



UNIVERSITY  
of THESSALY

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Σχολή Επιστημών Υγείας  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας



Επίδραση της έκφρασης των ετερόλογων μεταγραφικών παραγόντων *MtTSAR1,2* στο βιοσυνθετικό μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος στο φυτό *Trigonella foenum - graecum*

Effect of the expression of the heterologous transcription factors *MtTSAR1,2* on the biosynthetic pathway of mevalonic acid in *Trigonella foenum-graecum*

Διπλωματική εργασία  
Μπεριτζά Κωνσταντίνα  
Λάρισα, 2018

## Τριμελής Επιτροπή

---

- Παπαδοπούλου Καλλιόπη

Αναπληρώτρια καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

- Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος

Καθηγητής - Πρόεδρος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

- Γιακουντής Αντώνιος

Επίκουρος Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

*Normality is a paved road.  
It's comfortable to walk, but no flowers grow*  
-Vincent van Gogh

*There are always flowers for those who want to see them*  
-Henry Matisse

*And the day came when the risk  
to remain in a tight bud was more painful  
than the risk it took to blossom*  
-Anaïs Nin



Οι κοτυληδόνες του φυτού *Trigonella foenum – graecum*  
9 ημερών κάτω από το στερεοσκόπιο

## Ευχαριστίες

---

Θα ήθελα, πρωτίστως, να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου για την αμέριστη εμπιστοσύνη που μου έδειξε εξαρχής, τις πολύτιμες συμβουλές της τόσο για την δραστηριότητά μου στο εργαστήριό της, όσο και για την μετέπειτα ακαδημαϊκή μου εξέλιξη και τη συμβολή της στο να βρω το αντικείμενο με το οποίο επιθυμώ να συνεχίσω τις σπουδές μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον Δρ. Κωνσταντίνο Γκαραγκούνη που πίστεψε σε μένα, καθώς επίσης, για τις παρατηρήσεις και συμβουλές που μου έδωσε, το χρόνο και την υπομονή που διέθεσε καθ' όλη τη διάρκεια παραμονής μου στο εργαστήριο. Ακόμη, ευχαριστίες απευθύνω σε όλα τα παιδιά του εργαστηρίου για την πρόθεση να βοηθήσουν σε ότι χρειαζόμουν οποιαδήποτε στιγμή, καθιστώντας τη συνεργασία μας ευχάριστη και δημιουργική.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω την οικογένειά μου, για την στήριξη, την κατανόηση και την ανιδιοτελή αγάπη τους όλα αυτά τα 22 χρόνια.

# Περιεχόμενα

---

Περίληψη.....	7
Abstract.....	8
<b>1. Εισαγωγή.....</b>	<b>9</b>
1.1 Το φυτό <i>Trigonella foenum – graecum</i> .....	10
1.1.1 Το γονιδίωμα και η μορφολογία του φυτού.....	10
1.1.2 Η σύσταση ουσιών που παράγονται από το φυτό.....	11
1.1.3 Εξειδικευμένοι μεταβολίτες βιολογικής σημασίας.....	11
1.1.4 Μετασχηματισμός <i>hairy roots</i> .....	12
1.2 Τερπενοειδή.....	13
1.2.1 Οι δύο οδοί βιοσύνθεσης τερπενοειδών.....	14
1.2.2 Παραγωγή τριτερπενίων.....	16
1.2.2 Πολυλειτουργικότητα των φυτικών τερπενοειδών.....	17
1.3 Σαπωνίνες.....	18
1.3.1 Βιοσύνθεση σαπωνινών.....	19
1.3.2 Βιολογική δράση σαπωνινών.....	20
1.4 Το φυτό <i>Medicago truncatula</i> .....	21
1.4.1 Οι μεταγραφικοί παράγοντες επαγωγής της βιοσύνθεσης σαπωνινών, TSAR1 και TSAR2.....	22
<b>Σκοπός Εργασίας.....</b>	<b>23</b>
<b>2. Υλικά και Μέθοδοι.....</b>	<b>24</b>
2.1 Μετασχηματισμός φυτού <i>T. foenum – graecum hairy roots</i> .....	24
2.2 Απομόνωση DNA με τη χρήση διαλύματος CTAB.....	24
2.3 PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης).....	25
2.4 Απομόνωση RNA από τις ρίζες του φυτού <i>T. foenum – graecum</i> με χρήση LiCl(Brusslan & Tobin, 1992).....	26
2.5 Απομάκρυνση γονιδιωματικού DNA από RNA.....	27

2.6 Ποσοτικοποίηση DNA και RNA με χρήση Qubit® .....	28
2.7 Σχετική Real Time-PCR (RT-qPCR) Luna®.....	28
2.8 Εκχύλιση σαπωνινών.....	30
2.9 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC) .....	31
<b>3. Αποτελέσματα.....</b>	<b>33</b>
3.1 Επιβεβαίωση του μετασχηματισμού hairy roots σε φυτά <i>Trigonella foenum-graecum</i> .....	33
3.2 Απομόνωση RNA από τις ρίζες του φυτού <i>Trigonella foenum-graecum</i> .....	35
3.3 Πειράματα σχετικής RT-PCR (RT-qPCR) .....	36
3.4 Εκχύλιση σαπωνινών και Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας .....	39
<b>4. Συμπεράσματα-Συζήτηση .....</b>	<b>41</b>
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>45</b>
<b>Παράρτημα .....</b>	<b>53</b>

## Περίληψη

---

Το *Trigonella foenum-graecum*, ένα φυτό με ιατρικό και φαρμακευτικό ενδιαφέρον χρησιμοποιείται ευρέως εφόσον παράγει βιοδραστικούς δευτερογενείς μεταβολίτες όπως αλκαλοειδή, φλαβονοειδή, στεροειδή τριτερπένια και σαπωνίνες, με σημαντικότερο την στεροειδή σαπωνίνη διοσγενίνη. Η βιοσύνθεση τέτοιων μεταβολιτών και η ρύθμιση της στα φυτά αποτελεί στόχο της έρευνας στην μεταβολική μηχανική. Με απώτερο στόχο την ταυτοποίηση βιοσυνθετικών γονιδίων και ρυθμιστών του μεταβολισμού που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε προσεγγίσεις γενετικής μηχανικής για ενίσχυση της παραγωγής μεταβολιτών υψηλής αξίας και την λεπτή ρύθμιση του μεταβολισμού οργανισμών-ξενιστών/σασί. Έχει δειχθεί πρόσφατα ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες TSAR1 και TSAR2 (Triterpene Saponin Activation Regulators 1, 2) του συγγενικού ψυχανθούς *Medicago truncatula* είναι ικανοί να επάγουν την έκφραση γονιδίων ολόκληρου του μονοπατιού βιοσύνθεσης τριτερπενοειδών σαπωνινών, από το μεβαλονικό οξύ μέχρι τα τελικά μόρια σαπωνινών. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της ετερόλογης έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων αυτών στο φυτό *Trigonella foenum-graecum* μετά από μετασχηματισμό των κυττάρων της ρίζας (hairy root transformation), με στόχο τη διερεύνηση της μεταγραφικής δραστηριότητας γονιδίων που εμπλέκονται στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των τριτερπενοειδών σαπωνινών. Βασικός σκοπός πίσω από την υπερέκφραση των TSAR1 και TSAR2 είναι να απαντηθεί το ερώτημα αν αυτός ο ρυθμιστικός μηχανισμός είναι συντηρημένος σε διαφορετικά ψυχανθή. Επιπρόσθετα, η φαρμακευτική αξία των στεροειδών σαπωνινών που παράγονται από το *T. foenum-graecum* καθιστά απαραίτητη την μελέτη των γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι, με στόχο την κατανόηση της ρύθμισής του και την πιθανή τροποποίησή του, ώστε τελικά να είναι δυνατή η αύξηση παραγωγής των ενεργών αυτών ουσιών. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η σχετική έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν σε σημαντικά στάδια του μονοπατιού, όπως το πρώτο ένζυμο-κλειδί του μονοπατιού (γονίδιο *HMGR*, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase), το οποίο καταλύει τον μη αντιστρεπτό σχηματισμό του πρώτου μεταβολίτη, του μεβαλονικού οξέος. Συμπληρωματικά, εξετάστηκε η επίδραση στην έκφραση του γονιδίου διακλάδωσης προς παραγωγή στεροειδών σαπωνινών (γονίδιο *CAS*, Cycloartenol Synthase). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, ήταν αντικρουόμενα σε σχέση με ότι είχε βρεθεί μέχρι στιγμής σε συγγενή φυτά, παρατηρώντας μια ανταγωνιστική δράση μεταξύ των ετερόλογων και των ενδογενών μεταγραφικών παραγόντων, αποδεικνύοντας, με αυτό τον τρόπο, τη δυναμική εξειδίκευση της ρύθμισης στο βιοσυνθετικό μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος του *T. foenum-graecum*.

