

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και**  
**Βιοτεχνολογίας**  
**ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**



**ΤΖΕΒΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**  
**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗ**  
**ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΡΙΤΕΡΠΗΝΟΕΙΔΩΝ ΣΤΟ ΦΥΤΟ *LOTUS JAPONICUS*»**

**ΛΑΡΙΣΑ**  
**ΙΟΥΝΙΟΣ 2010**

**«Μελέτη της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση  
τριτερπενοειδών στο φυτό *Lotus japonicus*»**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Παπαδοπούλου Καλλιόπη**

**Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών**

**Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

**Καρπούζας Δημήτριος**

**Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Αποικοδομητικών Μικροοργανισμών**

**Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

**Οιγαλιώτης Κωνσταντίνος**

**Επίκουρος Καθηγητής Γονιμότητας και Βιολογίας Εδάφους του τμήματος**

**Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανική Γεωπονικό**

**Πανεπιστήμιο Αθηνών**

### **Ευχαριστίες**

Θεωρώ υποχρέωση μου να ευχαριστήσω την καθηγήτρια κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη για την ανάθεση της παρούσας διπλωματικής μεταπτυχιακής εργασίας, την επίβλεψη της κατά την διάρκεια της εκπόνησης της και για τις πολύτιμες υποδείξεις και διορθώσεις της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Κροκιδά Αφροδίτη, τον διδάσκοντα ΠΔ407 Δελή Κωνσταντίνο, την υποψήφια διδάκτορα Μίρτζιου Ιωάννα και τον φοιτητή Γκαραγκούνη Κωνσταντίνο για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας και συγγραφής της παρούσας διπλωματικής μεταπτυχιακής εργασίας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Το <i>Lotus japonicus</i> ως φυτικό μοντέλο των ψυχανθών.....	7
2. Η συμβιωτική σχέση ριζοβίου – ψυχανθούς.....	9
3. Δευτερογενείς μεταβολίτες – γενικά.....	12
3.1. Βιοσύνθεση τερπενοειδών.....	14
3.2. OSCs.....	17
4. Σαπωνίνες και P450s.....	21
5. <i>Lotus japonicus</i> και OSCs.....	23
5.1. Οργάνωση των OSC γονιδίων στο <i>Lotus japonicus</i> .....	25
6. Οργάνωση γονιδιακών συστοιχιών που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση τριτερπενοειδών.....	26

### 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Το ψυχανθές <i>Lotus japonicus</i> ως φυτικό μοντέλο.....	31
1.1. Προετοιμασία των σπόρων.....	31
1.2. Καλλιέργεια ριζοβίων και μόλυνση φυτών.....	31
1.3. Συνθήκες ανάπτυξης και καλλιέργειας του <i>Lotus japonicus</i> .....	32
2. Απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς (RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN).....	32
2.1. Χειρισμός του ολικού RNA με DNάση.....	33
2.2. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων..	34
3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	35
3.1. PCR για τον έλεγχο ύπαρξης γονιδιωματικού DNA.....	36
3.2. RT-PCR.....	37
4. PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR).....	39
4.1. Επιλογή των εκκινήτων.....	39
4.2. Αντίδραση της real time PCR.....	41
5. <i>In situ</i> RNA – RNA υβριδισμός.....	42
5.1. Μονιμοποίηση ιστών.....	42
5.2. Διαφανοποίηση των ιστών.....	43
5.3. Εγκλεισμός ιστών σε παραφίνη.....	44

5.4. Καθαρισμός και προετοιμασία των αντικειμενοφόρων.....	44
5.5. Λήψη τομών και τοποθέτηση στις αντικειμενοφόρους.....	45
5.6. Προετοιμασία του Σημασμένου RNA Ανιχνευτή.....	45
5.6.1. Πέψη πλασμιδιακού φορέα.....	46
5.6.2. <i>In vitro</i> μεταγραφή σημασμένου RNA.....	46
5.6.3. Υδρόλυση του σημασμένου RNA.....	47
5.6.4. Προετοιμασία διαλύματος υβριδισμού.....	48
5.7. Προετοιμασία τομών για υβριδισμό.....	48
5.8. Υβριδισμός.....	49
5.9. Ξεπλύματα υβριδισμού.....	49
5.10. Ανοσολογική ανίχνευση θετικού υβριδισμού.....	50

### 3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Συσσώρευση των μεταγραφημάτων των γονιδίων <i>AMY2</i> , <i>P450-71</i> και <i>P450-88</i> σε συμβιωτικούς και μη συμβιωτικούς ιστούς του <i>Lotus japonicus</i> .....	53
2. Χωροταξικό πρότυπο της έκφρασης των γονιδίων <i>AMY2</i> , <i>P450-71</i> και <i>P450-88</i> σε φυμάτια του <i>Lotus japonicus</i> .....	57
3. Συζήτηση.....	58
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	61

# **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## 1. Το *Lotus japonicus* ως φυτικό μοντέλο των ψυχανθών

Το *Lotus japonicus* ανήκει στην τάξη Leguminosae ή Fabales (χεδρωπών) και στην οικογένεια των Papilionaceae ή Fabaceae (ψυχανθών). Τα ψυχανθή είναι εξαιρετικά σημαντικά φυτά, καθώς αποτελούν πηγή τροφής για τον άνθρωπο και τα ζώα και παρέχουν πρώτες ύλες για τη βιομηχανία [1]. Ορισμένα εμπορικής σημασίας ψυχανθή είναι η μηδική (*Medicago sativa*), η φακή (*Lens culinaris*) και το μπιζέλι (*Pisum sativum*). Τα περισσότερα ψυχανθή διαθέτουν ισχυρό ριζικό σύστημα, στο οποίο παρατηρούνται χαρακτηριστικές δομές, οι οποίες καλούνται φυμάτια. Τα φυμάτια αποτελούν συμβιωτικές κατασκευές στις οποίες αναπτύσσονται διάφορα είδη βακτηρίων της οικογένειας *Rhizobiaceae*, που έχουν την ικανότητα δέσμευσης του ατμοσφαιρικού αζώτου. Η δημιουργία των φυματίων στις ρίζες και η ικανότητα δέσμευσης του ατμοσφαιρικού αζώτου από τα ψυχανθή είναι ίσως το βασικό χαρακτηριστικό τους. Από βοτανική άποψης τα ψυχανθή φέρουν χαρακτηριστικά άνθη και καρπούς τα οποία διακρίνονται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1: Το άνθος και ο καρπός του *Lotus japonicus*



Υπολογίζεται ότι περίπου 40-60 εκατομμύρια τόνοι αζώτου παρέχονται ετησίως από τα καλλιεργούμενα ψυχανθή [2]. Τα ψυχανθή βρίσκονται στην τρίτη θέση των φυτών εντατικής καλλιέργειας, έχουν μεγάλη διατητική αξία και παρέχουν μεγάλες ποσότητες ελαίου. Επιπλέον, παράγουν ένα ευρύ φάσμα δευτερογενών μεταβολιτών, που χρησιμοποιούνται με θετικά αποτελέσματα ως συστατικά φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων των ισοφλαβονών [3]. Παρ' όλη τη σημασία τους στη γεωργία, η αύξηση στην παραγωγή των ψυχανθών υστερεί σε σύγκριση με αυτές των σιτηρών. Μια πληθώρα βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων μειώνουν την παραγωγή, όπως η ξηρασία, η αλατότητα και η οξύτητα του εδάφους, οι περιορισμένες ποσότητες των θρεπτικών στοιχείων στο έδαφος, καθώς και ένας μεγάλος αριθμός ασθενειών και ζιζανίων [1]. Η δημιουργία ανθεκτικών φυτών στις παραπάνω καταπονήσεις παραμένει κύριος στόχος των ερευνητών. Αν και η έρευνα σε μη – ψυχανθή είδη, όπως το *Arabidopsis thaliana*, παρέχει πληροφορίες για πολλές πτυχές της βιολογίας του φυτού, δε μπορεί να συμπεριλάβει κάποια από τα χαρακτηριστικά των ψυχανθών, όπως είναι η αζωτοδέσμευση [4]. Σαν αποτέλεσμα, τα φυτά *Lotus japonicus* και *Medicago truncatula* έχουν γίνει αποδεκτά ως φυτά-μοντέλα για τη μελέτη της έρευνας της βιολογίας των ψυχανθών, λόγω των χαρακτηριστικών τους [5].

Το γένος *Lotus* αποτελείται από περισσότερα από 200 είδη, με πιθανό κέντρο εξάπλωσης τη λεκάνη της Μεσογείου, όπου απαντάται και μεγαλύτερη ποικιλία ειδών. Από τις μέχρι τώρα έρευνες, μόνο τα είδη *L. corniculatus*, *L. uliginosus*, *L. tenuis* έχουν αγροοικονομική σημασία [5]. Τα τελευταία χρόνια το διπλοειδές είδος *L. japonicus* χρησιμοποιείται για τη μελέτη της συμβιωτικής σχέσης ψυχανθών – ριζοβίων λόγω των εξής πλεονεκτημάτων που εμφανίζει:

- ✚ το μικρό του μέγεθος
- ✚ ο σχετικά μικρός κύκλος ζωής (2 – 3 μήνες)
- ✚ η αυτογονιμοποίηση
- ✚ το μικρό μέγεθος του γενώματος (472.1 Mb) και
- ✚ η δυνατότητα δημιουργίας διαγονιδιακών φυτών.

## 2. Η συμβιωτική σχέση ριζοβίου – ψυχανθούς

Η συμβιωτική σχέση δέσμευσης του μοριακού αζώτου είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ των ψυχανθών φυτών και των βακτηρίων της οικογένειας *Rhizobiaceae* του εδάφους. Η οικογένεια *Rhizobiaceae* περιλαμβάνει έξι γένη, το *Rhizobium*, το *Sinorhizobium*, το *Mesorhizobium*, το *Allorhizobium*, το *Azorhizobium* και το *Bradyrhizobium*, που καλούνται με τον γενικότερο όρο ριζόβια. Η αλληλεπίδραση μεταξύ φυτών και ριζοβίων έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός νέου φυτικού οργάνου, του φυματίου. Στην εικόνα 2 διακρίνονται τα φυμάτια ως διογκώσεις. Ξεκινώντας από το κέντρο του φυματίου, ο πρώτος ιστός που συναντάται είναι ο κεντρικός ιστός, ο οποίος αποτελείται από τα μολυσμένα και τα μη μολυσμένα κύτταρα. Τα μολυσμένα κύτταρα είναι μεγαλύτερα και γεμάτα με βακτηριοειδή, δηλαδή με διαφοροποιημένες μορφές των ριζοβίων. Ο κεντρικός ιστός περιβάλλεται από μια σειρά περιφερειακών ιστών, το παρέγχυμα του φυματίου, την ενδοδερμίδα και το φλοιώδες παρέγχυμα. Έχουν προσδιοριστεί δύο τύποι φυματίων, τα καθορισμένα και τα μη καθορισμένα φυμάτια. Τα καθορισμένα φυμάτια στερούνται συνεχούς δραστηριότητας του μεριστώματος και έχουν σφαιρικό σχήμα. Έχουν μικρή διάρκεια ζωής και καθώς η ρίζα επιμηκύνεται σχηματίζονται καινούρια φυμάτια. Στα μη καθορισμένα φυμάτια παρατηρείται μία συνεχής δραστηριότητα του μεριστώματος και οι συνεχείς κυτταροδιαιρέσεις συμβάλουν στο κυλινδρικό-ελλειψοειδές σχήμα του φυματίου. Σε αυτόν τον τύπο φυματίων παρατηρείται ένα εκτεταμένο σύστημα ηθμαγγειωδών δεσμίδων σε σύγκριση με τα καθορισμένα φυμάτια. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί πως στα μη καθορισμένα φυμάτια, τις περισσότερες φορές, το άμυλο αποθηκεύεται και στα μολυσμένα και τα μη μολυσμένα κύτταρα, σε αντίθεση με τα καθορισμένα φυμάτια, στα οποία το άμυλο δεν εντοπίζεται στα μολυσμένα κύτταρα [6].

Στο φυμάτιο τα βακτηριοειδή μετατρέπουν το ατμοσφαιρικό άζωτο σε αμμωνία, η οποία αφομοιώνεται από το φυτό ως γλουταμίνη και γλουταμινικό οξύ ή ως ουρείδες [7]. Ως αντάλλαγμα, το φυτό παρέχει στους μικροσυμβιώτες άνθρακα για την ανάπτυξή τους και την παραγωγή ενέργειας. Τα φυμάτια εξαρτώνται αρχικά από την παραγωγή και το μεταβολισμό της σουκρόζης για να διασφαλίσουν την απαιτούμενη ενέργεια, ώστε να αφομοιώσουν την αμμωνία και να εξάγουν αμινοξέα και άλλες ενώσεις του αζώτου [8]. Επί πρόσθετα, η σουκρόζη είναι η πρωταρχική

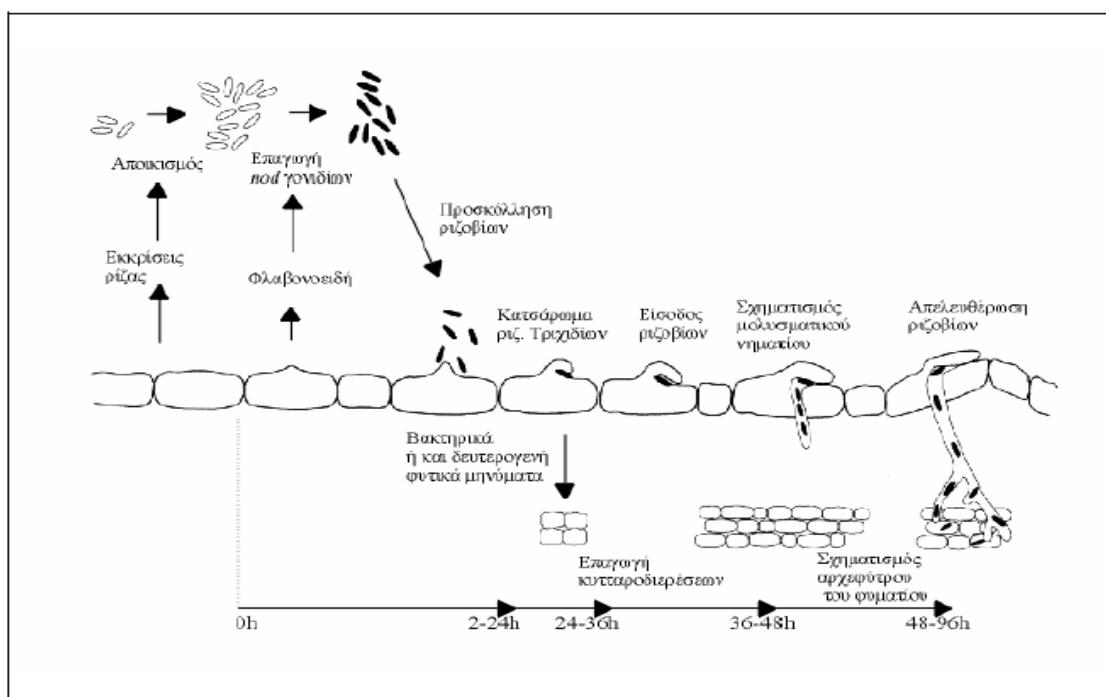
πηγή ανθρακικών σκελετών για την παραγωγή κυτταρίνης και τη βιοσύνθεση του αμύλου κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του φυματίου.



Εικόνα 2: Φυμάτια στη ρίζα του *Lotus japonicus*

Η εδραίωση της συμβίωσης είναι μια περίπλοκη βιολογική διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει μια σειρά από επιμέρους στάδια, διεργασίες και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο συμβιωτών [9]. Το φυτό και το βακτήριο που συμμετέχουν σε μία συμβιωτική σχέση, παρουσιάζουν έναν υψηλό βαθμό αμοιβαίας εξειδίκευσης, ο οποίος ρυθμίζεται από την ανταλλαγή χημικών σιγνάλων [10]. Τα φυτικά σήματα, που είναι φλαβονοειδή που εξέρχονται από τη ρίζα, ενεργοποιούν την έκφραση των *nod* γονιδίων των ριζοβίων και το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή σιγνάλων λιπο-χιτο-

ολιγοσακχαριδιακής φύσης από τα ριζόβια που καλούνται Nod παράγοντες. Εκτός από τους Nod παράγοντες, κάποια ενδογενή σήματα του φυτού, κυρίως οι φυτικές ορμόνες, είναι επίσης σημαντικά για την εγκαθίδρυση της σωστής αλληλεπίδρασης μεταξύ ριζοβίων και ψυχανθών [11]. Το αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων, που αναφέρθηκαν παραπάνω, είναι η επαγωγή του σχηματισμού του φυματίου από το φυτό και η απελευθέρωση των βακτηρίων εντός των εξειδικευμένων κυττάρων του διαφοροποιημένου φυματίου. Στην εικόνα 3 φαίνονται αναλυτικά τα στάδια σχηματισμού του φυματίου.



Εικόνα 3: Τα στάδια σχηματισμού του φυματίου.

Οι περισσότερες ερευνητικές προσπάθειες έχουν εστιαστεί στην αρχική φάση της αλληλεπίδρασης φυτού – βακτηρίου, που περιλαμβάνει τη μορφογένεση του φυματίου και την έναρξη της αζωτοδέσμευσης. Η φάση γήρανσης του φυματίου, η οποία πραγματοποιείται μετά το «γέμισμα» των καρπών των ετήσιων ψυχανθών, δεν είναι επαρκώς κατανοητή αν και είναι καθοριστική για την εξέλιξη της συμβίωσης [12]. Σε πρόσφατες μελέτες, προτείνεται πως τα βακτηριοειδή πιθανόν να έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα επιβίωσης, έπειτα από τη γήρανση του φυματίου, σε σύγκριση με τα ελεύθερα διαβιούντα ριζόβια στη ριζόσφαιρα [13].

### 3. Δευτερογενείς μεταβολίτες - γενικά

Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη μελετήθηκε ο ρόλος τριών γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στη βιοσύνθεση και τον μεταβολισμό των τριτερπενοειδών. Τα τριτερπενοειδή ανήκουν στους δευτερογενείς μεταβολίτες. Ως δευτερογενείς μεταβολίτες ορίζονται ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, με περιορισμένη κατανομή στο φυτικό βασίλειο, οι οποίες δεν παίζουν πρωταρχικό ρόλο στην ανάπτυξη και αύξηση του φυτού και η προέλευση των οποίων δεν ακολουθεί τους γνωστούς πρωτογενείς μεταβολικούς δρόμους, που είναι όμοιοι για όλα τα φυτά. Συνεπώς τα δευτερογενή αυτά προϊόντα δεν αποτελούν βασικά μοριακά δομικά συστατικά του φυτικού κυττάρου, αλλά σχηματίζονται μόνο σε ιδιαίτερους ιστούς ή όργανα και σε κατάλληλα στάδια της ανάπτυξης. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι οι ουσίες που συντίθενται κατά τις μεταβολικές διαδικασίες των υδατανθράκων, των λιπών και των αμινοξέων και η ονομασία τους οφείλεται στη βιοσύνθεση τους και όχι στην σημασία τους για τα φυτά. Μέχρι πρόσφατα, οι δευτερογενείς μεταβολίτες θεωρούνταν μόνο συνδεδεμένοι με οικολογικούς ρόλους [14,15].

