

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ Π.Μ.Σ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

# «Ταυτοποίηση της μετάλλαξης mosaic του φυτού

Arabidopsis thaliana"

ΜΑΡΙΑ-ΑΝΝΑ Σ. ΜΟΥΣΟΥΡΑΚΗ <u>ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ</u> ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΣΤΑΜΑΤΗΣ ΡΗΓΑΣ

AOHNA, 2019

# <u>ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ</u>

# «Ταυτοποίηση της μετάλλαξης mosaic του φυτού Arabidopsis thaliana»

# «Identification of the *mosaic* mutation of the *Arabidopsis thaliana* plant»

## ΜΑΡΙΑ-ΑΝΝΑ Σ. ΜΟΥΣΟΥΡΑΚΗ

## ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ρήγας Σταμάτης, Επίκουρος Καθηγητής (Επιβλέπων)
Μηλιώνη Δήμητρα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Μέλος)
Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής (Μέλος)

Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Βιοτεχνολογίας στις \_/\_2018, κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή της διατριβής.

# Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία αποτελεί το τελευταίο μέρος του μεταπτυχιακού προγράμματος «Βιολογία Συστημάτων» και εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής συνέβαλαν αρκετά πρόσωπα, το καθένα με τον δικό του ξεχωριστό τρόπο.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κο Πολυδεύκη Χατζόπουλο για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας αλλά και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στην προσπάθειά μου να ανταπεξέλθω σε ένα απαιτητικό πρόγραμμα σπουδών, διαφορετικού γνωστικού υποβάθρου από αυτό που κατείχα. Ακολούθως, ευχαριστώ τον επιβλέπων μου Επίκουρο Καθηγητή κο Σταμάτη Ρήγα που μου ανέθεσε να μελετήσω το συγκεκριμένο θέμα, το οποίο ήλθε εις πέρας χάρη στις εποικοδομητικές συμβουλές και παρατηρήσεις του, τόσο κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους του όσο και κατά τη συγγραφή αυτού. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Δήμητρα Μηλιώνη, για το ενδιαφέρον και την ενθάρρυνση κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

Επίσης, ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου, καθώς ο καθένας συνέβαλε ξεχωριστά, λιγότερο ή περισσότερο στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Μεταδιδακτορικούς ερευνητές Ντικράν Τσιτσεκιάν και Γεράσιμο Δάρα, οι οποίοι με καλωσόρισαν στο εργαστήριο με φιλική διάθεση και μου δίδαξαν τις τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας με πολλή υπομονή. Σημαντικά πρόσωπα στην πορεία αυτού του μεταπτυχιακού προγράμματος ήταν οι φίλοι και συμφοιτητές μου Ιωάννα Καλτσά, Ιωσήφ Ζαχαρία και Γιώργος Πρεμέτης καθώς και οι υποψήφιοι Διδάκτορες Δημήτρης Τεμπλαλέξης, Μαργαρίτα Θωμοπούλου και Παναγιώτα Πλίτση, των οποίων η βοήθεια και η στήριξη ήταν καταλυτική για την ολοκλήρωση αυτού του εγχειρήματος, από πολλές απόψεις.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου, η οποία με στήριξε και συνεχίζει να με στηρίζει με τον καλύτερο δυνατό τρόπο σε κάθε απόφαση που παίρνω και ιδιαίτερα τη θεία μου Κατερίνα για την αγάπη, την υπομονή και την καθοδήγησή της όλα τα χρόνια των σπουδών μου και στη ζωή μου γενικότερα.

# Περίληψη

Η μετάλλαξη mosaic του φυτού Arabidopsis thaliana, αποτελεί προϊόν EMS μεταλλαξιγένεσης του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Φαινοτυπικά, το μετάλλαγμα εμφανίζει ένα ιδιόρρυθμο κλιμακούμενο πρότυπο χλώρωσης ξεκινώντας από τις κεντρικές νευρώσεις των φύλλων τις ροζέτας με σταδιακή επέκταση σε ολόκληρη την επιφάνεια του ελάσματος. Ο φαινότυπος mosaic οφείλεται σε υπολειπόμενη μετάλλαξη, που εντοπίζεται σε μία περιοχή 64.000bp του κάτω βραχίονα του χρωμοσώματος IV, η οποία απαρτίζεται από 14 γονίδια (At4g21380-At4g21510), σημαντικός αριθμός των οποίων εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα σε αμυντικούς μηχανισμούς. Παρότι η ακριβής θέση της μετάλλαξης δεν είχε έως σήμερα προσδιοριστεί, η ιδιαιτερότητα αυτή της περιοχής δημιούργησε ως επικρατέστερη ερμηνεία για τη λειτουργική δράση του υπεύθυνου γονιδίου αυτήν ενός αρνητικού ρυθμιστή στο αμυντικό

Σκοπό της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης αποτέλεσε η ταυτοποίηση της μετάλλαξης mosaic. Δεδομένα ανάλυσης μικροσυστοιχιών από βάσεις δεδομένων υπέδειξαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης τόσο στα φύλλα όσο και έναντι παραγόντων βιοτικής ή αβιοτικής καταπόνησης για έξι γονίδια προς εξέταση από την προαναφερθείσα περιοχή. Κλωνοποίηση και ανάλυση των αποτελεσμάτων αλληλούχισής τους, οδήγησε τελικά στον εντοπισμό της μετάλλαξης, ως μία splice-site mutation του γονιδίου *FMN/FHY* (*At4g21470*), που κωδικοποιεί για ένα ένζυμο με διττή δράση ως κινάση της ριβοφλαβίνης.

Η βιβλιογραφία αποδίδει στη ριβοφλαβίνη και στα παράγωγά της σημαντικό ρόλο σε αναπτυξιακές και αμυντικές διεργασίες. Η πλειοψηφία των αναφορών θεωρεί τη ριβοφλαβίνη ως επαγωγέα της άμυνας κυρίως μέσω εξωγενούς χορήγησής της, ωστόσο έρευνες μεταλλαγμάτων για γονίδια του μονοπατιού ενισχύουν αυτήν την υπόθεση παρέχοντας δεδομένα και για την επίδραση που φέρουν μεταβολές των ίδιων των ενδογενών επιπέδων της. Αξιοσημείωτη είναι η περίπτωση του μεταλλάγματος για το γονίδιο *PHS1* (<u>*ph*</u>oto<u>s</u>ensitive 1), συστατικού του ίδιου μονοπατιού, το οποίο εμφανίζει ανάλογο πρότυπο χλώρωσης και ανάπτυξης με το mosaic, δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στη φωτοευαίσθητη φύση των δύο μεταλλαγμάτων. Η μελέτη του *PHS1* υποδεικνύει πως αυτή η φαινοτυπική ανωμαλία οφείλεται σε φωτο-οξειδωτική καταπόνηση, γεγονός που θα μπορούσε να έχει εφαρμογή και στο mosaic. Φυσικά περαιτέρω πειραματικοί χειρισμοί χρειάζονται να πραγματοποιηθούν μελλοντικά για την τεκμηρίωση της συγκεκριμένης υπόθεσης.

*Λέξεις-κλειδιά*: μετάλλαξη, χλώρωση, μοριακή κλωνοποίηση, αλληλούχιση γονιδίων, ριβοφλαβίνη, αβιοτική καταπόνηση

## Abstract

Mosaic is an EMS-derived mutant of the plant Arabidopsis thaliana, created at the Molecular Biology Laboratory of the Agricultural University of Athens. Phenotypically, the mutants exhibit a peculiar chlorotic pattern starting from the central vein of the senescent leaves and gradually expanding over the entire surface of young leaves during the development of mosaic plants. Mosaic owes its phenotype to a recessive mutation which is located in a 64kbp region on the Arabidopsis chromosome IV, consisting of 14 genes (with annotation numbers At4g21380 to At4g21510), a significant number of which are engaged directly or indirectly to defense mechanisms. Although the exact position of the mutation has not been determined to date, this region being connected to immune responses has resulted to the most prevalent interpretation for the functional role of the mutated gene as a negative regulator in the plant signal transduction upon perception of pathogen attacks.

The aim of the current Master thesis was the identification of the *mosaic* mutation. Microarray analysis data collected from online databases indicated increased levels of expression in older leaves tissues and elicitor-treated tissues for six candidate genes to be examined. Subsequently, molecular cloning and analysis of their sequencing data resulted to the identification of the *mosaic* mutation and its characterization as a splice-site mutation of the *FMN/FHY* gene, which encodes an enzyme of the riboflavin biosynthetic pathway.

Current literature attributes riboflavin and its derivatives to a significant role in numerous developmental and defense processes. The majority of scientific reports refer to riboflavin as a defense elicitor but this has been mainly suggested due to its ability to induce defense responses after exogenous treatment with riboflavin. However, research into mutants for genes being part of the riboflavin biosynthesis enhance this hypothesis by providing data on the effect of the altered endogenous levels of flavins have on plant immune adaptation. Remarkably, a mutant for the *PHS1* gene, a component of riboflavin biosynthesis, exhibited a similar to *mosaic* phenotypic pattern of chlorosis and development indicating the photosensitive nature of both mutants. The study of *phs1* suggests that this phenotypic abnormality is owing to photooxidative stress, a suggestion that could be applied also to *mosaic*. Undoubtedly, the specific case should be experimentally validated in the future.

*Keywords*: mutation, chlorosis, molecular cloning, gene sequencing, riboflavin, abiotic stress

# Πίνακας περιεχομένων

1	ΕΙΣΑ	ΓΩΓΗ				8
1.1	Το μ	ετάλλαγμα <i>mosa</i>	ic			9
	1.1.1	Φαινοτυπική	περιγραφή	του	μεταλλάγματος-Επεκτεινό	μενος
	κυτταρ	ικός θάνατος και	περιορισμένη	ανάπτυξ	η	9
	1.1.2	Μεταλλαξιγένεα	ση και έλεγχος <sup>-</sup>	του τύπα	ου της μετάλλαξης	11
	1.1.3	Χαρτογράφηση	της μετάλλαξη	ς		12
1.2	Υποδ	δοχείς αναγνώρια	σης μοτίβων (Ρ	attern F	Recognition Receptors, PRR	s) και
٤٧	εργοπο	ίηση της αμυντικ	ής απόκρισης .			15
1.3	Κυττ	αρικός θάνατος	σε βιοτικές κα	ι αβιοτι	κές καταπονήσεις- Η παρα	<b>χγωγή</b>
τω	v ROS (	ως κοινός παρονα	ρμαστής			18
1.4	Σκοπ	ός του πειράματ	ος			22
2	ΥΛΙΚ	А & МЕӨОΔОІ				23
2.1	Φυτι	κό υλικό				24
2.2	Προε	ετοιμασία και συν	νθήκες ανάπτυδ	ξης Arab	idopsis thaliana	24
2.3	Πρω	τόκολλο απομόνα	ωσης γονιδιωμα	ατικού D	νΝΑ από φυτά Arabidopsis	25
2.4	Αλυσ	σιδωτή αντίδρασι	η πολυμεράσης	; (PCR)		25
2.5	Ανάλ	ιυση δεσοξυριβο	νουκλεϊνικών ο	ξέων (D	NA)	27
	2.5.1	Διαδικασία παρ	ασκευής πηκτή	ις αγαρό	ζης	28
	2.5.2	Ηλεκτροφόρησι	ι νουκλεϊνικών	οξέων σ	ε πηκτή αγαρόζης	28
2.6	Αποι	ιόνωση και καθα	ρισμός κλασμά	των DN	Α από πηκτή αγαρόζης	29
2.7	Ενοπ	οίηση τμημάτων	DNA με κολλώ	δη ή τυά	þλά άκρα (Ligation)	30
2.8	Βακτ	ηριακά κύτταρα	και μετασχημα	τισμός		31
	2.8.1	Προετοιμασία δ	εκτικών βακτη	ριακών κ	κυττάρων Escherichia coli	31
	2.8.2	Μετασχηματισμ	ιός δεκτικών κι	υττάρων	Escherichia coli με πλασμι	.διακό
	DNA					32

2.9 Αποθήκευση μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα					
χρονικά διαστήματα					
2.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα					
2.10.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης 33					
2.10.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με χρήση κολώνας					
2.11 Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού					
2.12 Σύσταση και παρασκευή διαλυμάτων και θρεπτικών μέσων ανάπτυξης 37					
2.12.1 Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης φυτών ½ MS					
2.12.2 Διαλύματα προετοιμασίας, ανάπτυξης και επιλογής βακτηριακών					
κυττάρων Ε. coli DH5a38					
2.12.2.1 Διαλύματα ανάπτυξης και επιλογής βακτηριακών					
κυττάρων Ε. Coli DH5a38					
2.12.2.2 Διαλύματα προετοιμασίας δεκτικών βακτηριακών					
κυττάρων Ε. Coli DH5a					
2.12.3 Διαλύματα απομόνωσης και ανάλυσης νουκλεινικών οξέων					
2.12.3.1 Διαλύματα απομόνωσης γονιδιωματικού DNA					
2.12.3.2 Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA με τη					
μέθοδο της αλκαλικής λύσης					
2.12.3.3 Διαλύματα ανάλυσης νουκλεινικών οξέων					
2.13 Προγράμματα Βιοπληροφορικής και Βάσεις Δεδομένων					
2.14 Λοιπά προγράμματα ανάλυσης αλληλουχιών					
<i>3</i> ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ					
3.1 Αξιολόγηση και επιλογή των υποψήφιων προς μελέτη γονιδίων					
3.2 Κλωνοποίηση τμημάτων των γονιδίων <i>mosaic</i> για αλληλούχιση					
3.3 Αποτελέσματα αλληλούχισης και ταυτοποίηση της μετάλλαξης 52					
4 <i>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</i>					
4.1 Ο λειτουργικός ρόλος του γονιδίου Χ					

4.2 Το γονίδιο συμμετέχει στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της ριβοφλαβίνης 57
4.2.1 Η σχέση του μονοπατιού με τη δημιουργία ROS και την επαγωγή της
φυτικής άμυνας64
4.2.2 Ο φαινότυπος mosaic είναι πιθανό αποτέλεσμα φωτο-οξειδωτικής
καταπόνησης (photooxidative stress)68
4.3 Μελλοντική εργασία στο μετάλλαγμα <i>mosaic</i>
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ72
ПАРАРТНМА
Α. Λίστα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πειραματική
μελέτη84
Β. Αποτελέσματα μικροσυστοιχιών-Έκφραση των γονιδίων της περιοχής στα
φύλλα
Γ. Αποτελέσματα μικροσυστοιχιών-Έκφραση των γονιδίων της περιοχής σε βιοτικές
καταπονήσεις92
Δ. Αποτελέσματα μικροσυστοιχιών-Έκφραση των γονιδίων της περιοχής σε
αβιοτικές καταπονήσεις93
Ε. Αποτελέσματα αλληλούχισης των υποψήφιων προς μελέτη γονιδίων94

# 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### 1.1 Το μετάλλαγμα mosaic

Αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας αποτέλεσε ένα μετάλλαγμα του φυτού Arabidopsis thaliana, ονόματι mosaic, το οποίο δημιουργήθηκε και αναλύθηκε από παλαιότερα πειράματα στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Πατσουμάς, 2006, Τσιτσεκιάν, 2009). Παρακάτω, ακολουθεί μια σύντομη ανασκόπηση της μέχρι τώρα πειραματικής μελέτης του μεταλλάγματος και των πληροφοριών που έχουν συλλεχθεί έως σήμερα σχετικά με αυτό. Σε αυτήν, γίνεται φαινοτυπική περιγραφή του μεταλλάγματος συγκριτικά με φυτά Arabidopsis αγρίου τύπου (οικότυπος Columbia, Col-0 N1093), καθώς και περιληπτική αναφορά του τρόπου δημιουργίας και χαρτογράφησης της μετάλλαξης.

#### 1.1.1 Φαινοτυπική περιγραφή του μεταλλάγματος-Επεκτεινόμενος κυτταρικός θάνατος και περιορισμένη ανάπτυξη

Το υπό μελέτη μετάλλαγμα εμφανίζει εκτεταμένη χλώρωση, ξεκινώντας από την κεντρική νεύρωση του φύλλου κι επεκτείνεται προοδευτικά προς το έλασμα (Εικόνα 1). Αυτό το κλιμακούμενο πρότυπο χλώρωσης κάνει τη γενική εικόνα των χλωρωτικών και των πράσινων περιοχών των φύλλων του φυτού να θυμίζει μωσαϊκό, γεγονός που οδήγησε στην απόδοση της ονομασίας *mosaic* στο μετάλλαγμα.



Εικόνα 1. Φυτά mosaic (A) και Col-0 (B) ηλικίας 30 ημερών στο χώμα. Τα φυτά mosaic εμφανίζουν έντονη χλώρωση με συγκεκριμένο πρότυπο, που ξεκινά από την κεντρική νεύρωση των φύλλων της ροζέτας και σταδιακά επεκτείνεται σε όλο το έλεσμα, όπως υποδεικνύουν τα λευκά βέλη (Γ).

Εκτός του κλιμακούμενου προτύπου χλώρωσης, το μετάλλαγμα διαφέρει σημαντικά από τα φυτά αγρίου τύπου ως προς τον τρόπο ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, τα φυτά της μετάλλαξης mosaic παρουσιάζουν μικρότερη ανάπτυξη της ρίζας (Εικόνα 2 Α,Β) αλλά και καθυστερημένη ανάπτυξη του κεντρικού βλαστού (Εικόνα 2Γ). Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί σποραδικά πως ο φαινότυπός του παρουσιάζει μεταβολές ανάλογα με την ένταση φωτός που λαμβάνουν τα φυτά κατά την ανάπτυξή τους σε θαλάμους ανάπτυξης, με την «ένταση» του χλωρωτικού προτύπου να ποικίλει. Ιδιαίτερα σε συνθήκες υψηλής έντασης φωτισμού η επιβίωση των φυτών mosaic καθίσταται αδύνατη. Τέλος, το μετάλλαγμα δεν καταφέρνει πάντοτε να ολοκληρώσει επιτυχώς τον βιολογικό του κύκλο, καθώς έχουν παρατηρηθεί φυτά που είτε δεν προλαβαίνουν να ωριμάσουν οι καρποταξίες τους είτε τα σπέρματα που παράγουν είναι πολύ λίγα σε αριθμό.



Εικόνα 2. Φυτάρια mosaic (A) και Col-0 (B) ηλικίας 5 ημερών. Είναι εμφανής η καθυστέρηση στην ανάπτυξη του μεταλλάγματος συγκριτικά με εκείνη των φυτών αγρίου τύπου. (Γ) Ο φαινότυπος φυτών mosaic (αριστερά) και Col-0 (δεξιά) ηλικίας 30 ημερών.

Αξίζει να σημειωθεί πως φαινότυποι παρόμοιοι με αυτό το πρότυπο κλιμακούμενης χλώρωσης έχουν παρατηρηθεί σε περιπτώσεις φυτών που φέρουν μεταλλάξεις σε γονίδια που σχετίζονται στις αμυντικές αποκρίσεις έναντι επιθέσεων από παθογόνους μικροοργανισμούς (Lorrain *et al.*, 2003) ή έναντι περιβαλλοντικών καταπονήσεων (Petrov *et al.*, 2015). Τέτοιοι τυπικοί φαινότυποι χαρακτηρίζονται από νανισμό, αυξημένα επίπεδα σαλικυλικού οξέος, έκφραση γονιδίων άμυνας, εκδήλωση κυτταρικού θανάτου ή σχηματισμό μακροσκοπικά εμφανών αλλοιώσεων παράλληλα με διαταραγμένη ομοιόσταση των ενεργών μορφών οξυγόνου (Rodriguez *et al.*, 2015, Van Wersch *et al.*, 2016).

#### 1.1.2 Μεταλλαξιγένεση και έλεγχος του τύπου της μετάλλαξης

Το μετάλλαγμα mosaic αποτελεί προϊόν πρόσθιας γενετικής ανάλυσης και συγκεκριμένα χημικώς επαγόμενης μεταλλαξιγένεσης με την εφαρμογή του χημικού μεταλλαξιγόνου παράγοντα μεθανοσουλφονικού αιθυλίου (Ethyl Methane Sulfonate-EMS) σε σπέρματα *A. thaliana*\_του οικοτύπου *Columbia* (*Col-O*). Το EMS δεν ενσωματώνεται στο μόριο του DNA αλλά δρα τροποποιώντας τις βάσεις του. Ειδικότερα, προσθέτει μια αιθυλική ομάδα σε πολλές θέσεις κατά μήκος του μορίου του DNA και στις 4 βάσεις με αποτέλεσμα να τους αλλάζει τις ιδιότητες σχηματισμού ζευγών βάσεων. Η κυριότερη δράση του EMS είναι η προσθήκη μιας αιθυλικής ομάδας στο μόριο της γουανίνης. Τελικά, προκύπτει ένα μη κανονικό νουκλεοτίδιο, το οποίο ονομάζεται 6-αίθυλο-γουανίνη. Κατά την αντιγραφή του DNA, η 6-αίθυλο-γουανίνη, αντί να δημιουργήσει δεσμό υδρογόνου με την κυτοσίνη, δημιουργεί δεσμό με μια θυμίνη. Καθώς επαναλαμβάνονται οι κύκλοι αντιγραφής του μορίου DNA, το αποτέλεσμα της δράσης του EMS είναι η αλλαγή ενός ζεύγους G:C σε ένα ζεύγος A:T, στη συγκεκριμένη θέση (**Εικόνα 3**).



Εικόνα 3. Η χημική δράση του EMS.

Οι σημειακές μεταλλάξεις που προκαλούνται από το EMS χαρακτηρίζονται ως: α) μεταλλάξεις με λάθος νόημα (missense mutations) όταν αλλάζουν ένα κωδικόνιο με ένα άλλο που αντιπροσωπεύει ένα άλλο αμινοξύ, τροποποιώντας έτσι την πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης ή β) μεταλλάξεις χωρίς νόημα (nonsense mutations) όταν ένα κωδικόνιο αλλάζει σε κωδικόνιο λήξης, προκαλώντας έτσι πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης του μηνύματος του mRNA του γονιδίου.

Προκειμένου να διαλευκανθεί ο τρόπος κληρονόμησης της μετάλλαξης, σε παλαιότερο πείραμα (Τσιτσεκιάν, 2009), πραγματοποιήθηκε η διασταύρωση Ρ: ♀ *mosaic* (aa) x ♂ Ler-0 (AA). Όλα τα φυτά που είχαν προκύψει στην F1 γενιά της διασταύρωσης έφεραν φαινότυπο αγρίου τύπου (με γονότυπο Aα). Έχοντας ως δεδομένο ότι η μετάλλαξη είναι υπολειπόμενη, στην F2 γενιά αναμενόταν η γονοτυπική αναλογία 1 ΑΑ: 2 Αα: 1 αα ή φαινοτυπικά 3 αγρίου τύπου: 1 μεταλλαγμένο. Πράγματι, τα αποτελέσματα που προέκυψαν τότε από την ανάδρομη διασταύρωση του μεταλλάγματος *mosaic* με τα φυτά του οικοτύπου Col-Ο στην F2 γενιά, επιβεβαίωσαν ότι **η μετάλλαξη είναι ομόζυγη υπολειπόμενη**. Το παρατηρούμενο και αναμενόμενο πλήθος φυτών αγρίου τύπου και *mosaic* συνοψίζεται στον **Πίνακα 1**.

	Παρατηρούμενα	Αναμενόμενα
Φυτά Αγρίου Τύπου	3192	3173
mosaic	1038	1057
Σύνολο	4230	4230

Πίνακας 1. Το παρατηρούμενο και αναμενόμενο πλήθος φυτών στην F2 γενιά της ανάδρομης διασταύρωσης του μεταλλάγματος *mosaic* με φυτά του οικοτύπου *Col-0* (Τσιτσεκιάν, 2009).

### 1.1.3 Χαρτογράφηση της μετάλλαξης

Από προηγούμενα πειράματα (Πατσουμάς, 2006), η μετάλλαξη mosaic είχε περιοριστεί στον κάτω βραχίονα του χρωμοσώματος IV του φυτού Arabidopsis, σε μια περιοχή 2566kbp η οποία ορίζεται μεταξύ των μοριακών δεικτών CER4C και F13C5. Η πληροφορία αυτή αξιοποιήθηκε εκ νέου (Τσιτσεκιάν, 2009), με το σχεδιασμό νέων μοριακών δεικτών εντός αυτής της περιοχής ούτως ώστε να περιοριστεί ακόμη περισσότερο ο γενετικός τόπος όπου βρίσκεται η μετάλλαξη. Το αποτέλεσμα της χαρτογράφησης αυτής περιόρισε εν τέλει τη μετάλλαξη mosaic με τους ακραίους μοριακούς δείκτες SNP21370 από αριστερά, με ένα ανασυνδυασμένο άτομο, το D289, ενώ από δεξιά με το δείκτη SNP21520 με πέντε ανασυνδυασμένα άτομα, τα D58, D76, D304 και D512. Σήμερα, η περιοχή «εγκλωβισμού» της μετάλλαξης αφορά σε ένα συγκεκριμένο μοριακό τόπο, μια περιοχή 64kbp, η οποία περιέχει 14 γονίδια με κωδικούς AGI από At4g21380 έως και At4g21510. Η τελική εικόνα της προαναφερθείσας μοριακής χαρτογράφησης παρουσιάζεται στην **Εικόνα 4**.



