



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Διπλωματική Εργασία

ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΘΑΣΗΣ ΤΗΣ ΛΟΥΠΕΟΛΗΣ ΣΕ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΑ
ΦΥΤΑ *Lotus japonicus*

ΠΛΕΣΣΑ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ
ΛΑΡΙΣΑ 2010

**«Έκφραση της συνθάσης της λουπεόλης σε αναπτυσσόμενα
φυτά *Lotus japonicus*»**

Υπεύθυνη Καθηγήτρια

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος

Τριμελής Επιτροπή

1. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος
2. Καρπούζας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος
3. Δελής Κωνσταντίνος, Διδάσκων ΠΔ407 Βιοτεχνολογία Φυτών, Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν στην περάτωση αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά Κα Παπαδοπούλου Καλλιόπη, που μου ανέθεσε αυτή την εργασία και που μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος. Την ευχαριστώ για την καθοδήγησή της και για το ενδιαφέρον της κατά τη συγγραφή και διόρθωση της εργασίας. Ακόμα, την ευχαριστώ για τις γνώσεις που μου παρείχε κατά τις ώρες διδασκαλίας αλλά και για τις γνώσεις που αποκόμισα κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Είναι σημαντικό για εμένα να την ευχαριστήσω και για την ηθική και ψυχολογική της υποστήριξη, καθώς και για την υπομονή της καθ'όλη την διάρκεια της συνεργασίας μας.

Ευχαριστώ τον Κο Δελή Κωνσταντίνο για την καθοριστικής σημασίας προσφορά του κατά την διάρκεια του πειραματικού μέρους. Τον ευχαριστώ για τις γνώσεις του και την υποστήριξή του. Επίσης τον ευχαριστώ για την καθοδήγηση και τις υποδείξεις του κατά την διόρθωση της εργασίας.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στην διδακτορική φοιτήτρια Κροκιδά Αφροδίτη η οποία βρισκόταν πάντα δίπλα μου όλο αυτό το διάστημα. Την ευχαριστώ για την καθοδήγηση, την υποστήριξη και τη αμέριστη βοήθειά της κατά την πραγματοποίηση του πειραματικού και του συγγραφικού μέρους της εργασίας. Επίσης, πέρα από την άριστη συνεργασία μας θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την φιλία της.

Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο περιβάλλον, καθώς και τους φίλους μου που με βοήθησαν και με υποστήριξαν όσες φορές χρειάστηκε.

Πίνακας περιεχομένων

1. Εισαγωγή.....	5
1.1. Ψυχανθή- <i>Lotus japonicus</i>	5
1.2. Δευτερογενείς μεταβολίτες.....	7
1.3. Βιοσύνθεση τερπενίων.....	8
1.4. Βιοσύνθεση τριτερπενοειδών.....	10
1.5. OSCs- κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου.....	12
1.6. Η συνθάση της λουπεόλης.....	15
1.7. Το ενεργό κέντρο της συνθάσης της λουπεόλης.....	16
1.8. Οι δύο κλάδοι της συνθάσης της λουπεόλης.....	18
1.9. Η συνθάση της λουπεόλης στο <i>Lotus Japonicus</i>	22
1.10. Σχηματισμός φυματίων- ριζόβια βακτήρια.....	25
2. Σκοπός.....	28
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	29
4.1. Το ψυχανθές <i>Lotus japonicus</i> ως φυτικό μοντέλο.....	29
4.2. Προετοιμασία των σπόρων.....	29
4.3. Καλλιέργεια ριζοβίων και μόλυνση φυτών.....	29
4.4. Συνθήκες ανάπτυξης και καλλιέργειας του <i>Lotus Japonicus</i>	30
4.5. Απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς(RNeasy Plant Mini Kit,QIAGEN).30	
4.6. Χειρισμός του ολικού RNA με DNάση.....	31
4.7. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων.....	32
4.8.α. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	33
4.8.β. PCR για τον έλεγχο ύπαρξης γενωμικού DNA.....	34
4.9. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης...35	
4.10. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time PCR).....	37
4. Αποτελέσματα.....	40
References	

1. Εισαγωγή

1.1. Ψυχανθή- *Lotus Japonicus*

Τα φυτά της τάξης των ψυχανθών ανήκουν στην οικογένεια των Χεδρωπών (Leguminosae) γνωστή επίσης και ως οικογένεια των Κυαμοειδών (Fabaceae). Η οικονομική σημασία των συγκεκριμένων φυτών για τον άνθρωπο είναι εξαιρετικά σημαντική. Πιο συγκεκριμένα στα ψυχανθή ανήκουν τα φασόλια (*Phaseolus vulgaris*), τα μπιζέλια (*Pisum sativum*), οι φακές (*Lens culinaris*) που είναι βασικά συστατικά της μεσογειακής διαίτας καθώς και ο βίκος (*Vicia ervilia*) και η μηδική (*Medicago sativa*) που είναι βασικές ζωοτροφές. Έτσι έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν τροφή πλούσια σε πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και φυτικά έλαια και χρησιμοποιούνται εκτενώς στην βιομηχανία τροφίμων ως πρώτη ύλη.

Τα ψυχανθή λόγω της ικανότητας να δημιουργούν συμβιωτικές σχέσεις αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο για την αειφόρο γεωργική ανάπτυξη. Μέσω της συμβίωσης με ριζόβια βακτήρια, τα ψυχανθή παρέχουν στα ίδια μία ανανεώσιμη πηγή αζώτου εμπλουτίζοντας ταυτόχρονα το έδαφος με άζωτο για τις επόμενες καλλιέργειες. Η συμβιωτική αζωτοδέσμευση που λαμβάνει χώρα στα φυμάτια των ψυχανθών αποτελεί με μεγάλη διαφορά την αποδοτικότερη, από πλευράς αζωτοδέσμευσης, συμβιωτική σχέση ανωτέρων φυτών με εξειδικευμένα βακτήρια [37]. Ένας σημαντικός στόχος της αειφόρου γεωργικής ανάπτυξης είναι η αξιοποίηση και η περαιτέρω βελτιστοποίηση της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης. Έτσι θα μπορέσει να περιοριστεί η χρήση λιπασμάτων που είναι πλούσια σε άζωτο [37]. Σημαντικά αποτελέσματα της βασικής έρευνας στο μηχανισμό εγκαθίδρυσης της συμβιωτικής σχέσης ριζοβίων- ψυχανθών που έχουν συσσωρευτεί τα τελευταία χρόνια έρχονται να δώσουν νέες διαστάσεις στη μελλοντική πιθανότητα μεταφοράς του μηχανισμού και σε άλλα καλλιεργούμενα φυτικά είδη [37]. Τα ψυχανθή μπορούν να συμβιώνουν και με μύκητες και έτσι απορροφούν αποτελεσματικότερα τον φώσφορο και άλλα σημαντικά θρεπτικά συστατικά του εδάφους [14]. Οι συμβιωτικές σχέσεις που εγκαθιδρύουν τα ψυχανθή στο ριζικό τους σύστημα, τους αποδίδουν συγκριτικό πλεονέκτημα έναντι άλλων φυτικών ειδών, ιδιαίτερα σε εδάφη τα οποία είναι φτωχά σε θρεπτικά συστατικά. Οι παραπάνω λόγοι συντέλεσαν στην επιλογή της καλλιέργειας ψυχανθών από τα αρχαία χρόνια μέχρι και σήμερα όπου η παγκόσμια παραγωγή ξεπερνάει τους 60 εκατομμύρια τόνους ετησίως και τα κατατάσσει στην τρίτη θέση στα φυτά μεγάλης καλλιέργειας.

Τα ψυχανθή είναι ένα χρήσιμο εργαλείο και στην επιστημονική έρευνα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα πειράματα του Mendel στο μπιζέλι (*P. Sativum*) μέσα από τα οποία τέθηκαν τα θεμέλια της σύγχρονης γενετικής. Τα πειράματα του Mendel υπέδειξαν το πόσο σημαντικό είναι ο οργανισμός που επιλέγεται ως μοντέλο για έρευνα να είναι εύχρηστος. Το *P. Sativum* είναι ένα διπλοειδές φυτό το οποίο ήταν λειτουργικό για τα πειράματα της κλασικής γενετικής. Όμως, αργότερα το μεγάλο γονιδίωμα αποτέλεσε εμπόδιο για την αποτελεσματική απομόνωση και ταυτοποίηση σημαντικών γονιδίων των ψυχανθών. Εδώ και περίπου 17 χρόνια το ψυχανθές *Lotus Japonicus* (εικόνα 1) έχει επιλεγεί ως οργανισμός-φυτικό μοντέλο για την μελέτη των ψυχανθών [14]. Άλλο ένα φυτό που χρησιμοποιείται ως μοντέλο για τα ψυχανθή είναι το *Medicago truncatula*. Η βασική διαφορά είναι ότι το *M. truncatula* αδυνατεί να σχηματίσει τα καθορισμένα φυμάτια που σχηματίζει το *L. japonicus*. Το *L. Japonicus* είναι ιδανικό φυτό-μοντέλο για τα ψυχανθή καθώς:

- ✓ είναι μικρό φυτό με μεγάλα και άφθονα λουλούδια και υψηλή παραγωγή σπόρων
- ✓ είναι αυτογονιμοποιούμενο
- ✓ είναι εύκολο να καλλιεργηθεί και έχει μικρό κύκλο ζωής (2 – 3 μήνες)
- ✓ έχει μικρό μέγεθος γενόματος (472.1 Mb) και
- ✓ είναι αποδοτικό στο μετασχηματισμό και την αναγέννηση από καλλιέργειες ιστού.

Το *L. japonicus* όπως αναφέρθηκε ανήκει στην οικογένεια των Leguminosae η οποία σήμερα αριθμεί περίπου 20.000 μέλη και είναι η τρίτη μεγαλύτερη οικογένεια αγγειόσπερμων. Είναι διπλοειδές με έξι απλοειδή χρωμοσώματα ($n=6$), ανήκει στην τάξη των Κυαμωδών (Fabales) και είναι δικοτυλήδονο.



Εικόνα 1: a) τα άνθη του *L. japonicus*. b) τα σπόρια του *L. japonicus* [14]. c) *L. japonicus* 2 μηνών στο οποίο διακρίνονται τα φυμάτια στις ρίζες του [14].

1.2. Δευτερογενείς μεταβολίτες

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες γνωστοί και ως φυσικά προϊόντα [7] απαρτίζουν μία μεγάλη ομάδα οργανικών ενώσεων που παράγουν τα φυτά. Ο ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών δεν είναι πλήρως καθορισμένος. Έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν σε ποικίλες λειτουργίες όπως η άμυνα του φυτού έναντι παθογόνων μικροβίων και θηρευτών, η αντίδραση σε καταπονήσεις [4], η επικοινωνία μεταξύ παρακείμενων φυτών και η έλξη εντόμων που βοηθούν στην αναπαραγωγή των φυτών. Ως δευτερογενείς μεταβολίτες ορίζονται ενώσεις μικρού σχετικά μοριακού βάρους με περιορισμένη κατανομή στο φυτικό βασίλειο και που δεν παίζουν πρωταρχικό ρόλο στην ανάπτυξη και αύξηση του φυτού. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες διαφέρουν από τους πρωτογενείς μεταβολίτες καθώς, εκτός από το γεγονός ότι δεν είναι ομοιόμορφα κατανομημένοι στα φυτικά είδη, επίσης δεν έχουν κάποιο αναγνωρισμένο ρόλο στις διαδικασίες της φωτοσύνθεσης, αναπνοής, μεταφοράς διαλυμένων ουσιών, αφομοίωσης θρεπτικών ουσιών και διαφοροποίησης [1]. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες προέρχονται από ενδιάμεσες ενώσεις του πρωτογενούς μεταβολισμού, παράγονται συνήθως σε επιμέρους ιστούς και σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια. Η παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών αποτελεί μία συντονισμένη και ολοκληρωμένη δραστηριότητα των φυτικών κυττάρων. Επίσης, συνδέεται στενά με την ικανότητα διαφοροποίησης των κυττάρων [2].

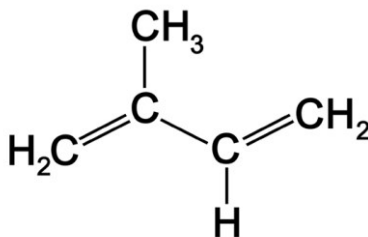
Οι δευτερογενείς μεταβολίτες κατατάσσονται στις παρακάτω ομάδες ανάλογα με το πρόδρομο μόριο του πρωτογενούς μεταβολισμού από το οποίο προέρχονται και τον περαιτέρω μεταβολισμό του:

- 1) Ενώσεις που περιέχουν άζωτο (N): Αυτές οι ενώσεις προέρχονται από αμινοξέα και είναι αλκαλοειδή, μεταλαΐνες, αμίνες, κυανογόνα γλυκοζίδια, θειογλυκοζίτες, αμυντικές πρωτεΐνες και αμίνες.
- 2) Φαινυλπροπανοειδή: Συντίθενται από το αρωματικό αμινοξύ φαινυλαλανίνη το οποίο προέρχεται από το μονοπάτι του σισκεμικού. Η φαινυλαλανίνη μεταβολίζεται αρχικά σε κινναμικό οξύ και στη συνέχεια παράγονται τα φαινυλπροπανοειδή.
- 3) Βενζενοειδή: Παράγονται από την φαινυλαλανίνη με αφαίρεση δύο ατόμων άνθρακα[3].
- 4) Φλαβονοειδή: Παράγονται από την φαινυλαλανίνη και από το μηλονυλο-CoA [15].

- 5) Τερπένια: Παράγονται ύστερα από σταδιακή συμπίκνωση μορίων ακετυλο- CoA μέσω της οδού βιοσύνθεσης του μεβαλονικού.

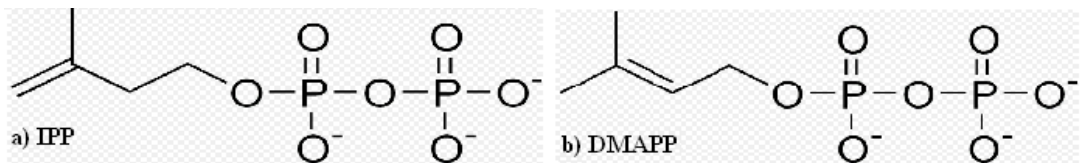
1.3. Βιοσύνθεση τερπενίων

Έχουν βρεθεί πάνω από 25.000 είδη τερπενίων και τερπενοειδών. Η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών είναι συνδεδεμένη με τους φυτικούς οργανισμούς. Παρόλα αυτά υπάρχουν και άλλων ειδών οργανισμοί που παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως ο μύκητας *Hypericum perforatum* που συνθέτει δύο είδη τερπενοειδών [5]. Τα τερπένια συμμετέχουν στην απάντηση του φυτού στις καταπονήσεις, στην έλξη των επικονιαστών και στην άμυνα απέναντι σε έντομα και φυτοφάγα ζώα. Επίσης, τα τερπένια μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση των γονιδίων γειτονικών φυτών από αυτό που τα παράγει. Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών έχει στραφεί στο ρόλο που έχουν τα τερπένια στην ατμόσφαιρα της γης. Βρέθηκε ότι οι παγκόσμιες εκπομπές ισοπρενίου, δηλαδή του πρόδρομου μορίου των τερπενίων, ανέρχονται στα 500 Tg (500.000.000 τόνοι) ετησίως [6]. Το ισοπρένιο είναι ένα μόριο που αποτελείται από υδρογόνο και άνθρακα. Τέτοια μόρια ισοπρενίου περιλαμβάνονται στα τερπένια, ενώ στα τερπενοειδή έχει προστεθεί και οξυγόνο στο ισοπρένιο[7] (εικόνα 2).