Τα φυτά παράγουν πληθώρα δευτερογενών μεταβολιτών πολλοί από τους οποίους μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη των μικροβίων *in vitro*. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι επίσης γνωστοί σαν παράγοντες οι οποίοι μεσολαβούν στην επικοινωνία των φυτών. Επίσης, βοηθούν την αμυντική λειτουργία του φυτού, απομακρύνοντας τα έντομα και διάφορα παθογόνα ή καταστέλλουν την ανάπτυξη γειτονικών φυτών. Η ικανότητα των φυτών να συνθέτουν συγκεκριμένες ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών πιθανόν να οφείλεται στον διαφορετικό τρόπο με τον οποίο τα φυτά και τα ζώα αντιμετωπίζουν τους διάφορους εχθρούς και τις ασθένειες. Οι μεταβολίτες αυτοί πιθανόν να συντίθενται κατά τη διάρκεια της κανονικής αύξησης και ανάπτυξης του φυτού δημιουργώντας αντιμικροβιακά συστατικά, ενώ είναι πιθανό να απουσιάζουν από υγιή φυτά και να συσσωρεύονται μόνο σε περιπτώσεις σε παθογόνα ή καταπόνησης από αβιοτικό στρες ή παρουσίας παθογόνων [16,17]. Για παράδειγμα, τα τερπένια, τα οποία συγκροτούν μια μεγάλη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών μπορούν να δράσουν ως τοξίνες και να αποτρέψουν την βοσκή σε ένα μεγάλο αριθμό εντόμων και θηλαστικών. Ορισμένα από αυτά έχουν ένα καλά χαρακτηρισμένο ρόλο στην φυτική αύξηση και ανάπτυξη των φυτών. Επίσης οι γιββερελλίνες, μια ομάδα φυτικών ορμονών, είναι διτερπένια.

Τα καροτενοειδή είναι τετρατερπένια και λειτουργούν ως βοηθητικές χρωστικές στην φωτοσύνθεση [17].

Με βάση τις πρόδρομες ενώσεις που χρησιμοποιούνται για την βιοσύνθεση τους, οι δευτερογενείς μεταβολίτες που έχουν ταυτοποιηθεί στο φυτό *Arabidopsis thaliana* ταξινομούνται στις εξής κατηγορίες οι οποίες παρουσιάζονται και στον πίνακα 1 με τις λειτουργίες της κάθε κατηγορίας. [14].

1. Ενώσεις που περιέχουν άζωτο (indole and indole-sulfur compounds, glucosinolates)
2. Φαινυλπροπανοειδή (phenylpropanoids)
3. Βενζοειδή (benzenoids)
4. Φλαβονοειδή (flavonoids)
5. Τερπένια (terpenes)

Οι ινδολικές και ινδολοθειϊκές ενώσεις σχηματίζονται από το ινδολικό οξύ και συσσωρεύονται στα φυτά σε περιπτώσεις μόλυνσης από παθογόνα. Τα γλυκοσυνολικά οξέα είναι η πιο χαρακτηριστική ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών στο *Arabidopsis thaliana*. Η βιοσύνθεσή τους προέρχεται από αρκετά αμινοξέα όπως η μεθειονίνη και η τρυπτοφάνη. Επίσης εντοπίζονται σε όλα τα φυτικά όργανα και πιστεύεται ότι βοηθούν την άμυνα του φυτού απέναντι σε παθογόνα και φυτοφάγα ζώα. Τα φαινυλπροπανοειδή ανήκουν στους αρωματικούς δευτερογενείς μεταβολίτες και σχηματίζονται μέσω του μονοπατιού των φαινυλπροπανοειδών με αρχικό μόριο την φαινυλαλανίνη, ενώ χρησιμοποιούνται και ως πρόδρομες ενώσεις για τη βιοσύνθεση των βενζοειδών. Και οι δύο ομάδες παρέχουν προστασία στα φυτά έναντι σε παθογόνα καθώς και προστασία από υπεριώδη ακτινοβολία, ενώ βοηθούν και στην προσέλκυση επικονιαστών [14]. Τα φλαβονοειδή βιοσυντίθενται μέσω δύο μεταβολικών μονοπατιών με αρχικές ενώσεις την φαινυλαλανίνη και το μαλονικό οξύ. Τα φλαβονοειδή ταξινομούνται σε ανθοκυανίνες, φλαβόνες και φλαβονόλες [15]. Παρουσιάζουν ένα πολυσύνθετο λειτουργικό ρόλο στη φυσιολογία των φυτών παρουσιάζοντας αυξημένη συγκέντρωση σε περιπτώσεις προσβολής από παθογόνα και έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία. Επίσης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών εμποδίζοντας την πολική μεταφορά της αυξίνης, ενώ πιστεύεται ότι ελέγχουν το λήθαργο των σπόρων [14].

Class	Approximate number of structures <sup>a</sup>	Suggested functions
Indole and indole-sulfur compounds	10	Defense against pathogens
Glucosinolates	35	Defense against pathogens and herbivores
Phenylpropanoids	20	UV protection. Defense against pathogens?
Benzenoids	25	Pollinator attractants? Defense against pathogens?
Flavonoids	15	UV protection. Auxin transport. Seed dormancy. Defense against pathogens?
Terpenes	50	Herbivore feeding deterrents? Resistance to oxidative stress? Defense against pathogens?
Fatty acid derivatives	15	Defense against pathogens? Volatile signals?

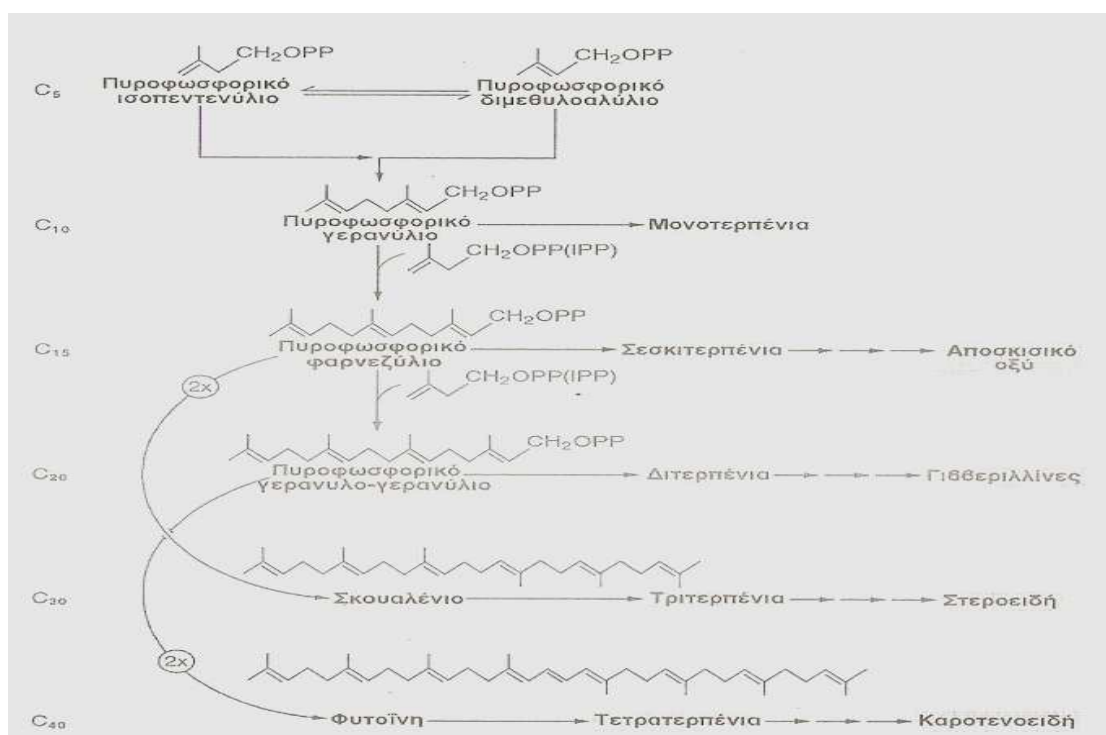
Πίνακας 1: Κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών , δευτερογενείς αλλά και πρωταρχικές λειτουργίες του φυτού με τις οποίες εμπλέκονται [14].

### 3.1. Βιοσύνθεση τερπενοειδών

Τα τερπένια είναι η πιο πολυάριθμη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών, αριθμώντας πάνω από 20.000 μέλη και είναι πολυμερή του ισοπρενίου(1). Δημιουργούνται με τη σύντηξη μονάδων διφωσφορικού ισοπεντενυλίου (IPP), της ενεργοποιημένης μορφής του ισοπρενίου. Ανάλογα με τις μονάδες ισοπρενίου από τις οποίες αποτελούνται κατατάσσονται σε μονοτερπένια (C10), σεσκιτερπένια (C15) και τριτερπένια (C30). Αντιπρόσωποι των δύο πρώτων κατηγοριών, όπως το λιμονένιο έχουν ανιχνευθεί ως πτητικά αέρια που εκλύουν τα φυτά μπροστά στον κίνδυνο βοράς από φυτοφάγα ζώα. Στα τριτερπενοειδή ανήκουν οι στερόλες, τα στεροειδή και οι σαπωνίνες με πιο γνωστά την α- και β-αμυρίνη και τη λουπεόλη. Οι στερόλες χρησιμοποιούνται ως πρόδρομες ουσίες για την βιοσύνθεση ορμονών στα φυτά και στα ζώα. Η βιολογική λειτουργία των τριτερπενοειδών στα φυτά δεν είναι πολύ γνωστή. Αρκετά φυτά συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες τριτερπενοειδών κυρίως στις ρίζες τα οποία εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών έναντι σε μύκητες και παθογόνα [18,19].

Προκειμένου να φτάσουμε σε σκελετό με τριάντα άτομα άνθρακα και στη σύνθεση τριτερπενοειδών η διαδικασία ξεκινάει από ενώσεις με πέντε άτομα άνθρακα και συγκεκριμένα το διφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) όπως ειπώθηκε προηγουμένως, το οποίο παράγεται από το μεβαλονικό οξύ. Το IPP και η ισομερής του μορφή το διφωσφορικό διμεθυλοαλύλιο (DMAPP) είναι τα ενεργά C5 δομικά συστατικά των τερπενίων. Τα δύο αυτά ισομερή αντιδρούν και σχηματίζουν το διφωσφορικό γερανύλιο (GPP), το οποίο αποτελεί την πρόδρομο μορφή σχεδόν όλων

των μονοτερπενίων με 10 άτομα C. Στη συνέχεια το διφωσφορικό γερανύλιο συμπυκνώνεται με το IPP και σχηματίζεται το διφωσφορικό φαρνεζύλιο (FPP) με 15 άτομα C πρόδρομος ένωση των σεσκιτερπενίων. Το τελευταίο βήμα για την δημιουργία των τριτερπενοειδών είναι η συμπύκνωση δύο FPP προκειμένου να σχηματιστεί το σκουαλένιο (C<sub>30</sub>) με τη βοήθεια της συνθάσης του σκουαλενίου (SQS) (Σχήμα 2). Το σκουαλένιο μετατρέπεται σε 2,3 οξειδοσκουαλένιο με τη βοήθεια της εποξειδάσης του σκουαλενίου (SQE) η οποία είναι μια μονοξυγενάση [15,20].



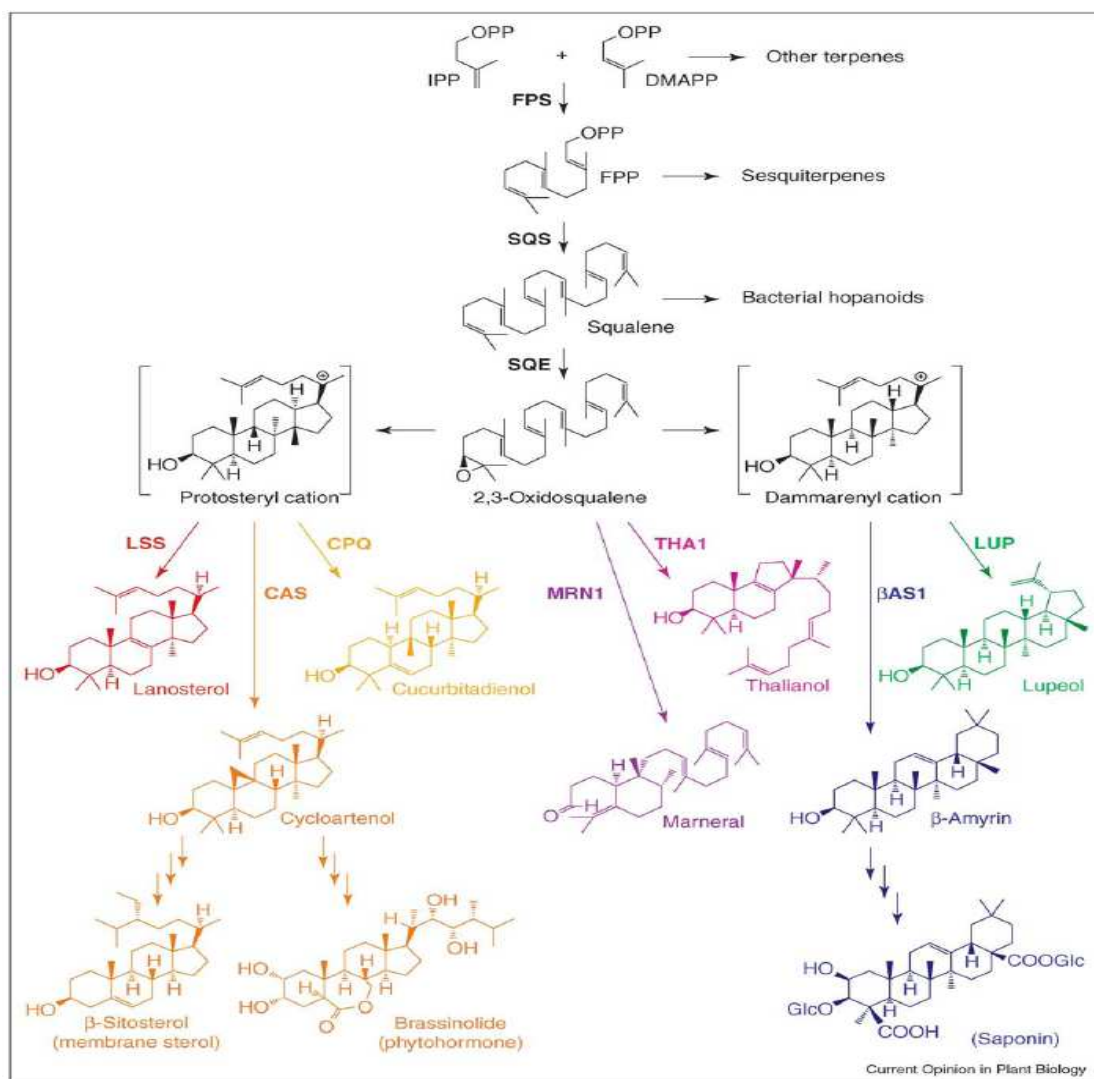
Σχήμα 2: Οι κυριότερες υποκλάσεις των τερπενίων που βιοσυντίθεται από το διφωσφορικό ισοπεντενύλιο και το διφωσφορικό διμεθυλοααλύλιο

Το 2,3 οξειδοσκουαλένιο, ανάλογα με το μονοπάτι που θα ακολουθήσει, μπορεί να μετατραπεί σε στερόλες και στεροειδείς ορμόνες ή σε τριτερπενοειδείς αλκοόλες. Οι δύο εναλλακτικές επιλογές υπάρχουν μόνο στα φυτά αφού στα ζώα ο μοναδικός δρόμος του 2,3 οξειδοσκουαλενίου είναι να μετατραπεί σε λανοστερόλη μέσω της συνθάσης της λανοστερόλης (LSS) και έπειτα η λανοστερόλη μετατρέπεται σε χοληστερόλη, η οποία είτε παραμένει αυτούσια είτε μετατρέπεται σε στεροειδείς ορμόνες και γενικότερα σε στεροειδή, τα οποία αποτελούν βασικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών. Πολλά από τα στεροειδή έχουν τροποποιηθεί ώστε να έχουν



λιγότερα από 30 άτομα άνθρακα και είναι δομημένα από 6 ισοπρενοειδείς μονάδες. Τα πιο διαδεδομένα στεροειδή στα χλωροφύκη και τα ανώτερα φυτά είναι η σιτοστερόλη (29C) η στιγμαστερόλη (29C) και η καμπεστερόλη (28C). Σήμερα γνωρίζουμε πάνω από 150 φυσικής προέλευσης στερόλες με πολύ μεγάλη ποικιλία ενώσεων και εξαιρετικά σημαντικές βιολογικές δράσεις. Έτσι εκτός από την χοληστερόλη στα στεροειδή ανήκουν τα χολικά οξέα, η βιταμίνη-D, αντιβιοτικά, ορμόνες εντόμων κ.λ.π.

Οι πιο ευρέως διαδεδομένες τριτερπενοειδείς αλκοόλες, οι οποίες έχουν μελετηθεί περισσότερο είναι η β-αμυρίνη και η λουπεόλη. Ειδικά η β-αμυρίνη η οποία παράγεται από το 2,3 οξειδοσκουαλένιο μέσω της συνθάσης της β-αμυρίνης, είναι η πρόδρομος ουσία για την παραγωγή των σαπωνινών όπως θα δούμε παρακάτω[15,20]. Η συνολική βιοσυνθετική πορεία παρουσιάζεται στο σχήμα 3.



Σχήμα 3: Βιοσύνθεση τριτερπενοειδών [20]

### 3.2. OSCs

Τα ένζυμα που παραλαμβάνουν το 2,3 οξειδοσκουαλένιο και το μετατρέπουν σε κυκλικές τριτερπενοειδείς αλκοόλες με τουλάχιστον έξι δακτυλίους ονομάζονται κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου (oxidosqualene cyclases (OSCs)). Το γένωμα του *Arabidopsis thaliana* κωδικοποιεί για 13 OSCs, του *Oryza sativa* για 9 και του *Lotus japonicus* για 8(OSC1-OSC8) [20]. Οι OSCs διακρίνονται σε δύο κατηγορίες με βάση το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που σχηματίζεται: σε αυτές που σχηματίζουν με διαμόρφωση ανάκλιντρου-λουτήρα-ανάκλιντρου το κατιόν του προτεστερυλίου (*protosteryl cation*) και σε αυτές που σχηματίζουν το κατιόν του νταμαρενυλίου (*dammarenyl cation*) με διαμόρφωση ανάκλιντρου-ανάκλιντρου-ανάκλιντρου[21]. Στην πρώτη κατηγορία ανήκει η LSS που αναφέραμε και η συνθάση της κυκλοαρτενόλης (*cycloartenol synthase, CAS*), η οποία είναι η κύρια φυτική κυκλάση για την παραγωγή των στερολών και των στεροειδών φυτοορμονών (π.χ. μπρασσινοστεροειδή). Βέβαια σε αρκετά γένη φυτών έχει βρεθεί και η LSS η οποία συναντάται κυρίως στα ζώα και στους μύκητες ως η αρχική στερόλη [20]. Για παράδειγμα στο φυτό *Arabidopsis thaliana* μια πρωτεΐνη με ομολογία 65% με την CAS κωδικοποιεί για την συνθάση της λανοστερόλης. Η συντήρηση της συνθάσης της κυκλοαρτενόλης σε φυτά που έχουν εξεταστεί φαίνεται στον πίνακα 2 και δείχνει ότι τα φυτά απαιτούν κάποιους μεταβολίτες της κυκλοαρτενόλης, οι οποίοι δεν μπορούν να παραχθούν από τη λανοστερόλη. Υπάρχουν και άλλα ένζυμα τα οποία σχηματίζονται από το κατιόν του προτοστερυλίου και έχουν προέλθει από γονιδιακό αναδιπλασιασμό και διαφοροποίηση του γονιδίου της συνθάσης της κυκλοαρτενόλης [22]. Για παράδειγμα η συνθάση της κουκουρμπιταδιανόλης (CPQ) από το φυτό *Cucurbita pepo* είναι αρκετή ομόλογη στις συνθάσες της κυκλοαρτενόλης και της λανοστερόλης (65% και 71% αντίστοιχα), αλλά παράγει κουκουρμπιταδιανόλη[23].

