

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Μελέτη της οξειδωτικής καταπόνησης σε μικροφύκη με έμφαση  
στην Selenium Binding Protein»**

Κωλέττη Κατερίνα  
Α.Μ. 81703

Επιβλέποντες καθηγητές: Ρούσσης Ανδρέας, Φλεμετάκης Εμμανουήλ

ΑΘΗΝΑ  
2019



Περιεχόμενα	
Πρόλογος .....	5
Περίληψη .....	7
Abstract .....	8
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή.....	9
1.1. Μικροφύκη .....	9
1.1.1 Καλλιέργεια μικροφυκών και προϊόντα της.....	10
1.1.2 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	13
1.2 Καταπονήσεις .....	14
1.2.1 Οξειδωτική καταπόνηση .....	15
1.2.2 Οξειδωτική καταπόνηση και μικροφύκη .....	16
1.3 Selenium Binding Protein (SBP).....	19
1.3.1 Selenium (Se).....	19
1.3.2 56kDa selenium binding protein (SBP56) .....	21
1.3.3 SBP στο <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	22
1.3.4 SBP στο <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	23
1.4 Σκοπός της εργασίας.....	24
Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι .....	26
2.1 Στελέχη <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	26
2.2 Καλλιέργειες .....	28
2.3 Οξειδωτική καταπόνηση .....	28
2.4 Μέτρηση αριθμού κυττάρων.....	29
2.5 Απομόνωση RNA .....	30
2.6 Σύνθεση cDNA.....	32
2.7 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-qPCR).....	33
2.7.1 Ανάλυση δεδομένων RT-qPCR .....	35
2.8 Λυοφιλίωση .....	36
2.9 Μέθοδος FRAP .....	36
2.10 Αέρια χρωματογραφία – φασματοσκοπία μάζας (GC-MS).....	38
2.10.1 Προετοιμασία δειγμάτων .....	38
2.10.2 Πτητικοποίηση.....	39
2.10.3 Ανάλυση .....	40
Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα.....	41
3.1 Οξειδωτική καταπόνηση σε καλλιέργειες <i>C. reinhardtii</i> .....	41
3.1.1 Στέλεχος αγρίου τύπου.....	41
3.1.2 Μετάλλαγμα .....	44

3.1.3 Σύγκριση .....	47
3.2 Ολικό αντιοξειδωτικό δυναμικό (μέθοδος FRAP).....	48
3.3 Σχετική έκφραση γονιδίων (RT-qPCR).....	50
3.3.1 Γονίδια σχετιζόμενα με την οξειδωτική καταπόνηση .....	50
3.3.2 Γονίδια που αλληλεπιδρούν με την SBP .....	53
3.4 Μεταβολικό προφίλ (GC-MS).....	54
3.4.1 Συγκριτική μελέτη των δύο στελεχών.....	63
3.4.2 Επίδραση οξειδωτικής καταπόνησης.....	64
<b>Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα .....</b>	<b>66</b>
4.1 Οξειδωτική καταπόνηση σε καλλιέργειες <i>C. reinhardtii</i> .....	66
4.2 Ολικό αντιοξειδωτικό δυναμικό (μέθοδος FRAP).....	66
4.3 Σχετική έκφραση γονιδίων (RT-qPCR).....	67
4.3.1 Γονίδια σχετιζόμενα με την οξειδωτική καταπόνηση .....	67
4.3.2 Γονίδια που αλληλεπιδρούν με την SBP.....	68
4.4 Μεταβολικό προφίλ (GC-MS).....	69
4.4.1 Συγκριτική μελέτη των δύο στελεχών.....	69
4.4.2 Επίδραση οξειδωτικής καταπόνησης.....	70
<b>Παράρτημα.....</b>	<b>71</b>
<b>Κεφάλαιο 5: Βιβλιογραφία.....</b>	<b>87</b>

## Πρόλογος

«Σα βγεις στον πηγαιμό για την Ιθάκη,  
να εύχεσαι νάναι μακρύς ο δρόμος,  
γεμάτος περιπέτειες, γεμάτος γνώσεις...»

Η παρούσα διπλωματική εργασία, εκπονήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Μικροβιακή Βιοτεχνολογία». Μεγάλο μέρος των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του κ. Εμμανουήλ Φλεμετάκη. Επίσης, είχα τη χαρά να δουλέψω στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, τομέα Βοτανικής, τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του κ. Ανδρέα Ρούσση. Ευχαριστώ από καρδιάς και τους δύο για τη συνεχή έννοια, τη συμπαράσταση και τις συμβουλές τους.

Η συνεργασία με το εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας του Γ.Π.Α. για τη λυοφιλίωση του συνόλου των δειγμάτων, ήταν άψογη. Οι αναλύσεις GC-MS πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Φυσιολογίας, Θρέψεως και Διατροφής του Γ.Π.Α. με την καταλυτική βοήθεια του κ. Βασίλη Ηλιόπουλου. Η συμβολή τους στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας ήταν καθοριστική και τους ευχαριστώ θερμά.

Και επειδή η δουλειά δεν είναι ποτέ ατομική υπόθεση, Μαριέλα, Δημήτρη, Φώτη, Χρυσάνθη, Rodica ευχαριστώ για τη βοήθεια, τις συμβουλές, τη στήριξη. Συνάδελφε Ειρήνη ευχαριστώ για την υπομονή και την κατανόηση.

Τέλος, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που ήταν ουσιαστικά δίπλα μου (και) σε αυτή τη διετή πορεία. Τους γονείς, τα αδέρφια, τη γιαγιά και τον παππού μου για όλα όσα έχουν οι ίδιοι στερηθεί για να μπορώ εγώ να κάνω αυτό που αγαπάω. Την Πωλίνα και την Ειρήνη, δυο συναδέλφους -κυρίως όμως φίλες- για όλες τις φορές που στάθηκαν δίπλα μου, εντός και εκτός εργαστηρίου.

«Πάντα στον νου σου νάχεις την Ιθάκη.  
Το φθάσιμον εκεί είν' ο προορισμός σου.  
Αλλά μη βιάζεις το ταξείδι διόλου.  
Καλλίτερα χρόνια πολλά να διαρκέσει·  
και γέρος πια ν' αράξεις στο νησί,  
πλούσιος με όσα κέρδισες στον δρόμο,  
μη προσδοκώντας πλούτη να σε δώσει η Ιθάκη.»

Κ.Π. Καβάφης



## Περίληψη

Η οξειδωτική καταπόνηση αποτελεί μια από τις βασικές αιτίες καταπόνησης των φωτοσυνθετικών οργανισμών και μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές επιπτώσεις σε περιβαλλοντικό και οικονομικό επίπεδο. Η SBP είναι μια ιδιαίτερα συντηρημένη πρωτεΐνη, απαραίτητη για τους οργανισμούς σε μικρές συγκεντρώσεις και ταυτόχρονα τοξική σε μεγαλύτερες. Ο ακριβής βιολογικός της ρόλος δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα πλήρως. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης της οξειδωτικής καταπόνησης στο μικροφύκος-μοντέλο *Chlamydomonas reinhardtii* με την παράλληλη αναζήτηση πιθανής συμμετοχής της SBP στην αντιμετώπιση του.

Για την επίτευξη του σκοπού αυτού αναπτύχθηκαν καλλιέργειες στελέχους φυσικού τύπου του *C. reinhardtii* αλλά και μεταλλάγματος χωρίς έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την SBP. Οι καλλιέργειες εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις 0 mM, 2 mM, 5 mM και 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για 0, 1, 6 και 12 ώρες. Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του ρυθμού ανάπτυξης και του ποσοστού επιβίωσης των κυττάρων και ακολούθησε μέτρηση του ολικού οξειδωτικού δυναμικού των καλλιεργειών με τη μέθοδο FRAP. Για τη μελέτη των σχετικών επιπέδων έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την οξειδωτική καταπόνηση αλλά και γονιδίων που αλληλεπιδρούν με την SBP έγινε ανάλυση με τη μέθοδο RT-qPCR. Τέλος, το μεταβολικό προφίλ των κυττάρων που εκτέθηκαν σε κάθε χειρισμό προσδιορίστηκε με αέρια χρωματογραφία – φασματοσκοπία μάζας (GC-MS).

Η παρουσία υπεροξειδίου αποδείχθηκε πως επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο την επιβίωση των δύο στελεχών, με το μετάλλαγμα να εμφανίζει υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης. Διαφορές υπάρχουν και στο ολικό οξειδωτικό δυναμικό των δύο στελεχών με τρόπο που εξαρτάται από τους χειρισμούς στους οποίους εκτέθηκαν κάθε φορά. Η μέθοδος RT-qPCR έδειξε πως τα σχετικά επίπεδα έκφρασης γονιδίων που αλληλεπιδρούν με την SBP αυξάνονται στο μεταλλαγμένο στέλεχος. Τέλος, με την ανάλυση GC-MS ταυτοποιήθηκαν 164 διαφορετικοί μεταβολίτες που παράγει το μικροφύκος *C. reinhardtii* και το μεταβολικό προφίλ που αναπτύσσει όταν εκτεθεί σε οξειδωτική καταπόνηση.

## **Abstract**

Oxidative stress is one of the main causes of stress of photosynthetic organisms and can lead to significant environmental and economic impacts. SBP is a highly conserved protein, essential for organisms at low concentrations and at the same time toxic to larger ones. Its exact biological role has not yet been fully elucidated. The aim of the present project is to study the effect of oxidative stress on the microalgae- model *Chlamydomonas reinhardtii* with a parallel search for possible involvement of SBP in its treatment.

To achieve this aim cultivations of both wild type strain and a mutant strain, knock-out for the gene encoding SBP, were grown. The cultures were exposed to concentrations of 0 mM, 2 mM, 5 mM and 7 mM H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> for 0, 1, 6 and 12 hours. Determination of growth rate and survival rate of cells was performed, followed by measurement of the total oxidative potential of cultures using the FRAP method. To study the relative levels of gene expression of genes associated with oxidative stress and genes interacting with SBP, RT-qPCR analysis was performed. Finally, the metabolic profile of the cells exposed to each treatment was determined by gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS).

The presence of superoxide has been shown to affect the survival of the two strains differently, with the mutant displaying higher survival rates. Differences exist in the total oxidative potential of the two strains in a manner dependent on the manipulations to which they were exposed each time. The RT-qPCR method showed that the relative expression levels of genes that interact with SBP increase in the mutant strain. Lastly, with the GC-MS analysis, 164 different metabolites produced by *C. reinhardtii* were identified as well as the metabolic profile it develops when exposed to oxidative stress.

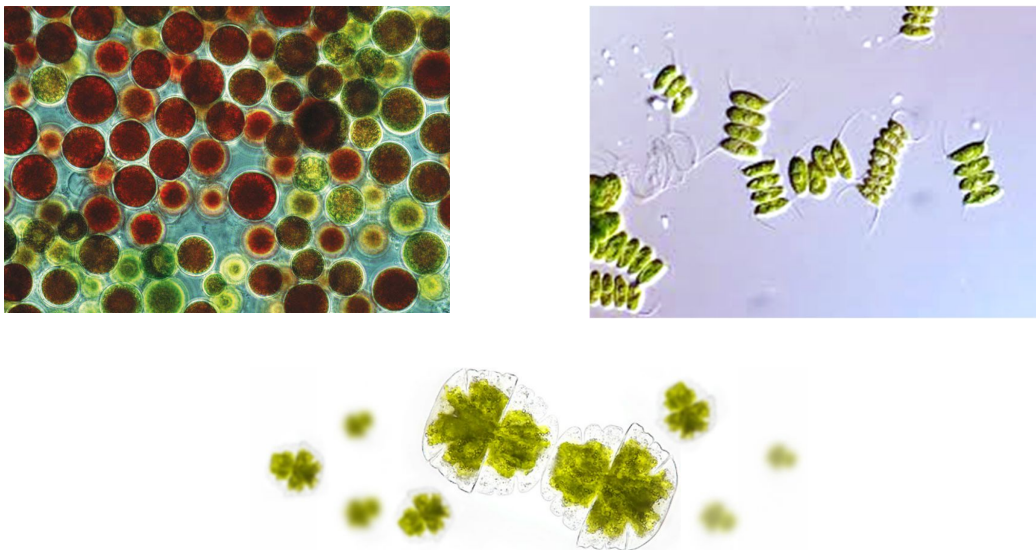


## Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

### 1.1. Μικροφύκη

Τα μικροφύκη είναι μικροσκοπικοί (2-200 nm), αυτότροφοι, φωτοσυνθετικοί, πολυφυλετικοί οργανισμοί. Ανήκουν στους ευκαρυώτες, αν και συχνά ταξινομούνται στα μικροφύκη και τα προκαρυωτικά κυανοβακτήρια (Greenwell et al. 2010, Mutanda et al. 2011). Διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα πλούσιο σε κυτταρίνη, χλωροπλάστες και συνολικά κυτταρική δομή παρόμοια με αυτή του τυπικού ευκαρυωτικού κυττάρου ενώ κάποια έχουν μαστίγια. Χάρη στη μονοκύτταρη ή απλή πολυκύτταρη δομή τους μπορούν να αναπαράγονται γρήγορα, γεγονός που τους επιτρέπει να επιβιώνουν σε δύσκολα περιβάλλοντα (υψηλές θερμοκρασίες, αλατότητα) (Mata et al. 2010). Αναπαράγονται κυρίως αγενώς αλλά και εγγενώς σε λιγότερο ευνοϊκές συνθήκες.

Εμφανίζουν ιδιαίτερα μεγάλη ποικιλομορφία (Εικόνα 1.1) καθώς σύμφωνα με υπολογισμούς υπάρχουν περισσότερα από 200.000-800.000 είδη, ενώ μόνο 35.000 έχουν περιγραφεί βιβλιογραφικά (Cheng & Ogden 2011, Ebenezer et al. 2012).



Εικόνα 1.1 Ποικιλομορφία ανάμεσα στα μικροφύκη

Εξελικτικά η πρώτη εμφάνιση των μικροφυκών στον πλανήτη χρονολογείται στο ανώτερο Προκάμβριο. Συμμετείχαν δραστικά στην κατανάλωση του τότε κυρίαρχου στην ατμόσφαιρα  $CO_2$  και στη μετατροπή του, μέσω της φωτοσύνθεσης, σε  $O_2$  διαμορφώνοντας τη σημερινή ατμοσφαιρική σύνθεση.

Παραδοσιακά η ταξινόμηση των μικροφυκών γίνεται με βάση τον κύκλο ζωής, τις βασικές κυτταρικές δομές και τις χρωστικές που συσσωρεύουν. Πλέον στην ανακάλυψη και ταξινόμηση των νέων ειδών σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η αλληλούχηση του γονιδιώματος τους με τεχνικές αλληλούχησης επόμενης γενιάς (NGS) (Brennan & Owende 2010, Ebenezer et al. 2012, Mutanda et al. 2011).

Τα μικροφύκη είναι κομβικής σημασίας για τα θαλάσσια οικοσυστήματα καθώς αποτελούν την κύρια πηγή βιομάζας που υποστηρίζει όλα τα υπόλοιπα τροφικά επίπεδα, με τον άνθρωπο να βρίσκεται συχνά στο τέρμα της τροφικής αλυσίδας.

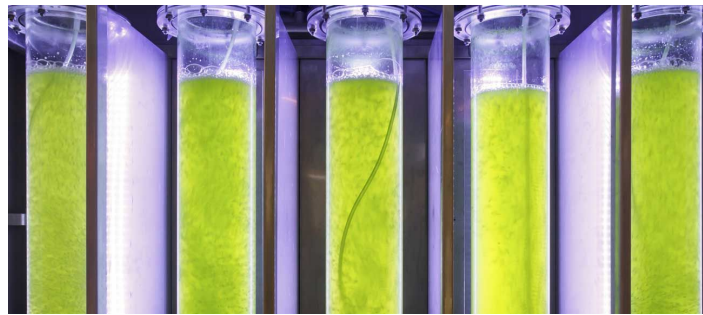
### **1.1.1 Καλλιέργεια μικροφυκών και προϊόντα της**

Οι πρώτες προσπάθειες απομόνωσης και αξενικής καλλιέργειας μικροφυκών πραγματοποιήθηκαν τον 19<sup>ο</sup> αιώνα με αξιοποίηση διαλυμάτων αλάτων χωρίς επιπρόσθετη πηγή άνθρακα (Anderson 2005, Huntley & Redalje 2007). Το σύνολο των μεθοδολογιών που χρησιμοποιούνται σήμερα (φωτοβιοαντιδραστήρες, ανοιχτές ρηχές λίμνες κτλ.) μπήκαν σε εφαρμογή ήδη από τα μέσα του 20<sup>ου</sup> αιώνα. Πλέον, πρόκληση αποτελεί η ταυτοποίηση και χρήση των βέλτιστων ειδών μικροφυκών για κάθε περίπτωση. Σαν «βέλτιστο» είδος μπορεί να θεωρηθεί εκείνο που εμφανίζει τις εξής επιθυμητές ιδιότητες: υψηλό ρυθμό ανάπτυξης, υψηλό ρυθμό παραγωγής του εκάστοτε επιθυμητού προϊόντος και ευκολία στη συλλογή της βιομάζας και του τελικού προϊόντος (Greenwell et al. 2010).

Οι περισσότερες από τις καλλιέργειες μικροφυκών που αναπτύσσονται για εμπορικούς σκοπούς βασίζονται σε ανοιχτά συστήματα ρηχών λιμνών. Αξιοποιούν σαν θρεπτικό υπόστρωμα υδάτινα απόβλητα και την ηλιακή ακτινοβολία σαν πηγή φωτός (Dassey et al., 2014). Η τυπική μορφή τους έχει βάθος 20-40 cm καθώς το βάθος αυτό επιτρέπει την ισοκατανομή του ηλιακού φωτός. Απαραίτητη ωστόσο είναι η καλή ανάδευση της καλλιέργειας για να αποφευχθεί η καθίζηση των κυττάρων και να εξασφαλιστεί ο καλύτερος αερισμός της (Rawat et al. 2013). Υπάρχουν ανοιχτά συστήματα καλλιέργειας μικροφυκών με συνολική έκταση ως και 0.5 εκτάρια (Dassey et al., 2014). Συνολικά, αποτελούν πιο οικονομικές προσεγγίσεις για την παραγωγή βιομάζας μικροφυκών σε σύγκριση με τους φωτοβιοαντιδραστήρες ενώ τα βασικά τους μειονεκτήματα είναι η χαμηλότερη παραγωγικότητα ανά μονάδα όγκου, ο μεγάλος

κίνδυνος επιμόλυνσης και η αδυναμία αυστηρού ελέγχου των συνθηκών του περιβάλλοντος (θερμοκρασία, υγρασία, εξάτμιση κτλ) (Rawat et al. 2013).

Οι φωτοβιοαντιδραστήρες (Εικόνα 1.2) αποτελούν κλειστά συστήματα καλλιέργειας μικροφυκών που χρησιμοποιούνται συνήθως για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Υπάρχουν διάφορες μορφές φωτοβιοαντιδραστήρων (επίπεδοι, κυλινδρικοί κτλ), όλοι τους όμως μπορούν να αξιοποιήσουν τόσο την ηλιακή ακτινοβολία όσο και τεχνητές πηγές φωτός. Η κατασκευή τους επιτρέπει τον αυστηρό έλεγχο των φυσικοχημικών συνθηκών καλλιέργειας αποτρέποντας τις επιμολύνσεις ενώ οδηγεί στην επίτευξη μεγαλύτερων πυκνοτήτων (cells/mL). Καθώς αποτελούν κλειστές κατασκευές απαιτούν συνεχή παροχή διοξειδίου του άνθρακα και ανάδευση της καλλιέργειας (Rawat et al., 2013). Η απόδοση της καθήλωσης του διοξειδίου του άνθρακα στους φωτοβιοαντιδραστήρες είναι υψηλότερη σε σχέση με τις ανοιχτές καλλιέργειες.



Εικόνα 1.2 Φωτο-βιοαντιδραστήρας

Βιβλιογραφικά έχουν περιγραφεί αρκετές διαφορετικές εκδοχές φωτοβιοαντιδραστήρων (Carvalho et al. 2006, Eriksen 2008, Greenwell et al. 2010). Παρά τα αναντίρρητα πλεονεκτήματά τους όμως, οι φωτοβιοαντιδραστήρες δεν αξιοποιούνται εκτεταμένα για καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας. Αυτό συμβαίνει γιατί το κόστος ανάπτυξης και λειτουργίας τους είναι πολύ μεγαλύτερο συγκρινόμενο με τα ανοιχτά συστήματα καλλιέργειας αφού απαιτούν κατάλληλες υποδομές (Sandeep et al. 2018).

Σε εργαστηριακό επίπεδο, η καλλιέργεια των μικροφυκών πραγματοποιείται σε θρεπτικά υποστρώματα εμπλουτισμένα με τα κατάλληλα χημικά στοιχεία, ανάλογα με το περιβάλλον από το οποίο προέρχεται το κάθε είδος (Mutanda et al., 2011). Για την περαιτέρω αποφυγή επιμολύνσεων στο θρεπτικό υπόστρωμα μπορούν να προστεθούν αντιβιοτικά, γνωρίζοντας όμως ότι η εκτεταμένη έκθεση των μικροφυκών σε αυτά επηρεάζει αρνητικά τη φυσιολογία τους (Abu et al., 2007).

Η καλλιέργεια τους εμφανίζει πλεονεκτήματα καθώς ως φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί καταναλώνουν το ατμοσφαιρικό CO<sub>2</sub> για την παραγωγή υδατανθράκων. Επίσης, λόγω της μεγάλης επιφάνειας επαφής με το εξωτερικό περιβάλλον, μπορούν να απορροφούν θρεπτικά (N,P) από το περιβάλλον τους ιδιαίτερα αποδοτικά. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν τα μονοκύτταρα μικροφύκη σημαντικούς οικοτοξικολογικούς παράγοντες. (Torres et al. 2008). Επιπλέον, η καλλιέργεια τους δεν καταλαμβάνει μεγάλες χερσαίες εκτάσεις με αποτέλεσμα να μην ανταγωνίζεται τις γεωργικές καλλιέργειες ενώ ταυτόχρονα μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή χρήσιμων προϊόντων (Pierobon et al. 2018).

Σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση μιας καλλιέργειας είναι η ένταση, η φασματική κατανομή και η χρονική διακύμανση της έκθεσης σε φως. Αύξηση της έντασης του φωτός επάγει την ανάπτυξη της καλλιέργειας, ωστόσο υπάρχει μια ένταση κορεσμού πάνω από την οποία η ακτινοβολία γίνεται επιβλαβής, λόγω της έντονης παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) από τα μικροφύκη (Pierobon et al. 2018).

Τα μικροφύκη συνήθως συλλέγονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης της καλλιέργειας τους (Rawat et al., 2013). Η συλλογή τους εμφανίζει τεχνικές δυσκολίες λόγω του μικρού μεγέθους τους. Κατά συνέπεια έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές και πρωτόκολλα που συμβάλλουν στην αντιμετώπιση αυτών των δυσκολιών και την επιτυχή συλλογή τους (κροκίδωση, φυγοκέντρωση, διήθηση, συσσωμάτωση και αφυδάτωση υπό πίεση) (Halim et al., 2012).

Σε εργαστηριακό επίπεδο πραγματοποιείται εντατική έρευνα γύρω από την αξιοποίηση των μικροφυκών για την παραγωγή βιοκαυσίμων αλλά και βιοενεργών ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας με σκοπό τη χρήση τους στη διατροφή και την κοσμετολογία. Βιομάζα μικροφυκών χρησιμοποιείται σε αρκετές περιπτώσεις ως τρόφιμο (Huang et al. 2010). Προϊόντα του μεταβολισμού τους, βιοενεργές ενώσεις όπως φυκοβιλιπρωτεΐνες, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), στερόλες, χρωστικές, ένζυμα αλλά και τοξίνες αξιοποιούνται στη φαρμακευτική και την κοσμετολογία (Ođjadjare et al. 2017). Επιπλέον, τα μικροφύκη χρησιμοποιούνται για την αποκατάσταση λυμάτων αλλά και ως ζωοτροφές (Huang et al., 2010, Taberner et al., 2012). Αξιοποιούνται επίσης σαν συστήματα – μοντέλα για τη μελέτη θεμελιωδών διαδικασιών όπως η φωτοσύνθεση, η λειτουργία των μαστιγίων και η απορρόφηση θρεπτικών (Allorent et al. 2016, Nishijimaa et al. 2017).

Ακόμα όμως το κόστος καλλιέργειας παραμένει υψηλό (Misra et al. 2014) καθώς δεν είναι γνωστές οι βέλτιστες συνθήκες καλλιέργειας. Η απομόνωση των επιθυμητών προϊόντων εμφανίζει επίσης σημαντικές δυσκολίες καθιστώντας την παραγωγή βιοκαυσίμων, για παράδειγμα, οικονομικά ασύμφορη. Για την επίλυση αυτού του προβλήματος μελετάται και υιοθετείται η προσέγγιση «βιοδιυλιστήρα» όπου παράγονται πολλαπλά προϊόντα κατά μήκος μιας διαδικασίας καθαρισμού, μειώνοντας έτσι το κόστος παραγωγής κάθε μεμονωμένου προϊόντος. (Pierobon et al. 2018, Darvehei et al. 2018).

### 1.1.2 *Chlamydomonas reinhardtii*

Το *Chlamydomonas reinhardtii* είναι ένα απλοειδές, μονοκύτταρο, φωτοαυτότροφο μικροφύκος που ανήκει στα Χλωροφύκη (Chlorophyta) (Πίνακας 1.1). Εμφανίζει μεγάλη οικολογική εξάπλωση καθώς συναντάται σε όλον τον κόσμο, τόσο στα υδάτινα οικοσυστήματα όσο και στο έδαφος. Ως μονοκύτταρος οργανισμός βρίσκεται ιδιαίτερα εκτεθειμένος στο περιβάλλον και αντιμετωπίζει υψηλά επίπεδα αλατότητας και οξειδωτικής καταπόνησης (Navilala S. et al. 2015).

Πίνακας 1.1 Ταξινομική κατάταξη του *C. reinhardtii*

Βασίλειο	Eukaryota
Υποβασίλειο	Viridiplantae
Φύλο	Chlorophyta
Κλάση	Chlorophyceae
Τάξη	Chlamydomonadales
Οικογένεια	Chlamydomonadaceae
Γένος	<i>Chlamydomonas</i>
Είδος	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>

Το κύτταρο του διαθέτει ένα μεγάλο χλωροπλάστη που καταλαμβάνει το 66% του κυτταρικού χώρου. Έχει επίσης αρκετά μιτοχόνδρια για την παραγωγή ενέργειας, δύο συστατά χυμοτόπια, δύο μαστίγια και οφθαλμική κηλίδα (Εικόνα 1.3). Το απλοειδές κύτταρο έχει πυρηνικό DNA μεγέθους ~1.6 Mb οργανωμένο σε 17 μικρά χρωμοσώματα, μιτοχονδριακό DNA μεγέθους ~15.8 Kb και πλαστιδιακό >200 Kb.



α.



β.

Εικόνα 1.3 *C. reinhardtii*, α. σχηματική αναπαράσταση, β. φωτογραφία από οπτικό μικροσκόπιο, 40x

Σε συνθήκες επάρκειας θρεπτικών αναπαράγεται μιτωτικά ενώ σε συνθήκες έλλειψης αζώτου επάγεται ο σχηματισμός γαμετών μέσω της μείωσης και η διαφοροποίησή τους σε έναν από τους δύο συζευκτικούς τύπους (συν ή πλην). Ο συζευκτικός τύπος καθορίζεται από έναν πολυγονιδιακό τόπο, *mt* που εδράζεται στο 6<sup>ο</sup> (VI) χρωμόσωμα (Goodenough et al. 2007, Nishimura 2010). Σύντηξη δύο γαμετών αντίθετων συζευκτικών τύπων οδηγεί στη δημιουργία του ζυγοσπορίου, κυττάρου με ιδιαίτερα παχύ και ανθεκτικό κυτταρικό τοίχωμα.

Το *C. reinhardtii* χρησιμοποιείται εκτεταμένα στα ερευνητικά εργαστήρια σαν οργανισμός- μοντέλο καθώς φέρει μια σειρά χαρακτηριστικών που το καθιστούν ιδανικό για έρευνες φυσιολογίας, γενετικής, κυτταρικής και μοριακής βιολογίας. Είναι μονοκύτταρο, μπορεί να υπάρξει σε απλοειδή αλλά και διπλοειδή μορφή ενώ έχει γενετικό υλικό μικρού μεγέθους. Επίσης έχει μικρό χρόνο διπλασιασμού και είναι αυτότροφο με αποτέλεσμα η καλλιέργειά του να αποτελεί γρήγορη και εύκολη διαδικασία. Μπορεί να αναπτυχθεί και στο σκοτάδι με εξωτερική πηγή άνθρακα. Τέλος το ότι πρόκειται για ευκαρυωτικό οργανισμό του δίνει ένα ακόμα πλεονέκτημα σε σχέση με προκαρυωτικούς οργανισμούς-μοντέλα όταν οι έρευνες σχετίζονται άμεσα με τον άνθρωπο (Vavilala S. et al. 2015).

## 1.2 Καταπονήσεις

Λόγω της φυσιολογίας τους φυτά και φύκη είναι ιδιαίτερα εκτεθειμένα στις μεταβολές του περιβάλλοντος. Ακραίες μεταβολές που μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη τους ορίζονται ως καταπονήσεις και διακρίνονται σε βιοτικές και αβιοτικές

(υψηλή αλατότητα, αναερόβιες συνθήκες, βαρέα μέταλλα, υψηλές ή χαμηλές θερμοκρασίες κτλ) (Vavilala S. et al. 2015). Οι διάφορες καταπονήσεις έχουν το δυναμικό να προκαλέσουν μεγάλες ζημιές στη χλωρίδα οδηγώντας σε σημαντικά περιβαλλοντικά και οικονομικά προβλήματα παγκοσμίως. Βέβαια, μέσω της εξέλιξης και της επιλεκτικής προσαρμογής πολλά είδη έχουν αναπτύξει μηχανισμούς επιβίωσης στις αντίξοες αυτές συνθήκες. Η κατανόηση του μοριακού υπόβαθρου της εκάστοτε προσαρμογής αλλά και του τρόπου που τα κύτταρα αντιλαμβάνονται τις περιβαλλοντικές μεταβολές και προσαρμόζουν τον κυτταρικό τους μηχανισμό σε αυτές εμφανίζει μεγάλο ενδιαφέρον και μπορεί να συμβάλει στην επίλυση σημαντικών ζητημάτων (Xiong & Zhu, 2002).

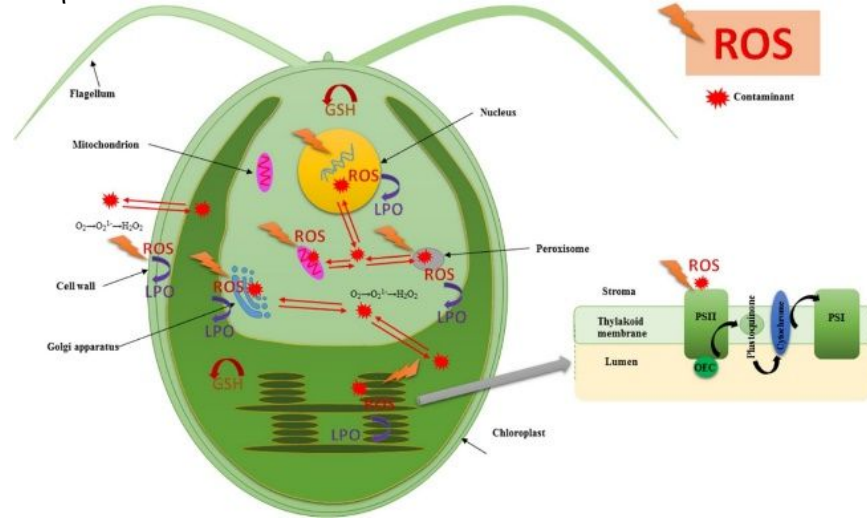
### **1.2.1 Οξειδωτική καταπόνηση**

Οξειδωτική καταπόνηση μπορεί να επάγεται από δύο διαφορετικούς μηχανισμούς. Τη συσσώρευση ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) στο εσωτερικό του κυττάρου (Moradas-Ferreira et al. 1996) και τη διαταραχή της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του (Teixeira de Mattos and Neijssel 1997). Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου είναι αναπόφευκτο παραπροϊόν του μεταβολισμού σε αερόβιο περιβάλλον και η παραγωγή τους είναι ακόμα πιο έντονη στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς. Στη φωτοσύνθεση, διαταραχή της ισορροπίας ανάμεσα στην εισερχόμενη ενέργεια διέγερσης στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και στους τερματικούς αποδέκτες ηλεκτρονίων μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή και τη συσσώρευση ενεργών ριζών οξυγόνου.