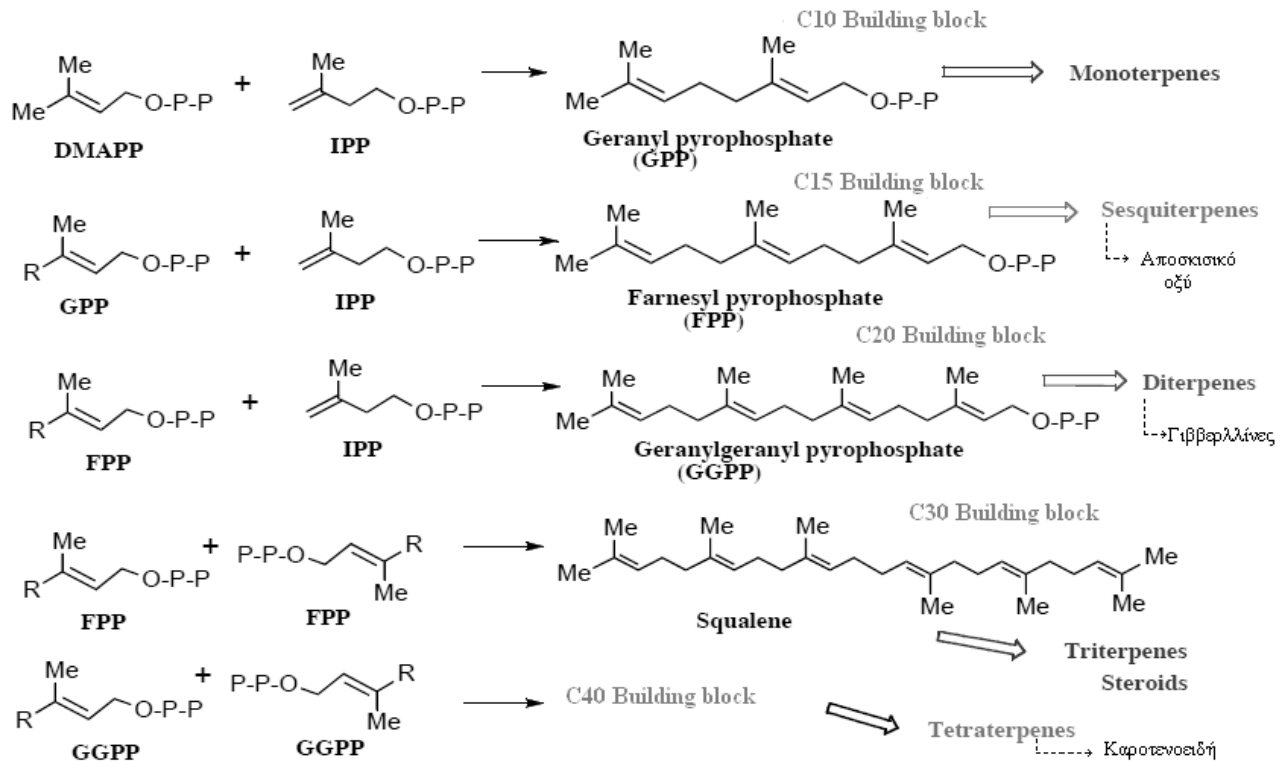
Εικόνα 2: Ισοπρένιο.

Τα τερπένια είναι πολυμερή του ισοπρενίου και συγκεκριμένα της ενεργοποιημένης μορφής του που είναι το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP). Το IPP αποτελείται από 5 άτομα άνθρακα (C5) και η ισομερής του μορφή είναι το πυροφωσφορικό διμεθυλοαλύλιο (DMAPP), (εικόνα 3).



Εικόνα 3: a) πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP). b) πυροφωσφορικό διμεθυλοαλύλιο (DMAPP). Την αντίδραση ισομερίωσης μεταξύ των IPP και DMAPP καταλύει το ένζυμο ισοπεντενυλο-πυροφωσφορική ισομεράση (isopentenyl pyrophosphate isomerase).

Το ισοπρένιο αντιπροσωπεύει την δομική μονάδα των τερπενίων, τα ημιτερπένια (C5). Το IPP συμπυκνώνεται με το DMAPP για να σχηματιστεί το πυροφωσφορικό γερανύλιο (GPP). Το GPP είναι η πρόδρομη ένωση των μονοτερπενίων (C10). Όταν το GPP συμπυκνώνεται με IPP παράγεται πυροφωσφορικό φαρνεζύλιο (FPP). Το FPP είναι η πρόδρομη ένωση των σεσκιτερπενίων (C15). Όταν συμπυκνωθούν το FPP και το IPP παράγεται πυροφωσφορικό γερανυλο-γερανύλιο (GGPP). Το GGPP είναι η πρόδρομη ένωση των διτερπενίων (C20). Η συμπύκνωση δύο FPP με την δράση του ενζύμου συνθάση του σκουαλενίου (SQS) οδηγεί στην παραγωγή του σκουαλενίου το οποίο είναι η πρόδρομη ένωση των τριτερπενοειδών (C30). Ενώ η συμπύκνωση δύο πυροφωσφορικών γερανυλο-γερανυλίων έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή της φυτοΐνης η οποία είναι πρόδρομος ένωση των τετρατερπενίων (C40) [1,7,8] (σχήμα 1).



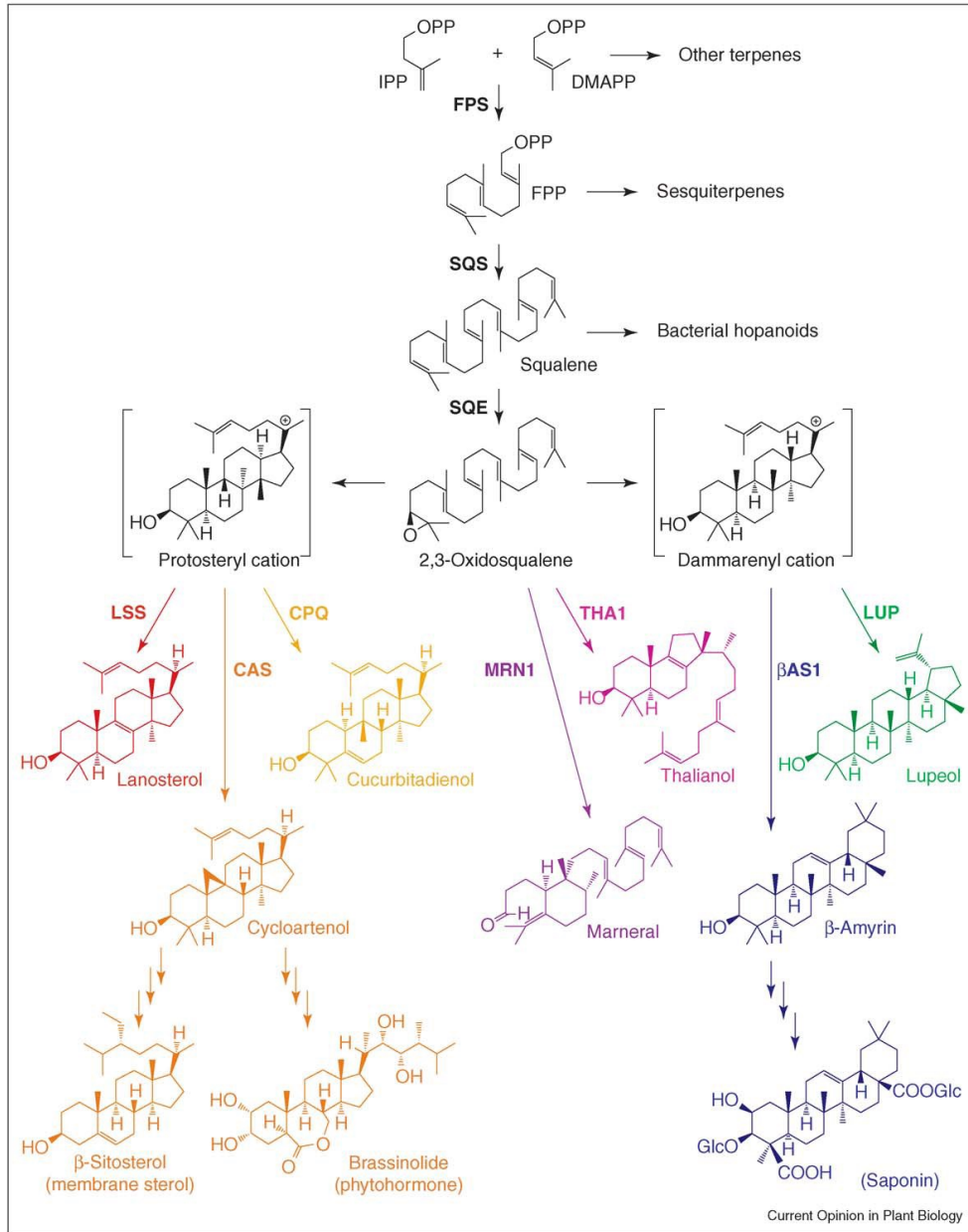
Σχήμα 1: Βιοσύνθεση τερπενίων και οι κυριότερες υποκλάσεις τους.

1.4. Βιοσύνθεση τριτερπενοειδών

Δεν έχει μελετηθεί πλήρως η βιολογική σημασία των τριτερπενοειδών στους φυτικούς οργανισμούς. Αρκετά φυτά συσσωρεύουν ποσότητες τριτερπενοειδών σαπωνινών στους ιστούς τους και κυρίως στις ρίζες τους [24]. Μελετήθηκαν γλυκοσίδια τριτερπενίων τα οποία παρουσιάζουν αντιμυκητιασική δράση [24, 25, 26]. Κάποια έχουν και επιπλέον δράσεις όπως για παράδειγμα οι σαπωνίνες του φασολιού οι οποίες φαίνεται να ελέγχουν τον γεωτροπισμό και να συμμετέχουν στη σύνθεση σελουλόζης (cellulose) [27, 28].

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το πρόδρομο μόριο για την σύνθεση τριτερπενοειδών είναι το σκουαλένιο. Το σκουαλένιο μετατρέπεται σε 2,3 οξειδοσκουαλένιο με τη δράση του ενζύμου εποξειδάση του σκουαλενίου (SQE). Στη συνέχεια οι κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου (OSCs) μετατρέπουν το 2,3 οξειδοσκουαλένιο σε ενδιάμεσα προϊόντα για την παραγωγή στερολών, στεροειδών και τριτερπενοειδών σαπωνινών (σχήμα 2). Το σημείο-κλειδί για την μετάβαση από τον πρωτογενή στον δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών είναι η κυκλοποίηση

του 2,3 οξειδοσκουαλενίου [23]. Η β-αμυρίνη και η λουπεόλη είναι από τις πιο γνωστές τριτερπενοειδείς αλκοόλες.



Σχήμα 2: Βιοσύνθεση τριτερπενοειδών [8].

1.5. OSCs- κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου

Οι περισσότερες μελέτες για να χαρακτηριστούν οι OSCs των φυτών έγιναν σε αγγειόσπερμα. Στους ευκαρυώτες, οι OSCs μετατρέπουν το 2,3 οξειδοσκουαλένιο σε κυκλικές τριτερπενοειδείς αλκοόλες με το πολύ έξι δακτυλίους. Τα κυκλικά τριτερπενοειδή δημιουργούνται ύστερα από πρωτονίωση και άνοιγμα του δακτυλίου του οξιρανίου του 2,3 οξειδοσκουαλενίου, κυκλοποίηση, ανακατανομή της ανθρακικής αλυσίδας και τελική αποπρωτονίωση ή ενυδάτωση του μορίου. Αντίθετα, στους προκαρυώτες τα κυκλικά τριτερπενοειδή δημιουργούνται ύστερα από κυκλοποίηση του σκουαλενίου από τις κυκλάσες του σκουαλενίου, ένζυμα τα οποία δεν βρίσκονται στα αγγειόσπερμα [9]. Τα φυτά βιοσυνθέτουν διάφορα είδη τριτερπενοειδών και κωδικοποιούν για πολλές OSCs. Χαρακτηριστικά στον πίνακα 1 αναφέρονται κάποιοι οργανισμοί και ο αριθμός των OSCs που κωδικοποιεί το γένωμά τους.

Οργανισμός	Αριθμός OSCs
<i>Arabidopsis thaliana</i>	13
<i>Oryza sativa</i>	9
<i>Lotus japonicus</i>	8

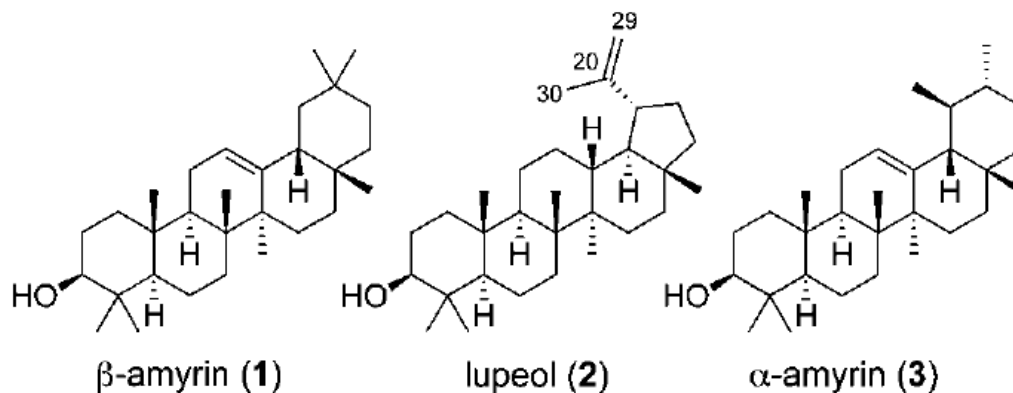
Πίνακας 1

Στα φυτά οι OSCs σχηματίζουν δύο κύρια ενδιάμεσα κατιόντα κατά την βιοσύνθεση των κυκλικών τριτερπενοειδών: το ενδιάμεσο κατιόν του προτεστερυλίου (protosteryl cation) με διαμόρφωση ανάκλιντρου-λουτήρα-ανάκλιντρου ή το ενδιάμεσο κατιόν του νταμαρενυλίου (dammarenyl cation) με διαμόρφωση ανάκλιντρου-ανάκλιντρου-ανάκλιντρου. Τα τελευταία χρόνια, σε μελέτες του γονιδιώματος του *Arabidopsis* βρέθηκαν δύο νέα ένζυμα, το THA1 και το MRN1. Αυτά τα ένζυμα έχουν το 2,3 οξειδοσκουαλένιο ως υπόστρωμα και προωθούν τον σχηματισμό ανθρακικών δομών οι οποίες δεν είναι πλήρως κυκλοποιημένες. Το THA1 συμμετέχει στο σχηματισμό της τρικυκλικής αλκοόλης θαλιανόλη και το MRN1 συμμετέχει στο σχηματισμό της μονοκυκλικής αλδεϋδης μαρνεράλη (σχήμα 2).