**Characterized plant oxidosqualene cyclases.**

Synthase	Plant	Name (Genbank accession) <sup>a</sup>	Products <sup>b</sup> (product identification method [reference(s)])
Cycloartenol	<i>Abies magnifica</i>	CAS1 ( <a href="#">AAG44096</a> )	Cycloartenol (NMR, GC; <sup>c</sup> )
Cycloartenol	<i>A. thaliana</i>	<a href="#">At2g07050</a> /CAS1 ( <a href="#">P38605</a> )	Cycloartenol (NMR, IR, MS [4])
Cycloartenol	<i>B. platyphylla</i>	BPX1 ( <a href="#">BAB83085</a> ) BPX2 ( <a href="#">BAB83086</a> )	Cycloartenol (LC-MS [53])
Cycloartenol	<i>C. speciosus</i>	CSOSC1 ( <a href="#">BAB83253</a> )	Cycloartenol (LC-MS [38])
Cycloartenol	<i>C. pepo</i>	CPX ( <a href="#">BAD34644</a> )	Cycloartenol (LC-MS [17**])
Cycloartenol	<i>G. glabra</i>	GgCAS1 ( <a href="#">BAA76902</a> )	Cycloartenol [54]
Cycloartenol	<i>L. cylindrica</i>	LcCAS1 ( <a href="#">BAA85266</a> )	Cycloartenol [55]
Cycloartenol	<i>P. ginseng</i>	PNX ( <a href="#">BAA33460</a> )	Cycloartenol (HPLC [56])
Cycloartenol	<i>P. sativum</i>	CASPEA ( <a href="#">BAA23533</a> )	Cycloartenol [57]
Lanosterol	<i>A. thaliana</i>	<a href="#">At3g45130</a> /LSS1/PEN7	Lanosterol (GC-MS, NMR [12**])
Cucurbitadienol	<i>C. pepo</i>	CPO ( <a href="#">BAD34645</a> )	Cucurbitadienol (LC-MS, NMR [17**])
β-Amyrin	<i>Avena strigosa</i>	AsβAS1 ( <a href="#">CAC84558</a> )	β-Amyrin (Genetic analysis, HPLC [19])
β-Amyrin	<i>B. platyphylla</i>	BPY ( <a href="#">BAB83088</a> )	β-Amyrin (LC-MS [53])
β-Amyrin	<i>Euphorbia tirucalli</i>	ELAS ( <a href="#">BAE43642</a> )	β-Amyrin (GC-MS, NMR [58])
β-Amyrin	<i>G. glabra</i>	GgβAS1 ( <a href="#">BAA89815</a> )	β-Amyrin (LC-MS [59])
β-Amyrin	<i>M. truncatula</i>	MtAMY1/βAS1 ( <a href="#">CAD23247</a> )	β-Amyrin (GC-MS, NMR [23]; HPLC [24])
β-Amyrin	<i>P. ginseng</i>	PNY1 ( <a href="#">BAA33461</a> ) PNY2 ( <a href="#">BAA33722</a> )	β-Amyrin (HPLC, MS, NMR [56,60])
β-Amyrin	<i>P. sativum</i>	PSY ( <a href="#">BAA97558</a> )	β-Amyrin (LC-MS, GC-MS, NMR [32])
Lupeol	<i>B. platyphylla</i>	BPW ( <a href="#">BAB83087</a> )	Lupeol (LC-MS [53])
Lupeol	<i>G. glabra</i>	GgLUS1 ( <a href="#">BAD08587</a> )	Lupeol (LC-MS [26**])
Lupeol	<i>O. europaea</i>	OEW ( <a href="#">BAA86930</a> )	Lupeol (LC-MS, NMR [29])
Lupeol	<i>T. officinale</i>	TRW ( <a href="#">BAA86932</a> )	Lupeol (LC-MS, NMR [29])
Thalianol	<i>A. thaliana</i>	<a href="#">At5g48010</a> /THA1/PEN4	Thalianol (NMR [39**])
Marneral	<i>A. thaliana</i>	<a href="#">At5g42600</a> /MRN1/PEN5	Marneral (NMR [40**])
Isomultiflorenol	<i>L. cylindrica</i>	LcIMS1 ( <a href="#">BAB68529</a> )	Isomultiflorenol (LC-MS [30])
Mixed	<i>A. thaliana</i>	<a href="#">At1g78970</a> /LUP1	<b>Lupeol, 3β,20-dihydroxylupane, β-amyrin, germanicol, taraxasterol and ψ-taraxasterol</b> (GC, MS [33]; NMR [33-35])
Mixed	<i>A. thaliana</i>	<a href="#">At1g78960</a> /LUP2/ YUP8H12R.43	<b>β-Amyrin, taraxasterol, tirucalla-7,21-dien-3β-ol, lupeol, bauerenol, butyrospermol, multiflorenol, α-amyrin and ψ-taraxasterol</b> (HPLC, NMR [2,36]; GC-MS [2]; LC-MS [36])
Mixed	<i>A. thaliana</i>	<a href="#">At1g66960</a> /LUP5	Tirucalla-7,21-dien-3β-ol and additional uncharacterized (LC-MS [37])
Mixed	<i>A. thaliana</i>	<a href="#">At1g78500</a> /PEN6	Bauerenol, lupeol, α-amyrin and additional uncharacterized (LC-MS [37])
Mixed	<i>C. speciosus</i>	CsOSC2 ( <a href="#">BAB83254</a> )	Lupeol, germanicol, β-amyrin and additional uncharacterized (LC-MS [38])
Mixed	<i>L. japonicus</i>	AMY2 ( <a href="#">AAO33580</a> )	<b>Lupeol, β-amyrin</b> and additional uncharacterized (HPLC [24])
Mixed	<i>P. sativum</i>	PSM ( <a href="#">BAA97559</a> )	<b>α-Amyrin, β-amyrin, δ-amyrin, ψ-taraxasterol, butyrospermol, lupeol, germanicol and taraxasterol</b> (LC-MS, GC-MS, NMR [32])

<sup>a</sup> *A. thaliana* PEN and LUP designations are from [2].

<sup>b</sup> For OSC enzymes with mixed products, major products are listed in bold text if known.

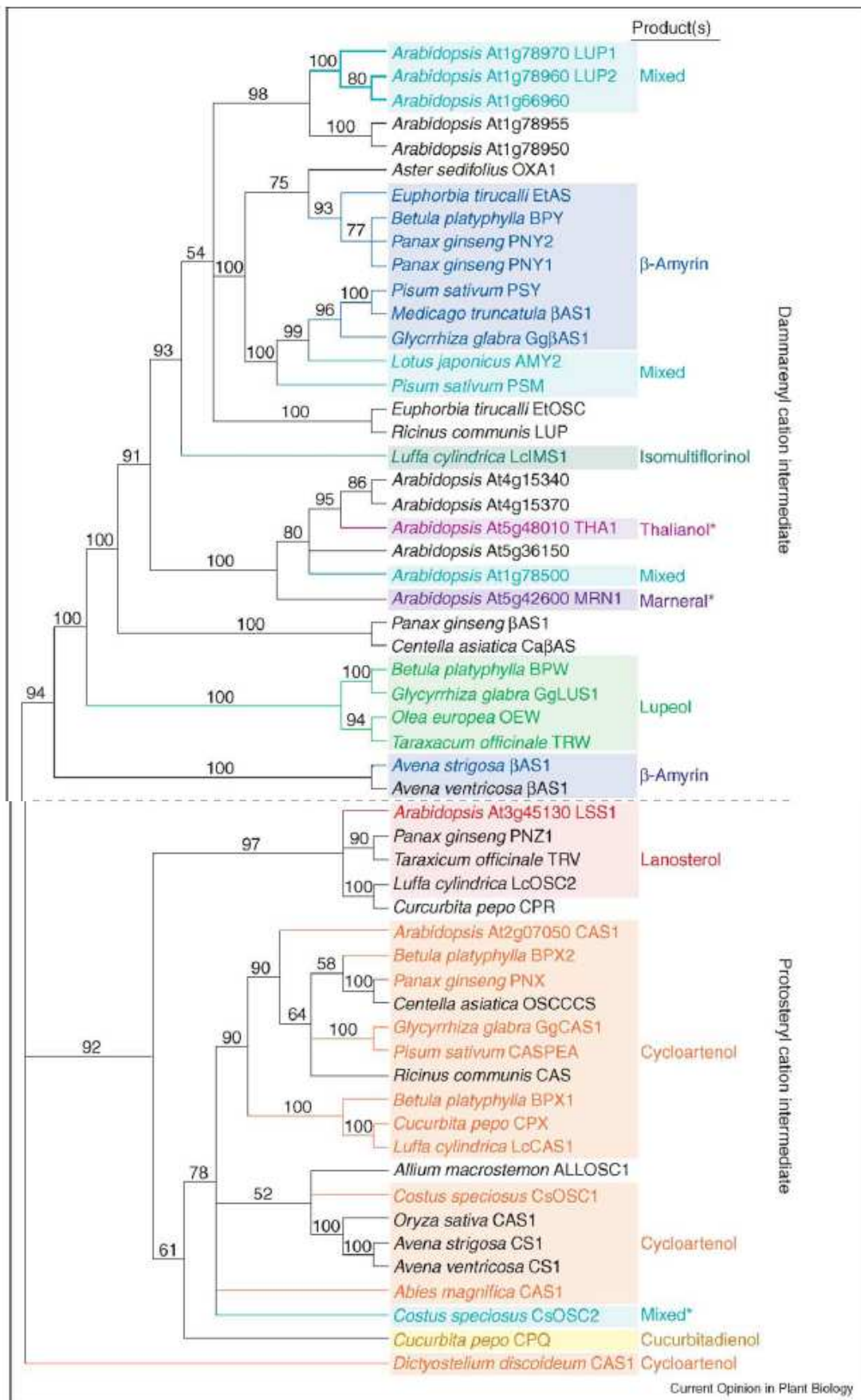
<sup>c</sup> JBR Herrera, PhD thesis, Rice University, 1999. Abbreviations: GC, gas chromatography; HPLC, high pressure LC; IR, infrared spectroscopy; LC, liquid chromatography; MS, mass spectrometry; NMR, nuclear magnetic resonance.

Πίνακας 2: Ταυτοποιημένες φυτικές κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου [20].

Οι κυκλάσες που σχηματίζουν ενδιάμεσα το κατιόν του νταμαρενυλίου απαντώνται αποκλειστικά στα φυτά και μάλιστα σε αυτά με αγγειακό αγωγό σύστημα (τραχεόφυτα) και είναι υπεύθυνες για την παραγωγή των τριτερπενοειδών αλκοολών. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν η συνθάση της β-αμυρίνης και η συνθάση της λουπεόλης. Όσον αφορά την εξελικτική πορεία των OSCs, η συνθάση της κυκλοαρτενόλης μεταξύ διαφορετικών ειδών παρουσιάζει μεγάλη ομολογία, γεγονός που επιβεβαιώνει το γεγονός ότι έχει σημαντικό ρόλο για την ομοιόσταση του φυτικού κυττάρου. Σε αντίθεση, οι κυκλάσες που χρησιμοποιούν ως ενδιάμεσο το κατιόν του νταμαρενυλίου εμφανίζουν μικρή ομοιότητα μεταξύ τους[18]. Για παράδειγμα οι συνθάσες της λουπεόλης από τα φυτά *Glycyrrhiza glabra*, *Betula platyphylla*, *Taraxacum officinale* και *Olea europa* εμφανίζουν ομολογία της τάξης του 74-81% και συγκροτούν μια ξεχωριστή και διακριτή ομάδα κυκλασών (Σχήμα 4). Επίσης υπάρχουν κάποιες OSCs από μονοκοτυλήδωνα και δικοτυλήδωνα φυτά οι

οποίες παράγουν αποκλειστικά και μόνο β-αμυρίνη. Οι συνθάσες της β-αμυρίνης των διαφόρων φυτών αυτών παρουσιάζουν μικρή ομολογία (48-50%) σε αντίθεση με την συνθάση της κυκλοαρτενόλης με την οποία παρουσιάζουν υψηλότερη ομολογία (70-79%) [20]. Αυτό σημαίνει ότι μετά το διαχωρισμό των ειδών, είχαν την δυνατότητα να συσσωρεύσουν μεταλλάξεις, ευνοϊκές βέβαια αφού επικράτησαν, για την επιβίωση των ειδών στο εκάστοτε περιβάλλον. Συνεπώς, αυτό έρχεται σε συμφωνία με το ότι οι περισσότερες από αυτές παράγουν προϊόντα που ευνοούν την προσαρμογή και επιβίωση του φυτού στο περιβάλλον, π.χ. σαπωνίνες και άμυνα έναντι μυκήτων[18].

Η ποικιλομορφία των φυτικών τριτερπενοειδών προκύπτει όχι μόνο από την ποικιλία των OSCs αλλά και από την ικανότητα κάποιων κυκλασών να παράγουν σύνθετα προϊόντα. Αυτές οι OSCs ανήκουν στην κατηγορία αυτών που σχηματίζουν το κατιόν του νταμαρενυλίου, αλλά θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν και σαν μια τρίτη κατηγορία, αυτή των πολυλειτουργικών κυκλασών. (πίνακας 2). Συνθάσες της β-αμυρίνης οι οποίες παράγουν σύνθετα προϊόντα έχουν χαρακτηριστεί στα ψυχανθή και κυρίως στο *Pisum sativum* (μπιζέλι) και στο *Lotus japonicus* [24,25]. Οι πολυλειτουργικές κυκλάσες έχουν προκύψει μέσω της εξέλιξης των αγγειόσπερμων. Στα ψυχανθή οι συνθάσες της β-αμυρίνης που παράγουν σύνθετα προϊόντα έχουν κοινό πρόγονο με αυτές οι οποίες έχουν πιο εξειδικευμένη δράση. Αντίθετα στο *Arabidopsis thaliana* έχουν μικρότερη συγγένεια μεταξύ τους και μεγαλύτερη απόσταση στο φυλογενετικό δέντρο (σχήμα 4) [20].



Σχήμα 4: Κατηγοριοποίηση των OSCs και η μεταξύ τους ομολογία [20].

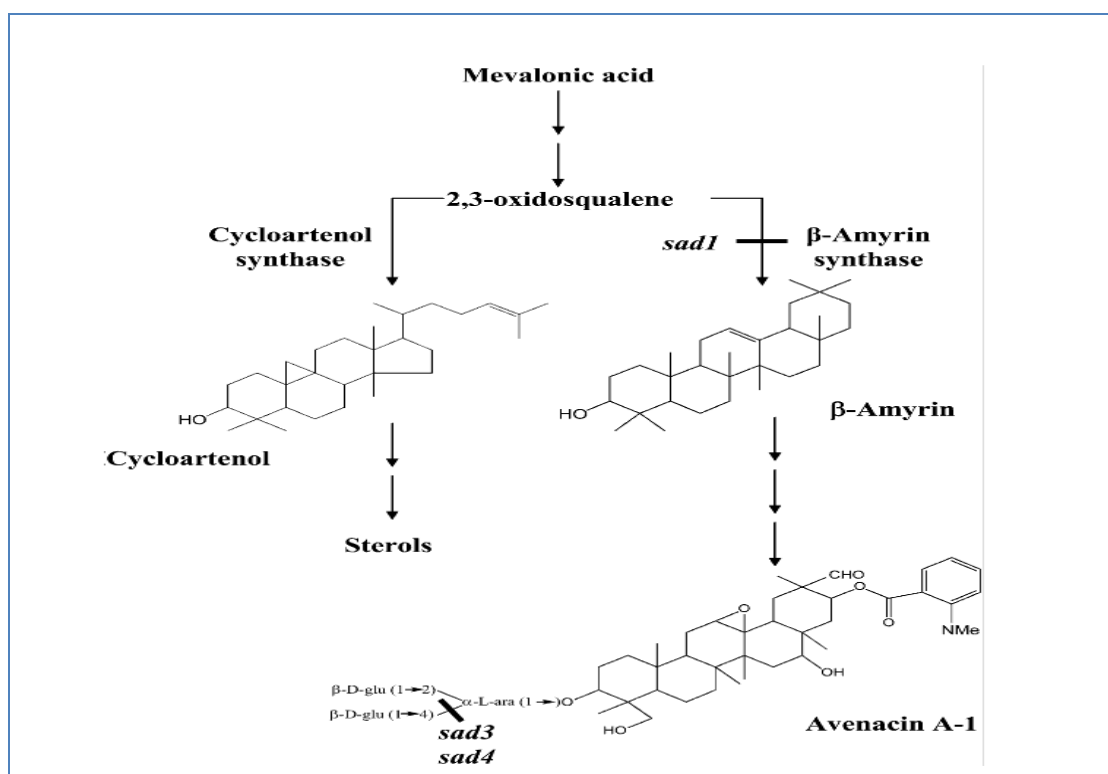
Οι συνθάσες των τερπενίων ανήκουν σε μια οικογένεια ενζύμων που καταλύουν πολύπλοκες αντιδράσεις πολλών βημάτων και παράγουν προϊόντα ποικίλης δομής με βιολογική και εμπορική σημασία. Η τρισδιάστατη δομή των ενζύμων αυτών είναι καλά διατηρημένη από τους μύκητες μέχρι τα φυτά και περιλαμβάνει την «αναδίπλωση τερπενίων». Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, για την δραστικότητα των ενζύμων αυτών δεν παίζουν ρόλο μόνο κάποια συγκεκριμένα αμινοξέα του ενεργού κέντρου, αλλά και το σύνολο των αμινοξέων που το περιβάλλουν. Με τον τρόπο αυτό του προσδίδουν την κατάλληλη στερεοδιάταξη και γεωμετρία για την κατάλυση των πολύπλοκων αντιδράσεων [26]. Από μελέτες στην ευκαρυωτική συνθάση της λανοστερόνης (LSS), βρέθηκε ότι περιέχει κοντά στο ενεργό κέντρο και ένα λιποφιλικό κανάλι, καθώς και ένα στενό πέρασμα μεταξύ τους, το οποίο σχηματίζει μία εύκαμπτη θηλιά ώστε να επιτρέπει την δίοδο του υποστρώματος. Αποδείχτηκε ότι η υψηλή εξειδίκευση των κυκλασών οφείλεται στις περιοχές αυτές [27].

