμοί αυτοί 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 μορφών *trans* και *cis*. Επομένως, η προλίνη μπορεί να επηρεάσει ιδιαίτερα την πρωτεϊνική αρχιτεκτονική διότι ο δακτύλιος της δομής της την κάνει πιο άκαμπτη από ότι άλλα αμινοξέα. [2]

Η δημιουργία της τρισδιάστατης δομής μιας πρωτεΐνης είναι μια διεργασία απαραίτητη για την βιολογική της δράση και καθορίζεται πάντα από την αμινοξική αλληλουχία της εκάστοτε πρωτεΐνης. Οι πρωτεΐνες μοριακοί συνοδοί (molecular chaperones) λειτουργούν ως καταλύτες στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών και στο σχηματισμό μακρομοριακών συμπλόκων. 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 Heat Shock Proteins (HSPs/πρωτεΐνες θερμικού σοκ). Οι HSPs σταθεροποιούν άλλες πρωτεΐνες και διευκολύνουν την επαναδίπλωση τους μετά τη μερική αποδιάταξη που υφίστανται λόγω έκθεσής τους σε υψηλές θερμοκρασίες. Επιπλέον, 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 ουβικουιτίνωση των λάθος αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και στην αποικοδόμησή τους από το πρωτεασώματα. [2] Εκτός των μοριακών συνοδών, τα κύτταρα διαθέτουν και έναν άλλο τύπο ενζύμου που καταλύει αναδίπλωση πρωτεϊνών, την PPIase. Η PPIase καταλύει τον ισομερισμό ανάμεσα στη *cis* και την *trans* διαμόρφωση των πεπτιδικών δεσμών που προηγούνται των καταλοίπων προλίνης (εικόνα 1).



**Εικόνα 1.** *Cis-trans* διαμόρφωση του πεπτιδικού δεσμού της προλίνης

## 2.2. Κυκλοφιλίνες και ανοσοφιλίνες

Οι κυκλοφιλίνες ανήκουν σε μια ομάδα πρωτεϊνών που έχουν λειτουργία *cis-trans* ισομεράσης του πεπτιδικού δεσμού της προλίνης. Αυτές οι πρωτεΐνες βρίσκονται σε όλα τα κύτταρα όλων των οργανισμών που έχουν μελετηθεί, τόσο στους προκαρυώτες, όσο και στους ευκαρυώτες. Στον άνθρωπο έχουν βρεθεί 16 κυκλοφιλίνες και στο *A. thaliana* 29. Η πρώτη πρωτεΐνη της ομάδας που έχει αναγνωριστεί στα θηλαστικά είναι η κυκλοφιλίνη A, η οποία είναι ο κύριος κυτταρικός στόχος του ανοσοκατασταλτικού φαρμάκου κυκλοσπορίνης A. Η κυκλοσπορίνη A δημιουργεί σύμπλοκο με την πρωτεϊνική φωσφατάση ser/thr ενεργοποιούμενη από ασβέστιο-καλμοδουλίνη (καλσινευρίνη). Ο σχηματισμός αυτού του συμπλόκου εμποδίζει την καλσινευρίνη να ρυθμίσει την μεταγραφή γονιδίων κυτοκινών. Πρόσφατες μελέτες έχουν φανερώσει ότι οι κυκλοφιλίνες έχουν ρόλο μοριακών συνοδών και συμμετέχουν σε κυτταρικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος [3]

Οι ανοσοφιλίνες (immunophilins) είναι πρωτεΐνες που καταλύουν τον ισομερισμό του πεπτιδικού δεσμού της προλίνης, μεταξύ της *cis* και της *trans* διαμόρφωσης. Οι ανοσοφιλίνες αναγνωρίζονται από ανοσοκατασταλτικά φάρμακα. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι κυκλοσπορίνες, οι οποίες αναγνωρίζονται από την κυκλοσπορίνη, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως σε μεταμοσχεύσεις οργάνων. Στις ανοσοφιλίνες ανήκουν και οι FKBP. Οι πρωτεΐνες αυτές αναγνωρίζονται από ένα ανοσοκατασταλτικό φάρμακο, το FK506, το οποίο επίσης χρησιμοποιείται για την



αποφυγή απόρριψης μοσχεύματος. Καθότι οι FKBP's ανήκουν στην οικογένεια των ανοσοφιλίνων, διαθέτουν και αυτές δράση PPIase. Η δράση αυτή εμποδίζεται με την παρουσία ανοσοκασταλτικών φαρμάκων. [3,4]

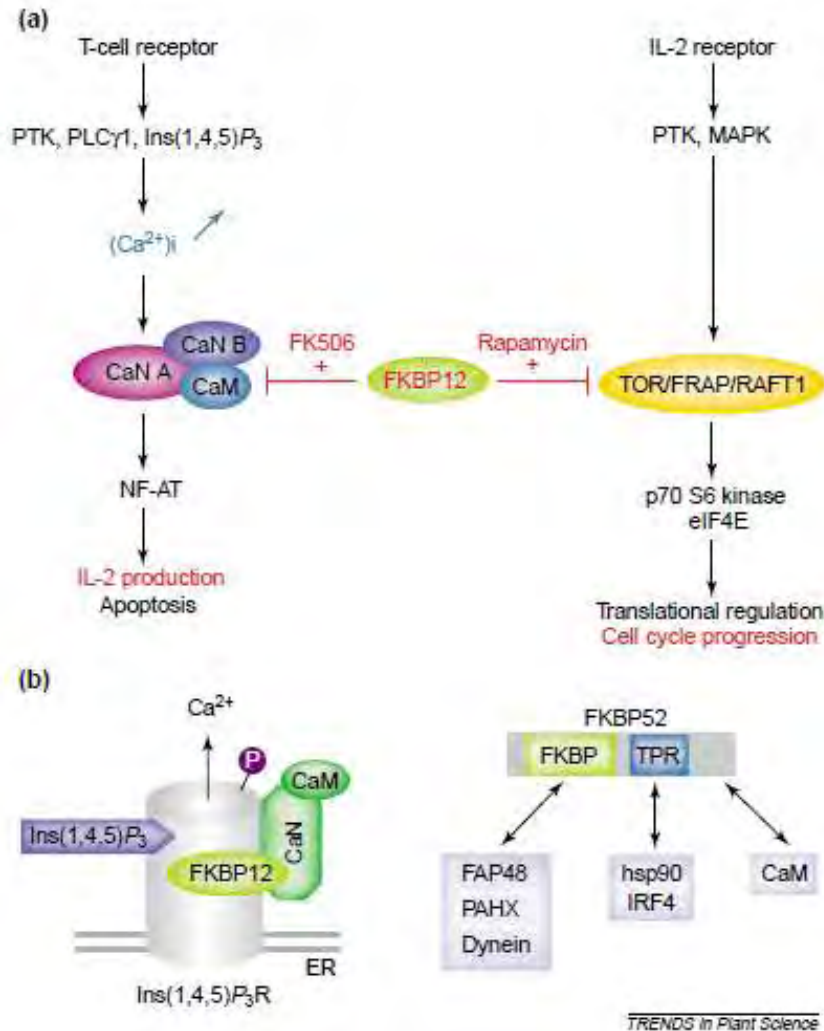
### 2.3. Ρόλος FKBP's στα θηλαστικά

Στα θηλαστικά, οι FKBP's, χαμηλού μοριακού βάρους, περιλαμβάνουν μια FKBP περιοχή (FKBD) ικανή να έχει λειτουργία PPIase και σύνδεση με το FK506 φάρμακο. Απουσία του ανοσοκατασταλτικού φαρμάκου, η FKBP12 προσδένεται και ρυθμίζει τη λειτουργία καναλιών ασβεστίου, όπως στον υποδοχέα ρυανοδίνης (RyR) και στον υποδοχέα τριφωσφορικής ινοσιτόλης (Ins(1,4,5)P3-R) ή συνεργάζεται με τον TGF-β (*trans* - forming growth factor-β). [5]

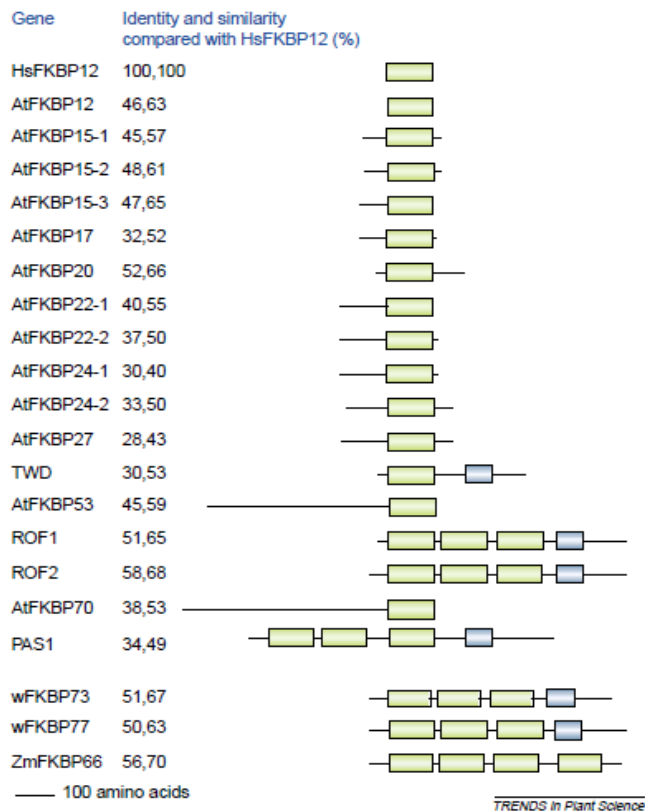
Σε προηγούμενες μελέτες, ποντίκια στα οποία είχαν αφαιρεθεί οι ισομορφές του FKBP12 έδειξαν είτε σημαντικές καρδιακές ανωμαλίες και τροποποιημένη λειτουργία του RyR ή τερματισμός του κυτταρικού κύκλου. Με απλά λόγια, η πρόσδεση του FK506/tarapmycin-FKBP12 συμπλόκου μπλοκάρει την λειτουργία φωσφατάσης της καλσινευρίνης ή/και την λειτουργία κινάσης των ομολόγων της TOR οδηγώντας σε αναστολή της μεταγωγής σήματος, και συνεπώς αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων και την μεταγενέστερη απόρριψη μοσχεύματος ή τερματίζοντας τον κυτταρικό κύκλο (εικόνα 2). [5]

Οι με περισσότερες περιοχές (μεγάλου μοριακού βάρους) περιέχουν μέχρι και τρεις FKBDs ακολουθούμενη από μία TPR περιοχή (tetratricopeptidomain) και ένα καρβοξυτελικό άκρο με περιοχές πρόσδεσης με καλμοδουλίνη (calmodulin-bindingdomains - CaM-BDs). Και οι δύο αυτές περιοχές είναι πολύ σημαντικές για αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (εικόνα 2). Η πιο αντιπροσωπευτική από τις μεγάλου μοριακού βάρους FKBP's των θηλαστικών είναι η FKBP52, η οποία σχετίζεται με το σύμπλεγμα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Η FKBP52 αντικαθιστά την FKBP51 με αποτέλεσμα την εναλλαγή του κυτταροπλασματικού υποδοχέα σε έναν με υψηλότερη συγγένεια για την πρόσδεσή του σε ορμόνες. Στη συνέχεια, η FKBP52 προωθεί την μετακίνηση του υποδοχέα στον πυρήνα συνδέοντας τον υποδοχέα μέσω της πρωτεΐνης θερμικού σοκ HSP90 που

προσδέεται στην TPR περιοχή με μια οικογένεια πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού που προσδέονται στην PPIase περιοχή της FKBP52. [5,6]



**Εικόνα 2.** Α) η πρόσδεση του FK506/rapamycin-FKBP12 συμπλόκου μπλοκάρει την λειτουργία φωσφατάσης της καλσινευρίνης ή/και την λειτουργία κινάσης των ομολόγων της TOR οδηγώντας σε αναστολή της μεταγωγής σήματος, και συνεπώς αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων. Β) Αριστερά, φαίνεται η αλληλεπίδραση της FKBP12 με κανάλια ιόντων ασβεστίου. Δεξιά, απεικονίζονται οι περιοχές της FKBP52, που συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης: FKBP, TPR και CaM-BD (πχ. Πρόσδεση HSP90 στην TPR).



**Εικόνα 3.** Σύγκριση δομικών περιοχών ανάμεσα στις FKBPστης *A. thaliana*, του ανθρώπου (HsFKBP12), του σιταριού (wFKBP73, wFKBP77) και καλαμποκιού (ZmFKBP66).

#### 2.4. Ρόλος των FKBPσ στα φυτά

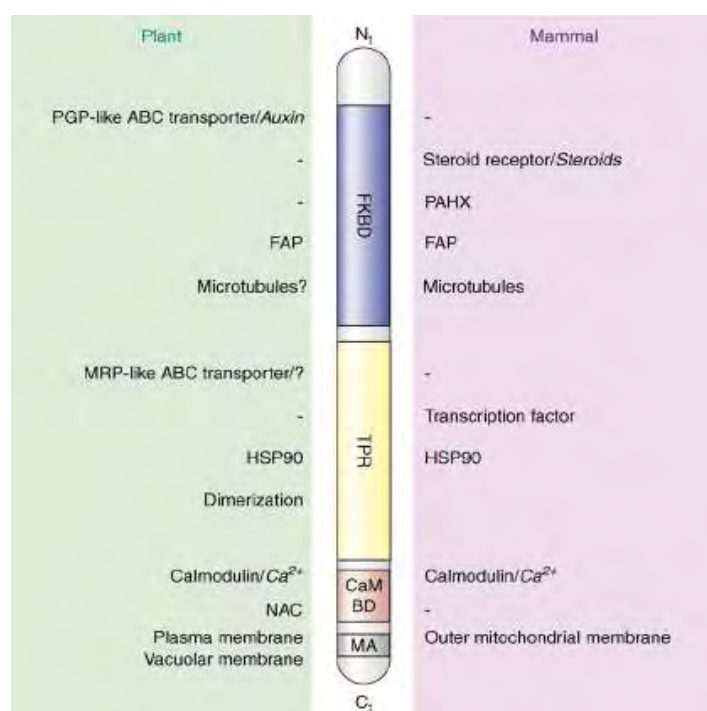
Πολλές FKBPσ έχουν λειτουργία PPIase (rotamase), δημιουργώντας την εντύπωση ότι οι FKBPσ παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Παρά ταύτα, εκτεταμένη έρευνα την περασμένη δεκαετία έδειξε δύο ξεχωριστές λειτουργίες των FKBPσ:

1) Λειτουργία PPIase η οποία αναστέλλεται από ανοσοκατασταλτικά φάρμακα, όπως είναι το FK506 και η ραπαμυκίνη (εικόνα 2) και

2) η λειτουργία τους ως πρωτεΐνες μοριακοί συνοδοί, ανεξάρτητα από την PPIase λειτουργία, μένοντας ανεπηρέαστη από τα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα (εικόνα 2)

Μετά από αναλύσεις των δομών και των αλληλεπιδράσεων των μεγάλων FKBPσ (εικόνα 3 και 4) στα φυτά, διαπιστώθηκε ο μοριακός τους ρόλος στον έλεγχο της ανάπτυξης, πέρα από τον γνωστό ρόλο τους στην αναδίπλωση πρωτεϊνών. Η

πρόταση ως τώρα είναι ότι αυτές οι FKBP ρυθμίζουν μονοπάτια φυτικών ορμονών, στρατολογώντας ή διαμορφώνοντας πρωτεΐνες-πελάτες μέσω αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Σε πρόσφατες μελέτες βρέθηκαν νέα μόρια τα οποία αλληλεπιδρούν με τις FKBP, νέοι μηχανισμοί και λειτουργίες των FKBP, πέρα από τη λειτουργία τους σαν τσαπερόνες. Έχει παρατηρηθεί επίσης, ότι πολλές φυτικές και συγγενικές FKBP των θηλαστικών έχουν χάσει ή διατηρούν μειωμένη PPIase activity, παρά το αποδεκτό πλέον γεγονός πως η λειτουργία τους ως μοριακοί συνοδοί είναι ανεξάρτητη από την λειτουργία τους ως PPIase. Η PPIase δραστηριότητα σχετίζεται με την συντήρηση πέντε αμινοξέων, τα οποία καθορίζουν ένα ενεργό κέντρο, το οποίο φαίνεται να προβλέπει αυτή τη λειτουργία. [6,7]