Ως αναφορά την πορεία της βιοσύνθεσης τριτερπενοειδών μετά τον σχηματισμό του κατιόντος του προτεστερυλίου, τα ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτή την πορεία παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα μεταξύ τους. Η συνθάση της κυκλοαρτενόλης (CAS) είναι το κυριότερο ένζυμο αυτής της ομάδας OSCs. Η CAS μετατρέπει το κατιόν του προτεστερυλίου σε κυκλοαρτενόλη. Η κυκλοαρτενόλη είναι πρόδρομη ένωση για την παραγωγή μεμβρανικών στερολών και φυτοορμονών. Ομόλογες συνθάσες της CAS των φυτών έχουν βρεθεί σε βακτήρια και στην αμοιβάδα. Η συνθάση της λανοστερόλης (LSS) μοιάζει πολύ με την CAS και καταλύει τον σχηματισμό της λανοστερόλης από το κατιόν του προτεστερυλίου. Η LSS απαντάται σε αρκετά γένη φυτών, αλλά όχι τόσο συχνά όσο η CAS. Το προϊόν της LSS, δηλαδή η λανοστερόλη, έχει βρεθεί εκτός των φυτών σε ζώα, μύκητες καθώς και στην οικογένεια των *trypanosomatids*. Επιπλέον, υπάρχουν αρκετά ένζυμα τα οποία έχουν προκύψει κατά την εξέλιξη ύστερα από διπλασιασμό και διαφοροποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την CAS. Ένα τέτοιο ένζυμο είναι και η συνθάση της κουρκουβιταδιενόλης (CPQ). Η εξελικτική απόκλιση των φυτικών συνθασών LSS και CPQ από την αρχική CAS είναι μικρή.

Οι OSCs που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση τριτερπενοειδών αλκοολών μέσω του κατιόντος του νταμαρενυλίου, σε αντίθεση με τα παραπάνω, δεν παρουσιάζουν πολύ μεγάλη ομοιότητα μεταξύ τους. Αυτή η κατηγορία OSCs απαντάται μόνο σε φυτά που έχουν αγγειακό σύστημα, στα τραχεόφυτα. Οι κυριότερες OSCs που χρησιμοποιούν το ενδιάμεσο κατιόν του νταμαρενυλίου για την βιοσύνθεση τριτερπενοειδών είναι η συνθάση της λουπεόλης και η συνθάση της β-αμυρίνης. Επίσης, σε αυτή την κατηγορία OSCs ανήκουν και πολυλειτουργικές συνθάσες οι οποίες παράγουν μείγματα προϊόντων. Η συνθάση της λουπεόλης καταλύει την κυκλοποίηση του 2,3 οξειδοσκουαλενίου σε ενδιάμεσο κατιόν του νταμαρενυλίου και στη συνέχεια σε λουπεόλη. Η πορεία σύνθεσης της λουπεόλης αναφέρεται πιο αναλυτικά παρακάτω. Η συνθάση της β-αμυρίνης καταλύει και αυτή την κυκλοποίηση του 2,3 οξειδοσκουαλενίου προς το ενδιάμεσο κατιόν του νταμαρενυλίου και στη συνέχεια μοιράζεται τα βήματα του μονοπατιού της σύνθεσης της λουπεόλης έως και την δημιουργία του λουπιλ-κατιόντος (lupyl cation). Κατόπιν, η συνθάση της β-αμυρίνης καταλύει την περαιτέρω διαμόρφωση της ανθρακικής αλυσίδας του υποστρώματος και τη δημιουργία ανθρακικών δακτυλίων ώστε μετά από αποπρωτονίωση να δημιουργηθεί τελικά η β-αμυρίνη. Μία ακόμα γνωστή τριτερπενοειδής αλκοόλη που παράγεται από το ενδιάμεσο κατιόν του νταμαρενυλίου είναι η α-αμυρίνη (εικόνα 3).

Τα τελευταία χρόνια μελετηθήκαν οι λειτουργίες διάφορων OSCs με κλωνοποίηση και έκφρασή τους σε κύτταρα ζύμης [29]. Μεταξύ αυτών, μελετήθηκε η συνθάση της λουπεόλης από το *Olea europea* (ελιά) [22], το *Taraxacum officinale* [22] και το *Arabidopsis thaliana* [18]. Ακόμη, χαρακτηρίστηκαν και πολυλειτουργικές OCSs από το *P. vulgaris* και το *A. thaliana* οι οποίες συνθέτουν α-αμυρίνη και β-αμυρίνη η πρώτη [31] και α-αμυρίνη, β-αμυρίνη και λουπεόλη η δεύτερη [30, 32]. Μελέτη της έκφρασης γονιδίων OSCs όπως της συνθάσης της λουπεόλης, της συνθάσης της α-αμυρίνης και της συνθάσης της β-αμυρίνης στα φυτικά μοντέλα *L. japonicus*, *M. truncatula* και *P. sativum* έδειξε ότι αυτά τα γονίδια εκφράζονται διαφορετικά στους διάφορους ιστούς [23]. Αυτά τα γονίδια φάνηκε να έχουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης και κατά τον σχηματισμό των φυματίων. Αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι αυτά τα ένζυμα μπορεί να έχουν διάφορους ρόλους στην φυσιολογία και στην ανάπτυξη του φυτού [23].



Εικόνα 3: Τα τριτερπενοειδή β-αμυρίνη (1), λουπεόλη (2) και α-αμυρίνη (3) στο *A. thaliana* [13].

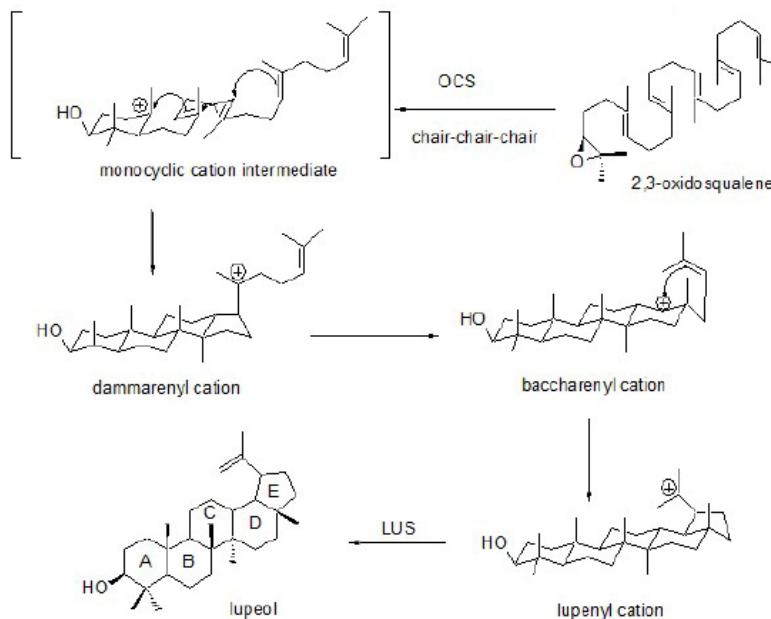
Η β-αμυρίνη, η λουπεόλη και η α-αμυρίνη είναι σαπωνίνες [12]. Οι σαπωνίνες είναι γλυκοσίδια τριτερπενίων (triterpene glycosides). Ένα παράδειγμα αυτής της κατηγορίας δευτερογενών μεταβολιτών αποτελεί η αντιμυκητιασική αβενασίνη η οποία βρίσκεται στις ρίζες του φυτού της βρώμης (*Avena strigosa*) [10,11]. Οι σαπωνίνες ονομάστηκαν έτσι γιατί όταν αναμειχτούν με νερό παράγεται αφρός, όπως γίνεται με το σαπούνι [12]. Τα τριτερπενοειδή και οι τριτερπενοειδείς σαπωνίνες θεωρείται ότι συμμετέχουν στο σύστημα άμυνας του φυτού απέναντι στα παθογόνα μικρόβια και στα έντομα. Επιπρόσθετα, οι σαπωνίνες χρησιμοποιούνται κατά την παραγωγή φαρμάκων, γλυκαντικών, απορρυπαντικών και καλλυντικών [16].

1.6. Η συνθάση της λουπεόλης

Η συνθάση της λουπεόλης, η οποία συχνά συμβολίζεται ως LUS, είναι μία ισομεράση με δράση ενδομοριακής μεταφοράς. Οι ισομεράσεις προκαλούν ανακατατάξεις δεσμών και ομάδων μέσα στα υποστρώματά τους. Η LUS έχει τον ενζυμικό αριθμό EC 5.4.99.B3 και μεταφέρει ομάδες οι οποίες δεν είναι αμινομάδες, ακυλομάδες ή φωσφορικές ομάδες από ένα τμήμα ενός μορίου στο ίδιο το μόριο.

Η συνθάση της λουπεόλης καταλύει την κυκλοποίηση του 2,3 οξειδοσκουαλενίου σε κατιόν του νταμαρενυλίου και επάγει την επέκταση της ανθρακικής αλυσίδας ώστε να δημιουργηθεί ένας νέος ανθρακικός δακτύλιος. Πιο αναλυτικά, αρχικά η LUS προσθέτει ηλεκτρόνια στο μόριο του 2,3 οξειδοσκουαλενίου ώστε να διασπαστούν οι δεσμοί οξυγόνου με τον πρώτο ανθρακικό δακτύλιο και να δημιουργηθεί ο δακτύλιος A. Παράλληλα, η LUS κυκλοποιεί περαιτέρω την ανθρακική αλυσίδα ώστε να σχηματιστούν οι δακτύλιοι B,C και D. Έτσι σχηματίζεται το κατιόν του νταμαρενυλίου. Στη συνέχεια, η LUS αναδιαμορφώνει την ανθρακική αλυσίδα του κατιόντος του νταμαρενυλίου και σχηματίζει το baccharrenyl cation. Η διαμόρφωση του baccharrenyl cation είναι τέτοια που επιτρέπει την δημιουργία του E δακτυλίου ύστερα από κυκλοποίηση με τη δράση της LUS. Έτσι, παράγεται το λούπενιλ-κατιόν (lupenyl cation) ή αλλιώς λουπιλ-κατιόν (lupyl cation). Τελικό στάδιο της διαδικασίας, ώστε να παραχθεί η λουπεόλη (lupenol), είναι η αποπρωτονίωση του κατιόντος (μεθυλομάδα) στη θέση C-29 με την δράση της LUS [9, 17, 18].

Εικόνα 4: Βιοσύνθεση της λουπεόλης με την δράση της συνθάσης της λουπεόλης (LUS).



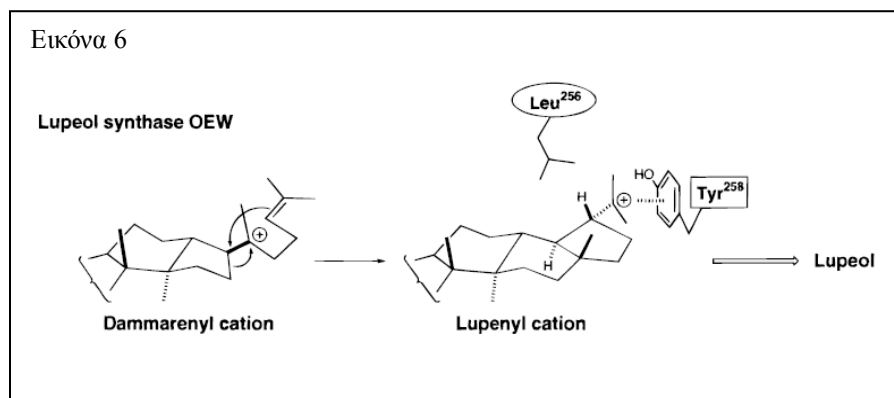
1.7. Το ενεργό κέντρο της συνθάσης της λουπεόλης.

Η περιοχή του ενεργού κέντρου της συνθάσης της λουπεόλης η οποία προσδίδει την εξειδίκευση για την παραγωγή της λουπεόλης είναι το εξαπεπτιδίο MLCYCR [19]. Στην εικόνα 5 φαίνεται η αμινοξική αλληλουχία της συνθάσης της λουπεόλης καθώς και το εξαπεπτιδίο MLCYCR.

```
>BAE53430.1
MWKCLKVAEGGKGLVSVSNFIGRQHWVFDPNAGTPQEHEEIERMRQEFTKNRFSIKQ
SADLLMRMQLRKENPCGPIPPAVKLRDVEKVTAEALITTIRRSITFYSSIQAHDGHWP
AESAGPLFFVQPLVMALYITGSLDDVLGPQHKKEIIRYLYNHQNEGGWGFHIEGHS
TMFGSALSIALRVLGQSLEDGEDMAVARGRKWILDHGGGLVAIPSWGKFWVTVLG
VYEWSGCNPLPPEFWLLPKIFPIHPGKMLCYCRLVYMPMSYLYGKKFVGPITALVR
SLRKELYNEPYDRVDWNKARNTVAKEDLYYPHPLIQDMLWGFLHHVGERVLNTWP
FSMLRQKAIEVAINHVRYEDETTRYLCIGSVEKVLYLIARWVEDPNSEAYKLHLARIP
DYFWLAEDGLKIQSFGCQMWDAAFAIQAILSGNVSEEYGP TLKKAHHFVKASQVR
ENPSGDFKAMYRHISKGAWTFMHDHG WQVSDCTA EGLKVALLSEMSDDLVA
KMETEQFYDAVNVILSLQSSNGGFPAWEPQRAYQWLEKFNPT EFFEETLIEREYVEC
TGSAMQALALFRKLYPKHRRKEIDRCISKAIRYIENTQNPDG SWYGCWGCYTYGT
WFAVEGLTACGKNFQNSVTLRRACKFLLSKQLPNGG WGESYLSSQDKVYTNIEGKR
ANLVQSSWALLSLMRAGQAEIDPTPIHRGIRLLINSQMDDGDFPQQEITGVFMRNCT
LNYSSYRNIFPIWALGEYRRRVLCA
```

Εικόνα 5: Η αμινοξική αλληλουχία της συνθάσης της λουπεόλης στο *L. japonicus*. Το εξαπεπτιδίο MLCYCR είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της λουπεόλης. L= λευκίνη, Y= τυροσίνη. Στην ηλεκτρονική βάση δεδομένων DDBG/GenBank/EMBL ο κωδικός BAE53430.1 αφορά την ταυτότητα (id) της συνθάσης της λουπεόλης του *L.japonicus*.

Συγκεκριμένα, η αλειφατική πλευρική ομάδα της λευκίνης (Leu256) σταθεροποιεί το λουπενιλ-κατιόν ώστε να ακολουθήσει αποπρωτονίωση της μίας μεθυλομάδας του E δακτυλίου του λουπενιλ-κατιόντος (εικόνα 4) με παρεμβολή H₂O [19,20]. Το αμινοξύ τυροσίνη (Tyr258) φαίνεται να προσδίδει σταθερότητα στον νεοσχηματιζόμενο E δακτύλιο ώστε η LUS να δίνει πεντακυκλικό προϊόν [19]. Στην εικόνα 6 διακρίνεται η συμβολή της λευκίνης (Leu256) και της τυροσίνης (Tyr258) του ενεργού κέντρου της συνθάσης της λουπεόλης κατά την μετατροπή του λουπενιλ-κατιόντος σε λουπεόλη [19].



Εικόνα 6: Η συμβολή της λευκίνης (Leu256) και της τυροσίνης (Tyr258) του ενεργού κέντρου της συνθάσης της λουπεόλης από την *Olea europaea* (OEW) κατά την μετατροπή του λουπενιλ-κατιόντος σε λουπεόλη [19].

