



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Η ετερόλογη έκφραση των γονιδίων TSAR (Triterpene Saponin Activating Regulators) του φυτού *Medicago truncatula* στο φυτό *Lotus japonicus* και ο ρόλος τους στην βιοσύνθεση τριτερπενοειδών σαπωνινών

Heterologous expression of *Medicago truncatula* Triterpene Saponin Activating Regulators (TSARs) in *Lotus japonicus* and their role in triterpene saponin biosynthesis.

Διπλωματική εργασία
Δημάκου Φωτεινή
Λάρισα, 2017

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

1. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επιβλέπουσα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

2. Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος

Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

3. Καρπούζας Δημήτριος

Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, για την πολύτιμη βοήθειά της τόσο σε επιστημονικό όσο και σε συμβουλευτικό επίπεδο, αποτελώντας έτσι σημαντική επιρροή στην συνέχιση των σπουδών μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Δρ Γκαραγκούνη Κωνσταντίνο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθόλη την διάρκεια της πτυχιακής μου, για τις παρατηρήσεις και τις συμβουλές που μου έδωσε και φυσικά για την υπομονή και τον χρόνο που διέθεσε για την καθοδήγηση του πειράματός μου στο εργαστήριο. Ακόμη, θέλω να ευχαριστήσω την Δρ Catalina Stedel και την υποψήφια διδάκτορα Βασιλική Σκιαδά καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την βοήθειά τους, οποιαδήποτε στιγμή την χρειάστηκα και για το ευχάριστο κλίμα.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους γονείς μου για την στήριξή τους με κάθε δυνατό τρόπο, αλλά και τους φίλους μου για όλες τις στιγμές που μου χάρισαν κατά την διάρκεια της φοιτητικής μου ζωής.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη	6
Abstract.....	6
1. Εισαγωγή	7
1.1 Σαπωνίνες	7
1.2 Δομή των σαπωνινών	8
1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή των σαπωνινών.....	8
1.4 Βιολογική δράση των σαπωνινών.....	9
1.5 Κατηγορίες σαπωνινών	10
1.6 Το βιοσυνθετικό μονοπάτι των τριτερπενίων	11
1.7 Κυκλάσες του 2,3-οξειδοσκουαλενίου	12
1.8 Τελικές τροποποιήσεις των τριτερπενοειδών σαπωνινών-τελικά προϊόντα του μονοπατιού	14
1.9 <i>Lotus japonicus</i>	15
1.10 Gene clusters.....	16
1.11 <i>Medicago truncatula</i>	17
1.12 Οι μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποίησης της βιοσύνθεσης σαπωνινών, TSAR1 και TSAR2	18
1.13 Τα γονίδια TSAR1 και TSAR2 και ο διακριτός τους ρόλος στην βιοσύνθεση σαπωνινών.....	19
1.14 Σκοπός διατριβής.....	19
2. Υλικά και μέθοδοι	21
2.1 Συνθήκες ανάπτυξης του φυτού <i>Lotus japonicus</i>	21
2.2 Κλωνοποίηση (LR reaction).....	21
2.3 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> με πλασμιδιακό DNA ...	22
2.4 Stock γλυκερόλης για αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων	22
2.5 Απομόνωση πλασμιδίου DNA από βακτήρια <i>E.coli</i>	23
2.6 Πέψη πλασμιδίου με ένζυμα περιορισμού	23
2.7 Freeze-thaw method: Μετασηματισμός βακτηρίων <i>E.coli</i> με βακτήρια <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	24

2.8 Σταθερός μετασχηματισμός σπόρων <i>Lotus japonicus</i>	24
2.9 PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης).....	25
2.10 Απομόνωση DNA με την χρήσης CTAB	26
2.11 Απομόνωση RNA	27
2.12 Πειράματα qRT-PCR (ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου).....	27
2.13 Απομόνωση μεταβολιτών για ανάλυση μεταβολικού περιεχομένου με GC και LC-MS.....	28
2.14 Θρεπτικά υλικά και διαλύματα.....	28
3. Αποτελέσματα	30
3.1 Πλασμιδιακοί φορείς.....	30
3.2 Κατασκευή δυαδικών φορέων για ετερόλογη έκφραση των TSARs σε μετασχηματισμένες ρίζες <i>Lotus japonicus</i>	30
3.3 Επιβεβαίωση του μετασχηματισμού των hairy roots.....	31
3.4 Επιβεβαίωση της ετερόλογης έκφρασης των TSARs σε μετασχηματισμένες ρίζες <i>Lotus japonicus</i>	33
3.5 Πειράματα RT-PCR (qPCR)	34
3.6 Στατιστική ανάλυση.....	39
4. Συζήτηση.....	42
5. Βιβλιογραφία	45
6. Παράρτημα.....	48

Περίληψη

Οι μεταγραφικοί παράγοντες TSAR1 και TSAR2 του ψυχανθούς *Medicago truncatula* μπορούν να ενεργοποιήσουν την έκφραση γονιδίων ολόκληρου του μονοπατιού βιοσύνθεσης τριτερπενοειδών σαπωνινών, από το μεβαλονικό οξύ μέχρι την τελική σαπωνίνη. Η παρούσα εργασία χρησιμοποιεί την ετερόλογη έκφραση των γονιδίων αυτών στο φυτό *Lotus japonicus* μέσω μετασχηματισμού των κυττάρων της ρίζας (hairy root transformation), με σκοπό να βρεθεί εάν οι μεταγραφικοί παράγοντες αυτοί μπορούν να επάγουν την παραγωγή τριτερπενίων και σ' αυτό το φυτό. Δηλαδή, εάν ο ρυθμιστικός μηχανισμός των TSARs είναι συντηρημένος σε διαφορετικά ψυχανθή. Γι' αυτό μελετήθηκε η σχετική έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν σε διάφορα στάδια βιοσύνθεσης τριτερπενίων, όπως τα γονίδια *HMGR* τα οποία αποτελούν τους ρυθμιστές του μονοπατιού καθώς καταλύουν τον μη αντιστρεπτό σχηματισμό του πρώτου μεταβολίτη για τη βιοσύνθεση τριτερπενίων, του μεβαλονικού οξέος, το γονίδιο μίας συνθάσης της β-αμυρίνης (*AMY2*) και το γονίδιο *OSC3* που κωδικοποιεί την συνθάση της λουπεόλης (LuS), που αποτελούν κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου, δηλαδή σχηματίζουν σκελετούς τριτερπενίων πάνω στους οποίους δρουν τροποποιητικά ένζυμα, καθώς και το γονίδιο της P450 οξυγενάσης *CYP71D353*, που σχηματίζει σύμπλεγμα με το γονίδιο της *AMY2*.

Abstract

TSAR1 and TSAR2 transcription factors of the legume *Medicago truncatula* can activate gene expression of the entire triterpene saponin biosynthetic pathway, from mevalonic acid to the final saponin. The present study uses the heterologous expression of these genes in the *Lotus japonicus* plant by hairy root transformation, in order to find out whether these transcription factors can induce the production of triterpenes in this plant. Therefore, the relative expression of genes involved in various triterpene biosynthesis stages was studied, such as the *HMGR* genes which are the pathway regulators as they catalyze the irreversible formation of the first metabolite for the triterpene biosynthesis of mevalonic acid. Also, the gene of a β-amyrin synthase (*AMY2*) gene was studied, which encodes an oxidosqualene cyclase, which forms triterpene skeletons on which modifying enzymes act as well as the *CYP71D353* modifying enzyme, which belongs to a metabolic gene cluster with *AMY2*. Furthermore, the relative expression of lupeol synthase (LuS) was studied, encoded by *OSC3*, in an attempt to find out whether this biosynthetic pathway is conserved among legumes.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα φυτά συνθέτουν ένα ευρύ φάσμα δευτερογενών μεταβολιτών, είτε κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής τους ανάπτυξης είτε ως απάντηση σε κάποια επίθεση παθογόνου μικροοργανισμού ή σε καταστάσεις καταπόνησης.

Η κατανομή αυτών των φυσικών προϊόντων ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των φυτικών ειδών, των μεμονωμένων φυτών του ίδιου είδους, των οργάνων και των ιστών, κατά την ανάπτυξη και την ωρίμανση και παρουσιάζει εποχιακές διακυμάνσεις. Μερικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι διακυμάνσεις στην κατανομή των σαπωνινών μπορεί να αντανακλούν τις διάφορες ανάγκες για φυτοπροστασία. Η ικανότητα διαφορετικών φυτικών ειδών να συνθέσουν ξεχωριστούς δευτερογενείς μεταβολίτες θεωρείται γενικά ότι είναι απαραίτητη για την επιβίωσή τους. Πράγματι, η περιεκτικότητα ενός φυτού σε σαπωνίνες ποικίλλει και επηρεάζεται από το περιβάλλον και το στάδιο ανάπτυξης (Szakiel et al., 2011). Αυτές οι ενώσεις, οι οποίες παραδοσιακά θεωρούνται ως δευτερογενείς μεταβολίτες, έχουν σημαντικούς ρόλους στα φυτά σε διάφορα στάδια ανάπτυξης, όπως η βλάστηση των σπόρων, η βλαστική ανάπτυξη, η καρποφορία και ο σχηματισμός φυματίων.

Φαίνεται, ακόμη, να προσδίδουν κάποια επιλεκτικά πλεονεκτήματα, για παράδειγμα καταστέλλοντας την ανάπτυξη των γειτονικών φυτών ή προστατεύοντας τα φυτά από διάφορους παρασιτικούς οργανισμούς και καταπονήσεις. Εκτός από τους φυσικούς ρόλους των δευτερογενών μεταβολιτών αποτελούν επίσης μια τεράστια πηγή σύνθετων μορίων που μπορούν να αξιοποιηθούν από τον άνθρωπο για τις φαρμακολογικές και όχι μόνο ιδιότητές τους (Moses et al., 2014, Wink M, 1999; Osbourn, 1996).

Μία από τις μεγαλύτερες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών είναι τα τριτερπένια στα οποία ανήκουν και οι σαπωνίνες που αποτελούν πολύπλοκα γλυκοζυλιωμένα τριτερπένια και έχουν την ικανότητα να παρέχουν προστασία έναντι παθογόνων μικροοργανισμών και παρασίτων όπως θα δούμε παρακάτω.

1.1 Σαπωνίνες

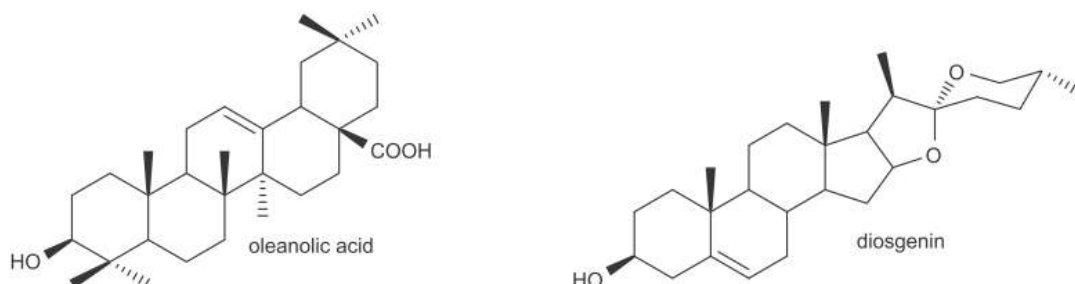
Οι σαπωνίνες είναι γνωστές ως μη πτητικά μόρια, με επιφανειοδραστικές ιδιότητες που εμφανίζονται κυρίως στο φυτικό βασίλειο (Lasztity et al., 1998, Oleszek, 2002, Hostettmann and Marston, 2005). Το όνομά τους προέρχεται από την λατινική λέξη "sapo" που σημαίνει σαπούνι, και λόγω των επιφανειοδραστικών ιδιοτήτων τους σχηματίζουν αφρούς όταν ανακινούνται σε υδατικό διάλυμα.

Τα μόρια αυτά τα συναντούμε συνήθως στα δικοτυλήδονα, διαθέτουν δομική ποικιλομορφία και αναφέρονται ως τριτερπενικοί και στεροειδικοί γλυκοζίτες (Vincken et al., 2007). Έχουν βέβαια βρεθεί και σε ορισμένους θαλάσσιους οργανισμούς, όπως ο αστερίας (Turner, Smith and Mackie, 1971) και τα αγγούρια της θάλασσας (Patrick Flammang et al, 2010).

1.2 Δομή των σαπωνινών

Οι σαπωνίνες είναι ισοπρενοειδή που συντίθενται από πρωτογενείς μεταβολίτες μέσω της οδού του μεβαλονικού οξέος. Αποτελούνται από 30 άτομα άνθρακα, δηλαδή από 6 μονάδες ισοπρενίου και η σύνθεσή τους λαμβάνει χώρα στο κυτοσόλιο (Taiz and Zeiger, 2010). Οι σαπωνίνες είναι αμφιπαθείς γλυκοζίτες με ένα λιποφιλικό τριτερπενοειδές, στεροειδές ή στεροειδικό αλκαλοειδές σκελετό αγλυκόνης, που ονομάζεται σαπωνγενίνη, και συνδέεται ομοιοπολικά με μία ή περισσότερες υδροφιλικές αλυσίδες μέσω γλυκοσιδικών δεσμών (Augustin et al., 2011; Osbourn et al., 2011; Gholami et al., 2014). Αυτός ο συνδιασμός πολικών και μη πολικών δομικών στοιχείων εξηγεί και τις αμφιπαθείς ιδιότητες των σαπωνινών (Εικόνα 1), (Vincken et al., 2007).

Η δομική ποικιλομορφία καθώς και οι διάφορες βιολογικές δραστηριότητες αυτών των φυσικών προϊόντων παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη νέων ενώσεων για βιομηχανικές, γεωργικές και φαρμακευτικές εφαρμογές. Βέβαια αυτή η δομική πολυπλοκότητα των σαπωνινών, σε συνδυασμό με τα προβλήματα της ανίχνευσης και απομόνωσής τους από τη φύση και τις προκλήσεις της χημικής σύνθεσης, καθιστά δύσκολη τη μελέτη της σχέσης δομής-δραστικότητας που θα οδηγούσε στην ανάπτυξη ενώσεων για εμπορικές εφαρμογές (Osbourne et al 2011).



Εικόνα 1: Δύο αντιπροσωπευτικοί τριτερπενοειδείς (oleanolic acid) και στεροειδείς (diosgenin) σκελετοί (Soren Bak, 2011)

1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή σαπωνινών

Η περιεκτικότητα ενός φυτού σε σαπωνίνες καθώς και η σύνθεσή τους μπορεί να ποικίλει σημαντικά ανάλογα με το γενετικό υπόβαθρο του κάθε φυτού, τον τύπο του ιστού, την ηλικία και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες (Hostettmann et al., 1995).

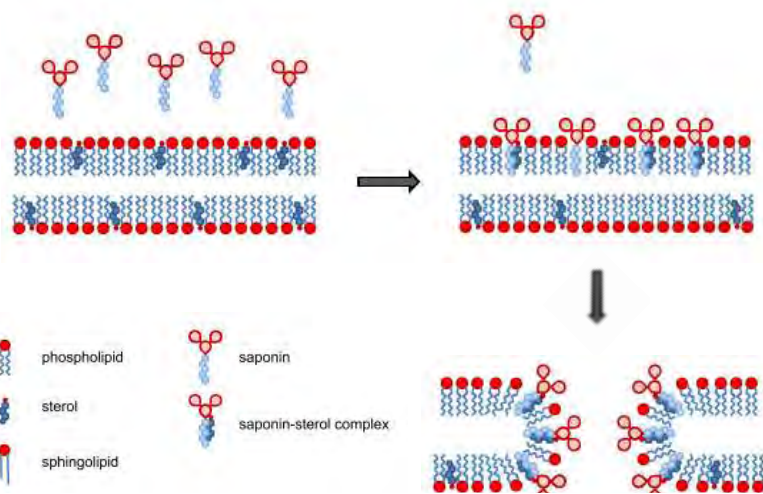
Τόσο η ποιότητα, όσο και η ποσότητα των σαπωνινών είναι γνωστό ότι επηρεάζεται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών και νερού και η ακτινοβολία του φωτός (Mosses et al, 2014, Szakiel et al., 2011). Επιπλέον, η ποσότητα των σαπωνινών έχει βρεθεί να διαφέρει σε μεγάλο βαθμό σε επιμέρους όργανα των φυτών ή στους ιστούς κατά τη διάρκεια

της ανάπτυξης ή να παρουσιάζει εποχιακή διακύμανση. Οι διακυμάνσεις αυτές αντιπροσωπεύουν τις διαφορετικές ανάγκες για προστασία του φυτού έναντι σε φυτοφάγα και παράσιτα (Bak et al., 2011).

Τα επίπεδα των σαπωνινών συχνά αυξάνονται σε απόκριση σε μόρια-επαγωγείς (elicitors) όπως το εκχύλισμα ζύμης ή τα παράγωγα ιασμονικού οξέος (Yendo et al., 2010). Τα παράγωγα του ιασμονικού οξέος είναι γνωστά για την ενεργοποίηση της άμυνας των φυτών στα φυτοφάγα (Howe και Jander, 2008), επιβεβαιώνοντας την υπόθεση ότι οι σαπωνίνες εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών, όπως έχει αποδειχθεί για παθογόνους μύκητες της ρίζας (Paradopolou et al, 1999).

1.4 Βιολογική δράση των σαπωνινών

Η πιο εκτενώς μελετημένη επίδραση των σαπωνινών και πολλών στεροειδικών γλυκοαλκανοειδών είναι η ικανότητά τους να προκαλούν διατάραξη



Εικόνα 2: Μοντέλο σχηματισμού πόρου στις μεμβράνες των κυττάρων λόγω αλληλεπίδρασης των σαπωνινών με τις στερόλες (J.M. Augustin et al. *Phytochemistry* 72 (2011) 435–457)

της κυτταρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητάς της. Με βάση τις παρατηρήσεις των Glauert et al. (1962) προτάθηκε το πρώτο μοντέλο δράσης των σαπωνινών στις μεμβράνες (Εικόνα 2). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, αρχικά

σχηματίζονται σύμπλοκα μεταξύ των σαπωνινών και των μορίων χοληστερόλης των μεμβρανών και στη συνέχεια αυτά τα σύμπλοκα ενώνονται σχηματίζοντας μια δομή που μοιάζει με μικυλλιακή οδηγώντας στον σχηματισμό ενός πόρου στην μεμβράνη. Τέτοιοι πόροι θα μπορούσαν να προκαλέσουν μια αύξηση στη διαπερατότητα της μεμβράνης που επιτρέπει από ιόντα και μακρομόρια μέχρι πρωτεΐνες να περάσουν από την μεμβρανική διπλοστοιβάδα. Αυτή η ικανότητα συχνά αναφέρεται ως “αιμολυτική δράση των σαπωνινών” καθώς θεωρείται ότι αποτελεί την μοριακή βάση της ικανότητας των σαπωνινών να προκαλούν λύση των ερυθροκυττάρων στα θηλαστικά (Baumann et al., 2000, Chwalek et al., 2006, Seeman et al., 1973).

Η αιμολυτική αυτή δράση επηρεάζεται από παράγοντες όπως η δομή του τμήματος αγλυκόνης (Gauthier et al., 2009a,b, Oda et al., 2000), ο αριθμός των σακχαρικών αλυσίδων (Hase et al., 1981, Hu et al., 1996), το μήκος αυτών των αλυσίδων (Armah et al., 1999, Chwalek et al., 2006) καθώς και η φύση των μονάδων σακχάρου (Chwalek et al., 2006, Hu et al., 1996).

Οι σαπωνίνες, λόγω της μεγάλης δομικής ποικιλομορφίας τους, έχουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων (Osbourne et al., 2011). Πολλές μελέτες δίνουν έμφαση στη μυκητοκτόνο (Lee et al., 2001, Morrissey and Osbourne, 1999), αντιμικροβιακή (Avato et al., 2006, Sung and Lee, 2008b), αλληλοπαθή (Waller et al., 1993) και εντομοκτόνο (Kuzina et al., 2009) δράση. Βέβαια, διαθέτουν και φαρμακολογικές ιδιότητες όπως αντιφλεγμονώδεις (Sun et al., 2010b), αντικαρκινικές (Musende et al., 2009) και αντι-ιικές (Cinatl et al., 2003) στα ζώα.

Μία ακόμα δράση των τριτερπενίων και των τριτερπενοειδών σαπωνινών είναι η κυτταροτοξικότητα και η ικανότητά τους να επάγουν απόπτωση μέσω διάφορων μηχανισμών. Με αυτό το τρόπο μπορούν να δράσουν σαν αντικαρκινικά μόρια (Lee et al., 2011, Podolak et al., 2010, Sun et al., 2006a, Thakur et al., 2011).

Επίσης, η ικανότητα των σαπωνινών να ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα τα καθιστά πιθανά ανοσοενισχυτικά. Ακόμη, οι σαπωνίνες μπορούν να ενεργοποιήσουν τα βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα (Th1) και τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα (CTLs) (Sun et al., 2009). Οι ικανότητες αυτές τα καθιστούν ιδανικά μόρια για χρήση σε εμβόλια κατά των παθογόνων αλλά και ενάντια στον καρκίνο (Moses et al., 2014).

Λόγω των χημικών ιδιοτήτων και των ικανοτήτων τους (παράγοντες αφρισμού), οι σαπωνίνες έχουν αξιοποιηθεί από τη βιομηχανία ως πρόσθετα στα τρόφιμα και στα καλλυντικά. Θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω βιομηχανικές εφαρμογές, όπως συντηρητικά, τροποποιητές γεύσης και παράγοντες για την απομάκρυνση της χοληστερόλης από γαλακτοκομικά προϊόντα (αναφέρεται από τους Güçlü-Üstündağ και Mazza, 2007, San Martín και Briones, 1999).

