



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Διερεύνηση του προφίλ έκφρασης του γονιδίου της κινάσης
της ριβοφλαβίνης/φωσφατάσης του FMN στο *Arabidopsis thaliana*

Αγγελική Β. Ξυδερού Μαλεφάκη

Επιβλέπων καθηγητής:
Γεράσιμος Δάρας, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2023**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Διερεύνηση του προφίλ έκφρασης του γονιδίου της κινάσης
της ριβοφλαβίνης/φωσφατάσης του FMN στο *Arabidopsis thaliana*

Investigating the expression profile of FMN riboflavin kinase/phosphatase gene
in *Arabidopsis thaliana*

Αγγελική Β. Ξυδερού Μαλεφάκη

Εξεταστική επιτροπή:

Γεράσιμος Δάρας, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Δήμητρα Μηλιώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

Σταμάτης Ρήγας, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Διερεύνηση του προφίλ έκφρασης του γονιδίου της κινάσης της ριβοφλαβίνης/φωσφατάσης του FMN στο *Arabidopsis thaliana*

*ΠΜΣ Βιολογία Συστημάτων
Τμήμα Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας*

Περίληψη

Η ριβοφλαβίνη ή αλλιώς όπως ονομάζεται βιταμίνη B₂ αποτελεί μία εκ των συνολικά 8 υδατοδιαλυτών, ουσιών που ανήκουν στην ομάδα των βιταμινών του συμπλέγματος B. Η απομόνωση και η αποσαφήνιση της δομής της κορυφώθηκε με την απονομή του βραβείου Νόμπελ χημείας στους Paul Karrer και Richard Kuhn το 1937 και 1938. Η βιομηχανική της σημασία είναι μεγάλη με την παραγωγή της αρχικά με χημικές μεθόδους και έπειτα με βιοτεχνολογικές μεθόδους με τη χρήση βακτηριακών στελεχών, οι οποίες και επικράτησαν. Η παγκόσμια αγορά παραγωγής ριβοφλαβίνης για ανθρώπινη και ζωική χρήση έχει υπερδιπλασιαστεί πλέον και ξεπερνά τους 9000 τόνους το χρόνο. Η ριβοφλαβίνη έχει ήδη αποτελέσει αντικείμενο πολυετών ερευνών, οι οποίες έχουν οδηγήσει στη χαρτογράφηση του βιοσυνθετικού της μονοπατιού σε βακτήρια και μύκητες. Ωστόσο, παρότι το αντίστοιχο μονοπάτι στα φυτά παρουσιάζει ομοιότητες με εκείνο των βακτηρίων, δεν έχουν ξεκαθαριστεί πλήρως όλα τα ένζυμα που συμμετέχουν αλλά και οι αλληλεπιδράσεις τους με άλλες πρωτεΐνες. Το γονίδιο At4g21470 κωδικοποιεί ένα διλειτουργικό ένζυμο στο μονοπάτι της ριβοφλαβίνης, της κινάσης ριβοφλαβίνης/φωσφατάσης FMN, και έχει εμφανίσει συσχέτιση με την αντίδραση στο οξειδωτικό στρες.

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, προσπαθήσαμε να εξετάσουμε το πρότυπο έκφρασης αυτού του γονιδιακού τύπου και να διαφυλάξουμε την υποκυτταρική και ιστοειδική του θέση. Για αυτόν τον σκοπό, εισαγάγαμε την επιθυμητή γενετική κατασκευή σε φυτά *Arabidopsis thaliana* μέσω μιας σειράς μοριακών κλωνοποιήσεων. Ταυτόχρονα, εξέτασαμε τον υποκινητή του γονιδίου, όπου η αναζήτηση σε βιολογικές βάσεις δεδομένων ανέδειξε περίπου 50 διαφορετικά σημεία σύνδεσης για αυτόν τον συγκεκριμένο υποκινητή. Παρ' όλα αυτά, είναι αναγκαία η περαιτέρω μελέτη του προτύπου έκφρασής του σε διάφορους ιστούς και αναπτυξιακά στάδια, όπου η γύρη αναπτύσσεται. Επιπλέον, μια ανάλυση της αλληλεπίδρασης του υποκινητή αυτού του γονιδίου με άλλες πρωτεΐνες σύνδεσης προς αυτόν μπορεί να εξεταστεί μέσω του συστήματος δύο υβριδίων στις ζύμες, με σκοπό να διερευνήσουμε περαιτέρω τον ρόλο του υποκινητή στον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου.

Επιστημονική περιοχή: Μοριακή Βιολογία

Λέξεις-κλειδιά: ριβοφλαβίνη; Φλαβο-συνένζυμο; διλειτουργικό ένζυμο; FAD και FMN χλώρωση, αβιοτική καταπόνηση

Investigating the expression profile of FMN riboflavin kinase/phosphatase gene in *Arabidopsis thaliana*

MSc Systems Biology

Biotechnology Department

Molecular Biology Laboratory

Summary

Riboflavin, or vitamin B2 as it is called, is one of a total of 8 water-soluble substances that belong to the group of vitamins of the B complex. The isolation and elucidation of its structure culminated in awarding the Nobel Prize in Chemistry to Paul Karrer and Richard Kuhn in 1937 and 1938. Its industrial importance is great with its production initially by chemical methods and then by biotechnological methods using bacterial strains, which prevailed. The global market for riboflavin production for human and animal use has now more than doubled to over 9000 tons per year. Riboflavin has already been the subject of many years of research, which has led to the mapping synthetic pathway in bacteria and fungi. However, although the corresponding pathway in plants shows similarities with that of bacteria, not all the enzymes involved and their interactions with other proteins have been fully elucidated. The At4g21470 gene encodes a bifunctional enzyme in the riboflavin pathway, riboflavin kinase/FMN phosphatase, and has been shown to be associated with oxidative stress response.

In the context of the present work, we attempted to examine this gene locus's expression pattern and preserve its subcellular and tissue-specific location. To this end, we introduced the desired genetic construct into *Arabidopsis thaliana* plants through a series of molecular cloning. At the same time, we examined the gene's promoter, where a search of biological databases revealed approximately 50 different binding sites for this promoter. Nevertheless, further study of its expression pattern in various tissues and developmental stages, where the pollen develops, is necessary. In addition, an analysis of the interaction of the promoter of this gene with other proteins binding to it can be examined through the yeast two-hybrid system, to further investigate the role of the promoter in the control of gene expression.

Scientific area: Molecular Biology

Keywords: riboflavin; Flavo-coenzyme; bifunctional enzyme; FAD and FMN chlorosis; abiotic stress

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	9
1. Εισαγωγή.....	10
1.1 Η Ριβοφλαβίνη (7,8-dimethyl-10-ribityl-isoalloxazine)	10
1.1.1 Βιοσύνθεση της ριβοφλαβίνης.....	11
1.1.2 Μεταβολισμός της ριβοφλαβίνης.....	12
1.1.3 FMN, FAD και Φλαβοπρωτεΐνες.....	12
1.1.4 Εξέλιξη και Υποκυτταρική τοποθέτηση του ενζύμου	13
1.1.5 Οικονομική σημασία της ριβοφλαβίνης.....	14
1.2 Οργανισμός μοντέλο <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
1.2.1 Ανάπτυξη του <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
1.3 Μετάλλαγμα “ <i>mosaic</i> ”.....	17
1.3.1 Φαινοτυπική περιγραφή του μεταλλάγματος.....	17
1.3.2 Γονοτυπική περιγραφή της μετάλλαξης.....	18
1.3.3 Πού οφείλεται ο φαινότυπος του μεταλλάγματος;.....	18
1.3.4 Χαρτογράφηση της μετάλλαξης	19
1.3.5 Πως η παραγωγή ROS συσχετίζεται με το κυτταρικό θάνατο;	19
1.4 GUS reporter system.....	20
1.4.1 Χαρακτηριστικά συστήματος GUS.....	21
1.4.2 Πλεονεκτήματα και περιορισμοί μεθόδου	21
1.5 Βιολογικές Βάσεις Δεδομένων	22
1.6 Σκοπός του πειράματος.....	23
2. Υλικά και Μέθοδοι	24
2.1 Προετοιμασία και συνθήκες ανάπτυξης <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
2.2 LB Media	24
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)	25
2.4 Ανάλυση δεσοξυριβονουκείκων οξέων σε πηκτή αγαρόζης	27
2.3.1 Διαδικασία παρασκευής πηκτής αγαρόζης	27
2.4 Διαχωρισμός μορίων DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και απεικόνιση.....	28
2.6 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA (Plasmid prep)	29
2.7 Klenow fragment treatment	30
2.8 Ενοποίηση τμημάτων DNA με κολλώδη ή τυφλά άκρα (Ligation).....	31
2.9 Βακτηριακά κύτταρα και μετασχηματισμός.....	32

2.9.1	Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>Escherichia coli</i>	32
2.9.2	Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> με πλασμιδιακό DNA.....	33
2.9.3	Αποθήκευση μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα	33
2.10	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα	33
2.10.1	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης	33
2.11	Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού.....	34
2.12	Έλεγχος επιτυχίας μετασχηματισμού μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης Colony PCR	35
2.13	Σύσταση και παρασκευή διαλυμάτων και θρεπτικών μέσων ανάπτυξης	36
2.13.1	Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης φυτών ½ MS	36
2.13.2	Διαλύματα προετοιμασίας, ανάπτυξης και επιλογής βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> DH5a	37
2.14	Χρήση του συστήματος του <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
2.14.1	Μετασχηματισμός Αγροβακτηρίων.....	39
2.14.2	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , Miniprep.....	39
2.14.3	Σταθερός μετασχηματισμός φυτών - Infiltration method	40
2.15	Εργαλεία βιοπληροφορικής ανάλυσης.....	42
3.1.1	Περιγραφή βιολογικών βάσεων δεδομένων.....	43
3	Αποτελέσματα.....	47
3.1	Απομόνωση κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου FMN/FHY και κλωνοποίηση σε πλασμιδιακό φορέα pBluescript II SK(-)	47
3.3	Καθαρισμός ενθεμάτων και φορέων έκφρασης.....	50
3.4	Μετασχηματισμός κυττάρων <i>E. coli</i> με ανασυνδυασμένα πλασμίδια	51
3.5	Colony PCR	51
3.6	Μετασχηματισμός Αγροβακτηρίων (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>) και Σταθερός Μετασχηματισμός φυτών (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	54
3.7	Παρατήρηση με χρώση GUS	55
3.8	Αναζήτηση σε βιολογικές βάσεις δεδομένων	56
3.8.1	Γονίδια εμπλεκόμενα στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης της ριβοφλαβίνης.....	59
3.8.2	Οντολογία γονιδίων ενδιαφέροντος (GO annotations)	60
3.8.3	Ιστοειδική και υποκυτταρική τοποθέτηση του FMN/FHY	64
3.8.4	Στοιχεία υποκινητή και συνέκφραση.....	71
4	Συζήτηση.....	77

4.8	Το μετάλλαγμα <i>mosaic</i>	77
4.9	Φαινότυπος <i>Mosaic</i>	77
4.10	Στοιχεία υποκινητή- έκφραση.....	78
4.11	Ριβοφλαβίνη στα φυτά και κλιματική αλλαγή και υγεία	79
4.12	Μελλοντική εργασία στο μετάλλαγμα <i>mosaic</i>	80
	Βιβλιογραφικές αναφορές.....	82
	Παράρτημα	86
	Το γονίδιο και ο υποκινητής του.....	86
	Πλασμιδιακοί φορείς	93

Η ανάθεση της τρέχουσας μεταπτυχιακής διατριβής πραγματοποιήθηκε με την απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Βιοτεχνολογίας στις 6 Οκτωβρίου 2023, κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα της διατριβής και η Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή της διατριβής.

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και την οικογένεια μου οι οποίοι συνέβαλλαν στην ομαλή εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Συγκεκριμένα, από το εργαστήριο Μοριακής θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου Γεράσιμο Δάρα, ο οποίος με υπομονή μου δίδαξε πολλά από απλές εργαστηριακές τεχνικές έως έναν ερευνητικό τρόπο σκέψης, τους καθηγητές Σταμάτη Ρήγα και Πολυδεύκη Χατζόπουλο που ήταν διαθέσιμοι σε κάθε απορία μου αλλά και τους διδακτορικού φοιτητές καθώς και το υπόλοιπο επιστημονικό προσωπικό για την πολύτιμη βοήθεια τους, την οποία παρείχαν απλόχερα σε καθημερινή βάση.

Τέλος, να ευχαριστήσω τους γονείς και τον μικρό μου αδερφό που με στηρίζουν σε κάθε μου βήμα.

1. Εισαγωγή

1.1 Η Ριβοφλαβίνη (7,8-dimethyl-10-ribityl-isoalloxazine)

Η ριβοφλαβίνη, γνωστή και ως βιταμίνη B2, είναι μία από τις οκτώ υδατοδιαλυτές ουσίες που ανήκουν στην ομάδα των βιταμινών του συμπλέγματος Β. Οι άλλες επτά βιταμίνες του συμπλέγματος Β είναι η θειαμίνη (B1), η νιασίνη (B3), το παντοθενικό οξύ (B5), η πυριδοξίνη (B6), η βιοτίνη (B7), το φολικό οξύ (B9) και η κοβαλαμίνη (B12). Εκτός από την κοβαλαμίνη, τα φυτά μπορούν να συνθέσουν όλες τις άλλες βιταμίνες του συμπλέγματος Β (Gerdes S. κ.ά., 2012).

Η απομόνωση και η αποσαφήνιση της δομής της ριβοφλαβίνης πραγματοποιήθηκε κατά την περίοδο 1920-1930 και ολοκληρώθηκε με την απονομή του βραβείου Νόμπελ στον Paul Karrer και τον Richard Kuhn για τη χημεία τους το 1937 και 1938 (Bacher, A., Eberhardt, S., Eisenreich, W., Fischer, M., Herz, S., Illarionov, B., Kis, K. και Richter, G., 2001). Στη συνέχεια, αποκαλύφθηκε ο ρόλος των φλαβοενζύμων της ριβοφλαβίνης 5-μονοφωσφορικού και δινουκλεοτιδίου αδενίνης της φλαβίνης (FAD) ως συμπαραγόντες των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων άρχισαν να ξεδιπλώνονται στα χρόνια που ακολούθησαν τη διαλεύκανση της δομής.

Αναφορικά με τη δομή του μορίου της ριβοφλαβίνης αυτό συνίσταται από ένα τριπλό δακτύλιο ισοαλλοξαζίνης και μία ριβιτυλομάδα (IUPAC name: 7,8-Dimethyl-10-[(2S,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxyethyl]benzo[g]pteridine-2,4-dione) (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), Turck, D., Bresson, J.L., Burlingame, B., Dean, T., Fairweather-Tait, S., Heinonen, M., Hirsch-Ernst, K.I., Mangelsdorf, I., McArdle, H.J. and Naska, A., 2017). Η ριβοφλαβίνη αποτελεί πρόδρομος του μονονουκλεοτιδίου της φλαβίνης αλλά και του δινουκλεοτιδίου της αδενίνης της φλαβίνης. Τα τελευταία μόρια είναι συμπαραγόντες απαραίτητοι για ένα πλήθος βασικών μεταβολικών ενζύμων που μεσολαβούν στις αντιδράσεις μεταφοράς υδριδίου, οξυγόνου και ηλεκτρονίων. Με άλλα λόγια η ριβοφλαβίνη καθορίζει, μέσω της διαθεσιμότητας της ομαλή διεξαγωγή ενός πλήθους λειτουργιών, κρίσιμων για κυτταρικές διεργασίες τόσο διαφορετικές όσο ο κύκλος του κιτρικού οξέος, η οξείδωση λιπαρών οξέων, η φωτοσύνθεση, η μεταφορά των ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια και η *de novo* βιοσύνθεση της πυριμιδίνης (Jordan, D.B., Bacot, K.O., Carlson, T.J., Kessel, M. and Viitanen, P.V., 1999).

Πολύ σύντομα θα αναφέρουμε εδώ πως όπως όλες οι βιταμίνες του συμπλέγματος Β, έτσι και η ριβοφλαβίνη είναι σημαντικό συστατικό της διατροφής του ανθρώπου. Επίσης, η ριβοφλαβίνη κατέχει σημαντικό ρόλο στις μεταβολικές διεργασίες και στην άμυνα των φυτών. Ωστόσο, παρά το γεγονός πως είναι πολύ σημαντική, τα ανώτερα ζώα, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου δεν είναι σε θέση να τη συνθέσουν. Ωστόσο, η κατάσταση δεν είναι φυσικά η ίδια για τα φυτά αλλά και ορισμένους μικροοργανισμούς.

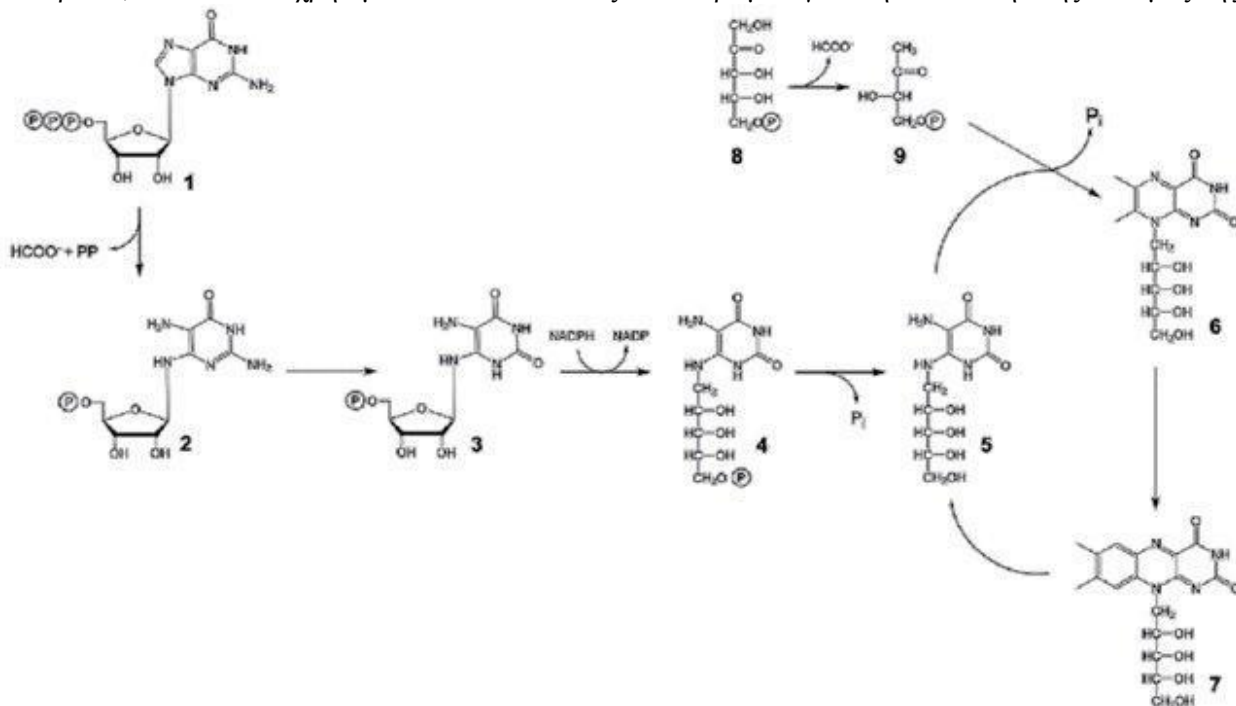
Η ριβοφλαβίνη έχει ήδη αποτελέσει αντικείμενο πολυετών ερευνών, οι οποίες έχουν οδηγήσει στη χαρτογράφηση του βιοσυνθετικού της μονοπατιού σε βακτήρια και μύκητες. Όσον αφορά τη βιοσύνθεση της ριβοφλαβίνης στα φυτά, το μονοπάτι έχει μεγάλες ομοιότητες με εκείνο των βακτηρίων (Fischer & Bacher, 2006), ωστόσο δεν έχουν ξεκαθαριστεί πλήρως όλα τα ένζυμα που συμμετέχουν.

Η ριβοφλαβίνη ξεκίνησε να παράγεται σε βιομηχανική κλίμακα αρχικά με χημικές μεθόδους και έπειτα με βιοτεχνολογικές μεθόδους, οι οποίες και επικράτησαν (Fischer & Bacher, 2006; Liu et al., 2020). Πιο συγκεκριμένα, ως επί το πλείστον αξιοποιούνται οι μικροοργανισμοί *Bacillus subtilis* (Gram+ βακτήριο)

και *Ashbya gossypii* (ημισκομύκητας), λόγω της εύκολης διαχείρισής τους και της γνώσης και πληροφορίας που υπάρχει για αυτούς τους μικροοργανισμούς αναφορικά με το συγκεκριμένο βιοσυνθετικό μονοπάτι. Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της ριβοφλαβίνης συνδέεται και με τα μονοπάτια β-οξείδωσης, γλυκονεογένεσης, πουρινών και φωσφορικών πεντοζών, καθώς και με το γλυοξυλικό κύκλο και τον κύκλο του Krebs (Liu et al., 2020). Επομένως, για μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα, τα στελέχη τροποποιούνται έτσι, ώστε να υπερεκφράζουν γονίδια που συμβάλλουν θετικά στο μονοπάτι βιοσύνθεσης και να καταστέλλουν γονίδια που επιδρούν αρνητικά σε αυτό. Η ριβοφλαβίνη που παράγεται, χρησιμοποιείται ως πρόσθετο στα τρόφιμα, ως συμπλήρωμα διατροφής και για φαρμακευτικούς σκοπούς.

1.1.1 Βιοσύνθεση της ριβοφλαβίνης

Η βιοσύνθεση της ριβοφλαβίνης (Εικόνα 1) ξεκινά από τα ένζυμα GTP κυκλοϋδρολάση II (GCHII) και 3,4-διυδροξυ-2-βουτανο-4-φωσφορική συνθάση (DHBPS) μετατρέποντας το GTP (1) σε 2,5-διαμινο-6-ριβοσυλαμινο-4(3H) -5'-φωσφορική πυριμιδινόνη (2) και 5-φωσφορική ριβουλόζη σε 4-φωσφορική 3,4-διυδροξυ-2-βουτανόνη (9), αντίστοιχα. Τόσο το 2 όσο και το 9 είναι τα πρώτα δεσμευμένα υποστρώματα της βιοσυνθετικής οδού της ριβοφλαβίνης. Ακολουθώντας τη βιοσυνθετική οδό προς τη ριβοφλαβίνη (7), το 2 τροποποιείται διαδοχικά σε 5'-φωσφορική 5-αμινο-6-ριβοσυλαμινο-2,4(1H,3H)-πυριμιδίνη (3), 5-αμινο-6-ριβτυλαμινο-2, 5'-φωσφορική 4(1H,3H)-πυριμιδινοδιόνη (4) και 5-αμινο-6-ριβιτυλαμινο-2,4(1H,3H)-πυριμιδινοδιόνη (5) με αντιδράσεις απαμινάσης, αναγωγάσης και φωσφατάσης, αντίστοιχα. Το 5 συμπυκνώνεται με 9 από το ένζυμο συνθάση της λουμαζίνης δίνοντας την 6,7-διμεθυλ-8-ριβιτυλλουμαζίνη (6). Τέλος, η συνθάση της ριβοφλαβίνης καταλύει μια αντίδραση δυσμετάλλαξης δύο μορίων των 6 για να σχηματίσει το 7 αποδίδοντας το 5 ως υποπροϊόν, το οποίο χρησιμεύει και πάλι ως υποπροϊόν, το οποίο χρησιμεύει και πάλι ως υπόστρωμα για τη συνθάση της λουμαζίνης.



Εικόνα 1: Διαγραμματική απεικόνιση της βιοσύνθεσης της ριβοφλαβίνης (Hiltunen, Hanna-Maija, Boris Illarionov, Boris Hedtke, Markus Fischer, and Bernhard Grimm, 2012).

Οι εργασίες για τη βιοσύνθεση της ριβοφλαβίνης έχουν πραγματοποιηθεί με μικροοργανισμούς, από βακτήρια κυρίως *Bacillus subtilis* και *Escherichia coli*, ζυμομύκητες (π.χ., *Saccharomyces cerevisiae* και *Candida guilliermondii*), και ασκομύκητες (*Ashbya gossypii*, *Eremothecium ashbyii*). Αυτές οι μελέτες (Bacher et al., 2001) κορυφώθηκαν με την ανάπτυξη αποτελεσματικών διαδικασιών ζύμωσης για την παραγωγή της βιταμίνης που σταδιακά αντικατέστησαν τη χημική σύνθεση ως μέθοδος για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων.

1.1.2 Μεταβολισμός της ριβοφλαβίνης

Μετά την κυτταρική πρόσληψη, η ριβοφλαβίνη υφίσταται φωσφορυλίωση που εξαρτάται από την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) με τη βοήθεια της κινάσης ριβοφλαβίνης (RFK) (EC 2.7.1.26), μιας ενζύμου που βρίσκεται πανταχού παρούσα και περιορίζει τον ρυθμό της αντίδρασης. Αυτή η φωσφορυλίωση οδηγεί στο σχηματισμό του FMN (flavin mononucleotide), το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε FAD (flavin adenine dinucleotide) με τη δράση της FAD συθετάσης (EC 2.7.7.2). Η ριβοφλαβίνη μπορεί να απελευθερωθεί στο αίμα και στο ήπαρ είτε σε ελεύθερη μορφή είτε ως FMN μετά τη μεταφορά της μέσω των πρωτεϊνών RFVT1 (προηγουμένως hRFT1) και RFVT2 (προηγουμένως hRTF3), τα οποία κωδικοποιούνται από τα γονίδια SLC52A1 και SLC52A2, αντίστοιχα, και είναι εκφρασμένα στις βασικές μεμβράνες των εντεροκυττάρων και των εμβρυακών κυττάρων. Η RFVT1 εκφράζεται επίσης στον πλακούντα, όπου μεταφέρει τη ριβοφλαβίνη από τη μητέρα στο έμβρυο.

Η ριβοφλαβίνη μπορεί να μεταφέρεται στον εγκέφαλο μέσω της RFVT2, μιας πρωτεΐνης μεταφοράς που είναι εκτεταμένα εκφρασμένη στον εγκέφαλο. Επιπλέον, η RFVT2 είναι εκφρασμένη και σε ενδοκρινικά όργανα όπως το πάγκρεας, το ήπαρ και οι μύες. Αυτό επιτρέπει την πρόσληψη της ριβοφλαβίνης από αυτά τα όργανα.

Στο πλάσμα, η ριβοφλαβίνη μπορεί να είναι δεμένη με την αλβουμίνη και τις ανοσοσφαιρίνες ή να μετατρέπεται στις συνενζυμικές της μορφές στα ερυθροκύτταρα ή τα λευκοκύτταρα. Οι μη δεσμευμένες φλαβίνες υδρολύονται γρήγορα σε ελεύθερη ριβοφλαβίνη και αποβάλλονται μέσω των ούρων. Η ριβοφλαβίνη δεν αποθηκεύεται σημαντικά στο σώμα, επομένως οποιαδήποτε πρόσληψη ριβοφλαβίνης που υπερβαίνει τις ανάγκες των ιστών ή τη νεφρική επαναρρόφηση αποβάλλεται μέσω των ούρων ως ριβοφλαβίνη ή σε μεταβολίτες όπως η 7-άλφα-υδροξυριβοφλαβίνη, η 10-υδροξυαιθυλοφλαβίνη και λουμιφλαβίνη. Ως αποτέλεσμα, η ριβοφλαβίνη έχει σχετικά χαμηλή τοξικότητα ακόμη και σε υπερφαρμακολογικές δόσεις (Balasubramaniam et al., 2020).

1.1.3 FMN, FAD και Φλαβοπρωτεΐνες

Η ριβοφλαβίνη είναι το πρόδρομο μόριο των FMN (flavin mononucleotide) και FAD (flavin adenine dinucleotide) και οι τρεις αυτές ενώσεις ονομάζονται φλαβίνες. Για την παραγωγή του FMN απαιτείται φωσφορυλίωση της ριβοφλαβίνης, ενώ για το FAD απαιτείται η προσθήκη AMP στο μόριο του FMN. Τα μόρια FMN και FAD δρουν ως συνένζυμα για πληθώρα οξειδοαναγωγικών ενζύμων καθώς και άλλων, όπως είναι τρανσφεράσες, λυάσες, ισομεράσες και λιγάσες καθώς και ως προσθετικές ομάδες σε ένζυμα του μονοπατιού β-οξείδωσης (Pinto & Zempleni, 2016; Schwechheimer et al., 2016). Επίσης, συμμετέχουν στην επιδιόρθωση των διμερών θυμιδίνης στο photodamaged DNA (Massey, 2000). Η εκτενής χρήση τους σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις οφείλεται στο γεγονός ότι μπορούν να καταλύουν τη μεταφορά είτε ενός, είτε δύο ηλεκτρονίων, άρα να έχουν τρεις πιθανές καταστάσεις, πλήρως οξειδωμένη, ανηγμένη κατά ένα ηλεκτρόνιο, πλήρως ανηγμένη (Joosten & Berkel 2007, Fischer & Bacher, 2006). Τα φλαβοένζυμα είναι συνήθως συνδεδεμένα είτε με το συνένζυμο FMN, είτε με το FAD, με μη ομοιοπολικό δεσμό (Joosten & Berkel, 2007). Τόσο στα προκαρυωτικά όσο και στα ευκαρυωτικά γονιδιώματα, εκτιμάται πως το 1-3% όλων των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται είναι φλαβοπρωτεΐνες (Fischer & Bacher, 2011; De Collibus & Mattevi, 2006).

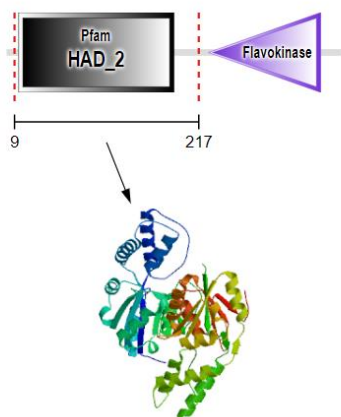


Figure 1 Η εικόνα αυτή ανακτήθηκε από το την βιολογική βάση δεδομένων STRING. Πηγή: <https://string-db.org/cgi/network?taskId=bxuguYhXVcZD&sessionId=bGeRH1F2yIto>

1.1.4 Εξέλιξη και Υποκυτταρική τοποθέτηση του ενζύμου

Από παλαιότερες μελέτες που έχουν γίνει για την εξέλιξη της ριβοφλαβίνης (Fischer et al., 2005; Fischer et al., 2004) σε βιολογικές βάσεις δεδομένων έχουν αποκαλύψει πως, φαίνεται ότι υπάρχει ένα πρόβλημα στην ανακατασκευή του μεταλλαγμένου στελέχους *ribD* (*Rib1*) από το προβλεπόμενο γονίδιο του *A. thaliana*. Επίσης, η πρωτεΐνη που προβλέπεται από το *A. thaliana* αποδεικνύεται ότι αποτυγχάνει να καταλύσει την αναμενόμενη αναγωγή της ένωσης. Ένα πείραμα διασταυρούμενου ελέγχου δείχνει ότι η συγχώνευση του γονιδίου του *A. thaliana* με τα γονίδια της μαγιάς (*Saccharomyces cerevisiae*) *RIB7* και *RIB2* δεν οδηγεί σε συμπλήρωση. Αυτό υποδηλώνει ότι το δεύτερο βήμα στην οδό παραγωγής ριβοφλαβίνης στο *A. thaliana* είναι παρόμοιο με την αντίδραση που συμβαίνει στα βακτήρια.

Το N-τερμινάλ τμήμα των πρωτεϊνών *RibD* στα βακτήρια φέρεται να περιέχει τον τομέα της απαμινάσης. Με βάση την αλληλουχία αμινοξέων και τις λειτουργικές περιοχές απαμινάσης του *Bacillus subtilis*, δημιουργήθηκαν φυτικές πρωτεΐνες με C-τερμινάλ κολλημένες περιοχές. Ένας υποτομέας που αποτελείται από υπολείμματα αμινοξέων 64-250 του ψευδοώριμου φυτικού ενζύμου βρέθηκε επαρκής για τη δραστηριότητα της απαμινάσης. Αυτό υποδηλώνει ότι το υποτιθέμενο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του *A. thaliana* κατευθύνει τη σύνθεση του α-υποτομέα της απαμινάσης, ο οποίος μπορεί να διπλωθεί ανεξάρτητα.

Με βάση τα παραπάνω, παρατηρείται ότι η εκτεταμένη ανάλυση αλληλουχίας έχει δείξει ομολογία μεταξύ ευβακτηριακών και φυτικών αλληλουχιών. Ειδικότερα, φαίνεται ότι τα Gram-αρνητικά βακτήρια αποτελούν μια υποομάδα με ομοιότητες, όπως και οι θετικοί κατά Gram εκτός από λίγες εξαιρέσεις. Οι φυτικές αλληλουχίες είναι γενετικά συνδεδεμένες με κυανοβακτήρια, φυτικά παθογόνα και βακτήρια εδάφους.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ένα από τα 17 πλήρως αλληλουχημένα αρχαιοβακτήρια, το *Pyrococcus furiosus*, παρουσιάζει ένα υποτιθέμενο γονίδιο με κοντινή ομοιότητα με τη διλειειτουργική πρωτεΐνη *RibD* του *B. subtilis* και δεν περιέχει τα υποτιθέμενα ορθόλογα του *Methanococcus jannaschii*. Μόνο ένα ευβακτήριο, το *Buchnera aphidicola*, *subsp. Schizaphis graminum*, περιέχει ξεχωριστά γονίδια για την αποαμινάση και την αναγωγή, αλλά με διαδοχική σειρά. Επίσης, στο ζυμομύκητα εμφανίζονται πυριμιδικές απαμινάσες της οδού ριβοφλαβίνης με ομολογία αλληλουχίας με απαμινάση κυτοσίνης. Το ένζυμο έχει βρεθεί σε προκαρυώτες και μύκητες, όπου είναι α-μέλος της οδού διάσωσης της πυριμιδίνης

(Fischer et al., 2005; Fischer et al., 2004). Κάθε ενεργός τοποθεσία περιέχει ένα μόνο καταλυτικό ιόν ψευδαργύρου που συντονίζεται από α-ιστιδίνη, δύο κυστεΐνες και ένα μόνο δεσμευμένο μόριο νερού που βρέθηκε ότι δρα ως πυρηνόφιλο στην αντίδραση απαμινάσης. Η θέση συντονισμού για το ιόν ψευδαργύρου, η οποία είναι γνωστή από τη δομή της απαμινάσης της κυτοσίνης ζυμομύκητα, είναι αυστηρά διατηρημένη. Λειτουργικά υπολείμματα που εμπλέκονται στο συντονισμό ψευδαργύρου ή στο στερέωση του υποστρώματος υπάρχουν και στα τρία ένζυμα, τα πυριμιδίνη, η κυτοσίνη και οι απαμινάσες της κυτιδίνης. Έτσι, αυτή η ομολογία θα μπορούσε να υποδεικνύει ότι οι διαμινάσες αυτής της ομάδας έχουν εξελιχθεί από μια κοινή προέλευση που επιλέχθηκε για να εκτελέσει μια παρόμοια αντίδραση με βάση διαφορετικά μόρια υποστρώματος. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι τα φυτά χρησιμοποιούν την ίδια οδό με την ευβακτήρια για τη μετατροπή του 1 σε 4, ενώ οι μύκητες χρησιμοποιούν διαφορετική οδό (Bacot et al., 1999; Herz et al., 2000).

Με βάση πειραματικά και βιοπληροφορικά στοιχεία, τα ένζυμα της βιοσύνθεσης της φυτικής ριβοφλαβίνης θεωρείται ότι εντοπίζονται στα πλαστίδια. Στη συνέχεια της οδού, η φωσφορυλίωση της ριβοφλαβίνης σε FMN και η επακόλουθη αδενυλίωση σε FAD καταλύονται από τα ένζυμα κινάση ριβοφλαβίνης και συνθετάση του FAD, αντίστοιχα, παρουσία ATP και Mg²⁺. Αυτές οι πρωτεΐνες φαίνεται στα φυτά πως δεν βρίσκονται αποκλειστικά στα πλαστίδια. Παρόλα αυτά, η υποκυτταρική κατανομή των ενζύμων, η βιοσύνθεση και υδρόλυση νουκλεοτιδίων φλαβίνης δεν είναι πλήρως κατανοητή στα φυτά ούτε και σε άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

1.1.5 Οικονομική σημασία της ριβοφλαβίνης

Η ριβοφλαβίνη (βιταμίνη B2) είναι, όπως προαναφέρθηκε απαραίτητο θρεπτικό συστατικό για τον άνθρωπο και τα ζώα που πρέπει να λαμβάνεται από τη διατροφή. Αντίστοιχα, συνήθως περιλαμβάνεται σε εμπλουτισμένα τρόφιμα και πολυβιταμινούχα συμπληρώματα. Η παραγωγή ριβοφλαβίνης με μικροβιακή ζύμωση είναι ένα παραδειγματικό παράδειγμα λευκής βιοτεχνολογίας που χρησιμοποιεί διαφορετικά εργοστάσια κυττάρων όπως *Bacillus subtilis*, *Candida flareri* και, ειδικά, *Ashbya gossypii*. Πράγματι, σχεδόν η μισή παγκόσμια παραγωγή ριβοφλαβίνης (8000 τόνοι ετησίως) λαμβάνεται μέσω της ζύμωσης των στελεχών *A. gossypii*.

Το *Ashbya gossypii* είναι ένας νηματώδης ημιασκομύκητας που υπερπαραγάγει ριβοφλαβίνη με φυσικό τρόπο. Έτσι, βιομηχανικά στελέχη του *A. gossypii* για παραγωγή ριβοφλαβίνης έχουν ληφθεί με συνδυασμό τυχαίας χημικής μεταλλαξογένεσης με μεταβολική μηχανική της οδού πουρίνης. Η ανάπτυξη ορθολογικών προσεγγίσεων για τον χειρισμό του *A. gossypii* υποστηρίζεται τώρα με νέα γονιδιωματικά εργαλεία, συμπεριλαμβανομένου ενός μεταβολικού μοντέλου σε κλίμακα γονιδιώματος του *A. gossypii* (iRL766). Επιπλέον, πρόσφατα έχουν περιγραφεί νέα στελέχη του *A. gossypii* για την παραγωγή φυλλικού οξέος και μονοκυτταρικού ελαίου.

Μεγάλη ποσότητα ριβοφλαβίνης παρασκευάζεται βιοτεχνολογικά για να ικανοποιήσει την ανάγκη αυτής της βιταμίνης στη διατροφή του ανθρώπου και των ζώων και ως χρωστική τροφίμων (Surw et al., 1941). Η βιομηχανική παραγωγή ριβοφλαβίνης μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο με χημική σύνθεση όσο και με ζύμωση. Η οδός ζύμωσης επιτρέπει την παραγωγή της βιταμίνης B2 σε ένα μόνο βήμα, το οποίο είναι οικονομικά αποδοτικό. Αντίθετα, οι χημικές διεργασίες είναι πολλαπλών σταδίων και δαπανηρές. Έτσι, στις μέρες μας, η ζυμοτική παραγωγή ριβοφλαβίνης είναι οικονομικά και οικολογικά πιο εφικτή και έχει αντικαταστήσει πλήρως τη χημική σύνθεση. Η παγκόσμια αγορά παραγωγής ριβοφλαβίνης για ανθρώπινη και ζωική χρήση έχει υπερδιπλασιαστεί σε 13 χρόνια, από 4000 τόνους α-1 το 2002 σε 9000 τόνους α-1 το 2015 (Schwechheimer et al., 2016). Περίπου το 70% της ριβοφλαβίνης που διατίθεται σήμερα στην αγορά χρησιμοποιείται κυρίως ως πρόσθετο ζωοτροφών, συγκεκριμένα η βιταμίνη B2 (ποιότητας 80%), η οποία

παράγεται μέσω ζύμωσης με γενετικά τροποποιημένα στελέχη. Οι παγκόσμιοι παραγωγοί, όπως η BASF (Γερμανία), η DSM (πρώην Roche, Ολλανδία), η Hubei Guangji Pharmaceuticals και η Shanghai Acebright Pharmaceuticals (πρώην Desano, Κίνα), παράγουν ριβοφλαβίνη από τα κύτταρα βιομηχανικών μικροβιακών στελεχών του *Ashbya gossypii*, *Candida flareri* και *Bacillus subtilis*, φτάνοντας σε τίτλο έως και 15, 20 και 14 g/L, αντίστοιχα (Lim et al., 2001; Revuelta et al., 2016).

Τις τελευταίες δεκαετίες, αρκετές ομάδες ερευνητών έχουν αναφέρει επιτυχημένα επιτεύγματα στην κατασκευή γενετικά τροποποιημένων στελεχών ειδών, όπως τα *Escherichia coli*, *B. subtilis*, *Corynebacterium ammoniagenes* και *Candida spp.*, εφαρμόζοντας στρατηγικές μεταβολικής μηχανικής. Συχνότερα, τέτοιες στρατηγικές έχουν οδηγήσει στην υπερέκφραση δομικών και ρυθμιστικών γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση της ριβοφλαβίνης ή των προδρόμων ουσιών της. Κατά συνέπεια, αυτό έχει βελτιώσει την παραγωγικότητα και την απόδοση του στελέχους του προϊόντος βιομηχανικής ζύμωσης (Perkins et al., 1999a,b; Koizumi et al., 2000; Taniguchi and Wendisch, 2015; Wang et al., 2015). Ωστόσο, εξακολουθούν να υπάρχουν ανεπίλυτα ζητήματα που προκαλούνται από διάφορες μη ειδικές αντιδράσεις στη βιοσύνθεση της ριβοφλαβίνης, τα οποία δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητά.