#### **4. Σαπωνίνες και P450s.**

Οι σαπωνίνες είναι τριτερπενικοί γλυκοζίτες στεροειδών, οι οποίες συναντώνται σε πολλά φυτικά είδη και ονομάστηκαν έτσι διότι με το νερό σχηματίζουν αφρό. Εκτός από τις απορρυπαντικές ιδιότητες εμφανίζουν και τοξικές ιδιότητες έναντι σε φυτοφάγα σπονδυλωτά αφού έχουν την ικανότητα να αποδιοργανώνουν τις μεμβράνες και να προκαλούν αιμόλυση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Κατά την υδρόλυση τους δίνουν μια σειρά σακχάρων όπως η γλυκόζη, η γαλακτόζη και η ξυλόζη καθώς και την «αγλυκόνη» που ονομάζεται σαπωγενίνη [15]. Λόγω της υψηλής συγκέντρωσης τους σε υγιή φυτά οι σαπωνίνες έχουν χαρακτηριστεί ως αντιμικροβιακά συστατικά και γενικότερα ως ουσίες οι οποίες εμπλέκονται στην άμυνα του φυτού απέναντι στα παθογόνα. Στο φυτό δακτυλίτης (*Digitalis purpurea*) εντοπίζεται η διγιτονίνη ενώ στη βρώμη (*Avena sativa*) συσσωρεύονται σαπωνίνες στις ρίζες γνωστές ως αβενασίνες [15,18]. Η διαδικασία της βιοσύνθεσης των σαπωνινών δεν είναι ιδιαίτερα γνωστή, παρά το μεγάλο ενδιαφέρον που παρουσιάζουν αυτά τα φυτικά προϊόντα. Το πρώτο βήμα για την βιοσύνθεση των σαπωνινών είναι η δημιουργία της β-αμυρίνης, και η αντίδραση καταλύεται από μία κυκλάση του οξειδοσκουαλενίου (OSC), τη συνθάση της β-

αμυρίνης.[19]. Η β-αμυρίνη δεν έχει σημαντική αντιμικροβιακή δράση αλλά μετατρέπεται στη βιολογικά ενεργή σαπωνίνη, μέσα από μια σειρά τροποποιήσεων στις οποίες εμπλέκονται ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια του κυτοχρώματος P450 (P450 εξαρτώμενες μονοξυγενάσες), ακυλοτρανσφεράσες και γλυκοσυλιοτρανσφεράσες (Σχήμα 5).

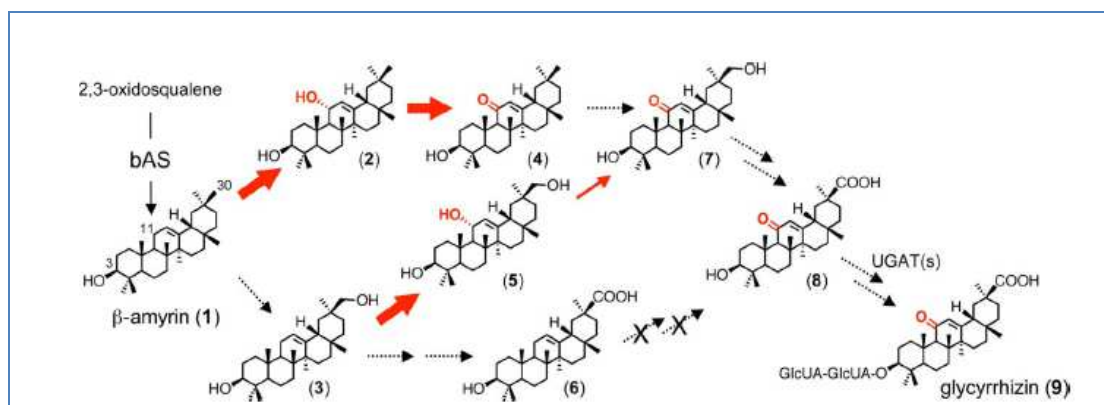
Στη βρώμη η συνθάση της β-αμυρίνης κωδικοποιείται από το γονίδιο *Sad1*, ενώ έχει κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί ένα άλλο γονίδιο το *Sad2*, το οποίο κωδικοποιεί για μια μονοξυγενάση του κυτοχρώματος P450, είναι ορθόλογο του *AsCYP51H10* και ανήκει στην υποοικογένεια CYP51H των ενζύμων του κυτοχρώματος P450. Το εν λόγω ένζυμο θεωρούνταν ότι ήταν υπεύθυνο για την σύνθεση στερολών, αλλά αποδείχθηκε ότι έχει δευτερεύουσα σημασία στην διαδικασία αυτή και τελικά συμμετέχει ενεργά στην βιοσύνθεση σαπωνινών και ιδιαίτερα της αβενασίνης, η οποία προσδίδει αντίσταση απέναντι στα παθογόνα και αντιμικροβιακή δράση στην βρώμη [28].



Σχήμα 5: Η βιοσύνθεση στερολών και της αβενασίνης στη βρώμη [29]

Τα ένζυμα που ανήκουν στην ομάδα του κυτοχρώματος P450 παίζουν σημαντικό ρόλο στις οξειδωτικές αντιδράσεις της βιοσύνθεσης των τριτερπενοειδών

παρότι ο ρόλος του δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Η γλυκυριζίνη είναι ένα βιοενεργό συστατικό το οποίο προέρχεται κυρίως από τις ρίζες και τους βλαστούς του φυτού γλυκόριζα (*Glycyrrhiza glabra* και *Glycyrrhiza uralensis*, Fabaceae). Έχουν αναφερθεί διάφορες φαρμακευτικές ιδιότητες της γλυκυριζίνης όπως αντιφλεγμονώδεις, ανοσοποιητικές και αντιαλλεργικές ιδιότητες. Η γλυκυριζίνη είναι ένα τριτερπενοειδές που ανήκει στις γλυκοσυλιωμένες σαπωνίνες και συντίθεται από την β-αμυρίνη. Τα στάδια στη βιοσύνθεση της γλυκυριζίνης πιστεύεται ότι εμπλέκουν μια σειρά από οξειδωτικές αντιδράσεις (προσθήκη υδροξυλίου) στις θέσεις C-11 και C-30 της β-αμυρίνης, ακολουθούμενες από μία γλυκοσυλίωση στη 3 θέση του υδροξυλίου της β-αμυρίνης. Πρόσφατα έχει επιτυχώς ταυτοποιηθεί μία μονοξυγενάση της οικογένειας του κυτοχρώματος P450, ως ένα γονίδιο που εμπλέκεται στην βιοσύνθεση της γλυκυριζίνης. Το γονίδιο ονομάστηκε *CYP88D6* και φαίνεται ότι καταλύει δύο διαδοχικά βήματα στην οξείδωση της β-αμυρίνης. Τη μετατροπή της β-αμυρίνης σε 11-οξο-β-αμυρίνη μέσω ενός ενδιάμεσου προϊόντος της 11-υδροξυ-β-αμυρίνης, με τελικό προϊόν την γλυκυριζίνη μέσω γλυκοσυλίωσης. Το *CYP88D6* αποτελεί μια υποοικογένεια των ενζύμων *CYP88* τα οποία φαίνεται ότι παρουσιάζονται αποκλειστικά στα φυτά της οικογένειας Fabaceae[30].



Σχήμα 6: Προτεινόμενο μονοπάτι βιοσύνθεσης γλυκυριζίνης [30].

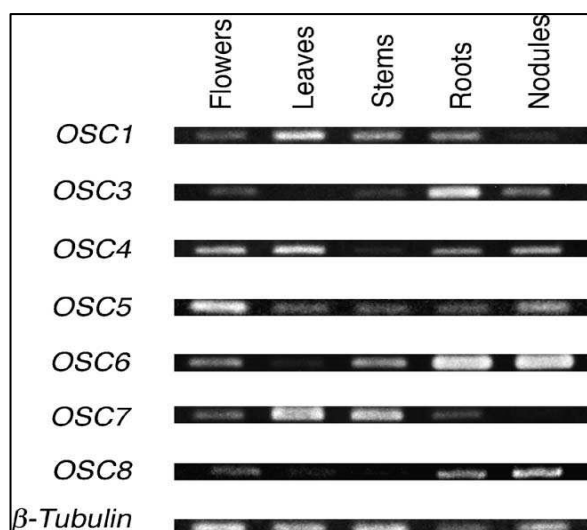
## 5. Lotus japonicus και OSCs.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, αποκαλύφθηκε ότι το φυτό *Arabidopsis thaliana* έχει 13 γονίδια θεωρούμενα ως OSCs μερικά από τα οποία έχουν



ταυτοποιηθεί λειτουργικά, ενώ στο φυτό *Lotus japonicus* έχουν αναγνωριστεί 8 OSCs, δύο εκ των οποίων, συμπεριλαμβανομένης και ενός από το *Medicago truncatula*, έχουν αναλυθεί και ταυτοποιηθεί. Οι OSCs που αναλύθηκαν περιλαμβάνουν την συνθάση της β-αμυρίνης από το *M. truncatula* (MtAMY1) και μια πολυλειτουργική OSC από το *L. japonicus* (LjAMY2) η οποία παράγει ένα μίγμα τριτερπενοειδών που αποτελείται από τη λουπεόλη και την β-αμυρίνη. Επίσης έχει παρατηρηθεί ένας επιμέρους cDNA κλώνος από το *L. Japonicus*, ο οποίος κωδικοποιεί για την συνθάση της β-αμυρίνης και έχει καθοριστεί ως *LjAMY1*, λόγω της μεγάλης ομολογίας με το *LjAMY2*[25]. Η λειτουργία και η δομή των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις OSCs στο *Lotus japonicus* έχουν αναλυθεί και συγκριθεί με αυτά από το *Arabidopsis thaliana* για να διευκρινιστεί η διαφοροποίηση των φυτικών τριτερπενοειδών αλκοολών. Οκτώ OSCs (*OSC1 – OSC8*) σχηματίζουν δύο ομάδες γονιδίων (clusters) στα χρωμοσώματα 2 και 3 στο *L.japonicus*. Οι OSC1 και OSC8 αντιστοιχούν στα προαναφερθέντα LjAMY1 και LjAMY2. Οι OSC1 (το πλήρες απομονωμένο γονίδιο του *LjAMY1*), OSC3 και OSC5 έχουν ταυτοποιηθεί ως συνθάση της β-αμυρίνης, συνθάση της λουπεόλης και συνθάση της κυκλοαρτενόλης αντίστοιχα, μέσω ετερόλογης έκφρασης των cDNA κλώνων σε μεταλλάγματα ζύμης[21].

Ανάλυση των OSCs γονιδίων μέσω της RT-PCR έδειξε ότι τα μεταγραφήματα τριών γονιδίων (*OSC1, OSC4 και OSC8*) τα οποία κωδικοποιούν για την συνθάση της β-αμυρίνης, είχαν υψηλή συγκέντρωση στα φύλλα, ενώ αντίθετα η *OSC3* που κωδικοποιεί για τη συνθάση της λουπεόλης είχε χαμηλή συγκέντρωση στα φύλλα και υψηλή στις ρίζες του *Lotus japonicus*. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τα τριτερπενοειδή εντοπίζονται σε συγκεκριμένους φυτικούς ιστούς (Σχήμα 7)[21].



Σχήμα 7: Ανάλυση RT-PCR η οποία δείχνει την συσσώρευση των OSCs στα όργανα του *Lotus japonicus*

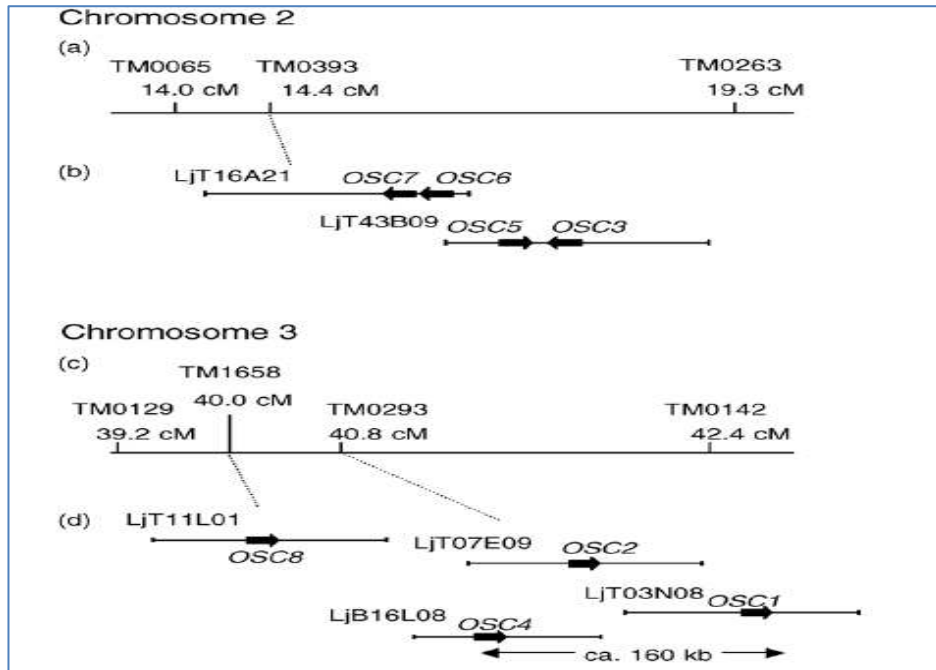
## 5.1. Οργάνωση των OSC γονιδίων στο *Lotus japonicus*

Όπως προαναφέρθηκε τα γονίδια των OSC στη βρώμη, το *Arabidopsis thaliana* και στο *Lotus japonicus* σχηματίζουν clusters, κάτι το οποίο δείχνει ότι έχουν δημιουργηθεί από επαναλαμβανόμενο τοπικό γονιδιακό διπλασιασμό (repeated local gene duplication) και ακολούθησε αλλαγή, εισαγωγή και διαγραφή νουκλεοτιδίων. Ειδικότερα στο *Lotus japonicus*, οκτώ OSC γονίδια σχηματίζουν δύο clusters στα χρωμοσώματα 2 και 3. Έχουν παρατηρηθεί και ταυτοποιηθεί διάφοροι γενομικοί κλώνοι οι οποίοι απεικονίζονται στον πίνακα 3.

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

Πίνακας 3: Ταυτοποιημένοι cDNA κλώνοι που κωδικοποιούν για τις OSCs στο *Lotus japonicus*[13]

Ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των παραπάνω κλώνων έδειξε ότι οι *LjB16L08*, *LjT07E09* και *LjT03N08* αποτελούν μια ομάδα γονιδίων και οι κλώνοι *OSC1*, *OSC2* και *OSC4* εντοπίζονται σε μια περιοχή 160 kb. Το *OSC2* αποκαλύφθηκε ότι είναι 1 kb μικρότερη από τα άλλες λειτουργικά *OSCs* και έχει έλλειψη έξι εξονίων, γι' αυτό ίσως να είναι ψευδογονίδιο. Η παραπάνω ομάδα γονιδίων εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του *LjB16L08* δεν έχει πλήρως ταυτοποιηθεί, με αποτέλεσμα η πλήρης αλληλουχία του γονιδίου *OSC4* να μην είναι ακόμη γνωστή. Ο γονιδιωματικός κλώνος *LjT43B09* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 2 και περιλαμβάνει τα γονίδια *OSC3*, *OSC5* και *OSC6*, παρότι το τελευταίο δεν έχει πλήρως ταυτοποιηθεί (σχήμα 8)[21].



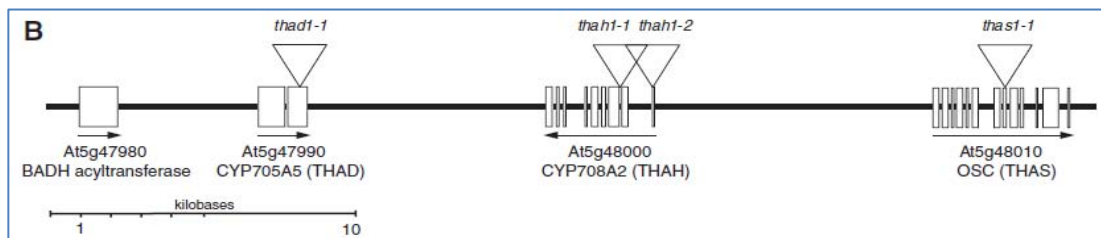
Σχήμα 8:  
Οργάνωση  
των OSCs στο  
*Lotus  
japonicus*.

## 6. Οργάνωση γονιδιακών συστοιχιών που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση τριτερπενοειδών

Τα οπερόνια είναι γονιδιακές συστοιχίες (clusters) τα οποία αποτελούνται από μη συσχετιζόμενα γονίδια τα οποία όμως έχουν σχετικές λειτουργίες. Αυτό το χαρακτηριστικό των προκαρυωτών έχει παρουσιαστεί και περιγραφεί στη βρώμη και το *Arabidopsis thaliana* όπου κάποια γονίδια συνεκφράζονται και αποτελούν μια τέτοια γονιδιακή συστοιχία όμοια με ένα οπερόνιο[18].

Στη βρώμη έχουν ταυτοποιηθεί εννιά γονιδιακοί τόποι (loci) δύο εκ των οποίων έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί όπως είδαμε παραπάνω (*Sad1*, *Sad2*). Τα δύο γονίδια αυτά κωδικοποιούν για την συνθάση της β-αμυρίνης και για μια μονοξυγενάση του κυτοχρώματος P450. Αυτά τα δύο γονίδια μαζί με άλλα πέντε οργανώνονται σε μια γονιδιακή συστοιχία (cluster) στο γονιδίωμα της βρώμης. Επίσης στο cluster εντοπίζονται ακυλοτρανσφεράσες και γλυκοσυλιωτρανσφεράσες οι οποίες εμπλέκονται στην περαιτέρω μετατροπή της αβενασίνης. Η αβενασίνη A-1 συντίθεται και συσσωρεύεται στα επιδερμικά κύτταρα των ριζών της βρώμης. Η έκφραση των *Sad1* και *Sad2* πραγματοποιείται κυρίως σε αυτά τα κύτταρα και υπόκειται σε αναπτυξιακό έλεγχο. Η σωστή γλυκοσυλίωση της αβενασίνης είναι

σημαντική για την αντιμικροβιακή δραστηριότητα. Αφαίρεση ενός μορίου γλυκόζης από την γλυκοσυλιωμένη αβενασίνη μειώνει την τοξικότητα της. Κάποιοι μύκητες του εδάφους παράγουν υδρολάσες της γλυκόζης οι οποίες αποτοξικοποιούν την αβενασίνη αφαιρώντας ένα ή περισσότερα μόρια γλυκόζης. Στα φυτά η προσθήκη γλυκόζης στις τριτερπενοειδείς αλκοόλες συμβαίνει στο τέλος του βιοσυνθετικού μονοπατιού και είναι σημαντική για την σταθερότητα των προϊόντων. Μεταλλάγματα των γονιδίων *Sad3* και *Sad4* είναι υπεύθυνα για τη μείωση στην ριζική ανάπτυξη και επηρεάζονται στην ικανότητα τους να γλυκοσυλιώνουν την αβενασίνη, ενώ συσσωρεύεται ένα ενδιάμεσο προϊόν (αβενασίνη με έλλειψη της β-1,4-γλυκόζης). Αυτά τα μεταλλάγματα εντοπίζονται στα επιδερμικά κύτταρα των ριζών και καταστέλλονται από μεταλλάξεις του *Sad1*, του γονιδίου που κωδικοποιεί για την συνθάση της β-αμυρίνης. Έτσι φαίνεται ότι η συσσώρευση της μονογλυκοσυλιωμένης αβενασίνης A-1 είναι η αιτία και όχι το αποτέλεσμα των παρατηρούμενων ελαττωμάτων στη ρίζα. Το γονίδιο *Sad3* ανήκει στη γονιδιακή συστοιχία που αναφέρθηκε παραπάνω και έχει συγκεκριμένο ρόλο στη βιοσύνθεση της αβενασίνης, ενώ το γονίδιο *Sad4* δεν είναι συνδεδεμένο στην συστοιχία αυτή και έχει ένα πιο διευρυμένο λειτουργικό ρόλο[29].