1.5 Κατηγορίες σαπωνινών

Η ταξινόμηση των διάφορων τύπων σαπωνινών βασίζεται στον ανθρακικό σκελετό του αγλυκονικού τμήματος της σαπωνίνης. Οι δύο κύριες κατηγορίες των σαπωνινών είναι οι στεροειδείς και οι τριτερπενοειδείς σαπωνίνες. Και στις δύο κατηγορίες ο σκελετός του τμήματος αγλυκόνης προέρχεται από ένα γραμμικό πρόδρομο μόριο, που αποτελείται από 30 άτομα άνθρακα, το 2,3-οξειδοσκουαλένιο. Κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης το στεροειδές τμήμα αγλυκόνης χάνει τρεις ομάδες μεθυλίου και συνεπώς παράγει έναν σκελετό με 27 άτομα άνθρακα, ενώ το τριτερπενοειδές τμήμα αγλυκόνης διατηρεί και τα 30 άτομα άνθρακα στον σκελετό του. Μία ακόμη κατηγορία σαπωνινών μπορούν να θεωρηθούν τα στεροειδή γλυκοαλκαλοειδή τα οποία προκύπτουν από το ίδιο βιοχημικό μονοπάτι με τις στερόλες και περιέχουν ένα άτομο αζώτου ενσωματωμένο στον σκελετό αγλυκόνης (Augustin et al., 2011; Friedman, 2006; Ginzberg et al., 2009; Itkin et al., 2013).

Υπάρχουν 11 βασικοί σκελετοί άνθρακα στις σαπωνίνες: 1) dammaranes, 2) tirucallanes, 3) lupanes, 4) hopanes, 5) oleananes, 6) taraxasteranes, 7) ursanes, 8) cucurbitanes, 9) cycloartanes, 10) lanostanes και 11) τα στεροειδή που αντιπροσωπεύουν τα τελικά προϊόντα της κυκλοποίησης, της αναδιάταξης και των αντιδράσεων αποικοδόμησης (Vincken, 2007).

1.6 Το βιοσυνθετικό μονοπάτι των τριτερπενίων

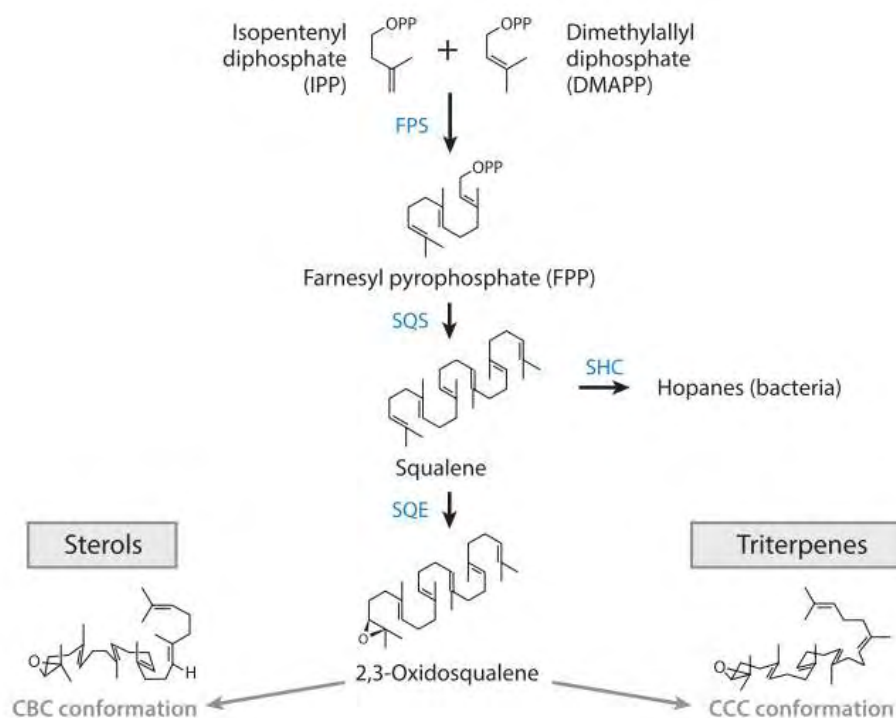
Όλα τα τερπένια προέρχονται από την συνένωση συστατικών με 5 άτομα άνθρακα που έχουν τον διακλαδισμένο σκελετό του ισοπεντανίου. Οι βασικές μονάδες των τερπενίων ονομάζονται και μονάδες ισοπρενίου. Τα τερπένια ταξινομούνται σύμφωνα με τον αριθμό των μονάδων C5 που περιέχουν, αν και μερικές φορές μπορεί να καταστεί δύσκολη η αναγνώριση των καταλοίπων με τα 5 άτομα άνθρακα, λόγω των εκτεταμένων μεταβολικών τροποποιήσεων που υφίστανται τα αρχικά μόρια. Τα τερπένια με 10 άτομα άνθρακα ονομάζονται μονοτερπένια, ενώ τα τερπένια με 30 άτομα άνθρακα τριτερπένια.

Τα τερπένια συντίθεται από τους πρωτογενείς μεταβολίτες με τουλάχιστον δύο διαφορετικούς τρόπους. Μέσω της καλά μελετημένης οδού του μεβαλονικού οξέος, 3 μόρια ακέτυλο-CoA ενώνονται διαδοχικά για να σχηματίσουν το μεβαλονικό οξύ. Αυτή η σημαντική ενδιάμεση ένωση έξι ατόμων άνθρακα στη συνέχεια πυροφωσφορυλιώνεται, αποκαρβοξυλιώνεται και αφυδατώνεται για να σχηματιστεί διφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP). Το IPP είναι η ενεργοποιημένη δομική μονάδα των τερπενίων που αποτελείται από πέντε άτομα άνθρακα.

Το IPP μπορεί επίσης να σχηματιστεί από ενδιάμεσους μεταβολίτες της γλυκόλυσης ή του φωτοσυνθετικού κύκλου αναγωγής του άνθρακα μέσω μιας σειράς ξεχωριστών αντιδράσεων που ονομάζεται οδός της φωσφορικής μεθυλερυθριτόλης (MEP, methyl-erythritol-phosphate pathway), η οποία διεξάγεται στους χλωροπλάστες και σε άλλα πλαστίδια.

Η βιοσυνθετική οδός του μεβαλονικού οξέως είναι κατά κύριο λόγο κυτοσολική, σε αντίθεση με το μονοπάτι MEP που εντοπίζεται σε πλαστίδια και είναι η πηγή των μονοτερπενίων, των διτερπενίων, των τετρατερπενίων (καροτενοειδή) και πολυ-πρενολών. Υπάρχουν θεμελιώδεις διαφορές στα βιοσυνθετικά μονοπάτια για τις διάφορες κατηγορίες ισοπρενοειδών (Taiz and Zeiger, 2010).

Αρχικά, η αναγωγή του 3-υδροξυ-3-μεθυλο-γλουταρυλ-CoA (HMGR) καταλύει τη μετατροπή του ακετυλ-CoA, παράγοντας ένα πρόδρομο τερπένιο πέντε ανθράκων, το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP), το οποίο στη συνέχεια ισομερίζεται προς το ισομερές του dimethyl-allyl-γγορφοσφατε (DMAPP) από το ένζυμο διφωσφορική ισομεράση του ισοπεντενυλίου (IDI). Στη συνέχεια, συμπυκνώνονται δύο μονάδες IPP με μία μονάδα DMAPP με αποτέλεσμα τον σχηματισμό του πυροφωσφορικού φαρνεσυλίου (FPP) που περιέχει 15 άτομα άνθρακα. Τέλος, η συμπύκνωση δύο μονάδων FPP από τη συνθετάση του σκουαλενίου (SQS) δημιουργεί το πρόδρομο σκουαλένιο 30 ατόμων άνθρακα, το οποίο οξειδώνεται σε 2,3-οξειδοσκουαλένιο από το ένζυμο εποξειδάση του σκουαλενίου (SQE). Η εποξειδάση του σκουαλενίου χρησιμοποιεί το μοριακό οξυγόνο και το NADPH για να οξειδώσει το σκουαλένιο σε 2,3-οξειδοσκουαλένιο (Εικόνα 3). Το 2,3-οξειδοσκουαλένιο κυκλοποιείται από ένα ευρύ φάσμα κυκλασών του οξειδοσκουαλενίου (OSCs) σε πολυκυκλικές δομές, οι οποίες σε ανώτερα φυτά σηματοδοτούν το σημείο διακλάδωσης μεταξύ του πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού (Moses et al., 2014).



Εικόνα 3: Τα πρώτα στάδια του μονοπατιού βιοσύνθεσης τριτερπενοειδών σαπωνινών. Αρχικά, η HMGCR καταλύει την μετατροπή του ακέτυλο-CoA σε IPP, δύο μόρια του οποίου σχηματίζουν το DMAPP. Μέσα από τις αντιδράσεις που φαίνονται παράγεται το 2,3 οξειδοσκουαλένιο από το οποίο μπορούν να προκύψουν στερόλες ή τριτερπένια. Συντομογραφίες ενζύμων: FPS, farnesyl pyrophosphate synthase; SQS, squalene synthase; SQE, squalene monooxygenase or epoxidase; SHC, squalene-hopene cyclase; LAS, lanosterol synthase; CAS, cycloartenol synthase; CPQ, cucurbitadienol synthase; BAS, β-amyrin synthase. Other abbreviations: CBC, chair-boat-chair; CCC, chair-chair-chair (Thimmappa, 2014).

1.7 Κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου

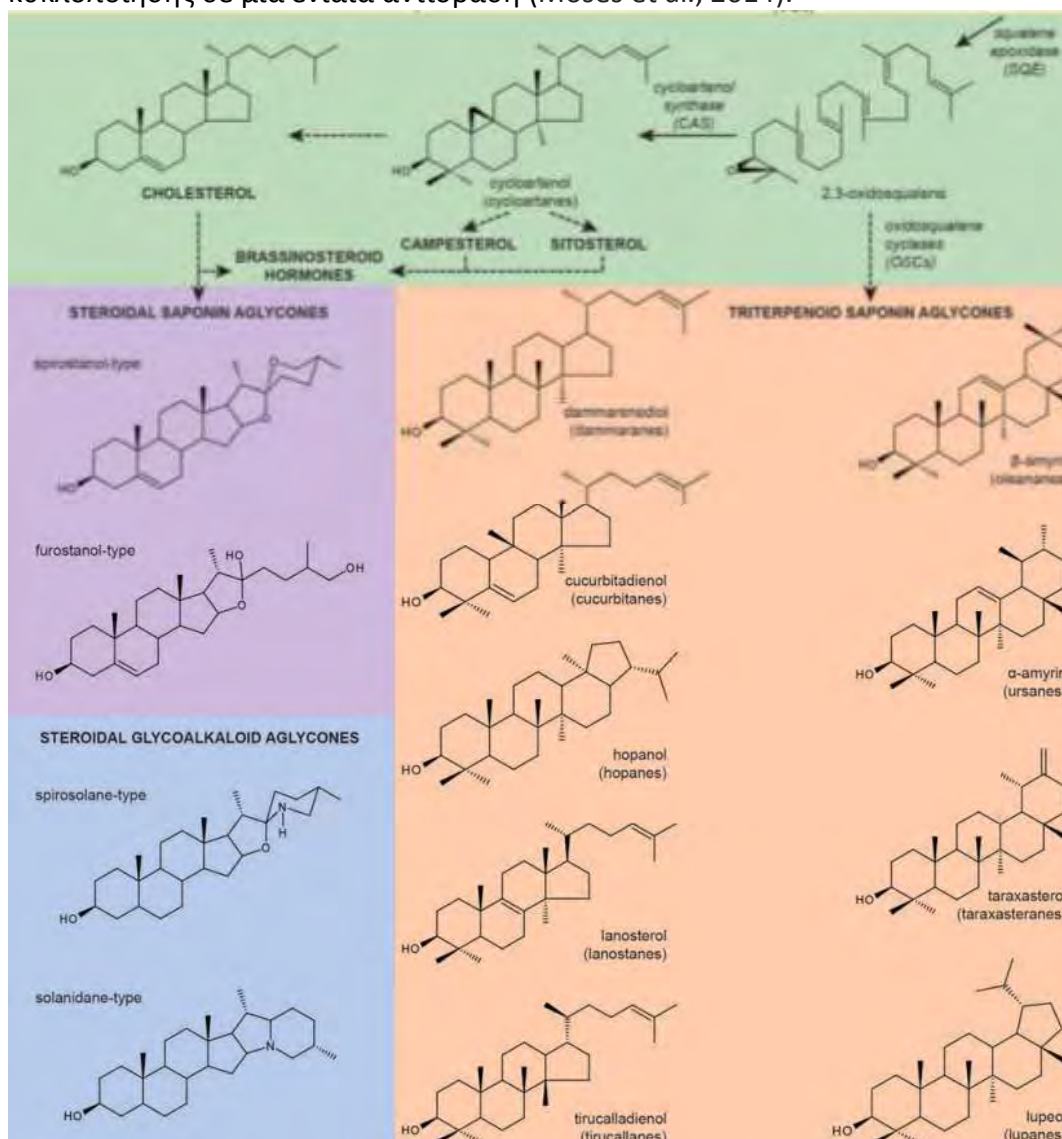
Οι κυκλάσες του 2,3-οξειδοσκουαλενίου καταλύουν την μετατροπή του 2,3-οξειδοσκουαλενίου σε μία πληθώρα πολυκυκλικών μοριών (Εικόνα 3). Στο μονοπάτι βιοσύνθεσης στερολών εμπλέκονται η cycloartenol synthase (CAS) και η lanosterol synthase (LS), ενώ στο μονοπάτι βιοσύνθεσης τριτερπενίων οι τριτερπενοειδείς συνθάσες που οδηγούν στην παραγωγή τετρακυκλικών και πεντακυκλικών τριτερπενίων (Nes and McKean, 1977, Abe et al., 1993). Μέχρι στιγμής έχουν χαρακτηριστεί πάνω από 80 λειτουργικές κυκλάσες οι οποίες δίνουν προϊόντα όπως λανοστερόλη, κυκλοαρτενόλη, β-αμυρίνη (bAS, b-amyrin synthase), α-αμυρίνη (aAS, a-amyrin synthase), λουπεόλη (lupeol synthase) και πολλά ακόμα προϊόντα (Thimmappa, 2014).

Μια χαρακτηριστική διαφορά που προκύπτει από τα μονοπάτια κυκλοποίησης που καταλύονται από τις OSC είναι το γεγονός ότι η κυκλοποίηση προς τριτερπενοειδείς σαπωνίνες οδηγεί σε μία διαμόρφωση chair-chair-chair του 2,3-οξειδοσκουαλενίου, ενώ η κυκλοποίηση προς στεροειδή καταλήγει σε διαμόρφωση chair-boat-chair του 2,3-οξειδοσκουαλενίου (Bak, 2011).

Το τετρακυκλικό πρόδρομο μόριο κυκλοαρτενόλη παράγεται από την κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου από το ένζυμο συνθάση της κυκλοαρτενόλης (CAS) για δώσει σαν πρόδρομο μόριο την χοληστερόλη και τελικά τους στεροειδείς σκελετούς.

Τα στεροειδή γλυκοαλκαλοειδή χρησιμοποιούν επίσης τη χοληστερόλη σαν πρόδρομο μόριο, αλλά ενσωματώνουν και μια αμινομάδα μέσω τροποποιήσεων της πλευρικής αλυσίδας για τη δημιουργία άγλυκων τμημάτων (Ginzberg et al, 2009?.. Itkin et al, 2013).

Τα προϊόντα κυκλοποίησης του 2,3-οξειδοσκουαλενίου καθίστανται πρόδρομα μόρια για τη σύνθεση εξειδικευμένων τριτερπενίων (Εικόνα 4). Οι OSCs που καταλύουν αυτές τις αντιδράσεις είναι είτε εξειδικευμένες είτε έχουν πολυλειτουργικό χαρακτήρα, και κυκλοποιούν το 2,3-οξειδοσκουαλένιο σε ένα μόνο προϊόν ή σε πολλά προϊόντα που προέρχονται από μια συγκεκριμένη οδό κυκλοποίησης σε μια ενιαία αντίδραση (Moses et al., 2014).



Εικόνα 4: Από την κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου στην παραγωγή τριτερπενοειδών σκελετών ή στεροειδικών σκελετών (Osbourn et al., 2014).

Τα άγλυκα τμήματα των τριτερπενίων στην συνέχεια υφίστανται περαιτέρω τροποποιήσεις.

Οι αλλαγές της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν τις OSCs έχει αποκαλύψει ότι τα απλά τριτερπένια μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη των φυτών και τον σχηματισμόν φυματίων. Φυτά *Arabidopsis thaliana* που υπερεκφράζουν το γονίδιο της θειαλινολικής συνθάσης (*THAS*), το οποίο κωδικοποιεί μια ένζυμο που καταλύει την κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου στην εξειδικευμένη τριτερπενική θαλαλόλη, παρουσιάζουν ασταθή ανάπτυξη αλλά έχουν μεγαλύτερες ρίζες σε σύγκριση με φυτά αγρίου τύπου (Field & Osbourn, 2008). Ομοίως, η έλλειψη ή η υπερσυσσώρευση των μεταβολιτών που προκύπτουν από την κυκλοποίηση επιφέρει επιβλαβείς επιδράσεις στην ανάπτυξη των φυτών *A. thaliana* (Field et al., 2011).

Η έκφραση του γονιδίου *OSC3* (συνθετάση λουπεόλης) σε φυτά *L. japonicus* επάγεται κατά τον σχηματισμό φυματίων. Το μοντέλο έκφρασης του γονιδίου *OSC3* μπορεί να υποδηλώσει ένα δομικό ρόλο της λουπεόλης στη μεμβράνη των αναπτυσσόμενων φυματίων και / ή ενός ρόλου στη μεταφορά ενώσεων εντός και εκτός των φυματίων (Delis et al., 2011). Η σίγαση της *OSC3* στο *L. japonicus* μείωσε τη σύνθεση λουπεόλης και οδήγησε σε σημαντική αύξηση των φυματίων σε σύγκριση με τα φυτά ελέγχου, 20 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με *M. Loti*. Στις ρίζες του *L. japonicus* που έχουν υποστεί σίγησης της *OSC3*, η απουσία λουπεόλης είχε ως αποτέλεσμα ένα φαινότυπο γρήγορου σχηματισμού φυματίων και συνοδεύτηκε από την αυξημένη έκφραση του παράγοντα ENOD40, ενός πρώιμου γονιδίου δείκτη για την έναρξη του σχηματισμού φυματίων και τη διαίρεση των κυττάρων του φλοιού.

1.8 Τελικές τροποποιήσεις τριτερπενοειδών σκελετών-τελικά προϊόντα του μονοπατιού

Τα τελευταία βήματα τροποποίησης δεν προέρχονται από τη ποικιλία των αντιδράσεων που καταλύονται από τις OSCs, αλλά από αλλαγές στον σκελετό που προέρχονται από την δράση ενζύμων στα τελικά στάδια του μονοπατιού κυκλοποίησης του 2,3-οξειδοσκουαλενίου, οδηγώντας έτσι στην ολοκλήρωση της βιοσύνθεσης των σαπωνινών (Bak, 2011).

Παρόλου που τα απλά τριτερπένια όπως η β-αμυρίνη και η λουπεόλη είναι κοινά στα φυτά, συχνά οι τριτερπενοειδείς σκελετοί τροποποιούνται περαιτέρω σε πιο περίπλοκα μόρια από ένζυμα που είναι γνωστά ως τροποποιητικά, "tailoring". Αυτές οι τροποποιήσεις προσθέτουν ένα δεύτερο επίπεδο της πολυπλοκότητας και αυξάνουν τη δομική ποικιλομορφία των σκελετών των τριτερπενίων. Τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 (μονοοξυγενάσες) οξειδώνουν τους σκελετούς των τριτερπενίων χρησιμοποιώντας το μοριακό οξυγόνο (Osbourn et al., 2011, Moses et al., 2013, Thimmaparra et al., 2014). Διαδοχικές οξειδώσεις σε διάφορες θέσεις του σκελετού του τριτερπενίου αυξάνουν την πολικότητα των σκελετών και εισάγουν δραστικές χαρακτηριστικές ομάδες, οι οποίες εν συνεχεία τροποποιούνται από μια σειρά τρανσφερασών, συμπεριλαμβανομένων UDP-εξαρτώμενων

γλυκοζυλοτρανσφερασών (UGTs), ακυλοτρανσφερασών, μηλότυλο-τρανσφερασών και μεθυλοτρανσφερασών (Moses et al., 2014). Η γλυκοσυλίωση αυτή οδηγεί σε αύξηση της πολικότητας και πολλές φορές σχετίζεται με την βιοδραστικότητα των σαπωνινών (Augustin et al., 2011).

Τα μοτίβα της γλυκοζυλίωσης των σαπωνινών θεωρούνται ζωτικής σημασίας για τις βιολογικές τους δραστηριότητες (Bak, 2011). Συνήθως μία ή περισσότερες αλυσίδες σακχάρου συνδέονται στις θέσεις C-3 και/ή C-28. Αυτές οι αλυσίδες σακχάρου συνήθως αποτελούνται από γλυκόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη και ραμνόζη (Vincken et al., 2007). Οι αντιδράσεις αυτές καταλύονται από γλυκοτρανσφεράσες (UGTs), οι οποίες μεταφέρουν σάκχαρα από διφωσφορικά νουκλεοτίδια (UDP-glucose) στους σκελετούς των σαπωνινών (Vogt et al., 2000).