1.2 Οργανισμός μοντέλο *Arabidopsis Thaliana*

Το *Arabidopsis thaliana* είναι ένα μικρό φυτό στην οικογένεια μoustάρδας που έχει γίνει το πρότυπο σύστημα επιλογής για έρευνα στη βιολογία των φυτών. Έχουν σημειωθεί σημαντικές πρόοδοι στην κατανόηση της ανάπτυξης και της ανάπτυξης των φυτών εστιάζοντας στη μοριακή γενετική αυτού του απλού αγγείοσπερμου. Το γονιδίωμα 120 megabase του *Arabidopsis* οργανώνεται σε πέντε χρωμοσώματα και περιέχει περίπου 20.000 γονίδια.

1.2.1 Ανάπτυξη του *Arabidopsis Thaliana*

Η εμβρυογένεση στα φυτά αναφέρεται στο στάδιο της φυτικής ανάπτυξης που λαμβάνει χώρα στον εμβρύοσακκο της σπερματικής βλάστης ή στο ανώριμο σπέρμα. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, διαμορφώνονται βασικά χαρακτηριστικά του πρωτογενούς φυτικού σώματος σε αρχική μορφή. Η εμβρυογένεση συμβαίνει σε συγκεκριμένα στάδια, τα οποία προκύπτουν από ειδικά πρότυπα κυτταρικής διαίρεσης.

Μετά τη γονιμοποίηση, διαμορφώνεται η πολικότητα και ο άξονας συμμετρίας στο γονιμοποιημένο ωάριο. Η συμμετοχή του μητρικού ιστού στην εγκαθίδρυση της πολικότητας αμφισβητείται, ενώ άλλοι πιθανοί μηχανισμοί που ενδέχεται να επηρεάζουν την πολικότητα περιλαμβάνουν φυσικά αίτια ή/και μικρά μόρια που διαχέονται προς το γονιμοποιημένο ωάριο.

Κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, το αξονικό πρότυπο κορυφής-βάσης του σποροφύτου διαιρείται σε 5 ζώνες: το κορυφαίο μερίστωμα, τις κοτυληδόνες, το υποκοτύλιο, τη ρίζα και το μερίστωμα ρίζας.

Αυτό το αξονικό πρότυπο εδραιώνεται κατά τη διάρκεια της πρώτης διαίρεσης του ζυγωτού, η οποία είναι ασύμμετρη. Κατά την πρώτη διαίρεση του ζυγωτού δημιουργείται πολικότητα στο έμβryo με διαφορετικά κύτταρα στην κορυφή και στη βάση. Το μικρότερο κύτταρο στην κορυφή δίνει το μεγαλύτερο μέρος του εμβρύου, ενώ το μεγαλύτερο κύτταρο στη βάση δημιουργεί τον αναρτήρα. Οι

5 ζώνες του άξονα του σποροφύτου δημιουργούνται σταδιακά και το ακτινωτό πρότυπο κορυφής-βάσης είναι ορατό κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης.

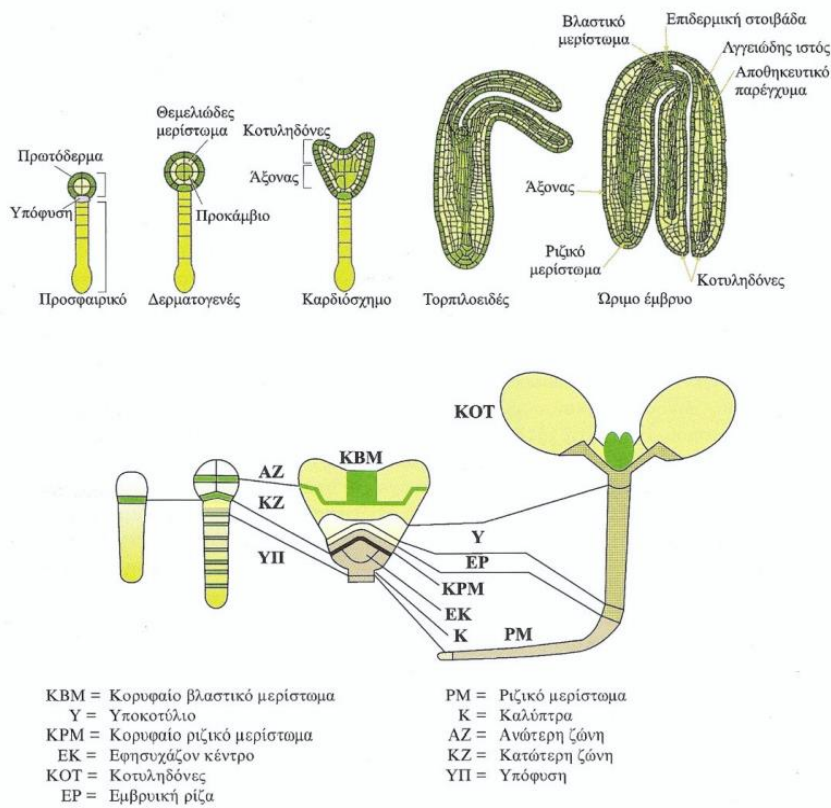


Figure 2 Στάδια ανάπτυξης του Arabidopsis

Στάδιο της τορπίλης και ώριμο εμβρύου: Κατά αυτά τα στάδια, ολοκληρώνεται η διαμόρφωση του εμβρύου με τη δημιουργία του υποκοτυλίου, του μεριστώματος της ρίζας και της κεντρικής καλύπτρας. Τα πρωτογενή μεριστώματα του βλαστού και της ρίζας δημιουργούνται στους πόλους του άξονα 1 του εμβρύου. Το βλαστίδιο είναι οργανωμένο σε ζώνες και στιβάδες. Από το κορυφαίο μερίστωμα προέρχονται οι κοτυληδόνες, όργανα ομόλογα των φύλλων, που δημιουργούνται στην κορυφή του βλαστού, ενώ από το ριζικό μερίστωμα προέρχεται η ρίζα.

Σημαντική είναι η αύξηση των κοτυληδόνων μετά το στάδιο της τορπίλης, καθώς αυξάνονται τόσο σε αριθμό κυττάρων όσο και σε μέγεθος και μπορεί να αποτελέσουν το 90% της συνολικής εμβρυακής μάζας. Οι κοτυληδόνες αποθηκεύουν πρωτεΐνες, άμυλο και λιπίδια, τα οποία χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της φάσης της βλάστησης των σπερμάτων και της ετεροτρόφου αύξησης. Αν και αποθέτουν αποθέματα τροφής, η αύξηση των κοτυληδόνων δεν είναι τόσο έντονη όσο σε άλλα φυτά.

1.3 Μετάλλαγμα "mosaic"

Το αντικείμενο της παρούσας εργασίας αφορούσε ένα μετάλλαγμα του φυτού *Arabidopsis thaliana*, το οποίο είναι γνωστό ως "mosaic." Αυτό το μετάλλαγμα είχε δημιουργηθεί και μελετηθεί σε προηγούμενα πειράματα στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, όπως περιγράφηκε από τον Πατσουμάς το 2006. Στη συνέχεια, παραθέτουμε μια συνοπτική επισκόπηση της έως τώρα πειραματικής μελέτης του μεταλλάγματος και των πληροφοριών που έχουν συγκεντρωθεί μέχρι σήμερα σχετικά με αυτό. Σε αυτήν την επισκόπηση, παρουσιάζεται η φαινοτυπική χαρακτηριστικά του μεταλλάγματος σε σύγκριση με τα φυτά *Arabidopsis* τύπου (οικότυπος *Columbia*, Col-0 N1093), καθώς και περιληπτικά αναφέρονται οι διαδικασίες δημιουργίας και χαρτογράφησης της μετάλλαξης.

Η χημική μεταλλαξογένεση με EMS φυτών *Arabidopsis thaliana* οικότυπου *Columbia* (*Col* – 0) οδήγησε σε ένα φυτό με ενδιαφέρον φαινότυπο. Μετά από διαδικασίες χαρτογράφησης, φάνηκε πως η μετάλλαξη που προκάλεσε τον φαινότυπο εδραζόταν στο γονίδιο At4g21470, το οποίο κωδικοποιεί για το ένζυμο διπλής λειτουργίας FMN/FHY. Πιο συγκεκριμένα, επρόκειτο για μια splice-site mutation η οποία προκαλούσε πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης και συνεπώς οδηγούσε σε μη επαρκώς λειτουργική πρωτεΐνη. Το φυτό εμφάνιζε εκτεταμένη χλώρωση καθώς και δυσκολία στην ανάπτυξη της ρίζας και του κεντρικού βλαστού. Επίσης παρουσίαζε ευαισθησία στο φως, τέτοια ώστε να πεθαίνει στην έκθεση υψηλής έντασης. Στο σύνολο του το φυτό ήταν καχεκτικό, ώστε μερικές φορές να μην καταφέρνει να ολοκληρώσει το βιολογικό του κύκλο, επομένως να δώσει απογόνους. Παρατηρήθηκε πως ο φαινότυπος παρουσιάζει ομοιότητες με μεταλλάγματα άλλων γονιδίων, υπεύθυνων για την άμυνα ενάντια σε παθογόνα και για την απόκριση σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Δεδομένης της σχέσης που έχουν οι φλαβίνες με την αντίληψη του φωτός, η οποία τις κάνει να συμμετέχουν στην αντιμετώπιση του φωτοξειδωτικού στρες, δεν προκαλεί έκπληξη ο χλωρωτικός και καχεκτικός φαινότυπος που παρουσιάζεται στο μετάλλαγμα *mosaic*.

1.3.1 Φαινοτυπική περιγραφή του μεταλλάγματος

Το εξεταζόμενο μετάλλαγμα παρουσιάζει έντονη χλώρωση που ξεκινά από το κέντρο των φύλλων και εξαπλώνεται σταδιακά προς τα άκρα τους (Εικόνα 3). Αυτό το χαρακτηριστικό μοτίβο χλώρωσης δημιουργεί μια γενική εντύπωση μοζαϊκού σχήματος στις χλωρωτικές και πράσινες περιοχές των φύλλων του φυτού. Αυτή η ειδική εμφάνιση οδήγησε στην ονομασία του μεταλλάγματος ως "mosaic."



Figure 3 A. Φαινότυπος μεταλλάγματος *mosaic*, B. *Columbia* και Γ. εστίαση στις κοτύλες όπου φαίνεται ο χλωρωτικός φαινότυπος.

1.3.1.1 Επεκτεινόμενος κυτταρικός θάνατος και περιορισμένη ανάπτυξη

Πέρα από το χαρακτηριστικό κλιμακούμενο πρότυπο χλώρωσης, το μετάλλαγμα έχει σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου όσον αφορά τον τρόπο ανάπτυξής του. Συγκεκριμένα, τα φυτά της μετάλλαξης mosaic έχουν μικρότερη ανάπτυξη των ριζών και καθυστερημένη ανάπτυξη του κεντρικού βλαστού. Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί περιστασιακά ότι ο φαινότυπός του εμφανίζει διακυμάνσεις ανάλογα με τη φωτεινότητα που λαμβάνουν τα φυτά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους σε θάλαμους καλλιέργειας. Η ένταση του χλωρωτικού προτύπου εμφανίζει ποικιλία, ιδίως υπό συνθήκες υψηλής φωτεινότητας, με την επιβίωση των φυτών mosaic να αποτελεί πρόκληση. Τέλος, το μετάλλαγμα δεν επιτυγχάνει πάντα την ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου του, καθώς έχουν παρατηρηθεί φυτά που είτε δεν φθάνουν στο στάδιο ωρίμανσης των καρπών τους, είτε παράγουν σπόρους σε πολύ μικρή ποσότητα.

1.3.2 Γονοτυπική περιγραφή της μετάλλαξης

Το γονίδιο At4g21470, γνωστό και ως riboflavin kinase/FMN hydrolase (FMN/FHY), κωδικοποιεί ένα διλειτουργικό ένζυμο που συμμετέχει στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης της ριβοφλαβίνης (Sandoval & Roje, 2005). Δυστυχώς, δεν υπάρχουν διαθέσιμες βιβλιογραφικές αναφορές που να περιγράφουν μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο ή τον ρόλο του στην ανάπτυξη των φυτών. Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές που συσχετίζουν τη ριβοφλαβίνη και τα παράγωγά της, όπως το FMN και το FAD, με την άμυνα των φυτών. Συγκεκριμένα, αναφέρουν ότι αυτές οι ενώσεις συμμετέχουν στην ενεργοποίηση της αμυντικής σηματοδότησης με τη διέγερση 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).

1.3.3 Πού οφείλεται ο φαινότυπος του μεταλλάγματος;

Το μετάλλαγμα mosaic δημιουργήθηκε μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται χημικώς επαγόμενη μεταλλαξιγένεση. Κατά τη διαδικασία αυτή, χρησιμοποιήθηκε το χημικό μεταλλαξιγόνο Ethyl Methane Sulfonate (EMS) για να προκαλέσει μεταλλάξεις στο γονίδιο. Αυτή η διαδικασία εφαρμόστηκε σε σπέρματα της φυτικής είδους *A. thaliana* του οικοτύπου Columbia (Col-0). Το EMS δεν ενσωματώνεται στο DNA του φυτού, αλλά δρα τροποποιώντας τις βάσεις του DNA. Κυρίως, προσθέτει αιθυλικές ομάδες σε πολλές θέσεις κατά μήκος του DNA και επηρεάζει τις αλληλουχίες των βάσεων. Μία από τις κύριες επιπτώσεις της δράσης του EMS είναι η μετατροπή της γουανίνης σε ένα μη κανονικό νουκλεοτίδιο που ονομάζεται 6-αιθυλο-γουανίνη. Κατά την αντιγραφή του DNA, η 6-αιθυλο-γουανίνη δημιουργεί αντί για δεσμό υδρογόνου με την κυτοσίνη, ένα δεσμό με τη θυμίνη. Κατά την επαναλαμβανόμενη αντιγραφή του DNA, αυτό οδηγεί στην αλλαγή ενός ζεύγους βάσεων G:C σε ένα ζεύγος A:T σε συγκεκριμένη θέση.

Οι μεταλλάξεις που προκαλούνται από το EMS είναι είτε μεταλλάξεις με λάθος νόημα (missense mutations), κατά τις οποίες ένα κωδικόνιο αλλάζει και οδηγεί στην αλλαγή του αμινοξέος που αντιστοιχεί, αλλάζοντας έτσι τη δομή της πρωτεΐνης, ή μεταλλάξεις χωρίς νόημα (nonsense mutations), κατά τις οποίες ένα κωδικόνιο αλλάζει σε ένα κωδικόνιο λήξης, προκαλώντας την πρόωρη τερματισμό της μετάφρασης του μηνύματος του mRNA του γονιδίου. Για να διευκρινιστεί ο τρόπος κληρονομής της μετάλλαξης, πραγματοποιήθηκε μια διασταύρωση μεταξύ φυτών που είχαν τη μετάλλαξη mosaic (aa) και φυτών του οικοτύπου Ler-0 (AA). Όλα τα φυτά στη γενιά F1 παρουσίαζαν το φυσιολογικό φαινότυπο του αγρίου τύπου (με γονότυπο Aa). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η μετάλλαξη θεωρήθηκε ως υπολειπόμενη. Στη γενιά F2 αναμενόταν η γονοτυπική αναλογία 1 AA: 2 Aa: 1 aa ή φαινοτυπικά 3 αγρίου τύπου: 1 μεταλλαγμένο. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την υπολειπόμενη φύση της μετάλλαξης mosaic.

1.3.4 Χαρτογράφηση της μετάλλαξης

Από προηγούμενες μελέτες (Πατσούμας, 2006), περιορίστηκε ότι η μετάλλαξη mosaic βρίσκεται στον κάτω βραχίονα του χρωμοσώματος IV του φυτού *Arabidopsis*, μεταξύ των μοριακών δεικτών CER4C και F13C5, σε μια περιοχή 2566kbp. Έγινε περαιτέρω διευκρίνιση αυτής της περιοχής με τη χρήση νέων μοριακών δεικτών, με το αποτέλεσμα να περιοριστεί η μετάλλαξη ακόμη περισσότερο. Τώρα, η μετάλλαξη "mosaic" συνδέεται με ένα συγκεκριμένο γενετικό τόπο μόλις 64kbp, περιλαμβάνοντας 14 γονίδια από At4g21380 έως At4g21510 (Τσιτσεκιάν, 2009).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο αριθμός των γονιδίων που σχετίζονται με αμυντικές αποκρίσεις και ανιχνευτές μοτίβων αναγνώρισης (PRRs) στο φυτό (τα οποία υποδεικνύονται με πράσινο χρώμα), καθώς πολλά από αυτά έχουν συσχετιστεί με την ενεργοποίηση της άμυνας εναντίον περιβαλλοντικών παραγόντων. Οι αναφορές (Lorrain et al., 2003, Rodriguez et al., 2015, Van Wersch et al., 2016) υποστηρίζουν αυτήν τη σχέση, ακολουθώντας τον συλλογισμό ότι η μετάλλαξη "mosaic" παρουσιάζει παρόμοια φαινότυπα με φυτά που επηρεάζονται από παθογόνους.

Επιπλέον, οι PRRs αποτελούν την αρχική γραμμή άμυνας των φυτών κατά των παθογόνων, αναγνωρίζοντας μόρια που συνδέονται με τους παθογόνους (PAMPs). Η αναγνώριση αυτών των PAMPs ενεργοποιεί την αμυ

ντική απάντηση των φυτών (PTI), καθοδηγώντας σε διάφορες αλλαγές, όπως η παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) και φυτικών ορμονών όπως το σαλικυλικό οξύ (SA), το ιασμονικό οξύ (JA) και το αιθυλένιο (ET) (Muthamilarasan & Prasad, 2013).

1.3.5 Πως η παραγωγή ROS συσχετίζεται με το κυτταρικό θάνατο;

Οι "lesion mimic mutants (LMMs)" αποτελούν μεταλλάγματα που εκδηλώνουν αυθόρμητα λανθασμένα ρυθμιζόμενο κυτταρικό θάνατο και εμφανίζουν έντονο χλωρωτικό φαινότυπο που δίνει την εντύπωση ενός συνεχώς επεκτεινόμενου κυτταρικού θανάτου (Lorrain et al., 2003). Η εμφάνιση αυτού του φαινοτύπου συνδέεται με ανωμαλίες που επηρεάζουν την ικανότητα των φυτών να ελέγχουν την εξάπλωση του κυτταρικού θανάτου από τη στιγμή που θα ξεκινήσει. Τέτοιες ανωμαλίες συνδέονται συχνά με γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν παθογόνους μικροοργανισμούς και σχετίζονται με την εκδήλωση του κυτταρικού θανάτου (Zipfel, 2008).

Ο κυτταρικός θάνατος, ανεξάρτητα από την πηγή της καταπόνησης, συνδέεται με την αύξηση και την ανεπαρκή μείωση των ενεργών οξειδωτικών ειδών (ROS). Οι πηγές παραγωγής ROS περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες NADPH οξειδάσης (ή RBOH), που θεωρούνται ως κύρια πηγή υπεροξειδίου, το οποίο με τη δράση της δεσμουτάσης του υπεροξειδίου μετατρέπεται σε υδρογόνο υπεροξειδίου (H₂O₂), που αποτελεί σηματοδότη του κυτταρικού θανάτου (Overmyer et al., 2003). Τα μιτοχόνδρια αποτελούν επίσης σημαντική πηγή ROS και συμβάλλουν στη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου, μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων που παράγει ηλεκτρόνια που μεταφέρονται σε μοριακό οξυγόνο, μετατρέποντάς το σε υπεροξείδιο (O₂) (Overmyer et al., 2003). Επιπλέον, οι μεταγραφικοί παράγοντες (όπως AS1, MYB30, MYC2, WRKY70), ρυθμιστές ορμονών (AXR1, ERA1, SID2, EDS1, SGT1b), και ρυθμιστές του κυτταρικού θανάτου (RCD1, DND1) συνδέονται με το ROS-εξαρτώμενο κυτταρικό θάνατο (Kaurilind et al., 2015).

Επιπλέον, οι φυτικές ορμόνες όπως το ET, το SA και το JA, συμμετέχουν στη σηματοδότηση του κυτταρικού θανάτου. Το ET ενισχύει την παραγωγή ROS, δημιουργώντας έναν θετικό κύκλο ανατροφοδότησης που ενισχύει τη σηματοδότηση και οδηγεί σε αμυντικές αποκρίσεις και, τελικά, στον κυτταρικό θάνατο (Overmyer et al., 2000). Τα μεταλλάγματα eto1 και eto3, που οδηγούν σε υπερπαραγωγή

ET, έχουν επίσης αυξημένο ROS-εξαρτώμενο κυτταρικό θάνατο (Rao et al., 2002). Αντίθετα, το JA φαίνεται να συμβάλλει στον περιορισμό της εξάπλωσης του ROS-εξαρτώμενου κυτταρικού θανάτου (Overmyer et al., 2000, Turner et al., 2002, Van Wees & Glazebrook, 2003).

Όλα αυτά τα στοιχεία αναδεικνύουν τη σύνθετη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου στα φυτά, που επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες και παραμένει ακόμη αντικείμενο ερευνών και διερεύνησης (Jalimi & Sinha, 2015). Τα MAPK 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 MAPK μονοπατιών από τα ROS υπό συγκεκριμένες καταπονήσεις, δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος (Jalimi & Sinha, 2016).

Υπό την αντίληψη ερεθισμάτων διαφόρων τύπων καταπονήσεων, οι MAPKs δρουν στις RBOH πρωτεΐνες οδηγώντας στην παραγωγή ROS (Asai et al., 2008). Μέχρι στιγμής τα μονοπάτια MAPK που είναι γνωστά για τη ρύθμιση της RBOH-μεσολαβούμενης οξειδωτικής έκρηξης είναι τα NPK11-MEK1-NTF6 και MEK2-SIPK και δρουν ανοδικά των ROS (Asai et al., 2008). Από την άλλη, τα μονοπάτια MEKK1-MKK2-MPK4/6 είναι ένα παράδειγμα MAPK 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 Jalimi και Sinha (2016) σε ανασκόπησή τους, αναφέρουν πολλές περιπτώσεις μονοπατιών MAPK 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 isoμορφές, 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.

1.4 GUS reporter system

Ένα γονίδιο αναφοράς κωδικοποιεί ένα ένζυμο ή άλλη πρωτεΐνη που μπορεί να ανιχνευθεί άμεσα ή έμμεσα χρησιμοποιώντας μια βιοχημική ανάλυση. Η καθιέρωση διαδικασιών γενετικού μετασχηματισμού βασίστηκε, μεταξύ άλλων παραγόντων, στη χρήση αποτελεσματικών γονιδίων δεικτών αναφοράς, τα οποία επιτρέπουν εύκολα την ανίχνευση διαγονιδιακών συμβάντων μετά από ένα πείραμα μετασχηματισμού, είτε σε παροδική είτε σε σταθερή δοκιμασία έκφρασης. Η παραγωγή διαγονιδιακών φυτών σε πολλές περιπτώσεις εξαρτάται επίσης από τη χρήση γονιδίων αναφοράς, καθώς διευκολύνει την ταυτοποίηση σταθερά μετασχηματισμένων ατόμων αφού υποβληθούν σε διαδικασία επιλογής με βάση το επιλέξιμο γονίδιο δείκτη που χρησιμοποιήθηκε στο ίδιο πείραμα. Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι τα συστήματα αναφοράς γονιδίων έχουν παίξει βασικό ρόλο σε πολλές μελέτες γονιδιακής έκφρασης και ρύθμισης, στις οποίες η έκφραση ενός γονιδίου αναφοράς κάτω από, για παράδειγμα, μπορεί να διερευνηθεί η κατεύθυνση διαφορετικών προαγωγέων ή η παρουσία διαφορετικών μεταγραφικών παραγόντων (Gaggia, Carpece and Marino, 2008).

1.4.1 Χαρακτηριστικά συστήματος GUS

Εφόσον το γονίδιο της β-γλυκουρονιδάσης (GUS) (*gus*, *gusA* ή *uidA*) απομονώθηκε για πρώτη φορά από το *Escherichia coli*, έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την ανάπτυξη του *uidA* gene ως σύστημα αναφοράς για μετασχηματισμό φυτών. Πράγματι, έχει γίνει το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα δεικτών, κυρίως λόγω της σταθερότητας του ενζύμου και της υψηλής ευαισθησίας και καταλληλότητας της ανάλυσης στην ανίχνευση με φθορομετρικές, φασματοφωτομετρικές ή ιστοχημικές τεχνικές. Επιπλέον, υπάρχει μικρή ή καθόλου ανιχνεύσιμη δραστηριότητα GUS σε σχεδόν οποιονδήποτε ανώτερο φυτικό ιστό, με ορισμένες εξαιρέσεις. Αυτά συγκεντρώνουν ένα μεγάλο μέρος των χαρακτηριστικών που πρέπει να αντιπροσωπεύει ένα γονίδιο αναφοράς του *E. coli* το GUS έχει μονομερές μοριακό βάρος 68.200 και φαίνεται να λειτουργεί ως τετραμερές. Αυτό το ένζυμο υδρολύει τα β-γλυκουρονίδια ως υποστρώματα και η μέθοδος ανίχνευσης θα ποικίλλει ανάλογα με το συγκεκριμένο υπόστρωμα και το προϊόν που σχηματίζεται μετά την αντίδραση. Στα φυτά λειτουργεί ως γονίδιο σύντηξης, όπου ένας υποκινητής που προέρχεται από διαφορετικό οργανισμό κατευθύνει τη μεταγραφή της κωδικής αλληλουχίας *uidA*, ρυθμίζοντας συγκεκριμένα την έκφραση γονιδίου σε χρόνο, ποσότητα και θέση κυττάρου ή ιστού.

1.4.2 Πλεονεκτήματα και περιορισμοί μεθόδου

Ορισμένοι πιθανοί περιορισμοί έχουν αναφερθεί στη χρήση και στη μετέπειτα ανίχνευση της δραστηριότητας GUS σε μετασχηματισμένους φυτικούς ιστούς: δραστηριότητα υποβάθρου, συνήθως λόγω της διάχυσης του προϊόντος αντίδρασης ή της ενδογενούς δραστηριότητας. Αυτοφθορισμός ή αναστολές; μικροβιακή μόλυνση. Σε ένα σύστημα μετασχηματισμού που διαμεσολαβείται από *Agrobacterium*, είναι επαρκής η χρήση ενός γονιδίου αναφοράς τροποποιημένο από την παρουσία ενός ιντρονίου, το οποίο θα εμποδίσει την έκφραση γονιδίου στα βακτήρια και συνεπώς θα παρεμποδίσει τη δοκιμασία ανίχνευσης. Ένα μειονέκτημα του γονιδίου *uidA* ως δείκτης αναφοράς είναι ότι οι κοινώς χρησιμοποιούμενες αναλύσεις GUS περιλαμβάνουν καταστροφή φυτικού υλικού. Ωστόσο, είναι δυνατό να ανιχνευθεί η δραστηριότητα της γλυκουρονιδάσης με μη καταστροφικό τρόπο. Η έκθεση φυτικού υλικού σε 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-β-D-γλυκουρονίδιο (X-Gluc) ή 4-μεθυλ-ομπελλιφερυλ-β-D-γλυκουρονίδιο (MUG) για σύντομες χρονικές περιόδους μειώνει την τοξικότητα αυτών των υποστρωμάτων ως για να επιτραπεί αργότερα η διάσωση φυτικού υλικού. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, έχουν αναπτυχθεί άλλοι δείκτες, για παράδειγμα, που κωδικοποιούν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) της *Aequorea victoria*, η οποία έχει αποδειχθεί πιο χρήσιμη για ορισμένες εφαρμογές από το *uidA* gene, καθώς μπορεί να απεικονιστεί χωρίς να απαιτείται η καταστροφή φυτικού υλικού. Οι δοκιμές GUS μπορούν να πραγματοποιηθούν σε μεγάλη ποικιλία ιστών, ακόμη και σε πρωτοπλαστές, λαμβάνοντας υπόψη ότι οι διαφορές στη δομή του ιστού ενδέχεται να απαιτούν ελαφρές αλλαγές στα πρωτόκολλα ανίχνευσης. Επιπλέον, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε ότι οι αναπαραγωγικοί ιστοί μπορεί να εμφανίζουν ενδογενή δραστηριότητα GUS και ότι η ανάπτυξη των φυτών μπορεί επίσης να επηρεάσει την έκφραση του γονιδίου GUS. Αν και υπάρχουν άλλα διαθέσιμα υποστρώματα, δύο από αυτά είναι τα πιο χρησιμοποιούμενα σήμερα, το X-Gluc για τον εντοπισμό GUS ιστοχημικά και το MUG για την φθορομετρική ποσοτικοποίηση GUS.

1.5 Βιολογικές Βάσεις Δεδομένων

Οι βιολογικές βάσεις δεδομένων, αποτελούν βασικό κομμάτι της σύγχρονης βιοπληροφορικής, καθώς αποτελούν τη βασική πηγή δεδομένων από την οποία ένας ερευνητής αντλεί τα δεδομένα στα οποία θα βασίσει την ανάλυση του. Η τεχνολογική εξέλιξη όμως οδήγησε στην αύξηση του όγκου των πειραματικών εργασιών και της διεκπεραίωσής τους, που σε συνδυασμό με τον διαρκή προσδιορισμό γονιδιωμάτων διαφόρων οργανισμών, αύξησε σημαντικά τον όγκο της πληροφορίας σε όλα τα επίπεδα. Η συντήρηση μιας βάσης απαιτεί μεγάλο αριθμό εξειδικευμένων επιστημόνων που θα ασχολούνται αποκλειστικά με την επισήμανση ενδεχόμενων λαθών καθώς και με το σχολιασμό (annotation) των νεοεισερχόμενων δεδομένων. Κάθε ερευνητής μπορεί να έχει πρόσβαση στις βάσεις αυτές μέσω της χρήσης διαδικτύου. Αρκεί η επίσκεψη στην ιστοσελίδα της βάσης, η αναζήτηση των δεδομένων ενδιαφέροντος και στη συνέχεια η αποθήκευσή τους στον υπολογιστή. Παράλληλα έχουν δημιουργηθεί βάσεις στις οποίες η πληροφορία στο επίπεδο της αλληλουχίας και της δομής είναι ταξινομημένη με τέτοιο τρόπο ώστε η πληροφορία να είναι οργανωμένη για την εξαγωγή συμπερασμάτων ως προς την βιολογική τους σημασία. Οι βιολογικές βάσεις δεδομένων, γενικά, μπορούν να διακριθούν σε 2 μεγάλες κατηγορίες, με επιμέρους κατηγοριοποιήσεις, όπως περιγράφονται παρακάτω. Καταρχάς, υπάρχουν οι πρωτογενείς βάσεις δεδομένων, οι οποίες περιέχουν τα πρωτογενή πειραματικά δεδομένα και οι οποίες αναλύονται κυρίως σε βάσεις δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, αμινοξικών αλληλουχιών πρωτεϊνών, τρισδιάστατων βιολογικών δομών, γονιδιακής έκφρασης, βάσεις δεδομένων γενετικής ποικιλομορφίας, βάσεις δεδομένων βιβλιογραφίας. Από την άλλη πλευρά στις δευτερογενείς βάσεις δεδομένων υπάρχουν κυρίως ταξινομήσεις των πρωτογενών δεδομένων, χρήσιμες για αναλυτικούς σκοπούς, οι οποίες διακρίνονται σε βάσεις δεδομένων οικογενειών και εξειδικευμένες βάσεις δεδομένων.

1.6 Σκοπός του πειράματος

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, διερευνήθηκε το προφίλ έκφρασης του γονιδίου της κινάσης της ριβοφλαβίνης/φωσφατάσης του FMN στο *Arabidopsis thaliana* (At4g21470). Για τον σκοπό αυτό, απαραίτητη ήταν μια σειρά πειραμάτων που να επιβεβαιώνουν την υπόθεση κάθε βήματος που ακολουθήθηκε, αλλά και τον συνδυασμό αποτελεσμάτων, με σκοπό την εξαγωγή ορθών συμπερασμάτων. Συγκεκριμένα, το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον υποκινητή του γονιδίου ενδιαφέροντος, αφού απομονώθηκε, εισήχθη ακολουθώντας μεθόδους μοριακής βιολογίας και μηχανικής σε έναν πλασμιδιακό φορέα. Στη συνέχεια, η κατασκευή, εισήχθει σε νέο πλασμίδιο, από το οποίο έλειπε ο υποκινητής του γονιδίου της X-gluc αλλά όχι και το γονίδιο.

Το μετάλλαγμα mosaic, που προέρχεται από μεταλλαξιγένεση EMS στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, παρουσιάζει ένα ιδιόρρυθμο αναπτυξιακό και χλωρωτικό πρότυπο. Συγκεκριμένα, παρουσιάζει σημαντική καθυστέρηση στην ανάπτυξη του σε σύγκριση με τα άγρια φυτά, ενώ φαινοτυπικά χαρακτηρίζεται από έντονη χλωρώση. Η χλώρωση ξεκινά από το κέντρο της παλαιότερης ροζέτας φύλλων και σταδιακά εξαπλώνεται σε όλο το φυτό.

Η μοριακή χαρτογράφηση της μετάλλαξης με τη χρήση μοριακών δεικτών έχει οδηγήσει σε έναν γενετικό τόπο μήκους 64kb, ο οποίος περιλαμβάνει 14 γονίδια. Στην πλειοψηφία τους, τα γονίδια αυτά σχετίζονται με μηχανισμούς που σχετίζονται με την αντιμετώπιση καταπονήσεων και την ανάπτυξη αμυντικών μηχανισμών. Κοινό σημείο σύνδεσης αυτών των γονιδίων φαίνεται να είναι η ομοιότητα των ενεργών οξειδωτικών ειδών (ROS).

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Προετοιμασία και συνθήκες ανάπτυξης *Arabidopsis thaliana*

Πριν από την ανάπτυξή τους, τα σπέρματα υδατώνονται και τοποθετούνται σε χαμηλή θερμοκρασία (4°C) για τουλάχιστον 24 ώρες, με σκοπό να αρθρώσουν από την αδράνειά τους και να ξεκινήσουν την ανάπτυξή τους συγχρόνως. Στη συνέχεια, τα σπέρματα υποβάλλονται σε διαδικασία απολύμανσης, η οποία περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Τα σπέρματα αντιμετωπίζονται με 20% διάλυμα χλωρίνης και 0,01% Triton X-100 σε δύο επαναλήψεις διάρκειας 2 λεπτών.
- Ακολουθούν πέντε συνεχόμενες εκπλύσεις των σπερμάτων με αποστειρωμένο νερό (ddH₂O) για την αραίωση του χλωρίνης διαλύματος και την πλήρη αφαίρεση του.
- Τα σπέρματα τοποθετούνται σε πετρίλια μαζί με κατάλληλο θρεπτικό μέσο 1/2MS.
- Τα πετρίλια σφραγίζονται με parafilm και τοποθετούνται σε θάλαμο υπό ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία 22°C, 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι, σχετική υγρασία περίπου 50%).

Μετά από περίπου 3-5 ημέρες, τα σπέρματα αρχίζουν να βλαστούν, ξεκινώντας με την εμφάνιση των εβρυακών ριζών, και στη συνέχεια αναπτύσσουν τα κοτυληδόνια τους. Κατά τη διάρκεια περίπου 2 εβδομάδων, και υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, τα φυτά αναπτύσσουν το ανώτερο τμήμα της βλάστης τους. Σε αυτό το σημείο, τα φυτά μεταφυτεύονται σε γλαστράκια με εδάφος και τοποθετούνται πάλι στον ίδιο χώρο ανάπτυξης, όπου παραμένουν μέχρι την ολοκλήρωση του βιολογικού τους κύκλου. Κατά τις πρώτες ημέρες μετά τη μεταφύτευση, τα φυτά καλύπτονται με διαφανές υλικό για διατήρηση υψηλής σχετικής υγρασίας και αντιμετώπιση πιθανής μεταφυτευτικής καταπόνησης.

2.2 LB Media

Το θρεπτικό μέσο LB παρέχει αποδεδειγμένα τις κατάλληλες ουσίες για την ομαλή ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό κυττάρων *E.coli* και *A.tumefaciens*, ενώ δίνει τη δυνατότητα παρασκευής υγρού ή στερεού διαλύματος, αλλά και προσθήκης αντιβιοτικών ουσιών, ανάλογα με τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος. Για παρασκευή 100 mL θρεπτικού μέσου, διαλύονται τα παρακάτω σε ddH₂O:

Table 1 Συνταγή LB media

Yeast extract	0,5 g
Peptone	1 g
NaCl	1 g
Agar	1,4 g

Στην περίπτωση παρασκευής υγρού θρεπτικού μέσου, παραλείπεται το Agar. Το διάλυμα αποστειρώνεται στους 120° C για 20 min.

Για ανάπτυξη αποικιών με ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά (Rifampicin, Gentamycin, Kanamycin), γίνεται προσθήκη αντιβιοτικού σε ποσότητα τέτοια, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 50 mg/L. Για προσθήκη του αντιβιοτικού Ampicillin, η τελική συγκέντρωση θα πρέπει να είναι ίση με 100 mg/L. Η προσθήκη

αντιβιοτικού γίνεται πάντα μετά από την αποστείρωση. Το στερεό θρεπτικό μέσο στρώνεται σε τρυβλία Petri.

- Peptone: labkem, TRYN-00P
- Yeast extract: labkem, YEEY – 0MB
- Sodium chloride: PENTA
- Agar: labkem AGAG – 00P

2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η PCR (Polymerase Chain Reaction) είναι η διαδικασία κατά την οποία παράγονται πολλαπλά αντίγραφα μίας αλληλουχίας DNA *in vitro*. 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 παραγωγή πολλαπλών πανομοιότυπων αλληλουχιών επιτυγχάνεται με την αξιοποίηση μίας θερμοανθεκτικής πολυμεράσης, η οποία προσθέτει νουκλεοτίδια συμπληρωματικά με τη μητρική ακολουθία της οποίας επιθυμείται ο πολλαπλασιασμός. Στην αντίδραση είναι απαραίτητα τα μονονουκλεοτίδια AMP, TMP, CMP, GMP για τη δόμηση της νέας αλυσίδας και δύο εκκινητές που σηματοδοτούν τα σημεία έναρξης της αντιγραφής (ένας forward κι ένας reverse) και βρίσκονται στα δύο άκρα της ακολουθίας που πρόκειται να αντιγραφεί. Επίσης είναι απαραίτητο και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για να λειτουργήσει η πολυμεράση (buffer).

Η αντίδραση διεξάγεται εντός ενός θερμοκυκλοποιητή, ο οποίος μπορεί να ρυθμίζει τη θερμοκρασία γρήγορα και ακολουθεί προγραμματισμένα στάδια, τα οποία καθορίζονται βάσει των χαρακτηριστικών του τμήματος DNA που ενισχύεται και της πολυμεράσης που χρησιμοποιείται (βλ. Πίνακας 2). Τα βήματα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Κάθε συστατικό προστίθεται σε φιαλίδια PCR χωρητικότητας 0,2 ml. Μετά την ολοκλήρωση των αντιδράσεων PCR, ακολουθεί η ανάλυσή τους σε πηκτή αгарόζης, η οποία ποικίλλει ανάλογα με το μέγεθος των DNA τμημάτων και τον απαιτούμενο διαχωρισμό. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR, των οποίων τα προϊόντα προορίζονται για κλωνοποιήσεις, σχεδιάστηκαν με αναγνώριση του ενζύμου περιορισμού στο 5' άκρο, προκειμένου να διευκολύνουν τη διαδικασία υποκλωνοποίησης του τμήματος σε άλλους φορείς. Η

θέση αναγνώρισης επιλέχθηκε έτσι ώστε να είναι μοναδική τόσο εντός του επιθυμητού τμήματος DNA προς κλωνοποίηση όσο και σε άλλους φορείς.

Table 2 Βήματα 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 ⁽¹⁾] για 30 δευτερόλεπτα
4	Επιμήκυνση στους 72°C για x ⁽²⁾ δευτερόλεπτα
5 ^(*)	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

Στο βήμα 5 καθορίζουμε τον αριθμό των κύκλων θερμοκύκλωσης, δηλαδή πόσες φορές θα επαναληφθούν τα βήματα 2-4 της αντίδρασης. Ο αριθμός αυτός επιλέγεται ανάλογα με τον επιθυμητό αριθμό αντιγράφων που χρειάζεται να παραχθούν και την πολυπλοκότητα του DNA. Συνήθως, ο αριθμός των κύκλων κυμαίνεται μεταξύ 25-35. (1) Η θερμοκρασία υβριδισμού (annealing) εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης (melting temperature, Tm) των εκκινητών. Το Tm κάθε εκκινητή υπολογίζεται με βάση τον τύπο: $69,3 + 0,41 * \text{ποσοστό GC} - (650 / \text{αριθμός βάσεων του εκκινητή})$. Συνήθως, η θερμοκρασία υβριδισμού ορίζεται κατά 2-3 βαθμούς χαμηλότερα από το μικρότερο Tm. (2) Ο χρόνος επέκτασης (extension) εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος DNA που πρέπει να ενισχυθεί και από την ταχύτητα πολυμερισμού της DNA πολυμεράσης που χρησιμοποιείται.