Εικόνα 4. Η τελική εικόνα της χαρτογράφησης. Στην εικόνα φαίνονται όλοι οι πολυμορφισμοί καθώς και τα άτομα του πληθυσμού που ήταν ανασυνδυασμένα σε κάθε δείκτη. Ο κόκκινες γραμμές αντιστοιχούν στα BACs, τα μαύρα βέλη στα γονίδια, οι μπλε κάθετες γραμμές και τα μπλε βέλη ορίζουν τη θέση των μοριακών δεικτών στην περιοχή και την μεταξύ τους απόσταση. Με μαύρη έντονη γραμματοσειρά καταγράφονται τα ονόματα των μοριακών δεικτών, με κόκκινη έντονη γραμματοσειρά καταγράφονται οι ανασυνδυασμοί για κάθε δείκτη και με πράσινη γραμματοσειρά καταγράφονται οι αριθμοί των ανασυνδυασμένων ατόμωνδειγμάτων. (Πηγή: Τσιτσεκιάν, 2009)

Τα γονίδια που απαρτίζουν την περιοχή που περιορίστηκε η μετάλλαξη, καταγράφονται στον ακόλουθο Πίνακα 2 μαζί με τις προτεινόμενες πιθανές λειτουργίες τους, όπως αυτές αναγράφονται στη βάση δεδομένων TAIR.

Πίνακας 2. Τα 14 υποψήφια γονίδια και οι προτεινόμενες λειτουργίες τους. Με πράσινο χρώμα έχουν επισημανθεί τα γονίδια για τα οποία γίνται αναφορά περί εμπλοκής τους στον μηχανισμό απόκρισης και άμυνας του φυτού εναντίον βιοτικών ή αβιοτικών καταπονήσεων (Τσιτσεκιάν, 2009).

ΓΟΝΙΔΙΟ (AGI) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ				
AT4G21380.1	encodes a putative receptor-like serine/threonine protein kinases that is similar to Brassica self-incompatibility (S) locus.	Protein Kinase		
AT4G21390.1	B120; protein kinase/ sugar binding; similar to carbohydrate binding / kinase [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G11300.1); similar to S-locus lectin protein kinase family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G11330.1); similar to S-locus lectin protein kinase family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G61610.1); similar to serine/threonine kinase [Brassica oleracea] (GB:CAA73134.1); similar to unnamed protein product [Vitis vinifera] (GB:CAO45331.1); similar to unnamed protein product [Vitis vinifera] (GB:CAO17789.1	Protein Kinase / Sugar Binding		
AT4G21400.1	protein kinase family protein; Identical to Cysteine-rich receptor-like protein kinase 28 precursor (CRK28) [Arabidopsis Thaliana] (GB:O65405); similar to protein kinase family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G21410.1); similar to unnamed protein product [Vitis vinifera] (GB:CAO22277.1);	Protein Kinase/ DUF26		
AT4G21410.1	protein kinase family protein; Identical to Cysteine-rich receptor-like protein kinase 29 precursor (CRK29) [Arabidopsis Thaliana] (GB:Q8S9L6;GB:O65406); similar to protein kinase family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G21400.1	Protein Kinase/ DUF26		

AT4G21420.1	transposable element gene; gypsy-like retrotransposon family, has a 6.9e-06 P-value blast match to GB:BAA84458 GAG-POL precursor (gypsy_Ty3- element) (Oryza sativa)gi 5902445 dbj BAA84458.1  GAG-POL precursor (Oryza sativa (japonica cultivar-group)) (RIRE2) (Gypsy_Ty3-family)	Retrotranspozon
AT4G21430.1	B160; transcription factor; similar to transcription factor [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G11950.1); similar to unnamed protein product [Vitis vinifera] (GB:CAO21257.1	Transcription factor
AT4G21440.1	Encodes a MYB transcription factor <b>involved in wounding and osmotic</b> <b>stress response.</b> Member of the R2R3 factor gene family.	MYB Transcription factor
AT4G21450.1	vesicle-associated membrane family protein / VAMP family protein; similar to vesicle-associated membrane family protein / VAMP family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G05060.1	VAMP family
AT4G21460.1	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G18240.2); similar to Os08g0513300 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:NP_001062225.1); similar to <b>Protein involved in high osmolarity</b> signaling pathway (ISS) [Ostreococcus tauri] (GB:CAL57599.1	Osmotic stress signalling
AT4G21470.1	Bifunctional enzyme that catalyzes hydrolysis of FMN to riboflavin, and phosphorylation of riboflavin to FMN.	FMN Riboflavin
AT4G21480.1	glucose transporter, putative; Identical to Sugar transport protein 12 (STP12) [Arabidopsis Thaliana] (GB:O65413); similar to STP1 (SUGAR TRANSPORTER 1), carbohydrate transmembrane transporter/ sugar:hydrogen ion symporter [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G11260.1); similar to hexose transporter 1 [Juglans regia] (GB:AAY89231.1); similar to monosaccharide- H+ symporter [Datisca glomerata] (GB:CAD30830.1	Sugar Transporter
AT4G21490.1	NDB3; NADH dehydrogenase; similar to NDB1 (NAD(P)H DEHYDROGENASE B1), NADH dehydrogenase/ disulfide oxidoreductase [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G28220.1); similar to NDB4 (NAD(P)H DEHYDROGENASE B4), NADH dehydrogenase [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT2G20800.1); similar to NDB2 (NAD(P)H DEHYDROGENASE B2), disulfide oxidoreductase [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G05020.1	NADH dehyrdogenase / disulfide oxidoreductase
AT4G21500.1	similar to conserved hypothetical protein [Medicago truncatula] (GB:ABD32605.1)	
AT4G21510.1	F-box family protein; Identical to F-box protein At4g21510 [Arabidopsis Thaliana] (GB:O65416); similar to F-box family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G05010.1); similar to At1g61340 [Medicago truncatula] (GB:ABD32592.1); contains InterPro domain Cyclin-like F-box (InterPro:IPR001810)	F-Box family

Στην περιοχή εντοπισμού της μετάλλαξης υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός γονιδίων που σχετίζονται με αμυντικές αποκρίσεις (πράσινη επισήμαναση) έναντι περιβαλλοντικών καταπονήσεων (Τσιτσεκιάν, 2009) και τα πρώτα 4 από αυτά κωδικοποιούν για υποδοχείς αναγνώρισης μοριακών προτύπων σχετιζόμενων με παθογόνα (pattern recognition receptors, **PRRs**). Συνοπτικά, Η ιδιότητα αυτή των γονιδίων να σχετίζονται με αμυντικές αποκρίσεις καθώς και η ομοιότητα του φαινοτύπου του μεταλλάγματος με φαινοτύπους κυτταρικού θανάτου που προκύπτουν σε φυτά προσβεβλημένα από παθογόνους μικροοργανισμούς (Lorrain *et al.*, 2003, Rodriguez *et al.*, 2015, Van Wersch *et al.*, 2016), έδωσαν το έναυσμα ώστε να επιλεχθούν αρχικά -όπως φαίνεται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων- τα

περισσότερο πιθανά γονίδια ως υπεύθυνα για την μετάλλαξη mosaic. Επιπλέον, τα δύο αυτά χαρακτηριστικά, οδήγησαν δευτερευόντως στην υπόθεση μιας πιθανής σύνδεσης του μεταλλαγμένου γονιδίου με γνωστούς από τη βιβλιογραφία υποδοχείς που αντιλαμβάνονται επιθέσεις μικροοργανισμών και ρυθμίζουν τη σηματοδότηση των μονοπατιών για επαγωγή της άμυνας. Μία σύντομη ανασκόπηση του τρόπου δόμησης και λειτουργίας αυτών των υποδοχέων παρουσιάζεται ακολούθως.

# 1.2 Υποδοχείς αναγνώρισης μοτίβων (Pattern Recognition Receptors, PRRs) και ενεργοποίηση της αμυντικής απόκρισης

Η επιτυχής ενεργοποίηση των φυτικών αμυντικών μηχανισμών στηρίζεται στην επιστράτευση υποδοχέων μικροβιακών μοτίβων (**PRRs**) και πρωτεϊνών ανθεκτικότητας (resistance proteins, **R**) που αναγνωρίζουν μόρια εκκρινόμενα από παθογόνα, όπως είναι οι διεγέρτες (elicitors). (Dodds & Rathjen, 2010, Dangl *et al.*, 2013, Muthamilarasan & Prasad, 2013) (**Εικόνα 5**).

Το πρώτο επίπεδο της φυτικής άμυνας έναντι των παθογόνων, ξεκινά στην επιφάνεια του κυττάρου, με την αναγνώριση μοριακών προτύπων παθογόνων μικροοργανισμών (pathogen-associated molecular patterns, **PAMPs**) από τους PRRs (Boehm et al., 2014, Zipfel, 2014), οδηγώντας στην εκδήλωση της πρώτης φάσης της άμυνας (PAMP-triggered immunity (PTI) (Jones & Dangl, 2006, Dodds & Rathjen, 2010). Τα PAMPs είναι δομικά συντηρημένα μόρια όπως η φλατζελίνη (flagellin), η χιτίνη (chitin), βακτηριακές cold shock πρωτεΐνες και ο παράγοντα επιμήκυνσης Tu (EF-Tu). Οι κινάσες τύπου υποδοχέα (Receptor-like kinases, **RLKs**) και πρωτεΐνες τύπου υποδοχέα (Receptor-like proteins, **RLPs**) ανήκουν στην οικογένεια των PRRs. Οι RLKs εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη και κατέχουν μια εξωκυτταρική περιοχή σύνδεσης προσδέτη (ligand), μια διαμεμβρανική περιοχή και μία ενδοκυτταρική περιοχή με δράση κινάσης σερίνης-θρεονίνης (Shiu & Bleecker, 2001, Couto & Zipfel, 2016). Οι RLPs αποτελούνται, επίσης, από μια εξωκυτταρική και διαμεμβρανική περιοχή (Wang et al., 2008) αλλά η απουσία ενδοκυτταρικής περιοχής αναγνώρισης καθιστά απαραίτητη την αλληλεπίδρασή τους με ρυθμιστικές RLKs για την έναρξη της σηματοδότησης (Zipfel, 2008, Gust & Felix, 2014). Η αντίληψη των PAMPs από τις RLKs και RLPs συνεπάγεται αλυσιδωτές φωσφορυλιώσεις και ετεροδιμερισμούς με άλλες πρωτεϊνικές κινάσες, οδηγώντας σε αλλαγές της διαμόρφωσης των υποδοχέων και την καθοδική ενεργοποίηση της σηματοδότησης (Muthamilarasan & Prasad, 2013). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το σύμπλοκο υποδοχέων FLS2/BAK1 (Chincilla et al., 2007, Chincilla et al., 2009, Dodds & Rathjen, 2010, Muthamilarasan & Prasad, 2013). Αυτά τα γεγονότα επάγουν τις πρώτες αμυντικές αποκρίσεις κατά τις οποίες τα στόματα κλείνουν και παράγονται ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) καθώς και φυτικές ορμόνες όπως το

σαλικυλικό οξύ (SA), το ιασμονικό οξύ (JA) και το αιθυλένιο (ET) (Muthamilarasan & Prasad, 2013).

Ορισμένα παθογόνα έχουν προσαρμοστεί εξελικτικά και δύνανται να καταστείλουν την PTI, εκκρίνοντας πρωτεΐνες effectors, οι οποίες συνεισφέρουν στην μικροβιακή παθογένεια είτε στοχεύοντας και καταστέλλοντας τη δράση συμπλόκων PRR -οδηγώντας σε αναστολή της PTI- είτε επάγοντας την παραγωγή θρεπτικών στοιχείων που απαιτούνται για την επιβίωση του παθογόνου και τη θετική ρύθμιση γονιδίων που συνεισφέρουν στην εξάπλωση της μόλυνσης (Muthamilarasan & Prasad, 2013).

Η έκκριση των effectors σηματοδοτεί την έναρξη του δεύτερου επιπέδου της φυτικής άμυνας που λαμβάνει χώρα ενδοκυτταρικά, με την ενεργοποίηση των R πρωτεϊνών για την αναγνώριση των πρώτων. Οι R πρωτεΐνες ανήκουν σε μία οικογένεια πρωτεϊνών που φέρουν μια περιοχή δέσμευσης νουκλεοτιδίων και μια περιοχή πλούσια σε επαναλήψεις λευκίνης (Nucleotide-binding Leucine-rich repeat, **NB-LRRs**) (Takken et al., 2006). Οι NB-LRRs αλληλεπιδρούν με τους effectors άμεσα ή έμμεσα. Μία άμεση φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ μίας NB-LRR κι ενός effector οδηγεί σε διαμορφωτικές αλλαγές της πρώτης, ενεργοποιώντας το δεύτερο επίπεδο άμυνας, ή αλλιώς ETI (Effector-Triggered immunity, ETI) (Takken et al., 2006). Η έμμεση αναγνώριση των effectors επιτυγχάνεται μέσω βοηθητικών πρωτεϊνών τις οποίες στοχεύουν οι effectors. Αυτές οι βοηθητικές πρωτεΐνες είτε είναι στόχοι μολυσματικότητας των effectors (guard proteins) ή λειτουργούν ως «δόλωμα» (decoy proteins) που το φυτό έχει αναπτύξει με στόχο να μιμείται τους αντίστοιχους στόχους των effectors (Dangl & Jones 2001, Van Der Hoorn & Kamoun, 2008, Dodds & Rathjen, 2010). Αλλαγές στη διαμόρφωση των guard και των decoy πρωτεϊνών από τους effectors οδηγεί στην εκδήλωση της ΕΤΙ. Οι αμυντικές αποκρίσεις της ΕΤΙ είναι παρόμοιες με εκείνες της ΡΤΙ και περιλαμβάνουν τη βιοσύνθεση SA, JA και ΕΤ, την παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων καθώς και μετατροπές των κυτταρικών τοιχωμάτων στα σημεία προσβολής. Παρ' όλα αυτά, η ETI θεωρείται ότι παρέχει δυνατότερη προστασία στις επιθέσεις των παθογόνων και συνοδεύεται συχνά από την εκδήλωση αντίδρασης υπερευαισθησίας (hypersensitive response, HR), μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (programmed cell death, PCD) που εντοπίζεται στην περιοχή μόλυνσης περιορίζοντας, έτσι, την εξάπλωση του παθογόνου.



Εικόνα 5. Οι αρχές της φυτικής ανοσίας. Μόρια εκκρίνονται από τους παθογόνους μικροοργανισμούς στον εξωκυττάριο χώρο των φυτών (PAMPs) και αναγνωρίζονται από υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων (PRRs). Η αναγνώριση αυτή επάγει το πρώτο στάδιο της φυτικής ανοσίας (PTI). Οι PRRs αποτελούνται από μία εξωκυτταρική περιοχή LRR (μπλε χρώμα) κα μία ενδοκυτταρική περιοχή κινάσης (κόκκινο χρώμα). Πολλοί PRRs (όπως ο FLAGELLIN SENSITIVE2, FLS2) αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα BAK1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-ASSOCIATED KINASE 1) ώστε να ξεκινήσει το σηματοδοτικό μονοπάτι της PTI. Τα βακτηριακά παθογόνα μεταφέρουν πρωτεΐνες effectors εντός του κυττάρου-ξενιστή ενώ οι μύκητες και οι ωομύκητες μεταφέρουν effectors από τους μυζητήρες ή άλλες ενδοκυτταρικές δομές με άγνωστο μηχανισμό. Αυτοί οι ενδοκυτταρικοί effectors συχνά δρουν κατασταλτικά προς την PTI. Οι NB-LRRs αποτελούνται από τους ενδοκυτταρικούς υποδοχείς NB-LRRs, οι οποίοι επάγουν την ETI. Οι NB-LRRs αποτελούνται από ένα καρβοξυ-τελικό άκρο LRR (γαλάζιο χρώμα), μία κεντρική NB περιοχή (πορτοκαλί χρώμα) που δεσμεύει ATP ή ADP (κίτρινη σφαίρα) και από ένα αμινο-τελικό άκρο (μωβ χρώμα). (Πηγή: Dodds & Rathjen, 2010)

## 1.3 Κυτταρικός θάνατος σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις- Η παραγωγή των ROS ως κοινός παρονομαστής

Το μετάλλαγμα mosaic φέρει έντονο χλωρωτικό φαινότυπο που δίνει την εντύπωση ενός συνεχώς επεκτεινόμενου κυτταρικού θανάτου. Μεταλλάγματα που εκδηλώνουν αυθόρμητα λανθασμένα ρυθμιζόμενο κυτταρικό θάνατο ονομάζονται lesion mimic mutants (LMMs) και αφορούν περιπτώσεις φαινοτυπικών αλλοιώσεων μεταβλητού μεγέθους ή φέρουν ανωμαλίες που δεν τους επιτρέπουν να ελέγξουν την εξάπλωση του κυτταρικού θανάτου από τη στιγμή που θα ξεκινήσει (Lorrain *et al.*, 2003). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η περιοχή που εντοπίζεται η μετάλλαξη απαρτίζεται, μεταξύ άλλων, από γονίδια που κωδικοποιούν για PRRs οι οποίοι, βιβλιογραφικά, έχουν φανεί να σχετίζονται με την επαγωγή της σηματοδότησης που οδηγεί στην εκδήλωση κυτταρικού θανάτου (Zipfel, 2008). Ωστόσο, η εμφάνιση του τελευταίου δεν αποτελεί αποκλειστικά αποτέλεσμα επιθέσεων παθογόνων αλλά και ποικίλων περιβαλλοντικών καταπονήσεων (Petrov *et al.*, 2015).

Κοινό σημείο στην εμφάνιση κυτταρικού θανάτου, ανεξάρτητα από την εναρκτήρια πηγή της καταπόνησης, αποτελεί η συσσώρευση και μη αποτελεσματική μείωση των ROS. Οι πηγές παραγωγής ROS είναι γνωστές. Οι NADPH οξειδάσες (ή RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGS, RBOH πρωτεΐνες) θεωρούνται ως η κύρια πηγή της αποπλαστικής ρίζας του υπεροξειδίου  $(O_2)$ , η οποία με τη δράση της δεσμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD) μετατρέπεται σε  $H_2O_2$ , σηματοδότη του κυτταρικού θανάτου (Overmyer et al., 2003). Τα μιτοχόνδρια αποτελούν άλλη μία σημαντική πηγή ROS και συστατικό της ρύθμισης του κυτταρικού θανάτου. Μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων μπορούν να μεταφερθούν ηλεκτρόνια σε μοριακό οξυγόνο, μετατρέποντάς το σε ρίζα Ο2 (Overmyer et al., 2003). Οι παραπάνω διεργασίες παραγωγής των ROS βρίσκονται σε ισορροπία υπό φυσιολογικές συνθήκες μέσω της επιστράτευσης ποικίλων αντιοξειδωτικών παραγόντων όπως το ασκορβικό οξύ (ASC), η τοκοφερόλη και η γλουταθειόνη (GSH) και διάφοροι ενζυμικοί παράγοντες (Jalmi & Sinha, 2015). Υπό την αντίληψη, όμως, ερεθισμάτων καταπόνησης, οι πρώτες μεταβολές που συμβαίνουν στα κύτταρα, αφορούν μεταβολές στην ισορροπία των ROS.

Τα ROS είναι σημαντικοί παράγοντες στη σηματοδότηση της άμυνας έναντι αβιοτικών και βιοτικών καταπονήσεων και υπάρχουν ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια τόσο προστατευτικά όσο και ζημιογόνα για το φυτό, που ενεργοποιούνται από τα ROS (Li *et al.*, 2017). Πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες (AS1, MYB30, MYC2, WRKY70), ρυθμιστές ορμονών (AXR1, ERA1, SID2, EDS1, SGT1b) και ρυθμιστές του κυτταρικού θανάτου (RCD1, DND1) ρυθμίζονται στον H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>επαγόμενο κυτταρικό θάνατο (Kaurilind *et al.*, 2015). Ωστόσο, παρά τη διαπιστωμένη σχέση τους στην επαγωγή του κυτταρικού θανάτου, ο τρόπος με τον οποίο αυτά ενεργοποιούν τις αμυντικές αποκρίσεις που τελικά οδηγούν στην εκδήλωσή του, καθώς και η δόμηση των σηματοδοτικών μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν, δεν έχουν ακόμη διαλευκανθεί πλήρως (Jalmi & Sinha, 2015). Οι πληροφορίες για τη σηματοδοτική ρύθμιση του ROS-εξαρτώμενου κυτταρικού θανάτου αφορούν κυρίως φυτικές ορμόνες καθώς και τα MAPK (Mitogen – activated protein kinases) μονοπάτια.

Όσον αφορά τις ορμόνες ΕΤ, SA και JA, αυτές συνδέονται σημαντικά στον ROS-εξαρτώμενο κυτταρικό θάνατο. Τα ορμονικά σηματοδοτικά μονοπάτια δεν λειτουργούν ανεξάρτητα αλλά συνδέονται σε ένα πολύπλοκο δίκτυο αλληλεπιδράσεων (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Ορμονική ρύθμιση του οξειδωτικού κυτταρικού θανάτου. Η αυξημένη συσσώρευση ROS παράλληλα με το SA επάγουν τον κυτταρικό θάνατο. Το ET απαιτείται για την ενίσχυση της παραγωγής των ROS, οδηγώντας σε έναν θετικό κύκλο ανατροφοδότησης (+) που προωθεί την εξάπλωση της κυτταρικής βλάβης. Η αυξημένη συσσώρευση JA δρα ως αρνητικός ρυθμιστής του οξειδωτικού κυτταρικού θανάτου και μπορεί να ξεπεράσει την ικανότητα του ET να παράγει ROS, με αποτέλεσμα τον περιορισμό της εξάπλωσης της κυτταρικής βλάβης (Πηγή: Overmyer et al., 2003)

Το SA και τα ROS βρίσκονται σε έναν θετικό βρόχο ανατροφοδότησης που ενισχύει τη σηματοδότηση, η οποία οδηγεί σε αμυντικές αποκρίσεις και τελικά στον κυτταρικό θάνατο (Draper, 1997, Van Camp *et al.*, 1998). Το ET απαιτείται για την ενίσχυση της παραγωγής ROS, η οποία έχει ως αποτέλεσμα έναν θετικό κύκλο τροφοδότησης που προωθεί την εξάπλωση του κυτταρικού θανάτου (**Εικόνα 6**). Πειραματικά, εξωγενής χορήγηση ET κατά τη διάρκεια κυτταρικού θανάτου είχε ως αποτέλεσμα την εξάπλωση αυτού και την αύξηση της παραγωγής O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Overmyer *et al.*, 2000). Επιπλέον, τα μεταλλάγματα *eto1* και *eto3* για την υπερπαραγωγή ET επέδειξαν αυξημένο ROS-εξαρτώμενο κυτταρικό θάνατο (Rao *et al.*, 2002). Τέλος, το JA, αντίθετα με τα προηγούμενα, θεωρείται ότι εμπλέκεται στον περιορισμό της εξάπλωσης του ROS-εξαρτώμενου κυτταρικού θανάτου (Overmyer *et al.*, 2000, Turner *et al.*, 2002, Van Wees & Glazebrook, 2003 (**Εικόνα 6**). Βέβαια, υπό συνθήκες στρες, παράγονται παράγωγα του JA όπως το MeJA (methyl jasmonate), τα οποία ενεργοποιούν τον κυτταρικό θάνατο επάγοντας τη δημιουργία ROS, μεταβολές στο δυναμικό των μιτοχονδρίων και κατάρρευση της φωτοσύνθεσης (Zhang & Xing, 2008). Όλες αυτές οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φυτοορμονών και των ROS υποδεικνύουν την περιπλοκότητα της ρύθμισης του κυτταρικού θανάτου.

Τα ΜΑΡΚ μονοπάτια αποτελούν άλλη μία σημαντική περίπτωση που δρα στη μετάδοση των ερεθισμάτων καταπόνησης. Έχει βρεθεί πως μπορούν να δρουν τόσο καθοδικά όσο και ανοδικά των ROS (Asai et al., 2002) αλλά ο ακριβής μηχανισμός πίσω από την ενεργοποίηση συγκεκριμένων ΜΑΡΚ μονοπατιών από τα ROS υπό συγκεκριμένες καταπονήσεις, δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος (Jalmi & Sinha, 2016) (Εικόνα 7). Υπό την αντίληψη ερεθισμάτων διαφόρων τύπων καταπονήσεων, οι ΜΑΡΚς δρουν στις RBOH πρωτεΐνες οδηγώντας στην παραγωγή ROS (Asai et al., 2008). Μέχρι στιγμής τα μονοπάτια ΜΑΡΚ που είναι γνωστά για τη ρύθμιση της RBOH-μεσολαβούμενης οξειδωτικής έκρηξης είναι τα NPKI1-MEK1-NTF6 και MEK2-SIPK και δρουν ανοδικά των ROS (Asai et al., 2008). Από την άλλη τα μονοπάτια ΜΕΚΚ1-ΜΚΚ2-ΜΡΚ4/6 είναι ένα παράδειγμα ΜΑΡΚ μονοπατιού που δρα καθοδικά της παραγωγής τους και συμμετέχουν στη σηματοδότηση βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων (Teige et al., 2004, Pitzschke et al., 2009, Furuya et al., 2014). Οι Jalmi και Sinha (2016) σε ανασκόπησή τους, αναφέρουν πολλές περιπτώσεις μονοπατιών ΜΑΡΚ που δρουν σε διαφορετικών τύπων καταπονήσεις είτε ανοδικά είτε καθοδικά των ROS. Έρευνες προτείνουν ότι η εξειδίκευση της απόκρισης σε κάθε καταπόνηση μπορεί να οφείλεται στον τύπο των ROS που παράγονται από διαφορετικές Rboh ισομορφές, στα επίπεδά τους, στο σημείο παραγωγής και δράσης τους, τη διάχυσή τους και το χρόνο ημιζωής (Gupta, 2010, Tripathy & Oelmuller, 2012).

Γενικότερα, γίνεται αντιληπτό ότι τα ROS ρυθμίζουν ένα πολύπλοκο δίκτυο μεταγωγής σημάτων στην απόκριση των φυτών σε βιοτικές και περιβαλλοντικές καταπονήσεις, οδηγώντας στην εκδήλωση του κυτταρικού θανάτου. Παρ' όλα αυτά, οι συγκεκριμένοι μηχανισμοί με τους οποίους τον επιτυγχάνουν και η δόμηση των σηματοδοτικών μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν, απαιτούν επιπλέον διερεύνηση.



Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση της ROS-εξαρτώμενης ρύθμισης των MAPK σηματοδοτικών μονοπατιών υπό συνθήκες βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων. Τα ROS είναι ένα κοινό παραγόμενο σήμα στην απόκριση και των δύο τύπων καταπονήσεων, δρώντας είτε ανοδικά είτε καθοδικά των MAPK μονοπατιών. Παρά το γεγονός ότι αποτελεί ένα συνήθη ρυθμιστή της MAPK σηματοδότησης, η απόκριση των φυτών φαίνεται να είναι διαφορετική μεταξύ των δύο καταπονήσεων. Το μωβ και το πράσινο χρώμα αναπαριστούν τη βιοτική και την αβιοτική καταπόνηση, αντιστοίχως. (Πηγή: Jalmi & Sinha, 2015)

#### 1.4 Σκοπός του πειράματος

Το μετάλλαγμα mosaic, προϊόν EMS μεταλλαξιγένεσης του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας, εμφανίζει ένα ιδιόρρυθμο αναπτυξιακό και χλωρωτικό πρότυπο. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί σημαντικά μεγαλύτερη καθυστέρηση στην ανάπτυξή του συγκριτικά με φυτά αγρίου τύπου ενώ φαινοτυπικά εμφανίζει έντονη χλώρωση, ξεκινώντας από την κεντρική νεύρωση των παλαιότερων φύλλων της ροζέτας, η οποία σταδιακά επεκτείνεται σε όλο το έλασμα. Μοριακή χαρτογράφηση της μετάλλαξης με τη χρήση μοριακών δεικτών έχει οδηγήσει σε έναν γενετικό τόπο 64kb, αποτελούμενο από 14 γονίδια. Στην πλειοψηφία τους τα γονίδια σχετίζονται με καταπονήσεις και αμυντικούς μηχανισμούς που έχουν σαν κοινό παρανομαστή την ομοιόσταση των ROS. Έτσι διατυπώθηκε η υπόθεση ότι ο φαινότυπος της μετάλλαξης mosaic οφείλεται στην μόνιμη ενεργοποίηση ενός αμυντικού μηχανισμού ή στην διαταραχή των ROS με αποτέλεσμα την χλώρωση και τον κυτταρικό θάνατο.

Σκοπό της παρούσας πειραματικής μελέτης αποτέλεσε η ταυτοποίηση του υπεύθυνου γονιδίου για την μετάλλαξη mosaic του φυτού A. thaliana. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού, αρχικά θα επιλεχθούν τα υποψήφια προς μελέτη γονίδια βάσει δεδομένων μικροσυστοιχιών για την έκφρασή τους τόσο ιστοειδικά (και συγκεκριμένα στα φύλλα) όσο και υπό συνθήκες καταπονήσεων. Ακολούθως, θα δημιουργηθούν κατασκευές με κλωνοποίηση των ενθέτων-γονιδίων σε πλασμιδιακό φορέα προκειμένου να σταλούν για αλληλούχιση και τελικά να εντοπιστεί το γονίδιο και η θέση της μετάλλαξης. Μετά την ταυτοποίηση της μετάλλαξης θα ακολουθήσει ανασκόπηση σχετικά με τη λειτουργία του γονιδίου και τον πιθανό του ρόλο στην ανάπτυξη του φυτού.

# 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 2.1 Φυτικό υλικό

Ως φυτικό υλικό για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν φυτά Arabidopsis thaliana (οικότυπος Columbia (Col-O N1093) και μεταλλάγματα mosaic, τα οποία είναι αποτέλεσμα EMS μεταλλαξιγένεσης σε φυτά με υπόβαθρο Col-O), της οικογένειας των Σταυρανθών (Brassicaceae).

### 2.2 Προετοιμασία και συνθήκες ανάπτυξης Arabidopsis thaliana

Πριν την ανάπτυξη, πραγματοποιείται ενυδάτωση των σπερμάτων και παραμένουν στους 4°C για διάρκεια τουλάχιστον 24 ωρών, ώστε να διακοπεί ο λήθαργος και να επιτευχθεί συγχρονισμένη βλάστηση του πληθυσμού. Ακολούθως, πραγματοποιείται απολύμανση των σπερμάτων σε θάλαμο νηματικής ροής για την εξασφάλιση ασηπτικών συνθηκών, ως εξής:

- Τα σπέρματα απολυμαίνονται σε 20% διάλυμα χλωρίνης, 0,01% Triton X-100 σε δύο επαναλήψεις των 2 λεπτών.
- Ακολουθούν 5 διαδοχικές εκπλύσεις των σπερμάτων με αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O, ώστε να αραιωθεί και σταδιακά να απομακρυνθεί πλήρως το διάλυμα χλωρίνης.
- Τα σπέρματα επιστρώνονται στη σειρά σε τρυβλία, παρουσία κατάλληλου θρεπτικού μέσου 1/2MS.
- Τα τρυβλία ασφαλίζονται με parafilm και τοποθετούνται σε θάλαμο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22°C, φωτοπερίοδος 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι, σχετική υγρασία ~50%).

Μετά την πάροδο 3-5 ημερών περίπου, τα σπέρματα βλαστάνουν, με την εβρυακή ρίζα να γίνεται αρχικά εμφανής και την έκπτυξη των κοτυληδόνων να ακολουθεί. Σε διάστημα περίπου 2 εβδομάδων και υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, τα φυτά έχουν αναπτύξει τον κορυφαίο βλαστό. Τότε, μεταφυτεύονται σε γλαστράκια με χώμα, τοποθετούνται στον ίδιο θάλαμο ανάπτυξης και παραμένουν εκεί μέχρι την ολοκλήρωση του βιολογικού τους κύκλου. Επισημαίνεται ότι τις πρώτες ημέρες μετά την μεταφύτευση, τα φυτά παραμένουν καλυμμένα με διάφανο υλικό ούτως ώστε να διατηρούνται σε περιβάλλον υψηλής σχετικής υγρασίας προκειμένου να ανταπεξέλθουν της μεταφυτευτικής καταπόνησης.

### 2.3 Πρωτόκολλο απομόνωσης γονιδιωματικού DNA από φυτά Arabidopsis

Για την απομόνωση γονιδιωματικού DNA από φυτό Arabidopsis, εφαρμόζεται το πρωτόκολλο CTAB DNA miniprep του Clark (2009). Πρωτού ξεκινήσει η απομόνωση, προθερμαίνεται το ρυθμιστικό διάλυμα CTAB στους 65°C. Εν συνεχεία, φρέσκο φυτικό υλικό συλλέγεται και ομογενοποιείται παρουσία υγρού αζώτου με κατάλληλο γουδί λειοτρίβησης. Έπειτα, ξεκινά το πρωτόκολλο απομόνωσης ως εξής:

- Μεταφορά του ομογενοποιημένου δείγματος σε φιαλίδιο eppendorf των 1,5ml.
- Προσθήκη ενός όγκου (200μl) ζεστού CTAB και τοποθέτηση των φιαλιδίων eppendorf σε υδατόλουτρο στους 65°C για 20-30 λεπτά.
- Προσθήκη ίσου όγκου SEVAG [χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (24:1)] και έντονη ανάδευση του μείγματος 2 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό.
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρό φιαλίδιο eppendorf.
- Προσθήκη 0,7 του όγκου (140μl) ισοπροπανόλης, ανάδευση με το χέρι και παραμονή του δείγματος σε ηρεμία για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση του δείγματος για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στις
   13.000 στροφές/λεπτό.
- Ξέπλυμα του ιζήματος με προσθήκη 0,5ml 70% κρύας αιθανόλης.
- Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό.
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 50μl αποστειρωμένο ddH₂O.

## 2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR είναι μια κλασική τεχνική της μοριακής βιολογίας κι ένας απλός τρόπος *in vitro* πολλαπλασιασμού συγκεκριμένων τμημάτων του αρχικώς χρησιμοποιούμενου γενετικού υλικού παράγοντας εξαιρετικά μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Με αυτόν τον τρόπο η PCR καθιστά εφικτή την περαιτέρω μελέτη του ενισχυόμενου τμήματος DNA με διάφορες μεθόδους, όπως η αλληλούχηση, η πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, η ηλεκτροφόρηση κ.ά.

Η αντίδραση πραγματοποιείται εντός ενός θερμοκυκλοποιητή (thermocycler), ο οποίος έχει την ικανότητα να αυξομειώνει τη θερμοκρασία με μεγάλη ταχύτητα, ακολουθώντας συγκεκριμένα και προγραμματισμένα στάδια, τα οποία ορίζονται βάσει των χαρακτηριστικών του ενισχυόμενου τμήματος και της πολυμεράσης που χρησιμοποιείται (Πίνακας 3). Ένα γενικό πρωτόκολλο αντίδρασης

PCR παρουσιάζεται στον Πίνακα 4. Καθένα από τα συστατικά της αντίδρασης προστίθεται εντός φιαλιδίων PCR χωρητικότητας 0,2ml.

Με το πέρας των PCR αντιδράσεων ακολουθεί η ανάλυσή τους σε πηκτή αγαρόζης 0,8%-3%, ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA και το διαχωρισμό που χρειάζεται να επιτευχθεί.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR, των οποίων τα προϊόντα προορίζονται για κλωνοποιήσεις, σχεδιάστηκαν με θέση αναγνώρισης ενζύμου περιορισμού στο 5' άκρο, η οποία διευκολύνει τη διαδικασία υποκλωνοποίησης του τμήματος σε άλλος φορείς. Η θέση αναγνώρισης επιλέχθηκε ώστε να είναι μοναδική τόσο εντός του επιθυμητού προς κλωνοποίηση τμήματος DNA όσο και σε άλλους φορείς.

#### Πίνακας 3. Τα στάδια-θερμοκύκλοι της αντίδρασης PCR.

Βήμα	Διαδικασία			
1	Αποδιάταξη του DNA εκμαγείου για 2 λεπτά στους 94°C			
2	Αποδιάταξη στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα			
3	Υβριδισμός εκκινητών στους x°C [αντίστοιχο Tm <sup>(1)</sup> ] για 30 δευτερόλεπτα			
4	Επιμήκυνση στους 72°C για x <sup>(2)</sup> δευτερόλεπτα			
5 <sup>(*)</sup>	Επιστροφή στο βήμα 2, x φορές			
6	Τελική επιμήκυνση προϊόντος στους 72°C για 10 λεπτά			
7	Διατήρηση στους 10°C για 5 λεπτά			
8	Τέλος			

<sup>(\*)</sup> Στο βήμα 5 ορίζεται ο αριθμός των θερμοκύκλων, δηλαδή ο αριθμός των επαναλήψεων των βημάτων 2-4 της αντίδρασης. Ο αριθμός των κύκλων ορίζεται κάθε φορά βάσει της επιθυμητής ποσότητας αντιγράφων και του επιπέδου πολυπλοκότητας του DNA. Συνήθως οι κύκλοι κυμαίνονται μεταξύ 25-35.

<sup>(1)</sup>Η θερμοκρασία υβριδισμού (annealing) εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης (melting temperature, Tm) των εκκινητών. Το Tm κάθε εκκινητή υπολογίζεται βάσει του τύπου: 69,3 + 0,41\*GC% - (650/αριθμός βάσεων εκκινητή). Συνήθως η θερμοκρασία υβριδισμού ορίζεται 2-3 βαθμούς χαμηλότερα από το μικρότερο Tm.
<sup>(2)</sup> Ο χρόνος επιμήκυνσης (extension) εξαρτάται από το μέγεθος του προς ενίσχυση τμήματος DNA και από την ταχύτητα πολυμερισμού της DNA πολυμεράσης που χρησιμοποιείται.

#### Πίνακας 4. Ένα τυπικό πρωτόκολλο αντίδρασης PCR.

Συστατικά Αντίδρασης	Πυκνό Διάλυμα	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση	
DNA εκμαγείο <sup>(1)</sup>	-	x μl	x ng	
Ρυθμιστικό Διάλυμα ενζύμου PCR <sup>(2)</sup>	5X	10 µl	1X	
dNTPs	2mM	5 μl	200 µM	
Ορθός εκκινητής	ЗμМ	5 μl	300 nM	
Ανάστροφος εκκινητής	ЗμМ	5 μl	300 nM	
DNA Πολυμεράση <sup>(3)</sup>	x units/µl	x μl	x units	
ddH2O	-	Έως τα 50 μΙ	-	
Τελικός Όγκος Αντίδρασης 50μΙ				

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

<sup>(2)</sup> Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το KAPA HiFi GC Buffer (5X) MgCl<sub>2</sub> (25mM) της KAPABIOSYSTEMS.

<sup>(3)</sup> Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η KAPA HiFi DNA Polymerase (KK2101) της KAPABIOSYSTEMS. Η πολυμεράση αυτή παρέχει σημαντική βελτίωση της παραγόμενης ποσότητας του προϊόντος, της ταχύτητας πολυμερισμού και της ικανότητας επιδιόρθωσης λαθών (proof-reading) κατά την PCR.

#### 2.5 Ανάλυση δεσοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA)

Για την ανάλυση κλασμάτων νουκλεϊνικών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών διαμορφώσεων πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης αποτελεί μέθοδο διαχωρισμού, ταυτοποίησης και απομόνωσης νουκλεϊνικών οξέων (DNA, RNA) βάσει μεγέθους, ηλεκτρικού φορτίου και άλλων φυσικών ιδιοτήτων τους. Τα μόρια των νουκλεϊνικών οξέων διέρχονται μέσα από το πήκτωμα λόγω εφαρμογής ηλεκτρικού ρεύματος. Τα νουκλεϊνικά οξέα όντας μόρια αρνητικά φορτισμένα, μετακινούνται προς τον θετικό πόλο, με ταχύτητα ανάλογη του δυναμικού του ηλεκτρικού πεδίου και αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογαρίθμου του μοριακού μεγέθους τους. Η πηκτή αγαρόζης αποτελείται από πολυμερή αγαρόζης, τα οποία σχηματίζουν ένα τρισδιάστατο πλέγμα πόρων. Η περιεκτικότητα της πηκτής σε αγαρόζη και κατ' επέκταση το μέγεθος των πόρων, εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν. Όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθός τους, τόσο μεγαλύτερο επιβάλλεται να είναι το μέγεθος των πόρων. Συνήθως, χρησιμοποιείται πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης από 0,8% ως 4% w/v.

Τα κλάσματα των νουκλεϊνικών οξέων γίνονται ορατά στην πηκτή αγαρόζης με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), μίας χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων και έχει την ιδιότητα να φθορίζει παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Η διακριτική ικανότητα του βρωμιούχου αιθιδίου είναι της τάξεως 5ng DNA ανά ζώνη.

### 2.5.1 Διαδικασία παρασκευής πηκτής αγαρόζης

- Σύγισμα κατάλληλης ποσότητας αγαρόζης και προσθήκη σε κωνική φιάλη που περιέχει τον κατάλληλο όγκο  $ddH_2O$ .
- Θέρμανση του μείγματος σε φούρνο μικροκυμάτων με ενδιάμεση τακτική ανάδευση, μέχρις ότου ομογενοποιηθεί και καταστεί διαυγές.
- Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας 50Χ ΤΑΕ (2ml ανά 100ml πηκτής) με τελική συγκέντρωση 1Χ ΤΑΕ.
- Προσθήκη διαλύματος EtBr τελικής συγκέντρωσης 0,005% v/v (5μl ανά 100ml πηκτής).
- Τοποθέτηση της πηκτής σε κατάλληλο δοχείο συσκευής ηλεκτροφόρησης με την ανάλογη «χτένα» και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου στερεποιηθεί.
- Αφαίρεση της «χτένας» από την πηκτή μετά τη στερεοποίησή της και τοποθέτηση του δοχείου με την πηκτή εντός συσκευής ηλεκτροφόρησης, η οποία περιέχει κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1X TAE-0,005% EtBr.

### 2.5.2 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

- Ανάμειξη μιας ποσότητας από τα προς ανάλυση δείγματα με 2μl από διάλυμα μπλε χρωστικής (loading dye).
- Τοποθέτηση των δειγμάτων στις ειδικές θέσεις της πηκτής (πηγάδια), που σχηματίστηκαν από την αφαίρεση της «χτένας» και εφαρμογή ηλεκτροφόρησης παρουσία συνεχούς τάσης 50-120V, η οποία ποικίλλει ανάλογα με την επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού, το μέγεθος της συσκευής ηλεκτροφόρησης και την περιεκτικότητα της πηκτής σε αγαρόζη.
- Η απεικόνιση της ανάλυσης των νουκλεϊνικών οξέων πραγματοποείται σε ειδικό θάλαμο (Gel Doc 1000 της εταιρείας BIORAD) που περιέχει τράπεζα

υπεριώδους ακτινοβολιας (UV) και η αποτύπωση της εικόνας της πηκτής λαμβάνεται με κάμερα **Nikon D5200**, προσαρμοσμένη στον θάλαμο και συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Η αξιολόγηση των μοριακών μεγεθών των κλασμάτων DNA γίνεται μέσω της σύγκρισης του μετώπου ανάλυσης των δειγμάτων με το μέτωπο ανάλυσης ενός κλιμακούμενο δείκτη γνωστών μοριακών μεγεθών. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο μοριακός δείκτης **1kb Opti-DNA Marker** (**#G106**) της εταιρείας **Applied Biological Materials Inc**. Η κλίμακα του δείκτη, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 8**, αποτελείται από 19 θραύσματα DNA γνωστού μοριακού μεγέθους, τρία εκ των οποίων αποτελούν θραύσματα αναφοράς (στα 500, 1500 και 3000 ζ.β.) για εύκολο προσανατολισμό.



#### 1kb Opti-DNA Marker

Εικόνα 8. Ο μοριακός δείκτης 1kb Opti-DNA Marker (#G106) της εταιρείας Applied Biological Materials Inc.

#### 2.6 Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης

- Ανάλογα με το μέγεθος του προς απομόνωση κλάσματος DNA, προετοιμάζεται πηκτή αγαρόζης επιθυμητής συγκέντρωσης.
- Το δείγμα αναλύεται με ηλεκτροφόρηση με εφαρμογή τάσης πολύ χαμηλής ισχύος. Εφόσον ο διαχωρισμός του κλάσματος, που πρόκειται να

απομονωθεί από τα υπόλοιπα, είναι ικανοποιητικός, αποκόπτεται η ζώνη που το περικλείει με τη βοήθεια κοπιδιού.

- Το κομμάτι της πηκτής που φέρει το επιθυμητό τμήμα DNA, τοποθετείται σε φιαλίδιο eppendorf 1,5ml.
- Ev συνεχεία τοποθετείται στους -80°C για 15 λεπτά ή overnight.
- Ακολουθεί απομόνωση και καθαρισμός του επιθυμητού κλάσματος DNA από την πηκτή αγαρόζης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit της εταιρείας Macherey-Nagel.
- Το κλάσμα μετά τον καθαρισμό εκλούεται σε 15-30μl ddH<sub>2</sub>O. Ο όγκος του νερού εξαρτάται από την ένταση της μπάντας που αποκόπηκε από την πηκτή και από το πόσο συγκεντρωμένη επιθυμούμε να την έχουμε. Το κλάσμα DNA αποθηκεύεται στους -20°C.

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

Προκειμένου το επιθυμητό τμήμα DNA να κλωνοποιηθεί σε πλασμιδιακό φορέα, ο φορέας υφίσταται αρχικά πέψη με κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, ώστε να γραμμικοποιηθεί και να αποκτήσει τα κατάλληλα άκρα, κολλώδη (cohesive) ή τυφλά (blunt). Αντιστοίχως, το τμήμα DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί είτε έχει ενισχυθεί μέσω PCR με DNA πολυμεράση που δημιουργεί κατάλληλα άκρα για κλωνοποίηση είτε έχει κοπεί με τις ίδιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες όπως ο φορέας. Τόσο ο φορέας όσο και το εισερχόμενο τμήμα DNA, έχουν απομονωθεί και καθαριστεί από πηκτή αγαρόζης. Όντας πλέον γραμμικά και καθαρισμένα και τα δύο μόρια DNA, μπορούν να ενωθούν στα άκρα τους με μια διαδικασία γνωστή ως λιγοποίηση (ligation).

Η λιγοποίηση καταλύεται από το ένζυμο T4 DNA λιγάση, που έχει απομονωθεί από τον T4 βακτηριοφάγο. Η T4 DNA λιγάση καταλύει τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ του 3'-OH και του 5'-P για την ένωση των δύο γραμμικών αλυσίδων DNA. Το ένζυμο είναι ικανό να ενώνει τόσο κολλώδη όσο και τυφλά άκρα. Μια τυπική αντίδραση λιγοποίησης άκρων DNA περιγράφεται ακολούθως στον Πίνακα 5 και έχει ως εξής:

- Σε φιαλίδιο eppendorf τοποθετημένο στον πάγο, προσθήκη κατάλληλης ποσότητας DNA από τον πλασμιδιακό φορέα και από το ένθετο. Ο όγκος αυτών των δύο θα πρέπει να ανέρχεται το πολύ στο 50% του συνολικού όγκου της αντίδρασης.
- Προσθήκη 2μl 10Χ ρυθμιστικού διαλύματος Τ4 της αντίδρασης.
- Προσθήκη 1μl DNA Τ4 λιγάσης (0,1U/μl, NEBiolabs).
- Ανάμειξη του δείγματος και επώασή του στους 16°C για 4 ώρες (overday) ή 16 ώρες (overnight).

Πίνακας 5. Τυπικό πρωτόκολλο αντίδρασης λιγοποίησης άκρων DNA.

Συστατικά	Stock Διάλυμα	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση	
Πλασμιδιακός Φορέας <sup>(1)</sup>	-	x μl	20-100ng	
DNA ένθετο <sup>(2)</sup>	-	x μl	1:1 έως 5:1 molar ratio over vector	
Ρυθμιστικό διάλυμα T4 DNA λιγάσης <sup>(3)</sup>	10X	2μΙ	1X	
PEG 4000(4)	50%	2μΙ	5%	
T4 DNA λιγάση <sup>(5)</sup>	X Weiss U/μl	x μl	1-5 Weiss U	
ddH₂O	- Έως τα 20μl -			
Συνολικός Όγκος Αντίδρασης 20μΙ				

(1), (2) Καθώς η λιγάση αναγνωρίζει άκρα και όχι ποσότητα DNA, χρειάζεται να υπολογιστεί σωστά η αναλογία των άκρων του ένθετου DNA προς τα άκρα του πλασμιδιακού φορέα. Συνηθέστερα, χρησιμοποιείται αναλογία μορίων ένθετο(3):(1)πλασμιδιακός φορέας. Η ποσότητα σε ng που χρησιμοποιείται από κάθε τμήμα DNA υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

> ng of vector\*size of insert (kb) size of vector (kb) \* (insert : vector) molar ratio = ng of insert

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

(3) Η αρχική συγκέντρωση εξαρτάται από την εταιρεία που προμηθεύει το ένζυμο, με συνηθέστερη 10X ή 2X. Το ρυθμιστικό διάλυμα παρέχει στο ένζυμο το απαραίτητο ATP για να καταλύσει την αντίδραση. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα KAPA Ligase Buffer (10X)

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

(5) Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η T4 DNA Ligase (NEB #M0202)

#### 2.8 Βακτηριακά κύτταρα και μετασχηματισμός

#### 2.8.1 Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων Escherichia coli

Το βακτηριακό στέλεχος στο οποίο κλωνοποιήθηκαν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια είναι το *E. coli* DH5a. Το στέλεχος αυτό χρησιμοποιείται συνήθως για την κλωνοποίηση πλασμιδίων έχοντας υψηλή ικανότητα μετασχηματισμού (>1x10<sup>6</sup>

transformants/µg pUC19 DNA). Ο γενότυπος χαρακτηρίζεται από την έλλειψη Δ(lacZ)M15 που εκφράζει το καρβόξυ τµήµα της β-γαλακτοσιδάσης επιτρέποντας έτσι την α-συµπληρωµατικότητα µε το *lac* α τµήµα που κωδικοποείται από πολλούς πλασµιδιακούς φορείς. Με αυτόν τον τρόπο, είναι δυνατή η επιλογή µπλε/λευκών αποικιών. Ωστόσο, προκειµένου τα βακτηριακά κύτταρα να είναι ικανά να λάβουν στο εσωτερικό τους ξένο πλασµίδιο, προαπαιτείται µια διαδικασία µετά την οποία τα κύτταρα καθίστανται δεκτικά. Η διαδικασία της προετοιµασίας των δεκτικών κυττάρων έχει ως εξής:

- Ανάπτυξη μονής αποικίας κατάλληλου βακτηριακού στελέχους DH5a σε υγρό θρεπτικό μέσο LB για 12 ώρες στους 37°C.
- Μεταφορά 2ml από την αρχική καλλιέργεια σε κωνική φιάλη που περιέχει 200ml θρεπτικού μέσου LB. Ανάπτυξη της καλλιέργειας στους 37°C έως ότου η οπτική πυκνότητά της φτάσει O.D<sub>550</sub> =0,5.
- Τοποθέτηση της καλλιέργειας για 10 λεπτά στον πάγο και κατακρήμνιση των βακτηριακών κυττάρων με φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 5000 στροφές/λεπτό στους 4°C.
- Επαναιώρηση του βακτηριακού ιζήματος στον μισό όγκο της αρχικής καλλιέργειας με 25mM παγωμένο διάλυμα CaCl<sub>2</sub>.
- Επανάληψη της κατακρήμνισης κατά τον ίδιο τρόπο.
- Επαναιώρηση του βακτηριακού ιζήματος σε 75mM παγωμένου διαλύματος CaCl<sub>2</sub>, σε όγκο διαλύματος ίσο με το 1/15 του όγκου της αρχικής καλλιέργειας.
- Προσθήκη αποστειρωμένης γλυκερόλης με τελική συγκέντρωση 15% v/v. Πολύ καλή ανάμειξη του δείγματος.
- Μοίρασμα του μείγματος των δεκτικών κυττάρων σε φιαλίδια eppendorf και άμεση ψύξη σε υγρό άζωτο.
- Διατήρηση των "δεκτικών", πλέον, βακτηριακών κυττάρων, για μακρά χρονικά διαστήματα με την αποθήκευσή τους στους -80°C.