## Abstract

---

*Trigonella foenum-graecum*, is a plant of considerable medicinal and pharmaceutical significance, and is widely cultivated since it produces bioactive secondary metabolites such as alkaloids, flavonoids, triterpenes and saponins, most notably the steroidal saponin diosgenin. The biosynthesis of such metabolites and its regulation in plants is a focal point of research in metabolic engineering. With the ultimate aim being the identification of biosynthetic genes and regulators of metabolism that can be used in genetic engineering approaches in order to boost production of high-value metabolites and fine-tune host/chassis organism metabolism. It was previously shown that the TSAR1 and TSAR2 (Triterpene Saponin Activation Regulators 1, 2) transcription factors of the legume *Medicago truncatula* are capable of inducing gene expression of the entire triterpene saponin biosynthetic pathway, from mevalonic acid to the final saponins. The present thesis investigated the effect of heterologous expression of these transcription factors on the transcriptional activity of genes involved in the triterpenoid saponin biosynthetic pathway following hairy root transformation of the closely related plant *Trigonella foenum-graecum*. The main purpose, therefore, behind TSAR1 and TSAR2 overexpression is to answer the question whether this regulatory mechanism is conserved in different legumes. Additionally, the pharmaceutical value of the steroid saponins produced in *T. foenum-graecum* renders the study of the genes involved in the pathway necessary so as to understand its regulation and its presumptive modification, thereby eventually enabling the increase in the production of these active compounds through genetic engineering approaches. For that reason, the relative expression of genes involved in important stages of the pathway, such as the first key enzyme of the pathway (*HMGR* gene, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase), which catalyzes the irreversible formation of the first metabolite, mevalonic acid, was studied. Furthermore, the effect of the expression of the branching gene producing steroidal saponins (*CAS* gene, Cycloartenol Synthase) was examined. The results obtained were contradictory to other findings so far in legumes, indicating a possible competitive effect between heterologous and endogenous transcription factors. This demonstrates the dynamic specificity in regulation of the mevalonic acid biosynthesis pathway in *T. foenum-graecum*.



# 1. Εισαγωγή

---

Όπως οι άνθρωποι και τα ζώα, έτσι και τα φυτά έχουν να αντιμετωπίσουν πολυάριθμες προκλήσεις στο οικοσύστημά τους και δεν μπορούν εύκολα να παραβλέψουν ή να διαχειριστούν αυτό το ανταγωνιστικό περιβάλλον. Επομένως, πολλά από τα φυτά παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες για να αντιμετωπίσουν τους περιορισμούς αυτούς.

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες, τουλάχιστον οι μείζονες που υπάρχουν σε ένα φυτό, προφανώς λειτουργούν ως άμυνα (έναντι φυτοφάγων, μικροβίων, ιών η ανταγωνιστικών φυτών) και ως σηματοδότες (για την προσέλκυση ζώων επικονίασης ή διασποράς σπόρων). Είναι επομένως σημαντικά για την επιβίωση και την αναπαραγωγική ικανότητα του φυτού. Ως εκ τούτου, οι δευτερογενείς μεταβολίτες αντιπροσωπεύουν προσαρμοστικούς χαρακτήρες που έχουν υποβληθεί σε φυσική επιλογή κατά την εξέλιξη (Wink, 2003). Η ταξινόμησή τους βασίζεται στη χημική δομή, στη σύνθεση, στη διαλυτότητα τους σε διάφορα μέσα ή στο μονοπάτι από το οποίο συνθέτονται. Το βασικό σύστημα ταξινόμησης περιλαμβάνει τρεις κύριες ομάδες: τερπενοειδή, αλκαλοειδή και φαινόλες (Kibera et al., 2014).

Το φυτό *Trigonella foenum-graecum* είναι ένα δικοτυλήδονο φυτό που ανήκει στην οικογένεια των Fabaceae (υποοικογένεια Papilionaceae), που χρησιμοποιείται ευρέως για διάφορες ιατρικές εφαρμογές σε όλο τον κόσμο, αφού παράγει βιοδραστικούς δευτερογενείς μεταβολίτες όπως αλκαλοειδή, φλαβονοειδή, στεροειδή τριτερπένια και σαπωνίνες. Συγκεκριμένα, η διοσγενίνη, μία στεροειδής σαπωνίνη, έχει διερευνηθεί για τις φαρμακευτικές της χρήσεις και έχει αναφερθεί ως πηγή πρώτης ύλης για την παραγωγή στεροειδών ορμονών (Chaudhary et al., 2018).

Συνεπώς, τα οφέλη που έχουν να προσφέρουν οι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από το φυτό αυτό, καθιστά αναγκαία τόσο τη μελέτη όσο και την τροποποίηση του μεταβολισμού με αποτέλεσμα την αύξηση παραγωγής των ενεργών αυτών ουσιών.

## 1.1 Το φυτό *Trigonella foenum-graecum* – graecum

Το φυτό *Trigonella foenum-graecum* L. (*T. foenum-graecum*), ευρέως γνωστή ως **Τριγωνέλλα**, είναι ένα μικρό, σύσπορο, ετήσιο δικοτυλήδονο ψυχανθές που ανήκει στην υποοικογένεια Papilionaceae, οικογένεια Fabaceae (Εικόνα 1). Το φυτό *Trigonella* L. περιλαμβάνει περίπου 135 ποικιλίες παγκοσμίως και προέρχεται από τη νοτιοανατολική Ευρώπη και τη δυτική Ασία (Wani & Kumar, 2018). Η *Τριγωνέλλα* καλλιεργείται ευρέως στην Ινδία, την Αργεντινή, την Αίγυπτο και τις μεσογειακές χώρες. Το γένος *Trigonella* σημαίνει «τριγωνικό», ίσως λόγω του τριγωνικού σχήματος των λουλουδιών του, ενώ το όνομα του είδους *foenum-graecum* σημαίνει «ελληνικό χόρτο» (Petrooulos, 2002).



Εικόνα 1. Το φυτό *Trigonella foenum-graecum* L.

### 1.1.1 Το γονιδίωμα και η μορφολογία του φυτού

Το *T. foenum-graecum* είναι ένα **διπλοειδές** ( $2n = 16$ ) φυτό (Ahmad et al., 2016) χωρίς ανευπλοειδισμό (Flammang et al., 2004). Το μέγεθος του γονιδιώματός του είναι περίπου 685 Mbp, το οποίο είναι περίπου 1,5 φορά μεγαλύτερο από αυτό των φυτών-μοντέλων ψυχανθών, *Lotus corniculatus* L. var. *japonicus* Regel [συντομογραφία: *Lotus japonicus* (Regel) K Larsen] και *Medicago truncatula*, τα οποία έχουν συμπαγή γονιδιώματα μεγέθους περίπου 470 Mbp (Vaidya et al., 2013; Young et al., 2003). Τα φύλλα είναι τρίφυλλα αποτελούμενα από τρία οδοντωτά ωσειδή φυλλάρια. Τα λουλούδια, μεμονωμένα ή σε ομάδες των δύο, είναι λευκά ή υποκίτρινα έως μοβ ανοικτό και παρουσιάζουν τριγωνικό σχήμα που χαρακτηρίζεται από στεφάνη ψυχανθών. Δύο τύποι λουλουδιών έχουν περιγραφεί, τα κλειστόγαμα (κλειστά) και

ανοικτόγαμα (ανοιχτά) λουλούδια. Η πρώτη είναι η μορφή που παρατηρείται συνήθως. Ο καρπός είναι επιμήκης τοξωτός λοβός. Οι ώριμοι σπόροι είναι πολύ σκληροί, επίπεδοι, χρώματος ανοιχτού έως κοκκινωπού καφέ και χαρακτηρίζονται από ένα αυλάκι που σκιαγραφεί δύο άνισα μέρη (A. Basu et al., 2014; S. K. Basu et al., 2006). Το στέλεχος είναι μακρύ κυλινδρικό (μήκους 30-60 cm) σε ροζ χρώμα (Basu, 2006; Mehrafarin et al., 2011).

### *1.1.2 Η σύσταση ουσιών που παράγονται από το φυτό*

Οι σπόροι της *Τριγωνέλλας* περιέχουν 45-60% υδατάνθρακες, κυρίως βλεννώδεις ίνες (γαλακτομαννάνες), 20-30% πρωτεΐνες υψηλού ποσοστού σε λυσίνη και τρυπτοφάνη, 5-10% σταθερά έλαια (λιπίδια), αλκαλοειδή πυριδίνης, κυρίως τριγωνελλίνη (0.2-0.38%, 0.09%), αργινίνη, ιστιδίνη και λυσίνη, ασβέστιο και σίδηρο, σαπωνίνες (0.6%), γεντιανίνη και καρπεΐνη, τα φλαβονοειδή απιγενίνη, λουτεολίνη, οριεντίνη, κουερσετίνη, βιτεξίνη και ισοβιτεξίνη (1,7%), γλυκοζίτες που παράγουν στεροειδείς σαπωνίνες κατά την υδρόλυση (διοσγενίνη, γιαμογενίνη, τιγογενίνη, νεοτιγογενίνη), χοληστερόλη και σιτοστερόλη, βιταμίνες A, B1, C, νικοτινικό οξύ και πτητικά έλαια 0,015% (n-αλκάνια και σεσκιτερπένια) (Mehrafarin et al., 2011).