**Εικόνα 4.** Δομικές περιοχές των FKBP και οι ρόλοι τους σε φυτά (αριστερά) και σε θηλαστικά (δεξιά).

### 3. ROF1 ΚΑΙ ROF2

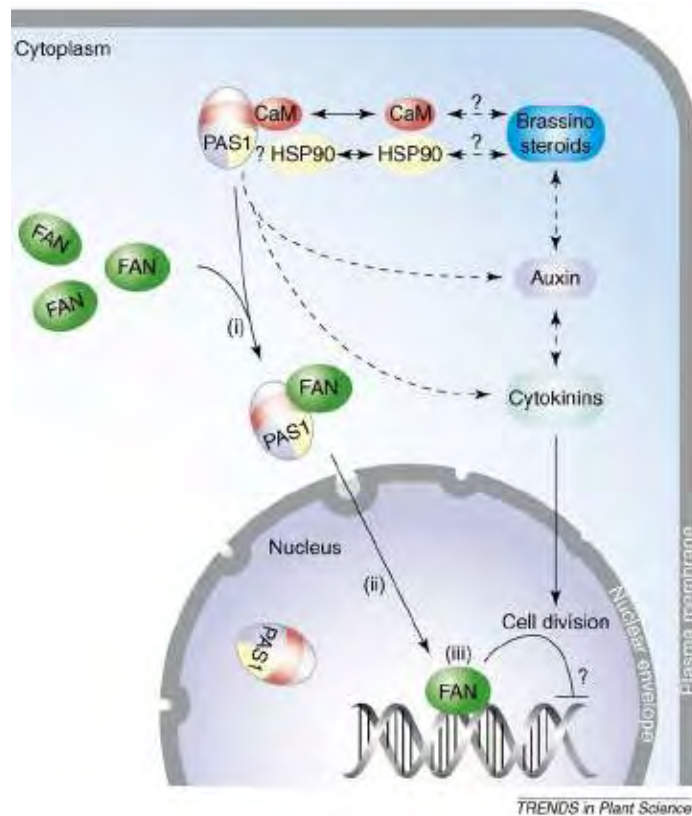
#### 3.1. Δομή και λειτουργία

Οι ισομεράσες του πεπτιδικού δεσμού της προλίνης εκφράζονται τόσο σε προκαρυωτικά όσο και σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Τα μέλη της οικογένειας των FKBP ποικίλουν ανάλογα το μοριακό βάρος, το οποίο κυμαίνεται μεταξύ 12 έως

>77 kDa. Η ανθρώπινη FKBP12 περιλαμβάνει μια FKBD (FK506 Binding Domain) περιοχή, η οποία αποτελεί τον κοινό παρανομαστή της οικογένειας. Οι πρωτεΐνες με πολλές FKBD περιοχές μπορεί να χαρακτηρίζονται δομικά και από επιπλέον πρωτεϊνικά μοτίβα, τα οποία είναι συνήθως: μια τριμερής TPR περιοχή (tetratricopeptidedomain), η οποία εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, και μια περιοχή πρόσδεσης της καλμοδουλίνης (calmodullin-bindingdomain: CaMBD) (εικόνα 4). Η FKBP51 και η FKBP52 των θηλαστικών σχετίζεται με την πρωτεΐνη θερμικού σοκ HSP90 μέσω της TPR περιοχής. Μετά από αναλύσεις των δομών και των αλληλεπιδράσεων των μεγάλων FKBP στα φυτά, διαπιστώθηκε και ο μοριακός τους ρόλος στον έλεγχο της ανάπτυξης, πέρα από τον γνωστό ρόλο τους στην αναδίπλωση πρωτεϊνών. Η πρόταση ως τώρα είναι ότι αυτές οι FKBP ρυθμίζουν μονοπάτια φυτικών ορμονών, στρατολογώντας ή διαμορφώνοντας πρωτεΐνες-πελάτες μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Έχει παρατηρηθεί, ότι πολλές φυτικές και συγγενικές FKBP των θηλαστικών έχουν χάσει ή διατηρούν μειωμένη λειτουργία PPIase. Η PPIase λειτουργία σχετίζεται με την συντήρηση πέντε αμινοξέων, τα οποία καθορίζουν ένα ενεργό κέντρο που προβλέπει αυτή τη λειτουργία. Κάποιες FKBP των φυτών (ROF1 και οι ομόλογές της) έχουν λειτουργία μοριακού συνοδού σε ανταπόκριση στο στρες, η οποία εξαρτάται από την λειτουργία ως PPIase, ανάλογη με τη λειτουργία τσαπερόνης των FKBP στα θηλαστικά. Αντίθετα, μια άλλη υποκατηγορία FKBP (που χαρακτηρίστηκε από το PAS1 και TWD1, όπως θα αναλυθεί παρακάτω) απομονώθηκε και έχει αποδειχθεί να είναι μοναδική στα φυτά, με βασικό ρόλο στον έλεγχο της μεταφοράς και της λειτουργίας ορμονών. [6, 7]

Η αλληλούχιση του φυτού *A. thaliana* αποκάλυψε 23 FKBP, επτά εκ των οποίων περιλαμβάνουν πολλαπλές περιοχές(εικόνα 4), δυο εκ των οποίων η λειτουργία έχει χαρακτηριστεί. Η πρωτεΐνη PASTICCINO1 (pas1, AtFKBP72) είναι μέλος της οικογένειας FKBP, και μεταλλάξεις στην κωδική περιοχή εμφανίζουν σοβαρές αναπτυξιακές ανωμαλίες, τροποποιημένη ανταπόκριση στις κυτοκίνες και αρνητική ρύθμιση των γονιδίων απάντησης σε αυξίνη. Το προϊόν του pas1 έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά με το μεταγραφικό παράγοντα FAN (FKBP-associated NAC) (εικόνα 5). Χαρακτηρισμός των μεταλλαγμάτων twisted dwarf1 (twd1) και ultracurvata 2

(UCU2), τα οποία είναι knockouts της AtFKBP42, αποκάλυψε κοινές πλειοτροπικές επιδράσεις που προκαλούν νανισμό, παραμορφωμένες ρίζες και βλαστό και ελικοειδή περιστροφή των φυτικών οργάνων. Σε πρόσφατη μελέτη βρέθηκε η κρυσταλλική δομή της AtFKBP42. Αυτά τα δεδομένα έριξαν φως στους τρόπους σύνδεσης της HSP90. [6]



**Εικόνα 5.** Μοντέλο δράσης της PAS1. Αλληλεπίδραση με τον μεταγραφικό παράγοντα FAN, μεταφορά στον πυρήνα και πιθανή παρεμπόδιση μεταγραφής γονιδίων κυτοκινών.

Οι AtFKBP62 (ROF1) και AtFKBP65 (ROF2) του *A.thaliana* έχουν παρόμοιες δομικές περιοχές και υψηλή ομολογία. Η RNA ανάλυση και πρωτεϊνική ανάλυση του προφίλ έκφρασης της ROF1 και ROF2 δείχνουν ότι η έκφραση αυτών σχετίζεται με το αναπτυξιακό στάδιο και το αβιοτικό στρες. Η ROF1 και ROF2 εκφράζονται σε αγγειακούς ιστούς (ξύλωμα, ηθμός), βλαστίδια και άνθη, και η έκφρασή τους αυξάνεται με heatstress. Σε προηγούμενες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η ROF1 προσδένεται στην πρωτεΐνη θερμικού σοκ HSP90 και η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση πραγματοποιείται μέσω της TPR περιοχής(εικόνα 4, 5), γεγονότα που θα αναλυθούν παρακάτω. [7, 10]

### 3.2. Πρωτεΐνες μοριακοί συνοδοί και HSPs

Οι ROF1 και ROF2 του *A.thaliana*, ρυθμίζουν μονοπάτια σηματοδότησης στρατολογώντας ή διαμορφώνοντας πρωτεΐνες-πελάτες μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Χαρακτηρίζονται από τη λειτουργία που διαθέτουν ως μοριακοί συνοδοί σε ανταπόκριση στο στρες, η οποία εξαρτάται από την λειτουργία ως PPIase, καθώς περιέχουν μια περιοχή που διαθέτει λειτουργία *cis/trans* ισομεράσης πεπτιδικού δεσμού της προλίνης. Οι μοριακοί συνοδοί (chaperones) είναι μια μεγάλη ομάδα πρωτεϊνών που βοηθούν στην πτύχωση πρωτεϊνών και στη συναρμολόγηση πρωτεϊνικών συμπλόκων. Είναι απαραίτητοι για τη διατήρηση της κατάστασης υψηλού επιπέδου ευρυθμίας ενός ζωντανού κυττάρου. Οι τρέχουσες θεωρίες της αναδίπλωσης πρωτεϊνών ξεκινούν από την υπόθεση ότι η φυσική κατάσταση μιας πρωτεΐνης αναπαριστά την πλέον ευνοϊκή θερμοδυναμικά διαμόρφωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, η οποία οργανώνεται αυθόρμητα από τη γενετικά καθορισμένη πρωτοταγή δομή της. Σε υδατικό περιβάλλον, η ενέργεια για τη φυσική πτύχωση πηγάζει από την τάση των πρωτεϊνών να κρύψουν τις υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων στο εσωτερικό τους, δηλαδή να υιοθετήσουν μια διαμόρφωση χαμηλής ενέργειας. Ωστόσο, η φυσική κατάσταση σε καμία περίπτωση δε ταυτίζεται πάντα με τη λειτουργική κατάσταση. Επιπλέον, μια αυθόρμητη αναδίπλωση με σκοπό τη φυσική διαμόρφωση έχει παρατηρηθεί μόνο για μικρές πρωτεΐνες υπό μη φυσιολογικές συνθήκες. Μεγαλύτερες πρωτεΐνες τείνουν να σχηματίσουν σταθερές, ημιτελώς πτυχωμένες ενδιάμεσες μορφές κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης του πολυπεπτιδίου στο ριβόσωμα και να συσσωματώνονται μη ειδικά, λόγω της πολύ υψηλής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, καθιστώντας έτσι το κυτταρόπλασμα ένα ημιστερεό μέσο. Επιπλέον, μια μεγάλη ποικιλία παραγόντων stress, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης θερμοκρασίας (για αυτό το λόγο ορισμένοι συνοδοί είναι γνωστοί ως πρωτεΐνες θερμικού σοκ, HSPs), ξηρασίας και πλημμύρας, προκαλεί μετουσίωση πρωτεϊνών και αποτυχία της συναρμολόγησής τους. Η διατάραξη της ορθής πτύχωσης των πρωτεϊνών και της συναρμολόγησης βλάπτει κυτταρικές λειτουργίες και ενδέχεται να έχει σοβαρές κυτταροτοξικές επιδράσεις με μοιραίες συνέπειες, επομένως είναι απαραίτητο να προλαμβάνονται τέτοια ατυχήματα. Αυτό είναι το καθήκον των μοριακών συνοδών.

Δύο τύποι πρωτεϊνών θερμικού σοκ, η HSP70 και η HSP90, ανήκουν στο βασικό εξοπλισμό όλων των κυττάρων και συγκαταλέγονται μεταξύ των αφθονότερων πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος. Εκφράζονται σε πολυάριθμες ισομορφές και είναι απαραίτητες για την επιβίωση. Αυτοί οι συνοδοί συνεργάζονται μεταξύ τους, και όχι μόνο προστατεύουν τις πρωτεΐνες από το stress, αλλά έχουν και επιπλέον σημαντικές λειτουργίες. Η συνοδός πρωτεΐνη HSP70 προωθεί την πύκωση πολυπεπτιδικών αλυσίδων που βρίσκονται σε διαδικασία αύξησης. Σε συνδυασμό με την HSP90, διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην κυτταρική επεξεργασία του σήματος, επάγοντας το σχηματισμό των λειτουργικών διαμορφώσεων της πρωτεΐνης, οι οποίες είναι θερμοδυναμικά ασταθείς. Για παράδειγμα, οι HSPs συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των υποδοχέων στεροειδών ορμονών και στη δημιουργία κατάλληλης διαμόρφωσης που επιτρέπει την φωσφορυλίωση του βρόγχου ενεργοποίησης των πρωτεϊνικών κινασών. Οι πρωτεΐνες συνοδοί αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες-πελάτες τους μέσω γραμμικών υδρόφοβων αλληλουχιών αμινοξέων που συνήθως βρίσκονται εκτεθειμένες σε ανώριμες ή μετουσιωμένες πρωτεΐνες. Για την πλήρη αναδίπλωση, η πρωτεΐνη-πελάτης υπόκειται σε αρκετούς κύκλους σύνδεσης και αποσύνδεσης από την πρωτεΐνη συνοδό. Το σήμα εξόδου της πρωτεΐνης συνοδού είναι η τροποποιημένη λειτουργία της πρωτεΐνης-πελάτη. Για παράδειγμα, η ενζυμική δραστηριότητα ή η τάση για σωστή αλληλεπίδραση με σηματοδοτικούς προσδέτες. Όταν οι προσδέτες είναι άλλες πρωτεΐνες, τότε η συνοδός προωθεί τη δημιουργία λειτουργικών συμπλόκων. Στην πραγματικότητα, η δημιουργία δομών αποτελούμενων από πολλαπλές πρωτεΐνες όπως οι chaperonins, τα νουκλεοσώματα και τα πρωτεοσώματα ελέγχονται από μια σειρά συνοδών υψηλού βαθμού εξειδίκευσης.

### 3.3. Θερμοκρασιακή καταπόνηση και HSPs

Η HSP90 παίζει πολύ βασικό ρόλο σε πολλά μονοπάτια μεταγωγής σήματος και έχει ευρείες επιπτώσεις στη γέννηση φαινοτυπικής ποικιλότητας. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της λειτουργίας της HSP90 των θηλαστικών είναι η αλληλεπίδρασή της με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Ο υποδοχέας αλληλεπιδρά με ομόλογες των ROF1 και ROF2 στα θηλαστικά, FKBP52 και FKBP51 αντίστοιχα. Το *A.thaliana*



περιέχει επτά περιοχές που κωδικοποιούν την HSP90, τέσσερις από τις οποίες την κωδικοποιούν στο κυτταρόπλασμα (cytosolic HSP90). Η κυτταροπλασματική HSP90 έχει τη δυνατότητα να επάγεται μετά από στρες και οι υπόλοιπες τρεις πρωτεΐνες θερμικού σοκ εκφράζονται διαρκώς.[10] Οι ισομορφές της HSP90 του *A. thaliana* έχουν πάνω από 85% ομοιότητα μεταξύ τους και τα αντίστοιχα γονίδια βρίσκονται το ένα δίπλα στο άλλο στο χρωμόσωμα 5 του φυτού κωδικοποιώντας πρωτεΐνες που κατά 97% όμοιες, υπονοώντας ότι προκύπτουν από πρόσφατο αναδιπλασιασμό των γονιδίων. Η ακριβής λειτουργία της πρωτεΐνης θερμικού σοκ στο κυτταρόπλασμα δεν έχει κατανοηθεί πλήρως προς το παρόν. Μια ισομορφή της HSP90 βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα HSF, του οποίου η έκφραση είναι συνεχής. Στο *A.thaliana*, η HSP90 φαίνεται να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που επάγονται από τη θερμοκρασία, αναστέλλοντας την λειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα HSF. Η συσσώρευση HSPs και HSFs παίζει μείζονα ρόλο στην απόκριση σε heatstress και συγκεκριμένα στην απόκτηση αντοχής του φυτού σε υψηλές θερμοκρασίες (Acquired Thermotolerance: AT). Δηλαδή, στη δυνατότητα των φυτών να ανταπεξέρχονται στο επαναλαμβανόμενο θερμοκρασιακό στρες. Η AT επιτυγχάνεται με συνεχή εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας, τέτοιας ώστε το φυτό να μην θανατώνεται, και ελαττώνεται με την πάροδο του χρόνου, μαζί με την μείωση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ. Βασικός παράγοντας στην ανοχή του φυτού στη θερμότητα είναι η επαγωγή και σύνθεση πρωτεϊνών μοριακών συνοδών. [9,10]