# 2.8.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων Escherichia coli με πλασμιδιακό DNA

Η διαδικασία μετασχηματισμού των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Προσθήκη 10-50 ng πλασμιδιακού DNA ή του μείγματος της λιγοποίησης, σε 200μl δεκτικών βακτηριακών κυττάρων DH5α.
- Ανάμειξη του δείγματος και επώαση στον πάγο για 30 λεπτά.

- Ακολουθεί θερμικό σοκ του δείγματος με επώαση για 2-3 λεπτά στους 42°-43°C.
- Προσθήκη 1,3 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB, ανάμειξη του δείγματος και επώαση για 1 ώρα στους 37°C.
- Φυγοκέντρηση του δείγματος για 30 δευτερόλεπτα στις 13.000 στροφές/λεπτό.
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναιώρηση του ιζήματος σε 100-200μl υγρού θρεπτικού μέσου LB.
- Επίστρωση του δείγματος σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό μέσο LB, που περιέχει κατάλληλο αντιβιοτικό ως μέσο επιλογής για τον εκάστοτε χρησιμοποιούμενο πλασμιδιακό φορέα. Σε περίπτωση χρήσης πλασμιδιακού φορέα που φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης υπάρχει δυνατότητα επιλογής μπλε/λευκών αποικιών. Για να επιτευχθεί αυτό, πριν την επίστρωση των βακτηριακών κυττάρων, επιστρώνονται πάνω στο στερεό θρεπτικό μέσο το χρωμοφόρο υπόστρωμα X-gal ο παράγοντας IPTG που δρα σαν επαγωγέας του υποκινητή του lacZ γονιδίου, σε τελικές συγκεντρώσεις 5x10<sup>-3</sup> και 50mM αντιστοίχως.
- Επώαση των τρυβλίων για 12-16 ώρες σε θάλαμο με 37°C.

## 2.9 Αποθήκευση μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα

- Ανάπτυξη μονής αποικίας βακτηριακού στελέχους *E.coli* σε υγρό θρεπτικό μέσο LB (παρουσία των κατάλληλων αντιβιοτικών) στους 37°C για 12 ώρες
- Μεταφορά 600μl από αυτή την καλλιέργεια σε φιαλίδιο eppendorf.
- 🖡 🛛 Προσθήκη 300μΙ γλυκερόλης 99%. Έντονη ανάμειξη του δείγματος.
- 🕨 Άμεση ψύξη του μείγματος κυττάρων-γλυκερόλης σε υγρό άζωτο.
- Αποθήκευση στους -80°C. Τα βακτήρια παραμένουν ζωντανά τουλάχιστον για 10 χρόνια.

## 2.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα

## 2.10.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης

- Καλλιέργεια μονής βακτηριακής αποικίας, που περιέχει το προς απομόνωση πλασμίδιο, σε υγρό θρεπτικό μέσο LB στους 37°C για 12 ώρες.
- Μεταφορά 1,5ml από αυτή την καλλιέργεια σε φιαλίδιο eppendorf και φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό.
- Επαναδιάλυση του βακτηριακού ιζήματος σε 200μl διαλύματος P1.

- Προσθήκη 200μΙ από το διάλυμα λύσης P2. Ακολουθεί πολύ ελαφριά ανακίνηση μέχρι το δείγμα να γίνει διαυγές και επώαση του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου το πολύ για 3 λεπτά.
- Προσθήκη 200μΙ διαλύματος 3M/5M CH<sub>3</sub>COOK κι εντονότερη ανάμειξη από το προηγούμενο βήμα, μέχρι την εμφάνιση λευκών κομματιών που υποδεικνύουν τη λύση των κυτταρικών μεμβρανών και άλλων παραπροϊόντων. Επώαση του δείγματος στον πάγο για 15 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση του δείγματος για 20 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό στους 4°C.
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρό φιαλίδιο eppendorf. Προσθήκη διπλάσιου όγκου αιθανόλης (μέχρι το χείλος). Ανάμειξη και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση του δείγματος για 15 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου και, αφού στεγνώσει το ίζημα, προσθήκη 40μl dH<sub>2</sub>O.
- Τοποθέτηση του δείγματος στον πάγο μέχρι να ενυδατωθεί το ίζημα και ενδιάμεσα, χτύπημα του φιαλιδίου με το χέρι ώστε να επαναδιαλυθεί.
- Ακολουθεί ελαφρύ vortex και στιγμιαία φυγοκέντρηση.
- Αποθήκευση στους -20°C.

#### 2.10.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με χρήση κολώνας

Περιπτώσεις όπως εκείνη της αντίδρασης αλληλούχισης (sequencing) απαιτούν χρήση πλασμιδιακού DNA υψηλής καθαρότητας. Γι αυτήν την περίπτωση η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του Nucleospin Plasmid EasyPure (DNA Purification Kit, Cat No: 740727.50) της εταιρείας Macherey-Nagel. Η τελική έκλουση του πλασμιδιακού DNA από την κολώνα γίνεται με αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O και η ποσότητα εξαρτάται από τη διαδικασία στην οποία πρόκειται να χρησιμοποιηθεί.

### 2.11 Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Μετά την κλωνοποίηση ενός τμήματος DNA σε βακτηριακό ξενιστή είναι αναγκαία η επιβεβαίωση της φοράς εισαγωγής του τμήματος στο φορέα. Η επιβεβαίωση αυτή προκύπτει έπειτα από τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών τύπου ΙΙ ή κοινώς ενζύμων περιορισμού. Η πλειονότητα των ενζύμων αυτών αναγνωρίζει μια παλίνδρομη ακολουθία μήκους 4-8 νουκλεοτιδίων στο DNA, του οποίου διακόπτουν τη συνέχειά του δημιουργώντας 5' ή 3' προεξέχοντα άκρα (κάθε συμπληρωματική αλυσίδα κόβεται σε διαφορετικό σημείο) ή τυφλά άκρα (οι αλυσίδες κόβονται στο ίδιο σημείο).

Μία τυπική αντίδραση πέψης σύμφωνα με τη ΝΕΒ παρουσιάζεται στον ακόλουθο Πίνακα 6 κι έχει ως εξής:

Συστατικά	Stock Διάλυμα	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση	
Πλασμιδιακός φορέας	-	x μl	1µg	
Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου <sup>(1)</sup>	10X	4μΙ	1X	
BSA <sup>(2)</sup>	10X	4µl	1X	
Ένζυμο περιορισμού <sup>(3)</sup>	x U/μl	0,8-1µl	10 units είναι ικανοποιητικά	
ddH₂O	-	Έως τα 40μΙ	-	
Τελικός όγκος αντίδρασης <sup>(4)</sup> 40μl				

#### Πίνακας 6. Γενικό πρωτόκολλο αντίδρασης πέψης.

<sup>(1)</sup>Κάθε ένζυμο περιορισμού έχει διαφορετικές απαιτήσεις σε ρυθμιστικό διάλυμα για να δράσει. Κάθε εταιρεία παρέχει δικά της ρυθμιστικά διαλύματα μαζί με τα ένζυμα.

<sup>(2)</sup>Αλβουμίνη ορού μόσχου: προστίθεται προαιρετικά όταν κρίνεται απαραίτητο για τη δράση του ενζύμου.

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

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

Προσθήκη, σε φιαλίδιο eppendorf κατάλληλου όγκου:

- ddH<sub>2</sub>O
- 1/10 του όγκου 10x του κατάλληλου κατά περίσταση ρυθμιστικού διαλύματος
- DNA
- Ενζύμου περιορισμού
- Καλή ανάμειξη του δείγματος (vortex) και spin και επώαση από 1-12 ώρες στους 37°C. Η άριστη θερμοκρασία δράσης διαφέρει μεταξύ των διαφόρων ενζύμων περιορισμού. Ωστόσο, η πλειονότητα αυτών λειτουργεί άριστα στους 37°C.
Μετά το πέρας του απαραίτητου χρονικού διαστήματος, τοποθέτηση του μείγματος της πέψης στον πάγο ώστε να ελαττωθεί σημαντικά η δράση του ενζύμου.

Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, τα ρυθμιστικά τους διαλύματα καθώς και λοιπά χαρακτηριστικά τους, παρουσιάζονται στον Πίνακα 7. Τα βέλη στις αλληλουχίες υποδηλώνουν το σημείο τομής τους από το εκάστοτε ένζυμο περιορισμού.

Πίνακας 7. Ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Αναγράφονται τα ρυθμιστικά διαλύματά τους, οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν, καθώς και οι συνθήκες επώασης των δειγμάτων που υποβλήθηκαν σε πέψη με το εκάστοτε ένζυμο.

Ένζυμο	Ρυθμιστικό διάλυμα	Αλληλουχία	Συνθήκες	
περιορισμού	····	αναγνώρισης	επώασης	
EcoRI (#R601A) Promega	Buffer H 10X (#R008A) + BSA (#R396E)	5′G <sup>▼</sup> AATT C3′ 3′C TTAA <sub>▲</sub> G5′	37°C, 1 ώρα	
HindIII (#R0104S)	1X NEBuffer™ 2.1	<b>5'A<sup>▼</sup>AGCT T3'</b>	37°C, 1 ώρα	
NEB	(#B7202S)	3'T TCGA <sub>▲</sub> A5'		
Kpnl (#R0142S)	1X NEBuffer™ 1.1	5′G GTAC <sup>▼</sup> C3′	37°C, 1 ώρα	
NEB	(#B7201S)	3′C <sub>▲</sub> CATG G5′		
Sall-HF(#R3138S)	1X CutSmart <sup>®</sup> Buffer	5′G <sup>▼</sup> TCGA C3′	37°C, 1 ώρα	
NEB	(#B7204S)	3′C AGCT <sub>▲</sub> G5′		
Xbal (#R0145S)	1X CutSmart <sup>®</sup> Buffer	5′T <sup>▼</sup> CTAG A3′	37°C, 1 ώρα	
NEB	(#B7204S)	3′A GATC <sub>▲</sub> T5′		
Xhol (#R0146S)	1X CutSmart <sup>®</sup> Buffer	5′C <sup>▼</sup> TCGAG3′	37°C, 1 ώρα	
NEB	(#B7204S)	3′GAGCT <sub>▲</sub> C5′		
BamHI (#R0136S)	1X CutSmart <sup>®</sup> Buffer	5′G <sup>▼</sup> GATC C3′	37°C, 1 ώρα	
NEB	(#B7204S)	3′C CTAG <sub>▲</sub> G5′		
Smal (#R0141S)	1X CutSmart <sup>®</sup> Buffer	5'CCC <sup>▼</sup> GGG3'	37°C, 1 ώρα	
NEB	(#B7204S)	3'GGG <sub>▲</sub> CCC5'		
Pstl (#R0140S)	1X CutSmart <sup>®</sup> Buffer	5'CTGCA <sup>▼</sup> G3'	37°C, 1 ώρα	
NEB	(#B7204S)	3'G <sub>▲</sub> ACGT G5'		

### 2.12 Σύσταση και παρασκευή διαλυμάτων και θρεπτικών μέσων ανάπτυξης

#### 2.12.1 Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης φυτών ½ MS

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα πειραματική μελέτη προετοιμάστηκε και αναπτύχθηκε υπό συγκεκριμένες σηπτικές συνθήκες, όπως αυτές περιγράφηκαν στην παράγραφο 2.2. Το θρεπτικό μέσο στο οποίο αναπτύχθηκαν τα φυτά ήταν ½ X MS (Murashige & Skoog, 1962, Duchefa Biochemie B.V.), επιστρωμένο σε τρυβλία petri. Η σύνθεσή του περιγράφεται ακολούθως στον Πίνακα 8:

Πίνακας 8. Σύσταση θρεπτικού μέσου ανάπτυξης φυτών ½ X MS (Murashige & Skoog).

Συστατικά	Ποσότητες (g/100ml)
MS <sup>(1)</sup> (including vitamins, DUCHEFA)	0,22
D- Sucrose <sup>(2)</sup>	1
MES – monohydrate <sup>(3)</sup>	0,05
Agarose/Phytagel <sup>(4)</sup>	0,6/0,3
ddH₂O	Έως τα 100ml

<sup>(1)</sup>MS: Μείγμα μικροστοιχείων, μακροστοιχείων και βιταμινών απαραίτητων για την ανάπτυξη των φυτών

<sup>(2)</sup>Σουκρόζη: Πηγή των απαραίτητων υδατανθράκων

<sup>(3)</sup>MES: Χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση του pH του θρεπτικού διαλύματος

<sup>(4)</sup>Αγαρόζη/Phytagel: Σταθεροποιητικό μέσο του υποστρώματος

Η τελική ρύθμιση της τιμής του pH του υποστρώματος σε τιμή 5,7 πραγματοποιείται με σταδιακή προσθήκη κατάλληλης ποσότητας KOH 1N και παράλληλη μέτρηση με pHμετρο, μετά την ομογενοποίηση των υπόλοιπων συστατικών, εξαιρουμένου του στερεοποιητικού μέσου. Έπειτα, ακολουθεί αποστείρωση του θρεπτικού μέσου σε θερμοκρασία 120°C και πίεση 1,5atm για περίπου 20 λεπτά. Όταν η θερμοκρασία του θρεπτικού μέσου πέσει και όσο παραμένει ακόμα υγρό, τοποθετείται σε τρυβλία petri σε απαγωγό νηματικής ροής για την εξασφάλιση ασηπτικών συνθηκών. Μετά την πήξη του θρεπτικού μέσου, τα τρυβλία φυλάσσονται στους 4°C για μελλοντική χρήση.

## 2.12.2 Διαλύματα προετοιμασίας, ανάπτυξης και επιλογής βακτηριακών κυττάρων Ε. coli DH5a

#### 2.12.2.1 Διαλύματα ανάπτυξης και επιλογής βακτηριακών κυττάρων Ε. Coli DH5a

Η σύσταση του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης των βακτηρίων LB (Lysogeny broth) περιγράφεται στον ακόλουθο Πίνακα 9 :

Πίνακας 9. Σύσταση θρεπτικού διαλύματος ανάπτυξης βακτηρίων LB (Lysogeny broth).

Συστατικά	Ποσότητες (w/v)
Εκχύλισμα ζύμης	0,5g
Πεπτόνη	1g
NaCl	1g
Άγαρ (μόνο για στερεό θρεπτικό μέσο)	1,4g
ddH₂O	Έως τα 100ml

Τα αντιβιοτικά και τα διαλύματα επιλογής των μετασχηματισμένων βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές διαδικασίες παρουσιάζονται παρακάτω. Όλα φυλάσσονται στους -20°C.

- X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside): 20mg/ml σε διμεθυλ-φορμαμίδιο (DMFO)
- **IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)**: 200mg/ml IPTG σε H<sub>2</sub>O
- Αμπικιλλίνη: 100mg/ml σε ddH<sub>2</sub>O
- **Καναμυκίνη**: 50mg/ml σε ddH<sub>2</sub>O

## 2.12.2.2 Διαλύματα προετοιμασίας δεκτικών βακτηριακών κυττάρων Ε. Coli DH5a

- **25mM CaCl2** σε 10mM Tris-HCL pH 8,0
- **75mM CaCl2** σε 10mM Tris-HCL pH 8,0 15% Glycerol
- LB υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης
- LB στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης

## 2.12.3 Διαλύματα απομόνωσης και ανάλυσης νουκλεινικών οξέων

## 2.12.3.1 Διαλύματα απομόνωσης γονιδιωματικού DNA

- RNA extraction buffer: 100mM Tris-HCl (pH 9,5), 0,5% SDS w/v
- Sevag: 24:1Χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη
- **Φαινόλη**: pH 8,0
- CTAB DNA Ρυθμιστικό διάλυμα απομόνωσης: 2% (w/v) CTAB, 100mM Tris pH 8,0, 20mM EDTA pH 8,0, 1,4M NaCl, 1% (w/v) PVP (πολυβινυλπυρρολιδόνη, M.B 40.000), 2% (w/v) CTAB

## 2.12.3.2 <u>Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής</u> <u>λύσης</u>

- P1 ρυθμιστικό διάλυμα επαναιώρησης: 50mM Tris-HCl pH 8,0, 10mM EDTA pH 8,0 και 100μg/ml RNάση
- P2 Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης: 0,2N NaOH, 1% (w/v) SDS 1% (w/v)
- 3M/5M CH3COOK: 60ml 5M οξικού καλίου pH 4,8-5,2 αναμειγνύονται με 11,5ml οξικού οξέος και 28,5ml ddH<sub>2</sub>O.
- **RΝάση**: Διάλυμα RΝάσης 10mg/ml σε 10mM Tris-HCl pH 7,4, 15mM NaCl. Βρασμός του διαλύματος για 15λεπτά. Διακοπή για 20 λεπτά και επανάληψη βρασμού, ώστε να καταστραφούν τα υπολείμματα DΝάσης. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

## 2.12.3.3 Διαλύματα ανάλυσης νουκλεινικών οξέων

## <u>Σύσταση πηκτής αγαρόζης Χ%</u>

- Χg αγαρόζης
- 2ml 1xTAE
- 5μl βρωμιούχου αιθιδίου
- 98ml ddH2O

Τελικός όγκος 100ml

## Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης

- 20ml 1xTAE
- 50μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr)
- 980ml ddH₂O

Τελικός όγκος 1000ml

**TAE (50X)**: 100ml/lt EDTA (0,5M, pH 8), 57ml/lt CH3COOH, 24,2gr (w/v) Tris base **EtBr**: 10mg/ml (φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο δοχείο σε θερμοκρασία δωματίου)

#### <u>Σύσταση μητρικού διαλύματος χρωστικών 6x (loading dye)</u>

- 0,25 % μπλε της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue)
- 0,25 % κυανολοξυλένιο (xylene cyanol FF)
- 🕨 40% σουκρόζη

## 2.13 Προγράμματα Βιοπληροφορικής και Βάσεις Δεδομένων

- Tair: <u>https://www.arabidopsis.org/</u>
- NCBI: <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</u>
- BLAST: <u>https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</u>
- eFPBrowser: http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi
- GENEVESTIGATOR: <u>https://genevestigator.com/gv/index.jsp</u>
- STRING: <u>https://string-db.org/</u>
- KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes): https://www.genome.jp/kegg/pathway.html

## 2.14 Λοιπά προγράμματα ανάλυσης αλληλουχιών

Ο γονιδιωματικοί χάρτες των υπό μελέτη γονιδίων δημιουργήθηκαν με το πρόγραμμα SeqBuilder version 7.0.0.43. Για τον έλεγχο όλων των αλληλουχιών των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα PrimerSelect version 7.0.0.0. Τα προαναφερθέντα προγράμματα ανήκουν στο πακέτο DNAstar Lasergene 7.0.0. Η πολλαπλή ευθυγράμμιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση των αποτελεσμάτων αλληλούχησης, πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα CLUSTALX 1.83. Τα αποτελέσματα αναρτήθηκαν σε μορφή GCG/MSF και αναλύθηκαν με το πρόγραμμα GeneDoc MFC Application version 2.6.0.2.

# . ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 Αξιολόγηση και επιλογή των υποψήφιων προς μελέτη γονιδίων

Δεδομένου του ότι η περιοχή της μετάλλαξης αποτελείται από 14 γονίδια, εφαρμόσθηκαν ορισμένα κριτήρια επιλογής προκειμένου να μειωθεί ο αριθμός όσον επρόκειτο να μελετηθούν. Τα κριτήρια αφορούσαν στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις αλλά και ιστοειδικά όσον αφορά τα φύλλα. Η επιλογή αυτών στηρίχθηκε: α) στο ότι φαινότυποι που χαρακτηρίζονται από χλώρωση ή καθυστερημένη ανάπτυξη έχουν παρατηρηθεί υπό συνθήκες βιοτικής και αβιοτικής καταπόνησης και β) στο ότι η χλώρωση του *mosaic* γίνεται εμφανής στα φύλλα.

Για τη διαλογή ανακτήθηκαν αποτελέσματα πειραμάτων μικροσυστοιχιών για τα επίπεδα έκφρασης των 14 γονιδίων της περιοχής, από την εφαρμογή **Genevestigator** και τη βάση δεδομένων **Arabidopsis eFP Browser**. Οι εικόνες των αποτελεσμάτων για την έκφραση σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις παρατίθενται στο **Παράρτημα B** και **Γ** αντίστοιχα ενώ για την έκφραση στα φύλλα στο **Παράρτημα Δ**. Εξετάζοντας ποια από τα 14 γονίδια εμφανίζουν τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης και στα τρία κριτήρια, δημιουργήθηκε ο ακόλουθος **Πίνακας 10**, που παρουσιάζει συνοπτικά τα αποτελέσματα της αξιολόγησης και επιλογής.

Γονίδιο	Βιοτική καταπόνηση + elicitors	Αβιοτική καταπόνηση	Φύλλα	Διαλογή	
At4g21380	+	+	+	Επιλογή	
At4g21390	+	+	+	Επιλογή	
At4g21400	+	+	+	Επιλογή	
At4g21410	+	+	+	Επιλογή	
At4g21420	-	-	-	Απόρριψη	
At4g21430	-	-	+	Απόρριψη	
At4g21440	+	+	+	Επιλογή	
At4g21450	-	+	+	Απόρριψη	
At4g21460	-	-	+	Απόρριψη	
At4g21470	+	+	+	Επιλογή	
At4g21480	-	-	-	Απόρριψη	
At4g21490	-	-	-	Απόρριψη	
At4g21500	+	+	-	Απόρριψη	
At4g21510	-	+	+	Απόρριψη	

Πίνακας 10. Πίνακας αξιολόγησης και επιλογής των υποψήφιων προς μελέτη γονιδίων.

#### At4g21380 (Receptor Kinase 3, RK3)

Το γονίδιο *At4g21380* κωδικοποιεί μία Receptor-like Kinase παρόμοια με την Receptor Kinase SFR2 κατά 81.5% των φυτών του γένους Brassica (Rocher *et al.*, 2005). Συγκεκριμένα, η εξελικτικά συντηρημένη περιοχή που μοιράζονται αποτελείται από ένα μοτίβο απαντώμενο στα γνωστά W-boxes, τα οποία δεσμεύουν μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας WRKY και μεσολαβούν στην μεταγραφική απόκριση έναντι παθογονικών elicitors (Eulgem *et al.*, 2000). Επιπλέον, οι Pastuglia *et al.* (2002) έδειξαν πως mRNA του *At4g21380* συσσωρεύονται ως απόκριση σε τραυματισμούς και μόλυνση από βακτήρια.

#### At4g21390 (B120)

Το At4g21390, το οποίο κωδικοποιεί κι αυτό για μία πρωτεϊνική κινάση, βρέθηκε να εκφράζεται ισχυρά σε πειράματα ανάλυσης μικροσυστοιχιών έπειτα από επίδραση του πεπτιδίου flg22 (Navarro et al., 2004). Αντίστοιχες μελέτες σχετικά με την επαγωγή σηματοδότησης τόσο σε βιοτική όσο και σε αβιοτική καταπόνηση εμφάνισαν αποτελέσματα υψηλής έκφρασης του γονιδίου, υποδεικνύοντας την εμπλοκή του σε μονοπάτια σηματοδότησης της άμυνας (Stanley Kim et al., 2005, Qutob et al., 2006, Benschop et al., 2007).

## At4g21400 [cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 28, CRK28] At4g21410 [cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 29, CRK29]

Και για το At4g21400 πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχα πειράματα μελέτης της επαγωγής της έκφρασής του υπό την αντίληψη του ολιγοπεπτιδίου flg22, με παρόμοια αποτελέσματα όπως αυτά του προηγούμενου γονιδίου (Navarro et al., 2004). Πιο πρόσφατη έρευνα, αυτή των Yadeta et al. (2017), κάνει λόγω περί άμεσης και ιδιαίτερα αυξημένης έκφρασης της κινάσης-υποδοχέα CRK28 -που κωδικοποιείται από το At4q21400- υπό την αντίληψη μοριακών προτύπων σχετιζόμενων με μικρόβια (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs) επιδεικνύοντας ανθεκτικότητα στο παθογόνο Pseudomonas syringae pv. tomato στέλεχος DC3000. Επιπλέον, έδειξαν πως αυτή η κινάση-υποδοχέας σχετίζεται με το σύμπλοκο υποδοχέων FLS2-BAK1 που αποτελεί κλειδί στην ενεργοποίηση της φυτικής ανοσίας, δηλώνοντας έτσι τη συμμετοχή του στην προώθηση της άμυνας. Οι Bourdais et al. (2015) σε έρευνα που περιελάμβανε φαινοτυπικό έλεγχο μεγάλης κλίμακας, κατέληξαν στο συμπέρασμα πως πολλές CRKs, εξ αυτών η CRK28 και η CRK29 που κωδικοποιείται από το At4g21410, διαδραματίζουν εξέχοντα ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης αλλά και της προσαρμογής στις καταπονήσεις, ιδιαίτερα στη σηματοδότηση που ενεργοποιούν τα ROS. Για το At4g21410 ιδιαίτερα, η έκφρασή του μελετήθηκε σε πειράματα εφαρμογής αμπσισικού οξέος (ABA) (Xin et

*al.*, 2005, Nemhauser *et al.*, 2006, Lumba *et al.*, 2014), φανερώνοντας τη συμμετοχή του στο μονοπάτι σηματοδότησης που επάγει το ABA, ορμόνη γνωστή για τη ρύθμιση που παρέχει σε πληθώρα αναπτυξιακών διαδικασιών και αποκρίσεων σε συνθήκες καταπόνησης.