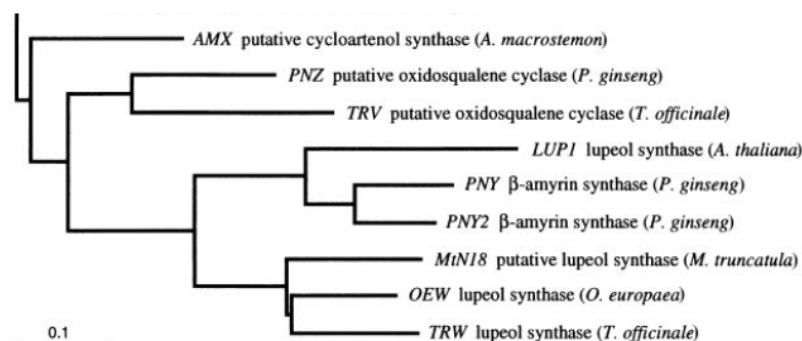
Στον πίνακα 2 [33] φαίνεται το εξαπεπτίδιο MLCYCR του ενεργού κέντρου της συνθάσης της λουπεόλης διαφόρων φυτών. Τα υπολείμματα 412SerPhe415, τα οποία σημειώνονται στον πίνακα (●●), παίζουν ρόλο στην διαφορετική καταλυτική δραστηριότητα της συνθάσης της λουπεόλης και της συνθάσης της β-αμυρίνης από αυτή της συνθάσης της κυκλοαρτενόλης και της συνθάσης της λανοστερόλης. Επίσης, η Lys449 φαίνεται να είναι και αυτή σημαντική για την εξειδικευμένη παραγωγή του προϊόντος. Ακόμη, συγκρίνονται οι αμινοξικές αλληλουχίες διαφόρων συνθασών της β-αμυρίνης καθώς και διαφόρων πολυλειτουργικών συνθασών οι οποίες μεταξύ των άλλων μπορεί να παράγουν και λουπεόλη. Για παράδειγμα η LjAMY2 του *L. japonicus* παράγει β-αμυρίνη και λουπεόλη.

Πίνακας 2		Motifs								
		MW(L)CYCR *			MQSFGSQ ••			FIKKSQ ◆		
Enzyme	Plant genes									
βAS	<i>Betula</i> BPY	256	MWCYCR	261	410	MQSFGSQ	416	446	FIKKSQ	451
	<i>Pisum</i> PSY	256	MWCYCR	261	410	MQSFGSQ	416	446	FIKKSQ	451
	<i>Glycyrrhiza</i> GgbAS1	256	MWCYCR	261	410	MQSFGSQ	416	446	FIKKSQ	451
	<i>Panax</i> PNY	258	MWCYCR	263	411	MQSFGSQ	417	447	FIKKSQ	452
	<i>Euphorbia</i> EtAS	256	MWCYCR	261	410	MQSFGSQ	416	446	FIKKSQ	451
	<i>Bruguiera</i> BgbAS	256	MWCYCR	261	410	MQSFGSQ	416	446	FIKKSQ	451
LUS	<i>Betula</i> BPW	255	MLCYCR	260	407	IQSFGSQ	413	443	FVKASQ	448
	<i>Olea</i> OEW	255	MLCYCR	260	408	MQSFGSQ	414	444	FVKASQ	449
	<i>Taraxacum</i> TRW	257	MLCYCR	262	410	MQSFGSQ	416	446	FVKASQ	451
	<i>Glycyrrhiza</i> GgLUS	255	MLCYCR	260	407	IQSFGSQ	413	443	FVKASQ	448
	<i>Lotus</i> OSC3	255	MLCYCR	260	407	IQSFGSQ	413	443	FVKASQ	448
	<i>Ricinus</i> RcLUS	256	MLCYCR	261	409	MQSFGSQ	415	445	FVKASQ	450
	<i>Bruguiera</i> BgLUS	256	MLCYCR	261	409	IQSFGSQ	415	445	FVKASQ	450
MFS	<i>Arabidopsis</i> Atlg78970/LUP1	254	ILCYSR	259	408	MQSFGSQ	414	444	YIKASQ	449
	<i>Arabidopsis</i> Atlg78500	259	LWLYFR	264	413	IQSFGSQ	419	453	FLNKSQ	458
	<i>Arabidopsis</i> Atlg78960	257	TLCYTR	262	411	MQSFGSQ	417	447	FIKKSQ	452
	<i>Arabidopsis</i> Atlg66960	257	AFSYTR	262	411	MQSFGSQ	417	447	YIKKSQ	452
	<i>Lotus</i> LjAMY2	256	MWCYCR	261	410	MQSFGSQ	416	446	FIKKSQ	451
	<i>Pisum</i> PSM	256	MLCYCR	261	410	MQSFGSQ	416	446	FIKKSQ	451
	<i>Kandelia</i> KcMS	256	MLCYCR	261	409	IQSFGSQ	415	445	FIKKSQ	450
	<i>Rhizophora</i> RsM1	256	MWCYCR	261	410	MQSFGSQ	416	446	FIKKSQ	451
	<i>Rhizophora</i> RsM2	258	MWCYCR	263	412	ITGIGSQ	418	448	FLNKSQ	453

Πίνακας 2: Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών γύρω από τα σημαντικά υπολείμματα των βAS (συνθάση της β-αμυρίνης), LUS (συνθάση της λουπεόλης) και MFS (πολυλειτουργική συνθάση) διαφόρων φυτών [33].

1.8. Οι δύο κλάδοι της συνθάσης της λουπεόλης.

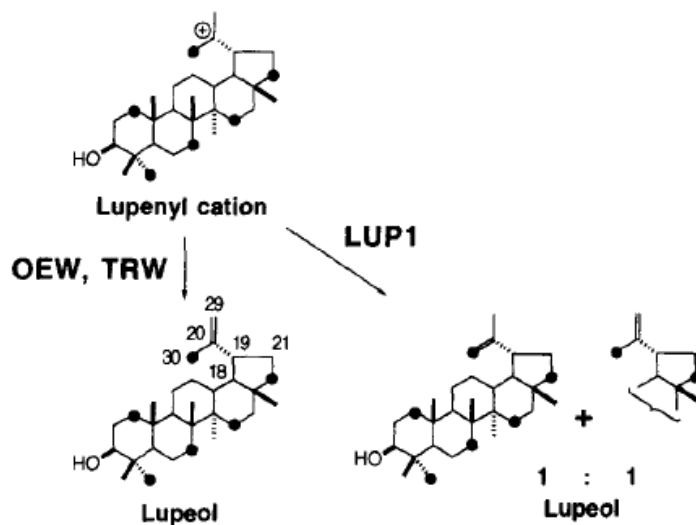
Από μελέτες σύγκρισης της αλληλουχίας της συνθάσης της λουπεόλης στο *A. thaliana*, στο *O. europaea* και *T. officinale* (τα ονόματα των συνθασών είναι LUP1, OEW και TRW αντίστοιχα) βρέθηκε ότι ενώ η OEW και η TRW είναι όμοιες κατά 78 % , η LUP1 έχει μόνο κατά 57 % ομοιότητα με τις OEW και TRW [21,22]. Έτσι φαίνεται να υπάρχουν δύο κλάδοι συνθασών της λουπεόλης (εικόνα 7) [21,22].



Εικόνα 7: Φυλογενετικό δέντρο φυτικών OSCs. Οι αποστάσεις μεταξύ των κλώνων και των κλάδων υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα CLUSTAL W (the indicated scale represents 0.1 amino acid substitution per site) [22]. Διακρίνεται η LUP1 η οποία βρίσκεται σε διαφορετικό κλάδο από τις OEW και TRW.

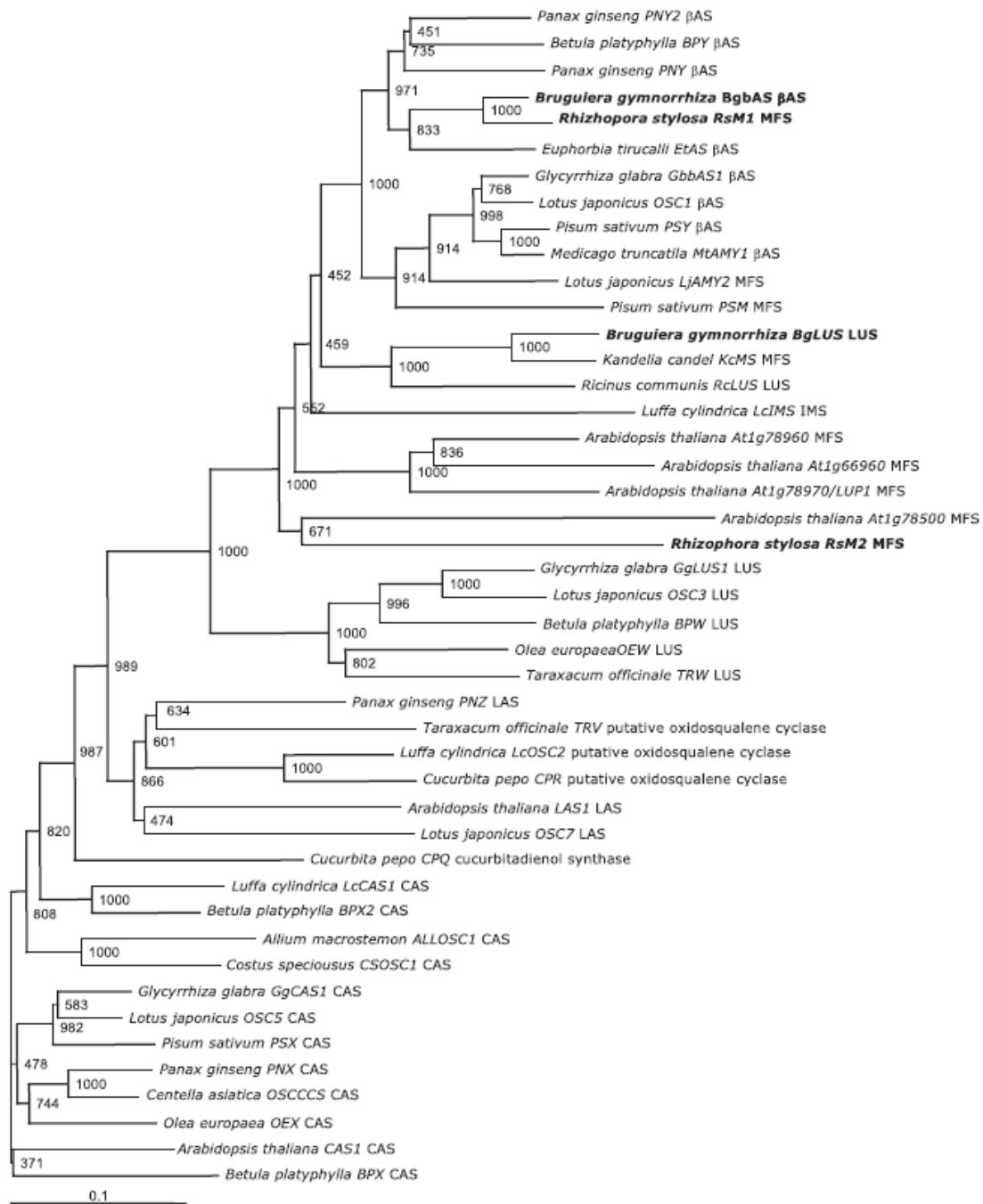
Οι δύο κλάδοι συνθασών της λουπεόλης, οι οποίοι είτε δημιουργήθηκαν κατά την εξέλιξη των φυτών είτε η ύπαρξή τους οφείλεται σε γενετικό θόρυβο [22], χωρίζονται ως εξής:

- i. Ο κλάδος που περιλαμβάνει την OEW και την TRW μπορεί να θεωρηθεί ότι εκπροσωπεί τους κλώνους της αυθεντικής συνθάσης της λουπεόλης [22]. Οι αυθεντικές συνθάσεις της λουπεόλης έχουν ευρεία κατανομή ανάμεσα στα είδη του φυτικού βασιλείου [22]. Οι OEW και TRW κατά την αποπρωτονίωση του λουπενιλ-κατιόντος αφαιρούν συγκεκριμένα το πρωτόνιο του (Z)-μεθυλίου του 2,3 οξειδοσκουαλενίου το οποίο προέρχεται από τον C6 του μεβαλονικού [21,22] (εικόνα 8).
- ii. Ο άλλος κλάδος περιλαμβάνει την LUP1. Η LUP1 πιθανώς να βρίσκεται σε στάδιο μετάβασης από ένζυμο με ενεργότητα συνθάσης της λουπεόλης σε κάποιο άλλο άγνωστο μέχρι στιγμής ένζυμο που συνθέτει τριτερπένια [22]. Η LUP1 κατά την αποπρωτονίωση του λουπενιλ-κατιόντος αφαιρεί το πρωτόνιο μη ειδικά από την μία εκ των δύο μεθυλομάδων του E δακτυλίου του 1,2 οξειδοσκουαλενίου με ίση πιθανότητα [21,22] (εικόνα 8).



Εικόνα 8: Το στάδιο της τελικής αποπρωτονίωσης του λουπενιλ-κατιόντος κατά τον σχηματισμό λουπεόλης με την δράση των συνθασών της λουπεόλης OEW (*O. europaea*), TRW (*T. officinale*) και LUP1 (*A. thaliana*). Η LUP1 προκαλεί μη ειδική αποπρωτονίωση σε αντίθεση με την OEW και την TRW.

Στο φυλογενετικό δέντρο της εικόνας 9 η συνθάση της λουπεόλης του *L. japonicus* OSC3 LUS βρίσκεται πολύ πιο κοντά φυλογενετικά στις συνθάσες της λουπεόλης OEW και TRW σε σχέση με την συνθάση της λουπεόλης του *A. thaliana* At1g78970/LUP1. Η At1g78970/LUP1 είναι μία πολυλειτουργική συνθάση η οποία δεν παράγει λουπεόλη ως μοναδικό προϊόν. Συμπερασματικά η συνθάση της λουπεόλης του *L. japonicus* ίσως ανήκει στον πρώτο κλάδο των συνθασών της λουπεόλης (i). Ως συνέπεια αυτού, η συνθάση της λουπεόλης του *L. japonicus* θα ακολουθεί και αυτή τον τρόπο αποπρωτονίωσης του υποστρώματος που έχουν οι συνθάσες OEW και TRW.



Εικόνα 9: Φυλογενετικό δέντρο φυτικών OSCs. Οι αποστάσεις μεταξύ των αμινοξικών αλληλουχιών υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα CLUSTAL W (The indicated scale represents 0.1 amino acid substitutions per site. Numbers indicate bootstrap values from 1000 replicates.) [33].

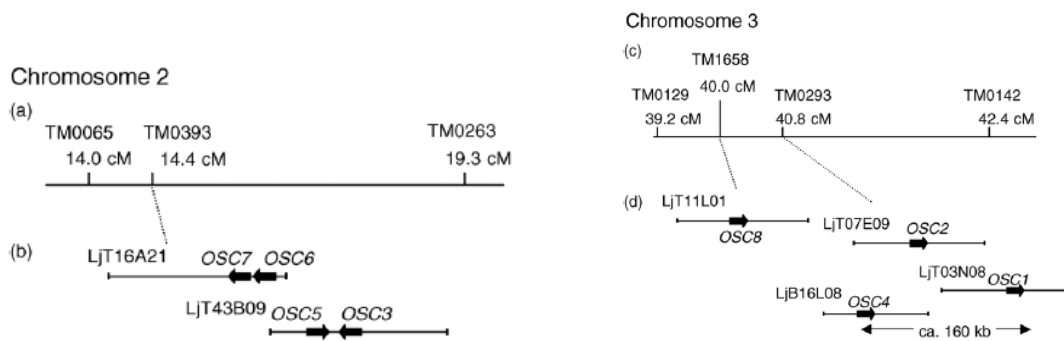
1.9. Η συνθάση της λουπεόλης στο *Lotus Japonicus*.