1.9 *Lotus japonicus*



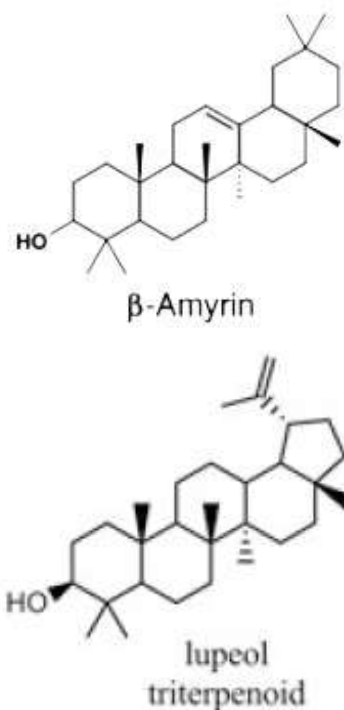
Εικόνα 5: *Lotus japonicus*

Το *L. japonicus* (Εικόνα 5) ανήκει στην οικογένεια των Fabaceae και προτάθηκε ως οργανισμός μοντέλο λόγω ορισμένων χαρακτηριστικών που το καθιστούν πολύ επιδεκτικό στην έρευνα στον τομέα των ψυχανθών. Αυτά τα χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν μικρά φυτά, μεγάλα και άφθονα άνθη, εύκολη επικονίαση, μεγάλη παραγωγή σπόρων, σύντομο χρονικό διάστημα παραγωγής,

εύκολη καλλιέργεια, δεκτικότητα στον μετασηματισμό και αναγέννησης των φυτών από ιστοκαλλιέργεια (Márquez, 2005).

Τα ψυχανθή θεωρούνται «πρωτοπόρα» φυτά καθώς είναι σε θέση να αναπτυχθούν σε εδάφη που είναι φτωχά σε θρεπτικά συστατικά λόγω της ικανότητάς τους να δημιουργήσουν συμβιωτικές σχέσεις με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια και με τους μύκητες του εδάφους, οι οποίοι παρέχουν στα φυτά φωσφόρο και άλλα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Αυτά τα φυσικά χαρακτηριστικά ευνόησαν την υιοθεσία των ψυχανθών στην γεωργία και αυτή τη στιγμή αποτελούν σημαντικό μέρος των αειφόρων γεωργικών συστημάτων (Márquez, 2005).

Το φυτό *L. japonicus* είναι διπλοειδής, αυτοφυής οργανισμός, αναπτύσσει ευθεία φασόλια με δύο λοβούς και οι σπόροι του είναι διατεταγμένοι κατά μήκος ενός γραμμικού άξονα (Stougaard J., 2005). Τα τριτερπένια που εμφανίζονται στο *L. japonicus* περιλαμβάνουν την β-αμυρίνη και την λουπεόλη (Εικόνα 6) (Delis et al., 2011). Η λουπεόλη, που αποτελεί απλό



Εικόνα 6: Χημική δομή της β-αμυρίνης και της λουπεόλης

τριτερπενοειδή σκελετό, φαίνεται να παίζει ρόλο στην απόπτωση, και έχει πολλαπλές επιπτώσεις σε διαφορετικά σημεία του μονοπατιού σηματοδότησης της β-κατενίνης. Η λουπεόλη εμπλέκεται επίσης στην καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού όταν τα φυτά αλληλεπιδρούν με συμβιωτικά βακτήρια (Saleem et al., 2009).

Επίσης, απλοί σκελετοί τριτερπενίων όπως η β-αμυρίνη έχουν βρεθεί στις ρίζες ψυχανθών κατά την διάρκεια συμβίωσης του φυτού με ριζόβια βακτήρια και μυκόριζες (Iturbe-Ormaetxe et al., 2003).

Οι σαπωνίνες που προέρχονται από την β-αμυρίνη, όπως οι γλυκοζίτες της σογιασαπογενόλης Β, έχουν αναφερθεί στο γένος *Lotus* και σε άλλα ψυχανθή (Tava et al., 2011) αλλά όχι στο *Lotus japonicus*.

Η μελέτη της βιοσύνθεσης των τριτερπενίων στο *L. japonicus* περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό στις OSCs. Οι OSCs από το *L. japonicus* ταυτοποιήθηκαν με κλωνοποίηση cDNA και απομονώθηκαν από γονιδιωματικές βιβλιοθήκες και χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά (Iturbe-Ormaetxe et al., 2003). Ταχτοποιήθηκαν 8 γονίδια που κωδικοποιούν τις κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου και βρίσκονται στο χρωμόσωμα 2 και το χρωμόσωμα 3. Ο χαρακτηρισμός των γονιδίων αυτών σε λειτουργικό επίπεδο έγινε στην ζύμη και έδειξε ότι η *OSC1* κωδικοποιεί μία συνθάση της β-αμυρίνης, η *OSC3* μία συνθάση της λουπεόλης και η *OSC5* μία συνθάση της κυκλοαρτενόλης (Iturbe-Ormaetxe et al. 2003). Η έκφραση των *LjAMY1* (*OSC1*) και *LjAMY2* (*OSC8*) στη ζύμη έδειξε ότι η *AMY1* είναι μία συνθάση της β-αμυρίνης ενώ η *AMY2* είναι μία κυκλάση που έχει την ικανότητα να παράγει τόσο β-αμυρίνη όσο και λουπεόλη. Είναι γνωστό ότι η *OSC1*, η *OSC8* και η *OSC3* εκφράζονται επιλεκτικά στις ρίζες και στα φυμάτια του *L. japonicus* (Iturbe-Ormaetxe et al, 2003, Sawai et al, 2006, Delis et al., 2011).

1.10 Gene clusters

Τα συμπλέγματα γονιδίων ή αλλιώς “gene clusters” αποτελούνται από πολλά γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα του ίδιου βιοσυνθετικού μονοπατιού και γειτονεύουν στο χρωμόσωμα. Τα συμπλέγματα γονιδίων έχουν βρεθεί σε πολλά είδη φυτών, τόσο σε μονοκοτυλήδονα όσο και σε δυκοτυλήδονα και απαιτούνται για τη βιοσύνθεση διάφορων μορίων όπως τα τερπένια και τα αλκαλοειδή. Ένα κοινό χαρακτηριστικό είναι η ύπαρξη τουλάχιστον τριών μη-ομόλογων βιοσυνθετικών γονιδίων που συμμετέχουν σε ένα διακριτό χημικό μονοπάτι. Το ένα γονίδιο κωδικοποιεί ένα ένζυμο που συμβάλλει στην παραγωγή των σκελετικών δομών των εξειδικευμένων μεταβολιτών και τα επιπλέον γονίδια κωδικοποιούν για τροποποιητικά ένζυμα του βασικού αυτού σκελετού, όπως οξειδοαναγωγάσες, μεθυλοτρανσφεράσες και γλυκοτρανσφεράσες (Osbourne, 2014).

Μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί 13 συμπλέγματα γονιδίων σε διαφορετικά είδη φυτών δείχνοντας έτσι ότι αυτή η οργάνωση γονιδίων δεν είναι η εξαίρεση στον κανόνα αλλά ένα συχνό φαινόμενο. Παρόλα αυτά δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο εάν η οργάνωση των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση

δευτερογενών μεταβολιτών κυριαρχεί στα φυτά, όπως συμβαίνει στους μύκητες και τα βακτήρια (Osbourne, 2014).

Ένα σύμπλεγμα γονιδίων που έχει βρεθεί στο φυτό *L. japonicus*. Πιο συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι το γονίδιο της κυκλάσης του οξειδοσκουαλενίου *AMY2* στο φυτό *L. japonicus* συνιστά, μαζί με τα γονίδια *LjCYP88D5* και *LjCYP71D353*, ένα σύμπλεγμα γονιδίων που συνεκφράζονται σε όλους τους ιστούς και σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια. Το ένζυμο *CYP71D353* ανήκει στις οξειδάσες του κυτοχρώματος P450 και καταλύει το σχηματισμό της 20-υδροξυλουπεόλης από την διυδρολουπεόλη μέσω μιας αντίδρασης οξείδωσης. Επίσης, καταλύει τον σχηματισμό του 20-hydroxybetulinic από την 20-υδροξυλουπεόλη μέσω τριών διαδοχικών αντιδράσεων οξείδωσης (Krokida et al., 2013).

Τα επιλεκτικά πλεονεκτήματα των συμπλεγμάτων γονιδίων είναι ότι πρώτον υπάρχει η ανάγκη για ταυτόχρονη ρύθμιση των γονιδίων που συμμετέχουν σε ένα σύμπλεγμα και δεύτερον η ανάγκη των γονιδίων αυτών να συν-κληρονομούνται από γενιά σε γενιά (Osbourne, 2010). Παρόλου που όλα τα γονίδια των συμπλεγμάτων δείχνουν συνέκφραση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, κάποια γονίδια των συμπλεγμάτων μεταγράφονται ξεχωριστά κάτω από άλλες συνθήκες (Osbourne, 2014).

1.11 *Medicago Truncatula*



Εικόνα 7: *Medicago truncatula*

Το φυτό *Medicago truncatula* (Εικόνα 7) αποτελεί ένα ψυχανθές μοντέλο που ανήκει στην οικογένεια των Fabaceae φυτών και αποτελεί πλούσια πηγή πεντακυκλικών τριτερπενοειδών σαπωνινών του τύπου των oleanane. Το φυτό αυτό χρησιμοποιείται ευρέως για την μελέτη της βιοσύνθεσης των τριτερπενοειδών σαπωνινών (Gholami et al., 2014).

Το εξειδικευμένο μονοπάτι βιοσύνθεσης των σαπωνινών ξεκινάει με την κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου, που αποτελεί το σημείο διακλάδωσης μεταξύ του πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού. Κατά την διάρκεια της βιοσύνθεσης στερολών το 2,3-οξειδοσκουαλένιο κυκλοποιείται σε κυκλοαρτενόλη από την CAS (Corey et al., 1993), ενώ κατά την βιοσύνθεση τριτερπενοειδών η κυκλοποίηση παράγει β-αμυρίνη (από την κυκλάση βAS) (Suzuki et al., 2002, Iturbe-Ormaetxe et al., 2003).

Το ένζυμο κλειδί για την ρύθμιση του μονοπατιού είναι η αναγωγή του 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρυλο-CoA (HMGR) που καταλύει τον σχηματισμό του μεβαλονικού οξέος. Στο *Medicago truncatula* έχουν βρεθεί πέντε ισομορφές του ενζύμου αυτού (Kevei et al., 2007, Mertens et al., 2014). Η μετά-μεταγραφική ρύθμιση της βιοσύνθεσης επιτελείται από την Makibishi1 (MKB1), μία λιγάση της ουβικιτίνης που στοχεύει την HMGR και επάγει την αποικοδόμησή της. (Pollier et al., 2013a)

Επίσης, η ανταγωνιστική δράση δύο μονοοξυγενασών του κυτοχρώματος P450 δημιουργεί ακόμη ένα σημείο διακλάδωσης στο μονοπάτι βιοσύνθεσης τριτερπενοειδών στο *Medicago* και συνεπώς οι τριτερπενοειδείς σαπωνίνες χωρίζονται σε δύο τάξεις, τις αιμολυτικές και τις μη αιμολυτικές.

Το πρώτο βήμα για την παραγωγή των αιμολυτικών σαπωνινών διεξάγεται από το ένζυμο CYP716A12, που πραγματοποιεί τρεις διαδοχικές οξειδώσεις στην θέση C-28 της β-αμυρίνης για να δώσει το ολεανολικό οξύ (Carelli et al., 2011; Fukushima et al., 2011).

Οι μη αιμολυτικές σαπωνίνες παράγονται μέσω υδροξυλίωσης της β-αμυρίνης στην θέση C-24, μια αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο CYP93E2 (Fukushima et al., 2013). Αυτή η τροποποίηση εμποδίζει την οξείδωση στην θέση C-28 (Tava et al., 2011) και ακολουθεί οξείδωση στην θέση C-22 από το ένζυμο CYP72A61v2 για να δώσει soyasapogenol B (Fukushima et al., 2013). Ο σκελετός υφίσταται κι άλλες τροποποιήσεις από ένζυμα του κυτοχρώματος P450 και από γλυκοτρανσφεράσες (UGTs) αυξάνοντας την ποικιλομορφία των τριτερπενοειδών σαπωνινών στο *Medicago truncatula* (Achnine et al., 2005, Naoumkina et al., 2010; Gholami et al., 2014)

1.12 Οι μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποίησης της βιοσύνθεσης σαπωνινών, TSAR₁ και TSAR₂

Η επαγόμενη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών σαπωνινών μεσολαβείται από τη μεταγραφική ενεργοποίηση του μονοπατιού βιοσύνθεσης (Broeckling et al., 2005, Suzuki et al., 2005, Pollier et al., 2013a), μια μοριακή διεργασία στην οποία παίζει καταλυτικό ρόλο το ιασμονικό οξύ (Mertens et al., 2015).

Ο Mertens κ.ά προσπάθησαν να βρουν τους μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση του μονοπατιού βιοσύνθεσης των τριτερπενοειδών σαπωνινών αφού μέχρι τότε δεν υπήρχε καμία αναφορά στον τρόπο με τον οποίο ξεκινάει η βιοσύνθεση.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν εξειδικευμένα μονοπάτια συνήθως συνεκφράζονται με τα ένζυμα που συμμετέχουν στα μονοπάτια αυτά (De Geyter et al., 2012). Έτσι, ο Mertens και οι υπόλοιποι συνεργάτες, για να βρουν τους υποψήφιους μεταγραφικούς παράγοντες του μονοπατιού βιοσύνθεσης τριτερπενοειδών σαπωνινών στο *M. truncatula* έψαξαν στο *M. truncatula* Gene Expression Atlas για γονίδια που έχουν ίδιο προφίλ έκφρασης με τα γονίδια *HMGR1* και *MKB1* και βρήκαν έξι υποψήφιους μεταγραφικούς παράγοντες, τα οποία, όπως αναφέρεται παραπάνω, έχουν καθοριστικό ρόλο στον έλεγχο της βιοσύνθεσης τριτερπενίων στο *M. truncatula*. Επιπλέον, είχε παρατηρηθεί συν-έκφραση της *HMGR1* και της *MKB1* στις ρίζες φυτών *M. truncatula* κάτω από συνθήκες στρες ή/και όταν αυτά τα φυτά εκτίθονταν σε φυτοορμόνες, όπως το ιασμονικό οξύ (Pollier et al., 2013a). Μέσω αυτής της μελέτης βρήκαν έξι υποψήφιους μεταγραφικούς παράγοντες.

Στην συνέχεια έλεγξαν εάν αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι μέσω παροδικής τους έκφρασης σε πρωτοπλάστες *Nicotiana tabacum* (De Sutter et al., 2005, Vanden Bossche et al., 2013). Το πείραμα

αυτό έδειξε ότι δύο μεταγραφικοί παράγοντες της βασικής δομής έλικά-στροφή-έλικά μπορούσαν να επάγουν την έκφραση της λουσιφεράσης (γονίδιο αναφοράς). Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες ονομάστηκαν ρυθμιστικοί ενεργοποιητές τριτερπενοειδών σαπωνινών (Triterpene Saponin Activation Regulator), TSAR1 και TSAR2. Βρήκαν ακόμη ότι οι TSAR1 και TSAR2 ενεργοποιούν την έκφραση των γονιδίων *HMGR*, μέσω της πρόσδεσής τους στον υποκινητή των γονιδίων *HMGR* (Mertens et al., 2015).

1.13 Τα γονίδια *TSAR1* και *TSAR2* και ο διακριτός τους ρόλος στην βιοσύνθεση σαπωνινών

Ο Mertens και οι άλλοι συνεργάτες προσπάθησαν να ανακαλύψουν τον ρόλο των TSAR1 και TSAR2 στη ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης τριτερπενοειδών.

Έτσι, δημιούργησαν τρεις ανεξάρτητες σειρές σταθερά μετασχηματισμένων hairy root από το φυτό *M. truncatula*, οι οποίες να υπερεκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα TSAR1. Κάνοντας ποσοτική RT-PCR (qPCR) ανάλυση βρήκαν μία μέτρια αύξηση των μεταγράφων της *HMGR1* και της *MKB1* αλλά και μία σημαντική αύξηση των μεταγράφων των ενζύμων *BAS*, *CYP93E2*, *UGT73F3* και *UGT73K1* σε σχέση πάντα με τα control δείγματα. Τα δεδομένα αυτά αποδεικνύουν ότι η υπερέκφραση του TSAR1 έχει μεγάλη επίδραση στην συσσώρευση μη-αιμολυτικών σαπωνινών και υποστηρίζουν ότι ο TSAR1 αποτελεί ρυθμιστής της βιοσύνθεσης μη αιμολυτικών τριτερπενοειδών σαπωνινών.

Επίσης, δημιούργησαν και τρεις ανεξάρτητες σειρές σταθερά μετασχηματισμένων φυτών hairy root που να υπερεκφράζουν τον TSAR2. Η ανάλυση έδειξε μια μέτρια αύξηση των μεταγράφων της *MKB1* αλλά και μια τεράστια αύξηση (πάνω από 50 φορές) των μεταγράφων του *CYP716A12* δείχνοντας την εξειδίκευση του TSAR2 στην ενεργοποίηση του μονοπατιού βιοσύνθεσης αιμολυτικών τριτερπενοειδών σαπωνινών (Mertens et al., 2015).

1.14 Σκοπός διατριβής

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της ετερόλογης έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων TSAR1 και TSAR2 (Triterpenoid Saponin Activating Regulators 1,2) στο φυτό *L. jaronicus*. Η έκφραση αυτή μπορεί να επηρεάσει την μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των τριτερπενοειδών σαπωνινών, όπως έχει δείξει και μία παρόμοια μελέτη στο φυτό *Medicago truncatula*. Ο κύριος στόχος λοιπόν πίσω από την υπερέκφραση των TSAR1 και TSAR2 είναι να απαντηθεί το ερώτημα αν το βιοσυνθετικό μονοπάτι είναι συντηρημένο μεταξύ αυτών των φυτών.

Αν και γνωρίζουμε ότι στο *L. jaronicus* δεν έχουν ανιχνευτεί μέχρι τώρα σαπωνίνες, έχει ενδιαφέρον η μελέτη των πρώιμων σταδίων του βιοσυνθετικού

μονοπατιού και κυρίως η μελέτη των γονιδίων *HMGR1*, *HMGR2* και *HMGR3* που κωδικοποιούν τα ρυθμιστικά ένζυμα του μονοπατιού. Βέβαια, μεγάλο ενδιαφέρον έχει και η μελέτη των σταδίων βιοσύνθεσης απλών τριτερπενοειδών σκελετών, όπως είναι η λουπεόλη και η β-αμυρίνη, ο σχηματισμός των οποίων καταλύεται από τα ένζυμα *OSC3* και *AMY2* αντίστοιχα. Αυτό, λοιπόν, που αναμένουμε να διευκρινιστεί είναι όχι τόσο εάν το μονοπάτι βιοσύνθεσης τριτερπενίων καταλήγει στην παραγωγή σαπωνινών, αλλά κυρίως εάν τα προηγούμενα στάδια της βιοσύνθεσης μπορούν να ενεργοποιηθούν λόγω της ετερόλογης έκφρασης των TSARs και να δώσουν προϊόντα απλούς τριτερπενοειδείς μεταβολίτες.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Συνθήκες ανάπτυξης του φυτού *L. japonicus*

Το φυτό *L. japonicus* (οικότυπος Gifu B129) αναπτύχθηκε αρχικά σε τετράγωνα τρυβλία με θρεπτικό μέσο που περιείχε MS, σουκρόζη και άγαρ. Όταν τα φυτά έβγαλαν ρίζα μεταφέρθηκαν σε γλάστρες με αποστειρωμένη άμμο και βερμικουλίτη σε αναλογία 2:1. Τα φυτά βρίσκονταν σε θερμοκρασία δωματίου (22-23°C) και με φωτοπερίοδο 16/8 ώρες φώς/σκοτάδι. Το πότισμα γινόταν κάθε δύο μέρες, με νερό και διάλυμα Hoagland εναλλάξ.

2.2 Κλωνοποίηση (Gateway LR reaction)

Η κλωνοποίηση των κωδικών αλληλουχιών του *MtTSAR1* και του *MtTSAR2* έγινε μέσω του τοπο-ειδικού συστήματος ανασυνδιασμού Gateway (Εικόνα 8). Πιο συγκεκριμένα, ένα πλασμίδιο (entry clone) βασισμένο στον σκελετό του pDONR207 (Invitrogen-Life Technologies) περιέχει την επιθυμητή αλληλουχία (TSAR1 και 2, Mertens et al., 2015) η οποία πλαισιώνεται από κάποιες θέσεις ανασυνδιασμού (attL1 και attL2). Το πλασμίδιο αυτό, παρουσία ενζύμων ανασυνδιασμού (LR clonase™ enzyme mix), ανασυνδιάζεται με τις θέσεις attR1 και attR2 ενός πλασμιδίου pUB-GWS-GFP (Mekawa et al., 2008) (destination vector) που περιέχει ένθεση του γονιδίου ccdB. Η αντίδραση της LR κλωνάσης δίνει ένα πλασμίδιο (expression clone) που φέρει την κωδική αλληλουχία του επιθυμητού γονιδίου μπροστά από την αλληλουχία του υποκινητή της ουβικιτίνης του *L. japonicus* ανάμεσα στα άκρα attB1 και attB2. Επίσης παράγεται το παραπροϊόν donor vector που περιέχει το γονίδιο ccdB, η έκφραση του οποίου είναι τοξική για τα βακτηριακά κύτταρα και οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο. Η πρωτεΐνη CcdB είναι ένα φυσικό δηλητήριο που αλληλεπιδρά με την γυράση, μια βασική τοποϊσομεράση που βρίσκεται σε όλα τα βακτήρια. Η γυράση μεταβάλλει την τοπολογία του DNA πραγματοποιώντας ένα παροδικό σπάσιμο της διπλής έλικας του DNA. Το δηλητήριο CcdB δρα παγιδεύοντας την DNA γυράση σε ένα σύμπλεγμα με την υπομονάδα A της γυράσης ομοιοπολικά συνεδεμένη στο διασπασμένο DNA, προκαλώντας θραύση των πλασμιδίων και του χρωμοσωμικού DNA, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο στον κυτταρικό θάνατο (Bernard P. et al., 1992). Χρησιμοποιείται ακόμα ένας δείκτης επιλογής, καθώς ο entry clone και ο destination vector διαθέτουν διαφορετικό γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό (καναμυκίνη για τον entry clone και αμπικιλίνη για τον expression vector). Έτσι, το πλασμίδιο με το επιθυμητό γονίδιο θα έχει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη.