#### At4g21440

Το At4g21440 έχει χαρακτηριστεί ως μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιείται κατά την άμυνα του φυτού ενάντια στο φυτοφάγο λεπιδόπτερο Pieris rapae (De Vos et al. 2006). Επιπλέον, πρόσφατη έρευνα (Zhu et al., 2018) υποδεικνύει ότι το γονίδιο λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της αντίστασης του φυτού Arabidopsis στην αφίδα Myzus persicae μέσω παρεμβολής του σε σηματοδοτικά μονοπάτια εξαρτώμενα από τα ενδογενή επίπεδα αιθυλενίου, των οποίων φάνηκε ότι προάγει τη συσσώρευσή τους.

### At4g21470 (riboflavin kinase/FMN hydrolase, FMN/FHY)

Το At4g21470 κωδικοποιεί για ένα διλειτουργικό ένζυμο του μονοπατιού βιοσύνθεσης της ριβοφλαβίνης (Sandoval & Roje, 2005) ωστόσο δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές που να περιγράφουν κάποιο μετάλλαγμα του γονιδίου ή το ρόλο του στην ανάπτυξη του φυτού. Υπάρχει όμως μια σειρά από αναφορές που σχετίζουν τη ριβοφλαβίνη και τα παράγωγά της (FMN και FAD) με την άμυνα των φυτών και ειδικότερα στην ενεργοποίηση της αμυντικής σηματοδότησης μέσω ενεργοποίησης της οξειδωτικής έκρηξης και των MAPK μονοπατιών (Dong & Beer, 2000, Xiao *et al.*, 2004, Taheri & Hofte, 2006, Zhang *et al.*, 2009, Asai *et al.*, 2010, Taheri & Tarighi, 2010, Deng *et al.*, 2011, Nie & Xu, 2016).

## 3.2 Κλωνοποίηση τμημάτων των γονιδίων mosaic για αλληλούχιση

Για την ταυτοποίηση της μετάλλαξης mosaic, σχεδιάστηκαν κατασκευές, με βασικό κορμό τη γονιδιωματική ακολουθία των έξι υποψήφιων γονιδίων, όπως αυτή αναγράφεται στη βάση δεδομένων TAIR, σε σύντηξη με τον πλασμιδιακό φορέα pUC19. Η στρατηγική κλωνοποίησης των γονιδίων που ακολουθήθηκε για τη δημιουργία των προς αλληλούχιση κατασκευών, ήταν κοινή για όλες τις κατασκευές. Αρχικά, η εκάστοτε επιθυμητή γονιδιωματική περιοχή ενισχύθηκε μέσω PCR από συγκεκριμένα ζεύγη εκκινητών (Παράρτημα Α, Πίνακα Α1). Η PCR πραγματοποιήθηκε με χρήση της KAPA HiFi Polymerase, η οποία δημιουργεί τυφλά άκρα στο παραγόμενο προϊόν. Η ικανότητα αυτή της πολυμεράσης αξιοποιήθηκε ώστε τα ενισχυόμενα τμήματα DNA να κλωνοποιηθούν μετέπειτα στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης pUC19 στη θέση Smal. Ο φορέας είχε προηγουμένως κοπεί με το ένζυμο περιορισμού Smal (NEB) (Εικόνα 9), το οποίο, επίσης, δημιουργεί τυφλά άκρα. Ακολούθως, με την μέθοδο επιλογής της α-συμπληρωματικότητας, οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι επιλέχθηκαν, ενώ η επιθυμητή φορά εισαγωγής του ένθετου μέσα στο φορέα ταυτοποιήθηκε με επιβεβαιωτικές πέψεις του πλασμιδιακού DNA, με ένζυμα διαφορετικά για κάθε ένθετο. Οι κλώνοι που, εν τέλει, επιλέχθηκαν να σταλούν προς αλληλούχιση, φυλάχθηκαν σε στοκ γλυκερόλης στους -80°C. Παρακάτω, παρατίθεται σε εικόνες η πορεία των κλωνοποιήσεων, ενώ τα αναλυτικά αποτελέσματα των αλληλουχίσεων (sequencing), παρουσιάζονται στις **Εικόνες** στο **Παράρτημα Ε**.



Εικόνα 9. (α) Η πολυκλωνική περιοχή του πλασμιδιακού φορέα pUC19 στην οποία προσδιορίζεται το σημείο τομής του ενζύμου Smal. (β) Απεικόνιση του μεγέθους του γραμμικοποιημένου φορέα μετά από πέψη του με το ένζυμο Smal.

#### Κατασκευή At4g21380/pUC19(Smal)



Εικόνα 10. Ενίσχυση και κλωνοποίηση του γονιδίου At4g21380. (α) Η θέση και η δομή του γονιδίου. Αναγράφονται τα εξώνια (πράσινα ορθογώνια), οι UTR αμετάφραστες περιοχές (ανοιχτά πράσινα άκρα) και τα εσώνια (μαύρες γραμμές). Με βέλη προσδιορίζονται το ATG κωδικόνιο έναρξης της μεταγραφής και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν τόσο για την ενίσχυση και το «διάβασμα» του γονιδίου. Το κωδικόνιο λήξης απεικονίζεται με μαύρο αστερίσκο. (β) Απεικόνιση του προϊόντος PCR μετά τον καθαρισμό του και το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος. Σε γαλάζιο πλαίσιο περικλείονται τα ονόματα των εκκινητών. (γ) Αναπαράσταση του χάρτη της κατασκευής του ενθέτου (πράσινη γραμμή) στην πολυκλωνική περιοχή του φορέα pUC19 (μαύρη γραμμή) στη θέση Smal. Στην κατασκευή αναγράφονται οι θέσεις των ενζύμων περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στις επιβεβαιωτικές πέψεις (πράσινη γραμμή) και των ενζύμων της πολυκλωνικής περιοχής του φορέα. (δ) Αποτελέσματα των επιβεβαιωτικών πέψεων του επιλεγμένου κλώνου μαζί με τα αναμενόμενα μεγέθη αυτής της φοράς εισαγωγής.

#### Κατασκευή At4g21390/pUC19(Smal)



Εικόνα 11. Ενίσχυση και κλωνοποίηση του γονιδίου At4g21390. (α) Η θέση και η δομή του γονιδίου. Αναγράφονται τα εξώνια (πράσινα ορθογώνια), οι UTR αμετάφραστες περιοχές (ανοιχτά πράσινα άκρα) και τα εσώνια (μαύρες γραμμές). Με βέλη προσδιορίζονται το ATG κωδικόνιο έναρξης της μεταγραφής και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν τόσο για την ενίσχυση και το «διάβασμα» του γονιδίου. Το κωδικόνιο λήξης απεικονίζεται με μαύρο αστερίσκο. (β) Απεικόνιση του προϊόντος PCR μετά τον καθαρισμό του και το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος. Σε γαλάζιο πλαίσιο περικλείονται τα ονόματα των εκκινητών. (γ) Αναπαράσταση του χάρτη της κατασκευής του ενθέτου (πράσινη γραμμή) στην πολυκλωνική περιοχή του φορέα pUC19 (μαύρη γραμμή) στη θέση Smal. Στην κατασκευή αναγράφονται οι θέσεις των ενζύμων περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στις επιβεβαιωτικές πέψεις (πράσινη γραμμή) και των ενζύμων της πολυκλωνικής περιοχής του φορέα. (δ) Αποτελέσματα των επιβεβαιωτικών πέψεων του επιλεγμένου κλώνου μαζί με τα αναμενόμενα μεγέθη αυτής της φοράς εισαγωγής..\* Άκοπο προϊόν.

#### Κατασκευή At4g21400/pUC19(Smal)



Εικόνα 12. Ενίσχυση και κλωνοποίηση του γονιδίου At4g21400. (α) Η θέση και η δομή του γονιδίου. Αναγράφονται τα εξώνια (πράσινα ορθογώνια), οι UTR αμετάφραστες περιοχές (ανοιχτά πράσινα άκρα) και τα εσώνια (μαύρες γραμμές). Με βέλη προσδιορίζονται το ATG κωδικόνιο έναρξης της μεταγραφής και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν τόσο για την ενίσχυση και το «διάβασμα» του γονιδίου. Το κωδικόνιο λήξης απεικονίζεται με μαύρο αστερίσκο. (β) Απεικόνιση του προϊόντος PCR μετά τον καθαρισμό του και το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος. Σε γαλάζιο πλαίσιο περικλείονται τα ονόματα των εκκινητών. (γ) Αναπαράσταση του χάρτη της κατασκευής του ενθέτου (πράσινη γραμμή) στην πολυκλωνική περιοχή του φορέα pUC19 (μαύρη γραμμή) στη θέση Smal. Στην κατασκευή αναγράφονται οι θέσεις των ενζύμων περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στις επιβεβαιωτικές πέψεις (πράσινη γραμμή) και των ενζύμων της πολυκλωνικής περιοχής του φορέα. (δ) Αποτελέσματα των επιβεβαιωτικών πέψεων του επιλεγμένου κλώνου μαζί με τα αναμενόμενα μεγέθη αυτής της φοράς εισαγωγής. \* Αποτυχία πέψης λόγω DAM μεθυλίωσης, \*\* Άκοπο προϊόν.

#### Κατασκευή At4g21410/pUC19(Smal)



Εικόνα 13. Ενίσχυση και κλωνοποίηση του γονιδίου At4g21410. (α) Η θέση και η δομή του γονιδίου. Αναγράφονται τα εξώνια (πράσινα ορθογώνια), οι UTR αμετάφραστες περιοχές (ανοιχτά πράσινα άκρα) και τα εσώνια (μαύρες γραμμές). Με βέλη προσδιορίζονται το ATG κωδικόνιο έναρξης της μεταγραφής και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν τόσο για την ενίσχυση και το «διάβασμα» του γονιδίου. Το κωδικόνιο λήξης απεικονίζεται με μαύρο αστερίσκο. (β) Απεικόνιση του προϊόντος PCR μετά τον καθαρισμό του και το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος. Σε γαλάζιο πλαίσιο περικλείονται τα ονόματα των εκκινητών. (γ) Αναπαράσταση του χάρτη της κατασκευής του ενθέτου (πράσινη γραμμή) στην πολυκλωνική περιοχή του φορέα pUC19 (μαύρη γραμμή) στη θέση Smal. Στην κατασκευή αναγράφονται οι θέσεις των ενζύμων περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στις επιβεβαιωτικές πέψεις (πράσινη γραμμή) και των ενζύμων της πολυκλωνικής περιοχής του φορέα. (δ) Αποτελέσματα των επιβεβαιωτικών πέψεων του επιλεγμένου κλώνου μαζί με τα αναμενόμενα μεγέθη αυτής της φοράς εισαγωγής.

#### Κατασκευή At4g21440/pUC19(Smal)



Εικόνα 14. Ενίσχυση και κλωνοποίηση του γονιδίου At4g21440. (α) Η θέση και η δομή του γονιδίου. Αναγράφονται τα εξώνια (πράσινα ορθογώνια), οι UTR αμετάφραστες περιοχές (ανοιχτά πράσινα άκρα) και τα εσώνια (μαύρες γραμμές). Με βέλη προσδιορίζονται το ATG κωδικόνιο έναρξης της μεταγραφής και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν τόσο για την ενίσχυση και το «διάβασμα» του γονιδίου. Το κωδικόνιο λήξης απεικονίζεται με μαύρο αστερίσκο. (β) Απεικόνιση του προϊόντος PCR μετά τον καθαρισμό του και το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος. Σε γαλάζιο πλαίσιο περικλείονται τα ονόματα των εκκινητών. (γ) Αναπαράσταση του χάρτη της κατασκευής του ενθέτου (πράσινη γραμμή) στην πολυκλωνική περιοχή του φορέα pUC19 (μαύρη γραμμή) στη θέση Smal. Στην κατασκευή αναγράφονται οι θέσεις των ενζύμων περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στις επιβεβαιωτικές πέψεις (πράσινη γραμμή) και των ενζύμων της πολυκλωνικής περιοχής του φορέα. (δ) Αποτελέσματα των επιβεβαιωτικών πέψεων του επιλεγμένου κλώνου μαζί με τα αναμενόμενα μεγέθη αυτής της φοράς εισαγωγής.

#### Κατασκευή At4g21470/pUC19 (Smal)



Εικόνα 15. Ενίσχυση και κλωνοποίηση του γονιδίου At4g21470. (α) Η θέση και η δομή του γονιδίου. Αναγράφονται τα εξώνια (πράσινα ορθογώνια), οι UTR αμετάφραστες περιοχές (ανοιχτά πράσινα άκρα) και τα εσώνια (μαύρες γραμμές). Με βέλη προσδιορίζονται το ATG κωδικόνιο έναρξης της μεταγραφής και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν τόσο για την ενίσχυση και το «διάβασμα» του γονιδίου. Το κωδικόνιο λήξης απεικονίζεται με μαύρο αστερίσκο. (β) Απεικόνιση του προϊόντος PCR μετά τον καθαρισμό του και το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος. Σε γαλάζιο πλαίσιο περικλείονται τα ονόματα των εκκινητών. (γ) Αναπαράσταση του χάρτη της κατασκευής του ενθέτου (πράσινη γραμμή) στην πολυκλωνική περιοχή του φορέα pUC19 (μαύρη γραμμή) στη θέση Smal. Στην κατασκευή αναγράφονται οι θέσεις των ενζύμων περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στις επιβεβαιωτικές πέψεις (πράσινη γραμμή) και των ενζύμων της πολυκλωνικής περιοχής του φορέα. (δ) Αποτελέσματα των επιβεβαιωτικών πέψεων του επιλεγμένου κλώνου μαζί με τα αναμενόμενα μεγέθη αυτής της φοράς εισαγωγής.

#### 3.3 Αποτελέσματα αλληλούχισης και ταυτοποίηση της μετάλλαξης

Δεδομένου του γεγονότος ότι οι κατασκευές των γονιδίων που παρουσιάζονται στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη είναι έξι, τα αποτελέσματα των αλληλουχίσεων ολόκληρου του μήκους των γονιδίων θα παρουσιαστούν αναλυτικότερα στο Παράρτημα Ε. Από τη διαδικασία στοίχισης κάθε γονιδίου με τις υποθετικές ακολουθίες της βάσης δεδομένων TAIR, δεν προέκυψαν αλλαγές για τα *At4g21380, At4g21390, At4g21400, At4g21410* και *At4g21440*. Αντιθέτως, η στοίχιση για το γονίδιο *At4g21470* εμφάνισε αλλαγή ενός G σε A στη θέση 548.

Η θέση αυτή, βρίσκεται στο τέλος του δεύτερου ιντρονίου και συγκεκριμένα ακριβώς πριν το επόμενο εξώνιο (Εικόνα 16), δηλαδή πρόκειται για μια μετάλλαξη αντικατάστασης σε θέση ματίσματος (substitution splice-site mutation). Η αρχή και το τέλος των εξωνίων και των ιντρονίων έχουν σημειωθεί σύμφωνα με τις ακολουθίες που παρέχουν οι βάσεις δεδομένων **Araport** και **TAIR**.



Εικόνα 16. Τμήμα της νουκλεοτιδικής στοίχισης του προϊόντος PCR του At4g21470 με την υποθετική ακολουθία, στο οποίο παρουσιάζεται η μετάλλαξη. Με πράσινο χρώμα δηλώνονται τα εξώνια, ενώ με μαύρο τα εσώνια, όπως αυτά προκύπτουν από τις βάσεις δεδομένων Araport και TAIR. Η μετάλλαξη mosaic (αντικατάσταση του G από A) υποδηλώνεται με γκρι χρώμα. Στο άνω τμήμα της στοίχισης παρατίθεται τμήμα των χρωματογραφημάτων από τα αλληλοεπικαλυπτόμενα διαβάσματα δύο εκκινητών για επιβεβαίωση της αλλαγής. Με κόκκινο χρώμα περικλείονται οι περιοχές των ιντρονίων που αναγνωρίζονται κατά το μάτισμα.

Εντός των ιντρονίων, υπάρχουν δύο συγκεκριμένες περιοχές του μεταγραφήματος που αναγνωρίζονται από το spliceosome και απαιτούνται για την

πραγματοποίηση του ματίσματος: μία *donor site* στο 5' άκρο του ιντρονίου που περιέχει μία σχεδόν αμετάβλητη ακολουθία GU και μία *acceptor site* στο 3' άκρο του ιντρονίου με μία επίσης σχεδόν αμετάβλητη ακολουθία AG, η οποία και δηλώνει το τέλος του ιντρονίου (Brown, 1996).

Όσον αφορά τα φυτά mosaic, η μετάλλαξη αυτή πρακτικά σημαίνει πως το ζεύγος AG στο 3' άκρο που υποδηλώνει την acceptor site παύει να υφίσταται, παίρνοντας την μορφή ενός ζεύγους ΑΑ. Εφόσον, θεωρητικά, η λήξη του ματίσματος σε εκείνο το σημείο καθίσταται αδύνατη, ως πιθανότερο αποτέλεσμα αυτής της αντικατάστασης θα είναι η ενεργοποίηση μίας cryptic splice site, δηλαδή ενός άλλου ζεύγους AG, στο ακόλουθο εξώνιο. Στην περίπτωση του mosaic, ακριβώς ένα νουκλεοτίδιο μετά από το «νέο» Α έπεται ένα G, οδηγώντας έτσι στη δημιουργία μίας νέας acceptor site AG ή αλλιώς μιας cryptic splice site. Κατά το μάτισμα θα αφαιρεθεί όλη η ακολουθία του 2<sup>ου</sup> ιντρονίου όπως θα γινόταν υπό φυσιολογικές συνθήκες αλλά μαζί με αυτήν θα συμπεριληφθεί και το ένα επιπλέον νουκλεοτίδιο G που «δανείστηκε» από το 3° εξώνιο προκειμένου να σηματοδοτηθεί η λήξη του ματίσματος. Το ώριμο mRNA που θα παραχθεί θα είναι έτοιμο για μετάφραση, με τη διαφορά ότι θα υπολείπεται ενός νουκλεοτιδίου. Η αφαίρεση μιας βάσης αλλάζει όλο το πλαίσιο ανάγνωσης από εκείνο το σημείο κι έπειτα, έχοντας ως επακόλουθο την παραγωγή μιας πρωτεΐνης μη λειτουργικής. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του At4q21470, συνεχίζοντας το «διάβασμα» κάθε τριπλέτας που ακολουθεί μετά από τη διαγραφή του νουκλεοτιδίου, εμφανίζεται κωδικόνιο λήξης μόλις 39 νουκλεοτίδια μετά. Το τελικό προϊόν της μετάφρασης, πιθανόν αφορά ένα πεπτίδιο 100 αμινοξέων (Εικόνα 17). Προφανώς, τα παραπάνω μπορούν να επιβεβαιωθούν μόνο έχοντας εικόνα της ακολουθίας της ίδιας της πρωτεΐνης, παρ' όλα αυτά μία σύντομη σχηματική αναπαράσταση της ανωτέρω υπόθεσης ακολουθεί στην Εικόνα 18.



Εικόνα 17. Η φυσιολογική (α) και η έπειτα από την μετάλλαξη (β) αμινοξική ακολουθία της πρωτεΐνης FMN/FHY. Με πράσινο χρώμα δηλώνεται το μήκος της ακολουθίας που είναι όμοιο και στις δύο περιπτώσεις.



Εικόνα 18. Προσοομοίωση της διαδικασίας του ματίσματος στην περιοχή του 2<sup>ου</sup> ιντρονίου μεταξύ 2<sup>ου</sup> και 3<sup>ου</sup> εξωνίου του γονιδίου At4g21470. Στο άνω τμήμα της εικόνας παρουσιάζεται η κανονική διαδικασία του ματίσματος ενώ στο κάτω τμήμα παρουσιάζεται το αποτέλεσμα του ματίσματος μετά την μετάλλαξη. Τα πράσινα ορθογώνια υποδηλώνουν τα εξώνια ενώ η γραμμή μεταξύ τους τα ιντρόνια. Με μωβ πλαίσιο περικλείεται το παραγώμενο πολυπεπτίδιο.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 4.1 Ο λειτουργικός ρόλος του γονιδίου Χ

Το μετάλλαγμα mosaic χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση εκτεταμένης χλώρωσης ήδη από τα αρχικά στάδια της ανάπτυξής του. Η χλώρωση αυτή εμφανίζει ένα συγκεκριμένο, κλιμακούμενο πρότυπο, ξεκινώντας από την κεντρική νεύρωση των παλαιότερων φύλλων της ροζέτας ενώ σταδιακά επεκτείνεται προς το έλασμα. Επιπρόσθετα, το μετάλλαγμα παρουσιάζει καθυστερημένο ρυθμό ανάπτυξης συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής του ενώ δεν είναι πάντα σε θέση να ολοκληρώσει επιτυχώς το βιολογικό του κύκλο. Μέχρι πρότινος, η περιοχή εντοπισμού της μετάλλαξης είχε περιοριστεί εντός ενός μοριακού τόπου αποτελούμενου από 14 γονίδια, σημαντικός αριθμός των οποίων, βιβλιογραφικά, εμπλέκονται σε αμυντικούς μηχανισμούς.

Αυτό το χλωρωτικό και καθυστερημένο πρότυπο ανάπτυξης, προσπάθησε αρχικά να εξηγηθεί μέσα από την πιθανή σύνδεση και αλληλεπίδραση του μεταλλαγμένου γονιδίου με γονίδια που συμμετέχουν στη σηματοδότηση και κατ' επέκταση ενεργοποίηση αμυντικών αποκρίσεων σχετιζόμενων με την αντίληψη παθογόνων. Τα προηγούμενα δεδομένα, θεωρητικά, θα μπορούσαν να υποδηλώνουν ότι το υπεύθυνο για το φαινότυπο mosaic γονίδιο, πιθανών είτε να λειτουργεί το ίδιο ως αρνητικός ρυθμιστής-διακόπτης στο μονοπάτι απόκρισης του φυτού στην άμυνα έναντι προσβολής από παθογόνους μικροοργανισμούς είτε να συμμετέχει σε κάποιο μονοπάτι απόκρισης που αποτελείται από κάποιον αρνητικό ρυθμιστή. Στα φυτά αγρίου τύπου, υπό φυσιολογικές συνθήκες, το μονοπάτι αυτό παραμένει ανενεργό και ενεργοποιείται μετά από την προσβολή. Στην περίπτωση των φυτών mosaic η EMS μεταλλαξιγένεση απενεργοποιεί την αρνητική ρυθμιστή δράση του συγκεκριμένου γονιδίου-διακόπτη με αποτέλεσμα το φυτό να αντιλαμβάνεται επί μονίμου βάσεως ότι δέχεται προσβολή από παθογόνα, δικαιολογώντας, έτσι, και το σταδιακά επεκτεινόμενο πρότυπο χλώρωσης με την ανάπτυξη των φυτών.

Η υπόθεση αυτή φαινόταν να ενισχύεται καθώς παρόμοιοι φαινότυποι με μεταλλάγματος mosaic έχουν καταγραφεί σε περιπτώσεις αυτόν του μεταλλαγμάτων γονιδίων που εμπλέκονται στην απόκριση του φυτού σε παθογόνα (Lorrain et al., 2003). Γενικότερα, η φυτική ανοσία βρίσκεται υπό στενό αρνητικό έλεγχο με σκοπό την αποτροπή της ενεργοποίησής της απουσία παθογόνων μικροοργανισμών. Οι ανοσολογικοί υποδοχείς παραμένουν σε αδρανή φάση και ενεργοποιούνται μόνο υπό την ανίχνευση παθογόνων. Μεταλλάξεις απώλειας της λειτουργίας (loss-of-function) αρνητικών ρυθμιστών ή μεταλλάξεις επαναφοράς της λειτουργίας φυτικών υποδοχέων οδηγούν συχνά στην εκδήλωση αυτοανοσίας (autoimmunity). Οι τυπικοί φαινότυποι μεταλλαγμάτων αυτοανοσίας περιλαμβάνουν νανισμό, αυξημένα επίπεδα σαλικυλικού οξέος, έκφραση γονιδίων άμυνας, εκδήλωση κυτταρικού θανάτου ή σχηματισμό μακροσκοπικά εμφανών αλλοιώσεων (Rodriguez et al., 2015, Van Wersch et al., 2016).

#### 4.2 Το γονίδιο συμμετέχει στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της ριβοφλαβίνης-

Η ταυτοποίηση της μετάλλαξης με τη διαδικασία της αλληλούχισης ακολουθήθηκε από μία εκτενέστερη βιοπληροφορική ανάλυση όσον αφορά τα δίκτυα και μονοπάτια στα οποία συμμετέχει το συγκεκριμένο γονίδιο. Αρχικά, μέσω της βάσης δεδομένων **KEGG**, εντοπίστηκε η παρουσία του γονιδίου στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της ριβοφλαβίνης (**Εικόνα 19**).



Εικόνα 19. Το μονοπάτι βιοσύνθεσης της ριβοφλαβίνης σύμφωνα με τη βάση δεδομένων KEGG. Τα ορθογώνια αντιπροσωπεύουν τα γονίδια που συμμετέχουν στο μονοπάτι. Το γονίδιο At4g21470 αντιστοιχεί στα πράσινα ορθογώνια με κόκκινο περίγραμμα. Με κόκκινη σήμανση αναφέρονται τα γονίδια του μονοπατιού για τα οποία υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τη λειτουργία τους.