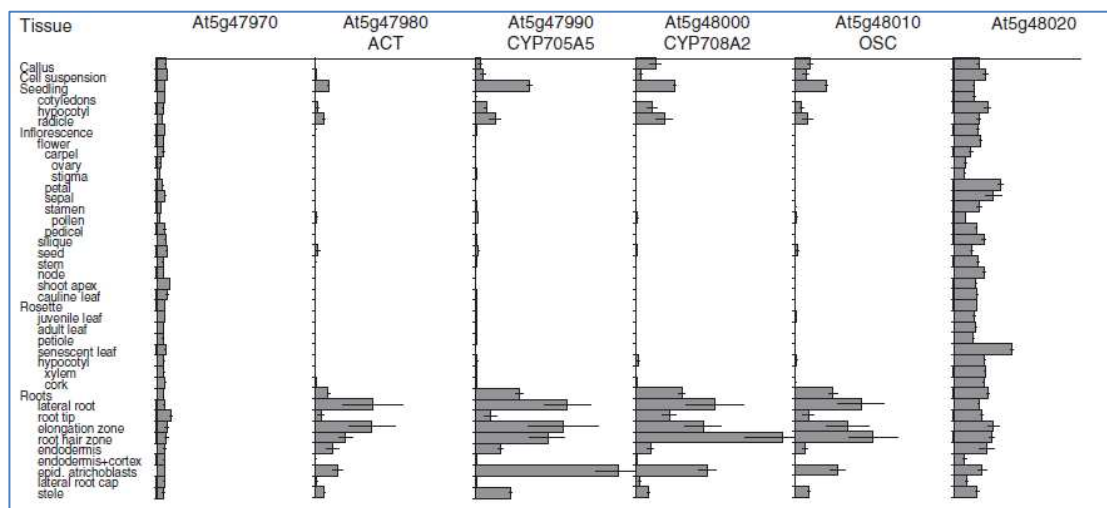


Σχήμα 9: χάρτης της γονιδιακής συστοιχίας που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών στο *Arabidopsis thaliana*.

Στο *Arabidopsis thaliana* έχουν ταυτοποιηθεί 13 γονίδια που κωδικοποιούν για κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου (OSCs). Η γενωμική περιοχή γύρω από αυτά τα γονίδια εξετάστηκε για την πιθανότητα τα γονίδια που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών να οργανώνονται σε cluster. Παρατηρήθηκε ότι εκατέρωθεν τεσσάρων από τα παραπάνω γονίδια βρίσκονται γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για διαφορετικούς τύπους ενζύμων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών και γενικότερα στο δευτερογενή μεταβολισμό. Οι παρατηρήσεις επικεντρώθηκαν σε μια γονιδιωματική περιοχή η οποία περιέχει τέσσερα συνεχόμενα γονίδια εισάγοντας T-DNA. Τα γονίδια αυτά, τα οποία παρουσιάζουν μια σημαντική ομολογία μεταξύ τους, κωδικοποιούν για μια OSC (*At5g48010*), δυο P450s

(*At5g48000* και *At5g47990*) και μια ακυλοτρανσφεράση (ACT) (*At5g47980*) (σχήμα 9).

Η έκφραση των τεσσάρων γονιδίων συσχετίζεται σημαντικά και λαμβάνει χώρα κυρίως στα επιδερμικά κύτταρα της ρίζας. Αυτό σημαίνει ότι τα γονίδια αυτά συσχετίζονται λειτουργικά και ανήκουν σε μια γονιδιακή συστοιχία (σχήμα 10).



Σχήμα 10: προφίλ της έκφρασης των γονιδίων του σχήματος 9.

Η κυκλάση του οξειδοσκουαλενίου που εντοπίζεται στην περιοχή αυτή μετατρέπει το 2,3 οξειδοσκουαλένιο στο τριτερπενοειδές θαλιανόλη (thalianol) όταν εκφράζεται σε ζύμες και αναφέρεται ως συνθάση της θαλιανόλης. Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* έχουν ανιχνευθεί χαμηλά επίπεδα της θαλιανόλης στις ρίζες αλλά όχι στα φύλλα. Παρόλα αυτά υπερέκφραση της συνθάσης της θαλιανόλης είχε ως αποτέλεσμα συσσώρευση της θαλιανόλης στα φύλλα του *Arabidopsis*. Τα δύο γονίδια που κωδικοποιούν για τις P450s ανήκουν στις μη χαρακτηρισμένες λειτουργικά οικογένειες CYP708 και CYP705 αντίστοιχα που εντοπίζονται κυρίως στα φυτά της οικογένειας Brassicaceae[31].

Είναι γνωστό ότι η μετατροπή των απλών τριτερπενοειδών όπως η β-αμυρίνη, η λουπεόλη, η αβενασίνη και η θαλιανόλη, σε πιο περίπλοκες δομές απαιτεί και περιλαμβάνει διάφορα ένζυμα όπως μονοξυγενάσες και διοξυγενάσες του κυτοχρώματος P450, ακυλομεταφοράσες, γλυκοσυλιομεταφοράσες κ.α. Έχει ήδη εντοπιστεί μια τουλάχιστον γονιδιακή συστοιχία στο γονιδίωμα του φυτού *Lotus japonicus* η οποία περιλαμβάνει μια OSC (συνθάση της β-αμυρίνης, AMY2) και γονίδια που κωδικοποιούν για πιθανές μονοξυγενάσες/υδροξυλάσες του κυτοχρώματος P450, η P450-71 και η P450-88. Τα τρία αυτά γονίδια εντοπίζονται

στο χρωμόσωμα 3 του φυτού *Lotus japonicus* και ειδικότερα στο τμήμα (d) του σχήματος 8 (Κροκιά, Δελής, Παπαδοπούλου, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα).

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να μελετηθεί η ρύθμιση των γονιδίων αυτών και να διερευνηθεί η περίπτωση να υπάρχει συν-ρύθμιση όλων των γονιδίων που οργανώνονται σε συστοιχία. Για το σκοπό αυτό, με τη χρήση της PCR πραγματικού χρόνου θα προσδιοριστούν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σε διάφορους ιστούς του *Lotus japonicus* σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Επίσης θα μελετηθεί το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων σε φυτά τα οποία έχουν εμβολιαστεί με κατάλληλο στέλεχος ριζοβίου.

# **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 1. Το ψυχανθές *Lotus japonicus* ως φυτικό μοντέλο

Ως φυτικό υλικό για τη διεξαγωγή των πειραμάτων που αφορούν στη μελέτη του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη συνθάση της β- αμυρίνης (AMY2), καθώς και δύο γονιδίων του κυτοχρώματος P450, των P450-71 και P450-88, χρησιμοποιήθηκε το ψυχανθές *Lotus japonicus* (οικότυπος Gifu). Για την μέτρηση της έκφρασης των γονιδίων αυτών απομονώθηκε ολικό RNA από φυμάτια ηλικίας 14 και 28 ημερών μολυσμένων φυτών καθώς και ρίζες και φύλλα ηλικίας 7, 14 και 28 ημερών από μη μολυσμένα και μολυσμένα φυτά. Για την τεχνική του *in situ* υβριδισμού χρησιμοποιήθηκαν φυμάτια από φυτά ηλικίας 7, 14 και 28 ημερών.

### 1.1. Προετοιμασία των σπόρων

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

### 1.2. Καλλιέργεια ριζοβίων και μόλυνση φυτών

Για τη μόλυνση των φυτών χρησιμοποιείται το ριζόβιο βακτήριο *Mesorhizobium loti* στέλεχος R7A. Τα ριζόβια αναπτύσσονται σε τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό υλικό YM + 1,5% Agar. Η επώαση των καλλιιεργειών πραγματοποιείται στους 30°C για 72 ώρες. Η μόλυνση των φυτών γίνεται αμέσως μετά την προβλάστηση των σπερμάτων, κατά τη διαδικασία της φύτευσης, με την



προσθήκη 500 μl καλλιέργειας ριζοβίου σε θρεπτικό διάλυμα YM (OD : 0,1) σε κάθε ριζίδιο από τα προβλαστημένα φυτά.

» YM : σε 1 lt dH<sub>2</sub>O προστίθενται 10 gr Mannitol, 0,5 gr K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 gr MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,1 gr NaCl και 0,5 gr Yeast extract. Για την παρασκευή τρυβλίων προστίθενται 15 gr Agar.

### 1.3. Συνθήκες ανάπτυξης και καλλιέργειας του *Lotus japonicus*

Για την ανάπτυξή τους, τα νεαρά έμφυτα μεταφέρονται σε δοχεία που περιέχουν αποστειρωμένο περλίτη και βερμικουλίτη σε αναλογία 1:1 και ποτίζονται με θρεπτικό διάλυμα Hoagland. Στην περίπτωση που τα φυτά έχουν μολυνθεί με ριζόβια, χρησιμοποιείται θρεπτικό διάλυμα Hoagland χωρίς άζωτο. Τα φυτά τοποθετούνται σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 26°C, φωτοπερίοδος 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι).

» Hoagland 100% (σε 1 lt H<sub>2</sub>O): 2 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>, 1 ml 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 ml 0.1 M FeEDTA, 10 ml CaCl<sub>2</sub> 0.5 M, 5 ml KCl 1 M, 5 ml 1M KNO<sub>3</sub>, 5 ml 1M Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1ml διαλύματος ιχνοστοιχείων.

» Διάλυμα ιχνοστοιχείων (σε 1 lt H<sub>2</sub>O): αναμιγνύονται 2.86 gr H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1,81 gr MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,11 gr ZnCl<sub>2</sub>, 0,05 gr CuCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, 0,02 gr H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.

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

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

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

## 2.1. Χειρισμός του ολικού RNA με DNάση.

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

- Σε 25,5 μl ολικού RNA που απομονώθηκε με την προηγούμενη διαδικασία προστίθεται:
  - 3 μl 10X ρυθμιστικό διάλυμα DNάσης.
  - 0,5 μl αναστολέα RNase.
  - 1 μl DNάση ελεύθερης από RNάσες (1U / μg RNA).
- Ο τελικός όγκος είναι 30 μl και ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 20 λεπτά.
- Προστίθενται 3 όγκοι αρχικού διαλύματος ddH<sub>2</sub>O (90 μl) και 4 όγκοι αρχικού διαλύματος φαινόλη (120 μl). Το μίγμα αναδεύεται σε μηχανικό αναδευτήρα και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 5 λεπτά.

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

## 2.2. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων

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

- Σε ειδική κυβέττα χαλαζία, που περιείχε 49 μl dH<sub>2</sub>O, τοποθετήθηκαν 1 μl δείγματος και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του διαλύματος σε μήκος κύματος 260nm.
- Η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων, χωρίς την παρουσία άλλων προσμίξεων, όπως πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, δίνεται από τον τύπο :

$$C = O.D._{260} * D * \text{συντελεστής αραιώσης},$$

όπου O.D. είναι η απορρόφηση του δείγματος στα 260nm και D είναι η σταθερά που εξαρτάται από το είδος του νουκλεϊνικού οξέος. Σε καθαρά διαλύματα DNA η σταθερά

D ισούται με 50 mg/ml, σε διαλύματα RNA ισούται με 40 mg/ml, ενώ στην περίπτωση ολιγονουκλεοτιδίων ισούται με 30 mg/ml.

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

### 3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

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

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

Κάθε κύκλος περιλαμβάνει :

- Θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (93 – 95°C) ώστε να αποδιαταχθεί το DNA (denaturation step) και από δίκλωνο μετατρέπεται σε μονόκλωνο.
- Θερμοκρασία υβριδισμού (annealing step), προκειμένου οι εκκινητές να υβριδίσουν με το DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από το μήκος του εκκινητή και την περιεκτικότητά του σε G και C. Ένας τρόπος υπολογισμού της θερμοκρασίας του εκκινητή είναι μέσω του τύπου  $T_m =$

$2(A+T) + 4(C+G)$ . Η θερμοκρασία του υβριδισμού είναι τελικά 5°C κάτω από τον μέσο όρο των τιμών  $T_m$  των δύο εκκινητών της αντίδρασης.

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

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

### 3.1. PCR για τον έλεγχο ύπαρξης γονιδιωματικού DNA

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

- Σε σωλήνα erppendorf προστίθενται τα παρακάτω σε τελικό όγκο 20μl.

- 15,42 μl ddH<sub>2</sub>O
- 2 μl 10X ρυθμιστικό διάλυμα Kapa Taq
- 0,4 μl μίγμα dNTPs
- 0,5 μl ολικό RNA
- 0,8 μl εκκινητής έμπροσθεν
- 0,8 μl εκκινητής ανάστροφος
- 0,08 μl DNA πολυμεράση kapa Taq (1 Unit/μl)

- Το μίγμα αναμιγνύεται με γρήγορη φυγοκέντρηση και τοποθετείται στη συσκευή PCR, προκειμένου να εκτελεστεί το παρακάτω πρόγραμμα:

	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αρ. κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	3 λεπτά	1
Αποδιάταξη αλυσίδων DNA	95 °C	30 δευτερόλεπτα	35
Υβριδισμός εκκινητών		1 λεπτό	35
Σύνθεση νέων αλυσίδων DNA	72 °C	2 λεπτό	35
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 λεπτά	1

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

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

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

- 10X ρυθμιστικό διάλυμα PCR:
- Μετά το τέλος της διαδικασίας το προϊόν της PCR αναλύεται σε πηκτή αγαρόζης.

### 3.2. RT-PCR

Στην PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) ως αρχικό δείγμα χρησιμοποιείται το ολικό RNA το οποίο μετατρέπεται σε cDNA παρουσία του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase). Για τη μεταγραφή αυτή χρησιμοποιούνται τυχαία εξαμερή ή εννεαμερή ολιγοdTs και το cDNA που θα παραχθεί θα χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο για την DNA πολυμεράση στη συνήθη τεχνική της PCR. Εξελίξεις στην RT-PCR περιλαμβάνουν την ανάπτυξη απλών πρωτοκόλλων στα οποία η σύνθεση cDNA και η αντίδραση PCR εκτελούνται σε ένα στάδιο (one step RT-PCR). Τα πρωτόκολλα αυτά βασίζονται στην αξιοποίηση της

διπλής ιδιότητας ορισμένων θερμοσταθερών DNA πολυμερασών όπως η T. Thermophilus (Tth) DNA πολυμεράση να μεταγράψουν αντίστροφα RNA παρουσία  $Mn^{2+}$ , ενώ ταυτόχρονα δρουν και ως DNA πολυμεράσες.

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

- Αρχικά σε σωλήνα erpendorf τοποθετούνται τα παρακάτω συστατικά
  - 1 ng – 5 mg ολικού RNA
  - 1 μl oligo(dT)<sub>15</sub> primer (0,5 mg / αντίδραση)
  - δις απεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O) μέχρι τελικό όγκο 5 μl.
- Το παραπάνω μίγμα φυγοκεντρείται γρήγορα και θερμαίνεται στους 70 °C για πέντε λεπτά.
- Τοποθετείται αμέσως στον πάγο για 5 λεπτά, φυγοκεντρείται γρήγορα και διατηρείται στον πάγο μέχρι να ετοιμαστεί το επόμενο μίγμα.
  - ✓ Σε δεύτερο σωλήνα erpendorf δημιουργείται το μίγμα της αντίδρασης με την αντίστροφη μεταγραφάση το οποίο περιέχει τα παρακάτω συστατικά
    - ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 15 μl
    - 4 μl ImProm-II™ 5X Reaction Buffer
    - 0,5 μl MgCl<sub>2</sub> (final concentration 1.5–8.0mM)
    - 1 μl dNTPs Mix (final concentration 0.5mM each dNTP)
    - 1 μl αναστολέας RNάσης (20 units)
    - 1 μl ImProm-II™ αντίστροφη μεταγραφάση
  - ✓ Το παραπάνω μίγμα φυγοκεντρείται γρήγορα και προστίθεται στο πρώτο σωλήνα erpendorf ο οποίος περιέχει το αρχικό δείγμα. Έτσι προκύπτει τελικός όγκος 20 μl.
- Το τελικό διάλυμα τοποθετείται στην συσκευή PCR όπου πραγματοποιούνται τα παρακάτω στάδια:

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

#### 4. PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR)

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

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

##### 4.1. Επιλογή των εκκινητών

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



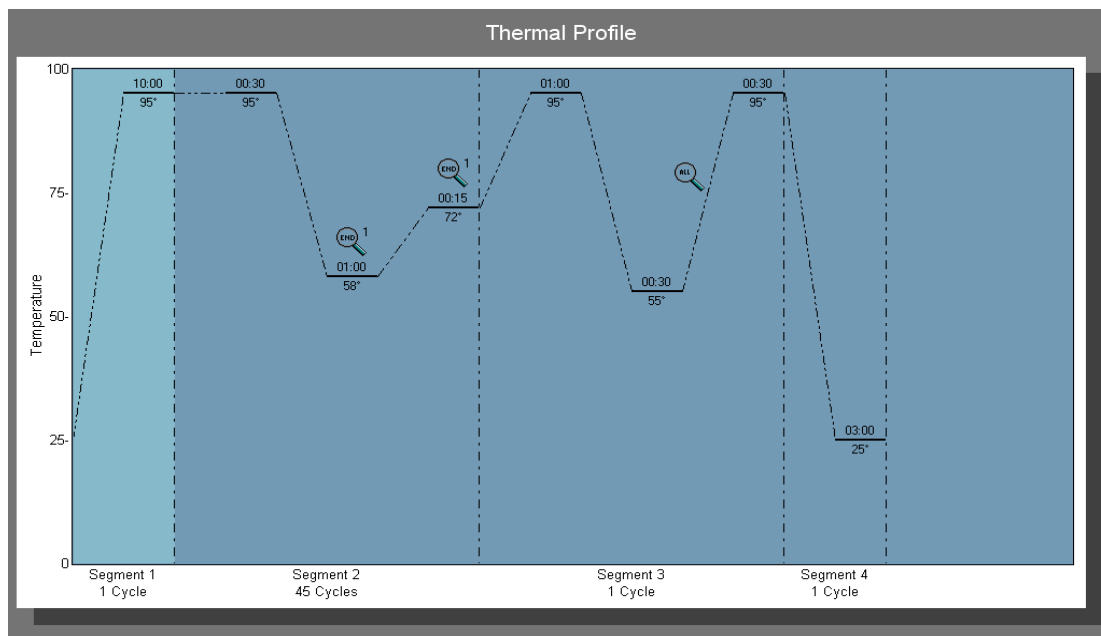
Η επιλογή των εκκινητών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εξειδικευμένου προγράμματος επιλογής εκκινητών Beacon designer v7.0. Το μέγεθος των ενισχυόμενων τμημάτων ήταν περίπου 100 ζεύγη βάσεων. Οι εκκινητές επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός ομοδιμερών ή ετεροδιμερών. Η δημιουργία ομο- και ετερο-διμερών από τους εκκινητές έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή μη εξειδικευμένου φθορισμού κατά την αντίδραση της PCR πραγματικού χρόνου.