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση του τοπο-ειδικού συστήματος ανασυνδιασμού Gateway (Katzen,2007)

Η αντίδραση LR έχει τελικό όγκο 2,5μl και περιλαμβάνει:

- 0,5μl entry clone (pDONR207:TSAR1/TSAR2 ~100ng)
- 0,5μl destination vector (pUB-GW-HYG ~150ng)
- 0,5μl LR clonase mix
- 1μl H₂O

Αφού προστέθηκαν όλα τα παραπάνω η αντίδραση παρέμεινε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).

2.3 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli* με πλασμιδιακό DNA.

Για τον μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *E.coli* χρησιμοποιήθηκαν 80μl διαλύματος κυττάρων στα οποία προστέθηκαν 2,5μl από την αντίδραση LR και έμειναν στον πάγο για 30 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε θερμικό σοκ στους 42°C για 50 δευτερόλεπτα. Ακολούθησε η επώαση στον πάγο για 5 λεπτά και η προσθήκη 1ml LB σε κάθε tube τα οποία επώαστηκαν για 1 ώρα στους 37°C. Στρώθηκαν, τέλος, οι καλλιέργειες (250μl) σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό και επώαστηκαν για 12-14 ώρες (37°C/210rpm). Την επόμενη μέρα, μεταφέρθηκαν αποικίες (με αποστειρωμένο tip πιπέτας) σε υγρό θρεπτικό υλικό 5ml με 5μl καναμυκίνης (50mg/ml) και επώαστηκαν overnight (37°C/210 rpm).

2.4 Stock γλυκερόλης για αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων

Προκειμένου να αποθηκευτεί η καλλιέργεια των μετασχηματισμένων βακτηρίων *E.coli* παρασκευάστηκε stock γλυκερόλης 30% με προσθήκη σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου erpendof, 300μl γλυκερόλης και 700μl υγρής καλλιέργειας. Στη συνέχεια, μετά από ανάδευση, το σωληνάριο ψύχθηκε σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκε στους -80°C.

2.5 Απομόνωση πλασμιδίου DNA από βακτήρια *E. coli*

Η απομόνωση των πλασμιδίων DNA από τις υγρές καλλιέργειες μετασχηματισμένων βακτηρίων *E. coli* έγινε με αλκαλική λύση, ως εξής: ξεκινάει με την φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 10,000g 1,5ml υγρής καλλιέργειας σε tube των 1,5ml. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση άλλες δύο φορές. Ακολούθησε προσθήκη 300μl buffer P1 και 3μl RNάσης και έγινε μίξη με vortex. Προστέθηκαν 300μl buffer P2 και έγινε ήπια ανάδευση για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 300μl buffer P3 και πάλι αναδεύτηκαν ήπια. Το tube τοποθετήθηκε για 10 λεπτά στον πάγο και μετά φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 10,000g. Έπειτα, προστέθηκαν 600μl ισοπροπανόλης και έγινε ήπια ανάδευση. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις μέγιστες στροφές και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο. Προστέθηκαν 500μl 70% αιθανόλης και αναδεύτηκαν ήπια. Φυγοκεντρήθηκε και πάλι το μίγμα για 10 λεπτά στις 10,000g και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο. Τέλος, έγινε στέγνωμα για 10 λεπτά στους 37°C και μετά επαναδιάλυση του pellet σε 30μl H₂O. Το πλασμιδιακό DNA αποθηκεύτηκε στους -20°C.

Buffers:

- Το buffer P1 περιέχει 50mM Tris, 10mM EDTA και pH 8 HCl
- Το buffer P2 περιέχει 200mM NaOH και 1% SDS
- Το buffer P3 περιέχει 3M Potassium acetate και pH 5,5 glacial acetic acid

2.6 Πέψη πλασμιδίων με ένζυμα περιορισμού

Η πέψη των πλασμιδίων έγινε με βάση το πρωτόκολλο της NEB.

Η αντίδραση πέψης για τα απομονωμένα πλασμίδια με την κωδική αλληλουχία του TSAR1 χρειάζεται:

- 1μl DNA
- 2,5μl buffer 2.1
- 0,5μl EcoRV
- 21μl ddH₂O

Η αντίδραση πέψης για τα μετασχηματισμένα βακτήρια με την κωδική αλληλουχία του TSAR2 χρειάζεται:

- 2μl DNA
- 2,5μl buffer 2.1
- 0,5μl HindIII
- 20μl ddH₂O

Και στις δύο περιπτώσεις πραγματοποιείται επώαση στους 37°C για 90 λεπτά.

2.7 Freeze-thaw method: Μετασχηματισμός βακτηρίων *Agrobacterium rhizogenes*

Για τον άμεσο μετασχηματισμό *Agrobacterium rhizogenes* αρχικά καλλιεργήθηκε το στέλεχος *Agrobacterium rhizogenes* LBA 1334 σε 5ml θρεπτικού υλικού με προσθήκη των αντιβιοτικών σπεκτινομυκίνη (τελική συγκέντρωση 50μg/ml) και ριφαμπικίνη (τελική συγκέντρωση 25μg/ml) overnight στους 28°C. Η χρήση δύο αντιβιοτικών έγινε ώστε να αναπτυχθούν μόνο τα στελέχη του βακτηρίου που έχουν ανθεκτικότητα και στα δύο αντιβιοτικά. Την επόμενη ημέρα προστέθηκαν 2ml από την overnight καλλιέργεια σε 50ml θρεπτικό υλικό σε φλάσκα των 250ml και ανακινήθηκαν στους 28°C μέχρι η καλλιέργεια να έχει O.D.₆₀₀=0,5-1,0. Αφού η καλλιέργεια απέκτησε την επιθυμητή οπτική πυκνότητα τοποθετήθηκε στον πάγο μέχρι να παγώσει. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 3,000g για 5 λεπτά στους 4°C και έπειτα αφαιρέθηκε το υπερκείμενο. Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 1ml 20mM CaCl₂. Προστέθηκε, στην συνέχεια, 1μg πλασμιδιακού DNA και τα κύτταρα ψύχθηκαν σε υγρό άζωτο. Έπειτα, τα κύτταρα ξεπαγώθηκαν σε υδατόλουτρο στους 37°C και μετά προστέθηκε 1ml θρεπτικού υλικού και έγινε επώαση στους 28°C για 2-4 ώρες σε ήπια ανάδευση. Αυτή η χρονική περίοδος επιτρέπει στα βακτήρια να εκφράσουν το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό. Το tube φυγοκεντρήθηκε για 30 δευτερόλεπτα σε 3.500xg και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο. Στη συνέχεια, έγινε επαναδιάλυση σε 100μl θρεπτικού υλικού. Τέλος, τα κύτταρα απλώθηκαν σε τρυβλία LB (που περιείχε καναμυκίνη) και τα τρυβλία επώαστηκαν στους 28°C για 2-3 μέρες.

2.8 Σταθερός μετασχηματισμός σπόρων *L. jaronicus*

Η διαδικασία μετασχηματισμού σπόρων *L. jaronicus* διαρκεί τουλάχιστον 16 ημέρες και κάποιες φορές παραπάνω, ανάλογα με την ταχύτητα ανάπτυξης του φυτού. Την πρώτη ημέρα έγινε η αποστείρωση των σπόρων όπου 100 σπόροι του φυτού *L. jaronicus* τοποθετήθηκαν σε tube του 1,5ml και προστέθηκε 1ml θεικού οξέος. Έγινε ήπια ανάδευση για 10 λεπτά και έπειτα 4 πλύσεις με νερό. Στην συνέχεια, προστέθηκε 1ml 20% χλωρίνης και έγινε ήπια ανάδευση για 20 λεπτά. Ακολούθησαν 5-6 πλύσεις με νερό, προστέθηκε 1 ml νερού και τα tubes αποθηκεύτηκαν για 1-2 μέρες στους 4°C τυλιγμένα με αλουμινόχαρτο. Την δεύτερη ημέρα οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε τετράγωνα τρυβλία με θρεπτικό υλικό (24 σπόροι/τρυβλίο) τα οποία τυλίχθηκαν με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκαν στους -4°C. Την τρίτη ημέρα τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης με θερμοκρασία 22°C. Την πέμπτη ημέρα αφαιρέθηκε το αλουμινόχαρτο από τα τρυβλία και αυτά διατηρήθηκαν στον θάλαμο με φωτοπερίοδο 16/8 ώρες φως/σκοτάδι. Την έκτη ημέρα παρασκευάστηκαν υγρές καλλιέργειες *A. rhizogenes* από αποικίες που υπήρχαν ήδη στα τρυβλία και προστέθηκαν σε αυτές τα

αντιβιοτικά στεκτινομυκίνη και καναμυκίνη. Χρειάστηκαν 5ml υγρής καλλιέργειας για κάθε 100 φυτά. Την όγδοη ημέρα μεταφέρθηκαν 0,5ml από τις υγρές καλλιέργειες *Agrobacterium* σε τρυβλία με επιλογή στην καναμυκίνη και την στεκτινομυκίνη και επώαστηκαν στους 38°C overnight. Την ένατη ημέρα προστέθηκαν 2-3ml H₂O στα τρυβλία από τις καλλιέργειες αγροβακτηρίων και ξύθηκε η επιφάνεια τους με τυπ πιπέτας ώστε οι αποικίες των βακτηρίων να ξεκολλήσουν. Στην συνέχεια, αυτά τα 2-3ml προστέθηκαν στα τρυβλία με αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί πάνω στο οποίο τοποθετήθηκαν τα φυτά που είχαν αναπτυχθεί. Έπειτα, κόπηκε η ρίζα στο σημείο του υποκοτυλίου και προστέθηκε στο τρυβλίο ακόμη 1ml υγρής καλλιέργειας. Τα μολυσμένα πλέον φυτά τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με ½ MS και σουκρόζη (Εικόνα 9). Τα τρυβλία, τέλος, καλύφθηκαν με αλουμινοχαρτο και παρέμειναν στους 22°C για 2 ημέρες. Την εντέκατη ημέρα αφαιρέθηκε το αλουμινοχαρτο από τα τρυβλία. Την δέκατη έκτη ημέρα σε ένα άδειο τρυβλίο προστέθηκε H₂O και 200ml σεφοταξάμης. Τα φυτά μεταφέρθηκαν στο τρυβλίο αυτό και παρέμειναν για 2-3 λεπτά. Αργότερα τοποθετήθηκαν ανάμεσα σε 2 αποστειρωμένα διηθητικά χαρτιά και στη συνέχεια σε τετράγωνα τρυβλία με θρεπτικό υλικό ½ MS, σουκρόζη και σεφοταξάμη (10 φυτά/τρυβλίο). Τέλος, τα τρυβλία μπήκαν σε ψυγείο με σταθερή θερμοκρασία 22°C μέχρι να παρατηρηθεί ανάπτυξη της ρίζας (hairy root), δηλαδή για 1-2 εβδομάδες. Μετά, τα φυτά μεταφέρονται σε γλάστρες με άμμο και βερμοκουλίτη με αναλογία 2:1.



Εικόνα 9: Μετασηματισμένα φυτά σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο, σουκρόζη και αντιβιοτικό

2.9 PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιείται για την *in vitro* ενίσχυση ακολουθιών DNA. Ο πολλαπλασιασμός των αλληλουχιών του DNA γίνεται με ταυτόχρονη επέκταση των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων. Τα απαραίτητα συστατικά μιας αντίδρασης PCR είναι:

- Το δίκλωνο μόριο DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε.
- Ένα ζεύγος κατάλληλων εκκινητών που υβριδίζουν στις συμπληρωματικές αλυσίδες DNA και προσδιορίζουν τα σημεία έναρξης της αντιγραφής (0,1-1μM).
- Μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (20-25 units/ml),
- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (200μM από το καθένα) και
- Ιόντα Mg²⁺

Μια τυπική αντίδραση PCR περιλαμβάνει σε πρώτη φάση την αποδιάταξη του DNA στόχου σε υψηλή θερμοκρασία. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας και υβριδισμός των εκκινητών στις αποδιατεταγμένες αλυσίδες. Στην συνέχεια

αυξάνουμε την θερμοκρασία για να γίνει η σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων από την πολυμεράση. Οι τρεις αυτές διαδικασίες επαναλαμβάνονται από 20 έως 30 φορές με αποτέλεσμα η αλληλουχία στόχος να πολλαπλασιάζεται εκθετικά. Στο πείραμα αυτό, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση ενός τμήματος του γονιδίου επιλογής (υδρομυκίνη) στα μετασχηματισμένα φυτά *L. jaronicus* και για την ενίσχυση του γονιδίου της ουβικιτίνης στον έλεγχο απομάκρυνσης του γενωμικού DNA μετά την απομόνωση του RNA. Η PCR έγινε με πολυμεράση Taq της Kappa.

Αντιδραστήρια PCR	Αρχική Συγκέντρωση	Όγκος
Μήτρα DNA		1-3μl
KapaTaq buffer with MgCl ₂	5x	2μl
Μίγμα dNTPs	10μM	0,4μl
Forward primer	10μM	0,4μl
Reverse primer	10μM	0,4μl
KapaTaq	5U/μl	0,08μl
ddH ₂ O		Μέχρι τελικό όγκο 20μl

Το πρόγραμμα θερμοκυκλοποίησης φαίνεται στον παρακάτω πίνακα και επαναλήφθηκε για 35 κύκλους στην ενίσχυση τμήματος του γονιδίου επιλογής (υδρομυκίνη) και στην περίπτωση ενίσχυσης του γονιδίου της ουβικιτίνης.

Οι συνθήκες ενίσχυσης ήταν οι εξής:

Συνθήκες ενίσχυσης	
Αρχική αποδιάταξη	95°C για 2 λεπτά
Αποδιάταξη	95°C για 30 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση	55°C για 30 δευτερόλεπτα
Επέκταση	72°C για 1λεπτό/Kb
Τελικά επέκταση	72°C για 2 λεπτά

2.10 Απομόνωση DNA με την χρήση CTAB

Η απομόνωση του DNA ξεκινάει με την λειοτρίβιση του ιστού σε υγρό άζωτο (στην περίπτωση αυτή είναι 10mg από τις ρίζες των μετασχηματισμένων φυτών) με πλαστικό έμβολο. Παράλληλα προθερμάνθηκε το διάλυμα CTAB buffer στους 65°C στο υδατόλουτρο. Σε κάθε tube προστίθονται 100μl CTAB buffer και 1μl μερκαπτοαιθανόλης και επωάζονται για 15 λεπτά στους 65°C στο υδατόλουτρο. Στην συνέχεια, προστίθενται 150μl χλωροφόρμιο και 1:25 ισοαμυλική αλκοόλη και αναμιγνύονται με vortex. Γίνεται φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 rpm. Έπειτα, το υδατικό υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο tube και προστέθηκε σε αυτό 0,7 vol ισοπροπανόλης. Το μίγμα αναδεύτηκε ήπια και επώαστηκε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000 rpm. Αφαιρέθηκε, έπειτα, το υπερκείμενο και προστέθηκαν 0,5ml παγωμένης αιθανόλης. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις μέγιστες στροφές. Τέλος, αφαιρέθηκε και πάλι το υπερκείμενο και έγινε επαναδιάλυση σε 15μl H₂O και RNάση σε τελική συγκέντρωση 0,66 mg/ml.

2.11 Απομόνωση RNA

Για την απομόνωση του RNA χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο ISOLATE II RNA Plant Kit της Biorline. Στο πρώτο βήμα της διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε το buffer RLY (περιέχει guanidinium thiocyanate που απενεργοποιεί τις ενδογενείς RNάσες). Επίσης, παρακάμθηκε το στάδιο της πέψης του DNA διότι θα εφαρμοστεί μετά την απομόνωση του RNA. Για την διαλυτοποίηση προστέθηκαν 30μl νερού (RNase free-water) στο κέντρο της μεμβράνης και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση σε 11,000 xg για 1 min. Το τελευταίο αυτό βήμα πραγματοποιήθηκε δύο φορές ώστε να αποκολληθεί μεγαλύτερη ποσότητα RNA από την μεμβράνη. Η ποσότητα του RNA που απομονώθηκε μετρήθηκε με το αντιδραστήριο και την συσκευή Qubit της Invitrogen/Life technologies.

Ακολούθησε αντίδραση DNάσης της Thermo Scientific. Πιο συγκεκριμένα για κάθε αντίδραση προστέθηκαν:

- 7,5 μl RNA
- 1 μl 10x reaction buffer with MgCl₂
- 1 μl DNase I, RNase free (1 U)
- 0,5 μl RNase inhibitor (RNase out)

Για να διαπιστωθεί εάν η αντίδραση DNάσης έχει πετύχει και το DNA έχει απομακρυνθεί, πραγματοποιήθηκε μία PCR με εκκινητές για την ουβικιτίνη και χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA από *L. jaronicus* σαν θετικό control.

Στη συνέχεια το απομονωμένο RNA χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση cDNA με βάση το πρωτόκολλο της Takara. Για όλα τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε η μέγιστη ποσότητα RNA (7,5μl). Στο τέλος η απενεργοποίηση του ενζύμου έγινε στους 70°C για 15 λεπτά.

2.12 Πειράματα qRT-PCR (ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου)

Η ποσοτική PCR είναι η διαδικασία ενίσχυσης μιας DNA αλληλουχίας με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) και ταυτόχρονα της ανίχνευσης του παραγόμενου προϊόντος σε πραγματικό χρόνο καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης (Real-time PCR), μέσω της χρήσης ειδικών φθορίζοντων χρωστικών που ενσωματώνονται στην αλληλουχία που ενισχύεται. Το σημείο/κύκλος της αντίδρασης κατά το οποίο ο ανιχνευόμενος φθορισμός από κάθε δείγμα ξεπερνά το υπόβαθρο φθορισμού ορίζεται ως «κύκλος-κατώφλι» (Threshold Cycle ή Ct) ο οποίος εξαρτάται από το ρυθμού αύξησης της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος και άρα την αρχική ποσότητα μορίων-στόχων, μήτρας, της PCR. Έτσι, όσο λιγότερα αντίγραφα μορίου-στόχου περιέχονται στο δείγμα, τόσο περισσότεροι κύκλοι απαιτούνται για να εισέλθει η αντίδραση στην εκθετική της φάση και να ανιχνευθεί το παραγόμενο σήμα που αντιστοιχεί στο Ct.

Η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα είναι η SYBR Green qPCR mix της Kappa. Η παρεμβαλλόμενη σε δίκλωνο μόριο DNA (dsDNA) χρωστική παρουσιάζει ελάχιστο ή καθόλου φθορισμό όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα, ενώ παράγει ποσοτική αύξηση του φθορισμού, όταν δεσμεύεται σε dsDNA.

Η αντίδραση της PCR περιλαμβάνει τα εξής:

Αντιδραστήρια PCR	Συγκέντρωση	Όγκος
SYBR Green		5μl
Forward primer	10μM	0,2μl
Reverse primer	10μM	0,2μl
RNase free-water		3,6μl

2.13 Απομόνωση μεταβολιτών για ανάλυση μεταβολικού περιεχομένου GC και LC-MS

Για την εκχύλιση μεταβολιτών από μετασηματισμένα φυτά TSAR1 και TSAR2 αρχικά λειοτριβήθηκαν ιστοί ρίζας σε υγρό άζωτο. Στην συνέχεια, ζυγίστηκαν 400mg για κάθε δείγμα LC (υγρή χρωματογραφία) και 50mg για δείγματα GC (αέρια χρωματογραφία) από τρεις φορές για κάθε δείγμα και κάθε μέθοδο χρωματογραφίας. Σε όλα τα δείγματα προστέθηκαν 800μl μεθανόλης και έγινε vortex, ενώ έπειτα τα δείγματα παρέμειναν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις μέγιστες στροφές (17.000 g) και μετά τα δείγματα τοποθετήθηκαν στην φυγόκεντρο κενού για 1 ώρα (μέχρι να εξατμιστεί η μεθανόλη).

2.14 Θρεπτικά υλικά και διαλύματα

Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης *E. coli* και *Agrobacterium tumefaciens*: 0,5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 1%(w/v) NaCl, 1% (w/v) πεπτόνη
Στην περίπτωση στερεού υποστρώματος, προστίθεται 1,5% (w/v) άγαρ.

Θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη σπόρων *L. jaronicus*: 1% σουκρόζη, 0,22% MS, 0,35% Άγαρ.

Θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη φυτών μολυσμένων με *A. Rhizogenes*: 1% σουκρόζη, 0,22% MS, 0,7% gelrite, σεφοταξάμη (σε τελική συγκέντρωση 300μg/ml)

Διάλυμα CTAB για την απομόνωση DNA: 100mM Tris-HCl (pH=8), 20mM EDTA (pH=8), 1,4M NaCl, 2% w/v cetyltrimethyl ammonium bromide, 1% PVP

Διάλυμα Hoagland: 2ml MgSO_4 (1M), 1ml KH_2PO_4 (1M), 1ml FeEDTA (0,1M), 1ml Microelements, 5ml KNO_3 (20gr/ml), 5ml $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (2,36gr/ml).

Microelements stock solution: H_3BO_3 (2,86gr/ml), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,81gr/ml), ZnCl_2 (0,11gr/ml), $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,05gr/ml), H_2MoO_4 (0,02gr/ml).

TAE 1x: 89 mM Tris (pH 7.6), 89 mM boric acid, 2 mM EDTA.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Πλασμιδιακοί φορείς

Οι κωδικές αλληλουχίες των γονιδίων *MtTSAR1* και *MtTSAR2* του *Medicago truncatula* κλωνοποιήθηκαν σε ένα δυαδικό φορέα χρησιμοποιώντας τον υποκινητή του γονιδίου της ουβικιτίνης του *L. jaronicus* για να οδηγήσει την έκφραση των TSAR και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη (Hyg^R) σαν δείκτης επιλογής. Το ένθεμα που κατασκευάστηκε φαίνεται στην εικόνα 10.



Εικόνα 10 : Το ένθεμα του T-DNA που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή δυαδικού φορέα. Ανάμεσα στο δεξί συνοριακό (RB) και στο αριστερό (LB) περιέχονται ο υποκινητής του γονιδίου της ουβικιτίνης (*LjUbq1pr*), οι κωδικές αλληλουχίες των γονιδίων *TSAR1* και *TSAR2* και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη (Hyg^R).

3.2 Κατασκευή δυαδικών φορέων για ετερόλογη έκφραση των TSARs στο *L. jaronicus*

Σε καλλιέργειες δεκτικών κυττάρων *E.coli* προστέθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pUB-Hyg . Οι καλλιέργειες των βακτηρίων μετασηματίστηκαν ξεχωριστά με καθένα από τα δύο πλασμίδια (pUB:TSAR1, TSAR2) αλλά και με ένα πλασμίδιο χωρίς την κωδική αλληλουχία των TSAR που χρησιμοποιήθηκε ως control. Οι αποικίες οι οποίες αναπτύχθηκαν στα τρυβλία με καναμυκίνη δηλώνουν την επιτυχία του μετασηματισμού καθώς τα δεκτικά κύτταρα *E.coli* δεν διαθέτουν ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη. Οι αποικίες αυτές στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε υγρό LB και αναπτύχθηκαν ώστε να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA. Οι αποικίες ονομάστηκαν TSAR1-1, TSAR2-1, TSAR2-2, TSAR2-4, TSAR2-5 και TSAR2-6. Για τον έλεγχο της επιτυχίας του μετασηματισμού των βακτηριακών στελεχών *E.coli* με τα σωστά/επιθυμητά πλασμίδια έγινε αρχικά απομόνωση του πλασμιδιακού DNA και στη συνέχεια πέψη με περιοριστικά ένζυμα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες και τις κόβουν τόσο στο ένθεμα όσο και στον φορέα. Πιο συγκεκριμένα, για την πέψη των φορέων που περιείχαν την κωδική αλληλουχία του *TSAR1* χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *EcoRV* που κόβει μία φορά στο ένθεμα και δύο φορές στον φορέα. Για τους φορείς που περιείχαν την κωδική αλληλουχία του *TSAR2* χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *HindIII* που κόβει μία φορά στο ένθεμα και μία φορά στον φορέα. Μετά την αντίδραση πέψης τα δείγματα φορτώθηκαν σε gel αγαρόζης 1%. Το αρνητικό control δούλεψε άρα και η PCR, και παρατηρήθηκε ότι τα προϊόντα της αντίδρασης ήταν τρία για τον φορέα με την αλληλουχία *TSAR1* (μία μπάντα 7,5Kb, μία μπάντα 2,6Kb και μία 1,3Kb) και δύο για

τον φορέα με την αλληλουχία *TSAR2*, επιβεβαιώνοντας έτσι την επιτυχία του μετασχηματισμού (Εικόνα 11,12).



Εικόνα 12: Προϊόντα πέψης με το ένζυμο *HindIII* στα μετασχηματισμένα δείγματα με *TSAR2*. Στο πρώτο πηγαδάκι εμφανίζεται ο δείκτης (M), στο δεύτερο το αρνητικό control (-C) και από το τέταρτο πηγαδάκι και έπειτα είναι φορτωμένα τα δείγματα. Σε όλα τα δείγματα βλέπουμε δύο μπάντες, μία 10Kb και μία 700bp

Εικόνα 11: Προϊόντα πέψης με το ένζυμο *EcoRV* στα μετασχηματισμένα δείγματα *TSAR1*. Στο πρώτο πηγαδάκι εμφανίζεται ο δείκτης (M), στο δεύτερο το αρνητικό control (-C) και στο τρίτο το δείγμα TS1-1.

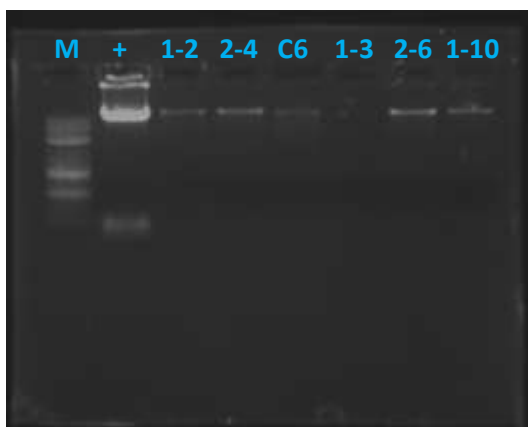
3.3 Επιβεβαίωση του μετασχηματισμού των hairy roots

Φυτά *L. jaronicus* μετασχηματίστηκαν με *A. rhizogenes* που περιείχε στο T-DNA τις κωδικές αλληλουχίες των γονιδίων *TSAR*. Δημιουργήθηκαν δύο μετασχηματισμένες ομάδες φυτών, μία σειρά μετασχηματίστηκε με το ένθεμα *TSAR1* και μία με το ένθεμα *TSAR2* (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Αντιπροσωπευτικές εικόνες αναγεννημένων hairy roots τρεις εβδομάδες μετά τον μετασχηματισμό με το pUB-TSAR1-HygromycinR (*TSAR1* φυτά, A) και το pUB-HygromycinR (φυτά control, B).

5 εβδομάδες μετά την μόλυνση με το αγροβακτήριο έγινε δειγματοληψία και έπειτα απομόνωση DNA με την μέθοδο CTAB. Για τον έλεγχο της επιτυχούς απομόνωσης DNA αλλά και για υπάρξει μία σχετική ένδειξη της ποσότητας που έχει απομονωθεί, μικρή ποσότητα από κάποια δείγματα ενδεικτικά φορτώθηκε σε gel αγαρόζης 1%. Η PCR φαίνεται πως έχει δουλέψει καθώς βλέπουμε μπάντες στο



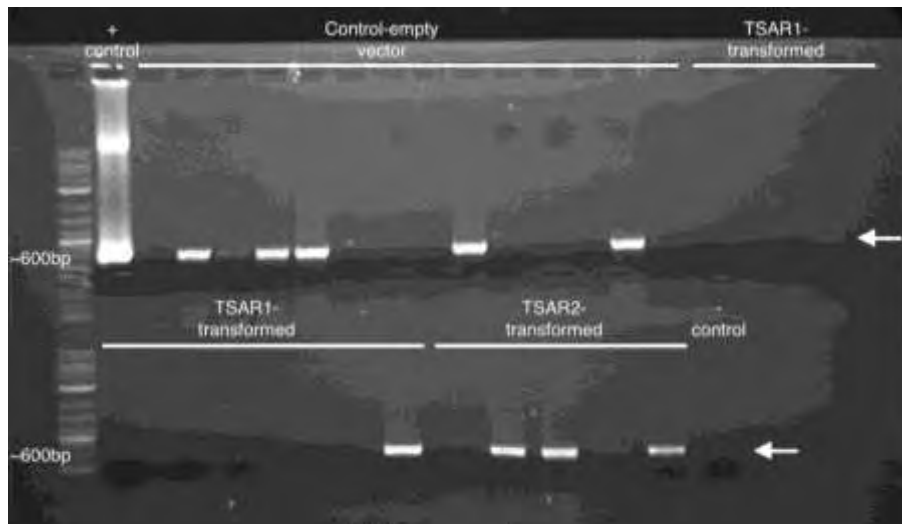
Εικόνα 14: Προϊόντα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων DNA. Φορτώθηκαν ενδεικτικά κάποια από τα δείγματα των μετασηματισμένων φυτών για τον έλεγχο της απομόνωσης DNA.

θετικό control. Σχεδόν σε όλα τα δείγματα (εκτός από το δείγμα TSAR1-3) παρατηρήθηκε αρκετή ποσότητα DNA, άρα διαπιστώσαμε ότι η απομόνωση DNA έχει πετύχει (Εικόνα 14). Για τον έλεγχο του μετασηματισμού και την διαλογή των δειγμάτων με τα οποία συνεχίστηκε το πείραμα, πραγματοποιήθηκε μία PCR με εκκινητές για ένα τμήμα της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου της υγρομυκίνης, το οποίο βρίσκεται μέσα στο ένθεμα T-DNA. Μετά το τέλος της ενίσχυσης, τα δείγματα φορτώθηκαν σε gel αγαρόζης 0,8% και παρατηρήθηκαν

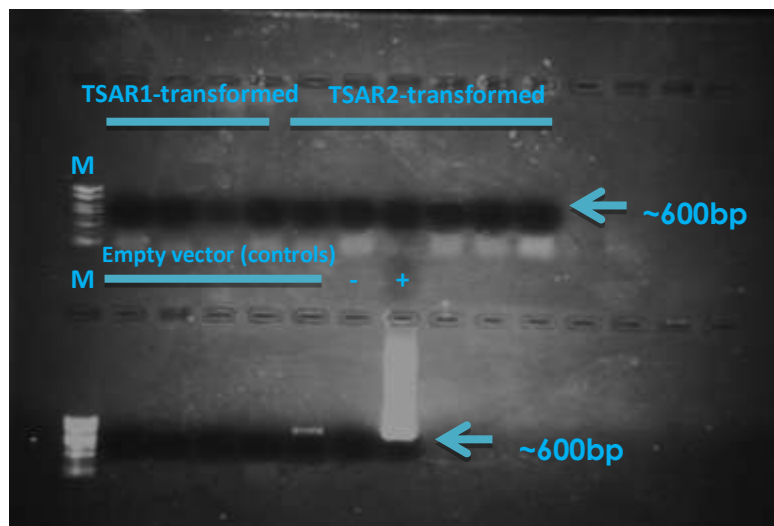
μπάντες 600bp σε κάποια δείγματα (Εικόνα 15,16). Η PCR έχει δουλέψει καθώς δεν βλέπουμε μπάντα στο αρνητικό control και στο θετικό control βλέπουμε μπάντες σε διάφορα μεγέθη. Η παρουσία μιας μπάντας περίπου 600bp υποδηλώνει την ύπαρξη του γονιδίου της υγρομυκίνης άρα και την επιτυχία του μετασηματισμού των hairy roots. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) φαίνεται ο αριθμός των φυτών που ελέγχθηκαν για την παρουσία του γονιδίου ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη και ο αριθμός των μετασηματισμένων δειγμάτων.

Μετασηματισμένες σειρές	Αριθμός δειγμάτων που ελέγχθηκαν για την παρουσία του T-DNA	Αριθμός μετασηματισμένων φυτών
TSAR1	29	15
TSAR2	21	16
Control	23	13

Πίνακας 1: Τα δείγματα TSAR1, TSAR2 και control ελέγχθηκαν για την παρουσία του T-DNA. Στον πίνακα φαίνεται πόσα από αυτά τα φυτά είναι μετασηματισμένα με το T-DNA. Τα στοιχεία αυτά αποτελούν τμήμα του 2^{ου} πειράματος.



Εικόνα 15: Αποτελέσματα PCR με εκκινητές για το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη που περιέχεται στο T-DNA. Το άδειο pUB πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε ως θετική control και ως αρνητικό control χρησιμοποιήθηκε καθαρό νερό. Το αναμενόμενο προϊόν είναι 600bp (βέλη).

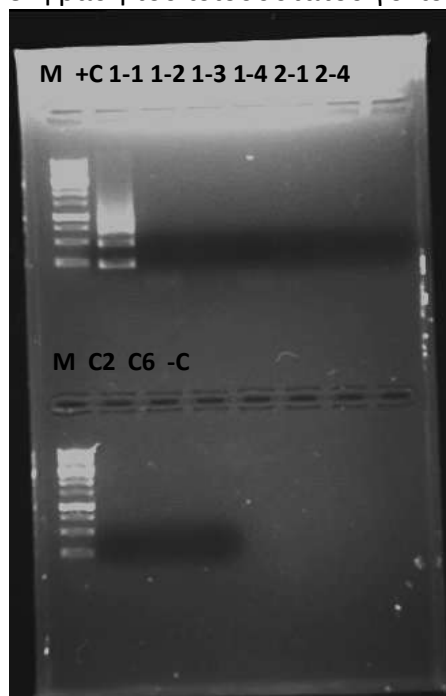


Εικόνα 16: Προϊόντα PCR με εκκινητές για αλληλουχίες μέσα στο γονίδιο επιλογής (γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη). Το θετικό και το αρνητικό control δίνουν τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Τα δείγματα 2-1, 2-4, C2 και C6 εμφανίζουν μία μπάντα με το επιθυμητό μέγεθος (600bp). Άρα τα δείγματα αυτά είναι μετασηματισμένα.

3.4 Επιβεβαίωση ετερόλογης έκφρασης των TSARs σε μετασηματισμένες ρίζες *Lotus japonicus*

Απομονώθηκε RNA από ρίζες μετασηματισμένων φυτών (που επιλέχθηκαν με βάση τις προηγούμενες PCR) και η ποσότητα του RNA μετρήθηκε. Έπειτα, ακολούθησε η απομάκρυνση του γενωμικού DNA από τα δείγματα με χρήση DNάσης. Ο έλεγχος της επιτυχίας της απομάκρυνσης έγινε με PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές για το ενδογενές γονίδιο της ουβικιτίνης (Εικόνα 17). Το θετικό κοντρόλ έχει προϊόν, άρα δουλεύει η PCR μ' αυτές τις συνθήκες, ενώ τα δείγματα RNA δεν

δίνουν προϊόν, συνεπώς τα επίπεδα DNA είναι μη-ανιχνεύσιμα σ' αυτά τα δείγματα και έχει πετύχει η απομάκρυνση του γενωμικού DNA. Στη συνέχεια, ακολούθησε σύνθεση cDNA από το RNA και έπειτα ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου qRT-PCR ώστε να κανονικοποιηθεί η συνολική ποσότητα cDNA στα δείγματα με βάση την έκφραση του ιδιοσυστατου γονιδίου αναφοράς την ουβικιτίνης.

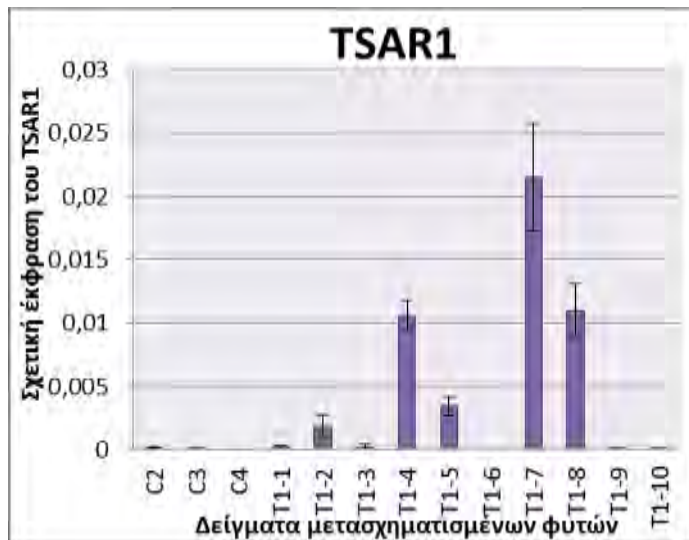


Εικόνα 17: Προϊόντα ηλεκτροφόρησης από PCR με εκκινητές για το ενδογενές γονίδιο της ουβικιτίνης. Η PCR είναι επιτυχής και τα δείγματα δεν περιέχουν ανιχνεύσιμες ποσότητες DNA.

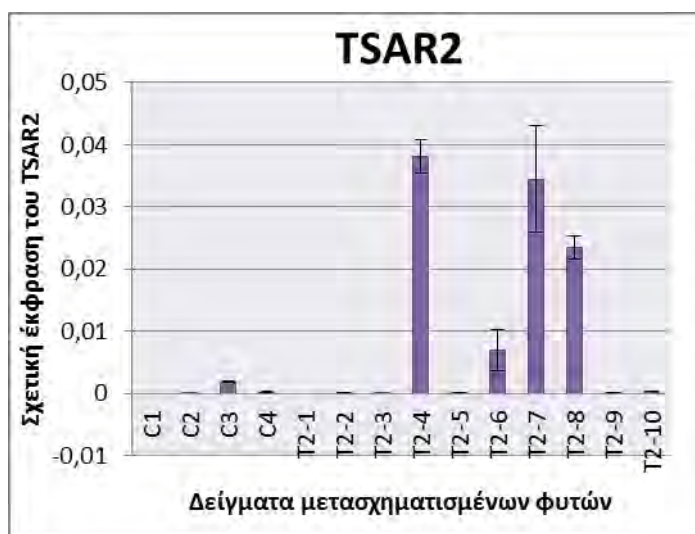
3.5 Πειράματα RT-PCR (qPCR)

Για να αναλυθούν οι αλλαγές που συνέβησαν σε μεταγραφικό επίπεδο στα μετασχηματισμένα φυτά *L. jaronicus* χρησιμοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου (ποσοτική-qPCR) με εκκινητές για διάφορα γονίδια του μονοπατιού βιοσύνθεσης των τριτερπενίων. Οι εκκινητές αυτοί, που είναι συμπληρωματικοί με τις αλληλουχίες των μεταγράφων των γονιδίων, δεσμεύονται στο cDNA και ενισχύουν τις αλληλουχίες παράγοντας ένα σήμα φθορισμού σε κάθε κύκλο ενίσχυσης. Η ύπαρξη, λοιπόν, μεταγράφων αντικατοπτρίζει την έκφραση των γονιδίων. Τα γονίδια αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το γονίδιο της ουβικιτίνης και το γονίδιο της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 2 (*PP2A*). Και οι δύο αυτά γονίδια είναι ιδιοσυστατα εκφραζόμενα γονίδια, δηλαδή στα γονίδια που είναι απαραίτητα για την κυτταρική λειτουργία και εκφράζονται σε όλους ιστούς, σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και κάτω από οποιαδήποτε περιβαλλοντική συνθήκη. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να αποτελέσουν ένα δείκτη της ποσότητας του cDNA που υπάρχει σε κάθε δείγμα. Επειδή δεν είναι γνωστή η θέση ένθεσης του T-DNA που μεταφέρει το *A. rhizogenes* στο *L. jaronicus*, αρχικά μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων *TSAR1* και *TSAR2* στα μετασχηματισμένα φυτά ώστε να βρεθούν οι σειρές στις οποίες οι κατασκευές υπερέκφρασης είχαν εντεθεί σε ενεργά μεταγραφική περιοχή και άρα

εκφράζουν τα γονίδια αυτά (Εικόνα 16,17). Επίσης, πρέπει να προστεθεί ότι το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές και ελέγχθηκαν περισσότερα φυτά από αυτά που παρουσιάζονται. Για λόγους εξοικονόμησης χώρου και χρόνου, τα αποτελέσματα αυτά παρατίθενται στο παράρτημα. Από το δεύτερο πείραμα τα διαγράμματα



Εικόνα 18: Αποτελέσματα qPCR με εκκινητές για το γονίδιο TSAR1 σε 3 ανεξάρτητες σειρές control φυτών και 10 ανεξάρτητες σειρές μετασχηματισμένων φυτών (2ο πείραμα). Για κάθε δείγμα οι τιμές που φαίνονται είναι η μέση τιμή±SD 3 τεχνικών επαναλήψεων.



Εικόνα 19: Αποτελέσματα qPCR με εκκινητές για το γονίδιο TSAR2 σε 3 ανεξάρτητες σειρές control φυτών και 10 ανεξάρτητες σειρές μετασχηματισμένων φυτών (2ο πείραμα). Για κάθε δείγμα οι τιμές που φαίνονται είναι η μέση τιμή±SD 3 τεχνικών επαναλήψεων.