Έπειτα, μέσω της βάσης δεδομένων **STRING**, ανακτήθηκε το πρωτεϊνικό δίκτυο αλληλεπιδράσεων για το ένζυμο FMN/FHY (**Εικόνα 20**), το οποίο δίνει μία πρώτη εικόνα σχετικά με το πόσο ισχυρά αλληλεπιδρά το ένζυμο με τα υπόλοιπα του μονοπατιού της **Εικόνας 19** αλλά και με άλλα γειτονικά του. Οι κόμβοι του δικτύου αντιπροσωπεύουν πρωτεΐνες, χωρίς να λαμβάνονται ωστόσο υπόψη οι ισομορφές που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα ή οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Οι ακμές μεταξύ των πρωτεϊνών εκφράζουν ήδη γνωστές ή προβλεπόμενες σχέσεις μεταξύ των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν τα αντίστοιχα γονίδια. Οι σχέσεις αυτές θεωρούνται συγκεκριμένες και σημαντικές, υποδηλώνοντας λόγου χάρη την από κοινού συνεισφορά των πρωτεϊνών σε μία κοινή λειτουργία. Το πόσο ισχυρή είναι η σχέση μεταξύ των πρωτεϊνών προσδιορίζεται αριθμητικά με έναν βαθμό εμπιστοσύνης ( <=0.100 έως >=0.900) και απεικονίζεται με διαφορετικού χρώματος ένταση για κάθε ακμή (**Εικόνα 28**).



Εικόνα 20. Πρωτεϊνικό δίκτυο αλληλεπιδράσεων του ενζύμου FMN/FHY. (α) Τα χρώματα των ακμών υποδεικνύουν τις εξής σχέσεις: Γαλάζιο= γνωστή αλληλεπίδραση από συγκεκριμένες βάσεις δεδομένων, Ροζ= γνωστή αλληλεπίδραση προσδιορισμένη πειραματικά, Πράσινο= γειτονικό γονίδιο (προβλεπόμενη αλληλεπίδραση), Κόκκινο= σύντηξη γονιδίων (προβλεπόμενη αλληλεπίδραση), Μπλε= γονιδιακή συνύπαρξη (προβλεπόμενη αλληλεπίδραση), Μπλε= γονιδιακή συνύπαρξη (προβλεπόμενη αλληλεπίδραση), Μπλε= γονιδιακή συνύπαρξη αλληλεπίδραση), Κότκινο= σύντηξη γονιδίων (προβλεπόμενη αλληλεπίδραση), Μπλε= γονιδιακή συνύπαρξη (προβλεπόμενη αλληλεπίδραση), Μαύρο= συν-έκφραση (προβλεπόμενη αλληλεπίδραση), Ανοιχτό μπλε= ομόλογη πρωτεΐνη (προβλεπόμενη αλληλεπίδραση). (β) Η ένταση του χρώματος των ακμών υποδεικνύει το βαθμό εμπιστοσύνης μεταξύ των αλληλεπιδράσεων, ο οποίος είναι χαμηλός (0.150), μέτριος (0.400), υψηλός (0.700) και μέγιστος (0.900).

Παρότι το δίκτυο ανωτέρω παρέχει ορισμένες πληροφορίες σχετικά με τις άμεσα συνδεδεμένες ή γειτονικές πρωτεΐνες της πρωτεΐνης του γονιδίου *At4g21470*, βιβλιογραφικές αναφορές που να αφορούν μεταλλάξεις αυτών των γονιδίων δεν είναι αρκετές ώστε να γίνει πλήρως εφικτή η σύγκριση με το υπό μελέτη γονίδιο. Εκτενέστερη αναφορά για τα γονίδια αυτά θα πραγματοποιηθεί παρακάτω.

Εμβαθύνοντας στη βιοσύνθεση της ριβοφλαβίνης, οι flavins έχουν τρεις κύριες μορφές, τη ριβοφλαβίνη (ή βιταμίνη B2, RIB), το φλαβινο-μονονουκλεοτίδιο (flavin mononucleotide, FMN) και το φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (flavin adenine dinucleotide, FAD) (Deng *et al.*, 2011). Η RIB αποτελεί πρόδρομο των FMN και FAD και η σύνθεσή της λαμβάνει χώρα αποκλειστικά στα πλαστίδια, καθώς έχει βρεθεί πως τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα μέχρι στιγμής γνωστά φυτικά ένζυμα που εμπλέκονται στη βιοσύνθεσή της, κατέχουν στο αμινο-τελικό τους άκρο τμήματα που μπορούν να χαρακτηριστούν ως αλληλουχίες στόχευσης πλαστιδίων (Fisher & Bacher, 2011). Από την άλλη μεριά, η επιτυχής μετατροπή της σε FMN και FAD -ή αντιστρόφως- θεωρείται πως πραγματοποιείται εντός των πλαστιδίων, του κυταρροπλάσματος και των μιτοχονδρίων (Giancaspero *et al.*, 2009, Sandoval *et al.*, 2008, Torchetti *et al.*, 2010, Yruela *et al.*, 2010) (**Εικόνα 21**).



Εικόνα 21. Προτεινόμενο μοντέλο για τη βιοσύνθεση, την υδρόλυση και την μεταφορά των flavins εντός των φυτικών κυττάρων. Τα μαύρα βέλη υποδεικνύουν εκείνα τα ένζυμα των οποίων τα cDNAs έχουν κλωνοποιηθεί και οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες έχουν βιοχημικώς χαρακτηριστεί. Τα γκρι βέλη υποδεικνύουν ένζυμα των οποίων η ύπαρξη υποστηρίζεται από δεδομένα βιοπληροφορικής και βιοχημικών αναλύσεων. Τα διακεκομμένα γκρι βέλη εννοούν μια πιθανή μιτοχονδριακή FAD συνθετάση και τα προβλεπόμενα βήματα διαμεμβρανικής μεταφοράς. Τα λευκά βέλη υποδεικνύουν το μονοπάτι βιοσύνθεσης της RIB. Οι αριθμοί αντιπροσωπεύουν τα εξής: 1. Ένζυμο FMN/FHY, 2. Ένζυμο RibF, 3. κυτταροπλασματική FAD συνθετάση, 4. Οργανιδιακή κινάση ριβοφλαβίνης, 5. Οργανιδιακή FMN υδρολάση, 6. Οργανιδιακή FAD πυροφωσφατάση, 7. Μιτοχονδριακή FAD συνθετάση. (Πηγή: Sandoval & Roje, 2008)

Σύμφωνα με τους Fischer και Bacher (2011), καθένα από τα κυτταρικά διαμερίσματα δημιουργεί από μόνο του τα απαραίτητα flavocoenzymes για την μετατροπή της RIB, κάνοντας χρήση της RIB που εκκρίνεται στο κυτταρόπλασμα από τους χλωροπλάστες και μετέπειτα μπορεί να δεσμευτεί από τα μιτοχόνδρια. Παρότι υπάρχουν δεδομένα σχετικά με τη διαμεμβρανική μεταφορά της RIB και γενικά των flavins σε άλλους ευκαρυωτικούς ή προκαρυωτικούς οργανισμούς, οι πληροφορίες για τα φυτά είναι ελάχιστες (Sandoval & Roje, 2005) για να διαφωτίσουν περαιτέρω το μοντέλο της **Εικόνας 21**. Συγκεκριμένα, υπάρχουν ενδείξεις σε ορισμένα φυτικά είδη στα οποία παρατηρήθηκε έκκριση flavins στο μέσο ανάπτυξής τους λόγω έλλειψης σιδήρου (Susin *et al.*, 1993, Lopez-Millan *et al.*, 2000), ενώ μια μελέτη στο σπανάκι αναφέρει ενεργότητα ενζύμου με δράση κινάσης-ριβοφλαβίνης στο κυτταρόπλασμα και σε ένα τμήμα του κυττάρου που περιέχει χλωροπλάστες και μιτοχόνδρια (Mitsuda *et al.*, 1970). Παρόλα αυτά, οι πιθανοί διαμεμβρανικοί μεταφορείς που επιτρέπουν την ανταλλαγή RIB μεταξύ των κυτταρικών διαμερισμάτων παραμένουν ακόμη άγνωστοι.

Όσον αφορά το γονίδιο *At4g21470*, σύμφωνα με τους Sandoval και Roje (2005) κωδικοποιεί για ένα ένζυμο με διπλή λειτουργία, καταλύοντας την υδρόλυση του FMN σε RIB αλλά και την φωσφορυλίωση της RIB σε FMN, αντιστρόφως. Συγκεκριμένα, το καρβοξυ-τελικό άκρο του φέρει δράση παρόμοια με την μονολειτουργική κινάση της RIB (monofunctional riboflavin kinase) της ζύμης, ενώ το αμινο-τελικό άκρο του αποτελεί μέλος της υπεροικογένειας haloacid dehydrogenase (HAD superfamily), δρώντας ως φωσφατάση που αποδέχεται το FMN ως υπόστρωμα (δράση κινάσης-ριβοφλαβίνης/FMN υδρολάσης). Τα αντίστοιχα μοτίβα στην αμινοξική ακολουθία του ενζύμου φαίνονται στην **Εικόνα 22**. Παρότι οι ίδιοι και σε επόμενη έρευνά τους το 2008, εντόπισαν αλληλουχίες στόχευσης στο αμινο-τελικό άκρο άλλων διλειτουργικών ενζύμων του φυτού *A. thaliana* (AtRibF1, AtRibF2) (αλλά με δράση κινάσης-ριβοφλαβίνης/FAD συνθετάσης), δεν έγινε εφικτός ο εντοπισμός αντίστοιχων σινιάλων για το FMN/FHY προτείνοντας ότι τοποθετείται πιθανώς στο κυτταρόπλασμα (Sandoval & Roje, 2008) (**Εικόνα 21**).

#### Motifs in ath:AT4G21470

Gene: AT4G21470 Definition: K20884 riboflavin kinase / FMN hvdrolase [EC:2.7.1.26 3.1.3.102] (RefSeq) FMN/FHY; riboflavin kinase/FMN hydrolase

Motif id	From	То	Definition	E value	Score
pf:HAD_2	14	193	Haloacid dehalogenase-like hydrolase	5.7e-27	- I
pf:HAD	14	143	haloacid dehalogenase-like hydrolase	7.3e-05	
pf:Hydrolase_6	15	122	Haloacid dehalogenase-like hydrolase	0.015	1 × 1
pf:Hydrolase	80	187	haloacid dehalogenase-like hydrolase	4.5e-16	-
pf:Hydrolase_like	149	194	HAD-hyrolase-like	1.1e-05	
pf:Flavokinase	238	362	Riboflavin kinase	1.2e-32	-

50	100	150	200	250	300	350
of:HAD_2			1.1	pf:Flave	okinase	
pf:HAD pf:		pf:Hyc	rolase_1	ike		
pf:Hydrolase_	.6					

Εικόνα 22. Χαρακτηριστικά μοτίβα στην αμινοξική ακολουθία της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το *At4g21470*. Στο αμινο-τελικό άκρο παρατηρείται μοτίβο χαρακτηριστικό της υπεροικογένειας υδρολασών HAD ενώ στο καρβοξυ-τελικό άκρο, παρατηρείται μοτίβο που σχετίζεται με δράση κινάσης-ριβοφλαβίνης. (Πηγή: KEGG)

Στην παρούσα εργασία, χρήση του αλγορίθμου BLAST αλλά και αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων για τον εντοπισμό ομόλογων πρωτεϊνών της FMN/FHY στο ίδιο το φυτό A. thaliana δεν εμφάνισε ομοιότητες σε ποσοστά τέτοια που να υποδεικνύουν πως η πρωτεΐνη ανήκει σε μία συγκεκριμένη ομάδα γονιδίων. Αναλυτικότερα, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων KEGG υπάρχουν πολυάριθμες ορθόλογες σε άλλα φυτικά είδη αλλά και στο άμεσα συγγενικό είδος A. lyrata με αντίστοιχη δράση κινάσης-ριβοφλαβίνης/FMN υδρολάσης και ομοιότητα >90% (https://www.kegg.jp/ssdb-bin/ssdb\_best?org\_gene=ath:AT4G21470) (Εικόνα 23). Αντιθέτως, η αναζήτηση ομολόγων στο ίδιο το *Α. thaliana* είχε ως αποτέλεσμα λίγες περιπτώσεις γονιδίων, όχι άμεσα συγγενικών. Το ποσοστό ομοιότητας αυτών (<36%) εντοπιζόταν μόνο στο τμήμα της αλληλουχίας που φέρει το χαρακτηριστικό μοτίβο της ΗΑD υπεροικογένειας (Εικόνα 24) που προσδίδει τη δράση υδρολάσης, ενώ καμία από τις πρωτεΐνες που προέκυψαν δεν είχε την ίδια δράση κινάσηςριβοφλαβίνης/FMN υδρολάσης με το FMN/FHY. Γενικότερα, από τα αποτελέσματα αυτά, μπορεί να θεωρηθεί πως το At4g21470 είναι single-copy gene στο είδος A. thaliana, όντας το μοναδικό που κωδικοποιεί για ένζυμο με τη συγκεκριμένη διπλή λειτουργία κινάσης-ριβοφλαβίνης/FMN υδρολάσης.

Common motifs	:	Oth	mer motifs					
ath:AT4G21470	0		100		200		300	379
		HAD_2				Flavokinase		
			Hydrolase		- 			
		HAD Hudrolase 6		Hydrolas	e_like			
	_	ngar orase_o						
aly:HRHLYDRHFT_914526	ò		100		200		300	. 380
		HAD_2				Flavokinase		
			Hydrolase	Hudsol a	a lika			
		HAD		ngur oras	e_116			
			HGTP_anti	codon				
crb:17877393	0		100		200		300	379
		HAD_2				Flavokinase		
			Hydrolase		<b>•</b>			
		HAD		Hydrolas	e_like			
		Hydrolase_6						
eus:EUTSA_v10025469mg	0	1 1 1	100		200		300	379
		HAD_2				Flavokinase		
		Hydrolase			_			
		HAD		Hydrolas	e_like			
	_	Hydrolase_6						
csat:104731393	0	1 1 1	100		200		300	379
		HAD_2			-	Flavokinase		
		Hydrolase			-			
		HAD Hudrolase 6		Hydrolas	e_like			
	_	ngui orașe_o						
bna:106440120	ò		100		200		300	' 3/9
		HAD_2			-	Flavokinase		_
		Hydrolase	Hydrolase					
		HHU Hudrolase 6		Hydrolas	е_11ке			
		Hydrolase_3						
brp:103859068	Ļ		' '				200	379
	v		100		200	Elsuskinses	300	
		HU_2 Hudrolase	Hudrolase			FIdVUKINdSe		
		HAD		Hydrolas	e_like			
		Hydrolase_6						
		Hydrolase_3						
boe:106309810	0	1 1 1	100		200		300	379
		HAD_2			_	Flavokinase		
		Hydrolase	Hydrolase		-			
		HAD		Hydrolas	e_like			
		Hydrolase_6						
		ngui orașe_a						

Εικόνα 23. Κοινά μοτίβα μεταξύ του *At4g21470* και των 7 ορθολόγων του με τα μεγαλύτερα ποσοστά ομοιότητας, όπως προκύπτουν από τη βάση δεδομένων KEGG. Όλα τα ορθόλογα της στοίχισης κωδικοποιούν για διλειτουργικά ένζυμα με δράση κινάσης-ριβοφλαβίνης/FMN υδρολάσης.



Εικόνα 24. Κοινά μοτίβα μεταξύ του At4g21470 και των 9 παραλόγων του με τα μεγαλύτερα ποσοστά ομοιότητας, όπως προκύπτουν από τη βάση δεδομένων KEGG. Όλα τα παράλογα της στοίχισης κωδικοποιούν για μονολειτουργικά ένζυμα με δράση υδρολάσης.)

## 4.2.1 Η σχέση του μονοπατιού με τη δημιουργία ROS και την επαγωγή της φυτικής άμυνας

Τα FMN και FAD σχετίζονται με διάφορες διεργασίες στα φυτά όπως η φωτοσύνθεση, η μεταφορά ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια, η αντίληψη του φωτός και η επιδιόρθωση του DNA (Sancar, 1994, Briggs & Huala, 1999, Losi & Gartner, 2012) και την ίδια στιγμή αποτελούν σημαντικούς αντιοξειδωτικούς συμπαράγοντες λαμβάνοντας μέρος σε πολλές μεταβολικές διεργασίες (Gerdes *et al.*, 2012, Sandoval *et al.*, 2008) οι οποίες σχετίζονται με τη δημιουργία ROS και ιδιαιτέρως του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Ashtamker *et al.*, 2007, Paranagama *et al.*, 2010, Torres, 2010), τα οποία έχουν ως επακόλουθο την εκδήλωση αντίδρασης υπερευαισθησίας (Dong & Beer, 2000). Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> λειτουργεί ως κυτταρικός σηματοδότης σε ποικίλες διεργασίες και συχνά συσσωρεύεται στη ρύθμιση αμυντικών αποκρίσεων στα φυτά (Orrenius *et al.*, 2007, Torres, 2010) και οδηγεί στην εκδήλωση του κυτταρικού θανάτου (Overmyer *et al.*, 2003, Gechev *et al.*, 2006, Gadjev *et al.*, 2008, Jaspers & Kangasjarvi, 2010, Wituszynska & Karpinski, 2012, Jalmi & Sinha, 2015, Petrov *et al.*, 2015).

Έρευνες έχουν προτείνει ότι ο μεταβολισμός των flavins μπορεί να σχετίζεται γενικότερα με τη σηματοδότηση του ιασμονικού οξέος, τον κυτταρικό θάνατο και την απόκριση σε επιθέσεις παθογόνων μικροοργανισμών (Dong & Beer, 2000, Xiao et al., 2004, Taheri & Hofte, 2006, Zhang et al., 2009, Asai et al., 2010, Taheri & Tarighi, 2010, Deng et al., 2011, Nie & Xu, 2016). To mosaic παρουσιάζοντας έντονο φαινότυπο διαχεόμενου κυτταρικού θανάτου και φέροντας μετάλλαξη σε γονίδιο που κωδικοποιεί για κομβική πρωτεΐνη στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της RIB, θα μπορούσε να ενισχύσει αυτές τις απόψεις περί σύνδεσης των flavins με την φυτική άμυνα. Ωστόσο, ορισμένες από τις προαναφερθείσες έρευνες κάνουν μεν λόγο για επαγωγή της άμυνας εξαιτίας είτε κυτταρικών (παραγωγή H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, εναπόθεση λιγνίνης και καλόζης) είτε μοριακών (ενεργοποίηση PR γονιδίων, μεταβολές στην έκφραση γονιδίων σχετιζόμενων με το μεταβολισμό των flavins) μεταβολών όμως μέσω της μεταχείρισης των φυτών με εξωγενή χρήση RIB ως elicitor ανθεκτικότητας. Το γεγονός αυτό δεν παρέχει σημαντικές πληροφορίες για το πώς μεταβολές των ενδογενών επιπέδων flavins θα μπορούσαν να επηρεάσουν την άμυνα των φυτών. Όμοια, οι Deng et al. (2011) υποστηρίζουν πως η εξωγενής εφαρμογή της RIB είναι αβέβαιο εάν δύναται να αυξήσει τη δράση που έχει η υπάρχουσα ενδοκυτταρική περιεκτικότητα RIB στο να παράγει H2O2 και να επάγει αμυντικές αποκρίσεις.

Πληροφορίες για το ρόλο που έχουν τα ενδογενή επίπεδα flavins στην άμυνα θα μπορούσαν να αντληθούν κυρίως μέσω της μελέτης μεταλλαγμάτων για γονίδια που συμμετέχουν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της RIB, όπως το *mosaic*. Μέχρι σήμερα, υπάρχουν πειραματικά αποτελέσματα που υποδεικνύουν συσχέτιση της μεταβολής των ενδογενών συγκεντρώσεων παραγόντων του μονοπατιού της RIB με την επαγωγή της δημιουργίας ROS και κατ' επέκταση την ενεργοποίηση αμυντικών αποκρίσεων. Τα δεδομένα αυτά αφορούν τις εξής περιπτώσεις:

#### Γονίδιο NbRibA

Οι Asai *et al.* (2010) σε έρευνά τους ταυτοποίησαν το *NbRibA* (77.0% ομοιότητα των cDNA με το γονίδιο *RibA1* του *A. thaliana,* **Εικόνα 18**) που κωδικοποιεί για ένα διλειτουργικό ένζυμο-κλειδί στη βιοσύνθεση των flavins, εφαρμόζοντας screening για γονίδια σχετιζόμενα με τον MAPK-επαγόμενο κυτταρικό θάνατο, έχοντας κάνει χρήση VIGS (Virus-Induced Gene Silencing). Φυτά καπνού *Nicotiana umbratica* εμφάνισαν μειωμένα ενδογενή επίπεδα RIB, FMN και FAD και ανέπτυξαν σχετικά νάνο φαινότυπο που συνοδευόταν όχι μόνο από μικρότερης έντασης κηλίδες κυτταρικού θανάτου αλλά κι από μειωμένη παραγωγή NO και ROS έπειτα από εφαρμογή INF1 (elicitin του ωομύκητα *Phytophthora infestans*) και παρουσία ενεργούς NbMEK2<sup>DD</sup>. Ωστόσο, εξωγενής χορήγηση RIB, FMN και FAD «συμπλήρωσε» τον φαινότυπο των mutants και αύξησε την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου.

Τα NO και ROS κατέχουν σημαντικό ρόλο στη φυτική άμυνα έναντι επιθέσεων από παθογόνα και κυρίως στην αντίδραση υπερευαισθησίας (Delledonne *et al.*, 2001, Wendehenne *et al.*, 2004, Delledonne, 2005, Tarantino *et al.*, 2005, Zago *et al.*, 2006, Zaninotto *et al.*, 2006) ενώ παράγονται ταυτόχρονα μέσω του MAPK-σηματοδοτικού μονοπατιού MEK2-SIPK (salicylic acid-induced protein kinase) (Asai *et al.*, 2008). Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν ότι: i) ο παρόν φαινότυπος είναι αποτέλεσμα της μείωσης των ενδογενών επιπέδων αυτών των flavins , ii) η βιοσύνθεση των flavins πιθανόν να λαμβάνει μέρος στη ρύθμιση της οξειδωτικής έκρηξης (oxidative burst) και κατ' επέκταση στον κυτταρικό θάνατο (**Εικόνα 25**) και iii) ότι το γονίδιο *NbRibA* συμμετέχει σε μονοπάτια κυτταρικού θανάτου μέσω μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας.



Εικόνα 25. Ένα υποθετικό μοντέλο του ρόλου του *NbRibA* στην οξειδωτική έκρηξη και τον κυτταρικό θάνατο. Το NbRibA καταλύει τα αρχικά στάδια του μονοπατιού βιοσύνθεσης RIB. Τα FMN και FAD απαιτούνται για την ενεργοποίηση υποθετικών NOS-like ενζύμων. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν χαμηλότερη επίδραση των αναγραφόμενων παραγόντων στον κυτταρικό θάνατο. Στα αγρίου τύπου φυτά (a), η αντίληψη των παθογόνων επάγει μία επαρκή έκρηξη ελευθέρων ριζών, οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο. Στα φυτά με αποσιωπημένο το *NbRibA* (b), η καταστολή της παραγωγής RIB έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των ενδογενών επιπέδων FMN και FAD. Μειώσεις στην ενεργότητα των υποθετικών NOS-like ενζύμων NR και RBOH, υπεύθυνων για την έκρηξη ελευθέρων ριζών, οδηγούν σε μείωση της εκδήλωσης του κυτταρικού θανάτου. (Πηγή: Asai *et al.*, 2010)

#### Γονίδιο COS1

Το ιασμονικό οξύ (JA) και τα παράγωγά του έχουν επιβεβαιωμένο ρόλο στη διαμόρφωση της έκφρασης πολυάριθμων γονιδίων (Reymond *et al.*, 2000, Schenk *et al.*, 2000, Sasaki *et al.*, 2001, Feng *et al.*, 2003), τη διαμεσολάβηση αποκρίσεων σε βιοτικές ή αβιοτικές καταπονήσεις (McConn *et al.*, 1997, Wasternack & Parthier, 1997, Reymond & Farmer, 1998, Farmer, 2001), την αναπαραγωγή (Feys *et al.*, 1994, Xie *et al.*, 1998) και τη ρύθμιση πολλών άλλων αναπτυξιακών διεργασιών (Creelman & Mullet, 1997). Η πρωτεΐνη COI1 έχει φανεί πως σχηματίζει σύμπλοκα SCF<sup>COI1</sup> (Xu *et al.*, 2002), τα οποία καταλύουν αντιδράσεις ουβικιτινίωσης. Τα σύμπλοκα αυτά θεωρείται ότι ρυθμίζουν τον αριθμό πρωτεϊνών οι οποίες επηρεάζουν αρνητικά την έκφραση σημαντικών γονιδίων για τις JA αμυντικές αποκρίσεις (Xie *et al.* 1998, Xu *et al.*, 2002) (**Εικόνα 26**).

Οι Xiao et al. (2004) προσπαθώντας να κατανοήσουν το μοριακό μηχανισμό με τον οποίο το COl1 ρυθμίζει αρνητικά τη σηματοδότηση JA και χρησιμοποιώντας μεταλλάγματα coi1, εντόπισαν μέσω screening ένα μετάλλαγμακαταστολέα του coi1, με το όνομα cos1 (coi1 suppressor). Το COS1 (Εικόνα 19) αποτελεί συστατικό-κλειδί στη βιοσύνθεση της RIB. Σειρά αναλύσεων και διασταυρώσεων με στόχο τη δημιουργία διπλών μεταλλαγμάτων cos1 coi1 έδειξε πως το cos1 μπορεί να αποκαταστήσει το φαινότυπο και τη μειωμένη ευαισθησία που παρουσιάζει το *coi1* στη χορήγηση JA. Τα αποτελέσματά τους υπέδειξαν μία νέα, πιθανή λειτουργία του μονοπατιού βιοσύνθεσης της RIB στην JA-επαγόμενη μεταγωγή σήματος, ως ουσιαστικό μονοπάτι στις κατασταλτικές δράσεις που ασκούν αρνητικοί ρυθμιστές (όπως το σύμπλοκο SCF<sup>COI1</sup>) στις JA-επαγόμενες αποκρίσεις (Εικόνα 26).



