

**Μελέτη των μοριακών και
βιοχημικών μηχανισμών
προσαρμογής των μικροφυκών
σε αβιοτικές καταπονήσεις**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
Αικατερίνη Κωλέττη**

**Επιβλέπων καθηγητής:
Εμμανουήλ Φλεμετάκης**

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
& ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS
SCHOOL OF FOOD, BIOTECHNOLOGY
& DEVELOPMENT
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
LABORATORY OF MOLECULAR BIOLOGY

Διδακτορική Διατριβή

Μελέτη των μοριακών και βιοχημικών μηχανισμών προσαρμογής
των μικροφυκών σε αβιοτικές καταπονήσεις

Αικατερίνη Κωλέττη

Επιβλέπων Καθηγητής:

Εμμανουήλ Φλεμετάκης, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Εμμανουήλ Φλεμετάκης, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Ανδρέας Ρούσσης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.



**ΑΘΗΝΑ
2024**

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
& ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS
SCHOOL OF FOOD, BIOTECHNOLOGY
& DEVELOPMENT
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
LABORATORY OF MOLECULAR BIOLOGY

Διδακτορική Διατριβή

Μελέτη των μοριακών και βιοχημικών μηχανισμών προσαρμογής
των μικροφυκών σε αβιοτικές καταπονήσεις

Study of the molecular and biochemical adaptation mechanisms
of microalgae to abiotic stresses

Αικατερίνη Κωλέττη

Επταμελής εξεταστική επιτροπή:

Εμμανουήλ Φλεμετάκης, Καθηγητής Γ.Π.Α. (επιβλέπων)

Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Ανδρέας Ρούσσης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.

Κοτζαμπάσης Κυριάκος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Νικόλαος Λάμπρου, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Δημήτριος Βλαχάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Γεράσιμος Δάρας, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

Μελέτη των μοριακών και βιοχημικών μηχανισμών προσαρμογής των μικροφυκών σε αβιοτικές καταπονήσεις

Τμήμα Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μικροφύκη συναντώνται σε όλα τα υδάτινα περιβάλλοντα του πλανήτη και συχνά αντιμετωπίζουν συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης στα φυσικά ενδιαίτηματά τους. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτύξει κατάλληλους μηχανισμούς προσαρμογής στις οξειδωτικές συνθήκες, οι οποίοι σε πολλές περιπτώσεις είναι μοναδικοί για κάθε είδος. Η μελέτη και κατανόηση τους μπορεί να προσφέρει πολύτιμες γνώσεις για την αξιοποίηση τους στο μεταβολικό χειρισμό των μικροφυκών. Στην παρούσα διατριβή, αξιοποιήθηκαν -ομικές τεχνολογίες, συμπεριλαμβανομένων των RNAseq, GC-MS και GC-FID, προκειμένου να διερευνηθούν οι μηχανισμοί προσαρμογής τριών ειδών μικροφυκών, των *Tetraselmis chuii*, *Chlorella variabilis* και *Chlamydomonas reinhardtii*. Η έκθεση του *T. chuii* σε 0.5-mM H₂O₂ οδήγησε σε μειωμένη βιωσιμότητα των κυττάρων, ενώ η εφαρμογή υψηλότερων συγκεντρώσεων προκάλεσε δραστική μείωση. Επίσης, μετά από 1 ώρα έκθεσης η φωτοσυνθετική ικανότητα (Qy) επηρεάστηκε αρνητικά και η μείωση εντάθηκε μετά από 6 ώρες συνεχούς καταπόνησης. Ωστόσο, το *T. chuii* εμφάνισε ταχεία απόκριση στην επαγόμενη από H₂O₂ οξειδωτική καταπόνηση, οδηγώντας σε σημαντικές τροποποιήσεις στο μεταγραφομικό και μεταβολομικό προφίλ του εντός της πρώτης ώρας. Η ροή άνθρακα και ενέργειας ήταν μεταξύ των κυτταρικών λειτουργιών που επηρεάστηκαν δυσμενώς, με το γονίδιο *psbQ* που σχετίζεται με τη φωτοσύνθεση να μειώνει την έκφραση του κατά 2.4 φορές, την πυροσταφυλική κινάση να μειώνεται 1.5 φορά και την περιεκτικότητα σε ουρία να μειώνεται 3 φορές. Η παρατεταμένη έκθεση σε H₂O₂ είχε υψηλό ενεργειακό κόστος, παρεμποδίζοντας τις προσπάθειες για την ενίσχυση του μεταβολισμού του άνθρακα, όπως υποδεικνύεται από την αύξηση της έκφρασης των *PetC* και *PetJ* που σχετίζονται με τα φωτοσυστήματα κατά περισσότερο από 2 φορές. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα, ενώ το *T. chuii* ανταποκρίνεται γρήγορα στην οξειδωτική καταπόνηση, η παρατεταμένη έκθεση μπορεί να έχει επιζήμια αποτελέσματα στις κυτταρικές του λειτουργίες. Παρόμοια εικόνα εμφάνισε και το μικροφύκος *C. variabilis*, για το οποίο ωστόσο χρειάστηκε εφαρμογή 2-mM H₂O₂ για την επαγωγή της καταπόνησης. Έκθεση του συγκεκριμένου μικροφύκου στην καταπόνηση για 1 ώρα οδήγησε σε μειωμένη βιωσιμότητα των κυττάρων και πτώση της φωτοσυνθετικής ικανότητας. Τα μεταγραφομικά και μεταβολομικά προφίλ επηρεάστηκαν επίσης, σε μια προσπάθεια διατήρησης της κυτταρικής ομοιόστασης. Η παρατεταμένη έκθεση των καλλιεργειών σε H₂O₂ για 6 ώρες είχε σημαντικά αρνητική επίδραση στα κύτταρα του *C. variabilis*. Το μικροφύκος-μοντέλο *C. reinhardtii* χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση μιας ανάλυσης σε βάθος του ρόλου του CrSBD1, ενός ομόλογου γονιδίου της SBP, στην απόκριση στην οξειδωτική καταπόνηση. Οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν το σελήνιο (SBPs) αντιπροσωπεύουν μια ευρέως διαδεδομένη οικογένεια πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε διάφορες αποκρίσεις σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις, αν και ο ακριβής μοριακός και φυσιολογικός ρόλος τους παραμένει αδιευκρίνιστος. Η ανάλυση ανάπτυξης του μεταλλαγμένου στελέχους *C. reinhardtii sbd1* αποκάλυψε ότι η απουσία λειτουργικού CrSBD1 είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη

βιωσιμότητα υπό ήπιες συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης, η οποία μειώθηκε ταχύτατα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις H_2O_2 . Επιπλέον, το μετάλλαγμα *sbd1* εμφάνισε σημαντικά μειωμένες μοριακές και βιοχημικές τροποποιήσεις ως αποκρίσεις στην οξειδωτική καταπόνηση, σε σύγκριση με το στέλεχος φυσικού τύπου. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι το CrSBD1 παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των πρώιμων αποκρίσεων του *C. reinhardtii* στην οξειδωτική καταπόνηση. Συνολικά, η παρούσα διδακτορική διατριβή μελετά τις αποκρίσεις στην οξειδωτική καταπόνηση τριών διαφορετικών ειδών μικροφυκών σε μια προσπάθεια να προσεγγίσει την ποικιλότητα τους. Από τα αποτελέσματα υπογραμμίζεται η δυνατότητα αξιοποίησης της οξειδωτικής καταπόνησης για το μεταβολικό χειρισμό των μικροφυκών προς την αύξηση της έκφρασης συγκεκριμένων μονοπατιών και την παραγωγή συγκεκριμένων μεταβολιτών.

Επιστημονική περιοχή: Προσαρμογή σε αβιοτικές καταπονήσεις

Λέξεις κλειδιά: μικροφύκη, *C. reinhardtii*, *T. chuii*, *C. variabilis*, οξειδωτική καταπόνηση, H_2O_2 , ομικές αναλύσεις, RNAseq, GC-MS, GC-FID, SBP

Study of the molecular and biochemical adaptation mechanisms of microalgae to abiotic stresses

Department of Biotechnology
Laboratory of Molecular Biology

ABSTRACT

Microalgae are ubiquitous in aquatic environments, and they frequently encounter oxidative stress in their natural habitats, prompting the development of species-specific adaptation mechanisms. Understanding these mechanisms can offer valuable insights for biotechnological applications in microalgae metabolic manipulation. In the present study, we conducted a global multi-omics analysis, encompassing RNAseq, GC-MS, and GC-FID, to uncover the adaptation mechanisms of three microalgal species: *Tetraselmis chuii*, *Chlorella variabilis*, and *Chlamydomonas reinhardtii*. Exposure to 0.5-mM H₂O₂ resulted in reduced cell viability in *T. chuii*, an industrially significant microalga, with higher concentrations causing a drastic decline. After 1 hour of H₂O₂ exposure, the photosynthetic capacity (Q_y) was negatively impacted, and this reduction intensified after 6 hours of continuous stress. However, *T. chuii* exhibited a rapid response to H₂O₂-induced oxidative stress within the first hour, leading to significant changes in both transcriptomic and metabolomic profiles. Carbon and energy flow were among the cellular functions adversely affected, with photosynthesis-related *psbQ* downregulated by 2.4-fold, pyruvate kinase decreasing by 1.5-fold, and urea content reduced by 3-fold. Extended exposure to H₂O₂ imposed a high energy cost, hampering efforts to enhance carbon metabolism, as evidenced by the upregulation of photosystems-related *PetC* and *PetJ* by more than 2-fold. These findings indicate that while *T. chuii* rapidly responds to oxidative stress, prolonged exposure can have detrimental effects on its cellular functions. Similarly, exposure of *C. variabilis* to 2-mM H₂O₂-induced oxidative stress for 1 hour resulted in decreased cell viability and photosynthetic capacity. Transcriptomic and metabolomic profiles were also affected as an attempt to maintain cellular homeostasis. Extended exposure for 6 hours had a substantial impact on *C. variabilis* cells. The model-organism *C. reinhardtii* was utilized to conduct an in-depth analysis of the role of *CrSBD1*, an SBP homologue, in the response to oxidative stress. Selenium-binding proteins (SBPs) represent a widely distributed protein family implicated in various environmental stress responses, although their exact molecular and physiological roles remain elusive. Growth analysis of the *C. reinhardtii sbd1* mutant strain revealed that the absence of functional *CrSBD1* resulted in increased growth under mild oxidative stress conditions, although cell viability rapidly declined at higher H₂O₂ concentrations. Furthermore, the *sbd1* mutant exhibited a significant reduction in molecular and biochemical responses to H₂O₂-induced oxidative stress compared to the wild type. This study suggests that *CrSBD1* plays a novel role in regulating early responses to oxidative stress in *C. reinhardtii*. Overall, the present PhD thesis investigates the oxidative stress responses of three distinct microalgal species, aiming to elucidate their diversity. The findings underscore the potential for leveraging oxidative stress to manipulate the metabolism of microalgae with the goal of enhancing the production of specific metabolites.

Scientific area: Adaptation to abiotic stresses

Key words: microalgae, *C. reinhardtii*, *T. chuii*, *C. variabilis*, oxidative stress, H₂O₂, multi-omics, RNAseq, GC-MS, GC-FID, SBP

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του μήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Κλείνοντας έναν ακόμα κύκλο σπουδών, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα Καθηγητή Εμμανουήλ Φλεμετάκη για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου δίνοντας μου χώρο στο εργαστήριο, από προπτυχιακή φοιτήτρια έως σήμερα. Η παροχή όλου του υλικοτεχνικού εξοπλισμού για την ολοκλήρωση πειραμάτων δεν είναι ούτε απλή, ούτε δεδομένη, συνυπολογίζοντας τα χρόνια και τις δυσκολίες των “lockdown”. Τον ευχαριστώ ακόμα για τις συμβουλές και την επιστημονική καθοδήγηση σε όλη αυτή την πορεία.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών Ανδρέα Ρούσση που υπήρξε υπεύθυνος της πτυχιακής και μεταπτυχιακής εργασίας μου καθώς και μέλος της τριμελούς επιτροπής της παρούσας διατριβής. Η συνεργασία μας υπήρξε άκρως επικοινωνιακή για εμένα και συνέβαλε τα μέγιστα στην ομαλή και επιτυχή ολοκλήρωση των σπουδών μου.

Θέλω ακόμα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών Πολυδεύκη Χατζόπουλο για την κριτική ανάγνωση του κειμένου και τις παρατηρήσεις του, ως μέλους της τριμελούς επιτροπής, καθώς και όλα τα μέλη της επιτροπής αξιολόγησης για τη συμμετοχή τους στη βελτίωση του τελικού κειμένου.

Στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας πέρασα χρόνο για χρόνια και όλα τα μέλη του υπήρξαν πολύτιμοι αρωγοί στην ολοκλήρωση της προσπάθειας μου. Rodica, Κατερίνα, Χρυσάνθη, Δημήτρη, Μαριέλα, Σοφία, Αλέξανδρε, Πολυξένη, Μάνο σας ευχαριστώ για κάθε συμβουλή και βοήθεια εντός και εκτός εργαστηρίου. Συνολικά ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας, του εργαστηρίου Ενζυμικής Τεχνολογίας και του εργαστηρίου Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων για την πρόθυμη βοήθεια και την ομαλή συνεργασία κάθε φορά που το χρειάστηκα. Θερμά ευχαριστώ και τη Δρ. Ειρήνη Δερβίση για τη μακροχρόνια συνεργασία που έχουμε με το τμήμα Βιολογίας του ΕΚΠΑ.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους, γιατί χωρίς αυτούς δεν θα έφτανα ποτέ ως εδώ. Τον Πολυζώη, γιατί με στήριξε και με πίστεψε στις δύσκολες στιγμές της πορείας. Τη μητέρα και τον πατέρα μου γιατί χωρίς αυτούς δεν θα είχα καν ξεκινήσει. Τα αδέρφια μου που έκαναν όλη τη διαδικασία διασκεδαστική. Την Πωλίνα γιατί ήταν το θετικό παράδειγμα. Τον παππού γιατί «η ζωή είναι μικροχαρές» και τη γιαγιά γιατί υπήρξε αυτή που με έμαθε να διαβάζω. Σε εσένα γιαγιά αφιερώνω και την ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας.

Η εικόνα του εξωφύλλου που χρησιμοποιείται και στο εσωτερικό της διατριβής αποτελεί δημιουργία της αδερφής και συναδέλφου μου Χαρούλας Κωλέττη, την οποία καμαρώνω και ευχαριστώ.

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.

Δημοσιεύσεις

Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής περιλαμβάνονται στις παρακάτω επιστημονικές δημοσιεύσεις και συνέδρια:

Koletti, A., Skliros, D., Kalloniati, C., Marka, S., Zografaki, M. E., Infante, C., Mantecón L., & Flemetakis, E. (2024). Global omics study of *Tetraselmis chuii* reveals time-related metabolic adaptations upon oxidative stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *108*, 1-21.

Koletti, A., Dervisi, I., Kalloniati, C., Zografaki, M. E., Rennenberg, H., Roussis, A., & Flemetakis, E. (2022). Selenium-Binding Protein 1 (SBD1): A stress response regulator in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, *189*(4), 2368-2381.

Koletti, A., Dervisi, I., Roussis, A., & Flemetakis, E. (in preparation). Omics derived information for microalgal adaptation mechanisms upon oxidative stress. Review paper. In Preparation.

Koletti, Skliros, Kalloniati, Infante, Mantecón and Flemetakis "Implications of short- and long-term exposure of the microalga *Tetraselmis chuii* to H₂O₂-induced oxidative stress, as revealed by multi-omics analysis", 10th Conference of Microbiokosmos, Larissa 30 November-2 December 2023. (oral presentation)

Koletti, Zografaki, Kalloniati, Iliopoulos, Roussis, Flemetakis "Oxidative stress responses in microalgae: New lessons learned from higher plants", 70 Annual Conference of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology, Athens November 29 - December 1, 2019. Book of abstracts p.108, 2019. (poster)

Κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής φιλοξενήθηκα ως επισκέπτρια ερευνήτρια στην εταιρεία Biopolis SL με έδρα στη Βαλένθια της Ισπανίας, για 1 μήνα το 2022 και για 2 μήνες το 2023. Η συγκεκριμένη εταιρεία δραστηριοποιείται στο χώρο της γονιδιωματικής και βιοπληροφορικής ανάλυσης. Οι μετακινήσεις χρηματοδοτήθηκαν από την Ευρωπαϊκή Ένωση, στα πλαίσια του Horizon 2020 Marie Skłodowska-Curie, με όνομα έργου ICHTHYS-Enhancing Seafood Quality and Shelf-Life - Project nr. 872217.

Περιεχόμενα

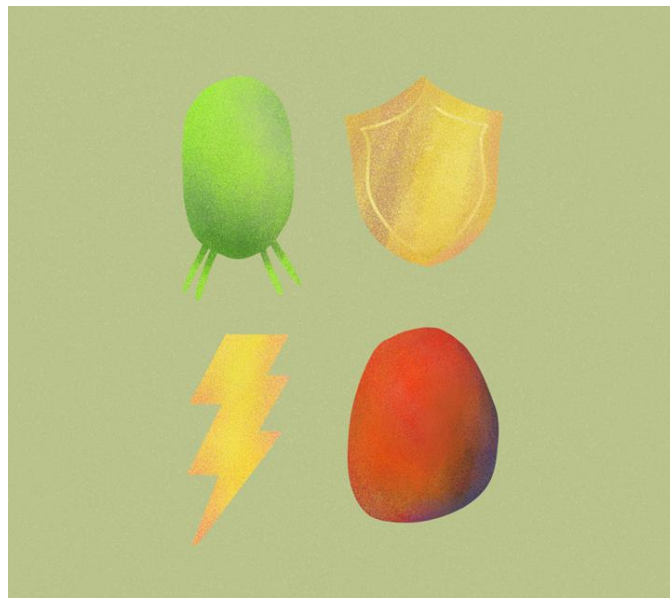
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	5
Ευχαριστίες.....	6
Κεφάλαιο 1 ^ο : Εισαγωγή	13
1.1 Μικροφύκη	14
1.1.1 Θαλάσσια μικροφύκη	16
1.1.2 Μικροφύκη γλυκού νερού	16
1.2 Καλλιέργεια μικροφυκών.....	17
1.2.1 Συστήματα καλλιέργειας.....	18
1.2.2 Τρόποι ανάπτυξης	23
1.2.3 Άλλοι παράγοντες	25
1.3 Προϊόντα και εφαρμογές	27
1.4 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	30
1.5 <i>Tetraselmis chuii</i>	33
1.6 <i>Chlorella variabilis</i>	35
1.7 Αβιοτικές καταπονήσεις.....	38
1.7.1 Οξειδωτική καταπόνηση	39
1.8 Οξειδωτική καταπόνηση και μικροφύκη	41
1.9 Selenium Binding Protein (SBP)	43
1.10 Σκοπός της διατριβής	45
Κεφάλαιο 2 ^ο : Υλικά και Μέθοδοι.....	47
2.1 Καλλιέργειες μικροφυκών.....	48
2.1.1 <i>T. chuii</i>	48
2.1.2 <i>C. variabilis</i>	49
2.1.3 <i>C. reinhardtii</i>	50
2.2 Εφαρμογή οξειδωτικής καταπόνησης.....	55
2.2.1 Σε καλλιέργειες <i>T. chuii</i>	55
2.2.2 Σε καλλιέργειες <i>C. variabilis</i>	56
2.2.3 Σε καλλιέργειες <i>C. reinhardtii</i>	56

2.3 Προσδιορισμός ανάπτυξης καλλιεργειών και κυτταρικής βιωσιμότητας.....	57
2.3.1 Καμπύλες ανάπτυξης	57
2.3.2 Προσδιορισμός κυτταρικής βιωσιμότητας.....	57
2.4 Απομόνωση και καθαρισμός RNA	59
2.4.1 Απομόνωση RNA από μικροφύκη	59
2.4.2 Καθαρισμός RNA από DNA	60
2.5 Ανάλυση μεταγραφωμάτων με RNAseq	62
2.5.1 Κατασκευή cDNA βιβλιοθηκών	62
2.5.2 <i>In silico</i> αλληλούχιση μεταγραφώματος.....	63
2.5.3 Χαρτογράφηση (mapping) και προσδιορισμός επιπέδων έκφρασης	63
2.6 Ανάλυση μεταγραφώματος με RT-qPCR.....	64
2.6.1 Σύνθεση cDNA.....	64
2.6.2 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR).....	65
2.7 Μεταβολομική ανάλυση	69
2.7.1 Αέρια χρωματογραφία – Φασματομετρία μάζας (GC-MS).....	69
2.7.2 Αέρια χρωματογραφία – Ανίχνευση ιονισμού φλόγας (GC-FID)	71
2.8 Μετρήσεις φθορισμού χλωροφυλλών.....	72
2.9 Στατιστική ανάλυση	73
Κεφάλαιο 3ο: Αποκρίσεις του <i>T. chuii</i> στην οξειδωτική καταπόνηση.....	74
3.1 Αποτελέσματα	75
3.1.1 Επίδραση της οξειδωτικής καταπόνησης στη βιωσιμότητα του <i>T. chuii</i>	75
3.1.2 Συγκριτική μεταγραφομική απόκριση του <i>T. chuii</i> στην επαγόμενη από H ₂ O ₂ οξειδωτική καταπόνηση.....	76
3.1.3 Συγκριτική μεταβολομική απόκριση του <i>T. chuii</i> στην επαγόμενη από H ₂ O ₂ οξειδωτική καταπόνηση.....	88
3.1.4 Συγκριτική λιπιδομική απόκριση του <i>T. chuii</i> στην επαγόμενη από H ₂ O ₂ οξειδωτική καταπόνηση	92
3.2 Συζήτηση.....	94
3.2.1 Τροποποιήσεις στην κυτταρική φυσιολογία υποδεικνύουν το μεταβολικό επαναπρογραμματισμό του <i>T. chuii</i> κατά την οξειδωτική καταπόνηση	94
3.2.2 Το <i>T. chuii</i> περιορίζει την καθήλωση του άνθρακα σαν απόκριση στη βραχυπρόθεσμη οξειδωτική καταπόνηση	95

3.2.3 Στο <i>T. chuii</i> αυξάνεται η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τη φωτοσύνθεση μετά από μακροχρόνια έκθεση σε οξειδωτική καταπόνηση.....	98
Κεφάλαιο 4ο: Αποκρίσεις του <i>C. variabilis</i> στην οξειδωτική καταπόνηση	102
4.1 Αποτελέσματα	103
4.1.1 Επίδραση της οξειδωτικής καταπόνησης στη βιωσιμότητα του <i>C. variabilis</i>	103
4.1.2 Συγκριτική μεταγραφομική απόκριση του <i>C. variabilis</i> στην επαγόμενη από H ₂ O ₂ οξειδωτική καταπόνηση.....	104
4.1.3 Συγκριτική μεταβολομική απόκριση του <i>C. variabilis</i> στην επαγόμενη από H ₂ O ₂ οξειδωτική καταπόνηση.....	113
4.1.4 Συγκριτική λιπιδιομική απόκριση του <i>C. variabilis</i> στην επαγόμενη από H ₂ O ₂ οξειδωτική καταπόνηση.....	117
4.2 Συζήτηση.....	118
4.2.1 Φυσιολογικές τροποποιήσεις ως απόκριση του <i>C. variabilis</i> στην οξειδωτική καταπόνηση	119
4.2.2 Το <i>C. variabilis</i> ξεδιπλώνει άμεσα ένα ευρύ φάσμα αντιοξειδωτικών αποκρίσεων	120
4.2.3 Μακροπρόθεσμη έκθεση σε H ₂ O ₂ καταστέλλει βασικές κυτταρικές λειτουργίες του <i>C. variabilis</i>	122
Κεφάλαιο 5ο: Αποκρίσεις του <i>C. reinhardtii</i> στην οξειδωτική καταπόνηση.....	125
5.1 Αποτελέσματα	126
5.1.1 Επίδραση της οξειδωτικής καταπόνησης στη βιωσιμότητα των στελεχών φυσικού τύπου και <i>sbd1</i> του <i>C. reinhardtii</i>	126
5.1.2 Συγκριτική μεταγραφομική απόκριση των στελεχών <i>C. reinhardtii</i> στην επαγόμενη από H ₂ O ₂ οξειδωτική καταπόνηση	128
5.1.3 Συγκριτική μεταβολομική απόκριση των στελεχών <i>C. reinhardtii</i> στην επαγόμενη από H ₂ O ₂ οξειδωτική καταπόνηση	135
5.1.4 Συγκριτική λιπιδιομική απόκριση του <i>C. reinhardtii</i> στην επαγόμενη από H ₂ O ₂ οξειδωτική καταπόνηση.....	137
5.2 Συζήτηση.....	139
5.2.1 Η απουσία λειτουργικής πρωτεΐνης <i>CrSBD1</i> επηρεάζει την απόκριση του <i>C. reinhardtii</i> στην επαγόμενη από H ₂ O ₂ οξειδωτική καταπόνηση.....	139
5.2.2 Η <i>CrSBD1</i> δείχνει ένα συντηρημένο ρόλο των μελών της οικογένειας SBP ως ρυθμιστές των αποκρίσεων σε καταπονήσεις, στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς	144
Κεφάλαιο 6°: Κοινές και μοναδικές αποκρίσεις των μικροφυκών: κλειδί στην περαιτέρω αξιοποίηση τους.....	146

Βιβλιογραφία.....	150
Παραρτήματα.....	171
Παράρτημα 1. Δεδομένα RNAseq για μετάγραφα του <i>T. chuii</i>	172
Παράρτημα 2. Σχετικά επίπεδα των μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν με GC-MS για το <i>T. chuii</i>	216
Παράρτημα 3. Δεδομένα RNAseq για μετάγραφα του <i>C. variabilis</i>	220
Παράρτημα 4. Σχετικά επίπεδα των μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν με GC-MS για το <i>C. variabilis</i>	235
Παράρτημα 5. Δεδομένα RNAseq για μετάγραφα των στελεχών <i>C. reinhardtii</i>	239
Παράρτημα 6. Σχετικά επίπεδα έκφρασης γονιδίων σύμφωνα με την RT-qPCR για τα στελέχη <i>C. reinhardtii</i>	255
Παράρτημα 7. Σχετικά επίπεδα των μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν με GC-MS για τα στελέχη <i>C. reinhardtii</i>	256

Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή



1.1 Μικροφύκη

Ως μικροφύκη ορίζονται οι ευκαρυωτικοί, μονοκύτταροι, φωτοσυνθετικοί οργανισμοί που ενδιαιτούν σε όλα τα οικοσυστήματα του πλανήτη (Park et al., 2022) και ζουν ως μεμονωμένα άτομα ή συμβιωτικά (M. I. Khan et al., 2018). Συναντώνται κυρίως στα υδάτινα οικοσυστήματα, έχουν βρεθεί ωστόσο και σε χερσαία, ακόμα και ερημικά (Treves et al., 2020). Σε έναν πιο ευρύ ορισμό τους, τα μικροφύκη περιλαμβάνουν και τα προκαρυωτικά κυανοβακτήρια, με τα οποία εμφανίζουν πολλές ομοιότητες ως προς τη φυσιολογία, την οικολογία και τις εφαρμογές τους (Thoré et al., 2023). Εξελικτικά, τα κυανοβακτήρια ήταν τα πρώτα που ανέπτυξαν την ικανότητα της φωτοσύνθεσης. Τα ευκαρυωτικά μικροφύκη προέκυψαν από το γεγονός της πρωτογενούς ενδοσυμβίωσης ευκαρυωτικού κυττάρου και κυανοβακτηρίου, 1.5 δισεκατομμύρια χρόνια πριν (Reyes-Prieto et al., 2007). Με τον τρόπο αυτό εμφανίστηκαν τα Χλωρόφυτα (*Chlorophyta*), τα Ροδόφυτα (*Rhodophyta*) και τα Φαιοφύκη (*Glaucophyta*) (Keeling et al., 2005). Συγκεκριμένα, τα πράσινα μικροφύκη (Χλωρόφυτα) είναι μια ομάδα φωτοσυνθετικών ευκαρυωτών με μεγάλη ποικιλομορφία από τα οποία προήλθαν εξελικτικά τα χερσαία φυτά, πριν από περισσότερο από 1 δισεκατομμύριο χρόνια (Heckman et al., 2001). Κατά τη διάρκεια της εξελικτικής ιστορίας της Γης, απέκτησαν κομβικό ρόλο στην παγκόσμια παραγωγή ενέργειας/βιομάζας και στην ανακύκλωση των χημικών στοιχείων μέσω των βιογεωχημικών κύκλων (Grossman, 2005).

Τα μικροφύκη αποτελούν πολυφυλετική ομάδα καθώς δεν μοιράζονται όλα την ίδια εξελικτική προέλευση και έναν κοινό πρόγονο. Αυτό οφείλεται στο ότι την πρωτογενή ενδοσυμβίωση ακολούθησαν και δευτερεύοντα ενδοσυμβιωτικά γεγονότα που δημιούργησαν νέες εξελικτικές γραμμές και ώθησαν σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη ποικιλομορφίας στα μικροφύκη ως προς το μέγεθος, την κυτταρική δομή, τις φωτοσυνθετικές χρωστικές κ.α. (Εικόνα 1) (A. K. Khan et al., 2020; Sukenik et al., 2009). Σύμφωνα με τις σύγχρονες μεθόδους μοριακής ταξινόμησης, τα μικροφύκη κατατάσσονται σε εννέα φύλα. Συγκεκριμένα πρόκειται για τα προκαρυωτικά κυανοβακτήρια και τα ευκαρυωτικά *Dinophyta*, *Glaucophyta*, *Cryptophyta*, *Euglenophyta*, *Ochrophyta*, *Haptophyta*, *Rhodophyta* και *Chlorophyta* (Sahoo & Seckbach, 2015). Υπολογίζεται ότι υπάρχουν περισσότερα από 30.000 είδη μικροφυκών, ωστόσο λίγες εκατοντάδες από αυτά έχουν μελετηθεί ερευνητικά και ελάχιστα αξιοποιούνται στο βιομηχανικό τομέα (Paradopoulos, 2008).

Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή



Εικόνα 1 Ποικιλομορφία των μικροφυκών (what-are-algae.com/).

Για να επιτύχουν την προσαρμοστικότητα στα ποικίλα οικοσυστήματα που ενδιαιτούν τα μικροφύκη έχουν αναπτύξει μηχανισμούς ανθεκτικότητας σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, προσαρμόζοντας κατάλληλα το μεταβολικό ρεπερτόριο τους (Odjadjare et al., 2017). Στο πλαίσιο αυτό, εμφανίζουν την ικανότητα παραγωγής μοναδικών μεταβολιτών που δεν συναντώνται σε άλλους οργανισμούς. Το χαρακτηριστικό αυτό καθιστά ιδιαίτερα υποσχόμενη την αξιοποίηση των μικροφυκών από την ανθρώπινη βιομηχανία για την παραγωγή θρεπτικών ουσιών και φαρμακευτικών προϊόντων (Bhalamurugan et al., 2018). Επίσης, καθώς στα υδάτινα οικοσυστήματα τα μικροφύκη αντιμετωπίζουν συνεχείς διακυμάνσεις στην ένταση και την ποιότητα του φωτός, έχουν αναπτύξει ικανότητα προσαρμογής και εγκλιματισμού σε αυτές μέσω των ποικίλων χρωστικών που παράγουν και συσσωρεύουν (Michel-Rodriguez et al., 2021).

Συχνά χρησιμοποιείται ο όρος «φυτοπλαγκτόν» για να περιγράψει τα μικροφύκη των υδάτινων οικοσυστημάτων. Πρόκειται για τους κύριους παραγωγούς των οικοσυστημάτων αυτών που παρέχουν, μέσω της φωτοσύνθεσης, ενέργεια, οργανική ύλη και θρεπτικά συστατικά σε όλους τους υπόλοιπους οργανισμούς (Thoré et al., 2023). Συνολικά τα μικροφύκη πραγματοποιούν σχεδόν το 50% της παγκόσμιας πρωτογενούς παραγωγής, φωτοσυνθέτοντας με μεγαλύτερη απόδοση από τα χερσαία φυτά και έχοντας σημαντική επίδραση στους βιογεωχημικούς κύκλους (Fernández et al., 2021). Ο αριθμός των μικροφυκών που ενδιαιτούν σε ένα οικοσύστημα και συνεπώς ο ρυθμός φωτοσύνθεσης εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη διαθεσιμότητα θρεπτικών. Υδάτινες περιοχές πλούσιες σε θρεπτικά, όπως οι παράκτιες περιοχές, επιτρέπουν

την ομαλή ανάπτυξη των μικροφυκών. Ωστόσο, ο εμπλουτισμός των υδάτινων οικοσυστημάτων με τα υπολείμματα θρεπτικών που χρησιμοποιούνται στη γεωργία και τη βιομηχανία συχνά προκαλεί ραγδαία αύξηση των πληθυσμών μικροφυκών, καταστρέφοντας την ισορροπία και οδηγώντας σε υπερσυσσωρεύσεις μικροφυκών, τα γνωστά “algal blooms” (Thoré et al., 2023).

1.1.1 Θαλάσσια μικροφύκη

Οι ωκεανοί καλύπτουν σημαντικό τμήμα του πλανήτη και φιλοξενούν πλήθος ζωντανών οργανισμών. Η υψηλή τους αλατότητα αποτελεί πιθανό εμπόδιο για την επιβίωση συγκεκριμένων οργανισμών, ωστόσο πολλά μικροφύκη έχουν προσαρμοστεί ιδιαίτερα αποτελεσματικά στις περιβαλλοντικές συνθήκες των ωκεανών και ευδοκίμουν σε αυτούς. Καθώς η ηλιακή ακτινοβολία είναι άφθονη, ιδίως στα μικρά βάθη, τα θαλάσσια μικροφύκη έχουν αναπτύξει υψηλούς φωτοσυνθετικούς ρυθμούς και την ικανότητα ταχείας σύνθεσης βιομάζας. Επίσης, λόγω του υψηλού ανταγωνισμού με τους υπόλοιπους θαλάσσιους μικροοργανισμούς, διαθέτουν πλούσιο μεταβολικό ρεπερτόριο με δευτερογενείς μεταβολίτες που τους προσδίδουν μοναδικά χαρακτηριστικά. Διαδεδομένα θαλάσσια μικροφύκη είναι τα *Tetraselmis sp.* και *Nannochloropsis sp.* που κατά τις τελευταίες δεκαετίες έχουν κερδίσει το επιστημονικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον. Στα θετικά της αξιοποίησης των θαλάσσιων μικροφυκών είναι η δυνατότητα χρήσης του άφθονου θαλάσσιου νερού και ο μη ανταγωνισμός τους με τις χερσαίες καλλιέργειες για γλυκό νερό και εκτάσεις (Chew et al., 2018).

1.1.2 Μικροφύκη γλυκού νερού

Τα υδάτινα οικοσυστήματα γλυκού νερού χαρακτηρίζονται από χαμηλή αλατότητα και έχουν ποικίλες μορφές, με τις λίμνες και τα ποτάμια να αποτελούν τις πλέον συνηθισμένες. Στις λίμνες τα νερά είναι στάσιμα και ζεστά, λόγω της συνεχούς έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία, και συνήθως υπάρχουν άφθονα διαθέσιμα θρεπτικά. Οι συνθήκες αυτές καθιστούν τα λιμναία οικοσυστήματα ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη πολλών οργανισμών, ανάμεσα στους οποίους και τα μικροφύκη (Chew et al., 2018). Διαφορετική είναι η κατάσταση στα ποτάμια όπου τα χαρακτηριστικά του νερού διαφέρουν από σημείο σε σημείο. Στις περιοχές που η ροή

Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή

του ποταμού είναι γρήγορη, το νερό εμφανίζει υψηλή περιεκτικότητα σε οξυγόνο ωστόσο δεν αποτελεί ιδανικό ενδιαίτημα για τα μικροφύκη. Καθώς η ροή επιβραδύνει, η συγκέντρωση των διαθέσιμων θρεπτικών στο νερό αυξάνεται δημιουργώντας ευνοϊκότερες συνθήκες για την ανάπτυξη μικροφυκών. Στις εκβολές των ποταμών τα θρεπτικά είναι ιδιαίτερα άφθονα, ωστόσο συνήθως τα νερά είναι θολά και η έλλειψη επαρκούς φωτισμού τα καθιστά και πάλι ακατάλληλα για τα μικροφύκη (Kalana et al., 2016). Από τα πλέον γνωστά και διαδεδομένα μικροφύκη του γλυκού νερού είναι τα γένη *Haematococcus sp.* και *Chlorella sp.*, τα οποία αξιοποιούνται τόσο στην έρευνα όσο και στη βιομηχανία. Μάλιστα το τελευταίο καλλιεργείται εκτεταμένα σε χώρες όπως οι Η.Π.Α., η Ιαπωνία και η Γερμανία (Chew et al., 2018).

1.2 Καλλιέργεια μικροφυκών

Ο τομέας της καλλιέργειας μικροφυκών έχει γνωρίσει μεγάλη πρόοδο και ανάπτυξη τις τελευταίες δεκαετίες. Σε αυτό συνέβαλαν παράλληλα η τεχνολογική εξέλιξη και η συσσώρευση γνώσεων για τη βιολογία των μικροφυκών. Καθώς η ποικιλομορφία των μικροοργανισμών αυτών είναι τεράστια, απαιτούνται εξειδικευμένες γνώσεις για κάθε είδος που πρόκειται να καλλιεργηθεί, ώστε να πληρούνται οι εκάστοτε απαραίτητες συνθήκες ανάπτυξης. Οι συνθήκες αυτές ποικίλουν μεταξύ άλλων ως προς το θερμοκρασιακό εύρος, την ένταση του φωτός, τα απαραίτητα θρεπτικά, την ανταλλαγή αερίων και την ανάδευση (Zuccaro et al., 2020).

Γενικά, η καλλιέργεια των μικροφυκών είναι μια διαδικασία που εμφανίζει πλεονεκτήματα. Καθώς πρόκειται για φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς, για την ανάπτυξη τους δεν απαιτούν πηγή άνθρακα αφού δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό διοξείδιο του άνθρακα για να τροφοδοτήσουν το μεταβολισμό τους. Επίσης, χάρη στη μονοκύτταρη μορφή τους, έχουν μεγάλη επιφάνεια επαφής με το περιβάλλον και μπορούν να απορροφούν άζωτο και φώσφορο αποδοτικά, αποτελώντας έτσι σημαντικούς οικοτοξικολογικούς παράγοντες (M. A. Torres et al., 2008). Τέλος, οι καλλιέργειες των μικροφυκών δεν απαιτούν μεγάλες χερσαίες εκτάσεις και δεν ανταγωνίζονται σε αυτόν τον τομέα τις γεωργικές καλλιέργειες (Pierobon et al., 2018).

1.2.1 Συστήματα καλλιέργειας

Τα ευρέως διαδεδομένα συστήματα καλλιέργειας μικροφυκών είναι δύο, τα ανοιχτά και τα κλειστά, και ποικίλουν ως προς τα τεχνικά χαρακτηριστικά, τη διάταξη και τον όγκο τους (Εικόνα 2) (Blancken et al., 2013). Ο τύπος συστήματος καλλιέργειας που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση καθώς και τα ακριβή χαρακτηριστικά του καθορίζονται από το είδος του μικροφύκου που θα καλλιεργηθεί και το διαθέσιμο κεφάλαιο. Η σωστή επιλογή συστήματος είναι ιδιαίτερα σημαντική, γιατί επηρεάζει το ρυθμό ανάπτυξης της καλλιέργειας και την κυτταρική πυκνότητα, άρα την ποσότητα της παραγόμενης βιομάζας (Chew et al., 2018).



Εικόνα 2 Φωτοβιοαντιδραστήρες ανοιχτού και κλειστού τύπου, σε λειτουργία, στις εγκαταστάσεις του AlgaePARC, Ολλανδία (de Vree et al., 2015).

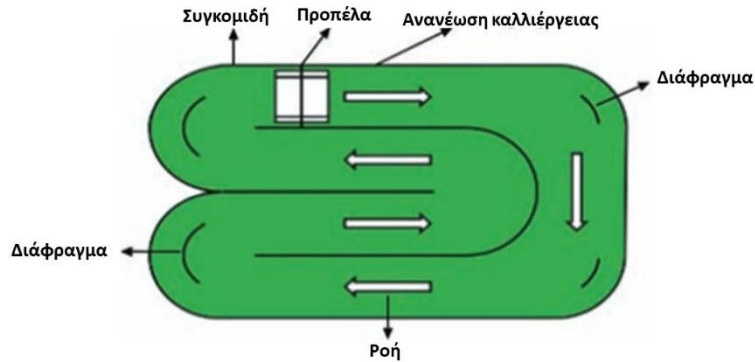
Τα ανοιχτά συστήματα καλλιέργειας μικροφυκών αξιοποιούν την ηλιακή ακτινοβολία ως πηγή φωτός και συχνά εμπλουτίζονται σε θρεπτικά μέσα από τους διαθέσιμους φυσικούς πόρους (Zuccaro et al., 2020). Αποτελούν έτσι ιδιαίτερα οικονομική επιλογή, εμφανίζουν όμως το

Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή

μειονέκτημα της έκθεσης της υπό ανάπτυξη καλλιέργειας στο περιβάλλον καθιστώντας την ευάλωτη στις περιβαλλοντικές συνθήκες και επιρρεπή σε μολύνσεις (Chisti, 2007). Για την επιτυχή ανάπτυξη των μικροφυκών σε ανοιχτό σύστημα καλλιέργειας είναι απαραίτητο να ληφθούν υπόψιν ποικίλοι παράγοντες όπως η ένταση του παρεχόμενου φωτός, η θερμοκρασία του θρεπτικού μέσου, η εξάτμιση και οι εποχικές μεταβολές στις καιρικές συνθήκες (Zuccaro et al., 2020). Υπάρχουν διάφορες εναλλακτικές διατάξεις για την εφαρμογή ανοικτής καλλιέργειας.

Η πιο απλή μορφή καλλιέργειας ανοιχτού τύπου είναι σε μικρές, ρηχές λίμνες – λάκκους (open ponds), χωρίς ανάδευση. Συνήθως το βάθος τους δεν ξεπερνά το μισό μέτρο, προκειμένου να επιτρέπεται η καλή διαπερατότητα από το φως. Πρόκειται για οικονομικό τρόπο καλλιέργειας μικροφυκών που αξιοποιεί την ηλιακή ακτινοβολία και τις φυσικές παροχές νερού, όπως για παράδειγμα τις όχθες λιμνών ή της θάλασσας. Μειονεκτήματα αποτελούν η αργή διάχυση των θρεπτικών και τα φαινόμενα μη ομαλής διάχυσης του φωτός που περιορίζουν τη βέλτιστη ανάπτυξη των μικροφυκών. Παράδειγμα μικροφύκους που καλλιεργείται εκτεταμένα με αυτήν την τεχνική είναι το *Dunaliella salina* (Chew et al., 2018).

Μια άλλη διάταξη ανοικτής καλλιέργειας είναι η λίμνη τύπου πίστας αγώνων (race track-type pond) που αξιοποιείται ευρέως για την καλλιέργεια μικροφυκών σε βιομηχανική κλίμακα (Εικόνα 3). Σε αυτήν την περίπτωση, οι λίμνες έχουν βάθος 15-50 cm και έχουν τη μορφή καναλιών (Ting et al., 2017). Ειδικά τοποθετημένες προπέλες πραγματοποιούν ανάδευση της καλλιέργειας, ούτως ώστε η πυκνότητα της να είναι ομοιόμορφη σε όλο τον όγκο της και τα κύτταρα να μην παραμένουν στάσιμα σε περιοχές με σκίαση αλλά να έχουν τη δυνατότητα απορρόφησης φωτός και CO₂ από το περιβάλλον. Η διάταξη αυτής της μορφής χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια των γενών *Chlorella sp.*, *Haematococcus sp.*, *Spirulina sp.* και *Dunaliella sp.* (Chew et al., 2018). Στην Ασία συχνά χρησιμοποιούνται και οι κυκλικές λίμνες-λάκκοι που έχουν ενσωματωμένο στο κέντρο τους έναν αναδευτήρα. Οι διατάξεις αυτές έχουν διάμετρο 40-50 cm, βάθος 20-30 cm και είναι αρκετά πιο αποδοτικές από τις λίμνες χωρίς ανάδευση (Ting et al., 2017).



Εικόνα 3 Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης λίμνη τύπου πίστας αγώνων (Τροποποίηση, Ting et al., 2017).

1.2.1.2 Κλειστά συστήματα καλλιέργειας

Τα κλειστά συστήματα καλλιέργειας ή φωτοβιοαντιδραστήρες έχουν σημαντικά υψηλότερο κόστος κατασκευής και χρήσης σε σχέση με τα ανοιχτά, εμφανίζουν ωστόσο πλεονεκτήματα. Αρχικά, επιτρέπουν τον έλεγχο των συνθηκών που επικρατούν στην καλλιέργεια (θερμοκρασία, pH κ.α.) ενώ ταυτόχρονα διατηρούν το περιβάλλον των καλλιεργειών ελεγχόμενο, αποτρέποντας τις επιμολύνσεις από άλλους μικροοργανισμούς (Masi et al., 2023). Ακόμα οδηγούν σε ταχεία ανάπτυξη των καλλιεργούμενων μικροφυκών και σε υψηλούς ρυθμούς παραγωγής βιομάζας, καλύπτοντας ως ένα βαθμό το κόστος για την εγκατάσταση και τη χρήση τους (de Vree et al., 2015). Υπάρχουν αρκετοί διαθέσιμοι τύποι κλειστού φωτοβιοαντιδραστήρα, καθένας από τους οποίους προσπαθεί να επιλύσει κάποιο από τα μειονεκτήματα που έχουν οι κλειστές καλλιέργειες, όπως η διαπερατότητα στο φως ή η συσσώρευση οξυγόνου σε βαθμό τοξικό για τα μικροφύκη. Η επιλογή του κατάλληλου βιοαντιδραστήρα βασίζεται στο είδος που θα καλλιεργηθεί, το επιθυμητό προϊόν και το διαθέσιμο κεφάλαιο (Zuccaro et al., 2020).

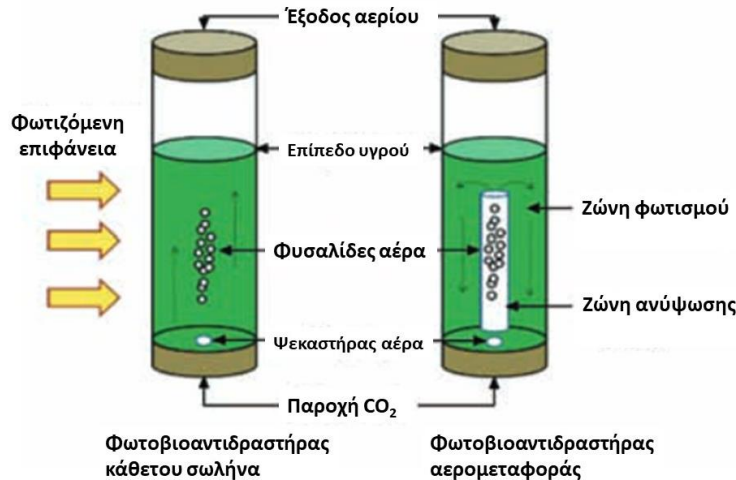
Τα πρώτα κλειστά συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια μικροφυκών είναι οι οριζόντιοι φωτοβιοαντιδραστήρες. Αποτελούνται από οριζόντιους σωλήνες, σχετικά μεγάλου μήκους, που τοποθετούνται με διάφορους τρόπους ώστε να σχηματίζουν επίπεδα, έλικες, τοίχους κ.α. Η διάμετρος του κάθε σωλήνα είναι μικρή, ενώ το μεγάλο μήκος του ευνοεί την απορρόφηση φωτός από την καλλιέργεια, ιδιότητα που τους καθιστά κατάλληλους για καλλιέργειες μικροφυκών που αξιοποιούν το ηλιακό φως. Στη διάταξη περιλαμβάνεται αντλία

Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή

που ανακυκλώνει το θρεπτικό υλικό, επιτρέποντας τη διαδοχική έκθεση όλων των κυττάρων στο φως και αποτρέποντας την κροκίδωση τους (Klinthong et al., 2015). Σημαντικό μειονέκτημα αυτής της διάταξης είναι η απαίτηση μεγάλης διαθέσιμης έκτασης για την εγκατάσταση της. Ο απαιτούμενος χώρος μπορεί να μειωθεί αν τοποθετηθούν οι σωλήνες αρκετά κοντά ο ένας στον άλλο, σε αυτήν την περίπτωση όμως αυξάνονται τα φαινόμενα σκίασης της καλλιέργειας. Λύσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί για αυτό το πρόβλημα είναι η προσθήκη τεχνητής εξωτερικής πηγής φωτός αλλά και η μείωση της διαμέτρου των σωλήνων, στο βαθμό που αυτό είναι εφικτό (Yen & Chiang, 2012).

Η πλέον κοινή διάταξη κλειστής καλλιέργειας είναι οι φωτοβιοαντιδραστήρες κάθετου σωλήνα (vertical tube photobioreactor) (Εικόνα 4). Στο κάτω μέρος των αντιδραστήρων αυτών υπάρχει ενσωματωμένη παροχή αέρα με τη μορφή ψεκαστήρα, με το ρόλο του παρεχόμενου αέρα είναι διττός καθώς ανακατεύει την καλλιέργεια χωρίς να τραυματίζει τα κύτταρα ενώ ταυτόχρονα ρυθμίζει τις συγκεντρώσεις οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα. Στην πιο απλή τους μορφή οι φωτοβιοαντιδραστήρες αυτοί είναι μονοκόμματοι, με το ύψος τους να είναι διπλάσιο της διαμέτρου τους, χαρακτηριστικό που τους προσδίδει υψηλό λόγο επιφάνειας προς όγκο. Η πηγή φωτός είναι εξωτερική και μέσω της ανάδευσης με τον αέρα αποφεύγονται τα φαινόμενα σκίασης. Η παροχή της κατάλληλης ροής αέρα είναι σημαντική καθώς επηρεάζει το χρόνο έκθεσης των κυττάρων σε φως ή σκίαση (light-dark cycle) (Ting et al., 2017). Μία βελτιωμένη μορφή φωτοβιοαντιδραστήρα αποτελείται από δύο επιμέρους ζώνες, τη ζώνη ανύψωσης που βρίσκεται στο εσωτερικό και σε αυτήν κυκλοφορούν οι φυσαλίδες αέρα και τη ζώνη καθόδου που βρίσκεται στο εξωτερικό και δέχεται άφθονο φως (Εικόνα 4). Η διάταξη αυτή λέγεται «αερομεταφορά» (“airlift”), καθώς οι φυσαλίδες αέρα οδηγούν σε μια διαρκή ανακύκλωση του θρεπτικού καλλιέργειας από την εσωτερική ζώνη ανόδου προς την εξωτερική και το φως (Chew et al., 2018). Σημαντική παράμετρος στις καλλιέργειες μικροφυκών που πραγματοποιούνται σε φωτοβιοαντιδραστήρες αυτής της μορφής με παροχή αέρα είναι η σωστή ρύθμιση της ροής του. Καθώς οι φυσαλίδες αυξάνουν την επιφάνεια επαφής νερού και αέρα, απορροφούν αποδοτικά από την υδατινή φάση το οξυγόνο που παράγουν τα μικροφύκη. Με τον τρόπο αυτό η συγκέντρωση οξυγόνου στην καλλιέργεια είναι χαμηλότερη όταν παρέχεται σε αυτήν επιπλέον αερισμός, επιτρέποντας την καλύτερη ανάπτυξη των μικροφυκών (Ting et al., 2017). Επιπλέον,

οι βιοαντιδραστήρες με κατακόρυφη διάταξη εμφανίζουν υψηλότερη απόδοση στην παραγωγή βιομάζας από τους αντίστοιχους οριζόντιους γιατί επιτρέπουν την ομαλότερη κατανομή του φωτός, οδηγώντας σε υψηλότερες αποδόσεις της φωτοσύνθεσης (de Vree et al., 2015).



Εικόνα 4 Σχηματική αναπαράσταση φωτοβιοαντιδραστήρων κάθετου σωλήνα (Τροποποίηση, Ting et al., 2017).

Ως τροποποίηση του κλασσικού αντιδραστήρα ζύμωσης, για την καλλιέργεια μικροφυκών χρησιμοποιείται ο αναδευόμενος φωτοβιοαντιδραστήρας (stirred tank photobioreactor). Σε αυτή τη διάταξη η ανάδευση του θρεπτικού υλικού επιτυγχάνεται με την κίνηση ενός μηχανικού αναδευτήρα ενώ η απαραίτητη πηγή φωτός τοποθετείται εξωτερικά. Ο αντιδραστήρας αυτής της μορφής αξιοποιείται εύκολα για την καλλιέργεια μικροφυκών σε εσωτερικούς χώρους, καθώς επιτρέπει τον αποτελεσματικό έλεγχο των συνθηκών και την υψηλή απόδοση της καλλιέργειας (Ting et al., 2017). Ωστόσο, λόγω του σχήματος του εμφανίζει το αρνητικό του χαμηλού λόγου εξωτερικής επιφάνειας προς τον όγκο, που επηρεάζει την απόδοση της φωτοσύνθεσης. Συνήθως αυτή η διάταξη συναντάται στις καλλιέργειες μικροφυκών σε ερευνητικά εργαστήρια, ενώ γίνονται ακόμα προσπάθειες για τη βελτιστοποίηση της ώστε να δίνει υψηλές αποδόσεις και σε βιομηχανική κλίμακα (Chew et al., 2018).

Άλλη κοινή διάταξη κλειστού συστήματος καλλιέργειας είναι ο φωτοβιοαντιδραστήρας με μορφή επίπεδου πάνελ (flat panel photobioreactor). Η διάταξη αποτελείται από διαφανείς ή ημι-διαφανείς γυάλινες επιφάνειες, οι οποίες σχηματίζουν ένα λεπτό πάνελ. Το μικρό βάθος επιτρέπει την υψηλή διαπερατότητα από το φως και την αξιοποίηση του αντιδραστήρα σε

Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή

εξωτερικούς χώρους με μόνη πηγή φωτός τον ήλιο. Για ακόμα υψηλότερη απόδοση το πάνελ τοποθετείται με συγκεκριμένη κλίση προς τη φωτεινή πηγή (Ting et al., 2017). Επιπλέον, είναι δυνατή η προσθήκη αντλίας για την ανάδευση της καλλιέργειας και την παροχή αέρα, ούτως ώστε να αυξηθεί σημαντικά η παραγωγή βιομάζας (Klinthong et al., 2015). Πλεονεκτήματα αυτού του συστήματος καλλιέργειας είναι ο πολύ μεγάλος λόγος εξωτερικής επιφάνειας προς όγκο, ο μικρός απαιτούμενος χώρος για την εγκατάσταση καθώς και η ευελιξία στην τοποθέτηση (Ting et al., 2017). Στα μειονεκτήματα, περιλαμβάνεται η υδροδυναμική καταπόνηση που προκαλείται στα κύτταρα από την προσθήκη αερισμού, η προσκόλληση κυττάρων στα τοιχώματα του αντιδραστήρα αλλά και η τάση ανόδου της θερμοκρασίας της καλλιέργειας, για την οποία απαιτείται σταθεροποίηση με μηχανικό τρόπο (Chew et al., 2018).

Μια εναλλακτική επιλογή που κερδίζει συνεχώς έδαφος είναι οι φωτοβιοαντιδραστήρες πλαστικής σακούλας (plastic bag photobioreactor). Μεγάλα πλεονεκτήματα σε αυτή την περίπτωση είναι το χαμηλό κόστος τους και η ευελιξία στην επιλογή του επιθυμητού όγκου και την τοποθέτηση. Όταν ο όγκος τους είναι αρκετά μεγάλος μπορεί να χρησιμοποιηθεί εξωτερικά νερό για να διατηρηθεί η θερμοκρασία του αντιδραστήρα στα επιθυμητά επίπεδα. Στα αρνητικά τους περιλαμβάνονται τα φαινόμενα σκίασης που γίνονται πιο έντονα όταν αυξάνεται ο όγκος, η δυσκολία στην ανάμειξη της καλλιέργειας και οι διαρροές που συμβαίνουν λόγω φθοράς της σακούλας (Zuccaro et al., 2020).

1.2.2 Τρόποι ανάπτυξης

Η καλλιέργεια μικροφυκών μπορεί να διαφοροποιηθεί ως προς τον τρόπο ανάπτυξης και το μεταβολικό μονοπάτι που αξιοποιεί για την παραγωγή ενέργειας (Zuccaro et al., 2020). Διαδεδομένοι τρόποι ανάπτυξης είναι οι: φωτοαυτοτροφικός, ετεροτροφικός και μιξοτροφικός (Chew et al., 2018).

Ο πιο κοινός τρόπος ανάπτυξης μικροφυκών είναι ο φωτοαυτοτροφικός. Τα μικροφύκη που καλλιεργούνται με τον τρόπο αυτό έχουν την ικανότητα να απορροφούν την ηλιακή ακτινοβολία και το CO₂ της ατμόσφαιρας και να τα αξιοποιούν ως πηγή ενέργειας και άνθρακα αντίστοιχα για την παραγωγή οργανικών ενώσεων (Vuppaladadiyam et al., 2018). Η αξιοποίηση της ηλιακής

ακτινοβολίας ως πηγή ενέργειας καθιστά την όλη διαδικασία οικονομική επιλογή, ιδίως για τη βιομηχανία (Brennan & Owende, 2010). Ωστόσο υπάρχουν περιπτώσεις που η ηλιακή ακτινοβολία δεν επαρκεί για την κάλυψη των αναγκών, όπως όταν η καλλιέργεια γίνεται σε αντιδραστήρες μεγάλου όγκου, σε εσωτερικό χώρο ή εξωτερικά σε περιοχές του πλανήτη που η διάρκεια της ημέρας είναι μικρή. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος χρησιμοποιούνται τεχνητές πηγές φωτός, όπως λάμπες LED, οι οποίες δίνουν επιπλέον τη δυνατότητα ενίσχυσης της παραγωγής συγκεκριμένων μεταβολιτών αν χρησιμοποιηθούν λάμπες με τα κατάλληλα μήκη κύματος (Saha & Murray, 2018). Ένας ακόμα παράγοντας που μπορεί να περιορίσει την ανάπτυξη των μικροφυκών είναι η χαμηλή συγκέντρωση του ατμοσφαιρικού αέρα σε CO₂ που επιλύεται με την επιπλέον τεχνητή παροχή CO₂ (Wilson et al., 2014).

Στον ετεροτροφικό τρόπο ανάπτυξης τα μικροφύκη χρησιμοποιούν οργανικά υποστρώματα ως πηγή άνθρακα αλλά και ενέργειας. Η ετεροτροφία επιλέγεται στις περιπτώσεις που ο μη επαρκής φωτισμός αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την επίτευξη υψηλής παραγωγής βιομάζας. Ως πηγές άνθρακα χρησιμοποιούνται συνήθως υποστρώματα χαμηλού κόστους όπως η γλυκερόλη, η λακτόζη, η μαννόζη και το οξικό οξύ, ώστε να μη γίνεται ιδιαίτερα δαπανηρή η ανάπτυξη της καλλιέργειας. Θετικό αυτής της μεθόδου είναι ότι επιτυγχάνονται με γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης πολύ υψηλές συγκεντρώσεις βιομάζας, ενώ στα αρνητικά περιλαμβάνεται ο αυξημένος κίνδυνος επιμόλυνσης της καλλιέργειας λόγω της παρουσίας οργανικών υποστρωμάτων (Zuccaro et al., 2020). Ο ετεροτροφικός τρόπος ανάπτυξης δεν προτιμάται όταν τα επιθυμητά προϊόντα είναι δευτερογενείς μεταβολίτες και χρωστικές, αφού το σκοτάδι οδηγεί σε αναστολή της παραγωγής τους (Lowrey et al., 2016).

Στις καλλιέργειες που αναπτύσσονται μιξοτροφικά τα μικροφύκη μπορούν να αξιοποιήσουν τόσο την ηλιακή ακτινοβολία και το CO₂ όσο και οργανικές ενώσεις που είναι διαθέσιμες στο υπόστρωμα. Το φως και ο ανόργανος άνθρακας χρησιμοποιούνται στη φωτοσύνθεση και ο οργανικός άνθρακας στην αερόβια αναπνοή (Zuccaro et al., 2020). Η μιξοτροφία συνδυάζει τα θετικά αυτοτροφίας και ετεροτροφίας, ενώ αποφεύγει τα μειονεκτήματά τους (Zhan et al., 2017). Συγκεκριμένα, σε αυτό τον τύπο ανάπτυξης η διαθεσιμότητα φωτός δεν αποτελεί πλέον περιοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη των μικροφυκών, ενώ οι δευτερογενείς μεταβολίτες

Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή

που απουσιάζουν από τις καλλιέργειες που αναπτύσσονται ετεροτροφικά παράγονται κανονικά από τα μικροφύκη (Alkhamis & Qin, 2016).

1.2.3 Άλλοι παράγοντες

Όπως έχει γίνει ήδη κατανοητό ιδιαίτερη σημασία για την ομαλή ανάπτυξη των μικροφυκών έχει η διαθεσιμότητα φωτός. Εκτός από τις καιρικές συνθήκες ή το είδος της τεχνητής πηγής που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια τους, η διαθεσιμότητα του φωτός εξαρτάται και από παράγοντες εντός της καλλιέργειας. Καθώς τα κύτταρα μετακινούνται μέσα στο θρεπτικό μέσο και αλλάζουν διαρκώς θέση, μεταβάλλεται η απόσταση τους από τη φωτεινή πηγή και συνεπώς η ένταση και η ποιότητα του φωτός που φτάνει σε αυτά (Abu-Ghosh et al., 2016). Επίσης, σημαντική παράμετρος είναι η πυκνότητα της καλλιέργειας, αφού όσο αυτή αυξάνεται τόσο εντείνονται τα φαινόμενα αυτο-σκίασης (self-shade) μεταξύ των κυττάρων επηρεάζοντας αρνητικά τη φωτοσύνθεση (González-Camejo et al., 2019).

Η θερμοκρασία είναι ένας ακόμα παράγοντας που επιδρά άμεσα στη φυσιολογική και μορφολογική κατάσταση των μικροφυκών και της καλλιέργειας συνολικά (Kalita et al., 2011). Κάθε είδος εμφανίζει τη δική του βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης, με τα περισσότερα να κυμαίνονται ανάμεσα στους 18 και τους 30 °C. Η διατήρηση της θερμοκρασίας εντός του βέλτιστου εύρους για το καλλιεργούμενο μικροφύκος είναι σημαντική για την ομαλή ανάπτυξη του, αφού μη ευνοϊκές θερμοκρασίες οδηγούν σε αναστολή ζωτικών κυτταρικών λειτουργιών, όπως η αναπνοή (Vurpaladadiyam et al., 2018). Επιπλέον, σημαντική για τη διαδικασία της καλλιέργειας είναι η σωστή αλατότητα του θρεπτικού μέσου, καθώς υψηλές τιμές οδηγούν σε ωσμωτική καταπόνηση και επιδρούν αρνητικά στον κυτταρικό μεταβολισμό (Vurpaladadiyam et al., 2018).

Παράλληλα, υψηλής σπουδαιότητας είναι η διατήρηση του επιθυμητού για κάθε είδος εύρους pH, καθώς και αυτό αποτελεί παράγοντα που επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη των μικροφυκών. Συγκεκριμένα, το pH επιδρά μεταξύ άλλων στην ενεργότητα των ενζύμων, την ικανότητα πρόσληψης θρεπτικών όπως ο φώσφορος και τη διαθεσιμότητα του ανόργανου άνθρακα (Khalil et al., 2010). Τα περισσότερα είδη εμφανίζουν βέλτιστη ανάπτυξη σε ελαφρώς

αλκαλικές συνθήκες. Ωστόσο, κατά την καλλιέργεια σε κλειστά συστήματα, το pH σταδιακά αυξάνεται λόγω της απορρόφησης του διαλυμένου στο θρεπτικό μέσο CO₂ από τα κύτταρα. Για τη διατήρηση του pH στα επιθυμητά επίπεδα χρησιμοποιείται η παροχή επιπρόσθετου CO₂, οργανικών ή ανόργανων οξέων (Grobbelaar, 2003; Zuccaro et al., 2020).

Στους σημαντικούς παράγοντες για την επιτυχή ανάπτυξη μιας καλλιέργειας περιλαμβάνονται τα περιεχόμενα στο θρεπτικό μέσο θρεπτικά συστατικά. Για την βέλτιστη ανάπτυξη τους τα μικροφύκη χρειάζονται ένα σύνολο μακροθρεπτικών, βιταμινών και ιχνοστοιχείων στις κατάλληλες ποσότητες και στις κατάλληλες βιο-απορροφήσιμες χημικές μορφές. Με βάση τη διαθέσιμη βιβλιογραφία έχουν αναπτυχθεί θρεπτικά μέσα που έχουν συγκεκριμένη σύσταση και ακολουθούν την C:N:P αναλογία 106:16:1, η οποία έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα αποδοτική. Ωστόσο, σε αρκετές περιπτώσεις η σύσταση του θρεπτικού αποκλίνει από την παραπάνω αναλογία προκειμένου να προσαρμοστεί στις ακριβείς μεταβολικές ανάγκες του καλλιεργούμενου μικροφύκου και στις περιβαλλοντικές συνθήκες (Arrigo, 2005).

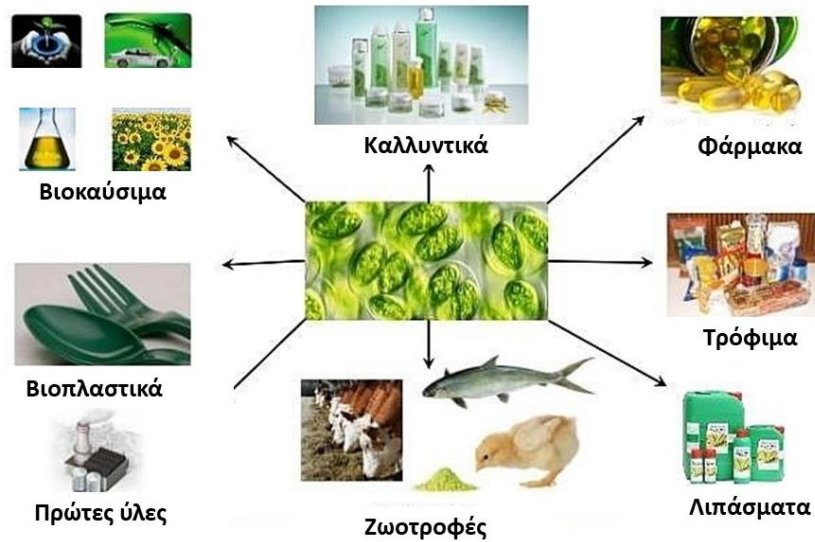
Το πλέον σημαντικό από τα απαραίτητα χημικά στοιχεία είναι ο άνθρακας (C), που αποτελεί κατά μέσο όρο το 50% του ξηρού βάρους των μικροφυκών. Τα κύτταρα απορροφούν άνθρακα, στη μορφή του ελεύθερου CO₂, με παθητική διάχυση ή με ενεργητική μεταφορά μέσα από μεμβρανικές αντλίες. Αξιοποιούν αυτή την ανόργανη μορφή μέσω της φωτοσύνθεσης, σε μια χημική ισορροπία που εξαρτάται άμεσα από το pH του θρεπτικού μέσου (Zuccaro et al., 2020). Το άζωτο (N) αποτελεί συστατικό των νουκλεϊκών οξέων, των αμινοξέων αλλά και χρωστικών, συνεπώς είναι απαραίτητο για τα μικροφύκη και αποτελεί το 1-14% του ξηρού τους βάρους (Grobbelaar, 2003). Η προσθήκη του στο θρεπτικό γίνεται κυρίως σε ανόργανη μορφή σαν NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺, αλλά και σε οργανική μορφή ως αμινοξέα ή ουρία (Zuccaro et al., 2020). Ο φώσφορος αποτελεί συχνά περιοριστικό παράγοντα στην ανάπτυξη των μικροφυκών γιατί δεν παρέχεται στο θρεπτικό μέσο σε επαρκείς ποσότητες. Πρόκειται για χημικό στοιχείο απαραίτητο μεταξύ άλλων για την ενδοκυτταρική μεταφορά ενέργειας και τη σύνθεση φωσφολιπιδίων. Επιπλέον, αναγκαία για την ομαλή ανάπτυξη των καλλιεργειών μικροφυκών είναι κάποια ιχνοστοιχεία όπως το πυρίτιο, οι βιταμίνες και μέταλλα (Vurpaladadiyam et al., 2018).

Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή

1.3 Προϊόντα και εφαρμογές

Εκτός από την καθοριστική συμμετοχή τους στην ισορροπία των οικοσυστημάτων, αφού σε πολλά αποτελούν τους βασικούς παραγωγούς, τα τελευταία χρόνια τα μικροφύκη συμμετέχουν ενεργά στην ανθρώπινη βιομηχανία και οικονομία (Εικόνα 5). Βιομάζα μικροφυκών καταναλώνεται απευθείας σαν τρόφιμο σε πολλές περιοχές του κόσμου, ενώ χρησιμοποιείται και σαν συμπλήρωμα στην τροφή ζώων ώστε να βελτιωθεί η υγεία τους και η ποιότητα των παραγόμενων από αυτά προϊόντων (Ścieszka & Klewicka, 2019). Χάρη στον ιδιαίτερο μεταβολισμό τους τα μικροφύκη παράγουν πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες με φαρμακευτικό ενδιαφέρον, αφού εμφανίζουν αντι-βακτηριακές και αντι-ιικές ιδιότητες (Stevenson et al., 2002). Οι ενώσεις αυτές αξιοποιούνται από τη βιομηχανία για την παραγωγή ποικίλων προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Τέτοιες ενώσεις μπορεί να είναι βιταμίνες, πεπτίδια, καροτενοειδή, λιπαρά οξέα, αντιοξειδωτικά κ.α. (Levasseur et al., 2020). Τα τελευταία χρόνια, η βιομάζα μικροφυκών και οι ενώσεις που προκύπτουν από τα εκχυλίσματα τους ελέγχονται από ερευνητικές ομάδες, παρέχοντας πολύ υποσχόμενα αποτελέσματα για αξιοποίηση τους για τη μείωση της συχνότητας εμφάνισης καρκίνου, την πρόληψη ασθενειών, τον έλεγχο των φλεγμονών και της παχυσαρκίας (Deng & Chow, 2010; Lordan et al., 2011). Άλλα χαρακτηριστικά παραδείγματα προϊόντων που παράγονται με βάση τα μικροφύκη αποτελούν οι χρωστικές για τη βιομηχανία των τροφίμων, το άγαρ και διάφορα λιπάσματα (Sharma & Sharma, 2017). Όλα τα παραπάνω εμπορικά προϊόντα προωθούν τη βιοτεχνολογία των μικροφυκών και υποστηρίζουν την παγκόσμια οικονομία, βρίσκοντας εφαρμογές σε πολλούς τομείς όπως η διατροφή, η φαρμακευτική και η κοσμετολογία (Bhalamurugan et al., 2018).

Επιπλέον, μελετάται η χρήση των μικροφυκών σαν εναλλακτική και ανανεώσιμη πηγή ενέργειας με τη μορφή βιοκαυσίμων (αιθανόλη, βουτάνιο, μεθανόλη κ.α.) (A. K. Khan et al., 2020). Τα βιοκαύσιμα τρίτης γενιάς που παράγονται από μικροφύκη παρουσιάζουν ενδιαφέρον λόγω των αυξημένων ενεργειακών αποδόσεων ανά μονάδα επιφάνειας, της κατανάλωσης διοξειδίου του άνθρακα, της ικανότητας κατανάλωσης πόρων χαμηλού κόστους για την ανάπτυξη τους και του χαμηλού ανταγωνισμού με τη βιομηχανία τροφίμων. Συχνή είναι και η χρήση τους για εμπορικές εφαρμογές σχετιζόμενες με την παραγωγή υδρογόνου (Hu et al., 2008; Melis & Harpe, 2001).



Εικόνα 5 Προϊόντα και εφαρμογές των μικροφυκών (Τροποποίηση, solarisbiotechusa.com).

Παρά τα πολλαπλά οφέλη και πλεονεκτήματα που εμφανίζει η αξιοποίηση μικροφυκών στη βιομηχανία για την παραγωγή προϊόντων, η προσέγγιση αυτή εμφανίζει ένα σοβαρό μειονέκτημα. Πρόκειται για το υψηλό κόστος ανάπτυξης των μικροφυκών και απομόνωσης των προϊόντων τους (Behera et al., 2022). Η αντιμετώπιση αυτού του ζητήματος έχει κερδίσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητικών ομάδων τα τελευταία χρόνια. Σαν κυρίαρχη λύση για τη μείωση του κόστους εμφανίζεται η ανάπτυξη μικροφυκών μέσα από τη λογική του βιοδιυλιστήρα. Με τρόπο παρόμοιο με το συμβατικό διυλιστήριο του πετρελαίου, και στο βιοδιυλιστήριο ακολουθείται αλυσίδα διαδοχικών διεργασιών που οδηγεί σε παραγωγή πολλαπλών προϊόντων από ένα αρχικό υλικό (Behera et al., 2022; Chandra et al., 2019). Για την επίτευξη αυτού του σκοπού είναι απαραίτητη η καλή γνώση των φυσιολογικών και βιοχημικών ιδιοτήτων των μικροφυκών, ώστε να επιλεγούν τα κατάλληλα προϊόντα-στόχοι και οι σωστές διεργασίες για την απόκτηση τους. Συχνά γίνεται προσπάθεια ταυτόχρονης παραγωγής και απομόνωσης πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών από τη βιομάζα των μικροφυκών (Park et al., 2022).

Μια άλλη προσέγγιση που ακολουθείται στην προσπάθεια μείωσης του κόστους των μικροφυκών και των προϊόντων τους είναι η βελτιστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας (pH, θερμοκρασία, διαθεσιμότητα φωτός κτλ.) για κάθε συγκεκριμένο είδος που καλλιεργείται. Με

Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή

τον τρόπο αυτό αυξάνεται η απόδοση της διαδικασίας παραγωγής των επιθυμητών προϊόντων, χωρίς να αυξάνεται το κόστος παραγωγής (Loke Show, 2022). Σαν πιθανή εναλλακτική για την αύξηση της παραγωγής και κατ' επέκταση τη μείωση του κόστους μελετάται και η μεταβολική χειραγώγηση των μικροφυκών. Έχει δειχθεί ότι η ελεγχόμενη τροποποίηση κάποιων συνθηκών καλλιέργειας σε μη βέλτιστες τιμές μπορεί να κατευθύνει το μεταβολισμό των κυττάρων προς συγκεκριμένα μονοπάτια και να οδηγήσει στην αύξηση της παραγωγής συγκεκριμένων μεταβολιτών (Lehmuskero et al., 2018). Για παράδειγμα, η ανάπτυξη σε έντονα βασικές τιμές pH οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή και συσσώρευση λιπαρών ενώ παρόμοιο αποτέλεσμα έχει και η μειωμένη παροχή αζώτου στα μικροφύκη (Breuer et al., 2013; Feng et al., 2020).

Η λογική του βιο-διυλιστήρα και η μεταβολική χειραγώγηση μπορούν να συνδυαστούν πολύ αποδοτικά και να συμβάλουν στην παραγωγή οικονομικά βιώσιμων προϊόντων από μικροφύκη. Με την κατάλληλη χρήση κάποιου παράγοντα καταπόνησης, τροποποιείται ο κυτταρικός μεταβολισμός και στρέφεται προς την επιθυμητή κατεύθυνση. Σαν αποτέλεσμα, μειώνεται ο χρόνος που απαιτείται για να ξεκινήσει η παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών και επιτυγχάνεται η ταυτόχρονη συν-παραγωγή τους με τους πρωτογενείς μεταβολίτες. Η συν-παραγωγή επιτρέπει με τη σειρά της την ταυτόχρονη απομόνωση πολλαπλών μεταβολιτών-προϊόντων χωρίς να απαιτούνται διακριτές διεργασίες, μειώνοντας εντυπωσιακά το χρόνο και το κόστος της συνολικής πορείας απομόνωσης (Park et al., 2022).

Τα μικροφύκη αξιοποιούνται όλο και περισσότερο για εμπορική εκμετάλλευση και παραγωγή προϊόντων, ωστόσο η αξενική καλλιέργεια τους σε βιομηχανική κλίμακα είναι δύσκολη και η ταυτόχρονη παρουσία άλλων μικροοργανισμών συχνά θεωρείται αρνητική επιμόλυνση (Ramanan et al., 2015). Λόγω της συνύπαρξης τους με άλλους μικροοργανισμούς στο φυσικό περιβάλλον, συχνά τα μικροφύκη αναπτύσσονται καλύτερα σε συγκαλλιέργειες, με βακτήρια για παράδειγμα, παρά σε αξενικές συνθήκες (Mouget et al. 1995; Guo & Tong, 2014). Γενικά, η απόκτηση, η μελέτη και η διατήρηση αξενικών καλλιεργειών μικροφυκών είναι δύσκολη και εμφανίζει διαφορές στη φυσιολογία και το μεταβολισμό, σε σχέση με συγκαλλιέργειες (Amin et al., 2015; Cho et al., 2013, 2015).

Μετά την επιτυχή ανάπτυξη της καλλιέργειας των μικροφυκών είναι απαραίτητη η συλλογή, η απομόνωση και ο καθαρισμός του προϊόντος. Η καθίζηση στον πυθμένα του βιοαντιδραστήρα λόγω βαρύτητας δεν είναι αποτελεσματική για όλα τα μικροφύκη, καθώς αρκετά είδη διαθέτουν μαστίγια με τα οποία κολυμπούν. Μέθοδοι που χρησιμοποιούνται ανάλογα με το μέγεθος και τις υπόλοιπες ιδιότητες των υπό καλλιέργεια ειδών είναι η φυγοκέντρηση, το φιλτράρισμα μέσω κάποιας μεμβράνης υπό διαφορά πίεσης και η επίπλευση υπό αερισμό, για είδη που έχουν χαμηλή πυκνότητα (Chew et al., 2018). Όταν το επιθυμητό προϊόν δεν είναι συνολικά η βιομάζα, τα κύτταρα χρειάζεται να σπάσουν ώστε να απομονωθούν οι επιμέρους ενώσεις. Παραδείγματα διεργασιών που χρησιμοποιούνται είναι η μηχανική διάσπαση, η εφαρμογή υπερήχων και η ενζυμική διάσπαση (Kiran & Venkata Mohan, 2021). Επειδή πολλές από τις επιθυμητές βιοδραστικές ενώσεις είναι ευαίσθητες οι διαδικασίες εξαγωγής και εκχύλισης παρακολουθούνται στενά ούτως ώστε να αποφεύγονται φαινόμενα όπως η οξείδωση (Masi et al., 2023).

1.4 *Chlamydomonas reinhardtii*

Το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* είναι ένα μονοκύτταρο, φωτοσυνθετικό Χλωροφύκος (*Chlorophyta*), που χρησιμοποιείται ευρέως στις εργαστηριακές μελέτες σαν οργανισμός μοντέλο (Εικόνα 6, Πίνακας 1). Η πρώτη απομόνωση του συγκεκριμένου είδους πραγματοποιήθηκε το 1945 στο έδαφος χωραφιού με καλλιέργειες πατάτας, στη Μασαχουσέτη των ΗΠΑ (Masi et al., 2023). Η μορφολογική περιγραφή του, μαζί με γενετικές μελέτες παρουσιάστηκαν το 1992 από το Ralph Lewin στο 5^ο Παγκόσμιο Συνέδριο για το *Chlamydomonas* και αποτέλεσαν την απαρχή της ευρείας ερευνητικής αξιοποίησης του (Harris, 2001).

Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή



Εικόνα 6 *C. reinhardtii* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) (Smith & Lefebvre, 1996).

Στα πλεονεκτήματα της χρήσης του περιλαμβάνεται η ευκολία και η ταχύτητα στην ανάπτυξη του στο εργαστήριο, σε σχέση με τα φυτικά μοντέλα, καθώς υπό ευνοϊκές συνθήκες διπλασιάζεται κάθε οκτώ ώρες (Harris, 2001). Επιπλέον, είναι ένα απλοειδές σύστημα και επιτρέπει στις μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας (loss-of-function) να γίνονται άμεσα παρατηρήσιμες στο φαινότυπο (Sasso et al., 2018). Αν και σύμφωνα με τις ταξινομικές μελέτες υπάρχουν περισσότερα από 500 γνωστά είδη που ανήκουν στο γένος *Chlamydomonas*, το *C. reinhardtii* είναι αυτό που χρησιμοποιείται και μελετάται ευρέως (Sasso et al., 2018). Πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι τα εργαστηριακά στελέχη έχουν συσσωρεύσει μέσα σε αυτές τις δεκαετίες πλήθος μεταλλάξεων, με τα γενετικά τους χαρακτηριστικά να διαφοροποιούνται αισθητά από το στέλεχος φυσικού τύπου, με αποτέλεσμα πιθανότατα να έχουν χάσει τη δυνατότητα επιβίωσης εκτός εργαστηρίου, στο περιβάλλον (Sasso et al., 2018).

Πίνακας 1. Ταξινομική κατάταξη του <i>C. reinhardtii</i> (www.ncbi.nlm.nih.gov).	
Βασίλειο	Eukaryota
Υποβασίλειο	Viridiplantae
Φύλο	Chlorophyta
Κλάση	Chlorophyceae
Τάξη	Chlamydomonadales
Οικογένεια	Chlamydomonadaceae
Γένος	<i>Chlamydomonas</i>
Είδος	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>

Το *C. reinhardtii* τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται εκτεταμένα για εργαστηριακή έρευνα σε πολλούς κλάδους. Έχει αξιοποιηθεί, μεταξύ άλλων, για τη μελέτη της βιογένεσης των μαστιγίων και του μηχανισμού κίνησης, της κυτταρικής διαίρεσης, της φωτοσύνθεσης και του τρόπου λειτουργίας των φωτοσυστημάτων, σε εργασίες γενετικής μηχανικής αλλά και για τη μελέτη συγκεκριμένων μεταβολικών μονοπατιών (Masi et al., 2023). Σημαντική για την καλύτερη αξιοποίηση του είδους υπήρξε η ολοκλήρωση της αλληλούχισης του γονιδιώματος του το 2007 (Merchant et al., 2007). Πλήθος πληροφοριών γύρω από το γονιδίωμα και το μεταγράφημα του *C. reinhardtii* υπάρχει πλέον διαθέσιμο στο διαδικτυακό τόπο Phytozome του Joint Genome Institute (Goodstein et al., 2012). Ένα ακόμη καθοριστικό ορόσημο για την ερευνητική αξιοποίηση του συγκεκριμένου είδους υπήρξε η δημιουργία μιας βιβλιοθήκης με μεταλλάγματα *C. reinhardtii* που έχουν προκύψει με ένθεση πλασμιδίου σε συγκεκριμένα σημεία του γονιδιώματος του στελέχους φυσικού τύπου. Στη βιβλιοθήκη αυτή υπάρχουν διαθέσιμα χιλιάδες καλά χαρτογραφημένα μεταλλάγματα που καλύπτουν σχεδόν οποιοδήποτε σημείο του γονιδιώματος του μικροφύκου (X. Li et al., 2016).