είναι μετασχηματισμένα με T-DNA από το οποίο απουσιάζει η κωδική αλληλουχία των μεταγραφικών παραγόντων, δεν δείχνουν καθόλου σχετική έκφραση όπως και αναμένεται. Στην εικόνα 19 φαίνεται ότι το δείγμα C3 εμφανίζει μια μικρή τιμή σχετικής έκφρασης. Το γεγονός αυτό οφείλεται σε μη ειδικά προϊόντα ή σήμα από την qPCR αφού το *Lotus* δεν εκφράζει από μόνο του πρωτεΐνες με πολύ μεγάλη ομοιότητα με τα TSAR. Για τα επόμενα πειράματα ποσοτικής PCR πραγματικού

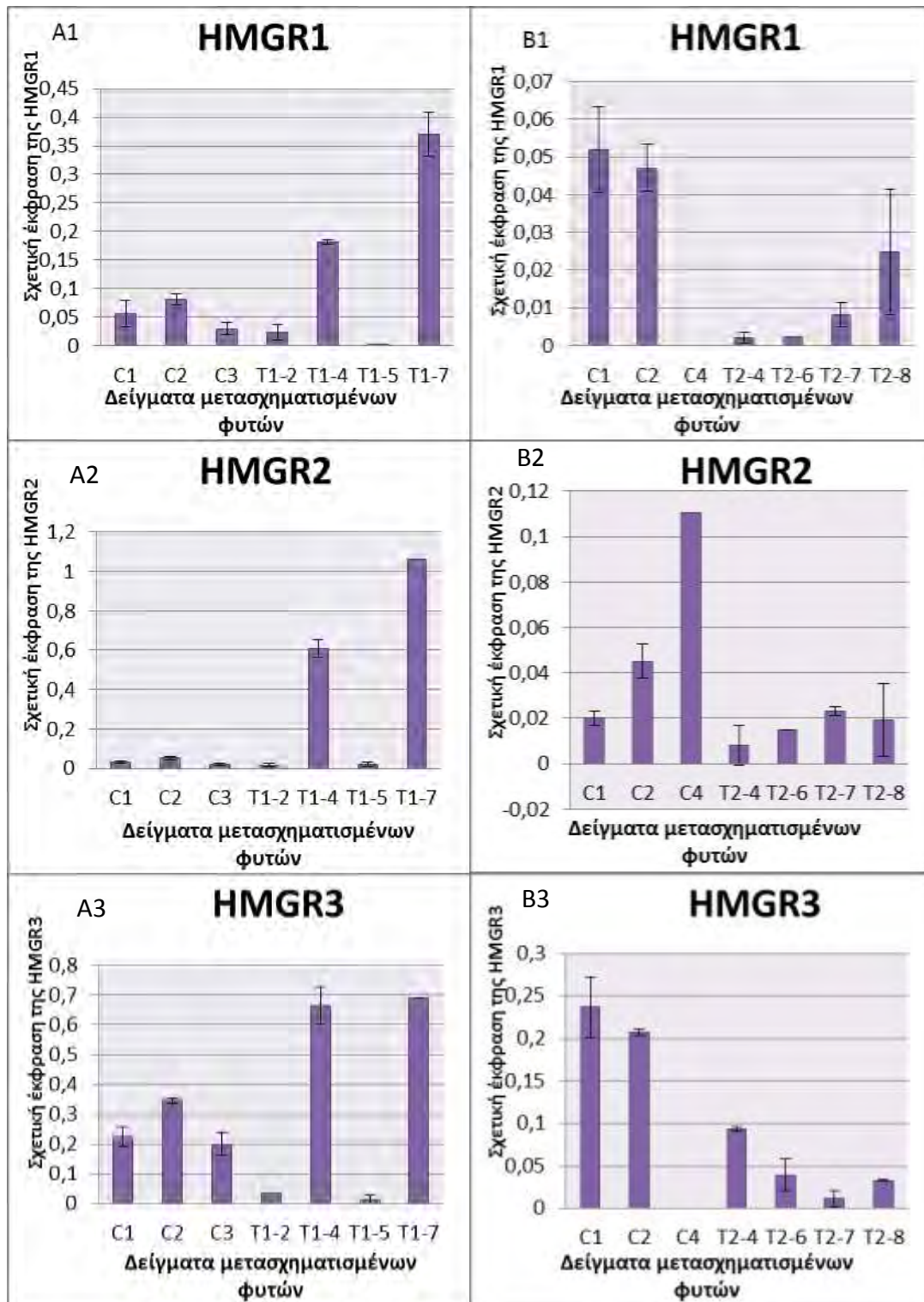
σχετικής έκφρασης των γονιδίων *TSAR1* και *TSAR2* φαίνονται στην εικόνα 16 και 17. Για να επιβεβαιωθεί το γεγονός ότι τα αποτελέσματα δεν οφείλονται σε κάποιο τυχαίο γεγονός ή σε κάποιον παράγοντα που έχει αμεληθεί, αλλά είναι επαναλήψιμα, το πείραμα επαναλήφθηκε ξεκινώντας από τον μετασχηματισμό και άλλων σειρών φυτών *L. japonicus*. Πάλι βρέθηκαν φυτά με επιτυχία μετασχηματισμού όπως φαίνεται στα διαγράμματα που βρίσκονται στο παράρτημα.

Στις εικόνες 18 και 19 φαίνεται η σχετική έκφραση των γονιδίων *TSAR1* και *TSAR2* σε δέκα ανεξάρτητες σειρές μετασχηματισμένων φυτών και τρεις ανεξάρτητες σειρές control φυτών. Από τα δέκα μετασχηματισμένα φυτά τα δείγματα T1-4, T1-5, T1-7 και T1-8 εκφράζουν το γονίδιο *TSAR1*. Όσο αφορά τα *TSAR2* μετασχηματισμένα φυτά, τα δείγματα T2-4, T2-6, T2-7 και T2-8 φαίνεται να εκφράζουν το γονίδιο *TSAR2*.

Τα δείγματα control που

χρόνου (qRT-PCR) επιλέχθηκαν τα δείγματα τα οποία φαίνεται να εκφράζουν αυτούς τους μεταγραφικούς παράγοντες.

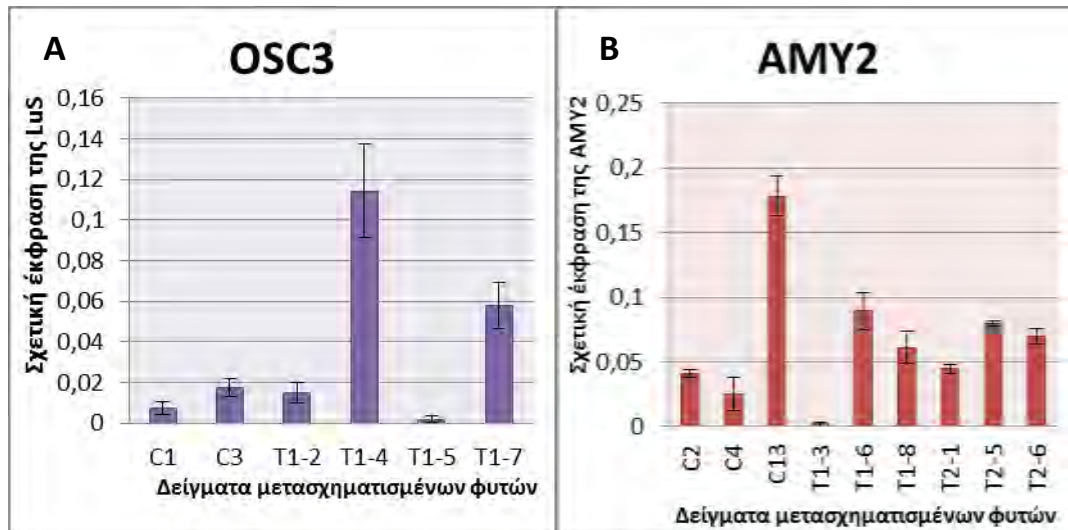
Κατόπιν, τέθηκε το ερώτημα εάν οι TSAR1 και TSAR2 μπορούν να ενεργοποιήσουν τα γονίδια *HMGR1*, *HMGR2* και *HMGR3* τα οποία κωδικοποιούν το ένζυμο που ελέγχει τη ροή μεταβολιτών για το βιοσυνθετικό μονοπάτι των τριτερπενίων, σχηματίζοντας το πρόδρομο μόριό τους, μεβαλονικό οξύ. Γι' αυτό χρησιμοποιήθηκαν ζευγάρια εκκινήτων για τα γονίδια των *HMGR* και εκκινήτες για το γονίδιο της *PP2A* (γονίδιο αναφοράς). Τα αποτελέσματα του δεύτερου πειράματος (Εικόνα 20) δείχνουν ότι δύο από τα τέσσερα μετασχηματισμένα φυτά TSAR1 (T1-4 και T1-7) εκφράζουν και τις τρεις *HMGR* σε σχέση με τα control δείγματα. Αντιθέτως, το μοτίβο αυτό αντιστρέφεται στην περίπτωση των μετασχηματισμένων φυτών TSAR2, όπου παρατηρείται ότι κανένα από τα δείγματα δεν εκφράζει τις *HMGR* με μεγαλύτερη σχετική έκφραση από τα φυτά control. Άρα, ο μεταγραφικός παράγοντας TSAR1 μπορεί να επάγει την έκφραση των *HMGR* γονιδίων, ενώ ο μεταγραφικός παράγοντας TSAR2 δεν επηρεάζει την έκφραση των *HMGR*.



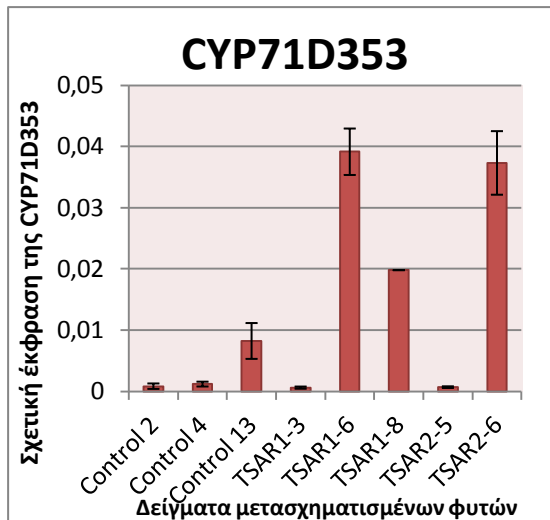
Εικόνα 20: Αποτελέσματα qPCR με εκκινήτες για τα γονίδια *HMGR1*, *HMGR2* και *HMGR3* σε 3 ανεξάρτητες σειρές control φυτών και σε τέσσερις σειρές μετασχηματισμένων φυτών TSAR1 (A1,A2,A3) και τέσσερις σειρές μετασχηματισμένων φυτών TSAR2 (B1,B2,B3). Η σχετική έκφραση των *HMGR* στα μετασχηματισμένα δείγματα TSAR1 και TSAR2 φαίνεται στα διαγράμματα. Για κάθε δείγμα οι τιμές που φαίνονται είναι η μέση τιμή±SD 3 τεχνικών επαναλήψεων.

Επίσης, μελετήθηκε η μεταγραφική ενεργοποίηση της συνθάσης της λουπεόλης. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για το γονίδιο της *OSC3* και υπολογίστηκε η σχετική της έκφραση. Όπως φαίνεται στην εικόνα 21A δύο από τα τέσσερα μετασηματισμένα φυτά *TSAR1* (*TSAR1-4* και *TSAR1-7*) φαίνεται ότι εκφράζουν την *OSC3* σε σχέση με τα δείγματα control που φαίνεται να την εκφράζουν. Έτσι, ο μεταγραφικός παράγοντας *TSAR1* ενεργοποιεί την μεταγραφή του γονιδίου της συνθάσης της λουπεόλης. Στο παράρτημα βρίσκονται και τα διαγράμματα από ακόμη δύο qRT-PCR με εκκινητές για το γονίδιο της συνθάσης της λουπεόλης που επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα.

Ένα ακόμη ένζυμο που συμμετέχει στην βιοσυνθετική οδό των τριτερπενίων και καταλύει τον σχηματισμό της λουπεόλης και της β-αμυρίνης, μελετήθηκε για την μεταγραφική του ενεργοποίηση. Το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο αυτό είναι το *AMY2*. Επίσης, έχει βρεθεί ότι το γονίδιο *AMY2* βρίσκεται σε κοινό σύμπλεγμα γονιδίων με το γονίδιο *CYP71D353* με αποτέλεσμα να τα δύο αυτά γονίδια να συνεκφράζονται. Στην εικόνα 21B φαίνονται οι τιμές της σχετικής έκφρασης για τα γονίδια αυτά στα διάφορα δείγματα. Τα αποτελέσματα της qPCR δείχνουν ότι, εκτός από το control 13 που έχει σχετική έκφραση μεγαλύτερη από τα υπόλοιπα δείγματα, όλα τα υπόλοιπα δείγματα εκφράζουν στον ίδιο μέτριο βαθμό την *AMY2*. Για την *CYP71D353* (Εικόνα 22) παρατηρείται ότι η σχετική έκφραση των δειγμάτων είναι μεγαλύτερη από αυτήν των φυτών control, άρα μπορούμε να πούμε ότι έχει γίνει επαγωγή της έκφρασής της. Βέβαια, γνωρίζουμε ότι η *AMY2* παρουσιάζει κοινό πρότυπο έκφρασης με την *CYP71D353* κάτι που δεν επιβεβαιώνεται στα αποτελέσματα αυτά.



Εικόνα 21: Αποτελέσματα qPCR με εκκινητές για γονίδια που συμμετέχουν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης τριτερπενίων. Α) Σχετική έκφραση της *OSC3* σε μετασηματισμένα φυτά *TSAR1* (2ο πείραμα), Β) Σχετική έκφραση της *AMY2* σε μετασηματισμένα φυτά *TSAR1* και *TSAR2*, Για κάθε δείγμα οι τιμές που φαίνονται είναι η μέση τιμή±SD 3 τεχνικών επαναλήψεων στην περίπτωση της *OSC3* και η μέση τιμή±SD 2 τεχνικών επαναλήψεων στην περίπτωση της *AMY2*.



Εικόνα 22: Σχετική έκφραση του τροποποιητικού ενζύμου CYP71D353 σε 3 ανεξάρτητες σειρές φυτών control και 5 σειρές μετασηματισμένων φυτών TSAR1 και TSAR2. Για κάθε δείγμα οι τιμές που φαίνονται είναι η μέση τιμή±SD 3 τεχνικών επαναλήψεων.

3.6 Στατιστική ανάλυση

Για να ελεγχθεί περαιτέρω η επίδραση της ετερόλογης έκφρασης των TSARs χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης Pearson για να εξεταστεί εάν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που μελετήθηκαν παραπάνω σχετίζονται με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων TSAR1 και TSAR2 στα αντίστοιχα μετασηματισμένα φυτά. Ο συντελεστής Pearson είναι η ενδεδειγμένη εκτιμήτρια (στατιστική) για τη μέτρηση γραμμικής συσχέτισης δύο μεταβλητών που έχουν μετρηθεί σε φυσική κλίμακα ή σε κλίμακα διαστήματος. Στην περίπτωση αυτή οι δύο μεταβλητές είναι η έκφραση των TSAR1 και TSAR2 σε σχέση με την έκφραση των εκάστοτε γονιδίων που μελετούνται. Στους πίνακες 2 και 3 φαίνονται οι συντελεστές συσχέτισης της έκφρασης των γονιδίων TSAR με τα γονίδια των HMGR από το πρώτο και το δεύτερο πείραμα.

1 ^ο πείραμα	TSAR1	HMGR1	HMGR2	HMGR3
TS1-3	0,552021	0,00391	0,000554	0,016973
TS1-6	0,000937	0,000626	0,000328	0,001334
TS1-8	0,010016	0,000644	0,000145	0,001879
Pearson's correlation	0,999955	0,887978	0,999867	
	TSAR2	HMGR1	HMGR2	HMGR3
TS2-1	0,005379	0,021756	0,00654	0,026487
T2-5	0,011056	0,002478	0,004294	0,020245
T2-6	0	0,005053	0,00147	0,011077
Pearson's correlation	-0,13846	0,542724	0,578721	

Πίνακας 2: Πίνακας συντελεστών συσχέτισης Pearson μεταξύ των τιμών σχετικής έκφρασης των γονιδίων TSAR και των γονιδίων HMGR του 1^{ου} πειράματος.

2 ^ο πείραμα	TSAR1	HMGR1	HMGR2	HMGR3
TS1-2	0,001896992	0,022276	0,016139	0,037644
TS1-4	0,010611186	0,181326	0,609548	0,665266
TS1-5	0,003432666	0,001041	0,02213	0,014888
TS1-7	0,021541953	0,370498	1,06345	0,427323
Pearson's correlation		0,991262	0,986875	0,666647
	TSAR2	HMGR1	HMGR2	HMGR3
TS2-4	0,038125278	0,001928	0,007956	0,093614
TS2-6	0,007016386	0,00241	0,014777	0,039647
TS2-7	0,034499011	0,008075	0,023188	0,01136
TS2-8	0,023408736	0,024867	0,019221	0,032746
Pearson's correlation		-0,02073	-0,07785	0,297402

Πίνακας 3: Πίνακας συντελεστών συσχέτισης Pearson μεταξύ των τιμών σχετικής έκφρασης των γονιδίων TSAR και των γονιδίων HMGR του 2ου πειράματος.

Τα δύο πειράματα φαίνεται να συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι η έκφραση του TSAR1 οδηγεί σε μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων που εκφράζουν τα ένζυμα κλειδιά (ρυθμιστές) του μονοπατιού βιοσύνθεσης των τριτερπενοειδών σαπωνινών. Δηλαδή, οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες που ανακαλύφθηκαν πρώτα στο φυτό *Medicago truncatula* και μπορούν να ενεργοποιούν την μεταγραφή γονιδίων που παίζουν ρόλο στην βιοσύνθεση τριτερπενίων, μπορούν επίσης να ενεργοποιούν την μεταγραφή του πρώτου ενζύμου του μονοπατιού στα μετασχηματισμένα φυτά *L. jaronicus*.

Όσο αφορά την συνθάση της λουπεόλης η στατιστική ανάλυση φαίνεται στον πίνακα 4 για το 1^ο και το 2^ο πείραμα. Στο 1^ο πείραμα η συσχέτιση μεταξύ του TSAR1 και της OSC3 είναι θετική, δηλαδή όσο αυξάνεται η έκφραση του TSAR1 αυξάνεται και η έκφραση της OSC3. Στο 2^ο πείραμα η συσχέτιση των τιμών έκφρασης είναι ελαφρώς θετική.

1ο πείραμα	TSAR1	OSC3
T1-3	0,552021	0,012171
T1-6	0,000937	-
T1-8	0,010016	0,0002662
T1-14	3,379E-05	5,688E-05
Pearson's correlation		0,9999997
2ο πείραμα	TSAR1	OSC3
T1-2	0,001897	0,00507
T1-4	0,0106112	0,023195
T1-5	0,0034327	0,001691
T1-7	0,021542	0,011657
Pearson's correlation		0,481703

Πίνακας 4: Πίνακας συντελεστών συσχέτισης Pearson μεταξύ των τιμών σχετικής έκφρασης των γονιδίων TSAR1 και OSC3 του 1ου και 2^{ου} πειράματος.

Όσο αφορά την συσχέτιση μεταξύ των γονιδίων *TSAR1* και *AMY2* (Πίνακας 5) παρατηρήθηκε ότι τόσο στην πρώτη επανάληψη της qPCR όσο και στην 2^η η συσχέτιση είναι αρνητική, δηλαδή όσο αυξάνεται η έκφραση του *TSAR1* τόσο μειώνεται η έκφραση της *AMY2*. Επίσης, φαίνεται ότι η συσχέτιση του *TSAR1* με το *CYP71D353* είναι αρνητική. Όσο αφορά την συσχέτιση του *AMY2* με το *CYP71D353* φαίνεται ότι είναι θετική.

	TSAR1	CYP71	AMY2	AMY2-CYP71
TS1-3	0,552021	0,000620199	0,001887626	
TS1-6	0,000937	0,039132878	0,089208843	
TS1-8	0,010016	0,019807828	0,061000232	
Pearson's correlation		-0,872121974	-0,95304565	0,979341667

Πίνακας 5: Πίνακας συντελεστών συσχέτισης Pearson μεταξύ των τιμών σχετικής έκφρασης των γονιδίων *TSAR1*, *AMY2* και *CYP71D353*.

4. Συζήτηση

Τα φυτά έρχονται συχνά αντιμέτωπα με διάφορες καταστάσεις βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων. Στις καταστάσεις αυτές, τα φυτά ενεργοποιούν αμυντικούς μηχανισμούς όπως είναι η παραγωγή ειδικών μεταβολιτών. Ορμονικοί διεγέρτες όπως είναι το ιασμονικό οξύ, ωθούν ένα πολύπλοκο σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγεί στην ενεργοποίηση συγκεκριμένων μεταβολικών μονοπατιών. Βέβαια, για πολλά εξειδικευμένα μονοπάτια οι μεταγραφικοί παράγοντες που συμμετέχουν παραμένουν άγνωστοι.

Μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί πολύ λίγοι μεταγραφικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση των τερπενίων. Ένα παράδειγμα είναι ο μεταγραφικός παράγοντας MYC2 με δομή έλικας-στροφής-έλικας. Ο MYC2 είναι ο κύριος ρυθμιστής στο μονοπάτι σηματοδότησης του ιασμονικού οξέος και ελέγχει ένα ευρύ φάσμα αποκρίσεων σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες (Kazan and Manners, 2013).

Επίσης, ομόλογα γονίδια του MYC2 φαίνεται να παίζουν ρόλο στην ρύθμιση της βιοσύνθεσης σεσκιτερπενίων στο *Arabidopsis thaliana*, το *Solanum lycopersicum* (tomato) και το *Artemisia annua* (Hong et al., 2012, Ji et al., 2014, Spyropoulou et al., 2014). Ακόμη, πρόσφατα δύο άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες ο Bl (bitter leaf) και ο Bt (bitter fruit), που δεν σχετίζονται με τον MYC2, βρέθηκε ότι ρυθμίζουν την συσσώρευση του τριτερπενοειδούς μεταβολίτη cucurbitacin στο *Cucumis sativus* (cucumber) (Shang et al., 2014).