Στο *L. japonicus* έχουν μελετηθεί δύο OSCs που καταλύουν τον σχηματισμό της λουπεόλης. Αρχικά μελετήθηκε η πολυλειτουργική OSC LjAMY2 σε κύτταρα ζύμης στα οποία εισήχθη ολόκληρο το μήκος cDNA της *LjAMY2* [23]. Αυτή η πολυλειτουργική OSC είναι το πρώτο ένζυμο που βρέθηκε ότι παράγει δύο κύρια προϊόντα σε σχεδόν ισάξιες ποσότητες, την λουπεόλη και την β-αμυρίνη, καθώς και κάποια άλλα προϊόντα σε μικρότερες ποσότητες [23]. Στη συνέχεια μελετήθηκε μία άλλη αμινοξική αλληλουχία της οποίας το cDNA εισήχθη σε κύτταρα ζύμης και έδωσε ως μοναδικό προϊόν λουπεόλη [9]. Το γονίδιο αυτής της συνθάσης είναι το *OSC3* [9] και κωδικοποιεί για μία συνθάση της λουπεόλης η οποία παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με την συνθάση της λουπεόλης του *Glycyrrhiza glabra* (86%) [33]. Επίσης, στην ίδια μελέτη αναφέρεται και το όνομα του γονιδίου που κωδικοποιεί για την *LjAMY2*, το *OSC8* [33]. Στον πίνακα 3 αναγράφονται τα γονίδια των OSCs του *L. japonicus* και τα προϊόντα τους.

Gene	Genomic clone	cDNA	ORF in the cDNA	Triterpene alcohols produced by the recombinant yeast GIL77
<i>OSC1</i>	LjT03N08	<i>LjAMY1</i> [19] <i>cOSC1</i>	Partial Full	– β-Amyrin
<i>OSC2</i>	LjT07E09	–	–	–
<i>OSC3</i>	LjT43B09	<i>cOSC3</i>	Full	Lupeol
<i>OSC4</i>	LjB16L08	D9FR	Partial	–
<i>OSC5</i>	LjT43B09	<i>cOSC5</i>	Full	Cycloartenol
<i>OSC6</i>	LjT43B09, LjT16A21	Not cloned	–	–
<i>OSC7</i>	LjT16A21	Not cloned	–	–
<i>OSC8</i>	LjT11L01	<i>LjAMY2</i> [19]	Full	β-Amyrin, lupeol [19]

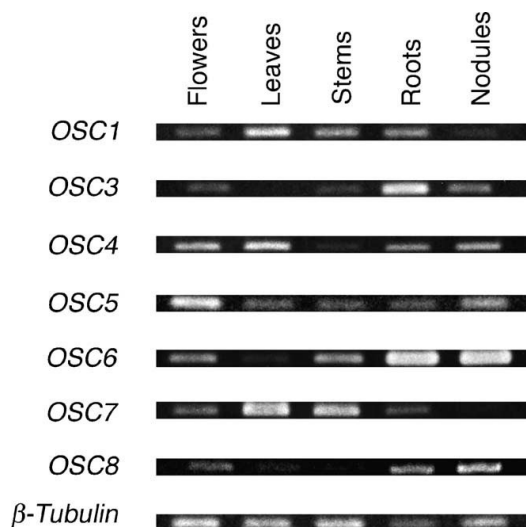
Πίνακας 3: Τα γονίδια των OSCs του *L. japonicus*, οι αντίστοιχοι γενομικοί κλώνοι και τα προϊόντα τους. Η μελέτη έγινε με κλωνοποίηση των αντίστοιχων cDNA με RT-PCR [9].

Το γονίδιο της αυθεντικής συνθάσης της λουπεόλης στο *L. japonicus* είναι το *OSC3*, με ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσής μεγέθους 2268bp (εικόνα 5). Το *OSC3* κωδικοποιεί για πρωτεΐνη μήκους 755aa και βρίσκεται στον γενομικό κλώνο LjT43B09 ο οποίος εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 2 (εικόνα 10) [9]. Το γονίδιο της συνθάσης της λουπεόλης *OSC3* φαίνεται να υπάρχει σε ένα μόνο αντίγραφο στο γονιδίωμα του *L. japonicus* [9].



Εικόνα 10: Η οργάνωση των γονιδίων των OSCs στο *L. japonicus* [9]. Τα γονίδια των OSCs στο *L. japonicus* φαίνεται ότι οργανώνονται σε clusters, όπως και τα OSCs γονίδια του *A. thaliana* [9].

Στην εικόνα 11 φαίνεται η έκφραση των *OSC*s γονιδίων στους διάφορους ιστούς του ώριμου *L. japonicus* [9]. Το μετάγραφο του *OSC3* που κωδικοποιεί για την συνθάση της λουπεόλης συσσωρεύεται κυρίως στις ρίζες και στα ριζικά φυμάτια [9, 23]. Τα γονίδια *OSC1*, *OSC4* και *OSC8* έχουν περισσότερο από 90% ομοιότητα στην κωδική τους αλληλουχία. Παρόλα αυτά, αυτά τα γονίδια έχουν διαφορετικά μοτίβα έκφρασης ανάμεσα στα όργανα του φυτού, κάτι το οποίο υποδηλώνει ότι η έκφρασή τους ρυθμίζεται ξεχωριστά [9]. Παρατηρείται δηλαδή οργανοειδική έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις συνθάσες των τριτερπενοειδών, συμπεριλαμβανομένου και του γονιδίου που κωδικοποιεί για την συνθάση της λουπεόλης. Πιθανώς η λουπεόλη εμπλέκεται σε κάποιον φυσιολογικό ρόλο στις ρίζες και στα φυμάτια που δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί [34].



Εικόνα 11: Έκφραση των *OSC*s γονιδίων στους διάφορους ιστούς του *L. japonicus* Gifu B-129. Για να εκτιμηθεί η συσσώρευση των OSCs μεταγράφων έγινε RT-PCR ανάλυση. Τα cDNA που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από τα όργανα ώριμων φυτών *L. japonicus*. Έγινε κανονικοποίηση των δειγμάτων των ιστών χρησιμοποιώντας το μετάγραφο της β -τουμπουλίνης ώστε να μπορεί να γίνει η σύγκριση των αποτελεσμάτων [9].

Η έκφραση της συνθάσης της λουπεόλης σχετίζεται με την δημιουργία φυματίων σε διάφορα φυτά [8]. Για παράδειγμα, στο *G. glabra* η συνθάση της λουπεόλης εκφράζεται στα φυμάτια και σε κύτταρα καλλιέργειας, στα οποία παρατηρείται και η έκφραση της μπετουλίνης (betulinic acid) [16]. Η μπετουλίνη είναι μεταβολίτης της λουπεόλης. Στο *Vicia faba* το 82% των διαλυτών οργανικών ενώσεων που βρίσκονται στον εξωτερικό φλοιό των φυματίων αποτελείται από μπετουλίνη και άλλο ένα 7% αποτελείται από λουπεόλη [35]. Ακόμη, σε μελέτη των γονιδίων που εκφράζονται κατά την δημιουργία φυματίων στο *M. truncatula* απομονώθηκε ένα μέρος μίας OSC αλληλουχίας [36] η οποία εμφανίζει μεγάλη συγγένεια με τις συνθάσες της λουπεόλης [22,23] και εκφράζεται κυρίως στα ριζικά φυμάτια [23]. Το γονίδιο που εκφράζεται στα φυμάτια του *M. truncatula* και έχει ομολογία με την συνθάση της λουπεόλης του *A. thaliana* είναι Nar (nodulation in absence of Rhizobium) παράγοντας, δηλαδή εμπλέκεται στη δημιουργία των φυματίων [34].

Σε *in situ* ανάλυση που έγινε για τον εντοπισμό του mRNA του *OSC3* σε φυμάτια του *L. japonicus*, παρατηρήθηκε ότι αυτό το mRNA συσσωρεύεται κυρίως στο σημείο επαφής του φυματίου και της ρίζας [Delis et al, Unpublished Results]. Επίσης, σε μελέτη όπου έγινε αποσιώπηση του γονιδίου *OSC3* του *L. japonicus* με ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού, έδειξε ότι ο αριθμός των σχηματιζόμενων φυματίων επηρεάζεται από την αποσιώπηση του *OSC3* [34].

Η περαιτέρω μελέτη της συνθάσης της λουπεόλης *OSC3* του *L. japonicus*, και συγκεκριμένα ως αναφορά τον σχηματισμό των φυματίων, είναι επακόλουθο των παραπάνω στην αναζήτηση του ρόλου της.

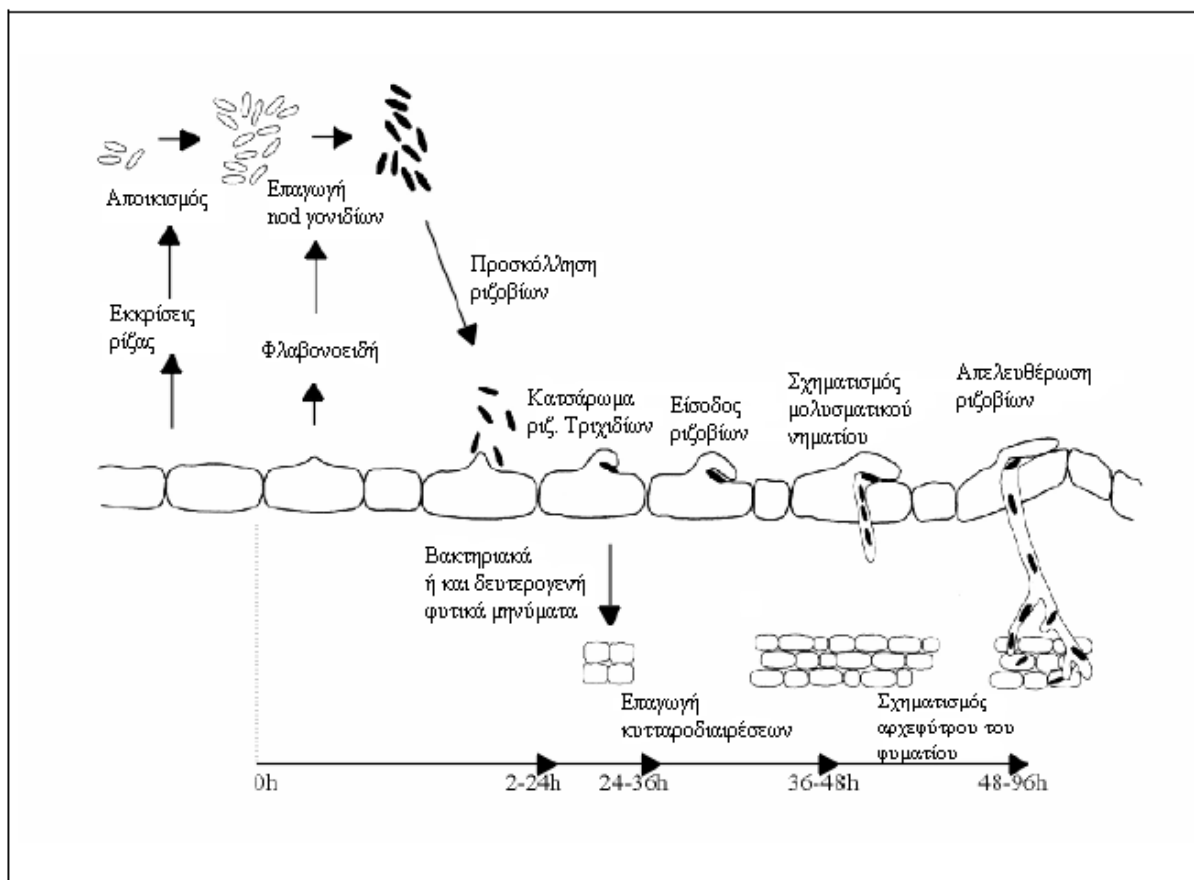
1.10. Σχηματισμός φυματίων- ριζόβια βακτήρια

Η συμβιωτική σχέση ριζοβίου-ψυχανθούς έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός νέου φυτικού οργάνου, με ιδιαίτερα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά, που ονομάζεται φυμάτιο και φέρεται συνήθως στη ρίζα και σπανιότερα στο βλαστό του ψυχανθούς [39]. Ο όρος ριζόβια έχει δοθεί σε μία κατηγορία άλφα-πρωτεοβακτηρίων (οικογένεια Rhizobiaceae) τα οποία δεσμεύουν άζωτο και δημιουργούν φυμάτια με τα ψυχανθή. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium*, και *Sinorhizobium*, καθώς και το *Agrobacterium* [38; pp. 15-18]. Τα ριζόβια είναι Gram-βακτήρια, υποχρεωτικά αερόβια [34] και συνήθως παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς τα ψυχανθή με τα οποία συνάπτουν συμβιωτικές σχέσεις.

Τα ριζόβια και τα ψυχανθή πρέπει να αναγνωρίσουν το ένα το άλλο ώστε να αρχίσει η διαδικασία της φυματιογένεσης στις ρίζες του ψυχανθούς. Τα ριζόβια παρουσιάζουν θετικό χημειοτακτισμό στις εκκρίσεις των ριζών. Σε αυτές τις εκκρίσεις περιλαμβάνονται σε αφθονία ουσίες θρεπτικής σημασίας, όπως αμινοξέα και δικαρβοξυλικά οξέα, αλλά και ουσίες σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, όπως τα φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή εν συνεχεία επάγουν την έκφραση γονιδίων του ριζοβίου, τα οποία καλούνται nod γονίδια. Τα προϊόντα των nod γονιδίων είναι πολύ σημαντικά για τον σχηματισμό του φυματίου και ονομάζονται παράγοντες Nod. Όταν ο παράγοντας Nod αναγνωριστεί από τα κύτταρα της ρίζας του ψυχανθούς τότε επάγεται ένας συνδυασμός βιοχημικών και μορφολογικών αλλαγών στο φυτό. Σε μελέτη παλαιότερων ερευνών που πραγματοποιήθηκαν πάνω σε φυτά μηδικής αναφέρεται η υπόθεση η οποία θέλει τους Nod παράγοντες να δρουν σαν ρυθμιστές ανάπτυξης με το να επάγουν έναν ενδογενή μηχανισμό του φυτού για σχηματισμό φυματίων, που χρησιμοποιεί σαν ρυθμιστή ενδογενή μόρια με δομή ανάλογη των Nod παραγόντων [39,40]. Η διαδικασία του σχηματισμού του φυματίου κατά τα πρώιμα στάδια περιγράφεται στην εικόνα 12.