Table 3 Κλασική αντίδραση της πολυμεράσης PCR

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

2.4 Ανάλυση δεσοξυριβονουκείκων οξέων σε πηκτή αγαρόζης

Για τον διαχωρισμό νουκλεϊνικών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών δομών, εφαρμόσαμε την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την απομόνωση νουκλεϊνικών οξέων (DNA, RNA) με βάση το μέγεθος, το ηλεκτρικό φορτίο και άλλες φυσικές ιδιότητές τους. Τα μόρια των νουκλεϊνικών οξέων μετακινούνται μέσα από την πηκτή αγαρόζης όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα. Επειδή τα νουκλεϊνικά οξέα είναι αρνητικά φορτισμένα, μετακινούνται προς τον θετικό πόλο με ταχύτητα που εξαρτάται από το ηλεκτρικό πεδίο και αντιστρόφως από το μοριακό τους μέγεθος.

Η πηκτή αγαρόζης αποτελείται από πολυμερή αγαρόζη που δημιουργεί ένα τρισδιάστατο πλέγμα πόρων. Το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων που διαχωρίζονται. Όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος των μορίων, τόσο μεγαλύτερο πρέπει να είναι το μέγεθος των πόρων. Συνήθως, χρησιμοποιούμε πηκτή αγαρόζης σε συγκέντρωση από 0,8% έως 4% κατά βάρος. Τα κλάσματα των νουκλεϊνικών οξέων γίνονται ορατά στην πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιώντας το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), ένα χρωστικό που ενσωματώνεται μεταξύ των βάσεων και εκπέμπει φωτεινό φως υπό υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Η ευκρίνεια του διαχωρισμού είναι περίπου 5 ng της DNA ανά ζώνη.

Η ποσότητα της αγαρόζης εξαρτάται από το επιθυμητό επίπεδο διαχωρισμού:

- Για διαφορές μεγέθους > 1000 bp, χρησιμοποιούμε 1-1,5%.
- Για διαφορές μεγέθους ≤ 100 bp, χρησιμοποιούμε 4%.

2.3.1 Διαδικασία παρασκευής πηκτής αγαρόζης

- Ακριβή ζύγισμα της κατάλληλης ποσότητας αγαρόζης και προσθήκη σε κωνική φιάλη που περιέχει τον αναγκαίο όγκο ddH₂O.
- Θέρμανση του μείγματος σε φούρνο μικροκυμάτων με ενδιάμεση ανάδευση, μέχρι να γίνει ομοιόμορφο και διάφανο.
- Προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας 50X TAE (2ml ανά 100ml πηκτής) για να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 1X TAE.
- Προσθήκη διαλύματος EtBr με τελική συγκέντρωση 0,005% v/v (5μl ανά 100ml πηκτής).
- Εισαγωγή της πηκτής σε κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης με την αντίστοιχη "χτένα" και αναμονή σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να πήξει.
- Αφαίρεση της "χτένας" από την πηκτή αφού πήξει και τοποθέτηση του δοχείου με την πηκτή στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιέχει κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1X TAE-0,005% EtBr..

Για παρασκευή 100 mL πηκτής, διάλυση των παρακάτω σε ddH₂O:

Table 4 Συνταγή διαλύματος πηκτής αγαρόζης

TAE (Tris, acetic acid, EDTA) (50x)	2 mL
EtBr (10 mg/mL)	5 μL (τελική συγκέντρωση 0,005% v/v)
Agarose	1-4 % w/v

2.4 Διαχωρισμός μορίων DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και απεικόνιση

- Ετοιμασία του αγαρόζης gel όπως περιγράφηκε προηγουμένως.
- Ανάμειξη των δειγμάτων που θα αναλυθούν με 2μl από το διάλυμα μπλε χρωστικής (loading dye).
- Τοποθέτηση των δειγμάτων στις ειδικές θέσεις της πηκτής (πηγάδια), που δημιουργήθηκαν από την αφαίρεση της "χτένας," και εφαρμογή ηλεκτροφόρησης υπό συνεχή τάση 50-120V, ανάλογα με την επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού, το μέγεθος της ηλεκτροφορητικής συσκευής και την περιεκτικότητα της πηκτής σε αγαρόζη.
- Η ανάλυση των νουκλεϊνικών οξέων γίνεται σε ειδικό θάλαμο (Gel Doc 1000 της εταιρείας BIORAD) που περιλαμβάνει υπεριώδη ακτινοβολία (UV) και η εικόνα του αναλύεται με μια Nikon D5200 κάμερα, που έχει προσαρμοστεί στον θάλαμο και συνδεθεί με έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Τα δείγματα DNA περιέχουν μόρια των οποίων τα μεγέθη μπορεί να ποικίλλουν. Για την εκτίμηση του μεγέθους κάθε μορίου, μαζί με το δείγμα "τρέχει" παράλληλα (σε κοντινό πηγάδι) και το λεγόμενο ladder. Πρόκειται για ένα διάλυμα το οποίο περιέχει μόρια DNA γνωστών μεγεθών και σε γνωστές συγκεντρώσεις. Ανάλογα και το ποσοστό % w/v της αγαρόζης, το ladder "τρέχει" μαζί με τα δείγματα που αναλύονται και τα μόρια του διαχωρίζονται ανάλογα το μέγεθός τους. Όταν γίνει απεικόνιση του gel σε τράπεζα UV, οι θέσεις των μπαντών που φανερώνονται στα δείγματα συγκρίνονται με τις θέσεις των μπαντών του ladder. Εξ ορισμού, τα μόρια DNA με ίδιο μεταξύ τους μέγεθος τρέχουν με την ίδια ταχύτητα στο ίδιο gel. Επομένως μία μπάντα που αντιστοιχεί σε μόρια DNA αγνώστου μεγέθους μπορεί να προσδιοριστεί μελετώντας τη θέση της σε σχέση με τις μπάντες του ladder. Το ladder που χρησιμοποιήθηκε για την παρούσα πειραματική διαδικασία ήταν το FastGene® 1kb DNA Marker Pro της Nippon Genetics.

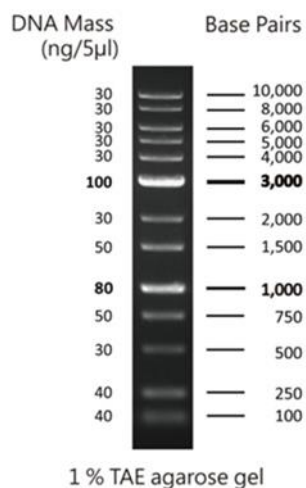


Figure 4 Ladder για την εκτίμηση των μεγεθών των DNA μορίων.

Η αξιολόγηση των μοριακών μεγεθών των κλασμάτων DNA γίνεται μέσω της σύγκρισης του μετώπου ανάλυσης των δειγμάτων με το μέτωπο ανάλυσης ενός κλιμακούμενου δείκτη γνωστών μοριακών μεγεθών.

Χρησιμοποιήθηκε ο μοριακός δείκτης 1kb Opti-DNA Marker (#G106) της εταιρείας Applied Biological Materials Inc. Η κλίμακα του δείκτη, 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.

2.5 Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης

Όπως ειπώθηκε προηγουμένως, 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 erpendorf 1,5ml.
- Εν 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 εκλύεται σε 15-30μl ddH₂O. Ο όγκος του νερού εξαρτάται από την ένταση της μπάνας που αποκόπηκε από την πηκτή και από το πόσο συγκεντρωμένη επιθυμούμε να την έχουμε.. Τέλος, μπορεί να γίνει αποθήκευση του δείγματος DNA σε θερμοκρασία -20°C .

2.6 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA (Plasmid prep)

- Από το stock της βακτηριακής καλλιέργειας που περιλαμβάνει το πλασμίδιο γίνεται επίστρωση σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό μέσο LB με το αντίστοιχο αντιβιοτικό στο οποίο παρουσιάζει ανθεκτικότητα
- Επώαση τρυβλίου στους 37°C overnight ανάποδα.
- Την επόμενη μέρα λαμβάνεται δείγμα από μια μονή αποικία με οδοντογλυφίδα και τοποθετείται σε υγρή καλλιέργεια για να αναπτυχθεί overnight (~12h)
- Μεταφέρεται 1,5 mL από την υγρή καλλιέργεια σε Eppendorf tube και φυγοκεντρείται για 1-2 min στις 13000 rpm
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα διατηρούνται στον πάτο
- Προστίθενται 200 μL από το διάλυμα P1

Το διάλυμα P1 παρασκευάζεται ως εξής:

Για 300 μL P1:

EDTA 0,5 M	20 μL
Tris-HCl pH 8.0	50 μL
RNase	10 μL
ddH₂O	220 μL

*Φυλάσσεται σε θερμοκρασία 4°C

- Τα κύτταρα επαναιωρούνται με πιπέτα
- Προστίθενται 200 μL P2 και γίνεται ελαφριά ανάδευση μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές

Το διάλυμα P2 παρασκευάζεται ως εξής:

Για 1 mL P2:

SDS 20%	50 μ L
NaOH 10 N	20 μ L

- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 min
- Προστίθενται 200 μ L P3

Το διάλυμα P3 παρασκευάζεται ώστε να έχει τις εξής τελικές συγκεντρώσεις:
CH₃COOK 3M και CH₃COOH 5M

- Γίνεται ελαφριά ανάμιξη μέχρι να παρατηρηθούν λευκά κομμάτια (κυτταρικά τοιχώματα)
- Επώαση στον πάγο για 15 min
- Φυγοκέντρηση 13000 rpm για 20-30 min στους 4°C
- Μεταφέρεται το υπερκείμενο σε καινούριο Eppendorf tube χωρίς να ληφθούν κυτταρικά τοιχώματα
- Προστίθενται 2 όγκοι από παγωμένη EtOH (100%) και γίνεται καλή ανάμιξη 10 φορές
- Επώαση για 10 min σε room temperature
- Φυγοκέντρηση 15 min 13000 rpm
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και γίνεται ξανά φυγοκέντρηση για 15 sec στις 13000 rpm
- Με πιπέτα αφαιρείται όση αιθανόλη έμεινε χωρίς να ληφθεί το pellet. Το δείγμα μένει ανοιχτό για να στεγνώσει η αιθανόλη για 5-10 min
- Επαναδιάλυση σε 40 μ L ddH₂O

2.7 Klenow fragment treatment

Η διαδικασία μετατρέπει τα κολλώδη άκρα μιας αλληλουχίας DNA σε τυφλά.

DNA polymerase I	1 μL
10x buffer	2 μL
330 μM dNTPs	2 μL
ddH₂O	5 μL
DNA template	10 μL
Total volume	20 μL

-Επώαση για 15 min στους 25° C για δράση της πολυμεράσης

-Επώαση για 20 min στους 75° C για απενεργοποίηση της πολυμεράσης

2.8 Ενοποίηση τμημάτων DNA με κολλώδη ή τυφλά άκρα (Ligation)

Για να γίνει η κλωνοποίηση του επιθυμητού τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα, πραγματοποιούνται αρχικά περιοριστικές ενδονουκλεάσεις στον φορέα, ώστε να γίνει γραμμικοποίηση του DNA και να δημιουργηθούν κατάλληλα άκρα, είτε κολλώδη (cohesive) είτε τυφλά (blunt). Το τμήμα DNA που θα κλωνοποιηθεί προετοιμάζεται επίσης είτε με ενίσχυση μέσω PCR, δημιουργώντας κατάλληλα άκρα για την κλωνοποίηση, είτε με περιοριστικές ενδονουκλεάσεις που αντιστοιχούν στον φορέα.

Και τα δύο μόρια DNA, ο γραμμικοποιημένος φορέας και το εισερχόμενο τμήμα DNA, έχουν απομονωθεί και καθαριστεί από πηκτή αгарόζης. Μετά τον καθαρισμό, τα δύο γραμμικά μόρια DNA μπορούν να ενωθούν μεταξύ τους μέσω της διαδικασίας της λιγοποίησης. Η λιγοποίηση επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας το ένζυμο T4 DNA λιγάση, το οποίο έχει απομονωθεί από τον βακτηριοφάγο T4. Αυτό το ένζυμο καταλύει τη δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ του 3'-OH και του 5' επιτρέποντας τη σύνδεση των δύο γραμμικών αλυσίδων DNA. Αυτό το ένζυμο είναι ικανό να ενώσει τόσο κολλώδη όσο και τυφλά άκρα. Μια τυπική αντίδραση λιγοποίησης άκρων DNA περιγράφεται ακολούθως:

1. Σε ένα φιαλίδιο erpendorf που τοποθετείται στον πάγο, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα DNA από τον πλασμιδιακό φορέα και το εισερχόμενο τμήμα. Ο συνολικός όγκος αυτών των δύο πρέπει να ανέρχεται σε μέγιστο 50% του συνολικού όγκου της αντίδρασης.
2. Προστίθενται 2 μλ 10X ρυθμιστικού διαλύματος T4 στην αντίδραση.
3. Προστίθενται 1 μλ DNA T4 λιγάσης (0,1U/μλ, NEBiolabs).
4. Το δείγμα αναμειγνύεται και αντιδρά για 4 ώρες (overday) ή 16 ώρες (overnight) στους 16°C.

Αυτή η διαδικασία επιτρέπει την ενωμένη κλωνοποίηση του επιθυμητού τμήματος DNA στον πλασμιδιακό φορέα.

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

Figure 5 Αναλογίες και συστατικά λιγοποίησης άκρων DNA

(1), (2) Καθώς η λιγάση αναγνωρίζει τα άκρα του DNA και όχι την ποσότητά του, είναι σημαντικό να υπολογίσουμε σωστά την αναλογία των άκρων του εισερχόμενου DNA προς τους φορείς του πλασμιδίου. Συνήθως χρησιμοποιείται μια αναλογία μορίων μεταξύ του εισερχόμενου DNA και του πλασμιδίου, που είναι το (1) προς (1). Η ποσότητα του κάθε τμήματος DNA σε nanograms (ng) υπολογίζεται με βάση τον ακόλουθο τύπο: $\text{ng του φορέα} * \text{μέγεθος του εισερχόμενου (σε kb)} / \text{μέγεθος του φορέα (σε kb)} * \text{αναλογία (εισερχόμενο: φορέα)} = \text{ng του εισερχόμενου}$.

Είναι σημαντικό να διατηρηθεί ο συνολικός όγκος του DNA κάτω από το 50% του τελικού όγκου της αντίδρασης, δηλαδή κάτω από 10 μL .

(3) Η αρχική συγκέντρωση του ένζυμου T4 DNA Ligase εξαρτάται από την εταιρεία που το παρέχει και συνήθως είναι διαθέσιμο ως 10X ή 2X. Το ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει το απαραίτητο ATP που χρειάζεται το ένζυμο για να πραγματοποιήσει την λιγοποίηση.

(4) Το PEG (Πολυαιθυλενογλυκόλη) βελτιώνει την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης, ειδικά όταν πρόκειται για λιγοποίηση τυφλών άκρων (blunt-end ligation), καθώς προσεγγίζει τα άκρα των τμημάτων DNA, βοηθώντας την λιγάση να τα ενώσει ευκολότερα.

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

The vector from Klenow 3,5 μL mix	
insert	6 μL
T4 ligase	1 μL
10x buffer	2 μL
PEG	2 μL
ddH ₂ O	5,5 μL
Total volume	20 μL

2.9 Βακτηριακά κύτταρα και μετασχηματισμός

2.9.1 Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *Escherichia coli*

- Η προετοιμασία των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων γίνεται ως εξής:
- Εκτροφή μιας μονής αποικίας του κατάλληλου βακτηριακού στελέχους DH5a σε υγρό θρεπτικό μέσο LB για 12 ώρες στους 37°C.
- Μετάφεση 2ml από την αρχική καλλιέργεια σε κωνική φιάλη που περιέχει 200ml θρεπτικού μέσου LB.
- Εκτροφή της καλλιέργειας στους 37°C μέχρι την οπτική πυκνότητά της να φτάσει στο O.D550=0,5.
- Ψύξη της καλλιέργειας στον πάγο για 10 λεπτά και κατακρήμνιση των βακτηριακών κυττάρων με φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά στους 4°C.
- Επανάληψη της διαδικασίας αποκράσης με προσθήκη διαλύματος CaCl₂ 25mM και άλλη κατακρήμνιση.
- Επανάληψη της διαδικασίας αποκράσης με προσθήκη διαλύματος CaCl₂ 75mM.
- Προσθήκη αποστειρωμένης γλυκερόλης με τελική συγκέντρωση 15% v/v και ανάμειξη του δείγματος.

- Διανομή του μείγματος των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων σε φιαλίδια erpendorf και τοποθέτηση τους σε υγρό άζωτο για αποθήκευση στους -80°C..

2.9.2 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli* με πλασμιδιακό DNA

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

1. Προσθήκη 10-50 ng πλασμιδιακού DNA ή του μείγματος λιγοποίησης σε 200μl δεκτικών βακτηριακών κυττάρων DH5α. Ανάμειξη του δείγματος και επώαση στον πάγο για 30 λεπτά.
2. Ακολουθεί θερμική επεξεργασία του δείγματος με επώαση για 2-3 λεπτά στους 42ο-43οC.
3. Προσθήκη 1,3 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB, ανάμειξη του δείγματος και επώαση για 1 ώρα στους 37οC.
4. Κεντροφυγούμε το δείγμα για 30 δευτερόλεπτα στις 13.000 στροφές/λεπτό.
5. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναστρώνουμε το ιζήμα σε 100-200μl υγρού θρεπτικού μέσου LB.
6. Καλύπτουμε το δείγμα σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό μέσο LB, που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό ως μέσο επιλογής για τον συγκεκριμένο πλασμιδιακό φορέα. Σε περίπτωση που χρησιμοποιούμε πλασμιδιακό φορέα που περιλαμβάνει το γονίδιο β-γαλακτοσιδάσης, υπάρχει δυνατότητα επιλογής μπλε ή λευκών αποικιών. Πριν την επιστροφή των βακτηριακών κυττάρων στο στερεό θρεπτικό μέσο, προστίθενται το χρωμοφόρο υπόστρωμα X-gal και ο παράγοντας IPTG σε τελικές συγκεντρώσεις 5×10^{-3} και 50mM αντίστοιχα. Τα τρυβλία επώασης αφήνονται για 12-16 ώρες σε θάλαμο με θερμοκρασία 37οC.

2.9.3 Αποθήκευση μετασηματισμένων 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 erpendorf.
- Προσθήκη 300μl 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

- Καλλιέργηση μονής βακτηριακής αποικίας που περιέχει το πλασμίδιο που θέλουμε να απομονώσουμε, σε υγρό θρεπτικό μέσο LB στους 37°C για 12 ώρες.
- Μετάφερομε 1,5ml από αυτήν την καλλιέργεια σε ένα φιαλίδιο erpendorf και κεντροφυγούμε για 2 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό.
- Διαλύομε το βακτηριακό ιζήμα σε 200μl διαλύματος P1.
- Προσθέτομε 200μl από το διάλυμα P2.
- Ανακατεύομε ελαφρά μέχρι το δείγμα να γίνει διαυγές και επώαση του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για το πολύ 3 λεπτά.

- Προσθέτουμε 200μl διαλύματος 3M/5M CH₃COOK και ανακατεύουμε πολύ μέχρι να εμφανιστούν λευκά κομμάτια, υποδεικνύοντας τη διάλυση των κυτταρικών μεμβρανών και άλλων παραπροϊόντων.
- Επώαση του δείγματος στον πάγο για 15 λεπτά.
- Κεντροφυγούμε το δείγμα για 20 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό στους 4°C. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε ένα καθαρό φιαλίδιο erpendorf.
- Προσθέτουμε διπλάσιο όγκο αιθανόλης (μέχρι το χεΐλος). Ανακατεύουμε και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Κεντροφυγούμε το δείγμα για 15 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και, αφού στεγνώσει το ιζήμα, προσθέτουμε 40μl νερού (dH₂O).
- Τοποθετούμε το δείγμα στον πάγο μέχρι να ενυδατωθεί το ιζήμα και με ένα ελαφρύ κρύο ανακίνημα και στη συνέχεια στιγμιαία κε.

2.11 Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Μετά την εισαγωγή ενός τμήματος DNA σε ένα βακτηριακό ξενιστή, είναι αναγκαίο να επιβεβαιώσουμε τη σωστή ενσωμάτωση του τμήματος στον φορέα. Αυτή η επιβεβαίωση επιτυγχάνεται μέσω της χρήσης περιοριστικών ενδονουκλεασών τύπου II ή, όπως είναι γνωστά, ενζύμων περιορισμού. Τα περισσότερα από αυτά τα ενζύματα αναγνωρίζουν μια αντίστροφη ακολουθία μεταξύ 4-8 νουκλεοτιδίων στο DNA και το κόβουν, δημιουργώντας προεξέχοντα άκρα στο 5' ή 3' άκρο (όπου καθεμία αλυσίδα κόβεται σε διαφορετικά σημεία) ή τυφλά άκρα (όπου οι αλυσίδες κόβονται στο ίδιο σημείο). Μια τυπική αντίδραση πέψης σύμφωνα με τη NEB παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα και έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

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

Εικόνα 4 Αντίδραση πέψης

Κάθε ενζύμο περιορισμού έχει διαφορετικές απαιτήσεις όσον αφορά το ρυθμιστικό διάλυμα που απαιτείται για την αποτελεσματική λειτουργία του. Κάθε εταιρεία παρέχει τα δικά της ρυθμιστικά διαλύματα μαζί με τα ενζύμα της. Η προσθήκη αλβουμίνης ορού μόσχου είναι προαιρετική και πραγματοποιείται όταν κρίνεται απαραίτητη για την βέλτιστη λειτουργία του ενζύμου. Ο όρος "Unit" ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να πεπτικοποιήσει 1μg του λοιπού DNA σε 1 ώρα, στην κατάλληλη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου και σε τελικό όγκο 50μl. Τα πρωτόκολλα των ενζύμων συνήθως συνιστούν την πραγματοποίηση της αντίδρασης σε τελικό όγκο 50μl, αλλά ο όγκος μπορεί να προσαρμοστεί ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος.

- Προσθήκη, σε φιαλίδιο erpendorf κατάλληλου όγκου:
- ddH₂O 1/10 του όγκου 10x του κατάλληλου κατά περίπτωση ρυθμιστικού διαλύματος 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. Τα βέλη στις αλληλουχίες υποδηλώνουν το σημείο τομής τους από το εκάστοτε ένζυμο περιορισμού.

Ένζυμο περιορισμού	Ρυθμιστικό διάλυμα	Αλληλουχία αναγνώρισης	Συνθήκες επώασης
EcoRI (#R601A) Promega	Buffer H 10X (#R008A) +	5'...G [▼] AATT C...3' 3'...C TTAA [▲] G...5'	37°C, 1 ώρα
	BSA (#R396E)		
HindIII (#R0104S) NEB	1X NEBuffer™ 2.1 (#B7202S)	5'...A [▼] AGCT T...3' 3'...T TCGA [▲] A...5'	37°C, 1 ώρα
KpnI (#R0142S) NEB	1X NEBuffer™ 1.1 (#B7201S)	5'...G GTAC [▼] C...3' 3'...C [▲] CATG G...5'	37°C, 1 ώρα
Sall-HF(#R3138S) NEB	1X CutSmart® Buffer (#B7204S)	5'...G [▼] TCGA C...3' 3'...C AGCT [▲] G...5'	37°C, 1 ώρα
XbaI (#R0145S) NEB	1X CutSmart® Buffer (#B7204S)	5'...T [▼] CTAG A...3' 3'...A GATC [▲] T...5'	37°C, 1 ώρα
XhoI (#R0146S) NEB	1X CutSmart® Buffer (#B7204S)	5'...C [▼] TCGAG...3' 3'...GAGCT [▲] C...5'	37°C, 1 ώρα
BamHI (#R0136S) NEB	1X CutSmart® Buffer (#B7204S)	5'...G [▼] GATC C...3' 3'...C CTAG [▲] G...5'	37°C, 1 ώρα
SmaI (#R0141S) NEB	1X CutSmart® Buffer (#B7204S)	5'...CCC [▼] GGG...3' 3'...GGG [▲] CCC...5'	37°C, 1 ώρα
PstI (#R0140S) NEB	1X CutSmart® Buffer (#B7204S)	5'...CTGCA [▼] G...3' 3'...G [▲] ACGT G...5'	37°C, 1 ώρα

Figure 6 ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

2.12 Έλεγχος επιτυχίας μετασχηματισμού μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης Colony PCR

Η colony-PCR είναι μια μέθοδος για την ταχεία διαλογή αποικιών ζυμομυκήτων ή βακτηρίων που έχουν αναπτυχθεί σε επιλεκτικά μέσα μετά από ένα βήμα μετασχηματισμού, για να επαληθευτεί ότι υπάρχει το επιθυμητό γενετικό κατασκεύασμα ή για να ενισχυθεί ένα τμήμα του κατασκευάσματος. Η Colony-PCR είναι μια αποδοτική τεχνική που χρησιμοποιείται για να εξακριβώσει εάν ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA έχει ενσωματωθεί ή όχι στον πλασμιδιακό φορέα μέσα σε βακτηριακά κύτταρα μετά τη διαδικασία του μετασχηματισμού.

Για να πραγματοποιηθεί αυτή η μέθοδος, αρχικά λαμβάνεται μια αποικία βακτηρίων, και χρησιμοποιώντας ένα αποστειρωμένο tip, αυτή η αποικία μεταφέρεται σε ένα μίγμα διαλυμάτων που χρησιμοποιείται στην αντίδραση PCR. Κατά τη διάρκεια του αρχικού βήματος θέρμανσης, τα κύτταρα λύνονται, απελευθερώντας το πλασμιδιακό DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα στη συνέχεια της αντίδρασης ενίσχυσης. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται είναι οι ίδιοι με εκείνους που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση PCR για την ενίσχυση των επιθυμητών τμημάτων DNA, καθώς είναι σχεδιασμένοι για τα άκρα των εισαχθέντων τμημάτων στους πλασμιδιακούς φορείς. Η παρουσία ή απουσία των επιθυμητών τμημάτων και το μέγεθος των προϊόντων της αντίδρασης PCR καθορίζεται με τη χρήση ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης, ενώ παράλληλα χρησιμοποιείται μάρτυρας DNA γνωστού μεγέθους. Συνήθως, όπως και στη προκειμένη περίπτωση, μετά το transformation, ακολουθεί επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλίο με στερεό LB και επώαση στους 37° C overnight.

- Παραλαβή μοναδικών αποικιών από το τρυβλίο χρησιμοποιώντας pipette tips. Μόλις εντοπιστεί μία αποικία, πίεση του tip ελαφρά επάνω της για παραλαβή δείγματος κυττάρων.
- Διάλυση των κυττάρων σε 15 μL ddH₂O.
- Σύνθεση δειγμάτων με κύτταρα από 5 αποικίες, αντλώντας 3 μL από κάθε μία
- Χρήση των νέων δειγμάτων για πραγματοποίηση PCR όπως περιεγράφηκε προηγουμένως

2.13 Σύσταση και παρασκευή διαλυμάτων και θρεπτικών μέσων ανάπτυξης

2.13.1 Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης φυτών 1/2 MS

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε σε αυτήν την πειραματική μελέτη προετοιμάστηκε και αναπτύχθηκε υπό συγκεκριμένες συνθήκες απολύτως υγιείς και στείρες, όπως αυτές περιγράφηκαν στην παράγραφο 2.2 της μελέτης. Τα φυτά καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε το 1/2 X MS (Murashige & Skoog, 1962, Duchefa Biochemie B.V.), και το μείγμα αυτού του θρεπτικού μέσου παρουσιάζεται με λεπτομέρειες στον πίνακα που παρουσιάζεται στην Εικόνα 6 της μελέτης:

Συστατικά	Ποσότητες (g/100ml)
MS ⁽¹⁾ (including vitamins, DUCHEFA)	0,22
D- Sucrose ⁽²⁾	1
MES – monohydrate ⁽³⁾	0,05
Agarose/Phytigel ⁽⁴⁾	0,6/0,3
ddH ₂ O	Έως τα 100ml

Εικόνα 6 Σύσταση θρεπτικού μέσου ανάπτυξης φυτών 1/2 X MS (Murashige & Skoog).

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

(2)Σουκρόζη: Πηγή των απαραίτητων υδατανθράκων

(3)MES: Χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση του pH του θρεπτικού διαλύματος

(4)Αγαρόζη/ Phytigel: Σταθεροποιητικό μέσο του υποστρώματος

Η τελική ρύθμιση της τιμής του pH του υποστρώματος στο επίπεδο 5,7 επιτυγχάνεται μέσω σταδιακής προσθήκης κατάλληλης ποσότητας KOH 1N, και παράλληλα γίνεται μέτρηση με τη χρήση ενός pH μέτρου. Αυτή η ρύθμιση πραγματοποιείται μετά τον εναρμονισμό όλων των υπολοίπων συστατικών, εκτός από το στερεοποιητικό μέσο. Στη συνέχεια, το θρεπτικό μέσο αποστειρώνεται στους 120°C υπό πίεση 1,5atm

περίπου για 20 λεπτά. Μόλις η θερμοκρασία του θρεπτικού μέσου πέσει και ενώ παραμένει υγρό, μεταφέρεται σε τρυβλία Petri χρησιμοποιώντας έναν απαγωγό νηματικής ροής, προκειμένου να διατηρηθούν ασηπτικές συνθήκες. Αφού το θρεπτικό μέσο πηξει, τα τρυβλία φυλάσσονται στους 4°C για μελλοντική χρήση.

2.13.2 Διαλύματα προετοιμασίας, ανάπτυξης και επιλογής βακτηριακών κυττάρων *E. coli* DH5a

2.13.2.1 Διαλύματα ανάπτυξης και επιλογής βακτηριακών κυττάρων *E. Coli* DH5a

Η σύσταση του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης των βακτηρίων LB (Lysogeny broth) περιγράφεται στον ακόλουθο Πίνακα 5:

Table 5 θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηρίων LB

Συστατικά	Ποσότητες (w/v)
Εκχύλισμα ζύμης	0,5g
Πεπτόνη	1g
NaCl	1g
Άγαρ (μόνο για στερεό θρεπτικό μέσο)	1,4g
ddH ₂ O	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 H₂O
- **Αμπικιλίνη:** 100mg/ml σε ddH₂O
- **Καναμυκίνη:** 50mg/ml σε ddH₂O

2.13.2.2 Διαλύματα προετοιμασίας δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. 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

2.13.2.3 Διαλύματα απομόνωσης γονιδιωματικού DNA

RNA extraction buffer: 100mM Tris-HCl (pH 9,5), 0,5% SDS w/v Sevag: 24:1Χλωροφόρμιο: ισοαμλική 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 (πολυβινυλ- πυρρολιδόνη, M.B 40.000), 2% (w/v) CTAB

2.13.2.4 Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης

- **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 ddH₂O.
- **RNάση**: Διάλυμα RNάσης 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 DNάσης. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20oC.

2.13.2.5 Διαλύματα ανάλυσης νουκλεϊνικών οξέων

Σύσταση πηκτής αγαρόζης 1,5%

αγαρόζη	1,5 g
1xTAE	2ml
βρωμιούχο αιθίδιο	5μl
ddH ₂ O	98ml
Τελικός όγκος	100ml

Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης

1xTAE	20ml
βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)	50μl
ddH ₂ O	980ml
Τελικός όγκος	1000ml

TAE (50X): 100ml/lit EDTA (0,5M, pH 8), 57ml/lit CH₃COOH, 24,2gr (w/v) Tris base

EtBr: 10mg/ml (φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο δοχείο σε θερμοκρασία δωματίου)

Σύσταση μητρικού διαλύματος χρωστικών 6x (loading dye)

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

2.13.2.6 Καλλιέργεια φυτών *Arabidopsis thaliana* οικότυπου *Columbia* (Col-0)

Για να καλλιεργηθούν τα φυτά *Arabidopsis thaliana*, απαιτείται αρχικά η διαδικασία της άρσης του ληθάργου (stratification), η οποία πραγματοποιείται μέσω της ανάπτυξης των σπερμάτων και της διάβρεξής τους σε νερό (imbibition). Τα σπέρματα διατηρούνται σε dH₂O για δύο έως τέσσερις ημέρες στους 4°C, έτσι ώστε να απορροφήσουν το νερό, να ενεργοποιηθούν ένζυμα του μεταβολισμού τους και να παράγουν την απαραίτητη ενέργεια για τις επόμενες διαδικασίες ανάπτυξης. Στη συνέχεια, τα σπέρματα αποστειρώνονται και μεταφέρονται σε ασηπτικές συνθήκες σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MS (Murashige & Skooge, 1962). Για την αφαίρεση του νερού, χρησιμοποιείται ένας απαγωγός νηματικής ροής, ενώ στη συνέχεια προστίθεται 1ml διαλύματος αιθανόλης (75%), και τα σπέρματα παραμένουν για 2 λεπτά με ανάδευση. Στη συνέχεια, αφαιρείται το διάλυμα της αιθανόλης, προστίθεται 1ml διάλυμα χλωρίνης (25%) και ανακινείται για 4 λεπτά. Έπειτα, αφαιρείται το διάλυμα χλωρίνης και προστίθεται 1ml αποστειρωμένου dH₂O, με ανάδευση για 2 λεπτά, διαδικασία που επαναλαμβάνεται τέσσερις φορές. Τέλος, τα σπέρματα διαιρούνται ένα προς ένα σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MS χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη βελόνα. Τα τρυβλία τοποθετούνται κάθετα σε ένα θάλαμο με ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία 22°C, υγρασία 40%, φωτοπερίοδος 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι).

2.14 Χρήση του συστήματος του *Agrobacterium tumefaciens*

Σε συνθήκες εργαστηρίου, μπορεί να γίνει διαγραφή της περιοχής της T-DNA μεταξύ των LB και RB συνοριακών περιοχών χωρίς να επηρεαστεί η ανάπτυξη του *Agrobacterium*. Παράλληλα, έχει δείχτει ότι τα βακτηριακά κύτταρα διατηρούν την ικανότητά τους να μολύνουν φυτά, όσον αφορά τη Vir περιοχή του Ti πλασμιδίου, εφόσον αυτή παραμείνει ανέπαφη. Βασιζόμενοι σε αυτά τα ευρήματα, οι ερευνητές προχώρησαν στη δημιουργία διαφόρων γενετικά τροποποιημένων στελεχών του αγροβακτηρίου, τα οποία φέρουν Ti-πλασμίδια απαλλαγμένα από το ενδογενές T-DNA, αλλά διατηρούν τα γονίδια της Vir περιοχής (αφοπλισμένα Ti-πλασμίδια, disarmed Ti-plasmids).

2.14.1 Μετασχηματισμός Αγροβακτηρίων

Για να ξεκινήσετε το πρωτόκολλο, πρέπει να ξεπαγώσετε τα δεκτικά κύτταρα GV3101, τα οποία βρίσκονται σε σωλήνες συλλογής όγκου 1,5 ml στη θερμοκρασία -80°C , τοποθετώντας τους σε πάγο. Στη συνέχεια, προσθέτετε περίπου 5ml του μετασχηματισμένου πλασμιδιακού φορέα (pCambia1301, pGBKT7) και τον τοποθετείτε άμεσα σε υγρό άζωτο. Ακολούθως, πραγματοποιείτε επίστρωση σε 37°C για 5 λεπτά και προσθέτετε 1μl θρεπτικού YEB ανά σωλήνα συλλογής. Στη συνέχεια, γίνεται επίστρωση στους 28°C για δύο ώρες με ταυτόχρονη ανάκλιση, φυγοκέντρωση των δειγμάτων για 30 δευτερόλεπτα στα 11.000xg, αφαίρεση του υπερκειμένου και επαναδιάλυση τους σε 100μl YEB. Τέλος, γίνεται επίστρωση σε τρυβλία YEB agar με την κατάλληλη προσθήκη αντιβιοτικών ανάλογα με τον πλασμιδιακό φορέα, και πραγματοποιείται επίστρωση για δύο μέρες στους 28°C . Μετά τη λήξη της περιόδου επίστρωσης, επιλέγετε μονή αποικία από τα τρυβλία και την ανακαλλιεργείτε σε υγρό θρεπτικό YEB για περίπου 36 ώρες. Στη συνέχεια, απομονώνετε το πλασμιδιακό DNA και το μετασχηματίζετε ξανά σε στελέχη Omnimax των *E. coli* (Επαναμετασχηματισμός).

2.14.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από *Agrobacterium tumefaciens*, Miniprep

Το *Agrobacterium tumefaciens* είναι ένα βακτήριο εδάφους που προκαλεί στα φυτά την ασθένεια του κορωνωτού κάλλου. Το βακτήριο αυτό είναι γραμ-αρνητικό και ανήκει στην οικογένεια των Rhizobiaceae. Έχει τη δυνατότητα να προσβάλει πρακτικά όλα τα δικοτυλήδονα φυτά καθώς και ορισμένα μονοκοτυλήδονα της οικογένειας *Lilaceae* και *Amaryllideae*. Η ικανότητά του να προκαλεί παθήσεις σε φυτά συνδέεται άμεσα με την παρουσία ενός μεγάλου πλασμιδίου, γνωστού ως πλασμίδιο Ti, στον αγριότυπο του βακτηρίου. Γενετικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι δύο περιοχές αυτού του πλασμιδίου, ονομαζόμενες ως περιοχές Vir και T-DNA, είναι υπεύθυνες για την ικανότητά του να μολύνει τα φυτικά κύτταρα. Η περιοχή Vir περιλαμβάνει μια σειρά γονιδίων που, όταν ενεργοποιηθούν, παράγουν τις πρωτεΐνες Vir. Αυτές οι πρωτεΐνες, από τη μεριά τους, μεταφέρουν και ενσωματώνουν ένα αντίγραφο της περιοχής T-DNA στο γονιδίωμα του φυτού. Η έκφραση αυτών των γονιδίων ρυθμίζεται από ένα σύστημα χημικών ανιχνευτών, το οποίο αναγνωρίζει φυτικούς μεταβολίτες που παράγονται κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης της λιγνίνης στο κυτταρικό τοίχωμα. Από την άλλη πλευρά, η περιοχή T-DNA του πλασμιδίου περιλαμβάνει γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση ή τροποποίηση βασικών αυξητικών παραγόντων. Η ρύθμιση της έκφρασης αυτών των γονιδίων επηρεάζει τη φυσιολογική ανάπτυξη των φυτικών κυττάρων και οδηγεί στην ανάπτυξη νέων εξαρτήματων. Η μεταφορά του T-DNA στο φυτό εξαρτάται κυρίως από δύο περιοχές συνοριακής ακολουθίας που βρίσκονται στα άκρα του T-DNA. Συνήθως, το *Agrobacterium tumefaciens* βρίσκεται στη ριζόσφαιρα του εδάφους, αλλά έχει ανακαλυφθεί επίσης στο αγγειακό σύστημα πολλών φυτών. Όπως και πολλά άλλα βακτήρια, το *Agrobacterium* εί

ναί έλκον προς διάφορα σάκχαρα και αμινοξέα, και διαθέτει την ικανότητα να αναγνωρίζει δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών, όπως τα ενδιάμεσα προϊόντα της βιοσύνθεσης της λιγνίνης.).

Στην παρούσα εργασία για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από *Agrobacterium* ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. Μια μονή καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους *Agrobacterium* αναπτύσσεται σε 8 ml υγρού θρεπτικού μέσου YEB και διαρκεί για 36 ώρες σε θερμοκρασία 28-30°C, παρουσιάζοντας παράλληλα την παρουσία των αντίστοιχων αντιβιοτικών.
2. Χρησιμοποιήθηκαν 1,5 ml από την καλλιέργεια και υποβλήθηκαν σε διαδικασία φυγοκέντρησης για 2 λεπτά στην επιτάχυνση xg. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του υπερκείμενου και το βήμα επαναλήφθηκε.
3. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου, προστέθηκαν 100 ml διαλύματος διαλυτοποίησης P1 για την ανάλυση του ιζήματος. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 10 ml διαλύματος λυσοζύμης συγκέντρωσης 40 mg/ml. Πραγματοποιήθηκε έντονη ανάδευση (vortex) για 20 δευτερόλεπτα και η καλλιέργεια υποβλήθηκε σε επίσημη επίσημη θέρμανση στους 37°C για 15 λεπτά, ώστε να δράσει το ένζυμο.
4. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 200 ml διαλύματος λύσης (αντίστοιχο με το P2, περιέχοντας 0,2 M NaOH και 1% SDS) με έντονη ανάδευση για 20 δευτερόλεπτα, ακολουθούμενη από την προσθήκη 50 ml φαινόλης.
5. Έπειτα, προστέθηκαν 200 ml διαλύματος εξουδετέρωσης (περιέχοντας 3M Na Acetate/ sodium με pH: 5,2), και η καλλιέργεια υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στην επιτάχυνση 12.000xg.
6. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε ένα νέο αποστειρωμένο δοχείο συλλογής, όπου προστέθηκε το διπλάσιο όγκος 100% αιθανόλης σε σχέση με τον όγκο του δείγματος. Αναμίχθηκαν και επώαστηκαν για 10 λεπτά στον πάγο, και έπειτα υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στην επιτάχυνση 12.000xg.
7. Μετά την απόρριψη του υπερκείμενου, προστέθηκαν 300 ml αιθανόλης συγκέντρωσης 75% και υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε πλήρη ταχύτητα. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε ξανά από το δείγμα.