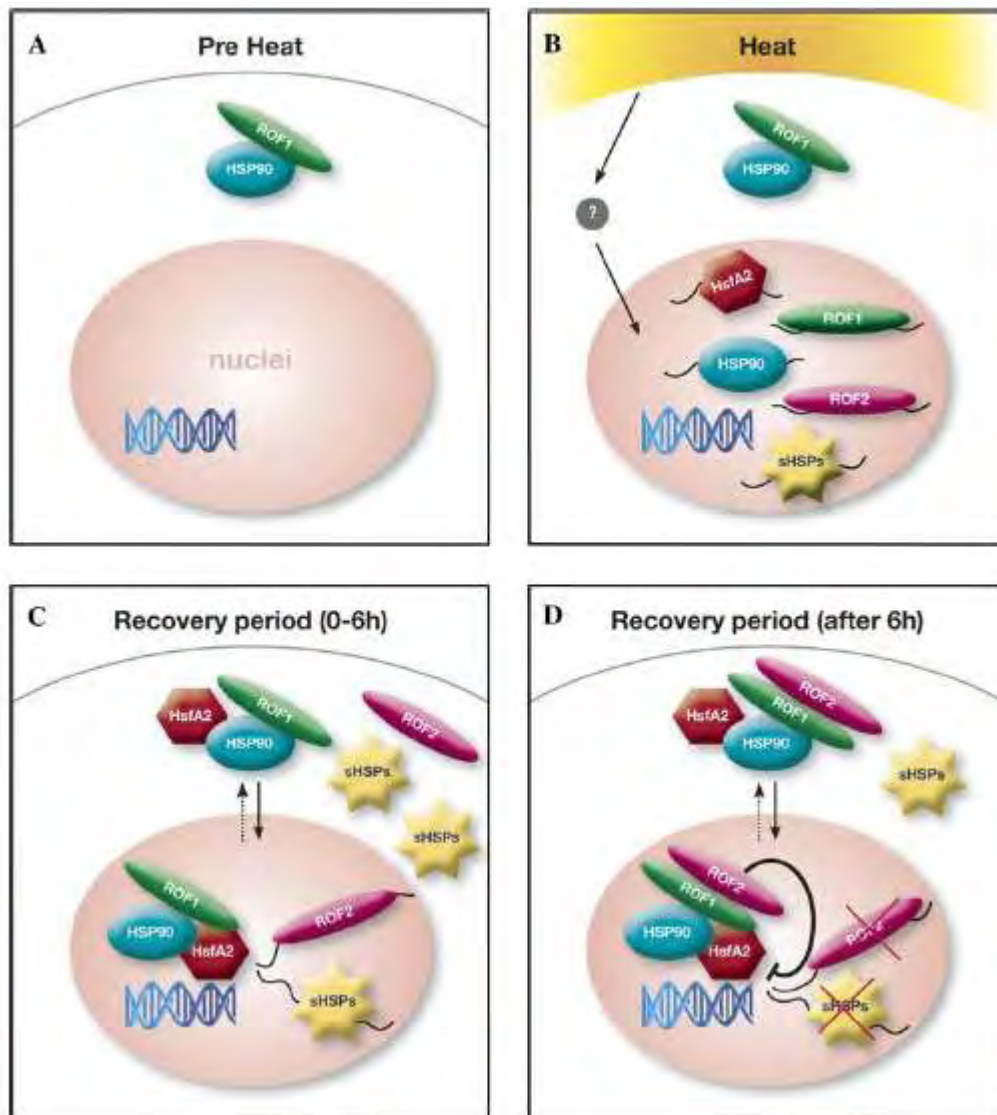
Η πρωτεΐνη HSP90 είναι μια πρωτεΐνη του κυτταροπλάσματος, η οποία βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις και είναι σημαντική τόσο σε συνθήκες στρες όσο και σε φυσιολογικές συνθήκες. Λειτουργεί σαν κεντρική πλατφόρμα για σύμπλοκα με πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς, όπως το σύμπλοκο του υποδοχέα στεροειδών ορμονών, με επιπρόσθετους συμπαράγοντες, όπως η πρωτεΐνη p23. [10,11] Μετά από ανάλυση των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, αποδείχθηκε ότι η ROF1 συνεργάζεται με την HSP90. Τα πέντε αμινοξέα τα οποία είναι απαραίτητα για την αναγνώριση και την αλληλεπίδραση μεταξύ των μοριακών συνοδών στα θηλαστικά και της HSP90 είναι συντηρημένα στο σύμπλοκο ROF1-HSP90 των φυτών. Προτάθηκε ότι ο σχηματισμός του συμπλόκου ROF1-HSP90 εξαρτάται από την σποραδική και παροδική έκφραση των πρωτεϊνών αυτών. Τέτοια σύμπλοκα μπορεί

να ρυθμίζονται από περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως θερμικό στρες ή εσωτερικά σήματα, όπως ορμόνες. Η αλληλεπίδραση ROF1-HSP90 πραγματοποιείται μέσω της περιοχής TPR, όπου υπάρχουν τα πέντε αμινοξέα-κλειδιά, απαραίτητα για την αλληλεπίδραση αυτή, τα οποία έχουν αναγνωρισθεί. Με τη χρήση της κρυσταλλικής δομής της πρωτεΐνης HOP(πρωτεΐνη οργάνωσης των HSP70 και HSP90, γνωστή και ως p60 ή Sti1p) σχηματίστηκε το μοντέλο της ROF1 με την περιοχή TPR. Τα αμινοξέα που είναι υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση με την HSP90 υπέστησαν μετάλλαξη, ακολουθούμενη από ανάλυση πρόσδεσης. Οι κρυσταλλικές δομές των ανοσοφιλίνων που περιέχουν TPR περιοχές FKBP51, FKBP52, σε σύμπλοκο με ένα πεπτίδιο που περιέχει κατάλοιπα της HSP90 στο καρβοξυτελικό άκρο επέτρεψε την αναγνώριση των πέντε αυτών καταλοίπων της TPR δομής, απαραίτητων για την πρόσδεση της HSP90. Αυτά τα πέντε πολύ σημαντικά κατάλοιπα βρέθηκαν συντηρημένα και στην HOP και στην πρωτεϊνική φωσφατάση (proteinphosphatase 5 - PP5).

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ, κυρίως οι μικρού μοριακού βάρους (sHSPs), παίζουν κίριο ρόλο ως μοριακοί συνοδοί στην προστασία του φυτού από στρες, στην αναδίπλωση και στην ενδοκυτταρική διανομή αποδόμηση πρωτεϊνών. Οι μεταγραφικοί παράγοντες του heatstress (Hsfs) είναι οι κεντρικοί ρυθμιστές, υπεύθυνοι για την έκφραση γονιδίων ανταπόκρισης στην αύξηση θερμοκρασίας, των sHSPs και άλλων επιπρόσθετων μοριακών συνοδών. Ανάμεσα στα 21 μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων Hsfs, ξεχωρίζει ο HsfA2, ο οποίος εμφανίζει έντονη επαγωγή μετά από heatstress. Ο χαρακτηρισμός του φαινομένου της ανεκτικότητας στην θερμότητα φανερώνει ότι ο μεταγραφικός παράγοντας HsfA2 έχει ένα προστατευτικό ρόλο κάτω από συνθήκες επαναλαμβανόμενου heatstress. Αναλυτικότερα, βρέθηκε ότι η έκφραση της ROF2 μειώνεται σε μεταλλάγματα που είναι ελαττωματικά στους μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν heatshock γονίδια (AthsfA1a/AthsfA1b), όπως όμοια συμβαίνει με σημαντικές heatshock πρωτεΐνες (π.χ. HSP17.6-CI, HSP101, HSP70, and HSP83.1). Σε μετέπειτα μελέτη, αποδείχθηκε ότι η μεταγραφή της ROF2 όντως τροποποιείται από τον μεταγραφικό παράγοντα HsfA2. Η μεταφορά της ROF2 στον πυρήνα παρατηρήθηκε αρκετές ώρες μετά την έκθεση σε heatstress και είναι ανεξάρτητη

από τη παρουσία της HSP90 ή του μεταγραφικού παράγοντα HsfA2. Η ROF2 φαίνεται να αλληλεπιδρά με την ROF1 σε μορφή ετεροδιμερούς και μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης έρχεται σε επαφή με το σύμπλοκο ROF1-HSP90-HsfA2. Ταυτόχρονη έκφραση της ROF2 μαζί με την ROF1 εμποδίζει την μεταγραφή μικρών HSPs (εικόνα 6). Υποστηρίζεται ότι η λειτουργία της ROF2 ως ρυθμιστή του heatstress περιλαμβάνει ρύθμιση μέσω αρνητικού μηχανισμού ανατροφοδότησης (negativefeedback) του μεταγραφικού παράγοντα HsfA2. [10,11]

Παρά το γεγονός ότι οι ROF1 και ROF2 είναι ομόλογες κατά πολύ μεγάλο ποσοστό, η έκφρασή τους στην απόκριση σε heatstress ρυθμίζεται διαφορετικά. Και τα δύο γονίδια ενεργοποιούνται όταν το φυτό εκτίθεται στους 37ο C, αλλά μόνο η ROF2 θεωρείται πρωτεΐνη heatstress, καθώς δεν εντοπίζεται όταν τα φυτά μεγαλώνουν στους 22ο C. Οι πρωτεΐνες ROF1/ROF2 συσσωρεύονται στους 37ο C και παραμένουν σταθερές για περίπου 4 ώρες μετά την επαναφορά τους στους 22ο C, ενώ τα επίπεδα των mRNA μειώνονται μετά τη μία ώρα επαναφοράς στους 22ο C. [9,10]



**Εικόνα 6.** Α) Σε φυσιολογικές συνθήκες, στους 22°C, η ROF1 αλληλεπιδρά με την HSP90 στο κυτταρόπλασμα. Β) Έπειτα από heatstress, ενεργοποιούνται γονίδια, όπως ο μεταγραφικός παράγοντας HsfA2, η ROF2, και μικρές πρωτεΐνες θερμικού σοκ. Γ) Στο αρχικό στάδιο επαναφοράς στα φυσιολογικά, ο HsfA2 αλληλεπιδρά με την HSP90 και το σύμπλοκο ROF1 –HSP90 –HsfA2 μεταφέρεται στον πυρήνα. Το σύμπλοκο αυτό είναι υπεύθυνο για τη μεταγραφή sHSPs και της ROF2. Δ) Μετά από 6 ώρες, η ROF2 ενδέχεται να ρυθμίζει την μεταγραφή του HsfA2, μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης.

### 3.4 Αβιοτικό στρες αλατότητας – οσμωτικό στρες

Προηγούμενα δημοσιευμένα δεδομένα του εργαστηρίου σχετικά με την απόκριση σε στρες αλατότητας, έδειξαν ότι αυτό επηρεάζει την βλάστηση των σπόρων

(germination) [12]. Το στρες αλατότητας είναι ένα περίπλοκο φαινόμενο το οποίο οδηγεί το φυτό σε υπεροσμωτική καταπόνηση, ιοντική ανισορροπία και διακοπή πολλών μεταβολικών μονοπατιών. Επομένως, οι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται ως απάντηση στο στρες αποσκοπούν στο να μειώσουν την ιοντική αστάθεια που έχει προκληθεί ή να απαλύνουν τις δευτερεύουσες επιπτώσεις που προκαλούνται. Η περιβαλλοντική αντίληψη των φυτών αποτελεί σήμα για την έναρξη μηχανισμών μεταγωγής σήματος, αλλά και στη συντονισμένη μεταφορά σηματοδοτικών ενδιάμεσων μορίων, μέσω κυστιδικής μεταφοράς. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το φυτό έχει υψηλότερη συγκέντρωση αλάτων από το έδαφος, έτσι ώστε λόγω οσμωτικής πίεσης το φυτό να απορροφά νερό. Σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, αντιστρέφεται αυτή η διαβάθμιση, με αποτέλεσμα να μειώνεται η ικανότητα του φυτού να απορροφά νερό και άλλα απαραίτητα μέταλλα, όπως ιόντα καλίου και ασβεστίου. Για να ενεργοποιηθούν όλοι οι μηχανισμοί απόκρισης στο στρες, τα φυτά πρέπει να λάβουν το μήνυμα και να ενεργοποιηθεί μια σειρά μονοπατιών μεταγωγής σήματος, ξεκινώντας από την ενδοκυτταρική αύξηση του ασβεστίου. Έχει βρεθεί πως η σηματοδότηση μέσω λιπιδίων έχει έναν ενοποιητικό ρόλο στην απόκριση στο στρες αλατότητας. Τροποποιήσεις στα λιπίδια της μεμβράνης παράγουν διάφορους δεύτερους διαβιβαστές, οι οποίοι προκαλούν πολλά διαφορετικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος. [13]

#### Τα πολυφωσφολιπίδια της ινοσιτόλης (PPI) της κυτταρικής μεμβράνης

Η  $PIP_2$  είναι το μόριο που υδρολύει η φωσφολιπάσηC σε  $IP_3$  και DAG. Είναι ένα ασυνήθιστο γλυκερο-φωσφολιπίδιο της μεμβράνης, γιατί περιέχει τρεις φωσφορικές ομάδες αντί μια που έχουν όλα τα άλλα λιπίδια της μεμβράνης. Ονομάζεται φωσφατιδυλ-4,5-διφωσφορική ινοσιτόλη γιατί παράγεται από τη φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη (PI), η οποία προσλαμβάνει αρχικά ένα άτομο φωσφόρου στο τέταρτο άτομο άνθρακα του κύκλου της ινοσιτόλης της παράγοντας τη φωσφατιδυλ-μονοφωσφορική ινοσιτόλη (PIP). Στη συνέχεια η PIP προσλαμβάνει ακόμη ένα άτομο φωσφόρου στο πέμπτο άτομο άνθρακα και μετατρέπεται σε φωσφατιδυλ-διφωσφορική ινοσιτόλη ( $PIP_2$ ). Τα φωσφολιπίδια αυτά ονομάζονται πολυφωσφο-ινοσιτίδια (PPI) και αποτελούν μόλις το 1% των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης ενός ευκαρυωτικού κυττάρου. Τα φωσφολιπίδια της

ινοσιτόλης βρίσκονται σε ένα μεταβολικό κύκλο όπου καταβολίζονται και αναγεννώνται συνεχώς. Η φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη αναγεννάται από τη διακυλογλυκερόλη, η οποία μετατρέπεται σε φωσφατιδικό οξύ, από το οποίο στη συνέχεια δημιουργείται η CDP-γλυκερόλη. Από τη CDP-γλυκερόλη, με την προσθήκη ινοσιτόλης και με τη βοήθεια της συνθάσης της φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης, δημιουργείται η φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη της μεμβράνης. Η  $PIP_2$ , μέσω της φωσφολιπάσης C μετατρέπεται σε  $IP_3$  και DAG. Η DAG φωσφορυλιώνεται από τη DAGκινάση και μετατρέπεται σε φωσφατιδικό οξύ (PA) από το οποίο, μέσω της CDP-DAG-συνθάσης δημιουργείται η CDP-γλυκερόλη. Από την τελευταία δημιουργείται  $PIP_2$  και μέσω της PI3-K μετατρέπεται σε  $PIP_3$ .

#### Φωσφολιπάση C και $IP_3$ / διακυλογλυκερόλη

Η φωσφολιπάση C (phospholipase C, PLC) αποτελεί ένα σημαντικό τελεστή γιατί παράγει παράλληλα δυο δεύτερους διαβιβαστές : την τριφωσφορική ινοσιτόλη (inositol-1,4,5-triphosphate,  $IP_3$ ) και την διακυλογλυκερόλη (diacylglycerol, DAG). Η φωσφολιπάση C είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη και εκτελεί χρέη φωσφοδιεστεράσης. Δηλαδή, υδρολύει την φωσφατιδυλ-διφωσφορική ινοσιτόλη ( $PIP_2$ ) σε DAG, η οποία παραμένει στην κυτταρική μεμβράνη και σε τριφωσφορική ινοσιτόλη, η οποία ελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. Υπάρχουν πολλές κατηγορίες φωσφολιπασών και κοινό όλων είναι τρεις περιοχές, η περιοχή μέσω της οποίας δεσμεύονται στη φωσφατιδυλ-διφωσφορική ινοσιτόλη, η περιοχή που δεσμεύει τα ιόντα ασβεστίου και τέλος η καταλυτική περιοχή μέσω της οποίας διασπών τα φωσφολιπίδια. [13]

Συμπερασματικά, τα φωσφοϊνοσιτίδια φαίνονται να παίζουν μείζονα ρόλο στη ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών καθώς τα προϊόντα τους είναι πολύπλευρα, εξού και είναι άμεσα διαθέσιμα για την στρατολόγηση κυτταροσκελετικών και μεμβρανικών πρωτεϊνών. Οι περισσότερες πρωτεΐνες που αναγνωρίστηκαν να αλληλεπιδρούν με φωσφοϊνοσιτίδια χαρακτηρίζονται από περιοχές πλούσιες σε λυσίνη/αργινίνη.

Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου, ταυτοποιήθηκε η άμεση πρόσδεση σε ινοσιτίδια, ορισμένων σημαντικών ρυθμιστών της μεμβρανικής διακίνησης και

παραγόντων ποιοτικού ελέγχου πρωτεϊνών, όπως ο ATG18p, ο οποίος συμμετέχει στο σχηματισμό αυτοφαγοσώματος (autophagosome). Άλλα δεδομένα έχουν δείξει ότι μια πρωτεΐνη, που περιέχει PPRεπαναλήψεις (pentatricopeptiderepeats), συνδέεται άμεσα με τα PI(3,5)P<sub>2</sub>. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι, μετά από στρες αλατότητας, μια ριβοσωμική πρωτεΐνη, η S5-140S, που σχετίζεται με τα PIPs δεν ήταν πλέον ανιχνεύσιμη. Στη συνέχεια, αλληλεπιδρώντα μόρια καθαρίστηκαν και μια προτεινόμενη θεωρία είναι πως μια έμμεση επίπτωση της πρόσδεσης των ινσοσιτιδίων σε άλλες πρωτεΐνες είναι η στρατολόγηση του COP9 signalosome, των HSPs και των αναγνωρισμένων 26S πρωτεοσωμικών υπομονάδων. Το PI(3,5)P<sub>2</sub> έχει ιδιαίτερο βιολογικό ενδιαφέρον διότι βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση και δεν έχει εντοπιστεί ενδογενώς στην *A. Thaliana*, ενώ υπάρχουν στοιχεία για την ύπαρξή του σε φυτά. Επιπλέον, το PI(3,5)P<sub>2</sub> είναι ένα εκτενώς μελετημένο ινσοσιτίδιο στα ζωικά συστήματα και στα συστήματα των μυκήτων, ενώ στα φυτά οι γνώσεις μας πάνω στο ρόλο τους και τα αλληλεπιδρώντα με αυτά μόρια είναι πολύ περιορισμένες. Αποτελέσματα της έρευνας αυτής έδειξαν ότι η ανοσοφιλίνη ROF1 αλληλεπιδρά με μία υπομονάδα του COP9 signalosome, είτε απευθείας, είτε έμμεσα, μέσω κάποιας πρωτεοσωμικής υπομονάδας, ή κάποιας μέχρι τώρα άγνωστης πρωτεΐνης. Η TPR περιοχή της ROF1 είναι καταλυτική σε αυτή την αλληλεπίδραση, καθώς δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση σε τροποποιημένη ROF1, στην οποία έλειπαν οι TPR περιοχές. Επίσης, αναγνωρίστηκε ο μεταγραφικός παράγοντας HSFA2, ο οποίος αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα. Αυτός φαίνεται να συμμοϋλιώνεται, γεγονός που τροποποιεί την λειτουργία του. Πρόσφατες μελέτες προτείνουν σχέση ανάμεσα στη συμμοϋλίωση και την ουβικιτίνωση, με τον μικρό τροποποιητή με δράση τύπου ουβικουιτίνης (SUMO-1) να δρα ταυτόχρονα με το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος. [12]

#### 4. ΣΚΟΠΟΣ

Πολύ σημαντικό για τη μελέτη μας ήταν ότι είχαμε στη διάθεσή μας μια ποικιλία μεταλλαγμένων σπόρων της *A. Thaliana* (wt, *rof1*<sup>-</sup>, *rof2*<sup>-</sup>, *rof1*<sup>-</sup>/*rof2*<sup>-</sup> doubleknockout, ROF1OE), τους οποίους και χρησιμοποιούμε, προκειμένου να διαλευκάνουμε μηχανισμούς στους οποίους εμπλέκονται οι ROF1 και ROF2 πρωτεΐνες. Οι παρατηρήσεις αυτές έγιναν κάτω από κανονικές συνθήκες, συνθήκες υψηλών

θερμοκρασιών, ξηρασίας και υγρασίας, όπως και σε διαφορετικές φάσης ανάπτυξης στο φυτό-μοντέλο *A. thaliana*. Η εμπλοκή των πρωτεϊνών της οικογένειας των FKBP's σε πολλαπλούς κυτταρικούς μηχανισμούς μέσω των πολλών και διαφορετικών κυρίαρχων περιοχών τους, τις καθιστά επιστημονικά ενδιαφέρουσες. Ο ρόλος που έχουν ως μοριακοί συνοδοί είναι πολύ σημαντικός όχι μόνο για τη διατήρηση της ορθής δομής των πρωτεϊνών αλλά και στην μεταγωγή σήματος, επάγοντας την στρατολόγηση ή διαμόρφωση πρωτεϊνών-πελατών μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Επομένως, οποιαδήποτε πληροφορία σχετικά με την έκφρασή τους, θα μας βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση της εμπλοκής τους στους μηχανισμούς απόκρισης και στο αβιοτικό στρες.

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ**

Συσκευή ηλεκτροφόρησης: Amersham Biosciences/SerialNo. 20134676

Electrophoresis Power Supply: Amersham Biosciences/EP5 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



## 2. ΤΕΧΝΙΚΕΣ

### 2.1. SDS-PAGE

#### Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η πρωτεΐνη έχει εκφραστεί υπό διαλυτή μορφή απαιτείται να γίνει ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).

Κατά την ηλεκτροφόρηση, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, καθώς κινούνται μέσα από τους πόρους της πηκτής. Η ταχύτητα μετακίνησής τους ( $U$ ) εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου ( $E$ ), το καθαρό φορτίο του μορίου ( $Z$ ), και από τον συντελεστή τριβής ( $f$ ), σύμφωνα με τον τύπο  $U = E \cdot Z / f$ . Η σταθερά τριβής  $f$  εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται, καθώς επίσης και από το ιξώδες του πηκτώματος. Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής μετακινούνται εύκολα διαμέσου του πηκτώματος, ενώ τα μεγάλα μόρια μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Τα μόρια ενδιαμέσου μεγέθους μετακινούνται μέσω των πόρων της πηκτής με διαφορετικές ταχύτητες. Το πήκτωμα για τις πρωτεΐνες που χρησιμοποιείται είναι ακρυλαμίδη, γιατί είναι χημικά αδρανής, διάφανη, σταθερή σε μεγάλο εύρος pH, θερμοκρασίας και ιοντικής ισχύος. Στο ασυνεχές σύστημα ηλεκτροφόρησης, ένα μη περιοριστικό πήκτωμα με μεγάλους πόρους, που ονομάζεται πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel), είναι τοποθετημένο πάνω από ένα πήκτωμα διαχωρισμού (running ή separating gel), το οποίο είναι πιο πυκνό σε πολυακρυλαμίδη από το πρώτο. Αναλυτικότερα, η σύσταση, το pH και το μέγεθος των πόρων των δύο πηκτών είναι τέτοια, ώστε στην πηκτή συσσώρευσης, τα δείγματα να συμπυκνώνονται και στο τέλος οι πρωτεΐνες να συσσωρεύονται σε στενές ζώνες μεγάλης συγκέντρωσης. Στην πηκτή διαχωρισμού επιτελείται ο διαχωρισμός τους, λόγω της διαφορετικής κινητικότητας κάθε πρωτεΐνης. Με αυτό 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 χρησιμοποιείταιθειικό άλας νατρίου (SDS). Το SDS είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό, το οποίο δεσμεύεται στην πολυπεπτιδική αλυσίδα με υδρόφοβους δεσμούς. Τοθειικό άλας νατρίου συνδέεται αρκετά εξειδικευμένα και έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση όλων των μη ομοιοπολικών δεσμών στο μόριο της πρωτεΐνης, και επομένως 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.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην SDS-PAGE είναι:

### 1) Ακρυλαμίδη

Η ουσία που πολυμερίζεται δίνοντας το πολυακρυλαμίδιο. Όταν βρίσκεται σε υδατικό διάλυμα παρατηρείται αργός αυτοπολυμερισμός, καθώς μόρια ακρυλαμιδίου ενώνονται σχηματίζοντας αλυσίδες πολυακρυλαμίδης. Η παρουσία ενός συστήματος ελευθέρων ριζών επιταχύνει κατά πολύ τη διαδικασία. Στο εργαστήριο, για την κατασκευή των gel χρησιμοποιούμε ως επί το πλείστον 10% ακρυλαμίδη, με εξαίρεση το πείραμα με τα αβιοτικά στρες ξηρασίας και υγρασίας που βάλουμε 12%, όπως θα αναφερθεί παρακάτω.

### 2) SDS (SodiumDodecylSulphate)

Τοθειικό άλας νατρίου συνδέεται εξειδικευμένα, με σταθερό ποσό SDS ανά μονάδα πρωτεΐνης (1,4 gSDS ανά 1 g πρωτεΐνης) και έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση όλων των μη ομοιοπολικών δεσμών στο μόριο της πρωτεΐνης, και επομένως 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.

### 3) APS (Ammonium Persulfate)

Πηγή ελευθέρων ριζών που χρησιμοποιούνται για την επιτάχυνση του πολυμερισμού της ακρυλαμίδης. Για την παρασκευή των gel χρησιμοποιούμε APS 10%. Παρασκευάζεται διαλύοντας 100mg APS σε 1ml ddH<sub>2</sub>O. Αποθηκεύεται σε

κατάψυξη στους  $-20^{\circ}\text{C}$  και κατά τη διάρκεια χρήσης του παραμένει τοποθετημένο σε πάγο ( $4^{\circ}\text{C}$ ).

#### 4)TEMED (TEtraMethylEthyleneDiamine)

Σταθεροποιεί τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται από το APS και ενισχύει τον πολυμερισμό. Η ταχύτητα του πολυμερισμού και οι ιδιότητες του τζελ που προκύπτουν εξαρτώνται από τη συγκέντρωση των ελευθέρων ριζών. Το χρησιμοποιούμε χωρίς κάποια αραιώση, όπως ακριβώς παραλαμβάνεται. Αποθηκεύεται στους  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### 5)Sample/Loading buffer

Αναμιγνύουμε το δείγμα με loading buffer, το οποίο περιέχει ουσίες που αυξάνουν την πυκνότητα του δείγματος. 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 Sample buffer: 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 midi gels φτιάξαμε:

Runninggel 10% (τελικός όγκος 40ml)

- 10% APS: 0,24ml

- TEMED: 24μl (MERCK)
- Buffer A: 11,84ml
- Acr: 11,3ml
- H<sub>2</sub>O: 14,8ml

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

- 10% APS: 0,15ml
- TEMED: 10μl
- Buffer B: 5ml
- Acr: 3ml
- H<sub>2</sub>O: 12ml

Για 10 mini gels φτιάξαμε:

Running gel 10% 60ml

- 10% APS: 0,36ml
- TEMED: 36μl
- Buffer A: 17,76ml
- Acr: 20,04ml
- H<sub>2</sub>O: 22,2ml

Stacking gel 4,5% 40ml

- 10% APS: 0,3ml
- TEMED: 20μl
- Buffer B: 10ml
- Acr: 6ml
- H<sub>2</sub>O: 24ml

## 2.2. Μονιμοποίηση του τζελ:

### Coomassie Brilliant Blue(R-250)

Πρόκειται για τη συχνότερη χρωστική πρωτεϊνών. Είναι ανιονική και προσδένεται μη ειδικά σε πρωτεΐνες. Η δομή της είναι μη πολική και χρησιμοποιείται διαλύματα που έχουν οξικό οξύ. Αφού τρέξει το τζελ, οι πρωτεΐνες μονιμοποιούνται από το οξικό οξύ και έπειτα βάζονται από τη χρωστική. Η περίσσεια της χρωστικής ξεπλένεται με οξικό. Μετά τη χρώση, οι πρωτεΐνες ανιχνεύονται ως μπλε μπάντες. Τα όρια ευαισθησίας της τεχνικής αυτής φθάνουν τα 10ng πρωτεΐνης.

### Silver staining

Η τεχνική αυτή πραγματοποιείται με τη βοήθεια νιτρικού αργύρου και χρησιμοποιείται όταν είναι απαραίτητη μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανίχνευση πρωτεϊνών. Τα όρια της τεχνικής αυτής φθάνουν τα 0,5ng πρωτεΐνης, δηλαδή 20 φορές περισσότερο από την Coomassie. Συγκεκριμένα, για την τεχνική αυτή χρησιμοποιούμε:

- Διάλυμα fix: 10% CH<sub>3</sub>COOH, 30% EtOH(SIGMA)
- Πλύσεις: 30% EtOH (όγκο X 5 gel)
- AgNO<sub>3</sub>: 0,2% (όγκο X 5 gel)
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 10% (όγκοX5 gel) (SIGMA)
- CH<sub>2</sub>O:0,02% (SIGMA)
- Για να σταματήσει η αντίδραση: CH<sub>3</sub>COOH1%

## 2.3. Western Blot

Η διαδικασία μεταφοράς των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη καλείται «αποτύπωμα» ή «στύπωμα» και μπορεί να επιτευχθεί με απλή ροή του διαλύτη, αλλά και ηλεκτροφορητικά, καθώς έτσι πραγματοποιείται πιο γρήγορα. Η μεταφορά δηλαδή, ακολουθεί την ίδια βασική αρχή με την ηλεκτροφόρηση μόνο που αυτή τη φορά το ρεύμα εφαρμόζεται σε γωνία 90° ως προς το πήκτωμα προκειμένου να μεταναστεύσουν οι πρωτεΐνες από το πήκτωμα στη μεμβράνη. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα του στυπώματος είναι ότι οι πρωτεΐνες είναι περισσότερο

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. Έτσι, όταν αποτυπώνονται πηκτώματα SDS-PAGE, συνήθως σε ουδέτερα ή ελαφρώς αλκαλικά ρυθμιστικά διαλύματα μεταφοράς, τα πολυπεπίδια συμπεριφέρονται ως ανιόντα και η νιτροκυτταρίνη μεταφοράς πρέπει να βρίσκεται στην ανοδική πλευρά του πηκτώματος. Το διάλυμα μεταφοράς περιέχει Tris 1,98g, 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. Αρχικά, γίνεται κάλυψη όλων των θέσεων πρόσδεσης της μεμβράνης με πρωτεΐνη (συνήθως BSA), ώστε να περιοριστεί η μη-ειδική σύνδεση (δηλαδή το αντίσωμα να «πιάσει» μόνο στην πρωτεΐνη-στόχο, και όχι σε άλλες μη-ειδικές θέσεις – οι οποίες έχουν καλυφθεί από την BSA).
2. Πρόσδεση 1<sup>ου</sup> αντισώματος σε πρωτεΐνη-στόχο.
3. Το 1ο αντίσωμα προσδένεται από ένα 2ο αντίσωμα, το οποίο έχει αναπτυχθεί ώστε να αναγνωρίζει αντισώματα. Στο 2ο αντίσωμα, είναι συζευγμένο ένα ένζυμο (συνήθως αλκαλική φωσφατάση, ή υπεροξειδάση)
4. Προσθήκη υποστρώματος (S) και παραγωγή προϊόντος (P) που δίνει σήμα στην αντίδραση (π.χ. φως). Έτσι προσδιορίζεται η πρωτεΐνη-στόχος.

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 ετοιμάσαμε δυο διαλύματα (homemade ECL system), τελικού όγκου 10ml:

Διάλυμα I :

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

Διάλυμα II :

- Υπεροξείδιο: 6,1 μl
- Tris: 1ml, pH 8,5
- MQ νερό: 9 ml

#### 2.4. Mass spectrometry

Η φασματομετρία μάζας είναι μία ευαίσθητη τεχνική για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό χημικών ενώσεων. Βασίζεται στον διαχωρισμό των μαζών φορτισμένων σωματιδίων με την βοήθεια κατάλληλης διάταξης (μαγνητική, τετραπόλου, χρόνου πτήσης) και την εύρεση της αντιστοιχίας των μαζών των λαμβανομένων ιόντων με την δομή της πρόδρομης ένωσης. Η αντιστοιχία αυτή προϋποθέτει την γνώση των διαδικασιών ιονισμού και επιπλέον του μηχανισμού της πιθανής θραυσματοποίησης των ιόντων. Η άμεση πρόβλεψη όλων των διαδικασιών θραυσματοποίησης ενός ιόντος δεν είναι απλή, ιδιαίτερα αν το ποσοστό θραυσματοποίησης σε κάθε πορεία είναι το κυρίως ζητούμενο. Μία απλή ποιοτική πρόβλεψη των κυριότερων πορειών είναι δυνατόν να επιτευχθεί με γνώμονα την χημική δομή του ιόντος καθώς και των προϊόντων θραυσματοποίησης χρησιμοποιώντας επιχειρήματα γενικής και οργανικής χημείας.