Συνέπεια της συσσώρευσης αυτής είναι η οξείδωση, και απώλεια λειτουργικότητας, συστατικών του κυττάρου όπως τα λιπίδια των μεμβρανών, οι πρωτεΐνες και το DNA (Moradas-Ferreira et al. 1996). Σε μεγάλο βαθμό επηρεάζεται και ο χλωροπλάστης στον οποίο πραγματοποιείται η φωτοσύνθεση. Η υπερπαραγωγή ROS σε αυτόν μπορεί να ενεργοποιήσει μηχανισμούς προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Ledford et al., 2007). Επίσης οι ενεργές ρίζες έχουν άμεση επίδραση στη μιτοχονδριακή μορφολογία, συμβάλλοντας και πάλι στην επαγωγή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Logan 2006).

Το κύτταρο διαθέτει μηχανισμούς άμυνας στην οξειδωτική καταπόνηση που απομακρύνουν τις ενεργές ρίζες και αποκαθιστούν την ισορροπία (Εικόνα 1.4).

Κυρίαρχο ρόλο σε αυτούς έχει η δράση ενζύμων όπως η καταλάση και η υπεροξειδική δισμουτάση.



Εικόνα 1.4 Σχηματισμός και κυκλοφορία των ενεργών ριζών οξυγόνου μέσα στο κύτταρο του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii* (Almeida et al. 2017)

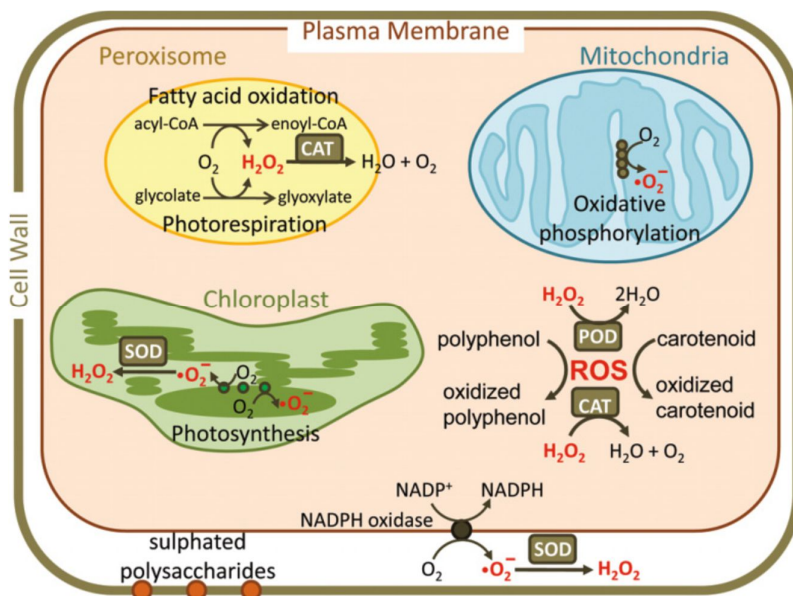
Παρά τις αναντίρρητες αρνητικές επιπτώσεις της συσσώρευσης ενεργών ριζών οξυγόνου για το κύτταρο, σταδιακά προκύπτουν πειραματικές ενδείξεις και βιβλιογραφικές αναφορές για συμμετοχή τους και σε άλλους κυτταρικούς μηχανισμούς. Συγκεκριμένα, σε μη θανατηφόρες συγκεντρώσεις δρουν σαν δευτερογενή μηνύματα και ενεργοποιούν μονοπάτια που ενισχύουν την αμυντική απόκριση του κυττάρου ενισχύοντας τις πιθανότητες του να επιβιώσει από την καταπόνηση που προκάλεσε την παραγωγή τους (Collinson and Dawes 1992, Ledford et al. 2007, Rentel M.C. et al. 2004, Storz G. et al. 1990).

### 1.2.2 Οξειδωτική καταπόνηση και μικροφύκη

Η οξειδωτική καταπόνηση μπορεί να είναι συνέπεια τόσο ενδογενών διεργασιών όσο και εξωγενών συνθηκών, όπως η έκθεση σε έντονο φωτισμό και συγκεκριμένα χημικά. Τα μικροφύκη αντιμετωπίζουν την καταπόνηση αυτή παράγοντας ενώσεις μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους. Διαθέτουν και ενεργοποιούν μηχανισμούς που συναντώνται και σε άλλους θαλάσσιους ή χερσαίους οργανισμούς αλλά και μηχανισμούς που αποτελούν μοναδικές προσαρμογές των μικροφύκων που συμβάλλουν στην επιβίωση τους.



Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα έχουν πρωταγωνιστικό ρόλο στον έλεγχο της συγκέντρωσης των ενεργών ριζών στα μικροφύκη (Εικόνα 1.5). Με τη δράση τους, οι ενεργές ρίζες οξυγόνου μετατρέπονται σε άλλα πιο αδρανή μόρια όπως το  $O_2$  και το  $H_2O$ . Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT) και οι υπεροξειδάσες (APX, GPX) είναι μόνο κάποια παραδείγματα ενζύμων των οποίων η συγκέντρωση αυξάνεται με τρόπο ανάλογο της έντασης και της χρονικής διάρκειας της οξειδωτικής καταπόνησης (Shao et al. 2008, Cirulis et al. 2013).



Εικόνα 1.5 Ενδοκυτταρική κυκλοφορία των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) στα μικροφύκη (Cirulis et al., 2013)

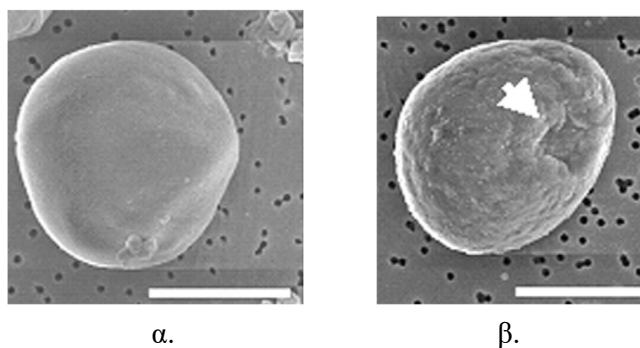
Ο μειωμένος αριθμός ανάπτυξης των μικροφυκών αποτελεί ένδειξη ύπαρξης οξειδωτικής καταπόνησης ενώ για την ακριβή ταυτοποίησή της αξιοποιούνται διάφορα μόρια-δείκτες. Η χλωροφύλλη α συμμετέχει στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και μπορεί να επηρεάσει την ποσότητα των ενδογενώς παραγόμενων ενεργών ριζών. Κατά συνέπεια, σαν απόκριση του κυττάρου στην παρουσία οξειδωτικής καταπόνησης, η συγκέντρωση της μειώνεται. Αντιθέτως, αυξάνεται η συγκέντρωση μορίων που μπορούν να λειτουργήσουν σαν δέκτες ηλεκτρονίων (αναγωγικοί παράγοντες) και δρουν προστατευτικά για το κύτταρο, όπως η λουτεΐνη. Επίσης, σε χαμηλά επίπεδα καταπόνησης αυξάνεται και η συγκέντρωση των καροτενοειδών.

Η παρουσία ενεργών ριζών οξυγόνου έχει συνδεθεί με την εμφάνιση πολλών ασθενειών (αθηροσκλήρωση, χρόνιες φλεγμονές, νευροεκφυλιστικές νόσοι, διάφορες μορφές καρκίνου) στον άνθρωπο. Το γεγονός ότι αυτές οι ασθένειες μπορούν να

καταπολεμηθούν, έστω μερικώς, από τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, σε συνδυασμό με την αυξημένη προτίμηση για φυσικά προϊόντα, οδηγούν σε αυξημένη ζήτηση αντιοξειδωτικών εύκολα και ευρέως διαθέσιμων σε καθαρή μορφή. Μια πιθανή πηγή για την απομόνωση τέτοιων ενζύμων είναι τα μικροφύκη (Sansone et al. 2016).

Γενικά, πολλές από τις ενώσεις που παράγουν τα μικροφύκη για να αντιμετωπίσουν την οξειδωτική καταπόνηση κατατάσσονται στα αντιοξειδωτικά. Μπορούν να αξιοποιηθούν για την ανάπτυξη φαρμακευτικών σκευασμάτων, συμπληρωμάτων διατροφής και καλλυντικών. Συνεπώς, η μελέτη των μηχανισμών απόκρισης των μικροφυκών στην οξειδωτική καταπόνηση εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και μπορεί να οδηγήσει στην αύξηση της παραγωγής των ήδη γνωστών ενώσεων αλλά και την ανακάλυψη άγνωστων ως τώρα βιοενεργών ουσιών (Cirulis et al., 2013).

Πειραματικά, σε καλλιέργειες του μικροφύκου *C. reinhardtii* που εκτέθηκαν σε 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για μισή και μία ώρα ο αριθμός των κυττάρων και ο ρυθμός ανάπτυξης της καλλιέργειας παρέμειναν ανεπηρέαστοι (Blaby et al. 2015). Σε πειράματα που έγιναν στο μικροφύκος *Chlorella sorokiniana* με τη χρήση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> έδειξαν πως ο συγκεκριμένος οξειδωτικός παράγοντας οδηγεί στη διάνοιξη μικροσκοπικών οπών στη μεμβράνη των κυττάρων επιτρέποντας την είσοδο του στο εσωτερικό και την επακόλουθη οξείδωση του DNA και των πρωτεϊνών (Εικόνα 1.6). Άμεσο αποτέλεσμα ήταν η διακοπή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Imase et al. 2013).



Εικόνα 1.6 Κύτταρα *Chlorella sorokiniana* χωρίς έκθεση σε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (α) και μετά από έκθεση σε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (β) (Imase et al. 2013)

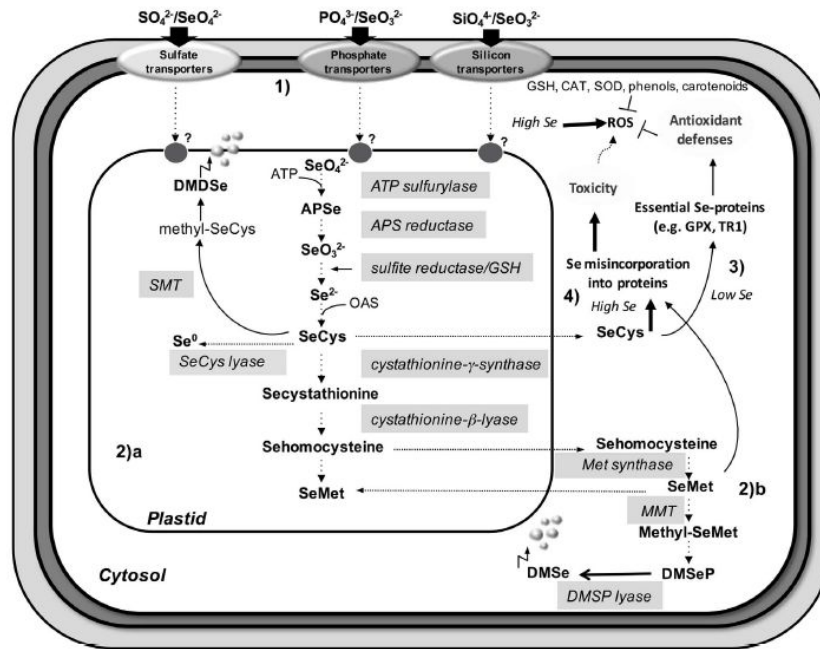
### 1.3 Selenium Binding Protein (SBP)

#### 1.3.1 Selenium (Se)

Το σελήνιο (Se) είναι χημικό στοιχείο με ατομικό αριθμό 34. Στα οικοσυστήματα, με βάση τις οξειδωτικές συνθήκες που επικρατούν, συναντάται σε δύο κυρίως ανόργανες μορφές με διαφορετικό βαθμό οξείδωσης. Ως selenate (Se (+VI),  $\text{SeO}_4^{2-}$ ) και selenite (Se (+IV),  $\text{SeO}_3^{2-}$ ). Οι δύο αυτές μορφές έχουν διαφορετική τοξικότητα και εμφανίζονται με διαφορετική συχνότητα στο περιβάλλον, με το εξασθενές σελήνιο να κυριαρχεί, αφού αντιπροσωπεύει το 67% του συνολικού διαλυμένου σεληνίου (Geoffroy et al. 2007). Τα μικροφύκη μπορούν να προσλαμβάνουν τόσο το τετρασθενές όσο και το εξασθενές σελήνιο (Cutter and Bruland 1984, Plant et al. 2004). Η απόδοση αυτής της πρόσληψης εξαρτάται από το pH του νερού (Tuzen & Sari, 2010). Για το *Chlamydomonas reinhardtii* η πρόσληψη τετρασθενούς σεληνίου εμφανίζει μέγιστο σε pH 8 ενώ για το εξασθενές η μέγιστη πρόσληψη επιτυγχάνεται σε πιο όξινες τιμές pH (Riedel & Sanders, 1996).

Τα μεταβολικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχει το σελήνιο είναι αρκετά συντηρημένα καθώς συναντώνται σε πολλούς προκαρυώτες και ευκαρυώτες, ανάμεσα στους οποίους και τα φύκη. Δεν συναντώνται ωστόσο στα χερσαία φυτά και τους μύκητες, πιθανώς γιατί το σελήνιο δεν είναι άμεσα διαθέσιμο στα χερσαία οικοσυστήματα (Zhang & Gladyshev, 2009). Αν και δεν είναι απαραίτητο για την επιβίωση τους, το σελήνιο θεωρείται σαν ευεργετικό στοιχείο για τα φυτά ευνοώντας την ανάπτυξη τους και την αντοχή τους σε διάφορες καταπονήσεις (Hartikainen, 2005, Pilon-Smits et al., 2009). Γενικά, το θείο και ο φώσφορος επηρεάζουν τη συσσώρευση σεληνίου καθώς λειτουργούν σαν ανταγωνιστές (Simmons & Emery, 2011).

Στους οργανισμούς το σελήνιο συναντάται σε αρκετές μορφές. Κυρίαρχη είναι αυτή της σεληνοκυστεΐνης που αποτελεί το 21<sup>ο</sup> αμινοξύ. Χρησιμοποιείται για το σχηματισμό σεληνοπρωτεϊνών, κωδικοποιείται από το κωδικόνιο UGA και υπάρχουν ειδικά tRNAs για τη μεταφορά της στο ριβόσωμα. Επίσης συναντάται στα νουκλεϊκά οξέα ως 5-methylaminomethyl-2-selenouridine (mnm5Se2U) σε πολλά βακτηριακά είδη (Nauser et al. 2012, Böck et al. 1991, Atkins and Gesteland 2000). Στα μικροφύκη δεν έχουν εντοπιστεί απαραίτητες σεληνοπρωτεΐνες ενώ έχει παρατηρηθεί η πτητικοποίηση του σεληνίου (de Souza et al., 2002) (Εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.7 Μεταβολικά μονοπάτια κυκλοφορίας του Se στα φυτικά κύτταρα (Schiavon M. et al. 2017)

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις αποτελεί απαραίτητο ιχνοστοιχείο για πολλούς οργανισμούς (βακτήρια, αρχαία, ζώα και χλωροφύκη) ενώ δεν είναι απαραίτητο για τα χερσαία φυτά (Novoselov et al., 2002; Rayman, 2012; Mangiarpane et al., 2014). Ωστόσο, σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι τοξικό για όλους τους οργανισμούς. Αυτό οφείλεται κυρίως στη δομική ομοιότητα του με το θείο (S) και την ικανότητα του να υποκαθιστά στις πρωτεΐνες καταστρέφοντας την στερεοδιάταξη τους (Van Hoewyk et al., 2008). Μάλιστα, τα όρια ανάμεσα στην ανοχή και την τοξικότητα είναι ιδιαίτερα στενά συγκρίνοντας το σελήνιο με τα υπόλοιπα ιχνοστοιχεία (Stadtman, 1990). Βιβλιογραφικά αναφέρεται σαν το “αναγκαίο δηλητήριο” (“essential poison”, Jukes 1983).

Σε σχέση με το θείο το σελήνιο εμφανίζει δύο σημαντικά πλεονεκτήματα. Αρχικά έχει ενισχυμένη χημική ενεργότητα καθώς οι ενζυμικές αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχει επιτελούνται με ταχύτερο ρυθμό συγκρινόμενες με τις αντίστοιχες, όταν σε αυτές συμμετέχει το θείο. Επιπλέον έχει τη μοναδική ιδιότητα να αντιδρά με το οξυγόνο και τις ενεργές ρίζες του με τρόπο εύκολα αναστρέψιμο, γεγονός που αποτρέπει τη μονιμοποίηση της οξείδωσης του (Reich and Hondal 2016).

### 1.3.2 56kDa selenium binding protein (SBP56)

Πρόκειται για μια ιδιαίτερα συντηρημένη οικογένεια πρωτεϊνών που συναντάται στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και στην πλειοψηφία των προκαρυωτικών. Ο βαθμός συντήρησης είναι τόσο υψηλός (όσο οι ιστόνες και η ακτίνη), που υποδεικνύει πιθανή συμμετοχή της SBP σε θεμελιώδεις βιολογικές διαδικασίες (Agalou et al. 2006). Ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά σε ήπαρ ποντικού ως μία από τις κύριες κυτοσολικές πρωτεΐνες με ικανότητα δέσμευσης ραδιενεργού σεληνίου (Bansal et al. 1989, Bansal et al. 1990). Ορισμένοι οργανισμοί διαθέτουν περισσότερα του ενός ομόλογα γονίδια που κωδικοποιούν SBPs (*H. sapiens* 2, *A. thaliana* 3) με την κάθε μία να έχει τη δική της λειτουργικότητα.

Δομικά, στην SBP56 οικογένεια εμφανίζονται συχνά αλληλουχίες που οδηγούν στο μοτίβο β-πτυχωτής επιφάνειας (Adindla et al. 2007). Δεδομένα σχετικά με τη δευτεροταγή δομή των SBP 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 (Darienکو and Proschold 2015). Στοιχεία για την τριτοταγή δομή των SBP πρωτεϊνών δίνει η καταχώρηση 2ECE της PDB (Protein Data Bank). Στη συγκεκριμένη καταχώρηση παρουσιάζεται η στερεοδιάταξη της SBP πρωτεΐνης του *Sulfolobus tokodaii*, όπως προέκυψε από την αξιοποίηση δεδομένων κρυσταλλογραφίας ακτίνων X (Εικόνα 1.8). Διαπιστώθηκε πως η SBP εμφανίζει ασύμμετρη δομή και αποτελείται από μία αλυσίδα (μονομερές). Επίσης διευκρινίστηκε η ακριβής θέση των αμινοξέων που την αποτελούν στο χώρο και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις.

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 δυναμικές 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 του οξειδωτικού stress (Agalou et al. 2006, Porat et al. 2000).



Εικόνα 1.8 Δομή της υποθετικής selenium-binding πρωτεΐνης από το *Sulfolobus tokodaii*, ST0059 (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=2ECE&bionumber=1>)

### 1.3.3 SBP στο *Arabidopsis thaliana*

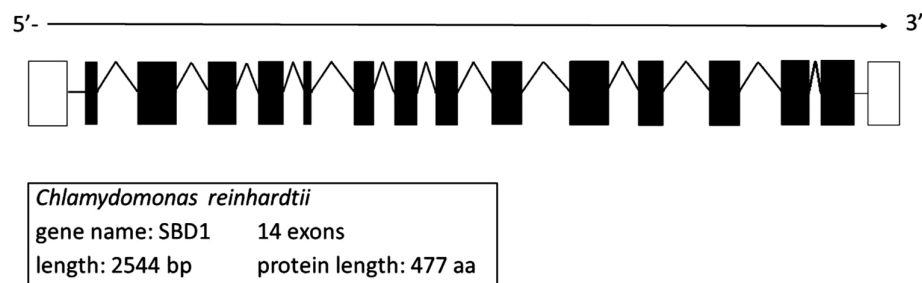
Στο γονιδίωμα του *Arabidopsis thaliana* υπάρχουν τρία ομόλογα γονίδια που κωδικοποιούν SBPs. Οι πρωτεΐνες αυτές συμμετέχουν άμεσα στο μεταβολισμό και την κυκλοφορία του σεληνίου μέσα στο φυτό ενώ εκφράζονται σε μεγαλύτερο βαθμό σε ιστούς με μεγάλες ενεργειακές απαιτήσεις όπως τα έμβρυα και οι άκρες των ριζικών τριχιδίων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες στο σύνολο των ιστών του φυτού εκφράζεται κυρίως η SBP1 (AtSBP1) η οποία και εμφανίζει υψηλή ομοιότητα με τις SBPs των θηλαστικών. Γενικευμένη έκφραση αλλά σε μικρότερες ποσότητες δείχνει η AtSBP2. Αντιθέτως η έκφραση της AtSBP3 είναι πολύ περιορισμένη τόσο τοπικά όσο και ποσοτικά (Dutilleul et al. 2008).

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, η υπερέκφραση της AtSBP1 οδηγεί σε αυξημένη ανθεκτικότητα του φυτού απέναντι στο σελήνιο και το κάδμιο (Agalou et al. 2005). Αντίστοιχα, μειωμένη έκφραση των AtSBP1 και AtSBP2 αυξάνει την ευαισθησία του φυτού στα τοξικά αυτά στοιχεία, σε περίπτωση όμως που οι συνθήκες είναι φυσιολογικές ο φαινότυπος δεν διαφέρει από τον αγρίου τύπου. Γενικά φαίνεται να υπάρχει αλληλεπίδραση των 3 SBPs οπότε σε περίπτωση μείωσης της έκφρασης κάποιας επάγεται η έκφραση των υπολοίπων προκειμένου να καλυφθεί το λειτουργικό κενό με το λιγότερο δυνατό κόστος για τον οργανισμό (Agalou et al. 2005).

Στην AtSBP1 η περιοχή πρόσδεσης του σεληνίου (selenium-binding site) είναι σύμπλοκο της μορφής R-S-Se(II)-S-R που περιλαμβάνει τις Cys21 και Cys22 (Schild et al. 2014). Επίσης υπάρχει το μοτίβο CSSC, σημαντικό για τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, καθώς και τις συντηρημένες αλληλουχίες HxxH και HxD που θεωρούνται περιοχές πρόσδεσης μετάλλων (metal-binding domains). Τέλος, διαθέτει ακόμα 7 εξαιρετικά συντηρημένα αμινοξέα που σχηματίζουν στην τριτοταγή δομή υδρόφιλο κώνο (H90, H91, H154, Y205, E270, Q409, H475) (Agalou et al. 2006, Flemetakis et al. 2002).

### 1.3.4 SBP στο *Chlamydomonas reinhardtii*

Το *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<sup>ο</sup> χρωμόσωμα, έχει συνολικό μήκος 2544 bp, αποτελείται από 14 εξώνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη SBP μήκους 477 αμινοξέων (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.9 Χαρτογράφηση του γονιδίου SBD1

Πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι έκθεση του *C. reinhardtii* σε περιβάλλον με σελήνιο έχει ως αποτέλεσμα την ενδοκυτταρική συσσώρευση του. Συνέπεια της συσσώρευσης αυτής είναι η σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης της καλλιέργειας ή η πλήρης αναστολή της, ανάλογα με τη συγκέντρωση του ρύπου. Σημαντική είναι η επίδραση του σεληνίου και στο χλωροπλάστη, ο οποίος επηρεάζεται τόσο δομικά όσο και λειτουργικά (Geoffroy et al. 2007).

Επίσης, βιβλιογραφικά αναφέρονται πειράματα οξειδωτικής καταπόνησης με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο *C. reinhardtii* (Blaby et al. 2015, Vavilala S. et al. 2015). Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε από τους Blaby et al., καλλιέργειες του μικροφύκου *C. reinhardtii* εκτέθηκαν σε 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Αμέσως πριν την προσθήκη του υπεροξειδίου καθώς και

μισή και μία ώρα μετά έγιναν μετρήσεις του αριθμού των κυττάρων της καλλιέργειας, ενώ πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA για cDNA αλληλούχηση (RNA-Seq). Στους συγκεκριμένους χειρισμούς η έκφραση της SBP σημείωσε μια μικρή αλλά όχι στατιστικά σημαντική αύξηση (Blaby et al. 2015).

#### 1.4 Σκοπός της εργασίας

Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας είναι να μελετηθεί η οξειδωτική καταπόνηση και οι αλλαγές που αυτή επάγει στο μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*, δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στον πιθανό ρόλο της SBP. Το συγκεκριμένο μικροφύκος επιλέχθηκε καθώς αποτελεί οργανισμό – μοντέλο για παρόμοιες μελέτες λόγω μιας σειράς χαρακτηριστικών που διαθέτει.

Τα μικροφύκη καλλιεργούνται εκτενώς σε κλειστά συστήματα φωτοβιοαντιδραστήρων με απώτερο στόχο την παραγωγή κάποιου προϊόντος (βιομάζα, φάρμακα, καλλυντικά κ.α.). Λόγω της φωτοσύνθεσης και της συσσώρευσης κυττάρων η οξειδωτική καταπόνηση είναι μια συνήθης κατάσταση για τα καλλιεργούμενα μικροφύκη η οποία όμως επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Η γνώση των συνθηκών καταπόνησης και των μεταβολών που προκαλεί στη φυσιολογία και το μεταβολισμό των μικροφυκών μπορεί να επιτρέψει τόσο την αποφυγή της καταπόνησης όσο και τη διατήρηση και σταθεροποίηση της σε περίπτωση που επιθυμούμε την μεταβολική επαγωγή της παραγωγής κάποιου προϊόντος.

Για τη διερεύνηση της επίδρασης των καταπονήσεων έγινε ένα σύνολο μετρήσεων. Αρχικά αναπτύχθηκαν καλλιέργειες και εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις  $H_2O_2$ . Προσδιορίστηκε το ποσοστό επιβίωσης των καλλιεργειών σε κάθε συνθήκη με χρήση των κατάλληλων χρωστικών και μικροσκοπίου φθορισμού ενώ η περαιτέρω αξιολόγηση του οξειδωτικού δυναμικού έγινε με τη μέθοδο FRAP. Επίσης πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA και ποσοτικοποίηση της έκφρασης του SBD1 και άλλων γονιδίων μέσω RT-PCR. Ανάλυση του μεταβολικού προφίλ του μικροφύκου στις συγκεκριμένες συνθήκες έγινε με τη μέθοδο GC-MS.

Από το σύνολο των αποτελεσμάτων έγινε εμφανής η επίδραση της οξειδωτικής καταπόνησης στο συγκεκριμένο μικροφύκος. Ενδιαφέρον εμφανίζει η διαφορετική απόκριση των δύο στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν (φυσικού τύπου και



μεταλλάγματος χωρίς έκφραση της SBP), τόσο σε επίπεδο επιβίωσης των καλλιιεργειών όσο και στα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων και στο μεταβολικό προφίλ. Για την αποσαφήνιση του ρόλου της SBP στην απόκριση σε οξειδωτική καταπόνηση περαιτέρω μελέτες είναι χρήσιμες.

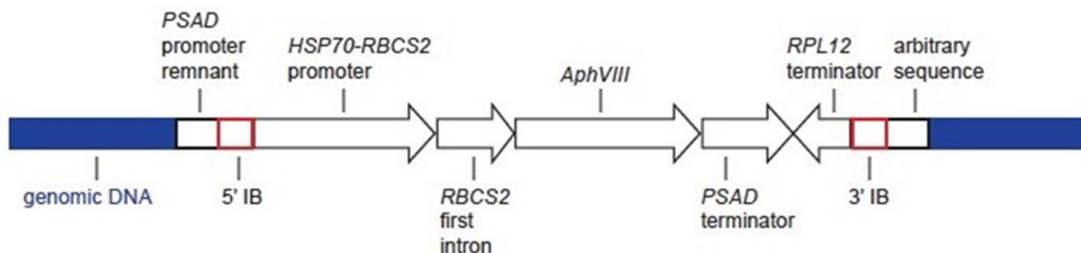
## Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Στελέχη *Chlamydomonas reinhardtii*

Για την πραγματοποίηση της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη (αγρίου τύπου και μετάλλαγμα στο οποίο δεν εκφράζεται η SBP) του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii*. Και τα δύο προήλθαν από τη βιβλιοθήκη Chlamy Library (<https://www.chlamylibrary.org/>) που είναι αποτέλεσμα της συνεργασίας των Chlamydomonas Mutant Library Group, Carnegie Institution for Science και Chlamydomonas Resource Center, University of Minnesota (Zhang et al. 2014).

Ως στέλεχος αγρίου τύπου χρησιμοποιήθηκε το cMJ030, ένα mt- στέλεχος *C. reinhardtii* με την μεταλλαγή cw15, επίσης γνωστό ως cc-4533. Εκτός της αγοράς από την Chlamy Library, το cc-4533 προσφέρθηκε και από το εργαστήριο του κ. Michel Goldschmidt-Clermont (Department of Botany and Plant Biology, University of Geneva), τον οποίο ευχαριστούμε θερμά (Allorent et al. 2016).

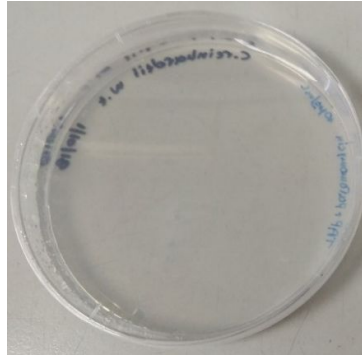
Τα μεταλλάγματα της συγκεκριμένης βιβλιοθήκης έχουν προκύψει από το στέλεχος αγρίου τύπου με ένθεση του δίκλωνου πλασμιδίου CIB1 (Εικόνα 2.1). Στο πλασμίδιο έχει προστεθεί και γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό paromomycin (παρομομυκίνη).



Εικόνα 2.1 Σχηματική απεικόνιση της κασέτας ένθεσης

(<https://www.chlamylibrary.org/content/CIB1> )

Η παρομομυκίνη δρα ως αναστολέας της σύνθεσης πρωτεϊνών μέσω σύνδεσης στο 16S ριβοσωμικό RNA. Πρόκειται δηλαδή για αντιβιοτικό ευρέος φάσματος, διαλυτό στο νερό, που εμφανίζει παρόμοια δράση με τη νεομυκίνη. Συνεπώς, μόνο κύτταρα με γονίδιο ανθεκτικότητας επιβιώνουν παρουσία παρομομυκίνης. Ο μηχανισμός αυτός αξιοποιήθηκε για τον έλεγχο της επιτυχούς ένθεσης του παραπάνω πλασμιδίου στα μεταλλάγματα (Εικόνα 2.2).



α.



β.