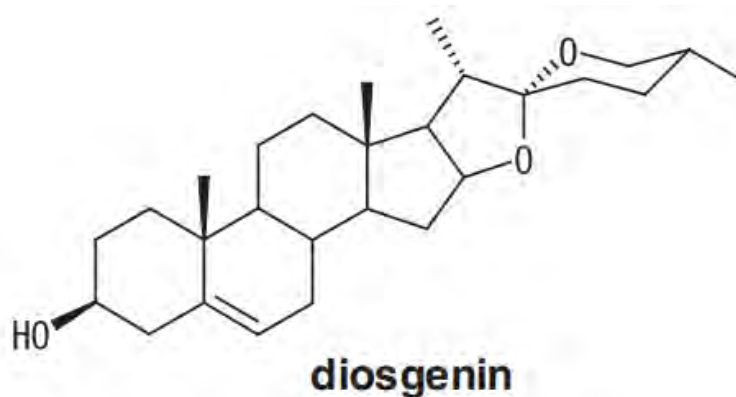
### *1.1.3 Εξειδικευμένοι μεταβολίτες βιολογικής σημασίας*

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες από φυτά, οι οποίοι διακρίνονται από τους πρωτογενείς μεταβολίτες όπως τα νουκλεϊνικά οξέα, αμινοξέα, υδατάνθρακες, λιπίδια, είναι εξαιρετικά ποικίλοι. Κάθε φυτική οικογένεια, γένος ή είδος παράγει ένα χαρακτηριστικό μίγμα αυτών, ενώ μερικές φορές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χαρακτήρες στην ταξινόμηση φυτών (Kabera et al., 2014).

Πολλές επιστημονικές πηγές δηλώνουν ότι ο ρόλος τους δεν είναι ζωτικής σημασίας για τα ζωντανά κύτταρα σε φυσιολογική ανάπτυξη και αναπαραγωγή, αλλά ενεργούν αποσκοπώντας στην προστασία του από όσο το δυνατόν περισσότερους επιβλαβείς περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ωστόσο ο κάθε δευτερογενής μεταβολίτης προστατεύει από έναν τύπο ή ένα στενό εύρος καταπονήσεων. Ως εκ τούτου, συνήθως συντίθενται σε φυτά σε ειδικές περιπτώσεις, όπως να προστατεύουν τα φυτά έναντι φυτοφάγων οργανισμών και έναντι μολύνσεων από παθογόνους μικροοργανισμούς, να προσελκύουν επικονιαστές και ζώα που συμβάλλουν στη διασπορά των σπερμάτων και να λειτουργούν ως παράγοντες ανταγωνισμού μεταξύ των φυτών και συμβίωσής τους με μικροοργανισμούς (Gunning, B.E.S and Steer, M.W., 1996). Οι δευτερεύοντες μεταβολίτες μπορεί συχνά να δημιουργούνται από τροποποιημένα βιοσυνθετικά μονοπάτια από έναν πρωτογενή μεταβολίτη ή να μοιράζονται πρόδρομα μόρια πρωτογενών μεταβολιτών (Stamp, 2003). Τα φυτά εξελίσσονται για να προσαρμοστούν στο περιβάλλον παράγοντας ποικίλα βιοσυνθετικά ένζυμα δευτερογενών μεταβολιτών. Οι ενώσεις αυτές

χρησιμοποιούνται ως φάρμακα, αρώματα, ειδικά αιθέρια έλαια. Στις περισσότερες αναφορές, φαίνεται ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες που εξάγονται από φυτά υποδιαιρούνται σε τρεις κύριες κατηγορίες: τερπενοειδή, αλκαλοειδή και φαινολικά με ενδιαφέρουσες φαρμακολογικές δραστηριότητες(Savithramma & Rao, 2011; Verpoorte, 1998).

Πολλές βιολογικά ενεργές φυτοχημικές ουσίες έχουν αναφερθεί στο φυτό *T. foenum – graecum*, συμπεριλαμβανομένων σαπωνινών, μια κατηγορία γλυκοζυλιωμένων τριτερπενίων που εμφανίζουν αντιμικροβιακές, αντιϊκές και εντομοκτόνες δραστηριότητες(Harsha. et al., 2012). Αυτές οι ενώσεις αντιπροσωπεύουν ένα μέρος των μηχανισμών άμυνας των φυτών κατά των βιοτικών καταπονήσεων και, ως εκ τούτου, μπορούν επίσης να ταξινομηθούν ως φυτοπροστατευτικά. Μεταξύ των στεροειδών σαπωνινών, η διοσγενίνη είναι ένα από τα πιο βιοενεργά συστατικά του φυτού που έχει ερευνηθεί λόγω των αντικαρκινικών και αντιγηραντικών δραστηριοτήτων (Εικόνα 2). Χρησιμοποιείται επίσης ως αντισυλληπτικό και για την πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων. Ειδικότερα, η σύνθεση μερικών στεροειδών φαρμάκων και ορμονών όπως η τεστοστερόνη, τα γλυκοκορτικοειδή και η προγεστερόνη μπορεί να προκύψουν από την διοσγενίνη, η οποία χρησιμοποιείται ως πρόδρομη ουσία για την ημισυνθετική παρασκευή τους(Chaudhary et al., 2015).



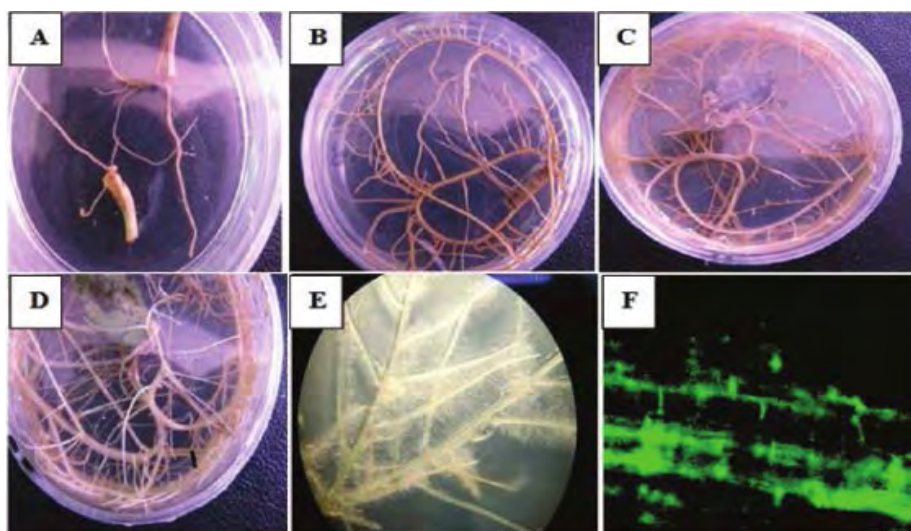
Εικόνα 2. Χημική δομή της διοσγενίνης (Uemura et al., 2010).

#### 1.1.4 Μετασχηματισμός *hairy roots*

Ο μετασχηματισμός *hairy roots* προκαλείται από το βακτήριο του εδάφους *A. rhizogenes*, με αποτέλεσμα το λεγόμενο **φαινότυπο τριχωτής ρίζας** (Εικόνα 3). Η μόλυνση που προκαλείται από αυτά τα βακτήρια οδηγεί στον μετασχηματισμό μέσω πλασμιδίου, το οποίο ονομάζεται επίσης πλασμίδιο που προκαλεί τον σχηματισμό ριζών (Ri-Root inducing) που περιέχει T-DNA (transferred - DNA), το οποίο μεταφέρεται στο φυτικό κύτταρο, ενσωματώνεται

στο γονιδίωμα του φυτού και εκφράζεται εκεί. Αυτό το **πλασμίδιο Ri** αποτελείται από T-DNA, που βρίσκεται μεταξύ των περιοχών του δεξιού (RB-right border) και αριστερού (LB-left border) συνοριακού. Το πλασμίδιο Ri μόλις μεταφερθεί ενοποιείται με το πυρηνικό γονιδίωμα του φυτού ξενιστή. Όπως στην περίπτωση του *A. tumefaciens*, ο μετασχηματισμός φυτικών κυττάρων μέσω πλασμιδίου του *A. rhizogenes* οδηγεί επίσης στην παραγωγή σπών, οι οποίες χρησιμεύουν ως ειδική τροφή για τα βακτήρια (Bhatia et al., 2015). Οι νεοπλασματικές ρίζες που παράγονται από μόλυνση με *A. rhizogenes* χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό ανάπτυξης και γενετική σταθερότητα. Αυτές οι γενετικά μετασχηματισμένες καλλιέργειες ριζών μπορούν να παράγουν υψηλότερα επίπεδα των δευτερογενών μεταβολιτών ή ποσότητες συγκρίσιμες με εκείνες των άθικτων φυτών (Hu & Du, 2006).