Η συμβίωση ριζοβίου-ψυχανθούς ωφελεί και τις δύο πλευρές. Το φυτό παρέχει στα ριζόβια ένα περιβάλλον πλούσιο σε πηγές άνθρακα, απαλλαγμένο από τον μικροβιακό ανταγωνισμό του εδάφους. Τα ριζόβια προσφέρουν στο φυτό το μεγαλύτερο μέρος των αναγκών του σε αφομοιώσιμο άζωτο. Τα ριζόβια βακτήρια παραμένουν μέσα στα μολυσμένα κύτταρα των φυματίων και μετατρέπονται σε βακτηριοειδή. Στα μολυσμένα κύτταρα τα κυτταρικά οργανίδια συγκεντρώνονται στην περιφέρεια του κυττάρου και ο κεντρικός χώρος

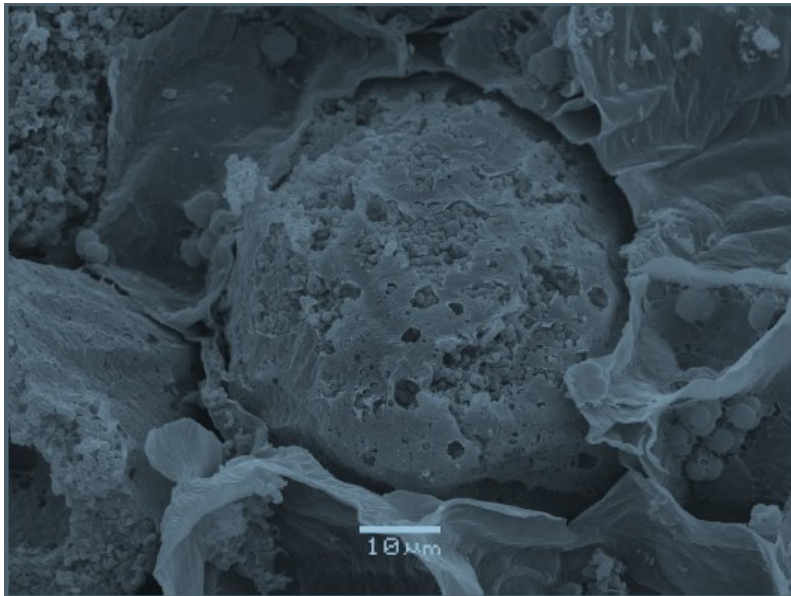
καταλαμβάνεται από τα βακτηριοειδή [34]. Τα βακτηριοειδή παράγουν το ενζυμικό σύμπλοκο της νιτρογενάσης και με τη δράση του καθιλώνουν το μοριακό άζωτο σε αμμωνία [39]. Η αμμωνία εξέρχεται των βακτηριοειδών και μετατρέπεται αμέσως σε αμμωνιακά ιόντα, τα οποία στη συνέχεια συμμετέχουν στην παραγωγή της γλουταμίνης από το φυτό.



Εικόνα 12: Τα πρώιμα στάδια κατά τον σχηματισμό των φυματίων [41].

Οι Nod παράγοντες που εκκρίνουν τα ριζόβια επάγουν την έκφραση μίας σειράς γονιδίων του φυτού. Αυτά τα γονίδια ονομάζονται γονίδια νοντουλινών, διακρίνονται σε πρώιμα και όψιμα και τα προϊόντα τους ονομάζονται νοντουλίνες. Οι πρώιμες νοντουλίνες εκφράζονται κατά τα πρώτα στάδια της αλληλεπίδρασης φυτού-ριζοβίου και του σχηματισμού του φυματίου. Οι όψιμες νοντουλίνες εκφράζονται κατά τα τελευταία στάδια του σχηματισμού του φυματίου, και η έκφρασή τους σχετίζεται χρονικά με την έναρξη της αζωτοδέσμευσης [39].

Υπάρχουν δύο ειδών μορφές φυματίων: τα καθορισμένα φυμάτια και τα μη καθορισμένα φυμάτια. Οι διαφορές που παρατηρούνται στις δυο μορφές των φυματίων είναι αποτέλεσμα τις χρονικής διάρκειας των κυτταρικών διαιρέσεων του μεριστώματος. Το μερίστωμα δημιουργείται μετά την είσοδο των ριζοβίων στη ρίζα. Στα μη καθορισμένα φυμάτια η μεριστωματική δραστηριότητα είναι παρούσα σε όλη τη διάρκεια της ζωής των φυματίων, των οποίων το σχήμα επιμηκύνεται συνεχώς. Αντιθέτως, στα καθορισμένα φυμάτια η μεριστωματική δραστηριότητα σταματά μετά το πέρας ενός μικρού χρονικού διαστήματος από την στιγμή της μόλυνσης της ρίζας από τα ριζόβια. Το σχήμα των καθορισμένων φυματίων είναι χαρακτηριστικά σφαιρικό και η αύξηση του οφείλεται μόνο στην αύξηση του μεγέθους των κυττάρων και όχι στην ανάπτυξη νέων κυττάρων. Το είδος των φυματίων που θα σχηματιστεί στις ρίζες του ψυχανθούς εξαρτάται από το είδος του φυτού. Για παράδειγμα το *M. truncatula* και το *P. sativum* σχηματίζουν μη καθορισμένα φυμάτια, ενώ το *L. japonicus* σχηματίζει καθορισμένα φυμάτια [23,39] (εικόνα 13).



Εικόνα 13: Μολυσμένα κύτταρα φυματίων του ψυχανθούς *L. japonicus* γεμάτα με αζωτοδεσμευτικά ριζόβια βακτήρια [37].

2. Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της έκφρασης της συνθάσης της λουπεόλης σε αναπτυσσόμενα φυτά *L. japonicus*. Για τον σκοπό αυτό έγινε απομόνωση ολικού mRNA, ακολούθησε PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) και στη συνέχεια ανάλυση PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR), χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές για την συνθάση της λουπεόλης. Για τη μελέτη της έκφρασης της συνθάσης της λουπεόλης η οποία φαίνεται να έχει σχέση με την δημιουργία των φυματίων, αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο δύο ομάδες φυτών. Στη μία ομάδα επιτράπηκε η συμβίωση με ριζόβια βακτήρια ώστε να σχηματιστούν τα φυμάτια, ενώ στην άλλη ομάδα δόθηκε άζωτο σε αφομοιώσιμη μορφή μαζί με το θρεπτικό διάλυμα ποτίσματος (ομάδα control).

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Το ψυχανθές *Lotus japonicus* ως φυτικό μοντέλο.

Ως φυτικό υλικό για τη διεξαγωγή των πειραμάτων που αφορούν στη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη συνθάση της λουπεόλης (OSC3), χρησιμοποιήθηκε το ψυχανθές *Lotus japonicus* (οικότυπος Gifu). Για την μελέτη της έκφρασης του OSC3 χρησιμοποιήθηκαν ρίζες, βλαστοί και φύλλα ηλικίας 7, 14 και 28 ημερών από μη μολυσμένα και μολυσμένα φυτά με το βακτήριο *Mesorhizobium loti strain R7A* καθώς και φυμάτια ηλικίας 14 και 28 ημερών.

3.2. Προετοιμασία των σπόρων.

Για την ομοιόμορφη και γρήγορη βλάστηση των σπερμάτων του *L. japonicus* είναι απαραίτητη η τοποθέτησή τους σε πυκνό θειικό (H_2SO_4) οξύ για 5 λεπτά. Ακολουθούν πέντε εκπλύσεις με απιονισμένο κρύο νερό. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αποστείρωση των σπερμάτων, εμβαπτίζονται σε διάλυμα 2% υποχλωριώδους νατρίου και 0,02% Tween 20 (BDH) για 20 λεπτά. Ακολούθως, τα σπέρματα ξεπλένονται 6 φορές με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό και απλώνονται σε τρυβλία, ο πάτος των οποίων καλύπτεται με 2 φύλλα διηθητικό χαρτί Whatmann 3MM, εμποτισμένα με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Τα τρυβλία αφήνονται στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου για 72 έως 96 ώρες, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η προβλάστηση των σπερμάτων.

3.3. Καλλιέργεια ριζοβίων και μόλυνση φυτών.

Για τη μόλυνση των φυτών χρησιμοποιείται το ριζόβιο βακτήριο *Mesorhizobium loti* στέλεχος R7A. Τα ριζόβια αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό YM. Η επώαση των καλλιιεργειών πραγματοποιείται στους 30°C για 72 ώρες. Η μόλυνση των φυτών γίνεται αμέσως μετά την

προβλάστηση των σπερμάτων, κατά την διαδικασία της φύτευσης, με τη προσθήκη 500 μl εναιωρήματος ριζοβίου σε θρεπτικό διάλυμα YM (OD : 0,1) σε κάθε ριζίδιο από τα προβλαστημένα φυτά.

» YM : σε 1 lt dH₂O προστίθενται 10 gr Mannitol, 0,5 gr K₂HPO₄, 0,2 gr MgSO₄.7H₂O, 0,1 gr NaCl και 0,5 gr Yeast extract.

3.4. Συνθήκες ανάπτυξης και καλλιέργειας του *Lotus Japonicus*.

Για την ανάπτυξή τους, τα νεαρά έγκυτα μεταφέρονται σε δοχεία που περιέχουν αποστειρωμένο περλίτη και βερμικουλίτη σε αναλογία 1:1 και ποτίζονται με θρεπτικό διάλυμα Hoagland. Στην περίπτωση που τα φυτά έχουν μολυνθεί με ριζόβια, χρησιμοποιείται θρεπτικό διάλυμα Hoagland χωρίς άζωτο. Τα φυτά τοποθετούνται σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 23°C, φωτοπερίοδος 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι).

» Hoagland 100% (σε 1 lt H₂O): 2 ml 1 M MgSO₄, 1 ml 1M KH₂PO₄, 1 ml 0.1 M FeEDTA, 10 ml CaCl₂ 0.5 M, 5 ml KCl 1 M, 5 ml 1M KNO₃, 5 ml 1M Ca(NO₃)₂.4H₂O, 1ml διαλύματος ιχνοστοιχείων.

» διάλυμα ιχνοστοιχείων (σε 1 lt H₂O): αναμιγνύονται 2.86 gr H₃BO₃, 1,81 gr MnCl₂.4H₂O, 0,11 gr ZnCl₂, 0,05 gr CuCl₂.H₂O, 0,02 gr H₂MoO₄.

3.5. Απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς (RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN).

- ♦ Χρησιμοποιούνται 100 mg φυτικού ιστού τα οποία ομογενοποιούνται με ελαιοτρίβιση σε σωλήνα eppendorf 2 ml μαζί με υγρό άζωτο.
- ♦ Προσθήκη 500 μl buffer RLT [σε 1 ml buffer RLT έχει προστεθεί 10 μl β-μερκαπτεθανόλη (β-ME)].
- ♦ Ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα και επώαση στους 56 °C για ένα έως τρία λεπτά.

- ♦ Μεταφορά του δείγματος σε στήλη φυγοκέντρησης QIAshredder, η οποία τοποθετείται σε σωλήνα erpendorf 2 ml και φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 2 λεπτά.
- ♦ Προσεκτικά μεταφέρεται με πιπέτα το υπερκείμενο χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα σε νέο σωλήνα erpendorf 1,5 ml.
- ♦ Προσθήκη 250 μl αιθανόλη (96-100 %), το 1/2 του αρχικού όγκου του διαλύματος και ανάμιξη με την πιπέτα.
- ♦ Μεταφορά του διαλύματος (750 μl) σε στήλη φυγοκέντρησης RNeasy η οποία τοποθετείται σε σωλήνα erpendorf 2 ml. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 2 λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου.
- ♦ Προσθήκη 500μl buffer RPE και φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 2 λεπτά. Απόρριψη του υπερκείμενου και νέα φυγοκέντρηση στις ίδιες στροφές και λεπτά. Τοποθέτηση της στήλης σε νέο σωλήνα erpendorf 1,5 ml.
- ♦ Προσθήκη 50 μl “RNase-free” νερού στο κέντρο της στήλης και φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 1 λεπτό για έκλυση του RNA.

3.6. Χειρισμός του ολικού RNA με DNάση.

Με αυτή τη μέθοδο απομακρύνεται το γονιδιωματικό DNA που, ίσως, συνυπάρχει με το RNA που απομονώθηκε από τον ιστό. Αρχικά προστίθεται DNάση στο αρχικό δείγμα RNA και στη συνέχεια γίνεται μεταχείριση με φαινόλη και χλωροφόρμιο για τον “καθαρισμό” του RNA. Συνολικά ακολουθούνται τα εξής βήματα :

- ♦ Σε 25,5 μl ολικού RNA που απομονώθηκε με την προηγούμενη διαδικασία προστίθεται: 3 μl 10X ρυθμιστικό διάλυμα DNάσης, 0,5 μl αναστολέα RNase., 1 μl DNάση ελεύθερης από RNάσες (1U / μg RNA).
- ♦ Ο τελικός όγκος είναι 30 μl και ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 20 λεπτά.
- ♦ Προστίθενται 3 όγκοι αρχικού διαλύματος ddH₂O (90 μl) και 4 όγκοι αρχικού διαλύματος φαινόλη (120 μl). Το μίγμα αναδεύεται σε μηχανικό αναδευτήρα και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 5 λεπτά.

- ♦ Η πάνω φάση του υδατικού διαλύματος που προκύπτει (περίπου 120 μl) μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf και η ίδια διαδικασία ακολουθείται και κατά την ανάμιξη με φαινόλη/χλωροφόρμιο σε αναλογία 1:1 και σε ανάμιξη με ίσο όγκο χλωροφόρμιο.
- ♦ Η κατακρήμνιση του RNA γίνεται με προσθήκη 1/20 του όγκου του διαλύματος CH₃COONa pH=5,3 και προσθήκη 2,5 όγκων αιθανόλης. Το δείγμα διατηρείται στους –20°C για 12 ώρες τουλάχιστον ή εναλλακτικά στους –80 °C για 1 ώρα.
- ♦ Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C και αφαιρείται το υπερκείμενο.
- ♦ Προστίθεται ίσος όγκος αρχικού διαλύματος αιθανόλη 70% και ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Αφαιρείται το υπερκείμενο και επιπροσθέτως μπορεί να πραγματοποιηθεί και μία δεύτερη φυγοκέντρηση για 5 λεπτά για την πλήρη αφαίρεση της αιθανόλης.
- ♦ Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει στον πάγο για περίπου 15 λεπτά και επαναδιαλύεται σε 21 μl ddH₂O.

3.7. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων, χρησιμοποιούμε την ποσοτική φωτομετρική ανάλυση. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο νόμο των Beer και Lambert. Με το νόμο αυτό η απορρόφηση του φωτός από ένα διάλυμα συσχετίζεται με τη συγκέντρωση της ουσίας και το μήκος της διαδρομής του φωτός μέσα από το διάλυμα.

- ♦ Σε ειδική κυβέττα χαλαζία, που περιείχε 49 μl dH₂O, τοποθετήθηκαν 1 μl δείγματος και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του διαλύματος σε μήκος κύματος 260nm.
- ♦ Η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων, χωρίς την παρουσία άλλων προσμίξεων, όπως πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, δίνεται από τον τύπο :

$C = O.D._{260} * D * \text{συντελεστής αραίωσης}$, όπου O.D. είναι η απορρόφηση του δείγματος στα 260nm και D είναι η σταθερά που εξαρτάται από το είδος του νουκλεϊνικού οξέος. Σε καθαρά διαλύματα DNA η σταθερά D ισούται με 50 mg/ml, σε διαλύματα RNA ισούται με 40 mg/ml, ενώ στην περίπτωση ολιγονουκλεοτιδίων ισούται με 30 mg/ml.

- ♦ Προκειμένου να υπολογιστεί η καθαρότητα ενός δείγματος νουκλεϊνικών οξέων, υπολογίζονται οι λόγοι $O.D._{260}/O.D._{280}$ και $O.D._{240}/O.D._{260}$. Όταν η τιμή του πρώτου λόγου κυμαίνεται μεταξύ 1,8 – 2,0 και του δεύτερου στο 0,5, τότε το δείγμα θεωρείται ικανοποιητικής καθαρότητας.

3.8.α. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είναι ο *in vitro* πολλαπλασιασμός αλληλουχιών DNA με ταυτόχρονη επέκταση των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων. Η διαδικασία περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους σε διαφορετικές θερμοκρασίες, με γρήγορη μετάβαση από τη μια θερμοκρασία στην άλλη. Σε χρονικό διάστημα ολίγων ωρών, η συγκεκριμένη περιοχή του DNA που επεκτείνεται (DNA στόχος), πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την PCR είναι DNA στόχος, εκκινητές “primers”, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, ένζυμο *Taq DNA* πολυμεράση, ιόντα Mg^{++} απαραίτητα για την ενζυμική δράση και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα $pH \approx 8.2$ για τη δράση του ενζύμου.