Εικόνα 2.2 Καλλιέργειες *C. reinhardtii* σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα παρουσία παρομομυκίνης 10  $\mu\text{g/mL}$ , α. στέλεχος αγρίου τύπου και β. μετάλλαγμα

Το μετάλλαγμα που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία είναι το LMJ.RY0402 (Li X et al. 2016). Στο στέλεχος αυτό η 5' UTR του γονιδίου της SBP (SBD1) έχει διακοπεί από την ένθεση ολόκληρου του πλασμιδίου. Περισσότερες πληροφορίες για το συγκεκριμένο στέλεχος στο Παράρτημα 1. Για να επιβεβαιωθεί ότι στο μεταλλαγμένο στέλεχος έχει συμβεί η ένθεση όπως αυτή παρουσιάζεται βιβλιογραφικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος μέσω PCR, σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο, όπως προτεινόταν από τη Chlamy Library (Εικόνα 2.3).

1) εμβολιασμός και ανάπτυξη των στελεχών σε στερεές καλλιέργειες μέχρι την απόκτηση αποικιών (single cell colonies) διαμέτρου τουλάχιστον 3 mm

2) απομόνωση DNA από 3 αποικίες κάθε στελεχούς

- σε PCR tubes προσθήκη 50  $\mu\text{L}$  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

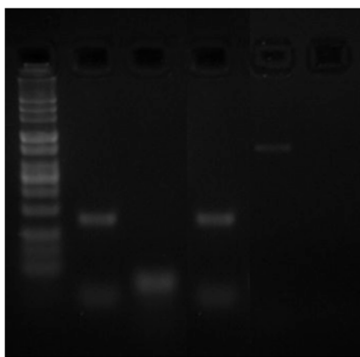
- vortex για 10 sec

- φυγοκέντρωση σε 1000g για 1 min

- μεταφορά του υπερκείμενου και διατήρηση του στους -20°C

3) πραγματοποίηση PCR

Οι αλληλουχίες εκκινητών (primers) που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στο Παράρτημα 2, οι συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης στο Παράρτημα 3.



- 1) Ladder
- 2) θετικός μάρτυρας, στέλεχος αγρίου τύπου
- 3) κασέτα ένθεσης, στέλεχος αγρίου τύπου
- 4) θετικός μάρτυρας, μετάλλαγμα
- 5) κασέτα ένθεσης, μετάλλαγμα
- 6) αρνητικός μάρτυρας

Εικόνα 2.3 Gel αγαρόζης με τα προϊόντα της PCR για την ταυτοποίηση της ένθεσης στο μετάλλαγμα

## 2.2 Καλλιέργειες

Για την καλλιέργεια του μικροφύκου χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό TAP (Tris-Acetate-Phosphate, παράρτημα 4) (Gorman and Levine 1965, Hutner et al. 1950). Τα γυάλινα σκεύη στα οποία αναπτύσσονταν οι καλλιέργειες αποστειρώνονταν σε αυτόκαυστο (121°C/20 min). Οι υγρές καλλιέργειες είχαν όγκο 1000 mL και αναπτύσσονταν υπό συνεχή φωτισμό (λαμπτήρες φθορισμού Osram 36W/77 fluora και Philips 36W/15 red), σε θερμοκρασία δωματίου, υπό συνεχή ανάδευση, με παροχή φιλτραρισμένου ατμοσφαιρικού αέρα. Οι καλλιέργειες ξεκινούσαν με εμβολιασμό υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminar Flow) από προκαλλιέργεια σε εκθετική φάση ανάπτυξης. Η αρχική συγκέντρωση τους ήταν  $1 \times 10^6$  cells/mL.

## 2.3 Οξειδωτική καταπόνηση

Σε πρώτη φάση πραγματοποιήθηκαν κάποια δοκιμαστικά πειράματα για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων  $H_2O_2$  που θα χρησιμοποιούνταν περαιτέρω. Σύμφωνα με τις υπάρχουσες βιβλιογραφικές αναφορές (Sirisha L. et al. 2015, Blaby et al. 2015), σε καλλιέργειες *C. reinhardtii* που βρίσκονταν στην εκθετική φάση ανάπτυξης προστέθηκαν από 2 mM έως και 50 mM  $H_2O_2$ . Συγκεντρώσεις άνω των 10 mM οδηγούσαν σε θανάτωση όλων των κυττάρων των καλλιεργειών 12 ώρες μετά την προσθήκη του οξειδωτικού παράγοντα. Με βάση και τη στατιστική ανάλυση των

δεδομένων που προέκυψαν επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις 2 mM, 5 mM και 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για τη συνέχιση των πειραμάτων.

Ακολούθησε ο εμβολιασμός νέων καλλιέργειών *C. reinhardtii*. Όταν οι καλλιέργειες έφταναν στην εκθετική φάση ανάπτυξης και σε συγκέντρωση κυττάρων περίπου 2x10<sup>6</sup> cells/mL (Εικόνα 2.4) γινόταν η προσθήκη του οξειδωτικού παράγοντα. Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> που χρησιμοποιήθηκε είχε MB=34.01, 30% w/w και ρ=1.1 g/cm<sup>3</sup>. Χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 0 mM (control), 2 mM, 5 mM και 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Ακριβώς πριν την προσθήκη του οξειδωτικού παράγοντα, 6 και 12 ώρες αργότερα γινόταν συλλογή δείγματος και μέτρηση του ρυθμού ανάπτυξης της καλλιέργειας καθώς και του αριθμού ζωντανών και νεκρών κυττάρων.

Επίσης, στις χρονικές στιγμές 1, 6 και 12 ώρες μετά την προσθήκη του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> πραγματοποιούνταν συλλογή δείγματος από κάθε καλλιέργεια και απομόνωση RNA από αυτό. Στις ίδιες χρονικές στιγμές γινόταν και συλλογή δείγματος για την πραγματοποίηση της αέριας χρωματογραφίας.

Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σε τρεις βιολογικές επαναλήψεις, τόσο για το στέλεχος αγρίου τύπου όσο και για το μετάλλαγμα.



Εικόνα 2.4 Καλλιέργειες *C. reinhardtii* στην εκθετική φάση ανάπτυξης

## 2.4 Μέτρηση αριθμού κυττάρων

Προκειμένου να καταμετρηθεί ο αριθμός των κυττάρων κάθε καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε πλάκα Neubauer (αιμοκυτταρόμετρο) της HBG. Μετατροπή του αριθμού των κυττάρων που μετρούνταν κάθε φορά σε cells/mL καλλιέργειας έγινε σύμφωνα με τον τύπο:  $\text{cells/mL} = (N_{\text{cell}} / N_{\text{squares}}) \times 400 \times 10^4$ .

Για το διαχωρισμό ζωντανών/νεκρών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα χρωστική της Sigma-Aldrich Co. LLC, Fluorescein diacetate F7378-5G. Το διάλυμα χρωστικής που χρησιμοποιήθηκε προέκυψε με διάλυση 5mg FDA/mL ακετόνης και η διατήρηση του έγινε, για σύντομο χρονικό διάστημα, στους -20 °C. Σε δείγμα καλλιέργειας 1 mL γινόταν προσθήκη 1μL χρωστικής πέντε λεπτά πριν την παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Εξαιτίας της κυτταρικής κίνησης του *C. reinhardtii*, που οφείλεται στα μαστίγια του, η παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού απαιτούσε την ακινητοποίησή του, ενώ τα κύτταρα παραμένουν ζωντανά. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε 1 mL Lugol (Lugol solution, Sigma, L6146).

Η παρατήρηση του *C. reinhardtii* έγινε στο μικροσκόπιο φθορισμού ZEISS AX10 στο οποίο ήταν συνδεδεμένη η κάμερα AxioCam ICm1, ZEISS. Η εικόνα μεταφερόταν στον υπολογιστή μέσω του προγράμματος ZEN2 lite της ίδιας εταιρίας.

Στις φωτογραφίες που λήφθηκαν στο ορατό φως εικονίζεται το σύνολο των κυττάρων της καλλιέργειας ενώ με τη χρήση του φίλτρου υπεριώδους ακτινοβολίας διακρίνονται μόνο τα ζωντανά κύτταρα λόγω του φθορισμού τους. Για τη διάκριση των κυττάρων που φθορίζουν δύο φωτογραφίες του ίδιου οπτικού πεδίου με χρήση α. ορατού φωτός και β. φίλτρου UV στοιβάζονται ώστε να είναι δυνατό να παρατηρηθούν ταυτόχρονα και οι δύο. Στην προκύπτουσα εικόνα διακρίνονται τα συνολικά κύτταρα, με τα ζωντανά να ξεχωρίζουν ως φθορίζοντα και ως μη φθορίζοντα τα μεταβολικά ανενεργά. Η επεξεργασία των φωτογραφιών και το overlay έγινε με χρήση του Adobe Photoshop 7.0.

## 2.5 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση του RNA από τις καλλιέργειες έγινε σε δείγματα όγκου 40 mL για την κάθε μέτρηση με χρήση του NucleoZOL, MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG 1609/001, σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

- τοποθέτηση 40 mL δείγματος από κάθε καλλιέργεια σε παγωμένα falcons
- φυγοκέντρηση στις 2800 στροφές για 4 λεπτά, στους 4 °C
- απόρριψη του υπερκείμενου, προσθήκη 1mL θρεπτικού TAP στο ίζημα
- επαναδιάλυση και μεταφορά σε Eppendorf 1.5 mL
- φυγοκέντρηση στις 8000 στροφές για 3 λεπτά
- προσθήκη 300 μL NucleoZOL

- λειοτριβήση με έμβολο, vortex και φυγοκέντρωση στις 8000 στροφές για 3 λεπτά (x 3)
- προσθήκη 200  $\mu$ L NucleoZOL, vortex
- προσθήκη 200  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, vortex
- επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- φυγοκέντρωση σε 12000 g για 15 λεπτά
- μεταφορά του υπερκείμενου σε καινούρια Eppendorf
- προσθήκη (στο υπερκείμενο) 700  $\mu$ L ισοπροπανόλης
- επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- φυγοκέντρωση για 15 λεπτά σε 13000 στροφές
- απόρριψη υπερκείμενου, προσθήκη στο ίζημα 100 mL 75% αιθανόλης, διαλυτοποίηση
- φυγοκέντρωση για 5 λεπτά σε 13000 στροφές
- επανάληψη των 2 προηγούμενων βημάτων
- εξάτμιση της αιθανόλης
- επαναδιάλυση σε 31  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O

Το σπεκτροφωτόμετρο NanoDrop ND-1000 και το πρόγραμμα ND-1000 V3.3.1 χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της ποσότητας του RNA που απομονώθηκε από κάθε δείγμα. Η παρουσία RNA και η καθαρότητα των δειγμάτων επιβεβαιώθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Παράρτημα 5). Για τη λήψη φωτογραφιών από όλες τις ηλεκτροφορήσεις χρησιμοποιήθηκε το Alpha Innotech light cabinet και το πρόγραμμα Alpha Imager.

Για τον περαιτέρω καθαρισμό των δειγμάτων ακολούθησε επεξεργασία με DNase σύμφωνα με το πρωτόκολλο:

- 1) ddH<sub>2</sub>O: 28,5  $\mu$ L
- 2) buffer (Ambion L/N: 00289202): 5  $\mu$ L
- 3) δείγμα RNA: στον απαραίτητο όγκο για τελική ποσότητα 3000 ng
- 4) DNase (Ambion L/N: 00301791): 0,75  $\mu$ L
- 5) επώαση στους 37 °C για 30 λεπτά
- 6) DNase: 0,75  $\mu$ L
- 7) επώαση στους 37 °C για 30 λεπτά
- 8) αποθήκευση στους -80 °C

Για τη διακοπή της δράσης της DNase χρησιμοποιήθηκε 1  $\mu$ L RQ1 DNase stop solution (Promega) σε 2  $\mu$ L κάθε δείγματος, παρουσία 7  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O και επώαση

στους 75 °C για 30 λεπτά. Έγινε έλεγχος της παρουσίας επιμόλυνσης με DNA στα συγκεκριμένα δείγματα με πραγματοποίηση PCR (Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler) και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Αφού βεβαιώθηκε η απομάκρυνση του συνόλου του DNA, ο καθαρισμός των δειγμάτων RNA ολοκληρώθηκε με αφαίρεση των DNAσών σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

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

Η ποσότητα και η καθαρότητα του RNA που απομονώθηκε από κάθε δείγμα μετρήθηκε με χρήση σπεκτροφωτόμετρου NanoDrop και με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

## 2.6 Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκε με χρήση του SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen, 11904-018, σύμφωνα με το πρωτόκολλο:

1. ανάδευση και σύντομη φυγοκέντρηση όλων των συστατικών της αντίδρασης



2. για κάθε δείγμα, σε αποστειρωμένο tube 0.5 mL:
  - RNA για συνολική ποσότητα 1 µg
  - 10 mM dNTP mix 1 µl
  - oligo(dT) 1 µl
  - DEPC-treated H<sub>2</sub>O ως συνολικό όγκο 10 µl
3. επώαση του δείγματος στους 65°C για 5 λεπτά, στη συνέχεια επώαση σε πάγο για τουλάχιστον 1 λεπτό
4. σε ξεχωριστό αποστειρωμένο tube ετοιμάζεται το stock της 2x αντίδρασης. Τα συστατικά προστίθενται με την εξής σειρά:
  - 10x RT buffer 2 µl (για κάθε δείγμα)
  - 25 mM MgCl<sub>2</sub> 4 µl (για κάθε δείγμα)
  - 0.1 M DTT 2 µl (για κάθε δείγμα)
  - RNaseOUT™ (40 U/µl) 1 µl (για κάθε δείγμα)
5. προσθήκη σε κάθε δείγμα (από το βήμα 3) 9 µL από το stock της 2x αντίδρασης, ήπια ανάδευση και σύντομη φυγοκέντρηση
6. επώαση στους 42 °C για 2 λεπτά
7. προσθήκη 1 µl SuperScript™ II RT σε κάθε δείγμα
8. επώαση στους 42 °C για 50 λεπτά
9. τερματισμός της αντίδρασης με επώαση στους 70°C για 15 λεπτά
10. αποθήκευση στους -20 °C

## 2.7 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-qPCR)

Η ποσοτική PCR διατηρεί τις βασικές αρχές μεθόδου της κλασσικής PCR και εμφανίζει κάποιες διαφοροποιήσεις που επιτρέπουν τη λήψη ποσοτικών δεδομένων για το επιθυμητό προϊόν σε πραγματικό χρόνο. Το προϊόν αυτό μπορεί να είναι DNA, cDNA ή RNA. Για την πραγματοποίηση της απαιτείται εξειδικευμένος αναλυτής και εκκινητές ειδικά σχεδιασμένοι για τη συγκεκριμένη αντίδραση. Επίσης, ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της real-time PCR είναι η χρησιμοποίηση φθορίζουσών χρωστικών, όπως η Syber Green, ή σημασμένων με φθοροφόρα ανιχνευτών DNA, όπως το TaqMan, για την ποσοτικοποίηση του τελικού προϊόντος.

Γενικά πρόκειται για μια μέθοδο που χρησιμοποιείται ευρέως για την ποσοτική ανάλυση νουκλεϊκών οξέων. Αν και υπάρχει κάποιο οικονομικό κόστος, η υψηλή

ακρίβεια και ευαισθησία, η καλή αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων καθώς και η εύκολη και σύντομη χρονικά πραγματοποίηση της δημιουργούν μια εύλογα καλή σχέση κόστους και αποτελέσματος (Pfaffl MW 2010).

Τα δείγματα cDNA που προέκυψαν από τις παραπάνω διαδικασίες χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση RT-qPCR με σκοπό τον προσδιορισμό της σχετικής έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση στην οξειδωτική καταπόνηση καθώς και γονιδίων που αλληλεπιδρούν με την SBP (Πίνακας 2.1). Ως house-keeping γονίδια χρησιμοποιήθηκαν το γονίδιο της ακτίνης και το ενδογενές γονίδιο σταθερής έκφρασης *cb1p* (Chang et al. 2005, Pootakham et al. 2010; Cordero et al. 2011, Ψυχάρη 2015).

Πίνακας 2.1 Εκκινητές γονιδίων που μελετήθηκαν με RT-qPCR

Γονίδια που σχετίζονται με την οξειδωτική καταπόνηση	
MBS-F	5'- TGGACGTGTGTGATGGGAAG -3'
MBS-R	5'- AGCCTGTATCATCGTTGCC -3'
LHCB7-F	5'- GTAAGGATGGGCTGGTTGCT -3'
LHCB7-R	5'- CGCTACTTTACACAGGGT -3'
TRXh1-F	5'- CTAGCAGACAGGGCTCCATG -3'
TRXh1-R	5'- GACGCACACATCATACTGC -3'
GRX4-F	5'- ATCTTGTCATGCTGGGTCG -3'
GRX4-R	5'- GCGTGCCTATAATGCACTGG -3'
GPX5-F	5'- GGCTGTGCGAAGTTTTGGTC -3'
GPX5-R	5'- TGCTCCAATCTTGACCTCC -3'
SOD-F	5'- CAACCAGGACAACCCACTCA -3'
SOD-R	5'- ACACGTCGATGCCAGTATG -3'
CAT-F	5'- TAGGGAGCCATCCGATTGA -3'
CAT-R	5'- TCGCTCTGTGCTAATGACGA -3'
GSH-F	5'- ATACGTGGAGCAGGGAGCTA -3'
GSH-R	5'- ACCTACTGTCACAACGTCCG -3'
APX1-F	5'- TTCCGCCCTATGCTGAGAA -3'
APX1-R	5'- TTCTGGTGGCTGACGCAGTA -3'

House-keeping γονίδια	
Actin-F	5'- GCACGTCTTGACACCTGAGA -3'
Actin-R	5'- GTTTCAGTGCCTGAGCTTGT -3'
CBLP-F	5'- CTTCTCGCCCATGACCACC -3'
CBLP-R	5'- GCCCACCAGGTTGTTCTTCAG -3'
SBP-F	5'- ATCGACGTGGACCCTGAGA -3'
SBP-R	5'- GCTCCTTGCCGAAGTCAATG -3'

Γονίδια που αλληλεπιδρούν με την SBP	
GAPN1-F	5'- AGTGACGCAATGGAGACCG -3'
GAPN1-R	5'- CTGGAAAGGGAAGTGGTCCG -3'
FBA3-F	5'- GGAGAGCGGATTGTACCGAG -3'
FBA3-R	5'- CGGGACCAACCAAACTGC -3'
GRX3-F	5'- GTCACGAACTGTCCGGGA -3'
GRX3-R	5'- CGGGTCAAGGGGAAGTTTTG -3'
GRX6-F	5'- TCACGATGCATGGACCATGA -3'
GRX6-R	5'- TTCCCACGCCACACAAAATT -3'
CEP2-F	5'- AAGCGGTTGGAAGAGAGGTC -3'
CEP2-R	5'- AATCAGGGTTCGTTGGGCT -3'

Για το σχεδιασμό των απαραίτητων εκκινητών (Πίνακας 2.1) χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα primer designing tool και primer-blast του NCBI

(National Center for Biotechnology Information) καθώς και το primer express 2.0 software, Applied Biosystems. Επειδή στο 3' άκρο των γονιδίων η αλληλούχηση 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 επιβεβαιώθηκε η καταλληλότητα των συγκεκριμένων ζευγαριών εκκινητών για ποσοτική PCR.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με το θερμικό κυκλοποιητή StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Σε όλες τις αντιδράσεις έγινε χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green Supermix με ROX (Applied Biosystems) PCR Mastermix. Ο συνολικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 10 μl και περιελάμβανε 1 μl cDNA, 2 μl πρόσθιου εκκινητή (0,5 μM), 2 μl ανάστροφου εκκινητή (0,5 μM) και 5 μl SYBR Green Supermix με ROX (Applied Biosystems). Το πρόγραμμα της 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.

### 2.7.1 Ανάλυση δεδομένων RT-qPCR

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων αποκτήθηκαν με τη βοήθεια του StepOne Software v2.3. Με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία και τα επίπεδα έκφρασης των house-keeping γονιδίων στα δείγματα cDNA, για την κανονικοποίηση της έκφρασης του συνόλου των γονιδίων χρησιμοποιήθηκε η έκφραση του γονιδίου *cblp* (Fang et al. 2012, Colina et al. 2019).

Για την περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η επέκταση του Excel Kutools 19.0 καθώς και το πρόγραμμα LinRegPCR 7.5 (Ruijter, Ramakers 2003). Η δημιουργία των γραφημάτων πραγματοποιήθηκε με το SigmaPlot v12.2 και η στατιστική ανάλυση της διακύμανσης μεταξύ των δειγμάτων με one way ANOVA.

## 2.8 Λυοφιλίωση

Για την πραγματοποίηση αέριας χρωματογραφίας – φασματοσκοπίας μάζας και τον προσδιορισμό του οξειδωτικού δυναμικού με τη μέθοδο FRAP ήταν απαραίτητη η μετατροπή των δειγμάτων μας σε μορφή ξηρής βιομάζας. Αυτό επετεύχθη με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης.

Για κάθε δείγμα, καλλιέργεια όγκου 47 mL φυγοκεντρήθηκε στις 2800 στροφές για 4 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1 mL θρεπτικού TAP και μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένα Eppendorf 2 mL. Ακολούθησε νέα φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 4 λεπτά, απόρριψη του υπερκείμενου και φύλαξη των δειγμάτων στους -80 °C για ένα βράδυ. Την επόμενη μέρα ενώ τα δείγματα παρέμεναν σε πάγο έγιναν τρύπες στα πάματα των Eppendorf και τοποθέτηση τους στη συσκευή λυοφιλίωσης (Hetosicc, PD 2.5). Η λυοφιλίωση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στους -60 °C, υπό κενό.

## 2.9 Μέθοδος FRAP

Υπάρχουν ποικίλες δοκιμές που μετρούν την ολική ενζυματική αντιοξειδωτική δράση σε βιολογικά υγρά. Για την πραγματοποίηση της μέτρησης χρησιμοποιούνται δείκτες όπως το ποσοστό της χρήσης του οξυγόνου ή η χημειοφωταύγεια. Η μέτρηση αυτών των σημάτων όμως απαιτεί ειδικό εξοπλισμό και τέτοιου είδους δοκιμές μπορεί να είναι χρονοβόρες.

Πιο απλή στην πραγματοποίηση της και σύντομη χρονικά είναι η μέθοδος FRAP. Σε χαμηλό pH, όταν το αντιδραστήριο ferric-tripyridyltriazine (FeIII-TPTZ) ανάγεται σε μορφή δισθενή σιδήρου (FeII), αναπτύσσεται ένα έντονο μπλε χρώμα και συνοδεύεται από μέγιστη απορρόφηση στα 593nm (Benzie 1996). Η αντίδραση είναι μη ειδική και κάθε ημιαντίδραση που έχει μια μικρότερη-θετική αναγωγική δυνατότητα, υπό τις συνθήκες της αντίδρασης, σε σχέση με την ημιαντίδραση FeIII/FeII-TPTZ θα οδηγήσει στην αντίδραση αναγωγής FeIII-TPTZ. Οι συνθήκες δοκιμής ευνοούν την συγκεκριμένη αναγωγή και κατά συνέπεια την ανάπτυξη χρώματος, με την προϋπόθεση ότι ένα αναγωγικό (αντιοξειδωτικό) είναι παρόν. Η φεροζίνη (Ferrozine), μία ένωση που σχετίζεται με το TPTZ έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως, με περίσσεια ασκορβικού οξέος, ώστε να μετρηθεί ο σίδηρος. Στη δοκιμασία

FRAP, χρησιμοποιείται περίσσεια FeIII και ο περιοριστικός παράγοντας της τιμής του σχηματισμού του FeII-TPTZ, και κατά συνέπεια του χρώματος, είναι η αναγωγική ικανότητα του δείγματος (Benzie and Strain 1996).

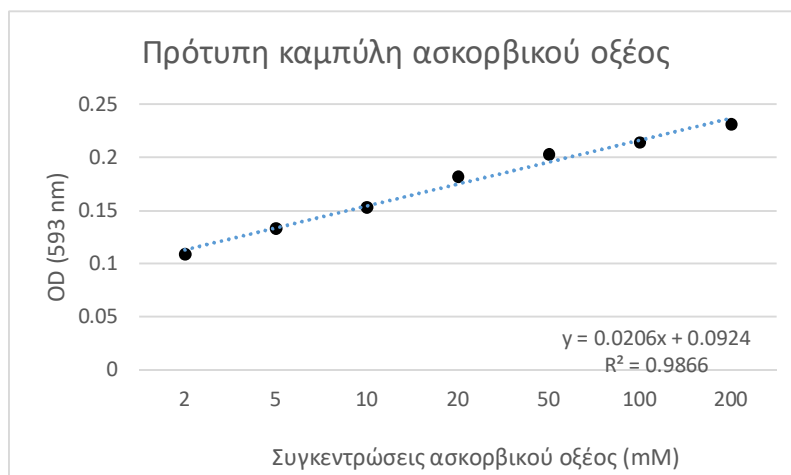
Το διάλυμα που χρησιμοποιείται για τη δοκιμή FRAP, συντίθεται από τα τρία παρακάτω χημικά αντιδραστήρια A,B,Γ σε αναλογία 10:1:1 και διατηρείται σε θερμοκρασία 37°C για 2 ώρες.

- A: 300mM CH<sub>3</sub>COONa\*3H<sub>2</sub>O
- B: 10mM TPTZ [2,4,6-Tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine]
- Γ: 20mM FeCl<sub>3</sub>\*6H<sub>2</sub>O

Εκχυλίσματα από τη βιομάζα των μικροφυκών προκύπτουν με προσθήκη 10 mg λυοφιλιωμένης βιομάζας σε 700 μL γλυκερόλη + 300 μL ddH<sub>2</sub>O. Ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά στο σκοτάδι, καλή ανάδευση και εκ νέου επώαση για 15 λεπτά στο σκοτάδι.

Για την πραγματοποίηση της μέτρησης, σε κυψελίδα φωτομέτρησης προστίθενται 2 mL από το παραπάνω διάλυμα και 10 μL εκχυλίσματος. Γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 530 nm, στο σπεκτροφωτόμετρο Hitachi U-1100. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 4 λεπτά και δεύτερη μέτρηση της απορρόφησης στο ίδιο μήκος κύματος.

Για την ποσοτικοποίηση του ολικού οξειδωτικού δυναμικού δημιουργήθηκε πρότυπη καμπύλη με τη μέτρηση της απορρόφησης στα 593 nm για διαλύματα ασκορβικού οξέος γνωστών συγκεντρώσεων (Εικόνα 2.5).



Εικόνα 2.5 Πρότυπη καμπύλη ασκορβικού οξέος

## 2.10 Αέρια χρωματογραφία – φασματοσκοπία μάζας (GC-MS)

Η αέρια χρωματογραφία – φασματοσκοπία μάζας (GC-MS) είναι τεχνική που αξιοποιείται στον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό πτητικών και ήμι-πτητικών οργανικών ενώσεων σε ποικίλα δείγματα. Στην πραγματικότητα πρόκειται για το συνδυασμό δύο διαφορετικών τεχνικών. Η αέρια χρωματογραφία (GC) διαχωρίζει αποδοτικά πολλές πτητικές και ημι-πτητικές ενώσεις χωρίς να μπορεί πάντα να τις ανιχνεύει επιτυχώς. Από την άλλη, η φασματοσκοπία μάζας (MS) εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανίχνευση των διαφορετικών ενώσεων χωρίς να μπορεί πάντα να τις διαχωρίζει. Από κοινού αέρια χρωματογραφία και φασματοσκοπία μάζας συμπληρώνουν η μία την άλλη και οδηγούν σε όριο ανίχνευσης μιας ένωσης μικρότερο του ng. Για την πραγματοποίηση της τα δείγματα πρέπει να βρίσκονται υπό τη μορφή διαλύματος και η ανάλυση-διαχωρισμός τους ξεκινά πρώτα από τον αέριο χρωματογράφο (Sneddon J. et al. 2007).

Η GC-MS χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση πρωτογενών μεταβολιτών σε δείγματα εργαστηριακής προέλευσης, για την ταυτοποίηση ενεργών ενώσεων για φαρμακευτικά σκευάσματα αλλά και για την ανάλυση δειγμάτων νερού, εδάφους κτλ.

### 2.10.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Η προετοιμασία των δειγμάτων για την αέρια χρωματογραφία γίνεται σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

- 1) τα δείγματα υπό μορφή λυοφιλιωμένης βιομάζας έρχονται σε θερμοκρασία δωματίου
- 2) ζυγίζονται 50 mg δείγματος και μεταφέρονται σε ήδη παγωμένο με υγρό άζωτο γουδί
- 3) καλή λειοτρίβηση του δείγματος παρουσία υγρού αζώτου μέχρι να πάρει μορφή πούδρας
- 4) διαλυτοποίηση του δείγματος σε 400  $\mu\text{L}$  extraction buffer
- 5) μεταφορά σε Eppendorf, vortex
- 6) επώαση στους 70  $^{\circ}\text{C}$  για 15 λεπτά με διαδοχική ήπια ανάδευση
- 7) προσθήκη 200  $\mu\text{L}$  χλωροφόρμιο, vortex

- 8) επώαση στους 37 °C για 5 λεπτά με ανάδευση
- 9) προσθήκη 400 µL ddH<sub>2</sub>O, vortex
- 10) φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 11) μεταφορά 100 µL σε καινούριο Eppendorf
- 12) εξάτμιση των δειγμάτων με αέριο άζωτο
- 13) αποθήκευση στους -80 °C

Το extraction buffer αποτελείται από 9,875 mL μεθανόλης και 0,125 mL διαλύματος ρεβιτόλης.

Το διάλυμα ρεβιτόλης αποτελείται από 10 mg ρεβιτόλης διαλυμένο σε 1 mL ddH<sub>2</sub>O.

### 2.10.2 Πτητικοποίηση

Για την πτητικοποίηση των εξατμισμένων δειγμάτων ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

- προσθήκη 25 µL MOX\* σε κάθε δείγμα
- επώαση στους 30 °C για 90 λεπτά, με διαδοχική ανάδευση
- φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 30 δευτερόλεπτα
- προσθήκη 75 µL MSTFA\*\*
- επώαση στους 37 °C για 30 λεπτά
- φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 2 λεπτά

\*Methoxylamine hydrochloride, 98+%, Alfa Aesar, A19188

\*\* MSTFA, Macherey-Nagel, 701270.201

Το υπερκείμενο μεταφέρεται στα κατάλληλα φυαλίδια, κλείνεται αεροστεγώς και μετά την παραμονή του σε ηρεμία για 2 ώρες αναλύεται στον αέριο χρωματογράφο. Χρησιμοποιήθηκε ο αέριος χρωματογράφος Agilent 7890A σε συνδυασμό με φασματογράφο μάζας Agilent 5973C. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο. Ο διαχωρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε στήλη HP-5MS (30 m, 0.25 mm ID, πάχος φιλμ: 0.25 µm, Agilent).

### 2.10.3 Ανάλυση

Η ανάλυση των χρωματογραφημάτων που προέκυψαν πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό AMDIS (Automated Mass spectral Deconvolution and Identification System, version 2.71) του NIST (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA). Για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών αξιοποιήθηκαν οι βιβλιοθήκες FiehnLab και Golm με βάση την ομοιότητα των φασμάτων μαζών και το χρόνο έκλουσης από την στήλη χρωματογραφίας.

Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές του εμβαδού κορυφής κάθε μεταβολίτη. Η κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε ως προς την τιμή της ρεβιτόλης που χρησιμοποιήθηκε σαν μεταβολίτης αναφοράς και ως προς το βάρος κάθε δείγματος. Επίσης, πραγματοποιήθηκε πολυμεταβλητή ανάλυση με τη μέθοδο PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis) μέσω της επέκτασης του Excel Multibase 2015.