Ο κύριος περιορισμός αυτής της προσέγγισης είναι ότι, δεδομένου ότι οι βλαστοί δεν μετασχηματίζονται, η διαρκής συντήρηση των σύνθετων φυτών δεν είναι δυνατή είτε με αγενή πολλαπλασιασμό, είτε με αυτογονιμοποίηση. Παρ' όλα αυτά, ο περιορισμός αυτός μπορεί πλέον να παρακαμφθεί, δεδομένου ότι έχει προσφάτως δειχθεί ότι μετασχηματισμένες από Ri T-DNA ρίζες *M. truncatula* μπορούν να αναγεννηθούν επιτυχώς σε φυτάρια (Crane et al., 2006).



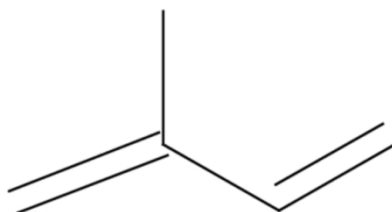
Εικόνα 3. A-B: διαφορετικά στάδια του σχηματισμού τριχωτής ρίζας από έκφυτα στελεχών, C-D: τριχωτές ρίζες που αναπτύσσονται από έκφυτα φύλλων, E: απεικόνιση των ριζών κάτω από μικροσκόπιο φθορισμού, ρίζες που εκφράζουν GFP κάτω από μικροσκόπιο φθορισμού (Shahabzadeh et al., 2013).

## 1.2 Τερπενοειδή

Τα **τερπενοειδή (ισοπρενοειδή)** αντιπροσωπεύουν τη μεγαλύτερη και πιο διαφοροποιημένη κατηγορία χημικών ουσιών μεταξύ των ενώσεων που παράγονται από τα φυτά (Εικόνα 4). Τα φυτά χρησιμοποιούν τερπενοειδή για



μια ποικιλία βασικών λειτουργιών στην ανάπτυξη, αλλά η πλειοψηφία των τερπενοειδών χρησιμοποιείται για εξειδικευμένες χημικές αλληλεπιδράσεις και προστασία στο αβιοτικό και βιοτικό περιβάλλον. Παραδοσιακά, τα φυτικά τερπενοειδή έχουν χρησιμοποιηθεί από τον άνθρωπο στα τρόφιμα, σε φαρμακευτικές και χημικές βιομηχανίες και, πιο πρόσφατα, έχουν αξιοποιηθεί για την ανάπτυξη βιοκαυσίμων (Tholl, 2015). Η βιοσύνθεση των τερπενοειδών μπορεί να χωριστεί εννοιολογικά σε τέσσερα διαφορετικά στάδια. Όλα τα τερπενοειδή προέρχονται από τις δομικές μονάδες με πέντε άτομα άνθρακα, που συντίθενται μέσω δυο διαφορετικών οδών. Τα φωσφορυλιωμένα ενδιάμεσα προϊόντα, το **διφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP)** και το αλλυλικό ισομερές του, το **διφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP)** ενώνονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν τερπένια αποτελούμενα από 10, 15 ή περισσότερα άτομα άνθρακα (Markus Lange & Ahkami, 2013).



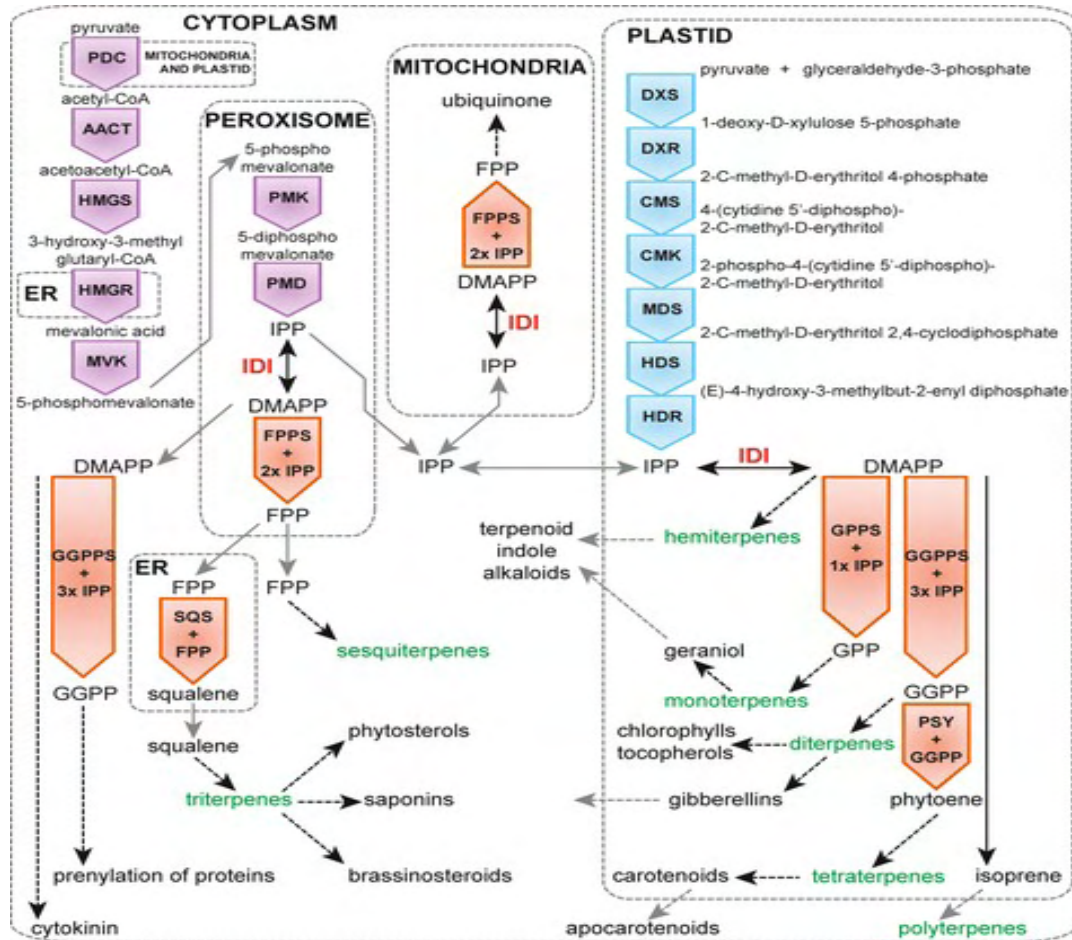
**Εικόνα 4. Χημική δομή του ισοπρενίου** (Król, B et al., 2015)

### *1.2.1 Οι δύο οδοί βιοσύνθεσης τερπενοειδών*

Στα φυτά, το IPP και κατ' επέκταση DMAPP μπορούν να συντεθούν μέσω δύο οδών, που πραγματοποιούνται σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα. Το **μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος** (mevalonic acid - **MVA**) στο κυτοσόλιο (πρώιμα στάδια), το ενδοπλασματικό δίκτυο (αναγωγή του 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρυλο-CoA) και τα υπεροξειδιοσώματα (τελευταία στάδια) (Carrie et al., 2007; Cirioni & Bach, 2007; Leivar Pablo et al., 2005; Nagegowda et al., 2005; Sapir-Mir et al., 2008; Simkin et al., 2011). Αντίθετα, όλα τα ένζυμα της **οδού της φωσφορικής μεθυλερυθριτόλης** (methylerythritol phosphate - **MEP**) εντοπίζονται σε πλαστίδια (Εικόνα 5) (Hsieh et al., 2008; Suire et al., 2000).

Η σχετική συμβολή αυτών των οδών σε συγκεκριμένα τερπενοειδή τελικά προϊόντα μπορεί να ποικίλει ουσιαστικά σε διαφορετικά φυτά ή ιστούς. Τα τερπένια συντίθενται από τους πρωτογενείς μεταβολίτες με τουλάχιστον δύο διαφορετικούς τρόπους. Μέσω της καλά μελετημένης οδού του μεβαλονικού οξέος, 3 μόρια ακέτυλο-CoA ενώνονται διαδοχικά για να σχηματίσουν το μεβαλονικό οξύ. Αυτή η σημαντική ενδιάμεση ένωση έξι ατόμων άνθρακα στη

συνέχεια πυροφωσφορυλιώνεται, αποκαρβοξυλιώνεται και αφυδατώνεται για να σχηματιστεί διφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP)(Taiz and Zeiger, 2010).



Εικόνα 5. Βιοσύνθεση τερπενοειδών στα φυτά. Δύο διακριτές οδοί για τη σύνθεση των προδρόμων διφωσφορικού ισοπεντενυλίου (IPP) και διφωσφορικού διμεθυλαλλυλίου (DMAPP): το μονοπάτι μεβαλονικού οξέος (MVA) που λαμβάνει μέρος σε κυτταρόπλασμα, υπεροξειδισώματα, μιτοχόνδρια, πλαστίδια και ενδοπλασματικό δίκτυο (μωβ) και το μονοπάτι φωσφορικής μεθυλερυθριτόλης (MEP) στα πλαστίδια (μπλε) (Moses et al., 2013).