Παράλληλα, διαρκώς αυξανόμενη εξάπλωση γνωρίζει η καλλιέργεια του *C. reinhardtii* για την παραγωγή εμπορικά αξιοποιήσιμων προϊόντων. Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του μεταβολισμού του, του επιτρέπουν την παραγωγή πλήθους πρωτογενών και δευτερογενών

Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή

μεταβολιτών με εμπορικό ενδιαφέρον. Σε αυτούς περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων πολυσακχαρίτες, χλωροφύλλες, καροτενοειδή, λιπίδια, πολυφαινόλες, φλαβονοειδή και ταννίνες που αξιοποιούνται στους τομείς της φαρμακευτικής και της διατροφής (Masi et al., 2023; Scranton et al., 2015). Μάλιστα κατά τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια ώστε να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες καλλιέργειας του συγκεκριμένου μικροφύκου για την ταχύτερη και πιο αποδοτική οικονομικά ανάπτυξη του σε μεγάλη κλίμακα, με την καλλιέργεια σε ετεροτροφικές συνθήκες να είναι πολλά υποσχόμενη (Zhang et al., 2019). Σύμφωνα με τη σχετική άδεια (No 773) του Οργανισμού Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) το *C. reinhardtii* αναγνωρίζεται ως οργανισμός ασφαλής για την κατανάλωση από τον άνθρωπο (GRAS) γεγονός που απελευθερώνει την αξιοποίηση του στους σχετικούς βιομηχανικούς τομείς (Masi et al., 2023). Η ενσωμάτωση του *C. reinhardtii* αλλά και ενώσεων που παράγονται από αυτό στην ανθρώπινη διατροφή εμφανίζει πλεονεκτήματα. Σε αυτά περιλαμβάνεται η βελτίωση της υγείας του γαστρεντερικού συστήματος, όπως φάνηκε από κλινική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε εθελοντές στους οποίους η κατανάλωση κυττάρων *C. reinhardtii* οδήγησε σε βελτίωση του μικροβιώματος, μείωση των ανισορροπιών και βελτίωση της συνολικής υγείας του εντέρου, ακόμη και υπό συνθήκες καταπόνησης (Fields et al., 2020). Μια άλλη εφαρμογή, με ενδιαφέρον για τον κλάδο της ιατρικής, σχετίζεται με το πρόβλημα της διαρκώς αυξανόμενης αντοχής των παθογόνων μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά. Το *C. reinhardtii* έχει την ικανότητα να παράγει αρκετούς μεταβολίτες που εμφανίζουν αντιβιοτική δραστηριότητα, οι οποίοι πλέον μελετώνται διεξοδικά (Bhowmick et al., 2020). Ανάμεσα τους, ως πολλά υποσχόμενοι, ξεχωρίζουν οι θειούχοι πολυσακχαρίτες οι οποίοι αναστέλλουν το σχηματισμό των βακτηριακών βιοϋμενίων, τα οποία ευθύνονται για μολύνσεις τροφίμων και ταυτόχρονα αποτελούν σοβαρό πρόβλημα σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα (Kamble et al., 2018; Vishwakarma & Vavilala, 2019).

1.5 *Tetraselmis chuii*

Ένα από τα πλέον διαδεδομένα μονοκύτταρα, θαλάσσια μικροφύκη είναι το *Tetraselmis chuii* (*Chlorophyta*) που απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον Butcher το 1959 στις ακτές της Μεγάλης Βρετανίας (Εικόνα 7, Πίνακας 2). Φέρει μαστίγια για τη μετακίνηση του και υπό βέλτιστες συνθήκες έχει ταχύ ρυθμό ανάπτυξης, αν και αναπτύσσεται ικανοποιητικά σε ποικίλες

συνθήκες θερμοκρασίας, αλατότητας και pH, συνεπώς η καλλιέργεια του είναι σχετικά εύκολη (Rahman et al., 2017). Το συγκεκριμένο μικροφύκος δεν παράγει τοξίνες και είναι αβλαβές για τα υπόλοιπα θαλάσσια είδη, ενώ ταυτόχρονα έχει ιδανική σύσταση σε βιομόρια με αποτέλεσμα να έχει υψηλή διατροφική αξία (Brown et al., n.d.; Hallmann, n.d.). Για το λόγο αυτό ήδη από τα τέλη της δεκαετίας του '90 το *T. chuii* χρησιμοποιήθηκε ως ζωντανή τροφή για προνύμφες και μετανύμφες γαρίδων, καθώς και για την εκτροφή δίθυρων μαλακίων (D'Souza, n.d.; Patino-Suarez et al., 2004).



Εικόνα 7 *T. chuii* σε οπτικό μικροσκόπιο (utex.org).

Πίνακας 2 Ταξινομική κατάταξη του <i>T. chuii</i> (www.ncbi.nlm.nih.gov).	
Βασίλειο	Eukaryota
Υποβασίλειο	Viridiplantae
Φύλο	Chlorophyta
Κλάση	Chlorodendrophyceae
Τάξη	Chlorodendrales
Οικογένεια	Chlorodendraceae
Γένος	<i>Tetraselmis</i>
Είδος	<i>Tetraselmis chuii</i>

Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή

Συγκεκριμένα, το *T. chuii* παράγει πλήθος επιθυμητών ενώσεων, με κύριες τις πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες και τα λιπαρά οξέα (Becker, 2007). Ιδιαίτερα ευνοϊκή είναι η ικανότητα του να βιοσυνθέτει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα, ενώ ταυτόχρονα παράγει τα υψηλής θρεπτικής αξίας πολυακόρεστα λιπαρά οξέα εικοσαπεντανοϊκό (EPA) και εικοσιδιεξανοϊκό (DHA) (Mantecón et al., 2019). Επιπλέον, το μικροφύκος αυτό παράγει πλήθος φαινολικών ενώσεων καθώς και κατοτενοειδή, όπως ασταξανθίνη, ζεαξανθίνη, α-καροτένιο και λουτεΐνη (Banskota et al., 2019; Goiris et al., 2012). Σύμφωνα με μελέτες, υψηλό είναι και το αντιοξειδωτικό δυναμικό των εκχυλισμάτων *T. chuii*, όπως αυτό προσδιορίστηκε με τις μεθόδους FRAP και TEAC (Banskota et al., 2019; Goiris et al., 2012).

Χάρη σε όλα τα παραπάνω ευνοϊκά χαρακτηριστικά του *T. chuii*, η αξιοποίηση του στη βιομηχανία είναι πλέον εκτεταμένη, με την κύρια χρήση του να είναι ως πρώτη ύλη στις υδατοκαλλιέργειες (Rahman et al., 2017). Χρησιμοποιείται για τη διατροφή των προνυμφών σε μαλάκια, γαρίδες αλλά και ψάρια, καθώς και στον εμπλουτισμό των καλλιεργειών rotifers και *Artemia nauplii* που πραγματοποιείται στις εγκαταστάσεις υδατοκαλλιέργειών (Conceição et al., 2010). Σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε γαρίδες και ψάρια, η κατανάλωση *T. chuii* έχει θετικό αντίκτυπο στο ανοσοποιητικό σύστημα των οργανισμών (Cerezuela et al., 2012; Rahman et al., 2017). Σχετικά πρόσφατη καινοτομία αποτελεί η ανάπτυξη δύο προϊόντων με βάση λυοφιλωμένη βιομάζα του μικροφύκου *T. chuii* από την εταιρεία Fitorplancton Marino, S.L. (El Puerto de Santa Maria, Cadiz, Spain), που εξασφάλισε τη σχετική αδειοδότηση για ανθρώπινη κατανάλωση από την Ευρωπαϊκή Ένωση, ενώ το 2018 επιτράπηκε και η κατανάλωση τους στον Καναδά (Mantecón et al., 2019; S. Torres et al., 2021).

1.6 *Chlorella variabilis*

Τα πράσινα μικροφύκη του γένους *Chlorella* εμφανίστηκαν πριν 2.5 δισεκατομμύρια χρόνια και επιβίωσαν στις ιδιαίτερα αφιλόξενες συνθήκες που επικρατούσαν τότε στον πλανήτη χάρη στο εξαιρετικά σκληρό εξωτερικό κυτταρικό τοίχωμα τους και την ικανότητα γρήγορης ανάπτυξης (Rajaritamahuni et al., 2019). Σήμερα, τα είδη του γένους συναντώνται ευρέως σε υδάτινα οικοσυστήματα γλυκού νερού ενώ εντοπίζονται και στην ξηρά. Τυπικά εμφανίζουν μικρό

μέγεθος (διάμετρος 2 έως 10 mm) και είναι μονοκύτταρα, κοκοειδή, μη κινητικά και περιέχουν ένα μόνο χλωροπλάστη (Blanc et al., 2010). Αρχικά, περισσότερα από 100 στελέχη μικροφυκών είχαν αποδοθεί στο γένος *Chlorella*, με την ταξινόμηση τους να παραμένει αναξιόπιστη λόγω της έλλειψης ευδιάκριτων μορφολογικών χαρακτηριστικών. Πλέον, σύμφωνα με τις μοριακές αναλύσεις, τα στελέχη αυτά κατανέμονται σε δύο κατηγορίες Χλωροφύτων, τα *Trebouxiophyceae* που περιέχουν το γένος *Chlorella*, και τα *Chlorophyceae* (Takeda, 1988). Τα *Trebouxiophyceae* περιλαμβάνουν τα περισσότερα γνωστά ενδοσυμβιωτικά πράσινα μικροφύκη, που ζουν σε λειχήνες, μονοκύτταρους ευκαρυώτες, φυτά και ζώα (π.χ. μύδια, ύδρα, κ.λπ.) (Blanc et al., 2010).

Ερευνητικά, το γένος *Chlorella sp.* αξιοποιείται εκτεταμένα, χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι πρώτες μελέτες σχετικά με το μηχανισμό της φωτοσύνθεσης (Benson, n.d.). Παράλληλα, εμφανίζει μεγάλο εμπορικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον. Γνωστές εφαρμογές είναι η αξιοποίηση για την παραγωγή βιοκαυσίμων, τη δέσμευση CO₂, τη διαχείριση υδάτινων λυμάτων, την παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων (González et al., 1997; Morimoto et al., 1995; Ramanan et al., 2010; H. Xu et al., 2006), αλλά και την κατανάλωση σαν τρόφιμο. Σύμφωνα με έρευνες ήδη καταναλώνεται από 10 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως (Andersen, 2005). Επίσης, αρκετά είδη *Chlorella* μελετώνται ερευνητικά ως προς τις αλληλεπιδράσεις τους με άλλους οργανισμούς, όπως τα βακτήρια και οι ιοί. Παράδειγμα αποτελεί η χρήση των βακτηρίων *Azospirillum sp.* και *Bacillus sp.* για την προώθηση της ανάπτυξης του *Chlorella vulgaris*, επηρεάζοντας την κυτταρική μορφολογία και την παραγωγή λιπιδίων και χρωστικών (Gonzalez & Bashan, 2000).

Το *Chlorella variabilis* είναι ένα χαρακτηριστικό μέλος του γένους *Chlorella*, που ανήκει στα *Trebouxiophyceae* (Πίνακας 3) (Blanc et al., 2010). Είναι πράσινο, μονοκύτταρο, φωτοσυνθετικό μικροφύκος του γλυκού νερού, με βασικό γνώρισμα του την παρουσία γλυκοζαμίνης ως κύριο συστατικό των ισχυρών κυτταρικών τοιχωμάτων του (Εικόνα 8) (Chuchird et al., 2001). Το πυρηνικό γονιδίωμα του έχει μέγεθος 46.2-Mb (Blanc et al., 2010). Αποτελεί επίσης οργανισμό-μοντέλο για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μικροφυκών/ιών αλλά και μια πιθανή πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων (Blanc et al., 2010) (Misra et al., 2013). Πρόκειται για ιδιαίτερο μικροφύκος που φέρει μια σειρά από μοναδικά χαρακτηριστικά. Είναι ενδοσυμβιώτης του

Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή

μονοκύτταρου πρωτόζωου *Paramecium bursaria*, ενώ και οι δύο μικροοργανισμοί διατηρούν την ικανότητα να αναπτύσσονται και χωριστά. Επίσης φιλοξενεί μια οικογένεια μεγάλων δίκλωνων DNA που βρίσκονται στο γλυκό νερό. Τέλος, το *C. variabilis* είναι το μοναδικό γνωστό μικροφύκος που περιέχει τα γονίδια HYDA που κωδικοποιούν για FeS cluster-binding domains (Meuser et al., 2011), γεγονός που το καθιστά ιδανικό για τη μελέτη της παραγωγής H₂ κατά τον αναερόβιο μεταβολισμό (Juneja et al., 2016).

Στην εργασία τους οι *Blanc et al.* πραγματοποίησαν αλληλούχιση και μελέτη του γονιδιώματος του *C. variabilis* NC64A (Blanc et al., 2010). Στα αποτελέσματα τους ταυτοποίησαν γονίδια που εμπλέκονται στη μείωση, τη σύντηξη γαμετών και τα μαστίγια και οδηγήθηκαν στην υπόθεση ότι το γένος *Chlorella* πιθανά διατήρησε την ικανότητα της σεξουαλικής αναπαραγωγής παρά το γεγονός ότι δεν έχει περιγραφεί ως τώρα κύκλος σεξουαλικής ζωής σε αυτό. Ωστόσο, είναι άξια απορίας η παρουσία εγγενούς αναπαραγωγής σε ένα μικροοργανισμό που μπορεί να πολλαπλασιάζεται ταχύτατα μέσω απλής διχοτόμησης. Στο *C. reinhardtii*, η σεξουαλική αναπαραγωγή πραγματοποιείται συνήθως σε συνθήκες καταπόνησης, όπως η έλλειψη αζώτου, οδηγώντας στη δημιουργία ενός ανθεκτικού ζυγώτη (Goodenough et al., 2007).



Εικόνα 8 *C. variabilis* σε οπτικό μικροσκόπιο (ccap.ac.uk).

Πίνακας 3 Ταξινομική κατάταξη του <i>C. variabilis</i> (www.algaebase.org).	
Βασίλειο	Eukaryota
Υποβασίλειο	Viridiplantae
Φύλο	Chlorophyta
Κλάση	Trebouxiophyceae
Τάξη	Chlorellales
Οικογένεια	Chlorellaceae
Γένος	<i>Chlorella</i>
Είδος	<i>Chlorella variabilis</i>

1.7 Αβιοτικές καταπονήσεις

Οι μονοκύτταροι οργανισμοί ζουν σε περιβάλλοντα που μεταβάλλονται διαρκώς, με αποτέλεσμα να εκτίθενται σε μη ευνοϊκές ή ακόμα και δυσμενείς συνθήκες και να καταπονούνται. Η καταπόνηση μπορεί να οφείλεται στη δράση άλλων μικροοργανισμών, οπότε και ονομάζεται βιοτική καταπόνηση, ή σε αβιοτικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα θρεπτικών, η αλατότητα κ.α. Σε αυτήν την περίπτωση πρόκειται για αβιοτική καταπόνηση (Zhu, 2016). Κοινή παράμετρος σε αρκετές αβιοτικές καταπονήσεις είναι η άμεση ή έμμεση αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) (Mittler, 2006). Προκειμένου να προσαρμοστούν στις αβιοτικές καταπονήσεις οι μικροοργανισμοί τροποποιούν το μεταβολισμό τους και παράγουν ενώσεις που συμβάλλουν στην επιβίωση τους, με τρόπο συγκεκριμένο και προσαρμοσμένο στην καταπόνηση που αντιμετωπίζουν σε κάθε περίπτωση. Συχνά οι μικροοργανισμοί εκτίθενται ταυτόχρονα σε περισσότερους από έναν παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης, όπως η ακατάλληλη θερμοκρασία και η έλλειψη θρεπτικών. Τέτοιου είδους περιβαλλοντικά ερεθίσματα, έχει αποδειχθεί στα φυτά ότι επάγουν την έκφραση διαφορετικών μοριακών και μεταβολικών μονοπατιών από ότι αν η κάθε καταπόνηση αντιμετωπιζόταν μεμονωμένα (Suzuki et al., 2005).

Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή

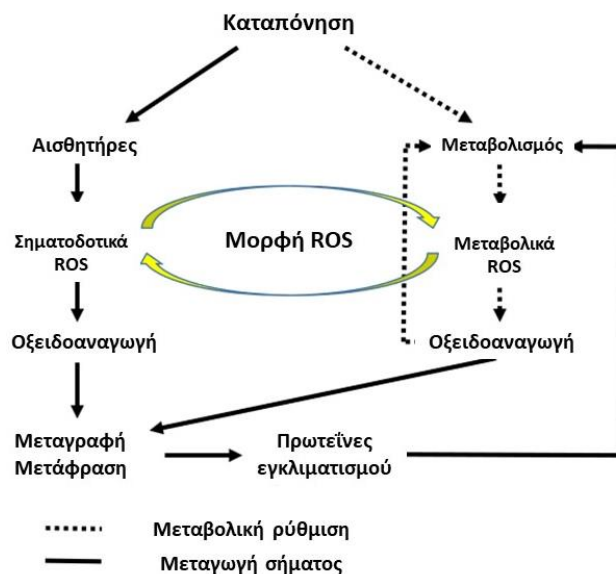
Τα μικροφύκη, χάρη στα ιδιαίτερα κυτταρικά χαρακτηριστικά τους, διαθέτουν μεγάλη προσαρμοστικότητα απέναντι στις αβιοτικές καταπονήσεις. Στους κύριους μηχανισμούς προσαρμογής και άμυνας τους περιλαμβάνεται η παραγωγή συγκεκριμένων μεταβολιτών. Αρκετοί από αυτούς έχουν μεγάλη αξία για τον άνθρωπο καθώς μπορούν να αξιοποιηθούν σε διάφορους τομείς της βιομηχανίας (Paliwal et al., 2017). Σαν αποτέλεσμα, οι αβιοτικές καταπονήσεις εφαρμόζονται συχνά σε καλλιέργειες μικροφυκών σαν εργαλείο που επάγει την παραγωγή των επιθυμητών προϊόντων. Ωστόσο, αν δεν ρυθμιστούν σωστά μπορεί να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο και κατάρρευση της καλλιέργειας, γεγονός με σημαντικό αντίκτυπο τόσο σε ερευνητικό όσο και σε βιομηχανικό επίπεδο. Μια συνήθης τακτική για την αποφυγή του μαζικού κυτταρικού θανάτου είναι η πραγματοποίηση της καλλιέργειας σε δύο επίπεδα. Αρχικά το μικροφύκος αναπτύσσεται υπό τις βέλτιστες συνθήκες και αφού παραχθεί αρκετή βιομάζα οι συνθήκες καλλιέργειας τροποποιούνται ώστε να προκύψει η καταπόνηση. Τέτοιες καλλιέργειες δίνουν το επιθυμητό προϊόν κατά τη δεύτερη φάση (M. Chen et al., 2011). Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετά διαθέσιμα παραδείγματα εφαρμογής αβιοτικών καταπονήσεων σε καλλιέργειες μικροφυκών με στόχο τη συσσώρευση κάποιου επιθυμητού μεταβολίτη. Η μειωμένη παροχή αζώτου ή φωσφόρου οδηγούν στη συσσώρευση τριακυλγλυκερόλης (TAG) (Rodolfi et al., 2009; Yeessang & Cheirsilp, 2011). Υψηλή αλατότητα, μη βέλτιστη θερμοκρασία καλλιέργειας ή ένταση φωτός οδηγούν στην αυξημένη παραγωγή λιπιδίων (Gouveia & Oliveira, 2009; Griffiths & Harrison, 2009) και κυρίως πολυακόρεστων ωμέγα 3 λιπαρών οξέων (PUFAs), καθώς το υψηλό ενεργειακό περιεχόμενο τους σε συνδυασμό με την ικανότητα τους να διατηρούν τη ρευστότητα των μεμβρανών συμβάλουν στην κυτταρική επιβίωση υπό τις αντίξοες συνθήκες (Cohen et al., 2000).

1.7.1 Οξειδωτική καταπόνηση

Μια από τις πλέον κοινές αβιοτικές καταπονήσεις που αντιμετωπίζουν οι οργανισμοί, και τα μικροφύκη ανάμεσα τους, είναι η οξειδωτική καταπόνηση. Περιβαλλοντικοί παράγοντες αλλά και ενδοκυτταρικές διεργασίες μπορεί να οδηγήσουν στη συσσώρευση ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) στο κύτταρο (Cirulis et al., 2013). Γενικά, οι ενεργές ρίζες οξυγόνου αποτελούν μερικώς ανοιγμένες ή ενεργοποιημένες μορφές του ατμοσφαιρικού οξυγόνου που θεωρούνται ως

αναπόφευκτο παραπροϊόν του αερόβιου μεταβολισμού και εμφανίστηκαν παράλληλα με τους πρώτους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς (Mittler et al., 2011). Οι ενεργές ρίζες, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), οξειδώνουν τα βιομόρια (νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα) με αποτέλεσμα να καταστρέφουν τη βιοχημική ενεργότητα τους και να αποσταθεροποιούν την κυτταρική ισορροπία (Almeida et al., 2017). Επίσης, επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό το χλωροπλάστη, γιατί υπερπαραγωγή ROS σε αυτόν μπορεί να ενεργοποιήσει μηχανισμούς προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Ledford et al., 2007). Ταυτόχρονα, οι ενεργές ρίζες επιδρούν άμεσα και στη μιτοχονδριακή μορφολογία, συμβάλλοντας και πάλι στην επαγωγή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Logan et al., n.d.).

Σαν αποτέλεσμα της φυσιολογικής ενδοκυτταρικής παραγωγής των ενεργών ριζών οξυγόνου, οι οργανισμοί έχουν προσαρμοστεί στην παρουσία τους και έχουν εξελιχθεί αναπτύσσοντας εξειδικευμένα μεταβολικά μονοπάτια για να αντιμετωπίσουν τις αρνητικές τους συνέπειες, ενώ ταυτόχρονα διατηρούν την ικανότητα να τις αξιοποιούν σαν δευτερογενή σηματοδοτικά μόρια (Foyer & Noctor, 2013; Mignolet-Spruyt et al., 2016). Υπάρχει συνεπώς μια διαρκής ισορροπία, μια ομοιόσταση, ανάμεσα στην παραγωγή ROS για τη σηματοδότηση και στη διάσπαση τους (Εικόνα 9) (Mittler et al., 2004). Όταν η ισορροπία αυτή διαταραχθεί, συχνά κάτω από μη ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες, επάγεται η οξειδωτική καταπόνηση (Das & Roychoudhury, 2014).

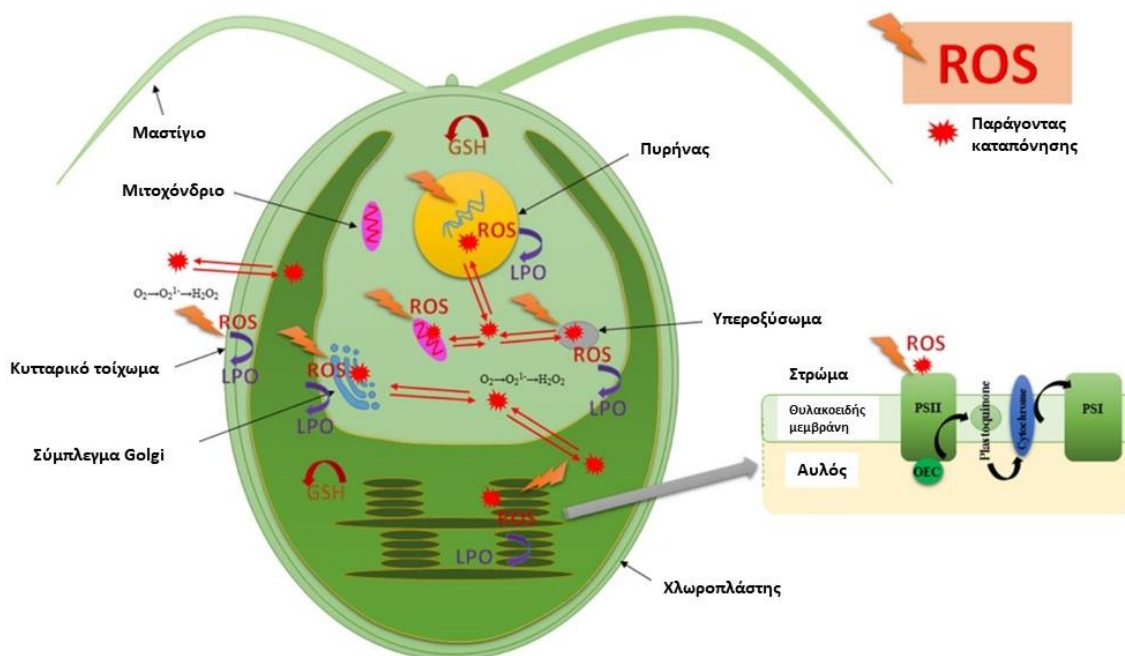


Εικόνα 9 Διαγραμματική απεικόνιση του ρόλου των ROS στην αβιοτική οξειδωτική καταπόνηση (Τροποποίηση, Choudhary et al., 2023).

Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή

1.8 Οξειδωτική καταπόνηση και μικροφύκη

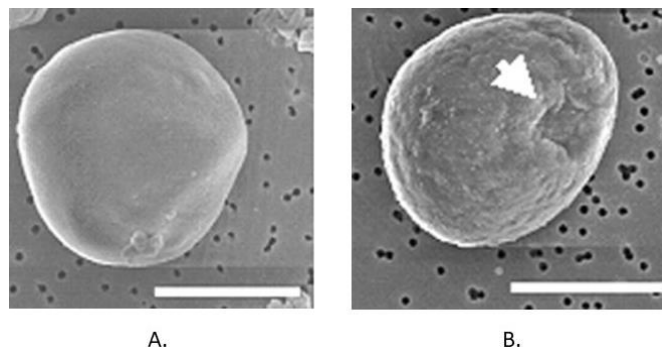
Τα μικροφύκη στα πλαίσια της προσαρμογής τους στις περιβαλλοντικές συνθήκες έχουν αναπτύξει πλήθος αντιοξειδωτικών μηχανισμών μέσω των οποίων εξουδετερώνουν την περίσσεια των οξειδωτικών παραγόντων και των ενεργών ριζών, αποφεύγοντας τις τοξικές συνέπειες των ROS (Εικόνα 10) (Barone et al., 2021a). Σε αυτούς περιλαμβάνονται ενζυμικοί μηχανισμοί (καταλάση, δισμουτάση υπεροξειδίου κ.α.) καθώς και ποικίλες αντιοξειδωτικές ενώσεις, όπως τα καροτενοειδή ασταξανθίνη και λουτεΐνη (Lu et al., 2021; Mishra & Jha, 2011). Υπάρχουν επίσης και μεταβολίτες με αντιοξειδωτική δράση που παράγονται μόνο από συγκεκριμένα είδη μικροφυκών (Cirulis et al., 2013). Η κατανόηση των μηχανισμών μέσω των οποίων εκτυλίσσεται η οξειδωτική καταπόνηση είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς, όπως αναφέρθηκε για τις αβιοτικές καταπονήσεις, μπορεί να οδηγήσει στην υπερπαραγωγή επιθυμητών προϊόντων μέσω της κατάλληλης μεταβολικής χειραγώγησης ή στην κατάρρευση της καλλιέργειας αν η καταπόνηση βγει εκτός ελέγχου (Lu et al., 2021).



Εικόνα 10 Κυκλοφορία των ROS μέσα στο *Chlamydomonas reinhardtii* (Τροποποίηση, Almeida et al. 2017).

Στις περιπτώσεις τεχνητής επαγωγής οξειδωτικής καταπόνησης σε καλλιέργειες μικροφυκών, υπάρχουν αρκετοί τρόποι για την πρόκληση της. Η χρήση υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) είναι ένας από αυτούς, με το πλεονέκτημα της διάσπασης του σε νερό και οξυγόνο, χωρίς να υπάρχουν τοξικά κατάλοιπα (Qiao et al., 2021). Στην εργασία τους οι Barone et al., έδειξαν πως η προσθήκη H_2O_2 στο θρεπτικό μέσο προκαλεί οξειδωτική καταπόνηση και οδηγεί σε αλλαγές στο μεταβολισμό σε διάφορα είδη μικροφυκών, με τρόπο πολύ συγκεκριμένο για κάθε είδος (Barone et al., 2021). Επίσης, περιβαλλοντικές μελέτες έδειξαν πως τα πράσινα μικροφύκη, όπως το *Chlorella sp.*, διασπούν το H_2O_2 πολύ ταχύτερα από τα κυανοβακτήρια, προστατεύοντας τα από την οξειδωτική καταπόνηση, όταν μικροφύκη και κυανοβακτήρια συνυπάρχουν (Weenink et al., 2021). Ακόμα, η ενσωμάτωση του μικροφύκου *Tetraselmis chuii* στην τροφή μετανυμφών *Litopenaeus vannamei* είχε θετική επίδραση στην αντιμετώπιση των οξειδωτικών καταπονήσεων που αντιμετώπιζαν, αυξάνοντας τόσο τα ποσοστά επιβίωσης τους όσο και την ανθεκτικότητά τους σε καταπόνηση υψηλής αλατότητας (Rahman et al., 2017).

Καλλιέργειες του μικροφύκου *C. reinhardtii* εκτέθηκαν σε 1 mM H_2O_2 για μισή και μία ώρα με τον αριθμό των κυττάρων και το ρυθμό ανάπτυξης της καλλιέργειας να παραμένουν ανεπηρέαστοι (Blaby et al., 2015). Σύμφωνα με ερευνητική μελέτη που πραγματοποιήθηκε με χρήση του μικροφύκου *Chlorella sorokiniana* και προσθήκη H_2O_2 στο θρεπτικό μέσο, ο συγκεκριμένος οξειδωτικός παράγοντας προκαλεί τη διάνοιξη μικροσκοπικών οπών στη μεμβράνη των κυττάρων. Με τον τρόπο αυτό εισέρχεται στα κύτταρα και προκαλεί οξείδωση του DNA και των πρωτεϊνών (Εικόνα 11), με άμεσο αποτέλεσμα τη διακοπή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Imase et al., 2013).



Εικόνα 11 Φωτογραφία από SEM κυττάρων *C. sorokiniana* πριν (A) και μετά (B) την έκθεση σε H_2O_2 . (Τροποποίηση, Imase et al. 2013).

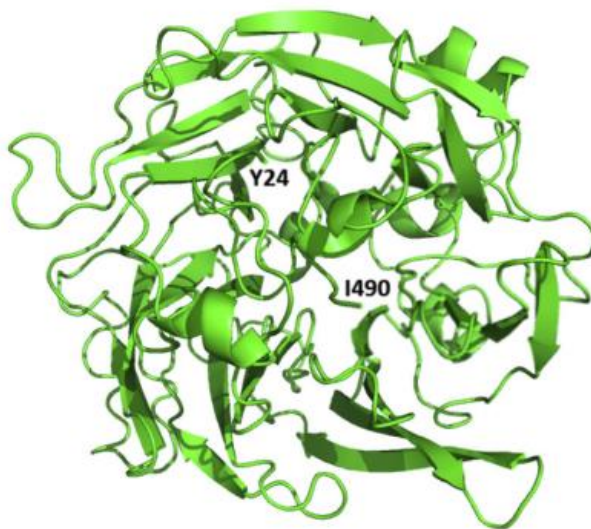
Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή

Η αύξηση των ενδοκυτταρικών ROS λόγω κάποιας αβιοτικής καταπόνησης επάγει τη βιοσύνθεση λιπιδίων, μέσα από ενεργοποίηση πρωτεϊνών που έχουν κομβικούς ρόλους στα αντίστοιχα μεταβολικά μονοπάτια (Zhao et al., 2019). Μικρή αύξηση της συγκέντρωσης H₂O₂, λόγω έκθεσης σε καταπόνηση αλατότητας, ευνόησε τη συσσώρευση λιπιδίων σε ποσοστό 18-24%. Αντιθέτως, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μείωσαν σημαντικά την παραγωγή λιπιδίων από τα μικροφύκη (Yu et al., 2021). Επιπλέον, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο *C. reinhardtii* έδειξαν ότι η έκθεση του σε H₂O₂ προκάλεσε εκτεταμένη τροποποίηση του μεταγραφώματος του. Σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην αδρανοποίηση των ενεργών ριζών, στην απόκριση σε καταπονήσεις και στην πρωτεϊνική αποικοδόμηση. Αντίστοιχα, σημαντικά μειώθηκε η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη φωτοσύνθεση και τον κεντρικό μεταβολισμό του άνθρακα (Blaby et al., 2015). Γενικά το υπεροξειδίο του υδρογόνου μπορεί να αξιοποιηθεί για την επαγωγή οξειδωτικής καταπόνησης με στόχο τη μεταβολική χειραγώγηση και τη συσσώρευση επιθυμητών μεταβολιτών, ωστόσο είναι απαραίτητη η βελτιστοποίηση της χρησιμοποιούμενης δοσολογίας ανάλογα με το είδος μικροφύκους που καλλιεργείται σε κάθε περίπτωση (Barone et al., 2021).

1.9 Selenium Binding Protein (SBP)

Οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια των συνδεόμενων με σελήνιο πρωτεϊνών (selenium-binding proteins, SBPs) συναντώνται στα περισσότερα είδη των ζωντανών οργανισμών και εμφανίζουν πολύ υψηλό βαθμό συντήρησης (Agalou et al., 2006). Δομικά, οι SBP πρωτεΐνες έχουν ασύμμετρη δομή, αποτελούνται από μία αλυσίδα (μονομερή) και φέρουν αρκετές αλληλουχίες που οδηγούν στο μοτίβο β-πτυχωτής επιφάνειας (Εικόνα 12) (Adindla et al., 2007). Δεδομένα σχετικά με τη δευτεροταγή δομή τους δείχνουν ότι μάλλον δεν πρόκειται για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (Flemetakis et al., 2002). Αντιθέτως, συναντώνται κυρίως στο κυτοσόλιο, ενώ υπάρχει και ένα σημαντικό ποσοστό τους που εντοπίζεται περιφερειακά των μεμβρανών του συμπλέγματος Golgi (Darienko & Pröschold, 2015).

Οι SBP πρωτεΐνες δεσμεύουν σελήνιο σε αντιστοιχία 1:1 με τα αποτελέσματα αυτής της σύνδεσης να μην είναι ακόμα απολύτως γνωστά (Schild et al., 2014). Εκτός από τη θέση σύνδεσης για το σελήνιο διαθέτουν και αρκετές δυνητικές θέσεις σύνδεσης άλλων μετάλλων, γεγονός που τις καθιστά ικανές να συμμετέχουν σε μονοπάτια αποτοξίνωσης. Τα έως τώρα πειραματικά δεδομένα σχετικά με τη λειτουργία τους δείχνουν συμμετοχή τους στα τελευταία στάδια της μεταφοράς πρωτεϊνών μέσα στο σύμπλεγμα Golgi, στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στον πολλαπλασιασμό των υπεροξεισωμάτων. Θεωρείται επίσης ότι συμμετέχουν στον έλεγχο και τη ρύθμιση της οξειδωτικής καταπόνησης (Agalou et al., 2006; Porat et al., 2000).



Εικόνα 12 Δομή της SBP του *Arabidopsis thaliana* (Valassakis et al., 2019).

Εδώ και αρκετά χρόνια η συγκεκριμένη πρωτεϊνική οικογένεια έχει συνδεθεί με την απόκριση σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις, χωρίς ωστόσο να έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ο βιοχημικός και βιολογικός ρόλος της. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα συναντάται το ομόλογο γονίδιο *SBP1*, η δράση του οποίου έχει συνδεθεί με ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες, ενώ αντίστοιχα η απουσία του με τύπους κακοήθειας και ασθένειες (Elhodaky & Diamond, 2018). Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη, η *HsSBP* εμφανίζει δράση οξειδάσης της μεθανοθειόλης (ΜΤΟ), μετατρέποντας τη μεθανοθειόλη σε H_2O_2 , φορμαλδεΰδη και H_2S , μια ενεργότητα που δεν είχε εντοπιστεί ξανά στον άνθρωπο (Pol et al., 2018). Επιπλέον βρέθηκε ότι οι βακτηριακές ΜΤΟ που

Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή

συμμετέχουν στον κύκλο του θείου, είναι μέλη της οικογένειας των SBPs (Eyice et al., 2018). Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* η SBP1 θεωρείται πως συμμετέχει στους μηχανισμούς αποτοξίνωσης από υπερέκθεση σε σελήνιο και κάδμιο, μέσω άμεσης σύνδεσης του πρωτεϊνικού μορίου με το μέταλλο (Schild et al., 2014; Valassakis et al., 2018). Ακόμα, η AtSBP1 συμμετέχει σε ένα πρωτεϊνικό δίκτυο απόκρισης στις αβιοτικές καταπονήσεις, μέσα από την αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες (Dervisi et al., 2020; Dutilleul et al., 2008; Valassakis et al., 2019). Το μικροφύκος *C. reinhardtii* διαθέτει στο γονιδίωμα του ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για SBP (SBD1). Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων Phytozome 12, JGI το γονίδιο βρίσκεται στο 3^ο χρωμόσωμα, έχει συνολικό μήκος 2544 ζευγών βάσεων, αποτελείται από 14 εξώνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη SBP μήκους 477 αμινοξέων.

1.10 Σκοπός της διατριβής

Η μεγάλη ποικιλότητα που χαρακτηρίζει τα μικροφύκη, τόσο στο φαινότυπο τους όσο και στα οικοσυστήματα στα οποία ενδιαιτούν, αποτελεί και ένδειξη για το πλήθος των διαφορετικών ιδιοτήτων και ικανοτήτων τους, μεγάλο μέρος των οποίων παραμένει ακόμα ανεξερεύνητο και αναξιοποίητο (A. K. Khan et al., 2020). Είναι σημαντικό να γίνει αντιληπτό πως κάθε είδος έχει τα δικά του ιδιαίτερα χαρακτηριστικά καθώς και πολύ εξειδικευμένο τρόπο αντιμετώπισης των αβιοτικών καταπονήσεων (Cirulis et al., 2013). Παράλληλα, είναι μια πραγματικότητα πως τα τελευταία χρόνια τα μικροφύκη έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον του βιομηχανικού κλάδου και χρησιμοποιούνται σε πολλές εφαρμογές και για την παραγωγή ποικίλων προϊόντων, ωστόσο η καλλιέργειά τους είναι κατά κανόνα ιδιαίτερα δαπανηρή (Behera et al., 2022). Οι αβιοτικές καταπονήσεις, όπως η επαγόμενη με H₂O₂ οξειδωτική καταπόνηση, μπορούν να αξιοποιηθούν για το μεταβολικό χειρισμό των μικροφυκών προς την παραγωγή των επιθυμητών προϊόντων, ώστε να γίνει πιο οικονομικά βιώσιμη η καλλιέργειά τους (Park et al., 2022). Συνεπώς, γίνεται αντιληπτό πως εξειδικευμένες ερευνητικές μελέτες είναι απαραίτητες προκειμένου να διαφωτιστούν οι μοριακοί και βιοχημικοί μηχανισμοί με τους οποίους τα μικροφύκη αποκρίνονται στις αβιοτικές καταπονήσεις, καθώς και να προσδιοριστούν μόρια που διαδραματίζουν κομβικούς ρόλους σε αυτούς, όπως φαίνεται να είναι η SBP. Επιπλέον,

πειραματικές διαδικασίες χρειάζονται για τον προσδιορισμό των συγκεκριμένων για κάθε είδος συνθηκών καταπόνησης που μπορούν να οδηγήσουν στη βέλτιστη αξιοποίηση του παραγωγικού δυναμικού κάθε μικροφύκου, ούτως ώστε να γίνει εφικτή η αποδοτική αξιοποίηση του. Αυτός ήταν και ο διττός σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Συγκεκριμένα, για την επίτευξη του χρησιμοποιήθηκαν το Χλωροφύκος αλμυρού νερού *C. reinhardtii*, το Χλωροδενδροφύκος αλμυρού νερού *T. chuii* και το Χλωροφύκος γλυκού νερού *C. variabilis*. Η επιλογή τους έγινε με βάση το αυξημένο εμπορικό ενδιαφέρον που εμφανίζουν αλλά και σε μια προσπάθεια κάλυψης του μεγαλύτερου δυνατού εύρους από την βιοποικιλότητα των μικροφυκών. Πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια των παραπάνω μικροφυκών και έκθεση τους σε οξειδωτική καταπόνηση επαγόμενη από H_2O_2 . Η απόκριση τους μελετήθηκε σε φυσιολογικό επίπεδο αλλά και με τη χρήση ομικών τεχνολογιών (RNAseq, GC-MS, GC-FID) για τον προσδιορισμό των τροποποιήσεων στο μεταγράφημα και το μεταβόλωμα τους. Επιπλέον, στο μικροφύκος μοντέλο *C. reinhardtii*, στο οποίο υπήρχαν διαθέσιμα τα απαραίτητα εργαλεία, πραγματοποιήθηκε εις βάθος μελέτη του ρόλου της εξελικτικά συντηρημένης πρωτεΐνης SBP στην απόκριση σε αβιοτικές καταπονήσεις.

Κεφάλαιο 2^ο: Υλικά και Μέθοδοι



2.1 Καλλιέργειες μικροφυκών

2.1.1 *T. chuii*

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *T. chuii* (στέλεχος CCFM-03). Η καλλιέργεια του πραγματοποιήθηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο F/2 (G0154, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) (Guillard & Ryther, 1962), με προσθήκη sea salt (S9883, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) σε συγκέντρωση 40 τοις χιλίοις. Τα σκεύη στα οποία αναπτύσσονταν οι καλλιέργειες αποστειρώνονταν σε αυτόκαυστο (121 °C/20 min). Οι καλλιέργειες μικρής κλίμακας, οι οποίες αναπτύχθηκαν για τα πιλοτικά πειράματα, είχαν τελικό όγκο 50 mL. Στις μεγαλύτερες καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν για τα τελικά πειράματα, ο συνολικός όγκος ήταν 1 L. Όλες οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν υπό διαρκή φωτισμό ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) και ανάδευση, με σταθερή παροχή φιλτραρισμένου ατμοσφαιρικού αέρα, σε θερμοκρασία 25 °C. Για την έναρξη νέων καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκε εμβόλιο από καλλιέργεια σε εκθετική φάση ανάπτυξης και η αρχική κυτταρική πυκνότητα των νέων καλλιεργειών ήταν $1 \cdot 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ (Εικόνα 13).



Εικόνα 13 Καλλιέργειες *T. chuii* (1 L) αμέσως μετά τον εμβολιασμό.

Κεφάλαιο 2^ο: Υλικά και Μέθοδοι

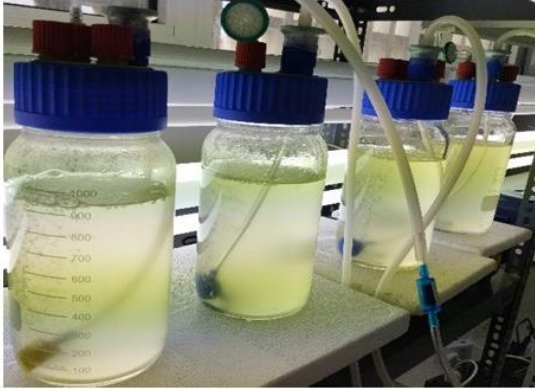
2.1.2 *C. variabilis*

Αναφορικά με το μικροφύκος *C. variabilis*, στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *C. variabilis* CCAP 211/84, το οποίο προήλθε από τη συλλογή Culture Collection of algae & protozoa (<https://www.ccap.ac.uk/>). Η καλλιέργεια του πραγματοποιήθηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο Walne (Walne, 1966), η παρασκευή του οποίου γινόταν σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο (Πίνακας 4, 5). Επιπλέον το θρεπτικό υλικό ήταν εμπλουτισμένο με sea salt (S9883, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) σε συγκέντρωση 3 τοις χιλίους. Τα σκεύη στα οποία αναπτύσσονταν οι καλλιέργειες αποστειρώνονταν σε αυτόκαυστο (121°C/20 min).

Πίνακας 4 Θρεπτικό Walne.	
Αντιδραστήρια	/L
Διάλυμα Α	1.0 mL
Διάλυμα Β	0.1 mL

Πίνακας 5 Αντιδραστήρια θρεπτικού Walne.			
Διάλυμα Α	/L	Διάλυμα Β	/L
FeCl ₃ *6H ₂ O	1.3 g	ZnCl ₂	2.1 g
MnCl ₂ *4H ₂ O	0.4 g	CoCl ₂ *6H ₂ O	2.0 g
H ₃ BO ₃	33.6 g	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4H ₂ O	0.9 g
Na ₂ EDTA	45.0 g	CuSO ₄ *7H ₂ O	2.0 g
NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O	20.0 g	Concentrated HCl	10 mL
NaNO ₃	100.0 g		
Διάλυμα Β	1 mL		

Οι καλλιέργειες μικρής κλίμακας που χρησιμοποιήθηκαν για τα πιλοτικά πειράματα, είχαν συνολικό όγκο 50 mL, ενώ στις καλλιέργειες των τελικών πειραμάτων ο όγκος ήταν 1 L. Όλες οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν υπό διαρκή φωτισμό (30 μmol m⁻² s⁻¹) και με σταθερή παροχή φιλτραρισμένου ατμοσφαιρικού αέρα, σε θερμοκρασία 23 °C. Για την έναρξη νέων καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκε εμβόλιο από καλλιέργεια σε εκθετική φάση ανάπτυξης και η αρχική κυτταρική πυκνότητα των νέων καλλιεργειών ήταν 1*10⁶ cells mL⁻¹ (Εικόνα 14A, B).



A.

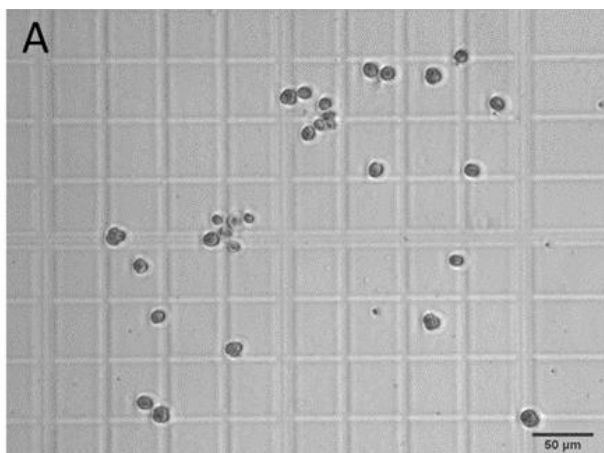


B.

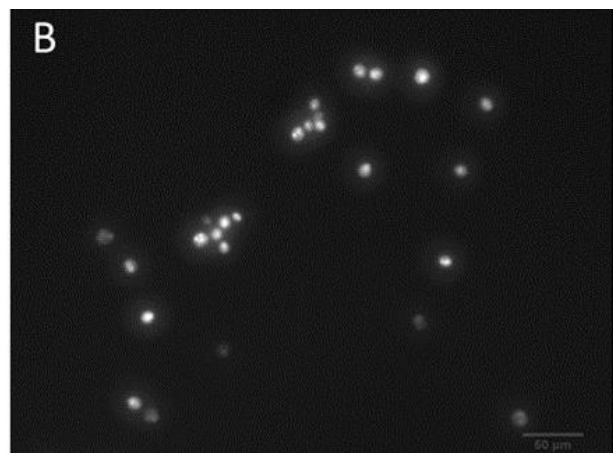
Εικόνα 14 Καλλιέργειες *C. variabilis* A. μετά τον εμβολιασμό, B. στην εκθετική φάση ανάπτυξης.

2.1.3 *C. reinhardtii*

Τα στελέχη του μικροφύκου *C. reinhardtii* προήλθαν από τη βιβλιοθήκη Chlamydomonas Library Project (<https://www.chlamylibrary.org/>). Ως στέλεχος αγρίου τύπου χρησιμοποιήθηκε το cc-4533, ένα mt- στέλεχος με την μεταλλαγή cw15 (Εικόνα 15A,B). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε το LMJ.RY0402 ως στέλεχος *sbd1* στο οποίο δεν εκφράζεται η SBP (Li X et al. 2016). Το μετάλλαγμα αυτό έχει προκύψει από το στέλεχος αγρίου τύπου μέσω της ένθεσης του πλασμιδίου CIB1 στην 5' UTR του γονιδίου της SBP (SBD1), διακόπτοντάς την.



A

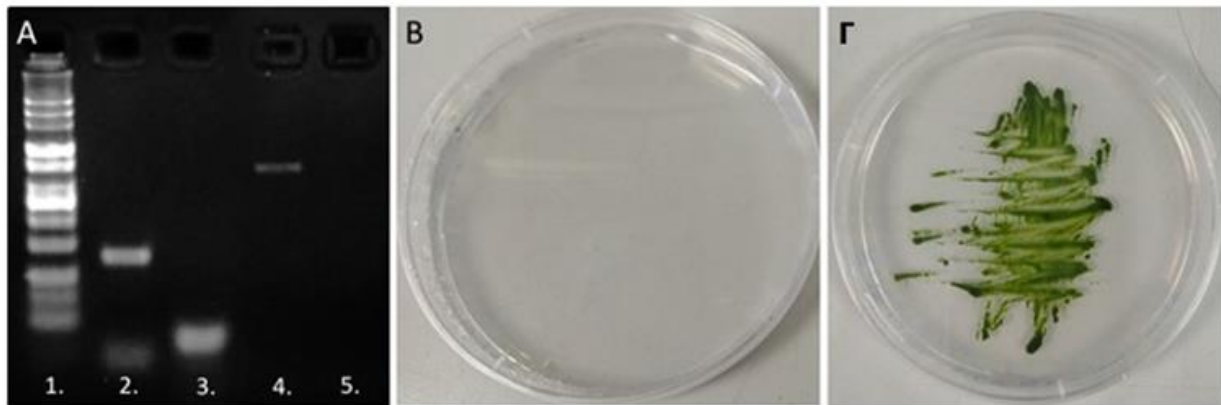


B

Εικόνα 15 Χαρακτηριστικές εικόνες του στελέχους φυσικού τύπου του *C. reinhardtii* στο μικροσκόπιο. A. οπτικό, B. φίλτρο φθορισμού (κλίμακα 50μm).

Κεφάλαιο 2^ο: Υλικά και Μέθοδοι

Το πλασμίδιο CIB1 φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό παρομομυκίνη, η οποία δρα ως αναστολέας της σύνθεσης πρωτεϊνών μέσω σύνδεσης στο 18S ριβοσωμικό RNA. Συνεπώς, μόνο κύτταρα στα οποία ενσωματώθηκε επιτυχώς το πλασμίδιο έχουν την ικανότητα επιβίωσης παρουσία παρομομυκίνης. Το χαρακτηριστικό αυτό αξιοποιήθηκε για την ταυτοποίηση του μεταλλάγματος (Εικόνα 16Α), σε συνδυασμό με αντίδραση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR, όπως προτεινόταν από τη Chlamydomonas Library Project (Εικόνα 16Β,Γ).



Εικόνα 16 Η επιβεβαίωση της ένθεσης στο στέλεχος *sbd1* (LMJ.RY0402.064068) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το προτεινόμενο πρωτόκολλο από την Chlamydomonas Library Project (Li et al., 2016). Α. ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης (1. Ladder, 2. θετικός μάρτυρας για το στέλεχος αγρίου τύπου, 3. θέση ένθεσης, στέλεχος αγρίου τύπου, 4. θέση ένθεσης, στέλεχος *sbd1*, 5. αρνητικός μάρτυρας). Επιπλέον, στερεές καλλιέργειες του *C. reinhardtii* αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό TAP, εμπλουτισμένου με 1.5% άγαρ και 10 μg/mL παρομομυκίνης. Β. στέλεχος αγρίου τύπου, Γ. στέλεχος *sbd1*.

Για την πραγματοποίηση PCR με στόχο την ταυτοποίηση των στελεχών *C. reinhardtii* αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη τους σε στερεές καλλιέργειες, σε θρεπτικό υλικό TAP με την προσθήκη 1.5% άγαρ, μέχρι την απόκτηση αποικιών (single cell colonies), διαμέτρου τουλάχιστον 3 mm.

Στη συνέχεια, απομονώθηκε DNA από 3 αποικίες κάθε στελέχους σύμφωνα με τα ακόλουθα βήματα:

- σε PCR tubes προσθήκη 50 μL 10 mM EDTA, pH 8.0

- μεταφορά της αποικίας με αποστειρωμένο tip
- vortex για 10 sec
- βρασμός στους 100°C για 10 min
- ψύξη στους 4 °C για 1 min
- vortex για 10 sec
- φυγοκέντρηση σε 1000 g για 1 min
- μεταφορά του υπερκείμενου και διατήρηση του στους -20 °C.

Ακολούθησε η προετοιμασία των αντιδραστηρίων (Πίνακας 6) με χρήση των εκκινητών που πρότεινε η Chlamydomonas Library (Πίνακας 7) και η πραγματοποίηση της PCR, με το αντίστοιχα προτεινόμενο πρόγραμμα (Πίνακας 8). Η PCR πραγματοποιήθηκε στον κυκλοποιητή Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler.

Πίνακας 6 Αντιδραστήρια για την πραγματοποίηση PCR.	
Αντιδραστήριο	Όγκος
1) DNA	1 μL
2) εκκινητής F	0.7 μL
3) εκκινητής R	0.7 μL
4) dNTPs	0.7 μL
5) ρυθμιστικό δ/μα	5 μL
6) Taq πολυμεράση	1.5 μL
7) ddH ₂ O	15.4 μL
	Τελικός όγκος = 25 μL

Κεφάλαιο 2^ο: Υλικά και Μέθοδοι

Πίνακας 7 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των στελεχών.	
Όνομα	Αλληλουχία
Control locus F	5'-ATGCTTCTCTGCATCCGTCT-3'
Control locus R	5'-ATGTTTTACGTCCAGTCCGC-3'
Suggested primer 1	5'-GATCAGCTGTTTGCTACCA-3'
Suggested primer 2	5'-TGC GTTGAATTGCATCTAGC-3'
5' end, plasmid R	5'-GCACCAATCATGTCAAGCCT-3'
3' end, plasmid F	5'-GACGTTACAGCACACCCTTG-3'

Πίνακας 8 Συνθήκες πραγματοποίησης PCR.		
	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος
1x	95	5 min
40x	95	30 s
	58	45 s
	72	2 min
1x	72	10 min

Για την καλλιέργεια του μικροφύκου *C. reinhardtii* χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό TAP (Tris-Acetate-Phosphate) (Gorman and Levine 1965, Hutner et al. 1950), το οποίο παρασκευαζόταν σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο (Πίνακας 9,10).

Πίνακας 9 Θρεπτικό TAP.	
Αντιδραστήρια	/L
1M Tris base	20.0 mL
Ρυθμιστικό διάλυμα	1.0 mL
Διάλυμα A	10.0 mL
Ιχνοστοιχεία Hutner	1.0 mL
Οξικό οξύ	1.0 mL

Πίνακας 10 Αντιδραστήρια θρεπτικού TAP.			
Ρυθμιστικό διάλυμα	/100 mL	Ιχνοστοιχεία Hutner	/L
K ₂ HPO ₄	10.8 g	EDTA	50 g 250 mL H ₂ O
KH ₂ PO ₄	5.6 g	ZnSO ₄ *7H ₂ O	22 g 100 mL
Διάλυμα A	/500 mL	H ₃ BO ₃	11.4 g 200 mL
NH ₄ Cl	20 g	MnCl ₂ *4H ₂ O	5.06 g 50 mL
MgSO ₄ *7H ₂ O	5 g	COCl ₂ *6H ₂ O	1.61 g 50 mL
CaCl ₂ *2H ₂ O	2.5 g	CuSO ₄ *5H ₂ O	1.57 g 50 mL
		(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4H ₂ O	1.10 g 50 mL
		FeSO ₄ *7H ₂ O	4.99 g 50 mL

Τα σκεύη στα οποία αναπτύσσονταν οι καλλιέργειες αποστειρώνονταν σε αυτόκαυστο (121°C/20 min). Οι καλλιέργειες μικρής κλίμακας είχαν τελικό όγκο 50 mL και στις μεγαλύτερες ο όγκος ήταν 1 L (Εικόνα 17). Όλες οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν υπό διαρκή φωτισμό (30 μmol m⁻² s⁻¹) και ανάδευση, με σταθερή παροχή φιλτραρισμένου ατμοσφαιρικού αέρα, σε θερμοκρασία 25 °C. Για την έναρξη νέων καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκε εμβόλιο από καλλιέργεια σε εκθετική φάση ανάπτυξης και η αρχική κυτταρική πυκνότητα των νέων καλλιεργειών ήταν 1*10⁶ cells mL⁻¹.



Εικόνα 17 Καλλιέργειες *C. reinhardtii* στην εκθετική φάση ανάπτυξης.

2.2 Εφαρμογή οξειδωτικής καταπόνησης

2.2.1 Σε καλλιέργειες *T. chuii*

Προκειμένου να μελετηθεί η απόκριση του *T. chuii* στην επαγόμενη από H₂O₂ οξειδωτική καταπόνηση, αρχικά δοκιμάστηκε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων (από 0.05 mM έως και 30 mM H₂O₂) σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας (50mL). Λόγω της πολύ μεγάλης θνησιμότητας που προκάλεσαν οι υψηλότερες συγκεντρώσεις, εγκαταλείφθηκε η χρήση τους και η πειραματική διαδικασία συνεχίστηκε με τις συγκεντρώσεις H₂O₂ 0 mM (control), 0.5 mM, 0.7 mM, 0.85 mM, 1 mM, 1.2 mM, 1.35 mM και 1.5 mM. Ο συνολικός αριθμός κυττάρων καθώς και η κυτταρική βιωσιμότητα προσδιορίστηκαν για τις καλλιέργειες *T. chuii* που εκτέθηκαν στις συγκεντρώσεις αυτές για 0h, 6h, 12h και 24 ώρες, με τη μεθοδολογία που θα αναλυθεί στη συνέχεια.

Με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν από το πιλοτικό πείραμα, η διαδικασία συνεχίστηκε με καλλιέργειες σε φωτοβιοαντιδραστήρες μεγαλύτερης κλίμακας (1 L). Σε αυτές χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις H₂O₂ 0 mM (control), 0.5 mM, 0.7 mM, 1 mM και 1.5 mM και πραγματοποιήθηκαν τρεις βιολογικές επαναλήψεις για κάθε χειρισμό. Η προσθήκη του κατάλληλου όγκου H₂O₂ (AppliChem, Gatersleben, Germany) σε κάθε καλλιέργεια, γινόταν όταν έφθανε την εκθετική φάση ανάπτυξης ($2 \cdot 10^6$ cells mL⁻¹). Για τον προσδιορισμό της κυτταρικής βιωσιμότητας καθώς και της ανάπτυξης των καλλιεργειών, δείγματα από κάθε καλλιέργεια λαμβάνονταν ακριβώς πριν την προσθήκη H₂O₂ (0h), 6 ώρες και 12 ώρες αργότερα (6h, 12h).

Τέλος, για περαιτέρω εμβάθυνση στην απόκριση του *T. chuii* στην οξειδωτική καταπόνηση και αξιοποιώντας το σύνολο των δεδομένων που προέκυψαν από τις προηγούμενες καλλιέργειες, επιλέχθηκε η χρήση της συγκέντρωσης 0.5 mM H₂O₂ σε καλλιέργειες όγκου 1 L, σε τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Η κυτταρική βιωσιμότητα καθώς και η ανάπτυξη των καλλιεργειών, προσδιορίστηκαν ακριβώς πριν την προσθήκη H₂O₂ (0h), 1 ώρα και 6 ώρες αργότερα (1h, 6h). Τις ίδιες χρονικές στιγμές πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA για τις αναλύσεις RNAseq και RT-qPCR όπως και ο προσδιορισμός του φθορισμού των χλωροφυλλών με χρήση PAM. Επιπλέον, στις χρονικές στιγμές 0h, 1h και 6h έγινε συλλογή βιομάζας και λυοφιλίωση της, ούτως ώστε να χρησιμοποιηθεί για τις αναλύσεις GC-MS και GC-FID.

2.2.2 Σε καλλιέργειες *C. variabilis*

Με παρόμοιο τρόπο μελετήθηκε και η απόκριση του *C. variabilis* στην επαγόμενη από H_2O_2 οξειδωτική καταπόνηση. Λαμβάνοντας υπόψιν τα όρια αντοχής του *T. chuii* που είχαν ήδη προσδιοριστεί, δοκιμάστηκαν σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας (50mL) συγκεντρώσεις από 0.1 mM έως και 5 mM H_2O_2 . Η προσθήκη του H_2O_2 (AppliChem, Gatersleben, Germany) γινόταν στην αρχή της εκθετικής φάσης ανάπτυξης ($2 \cdot 10^6$ cells mL^{-1}) για κάθε καλλιέργεια, ενώ ο προσδιορισμός της κυτταρικής βιωσιμότητας και της ανάπτυξης των καλλιεργειών γινόταν πριν την προσθήκη H_2O_2 (0h), 6 ώρες και 12 ώρες αργότερα (6h, 12h).

Αξιολογώντας τα δεδομένα που προέκυψαν, επιλέχθηκε η συγκέντρωση 2 mM για να συνεχιστεί η μελέτη της απόκρισης του συγκεκριμένου μικροφύκου στην οξειδωτική καταπόνηση. Αναπτύχθηκαν καλλιέργειες όγκου 1 L, σε τρεις βιολογικές επαναλήψεις και αφού έφτασαν στην εκθετική φάση έγινε η προσθήκη H_2O_2 (AppliChem, Gatersleben, Germany). Η κυτταρική βιωσιμότητα και η ανάπτυξη των καλλιεργειών, προσδιορίστηκαν πριν την προσθήκη H_2O_2 (0h), 1 ώρα και 6 ώρες αργότερα (1h, 6h). Τις ίδιες χρονικές στιγμές πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA για την ανάλυση RNAseq καθώς και ο προσδιορισμός του φθορισμού των χλωροφυλλών με χρήση PAM. Επιπλέον, στις χρονικές στιγμές 0h, 1h και 6h έγινε συλλογή βιομάζας και λυοφιλίωση της, ούτως ώστε να χρησιμοποιηθεί για τις αναλύσεις GC-MS και GC-FID.

2.2.3 Σε καλλιέργειες *C. reinhardtii*

Αξιοποιώντας τα αποτελέσματα που είχαν παραχθεί στο εργαστήριο από προγενέστερα πειράματα επιλέχθηκε η εφαρμογή 2 mM H_2O_2 σε καλλιέργειες *C. reinhardtii* προκειμένου να μελετηθεί διεξοδικά η απόκριση του μικροφύκου στην οξειδωτική καταπόνηση. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε τόσο για το στέλεχος φυσικού τύπου όσο και για το μετάλλαγμα *sbd1*. Καλλιέργειες όγκου 1 L αναπτύχθηκαν σε φωτοβιοαντιδραστήρες ως την αρχή της εκθετικής φάσης ($2 \cdot 10^6$ cells mL^{-1}) και ακολούθως έγινε προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας H_2O_2 (AppliChem, Gatersleben, Germany), ώστε η συγκέντρωση H_2O_2 σε κάθε καλλιέργεια να είναι 2 mM. Για τη συγκέντρωση αυτή πραγματοποιήθηκαν τρεις βιολογικές επαναλήψεις, διατηρώντας τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Για τον προσδιορισμό της κυτταρικής

Κεφάλαιο 2^ο: Υλικά και Μέθοδοι

βιωσιμότητας και ανάπτυξης των καλλιεργειών, μετρήσεις έγιναν πριν την προσθήκη H₂O₂ (0h), 1 ώρα και 6 ώρες αργότερα (1h, 6h). Στις ίδιες χρονικές στιγμές πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA για τις αναλύσεις RNAseq και RT-qPCR. Επιπλέον, στις χρονικές στιγμές 0h, 1h και 6h έγινε συλλογή βιομάζας και λυοφιλίωση της, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για τις αναλύσεις GC-MS και GC-FID.

2.3 Προσδιορισμός ανάπτυξης καλλιεργειών και κυτταρικής βιωσιμότητας

2.3.1 Καμπύλες ανάπτυξης

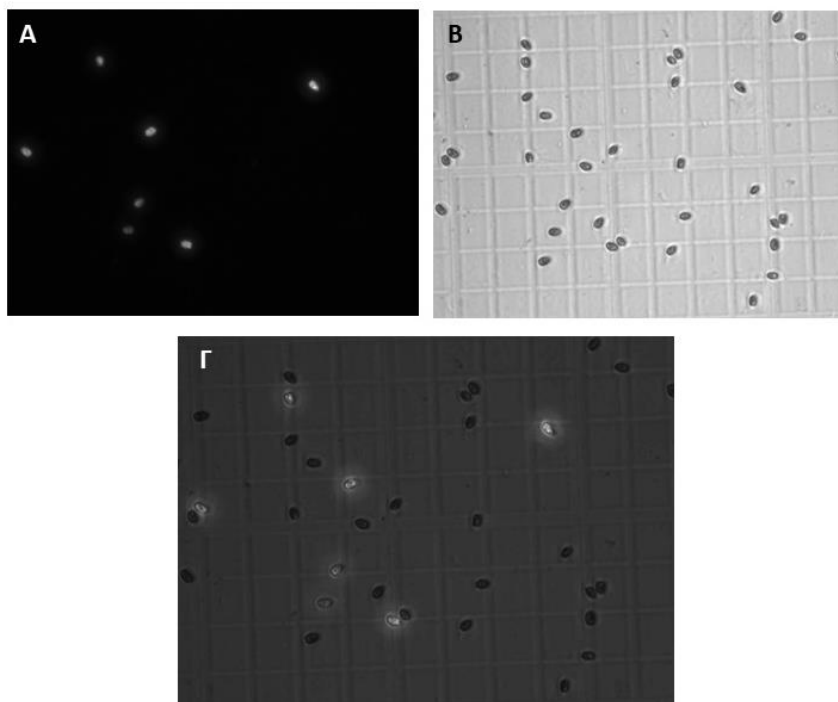
Η ανάπτυξη των καλλιεργειών για όλα τα μικροφύκη προσδιορίστηκε με καταμέτρηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων τους (10^4 ή 10^6 κύτταρα mL⁻¹), σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε πλάκα Neubauer (αιμοκυτταρόμετρο) της HBG και ο τύπος υπολογισμού: $\text{κύτταρα/mL} = (\text{Nκυττάρων}/\text{Nτετραγώνων}) \times 400 \times 10^4$, όπως αυτός προτείνεται από τον κατασκευαστή (Darvehei et al., 2018). Η καταμέτρηση του συνολικού αριθμού κυττάρων των καλλιεργειών έγινε στο μικροσκόπιο ZEISS AX10 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Λήψη εικόνων από το μικροσκόπιο πραγματοποιήθηκε με την κάμερα AxioCam ICm1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) και το πρόγραμμα ZEN2 lite της ίδιας εταιρίας.

2.3.2 Προσδιορισμός κυτταρικής βιωσιμότητας

Για τον προσδιορισμό της κυτταρικής βιωσιμότητας χρησιμοποιήθηκε επιπλέον η φθορίζουσα χρωστική Fluorescein Diacetate (F7378, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Το διάλυμα εργασίας κατασκευαζόταν με διάλυση 5 mg χρωστικής FDA σε 1 mL ακετόνης και διατηρούταν, για σύντομο χρονικό διάστημα, στους -20 °C. Για τη χρώση των κυττάρων, η τελική συγκέντρωση της χρωστικής μέσα στο δείγμα καλλιέργειας ήταν 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Ταυτόχρονα γινόταν προσθήκη 1 μL Lugol solution (L6146, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) ώστε να ακινητοποιηθούν όσα από τα κύτταρα διαθέτουν μαστίγια, ενώ παραμένουν ζωντανά. Μετά από επώαση 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου γινόταν η παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού ZEISS AX10 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) στο οποίο ήταν συνδεδεμένο φίλτρο FITC (διέγερση: 450–490 nm,

εκπομπή: 515–565 nm). Σημειώνεται πως το ίδιο μικροσκόπιο, ως οπτικό, χωρίς χρήση των φίλτρων, αξιοποιήθηκε και για την καταμέτρηση του συνολικού αριθμού κυττάρων των καλλιιεργειών.

Λήψη εικόνων από το μικροσκόπιο πραγματοποιήθηκε με την κάμερα AxioCam ICm1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) και το πρόγραμμα ZEN2 lite της ίδιας εταιρίας. Στις φωτογραφίες που λήφθηκαν στο ορατό φως διακρίνεται το σύνολο των κυττάρων της καλλιέργειας, ενώ με τη χρήση του φίλτρου υπεριώδους ακτινοβολίας δίνουν σήμα φθορισμού και συνεπώς διακρίνονται μόνο τα ζωντανά κύτταρα. Για την ορθή καταμέτρηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων, πραγματοποιούταν λήψη δύο φωτογραφιών του ίδιου οπτικού πεδίου με χρήση ορατού φωτός και φίλτρου UV (Εικόνα 18Α,Β). Οι φωτογραφίες αυτές στοιβάζονταν (overlay), ώστε να είναι εφικτή η ταυτόχρονη παρατήρηση και των δύο. Στην νέα αυτή εικόνα διακρίνονται τα συνολικά κύτταρα, ενώ τα ζωντανά ξεχωρίζουν ως φθορίζοντα και τα μεταβολικά ανενεργά ως μη φθορίζοντα (Εικόνα 18Γ). Η επεξεργασία των φωτογραφιών και το overlay έγινε με χρήση του Adobe Photoshop 7.0.



Εικόνα 18 Κύτταρα *T. chuii* στην πλάκα Neubauer (φακός 20x). Α. Μικροσκόπιο φθορισμού, με χρώση FDA, Β. οπτικό μικροσκόπιο, Γ. overlay των δύο φωτογραφιών όπου διακρίνονται μεταβολικά ενεργά και μεταβολικά ανενεργά κύτταρα.

2.4 Απομόνωση και καθαρισμός RNA

2.4.1 Απομόνωση RNA από μικροφύκη

Η απομόνωση του ολικού RNA των μικροφυκών ήταν απαραίτητη για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων RT-qPCR καθώς και για την αλληλούχηση του μεταγραφώματος (RNAseq). Πραγματοποιήθηκε σε δείγματα από τις καλλιέργειες όγκου 1 L (3 βιολογικές επαναλήψεις) στις χρονικές στιγμές που αναφέρθηκαν παραπάνω, για κάθε μικροφύκος. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν κοινό για *T. chuii*, *C. variabilis* και *C. reinhardtii* και βασίστηκε στη χρήση του NucleoZOL (Machery-Nagel, Duren, Germany) και στα προτεινόμενα από τον κατασκευαστή βήματα, με κάποιες μικρές τροποποιήσεις. Συνολικά, για την απομόνωση ολικού RNA από τα τρία είδη μικροφυκών έγιναν τα ακόλουθα:

- τοποθέτηση 40 mL από κάθε καλλιέργεια σε falcons
- φυγοκέντρηση στις 2800 στροφές για 4 λεπτά, στους 4 °C
- απόρριψη του υπερκείμενου, πλύσιμο των κυττάρων με προσθήκη 1 mL θρεπτικού στο ίζημα
- επαναδιάλυση και μεταφορά σε Eppendorf 1.5 mL
- φυγοκέντρηση στις 8000 στροφές για 3 λεπτά
- προσθήκη 300 μL NucleoZOL
- λειοτρίβηση με έμβολο, ανάδευση σε vortex για λίγα δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση στις 8000 στροφές για 3 λεπτά (το στάδιο επαναλαμβάνεται για τρεις φορές)
- προσθήκη 200 μL NucleoZOL, ανάδευση σε vortex
- προσθήκη 200 μL ddH₂O, ανάδευση σε vortex
- επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- φυγοκέντρηση σε 12000 g για 15 λεπτά
- μεταφορά του υπερκείμενου σε καινούρια Eppendorf
- προσθήκη (στο υπερκείμενο) 700 μL ισοπροπανόλης
- επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε 13000 στροφές
- απόρριψη υπερκείμενου, προσθήκη 100 μL 75% αιθανόλης στο ίζημα, διαλυτοποίηση με την πιπέτα
- φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 13000 στροφές

- επανάληψη των 2 προηγούμενων βημάτων
- τοποθέτηση των δειγμάτων στον απαγωγό για σύντομη εξάτμιση της αιθανόλης που έχει παραμείνει
- επαναδιάλυση ιζήματος σε 31 μL ddH₂O.

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η ποσότητα και η ποιότητα των απομονωμένων δειγμάτων RNA με χρήση σπεκτροφωτόμετρου (NanoDrop ND-1000, Thermofischer) και του προγράμματος ND-1000 V3.3.1. Συγκεκριμένα προσδιορίστηκαν η συγκέντρωση (ng/ μL) κάθε δείγματος σε RNA καθώς και οι λόγοι των απορροφήσεων στα νανόμετρα 260/280 και 260/230, οι οποίοι και αποτελούν δείκτες καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων από πρωτεΐνες και άλλες ουσίες (EDTA, φαινόλες κ.α.), αντίστοιχα. Η ποιότητα των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση επιβεβαιώθηκε και με ηλεκτροφόρηση σε αποστειρωμένο πήκτωμα αγαρόζης 2%. Η λήψη φωτογραφιών από τις ηλεκτροφορήσεις πραγματοποιήθηκε με το Alpha Innotech light cabinet και το πρόγραμμα Alpha Imager.

2.4.2 Καθαρισμός RNA από DNA

Αφού επιβεβαιώθηκε η ποιότητα των δειγμάτων RNA, στο επόμενο στάδιο ακολούθησε ο καθαρισμός τους από τυχόν υπολείμματα DNA. Ο καθαρισμός αυτός πραγματοποιήθηκε μέσω μιας αντίδρασης DNase (Turbo DNase, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

Τοποθέτηση σε αποστειρωμένο Eppendorf 1.5 mL

- ddH₂O: κατάλληλο όγκο ώστε συνολικά ο όγκος της αντίδρασης να είναι 50 μL
- ρυθμιστικό διάλυμα: 5 μL
- δείγμα RNA: κατάλληλο όγκο ώστε η τελική ποσότητα να είναι 3000 ng
- Turbo DNase: 0,75 μL

επώαση στους 37 °C για 30 λεπτά

προσθήκη 0,75 μL Turbo DNase

επώαση στους 37 °C για 30 λεπτά

συνέχιση των καθαρισμών ή αποθήκευση στους -80 °C.

Κεφάλαιο 2^ο: Υλικά και Μέθοδοι

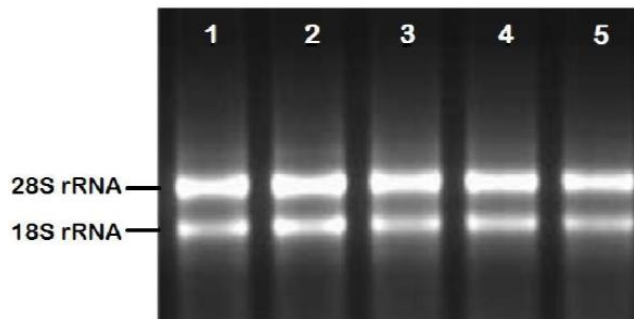
Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η απομάκρυνση των υπολειμμάτων DNA, χρησιμοποιήθηκαν 2 μL από κάθε δείγμα, μετά το χειρισμό με DNase. Σε αυτά προστέθηκε 1 μL RQ1 DNase stop solution (Promega), παρουσία 7 μL ddH₂O και ακολούθησε επώαση στους 75 °C για 30 λεπτά. Τα δείγματα αυτά, στα οποία έχει πλέον διακοπεί η δράση της DNase, ελέγχθηκαν για την παρουσία DNA με πραγματοποίηση PCR (Applied Biosystems Veriti Thermal Cyclor) και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Όταν πλέον τα δείγματα RNA δεν έφεραν επιμολύνσεις από DNA, ακολούθησε το ιδιαίτερα σημαντικό στάδιο των καθαρισμών.

- προσθήκη ddH₂O σε κάθε δείγμα RNA μέχρι τελικού όγκου 150 μL
- προσθήκη μίγματος φαινόλης/χλωροφορμίου κατάλληλου για RNA σε όγκο 1:1
- ανάδευση σε vortex για λίγα δευτερόλεπτα
- φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 5 λεπτά
- μεταφορά του υπερκείμενου σε καινούρια Eppendorf
- προσθήκη μίγματος φαινόλης/χλωροφορμίου κατάλληλου για RNA σε όγκο 1:1
- ανάδευση σε vortex για λίγα δευτερόλεπτα
- φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 5 λεπτά
- μεταφορά του υπερκείμενου σε καινούρια Eppendorf
- προσθήκη NaAc (pH=5,2) σε αναλογία 1:10
- προσθήκη 2,5x όγκου 100% αιθανόλης
- παραμονή στους -80 °C για 24 ώρες, για κατακρήμνιση
- φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 30 λεπτά, στους 4 °C
- απόρριψη υπερκείμενου και διαλυτοποίηση ιζήματος με 100 μL 75% αιθανόλης
- φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 10 λεπτά

- τοποθέτηση των δειγμάτων στον απαγωγό για σύντομη εξάτμιση της αιθανόλης που έχει παραμείνει.

Μετά την ολοκλήρωση των παραπάνω σταδίων, η ποσότητα και η καθαρότητα των δειγμάτων RNA που απομονώθηκαν από κάθε δείγμα μικροφύκους και καθαρίστηκαν, προσδιορίστηκαν εκ νέου με χρήση του σπεκτροφωτόμετρου NanoDrop και με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (Εικόνα 19).



Εικόνα 19 Παράδειγμα ευκαρυωτικού RNA μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

2.5 Ανάλυση μεταγραφωμάτων με RNAseq

2.5.1 Κατασκευή cDNA βιβλιοθηκών

Τα δείγματα RNA που απομονώθηκαν από τις καλλιέργειες των μικροφυκών, μετά τον ποιοτικό έλεγχο, αξιοποιήθηκαν για ανάλυση του μεταγραφώματος των υπό μελέτη ειδών μέσω αλληλούχησης RNAseq. Για την κατασκευή των βιβλιοθηκών cDNA από τα RNA χρησιμοποιήθηκε το Illumina TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2 (Illumina, San Diego, CA USA), και η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτείνει ο κατασκευαστής. Για κάθε δείγμα-χειρισμό και βιολογική επανάληψη κατασκευάστηκαν διακριτές cDNA βιβλιοθήκες ούτως ώστε να μελετηθεί το μεταγράφομα σε κάθε συνθήκη και να μπορεί να πραγματοποιηθεί στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Η πορεία που ακολουθήθηκε για την *in silico* αλληλούχηση, χαρτογράφηση και ανάλυση του μεταγραφώματος φαίνεται συνοπτικά στο διάγραμμα που ακολουθεί (Εικόνα 20).

αναφοράς, για την πραγματοποίηση της χαρτογράφησης. Για τη χαρτογράφηση του *C. variabilis* χρησιμοποιήθηκε το *Chlorella variabilis* NC64A v1.0 όπως βρίσκεται δημοσιευμένο στη βάση δεδομένων JGI (JGI/Project Id: 1076509). Πάνω στο κατάλληλο για κάθε μικροφύκος γονιδίωμα αναφοράς, πραγματοποιήθηκε η χαρτογράφηση (mapping) των καθαρών αλληλουχιών των δειγμάτων.

Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων υπολογίστηκε με τη μέθοδο RPKM (Reads Per Kilobase of transcript per Million fragments mapped). Για τον προσδιορισμό των διαφορικών επιπέδων έκφρασης των χαρτογραφημένων αλληλουχιών (differential expression levels) και τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Deseq2 (Love et al., 2014). Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων ως όριο για τη στατιστικά σημαντική διαφορική έκφραση ορίστηκε το adjusted $P < 0.05$ και η differential expression absolute confidence > 6 .

2.6 Ανάλυση μεταγραφώματος με RT-qPCR

2.6.1 Σύνθεση cDNA

Προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι αντιδράσεις RT-qPCR το συνολικό RNA των μικροφυκών πρέπει να μετατραπεί σε cDNA, το οποίο χρησιμοποιείται ως μήτρα για τις αντιδράσεις αυτές. Η σύνθεση του cDNA καταλύεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση. Η δράση του ξεκινά με πρόσδεση σε dT-ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία παίζουν ρόλο εκκινητών όταν μεταγράφεται το σύνολο του mRNA.

Συνεπώς, το RNA από τρεις νέες καλλιέργειες για κάθε μικροφύκος (τρεις βιολογικές επαναλήψεις), απομονώθηκε και καθαρίστηκε με τη μεθοδολογία που αναφέρθηκε παραπάνω. Αφού επιβεβαιώθηκε η ποιότητα τους, 5ng από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα για τη σύνθεση cDNA με το ένζυμο Super-Script II (11904-018, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and Oligo (dT) εκκινητές. Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε είναι το ακόλουθο:

1. ανάδευση και σύντομη φυγοκέντρηση όλων των συστατικών της αντίδρασης
2. προσθήκη σε αποστειρωμένο Eppendorf 0.5 mL:

Κεφάλαιο 2^ο: Υλικά και Μέθοδοι

- κατάλληλου όγκου RNA, ώστε η συνολική ποσότητα στο δείγμα να είναι 1 µg
 - 1 µl dNTP mix 10 mM
 - 1 µl oligo(dT)
 - κατάλληλου όγκου DEPC-treated H₂O, ώστε ο συνολικός όγκος να είναι 10 µl
3. επώαση του δείγματος στους 65 °C για 5 λεπτά και ακολούθως επώαση στον πάγο για 1 λεπτό
 4. προετοιμασία του stock της 2x αντίδρασης, με προσθήκη σε ξεχωριστό Eppendorf:
 - 2 µl 10x RT buffer (για κάθε δείγμα)
 - 4 µl MgCl₂ 25 mM (για κάθε δείγμα)
 - 2 µl DTT 0.1 M (για κάθε δείγμα)
 - 1 µl RNaseOUT™ (40 U/µl) (για κάθε δείγμα)
 5. προσθήκη 9 µl από το παραπάνω stock, σε κάθε δείγμα (από το βήμα 3), ήπια ανάδευση και σύντομη φυγοκέντρηση
 6. επώαση στους 42 °C για 2 λεπτά
 7. προσθήκη 1 µl SuperScript II
 8. επώαση στους 42 °C για 50 λεπτά
 9. επώαση στους 70 °C για 15 λεπτά, για τερματισμό της αντίδρασης
 10. αποθήκευση στους -20 °C

2.6.2 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR)

Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR) ακολουθεί τις βασικές αρχές μεθόδου της κλασσικής PCR, ενώ εμφανίζει κάποιες τροποποιήσεις που επιτρέπουν τη λήψη ποσοτικών δεδομένων σε πραγματικό χρόνο. Το προϊόν που ενισχύεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης μπορεί να είναι μόρια DNA, cDNA ή RNA. Πρόκειται για μέθοδο που χρησιμοποιείται ευρέως για

την ποσοτική ανάλυση νουκλεϊκών οξέων και η αξιοποίηση της έγινε ακόμα πιο έντονη κατά την πρόσφατη υγειονομική κρίση. Αν και υπάρχει κάποιος οικονομικός κόστος για την πραγματοποίηση της, η υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία, η καλή επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων, η σύντομη χρονικά διάρκεια της και η ευκολία στην πραγματοποίηση της δημιουργούν μια πολύ καλή σχέση ανάμεσα στο κόστος και το αποτέλεσμα (Pfaffl MW 2010). Στα προαπαιτούμενα για την εκτέλεση μιας RT-qPCR είναι η ύπαρξη εξειδικευμένου εξοπλισμού καθώς και των κατάλληλων εκκινητών. Όπως και στην κλασική PCR, οι εκκινητές σχεδιάζονται ειδικά για κάθε μια αντίδραση, ανάλογα με το προϊόν-στόχο. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της RT-qPCR που επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του τελικού προϊόντος είναι η χρησιμοποίηση φθορίζουσών χρωστικών, όπως η Syber Green, ή ανιχνευτών DNA σημασμένων με φθοροφόρα, όπως το TaqMan.

Συγκεκριμένα, η φθορίζουσα χρωστική Syber Green έχει την ιδιότητα να φθορίζει όταν συνδέεται σε δίκλινα μόρια DNA (dsDNA). Κατά τη φάση αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA, η Syber Green βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή και συνεπώς δίνει πολύ χαμηλό σήμα φθορισμού. Κατά τις φάσεις ενίσχυσης του DNA και καθώς προχωρούν οι κύκλοι της αντίδρασης, πολλαπλασιάζονται τα δίκλινα μόρια, η Syber Green προσδένεται σε αυτά και ο παραγόμενος φθορισμός αυξάνεται σημαντικά. Το ποσοστό αύξησης του φθορισμού εξαρτάται από την ποσότητα του διαθέσιμου cDNA-μήτρας κατά την έναρξη της αντίδρασης. Η ανίχνευση του φθορισμού πραγματοποιείται στα 520 nm από ειδικό φωτόμετρο.