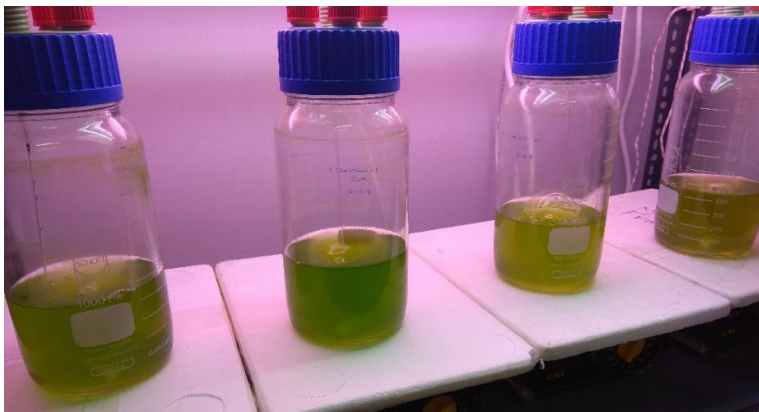
## Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα

### 3.1 Οξειδωτική καταπόνηση σε καλλιέργειες *C. reinhardtii*

Σε καλλιέργειες του στελέχους αγρίου τύπου και του μεταλλάγματος (LMJ.RY0402, knock-out για την SBP) του *C. reinhardtii* που βρίσκονταν στην εκθετική φάση ανάπτυξης έγινε προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων υπεροξειδίου. Χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 0 mM (καλλιέργειες ελέγχου), 2 mM, 5 mM και 7 mM και μελετήθηκε η απόκριση των κυττάρων σε κάθε μεταχείριση 1 ώρα, 6 ώρες και 12 ώρες μετά την προσθήκη του υπεροξειδίου.

#### 3.1.1 Στέλεχος αγρίου τύπου

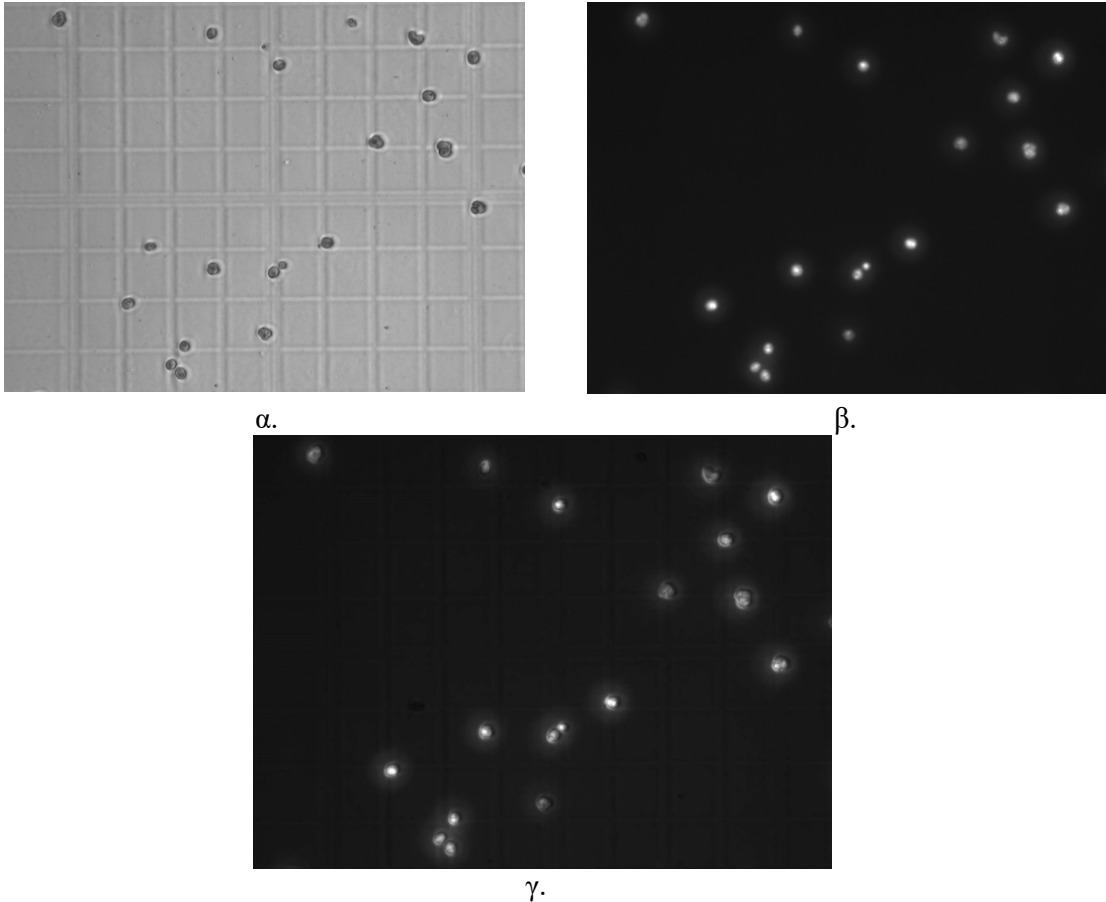
Η επίδραση του υπεροξειδίου γινόταν εμφανής μακροσκοπικά. Οι καλλιέργειες που εκτέθηκαν σε 5 mM και 7 mM υπεροξειδίου αποχρωματίζονταν σαν συνέπεια της παρουσίας του. Αντιθέτως οι καλλιέργειες που αναπτύσσονταν παρουσία συγκέντρωσης 2 mM εμφάνιζαν πράσινο χρώμα, εντονότερο από αυτό των καλλιεργειών ελέγχου (Εικόνα 3.1).



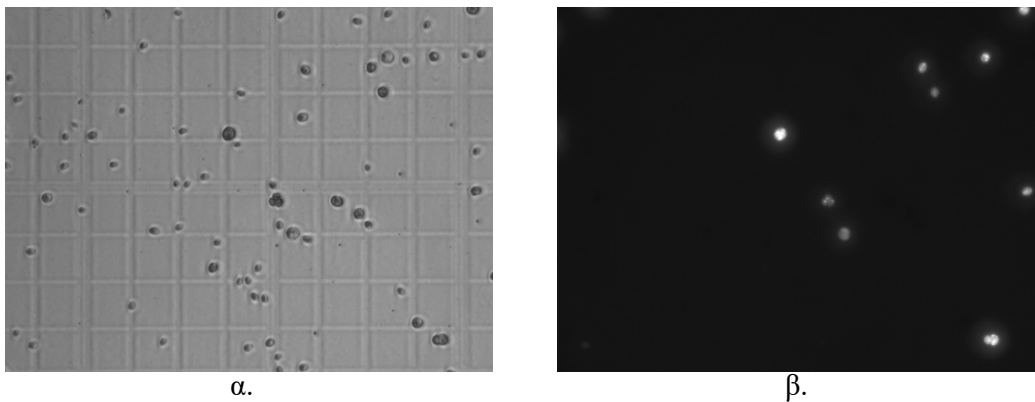
Εικόνα 3.1 Καλλιέργειες στελέχους αγρίου τύπου που έχουν εκτεθεί σε 0 mM, 2 mM, 5 mM και 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> αντίστοιχα, για 12 ώρες

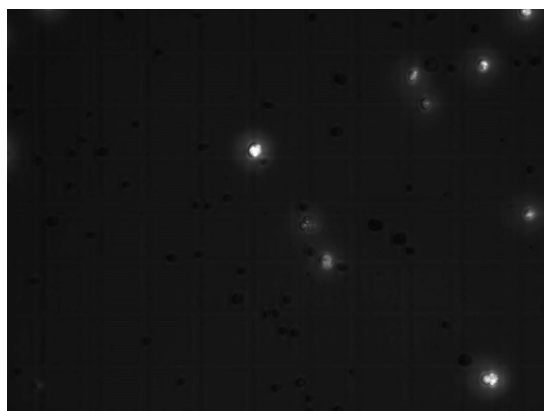
Ακολούθως, ποσοτικοποιήθηκε η επιβίωση των κυττάρων μέσω της παρατήρησης σε οπτικό μικροσκόπιο με φίλτρο UV, μετά από χρώση τους με φθορίζουσα χρωστική ζωτικότητας (FDA) και τοποθέτησης σε πλάκα Neubauer. Λήψη

φωτογραφιών του ίδιου οπτικού πεδίου με ορατό φως και φίλτρο UV, σε κάθε καλλιέργεια και κάθε χρονική στιγμή, επέτρεψε τη συγκριτική μελέτη συνολικών και ζωντανών κυττάρων, τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και των υπολογισμό του ποσοστού επιβίωσης σε κάθε καλλιέργεια.



Εικόνα 3.2 Φωτογραφίες του ίδιου οπτικού πεδίου από οπτικό μικροσκόπιο φθορισμού με χρήση φακού 20x. Δείγμα καλλιέργειας ελέγχου. α.ορατό φως, β. φίλτρο UV όπου διακρίνονται να φθορίζουν τα ζωντανά κύτταρα, γ. επικάλυψη των 2 φωτογραφιών όπου διακρίνονται ζωντανά και νεκρά κύτταρα





γ.

Εικόνα 3.3 Φωτογραφίες του ίδιου οπτικού πεδίου από μικροσκόπιο φθορισμού με χρήση φακού 20x. Δείγμα καλλιέργειας μετά από 12 ώρες έκθεσης σε 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. α.ορατό φως, β. φίλτρο UV όπου διακρίνονται να φθορίζουν τα ζωντανά κύτταρα, γ. επικάλυψη των 2 φωτογραφιών όπου διακρίνονται ζωντανά και νεκρά κύτταρα

Ο αριθμός των μεταβολικά ενεργών κυττάρων που παρατηρούνταν στο μικροσκόπιο μειωνόταν σημαντικά με την πάροδο του χρόνου και την αύξηση της συγκέντρωσης (Εικόνα 3.2, Εικόνα 3.3).

Από τις μετρήσεις του συνολικού αριθμού των κυττάρων σε κάθε καλλιέργεια, την κάθε χρονική στιγμή υπολογίστηκε το ποσοστό ανάπτυξης κάθε μίας. Οι καλλιέργειες που εκτέθηκαν σε 0 mM, 2 mM και 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> δεν έδειξαν να επηρεάζονται σημαντικά σε αντίθεση με εκείνες στις οποίες χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ο πολλαπλασιασμός των οποίων ανακόπηκε (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1 Ποσοστό ανάπτυξης (%) των καλλιεργειών

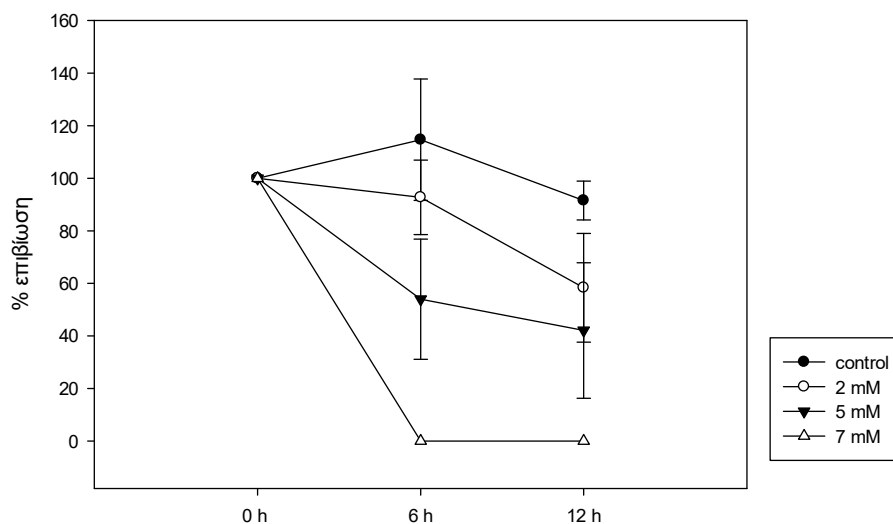
	0 mM	2 mM	5 mM	7 mM
0 ώρες	100	100	100	100
6 ώρες	114,868	132,8119	130,2522	85,98268
12 ώρες	121,8755	128,4968	127,4043	92,16495

Συγκρίνοντας τον αριθμό των συνολικών κυττάρων κάθε καλλιέργειας με αυτόν των μεταβολικά ενεργών υπολογίστηκε το ποσοστό επιβίωσης σε κάθε καλλιέργεια (Πίνακας 3.2). Τις υψηλότερες τιμές εμφάνισαν οι καλλιέργειες ελέγχου ενώ η συγκέντρωση 7 mM οδηγούσε σε νέκρωση του συνόλου των κυττάρων μέσα σε λιγότερο από 6 ώρες. Η έκθεση σε 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> φάνηκε να μην επιδρά ιδιαίτερα στην

επιβίωση των κυττάρων άμεσα (ως 6 ώρες μετά την προσθήκη) αλλά με τη συνέχιση της καταπόνησης τα ποσοστά επιβίωσης μειώνονταν σημαντικά. Η συγκέντρωση 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> είχε άμεση και σταθερή επίδραση στην επιβίωση των κυττάρων μειώνοντας τη κατά σχεδόν 50% (Πίνακας 3.2, Εικόνα 3.4).

Πίνακας 3.2 Ποσοστό επιβίωσης (%) των καλλιιεργειών

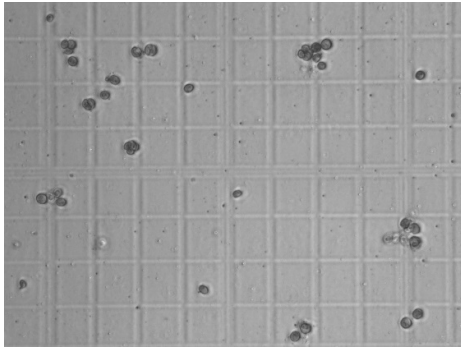
	control	2 mM	5 mM	7 mM
0 ώρες	100	100	100	100
6 ώρες	114,681	92,742	53,99247	0
12 ώρες	91,55541	58,33862	42,09971	0



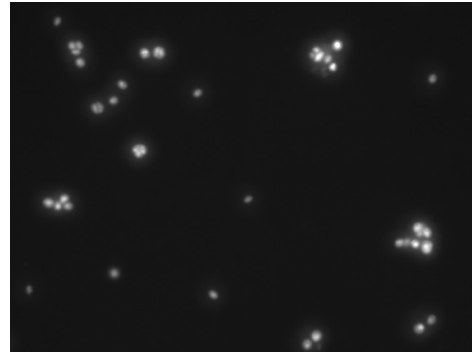
Εικόνα 3.4 Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού επιβίωσης των καλλιιεργειών του στελέχους αγρίου τύπου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 3.1.2 Μετάλλαγμα

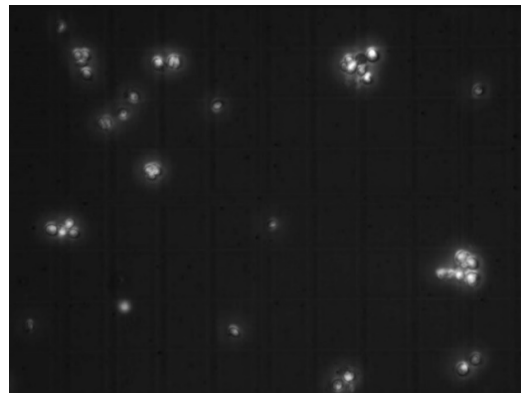
Παρόμοια προσέγγιση μελέτης με το στέλεχος αγρίου τύπου ακολουθήθηκε και για το μετάλλαγμα. Φωτογραφίες του ίδιου οπτικού πεδίου με ορατό φως και φίλτρο UV, σε κάθε καλλιέργεια και κάθε χρονική στιγμή, επέτρεψαν τη συγκριτική μελέτη συνολικών και ζωντανών κυττάρων, τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και των υπολογισμό του ποσοστού επιβίωσης σε κάθε καλλιέργεια.



α.



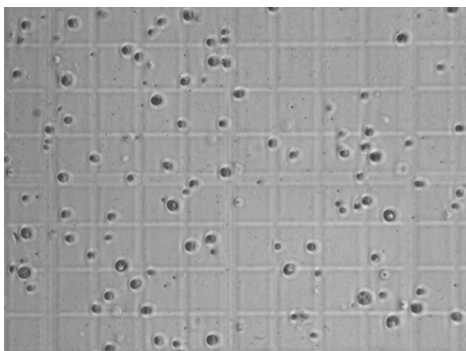
β.



γ.

Εικόνα 3.5 Φωτογραφίες του ίδιου οπτικού πεδίου από οπτικό μικροσκόπιο φθορισμού με χρήση φακού 20x. Δείγμα καλλιέργειας ελέγχου. α.ορατό φως, β. φίλτρο UV όπου διακρίνονται να φθορίζουν τα ζωντανά κύτταρα, γ. επικάλυψη των 2 φωτογραφιών όπου διακρίνονται ζωντανά και νεκρά κύτταρα

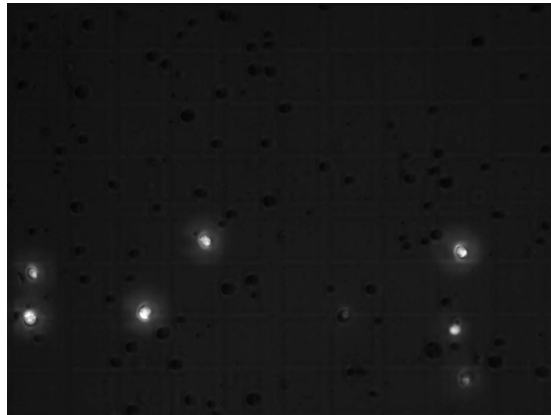
Ο αριθμός των μεταβολικά ενεργών κυττάρων που παρατηρούνταν στο μικροσκόπιο μειωνόταν σημαντικά με την πάροδο του χρόνου και την αύξηση της συγκέντρωσης (Εικόνα 3.5, Εικόνα 3.6).



α.



β.



γ.

Εικόνα 3.6 Φωτογραφίες του ίδιου οπτικού πεδίου από οπτικό μικροσκόπιο φθορισμού με χρήση φακού 20x. Δείγμα καλλιέργειας μετά από 12 ώρες έκθεσης σε 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. α.ορατό φως, β. φίλτρο UV όπου διακρίνονται να φθορίζουν τα ζωντανά κύτταρα, γ. επικάλυψη των 2 φωτογραφιών όπου διακρίνονται ζωντανά και νεκρά κύτταρα

Από τις μετρήσεις του συνολικού αριθμού των κυττάρων σε κάθε καλλιέργεια, την κάθε χρονική στιγμή υπολογίστηκε το ποσοστό ανάπτυξης κάθε μίας. Οι καλλιέργειες που εκτέθηκαν σε όλες τις συγκεντρώσεις H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> δεν έδειξαν να επηρεάζονται σημαντικά (Πίνακας 3.3).

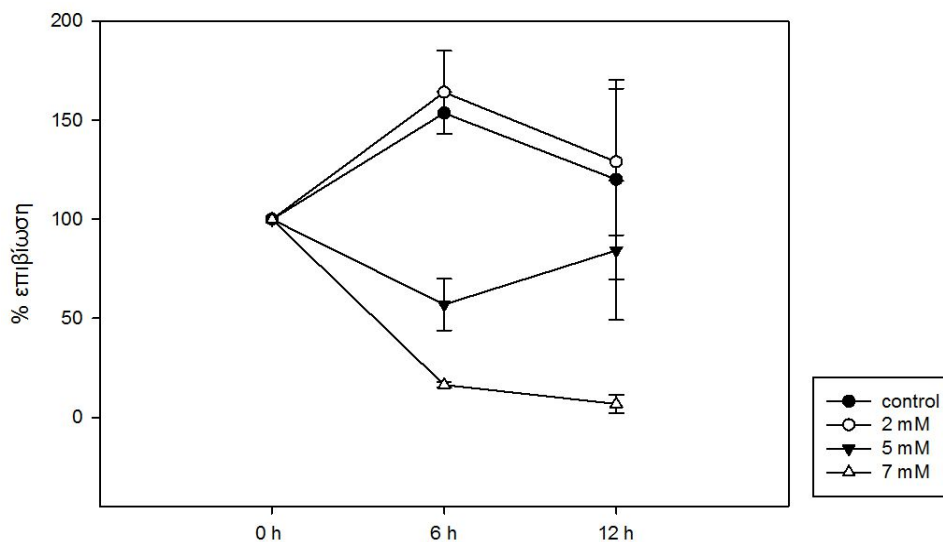
Πίνακας 3.3 Ποσοστό ανάπτυξης (%) των καλλιεργειών

	0 mM	2 mM	5 mM	7 mM
0 ώρες	100	100	100	100
6 ώρες	124,452	119,3161	102,1291	134,9374
12 ώρες	111,8018	127,7731	109,4576	112,5725

Συγκρίνοντας τον αριθμό των συνολικών κυττάρων κάθε καλλιέργειας με αυτόν των μεταβολικά ενεργών υπολογίστηκε το ποσοστό επιβίωσης σε κάθε καλλιέργεια (Πίνακας 3.4). Οι καλλιέργειες που εκτέθηκαν σε 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> εμφάνισαν υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης από τις καλλιέργειες ελέγχου τόσο 6 ώρες όσο και 12 ώρες μετά την προσθήκη του. Οι συγκεντρώσεις 5 mM και 7 mM είχαν σαν αποτέλεσμα την έντονη μείωση της επιβίωσης των κυττάρων στις καλλιέργειες (Πίνακας 3.4, Εικόνα 3.7).

Πίνακας 3.4 Ποσοστό επιβίωσης (%) των καλλιιεργειών

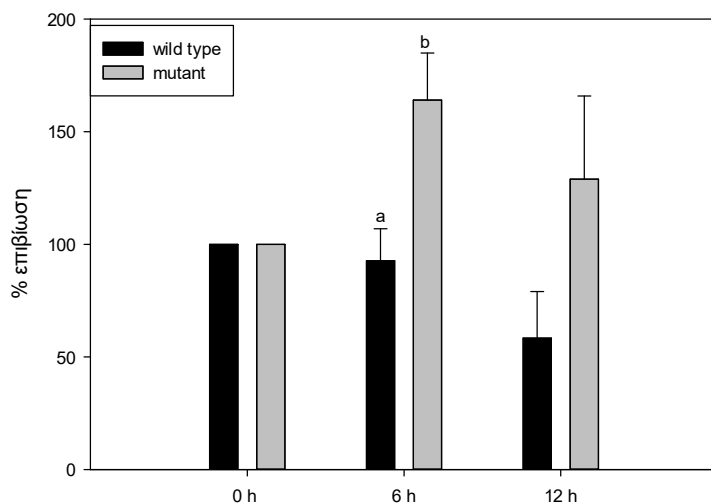
	0 mM	2 mM	5 mM	7 mM
0 ώρες	100	100	100	100
6 ώρες	151,231	164,0551	56,92536	16,38387
12 ώρες	107,7288	122,2838	84,25901	6,786001



Εικόνα 3.7 Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού επιβίωσης των καλλιιεργειών του μεταλλαγμένου στελέχους παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 3.1.3 Σύγκριση

Οι παραπάνω παρατηρήσεις καθιστούν χρήσιμη μια άμεση σύγκριση μεταξύ των δύο στελεχών. Συνολικά, για όλες τις συγκεντρώσεις το μεταλλαγμένο στέλεχος εμφανίζει υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης από το φυσικού τύπου. Ιδιαίτερα, στη συγκέντρωση 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> παρατηρείται πως το μετάλλαγμα εμφανίζει πολύ υψηλότερη επιβίωση, με τη συνολική διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική, σύμφωνα με την ανάλυση διακύμανσης (one way ANOVA) που πραγματοποιήθηκε (Εικόνα 3.8).



Εικόνα 3.8 Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού επιβίωσης των καλλιιεργειών του στελέχους αγρίου τύπου και του μεταλλάγματος παρουσία 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 3.2 Ολικό αντιοξειδωτικό δυναμικό (μέθοδος FRAP)

Υγρές καλλιέργειες του *C. reinhardtii*, τόσο του στελέχους αγρίου τύπου όσο και του μεταλλάγματος, εκτέθηκαν σε οξειδωτική καταπόνηση επαγόμενη από διαφορετικές συγκεντρώσεις H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Δείγματα ξηρής βιομάζας λήφθηκαν σε τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές, 1 ώρα, 6 και 12 ώρες μετά την προσθήκη του υπεροξειδίου. Στα εκχυλίσματα που προέκυψαν έγινε ποσοτικοποίηση του ολικού οξειδωτικού δυναμικού τους με τη μέθοδο FRAP.

Στα δείγματα των καλλιιεργειών ελέγχου, και για τις τρεις χρονικές στιγμές, το στέλεχος αγρίου τύπου εμφάνισε σταθερά υψηλότερο οξειδωτικό δυναμικό από το μεταλλαγμένο στέλεχος (Εικόνα 3.9α, Πίνακας 3.5). Οι καλλιιεργειες και των δύο στελεχών που εκτέθηκαν σε 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> είχαν ιδιαίτερα παραπλήσιες τιμές οξειδωτικού δυναμικού. Εξάιρεση αποτελεί η σημαντική αύξηση του δυναμικού στα δείγματα μεταλλάγματος που εκτέθηκαν για 12 ώρες σε αυτή τη συγκέντρωση υπεροξειδίου (Εικόνα 3.9β, Πίνακας 3.5).

Για τις καλλιιεργειες των δύο στελεχών που εκτέθηκαν σε 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> το ολικό οξειδωτικό δυναμικό εμφανίζει κοινό μοτίβο αυξομειώσεων. Μία ώρα μετά την προσθήκη του παράγοντα καταπόνησης το δυναμικό είναι υψηλότερο από αυτό των καλλιιεργειών ελέγχου ενώ για τις υπόλοιπες χρονικές στιγμές κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με αυτές (Εικόνα 3.9γ, Πίνακας 3.6). Τέλος, οι καλλιιεργειες αγρίου τύπου που



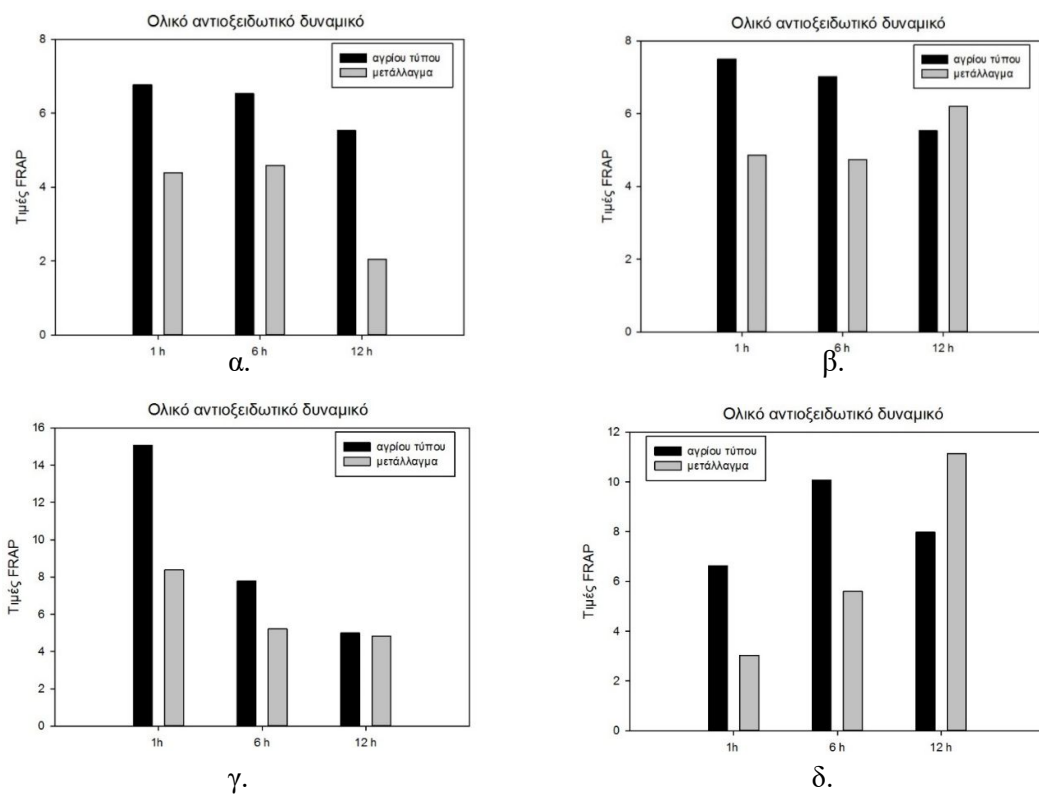
εκτέθηκαν σε 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> εμφανίζουν μια μικρή αύξηση στις τιμές του ολικού οξειδωτικού δυναμικού τους ενώ από τις καλλιέργειες του μεταλλάγματος σημαντική αύξηση εμφάνισαν εκείνες που εκτέθηκαν σε αυτή τη συγκέντρωση για 12 ώρες (Εικόνα 3.9δ, Πίνακας 3.6).

Πίνακας 3.5 Τιμές ολικού οξειδωτικού δυναμικού (FRAP values)

	Καλλιέργειες ελέγχου			2 mM		
	1 ώρα	6 ώρες	12 ώρες	1 ώρα	6 ώρες	12 ώρες
αγρίου τύπου	6,776699	6,533981	5,538835	7,504854	7,019417	5,538835
μετάλλαγμα	4,398058	4,592233	2,043689	4,859223	4,737864	6,194175

Πίνακας 3.6 Τιμές ολικού οξειδωτικού δυναμικού (FRAP values)

	5 mM			7 mM		
	1 ώρα	6 ώρες	12 ώρες	1 ώρα	6 ώρες	12 ώρες
αγρίου τύπου	15,0534	7,796117	5,004854	6,631068	10,07767	7,990291
μετάλλαγμα	8,378641	5,223301	4,834951	3,038835	5,61165	11,14563



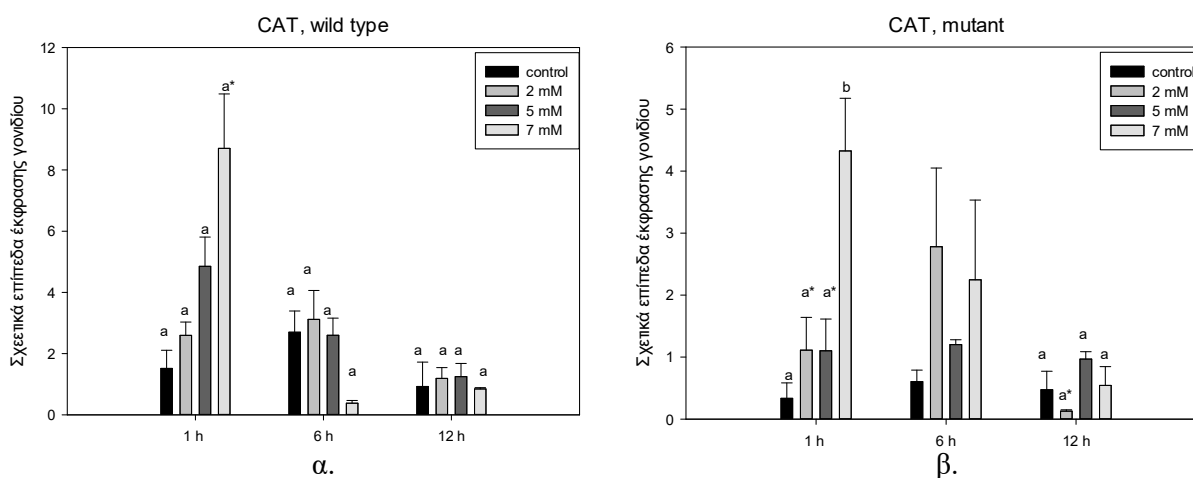
Εικόνα 3.9 Ολικό αντιοξειδωτικό δυναμικό καλλιεργειών μετά από έκθεση σε: α. 0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (καλλιέργειες ελέγχου), β. 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, γ. 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, δ. 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 3.3 Σχετική έκφραση γονιδίων (RT-qPCR)

Η μελέτη της έκφρασης γονιδίων πραγματοποιήθηκε σε δείγματα cDNA που παρασκευάστηκαν από RNA καλλιιεργειών του μικροφύκου *C. reinhardtii*. Οι καλλιιεργειες, τόσο του φυσικού στελέχους όσο και του knock-out για την SBP μεταλλάγματος, εκτέθηκαν για χρονικά διαστήματα 1 ώρας, 6 και 12 ωρών σε 0 mM, 2 mM, 5 mM και 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα γονίδια που μελετήθηκαν επιλέχθηκαν με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη περιλαμβάνει γονίδια που σχετίζονται άμεσα με την οξειδωτική καταπόνηση και η δεύτερη γονίδια που αλληλεπιδρούν με την SBP. Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε κάθε φορά σύγκριση με τις αντίστοιχες καλλιιεργειες ελέγχου του ίδιου στελέχους στον ίδιο χειρισμό.