Το δεύτερο στάδιο της τερπενοειδούς βιοσύνθεσης περιλαμβάνει αντιδράσεις συμπύκνωσης των DMAPP και IPP καταλυόμενων από πρενυλ-τρανσφεράσες ειδικές για το μήκος της αλυσίδας. Η συμπύκνωση ενός μορίου DMAPP και ενός μορίου IPP οδηγεί σε διφωσφορικό γερανύλιο (GPP), την πρόδρομη ένωση 10 ατόμων άνθρακα των περισσότερων μονοτερπενίων. Αυτή η αντίδραση καταλύεται από τη συνθάση του διφωσφορικού γερανυλίου (Burke & Croteau, 2002; Tholl et al., 2001). Η συνένωση ενός μορίου DMAPP με ένα ακόμη μόριο IPP σχηματίζει ένωση 15 ατόμων άνθρακα, το διφωσφορικό φαρνεζύλιο (FPP), την πρόδρομη ένωση των περισσότερων σесκικτερπενίων, η οποία καταλύεται από τη συνθάση του διφωσφορικού φαρνεζυλίου (FPS). Από τα γονιδιώματα φυτών φαίνονται να κωδικοποιούνται διάφορες ισομορφές FPS που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, τα πλαστίδια, τα μιτοχόνδρια ή τα υπεροξειδισώματα (Cunillera et al., 1997; Hemmerlin et al., 2003; Sanmiya et al.,

1999). Προσθήκη ενός επιπλέον μορίου IPP οδηγεί στην πρόδρομη ένωση των διτερπενίων, μια ένωση με 20 άτομα άνθρακα, το διφωσφορικό γερανυλογερανύλιο, με κατάλυση της συνθάσης διφωσφορικού γερανυλογερανυλίου. Οι ισομορφές αυτού του ενζύμου έχουν αναφερθεί ότι εμφανίζονται σε πλαστίδια, το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και τα μιτοχόνδρια (Okada et al., 2000; Sitthithaworn et al., 2001; Thabet et al., 2012; Turner et al., 1999).

Στο τρίτο στάδιο της βιοσύνθεσης τερπενοειδών, οι αντιδράσεις που καταλύονται από συνθάσες τερπενίων έχουν ως αποτέλεσμα τη συναρμολόγηση του δομικού πυρήνα κάθε κατηγορίας τερπενοειδών. Αυτή η κατηγορία ενζύμων είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση εκατοντάδων διαφορετικών σκελετών υδρογονανθράκων. Γενικά, οι συνθάσες μονοτερπενίου εντοπίζονται σε πλαστίδια, ενώ οι συνθάσες σεσκιτερπενίου βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα (Chen et al., 2011). Εντούτοις, έχουν αναφερθεί εξαιρέσεις σε αυτόν τον κανόνα, ειδικότερα στον εντοπισμό συνθασών μονοτερπενίου στο κυτοσόλιο (Aharoni, 2003) και συνθασών σεσκιτερπενίου σε πλαστίδια (Sallaud et al., 2009).

Τέλος, στο τέταρτο στάδιο της οδού παραγωγής τερπενίων, οι σκελετοί τερπενοειδών τροποποιούνται περαιτέρω, μέσω οξειδοαναγωγής, σύζευξης και άλλων αντιδράσεων τροποποίησης, για να δώσουν ένα ευρύ φάσμα τελικών προϊόντων (Markus Lange & Ahkami, 2013). Η συμπύκνωση δύο μονάδων FPP από τη συνθάση του σκουαλενίου (SQS) δημιουργεί το πρόδρομο σκουαλένιο 30 ατόμων άνθρακα, το οποίο οξειδώνεται σε 2,3-οξειδοσκουαλένιο από το ένζυμο εποξειδάση του σκουαλενίου (SQE). Η εποξειδάση του σκουαλενίου χρησιμοποιεί το μοριακό οξυγόνο και το NADPH για να οξειδώσει το σκουαλένιο σε 2,3-οξειδοσκουαλένιο. Το 2,3-οξειδοσκουαλένιο κυκλοποιείται από ένα ευρύ φάσμα κυκλασών του οξειδοσκουαλενίου (OSCs) σε πολυκυκλικές δομές, οι οποίες σε ανώτερα φυτά σηματοδοτούν το σημείο διακλάδωσης μεταξύ του πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού (Moses et al., 2014).

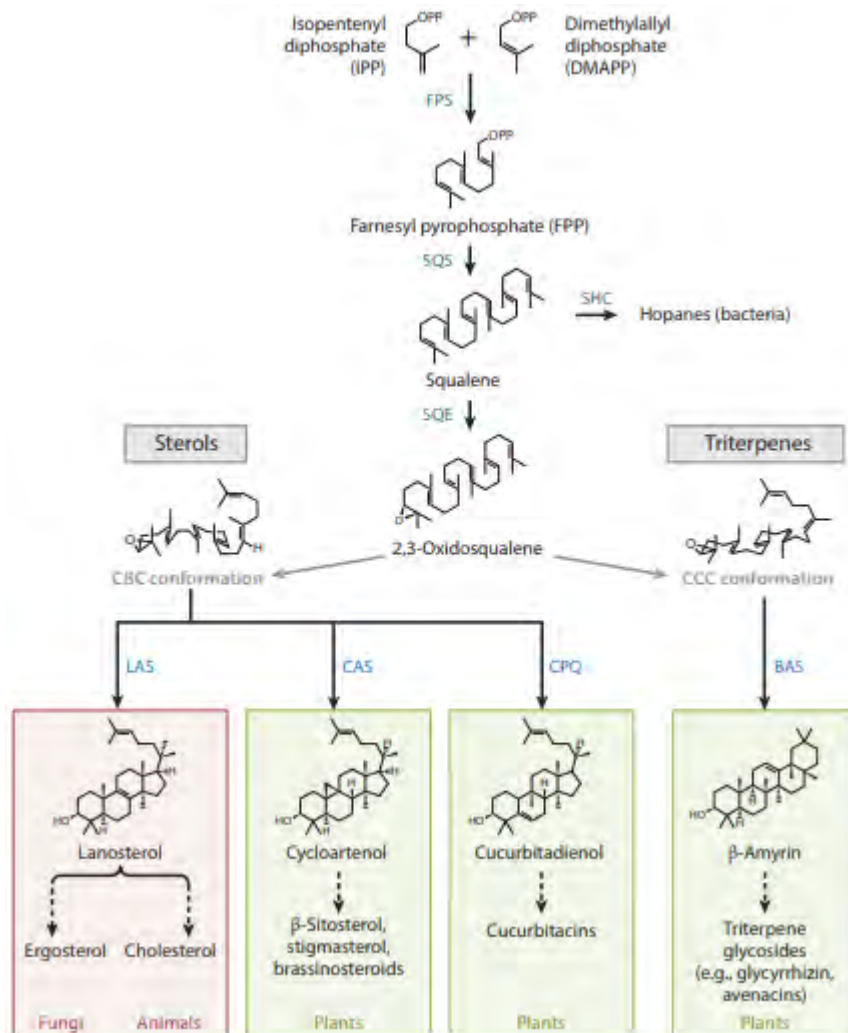
### *1.2.2 Παραγωγή τριτερπενίων*

Στο μονοπάτι βιοσύνθεσης στερολών εμπλέκονται η συνθάση της κυκλοαρτενόλης (cycloartenol synthase - CAS) και η συνθάση της λανοστερόλης (lanosterol synthase - LS), ενώ στο μονοπάτι βιοσύνθεσης τριτερπενίων οι τριτερπενοειδείς συνθάσες που οδηγούν στην παραγωγή τετρακυκλικών και πεντακυκλικών τριτερπενίων (Abe et al., 1993). Τα τριτερπένια συντίθενται από το 2,3-οξειδοσκουαλένιο από τις κυκλάσες οξειδοσκουαλενίου (OSCs), οι οποίες συλλογικά παράγουν περισσότερα από 100 διαφορετικά ικριώματα τριτερπενίου. Αυτά τα ικριώματα στη συνέχεια τροποποιούνται περαιτέρω με προσαρμοστικά ένζυμα (π.χ. κυτοχρώματα P450, τρανσφεράσες σακχάρων, και ακυλοτρανσφεράσες) για να δώσουν ακόμη μεγαλύτερη μεταβολική ποικιλομορφία. Τα γονίδια για τις βιοσυνθετικές οδούς τριτερπενίου



οργανώνονται συνήθως σε γονιδιώματα φυτών ως συμπλέγματα - ομάδες μεταβολικών γονιδίων (gene clusters).

Μέχρι στιγμής έχουν χαρακτηριστεί πάνω από 80 λειτουργικές κυκλάσες οι οποίες δίνουν προϊόντα όπως λανοστερόλη, κυκλοαρτενόλη, β-αμυρίνη (β-amyrin synthase - bAS), α-αμυρίνη (α-amyrin synthase - aAS), λουπεόλη (lupeol synthase) και πολλά ακόμα προϊόντα (Εικόνα 6)(Thimmapra et al., 2014).