Συγκεκριμένα, για τα πειράματά μας, έγινε επεξεργασία των δειγμάτων με το πρωτόκολλο FASP, χρησιμοποιώντας σύστημα φιλτραρίσματος 10kDa cutoff (Sartorius, VN01H02). Έγινε πέψη των πρωτεϊνών (alkylation και trypsin digestion) (1 μg trypsin/ LysC mix mass spec grade, Promega). Τα προϊόντα πεπτιδίων που

προέκυψαν αναλύθηκαν με nano-LC-MS/MS χρησιμοποιώντας LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) συνδεδεμένο σε nano-LC HPLC (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 εξομάλυνσης (LFQ intensity). Το LFQ καθορίστηκε με ένα ελάχιστο κλάσμα μέτρησης 2. Η στατιστική ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας Perseus (version 1.5.3.2). Οι πρωτεΐνες οι οποίες εντοπίστηκαν ως επιμόλυνση και αυτές που εμπεριείχαν λιγότερο από δύο πεπτίδια απορρίφθηκαν.

#### Η φασματομετρία μαζών προσφέρει πληροφορίες για:

- α) την ποιοτική και ποσοτική σύσταση αγνώστων μιγμάτων,
- β) τη χημική δομή πολύ μεγάλου αριθμού ενώσεων,
- γ) την παρουσία και το ποσοστό ισotόπων,
- δ) τη δομή και σύσταση επιφανειών με μορφή απεικόνισης (MS Imaging).

#### Ταυτοποίηση με Σύγκριση Φασμάτων (DataLibraries)

Οι βιβλιοθήκες φασμάτων χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: τις εμπορικές, τις τοπικές που δημιουργεί ο κάθε αναλυτής στο όργανο και τις κοινόχρηστες που είναι διαθέσιμες στο διαδίκτυο. Οι εμπορικές βιβλιοθήκες φασμάτων έχουν δημιουργηθεί από εταιρίες/οργανισμούς ως βάσεις δεδομένων των αναλύσεων χιλιάδων ενώσεων με ιονισμό ηλεκτρονίων. Αποθηκεύονται φάσματα που έχουν ληφθεί από πιστοποιημένα εργαστήρια και είναι γενικές βιβλιοθήκες (NIST, Willey) ή ειδικές, με εφαρμογή σε ορισμένα πεδία (Mauger Toxicology, Fiehn Metabolomics). Οι ανοιχτές βάσεις δεδομένων που φιλοξενούνται στο διαδίκτυο, ουσιαστικά δεν ελέγχονται και μπορεί οποιοσδήποτε εγγεγραμμένος ερευνητής να συνεισφέρει και να εισάγει δεδομένα. Επειδή πρόκειται συνήθως για δεδομένα ατμοσφαιρικού



ιονισμού, η σύγκριση με αυτά δεν προσφέρει μεγάλη βεβαιότητα για την ταυτοποίηση ενώσεων. Η μέτρηση στη φασματομετρία μαζών είναι πολυδύναμη διαδικασία, η οποία επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Μικρές διαφορές στις συνθήκες ανάλυσης μπορεί να διαφοροποιήσουν τα αποτελέσματα σε μεγάλο βαθμό. Έτσι μπορεί να λαμβάνονται φάσματα διαφορετικής μορφής για την ίδια ένωση, ακόμα κι όταν αυτή αναλύεται με την ίδια τεχνική. Οι βιβλιοθήκες λειτουργούν με αλγόριθμο ο οποίος συγκρίνει τα φάσματα. Ανάλογα με την ακριβή μάζα του μοριακού ιόντος, τη μάζα των κορυφών και τη σχετική ένταση αυτών προτείνονται (ανάλογα με τη ρύθμιση του προγράμματος) οι πιθανότεροι μοριακοί τύποι και πιθανές ενώσεις. Η αναζήτηση σε σύγχρονες ανοιχτές βάσεις δεδομένων (ChemSpider, HMDB, MassBank, LipidMaps, METLIN) δίνει μεγάλο αριθμό πιθανών ενώσεων (hits) από όπου ακολουθεί φιλτράρισμα με κριτήρια (π.χ. χρόνος συγκράτησης στη χρωματογραφία, φύση του μορίου κ.ά.) καθώς και επιπλέον αναλύσεις.

### Ποσοτική Ανάλυση με Φασματομετρία μαζών

Πέραν της μεγάλης αξίας της φασματομετρίας μαζών στην ταυτοποίηση (ποιοτική ανάλυση) αγνώστων ενώσεων, πολύ σημαντική είναι η εφαρμογή της τεχνικής στον ποσοτικό προσδιορισμό γνωστών ενώσεων. Στην περίπτωση αυτή ο φασματογράφος μάζας λειτουργεί ως εξειδικευμένος ανιχνευτής. Το πλεονέκτημά του είναι η υψηλή ευαισθησία και η απόλυτη μοριακή αναγνώριση, αφού σε αντίθεση με άλλες τεχνικές ανίχνευσης οι οποίες χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία, θεωρείται ότι πρακτικά δεν υπάρχει πιθανότητα συμπροσδιορισμού της αναλυόμενης ένωσης με άλλες ενώσεις που μπορεί να συνεκλούνται με αυτήν.

## **3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ**

### 3.1. Σπόροι του *A. thaliana* για MassSpec

Συγκεντρώθηκαν όλα τα μεταλλάγματα των σπόρων του *A. thaliana* που διατίθενται στο εργαστήριο (wt, *rof1*<sup>-</sup>, *rof2*<sup>-</sup>, *rof1*<sup>-</sup> / *rof2*<sup>-</sup> double knockout και ROF1OE). Κατόπιν εμποτισμού (imbibition) και εξαγωγής με 170μl sample buffer, πραγματοποιήθηκε

SDS-PAGE, σύμφωνα με το προαναφερόμενο πρωτόκολλο. Τα δείγματα εστάλησαν στο “AlexanderFleming” B.S.R.C.γιαφασματομετρία μάζας.

### 3.2. ΠΕΙΡΑΜΑ heatstress σε seedlings και σπόρους

Από το stock μεταλλαγμένων σπόρων που έχουμε στο εργαστήριο επιλέχθηκαν 3-4 ρέπλικες από το καθένα(wt, *rof1<sup>-</sup>*, *rof2<sup>-</sup>*, *rof1<sup>-</sup> / rof2<sup>-</sup>* double knockout και ROF1OE) και αφού εμποτίστηκαν, τοποθετήθηκαν (spotting) σε χαρτί whatman σε υγρές συνθήκες. Αντίστοιχα, σπόροι σιταριού επώασθηκαν σε νερό για 18 ώρες. Περίπου 100 σπόροι *A. thaliana* χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε ρέπλικα, ενώ κάθε μεταχείριση σε πειράματα με σιτάρι περιελάμβανε 3 σπόρους σιταριού.

Για τα πειράματα με βλαστίδια επιλέξαμε τα seedlings που αναπτύχθηκαν καλύτερα και είχαν την μεγαλύτερη ομοιογένεια στην ανάπτυξή τους, για να πραγματοποιήσουμε SDS-PAGE σε επόμενη φάση. Κόψαμε τα χαρτιά whatman στη μέση για να εφαρμόσουμε συνθήκες heat stress στα μισά δείγματα και κρατήσαμε τα υπόλοιπα μισά για να τα χρησιμοποιήσουμε ως control. Για το heat stressπροθερμάνθηκε το heat block στους 38°C, και επάνω σε αυτό τοποθετήθηκαν τα χαρτιά whatman με τα δείγματα. Για να διατηρείται αυτή η θερμοκρασία φτιάξαμε μια τεχνητή κάμαρα, τοποθετώντας πάνω στο μπλοκ ένα γυάλινο σκεύος, το οποίο περιέκλειε τα δείγματα και διατηρούσε σταθερή τη θερμοκρασία στους 37,5°C (συνεχής έλεγχος της θερμοκρασίας με θερμόμετρο). Οι συνθήκες εφαρμόστηκαν για 4,5 ώρες.

Για το extraction των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε sample buffer. Ακολούθησε SDS-PAGE και στη συνέχεια μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για ανοσοαποτύπωση Western Blot.

### 3.3. ΠΕΙΡΑΜΑ Αβιοτικού στρες υδατικής ανεπάρκειας και υγρασίας σε σπόρους και άνθη (bads)

Θέσαμε το heat block στους 37°C. Επιλέχθηκαν από όλα τα μεταλλαγμένα φυτά που διαθέτουμε στο εργαστήριο. Σε erpendorfs τοποθετούμε τα bads που κόψαμε από τα φυτά και για να επιτύχουμε συνθήκες υδατικής ανεπάρκειας και υγρασίας, τοποθετήθηκαν με τρόπο που φαίνεται στην εικόνα 7. Για τους σπόρους

δημιουργήσαμε τις ίδιες συνθήκες, σε erpendorfs με πολύ λίγο νερό και με περίσσεια νερού αντίστοιχα για κάθε στρες. Έπειτα, τοποθετήσαμε όλα τα δείγματα ταυτόχρονα στο heat block και τα αφήσαμε για 4,5 ώρες.



**Εικόνα 7.** Αβιοτικό στρες υδατικής ανεπάρκειας (droughtstress) σε άνθος – αριστερά – και στρες πλημμυρίσματος σε άνθος – δεξιά – Στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε μια μικρή ποσότητα νερού ώστε κατά τη διάρκεια των 4,5 ωρών καταπόνησης να μην αποξηραθεί εντελώς το άνθος.

Τέσσερις ώρες αργότερα, ξεκινήσαμε το extraction και χρησιμοποιήσαμε sample buffer με DTT. Τα δείγματα κρατήθηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για μία ημέρα και την επόμενη πραγματοποιήσαμε SDS-PAGE. Ακολούθησε μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτύπωση Western Blot.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Αποτελέσματα πειράματος heatstress σε seedlings –WesternBlot

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



**Εικόνα 8.** Ανοσοαποτύπωση τύπου Western σε seedlings, έπειτα από heatstress

- |                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| 1. WT control                        | 7. <i>rof2</i> <sup>-</sup> control  |
| 2. WT stressed                       | 8. <i>rof2</i> <sup>-</sup> stressed   |
| 3. OE control                        | 9. <i>rof1</i> <sup>-</sup> / <i>rof2</i> <sup>-</sup> double knockout control   |
| 4. OE stressed                       | 10. <i>rof1</i> <sup>-</sup> / <i>rof2</i> <sup>-</sup> double knockout stressed |
| 5. <i>rof1</i> <sup>-</sup> control  | 11. WT σπόροι control  |
| 6. <i>rof1</i> <sup>-</sup> stressed | 12. WT σπόροι stressed   |

Παρατηρήσεις:

Η ROF1 εμφανίζεται στα 62 kDa και η ROF2 στα 65 kDa. Παρατηρούμε ότι σε σπόρους που έχουν βλαστήσει υπάρχει ξεκάθαρη επαγωγή της ROF2, όταν έχουν εφαρμοστεί συνθήκες θερμοκρασιακής καταπόνησης. Συγκρίνοντας τα στρεσαρισμένα δείγματα με τα δείγματα control επιβεβαιώνουμε την επαγωγή της ROF2. Στο τέλος του gel είχαμε προσθέσει δείγμα σπόρων που δεν είχαν βλαστήσει, έχοντας εφαρμόσει στρες στο ένα και κρατώντας το άλλο σε φυσιολογικές συνθήκες. Παρατηρούμε ότι η ROF2 δεν επάγεται. Το πείραμα έχει επαναληφθεί σε σπόρους οι οποίοι έχουν εμποτιστεί για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (1-24 ώρες) και σε σπόρους που έχουν εμποτιστεί σε 2-4°C και προέκυψαν τα ίδια αποτελέσματα, σε ότι αφορά την επαγωγή της ROF2 στο σπόρο.

Σπόρι του *A. thaliana* για Mass Spec:

Παρακάτω απεικονίζεται Coomassie staining δείγματος που στάλθηκε για Mass Spec:

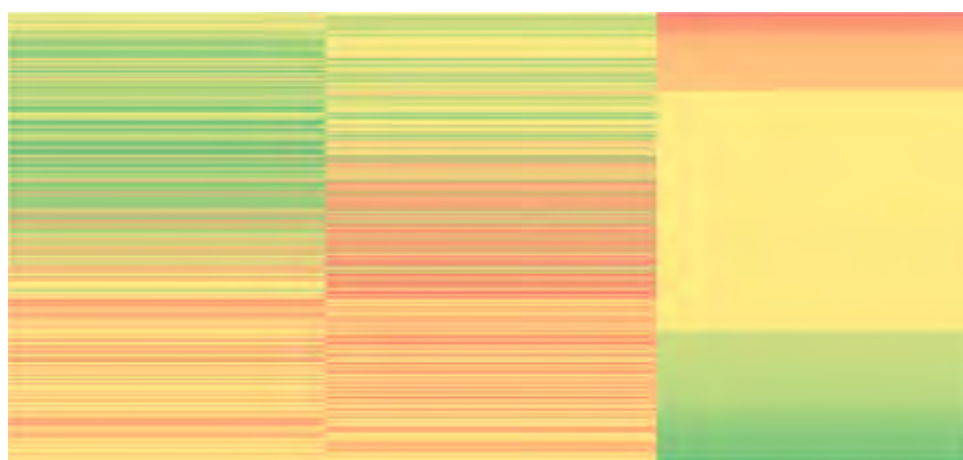
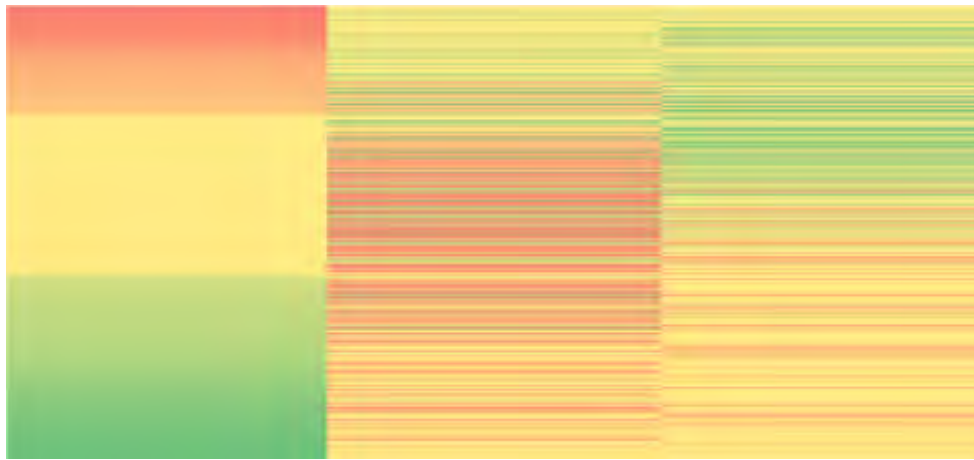


**Εικόνα 9.** Coomassie Staining σε δείγμα σπόρων του *A. thaliana*.

Τα αποτελέσματα των δειγμάτων που έχουμε λάβει μέχρι αυτή τη στιγμή είναι από σπόρους wt, ROF1OE και *rof1*/*rof2*<sup>-</sup> double knock out. Έχει μεγάλο ενδιαφέρον να

παρατηρήσουμε τις διαφορές ανάμεσα σε αυτά τα μεταλλάγματα, για να δούμε τι διαφοροποιείται σε καθένα από αυτά, απουσία των ισομερασών ROF1 και ROF2 ή υπερέκφρασής τους, συγκριτικά με το wt. Από το αρχείο που περιέχει όλες τις πρωτεΐνες που αναγνωρίστηκαν στην Mass Spec, ομαδοποιήσαμε τις πρωτεΐνες που έχουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον, όπως οι HSPs. Παρατηρήσαμε ότι, ενώ στο wt οι μεγάλοι μοριακού βάρους HSPs (HSP70, HSP90) είναι σε υψηλές συγκεντρώσεις, στα double knockout είναι υπερβολικά χαμηλές. Άλλη μια ενδιαφέρουσα ομάδα πρωτεϊνών που ανιχνεύθηκε είναι οι πρωτεοσωμικές υπομονάδες και οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες πρωτεοσωμάτων και ουβικουιτίνης. Αυτές, στα double knockout φαίνεται να είναι σε χαμηλά επίπεδα, ενώ στο wt ανιχνεύθηκαν σε πολύ μεγάλη ποσότητα.