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, τα δείγματα cDNA μικροφυκών που προέκυψαν με τη μεθοδολογία που ήδη περιεγράφηκε χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση RT-qPCR, με σκοπό τον προσδιορισμό της σχετικής έκφρασης γονιδίων ενδιαφέροντος ώστε να διασταυρωθούν τα αντίστοιχα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση RNAseq. Οι κατάλληλοι εκκινητές για κάθε γονίδιο σχεδιάστηκαν με χρήση του προγράμματος Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Επειδή στο 3' άκρο των γονιδίων η αλληλούχιση γίνεται με μεγαλύτερη ακρίβεια επιλέχθηκαν ζεύγη εκκινητών που να βρίσκονται σε αυτές τις περιοχές (Thornton and Basu 2011). Ακολούθησε έλεγχος τους με την εφαρμογή OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies) για το σχηματισμό ομοδιμερών και ετεροδιμερών. Τέλος μέσω του uMelt, Melting Curve Prediction (University of Utah, Wittwer

Κεφάλαιο 2^ο: Υλικά και Μέθοδοι

Lab) επιβεβαιώθηκε η καταλληλότητα των συγκεκριμένων ζευγαριών εκκινητών για ποσοτική PCR.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στο θερμικό κυκλοποιητή StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Σε όλες τις αντιδράσεις έγινε χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green with ROX PCR Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Ο συνολικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 10 μ L και σε αυτόν περιλαμβάνονταν:

- 1 μ L δείγματος cDNA
- 2 μ L εκκινητή F, 0.5 μ M
- 2 μ L εκκινητή R, 0.5 μ M
- 5 μ L SYBR Green.

Το πρόγραμμα για την εκτέλεση της RT-qPCR αποτελείτο από αποδιάταξη για 10 λεπτά στους 95 °C και 40 κύκλους με υβριδοποίηση των εκκινητών στους 95 °C για 15 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση για 1 λεπτό στους 60 °C. Η ανάκτηση των δεδομένων από τις αντιδράσεις έγινε με το λογισμικό StepOne Software v2.3. Η απόδοση της επιμήκυνσης για κάθε αντίδραση υπολογίστηκε με τη μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression) και το λογισμικό LinRegPCR 7.5 (Ramakers et al., 2003). Για τον υπολογισμό της σχετικής μεταβολής στα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος $Eff^{-\Delta Ct}$, όπου Eff είναι η απόδοση της αντίδρασης και ΔCt : Ct γονιδίου – GeoMean ΔCt h/k γονιδίων. Η τιμή Ct αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κύκλων που πραγματοποιούνται κατά την πραγματοποίηση της αντίδρασης προκειμένου το σήμα φθορισμού να φτάσει ένα συγκεκριμένο επίπεδο και η αντίδραση να εξελίσσεται εκθετικά. Τα γονίδια αναφοράς (housekeeping genes – h/k) επιλέχθηκαν σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία για κάθε μικροφύκος ξεχωριστά, ώστε να εκφράζονται στα συγκεκριμένα είδη και να διατηρούν σταθερά τα επίπεδα έκφρασης τους.

Για το μικροφύκος *T. chuii* χρησιμοποιήθηκαν τα *TccdK* and *TcUBCE* (S. Torres et al., 2021), ενώ προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης πέντε γονιδίων που συμμετέχουν σε ποικίλα μεταβολικά μονοπάτια ή κωδικοποιούν για σημαντικές πρωτεΐνες. Ακολουθούν οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 11).

Πίνακας 11 Αλληλουχίες εκκινητών για RT-qPCR στο <i>T. chuii</i> .	
Όνομα	Αλληλουχία (5'-3')
<i>F-ATPASE</i>	TGCCGCGGTTTCTTATGATG
<i>R-ATPASE</i>	TGATGTTAACCCTTGTCCGCC
<i>F-TABP</i>	TCGTATAGCGGCTGGATAACG
<i>R-TABP</i>	TACAAGGTCACTTCCGAAGCG
<i>F-TF</i>	CATGCGCTTAAAATCCGCAGT
<i>R-TF</i>	TCATCAAGGACCCGGTGGATA
<i>F-RBCL</i>	GGCAGTTTATCAGCCGCAAAT
<i>R-RBCL</i>	TGCTGAAATCGGCGGCTAT
<i>F-MALD</i>	TGGACGTTGTCCGATCGAA
<i>R-MALD</i>	AATAGTAACGCCAGCATGGCC
<i>F-cdkA</i>	ACCGCAGAACTTACTGATTGACCGT
<i>R-cdkA</i>	CGGTACCACAGAGTCACAACCTCGT
<i>F-UBCE</i>	CCAAACATCAACAGCAACGGCAGCA
<i>R-UBCE</i>	TGCGCAATCTCGGGCACCAG

Για το μικροφύκος *C. reinhardtii* ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το ενδογενές γονίδιο σταθερής έκφρασης *CrCBLP* (Colina et al., 2019; Fang et al., 2012). Με χρήση της RT-qPCR προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης 11 γονιδίων. Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα παρακάτω:

Πίνακας 12 Αλληλουχίες εκκινητών για RT-qPCR στο <i>C. reinhardtii</i> .			
Όνομα	Αλληλουχία (5'-3')	Όνομα	Αλληλουχία (5'-3')
<i>F-GRX6</i>	TCACGATGCATGGACCATGA	<i>F-FBA3</i>	GGAGAGCGGATTGTACCGAG
<i>R-GRX6</i>	TCCCCACGCCACACAAAATT	<i>R-FBA3</i>	CGGGACCAACCAAAACTGC
<i>F-GRX3</i>	GTCACGAACTTGTCGGGGA	<i>F-GPX5</i>	GCTGTGCGAAGTTTTGGTC
<i>R-GRX3</i>	CGGGTCAAGGGGAAGTTTTG	<i>R-GPX5</i>	TGCTCCAATCTTGACCTCCC
<i>F-CEP2</i>	AAGCGGTTGGAAGAGAGGTC	<i>F-GAPN1</i>	AGTGACGCAATGGAGACCG

Κεφάλαιο 2^ο: Υλικά και Μέθοδοι

<i>R-CEP2</i>	AATCAGGGTTCGTTTGGGCT	<i>R-GAPN1</i>	CTGGAAAGGGAAGTGGTCGG
<i>F-SBD1</i>	ATCGACGTGGACCCTGAGA	<i>F-LHCB7</i>	GTAAGGATGGGCTGGTTGCT
<i>R-SBD1</i>	GCTCCTTGCCGAAGTCAATG	<i>R-LHCB7</i>	CGCTACTTTACACAGGGGT
<i>F-APX1</i>	TTCCGCCCTATGCTGAGAA	<i>F-IDA5</i>	GCACGTCCTGACACCTGAGA
<i>R-APX1</i>	TTCTGGTGGCTGACGCAGTA	<i>R-IDA5</i>	GTTTCAGTGCCTGAGCTTGT
<i>F-GRX4</i>	ATCTTGTCCATGCTGGGTCG	<i>F-CBLP</i>	CTTCTCGCCCATGACCACC
<i>R-GRX4</i>	GCGTGCCTATAATGCACTGG	<i>R-CBLP</i>	GCCCACCAGGTTGTTCTTCAG

2.7 Μεταβολομική ανάλυση

Η διαδικασία της μεταβολομικής ανάλυσης των δειγμάτων μικροφυκών ξεκίνησε με τη συλλογή βιομάζας από τις καλλιέργειες. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν φυγοκεντρήσεις για 4 λεπτά, στις 2.800 rpm, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (4 °C). Τα κύτταρα που συσσωρεύθηκαν σε μορφή ιζήματος ξεπλύθηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε 1 mL του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε λυοφιλίωση. Η ξηρή βιομάζα που προέκυψε αποθηκεύτηκε στους -20 °C και χρησιμοποιήθηκε για τη μεταβολομική ανάλυση.

2.7.1 Αέρια χρωματογραφία – Φασματομετρία μάζας (GC-MS)

Η αέρια χρωματογραφία είναι μέθοδος διαχωρισμού ενός μίγματος στα συστατικά του, χρησιμοποιώντας μια κινητή αέρια φάση που κινείται μέσα σε ειδική στήλη και μια στατική φάση (υγρή ή στερεή). Σαν μέθοδος μπορεί να διαχωρίσει οργανικές ενώσεις ενώ δεν χρησιμοποιείται για την ανάλυση ανόργανων συστατικών. Συχνά η αέρια χρωματογραφία πραγματοποιείται σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας, δίνοντας την ανάλυση GC-MS. Στη φασματομετρία μάζας ηλεκτρόνια σχετικά υψηλής ενεργειακής στάθμης προσκρούουν σε μόρια της αναλυόμενης ένωσης, που βρίσκεται στην αέρια φάση, και παράγουν ιόντα με θετικό συνήθως φορτίο. Ακολουθώς, τα ιόντα αυτά διαχωρίζονται σύμφωνα με το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z). Η συνδυαστική μέθοδος GC-MS εμφανίζει το πλεονέκτημα της υψηλής ικανότητας

ανίχνευσης και ταυτοποίησης ουσιών, ωστόσο η απόκτηση και η συντήρηση του κατάλληλου εξοπλισμού έχουν μεγάλο κόστος.

Προκειμένου να γίνει εφικτή η ανίχνευση ενώσεων από τους αναλυτές GC-MS, οι ενώσεις αυτές πρέπει να βρίσκονται στην κατάλληλη μορφή. Συνεπώς, σημαντικό βήμα για την επιτυχή ανάλυση είναι η χημική μετατροπή των δειγμάτων σε πτητικά και θερμοσταθερά, μέσω του πρωτοκόλλου παραγωγοποίησης (derivatization).

Για την πραγματοποίηση της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας για κάθε μικροφύκος και χειρισμό χρησιμοποιήθηκαν τρεις ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις και σε κάθε μία από αυτές έγιναν δύο τεχνικές επαναλήψεις (n=6).

Η εκχύλιση των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε από 50 mg ξηρής βιομάζας, με τη μεθοδολογία που έχει περιγραφεί βιβλιογραφικά (Patelou et al., 2020). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε υγρό άζωτο προκειμένου να κονιορτοποιηθεί η βιομάζα και σε αυτή προστέθηκαν 395 μL παγωμένης μεθανόλης και 5 μL διαλύματος ρεβιτόλης, αρχικής συγκέντρωσης 1 mg/mL . Ακολούθησε επώαση στους 70 °C για 15 λεπτά, υπό συχνή ανάδευση, προσθήκη 200 μL χλωροφορμίου και νέα επώαση στους 37 °C για 5 λεπτά, υπό συχνή ανάδευση. Επιπλέον προστέθηκαν 400 μL ddH₂O, έγινε καλή ανάμιξη με χρήση vortex και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm, για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Η υδατική φάση, στην οποία βρίσκεται το κλάσμα των πολικών μεταβολιτών, εξατμίστηκε με αέριο άζωτο ούτως ώστε να αποφευχθεί η οξείδωση των μεταβολιτών από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο.

Η παραγωγοποίηση των εξατμισμένων δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με επαναδιάλυση τους σε methoxyamine - HCl (20 mg mL^{-1} pyridine) και επώαση στους 30 °C για 90 λεπτά, υπό συχνή ανάδευση. Μετά από φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 30 sec, έγινε προσθήκη 75 μL N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (MSTFA). Τέλος, πραγματοποιήθηκε επώαση για 30 λεπτά στους 37 °C και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 2 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε αέριο χρωματογράφο (Agilent 7890A, CA, USA) συζευγμένο με φασματοσκόπιο μάζας (Agilent 5973C, CA, USA). Για το διαχωρισμό των κλασμάτων των μεταβολιτών έγινε χρήση της τριχοειδούς στήλης HP-5MS (30 m, 0.25 mm ID, πάχος φιλμ 0.25 μm , Agilent). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο, με ρυθμό ροής 1 mL min^{-1} . Για τον

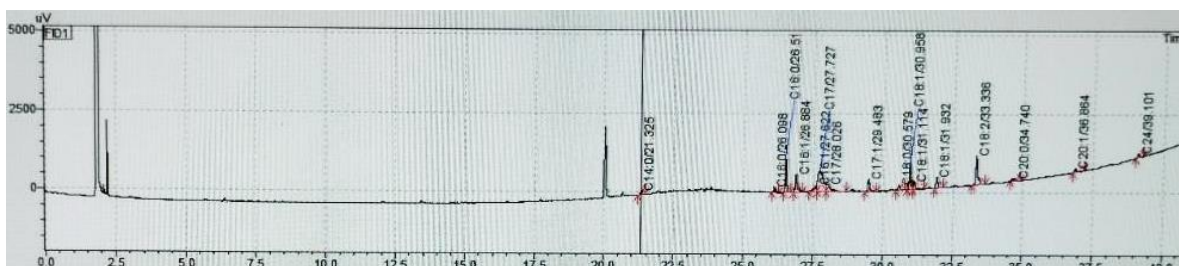
Κεφάλαιο 2^ο: Υλικά και Μέθοδοι

προσδιορισμό των δεικτών κατακράτησης (retention indexes - RIs) ένα μίγμα μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (FAME) εγχύθηκε ξεχωριστά. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε ο τρόπος έγχυσης με παλμικό διαχωρισμό, με τον όγκο της ένεσης στο 1 μL . Η θερμοκρασία εισόδου στον αέριο χρωματογράφο ήταν 230 $^{\circ}\text{C}$ και η συνολική διάρκεια της ανάλυσης ήταν 61 λεπτά. Το πρόγραμμα θερμοκρασίας για το φούρνο ήταν το εξής: αρχικά θερμοκρασία 80 $^{\circ}\text{C}$ για 3 λεπτά και επακόλουθη σταδιακή αύξηση της με ρυθμό 5 $^{\circ}\text{C}/\text{λεπτό}$ έως τους 320 $^{\circ}\text{C}$ και διατήρηση τους για 10 λεπτά. Η πηγή της φασματοσκοπίας μάζας διατηρήθηκε στους 250 $^{\circ}\text{C}$ και το τετραπλό στους 150 $^{\circ}\text{C}$, σκανάροντας το φάσμα των m/z από την τιμή 83 ως την τιμή 500. Για την εξαγωγή των ενώσεων που αναλύθηκαν με τη μέθοδο GC-MS χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution & Identification System) του ινστιτούτου NIST (National Institute of Standards and Technology). Οι βιβλιοθήκες ενώσεων Feihnlab (Fiehn et al., 2011) χρησιμοποιήθηκαν για την αναγνώριση κάθε συστατικού, σύμφωνα με το φάσμα μάζας και το χρόνο κατακράτησης.

2.7.2 Αέρια χρωματογραφία – Ανίχνευση ιονισμού φλόγας (GC-FID)

Η μέθοδος που περιγράφηκε από τους Laurens et al. (Laurens et al., 2012) χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των λιπαρών οξέων σε δείγματα λυοφιλιωμένης βιομάζας μικροφυκών. Συγκεκριμένα το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής: σε 15 mg λυοφιλιωμένης βιομάζας προστέθηκαν ταυτόχρονα 0.2 mL διαλύματος χλωροφόρμιο/μεθανόλη (2:1 v/v) (Merck KGaA) και 0.3 mL διαλύματος HCl/μεθανόλη (5% v/v) (Merck KGaA). Το μίγμα θερμάνθηκε για 1 ώρα στους 85 $^{\circ}\text{C}$ παρουσία 250 μg μεθυλεστέρα τριδεκανοϊκού οξέος (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich Co., ΗΠΑ) ως εσωτερικού προτύπου. Οι προκύπτοντες μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAMEs) εκχυλίστηκαν με 1 mL εξανίου, σε θερμοκρασία δωματίου, για 1 ώρα.

Η ανάλυση των FAMES πραγματοποιήθηκε στον αέριο χρωματογράφο Shimadzu, Nexis GC-2030, ο οποίος είναι εξοπλισμένος με αυτόματο δειγματολήπτη, στήλη Mega-Wax (30 m*0.25 mm, πάχος φιλμ 0.25 μm MEGA Srl) και ανιχνευτή FID που χρησιμοποιεί ήλιο ως φέρον αέριο (1.1 mL/min). Για την ταυτοποίηση των FAMES χρησιμοποιήθηκε πρότυπο αναφοράς (Supelco® 37 Component FAME Mix, 10 mg/mL, CH_2Cl_2 , 47885-U, Merck). Το πρόγραμμα λειτουργίας του φούρνου ξεκίνησε στους 100 °C (χρόνος διατήρησης 8 λεπτά), σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας ως τους 200 °C με ρυθμό 5 °C/λεπτό (χρόνος διατήρησης 1 λεπτό) και στη συνέχεια περαιτέρω αύξηση με ρυθμό 3 °C/λεπτό έως τους 245 °C (χρόνος διατήρησης 2 λεπτά). Η θερμοκρασία του ανιχνευτή ήταν ρυθμισμένη στους 250 °C (Εικόνα 21).



Εικόνα 21 Χρωματογράφημα λιπαρών οξέων του *T. chuii*.

Κάθε κορυφή ταυτοποιήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως πρότυπο αναφοράς ένα μίγμα FAME 37 συστατικών (Supelco, Sigma-Aldrich Co., ΗΠΑ). Για τη σωστή ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές της μάζας του αρχικού δείγματος και του προτύπου. Βασικό στοιχείο για την ποσοτικοποίηση των λιπαρών οξέων ήταν το ποσοστό του εμβαδού κάθε κορυφής σε σχέση με το συνολικό εμβαδόν όλων των κορυφών ενός δείγματος.

2.8 Μετρήσεις φθορισμού χλωροφυλλών

Η μέγιστη κβαντική απόδοση του φωτοσυστήματος II (PSII) (Qy) προσδιορίστηκε για τα δείγματα καλλιεργειών μικροφυκών με μέτρηση του φθορισμού της χλωροφύλλης σε ένα φορητό φθορόμετρο διαμόρφωσης πλάτους παλμών (PAM, Εικόνα 22) (AquaPen AP-100, Photon Systems Instruments, Czech Republic), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα δείγματα των καλλιεργειών που χρησιμοποιήθηκαν για αυτές τις μετρήσεις είχαν όγκο 3 mL και

Κεφάλαιο 2^ο: Υλικά και Μέθοδοι

προσαρμόστηκαν σε σκοτεινές συνθήκες για 10 λεπτά πριν από την πραγματοποίηση της κάθε μέτρησης.

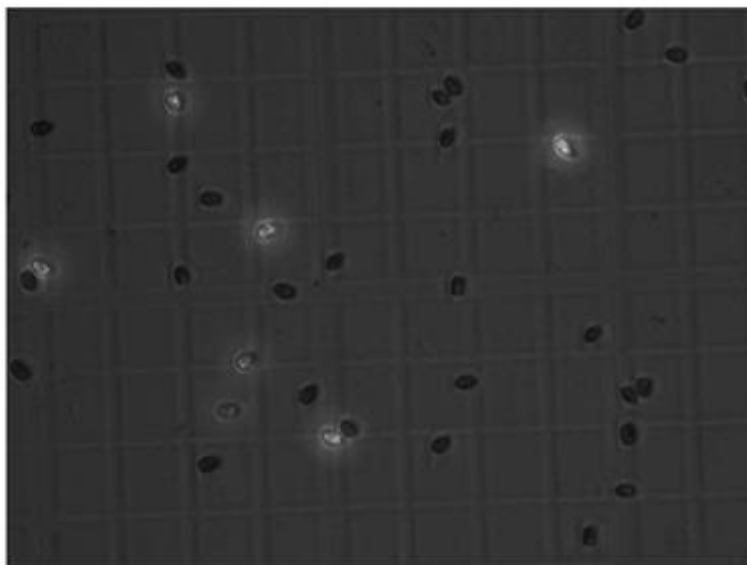


Εικόνα 22 PAM AquaPen AP-100.

2.9 Στατιστική ανάλυση

Η αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων σε κάθε μέθοδο πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό IBM SPSS Statistics 23, μέσω του οποίου έγινε ανάλυση της διακύμανσης (analysis of variance - ANOVA) και στη συνέχεια πολλαπλή σύγκριση με τη μέθοδο Tukey's HSD (Honestly Significant Difference), ορίζοντας ως επίπεδο σημαντικότητας το 95% ($p < 0.05$). Οι αναλύσεις partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) και principal component analysis (PCA) έγιναν με χρήση μιας επέκτασης του Excel, του Multibase 2015. Για τη δημιουργία των γραφημάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SigmaPlot 12.0 (Systat Software), ενώ τα γραφήματα με μορφή πίτας έγιναν στο Excel. Τέλος, οι απεικονίσεις των μεταβολικών χαρτών έγιναν στο BioRender.com.

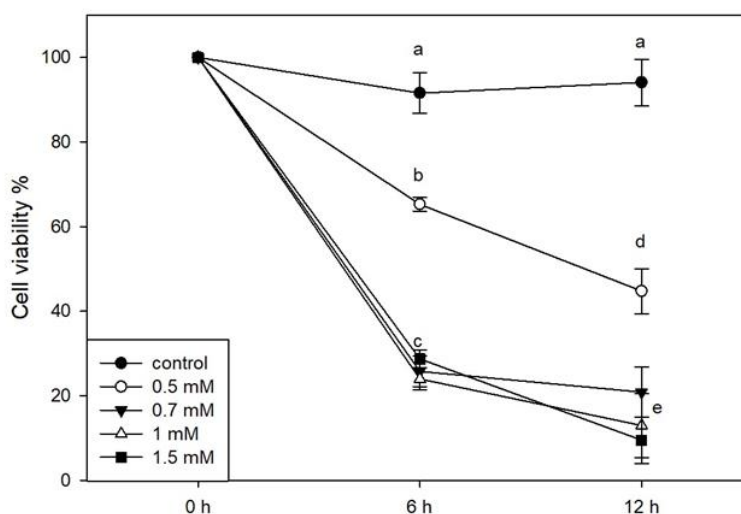
Κεφάλαιο 3ο: Αποκρίσεις του *T. chuii* στην οξειδωτική καταπόνηση



3.1 Αποτελέσματα

3.1.1 Επίδραση της οξειδωτικής καταπόνησης στη βιωσιμότητα του *T. chuii*

Προκειμένου να μελετηθούν οι συνέπειες της επαγόμενης από το H₂O₂ οξειδωτικής καταπόνησης στην ανάπτυξη του μικροφύκου *T. chuii*, χρησιμοποιήθηκαν πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις H₂O₂ (0 mM, 0.5 mM, 0.7 mM, 1 mM και 1.5 mM), σε τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Οι καλλιέργειες ελέγχου εμφάνισαν σταθερά επίπεδα βιωσιμότητας σε όλη τη χρονική διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Η έκθεση σε 0.7, 1 και 1.5 mM H₂O₂ για 6 ώρες προκάλεσε σημαντική πτώση της βιωσιμότητας των κυττάρων, έως και λίγο πάνω από το 20%. Στατιστικά σημαντική ήταν και η μείωση της βιωσιμότητας για τις καλλιέργειες που εκτέθηκαν σε 0.5 mM H₂O₂ για 6 ώρες, με το χειρισμό αυτό να εμφανίζει ωστόσο τις λιγότερο αρνητικές συνέπειες (Εικόνα 23). Η παράταση της καταπόνησης για ακόμα 6 ώρες, ως τις 12 ώρες συνολικά, οδήγησε σε περαιτέρω μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας. Οι καλλιέργειες που εκτέθηκαν σε 0.5 mM H₂O₂ εμφάνισαν 45% βιωσιμότητα ενώ για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν η βιωσιμότητα των καλλιεργειών έπεσε κάτω από το 20% (Εικόνα 23). Αξιολογώντας αυτά τα αποτελέσματα, επιλέχθηκε η εφαρμογή 0.5 mM H₂O₂ για 6 ώρες ως ο πλέον κατάλληλος χειρισμός για τη συνέχιση της μελέτης της απόκρισης του *T. chuii* στην οξειδωτική καταπόνηση.



Εικόνα 23 Κυτταρική βιωσιμότητα καλλιεργειών *T. chuii* που εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις H₂O₂. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται ως μέσος όρος ±SE των τριών βιολογικών επαναλήψεων (n=3). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται με διαφορετικά γράμματα (Tukey's HSD, P<0.05).

Για τον προσδιορισμό της ικανότητας φωτοσύνθεσης των καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκε η μέγιστη κβαντική απόδοση του φωτοσυστήματος II (maximal Photosystem II quantum yield, F_v/F_m). Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε η απόδοση του κέντρου αντίδρασης του PSII στη μετατροπή της φωτεινής ενέργειας. Πριν την έναρξη της καταπόνησης (0 ώρες) ο λόγος F_v/F_m είχε τιμή 0.67. Η έκθεση σε 0.5 mM H_2O_2 για 1 ώρα είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση αυτής της τιμής στο 0.51, ενώ η παρατεταμένη έκθεση για 6 ώρες προκάλεσε περαιτέρω μείωση στο 0,37 (Πίνακας 13).

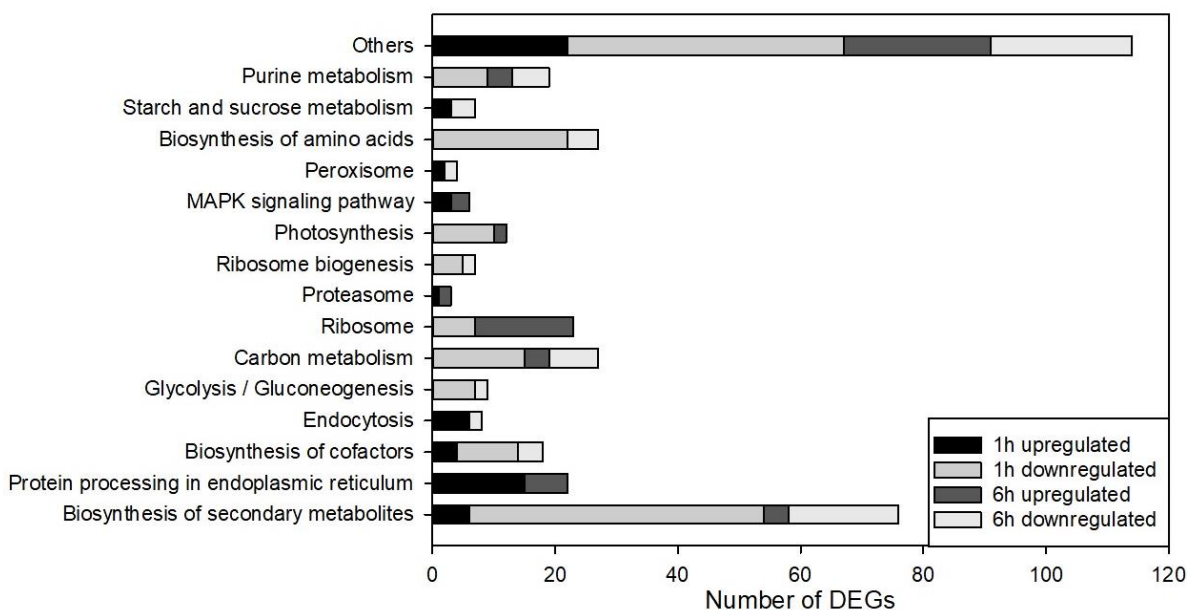
Πίνακας 13 Τιμές F_v/F_m μετά από έκθεση σε 0.5 mM H_2O_2 για 0h, 1h και 6h. Για κάθε χειρισμό, ο λόγος υπολογίστηκε από το μέσο όρο 2 βιολογικών και 2 τεχνικών επαναλήψεων ($n=4$). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται με διαφορετικά γράμματα (Tukey's HSD, $P<0.05$).

	F_v/F_m	SE
0 h	0.67 ^a	0.02
1 h	0.51 ^b	0.01
6 h	0.37 ^c	0.04

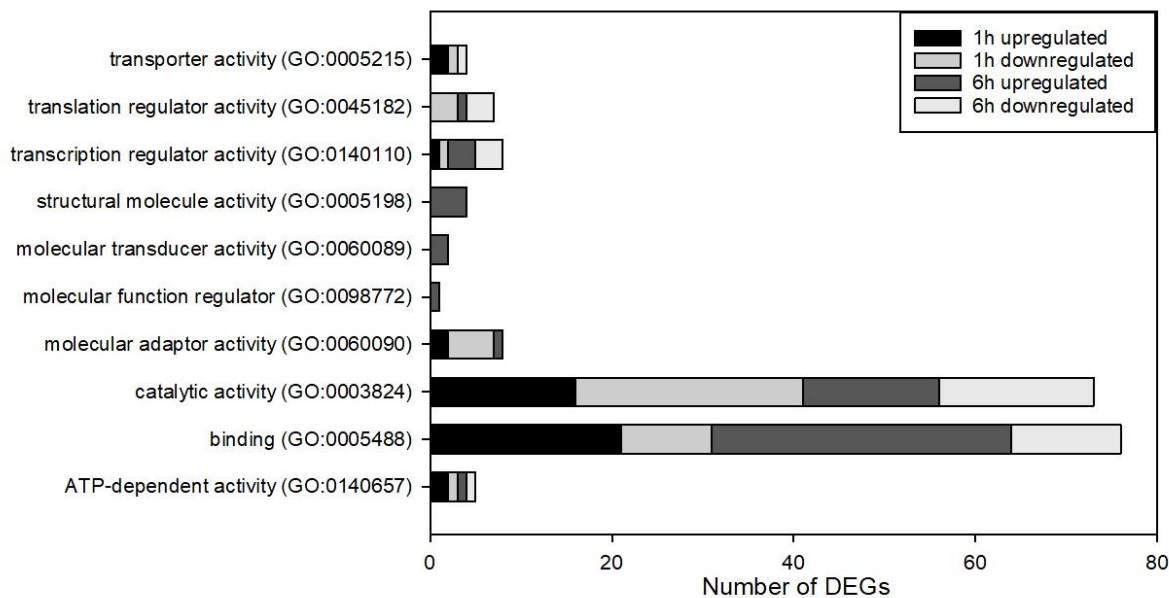
3.1.2 Συγκριτική μεταγραφομική απόκριση του *T. chuii* στην επαγόμενη από H_2O_2 οξειδωτική καταπόνηση

Για να αποσαφηνιστεί περαιτέρω ο μηχανισμός μοριακής προσαρμογής που διέπει την απόκριση του *T. chuii* στην οξειδωτική καταπόνηση, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του συνολικού μεταγραφώματος του. Για κάθε μία από τις cDNA βιβλιοθήκες που κατασκευάστηκαν δημιουργήθηκαν τουλάχιστον 12 εκατομμύρια καθαρές αλληλουχίες (clean reads) και από αυτές το 41%, κατά μέσο όρο, χαρτογραφήθηκε επιτυχώς πάνω στο μεταγράφομα αναφοράς. Αποτέλεσμα της χαρτογράφησης ήταν η απόκτηση ποσοτικών δεδομένων για τα επίπεδα έκφρασης σε περισσότερες από 22.500 μοναδικές κωδικοποιούσες περιοχές (coding sequences – CDS) (Παράρτημα 1). Από αυτές, οι 1761 χαρακτηρίστηκαν ως διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια (Differentially Expressed Genes - DEGs) ανάμεσα στους διαφορετικούς χειρισμούς. Στην ανάλυση που ακολούθησε προέκυψε ότι 501 από τα DEGs είναι χαρακτηρισμένα με KOs (Kegg Orthology identifiers) και έχουν χαρτογραφηθεί σε συγκεκριμένα μονοπάτια (Εικόνα 24). Επίσης, ο λειτουργικός χαρακτηρισμός (functional annotation) των DEGs πάνω στη βάση δεδομένων Gene Ontology (GOs) έδειξε πως το 41.4% από αυτά είναι μη ταξινομημένο, ενώ τα

υπόλοιπα αντιστοιχίζονται σε πλήθος μοριακών λειτουργιών, με τις πρόσδεση και καταλυτική ενεργότητα να είναι να είναι οι κυρίαρχες (Εικόνα 25).

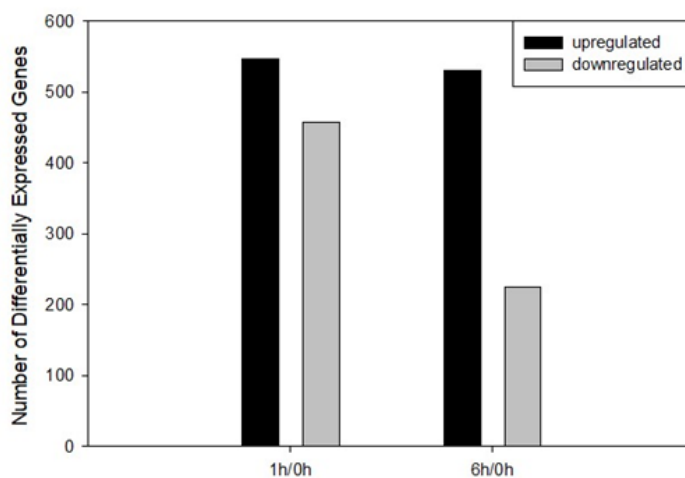


Εικόνα 24 Αριθμός των DEGs με αυξημένα ή μειωμένα επίπεδα έκφρασης που έχουν χαρτογραφηθεί σε μεταβολικά μονοπάτια, για κάθε χειρισμό των καλλιεργειών *T. chuii*.



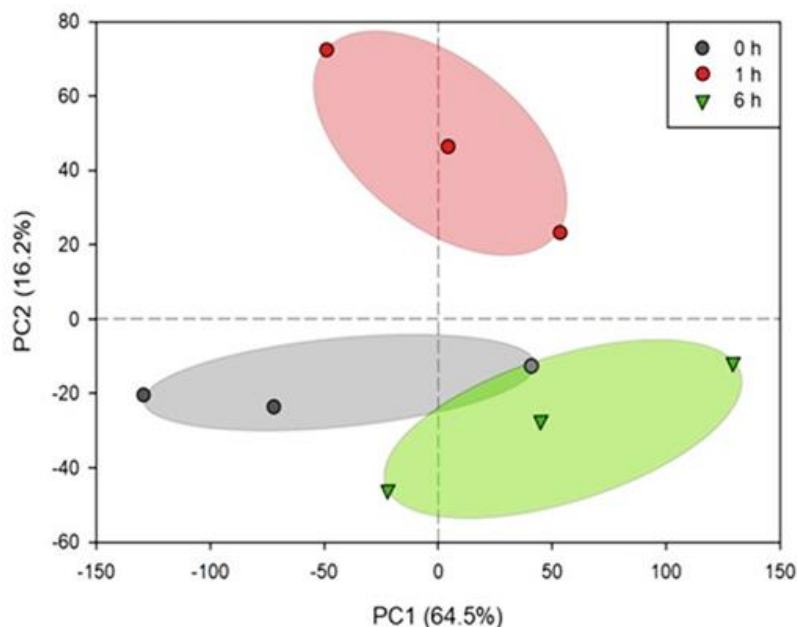
Εικόνα 25 Αριθμός των DEGs με αυξημένα ή μειωμένα επίπεδα έκφρασης που έχουν λειτουργικό χαρακτηρισμό, για κάθε χειρισμό των καλλιεργειών *T. chuii*.

Συγκρίνοντας τα DEGs που εμφάνισαν οι καλλιέργειες *T. chuii* που εκτέθηκαν σε 0.5 mM H₂O₂ για 1 ώρα με τα αντίστοιχα των καλλιεργειών ελέγχου, αποκαλύφθηκε ένας εκτεταμένος μεταγραφικός επαναπρογραμματισμός των κυττάρων. Συνολικά, εντοπίστηκαν 1005 DEGs (differential expression adjusted P<0.05), με τα 547 από αυτά να εμφανίζουν αύξηση στα επίπεδα έκφρασης τους και τα 458 μείωση (Εικόνα 26, Παράρτημα 1.1). Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν ότι η έκθεση των μικροφυκών στον παράγοντα καταπόνησης για 6 ώρες είχε λιγότερο έντονες συνέπειες στις τροποποιήσεις του μεταγραφώματος, καθώς εντοπίστηκαν 756 DEGs, από τα οποία 531 παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης, συγκρινόμενα με τις καλλιέργειες ελέγχου, και τα υπόλοιπα 225 παρουσίασαν μείωση (Εικόνα 26, Παράρτημα 1.2).



Εικόνα 26 Αριθμός των DEGs (P<0.05) ανάμεσα στους διαφορετικούς χειρισμούς (n = 1005).

Σύμφωνα με την ανάλυση κύριων συνιστωσών (principal component analysis - PCA) υπάρχει στενή ομαδοποίηση των μεταγραφομάτων που μελετήθηκαν (Εικόνα 27). Λαμβάνοντας υπόψιν τις συνιστώσες PC1 και PC2, που συνεισφέρουν αθροιστικά το 80.7% της συνολικής μεταβλητότητας, όλες οι επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν για κάθε χειρισμό ομαδοποιήθηκαν, χωρίς να παρεμβάλλονται άλλοι χειρισμοί. Μάλιστα, στον Ευκλείδειο χώρο που ορίζεται από τα PC1 και PC2, μεγαλύτερη απόσταση υπάρχει ανάμεσα στα μεταγραφόματα των καλλιεργειών που εκτέθηκαν στο H₂O₂ για 1 και 6 ώρες, ενώ το μεταγράφομα των καλλιεργειών ελέγχου βρίσκεται σε ενδιάμεση θέση (Εικόνα 27).

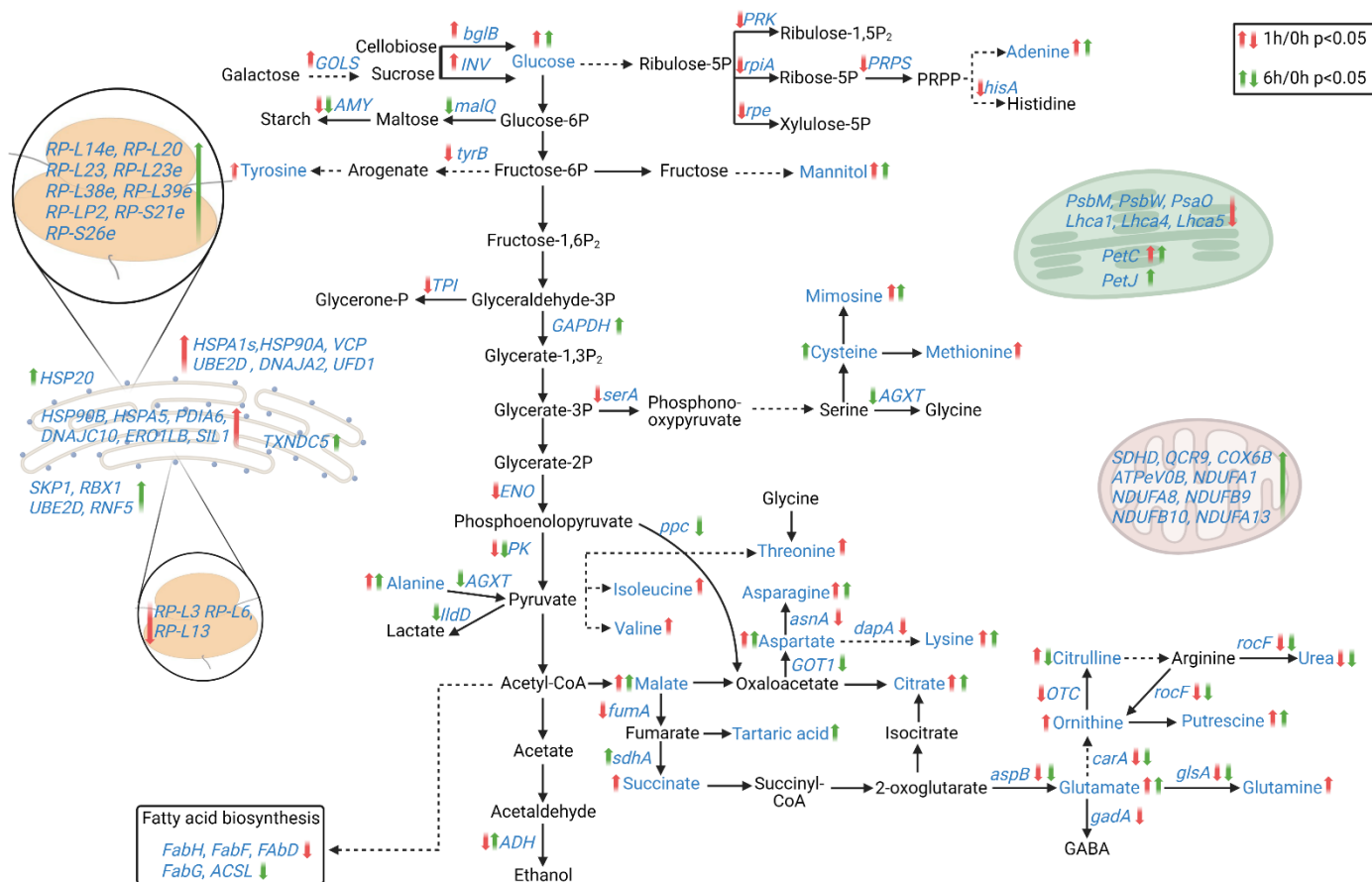


Εικόνα 27 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) των μεταγραφωμάτων μετά την έκθεση σε 0.5 mM H₂O₂. Για κάθε χειρισμό οι βιολογικές επαναλήψεις απεικονίζονται ξεχωριστά (n=3). Η διακεκομμένη γραμμή χωρίζει το ανώτερο θετικό τεταρτημόριο του PC1.

Όταν η ανάλυση εστιάστηκε σε συγκεκριμένες μεταβολικές βιοχημικές διεργασίες (Εικόνα 28), παρατηρήθηκε από τη χαρτογράφηση των ταυτοποιημένων DEGs ένα ευρύ φάσμα μεταγραφωμικών αποκρίσεων. Συγκεκριμένα, 9 γονίδια που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των πουρινών (map00230) μείωσαν σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης τους στη μία ώρα, ενώ στις 6 ώρες τέσσερα τα αύξησαν και έξι τα μείωσαν. Αναφορικά με τη φωτοσύνθεση (map00195), 10 γονίδια εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης στη μία ώρα και δύο αύξησαν την έκφραση τους στις 6 ώρες. Ο μεταβολισμός του άνθρακα (map01200) εμφάνισε 15 γονίδια με μειωμένα επίπεδα έκφρασης στη 1 ώρα, ενώ στις 6 ώρες 8 γονίδια είχαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης και τέσσερα αυξημένα. Τα γονίδια που συνδέονται με τη γλυκόλυση (map00010) εμφάνισαν μείωση στα επίπεδα έκφρασης τους, συγκεκριμένα μειώθηκαν επτά στη 1 ώρα και δύο στις 6 ώρες. Σημαντική μείωση είχε και η βιοσύνθεση των αμινοξέων (map01230), με τα επίπεδα έκφρασης να μειώνονται για 22 γονίδια στη 1 ώρα και για 5 γονίδια στις 6 ώρες. Η βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών (map01110) παρουσίασε αξιοσημείωτη μείωση, με 48 γονίδια να μειώνουν την έκφραση τους στη 1 ώρα και 18 στις 6 ώρες. Τα αποτελέσματα αυτά

υπογραμμίζουν τη μειωμένη μεταβολική δραστηριότητα που παρατηρείται σε πολλές κύριες οδούς μετά από 1 ώρα έκθεσης σε H_2O_2 , καθώς και την προσπάθεια επανενεργοποίησης της φωτοσύνθεσης και του μεταβολισμού του άνθρακα μετά από παρατεταμένη έκθεση για 6 ώρες.

Εστιάζοντας περισσότερο στη σύγκριση των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων ανάμεσα στις καλλιέργειες που εκτέθηκαν σε 0.5 mM H_2O_2 για 1 ώρα και εκείνες που δεν εκτέθηκαν καθόλου στον παράγοντα καταπόνησης (0 ώρες), αποκαλύφθηκε ένας εκτεταμένος πρώιμος μεταγραφομικός επαναπρογραμματισμός των κυττάρων (Εικόνα 28, Πίνακας 14, Παράρτημα 1.1). Ανάμεσα στα DEGs που εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης, 15 συμμετείχαν στην επεξεργασία πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER). Σε αυτά περιλαμβάνονται τα *SIL1*, *DNAJC10*, *HSPA5* και *HSP90B*, που εμπλέκονται στην αναγνώριση πρωτεϊνών από τις συνοδούς (chaperons) του ενδοπλασματικού αυλού και βρέθηκαν τα δύο πρώτα αυξημένα κατά 3 φορές και τα υπόλοιπα 2.3 φορές και 1.8 φορές αντίστοιχα, υψηλότερα από ότι στις καλλιέργειες ελέγχου. Επιπροσθέτως, αύξηση εμφάνισαν το *ERO1LB*, κατά 3 φορές, και το *PDIA6*, κατά 1.2 φορές, και τα δύο υπεύθυνα για τη στόχευση πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Αρκετά μετάγραφα που κωδικοποιούν για το σύμπλεγμα λιγάσης ουβικιτίνης (ubiquitin ligase complex) και την επακόλουθη αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα εμφάνισαν επίσης αύξηση στην έκφραση τους. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα *HSPA1s*, *UBE2D* και *HSP90A* που έδειξαν 2.5 φορές, 1.2 φορές και 4.9 φορές αντίστοιχα υψηλότερη έκφραση. Επιπλέον, τα γονίδια *HMGCL* και *MPV17* που σχετίζονται με τη λειτουργία των υπεροξεισωμάτων εμφάνισαν 2.8 φορές και 2.3 φορές αύξηση στα επίπεδα έκφρασής τους. Η έκθεση σε H_2O_2 προκάλεσε την αύξηση της έκφρασης των *INV* και *hglB* που συμμετέχουν στο μεταβολισμό αμύλου και σακχαρόζης. Ακόμα, θετικός ήταν ο αντίκτυπος στο μεταβολισμό της γαλακτόζης όπως αποδεικνύεται από την αύξηση των επιπέδων έκφρασης τριών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένης της εντυπωσιακής αύξησης κατά 8.6 φορές του γονιδίου *GOLS*. Ανάμεσα στα DEGs των οποίων η έκφραση έχει επαχθεί περιλαμβάνονται τα *RNF41*, *CHMP1*, *VPS29* και *IST1*, τα οποία διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στον μηχανισμό της ενδοκύττωσης. Η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών παρουσίασε σημαντική αύξηση, ενώ η βιοσύνθεση των συμπαραγόντων και η MAPK οδός σηματοδότησης επηρεάστηκαν επίσης θετικά.



Εικόνα 28 Συνολική επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων H_2O_2 στο μεταγράφομα και το μεταβόλομα του *T. chuii*. Απεικόνιση των μεταβολικών μονοπατιών που περιλαμβάνουν γονίδια (n=3 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις, P<0.05) ή μεταβολίτες (n=6, τρεις ανεξάρτητες βιολογικές και δύο τεχνικές επαναλήψεις στην κάθε μία, P<0.05) που επηρεάζονται σημαντικά. Τα γονίδια και οι μεταβολίτες που προσδιορίστηκαν σε αυτή τη μελέτη εμφανίζονται με μπλε χρώμα, ενώ οι μεταβολίτες σε μαύρο χρώμα όχι. Τα βέλη δίπλα σε γονίδια ή μεταβολίτες αντιπροσωπεύουν στατιστικά σημαντική ανοδική ρύθμιση/συσσώρευση και μείωση/εξάντληση. Τα κόκκινα βέλη υποδεικνύουν τα σχετικά επίπεδα των μεταγράφων ή των μεταβολιτών του *T. chuii* όταν αναπτύχθηκε παρουσία 0.5 mM H_2O_2 για 1 ώρα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα των καλλιεργειών ελέγχου (1h/0h). Τα πράσινα βέλη υποδεικνύουν τα σχετικά επίπεδα των μεταγράφων ή των μεταβολιτών του *T. chuii* όταν αυτό αναπτύχθηκε παρουσία 0.5 mM H_2O_2 για 6 ώρες, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα των καλλιεργειών ελέγχου (6h/0h).

Συνεχίζοντας τη μελέτη των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων, μετά την έκθεση καλλιεργειών *T. chuii* σε 0.5 mM H_2O_2 για 1 ώρα, εντοπίστηκαν αρκετά με σημαντικά μειωμένα επίπεδα

έκφρασης (Εικόνα 28, Πίνακας 14, Παράρτημα 1.1). Ο μεταβολισμός του άνθρακα επηρεάστηκε σε μεγάλο βαθμό, καθώς 15 από τα DEGs με μείωση στην έκφραση τους συμμετέχουν σε αυτή τη διεργασία. Σε αυτά περιλαμβάνονται βασικοί παράγοντες της γλυκόλυσης / γλυκονεογένεσης, όπως η πυροσταφυλική κινάση (*PK*) και η ενολάση (*ENO*), που βρέθηκαν και οι δύο μειούμενες κατά 1.5 φορές, καθώς και άλλα γονίδια όπως τα *frmA*, *PDH* και *TPI*. Η μείωση του μεταβολισμού του άνθρακα απεικονίστηκε επίσης στη μείωση της καθήλωσης του άνθρακα, όπως υποδεικνύεται από τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης πολλών μεταγραφών, συμπεριλαμβανομένης της μείωσης κατά 1.8 φορές του *griA*. Σχετικά με τη φωτοσύνθεση, η επίδραση της καταπόνησης ήταν οξεία, καθώς τέσσερα γονίδια που κωδικοποιούν για τις υπομονάδες του PSI και πέντε γονίδια που κωδικοποιούν για τις υπομονάδες του PSII εμφάνισαν μειωμένη έκφραση, με την έκφραση του *psbQ* να μειώνεται κατά 2.4 φορές. Η έκφραση του *petE* που κωδικοποιεί την πλαστοκυανίνη και του γονιδίου *petH* της αναγωγάσης της φερρεδοξίνης-NADP⁺ μειώθηκαν κατά 1.7 και 1.4 φορές, αντίστοιχα. Επιπλέον, μειώθηκε η έκφραση πολλών μεταγραφών που κωδικοποιούν για τα σύμπλοκα συγκομιδής φωτός. Η μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων επηρεάστηκε επίσης αρνητικά από την έκθεση στο H₂O₂, καθώς παρατηρήθηκαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης της Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase (*fabD*), της Beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (*fabH*) και της β-ketoacyl-acyl carrier protein (ACP) synthase II (*fabF*). Η βιοσύνθεση των αμινοξέων επηρεάστηκε αρνητικά σε μεγάλο βαθμό, καθώς εντοπίστηκαν 22 DEGs με μειωμένα επίπεδα έκφρασης που συμμετέχουν σε αυτά τα μονοπάτια. Ανάμεσα τους, την πιο έντονη μείωση στα επίπεδα μεταγραφής είχαν τα *OTC*, *PRPS* και *hisC*, παρουσιάζοντας μείωση κατά 2.6, 2.4 και 2.3 φορές αντίστοιχα. Η έκφραση αρκετών γονιδίων που κωδικοποιούν για δομικές πρωτεΐνες του ριβοσώματος βρέθηκε επίσης μειωμένη, συμπεριλαμβανομένων των *RP-L3*, *RP-L6* και *RP-L13*, καθώς και πέντε γονιδίων που εμπλέκονται στη βιογένεση του ριβοσώματος. Η έκθεση σε 0.5 mM H₂O₂ για 1 ώρα είχε αρνητικό αντίκτυπο και σε άλλες μεταβολικές οδούς, όπως ο μεταβολισμός των πουρινών και ο μεταβολισμός της πορφυρίνης.

Πίνακας 14 Συγκριτικά επίπεδα έκφρασης (log2-normalized fold changes) καλά χαρακτηρισμένων γονιδίων μεταξύ 1 ώρας και 0 ωρών ($p < 0.05$). Για κάθε χειρισμό, οι λόγοι υπολογίστηκαν από τον μέσο όρο των 3 βιολογικών επαναλήψεων ($n=3$).

ID	Όνομα γονιδίου	Λειτουργία	DE Log2 Ratio	DE Log2 SE	DE Adj p-value
MMETSP0491_2-20121128 4728_1	<i>GOLS</i>	Galactose metabolism	8,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9083_1	<i>HSP90A</i>	ER-associated degradation	4,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4597_1	<i>galA</i>	Galactose metabolism	4,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11001_1	<i>UFD1</i>	ER-associated degradation	4,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11484_1	<i>HSPBP1</i>	ER-associated degradation	3,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4903_1	<i>SIL1</i>	Protein recognition by luminal chaperones	3,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10615_1	<i>DNAJC10</i>	Protein recognition by luminal chaperones	3,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11713_1	<i>ERO1</i>	Protein targeting in ER	3,0	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1139_1	<i>HMGCL</i>	Peroxisome	2,8	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3720_1	<i>DUSP10</i>	MAPK signaling pathway	2,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13689_1	<i>RNF41</i>	Endocytosis	2,6	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 23552_1	<i>HSPA1s</i>	Ubiquitin ligase complex	2,5	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 18022_1	<i>MPV17</i>	Peroxisome	2,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10621_1	<i>HSPA5</i>	Protein recognition by luminal chaperones	2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6655_1	<i>UFD1</i>	ER-associated degradation	2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13332_1	<i>SC5DL</i>	Biosynthesis of secondary metabolites	2,0	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10017_1	<i>PYRP2</i>	Biosynthesis of secondary metabolites	1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6772_1	<i>HSP90B</i>	Protein recognition by luminal chaperones	1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9314_1	<i>CHMP1</i>	Endocytosis	1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14176_1	<i>VPS29</i>	Endocytosis	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1680_1	<i>INV</i>	Starch and sucrose metabolism	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10097_1	<i>pdxH</i>	Biosynthesis of cofactors	1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11152_1	<i>DNAJA2</i>	Ubiquitin ligase complex	1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10955_1	<i>IST1</i>	Endocytosis	1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1626_1	<i>CHMP5</i>	Endocytosis	1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7112_1	<i>nadB</i>	Biosynthesis of cofactors	1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4094_1	<i>bgIB</i>	Starch and sucrose metabolism	1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9633_1	<i>UBE2D</i>	Ubiquitin ligase complex	1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6663_1	<i>PDIA4</i>	Protein targeting in ER	1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1976_1	<i>VCP</i>	ER-associated degradation	1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9249_1	<i>SPS, sds</i>	Biosynthesis of secondary metabolites	1,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9380_1	<i>iscS</i>	Biosynthesis of cofactors	1,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9618_1	<i>psaD</i>	Photosynthesis	-1,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11052_1	<i>RPE</i>	Carbon fixation in photosynthetic organisms	-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6312_1	<i>asnA</i>	Biosynthesis of amino acids	-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10314_1	<i>PPOX</i>	Porphyrin metabolism	-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1160_1	<i>pgm</i>	Glycolysis / Gluconeogenesis	-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9504_1	<i>MDH2</i>	Carbon fixation in photosynthetic organisms	-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9480_1	<i>bchM</i>	Porphyrin metabolism	-1,3	0,2	0,0

MMETSP0491_2-20121128 10005_1	<i>psb27</i>	Photosynthesis	-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12612_1	<i>psaO</i>	Photosynthesis	-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13958_1	<i>PWP2</i>	Ribosome biogenesis in eukaryotes	-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9356_1	<i>RP-L15</i>	Ribosome	-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9632_1	<i>frmA</i>	Glycolysis / Gluconeogenesis	-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6490_1	<i>HIS7</i>	Biosynthesis of amino acids	-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9946_1	<i>psaF</i>	Photosynthesis	-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6547_1	<i>purD</i>	Purine metabolism	-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10216_1	<i>RP-S5</i>	Ribosome	-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16252_1	<i>psbM</i>	Photosynthesis	-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10855_1	<i>petH</i>	Photosynthesis	-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 944_1	<i>purM</i>	Purine metabolism	-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9426_1	<i>UTP6</i>	Ribosome biogenesis in eukaryotes	-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8486_1	<i>PAT</i>	Biosynthesis of amino acids	-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11852_1	<i>RP-L13</i>	Ribosome	-1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 104_1	<i>dapA</i>	Biosynthesis of amino acids	-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8089_1	<i>adk</i>	Purine metabolism	-1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10244_1	<i>PK</i>	Glycolysis / Gluconeogenesis	-1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12116_1	<i>psaG</i>	Photosynthesis	-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13249_1	<i>ENO</i>	Glycolysis / Gluconeogenesis	-1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16998_1	<i>fabD</i>	Fatty acid metabolism	-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13938_1	<i>PRK</i>	Carbon fixation in photosynthetic organisms	-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2107_1	<i>NOL</i>	Porphyrin metabolism	-1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11417_1	<i>serC</i>	Biosynthesis of amino acids	-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10380_1	<i>RP-L6</i>	Ribosome	-1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 21532_1	<i>argAB</i>	Biosynthesis of amino acids	-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11940_1	<i>psbW</i>	Photosynthesis	-1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10242_1	<i>RP-L22</i>	Ribosome	-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3989_1	<i>PFAS</i>	Purine metabolism	-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10543_1	<i>petE</i>	Photosynthesis	-1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2664_1	<i>serA</i>	Biosynthesis of amino acids	-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11644_1	<i>asd</i>	Biosynthesis of amino acids	-1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6762_1	<i>leuB</i>	Biosynthesis of amino acids	-1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10437_1	<i>RP-L3</i>	Ribosome	-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7029_1	<i>chlG</i>	Porphyrin metabolism	-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14214_1	<i>rpiA</i>	Carbon fixation	-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12590_1	<i>PDHA</i>	Glycolysis / Gluconeogenesis	-1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4844_1	<i>argG</i>	Biosynthesis of amino acids	-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20808_1	<i>TPI</i>	Glycolysis / Gluconeogenesis	-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11200_1	<i>add</i>	Purine metabolism	-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1536_1	<i>fabF</i>	Fatty acid metabolism	-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4142_1	<i>leuA</i>	Biosynthesis of amino acids	-1,9	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13363_1	<i>DVR</i>	Porphyrin metabolism	-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5462_1	<i>GDA</i>	Purine metabolism	-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17255_1	<i>trpA</i>	Biosynthesis of amino acids	-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9413_1	<i>DKC1</i>	Ribosome biogenesis in eukaryotes	-2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12499_1	<i>EARS</i>	Porphyrin metabolism	-2,1	0,3	0,0

MMETSP0491_2-20121128 10522_1	<i>RP-S1</i>	Ribosome	-2,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3515_1	<i>NOP56</i>	Ribosome biogenesis in eukaryotes	-2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 24710_1	<i>fabH</i>	Fatty acid metabolism	-2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11704_1	<i>hisA</i>	Biosynthesis of amino acids	-2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9718_1	<i>HEMC</i>	Porphyrin metabolism	-2,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13623_1	<i>PRPS</i>	Biosynthesis of amino acids	-2,4	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6755_1	<i>psbQ</i>	Photosynthesis	-2,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3189_1	<i>OTC</i>	Biosynthesis of amino acids	-2,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 24097_1	<i>NOP5</i>	Ribosome biogenesis in eukaryotes	-2,9	0,4	0,0

Η παρατεταμένη έκθεση των κυττάρων *T. chuii* σε 0.5 mM H₂O₂ για 6 ώρες είχε ως αποτέλεσμα την τροποποίηση των επιπέδων έκφρασης μικρότερου αριθμού DEGs (Εικόνα 28, Πίνακας 15, Παράρτημα 1.2). Από τα DEGs που εμφάνισαν αύξηση στην έκφραση τους, 9 σχετίζονταν με την οξειδωτική φωσφορυλίωση, όπως το *NDUFA1* του οποίου η έκφραση αυξήθηκε κατά 2 φορές και το *NDUFA8*. 2 φορές αύξηση εμφάνισαν και τα *PetJ* και *PetC*, τα προϊόντα των οποίων εμπλέκονται στη φωτοσύνθεση. Ακόμα, θετικά επηρεάστηκαν πολλά γονίδια που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του άνθρακα, μεταξύ των οποίων η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (*GAPDH*) που αύξησε τα επίπεδα μεταγραφής της κατά τουλάχιστον 2 φορές. Επιπλέον, ενισχύθηκε σε μεγάλο βαθμό ο σχηματισμός ριβοσωμάτων, καθώς 16 γονίδια που κωδικοποιούν δομικές πρωτεΐνες τόσο των μικρών όσο και των μεγάλων ριβοσωμικών υπομονάδων, εμφάνισαν αύξηση στην έκφραση τους κατά τουλάχιστον 2.1 φορές, συμπεριλαμβανομένων των *RP-L38e*, *RP-L35e* και *RP-L23e*. Τα γονίδια *TXNDC5* που συμμετέχει στη στόχευση πρωτεϊνών στο ER, ταυτοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή με αύξηση 2 φορές, ενώ αυξημένα επίπεδα μεταγραφής εμφάνισε και το *HSP20* που εμπλέκεται στην σχετιζόμενη με το ενδοπλασματικό δίκτυο αποικοδόμηση. Το σύμπλοκο της λιγάσης της ουβικιτίνης επηρεάστηκε επίσης θετικά, με τα γονίδια *SKP1*, *RBX1*, *RNF5* και *UBE2D* να εμφανίζουν αύξηση στην έκφραση τους. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *RPABC2* και *PCNA* που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση της εκτομής νουκλεοτιδίων αυξήθηκαν κατά 2.5 και 1.8 φορές, αντίστοιχα. Τέλος, άλλα DEGs με αυξημένα επίπεδα έκφρασης κωδικοποιούν για υπομονάδες του πρωτεασώματος.

Αντιθέτως, η έκθεση σε 0.5 mM H₂O₂ για 6 ώρες προκάλεσε μείωση της έκφρασης αρκετών βιοσυνθετικών μονοπατιών. Συγκεκριμένα, 18 από τα DEGs με μειωμένα επίπεδα έκφρασης

συμμετέχουν στη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών, με τα *GBE1* και *AGXT* να παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη μείωση, κατά 2 και 2.1 φορές αντίστοιχα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των αμινοξέων, συμπεριλαμβανομένης της αλανίνης, του ασπαρτικού και του γλουταμικού, όπως το *GOT2* τα μετάγραφα του οποίου μειώθηκαν σημαντικά. Μειωμένη έκφραση παρατηρήθηκε σε τρία γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της αργινίνης και της προλίνης, καθώς και σε DEGs που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση συμπαραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της μείωσης του *carB* κατά 2 φορές. Παρομοίως, η πυροσταφυλική κινάση (*PK*) που παίζει βασικό ρόλο στη γλυκόλυση καθώς και το *rgm*, εντοπίστηκαν μεταξύ των DEGs με μείωση στα επίπεδα έκφρασης. Παράλληλα, μειώθηκε η μεταγραφική έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, όπως τα *fabG* και *ACSL* που βρέθηκαν 1.6 και 1.3 φορές χαμηλότερα αντίστοιχα, σε σύγκριση με τις καλλιέργειες ελέγχου. Η φωτοαναπνοή παρουσίασε σημαντική μείωση, όπως υποδεικνύεται από τη μείωση των επιπέδων πολλών μεταγραφών που εμπλέκονται σε αυτή τη μεταβολική διαδικασία, συμπεριλαμβανομένης της αμινομεθυλοτρανσφεράσης *gcnT*. Ανάμεσα στα DEGs με μειωμένα επίπεδα έκφρασης ταυτοποιήθηκαν και αρκετά που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των πουρινών, συμπεριλαμβανομένης της στατιστικά σημαντικής μείωσης του *PDE-4*.

Πίνακας 15 Συγκριτικά επίπεδα έκφρασης (log₂-normalized fold changes) καλά χαρακτηρισμένων γονιδίων μεταξύ 6 ωρών και 0 ωρών (p<0.05). Για κάθε χειρισμό, οι λόγοι υπολογίστηκαν από τον μέσο όρο των 3 βιολογικών επαναλήψεων (n=3).

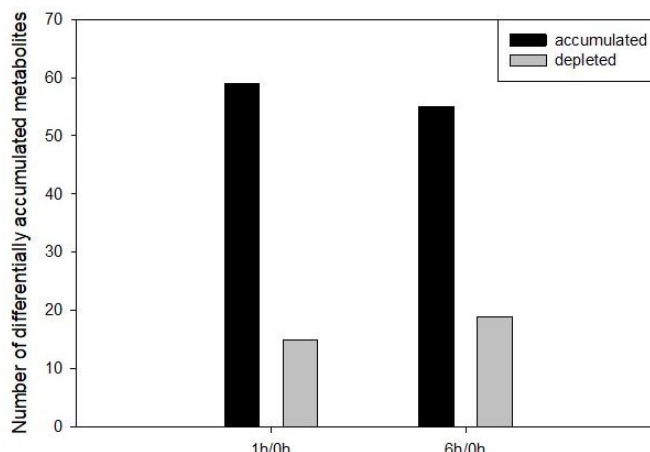
ID	Όνομα γονιδίου	Λειτουργία	DE Log ₂ Ratio	DE Log ₂ SE	DE Adj p-value
MMETSP0491_2-20121128 12403_1	<i>HSP20</i>	Protein processing in endoplasmic reticulum	2,7	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10577_1	<i>RPABC2</i>	Nucleotide excision repair	2,5	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12012_1	<i>petJ</i>	Photosynthesis	2,4	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9377_1	<i>TXNDC5</i>	Protein processing in endoplasmic reticulum	2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8_1	<i>RP-L38e</i>	Ribosome	2,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 64_1	<i>RP-L35e</i>	Ribosome	2,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17551_1	<i>petC</i>	Photosynthesis	2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 26433_1	<i>GAPDH</i>	Carbon metabolism	2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 404_1	<i>RP-L23e</i>	Ribosome	2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7691_1	<i>NDUFA8</i>	Oxidative phosphorylation	2,0	0,3	0,0

MMETSP0491_2-20121128 6646_1	<i>NDUFA1</i>	Oxidative phosphorylation	2,0	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 23295_1	<i>SOS3</i>	MAPK signaling pathway	1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 535_1	<i>RP-LP2</i>	Ribosome	1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10266_1	<i>RP-L20</i>	Ribosome	1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2046_1	<i>PCNA</i>	Nucleotide excision repair	1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 470_1	<i>RP-L39e</i>	Ribosome	1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14849_1	<i>NDUFB10</i>	Oxidative phosphorylation	1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9868_1	<i>RP-L22e</i>	Ribosome	1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11381_1	<i>RP-L32</i>	Ribosome	1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12716_1	<i>SDHD</i>	Oxidative phosphorylation	1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8425_1	<i>UBE2M</i>	Ubiquitin mediated proteolysis	1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 928_1	<i>RP-L14e</i>	Ribosome	1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11144_1	<i>SNRPD2</i>	Spliceosome	1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 306_1	<i>POLD4</i>	Nucleotide excision repair	1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5347_1	<i>QCR9</i>	Oxidative phosphorylation	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8352_1	<i>croR</i>	Carbon metabolism	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13222_1	<i>ATPeVOB</i>	Oxidative phosphorylation	1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9633_1	<i>UBE2D</i>	Ubiquitin mediated proteolysis	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11484_1	<i>HSPBP1</i>	Protein processing in endoplasmic reticulum	1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 265_1	<i>RP-L30</i>	Ribosome	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 23853_1	<i>RNF5</i>	Protein processing in endoplasmic reticulum	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4784_1	<i>RP-S12e</i>	Ribosome	1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14826_1	<i>SNRPG</i>	Spliceosome	1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12293_1	<i>NDUFB9</i>	Oxidative phosphorylation	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1186_1	<i>POLE4</i>	Nucleotide excision repair	1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6618_1	<i>POMP</i>	Proteasome	1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11632_1	<i>RP-S26e</i>	Ribosome	1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 544_1	<i>RP-L23</i>	Ribosome	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13429_1	<i>RP-L36</i>	Ribosome	1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20297_1	<i>COX6B</i>	Oxidative phosphorylation	1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12367_1	<i>SKP1</i>	Ubiquitin mediated proteolysis	1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3780_1	<i>ilvA</i>	Carbon metabolism	1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9586_1	<i>CYN22</i>	Spliceosome	1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11754_1	<i>NDUFA13</i>	Oxidative phosphorylation	1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11716_1	<i>RBX1</i>	Ubiquitin mediated proteolysis	1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3720_1	<i>DUSP10</i>	MAPK signaling pathway	1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11143_1	<i>PSMA2</i>	Proteasome	1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10631_1	<i>RP-S24e</i>	Ribosome	1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9888_1	<i>RP-S21e</i>	Ribosome	1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4606_1	<i>malQ</i>	Biosynthesis of secondary metabolites	-1,1	0,2	0,0

MMETSP0491_2-20121128 10468_1	<i>glyA</i>	Biosynthesis of amino acids	-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3665_1	<i>ACSL</i>	Fatty acid metabolism	-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12902_1	<i>crtB</i>	Biosynthesis of secondary metabolites	-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6493_1	<i>HPR1</i>	Carbon metabolism	-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10314_1	<i>PPOX</i>	Biosynthesis of secondary metabolites	-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2615_1	<i>AMPD</i>	Biosynthesis of secondary metabolites	-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 34_1	<i>metF</i>	Carbon metabolism	-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10244_1	<i>PK</i>	Glycolysis / Gluconeogenesis	-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3823_1	<i>ALDH18A1</i>	Arginine and proline metabolism	-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 700_1	<i>CAS1</i>	Biosynthesis of secondary metabolites	-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14707_1	<i>fabG</i>	Fatty acid metabolism	-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12769_1	<i>PDE-4</i>	Purine metabolism	-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1160_1	<i>pgm</i>	Glycolysis / Gluconeogenesis	-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9343_1	<i>GOT2</i>	Biosynthesis of amino acids	-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14962_1	<i>ARG1</i>	Arginine and proline metabolism	-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15281_1	<i>AMY1</i>	Biosynthesis of secondary metabolites	-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11873_1	<i>gcvT</i>	Carbon metabolism	-1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4652_1	<i>GLDC</i>	Biosynthesis of secondary metabolites	-1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7046_1	<i>carB</i>	Biosynthesis of cofactors	-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14951_1	<i>GBE1</i>	Biosynthesis of secondary metabolites	-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9996_1	<i>AGXT</i>	Biosynthesis of secondary metabolites	-2,1	0,2	0,0

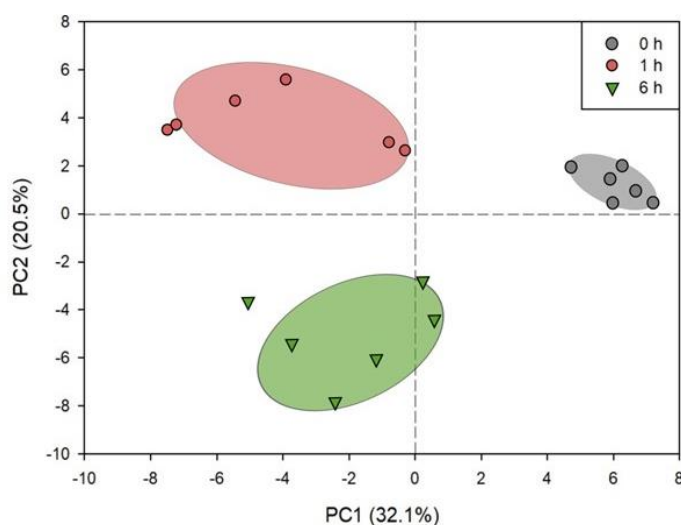
3.1.3 Συγκριτική μεταβολομική απόκριση του *T. chuii* στην επαγόμενη από H₂O₂ οξειδωτική καταπόνηση

Προκειμένου να κατανοηθούν περαιτέρω οι μεταβολικές προσαρμογές των κυττάρων *T. chuii* στην αβιοτική καταπόνηση, εφαρμόστηκε μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση με χρήση της τεχνολογίας GC-MS. Η ανάλυση αυτή οδήγησε στη σχετική ποσοτικοποίηση περισσότερων από 70 μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένων αμινοξέων, σακχάρων, οργανικών οξέων και ενώσεων που περιέχουν άζωτο (Παράρτημα 2). Η σύγκριση του σχετικού περιεχομένου μεταβολιτών των καλλιεργειών που εκτέθηκαν σε 0.5 mM H₂O₂ για 1 ώρα με την αντίστοιχη περιεκτικότητα των καλλιεργειών ελέγχου (0 ώρες), έδωσε 59 μεταβολίτες με αύξηση στο περιεχόμενό τους και 15 με μείωση. Η αντίστοιχη σύγκριση για τις καλλιέργειες που εκτέθηκαν σε H₂O₂ για 6 ώρες έδωσε σαν αποτέλεσμα 55 συσσωρευμένους μεταβολίτες και 19 με μειωμένο περιεχόμενο (Εικόνα 29).



Εικόνα 29 Αριθμός των μεταβολιτών των οποίων το περιεχόμενο επηρεάστηκε από τους χειρισμούς με H_2O_2 (n=74).

Προκειμένου να μελετηθεί η συνολική απόκριση του μεταβολισμού του μικροφύκου *T. chuii*, πραγματοποιήθηκε partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). Λαμβάνοντας υπόψιν το 52.6% της συνολικής διακύμανσης των κύριων συμμετεχόντων, οι μεταβολίτες κάθε χειρισμού ομαδοποιήθηκαν και υπήρχε σαφής διάκριση ανάμεσα στους διαφορετικούς χειρισμούς. Στη γραφική απεικόνιση οι μεταβολίτες των καλλιεργειών ελέγχου τοποθετήθηκαν στη μακρύτερη διαδρομή από τους μεταβολίτες των καλλιεργειών που εκτέθηκαν σε H_2O_2 τόσο για 1 ώρα όσο και για 6 ώρες (Εικόνα 30).



Εικόνα 30 PLS-DA ανάλυση των μεταβολιτών μετά την έκθεση σε 0.5 mM H_2O_2 . Για κάθε χειρισμό οι βιολογικές και τεχνικές επαναλήψεις απεικονίζονται ξεχωριστά (n=6). Η διακεκομμένη γραμμή χωρίζει το ανώτερο θετικό τεταρτημόριο του PC1.

Η σύγκριση των μεταβολομικών προφίλ των καλλιεργειών *T. chuii* που εκτέθηκαν σε 0.5 mM H₂O₂ για 1 ώρα αποκάλυψε αρκετούς διαφορεικά συσσωρευόμενους μεταβολίτες (Εικόνα 28, Πίνακας 16). Η περιεκτικότητα σε αμινοξέα επηρεάστηκε έντονα, καθώς 13 από αυτά συσσωρεύτηκαν σημαντικά. Ανάμεσα τους, η μεθειονίνη, η βαλίνη και η ασπαραγίνη που παρουσίασαν 10.72, 3.85 και 3.79 φορές υψηλότερο περιεχόμενο αντίστοιχα, σε σύγκριση με τις τιμές τους στις καλλιέργειες ελέγχου. Επιπλέον, σαν απόκριση στην οξειδωτική καταπόνηση η περιεκτικότητα οκτώ οργανικών οξέων αυξήθηκε, με το κιτρικό οξύ να εμφανίζει την εντονότερη συσσώρευση, κατά 7.54 φορές, ακολουθούμενο από το μηλικό οξύ που συσσωρεύτηκε 5.91 φορές. Σε σημαντικό βαθμό επηρεάστηκαν και τα επίπεδα της γλυκόζης, η οποία εμφάνισε συσσώρευση 5.79 φορές. Από τις ενώσεις που περιέχουν άζωτο, το περιεχόμενο της αδενίνης αυξήθηκε 3.05 φορές και της πουτρεσκίνης 1.53 φορές, ενώ η περιεκτικότητα σε ουρία ήταν 0.38 φορές χαμηλότερη από την αντίστοιχη των καλλιεργειών ελέγχου. Επιπλέον, η έκθεση σε 0.5 mM H₂O₂ για 1 ώρα οδήγησε σε υψηλότερα, κατά 1.43 φορές, επίπεδα μαννιτόλης.

Πίνακας 16 Συγκριτικοί λόγοι των επιπέδων ταυτοποιημένων μεταβολιτών που εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05) μεταξύ 1h και 0h. Για κάθε χειρισμό, οι λόγοι υπολογίστηκαν από τον μέσο όρο των 3 βιολογικών και 2 τεχνικών επαναλήψεων (n=6).				
	RT	m/z	Ratio 1h/C	P
Amino acids				
L-ornithine	26.3882	174	1.60	0.01
L-valine	12.0452	144	3.85	0.00
L-threonine	16.52835	218	2.78	0.00
citrulline	26.48755	157	1.30	0.05
L-norleucine	13.4872	158	6.48	0.00
L-asparagine	23.2636	231	3.79	0.00
Beta- alanine	17.3783	248	2.38	0.02
tyrosine	28.78545	218	129.21	0.00
L-methionine	19.62155	176	10.72	0.00
L-lysine	28.457	317	1.91	0.00
L-glutamine	25.4187	156	2.38	0.00
DL-isoleucine	14.0454	158	4.80	0.00
beta-cyano-L-alanine	16.0309	141	1.78	0.00
Organic acids				
succinic acid	14.46285	148	2.78	0.00

maleic acid	14.266	147	3.21	0.04
D-malic acid	19.0292	147	5.91	0.00
citric acid	26.58325	347	7.54	0.00
maleamic acid	19.57335	244	1.87	0.00
aspartic acid	19.7722	232	3.57	0.00
L-glutamic acid	22.07675	246	2.81	0.00
glyceric acid	15.08935	189	2.88	0.00
Sugars				
D-glucose	28.3958	319	5.79	0.02
Nitrogen-containing				
adenine	27.2088	264	3.05	0.00
urea	12.4749	147	0.38	0.00
putrescine	24.57765	174	1.53	0.00
Polyols				
D-mannitol	29.1167	319	1.43	0.00
Others				
methyl-beta-D-galactopyranoside	36.03205	204	3.65	0.02
DL-3-aminoisobutyric acid	11.3469	102	4.00	0.02

Αντιθέτως, η έκθεση σε 0.5 mM H₂O₂ για 6 ώρες είχε λιγότερο έντονες συνέπειες στο μεταβολισμό του *T. chuii* (Εικόνα 28, Πίνακας 17). Όσον αφορά τα αμινοξέα, η ασπαραγίνη συσσωρεύτηκε 2.57 φορές, η αλανίνη 3.44 φορές, η λυσίνη 1.76 φορές ενώ η περιεκτικότητα σε κιτροουλίνη μειώθηκε κατά 0.68 φορές. Η περιεκτικότητα επτά οργανικών οξέων επηρεάστηκε σε σημαντικό βαθμό, ανάμεσα στα οποία το κιτρικό οξύ εμφάνισε τη μεγαλύτερη συσσώρευση, κατά 11.72 φορές, ενώ το οξαλικό οξύ ήταν το μόνο με μειωμένο περιεχόμενο, κατά 0.19 φορές. Επίσης, η περιεκτικότητα σε γλυκόζη εμφάνισε αύξηση 14.15 φορές και η μαννιτόλη κατά 1.51 φορές. Επιπλέον, τέσσερις από τους μεταβολίτες που περιέχουν άζωτο εμφάνισαν συσσώρευση, συγκεκριμένα η αδερίνη κατά 2.55 φορές, η μεθυλαλανίνη 4.04 φορές, η πουτρεσκίνη 1.59 φορές και η σπερμιδίνη 3.16 φορές. Η περιεκτικότητα των κυττάρων σε ουρία μειώθηκε κατά 0.05 φορές. Τέλος, η συνολική περιεκτικότητα σε οργανικά οξέα ήταν υψηλότερη μετά την έκθεση σε H₂O₂. Συγκεκριμένα, η έκθεση για 1 ώρα οδήγησε στο υψηλότερο περιεχόμενο, το οποίο μειώθηκε τις επόμενες ώρες, παραμένοντας όμως σε υψηλότερα επίπεδα από τις καλλιέργειες ελέγχου (Παράρτημα 2).

Πίνακας 17 Συγκριτικοί λόγοι των επιπέδων ταυτοποιημένων μεταβολιτών που εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ 6h και 0h. Για κάθε χειρισμό, οι λόγοι υπολογίστηκαν από τον μέσο όρο των 3 βιολογικών και 2 τεχνικών επαναλήψεων ($n=6$).

	RT	m/z	Ratio 6h/C	P
Amino acids				
citrulline	26.48755	157	0.68	0.03
L-asparagine	23.2636	231	2.57	0.00
Beta- alanine	17.3783	248	3.44	0.00
L-lysine	28.457	317	1.76	0.00
Organic acids				
tartaric acid	25.626	147	2.29	0.00
D-malic acid	19.0292	147	4.72	0.01
citric acid	26.58325	347	11.72	0.00
maleamic acid	19.57335	244	1.87	0.00
oxalic acid	6.7197	147	0.19	0.02
aspartic acid	19.7722	232	2.28	0.05
L-glutamic acid	22.07675	246	2.82	0.00
Sugars				
D-glucose	28.3958	319	14.15	0.00
Nitrogen-containing				
adenine	27.2088	264	2.55	0.00
urea	12.4749	147	0.05	0.00
N-methylalanine	10.9415	130	4.04	0.02
putrescine	24.57765	174	1.59	0.00
spermidine	34.5784	174	3.16	0.01
Polyols				
D-mannitol	29.1167	319	1.51	0.00

3.1.4 Συγκριτική λιπιδομική απόκριση του *T. chuii* στην επαγόμενη από H₂O₂ οξειδωτική καταπόνηση

Τα λιπαρά οξέα του μικροφύκου *T. chuii*, τόσο σε συνθήκες ελέγχου όσο και μετά από έκθεση σε οξειδωτική καταπόνηση για 1 και 6 ώρες, απομονώθηκαν και μετατράπηκαν σε FAMES. Στον Πίνακα 18 παρουσιάζεται η σύνθεση των προφίλ λιπαρών που προέκυψαν καθώς και το ποσοστό των ακόρεστων (SFA), μονοακόρεστων (MUFA) και πολυακόρεστων (PUFA) λιπαρών οξέων.

Πίνακας 18 Προφίλ λιπαρών του <i>T. chuii</i> για κάθε χειρισμό.						
<i>T. chuii</i>	0h		1h		6h	
	AVG %	SE	AVG %	SE	AVG %	SE
C14:0	1,84	0,06	1,19 ^a	0,01	2,37 ^b	0,45
C14:1	2,41 ^a	0,25	1,79 ^b	0,00	1,77 ^b	0,25
C16:0	15,78	1,14	15,48	0,56	14,34	0,51
16:1n9	11,88 ^a	1,11	9,12 ^b	0,58	7,69 ^b	0,81
16:1n7	2,87 ^a	1,21	0,40 ^b	0,10	0,46 ^b	0,07
16:2n4	1,18	0,02	1,40 ^a	0,04	0,94 ^b	0,19
16:4n3	10,16	1,95	12,95	0,17	9,85	1,46
18:1n9	15,69 ^a	0,11	12,54 ^b	0,49	7,68 ^c	1,30
18:1n7	7,10 ^a	0,01	2,35 ^b	0,22	14,00 ^c	0,39
18:2n6	2,61 ^a	0,17	1,63 ^b	0,22	1,33 ^b	0,12
18:3n3	12,54	0,60	14,02	0,61	9,69	2,22
18:4n3	4,27 ^a	0,38	8,67 ^b	0,03	9,20 ^b	0,39
20:1n11	2,99 ^a	0,17	7,66 ^b	1,81	n.d.	
20:1n9	3,47 ^a	0,08	1,49 ^b	0,09	n.d.	
20:5n3	5,73 ^a	0,38	3,16 ^a	0,16	17,36 ^b	4,10
SFA	17,62		16,67		16,71	
MUFA	46,41 ^a		35,36 ^b		31,60 ^c	
PUFA	36,48 ^a		41,82 ^b		48,37 ^c	

Όλα τα λιπαρά οξέα που ταυτοποιήθηκαν βρίσκονται μέσα στο εύρος των C14-C24, με κυρίαρχα τα C16:0, C16:1n9, C16:4n3, C18:1n9, C18:1n7 και C18:3n3 που αποτελούν περίπου το 70% του συνολικού περιεχομένου των κυττάρων σε FAMES. Άλλα λιπαρά οξέα που ταυτοποιήθηκαν είναι τα C14:0, C14:1, C16:1n7, C16:2n4, C18:2n6, C18:4n3, C20:1n11, C20:1n9 και C20:5n3. Το περιεχόμενο των C16:0, C16:4n3 και C18:3n3 παρέμεινε σταθερό παρά την οξειδωτική καταπόνηση στην οποία εκτέθηκαν οι καλλιέργειες. Τα C14:1, C16:1n9, C16:1n7 και C18:2n6 μειώθηκαν παρουσία οξειδωτικής καταπόνησης ανεξάρτητα από τη χρονική διάρκεια της ενώ τα C18:1n9 και C20:1n9 εμφάνισαν μειούμενο περιεχόμενο όσο αυξανόταν η χρονική διάρκεια της καταπόνησης. Το περιεχόμενο των C14:0, C18:1n7 και C20:5n3 μειώθηκε την πρώτη ώρα έκθεσης σε H₂O₂ ενώ στις 6 ώρες εμφάνισε αύξηση. Η αντίστροφη μεταβολή παρατηρήθηκε για τα C16:2n4 και C20:1n11. Το λιπαρό οξύ C18:4n3 αύξησε το περιεχόμενο του την πρώτη ώρα της καταπόνησης και στη συνέχεια παρέμεινε σταθερό στο ίδιο επίπεδο. Επίσης, τα ποσοστά των SFA στα κύτταρα δεν μεταβλήθηκαν από την παρουσία καταπόνησης. Τα ποσοστά των MUFA

μειώνονταν όσο αυξανόταν η χρονική διάρκεια της καταπόνησης ενώ τα PUFA αυξάνονταν παρουσία της καταπόνησης και με την πάροδο του χρόνου.