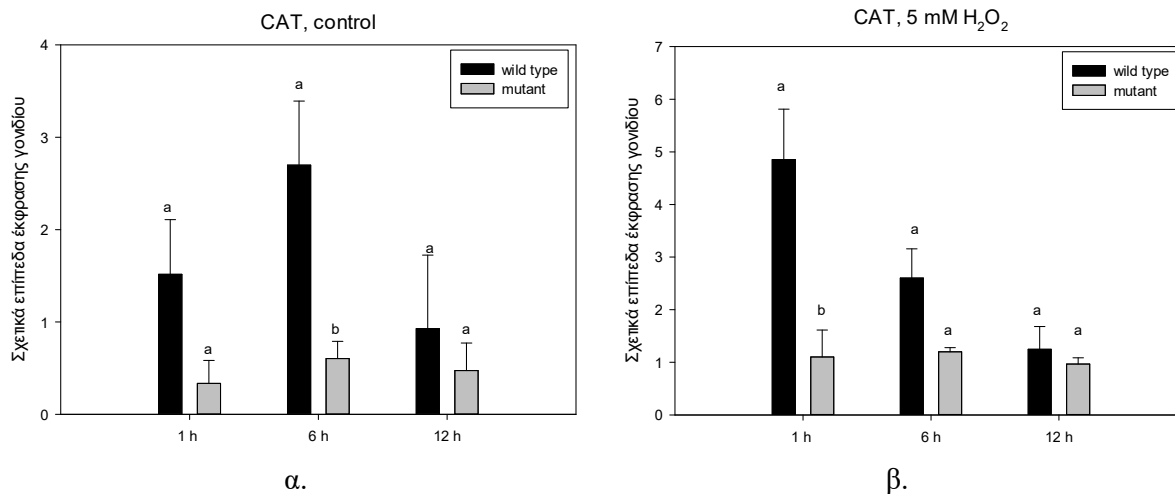
#### 3.3.1 Γονίδια σχετιζόμενα με την οξειδωτική καταπόνηση

Τα επίπεδα έκφρασης της καταλάσης (CAT) εμφανίζουν ανοδική τάση παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και στα δύο στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν. Μάλιστα ήδη από την πρώτη ώρα έκθεσης στην καταπόνηση δημιουργούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις καλλιιεργειες ελέγχου και σε αυτές που εκτέθηκαν σε 7 mM υπεροξειδίου (Εικόνα 3.10). Επίσης, στατιστικά σημαντικές διαφορές υπάρχουν ανάμεσα στα δύο στελέχη, με το μετάλλαγμα να εμφανίζει σταθερά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου (Εικόνα 3.11, Παράρτημα 6).



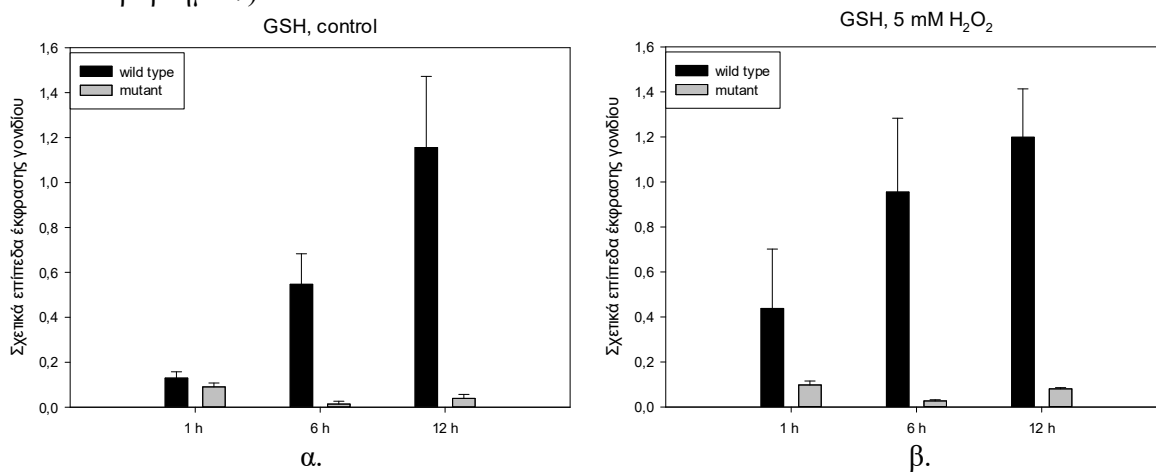
Εικόνα 3.10 Επίδραση της οξειδωτικής καταπόνησης με διαφορετικές συγκεντρώσεις H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου σε καλλιιεργειες στελεχών *C. reinhardtii* α. αγρίου τύπου, β. μεταλλάγματος. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό

σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.



Εικόνα 3.11 Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου CAT σε καλλιέργειες *C. reinhardtii* αγρίου τύπου και μεταλλάγατος που εκτέθηκαν στους ίδιους χειρισμούς α. καλλιέργειες ελέγχου, β. 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.

Παρομοίως, η έκφραση της γλουταθειόνης (GSH) επάγεται παρουσία οξειδωτικής καταπόνησης, καθώς οι καλλιέργειες ελέγχου εμφανίζουν σταθερά τις χαμηλότερες τιμές. Γενικά το μετάλλαγμα κινείται σε πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης ενώ το στέλεχος φυσικού τύπου εμφανίζει σταθερά υψηλότερες τιμές (Εικόνα 3.12, Παράρτημα 7).



Εικόνα 3.12 Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου GSH σε καλλιέργειες *C. reinhardtii* αγρίου τύπου και μεταλλάγατος που εκτέθηκαν στους ίδιους χειρισμούς

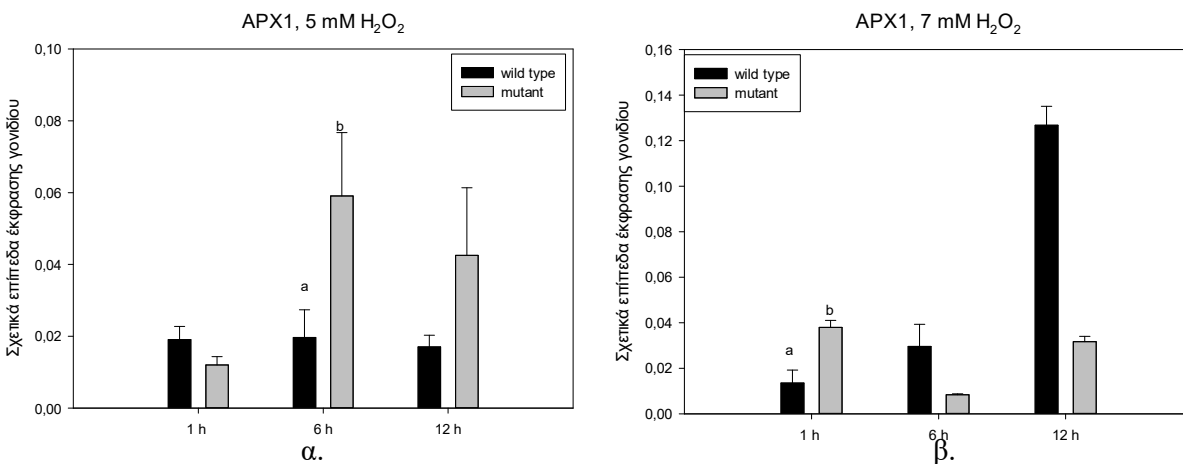
α. καλλιέργειες ελέγχου, β. 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.

Για την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX5) παρατηρείται αύξηση των επιπέδων έκφρασης της στις καλλιέργειες που εκτέθηκαν σε κάποια συγκέντρωση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ωστόσο, η αύξηση αυτή συμβαίνει μετά την πάροδο τουλάχιστον μίας ώρας από την έκθεση στην καταπόνηση. Στις καλλιέργειες ελέγχου το στέλεχος φυσικού τύπου εμφανίζει χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης συγκρινόμενο με το μετάλλαγμα. Η τάση αυτή αντιστρέφεται σε όλες τις καλλιέργειες που εκτέθηκαν σε υπεροξειδίο, με το μετάλλαγμα να εμφανίζει μικρότερο αριθμό μεταγράφων του GPX5. Παρ' όλα αυτά, στη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με one way ANOVA δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Παράρτημα 8).

Τα επίπεδα έκφρασης της θειορεδοξίνης (TRXh1) αυξάνονται παρουσία οξειδωτικής καταπόνησης και στα δύο στελέχη. Στο φυσικό στέλεχος μάλιστα, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις καλλιέργειες ελέγχου και σε αυτές που εκτέθηκαν σε υπεροξειδίο για μία ώρα. Επίσης, γίνεται εμφανές από τα συγκριτικά διαγράμματα ότι τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου είναι σταθερά υψηλότερα στο μεταλλαγμένο στέλεχος (Παράρτημα 9).

Τα γονίδια LHCB7 (πρωτεΐνη σχετιζόμενη με το φωτοσύστημα II, (Peers and Niyogi, 2008)), GRX4 (γλουταρεδοξίνη) και MBS (πρωτεΐνη που αποτελεί δείκτη για την οξειδωτική καταπόνηση στο *Arabidopsis thaliana*, (Shao et al. 2013)) δεν έδειξαν να έχουν κάποιο ιδιαίτερο μοτίβο έκφρασης σε σχέση με την οξειδωτική καταπόνηση για τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν. Γενικά τα επίπεδα έκφρασης τους παρουσίαζαν τάση για αύξηση, απαιτούσαν όμως την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων υπεροξειδίου για αρκετές ώρες (Παράρτημα 10, 11 και 12).

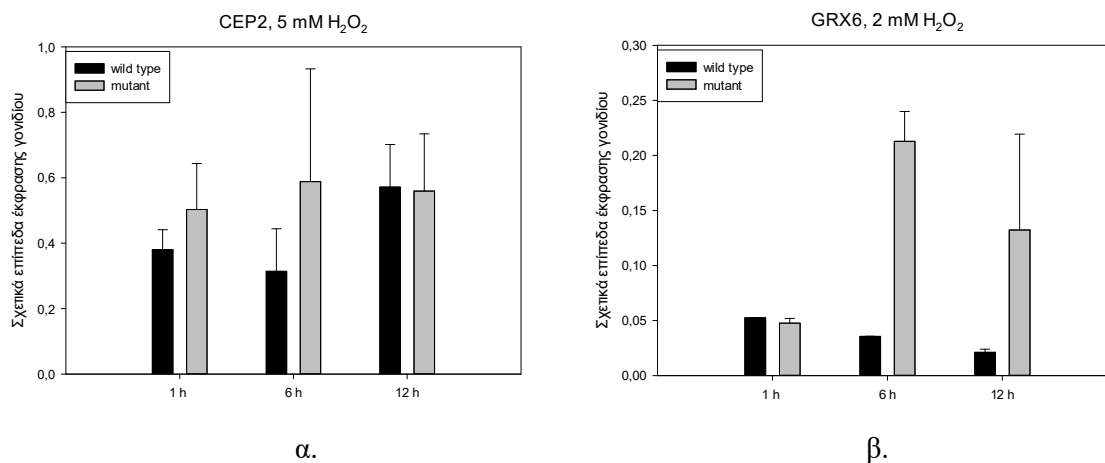
Η έκφραση του γονιδίου APX1 επάγεται παρουσία οξειδωτικής καταπόνησης και στα δύο στελέχη. Μάλιστα υπάρχουν και στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε δείγματα που εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου. Στις 6 ώρες μετά την προσθήκη 5 mM και 1 ώρα μετά την προσθήκη 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> το στέλεχος αγρίου τύπου εμφανίζει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου σε σχέση με το μεταλλαγμένο στέλεχος, με τη διαφορά ανάμεσα τους να είναι στατιστικά σημαντική (Εικόνα 3.13, Παράρτημα 13).

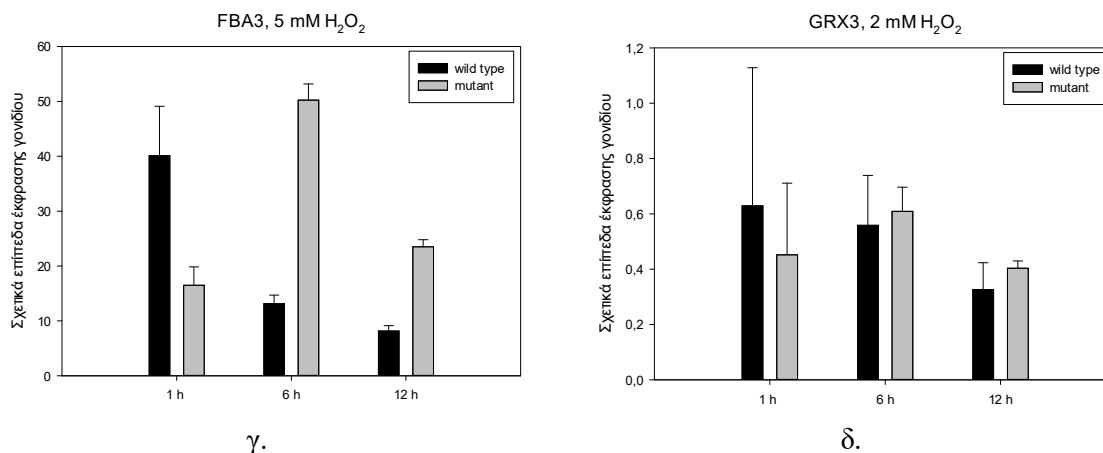


Εικόνα 3.13 Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου APX1 σε καλλιέργειες *C. reinhardtii* αγρίου τύπου και μεταλλάγματος που εκτέθηκαν στους ίδιους χειρισμούς α. 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, β. 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.

### 3.3.2 Γονίδια που αλληλεπιδρούν με την SBP

Συνολικά μελετήθηκαν τέσσερα γονίδια που αλληλεπιδρούν με την SBP, τα CEP2, GRX6, FBA3 και GRX3. Συγκεκριμένοι χειρισμοί είχαν σαν αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων έκφρασης τους χωρίς ωστόσο να υπάρχει κάποια σταθερή τάση που να μπορεί να συσχετιστεί με την οξειδωτική καταπόνηση (Παράρτημα 14, 15, 16 και 17). Κοινό γνώρισμα της έκφρασης των παραπάνω γονιδίων αποτελεί η παρουσία υψηλότερων τιμών στις καλλιέργειες του μεταλλάγματος που εκτέθηκαν σε 2 mM και 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε σχέση με τις αντίστοιχες καλλιέργειες του στελέχους φυσικού τύπου (Εικόνα 3.14).





Εικόνα 3.14 Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων α. CEP2, β. GRX6, γ. FBA3, δ. GRX3 σε καλλιέργειες *C. reinhardtii* αγρίου τύπου και μεταλλάγματος που εκτέθηκαν σε χειρισμούς με 2 mM ή 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.

### 3.4 Μεταβολικό προφίλ (GC-MS)

Με την πραγματοποίηση αέριας χρωματογραφίας – φασματοσκοπίας μάζας προσδιορίστηκε το μεταβολικό προφίλ του *C. reinhardtii*, τόσο του στελέχους φυσικού τύπου όσο και του μεταλλάγματος για την SBP. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ξηρή βιομάζα από καλλιέργειες των δύο στελεχών που εκτέθηκαν για χρονικά διαστήματα 1 ώρας, 6 και 12 ωρών σε 0 mM, 2 mM, 5 mM και 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Συνολικά ταυτοποιήθηκαν 164 μεταβολίτες του *C. reinhardtii* που περιλαμβάνουν αμινοξέα, σάκχαρα, αζωτούχες ενώσεις, οργανικά οξέα κ.α. (Πίνακας 3.7). Ακολούθησε συγκριτική μελέτη τους ανάμεσα στα διαφορετικά στελέχη και τους διαφορετικούς χειρισμούς με PLS-DA ανάλυση.

Πίνακας 3.7 Μεταβολίτες του *C. reinhardtii* που ταυτοποιήθηκαν με αέρια χρωματογραφία – φασματοσκοπία μάζας













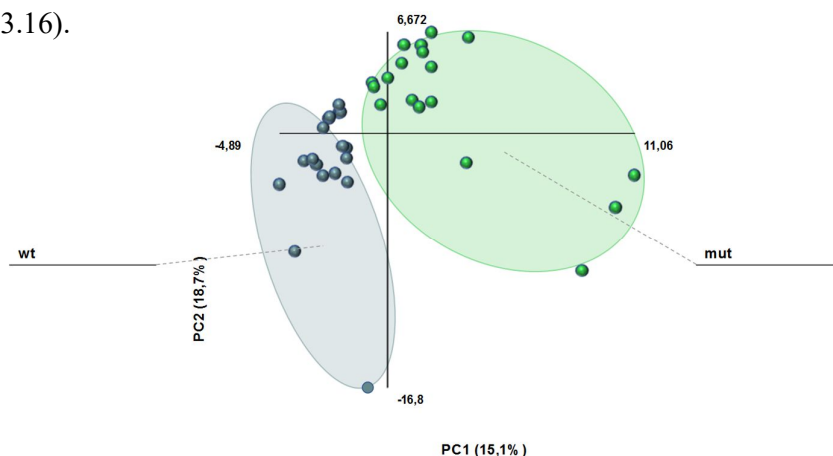




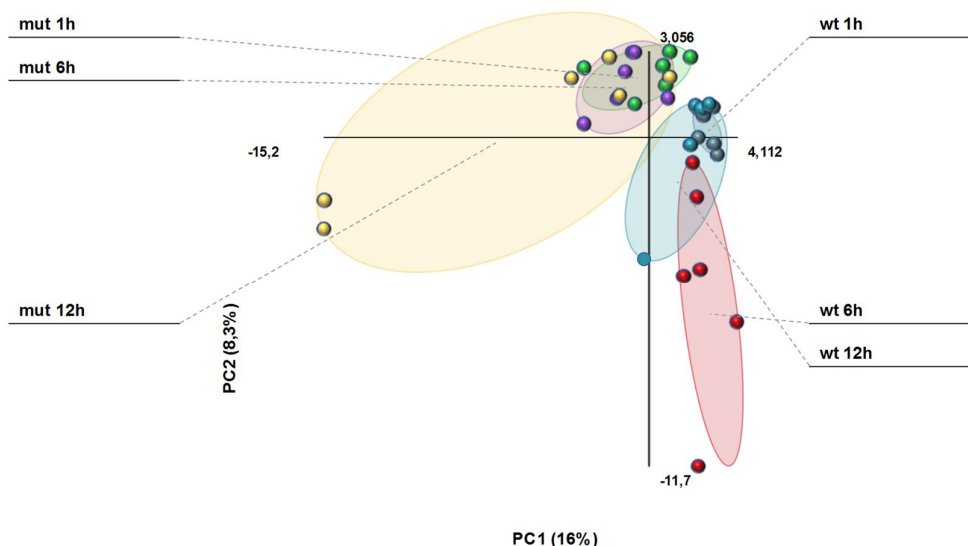


### 3.4.1 Συγκριτική μελέτη των δύο στελεχών

Από τη σύγκριση των μεταβολικών προφίλ του στελέχους φυσικού τύπου και του μεταλλάγματος, υπό φυσιολογικές συνθήκες (απουσία οξειδωτικής καταπόνησης), προέκυψε σαφής διάκριση ανάμεσα τους (Εικόνα 3.15). Σε δείγματα που λήφθηκαν συγκεκριμένες χρονικές στιγμές, με διαφορά 6 ωρών μεταξύ τους, διακρίνεται μια ελαφριά μεταβολή του μεταβολισμού των κυττάρων με την πάροδο του χρόνου. Και πάλι όμως, το σύνολο των μεταβολιτών που παράγει κάθε στέλεχος είναι διαφορετικό (Εικόνα 3.16).

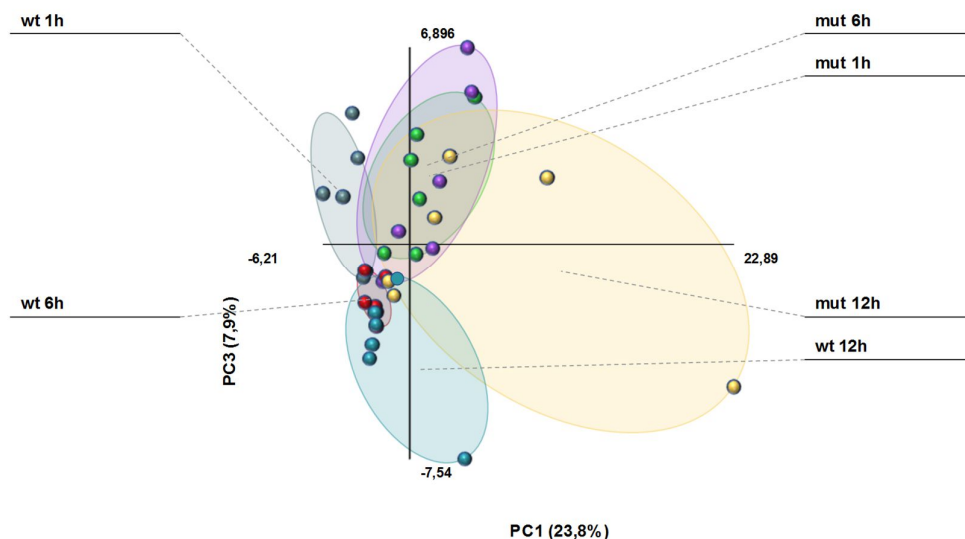


Εικόνα 3.15 Συγκριτική απεικόνιση του μεταβολικού προφίλ των στελεχών φυσικού τύπου και μεταλλάγματος, όταν αυτά δεν έχουν εκτεθεί σε οξειδωτική καταπόνηση.



Εικόνα 3.16 Συγκριτική απεικόνιση του μεταβολικού προφίλ των στελεχών φυσικού τύπου και μεταλλάγματος, όταν αυτά δεν έχουν εκτεθεί σε οξειδωτική καταπόνηση. Διακρίνονται οι διαφορετικές χρονικές στιγμές δειγματοληψίας.

Σε συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης (5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) η διάκριση ανάμεσα στα μεταβολικά προφίλ των δύο στελεχών σε μεγάλο ποσοστό παραμένει. Ωστόσο υπάρχουν αρκετοί μεταβολίτες που παράγονται τόσο από το μετάλλαγμα όσο και από το φυσικό στέλεχος προκειμένου να συμβάλλουν στην αντιμετώπιση του παράγοντα καταπόνησης (Εικόνα 3.17).



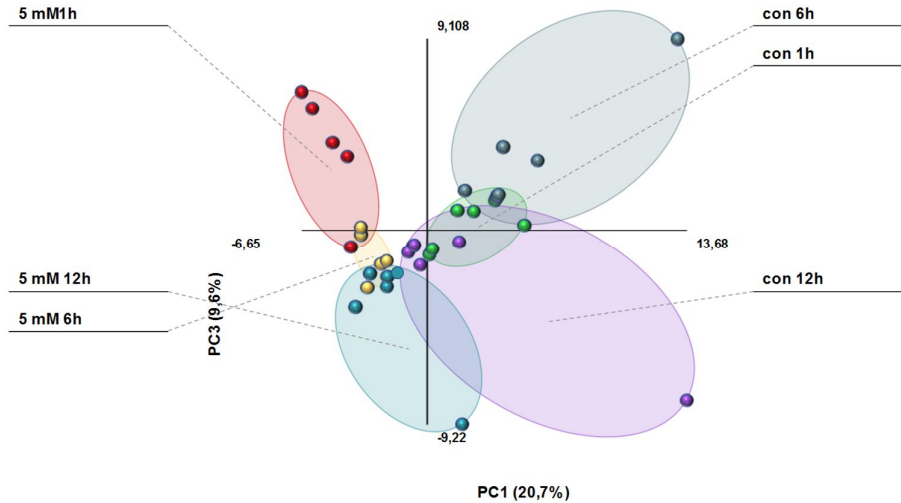
Εικόνα 3.17 Συγκριτική απεικόνιση του μεταβολικού προφίλ των στελεχών φυσικού τύπου και μεταλλάγματος, μετά από έκθεση σε 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Διακρίνονται οι διαφορετικές χρονικές στιγμές δειγματοληψίας.

### 3.4.2 Επίδραση οξειδωτικής καταπόνησης

Προκειμένου να γίνει αντιληπτή η πιθανή επίδραση της οξειδωτικής καταπόνησης στο μεταβολικό προφίλ του μικροφύκου *C. reinhardtii* έγινε σύγκριση των μεταβολιτών που αυτό παράγει παρουσία και απουσία υπεροξειδίου.

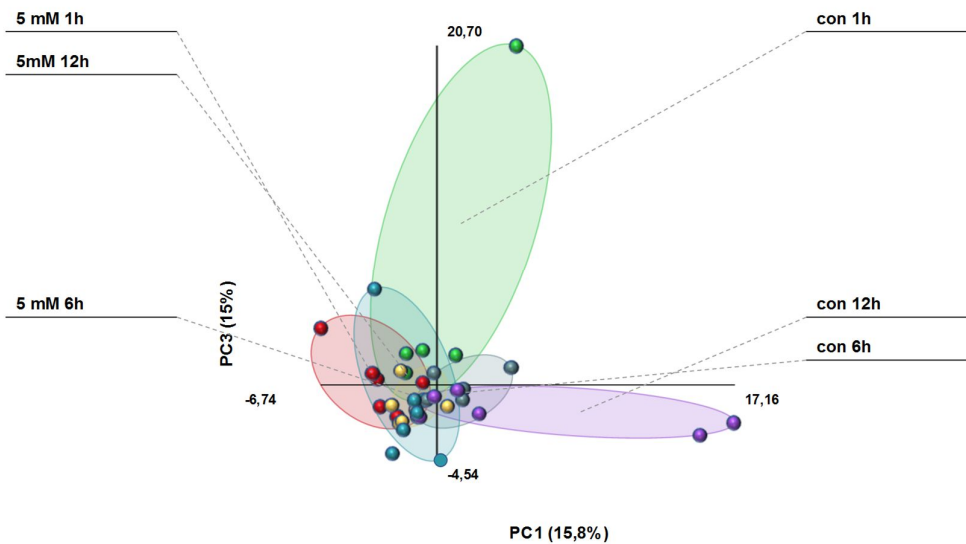
Αρχικά μελετήθηκαν οι μεταβολίτες που παράγει το στέλεχος φυσικού τύπου. Το μεταβολικό προφίλ των καλλιιεργειών ελέγχου διαφοροποιείται αισθητά από αυτό των καλλιιεργειών που αναπτύχθηκαν παρουσία 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Κοινοί μεταβολίτες εμφανίζονται στις καλλιέργειες που αντιμετώπισαν την οξειδωτική καταπόνηση για μεγάλο χρονικό διάστημα (6 και 12 ώρες) δείχνοντας την προσαρμογή των κυττάρων σε αυτή (Εικόνα 3.18).





Εικόνα 3.18 Συγκριτική απεικόνιση του μεταβολικού προφίλ καλλιεργείων του στελέχους φυσικού τύπου, απουσία (control) και παρουσία (5 mM) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Διακρίνονται οι διαφορετικές χρονικές στιγμές δειγματοληψίας.

Για το μεταλλαγμένο για την SBP στέλεχος ακολουθήθηκε συνολικά η ίδια διαδικασία. Ωστόσο, δεν εντοπίζεται σαφής διαφορά ανάμεσα στο μεταβολικό προφίλ των καλλιεργείων ελέγχου και σε αυτών που αναπτύχθηκαν παρουσία 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Εικόνα 3.19).



Εικόνα 3.19 Συγκριτική απεικόνιση του μεταβολικού προφίλ καλλιεργείων του μεταλλάγματος, απουσία (control) και παρουσία (5 mM) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Διακρίνονται οι διαφορετικές χρονικές στιγμές δειγματοληψίας.

## **Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα**

### **4.1 Οξειδωτική καταπόνηση σε καλλιέργειες *C. reinhardtii***

Η επίδραση της καταπόνησης με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε καλλιέργειες του στελέχους αγρίου τύπου του *Chlamydomonas reinhardtii* ήταν εμφανής. Όσο οι συγκεντρώσεις και ο χρόνος έκθεσης σε αυτές αυξάνονταν, η επιβίωση των κυττάρων μειωνόταν. Ωστόσο, το μικροφύκος φάνηκε όχι απλά να μπορεί να διαχειρίζεται επιτυχώς συγκέντρωση της τάξης των 2 mM για χρονικό διάστημα 6 ωρών, αλλά και να αυξάνει τα ποσοστά επιβίωσης του υπό αυτές τις συνθήκες.

Ο προσδιορισμός του ρυθμού ανάπτυξης κάθε καλλιέργειας δεν έδωσε ιδιαίτερες πληροφορίες, στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία. Αυτό οφείλεται αφ' ενός στα σύντομα χρονικά διαστήματα ανάμεσα στις μετρήσεις (λίγες ώρες) και αφ' ετέρου στις ιδιότητες του υπό μελέτη μικροφύκου. Πρόκειται για ευκαρυωτικό οργανισμό που δεν πολλαπλασιάζεται σημαντικά μέσα σε 12 ώρες, ενώ διαθέτει και ισχυρά κυτταρικά τοιχώματα, οπότε ακόμα και νέκρωση του κυττάρου δεν γίνεται εύκολα αντιληπτή στο οπτικό μικροσκόπιο άμεσα.

Στο μεταλλαγμένο για την SBP στέλεχος, τα ποσοστά επιβίωσης παρουσία οξειδωτικής καταπόνησης ήταν γενικά υψηλότερα από ότι στο στέλεχος αγρίου τύπου. Μάλιστα μετά από έκθεση σε 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για 6 ώρες οι πιθανότητες επιβίωσης ήταν μεγαλύτερες ακόμα και από τις καλλιέργειες ελέγχου. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η SBP διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην αντίδραση των κυττάρων στην οξειδωτική καταπόνηση. Επίσης, χαμηλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου για λίγες ώρες έδειξαν να ευνοούν την ανάπτυξη των καλλιεργειών.

### **4.2 Ολικό αντιοξειδωτικό δυναμικό (μέθοδος FRAP)**

Οι μετρήσεις του ολικού αντιοξειδωτικού δυναμικού για τις καλλιέργειες ελέγχου των δύο στελεχών αναδεικνύουν διαφορά ανάμεσα τους. Το στέλεχος αγρίου τύπου διαθέτει συνολικά υψηλότερο δυναμικό. Επιπλέον, μετά από έκθεση σε 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> οι καλλιέργειες του μεταλλάγματος πολλαπλασιάζουν το ολικό δυναμικό τους δείχνοντας και πάλι τη σημασία του συγκεκριμένου χειρισμού. Γενικά, παρουσία

οξειδωτικής καταπόνησης οι καλλιέργειες αυξάνουν την παραγωγή αντιοξειδωτικών, χωρίς ωστόσο να μπορούν να διατηρήσουν αυτήν την παραγωγή για μεγάλο χρονικό διάστημα.