Heatmap



OE

WT

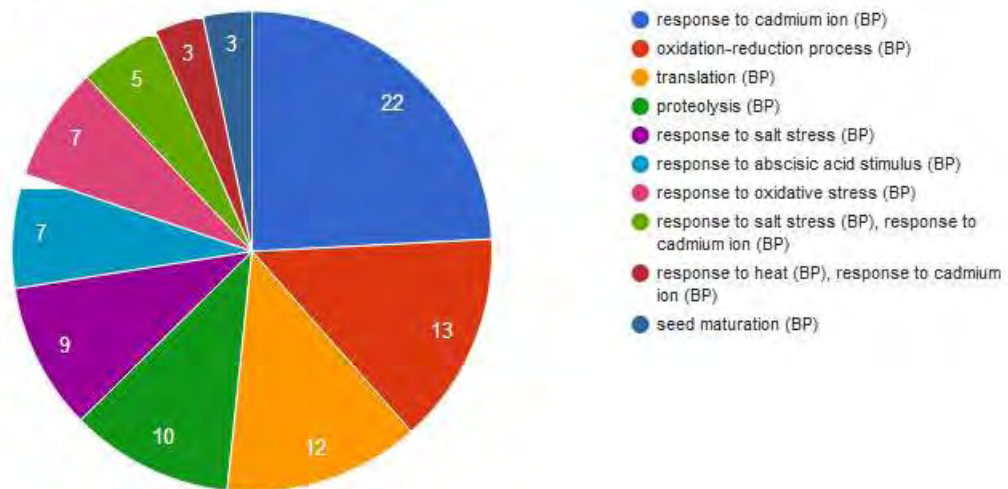
DN

Έπειτα από επεξεργασία των δεδομένων της πρωτεομικής, χρησιμοποιήσαμε το βιοπληροφορικό πρόγραμμα Gene Codis για την κατασκευή των παρακάτω διαγραμμάτων, λαμβάνοντας υπόψη τις περισσότερο αυξημένες πρωτεΐνες όπως εμφανίζονται στο heat map (πρωτεΐνες που εντοπίζονται στην κόκκινη περιοχή):

## A ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ: ΟΕ

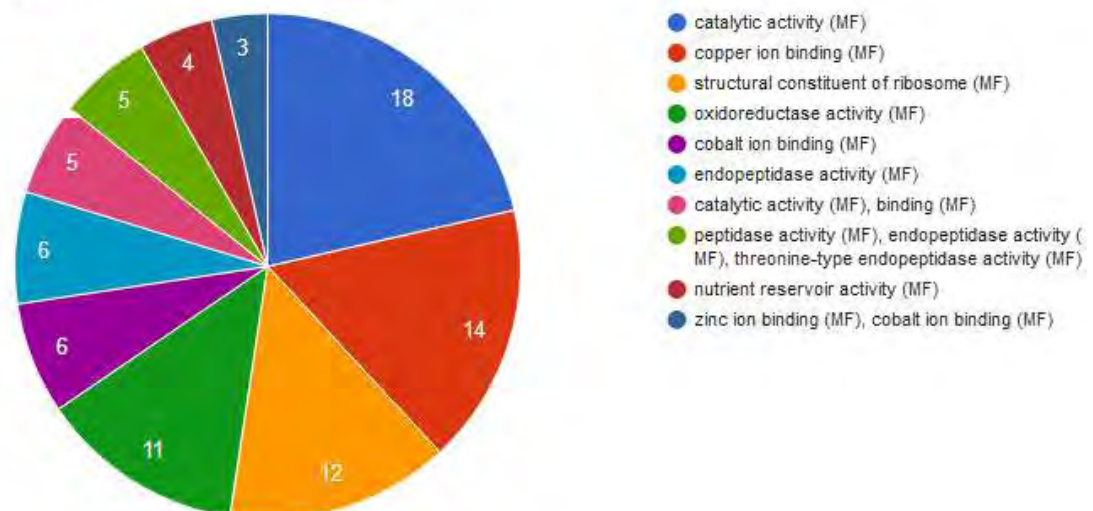
### Βιολογικές πορείες

Number of genes per concurrent annotations



### Μοριακές λειτουργίες

Number of genes per concurrent annotations



## Κυτταρικά Συστατικά

Number of genes per concurrent annotations



- cytosol (CC)
- chloroplast (CC)
- plasmodesma (CC)
- chloroplast (CC), cytosol (CC)
- cytosol (CC), plasma membrane (CC)
- chloroplast (CC), plasma membrane (CC)
- cytosol (CC), vacuolar membrane (CC)
- chloroplast (CC), cytosol (CC), plasma membrane (CC)
- chloroplast (CC), vacuolar membrane (CC)
- chloroplast (CC), cytosol (CC), vacuolar membrane (CC)

## KEGG Pathways

Number of genes per concurrent annotations



- Biosynthesis of secondary metabolites
- Ribosome
- Pyruvate metabolism
- Proteasome
- Citrate cycle (TCA cycle), Biosynthesis of secondary metabolites
- Tryptophan metabolism
- Nitrogen metabolism
- Alanine, aspartate and glutamate metabolism
- Galactose metabolism
- Arginine and proline metabolism, Nitrogen metabolism, Alanine, aspartate and glutamate metabolism



## Β ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ: WT

### Βιολογικές πορείες

Number of genes per concurrent annotations



- response to cadmium ion (BP)
- response to salt stress (BP)
- translation (BP)
- response to cold (BP)
- response to salt stress (BP), response to cadmium ion (BP)
- response to heat (BP)
- translation (BP), ribosome biogenesis (BP)
- response to zinc ion (BP)
- response to heat (BP), response to cadmium ion (BP)
- response to cold (BP), response to cadmium ion (BP)

### Μοριακές λειτουργίες

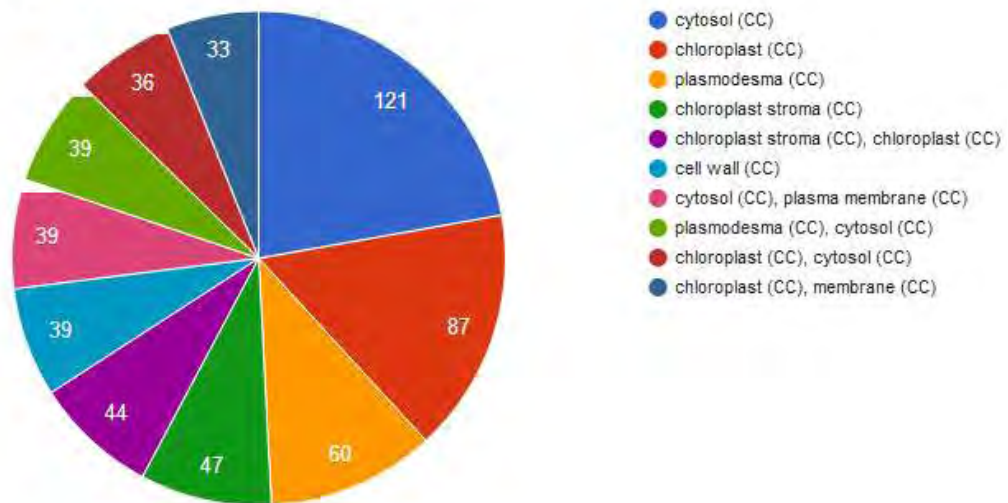
Number of genes per concurrent annotations



- catalytic activity (MF)
- structural constituent of ribosome (MF)
- copper ion binding (MF)
- structural molecule activity (MF)
- cobalt ion binding (MF)
- protein binding (MF), GTP binding (MF)
- translation elongation factor activity (MF)
- ATP binding (MF), unfolded protein binding (MF)
- proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism (MF)
- protein binding (MF), GTP binding (MF), GTPase activity (MF)
- L-aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase activity (MF)

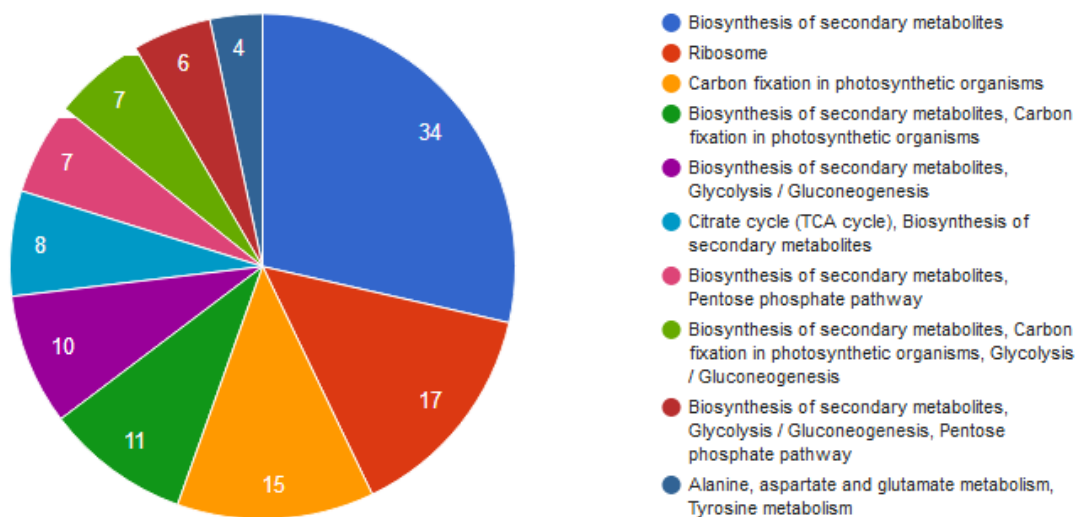
## Κυτταρικά συστατικά

Number of genes per concurrent annotations



## KEGG Pathways

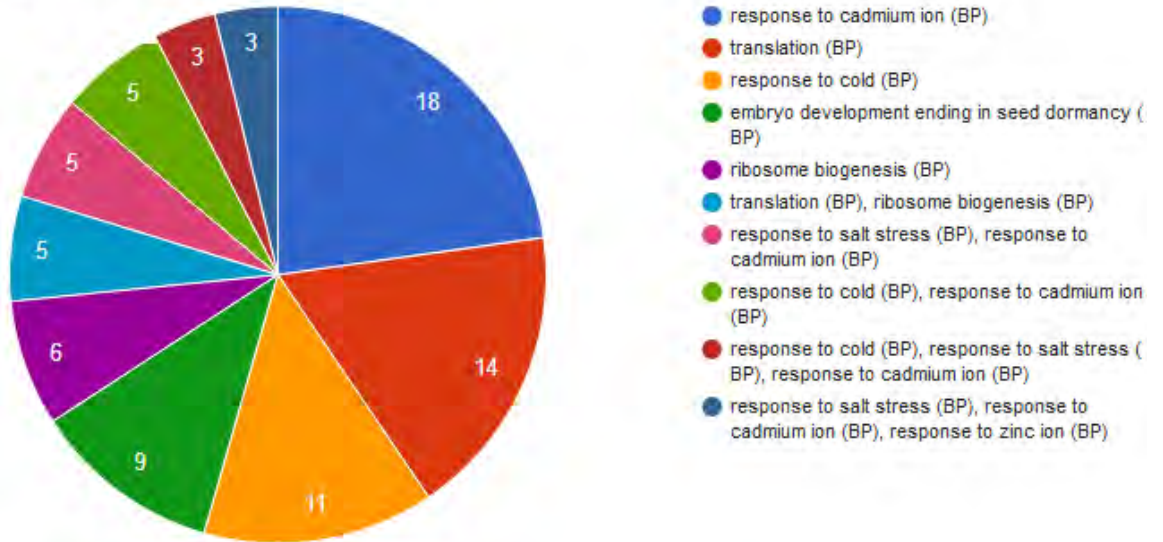
Number of genes per concurrent annotations