Οι εκκινητές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

<b>Σύμβολο εκκινητή</b>	<b>Νουκλεοτιδική αλληλουχία εκκινητή</b>
RtUbi, forward	5'-TTC ACC TTG TGC TCC GTC TTC-3'
RtUbi, reverse	5'AAC AAC AGC ACA CAC AGC CAA TCC-3'
RtAMY2, forward	5'-GCA GTT TAA CTT GTA AAG ATA GC-3'
RtAMY2, reverse	5'-GGC AAC AAA CCG ACA CTA AAT AC-3'
RtP450-88, forward	5'-TAG TGT TCT GGA AGT CAA TGA TG-3'
RtP450-88, reverse	5'-AGA TGT GTG GGT GTT GTG TAA G-3'
RtP450-71, forward	5'-ACA TTA AAG CCG TTC TTC AGG AC-3'
RtP450-71, reverse	5'-CCT CAA CAT ACC CTC TGC TAC C-3'

## 4.2. Αντίδραση της real time PCR

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Mx3005P (Stratagene). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στην εικόνα 1.



Εικόνα 1. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα της πραγματικού χρόνου αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης.

Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με το ίδιο θερμοκρασιακό πρόγραμμα και καταγράφονταν για 45 κύκλους. Στο τέλος κάθε αντίδρασης ακολουθούσε η παρακολούθηση της καμπύλης αποδιάταξης βάση της οποίας επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη ενός μόνο προϊόντος στην κάθε αντίδρασης.

Σε όλες τις περιπτώσεις το μίγμα της αντίδρασης προετοιμάζονταν σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας (Stratagene), ενώ στην τελική αντίδραση χρησιμοποιήθηκε η χρωστική αναφοράς ROX.

Μετά το τέλος των αντιδράσεων τα δεδομένα εξάχθηκαν με τη μορφή πινάκων και επεξεργάζονταν με τη χρήση του προγράμματος LinRegPCR προκειμένου να προσδιοριστούν η αποτελεσματικότητα των εκκινήτων (efficiency) της κάθε αντίδρασης αλλά και ο αριθμός των κύκλων ορίου (Ct), ο οποίος αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης πάνω από τους οποίους είναι δυνατή η ανίχνευση φθορισμού.

Για κάθε μία από τις βιολογικές επαναλήψεις πραγματοποιήθηκαν τρεις τεχνικές επαναλήψεις. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

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

- 10 μl 2X buffer
- 0,8μl εκκινητής έμπροσθεν
- 0,8μl εκκινητής ανάστροφος
- 1 μl cDNA (αραιωμένο 1:10)
- 0,4 μl χρωστική αναφοράς ROX
- 7μl ddH<sub>2</sub>O

Παρακολουθώντας την έκφραση του γονιδίου της ουμπικουΐτινης σε κάθε δείγμα βλέπουμε την πυκνότητα του cDNA που πήραμε από κάθε ιστό και κάνοντας τις κατάλληλες αραιώσεις ισοσκελίζουμε τις συγκεντρώσεις cDNA από κάθε δείγμα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η PCR πραγματικού χρόνου για κάθε γονίδιο (AMY2, P450-88, P450-71), για να διαπιστωθεί η έκφραση του σε κάθε ιστό και σε κάθε ηλικία του φυτού.

## **5. *In situ* RNA – RNA υβριδισμός**

Για τη μελέτη της χωροταξικής και χρονικής ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του *in situ* RNA-RNA υβριδισμού σε λεπτές τομές φυτικών ιστών (φυμάτια).

### **5.1. Μονιμοποίηση ιστών**

- Οι φυτικοί ιστοί, οι οποίοι βρίσκονται στο κατάλληλο στάδιο ανάπτυξης, συλλέχθηκαν προσεκτικά και τοποθετήθηκαν σε διάλυμα μονιμοποίησης.

- Οι ιστοί παρέμειναν στο διάλυμα μονιμοποίησης για 1 h σε υποπίεση, ώστε να απομακρυνθεί ο αέρας που βρίσκεται παγιδευμένος μέσα στον ιστό και να αντικατασταθεί με το διάλυμα μονιμοποίησης.
- Το διάλυμα μονιμοποίησης αντικαταστάθηκε με νέο, στο οποίο οι ιστοί παραμένουν για 3 h σε θερμοκρασία δωματίου ή εναλλακτικά για 12 h στους 4°C.
- Μετά το πέρας της μονιμοποίησης, οι ιστοί ξεπλύθηκαν με εμβάπτισή τους για 20 min σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα μονιμοποίησης.
- Ακολουθούσε αφυδάτωση των ιστών με εμβάπτισή τους σε σειρά διαλυμάτων αλκοόλης αυξανόμενης συγκεντρώσεως (10%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%), για 20 min στο κάθε διάλυμα.
- Κατά τη διαδικασία της αφυδάτωσης μπορεί να γίνει η χρώση των ιστών, όταν αυτοί βρίσκονται στο διάλυμα 50% αλκοόλης, με την προσθήκη 5% (w/v) σαφρανίνης. Στην περίπτωση της χρώσης, οι ιστοί παρέμειναν εντός της χρωστικής για 3 h σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τέλος, οι ιστοί εμβαπτίστηκαν τρεις φορές σε διάλυμα 100% αλκοόλης για 1 h.
  - Διάλυμα μονιμοποίησης 12% παραφορμαλδεΰδης (w/v), 1% γλουταραλδεΰδης (v/v), 10% ρυθμιστικού διαλύματος μονιμοποίησης.
  - 10X ρυθμιστικό διάλυμα μονιμοποίησης: 100 mM NaHPO<sub>4</sub>, pH 6,8, 1M NaCl.

## 5.2. Διαφανοποίηση των ιστών

- Το διάλυμα 100% αιθανόλης του προηγούμενου σταδίου της μονιμοποίησης, αντικαταστάθηκε με διάλυμα 25% ξυλενίου (σε 100% αιθανόλη), όπου και οι ιστοί παραμένουν για 1 h.
- Ακολουθούσαν αλλαγές του διαλύματος με 50%, 75% και 100% ξυλένιο για 1 h.
- Εμβάπτισή σε 100% ξυλένιο για 1 h επαναλαμβάνεται επιπλέον 3 φορές.

### 5.3. Εγκλεισμός ιστών σε παραφίνη

- Στα φιαλίδια που περιέχουν τους φυτικούς ιστούς εντός 100% ξυλενίου, προστίθονταν σταδιακά κομμάτια παραφίνης, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά τον κορεσμό του ξυλενίου, η διαδικασία συνεχίστηκε στους 42oC, μέχρι να επέλθει εκ νέου κορεσμός του ξυλενίου με παραφίνη.
- Το μίγμα ξυλενίου-παραφίνης απομακρύνθηκε γρήγορα και αντικαταστάθηκε με λιωμένη και φιλτραρισμένη παραφίνη στους 61oC.
- Οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο θερμοκρασίας 61oC, όπου η παραφίνη αντικαταστάθηκε με νέα, ενώ η διαδικασία επαναλαμβάνονταν τρεις φορές την ημέρα τουλάχιστον. Σε κάθε περίπτωση, η θερμοκρασία του θαλάμου δε θα πρέπει να υπερβεί τους 62oC, ώστε να μην αλλοιωθεί η δομή της παραφίνης.
- Η διάρκεια της συγκεκριμένης διαδικασίας εξαρτιόταν από το είδος και το μέγεθος του φυτικού τμήματος. Στην περίπτωση των ιστών που χρησιμοποιήθηκαν αρκούν 7-8 ημέρες.
- Μετά το πέρας της παραπάνω διαδικασίας, η παραφίνη με τους ιστούς μεταφέρθηκε σε προθερμασμένα ειδικά μεταλλικά εκμαγεία, τα οποία περιείχαν λιωμένη παραφίνη στους 61oC.
- Οι ιστοί προσανατολίστηκαν κατά το δυνατό, εντός της παραφίνης με τη βοήθεια προθερμασμένης βελόνας και τα εκμαγεία μεταφέρθηκαν προσεκτικά σε κρύα επιφάνεια, όπου αφέθηκαν μέχρι να στερεοποιηθεί πλήρως η παραφίνη.
- Οι εγκλεισμένοι ιστοί μπορούν να φυλαχτούν στους 4oC για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα, μέχρι τη λήψη των τομών.

### 5.4. Καθαρισμός και προετοιμασία των αντικειμενοφόρων

- Οι αντικειμενοφόροι τοποθετήθηκαν σε γυάλινα δοχεία χρώσεως και πλένονται σχολαστικά με απορρυπαντικό για 4 h τουλάχιστον.
- Ακολούθως, ξεπλένονται καλά με άφθονο νερό για 2 h και εμβαπτίστηκαν σε 10% v/v διάλυμα υδροχλωρικού οξέως (HCl).

- Το υδροχλωρικό οξύ ξεπλύθηκε καλά με απιονισμένο νερό και οι αντικειμενοφόροι αποστειρώθηκαν.
- Πριν στεγνώσουν από την αποστείρωση, οι αντικειμενοφόροι εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα πολυ-L-λυσίνης για τουλάχιστον 10 min.
- Η περίσσεια του διαλύματος απομακρύνθηκε και οι αντικειμενοφόροι αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου.
- Οι αντικειμενοφόροι φυλάσσονταν στους -20°C μέχρι τη χρήση τους, μέσα σε καλά σφραγισμένα κουτιά, ώστε να αποφευχθεί η είσοδος υγρασίας.
- Διάλυμα πολύ-L-λυσίνης: 100 μg/ml πολύ-L-λυσίνη (Sigma) σε διάλυμα 10 mM Tris-HCl pH 8,0.

### 5.5. Λήψη τομών και τοποθέτηση στις αντικειμενοφόρους

- Οι λεπτές τομές των ιστών (10 μm) πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια μικροτόμου (LEICA Jung RM2025), ο οποίος έφερε μεταλλικό μαχαίρι μιας χρήσης.
- Οι κατάλληλες τομές επιλέχθηκαν στο στερεοσκόπιο και μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρους στους 42°C. Πάνω στις αντικειμενοφόρους είχαν προηγουμένως τοποθετηθεί μερικές σταγόνες αποστειρωμένου νερού, ώστε να διευκολυνθεί η σωστή τοποθέτηση της τομής.
- Η περίσσεια του νερού απομακρύνθηκε και οι τομές αφήνονται στους 42°C για τουλάχιστον 14 h.

### 5.6. Προετοιμασία του Σημασμένου RNA Ανιχνευτή

Για την πραγματοποίηση του *in situ* υβριδισμού, προετοιμάζονται δύο μη ραδιενεργά σημασμένοι ανιχνευτές. Ο πρώτος αποτελεί μη ραδιενεργά σημασμένο αντιπληροφοριακό RNA και χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό της έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου ενώ ο δεύτερος αποτελεί μη ραδιενεργά σημασμένο πληροφοριακό RNA και χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό μη εξειδικευμένου σήματος υπόβαθρου. Και στις δύο περιπτώσεις το RNA προέρχεται από *in vitro*

μεταγραφή ένθετου DNA και η μη ραδιενεργός σήμανσή του γίνεται με χρήση DIG-11-dUTP σημασμένων νουκλεοτιδίων (Boheringer).

### 5.6.1. Πέψη πλασμιδιακού φορέα

Για την *in vitro* μεταγραφή του ένθετου DNA, ο πλασμιδιακός φορέας μετατρέπεται σε γραμμικό δίκλωνο μόριο, με τη χρήση κατάλληλου ένζυμου περιορισμού και καθαρίζεται με φαινόλη. Προκειμένου να παραχθεί αντιπληροφοριακό RNA, η πέψη πραγματοποιείται από την πλευρά του 5' άκρου του ένθετου DNA ενώ για την παραγωγή πληροφοριακού RNA, η πέψη πραγματοποιείται από την πλευρά του 3' άκρου του ένθετου DNA. Η τελική συγκέντρωση του γραμμικού μορίου σε κάθε περίπτωση καθορίζεται στα 0,2 ng/μl.

### 5.6.2. *In vitro* μεταγραφή σημασμένου RNA

Σε κάθε πείραμα *in situ* υβριδισμού προετοιμάσθηκε πληροφοριακό και αντιπληροφοριακό σημασμένο RNA. Το πρώτο χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση υβριδισμού, ώστε να εντοπιστεί τυχόν μη εξειδικευμένο σήμα υποβάθρου (θόρυβος εικόνας). Η μεταγραφή των δύο τύπων RNA καθορίστηκε από την πέψη του πλασμιδίου, όπως αναφέρθηκε ήδη, αλλά και από την επιλογή της κατάλληλης RNA πολυμεράσης. Η σήμανση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση DIG-11-dUTP σημασμένων νουκλεοτιδίων. Μια τυπική αντίδραση *in vitro* μεταγραφής πραγματοποιείται ως εξής:

- Σε σωλήνα erppendorf προστέθηκαν τα συστατικά:
  - Γραμμικό πλασμιδιακό DNA 11 μl (1-2 μg).
  - 10X σημασμένα NTPs 2 μl.
  - 5X ρυθμιστικό διάλυμα RNA πολυμεράσης 4μl.
  - RNasin TM (40u/μl) 1μl.
  - T3 ή T7 RNA ή SP6 πολυμεράση (20u/μl) 2μl.
- Το μίγμα επώαστηκε στους 37oC για 2 h.

- Για την απομάκρυνση του DNA προστέθηκε 2 μl DNάση (2 u/μl) και η επώαση στους 37°C συνεχίστηκε για 10 min.
- Η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη 2 μl διαλύματος 0,2M EDTA pH:8,0 και το σημασμένο RNA κατακρημνίστηκε με την προσθήκη 2,5μl 4M LiCl και 75μl αιθανόλης.
- Ακολουούσε επώαση στους -20°C για τουλάχιστον 2 h και το RNA συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm. για 15 min, στους 4°C.
- Το ίζημα ξεπλύθηκε με 70% v/v αιθανόλη και επαναδιαλύθηκε σε 100μl dH<sub>2</sub>O.
- Η συγκέντρωση του RNA προσδιορίστηκε φωτομετρικά ενώ η ποιότητα του ελέγχεται με ανάλυση δείγματος σε πηκτή αγαρόζης.

### 5.6.3. Υδρόλυση του σημασμένου RNA

- Για την καλύτερη διείδυση του RNA ανιχνευτή στο φυτικό ιστό, δημιουργείται ένα μίγμα μορίων μέσου μήκους 150 βάσεων, με προσθήκη στο RNA ίσου όγκου διαλύματος 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>. Ο χρόνος επώασης t (σε λεπτά) υπολογίζεται από τον τύπο:  $t = (L_i - L_f) / k * L_i * L_f$ , όπου L<sub>i</sub> το αρχικό μήκος του RNA σε kb, L<sub>f</sub> το επιθυμητό μήκος του RNA μετά την υδρόλυση (0,15 kb) και k σταθερά (0,11 kb\*λεπτό).
- Η υδρόλυση σταματά με προσθήκη 2 μl 5% οξικού οξέος. Το υδρολυμένο RNA κατακρημνίζεται με προσθήκη 2,5 μl 3 M οξικού νατρίου, διπλάσιου όγκου αιθανόλης και 1 μl γλυκογόνου (1 μg/μl) (Boehringer). Ακολουθεί επώαση στους -20°C για 14 ώρες και φυγοκέντρηση σε 13.000 σ.α.λ. για 15 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα dH<sub>2</sub>O.



#### 5.6.4. Προετοιμασία διαλύματος υβριδισμού

- Για την προετοιμασία του διαλύματος υβριδισμού, αρκετού για την επικάλυψη των τομών μίας αντικειμενοφόρου, σε 8 μl σημασμένου και υδρολυμένου RNA (0,1-0,5 μgr) προστίθενται 2 μl σημασμένου και μη υδρολυμένου RNA (συνολική ποσότητα 0,1-0,5 μgr) και 10 μl απιονισμένου φορμαμίδιου. Το μίγμα επωάζεται στους 68<sup>ο</sup> C για 10 λεπτά και αμέσως μετά μεταφέρεται στον πάγο.
- Προστίθενται 80 μl διαλύματος υβριδισμού, το οποίο αποτελείται από:
  - απιονισμένο φορμαμίδιο 40 μl
  - 5 M NaCl 6 μl
  - 50X Denhardt's 2 μl
  - 100X TE pH 7,5 1 μl
  - 1M DTT 7 μl
  - 50% Dextran sulphate 20 μl
  - dH<sub>2</sub>O 4 μl
- III. Το διάλυμα επωάζεται στους 60<sup>ο</sup> C για 3 λεπτά και αφού αναμιχθεί καλά χρησιμοποιείται απευθείας για τον υβριδισμό.
- ❖ διάλυμα 50X Denhardt's: 1% Ficoll (BDH), 1% Polyvinylpyrrolidone (BDH), 1% BSA (BDH).

#### 5.7. Προετοιμασία τομών για υβριδισμό

- Οι αντικειμενοφόροι με τις τομές αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον μία ώρα, χωρίς να ανοιχθούν προκειμένου να ξεπαγώσουν.
- Ακολούθως, οι τομές ενυδατώθηκαν με εμβάπτιση σε διαλύματα αιθανόλης 100% δύο φορές και από μία φορά σε 90%, 70%, 50%, 30%, 10%, για 1 min σε κάθε συγκέντρωση.
- Αφού ξεπλυθούν μία φορά με ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεΐνης K, μεταφέρθηκαν σε νέο διάλυμα πρωτεΐνης, το οποίο περιέχει 1 μg/ml πρωτεΐνη K, όπου και επώστηκαν για 30 min στους 37<sup>ο</sup>C.
- Μετά την επώαση, οι αντικειμενοφόροι ξεπλύθηκαν δύο φορές με αποστειρωμένο νερό.

- Στη συνέχεια, οι αντικειμενοφόροι μεταφέρθηκαν σε διάλυμα 0,1M τριαιθανολαμίνης/0,25% οξικού ανυδρίτη, όπου και επώαστηκαν για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση.
- Ακολούθως ξεπλύθηκαν σε διάλυμα 2X SSC για 5 min και αφυδατώθηκαν ακολουθώντας την αντίστροφη πορεία ενυδάτωσης στα διαλύματα.
- Τέλος οι αντικειμενοφόροι αφέθηκαν να στεγνώσουν για τουλάχιστον 1 h σε υποπίεση.
  - Ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεΐνάσης K: 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM EDTA.