### 4.3 Σχετική έκφραση γονιδίων (RT-qPCR)

#### 4.3.1 Γονίδια σχετιζόμενα με την οξειδωτική καταπόνηση

Για τα γονίδια που κωδικοποιούν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα καταλάση (CAT) και γλουταθειόνη (GSH) η αύξηση των επιπέδων έκφρασης σαν απόκριση στην οξειδωτική καταπόνηση ήταν αναμενόμενη (Blaby et al., 2015). Ενδιαφέρον εμφανίζει ωστόσο η στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης ανάμεσα στα δύο στελέχη, καθώς οι τιμές στο στέλεχος αγρίου τύπου είναι αισθητά υψηλότερες από τις αντίστοιχες στο μετάλλαγμα.

Ένα ακόμα γονίδιο-δείκτης της παρουσίας οξειδωτικής καταπόνησης επαγόμενης από  $H_2O_2$  είναι η ασκορβική περοξειδάση (APX1, Baruah et al. 2009). Τόσο στην υπάρχουσα βιβλιογραφία (Shao et al. 2013) όσο και στην παρούσα εργασία η έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου επάγεται παρουσία οξειδωτικής καταπόνησης. Μάλιστα, αν και τα επίπεδα έκφρασης του *apx1* αυξάνονται και στα δύο στελέχη, το φυσικό στέλεχος εμφανίζει υψηλότερες τιμές από τις αντίστοιχες του μεταλλάγματος, με τη διαφορά μεταξύ τους να είναι στατιστικά σημαντική.

Παρατηρείται ένα κοινό μοτίβο έκφρασης των τριών παραπάνω γονιδίων-δεικτών για την οξειδωτική καταπόνηση. Το μεταλλαγμένο στέλεχος, που δεν εκφράζει την SBP, συνθέτει σημαντικά λιγότερα μετάγραφα τους γεγονός που υποδεικνύει πιθανή συμμετοχή της SBP στην έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων. Από την άλλη, γνωρίζουμε ότι τα γονίδια αυτά συμβάλλουν στην επιτυχή αντιμετώπιση της καταπόνησης και συνεπώς την επιβίωση των κυττάρων. Ως εκ τούτου, αναμενόμενα θα ήταν τα μικρότερα ποσοστά επιβίωσης του μεταλλάγματος, κάτι που δεν παρατηρείται. Είναι πιθανόν λοιπόν το μεταλλαγμένο στέλεχος να αντιμετωπίζει την οξειδωτική καταπόνηση με κάποιον άλλο μηχανισμό και όχι με τα συγκεκριμένα αντιοξειδωτικά ένζυμα.

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX5), σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, δεν έχει σεληνο-κυστεΐνες στην πεπτιδική της αλυσίδα και χρησιμοποιεί τη θειορεδοξίνη

(TRXh1) σαν δότη ηλεκτρονίων, αντί της γλουταθειόνης (Dayer et al. 2008, Fischer et al. 2009, Leisinger et al. 2001). Οι Blaby et al. (2015) είχαν εντοπίσει αύξηση των επιπέδων έκφρασης και των δύο γονιδίων παρουσία οξειδωτικής καταπόνησης, κάτι που παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη. Μάλιστα για το γονίδιο *trxh1* τα επίπεδα έκφρασης στο μετάλλαγμα είναι υψηλότερα σε σύγκριση με το στέλεχος φυσικού τύπου, παρατήρηση που έρχεται σε αντιδιαστολή με την σχετική έκφραση του γονιδίου *gsh*.

Επιπλέον, λόγω βιβλιογραφικών αναφορών που αναφέρουν τη συσχέτιση τους με την οξειδωτική καταπόνηση μελετήθηκαν τα γονίδια *lhcb7*, *grx4* και *mbs*. Το γονίδιο *lhcb7* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του φωτοσυστήματος II (Peers and Niyogi 2008) και η έκφραση του επάγεται παρουσία υπεροξειδίου (Blaby et al. 2015). Η GRX4 είναι μια γλουταρεδοξίνη που θεωρείται ότι συμμετέχει στην αντιμετώπιση των ROS (Blaby et al. 2015). Η MBS (Methylene Blue Sensitivity) είναι πρωτεΐνη με δομή δακτύλων ψευδαργύρου (zinc-finger motifs) που έχει μελετηθεί στο *Arabidopsis thaliana*. Συμμετέχει στην ενεργοποίηση της έκφρασης άλλων γονιδίων με αντιοξειδωτική δράση, με αποτέλεσμα παρουσία οξειδωτικής καταπόνησης να εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό και η ίδια (Shao et al. 2013). Στο *C. reinhardtii* παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης και των τριών αυτών γονιδίων, χωρίς όμως να είναι ιδιαίτερα έντονη. Πιθανά αυτό να οφείλεται στις διαφορετικές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, σε σχέση με τις βιβλιογραφικές αναφορές, καθώς και στις διαφορές ανάμεσα σε *A. thaliana* και *C. reinhardtii*.

#### 4.3.2 Γονίδια που αλληλεπιδρούν με την SBP

Οι Agalou et al. με *in vitro* και *in vivo* πειράματα που πραγματοποίησαν στο *A. thaliana* απέδειξαν πως η SBP αλληλεπιδρά με διάφορες άλλες πρωτεΐνες. Σε αυτές ανήκει η FBA, φρουκτόζη-διφωσφορική αλδολάση, μια πρωτεΐνη με σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ενέργειας αφού συμμετέχει στη γλυκόλυση, τη γλυκονεογένεση και τον κύκλο του Calvin στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς καθώς επίσης και η πεπτιδάση της κυστεΐνης (CEP) (Agalou et al. 2006).

Οι γλουταρεδοξίνες (GRXs) είναι μια οικογένεια οξειδοαναγωγασών που εξαρτώνται από τη γλουταθειόνη (GSH) ή τη θειορεδοξίνη (TRX) και συμμετέχουν

στην απόκριση των κυττάρων στην οξειδωτική καταπόνηση (Rouhier et al. 2008). Πρόσφατα ταυτοποιήθηκε πειραματικά, στο *A. thaliana*, ότι συγκεκριμένες γλουταρεδοξίνες αλληλεπιδρούν άμεσα με την SBP (Valassakis, Dervisi et al. 2019).

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω επιλέχθηκαν για μελέτη τα γονίδια του *C. reinhardtii* *fba3*, *grx3*, *grx6* και *cep2*. Από τα σχετικά επίπεδα έκφρασης τους στους διάφορους χειρισμούς δεν αποδείχθηκε κάποια άμεση συσχέτιση τους με την οξειδωτική καταπόνηση. Ωστόσο, παρουσία υπεροξειδίου το μεταλλαγμένο για την SBP στέλεχος εμφάνιζε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης και των τεσσάρων γονιδίων, συγκρινόμενο με το φυσικό στέλεχος. Αυτό θα μπορούσε να υποδηλώνει την προσπάθεια των κυττάρων να αποκαταστήσουν το κατεστραμμένο δίκτυο αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών, υπερπαραγόντας όσες διαθέτουν, αφού η SBP απουσιάζει.

Επιπλέον, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, στο *A. thaliana* η οξειδωτική καταπόνηση οδηγεί σε μείωση των επιπέδων έκφρασης της AtSBP1, γεγονός που μπορεί να καθιστά τη μειωμένη έκφραση της SBP μέρος του μηχανισμού οξειδωτικής καταπόνησης (Dervisi et al. submitted). Η παρατήρηση αυτή θα μπορούσε να εξηγήσει τη μεγαλύτερη παραγωγή των παραπάνω πρωτεϊνών στο μετάλλαγμα όπου η SBP απουσιάζει πλήρως.

#### **4.4 Μεταβολικό προφίλ (GC-MS)**

##### **4.4.1 Συγκριτική μελέτη των δύο στελεχών**

Προκειμένου να διαπιστωθεί η πιθανή επίδραση της απουσίας SBP στο μεταβολικό προφίλ του μεταλλάγματος πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη των μεταβολιτών που αυτό παράγει υπό φυσιολογικές συνθήκες, με τους αντίστοιχους μεταβολίτες που παράγει το φυσικό στέλεχος.

Απουσία οξειδωτικής καταπόνησης τα μεταβολικά προφίλ των δύο στελεχών είναι ξεκάθαρα διακριτά, παρατήρηση που υποδεικνύει τη μεγάλη επίδραση που ασκεί η έλλειψη της SBP στη συνολική λειτουργία του κυττάρου. Οι παραγόμενοι από τα κύτταρα μεταβολίτες διαφοροποιούνται ελαφρώς κατά τη διάρκεια της ημέρας, όπως είναι αναμενόμενο.

Σε συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης, επαγόμενης από 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, παρά τις διαφορές τους και τα δύο στελέχη παράγουν κάποιους κοινούς μεταβολίτες. Η παραγωγή αυτή γίνεται με στόχο την καλύτερη προσαρμογή και διαχείριση του παράγοντα καταπόνησης και την τελική επιβίωση του κυττάρου.

#### 4.4.2 Επίδραση οξειδωτικής καταπόνησης

Το μεταβολικό προφίλ του φυσικού στελέχους διαφοροποιείται αισθητά αν οι καλλιέργειες του αναπτυχθούν παρουσία ή απουσία οξειδωτικού παράγοντα. Η παρατήρηση αυτή είναι αναμενόμενη αφού ένας από τους τρόπους προσαρμογής του μικροφύκου στην παρουσία υπεροξειδίου είναι η τροποποίηση του μεταβολισμού του. Το μεταλλαγμένο στέλεχος από την άλλη δεν εμφανίζει διακριτά μεταβολικά προφίλ αν αναπτυχθεί στις αντίστοιχες συνθήκες, υποδεικνύοντας και πάλι τη σημασία της απουσίας SBP για τη συνολική λειτουργία του κυττάρου.

## Παράρτημα

Παράρτημα 1. Πληροφορίες σχετικά με το μεταλλαγμένο στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στην εργασία

Mutant strain: LMJ.RY0402.064068

### Overview

Background strain: [cMJ030](#)  
Transformation condition: [RY0402](#)  
Antibiotic resistance: resistant to paromomycin

Insertion junctions					
Insertion junction	Locus disrupted	Locus common name	Define	Feature	Confidence (%)
<a href="#">LMJ.RY0402.064068_1</a>	<a href="#">Cre03.g166050</a>	SBD1	Selenium binding protein	5'UTR	95
<a href="#">LMJ.RY0402.064068_2</a>	<a href="#">Cre03.g166050</a>	SBD1	Selenium binding protein	5'UTR	95

[https://www.chlamylibrary.org/showInsertion?insertionName=LMJ.RY0402.064068\\_1](https://www.chlamylibrary.org/showInsertion?insertionName=LMJ.RY0402.064068_1)

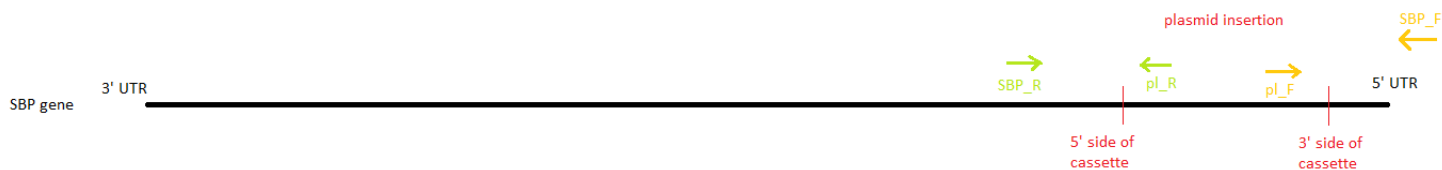
[https://www.chlamylibrary.org/showInsertion?insertionName=LMJ.RY0402.064068\\_2](https://www.chlamylibrary.org/showInsertion?insertionName=LMJ.RY0402.064068_2)

[https://phytozome.jgi.doe.gov/jbrowse/index.html?data=genomes%2FCreinhardtii&tracks=Transcripts%2CAlt\\_Transcripts%2CMutant\\_Sites&highlight=&loc=chromosome\\_3%3A3288971..3302360](https://phytozome.jgi.doe.gov/jbrowse/index.html?data=genomes%2FCreinhardtii&tracks=Transcripts%2CAlt_Transcripts%2CMutant_Sites&highlight=&loc=chromosome_3%3A3288971..3302360)

<https://www.chlamylibrary.org/files/Instructions%20on%20PCRs%20to%20check%20the%20insertion%20site.pdf>

Παράρτημα 2. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση του μεταλλάγματος

full name	tag name	sequence
Control locus Forward	con_F_C.r.	5'-ATGCTTCTCTGCATCCGTCT-3'
Control locus reverse	con_R_C.r.	5'-ATGTTTTACGTCCAGTCCGC-3'
Suggested primer 1	SBP_R_C.r.	5'-GATCAGCTGTTTGCTCACCA-3'
Suggested primer 2	SBP_F_C.r.	5'-TGCGTTGAATTGCATCTAGC-3'
5' end, plasmid reverse	pl_R_C.r.	5'-GCACCAATCATGTCAAGCCT-3'
3' end, plasmid forward	pl_F_C.r.	5'-GACGTTACAGCACACCCTTG-3'



### Παράρτημα 3. Συνθήκες πραγματοποίησης PCR

1) template (DNA)	1 $\mu$ L
2) primer F	0.7 $\mu$ L
3) primer R	0.7 $\mu$ L
4) dNTPs	0.7 $\mu$ L
5) buffer	5 $\mu$ L
6) Taq polymerase	1.5 $\mu$ L
7) ddH <sub>2</sub> O	15.4 $\mu$ L
	f.v.= 25 $\mu$ L

	Temperature °C	Time
once:	95	5 min
40 cycles:	95	30 s
	58	45 s
	72	2 min
once:	72	10 min
once:	10	$\infty$

### Παράρτημα 4. Πρωτόκολλο παρασκευής θρεπτικού TAP, για συνολικό όγκο 1 L (τελικό pH=7.0)

1M Tris base	20 mL
Phosphate Buffer II *	1.0 mL
Solution A *	10.0 mL
Hutner's trace elements *	1.0 mL
Glacial acetic acid	1.0 mL

-Phosphate Buffer II: για συνολικό όγκο 100 mL

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10.8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.6 g

-Solution A: για συνολικό όγκο 500 mL

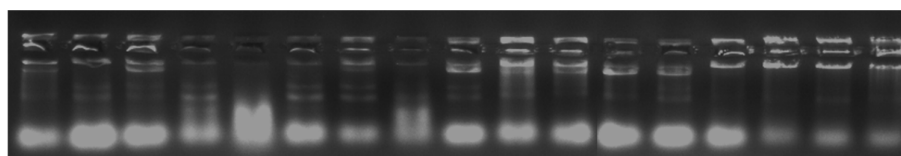
NH <sub>4</sub> Cl	20 g
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	5 g
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	2.5 g

-Hutner's trace elements: για συνολικό όγκο 1 L

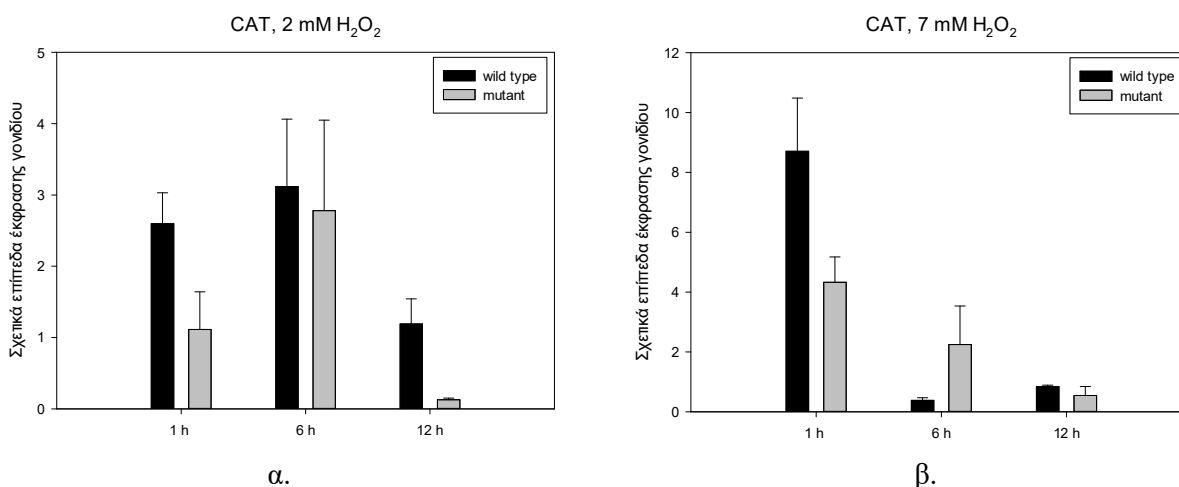
EDTA disodium salt	50 g	250 mL H <sub>2</sub> O
ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	22 g	100 mL
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11.4 g	200 mL
MnCl <sub>2</sub> * 4H <sub>2</sub> O	5.06 g	50 mL
COCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	1.61 g	50 mL
CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	1.57 g	50 mL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> *4H <sub>2</sub> O	1.10 g	50 mL
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	4.99 g	50 mL



Παράρτημα 5. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων RNA σε πήκτωμα αγαρόζης

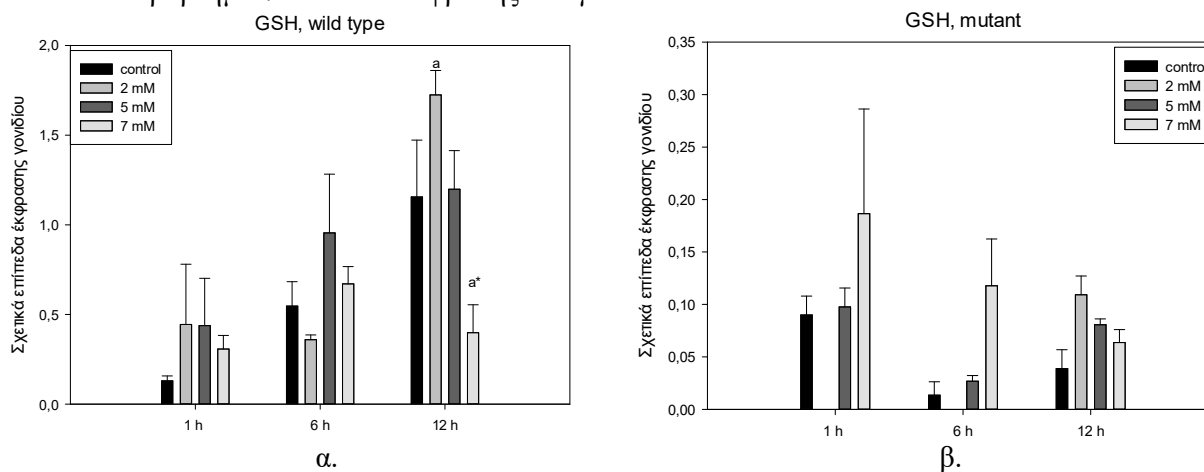


Παράρτημα 6. Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου CAT



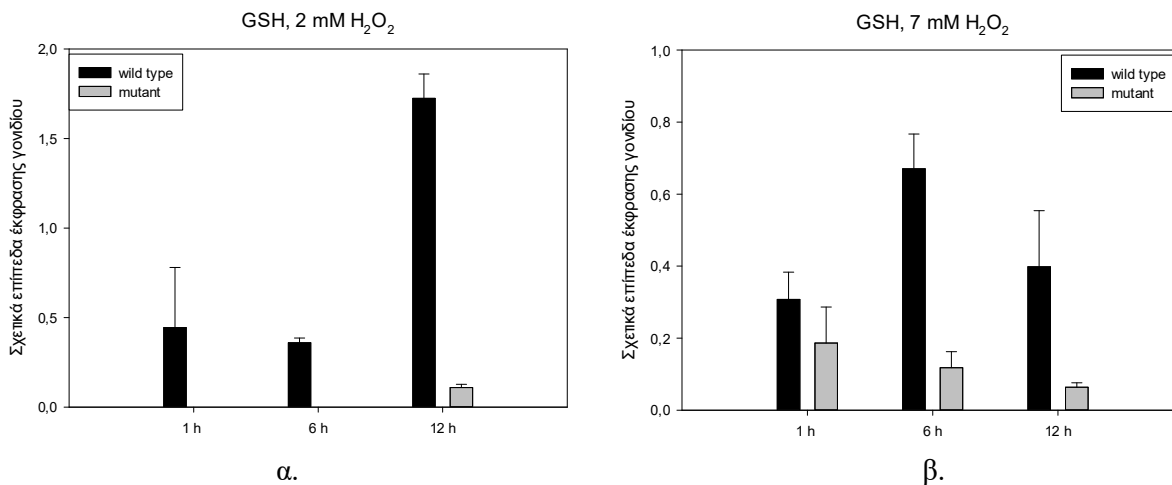
Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του CAT σε καλλιέργειες *C. reinhardtii* αγρίου τύπου και μεταλλάγματος που εκτέθηκαν στους ίδιους χειρισμούς α. 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, β. 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.

Παράρτημα 7. Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου GSH



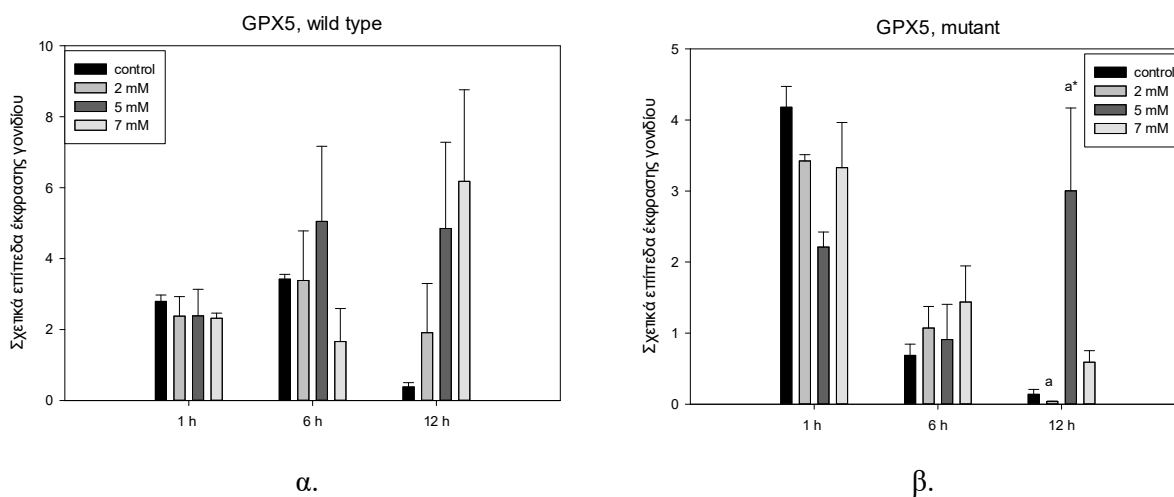
Επίδραση της οξειδωτικής καταπόνησης με διαφορετικές συγκεντρώσεις H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου σε καλλιέργειες στελεχών *C. reinhardtii* α. αγρίου τύπου, β. μεταλλάγματος. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό

σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.

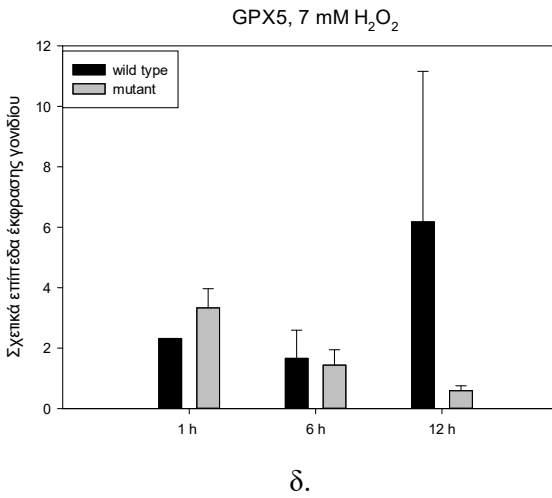
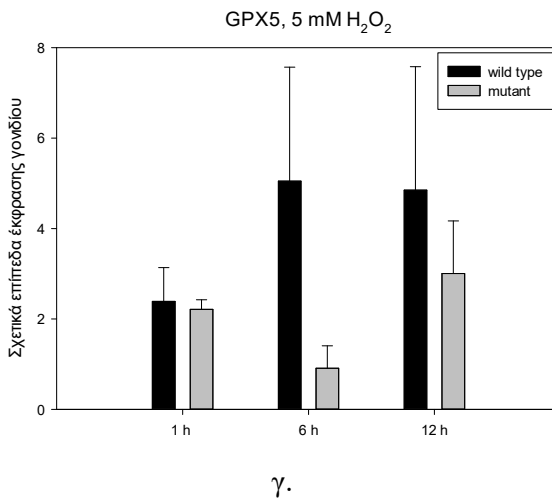
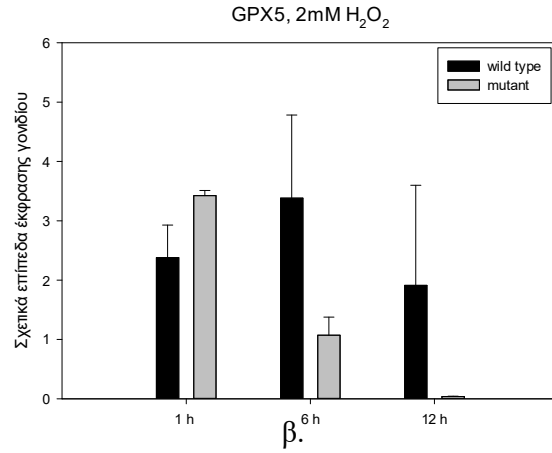
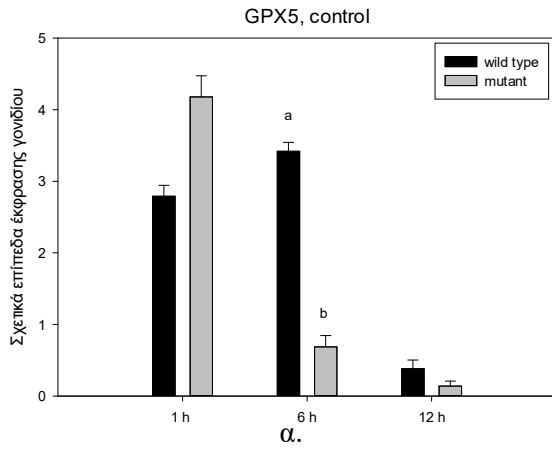


Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του GSH σε καλλιέργειες *C. reinhardtii* αγρίου τύπου και μεταλλάγματος που εκτέθηκαν στους ίδιους χειρισμούς α. 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, β. 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.

#### Παράρτημα 8. Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου GPX5

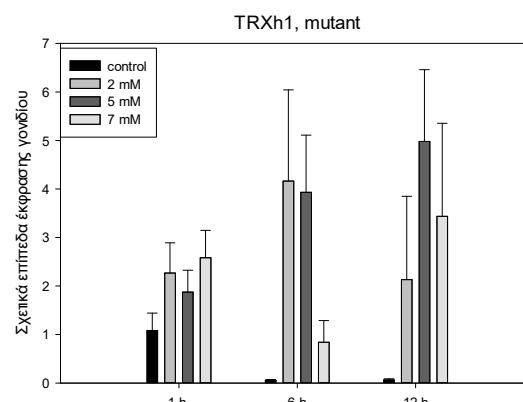
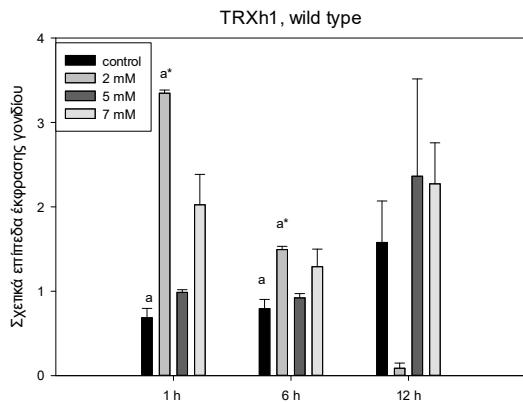


Επίδραση της οξειδωτικής καταπόνησης με διαφορετικές συγκεντρώσεις H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου σε καλλιέργειες στελεχών *C. reinhardtii* α. αγρίου τύπου, β. μεταλλάγματος. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.



Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του GPX5 σε καλλιέργειες *C. reinhardtii* αγρίου τύπου και μεταλλάγματος που εκτέθηκαν στους ίδιους χειρισμούς α. καλλιέργειες ελέγχου, β. 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, γ. 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, δ. 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.

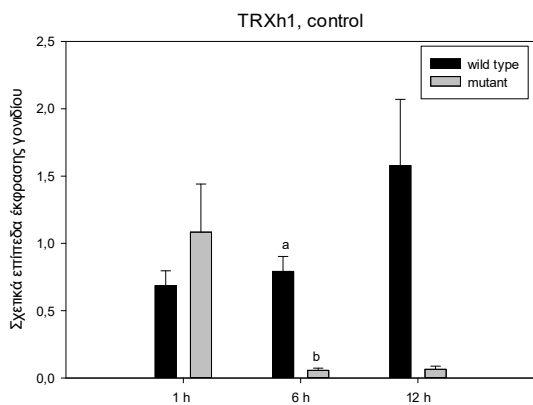
#### Παράρτημα 9. Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου TRXh1



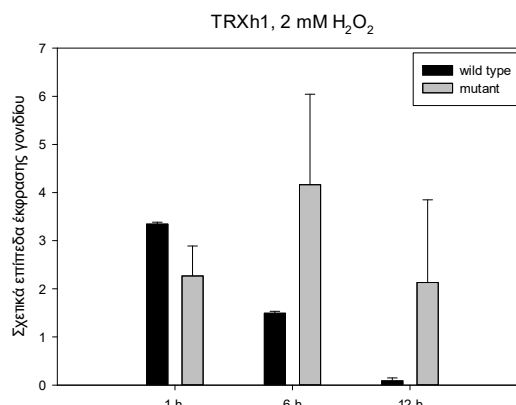
α.

β.

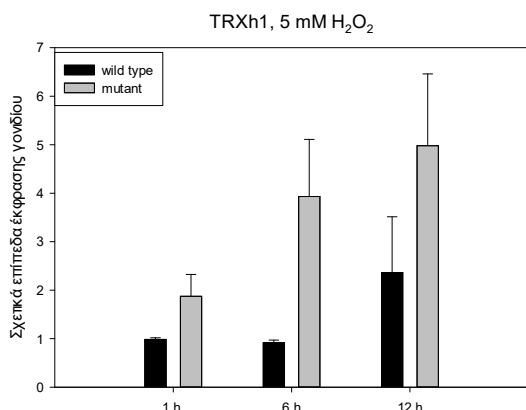
Επίδραση της οξειδωτικής καταπόνησης με διαφορετικές συγκεντρώσεις  $H_2O_2$  στα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου σε καλλιέργειες στελεχών *C. reinhardtii* α. αγρίου τύπου, β. μεταλλάγματος. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.



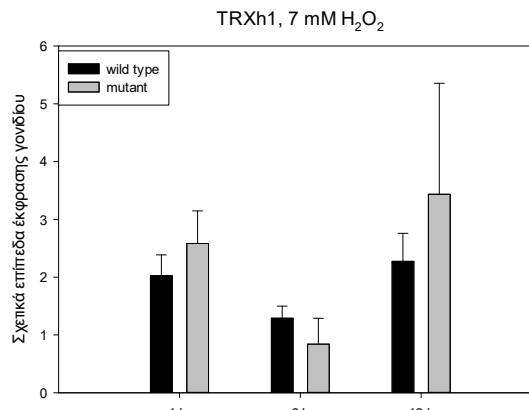
α.



β.