2.14.3 Σταθερός μετασχηματισμός φυτών - Infiltration method

Παρά την ακόμη ύπαρξη ανεπιλύτων ερωτημάτων σχετικά με τη διαδικασία μεταφοράς του T-DNA από το *Agrobacterium tumefaciens* στο φυτό, το σύστημα αυτό παραμένει ένα ισχυρό εργαλείο στα χέρια των μοριακών γενετιστών. Όσον αφορά το *Arabidopsis thaliana*, η μεθοδολογία μετασχηματισμού του περιλαμβάνει την εμφύτευση ανώριμων ανθικών στελεχών σε καλλιέργεια του *Agrobacterium* που φέρει την υπό μελέτη "κατασκευή" (μέθοδος αγροεμπότισμού - *Agrobacterium* infiltration method). Σε αυτή την εργασία, πραγματοποιήθηκε εμφύτευση των *A. thaliana* χρησιμοποιώντας την κατασκευή pmosaicGUS.

Για την εκτέλεση του πρωτοκόλλου μετασχηματισμού:

1. Προηγήθηκε η ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους *Agrobacterium* σε 8 ml YEB με παρουσία αντιβιοτικού (kanamycin 40μg/ml). Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν 3 ml της καλλιέργειας σε 300 ml YEP και παραμείναν για 36 ώρες στους 28°C με ανάδευση στις 200rpm.
2. Έγινε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD600), η οποία έπρεπε να είχε φτάσει στην τιμή περίπου 1,2 προκειμένου να συνεχισθεί το πρωτόκολλο. Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκαν 300 ml από κάθε καλλιέργεια στις 4000rpm για 15 λεπτά.
3. Επανααιρέθηκε η καλλιέργεια σε 2-3 ml IM και εκ νέου μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα, ενώ πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις μέχρι να επιτευχθεί η επιθυμητή τιμή της OD600 = 0,5-0,9.

4. Στη συνέχεια, προστέθηκαν τα διαλύματα BAP (0,01 mg/ml) και Silwet L-77 (200 μl/l), και τα φυτά υποβλήθηκαν σε εμβάπτιση σε αυτά για περίπου ένα λεπτό.
5. Αφού επαναλήφθηκε το βήμα αυτό, τα φυτά τοποθετήθηκαν σε φορητό θερμοκήπιο για λιγότερο από 24 ώρες, προκειμένου να αυξηθεί η υγρασία και η απόδοση του μετασχηματισμού.

2.14.1 Χρώση GUS

Στη δημιουργία των παραπάνω “κατασκευών” πολύ σημαντικό ρόλο παίζουν τα γονίδια “αναφοράς” που χρησιμοποιούνται στην μοριακή γενετική. Σε μεταγραφική ή/και μεταφραστική σύντηξη με υποκινητές γονιδίων ή/και ενδογενή γονίδια αποτελούν ένα πανίσχυρο εργαλείο στη μελέτη της επαγωγής και έκφρασης γονιδίων, του τοπολογικού εντοπισμού των αντίστοιχων πρωτεϊνών και των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων *in planta*. Το **σύστημα αναφοράς GUS** (GUS : β-γλυκουρονιδάση) είναι δηλαδή ένα σύστημα γονιδίου αναφοράς, ιδιαίτερα χρήσιμο στη μοριακή βιολογία των φυτών και τη μικροβιολογία. Διάφορα είδη ανάλυσης γονιδίου αναφοράς GUS είναι διαθέσιμα, ανάλογα με το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται. Ο όρος **χρώση GUS** αναφέρεται στην πιο κοινή από αυτές, μια ιστοχημική τεχνική.

Ο σκοπός αυτής της τεχνικής είναι να αναλύσει τη δραστηριότητα ενός προαγωγέα μεταγραφής γονιδίου (από την άποψη της έκφρασης ενός λεγόμενου γονιδίου αναφοράς υπό τον ρυθμιστικό έλεγχο αυτού του υποκινητή) είτε με ποσοτικό τρόπο, που περιλαμβάνει κάποιο μέτρο δραστηριότητας, είτε ποιοτικά (on έναντι off) μέσω της απεικόνισης της δραστηριότητάς του σε διαφορετικά κύτταρα, ιστούς ή όργανα. Η τεχνική χρησιμοποιεί το uidA γονίδιο της *Escherichia coli*, το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο, β-γλυκουρονιδάση αυτό το ένζυμο, όταν επώάζεται με συγκεκριμένα άχρωμα ή μη φθορίζοντα υποστρώματα, μπορεί να τα μετατρέψει σε σταθερά έγχρωμα ή φθορίζοντα προϊόντα. Η παρουσία του χρώματος που προκαλείται από το GUS υποδεικνύει πού έχει εκφραστεί ενεργά το γονίδιο. Με αυτόν τον τρόπο, η ισχυρή δραστηριότητα προαγωγέα παράγει πολύ χρώση και η ασθενής δραστηριότητα προαγωγέα παράγει λιγότερη χρώση.

Το uidA γονίδιο μπορεί επίσης να συγχωνευθεί με ένα γονίδιο που μας ενδιαφέρει, δημιουργώντας μια γονιδιακή σύντηξη. Η εισαγωγή του γονιδίου uidA θα προκαλέσει παραγωγή GUS, η οποία μπορεί στη συνέχεια να ανιχνευθεί χρησιμοποιώντας διάφορα γλυκουρονίδια ως υποστρώματα.

Υπάρχουν διαφορετικά πιθανά γλυκουρονίδια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα για τη β-γλυκουρονιδάση, ανάλογα με τον τύπο της ανίχνευσης που απαιτείται (ιστοχημική, φασματοφωτομετρική, φθοριομετρική). Το πιο συνηθισμένο υπόστρωμα για τη χρώση ιστοχημικών GUS είναι το 5-βρωμο-4-γλωρο-3-ινδολλο γλυκουρονίδιο (X-Gluc). Το X-Gluc υδρολύεται με GUS στο προϊόν 5,5'-διβρωμο-4,4'-διγλωρο-λουλακί (diX-indigo). Το DiX-indigo θα εμφανιστεί μπλε και μπορεί να φανεί χρησιμοποιώντας μικροσκοπία φωτός. Αυτή η διαδικασία είναι ανάλογη με την υδρόλυση του X-gal από τη βήτα-γαλακτοσιδάση για την παραγωγή κυττάρων κυττάρων όπως συνηθίζεται να χρησιμοποιείται σε προσδιορισμούς γονιδίων βακτηριακών αναφορών.

Για άλλους τύπους ανίχνευσης, τα κοινά υποστρώματα είναι το π-νιτροφαινυλο β-D-γλυκουρονίδιο για τη φασματοφωτομετρική δοκιμασία και το 4-μεθυλομβελλομερυλο-β-D-γλυκουρονίδιο (MUG) για τη φθοριομετρική δοκιμασία.

Το σύστημα αναπτύχθηκε αρχικά από τον Richard Anthony Jefferson κατά τη διάρκεια του διδακτορικού του στο Πανεπιστήμιο του Κολοράντο στο Boulder. Προσάρμοσε την τεχνική για χρήση με φυτά καθώς εργαζόταν στο Ινστιτούτο Αναπαραγωγής Φυτών του Κέιμπριτζ, μεταξύ 1985 και

1987. Από τότε χιλιάδες εργαστήρια έχουν χρησιμοποιήσει το σύστημα, καθιστώντας το ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα εργαλεία στη μοριακή βιολογία των φυτών, όπως υπογραμμίζεται από χιλιάδες παραπομπές στην επιστημονική βιβλιογραφία.

Έτσι, η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την ποιοτική ανίχνευση της GUS πρωτεΐνης (ενζυμική διάσπαση υποστρώματος X-Gluc) η οποία οδηγεί στην ανάπτυξη μπλε χρώματος ήταν η εξής::

1. Ο ιστός ή τα όργανα του *Arabidopsis thaliana* που θα υποστούν τη χρώση GUS, ξεπλένονται μια φορά με 700 μl Rinse solution (RS) και ακολουθεί αναμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 10min.
2. Στη συνέχεια, προστίθεται διάλυμα χρώσης 700 μl (GSS) [GUS solution] μέχρι ο ιστός να καλυφθεί πλήρως.
3. Ακολουθεί διείδυση των ιστών με τη βοήθεια αντλίας κενού 1 φορά. Σε αυτό το στάδιο δίνεται ιδιαίτερη προσοχή έτσι ώστε ο ιστός/ το όργανο να είναι πλήρως εμβαπτισμένο μέσα στο διάλυμα GUS και να μην υπάρχουν φυσαλίδες αέρος γύρω από τον ιστό.
4. Επώαση στους 37°C για 1-2 ώρες (ανάλογα με τον ιστό) και την ενζυμική δραστηριότητα.
5. Αφαιρείται το διάλυμα χρώσης GUS και αφυδατώνεται ο ιστός με διάλυμα αιθανόλης 70% το οποίο ανανεώνεται συχνά. Ο ιστός με αυτόν τον τρόπο αποχρωματίζεται καθώς απομακρύνεται σταδιακά η γλωροφύλλη και η εμφάνιση του μπλε χρώματος γίνεται πιο έντονη. Μετά την αφυδάτωση με την αιθανόλη, οι ιστοί τοποθετούνται σε διάλυμα 30%-50% γλυκερόλης, όπου μπορούν να παραμείνουν για αρκετές ημέρες.

➤ **Διαλύματα χρώσης GUS και παρατήρησης**

● **Rinse Solution:**

- 50mM Na₂P₂O₇, pH 7,2
- 0,5mM K₃Fe(CN)₆
- 0,5mM K₄Fe(CN)₆

● **GSS (GUS staining solution)**

- 50mM Na₂P₂O₇, pH 7,2
- 0,5mM K₃Fe(CN)₆
- 0,5mM K₄Fe(CN)₆
- 1,5mM X-Gluc Duchefa X1405, MW= 521,8

● **Chloral Hydrate**

2.15 Εργαλεία βιοπληροφορικής ανάλυσης

Οι βιολογικές βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται παρακάτω:

- **Tair:** <https://www.arabidopsis.org/>
- **NCBI:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- **PMN:** <https://pmn.plantcyc.org/PLANT/organism-summary>
- **KEGG:** <https://www.genome.jp/kegg/>
- **AthaMap:** <http://www.athamap.de/description.php>
- **Agris:** <https://agris-knowledgebase.org/>
- **TRAVA:** <http://travadb.org/>
- **ePLANT:** <https://bar.utoronto.ca/eplant/>
- **PlantReactome:** <http://plantreactome.gramene.org/index.php?lang=en>
- **Arabidopsis RNA-seq Database:** <http://ipf.sustech.edu.cn/pub/athrdb/>

3.1.1 Περιγραφή βιολογικών βάσεων δεδομένων

3.1.1.1 AGRIS

Ο διακομιστής ρυθμιστικών πληροφοριών για το γονίδιο *Arabidopsis* (AGRIS) είναι ένας νέος πόρος πληροφοριών που παρέχει αλληλουχίες υποκινητή *Arabidopsis*, παράγοντες μεταγραφής και τα γονιδια-στόχους τους. Το AGRIS περιλαμβάνει δύο βάσεις δεδομένων. Η πρώτη βάση δεδομένων, με την ονομασία AtcisDB, περιλαμβάνει 25.516 αναγνωρισμένες περιοχές γονιδίων *Arabidopsis* (βασισμένες στην έκδοση TAIR9), οι οποίες περιέχουν πειραματικά επικυρωμένα και προβλεπόμενα ρυθμιστικά στοιχεία cis. Η δεύτερη βάση δεδομένων, AtTFDB, παρέχει πληροφορίες για 1.773 παράγοντες μεταγραφής (TF). Οι παράγοντες μεταγραφής ομαδοποιούνται σε 50 οικογένειες με βάση τις διατηρημένες περιοχές. Τέλος, το AtRegNet περιλαμβάνει 1.638.778 άμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ παραγόντων μεταγραφής και γονιδίων-στόχων. Υπάρχει επίσης ένα εργαλείο οπτικοποίησης, το οποίο βρίσκεται υπό ανάπτυξη, για το AtRegNet.

Το AtcisDB παρέχει μια ολοκληρωμένη πηγή για την επιστημονική κοινότητα που εργάζεται με γονιδιακές ρυθμιστικές πληροφορίες του *Arabidopsis thaliana*. Το AtcisDB αποτελείται από μια σχεσιακή βάση δεδομένων με δυνατότητα αναζήτησης, η οποία περιλαμβάνει πολλούς διαφορετικούς τύπους δεδομένων, όπως πληροφορίες τοποθεσίας δέσμευσης παράγοντα μεταγραφής, ακολουθία προαγωγέα και σχετικούς σχολιασμούς. Τα δεδομένα μπορούν να προβληθούν χρησιμοποιώντας το Generic Genome Browser. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αναζήτηση με Gene Symbol ή Locus ID. Το σύμβολο γονιδίου μπορεί να είναι οποιοδήποτε σύμβολο που χρησιμοποιείται από το TAIR για σχολιασμό γονιδίων (π.χ. NAC, CAF, MYB κ.λπ.). Το Locus ID είναι επίσης το αναγνωριστικό που χρησιμοποιείται από το TAIR (π.χ. At1g01010, At1g01050 κ.λπ.). Τα αποτελέσματα αναζήτησης περιλαμβάνουν το Locus ID, το μοντέλο γονιδίου που αντιπροσωπεύει αυτόν τον τόπο και διασταυρούμενη αναφορά για σχολιασμό γονιδίου από τα MIPS, TIGR, TAIR και SALK. Ο σχολιασμός του ρυθμιστικού στοιχείου cis για κάθε γονίδιο μπορεί επίσης να ληφθεί.

Οι θέσεις είναι σε κάποιες περιπτώσεις χρωματικά κωδικοποιημένες με δύο χρώματα: κόκκινο και γκρι. Το κόκκινο χρώμα υποδεικνύει πειραματικά επικυρωμένο cis-ρυθμιστικό στοιχείο που υπάρχει σε έναν συγκεκριμένο προαγωγέα. Το γκρι χρώμα υποδηλώνει προβλεπόμενα μοτίβα. Οι συχνότητες για λέξεις μήκους 5 - 15 στα μη κωδικοποιητικά τμήματα του γονιδιώματος *Arabidopsis* είναι διαθέσιμες για λήψη και αναζήτηση.

3.1.1.1 AThaMap

Το AthaMap παρέχει έναν χάρτη σε όλο το γονιδίωμα δυνητικού παράγοντα μεταγραφής και μικρών θέσεων δέσμευσης RNA (TFBS) στο *Arabidopsis thaliana*. Τα δεδομένα στο AthaMap βασίζονται σε δημοσιευμένες εξειδικεύσεις δέσμευσης παράγοντα μεταγραφής (TF) που είναι διαθέσιμες ως μήτρες ευθυγράμμισης ή πειραματικά προσδιορισμένες μεμονωμένες θέσεις δέσμευσης. Πραγματοποιήθηκαν διαλογές με βάση τη μήτρα και το πρότυπο για τον εντοπισμό πιθανών θέσεων δέσμευσης μεταγραφικού παράγοντα στο γονιδίωμα του *Arabidopsis thaliana* (έκδοση TAIR 8). Η πλήρης λίστα των 211 παραγόντων μεταγραφής που περιλαμβάνονται στο AthaMap και οι αντίστοιχες αναφορές και τα αποτελέσματα διαλογής εμφανίζονται στη σελίδα Τεκμηρίωση.

Με τη χρήση της συνάρτησης Αναζήτησης, η αλληλουχία μιας συγκεκριμένης γονιδιωματικής θέσης ή γονιδίου μπορεί να εμφανιστεί σε ένα παράθυρο αλληλουχίας που περιλαμβάνει τις πιθανές θέσεις δέσμευσης του παράγοντα μεταγραφής. Μια συνάρτηση Colocalization επιτρέπει την αναζήτηση πιθανών συνδυαστικών στοιχείων που ορίζονται από το χρήστη. Ένα σύνολο προυπολογισμένων γνωστών συνδυαστικών στοιχείων έχει ήδη ενσωματωθεί στο AthaMap. Το εργαλείο ανάλυσης γονιδίων επιτρέπει

την αναγνώριση κοινών θέσεων δέσμευσης μεταγραφικού παράγοντα και μικρών θέσεων στόχων RNA σε ένα σύνολο γονιδίων που υποβάλλονται από τον χρήστη.

Το εργαλείο Gene Identification επιτρέπει την αναζήτηση γονιδίων που φιλοξενούν συγκεκριμένες θέσεις δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων. Όλα τα γονίδια που στοχεύουν τα smallRNA και miRNA αναγνωρίζονται στο AthaMap όταν χρησιμοποιούνται τα εργαλεία web Colocalization, Gene-Analysis και Gene Identification. Υποθετικά μικρά στοχευόμενα γονίδια RNA εμφανίζονται με πλάγιους χαρακτήρες, υποθετικά τα γονίδια που ρυθμίζονται με miRNA εμφανίζονται με έντονους χαρακτήρες. Η λειτουργία MicroRNA Targets επιτρέπει τον προσδιορισμό των γονιδίων-στόχων για τα miRNAs. 190 αλληλουχίες διαλογής που αντιστοιχούν στα 243 γονίδια miRNA και τον αριθμό των γονιδιωματικών επιτυχιών βρίσκονται στη σελίδα Τεκμηρίωση. Η συνάρτηση Small RNA Targets επιτρέπει την αναγνώριση μικρών στόχων RNA από διαφορετικές μικρές βιβλιοθήκες RNA που δίνονται στη σελίδα Documentation.

3.1.1.2 Tair

Το Arabidopsis Information Resource (TAIR) διατηρεί μια βάση δεδομένων γενετικής και μοριακής βιολογίας για το μοντέλο ανώτερου φυτού *Arabidopsis thaliana*. Τα δεδομένα που διατίθενται από το TAIR περιλαμβάνουν την πλήρη αλληλουχία γονιδιώματος μαζί με τη γονιδιακή δομή, πληροφορίες γονιδιακού προϊόντος, γονιδιακή έκφραση, αποθέματα DNA και σπόρων, χάρτες γονιδιώματος, γενετικούς και φυσικούς δείκτες, δημοσιεύσεις και πληροφορίες για την ερευνητική κοινότητα του *Arabidopsis*. Τα δεδομένα λειτουργίας γονιδιακού προϊόντος ενημερώνονται κάθε εβδομάδα από την πιο πρόσφατη δημοσιευμένη ερευνητική βιβλιογραφία και υποβολές κοινοτικών δεδομένων. Το TAIR παρέχει επίσης εκτενείς συνδέσμους από τις σελίδες δεδομένων μας σε άλλους πόρους *Arabidopsis*.

3.1.1.3 KEGG

Η βάση δεδομένων KEGG έχει αναπτυχθεί με σκοπό την αποκάλυψη λειτουργιών σε κυτταρικό επίπεδο από σύνολα δεδομένων μοριακού επιπέδου μεγάλης κλίμακας, ειδικά σετ γονιδίων στα πλήρη γονιδιώματα. Οι τρεις βάσεις δεδομένων, PATHWAY, BRITE και MODULE, περιέχουν πειραματικές γνώσεις τέτοιων λειτουργιών υψηλού επιπέδου που συλλαμβάνονται από τη δημοσιευμένη βιβλιογραφία και εκπροσωπούνται από την άποψη των χαρτών KEGG, των ιεραρχιών BRITE και των ενοτήτων KEGG, αντίστοιχα. Ο χάρτης διαδρομής KEGG είναι ένα χειροκίνητο γραφικό διάγραμμα που δείχνει μεταβολικά, σηματοδοτικά και άλλα μοριακά δίκτυα αλληλεπίδρασης/αντίδρασης. Η BRITE ιεραρχία είναι ένα σύστημα ταξινόμησης για διάφορα βιολογικά αντικείμενα, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων και των πρωτεϊνών. Η μονάδα KEGG είναι μια χειροκίνητα καθορισμένη λειτουργική μονάδα στα μεταβολικά δίκτυα, και όχι μόνο, που αντιπροσωπεύονται από τη λογική έκφραση για αυτόματη αξιολόγηση της παρουσίας ή της απουσίας της. Μεταξύ των τριών, η βάση δεδομένων PATHWAY χρησιμοποιείται ευρύτερα ως βάση γνώσης αναφοράς για τη βιολογική ερμηνεία των συνόλων δεδομένων χρηστών μέσω χαρτογράφησης μονοπατιών KEGG, ενός τύπου ανάλυσης εμπλουτισμού σετ γονιδίων (Kanehisa and Sato, 2020; c).

3.1.1.4 TRAVA

Το TraVA είναι μια βάση δεδομένων με προφίλ γονιδιακής έκφρασης στα αναπτυξιακά στάδια, όργανα και μέρη του *Arabidopsis thaliana* που βασίζονται σε ανάλυση RNA-seq. Στη βάση αυτή παρουσιάζονται

τα προφίλ 25706 γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (τα μοντέλα γονιδίων είναι σύμφωνα με την απελευθέρωση γονιδιώματος TAIR, 10) σε 79 δείγματα (η πλήρης λίστα δειγμάτων με τη λεπτομερή περιγραφή τους μπορείτε να βρείτε εδώ). Υπάρχουν δύο κύρια τμήματα ανάλυσης: 1) Τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης. 2) Η διαφορική έκφραση γονιδίου. Για οποιαδήποτε ανάλυση, το αναγνωστικό πλαίσιο γονιδίου θα πρέπει να εισαχθεί στο παράθυρο "Εισαγωγή αναγνωριστικού γονιδίου". Αποδεκτά αναγνωριστικά είναι τα αναγνωριστικά TAIR (ATXGXXXXX) ή τα ονόματα γονιδίων. Στην τελευταία περίπτωση, χρησιμοποιήστε μόνο συντομευμένα ονόματα (για παράδειγμα, LFY αλλά όχι LEAFY, SAP αλλά όχι STERILE APETALA). Εάν το γονίδιο είναι γνωστό με διαφορετικά ονόματα, μόνο το όνομα γονιδίου TAIR, όχι ψευδώνυμο, είναι αποδεκτό (για παράδειγμα, AGL8 για το AGAMOUS-LIKE8, γνωστό και ως FRUITFULL, αλλά και το AGAMOUS-LIKE10).

3.1.1.5 ePLANT

Το ePlant βοηθά τους βιολόγους να οπτικοποιήσουν τις φυσικές συνδέσεις μεταξύ αλληλουχιών DNA, φυσικές παραλλαγές (πολυμορφισμοί), μοριακές δομές, αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και μοτίβα έκφρασης γονιδίων συνδυάζοντας πολλά εργαλεία οπτικοποίησης δεδομένων με μια διεπαφή χρήστη με δυνατότητα μεγέθυνσης. Επίσης, συνδέεται με πολλές διαθέσιμες στο κοινό υπηρεσίες web για λήψη των πιο πρόσφατων δεδομένων γονιδιώματος, αλληλεπίδρασης και μεταγραφής για οποιονδήποτε αριθμό γονιδίων ή προϊόντων γονιδίων που μπορεί να σας ενδιαφέρουν. Τα δεδομένα εμφανίζονται με ένα σύνολο εργαλείων οπτικοποίησης που παρουσιάζονται με μια εννοιολογική ιεραρχία από μεγάλο σε μικρό. Οι σύνδεσμοι μεταξύ των διαφορετικών προβολών βοηθούν στην υπογράμμιση των συνδέσεων μεταξύ πολλαπλών επιπέδων ανάλυσης.

3.1.1.6 Arabidopsis RNA-seq Database

Η βάση δεδομένων Arabidopsis RNA-seq ενσωματώνει 20 068 διαθέσιμα στο κοινό δεδομένα βιβλιοθήκης Arabidopsis RNA-seq που έχουν κατατεθεί στο Gene Expression Omnibus, στο Sequence Read Archive, στο European Nucleotide Archive και στις βάσεις δεδομένων DNA Data Bank of Japan. Τα ακατέργαστα δεδομένα όλων των βιβλιοθηκών υποβλήθηκαν σε επανεπεξεργασία τους με μια τυποποιημένη διοχέτευση, χαρτογραφήθηκαν οι αναγνώσεις στο γονιδίωμα TAIR10 και υπολογίστηκε ένα κανονικοποιημένο επίπεδο έκφρασης σε FPKM (θραύσματα ανά κιλοβάση μεταγραφής ανά εκατομμύριο χαρτογραφημένες αναγνώσεις) σε κάθε βιβλιοθήκη και για τα 37 336 γονίδια που σχολιάστηκαν στο Araport11, και πραγματοποίησε ανάλυση συνέκφρασης χρησιμοποιώντας αυτά τα δεδομένα. Επίσης, ταξινομήσαμε όλες τις βιβλιοθήκες σε 1176, 1102, 12 και 176 ομάδες μεταλλαγμάτων, συνθήκες θεραπείας, ιστούς και στάδια ανάπτυξης, αντίστοιχα, και αναλύσαμε τα διαφορετικά εκφραζόμενα επίπεδα όλων των γονιδίων που δεν είναι διαφορετικά μεταλλαγμένα ή θεραπείες.

Το ARS είναι μια δωρεάν, προσβάσιμη στον ιστό και φιλική προς τον χρήστη βάση δεδομένων που υποστηρίζει ερωτήματα για αναγνωριστικά γονιδίων, αναγνωριστικά βιβλιοθήκης, αναγνωριστικά BioProject, λέξεις-κλειδιά ή συνδυασμό αυτών των τύπων ερωτημάτων για την εμφάνιση επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων σε επιλεγμένες βιβλιοθήκες στο μορφή ενός ή περισσότερων πινάκων και διαγραμμάτων. Επιπλέον, ένα ενσωματωμένο διαδικτυακό Integrative Genomics Viewer (IGV) (Robinson et al., 2017) υποστηρίζει την προβολή λεπτομερών ευθυγραμμίσεων ανάγνωσης κάθε βιβλιοθήκης και οι χρήστες μπορούν να αναζητήσουν και να επιλέξουν βιβλιοθήκες με λέξεις-κλειδιά. Τα αποτελέσματα αναζήτησης μπορούν εύκολα να κοινοποιηθούν με άλλους κάνοντας κλικ στο κουμπί «Κοινή χρήση» για να δημιουργήσετε έναν σύνδεσμο για την τρέχουσα σελίδα. Η καρτέλα «Πίνακας

δεδομένων» παρουσιάζει τις τιμές FPKM του SDC και στις 20 068 βιβλιοθήκες με τις πληροφορίες του ονόματος δείγματος, του έργου, του οικοτύπου, του γονότυπου, του ιστού, των συνολικών αναγνώσεων, του μοναδικά χαρτογραφημένου ρυθμού και της ημερομηνίας κυκλοφορίας. Η σελίδα "CoExpression" εμφανίζει άλλα γονίδια των οποίων τα μοτίβα έκφρασης σχετίζονται στενά με το ερωτώμενο γονίδιο. Η βάση δεδομένων μας μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τακτικούς χρήστες για την εύκολη εκτέλεση εξόρυξης δεδομένων μεγάλης κλίμακας.

3 Αποτελέσματα

3.1 Απομόνωση κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου FMN/FHY και κλωνοποίηση σε πλασμιδιακό φορέα pBluescript II SK(-)

Στόχος ήταν η σύνθεση μίας γονιδιακής κατασκευής η οποία να φανερώνει την ιστοειδική τοποθέτηση του ενζύμου FMN/FHY. Για να επιτευχθεί αυτό, αρχικά απομονώθηκε η κωδική αλληλουχία DNA του ενζύμου (mo) και πραγματοποιώντας αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) με μήτρα το γονίδιο και με τον ενδογενή υποκινητή του εισηγμένα σε πλασμίδιο. Για την PCR, χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές το ζεύγος *pmosaicFor* και *mosaicGUSrev*.

Έπειτα, τα δείγματα από τις αντιδράσεις PCR υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτώμα αγαρόζης που περιείχε 1%, υπό τάση 90-100 V, και το αποτέλεσμα οπτικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), ακολουθούμενο από έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Το αναμενόμενο μέγεθος των τμημάτων βάσεων στο ζεύγος ήταν 2560 bp. (Fragment 3).

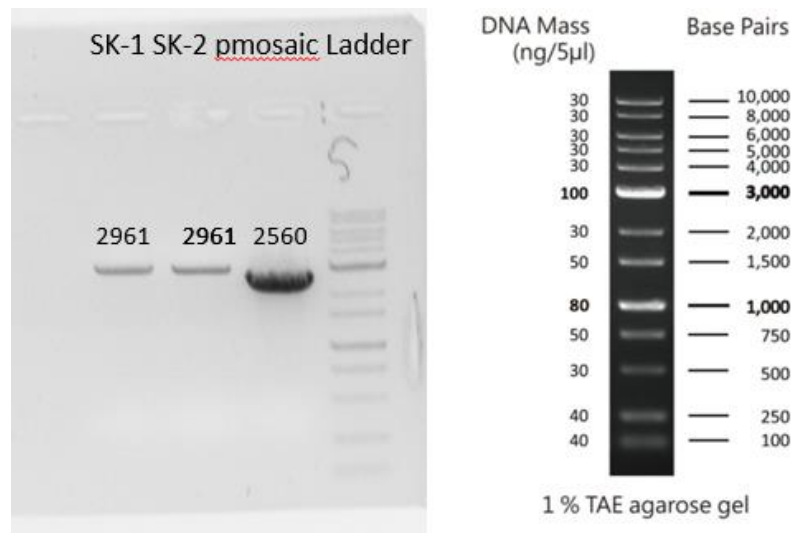


Figure 7 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων. Στο τρίτο πηγάδι (Fragment 3) βρίσκεται το αποτέλεσμα της PCR. Στο πρώτο και δεύτερο πηγάδι (Fragment 1 & 2) βρίσκεται το αποτέλεσμα της πέψης του pBluescript SK με το ένζυμο EcoRV, ενώ στο τέταρτο το Ladder.

Για τη σύνθεση της γονιδιακής κατασκευής επιλέχθηκε ο πλασμιδιακός φορέας *pBluescript SK (-)* ο οποίος στη συνέχεια υπέστη πέψη με το ένζυμο περιορισμού EcoRV που δημιουργεί τυφλά άκρα. Έπειτα, το δείγμα ηλεκτροφορήθηκε και λήφθηκε φωτογραφία σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).

3.2 Κλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript SK (-) και απομόνωση πλασμιδίων

Μετά από τη λήψη της κωδικής αλληλουχίας του επιθυμητού γονιδιακού τμήματος και του γραμμικού πλέον φορέα, πραγματοποιήθηκε λιγοποίηση των δύο δειγμάτων DNA με την αντίδραση της λιγάσης, με σκοπό την εισαγωγή του *pMosaic* στο πλασμίδιο. Το νέο κυκλικό μόριο που προέκυψε από τον ανασυνδυασμό, εισήχθη σε δεκτικά κύτταρα *E.coli* DH5A με μετασχηματισμό. Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA (pBluescriptSK(-)::Frag3) από τα κύτταρα αυτά πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο LB με αντιβιοτικό αμπικιλίνη και αφέθηκαν να αναπτύξουν αποικίες.

Από αυτές τις κυτταρικές καλλιέργειες, ελήφθησαν δείγματα κυττάρων και πραγματοποιήθηκε Colonies PCR για να επιβεβαιωθεί η επιτυχημένη εκτέλεση των μετασχηματισμών. Σαν αφετηρία χρησιμοποιήθηκαν οι αποικίες *E. coli*, οι οποίες είχαν αναπτυχθεί σε στερεό υπόστρωμα LB και περιείχαν το αντιβιοτικό αμπικιλίνη μετά τους μετασχηματισμούς. Οι αποικίες που βρέθηκαν ότι ήταν θετικές ως προς τα εξεταζόμενα ενθέματα αποθηκεύθηκαν σε γενικά σωληνάρια στους 4°C, διατηρώντας την παρουσία του αντιβιοτικού αμπικιλίνη (Amp 100).

Σημειώνεται πως γονιδιακή κατασκευή θα πρέπει να έχει αντίθετη κατεύθυνση από εκείνη της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου της αμπικιλίνης του *pBluescript SK*-. Επομένως, είναι σημαντικό να επιβεβαιωθεί ότι η αλληλουχία του FMN/FHY έχει εισαχθεί με τον επιθυμητό προσανατολισμό.

Μελετώντας τις αλληλουχίες τόσο του πλασμιδίου *pBluescript SK*- όσο και της ένθεσης *pMosaic*, εντοπίστηκαν τα σημεία όπου τα παραπάνω ένζυμα δύναται να δημιουργούν εγκοπή. Κάνοντας πέψη, η γονιδιακή κατασκευή κόβεται σε κομμάτια με τα μεγέθη που αναφέρονται στον Πίνακα.. τα οποία και επιβεβαιώνονται από τα μεγέθη που φαίνονται στην εικόνα ..

Για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της ενσωμάτωσης των ενθεμάτων στον πλασμιδιακό φορέα pBluescriptSK(-) με τα φληνακωτά άκρα (blunt ends), πραγματοποιήθηκε ανάλυση περιορισμού. Αυτό σημαίνει ότι πραγματοποιήθηκαν πειράματα πεψης χρησιμοποιώντας ενζύμα που εκτελούν τον κοπή κοντά στα άκρα των ενθεμάτων, καθώς και ενζύμα που εκτελούν τον κοπή μέσα στα ενθέματα. Στη συνέχεια, υπολογίστηκαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα σε ζεύγη βάσεων μετά την ηλεκτροφόρηση, για κάθε ένθεμα και για τις δύο περιπτώσεις. Όσον αφορά το γονίδιο, το οποίο υποκινείται από ένα υποκινητή, κοπήκε με ένζυμα περιορισμού (EcoRI, SmaI) που αναγνώριζαν θέσεις κοπής κοντά στα άκρα του. Έτσι, τα αναμενόμενα αποτελέσματα σε ζεύγη βάσεων με φορά 3'-5' για το EcoRI ήταν 5521 bp, αφού αυτό το ένζυμο δεν κόβει μέσα στον υποκινητή (δηλαδή το ένθεμα). Για το SmaI, τα αναμενόμενα αποτελέσματα ήταν δύο ζεύγη βάσεων, 984 bp και 2943 bp. Αντίστοιχα, για τα ένζυμα περιορισμού XhoI τα αναμενόμενα μεγέθη με την ίδια κατεύθυνση που επιβεβαιώθηκαν είναι 645 bp και 4876 bp, ενώ για την XbaI είναι 674 bp και 4847 bp.

Table 6 Αναμενόμενα μεγέθη DNA που προκύπτουν μετά από πέψη του πλασμιδίου pBluescript SK και pmosaic με τα ένζυμα περιορισμού XhoI, XbaI, EcoRI και SmaI.

Περιοριστική ενδονουκλεάση	Αντίθετη κατεύθυνση ένθεσης τμήμα 1	Αντίθετη κατεύθυνση ένθεσης τμήμα 2
XhoI	645 bp	4876 bp
XbaI	674 bp	4847 bp
EcoRI	-	5521 bp
SmaI	984 bp	2943 bp

Πέψη του SK- pMosaic με XhoI, XbaI, EcoRI και SmaI. ←

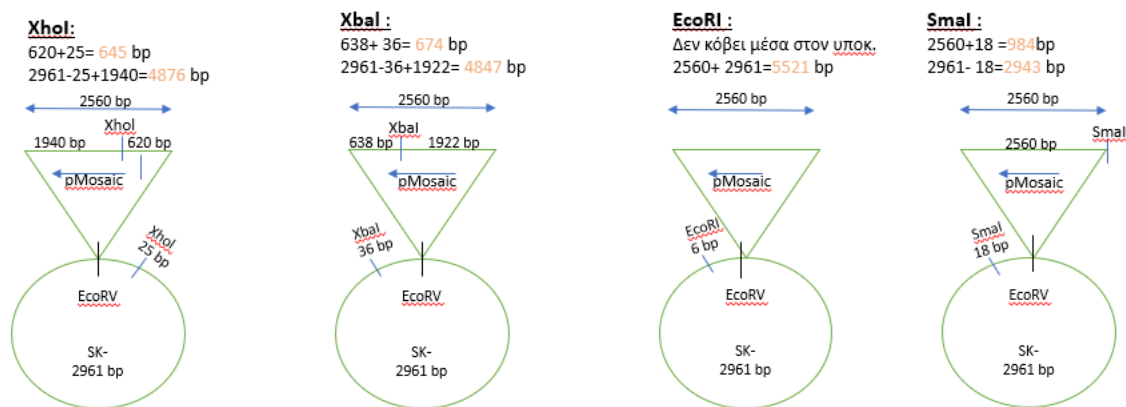


Figure 8 Σχηματική αναπαράσταση ένθεσης της αλληλουχίας pmosaic με κατεύθυνση αντίθετη της κωδικής αλληλουχίας του φορέα SK-.

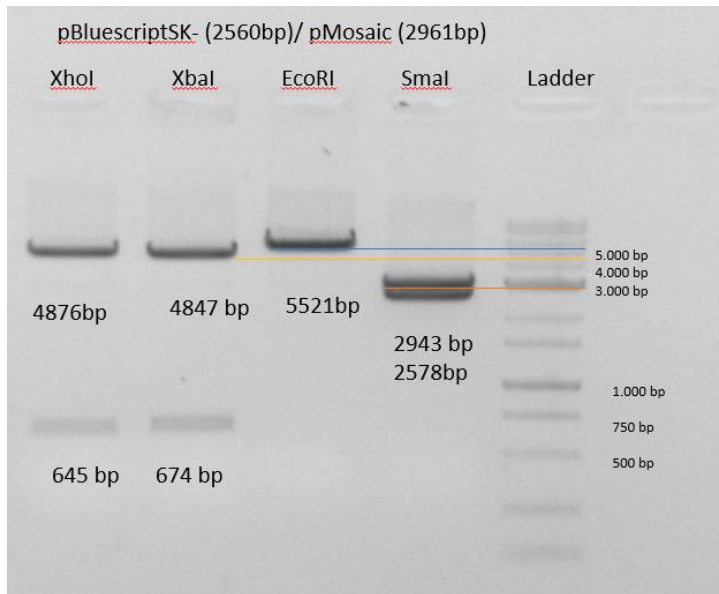


Figure 9 Πέψη του pBluescript II SK(-):p $mosaic$ με τα ένζυμα περιορισμού *XhoI*, *XbaI*, *EcoRI* και *SmaI*. Στο τελευταίο πηγάδι φαίνεται ο Ladder

3.3 Καθαρισμός ενθεμάτων και φορέων έκφρασης

Ακολούθησε η πέψη του κάθε απομονωμένου πλασμιδίου με περιοριστικό ένζυμο με σκοπό την απομόνωση και τον καθαρισμό των ενθεμάτων. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για την πέψη των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων επιλέχθηκε έτσι ώστε να αναγνωρίζει μοναδικές θέσεις περιορισμού εκτός από το πλαίσιο ανάγνωσης του εκάστοτε ενθέματος. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν οι πέψεις του πλασμιδίου pBluescript II SK(-) με το ένζυμο *SmaI*.

Το προϊόν κάθε πέψης υποβλήθηκε σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, υπό τάση 60-80 V, και το αποτέλεσμα οπτικοποιήθηκε με τη χρήση του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός των ενθεμάτων από το πήκτωμα, χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο NucleoSpinR Gel and PCR Clean-up.

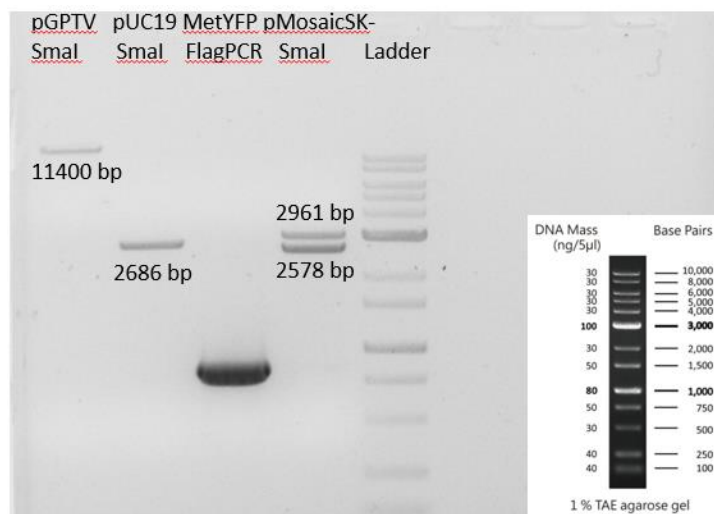


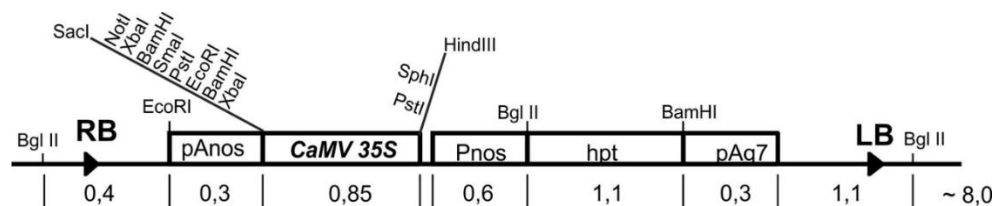
Figure 10 Τα προϊόντα της πέψης με *SmaI*. Στο πρώτο πηγάδι φαίνεται ο φορέας pGPTV, στο δεύτερο ο φορέας pUC19 και στο τέταρτο η κατασκευή pBluescriptII SK(-):p $mosaic$

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς έκφρασης τα πλασμίδια pGPTV και pUC19 (addgene). Αρχικά, οι συγκεκριμένοι φορείς χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό των χημειοδεκτικών βακτηριακών στελεχών *E. Coli*. Υπολογίστηκε ότι τα χημειοδεκτικά κύτταρα εμφανίζουν μια αποδοτικότητα μετασχηματισμού περίπου 107-108 cfu/μg πλασμιδιακού DNA. Ο μετασχηματισμός των στελεχών *E. coli* OmniMax με αυτούς τους φορείς πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ηλεκτροπόρωσης.