## ΓΠΕΡΙΠΤΩΣΗ: *rof1*<sup>-</sup> / *rof2*<sup>-</sup> doubleknockout

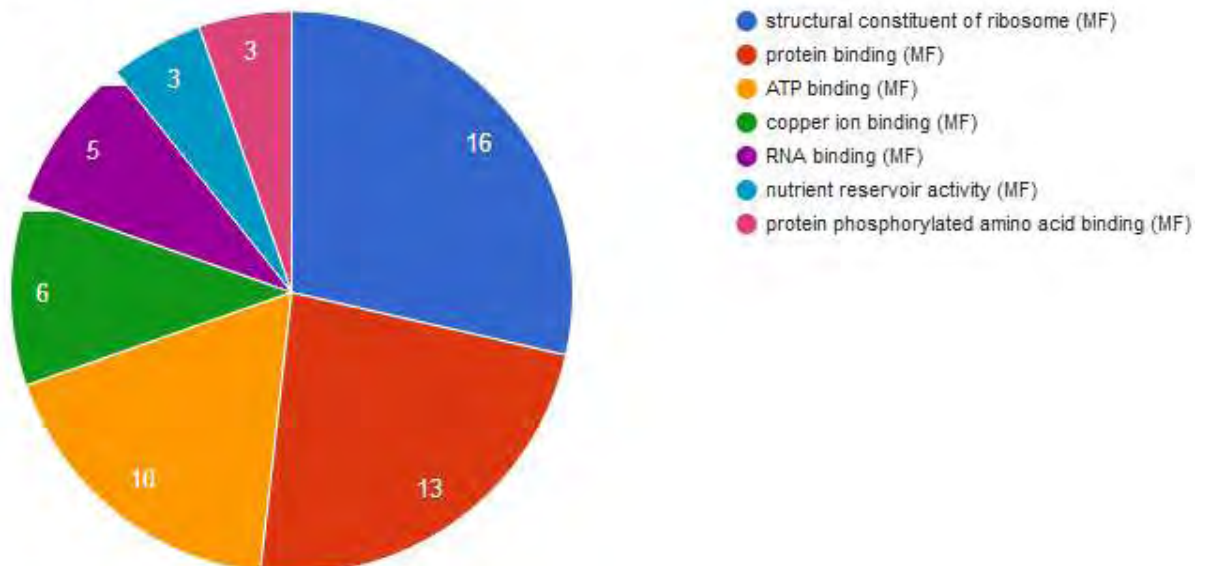
### Βιολογικές πορείες

Number of genes per concurrent annotations



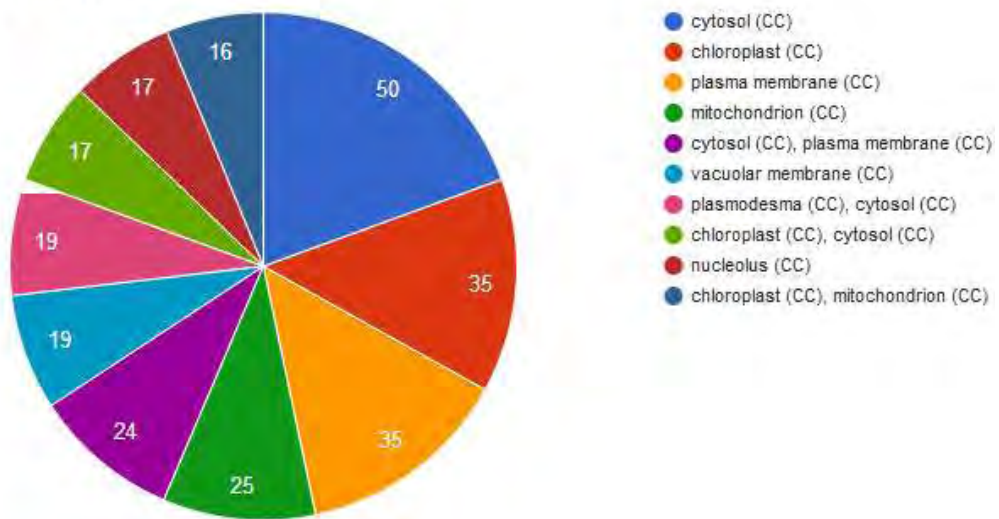
### Μοριακές λειτουργίες

Number of genes per concurrent annotations



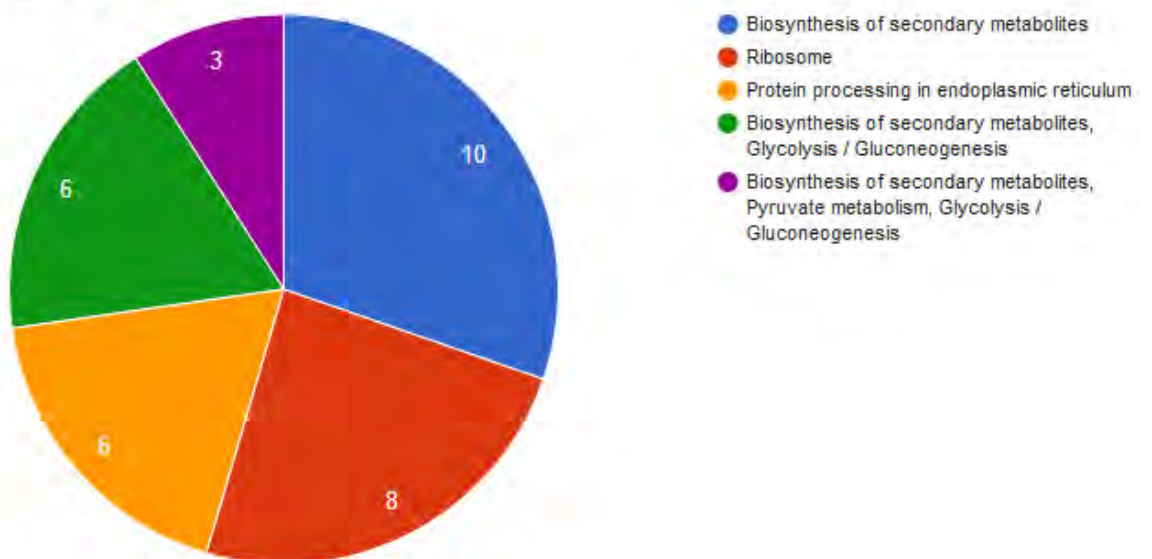
## Κυτταρικά συστατικά

Number of genes per concurrent annotations



## KEGG Pathways

Number of genes per concurrent annotations

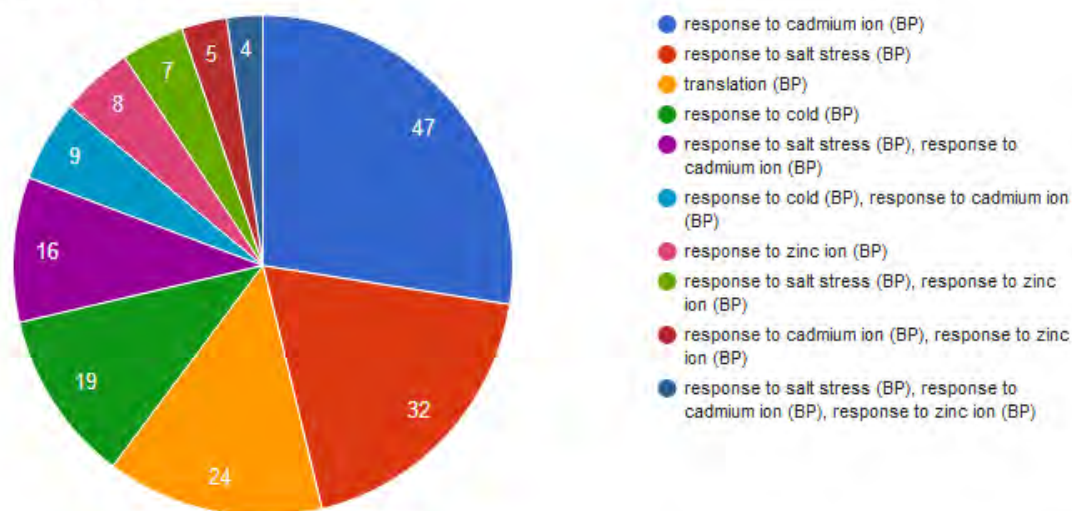


Έπειτα από επεξεργασία των δεδομένων της πρωτεομικής, χρησιμοποιήσαμε το βιοπληροφορικό πρόγραμμα GeneCodis για την κατασκευή των παρακάτω διαγραμμάτων, λαμβάνοντας υπόψη τις περισσότερο μειωμένες πρωτεΐνες όπως εμφανίζονται στο heat map (πρωτεΐνες που εντοπίζονται στην πράσινη περιοχή):

## A ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ: ΟΕ

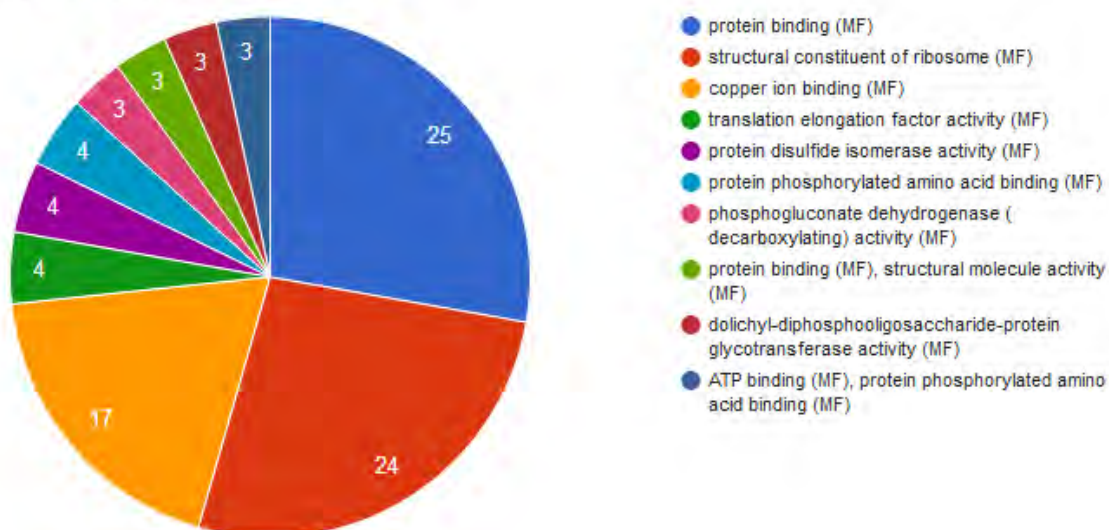
### Βιολογικές πορείες

Number of genes per concurrent annotations



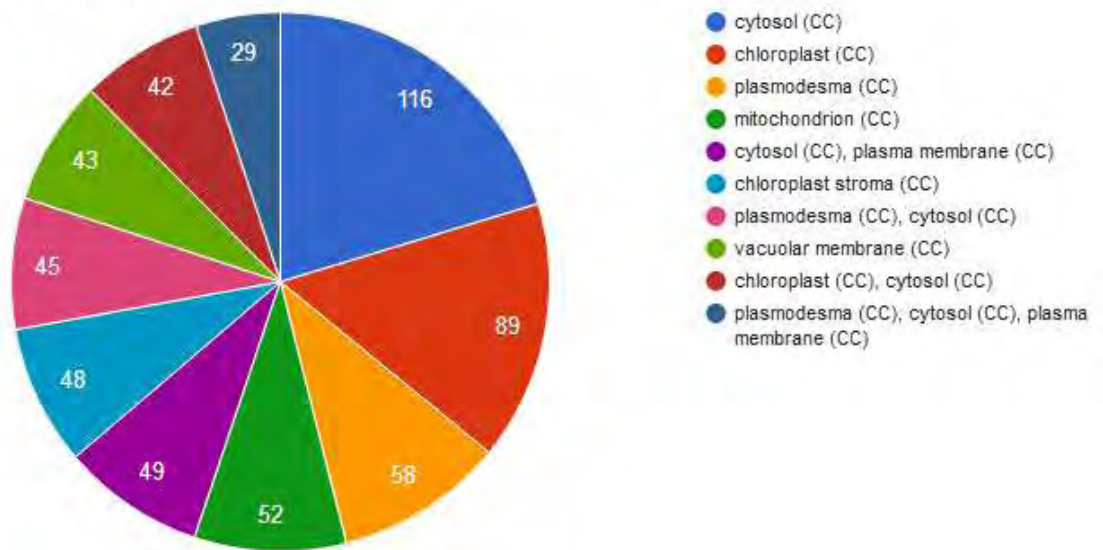
### Μοριακές λειτουργίες

Number of genes per concurrent annotations



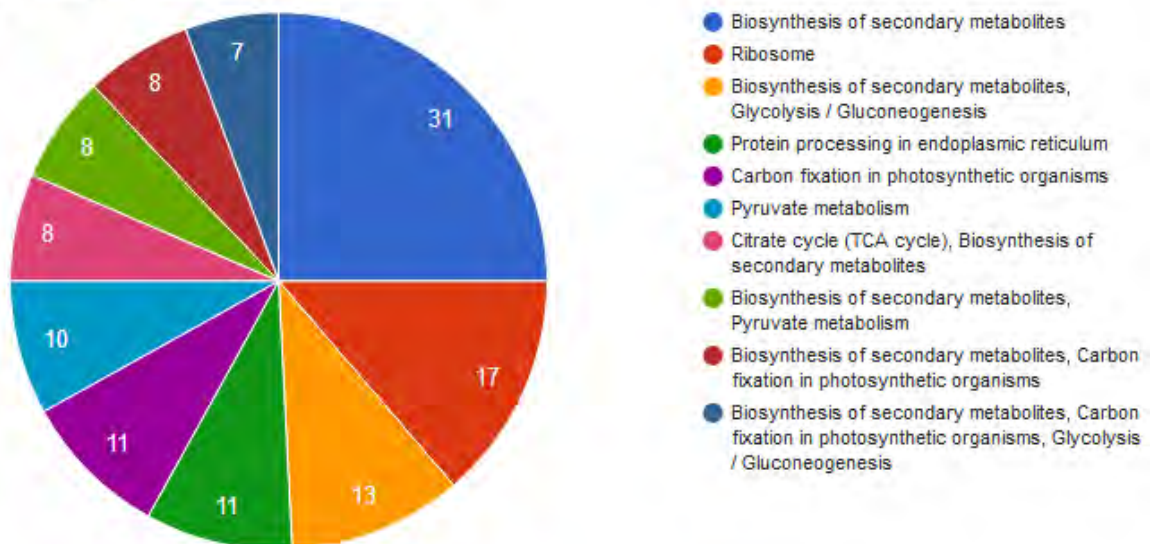
## Κυτταρικά συστατικά

Number of genes per concurrent annotations



## KEGG Pathways

Number of genes per concurrent annotations



## Β ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ: WT

### Βιολογικές πορείες

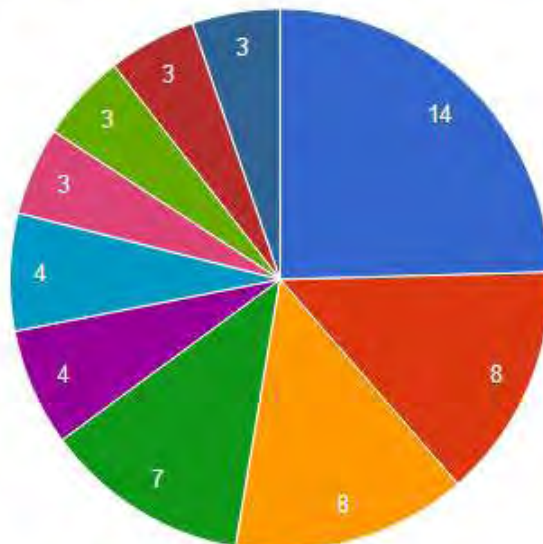
Number of genes per concurrent annotations



- response to cadmium ion (BP)
- response to salt stress (BP)
- response to abscisic acid stimulus (BP)
- proteolysis (BP)
- response to cold (BP)
- response to heat (BP)
- response to salt stress (BP), response to cadmium ion (BP)
- response to hydrogen peroxide (BP)
- response to heat (BP), response to cadmium ion (BP)
- response to salt stress (BP), response to cadmium ion (BP), response to zinc ion (BP)

### Μοριακές λειτουργίες

Number of genes per concurrent annotations



- protein binding (MF)
- oxidoreductase activity (MF)
- copper ion binding (MF)
- structural constituent of ribosome (MF)
- oxidoreductase activity (MF), binding (MF)
- endopeptidase activity (MF)
- aspartic-type endopeptidase activity (MF)
- nutrient reservoir activity (MF)
- ATP binding (MF), protein binding (MF)
- peptidase activity (MF), endopeptidase activity (MF), threonine-type endopeptidase activity (MF)

## Κυτταρικά συστατικά

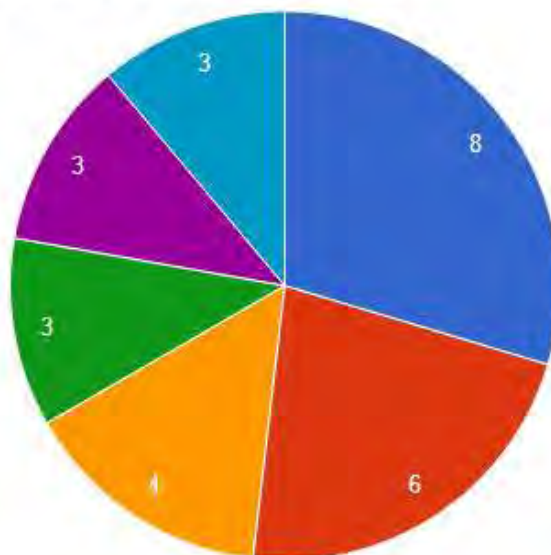
Number of genes per concurrent annotations



- cytosol (CC)
- chloroplast (CC)
- cytosol (CC), plasma membrane (CC)
- chloroplast (CC), cytosol (CC)
- vacuolar membrane (CC)
- chloroplast (CC), plasma membrane (CC)
- cytosol (CC), vacuolar membrane (CC)
- chloroplast (CC), cytosol (CC), plasma membrane (CC)
- chloroplast (CC), vacuolar membrane (CC)
- cytosol (CC), vacuolar membrane (CC), plasma membrane (CC)

## KEGG Pathways

Number of genes per concurrent annotations



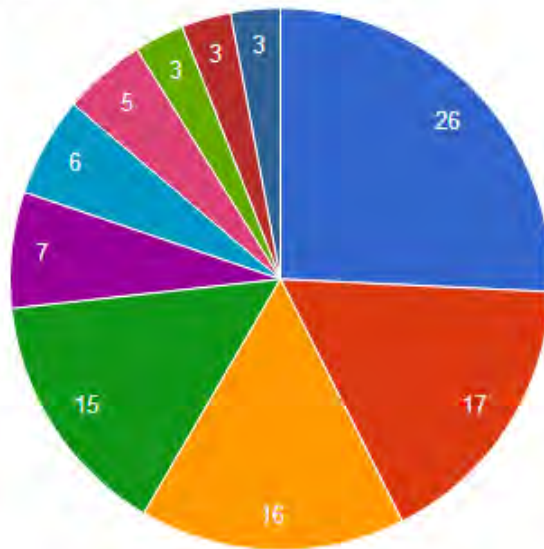
- Biosynthesis of secondary metabolites
- Ribosome
- Protein processing in endoplasmic reticulum
- Oxidative phosphorylation
- Proteasome
- Glyoxylate and dicarboxylate metabolism



## ΓΠΕΡΙΠΤΩΣΗ: *rof1* / *rof2* double knockout

### Βιολογικές πορείες

Number of genes per concurrent annotations



- response to cadmium ion (BP)
- oxidation-reduction process (BP)
- metabolic process (BP)
- translation (BP)
- response to cold (BP)
- translation (BP), ribosome biogenesis (BP)
- metabolic process (BP), oxidation-reduction process (BP)
- response to ozone (BP)
- response to heat (BP), response to cadmium ion (BP)
- metabolic process (BP), carbohydrate metabolic process (BP), glycosylceramide catabolic process (BP), oligosaccharide metabolic process (BP), glycoside catabolic process (BP)

### Μοριακές λειτουργίες

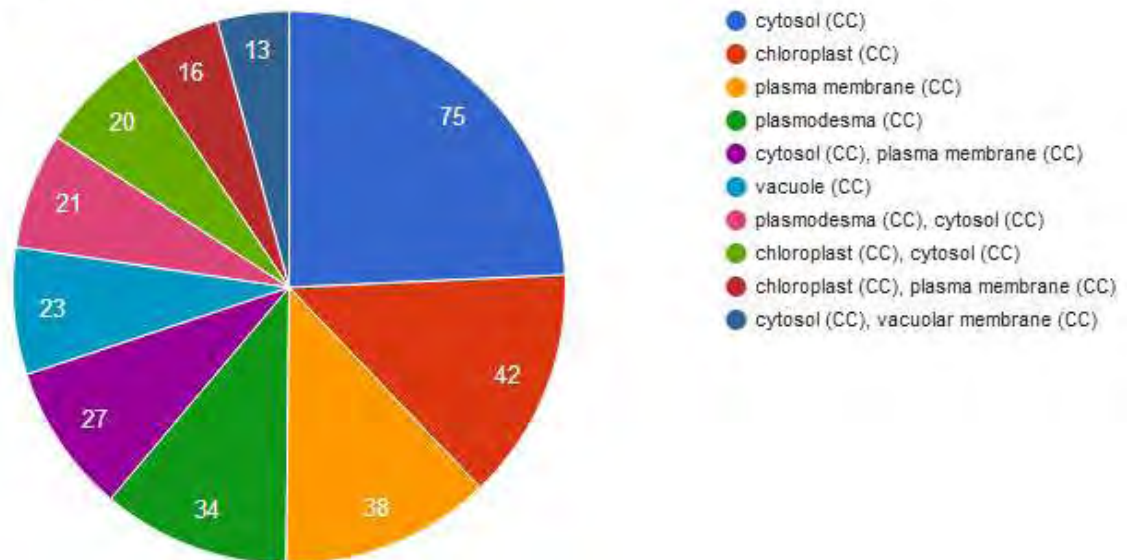
Number of genes per concurrent annotations