Εικόνα 26. Πιθανό μοντέλο της λειτουργίας του μονοπατιού βιοσύνθεσης της RIB στην επαγόμενη από JA μεταγωγή σήματος. Τα S1 και S2 αντιπροσωπεύουν δύο ομάδες καταστολέων που ενεργοποιούνται από σήματα JA για ουβικιτινίωση και αποδόμηση από το SCF<sup>COI1</sup>-26S πρωτεάσωμα. Τα G1 και G2 αντιπροσωπεύουν διαφορετικές ομάδες γονιδίων που ενεργοποιούν JA-επαγόμενες αποκρίσεις (I και II). Τα βέλη υποδεικνύουν θετική ρύθμιση, οι γραμμές σε σχήμα «T» υποδεικνύουν αρνητική ρύθμιση, το πάχος κάθε γραμμής υποδεικνύει το προβλεπόμενο επίπεδο ρύθμισης. Η σκίαση κάθε πιθανού συστατικού του μοντέλου αντιπροσωπεύει την αφθονία καθενός συστατικού. Στα φυτά *coi1*, η μετάλλαξη καταστέλλει τη δράση του SCF<sup>COI1</sup>, οδηγώντας σε υψηλά επίπεδα συσσώρευσης των πρωτεϊνών-καταστολέων, τα οποία συνεχώς καταστέλλουν γονίδια που εκφράζονται καθοδικώς, με αποτέλεσμα την μείωση των JA-επαγόμενων αποκρίσεων. Αντιθέτως, στα *cos1 coi1*, η μετάλλαξη *cos1* εξασθενεί το μονοπάτι RIB, επομένως μειώνεται η κατασταλτική δράση που ασκούν οι πρωτεϊνες (S1) και τελικά ενεργοποιείται η έκφραση των καθοδικώς εκφραζόμενων γονιδίων (G1), οδηγώντας σε αποκατάσταση των αντίστοιχων JA-επαγόμενων αποκρίσεων. (Πηγή: Xiao *et al.*, 2004)

#### Χειρισμός με Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 (Pst DC3000)

Οι Nie και Xu (2016) σε πρόσφατη έρευνά τους κάνουν εκτενή λόγο για εμπλοκή της επαγόμενης από RIB άμυνας με το MAPK-μονοπάτι σηματοδότησης (και ιδιαίτερα με τις MAPK3 και MAPK6) κατά την προσβολή με τον παθογόνο μικροοργανισμό Pst DC3000.

Παρ' όλα αυτά, προκειμένου να ελέγξουν και αν η ενδογενής βιοσύνθεση της RIB επηρεάστηκε κατά την προσβολή, ανέλυσαν τόσο την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα-συστατικά του μονοπατιού όσο και τα επίπεδα RIB, FMN και FAD. Ως αποτέλεσμα, η έκφραση των γονιδίων είχε αυξηθεί όπως και τα επίπεδα των flavins, προτείνοντας ότι τα φυτά αυξάνουν τη βιοσύνθεση της RIB ως αντίδραση στην προσβολή από Pst DC3000.

#### Γονίδιο PHS1

Η συγκεκριμένη έρευνα αναφέρεται στο γονίδιο *PHS1*, το οποίο ομοίως με τα προαναφερθέντα, συμμετέχει στη διαδικασία βιοσύνθεσης της ριβοφλαβίνης (Εικόνα 19). Η εργασία αυτή των Ouyang *et al*. (2010) θα αναλυθεί εκτενέστερα στην επόμενη υποενότητα καθώς ορισμένες από τις παρατηρήσεις τους θα μπορούσαν να έχουν πιο άμεση συσχέτιση με το ίδιο το μετάλλαγμα *mosaic*.

## 4.2.2 Ο φαινότυπος mosaic είναι πιθανό αποτέλεσμα φωτο-οξειδωτικής καταπόνησης (photooxidative stress)

Σε έρευνα τους το 2010 οι Ouyang *et al.*, μελετώντας το μετάλλαγμα *phs1*, κατέληξαν σε ορισμένα συμπεράσματα που δύνανται να έχουν εφαρμογή και στο μετάλλαγμα *mosaic*. Το μετάλλαγμα *phs1* εμφάνιζε χλώρωση έπειτα από ανάπτυξη των φυτών σε συνθήκες φωτός 140μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. Ως υπεύθυνο για την μετάλλαξη αυτή ταυτοποιήθηκε το γονίδιο *PHS1* (*At3g47390*). Το γονίδιο αυτό έχει βρεθεί πως κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη η οποία περιέχει μια λειτουργική περιοχή deaminase-reductase, συστατικό-κλειδί στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της ριβοφλαβίνης (**Εικόνα 19**).

Την ταυτοποίηση της μετάλλαξης *phs1*, ακολούθησαν μια σειρά από πειράματα με σκοπό την περαιτέρω μελέτη του χλωρωτικού αυτού φαινοτύπου. Αρχικά, η μεταβολή τόσο της ανάπτυξης όσο και του προτύπου χλώρωσης ελέγχθηκε σε τρείς διαφορετικές εντάσεις φωτός [30μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (χαμηλός φωτισμός), 80μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (κανονικός φωτισμός), 140μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (υψηλός φωτισμός)]. Τα αποτελέσματα του ελέγχου αυτού φανέρωσαν παρόμοιους φαινοτύπους μεταξύ των *phs1* και αγρίου τύπου φυτών όταν αυτά αναπτύσσονταν σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού, ενώ παρατηρήθηκε μειωμένη ανάπτυξη συνοδευόμενη από σταδιακά αυξανόμενη εμφάνιση χλώρωσης υπό κανονικό φωτισμό. Υπό συνθήκες υψηλού φωτισμού, ο χλωρωτικός φαινότυπος εκδηλώθηκε ραγδαία με τα φύλλα να γίνονται σχεδόν εξ' ολοκλήρου χλωρωτικά. Τα ανωτέρω δεδομένα είχαν ως αποτέλεσμα το χαρακτηρισμό του μεταλλάγματος ως φωτοευαίσθητου.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως το πρότυπο χλώρωσης του *phs1* είναι σχεδόν όμοιο με αυτό του *mosaic* σε συνθήκες κανονικού και υψηλού φωτισμού (Εικόνα 27) και παρότι δεν έχει πραγματοποιηθεί αντίστοιχη οργανωμένη καταγραφή του φαινοτύπου *mosaic* σε διαβαθμισμένες εντάσεις φωτισμού, ανάλογες μεταβολές του έχουν παρατηρηθεί σποραδικά.



WT

Εικόνα 27. Φυτά αγρίου τύπου (WT) και phs1 υπό ανάπτυξη σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού (30μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) επί 4 εβδομάδες, που ακολουθήθηκε από ανάπτυξη σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού (LL 30μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), κανονικού φωτισμού (NL 80 $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) ή υψηλού φωτισμού (HL 140 $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) για 2 εβδομάδες. (Πηγή: Ouyang et al., 2010)

Επανερχόμενοι στην έρευνα πάνω στο phs1, μία σειρά βιοχημικών και φυσιολογικών αναλύσεων (π.χ. αυξημένη περιεκτικότητα O2<sup>-</sup> και ενεργότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων του κύκλου γλουταθειόνης-ασκορβικού οξέως όπως το SOD και η DHAR (dehydroascorbate reductase) σε κανονικά και υψηλά επίπεδα φωτισμού) επεξηγεί πως η γενικότερη διατάραξη του μονοπατιού βιοσύνθεσης της ριβοφλαβίνης και των τελικών προϊόντων της μπορεί να οδηγήσει, αλυσιδωτά, στην εκδήλωση ενός φωτο-οξειδωτικού στρες, το οποίο φαίνεται να λογίζεται ως υπεύθυνο γι' αυτήν την φωτοευαισθησία του phs1. Συνοπτικά, το PHS1 εμπλέκεται στη διαδικασία βιοσύνθεσης της ριβοφλαβίνης ενώ τόσο η ριβοφλαβίνη όσο και τα FMN και FAD αποτελούν τα τελικά προϊόντα αυτού του μονοπατιού. Στα φυτά, το FAD αποτελεί ουσιαστικό συμπαράγοντα ποικίλων ενζύμων που συμμετέχουν σε πολλές μεταβολικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένων της αποκατάστασης του DNA (DNA repair) και του κιρκάδιου ρυθμού (circadian clock) (Hitomi et al., 2009), του καταβολισμού της γλυκερόλης (Quettier et al., 2008) και τη βιοσύνθεση της βιταμίνης C (Leferink et al., 2008), συνεπώς οποιαδήποτε μεταβολή των επιπέδων του συνεπάγεται διαταραχές στις βιολογικές διαδικασίες στις οποίες εμπλέκεται άμεσα ή έμμεσα.

Eμβαθύνοντας περισσότερο, το ένζυμο ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase (FNR) χρησιμοποιεί το FAD σαν συμπαράγοντα για την κατάλυση του τελικού σταδίου της φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (photosynthetic electron transport) στους χλωροπλάστες και όταν τα επίπεδα FAD δεν είναι επαρκή, η ενεργότητα του FNR μειώνεται και η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων διαταράσσεται. Επιπρόσθετα, το FAD εμπλέκεται στον κύκλο γλουταθειόνηςασκορβικού οξέος ο οποίος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των φυτών από βλάβες που προκαλεί η μεγάλη ένταση φωτισμού (photodamage) (Beutler, 1969, Ermler et al., 1991, May et al., 1998, Noctor & Foyer, 1998, Ding et al., 2009) αλλά και στο αμυντικό σύστημα των φυτών έναντι της οξειδωτικής καταπόνησης, αποτελώντας, ιδιαίτερα, ρυθμιστή των αυξημένων ενδοκυτταρικών επιπέδων H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, που παράγονται ως υποπροιόντα του μεταβολισμού (Apel & Hirt, 2004). Ο κύκλος αυτός περιλαμβάνει μη ενζυματικούς αντιοξειδωτικούς μεταβολίτες [όπως το ασκορβικό οξύ (ascorbate, ASC), η glutathione disulfide (GSSG) και η γλουταθειόνη (glutathione, GSH)] αλλά και τα ένζυμα που συνδέουν αυτούς [όπως τα SOD, DHAR, υπεροξειδάση του ασκορβικού (APX), υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και glutathione reductase (GR)]. Επιπλέον, πολλά από τα ένζυμα που εμπλέκονται στο μονοπάτι αυτό είναι φλαβοένζυμα (Ouyagn et al., 2010). Τα παραπάνω, μέσω διαδοχικών αντιδράσεων εξουδετερώνουν την περίσσεια H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> που σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της φωτοαναπνοής, καταλύοντας την μετατροπή του σε νερό και οξυγόνο (Apel & Hirt, 2004). Όσον αφορά μεμονωμένα τη γλουταθειόνη, θεωρείται ότι υπάρχει στενή σχέση μεταξύ της κατάστασής της και της αυξημένης συγκέντρωσης του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ενώ ο λόγος GSH/GSSG αποτελεί χρήσιμο δείκτη για το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από αυξημένη ενδοκυτταρική παραγωγή  $H_2O_2$  (Noctor *et al.*, 2012). Το ένζυμο GR προαπαιτεί διαθέσιμο FAD προκειμένου να δημιουργηθεί GSH από GSSG. Αυξημένη ενεργότητα GR σε συνθήκες φωτός μεγάλης έντασης συνεπάγεται πιο αποτελεσματική εξουδετέρωση ενεργών μορφών οξυγόνου, αλλά την ίδια στιγμή για να επιτευχθεί αυτό, οδηγεί σε μεγαλύτερη κατανάλωση FAD.

Τα δεδομένα αυτά, προσαρμόζοντάς τα στο *phs1*, οδηγούν στην υπόθεση πως, αντίστοιχα, η αυξημένη ενεργότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων που ερεύνησαν (SOD, DHAR) ή άλλων ενζύμων που αξιοποιούν το FAD, θα οδηγήσουν σε μεγαλύτερη κατανάλωση FAD. Όμως η μη επαρκής διαθεσιμότητά του (λόγω διαταραχής του μονοπατιού της RIB) συνεπάγεται μειωμένη ενεργότητα FNR και υπό τις δεδομένες συνθήκες αυξανόμενου φωτισμού, περισσότερα ηλεκτρόνια θα διοχετεύονται από το Φωτοσύστημα Ι (PSI) σε μοριακό οξυγόνο (O<sub>2</sub>) μέσω της αντίδρασης Mehler (Mehler, 1951) με αποτέλεσμα την παραγωγή ριζών υπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Κατά τους Krieger-Liszkay *et al.* (2008), η φωτεινή ενέργεια είναι σημαντική για τη διατήρηση της φυτικής ανάπτυξης και του μεταβολισμού, αλλά όταν το ποσό της ενέργειας που απορροφάται υπερβαίνει το ποσό της ενέργειας που απαιτείται από τον μεταβολισμό, τα φυτά τότε πιθανόν να υποφέρουν από φωτοαναστολή (photoinhibition) και οξειδωτική καταπόνηση. Συμπερασματικά, σύμφωνα με τους Ouyang et al., πιθανών το phs1 -και κατ' επέκταση το mosaic- να οφείλει το φαινότυπό του σε αβιοτική καταπόνηση φωτο-οξειδωτικού στρες, γεγονός που ενισχύεται και μέσω της δραστικής μείωσης που παρατήρησαν στην περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη και σε φωτοσυνθετικές πρωτεΐνες, υπό συνθήκες αυξανόμενου φωτισμού. Όσον αφορά το mosaic, μελλοντικά θα πρέπει να διεξαχθούν ανάλογες μετρήσεις φυσιολογικών και βιοχημικών παραγόντων προκειμένου να ενισχυθεί η σύνδεση του μεταλλάγματος με το phs1.

### 4.3 Μελλοντική εργασία στο μετάλλαγμα mosaic

Τα παραπάνω δεδομένα παρέχουν αρκετές πληροφορίες σχετικά με το λειτουργικό ρόλο της μετάλλαξης *mosaic* και τη διαταραχή των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του. Μελλοντικά, περαιτέρω πειραματικοί χειρισμοί θα χρειαστεί να πραγματοποιηθούν σχετικά με την λειτουργική ανάλυση του μεταλλάγματος. Ορισμένες αναλύσεις που θα μπορούσαν να έπονται της ταυτοποίησης της μετάλλαξης είναι οι ακόλουθες:

- Functional complementation του μεταλλαγμένου φαινοτύπου.
- Οργανωμένη παρατήρηση και καταγραφή του φαινοτύπου mosaic σε περιβάλλοντα μεταβαλλόμενης έντασης φωτισμού, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η φωτοευαισθησία του μεταλλάγματος.
- Ανάλυση βιοχημικών παραγόντων σχετιζόμενων με τη βιοσύνθεση της ριβοφλαβίνης όπως: περιεκτικότητα φύλλων σε FAD, ενεργότητα της πρωτεΐνης FNR, αναλογία NADPH/NADP<sup>+</sup>, συγκέντρωση ελευθέρων ριζών (εντοπισμός O<sub>2</sub><sup>-</sup> με χρώση με NBT και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> με DAB) και αντιοξειδωτικών ενζύμων, προσδιορισμός του βαθμού υπεροξείδωσης των λιπιδίων (ανάλυση TBARS), εξωγενής χορήγηση RIB και των παραγώγων της, χρώση με Trypan Blue για προσδιορισμό του κυτταρικού θανάτου. Οι μεταβολές των παραπάνω παρέχουν ενδείξεις για το αν και πως επηρέασαν την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, οδηγώντας σε αυξημένη παραγωγή ROS και κατ' επέκταση στην εκδήλωση φωτο-οξειδωτικής καταπόνησης στα φυτά mosaic και εμφάνιση διαχεόμενου κυτταρικού θανάτου.
- Πειραματική επιβεβαίωση του intron retention μέσω RT-PCR.
- Εξάταση της υποκυτταρικής τοποθέτησης της πρωτεΐνης FMN/FHY με χρήση μικροσκοπίας φθορισμού (δημιουργία κατασκευής του γονιδίου σε σύντηξη με φθορίζουσα πρωτεΐνη αναφοράς και παροδική έκφραση σε φύλλα Nicotiana benthamiana).
## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Apel, K., and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.

**Asai, S., Mase, K.** and **Yoshioka, H.** 2010. A key enzyme for flavin synthesis is required for nitric oxide and reactive oxygen species production in disease resistance. *The Plant Journal*, **62(6)**, 911-924.

Asai, S., Ohta, K., and Yoshioka, H. 2008. MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in Nicotiana benthamiana. *The Plant Cell*, **20(5)**, 1390-1406.

Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W. L. and Gomez-Gomez, L., ... & Sheen, J. 2002. MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature*, *415*(6875), 977.

Ashtamker, C., Kiss, V., Sagi, M., Davydov, O., and Fluhr, R. 2007. Diverse subcellular locations of cryptogein-induced reactive oxygen species production in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiology*, **143(4)**, 1817-1826.

Benschop, J. J., Mohammed, S., O'Flaherty, M., Heck, A. J., Slijper, M., and Menke, F. L. 2007. Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in Arabidopsis. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(7), 1198-1214.

**Beutler, E.** 1969. Effect of flavin compounds on glutathione reductase activity: in vivo and in vitro studies. *The Journal of clinical investigation*, **48(10)**, 1957-1966.

Boehm, H., Albert, I., Fan, L., Reinhard, A., and Nuernberger, T. 2014. Immune receptor complexes at the plant cell surface. *Current Opinion in Plant Biology*, *20*, 47-54.

**Bourdais, G., Burdiak, P., Gauthier, A., Nitsch, L., Salojärvi, J., Rayapuram, C. and Vaattovaara, A.** 2015. Large-scale phenomics identifies primary and fine-tuning roles for CRKs in responses related to oxidative stress. *PLoS genetics*, *11*(7), e1005373.

Briggs, W. R., and Huala, E. 1999. Blue-light photoreceptors in higher plants. Annual review of cell and developmental biology, 15(1), 33-62.

Brown, J. W. 1996. Arabidopsis intron mutations and pre-mRNA splicing. *The Plant Journal*, **10(5)**, 771-780.

Chinchilla, D., Shan, L., He, P., de Vries, S., and Kemmerling, B.2009. One for all: the receptor-associated kinase BAK1. *Trends in plant science*, *14*(10), 535-541.

Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J. D. and Boller, T. (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, *448*(7152), 497.

**Clarke, J. D.** 2009. Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) DNA miniprep for plant DNA isolation. *Cold Spring Harbor Protocols*, **2009(3)**, pdb-prot5177.

**Couto, D., and Zipfel, C.** 2016. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature Reviews Immunology*, **16(9)**, 537.

Creelman, R. A., and Mullet, J. E. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual review of plant biology*, **48(1)**, 355-381.

Dangl, J. L., and Jones, J. D. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, **411(6839)**, 826.

**Dangl, J. L., Horvath, D. M., and Staskawicz, B. J.** 2013. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science*, *341*(6147), 746-751.

**De Vos, M., Denekamp, M., Dicke, M., Vuylsteke, M., Van Loon, L. C., Smeekens, S. C., and Pieterse, C.** 2006. The Arabidopsis thaliana transcription factor AtMYB102 functions in defense against the insect herbivore Pieris rapae. *Plant signaling & behavior*, **1(6)**, 305-311.

**Delledonne, M.** 2005. NO news is good news for plants. *Current opinion in plant biology*, **8(4)**, 390-396.

**Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., and Lamb, C.** 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98(23)**, 13454-13459.

**Deng, B., Deng, S., Sun, F., Zhang, S., and Dong, H.** 2011. Down-regulation of free riboflavin content induces hydrogen peroxide and a pathogen defense in Arabidopsis. *Plant molecular biology*, **77(1-2)**, 185-201.

Ding, S., Lu, Q., Zhang, Y., Yang, Z., Wen, X., Zhang, L., and Lu, C. 2009. Enhanced sensitivity to oxidative stress in transgenic tobacco plants with decreased glutathione reductase activity leads to a decrease in ascorbate pool and ascorbate redox state. *Plant molecular biology*, *69*(5), 577.

**Dodds, P. N., and Rathjen, J. P.** 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, **11(8)**, 539.

**Dong, H., and Beer, S. V.** 2000. Riboflavin induces disease resistance in plants by activating a novel signal transduction pathway. *Phytopathology*, **90(8)**, 801-811.

**Draper, J.** 1997. Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defence. *Trends in Plant Science*, **2(5)**, 162-165.

**Ermler, U., Ghisla, S., Massey, V., and Schulz, G. E.** 1991. Structural, spectroscopic and catalytic activity studies on glutathione reductase reconstituted with FAD analogues. *European journal of biochemistry*, **199(1)**, 133-138.

Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S., and Somssich, I. E. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in plant science*, *5*(5), 199-206.

Farmer, E. E. 2001. Surface-to-air signals. Nature, 411(6839), 854.

Feng, S., Ma, L., Wang, X., Xie, D., Dinesh-Kumar, S. P., Wei, N., and Deng, X. W. 2003. The COP9 signalosome interacts physically with SCFCOI1 and modulates jasmonate responses. *The Plant Cell*, **15(5)**, 1083-1094.

Feys, B. J., Benedetti, C. E., Penfold, C. N., and Turner, J. G. 1994. Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *The Plant Cell*, *6*(5), 751-759.

**Fischer, M., and Bacher, A.** 2011. Biosynthesis of vitamin B2 and flavocoenzymes in plants. In *Advances in Botanical Research*, **58**, 93-152.

**Furuya, T., Matsuoka, D., and Nanmori, T.** 2014. Membrane rigidification functions upstream of the MEKK1-MKK2-MPK4 cascade during cold acclimation in Arabidopsis thaliana. *FEBS letters*, **588(11)**, 2025-2030.

Gadjev, I., Stone, J. M., and Gechev, T. S. 2008. Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. *International review of cell and molecular biology*, **270**, 87-144.

Gechev, T. S., Van Breusegem, F., Stone, J. M., Denev, I., and Laloi, C. 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays*, *28*(11), 1091-1101.

Gerdes, S., Lerma-Ortiz, C., Frelin, O., Seaver, S. M., Henry, C. S., de Crécy-Lagard, V., and Hanson, A. D. 2012. Plant B vitamin pathways and their compartmentation: a guide for the perplexed. *Journal of experimental botany*, *63*(15), 5379-5395.

Giancaspero, T. A., Locato, V., de Pinto, M. C., De Gara, L., and Barile, M. 2009. The occurrence of riboflavin kinase and FAD synthetase ensures FAD synthesis in tobacco mitochondria and maintenance of cellular redox status. *The FEBS journal*, **276(1)**, 219-231.

**Gupta, S. D**. 2010. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants* (pp. 14-43). CRC Press.

**Gust, A. A., and Felix, G.** 2014. Receptor like proteins associate with SOBIR1-type of adaptors to form bimolecular receptor kinases. *Current Opinion in Plant Biology*, **21**, 104-111.

**Hitomi, K., DiTacchio, L., Arvai, A. S., Yamamoto, J., Kim, S. T., Todo, T. and Getzoff, E. D.** 2009. Functional motifs in the (6-4) photolyase crystal structure make a comparative framework for DNA repair photolyases and clock cryptochromes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106(17)**, 6962-6967.

Jalmi, S. K., and Sinha, A. K. 2015. ROS mediated MAPK signaling in abiotic and biotic stress-striking similarities and differences. *Frontiers in plant science*, *6*, 769.

Jaspers, P., and Kangasjärvi, J. 2010. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiologia Plantarum*, **138(4)**, 405-413.

Jones, J. D., and Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. nature, 444(7117), 323.

**Kaurilind, E., Xu, E., and Brosché, M.** 2015. A genetic framework for H  $_2$  O  $_2$  induced cell death in Arabidopsis thaliana. *BMC genomics*, **16(1)**, 837.

Krieger-Liszkay, A., Fufezan, C., and Trebst, A. 2008. Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Research*, **98(1-3)**, 551-564.

**Leferink, N. G., van den Berg, W. A., and van Berkel, W. J.** 2008. I-Galactono-γ-lactone dehydrogenase from Arabidopsis thaliana, a flavoprotein involved in vitamin C biosynthesis. *The FEBS journal*, **275(4)**, 713-726.

**Li, R., Chen, S., Liu, G., Han, R., and Jiang, J**. 2017. Characterization and Identification of a woody lesion mimic mutant Imd, showing defence response and resistance to Alternaria alternate in birch. *Scientific reports*, **7(1)**, 11308.

López-Millán, A. F., Morales, F., Andaluz, S., Gogorcena, Y., Abadıa, A., De Las Rivas, J., and Abadıa, J. 2000. Responses of sugar beet roots to iron deficiency. Changes in carbon assimilation and oxygen use. *Plant Physiology*, **124(2)**, 885-898.

Lorrain, S., Vailleau, F., Balagué, C., and Roby, D. 2003. Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends in plant science*, **8(6)**, 263-271.

**Losi, A., and Gärtner, W.** 2012. The evolution of flavin-binding photoreceptors: an ancient chromophore serving trendy blue-light sensors. *Annual review of plant biology*, **63**, 49-72.

Lumba, S., Toh, S., Handfield, L. F., Swan, M., Liu, R., Youn, J. Y. and Desveaux, D. 2014. A mesoscale abscisic acid hormone interactome reveals a dynamic signaling landscape in Arabidopsis. *Developmental cell*, **29(3)**, 360-372.

May, M. J., Vernoux, T., Leaver, C., Montagu, M. V., and Inzé, D. 1998. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany*, **49**(**321**), 649-667.

McConn, M., Creelman, R. A., Bell, E., and Mullet, J. E. 1997. Jasmonate is essential for insect defense in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(10), 5473-5477.

**Mehler, A. H.** 1951. Studies on reactions of illuminated chloroplasts: I. Mechanism of the reduction of oxygen and other hill reagents. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **33(1)**, 65-77.