Μετά την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό LB-Amp100, τα πλασμίδια απομονώθηκαν βάσει του πρωτοκόλλου NucleoSpinR Plasmid DNA Purification της Macherey-Nagel. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8%, υπό τάση 90-100 V, και το αποτέλεσμα οπτικοποιήθηκε με τη χρήση EtBr και υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πέψεις και Gel Extraction, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, για τους φορείς στους οποίους θα κλωνοποιούνταν τα ενθέματα, διασφαλίζοντας ότι ο κάθε φορέας είχε συμπληρωματικά άκρα με το αντίστοιχο ένθεμα. Ο καθαρισμός των πλασμιδίων μετά την πέψη με το κάθε περιοριστικό ένζυμο πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο NucleoSpinR Gel and PCR Clean-up της Macherey-Nagel.

Η επιτυχία της διαδικασίας επιβεβαιώθηκε με την ηλεκτροφόρηση των κομμένων, γραμμικών πλασμιδιακών φορέων σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8%, υπό τάση 90-100 V, και την οπτικοποίησή τους με χρήση του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και υπεριώδους ακτινοβολίας (UV)..



3.4 Μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* με ανασυνδυασμένα πλασμίδια

Το κάθε ένθεμα, ενσωματώθηκε στον κατάλληλα κομμένο πλασμιδιακό φορέα με αντίδραση λιγάσης. Τα άκρα που προέκυψαν από τις πέψεις τόσο των γονιδίων όσο και του φορέα επέτρεψαν τη δράση του μορίου T4 DNA Ligase και την κατάλυση της δημιουργίας φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της 5' φωσφορικής ομάδας και του παρακείμενου 3' υδροξυλίου στα κομμένα σημεία, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Η αντίδραση έγινε για 18-20 h στους 16 °C μεταξύ του εκάστοτε τμήματος *pmosaic* (SmaI) με τους φορείς pGPTV και pUC19.

3.5 Colony PCR

Για τον έλεγχο της επιτυχίας του μετασχηματισμού των χημειοδεκτικών κυττάρων *E. coli* OmniMax με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια, χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) (Mullis et al., 1986, Mullis & Faloona, 1987). Για κάθε ένθεμα, ελέγχθηκαν μονές αποικίες μετασχηματισμένων κυττάρων μέσω της αντίδρασης Colony PCR, χρησιμοποιώντας το ενζύμο TaqPol II (Invitrogen), κατάλληλους εκκινητές (primers) και συγκεκριμένες συνθήκες. Τα προϊόντα των αντιδράσεων Colony PCR υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8%, υπό τάση 90-100 V, και τα αποτελέσματα οπτικοποιήθηκαν με τη χρήση του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκε φύτεμα των φυτών *Arabidopsis thaliana*

COL-0 σε χόμα, ώστε να είναι στο κατάλληλο στάδιο για τον σταθερό μετασχηματισμό, μετά τον μετασχηματισμό των αγροβακτηρίων.

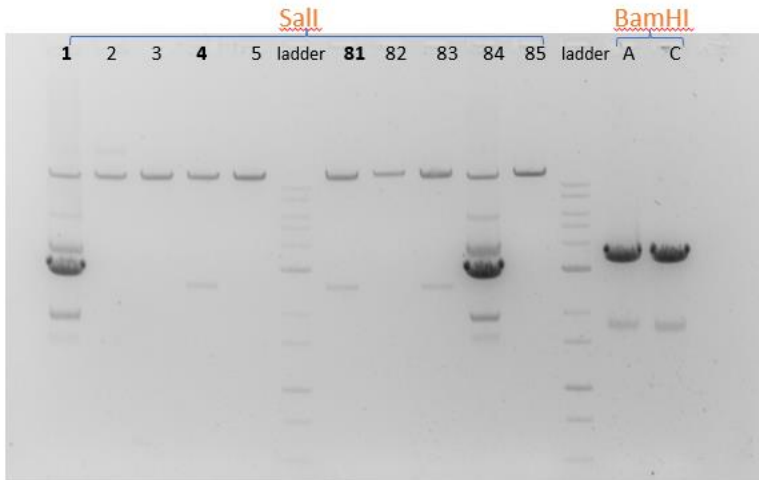
Οι αποικίες 1, 4 και 17, που παρουσίασαν θετικά αποτελέσματα στην αντίδραση PCR, υποβλήθηκαν σε καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό LB με την προσθήκη του αντιβιοτικού καναμικίνης, στους 37 °C για 16 ώρες με συνεχή ανακίνηση στα 180-200 rpm. Η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων από τα βακτηριακά κύτταρα *E. coli* πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης, και τα αποτελέσματα επαληθεύτηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Το μέγεθος των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων ήταν ακριβώς όπως αναμενόταν..



Figure 12 Αποτέλεσμα σε πήκτωμα αγαρόζης Colony PCR. Οι μπάντες είναι οι αναμενόμενες και επιλέχθηκαν οι κλώνοι 1, 4 και 17.

Μετά τα θετικά αποτελέσματα της Colony PCR, ακολούθησε η ίδια διαδικασία όπως κατά τον μετασχηματισμό του πλασμιδίου pBluescriptII SK-. Για να επιβεβαιωθεί η απομόνωση του επιθυμητού πλασμιδίου από τα βακτηριακά κύτταρα *E. coli*, πραγματοποιήθηκαν ξανά δοκιμαστικές πέψεις με περιοριστικά ένζυμα με παρόμοιο τρόπο για κάθε ένα από τα εισαχθέντα τμήματα, προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα εσφαλμένου θετικού αποτελέσματος. Τα ένζυμα επιλέχθηκαν έτσι ώστε να παράγουν μοναδικά πρότυπα ζωνών κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, ανάλογα με το γονίδιο.

Μετά την ηλεκτροφόρηση και την οπτικοποίηση των δειγμάτων, όσον αφορά τις δοκιμαστικές πέψεις που πραγματοποιήθηκαν με ένζυμα, οι αναμενόμενες ζώνες στο πήκτωμα αγαρόζης θα αντιστοιχούσαν στο μέγεθος των ενθεμάτων αυτών. Για παράδειγμα, στην περίπτωση του πλασμιδίου pGPTV-HPT, το ένζυμο BamHI δεν κόβει μέσα στον υποκινητή. Μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο HindIII, τα μεγέθη που προκύπτουν είναι 1351 bp, 102 bp και 12773 bp αντίστοιχα. Μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο XbaI, τα μεγέθη που προκύπτουν είναι 1980 bp και 14530 bp. Τέλος, μετά την πέψη με το ένζυμο Sall, τα μεγέθη είναι 2558 bp και 13953 bp.



Αυτή χρειάζεται?

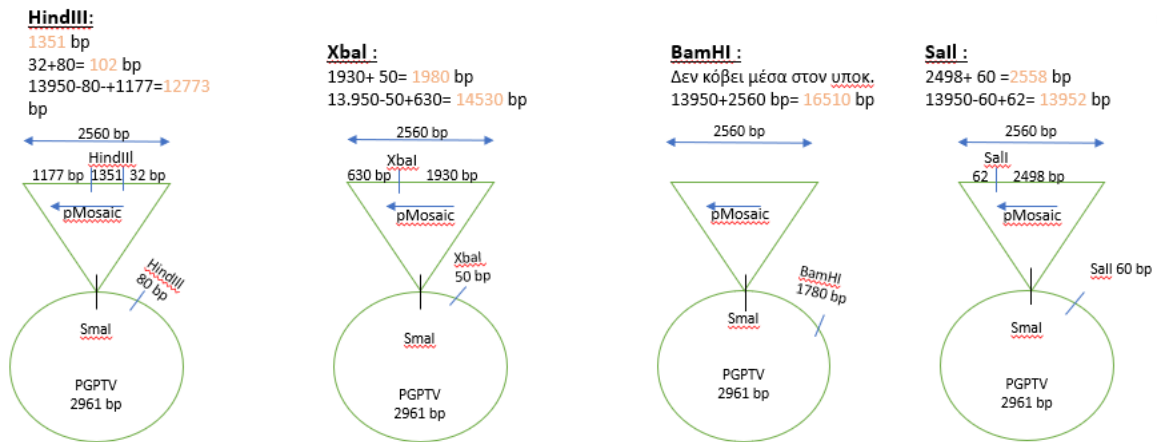


Figure 13 Πέψη του pGPTV-pmosaic με HindIII, XbaI, BamHI και Sall. Στο σχήμα φαίνονται τα μεγέθη με του ενθέματος με φορά 3'-5'.

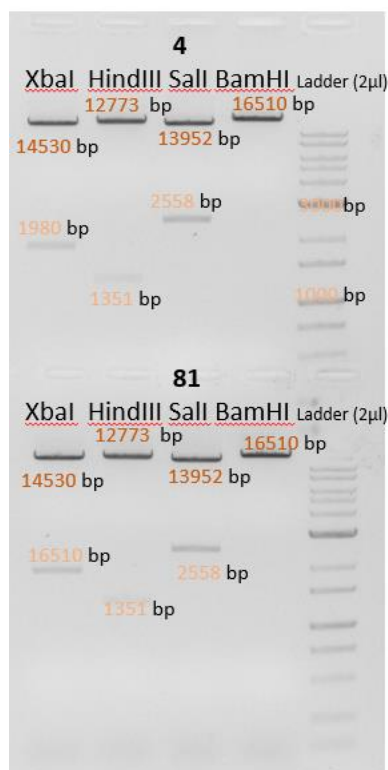


Figure 14 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων πέψεις κλώνων 4 (πάνω) και 81 (κάτω) που επιβεβαιώνει τη φορά ένθεσης για τον κλώνο 4 έως 3'-5' ενώ για τον κλώνο 81 5'-3'.

3.6 Μετασηματισμός Αγροβακτηρίων (*Agrobacterium tumefaciens*) και Σταθερός Μετασηματισμός φυτών (*Arabidopsis thaliana*)

Ακολούθησε η διαδικασία της απομόνωσης και του καθαρισμού των μετασηματισμένων πλασμιδίων από το πήκτωμα αγαρόζης μέσω της μεθόδου Gel Extraction, βάσει του πρωτοκόλλου Nucleospin Gel and PCR clean-up από την εταιρία Macherey-Nagel. Αυτό το βήμα ήταν απαραίτητο για τον μετέπειτα μετασηματισμό των αγροβακτηριακών στελεχών της *Agrobacterium tumefaciens* (competent cells).

Έπειτα από την επιτυχία της κατασκευής όλων των πλασμιδίων που ελέγχθηκε μέσω Colony PCR και περιοριστικών πεψεων, ακολούθησε ο μετασηματισμός των αγροβακτηριακών στελεχών. Αυτός ο μετασηματισμός πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο που περιγράφηκε προηγουμένως.

Μετά τον μετασηματισμό των αγροβακτηρίων, ακολούθησε η δεύτερη φάση του μετασηματισμού, κατά την οποία τα πλασμίδια που περιείχαν τα ενθέματα μετασηματίστηκαν εκ νέου σε βακτήρια *E. coli*, διαδικασία που ονομάζεται Back Transformation. Αυτό το βήμα είχε ως στόχο την επαλήθευση της επιτυχίας και της σωστής έκβασης του μετασηματισμού των πλασμιδίων.

Για την επαλήθευση της διαδικασίας του μετασηματισμού των αγροβακτηρίων, πραγματοποιήθηκαν πέψεις με τη χρήση ενζύμων που παρήγαγαν μοναδικά πρότυπα ζωνών για κάθε ένθεμα. Επιπλέον, όσον αφορά την επαλήθευση του μετασηματισμού των πλασμιδίων, πραγματοποιήθηκαν πέψεις με την χρήση ενζύμων, και τα αποτελέσματα ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση και οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων με EtBr και UV.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο σταθερός μετασηματισμός των φυτών *Arabidopsis thaliana*. Για τον έλεγχο της επιτυχίας του μετασηματισμού, χρησιμοποιήθηκαν πέψεις με αντίστοιχα μοναδικά πρότυπα

ζωνών για κάθε ένθεμα. Οι φυτογενετικές αλλαγές ελέγχθηκαν με τη χρήση του χρώματος GUS, και η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε μετά από τον καθαρισμό των σπερμάτων με αιθανόλη, χλωρίνη και αποστείρωση του νερού, με αυστηρές υγιεινές συνθήκες.

3.7 Παρατήρηση με χρώση GUS

Μετά από περίπου μία εβδομάδα, τα νεαρά φυτά απομονώθηκαν από το θρεπτικό υπόστρωμα, προκειμένου να ακολουθηθεί η διαδικασία του χρώσης με GUS. Μετά από μια ημέρα επώασης, τα νεαρά φυτά ήταν έτοιμα για μελέτη με στερεοσκόπιο και οπτικό μικροσκόπιο.

Αρχικά, μελετήθηκαν τα διάφορα μέρη του φυτού κατά τη διάρκεια του αναπτυξιακού σταδίου της τορπίλης και του ώριμου εμβρύου. Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, κατά τη διάρκεια αυτών των σταδίων, ολοκληρώνεται η διαμόρφωση του εμβρύου, με τη δημιουργία του υποκοτυλίου, του μεριστώματος της ρίζας και της κεντρικής καλύπτρας. Οι κοτυληδόνες αποτελούν τα αποθησαυριστικά όργανα των θρεπτικών συστατικών σε πολλά είδη φυτών. Κατά τη διάρκεια της φάσης αύξησης των κοτυληδόνων, αυτές συνθέτουν και αποθηκεύουν πρωτεΐνες, άμυλο και λιπίδια που θα χρησιμοποιηθούν στη φάση της βλάστησης των σπόρων, ιδίως κατά τη διάρκεια της ετεροτρόφου αύξησης. Το πρότυπο χρώσης ανιχνεύτηκε σε πολλά μέρη του φυτού, όπως στο αγωγό ιστού από τα υδατόδια και το αγωγό σύστημα των κοτυληδόνων, καθώς και στα νεαρά φύλλα. Η έντονη χρώση του αγωγού συστήματος της ρίζας καταγράφηκε, ιδίως στο άκραιο μερίσμα της, καθώς και στις άκρες των νεαρών φύλλων..

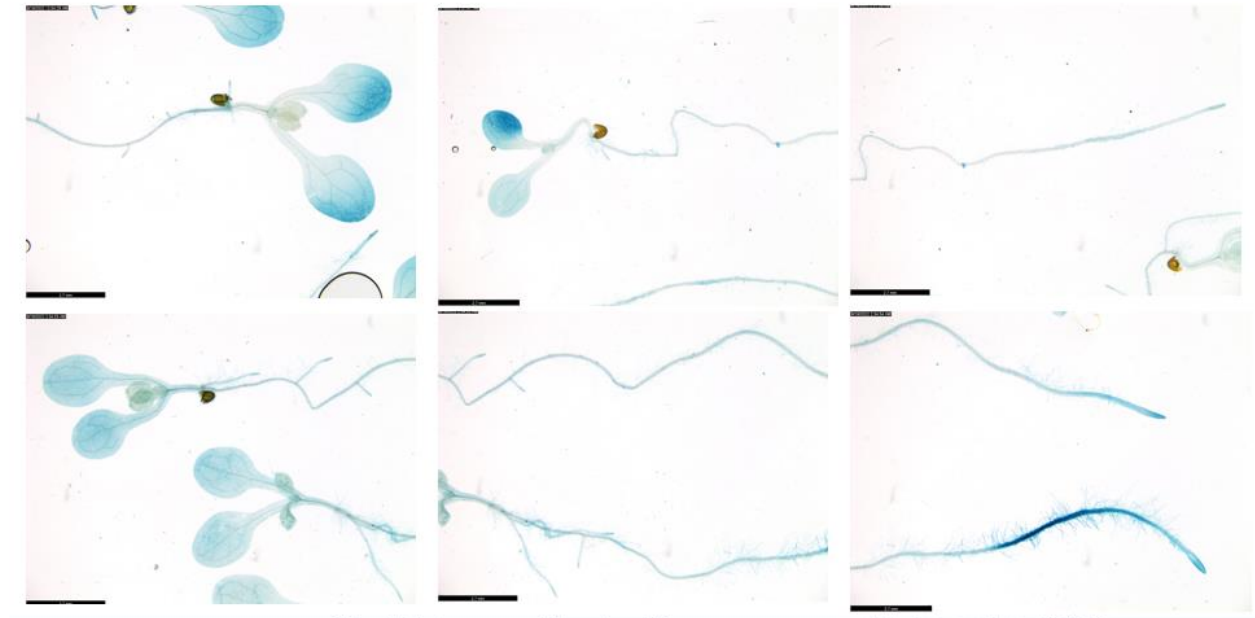


Figure 15 Αποτελέσματα χρώσης GUS. *Arabidopsis thaliana* seedlings mosaic F1-GUS. Παρατηρείται χρώση τόσο στα νεαρά φύλλα, όσο και στο ακρορίζιο, με ένταση και στις δύο περιπτώσεις στα άκρα.



Figure 16 Γηραιά φύλλα μεταλλάγματος mosaic F2 γενιάς

3.8 Αναζήτηση σε βιολογικές βάσεις δεδομένων

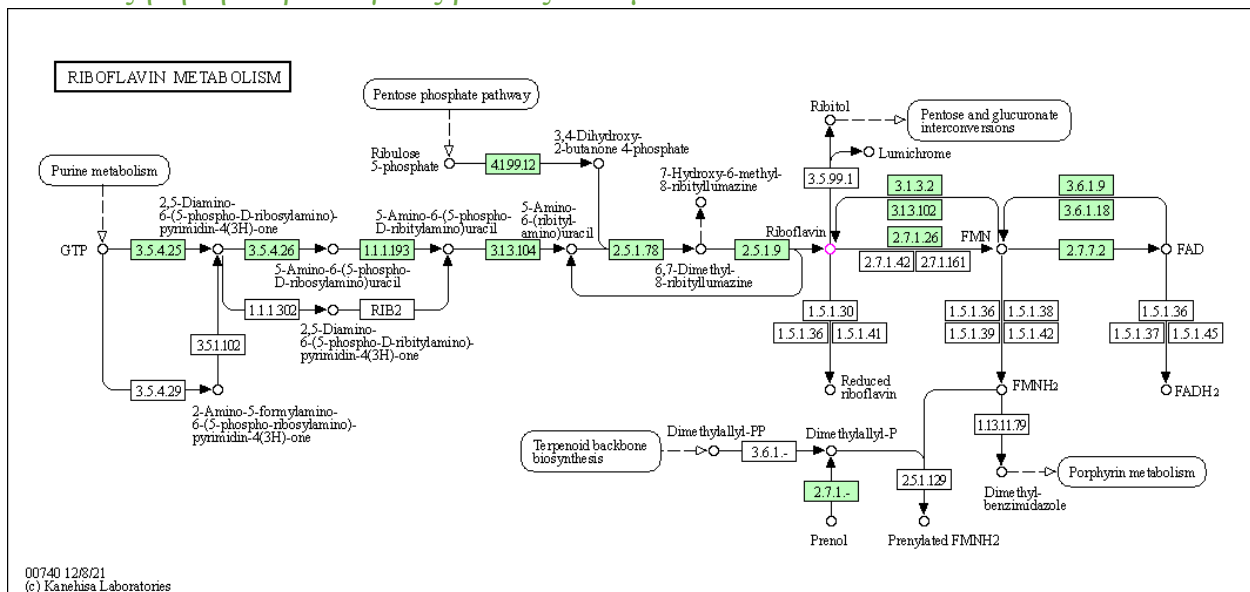


Figure 17 Διαγραμματική απεικόνιση μεταβολισμού της ριβοφλαβίνης από το Βιολογικό Εργαλείο KEGG.

Η βιοσύνθεση της ριβοφλαβίνης τροφοδοτείται από δύο κλάδους και αποτελείται από ένα μόριο GTP και δύο μόρια 5-φωσφορικής ριβουλόζης. Το πρώτο δεσμευμένο βήμα στην οδό καταλύεται από την GTP κυκλοδρόλαση II, η οποία είναι ένα διλειτουργικό ένζυμο που εκφράζει επίσης δραστικότητα συνθάσης 4-φωσφορικής 3,4-διυδροξυ-2-βουτανόνης. Επομένως, το ένζυμο καταλύει τα πρώτα βήματα και στους δύο κλάδους, δηλαδή τον σχηματισμό της πυριμιδίνης και του υδατάνθρακα από GTP και 5-φωσφορική ριβουλόζη, αντίστοιχα (Kobayashi et al., 1995) (Hertz et al., 2000).

Η απαμίνωση του προϊόντος αντίδρασης 5'-φωσφορική 2,5-διαμινο-6-ριβοσυλαμινο-4(3H)-πυριμιδινόνη για σχηματισμό 5'-φωσφορικής 5-αμινο-6-ριβοσυλλαμινο-2,4(1H,3H)-πυριμιδινοδιόνης πραγματοποιείται από τη διαμινοϋδροξυφωσφοριβοσυλαμινοπυριμιδίνη απαμινάση, η οποία δράση έχει αποδειχθεί στο *Arabidopsis thaliana* (Fischer et al., 2004). Ο περαιτέρω μεταβολισμός προς την 5-αμινο-6-ριβιτυλαμινο-2,4(1H,3H)-πυριμιδινοδιόνη λαμβάνει χώρα από τη διαδοχική δράση μιας αναγωγάσης και μιας φωσφατάσης που και οι δύο δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί στο *Arabidopsis*. Η συμπύκνωση αυτού του παραγώγου πυριμιδίνης με 3,4-διυδροξυ-2-βουτανον-4-φωσφορικό (από τον κλάδο 5-φωσφορικής ριβουλόζης) για να δώσει 6,7-διμεθυλ-8-ριβιτυλλουμαζίνη πραγματοποιείται από 6,7-διμεθυλ- Συνθάση 8-ribityllumazine (DMRL), ένα ένζυμο με σύνθετη δομή 60 πανομοιότυπων υπομονάδων 16,5 kDa (Persson et al., 1999).

Η ακόλουθη μετατροπή της 6,7-διμεθυλ-8-ριβιτυλουμαζίνης για να σχηματίσει ριβοφλαβίνη καταλύεται από τη συνθάση της ριβοφλαβίνης. Το παραπροϊόν 5-αμινο-6-ριβιτυλαμινο-2,4(1H,3H)-πυριμιδινοδιόνης μετάλλαξης ανακυκλώνεται και τροφοδοτείται πίσω στη βιοσυνθετική οδό ριβοφλαβίνης (Fischer et al., 2005).

Πέρα από το πεδίο της βιοσύνθεσης της ριβοφλαβίνης, ο σχηματισμός των φλαβοενζύμων FMN και FAD καταλύεται από δύο φωσφοτρανσφεράσες, δηλαδή, κινάση ριβοφλαβίνης και αδενυλυλοτρανσφεράση FMN, αντίστοιχα. Το προηγούμενο ένζυμο έχει ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί στο *Arabidopsis* που στην πραγματικότητα καταδεικνύει τη διλειτουργική φύση του ενζύμου ως συνθάση ριβοφλαβίνης/υδρολάση FMN (Sandoval et al., 2005).

PMN *PlantCyc* Pathway: flavin biosynthesis I (bacteria and plants)

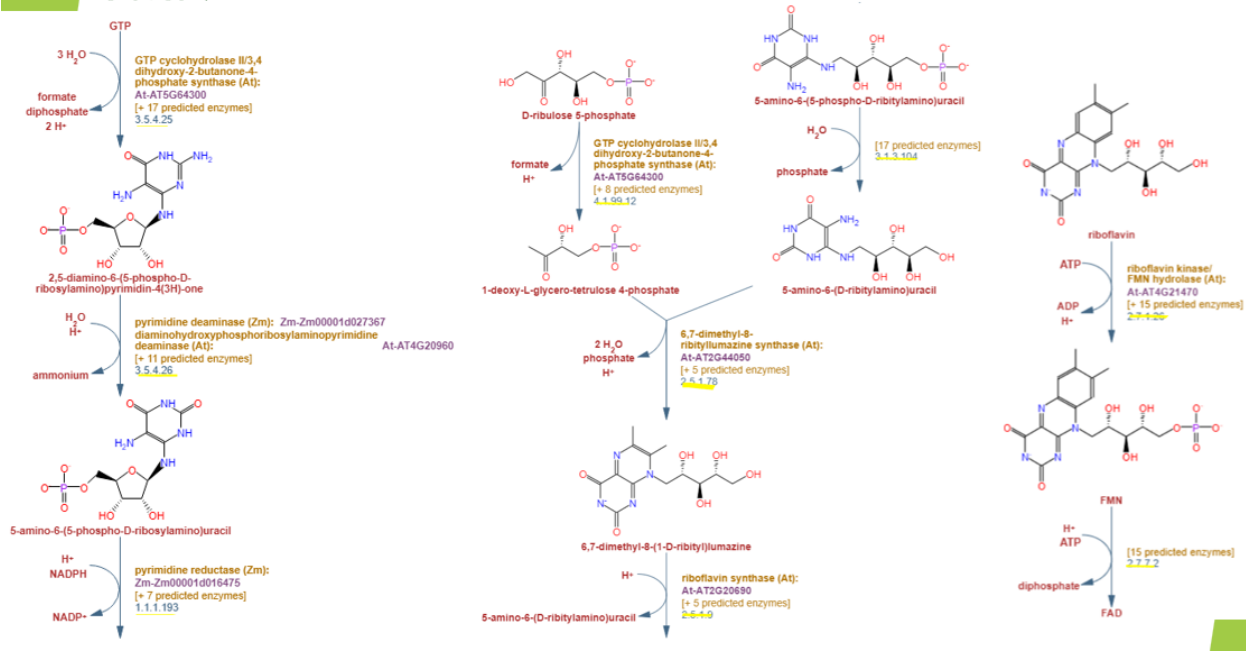


Figure 18 Μονοπάτι βιοσύνθεσης της ριβοφλαβίνης όπως παρουσιάζεται από τη βάση δεδομένων PMN. Πηγή: PMN.

Η FAD συνθετάση απαιτεί Mg²⁺ και είναι εξαιρετικά ειδικό για το ATP ως δότη φωσφορικών (Brizio et al., 2006). Οι συμπράγοντες FMN και FAD συμμετέχουν σε πολυάριθμες διεργασίες σε όλους τους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της μιτοχονδριακής μεταφοράς ηλεκτρονίων, της φωτοσύνθεσης, της οξειδωσης των λιπαρών οξέων και του μεταβολισμού της βιταμίνης B6, της βιταμίνης B12 και των φολικών (Sandoval et al., 2005). Ενώ η μονολειτουργική συνθετάση FAD βρίσκεται σε ευκαρυώτες και σε ορισμένους προκαρυώτες, τα περισσότερα προκαρυωτικά έχουν ένα διλειτουργικό ένζυμο που εμφανίζει τόσο αυτή τη δράση όσο και αυτή της EC 2.7.1.26, κινάση ριβοφλαβίνης (Sandoval et al., 2005 Brizio et al., 2006)

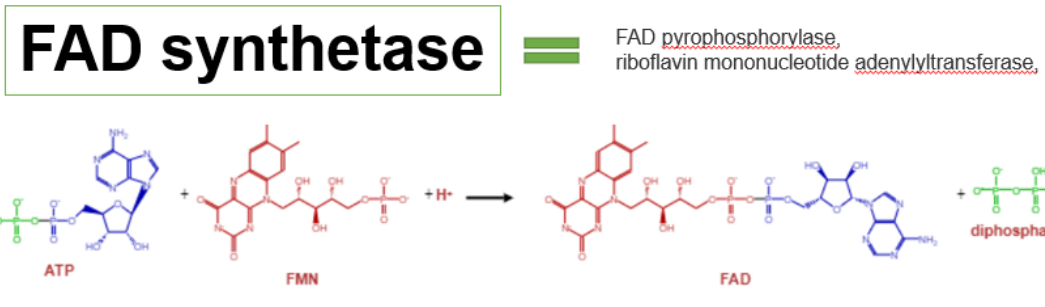


Figure 19 Η FAD συνθετάση καταλύει την αντίδραση του FMN σε FAD

3.8.1 Γονίδια εμπλεκόμενα στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης της ριβοφλαβίνης

Προκειμένου να αναλυθεί η έκφραση και κατά επέκταση ο ρόλος του γονιδίου ενδιαφέροντος, αρχικά έγινε μια αναζήτηση σε βιολογικές βάσεις δεδομένων ώστε να συγκεντρωθούν όλα τα γονίδια που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση της ριβοφλαβίνης. Αυτά παρουσιάζονται στο πίνακα της εικόνας 20. Στη πρώτη στήλη αναγράφεται ο μοναδικός κωδικός της βάσης για το αντίστοιχο γονίδιο αλλά και τα συσχετιζόμενα με αυτό γονίδια. Έτσι βρέθηκε το γονίδιο με κωδικό AT5G64300 που κωδικοποιεί τη διλειτουργική GTP κυκλοϋδρολάση Π/3,4-διυδροξυ-2-βουτανόνη 4-φωσφορική συνθάση ταυτοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε στο *Arabidopsis thaliana* (Kobayashi, 1995). Το ένζυμο καταλύει τα αρχικά στάδια και των δύο κλάδων της συγκλίνουσας οδού βιοσύνθεσης ριβοφλαβίνης, δηλαδή τον σχηματισμό της πυριμιδίνης και του υδατάνθρακα από GTP και 5-φωσφορική ριβουλόζη, αντίστοιχα. Οι μοριακές λειτουργίες έχουν αποδειχθεί με λειτουργική συμπλήρωση μεταλλαγμένων στελεχών *E.coli* ελαττωματικών και στα δύο γονίδια για αυτές τις ενζυμικές λειτουργίες και με την ανασυνδυασμένη έκφραση και χαρακτηρισμό του γονιδίου *Arabidopsis* στο *E. coli*. Επίσης σημαντικό, το γονίδιο με κωδικό AT4G20960. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την απαμινάση της διαμινο-ϋδροξυ-φωσφοριβουλοσουλαιμινοπυριμιδίνης που καταλύει την απαμίνωση της 5'-φωσφορικής 2,5-διαμινο-6-ριβουλοσουλαιμινο-4(3H)-πυριμιδινόνης για να σχηματίσει την 5-αμινο-6-ριβουλοσουλαιμινο-2,4(1H,3H)-πυριμιδίνη. Το 5'-φωσφορικό έχει ταυτοποιηθεί στο *Arabidopsis thaliana* (Fischer, 2004).

Το γονίδιο PHS1, AT3G47390, φαίνεται να περιέχει μια περιοχή που σχετίζεται με τη μετατροπή της ριβοφλαβίνης. Παρόλο που η ακριβής λειτουργία της πρωτεΐνης αυτής δεν έχει ακόμη διαλευκανθεί, έρευνες που εξετάζουν το φωτοευαίσθητο μεταλλάγμα *phs1*, καθώς και τη θνησιμότητα που συνδέεται με την απώλεια της δραστηριότητας της διαμινοϋδροξυφωσφοριβουλοσουλαιμινοπυριμιδίνης, υποδεικνύουν ότι η PHS1 πιθανόν ενεργεί ως αναγωγάση πυριμιδίνης που συμμετέχει στην παραγωγή της ριβοφλαβίνης και της FAD. Η μετάλλαξη *phs1* προκαλεί μειωμένη ανάπτυξη, ανωμαλίες στην ανάπτυξη των χλωροπλαστών, μειωμένα επίπεδα χλωροφύλλης, αυξημένο οξειδωτικό στρες, μειωμένες αναλογίες NADPH/NADP+, μειωμένη μεταφορά ηλεκτρονικών στο φωτοσύστημα I και μειωμένα επίπεδα φωτοσυνθετικής πρωτεΐνης υπό υψηλό φωτισμό. Πολλές από αυτές τις ανωμαλίες φαίνεται ότι οφείλονται στη μείωση των επιπέδων FAD στη μετάλλαξη *phs1* (Ouyang, 2010). Επίσης, η μετάλλαξη *phs1* παράγει φυσιολογικά επίπεδα του μεταγράφου PHS1, αλλά παράγει μια ανωμαλή πρωτεΐνη. Βάσει της επιβίωσης της μετάλλαξης *phs1*, φαίνεται ότι η ανωμαλή πρωτεΐνη μπορεί να έχει κάποια υπολειμματική δραστηριότητα (Ouyang, 2010).

Αντίστοιχα, το γονίδιο που κωδικοποιεί τη διλειτουργική κινάση ριβοφλαβίνης/υδρολάση FMN, γνωστό ως AT2G44050, έχει ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί στο *Arabidopsis thaliana*. Έρευνες έχουν επιβεβαιώσει τόσο την κινάση της ριβοφλαβίνης για τον σχηματισμό FMN όσο και την αντίστροφη λειτουργία της υδρόλυσης FMN για την απόκτηση ριβοφλαβίνης (υδρολάση FMN) με την έκφραση και τον χαρακτηρισμό του ενζύμου στο *E. coli*. Οι λειτουργίες αυτές μπορούν να διαχωριστούν φυσικά, με μικρές αλλαγές στις ιδιότητές τους.

SYMBOL	GENES	PREDICTED GENES
3.5.4.25	AT5G64300 =RIBA1	GTP cyclohydrolase II (At): AT5G59750 , Cre14.g620350 , Cre09.g393900 , Glyma.08G132700 , Glyma.08G177300 , Glyma.08G070400 , Glyma.15G055700 , Glyma.15G041600 , Glyma.13G332633 , Glyma.13G332567 , Glyma.05G175500 , Os08g0481950 , Os02g0572400 , Os05g0460600 , Zm00001d050844 , Zm00001d010535 , Zm00001d031254
3.5.4.26	AT4G20960 = PYRD	Cre17.g702400 , Cre12.g555951 , Cre12.g542202 , Glyma.07G071800 , Glyma.03G010700 , Os03g0288500 , Os04g0177400 , Os03g0117200 , pyrimidine deaminase: Zm00001d027367, Zm00001d016595, Zm00001d027369
1.1.1.193	AT3G47390	Cre06.g286850 , Cre17.g728950 , Glyma.09G249800 , Glyma.18G242600 , Os02g0473000 , Zm00001d016475
3.1.3.104	AT3G10970 , AT4G11570	Cre09.g396500 , Cre13.g563200 , Cre03.g193300 , Glyma.10G248900 , Glyma.08G014400 , Glyma.11G235500 , Glyma.05G207700 , Glyma.18G021400 , Os11g0300400 , Os04g0557000 , Os09g0569100 , Os02g0302500 , Os05g0168300 , Zm00001d005329 , Zm00001d026148
4.1.99.12	AT5G64300	Same as 3.5.4.25
2.5.1.78	AT2G44050	Cre02.g088850 , Glyma.08G087500 , Os04g0497400 , Zm00001d002034 , Zm00001d026476
2.5.1.9	AT2G20690	Cre06.g296600 , Glyma.12G112900 , Os12g0541000 , Zm00001d023836 , Zm00001d023863
2.7.1.26	AT4G21470	Cre06.g311600 , Cre03.g206550 , Cre01.g025250 , Cre01.g025100 , Glyma.12G210300 , Glyma.08G058800 , Glyma.07G190300 , Glyma.13G291000 , Glyma.06G174200 , Glyma.03G230900 , Os10g0209300 , Os01g0757900 , Os10g0464400 , Zm00001d012707
2.7.7.2	AT5G08340 , AT5G23330 , AT5G03430	Cre13.g607600 , Cre13.g592500 , Glyma.20G102800 , Glyma.10G286400 , Glyma.03G184200 , Glyma.19G184800 , Os03g0801700 , Os01g0259600 , Zm00001d040308 , Zm00001d034493 , Zm00001d008320 , Zm00001d040380

SYMBOL	GENES	The gene	The enzyme
3.5.4.25	AT5G64300	encoding the bifunctional GTP cyclohydrolase II	catalyzes the initial steps of both branches of the convergent riboflavin biosynthesis pathway
3.5.4.26	AT4G20960	encoding diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine deaminase	pyrimidine deaminase , catalyzes the deamination of 2,5-diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinone 5'-phosphate to form 5-amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione 5'-phosphate
1.1.1.193	AT3G47390	One of the two functions encoded by bacterial multifunctional protein ribD	pyrimidine reductase
3.1.3.104	AT3G10970 , AT4G11570		5-amino-6-(5-phospho-D-ribitylamino)uracil phosphatase
4.1.99.12	AT5G64300	encoding the bifunctional GTP cyclohydrolase II/3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase	catalyzes the initial steps of both branches of the convergent riboflavin biosynthesis pathway
2.5.1.78	AT2G44050	cDNA encoding 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine (DMRL) synthase	catalyzing the condensation of 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate (DHBP) with 5-amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione
2.5.1.9	AT2G20690	riboflavin synthase	catalyzing the formation of riboflavin from 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine
2.7.1.26	AT4G21470	FMN/FHY; riboflavin kinase; FMN adenyltransferase	<u>riboflavin + ATP → ADP + FMN + H⁺</u>
2.7.7.2	AT5G08340 , AT5G23330 , AT5G03430	FAD synthetase	

Figure 20 Στο παραπάνω πίνακα φαίνονται όλα τα γονίδια που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση της ριβοφλαβίνης σύμφωνα με τις καταχωρήσεις στο NCBI. Πάνω .

3.8.2 Οντολογία γονιδίων ενδιαφέροντος (GO annotations)

Η ιδέα του Gene Ontology ξεκίνησε από μια ομάδα βιολογικών επιστημών με διαφορετικά υπόβαθρα και ενδιαφέροντα, το 1998, όμως πλέον υπάρχει μια τεράστια γκάμα από βάσεις δεδομένων που μπορούν να αποτελέσουν εύστοχα συστήματα βιοπληροφορικών συνδέσεων. Οι σχολιασμοί γονιδιακής οντολογίας (GO) παρέχουν μια εναλλακτική μέθοδο για σχολιασμό και ομαδοποίηση γονιδίων (Ashburner et al., 2000; Schulze-Kremer, 1997), περιέχοντας σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τα γονίδια, τις λειτουργίες τους και τις σχέσεις μεταξύ τους με ένα δομημένο τρόπο με σκοπό να αποσαφηνιστούν βιολογικά ερωτήματα,

έχοντας ως βάση να συσχετίσει εννοιολογικά, διάφορα επιμέρους βιολογικά στοιχεία, χρησιμοποιώντας κωδικοποιημένο λεξιλόγιο.

Οι οντολογίες λοιπόν είναι ένα δομημένο ειδικό λεξιλόγιο με ιεραρχία έτσι ώστε τα γονίδια που ανήκουν σε χαμηλότερο επίπεδο του λεξιλογίου να ανήκουν επίσης και σε υψηλότερα επίπεδα. Για παράδειγμα, γονίδια που επισημαίνονται με χαμηλότερο επίπεδο μιτοχονδρίων cristae (GO: 0030061), επισημαίνονται επίσης με το υψηλότερο επίπεδο όρου GO μιτοχόνδριο (GO: 0005739). Τα γονίδια μπορούν επίσης να ανήκουν σε πολλές ομάδες στο ίδιο επίπεδο. Έτσι, μια διαφοροποιημένη λίστα γονιδίων μπορεί να υπερεκπροσωπείται στατιστικά σε μια κατηγορία GO, όπως η ER. Τρεις είναι οι κατηγορίες- όροι (terms) GO, οι οποίες περιλαμβάνουν τη βιολογική διαδικασία (Biological Process, BP), την μοριακή λειτουργία (Molecular Function, MF) και την υποκυτταρική τοποθεσία (CC). Αυτοί οι τρεις περιγράφουν τις διάφορες λειτουργίες που έχουν τα γονίδια (gene function), ενώ τα annotations που είναι αντιστοιχίες υποσημειώσεις. Στην πιο πρόσφατη έκδοση του GO, του 2019 έχουν καταχωρηθεί 44.945 GO terms, 6.408.283 GO annotations και αυτά αφορούν 1.155.213 γονιδιακά προϊόντα 4.467 ειδών. Μερικά από τα πιο διαδεδομένα εργαλεία για την οντολογία γονιδίων είναι τα: Panther, EasyGO, PlantRegMap, GORILLA, AmiGo, DAVID, ενώ υπάρχουν πολλά ακόμη ώστε να διαλέξει κανείς για την έρευνά του.

Μετά από αναζήτηση στο Plant Reactome με λέξεις κλειδιά: «riboflavin, FMN and FAD biosynthesis» βρέθηκε η καταχώρηση pathway101257 για το μονοπάτι βιοσύνθεσης της ριβοφλαβίνης με όλα τα έως τώρα γνωστά συσχετιζόμενα γονίδια.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως το συμβάν αυτό έχει συναχθεί υπολογιστικά από ένα γεγονός που έχει αποδειχθεί σε άλλο είδος. Το συμπέρασμα δηλαδή στη βάση δεδομένων βασίζεται στις αντιστοιχίσεις ομολογίας από το Ensembl Compara. Εν συντομία, οι αντιδράσεις για τις οποίες όλες οι εμπλεκόμενες Φυσικές Οντότητες (σε είσοδο, έξοδο και καταλύτη) έχουν χαρτογραφημένο ορθόλογο/παράλογο (για σύμπλοκα τουλάχιστον το 1% των συστατικών πρέπει να έχουν χαρτογράφηση) συνάγονται με τα άλλα είδη.