3.2 Συζήτηση

Τα μικροφύκη εκτίθενται διαρκώς σε αβιοτικές καταπονήσεις ως συνέπεια του συνεχώς μεταβαλλόμενου οικοτόπου τους (Odjadjare et al., 2017). Προκειμένου να εξασφαλίσουν την επιβίωση τους έχουν αναπτύξει ένα πλήθος προσαρμογών, μοναδικό για κάθε είδος, χάρη στα ιδιαίτερα μορφολογικά, φυσιολογικά και γονιδιωματικά χαρακτηριστικά τους (Barone et al., 2021a). Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε, μεταξύ άλλων, η επίδραση της επαγόμενης από H₂O₂ οξειδωτικής καταπόνησης στο μικροφύκος *T. chuii*, παρέχοντας νέες πληροφορίες σχετικά με τους μοριακούς και βιοχημικούς μηχανισμούς προσαρμογής του σε αυτή.

3.2.1 Τροποποιήσεις στην κυτταρική φυσιολογία υποδεικνύουν το μεταβολικό επαναπρογραμματισμό του *T. chuii* κατά την οξειδωτική καταπόνηση

Όπως έγινε αντιληπτό από τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων, όλες οι συγκεντρώσεις H₂O₂ που χρησιμοποιήθηκαν οδήγησαν σε επαγωγή οξειδωτικής καταπόνησης στις καλλιέργειες του μικροφύκου *T. chuii*, μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα (Εικόνα 23). Η προσθήκη 0.5 mM H₂O₂ επηρέασε σε μεγάλο βαθμό τη βιωσιμότητα των κυττάρων, ενεργοποιώντας ταυτόχρονα έναν αντιοξειδωτικό μηχανισμό ανοχής της καταπόνησης. Η εφαρμογή υψηλότερων συγκεντρώσεων οδήγησε στην άμεση και δραματική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων και τελικά στην κατάρρευση των καλλιεργειών. Παρόμοια, άμεση απόκριση στο H₂O₂ παρατηρήθηκε και στο μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*, για το οποίο όμως απαιτούταν υψηλότερη συγκέντρωση H₂O₂, έως και 2 mM, προκειμένου να προκληθεί μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων (Koletti et al., 2022a). Η παρατήρηση αυτή υπογραμμίζει τις διαφορές που εμφανίζονται μεταξύ των ειδών μικροφυκών, με το *T. chuii* να παρουσιάζει συγκριτικά μεγαλύτερη ευαισθησία στην οξειδωτική καταπόνηση.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την έκθεση του *T. chuii* σε οξειδωτική καταπόνηση επιβεβαίωσαν τις παρατηρήσεις προηγούμενων μελετών, σύμφωνα με τις οποίες τα πράσινα μικροφύκη μειώνουν άμεσα τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης και επαναπρογραμματίζουν το μεταβολισμό τους ούτως ώστε να εμφανίσουν ανοχή στις αυξημένες συγκεντρώσεις ROS (S. Chen et al., 2020). Συγκεκριμένα, η έκθεση σε 0.5 mM H₂O₂ έδειξε ότι η απόκριση του μικροφύκου στην καταπόνηση εμφανίζεται εντός της πρώτης ώρας ενώ μετά από παρατεταμένη έκθεση λαμβάνει χώρα η μεταβολική προσαρμογή, με την φωτοσυνθετική ικανότητα του PSII να συνεχίζει να μειώνεται. Αυτή είναι μια παρατήρηση που προκύπτει ξεκάθαρα από την ανάλυση RNAseq, στην οποία προέκυψαν περισσότερα DEGs για τη σύγκριση 1h/0h σε σχέση με τη σύγκριση 6h/0h, υποδηλώνοντας ότι οι πιο έντονες αλλαγές στο μεταγράφομα εμφανίστηκαν μέσα στην πρώτη ώρα της καταπόνησης (Εικόνα 26). Μάλιστα το μεταγραφομικό προφίλ των καλλιεργειών μετά από έκθεση για 1 ώρα διαφοροποιήθηκε σημαντικά, ενώ το αντίστοιχο των 6 ωρών ήταν αισθητά πιο παρεμφερές με αυτό των καλλιεργειών ελέγχου (Εικόνα 27). Αυτό θα μπορούσε να υποδηλώνει την σχεδόν άμεση ενεργοποίηση του μεταβολικού επαναπρογραμματισμού των μικροφυκών, προκειμένου να ανταπεξέλθουν στην οξειδωτική καταπόνηση που προκαλείται από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Παρόμοια εικόνα έδωσε και η μεταβολομική ανάλυση, σύμφωνα με την οποία η μέγιστη τροποποίηση στο μεταβολικό προφίλ πραγματοποιήθηκε αμέσως μετά την προσθήκη H₂O₂ (Εικόνα 30). Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με προηγούμενη εργασία στο *C. reinhardtii*, στην οποία οι καλλιέργειες του μικροφύκου αποσυνθέτουν το H₂O₂ ταχέως, εντός 4 ωρών, και οι μεταγραφομικές αποκρίσεις στην καταπόνηση εμφανίζονται ήδη από την πρώτη ώρα έκθεσης στον αβιοτικό παράγοντα (Blaby et al., 2015).

3.2.2 Το *T. chuii* περιορίζει την καθήλωση του άνθρακα σαν απόκριση στη βραχυπρόθεσμη οξειδωτική καταπόνηση

Η επαγωγή βραχυπρόθεσμης οξειδωτικής καταπόνησης σε καλλιέργειες του μικροφύκου *T. chuii* επηρέασε σημαντικά πολλές κυτταρικές διεργασίες. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες συνοδούς στο ενδοπλασματικό δίκτυο

αυξήθηκαν, όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες (Ma et al., 2020). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αύξηση του αριθμού των μεταγράφων των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (heat shock proteins, HSPs), οι οποίες είναι μοριακές συνοδοί που συμμετέχουν στις αποκρίσεις σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα και έχουν περιγραφεί αναλυτικά στη βιβλιογραφία σε διάφορους οργανισμούς και στα κύτταρα μικροφυκών (Åkerfelt et al., 2010; Lee et al., 2014). Παρομοίως, έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση αρκετών HSPs σε καλλιέργειες *C. reinhardtii* που εκτέθηκαν σε 2 mM H₂O₂ για 1 ώρα (Koletti et al., 2022). Επίσης, αυξημένα επίπεδα έκφρασης παρουσίασαν αρκετά θερμο-επαγόμενα γονίδια που περιέχουν την περιοχή DNAJ, συμπεριλαμβανομένων των *DNAJA2* και *DNAJC10*. Τα γονίδια αυτά ανήκουν στις τέσσερις οικογένειες των εξελικτικά συντηρημένων μεταξύ όλων των βασιλείων πρωτεϊνών, που είναι ευαίσθητες στο H₂O₂ (Vandenbroucke et al., 2008). Αυξημένη βρέθηκε η έκφραση γονιδίων όπως τα *HSPA1s* και *UBE2D* που εμπλέκονται στη στόχευση πρωτεϊνών για αποικοδόμηση, υποδηλώνοντας μια πιθανή αύξηση στην ανακύκλωση πρωτεϊνών προκειμένου να αντιμετωπιστεί η μειωμένη διαθεσιμότητα σε αμινοξέα (Ma et al., 2020). Μετά από έκθεση σε H₂O₂ για 1 ώρα, γονίδια που σχετίζονται με τη λειτουργία των υπεροξεισωμάτων, όπως το *MPV17*, αύξησαν σε μεγάλο βαθμό τα επίπεδα έκφρασης τους, απεικονίζοντας την ενεργοποίηση του κυτταρικού μηχανισμού αποτοξίνωσης από τις ROS (Kao et al., 2018).

Είναι ενδιαφέρον ότι η οξειδωτική καταπόνηση για 1 ώρα, παράλληλα με την παρατηρούμενη αύξηση στη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την αποικοδόμηση πρωτεϊνών, οδήγησε και σε μείωση των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για τις υπομονάδες του ριβοσώματος, συμπεριλαμβανομένων των *RP-L3* και *RP-L6*. Επιπλέον, μεγάλη μείωση εμφάνισαν 22 μετάγραφα που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση βασικών αμινοξέων, συμπεριλαμβανομένων των *tyrB*, *hisA* και *dapA*. Αντιθέτως, από τη συνολική μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση προέκυψε ότι η περιεκτικότητα σε πολλά αμινοξέα, όπως η τυροσίνη, η μεθειονίνη, η ασπαραγίνη και η λυσίνη, αυξήθηκε σημαντικά μετά από έκθεση σε H₂O₂. Συγκεκριμένα για τη μεθειονίνη, η αυξημένη περιεκτικότητά της θα μπορούσε να οφείλεται στον προστατευτικό για τις πρωτεΐνες ρόλο της, παρουσία οξειδωτικής καταπόνησης (S. Luo & Levine, 2009). Συνολικά, τα αποτελέσματά της παρούσας διατριβής υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η αποικοδόμηση πρωτεϊνών και η μείωση της πρωτεϊνοσύνθεσης, οδηγούν σε συσσώρευση

αμινοξέων και θα μπορούσαν να αποτελούν μια πρώτη γραμμή άμυνας κατά της οξειδωτικής καταπόνησης, επιτρέποντας στα κύτταρα των μικροφυκών να τροφοδοτούν τη γλυκονογένεση (Blaby et al., 2015). Αποδεικτικά στοιχεία για την πρωτεϊνική αποικοδόμηση παρέχονται επίσης από την παρατηρούμενη συσσώρευση διαφόρων αζωτούχων ενώσεων, όπως η μιμοσίνη, η οποία ανιχνεύτηκε μόνο παρουσία καταπόνησης και έχει αποδειχθεί ότι δρα ως αντιοξειδωτικό σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης στο φυτό *Leucaena leucoccephala* (Honda & Borthakur, 2021). Αντίστοιχα, είναι επίσης γνωστό ότι η συσσώρευση αδενίνης επάγει την ανοχή στην καταπόνηση (Sukrong et al., 2012). Η αυξημένη περιεκτικότητα σε κιτροουλίνη και ορνιθίνη συμφωνεί με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών, με την πρώτη να αποτελεί δείκτη ανοχής σε αρκετές αβιοτικές καταπονήσεις στο *Cucumis melo*, ενώ η τελευταία έχει αποδειχθεί ότι συσσωρεύεται στην *Chlorella vulgaris* κατά τη διάρκεια επαγόμενης από κάδμιο καταπόνησης (Kusvuran et al., 2013). Τέλος, η πουτρεσκίνη είναι μια από τις πολυαμίνες που συναντώνται στα μικροφύκη και είναι γνωστό ότι συμμετέχει σε αρκετούς μοριακούς μηχανισμούς που χρησιμοποιεί το κύτταρο προκειμένου να μετριάσει τις δυσμενείς επιπτώσεις από το περιβάλλον (B. Xu et al., 2021).

Συνολικά, η οξειδωτική καταπόνηση που προκαλείται από H_2O_2 είχε ισχυρή επίδραση στο μεταβολισμό του άνθρακα και τη ροή ενέργειας στο *T. chuii*. Ανάμεσα στις πιο έντονες βιοχημικές προσαρμογές μετά από 1 ώρα έκθεσης στο H_2O_2 , ήταν η έντονη μείωση της έκφρασης του γονιδίου *PK*, που κωδικοποιεί για το βασικό γλυκολυτικό ένζυμο πυροσταφυλική κινάση. Παρόμοια παρατήρηση έχει γίνει στο Χλωρόφυτο *Ulva compressa*, στο οποίο η έκφραση της πυροσταφυλικής κινάσης ανεστάλη ως συνέπεια της οξειδωτικής καταπόνησης που προκαλείται από χαλκό (Laporte et al., 2020). Η άμεση μείωση στην παραγωγή ενέργειας μέσω της γλυκόλυσης ως συνέπεια της έκθεσης στο H_2O_2 επιδεινώνεται από τη μείωση των μεταγραφών *ENO*, γονιδίου που κωδικοποιεί για την προπυρουβική κινάση ενολάση, και άλλων γονιδίων που συμμετέχουν στη μεταβολική οδό της γλυκόλυσης. Γενικά, η γλυκόζη μπορεί να λειτουργήσει ως σημαντικός αντιοξειδωτικός μεταβολίτης λόγω της συμμετοχής της στην παραγωγή NADPH (Cherkas et al., 2020). Στα φυτά κατέχει επίσης κεντρικό ρόλο στη σηματοδότηση της καταπόνησης και στον εγκλιματισμό σε αυτή. Η αυξημένη περιεκτικότητα σε γλυκόζη ενισχύει την ανοχή στην αβιοτική καταπόνηση που σχετίζεται με τις ROS, όπως έχει

παρατηρηθεί σε φυτά που εκτίθενται σε υψηλή αλατότητα (Sanchez et al., 2007; Skliros et al., 2018). Συνεπώς, η συσσώρευση γλυκόζης έχει πολύπλευρο ρόλο σε φωτοσυνθετικούς οργανισμούς που αντιμετωπίζουν αβιοτικές καταπονήσεις που οδηγούν σε μείωση της καθήλωσης του άνθρακα, όπως απεικονίζεται από τη μείωση της έκφρασης του *rpiA* που κωδικοποιεί την ισομεράση Α της 5-φωσφορικής ριβόζης (ribose 5-phosphate isomerase A) στην παρούσα μελέτη. Επίσης, λόγω της οξειδωτικής καταπόνησης παρατηρήθηκε η επαγωγή του μεταβολισμού του αμύλου, μια απόκριση που έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία για αρκετά μικροφύκη (T. Li et al., 2015). Η έκθεση σε H₂O₂ για 1 ώρα οδήγησε ακόμα στη μείωση της έκφρασης πολλών γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες του συμπλέγματος συγκομιδής φωτός και στη μείωση του αριθμού των μεταγράφων για τα *PsbM*, *PsbW* και *PsaO* των PSI και PSII, παράλληλα με τη μείωση της μέγιστης κβαντικής απόδοσης του PSII. Οι παρατηρήσεις αυτές έρχονται σε συμφωνία με τον περιορισμένο ρυθμό φωτοσύνθεσης που έχει παρατηρηθεί στο *C. reinhardtii* ως αποτέλεσμα αβιοτικών καταπονήσεων (Koletti et al., 2022a; Pillai et al., 2014a) και υποστηρίζουν μια πιθανή στροφή προς την ενδοκυτταρική γλυκονεογένεση ως πηγή ενέργειας, χρησιμοποιώντας πιθανώς την περίσσεια ελεύθερων αμινοξέων που προκύπτει από την πρωτεϊνική αποικοδόμηση. Το γονίδιο *GOLS*, που συμμετέχει στο μεταβολισμό της γαλακτόζης, εμφάνισε αύξηση στην έκφραση, ένα εύρημα που συμφωνεί με τη μεγάλη αύξηση αυτού του μονοπατιού στο μικροφύκος *Chlorella vulgaris* ως απόκριση στην καταπόνηση με ελεύθερη αμμωνία (Dai et al., 2023). Επίσης, η παρατηρούμενη επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων που σχετίζονται με την ενδοκυττάρωση είναι μια κοινή απόκριση των πράσινων μικροφυκών στη βραχυπρόθεσμη αβιοτική καταπόνηση (Barten et al., 2022).

3.2.3 Στο *T. chuii* αυξάνεται η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τη φωτοσύνθεση μετά από μακροχρόνια έκθεση σε οξειδωτική καταπόνηση

Η παρατεταμένη έκθεση των καλλιεργειών *T. chuii* στην αβιοτική καταπόνηση οδηγεί στην επαγωγή διακριτών μακροπρόθεσμων μηχανισμών μοριακής προσαρμογής. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PetC* που σχετίζεται με το PSII αυξήθηκαν σημαντικά, αν και οι μετρήσεις της αποτελεσματικότητας του PSII συνέχισαν να μειώνονται. Ταυτόχρονα, ο αριθμός των

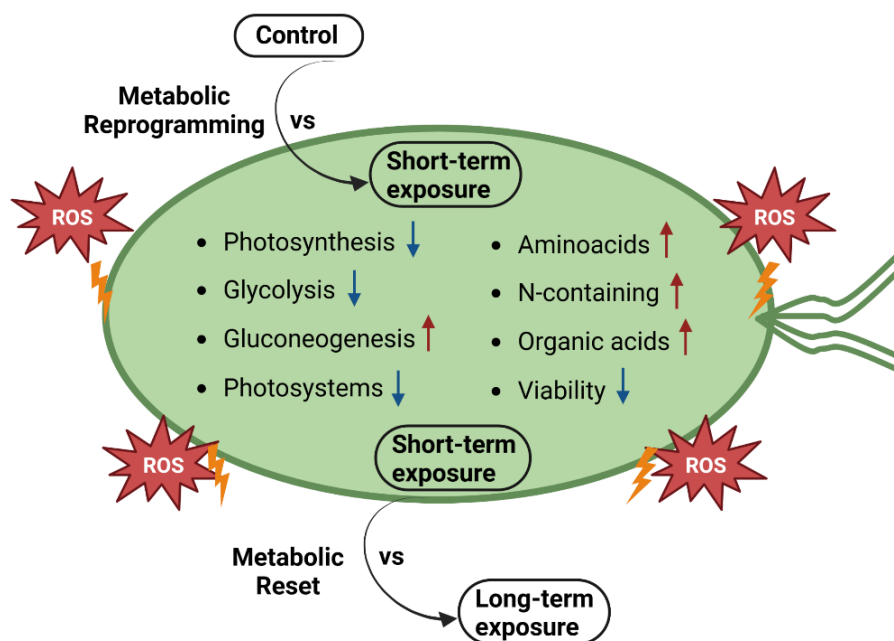
μεταγράφων του γονιδίου *PetJ* που σχετίζεται με το PSI αυξήθηκε επίσης σημαντικά, ενώ μετάγραφα που σχετίζονται με τη φωτοαναπνοή μειώθηκαν. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, είναι πιθανό τόσο σε μοριακό όσο και σε μεταβολικό επίπεδο, τα κύτταρα προσπαθούν να επαναφέρουν τη φωτοσυνθετική τους ικανότητα και στη συνέχεια την καθήλωση του άνθρακα, αλλά πιθανώς η παρατηρούμενη επίδραση των ROS στη σύνθεση πρωτεϊνών να δυσκολεύει την αποκατάσταση της φωτοσυνθετικής ομοιόστασης (Khorobrykh et al., 2020). Ακόμα, καθώς χλωροπλάστες και μιτοχόνδρια εμφανίζουν μια σύγκλιση των σημάτων H_2O_2 (Dourmap et al., 2020), διάφορα γονίδια που σχετίζονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση αύξησαν και αυτά την έκφραση τους. Μια άλλη προσαρμογή του *T. chuii* στην αβιοτική καταπόνηση, μετά από 6 ώρες έκθεσης σε H_2O_2 , ήταν η προσπάθεια επανέναρξης της καθήλωσης του άνθρακα, οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης του *GAPDH* που συμμετέχει στη γλυκόλυση. Ωστόσο, αυτή η πρόοδος παρεμποδίστηκε από τη μειωμένη έκφραση των *PK* και *pgm*. Είναι ενδιαφέρον ότι, ενώ η έκφραση του *fumA* που κωδικοποιεί τη φουμαράση Α μειώθηκε, η περιεκτικότητα σε ηλεκτρικό, μηλικό και κιτρικό οξύ, που όλα συμμετέχουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος, αυξήθηκε σημαντικά σε σύγκριση με τις καλλιέργειες ελέγχου. Γενικά, είναι πιθανό μετά από 6 ώρες έκθεσης σε οξειδωτική καταπόνηση, η ικανότητα γλυκονεογένεσης των μικροφυκών να εξαντλείται και τα κύτταρα να προσπαθούν ενεργά να επαναφέρουν τον ενεργειακό μεταβολισμό τους προς τη φωτοσύνθεση και τη γλυκόλυση για επιβίωση.

Επιπλέον, η επαγωγή μακροχρόνιας οξειδωτικής καταπόνησης στο *T. chuii* επηρέασε σημαντικά τα μετάγραφα που σχετίζονται με τις διεργασίες του ενδοπλασματικού δικτύου, καθώς τα επίπεδα έκφρασης των mRNAs θερμικού σοκ βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα. Σε αντίθεση με τα παρατηρούμενα αποτελέσματα μετά από 1 ώρα έκθεσης σε H_2O_2 , η μακροχρόνια έκθεση σε αυτό οδήγησε σε αυξημένη έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για τις ριβοσωμικές υπομονάδες, υπογραμμίζοντας τις διαφορετικές κυτταρικές αποκρίσεις στην παρατεταμένη καταπόνηση. Η περιεκτικότητα στις αζωτούχες ενώσεις πουτρεσκίνη, αδενίνη και σπερμιδίνη ήταν επίσης υψηλότερη μετά από 6 ώρες έκθεσης σε H_2O_2 , με την τελευταία να θεωρείται πως παρουσιάζει εκτεταμένη προστατευτική δράση έναντι οξειδωτικής βλάβης στο μικροφύκος *Chlorella sp.* (Z. Wang et al., 2020).

Είναι ενδιαφέρον ότι μια κοινή απόκριση προσαρμογής των κυττάρων *T. chuii* τόσο στη μακροπρόθεσμη όσο και στη βραχυπρόθεσμη οξειδωτική καταπόνηση ήταν η σημαντική αύξηση στο περιεχόμενο αζωτούχων ενώσεων. Αυτή είναι μια απόκριση που παρατηρείται συχνά ως συνέπεια της έκθεσης σε περιβαλλοντικές πιέσεις και εμφανίζεται στην προσπάθεια των κυττάρων να απομακρύνουν την περίσσεια ελεύθερης αμμωνίας (Rare, 1990). Επιπλέον, η σημαντική μείωση της ουρίας παρουσία H_2O_2 μπορεί να ερμηνευθεί ως αποτέλεσμα της συσσώρευσης όλων των προαναφερθέντων αζωτούχων ενώσεων, καθώς η ουρία θεωρείται τόσο μια καλή πηγή αζώτου (Witte, 2011) όσο και ένας αποτελεσματικός παράγοντας καθαρισμού των ROS. Γενικά, τα πράσινα μικροφύκη μπορούν να αποικοδομήσουν αποτελεσματικά την ουρία και στη συνέχεια να τη χρησιμοποιήσουν ως πηγή άνθρακα και αζώτου, όπως παρατηρείται στο *C. vulgaris* (Barros et al., 2017). Ωστόσο, αν η περιεκτικότητα του *T. chuii* σε αμινοξέα μετά από έκθεση σε H_2O_2 για 6 ώρες συγκριθεί με την αντίστοιχη για έκθεση 1 ώρας, εμφανίζεται μειωμένη. Αυτό θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της προσπάθειας των κυττάρων να επιστρέψουν σε αυτό το χρονικό σημείο στην κανονική μεταβολική ομοιόσταση. Τα οργανικά οξέα είναι γνωστό ότι αποτελούν την κύρια πηγή άνθρακα κατά τη διάρκεια αβιοτικών καταπονήσεων στα ανώτερα φυτά. Στην παρούσα διατριβή, παρατηρήθηκε μια εξάντληση των οργανικών οξέων από τη 1 έως τις 6 ώρες καταπόνησης, με εξαίρεση το κιτρικό οξύ, το οποίο μπορεί να προσδώσει ανοχή στην αβιοτική καταπόνηση στα μικροφύκη και στα φυτά (C. Li et al., 2013; Tahjib-Ul-Arif et al., 2021). Τέλος, η παρατηρούμενη μείωση του ποσοστού των MUFA και η παράλληλη αύξηση του αντίστοιχου ποσοστού των PUFA παρουσία οξειδωτικής καταπόνησης και με την πάροδο του χρόνου έρχεται σε συμφωνία με ανάλογες αναφορές, σύμφωνα με τις οποίες αβιοτικές καταπονήσεις ευνοούν τη συσσώρευση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Huang & Cheung, 2011; Paliwal et al., 2017). Κάτι τέτοιο είναι απαραίτητο καθώς τα PUFAs αποτελούν το υπόστρωμα για την πραγματοποίηση πλήθους μεταβολικών διεργασιών, ενώ ταυτόχρονα βοηθούν τα κύτταρα να διατηρήσουν τη λειτουργικότητα των μεμβρανών τους (Paliwal et al., 2017).

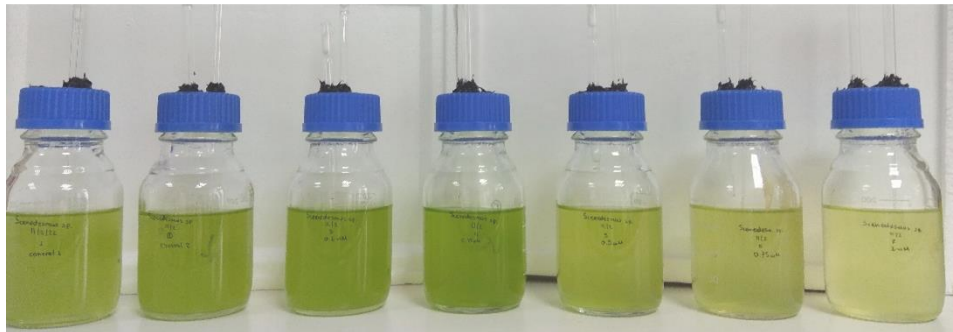
Συνολικά, τα αποτελέσματά δείχνουν ότι η επαγόμενη από 0.5 mM H_2O_2 οξειδωτική καταπόνηση επηρεάζει έντονα τη μοριακή και μεταβολική ομοιόσταση του *T. chuii*, επάγοντας διακριτούς βραχυπρόθεσμους και μακροπρόθεσμους μηχανισμούς προσαρμογής (Εικόνα 31).

Εντός της πρώτης ώρας έκθεσης, το κυτταρικό μεταγράφομα και μεταβόλομα μετατοπίστηκαν προς μια κατάσταση επιβίωσης στην καταπόνηση, ενώ κατά τη διάρκεια μιας μακροχρόνιας έκθεσης τουλάχιστον 6 ωρών παρατηρήθηκε προσπάθεια προσαρμογής των κυττάρων με στόχο τη διατήρηση μακροχρόνιας μεταβολικής ομοιόστασης. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, μια ενδιαφέρουσα υπόθεση είναι ότι ο *T. chuii* έχει αναπτύξει γρήγορη αντίληψη και απόκριση στην οξειδωτική καταπόνηση, οδηγώντας σε ταχύ μεταβολικό επαναπρογραμματισμό, αλλά η μακροχρόνια έκθεση έχει επιζήμια αποτελέσματα στην κυτταρική φυσιολογία και τη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών, απαιτώντας έναν διαφορετικό μεταβολικό επαναπρογραμματισμό. Αυτό θα μπορούσε να αποτελεί μια καλά ενορχηστρωμένη στρατηγική εξελικτικής προσαρμογής των πράσινων μικροφυκών στις βραχυπρόθεσμες οξειδωτικές συνθήκες του ταχέως μεταβαλλόμενου μικροπεριβάλλοντος τους.



Εικόνα 31 Σχηματική αναπαράσταση των κύριων μεταβολικών αλλαγών που λαμβάνουν χώρα μέσα στο κύτταρο κατά τη βραχυπρόθεσμη έκθεση σε οξειδωτική καταπόνηση. Τα κόκκινα βέλη απεικονίζουν την αύξηση της έκφρασης, τη συσσώρευση και την επαγόμενη μεταβολική δραστηριότητα. Τα μπλε βέλη απεικονίζουν τη μείωση της έκφρασης, την εξάντληση και τη μειωμένη μεταβολική δραστηριότητα.

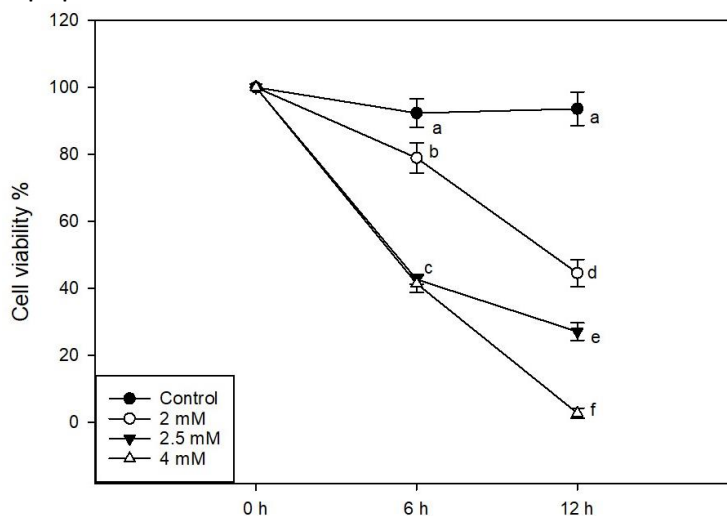
Κεφάλαιο 4ο: Αποκρίσεις του *C. variabilis* στην οξειδωτική καταπόνηση



4.1 Αποτελέσματα

4.1.1 Επίδραση της οξειδωτικής καταπόνησης στη βιωσιμότητα του *C. variabilis*

Το επόμενο στάδιο για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη των συνεπειών της επαγόμενης από H_2O_2 οξειδωτικής καταπόνησης στην ανάπτυξη του μικροφύκου *C. variabilis*. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις H_2O_2 (0 mM, 2 mM, 2.5 mM και 4 mM), σε τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Οι καλλιέργειες ελέγχου εμφάνισαν σταθερά επίπεδα βιωσιμότητας σε όλη τη χρονική διάρκεια της μελέτης. Η έκθεση σε 2.5 mM και 4 mM H_2O_2 για 6 ώρες προκάλεσε άμεση και σημαντική πτώση της βιωσιμότητας των κυττάρων. Παράλληλα, στατιστικά σημαντική ήταν η μείωση της βιωσιμότητας για τις καλλιέργειες που εκτέθηκαν σε 2 mM H_2O_2 για 6 ώρες, παραμένοντας ωστόσο στα επίπεδα του 80% (Εικόνα 32). Μετά από έκθεση σε οξειδωτική καταπόνηση για συνολικά 12 ώρες η κυτταρική βιωσιμότητα εμφάνισε περαιτέρω πτώση. Οι καλλιέργειες που εκτέθηκαν σε 2 mM H_2O_2 εμφάνισαν 45% βιωσιμότητα ενώ για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν προέκυψαν ακόμα χαμηλότερες τιμές (Εικόνα 32). Αξιολογώντας αυτά τα αποτελέσματα, επιλέχθηκε η έκθεση σε 2 mM H_2O_2 με μέγιστη διάρκεια τις 6 ώρες προκειμένου να πραγματοποιηθεί σε βάθος μελέτη της απόκρισης του *C. variabilis* στην οξειδωτική καταπόνηση.



Εικόνα 32 Κυτταρική βιωσιμότητα καλλιεργειών *C. variabilis* που εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις H_2O_2 . Τα αποτελέσματα απεικονίζονται ως μέσος όρος \pm SE των τριών βιολογικών επαναλήψεων ($n=3$). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται με διαφορετικά γράμματα (Tukey's HSD, $P<0.05$).

Ο προσδιορισμός της ικανότητας φωτοσύνθεσης των καλλιεργειών πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της μέγιστης κβαντικής απόδοσης του φωτοσυστήματος II (maximal Photosystem II quantum yield, F_v/F_m). Συγκεκριμένα, μετρήθηκε η απόδοση του κέντρου αντίδρασης του PSII στη μετατροπή της φωτεινής ενέργειας. Πριν την προσθήκη του παράγοντα οξείδωσης (0 ώρες) ο λόγος F_v/F_m είχε τιμή 0.65. Η έκθεση σε 2 mM H_2O_2 για 1 ώρα είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση αυτής της τιμής στο 0.34, ενώ η συνέχιση της έκθεσης για 6 ώρες οδήγησε σε περαιτέρω μείωση στο 0.05 (Πίνακας 19).

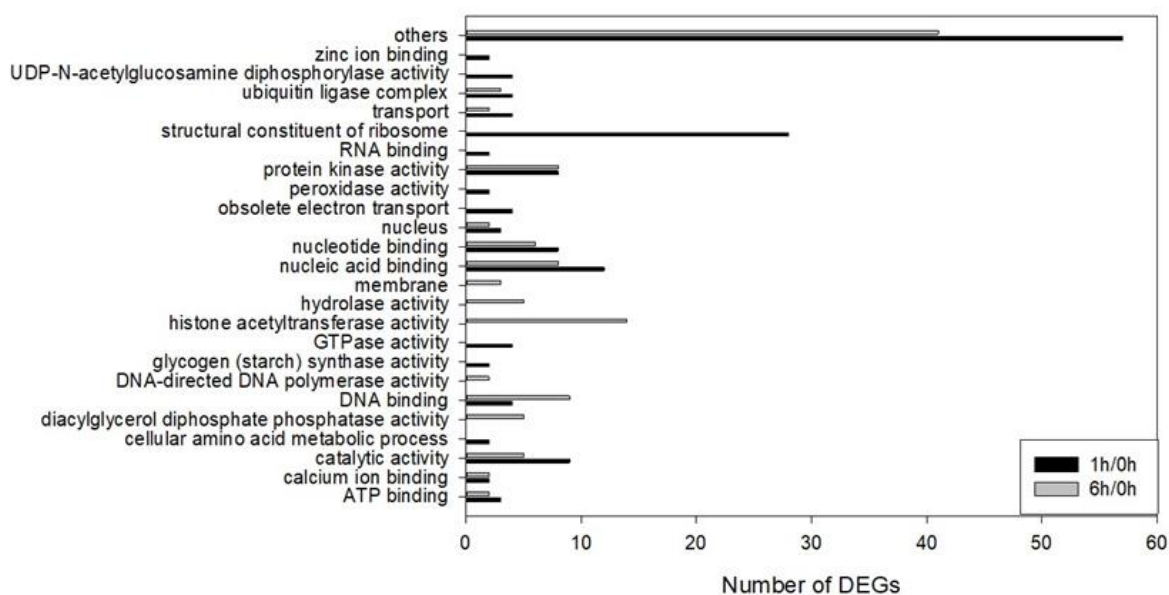
Πίνακας 19 Τιμές F_v/F_m μετά από έκθεση σε 2 mM H_2O_2 για 0h, 1h και 6h. Για κάθε χειρισμό, ο λόγος υπολογίστηκε από το μέσο όρο 2 βιολογικών και 2 τεχνικών επαναλήψεων (n=4). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται με διαφορετικά γράμματα (Tukey's HSD, $P < 0.05$).

	F_v/F_m	SE
0h	0.65 ^a	0.01
1h	0.34 ^b	0.03
6h	0.05 ^c	0.01

4.1.2 Συγκριτική μεταγραφομική απόκριση του *C. variabilis* στην επαγόμενη από H_2O_2 οξειδωτική καταπόνηση

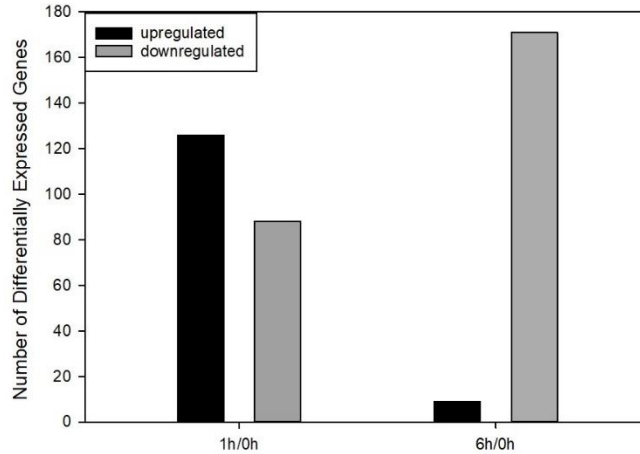
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση του συνολικού μεταγραφώματος του μικροφύκου *C. variabilis*, προκειμένου να μελετηθεί με περισσότερες λεπτομέρειες ο μηχανισμός μοριακής προσαρμογής του στην οξειδωτική καταπόνηση. Για κάθε μία από τις cDNA βιβλιοθήκες που κατασκευάστηκαν δημιουργήθηκαν τουλάχιστον 45 εκατομμύρια καθαρές αλληλουχίες (clean reads) με το 40% από αυτές να χαρτογραφείται επιτυχώς πάνω στο μεταγράφομα αναφοράς, οδηγώντας σε ποσοτικά δεδομένα για περισσότερες από 10.000 μοναδικές CDS (Παράρτημα 3).

Από τη στατιστική ανάλυση προέκυψαν 5.966 DEGs, πολλά από τα οποία έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά μέσω KOs ή/και GOs (Εικόνα 33, Παράρτημα 3).



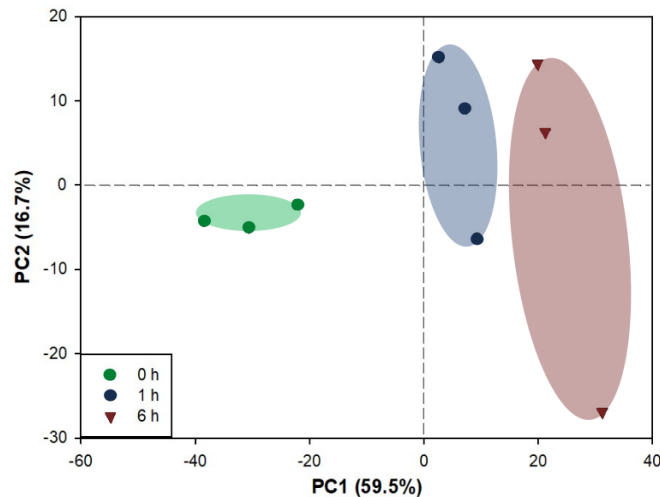
Εικόνα 33 Αριθμός των DEGs με $p < 0.05$ με λειτουργικό χαρακτηρισμό, για κάθε χειρισμό των καλλιεργειών *C. variabilis*.

Συγκρίνοντας τα DEGs των καλλιεργειών που εκτέθηκαν σε 2 mM H_2O_2 για 1 ώρα με τα αντίστοιχα των καλλιεργειών ελέγχου, αποκαλύφθηκαν τροποποιήσεις στο μεταγράφομα των κυττάρων. Συνολικά, εντοπίστηκαν 214 DEGs (differential expression adjusted $P < 0.05$), με τα 126 από αυτά να αυξάνουν τα επίπεδα έκφρασης τους και τα 88 να τα μειώνουν (Εικόνα 34, Παράρτημα 3.1). Από την άλλη, η έκθεση του μικροφύκου στον παράγοντα καταπόνησης για 6 ώρες οδήγησε σε 180 DEGs (differential expression adjusted $P < 0.05$), από τα οποία μόνο 9 παρουσίασαν αύξηση στα επίπεδα έκφρασης, σε σχέση με τις καλλιέργειες ελέγχου, ενώ 171 παρουσίασαν μείωση (Εικόνα 34, Παράρτημα 3.2).



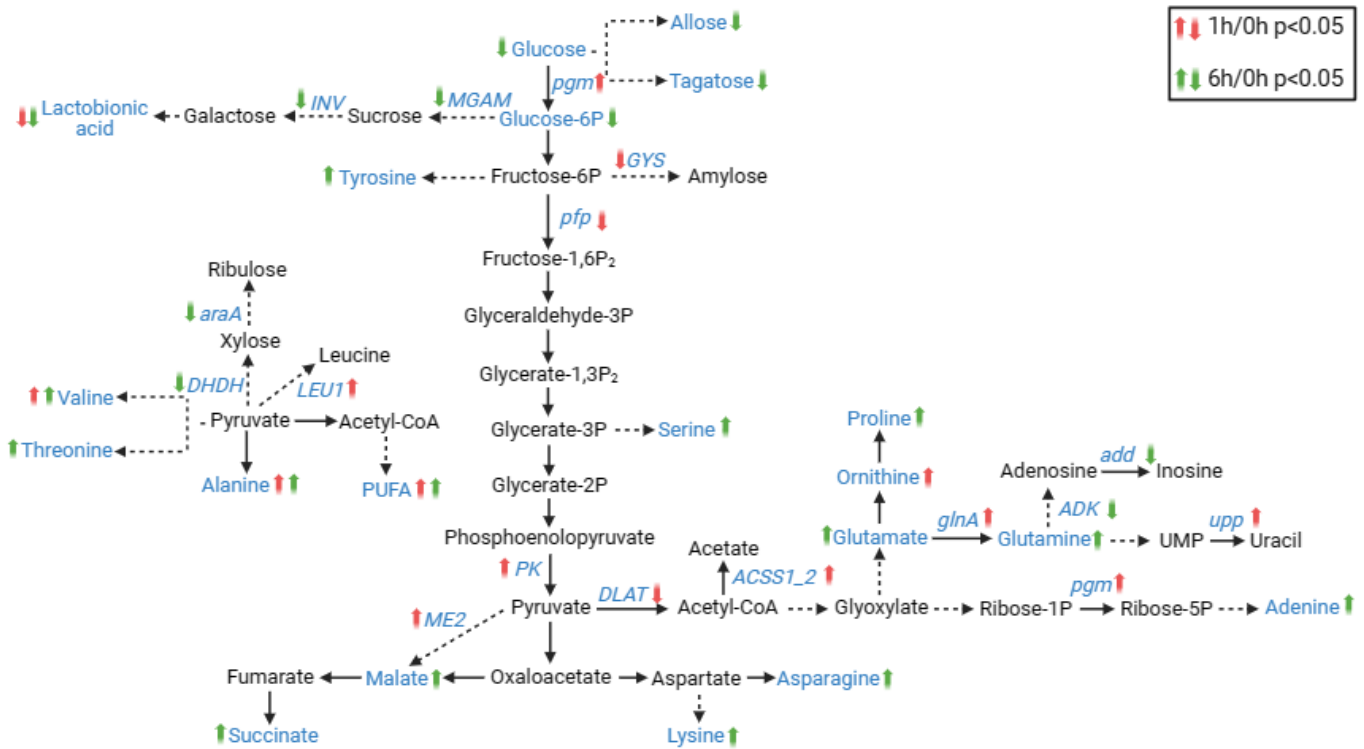
Εικόνα 34 Αριθμός των DEGs ($P < 0.05$) ανάμεσα στους διαφορετικούς χειρισμούς ($n=214$).

Σύμφωνα με την ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) που πραγματοποιήθηκε ακολούθως, υπάρχει στενή ομαδοποίηση των μεταγραφωμάτων για κάθε χειρισμό (Εικόνα 35). Λαμβάνοντας υπόψιν τις συνιστώσες PC1 και PC2, που συνεισφέρουν αθροιστικά το 76.2% της συνολικής μεταβλητότητας, όλες οι επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν για κάθε χειρισμό ομαδοποιήθηκαν, χωρίς να παρεμβάλλονται ή να επικαλύπτονται με άλλους χειρισμούς. Μάλιστα, στον Ευκλείδειο χώρο που ορίζεται από τα PC1 και PC2, τα μεταγραφώματα των καλλιεργειών που εκτέθηκαν στο H_2O_2 για 1 και 6 ώρες βρίσκονται κοντά μεταξύ τους, ενώ το μεταγράφομα των καλλιεργειών ελέγχου βρίσκεται σε μεγαλύτερη απόσταση (Εικόνα 35).



Εικόνα 35 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) των μεταγραφωμάτων μετά την έκθεση σε 2 mM H_2O_2 . Για κάθε χειρισμό οι βιολογικές επαναλήψεις απεικονίζονται ξεχωριστά ($n=3$). Η διακεκομμένη γραμμή χωρίζει το ανώτερο θετικό τεταρτημόριο του PC1.

Συγκρίνοντας πιο αναλυτικά τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων καλλιιεργειών που εκτέθηκαν σε 2 mM H₂O₂ για 1 ώρα και καλλιιεργειών που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες ελέγχου (0 ώρες), προσδιορίστηκαν οι μεταγραφομικές τροποποιήσεις που επάγει η συγκεκριμένη οξειδωτική καταπόνηση στα κύτταρα (Εικόνα 36, Πίνακας 20, Παράρτημα 3.1). Ανάμεσα στα DEGs που εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης, αρκετά κωδικοποιούν για επαγόμενες από καταπονήσεις πρωτεΐνες συνοδούς όπως το *HSP90* που αύξησε την έκφραση του κατά 3.3 φορές, το *BIP* με αύξηση 2.8 φορές, το *FTSH8* 1.9 φορές και το *ATJ1* 1.6 φορές. Ακόμα, αύξηση στα επίπεδα έκφρασης τους παρουσίασαν δομικές πρωτεΐνες τόσο της μικρής όσο και της μεγάλης υπομονάδας του ριβοσώματος, συμπεριλαμβανομένων των *RPL11* (1.4 φορές), *RPL44* (1.2 φορές) και *RPS14* (1.2 φορές). Μια άλλη ομάδα DEGs με αυξημένη έκφραση είναι αυτά που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη δομή του συμπλόκου του πρωτεασώματος, με το *PBE1*, η έκφραση του οποίου αυξήθηκε κατά 1.2 φορές, να αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα. Επίσης από την έκθεση σε υπεροξειδίο αυξήθηκαν κατά 1.1 φορές τα επίπεδα έκφρασης της πυροσταφυλικής κινάσης *PK* που έχει κομβικό ρόλο στη γλυκόλυση, ενώ η φωσφογλουκομουτάση *rgm* που συμμετέχει επίσης στη γλυκόλυση καταλύοντας τη μετατροπή της γλυκόζης-1P σε γλυκόζη-6P, αύξησε και αυτή τα επίπεδα έκφρασης της κατά 1.9 φορές. Αντιθέτως, ο συγκεκριμένος χειρισμός οδήγησε στη μείωση των επιπέδων έκφρασης της συνθάσης γλυκογόνου *GYS* κατά 0.8 φορές, καθώς και της φωσφοφρουκτοκινάσης *PFP* κατά 2.3 φορές. Μείωση στην έκφραση τους παρουσίασαν και αρκετές ακόμα κινάσες όπως η mitogen-activated protein kinase *MAPKKK18* (2.2 φορές), *AT1G18390* και *AT1G13640* (1.6 φορές) και *CKL13* (2.2 φορές). Μεγάλη μείωση, κατά 5.9 φορές, παρουσίασε και το *AT3G05000* που συμμετέχει στη μεταφορά πρωτεϊνών.



Εικόνα 36 Συνολική επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων H_2O_2 στο μεταγράφομα και το μεταβόλομα του *C. variabilis*. Απεικόνιση των μεταβολικών μονοπατιών που περιλαμβάνουν γονίδια (n=3 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις, $P<0.05$) ή μεταβολίτες (n=6, τρεις ανεξάρτητες βιολογικές και δύο τεχνικές επαναλήψεις στην κάθε μία, $P<0.05$) που επηρεάζονται σημαντικά. Τα γονίδια και οι μεταβολίτες που προσδιορίστηκαν σε αυτή τη μελέτη εμφανίζονται με μπλε χρώμα, ενώ οι μεταβολίτες σε μαύρο χρώμα όχι. Τα βέλη δίπλα σε γονίδια ή μεταβολίτες αντιπροσωπεύουν στατιστικά σημαντική ανοδική ρύθμιση/συσσώρευση και μείωση/εξάντληση. Τα κόκκινα βέλη υποδεικνύουν τα σχετικά επίπεδα των μεταγράφων ή των μεταβολιτών του *C. variabilis* όταν αναπτύχθηκε παρουσία 2 mM H_2O_2 για 1 ώρα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα των καλλιεργειών ελέγχου (1h/0h). Τα πράσινα βέλη υποδεικνύουν τα σχετικά επίπεδα των μεταγράφων ή των μεταβολιτών του *C. variabilis* όταν αυτό αναπτύχθηκε παρουσία 2 mM H_2O_2 για 6 ώρες, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα των καλλιεργειών ελέγχου (6h/0h).

Πίνακας 20 Συγκριτικά επίπεδα έκφρασης (log2-normalized fold changes) καλά χαρακτηρισμένων γονιδίων μεταξύ 1 ώρας και 0 ωρών ($p < 0.05$). Για κάθε χειρισμό, οι λόγοι υπολογίστηκαν από τον μέσο όρο των 3 βιολογικών επαναλήψεων ($n=3$).

ID	Όνομα γονιδίου	Λειτουργία	DE Log2 Ratio	DE Log2 SE
XP_005843734	<i>HSP90</i>	Molecular chaperone (HSP90 family)	3,3	0,3
XP_005851986	<i>AOR</i>	Zn ²⁺ -binding dehydrogenase (nuclear receptor binding factor-1)	3,2	0,4
XP_005843286	<i>UPM1</i>	Uroporphyrin III methyltransferase	3,0	0,4
XP_005848047	<i>BIP3</i>	Molecular chaperones mortalin/PBP74/GRP75, HSP70 superfamily	2,8	0,2
XP_005848149	<i>ADH1</i>	Alcohol dehydrogenase, class V	2,4	0,4
XP_005847819	<i>SR45a</i>	K-homology type RNA binding proteins	2,3	0,3
XP_005847525	<i>HDA08</i>	Histone deacetylase complex, catalytic component RPD3	2,3	0,3
XP_005844133	<i>MSH6</i>	Mismatch repair ATPase MSH6 (MutS family)	2,0	0,2
XP_005845499	<i>FTSH8</i>	Chaperone HSP104 and related ATP-dependent Clp proteases	1,9	0,3
XP_005846426	<i>PGM</i>	Phosphoglucomutase	1,9	0,2
XP_005845011	<i>AT1G72550</i>	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta subunit	1,8	0,3
XP_005845244	<i>HRS1</i>	Histidyl-tRNA synthetase	1,7	0,2
XP_005843907	<i>ATJ1</i>	Molecular chaperone (DnaJ superfamily)	1,6	0,2
XP_005851580	<i>MSD1</i>	Manganese superoxide dismutase	1,5	0,1
XP_005845354	<i>ACSS1_2</i>	Acyl-CoA synthetase	1,4	0,3
XP_005847315	<i>RPL11</i>	60S ribosomal protein L11	1,4	0,2
XP_005845371	<i>GAD2</i>	Glutamate decarboxylase and related proteins	1,3	0,2
XP_005852165	<i>AT1G02890</i>	Cation transport ATPase	1,3	0,2
XP_005845583	<i>PBE1</i>	20S proteasome, regulatory subunit beta type PSMB4/PRE4	1,2	0,1
XP_005846917	<i>RPL44</i>	60S ribosomal protein L44	1,2	0,2
XP_005843910	<i>UK/UPRT1</i>	Armadillo/beta-Catenin/plakoglobin	1,2	0,2
XP_005846821	<i>RPS14</i>	40S ribosomal protein S14	1,2	0,1
XP_005845420	<i>UBP2</i>	Ubiquitin-specific protease	1,1	0,2
XP_005849112	<i>PK</i>	Pyruvate kinase	1,1	0,2
XP_005845384	<i>ADK1</i>	Possible pfkB family carbohydrate kinase	1,1	0,2
XP_005848785	<i>RANBP1</i>	Ran-binding protein RANBP1 and related RanBD domain proteins	1,1	0,2

XP_005851754	<i>RPL27AB</i>	60s ribosomal protein L15/L27	1,1	0,1
XP_005849249	<i>RPS15</i>	40S ribosomal protein S15	1,1	0,2
XP_005844163	<i>RPL23AA</i>	60s ribosomal protein L23	1,0	0,2
XP_005843554	<i>Hsp60p</i>	Mitochondrial chaperonin, Cpn60/Hsp60p	1,0	0,2
XP_005849019	<i>glnA</i>	Glutamine synthetase	1,0	0,1
XP_005846534	<i>UGP3</i>	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase	1,0	0,1
XP_005847663	<i>ME2</i>	NADP+-dependent malic enzyme	1,0	0,2
XP_005846300	<i>ADK1</i>	Adenylate kinase	1,0	0,2
XP_005850463	<i>III1</i>	3-isopropylmalate dehydratase (aconitase superfamily)	1,0	0,2
XP_005847361	<i>GYS</i>	Glycogen synthase	-0,8	0,2
XP_005851487	<i>LTA3</i>	Dihydrolipoamide acetyltransferase	-0,8	0,2
XP_005846883	<i>CuAO1</i>	Copper amine oxidase	-1,0	0,2
XP_005847309	<i>HAC12</i>	K+-dependent Na+:Ca2+ antiporter	-1,4	0,2
XP_005850970	<i>emb2411</i>	DNA replication licensing factor, MCM5 component	-1,6	0,2
XP_005849414	<i>AT1G18390</i>	Serine/threonine protein kinase	-1,6	0,2
XP_005850733	<i>AT1G13640</i>	Phosphatidylinositol 4-kinase, involved in intracellular trafficking and secretion	-1,6	0,3
XP_005844162	<i>KCS1</i>	CTP synthase (UTP-ammonia lyase)	-1,6	0,2
XP_005850218	<i>CKL13</i>	Casein kinase (serine/threonine/tyrosine protein kinase)	-2,2	0,2
XP_005846540	<i>MAPKKK18</i>	Mitogen-activated protein kinase	-2,2	0,4
XP_005847186	<i>ALG12</i>	O-linked N-acetylglucosamine transferase OGT	-2,2	0,4
XP_005846325	<i>SPL2</i>	Ubiquitin-protein ligase	-2,3	0,4
XP_005846820	<i>HDA1</i>	Histone deacetylase complex, catalytic component HDA1	-2,3	0,2
XP_005850148	<i>PFP</i>	Pyrophosphate-dependent phosphofructo-1-kinase	-2,3	0,4
XP_005846476	<i>AT1G01350</i>	CCCH-type Zn-finger protein	-4,0	0,7
XP_005848562	<i>AT3G05000</i>	Transport protein particle (TRAPP) complex subunit	-5,9	0,6

Η παρατεταμένη έκθεση του *C. variabilis* στην οξειδωτική καταπόνηση για 6 ώρες είχε σαν αποτέλεσμα τη διαφορετική τροποποίηση του κυτταρικού μεταγραφώματος (Εικόνα 36, Πίνακας 21, Παράρτημα 3.2). Στα λιγιστά DEGs που εμφάνισαν αύξηση στην έκφραση τους συναντάται το *APX1* που κωδικοποιεί για ένα από τα βασικά αντιοξειδωτικά ένζυμα του κυττάρου, την ασκορβική υπεροξειδάση. Η έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου αυξήθηκε κατά 4.7 φορές. Επίσης, αύξηση 4.0 φορές παρουσίασε το γονίδιο *HSP90* που κωδικοποιεί την

αντίστοιχη πρωτεΐνη-μοριακή συνοδό. Η μεθυλτρανσφεράση της ουροπορφυρίνης (*UPM3*) παρουσίασε αυξημένη έκφραση κατά 3.8 φορές, ενώ 3.4 φορές περισσότερο από ότι στις συνθήκες ελέγχου εκφράστηκε το γονίδιο *HAD* που κωδικοποιεί για μια αποακετυλάση των ιστονών.

Η έκθεση σε 2 mM H₂O₂ για 6 ώρες επηρέασε αρνητικά ένα σύνολο κυτταρικών λειτουργιών. Πρώτη και κύρια η αντιγραφή του DNA των κυττάρων του *C. variabilis*, αφού αρκετά DEGs που σχετίζονται με τη συγκεκριμένη λειτουργία εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης. Για παράδειγμα, ο παράγοντας αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA (DNA replication licensing factor) *RFC* παρουσίασε μειωμένη έκφραση κατά 10.3 φορές, ενώ το *DDX11* που κωδικοποιεί για μια ελικάση μειώθηκε 10.0 φορές και η DNA πολυμεράση *REV3L* 8.9 φορές. Σημαντικό περιορισμό παρουσίασε και η διαδικασία της μεταγραφής, σαν απόκριση στη συγκεκριμένη καταπόνηση. Μεταγραφικοί παράγοντες όπως οι *NGA3*, *TCF20*, *ATF* και *TFIID* εμφάνισαν μειωμένη έκφραση κατά 10.4, 9.1, 8.1 και 7.7 φορές, αντίστοιχα. Επιπλέον, η RNA πολυμεράση *NRPB10* μειώθηκε κατά 11.1 φορές. Αρνητικά επηρεάστηκε η βιοσύνθεση της αδενίνης, με την απαμινάση *ADA* να μειώνει την έκφραση της 7.5 φορές. Το *MGAM* που συμμετέχει στο μονοπάτι σύνθεσης σακχαρόζης μείωσε τα επίπεδα έκφρασης του κατά 7.5 φορές.

Πίνακας 21 Συγκριτικά επίπεδα έκφρασης (log₂-normalized fold changes) καλά χαρακτηρισμένων γονιδίων μεταξύ 6 και 0 ωρών (p<0.05). Για κάθε χειρισμό, οι λόγοι υπολογίστηκαν από τον μέσο όρο των 3 βιολογικών επαναλήψεων (n=3).

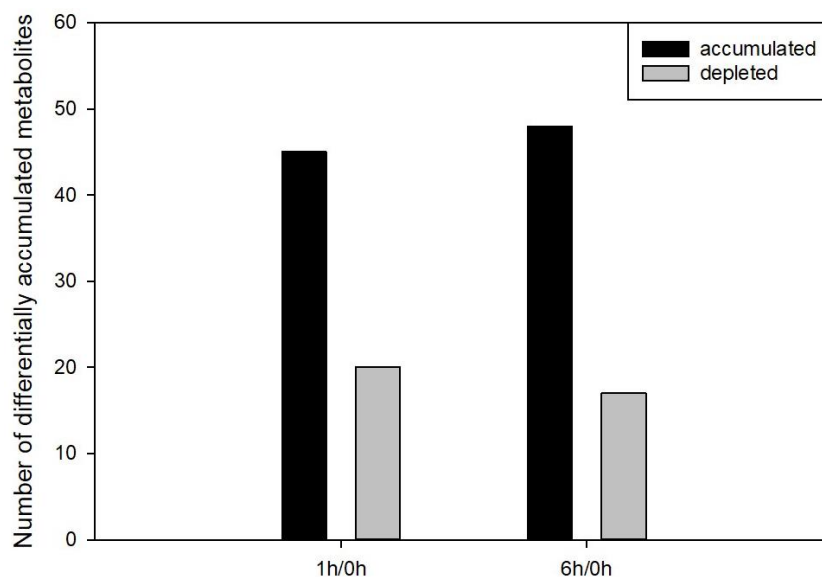
ID	Όνομα γονιδίου	Λειτουργία	DE Log ₂ Ratio	DE Log ₂ SE
XP_005851196	<i>APX1</i>	peroxidase activity	4,7	0,7
XP_005843734	<i>HSP90</i>	Molecular chaperone (HSP90 family)	4,0	0,6
XP_005843286	<i>UPM3</i>	Uroporphyrin III methyltransferase	3,8	0,7
XP_005847525	<i>HAD</i>	Histone deacetylase complex, catalytic component RPD3	3,4	0,6
XP_005846059	<i>PLPP</i>	ATP-dependent DNA helicase	-7,5	1,5
XP_005849064	<i>ADK</i>	Adenine deaminase/adenosine deaminase	-7,5	1,5
XP_005848336	<i>MGAM</i>	Maltase glucoamylase and related hydrolases, glycosyl hydrolase family 31	-7,5	1,5

XP_005850794	<i>ALG12</i>	GPI-alpha-mannosyltransferase III (GPI10/PIG-B) involved in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis	-7,6	1,5
XP_005844933	<i>TFIID</i>	Transcription initiation factor TFIID, subunit BDF1 and related bromodomain proteins	-7,7	1,5
XP_005852166	<i>NCOA</i>	Nuclear receptor coregulator SMRT/SMRTER, contains Myb-like domains	-7,8	1,5
XP_005851444	<i>MTHFD</i>	Phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribonucleotide (ProFAR) isomerase	-8,0	1,5
XP_005848284	<i>DCTD</i>	Deoxycytidylate deaminase	-8,0	1,5
XP_005848348	<i>ATF</i>	Transcription initiation factor TFIID, subunit BDF1 and related bromodomain proteins	-8,1	1,5
XP_005844971	<i>UCHL</i>	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	-8,1	1,5
XP_005849305	<i>HAT</i>	Kinase A-anchor protein Neurobeachin and related BEACH and WD40 repeat proteins	-8,4	1,4
XP_005847206	<i>MAN1A1</i>	Mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase and related glycosyl hydrolases	-8,8	1,4
XP_005846438	<i>GTF</i>	Transcription initiation factor TFIID, subunit BDF1 and related bromodomain proteins	-8,9	1,4
XP_005847139	<i>REV3L</i>	DNA polymerase zeta, catalytic subunit	-8,9	1,4
XP_005848160	<i>AKR</i>	Aldo/keto reductase family proteins	-9,0	1,4
XP_005844945	<i>TCF20</i>	Transcription factor TCF20	-9,1	1,3
XP_005852183	<i>SNAP50</i>	Small nuclear RNA activating protein complex - 50kD subunit (SNAP50)	-9,1	1,5
XP_005845647	<i>NCOA</i>	Nuclear receptor coregulator SMRT/SMRTER, contains Myb-like domains	-9,2	1,4
XP_005842975	<i>STK</i>	Serine-threonine protein kinase FUSED	-9,3	1,4
XP_005847092	<i>PCMT</i>	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	-9,4	1,4
XP_005849185	<i>PLPP</i>	SNF2 family DNA-dependent ATPase	-9,5	1,4
XP_005847969	<i>MPV17</i>	Peroxisomal membrane protein MPV17 and related proteins	-9,5	1,5
XP_005851329	<i>PTK</i>	Protein tyrosine kinase	-9,5	1,4
XP_005843911	<i>A4GNT</i>	N-acetylglucosaminyltransferase I	-9,6	1,4
XP_005847455	<i>TYK</i>	Tyrosine kinase specific for activated (GTP-bound) p21cdc42Hs	-9,7	1,4
XP_005844567	<i>DDX11</i>	DNA/RNA helicase MER3/SLH1, DEAD-box superfamily	-10,0	1,4
XP_005848310	<i>RFC</i>	DNA replication licensing factor, MCM6 component	-10,3	1,4

XP_005848340	<i>NGA3</i>	Transcription factor, Myb superfamily	-10,4	1,4
XP_005848562	<i>GOS11</i>	Transport protein particle (TRAPP) complex subunit	-10,6	1,4
XP_005847715	<i>NRPB10</i>	TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase II	-11,1	1,4
XP_005849729	<i>DAL1</i>	Ubiquitin-protein ligase	-12,2	1,4

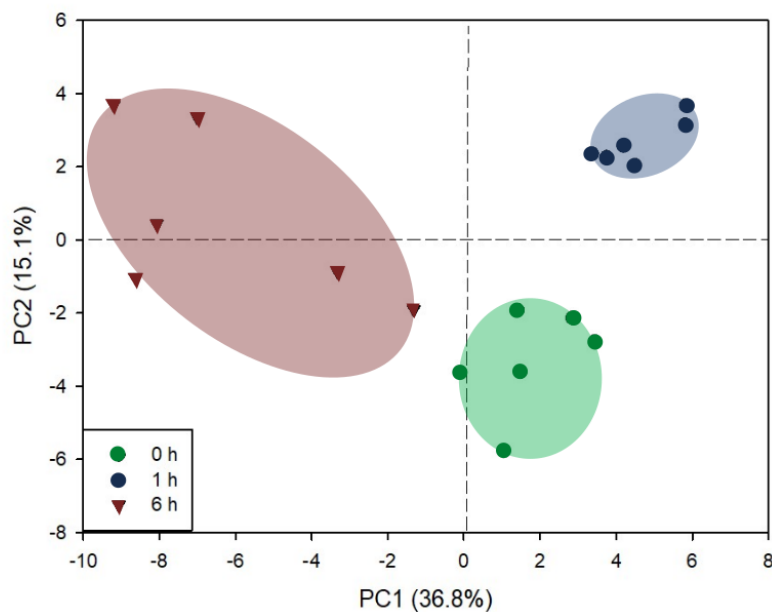
4.1.3 Συγκριτική μεταβολομική απόκριση του *C. variabilis* στην επαγόμενη από H₂O₂ οξειδωτική καταπόνηση

Προκειμένου να μελετηθούν οι μεταβολικές προσαρμογές του μικροφύκου *C. variabilis* στην αβιοτική καταπόνηση, εφαρμόστηκε μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση με χρήση της τεχνολογίας GC-MS. Η ανάλυση αυτή οδήγησε στη σχετική ποσοτικοποίηση 65 μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένων αμινοξέων, σακχάρων, οργανικών οξέων και ενώσεων που περιέχουν άζωτο (Παράρτημα 4). Συγκρίνοντας το σχετικό περιεχόμενο μεταβολιτών των καλλιεργειών που εκτέθηκαν σε 2 mM H₂O₂ για 1 ώρα με αυτό των καλλιεργειών ελέγχου (0 ώρες), προέκυψαν 45 μεταβολίτες με αυξημένο περιεχόμενο και 20 με μειωμένο. Η αντίστοιχη σύγκριση μετά από έκθεση σε H₂O₂ για 6 ώρες οδήγησε στον προσδιορισμό 48 συσσωρευμένων μεταβολιτών και 17 με μειωμένο περιεχόμενο (Εικόνα 37).



Εικόνα 37 Αριθμός των μεταβολιτών των οποίων το περιεχόμενο επηρεάστηκε από τους χειρισμούς με H₂O₂ (n=65).

Στη συνέχεια οι μεταβολίτες του *C. variabilis* αναλύθηκαν με partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). Λαμβάνοντας υπόψιν το 51.9% της συνολικής διακύμανσης των κύριων συνιστωσών, οι μεταβολίτες κάθε χειρισμού ομαδοποιήθηκαν και υπήρχε σαφής διάκριση ανάμεσα στους διαφορετικούς χειρισμούς. Στη γραφική απεικόνιση οι μεταβολίτες των καλλιεργειών που εκτέθηκαν σε 2 mM H₂O₂ για μία ώρα τοποθετήθηκαν στη μακρύτερη διαδρομή από τους δύο άλλους χειρισμούς ενώ το μεταβολικό προφίλ των καλλιεργειών ελέγχου βρισκόταν σε ενδιάμεση θέση (Εικόνα 38).



Εικόνα 38 PLS-DA ανάλυση των μεταβολιτών μετά την έκθεση σε 2 mM H₂O₂. Για κάθε χειρισμό οι βιολογικές και τεχνικές επαναλήψεις απεικονίζονται ξεχωριστά (n=6). Η διακεκομμένη γραμμή χωρίζει το ανώτερο θετικό τεταρτημόριο του PC1.

Η σύγκριση των μεταβολομικών προφίλ των καλλιεργειών που εκτέθηκαν σε 2 mM H₂O₂ για 1 ώρα με τα αντίστοιχα των καλλιεργειών ελέγχου αποκάλυψε μόλις πέντε διαφορεικά συσσωρευόμενους μεταβολίτες με στατιστικά σημαντικές διαφορές (Πίνακας 22). Συγκεκριμένα, επηρεάστηκε η περιεκτικότητα των αμινοξέων, καθώς 3 από αυτά συσσωρεύτηκαν σημαντικά. Πρόκειται για τις ορνιθίνη, βαλίνη και αλανίνη που παρουσίασαν 41.4, 2.4 και 2.6 φορές υψηλότερο περιεχόμενο αντίστοιχα, σε σύγκριση με τις τιμές τους στις

καλλιέργειες ελέγχου. Επιπλέον, σαν απόκριση στη συγκεκριμένη καταπόνηση μειώθηκε η περιεκτικότητα του οργανικού οξέος λακτοβιονικό οξύ κατά 2.0 φορές. Τέλος, σημαντική αύξηση, κατά 1.3 φορές, εμφάνισε η περιεκτικότητα της πιπεριδόνης.

Πίνακας 22 Συγκριτικοί λόγοι των επιπέδων ταυτοποιημένων μεταβολιτών που εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ 1h και 0h. Για κάθε χειρισμό, οι λόγοι υπολογίστηκαν από τον μέσο όρο των 3 βιολογικών και 2 τεχνικών επαναλήψεων (n=6).				
	RT	m/z	1h/0h	P
L-ornithine	21,921	142	41,6	0,01
L-valine	12,0505	144	2,4	0,00
L-alanine	9,2456	116	2,6	0,05
lactobionic acid	39,24855	217	0,5	0,00
2-piperidone	6,92195	156	1,3	0,01

Αντιθέτως, η έκθεση σε 2 mM H_2O_2 για 6 ώρες είχε ξεκάθαρα πιο έντονη επίδραση στο μεταβολισμό του *C. variabilis*, καθώς το περιεχόμενο 28 μεταβολιτών επηρεάστηκε σημαντικά (Πίνακας 23). Από τα αμινοξέα, 13 εμφάνισαν συσσώρευση με την ασπαραγίνη, την προλίνη και τη γλουταμίνη να εμφανίζουν τη μεγαλύτερη αύξηση του περιεχομένου τους, κατά 34.4, 10.4 και 9.7 φορές αντίστοιχα. Άλλα αμινοξέα που εμφάνισαν σημαντική συσσώρευση ήταν η μεθυλαλανίνη, η βαλίνη, η λυσίνη, η τυροσίνη κ.α., ενώ κανένα από τα αμινοξέα δεν μείωσε σε σημαντικό βαθμό το περιεχόμενο του. Επίσης, επηρεάστηκε η περιεκτικότητα τεσσάρων οργανικών οξέων. Μαλικό, ηλεκτρικό και αφυδροασκορβικό οξύ αύξησαν το περιεχόμενο τους κατά 3.0, 2.6 και 2.0 φορές αντίστοιχα. Αντιθέτως το λακτοβιονικό οξύ μείωσε το περιεχόμενο του κατά 2.8 φορές. Έξι από τα σάκχαρα επηρεάστηκαν από το συγκεκριμένο χειρισμό. Λυξόζη, ραφινόζη και ταγατόζη αυξήθηκαν κατά 14.0, 3.6 και 3.5 φορές αντίστοιχα, ενώ το περιεχόμενο της αλλόζης μειώθηκε κατά 5.7 φορές, της γλυκόζης 10.4 φορές και ταλόζης κατά 7.3 φορές. Σημαντική μείωση εμφάνισε και η γλυκόζη-6P (9.7 φορές). Ακόμα, τρεις αζωτούχες ενώσεις αύξησαν το περιεχόμενο τους σαν απόκριση στην έκθεση σε οξειδωτική καταπόνηση για 6 ώρες, με τις αδενίνη και θυμίνη να εμφανίζουν τη μεγαλύτερη μεταβολή κατά 6.1 και 2.8 φορές.

Πίνακας 23 Συγκριτικοί λόγοι των επιπέδων ταυτοποιημένων μεταβολιτών που εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ 6h και 0h. Για κάθε χειρισμό, οι λόγοι υπολογίστηκαν από τον μέσο όρο των 3 βιολογικών και 2 τεχνικών επαναλήψεων ($n=6$).

	RT	m/z	6h/0h	P
Amino acids				
L-valine	12,0505	144	3,3	0,00
L-threonine	16,5276	218	2,8	0,00
L-proline	14,0895	142	10,5	0,00
L-norleucine	13,48985	158	2,1	0,00
L-asparagine	23,2174	231	34,4	0,00
L-alanine	9,2456	116	2,7	0,03
L-serine	15,834	204	2,4	0,00
L-lysine	28,4555	317	3,8	0,00
L-glutamine	25,4029	156	9,7	0,01
Beta- alanine	17,3755	248	3,8	0,00
L-glutamic acid	22,0545	246	2,5	0,00
tyrosine	28,7828	218	2,8	0,01
N-methylalanine	10,9436	130	5,9	0,02
Organic acids				
succinic acid	14,46655	148	2,6	0,03
D-malic acid	19,0244	147	3,0	0,00
lactobionic acid	39,24855	217	-2,8	0,01
dehydroascorbic acid	27,1135	173	2,0	0,01
Sugars				
D-glucose	28,3894	319	-10,4	0,00
tagatose	28,09325	217	3,5	0,01
D-lyxose	23,70135	217	14,0	0,00
Raffinose	51,4991	87	3,6	0,00
talose	28,6692	319	-7,3	0,00

D-allose	28,6724	319	-5,7	0,01
N-containing				
adenine	27,2065	264	6,1	0,00
thymine	16,7733	255	2,8	0,03
1,3-diaminopropane	22,5781	174	2,0	0,01
Others				
D-glucose-6-phosphate	36,2285	387	-9,7	0,01
1-methylhydantoin	6,3233	171	9,3	0,00

4.1.4 Συγκριτική λιπιδομική απόκριση του *C. variabilis* στην επαγόμενη από H₂O₂ οξειδωτική καταπόνηση

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της οξειδωτικής καταπόνησης στο προφίλ λιπαρών οξέων του μικροφύκου *C. variabilis*, αναλύθηκαν τα λιπαρά οξέα από καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν τόσο σε συνθήκες ελέγχου όσο και παρουσία H₂O₂ για 1 και 6 ώρες. Στον Πίνακα 24 που ακολουθεί παρουσιάζεται η σύνθεση των προφίλ λιπαρών που προέκυψαν καθώς και το ποσοστό των ακόρεστων (SFA), μονοακόρεστων (MUFA) και πολυακόρεστων (PUFA) λιπαρών οξέων.

Πίνακας 24 Προφίλ λιπαρών του <i>C. variabilis</i> για κάθε χειρισμό.						
<i>C. variabilis</i>	0h		1h		6h	
	AVG %	SE	AVG %	SE	AVG %	SE
C12	0,93	0,09	1,16	0,25	0,72	0,27
C14:0	0,99 ^a	0,35	n.d.		2,07 ^b	0,30
C16:0	14,93 ^a	1,28	17,32 ^b	0,71	18,00 ^b	0,18
C16:3n4	11,93 ^a	1,02	14,62 ^b	0,45	12,21 ^a	1,25
C16:1n7	6,54 ^a	1,85	1,96 ^b	0,07	3,50 ^c	0,71
C17	4,74 ^a	1,07	3,99 ^a	0,19	6,60 ^b	0,41
C18:0	1,65	0,12	1,97	0,57	1,55	0,10
C18:1	22,93 ^a	1,28	29,44 ^b	2,22	25,74 ^c	1,14
C18:3n3	10,74 ^a	1,12	10,93 ^a	1,30	15,31 ^b	1,93
C18:2n6	1,49 ^a	0,18	1,62 ^a	0,12	1,91 ^b	0,11
C20:0	3,47 ^a	1,09	1,57 ^b	0,61	0,88 ^b	0,62

C20:5	2,68	0,56	2,27	0,39	1,94	0,79
C22	2,76 ^a	0,57	1,34 ^b	0,49	1,90 ^b	0,36
C24	12,20 ^a	1,55	11,83 ^a	1,46	7,18 ^b	0,23
SFA	41,67		39,18		38,90	
MUFA	29,48		31,4		29,24	
PUFA	26,84		29,44		31,37	

Όλα τα λιπαρά οξέα που ταυτοποιήθηκαν βρίσκονται μέσα στο εύρος των C12-C24, με κυρίαρχα τα C16:0, C16:3n4, C16:1n7, C18:1, C18:3n3 και C24 που αποτελούν περίπου το 80% του συνολικού περιεχομένου των κυττάρων σε FAMES. Άλλα λιπαρά οξέα που ταυτοποιήθηκαν είναι τα C12:0, C14:0, C17, C18:0, C18:2n6, C20:0, C20:5 και C22. Το περιεχόμενο των C12:0, C18:0 και C20:5 παρέμεινε σταθερό παρά την οξειδωτική καταπόνηση στην οποία εκτέθηκαν οι καλλιέργειες. Τα C14:0, C18:3n3 και C18:2n6 αυξήθηκαν μετά από έκθεση σε οξειδωτική καταπόνηση για 6 ώρες ενώ αντίθετα με τον ίδιο χειρισμό το περιεχόμενο των C17 και C24 μειώθηκε. Ακόμα, αποτέλεσμα της οξειδωτικής καταπόνησης ήταν η αύξηση του περιεχομένου των C16:0, C16:3n4 και C18:1. Η αντίστροφη μεταβολή παρατηρήθηκε για τα C16:1n7, C20:0 και C22. Επίσης, τα ποσοστά των SFA και MUFA στα κύτταρα δεν μεταβλήθηκαν από την παρουσία καταπόνησης ενώ τα ποσοστά των PUFA αυξανόταν όσο αυξανόταν η χρονική διάρκεια της καταπόνησης.

4.2 Συζήτηση

Τα μικροφύκη έχουν αναπτύξει πλήθος προσαρμογών στην οξειδωτική καταπόνηση, συχνά μοναδικών για κάθε είδος (Barone et al., 2021). Προκειμένου να μελετηθεί το δυνατόν ευρύτερο φάσμα από την ποικιλομορφία των μικροφυκών επιλέχθηκε για τη συνέχεια της παρούσας διατριβής το μικροφύκος του γλυκού νερού *C. variabilis*.

4.2.1 Φυσιολογικές τροποποιήσεις ως απόκριση του *C. variabilis* στην οξειδωτική καταπόνηση

Η μελέτη της απόκρισης του *C. variabilis* στην επαγόμενη από H_2O_2 οξειδωτική καταπόνηση ξεκίνησε με τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων. Όλες οι συγκεντρώσεις H_2O_2 που εφαρμόστηκαν οδήγησαν σε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των καλλιεργειών μέσα σε λίγες ώρες (Εικόνα 32). Η έκθεση σε 2 mM H_2O_2 για σύντομο χρονικό διάστημα αύξησε ως ένα βαθμό τη θνησιμότητα των κυττάρων, επέτρεψε ωστόσο στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό να ενεργοποιηθεί και να λειτουργήσει. Αντίθετα, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν προκάλεσαν την άμεση κατάρρευση των καλλιεργειών χωρίς να μπορεί να συνδράμει ο κυτταρικός αντιοξειδωτικός μηχανισμός. Μείωση της βιωσιμότητας κυττάρων *Chlorella sp.* μετά από έκθεση σε επαγόμενη από H_2O_2 οξειδωτική καταπόνηση έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά και σε άλλες ερευνητικές εργασίες (Imase et al., 2013). Κοινό μοτίβο άμεσης απόκρισης στην οξειδωτική καταπόνηση παρουσίασαν και τα άλλα δύο μικροφύκη που μελετήθηκαν. Μάλιστα ενώ για το *T. chuii* 0.5 mM H_2O_2 αρκούσαν για την επαγωγή οξειδωτικής καταπόνησης, τόσο το *C. variabilis* όσο και το *C. reinhardtii* χρειάστηκαν 2 mM για να οδηγηθούν στην ίδια απόκριση. Η παρατήρηση αυτή ίσως συνδέεται με το γεγονός ότι πρόκειται για δύο μικροφύκη του γλυκού νερού που πιθανώς έχουν προσαρμοστεί να αντιμετωπίζουν πιο έντονες μεταβολές και αβιοτικές καταπονήσεις στο περιβάλλον τους, σε σχέση με το σχετικά σταθερό θαλάσσιο περιβάλλον του *T. chuii*. Διαφορετική απόκριση και ευαισθησία ανάμεσα σε μικροφύκη του γλυκού νερού και θαλάσσια αναφέρουν και οι Xu et al. στην εργασία τους, χρησιμοποιώντας την έκθεση σε μικροπλαστικά (H. Xu et al., 2023).

Μια άλλη φυσιολογική προσαρμογή του *C. variabilis* στην έκθεση σε 2 mM H_2O_2 ήταν η σταδιακή μείωση της φωτοσυνθετικής ικανότητας του PSII. Ο λόγος F_v/F_m μειώθηκε σχεδόν στο μισό ήδη από την πρώτη ώρα έκθεσης στην καταπόνηση, ενώ η μείωση έγινε ακόμα πιο έντονη για συνεχιζόμενη καταπόνηση για 6 ώρες. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία όπου συναντώνται αρκετές αναφορές που συσχετίζουν την πτώση της φωτοσυνθετικής ικανότητας, όπως αυτή αποτυπώνεται στο λόγο F_v/F_m , με την επαγωγή αβιοτικής οξειδωτικής καταπόνησης σε μικροφύκη του γένους *Chlorella* (Matorin et al., 2009; Vanilin & Rubin, n.d.) (Phetchuay et al., 2019). Επίσης και από την ανάλυση RNAseq γίνεται ξεκάθαρο ότι η απόκριση του μικροφύκου στην καταπόνηση εκτυλίσσεται εντός της πρώτης

ώρας, καθώς ταυτοποιήθηκαν περισσότερα από 200 DEGs τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Από την άλλη, μέσα σε αυτό το χρονικό διάστημα δεν πρόλαβε να διαφοροποιηθεί έντονα το κυτταρικό μεταβόλομα, οδηγώντας σε στατιστικά σημαντικές αλλαγές στο περιεχόμενο μόλις πέντε μεταβολιτών. Η παράταση της καταπόνησης για 6 ώρες προκάλεσε εντονότερη τροποποίηση του μεταβολόματος, με 28 μεταβολίτες να διαφοροποιούνται σημαντικά, ενώ στο μεταγράφομα πραγματοποιήθηκαν λιγότερες τροποποιήσεις (180 DEGs). Μια ακόμα σημαντική προσαρμογή των κυττάρων στην έκθεση σε 2 mM H₂O₂ ήταν η συσσώρευση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) με τρόπο ανάλογο της χρονικής διάρκειας της καταπόνησης. Πρόκειται για συχνά εμφανιζόμενη απόκριση των μικροφυκών σε αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης που συμβάλει στην επιβίωση τους (Paliwal et al., 2017).

Συνεπώς, παρατηρείται η άμεση απόκριση των κυττάρων στον οξειδωτικό παράγοντα, εντός μίας ώρας, με μείωση της βιωσιμότητας, περιορισμό της φωτοσύνθεσης, συσσώρευση PUFAs και έντονες μεταγραφομικές αλλαγές. Η συνέχιση της καταπόνησης για 6 ώρες οδηγεί σε έντονη μείωση της βιωσιμότητας και της φωτοσυνθετικής ικανότητας με παράλληλη προσαρμογή του περιεχομένου των κυττάρων σε μεταβολίτες και ακόμα πιο μεγάλη αύξηση της περιεκτικότητας σε PUFAs.

4.2.2 Το *C. variabilis* ξεδιπλώνει άμεσα ένα ευρύ φάσμα αντιοξειδωτικών αποκρίσεων

Η επαγωγή βραχυπρόθεσμης οξειδωτικής καταπόνησης σε καλλιέργειες του μικροφύκου *C. variabilis* άσκησε σημαντική επιρροή σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες. Αρχικά, ενεργοποιήθηκαν άμεσα βασικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αύξηση του αριθμού των μεταγράφων HSPs, όπως τα *HSP90* και *FTSH8*. Πρόκειται για πρωτεΐνες που δρουν ως μοριακές συνοδοί και συμμετέχουν στις αποκρίσεις σε αβιοτικές καταπονήσεις (Lee et al., 2014). Αύξηση στην έκφραση των HSPs σαν αποτέλεσμα της έκθεσης σε H₂O₂ έχει παρατηρηθεί και στα Χλωροφύκη *T. chuii* και *C. reinhardtii* (Koletti et al., 2022). Παράλληλα αυξήθηκε η έκφραση του *PBE1* που κωδικοποιεί για τη δομική υπομονάδα του πρωτεασώματος 20S. Η ευρεία έκφραση των σωματιδίων 20S και 19S που σχηματίζουν τον πυρήνα του πρωτεασώματος αποτελεί μια κυτταρική προσαρμογή στην οξεία οξειδωτική

καταπόνηση και συναντάται σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς (X. Wang et al., 2010). Έχει αναφερθεί και σαν απόκριση του *C. reinhardtii* (Koletti et al., 2022). Μια άλλη σημαντική προσαρμογή των κυττάρων *C. variabilis*, που δεν τη διαθέτουν όλα τα μικροφύκη, ήταν η αύξηση της περιεκτικότητας σε PUFA, σαν αποτέλεσμα της έκθεσης σε H₂O₂. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι απαραίτητα για την ομαλή ανάπτυξη των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών ενώ εμφανίζουν τεράστιο φαρμακευτικό και εμπορικό ενδιαφέρον (Paliwal et al., 2017). Σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων έχει αναφερθεί ότι μικροφύκη, ανάμεσα τους και κάποια του γένους *Chlorella*, συσσωρεύουν PUFAs ώστε να επιβιώσουν στις αντίξοες συνθήκες του περιβάλλοντος (Paliwal et al., 2017). Στην προσπάθεια αυτή συμβάλει και η δράση ουσιών με υψηλό αντιοξειδωτικό δυναμικό. Μία από αυτές είναι η πιπεριδόνη, η ποσότητα της οποίας αυξήθηκε σημαντικά στα κύτταρα του *C. variabilis*. Πρόκειται για μια ένωση που περιέχει σύστημα δακτυλίου θειαζόλης και για το λόγο αυτό εμφανίζει υψηλή αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή ενεργότητα (Harini et al., 2017).