- catalytic activity (MF)
- structural constituent of ribosome (MF)
- oxidoreductase activity (MF)
- copper ion binding (MF)
- oxidoreductase activity (MF), catalytic activity (MF)
- catalytic activity (MF), binding (MF)
- catalytic activity (MF), hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds (MF)
- oxidoreductase activity (MF), catalytic activity (MF), binding (MF)
- oxidoreductase activity (MF), zinc ion binding (MF)
- catalytic activity (MF), hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds (MF), alpha-galactosidase activity (MF)

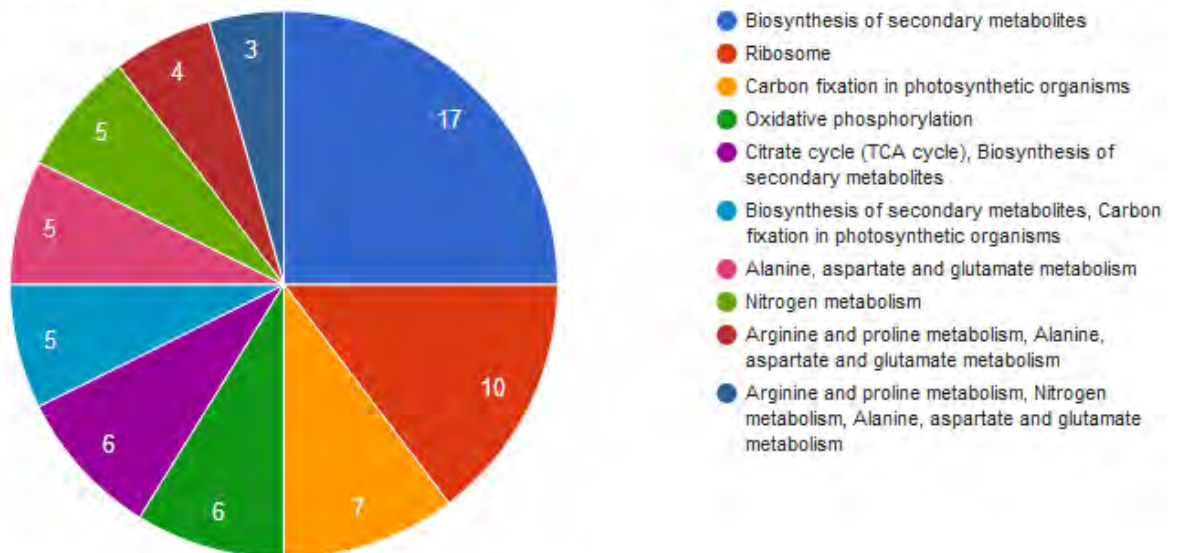
## Κυτταρικά συστατικά

Number of genes per concurrent annotations



## KEGGPathways

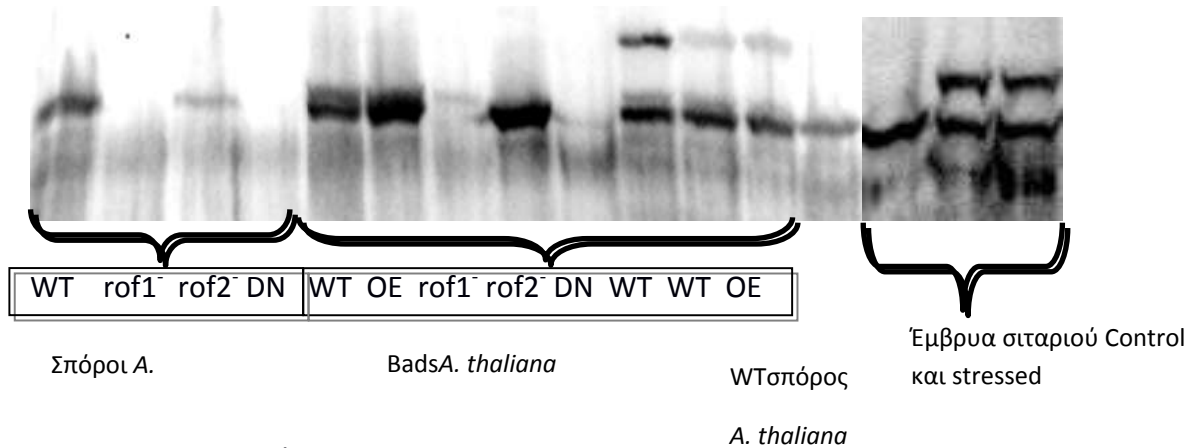
Number of genes per concurrent annotations



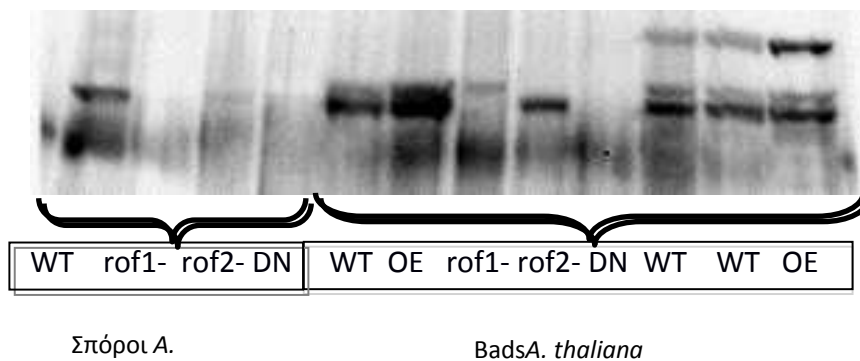
ΠΕΙΡΑΜΑ Αβιοτικό στρες υδατικής ανεπάρκειας και υγρασίας σε σπόρους και άνθη (bads)

Αποτελέσματα WesternBlot

- Στρες ξηρασίας



- Στρεςυγρασίας



**Εικόνα 9.** Ανοσοαποτύπωση τύπου Western σε seeds και bads του *A. thaliana* και σε σπόρους σιταριού, έπειτα από αβιοτικό στρες ξηρασίας (πάνω) και υγρασίας (κάτω).

Παρατηρήσεις:

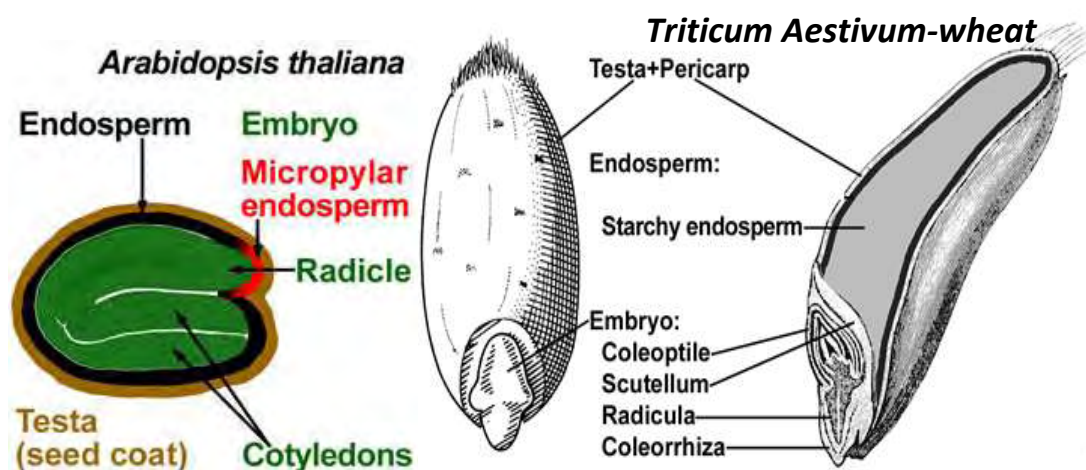
Παρατηρούμε ότι στους σπόρους της *A. thaliana* δεν έχουμε συσσώρευση της ROF2, έπειτα από αβιοτικό στρες θερμοκρασιακής καταπόνησης είτε συνδυασμός θερμοκρασιακής καταπόνησης με ξηρασία ή υγρασία. Συγκριτικά, παρατηρούμε ότι στα άνθη η ROF2 ανταποκρίνεται στα στρες. Στο σιτάρι βλέπουμε ξεκάθαρη συσσώρευση της ROF2 έπειτα από heat στρες, ενώ στο δείγμα control ανιχνεύεται μόνο η ROF1.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μελετήσαμε τον ρόλο των ROF FKBP, βασιζόμενοι σε προηγούμενα δεδομένων του εργαστηρίου που έδειξαν ότι οι ROF παίζουν σημαντικό ρόλο στην βλάστηση των σπόρων (germination), κάτω από συνθήκες οσμωτικού στρες όπως και σε δεδομένα άλλων εργαστηρίων, όπου περιγράφεται ο ρόλος των ROF στην θερμοαντοχή. Πρώτα μελετήσαμε διαφορετικά μεταλλάγματα των ROF σε θερμικό stress στην φάση του φυτρώματος. Για το σκοπό αυτό τα διαφορετικά μεταλλάγματα αρχικά μελετήθηκαν σε αναπτυξιακό στάδιο imbibitions κάτω από κανονικές συνθήκες (22°C–control δείγματα). Μετά από φασματομετρία μάζας, συγκρίναμε τα πρωτεομικά προφίλ των διαφορετικών μεταλλαγμάτων της *A. thaliana* (wt, *rof1*<sup>-</sup>, *rof2*<sup>-</sup>, *rof1*<sup>-</sup>/*rof2*<sup>-</sup> double knockout και ROF1OE) στο στάδιο αυτό. Από τα αποτελέσματα που πήραμε και την μετέπειτα επεξεργασία των δεδομένων της MassSpec, παρατηρήσαμε διαφορετική έκφραση πρωτεϊνών σε μεταλλάγματα, συγκριτικά με το wt. Από τις συνολικές πρωτεΐνες που αναγνωρίστηκαν στην MassSpec, ομαδοποιήσαμε πρωτεΐνες που έχουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον, όπως είναι οι HSPs, μεταγραφικοί παράγοντες, μεταβολικά ένζυμα, πρωτεασομικές υπομονάδες και άλλες τσαπερόνες που αλληλεπιδρούν με πρωτεάσωμα και ουβικουιτίνη και παρατηρήσαμε ότι ανιχνεύθηκαν σε διαφορετικά επίπεδα στα mutants σε σχέση με το wt.

Στη συνέχεια διερευνήσαμε τον ρόλο που παίζουν οι ROF στους μηχανισμούς ανταπόκρισης σε συνθήκες θερμοκρασιακής καταπόνησης, με ταυτόχρονη υδατική ανεπάρκεια και υγρασία. Τα προφίλ που πήραμε έπειτα από ανοσοαποτύπωση Western Blot έδειξαν, ότι **μετά την εφαρμογή συνθηκών αβιοτικής καταπόνησης, η ROF2 δεν συσσωρεύεται στους σπόρους του *A. thaliana* (σε αντίθεση με την ομόλογή FKBP77 στο σιτάρι), ενώ συσσωρεύεται σε άλλα αναπτυξιακά στάδια (βλαστίδια και άνθη).** Αναλυτικότερα, διαλέξαμε βλαστίδια 4 ημερών από όλα τα διαφορετικά μεταλλάγματα του *A. thaliana* που διαθέτουμε και, έπειτα από ανάλυση Western Blot, παρατηρούμε εμφανή συσσώρευση της ROF2 (εικόνα 8). Προκειμένου να μελετήσουμε την συμπεριφορά της ROF2 σε άλλο αναπτυξιακό στάδιο και κάτω από διαφορετικά αβιοτικά στρες, πήραμε άνθη από όλα τα μεταλλαγμένα και wt φυτά και τα εξετάσαμε κάτω από συνθήκες αβιοτικού στρες

υδατικής ανεπάρκειας και πλημμυρίσματος (εικόνα 7). Μετά από ανοσοαποτύπωση τύπου Western, παρατηρήσαμε ότι η ROF2 ανιχνεύεται και σε σπόρους σιταριού (εικόνα 9). Έχοντας υπόψη τη διαφορετική ανατομία σπόρου *A. thaliana* (δικοτυλήδονο) και σιταριού (μονοκοτυλήδονο) (εικόνα 10) αυτή η διαφορά απαιτεί εκτενέστερη μελέτη. [14]



**Εικόνα 10.** Απεικόνιση της μορφολογίας του σπόρου του *A. thaliana* (αριστερά) και του σιταριού (δεξιά)

Ο μηχανισμός ανταπόκρισης των φυτών σε αβιοτικά στρες μέσω των ROFή των ομολόγων τους θα διαλευκανθεί μελλοντικά, μέσω πειραμάτων στις συγκεκριμένες αβιοτικές καταπονήσεις και στα αναπτυξιακά στάδια που μας ενδιαφέρουν (όπως σπόροι σε στάδιο φυτρώματος), αρχικά με γενικό screening με τη βοήθεια του mass spec και στη συνέχεια με επιπλέον βιοχημικά πειράματα.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. 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
2. BERGM.J., TYMOCZKOL.J., STRYER L., ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ (ενιαίος τόμος), Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης (2012)
3. Ping Wang and Joseph Heitman (2005) Protein family review: The cyclophilins, *Genome Biology*, 6:226
4. Zengyong He, Legong Li, and Sheng Luan, (2004) Immunophilins and Parvulins. Superfamily of Peptidyl Prolyl isomerases in Arabidopsis, *Plant Physiol. Vol. 134*
5. Markus Geisler and Aurelien Bailly, Tete-a-tete: the function of FKBP in plant development, *TRENDS in Plant Science Vol.12 No.10*
6. Dileep Vasudevan, Gayathri Gopalana, Ashish Kumar, Veder J. Garcia, Sheng Luan, Kunchithapadam Swaminathan (2004) Plant immunophilins: a review of their structure-function relationship, *Biochimica et Biophysica Acta*
7. Peter J. Gollan, Mrinal Bhave, Eva-Mari Aro, (2012) The FKBP families of higher plants: Exploring the structures and functions of protein interaction specialists, *FEBS Letters* 586 3539–3547
8. Gerhard Krauss, (2013) *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, 5th Edition, WILEY-VCH
9. David Meiri and Adina Breiman, Department of Plant Sciences, Tel Aviv University, (2009) Arabidopsis ROF1 (FKBP62) modulates thermotolerance by interacting with HSP90.1 and affecting the accumulation of HsfA2-regulated sHSPs, *The Plant Journal* 59, 387–399
10. Keren Aviezer-Hagai, Julia Skovorodnikova, Mario Galigniana, Odelia Farchi-Pisanty, Erez Maayan, Shmuel Bocovza, Yael Efrat, Pascal von Koskull-Doering, Nir Ohad, Adina Breiman, (2007) Arabidopsis immunophilins ROF1 (AtFKBP62) and ROF2 (AtFKBP65) exhibit tissue specificity, are heat-stress induced, and bind HSP90, *Plant Mol Biol* 63:237–255
11. David Meiri, Keren Tazat, Reut Cohen-Peer, Odelia Farchi-Pisanty, Keren Aviezer-Hagai, Adi Avni, Adina Breiman, (2010) Involvement of Arabidopsis ROF2 (FKBP65) in thermotolerance *Plant Mol Biol* 72:191–203

12. David Oxley, Nicholas Ktistakis, Theodora Farmaki, (2013) Differential isolation and identification of PI(3)P and PI(3,5)P2 binding proteins from *Arabidopsis thaliana* using an agarose-phosphatidylinositol-phosphate affinity chromatography, *Journal Of Proteomics* 91 580 – 594

13. Debora Karali, David Oxley, John Runions, Nicholas Ktistakis, Theodora Farmaki, (2012) The *Arabidopsis thaliana* Immunophilin ROF1 Directly Interacts with PI(3)P and PI(3,5)P2 and Affects Germination under Osmotic Stress, *PLOS ONE*, Volume 7, Issue 11

14. The Seed Biology Place, <http://www.seedbiology.de/>, Website Gerhard Leubner Lab, Royal Holloway University of London