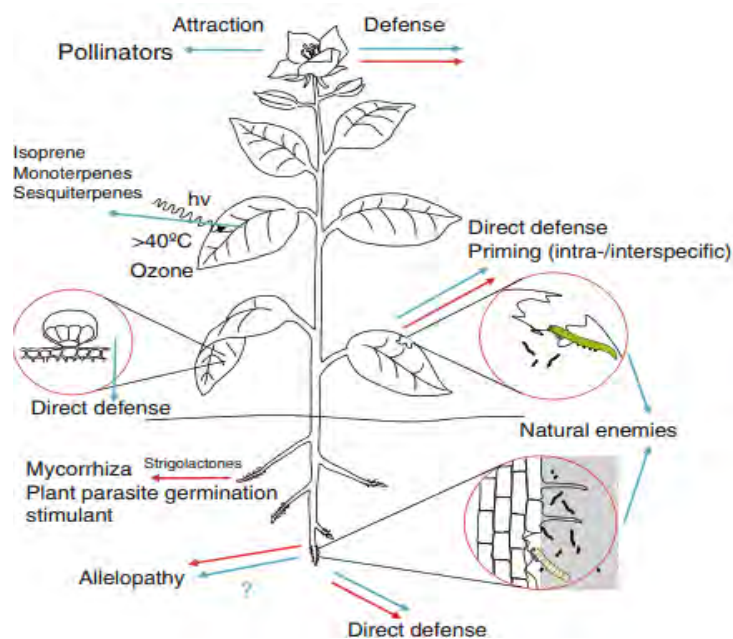


Εικόνα 6. Η βιοσυνθετική οδός προς παραγωγή στερολών και τριτερπενίων (Thimmapra et al., 2014)

### 1.2.2 Πολυλειτουργικότητα των φυτικών τερπενοειδών

Παρόλο που τα τερπενοειδή έχουν σημαντικές πρωτεύουσες λειτουργίες ως φωτοσυνθετικές χρωστικές ουσίες (καροτενοειδή), φορείς ηλεκτρονίων (πλευρικές αλυσίδες ουβικινόνης και πλαστοκινόνης), ρυθμιστές της αύξησης και της ανάπτυξης (γιββερελλίνες, αποκοπτικό οξύ, στριγγολακτόνες, βρασσινοστεροειδή, κυτοκινίνες), στη γλυκοζυλίωση πρωτεϊνών (δολιχόλες), ως στοιχεία της δομής και λειτουργίας της μεμβράνης (φυτοστερόλες), ως ειδικοί μεταβολίτες τερπενοειδών, ειδικότερα, έχουν αναγνωριστεί για μια σειρά

βιολογικών ρόλων. Τα πτητικά ή ημιπτητικά τερπενοειδή χαμηλού μοριακού βάρους, τα οποία περιέχουν μονάδα ισοπρενίου, τα μονοτερπενοειδή, τα σεσκιτερπενοειδή και τα διτερπενοειδή, εμπλέκονται στην προστασία των φυτών κατά αβιοτικών καταπονήσεων και σε διάφορες βιοτικές αλληλεπιδράσεις πάνω και κάτω από το έδαφος (Εικόνα 7)(Loreto et al., 2014; Tholl, 2015).



Εικόνα 7. Βιολογικές λειτουργίες των φυτικών τερπενοειδών (Tholl, 2015).

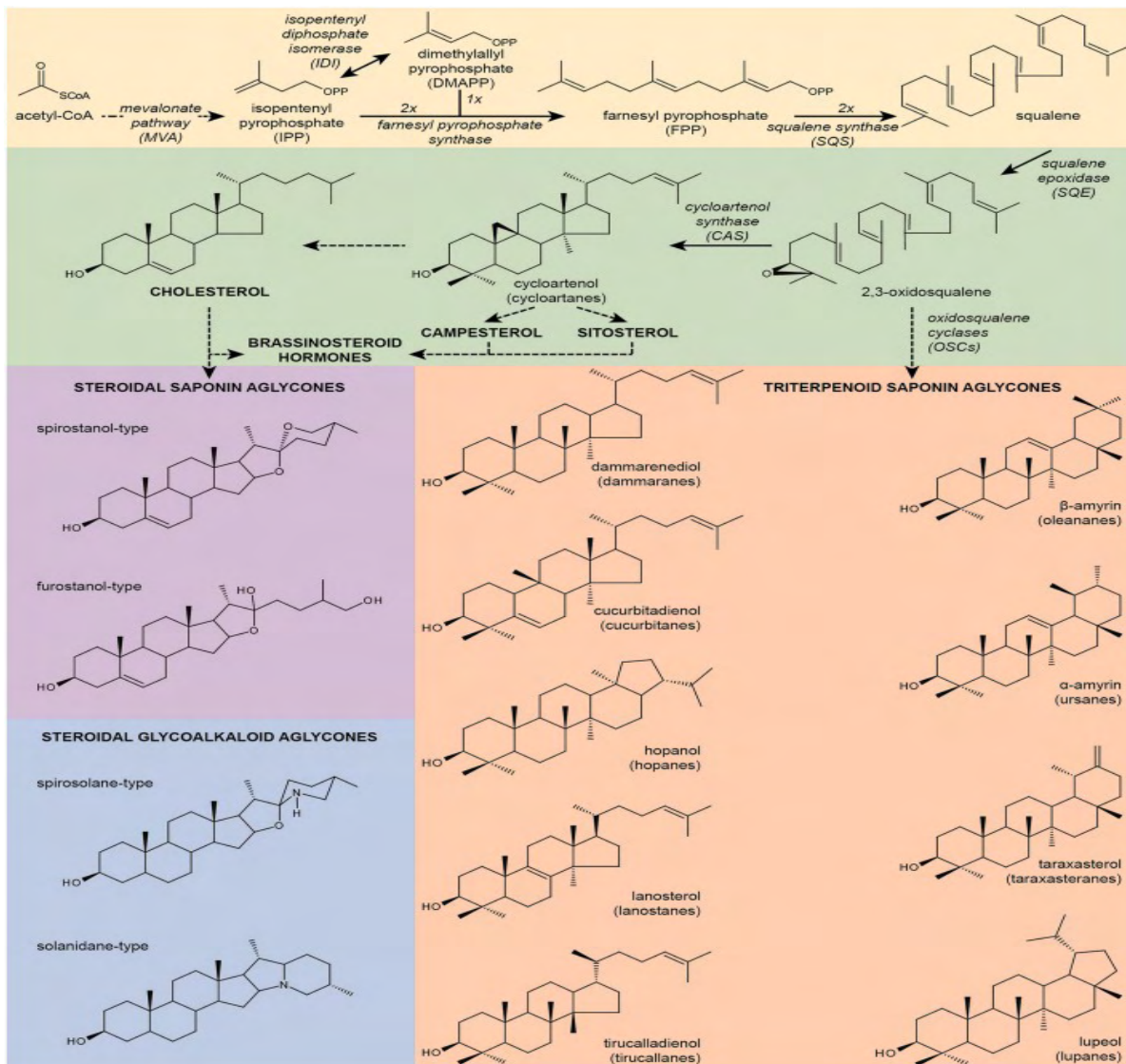
### 1.3 Σαπωνίνες

Τα τριτερπενοειδή, συμπεριλαμβανομένων των στεροειδών, είναι μια πολύ διαφοροποιημένη ομάδα φυσικών προϊόντων ευρέως διανεμημένων σε φυτά (Vincken et al., 2007). Τα φυτά συχνά συσσωρεύουν αυτές τις ενώσεις στη γλυκοζυλιωμένη τους μορφή - σαπωνίνη. Οι δύο κύριες κατηγορίες σαπωνινών είναι οι **στεροειδείς** και οι **τριτερπενοειδείς** σαπωνίνες. Και στις δύο κατηγορίες ο σκελετός του τμήματος αγλυκόνης προέρχεται από ένα γραμμικό πρόδρομο μόριο, που αποτελείται από 30 άτομα άνθρακα, το 2,3-οξειδοσκουαλένιο. Κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης το στεροειδές τμήμα αγλυκόνης χάνει τρεις ομάδες μεθυλίου και συνεπώς παράγει έναν σκελετό με 27 άτομα άνθρακα, ενώ το τριτερπενοειδές τμήμα αγλυκόνης διατηρεί και τα 30 άτομα άνθρακα στον σκελετό του. Μία ακόμη κατηγορία σαπωνινών μπορούν να θεωρηθούν τα στεροειδή γλυκοαλκαλοειδή τα οποία προκύπτουν από το ίδιο βιοχημικό μονοπάτι με τις στερόλες και περιέχουν ένα άτομο αζώτου ενσωματωμένο στον σκελετό αγλυκόνης (Augustin et al., 2011; Friedman, 2006; Ginzberg et al., 2009; Itkin, 2014). Βιολογικά, οι φυτικές σαπωνίνες θεωρούνται αμυντικές ενώσεις έναντι παθογόνων μικροβίων και φυτοφάγων (Osbourn, 2010; Szakiel & Pa, 2011; Kuzina et al.,

2009). Τα φυτά που περιέχουν σαπωνίνη προορίζονται για χρήση σε οικιακά απορρυπαντικά ("sapo" = σαπούνι)(Bruneton J, 1995).