Η επαγωγή οξειδωτικής καταπόνησης για 1 ώρα είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων έκφρασης αρκετών DEGs που κωδικοποιούν για υπομονάδες του ριβοσώματος, όπως τα *RPL11*, *RPL44* και *RPS15*. Ταυτόχρονα αυξήθηκε η περιεκτικότητα των κυττάρων στα αμινοξέα ορνιθίνη, βαλίνη και αλανίνη. Οι δύο αυτές παρατηρήσεις θα μπορούσαν να ερμηνευθούν σαν μια προσπάθεια του μικροφύκου να τονώσει τη διαδικασία της πρωτεϊνσύνθεσης προκειμένου να παράξει τις απαραίτητες πρωτεΐνες για να διαχειριστεί την καταπόνηση αλλά και να αντικαταστήσει όσες υπέστησαν οξειδωτική βλάβη. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες (RPs) έχουν συνδεθεί και με άλλες λειτουργίες, πέρα από το σχηματισμό των ριβοσωμάτων, με την απόκριση στις αβιοτικές καταπονήσεις να βρίσκεται ανάμεσα τους (Kalinina et al., 2018; Robles & Quesada, 2022; Xiong et al., 2021). Επίσης, η συσσώρευση ορνιθίνης έχει συσχετιστεί με τη βελτίωση της ανθεκτικότητας σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων στο φυτό *A. thaliana* (Kalamaki et al., 2009) ενώ και η συσσώρευση αλανίνης θεωρείται ως δείκτης καταπόνησης για το ίδιο φυτό (Kaplan et al., 2004).

Σχετικά με τον ενεργειακό μεταβολισμό των κυττάρων, παρατηρήθηκε μια στόχευση του. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πυροσταφυλική κινάση (PK) η οποία διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη γλυκόλυση αύξησε τα επίπεδα έκφρασης του μετά από 1 ώρα έκθεσης σε 2 mM H₂O₂,

όπως και το μηλικό ένζυμο (ME2) που σχετίζεται με τον κύκλο TCA. Πιθανώς το κύτταρο προσπαθεί να τροφοδοτήσει τον κύκλο του κιτρικού οξέος και το επιτυγχάνει ως ένα βαθμό, κρίνοντας από τη συσσώρευση μηλικού και ηλεκτρικού σε επόμενο χρόνο. Η ενίσχυση του κύκλου TCA έχει ιδιαίτερη σημασία για την επιτυχή αντιμετώπιση της καταπόνησης καθώς μέσω αυτού τροφοδοτούνται αντιοξειδωτικά μονοπάτια και παράγονται απαραίτητοι μεταβολίτες (Araño et al., 2014; Tahjib-Ul-Arif et al., 2021). Ταυτόχρονα υπάρχει σημαντική μείωση της φωτοσυνθετικής απόδοσης, όπως διακρίνεται από την πτώση του λόγου Fv/Fm, συνεπώς και μειωμένη είσοδος ενέργειας στο κύτταρο. Για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών και τη διαχείριση της καταπόνησης επιλέχθηκε η μείωση της παραγωγής αποθηκευτικών μορίων όπως απεικονίζεται από τη μείωση των επιπέδων έκφρασης του *GYS* που συμμετέχει στο μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής αμυλόζης αλλά και τη μείωση της συγκέντρωσης λακτοβιονικού οξέος, που αποτελεί ένα οξύ σακχάρου.

4.2.3 Μακροπρόθεσμη έκθεση σε H₂O₂ καταστέλλει βασικές κυτταρικές λειτουργίες του *C. variabilis*

Η παρατεταμένη έκθεση του *C. variabilis* στην αβιοτική καταπόνηση επάγει ένα διαφορετικό σύνολο κυτταρικών προσαρμογών. Κοινό σημείο αποτελεί η αύξηση των επιπέδων έκφρασης των μοριακών συνοδών (HSPs) οι οποίες πρωτοστατούν στην απόκριση σε αβιοτικές καταπονήσεις και συμμετέχουν στην έγκαιρη αίσθηση της επαγόμενης από H₂O₂ καταπόνησης στα φυτά (Davletova et al., 2005). Παράλληλα αυξήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *APX1* που κωδικοποιεί την ασκορβική υπεροξειδάση. Πρόκειται για ένζυμο με κεντρικό ρόλο στο δίκτυο διαχείρισης των ενεργών ριζών οξυγόνου που συναντάται σε πολλούς οργανισμούς, όπως το *A. thaliana* (Davletova et al., 2005). Επίσης, συνεχίστηκε και έγινε ακόμα πιο έντονη, σε σχέση με τη μία ώρα καταπόνησης, η συσσώρευση των εξαιρετικά σημαντικών για την αντιμετώπιση της καταπόνησης PUFAς.

Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης RNAseq αποκαλύφθηκε μείωση της έκφρασης πολλών γονιδίων που συμμετέχουν στην αντιγραφή του DNA, όπως αυτά που κωδικοποιούν για τον παράγοντα αδειοδότησης της αντιγραφής RFC, την ελικάση DDX11 και τη DNA πολυμεράση

REV3L. Η επίδραση των αβιοτικών καταπονήσεων στον κυτταρικό κύκλο και την αντιγραφή του DNA είναι ένα φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί και μελετάται και στα φυτά (Tuteja et al., 2011). Στο ίδιο πλαίσιο, έντονη υπήρξε η μείωση στην έκφραση DEGs που σχετίζονται με τη διαδικασία της μεταγραφής, όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες *NGA3* και *TCF20* και ο παράγοντας έναρξης της μεταγραφής *GTF*. Ο περιορισμός της μεταγραφικής λειτουργίας των κυττάρων θα μπορούσε να αποτελεί ένα μηχανισμό εξοικονόμησης ενέργειας και πρώτων υλών για τη βιοσύνθεση των απαραίτητων αντιοξειδωτικών ενώσεων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *HAD* που κωδικοποιεί για μια αποακετυλάση των ιστονών. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει διαφοροποίηση στο μοτίβο των επιγενετικών τροποποιήσεων παρουσία οξειδωτικής καταπόνησης και συνεπώς αλλαγές στην έκφραση γονιδίων και έρχεται σε συμφωνία με υπάρχουσες βιβλιογραφικές αναφορές (Asensi-Fabado et al., 2017).

Συνέπεια της παρατεταμένης έκθεσης σε 2 mM H₂O₂ ήταν η ενεργειακή κατάρρευση των κυττάρων. Ο λόγος Fv/Fm που προσδιορίζει τη φωτοσυνθετική ικανότητα έχει σχεδόν μηδενιστεί και ταυτόχρονα το περιεχόμενο των κυττάρων στους βασικούς μεταβολίτες της γλυκόλυσης γλυκόζη και γλυκόζη-6P έχει περιοριστεί σημαντικά. Αν και η γλυκόζη διαθέτει αντιοξειδωτικές ιδιότητες, η αυξημένη διάρκεια της καταπόνησης έχει αναγκάσει τα κύτταρα να την καταναλώσουν προκειμένου να τροφοδοτήσουν τα μεταβολικά τους μονοπάτια (Siddiqui et al., 2020). Επίσης παρατηρήθηκε συσσώρευση του μηλικού και του ηλεκτρικού οξέος καθώς ο κύκλος TCA είχε εκφραστεί σε σημαντικό βαθμό το προηγούμενο χρονικό διάστημα. Μια ακόμα κοινή απόκριση στις αβιοτικές καταπονήσεις που παρατηρήθηκε και στις καλλιέργειες *C. variabilis* ήταν η συσσώρευση 13 αμινοξέων, όπως η προλίνη. Τα συσσωρευμένα αμινοξέα συμμετέχουν στη ρύθμιση της μεταφοράς ιόντων, της ενεργότητας ενζύμων, της γονιδιακής έκφρασης και συνολικά της αντιοξειδωτικής ομοιόστασης (Stewart & Larher, 1980, Rai, 2002).

Συνολικά προκύπτει ότι η έκθεση σε 2 mM H₂O₂ επηρεάζει έντονα τη φυσιολογία και το μεταβολισμό του μικροφύκου *C. variabilis*. Καθοριστικός παράγοντας για την απόκριση του μικροφύκου στην καταπόνηση είναι η διάρκεια της. Βραχυπρόθεσμη έκθεση οδηγεί σε διατήρηση υψηλών ποσοστών βιωσιμότητας μέσω της ενεργοποίησης πλήθους αντιοξειδωτικών μηχανισμών ενώ ο κυτταρικός μεταβολισμός παραμένει ενεργός. Η παρατεταμένη καταπόνηση προκαλεί ραγδαία πτώση της βιωσιμότητας, η έκφραση πλήθους

γονιδίων μειώνεται σημαντικά και τα κύτταρα δεν μπορούν να διατηρήσουν την ομοιόσταση τους.

Κεφάλαιο 5ο: Αποκρίσεις του *C. reinhardtii* στην οξειδωτική καταπόνηση



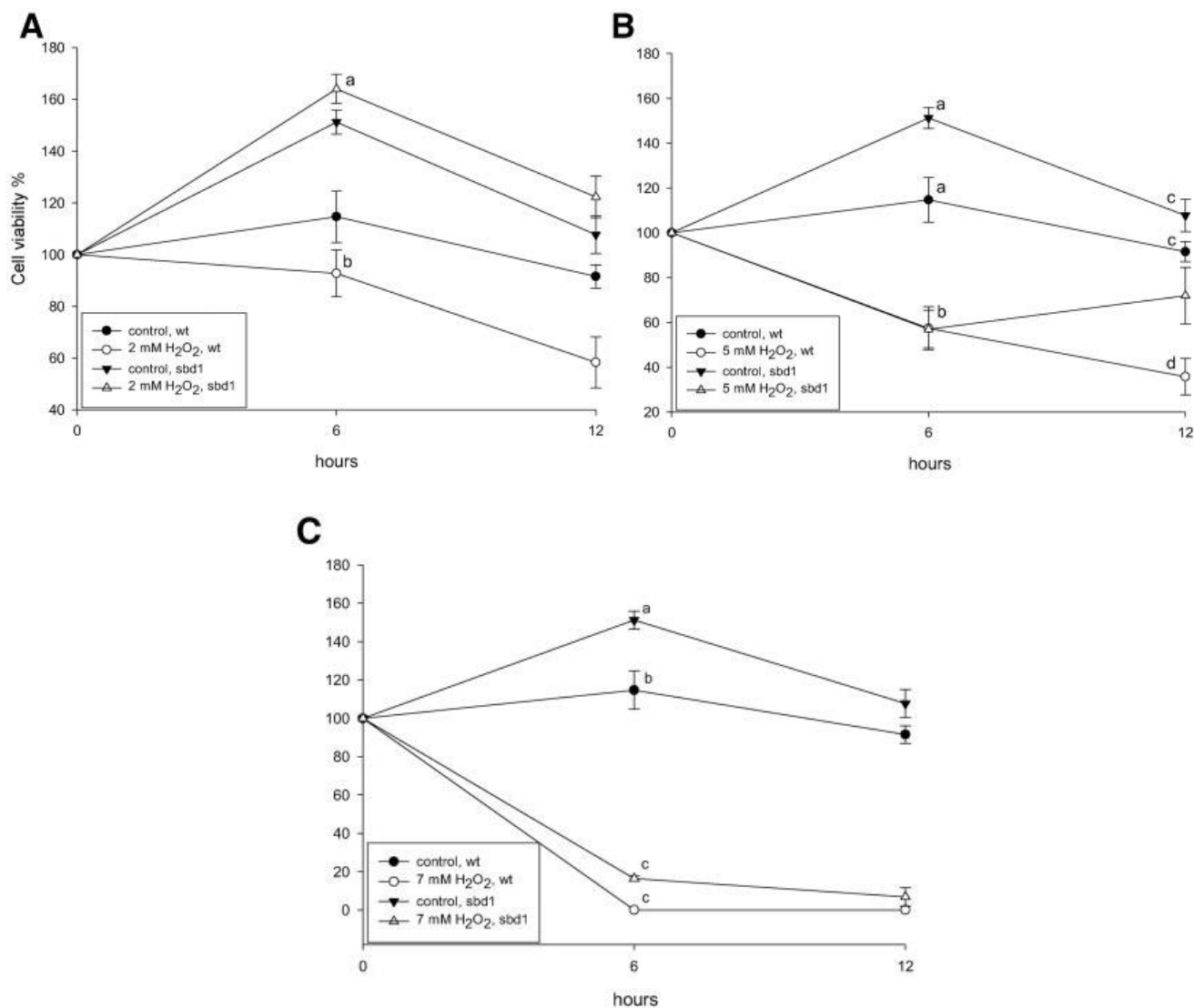
5.1 Αποτελέσματα

5.1.1 Επίδραση της οξειδωτικής καταπόνησης στη βιωσιμότητα των στελεχών φυσικού τύπου και *sbd1* του *C. reinhardtii*

Για να μελετηθεί η απόκριση του μικροφύκου *C. reinhardtii* στην επαγόμενη από H_2O_2 οξειδωτική καταπόνηση και παράλληλα να αποσαφηνιστεί ο πιθανός φυσιολογικός ρόλος της CrSBD1 στη διαδικασία αυτή, χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη δύο στελέχη από την CLiP library, το στέλεχος φυσικού τύπου (wt) και το μετάλλαγμα *sbd1* που φέρει ένθεση στη γονιδιακή περιοχή SBD1 (Cre03.g166050). Τα δύο στελέχη αναπτύχθηκαν ως την εκθετική φάση και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις H_2O_2 , 0mM (control), 2mM, 5mM και 7mM. Δείγματα λαμβάνονταν τις χρονικές στιγμές 0, 6 και 12 ώρες (h) από την προσθήκη του παράγοντα καταπόνησης, ενώ όλη η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

Σε συνθήκες ελέγχου, το στέλεχος *sbd1* εμφάνισε ελαφρώς υψηλότερα ποσοστά κυτταρικής βιωσιμότητας σε σχέση με το στέλεχος φυσικού τύπου, χωρίς ωστόσο να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Εικόνα 39A). Όταν τα μικροφύκη εκτέθηκαν σε 2 mM H_2O_2 , το στέλεχος *sbd1* είχε στατιστικά σημαντικά αυξημένη κυτταρική επιβίωση, συγκρινόμενο με το wt (Εικόνα 39A). Με την αύξηση της συγκέντρωσης H_2O_2 σε 5 mM και 7 mM τόσο το στέλεχος φυσικού τύπου όσο και το *sbd1* οδηγήθηκαν στατιστικά σημαντική μείωση της βιωσιμότητας τους, συγκρινόμενα με τις αντίστοιχες καλλιέργειες ελέγχου (Εικόνα 39B, Γ). Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα, η συγκέντρωση 2 mM επιλέχθηκε ως η κατάλληλη για την περαιτέρω μελέτη της απόκρισης του *C. reinhardtii* στην οξειδωτική καταπόνηση με μεταγραφομικές και μεταβολομικές αναλύσεις.

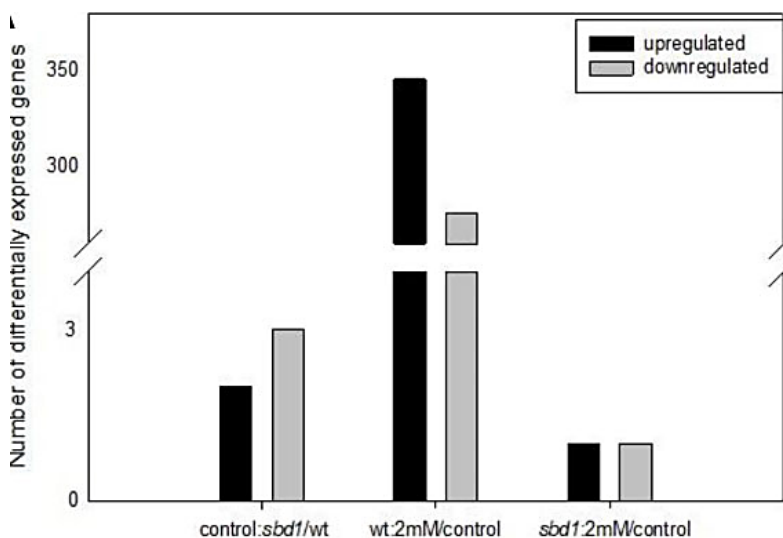
Κεφάλαιο 5ο: Αποκρίσεις του *C. reinhardtii* στην οξειδωτική καταπόνηση



Εικόνα 39 Κυτταρική βιωσιμότητα καλλιεργειών *C. reinhardtii* wt και *sbd1* που εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις H₂O₂. Βιωσιμότητα κυττάρων που εκτέθηκαν σε: (A) 2 mM H₂O₂, (B) 5 mM H₂O₂, (Γ) 7 mM H₂O₂. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται ως μέσος όρος ±SE των τριών βιολογικών επαναλήψεων (n=3). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται με διαφορετικά γράμματα (Tukey's HSD, P<0.05).

5.1.2 Συγκριτική μεταγραφομική απόκριση των στελεχών *C. reinhardtii* στην επαγόμενη από H₂O₂ οξειδωτική καταπόνηση

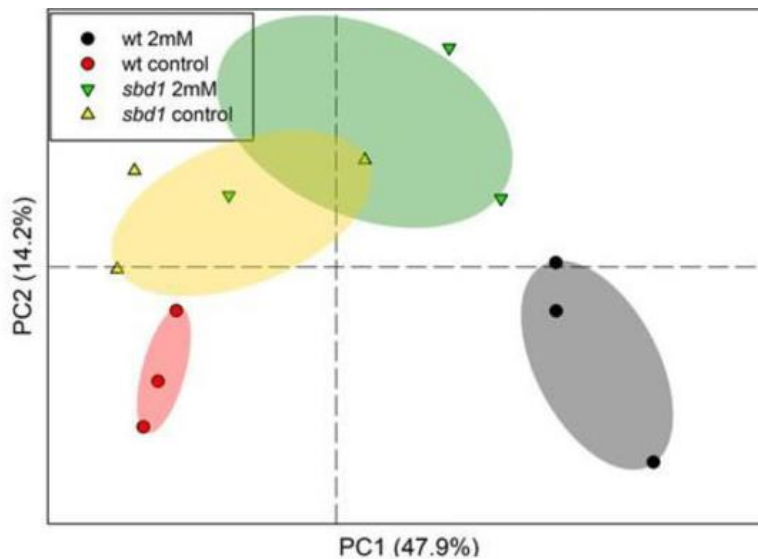
Για να αποσαφηνιστεί περαιτέρω ο μηχανισμός μοριακής προσαρμογής που διέπει την απόκριση του *C. reinhardtii* στην οξειδωτική καταπόνηση αλλά και ο ρόλος της *CrSBD1* σε αυτή, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του συνολικού μεταγραφώματος των δύο στελεχών. Με τον τρόπο αυτό ανιχνεύθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν 49.800 μοναδικές κωδικοποιούσες περιοχές (coding sequences – CDS) (Παράρτημα 3) και προσδιορίστηκαν τα διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια (Differentially Expressed Genes - DEGs) για κάθε χειρισμό. Από τη σύγκριση του μεταγραφομικού προφίλ του μεταλλάγματος *sbd1* σε συνθήκες ελέγχου, με το αντίστοιχο του στελέχους φυσικού τύπου, προέκυψαν μόλις πέντε μετάγραφα με σημαντικές διαφοροποιήσεις στα επίπεδα έκφρασης τους (differential expression adjusted $P < 0.05$), συγκεκριμένα η έκφραση τριών είχε αυξηθεί ενώ για δύο είχε μειωθεί (Εικόνα 40). Η εφαρμογή 2 mM H₂O₂ στο στέλεχος φυσικού τύπου του *C. reinhardtii* προκάλεσε εκτεταμένη αναπροσαρμογή του κυτταρικού μεταγραφώματος, καθώς τα επίπεδα έκφρασης 346 μεταγράφων αυξήθηκαν ενώ μειώθηκαν για 276 (Εικόνα 40). Αντίθετα, η επίδραση του H₂O₂ στο μεταγράφομα του στελέχους *sbd1* ήταν σημαντικά λιγότερο εκτεταμένη, καθώς μόνο δύο μετάγραφα εμφάνισαν διαφοροποίηση στα επίπεδα έκφρασης τους (Εικόνα 40).



Εικόνα 40 Αριθμός των DEGs ($P < 0.05$) ανάμεσα στους διαφορετικούς χειρισμούς ($n = 629$).

Κεφάλαιο 5ο: Αποκρίσεις του *C. reinhardtii* στην οξειδωτική καταπόνηση

Σύμφωνα με την ανάλυση κύριων συνιστωσών (principal component analysis - PCA) υπάρχει στενή ομαδοποίηση των μεταγραφωμάτων που μελετήθηκαν για τα διαφορετικά στελέχη και χειρισμούς (Εικόνα 41). Λαμβάνοντας υπόψιν τις συνιστώσες PC1 και PC2, που συνεισφέρουν αθροιστικά το 62.1% της συνολικής μεταβλητότητας, όλες οι επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν για κάθε χειρισμό ομαδοποιήθηκαν μεταξύ τους. Στον Ευκλείδειο χώρο που ορίζεται από τα PC1 και PC2, τα μετάγραφα του στελέχους φυσικού τύπου σε συνθήκες ελέγχου και τα αντίστοιχα μετά από έκθεση σε 2 mM H₂O₂ εμφάνισαν τη μεγαλύτερη απόσταση μεταξύ τους, ενώ το μεταγράφομα του στελέχους *sbd1* βρισκόταν σε ενδιάμεση θέση. Επίσης, τα μετάγραφα των δύο διαφορετικών χειρισμών του *sbd1* επικαλύπτονταν σε ένα βαθμό, δείχνοντας πως υπάρχουν κοινές μεταγραφομικές αποκρίσεις του στελέχους αυτού, παρουσία και απουσία καταπόνησης (Εικόνα 41). Από την άλλη, οι δύο χειρισμοί του στελέχους wt διαχωρίστηκαν πλήρως, πιθανώς λόγω της έντονης επίδρασης του H₂O₂ στο μεταγράφομα (Εικόνα 43).

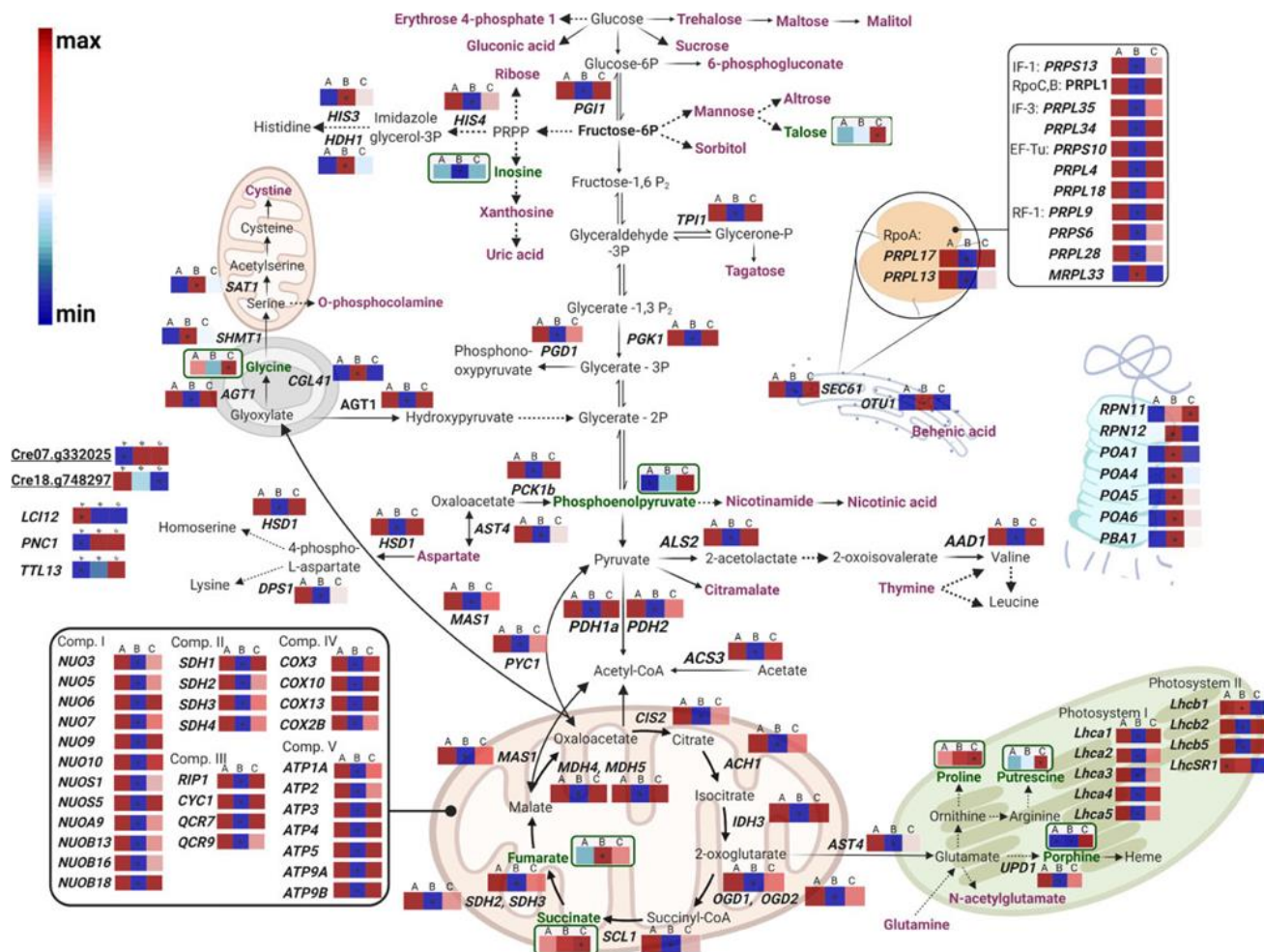


Εικόνα 41 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) των μεταγραφωμάτων των δύο στελεχών *C. reinhardtii* μετά την έκθεση σε 2 mM H₂O₂. Για κάθε χειρισμό οι βιολογικές επαναλήψεις απεικονίζονται ξεχωριστά (n=3). Η διακεκομμένη γραμμή χωρίζει το ανώτερο θετικό τεταρτημόριο του PC1.

Η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων ανάμεσα στις καλλιέργειες των δύο στελεχών του μικροφύκου *C. reinhardtii* που εκτέθηκαν σε 2 mM H₂O₂ και εκείνες που δεν εκτέθηκαν καθόλου στον παράγοντα καταπόνησης (0 ώρες), αποκάλυψε έναν εκτεταμένο μεταγραφομικό επαναπρογραμματισμό των κυττάρων (Εικόνα 42, Παράρτημα 5).

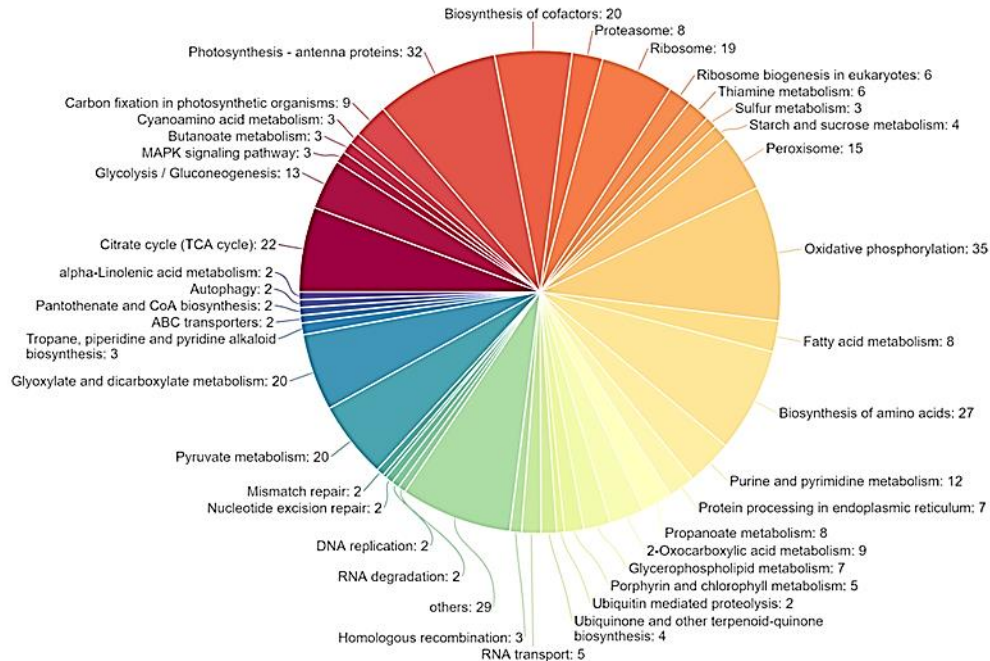
Συγκεκριμένα, από τη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων ανάμεσα στο στέλεχος φυσικού τύπου και το μετάλλαγμα *sbd1*, σε συνθήκες ελέγχου, προκύπτουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μόνο για πέντε μετάγραφα (Παράρτημα 5.1). Σε αυτά περιλαμβάνεται το γονίδιο *LCI12* (Cre19.g751047) που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη επαγόμενη από τη χαμηλή συγκέντρωση CO₂ (low-CO₂-inducible protein), καθώς και το γονίδιο *LHCSR1* (Cre08.g365900) που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη σχετιζόμενη με τις καταπονήσεις και συνδεόμενη με τις χλωροφύλλες α και β (stress-related chlorophyll a/b binding protein). Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αυτών αυξήθηκαν κατά 1- και 1.6-φορές, αντίστοιχα. Αντιθέτως, τα επίπεδα έκφρασης των νικοτιναμιδάση *PNC1* (Cre02.g081350), λιγάση τουμπουλίνης τυροσίνης (tubulin tyrosine ligase) *TTL13* (Cre16.g652300) και Cre07.g332025 με άγνωστη έως τώρα λειτουργία, βρέθηκαν σημαντικά μειωμένα.

Κεφάλαιο 5ο: Αποκρίσεις του *C. reinhardtii* στην οξειδωτική καταπόνηση



Εικόνα 42 Συνολική επίδραση του H_2O_2 στο μεταγράφομα και το μεταβόλωμα των στελεχών wt και *sbd1* του *C. reinhardtii*. Απεικόνιση των μεταβολικών μονοπατιών που περιλαμβάνουν γονίδια ($n=3$ ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις, $P<0.05$) ή μεταβολίτες ($n=6$, τρεις ανεξάρτητες βιολογικές και δύο τεχνικές επαναλήψεις στην κάθε μία, $P<0.05$) που επηρεάζονται σημαντικά. Τα γονίδια που προσδιορίστηκαν σε αυτή τη μελέτη εμφανίζονται με μαύρο χρώμα. Οι μεταβολίτες που εμφανίζονται με πράσινο χρώμα και χάρτη θερμότητας (heat map) έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, ενώ όσοι εμφανίζονται με μοβ χρώμα εκφράστηκαν σε μεμονωμένους χειρισμούς. Οι μεταβολίτες με μαύρο χρώμα δεν προσδιορίστηκαν σε αυτή τη μελέτη. Οι θερμικοί χάρτες απεικονίζουν τις αλλαγές στα σχετικά επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων και των μεταβολιτών. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώνονται με αστερίσκο. Τα γράμματα πάνω από τους θερμικούς χάρτες υποδηλώνουν: (A) σχετικά επίπεδα μεταγράφων ή μεταβολιτών του στελέχους *sbd1* συγκρινόμενα με το στέλεχος wt, όταν αναπτύχθηκαν σε συνθήκες ελέγχου (con: *sbd1*/wt). (B) Σχετικά επίπεδα μεταγράφων ή μεταβολιτών του στελέχους wt του *C. reinhardtii* όταν αναπτύχθηκε παρουσία 2 mM H_2O_2 για 6 ώρες, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα σε συνθήκες ελέγχου (wt: 2 mM H_2O_2 /con). (C) Σχετικά επίπεδα μεταγράφων ή μεταβολιτών του στελέχους *sbd1* του *C. reinhardtii* όταν αναπτύχθηκε παρουσία 2 mM H_2O_2 για 6 ώρες, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα σε συνθήκες ελέγχου (*sbd1*: 2 mM H_2O_2 /con).

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η επαγόμενη από H₂O₂ οξειδωτική καταπόνηση οδήγησε σε εκτεταμένο επαναπρογραμματισμό της μεταγραφομικής απόκρισης του στελέχους φυσικού τύπου του *C. reinhardtii*, καθώς τα επίπεδα έκφρασης 622 γονιδίων τροποποιήθηκαν σημαντικά, συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα σε συνθήκες ελέγχου (Εικόνα 40, Εικόνα 43, Παράρτημα 5.2). Από αυτά, 346 εμφάνισαν αύξηση στην έκφραση τους και 276 μείωση.



Εικόνα 43 Ταξινόμηση σύμφωνα με τη βάση δεδομένων KEGG pathway των λειτουργιών των DEGs του στελέχους φυσικού τύπου μετά από έκθεση σε 2 mM H₂O₂ για 6 ώρες.

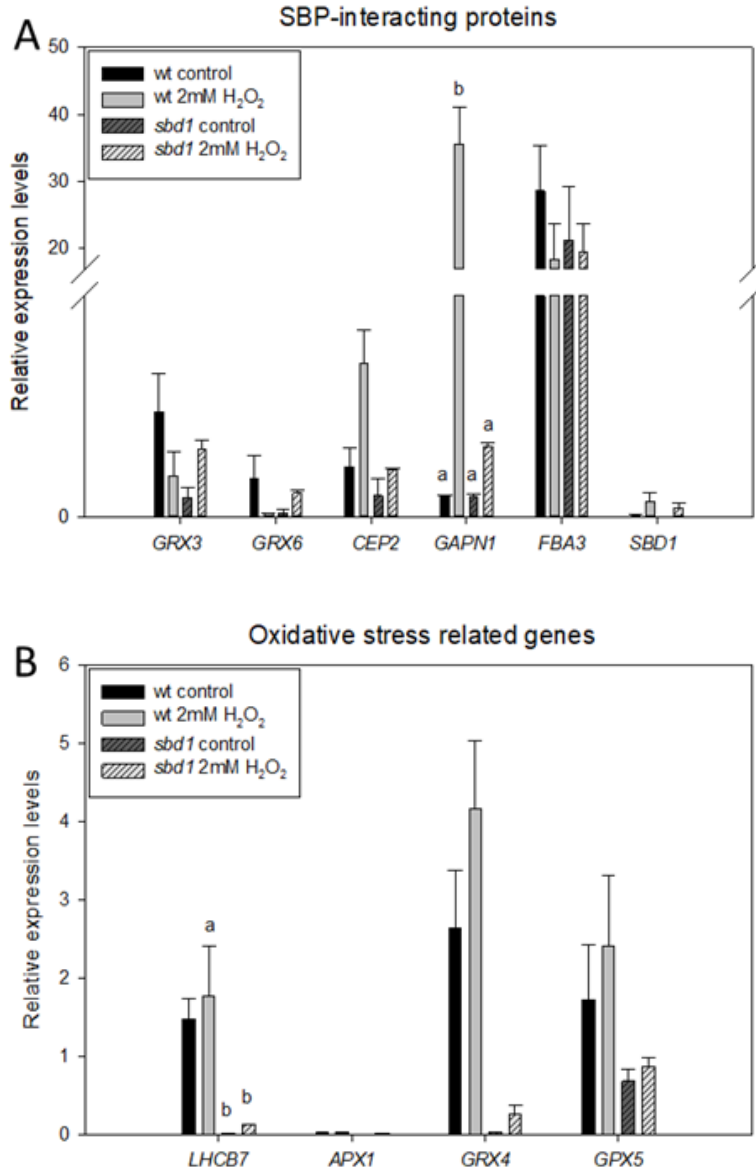
Ανάμεσα στα γονίδια που εμφάνισαν αυξημένη έκφραση βρίσκονται μια haloperoxidase-like πρωτεΐνη (Cre03.g177300), η εξπανσίνη A1 (Cre04.g226750), μία chaperonin-like RbcX πρωτεΐνη (CGL41), μία heat shock πρωτεΐνη (HSP22F) καθώς και μια ubiquitin fusion degradation πρωτεΐνη (Cre03.g179100). Επίσης, αύξηση εμφάνισε η έκφραση αρκετών γονιδίων που σχετίζονται με τις λειτουργίες του πρωτεασώματος και των υπεροξειδωμάτων. Στα γονίδια των οποίων τα επίπεδα έκφρασης μειώθηκαν ανήκουν το *MAS1* που κωδικοποιεί για τη μαλική συνθάση (malate synthase), μια πρωτεΐνη που συμμετέχει στη βιογένεση των ριβοσωμάτων (Cre10.g459600), το γονίδιο *ACS3* που κωδικοποιεί για την συνθάση/λιγάση του ακετυλοσυνενζύμου A (acetyl-CoA

Κεφάλαιο 5ο: Αποκρίσεις του *C. reinhardtii* στην οξειδωτική καταπόνηση

synthetase/ligase) καθώς και μια μιτοχονδριακή ATP συνθάση (ATP synthase, *ATP1A*). Ακόμα, γονίδια που σχετίζονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση, τη φωτοσύνθεση και τη σύνθεση πρωτεϊνών εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης. Συνολικά, παρατηρήθηκε η ύπαρξη ενός εκτεταμένου μηχανισμού μεταγραφομικής απόκρισης του *C. reinhardtii* στην οξειδωτική καταπόνηση.

Σε αντιδιαστολή με τις έντονες τροποποιήσεις στο μεταγράφομα του στελέχους φυσικού τύπου, μόνο δύο γονίδια μετέβαλαν σημαντικά την έκφραση τους στο στέλεχος *sbd1*, υποδεικνύοντας έναν εντελώς διαφορετικό μηχανισμό απόκρισης του στελέχους αυτού στην οξειδωτική καταπόνηση (Εικόνα 42, Παράρτημα 5.3). Συγκεκριμένα, το *RPN11* (Cre01.g011550) που κωδικοποιεί για μια από τις 26S υπομονάδες του πρωτεασώματος αύξησε τα επίπεδα έκφρασης του 3-φορές και το Cre18.g748297 είχε μειωμένη έκφραση κατά 3.2-φορές. Η ακριβής λειτουργία του τελευταίου δεν είναι ακόμα απολύτως ξεκαθαρισμένη, ωστόσο σύμφωνα με τη βάση δεδομένων Phytozome εμφανίζει ένα σημαντικό βαθμό ομοιότητας (similarity 37.9%, identity 27.5%, coverage 67.1%, and e-value 3e-70) με το Cre09.g404750 που κωδικοποιεί για μια scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) πρωτεΐνη.

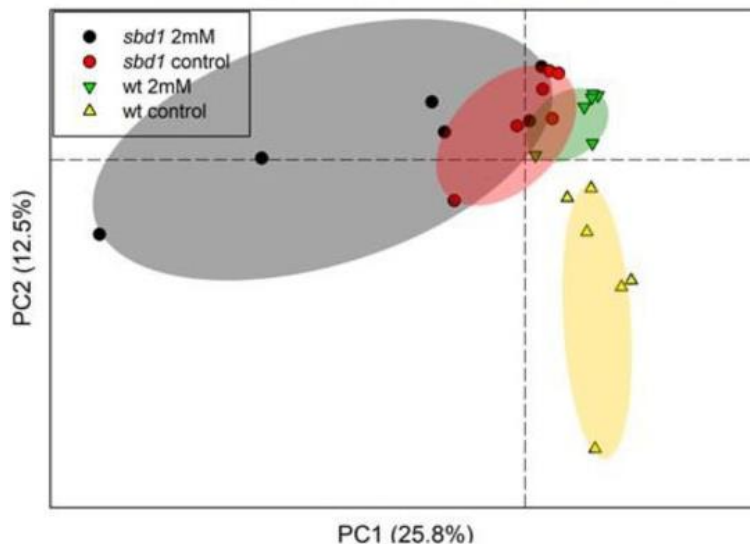
Για την περαιτέρω επαλήθευση της εικόνας που έδωσε η ανάλυση του μεταγραφώματος με RNAseq πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις RT-qPCR χρησιμοποιώντας δείγματα RNA από μια ανεξάρτητη επανάληψη της πειραματικής διαδικασίας. Συγκεκριμένα, μέσω της μεθόδου αυτής προσδιορίστηκαν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την SBP (SBP-interacting proteins) καθώς και γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση στην οξειδωτική καταπόνηση. Για όλα τα γονίδια που μελετήθηκαν, οι τάσεις στις αλλαγές των επιπέδων έκφρασης ήταν κοινές με αυτές που προσδιορίστηκαν μέσω του RNAseq, αν και οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ήταν λιγότερες (Παράρτημα 6). Συγκεκριμένα, το *CrGAPN1* εμφάνισε στατιστικά σημαντική αύξηση στην έκφραση του στο στέλεχος wt, μετά από έκθεση σε H₂O₂ (analysis of variance [ANOVA], Tukey's honestly significant difference [HSD] P<0.05, Εικόνα 44A). Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης του *CrLHCB7* ήταν σημαντικά διαφορετικά ανάμεσα στα δύο στελέχη του *C. reinhardtii*, υπό συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης (ANOVA, Tukey's HSD P<0.05, Εικόνα 44B).



Εικόνα 44 Σχετικά επίπεδα έκφρασης γονιδίων σύμφωνα με την ανάλυση RT-qPCR. (A) Επίπεδα έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για SBP-interacting proteins. (B) Επίπεδα έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση στην οξειδωτική καταπόνηση. Τα δεδομένα παρουσιάζονται σαν μέσος όρος \pm SE για τις 3 βιολογικές επαναλήψεις ($n=3$). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώνονται με διαφορετικούς λατινικούς χαρακτήρες (Tukey's HSD, $p<0.05$).

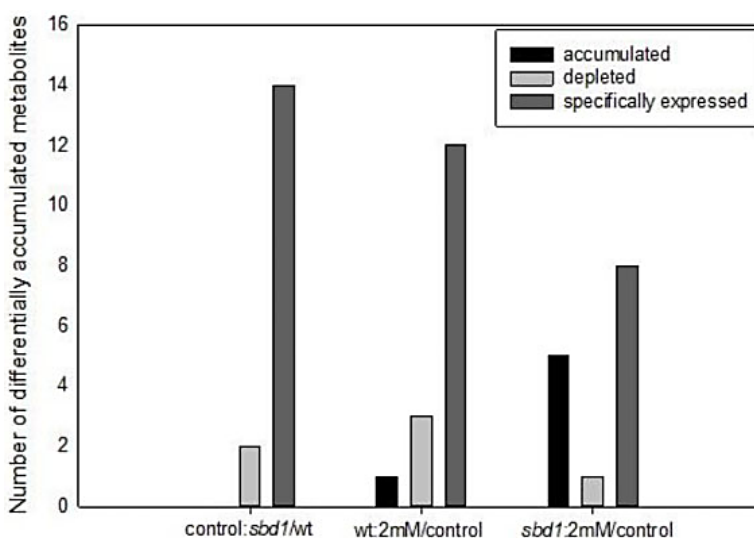
5.1.3 Συγκριτική μεταβολομική απόκριση των στελεχών *C. reinhardtii* στην επαγόμενη από H₂O₂ οξειδωτική καταπόνηση

Προκειμένου να κατανοηθούν περαιτέρω οι μεταβολικές προσαρμογές των δύο στελεχών *C. reinhardtii* στην αβιοτική καταπόνηση, εφαρμόστηκε μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση με χρήση της τεχνολογίας GC-MS. Η ανάλυση αυτή επέτρεψε τη σχετική ποσοτικοποίηση περισσότερων από 100 μεταβολιτών, για τα στελέχη και τους χειρισμούς που εφαρμόστηκαν, συμπεριλαμβανομένων αμινοξέων, σακχάρων, οργανικών οξέων και ενώσεων που περιέχουν άζωτο (Παράρτημα 7). Για να μελετηθεί η συνολική απόκριση του μεταβολισμού, πραγματοποιήθηκε partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). Λαμβάνοντας υπόψιν το 38.3% της συνολικής διακύμανσης των κύριων συμμετεχόντων, οι μεταβολίτες των δύο διαφορετικών χειρισμών του στελέχους φυσικού τύπου ήταν ομαδοποιημένοι ανά χειρισμό και υπήρχε σαφής διάκριση ανάμεσα στους διαφορετικούς χειρισμούς, υποδηλώνοντας και πάλι την έντονη απόκριση του στελέχους στην οξειδωτική καταπόνηση (Εικόνα 45). Από την άλλη, τα μεταβολομικά προφίλ του στελέχους *sbd1* για τους διαφορετικούς χειρισμούς επικαλύπτονταν (Εικόνα 45). Τα επίπεδα συσσώρευσης μεταβολιτών με στατιστικά σημαντικές διαφορές απεικονίζονται στην Εικόνα 42.



Εικόνα 45 PLS-DA ανάλυση των μεταβολιτών μετά την έκθεση σε 2 mM H₂O₂. Για κάθε χειρισμό οι βιολογικές και τεχνικές επαναλήψεις απεικονίζονται ξεχωριστά (n=6). Η διακεκομμένη γραμμή χωρίζει το ανώτερο θετικό τεταρτημόριο του PC1.

Από τη σύγκριση των μεταβολομικών προφίλ του στελέχους φυσικού τύπου και του μεταλλάγματος *sbd1*, όταν αυτά αναπτύχθηκαν σε συνθήκες ελέγχου, προέκυψαν 14 μεταβολίτες με συσσώρευση σε κάποιο από τα δύο στελέχη (Εικόνα 46). Από αυτούς, τα οργανικά οξέα ασπαρτικό και βεχενικό, τα σάκχαρα ταγατόζη και μαλτόζη, η μαλιτόλη καθώς και αζωτούχες ενώσεις όπως η ξανθοσίνη, το ουρικό και το νικοτινικό οξύ, συσσωρεύτηκαν σε σημαντικό βαθμό στο στέλεχος φυσικού τύπου. Αντιθέτως, το γλουκονικό οξύ, τα σάκχαρα ριβόζη και τρεχαλόζη, η σοβιτόλη και αζωτούχες ενώσεις όπως η θυμίνη και το νικοτιναμίδιο ανιχνεύθηκαν μόνο στο στέλεχος *sbd1* (Παράρτημα 5). Επίσης, στο στέλεχος φυσικού τύπου η πορφίνη που συμμετέχει στη βιοσύνθεση των χλωροφυλλών συσσωρεύθηκε 2.2-φορές και το φωσφοενολοπυροσταφυλικό 3.5-φορές. Κανένας μεταβολίτης δεν συσσωρεύθηκε στο στέλεχος *sbd1*, σε σύγκριση με το wt σε συνθήκες ελέγχου.



Εικόνα 46 Αριθμός μεταβολιτών των οποίων το περιεχόμενο επηρεάστηκε σε σημαντικό βαθμό από τους χειρισμούς με H_2O_2 στα δύο στελέχη *C. reinhardtii* (n=46).

Η πρόκληση οξειδωτικής καταπόνησης, μέσω εφαρμογής H_2O_2 , στο στέλεχος wt οδήγησε στην εξειδικευμένη συσσώρευση 12 μεταβολιτών (Εικόνα 46). Γλουταμίνη, κιτραμαλικό, διάφορα σάκχαρα (σακχαρόζη, μαλτόζη, αλτρόζη), αζωτούχες ενώσεις (ουρικό και νικοτινικό οξύ) και φωσφορικά άλατα (erythrose 4-phosphosphate, 6-φωσφογλουκονικό οξύ) εμφάνισαν συσσώρευση υπό συνθήκες ελέγχου. Από την άλλη, κυστεΐνη και σορβιτόλη ταυτοποιήθηκαν μόνο μετά από

Κεφάλαιο 5ο: Αποκρίσεις του *C. reinhardtii* στην οξειδωτική καταπόνηση

την έκθεση στο H₂O₂ (Παράρτημα 5). Επιπλέον, το φουμαρικό οξύ συσσωρεύθηκε σημαντικά σε συνθήκες καταπόνησης, ενώ τα επίπεδα πορφίνης και ινοσίνης μειώθηκαν σε σημαντικό βαθμό. Η μεταβολομική απόκριση του μεταλλάγματος *sbd1* στην οξειδωτική καταπόνηση εμφάνισε διαφορετικό μοτίβο. Το ασπαρτικό οξύ, η κυστεΐνη, η ταγατόζη, το νικοτινικό οξύ και η Ο-φωσφοχολαμίνη ταυτοποιήθηκαν μόνο παρουσία του παράγοντα καταπόνησης. Σάκχαρα όπως η φρουκτόζη, η σακχαρόζη και η αλτρόζη ανιχνεύθηκαν μόνο στις συνθήκες ελέγχου (Παράρτημα 7). Ακόμα, η εφαρμογή οξειδωτικής καταπόνησης οδήγησε στη συσσώρευση προλίνης, γλυκίνης, ηλεκτρικού, ταλόζης και πουτρεσκίνης ενώ τα επίπεδα κανενός μεταβολίτη δεν μειώθηκαν σημαντικά.

5.1.4 Συγκριτική λιπιδομική απόκριση του *C. reinhardtii* στην επαγόμενη από H₂O₂ οξειδωτική καταπόνηση

Τα λιπαρά οξέα των δύο στελεχών του μικροφύκου *C. reinhardtii*, τόσο σε συνθήκες ελέγχου όσο και μετά από έκθεση σε οξειδωτική καταπόνηση, απομονώθηκαν από 15 mg ξηρής βιομάζας και μετατράπηκαν σε FAMES. Στον Πίνακα 25 παρουσιάζεται η σύνθεση των προφίλ λιπαρών που προέκυψαν για κάθε στέλεχος και χειρισμό, καθώς και το ποσοστό των ακόρεστων (SFA), μονοακόρεστων (MUFA) και πολυακόρεστων (PUFA) λιπαρών οξέων.

Πίνακας 25 Προφίλ λιπαρών των στελεχών <i>C. reinhardtii</i> .								
	wt control		wt 2mM		<i>sbd1</i> control		<i>sbd1</i> 2mM	
	% content	SE	% content	SE	% content	SE	% content	SE
C16:0	20,8	1,1	22,2	1,3	22,3	1,4	24,9	0,7
C16:1	1,2	0,2	1,5	0,1	1,2	0,3	1,1	0,1
C16:2	1,7 ^a	0,1	1,3	0,1	1,5	0,2	1,1 ^b	0,1
C16:3	4,6	0,9	5,9	0,9	4,8	0,7	6,9	0,5
C16:4	11,0	1,0	11,8	0,9	11,7	1,3	13,6	0,6
C18:0	1,1 ^a	0,1	0,9	0,1	1,1 ^a	0,2	0,5 ^b	0,2
C18:1n9	12,2	0,9	12,8	0,8	12,1	1,0	11,9	0,9
C18:2 cis	3,0	0,3	2,6	0,2	2,8	0,5	2,3	0,1
C18:3n6	2,8	0,3	2,2	0,1	2,9	0,4	2,2	0,1
C18:3n3	15,4	1,6	12,4	1,1	15,6	1,9	11,8	0,8
SFA	21,9	1,1	23,0	1,3	23,4	1,4	25,4	0,6
MUFA	13,4	1,0	14,3	0,8	13,4	1,3	13,1	1,0
PUFA	38,5	0,6	36,3	0,7	39,2	1,4	37,9	0,2

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα πλέον άφθονα λιπαρά οξέα που συναντώνται στο *C. reinhardtii* είναι τα C16:0, C16:4, C18:1 και C18:3 (Pflaster et al., 2014; Siaux et al., 2011). Στην παρούσα διατριβή, τα λιπαρά οξέα που ταυτοποιήθηκαν βρίσκονται μέσα στο εύρος C16-C18, με κυρίαρχα τα C16:0, C16:4, C18:1n9 και C18:3n3 που αποτελούν το 60% του συνολικού περιεχομένου των κυττάρων σε FAMES. Άλλα λιπαρά οξέα που ταυτοποιήθηκαν είναι τα C16:1, C16:2, C16:3, C18:0, C18:2 και C18:3n6. Συνολικά, το περιεχόμενο των περισσότερων παρέμεινε σταθερό για τα στελέχη και τους χειρισμούς που μελετήθηκαν. Εξαίρεση αποτελεί το C18:0 (στεαρικό οξύ), το περιεχόμενο του οποίου μειώθηκε σημαντικά για το στέλεχος *sbd1* όταν αυτό εκτέθηκε σε H₂O₂. Επίσης, τα δύο στελέχη εμφάνισαν παρόμοια ποσοστά SFA, MUFA και PUFA, τόσο σε συνθήκες ελέγχου όσο και παρουσία οξειδωτικής καταπόνησης.

5.2 Συζήτηση

5.2.1 Η απουσία λειτουργικής πρωτεΐνης *CrSBD1* επηρεάζει την απόκριση του *C. reinhardtii* στην επαγόμενη από H_2O_2 οξειδωτική καταπόνηση

Όταν το μετάλλαγμα *C. reinhardtii sbd1* αναπτύσσεται σε συνθήκες ελέγχου, η απουσία λειτουργικής *CrSBD1* επηρεάζει την έκφραση μικρού αριθμού γονιδίων. Ανάμεσα τους, το Cre07.g332025 που δεν περιέχει κάποια γνωστή συντηρημένη περιοχή και δεν εμφανίζει σημαντική ομοιότητα με γνωστές πρωτεΐνες. Τα υπόλοιπα DEGs που ανιχνεύθηκαν σε αυτές τις συνθήκες ανάπτυξης σχετίζονται με την ενέργεια, τη φωτοσύνθεση και την πρωτεϊνική μεταφορά, λειτουργίες με μεγάλη σημασία για την κυτταρική προσαρμογή στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, το *TTL13* κωδικοποιεί για ένα από τα βασικά στοιχεία του κυτταροσκελετού που καταλύει τη βασιζόμενη σε ATP μετα-μεταφραστική προσθήκη τυροσίνης στο C-άκρο του γλουταμινικού οξέος μιας α -τουμπουλίνης (Szyk et al., 2011). Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της τουμπουλίνης είναι σημαντικές για τη σταθερότητα, τη δομή, την κυτταρική διαίρεση και την ενδοκυτταρική μεταφορά, ενώ η επιτυχής προσθήκη τυροσίνης σε αυτή είναι ζωτικής σημασίας για την κυτταρική ανάπτυξη και λειτουργία (Szyk et al., 2011). Για το λόγο αυτό, είναι πιθανό η παρατηρούμενη μείωση των επιπέδων έκφρασης του *TTL13* στο στέλεχος *sbd1* να ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη, όταν αυτό καλλιεργείται σε συνθήκες ελέγχου, ένα φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί και σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα (Kato et al., 2004). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν προκύψει από ερευνητική εργασία στον οργανισμό-μοντέλο *Caenorhabditis elegans*, όπου η απώλεια λειτουργίας (knockdown) του ομόλογου της SBP αυξάνει τη διάρκεια ζωής του οργανισμού (Köhnelein et al., 2020). Ενδιαφέρουσα παρατήρηση αποτελεί η μείωση των επιπέδων έκφρασης της νικοτιναμιδάσης (Nicotinamidase, PNC1/NAMase) στο στέλεχος *sbd1*, η οποία οδηγεί στη συσσώρευση NAM, ενώ το νικοτινικό οξύ βρίσκεται σε μη ανιχνεύσιμες ποσότητες. Στο μικροφύκος *C. reinhardtii* το NAD^+ μπορεί να συντίθεται από NAM, μέσω του μονοπατιού διάσωσης, στο οποίο η νικοτιναμιδάση μετατρέπει το NAM σε νικοτινικό οξύ και αμμωνία (Lin et al., 2010). Σαν αποτέλεσμα, είναι γνωστό ότι τα χαμηλά επίπεδα νικοτιναμιδάσης οδηγούν σε σημαντικές αλλοιώσεις στα οξειδοαναγωγικά και σηματοδοτικά μονοπάτια. Όπως και άλλα μικροφύκη και κυανοβακτήρια, το *C. reinhardtii* έχει αναπτύξει μηχανισμούς συμπύκνωσης του CO_2 (CCM), που συσσωρεύουν ανόργανο άνθρακα

μέσω ενεργής μεταφοράς CO_2 και HCO_3^- (Vance & Spalding, 2005), με απώτερο στόχο την αύξηση της ενεργότητας καρβοξυλάσης της Rubisco και την παράλληλη μείωση της ενεργότητας οξυγενάσης της (Kono & Spalding, 2020; Vance & Spalding, 2005). Σε αυτό το πλαίσιο, η αύξηση των επιπέδων έκφρασης που παρατηρήθηκε για το γονίδιο *LC112* μπορεί να αποτελεί πιθανή σύνδεση του *CrSBD1* με τη ρύθμιση του CCM, επιδρώντας στην απόδοση της καθήλωσης άνθρακα (carbon fixation) μέσω της φωτοσύνθεσης (Perozeni et al., 2020). Επίσης, τα μικροφύκη προκειμένου να αντιμετωπίσουν τη φωτο-φθορά (photodamage) έχουν αναπτύξει ένα μη φωτοχημικό (nonphotochemical quenching, NPQ) μηχανισμό στον οποίο η περίσσεια ενέργεια του φωτός διαχέεται ως θερμότητα, περιορίζοντας την παραγωγή ROS και επομένως, τις κυτταρικές βλάβες (Nawrocki et al., 2020). Ο μηχανισμός αυτός ενεργοποιείται από την κινητοποίηση των LHCSR1 και LHCSR3 στα θυλακοειδή (Perozeni et al., 2020). Αυτές οι NPQ υπομονάδες πιθανώς ρυθμίζονται από τις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, ωστόσο απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για το συνολικό χαρακτηρισμό της ρύθμισης τους (Perozeni et al., 2020). Στο *A. thaliana* η SBP1 έχει συνδεθεί με τις φωτοσυνθετικές λειτουργίες καθώς εμφανίζει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με τις υπομονάδες PSAE1 και PNSL2 του φωτοσυστήματος (Agalou et al., 2006). Αυτή η συσχέτιση ενισχύεται περαιτέρω από την παρατηρούμενη μείωση των ενδιάμεσων πορφυρίνης που μπορούν να λειτουργήσουν ως σήματα ρύθμισης της φωτοσύνθεσης (Tran et al., 2019). Αντίστοιχη εικόνα, χωρίς σημαντικές διαφοροποιήσεις ανάμεσα στα δύο στελέχη, προκύπτει και από τη σύγκριση των λιποδωμικών τους προφίλ μετά από ανάπτυξη σε συνθήκες ελέγχου.

Σε αντίθεση με τις στοχευμένες διαφορές που παρατηρήθηκαν στο μεταγράφομα και το μεταβόλομα των στελεχών wt και *sbd1* όταν αυτά αναπτύχθηκαν σε συνθήκες ελέγχου, η έκθεση σε H_2O_2 οδήγησε σε έντονες μεταγραφομικές διαφοροποιήσεις των δύο στελεχών. Η απόκριση του στελέχους φυσικού τύπου του *C. reinhardtii* στην οξειδωτική καταπόνηση περιλάμβανε τη σημαντική τροποποίηση στα επίπεδα έκφρασης 622 γονιδίων, υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για πολύπλευρη μοριακή και βιοχημική διαδικασία. Ανάμεσα στα DEGs των οποίων τα επίπεδα έκφρασης αυξήθηκαν περιλαμβάνονται αρκετά που κωδικοποιούν για υπομονάδες του πρωτεασώματος καθώς και για πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην ουβικουιτινίωση. Συνεπώς η οξειδωτική καταπόνηση έχει ξεκάθαρη επίδραση στην πρωτεϊνική αποικοδόμηση και

Κεφάλαιο 5ο: Αποκρίσεις του *C. reinhardtii* στην οξειδωτική καταπόνηση

ανακύκλωση (Ma et al., 2020). Επίσης, ένα καλά χαρακτηρισμένο αποτέλεσμα της έκθεσης σε H_2O_2 , που παρατηρήθηκε και στην παρούσα διατριβή, είναι η αύξηση της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες-συναδούς (chaperons), heat-sock πρωτεΐνες και άλλες σχετιζόμενες με καταπονήσεις πρωτεΐνες (Vandenbroucke et al., 2008). Παράλληλα, η αύξηση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τα υπεροξεισωμάτια (peroxisome-associated transcripts), όπως τα *CGL41* και *SHMT1*, υπογραμμίζει τον κεντρικό ρόλο που έχουν τα συγκεκριμένα υποκυτταρικά οργανίδια στην αποτοξίνωση από τις ROS και τη σηματοδότηση (Kao et al., 2018).

Η επαγωγή οξειδωτικής καταπόνησης είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων έκφρασης DEGs που κωδικοποιούν πολυπεπίδια σχετιζόμενα με το ριβόσωμα, οδηγώντας τα κύτταρα σε μια τελείως διαφορετική χρήση των πρωτεϊνών με συνολική αναδιαμόρφωση ή αποικοδόμηση των οξειδωμένων πρωτεϊνών και ταυτόχρονη μείωση της πρωτεϊνοσύνθεσης (Blaby et al., 2015). Ακόμα, η παρατηρούμενη μείωση των επιπέδων των mRNAs που κωδικοποιούν για τα φωτοσυστήματα I και II, σε συνδυασμό με τα μειωμένα επίπεδα πορφίνης από την ανάλυση GC-MS, συμφωνούν με τον αναμενόμενο περιορισμό στο ρυθμό φωτοσύνθεσης ως αποτέλεσμα της καταπόνησης (Pillai et al., 2014). Επιπλέον, αρκετά γονίδια που συμμετέχουν στη γλυκόλυση και τον κύκλο TCA βρίσκονται ανάμεσα στα DEGs των οποίων η έκφραση μειώθηκε. Συνολικά, οι παραπάνω παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η επαγόμενη με H_2O_2 οξειδωτική καταπόνηση προκαλεί μια γενικότερη μείωση του κυτταρικού μεταβολισμού, παρατήρηση σύμφωνη και με προηγούμενες εργασίες σε μικροφύκη (Blaby et al., 2015). Τέλος, σύμφωνα με τα δεδομένα μας και τη σχετική βιβλιογραφία, το ενεργειακό περιεχόμενο των κυττάρων του *C. reinhardtii* μειώνεται υπό συνθήκες καταπόνησης (Pillai et al., 2014).

Αξιοσημείωτο είναι ότι η ανάλυσή μας δεν αποκάλυψε ουσιαστικά καμία σημαντική μεταγραφομική αλλαγή στο στέλεχος *sbd1* όταν αναπτύχθηκε παρουσία H_2O_2 , καθώς εντοπίστηκαν μόνο δύο DEGs με στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης τους. Αυτά ήταν το *RPN11* (Cre01.g011550), που κωδικοποιεί για την από-ουβικουιτινάση (deubiquitinase) του ρυθμιστικού σωματιδίου 19S του συμπλέγματος πρωτεασώματος 26S (Schmidt et al., 2005) και το Cre18.g748297 με άγνωστη ακόμα λειτουργία. Μια κυτταρική απόκριση στην οξειδωτική καταπόνηση, συντηρημένη ανάμεσα στους ευκαρυωτικούς

οργανισμούς, είναι η αποσυναρμολόγηση του συμπλέγματος πρωτεασώματος 26S (X. Wang et al., 2010). Υπό ήπιες συνθήκες καταπόνησης η ενεργότητα του 26S πρωτεασώματος αυξάνεται προκειμένου να προστατευθούν τα κύτταρα από την οξειδωτική φθορά (Grune et al., 2004). Ωστόσο, όταν η καταπόνηση είναι οξεία ή μεγάλης διάρκειας, το σύμπλεγμα 26S αποσυναρμολογείται σε σωματίδια πυρήνα 20S και 19S, με επακόλουθη μείωση της δραστηριότητας 26S. Στα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, τα επίπεδα έκφρασης του *RPN11*, ως μέρους του συμπλέγματος 26S, αυξήθηκαν μετά την έκθεση του *sbd1* σε 2 mM H₂O₂, δείχνοντας ότι επρόκειτο για ήπια για το μικροφύκος καταπόνηση. Αντιθέτως, το στέλεχος wt αποκρίθηκε στην ίδια συνθήκη με την επαγωγή της έκφρασης συστατικών των σωματιδίων πυρήνα 20S, δείχνοντας προσαρμογή σε έντονη καταπόνηση. Παρόμοιος συσχετισμός των SBPs με το πρωτεάσωμα έχει αναφερθεί και για τη *hSP56* η οποία έχει ρόλο στα μονοπάτια ουβικουιτινίωσης και από-ουβικουιτινίωσης (Jeong et al., 2009). Σχετικά με τη μείωση των επιπέδων του Cre18.g748297, η παρατήρηση αυτή είναι σύμφωνη με αντίστοιχες αναφορές στη βάση δεδομένων Phytozome και πιθανά να ρυθμίζεται μέσω των miRNAs (Chung et al., 2017). Μετά από αναλυτική αναζήτηση στη Phytozome προέκυψε ότι το παραπάνω γονίδιο εμφανίζει ομοιότητα 37.9% (identity 27.5%, coverage 61.1%, e-value 3e-70) με το Cre09.g404750 το οποίο κωδικοποιεί για μια SRCR πρωτεΐνη. Οι πρωτεΐνες αυτές συναντώνται αποκλειστικά στην κυτταρική μεμβράνη ευκαρυωτών και συμμετέχουν στην πρόσδεση συγκεκριμένων μορίων, στην αναγνώριση μοριακών μοτίβων που σχετίζονται με παθογόνα και στην ενδοκυτταρική μεταφορά (Sun et al., 2020). Μελέτες έχουν δείξει ότι η απουσία υποδοχέα CD36 σε ποντίκια οδηγεί σε υψηλό βαθμό προστασίας έναντι της αθηροσκλήρωσης (Kuchibhotla et al., 2008), μιας ασθένειας που σχετίζεται άμεσα με την οξειδωτική καταπόνηση (Singh & Jialal, 2006). Μαζί, αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν την πιθανή συσχέτιση της απουσίας *CrSBD1* με την επιτυχή διαχείριση της οξειδωτικής καταπόνησης μέσω της μείωσης της έκφρασης των συγκεκριμένων υποδοχέων.

Όπως έχει αναφερθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία, μία από τις κύριες συνέπειες της οξειδωτικής καταπόνησης είναι η συνολική μείωση του κυτταρικού μεταβολισμού που σχετίζεται με την παραγωγή ενέργειας (Du et al., 2021; Liang et al., 2019). Σε συμφωνία με αυτές τις αναφορές, το περιεχόμενο αρκετών σακχάρων που μπορούν να τροφοδοτήσουν τον ενεργειακό μεταβολισμό

Κεφάλαιο 5ο: Αποκρίσεις του *C. reinhardtii* στην οξειδωτική καταπόνηση

μέσω της γλυκόλυσης, όπως η σακχαρόζη, η αλτρόζη και η μαλτόζη, μειώθηκε σε σημαντικό βαθμό στο στέλεχος wt. Στο μετάλλαγμα *sbd1* το περιεχόμενο σακχαρόζης και αλτρόζης μειώθηκε ενώ η ταγατόζη και η ταλόζη αύξησαν το περιεχόμενό τους. Επίσης, σχετικά με τον κύκλο TCA, τα επίπεδα ηλεκτρικού και φουμαρικού ανιχνεύθηκαν αυξημένα και στα δύο στελέχη σε συνθήκες καταπόνησης, δείχνοντας μια πιθανή επιβράδυνση του κύκλου, σύμφωνη και με τα αποτελέσματα από την ανάλυση RNAseq. Παρόμοια αναφορά υπάρχει ως απόκριση του *A. thaliana* στην οξειδωτική καταπόνηση όπου η μεταβολομική ανάλυση αποκάλυψε σημαντικές αυξήσεις του φουμαρικού και του ηλεκτρικού μετά από βραχυπρόθεσμη έκθεση σε DTT (Kolbe et al., 2006). Επιπροσθέτως, η μεταβολομική ανάλυση του στελέχους φυσικού τύπου ανέδειξε σημαντικές μειώσεις στο περιεχόμενο του ουρικού οξέος, της ξανθίνης και της ινοσίνης. Πρόκειται για μεταβολίτες που είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στο μεταβολισμό νουκλεοτιδίων πουρίνης (Stasolla et al., 2003). Ενώ η εμπλοκή των πουρινών στην απόκριση σε καταπονήσεις δεν είναι σαφής, το περιεχόμενο κανενός από τους παραπάνω μεταβολίτες δεν επηρεάστηκε σημαντικά στο *sbd1*, υπογραμμίζοντας περαιτέρω την προτεινόμενη μείωση της έντασης των κυτταρικών αποκρίσεων του στελέχους αυτού στην οξειδωτική καταπόνηση. Αρκετά αμινοξέα και πολυαμίνες έχουν επίσης συνδεθεί με αποκρίσεις σε αβιοτικές καταπονήσεις, συμπεριλαμβανομένης της προλίνης, της γλυκίνης και της πουτρεσκίνης (Qu et al., 2021). Ειδικά η συσσώρευση γλυκίνης θα μπορούσε να αποτελεί ένδειξη της επιταχυνόμενης φωτοαναπνευστικής δραστηριότητας, σε μια προσπάθεια να παραχθεί η ενέργεια που απαιτείται για τη βιοσύνθεση μεταβολιτών που σχετίζονται με την καταπόνηση (Qu et al., 2021; Slaveykova et al., 2021). Είναι ενδιαφέρον ότι η περιεκτικότητα αυτών των μεταβολιτών βρέθηκε σημαντικά αυξημένη στο μετάλλαγμα *sbd1* μετά από έκθεση σε H₂O₂. Η συσσώρευση αυτή θα μπορούσε επίσης να συμβάλει στην αυξημένη ανοχή του στελέχους *sbd1* στην οξειδωτική καταπόνηση, αν και οι ακριβείς μοριακοί και βιοχημικοί μηχανισμοί που πιθανώς συνδέουν τη CrSBD1 με τη βιοσύνθεση αυτών των ενώσεων δεν έχουν ακόμα αποσαφινιστεί. Επίσης, στο μετάλλαγμα *sbd1* παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων στεαρικού οξέος, σαν απόκριση στην οξειδωτική καταπόνηση. Το κορεσμένο στεαρικό οξύ χρησιμοποιείται κατά τη βιοσύνθεση των ακόρεστων ω-3 λιπαρών οξέων (Rismani & Shariati, 2017), μια διαδικασία που έχει δειχθεί ότι αποτελεί κυτταρική απόκριση στην οξειδωτική καταπόνηση (Gutierrez et al., 1998).

5.2.2 Η CrSBD1 δείχνει ένα συντηρημένο ρόλο των μελών της οικογένειας SBP ως ρυθμιστές των αποκρίσεων σε καταπονήσεις, στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς

Κατά τα τελευταία χρόνια, έχουν συσσωρευτεί αρκετά στοιχεία σχετικά με τη φυσιολογική και μοριακή λειτουργία των πρωτεϊνών της οικογένειας SBP και έχει επισημανθεί η πιθανή επίδρασή τους στις αποκρίσεις διαφόρων οργανισμών σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Στα φυτά *A. thaliana*, *Theobroma cacao* (κακάο) και *Triticum aestivum* (σιτάρι) έχει αποδειχθεί η σημασία των πιθανών ορθόλογων της SBP στην αποτοξίνωση και την ανθεκτικότητα στα στοιχεία Cd και Se (Agalou et al., 2005; Dutilleul et al., 2008; Martins Alves et al., 2019; F. Luo et al., 2020). Επίσης, έχει δειχθεί ότι στο *C. elegans* η SBP συνεισφέρει στην αύξηση της επιβίωσης υπό τοξικές συγκεντρώσεις σεληνίτη (selenite) (Köhnlein et al., 2020). Στο ρύζι (*Oryza sativa*) και το κακάο οι πρωτεΐνες της οικογένειας SBP διαδραματίζουν πιθανά προστατευτικό ρόλο απέναντι σε μολύνσεις από βακτήρια και μύκητες (Martins Alves et al., 2019). Μελέτες σχετικές με τον ανθρώπινο καρκίνο έχουν επίσης συνδέσει τις SBPs με την οξειδωτική καταπόνηση (Elhodaky & Diamond, 2018). Αν και ο ακριβής βιοχημικός ρόλος της παραμένει ακόμα άγνωστος, έχει υποστηριχθεί πως η SBP1 αποτελεί μέλος ενός εκτεταμένου δικτύου αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης το οποίο περιλαμβάνει πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον κυτταρικό οξειδοαναγωγικό έλεγχο, όπως οι GRXS14 και GRXS16 στο *Arabidopsis* (Valassakis et al., 2019), ενώ το ομόλογο της στον άνθρωπο αλληλεπιδρά με την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης 1 (glutathione peroxidase 1) (Fang et al., 2010). Ακόμα, η AtSBP1 αλληλεπιδρά με τη χλωροπλαστική φωσφολιπάση DALL3, μεσολαβώντας πιθανώς στη ρύθμιση του ιασμονικού οξέος, που αποτελεί σημαντική φυτοορμόνη απόκρισης σε καταπονήσεις, στην οποία συμμετέχει η DALL3 (Dervisi et al., 2020). Στον άνθρωπο, έχει αναφερθεί αλληλεπίδραση της SBP με την πρωτεΐνη von Hippel–Lindau η οποία με τη σειρά της αλληλεπιδρά με το ένζυμο από-ουβικουιτινίνωσης 1 (deubiquitinating enzyme 1) το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της πρωτεϊνικής αποικοδόμησης (Jeong et al., 2009). Η αναφορά αυτή συμφωνεί και με προηγούμενη εργασία σύμφωνα με την οποία η SBP1 έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με την parain-like πρωτεάση RD19c (Agalou et al., 2006).

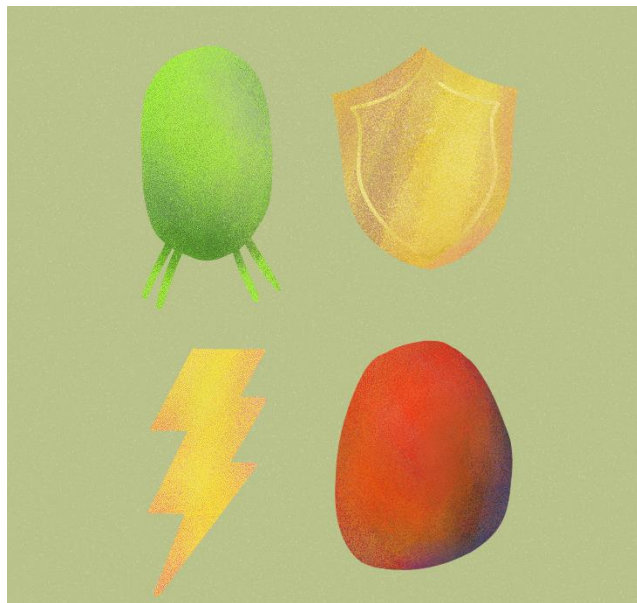
Συμπερασματικά, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής η CrSBD1 αποτελεί μέλος της ευρέως διαδεδομένης οικογένειας των SBP και εμπλέκεται στα αρχικά στάδια

Κεφάλαιο 5ο: Αποκρίσεις του *C. reinhardtii* στην οξειδωτική καταπόνηση

αίσθησης της οξειδοαναγωγής και στην ενεργοποίηση των επακόλουθων κυτταρικών αποκρίσεων, μέσω ενός συνόλου αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, η CrSBD1 ρυθμίζει ενεργά τις πολύπλοκες κυτταρικές μεταγραφικές και μεταβολικές προσαρμογές κατά την αίσθηση της οξειδωτικής καταπόνησης.

Παρά τις εκτεταμένες μεταβολές που προκάλεσε η οξειδωτική καταπόνηση στον κυτταρικό μηχανισμό του στελέχους φυσικού τύπου, το μεταλλάγμα *sbd1* έδειξε έναν εντελώς διαφορετικό τρόπο απόκρισης. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει πιθανή ανάμειξη της CrSBD1 στην αντίληψη και την απόκριση στην οξειδωτική καταπόνηση, με παράκαμψη των τοξικών συνεπειών του H₂O₂ και ταυτόχρονη αξιοποίηση των σηματοδοτικών του ιδιοτήτων. Τα αποτελέσματα αυτά αυξάνουν την πιθανότητα οι SBPs να συμμετέχουν σε πλήθος κυτταρικών διεργασιών που περιλαμβάνουν την ανίχνευση του H₂O₂ και την αξιοποίησή του για σηματοδότηση, πιθανώς ως μέλος ευρέως διατηρημένων πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων. Μελλοντική έρευνα με χρήση τόσο του μεταλλάγματος *sbd1* όσο και μεταλλαγμάτων για τις SBP-αλληλεπιδρώσεις πρωτεΐνες θα μπορούσε να βοηθήσει στην περαιτέρω διαλεύκανση του ακριβούς ρόλου της SBP στο κεντρικό σύστημα ρύθμισης της απόκρισης στις καταπονήσεις. Στην πραγματικότητα, η γνώση που αποκτήθηκε σχετικά με τη συμμετοχή της CrSBD1 στη ρύθμιση των αποκρίσεων σε καταπονήσεις στο *C. reinhardtii*, θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση για τον προσδιορισμό των φυσιολογικών και βιοχημικών ρόλων των μελών της οικογένειας SBP σε πολυκύτταρους οργανισμούς, όπως συνέβη για άλλες πολύπλοκες διαδικασίες, όπως η φωτοσύνθεση (Dent et al., 2001; Grossman, 2000; Minagawa & Tokutsu, 2015) και ο μεταβολισμός των υδατανθράκων (Hicks et al., 2001).

**Κεφάλαιο 6^ο: Κοινές και μοναδικές αποκρίσεις των μικροφυκών:
κλειδί στην περαιτέρω αξιοποίηση τους**



Τα τελευταία χρόνια οι αβιοτικές καταπονήσεις βρίσκονται όλο και περισσότερο στο προσκήνιο. Από τη μία η εξελισσόμενη κλιματική αλλαγή οδηγεί σε συχνότερες και εντονότερες καταπονήσεις των μικροφυκών στα φυσικά τους ενδιαίτηματα. Παράλληλα υπάρχουν αυξημένες ανάγκες και απαιτήσεις για τη βιομηχανική αξιοποίηση των μικροφυκών για την παραγωγή εμπορικών προϊόντων. Και στις δύο περιπτώσεις η απόκτηση γνώσεων για τους μηχανισμούς απόκρισης τους στην οξειδωτική καταπόνηση μπορεί να συμβάλει με καθοριστικό τρόπο. Μέσα σε αυτό το πλαίσιο, η παρούσα διδακτορική διατριβή αξιοποιεί κλασικές μεθόδους αλλά και σύγχρονες ομικές τεχνολογίες για τη μελέτη των μοριακών και βιοχημικών αποκρίσεων τριών ειδών μικροφυκών στην οξειδωτική καταπόνηση. Κρίνοντας από το σύνολο των δεδομένων που προέκυψαν, οι τεχνικές που επιλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν είναι κατάλληλες για τη σφαιρική και πλήρη προσέγγιση του αντικειμένου και μπορούν να αξιοποιηθούν και στο μέλλον για τη μελέτη της βιολογίας των μικροφυκών.

Σε επίπεδο αποτελεσμάτων, επιβεβαιώθηκε και με την παρούσα διατριβή η ποικιλομορφία των μικροφυκών και η τεράστια ποικιλότητα διαφορετικών μηχανισμών απόκρισης στις αβιοτικές καταπονήσεις που διαθέτουν ανά είδος. Κοινό χαρακτηριστικό των τριών ειδών που μελετήθηκαν, *T. chuii*, *C. variabilis* και *C. reinhardtii*, είναι η ικανότητα τους να αντιλαμβάνονται άμεσα την καταπόνηση και να αποκρίνονται σε αυτή εντός της πρώτης ώρας, επάγοντας σημαντικές τροποποιήσεις στα επίπεδα έκφρασης πλήθους γονιδίων τους. Ωστόσο, παρατεταμένη καταπόνηση υπερβαίνει τα όρια των αντοχών και των δυνατοτήτων τους, επάγει λιγότερο έντονες τροποποιήσεις στο μεταγράφομα τους και οδηγεί μεταξύ άλλων στην κατάρρευση της φωτοσυνθετικής τους ικανότητας και τελικά στον κυτταρικό θάνατο. Επίσης, τα δύο είδη γλυκού νερού που μελετήθηκαν έδειξαν αντοχή σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις H₂O₂ σε σχέση με το θαλάσσιο *T. chuii*, παρατήρηση που μένει να επαληθευθεί και με άλλα στελέχη. Παρόμοια παρατήρηση έχει καταγραφεί και σε άλλες μελέτες με την έκθεση σε μικροπλαστικά να είναι ο παράγοντας καταπόνησης (Xu et al., 2023).

Τα τρία είδη μικροφυκών που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή εμφάνισαν ένα σύνολο κοινών αποκρίσεων στη βραχυπρόθεσμη οξειδωτική καταπόνηση. Τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για υπομονάδες του πρωτεασώματος καθώς και για πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην ουβικουιτινίωση αυξήθηκαν, υπογραμμίζοντας τη συντηρημένη επίδραση

της καταπόνησης στην πρωτεϊνική αποικοδόμηση και ανακύκλωση (Ma et al., 2020). Επίσης, κοινή απόκριση αποτέλεσε η αύξηση της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες-συνόδους, heat-shock πρωτεΐνες και άλλες σχετιζόμενες με καταπονήσεις πρωτεΐνες (Vandenbroucke et al., 2008) αλλά και γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των υπεροξεισωματίων. Αύξηση παρατηρήθηκε και στο περιεχόμενο πολυαμινών με αντιξειδωτική δράση, όπως η πουτρεσκίνη. Παράλληλα, η βραχυπρόθεσμη έκθεση σε οξειδωτική καταπόνηση οδήγησε σε μείωση της φωτοσυνθετικής ικανότητας όλων των μικρόφυκων και μείωση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τα φωτοσυστήματα I και II. Συνολικά, παρατηρήθηκε μια γενική μείωση του ενεργειακού περιεχομένου και του κυτταρικού μεταβολισμού, παρατήρηση σύμφωνη και με προηγούμενες εργασίες σε μικροφύκη (Blaby et al., 2015).

Από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν εντοπίστηκαν και διαφορές στους μηχανισμούς απόκρισης στην οξειδωτική καταπόνηση των υπό μελέτη μικροφυκών. Συγκεκριμένα, όταν τα *T. chuii* και *C. reinhardtii* εκτέθηκαν στον οξειδωτικό παράγοντα προκλήθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης DEGs που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση των ριβοσωμάτων, κάτι που δεν παρατηρήθηκε στο *C. variabilis*. Η παρατήρηση αυτή θα μπορούσε να σχετίζεται με τη διττή χρήση των ριβοσωμικών πρωτεϊνών, από τη μία για το σχηματισμό των λειτουργικών ριβοσωμάτων και από την άλλη ως απόκριση σε αβιοτικές καταπονήσεις (Kalinina et al., 2018; Robles & Quesada, 2022; Xiong et al., 2021). Επιπλέον, στα *T. chuii* και *C. reinhardtii* παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση αρκετών γονιδίων που συμμετέχουν στην γλυκόλυση ενώ στο *C. variabilis* το PK αύξησε τα επίπεδα έκφρασης του. Συσσώρευση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) με τρόπο ανάλογο της χρονικής διάρκειας της καταπόνησης παρατηρήθηκε μόνο στο *C. variabilis*. Ακόμα, μόνο στο στέλεχος φυσικού τύπου του *C. reinhardtii* παρατηρήθηκε μείωση του κύκλου TCA σε επίπεδο μεταγράφων και μεταβολιτών ενώ το *T. chuii* ήταν το μόνο που εμφάνισε συσσώρευση γλυκόζης σαν απόκριση στην οξειδωτική καταπόνηση.

Από τα παραπάνω γίνεται εμφανές ότι ανάμεσα στα διαφορετικά γένη μικροφυκών υπάρχουν τόσο κοινοί όσο και μη κοινοί μηχανισμοί απόκρισης στην οξειδωτική καταπόνηση. Η παρατήρηση αυτή θα μπορούσε να βοηθήσει στην αξιοποίηση των μικροφυκών για την κατανόηση των κυτταρικών διεργασιών αλλά και την παραγωγή επιθυμητών μεταβολιτών υψηλής προστιθέμενης αξίας. Η επίτευξη των παραπάνω στόχων εμφανίζει μεγαλύτερες

πιθανότητες αν επιλεγούν τόσο το κατάλληλο μικροφύκος όσο και οι κατάλληλες συνθήκες καταπόνησης, που να επάγουν τα επιθυμητά μεταβολικά μονοπάτια και διεργασίες.