## 5.8. Υβριδισμός

- Οι αντικειμενοφόροι σκεπάστηκαν με καλυπτρίδες. Ιδιαίτερη προσοχή θα δόθηκε, έτσι ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων και σε αυτό το στάδιο.
- Οι αντικειμενοφόροι τοποθετήθηκαν σε κουτί, η βάση του οποίου καλύφθηκε με διηθητικό χαρτί εμποτισμένο σε διάλυμα 2X SSC, για να μη στεγνώσουν οι τομές.
- Ο υβριδισμός πραγματοποιήθηκε στους 42oC, για τουλάχιστον 12-16 h.

## 5.9. Ξεπλύματα υβριδισμού

- Οι καλυπτρίδες απομακρύνθηκαν με εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων σε διάλυμα 4X SSC /5mM DTT, για 10 min.
- Το διάλυμα αντικαταστάθηκε με νέο ίδιας σύστασης, όπου οι αντικειμενοφόροι αφέθηκαν για 10 min με τακτική ήπια ανακίνηση.
- Το παραπάνω ξέπλυμα επαναλήφθηκε τρεις φορές.
- Ακολούθως, οι αντικειμενοφόροι επώαστηκαν σε 200 ml ρυθμιστικού διαλύματος RNάσης το οποίο περιείχε 50 µg/ml RNάση A, στους 37oC για 30 min.
- Η RNάση απομακρύνθηκε με 4 ξεπλύματα σε ρυθμιστικό διάλυμα RNάσης στους 37oC για 20 min το καθένα.

- Τέλος, οι αντικειμενοφόροι ξεπλύθηκαν με διάλυμα 2X SSC / 1mM DTT σε θερμοκρασία δωματίου με τακτική ήπια ανακίνηση.
  - Ρυθμιστικό διάλυμα RNάσης: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 1mM EDTA.

### 5.10. Ανοσολογική ανίχνευση θετικού υβριδισμού

- Οι αντικειμενοφόροι εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα I για 3-5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολούθως, μεταφέρθηκαν σε διάλυμα II για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το διάλυμα αντικαταστάθηκε με διάλυμα III, όπου οι αντικειμενοφόροι αφήθηκαν για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Οι τομές καλύφθηκαν με διάλυμα I που περιέχει 1:500 αντίσωμα αντι-DIG και αφήθηκαν για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το μη δεσμευμένο αντίσωμα απομακρύνθηκε με εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων σε διάλυμα III για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθούσαν τρία ξεπλύματα με διάλυμα I, για 20 min το καθένα, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Οι τομές εξισορροπήθηκαν σε διάλυμα IV για 10 min και καλύφθηκαν με διάλυμα χρωματικής αντίδρασης (διάλυμα V).
- Η χρωματική αντίδραση πραγματοποιήθηκε στο σκοτάδι και η ανάπτυξη του χρώματος ελέγχθηκε ανά τακτά χρονικά διαστήματα στο μικροσκόπιο.
- Η χρωματική αντίδραση τερματίστηκε με ξέπλυμα των αντικειμενοφόρων με διάλυμα TE ή ddH<sub>2</sub>O.
- Οι τομές αφυδατώθηκαν με σειρά διαλυμάτων αιθανόλης 10%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90% και δύο φορές σε 100% για 1 min σε κάθε διάλυμα.
- Τέλος, αφού στεγνώσουν καλά οι τομές μονιμοποιούνται με την κάλυψη τους με DPX πριν την τοποθέτηση της καλυπτρίδας.
  - Διάλυμα I: 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl.
  - Διάλυμα II: 0,5% αντιδραστήριο παρεμπόδισης σε διάλυμα I.
  - Διάλυμα III: 0,3% Tween 20 (BDH) και 1% BSA σε διάλυμα I.

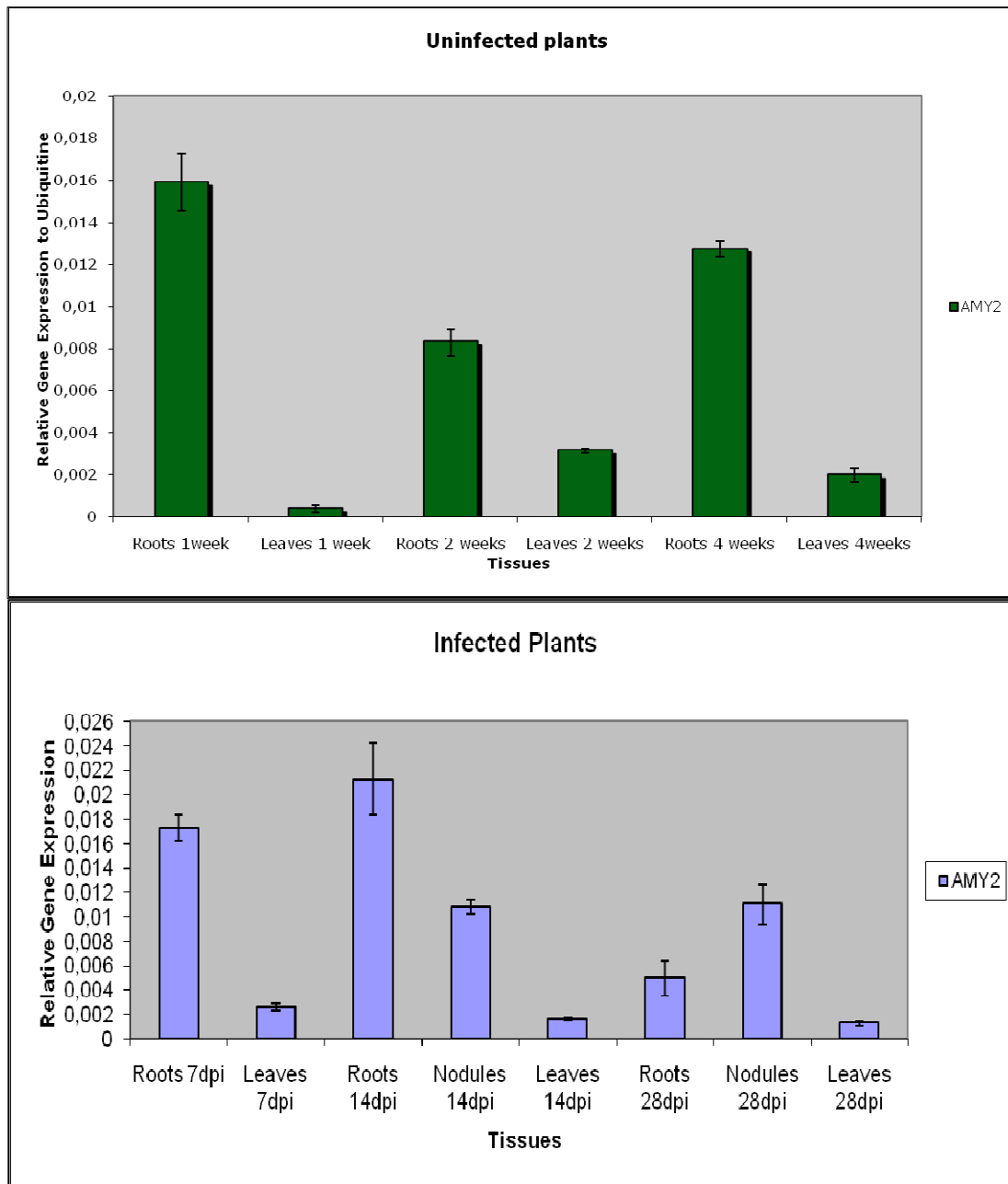
- Διάλυμα IV: 10 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub> (BDH) pH 9,2.
- Διάλυμα V: 0,34 mgr/ml NBT, 0,175 mg/ml BCIP σε διάλυμα αντίχρευσης III.

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## **1. Συσσώρευση των μεταγραφημάτων των γονιδίων *AMY2*, *P450-71* και *P450-88* σε συμβιωτικούς και μη συμβιωτικούς ιστούς του *Lotus japonicus***

Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των τριών γονιδίων συνθάση της β-αμυρίνης (*AMY-2*), *P450-71* και *P450-88* έγινε σε τρία αναπτυξιακά στάδια των φυτών (7, 14 και 28 ημέρες από την φύτευση). Επίσης μελετήθηκε η επίδραση της μόλυνσης με ριζόβιο στη γονιδιακή έκφραση των γονιδίων στα ίδια αναπτυξιακά στάδια. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκε ολικό RNA από ρίζες, φύλλα και φυμάτια από το φυτό *Lotus japonicus*. Τα μεταγραφικά επίπεδα των τριών γονιδίων ανιχνεύθηκαν με την PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR) αφού προηγήθηκε η PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR). Από τα αποτελέσματα διαπιστώνουμε ότι η συσσώρευση των μεταγραφημάτων και των τριών γονιδίων εντοπίστηκε σε όλους τους ιστούς και σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια τα οποία μελετήθηκαν. Οι τιμές που αποδίδονται στην γονιδιακή έκφραση έχουν συγκριθεί με την έκφραση του γονιδίου της ουμπικουΐνης.

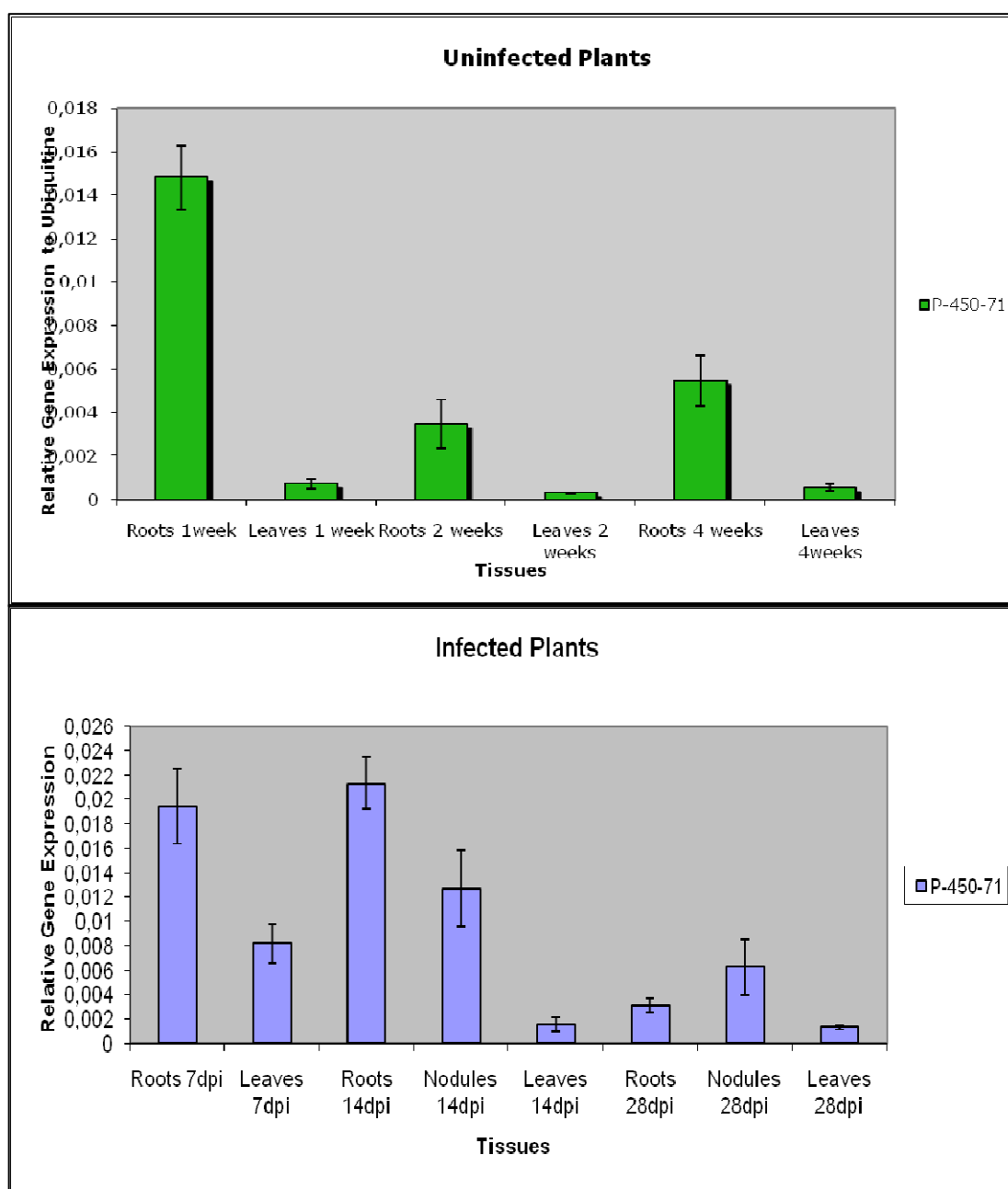
Πιο συγκεκριμένα όσον αφορά το γονίδιο της συνθάσης της β-αμυρίνης σε μη μολυσμένα φυτά, η μεγαλύτερη γονιδιακή έκφραση εντοπίστηκε σε ρίζες 7 και 28 ημερών. Αντίθετα στα φύλλα η μεγαλύτερη έκφραση εντοπίστηκε στις 14 ημέρες, ενώ σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια ανιχνεύονται χαμηλά επίπεδα έκφρασης συγκριτικά με τα επίπεδα έκφρασης της ρίζας. Σε μολυσμένα με ριζόβιο φυτά, τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης εντοπίστηκαν σε ρίζες 14 και 7 ημερών, ενώ 28 ημέρες μετά την μόλυνση η γονιδιακή έκφραση μειώνεται σημαντικά.. Τα αποτελέσματα των επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης της συνθάσης της β-αμυρίνης παρουσιάζονται στο σχήμα 1.



Σχήμα 1: Επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης της συνθάσης της β-αμυρίνης (AMY2) σε μη μολυσμένα και μολυσμένα φυτά (uninfected and infected plants).

Στα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης του *P450-71* παρατηρείται μια παρόμοια συμπεριφορά με του γονιδίου της συνθάση της β-αμυρίνης. Σε μη μολυσμένα φυτά, η μεγαλύτερη έκφραση διαπιστώθηκε σε ρίζες 7 ημερών ενώ στα φύλλα εντοπίζεται ένα χαμηλό αλλά σταθερό επίπεδο έκφρασης. Σε μολυσμένα φυτά αυξημένη έκφραση παρατηρείται επίσης σε ρίζες 7 και 14 ημερών μετά την μόλυνση, ενώ τα επίπεδα έκφρασης μειώνονται στις 28 ημέρες,. Τα επίπεδα έκφρασης των φύλλων δεν επηρεάζονται στα μολυσμένα φυτά αν και παρατηρείται μία αύξημένη

έκφραση 7 ημέρες από την μόλυνση, συγκριτικά με τα υπόλοιπα αναπτυξιακά στάδια. Τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης παρουσιάζονται στο σχήμα 2.

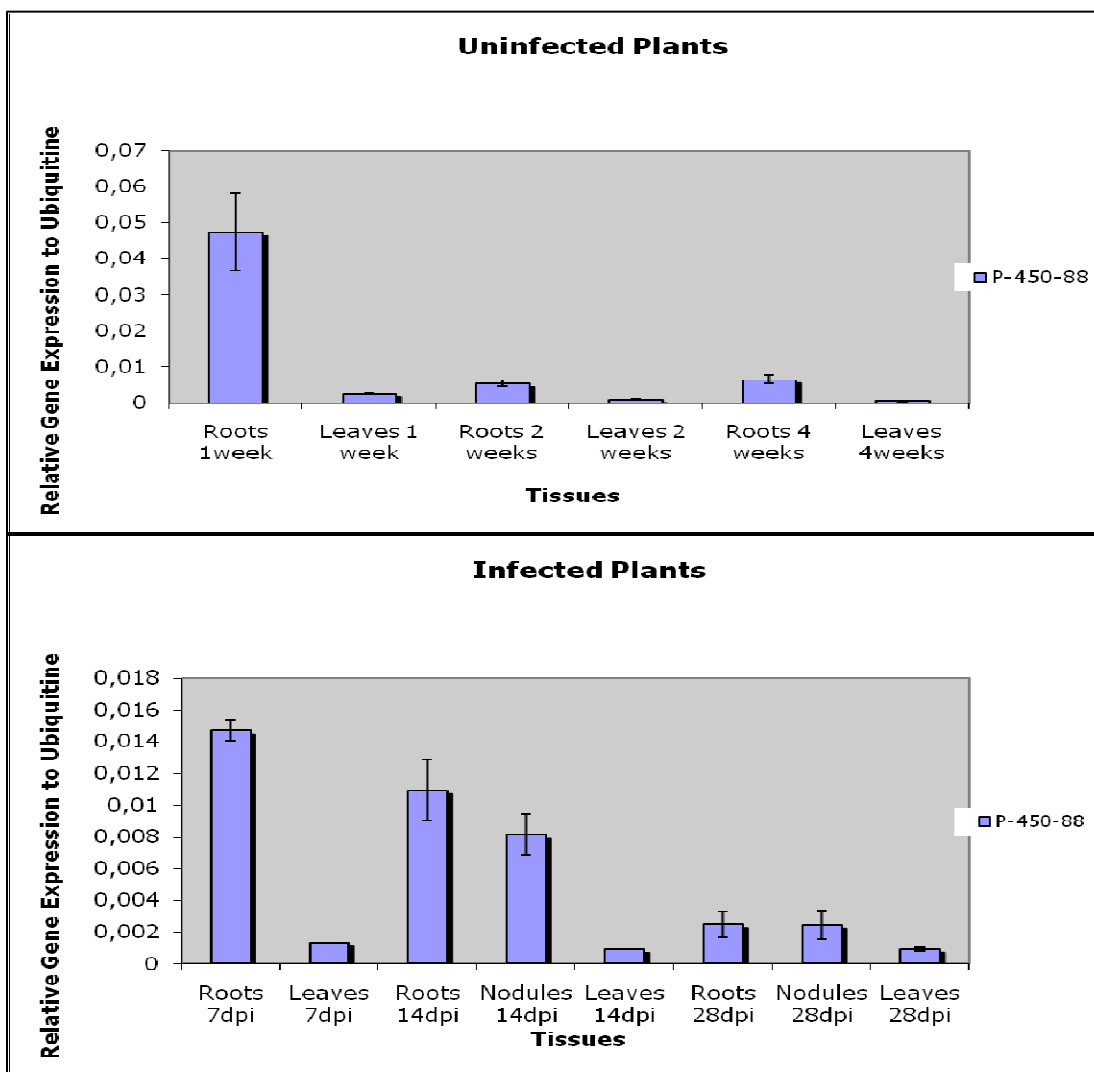


Σχήμα 2: Επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης του P450-71 σε μη μολυσμένα και μολυσμένα φυτά (uninfected and infected plants).