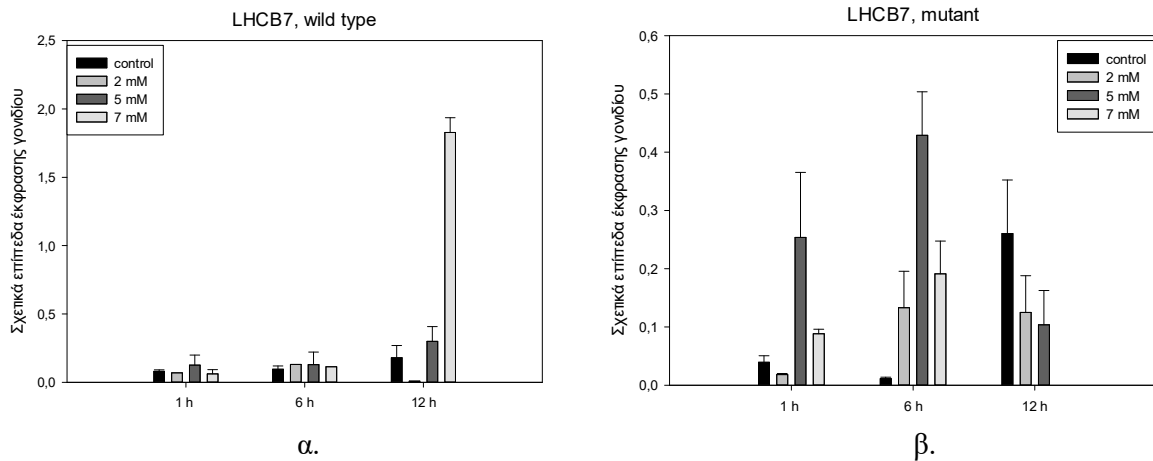
γ.



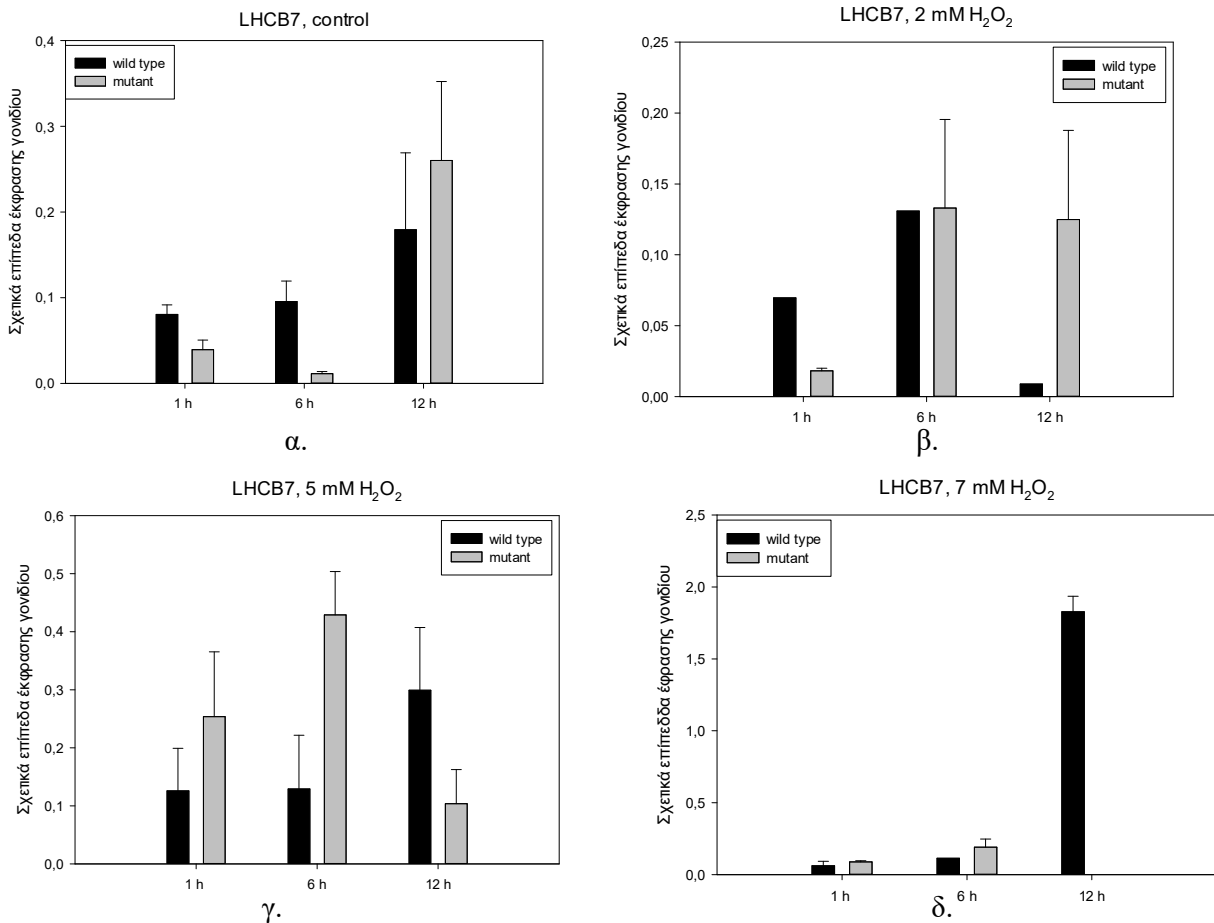
δ.

Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του TRXh1 σε καλλιέργειες *C. reinhardtii* αγρίου τύπου και μεταλλάγματος που εκτέθηκαν στους ίδιους χειρισμούς α. καλλιέργειες ελέγχου, β. 2 mM  $H_2O_2$ , γ. 5 mM  $H_2O_2$ , δ. 7 mM  $H_2O_2$ . Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.

## Παράρτημα 10. Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου LHCB7

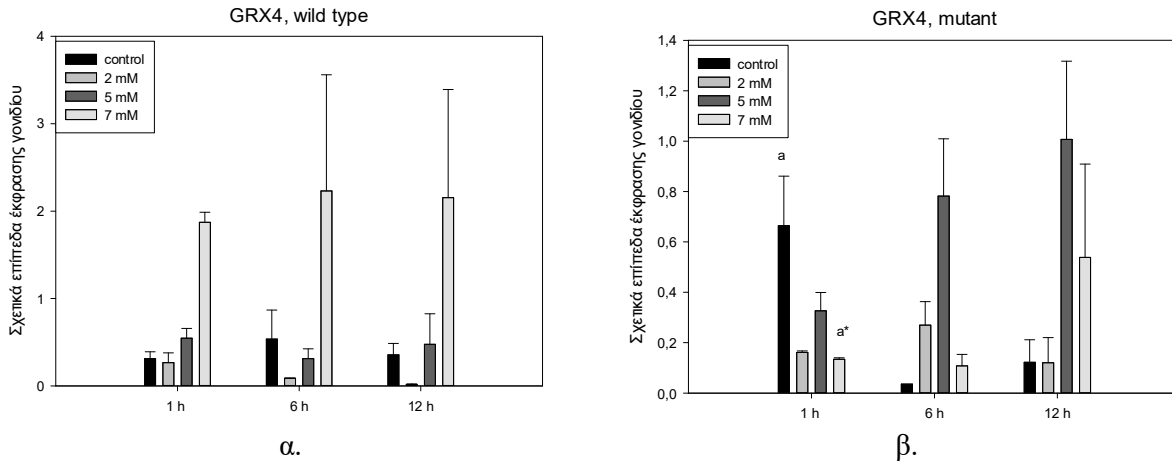


Επίδραση της οξειδωτικής καταπόνησης με διαφορετικές συγκεντρώσεις  $H_2O_2$  στα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου σε καλλιέργειες στελεχών *C. reinhardtii* α. αγρίου τύπου, β. μεταλλάγματος. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.

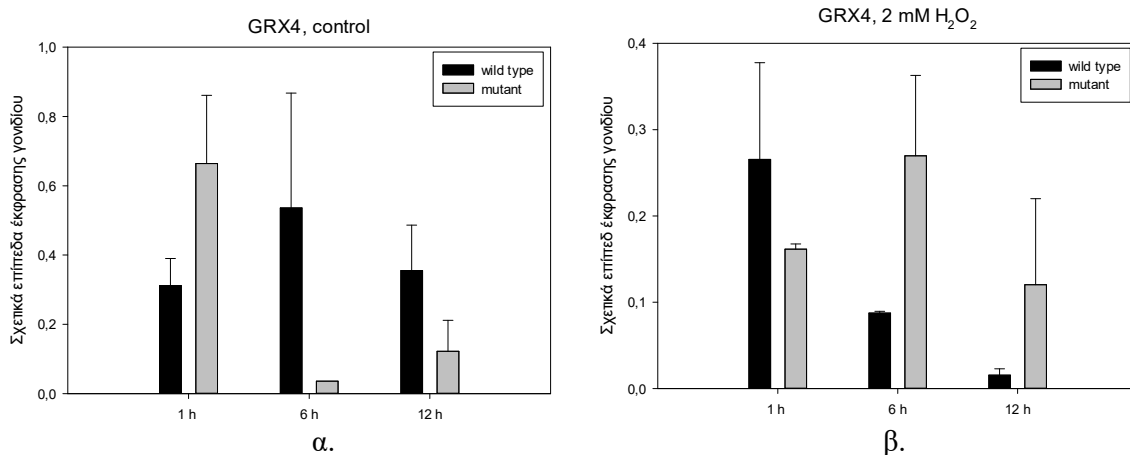


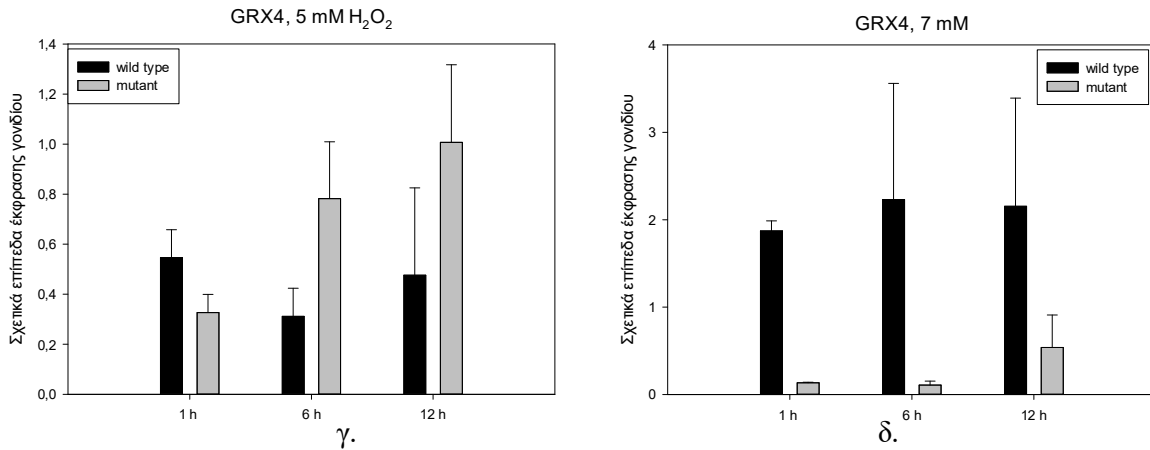
Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του LHCB7 σε καλλιέργειες *C. reinhardtii* αγρίου τύπου και μεταλλάγματος που εκτέθηκαν στους ίδιους χειρισμούς α. καλλιέργειες ελέγχου, β. 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, γ. 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, δ. 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.

#### Παράρτημα 11. Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου GRX4



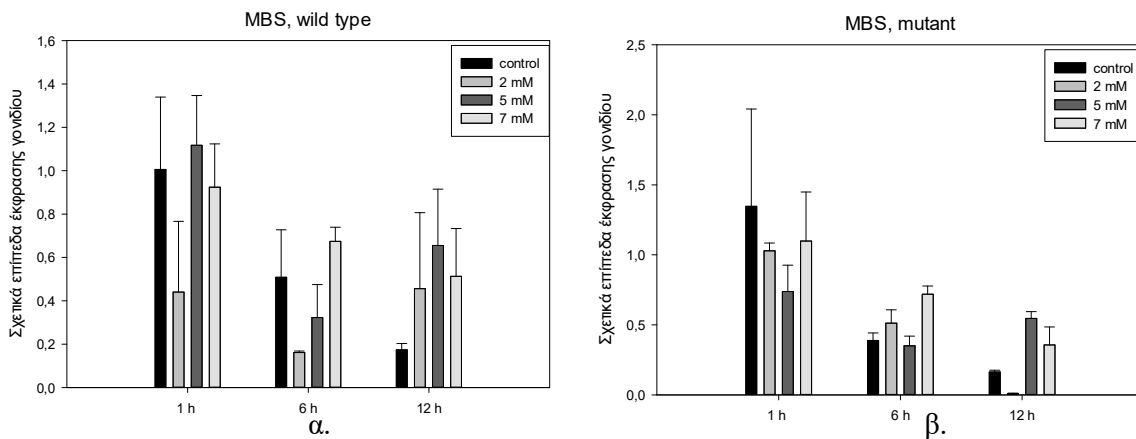
Επίδραση της οξειδωτικής καταπόνησης με διαφορετικές συγκεντρώσεις H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου σε καλλιέργειες στελεχών *C. reinhardtii* α. αγρίου τύπου, β. μεταλλάγματος. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.



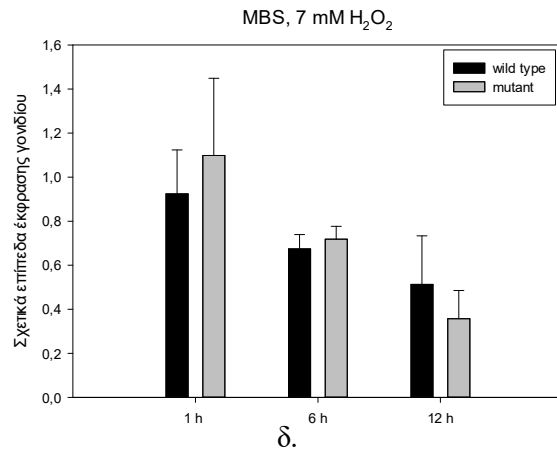
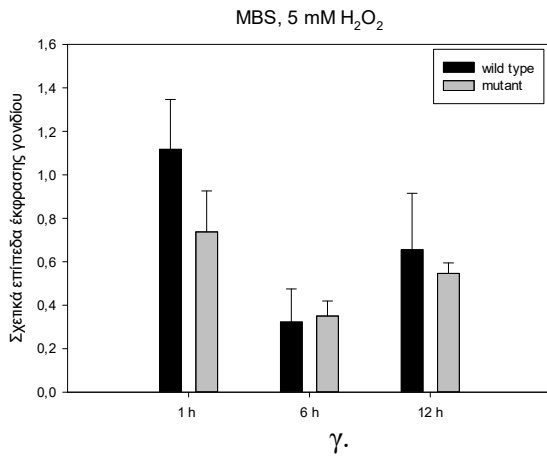
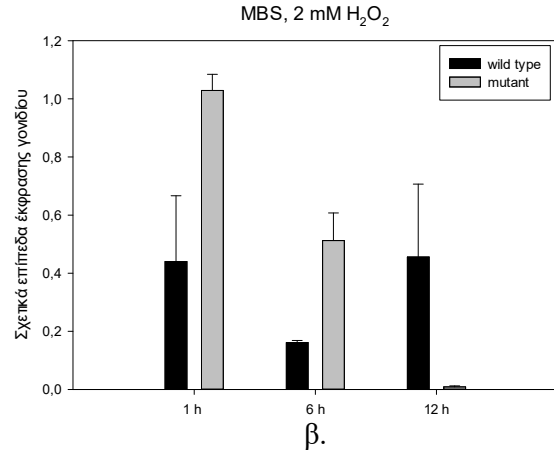
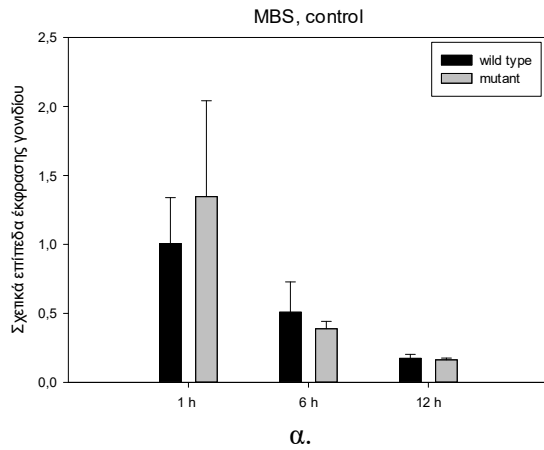


Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του GRX4 σε καλλιέργειες *C. reinhardtii* αγρίου τύπου και μεταλλάγατος που εκτέθηκαν στους ίδιους χειρισμούς α. καλλιέργειες ελέγχου, β. 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, γ. 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, δ. 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.

#### Παράρτημα 12. Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου MBS

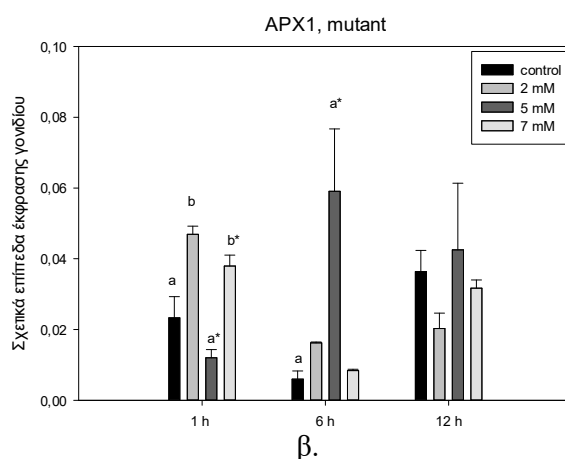
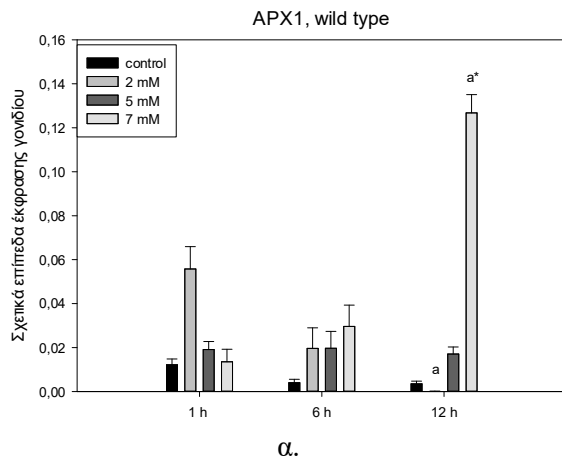


Επίδραση της οξειδωτικής καταπόνησης με διαφορετικές συγκεντρώσεις H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου σε καλλιέργειες στελεχών *C. reinhardtii* α. αγρίου τύπου, β. μεταλλάγατος. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.



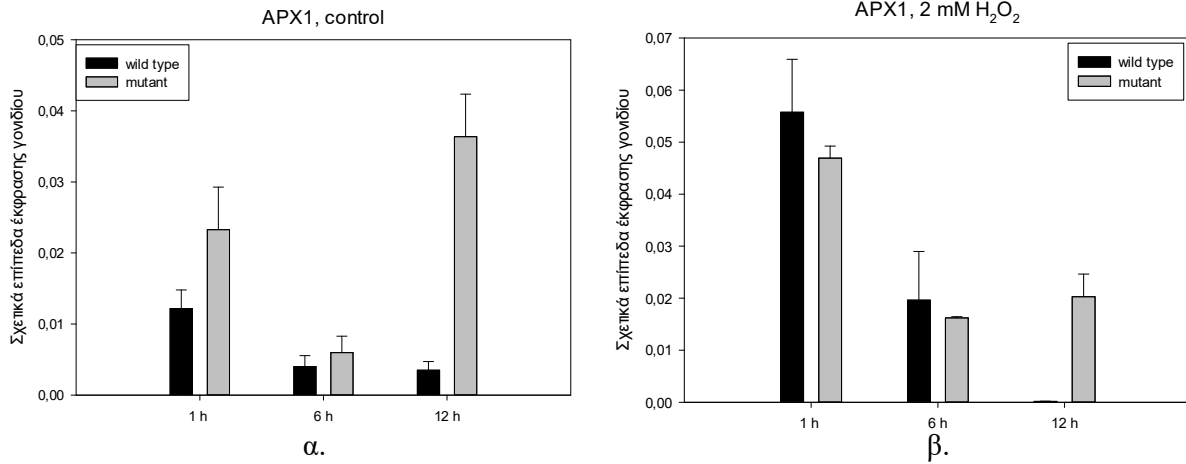
Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του MBS σε καλλιέργειες *C. reinhardtii* αγρίου τύπου και μεταλλάγματος που εκτέθηκαν στους ίδιους χειρισμούς α. καλλιέργειες ελέγχου, β. 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, γ. 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, δ. 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.

### Παράρτημα 13. Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου APX1



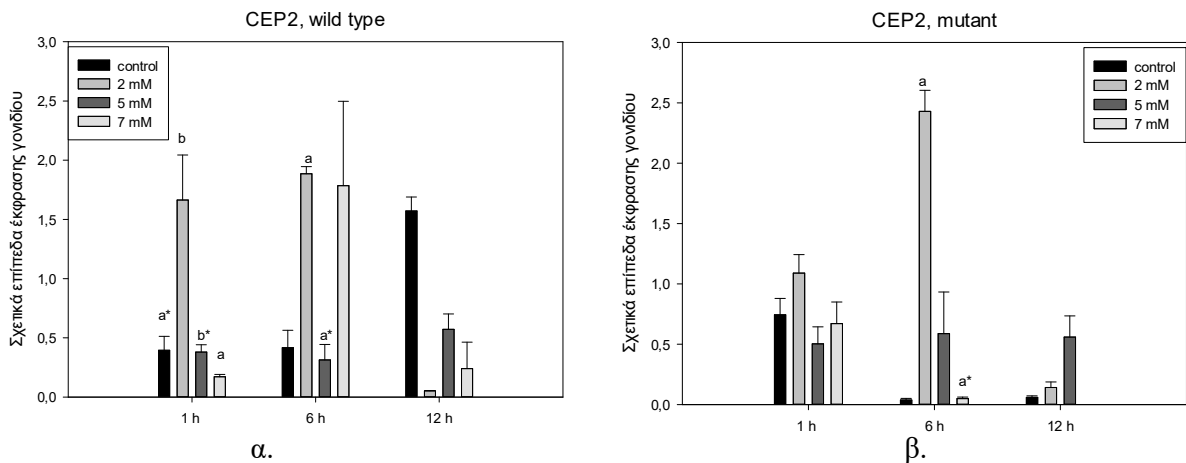


Επίδραση της οξειδωτικής καταπόνησης με διαφορετικές συγκεντρώσεις H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου σε καλλιέργειες στελεχών *C. reinhardtii* α. αγρίου τύπου, β. μεταλλάγματος. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.

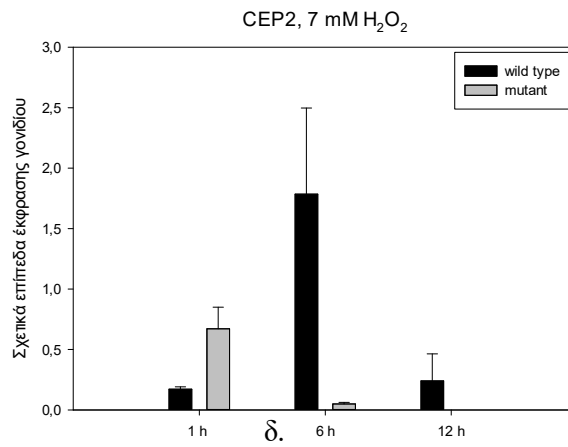
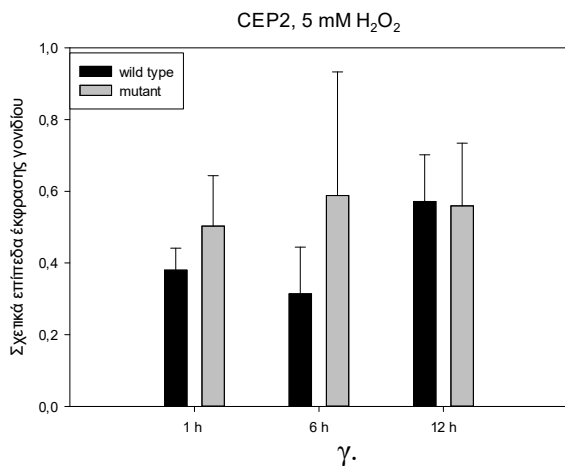
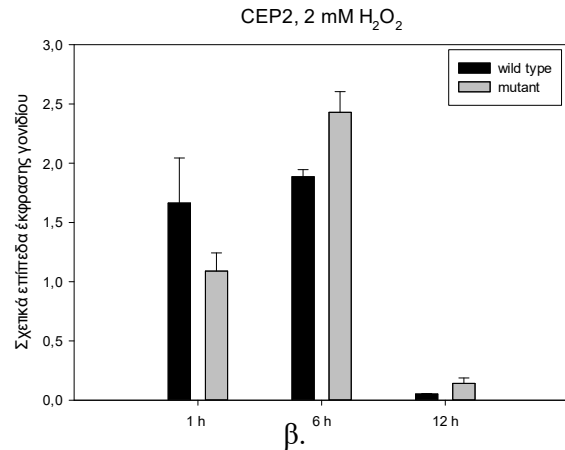
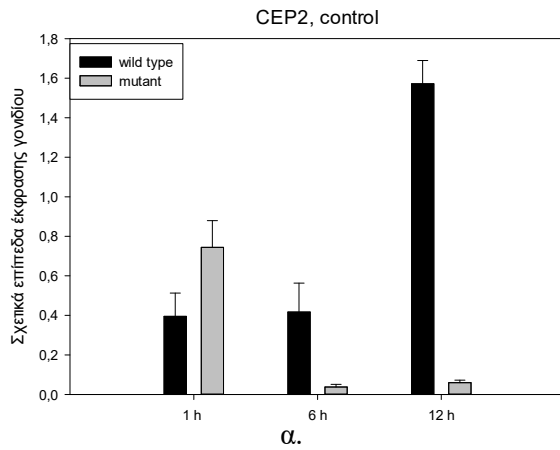


Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του APX1 σε καλλιέργειες *C. reinhardtii* αγρίου τύπου και μεταλλάγματος που εκτέθηκαν στους ίδιους χειρισμούς α. καλλιέργειες ελέγχου, β. 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.

#### Παράρτημα 14. Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου CEP2

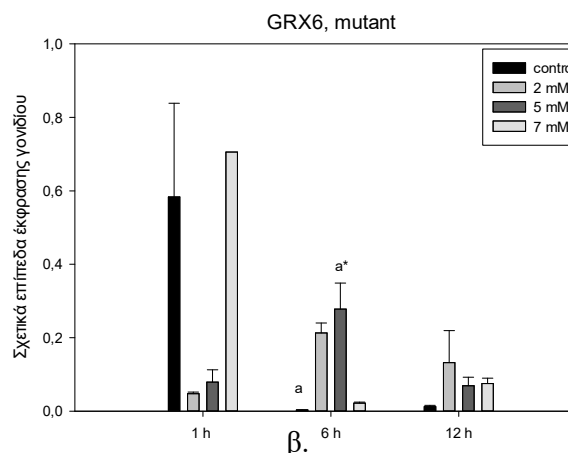
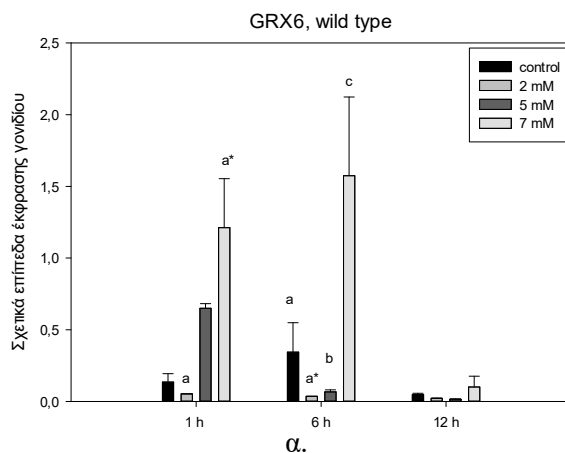


Επίδραση της οξειδωτικής καταπόνησης με διαφορετικές συγκεντρώσεις H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου σε καλλιέργειες στελεχών *C. reinhardtii* α. αγρίου τύπου, β. μεταλλάγματος. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.

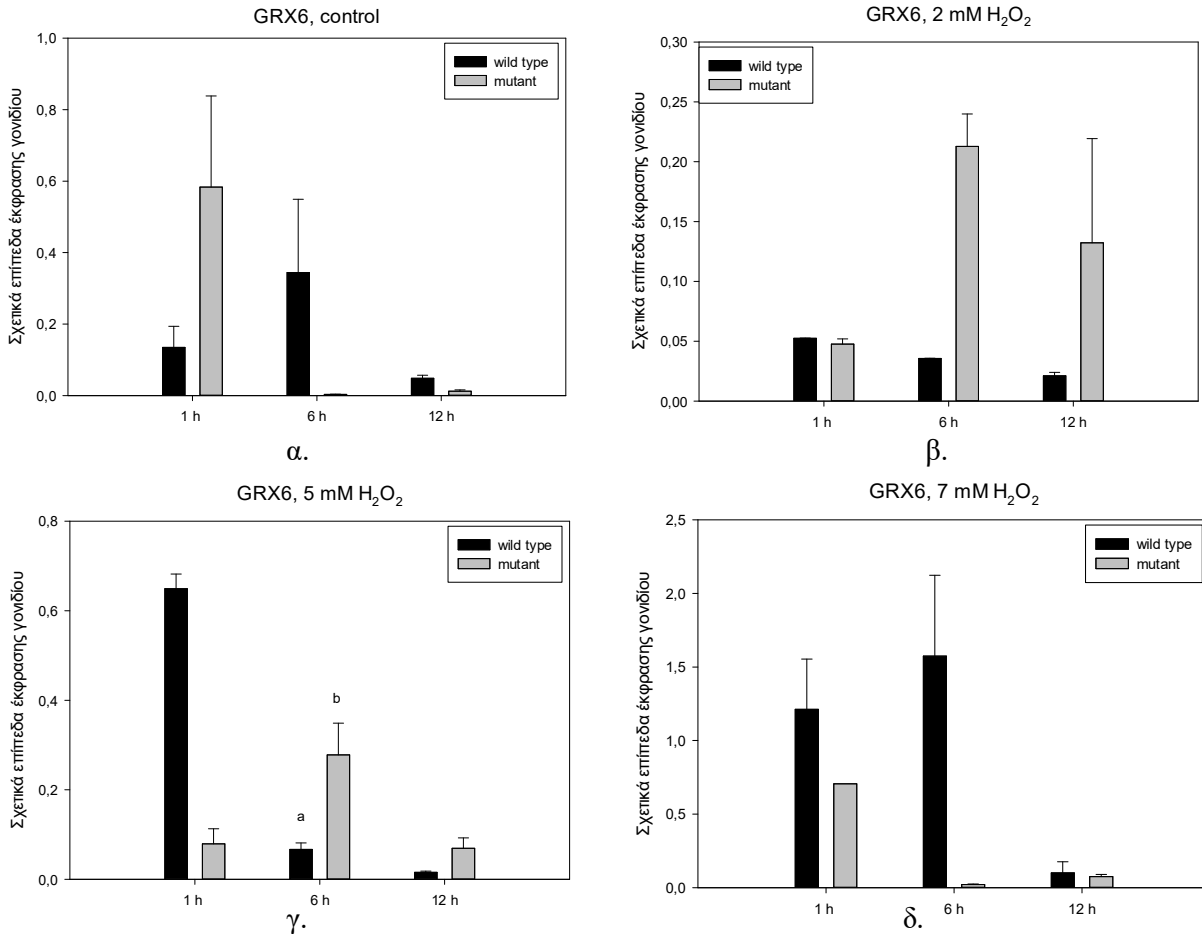


Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του CEP2 σε καλλιέργειες *C. reinhardtii* αγρίου τύπου και μεταλλάγματος που εκτέθηκαν στους ίδιους χειρισμούς α. καλλιέργειες ελέγχου, β. 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, γ. 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, δ. 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.