Τέλος, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το στέλεχος *sbd1* δεν έδειξε καμία έντονη μεταγραφομική αλλαγή όταν αναπτύχθηκε παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα. Συνεπώς, η SBP δείχνει να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αντίληψη και την απόκριση στην οξειδωτική καταπόνηση, με το *C. reinhardtii* να αποτελεί ιδανικό οργανισμό-μοντέλο για τη διαλεύκανση του ακριβούς ρόλου της.

Βιβλιογραφία



- Abu-Ghosh, S., Fixler, D., Dubinsky, Z., & Iluz, D. (2016). Flashing light in microalgae biotechnology. *Bioresource Technology*, *203*, 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.057>
- Adindla, S., Inampudi, K. K., & Guruprasad, L. (2007). Cell surface proteins in archaeal and bacterial genomes comprising “LVIVD”, “RIVW” and “LGxL” tandem sequence repeats are predicted to fold as β -propeller. *International Journal of Biological Macromolecules*, *41*(4), 454–468. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.06.004>
- Agalou, A., Roussis, A., & Spaink, H. P. (2005). The Arabidopsis selenium-binding protein confers tolerance to toxic levels of selenium. *Functional Plant Biology*, *32*(10), 881. <https://doi.org/10.1071/FP05090>
- Agalou, A., Spaink, H. P., & Roussis, A. (2006). Novel interaction of selenium-binding protein with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and fructose-bisphosphate aldolase of Arabidopsis thaliana. *Functional Plant Biology*, *33*(9), 847. <https://doi.org/10.1071/FP05312>
- Åkerfelt, M., Morimoto, R. I., & Sistonen, L. (2010). Heat shock factors: Integrators of cell stress, development and lifespan. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*(8), 545–555. <https://doi.org/10.1038/nrm2938>
- Alkhamis, Y., & Qin, J. G. (2016). Comparison of pigment and proximate compositions of *Tisochrysis lutea* in phototrophic and mixotrophic cultures. *Journal of Applied Phycology*, *28*(1), 35–42. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0599-0>
- Almeida, A. C., Gomes, T., Langford, K., Thomas, K. V., & Tollefsen, K. E. (2017). Oxidative stress in the algae *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to biocides. *Aquatic Toxicology*, *189*, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.05.014>
- Amin, S. A., Hmelo, L. R., Van Tol, H. M., Durham, B. P., Carlson, L. T., Heal, K. R., Morales, R. L., Berthiaume, C. T., Parker, M. S., Djunaedi, B., Ingalls, A. E., Parsek, M. R., Moran, M. A., & Armbrust, E. V. (2015). Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. *Nature*, *522*(7554), 98–101. <https://doi.org/10.1038/nature14488>
- Andersen, R. A. (Ed.). (2005). *Algal culturing techniques*. Elsevier/Academic Press.
- Araújo, W. L., Martins, A. O., Fernie, A. R., & Tohge, T. (2014). 2-Oxoglutarate: Linking TCA cycle function with amino acid, glucosinolate, flavonoid, alkaloid, and gibberellin biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00552>
- Arrigo, K. R. (2005). Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature*, *437*(7057), 349–355. <https://doi.org/10.1038/nature04159>
- Asensi-Fabado, M.-A., Amtmann, A., & Perrella, G. (2017). Plant responses to abiotic stress: The chromatin context of transcriptional regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, *1860*(1), 106–122. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.07.015>
- Banskota, A. H., Sperker, S., Stefanova, R., McGinn, P. J., & O’Leary, S. J. B. (2019). Antioxidant properties and lipid composition of selected microalgae. *Journal of Applied Phycology*, *31*(1), 309–318. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1523-1>

- Barone, M. E., Parkes, R., Herbert, H., McDonnell, A., Conlon, T., Aranyos, A., Fierli, D., Fleming, G. T. A., & Touzet, N. (2021). Comparative Response of Marine Microalgae to H₂O₂-Induced Oxidative Stress. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *193*(12), 4052–4067. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03690-x>
- Barros, A., Guerra, L. T., Simões, M., Santos, E., Fonseca, D., Silva, J., Costa, L., & Navalho, J. (2017). Mass balance analysis of carbon and nitrogen in industrial scale mixotrophic microalgae cultures. *Algal Research*, *21*, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.10.014>
- Barten, R., Kleisman, M., D'Ermo, G., Nijveen, H., Wijffels, R. H., & Barbosa, M. J. (2022). Short-term physiologic response of the green microalga *Picochlorum* sp. (BPE23) to supra-optimal temperature. *Scientific Reports*, *12*(1), 3290. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06954-6>
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, *25*(2), 207–210. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>
- Behera, B., Selvam S, M., & Paramasivan, B. (2022). Research trends and market opportunities of microalgal biorefinery technologies from circular bioeconomy perspectives. *Bioresourc Technology*, *351*, 127038. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127038>
- Benson, A. A. (n.d.). *Following the path of carbon in photosynthesis: A personal story*.
- Bhalamurugan, G. L., Valerie, O., & Mark, L. (2018). Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: A review. *Environmental Engineering Research*, *23*(3), 229–241. <https://doi.org/10.4491/eer.2017.220>
- Bhowmick, S., Mazumdar, A., Moulick, A., & Adam, V. (2020). Algal metabolites: An inevitable substitute for antibiotics. *Biotechnology Advances*, *43*, 107571. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107571>
- Blaby, I. K., Blaby-Haas, C. E., Pérez-Pérez, M. E., Schmollinger, S., Fitz-Gibbon, S., Lemaire, S. D., & Merchant, S. S. (2015). Genome-wide analysis on *Chlamydomonas reinhardtii* reveals the impact of hydrogen peroxide on protein stress responses and overlap with other stress transcriptomes. *The Plant Journal*, *84*(5), 974–988. <https://doi.org/10.1111/tpj.13053>
- Blanc, G., Duncan, G., Agarkova, I., Borodovsky, M., Gurnon, J., Kuo, A., Lindquist, E., Lucas, S., Pangilinan, J., Polle, J., Salamov, A., Terry, A., Yamada, T., Dunigan, D. D., Grigoriev, I. V., Claverie, J.-M., & Van Etten, J. L. (2010). The *Chlorella variabilis* NC64A Genome Reveals Adaptation to Photosymbiosis, Coevolution with Viruses, and Cryptic Sex. *The Plant Cell*, *22*(9), 2943–2955. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.076406>
- Blanken, W., Cuaresma, M., Wijffels, R. H., & Janssen, M. (2013). Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. *Algal Research*, *2*(4), 333–340. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.09.004>
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*(2), 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>

- Breuer, G., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B., & Wijffels, R. H. (2013). Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, *143*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.105>
- Brown, M. R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C., & Trenerry, C. (n.d.). *The vitamin content of microalgae used in aquaculture*.
- Cerezuela, R., Guardiola, F. A., Meseguer, J., & Esteban, M. Á. (2012). Enrichment of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) diet with microalgae: Effects on the immune system. *Fish Physiology and Biochemistry*, *38*(6), 1729–1739. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9670-9>
- Chandra, R., Iqbal, H. M. N., Vishal, G., Lee, H.-S., & Nagra, S. (2019). Algal biorefinery: A sustainable approach to valorize algal-based biomass towards multiple product recovery. *Bioresource Technology*, *278*, 346–359. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.104>
- Chen, M., Tang, H., Ma, H., Holland, T. C., Ng, K. Y. S., & Salley, S. O. (2011). Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, *102*(2), 1649–1655. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.062>
- Chen, S., Wang, L., Feng, W., Yuan, M., Li, J., Xu, H., Zheng, X., & Zhang, W. (2020). Sulfonamides-induced oxidative stress in freshwater microalga *Chlorella vulgaris*: Evaluation of growth, photosynthesis, antioxidants, ultrastructure, and nucleic acids. *Scientific Reports*, *10*(1), 8243. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65219-2>
- Cherkas, A., Holota, S., Mdzinarashvili, T., Gabbianelli, R., & Zarkovic, N. (2020). Glucose as a Major Antioxidant: When, What for and Why It Fails? *Antioxidants*, *9*(2), 140. <https://doi.org/10.3390/antiox9020140>
- Chew, K. W., Chia, S. R., Show, P. L., Yap, Y. J., Ling, T. C., & Chang, J.-S. (2018). Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *91*, 332–344. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.05.039>
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, *25*(3), 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- Cho, D.-H., Ramanan, R., Heo, J., Lee, J., Kim, B.-H., Oh, H.-M., & Kim, H.-S. (2015). Enhancing microalgal biomass productivity by engineering a microalgal–bacterial community. *Bioresource Technology*, *175*, 578–585. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.159>
- Cho, D.-H., Ramanan, R., Kim, B.-H., Lee, J., Kim, S., Yoo, C., Choi, G.-G., Oh, H.-M., & Kim, H.-S. (2013). Novel approach for the development of axenic microalgal cultures from environmental samples. *Journal of Phycology*, *49*(4), 802–810. <https://doi.org/10.1111/jpy.12091>
- Chuchird, N., Hiramatsu, S., Sugimoto, I., Fujie, M., Usami, S., & Yamada, T. (2001). Digestion of *Chlorella* Cells by Chlorovirus-encoded Polysaccharide Degrading Enzymes. *Microbes and Environments*, *16*(4), 206–212. <https://doi.org/10.1264/jsme2.2001.206>

- Chung, B. Y.-W., Deery, M. J., Groen, A. J., Howard, J., & Baulcombe, D. C. (2017). Endogenous miRNA in the green alga *Chlamydomonas* regulates gene expression through CDS-targeting. *Nature Plants*, *3*(10), 787–794. <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0024-6>
- Cirulis, J. T., Scott, J. A., & Ross, G. M. (2013). Management of oxidative stress by microalgae. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *91*(1), 15–21. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2012-0249>
- Cohen, Z., Khozin-Goldberg, I., Adlerstein, D., & Bigogno, C. (2000). The role of triacylglycerol as a reservoir of polyunsaturated fatty acids for the rapid production of chloroplastic lipids in certain microalgae. *Biochemical Society Transactions*, *28*.
- Colina, F., Amaral, J., Carbó, M., Pinto, G., Soares, A., Cañal, M. J., & Valledor, L. (2019). Genome-wide identification and characterization of CKIN/SnRK gene family in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Scientific Reports*, *9*(1), 350. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35625-8>
- Conceição, L. E. C., Yúfera, M., Makridis, P., Morais, S., & Dinis, M. T. (2010). Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research*, *41*(5), 613–640. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02242.x>
- Dai, J., Zheng, M., He, Y., Zhou, Y., Wang, M., & Chen, B. (2023). Real-time response counterattack strategy of tolerant microalgae *Chlorella vulgaris* MBFJNU-1 in original swine wastewater and free ammonia. *Bioresource Technology*, *377*, 128945. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128945>
- Darienko, T., & Pröschold, T. (2015). Genetic variability and taxonomic revision of the genus *Auxenochlorella* (Shihira et Krauss) Kalina et Puncocharova (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology*, *51*(2), 394–400. <https://doi.org/10.1111/jpy.12279>
- Darvehei, P., Bahri, P. A., & Moheimani, N. R. (2018). Model development for the growth of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *97*, 233–258. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.08.027>
- Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, *2*. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>
- Davletova, S., Rizhsky, L., Liang, H., Shengqiang, Z., Oliver, D. J., Coutu, J., Shulaev, V., Schlauch, K., & Mittler, R. (2005). Cytosolic Ascorbate Peroxidase 1 Is a Central Component of the Reactive Oxygen Gene Network of Arabidopsis. *The Plant Cell*, *17*(1), 268–281. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.026971>
- de Vree, J. H., Bosma, R., Janssen, M., Barbosa, M. J., & Wijffels, R. H. (2015). Comparison of four outdoor pilot-scale photobioreactors. *Biotechnology for Biofuels*, *8*(1), 215. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0400-2>
- Deng, R., & Chow, T.-J. (2010). Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*: Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*. *Cardiovascular Therapeutics*, *28*(4), e33–e45. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2010.00200.x>

- Dent, R. M., Han, M., & Niyogi, K. K. (2001). Functional genomics of plant photosynthesis in the fast lane using *Chlamydomonas reinhardtii*. *Trends in Plant Science*, 6(8), 364–371. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02018-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02018-0)
- Dervisi, I., Valassakis, C., Agalou, A., Papandreou, N., Podia, V., Haralampidis, K., Iconomidou, V. A., Kouvelis, V. N., Spaink, H. P., & Roussis, A. (2020). Investigation of the interaction of DAD1-LIKE LIPASE 3 (DALL3) with Selenium Binding Protein 1 (SBP1) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 291, 110357. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110357>
- Dourmap, C., Roque, S., Morin, A., Caubrière, D., Kerdiles, M., Béguin, K., Perdoux, R., Reynoud, N., Bourdet, L., Audebert, P.-A., Moullec, J. L., & Couée, I. (2020). Stress signalling dynamics of the mitochondrial electron transport chain and oxidative phosphorylation system in higher plants. *Annals of Botany*, 125(5), 721–736. <https://doi.org/10.1093/aob/mcz184>
- D'Souza, F. M. L. (n.d.). *Effects of monospeci^c and mixed-algae diets on survival, development and fatty acid composition of penaeid prawn (Penaeus spp.) larvae.*
- Du, F., Hu, C., Sun, X., Zhang, L., & Xu, N. (2021). Transcriptome analysis reveals the promoting effect of trisodium citrate on astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* under high light condition. *Aquaculture*, 543, 736978. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736978>
- Dutilleul, C., Jourdain, A., Bourguignon, J., & Hugouvieux, V. (2008). The Arabidopsis Putative Selenium-Binding Protein Family: Expression Study and Characterization of SBP1 as a Potential New Player in Cadmium Detoxification Processes. *Plant Physiology*, 147(1), 239–251. <https://doi.org/10.1104/pp.107.114033>
- Elhodaky, M., & Diamond, A. (2018). Selenium-Binding Protein 1 in Human Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3437. <https://doi.org/10.3390/ijms19113437>
- Eyice, Ö., Myronova, N., Pol, A., Carrión, O., Todd, J. D., Smith, T. J., Gurman, S. J., Cuthbertson, A., Mazard, S., Mennink-Kersten, M. A., Bugg, T. D., Andersson, K. K., Johnston, A. W., Op Den Camp, H. J., & Schäfer, H. (2018). Bacterial SBP56 identified as a Cu-dependent methanethiol oxidase widely distributed in the biosphere. *The ISME Journal*, 12(1), 145–160. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.148>
- Fang, W., Goldberg, M. L., Pohl, N. M., Bi, X., Tong, C., Xiong, B., Koh, T. J., Diamond, A. M., & Yang, W. (2010). Functional and physical interaction between the selenium-binding protein 1 (SBP1) and the glutathione peroxidase 1 selenoprotein. *Carcinogenesis*, 31(8), 1360–1366. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq114>
- Fang, W., Si, Y., Douglass, S., Casero, D., Merchant, S. S., Pellegrini, M., Ladunga, I., Liu, P., & Spalding, M. H. (2012). Transcriptome-Wide Changes in *Chlamydomonas reinhardtii* Gene Expression Regulated by Carbon Dioxide and the CO₂-Concentrating Mechanism Regulator *CIA5 / CCM1*. *The Plant Cell*, 24(5), 1876–1893. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.097949>
- Feng, P., Xu, Z., Qin, L., Asraful Alam, M., Wang, Z., & Zhu, S. (2020). Effects of different nitrogen sources and light paths of flat plate photobioreactors on the growth and lipid accumulation of *Chlorella*

- sp. GN1 outdoors. *Bioresource Technology*, 301, 122762.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122762>
- Fernández, F. G. A., Reis, A., Wijffels, R. H., Barbosa, M., Verdelho, V., & Llamas, B. (2021). The role of microalgae in the bioeconomy. *New Biotechnology*, 61, 99–107.
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.11.011>
- Fiehn, O., Barupal, D. K., & Kind, T. (2011). Extending Biochemical Databases by Metabolomic Surveys. *Journal of Biological Chemistry*, 286(27), 23637–23643.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R110.173617>
- Fields, F. J., Lejzerowicz, F., Schroeder, D., Ngoi, S. M., Tran, M., McDonald, D., Jiang, L., Chang, J. T., Knight, R., & Mayfield, S. (2020). Effects of the microalgae *Chlamydomonas* on gastrointestinal health. *Journal of Functional Foods*, 65, 103738. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103738>
- Flemetakis, E., Agalou, A., Kavroulakis, N., Dimou, M., Martsikovskaya, A., Slater, A., Spaink, H. P., Roussis, A., & Katinakis, P. (2002). *Lotus japonicus* Gene *Ljsbp* Is Highly Conserved Among Plants and Animals and Encodes a Homologue to the Mammalian Selenium-Binding Proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*[®], 15(4), 313–322.
<https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.4.313>
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2013). Redox Signaling in Plants. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(16), 2087–2090. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5278>
- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., & De Cooman, L. (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology*, 24(6), 1477–1486. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9804-6>
- Gonzalez, L. E., & Bashan, Y. (2000). Increased Growth of the Microalga *Chlorella vulgaris* when Coimmobilized and Cocultured in Alginate Beads with the Plant-Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1527–1531.
<https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1527-1531.2000>
- González, L. E., Cañizares, R. O., & Baena, S. (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology*, 60(3), 259–262.
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00029-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00029-1)
- González-Camejo, J., Viruela, A., Ruano, M. V., Barat, R., Seco, A., & Ferrer, J. (2019). Effect of light intensity, light duration and photoperiods in the performance of an outdoor photobioreactor for urban wastewater treatment. *Algal Research*, 40, 101511.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101511>
- Goodenough, U., Lin, H., & Lee, J.-H. (2007). Sex determination in *Chlamydomonas*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18(3), 350–361. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2007.02.006>
- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., & Rokhsar, D. S. (2012). Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D1178–D1186. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr944>

- Gorman, D. S., & Levine, R. P. (1965). Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 54(6), 1665-1669.
- Gouveia, L., & Oliveira, A. C. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(2), 269–274. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0495-6>
- Griffiths, M. J., & Harrison, S. T. L. (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), 493–507. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9392-7>
- Grobbelaar, J. U. (2003). Algal Nutrition—Mineral Nutrition. In A. Richmond (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture* (pp. 95–115). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470995280.ch6>
- Grossman, A. R. (2000). *Chlamydomonas reinhardtii* and photosynthesis: Genetics to genomics. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(2), 132–137. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)00053-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)00053-9)
- Grossman, A. R. (2005). Paths toward Algal Genomics. *Plant Physiology*, 137(2), 410–427. <https://doi.org/10.1104/pp.104.053447>
- Grune, T., Jung, T., Merker, K., & Davies, K. J. A. (2004). Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and ‘aggresomes’ during oxidative stress, aging, and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(12), 2519–2530. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.04.020>
- Guillard, R. R., & Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian journal of microbiology*, 8(2), 229-239.
- Guo, Z., & Tong, Y. W. (2014). The interactions between *Chlorella vulgaris* and algal symbiotic bacteria under photoautotrophic and photoheterotrophic conditions. *Journal of Applied Phycology*, 26(3), 1483–1492. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0186-1>
- Gutierrez, J. M. C., Quinlan, G. J., & Yamamoto, Y. (1998). Are Fatty Acid Patterns Characteristic of Essential Fatty Acid Deficiency Indicative of Oxidative Stress? *Free Radical Research*, 28(2), 109–114. <https://doi.org/10.3109/10715769809065796>
- Hallmann, A. (n.d.). *Algal Transgenics and Biotechnology*.
- Harini, S. T., Kumar, H. V., Rangaswamy, J., & Naik, N. (2017). Synthesis of thiazole-based substituted piperidinone oximes: Profiling of antioxidant and antimicrobial activity. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 43(2), 186–196. <https://doi.org/10.1134/S1068162017020042>
- Harris, E. H. (2001). *CHLAMYDOMONAS AS A MODEL ORGANISM*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52(1), 363–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.363>

- Heckman, D. S., Geiser, D. M., Eidell, B. R., Stauffer, R. L., Kardos, N. L., & Hedges, S. B. (2001). Molecular Evidence for the Early Colonization of Land by Fungi and Plants. *Science*, *293*(5532), 1129–1133. <https://doi.org/10.1126/science.1061457>
- Hicks, G. R., Hironaka, C. M., Dauvillee, D., Funke, R. P., D’Hulst, C., Waffenschmidt, S., & Ball, S. G. (2001). When Simpler Is Better. Unicellular Green Algae for Discovering New Genes and Functions in Carbohydrate Metabolism. *Plant Physiology*, *127*(4), 1334–1338. <https://doi.org/10.1104/pp.010821>
- Honda, M. D. H., & Borthakur, D. (2021). Mimosine is a stress-response molecule that serves as both an antioxidant and osmolyte in giant leucaena (*Leucaena leucocephala* subsp. *Glabrata*) during environmental stress conditions. *Plant Stress*, *2*, 100015. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2021.100015>
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *The Plant Journal*, *54*(4), 621–639. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>
- Huang, J. J., & Cheung, P. C.-K. (2011). +UVA treatment increases the degree of unsaturation in microalgal fatty acids and total carotenoid content in *Nitzschia closterium* (Bacillariophyceae) and *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyceae). *Food Chemistry*, *129*(3), 783–791. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.021>
- Hutner, S. H., Provasoli, L., Schatz, A., & Haskins, C. P. (1950). Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. *Proceedings of the American Philosophical Society*, *94*(2), 152-170.
- Imase, M., Ohko, Y., Takeuchi, M., & Hanada, S. (2013). Estimating the viability of *Chlorella* exposed to oxidative stresses based around photocatalysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *78*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.12.006>
- Jeong, J.-Y., Wang, Y., & Sytkowski, A. J. (2009). Human selenium binding protein-1 (hSP56) interacts with VDU1 in a selenium-dependent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *379*(2), 583–588. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.12.110>
- Juneja, A., Chaplen, F. W. R., & Murthy, G. S. (2016). Genome scale metabolic reconstruction of *Chlorella variabilis* for exploring its metabolic potential for biofuels. *Bioresource Technology*, *213*, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.118>
- Kalamaki, M. S., Merkouropoulos, G., & Kanellis, A. K. (2009). Can ornithine accumulation modulate abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*? *Plant Signaling & Behavior*, *4*(11), 1099–1101. <https://doi.org/10.4161/psb.4.11.9873>
- Kalana, U. L. D. I., Kalpage, C. S., & Yatigamma, S. K. (2016). Evaluation of the suitable environmental conditions for selected freshwater microalgae species with the potential for the production of biodiesel. *Ceylon Journal of Science*, *45*(3), 93. <https://doi.org/10.4038/cjs.v45i3.7405>

- Kalinina, N. O., Makarova, S., Makhotenko, A., Love, A. J., & Taliansky, M. (2018). The Multiple Functions of the Nucleolus in Plant Development, Disease and Stress Responses. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 132. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00132>
- Kalita, N., Baruah, G., Goswami, R. C. D., Talukdar, J., & Kalita, M. C. (2011). *Ankistrodesmus falcatus*: A promising candidate for lipid production, its biochemical analysis and strategies to enhance lipid productivity.
- Kamble, P., Cheriyaundath, S., Lopus, M., & Sirisha, V. L. (2018). Chemical characteristics, antioxidant and anticancer potential of sulfated polysaccharides from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology*, *30*(3), 1641–1653. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1397-2>
- Kao, Y.-T., Gonzalez, K. L., & Bartel, B. (2018). Peroxisome Function, Biogenesis, and Dynamics in Plants. *Plant Physiology*, *176*(1), 162–177. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01050>
- Kaplan, F., Kopka, J., Haskell, D. W., Zhao, W., Schiller, K. C., Gatzke, N., Sung, D. Y., & Guy, C. L. (2004). Exploring the Temperature-Stress Metabolome of Arabidopsis. *Plant Physiology*, *136*(4), 4159–4168. <https://doi.org/10.1104/pp.104.052142>
- Kato, C., Miyazaki, K., Nakagawa, A., Ohira, M., Nakamura, Y., Ozaki, T., Imai, T., & Nakagawara, A. (2004). Low expression of human tubulin tyrosine ligase and suppressed tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with impaired neuronal differentiation in neuroblastomas with poor prognosis. *International Journal of Cancer*, *112*(3), 365–375. <https://doi.org/10.1002/ijc.20431>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, *28*(12), 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Keeling, P. J., Burger, G., Durnford, D. G., Lang, B. F., Lee, R. W., Pearlman, R. E., Roger, A. J., & Gray, M. W. (2005). The tree of eukaryotes. *Trends in Ecology & Evolution*, *20*(12), 670–676. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.09.005>
- Khalil, Z. I., Asker, M. M. S., El-Sayed, S., & Kobbia, I. A. (2010). Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *26*(7), 1225–1231. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0292-z>
- Khan, A. K., Kausar, H., Jaferi, S. S., Drouet, S., Hano, C., Abbasi, B. H., & Anjum, S. (2020). An Insight into the Algal Evolution and Genomics. *Biomolecules*, *10*(11), 1524. <https://doi.org/10.3390/biom10111524>
- Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, *17*(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Khorobrykh, S., Havurinne, V., Mattila, H., & Tyystjärvi, E. (2020). Oxygen and ROS in Photosynthesis. *Plants*, *9*(1), 91. <https://doi.org/10.3390/plants9010091>

- Kiran, B. R., & Venkata Mohan, S. (2021). Microalgal Cell Biofactory—Therapeutic, Nutraceutical and Functional Food Applications. *Plants*, *10*(5), 836. <https://doi.org/10.3390/plants10050836>
- Klinthong, W., Yang, Y.-H., Huang, C.-H., & Tan, C.-S. (2015). A Review: Microalgae and Their Applications in CO₂ Capture and Renewable Energy. *Aerosol and Air Quality Research*, *15*(2), 712–742. <https://doi.org/10.4209/aaqr.2014.11.0299>
- Köhnlein, K., Urban, N., Guerrero-Gómez, D., Steinbrenner, H., Urbánek, P., Priebes, J., Koch, P., Kaether, C., Miranda-Vizueté, A., & Klotz, L.-O. (2020). A *Caenorhabditis elegans* ortholog of human selenium-binding protein 1 is a pro-aging factor protecting against selenite toxicity. *Redox Biology*, *28*, 101323. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101323>
- Kolbe, A., Oliver, S. N., Fernie, A. R., Stitt, M., van Dongen, J. T., & Geigenberger, P. (2006). Combined Transcript and Metabolite Profiling of Arabidopsis Leaves Reveals Fundamental Effects of the Thiol-Disulfide Status on Plant Metabolism. *Plant Physiology*, *141*(2), 412–422. <https://doi.org/10.1104/pp.106.081208>
- Koletti, A., Dervisi, I., Kalloniati, C., Zografaki, M.-E., Rennenberg, H., Roussis, A., & Fliemetakis, E. (2022). Selenium-binding Protein 1 (SBD1): A stress response regulator in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, *189*(4), 2368–2381. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac230>
- Kono, A., & Spalding, M. H. (2020). LCI1, a *Chlamydomonas reinhardtii* plasma membrane protein, functions in active CO₂ uptake under low CO₂. *The Plant Journal*, *102*(6), 1127–1141. <https://doi.org/10.1111/tpj.14761>
- Kuchibhotla, S., Vanegas, D., Kennedy, D. J., Guy, E., Nimako, G., Morton, R. E., & Febbraio, M. (2008). Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A I/II. *Cardiovascular Research*, *78*(1), 185–196. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvm093>
- Kusvuran, S., Dasgan, H. Y., & Abak, K. (2013). Citrulline Is an Important Biochemical Indicator in Tolerance to Saline and Drought Stresses in Melon. *The Scientific World Journal*, *2013*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/253414>
- Laporte, D., González, A., & Moenne, A. (2020). Copper-Induced Activation of MAPKs, CDPKs and CaMKs Triggers Activation of Hexokinase and Inhibition of Pyruvate Kinase Leading to Increased Synthesis of ASC, GSH and NADPH in *Ulva compressa*. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 990. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00990>
- Laurens, L. M. L., Quinn, M., Van Wychen, S., Templeton, D. W., & Wolfrum, E. J. (2012). Accurate and reliable quantification of total microalgal fuel potential as fatty acid methyl esters by in situ transesterification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *403*(1), 167–178. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5814-0>
- Ledford, H. K., Chin, B. L., & Niyogi, K. K. (2007). Acclimation to Singlet Oxygen Stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, *6*(6), 919–930. <https://doi.org/10.1128/EC.00207-06>
- Lee, M.-A., Guo, R., & Ki, J.-S. (2014). Different transcriptional responses of heat shock protein 20 in the marine diatom *Ditylum brightwellii* exposed to metals and endocrine-disrupting chemicals:

- Transcriptional Responses of *Hsp20* in the Diatom *D. brightwellii*. *Environmental Toxicology*, 29(12), 1379–1389. <https://doi.org/10.1002/tox.21868>
- Lehmuskero, A., Skogen Chauton, M., & Boström, T. (2018). Light and photosynthetic microalgae: A review of cellular- and molecular-scale optical processes. *Progress in Oceanography*, 168, 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2018.09.002>
- Levasseur, W., Perré, P., & Pozzobon, V. (2020). A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology Advances*, 41, 107545. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107545>
- Li, C., Yang, H., Xia, X., Li, Y., Chen, L., Zhang, M., Zhang, L., & Wang, W. (2013). High efficient treatment of citric acid effluent by *Chlorella vulgaris* and potential biomass utilization. *Bioresource Technology*, 127, 248–255. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.074>
- Li, T., Gargouri, M., Feng, J., Park, J.-J., Gao, D., Miao, C., Dong, T., Gang, D. R., & Chen, S. (2015). Regulation of starch and lipid accumulation in a microalga *Chlorella sorokiniana*. *Bioresource Technology*, 180, 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.005>
- Li, X., Zhang, R., Patena, W., Gang, S. S., Blum, S. R., Ivanova, N., Yue, R., Robertson, J. M., Lefebvre, P. A., Fitz-Gibbon, S. T., Grossman, A. R., & Jonikas, M. C. (2016). An Indexed, Mapped Mutant Library Enables Reverse Genetics Studies of Biological Processes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, 28(2), 367–387. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00465>
- Liang, M.-H., Wang, L., Wang, Q., Zhu, J., & Jiang, J.-G. (2019). High-value bioproducts from microalgae: Strategies and progress. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(15), 2423–2441. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1455030>
- Lin, H., Kwan, A. L., & Dutcher, S. K. (2010). Synthesizing and Salvaging NAD⁺: Lessons Learned from *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS Genetics*, 6(9), e1001105. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001105>
- Logan, B. E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W., & Rabaey, K. (n.d.). *Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology*.
- Loke Show, P. (2022). Global market and economic analysis of microalgae technology: Status and perspectives. *Bioresource Technology*, 127329. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127329>
- Lordan, S., Ross, R. P., & Stanton, C. (2011). Marine Bioactives as Functional Food Ingredients: Potential to Reduce the Incidence of Chronic Diseases. *Marine Drugs*, 9(6), 1056–1100. <https://doi.org/10.3390/md9061056>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lowrey, J., Armenta, R. E., & Brooks, M. S. (2016). Nutrient and media recycling in heterotrophic microalgae cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1061–1075. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7138-4>

- Lu, Q., Li, H., Zou, Y., Liu, H., & Yang, L. (2021). Astaxanthin as a microalgal metabolite for aquaculture: A review on the synthetic mechanisms, production techniques, and practical application. *Algal Research*, 54, 102178. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102178>
- Luo, F., Zhu, D., Zou, R., Duan, W., & Yan, Y. (2020). *Wheat (Triticum aestivum L.) selenium-binding protein-A enhances cadmium tolerance via interaction between CXXC motif and cadmium and detoxification* [Preprint]. Preprints. <https://doi.org/10.22541/au.159986255.54120052>
- Luo, S., & Levine, R. L. (2009). Methionine in proteins defends against oxidative stress. *The FASEB Journal*, 23(2), 464–472. <https://doi.org/10.1096/fj.08-118414>
- Ma, X., Zhang, B., Miao, R., Deng, X., Duan, Y., Cheng, Y., Zhang, W., Shi, M., Huang, K., & Xia, X.-Q. (2020). Transcriptomic and Physiological Responses to Oxidative Stress in a *Chlamydomonas reinhardtii* Glutathione Peroxidase Mutant. *Genes*, 11(4), 463. <https://doi.org/10.3390/genes11040463>
- Mantecón, L., Moyano, R., Cameán, A. M., & Jos, A. (2019). Safety assessment of a lyophilized biomass of *Tetraselmis chuii* (TetraSOD®) in a 90 day feeding study. *Food and Chemical Toxicology*, 133, 110810. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110810>
- Martins Alves, A. M., Pereira Menezes, S., Matos Lima, E., Peres Gramacho, K., Silva Andrade, B., Macêdo Ferreira, M., Pirovani, C. P., & Micheli, F. (2019). The selenium-binding protein of *Theobroma cacao*: A thermostable protein involved in the witches' broom disease resistance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 142, 472–481. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.08.005>
- Masi, A., Leonelli, F., Scognamiglio, V., Gasperuzzo, G., Antonacci, A., & Terzidis, M. A. (2023). *Chlamydomonas reinhardtii*: A Factory of Nutraceutical and Food Supplements for Human Health. *Molecules*, 28(3), 1185. <https://doi.org/10.3390/molecules28031185>
- Matorin, D. N., Osipov, V. A., Seifullina, N. Kh., Venediktov, P. S., & Rubin, A. B. (2009). Increased toxic effect of methylmercury on *Chlorella vulgaris* under high light and cold stress conditions. *Microbiology*, 78(3), 321–327. <https://doi.org/10.1134/S0026261709030102>
- Melis, A., & Happe, T. (2001). Hydrogen Production. Green Algae as a Source of Energy. *Plant Physiology*, 127(3), 740–748. <https://doi.org/10.1104/pp.010498>
- Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L. K., Maréchal-Drouard, L., Marshall, W. F., Qu, L.-H., Nelson, D. R., Sanderfoot, A. A., Spalding, M. H., Kapitonov, V. V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., ... Grossman, A. R. (2007). The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science*, 318(5848), 245–250. <https://doi.org/10.1126/science.1143609>
- Meuser, J. E., Boyd, E. S., Ananyev, G., Karns, D., Radakovits, R., Narayana Murthy, U. M., Ghirardi, M. L., Dismukes, G. C., Peters, J. W., & Posewitz, M. C. (2011). Evolutionary significance of an algal gene encoding an [FeFe]-hydrogenase with F-domain homology and hydrogenase activity in *Chlorella variabilis* NC64A. *Planta*, 234(4), 829–843. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1431-y>

- Michel-Rodriguez, M., Lefebvre, S., Crouvoisier, M., Mériaux, X., & Lizon, F. (2021). Underwater light climate and wavelength dependence of microalgae photosynthetic parameters in a temperate sea. *PeerJ*, 9, e12101. <https://doi.org/10.7717/peerj.12101>
- Mignolet-Spruyt, L., Xu, E., Idänheimo, N., Hoeberichts, F. A., Mühlenbock, P., Brosché, M., Van Breusegem, F., & Kangasjärvi, J. (2016). Spreading the news: Subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *Journal of Experimental Botany*, 67(13), 3831–3844. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw080>
- Minagawa, J., & Tokutsu, R. (2015). Dynamic regulation of photosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*, 82(3), 413–428. <https://doi.org/10.1111/tpj.12805>
- Mishra, A., & Jha, B. (2011). Antioxidant response of the microalga *Dunaliella salina* under salt stress. *Botanica Marina*, 54(2). <https://doi.org/10.1515/bot.2011.012>
- Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*, 11(1), 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.11.002>
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10), 490–498. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., & Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: The new wave? *Trends in Plant Science*, 16(6), 300–309. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.007>
- Morimoto, T., Nagatsu, A., Murakami, N., Sakakibara, J., Tokuda, H., Nishino, H., & Iwashima, A. (1995). Anti-tumour-promoting glyceroglycolipids from the green alga, *Chlorella vulgaris*. *Phytochemistry*, 40(5), 1433–1437. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00458-J](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00458-J)
- Mouget, J. L., Dakhama, A., Lavoie, M. C., & de la Noüe, J. (1995). Algal growth enhancement by bacteria: is consumption of photosynthetic oxygen involved?. *FEMS Microbiology Ecology*, 18(1), 35–43.
- Nawrocki, W. J., Liu, X., & Croce, R. (2020). *Chlamydomonas reinhardtii* Exhibits De Facto Constitutive NPQ Capacity in Physiologically Relevant Conditions. *Plant Physiology*, 182(1), 472–479. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00658>
- Odjadjare, E. C., Mutanda, T., & Olaniran, A. O. (2017). Potential biotechnological application of microalgae: A critical review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(1), 37–52. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1108956>
- Paliwal, C., Mitra, M., Bhayani, K., Bharadwaj, S. V. V., Ghosh, T., Dubey, S., & Mishra, S. (2017). Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. *Bioresource Technology*, 244, 1216–1226. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.058>
- Papadopoulos, K. N. (Ed.). (2008). *Food chemistry research developments*. Nova Science Publishers.

- Park, Y. H., Han, S.-I., Oh, B., Kim, H. S., Jeon, M. S., Kim, S., & Choi, Y.-E. (2022). Microalgal secondary metabolite productions as a component of biorefinery: A review. *Bioresource Technology*, *344*, 126206. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126206>
- Patelou, M., Infante, C., Dardelle, F., Randewig, D., Kouri, E. D., Udvardi, M. K., Tsiplakou, E., Mantecón, L., & Flemetakis, E. (2020). Transcriptomic and metabolomic adaptation of *Nannochloropsis gaditana* grown under different light regimes. *Algal Research*, *45*, 101735. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101735>
- Patino-Suarez, V., Aranda, D. A., & Zamora, A. G. (2004). Food ingestion and digestibility of five unicellular algae by 1-day-old *Strombus gigas* larvae. *Aquaculture Research*, *35*(12), 1149–1152. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01138.x>
- Perozeni, F., Beghini, G., Cazzaniga, S., & Ballottari, M. (2020). Chlamydomonas reinhardtii LHCSR1 and LHCSR3 proteins involved in photoprotective non-photochemical quenching have different quenching efficiency and different carotenoid affinity. *Scientific Reports*, *10*(1), 21957. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78985-w>
- Pflaster, E. L., Schwabe, M. J., Becker, J., Wilkinson, M. S., Parmer, A., Clemente, T. E., Cahoon, E. B., & Riekhof, W. R. (2014). A High-Throughput Fatty Acid Profiling Screen Reveals Novel Variations in Fatty Acid Biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* and Related Algae. *Eukaryotic Cell*, *13*(11), 1431–1438. <https://doi.org/10.1128/EC.00128-14>
- Phetchuay, P., Peerakietkhajorn, S., Duangpan, S., & Buapet, P. (2019). Toxicity effects of copper and zinc on the photosynthetic efficiency and oxidative stress-related parameters of the green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck. *Journal of Fisheries and Environment*, *43*(2), 14-26.
- Pierobon, S. C., Cheng, X., Graham, P. J., Nguyen, B., Karakolis, E. G., & Sinton, D. (2018). Emerging microalgae technology: A review. *Sustainable Energy & Fuels*, *2*(1), 13–38. <https://doi.org/10.1039/C7SE00236J>
- Pillai, S., Behra, R., Nestler, H., Suter, M. J.-F., Sigg, L., & Schirmer, K. (2014). Linking toxicity and adaptive responses across the transcriptome, proteome, and phenotype of *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to silver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(9), 3490–3495. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319388111>
- Pfaffl, M. W. (2010). The ongoing evolution of qPCR. *Methods*, *4*(50), 215-216.
- Pol, A., Renkema, G. H., Tangerman, A., Winkel, E. G., Engelke, U. F., De Brouwer, A. P. M., Lloyd, K. C., Araiza, R. S., Van Den Heuvel, L., Omran, H., Olbrich, H., Oude Elberink, M., Gilissen, C., Rodenburg, R. J., Sass, J. O., Schwab, K. O., Schäfer, H., Venselaar, H., Sequeira, J. S., ... Wevers, R. A. (2018). Mutations in SELENBP1, encoding a novel human methanethiol oxidase, cause extraoral halitosis. *Nature Genetics*, *50*(1), 120–129. <https://doi.org/10.1038/s41588-017-0006-7>
- Porat, A., Sagiv, Y., & Elazar, Z. (2000). A 56-kDa Selenium-binding Protein Participates in Intra-Golgi Protein Transport. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(19), 14457–14465. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.19.14457>

- Qiao, T., Zhao, Y., Zhong, D., & Yu, X. (2021). Hydrogen peroxide and salinity stress act synergistically to enhance lipids production in microalga by regulating reactive oxygen species and calcium. *Algal Research*, 53, 102017. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102017>
- Qu, R., Xie, Q., Tian, J., Zhou, M., & Ge, F. (2021). Metabolomics reveals the inhibition on phosphorus assimilation in *Chlorella vulgaris* F1068 exposed to AgNPs. *Science of The Total Environment*, 770, 145362. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145362>
- Rahman, N. A., Khatoon, H., Yusuf, N., Banerjee, S., Haris, N. A., Lananan, F., & Tomoyo, K. (2017). Tetraselmis chuii biomass as a potential feed additive to improve survival and oxidative stress status of Pacific white-leg shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *International Aquatic Research*, 9(3), 235–247. <https://doi.org/10.1007/s40071-017-0173-2>
- Rai, V. K. (2002). Role of amino acids in plant responses to stresses. *Biologia plantarum*, 45(4), 481-487.
- Rajapitamahuni, S., Bachani, P., Sardar, R. K., & Mishra, S. (2019). Co-cultivation of siderophore-producing bacteria *Idiomarina loihiensis* RS14 with *Chlorella variabilis* ATCC 12198, evaluation of micro-algal growth, lipid, and protein content under iron starvation. *Journal of Applied Phycology*, 31(1), 29–39. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1591-2>
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. L., & Moorman, A. F. M. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, 339(1), 62–66. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)01423-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01423-4)
- Ramanan, R., Kang, Z., Kim, B.-H., Cho, D.-H., Jin, L., Oh, H.-M., & Kim, H.-S. (2015). Phycosphere bacterial diversity in green algae reveals an apparent similarity across habitats. *Algal Research*, 8, 140–144. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.02.003>
- Ramanan, R., Kannan, K., Deshkar, A., Yadav, R., & Chakrabarti, T. (2010). Enhanced algal CO₂ sequestration through calcite deposition by *Chlorella* sp. And *Spirulina platensis* in a mini-rceway pond. *Bioresource Technology*, 101(8), 2616–2622. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.061>
- Rare, E. (1990). Stress physiology: The functional significance of the accumulation of nitrogen-containing compounds. *Journal of Horticultural Science*, 65(3), 231–243. <https://doi.org/10.1080/00221589.1990.11516052>
- Reyes-Prieto, A., Weber, A. P. M., & Bhattacharya, D. (2007). The Origin and Establishment of the Plastid in Algae and Plants. *Annual Review of Genetics*, 41(1), 147–168. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130134>
- Rismani, S., & Shariati, M. (2017). Changes of the Total Lipid and Omega-3 Fatty Acid Contents in two Microalgae *Dunaliella Salina* and *Chlorella Vulgaris* Under Salt Stress. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60(0). <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2017160555>
- Robles, P., & Quesada, V. (2022). Unveiling the functions of plastid ribosomal proteins in plant development and abiotic stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 189, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.07.029>

- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, *102*(1), 100–112. <https://doi.org/10.1002/bit.22033>
- Saha, S., & Murray, P. (2018). Exploitation of Microalgae Species for Nutraceutical Purposes: Cultivation Aspects. *Fermentation*, *4*(2), 46. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020046>
- Sahoo, D., & Seckbach, J. (Eds.). (2015). *The Algae World* (Vol. 26). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-7321-8>
- Sanchez, D. H., Lippold, F., Redestig, H., Hannah, M. A., Erban, A., Krämer, U., Kopka, J., & Udvardi, M. K. (2007). Integrative functional genomics of salt acclimatization in the model legume *Lotus japonicus*: Systems analysis of *Lotus japonicus* under salt stress. *The Plant Journal*, *53*(6), 973–987. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03381.x>
- Sasso, S., Stibor, H., Mittag, M., & Grossman, A. R. (2018). From molecular manipulation of domesticated *Chlamydomonas reinhardtii* to survival in nature. *ELife*, *7*, e39233. <https://doi.org/10.7554/eLife.39233>
- Schild, F., Kieffer-Jaquinod, S., Palencia, A., Cobessi, D., Sarret, G., Zubieta, C., Jourdain, A., Dumas, R., Forge, V., Testemale, D., Bourguignon, J., & Hugouvieux, V. (2014). Biochemical and Biophysical Characterization of the Selenium-binding and Reducing Site in *Arabidopsis thaliana* Homologue to Mammals Selenium-binding Protein 1. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(46), 31765–31776. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.571208>
- Schmidt, M., Hanna, J., Elsasser, S., & Finley, D. (2005). Proteasome-associated proteins: Regulation of a proteolytic machine. *Biological Chemistry*, *386*(8). <https://doi.org/10.1515/BC.2005.085>
- Ścieszka, S., & Klewicka, E. (2019). Algae in food: A general review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *59*(21), 3538–3547. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1496319>
- Scranton, M. A., Ostrand, J. T., Fields, F. J., & Mayfield, S. P. (2015). *Chlamydomonas* as a model for biofuels and bio-products production. *The Plant Journal*, *82*(3), 523–531. <https://doi.org/10.1111/tpj.12780>
- Sharma, P., & Sharma, N. (2017). Industrial and Biotechnological Applications of Algae: A Review. *Journal of Advances in Plant Biology*, *1*(1), 1–25. <https://doi.org/10.14302/issn.2638-4469.japb-17-1534>
- Siaut, M., Cuiné, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylidès, C., Li-Beisson, Y., & Peltier, G. (2011). Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: Characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnology*, *11*(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-7>
- Siddiqui, H., Sami, F., & Hayat, S. (2020). Glucose: Sweet or bitter effects in plants-a review on current and future perspective. *Carbohydrate Research*, *487*, 107884. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.107884>

- Singh, U., & Jialal, I. (2006). Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology*, *13*(3), 129–142. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2006.05.002>
- Skliros, D., Kalloniati, C., Karalias, G., Skaracis, G. N., Rennenberg, H., & Flemetakis, E. (2018). Global metabolomics analysis reveals distinctive tolerance mechanisms in different plant organs of lentil (*Lens culinaris*) upon salinity stress. *Plant and Soil*, *429*(1–2), 451–468. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3691-9>
- Slaveykova, V. I., Majumdar, S., Regier, N., Li, W., & Keller, A. A. (2021). Metabolomic Responses of Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* Exposed to Sublethal Concentrations of Inorganic and Methylmercury. *Environmental Science & Technology*, *55*(6), 3876–3887. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c08416>
- Stasolla, C., Katahira, R., Thorpe, T. A., & Ashihara, H. (2003). Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, *160*(11), 1271–1295. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01169>
- Stevenson, C. S., Capper, E. A., Roshak, A. K., Marquez, B., Eichman, C., Jackson, J. R., Mattern, M., Gerwick, W. H., Jacobs, R. S., & Marshall, L. A. (2002). The Identification and Characterization of the Marine Natural Product Scytonemin as a Novel Antiproliferative Pharmacophore. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *303*(2), 858–866. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.036350>
- Stewart, G. R., & Larher, F. (1980). Accumulation of Amino Acids and Related Compounds in Relation to Environmental Stress. In *Amino Acids and Derivatives* (pp. 609–635). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-675405-6.50023-1>
- Sukenik, A., Zohary, T., & Padišák, J. (2009). Cyanoprokaryota and Other Prokaryotic Algae. In *Encyclopedia of Inland Waters* (pp. 138–148). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012370626-3.00133-2>
- Sukrong, S., Yun, K.-Y., Stadler, P., Kumar, C., Facciuolo, T., Moffatt, B. A., & Falcone, D. L. (2012). Improved Growth and Stress Tolerance in the Arabidopsis oxt1 Mutant Triggered by Altered Adenine Metabolism. *Molecular Plant*, *5*(6), 1310–1332. <https://doi.org/10.1093/mp/sss065>
- Sun, S., Wang, L., Zhang, S., Zhang, C., Chen, Y., Wu, Q., & Dong, N. (2020). N-glycan in the scavenger receptor cysteine-rich domain of hepsin promotes intracellular trafficking and cell surface expression. *International Journal of Biological Macromolecules*, *161*, 818–827. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.109>
- Suzuki, N., Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., & Mittler, R. (2005). Enhanced Tolerance to Environmental Stress in Transgenic Plants Expressing the Transcriptional Coactivator Multiprotein Bridging Factor 1c. *Plant Physiology*, *139*(3), 1313–1322. <https://doi.org/10.1104/pp.105.070110>
- Szyk, A., Deaconescu, A. M., Piszczek, G., & Roll-Mecak, A. (2011). Tubulin tyrosine ligase structure reveals adaptation of an ancient fold to bind and modify tubulin. *Nature Structural & Molecular Biology*, *18*(11), 1250–1258. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2148>

- Tahjib-Ul-Arif, Md., Zahan, Mst. I., Karim, Md. M., Imran, S., Hunter, C. T., Islam, Md. S., Mia, Md. A., Hannan, Md. A., Rhaman, M. S., Hossain, Md. A., Brestic, M., Skalicky, M., & Murata, Y. (2021). Citric Acid-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 7235. <https://doi.org/10.3390/ijms22137235>
- Takeda, H. (1988). Classification of Chlorella strains by cell wall sugar composition. *Phytochemistry*, 27(12), 3823–3826. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)83025-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)83025-5)
- Thoré, E. S. J., Muylaert, K., Bertram, M. G., & Brodin, T. (2023). Microalgae. *Current Biology*, 33(3), R91–R95. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.12.032>
- Thornton, B., & Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and molecular biology education*, 39(2), 145-154.
- Ting, H., Haifeng, L., Shanshan, M., Zhang, Y., Zhidan, L., & Na, D. (2017). Progress in microalgae cultivation photobioreactors and applications in wastewater treatment: A review. *Biol Eng*, 10.
- Torres, M. A., Barros, M. P., Campos, S. C. G., Pinto, E., Rajamani, S., Sayre, R. T., & Colepicolo, P. (2008). Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.05.009>
- Torres, S., Lama, C., Mantecón, L., Flemetakis, E., & Infante, C. (2021). Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR in the green microalgae *Tetraselmis chui*. *PLOS ONE*, 16(1), e0245495. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245495>
- Tran, B. Q., Tran, L. H., Kim, S.-J., & Jung, S. (2019). Altered regulation of porphyrin biosynthesis and protective responses to acifluorfen-induced photodynamic stress in transgenic rice expressing *Bradyrhizobium japonicum* Fe-chelatase. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 159, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.05.017>
- Treves, H., Siemiatkowska, B., Luzarowska, U., Murik, O., Fernandez-Pozo, N., Moraes, T. A., Erban, A., Armbruster, U., Brotman, Y., Kopka, J., Rensing, S. A., Szymanski, J., & Stitt, M. (2020). Multi-omics reveals mechanisms of total resistance to extreme illumination of a desert alga. *Nature Plants*, 6(8), 1031–1043. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0729-9>
- Tuteja, N., Tran, N. Q., Dang, H. Q., & Tuteja, R. (2011). Plant MCM proteins: Role in DNA replication and beyond. *Plant Molecular Biology*, 77(6), 537–545. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9836-3>
- Valassakis, C., Dervisi, I., Agalou, A., Papandreou, N., Kapetsis, G., Podia, V., Haralampidis, K., Iconomidou, V. A., Spaink, H. P., & Roussis, A. (2019). Novel interactions of Selenium Binding Protein family with the PICOT containing proteins AtGRXS14 and AtGRXS16 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 281, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.01.021>
- Valassakis, C., Livanos, P., Minopetrou, M., Haralampidis, K., & Roussis, A. (2018). Promoter analysis and functional implications of the selenium binding protein (SBP) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*, 224–225, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.03.008>

- Vance, P., & Spalding, M. H. (2005). Growth, photosynthesis, and gene expression in *Chlamydomonas* over a range of CO₂ concentrations and CO₂/O₂ ratios: CO₂ regulates multiple acclimation states. *Canadian Journal of Botany*, 83(7), 796–809. <https://doi.org/10.1139/b05-064>
- Vandenbroucke, K., Robbens, S., Vandepoele, K., Inze, D., Van de Peer, Y., & Van Breusegem, F. (2008). Hydrogen Peroxide-Induced Gene Expression across Kingdoms: A Comparative Analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 25(3), 507–516. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm276>
- Vavilin, D. V., & Rubin, A. B. (n.d.). *Membrane lipid peroxidation, cell viability and Photosystem II activity in the green alga Chlorella pyrenoidosa subjected to various stress conditions.*
- Vishwakarma, J., & Vavilala, S. L. (2019). Evaluating the antibacterial and antibiofilm potential of sulphated polysaccharides extracted from green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Microbiology*, 127(4), 1004–1017. <https://doi.org/10.1111/jam.14364>
- Vuppaladadiyam, A. K., Prinsen, P., Raheem, A., Luque, R., & Zhao, M. (2018). Microalgae cultivation and metabolites production: A comprehensive review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 12(2), 304–324. <https://doi.org/10.1002/bbb.1864>
- Walne, P. R. (1966). Experiments on the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. *J Fish Invest Min Agric Fish London, Ser, 2*, 25-53.
- Wang, X., Yen, J., Kaiser, P., & Huang, L. (2010). Regulation of the 26 S Proteasome Complex During Oxidative Stress. *Science Signaling*, 3(151). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001232>
- Wang, Z., Cheng, J., Zhang, X., Yang, W., Park, J.-Y., Kim, H.-T., & Xu, L.-H. (2020). Spermidine Protects *Chlorella sp.* From Oxidative Damage Caused by SO₂ in Flue Gas from Coal-Fired Power Plants. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(40), 15179–15188. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c04527>
- Weenink, E. F. J., Matthijs, H. C. P., Schuurmans, J. M., Piel, T., van Herk, M. J., Sigon, C. A. M., Visser, P. M., & Huisman, J. (2021). Interspecific protection against oxidative stress: Green algae protect harmful cyanobacteria against hydrogen peroxide. *Environmental Microbiology*, 23(5), 2404–2419. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15429>
- Wilson, M. H., Groppo, J., Placido, A., Graham, S., Morton, S. A., Santillan-Jimenez, E., Shea, A., Crocker, M., Crofcheck, C., & Andrews, R. (2014). CO₂ recycling using microalgae for the production of fuels. *Applied Petrochemical Research*, 4(1), 41–53. <https://doi.org/10.1007/s13203-014-0052-3>
- Witte, C.-P. (2011). Urea metabolism in plants. *Plant Science*, 180(3), 431–438. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.11.010>
- Xiong, W., Lan, T., & Mo, B. (2021). Extraribosomal Functions of Cytosolic Ribosomal Proteins in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 12, 607157. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.607157>
- Xu, B., Bo, Y., Sun, X., Wang, H., Guo, H., Zhou, C., Ruan, R., Yan, X., & Cheng, P. (2021). Review of the effect of polyamines in microalgae when ingested by shellfish. *Algal Research*, 58, 102409. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102409>

- Xu, H., Li, L., Wang, Y., Qiu, K., Chen, S., Zeng, J., Liu, R., Yang, Q., & Huang, W. (2023). Differential physiological response of marine and freshwater microalgae to polystyrene microplastics. *Journal of Hazardous Materials*, 448, 130814. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.130814>
- Xu, H., Miao, X., & Wu, Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 126(4), 499–507. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.05.002>
- Yeesang, C., & Cheirsilp, B. (2011). Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. *Bioresource Technology*, 102(3), 3034–3040. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.013>
- Yen, H.-W., & Chiang, W.-C. (2012). Effects of mutual shading, pressurization and oxygen partial pressure on the autotrophical cultivation of *Scenedesmus obliquus*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43(6), 820–824. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2012.06.002>
- Yu, C., Li, X., Han, B., Zhao, Y., Geng, S., Ning, D., Ma, T., & Yu, X. (2021). Simultaneous improvement of astaxanthin and lipid production of *Haematococcus pluvialis* by using walnut shell extracts. *Algal Research*, 54, 102171. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102171>
- Zhan, J., Rong, J., & Wang, Q. (2017). Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(12), 8505–8517. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.12.021>
- Zhang, Z., Tan, Y., Wang, W., Bai, W., Fan, J., Huang, J., Wan, M., & Li, Y. (2019). Efficient heterotrophic cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology*, 31(3), 1545–1554. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1666-0>
- Zhao, Y., Wang, H.-P., Han, B., & Yu, X. (2019). Coupling of abiotic stresses and phytohormones for the production of lipids and high-value by-products by microalgae: A review. *Bioresource Technology*, 274, 549–556. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.030>
- Zhu, J.-K. (2016). Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, 167(2), 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>
- Zuccaro, G., Yousuf, A., Pollio, A., & Steyer, J.-P. (2020). Microalgae Cultivation Systems. In *Microalgae Cultivation for Biofuels Production* (pp. 11–29). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00002-3>

Παραρτήματα

Παράρτημα 1. Δεδομένα RNAseq για μετάγραφα του *T. chuii***Παράρτημα 1.1.** Δεδομένα RNAseq για μετάγραφα του *T. chuii* με adj.p < 0.05 (bold).

ID	1 h vs 0 h				
	Gene name	KEGG KO	DE Log2 Ratio	DE Log2 SE	DE Adj p-value
MMETSP0491_2-20121128 25888_1			10,7	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1572_1			9,9	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5980_1			9,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7033_1			9,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12555_1			8,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4728_1	<i>GOLS</i>	K18819	8,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14269_1			8,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10133_1			7,7	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6955_1	<i>ZIP2</i>	K14709	7,2	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1377_1			7,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15066_1			6,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17199_1			6,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15006_1		K02599	6,1	0,6	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11633_1			6,0	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14811_1			6,0	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9115_1			6,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2223_1			5,9	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 18096_1			5,9	0,6	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12361_1			5,7	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3141_1			5,6	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9496_1			5,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11090_1			5,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5265_1			5,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9815_1			5,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17551_1	<i>petC</i>	K02636	5,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17513_1			5,0	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17235_1			4,9	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14476_1			4,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9083_1	<i>HSP90A</i>	K04079	4,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5691_1			4,8	0,7	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7395_1			4,8	0,6	0,0
MMETSP0491_2-20121128 414_1			4,7	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 18666_1			4,6	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12680_1			4,6	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17925_1			4,6	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4597_1	<i>galA, rafA</i>	K07407	4,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4290_1			4,5	0,5	0,0

Παράρτημα

MMETSP0491_2-20121128 8350_1			4,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11404_1	<i>MTP1</i>	K14689	4,4	0,6	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11001_1	<i>UFD1</i>	K14016	4,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11114_1			4,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 21822_1			4,3	0,6	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6821_1			4,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6601_1			4,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13713_1			4,0	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13887_1			4,0	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5896_1			4,0	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7981_1	<i>BOR</i>	K24194	3,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16412_1			3,9	0,6	0,0
MMETSP0491_2-20121128 18646_1			3,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 25115_1			3,9	0,6	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13159_1			3,9	0,7	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11319_1		K00799	3,8	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2050_1	<i>P4HA</i>	K00472	3,8	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3180_1			3,8	0,7	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1947_1			3,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3430_1	<i>nudF</i>	K01515	3,7	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9081_1	<i>BOR</i>	K24194	3,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16707_1			3,7	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20712_1			3,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 22306_1			3,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15080_1	<i>ENA2</i>	K01536	3,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 26745_1			3,6	0,6	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5072_1			3,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10213_1			3,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 24528_1			3,5	0,6	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4678_1		K01536	3,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 21352_1			3,5	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 23719_1			3,4	0,6	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15157_1	<i>ST13</i>	K09560	3,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13908_1			3,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 22906_1			3,4	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10217_1			3,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1838_1			3,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2260_1			3,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2788_1			3,3	0,3	0,0

MMETSP0491_2-20121128 11484_1	<i>HSPBP1,</i> <i>FES1</i>	K09562	3,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13296_1			3,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1312_1			3,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3106_1			3,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 25316_1			3,2	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14048_1			3,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15321_1			3,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 789_1			3,1	0,6	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4732_1			3,1	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19358_1		K05681	3,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19548_1			3,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11905_1			3,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 703_1			3,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4903_1	<i>SIL1</i>	K14001	3,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10615_1	<i>DNAJC10</i>	K09510,K09530	3,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 539_1			3,0	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6041_1			3,0	0,6	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14557_1			3,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 110_1			3,0	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1114_1			3,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 888_1			3,0	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11713_1	<i>ERO1</i>	K10950,K10976	3,0	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8118_1	<i>yneE</i>	K08994	2,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19499_1			2,9	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2253_1			2,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4544_1			2,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8806_1			2,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 18918_1			2,9	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17037_1		K14709	2,9	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 756_1			2,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19091_1			2,9	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6904_1			2,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5304_1			2,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6437_1			2,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10584_1			2,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2792_1	<i>HSPA4</i>	K09489	2,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2634_1			2,8	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5350_1			2,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 23439_1			2,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7393_1			2,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5448_1			2,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8717_1			2,8	0,4	0,0

Παράρτημα

MMETSP0491_2-20121128 1139_1	<i>HMGCL</i>	K01640	2,8	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9094_1			2,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7684_1	<i>EGT2</i>	K20247	2,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3051_1			2,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5389_1	<i>DNAJB4</i>	K09510	2,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 24077_1			2,7	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 22876_1			2,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17672_1			2,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6728_1			2,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16788_1			2,7	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12161_1		K09510,K09530	2,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10092_1	<i>STIP1</i>	K09553	2,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1568_1			2,7	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4626_1			2,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6068_1			2,7	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4692_1			2,7	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8943_1			2,7	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3466_1			2,7	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11765_1			2,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3816_1			2,6	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3720_1	<i>DUSP10</i>	K20216	2,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20574_1			2,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14896_1			2,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6103_1		K09584	2,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3072_1			2,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3241_1		K14432	2,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 24999_1			2,6	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6563_1	<i>ENA</i>	K01536	2,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13621_1			2,6	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5604_1			2,6	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13689_1	<i>RNF41</i>	K11981	2,6	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3237_1			2,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11007_1			2,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11600_1			2,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 22512_1			2,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10019_1	<i>UBC</i>	K08770	2,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8606_1			2,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17314_1		K21773	2,5	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 23552_1	<i>HSPA1s</i>	K03283	2,5	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 21267_1		K00500	2,5	0,4	0,0

MMETSP0491_2-20121128 17630_1			2,4	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2224_1	<i>mtnD,</i>	K08967	2,4	0,4	0,0
	<i>mtnZ,</i>				
	<i>ADI1</i>				
MMETSP0491_2-20121128 6101_1			2,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11865_1			2,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17980_1	<i>kch</i>	K10716	2,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6692_1			2,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7582_1			2,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7525_1			2,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10754_1			2,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20616_1			2,4	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5943_1			2,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16381_1			2,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3805_1			2,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2409_1		K20246	2,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 18525_1			2,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9133_1			2,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 18023_1			2,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6130_1			2,3	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3787_1			2,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4461_1			2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 858_1			2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12456_1			2,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10189_1		K07304	2,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17752_1			2,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19171_1			2,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 21442_1			2,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4614_1		K15377	2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10943_1			2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 18022_1	<i>MPV17</i>	K13348	2,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11235_1	<i>ODA7</i>	K19750	2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7278_1			2,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10621_1	<i>HSPA5</i>	K09490	2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10745_1			2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10961_1	<i>DYNLL</i>	K10418	2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6851_1	<i>USP14,</i>	K11843	2,3	0,3	0,0
	<i>UBP6</i>				
MMETSP0491_2-20121128 15676_1			2,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20244_1			2,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3292_1			2,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14812_1		K14689	2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16656_1			2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 21178_1			2,2	0,3	0,0

Παράρτημα

MMETSP0491_2-20121128 482_1			2,2	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9095_1			2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6631_1			2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10059_1			2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 22420_1			2,2	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10481_1			2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10293_1			2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6079_1			2,2	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11219_1	<i>RABAC1,</i>	K20359	2,2	0,3	0,0
	<i>PRAF1</i>				
MMETSP0491_2-20121128 16166_1			2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9323_1	<i>HSPA1s</i>	K03283	2,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3718_1			2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2413_1			2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16260_1			2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2263_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2057_1			2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12490_1			2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15564_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10393_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16012_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9883_1	<i>UAPA_C</i>	K23887	2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12223_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3909_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14769_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 23979_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17182_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12841_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6899_1			2,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9877_1			2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3282_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14430_1	<i>IFT27,</i>	K07934	2,1	0,3	0,0
	<i>RAYL,</i>				
	<i>RABL4</i>				
MMETSP0491_2-20121128 6810_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8418_1	<i>WBP2</i>	K22524	2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17093_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5826_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15175_1			2,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 951_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20156_1			2,1	0,3	0,0

MMETSP0491_2-20121128 8324_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6109_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 21469_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8675_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6655_1	<i>UFD1</i>	K14016	2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16185_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11350_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 664_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4337_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11356_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7011_1			2,0	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1182_1	<i>SFU1</i>		2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12049_1	<i>SGT1</i>	K12795	2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6750_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1660_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9745_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11347_1			2,0	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13332_1	<i>SC5DL</i>	K00227	2,0	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14860_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8801_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 22416_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 23658_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15948_1			2,0	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16244_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6775_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11254_1			2,0	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 394_1	<i>FAH</i>	K19706	2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12503_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 289_1			2,0	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6284_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12190_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13365_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9628_1	<i>HSPA1s</i>	K03283	1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15007_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8058_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12728_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3706_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19339_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20273_1		K09578	1,9	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7767_1			1,9	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19704_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13294_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9838_1			1,9	0,2	0,0

Παράρτημα

MMETSP0491_2-20121128 916_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8169_1			1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3757_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13414_1			1,9	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2953_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12914_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17013_1			1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17658_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5551_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6479_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8487_1			1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12041_1	<i>BB</i>	K19045	1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 389_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9057_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4850_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13927_1	<i>FKBP4_5</i>	K09571	1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4994_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2875_1		K11885	1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13521_1			1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11095_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4618_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 18330_1			1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15116_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16127_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11015_1			1,8	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10837_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 187_1	<i>MED28</i>	K15141	1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10017_1	<i>PYRP2</i>	K22912	1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5599_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14005_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5346_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20302_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15223_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8345_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3921_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1046_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2014_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3228_1	<i>tag</i>	K01246	1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8149_1		K18168	1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6772_1	<i>HSP90B</i>	K09487	1,8	0,3	0,0

MMETSP0491_2-20121128 15874_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11221_1			1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 642_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6209_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5080_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11337_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 18166_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16806_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 21391_1	<i>mtlK</i>	K00009,K00040,K00045	1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12008_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14697_1			1,7	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9314_1	<i>CHMP1, VPS46</i>	K12197	1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8190_1	<i>PDIA1, P4HB</i>	K09580	1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13244_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13209_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3205_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7467_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4650_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2007_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9229_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 25190_1	<i>DPY30</i>	K14965,K14968	1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2346_1	<i>SLC30A2, ZNT2</i>	K14689	1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1868_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6162_1			1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7121_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11725_1			1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10279_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3981_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2873_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5559_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13770_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3280_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9008_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4794_1	<i>IFT52</i>	K19681	1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10153_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3530_1			1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8589_1		K18171	1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4954_1			1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8091_1			1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16070_1			1,7	0,3	0,0

Παράρτημα

MMETSP0491_2-20121128 10128_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 22129_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1382_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12512_1	<i>ITIH4</i>		1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3730_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6140_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20683_1			1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 26264_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 219_1			1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4595_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3283_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 21027_1	<i>AKR1</i>	K20032	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 22704_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9787_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12333_1	<i>CPN60A</i>		1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4585_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 18771_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5838_1	<i>EFHC1</i>	K23029	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14575_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2154_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4116_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7549_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17472_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17780_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 599_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6253_1			1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 23930_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12621_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4508_1		K13412	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13087_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4935_1	<i>LYPLA1</i>	K06128	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5014_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20384_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 397_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17878_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10661_1			1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13329_1		K19685	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14176_1	<i>VPS29</i>	K18467	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10507_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3745_1			1,6	0,3	0,0

MMETSP0491_2-20121128 15317_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1113_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1721_1	<i>HPGDS</i>	K04097	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9132_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6958_1	<i>groEL, HSPD1</i>	K04077	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8799_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12429_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4279_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9856_1		K05925,K17987,K2199 7	1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1420_1			1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 460_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11967_1			1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8366_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12646_1	<i>CALM</i>	K02183	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 841_1	<i>PPIL6</i>	K12739	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8364_1			1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1883_1			1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4066_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1680_1	<i>INV</i>	K01193	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9500_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4568_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3498_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6814_1	<i>NEDD8</i>	K12158	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 606_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19463_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12963_1			1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 26214_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2649_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1362_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1418_1			1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12475_1			1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6390_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6901_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12073_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7737_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11076_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8947_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20711_1			1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10258_1	<i>CYP3A</i>	K07424	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11181_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5453_1			1,5	0,3	0,0

Παράρτημα

MMETSP0491_2-20121128 12613_1	<i>ELMOD</i>	K23538	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11493_1	<i>RABL2</i>	K07931	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15773_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2716_1	<i>MOB1, Mats</i>	K06685	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8165_1		K15731	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5596_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15071_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3204_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5059_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10097_1	<i>pdxH</i>	K00275	1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5422_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 25612_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6816_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11152_1	<i>DNAJA2</i>	K09503	1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16212_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10407_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9002_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13111_1	<i>FKBP1</i>	K09568	1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10654_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4268_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14741_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 25838_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 22397_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12626_1	<i>PSMD13, RPN9</i>	K03039	1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 26265_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11864_1		K08516	1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10955_1	<i>IST1</i>	K19476	1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16197_1			1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6689_1			1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 22259_1		K14432	1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7547_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6557_1			1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9562_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10840_1	<i>ISCU</i>	K22068	1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13789_1			1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11190_1	<i>HM13</i>	K09595	1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9621_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12002_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17384_1	<i>RSP7</i>		1,4	0,3	0,0

MMETSP0491_2-20121128 1626_1	<i>CHMP5, VPS60</i>	K12198	1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16841_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 809_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12115_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13579_1			1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3402_1			1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9252_1		K13420	1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4091_1			1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13223_1			1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11609_1			1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5288_1	<i>TLL1</i>	K16599	1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7208_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1194_1			1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13583_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6057_1			1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8270_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3721_1			1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14678_1	<i>DBI, ACBP</i>	K08762	1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2600_1		K15280	1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11053_1			1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2369_1			1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10433_1			1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1461_1			1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9693_1			1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 729_1			1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6674_1	<i>LI818R</i>		1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15534_1	<i>pspA</i>	K03969	1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12643_1			1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6797_1		K07034	1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6596_1		K09131	1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2809_1			1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10496_1			1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10803_1			1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9392_1			1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11079_1		K05681	1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 21960_1			1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2663_1			1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1569_1			1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 21_1			1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5972_1			1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9686_1			1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9481_1			1,3	0,3	0,0

Παράρτημα

MMETSP0491_2-20121128 7112_1	<i>nadB</i>	K00278	1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7778_1			1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8514_1			1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7324_1			1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12415_1			1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1233_1			1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4094_1	<i>bglB</i>	K01188,K05350	1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7763_1			1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6029_1			1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11025_1			1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12479_1			1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7087_1	<i>QOR1</i>	K07119	1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2564_1			1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9633_1	<i>UBE2D</i>	K06689	1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6751_1		K09422	1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11672_1			1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12539_1			1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1555_1	<i>GLRX3</i>	K15216	1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6663_1	<i>PDIA4</i>	K09584	1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8267_1		K08824	1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1976_1	<i>VCP</i>	K13525	1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9249_1	<i>SPS, sds</i>	K05356	1,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6739_1			1,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4023_1			1,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9380_1	<i>iscS</i>	K04487	1,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4985_1			-1,0	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7652_1			-1,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9460_1	<i>LHCA5</i>	K08911	-1,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9618_1	<i>psaD</i>	K02692	-1,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7073_1	<i>SLC35E1</i>	K15283	-1,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6467_1			-1,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9520_1			-1,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11052_1	<i>RPE</i>	K01783	-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13603_1	<i>PPIB, ppiB</i>	K03768	-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11033_1			-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11478_1			-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6312_1	<i>asnA</i>	K01953	-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11856_1			-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2040_1			-1,2	0,2	0,0

MMETSP0491_2-20121128 10314_1	<i>PPOX, hemY</i>	K00231	-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12527_1			-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9070_1		K01014	-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4662_1			-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1160_1	<i>pgm</i>	K01835	-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10224_1			-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14898_1		K08912,K08913	-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9504_1	<i>MDH2</i>	K00026	-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19907_1	<i>LHCBS</i>	K08916	-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6181_1			-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5640_1	<i>EDS5</i>		-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6062_1			-1,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19375_1			-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11862_1	<i>ispH, lytB</i>	K03527	-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12270_1			-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9334_1	<i>TARS, thrS</i>	K01868	-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2602_1	<i>LHCA5</i>	K08911	-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6430_1			-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9480_1	<i>bchM, chlM</i>	K03428	-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11911_1			-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9482_1	<i>PARS, proS</i>	K01881	-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5281_1	<i>trmB, METTL1, TRM8</i>	K03439	-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10694_1			-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12742_1			-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11874_1			-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4325_1			-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10796_1			-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1322_1			-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9905_1			-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10005_1	<i>psb27</i>	K08902	-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3187_1		K09680	-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8479_1	<i>YARS, tyrS</i>	K01866	-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 631_1			-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11883_1			-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7825_1			-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12612_1	<i>psaO</i>	K14332	-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13013_1			-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13958_1	<i>PWP2</i>	K14558	-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4246_1			-1,3	0,3	0,0

Παράρτημα

MMETSP0491_2-20121128 34_1	<i>metF,</i> <i>MTHFR</i>	K00297	-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11970_1			-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13738_1			-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6902_1	<i>OLA1</i>	K19788	-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11305_1			-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11021_1	<i>PSRP3</i>	K19032	-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10582_1			-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9999_1	<i>RPF2</i>	K14847	-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9356_1	<i>RP-L15,</i> <i>MRPL15,</i> <i>rplO</i>	K02876	-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8265_1			-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5388_1			-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9632_1	<i>frmA</i>	K00121	-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7022_1	<i>MGD</i>	K03715	-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1510_1			-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6490_1	<i>HIS7</i>	K01663	-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6615_1			-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9946_1	<i>psaF</i>	K02694	-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8023_1			-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16049_1			-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5871_1			-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11876_1	<i>SLC25A23</i> <i>S</i>	K14684	-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6547_1	<i>purD</i>	K01945	-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8022_1		K15191	-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10794_1	<i>EIF3C</i>	K03252	-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10216_1	<i>RP-S5,</i> <i>MRPS5,</i> <i>rpsE</i>	K02988	-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13034_1	<i>FKBP1</i>	K09568	-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19053_1			-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8992_1			-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4543_1			-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7050_1			-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16252_1	<i>psbM</i>	K02714	-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12543_1			-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9476_1	<i>LHCB1</i>	K08912	-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7233_1		K01580	-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12007_1			-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11171_1			-1,4	0,3	0,0

MMETSP0491_2-20121128 9672_1			-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11559_1			-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4349_1			-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3940_1		K01802,K09565	-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10855_1	<i>petH</i>	K02641	-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11317_1	<i>ispD</i>	K00991	-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17610_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11485_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8796_1		K12824	-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10736_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 758_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 944_1	<i>purM</i>	K01933	-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2774_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 24464_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4476_1			-1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3830_1			-1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6976_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4192_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9426_1	<i>UTP6</i>	K14557	-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11067_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 462_1			-1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8486_1	<i>PAT, AAT</i>	K15849	-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9321_1	<i>LHCB1</i>	K08912	-1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9928_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11425_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11470_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7055_1		K03798	-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10648_1	<i>DEGP9</i>	K25897	-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3664_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7074_1	<i>bioB</i>	K01012	-1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16534_1		K14823	-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11073_1			-1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16680_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11852_1	<i>RP-L13</i>	K02871	-1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10991_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 104_1	<i>dapA</i>	K01714	-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8089_1	<i>adk</i>	K00939	-1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15886_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14982_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10244_1	<i>PK</i>	K00873	-1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2053_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11225_1			-1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 993_1			-1,5	0,3	0,0

Παράρτημα

MMETSP0491_2-20121128 12116_1	<i>psaG</i>	K08905	-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1961_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13249_1	<i>ENO</i>	K01689	-1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6942_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20815_1		K08582	-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20886_1		K03233	-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10478_1	<i>gcvH, GCSH</i>	K02437	-1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8357_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10729_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16998_1	<i>fabD</i>	K00645	-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13299_1	<i>ODC1, speC, speF</i>	K01581	-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8088_1			-1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5036_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3528_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13202_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6786_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 22466_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 310_1			-1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13938_1	<i>PRK</i>	K00855	-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12717_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2177_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14440_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2107_1	<i>NOL</i>	K13606	-1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15768_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19004_1	<i>fabD</i>	K00645	-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19693_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1946_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3468_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6315_1	<i>truB, PUS4, TRUB1</i>	K03177	-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11417_1	<i>serC</i>	K00831	-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12438_1			-1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8317_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9656_1	<i>HDS</i>	K03526	-1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6803_1		K01365,K08568,K1629 2	-1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6367_1		K11527	-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4262_1	<i>EF-TU</i>	K12852	-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10380_1	<i>RP-L6</i>	K02933	-1,6	0,2	0,0

MMETSP0491_2-20121128 3703_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 21532_1	<i>argAB</i>	K14682	-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7015_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10287_1			-1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7303_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11940_1	<i>psbW</i>	K02721	-1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15781_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8148_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10242_1	<i>RP-L22, MRPL22, rplV</i>	K02890	-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1596_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5041_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5082_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6317_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6844_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3268_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3780_1	<i>ilvA, tdcB</i>	K01754	-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4971_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16025_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5138_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11819_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3989_1	<i>PFAS</i>	K01952	-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11705_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8060_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4434_1		K14407	-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3643_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13364_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15895_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6945_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17836_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4385_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3169_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7838_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5916_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10336_1		K01866,K15437	-1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4353_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5892_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15816_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6770_1	<i>NVD, DAF36</i>	K14938	-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9648_1			-1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10543_1	<i>petE</i>	K02638	-1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2195_1		K11090	-1,7	0,3	0,0

Παράρτημα

MMETSP0491_2-20121128 2664_1	<i>serA</i>	K00058	-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10523_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 23417_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12162_1	<i>CGR1</i>	K14822	-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15793_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5679_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17561_1	<i>PAP2</i>	K09775	-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 21666_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13357_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6819_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10285_1			-1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10132_1			-1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16264_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 673_1			-1,7	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10566_1			-1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 26312_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4995_1		K00434	-1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8469_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6096_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 23349_1		K14864	-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 586_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11644_1	<i>asd</i>	K00133	-1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10362_1	<i>HEME3</i>		-1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 18370_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11718_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4813_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3948_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12213_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9430_1			-1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6216_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13366_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6762_1	<i>leuB</i>	K00052	-1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1877_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20119_1			-1,8	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10437_1	<i>RP-L3</i>	K02906	-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 23631_1			-1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5705_1	<i>EIF1AD</i>	K15025	-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6144_1		K03798	-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7029_1	<i>chlG</i>	K04040	-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 18839_1			-1,8	0,2	0,0

MMETSP0491_2-20121128 16442_1			-1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15942_1	<i>PRMT1</i>	K11434	-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13807_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3579_1	<i>LHCA1</i>	K08907	-1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3003_1		K02548	-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9361_1	<i>LHCA5</i>	K08911	-1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 22580_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14214_1	<i>rpiA</i>	K01807	-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5372_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17695_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16395_1	<i>TLP40</i>		-1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 78_1	<i>DUR3</i>	K20989	-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12453_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12590_1	<i>PDHA</i>	K00161	-1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12599_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7422_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9789_1	<i>chrA</i>	K07240	-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7558_1	<i>speE,</i> <i>SRM, SPE3</i>	K00797	-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5272_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12380_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19757_1			-1,8	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13154_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4844_1	<i>argG,</i> <i>ASS1</i>	K01940	-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4621_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4371_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6908_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5410_1			-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20808_1	<i>TPI</i>	K01803	-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12977_1			-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 335_1			-1,9	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3860_1			-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9794_1			-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1911_1			-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 26631_1			-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 25885_1			-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 26670_1			-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3629_1			-1,9	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8475_1			-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20206_1			-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4841_1			-1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9462_1			-1,9	0,3	0,0

Παράρτημα

MMETSP0491_2-20121128 11200_1	<i>add</i>	K01488	-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9011_1		K05302,K19199	-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5098_1			-1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1536_1	<i>fabF</i>	K09458	-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12095_1			-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6874_1			-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6974_1	<i>PSBX</i>		-1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3688_1			-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4142_1	<i>leuA, IMS</i>	K01649	-1,9	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17573_1		K14206,K14638	-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 18800_1			-1,9	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1057_1			-1,9	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20806_1			-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11608_1			-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 262_1		K20989	-1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5470_1			-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4308_1			-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13656_1			-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9979_1			-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 23071_1			-1,9	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13363_1	<i>DVR</i>	K19073	-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 866_1			-1,9	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12849_1			-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7057_1			-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14317_1		K14852	-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 26962_1			-2,0	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5462_1	<i>GDA</i>	K01487	-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3255_1			-2,0	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17060_1			-2,0	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16453_1		K02548	-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11553_1			-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3939_1			-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7938_1			-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 947_1			-2,0	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6992_1	<i>TOC75</i>		-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17255_1	<i>trpA</i>	K01695	-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7355_1	<i>SLC20A, PIT</i>	K14640	-2,0	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14569_1		K18787	-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5914_1		K18757	-2,0	0,3	0,0

MMETSP0491_2-20121128 7046_1		K01955	-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1738_1			-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15374_1			-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10574_1			-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 26936_1	<i>TIC20</i>		-2,0	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14076_1			-2,0	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15281_1	<i>AMY1</i>	K01176	-2,0	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10363_1			-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1948_1			-2,0	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17547_1			-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11822_1	<i>GGPS1</i>	K13789	-2,0	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8173_1			-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10874_1			-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19293_1			-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7281_1			-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2322_1			-2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16778_1		K01082,K15422	-2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10372_1			-2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9233_1			-2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5585_1			-2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5020_1		K01792	-2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9413_1	<i>DKC1, NOLA4, CBF5</i>	K11131	-2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12499_1	<i>EARS, gltX</i>	K01885	-2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15015_1			-2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3904_1			-2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9817_1			-2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17413_1			-2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5501_1			-2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7408_1			-2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 986_1			-2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17871_1			-2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10522_1	<i>RP-S1, rpsA</i>	K02945	-2,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 24977_1			-2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8219_1	<i>ilvH, ilvN</i>	K01653	-2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6833_1			-2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16604_1		K13181	-2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14592_1	<i>LHCA4</i>	K08910	-2,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3515_1	<i>NOP56</i>	K14564	-2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12725_1			-2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11849_1			-2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4889_1			-2,1	0,4	0,0

Παράρτημα

MMETSP0491_2-20121128 2143_1			-2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9037_1			-2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19407_1			-2,2	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12214_1			-2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2711_1			-2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10105_1	<i>yidC,</i>	K03217	-2,2	0,3	0,0
	<i>spolIII,</i>				
	<i>OXA1,</i>				
	<i>ccfA</i>				
MMETSP0491_2-20121128 5122_1			-2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6837_1			-2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2279_1			-2,2	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17034_1			-2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10010_1	<i>LHCA4</i>	K08910	-2,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20528_1			-2,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20065_1			-2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6276_1		K19788	-2,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13252_1			-2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12655_1			-2,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1115_1			-2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9732_1			-2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16797_1			-2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7367_1			-2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3193_1			-2,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 24710_1	<i>fabH</i>	K00648	-2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12013_1			-2,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11704_1	<i>hisA</i>	K00817	-2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1084_1			-2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 747_1			-2,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 22072_1			-2,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20117_1			-2,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17866_1			-2,3	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8285_1			-2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15598_1			-2,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6511_1			-2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15954_1			-2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3480_1			-2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16543_1	<i>RNY1</i>	K01166,K07870,K1443 0	-2,4	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9250_1			-2,4	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7302_1			-2,4	0,3	0,0

MMETSP0491_2-20121128 9718_1	<i>HEMC</i>	K01749	-2,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 24099_1			-2,4	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13623_1	<i>PRPS, prsA</i>	K00948	-2,4	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19482_1			-2,4	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6755_1	<i>psbQ</i>	K08901	-2,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15477_1			-2,5	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11988_1			-2,5	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1227_1			-2,5	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5210_1			-2,5	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1723_1			-2,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19695_1			-2,5	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 22193_1			-2,5	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16148_1			-2,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3189_1	<i>OTC, argF, argI</i>	K00611	-2,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9710_1			-2,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10963_1			-2,6	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14398_1			-2,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12880_1			-2,6	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 22609_1			-2,6	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2867_1			-2,6	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10040_1			-2,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8972_1			-2,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3818_1			-2,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 750_1		K20347	-2,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2612_1			-2,7	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4897_1		K01768,K22020	-2,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6037_1			-2,7	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 835_1			-2,7	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7098_1			-2,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7282_1			-2,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 25472_1			-2,7	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12458_1		K10334	-2,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4809_1			-2,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 23538_1			-2,7	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8323_1			-2,8	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4190_1			-2,8	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14827_1	<i>GUN4</i>		-2,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11790_1			-2,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 23015_1			-2,8	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 21114_1		K17681	-2,8	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5678_1			-2,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 24097_1	<i>NOP5</i>	K14565	-2,9	0,4	0,0

Παράρτημα

MMETSP0491_2-20121128 14962_1			-2,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8258_1			-2,9	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10309_1	<i>gor, CRYZ</i>	K00344	-3,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12489_1			-3,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12593_1	<i>LHCA4</i>	K08910	-3,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 22205_1			-3,5	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16477_1			-3,5	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19007_1			-3,6	0,7	0,0

Παράρτημα 1.2. Δεδομένα RNAseq για μετάγραφα του *T. chuii* με adj.p < 0.05 (bold).