Το DNA στόχος, πολλαπλασιάζεται μετά από πολλαπλές αντιγραφές, σε σημείο που να είναι ανιχνεύσιμο. Το DNA στόχος αποτελεί το πρότυπο DNA στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και ως αφετηρίες χρησιμοποιούνται 2 συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (18-22 βάσεων) που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση.

Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:

- ♦ Θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (93 – 95°C) ώστε να αποδιαταχθεί το DNA (denaturation step) και από δίκλωνο μετατρέπεται σε μονόκλωνο.
- ♦ Θερμοκρασία υβριδισμού (annealing step), προκειμένου οι εκκινητές να υβριδίσουν με το DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από το μήκος του εκκινητή και την περιεκτικότητά του σε G και C. Ένας τρόπος υπολογισμού της θερμοκρασίας του εκκινητή είναι μέσω του τύπου $T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$. Η θερμοκρασία του υβριδισμού είναι τελικά 5°C κάτω από τον μέσο όρο των τιμών T_m των δύο εκκινητών της αντίδρασης.

- ♦ Θερμοκρασία επιμήκυνσης ή πολυμερισμού (extention step). Κατά τη διάρκεια αυτού του βήματος λαμβάνει χώρα η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA, με τη δράση της DNA πολυμεράσης. Έτσι σχηματίζονται δύο καινούργιες αλυσίδες ή κλώνοι DNA συμπληρωματικές προς αυτές των δύο κλώνων του προτύπου DNA με αποτέλεσμα το διπλασιασμό του DNA στόχου.

Η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω επαναλαμβάνεται για 25 – 30 κύκλους συνήθως. Κατά τη διάρκεια των κύκλων η παραγωγή των προϊόντων της αντίδρασης γίνεται με εκθετικό ρυθμό, εφόσον βέβαια δεν παρουσιαστούν περιοριστικοί παράγοντες, όπως για παράδειγμα έλλειψη νουκλεοτιδίων. Η PCR βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς τομείς και, τελευταία, έχουν αναπτυχθεί πολλές παραλλαγές της παραπάνω βασικής αντίδρασης. Μία ευρέως χρησιμοποιούμενη παραλλαγή είναι η RT-PCR, κατά την οποία χρησιμοποιείται - ως μήτρα για ενίσχυση - RNA, το οποίο πρώτα μεταγράφεται σε cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφή (Reverse transcriptase).

3.8.β. PCR για τον έλεγχο ύπαρξης γενωμικού DNA.

Πραγματοποιείται η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης στο ολικό RNA που απομονώθηκε για να διαπιστωθεί τυχόν ύπαρξη DNA. Για αυτό το σκοπό θα ενισχυθεί το γονίδιο της ουμπικουϊτίνης το οποίο εκφράζεται σε όλους τους φυτικούς ιστούς.

- ♦ Σε σωλήνα erpendorf προστίθενται τα παρακάτω σε τελικό όγκο 20μl.
 - 15,42 μl ddH₂O
 - 2 μl 10X ρυθμιστικό διάλυμα Kara Taq
 - 0,4 μl μίγμα dNTPs
 - 0,5 μl ολικό RNA
 - 0,8 μl εκκινητής έμπροσθεν
 - 0,8 μl εκκινητής ανάστροφος
 - 0,08 μl DNA πολυμεράση kara Taq (1 Unit/μl)
- ♦ Το μίγμα αναμιγνύεται με γρήγορη φυγοκέντρηση και τοποθετείται στη συσκευή PCR, προκειμένου να εκτελεστεί το παρακάτω πρόγραμμα:

	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αρ. κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	2 λεπτά	1
Αποδιάταξη αλυσίδων DNA	95 °C	30 δευτερόλεπτα	35
Υβριδισμός εκκινητών		30 δευτερόλεπτα	35
Σύνθεση νέων αλυσίδων DNA	72 °C	30 δευτερόλεπτα	35
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 λεπτά	1

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για να ενισχύσουν το γονίδιο της ουμικουϊτίνης είναι:

εκκινητής έμπροσθεν Lj UbiF: 5'-TTC ACC TTG TGC TCC GTC TTC-3'

εκκινητής ανάστροφος Lj UbiR: 5'-AAC AAC AGC ACA CAC AGC CAA TCC-3'

- ♦ Μετά το τέλος της διαδικασίας το προϊόν της PCR αναλύεται σε πηκτή αγαρόζης.

3.9. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης.

Στην PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) ως αρχικό δείγμα χρησιμοποιείται το ολικό RNA το οποίο μετατρέπεται σε cDNA παρουσία του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase). Για τη μεταγραφή αυτή χρησιμοποιούνται τυχαία εξαμερή ή εννιαμερή όλιγοdTs και το cDNA που θα παραχθεί θα χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο για την DNA πολυμεράση στη συνήθη τεχνική της PCR. Εξελίξεις στην RT-PCR περιλαμβάνουν την ανάπτυξη απλών πρωτοκόλλων στα οποία η σύνθεση cDNA και η αντίδραση PCR εκτελούνται σε ένα στάδιο (one step RT-PCR). Τα πρωτόκολλα αυτά βασίζονται στην αξιοποίηση της διπλής ιδιότητας ορισμένων θερμοσταθερών DNA πολυμερασών όπως η T. Thermophilus (Tth) DNA πολυμεράση να μεταγράψουν αντίστροφα RNA παρουσία Mn^{2+} , ενώ ταυτόχρονα δρουν και ως DNA πολυμεράσες.

Η σύνθεση του cDNA έγινε χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο ImProm-II™ Reverse Transcription System της εταιρίας Promega και πραγματοποιείται σε ένα στάδιο.

- ♦ Αρχικά σε σωλήνα eppendorf τοποθετούνται τα παρακάτω συστατικά
 - 1 ng – 5 mg ολικού RNA
 - 1 µl oligo(dT)₁₅ primer (0,5 mg / αντίδραση)
 - δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O) μέχρι τελικό όγκο 5 µl.
- ♦ Το παραπάνω μίγμα φυγοκεντρείται γρήγορα και θερμαίνεται στους 70 °C για πέντε λεπτά.
- ♦ Τοποθετείται αμέσως στον πάγο για 5 λεπτά, φυγοκεντρείται γρήγορα και διατηρείται στον πάγο μέχρι να ετοιμαστεί το επόμενο μίγμα.
 - Σε δεύτερο σωλήνα eppendorf δημιουργείται το μίγμα της αντίδρασης με την αντίστροφη μεταγραφάση το οποίο περιέχει τα παρακάτω συστατικά
 - ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 15 µl
 - 4 µl ImProm-II™ 5X Reaction Buffer
 - 0,5 µl MgCl₂ (final concentration 1.5–8.0mM)
 - 1 µl dNTPs Mix (final concentration 0.5mM each dNTP)
 - 1 µl αναστολέας RNάσης (20 units)
 - 1 µl ImProm-II™ αντίστροφη μεταγραφάση
 - Το παραπάνω μίγμα φυγοκεντρείται γρήγορα και προστίθεται στο πρώτο σωλήνα eppendorf ο οποίος περιέχει το αρχικό δείγμα. Έτσι προκύπτει τελικός όγκος 20 µl.
- ♦ Το τελικό διάλυμα τοποθετείται στην συσκευή PCR όπου πραγματοποιούνται τα παρακάτω στάδια:

Θερμοκρασία	Χρόνος
25 °C	5 λεπτά
42 °C	60 λεπτά
70 °C	15 λεπτά

3.10. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time PCR).

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR) ή αλλιώς και ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) είναι μια μέθοδος που βασίζεται στην PCR και χρησιμοποιείται για να ενισχύσει τμήματα DNA και η οποία επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων. Επιτρέπει την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση πολλαπλών τμημάτων DNA σε απόλυτο αριθμό με τη χρήση προτύπων διαφόρων συγκεντρώσεων DNA. Η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο φθορισμός μετριέται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος.

Πολλές φορές η real-time PCR συνδυάζεται με την πρότερη μετατροπή μιας ποσότητας RNA σε DNA, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής, με σκοπό κυρίως την μελέτη των επιπέδων έκφρασης γονιδίων. Στη βασική έρευνα χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση και παρακολούθηση της διαφορικής έκφρασης γονιδίων-στόχων μετά από μεταχειρίσεις ή για την αναπτυξιακή μελέτη των επιπέδων έκφρασης γονιδίων-στόχων.

Επιλογή των εκκινητών

Οι αλληλουχίες γονιδίων που κωδικοποιούσαν για τα ίδια ένζυμα του βιοχημικού μονοπατιού ομοπαρατέθηκαν με τον αλγόριθμο ClustalW. Οι εκκινητές επιλέχθηκαν σε μη συντηρημένες περιοχές των γονιδίων, ώστε να αποφευχθεί ο μη εξειδικευμένος υβριδισμός των εκκινητών. Σε περιπτώσεις μη επικαλυπτόμενων αλληλουχιών που κωδικοποιούσαν για το ίδιο γονίδιο οι εκκινητές επαναδιερευνήθηκαν με τον αλγόριθμο BLAST σε όλες τις γονιδιακές βάσεις δεδομένων. Τελικά επιλέχθηκαν εκκινητές που υβρίδισαν πλήρως μόνο με την αλληλουχία που μας ενδιέφερε στο φυτό *L. japonicus*.

Η επιλογή των εκκινητών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εξειδικευμένου προγράμματος επιλογής εκκινητών Beacon designer v7.0. Το μέγεθος των ενισχυόμενων

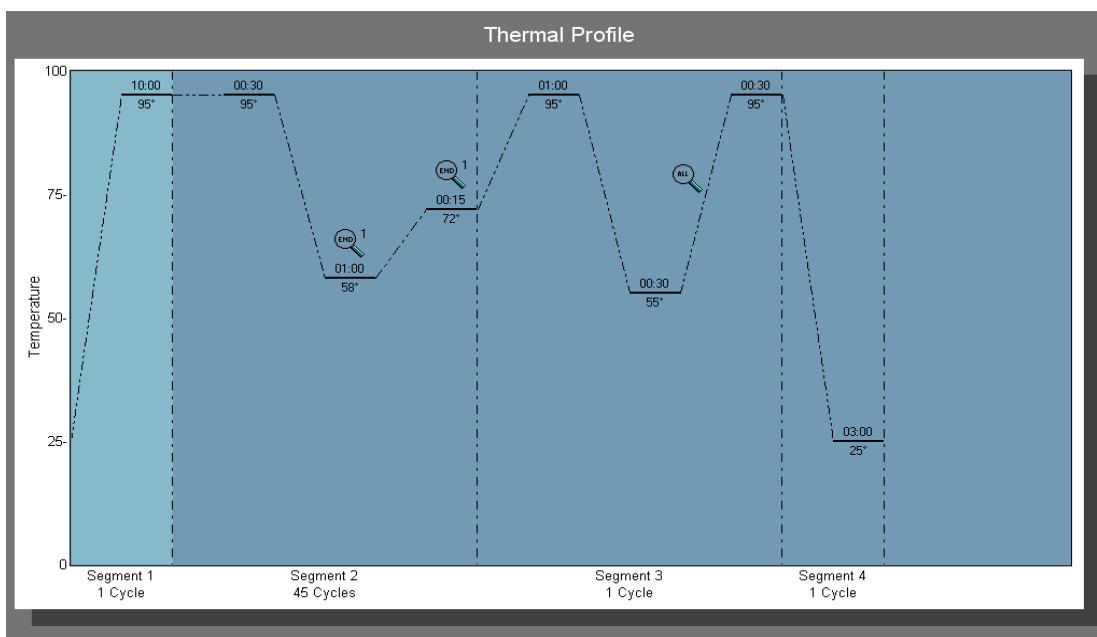
τιμημάτων ήταν περίπου 100 ζεύγη βάσεων. Οι εκκινητές επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός ομοδιμερών ή ετεροδιμερών. Η δημιουργία ομο- και ετερο-διμερών από τους εκκινητές έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή μη εξειδικευμένου φθορισμού κατά την αντίδραση της PCR πραγματικού χρόνου.

Οι εκκινητές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

Σύμβολο εκκινητή	Νουκλεοτιδική αλληλουχία εκκινητή
RtUbi, forward	5'-TTC ACC TTG TGC TCC GTC TTC-3'
RtUbi, reverse	5'-AAC AAC AGC ACA CAC AGC CAA TCC-3'
RtOSC3, forward	5'-TCA GAG GCT TAC AAA CTT CAT TTA G-3'
RtOSC3, reverse	5'-TGT TGG TCC ATA CTC TTC ACT C-3'

Αντίδραση της real time PCR.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που φαίνεται στην εικόνα 14, σε συσκευή Mx3005P (Stratagene) και καταγράφηκαν για 45 κύκλους.



Εικόνα 14: Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την real time PCR.

Στο τέλος κάθε αντίδρασης ακολουθεί η παρακολούθηση της καμπύλης αποδιάταξης βάση της οποίας επιβεβαιώνεται η ύπαρξη ενός μόνο προϊόντος στην κάθε αντίδραση. Σε όλες

τις περιπτώσεις το μίγμα της αντίδρασης προετοιμάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας (Stratagene), ενώ στην τελική αντίδραση χρησιμοποιήθηκε η χρωστική αναφοράς ROX. Μετά το τέλος των αντιδράσεων τα δεδομένα εξάχθηκαν με τη μορφή πινάκων και επεξεργάζονταν με τη χρήση του προγράμματος LinRegPCR προκειμένου να προσδιοριστούν η αποτελεσματικότητα των εκκινήτων (efficiency) της κάθε αντίδρασης αλλά και ο αριθμός των κύκλων ορίου (Ct), ο οποίος αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης πάνω από τους οποίους είναι δυνατή η ανίχνευση φθορισμού. Για κάθε μία από τις βιολογικές επαναλήψεις πραγματοποιήθηκαν τρεις τεχνικές επαναλήψεις. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η PCR πραγματικού χρόνου για το γονίδιο της ουμπικουΐτινης ώστε να γίνει κανονικοποίηση – ποσοτικοποίηση στα αρχικά δείγματα cDNA. Για το σκοπό αυτό σε optical tubes προστέθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια μέχρι τελικό όγκο 20 μ l.