Όσο αφορά το φυτό *Medicago truncatula* η επαγωγή της βιοσύνθεσης τριτερπενοειδών σαπωνινών κάτω από συνθήκες στρες μεσολαβείται από τη μεταγραφική ενεργοποίηση του μονοπατιού τριτερπενοειδών σαπωνινών, μια μοριακή διεργασία στην οποία παίζει σημαντικό ρόλο το ιασμονικό οξύ (Broeckling et al., 2005, Suzuki et al., 2005, Pollier et al., 2013a). Στην πρόσφατη μελέτη του Mertens (2015) ταυτοποιήθηκαν δύο μεταγραφικοί παράγοντες του παραπάνω μονοπατιού, ο TSAR1 και ο TSAR2, που μπορούν να ενεργοποιούν όλα τα πρώιμα γονίδια της οδού του μεβαλονικού οξέος, χωρίς να επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων βιοσύνθεσης στερολών, επιβεβαιώνοντας τον ειδικό τους ρόλο στην ρύθμιση του μεταβολισμού των τριτερπενίων στο *M. truncatula*.

Η ετερόλογη έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων TSAR1 και TSAR2 στο *L. jaronicus* φαίνεται να επιφέρει αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης τόσο των πρόδρομων γονιδίων του μονοπατιού βιοσύνθεσης τριτερπενίων, όσο και των γονιδίων που συμμετέχουν στα παρακάτω στάδια. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μία αύξηση στα επίπεδα των γονιδίων HMGR στα μετασχηματισμένα φυτά TSAR2 στην πρώτη επανάληψη του πειράματος αλλά και στα φυτά TSAR1 στην δεύτερη επανάληψη του πειράματος. Από την στατιστική ανάλυση βρέθηκε ότι η συσχέτιση έκφρασης του TSAR1 με τις HMGR είναι θετική και για τις τρεις HMGR, γεγονός που επιβεβαιώνεται και στις δύο επαναλήψεις του πειράματος. Έτσι, μπορούμε να πούμε ότι ο μεταγραφικός παράγοντας TSAR1 έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί την μεταγραφή των γονιδίων HMGR. Η στατιστική ανάλυση για την συσχέτιση του TSAR2 με τις HMGR έδειξε ότι η ετερόλογη έκφραση του TSAR2 δεν επηρέασε την έκφραση των HMGR1 και HMGR2. Η HMGR3 παρουσίασε μία ήπια συσχέτιση που σίγουρα δεν μπορεί να χαρακτηριστεί σαν

θετική. Ίσως, λοιπόν, ο TSAR2 να μην λειτουργεί σαν μεταγραφικός παράγοντας για τις *HMGR* ή η ετερόλογη έκφρασή του να μην είναι αρκετή για την μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων *HMGR*, με αποτέλεσμα να μην οδηγεί και στην ενεργοποίηση ολόκληρου του μονοπατιού βιοσύνθεσης τριτερπενίων.

Από την άλλη μεριά, το γονίδιο *OSC3* φάνηκε να επάγεται από την ετερόλογη έκφραση και παρουσιάζει θετική συσχέτιση στα επίπεδα έκφρασής του με το TSAR1. Βέβαια, η δεύτερη επανάληψη του πειράματος δεν έδειξε τόσο υψηλή τιμή συσχέτισης μεταξύ των γονιδίων αυτών, οπότε προφανώς η μεταγραφική ενεργοποίηση της συνθάσης της λουπεόλης δεν έγκειται αποκλειστικά στον συγκεκριμένο μεταγραφικό παράγοντα ή σε κάποιον παρόμοιας δομής και λειτουργίας, αλλά επηρεάζεται από έναν ή περισσότερους ρυθμιστικούς μηχανισμούς σαν απάντηση σε άλλα ερεθίσματα βιοτικών ή αβιοτικών καταπονήσεων.

Ακόμη, ο έλεγχος της *AMY2* έδειξε αρχικά ότι η έκφραση της δεν αυξήθηκε συστηματικά στα μετασχηματισμένα φυτά σε σχέση με τα control, αλλά στην ανάλυση συσχέτισης φάνηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης *TSAR1* έχουν αρνητική συσχέτιση με αυτά της *AMY2*. Ίσως λοιπόν η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων *MtTSAR1* και *MtTSAR2* να μην είναι αρκετή για την μεταγραφική ενεργοποίηση της *AMY2*. Μία εξήγηση είναι ότι οι *TSAR* καθώς έχουν εκφραστεί ετερόλογα, δεν μπορούν να λειτουργήσουν με την ίδια ακρίβεια και αποτελεσματικότητα σε έναν άλλο οργανισμό ακόμα κι αν οι οργανισμοί αυτοί είναι συγγενικοί. Μία δεύτερη εξήγηση είναι ότι η *AMY2* δεν αποτελεί το μοναδικό γονίδιο που εκφράζει το ένζυμο που καταλύει τον σχηματισμό της β-αμυρίνης, καθώς η *AMY1* (*OSC1*) επίσης καταλύει τον σχηματισμό της β-αμυρίνης. Έτσι, θα ήταν χρήσιμο να μελετηθεί η σχετική έκφραση της *AMY1* ώστε να διευκρινιστεί περαιτέρω εάν η ετερόλογη έκφραση των *TSARs* οδηγεί στην συσσώρευση β-αμυρίνης στις ρίζες του φυτού. Παράλληλα με την *AMY2* μελετήθηκε και η έκφραση της *CYP71D353* και βρέθηκε ότι σε κάποια φυτά *TSAR1* υπερεκφράζεται σε σχέση με τα control δείγματα όπου εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα, αλλά όχι ομοιόμορφα σε όλες τις σειρές υπερέκφρασης. Παράλληλα και ο συντελεστής συσχέτισης *TSAR1* και *CYP71D353* είναι αρνητικός όπως επίσης αρνητικός είναι και ο συντελεστής συσχέτισης της *AMY2*, ενώ η συσχέτιση μεταξύ του *AMY2* και του *CYP71D353* είναι θετική. Τα δεδομένα αυτά θα μπορούσαν να αποτελούν ένα στοιχείο που υποστηρίζει ότι τα δύο αυτά γονίδια συνεκφράζονται καθώς ανήκουν στο ίδιο σύμπλεγμα γονιδίων και η ρύθμισή τους γίνεται με τον ίδιο τρόπο.

Ένα επιπλέον στοιχείο που σίγουρα θα μπορούσε να διευκρινίσει περαιτέρω το τι συμβαίνει ακριβώς στον μεταβολισμό των μετασχηματισμένων φυτών *MtTSAR1* και *MtTSAR2* είναι τα αποτελέσματα από την αέρια και την υγρή χρωματογραφία που ακόμη εκκρεμούν. Μέσω αυτής της ανάλυσης θα μπορέσουμε να δούμε εάν επάγεται η παραγωγή των τριτερπενίων λόγω της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων *TSAR1* και *TSAR2* και άρα θα διαπιστώσουμε εάν το μονοπάτι βιοσύνθεσης τριτερπενίων καθοδηγείται από αυτούς τους μεταγραφικούς παράγοντες όχι μόνο στα πρόδρομα στάδια αλλά και στα μετέπειτα στάδια.

Συμπερασματικά, η ετερόλογη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *TSAR1* είναι αρκετή για να προκαλέσει μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων *HMGR1*, *HMGR2* και *HMGR3*, που καταλύουν τον σχηματισμό του μεβαλονικού οξέος και με αυτό τον τρόπο να θέσει σε κίνηση το μονοπάτι βιοσύνθεσης

τριτερπενίων. Όσο αφορά τον μεταγραφικό παράγοντα TSAR2, η ετερόλογη έκφρασή του φαίνεται να μην επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων *HMGR1*, *HMGR2* και *HMGR3*. Στις παρακάτω αντιδράσεις της βιοσυνθετικής οδού, η ετερόλογη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα TSAR1 οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης της *OSC3*. Βέβαια, δεν είναι γνωστό εάν ο TSAR1 αλληλεπιδρά απευθείας με τους υποκινητές των γονιδίων που ενεργοποιεί, εάν δημιουργεί σύμπλοκα με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες ή εάν η ενεργοποίηση της *OSC3* δεν απαιτεί την πρόσδεση του TSAR1 σε κάποια αλληλουχία του υποκινητή της. Γι'αυτό θα είχε ενδιαφέρον να μελετηθεί ο τρόπος με τον οποίο οι παράγοντες TSAR ενεργοποιούν τα γονίδια *HMGR* και *OSC3*, δηλαδή η περιοχή εκείνη του υποκινητή στην οποία προσδέεται ο TSAR1 προκαλώντας μεταγραφική ενεργοποίηση. Αυτό θα μπορούσε να γίνει με παροδική έκφραση ενός γονιδίου αναφοράς (π.χ. γονίδιο της λουσιφεράσης) σε πρωτοπλάστες του *Nicotiana tabacum* μπροστά από διαφορετικά τμήματα των υποκινητών των γονιδίων αυτών σε μετασχηματισμένα TSAR1 και TSAR2 φυτά *Nicotiana tabacum*, ώστε να προσδιοριστεί ποιες περιοχές είναι απαραίτητες για την μεταγραφική τους ενεργοποίηση. Με αυτόν τον τρόπο, θα μπορούσε να διευκρινιστεί εάν οι αλληλουχίες των υποκινητών των γονιδίων *HMGR* και *OSC3* είναι συντηρημένες μεταξύ των φυτών *Lotus japonicus* και *Medicago truncatula*. Επιπλέον, δεν είμαστε σίγουροι για το αν ο TSAR1 έχει ουδέτερη δράση όσο αφορά την ενεργοποίηση της *AMY2* ή εάν την καταστέλλει, όπως έδειξε ο συντελεστής συσχέτισης. Το ίδιο ερώτημα υπάρχει και για την *CYP71D353*.

5. Βιβλιογραφία

1. Abe I., Rohmer M. and Prestwich, G.D., 1993, Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes, *Chem. Rev.* 93: 2189–2206.
2. Achnine L., Huhman D.V., Farag M.A., Sumner L.W., Blount J.W., Dixon R.A., 2005, Genomics-based selection and functional characterization of triterpene glycosyltransferases from the model legume *Medicago truncatula*, *Plant J* 41: 875–887
3. Armah C.N., Mackie A.R., Roy C., Price K., Osbourn A.E., Bowyer P., Ladha S., 1999, The membrane-permeabilizing effect of avenacin A-1 involves the reorganization of bilayer cholesterol, *Biophys. J.* 76, 281–290
4. Augustin J.M., Kuzina V., Andersen S.B., Bak S., 2011, Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins, *Phytochemistry* 72:435–57
5. Avato P., Bucci R., Tava A., Vitali C., Rosato A., Bialy Z., Jurzysta M., 2006, Antimicrobial activity of saponins from *Medicago* sp.: structure–activity relationship, *Phytother. Res.* 20, 454–457
6. Baumann E., Stoya G., Völkner A., Richter W., Lemke C., Linss W., 2000, Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure, *Acta Histochem.* 102, 21–35.
7. Bernard P. & Couturier M., 1992, Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes, *J. Mol. Biol.* 226, 735–745.
8. Broeckling C.D., Huhman D.V., Farag M.A., Smith J.T., May G.D., Mendes P., Dixon R.A., Sumner L.W., 2005, Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism, *J Exp Bot* 56: 323–336
9. Carelli M., Biazzini E., Panara F., Tava A., Scaramelli L., Porceddu A., Graham N., Odoardi M., Piano E., Arcioni S., et al., 2011, *Medicago truncatula* CYP716A12 is a multifunctional oxidase involved in the biosynthesis of hemolytic saponins, *Plant Cell* 23: 3070–3081
10. Carter J.P., Spink J., Cannon P.F., et al., 1999, Isolation, characterization, and avenacin sensitivity of a diverse collection of cereal-root-colonizing fungi, *Appl Environ Microbiol* 65:3364–72.
11. Chwalek M., Lalun N., Bobichon H., Plé K., Voutquenne-Nazabadioko L., 2006, Structure–activity relationships of some hederagenin diglycosides: haemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction, *Biochim. Biophys. Acta* 1760, 1418–1427
12. Corey E.J., Matsuda S.P.T., Bartel B., 1993, Isolation of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding cycloartenol synthase by functional expression in a yeast mutant lacking lanosterol synthase by the use of a chromatographic screen, *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11628–11632
13. De Geyter N., Gholami A., Goormachtig S., Goossens A., 2012, Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism, *Trends Plant Sci* 17: 349–359
14. De Sutter V., Vanderhaeghen R., Tilleman S., Lammertyn F., Vanhoutte I., Karimi M., Inzé D., Goossens A., Hilson P., 2005, Exploration of jasmonate signalling via automated and standardized transient expression assays in tobacco cells, *Plant J* 44: 1065–1076
15. Delis C., Krokida A., Georgiou S. et al., 2011, Role of lupeol synthase in *Lotus japonicus* nodule formation, *New Phytol* 189:335 – 346
16. Field B. and Osbourn A.E., 2008, Metabolic diversification - independent assembly of operon-like gene clusters in different plants, *Science* 320, 543–547

17. Fukushima E.O., Seki H., Ohyama K., Ono E., Umemoto N., Mizutani M., Saito K., Muranaka T., 2011, CYP716A subfamily members are multifunctional oxidases in triterpenoid biosynthesis, *Plant Cell Physiol* 52: 2050-2061
18. Fukushima E.O., Seki H., Sawai S., Suzuki M., Ohyama K., Saito K., Muranaka T., 2013, Combinatorial biosynthesis of legume natural and rare triterpenoids in engineered yeast, *Plant Cell Physiol* 54: 740-749
19. Gauthier C., Legault J., Girard-Lalancette K., Mshvildadze V., Pichette A., 2009a, Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins, *Bioorg. Med. Chem.* 17, 2002–2008
20. Gholami A., De Geyter N., Pollier J., Goormachtig S., Goossens A., 2014, Natural product biosynthesis in *Medicago* species, *Nat Prod Rep* 31: 356-380
21. Ginzberg I., Tokuhisa J.G., Veilleux R.E., 2009, Potato steroidal glycoalkaloids: biosynthesis and genetic manipulation, *Potato Res* 52:1–15.
22. Güçlü-Üstündag Ö., Mazza G., 2007, Saponins: properties, applications and processing, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47, 231–258.
23. Hase J., Kobashi K., Mitsui K., Namba T., Yoshizaki M., Tomimori T., 1981, The structure–hemolysis relationship of oleanolic acid derivatives and inhibition of the saponin-induced hemolysis with sapogenins, *J. Pharmacobiodyn*, 4, 833– 837
24. Hostettmann K., Marston A., 2005, Saponins. Chemistry and pharmacology of natural products. Cambridge University Press, Cambridge, isbn-10: 0521020174.
25. Hu M., Konoki K., Tachibana K., 1996, Cholesterol-independent membrane disruption caused by triterpenoid saponins, *Biochim. Biophys. Acta* 1299, 252–258
26. Itkin M., Heinig U., Tzfadia O., et al., 2013, Biosynthesis of antinutritional alkaloids in solanaceous crops is mediated by clustered genes, *Science* 341:175–9.
27. Iturbe-Ormaetxe I., Haralampidis K., Papadopoulou K., Osbourn A.E., 2003, Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*, *Plant Mol Biol* 51: 731-743
28. Katzen F., 2007, Gateway recombination cloning: A biological operating system, Invitrogen Corp., 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, CA 92008, USA
29. Kevei Z., Loughon G., Mergaert P., Horváth G.V., Kereszt A., Jayaraman D., Zaman N., Marcel F., Regulski K., Kiss G.B., et al., 2007, 3- hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase1 interacts with NORK and is crucial for nodulation in *Medicago truncatula*, *Plant Cell* 19: 3974-3989
30. Kuzina V., Nielsen J.K., Augustin J.M., Torp A.M., Bak S., Andersen S.B., 2011, *Barbarea vulgaris* linkage map and quantitative trait loci for saponins, glucosinolates, hairiness and resistance to the herbivore *Phyllotreta nemorum*, *Phytochemistry* 72, 188–198.
31. Lasztity R., Hidvegi M., Bata A., 1998, Saponins in food. *Food Rev. Int.* 14, 371–390.
32. Lee M.-W., Kim S.U., Hahn D.-R., 2001, Antifungal activity of modified hederagenin glycosides from the leaves of *Kalopanax pictum* var. chinese, *Biol. Pharm. Bull.* 24, 718–719
33. Lee S.T., Wong P.F., Cheah S.C., Mustafa M.R., 2011, Alpha-tomatine induces apoptosis and inhibits nuclear factor-kappa B activation on human prostatic adenocarcinoma PC-3 cells, *PLoS One* 6:e18915
34. Márquez A.J., Stougaard J., Udvardi M., Parniske M., Spaink H., Saalbach, G., Webb J., Chiurazzi M., Márquez A.J. (Eds.), 2005, *Lotus japonicus Handbook* Márquez.
35. Morrissey J.P., Osbourn A.E., 1999, Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 708–724.
36. Moses T., Papadopoulou K., and Osbourn A., 2014, Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives

37. Moses T., Pollier J., Thevelein J.M., Goossens A., 2013, Bioengineering of plant (tri)terpenoids: from metabolic engineering of plants to synthetic biology in vivo and in vitro, *New Phytol.* 200:27–43
38. Naoumkina M.A., Modolo L.V., Huhman D.V., Urbanczyk-Wochniak E., Tang Y., Sumner L.W., Dixon R.A., 2010, Genomic and coexpression analyses predict multiple genes involved in triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*, *Plant Cell* 22: 850-866
39. Nes W. D. and Heftmann E., 1981, A comparison of triterpenoids with steroids as membrane components, *J. Nat. Prod.* 44, 377– 400.
40. Nützmann H.W., Osbourn A., 2014, Gene clustering in plant specialized metabolism, *Current Opinion in Biotechnology*, Volume 26, April 2014, Pages 199
41. Oda K., Matsuda H., Murakami T., Katayama S., Ohgitani T., Yoshikawa M., 2000, Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants, *Biol. Chem.* 381, 67–74
42. Oleszek W., Price K.R., Colquhoun I.J., Jurzysta M., Ploszynski M., Fenwick G.R., 1990, Isolation and identification of alfalfa (*Medicago sativa* L.) root saponins: their activity in relation to a fungal bioassay, *J. Agri. Food Chem.* 38, 1810–1817
43. Osbourn A., Goss R.J. and Field R.A., 2011, The saponins – polar isoprenoids with important and diverse biological activities
44. Osbourn A.E., 1996, *Plant Cell* 8:1821
45. Podolak I., Galanty A., Sobolewska D., 2010, Saponins as cytotoxic agents: a review, *Phytochem Rev* 9:425–74.
46. Pollier J., Moses T., González-Guzmán M., De Geyter N., Lippens S., Vanden Bossche R., Marhavý P., Kremer A., Morreel K., Guérin C.J., et al., 2013a, The protein quality control system manages plant defence compound synthesis, *Nature* 504: 148-152
47. Qi X. et al., 2004, A gene cluster for secondary metabolism in oat: Implications for the evolution of metabolic diversity in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8233–8238
48. Ross J., Li Y., Lim E.-K., Bowles D.J., 2001, Higher plant glycosyltransferases, *Genome Biol.* 2 (reviews3004)
49. Saleem M., *Cancer Lett.*, 2009, 285, 109–115
50. San Martín R., Briones R., 1999, Industrial uses and sustainable supply of Quillaja saponaria (*Rosaceae*) saponins, *Econ. Bot.* 53, 302–311.
51. Seeman P., Cheng D., Iles G.H., 1973, Structure of membrane holes in osmotic and saponin hemolysis, *J. Cell Biol.* 56, 519–527
52. Sun H.X., Xie Y., Ye Y.P., 2009, Advances in saponin-based adjuvants, *Vaccine* 27:1787–96
53. Sung W.S., Lee D.G., 2008b, The combination effect of Korean red ginseng saponins with Kanamycin and Cefotaxime against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Biol. Pharm. Bull.* 31, 1614–1617.
54. Suzuki H., Reddy M.S.S., Naoumkina M., Aziz N., May G.D., Huhman D.V., Sumner L.W., Blount J.W., Mendes P., Dixon R.A., 2005, Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic re-programming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula*, *Planta* 220: 696-707
55. Szakiel A., Paczkowski C., Henry M., 2011, . Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants, *Phytochem Rev.*
56. Tabata S., Stougaard J.(Eds.), 2014, *The Lotus japonicus Genome*
57. Taiz L., Zeiger E., Sinauer Associates, 2010, *Plant Physiology*, Inc., 23 Plumtree Road, Sunderland, MA 01375 U.S.A.
58. Tava A., Scotti C., Avato P., 2011, Biosynthesis of saponins in the genus *Medicago*, *Phytochem Rev* 10:459 – 469

59. Turner A.B., Smith D.S.H. and Mackie M.A., 1971, Characterization of the Principal Steroidal Saponins of the Starfish *Marthasterias glacialis*: Structures of the Aglycones
60. Van Dyck S., Gerbaux P. and Flammang P., 2010, Qualitative and quantitative Saponin Contents in Five Sea Cucumbers from the Indian Ocean
61. Vanden Bossche R., Demedts B., Vanderhaeghen R., Goossens A., 2013, Transient expression assays in tobacco protoplasts, In L Pauwels, A Goossens, eds, Jasmonate Signaling, Ed 1 Vol 1011, Springer, Clifton NJ, pp 227-239
62. Vincken J., Heng L., de Groot A., Gruppen H., 2007, Saponins classification and occurrence in the plant kingdom
63. Vogt T., Jones P., 2000, Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family, Trends Plant Sci. 5:380–86
64. Waller G.R., Jurzysta M., Thorne R.L.Z., 1993, Allelopathic activity of root saponins from alfalfa (*Medicago sativa* L.) on weeds and wheat, Bot. Bull. Acad. Sin. 34, 1– 11
65. Werck-Reichhart D., Feyereisen R., 2000, Cytochromes P450: a success story, Genome Biol. 1 (reviews3003)
66. Wink M., 1999, Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology, Sheffield Academic Press, Sheffield