ID	6h vs 0h				
	Gene name	KEGG KO	DE Log2 Ratio	DE Log2 SE	DE Adj p-value
MMETSP0491_2-20121128 19499_1			3,9	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9130_1			3,8	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 23650_1			3,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11905_1			3,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2608_1			3,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10059_1			3,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10961_1	<i>DLC-D</i>	K10418	3,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5819_1			3,4	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16172_1			3,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3936_1			3,2	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3603_1			3,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3458_1			3,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11239_1			3,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 90_1			3,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11337_1			3,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 460_1			3,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14315_1			3,0	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12223_1			2,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 26367_1			2,9	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 25190_1	<i>DPY30</i>	K14965,K14968	2,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11594_1			2,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10710_1			2,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3451_1			2,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3743_1			2,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15881_1		K17302	2,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5896_1			2,8	0,3	0,0

MMETSP0491_2-20121128 13111_1	<i>FPR1</i>	K09568	2,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 440_1			2,8	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5922_1			2,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 18226_1			2,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2716_1	<i>MOB1, Mats</i>	K06685	2,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13234_1	<i>DYNLRB, DNCL2</i>	K10419	2,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 367_1			2,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9342_1			2,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11076_1			2,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11832_1		K02183,K16465	2,7	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6390_1			2,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5670_1			2,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7033_1			2,7	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9866_1			2,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3241_1		K14432	2,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12403_1	<i>HSP20</i>	K13993	2,7	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9132_1			2,7	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17321_1			2,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9144_1			2,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12646_1	<i>CALM</i>	K02183	2,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1926_1			2,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15780_1			2,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 26207_1			2,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 18638_1			2,6	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11892_1			2,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6989_1			2,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 22185_1			2,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 482_1			2,6	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15116_1			2,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 22690_1			2,6	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15223_1			2,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7996_1			2,6	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10754_1			2,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10375_1			2,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5731_1		K11252	2,6	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3180_1			2,5	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11817_1			2,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 23638_1	<i>CLPB</i>	K03695	2,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12873_1	<i>HSPB11</i>	K19369	2,5	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9556_1			2,5	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6217_1			2,5	0,4	0,0

Παράρτημα

MMETSP0491_2-20121128 25613_1			2,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11446_1			2,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12545_1			2,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 58_1			2,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10577_1	<i>RPABC2</i>	K03014	2,5	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 22693_1			2,4	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12555_1			2,4	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5980_1			2,4	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4462_1			2,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 22043_1			2,4	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11424_1			2,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6814_1	<i>NEDD8</i>	K12158	2,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11734_1			2,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10842_1			2,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12012_1	<i>petJ</i>	K08906	2,4	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11086_1			2,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 18248_1			2,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10098_1			2,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3109_1			2,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6419_1	<i>TIM10</i>	K17778	2,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6456_1			2,4	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 22897_1			2,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15941_1			2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5551_1			2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6883_1			2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15512_1			2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1362_1			2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6466_1	<i>CETN1</i>	K16465	2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14198_1	<i>FAM183</i>	K25474	2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14269_1			2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20242_1			2,3	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12503_1			2,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 841_1	<i>PPIL6</i>	K12739	2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1344_1			2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14805_1			2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10230_1	<i>grxC, GLRX, GLRX2</i>	K03676	2,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9787_1			2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12190_1			2,2	0,2	0,0

MMETSP0491_2-20121128 15759_1			2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10062_1			2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19171_1			2,2	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6416_1			2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9377_1	<i>TXND C5</i>	K13984	2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7361_1			2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14566_1			2,2	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5206_1			2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 26619_1			2,2	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14678_1	<i>DBI, ACBP</i>	K08762	2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5616_1			2,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2488_1			2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2253_1			2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10279_1			2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10032_1			2,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15648_1			2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10407_1			2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12490_1			2,2	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2881_1			2,2	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15714_1			2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10704_1			2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14723_1			2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5481_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9405_1	<i>ELOF1, ELF1</i>	K25829	2,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9268_1			2,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8_1	<i>RP-L38e</i>	K02923	2,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6886_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6474_1	<i>SPATA4</i>	K25616	2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 64_1	<i>RP-L35e, RPL35</i>	K02918	2,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 473_1			2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15355_1	<i>MPC1</i>	K22138	2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16864_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7561_1			2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16530_1	<i>RSP8</i>		2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4728_1	<i>GOLS</i>	K18819	2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17551_1	<i>petC</i>	K02636	2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20368_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3568_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 21014_1			2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3251_1			2,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12058_1			2,1	0,3	0,0

Παράρτηματ

MMETSP0491_2-20121128 2073_1			2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13283_1	<i>ENKUR</i>	K25647	2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3039_1			2,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3630_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11918_1			2,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3584_1			2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9459_1	<i>LAGE3,</i> <i>PCC1</i>	K15902	2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5525_1			2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16103_1		K11549	2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 26433_1	<i>GAPDH</i>	K00134	2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2501_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 404_1	<i>RP-L23e</i>	K02894	2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 97_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9721_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12435_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 660_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12160_1			2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16260_1			2,0	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12259_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15763_1			2,0	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10086_1	<i>MPC1</i>	K22138	2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17494_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5325_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1180_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7691_1	<i>NDUFA8</i>	K03952	2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 23658_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5367_1			2,0	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10273_1			2,0	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2726_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1252_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 25661_1			2,0	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14662_1	<i>H3</i>	K11253	2,0	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9193_1	<i>H3</i>	K11253	2,0	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10697_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2413_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10450_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6071_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6646_1	<i>NDUFA1</i>	K03945	2,0	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16292_1			2,0	0,4	0,0

MMETSP0491_2-20121128 26483_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11113_1			2,0	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 22651_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6966_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6187_1		K00859	2,0	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12985_1			2,0	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16499_1			2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6781_1	TAF13	K03127	1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13365_1			1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5014_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5059_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10011_1	CETN1	K16465	1,9	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6848_1			1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20705_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20384_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 151_1	yhby	K07574	1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13723_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9127_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 187_1	MED28	K15141	1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9692_1			1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3282_1			1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11356_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9335_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 23295_1	SOS3	K06268	1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 21840_1	EIF5	K03262	1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3408_1		K13448	1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10461_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5345_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12663_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6936_1	tdk, TK	K00857	1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12492_1			1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4220_1			1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20439_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 535_1	RP-LP2	K02943	1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 26750_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7185_1	TMEM17	K19384	1,9	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5011_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 916_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8844_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 337_1	CETN1	K16465,K16466	1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20241_1			1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10266_1	RP-L20	K02887	1,9	0,2	0,0

Παράρτημα

MMETSP0491_2-20121128 3739_1	<i>groES,</i> <i>HSPE1</i>	K04078	1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13250_1	<i>groES,</i> <i>HSPE1</i>	K04078	1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5912_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13470_1			1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7155_1			1,9	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6718_1	<i>SAP18</i>	K14324	1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11791_1			1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15843_1			1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12598_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2536_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12912_1			1,8	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 162_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2046_1	<i>PCNA</i>	K04802	1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14355_1	<i>CFAP300</i>	K24230	1,8	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5242_1	<i>MTFP1,</i> <i>MTP18</i>	K17981	1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15832_1			1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3706_1			1,8	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9800_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 834_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15555_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7089_1		K10419	1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5349_1			1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10237_1			1,8	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 470_1	<i>RP-L39e</i>	K02924	1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1165_1		K17500	1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7933_1	<i>purU</i>	K00974,K01433	1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1488_1			1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14849_1	<i>NDUFB10</i>	K03966	1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3915_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3410_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2075_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16732_1			1,8	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 755_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6947_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 204_1	<i>MBD4</i>	K10801	1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3547_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11865_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7692_1			1,8	0,3	0,0

MMETSP0491_2-20121128 11138_1			1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12327_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9868_1	<i>RP-L22e,</i> <i>RPL22</i>	K02891	1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12348_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15268_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5394_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11381_1	<i>RP-L32,</i> <i>MRPL32,</i> <i>rpmF</i>	K02911	1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4661_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2649_1			1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12716_1	<i>SDHD</i>	K00237	1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5706_1			1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8425_1	<i>UBE2M,</i> <i>UBC12</i>	K10579	1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1784_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 321_1	<i>MACROD,</i> <i>ymdB</i>	K23518	1,7	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 18336_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13672_1	<i>DNALI</i>	K10410	1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5443_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 928_1	<i>RP-L14e</i>	K02875	1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12861_1	<i>YGK1,</i> <i>HDDC2</i>	K07023	1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4165_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4312_1	<i>EFCAB10</i>		1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11131_1	<i>PET100F</i>	K18187	1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6101_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9094_1			1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5494_1			1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1487_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 21_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11144_1	<i>SNRPD2,</i> <i>SMD2</i>	K11096	1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 157_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9624_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11672_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 306_1	<i>POLD4</i>	K03505	1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 164_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10650_1			1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13248_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6926_1	<i>H2A</i>	K11251	1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1377_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10306_1	<i>CALM</i>	K02183,K16465	1,7	0,3	0,0

Παράρτημα

MMETSP0491_2-20121128 6652_1	<i>PACRG</i>	K26163	1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15979_1	<i>CALM</i>	K02183	1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11219_1	<i>RABAC1,</i> <i>PRAF1</i>	K20359	1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4650_1			1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3741_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11319_1			1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11864_1	<i>YKT6</i>	K08516	1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 25573_1	<i>DNAAF2</i>	K19751	1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14281_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 18942_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10210_1	<i>kdsD,</i> <i>kpsF</i>	K06041	1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9740_1			1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5504_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 21570_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11259_1	<i>ARL2BP</i>	K16742	1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6353_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9419_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12512_1	<i>ITI4</i>		1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6995_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2007_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13240_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7840_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16563_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 409_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8495_1		K11982	1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 26534_1			1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10226_1			1,7	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15559_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20033_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5347_1	<i>QCR9</i>	K00419	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8204_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2118_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 18000_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7674_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6930_1	<i>PSMG4,</i> <i>PAC4</i>	K11878	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10618_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19917_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13243_1			1,6	0,2	0,0

MMETSP0491_2-20121128 20049_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8352_1	<i>croR</i>	K17865	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6596_1		K09131	1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12041_1	<i>BB</i>	K19045	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1740_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13222_1	<i>ATPeVOB</i>	K03661	1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15874_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10968_1			1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11884_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9930_1			1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9633_1	<i>UBE2D</i>	K06689	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12017_1	<i>cbn-1</i>		1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13814_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13229_1	<i>msrB</i>	K07305	1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11484_1	<i>HSPBP1,</i> <i>FES1</i>	K09562	1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5834_1			1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2849_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 155_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8957_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10888_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1564_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12157_1	<i>NSA2</i>	K10364,K14842	1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11235_1	<i>ODA7</i>	K19750	1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13770_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5228_1	<i>EGY1</i>	K22069	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12577_1	<i>DPM3</i>	K09659	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10893_1	<i>UCHL5,</i> <i>UCH37</i>	K05610	1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2587_1	<i>SDHAF1</i>	K18167	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1103_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5108_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17633_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 265_1	<i>RP-L30,</i> <i>MRPL30,</i> <i>rpmD</i>	K02907	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 23853_1	<i>RNF5</i>	K10666	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4784_1	<i>RP-S12e,</i> <i>RPS12</i>	K02951	1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9968_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5628_1	<i>URM1</i>	K12161	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13521_1			1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6142_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14825_1			1,6	0,2	0,0

Παράρτημα

MMETSP0491_2-20121128 7072_1	<i>PFN</i>	K05759	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9529_1	<i>MBF1</i>	K03627	1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 670_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13314_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4782_1	<i>EGD2, NACA</i>	K03626	1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9329_1			1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10601_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13367_1	<i>TAF7</i>	K03132	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9977_1	<i>FKBP2</i>	K09569	1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5523_1	<i>BUD20</i>	K14821	1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10737_1			1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8623_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5662_1			1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17319_1	<i>CML</i>	K13448	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10101_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6248_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17400_1	<i>GIN54, SLD5</i>	K10735	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5624_1	<i>REEP5_6</i>	K17279	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10030_1			1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8081_1	<i>stv1</i>	K00780,K03368	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16407_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4565_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 781_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10530_1	<i>ARL6, BBS3</i>	K07951	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 18325_1	<i>PAQR8</i>		1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12376_1		K11275	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14826_1	<i>SNRPG, SMG</i>	K11099	1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10015_1			1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 845_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 756_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5716_1			1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10943_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15392_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11574_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7592_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9818_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6453_1			1,5	0,2	0,0

MMETSP0491_2-20121128 6977_1	<i>MED10,</i> <i>NUT2</i>	K15151	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8006_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9135_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 486_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9697_1	<i>TAF10</i>	K03134	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 45_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12293_1	<i>NDUFB9</i>	K03965	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1186_1	<i>POLE4</i>	K03506	1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10844_1			1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10241_1			1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 687_1	<i>COX19</i>	K18183	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10496_1			1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5838_1	<i>EFHC1</i>	K23029	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6618_1	<i>POMP</i>	K11599	1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10640_1	<i>FXN</i>	K19054	1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 24984_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11095_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11632_1	<i>RP-S26e</i>	K02976	1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 544_1	<i>RP-L23</i>	K02892	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7393_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8269_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12003_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6407_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13690_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9562_1			1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13429_1	<i>RP-L36,</i> <i>MRPL36,</i> <i>rpmJ</i>	K02919	1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 376_1			1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12008_1			1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6475_1	<i>PSA2</i>		1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9463_1		K14566	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 401_1			1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13134_1	<i>WDR83OS</i>	K24963	1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 25_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4188_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9314_1	<i>CHMP1,</i> <i>VPS46,</i> <i>DID2</i>	K12197	1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1702_1		K06041	1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6603_1	<i>USP12_46</i>	K11842	1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10800_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2077_1			1,4	0,3	0,0

Παράρτημα

MMETSP0491_2-20121128 18027_1			1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9160_1	<i>trxA</i>	K03671	1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12580_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10311_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10574_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10542_1	<i>NOP16</i>	K14839	1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11637_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11340_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11014_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 21966_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20297_1	<i>COX6B</i>	K02267	1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9292_1			1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12367_1	<i>SKP1</i>	K03094	1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4268_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3081_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9240_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5312_1			1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16015_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1788_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 18213_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12300_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15521_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7978_1	<i>NHP6</i>		1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11789_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3780_1	<i>ilvA, tdcB</i>	K01754	1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10520_1			1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11485_1			1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16709_1			1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9586_1	<i>CYN22</i>	K09567	1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11057_1			1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8019_1	<i>efp</i>	K02356	1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12569_1	<i>PFDN2</i>	K09549	1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3322_1			1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10270_1			1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11698_1			1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9358_1			1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11279_1	<i>OTUB1</i>	K09602	1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12436_1	<i>GNA1</i>	K00621	1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11754_1	<i>NDUFA13</i>	K11353	1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17042_1			1,3	0,3	0,0

MMETSP0491_2-20121128 15794_1	<i>CALM</i>	K02183	1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1594_1			1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11794_1			1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9636_1	<i>RNLS</i>	K18208	1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4720_1			1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10696_1		K01515,K13987	1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1721_1	<i>HPGDS</i>	K04097	1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11716_1	<i>RBX1</i>	K03868	1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10802_1			1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10571_1			1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11373_1			1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3720_1	<i>DUSP10</i>	K20216	1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9544_1			1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10365_1			1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3341_1			1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5221_1		K12160	1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9137_1			1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1104_1	<i>MEMO1</i>	K06990	1,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15129_1	<i>tpm</i>	K00569	1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 26011_1			1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12454_1			1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14432_1			1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11143_1	<i>PSMA2</i>	K02726	1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6421_1	<i>CSN2</i>	K12176	1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15773_1			1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10631_1	<i>RP-S24e,</i> <i>RPS24</i>	K02974	1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9299_1			1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9888_1	<i>RP-S21e</i>	K02971	1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20680_1			1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6545_1			1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 945_1			1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11399_1			1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6767_1			1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10079_1			1,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11922_1	<i>SPL7</i>		1,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8121_1			-1,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12593_1	<i>LHCA4</i>	K08910	-1,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9943_1	<i>PP2C</i>	K14497	-1,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15078_1	<i>CARP,</i> <i>pepA</i>	K01255	-1,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4606_1	<i>malQ</i>	K00705	-1,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10803_1	<i>XCP</i>	K16290	-1,2	0,2	0,0

Παράρτημα

MMETSP0491_2-20121128 11003_1	<i>clpC</i>	K03696	-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8105_1	<i>SIN3A</i>	K11644	-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 23631_1			-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11861_1			-1,2	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9140_1			-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3401_1	<i>ABC F2</i>	K06185	-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10855_1	<i>petH</i>	K02641	-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1480_1		K12858	-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8307_1			-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10468_1	<i>glyA</i>	K00600	-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5640_1	<i>EDS5</i>		-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7386_1			-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3665_1	<i>ACSL</i>	K01897	-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5865_1	<i>CAPG</i>	K10368	-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11899_1			-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9334_1	<i>TARS, thrS</i>	K01868	-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8217_1	<i>pgm</i>	K01835	-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7015_1			-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19478_1			-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10207_1			-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12517_1	<i>SQD1</i>	K06118	-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12902_1	<i>crtB</i>	K02291	-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6493_1	<i>HPR1</i>	K15893	-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5398_1		K20043,K20044	-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2737_1			-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 947_1			-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 20528_1			-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1610_1			-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9628_1	<i>HSPA1s</i>	K03283	-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10314_1	<i>PPOX</i>	K00231	-1,3	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15914_1			-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8194_1			-1,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6785_1		K10590	-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5487_1			-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3325_1			-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10409_1	<i>prlC</i>	K01414	-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2615_1	<i>AMPD</i>	K01490	-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6663_1	<i>PDIL2-3</i>	K09584	-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 21035_1			-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3924_1	<i>SEX4</i>		-1,4	0,3	0,0

MMETSP0491_2-20121128 9060_1			-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 34_1	<i>metF</i>	K00297	-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5842_1			-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19375_1			-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 220_1			-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6409_1			-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16566_1			-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10519_1		K08857	-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10244_1	<i>PK</i>	K00873	-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1375_1			-1,4	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1084_1			-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10967_1			-1,4	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1255_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6549_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5375_1			-1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3823_1	<i>ALDH18A</i>	K12657	-1,5	0,3	0,0
	<i>1</i>				
MMETSP0491_2-20121128 5429_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 26005_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 565_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 631_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13366_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7324_1			-1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 700_1	<i>CAS1</i>	K01853	-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12725_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11838_1			-1,5	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12952_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2762_1	<i>LKHA4</i>	K01254	-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4609_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2946_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6563_1	<i>ENA</i>	K01536	-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19139_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19040_1			-1,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4438_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4783_1	<i>FBXL2_20</i>	K10268	-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4351_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14707_1	<i>fabG</i>	K00059	-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12769_1	<i>PDE-4</i>	K13293	-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8430_1			-1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9553_1	<i>ABCB6</i>	K05661	-1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8023_1			-1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10233_1			-1,6	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14726_1			-1,6	0,2	0,0

Παράρτημα

MMETSP0491_2-20121128 1472_1		K02519	-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6942_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 21403_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6062_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4371_1	<i>PWP2,</i>	K14558	-1,6	0,3	0,0
	<i>UTP1</i>				
MMETSP0491_2-20121128 12054_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15062_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3169_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1158_1			-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19467_1	<i>TPP2</i>	K01280	-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6025_1	<i>XPO7,</i>	K18460	-1,6	0,3	0,0
	<i>EXP7</i>				
MMETSP0491_2-20121128 632_1		K12741	-1,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7648_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8254_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1817_1		K19718	-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17764_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1160_1	<i>pgm</i>	K01835	-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2177_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9343_1	<i>GOT2</i>	K14455	-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9833_1		K13412	-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 22236_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14962_1	<i>ARG1</i>	K01476	-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12742_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7930_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10834_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4718_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7217_1		K14005	-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 23_1	<i>CPSF1,</i>	K14401	-1,7	0,3	0,0
	<i>CFT1</i>				
MMETSP0491_2-20121128 15281_1	<i>AMY1</i>	K01176	-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9482_1	<i>PARS,</i>	K01881	-1,7	0,3	0,0
	<i>proS</i>				
MMETSP0491_2-20121128 12048_1			-1,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7828_1			-1,7	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7048_1		K03235	-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6024_1			-1,8	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3528_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5952_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14562_1			-1,8	0,3	0,0

MMETSP0491_2-20121128 3948_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3447_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6216_1	<i>EF-TU</i>	K12852	-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17515_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15374_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2257_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10722_1			-1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5935_1	<i>DHRS12</i>	K11168	-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7581_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12655_1			-1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12990_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15787_1			-1,8	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5057_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5721_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9125_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13096_1		K01256	-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1437_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3817_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4475_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6881_1			-1,8	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11873_1	<i>gcvT</i>	K00605	-1,8	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2409_1		K20246	-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9285_1			-1,8	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13057_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13455_1			-1,8	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17056_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 24438_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10243_1			-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2907_1	<i>COPB1, SEC26</i>	K17301	-1,8	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2626_1			-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15629_1			-1,9	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3904_1			-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4652_1	<i>GLDC</i>	K00281	-1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7107_1			-1,9	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1631_1		K12856	-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3125_1			-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10132_1			-1,9	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2560_1			-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2251_1			-1,9	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1101_1			-2,0	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7046_1	<i>carB</i>	K01955	-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12134_1			-2,0	0,4	0,0

Παράρτηματ

MMETSP0491_2-20121128 6007_1			-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14951_1	<i>GBE1</i>	K00700	-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5667_1			-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8161_1	<i>AP2A</i>	K11824	-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 750_1		K20347	-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1603_1			-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 22831_1	<i>BCOP</i>	K17301	-2,0	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16797_1			-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 21363_1			-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 10523_1			-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1296_1			-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 25270_1			-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7875_1		K14326	-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9146_1			-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6803_1		K01365,K08568,K1629 2	-2,0	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9786_1			-2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14398_1			-2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19695_1			-2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 21965_1			-2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3984_1			-2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4685_1			-2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15781_1			-2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 21506_1			-2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6181_1			-2,1	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14535_1		K07179,K08794,K0886 3	-2,1	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9996_1	<i>AGXT</i>	K00830	-2,1	0,2	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3767_1			-2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3982_1			-2,2	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5869_1		K11647,K11786	-2,2	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2859_1	<i>GCN1L1</i>		-2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16256_1			-2,2	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 14779_1			-2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 13154_1			-2,2	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 1091_1			-2,2	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 2575_1	<i>DHRS12</i>	K11168	-2,2	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 8498_1			-2,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 26490_1	<i>RPA1A</i>	K07466	-2,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4881_1			-2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7367_1			-2,3	0,3	0,0

MMETSP0491_2-20121128 8783_1			-2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 19023_1			-2,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11988_1			-2,3	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 26139_1			-2,3	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 17796_1			-2,3	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 4654_1			-2,3	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 9250_1			-2,4	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 5152_1			-2,4	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 876_1			-2,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 18119_1		K12867	-2,5	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 3077_1	GWD1	K08244	-2,5	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 7825_1			-2,6	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 16680_1			-2,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 12717_1			-2,7	0,3	0,0
MMETSP0491_2-20121128 23315_1			-2,7	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 812_1			-2,8	0,4	0,0
MMETSP0491_2-20121128 11397_1			-3,0	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 15477_1			-3,0	0,5	0,0
MMETSP0491_2-20121128 6096_1			-3,5	0,3	0,0

Παράρτημα 2. Σχετικά επίπεδα των μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν με GC-MS για το *T. chuii*.

Παράρτημα 2.1. 1 h vs 0 h								
	RT	m/z	0h	SE	1 h	SE	1h/0h	P
Amino acids								
L-proline	14,08395	142	27,15	1,80	32,64	1,41	1,20	0,29
L-ornithine	26,3882	174	21,36	1,81	34,18	3,04	1,60	0,01
L-valine	12,0452	144	3,11	0,17	11,98	1,01	3,85	0,00
L-threonine	16,52835	218	11,86	0,93	33,01	2,32	2,78	0,00
L-tryptophan	33,9465	202	n.d	n.d	0,24	0,11	1h specific	
citrulline	26,48755	157	5,82	0,34	7,56	0,32	1,30	0,05
L-norleucine	13,4872	158	1,22	0,09	7,90	0,94	6,48	0,00
L-asparagine	23,2636	231	111,45	11,78	422,54	28,71	3,79	0,00
Beta- alanine	17,3783	248	1,06	0,22	2,54	0,40	2,38	0,02
L-cysteine	20,5573	220	n.d	n.d	0,67	0,20	1h specific	
L-alanine	9,2325	116	122,94	13,68	163,43	3,86	1,33	0,05
L-serine	15,83665	204	43,88	4,40	47,10	2,58	1,07	0,89
tyrosine	28,78545	218	0,02	0,02	2,90	0,47	129,21	0,00
L-methionine	19,62155	176	0,24	0,16	2,56	0,54	10,72	0,00
L-lysine	28,457	317	13,63	0,96	26,03	1,68	1,91	0,00
L-glutamine	25,4187	156	55,87	5,76	132,75	9,01	2,38	0,00
DL-isoleucine	14,0454	158	1,61	0,18	7,71	0,60	4,80	0,00

Παραρτήματ

beta-cyano-L-alanine	16,0309	141	10,01	0,88	17,84	0,52	1,78	0,00
glycine	14,3521	174	14,13	1,69	11,23	0,82	0,79	0,30
L-mimosine	11,44215	188	n.d	n.d	0,30	0,06	1h specific	
Organic acids								
myristic acid	26,66715	285	1,16	0,11	1,31	0,09	1,13	0,64
succinic acid	14,46285	148	2,15	0,11	5,98	0,48	2,78	0,00
L-(+) lactic acid	8,3065	147	1,32	0,22	1,19	0,20	0,90	1,00
maleic acid	14,266	147	0,34	0,15	1,10	0,22	3,21	0,04
tartaric acid	25,626	147	3,05	0,09	4,30	0,50	1,41	0,18
fumaric acid	15,2848	245	0,21	0,08	0,27	0,05	1,26	0,83
D-malic acid	19,0292	147	4,83	0,59	28,58	5,88	5,91	0,00
nicotinic acid	13,8528	180	n.d	n.d	0,03	0,02	1h specific	
citric acid	26,58325	347	0,11	0,05	0,84	0,14	7,54	0,00
maleamic acid	19,57335	244	1,71	0,22	3,20	0,26	1,87	0,00
gluconic acid	25,8024	333	0,63	0,29	3,08	0,68	4,88	0,09
oxalic acid	6,7197	147	2,48	0,60	2,24	0,47	0,90	0,88
aspartic acid	19,7722	232	10,54	1,43	37,68	4,02	3,57	0,00
L-glutamic acid	22,07675	246	104,81	5,97	294,93	20,19	2,81	0,00
glycolic acid	8,6283	147	0,56	0,19	1,77	0,42	3,16	0,41
glyceric acid	15,08935	189	7,16	0,57	20,66	2,25	2,88	0,00
Sugars								
L-fucose	24,56025	117	n.d	n.d	0,09	0,09	1h specific	
D-glucose	28,3958	319	1,78	1,13	10,31	2,77	5,79	0,02
D-glucose-6-phosphate	36,2296	387	n.d	n.d	0,01	0,01	1h specific	
tagatose	27,9894	217	0,98	0,15	0,81	0,16	0,83	0,85
talose	28,3863	319	0,80	0,60	1,85	1,38	2,30	0,75
D-allose	28,33315	319	1,46	0,45	1,89	0,31	1,29	0,78
D-lyxose	23,7026	217	n.d	n.d	0,20	0,14	1h specific	
threose	18,323	147	0,28	0,06	n.d	n.d	0h specific	
fructose	27,86755	307	0,27	0,27	0,10	0,10	0,38	0,98
N containing								
adenine	27,2088	264	0,22	0,03	0,66	0,05	3,05	0,00
thymine	15,9025	255	0,30	0,14	0,64	0,13	2,12	0,18
porphine	15,0278	285	0,73	0,26	0,47	0,25	0,64	0,52
uric acid	32,0871	441	31,19	4,31	55,74	3,43	1,79	0,17
urea	12,4749	147	1,17	0,16	0,45	0,14	0,38	0,00
D-lyxosylamine	23,7031	103	n.d	n.d	0,12	0,12	1h specific	
2-amino-1-phenylethanol	26,62015	174	n.d	n.d	0,31	0,02	1h specific	
N-methylglutamic acid	13,0203	98	n.d	n.d	0,10	0,05	1h specific	

N-methylalanine	10,9415	130	0,16	0,10	0,30	0,13	1,88	0,67
putrescine	24,57765	174	7,32	0,35	11,21	0,57	1,53	0,00
spermidine	34,5784	174	0,13	0,06	0,28	0,05	2,17	0,20
allantoin	27,9204	331	0,12	0,08	0,48	0,21	4,04	0,19
Polyols								
palatinitol	45,36715	361	n.d	n.d	1,07	0,23	1h specific	
p-cresol	10,38335	165	0,12	0,05	0,03	0,02	0,28	0,37
D-mannitol	29,1167	319	1761,88	52,23	2525,47	52,35	1,43	0,00
glycerol	13,62325	147	15,72	0,67	18,94	0,37	1,21	0,99
allo-inositol	31,9805	318	1,79	0,09	1,73	0,41	0,97	0,99
N-ethylglycine	6,8287	58	1,96	1,96	3,91	3,91	1,99	0,91
Others								
2-keto-L-gulonic acid	24,87965	147	0,18	0,11	0,12	0,12	0,68	0,96
indole-3-carbinol	33,9434	291	n.d	n.d	0,15	0,08	1h specific	
1,3-dihydroxyacetone	13,02725	147	0,27	0,09	n.d	n.d	0h specific	
4-guanidinobutyric acid	19,8754	174	2,01	0,09	2,77	0,24	1,38	0,32
alpha ketoglutaric acid	21,05115	147	n.d	n.d	0,26	0,15	1h specific	
methyl-beta-D-galactopyranoside	36,03205	204	0,17	0,04	0,62	0,15	3,65	0,02
DL-3-aminoisobutyric acid	11,3469	102	0,14	0,09	0,56	0,11	4,00	0,02
cysteinylglycine	26,33665	257	n.d	n.d	0,59	0,18	1h specific	

Παράρτημα 2.2. 6 h vs 0 h								
	RT	m/z	0h	SE	6h	SE	6h/0h	P
Amino acids								
L-proline	14,08395	142	27,15	1,80	35,98	3,64	1,33	0,06
L-ornithine	26,3882	174	21,36	1,81	18,32	3,37	0,86	0,79
L-valine	12,0452	144	3,11	0,17	4,82	0,29	1,55	0,16
L-threonine	16,52835	218	11,86	0,93	13,27	1,45	1,12	0,82
citrulline	26,48755	157	5,82	0,34	3,93	0,66	0,68	0,03
L-norleucine	13,4872	158	1,22	0,09	1,75	0,23	1,44	0,78
L-asparagine	23,2636	231	111,45	11,78	286,69	43,75	2,57	0,00
Beta- alanine	17,3783	248	1,06	0,22	3,66	0,38	3,44	0,00
L-cysteine	20,5573	220	n.d	n.d	1,08	0,16	6h specific	
L-alanine	9,2325	116	122,94	13,68	155,25	12,97	1,26	0,13
L-serine	15,83665	204	43,88	4,40	38,11	6,86	0,87	0,42
tyrosine	28,78545	218	0,02	0,02	0,55	0,05	24,71	0,40
L-methionine	19,62155	176	0,24	0,16	1,23	0,12	5,14	0,13
L-lysine	28,457	317	13,63	0,96	24,06	2,28	1,76	0,00
L-glutamine	25,4187	156	55,87	5,76	89,84	16,09	1,61	0,11
DL-isoleucine	14,0454	158	1,61	0,18	2,05	0,47	1,27	0,77

Παραρτήματ

beta-cyano-L-alanine	16,0309	141	10,01	0,88	7,26	1,56	0,73	0,20
glycine	14,3521	174	14,13	1,69	11,45	1,33	0,81	0,35
L-mimosine	11,44215	188	n.d	n.d	0,34	0,06	6h specific	
Organic acids								
myristic acid	26,66715	285	1,16	0,11	0,96	0,15	0,83	0,48
succinic acid	14,46285	148	2,15	0,11	2,53	0,61	1,17	0,58
L-(+) lactic acid	8,3065	147	1,32	0,22	1,40	0,13	1,06	1,00
maleic acid	14,266	147	0,34	0,15	0,63	0,22	1,84	0,57
tartaric acid	25,626	147	3,05	0,09	7,00	0,63	2,29	0,00
fumaric acid	15,2848	245	0,21	0,08	0,20	0,06	0,95	0,99
D-malic acid	19,0292	147	4,83	0,59	22,83	2,86	4,72	0,01
citric acid	26,58325	347	0,11	0,05	1,30	0,16	11,72	0,00
maleamic acid	19,57335	244	1,71	0,22	3,21	0,33	1,87	0,00
gluconic acid	25,8024	333	0,63	0,29	2,26	1,07	3,58	0,30
oxalic acid	6,7197	147	2,48	0,60	0,48	0,31	0,19	0,02
aspartic acid	19,7722	232	10,54	1,43	24,00	4,52	2,28	0,05
L-glutamic acid	22,07675	246	104,81	5,97	295,17	20,33	2,82	0,00
glycolic acid	8,6283	147	0,56	0,19	1,14	0,28	2,04	0,41
glyceric acid	15,08935	189	7,16	0,57	13,23	2,67	1,85	0,12
Sugars								
L-fucose	24,56025	117	n.d	n.d	0,53	0,25	6h specific	
D-glucose	28,3958	319	1,78	1,13	25,22	1,52	14,15	0,00
D-glucose-6-phosphate	36,2296	387	n.d	n.d	0,11	0,03	6h specific	
tagatose	27,9894	217	0,98	0,15	1,40	0,12	1,44	0,85
talose	28,3863	319	0,80	0,60	1,87	0,86	2,33	0,74
D-allose	28,33315	319	1,46	0,45	2,81	0,32	1,92	0,13
D-lyxose	23,7026	217	n.d	n.d	0,20	0,11	6h specific	
threose	18,323	147	0,28	0,06	n.d	n.d	0h specific	
6-deoxy-D-glucose	24,5641	117	n.d	n.d	0,42	0,30	6h specific	
fructose	27,86755	307	0,27	0,27	1,48	0,90	5,44	0,37
N containing								
adenine	27,2088	264	0,22	0,03	0,55	0,08	2,55	0,00
thymine	15,9025	255	0,30	0,14	0,55	0,11	1,82	0,38
porphine	15,0278	285	0,73	0,26	0,27	0,18	0,37	0,52
uric acid	32,0871	441	31,19	4,31	46,63	14,60	1,50	0,46
urea	12,4749	147	1,17	0,16	0,05	0,05	0,05	0,00
2-amino-1-phenylethanol	26,62015	174	n.d	n.d	0,76	0,30	6h specific	
1-methyl nicotinamide	18,4569	179	n.d	n.d	0,23	0,15	6h specific	
N-methylalanine	10,9415	130	0,16	0,10	0,64	0,10	4,04	0,02

putrescine	24,57765	174	7,32	0,35	11,67	0,92	1,59	0,00
spermidine	34,5784	174	0,13	0,06	0,40	0,07	3,16	0,01
allantoin	27,9204	331	0,12	0,08	0,19	0,09	1,56	0,94
Polyols								
palatinitol	45,36715	361	n.d	n.d	2,85	0,32	6h specific	
p-cresol	10,38335	165	0,12	0,05	0,10	0,05	0,85	0,95
D-mannitol	29,1167	319	1761,88	52,23	2667,27	128,30	1,51	0,00
glycerol	13,62325	147	15,72	0,67	56,73	26,37	3,61	0,17
allo-inositol	31,9805	318	1,79	0,09	0,82	0,40	0,46	0,14
iminodiacetic acid	18,6079	232	n.d	n.d	0,15	0,07	6h specific	
N-ethylglycine	6,8287	58	1,96	1,96	3,80	3,41	1,93	0,91
Others								
2-keto-L-gulonic acid	24,87965	147	0,18	0,11	0,43	0,21	2,45	0,49
indole-3-carbinol	33,9434	291	n.d	n.d	0,03	0,03	6h specific	
1,3-dihydroxyacetone	13,02725	147	0,27	0,09	n.d	n.d	0h specific	
4-guanidinobutyric acid	19,8754	174	2,01	0,09	1,49	0,57	0,74	0,57
alpha ketoglutaric acid	21,05115	147	n.d	n.d	0,03	0,03	6h specific	
methyl-beta-D-galactopyranoside	36,03205	204	0,17	0,04	0,35	0,10	2,04	0,49
DL-3-aminoisobutyric acid	11,3469	102	0,14	0,09	0,14	0,10	1,01	1,00
cysteinylglycine	26,33665	257	n.d	n.d	0,79	0,24	6h specific	

Παράρτημα 3. Δεδομένα RNAseq για μετάγραφα του *C. variabilis*

Παράρτημα 3.1 Δεδομένα RNAseq για μετάγραφα του *C. variabilis* με adj.p < 0.05 (bold).

Name	DE Log2 Ratio	DE Log2 SE	Pathway	GO Name	Kogdefline	ecNum	GO Acc
XP_005850426	4,8	0,4			tRNA and rRNA cytosine-C5-methylase (nucleolar protein NOL1/NOP2)		
XP_005845344	3,7	0,4		nucleic acid binding			GO:0003676
XP_005849182	3,6	0,3			Predicted membrane protein		
XP_005851196	3,6	0,3	Ascorbate aldarate metabolism	and peroxidase activity		1.11.1.11	GO:0004601
XP_005843734	3,3	0,3		obsolete chaperonin	Molecular chaperone (HSP90 family)	3.6.4.9	GO:0003763
XP_005847403	3,2	0,3		ATPase activity serine-type	Serine protease		GO:0004252
XP_005851986	3,2	0,4		endopeptidase activity zinc ion binding	Zn2+-binding dehydrogenase (nuclear receptor binding factor-1)	1.3.1.38	GO:0008270

Παραρτήματα

XP_005843286	3,0	0,4	Porphyrin and chlorophyll metabolism	uroporphyrin-III methyltransferase activity	C-Uroporphyrin III methyltransferase	2.1.1.107	GO:0004851
XP_005848047	2,8	0,2		ATP binding	Molecular chaperones mortalin/PBP74/GRP75, HSP70 superfamily		GO:0005524
XP_005847246	2,6	0,5		translation initiation factor activity	Mitochondrial translation initiation factor 2 (IF-2; GTPase)		GO:0003743
XP_005843998	2,6	0,4					
XP_005848149	2,4	0,4		zinc ion binding	Alcohol dehydrogenase, class V	1.1.1.255	GO:0008270
XP_005847819	2,3	0,3		nucleic acid binding	K-homology type RNA binding proteins		GO:0003676
XP_005847525	2,3	0,3		histone deacetylase activity	Histone deacetylase complex, catalytic component RPD3	3.5.1.48	GO:0004407
XP_005846213	2,3	0,2		metalloendopeptidase activity	AAA+-type ATPase containing the peptidase M41 domain		GO:0004222
XP_005849692	2,2	0,4		translation elongation factor activity	Mitochondrial translation elongation factor EF-Tsmt, catalyzes nucleotide exchange on EF-Tumt		GO:0003746
XP_005847380	2,2	0,2		cytoplasm	Serine O-acetyltransferase		GO:0005737
XP_005850636	2,1	0,2		quinolinate synthetase A activity			GO:0008987
XP_005848224	2,0	0,4					
XP_005847581	2,0	0,4			Oxidation resistance protein		
XP_005852074	2,0	0,3			Metalloendopeptidase family - saccharolysin & thimet oligopeptidase		
XP_005848299	2,0	0,4			Molecular chaperone (small heat-shock protein Hsp26/Hsp42)		
XP_005844133	2,0	0,2		damaged DNA binding	Mismatch repair ATPase MSH6 (MutS family)		GO:0003684
XP_005845499	1,9	0,3		nucleotide binding	Chaperone HSP104 and related ATP-dependent Clp proteases		GO:0000166
XP_005844535	1,9	0,3		nucleic acid binding	Polyadenylation factor I complex, subunit, Yth1 (CPSF subunit)		GO:0003676
XP_005851822	1,9	0,3		nucleotide binding	Pleiotropic drug resistance proteins (PDR1-15), ABC superfamily		GO:0000166
XP_005847966	1,9	0,3					
XP_005846426	1,9	0,2	Streptomycin biosynthesis	phosphoglucomutase activity	Phosphoglucomutase	5.4.2.2	GO:0004614
XP_005845011	1,8	0,3	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	phenylalanine-tRNA ligase activity	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta subunit	6.1.1.20	GO:0004826
XP_005851710	1,8	0,1	Nicotinate and nicotinamide metabolism	DNA-binding transcription factor activity		2.4.2.12	GO:0003700
XP_005849524	1,8	0,3		Mo-molybdopterin cofactor biosynthetic process	Molybdopterin biosynthesis protein		GO:0006777
XP_005845244	1,7	0,2	Histidine metabolism	aminoacyl-tRNA ligase activity	Histidyl-tRNA synthetase	6.1.1.21	GO:0004812
XP_005848732	1,7	0,2		ATP binding	Molecular chaperone (HSP90 family)		GO:0005524
XP_005846743	1,7	0,3		DNA binding	Sulfite reductase (ferredoxin)		GO:0003677
XP_005851951	1,7	0,2		phosphoglycerate kinase activity	U4/U6.U5 snRNP associated protein		GO:0004618

XP_005850119	1,6	0,3			NMD protein affecting ribosome stability and mRNA decay		
XP_005847433	1,6	0,3		structural constituent of ribosome	Mitochondrial/choloroplast ribosomal protein S15		GO:0003735
XP_005843907	1,6	0,2		protein folding	Molecular chaperone (DnaJ superfamily)		GO:0006457
XP_005852047	1,6	0,3	Folate biosynthesis	obsolete gamma-glutamyl hydrolase activity	Gamma-glutamyl hydrolase	3.4.19.9	GO:0008464
XP_005851580	1,5	0,1		superoxide dismutase activity	Manganese superoxide dismutase	1.15.1.1	GO:0004784
XP_005845552	1,4	0,3	Starch and sucrose metabolism	diacylglycerol diphosphate phosphatase activity	ATP-dependent RNA helicase	3.6.1.-	GO:0000810
XP_005850801	1,4	0,3		response to stress			GO:0006950
XP_005851941	1,4	0,3		RNA-3'-phosphate cyclase activity	RNA 3'-terminal phosphate cyclase	6.5.1.4	GO:0003963
XP_005845354	1,4	0,3	Reductive carboxylate cycle (CO2 fixation)	catalytic activity	Acyl-CoA synthetase	6.2.1.1	GO:0003824
XP_005848225	1,4	0,2					
XP_005845337	1,4	0,2	Reductive carboxylate cycle (CO2 fixation)	catalytic activity	Acyl-CoA synthetase	6.2.1.1	GO:0003824
XP_005847315	1,4	0,2		structural constituent of ribosome	60S ribosomal protein L11		GO:0003735
XP_005845371	1,3	0,2		cellular amino acid metabolic process	Glutamate decarboxylase and related proteins		GO:0006520
XP_005844499	1,3	0,2		obsolete electron transporter activity			GO:0005489
XP_005852165	1,3	0,2		catalytic activity	Cation transport ATPase	3.6.3.4	GO:0003824
XP_005844267	1,3	0,2		structural constituent of ribosome	40S ribosomal protein S28		GO:0003735
XP_005849452	1,3	0,2		structural constituent of ribosome	60s ribosomal protein L39		GO:0003735
XP_005849474	1,3	0,2		obsolete electron transport			GO:0006118
XP_005846815	1,2	0,2		structural constituent of ribosome	40S ribosomal protein S12		GO:0003735
XP_005850425	1,2	0,2		structural constituent of ribosome	60s ribosomal protein L34		GO:0003735
XP_005847526	1,2	0,2					
XP_005849740	1,2	0,2		structural constituent of ribosome	60S ribosomal protein L9		GO:0003735
XP_005850468	1,2	0,2		structural constituent of ribosome	60S ribosomal protein L31		GO:0003735
XP_005849005	1,2	0,2		structural constituent of ribosome	40S ribosomal protein S20		GO:0003735
XP_005845583	1,2	0,1		endopeptidase activity	20S proteasome, regulatory subunit beta type PSMB4/PRE4	3.4.25.1	GO:0004175
XP_005845237	1,2	0,2		nucleotide binding	Transporter, ABC superfamily (Breast cancer resistance protein)		GO:0000166
XP_005849924	1,2	0,2		structural constituent of ribosome	40S ribosomal protein S19		GO:0003735
XP_005846917	1,2	0,2		structural constituent of ribosome	60S ribosomal protein L44		GO:0003735
XP_005843532	1,2	0,2		structural constituent of ribosome	60S Ribosomal protein L13		GO:0003735

Παραρτήματα

XP_005843910	1,2	0,2	Pyrimidine metabolism	uracil phosphoribosyltransferase activity	Armadillo/beta-Catenin/plakoglobin	2.4.2.9	GO:0004845
XP_005851832	1,2	0,2			Zinc-binding protein of the histidine triad (HIT) family		
XP_005846821	1,2	0,1		structural constituent of ribosome	40S ribosomal protein S14		GO:0003735
XP_005845356	1,1	0,2		structural constituent of ribosome	60s ribosomal protein L15		GO:0003735
XP_005850116	1,1	0,2		structural constituent of ribosome	Ubiquitin-like/40S ribosomal S30 protein fusion		GO:0003735
XP_005851841	1,1	0,2		structural constituent of ribosome	60S ribosomal protein L37		GO:0003735
XP_005845471	1,1	0,2		nucleic acid binding	Chaperonin complex component, TCP-1 eta subunit (CCT7)		GO:0003676
XP_005845420	1,1	0,2		cysteine-type endopeptidase activity	Ubiquitin-specific protease	3.1.2.15	GO:0004197
XP_005850467	1,1	0,2		structural constituent of ribosome	60S ribosomal protein L27		GO:0003735
XP_005849112	1,1	0,2	Purine metabolism	pyruvate kinase activity	Pyruvate kinase	2.7.1.40	GO:0004743
XP_005852097	1,1	0,2		steroid metabolic process	Oxysterol-binding protein		GO:0008202
XP_005845384	1,1	0,2	Purine metabolism	adenosine kinase activity	Possible pfkB family carbohydrate kinase	2.7.1.20	GO:0004001
XP_005848785	1,1	0,2		GTPase activity	Ran-binding protein RANBP1 and related RanBD domain proteins		GO:0003924
XP_005851305	1,1	0,1					
XP_005850248	1,1	0,2		structural constituent of ribosome	60S ribosomal protein L36		GO:0003735
XP_005849917	1,1	0,2		RNA binding	Ribosomal protein S4		GO:0003723
XP_005843030	1,1	0,2		structural constituent of ribosome	60S ribosomal protein L26		GO:0003735
XP_005851754	1,1	0,1		structural constituent of ribosome	60s ribosomal protein L15/L27		GO:0003735
XP_005850601	1,1	0,2		structural constituent of ribosome	60S ribosomal protein L14/L17/L23		GO:0003735
XP_005851234	1,1	0,2			NADH:ubiquinone oxidoreductase, NDUFS6/13 kDa subunit		
XP_005849249	1,1	0,2		structural constituent of ribosome	40S ribosomal protein S15		GO:0003735
XP_005844163	1,0	0,2		RNA binding	60s ribosomal protein L23		GO:0003723
XP_005850905	1,0	0,2					
XP_005845487	1,0	0,1			Conserved Zn-finger protein		
XP_005843554	1,0	0,2		protein binding	Mitochondrial chaperonin, Cpn60/Hsp60p		GO:0005515
XP_005849033	1,0	0,2		structural constituent of ribosome	60S acidic ribosomal protein P2		GO:0003735
XP_005846987	1,0	0,2		structural constituent of ribosome	60S ribosomal protein L21		GO:0003735
XP_005849945	1,0	0,2		structural constituent of ribosome	60S ribosomal protein L13a		GO:0003735
XP_005843397	1,0	0,2		catalytic activity	Predicted haloacid-halidohydrolase and related hydrolases		GO:0003824

XP_005847580	1,0	0,2		nucleus	Nucleosome assembly protein NAP-1		GO:0005634
XP_005849019	1,0	0,1	Peptidoglycan biosynthesis	glutamate-ammonia ligase activity	Glutamine synthetase	6.3.1.2	GO:0004356
XP_005846534	1,0	0,1	Aminosugars metabolism	UDP-N-acetylglucosamine diphosphorylase activity	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase	2.7.7.23	GO:0003977
XP_005847663	1,0	0,2	Pyruvate metabolism	malic enzyme activity	NADP+-dependent malic enzyme	1.1.1.38	GO:0004470
XP_005846300	1,0	0,2	Purine metabolism	adenylate kinase activity	Adenylate kinase	2.7.4.3	GO:0004017
XP_005846511	1,0	0,1		threonine-type endopeptidase activity	20S proteasome, regulatory subunit beta type PSMB2/PRE1	3.4.25.1	GO:0004298
XP_005849221	1,0	0,1		structural constituent of ribosome	40s ribosomal protein S26		GO:0003735
XP_005848327	1,0	0,2		protein kinase activity	Mitogen-activated protein kinase		GO:0004672
XP_005842960	1,0	0,2		structural constituent of ribosome	60S ribosomal protein L7A		GO:0003735
XP_005849146	1,0	0,2		structural constituent of ribosome	60S ribosomal protein L35A/L37		GO:0003735
XP_005850463	1,0	0,2	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	3-isopropylmalate dehydratase activity	3-isopropylmalate dehydratase (aconitase superfamily)	4.2.1.33	GO:0003861
XP_005842918	0,9	0,2		peroxidase activity			GO:0004601
XP_005847310	0,9	0,1		cellular amino acid metabolic process	Glutamate/leucine/phenylalanine/valine dehydrogenases		GO:0006520
XP_005844200	0,9	0,2		nucleic acid binding	Polyadenylate-binding protein (RRM superfamily)		GO:0003676
XP_005851523	0,9	0,1					
XP_005848974	0,9	0,1		GTPase activity	Translation elongation factor EF-1 alpha/Tu		GO:0003924
XP_005843760	0,9	0,2	Tryptophan metabolism	obsolete electron transport	FOG: RCC1 domain	6.3.2.-	GO:0006118
XP_005843566	0,9	0,2		obsolete tricarboxylic acid cycle intermediate metabolic process	NAD-dependent malate dehydrogenase		GO:0006100
XP_005850349	0,8	0,1		nucleic acid binding	ATP-dependent RNA helicase		GO:0003676
XP_005850478	0,8	0,1	Purine metabolism	nucleotide binding	Replication factor C, subunit RFC2	2.7.7.7	GO:0000166
XP_005850452	0,8	0,2			SNARE protein TLG1/Syntaxin 6		
XP_005845642	0,8	0,2	ATP synthesis	obsolete hydrogen-transporting two-sector ATPase activity	FOF1-type ATP synthase, gamma subunit	3.6.3.14	GO:0003936
XP_005846485	0,8	0,1	Tryptophan metabolism	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2,6-diaminopimelate-D-alanyl-D-alanine ligase activity	FOG: RCC1 domain	6.3.2.-	GO:0008766
XP_005848761	0,8	0,1		GTPase activity	Translation elongation factor EF-1 alpha/Tu		GO:0003924
XP_005846913	0,8	0,1		nucleotide binding	ATPase component of ABC transporters with duplicated ATPase domains/Translation elongation factor EF-3b		GO:0000166
XP_005843378	0,8	0,1		calcium ion binding	Calmodulin and related proteins (EF-Hand superfamily)		GO:0005509
XP_005848431	0,7	0,1		proteolysis	ATP-dependent Clp protease, proteolytic subunit	3.4.21.92	GO:0006508
XP_005843275	0,7	0,1			26S proteasome regulatory complex, ATPase RPT4		

Παραρτήματα

XP_005849633	0,7	0,1		GTPase activity	Vacuolar sorting protein VPS1, dynamin, and related proteins		GO:0003924
XP_005845087	0,7	0,1			Predicted RNA-binding protein		
XP_005850000	0,6	0,1		nucleotide binding	26S proteasome regulatory complex, ATPase RPT1	3.4.25.1	GO:0000166
XP_005846449	0,6	0,1			Chromosome condensation complex Condensin, subunit G		
XP_005843115	0,5	0,1		ATP binding	Vacuolar H ⁺ -ATPase V1 sector, subunit A		GO:0005524
XP_005846307	-0,6	0,1		phosphorelay signal transduction system	GTPase Rab1/YPT1, small G protein superfamily, and related GTP-binding proteins		GO:0000160
XP_005847361	-0,8	0,2	Starch and sucrose metabolism	glycogen (starch) synthase activity	60S ribosomal protein L22	2.4.1.11	GO:0004373
XP_005848897	-0,8	0,1			Cyclin-dependent kinase inhibitor		
XP_005851487	-0,8	0,2	Glycolysis / Gluconeogenesis	dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase activity	Dihydrolipoamide acetyltransferase	2.3.1.12	GO:0004742
XP_005844970	-0,8	0,1					
XP_005850621	-0,9	0,2					
XP_005846883	-1,0	0,2	Phenylalanine metabolism	copper ion binding	Copper amine oxidase	1.4.3.6	GO:0005507
XP_005847884	-1,0	0,2		protein binding			GO:0005515
XP_005847872	-1,0	0,2		transporter activity	Mitochondrial solute carrier protein		GO:0005215
XP_005846104	-1,0	0,2		carbohydrate metabolic process			GO:0005975
XP_005847121	-1,2	0,2		protein kinase activity	Tyrosine kinase specific for activated (GTP-bound) p21cdc42Hs		GO:0004672
XP_005846914	-1,2	0,2		nucleotide binding	Chaperone HSP104 and related ATP-dependent Clp proteases	3.4.21.92	GO:0000166
XP_005847320	-1,2	0,2		nucleic acid binding	DNA polymerase theta/eta, DEAD-box superfamily		GO:0003676
XP_005845516	-1,2	0,2	Sphingoglycolipid metabolism	protein kinase activity	Glycogen synthase kinase-3	2.7.1.-	GO:0004672
XP_005844747	-1,2	0,3		obsolete protein import into nucleus, docking	Nuclear transport receptor CRM1/MSN5 (importin beta superfamily)		GO:0000059
XP_005851894	-1,3	0,2			Predicted alpha-helical protein, potentially involved in replication/repair		
XP_005852172	-1,3	0,2		molecular_function			GO:0003674
XP_005848708	-1,3	0,3		transporter activity	Permease of the major facilitator superfamily		GO:0005215
XP_005848975	-1,4	0,3		nucleotide binding	Signal recognition particle receptor, alpha subunit		GO:0000166
XP_005847789	-1,4	0,2					
XP_005852244	-1,4	0,3		ubiquitin ligase complex			GO:0000151
XP_005851460	-1,4	0,2		alpha-amylase activity	Alpha-amylase		GO:0004556
XP_005847309	-1,4	0,2		histone acetyltransferase activity	K ⁺ -dependent Na ⁺ :Ca ²⁺ antiporter	2.3.1.48	GO:0004402
XP_005848218	-1,4	0,3		calcium ion binding	Ca ²⁺ -binding protein, EF-Hand protein superfamily		GO:0005509
XP_005846330	-1,4	0,2		monooxygenase activity	Aromatic amino acid hydroxylase		GO:0004497
XP_005843846	-1,4	0,2			26S proteasome regulatory complex, subunit RPN6/PSMD11		

XP_005843742	-1,4	0,2		catalytic activity	Predicted guanosine polyphosphate pyrophosphohydrolase/synthase	GO:0003824
XP_005846504	-1,4	0,3		biosynthetic process		GO:0009058
XP_005844190	-1,4	0,2		nucleic acid binding	Protein Mei2, essential for commitment to meiosis, and related proteins	GO:0003676
XP_005845550	-1,5	0,3	Tryptophan metabolism	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2,6-diaminopimelate-D-alanyl-D-alanine ligase activity	Rho GTPase effector BNI1 and related formins	6.3.2.- GO:0008766
XP_005849048	-1,5	0,3		catalytic activity	Predicted guanosine polyphosphate pyrophosphohydrolase/synthase	GO:0003824
XP_005850403	-1,6	0,3		transporter activity	Synaptic vesicle transporter SVOP and related transporters (major facilitator superfamily)	GO:0005215
XP_005850970	-1,6	0,2	Purine metabolism	DNA binding	DNA replication licensing factor, MCM5 component	3.6.1.3 GO:0003677
XP_005849414	-1,6	0,2	Sphingoglycolipid metabolism	protein kinase activity	Serine/threonine protein kinase	2.7.1.- GO:0004672
XP_005844122	-1,6	0,3			Sof1-like rRNA processing protein (contains WD40 repeats)	
XP_005849338	-1,6	0,2			Predicted glycosyltransferase	
XP_005850733	-1,6	0,3	Inositol phosphate metabolism	1-phosphatidylinositol 4-kinase activity	Phosphatidylinositol 4-kinase, involved in intracellular trafficking and secretion	2.7.1.67 GO:0004430
XP_005844162	-1,6	0,2	Pyrimidine metabolism	catalytic activity	CTP synthase (UTP-ammonia lyase)	6.3.4.2 GO:0003824
XP_005847492	-1,7	0,3	Tryptophan metabolism	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2,6-diaminopimelate-D-alanyl-D-alanine ligase activity	FOG: RCC1 domain	6.3.2.- GO:0008766
XP_005844828	-1,8	0,3				
XP_005843975	-1,8	0,3			Metallothionein-like protein	
XP_005844330	-1,8	0,3			Putative transcription factor 5qNCA, contains JmjC domain	
XP_005850416	-1,8	0,3			Cobalamin synthesis protein	
XP_005845875	-1,8	0,3		ubiquitin ligase complex	Anaphase-promoting complex (APC), subunit 11	GO:0000151
XP_005843041	-1,8	0,3		protein kinase activity	Predicted unusual protein kinase	GO:0004672
XP_005852072	-1,9	0,3	Starch and sucrose metabolism	glycogen (starch) synthase activity		2.4.1.11 GO:0004373
XP_005843156	-1,9	0,4			PHD finger protein BR140/LIN-49	
XP_005844138	-1,9	0,2		membrane		GO:0016020
XP_005845675	-1,9	0,4		catalytic activity	Predicted lipase/calmodulin-binding heat-shock protein	GO:0003824
XP_005849394	-1,9	0,3		ubiquitin ligase complex	Topoisomerase I-binding arginine-serine-rich protein	GO:0000151
XP_005848934	-1,9	0,4		catalytic activity	Predicted esterase of the alpha-beta hydrolase superfamily	GO:0003824
XP_005851752	-1,9	0,4				
XP_005847103	-1,9	0,3			Centromere-associated protein HEC1	
XP_005846017	-1,9	0,3	N-Glycan degradation	exo-alpha-sialidase activity	Collagens (type IV and type XIII), and related proteins	3.2.1.18 GO:0004308

Παράρτημα

XP_005846257	-1,9	0,3		nucleic acid binding	FOG: RRM domain		GO:0003676
XP_005850917	-2,0	0,3					
XP_005846972	-2,0	0,2		nucleus	G2/Mitotic-specific cyclin A		GO:0005634
XP_005852110	-2,0	0,2		DNA binding			GO:0003677
XP_005852223	-2,1	0,3		cation transport	Membrane protein HUEL (cation efflux superfamily)		GO:0006812
XP_005848947	-2,1	0,4			O-acetyltransferase		
XP_005851576	-2,1	0,3			Predicted steroid reductase		
XP_005843959	-2,1	0,4		protein kinase activity	Protein kinase PCTAIRE and related kinases		GO:0004672
XP_005851671	-2,2	0,4		nucleic acid binding	Transcription initiation factor TFIID, subunit BDF1 and related bromodomain proteins	2.3.1.48	GO:0003676
XP_005850218	-2,2	0,2		protein kinase activity	Casein kinase (serine/threonine/tyrosine protein kinase)	2.7.1.37	GO:0004672
XP_005846540	-2,2	0,4		protein kinase activity	Mitogen-activated protein kinase	2.7.1.37	GO:0004672
XP_005847186	-2,2	0,4	O-Glycans biosynthesis	alpha-1,6-mannosyltransferase activity	O-linked N-acetylglucosamine transferase OGT	2.4.1.-	GO:0000009
XP_005848787	-2,2	0,3			Glucose-6-phosphate/phosphate and phosphoenolpyruvate/phosphate antip		
XP_005847417	-2,2	0,3		ribose phosphate diphosphokinase activity	Ribose-phosphate pyrophosphokinase		GO:0004749
XP_005845261	-2,3	0,4			Dystonin, GAS (Growth-arrest-specific protein), and related proteins		
XP_005842856	-2,3	0,2	Aminosugars metabolism	chitin synthase activity	Chitin synthase/hyaluronan synthase (glycosyltransferases)	2.4.1.16	GO:0004100
XP_005846325	-2,3	0,4		ubiquitin-protein transferase activity	Ubiquitin-protein ligase	6.3.2.19	GO:0004842
XP_005846820	-2,3	0,2		acetylspermidine deacetylase activity	Histone deacetylase complex, catalytic component HDA1	3.5.1.48	GO:0047611
XP_005850148	-2,3	0,4	Fructose and mannose metabolism	6-phosphofructokinase activity	Pyrophosphate-dependent phosphofructo-1-kinase	2.7.1.90	GO:0003872
XP_005852283	-2,3	0,3					
XP_005849481	-2,3	0,4		phosphorelay response regulator activity	GATA-4/5/6 transcription factors		GO:0000156
XP_005851587	-2,3	0,4		mitochondrial inner membrane	Mitochondrial import inner membrane translocase, subunit TIM17		GO:0005743
XP_005846292	-2,4	0,3					
XP_005844262	-2,5	0,3		binding	Mitochondrial carrier protein PET8		GO:0005488
XP_005844793	-2,5	0,3		obsolete transport	Sulfite oxidase, molybdopterin-binding component		GO:0006118
XP_005850549	-2,5	0,3		transport	Clathrin adaptor complex, small subunit		GO:0006810
XP_005843563	-2,5	0,4		nucleus	mRNA deadenylase subunit		GO:0005634
XP_005849530	-2,6	0,3		nucleic acid binding	FOG: RRM domain		GO:0003676
XP_005847090	-2,6	0,4					
XP_005847199	-2,6	0,3		protein binding	FOG: Armadillo/beta-catenin-like repeats		GO:0005515

XP_005845279	-2,8	0,3	protein phosphatase type 2A complex	Serine/threonine protein phosphatase 2A, regulatory subunit	3.1.3.16	GO:0000159
XP_005847816	-3,1	0,3		FOG: Leucine rich repeat		
XP_005846476	-4,0	0,7	nucleic acid binding	CCCH-type Zn-finger protein		GO:0003676
XP_005848562	-5,9	0,6	cis-Golgi network	Transport protein particle (TRAPP) complex subunit		GO:0005801

Παράρτημα 3.2 Δεδομένα RNAseq για μετάγραφα του *C. variabilis* με adj.p < 0.05 (bold).

Name	DE Log2 Ratio	DE Log2 SE	Pathway	GO Name	Kogdefine	ecNum	GO Acc
XP_005845344	4,91	0,80		nucleic acid binding			
XP_005851196	4,70	0,75	Ascorbate aldarate metabolism	and peroxidase activity		1.11.1.11	GO:0004601
XP_005847403	4,39	0,66		serine-type endopeptidase activity	Serine protease		GO:0004252
XP_005847930	4,33	0,66		thiamine biosynthetic process	Protein involved in thiamine biosynthesis and DNA damage tolerance		GO:0009228
XP_005849182	4,11	0,73			Predicted membrane protein		
XP_005843734	3,96	0,64		obsolete chaperonin ATPase activity	Molecular chaperone (HSP90 family)	3.6.4.9	GO:0003763
XP_005843286	3,77	0,71	Porphyrin chlorophyll metabolism	and uroporphyrin-III C-methyltransferase activity	Uroporphyrin III methyltransferase	2.1.1.107	GO:0004851
XP_005847525	3,41	0,62		histone deacetylase activity	Histone deacetylase complex, catalytic component RPD3	3.5.1.48	GO:0004407
XP_005846213	2,87	0,55		metalloendopeptidase activity	AAA+-type ATPase containing the peptidase M41 domain		GO:0004222
XP_005847425	-6,61	1,27		ubiquitin ligase complex	Predicted E3 ubiquitin ligase		GO:0000151
XP_005845593	-6,75	1,32	Starch and sucrose metabolism	diacylglycerol diphosphate phosphatase activity	SWI-SNF chromatin-remodeling complex protein	3.6.1.-	GO:0000810
XP_005850101	-6,76	1,21		catalytic activity	Predicted esterase of the alpha-beta hydrolase superfamily		GO:0003824
XP_005851238	-6,85	1,01		nucleotide binding	Pleiotropic drug resistance proteins (PDR1-15), ABC superfamily		GO:0000166
XP_005847756	-6,87	1,24		mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase activity	1, 2-alpha-mannosidase		GO:0004571
XP_005849436	-7,00	1,02			Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase		
XP_005852014	-7,02	1,21		nucleus	Small Nuclear ribonucleoprotein splicing factor		GO:0005634
XP_005848272	-7,08	1,34		DNA binding	60S ribosomal protein L22		GO:0003677
XP_005850685	-7,34	1,49		histone acetyltransferase activity	Uncharacterized conserved protein (Neuroblastoma-amplified protein)	2.3.1.48	GO:0004402
XP_005845596	-7,38	1,49		histone acetyltransferase activity	SWI-SNF chromatin-remodeling complex protein	2.3.1.48	GO:0004402
XP_005849770	-7,41	1,50		membrane	Magnesium transporters: CorA family		GO:0016020
XP_005847534	-7,44	1,48		structural constituent of ribosome	Mitochondrial/chloroplast ribosomal protein L36		GO:0003735
XP_005846059	-7,46	1,48	Starch and sucrose metabolism	diacylglycerol diphosphate phosphatase activity	ATP-dependent DNA helicase	3.6.1.-	GO:0000810

Παράρτημα

XP_005850679	-7,46	1,49		imidazoleglycerol-phosphate synthase activity	Initiator tRNA phosphoribosyl-transferase	2.4.2.-	GO:0000107
XP_005846354	-7,48	1,49		transporter activity			GO:0005215
XP_005844233	-7,48	1,50		nucleic acid binding	Collagens (type IV and type XIII), and related proteins		GO:0003676
XP_005849064	-7,48	1,48	Purine metabolism	adenosine deaminase activity	Adenine deaminase/adenosine deaminase	3.5.4.4	GO:0004000
XP_005843582	-7,49	1,48			ER-Golgi vesicle-tethering protein p115		
XP_005847825	-7,52	1,49		prenyltransferase activity			GO:0004659
XP_005847281	-7,53	1,50			Thyroid hormone receptor-associated coactivator complex component (TRAP170)		
XP_005848336	-7,53	1,48	Galactose metabolism	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	Maltase glucoamylase and related hydrolases, glycosyl hydrolase family 31	3.2.1.20	GO:0004553
XP_005842884	-7,54	1,47			Collagens (type IV and type XIII), and related proteins		
XP_005848370	-7,55	1,50	Purine metabolism	adenosine kinase activity	Possible pfb family carbohydrate kinase	2.7.1.20	GO:0004001
XP_005845850	-7,58	1,49	Galactose metabolism	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	Beta-fructofuranosidase (invertase)	3.2.1.26	GO:0004553
XP_005848450	-7,59	1,51		obsolete electron transport membrane	SWI-SNF chromatin-remodeling complex protein		GO:0006118
XP_005848415	-7,60	1,48			FOG: RCC1 domain		GO:0016020
XP_005851775	-7,60	1,49	O-Glycans biosynthesis	alpha-1,6-mannosyltransferase activity	Predicted guanosine polyphosphate pyrophosphohydrolase/synthase	2.4.1.-	GO:0000009
XP_005845397	-7,62	1,21		metalloendopeptidase activity	Disintegrin metalloproteinases with thrombospondin repeats	3.4.24.-	GO:0004222
XP_005852142	-7,64	1,51		nucleic acid binding	Nuclear receptor coregulator SMRT/SMRTER, contains Myb-like domains		GO:0003676
XP_005846222	-7,64	1,49			Predicted ATPase (PP-loop superfamily)		
XP_005850794	-7,64	1,48	O-Glycans biosynthesis	alpha-1,6-mannosyltransferase activity	GPI-alpha-mannosyltransferase III (GPI10/PIG-B) involved in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis	2.4.1.-	GO:0000009
XP_005843610	-7,65	1,47			Leucine permease transcriptional regulator		
XP_005850072	-7,65	1,48	Lysine degradation	histone-lysine N-methyltransferase activity	Histone H3 (Lys9) methyltransferase SUV39H1/Clr4, required for transcriptional silencing	2.1.1.43	GO:0018024
XP_005846661	-7,66	1,51			Ankyrin		
XP_005850090	-7,67	1,51		nucleic acid binding	Transcription regulator XNP/ATRX, DEAD-box superfamily		GO:0003676
XP_005849322	-7,67	1,48		nucleic acid binding	Predicted RNA-binding protein (RRM superfamily)		GO:0003676
XP_005849082	-7,70	1,47		hydrolase activity			GO:0016787
XP_005845960	-7,70	1,34		nucleic acid binding	Serine/threonine protein kinase		GO:0003676
XP_005851937	-7,70	1,54			Dystonin, GAS (Growth-arrest-specific protein), and related proteins		
XP_005849264	-7,71	1,46			CREB binding protein/P300 and related TAZ Zn-finger proteins		
XP_005850700	-7,73	1,47			RNA helicase nonsense mRNA reducing factor (pNORF1)		

XP_005844933	-7,75	1,50		DNA-binding transcription factor activity	Transcription initiation factor TFIID, subunit BDF1 and related bromodomain proteins	3.4.24.14	GO:0003700
XP_005851934	-7,75	1,50			Predicted membrane protein		
XP_005846233	-7,77	1,46			Transcriptional regulator		
XP_005850908	-7,77	1,51	DNA polymerase	telomerase activity	Translesion DNA polymerase - REV1 deoxycytidyl transferase	2.7.7.-	GO:0003720
XP_005850846	-7,77	1,46	Purine metabolism	DNA-directed DNA polymerase activity	Predicted DNA damage inducible protein	2.7.7.7	GO:0003887
XP_005852166	-7,78	1,49		histone acetyltransferase activity	Nuclear receptor coregulator SMRT/SMRTER, contains Myb-like domains	2.3.1.48	GO:0004402
XP_005847245	-7,80	1,47			Glucosyltransferase - Alg8p		
XP_005845574	-7,82	1,47	Purine metabolism	DNA-directed DNA polymerase activity	Transcription initiation factor TFIID, subunit BDF1 and related bromodomain proteins	2.7.7.7	GO:0003887
XP_005844139	-7,83	1,55		catalytic activity			GO:0003824
XP_005850395	-7,85	1,46			Collagens (type IV and type XIII), and related proteins		
XP_005848206	-7,88	1,45		nucleic acid binding	Predicted ATPase		GO:0003676
XP_005846584	-7,88	1,54		nucleotide binding	CREB binding protein/P300 and related TAZ Zn-finger proteins		GO:0000166
XP_005842728	-7,88	1,52		histone acetyltransferase activity	Collagens (type IV and type XIII), and related proteins	2.3.1.48	GO:0004402
XP_005849899	-7,92	1,51		nucleotide binding	Multidrug/pheromone exporter, ABC superfamily		GO:0000166
XP_005850351	-7,93	1,45			Ypt/Rab GTPase activating protein		
XP_005850987	-7,94	1,50			Predicted GTPase activator protein		
XP_005851560	-7,94	1,50			CCR4-NOT transcriptional regulation complex, NOT5 subunit		
XP_005843623	-7,94	1,47			Uncharacterized conserved protein		
XP_005847740	-7,95	1,47			C-type lectin		
XP_005843192	-7,96	1,45	Galactose metabolism	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	Maltase glucoamylase and related hydrolases, glycosyl hydrolase family 31	3.2.1.20	GO:0004553
XP_005849594	-7,97	1,46		obsolete legumain activity	Gpi-anchor transamidase	3.-.-.-	GO:0001509
XP_005849954	-7,99	1,46					
XP_005851997	-7,99	1,44		histone acetyltransferase activity	Cl- channel CLC-3 and related proteins (CLC superfamily)	2.3.1.48	GO:0004402
XP_005851444	-8,00	1,52	Histidine metabolism	histidine biosynthetic process	Phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribonucleotide (ProFAR) isomerase	5.3.1.16	GO:0000105
XP_005848284	-8,01	1,49	Type II secretion system	dCMP deaminase activity	Deoxycytidylate deaminase	3.5.4.12	GO:0004132
XP_005846762	-8,02	1,52			Anaphase-promoting complex (APC), subunit 1 (meiotic check point regulator/Tsg24)		
XP_005843197	-8,02	1,52		DNA binding			GO:0003677
XP_005851360	-8,02	1,44		DNA-binding transcription factor activity	E2F-like protein		GO:0003700
XP_005850190	-8,02	1,45			Uncharacterized conserved protein, contains WD40 repeats		
XP_005848079	-8,03	1,51		calcium ion binding	Magnesium transporters: CorA family		GO:0005509
XP_005848844	-8,03	1,46			Predicted membrane protein		
XP_005847939	-8,05	1,44			Rb (Retinoblastoma tumor suppressor)-related protein		
XP_005844948	-8,06	1,48		nucleus	Transcriptional activator, adenine-specific DNA methyltransferase		GO:0005634

Παράρτημα

XP_005849730	-8,06	1,46		N-methyl-D-aspartate receptor glutamate-binding subunit	
XP_005844820	-8,09	1,51		CLIP-associating protein	
XP_005845200	-8,09	1,44	nuclease activity	GIY-YIG type nuclease	GO:0004518
XP_005848348	-8,09	1,50	histone acetyltransferase activity	Transcription initiation factor TFIID, subunit BDF1 and related bromodomain proteins	2.3.1.48 GO:0004402
XP_005849751	-8,12	1,44	shikimate kinase activity	Pentafunctional AROM protein	GO:0004765
XP_005851512	-8,13	1,44		Predicted E3 ubiquitin ligase	
XP_005849705	-8,13	1,43		Uncharacterized conserved protein	
XP_005848982	-8,14	1,52			
XP_005844971	-8,15	1,47	cysteine-type endopeptidase activity	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	2.3.1.48 GO:0004197
XP_005847135	-8,17	1,52	DNA binding	5'-3' exonuclease	GO:0003677
XP_005849466	-8,21	1,45	histone acetyltransferase activity	Calcium-responsive transcription coactivator	2.3.1.48 GO:0004402
XP_005847528	-8,21	1,43			
XP_005844797	-8,21	1,43		Predicted E3 ubiquitin ligase	
XP_005843421	-8,24	1,44		Dystonin, GAS (Growth-arrest-specific protein), and related proteins	
XP_005843914	-8,26	1,43	histone acetyltransferase activity	Nuclear receptor coregulator SMRT/SMRTER, contains Myb-like domains	2.3.1.48 GO:0004402
XP_005847191	-8,27	1,44	histone acetyltransferase activity	Calcium-responsive transcription coactivator	2.3.1.48 GO:0004402
XP_005844909	-8,27	1,48		Iron transporter	
XP_005844041	-8,28	1,45		DNA-binding protein jumonji/RBP2/SMCY, contains JmjC domain	
XP_005846304	-8,30	1,45		N-acetylglucosaminyltransferase complex, subunit PIG-P, required for phosphatidylinositol biosynthesis	
XP_005851850	-8,32	1,46		Nuclear receptor coregulator SMRT/SMRTER, contains Myb-like domains	
XP_005843581	-8,32	1,42	DNA binding	DNA topoisomerase type II	GO:0003677
XP_005849355	-8,36	1,43		Predicted membrane protein, contains two CBS domains	
XP_005848918	-8,37	1,42		Regulator of nuclear mRNA	
XP_005851395	-8,39	1,42	transporter activity	Nuclear receptor coregulator SMRT/SMRTER, contains Myb-like domains	GO:0005215
XP_005842655	-8,40	1,42			
XP_005849305	-8,40	1,42	histone acetyltransferase activity	Kinase A-anchor protein Neurobeachin and related BEACH and WD40 repeat proteins	2.3.1.48 GO:0004402
XP_005847590	-8,40	1,46	protein folding	Molecular chaperone (DnaJ superfamily)	GO:0006457
XP_005844989	-8,41	1,45		Nucleotide-sugar transporter VRG4/SQV-7	
XP_005846616	-8,41	1,44	cycloeucaenol cycloisomerase activity		5.5.1.9 GO:0047793
XP_005848959	-8,41	1,43	protein kinase activity	Dual-specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase	GO:0004672
XP_005851914	-8,43	1,45		CDK8 kinase-activating protein cyclin C	
XP_005852305	-8,44	1,43	phosphorelay kinase activity	Sensory transduction histidine kinase	GO:0000155
XP_005851098	-8,45	1,42		Growth factor receptor-bound proteins (GRB7, GRB10, GRB14)	

XP_005851027	-8,45	1,46			Uncharacterized conserved protein		
XP_005846887	-8,46	1,42					
XP_005846281	-8,47	1,43			Putative transmembrane protein cmp44E		
XP_005848311	-8,49	1,44			DNA replication licensing factor, MCM6 component		
XP_005847684	-8,53	1,47		damaged DNA binding	Mismatch repair MSH3		GO:0003684
XP_005852290	-8,53	1,44			FOG: TPR repeat		
XP_005844171	-8,53	1,44					
XP_005845609	-8,55	1,45			Guanine nucleotide exchange factor		
XP_005845100	-8,56	1,42					
XP_005846981	-8,57	1,41	N-Glycans biosynthesis	obsolete dolichyl-phosphate-mannose-glycolipid alpha-mannosyltransferase activity	Protein involved in dolichol pathway for N-glycosylation (mannosyltransferase family)	2.4.1.130	GO:0004584
XP_005847649	-8,57	1,42		ubiquitin ligase complex	FOG: Predicted E3 ubiquitin ligase		GO:0000151
XP_005844307	-8,61	1,41			Predicted hydrolase (HAD superfamily)		
XP_005844632	-8,62	1,50		protein kinase activity	Tyrosine kinase specific for activated (GTP-bound) p21cdc42Hs		GO:0004672
XP_005846632	-8,67	1,41		catalytic activity			GO:0003824
XP_005852231	-8,71	1,40		obsolete carboxypeptidase activity	Zinc carboxypeptidase	3.4.17.22	GO:0004182
XP_005851988	-8,72	1,43		ATP binding	Sensory transduction histidine kinase		GO:0005524
XP_005849077	-8,73	1,42					
XP_005849617	-8,74	1,45			Translation initiation factor 4F, ribosome/mRNA-bridging subunit (eIF-4G)		
XP_005845600	-8,74	1,44		catalytic activity			GO:0003824
XP_005847206	-8,80	1,40	N-Glycans biosynthesis	mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase activity	Mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase and related glycosyl hydrolases	3.2.1.113	GO:0004571
XP_005844454	-8,80	1,42					
XP_005849211	-8,86	1,40		proteolysis	Collagens (type IV and type XIII), and related proteins		GO:0006508
XP_005843578	-8,87	1,44		DNA repair	Checkpoint 9-1-1 complex, RAD9 component		GO:0006281
XP_005842554	-8,88	1,43					
XP_005845792	-8,90	1,40		histone acetyltransferase activity	E3 ubiquitin-protein ligase/Putative upstream regulatory element binding protein	2.3.1.48	GO:0004402
XP_005846438	-8,90	1,40		histone acetyltransferase activity	Transcription initiation factor TFIID, subunit BDF1 and related bromodomain proteins	2.3.1.48	GO:0004402
XP_005845485	-8,90	1,40		protein kinase activity	Tyrosine kinase specific for activated (GTP-bound) p21cdc42Hs		GO:0004672
XP_005847139	-8,94	1,40	Purine metabolism	nucleotide binding	DNA polymerase zeta, catalytic subunit	2.7.7.7	GO:0000166
XP_005848160	-8,95	1,42		oxidoreductase activity	Aldo/keto reductase family proteins	1.1.1.179	GO:0016491
XP_005846476	-8,99	1,45		nucleic acid binding	CCCH-type Zn-finger protein		GO:0003676
XP_005850903	-9,00	1,41		calcium ion binding	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin subunit B), EF-Hand superfamily protein		GO:0005509
XP_005844917	-9,00	1,39			Predicted BBOX Zn-finger protein		
XP_005844011	-9,01	1,42					

Παραρτήματα

XP_005848312	-9,04	1,40		protein kinase activity	Tyrosine kinase specific for activated (GTP-bound) p21cdc42Hs		GO:0004672
XP_005842903	-9,04	1,40		amine transporter activity	Amino acid transporters		GO:0005275
XP_005850419	-9,05	1,39	Starch and sucrose metabolism	diacylglycerol diphosphate phosphatase activity	ATP-dependent RNA helicase	3.6.1.-	GO:0000810
XP_005845794	-9,07	1,41			Uncharacterized conserved protein		
XP_005844945	-9,09	1,28		DNA binding	Transcription factor TCF20		GO:0003677
XP_005852183	-9,11	1,48	Starch and sucrose metabolism	diacylglycerol diphosphate phosphatase activity	Small nuclear RNA activating protein complex - 50kD subunit (SNAP50)	3.6.1.-	GO:0000810
XP_005845647	-9,20	1,39		histone acetyltransferase activity	Nuclear receptor coregulator SMRT/SMRTER, contains Myb-like domains	2.3.1.48	GO:0004402
XP_005851570	-9,26	1,39		catalytic activity	Predicted lipase		GO:0003824
XP_005844776	-9,29	1,40			Dystonin, GAS (Growth-arrest-specific protein), and related proteins		
XP_005851566	-9,31	1,46			Uncharacterized conserved protein		
XP_005842975	-9,34	1,40	Sphingoglycolipid metabolism	protein kinase activity	Serine-threonine protein kinase FUSED	2.7.1.-	GO:0004672
XP_005847092	-9,36	1,38		protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase activity	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	O-	GO:0004719
XP_005844129	-9,40	1,39	Pentose and glucuronate interconversions	protein kinase activity	Predicted transporter (major facilitator superfamily)	5.3.1.4	GO:0004672
XP_005849185	-9,47	1,41	Starch and sucrose metabolism	diacylglycerol diphosphate phosphatase activity	SNF2 family DNA-dependent ATPase	3.6.1.-	GO:0000810
XP_005847969	-9,47	1,46		integral component of membrane	Peroxisomal membrane protein MPV17 and related proteins		GO:0016021
XP_005843467	-9,48	1,39		ATP binding	tRNA delta(2)-isopentenylpyrophosphate transferase		GO:0005524
XP_005844687	-9,50	1,40	Galactose metabolism	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	Beta-fructofuranosidase (invertase)	3.2.1.26	GO:0004553
XP_005851329	-9,54	1,38		protein kinase activity	Protein tyrosine kinase		GO:0004672
XP_005849197	-9,55	1,38		metal ion binding	DHHC-type Zn-finger proteins		GO:0046872
XP_005843911	-9,64	1,38		Golgi membrane	N-acetylglucosaminyltransferase I		GO:0000139
XP_005847455	-9,71	1,39	Sphingoglycolipid metabolism	protein kinase activity	Tyrosine kinase specific for activated (GTP-bound) p21cdc42Hs	2.7.1.-	GO:0004672
XP_005849647	-9,72	1,38		histone acetyltransferase activity	Negative regulator of histones	2.3.1.48	GO:0004402
XP_005848555	-9,86	1,37			Translation initiation factor 3, subunit i (eIF-3i)/TGF-beta receptor-interacting protein (TRIP-1)		
XP_005844567	-	1,40	Starch and sucrose metabolism	nucleotide binding	DNA/RNA helicase MER3/SLH1, DEAD-box superfamily	3.6.1.-	GO:0000166
XP_005847402	-	1,38			p53-interacting protein 53BP/ASPP, contains ankyrin and SH3 domains		
XP_005843138	-	1,37		membrane	Fe2+/Zn2+ regulated transporter		GO:0016020

XP_005848310	-	1,37	nucleotide binding	DNA replication licensing factor, MCM6 component	GO:0000166
		10,30			
XP_005848340	-	1,37	DNA binding	Transcription factor, Myb superfamily	GO:0003677
		10,38			
XP_005848562	-	1,36	cis-Golgi network	Transport protein particle (TRAPP) complex subunit	GO:0005801
		10,60			
XP_005847715	-	1,36	DNA binding	TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase II	GO:0003677
		11,13			
XP_005849729	-	1,36	ubiquitin-protein transferase activity	Ubiquitin-protein ligase	6.3.2.19 GO:0004842
		12,20			

Παράρτημα

Παράρτημα 4. Σχετικά επίπεδα των μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν με GC-MS για το *C. variabilis*.