### 1.3.1 Βιοσύνθεση σαπωνινών

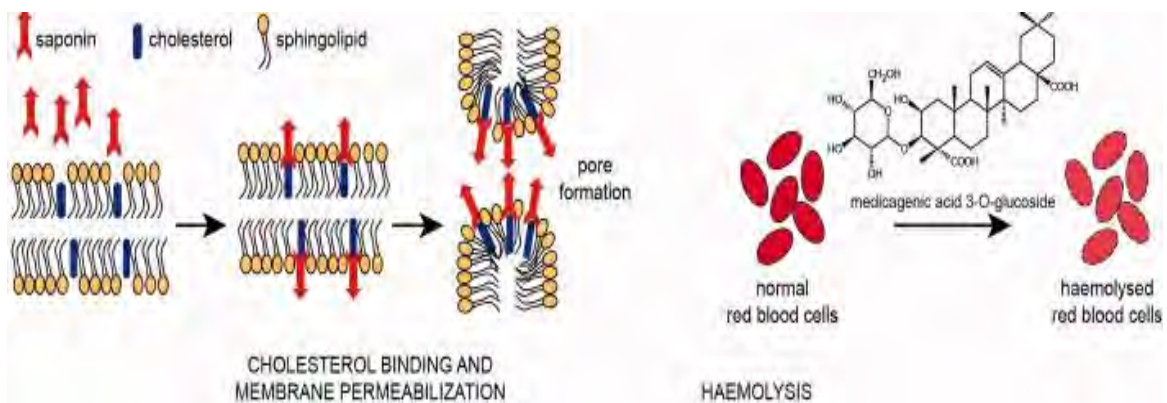
Αφού οι OSCs κατασκευάσουν τον βασικό τριτερπενοειδή σκελετό, ο σκελετός τροποποιείται προς δημιουργία μιας υδρόφοβης αγκυράς που ονομάζεται σαπωνογενίνη. Η πρώτη τροποποίηση αποτελεί την οξείδωση από την μονοοξυγενάση του κυτοχρώματος P450 (P450), και αυτό το στάδιο επιτρέπει περαιτέρω τροποποιήσεις όπως την Ο-γλυκοζυλίωση(Kahn, R. A., and Durst, F., 2000). Η γλυκοζυλίωση είναι απαραίτητη για τη βιοσύνθεση σαπωνινών (Εικόνα 8). Η γλυκοζυλίωση αυξάνει την υδατοδιαλυτότητα και αλλάζει τη βιολογική δραστηριότητα του τριτερπενοειδούς. Οι εξαρτώμενες από το UDP γλυκοζυλ-τρανσφεράσες της διφωσφορικής ουριδίνης (UGTs) αναγνωρίζουν ένα ευρύ φάσμα φυσικών προϊόντων ως μόρια δέκτες.



Εικόνα 8. Επισκόπηση της δομικής ποικιλομορφίας σαπωνινών (Moses et al., 2014).

### 1.3.2 Βιολογική δράση σαπωνινών

Με βάση τις παρατηρήσεις των Glauert κ.α. (Glauert et al., 1962) προτάθηκε το πρώτο μοντέλο δράσης των σαπωνινών στις μεμβράνες (Εικόνα 9). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, αρχικά σχηματίζονται σύμπλοκα μεταξύ των σαπωνινών και των μορίων χοληστερόλης των μεμβρανών και στη συνέχεια αυτά τα σύμπλοκα ενώνονται σχηματίζοντας μια δομή που μοιάζει με μικυλλιακή οδηγώντας στον σχηματισμό ενός πόρου στην μεμβράνη. Τέτοιοι πόροι θα μπορούσαν να προκαλέσουν αύξηση στη διαπερατότητα της μεμβράνης που επιτρέπει από ιόντα και μακρομόρια μέχρι πρωτεΐνες να περάσουν από την μεμβρανική διπλοστοιβάδα. Αυτή η ικανότητα συχνά αναφέρεται ως “αιμολυτική δράση των σαπωνινών” καθώς θεωρείται ότι αποτελεί την μοριακή βάση της ικανότητας των σαπωνινών να προκαλούν λύση των ερυθροκυττάρων στα θηλαστικά (Baumann et al., 2000; Chwalek et al., 2006; Seeman & Cheng, 1973).



Εικόνα 9. Δράση σαπωνινών στις βιολογικές μεμβράνες (Moses et al., 2014).

Ακόμη αξίζουν να σημειωθούν οι αναφορές που έχουν καταγραφεί στη μυκητοκτόνο (Lee et al., 2011; Morrissey & Osbourn, 1999), αντιμικροβιακή (Avato et al., 2006; Sang et al., 2008), αλληλοπαθή (Waller, et al., 1993) και εντομοκτόνο (Kuzina et al., 2009) δράση. Επιπρόσθετα, εμφανίζουν φαρμακολογικές ιδιότητες όπως αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές (Musende et al., 2009) και αντι-ικές (Cinatl et al., 2003) στα ζώα.

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

Χάρη στη χημική τους ιδιότητα να αποτελούν παράγοντες αφρισμού, οι σαπωνίνες έχουν αξιοποιηθεί από τη βιομηχανία ως πρόσθετα στα τρόφιμα και καλλυντικά. Θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω βιομηχανικές εφαρμογές, όπως συντηρητικά, τροποποιητές γεύσης και παράγοντες για την απομάκρυνση της χοληστερόλης από γαλακτοκομικά προϊόντα (Güçlü-Üstündağ & Mazza, 2007; Martín & Briones, 1999).



## 1.4 Το φυτό *Medicago truncatula*

Το φυτό *Medicago truncatula* (Εικόνα 10) αποτελεί ένα ψυχανθές μοντέλο που ανήκει στην οικογένεια των Fabaceae και αποτελεί πλούσια πηγή πεντακυκλικών τριτερπενοειδών σαπωνινών τύπου oleanane (Huhman et al., 2005). Το φυτό αυτό χρησιμοποιείται ευρέως για την μελέτη της βιοσύνθεσης των τριτερπενοειδών σαπωνινών (Gholami et al., 2014). Κατά συνέπεια, πολλές μελέτες σχετικά με τη σύνθεση μεταβολιτών του *M. truncatula* έχουν δημοσιευθεί την τελευταία δεκαετία χρησιμοποιώντας μεθόδους που βασίζονται σε LC-MS, αποκαλύπτοντας ένα πολύπλοκο μίγμα σαπωνινών σε διάφορους ιστούς (Sun et al., 2009).



Εικόνα 10. Το φυτό *Medicago truncatula* (National Science Foundation).

Κατά την διάρκεια της βιοσύνθεσης στερολών το 2,3-οξειδοσκουαλένιο κυκλοποιείται σε κυκλοαρτενόλη από την CAS (Corey et al., 1993), ενώ κατά την βιοσύνθεση τριτερπενοειδών η κυκλοποίηση παράγει β-αμυρίνη. Για τη βιοσύνθεση σαπωνινών στο *Medicago*, το 2,3-οξειδοσκουαλένιο κυκλοποιείται προς την πεντακυκλικού σκελετού τύπου-oleanane β-αμυρίνη από την συνθάση της β-αμυρίνης (BAS). Αυτό το στάδιο αποτελεί το σημείο διακλάδωσης μεταξύ του πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού (Iturbe-Ormaetxe et al., 2003; Suzuki et al., 2002).

Η αυξημένη συσσώρευση σαπωνινών διαμεσολαβείται από αυξημένα επίπεδα μεταγραφής των αντίστοιχων γονιδίων βιοσύνθεσης σαπωνινών. Το ένζυμο κλειδί για την ρύθμιση του μονοπατιού είναι η αναγωγάση του 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρυλο-CoA (HMGR) που καταλύει τον σχηματισμό του μεβαλονικού οξέος. Στο *Medicago truncatula* έχουν βρεθεί πέντε ισομορφές του ενζύμου αυτού (Kevei et al., 2007, Mertens et al., 2014). Ωστόσο, ένας άλλος ρυθμιστικός μηχανισμός, που λειτουργεί σε ένα μετα-μεταγραφικό επίπεδο, έχει πρόσφατα ανακαλυφθεί. Στο *M. truncatula*, η MAKIBISHI1 (MKB1), μία E3 λιγάση της ουβικουιτίνης στοχεύει το ένζυμο HMGR και επάγει την αποικοδόμησή του. Ακόμη, η ανταγωνιστική δράση δύο μονοοξυγενασών του κυτοχρώματος P450 προκαλεί μια άλλη διακλάδωση στο μονοπάτι βιοσύνθεσης τριτερπενοειδών στο *M. truncatula* και συνεπώς, οι τριτερπενοειδείς σαπωνίνες διακρίνονται σε δύο τάξεις: τις αιμολυτικές και μη αιμολυτικές (Mertens et al., 2016).