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Η κωδική αλληλουχία του γονιδίου TSAR1:

>TSAR1CDS

```
ATGGAGGATTCACCTGGAAAATTTGATTTCTTATATGGAAATGGAAGATGATGTGATCTTGA
ATCAAAGTAGCACCACCACATTTGATGAGCAAGAGTTTCTCAAAGATATCATCCTTGAAGAA
CCAGAATGTATTGAACTCTCTTCTTATCTTTGTTCCAATAAAACCAAAGACAATAGTACAAC
ATAATTAATGTTGAAGGTGATGCTACTAGCCCCACAAATAGTATTTTGTCTTTGATGAGAC
AAGTTTATTTTGTGGTGATTATGAGAATGTTGAAACAAACCACAAAAGTAATAACTCCAAC
CAATCAAGTCTTTGGAAAGATCTTGTGTTAGTTCTCCAGCCACATACCTTCTATCTTTTGGTA
ACTCAAGTATTGAACCAATCATTGAACCAATGTCACATAAACTAAAAGAAGGACAGATGA
ATCAAGGGGGGTGAAGGAAGCAACAAAGAAGGTTAGAAGATCATGTGAGACAGTACAAG
ATCATTTGATGGCTGAGAGGAAAAGGAGAAGGGAATTAAGTACTGAGAATATCATAGCACTTTC
AGCCATGATACCTGGCTTGAAAAGATGGACAAGTGTTATGTACTTAGCGAAGCTGTGAAT
TACACAAAACAGCTTCAAAGCGCATTAAAGAATTGGAGAATCAAAAACAAAGATAGCAAAC
CAAATCCAGCAATATTCAAGTGGAAATCTCAAGTTTCATCAAATAAAAAGAAGTCCTCAGAA
TCACTGCTCGAGGTTGAAGCTAGAGTCAAAGAAAAGGAAGTACTCATCAGAATTCATTGTG
AGAAGCAAAAAGACATAGTGCTCAAATACATGAATTGCTTGAAAAGTTCAATATCACTATA
ACAAGTAGTAGCATGTTACCATTTGGTGATTCTATTCTTGTAATCAACATTTGTGCTCAGATG
GATGAAGAAGACAGCATGACCATGGATGACCTTGTGAAAATCTGAGAAAATATCTATTGG
AAACTCATGAGAGTACTTGTGA
```

Η αλληλουχία αμινοξέων του μεταγραφικού παράγοντα TSAR1:

>TSAR1

```
MEDSLENLISYMEMEDDVILNQSSSTTFDEQEFLKDIILEEPECIELSSYLCSNKTCDNSTTIINVEG
DATSPTNSILSFDETSLFCGDYENVETNHKSNNSNSIKSLERSCVSPATYLLSFGNSSIEPIIPEMS
HKTKRRTDESRGVKEATKKVRRSCETVQDHLMAERKRRREL TENIIALSAMIPGLKKMDKCYVLS
EAVNYTKQLQKRIKELENQNKDSKPNPAIFKWKSQVSSNKKKSSLESLEVEARVKEKEVLIRIHCE
KQKDIVLKIHELLEKFNITITSSSMLPFGDSILVINICAQMDEEDSMTMDDLVENLRKYLLETHESY
L
```

Η κωδική αλληλουχία του γονιδίου TSAR2:

>gi|934174137|gb|KR349466.1| Medicago truncatula triterpene saponin activating regulator 2 (TSAR2) mRNA, complete cds

```
ATGGAGGAAATCAACAACCTCAGCTATGAAAGTATCATCATCAATCAGCAGCTGGTTATCTGA
TTTGGAAATGGACGAATACAATATATTTGCTGAGGAATGCAACCTTAATTTCTTGATGCTG
ATGTGGGAGGGTTTCTTTCAAATGACATATCTAATGTATTTCAAGAACAAAACAAACAACAA
TGTTTATCTTTGGGGTCCACTTTT
CATGAAACAATTGATAATAGTGACAAAAACAATGAATCTCTTTCTCCATCTTTTCAGTTTCAA
GTTCCATCTTTTGACAACCCCCAAATTCATCCCCTACTAACTCAAAGAGAATATTGAAACA
ATACCATTGTCTCCAACCGATTTGAAAATATGAATCACTCAACAGAAACCTCAAAGGGTC
```

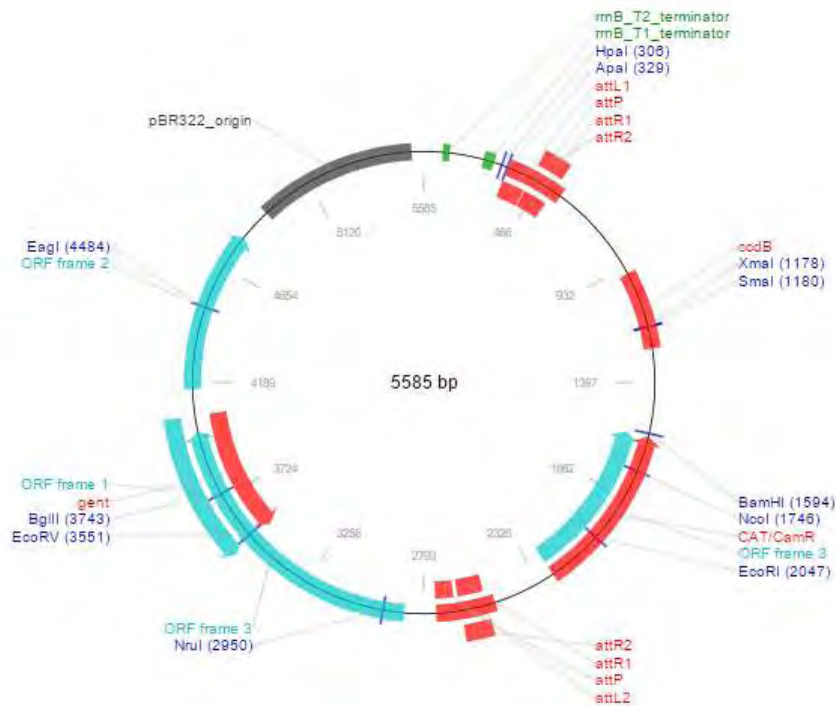
ATTGGAAAATAAAAAGTTGGAAACAAAAACCTCAAAAAGCAAAGGCCACGTGCTCATGGT
 AGAGATCACATCATGGCTGAGAGAAATCGAAGAGAGAACTCACCCAAAGCTTCATTGCTC
 TTGCAGCTCTTGTTCCTAACCTTAAGAAGATGGATAAACTATCTGTACTAATTGACACTATCA
 AATACATGAAAGAGCTTAAAAATCGTTTGGGAAGATGTGGAAGAACAAAACAAGAAAACAA
 AAAAAAATCATCGACCAAACCATGCCTATGCAGCGATGAAGATTCGTCATCATGTGAGGA
 TAACATTGAATGTGTTGTTGGTTCACCATTTCAAGTGGGAAGCAAGAGTGTTAGGAAAACAA
 GTGCTGATTCCGATCCAATGCAAGGAGCATAAGGGGCTTCTGGTTAAAATTATGGTCGAAA
 TTCAAAAATTTCAACTATTTGTTGTCAATAACAGTGTCTTACCCTTTGGAGATTCTACGCTCG
 ACATTACCATCATTGCTCAGTTGGGTGAAGGGTACAACCTTGAGCATAAAGGAACTTGTGAA
 GAACGTACGCATGGCATTATTGAAGTTTACGTCATCATAA

Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις PCR και στις RT-PCR:

Εκκινητής	Αλληλουχία
UBQ RT-F	5'-TTCACCTTGTGCTCCGTCCTTC-3'
UBQ RT-R	5'-CCAGAAGAGGCCACAACAAAC-3'
PP2A RT-F	5'-GTAAATGCGTCTAAAGATAGGGTCC-3'
PP2A RT-R	5'-ACTAGACTGTAGTGCTTGAGAGGC-3'
TSAR1 RT-F	5'-TGTGGTGATTATGAGAATGTTGA-3'
TSAR1 RT-R	5'-AAGGTATGTGGCTGGAGAA-3'
TSAR2 RT-F	5'-TCAGTTTCAAGTTCCATCTT-3'
TSAR2 RT-R	5'-AATCGGTTGGAGACAATG-3'
LjHMGR1 RT-F	5'-TCCCCCTGCCTCAACAATCT-3'
LjHMGR1 RT-R	5'-GACCCCGACACCACCTCC-3'
LjHMGR2 RT-F	5'-ACCAACAGAGGGTGTAAGGCGA-3'
LjHMGR2 RT-R	5'-CGAAGCGAACAACAGGGGCT-3'
LjHMGR3 RT-F	5'-GCCGCTGACAACAAACCAAC-3'
LjHMGR3 RT-R	5'-GCGACGACAATCTCCAAGCC-3'
Hyg F	5'-GACCAATGCGGAGCATATACG-3'
Hyg R	5'-CAGCTTCGATGTAGGAGGGC-3'
OSC3 RT-F	5'-TCAGAGGCTTACAACTTCATTTA-3'
OSC3 RT-R	5'-GTTGGTCCATACTCTTCACTC-3'
AMY2 RT-F	5'-GCAGTTTAACTTGTAAGATAGC-3'
AMY2 RT-R	5'-GGCAACAAACCGACACTAAATAC-3'

Πλασμιακοί φορείς:

- pDONR207, Invitrogen (Εικόνα 23)
- pUB-GW-HYG (Maekawa et al., 2008), (Εικόνα 24)



Εικόνα 23: Πλασμιδιακός χάρτης του pDONR 207, Full length: 5584 bp Composition: 1428 A; 1341 C; 1294 G; 1521 T; 0 OTHER Percentage: 26% A; 24% C; 23% G; 27% T; 0%OTHER, Invitrogen

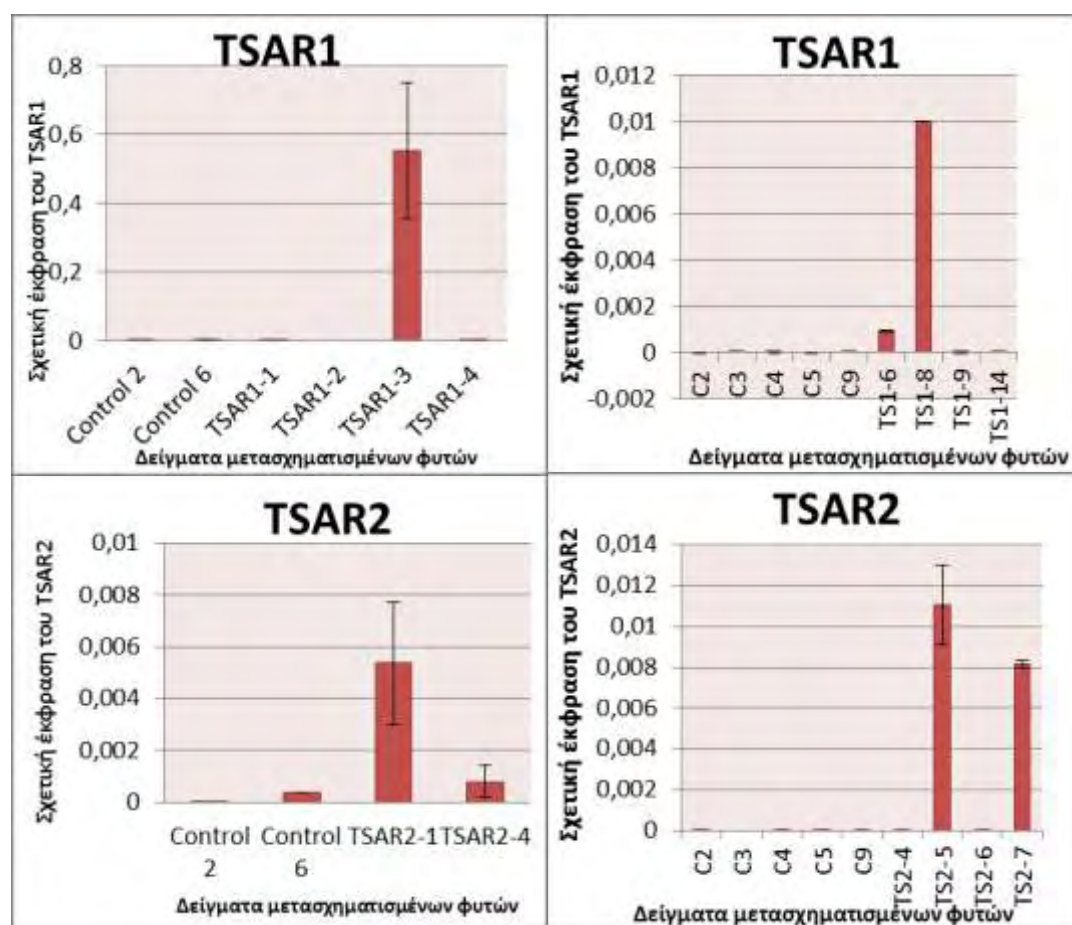
pUB-GW-Hyg



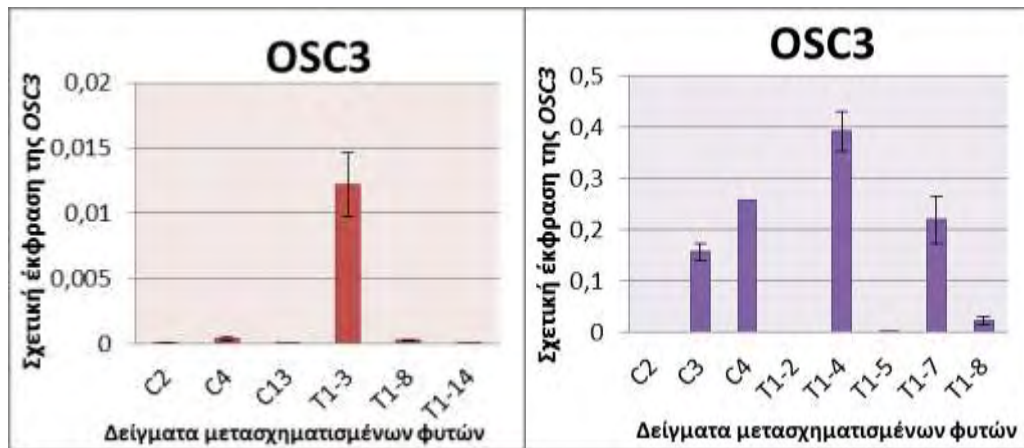
- | | |
|----------------|---------------------|
| 35S promoter | attR1 |
| nos terminator | attR2 |
| sGFP(S65T) | Chloramphenicol (R) |
| 35S terminator | ccdB |
| Ubi promoter | Intron1 of AtWRKY33 |
| Ubi intron | Hygromycin (R) |

Εικόνα 24: Πλασμιδιακός χάρτης του pUB-GW-Hyg (Maekawa et al., 2008).

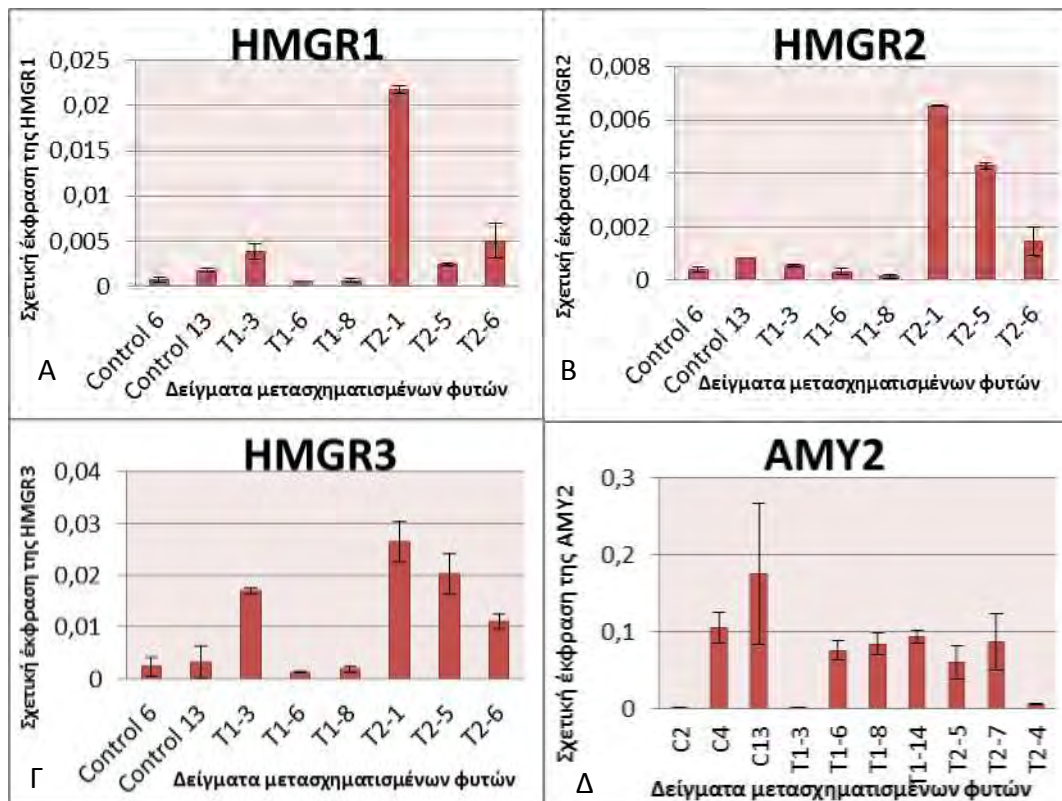
Συμπληρωματικά διαγράμματα:



Εικόνα 25: Επιβεβαίωση της ετερόλογης έκφρασης των γονιδίων TSAR1 και TSAR2 σε μετασηματισμένα φυτά TSAR1 και TSAR2 αντίστοιχα. Αποτελέσματα qPCR με εκκινητές για τα γονίδια TSAR1 και TSAR2 (1^ο πείραμα). Α) Σχετική έκφραση του TSAR1 σε 2 ανεξάρτητες σειρές control φυτών και 4 ανεξάρτητες σειρές μετασηματισμένων φυτών TSAR1. Β) Σχετική έκφραση του TSAR1 σε 5 δείγματα control φυτών και 4 δείγματα μετασηματισμένων TSAR1 φυτών. Γ) Σχετική έκφραση του γονιδίου TSAR2 σε 2 ανεξάρτητες σειρές control φυτών και 2 ανεξάρτητες σειρές μετασηματισμένων φυτών TSAR2. Δ) Σχετική έκφραση του γονιδίου TSAR2 σε 5 ανεξάρτητες σειρές control φυτών και 4 ανεξάρτητες σειρές μετασηματισμένων TSAR2 φυτών. Για κάθε δείγμα οι τιμές που φαίνονται είναι η μέση τιμή \pm SD 3 τεχνικών επαναλήψεων. Από όλα τα δείγματα των διαγραμμάτων τα πειράματα συνεχίστηκαν με τα δείγματα που έδειξαν έκφραση των TSAR1 και TSAR2, άρα με το TSAR1-3 (Α), TSAR1-6, TSAR1-8 (Β), TSAR2-1, TSAR2-4 (Γ), TSAR2-5, TSAR2-7 (Δ).



Εικόνα 26: Αποτελέσματα qPCR με εκκινήτες για το γονίδιο της *OSC3*. Α) Ελέγχθηκαν 3 δείγματα control και 3 δείγματα μετασηματισμένων φυτών TSAR1 για την ύπαρξη μεταγράφων της *OSC3* (1^ο πείραμα). Το δείγμα TSAR1-3 δείχνει να υπερεκφράζει την *OSC3* σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Β) Ελέγχθηκαν 3 δείγματα control και 5 δείγματα μετασηματισμένων φυτών TSAR1 για την ύπαρξη μεταγράφων της *OSC3* (2^ο πείραμα). Τα δείγματα TSAR1-4 και TSAR1-7 δείχνουν να εκφράζουν την *OSC3* σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Για κάθε δείγμα οι τιμές που φαίνονται είναι η μέση τιμή±SD 3 τεχνικών επαναλήψεων.



Εικόνα 27: Αποτελέσματα qPCR με εκκινήτες για τα γονίδια *HMGR1*, *HMGR2*, *HMGR3* και *AMY2*. Α,Β,Γ) Ελέγχθηκαν 2 δείγματα control και 6 δείγματα μετασηματισμένων φυτών TSAR1 για την ύπαρξη μεταγράφων των γονιδίων *HMGR1*, *HMGR2* και *HMGR3* (1^ο πείραμα). Το δείγμα TSAR2-1 δείχνει να εκφράζει και τις 3 *HMGRs* σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Το δείγμα TSAR2-5 εκφράζει την *HMGR2* και την *HMGR3*. Το TSAR1-3 δείχνει μία μικρή έκφραση της *HMGR1*. Δ) Ελέγχθηκαν 3 δείγματα control, 4 δείγματα μετασηματισμένων φυτών TSAR1 και 3 δείγματα φυτών TSAR2 για την ύπαρξη μεταγράφων της *AMY2* (1^ο πείραμα). Κανένα από τα δείγματα δεν φαίνεται να εκφράζει σημαντικά την *AMY2*. Για κάθε δείγμα οι τιμές που φαίνονται είναι η μέση τιμή±SD 3 τεχνικών επαναλήψεων.