Παράρτημα 4.1. 1h vs 0h								
	RT	m/z	0 h	SE	1 h	SE	1h/0h	P
Amino acids								
L-methionine	19,615	176	0,00	0,00	0,00	0,00	0,79	0,98
L-ornithine	21,921	142	0,00	0,00	0,00	0,00	41,35	0,01
L-valine	12,0505	144	0,03	0,00	0,08	0,01	2,40	0,00
L-threonine	16,5276	218	0,02	0,00	0,02	0,00	1,06	0,98
L-tryptophan	33,94435	202	0,00	0,00	0,00	0,00	1,57	0,17
L-proline	14,0895	142	0,03	0,00	0,12	0,01	3,91	0,36
L-norleucine	13,48985	158	0,02	0,00	0,02	0,00	1,41	0,26
L-asparagine	23,2174	231	0,00	0,00	0,00	0,00	2,10	0,97
L-alanine	9,2456	116	0,13	0,01	0,34	0,03	2,55	0,05
L-serine	15,834	204	0,04	0,01	0,04	0,00	1,21	0,80
aspartic acid	19,7701	232	0,00	0,00	0,00	0,00	0,71	0,79
L-lysine	28,4555	317	0,00	0,00	0,01	0,00	1,68	0,63
glycine	14,3554	174	0,03	0,00	0,04	0,00	1,43	0,39
DL-isoleucine	14,0511	158	0,01	0,00	0,01	0,00	1,23	0,88
L-glutamine	25,4029	156	0,00	0,00	0,00	0,00	1,72	0,95
L-homoserine	18,0427	218	n.d.		n.d.			
Beta- alanine	17,3755	248	0,00	0,00	0,00	0,00	1,79	0,35
L-glutamic acid	22,0545	246	0,08	0,01	0,07	0,01	0,97	1,00
tyrosine	28,7828	218	0,00	0,00	0,01	0,00	2,20	0,06
N-methylalanine	10,9436	130	0,00	0,00	0,00	0,00	2,15	0,71
Organic acids								
L-(+) lactic acid	8,3244	147	0,31	0,03	0,50	0,02	1,65	0,14
succinic acid	14,46655	148	0,05	0,01	0,07	0,01	1,41	0,59
D-malic acid	19,0244	147	0,01	0,00	0,00	0,00	0,31	0,32
citric acid	26,5791	347	0,00	0,00	0,00	0,00	1,06	1,00
malonic acid	12,4706	147	0,00	0,00	0,00	0,00	1,21	0,96
L-ascorbic acid	29,1813	332	0,00	0,00	0,00	0,00	1,27	0,85
lactobionic acid	39,24855	217	0,01	0,00	0,00	0,00	0,48	0,00
dehydroascorbic acid	27,1135	173	0,00	0,00	0,00	0,00	1,08	0,95

gluconic acid	30,33	333	0,00	0,00	0,00	0,00	0,38	0,35
glyceric acid	15,0904	189	0,00	0,00	0,00	0,00	0,47	0,68
tartaric acid	25,6125	147	0,00	0,00	0,00	0,00	4,58	1,00
Sugars								
D-glucose	28,3894	319	0,08	0,01	0,06	0,01	0,76	0,13
tagatose	28,09325	217	0,01	0,00	0,00	0,00	0,81	0,91
fructose	27,8831	307	0,01	0,00	0,01	0,00	0,72	0,97
Sucrose	41,3113	361	0,35	0,02	0,45	0,02	1,29	0,07
D (+)altrose	28,68655	205	0,02	0,01	0,02	0,00	1,08	0,96
D-mannose	28,2972	319	0,03	0,02	0,02	0,00	0,53	0,65
D-lyxose	23,70135	217	0,00	0,00	0,00	0,00	0,84	0,98
Raffinose	51,4991	87	0,00	0,00	0,00	0,00	2,44	0,09
talose	28,6692	319	0,02	0,00	0,02	0,00	0,84	0,23
D-allose	28,6724	319	0,01	0,00	0,01	0,00	0,76	0,60
N-containing								
adenine	27,2065	264	0,00	0,00	0,00	0,00	2,64	0,31
thymine	16,7733	255	0,00	0,00	0,00	0,00	1,33	0,86
uracil	15,1656	241	0,00	0,00	0,00	0,00	2,36	0,63
uric acid	32,0826	441	0,00	0,00	0,00	0,00	16,45	0,12
urea	12,476	147	0,00	0,00	0,00	0,00	1,39	0,96
5-aminovaleric acid	26,9378	174	0,00	0,00	0,00	0,00	2,70	0,59
iminodiacetic acid	18,6037	232	0,00	0,00	0,00	0,00	2,17	0,80
allo-inositol	31,9763	318	0,02	0,00	0,03	0,00	1,23	0,06
citrulline	26,4831	157	0,00	0,00	0,00	0,00	1,70	0,87
porphine	15,0329	285	0,00	0,00	0,00	0,00	1,06	0,99
1,3-diaminopropane	22,5781	174	0,00	0,00	0,00	0,00	0,84	0,84
putrescine	24,5733	174	0,00	0,00	0,00	0,00	1,63	0,45
Polyols								
acetol	20,7187	219	0,00	0,00	0,00	0,00	5,69	0,13
glycerol	13,6299	147	0,33	0,03	0,38	0,03	1,17	0,30
Phosphates								
phosphoric acid	13,592	299	0,06	0,03	0,01	0,01	0,20	0,13
O-phosphocolamine	25,7287	299	0,00	0,00	0,00	0,00	0,49	0,09
glycerol 1-phosphate	25,4263	357	0,01	0,00	0,01	0,00	0,51	0,13
3-phosphoglycerate	26,3871	357	0,00	0,00	n.d.		0,00	
D-glucose-6-phosphate	36,2285	387	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,46
Others								
2-amino-1-phenylethanol	13,3185	174	0,06	0,01	0,07	0,01	1,11	0,74
DL-3-aminoisobutyric acid	9,64765	102	0,00	0,00	0,00	0,00	2,07	0,21
1-methylhydantoin	6,3233	171	0,00	0,00	0,01	0,00	2,17	0,73
L-pyroglutamic acid	19,6689	156						

Παράρτημα

2-piperidone	6,92195	156	0,00	0,00	0,00	0,00	1,28	0,01
1,3-dihydroxyacetone	13,026	147	0,00	0,00	0,00	0,00	1,08	0,67

Παράρτημα 4.2. 6h vs 0h								
	RT	m/z	0 h	SE	6 h	SE	6h/0h	P
Amino acids								
L-methionine	19,615	176	0,00	0,00	0,00	0,00	3,08	0,07
L-ornithine	21,921	142	0,00	0,00	0,00	0,00	16,53	0,42
L-valine	12,0505	144	0,03	0,00	0,10	0,01	3,28	0,00
L-threonine	16,5276	218	0,02	0,00	0,05	0,00	2,78	0,00
L-tryptophan	33,94435	202	0,00	0,00	0,00	0,00	1,71	0,10
L-proline	14,0895	142	0,03	0,00	0,31	0,07	10,43	0,00
L-norleucine	13,48985	158	0,02	0,00	0,04	0,00	2,11	0,00
L-asparagine	23,2174	231	0,00	0,00	0,00	0,00	34,44	0,00
L-alanine	9,2456	116	0,13	0,01	0,35	0,09	2,65	0,03
L-serine	15,834	204	0,04	0,01	0,09	0,01	2,43	0,00
aspartic acid	19,7701	232	0,00	0,00	0,00	0,00	1,90	0,13
L-lysine	28,4555	317	0,00	0,00	0,02	0,00	3,83	0,00
glycine	14,3554	174	0,03	0,00	0,05	0,01	1,78	0,06
DL-isoleucine	14,0511	158	0,01	0,00	0,02	0,01	1,97	0,14
L-glutamine	25,4029	156	0,00	0,00	0,01	0,00	9,73	0,01
L-homoserine	18,0427	218	n.d.		0,00	0,00		
Beta- alanine	17,3755	248	0,00	0,00	0,00	0,00	3,75	0,00
L-glutamic acid	22,0545	246	0,08	0,01	0,19	0,03	2,53	0,00
tyrosine	28,7828	218	0,00	0,00	0,01	0,00	2,84	0,01
N-methylalanine	10,9436	130	0,00	0,00	0,00	0,00	5,91	0,02
Organic acids								
L-(+) lactic acid	8,3244	147	0,31	0,03	0,48	0,12	1,59	0,19
succinic acid	14,46655	148	0,05	0,01	0,13	0,02	2,60	0,03
D-malic acid	19,0244	147	0,01	0,00	0,03	0,00	2,99	0,00
citric acid	26,5791	347	0,00	0,00	0,06	0,03	33,10	0,12
malonic acid	12,4706	147	0,00	0,00	0,00	0,00	1,95	0,42
L-ascorbic acid	29,1813	332	0,00	0,00	0,00	0,00	1,39	0,75
lactobionic acid	39,24855	217	0,01	0,00	0,00	0,00	0,35	0,01

dehydroascorbic acid	27,1135	173	0,00	0,00	0,00	0,00	2,08	0,01
gluconic acid	30,33	333	0,00	0,00	0,00	0,00	0,78	0,86
glyceric acid	15,0904	189	0,00	0,00	0,00	0,00	1,25	0,91
tartaric acid	25,6125	147	0,00	0,00	0,00	0,00	24,84	0,33
Sugars								
D-glucose	28,3894	319	0,08	0,01	0,01	0,00	0,10	0,00
tagatose	28,09325	217	0,01	0,00	0,02	0,00	3,52	0,01
fructose	27,8831	307	0,01	0,00	0,02	0,01	2,15	0,60
Sucrose	41,3113	361	0,35	0,02	0,30	0,04	0,87	0,54
D (+)altrose	28,68655	205	0,02	0,01	0,00	0,00	0,15	0,10
D-mannose	28,2972	319	0,03	0,02	0,00	0,00	0,10	0,56
D-lyxose	23,70135	217	0,00	0,00	0,02	0,00	14,01	0,00
Raffinose	51,4991	87	0,00	0,00	0,00	0,00	3,60	0,00
talose	28,6692	319	0,02	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00
D-allose	28,6724	319	0,01	0,00	0,00	0,00	0,18	0,01
N-containing								
adenine	27,2065	264	0,00	0,00	0,00	0,00	6,09	0,00
thymine	16,7733	255	0,00	0,00	0,00	0,00	2,82	0,03
uracil	15,1656	241	0,00	0,00	0,00	0,00	1,52	0,89
uric acid	32,0826	441	0,00	0,00	0,00	0,00	21,06	0,80
urea	12,476	147	0,00	0,00	0,00	0,00	4,23	0,17
5-aminovaleric acid	26,9378	174	0,00	0,00	0,00	0,00	3,39	0,85
iminodiacetic acid	18,6037	232	0,00	0,00	0,00	0,00	4,52	0,13
allo-inositol	31,9763	318	0,02	0,00	0,03	0,00	1,20	0,12
citrulline	26,4831	157	0,00	0,00	0,00	0,00	3,46	0,20
porphine	15,0329	285	0,00	0,00	0,00	0,00	1,51	0,65
1,3-diaminopropane	22,5781	174	0,00	0,00	0,00	0,00	2,04	0,01
putrescine	24,5733	174	0,00	0,00	0,01	0,00	2,21	0,08
Polyols								
acetol	20,7187	219	0,00	0,00	0,00	0,00	6,62	0,06
glycerol	13,6299	147	0,33	0,03	0,26	0,02	0,79	0,16
Phosphates								
phosphoric acid	13,592	299	0,06	0,03	0,06	0,02	0,88	0,95
O-phosphocolamine	25,7287	299	0,00	0,00	0,00	0,00	0,98	1,00
glycerol 1-phosphate	25,4263	357	0,01	0,00	0,01	0,00	0,71	0,47
3-phosphoglycerate	26,3871	357	0,00	0,00	n.d.		0,00	
D-glucose-6-phosphate	36,2285	387	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,01
Others								
2-amino-1-phenylethanol	13,3185	174	0,06	0,01	0,06	0,01	0,91	0,82
DL-3-aminoisobutyric acid	9,64765	102	0,00	0,00	0,00	0,00	1,54	0,63
1-methylhydantoin	6,3233	171	0,00	0,00	0,03	0,00	9,32	0,00

Παραρτήματα

L-γυρογλυταμικό οξύ	19,6689	156	n.d.		0,03	0,01		
2-παιπεριδόνιο	6,92195	156	0,00	0,00	0,00	0,00	0,95	0,08
1,3-διυδροξυακετόνη	13,026	147	0,00	0,00	n.d.		0,00	0,98

Παράρτημα 5. Δεδομένα RNAseq για μετάγραφα των στελεχών *C. reinhardtii*

Παράρτημα 5.1. Δεδομένα RNAseq για μετάγραφα των στελεχών *C. reinhardtii* με adj.p < 0.05 (bold).

ID	<i>sbd1</i> con vs wt con			
	gene name	Dif. Expr. Log2 Ratio	Dif. Expr. Log2 SE	Dif. Expr. Adj. p-value
Cre19.g751047	<i>LCI12</i>	1,93556E+14	0,354759	0,000136
Cre08.g365900	<i>LHCSR1</i>	1,638E+14	0,332665	0,001693
Cre02.g081350	<i>PNC1</i>	-1,97467E+14	0,36008	0,000136
Cre07.g332025		-2,1077E+14	0,413739	0,000815
Cre16.g652300	<i>CMA2</i>	-3,94269E+14	0,351896	5,44E-11

Παράρτημα 5.2. Δεδομένα RNAseq για μετάγραφα των στελεχών *C. reinhardtii* με adj.p < 0.05 (bold).

ID	wt 2mM vs wt con			
	gene name	Dif. Expr. Log2 Ratio	Dif. Expr. Log2 SE	Dif. Expr. Adj. p-value
Cre03.g177300		8,61E+14	0,551194	1,7E-38
Cre04.g226750		8,34E+14	0,795478	5,91E-10
Cre06.g250700		7,91E+14	0,661966	6,93E-17
Cre17.g740800		7,41E+14	0,610244	7,52E-18
Cre01.g004926		7,18E+14	0,83652	0,024239
Cre13.g569400		7,13E+14	0,35359	6,46E-73
Cre16.g662450		7,08E+14	0,264711	1,8E-139
Cre03.g207489		6,78E+14	0,765124	0,002407
Cre12.g502600	<i>SLT1</i>	6,68E+14	0,334363	2,35E-71
Cre08.g361600		6,67E+14	0,411593	1,68E-42
Cre06.g250050		6,63E+14	0,474567	4,63E-28
Cre03.g177800		6,62E+14	0,563666	7,5E-16
Cre14.g630350		6,58E+14	0,574922	2,22E-14

Cre03.g151950	<i>LZY1B</i>	6,54E+14	0,300112	2,26E-87
Cre06.g249400		6,54E+14	0,738943	0,002644
Cre11.g477200		6,48E+14	0,655631	2,17E-08
Cre11.g468000		6,42E+14	0,348272	8,71E-59
Cre02.g094700		6,34E+14	0,358971	7,03E-53
Cre16.g671350	<i>ARS2</i>	6,29E+14	0,684401	0,000131
Cre01.g030350	<i>CGL41</i>	6E+14	0,325639	1,04E-58
Cre10.g430200	<i>ARS3</i>	6E+14	0,641553	3,22E-05
Cre14.g615400	<i>THB1</i>	5,99E+14	0,338878	4,85E-53
Cre13.g569450		5,92E+14	0,403408	2,19E-32
Cre07.g341750		5,9E+14	0,586694	3,91E-08
Cre15.g635400	<i>ZYS3</i>	5,88E+14	0,330186	5,47E-54
Cre16.g688550	<i>GST1</i>	5,82E+14	0,289561	2,69E-73
Cre14.g617400	<i>HSP22F</i>	5,75E+14	0,303445	5,32E-63
Cre06.g279450	<i>MUT68</i>	5,74E+14	0,426069	4,43E-25
Cre02.g089550		5,74E+14	0,593735	1,81E-06
Cre14.g617450	<i>HSP22E</i>	5,67E+14	0,322519	2,26E-52
Cre14.g626150		5,63E+14	0,641905	0,005097
Cre01.g019950	<i>DNJ7</i>	5,58E+14	0,604369	8,92E-05
Cre11.g467792		5,55E+14	0,507668	6,03E-12
Cre13.g570801		5,52E+14	0,485604	5,34E-14
Cre01.g033500		5,49E+14	0,586641	3,16E-05
Cre01.g033750		5,42E+14	0,485744	5,65E-13
Cre08.g380800		5,4E+14	0,615008	0,004572
Cre03.g155350		5,39E+14	0,335722	2,08E-41
Cre13.g589350	<i>FBB6</i>	5,38E+14	0,335254	1,98E-41
Cre03.g161450		5,35E+14	0,554581	2,1E-06
Cre02.g093750	<i>NRX2</i>	5,34E+14	0,249375	4,14E-85
Cre02.g095151		5,31E+14	0,367367	5,65E-31
Cre04.g214600		5,28E+14	0,452568	1,91E-17
Cre08.g366874		5,27E+14	0,525532	4,95E-08
Cre05.g234661	<i>BCS1</i>	5,27E+14	0,26878	2,24E-68
Cre12.g546550	<i>FEA1</i>	5,26E+14	0,287172	5,72E-58
Cre17.g723400		5,23E+14	0,326348	2,81E-41
Cre17.g723350	<i>SUL2</i>	5,06E+14	0,402885	4,12E-20
Cre01.g024500		5,05E+14	0,300616	2,15E-46
Cre06.g254300		5,02E+14	0,441013	5,03E-14
Cre11.g468050		4,98E+14	0,258859	2,25E-65
Cre07.g343050		4,96E+14	0,325572	6,09E-37
Cre10.g428966		4,94E+14	0,299438	2,02E-45
Cre03.g207100		4,85E+14	0,409985	2,91E-16
Cre06.g259550		4,79E+14	0,362981	1,27E-23
Cre06.g280750		4,74E+14	0,42201	2,08E-13

Παράρτημα

Cre12.g546600	<i>FEA2</i>	4,74E+14	0,40161	3,96E-16
Cre01.g053150	<i>GPD3</i>	4,74E+14	0,390586	9,02E-18
Cre09.g394658	<i>LCI28</i>	4,64E+14	0,414057	3,18E-13
Cre02.g118151		4,6E+14	0,508985	0,000494
Cre01.g004900		4,6E+14	0,219495	5,82E-80
Cre01.g016600	<i>PSBS1</i>	4,58E+14	0,423493	1,98E-11
Cre03.g195950		4,57E+14	0,448684	1,23E-08
Cre16.g653650		4,56E+14	0,285184	6,69E-41
Cre05.g239450		4,54E+14	0,299732	2,46E-35
Cre11.g482650		4,49E+14	0,286005	3,99E-39
Cre15.g636950		4,49E+14	0,457804	4,32E-07
Cre14.g623050		4,46E+14	0,389968	2,54E-15
Cre10.g445000	<i>SLT2</i>	4,41E+14	0,264343	8,81E-46
Cre16.g692800		4,41E+14	0,307172	2,25E-30
Cre06.g278246		4,39E+14	0,345384	8,57E-22
Cre05.g238311		4,38E+14	0,261299	2,7E-46
Cre15.g640600		4,37E+14	0,403925	1,91E-11
Cre06.g278099		4,36E+14	0,478598	0,000278
Cre13.g563950		4,35E+14	0,334268	1,83E-22
Cre01.g038900		4,34E+14	0,435822	1,05E-07
Cre01.g053000	<i>GPD2</i>	4,32E+14	0,321218	4,43E-25
Cre05.g247400	<i>RDP4</i>	4,32E+14	0,317285	4,85E-26
Cre06.g292750		4,3E+14	0,494301	0,008681
Cre10.g458100	<i>YEE1</i>	4,26E+14	0,282434	4,23E-35
Cre13.g589450		4,25E+14	0,447117	7,91E-06
Cre11.g478100		4,24E+14	0,311069	3,99E-26
Cre17.g725750		4,22E+14	0,265538	2,1E-40
Cre06.g293100		4,18E+14	0,297417	1,35E-28
Cre06.g281650		4,18E+14	0,379244	2,3E-12
Cre01.g042600		4,17E+14	0,471314	0,00255
Cre12.g521950		4,1E+14	0,417134	3,69E-07
Cre09.g389851		4,09E+14	0,443701	0,000102
Cre10.g447800		4,07E+14	0,2369	3,67E-49
Cre12.g557750		4,04E+14	0,37818	6,88E-11
Cre02.g118200		4,03E+14	0,335251	2,73E-17
Cre12.g517200		4,03E+14	0,446625	0,000566
Cre08.g368300		4,02E+14	0,381999	4,06E-10
Cre09.g408350		3,97E+14	0,490292	0,013193
Cre09.g396401	<i>UPM1</i>	3,97E+14	0,318073	1,37E-19
Cre17.g729950		3,97E+14	0,238137	1,48E-45

Cre16.g675749		3,96E+14	0,254384	3,71E-38
Cre12.g498500	<i>DEG11</i>	3,94E+14	0,333036	2,89E-17
Cre07.g329882		3,94E+14	0,384789	7,28E-09
Cre03.g202150		3,93E+14	0,378458	1,61E-09
Cre12.g492900		3,93E+14	0,397243	2,04E-07
Cre12.g555850		3,92E+14	0,351675	5,59E-13
Cre10.g431400	<i>TRZ1</i>	3,91E+14	0,350242	4,43E-13
Cre03.g174450		3,91E+14	0,267111	3,33E-35
Cre02.g094750		3,9E+14	0,240615	1,66E-42
Cre03.g210513		3,87E+14	0,250565	2,66E-37
Cre03.g161950		3,85E+14	0,427043	0,000605
Cre13.g569500		3,85E+14	0,263529	6,09E-33
Cre10.g445952		3,81E+14	0,425194	0,000923
Cre03.g179100		3,81E+14	0,314123	8,67E-18
Cre12.g551700		3,8E+14	0,28036	1,22E-25
Cre09.g389750		3,79E+14	0,337822	2,92E-13
Cre03.g144827		3,77E+14	0,241276	1,74E-38
Cre17.g739900		3,76E+14	0,330077	4,06E-14
Cre12.g527250		3,75E+14	0,435335	0,017945
Cre07.g333150		3,71E+14	0,300872	9,38E-19
Cre09.g406300		3,7E+14	0,430221	0,021225
Cre16.g672161		3,68E+14	0,320685	1,5E-14
Cre03.g174400	<i>CDO1</i>	3,68E+14	0,308831	9,86E-17
Cre11.g481050		3,66E+14	0,294471	2,8E-19
Cre12.g556750		3,65E+14	0,415903	0,00469
Cre02.g108150		3,64E+14	0,346554	4,37E-10
Cre12.g537226		3,6E+14	0,392356	0,000148
Cre02.g095084		3,56E+14	0,333458	7,34E-11
Cre03.g145267		3,55E+14	0,326186	8,28E-12
Cre09.g396500		3,53E+14	0,279711	1,91E-20
Cre06.g304400	<i>SOUL4</i>	3,52E+14	0,321423	4,33E-12
Cre11.g481313		3,52E+14	0,343763	7,99E-09
Cre02.g084300		3,51E+14	0,279422	3,72E-20
Cre04.g215650		3,51E+14	0,2907	1,56E-17
Cre01.g024850	<i>RDP2</i>	3,51E+14	0,359363	7,28E-07
Cre12.g505050		3,5E+14	0,26484	1,1E-23
Cre03.g207377		3,49E+14	0,329994	2,13E-10
Cre07.g353250		3,49E+14	0,351664	1,58E-07
Cre13.g586600		3,49E+14	0,330078	2,68E-10
Cre10.g466050		3,48E+14	0,259601	1,03E-24
Cre04.g214750		3,45E+14	0,334381	2,96E-09
Cre03.g155400		3,43E+14	0,270401	9,02E-21
Cre10.g457100		3,42E+14	0,245336	9,25E-28

Παράρτημα

Cre02.g108450	<i>FAP280</i>	3,39E+14	0,221454	2,26E-36
Cre12.g553700		3,39E+14	0,223869	2,88E-35
Cre12.g548550		3,38E+14	0,281252	3,36E-17
Cre13.g588150		3,38E+14	0,261786	6,83E-22
Cre08.g376350	<i>ASF1</i>	3,34E+14	0,273446	3,75E-18
Cre07.g323200		3,31E+14	0,324645	9,91E-09
Cre12.g505400		3,31E+14	0,312892	2,36E-10
Cre17.g726850		3,31E+14	0,257567	1,36E-21
Cre02.g093800	<i>NRX3</i>	3,3E+14	0,287292	1,42E-14
Cre11.g469350		3,29E+14	0,37651	0,006975
Cre07.g336800		3,27E+14	0,354923	0,000102
Cre06.g286550		3,26E+14	0,289683	1,79E-13
Cre12.g504950	<i>UOX1</i>	3,26E+14	0,354014	1,26E-05
Cre14.g625600		3,23E+14	0,317071	1,26E-08
Cre06.g298800		3,23E+14	0,317314	1,39E-08
Cre16.g676600		3,22E+14	0,256927	7,13E-21
Cre06.g278095		3,22E+14	0,378525	0,049506
Cre12.g544600		3,22E+14	0,343597	2,87E-05
Cre16.g664301		3,21E+14	0,334976	3,39E-06
Cre11.g467524		3,2E+14	0,21909	4,42E-32
Cre09.g406625		3,2E+14	0,302497	2,22E-10
Cre11.g467738		3,2E+14	0,238768	1,02E-25
Cre10.g456100	<i>AGG3</i>	3,19E+14	0,273522	1,66E-15
Cre12.g552750		3,17E+14	0,262074	1,02E-17
Cre05.g246300		3,17E+14	0,28192	1,74E-13
Cre01.g028777		3,17E+14	0,350983	0,000488
Cre16.g679750		3,17E+14	0,297499	1,14E-10
Cre06.g263050	<i>EFP2</i>	3,16E+14	0,358899	0,003495
Cre07.g316450		3,16E+14	0,363435	0,01029
Cre09.g397512		3,14E+14	0,287606	5,84E-12
Cre12.g498000		3,14E+14	0,343213	1,76E-05
Cre01.g023300		3,14E+14	0,276515	5,6E-14
Cre12.g551100		3,12E+14	0,301041	1,93E-09
Cre16.g654900		3,1E+14	0,27484	1,22E-13
Cre02.g078939		3,1E+14	0,336009	9,5E-05
Cre11.g467601		3,09E+14	0,317979	1,21E-06
Cre12.g510500		3,08E+14	0,325013	1,12E-05
Cre06.g281350	<i>LON1</i>	3,07E+14	0,345015	0,001585
Cre02.g085701		3,06E+14	0,343359	0,001461
Cre04.g211750		3,05E+14	0,33716	0,000432

Cre02.g077350	<i>HDH1</i>	3,05E+14	0,235929	5,93E-23
Cre08.g384650		3,04E+14	0,346796	0,005165
Cre09.g396809		3,02E+14	0,292079	2,82E-09
Cre02.g113652		3,01E+14	0,340481	0,002706
Cre06.g283900		3E+14	0,295187	1,23E-08
Cre01.g061807		2,99E+14	0,309812	2,02E-06
Cre14.g628702		2,99E+14	0,311383	3,59E-07
Cre09.g389550	<i>DNJ13</i>	2,98E+14	0,298919	8,9E-08
Cre16.g680350		2,97E+14	0,28992	7,26E-09
Cre03.g159851		2,97E+14	0,345293	0,023928
Cre06.g262800		2,96E+14	0,300151	2,42E-07
Cre03.g149250		2,96E+14	0,264018	2,56E-13
Cre07.g328800	<i>NSG13</i>	2,96E+14	0,305867	1,58E-06
Cre17.g700500		2,94E+14	0,311535	1,49E-05
Cre03.g176833		2,94E+14	0,299912	5,05E-07
Cre02.g079450		2,93E+14	0,320947	0,000212
Cre08.g374950		2,93E+14	0,288706	1,84E-08
Cre12.g552400		2,92E+14	0,342161	0,040615
Cre02.g105750		2,9E+14	0,300607	2,37E-07
Cre04.g217930		2,88E+14	0,267118	2,91E-11
Cre06.g299800		2,87E+14	0,311888	0,000133
Cre05.g233751		2,85E+14	0,304538	3,1E-06
Cre05.g241400		2,85E+14	0,297582	4,27E-06
Cre12.g541100		2,85E+14	0,275811	3,26E-09
Cre08.g361850		2,84E+14	0,269966	3,48E-10
Cre07.g338350	<i>CPLD50</i>	2,84E+14	0,257203	1,68E-12
Cre01.g035650		2,84E+14	0,343287	0,031956
Cre02.g090850	<i>CLPB3</i>	2,84E+14	0,275132	3,22E-09
Cre01.g034325		2,84E+14	0,288443	3,47E-07
Cre16.g656150		2,82E+14	0,26758	2,95E-10
Cre15.g641750		2,8E+14	0,239545	1,77E-15
Cre06.g310200		2,79E+14	0,284702	4,39E-07
Cre04.g217951	<i>LCI33</i>	2,79E+14	0,287144	1,06E-06
Cre02.g106450		2,79E+14	0,234621	1,56E-17
Cre10.g420950		2,78E+14	0,308317	0,000624
Cre07.g340900		2,78E+14	0,276384	4,83E-08
Cre12.g550400	<i>GRX2</i>	2,77E+14	0,275735	5,25E-08
Cre11.g479650		2,76E+14	0,266328	1,79E-09
Cre10.g450850		2,76E+14	0,283598	9,22E-08
Cre17.g737050		2,76E+14	0,265291	1,35E-10
Cre06.g278107		2,76E+14	0,286756	2,77E-07
Cre10.g444550	<i>SPP1</i>	2,75E+14	0,285803	2,36E-06
Cre06.g297450		2,75E+14	0,296782	6,79E-05

Παράρτημα

Cre01.g014850		2,74E+14	0,2983	1,3E-05
Cre06.g272000		2,74E+14	0,277633	2,38E-07
Cre09.g388150	<i>MRPL36</i>	2,73E+14	0,2375	1,12E-14
Cre17.g746897		2,73E+14	0,241818	1,19E-14
Cre01.g030850	<i>POA4</i>	2,71E+14	0,239917	9,45E-15
Cre17.g743547		2,7E+14	0,256715	3,53E-10
Cre11.g475450		2,69E+14	0,2499	3,01E-11
Cre10.g444000		2,69E+14	0,262824	8,59E-09
Cre06.g267700	<i>SPP2</i>	2,68E+14	0,257429	1,06E-10
Cre12.g521600		2,68E+14	0,303733	0,003047
Cre01.g031500		2,68E+14	0,27554	9,14E-07
Cre03.g200750		2,68E+14	0,293014	0,000211
Cre16.g648650		2,68E+14	0,286136	3,05E-05
Cre04.g222750	<i>CCP2</i>	2,68E+14	0,28965	8,82E-05
Cre09.g403550		2,67E+14	0,27927	4,4E-06
Cre10.g456750		2,66E+14	0,255775	1,18E-09
Cre01.g017500		2,65E+14	0,258365	5,06E-09
Cre16.g650050		2,65E+14	0,293404	5,74E-05
Cre07.g321550		2,64E+14	0,246087	4,12E-11
Cre10.g464850	<i>MSRA5</i>	2,63E+14	0,289792	0,000346
Cre16.g658850		2,63E+14	0,314311	0,014121
Cre04.g217903		2,63E+14	0,237766	1,76E-12
Cre12.g503600		2,62E+14	0,281821	4,47E-05
Cre12.g531100		2,62E+14	0,256508	1,04E-08
Cre03.g155001		2,6E+14	0,262251	1,74E-07
Cre03.g185100		2,59E+14	0,243296	9,38E-12
Cre06.g278205		2,59E+14	0,263637	3,28E-07
Cre01.g018600		2,59E+14	0,255417	2,07E-08
Cre06.g279000		2,58E+14	0,242997	1,26E-10
Cre07.g346100		2,58E+14	0,294928	0,006712
Cre16.g651350		2,56E+14	0,273985	3,13E-05
Cre16.g657800	<i>CCD3</i>	2,55E+14	0,284447	0,000894
Cre12.g498700	<i>CPLD13</i>	2,55E+14	0,293404	0,0111
Cre13.g580300		2,55E+14	0,273112	4,13E-05
Cre08.g377600		2,54E+14	0,24025	2,05E-10
Cre13.g570400		2,54E+14	0,303383	0,014554
Cre03.g178750		2,52E+14	0,276215	0,000247
Cre17.g731350		2,52E+14	0,267736	2,15E-05
Cre10.g466750	<i>SAT1</i>	2,51E+14	0,246035	9,84E-09
Cre16.g683200		2,51E+14	0,289004	0,010449

Cre02.g102350	<i>APG3</i>	2,51E+14	0,294554	0,044591
Cre13.g580900		2,47E+14	0,266494	6,04E-05
Cre02.g085200		2,47E+14	0,267777	9,37E-05
Cre01.g014900		2,47E+14	0,287713	0,00254
Cre06.g292800		2,46E+14	0,281171	0,006975
Cre13.g576466		2,45E+14	0,264767	8,2E-05
Cre02.g095093		2,43E+14	0,231844	4,98E-11
Cre16.g664550	<i>SHMT1</i>	2,43E+14	0,209162	3,12E-15
Cre11.g467692		2,42E+14	0,261843	8,23E-05
Cre10.g438100	<i>PGP2</i>	2,41E+14	0,256341	1,69E-05
Cre16.g682725	<i>GST2</i>	2,41E+14	0,236889	1,12E-08
Cre02.g087150		2,41E+14	0,250093	2,21E-06
Cre17.g708300	<i>RPN12</i>	2,4E+14	0,251232	5,05E-06
Cre03.g174050	<i>MRP4</i>	2,39E+14	0,253651	1,49E-05
Cre13.g590350		2,39E+14	0,242114	2,32E-07
Cre10.g449350		2,36E+14	0,269751	0,005427
Cre02.g082350	<i>CUT1</i>	2,36E+14	0,249954	1,32E-05
Cre10.g425800	<i>ORN1</i>	2,34E+14	0,270239	0,012526
Cre16.g689650	<i>APG8</i>	2,33E+14	0,222933	7,47E-10
Cre02.g095104		2,32E+14	0,269178	0,01918
Cre08.g373436		2,31E+14	0,267852	0,019471
Cre06.g280050	<i>XRN1</i>	2,3E+14	0,236538	9,93E-08
Cre12.g557900	<i>CDI1</i>	2,27E+14	0,224023	2,1E-08
Cre11.g467599		2,27E+14	0,243078	4,05E-05
Cre12.g500550		2,26E+14	0,257075	0,00448
Cre10.g435450	<i>CPL2</i>	2,25E+14	0,25704	0,00625
Cre03.g207600		2,24E+14	0,225333	1,09E-07
Cre12.g519350	<i>PHB2</i>	2,24E+14	0,221733	3,02E-08
Cre12.g517451		2,23E+14	0,250682	0,001832
Cre12.g522250		2,23E+14	0,237371	2,38E-05
Cre12.g510000		2,21E+14	0,255232	0,012711
Cre03.g194000		2,19E+14	0,221987	2,93E-07
Cre06.g302000		2,18E+14	0,235516	6,55E-05
Cre17.g724350	<i>POA5</i>	2,14E+14	0,25132	0,000396
Cre16.g653601		2,13E+14	0,246139	0,00161
Cre06.g308750		2,12E+14	0,227393	3,8E-05
Cre17.g725200		2,1E+14	0,234356	0,000117
Cre09.g414200	<i>VPS26</i>	2,07E+14	0,221011	2,51E-05
Cre14.g617100		2,06E+14	0,235509	0,006231
Cre12.g487850		2,05E+14	0,241118	0,041856
Cre09.g401100		2,04E+14	0,236173	0,01553
Cre06.g304300	<i>POA6</i>	2,04E+14	0,226595	0,00077
Cre01.g020918		2,02E+14	0,232278	0,009637

Παράρτημα

Cre16.g691353		2,02E+14	0,229189	0,003692
Cre01.g001983		2E+14	0,226008	0,002632
Cre10.g449100		1,98E+14	0,227934	0,00093
Cre03.g197050	<i>HTV2</i>	1,96E+14	0,208844	2,73E-05
Cre12.g516100		1,94E+14	0,225483	0,019471
Cre17.g705400	<i>POA1</i>	1,91E+14	0,224959	0,045458
Cre12.g524700		1,91E+14	0,223584	0,038024
Cre09.g402293		8,19E+13	0,798145	5,88E-09
Cre15.g637315		7,11E+13	0,752431	1,28E-05
Cre06.g297900		5,7E+13	0,343758	4,13E-45
Cre07.g352550	<i>RDP3</i>	5,25E+13	0,319479	4,56E-44
Cre07.g355800		5,16E+13	0,593767	0,009637
Cre04.g218350		4,43E+13	0,519722	0,039793
Cre06.g284150	<i>RHP2</i>	3,84E+13	0,408613	2,06E-07
Cre07.g337200		3,82E+13	0,332185	1,29E-14
Cre10.g428950		3,79E+13	0,434291	0,007935
Cre18.g748747		3,67E+13	0,278356	1,5E-23
Cre13.g576500		3,61E+13	0,353796	9,55E-09
Cre16.g676350		3,52E+13	0,255468	6,9E-27
Cre12.g552700		3,45E+13	0,352578	5,69E-07
Cre09.g409050		3,23E+13	0,358046	6,15E-05
Cre12.g556228	<i>NDA7</i>	3,2E+13	0,34869	0,000168
Cre09.g392208		2,96E+13	0,289929	9,81E-09
Cre10.g423550		2,86E+13	0,267301	6,26E-12
Cre06.g305050		2,86E+13	0,260877	4,94E-12
Cre01.g018900		2,73E+13	0,299432	0,000226
Cre02.g095200		2,66E+13	0,265464	6,17E-08
Cre02.g103850	<i>HIS3</i>	2,62E+13	0,218559	3,7E-17
Cre06.g298750	<i>AOT4</i>	2,62E+13	0,294689	0,002108
Cre09.g399626		2,51E+13	0,288249	0,009064
Cre05.g232800	<i>SRX1</i>	2,41E+13	0,243019	1,74E-07
Cre03.g182650		2,4E+13	0,272154	0,002997
Cre10.g445650	<i>SMC3</i>	2,39E+13	0,274121	0,00706
Cre08.g380000		2,32E+13	0,252247	0,00014
Cre16.g682350		2,05E+13	0,239919	0,030895
Cre02.g084100		1,99E+13	0,215436	7,7E-05
Cre02.g107000		5,01E+12	0,450409	7,95E-13
Cre01.g045600	<i>SRR12</i>	4,13E+12	0,312903	1,54E-23
Cre03.g194050		4,06E+12	0,457681	0,002002
Cre17.g718850		3,54E+12	0,317721	6,57E-13

Cre13.g569350		3,39E+12	0,282173	3,36E-17
Cre03.g195650	<i>PRPS10</i>	-2,3E+10	0,205425	8,05E-13
Cre09.g401900		-3E+11	0,354235	0,037158
Cre09.g416150	<i>ASA7</i>	-2,3E+12	0,221752	7,5E-10
Cre06.g296700		-2,2E+13	0,23839	0,000195
Cre16.g659950	<i>PRPS5</i>	-2,4E+13	0,228878	1,93E-09
Cre17.g731950	<i>ATP9B</i>	-2,4E+13	0,220113	9,47E-12
Cre10.g462950	<i>PRPL33</i>	-2,4E+13	0,235411	9,7E-10
Cre06.g300550		-2,4E+13	0,258985	4,43E-05
Cre12.g529950	<i>EIF4G</i>	-2,5E+13	0,255155	2,65E-06
Cre01.g015600		-2,5E+13	0,294081	0,013349
Cre06.g299000	<i>PRPL21</i>	-2,6E+13	0,250276	1,42E-09
Cre05.g238200		-2,6E+13	0,243616	1,98E-11
Cre02.g074800	<i>CYG9</i>	-2,7E+13	0,256064	1,42E-09
Cre12.g560950	<i>PSAG</i>	-2,7E+13	0,23259	1,28E-14
Cre02.g088551		-3,2E+13	0,332343	6,07E-06
Cre05.g243050		-3,2E+13	0,345844	2,25E-05
Cre16.g683793		-3,3E+13	0,312241	5,17E-10
Cre14.g620702		-3,5E+13	0,231046	4,18E-36
Cre05.g238687		-3,5E+13	0,204787	1,7E-49
Cre10.g433350		-3,5E+13	0,264876	1,08E-24
Cre02.g080250		-3,6E+13	0,276467	9,04E-22
Cre07.g328200	<i>PSBP6</i>	-3,7E+13	0,377744	5,31E-08
Cre16.g683350		-4,2E+13	0,450253	5,45E-06
Cre10.g430501		-4,2E+13	0,316593	3,93E-24
Cre08.g378550	<i>NUOP4</i>	-1,9E+14	0,216447	0,002879
Cre09.g387726	<i>AST1</i>	-1,9E+14	0,214545	0,001418
Cre11.g478700		-1,9E+14	0,226021	0,019606
Cre05.g240850	<i>THIC</i>	-2E+14	0,209363	2,44E-05
Cre04.g231222	<i>CPN60A</i>	-2E+14	0,216291	0,000332
Cre16.g683150		-2E+14	0,210927	3,56E-05
Cre06.g250800	<i>CRB1</i>	-2E+14	0,231158	0,041688
Cre08.g378050	<i>NUOP5</i>	-2E+14	0,219232	0,000513
Cre01.g050550		-2E+14	0,230852	0,024567
Cre12.g556050	<i>PRPL9</i>	-2E+14	0,222723	0,001068
Cre01.g051500		-2E+14	0,216919	9,5E-05
Cre03.g175400	<i>PGI1</i>	-2E+14	0,202309	1,24E-07
Cre17.g727300		-2E+14	0,232015	0,00469
Cre12.g519180		-2E+14	0,22597	0,000595
Cre06.g270950		-2E+14	0,229532	0,001832
Cre07.g327400	<i>NUO9</i>	-2,1E+14	0,22196	8,04E-05
Cre02.g111700		-2,1E+14	0,221126	5,29E-05
Cre02.g107300	<i>DPS1</i>	-2,1E+14	0,218786	1,84E-05

Παράρτημα

Cre11.g467640		-2,1E+14	0,231241	0,00162
Cre01.g030050	<i>PRPL34</i>	-2,1E+14	0,212687	6,82E-08
Cre06.g264350	<i>PRPL13</i>	-2,1E+14	0,224224	5,72E-05
Cre02.g108850	<i>PRPL17</i>	-2,1E+14	0,212492	3E-07
Cre12.g486300	<i>PSAL</i>	-2,1E+14	0,212949	3,6E-07
Cre01.g032300	<i>GBP1</i>	-2,1E+14	0,231472	0,000464
Cre12.g483950	<i>MDH4</i>	-2,1E+14	0,219831	5,75E-06
Cre11.g468750	<i>CPLD48</i>	-2,1E+14	0,219938	3,71E-08
Cre10.g440400		-2,1E+14	0,212216	1,19E-07
Cre08.g368050		-2,1E+14	0,223592	1,03E-05
Cre11.g467770	<i>PGK1</i>	-2,1E+14	0,210125	3,18E-08
Cre08.g372450	<i>PSBQ</i>	-2,1E+14	0,240142	0,002525
Cre09.g402300	<i>ASA8</i>	-2,1E+14	0,206876	3,46E-09
Cre07.g327900		-2,1E+14	0,245631	0,006884
Cre03.g157700	<i>COX5C</i>	-2,2E+14	0,216315	8,9E-08
Cre18.g749447	<i>AHD1</i>	-2,2E+14	0,252143	0,02586
Cre02.g142246		-2,2E+14	0,254486	0,049938
Cre02.g093650		-2,2E+14	0,199419	1,07E-11
Cre12.g519100		-2,2E+14	0,226593	1,33E-06
Cre02.g088900	<i>PRPL1</i>	-2,2E+14	0,214586	5,4E-09
Cre03.g156050		-2,2E+14	0,244761	0,000504
Cre14.g619350		-2,2E+14	0,231542	4,23E-06
Cre12.g483850		-2,2E+14	0,249445	0,000142
Cre01.g055453	<i>ALS2</i>	-2,2E+14	0,228782	3,88E-07
Cre12.g484000		-2,3E+14	0,230929	7,77E-07
Cre12.g483700		-2,3E+14	0,213404	1,26E-10
Cre13.g571150	<i>NUOP1</i>	-2,3E+14	0,247287	0,000138
Cre17.g722750		-2,3E+14	0,249397	2,58E-05
Cre12.g483650		-2,3E+14	0,250527	0,000293
Cre07.g346600		-2,3E+14	0,235345	1,03E-06
Cre03.g185600		-2,3E+14	0,253996	0,000496
Cre12.g537450	<i>COX13</i>	-2,3E+14	0,203014	6,75E-14
Cre13.g602650		-2,3E+14	0,266897	0,015549
Cre12.g499800		-2,3E+14	0,22801	1,8E-08
Cre05.g238332	<i>PSAD</i>	-2,3E+14	0,242069	3,88E-06
Cre10.g422600	<i>NUO6</i>	-2,3E+14	0,227559	9,01E-09
Cre10.g420350	<i>PSAE</i>	-2,4E+14	0,245237	3,47E-06
	<i>NUOB1</i>			
Cre06.g278188	<i>8</i>	-2,4E+14	0,261076	0,000475
Cre01.g052100	<i>PRPL18</i>	-2,4E+14	0,233881	2,71E-08

Cre02.g099850	<i>PDC2</i>	-2,4E+14	0,248258	4,84E-06
Cre12.g507400		-2,4E+14	0,246421	2,12E-06
Cre11.g479500	<i>PRPL4</i>	-2,4E+14	0,251558	1,03E-05
Cre01.g017300	<i>PRPS21</i>	-2,4E+14	0,228918	5,9E-10
Cre06.g272650	<i>LHCA8</i>	-2,4E+14	0,244808	3,6E-07
Cre13.g581650	<i>PRPL7</i>	-2,4E+14	0,221884	1,27E-11
Cre06.g265800	<i>PRPL28</i>	-2,4E+14	0,222025	1,27E-11
Cre12.g548950	<i>LHCBM7</i>	-2,4E+14	0,218972	1,38E-12
Cre16.g652250		-2,4E+14	0,283893	0,033297
Cre19.g750247		-2,4E+14	0,262272	6,24E-05
Cre03.g206600	<i>AAD1</i>	-2,4E+14	0,216692	1,97E-13
Cre09.g395350	<i>ASA9</i>	-2,4E+14	0,213254	2,49E-14
Cre12.g516350	<i>COX10</i>	-2,4E+14	0,22211	3E-12
Cre03.g201750		-2,5E+14	0,263127	3,01E-05
Cre10.g451752		-2,5E+14	0,258787	6,8E-06
Cre04.g214500	<i>IDH3</i>	-2,5E+14	0,241049	5,16E-09
Cre16.g657250	<i>GOX17</i>	-2,5E+14	0,265206	3,49E-05
Cre03.g193850	<i>SCL1</i>	-2,5E+14	0,216506	1,68E-14
Cre01.g051900	<i>RIP1</i>	-2,5E+14	0,204052	3,88E-18
Cre08.g358562	<i>CPN20</i>	-2,5E+14	0,287253	0,01005
Cre17.g724300	<i>PSAK</i>	-2,5E+14	0,236821	2,9E-10
Cre01.g029300	<i>TPI1</i>	-2,5E+14	0,239487	8,27E-11
Cre14.g619133		-2,5E+14	0,199476	5,2E-20
Cre12.g492300	<i>NUO10</i>	-2,5E+14	0,248837	3,11E-08
Cre06.g262700	<i>QCR7</i>	-2,5E+14	0,228206	2,39E-12
Cre16.g675550		-2,5E+14	0,245568	5,88E-09
Cre11.g468950	<i>QCR9</i>	-2,5E+14	0,243021	1,66E-09
Cre08.g379650	<i>TIC20</i>	-2,5E+14	0,255729	2,41E-07
Cre15.g635850	<i>ATP3</i>	-2,5E+14	0,211283	5,38E-17
Cre09.g386650	<i>ANT1</i>	-2,5E+14	0,247742	8,59E-09
Cre06.g269050		-2,5E+14	0,237224	7,91E-11
Cre03.g199535		-2,5E+14	0,304785	0,021963
Cre10.g442050		-2,5E+14	0,287011	0,002454
Cre02.g141400	<i>PCK1</i>	-2,5E+14	0,293574	0,011311
Cre08.g378900	<i>NUO3</i>	-2,6E+14	0,227355	1,48E-13
Cre05.g247950		-2,6E+14	0,289539	0,002467
	<i>NUOB1</i>			
Cre16.g664600	<i>6</i>	-2,6E+14	0,254856	3,69E-08
Cre13.g576650	<i>HIS4</i>	-2,6E+14	0,284305	0,000481
Cre12.g557600	<i>ADK4</i>	-2,6E+14	0,245123	1,95E-10
Cre02.g077300	<i>NOP1</i>	-2,6E+14	0,29012	0,000758
	<i>NUOB1</i>			
Cre13.g568800	<i>3</i>	-2,6E+14	0,286894	0,000227

Παραρτήματ

Cre17.g727801		-2,6E+14	0,273842	3,78E-06
Cre05.g246900		-2,6E+14	0,258776	1,76E-08
Cre10.g434450	<i>NUOA9</i>	-2,6E+14	0,305375	0,022026
Cre12.g485250		-2,6E+14	0,242509	1,28E-11
Cre03.g175200	<i>TOC75</i>	-2,6E+14	0,242736	1,26E-11
Cre06.g283950	<i>LHCBM4</i>	-2,6E+14	0,226305	1,36E-15
Cre07.g325734		-2,7E+14	0,264471	4,83E-08
Cre12.g535950	<i>NUOS1</i>	-2,7E+14	0,282175	1,8E-05
Cre01.g007850	<i>TEF29</i>	-2,7E+14	0,254689	1,02E-09
Cre09.g402552	<i>NUO11</i>	-2,7E+14	0,235181	8,83E-14
Cre15.g638500	<i>CYC1</i>	-2,7E+14	0,217703	1,41E-18
Cre10.g441400	<i>NOP58</i>	-2,7E+14	0,303292	0,003394
Cre16.g673650	<i>LHCB5</i>	-2,7E+14	0,305707	0,005178
Cre12.g520600	<i>PRPS6</i>	-2,7E+14	0,220704	6,59E-18
Cre09.g410700	<i>MDH5</i>	-2,7E+14	0,254256	2,95E-10
Cre16.g680000	<i>ATP5</i>	-2,7E+14	0,219717	2,31E-18
Cre03.g165100	<i>PSAI</i>	-2,7E+14	0,213352	2,58E-20
Cre05.g243950		-2,7E+14	0,30322	0,001885
Cre17.g715250	<i>BCC1</i>	-2,7E+14	0,270691	8,9E-08
Cre16.g691850	<i>COX90</i>	-2,7E+14	0,209436	3,9E-22
Cre02.g074850		-2,7E+14	0,291749	4,53E-05
Cre17.g698000	<i>ATP2</i>	-2,7E+14	0,194788	5,6E-28
Cre01.g049950		-2,7E+14	0,299054	0,000217
Cre16.g687900	<i>LHCA7</i>	-2,7E+14	0,242355	1,52E-13
Cre06.g283800		-2,7E+14	0,241007	4,52E-14
Cre09.g415550	<i>ASA2</i>	-2,7E+14	0,232504	3,65E-16
Cre10.g418400		-2,8E+14	0,298601	0,000109
Cre11.g467763		-2,8E+14	0,292254	1,46E-05
Cre07.g321000	<i>CYG14</i>	-2,8E+14	0,306985	0,000811
Cre08.g359350		-2,8E+14	0,256437	2,78E-12
Cre16.g657200		-2,8E+14	0,311321	0,001961
Cre06.g283050	<i>LHCA1</i>	-2,8E+14	0,242466	2,91E-14
Cre16.g693600	<i>ISG-C4</i>	-2,8E+14	0,292873	1,08E-06
Cre03.g146167	<i>TEF10a</i>	-2,8E+14	0,251923	2,15E-12
Cre08.g358553		-2,8E+14	0,319996	0,007237
Cre02.g100200	<i>NUOP3</i>	-2,8E+14	0,289468	1,62E-06
Cre07.g344950	<i>LHCA9</i>	-2,8E+14	0,250759	4,2E-13
Cre01.g016500	<i>DLD2</i>	-2,8E+14	0,252437	8,07E-13
Cre02.g089650		-2,8E+14	0,303874	6,85E-05
Cre07.g347400		-2,8E+14	0,322967	0,006198

Cre06.g274550		-2,8E+14	0,327563	0,012094
Cre02.g119850	<i>PDE9</i>	-2,8E+14	0,263049	2,3E-11
Cre06.g304250	<i>RLS2</i>	-2,8E+14	0,329782	0,018882
Cre03.g146187		-2,8E+14	0,262978	1,71E-11
Cre11.g467707	<i>ATP4</i>	-2,9E+14	0,213958	1,88E-24
Cre03.g172300		-2,9E+14	0,288921	2,04E-07
Cre04.g217932	<i>PRPL35</i>	-2,9E+14	0,276241	2,19E-09
Cre15.g641200		-2,9E+14	0,303465	1,54E-05
Cre12.g493950	<i>PRPS13</i>	-2,9E+14	0,262633	3,94E-12
Cre12.g540500		-2,9E+14	0,283575	1,43E-08
Cre13.g566000		-2,9E+14	0,333001	0,012433
Cre06.g264200	<i>SDH2</i>	-2,9E+14	0,209295	5,43E-28
Cre03.g201100		-2,9E+14	0,326114	0,002422
Cre06.g258700	<i>PYC1</i>	-2,9E+14	0,229264	1,73E-20
Cre07.g334550	<i>PSAO</i>	-2,9E+14	0,279223	1,05E-10
Cre06.g294650	<i>AGT1</i>	-2,9E+14	0,319101	0,000149
Cre06.g268600	<i>NAB1</i>	-2,9E+14	0,321245	0,000166
Cre03.g144627	<i>CGS1</i>	-2,9E+14	0,290323	1,47E-08
Cre06.g278213	<i>LHCA6</i>	-3E+14	0,250592	3,67E-16
Cre06.g306300	<i>CHLI1</i>	-3E+14	0,268545	2,1E-13
Cre01.g049500	<i>COX2B</i>	-3E+14	0,206033	1,59E-30
Cre06.g257601	<i>PRX1</i>	-3E+14	0,296763	6,71E-08
Cre03.g149100	<i>CIS2</i>	-3E+14	0,231744	1,06E-21
Cre06.g261700		-3E+14	0,288618	2,81E-09
Cre07.g344600	<i>PGD1</i>	-3E+14	0,350816	0,044169
Cre07.g340350	<i>ASA1</i>	-3E+14	0,198478	4,21E-35
Cre17.g713350	<i>OMT1</i>	-3E+14	0,214287	3,84E-28
Cre01.g037850	<i>BCC2</i>	-3E+14	0,246254	5,23E-18
Cre17.g721300	<i>ASA5</i>	-3E+14	0,271305	1,45E-12
Cre10.g425900	<i>LHCA5</i>	-3E+14	0,25808	2,43E-15
Cre12.g508750	<i>LHCA2</i>	-3E+14	0,238024	1,88E-20
Cre11.g467573	<i>LHCA3</i>	-3E+14	0,240932	1,06E-20
Cre16.g656750		-3E+14	0,299878	4,9E-08
Cre12.g557050	<i>CPLD8</i>	-3E+14	0,315524	5,34E-06
Cre10.g423650	<i>PRPL11</i>	-3E+14	0,322905	2,48E-06
Cre01.g012750		-3E+14	0,346596	0,006446
Cre10.g452100	<i>PSBY2</i>	-3E+14	0,277994	4,04E-12
Cre03.g171100		-3,1E+14	0,322906	1,25E-05
Cre10.g450400	<i>NUO5</i>	-3,1E+14	0,22059	2,03E-27
Cre07.g349350		-3,1E+14	0,221437	3,5E-27
Cre01.g015650		-3,1E+14	0,345402	0,002091
Cre12.g528950	<i>PUF1</i>	-3,1E+14	0,342777	0,001078
Cre10.g425050		-3,1E+14	0,347415	0,002508

Παράρτημα

Cre03.g158900	<i>DLA2</i>	-3,1E+14	0,261978	6,42E-16
Cre12.g523850	<i>QCR1</i>	-3,1E+14	0,209454	2,68E-34
Cre14.g623000		-3,1E+14	0,367443	0,004297
Cre13.g607850		-3,1E+14	0,28147	6,57E-13
Cre17.g732000	<i>ATP9A</i>	-3,1E+14	0,218807	3,11E-31
Cre12.g509750	<i>QCR2</i>	-3,1E+14	0,236328	3,88E-24
Cre03.g164700		-3,1E+14	0,342066	0,000117
Cre06.g282800	<i>ICL1</i>	-3,2E+14	0,303013	1,4E-09
Cre02.g116950		-3,2E+14	0,346501	0,000186
Cre01.g032650	<i>TAL1</i>	-3,2E+14	0,293852	2,46E-11
Cre01.g064362		-3,2E+14	0,261767	6,37E-18
Cre03.g194200	<i>PDH2</i>	-3,2E+14	0,292031	7,59E-12
Cre14.g625650		-3,2E+14	0,336807	8,74E-06
Cre12.g511200	<i>NUOS5</i>	-3,2E+14	0,291083	3,04E-12
Cre06.g304350		-3,2E+14	0,21732	4,15E-33
Cre12.g514200		-3,2E+14	0,260984	6,66E-19
Cre12.g548000		-3,2E+14	0,366148	0,003977
Cre01.g018800	<i>ATP6</i>	-3,2E+14	0,198134	4,77E-43
Cre07.g332800		-3,3E+14	0,350227	5,8E-05
Cre10.g452050	<i>LHCA4</i>	-3,3E+14	0,247823	3,11E-23
Cre02.g143000		-3,3E+14	0,277646	4,84E-16
Cre07.g338050	<i>ASA3</i>	-3,3E+14	0,209854	1,82E-38
Cre14.g629650	<i>NIK1</i>	-3,3E+14	0,339208	1,55E-06
Cre01.g027550		-3,3E+14	0,274909	5,07E-17
Cre03.g204650	<i>NUOB4</i>	-3,3E+14	0,261984	1,53E-20
Cre09.g387875	<i>IPY3</i>	-3,3E+14	0,19557	7,87E-48
Cre17.g719600		-3,3E+14	0,327007	9,43E-09
Cre06.g257950	<i>AST4</i>	-3,3E+14	0,29225	2,67E-14
Cre16.g682100		-3,3E+14	0,327413	7,93E-09
Cre09.g405850	<i>NUO7</i>	-3,4E+14	0,215209	2,21E-38
Cre06.g278148		-3,4E+14	0,301912	5,38E-14
Cre02.g083950	<i>PSRP3</i>	-3,4E+14	0,265889	1,11E-20
Cre12.g558900	<i>PETO</i>	-3,4E+14	0,218572	2,37E-37
Cre02.g081050	<i>FAP24</i>	-3,4E+14	0,331805	9,89E-09
Cre01.g020305		-3,4E+14	0,245554	2,04E-28
Cre06.g308533		-3,4E+14	0,317629	1,27E-11
Cre13.g567600		-3,5E+14	0,210173	3,6E-44
Cre11.g467760		-3,5E+14	0,347934	8,17E-09
Cre03.g183900		-3,5E+14	0,364191	4,13E-06
Cre13.g581600	<i>ASA4</i>	-3,5E+14	0,221571	2,99E-39

Cre10.g443050		-3,5E+14	0,23493	1,87E-34
Cre07.g343700	<i>OGD2</i>	-3,5E+14	0,218339	1,37E-41
Cre17.g699000	<i>PAT1</i>	-3,5E+14	0,328504	6,21E-11
Cre05.g238650	<i>PHC5</i>	-3,5E+14	0,349633	3,29E-08
Cre02.g097550		-3,5E+14	0,332244	1,17E-10
Cre03.g154350	<i>COX2A</i>	-3,6E+14	0,210887	9,27E-47
Cre01.g020350	<i>SDH3</i>	-3,6E+14	0,244804	2,21E-31
Cre13.g562900		-3,6E+14	0,281625	1,43E-20
Cre14.g616100		-3,6E+14	0,403809	0,002976
Cre05.g232600		-3,6E+14	0,333213	5,14E-11
Cre04.g214150	<i>THI4</i>	-3,6E+14	0,213753	2,7E-46
Cre06.g263300		-3,6E+14	0,232565	1,65E-37
Cre06.g278162	<i>PHC3</i>	-3,6E+14	0,292924	7,67E-19
Cre01.g054850		-3,7E+14	0,305329	2,32E-17
Cre11.g467700	<i>UPD1</i>	-3,7E+14	0,325274	3,66E-14
Cre04.g221700	<i>COX3</i>	-3,7E+14	0,246819	3,67E-35
Cre02.g116750	<i>ATP1A</i>	-3,7E+14	0,226993	5,36E-44
Cre13.g603750		-3,7E+14	0,304294	1,01E-18
Cre48.g761197		-3,8E+14	0,235067	6,69E-41
Cre01.g049000		-3,8E+14	0,3568	6,88E-11
Cre01.g042750	<i>ACH1</i>	-3,8E+14	0,215651	2,35E-53
Cre07.g353450	<i>ACS3</i>	-4E+14	0,349946	8,33E-15
Cre12.g537200	<i>OGD1</i>	-4,1E+14	0,217029	1,2E-61
Cre17.g702900		-4,2E+14	0,257399	2,81E-44
Cre09.g397623		-4,3E+14	0,348357	4,4E-19
Cre04.g220200		-4,3E+14	0,321031	1,67E-25
Cre04.g224883		-4,4E+14	0,504567	0,006281
Cre10.g459600		-4,4E+14	0,403843	4,51E-12
Cre03.g144807	<i>MAS1</i>	-4,8E+14	0,30843	5,06E-38
Cre12.g551552		-5,2E+14	0,602073	0,011877
Cre07.g346050	<i>CRD1</i>	-5,5E+14	0,32823	1,48E-45

Παράρτημα 5.3. Δεδομένα RNAseq για μετάγραφα των στελεχών *C. reinhardtii* με adj.p < 0.05 (bold).

ID	<i>sbd1</i> 2mM vs <i>sbd1</i> con			
	Gene name	Dif. Expr. Log2 Ratio	Dif. Expr. Log2 SE	Dif. Expr. Adj. p-value
Cre01.g011550	<i>RPN11</i>	3,05E+14	0,548841	0,000197
Cre18.g748297		-3,2E+14	0,579214	0,000197

Παράρτημα

Παράρτημα 6. Σχετικά επίπεδα έκφρασης γονιδίων σύμφωνα με την RT-qPCR για τα στελέχη *C. reinhardtii*.

Σχετικά επίπεδα έκφρασης γονιδίων των στελεχών wt και *sbd1* του *C. reinhardtii* που σχετίζονται με την οξειδωτική καταπόνηση. Οι τιμές παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος των τριών βιολογικών επαναλήψεων \pm S.E.

	control wt		2mM wt		control <i>sbd1</i>		2mM <i>sbd1</i>	
	Mean value	SE	Mean value	SE	Mean value	SE	Mean value	SE
<i>LHCB7</i>	1,4746	0,2694	1,7733	0,6424	0,0113	1,00E-04	0,1331	2,09E-03
<i>APX1</i>	0,0142	0,01	0,0196	9,35E-03	5,98E-03	2,03E-05	0,0162	2,40E-03
<i>GRX4</i>	2,6363	0,7431	4,1592	0,8718	0,0359	1,10E-03	0,2698	0,114
<i>GPX5</i>	1,7253	0,6951	2,407	0,8999	0,6872	0,1575	0,8718	0,1088

Σχετικά επίπεδα έκφρασης γονιδίων των στελεχών wt και *sbd1* του *C. reinhardtii* που κωδικοποιούν για SBP-interacting proteins. Οι τιμές παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος των τριών βιολογικών επαναλήψεων \pm S.E.

	control wt		2 mM wt		control <i>sbd1</i>		2mM <i>sbd1</i>	
	Mean value	SE	Mean value	SE	Mean value	SE	Mean value	SE
<i>GRX3</i>	0,9483	0,3433	0,3735	0,2125	0,1734	0,0864	0,6093	0,0871
<i>GRX6</i>	0,3442	0,2052	0,0356	1,70E-04	0,0385	0,0353	0,2128	0,0271
<i>CEP2</i>	0,4503	0,178	1,3897	0,2974	0,1898	0,1583	0,4293	0,0103
<i>GAPN1</i>	0,1886	8,88E-03	35,622	5,5301	0,1883	0,0198	0,6411	0,0237
<i>FBA3</i>	28,6366	6,7275	18,4415	5,1906	21,2383	7,9267	19,4287	4,316
<i>SBP</i>	0,0232	1,86E-03	0,141	0,0716	8,13E-04	1,30E-05	0,0825	0,0414

Παράρτημα 7. Σχετικά επίπεδα των μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν με GC-MS για τα στελέχη *C. reinhardtii*.

Παράρτημα 7.1. con *sbd1* vs con wt

Παραρήματ

	RT	mz	<i>sbd1</i> control	SE	wt control	SE	<i>sbd1</i> / wt	P value
Aminoacids								
L-homoserine	16,51	218,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,37	0,09
L-proline 1	9,19	70,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,61	0,99
L-proline 2	12,46	142,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,74	0,97
L-asparagine	21,69	231,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,52	0,68
Beta- alanine	15,83	248,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,46	0,81
L-cysteine	19,02	220,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,91	0,92
L-alanine 1	7,53	116,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,62	0,80
L-alanine 2	14,07	147,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,64	0,96
L-serine 1	11,44	132,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,48	0,63
L-serine 2	14,29	204,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,92	1,00
aspartic acid	15,70	160,00	n.d	n.d	0,00	0,00	wt specific	
L-lysine	26,87	317,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,57	0,96
L-tyrosine	27,19	218,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,87	1,00
L-leucine 1	8,74	86,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,97	1,00
L-leucine 2	11,88	158,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,59	0,95
L-methionine	18,06	176,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,62
L-valine	10,41	144,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,95	1,00
L-threonine 1	12,43	147,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,99
L-threonine 2	14,99	218,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,02	1,00
L-tryptophan	32,27	202,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,11	1,00
N-acetyl-L-glutamic acid	23,67	288,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,43
DL-isoleucine 1	9,27	86,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,08	1,00
DL-isoleucine 2	12,45	158,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,26	0,99
L-norleucine	11,88	158,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,85	0,98
L-glutamic acid	20,55	246,00	0,01	0,00	0,01	0,00	1,02	1,00
L-glutamic acid (dehydrated)	18,10	156,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,32	0,86
L-ornithine 1	20,39	142,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,16	0,99
L-ornithine 2	24,81	174,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,35	0,86
L-glutamine	23,85	156,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,76	0,88
citrulline	24,93	157,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,70	0,46
glycine	12,74	174,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,16	1,00
L-mimosine	9,81	188,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,52	0,65
Organic acids								

arachidic acid	35,65	369,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,54	0,69
pyruvic acid	6,35	174,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,41	0,93
L-(+) lactic acid	6,59	147,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,25	0,44
myristic acid	25,10	285,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,58	0,65
succinic acid	12,90	148,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,53	0,97
2-hydroxybutyric acid	8,16	147,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,27	0,38
fumaric acid	13,73	245,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,71	0,98
citric acid	25,03	347,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,96	1,00
D-malic acid	17,53	147,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,83	1,00
oxalic acid	8,28	147,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,85	0,99
malonic acid	10,88	147,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,97	1,00
glycolic acid	6,91	147,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,48	0,73
glyceric acid	13,53	189,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,60	0,94
behenic acid	38,66	397,00	n.d	n.d	0,00	0,00	wt specific	
gluconic acid	28,72	333,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,49	0,92
citramalic acid	17,06	147,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,56	0,99
Sugars								
D-mannose	26,90	319,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,82	0,99
maltotriose	51,57	361,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,11	1,00
D (+) galactose	26,59	319,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,96	0,83
D-glucose	26,69	319,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,54	0,37
tagatose	26,53	217,00	n.d	n.d	0,00	0,00	wt specific	
fructose	25,81	217,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,04	0,72
Sucrose	39,62	361,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,44	0,52
D (+)altrose	27,08	205,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,55	
talose 2	27,08	319,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,82	0,95
D-allose	31,37	319,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,99
maltose	41,11	361,00	n.d	n.d	0,00	0,00	wt specific	
D-lyxose	22,20	217,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,84	0,97
ribose	22,19	217,00	0,00	0,00	n.d	n.d	sbd1 specific	
D-(+) trehalose	41,08	361,00	0,00	0,00	n.d	n.d	sbd1 specific	
Polyols								
maltitol	41,48	361,00	n.d	n.d	0,00	0,00	wt specific	
D-threitol	17,97	217,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,70	0,96
D-sorbitol	27,57	319,00	0,00	0,00	n.d	n.d	sbd1 specific	

Παραρτήματ

D-mannitol	27,56	319,00	0,02	0,01	0,01	0,01	1,84	0,85
glycerol	12,09	147,00	0,03	0,01	0,02	0,00	1,50	0,94
allo-inositol	30,34	318,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,40	1,00
arabitol	22,55	217,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,61	0,87
N-containing								
putrescine	22,98	174,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,67	0,95
uracil	13,58	241,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,93	1,00
uric acid	30,50	441,00	n.d	n.d	0,00	0,00	wt specific	
xanthine	28,83	353,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,33	0,76
xanthosine	39,87	325,00	n.d	n.d	0,00	0,00	wt specific	
adenine	25,59	264,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,68	0,82
thymine	15,21	255,00	0,00	0,00	n.d	n.d	<i>sbd1</i> specific	
hypoxanthine	24,38	265,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,59	0,74
guanosine	41,20	324,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,08	0,93
adenosine	39,04	236,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,08	0,39
inosine	38,16	245,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,46	0,25
cytosine	18,17	254,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,51	0,91
nicotinamide	16,86	179,00	0,00	0,00	n.d	n.d	<i>sbd1</i> specific	
nicotinic acid	12,25	180,00	n.d	n.d	0,00	0,00	wt specific	
porphine	13,41	285,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,46	0,03
norvaline	7,10	72,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,79	0,98
Phosphates								
phosphoric acid	12,00	299,00	0,04	0,00	0,04	0,01	0,99	1,00
phosphoenolpyruvic acid	20,18	369,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,29	0,05
O-phosphocolamine	24,16	299,00	n.d	n.d	0,00	0,00	wt specific	
pyrophosphate	21,74	451,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,48	0,83
beta-glycerolphosphate	23,17	299,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,75	0,94
3-phosphoglycerate	24,84	357,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72	0,99
3-phosphoglyceric acid	24,86	387,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,62	1,00
adenosine-5-monophosphate	45,11	315,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,71	0,97

D-glucose-6-phosphate 1	34,58	387,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,92	0,96
D-glucose-6-phosphate 2	34,86	387,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,99	1,00
cytidine-5'-monophosphate	28,99	299,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,53	0,98
glycerol 1-phosphate	23,90	357,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,63	0,97
Others								
L-gulonic acid gamma-lactone	26,42	217,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,11
1-methyl nicotinamide	16,87	179,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,27	0,99

Παράρτημα 7.2. 2 mM wt vs con wt								
	RT	mz	wt control	SE	wt 2mM	SE	2mM wt / con wt	P value
Aminoacids								
L-homoserine	16,51	218,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,75	0,94
L-proline 1	9,19	70,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,10	1,00
L-proline 2	12,46	142,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,83	0,67
L-asparagine	21,69	231,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,63	0,82
Beta- alanine	15,83	248,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,24	1,00
L-cysteine	19,02	220,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,05	0,81
L-alanine 1	7,53	116,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,63
L-alanine 2	14,07	147,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,83	0,99
L-serine 1	11,44	132,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,27	0,40
L-serine 2	14,29	204,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,51	0,63
aspartic acid	15,70	160,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,90	1,00
L-lysine	26,87	317,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,86	1,00
L-tyrosine	27,19	218,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,43	0,92
L-leucine 1	8,74	86,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40	0,55
L-leucine 2	11,88	158,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,63	0,99
L-methionine	18,06	176,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,34	0,62
L-valine	10,41	144,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,48	0,89
L-threonine 1	12,43	147,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,46	0,98
L-threonine 2	14,99	218,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,64	0,97
L-tryptophan	32,27	202,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,45	0,87
L-cystine	33,70	266,00	n.d	n.d	0,00	0,00	2mM specific	
N-acetyl-L-glutamic acid	23,67	288,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,11	0,99

Παραρήματ

DL-isoleucine 1	9,27	86,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,61	0,97
DL-isoleucine 2	12,45	158,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,26	0,99
L-norleucine	11,88	158,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,48	0,61
L-glutamic acid	20,55	246,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,81	0,92
L-glutamic acid (dehydrated)	18,10	156,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,99	1,00
L-ornithine 1	20,39	142,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,84	0,98
L-ornithine 2	24,81	174,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,67	0,88
L-glutamine	23,85	156,00	0,00	0,00	n.d	n.d	control specific	
citrulline	24,93	157,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,96	1,00
glycine	12,74	174,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,47	0,95
L-mimosine	9,81	188,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,80	0,96
Organic acids								
arachidic acid	35,65	369,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,85	0,97
pyruvic acid	6,35	174,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,48	0,95
L-(+) lactic acid	6,59	147,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,40	0,62
myristic acid	25,10	285,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,34	1,00
succinic acid	12,90	148,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,01	0,82
2-hydroxybutyric acid	8,16	147,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,50
fumaric acid	13,73	245,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,42	0,03
citric acid	25,03	347,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,62	0,36
D-malic acid	17,53	147,00	0,00	0,00	0,01	0,00	2,21	0,40
oxalic acid	8,28	147,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,03	1,00
malonic acid	10,88	147,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,56	0,73
glycolic acid	6,91	147,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,05	1,00
glyceric acid	13,53	189,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,93	1,00
behenic acid	38,66	397,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,99	
gluconic acid	28,72	333,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,56	0,92
citramalic acid	17,06	147,00	0,00	0,00	n.d	n.d	control specific	
Sugars								
D-mannose	26,90	319,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,33	0,64
maltotriose	51,57	361,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,70	0,91
D (+) galactose	26,59	319,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,36	0,92
D-glucose	26,69	319,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,89	0,97

tagatose	26,31	217,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,56	0,84
fructose	25,81	217,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,62	0,99
Sucrose	39,62	361,00	0,00	0,00	n.d	n.d	control specific	
D (+)altrose	27,08	205,00	0,00	0,00	n.d	n.d	control specific	
talose	27,08	319,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,60	0,69
D-allose	31,37	319,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,08	0,98
maltose	41,11	361,00	0,00	0,00	n.d	n.d	control specific	
D-lyxose	22,20	217,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,37
Polyols								
maltitol	41,48	361,00	0,00	0,00	n.d	n.d	control specific	
D-threitol	17,97	217,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,36	0,97
D-sorbitol	27,57	319,00	n.d	n.d	0,00	0,00	2 mM specific	
D-mannitol	27,56	319,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,07	0,80
glycerol	12,09	147,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,50	0,94
allo-inositol	30,34	318,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,57	0,99
arabitol	22,55	217,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,62	0,96
N-containing								
putrescine	22,98	174,00	0,01	0,00	0,01	0,00	1,05	1,00
uracil	13,58	241,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,65	0,78
uric acid	30,50	441,00	0,00	0,00	n.d	n.d	control specific	
xanthine	28,83	353,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,44	0,98
xanthosine	39,87	325,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,27	0,04
adenine	25,59	264,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,84	1,00
hypoxanthine	24,38	265,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,53	0,55
guanosine	41,20	324,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,16	1,00
adenosine	39,04	236,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,81	0,99
inosine	38,16	245,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,04
cytosine	18,17	254,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,68	0,97
nicotinic acid	12,25	180,00	0,00	0,00	n.d	n.d	control specific	
porphine	13,41	285,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40	0,02
norvaline	7,10	72,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,63
Phosphates								
phosphoric acid	12,00	299,00	0,04	0,01	0,04	0,00	1,13	1,00

Παράρτημα

phosphoenolpyruvic acid	20,18	369,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,55	0,28
O-phosphocolamine	24,16	299,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,45	0,71
pyrophosphate	21,74	451,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,89	1,00
beta-glycerolphosphate	23,17	299,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,44	0,58
3-phosphoglycerate	24,84	357,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,85
3-phosphoglyceric acid	24,86	387,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,36	1,00
adenosine-5-monophosphate	45,11	315,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,61	0,94
D-glucose-6-phosphate 1	34,58	387,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,67	1,00
D-glucose-6-phosphate 2	34,86	387,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,40	0,90
erythrose 4-phosphate	28,02	357,00	0,00	0,00	n.d	n.d	control specific	
cytidine-5'-monophosphate	28,99	299,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,97	1,00
6-phosphogluconic acid	36,27	387,00	0,00	0,00	n.d	n.d	control specific	
glycerol 1-phosphate	23,90	357,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,97	1,00
Others								
L-gulonic acid gamma-lactone	26,42	217,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,38	0,08
1-methyl nicotinamide	16,87	179,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,01	1,00

Παράρτημα 7.3. 2 mM <i>sbd1</i> vs con <i>sbd1</i>								
	RT	mz	<i>sbd1</i> control	SE	<i>sbd1</i> 2mM	SE	2mM <i>sbd1</i>/ con <i>sbd1</i>	P value
Aminoacids								
L-homoserine	16,51	218,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,77	0,69
L-proline 1	9,19	70,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,29	0,38
L-proline 2	12,46	142,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,12	0,03
L-asparagine	21,69	231,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,60	0,26
Beta- alanine	15,83	248,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,52	0,33

L-cysteine	19,02	220,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,29	0,53
L-alanine 1	7,53	116,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,19	0,31
L-alanine 2	14,07	147,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,64	0,51
L-serine 1	11,44	132,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,85	0,72
L-serine 2	14,29	204,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,81	0,29
aspartic acid	15,70	160,00	n.d	n.d	0,00	0,00	2 mM specific	
L-lysine	26,87	317,00	0,00	0,00	0,01	0,00	2,78	0,12
L-tyrosine	27,19	218,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,87	0,30
L-leucine 1	8,74	86,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,90	1,00
L-leucine 2	11,88	158,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,63	0,92
L-methionine	18,06	176,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,72	0,75
L-valine	10,41	144,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,15	0,46
L-threonine 1	12,43	147,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,54	0,15
L-threonine 2	14,99	218,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,19	0,43
L-tryptophan	32,27	202,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,80	0,70
L-cystine	33,70	266,00	n.d	n.d	0,00	0,00	2 mM specific	
N-acetyl-L-glutamic acid	23,67	288,00	0,00	0,00	n.d	n.d	control specific	
DL-isoleucine 1	9,27	86,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,66	0,78
DL-isoleucine 2	12,45	158,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,50	0,88
L-norleucine	11,88	158,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,33	0,91
L-glutamic acid	20,55	246,00	0,01	0,00	0,01	0,00	1,10	0,99
L-glutamic acid (dehydrated)	18,10	156,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,35	0,71
L-ornithine 1	20,39	142,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,39	0,75
L-ornithine 2	24,81	174,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,91	0,99
L-glutamine	23,85	156,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,65	0,01
citrulline	24,93	157,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,08	1,00
glycine	12,74	174,00	0,00	0,00	0,01	0,00	3,57	0,03
L-mimosine	9,81	188,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,66	0,15
Organic acids								
arachidic acid	35,65	369,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,58	0,93
pyruvic acid	6,35	174,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,13	0,07
L-(+) lactic acid	6,59	147,00	0,00	0,00	0,01	0,00	5,42	0,15
myristic acid	25,10	285,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,41	0,93
succinic acid	12,90	148,00	0,00	0,00	0,01	0,00	3,81	0,01
2-hydroxybutyric acid	8,16	147,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,91	0,62
fumaric acid	13,73	245,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,24	0,20
citric acid	25,03	347,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,71	0,06

Παραρτήματ

D-malic acid	17,53	147,00	0,00	0,00	0,01	0,00	2,67	0,29
oxalic acid	8,28	147,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,69	0,06
malonic acid	10,88	147,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,55	0,65
glycolic acid	6,91	147,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72	0,82
glyceric acid	13,53	189,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,17	0,99
gluconic acid	28,72	333,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,39	0,90
citramalic acid	17,06	147,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,79	0,55
Sugars								
D-mannose	26,90	319,00	0,01	0,00	0,02	0,01	1,79	0,75
maltotriose	51,57	361,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,87	0,99
D (+) galactose	26,59	319,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,28	0,97
D-glucose	26,69	319,00	0,00	0,00	0,01	0,00	2,29	0,16
tagatose	26,31	217,00	n.d	n.d	0,00	0,00	2 mM specific	
fructose	25,81	217,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,78	0,98
Sucrose	39,62	361,00	0,00	0,00	n.d	n.d	control specific	
D (+)altrose	27,08	205,00	0,00	0,00	n.d	n.d	control specific	
talose	27,08	319,00	0,00	0,00	0,01	0,00	2,60	0,02
D-allose	31,37	319,00	0,00	0,00	0,00	0,00	97,14	0,40
D-lyxose	22,20	217,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,67	0,50
ribose	22,19	217,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,25	
D-(+) trehalose	41,08	361,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,52	
Polyols								
D-threitol	17,97	217,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,90	1,00
D-sorbitol	27,57	319,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,09	
D-mannitol	27,56	319,00	0,02	0,01	0,01	0,01	0,75	0,97
glycerol	12,09	147,00	0,03	0,01	0,05	0,02	1,50	0,84
allo-inositol	30,34	318,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,98	0,16
arabitol	22,55	217,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,44	0,81
N-containing								
putrescine	22,98	174,00	0,00	0,00	0,01	0,00	3,96	0,01
uracil	13,58	241,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,74	0,26
xanthine	28,83	353,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,45	0,88
adenine	25,59	264,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,59	0,59
thymine	15,21	255,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,12	
hypoxanthine	24,38	265,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,53	0,92
guanosine	41,20	324,00	0,00	0,00	0,01	0,00	2,69	0,58

adenosine	39,04	236,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,45	0,51
inosine	38,16	245,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,53	0,88
cytosine	18,17	254,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72	0,94
nicotinamide	16,86	179,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,14	
nicotinic acid	12,25	180,00	n.d	n.d	0,00	0,00	2 mM specific	
porphine	13,41	285,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,18	0,97
norvaline	7,10	72,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,74	0,62
Phosphates								
phosphoric acid	12,00	299,00	0,04	0,00	0,11	0,04	3,12	0,10
phosphoenolpyruvic acid	20,18	369,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,44	0,94
O-phosphocolamine	24,16	299,00	n.d	n.d	0,00	0,00	2 mM specific	
pyrophosphate	21,74	451,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,25	0,76
beta-glycerolphosphate	23,17	299,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,87	0,42
3-phosphoglycerate	24,84	357,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,49	0,63
3-phosphoglyceric acid	24,86	387,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,55	0,57
adenosine-5-monophosphate	45,11	315,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,07	0,67
D-glucose-6-phosphate 1	34,58	387,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,34	0,56
D-glucose-6-phosphate 2	34,86	387,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,40	0,87
cytindine-5'-monophosphate	28,99	299,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,71	0,25
glycerol 1-phosphate	23,90	357,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,71	0,23
Others								
L-gulonic acid gamma-lactone	26,42	217,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,95	0,26
1-methyl nicotinamide	16,87	179,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,90	0,66