Flavin biosynthesis

R-ATH-1119379	Stable Identifier
Pathway	Type
Arabidopsis thaliana	Species
cytosol (https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0005829)	Compartment
riboflavin, FMN and FAD biosynthesis, pathway101257	Synonyms

Locations in the PathwayBrowser

Collapse All

- Metabolism and regulation (Arabidopsis thaliana)
 - Cofactor biosyntheses (Arabidopsis thaliana)
 - Flavin biosynthesis (Arabidopsis thaliana) (/PathwayBrowser/#/R-ATH-1119379)

Summation

This event has been computationally inferred from an event that has been demonstrated in another species.

The inference is based on the homology mappings from Ensembl Compara. Briefly, reactions for which all involved PhysicalEntities (in input, output and catalyst) have a mapped orthologue/paralogue (for complexes at least 1% of components must have a mapping) are inferred to the other species. High level events are also inferred for these events to allow for easier navigation.

More details and caveats of the event inference in Reactome. (/electronic_inference_compara.html)

Participants

Events

- GTP cyclohydrolase II (Arabidopsis thaliana) ([../detail/R-ATH-1120402](/detail/R-ATH-1120402))
- diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine deaminase (Arabidopsis thaliana) ([../detail/R-ATH-1120864](/detail/R-ATH-1120864))
- 5-amino-6-(5-phosphoribosylamino)uracil reductase (Arabidopsis thaliana) ([../detail/R-ATH-1120673](/detail/R-ATH-1120673))
- riboflavin synthase (Arabidopsis thaliana) ([../detail/R-ATH-1120891](/detail/R-ATH-1120891))
- riboflavin kinase (Arabidopsis thaliana) ([../detail/R-ATH-1120748](/detail/R-ATH-1120748))
- FAD synthetase (Arabidopsis thaliana) ([../detail/R-ATH-1120908](/detail/R-ATH-1120908))

Figure 21 Αποτέλεσμα από αναζήτηση στη βάση δεδομένων REACTOME για το μονοπάτι της βιοσύνθεσης της ριβοφλαβίνης

Έτσι, φαίνεται πως το μονοπάτι της βιοσύνθεσης του FMN και FAD στο *Arabidopsis thaliana*, λαμβάνει χώρα κυρίως στο κυττόςολιο (Cytosol, GO:0005829) και τα γεγονότα στα οποία συμμετέχει συνοψίζονται στα εξής (εικόνα): GTP cyclohydrolase II, diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine deaminase, 5-amino-6-(5-phosphoribosylamino)uracil reductase, riboflavin synthase, riboflavin kinase, FAD synthetase. Από την άλλη πλευρά, η γενική κατηγορία στην οποία ταξινομείται αφορά τους συμπαράγοντες βιοσύνθεσης, ενώ αναφορικά με τη βιολογική διεργασία (GO BP) το συγκεκριμένο μονοπάτι αφορά τη βιοσυνθετική διεργασία του FAD και έχει υπολογιστεί από τη βιοσύνθεση της φάβινης στον οργανισμό *Oryza sativa*.

Μέσω του βιοπληροφορικού εργαλείου KEGG προέκυψαν για τα διάφορα γονίδια τα εξής σχετικά με την οντολογία γονιδίων (Gene Ontology), δηλαδή σχετικά με την βιολογική διεργασία (BP), υποκυτταρική τοποθέτηση (CC), και μοριακή λειτουργία (MF) :

- **RIBA1-AT5G64300**
 - BP [riboflavin biosynthetic process](#)
 - CC [chloroplast](#), [chloroplast stroma](#)
 - MF [GTP cyclohydrolase II activity](#)
- **PYRD-AT4G20960**
 - BP [riboflavin biosynthetic process](#)
 - CC [chloroplast](#), [chloroplast stroma](#)
 - MF [zinc ion binding](#)
- **HAD-AT3G10970**
 - BP [organelle organization](#), [response to light stimulus](#), [seed development](#)
 - CC [chloroplast](#)
- **COII-AT2G44050**
 - BP [riboflavin biosynthetic process](#)
 - CC [intracellular anatomical structure](#), [chloroplast](#), [chloroplast stroma](#)
 - MF [6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase activity](#), [identical protein binding](#), [protein binding](#)
- **AT2G20690**
 - BP [riboflavin biosynthetic process](#)
 - CC [chloroplast](#), [chloroplast stroma](#)
 - MF [riboflavin synthase activity](#)
- **FMN/FHY-AT4G21470**
 - BP [phosphorylation](#), [FMN biosynthetic process](#),
 - CC [chloroplast](#)
 - MF [FMN adenylyltransferase activity](#), [magnesium ion binding](#), [riboflavin kinase activity](#)

Επίσης, παρακάτω στην εικόνα 22, μπορούμε να διακρίνουμε τις προβλεπόμενες αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες. Αυτές φαίνεται να αντιστοιχούν σε γονίδια που αναλύθηκαν και παραπάνω. Πιο άμεσα φαίνεται να αλληλοεπιδρά με το προϊόν του γονιδίου AT5G23330 και AT1G79790. Σε δεύτερο χρόνο αλληλοεπιδρά με την COS1 και τη PAP17 αλλά και τη NUDX23. Ωστόσο, η δράση της δε περιορίζεται εκεί.

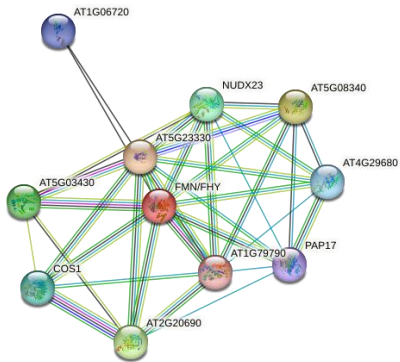


Figure 22 Αλληλεπίδραση του ενζύμου FMN-FHY με άλλες πρωτεΐνες, όπως παρουσιάζεται από τη βάση δεδομένων STRING.

3.8.3 Ιστοειδική και υποκυτταρική τοποθέτηση του FMN/FHY

3.8.3.1 Βάση δεδομένων TAIR

Από την αναζήτηση στη βάση δεδομένων TAIR, με μια πρώτη ματιά φαίνεται πως η έκφραση του γονιδίου φυσιολογικά ποικίλει, τόσο στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια όσο και στους διαφορετικούς ιστούς. Αρχικά, στην εικόνα 8 φαίνεται να εκφράζεται στο καρπόφυλλο, στους μίσχους, στα στόματα, στις κοτυληδόνες, στο λουλούδι, στα σέπαλα, στα καταφρακτικά κύτταρα, υποκοτύλιο, μερίστωμα, κορυφαίο μερίστωμα, τα πέταλα, το μίσχο, το φυτικό έμβρυο, τη ρίζα, το σπόρο, το ακρορίζιο και άλλα. Επίσης, φαίνεται πως η έκθεση του φυτού σε παθογόνα αυξάνει την έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου, πράγμα που είναι λογικό αν συλλογιστεί κανείς πως ο τύπος αυτός σχετίζεται στενά με την αντιμετώπιση εχθρών και το στρες.

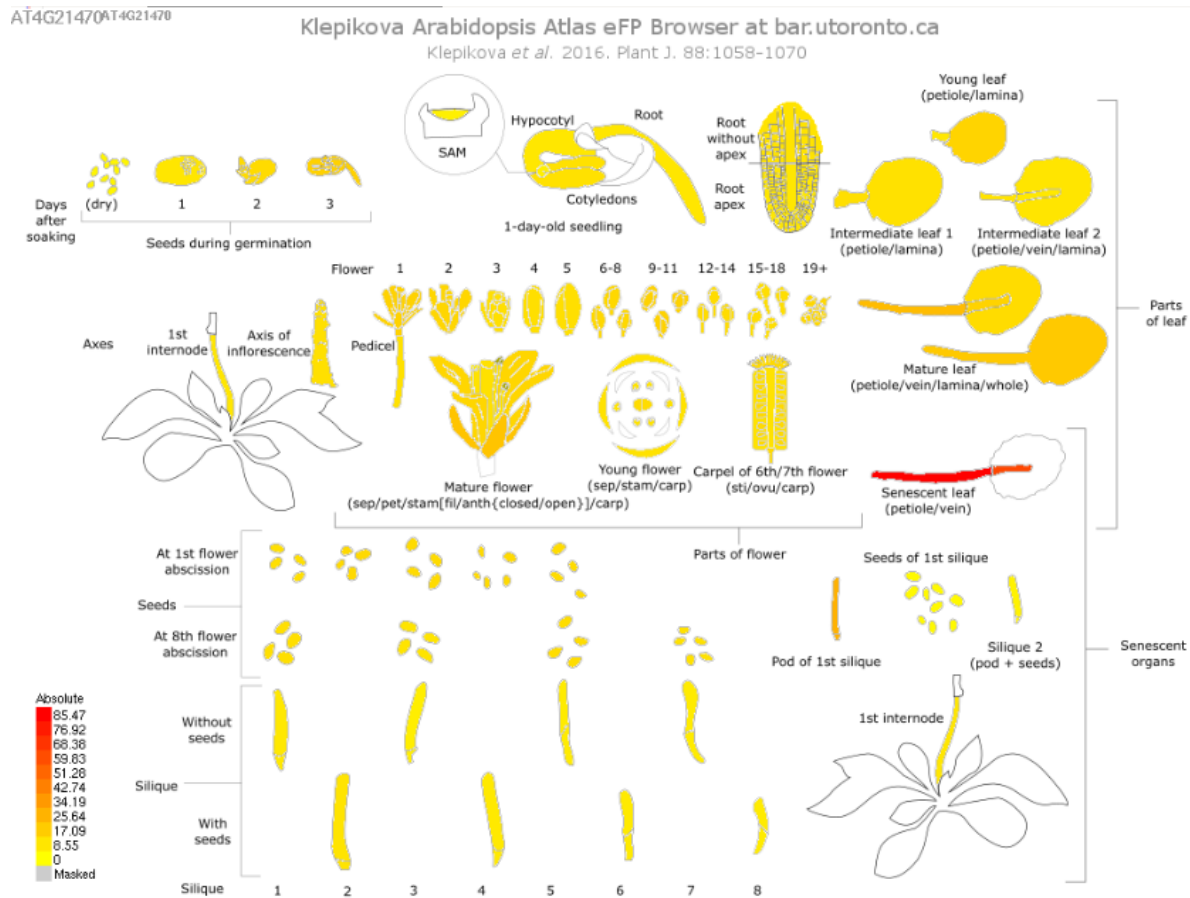


Figure 238 Πρόβλεψη έκφρασης του γονιδίου AT4G21470 στο *Arabidopsis thaliana* μέσω της βάσης δεδομένων tair

3.8.3.2 TRAVA: TRANscriptome Variation Analysis

Σε επόμενο βήμα, αξιοποιήθηκε η βάση δεδομένων TRANscriptome Variation Analysis (TRAVA), η οποία αφορά το γονιδιακό προφίλ έκφρασης στα φυτά βασισμένο σε πραγματικές αναλύσεις RNA-seq. Αρχικά, στο πλαίσιο αναζήτησης πληκτρολογήθηκε ο μοναδικός κωδικός του γονιδίου AT4G21470 και πατώντας αναζήτηση, εμφανίστηκαν σε γράφημα τα επίπεδα έκφρασης του στα διάφορα μέρη του φυτού. Το χρώμα των πλαισίων δειγμάτων βασίζεται στην τιμή των μετρήσεων ανάγνωσης και ποικίλλει από το 0 έως τη μέγιστη τιμή έκφρασης όταν ο τύπος αριθμού μετρήσεων ανάγνωσης ορίζεται στο "Raw Norm" ή στο 1 για την κανονικοποίηση "0-1".

Βλέπουμε ότι στη πετιόλη και την φλέβα του κιτρινωπού τρίτου φύλλου, δηλαδή στο στάδιο κατά το οποίο τα πρώτα σλικ είναι ώριμα, η έκφραση του γονιδίου προβλέπεται εντονότερη (1 και 0.79 αντίστοιχα στη κλίμακα 0-1), ενώ λίγο χαμηλότερη είναι και στα πρώτα κιτρινωπά σλικ (0.34), χωρίς σπόρο. Επίσης, σημαντική είναι η έκφραση και στους ανθήρες πριν αλλά και αμέσως μετά το άνοιγμα (0.40 και 0.43 αντίστοιχα). Το εργαλείο αυτό δίνει τη δυνατότητα για σύγκριση των διαφόρων επιπέδων έκφρασης με βάση τη στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς τους. Κάνοντας διπλό κλικ στο κουτί με τη τιμή 0.34 φαίνεται πως οι προαναφερθείσες τιμές δεν διαφέρουν σημαντικά. Ωστόσο, τα επίπεδα έκφρασης σε όλα τα υπόλοιπα μέρη του φυτού φαίνεται να είναι αρκετά χαμηλότερα (εικόνα 23).

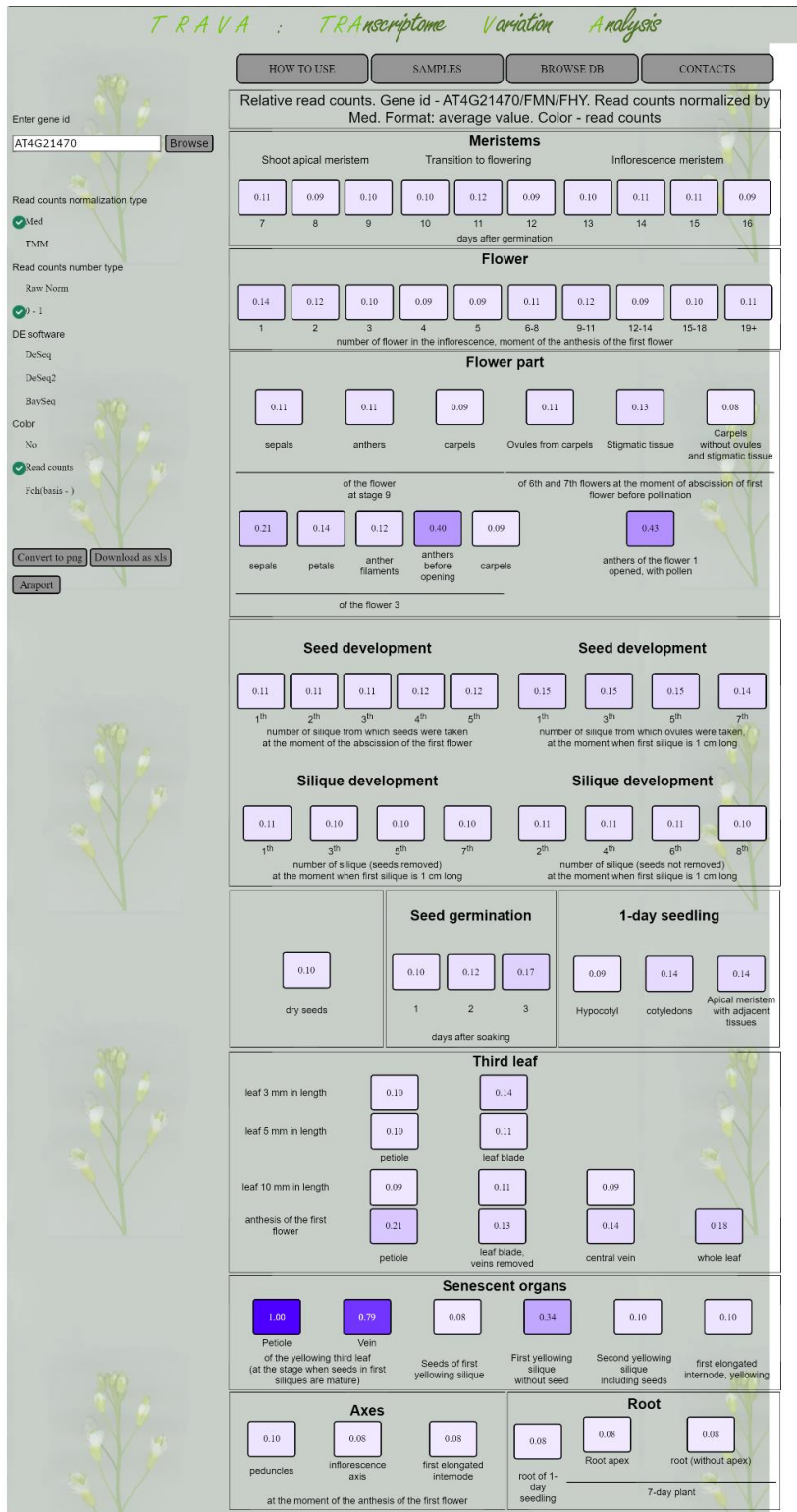


Figure 24 Η έκφραση του γονιδίου στα ανθικά μέρη του φυτού. Μεγαλύτερη είναι η έκφραση στους ανθήρες μόλις πριν και μετά το άνοιγμα. Η έκφραση του γονιδίου κατά το στάδιο του εμβρύου φαίνεται να είναι από ελάχιστη έως μέτρια. Η έκφραση του γονιδίου φαίνεται να είναι σημαντική στις κοτύλες αλλά και την κεντρική αρτηρία του φυτού.

3.8.3.3 Arabidopsis RNA-seq Database

Στη συνέχεια, ακολούθησε αναζήτηση στη βιολογική βάση δεδομένων για RNA-seq δεδομένα το *Arabidopsis* “Arabidopsis RNA-seq Database”. Από τα διαγράμματα “Data Plot” (εικόνα 23), φαίνεται πως τα επίπεδα έκφρασης είναι υψηλότερα στο εμβρυικό στάδιο, καθώς αυξημένα είναι και τα επίπεδα έκφρασης στα φύλλα. Ωστόσο, σε φύλλα 2-3 εβδομάδων η έκφραση φαίνεται να είναι αισθητά μεγαλύτερη (εικόνα 23) συγκριτικά με άλλα αναπτυξιακά στάδια, με μεγάλη ωστόσο διακύμανση.

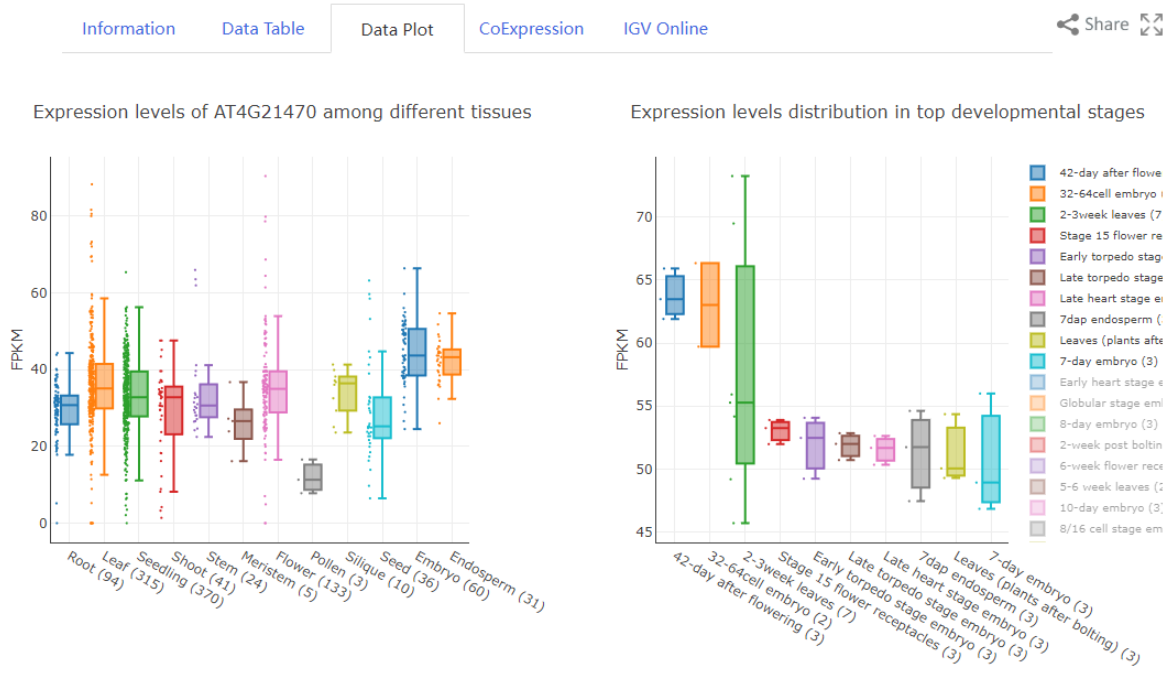


Figure 25 (α) Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου AT4G21470 στο *Arabidopsis thaliana* μέσω της *Arabidopsis* RNA seq Database (β) Κατανομή των επιπέδων έκφρασης στο τελευταίο στάδιο της ανάπτυξης.

Ταυτόχρονα, η βάση αυτή μας δίνει τη δυνατότητα για να εξερενήσουμε και τυχόν συνεκφραζόμενα γονίδια. Έτσι, ακολούθησε αναζήτηση για τη συνέκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου με άλλα. Φαίνεται πως το γονίδιο AT4G21470 συνεκφράζεται με το γονίδιο AT5G20150, με σύμβολο SPX1 με WGCNA 0.0250 (εικόνα 24). Έχει φανεί πειραματικά πως η έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου ρυθμίζεται προς τα πάνω στο βλαστό του μεταλλάγματος *cax1/cax3*. Επιπλέον, η έκφρασή του ανταποκρίνεται τόσο στα φωσφορικά (Pi) όσο και στα φωσφορώδη (Phi) τόσο στις ρίζες όσο και στους βλαστούς. Το mRNA είναι κινητό από κύτταρο σε κύτταρο. Το γονίδιο έχει συσχετισθεί με λειτουργίες και αποκρίσεις που αφορούν την κυτταρική απόκριση στην υποξία, κυτταρική απόκριση στην έλλειψη φωσφορικών, θετική ρύθμιση της κυτταρικής απόκρισης στη μειωμένη πρόσβαση σε φωσφορικά.

Co-expression neighborhood: AT4G21470 (top 20)

GeneID	WGCNA Correlation*	Symbol	Alias	Description
AT4G21470	1.0000	FMN/FHY	ATFMN/FHY	riboflavin kinase/FMN hydrolase
AT5G20150	0.0250	SPX1	ATSPX1	ARABIDOPSIS THALIANA SPX DOMAIN GENE 1

Figure 26 Αποτελέσματα από την αναζήτηση για την συνέκφραση γονιδίων με το AT4G21470 στη βάση δεδομένων Arabidopsis RNA-seq database

3.8.3.4 BAR e Plant Arabidopsis thaliana

Η βάση δεδομένων “BAR e Plant Arabidopsis thaliana”, δίνει τη δυνατότητα της οπτικοποίησης των πειραματικών δεδομένων. Στην εικόνα βλέπουμε ότι στη πετιόλη και την φλέβα του κιτρινωπού τρίτου φύλλου, δηλαδή στο στάδιο κατά το οποίο τα πρώτα σλικ είναι ώριμα, η έκφραση του γονιδίου προβλέπεται εντονότερη (1 και 0.79 αντίστοιχα στη κλίμακα 0-1), ενώ λίγο χαμηλότερη είναι και στα πρώτα κιτρινωπά σλικ (0.34), χωρίς σπόρο. Επίσης, σημαντική είναι η έκφραση και στους ανθήρες πριν αλλά και αμέσως μετά το άνοιγμα (0.40 και 0.43 αντίστοιχα), με πιο έντονη την έκφραση στο **μίσχο του γηρασμένου φύλλου senescent**. Το εργαλείο αυτό δίνει τη δυνατότητα για σύγκριση των διαφόρων επιπέδων έκφρασης με βάση τη στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς τους. Κάνοντας διπλό κλικ στο κουτί με τη τιμή 0.34 φαίνεται πως οι προαναφερθείσες τιμές δεν διαφέρουν σημαντικά. Ωστόσο, τα επίπεδα έκφρασης σε όλα τα υπόλοιπα μέρη του φυτού φαίνεται να είναι αρκετά χαμηλότερα.

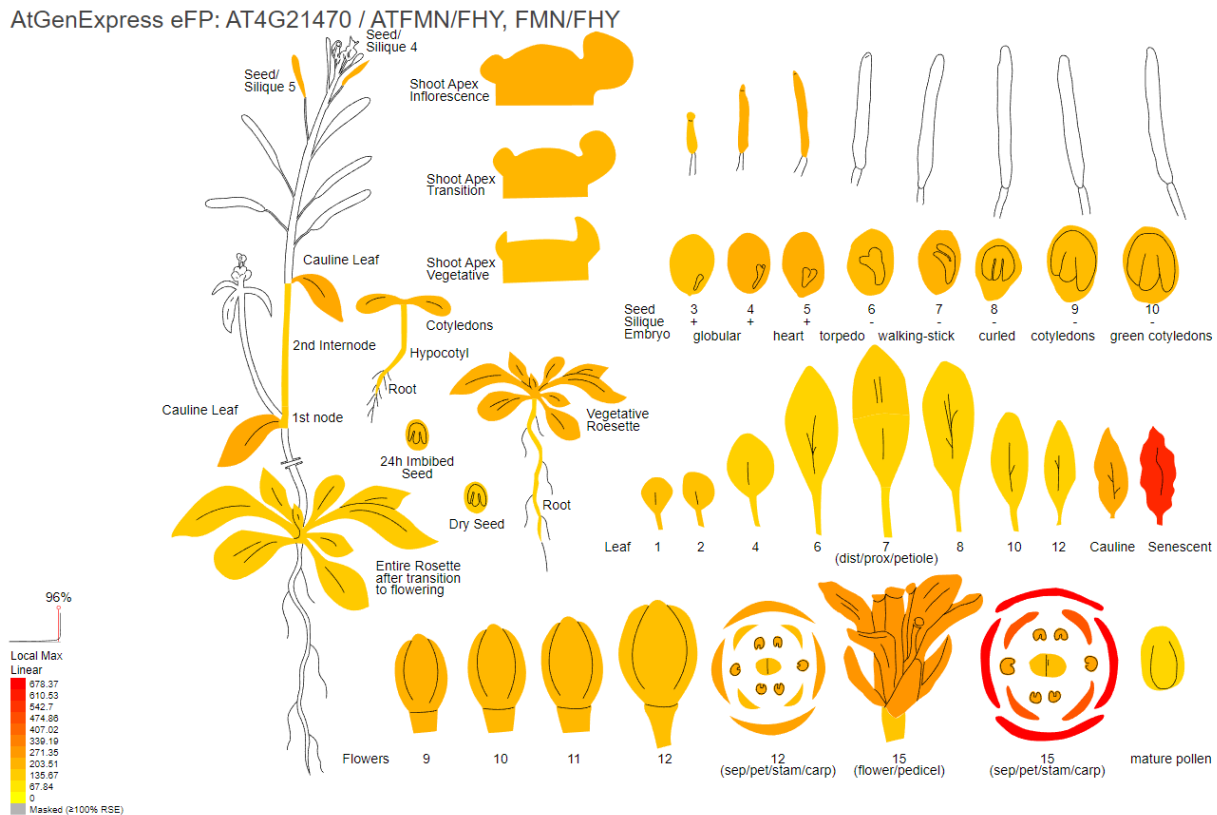


Figure 27 Η έκφραση του γονιδίου υπό φυσιολογικές συνθήκες, όπως προκύπτει από τα βιολογικά δεδομένα της TRAVA.

Chemical eFP: AT4G21470 / ATFMN/FHY, FMN/FHY

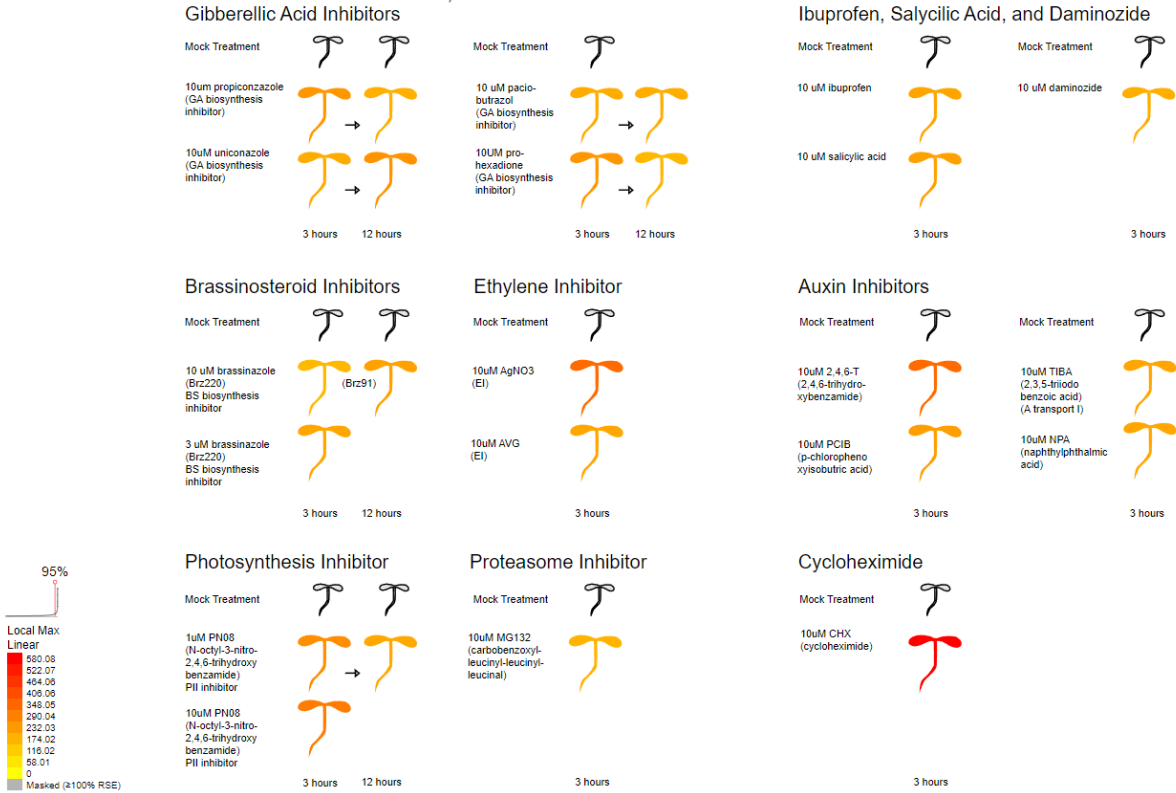


Figure 28 Η έκφραση του γονιδίου μετά από χημική καταπόνηση, όπως προκύπτει από τα βιολογικά δεδομένα της TRAVA.

Tissue Specific Guard And Mesophyll Cells eFP: AT4G21470 / ATFMN/FHY, FMN/FHY

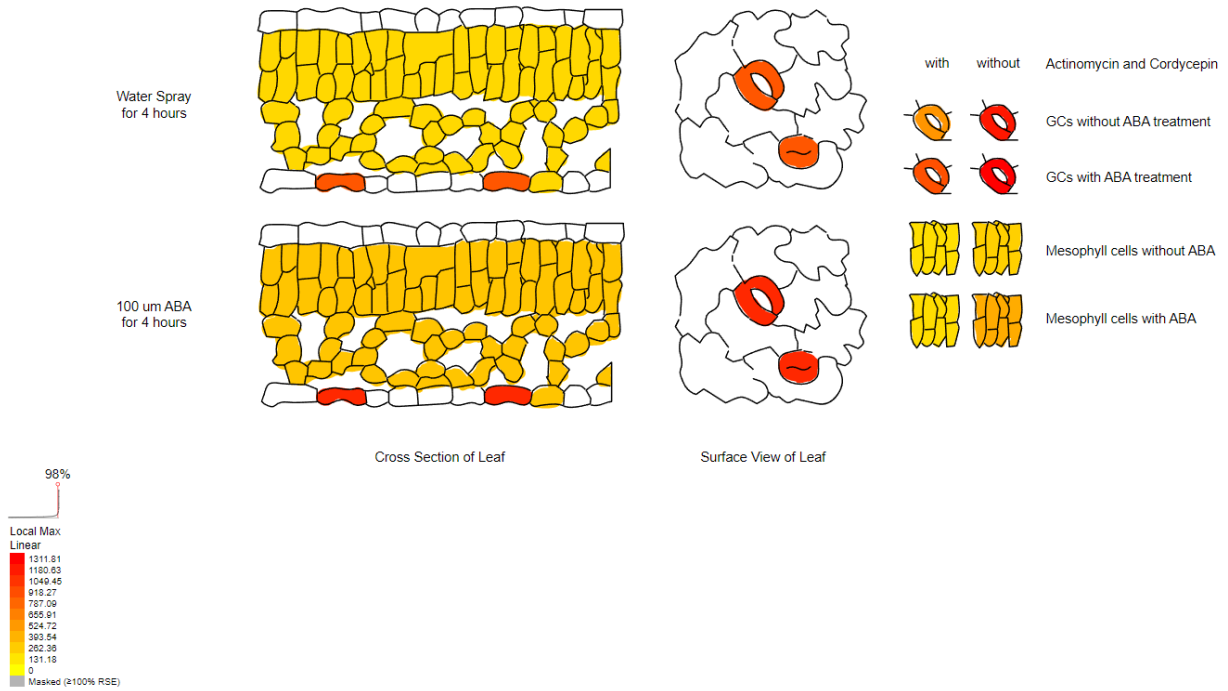


Figure 29 Η έκφραση του γονιδίου ιστοειδικά με ή χωρίς εφαρμογή ABA, όπως προκύπτει από τα βιολογικά δεδομένα της TRAVA.

DNA Damage eFP (RNA-Seq data): AT4G21470 / ATFMN/FHY, FMN/FHY

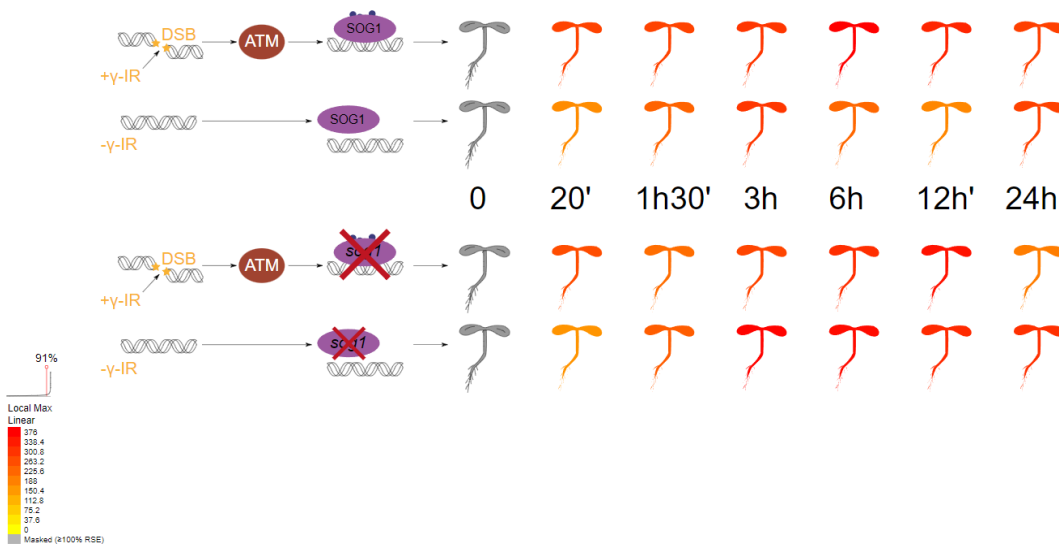


Figure 30 Η έκφραση του γονιδίου σε διαφορετικές χρονικές στιγμές με καταστροφή του DNA, όπως προκύπτει από τα βιολογικά δεδομένα της TRAVA.

3.8.4 Στοιχεία υποκινητή και συνέκφραση

Από τη βάση δεδομένων για μεταγραφικά στοιχεία AGRIS, πληκτρολογήσαμε το κωδικό του γονιδίου At4g21470 και εμφανίστηκαν η χρωμοσωμική του θέση στο χρωμόσωμα 4 με συντεταγμένες 11428292 – 11431134 (2842 bp). Επίσης, εμφανίζεται και η αλληλουχία του υποκινητή, η οποία και παρατίθεται στο παράρτημα, αλλά και ο τύπος του υποκινητή, που στη προκειμένη περίπτωση είναι ο προβλεπόμενος με πηγή τη βάση δεδομένων TAIR.

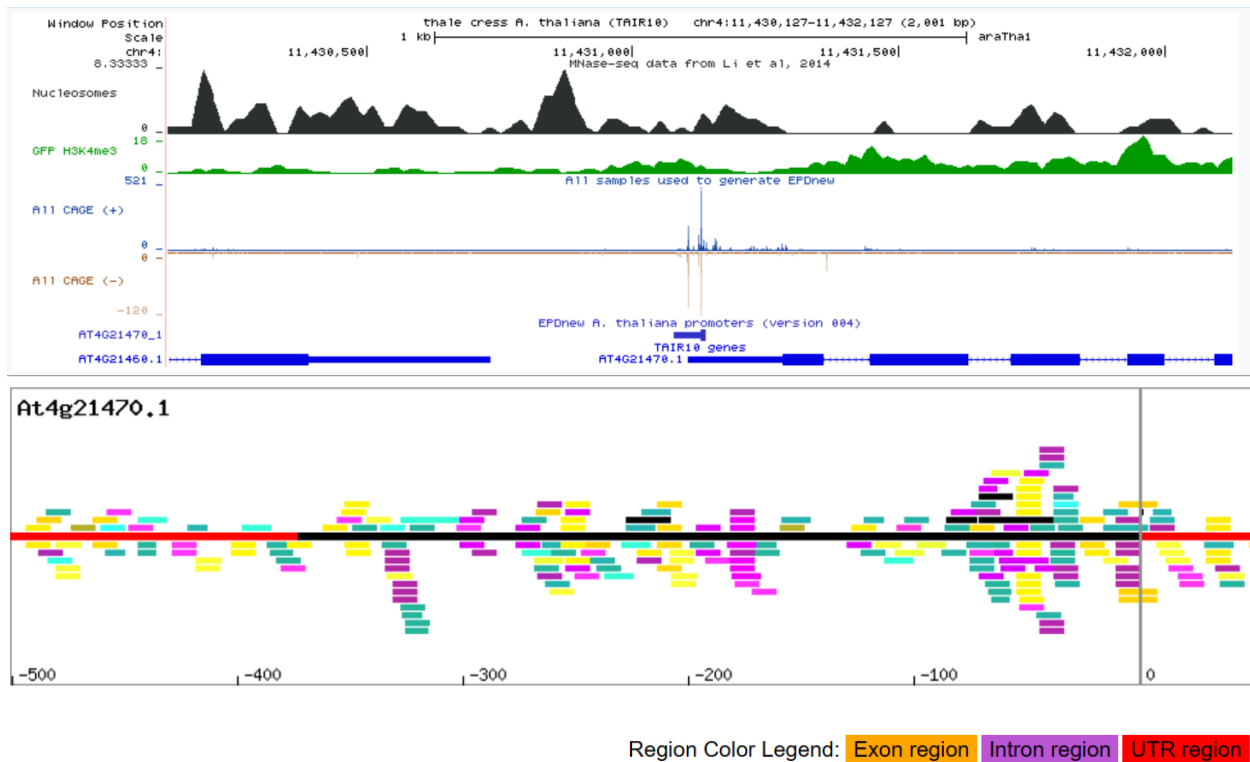


Figure 31 Σχηματική αναπαράσταση του υποκινητή, όπως προκύπτει από τη βάση δεδομένων Agris.

Οι προβλεπόμενες αλληλουχίες του υποκινητή προσδιορίστηκαν με λήψη των σχολιασμένων κωδικοποιητικών αλληλουχιών και των χρωμοσωμικών αλληλουχιών από τη βάση TAIR (<http://arabidopsis.org>). Στη συνέχεια χαρτογραφεί τις κωδικοποιητικές αλληλουχίες στις χρωμοσωμικές αλληλουχίες χρησιμοποιώντας BLAST. Εάν η ανάντη διαγονιδιακή περιοχή για κάθε γονίδιο είναι μεγαλύτερη από 3 kb, ανακτά 3 kb της αλληλουχίας ανάντη της θέσης έναρξης (ATG). Διαφορετικά, η διαγονιδιακή περιοχή θεωρείται ότι είναι ο προαγωγέας του επόμενου κατάντη γονιδίου, για να αποκλειστεί οποιαδήποτε κωδικοποιητική περιοχή ανοδικών γονιδίων. Στη συνέχεια οι επιμελημένοι υποκινητές βρέθηκαν ταιριάζοντας 13.181 πλήρους μήκους cDNA *Arabidopsis* από το ινστιτούτο Riken (http://pfgweb.gsc.riken.go.jp/pub_data/index.html) με τους 27.281 προβλεπόμενους υποστηρικτές από την AGRIS. Οι περιοχές ανάντη του ATG για ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) από τους προβλεπόμενους προαγωγείς που λαμβάνονται από το AGRIS ονομάζονται "Περιοχές ανάντη". Αυτές περιέχουν τις περιοχές προαγωγέα και τα αντίστοιχα 5'UTRs για καθένα από τα γονίδια. Έτσι, η AGRIS συγκρίνει τα πρώτα 30 bp κάθε FL cDNA με κάθε αλληλουχία Ανοδικής Περιοχής, επιτρέποντας καμία αναντιστοιχία. Από τα αποτελέσματα που λαμβάνονται η AGRIS ομαδοποιεί μοναδικά ζεύγη αντιστοιχίας (ένα προς ένα) μαζί και διπλασιάσαμε αντιστοιχίσεις (ένα προς πολλά) σε ομάδες για περαιτέρω ανάλυση της προβλεπόμενης θέσης έναρξης της μεταγραφής. Τέλος, εξετάζει μόνο τις συστάδες

στις οποίες τα FL cDNA αντιστοιχούν σε μία μόνο θέση έναρξης μεταγραφής για ένα γονίδιο *Arabidopsis* με ακριβή αναγνώριση της περιοχής προαγωγέα.