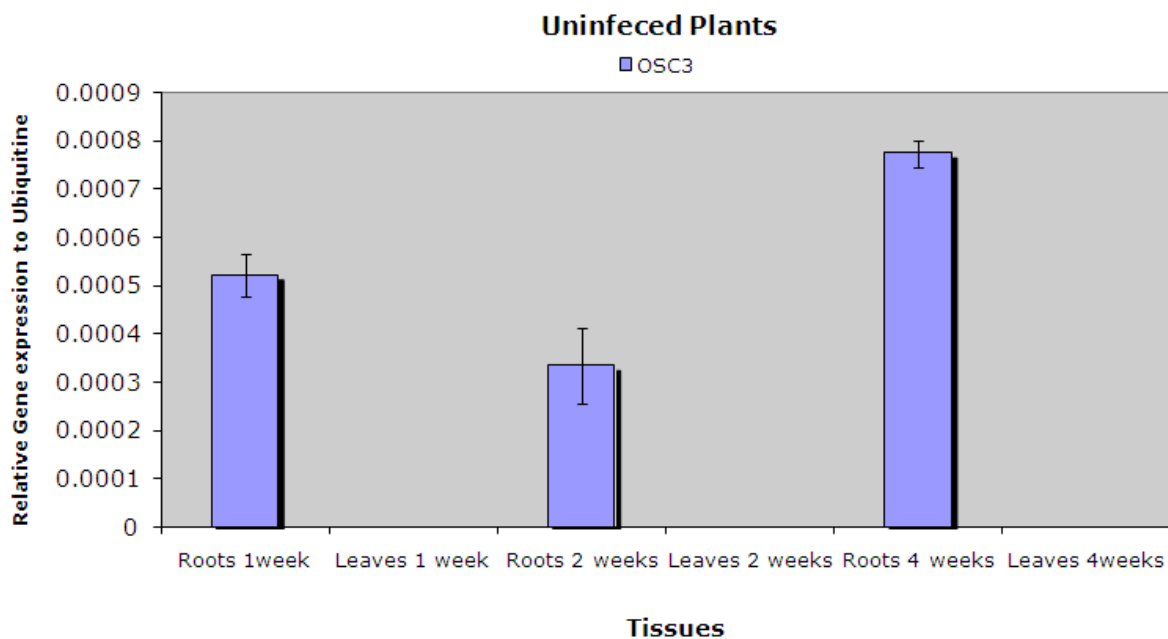
- ♦ 10 μ l 2X buffer
- ♦ 0,8 μ l εκκινήτης έμπροσθεν
- ♦ 0,8 μ l εκκινήτης ανάστροφος
- ♦ 1 μ l cDNA (αραιωμένο 1:10)
- ♦ 0,4 μ l χρωστική αναφοράς ROX
- ♦ 7 μ l ddH₂O

Παρακολουθώντας την έκφραση του γονιδίου της ουμπικουΐτινης σε κάθε δείγμα βλέπουμε την πυκνότητα του cDNA που πήραμε από κάθε ιστό και κάνοντας τις κατάλληλες αραιώσεις ισοσκελίζουμε τις συγκεντρώσεις cDNA από κάθε δείγμα. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η PCR πραγματικού χρόνου για το γονίδιο *OSC3*, για να διαπιστωθεί η έκφραση του σε κάθε ιστό και σε κάθε ηλικία του φυτού.

4. Αποτελέσματα

Η ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου της συνθάσης της λουπεόλης *OSC3* πραγματοποιήθηκε σε τρία αναπτυξιακά στάδια του φυτού *L. Japonicus* (7, 14 και 28 ημέρες μετά το φύτευμα). Στα ίδια αναπτυξιακά στάδια έγινε μελέτη της συσχέτισης της μόλυνσης από ριζόβιο *Mesorhizobium loti* με την έκφραση του *OSC3*. Για την διεξαγωγή του πειράματος απομονώθηκε ολικό RNA από τις ρίζες, τα φύλλα και τα φυμάτια. Πραγματοποιήθηκε PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) και ακολούθησε ανάλυση PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR) ώστε να ανιχνευθούν τα επίπεδα έκφρασης του *OSC3*. Μετάγραφα του *OSC3* βρέθηκαν σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν αλλά όχι σε όλους τους ιστούς.

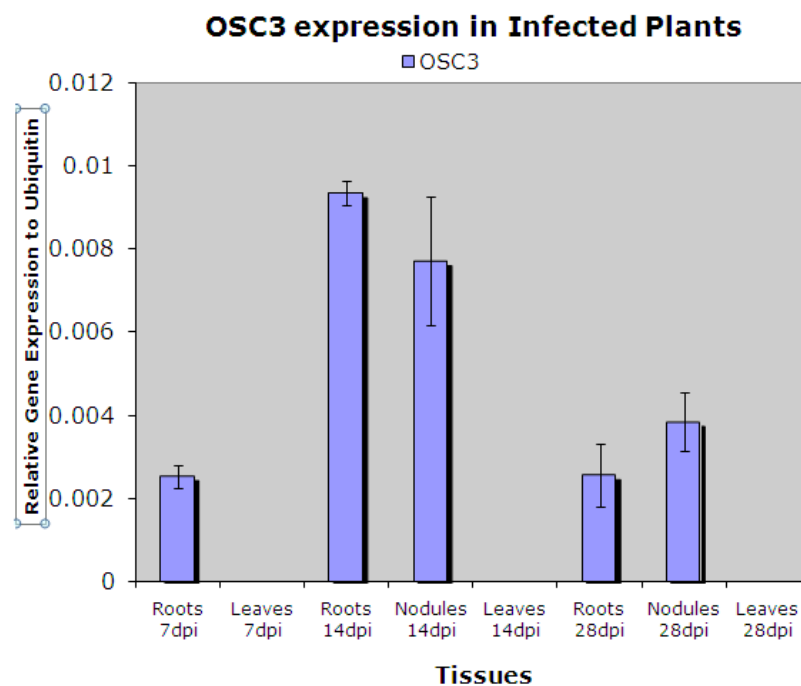
Στα μη μολυσμένα με ριζόβια φυτά (γράφημα 1) η έκφραση της συνθάσης της λουπεόλης είναι μεγαλύτερη στις ρίζες των 28 ημερών. Η χαμηλότερη έκφραση του ενζύμου αναφέρεται στις ρίζες 14 ημερών. Στα φύλα δεν ανιχνεύτηκαν μετάγραφα του *OSC3*.



Γράφημα 1: Επίπεδα έκφρασης του *OSC3* σε μη μολυσμένα με ριζόβια φυτά *L. Japonicus*.

Στα μολυσμένα με ριζόβια φυτά (γράφημα 2) τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης εντοπίζονται στις ρίζες και στα φυμάτια των 14 ημερών. Η έκφραση του *OSC3* στις ρίζες των

μολυσμένων φυτών 14 ημερών έχει επαχθεί σημαντικά σε σχέση με την έκφραση του *OSC3* στις ρίζες των μη μολυσμένων φυτών 14 ημερών. Στις ρίζες μολυσμένων με ριζόβια φυτών 7 και 28 ημερών ανιχνεύτηκαν τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου. Και στην ομάδα των μολυσμένων με ριζόβια φυτών, δεν ανιχνεύτηκαν μετάγραφα του γονιδίου στα φύλα.



Γράφημα 2: Επίπεδα έκφρασης του *OSC3* σε μολυσμένα με ριζόβια φυτά *L. Japonicus*.

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της συνθάσης της λουπεόλης στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια επηρεάζονται από την παρουσία του ριζοβίου.

5. References

1. Τσέκος, Ι., 2004. Μηχανισμοί άμυνας των φυτών και δευτερογενείς μεταβολίτες. Ι.Τσέκος, *Φυσιολογία Φυτών*. Θεσσαλονίκη: εκδοτικός οίκος αδελφών Κυριακίδη Α.Ε., 2004, 541-568.
2. Καραμπουρνιώτης, Γ., 2003. Δευτερογενής μεταβολισμός. Γαλάτης, Β., *et al.*, *Φυσιολογία Φυτών από το μόριο στο περιβάλλον*. Κρήτη: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
3. Orlova, I., Marshall-Colón, A., Schnepf, J., Wood, B., Varbanova, M., Fridman, E., Blakeslee, J.J., Peer, W.A., Murphy, A.S., Rhodes, D., Pichersky, E., and Dudareva, N. 2006. Reduction of Benzoid Synthesis in Petunia Flowers Reveals Multiple Pathways to Benzoic Acid and Enhancement in Auxin Transport. *The Plant Cell.*, 18:3458-3475.
4. Keeling, Cl., Bolmann, J., 2006. Genes, enzymes, and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytol.* 170: 657-675.
5. Kusari, S., Lamshöft, M., Zühlke, S., Spiteller, M., 2008. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. *Journal of Natural Products* 71, 159-162.
6. Guenther, A., Karl, T., Harley, P., Wiedinmyer, C., Palmer, P.I., and Geron, C., 2006. Estimates of global terrestrial isoprene emissions using MEGAN (model of emissions of gases and aerosols from nature). *Atmos. Chem. Phys.* 6, 3181–3210, 2006.
7. Zwenger S., Chhandak B., 2008. Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* Vol. 3 (1), pp. 001-007.
8. Phillips, D., Rasbery, J., Bartel, B., Matsuda, S., 2006. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Current Opinion in Plant Biology*, 9:305-314.
9. Sawai, S., Shindo, T., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Ayabe, S., Aoki, T., 2005. Functional and structural analysis of genes encoding oxidosqualene cyclases of *Lotus japonicus*. *Plant Science* 170 (2006) 247-257.
10. Qi, X., Bakht, S., Leggett, M., Maxwell, C., Melton, R., and Osbourn, A., 2004. A gene cluster for secondary metabolism in oat: Implications for the evolution of metabolic diversity in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:8233-8238.

11. Papadopoulou, K., Melton, R.E., Leggett, M., Daniels, M.J., and Osbourn, A.E., 1999. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:12923-12928.
12. Vincken, J.-P., Heng, L., Groot, A., Gruppen, H., 2006. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* 68 (2007) 275-297.
13. Shan, H., Wilson, W.K., Phillips, D.R., Bartel, B., and Matsuda, S.P.T., 2008. Trinorlupeol: A Major Nonsterol Triterpenoid in Arabidopsis. *Organic Letters*, Vol. xx, No. x, XXXX American Chemical Society, Published on web on 04/15/2008.
14. Márquez, A.J., Stougaard, J., Udvardi, M., Parniske, M., Spaink, H., Saalbach, G., Webb, J., Chiurazzi, M., and Márquez, A.J., 2005. *Lotus japonicus Handbook*. The Netherlands: Springer.
15. Μιχαήλ, Ηλ., 2009. Σταθεροποίηση ανθοκυανινών ιβίσκου ερυθραίας (*H. Sabdariffa*) με σχηματισμό συμπλόκου με β-κυκλοδεξτρίνη. Πτυχιακή εργασία, Τμήμα επιστήμης διατροφολογίας και διατροφής, Χαροκόπειο πανεπιστήμιο, Αθήνα.
16. Hayashi, H., Huang, P., Takada, S., Obinata, M., Inoue, K., Shibuya, M., and Ebizuka, Y., 2004. Differential Expression of Three Oxidosqualene Cyclase mRNAs in *Glycyrrhiza glabra*. *Biol. Pharm. Bull.* 27(7) 1086-1092.
17. Gallo, M., Sarachine, M., 2009. Biological Activities of Lupeol. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 3 (Special Issue 1), 46-66.
18. Herrera, J., Bartel, B., Wilson, W., and Matsuda, S., 1998. Cloning and characterization of the Arabidopsis thaliana lupeol synthase gene. *Phytochemistry*, 49:7: 1905- 1911.
19. Kushiro, T., Shibuya, M., Masuda, K., and Ebizuka, Y., 2000. Mutational Studies on Triterpene Synthases: Engineering Lupeol Synthase into β-Amyrin Synthase. *American Chemical Society*, 122 (29), pp 6816–6824.
20. Ebizuka, Y., Katsube, Y., Tsutsumi, T., Kushiro, T., and Shibuya, M., 2003. Functional Genomics Approach to the Study of Triterpene Biosynthesis. *Pure and Appl. Chem.*, 75:2-3:369-374.
21. Kushiro, T., Shibuya, M., and Ebizuka, Y., 1999. Cryptic Regiospecificity in Deprotonation Step of Triterpene Biosynthesis Catalysed by New Members of Lupeol Synthase, *Tetrahedron Letters*, 40:30:5553-5556.

22. Shibuya, M., Zhang, H., Endo, A., Shishikura, K., Kushiro, T., and Ebizuka, Y., 1999. Two Branches of the Lupeol Synthase gene in the Molecular Evolution of Plant Oxidosqualene Cyclases. *Eur. J. Biochem.*, 266(1):302-307.
23. Iturbe-Ormaetxe, I., Haralampidis, K., Papadopoulou, K., and Osbourn, A., 2003. Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology*, 51: 731-743.
24. Hostettmann, K.A. and Marston, A. 1991. Saponins (*Cambridge Univ. Press*, Cambridge, UK).
25. Price, K.R., Johnson, I.T. and Fenwick, G.R. 1987. The Chemistry and biological significance of saponins in food and feedingstuffs. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 26: 27–135
26. Papadopoulou, K., Melton, R.E., Leggett, M., Daniels, M.J. and Osbourn, A.E. 1999. Compromised disease resistance in saponindeficient plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 12923–12928.
27. Ohana, P., Delmer, D.P., Carlson, R.W., Glushka, J., Azadi, P., Bacic, T. and Benziman, M. 1998. Identification of a novel triterpenoid saponin from *Pisum sativum* as a specific inhibitor of the diguanylate cyclase of *Acetobacter xylinum*. *Plant and Cell Physiol.* 39: 144–152.
28. Rahman, A., Ahamed, A., Amakawa, T., Goto, N. and Tsurumi, S. 2001. Chromosaponin I specifically interacts with AUX1 protein in regulating the gravitropic response of *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* 125: 990–1000.
29. Haralampidis, K., Trojanowska, M. and Osbourn, A.E. 2001a. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnology* 75: 31–49.
30. Kushiro, T., Shibuya, M., Masuda, K. and Ebizuka, Y. 2000a. A novel multifunctional triterpene synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Tetrahedron Letts.* 41: 7705–7710.
31. Morita, M., Shibuya, M., Kushiro, T., Masuda, K. and Ebizuka, Y. 2000. Molecular cloning and functional expression of triterpene synthases from pea (*Pisum sativum*) – New alpha-amyrinproducing enzyme is a multifunctional triterpene synthase. *Eur. J. Biochem.* 267 (12): 3453–3460.
32. Husselstein-Muller, T., Schaller, H. and Benveniste, P. 2001. Molecular cloning and expression in yeast of 2,3-oxidosqualenotriterpenoid cyclases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 45: 75–92.

33. Basyuni, M., Oku, H., Tsujimoto, E., Kinjo, K., Baba, S., and Takara, K., 2007. Triterpene synthases from Okinawan mangrove tribe, Rhizophoraceae. *The FEBS Journal*, 247:19:5028-5042.
34. Γεωργίου, Σ., 2008. Διερεύνηση του φυσιολογικού ρόλου της συνθάσης της λουπεόλης σε ρίζες και φυμάτια του φυτού LOTUS JAPONICUS. Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.
35. Hartmann, K., Peiter, E., Koch, K., Schubert, S., and Schreiber, L., 2002. Chemical composition and ultrastructure of broad bean (*Vicia faba* L.) nodule endodermis in comparison to the root endodermis. *Planta*, 215:14-25.
36. Gamas, P., de Carvalho Niebel, F., Lescure, N., and Cullimore, J.V., 1996. Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol Plant Microbe Interact*, 9:233-242.
37. Φλεμετάκης, Μ., Απρίλιος-Μάιος 2009. Αποτελούν τα φυμάτια μία εξειδικευμένη εξελικτική προσαρμογή των ψυχανθών; *AgroBio-επικαιρότητα, Ενημερωτικό Δελτίο του Συλλόγου Γεωπόνων Βιοτεχνολόγων Ελλάδας*, τόμος 2, τεύχος 3.
38. Sprent, J., 2001. *Nodulation in legumes*. London: Royal Botanic Gardens, Kew.
39. Φλεμετάκης, Εμ., 2001. Δομή και ρύθμιση γονιδίων των νοντουλινών στα φυμάτια του *Lotus japonicus*. Διδακτορική διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
40. Truchet, G., Barker, D.G., Camut, S., De Billy, F., Vasse, J., and Huguet, T., 1989. Alfalfa nodulation in the absence of *Rhizobium*. *Mol. Gen. Genet.* 219:65-68.
41. Djordjevic, M.A., and Weinman, J.J., 1991. Factors determining host recognition in the clover-*Rhizobium* symbioses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:596-602.