Τα επίπεδα έκφρασης του *P450-88* σε μολυσμένα φυτά ακολουθούν τα πρότυπα έκφρασης του γονιδίου της συνθάσης της β-αμυρίνης και του *P450-71*. Πιο συγκεκριμένα η υψηλότερη γονιδιακή έκφραση του *P450-88* σε μολυσμένα φυτά εντοπίστηκε σε ρίζες 7 και 14 ημερών, ενώ μειώνεται στις 28 ημέρες. Σε μη



μολυσμένα φυτά το πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης συμβαδίζει με τα άλλα δύο γονίδια του cluster αν και σε ρίζες 7 ημερών διαπιστώνεται παρά πολύ υψηλή έκφραση, η οποία μειώνεται σημαντικά στις 14 και 28 ημέρες. Τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης παρουσιάζονται στο σχήμα 3.

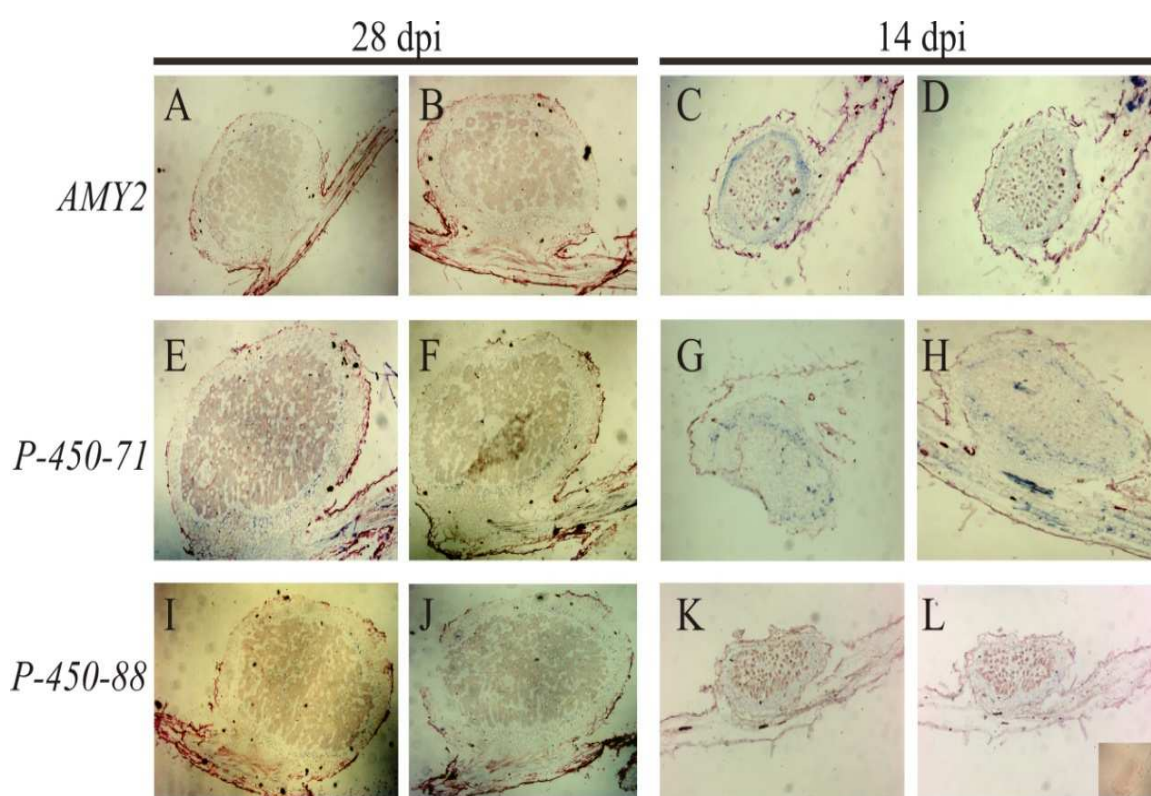


Σχήμα 3: Επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης του P450-88 σε μη μολυσμένα και μολυσμένα φυτά (uninfected and infected plants).

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τα τρία γονίδια τα οποία οργανώνονται σε μία γονιδιακή συστοιχία (cluster) εμφανίζουν ένα παρόμοιο πρότυπο γονιδιακής έκφρασης σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια και διαφορετικούς ιστούς του φυτού. Επίσης, τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης επηρεάζονται με το ίδιο τρόπο εξαιτίας της παρουσίας του ριζοβίου και στα τρία γονίδια.

## 2. Χωροταξικό πρότυπο της έκφρασης των γονιδίων *AMY2*, *P450-71* και *P450-88* σε φυμάτια του *Lotus japonicus*

Το χωροταξικό πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *AMY2*, *P450-71* και *P450-88* στα φυμάτια του *Lotus japonicus* μελετήθηκε με την τεχνική του *in situ* RNA-RNA υβριδισμού (Εικόνα 1). Για το σκοπό αυτό, τομές παραφίνης πάχους 7-10 μm από φυμάτια 14 και 28 ημερών υβριδίστηκαν με 11-digoxigenin-rUTP-σημασμένους RNA ανιχνευτές, οι οποίοι προέκυψαν από μεταγραφή των cDNA κλώνων *AMY2*, *P450-71* και *P450-88*. Παρατηρείται υψηλό σήμα υβριδισμού στο παρέγχυμα των φυματίων 28 ημερών, ενώ στα φυμάτια 14 ημερών εντοπίζεται λιγότερο έντονο σήμα υβριδισμού. Επίσης το σήμα που εμφανίζεται και στα τρία γονίδια εντοπίζεται στο παρέγχυμα των φυματίων και όχι σε άλλο ιστό, κάτι που ενισχύει την πεποίθηση ότι τα τρία γονίδια που οργανώνονται σε γονιδιακή συστοιχία, ελέγχονται μεταγραφικά με τον ίδιο τρόπο.



Εικόνα 1: *In situ* εντοπισμός των μεταγραφημάτων των γονιδίων *AMY2* (A,B,C,D), *P450-71* (E,F,G,H) και *P450-88* (I,J,K,L) σε φυμάτια του φυτού *Lotus japonicus*. Το σήμα του υβριδισμού διακρίνεται ως μπλε-μοβ ίζημα και εντοπίζεται στο παρέγχυμα των φυματίων, ενώ είναι πιο έντονο στα φυμάτια 14 ημερών. Επίσης παρατηρείται ότι και στα τρία γονίδια το σήμα του υβριδισμού εντοπίζεται στον ίδιο ιστό.

### 3. Συζήτηση

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή η μελέτη της βιοσύνθεσης των τριτερπενοειδών στα φυτά αποκάλυψε ότι υπάρχουν δύο παραδείγματα γονιδιακών συστοιχιών, οι οποίες συμπεριφέρονται σαν οπερόνια. Στη βρώμη εντοπίζεται το cluster της αβενασίνης και στο *Arabidopsis thaliana* της θαλιανόλης.

Η ανάλυση των γονιδίων και των ενζύμων τα οποία εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της αβενασίνης έδειξε ότι το μονοπάτι της βιοσύνθεσης έχει εξελιχθεί πρόσφατα. Η μεταφορά των γονιδίων που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση αντιμικροβιακών τριτερπενοειδών, όπως η αβενασίνη, σε άλλα δημητριακά όπως το σιτάρι, θα μπορούσε να αποδειχθεί πολύ σημαντική για τη βελτίωση της καλλιέργειάς τους. Η σύνθεση της αβενασίνης ρυθμίζεται αναπτυξιακά και συμβαίνει στα επιδερμικά κύτταρα του ριζικού μεριστώματος. Το αρχικό μόριο της αβενασίνης A-1 έχει υψηλό φθορισμό υπό την επίδραση υπεριώδους φωτός και εμφανίζεται σε αυτά τα κύτταρα. Ο φθορισμός που εμφανίζεται είναι μια ασυνήθιστη ιδιότητα των τριτερπενοειδών. Έχουν απομονωθεί πάνω από ενενήντα μεταλλάγματα με έλλειψη στην αβενασίνη. Αυτή η μεγάλη συλλογή μεταλλαγμάτων έχει διευκολύνει την κλωνοποίηση των γονιδίων και τη διαλεύκανση του βιοσυνθετικού μονοπατιού της αβενασίνης.

Τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της αβενασίνης είναι τα *Sad1* και *Sad2* τα οποία κωδικοποιούν αντίστοιχα για τη συνθάση της β-αμυρίνης και για τη μετατροπή του παραπάνω μορίου στην αβενασίνη. Τα δύο αυτά γονίδια πιθανόν να έχουν προέλθει από το μονοπάτι των στερολών μέσω γονιδιακής αναδίπλωσης και απόκτησης νέων λειτουργιών. Τα γονίδια *Sad1* και *Sad2* είναι παρακείμενα και απέχουν μεταξύ τους 70 kb στο γένωμα της βρώμης (*Avena strigosa*). Πρόσφατα έχει κλωνοποιηθεί και ένα τρίτο γονίδιο το *Sad7*, το οποίο κωδικοποιεί για μια ακετυλοτρανσφεράση η οποία είναι απαραίτητη για την ακετυλίωση της αβενασίνης. Το γονίδιο αυτό απέχει 60 kb από το γονίδιο *Sad1*. Τέσσερις άλλοι γονιδιακοί τόποι (loci) οι οποίοι απαιτούνται για την βιοσύνθεση της αβενασίνης, όπως τα γονίδια *Sad3* και *Sad4* που αναφέρθηκαν στην εισαγωγή, συνδιαχωρίζονται (co-segregate) με τα παραπάνω κλωνοποιημένα γονίδια. Η παρατήρηση αυτή δείχνει ότι τα περισσότερα γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι πιθανόν να οργανώνονται σε γονιδιακή συστοιχία. Εφόσον η αβενασίνη προσφέρει ένα ευρύ φάσμα αντίστασης στις ασθένειες στα φυτά, η παραπάνω γονιδιακή συστοιχία έχει προέλθει μέσω

επιστατικής επιλογής ώστε να διατηρηθούν οι λειτουργίες των συγκεκριμένων γονιδίων.

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή η γονιδιακή συστοιχία που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση του τριτερπενοειδούς θαλιανόλη στο φυτό *Arabidopsis thaliana* αποτελείται από τέσσερα γονίδια. Αυτά τα τέσσερα γονίδια κωδικοποιούν για μία κυκλάση του οξειδοσκουαλενίου, δύο τύπους γονιδίων του κυτοχρώματος P450 και μία ακετυλοτρανσφεράση. Το πρώτο γονίδιο κωδικοποιεί για τη συνθάση της θαλιανόλης, ενώ οι δύο P450s μετατρέπουν τη θαλιανόλη σε περαιτέρω παράγωγα όπως η θαλιαν-διόλη. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την ακετυλοτρανσφεράση θεωρείται ότι ανήκει στη γονιδιακή συστοιχία λόγω της θέσης του στο γονιδίωμα και του προφίλ της έκφρασης του, αλλά το προϊόν που παράγεται με τη δράση του δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί. Τα γονίδια της συστοιχίας που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της θαλιανόλης εκφράζονται κυρίως στα επιδερμικά κύτταρα του ριζικού μεριστώματος όπως και στην περίπτωση της βρώμης και της γονιδιακής συστοιχίας της αβενασίνης. Επίσης υπάρχει στενή ρύθμιση του βιοσυνθετικού μονοπατιού, αφού τα ενδιάμεσα παράγωγα της θαλιανόλης επηρεάζουν σημαντικά την αύξηση και ανάπτυξη του φυτού.

Υπάρχουν ομοιότητες μεταξύ των δύο γονιδιακών συστοιχιών στα δύο φυτά αφού τα γονίδια από τα οποία αποτελούνται κωδικοποιούν για μια κυκλάση του οξειδοσκουαλενίου, δύο CYP450s και μία ακετυλοτρανσφεράση. Ωστόσο το γεγονός ότι η βρώμη είναι μονοκοτυλήδονο φυτό και το *Arabidopsis* δικοτυλήδονο δείχνει ότι η δημιουργία των γονιδιακών συστοιχιών έχει συντελεστεί πρόσφατα και ανεξάρτητα από την κατηγορία των φυτών. Αυτό σημαίνει ότι η γονιδιακή επιλογή μπορεί να διαδραματιστεί κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων μεταβολικών μονοπατιών και να έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία γονιδιακών συστοιχιών. Επίσης τα βιοσυνθετικά μονοπάτια των τριτερπενοειδών έχουν προδιάθεση να οργανώνονται σε γονιδιακές συστοιχίες.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προκύπτει ότι η γονιδιακή έκφραση των τριών γονιδίων που μελετήθηκαν και τα οποία είναι οργανωμένα σε μια γονιδιακή συστοιχία στο γονιδίωμα του *Lotus japonicus*, εμφανίζει ένα πολύ παρόμοιο πρότυπο συν-ρύθμισης σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια και σε διαφορετικούς ιστούς του φυτού ενώ παρατηρήθηκε και παρόμοιο πρότυπο γονιδιακής έκφρασης και των τριών γονιδίων υπό συνθήκες αλληλεπίδρασης του

φυτού με το *Mesorhizobium loti* κατά την αναπτυξιακή πορεία δημιουργίας των φυματίων.

Επομένως, προκύπτει το συμπέρασμα ότι και στα ψυχανθή φαίνεται ότι υπάρχουν και λειτουργούν παρόμοιες συστοιχίες γονιδίων βιοσύνθεσης τριτερπενοειδών δευτερογενών μεταβολιτών, όπως έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα για το *Arabidopsis* και τη βρώμη.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Graham P.H., Vance C.P. (2003):** Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131, 872–877.
2. **Smil V. (1999):** Nitrogen in crop production: an account of global flows. *Global Biogeochem. Cycles* 13, 647-662.
3. **Dixon R.A., Sumner L.W. (2003):** Legume natural products: understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiol.* Vol. 131: 878–885.
4. **Udvardi M., Tabata S., Parniske M., Stougaard J. (2005):** *Lotus japonicus*: legume research in the fast lane. *TRENDS in Plant Science* Vol.10 No.5.
5. **Handberg K., Stougaard J. (1992):** *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant J.* 2: 487-496.
6. **Gordon A.J. (1995):** Sucrose metabolism to support N<sub>2</sub> fixation in legume root nodules. In: Tikhonovich IA, Provorov NA, Romanov VI, Newton WE (eds), Nitrogen fixation: fundamentals and applications. *Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands*, pp 533–538.
7. **Long S.R. (1989):** Rhizobium – legume nodulation: life together in the underground. *Cell* 56:203-14.
8. **Vance C.P., Miller S.S., Driscoll B.T., Robinson D.L., Trepp G., Gantt J.S., Samas D.A. (1997):** Nodule carbon metabolism: organic acids for N<sub>2</sub> fixation. In: Elmerich CE, Kondorosi A, Newton WE (eds), Biological nitrogen fixation for the 21th century. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands*, pp 443–448.
9. **Fisher R.F., Long S.R. (1992):** Rhizobium-plant signal exchange. *Nature* Vol. 357:655–660.
10. **Spaink H.P. (2000):** Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu Rev Microbiol* 54:257–88.
11. **Caetano-Anolles G., Gresshoff M. (1991):** Plant genetic control of nodulation. *Annu Rev Microbiol* Vol. 45:345–82.

12. **Sprent and Raven (1992):** Evolution of nitrogen fixing symbioses. In: Stacey G, Burris R, Evans H eds. *Biological nitrogen fixation*. New York: Chapman and Hall, 461-496.
13. **Provorof N. (1998):** Coevolution of rhizobia with legumes: facts and hypotheses. *Symbiosis* 24, 337-367.
14. **Auria J., Gershenzon J. (2005):** The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed. *Current Opinion in Plant Biology*. 8:308-316.
15. **Καράταγλης Στυλιανός (1999):** Δευτερογενείς μεταβολίτες, *Φυσιολογία Φυτών*, 365-385
16. **Osbourn A.E. (1996):** Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *Plant Cell* 8, 1821-1831.
17. **Τσέκος Ιωάννης (2004):** Μηχανισμοί άμυνας του φυτού και δευτερογενείς μεταβολίτες, *Φυσιολογία Φυτών*, 541-568.
18. **Papadopoulou K., Melton RE, Leggett M, Daniels MJ, Osbourn AE. (1999):** Compromized disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc Natl Acad Sci*, 12923-12928.
19. **Haralampidis K., Bryan G., Qi X., Papadopoulou K., Bakht S., Melton R., Osbourn A. (2001):** A new class of oxidosqualene cyclases directs synthesis of antimicrobial phytoprotectants in monocots. *Proc Natl Acad Sci*, 13431-13436.
20. **Phillips D., Rasbery J., Bartel B., Matsuda S. (2006):** Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Current Opinion in Plant Biology*, 9:305-314.
21. **Sawai S., Shindo T., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Ayabe S., Aoki T. (2006):** Functional and structural analysis of genes encoding oxidosqualene cyclases of *Lotus japonicus*. *Plant Science*, 170: 247-257.
22. **Kolesnikova MD, Xiong Q, Lodeiro S, Hua L, Matsuda SP. (2006):** Lanosterol biosynthesis in plants. *Arch Biochem Biophys* 447:87-95.
23. **Shibuya M, Adachi S, Ebizuka Y (2004):** Cucurbitadienol synthase, the first committed enzyme for cucurbitacin biosynthesis, is a distinct enzyme from cycloartenol synthase for phytosterol biosynthesis. *Tetrahedron*, 60:6995-7003.
24. **Morita M, Shibuya M, Kushiro T, Masuda K, Ebizuka Y. (2000):** Molecular cloning and functional expression of triterpene synthases from pea (*Pisum sativum*) new alpha-amyrin-producing enzyme is a multifunctional triterpene synthase. *Eur J Biochem*, 267:3453-3460.

- 25. Iturbe-Ormaetxe I, Haralampidis K, Papadopoulou K, Osbourn AE (2003):** Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Mol. Biol.* 51:731-743
- 26. Greenhagen BT., O'Maille PE., Noel JP., Chappell J. (2006):** Identifying and manipulating structural determinates linking catalytic specificities in terpene synthases. *Proc Natl Acad Sci*, 103:9826-9831.
- 27. Bosso, GAsch, Taramino, Scaldaferrri, Viola, Balliano (2005):** Access of the substrate to the active site of squalene and oxidosqualene cyclases. *Biochemical Society Transactions*, 1202-1205.
- 28. Qi X, Bakht S, Qin B, Leggett M, Hemmings A, Mellon F, Eagles J, Werck-Reichhart D, Schaller H, Lesot A, Melton R, Osbourn A (2006):** A different function for a member of an ancient and highly conserved cytochrome P450 family: From essential sterols to plant defense. 103:18848-18853.
- 29. Mylona P, Owatworakit A, Papadopoulou K, Jenner H, Qin B, Findlay K, Hill L, Qi X, Bakht S, Melton R, Osbourn A (2008):** Sad3 and Sad4 are required for saponin biosynthesis and root development in oat. *The Plant Cell* 20:201-212.
- 30. Seki H, Ohyama K, Sawai S, Mizutani M, Ohnishi T, Sudo H, Akashi T, Aoki T, Saito K, Murunaka T (2008):** Licorice b-amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:14204-14209.
- 31. Ben Field and Anne E. Osbourn (2008):** Metabolic diversification – Independent assembly of operon-like gene clusters in different plants. *Science Vol.320*: 543-547