Όλες οι θέσεις πρόσδεσης (Binding site) ανοδικά του γονιδίου ενδιαφέροντος εμφανίζονται στο πίνακα 7 αλλά και στην εικόνα 32.

Table 7 Θέσεις πρόσδεσης (binding site) ανοδικά του γονιδίου, όπως προκύπτουν από τη βάση δεδομένων AGRIS

BS Name	BS Genome start	BS Genome End	Binding Sequence	Site	Binding Family	Site
Z-box promoter motif	11431107	11431114	atacgtgt			
W-box promoter motif	11431010	11431015	ttgacc		WRKY	
W-box promoter motif	11428957	11428962	ttgact		WRKY	
T-box promoter motif	11429733	11429738	actttg			
SORLIP5	11428624	11428630	gagtgag			
SORLIP2	11429927	11429931	gggcc			
RAV1-B binding site motif	11430113	11430118	cacctg		ABI3VP1	
RAV1-B binding site motif	11429938	11429943	cacctg		ABI3VP1	
RAV1-A binding site motif	11429312	11429316	caaca		ABI3VP1	
RAV1-A binding site motif	11428762	11428766	caaca		ABI3VP1	
RAV1-A binding site motif	11428967	11428971	caaca		ABI3VP1	
RAV1-A binding site motif	11429611	11429615	caaca		ABI3VP1	
RAV1-A binding site motif	11430583	11430587	caaca		ABI3VP1	
RAV1-A binding site motif	11430165	11430169	caaca		ABI3VP1	
RAV1-A binding site motif	11430672	11430676	caaca		ABI3VP1	
RAV1-A binding site motif	11430961	11430965	caaca		ABI3VP1	
RAV1-A binding site motif	11430814	11430818	caaca		ABI3VP1	
RAV1-A binding site motif	11430275	11430279	caaca		ABI3VP1	
RAV1-A binding site motif	11429266	11429270	caaca		ABI3VP1	
MYB binding site promoter	11428798	11428805	aaccaaac		MYB	
MYB binding site promoter	11430535	11430542	aaccaaac		MYB	
MYB4 binding site motif	11430535	11430541	accaaac		MYB	
MYB4 binding site motif	11428798	11428804	accaaac		MYB	
MYB4 binding site motif	11429653	11429659	aacaaac		MYB	
LFY consensus binding site motif	11428611	11428616	ccaatg		LFY	
LFY consensus binding site motif	11428701	11428706	ccactg		LFY	

Ibox promoter motif	11428730	11428735	gataag	
Ibox promoter motif	11428922	11428927	gataag	
Ibox promoter motif	11429507	11429512	gataag	
GATA promoter motif [LRE]	11429508	11429513	agataa	
GATA promoter motif [LRE]	11428327	11428332	tgataa	
GATA promoter motif [LRE]	11430736	11430741	tgataa	
GATA promoter motif [LRE]	11430253	11430258	tgatag	
GATA promoter motif [LRE]	11428923	11428928	agataa	
DPBF1&2 binding site motif	11428812	11428818	acacttg	bZIP
DPBF1&2 binding site motif	11430785	11430791	acacaag	bZIP
CCA1 binding site motif	11428660	11428667	aaaaatct	MYB-related
BoxII promoter motif	11430888	11430893	ggtaa	
BoxII promoter motif	11430844	11430849	ggtaa	
BoxII promoter motif	11429521	11429526	ggtaa	
BoxII promoter motif	11428468	11428473	ggtaa	
Bellringer/replumless/pennywise BS1 IN AG	11430861	11430868	aaattaa	Homeobox
AtMYC2 BS in RD22	11429291	11429296	cacatg	BHLH
AtMYB2 BS in RD22	11430791	11430797	ctaacca	MYB
ARF binding site motif	11430155	11430160	tgtctc	
ARF binding site motif	11430434	11430439	tgtctc	
ARF1 binding site motif	11430434	11430439	tgtctc	ARF
ARF1 binding site motif	11430155	11430160	tgtctc	ARF
ABRE-like binding site motif	11431108	11431115	tacgtgta	


```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
      <-----DOF2
      <-----DOF5.7(1)
      <-----ALFIN1
      <-----MYB46(3)
      <-----AGL15 <-----DAG2 <-----TEIL <-----ICU4
      <-----NtERF2 <-----ZAT14 <-----GATA12
      <----->HSFB2a(2) <-----ETT(1) <----->HSFB2a(2) <-----MYB46(1)
      <----->HSFB2a(2) <----->SPL7(1) <----->HSFB2a(2) <----->GT1<-----YAB1
      <-----LBD16 <----->ZAT14 <----->AtLEC2<----->YAB1<-----MYB83 <-----ATHB12
gtcttcgtagcggaactataaacagaacagtcgaccactttttcatgctaactcttagattcataatgcaatggttgtaaaaatagacaatgaatgaaa 1143070
      <-----P
      <-----MYB52(1)
      <-----GAMYB
      <----->GT1
      <-----MYB46(3)
      <-----ANAC58
      <-----ANAC46
      <-----ANAC58
      <----->MYB52(1)<-----ANAC58
      <----->AHL12(2)<-----DOF2
      <----->AHL20(2)<-----ANAC58
      <----->AHL25(3)<-----ANAC46
      <-----DAG2 <----->GT1 <----->AHL20(2) <----->AHL20(2)<-----MYB46(3)
      <-----DOF2 <----->AHL12(2) <----->ICU4 <----->YAB1 <----->ALFIN1
->TEIL <----->AHL12(3) <----->RVE1(2) <----->ZAT6 <----->DOF5.7(1)
ctttttcatgtataaaaaatggaacttggggttgataatgaattgttcattgtaagactaaaaataaaaaacagaaggggtgcttgtgtgtagtgc 1143080
      <----->AHL12(2)
      <----->WOX13(2)
      <----->AHL12(2)
      <-----MYB52(1)
      <-----DOF5.7(1)
      <-----TOE1(2)
      <-----NtERF2
      <----->ETT(2) <----->RVE1(2)
      <----->ETT(2) <----->TOE1(2)
      <----->SPL7(1) <----->SPL7(1)
      <----->ARR11(3) <----->MYB52(1)<-----YAB1 <-----
      <----->WOX13(2) <----->GT1 <----->AHL20(2)
      <----->WOX13(2) <----->MYB52(1) <----->WOX13(2) <----->RAV1(2)
      <----->GT1 <----->ARR11(3) <----->WOX13(2) <----->AHL20(2) <----->GT1
->MYB52(2) <----->YAB5 <----->WOX13(2) <----->AHL25(3) <----->GT1
tcaattgttaaatcaacaattaagttctccgattaggcgttgaattaaccggtgcgccgttttttaattttcatcgttcgattttcaacttaacctgtcca 1143090
      <-----YAB5
      <-----DOF5.7(1) <-----TGA1
      <-----DOF5.7(1) <-----TGA2(1)
      <-----DAG2 <-----ETT(2)
      <----->HSFB2a(1) <-----TGA2(1)
      <----->HSFC1(2) <----->bZIP60(1)
      <----->HSFB2a(1) <----->bZIP60(1)
      <----->HSFC1(2) <----->ETT(2) <----->RAV1(1)
      <----->RAV1(1) <----->WOX13(2) <----->GAMYB
      <----->ETT(2) <----->WOX13(2) <----->MYB46(3)
=====RAV <----->MYB59 <----->STF1 <----->REM1(1) <----->At4g35610
--ZAT18<-----DOF2<-----YAB1 <-----YAB5 <-----WOX13(1)
ccagaaggtccctttgtgcctaattttgatgaaatgctgcatttcgctgttgagctacaacacaaaatacaaaacgttgtagttagattgctgaatc 1143100
      <-----KAN1
      <-----ARR14(2)
      <----->GLK1(2)
      <-----ARR11(1)
      <----->GATA12
      <-----TEIL
      <----->ARR14(2)
      <----->RVE1(2)
      <-----ARR14(1)

```



Figure 32 Αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου At4g21470. Φαίνονται οι θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων στη περιοχή του υποκινητή στο 3' άκρο του γονιδίου.

Επιπλέον, με αναζήτηση στη βάση δεδομένων TRAVA και KAGIANA βρέθηκε πως το γονίδιο ενδιαφέροντος συνεκφράζεται κατά βάση με τα εξής γονίδια:

At2g42680 με όνομα MBF1A (MULTIPROTEIN BRIDGING FACTOR 1A) που είναι ένα από τα τρία γονίδια στο *A. thaliana* που κωδικοποιεί τον πολυπρωτεϊνικό παράγοντα γεφύρωσης 1, έναν εξαιρετικά διατηρημένο μεταγραφικό συνενεργοποιητή. Μπορεί να χρησιμεύσει ως παράγοντας γέφυρας μεταξύ ενός παράγοντα bZIP και του TBP. Η έκφρασή του ρυθμίζεται αναπτυξιακά.

Το γονίδιο με κωδικό At1g24120 με όνομα ARL1 (ARG1-LIKE 1) που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που μοιάζει με DnaJ παρόμοια με την ARG1 και την ARL2 που εμπλέκονται και οι δύο στην απόκριση του βαρυτροπισμού της ρίζας και του υποκοτυλίδιου. Ωστόσο, η μηδενική μετάλλαξη σε αυτό το γονίδιο δεν οδηγεί σε ελαττώματα στον βαρυτροπισμό. Το γονίδιο εκφράζεται σε όλους τους ιστούς που εξετάστηκαν.

Το γονίδιο At5g37640 με ονομασία UBQ9, γονίδιο πολυουμικιτίνης με 4 επαναλήψεις ουβικιτίνης. Η πρώτη επανάληψη της ουβικιτίνης έχει 16 αντικαταστάσεις αμινοξέων.

At1g55310 με κωδικό SR33 που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη ματίσματος SR που εντοπίζεται σε πυρηνικές κηλίδες, αλληλεπιδρά με την SR45 και την πρωτεΐνη U1-70K του U1 snRNP, έχει αλληλουχία παρόμοια με την ανθρώπινη πρωτεΐνη SC35.

Το At3g52420 ή OEP7 που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μεμβράνης εξωτερικού περιβλήματος χλωροπλάστη 7 kDa.

Και τέλος το At1g75290, οξειδορεδουκτάση, που δρα σε NADH ή NADPH και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη της οποίας η αλληλουχία είναι παρόμοια με μια αναγωγάση ισοφλαβόνης.

Πίνακας 1 Συνεκφραζόμενα γονίδια με το At4g21470, σύμφωνα με το KAGIANA tool.

VF *	NF% *	CC	GENE ID	REP. ID	E-value	AGI code	Arabidopsis gene name
0.5	66.9	0.9	Contig8028_at	Contig8028	7.00E-14	At4g21470	ATFMN/FHY (riboflavin kinase/FMN hydrolase)
0.3	42.6	0.9	HV14L22u_s_a	HV14L22u	2.00E-04	At2g42680	MBF1A (MULTIPROTEIN BRIDGING FACTOR 1A)
0.3	42.6	0.9	Contig11582_at	Contig11582	4.00E-06	At1g24120	ARL1 (ARG1-LIKE 1)
0.3	42.6	0.9	Contig13829_at	Contig13829	3.00E-01	At5g37640	UBQ9
0.3	35.5	0.9	Contig18112_at	Contig18112	3.00E-01	At1g55310	SR33
0.2	27.2	0.9	Contig21187_at	Contig21187	1.00E+00	At3g52420	OEP7 (OUTER ENVELOPE MEMBRANE PROTEIN 7)
0.2	27.2	0.9	Contig19034_at	Contig19034	1.00E+00	At1g75290	oxidoreductase, acting on NADH or NADPH
	VF: Vertex F-measure network index; the higher the better						
	NF%: Network F-measure index for a cluster of genes; the larger the better						

4 Συζήτηση

4.8 Το μετάλλαγμα *mosaic*

Το μετάλλαγμα *mosaic* χαρακτηρίζεται από την παρουσία έντονης χλωρώσης από τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξής του. Αυτή η χλωρώση ακολουθεί ένα συγκεκριμένο, σταδιακό μοτίβο, ξεκινώντας από το κεντρικό νεύρωμα των παλαιότερων φύλλων της ροζέτας. Αυτό επιβεβαιώθηκε ακόμη και από τη μελέτη της γονιδιακής δομής με τη χρήση της τεχνικής GUS. Επιπρόσθετα, η χλωρώση εξαπλώνεται σταδιακά προς το βλαστό. Αυτό το μετάλλαγμα εμφανίζει αργότερο ρυθμό ανάπτυξης σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου καθόλη τη διάρκεια της ανάπτυξής του και δεν είναι πάντα σε θέση να ολοκληρώσει επιτυχώς τον βιολογικό κύκλο του. Μέχρι πρότινος, η περιοχή της μετάλλαξης είχε περιοριστεί σε ένα μοριακό πεδίο που αποτελείται από 14 γονίδια. Πολλά από αυτά τα γονίδια έχουν συνδεθεί στη βιβλιογραφία με αμυντικούς μηχανισμούς. Αρχικά, αυτό το χλωρωτικό πρότυπο και η καθυστέρηση στην ανάπτυξη εξηγήθηκαν μέσω της πιθανής σύνδεσης και αλληλεπίδρασης του μεταλλαγμένου γονιδίου με γονίδια που συμμετέχουν στην σήμανση και την ενεργοποίηση αμυντικών αποκρίσεων που σχετίζονται με την αντίληψη παθογόνων.

Από την αναζήτηση σε βιολογικές βάσεις δεδομένων και όπως παρουσιάστηκε στα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας, το γονίδιο αυτό φαίνεται να εκφράζεται μετά από προσβολή σε παθογόνα κυρίως στη ρίζα, μιας και το έδαφος αποτελεί τη βασική δίοδο επαφής με άλλους μικροοργανισμούς και παθογόνα, καθιστώντας αναμενόμενη της απόκριση στην περιοχή αυτή. Παράλληλα, βλέπουμε πως με το πέρας των ημερών μετά τη πρώτη εισβολή του παθογόνου η έκφραση στα συγκεκριμένα προσβαλλόμενα μέρη της ρίζας του φυτού όλο και αυξάνει. Όλα τα παραπάνω επιβεβαιώνεται τόσο από τα πειραματικά δεδομένα, όσο και από τις αναζητήσεις στις βάσεις δεδομένων που συμφωνούν.

Από τα προηγούμενα δεδομένα, φαίνεται ότι το γονίδιο που προκαλεί το φαινόμενο του *mosaic* μπορεί να είναι εμπλεκόμενο στη ρύθμιση της αντίδρασης του φυτού στην προσβολή από παθογόνους μικροοργανισμούς. Είναι δυνατόν να δρα ως αρνητικός ρυθμιστής ή διακόπτης σε ένα μονοπάτι απόκρισης, που όταν είναι απενεργοποιημένο, επιτρέπει στο φυτό να αντιληφθεί συνεχώς ότι υπάρχει προσβολή από παθογόνους μικροοργανισμούς και να βιώνει οξειδωτικό στρες. Αυτό εξηγεί το σταδιακό πρότυπο χλωρώσης που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών με αυτή τη μετάλλαξη. Συγκεκριμένα, η μεταλλαξιγένεση EMS μπορεί να απενεργοποιήσει την αρνητική ρύθμιση αυτού του γονιδίου-διακόπτη, επιτρέποντας στο φυτό να αντιλαμβάνεται συνεχώς την προσβολή και να βιώνει οξειδωτικό στρες κατά την ανάπτυξή του.

Με βάση πειραματικά και βιοπληροφορικά στοιχεία, τα ένζυμα της φυτικής βιοσύνθεσης ριβοφλαβίνης θεωρείται ότι βρίσκονται στα πλαστίδια. Χρησιμοποιώντας τα γονίδια αναφοράς *uidA* έχουμε προσπαθήσει να αποκαλύψουμε και την ιστοειδική τοποθέτηση, η οποία φαίνεται να είναι πιο πολύπλοκη και να εξαρτάται από τα αναπτυξιακά στάδια του φυτού.

4.9 Φαινότυπος *Mosaic*

Στο επίπεδο των φύλλων, η γήρανση αντιπροσωπεύει μια εκφυλιστική διαδικασία, αλλά ταυτόχρονα αποτελεί έναν αποτελεσματικό μηχανισμό ανακύκλωσης θρεπτικών συστατικών για το φυτό. Το μεγαλύτερο μέρος του αζώτου που απελευθερώνεται από τα γηρασμένα φύλλα προέρχεται από την αποικοδόμηση του Rubisco και άλλων πλαστιδικών πρωτεϊνών. Ως εκ τούτου, ένα σημαντικό επίκεντρο της έρευνας για τη γήρανση ήταν η αποσαφήνιση του μηχανισμού για την αποσυναρμολόγηση των χλωροπλαστών (Noodén et al., 1997; Guimmet et al., 2002; Otegui, 2018). Άλλες κυτταρικές αλλαγές που συμβαίνουν στα γηρασμένα φύλλα έχουν χαρακτηριστεί πολύ λιγότερο, και ακόμη λιγότερα είναι γνωστά

για τις αλλαγές που λαμβάνουν χώρα εκτός της πλασματικής μεμβράνης καθώς προχωρά η γήρανση των φύλλων.

Κατά τη γήρανση των φύλλων, η περιεκτικότητα σε δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) όπως O_2^- και H_2O_2 αυξάνεται περαιτέρω, το στρώμα του χλωροπλάστη καταστρέφεται, η θυλακοειδής μεμβράνη σπάει, η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη μειώνεται γρήγορα, ενώ η αποικοδόμηση των καρβοτενοειδών είναι σχετικά αργή. Επομένως, το πιο εμφανές χαρακτηριστικό της γήρανσης των φύλλων είναι ότι τα φύλλα αλλάζουν από πράσινα σε κίτρινα (Chu MY and Yu YC 2019; Matile et al. 2006). Η γήρανση των φύλλων δεν επηρεάζεται μόνο από την αναπτυξιακή ηλικία των φύλλων αλλά και από διάφορες βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Η γήρανση προκύπτει από τα κύτταρα των φύλλων που ενσωματώνουν εσωτερικές πληροφορίες ηλικίας και εξωτερικά περιβαλλοντικά σήματα. Τα σκληρά περιβάλλοντα περιλαμβάνουν κυρίως ξηρασία, αλατότητα, ακραίες θερμοκρασίες, μόλυνση από παθογόνους παράγοντες και σκίαση γειτονικών φυτών, που θα επιταχύνουν τη γήρανση των φύλλων. Επιπλέον, η γήρανση των φύλλων επηρεάζεται επίσης από τις αλλαγές στα ορμονικά σήματα μέσα στα φυτά. Μένει να φανεί να εξακριβωθεί πως το γονίδιο ενδιαφέροντος εμπλέκεται στην ανω ή κάτω ρύθμιση της γήρανσης των φύλλων

Αυτό που μπορεί πλέον να ειπωθεί είναι πως στα φύλλα παρουσιάζεται έντονο το επεκτεινόμενο πρότυπο χλώρωσης το οποίο επιβεβαιώνεται τόσο από τις βάσεις δεδομένων όσο και από το συγκεκριμένο πείραμα που έρχεται σε συμφωνία. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στην ενότητα αποτελέσματα, βρέθηκε πως στο μίσχο του γηρασμένου φύλλου η έκφραση του γονιδίου είναι μέγιστη, Στην βάση δεδομένων TRAVA, πειράματα έχουν γίνει στο μίσχο του τρίτου φύλλου. Το δείγμα συλλέχθηκε όταν το πρώτο σλικ ήταν εντελώς ώριμο και σχεδόν ανοίχτηκε αλλά και σε ώριμο φύλλο και σε ολόκληρο το τρίτο φύλλο. Το δείγμα συλλέχθηκε τη στιγμή της άνθησης του πρώτου λουλουδιού. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά στις βάσεις δεδομένων έρχεται το συγκεκριμένο πείραμα, όπως φαίνεται στην εικόνα με τα γηραιά φύλλα και τη χρώση GUS που αποκαλύπτει τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στους ιστούς των φύλλων αυτών και συγκριτικά με άλλα αναπτυξιακά στάδια. Επομένως, κατά τη γήρανση φαίνεται πως τα φύλλα του μεταλλάγματος έχουν εντονότερο φαινότυπο και αυτό συσχετίζεται με την έκφραση του γονιδίου. Επίσης, σε διάφορα πειράματα έχει βρεθεί πως τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου και επομένως το πρότυπο χλώρωσης εξαρτάται από την επίθεση σε παθογόνα αλλά και τα διάφορα αβιοτικά στρες.

4.10 Στοιχεία υποκινητή- έκφραση

Είναι φανερό από τις αναζητήσεις στις βάσεις δεδομένων πως τα γονίδια που συνεκφράζονται με το γονίδιο ενδιαφέροντος σχετίζονται με την ορθή λειτουργία του χλωροπλάστη, οπότε και εξηγείται το χλωρωτικό πρότυπο ιδιαίτερα στα γηραιά φύλλα, με την ανάπτυξη της ρίζας αλλά και το οξειδωτικό στρες και την απόκριση σε καταπονήσεις. Η ανάλυση της δομής του προαγωγέα είναι ένα από τα πιο σημαντικά ζητήματα. Η κατανόηση της δομής του προαγωγέα επιτρέπει προβλέψεις σχετικά με τις θέσεις του υποκινητή και τα προφίλ έκφρασης και ρίχνει φως στα κρυφά μεταγραφικά δίκτυα. Οι γονιδιακές ρυθμίσεις σε μεταγραφικό επίπεδο ελέγχονται από τα cis- elements που υπάρχουν στην περιοχή του προαγωγέα. Πολλαπλά cis-στοιχεία που ανταποκρίνονται σε διαφορετικές πιέσεις υποδηλώνουν τις πιθανές λειτουργίες ενός γονιδίου (Luo et al., 2020).

Είναι λοιπόν ενδιαφέρον να αναλυθεί η συσχέτιση των στοιχείων του υποκινητή του γονιδίου, τα οποία σε πολλές περιπτώσεις μπορεί να μοιράζονται και στα υπόλοιπα συνεκφραζόμενα γονίδια ώστε να γίνει περισσότερο κατανοητός ο τρόπος ρύθμισης της έκφρασης τους. Το IBOX αφορά μια διατηρημένη αλληλουχία ανάντη γονιδίων που ρυθμίζονται από το φως. Πρόκειται για αλληλουχία που βρέθηκε αρχικά στην περιοχή προαγωγέα του *gbcS* της τομάτας και του *Arabidopsis* (Yamamoto et al., 2007). Έχει βρεθεί πως στοιχεία φωτοαπόκρισης όπως το I-Box και το AE-Box υπάρχουν στον υποκινητή του *ZmRXO1* και

ενδέχεται να εμπλέκονται στον μηχανισμό επαγωγής φωτός στα φυτά αραβοσίτου (Tang et al., 2023 ;Tao et al., 2015).

Σε διαγονιδιακά φυτά ρυζιού είναι πλέον γνωστό (Yin et al., 1997) ότι, εκτός από το Box I και το Box II, απαιτούνται άλλα στοιχεία για τη γονιδιακή έκφραση του φλοιώματος, μεταξύ των οποίων είναι μια direct επανάληψη (ASL Box, nt -98 έως -79) και ένα μοτίβο GATA (nt -143 έως -135). Έτσι, συνήχθη το συμπέρασμα ότι αυτές οι περιοχές δρουν προσθετικά για να κατευθύνουν την ειδική για το φλόωμα γονιδιακή έκφραση.

Επιπλέον, σε μια πρόσφατη έρευνα με βάση δεδομένα μικροσυστοιχίας από φύλλα ρυζιού κατά τη διάρκεια πρώιμης γήρανσης, αναγνωρίστηκαν τα cis-στοιχεία W-box και G-box ως θετικοί ρυθμιστές της γήρανσης στη σημαντική ποικιλία ρυζιού Minghui 63. Και τα δύο στοιχεία cis δεσμεύτηκαν από πρωτεΐνες ειδικές για τη γήρανση των φύλλων στο *in vitro* και επηρέασε τη γήρανση *in vivo*. Επιπλέον, ο συνδυασμός των δύο στοιχείων οδήγησε σε βελτιωμένη έκφραση κατά τη γήρανση των φύλλων και οι αριθμοί αντιγράφων των cis-στοιχείων επηρέασαν σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης. Λαμβάνοντας υπόψη ότι υπάρχουν πολύ λίγα τεκμηριωμένα στοιχεία cis που σχετίζονται με την πρώιμη γήρανση, τα αποτελέσματά συνέβαλαν σημαντικά στην κατανόηση της ρύθμισης της γήρανσης των φύλλων σημαίας και παρέχουν στόχους προτεραιότητας για τη βελτίωση των χαρακτηριστικών παραμονής-πράσινου.

4.11 Ριβοφλαβίνη στα φυτά και κλιματική αλλαγή και υγεία

Οι ελλείψεις μικροθρεπτικών συστατικών είναι γνωστό ότι ταλαιπωρούν εκατομμύρια ανθρώπους στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Η ριβοφλαβίνη δρα στη μείωση του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής των νεύρων, που συμβάλλουν στους πονοκεφάλους της ημικρανίας. Η βιταμίνη είναι επίσης απαραίτητη για τις φυσιολογικές μιτοχονδριακές δραστηριότητες. Οι ημικρανίες προκαλούνται μερικές φορές από μιτοχονδριακές ανωμαλίες στον εγκέφαλο. Αν και τα μικροθρεπτικά συστατικά είναι άμεσα διαθέσιμα σε φρούτα, λαχανικά και ζωικά προϊόντα, συχνά δεν είναι εύκολα προσβάσιμα στους φτωχούς. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός πως η ριβοφλαβίνη βρίσκεται κυρίως στο κρέας και τα εμπλουτισμένα τρόφιμα, αλλά και σε ορισμένους ξηρούς καρπούς και πράσινα λαχανικά. Συχνά, τα τρόφιμα πλούσια σε μικροθρεπτικά συστατικά υποτιμώνται από εκείνους που τα χρειάζονται περισσότερο. Οι δίαιτες αυτών των εύάλωτων αποτελούνται κυρίως από υδατάνθρακες όπως ρίζες και κόνδυλοι και δημητριακά. Αναφορές από τον ΠΟΥ/Παγκόσμια Τράπεζα δείχνουν ότι περίπου δύο δισεκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως υποφέρουν από υποσιτισμό μικροθρεπτικών συστατικών (Dzomeku et al., 2020).

Πρόσφατη έρευνα (Smith and Mayers, 2019) έδειξε ότι το ρύζι που καλλιεργείται με επίπεδα διοξειδίου του άνθρακα που θα μπορούσαν να επιτευχθούν μόλις το 2050 θα μπορούσε να χάσει το 17-30% της περιεκτικότητάς του σε βιταμίνες Β. Μια νέα μελέτη από το Harvard T.H. Η Σχολή Δημόσιας Υγείας του Chan υπολογίζει τώρα ότι αυτή η τάση θα μπορούσε να θέσει δεκάδες εκατομμύρια ανθρώπους σε νέο κίνδυνο ανεπάρκειας σε κύριες βιταμίνες Β, όπως η θειαμίνη, η ριβοφλαβίνη και το φυλλικό οξύ. Η Αφρική και η Ασία, περιοχές που εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το ρύζι για τη διατροφή τους, θα επηρεαστούν περισσότερο, σύμφωνα με τη μελέτη. Κατά μέσο όρο, η αύξηση των επιπέδων διοξειδίου του άνθρακα θα μπορούσε να οδηγήσει σε επιπλέον 132 εκατομμύρια άτομα με ανεπάρκεια φυλλικού οξέος, 67 εκατομμύρια περισσότερα με ανεπάρκεια θειαμίνης και 40 εκατομμύρια περισσότερα με ανεπάρκεια ριβοφλαβίνης. Ποσοτικοποιώντας ένα μικρό μέρος της επιβάρυνσης της υγείας που σχετίζεται με αυτές τις αλλαγές, η υπολογίζεται ότι η ανεπάρκεια φυλλικού οξέος μεταξύ των μητέρων θα μπορούσε να οδηγήσει σε αύξηση 0,5% των γενετικών ανωμαλιών του νευρικού σωλήνα, που μεταφράζεται περίπου σε επιπλέον 27.900 χρόνια ζωής που χάνονται ετησίως και σε 260 περισσότερους θανάτους. κάθε χρόνο. Επειδή οι

αυξημένες συγκεντρώσεις CO₂ είναι πιθανό να μειώσουν τις βιταμίνες B σε άλλες καλλιέργειες πέρα από το ρύζι, τα νέα ευρήματα πιθανότατα υποτιμούν τις αρνητικές επιπτώσεις στην παγκόσμια υγεία.

Η κλιματική αλλαγή περιλαμβάνει ένα ευρύ σύνολο περιβαλλοντικών διεργασιών που σχετίζονται με την αύξηση του διοξειδίου του άνθρακα της ατμόσφαιρας (CO₂) και την αύξηση της παγκόσμιας θερμοκρασίας της επιφάνειας. Αυτές οι διεργασίες περιλαμβάνουν συχνότερη εμφάνιση ακραίων καιρικών φαινομένων, υποβάθμιση της κρυόσφαιρας, άνοδο της στάθμης της θάλασσας, αύξηση της υποξίας των ωκεανών, υποβάθμιση της γης, αυξημένο όζον στο επίπεδο του εδάφους και μεγαλύτερη αβιοτική και βιοτική καταπόνηση στα φυτά. Τόσο η απόδοση όσο και οι συγκεντρώσεις μικροθρεπτικών συστατικών των τροφίμων μπορεί να επηρεαστούν από την κλιματική αλλαγή και να αυξήσουν τον κίνδυνο ανεπάρκειας μικροθρεπτικών συστατικών στο γενικό πληθυσμό και ιδιαίτερα σε ευάλωτους πληθυσμούς.

Επί του παρόντος, το κοινό φασόλι καλλιεργείται από μικροκαλλιεργητές στη Ζάμπια, τη Ζιμπάμπουε, την Τανζανία, το δυτικό Μαλάουι και τη βόρεια Μοζαμβίκη. Μια μελέτη που χρησιμοποιεί το μοντέλο EcoCrop που αναπτύχθηκε από τον FAO των Ηνωμένων Εθνών προβλέπει ότι το μεγαλύτερο μέρος αυτής της περιοχής δεν θα είναι πλέον κατάλληλο για την καλλιέργεια του φασολιού μέχρι το 2050 λόγω της κλιματικής αλλαγής και των προβλεπόμενων συνθηκών ξηρασίας (Semba et al., 2022)

Σε αυτό το πλαίσιο θα πρέπει να μελετηθεί άμεσα πως οι επιδράσεις της κλιματικής αλλαγής έχουν αντίκτυπο στην ανάπτυξη του φυτού. Πως ρυθμίζονται τα γονίδια ανάλογα σε συνθήκες έλλειψης ριβοφλαβίνης, αυτό μπορεί να γίνει με τη χρήση του μεταλλάγματος *mosaic* και επίσης, πως αλλάζει η παραγωγή του μεταβολίτη σε διάφορες συνθήκες, πχ σε υπερβολικό φως, σε έλλειψη.

4.12 Μελλοντική εργασία στο μεταλλάγμα *mosaic*

Τα παραπάνω δεδομένα παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το προφίλ έκφραση *mosaic* και τη διαταραχή των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του. Μελλοντικά, περαιτέρω πειραματικοί χειρισμοί θα χρειαστεί να πραγματοποιηθούν σχετικά με την ανάλυση της τοποθέτησης του ενζύμου. Ορισμένες αναλύσεις που θα μπορούσαν να έπονται της αναζήτησης της κυτταρικής έκφρασης είναι οι ακόλουθες:

Η εκτενέστερη βιομετρική και αναπτυξιακή μελέτη του μεταλλάγματος *mosaic* θα βοηθήσει στην αποσαφήνιση του μονοπατιού της ριβοφλαβίνης στα φυτά καθώς θα μπορέσει να δώσει συγκεκριμένες ενδείξεις για πολλαπλούς φαινότυπους κατά τα διάφορα στάδια ανάπτυξης που μπορούν να συσχετίζονται με την έκφραση του υπό μελέτη ενζύμου αλλά και άλλων που αυτό μπορεί να επηρεάζει ή να επιδρά.

Γενικότερα, μια μεταγραφομική και μεταβολομική ανάλυση του μεταλλάγματος *mosaic* θα μπορούσε να ρίξει φως στις αλλαγές των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων σε σχέση με φυτά μάρτυρες, ώστε πιθανόν να συσχετισθούν με μεγαλύτερη σαφήνεια γονίδια που συνεκφράζονται. Η μεταβολομική ανάλυση από την άλλη του μεταλλάγματος θα βοηθήσει στο να ξεχωρίσουν οι αλλαγές στη ποσότητα και τη ποιότητα των μεταβολίτων.

Θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί μια συγκριτική ανάλυση αναφορικά με το σύστημα GUS που μελετήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία σε αντιδιαστολή με την υποκυτταρική διερεύνηση με GFP (Murray et al., 2004), καθώς και μια φθοριομετρική ανάλυση που θα επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό της δραστηριότητας GUS, κάτι τι οποίο δεν μελετήθηκε στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας. Συνολικά, αυτά τα αποτελέσματα θα δείξουν πώς το γονίδιο GFP και GUS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση του μονοπατιού της βιοσύνθεσης της ριβοφλαβίνης και να σχηματισθεί μια πιο ολοκληρωμένη άποψη για την ιστοειδική και υποκυτταρική τοποθέτηση του.

Συνοπτικά για το συγκεκριμένο θέμα ωστόσο, από τις έως τώρα παρατηρήσεις, θα μπορούσε να ειπωθεί πως, η έκφραση του γονιδίου λαμβάνει χώρα κυρίως στα πλαστίδια και σε ιστούς όπως τα φύλλα και στις κοτύλες.

Τέλος, Η μελέτη του προτύπου έκφρασης του γονιδίου σε διάφορους ιστούς και αναπτυξιακά στάδια, όπου συμβαίνει η ανάπτυξη της γύρης, αποτελεί σημαντικό βήμα προς την κατανόηση της ρόλου του γονιδίου αυτού. Η ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου σε διάφορους ιστούς και στάδια μπορεί να προσφέρει πληροφορίες σχετικά με το πώς το γονίδιο ρυθμίζεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της γύρης. Επιπλέον, η ανάλυση της αλληλεπίδρασης του πρωτεϊνικού προϊόντος του γονιδίου αυτού με άλλες πρωτεΐνες μέσω του συστήματος δύο υβριδίων στις ζύμες είναι μια πολύ χρήσιμη τεχνική για την ανίχνευση πιθανών πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Ενδεικτικά, η αναζήτηση της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος με άλλες πρωτεΐνες φάνηκε και στην εικόνα 24 στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων.

Λαμβάνοντας υπόψη την αξία των φλαβινών στις λειτουργίες του φυτού, ακόμη και η ελαφρά ανεπαρκής παραγωγή FMN και FAD είναι αρκετή για να προκαλέσει διαταραχές στο μεταβολισμό και την άμυνα (Murray et al., 2003).

Τέλος, δεν πρέπει να ξεχνάμε πως η μελέτη αυτή αφορά τους γενετικούς τόπους και την έκφραση των γονιδίων. Ωστόσο, για μια πιο ολοκληρωμένη άποψη θα πρέπει να μελετηθούν και οι επιγενετικοί μηχανισμοί που πιθανώς επιδρούν επηρεάζοντας την έκφραση του γονιδίου. Καταληκτικά η συνεισφορά της Βιολογίας Συστημάτων μέσω μιας ολοκληρωμένης ολιστικής ομικής ανάλυσης θα αποσαφηνίσει πλήρως το ρόλο του συγκεκριμένου γονιδιακού τόπου αλλά και της βιοσύνθεσης

Βιβλιογραφικές αναφορές

- Abu Hena Mostofa Jamal, M. *et al.* (2088) ‘Ultra-High Efficient Colony PCR for High Throughput Screening of Bacterial Genes’, *Indian Journal of Microbiology*, 57. doi: 10.1007/s12088-017-0665-1.
- Asensi-Fabado, M. A. and Munné-Bosch, S. (2010) ‘Vitamins in plants: Occurrence, biosynthesis and antioxidant function’, *Trends in Plant Science*, 15(10), pp. 582–592. doi: 10.1016/J.TPLANTS.2010.07.003.
- Averianova, L. A. *et al.* (2020) ‘Production of Vitamin B2 (Riboflavin) by Microorganisms: An Overview’, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, p. 1172. doi: 10.3389/FBIOE.2020.570828/BIBTEX.
- Bacher, A. *et al.* (2003) ‘Biosynthesis of Vitamin B2 (Riboflavin)’, <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.20.1.153>, 20, pp. 153–167. doi: 10.1146/ANNUREV.NUTR.20.1.153.
- Bacher, A. *et al.* (2001) ‘Biosynthesis of riboflavin’, *Vitamins and Hormones*, 61, pp. 1–49. doi: 10.1016/S0083-6729(01)61001-X.
- Balasubramaniam, S. and Yaplito-Lee, J. (2020) ‘Riboflavin metabolism: role in mitochondrial function’, *Journal of Translational Genetics and Genomics*, 4(4), pp. 285–306. doi: 10.20517/JTGG.2020.34.
- Balasubramaniam, S. and Yaplito-Lee, J. (2020) ‘Riboflavin metabolism: role in mitochondrial function’, *Journal of Translational Genetics and Genomics*, 4(4), pp. 285–306. doi: 10.20517/JTGG.2020.34.
- Bergkessel, M. and Guthrie, C. (2013) ‘Colony PCR’, *Methods in Enzymology*, 529, pp. 299–309. doi: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00025-2.
- Cervera, M. (2005) ‘Histochemical and fluorometric assays for uidA (GUS) gene detection.’, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 286, pp. 203–214. doi: 10.1385/1-59259-827-7:203/FIGURES/3.
- Davuluri, R. V *et al.* (2003) ‘AGRIS: Arabidopsis Gene Regulatory Information Server, an information resource of Arabidopsis cis-regulatory elements and transcription factors’.
- Dzomeku, B. M. *et al.* (2020) ‘Climate Change Enhanced Carotenoid Pro-Vitamin A Levels of Selected Plantain Cultivars’, *Plants*, 9(4). doi: 10.3390/PLANTS9040541.
- Fassbinder, F., Kist, M. and Bereswill, S. (no date) ‘Structural and functional analysis of the riboflavin synthesis genes encoding GTP cyclohydrolase II (ribA), DHBP synthase (ribBA), riboflavin synthase (ribC), and riboflavin deaminase/reductase (ribD) from Helicobacter pylori strain P1’. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09339.x.
- X.Fischer, M. and Bacher, A. (2006) ‘Biosynthesis of vitamin B2 in plants’, *Physiologia Plantarum*, 126(3), pp. 304–318. doi: 10.1111/J.1399-3054.2006.00607.
- X.Fischer, M. *et al.* (2005) ‘Evolution of vitamin B2 biosynthesis: riboflavin synthase of Arabidopsis thaliana and its inhibition by riboflavin’, *Biological Chemistry*, 386(5), pp. 417–428. doi: 10.1515/BC.2005.050.
- Fischer, M. *et al.* (2004) ‘Evolution of vitamin B2 biosynthesis: Structural and functional similarity between pyrimidine deaminases of eubacterial and plant origin’, *Journal of Biological Chemistry*, 279(35), pp. 36299–36308. doi: 10.1074/JBC.M404406200.