#### Παράρτημα 15. Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου GRX6

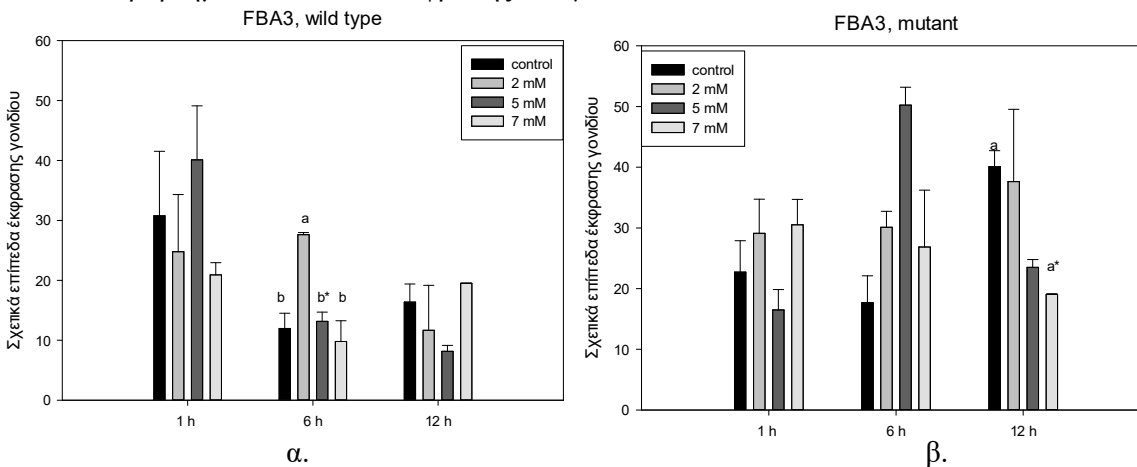


Επίδραση της οξειδωτικής καταπόνησης με διαφορετικές συγκεντρώσεις  $H_2O_2$  στα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου σε καλλιέργειες στελεχών *C. reinhardtii* α. αγρίου τύπου, β. μεταλλάγματος. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.

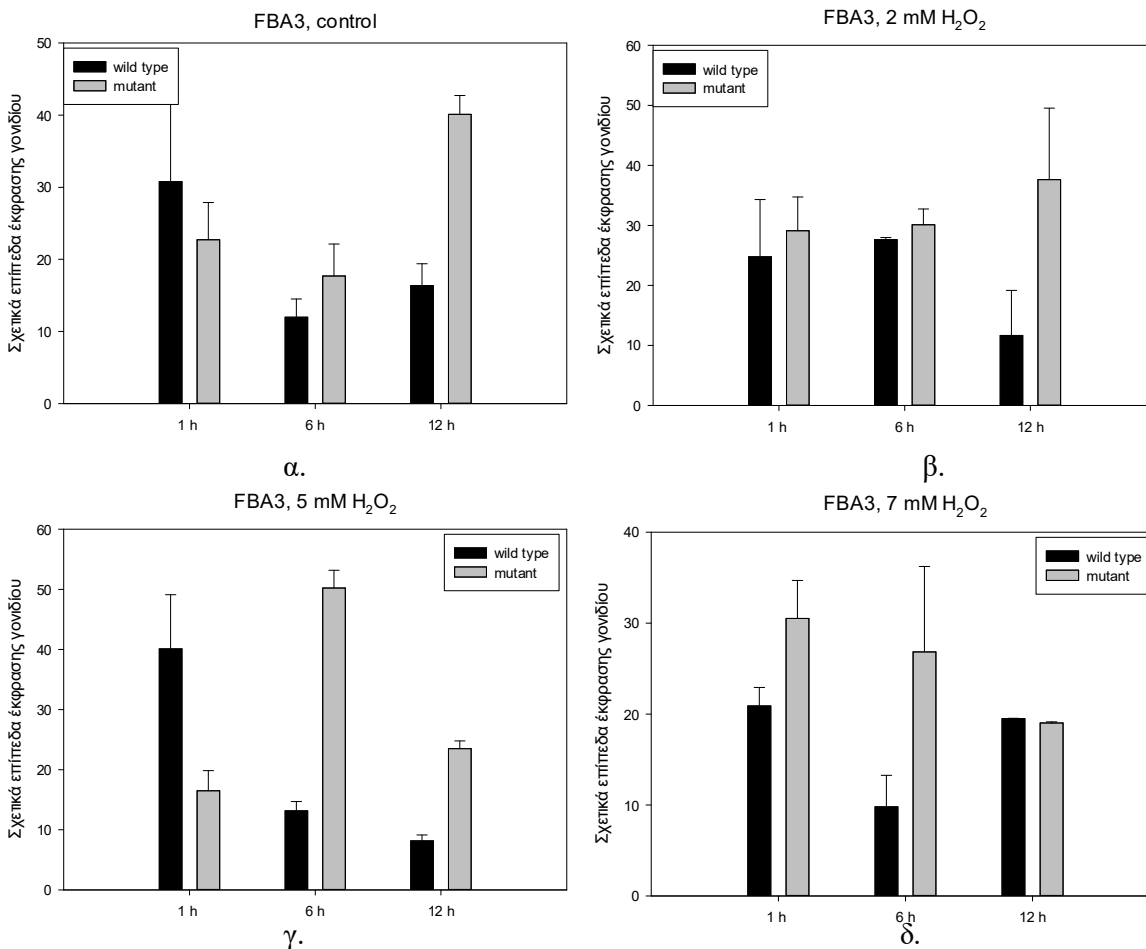


Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του GRX6 σε καλλιέργειες *C. reinhardtii* αγρίου τύπου και μεταλλάγματος που εκτέθηκαν στους ίδιους χειρισμούς α. καλλιέργειες ελέγχου, β. 2 mM  $H_2O_2$ , γ. 5 mM  $H_2O_2$ , δ. 7 mM  $H_2O_2$ . Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.

## Παράρτημα 16. Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου FBA3

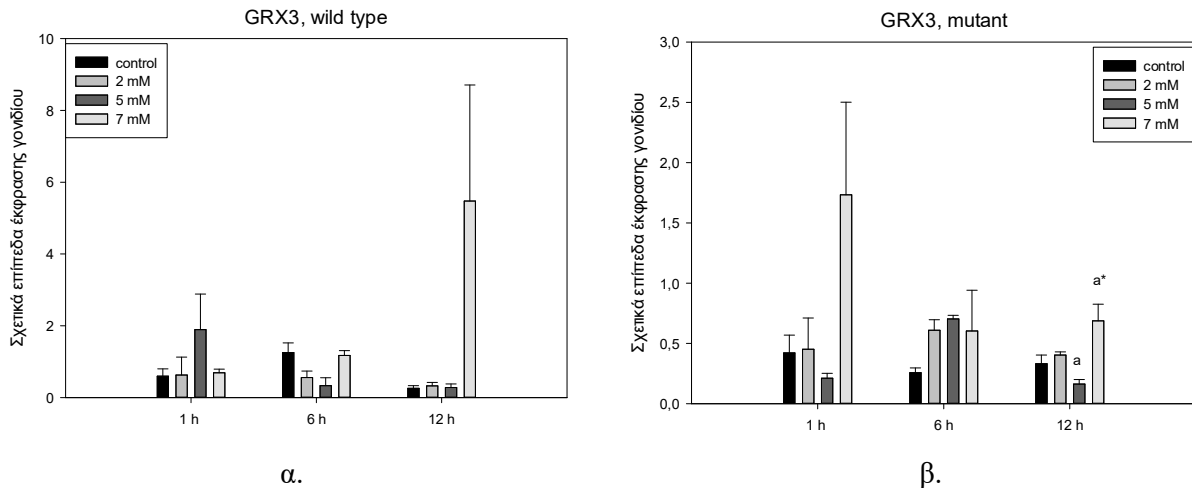


Επίδραση της οξειδωτικής καταπόνησης με διαφορετικές συγκεντρώσεις  $H_2O_2$  στα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου σε καλλιέργειες στελεχών *C. reinhardtii* α. αγρίου τύπου, β. μεταλλάγματος. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.

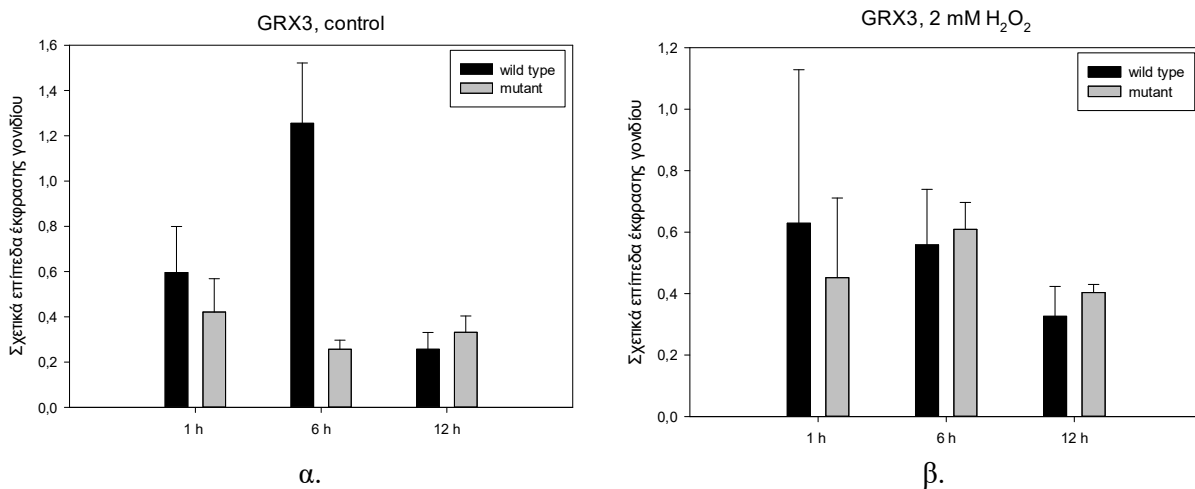


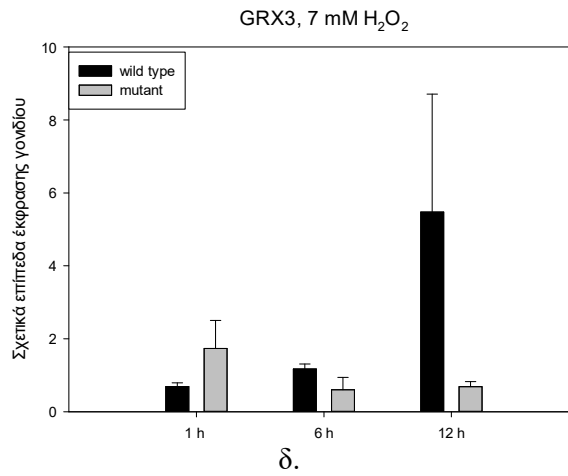
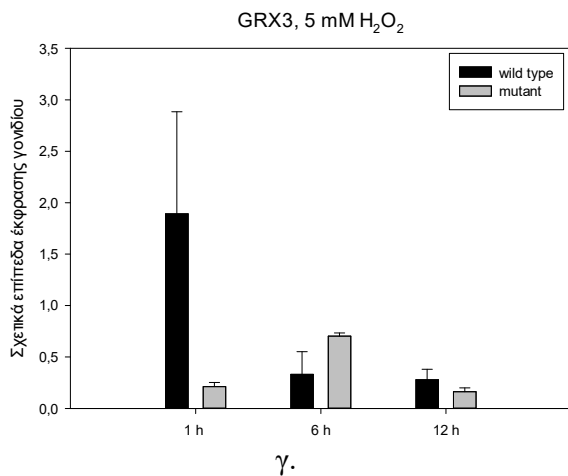
Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του FBA3 σε καλλιέργειες *C. reinhardtii* αγρίου τύπου και μεταλλάγματος που εκτέθηκαν στους ίδιους χειρισμούς α. καλλιέργειες ελέγχου, β. 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, γ. 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, δ. 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.

### Παράρτημα 17. Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου GRX3



Επίδραση της οξειδωτικής καταπόνησης με διαφορετικές συγκεντρώσεις H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου σε καλλιέργειες στελεχών *C. reinhardtii* α. αγρίου τύπου, β. μεταλλάγματος. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.





Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του GRX3 σε καλλιέργειες *C. reinhardtii* αγρίου τύπου και μεταλλάγματος που εκτέθηκαν στους ίδιους χειρισμούς α. καλλιέργειες ελέγχου, β. 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, γ. 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, δ. 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα error bars απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (SE) ανάμεσα στις επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one way ANOVA.

## **Κεφάλαιο 5: Βιβλιογραφία**

1. Abu et al. (2007), Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp., *Bioresource Technology*, 98 (11), 2207-2211.
2. Adindla Swathi, Kishore Inampudi Krishna, Guruprasad Lalitha (2007), Cell surface proteins in archaeal and bacterial genomes comprising “LVIVD”, “RIVW” and “LGxL” tandem sequence repeats are predicted to fold as  $\beta$ -propeller, *International Journal of Biological Macromolecules*, 41, 454–468.
3. Agalou Adamantia, Spaink Herman P. and Roussis Andreas (2006), Novel interaction of selenium-binding protein with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and fructose-bisphosphate aldolase of *Arabidopsis thaliana*, *Functional Plant Biology*, 33, 847–856.
4. Agalou Adamantia, Roussis Andreas and Spaink Herman P. (2005), The *Arabidopsis* selenium-binding protein confers tolerance to toxic levels of selenium, *Functional Plant Biology*, 32, 881–890.
5. Allorent Guillaume et al. (2016), UV-B photoreceptor-mediated protection of the photosynthetic machinery in *Chlamydomonas reinhardtii*, *PNAS*, 113 (51), 14864–14869.
6. Almeida Ana Catarina, Gomes Tania, Langford Katherine, Thomas Kevin V., Tollefsen Knut Erik (2017), Oxidative stress in the algae *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to biocides, *Aquatic Toxicology*, 189, 50-59.
7. Andersen Robert A., (2005), *Algal Culturing Techniques: A Book for All Phycologists*. Elsevier. ISBN: 0-12-088426-7.
8. Araujo et al. (2011), Bioprospecting for oil producing microalgal strains: Evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains. *Bioresource Technology*, 102 (8), 5248-5250.
9. Atkins, J. F., and Gesteland, R. F. (2000), The twenty-first amino acid. *Nature* 407, 463–464.
10. Bansal MP, Oborn CJ, Danielson KG, Medina D (1989), Evidence for two selenium-binding proteins distinct from glutathione peroxidase in mouse liver, *Carcinogenesis*, 10, 541–546.
11. Bansal MP, Mukhopadhyay T, Scott J, Cook RG, Mukhopadhyay R, Medina D (1990), DNA sequencing of a mouse liver protein that binds selenium: implications for selenium’s mechanism of action in cancer prevention, *Carcinogenesis*, 11, 2071–2073.
12. Baruah, A. , Šimková, K. , Hincha, D. K., Apel, K. and Laloi, C. (2009), Modulation of  $^1\text{O}_2$ -mediated retrograde signaling by the PLEIOTROPIC RESPONSE LOCUS 1 (PRL1) protein, a central integrator of stress and energy signaling, *The Plant Journal*, 60, 22-32.
13. Benzie, I. F. and Strain, J. J (1996), The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay, *Analytical biochemistry* 239, 70-76.
14. Benzie, I. F. F. (1996), An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA), *Clinical Biochemistry* 29, 111-116.

15. Bhalamurugan Gatamaneni Loganathan, Valerie Orsat, Mark Lefsrud (2018), Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: A review, *Environ. Eng. Res.*, 23(3), 229-241.
16. Blaby et al. (2015), Genome-wide analysis on *Chlamydomonas reinhardtii* reveals impact of hydrogen peroxide on protein stress responses and overlap with other stress transcriptomes, *Plant J.*,84(5), 974–988.
17. Böck, A., Forchhammer, K., Heider, J., Leinfelder, W., Sawers, G., Veprek, B., and Zinoni, F. (1991), Selenocysteine: the 21st amino acid. *Mol. Microbiol.* 5, 515–520.
18. Brennan & Owende (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.
19. Carvalho et al. (2006), Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol Prog.*, 22(6), 1490-506.
20. Causier Barry and Davies Brendan (2002), Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system, *Plant Molecular Biology*, 50, 855–870.
21. Chang C.-W., J. L. Moseley et al. (2005), The LPB1 Gene Is Important for Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to Phosphorus and Sulfur Deprivation, *Plant Physiology* 138(1), 319-329.
22. Cheng, K. C., & Ogden, K. L. (2011), Algal biofuels: The research. *Chemical Engineering Progress*. 107(3), 42-47.
23. Cirulis Judith T., Scott J. Ashley, and Ross Gregory M. (2013), Management of oxidative stress by microalgae, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 91, 15–21.
24. Colina Francisco et al. (2019), Genome-wide identification and characterization of CKIN/SnRK gene family in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Scientific Reports*, 9, 350.
25. Collinson, L. P., and I. W. Dawes (1992), Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress, *J. Gen. Microbiol.* 138, 329–335.
26. Cordero B. F., Couso I. et al. (2011), Enhancement of carotenoids biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* by nuclear transformation using a phytoene synthase gene isolated from *Chlorella zofingiensis*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 91(2), 341-351.
27. Cutter, G.A., Bruland, K.W. (1984), The marine biogeochemistry of selenium: a reevaluation, *Limnol. Oceanogr.* 29, 1179–1192.
28. Dassey Adam J., Hall Steven G., Theegala Chandra S. (2014), An analysis of energy consumption for algal biodiesel production: Comparing the literature with current estimates, *Algal Research*, 4, 89-95.
29. Darienko Tatyana and Proschold Thomas (2015), Genetic variability and taxonomic revision of the genus *Auxenochlorella* (Shihira et Krauss) Kalina et Puncocharova (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), *J. Phycol. Phycological Society of America*, 10.1111, 12279.
30. Darvehei, Pooya & Bahri, Parisa & Moheimani, Navid. (2018), Model development for the growth of microalgae: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 97, 233-258.
31. Dayer R, Fischer BB, Eggen RI, Lemaire SD (2008), The peroxiredoxin and glutathione peroxidase families in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Genetics*, 179, 41–57.



32. de Souza, M.P., Pickering, I.J., Walla, M., Terry, N. (2002), Selenium assimilation and volatilization from selenocyanate-treated Indian mustard and muskgrass. *Plant Physiol.* 128, 625–633.
33. Dutilleul Christelle, Jourdain Agnes, Bourguignon Jacques, and Hugouvieux Veronique (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, 239–251.
34. Ebenezer et al. (2012), Chlorination-induced cellular damage and recovery in marine microalga, *Chlorella salina*. *Chemosphere.* 89 (9), 1042-7.
35. Ejovwokoghene C. Odjadjare, Taurai Mutanda & Ademola O. Olaniran (2017) Potential biotechnological application of microalgae: a critical review, *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(1), 37-52.
36. Eriksen NT. (2008), The technology of microalgal culturing. *Biotechnol Lett.*, 30(9), 1525-36.
37. Fang Wei, Si Yaqing, Douglass Stephen, Casero David, Merchant Sabeeha S., Pellegrini Matteo, Ladunga Istvan, Liu Peng, and Spaldinga Martin H. (2012), Transcriptome-Wide Changes in *Chlamydomonas reinhardtii* Gene Expression Regulated by Carbon Dioxide and the CO<sub>2</sub>-Concentrating Mechanism Regulator CIA5/CCM1, *The Plant Cell*, 24, 1876–1893.
38. Fields Stanley and Song Ok-kyu (1989), A novel genetic system to detect protein–protein interactions, *Nature*, 3 (40), 245–246.
39. Fischer BB, Dayer R, Schwarzenbach Y, Lemaire SD, Behra R, Liedtke A, Eggen RI (2009), Function and regulation of the glutathione peroxidase homologous gene GPXH/GPX5 in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Mol Biol.*, 71, 569–583.
40. Fletmetakis Emmanouil, Agalou Adamantia, Kavroulakis Nektarios, Dimou Maria, Martsikovskaya Anna, Slater Andrian, Spaink Herman P., Roussis Andreas, and Katinakis Panagiotis (2002), *Lotus japonicus* Gene Ljsbp Is Highly Conserved Among Plants and Animals and Encodes a Homologue to the Mammalian Selenium-Binding Proteins, *MPMI* 15, 313–322.
41. Geoffroy et al. (2007), Effect of selenite on growth and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Aquatic Toxicology*, 83, 149–158.
42. Gorman, D.S., and R.P. Levine (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54, 1665-1669.
43. Greenwell, H. C. et al. (2009), Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of the Royal Society, Interface*, 7(46), 703–726.
44. Greenwell, H. C., Laurens, L. M., Shields, R. J., Lovitt, R. W., & Flynn, K. J. (2009), Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of the Royal Society, Interface*, 7(46), 703-26.
45. Halim Ronald, Danquah Michael K., Webley Paul A. (2012), Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review, *Biotechnology Advances*, 30 (3), 709-732.
46. Hamaji Takashi, Lopez David, Pellegrini Matteo and Umen James (Identification and Characterization of a cis-Regulatory Element for Zygotic Gene Expression in *Chlamydomonas reinhardtii*, *G3 Genes Genomes Genetics*, 6, 1541-1548.

47. Hartikainen Helinä (2005), Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18 (4), 309-318.
48. Huang Y-T, Su C-P (2010), High lipid content and productivity of microalgae cultivating under elevated carbon dioxide, *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 11, 703–710.
49. Huntley, M.E. and Redalje, D.G. (2007), CO<sub>2</sub> Mitigation and Renewable Oil from Photosynthetic Microbes: A New Appraisal. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 12, 573-608.
50. Hutner et al. (1950), *Proc. Am. Philos. Soc.* 94, 152-170.
51. Imase Masato, Ohko Yoshihisa, Takeuchi Mio, Hanada Satoshi (2013), Estimating the viability of *Chlorella* exposed to oxidative stresses based around photocatalysis, *International Biodeterioration & Biodegradation* 78, 1-6.
52. Jae-Hyeok Lee, Sabine Waffenschmidt, Linda Small, Ursula Goodenough (2007), Between-Species Analysis of Short-Repeat Modules in Cell Wall and Sex-Related Hydroxyproline-Rich Glycoproteins of *Chlamydomonas*, *Plant Physiology*, 144 (4) 1813-1826.
53. Jukes, T. H. (1983), Selenium, an “essential poison. *J. Appl. Biochem.* 5, 233–234.
54. Ledford Heidi K., Chin Brian L. and Niyogi Krishna K. (2007), Acclimation to Singlet Oxygen Stress in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Eukaryotic Cell*, 6, 919–930.
55. Leisinger U, Rüfenacht K, Fischer B, Pesaro M, Spengler A, Zehnder AJ, Eggen RI (2001), The glutathione peroxidase homologous gene from *Chlamydomonas reinhardtii* is transcriptionally up-regulated by singlet oxygen, *Plant Mol Biol.*, 46, 395–408.
56. Li X et al. (2016), An indexed, mapped mutant library enables reverse genetics studies of biological processes in *Chlamydomonas reinhardtii*, *The Plant Cell*, 28(2), 367-87.
57. Logan Bruce E. et al. (2006), Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology, *Environmental Science & Technology*, 40, 17, 5181-5192.
58. Mangiapane, E., Pessione, A., Pessione, E. (2014), Selenium and selenoproteins: an overview on different biological systems, *Curr. Protein Pept. Sci.* 15, 598–607.
59. Mata et al. (2010), Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217-232.
60. Melegari S.P. et al. (2013), Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Aquatic Toxicology* 142, 431– 440.
61. Misra Rohit, Guldhe Abhishek, Singh Poonam, Rawat Ismail and Bux Faizal (2014), Electrochemical harvesting process for microalgae by using nonsacrificial carbon electrode: A sustainable approach for biodiesel production, *Chemical Engineering Journal*, 255, 327-333.
62. Moradas-Ferreira P et al. (1996), The molecular defences against reactive oxygen species in yeast, *Mol Microbiol* 19(4),651-8.
63. Mutanda et al. (2011), Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresource Technology*, 102 (1), 57-70.

64. Nauser, T., Steinmann, D., and Koppenol, W. H. (2012), Why do proteins use selenocysteine instead of cysteine? *Amino Acids* 42, 39–44.
65. Nishijima Yuya, Hagiya Yohei, Kubob Tomohiro, Takeia Ryota, Katoha Yohei and Nakayama Kazuhisa (2017), RABL2 interacts with the intraflagellar transport-B complex and CEP19 and participates in ciliary assembly, *Molecular Biology of the Cell*, 28, 1652-1666.
66. Nishimura Y et al. (2010), Uniparental inheritance of cpDNA and the genetic control of sexual differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*, *J Plant Res*, 123-149.
67. Novoselov, S.V. et al. (2002), Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system in *Chlamydomonas reinhardtii*, *EMBO J.* 21, 3681–3693.
68. Odjadjare C. Ejovwokoghene, Mutanda Taurai and Olaniran Ademola (2015), Potential biotechnological application of microalgae: a critical review, *Critical Reviews in Biotechnology*, 37, 1-16.
69. Peers, G., & Niyogi, K. K. (2008), Pond scum genomics: the genomes of *Chlamydomonas* and *Ostreococcus*. *The Plant cell*, 20(3), 502–507.
70. Pfaffl MW (2010), The ongoing evolution of qPCR, *Methods* 50, 215–216
71. Pierobon et al. (2018), Emerging microalgae technology: a review, *Sustainable Energy Fuels*, 2, 13.
72. Pilon-Smiths E, Quinn C F, Tapken W, Malagoli M, Schiavon M. (2009), Physiological functions of beneficial elements, *Current Opinion in Plant Biology*, 12 (3), 267-274.
73. Plant, J.A., Kinniburgh, D.G., Smedley, P.L., Fordyce, F.M., Klinck, B.A. (2004), Arsenic and selenium. *Treatise on Geochemistry*, 9, 17–66.
74. Pootakham W., Gonzalez-Ballester D. et al. (2010), Identification and Regulation of Plasma Membrane Sulfate Transporters in *Chlamydomonas*, *Plant Physiology* 153(4), 1653-1668.
75. Pooya Darvehei, Parisa A. Bahri, Navid R. Moheimani (2018), Model development for the growth of microalgae: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 97, 233-258
76. Porat Amir, Sagiv Yuval, and Elazar Zvulun (2000), A 56-kDa Selenium-binding Protein Participates in Intra-Golgi Protein Transport, *The journal of biological chemistry*, 275, 14457–14465.
77. Ramakers C, Ruijter JM, Lekanne Deprez RH, Moorman AFM. (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time PCR data. *Neuroscience Letters*, In Press
78. Rayman, M.P. (2012), Selenium and human health, *Lancet* 379, 1256–1268.
79. Rawat I., Ranjith Kumar R., Mutanda T., Bux F. (2013), Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production, *Applied Energy*, 103, 444-467.
80. Reich Hans and Hondal Robert (2016), Why Nature Chose Selenium, *ACS Chem. Biol.*, 11, 821–841.
81. Rentel M.C. et al. (2004), OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*, *Nature*, 427, 858–861.

82. Riedel GF, Sanders JG, Gilmour CC (1996), Uptake, transformation, and impact of selenium in freshwater phytoplankton and bacterioplankton communities, *Aquatic Microbial Ecology*, 11, 43-51.
83. Rouhier N., Lemaire S.D., Jacquot J.P (2008), The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 143–166.
84. Sandeep Kumar Duran, Pramod Kumar and Sarbjot S Sandhu (2018), A review on microalgae strains, cultivation, harvesting, biodiesel conversion and engine implementation, *Biofuels*, 1759-7277.
85. Sansone Clementina et al. (2016), The green microalga *Tetraselmis suecica* reduces oxidative stress and induces repairing mechanisms in human cells, *Scientific Reports*, 7, 41215
86. Schiavon M. et al. (2017), Selenium accumulation and metabolism in algae, *Aquatic Toxicology* 189, 1–8.
87. Schild Florie, Kieffer-Jaquinod Sylvie, Palencia Andrés et al. (2014), Biochemical and Biophysical Characterization of the Selenium-binding and Reducing Site in *Arabidopsis thaliana* Homologue to Mammals Selenium-binding Protein 1, *The journal of biological chemistry*, 46, 31765–31776.
88. Shao Ning, Duan Guang You and Bock Ralph (2013), Mediator of Singlet Oxygen Responses in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Arabidopsis* Identified by a Luciferase-Based Genetic Screen in Algal Cells, *The Plant Cell*, 25, 4209–4226.
89. Shao H.-B. et al. (2008), Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants, *C. R. Biologies*, 331, 215–225.
90. Simmons Denina B D, Emery R J Neil (2011), Phytochelatin induction by selenate in *Chlorella vulgaris*, and regulation of effect by sulfate levels, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30 (2),469-76.
91. Sirisha L. Vavilala, Kanak K. Gawde, Mahuya Sinha & Jacinta S. D'Souza (2015) Programmed cell death is induced by hydrogen peroxide but not by excessive ionic stress of sodium chloride in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *European Journal of Phycology*, 50 (4), 422-438.
92. Sneddon J., Masuram S. and Richert J. C. (2007), Gas Chromatography-Mass Spectrometry-Basic Principles, Instrumentation and Selected Applications for Detection of Organic Compounds, *Analytical Letters*, 40 (6), 1003-1012.
93. Stadtman ER (1990), Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences, *Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences*, *Free Radical Biology and Medicine*, 9 (4), 315-325.
94. Storz, G., L. A. Tartaglia, and B. N. Ames (1990), Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation, *Science* 248, 189–194.
95. Taberner Antonio, Martín del Valle Eva M., Galán Miguel A. (2012), Evaluating the industrial potential of biodiesel from a microalgae heterotrophic culture: Scale-up and economics, *Biochemical Engineering Journal*, 63, 104-115.
96. Teixeira de Mattos and Neijssel (1997), Bioenergetic consequences of microbial adaptation to low-nutrient environments, *Journal of Biotechnology* 59, 117-126.

97. Thornton Brenda and Basu Chhandak (2011), Real-Time PCR (qPCR) Primer Design Using Free Online Software, *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 39 (2), 145–154
98. Torres MA et al. (2008), Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: a review, *Ecotoxicol Environ Saf*, 71(1), 1-15.
99. Tuzen Mustafa, Sarı Ahmet (2010), Biosorption of selenium from aqueous solution by green algae (*Cladophora hutchinsiae*) biomass: Equilibrium, thermodynamic and kinetic studies, *Chemical Engineering Journal*, 158, (2), 200-206.
100. Valassakis Chrysanthi, Dervisi Irene et al. (2019), Novel interactions of Selenium Binding Protein family with the PICOT containing proteins AtGRXS14 and AtGRXS16 in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Science*, 281, 102–112.
101. Van Hoewyk, D., Takahashi, H., Inoue, E., Hess, A., Tamaoki, M., Pilon-Smits, E.A. (2008) Transcriptome analyses give insights into selenium-stress responses and selenium tolerance mechanisms in *Arabidopsis*, *Physiol. Plant.* 132, 236–253.
102. Xiong L, Zhu JK (2002), Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress, *Plant Cell Environ.*, 25(2), 131-139.
103. Zhang R, Patena W, Armbruster U, Gang SS, Blum SR, Jonikas MC. (2014), High-Throughput Genotyping of Green Algal Mutants Reveals Random Distribution of Mutagenic Insertion Sites and Endonucleolytic Cleavage of Transforming DNA, *The Plant Cell.*, 26(4), 1398-1409.
104. Zhang Yan and Gladyshev Vadim N. (2009), Comparative Genomics of Trace Elements: Emerging Dynamic View of Trace Element Utilization and Function, *Chemical Reviews*, 109, 10, 4828-4861.
105. Ψυχάρη Ελένη (2015), Παραγωγή ιντερφερόνης α2b από το σύστημα του χλωροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii*, Βιβλιοθήκη Σχολής Θετικών Επιστημών.