Mistuda, H., Tsuge, H., Tomozawa, Y., and Kawai, F. 1970. On the enzymatic hydrolysis of FAD in spinach leaves. *The Journal of vitaminology*, **16(1)**, 31-38.

Muthamilarasan, M., and Prasad, M. 2013. Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. *Journal of biosciences*, **38(2)**, 433-449.

Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T., and Jones, J. D. 2004. The transcriptional innate immune response to *flg22*. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant physiology*, *135*(2), 1113-1128.

Nemhauser, J. L., Hong, F., and Chory, J. 2006. Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell*, **126(3)**, 467-475.

**Nie, S., and Xu, H.** 2016. Riboflavin-induced disease resistance requires the mitogenactivated protein kinases 3 and 6 in Arabidopsis thaliana. *PloS one*, **11(4)**, e0153175.

Noctor, G., and Foyer, C. H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant biology*, **49(1)**, 249-279.

Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y. I., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B. E. L. E. N., ... and Foyer, C. H. 2012. Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, cell & environment*, *35*(2), 454-484.

**Orrenius, S., Gogvadze, V., and Zhivotovsky, B.** 2007. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **47**, 143-183.

**Ouyang, M., Ma, J., Zou, M., Guo, J., Wang, L., Lu, C., and Zhang, L.** 2010. The photosensitive phs1 mutant is impaired in the riboflavin biogenesis pathway. *Journal of plant physiology*, **167(17)**, 1466-1476.

**Overmyer, K., Brosché, M., and Kangasjärvi, J.** 2003. Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends in plant science*, **8**(7), 335-342.

**Overmyer, K., Tuominen, H., Kettunen, R., Betz, C., Langebartels, C., Sandermann, H., and Kangasjärvi, J.** 2000. Ozone-sensitive Arabidopsis rcd1 mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *The Plant Cell*, **12(10)**, 1849-1862.

**Paranagama, M. P., Sakamoto, K., Amino, H., Awano, M., Miyoshi, H., and Kita, K.** 2010. Contribution of the FAD and quinone binding sites to the production of reactive oxygen species from Ascaris suum mitochondrial complex II. *Mitochondrion*, **10(2)**, 158-165.

**Pastuglia, M., Swarup, R., Rocher, A., Saindrenan, P., Roby, D., Dumas, C., and Cock, J.** M. 2002. Comparison of the expression patterns of two small gene families of S gene family receptor kinase genes during the defence response in Brassica oleracea and Arabidopsis thaliana. *Gene*, **282(1-2)**, 215-225.

**Petrov, V., Hille, J., Mueller-Roeber, B., and Gechev, T. S.** 2015. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Frontiers in plant science*, *6*, 69.

**Pitzschke, A., Djamei, A., Bitton, F., and Hirt**, H. 2009. A major role of the MEKK1– MKK1/2–MPK4 pathway in ROS signalling. *Molecular plant*, **2**(1), 120-137.

**Quettier, A. L., Shaw, E., and Eastmond, P. J.** 2008. SUGAR-DEPENDENT6 encodes a mitochondrial flavin adenine dinucleotide-dependent glycerol-3-P dehydrogenase, which is required for glycerol catabolism and postgerminative seedling growth in Arabidopsis. *Plant physiology*, **148(1)**, 519-528.

Qutob, D., Kemmerling, B., Brunner, F., Küfner, I., Engelhardt, S., Gust, A. A. and Glawischnig, E. 2006. Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins. *The Plant Cell*, **18**(12), 3721-3744.

**Rao, M. V., Lee, H. I., and Davis, K. R.** 2002. Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. *The Plant Journal*, **32(4)**, 447-456.

**Reymond, P., and Farmer, E. E.** 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current opinion in plant biology*, **1(5)**, 404-411.

**Reymond, P., Weber, H., Damond, M., and Farmer, E. E.** 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **12(5)**, 707-719.

Rocher, A., Dumas, C., and Cock, J. M. 2005. A W-box is required for full expression of the SA-responsive gene SFR2. *Gene*, *344*, 181-192.

Rodriguez, E., El Ghoul, H., Mundy, J., and Petersen, M. 2016. Making sense of plant autoimmunity and 'negative regulators'. *The FEBS journal*, 283(8), 1385-1391

Sancar, A. 1994. Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry*, 33(1), 2-9.

Sandoval, F. J., and Roje, S. 2005. An FMN hydrolase is fused to a riboflavin kinase homolog in plants. *Journal of Biological Chemistry*, **280(46)**, 38337-38345.

**Sandoval, F. J., Zhang, Y., and Roje, S.** 2008. Flavin nucleotide metabolism in plants monofunctional enzymes synthesize FAD in plastids. *Journal of Biological Chemistry*, **283(45)**, 30890-30900.

Sasaki, Y., Asamizu, E., Shibata, D., Nakamura, Y., Kaneko, T., Awai, K. and Shimada, H. 2001. Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in Arabidopsis by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. *Dna Research*, **8**(4), 153-161.

Schenk, P. M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C., and Manners, J. M. 2000. Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by

microarray analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97(21), 11655-11660.

Shiu, S. H., and Bleecker, A. B. 2001. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(19), 10763-10768.

Stanley Kim, H., Yu, Y., Snesrud, E. C., Moy, L. P., Linford, L. D., Haas, B. J. and Quackenbush, J. 2005. Transcriptional divergence of the duplicated oxidative stress-responsive genes in the Arabidopsis genome. *The Plant Journal*, **41(2)**, 212-220.

Susin, S., Abian, J., Sanchez-Baeza, F., Peleato, M. L., Abadia, A., Gelpi, E., and Abadia, J. 1993. Riboflavin 3'-and 5'-sulfate, two novel flavins accumulating in the roots of iron-deficient sugar beet (Beta vulgaris). *Journal of Biological Chemistry*, **268(28)**, 20958-20965.

**Taheri, P., and Höfte, M.** 2006. Riboflavin induces resistance in rice against Rhizoctonia sheath diseases by activating signal transduction pathways leading to upregulation of rice cationic peroxidase and formation of lignin as a structural barrier. In *Communications in agricultural and applied biological sciences*, **71(1)**, 255-258.

**Taheri, P., and Tarighi, S.** 2010. Riboflavin induces resistance in rice against Rhizoctonia solani via jasmonate-mediated priming of phenylpropanoid pathway. *Journal of plant physiology*, *167*(3), 201-208.

Takken, F. L., Albrecht, M., and Tameling, W. I. 2006. Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Current opinion in plant biology*, *9*(4), 383-390.

Tarantino, D., Vannini, C., Bracale, M., Campa, M., Soave, C., and Murgia, I. 2005. Antisense reduction of thylakoidal ascorbate peroxidase in Arabidopsis enhances paraquatinduced photooxidative stress and nitric oxide-induced cell death. *Planta*, **221(6)**, 757-765.

Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Dóczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., ... and Hirt, H. 2004. The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. *Molecular cell*, **15(1)**, 141-152.

Torchetti, E. M., Brizio, C., Colella, M., Galluccio, M., Giancaspero, T. A., Indiveri, C., ... and Barile, M. 2010. Mitochondrial localization of human FAD synthetase isoform 1. *Mitochondrion*, **10(3)**, 263-273.

Torres, M. A. 2010. ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum*, 138(4), 414-429.

Tripathy, B. C., and Oelmüller, R. 2012. Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant signaling & behavior*, **7(12)**, 1621-1633.

Turner, J. G., Ellis, C., and Devoto, A. 2002. The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell*, **14(suppl 1)**, S153-S164.

**Van Camp, W., Van Montagu, M., and Inzé, D.** 1998. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO: redox signals in disease resistance. *Trends in Plant Science*, **3(9)**, 330-334.

van der Hoorn, R. A., and Kamoun, S. 2008. From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant Cell*, **20(8)**, 2009-2017.

Van Wees, S. C., and Glazebrook, J. 2003. Loss of non-host resistance of Arabidopsis NahG to Pseudomonas syringae pv. phaseolicola is due to degradation products of salicylic acid. *The Plant Journal*, **33(4)**, 733-742.

van Wersch, R., Li, X., and Zhang, Y. 2016. Mighty dwarfs: Arabidopsis autoimmune mutants and their usages in genetic dissection of plant immunity. *Frontiers in plant science*, **7**, 1717.

Wang, G., Ellendorff, U., Kemp, B., Mansfield, J. W., Forsyth, A., Mitchell, K. and De Wit, P. J. 2008. A genome-wide functional investigation into the roles of receptor-like proteins in Arabidopsis. *Plant physiology*, **147(2)**, 503-517.

Wasternack, C., and Parthier, B. 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends in plant science*, **2(8)**, 302-307.

Wendehenne, D., Durner, J., and Klessig, D. F. 2004. Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Current opinion in plant biology*, **7(4)**, 449-455.

**Wituszyńska, W., and Karpiński, S**. 2013. Programmed cell death as a response to high light, UV and drought stress in plants. In *Abiotic Stress-Plant Responses and Applications in Agriculture*. IntechOpen.

Xiao, S., Dai, L., Liu, F., Wang, Z., Peng, W., and Xie, D. 2004. COS1: an Arabidopsis coronatine insensitive1 suppressor essential for regulation of jasmonate-mediated plant defense and senescence. *The Plant Cell*, *16*(5), 1132-1142.

**Xie, D. X., Feys, B. F., James, S., Nieto-Rostro, M., and Turner, J. G.** 1998. COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science*, *280*(5366), 1091-1094.

Xin, Z., Zhao, Y., and Zheng, Z. L. 2005. Transcriptome analysis reveals specific modulation of abscisic acid signaling by ROP10 small GTPase in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **139(3)**, 1350-1365.

Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W. L., Ma, H. and Xie, D. 2002. The SCFCOI1 ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **14(8)**, 1919-1935.

Yadeta, K. A., Elmore, J. M., Creer, A. Y., Feng, B., Franco, J. Y., Rufian, J. S. and Coaker, G. 2017. A cysteine-rich protein kinase associates with a membrane immune complex and the cysteine residues are required for cell death. *Plant physiology*, **173(1)**, 771-787.

**Yruela, I., Arilla-Luna, S., Medina, M., and Contreras-Moreira, B**. 2010. Evolutionary divergence of chloroplast FAD synthetase proteins. *BMC evolutionary biology*, **10(1)**, 311.

Zago, E., Morsa, S., Dat, J. F., Alard, P., Ferrarini, A., Inzé, D. and Van Breusegem, F. 2006. Nitric oxide-and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. *Plant Physiology*, **141(2)**, 404-411.

Zaninotto, F., La Camera, S., Polverari, A., and Delledonne, M. 2006. Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response. *Plant Physiology*, **141(2)**, 379-383.

**Zhang, L., and Xing, D.** 2008. Methyl jasmonate induces production of reactive oxygen species and alterations in mitochondrial dynamics that precede photosynthetic dysfunction and subsequent cell death. *Plant and Cell Physiology*, **49(7)**, 1092-1111.

Zhang, S., Yang, X., Sun, M., Sun, F., Deng, S., and Dong, H. 2009. Riboflavin-induced priming for pathogen defense in Arabidopsis thaliana. *Journal of Integrative Plant Biology*, *51*(2), 167-174.

**Zhu, L., Guo, J., Ma, Z., Wang, J., and Zhou, C.** 2018. Arabidopsis Transcription Factor MYB102 Increases Plant Susceptibility to Aphids by Substantial Activation of Ethylene Biosynthesis. *Biomolecules*, **8**(2), 39.

**Zipfel, C.** 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current opinion in immunology*, **20(1)**, 10-16.

Zipfel, C. 2014. Plant pattern-recognition receptors. *Trends in immunology*, 35(7), 345-351.

**Πατσουμάς Α.** 2006. Αποδοτικότητα μεταλλάγματος Arabidopsis στη χρήση Φωσφόρου, Μεταπτυχιακή Μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**Τσιτσεκιάν Ντ.** 2009. Μοριακή Χαρτογράφηση και λειτουργική μελέτη μετάλλαξης του φυτού Arabidopsis thaliana με κλιμακούμενο πρότυπο χλώρωσης, Πτυχιακή Μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

## ПАРАРТНМА

# Α. Λίστα εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πειραματική μελέτη

Στον Πίνακα Π Ι παρουσιάζονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και αναφέρονται στο παρόν κείμενο. Όλα τα stock διαλύματα των χρησιμοποιούμενων εκκινητών βρίσκονταν σε συγκέντρωση 100μΜ.

Πίνακας Π Ι. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων. Αναγράφεται η ονομασία τους, η 5'-3' ακολουθία τους, καθώς και η Tm τους.

ΟΡΘΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ					
Όνομα εκκινητή	Ακολουθία (5′ – 3′)	Tm (°C)			
4g21380-For	AATCGGTTACGTAAGGTTCACAC	58,9			
At4g21390-For	TCCTTTATTACGAAGATCCTCACTTG				
AT4G21400-FOR	TGATTTAGTTCAAAGACCATACTGCT				
AT4G21410-FOR	GGTCGACATTTACCATATAAAGACTC				
AT4G21440-FOR	CTCTGATTAGCTCATAAATACTAAAC	56,9			
AT4G21470-FOR	CAACTCATCGCCGGCGTTTACCA	54,8			
	ΑΝΑΣΤΡΟΦΟΙ ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ				
Όνομα εκκινητή	Ακολουθία (5′ – 3′)	Tm (°C)			
4g21380-Rev	CTTATTGTCGCTCAATTTAGTCATC	58,1			
At4g21390-Rev	CTTATCGTCCAAGAACAACCGTTGAAGTG				
AT4G21400-REV	CACACAAACAAAATCCATCATTGAAG				
AT4G21410-REV	AGTATCTCACAGCTTCACATTCATG				
AT4G21440-REV	CAGTATTTTACAAGTAAACAAATCG	64,2			

ομασία τους, η 5'-3' ακολουθία τους, καθώς και η Tm τους.					
ΟΡΘΟΙ ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ					
Όνομα εκκινητή	Ακολουθία (5′ – 3′)	Tm (°C)			
M13 uni (-21)	TGTAAAACGACGGCCAGT				
380seqA	CCGACAGATACTTTACTTCCG	58,33			
380seqB	GCACGGCGTTTGCGAATACGGAT	64,8			
380seqC	CATGAGTGAAACTTTTGATTACTAC	56,74			

Πίνακας Π ΙΙ. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλούχιση των γονιδίων. Αναγράφεται η ονομασία τους, η 5'-3' ακολουθία τους, καθώς και η Tm τους.

380seqC	CATGAGTGAAACTTTTGATTACTAC	56,74
380seqD	TAGGACAAGGTGGTTTTGGTATAG	59,73
380seqE	TGTCTCCTGAATATGCAATGGACG	61,45
4g21390-seqA	GTTGACGAATTATCTTTACGGAT	
4g21390-seB	CTCTGCTTCTATGGAGATTCAAGA	
400seqA	GTGCTGGTCAGGTTGGTCTTAGGTG	
400seqB	GTCTATGAGTTCATCAAGAACGCTA	
410seqA	GAATATTCCGAGTTGTTGTGATGCTG	
410seqB	CTTGCAAAGCTTCAACATAGGAAC	
440seqA	GATATCTCATCCATCTTAGCTTCATCTC	
470seqAF	GGAGTACCTGTGGCTTTGGCTTC	

ΑΝΑΣΤΡΟΦΟΙ ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ						
Όνομα εκκινητή	Ακολουθία (5′ – 3′)	Tm (°C)				
M13 Rev (-29)	CAGGAAACAGCTATGACC					
M13 Rev (-49)	GAGCGGATAACAATTTCACACAGG					
4g21390-seqC	GTTCCAACAACGCGAACCGTGT					
470seqBR	ACGTAGCTCTTCTCCGTAGAAATCCTC					
470seqCR	CAGCTGGATCTTTCTTCAATCTTTTCGC					

# Β. Αποτελέσματα μικροσυστοιχιών- Έκφραση των γονιδίων της περιοχής στα φύλλα











### Γ. Αποτελέσματα μικροσυστοιχιών-Έκφραση των γονιδίων της περιοχής σε βιοτικές καταπονήσεις

Showing 14 measure(s) of 14 gene(s) on selection: AT-2 Log2-ratio Down-regulated Lin-ner threshold for up-regulation AT-00391 A. brassicicola (Ler) / untreated leaf disc samples (Ler) AT-00661 A. brassicicola study 2 (Col-0) / mock treated leaf samples (Col-0) AT-00661 A. brassicicola study 3 (Col-0) / mock treated leaf samples (Col-0) AT-00147 B. cinerea / non-infected rosette leaf samples AT-00309 B. graminis (Col-0) / non-infected rosetile leaf samples AT-00202 E. coli (O157:H7) / mock inoculated leaf samples AT-00202 E. coli (TUV86-2 filC) / mock inoculated leaf samples AT-00614 G. orontii study 6 (CoI-0) / untreated rosette leaf samples (CoI-0) AT-00614 G. orontii study 6 (CoI-0) / untreated rosette leaf samples (CoI-0) AT-00634 H. arabidopsidis study 6 (Ws-4) / mock inoculated Ws-4 cotyledon s. AT-00672 L. huidobrensis (CoI-0) / untreated rosette leaf samples (CoI-0) AT-00550 M. incognita study 2 (One-Direct) / non-infested root cell samples (O. AT-00550 M. incognita study 2 (Pico) / non-infested root cell samples (Pico) AT-00638 P. cucumerina (CoI-0) / mock inoculated rosette samples (CoI-0) AT-00648 P. cucumerina study 2 (CoI-0) / mock inoculated rosette samples (Ci-AT-00108 P. infestans (6h) / mock treated leaf samples (6h) AT-00108 P. infestans (12h) / mock treated leaf samples (12h) AT-00425 P. parasitica (2.5h) / non-infected root samples (Col-0) AT-00425 P. parasitica (6h) / non-infected root samples (Co-0) AT-00425 P. parasitica (10.5h) / non-infected root samples (Co-0) AT-00425 P. parasitica (10.5h) / non-infected root samples (CoI-0) AT-00425 P. parasitica (30h) / non-infected root samples (CoI-0) AT-00406 P. syringae pv. maculicola (CoI-0) / mock related leaf samples (CoI-0) AT-00106 P. syringae pv. phaseolicola (2h) / P. syringae pv. tomato (DC3000 hr. AT-00106 P. syringae pv. phaseolicola (2h) / mock inoculated leaf samples (2h) AT-00106 P. syringae pv. phaseolicola (6h) / mock inoculated leaf samples (6h) AT-00106 P. syringae pv. phaseolicola (6h) / P. syringae pv. tomato study 2 (DC AT-00106 P. syringae pv. phaseolicola (24h) / mock inoculated leaf samples (2... AT-00106 P. syringae pv. tomato (DC3000) / mock inoculated leaf samples (2h) AT-00106 P. syringae pv. tomato (DC3000 avrRpm1) / mock inoculated leaf sa... AT-00106 P. syringae pv. tomato study 2 (DC3000 avrRpm1) / mock inoculated ... AT-00106 P. syringae pv. tomato study 2 (DC3000 avrRpm1) / P. syringae pv. to... AT-00106 P. syringae pv. tomato study 2 (DC3000 hrCc-) / P. syringae pv. tomat. AT-00106 P. syringae pv. tomato study 3 (DC3000) / mock inoculated leaf sam... AT-00106 P. syringae pv. tomato study 3 (DC3000 avrRpm1) / mock inoculated ... AT-00106 P. syringae pv. tomato study 3 (DC3000 hrcC-) / mock inoculated leaf... AT-00106 P. syringae pv. tomato study 3 (DC3000 hrcC-) / mock inoculated iear. AT-00211 P. syringae pv. tomato study 6 (Ws-0) / mock-inoculated ieaf sample... AT-00202 P. syringae pv. tomato study 7 (Ws-0) / mock-inoculated ieaf sample... AT-00203 P. syringae pv. tomato study 10 (DC3000 hrpA) / mock inoculated iear. AT-0033 P. syringae pv. tomato study 12 (CO-10) / untrated leaf tissue sampl... AT-00585 R. solani (AG2-1) / mock inoculated whole plant samples AT-00585 R. solani (AG8) / mock inoculated whole plant samples AT-00681 S. sclerotiorum (CoI-0) / mock inoculated rosette leaf samples (CoI-0) AT-00681 S. sclerotiorum study 2 (CoI-0) / mock inoculated rosette leaf sample... AT-00535 X, campestris pv, campestris (Ws-4) / untreated leaf samples (Ws-4) AT-00535 X. campestris pv. campestris study 2 (Ws-4) / untreated leaf sa Elicitor AT-00593 chitocctaose (CoI-0) / mock treated whole plant samples (CoI-0) AT-00597 EF-Tu (elf18) study 4 (CoI-0) / mock treated seedling samples (CoI-0) AT-00128 EF-Tu (elf26) (30min) / untreated whole plant samples (Ler-0) AT-00128 EF-Tu (elf26) (60min) / untreated whole plant samples (Ler-0) AT-00107 FLG22 (1h) / H20 treated leaf samples (1h) AT-00107 FLG22 (4h) / H20 treated leaf samples (4h) AT-0031 FLG22 + GA (1h) / untreated leaf disc samples (Ler) AT-00391 FLG22 + GA (2h) / untreated leaf disc samples (Ler) AT-00253 FLG22 study 2 (1h) / H2O treated CoI-0 seedlings (1h) AT-00253 FLG22 study 2 (1h) /H2O treated CoF0 seedlings (1h) AT-00253 FLG22 study 2 (3h) /H2O treated CoF0 seedlings (3h) AT-00392 FLG22 study 4 (CoF0) / untreated leaf disc samples (CoF0) AT-00391 FLG22 study 5 (CoF0) / untreated leaf disc samples (CoF0) AT-00391 FLG22 study 5 (Ler) / FLG22 study 8 (1h) AT-00391 FLG22 study 6 (Ler) / Untreated leaf disc samples (Ler) AT-00391 FLG22 study 7 (Ler) /FLG22 study 8 (2h) AT-00391 FLG22 study 10 (1h) /FLG22 study 10 (0h) AT-00391 FLG22 study 10 (2h) /FLG22 study 10 (0h) AT-00391 FLG22 study 10 (2h) /FLG22 study 10 (0h) AT-00391 FLG22 study 11 (2h) /FLG22 study 11 (0h) AT-00391 FLG22 study 10 (h) /FLG22 study 11 (0h) AT-00107 GST-NPP1 (1h) /GST (1h) AT-00107 GST-NPP1 (4h) / GST (4h) AT-00107 HrpZ (1h) / H2O treated leaf samples (1h) AT-00107 HrpZ (4h) / H2O treated leaf samples (4h) AT-00253 OGs (1h) / H2O treated Col-0 seedlings (1h) AT-00597 Pep2 (Col-0) / mock treated seedling samples (Col-0)

## **Δ. Αποτελέσματα μικροσυστοιχιών-Έκφραση των γονιδίων** της περιοχής σε αβιοτικές καταπονήσεις

Showing 14 measure(s) of 14 gene(s) on selection: AT-2

					1	thresho	old for	up-re	gulatio	n
Dowr	n-regulate	d					5	_	Up-reg	ulated
-2.5	-2.0	-1.5	-1.0	-0.5	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
					Log2-ra	tio				

#### ▼ Stress

AT-00120	cold study 2 (late) / untreated root samples (late)
AT-00670	cold study 21 (Col) / untreated rosette leaf samples (Col)
AT-00419	drought study 6 (Col-0) / untreated plant samples (Col-0)
AT-00419	drought study 7 (Col-0) / untreated plant samples (Col-0)
AT-00613	drought study 13 (Ull2-5) / mock treated Ull2-5 rosette leaf samples
AT-00626	drought study 15 (Col-0) / untreated Col-0 root samples
AT-00637	drought study 16 (Col) / mock treated Col whole plant samples
AT-00179	heat study 2 (ws) / untreated leaf samples (ws)
AT-00201	hypoxia study 6 (Col-0) / untreated plant samples (Col-0)
AT-00456	hypoxia study 9 (Col-0) / untreated root samples (Col-0)
AT-00120	osmotic (early) / untreated green tissue samples (early)
AT-00120	osmotic (late) / untreated green tissue samples (late)
AT-00413	oxidative study 3 / Tween 20 treated aeral tissue samples
AT-00120	salt study 2 (early) / untreated root samples (early)
AT-00120	salt study 2 (late) / untreated root samples (late)
AT-00678	shift cold to freezing study 3 (Col-0) / cold study 23 (Col-0)
AT-00120	wounding (early) / untreated green tissue samples (early)
	AT-00120 AT-00670 AT-00419 AT-00419 AT-00613 AT-00637 AT-00179 AT-00201 AT-0040120 AT-00120 AT-00120 AT-00413 AT-00120 AT-00120 AT-00120 AT-00120



### Ε. Αποτελέσματα αλληλούχισης των υποψήφιων προς μελέτη γονιδίων

Στις επόμενες σελίδες παρατίθονται ολόκληρες οι ακολουθίες των γονιδίων που απομονώθηκαν από το μετάλλαγμα στοιχιζόμενες με τις αντίστοιχες ακολουθίες των WT γονιδίων, όπως αυτές διατίθενται από τη βάση δεδομένων TAIR.

Σε κάθε εικόνα αλληλούχισης, η πρώτη σειρά αφορά την WT ακολουθία, ενώ η δεύτερη την ακολουθία του γονιδίου του μεταλλάγματος. Πάνω στις εικόνες, με πράσινο χρώμα περικλείεται το κωδικόνιο έναρξης ενώ με κόκκινο χρώμα το κωδικόνιο λήξης. Στην εικόνα αλληλούχισης του *At4g21470*, με το κυκλωμένο ζεύγος βάσεων με μωβ χρώμα υποδηλώνει την μετάλλαξη *mosaic*.

#### > At4g21380



94



#### > At4g21390







>At4g21400

98

#### > Atg4g21410



99

> At4g21440



#### > At4g21470