- Franco-Zorrilla, J. M. *et al.* (2014) 'DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(6), pp. 2367–2372. doi: 10.1073/PNAS.1316278111.
- Gerdes, S. *et al.* (2012) 'Plant B Vitamin Pathways and their Compartmentation: a Guide for the Perplexed', *Journal of Experimental Botany*, 63(15), pp. 5379–5395. doi: 10.1093/JXB/ERS208.
- Gupta, R. A. *et al.* (2010) 'Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis', *Nature*, 464(7291), pp. 1071–1076. doi: 10.1038/nature08975.
- Herz, S., Eberhardt, S. and Bacher, A. (2000) 'Biosynthesis of riboflavin in plants. The ribA gene of *Arabidopsis thaliana* specifies a bifunctional GTP cyclohydrolase II/3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase', *Phytochemistry*, 53(7), pp. 723–731. doi: 10.1016/S0031-9422(00)00013-3.
- Hiltunen, H. M. *et al.* (2012) 'Arabidopsis RIBA proteins: Two out of three isoforms have lost their bifunctional activity in riboflavin biosynthesis', *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), pp. 14086–14105. doi: 10.3390/IJMS131114086.
- Hiltunen, H. M. *et al.* (2012) 'Arabidopsis RIBA Proteins: Two out of Three Isoforms Have Lost Their Bifunctional Activity in Riboflavin Biosynthesis', *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), p. 14086. doi: 10.3390/IJMS131114086.
- Jayaprakash, V. *et al.* (2008) 'Pyrazoline-based mycobactin analogs as MAO-inhibitors', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(24), pp. 6362–6368. doi: 10.1016/J.BMCL.2008.10.084.
- Joosten, V. and van Berkel, W. J. (2007) 'Flavoenzymes', *Current Opinion in Chemical Biology*, 11(2), pp. 195–202. doi: 10.1016/J.CBPA.2007.01.010.
- Joosten, V. and van Berkel, W. J. (2007) 'Flavoenzymes', *Current Opinion in Chemical Biology*, 11(2), pp. 195–202. doi: 10.1016/J.CBPA.2007.01.010.
- Jordan, D. B. *et al.* (1999) 'Plant riboflavin biosynthesis. Cloning, chloroplast localization, expression, purification, and partial characterization of spinach lumazine synthase', *Journal of Biological Chemistry*, 274(31), pp. 22114–22121. doi: 10.1074/JBC.274.31.22114.
- Jordan, D. B. *et al.* (1999) 'Plant Riboflavin Biosynthesis CLONING, CHLOROPLAST LOCALIZATION, EXPRESSION, PURIFICATION, AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF SPINACH LUMAZINE SYNTHASE*', *Journal of Biological Chemistry*, 274, pp. 22114–22121. doi: 10.1074/jbc.274.31.22114.
- Kanehisa, M. *et al.* (2020) 'KEGG: integrating viruses and cellular organisms', *Nucleic Acids Research*, 49. doi: 10.1093/nar/gkaa970.
- Kanehisa, M. and Sato, Y. (2020) 'KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences', *Protein Science*, 29(1), pp. 28–35. doi: 10.1002/PRO.3711.
- Katherine Mejía-Guerra, M. *et al.* (no date) 'Core Promoter Plasticity Between Maize Tissues and Genotypes Contrasts with Predominance of Sharp Transcription Initiation Sites OPEN'. doi: 10.1105/tpc.15.00630.
- Kaurilind, E., Xu, E. and Brosché, M. (2015) 'A genetic framework for H₂O₂ induced cell death in *Arabidopsis thaliana*', *BMC Genomics*, 16(1), pp. 1–17. doi: 10.1186/s12864-015-1964-8.
- Lichtenberg, J. *et al.* (2009) 'BMC Genomics The word landscape of the non-coding segments of the *Arabidopsis thaliana* genome', *BMC Genomics*, 10, p. 463. doi: 10.1186/1471-2164-10-463.
- Liu, S. *et al.* (2020) 'Production of riboflavin and related cofactors by biotechnological processes', *Microbial Cell Factories* 2020 19:1, 19(1), pp. 1–16. doi: 10.1186/S12934-020-01302-7.

- Lorrain, S. *et al.* (2003) 'Lesion mimic mutants: Keys for deciphering cell death and defense pathways in plants?', *Trends in Plant Science*, 8(6), pp. 263–271. doi: 10.1016/S1360-1385(03)00108-0.
- Luo, Y., Wang, Q., Bai, R., Li, R., Chen, L., Xu, Y., Zhang, M. and Duan, D., 2020. The effect of transcription factor MYB14 on defense mechanisms in *Vitis quinquangularis*-Pingyi. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), p.706.
- Martin, T. *et al.* (1992) 'The GUS reporter system as a tool to study plant gene expression.', *GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression.*, pp. 23–43.
- Murray, F. *et al.* (2004) 'Comparison of Agrobacterium-mediated transformation of four barley cultivars using the GFP and GUS reporter genes', *Plant Cell Rep*, 22, pp. 397–402. doi: 10.1007/s00299-003-0704-8.
- Nie, S. and Xu, H. (2016) 'Riboflavin-Induced Disease Resistance Requires the Mitogen-Activated Protein Kinases 3 and 6 in *Arabidopsis thaliana*', *PLOS ONE*, 11(4), p. e0153175. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0153175.
- Ogata, Y., Sakurai, N., Aoki, K., Suzuki, H., Okazaki, K., Saito, K. and Shibata, D., 2009. KAGIANA: an Excel-based tool for retrieving summary information on *Arabidopsis* genes. *Plant and cell physiology*, 50(1), pp.173-177.
- Overmyer, K. *et al.* (2000) 'Ozone-sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death', *Plant Cell*, 12(10), pp. 1849–1862. doi: 10.1105/tpc.12.10.1849.
- Overmyer, K. *et al.* (2005) 'Ozone-Induced Programmed Cell Death in the *Arabidopsis* radical-induced cell death1 Mutant', *Plant Physiology*, 137(3), p. 1092. doi: 10.1104/PP.104.055681.
- Palaniswamy, S. K. *et al.* (2006) 'AGRIS and AtRegNet. A Platform to Link cis-Regulatory Elements and Transcription Factors into Regulatory Networks', *Plant Physiology*, 140(3), pp. 818–829. doi: 10.1104/PP.105.072280.
- Pandey, G. K. *et al.* (2015) 'ROS mediated MAPK signaling in abiotic and biotic stress- striking similarities and differences'. doi: 10.3389/fpls.2015.00769. Petrov, V. *et al.* (2015) 'ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants'. doi: 10.3389/fpls.2015.00069.
- Rao, A. V. and Balachandran, B. (2002) 'Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases', *Nutritional Neuroscience*, 5(5), pp. 291–309. doi: 10.1080/1028415021000033767.
- Rawat, R. *et al.* (2011) 'An FMN hydrolase of the haloacid dehalogenase superfamily is active in plant chloroplasts', *Journal of Biological Chemistry*, 286(49), pp. 42091–42098. doi: 10.1074/jbc.M111.260885.
- Sa, N. *et al.* (2016) 'Identification and characterization of the missing phosphatase on the riboflavin biosynthesis pathway in *Arabidopsis thaliana*', *The Plant Journal*, 88(5), pp. 705–716. doi: 10.1111/TPJ.13291.
- Salazar-Parra, C. *et al.* (2012) 'Climate change (elevated CO₂, elevated temperature and moderate drought) triggers the antioxidant enzymes' response of grapevine cv. Tempranillo, avoiding oxidative damage', *Physiologia Plantarum*, 144(2), pp. 99–110. doi: 10.1111/j.1399-3054.2011.01524.x.
- Semba, R. D. *et al.* (2022) 'The Potential Impact of Climate Change on the Micronutrient-Rich Food Supply', *Advances in Nutrition*, 13(1), pp. 80–100. doi: 10.1093/ADVANCES/NMAB104.

Smith, M. R. and Myers, S. S. (2019) ‘Global Health Implications of Nutrient Changes in Rice Under High Atmospheric Carbon Dioxide’, *GeoHealth*, 3(7), pp. 190–200. doi: 10.1029/2019GH000188.

Tang, J. *et al.* (2017) ‘Severe riboflavin deficiency induces alterations in the hepatic proteome of starter Pekin ducks’, *British Journal of Nutrition*, 118, pp. 641–650. doi: 10.1017/S0007114517002641.

Tao, Y., Wang, F., Jia, D., Li, J., Zhang, Y., Jia, C., Wang, D. and Pan, H., 2015. Cloning and functional analysis of the promoter of a stress-inducible gene (*ZmRXO1*) in maize. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33, pp.200-208.

Teige, M. *et al.* (2004) ‘The MKK2 Pathway Mediates Cold and Salt Stress Signaling in Arabidopsis lar metabolism to a changing environment. In fact, due to their sessile life cycle, plants must respond and protect themselves from all forms of environmental biotic and’, *Molecular Cell*, 15, pp. 141–152.

Tian, C. *et al.* (2014) ‘An organ boundary-enriched gene regulatory network uncovers regulatory hierarchies underlying axillary meristem initiation’, *Molecular Systems Biology*, 10(10), p. 755. doi: 10.15252/MSB.20145470.

Turck, D. *et al.* (2017) ‘SCIENTIFIC OPINION Dietary Reference Values for riboflavin EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA)’, *EFSA Journal*, 15(8), p. 4919. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4919.

Turner, J. G., Ellis, C. and Devoto, A. (2002) ‘The jasmonate signal pathway’, *Plant Cell*, 14(SUPPL.), pp. 153–164. doi: 10.1105/tpc.000679.

Wang, C., Chen, N., Liu, J., Jiao, P., Liu, S., Qu, J., Guan, S. and Ma, Y., 2022. Overexpression of *ZmSAG39* in maize accelerates leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, 98(3), pp.451-463.

Yang, K., Li, C.Y., An, J.P., Wang, D.R., Wang, X., Wang, C.K. and You, C.X., 2021. The C2H2-type zinc finger transcription factor *MdZAT10* negatively regulates drought tolerance in apple. *Plant Physiology and Biochemistry*, 167, pp.390-399.

Yilmaz, A. *et al.* (no date) ‘AGRIS: the Arabidopsis Gene Regulatory Information Server, an update’. doi: 10.1093/nar/gkq1120.

Yin, Y., Chen, L. and Beachy, R., 1997. Promoter elements are required for phloem-specific gene expression from the RTBV promoter in rice. *The Plant Journal*, 12(5), pp.1179-1188.

Zhang, S. *et al.* (2009) ‘Riboflavin-induced priming for pathogen defense in *Arabidopsis thaliana*’, *Journal of Integrative Plant Biology*, 51(2), pp. 167–174. doi: 10.1111/J.1744-7909.2008.00763.X.

Zipfel, C. (2008) ‘Pattern-recognition receptors in plant innate immunity’, *Current Opinion in Immunology*, 20(1), pp. 10–16. doi: 10.1016/J.COI.2007.11.003.

Συστημάτων, Π. Μ. Σ. Β. (2019) ‘« Ταυτοποίηση της μετάλλαξης mosaic του φυτού *Arabidopsis thaliana* »’.

Παράρτημα

Το γονίδιο και ο υποκινητής του

Παρακάτω βρίσκεται η αλληλουχία του mRNA του γονιδίου ενδιαφέροντος AT4G21470

>Chr4 Chr4:11431104..11433322 (+ strand) class=mRNA length=2219

```
ACGTCCTTCTCCGCCCTTCTTATTCATTTCTACTCTGCTGCGTTATTTCTCCGTCGTCCTCAACT
CATCGCCGGCGTTTACCATCCGCTAGATCCGTCGCTCTCCGGTCGACTATTTATATGGAATC
GTAAATTTACAGACACTAATAAGAATAGTTTGACAAAATCTGTAGCTGGAATAATGTCGATG
AGCAATTCCTTGAAAAAGCTCTCTTCTTGTGTTCTTATTGATCTCGATGGTACCTTAATCAAC
ACAGGTAACCTTAAAACCTCAATAGATTGTTTCAATTTCTGTTTATATAGCTTGGAAATTCGAAT
TTGATGTTTTTTTTAAAATTCATTGTAGATGGTGTGTTGGTGACATTTTGAGGAAATACTTGT
GTAAATATGGTAAACAGTGGGATGGAAGAGAATCATTGAAAATAGTTGGCAAAACTCCAGT
AGAAGCTGCTACTACTATTGTTGAAGATTATGAACTTCCTTGTAAGTTGATGAATTC AATTC
TGAATTCACCCTTTGTCTCTGCTCAGTAAGTTACCATAAAAAAATCGATCTTTGTCCCTTA
TTGTTGTAATCTTCATATTGTTGATTACCTCCGGTTTTGTAGGATGGACAAAATCAAATCTCT
TCCTGGTGCCAATAGGTTGATTTCGACATTTGAAGTGTCATGGAGTACCTGTGGCTTTGGCTTC
CAATTCCTCAAGAGCAAATATTGAATCCAAAATTTTCATATCATGAAGGTTTGT TTTATATGAA
ATGTTGTTACTCAATGCATAAGCTTGTATAGAGGTAAACTTGTTTTATGAAAATGGTTTCACT
TTTGTGTAGGGTGGAAAGGAATGCTTCTCGGTTATTGTTGGTAGTGATGAAGTCTCTAAAGGA
AAGCCTTCTCCTGATATGTAAGATCCATCTCTTGTACCCATTTGTGGTTTCATCTATTGATTC
CAATTAACAATGTCTGGTTAATGACAATGATCATATTTGTAAAAAGTTTTCTCGAAGCAGC
GAAAAGATTGAAGAAAGATCCAGCTGACTGTTTGGTTATTGAAGATTCTGTGTAAGTCTTAC
TTCTAGAGTATCGTTTTGCTGTTGTGTGTTTGATTCAATTCCTACTAATAGTTGTTTGAATGGT
AGGCCTGGTGTTATGGCTGGTAAAGCTGCTGGGACAAAAGTGATTGCTGTTCCCTTCTCTGCC
TAAGCAAACACATCTTTATACATCTGCAGATGAAGTCATCAATTCTCTACTCGACATAAGAC
TTGAAAATGGGGACTTCCTCCATTCCAAGACTGTAAAAATTCACTCATGAACTCTGTTCAA
TACTCCTCTTCCTTGATAACATGTTTCATCTCGGTAATGAGACTTTTATACTTGT AATTTGTAT
TTGCAGGGATAGAGAACACTTTACCAATTGATCCATGGCATAATTGGAGGTCCAGTCATCAA
GGATTTGGCCGTGGCTCTAAAGTACTCGGAATCCCCACCGGTCAGTGTACAAACCTCATTGA
ACTCAGCTCTTTTACATCATTATATATGGCTTCTTTTCTTATCGCTGCATTTGTTTTGTTTTCA
GCTAACTTGTCAACAAAGGATTATGCGGATGAGCTAGTGGAACATCCTTCGGGAGTGTACTT
TGGTTGGGCAGGCTTGGCAAAGAGAGGTGCTTTAAAATGGTCATGAGCATTGGTTGGAATC
CTTATTTCAATAACAAGGAGAAAACCTATTGTGAGTTCATAAAAAGTTCAAACAAAATCTTA
CTCCAGTGGTTGCTTCTTTAACTTTAGCTTTTGTATATAGGAACCATGGCTGCTTCACGATTT
CACTGAGGATTTCTACGGAGAAGAGCTACGTCTTATTATCGTTGGCTATATACGCCCTGAGG
TTATTATAACGTTATCATCATTCTTCATATGACTCCTTTGTGTAATGCAATATTCCTTGT
TTGCTCATATTGTTTGTGTTTGGCTAGGCTAATTTCTCTTCACTGGAGAGTCTCATTGCAAAGA
TTCACGAGGACAGGGAAGTTGCAGAGAAAGCTCTTGATCTTCCTTCGTATGCTAAGTTTAAG
GGTGATCCTTATCTGACTAAATGATAGAAGCTTTTATGAAAAGAATTCAAACACTTGGATTT
GTAATTTCATAACTCAAATCAGACTTGCATTGTTCTTTAGTACTATCAGCCTCTTTGATTTGA
TTAACTAGATAACAACCTTCGTTA
```

Summary of properties of promoter region At4g21470

Promoter ID	Gene Description	Chromosome Location	Promoter Sequence	Promoter Type	Promoter Source	Regulatory Network
At4g21470	protein	Chr4:11428292 - 11431134	Get Sequence	Predicted	TAIR	...

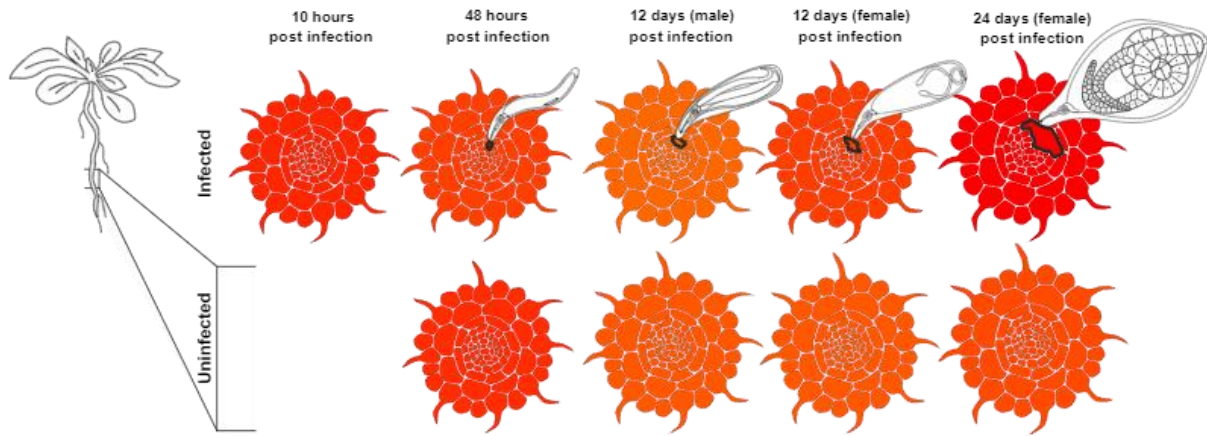
Η ακολουθία του υποκινητή του γονιδίου παρατίθεται ακολούθως:

>At4g21470

TTCATGTAAAAAAGAAATGTAAACTTGGGTTTGATGATAATGAATTGTTTCATGTTAAGGA
CTAATAAAACAGAGAAGAAAGTGTACTAAAATCGAAATTTGAGCTCTCCAATTACTAAA
TCGGTGCTAAATGAACCGGTCGGTCGTTTCTATATTTGATTCGTTTCGGTTTATCCTTTAA
CCGGTCGAACCGAAGCTTCTTTTGTTCGTATGAAGAAAATAAAAATCCAAATCTCTCTCT
GGTACACCATGAGAGGAGCTCTGTTTCAGAAATGCATCTCTCTGCGCTCGCAGAATCATTC
TTTCTTCTAGGATCTCCCCCAATGTTCCCTTCTCACTCCAATCGCCGCTCCGGCTCCTC
CCAAATTCAGATTTTTCAGTTCGGAATCCGGTGAGAATCGACTACTGCCACTGAGTCTT
CGCCGACTGATTCATCCGATAAGAAGGATCTCGTTGTAAAGGATGTCAGCAACAAAGGTA
ACAGACTCTATCCTCTCTTCAAGCTTGTGGTTACCTCACACTTGAAATGGCCTTGTAT
TAGTTGAAATGTGTGAGTCTAATTCTCATCTCGCCATTTCTGAATGCCTCACAGTTTTCA
ATTGATCCTTCGATATAAGATTTCGTAGCTTCTTATCTCCTGAACTACTAGGTAATCGTTT
GAAATTGACTTTATATGTTGGATTTTGTGGTCTCAGAGCTTAAAAGCCGTATAGACAAGT
CTTTCAATGAGGGTAATGAAGATGCTTTACCTGGAGTTATTGAAGCACTTCTACAGAGAA
GACTTGTAGACAAACACGCAGAGACTGATGATGAATTGATGGAAAAAATCGAGAGTCTAC
CTTTCAAAGATGATGTCAAGGATGAAGATTTTGAATCCGATTTTCGAAGAAGCGCATTCTA
CTGACGAAGAACTTGAGGATTTGTACAACCTCTCCCGAGTATGTAGCTGAAAAGATGAGGA
AGAAAGAATTTTTCAACATGGACGATAACAAGTGGGATCACATGATTAGAGAAGGTATCC
AACATGGCTGTCTTACCGATACTAAACAATGCGAGGAGATTCTCGAGGATATGCTCAAAT
GGGACCAGCTTCTTCCCTGGTAATGCTCTTTTATTTTTCAATCTTCCCGTTCATCGACTCA
CATCCTTAGACATAGATTAGGTTGATTAATAGACTATTGTGCCTCGTTATAGCTAAACAC
ACTCTCTTAGTGGAATCTCTTTTGTAGTTAACCTTTCTATTTGGATTTTAAATGAATCA
TGGTAGTAGAACCATCTTCTTTTCTTAACTCTTTCAAGGTAATGTAATGTAATGTCGGATTT
GTTGCTTCTCGGATCAGTAGGGCTGTTTATAGAGAATATATTGGTTTGTTCCTGTTATGCGT
ATGTATGAACATCCTCTAACTGTGTATCTTCATTCAGATGACTTGAAGAAAAAAGTTGAA
GCAAAGTTTAAATGAGCTCGGGGATATGTGTGAAAGAGGTGAAATTGAGGCCGAAGCAGCT
TATGAGCTTTTCAAGGAATTTGAAGATGAGATGGTAATTCAGTATGGGGATCAGATGGAA
GCTGAGGGTCTCCCCAATTTGGTGAAACAGATACTTCTGACAGGAATACTGACTTGGAT
GATCCCTCCGGTAAAGGCCCAATCCTCAGGTGGCAATCAAGGATAGTTTTTGTCTCTGGA
GGTATGCGTGGCATCCAAAGAACAGGAAAGTTAAAATGTCTGTTACAGTGAAAGAGCTT
GGGCTCTCAAATCATCAGGCTAAAAGGCTAAGGGAACCTTGTGGGAAAAAGATAACCATTCA
GGGAAAGATGAGCTTACAATCACCTGCGAGAGGTATATAAACTATAAATCTTAAAGCTTTT
CGCGAGACAAGAATGTTGAATCATGTAATGTTTTTGTCTGTACAGGTTTGAACACCGA
GAAGAAAACAGGAAAGACTGCTTGAGAACTCTTTACGGGTTGATAGAGGAAGCTGGGAAA
GCCAACAAGATCGCTGAAGACATAAGAATTCATATGTAAAACAGAGACTCCGAGCCAGT
CCAGCTTTTATGCAGAACTACAAGCCAAGATCATAAGGTCTAAAGAATCAAATGCCATC
AACGCTTGAAAAAACTTTTCCCGGTTTCGCGCCTTCTTCTTGTCTCACCAAATAATCTG
TGGATCGTCTTCTTTTGGCAATCATTTGATCCGGTACGGGTTTTTCAGATCGATGAAGAAT

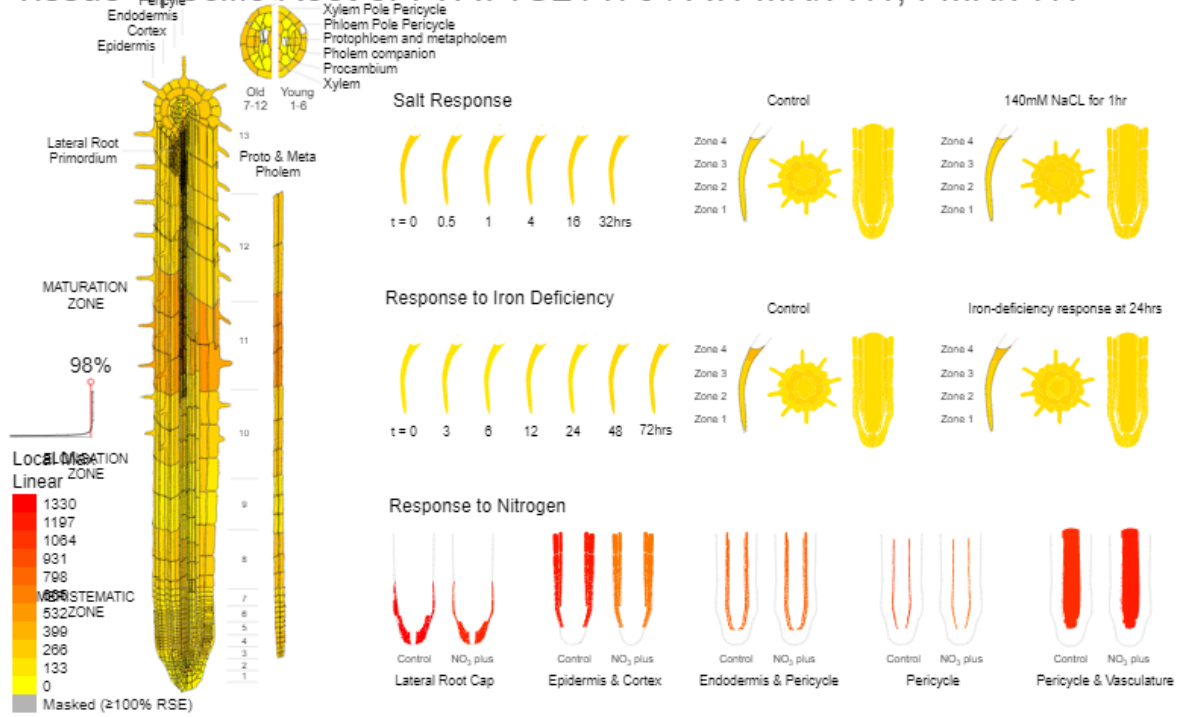
CTTTGATGGTAACTCCTATTTTAGTTTGGTTTGCTTCTTGTATCTCATGAAGACATGAAC
CTTGGCTGTGCTGTTGGTAACTCCATTTGTCTTCGTCGGGAAACTATAAACAGAACAGTC
CGACCACTTTTTTCATGCTAACTTCTAGATTCATAATGCAATGTTGGTAAAAATAGACAAT
GAATGAACTTTTTTCATGTATAAAAAATATGGAACTTGGGGTTGATAATGAATTGTTCA
TGTTAAGACTAAAATAAAAAACAGAAGAGGGTGCTTGTGTGGTTAGTCTCAATTGTTAAA
TCAACAATTAAGTTCTCCGATTAGGCGTTGAATTAACCGGTCGCCCGTTTTTAATTTTCA
TCGTTTCGATTTTCAACTTAACCTGTCCACCAGAAGGTCCTTTTGTGCCTAATTTTGATG
AAATGTCGTCATTTTCGTCGTTGAAGCTACAACACAAAATACAAAACGTTGTAGTTAGATT
GCTGAATCTCTTTGTACCGGTCAAACCTCGGTCATACCGAGTATCAATCCGAATGATCCGG
TAGGACCGGGATTTTAATTAGGAATCCGAATCTCTAAATTCCAGATGCTACCTTATACGT
GTACGTCTTCTCCGCCCTTCTT

Plant AT4G21470 expression levels



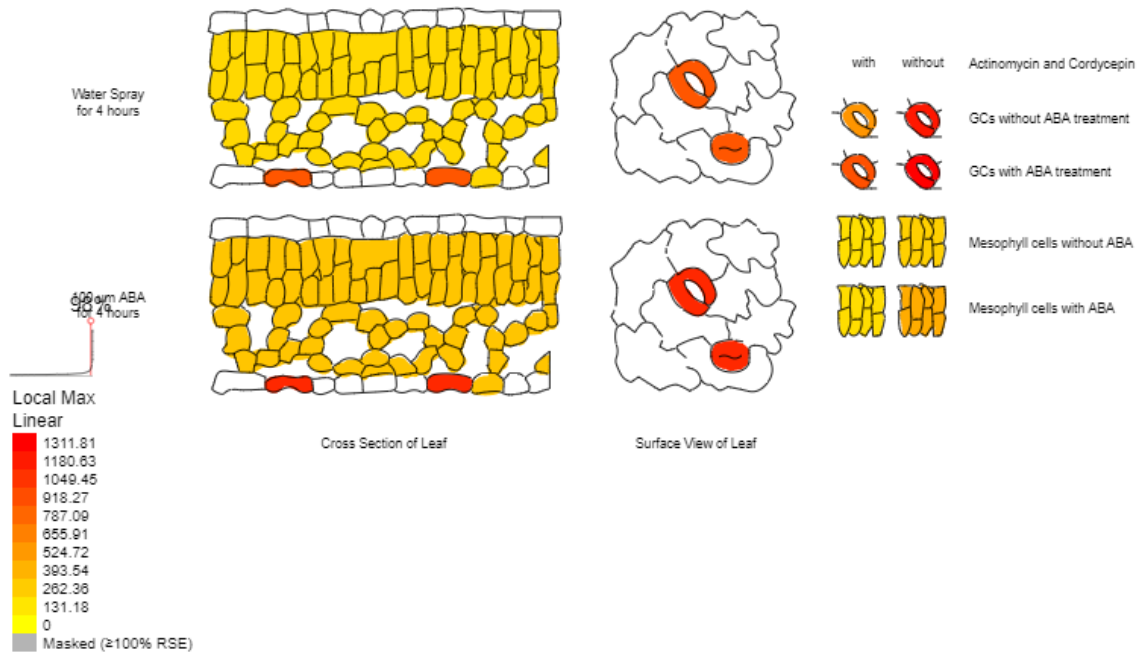
This image was generated with the Tissue Specific Root eFP at dat.lutro.umh.ca/eplant by Vraese et al. 2017

Tissue Specific Root eFP: AT4G21470 / ATFMN/FHY, FMN/FHY

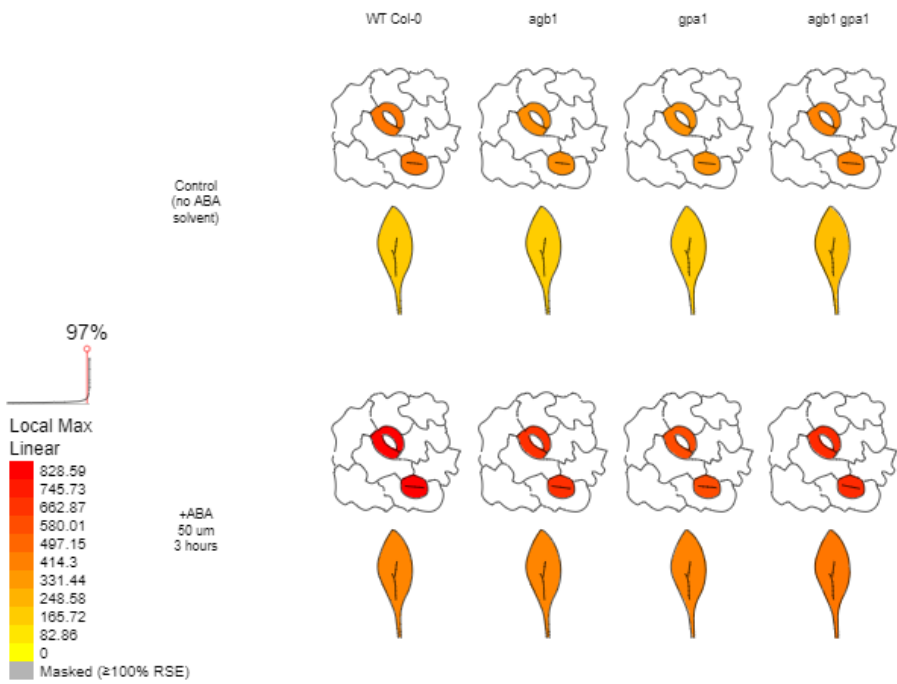


This image was generated with the Tissue Specific Guard And Mesophyll Cells eFP at dat.lutro.umh.ca/eplant by Vraese et al.

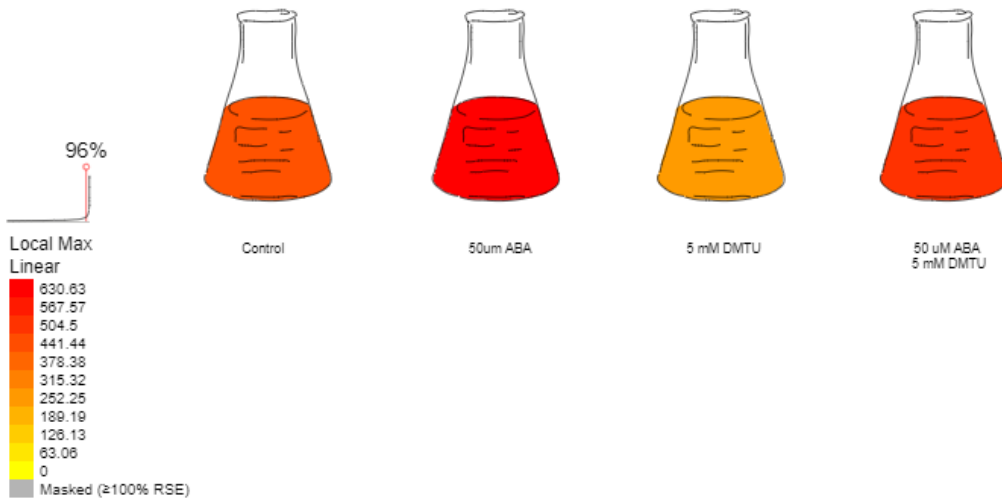
Tissue Specific Guard And Mesophyll Cells eFP: AT4G21470 / ATFMN/FHY



This image was generated with the Guard Cell mutant and wild type Guard Cell ABA response eFP: AT4G10310.01
Guard Cell Mutant And Wild Type Guard Cell ABA Response eFP: AT4G10310.01

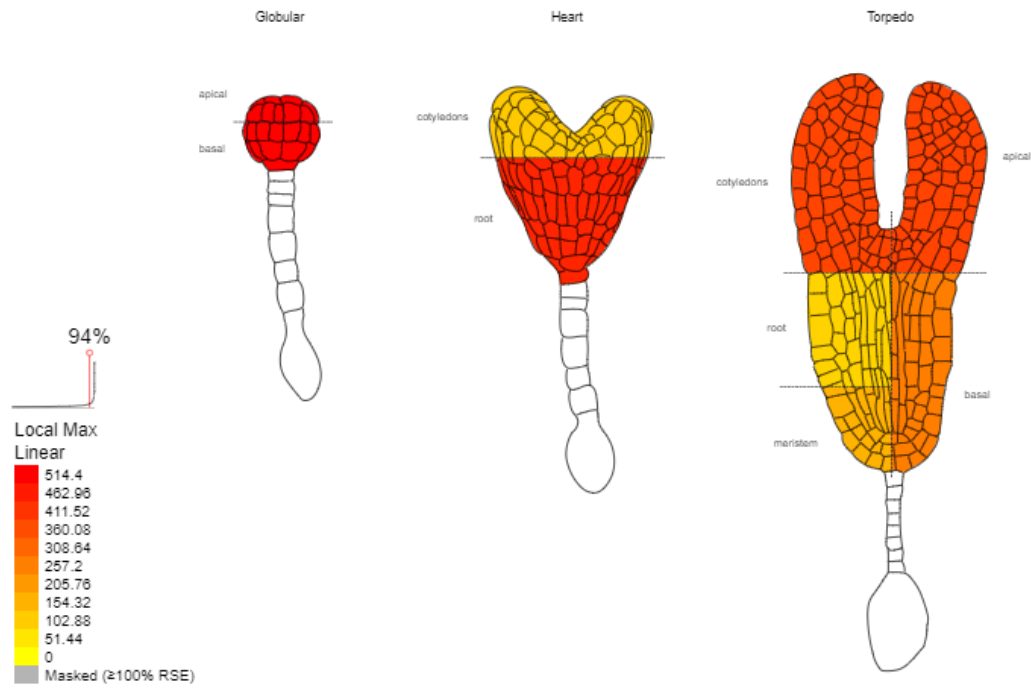


This image was generated with the Guard Cell Suspension Cell ABA Response With ROS Scavenger eFP: A
Guard Cell Suspension Cell ABA Response With ROS Scavenger eFP: A



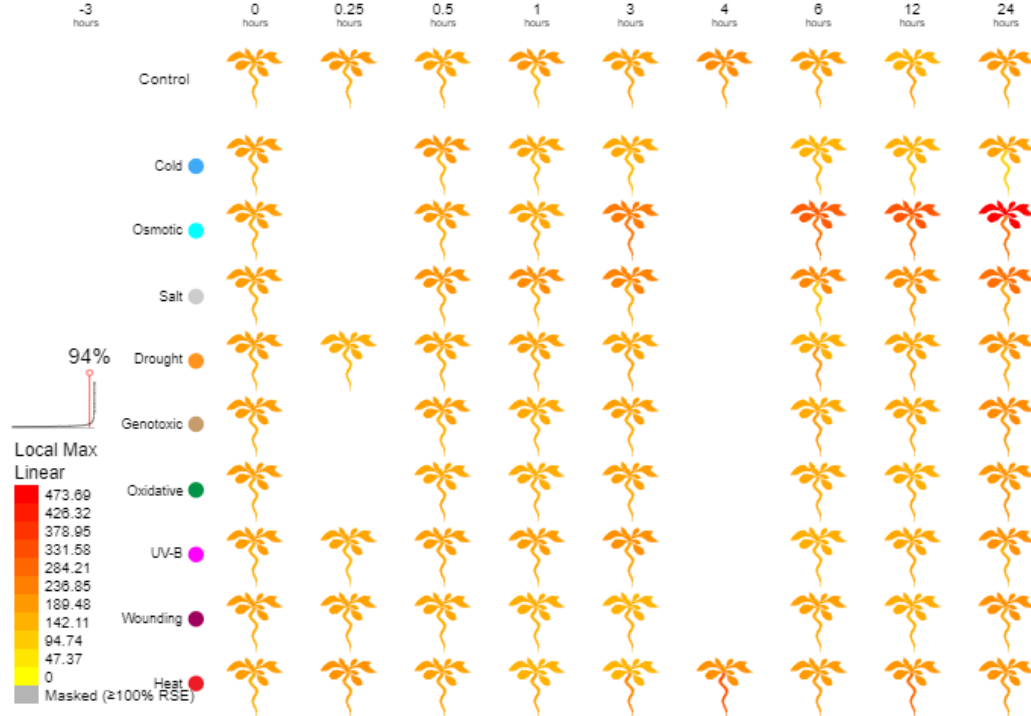
This image was generated with the Tissue Specific Embryo Development eFP at arabidopsis.careplant.org by Waese et al.

Tissue Specific Embryo Development eFP: AT4G21470 / ATFMN/FHY, FI



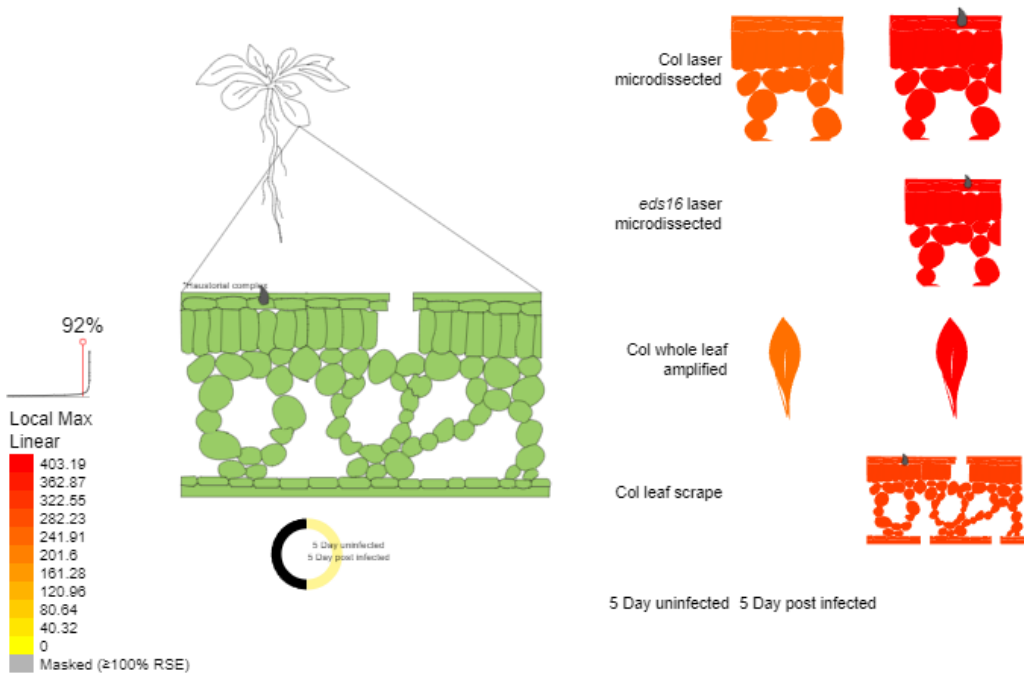
This image was generated with the Abiotic Stress eFP at arabidopsis.careplant.org by Waese et al. 2017

Abiotic Stress eFP: AT4G21470 / ATFMN/FHY, FMN/FHY



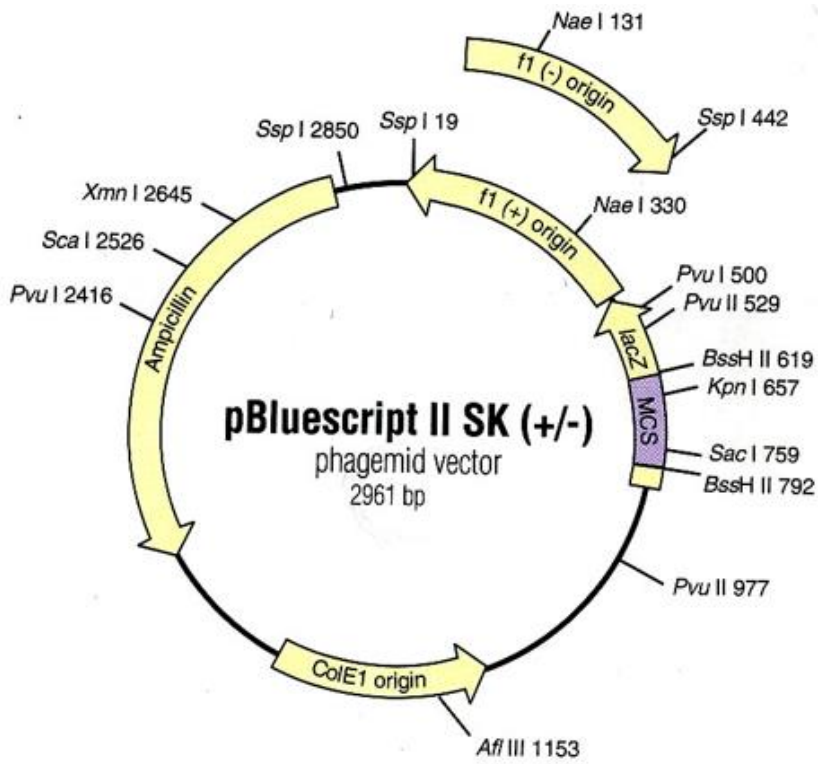
This image was generated with the Biotic Stress Colocalization tool at bit.ly/biostress, developed by Waese et al. 2017

Biotic Stress *Golovinomyces orontii* eFP: AT4G21470 / ATFMN/FHY, FMI



Πλασμιδιακοί φορείς

Πλασμιδιακός φορέας pBluescript II SK-



Πλασμιδιακός φορέας pGPTV