Η μεταγραφική απόκριση σε παθογόνα ή φυτοφάρμακα ελέγχεται από ένα σύνθετο καταρράκτη σηματοδότησης στον οποίο το ιασμονικό οξύ (JA) παίζει καθοριστικό ρόλο. Ως εκ τούτου, στη θεραπεία των φυτών *Medicago* με JA, το JA μπορεί να μιμηθεί την επίθεση παθογόνων ή φυτοφαρμάκων. Κατά συνέπεια, η έκθεση καλλιεργειών *M. truncatula* σε ιασμονικό μεθυλεστέρα (MeJA) οδηγεί στη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των σαπωνινών (Chaudhary et al., 2015).

#### 1.4.1 Οι μεταγραφικοί παράγοντες επαγωγής της βιοσύνθεσης σαπωνινών, TSAR1 και TSAR2

Ορμονικοί διεγέρτες, όπως το JA, ενεργοποιούν ένα σύνθετο κύκλωμα σηματοδότησης που οδηγεί στη συντονισμένη ενεργοποίηση συγκεκριμένων μεταβολικών οδών. Ωστόσο, για πολλά εξειδικευμένα μεταβολικά μονοπάτια, οι μεταγραφικοί παράγοντες που εμπλέκονται παραμένουν άγνωστοι (Mertens et al., 2016). Ο Mertens κ.α. στην προσπάθειά τους να βρουν μεταγραφικούς παράγοντες που συμμετέχουν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης τριτερπενοειδών σαπωνινών, αναφέρονται σε δύο σχετικά ομόλογους παράγοντες μεταγραφής.

Αναζητώντας πιθανούς μεταγραφικούς παράγοντες του μονοπατιού βιοσύνθεσης τριτερπενοειδών σαπωνινών στο *M. truncatula* έψαξαν στο *M. truncatula* Gene Expression Atlas για γονίδια που έχουν ίδιο προφίλ έκφρασης με τα γονίδια *HMGR1* και *MKB1*, τα οποία όπως αναφέρθηκε συμμετέχουν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης σαπωνινών και βρήκαν έξι πιθανούς μεταγραφικούς παράγοντες. Στην συνέχεια έλεγξαν εάν αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποιούν το μονοπάτι μέσω παροδικής τους έκφρασης σε πρωτοπλάστες *Nicotiana tabacum* (Sutter et al., 2005). Τελικά, δύο μεταγραφικοί παράγοντες της βασικής δομής έλικά-στροφή-έλικά μπορούσαν να επάγουν την έκφραση της λουσιφεράσης (γονίδιο αναφοράς). Οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες ονομάστηκαν ρυθμιστικοί ενεργοποιητές τριτερπενοειδών σαπωνινών (Triterpene Saponin Activation Regulators), TSAR1 και TSAR2. Η *trans*-ενεργοποίηση επιτυγχάνεται με άμεση σύνδεση των TSARs στο πλαίσιο N (N-box) του υποκινητή του *HMGR1* (Mertens et al., 2016).

Η υπερέκφραση TSAR1 ή TSAR2 σε *hairy roots* του *M. truncatula* είχε ως αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα μεταγραφής γνωστών γονιδίων που συμμετέχουν στην παραγωγή τριτερπενοειδών σαπωνινών και αύξησε έντονα τη συσσώρευση τριτερπενοειδών σαπωνινών. Η υπερέκφραση TSAR2 ενίσχυσε ειδικά τη βιοσύνθεση αιμολυτικών σαπωνινών, ενώ η υπερέκφραση TSAR1 προκάλεσε κυρίως τη βιοσύνθεση μη-αιμολυτικών σαπωνινών. Και οι δύο TSARs ενεργοποίησαν όλα τα γονίδια του πρόδρομου μονοπατιού βιοσύνθεσης μεβαλονικού οξέος αλλά δεν επηρέασαν τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση στερολών, αποδεικνύοντας τον ειδικό ρόλο τους ως εξειδικευμένοι ρυθμιστές του μεταβολισμού τριτερπενίων στο *M. truncatula* (Mertens et al., 2016).

# Σκοπός Εργασίας

---

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της ετερόλογης έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων TSAR1 και TSAR2 (Triterpenoid Saponin Activating Regulators 1,2) στο φυτό *T. foenum-graecum*. Η ετερόλογη αυτή έκφραση είναι πιθανό να επηρεάζει τη μεταγραφική δραστηριότητα γονιδίων που εμπλέκονται στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των τριτερπενοειδών σαπωνινών, όπως έχει αποδειχθεί ήδη στο συγγενικό φυτό *M. truncatula*. Ο κύριος στόχος λοιπόν πίσω από την υπερέκφραση των TSAR1 και TSAR2 είναι να απαντηθεί το ερώτημα αν ο ρυθμιστικός μηχανισμός αυτού του βιοσυνθετικού μονοπατιού είναι συντηρημένος μεταξύ αυτών των φυτών.

Επιπρόσθετα, η φαρμακευτική αξία των στεροειδών σαπωνινών που παράγονται από το *T. foenum-graecum* καθιστά απαραίτητη την μελέτη των γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι, με στόχο την κατανόηση της ρύθμισής του και την τροποποίησή του, ώστε τελικά να είναι δυνατή η αύξηση παραγωγής των ενεργών αυτών ουσιών. Αν και στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα για το γονιδίωμα του *T. foenum-graecum*, μέσω της ετερόλογης έκφρασης των TSARs θα έχουμε μία πρώτη εικόνα για το αν στο φυτό αυτό, παρόμοια με το *M. truncatula*, οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες μπορούν να ενεργοποιήσουν το πρώτο στάδιο-κλειδί του μονοπατιού (γονίδιο *HMGR*), αλλά και ποια είναι η επίδρασή τους όταν το μονοπάτι διακλαδίζεται προς παραγωγή στεροειδών σαπωνινών (γονίδιο *CAS*).

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Μετασχηματισμός φυτού *T. foenum* – *graecum hairy roots*

Ο μετασχηματισμός hairy roots στο φυτό *T. foenum* – *graecum* πραγματοποιήθηκε και περιγράφεται λεπτομερώς στην πτυχιακή εργασία της Γεωργοπούλου Μαρίας – Ελένης (Ανάπτυξη πρωτοκόλλου για τον μετασχηματισμό του φυτού *Trigonella foenum* – *graecum*, TBB-ΠΘ, 2018) με μόλυνση των φυτών με το στέλεχος ARQUA1 του *Agrobacterium rhizogenes* μετασχηματισμένο με τον φορέα *pUB* - *TSAR1,2* - *Hyg* (Φωτεινή Δημάκου - πτυχιακή BSc, TBB-ΠΘ, 2017 ; Maekawa et al., 2008). Ο φορέας αυτός, στο T-DNA περιέχει το ένθεμα που φαίνεται στην Εικόνα 11, όπου ανάμεσα στο δεξί και αριστερό συνοριακό περιέχονται οι κωδικές αλληλουχίες των *MtTSAR1,2* γονιδίων υπό τη ρύθμιση του υποκινητή του γονιδίου της ουβικουιτίνης του φυτού *Lotus japonicus*, και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη ως γονίδιο επιλογής. Τα φυτά - μάρτυρες μετασχηματίστηκαν με τον άδειο φορέα *pUB* - *GW* - *Hyg* (Maekawa et al., 2008).



Εικόνα 11. Απλοποιημένο σχεδιάγραμμα του T-DNA που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή φορέα. Ανάμεσα στο δεξί συνοριακό (RB) και στο αριστερό (LB) περιέχονται ο υποκινητής του γονιδίου της ουβικουιτίνης (*LjUbq1pr*), οι κωδικές αλληλουχίες των γονιδίων *TSAR1* και *TSAR2* και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη (*Hyg<sup>R</sup>*) με τον υποκινητή και την τερματική αλληλουχία του *35S*.

### 2.2 Απομόνωση DNA με τη χρήση διαλύματος CTAB

- Λειοτρίβηση του ιστού σε υγρό άζωτο
- Προσθήκη σε κάθε δείγμα 100μl CTAB ρυθμιστικό διάλυμα (προθερμασμένο στους 65°C) και 1μl μερκαπτοαιθανόλης και επώαση για 15 λεπτά στους 65°C
- Προσθήκη 150μl χλωροφόρμιο - ισοαμυλική αλκοόλη (1:25 v/v) και ανάμιξη με vortex
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 17,000g
- Μεταφορά υδατικής φάσης σε νέο σωληνάριο και προσθήκη 0,7 όγκων ισοπροπανόλης
- Ήπια ανάδευση και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 17,000g
- Αφαίρεση υπερκείμενου και προσθήκη 500μl παγωμένης αιθανόλης
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 17,000g
- Αφαίρεση υπερκείμενου και επαναδιάλυση σε 15μl ddH<sub>2</sub>O και RNάση (1μl RNάση σε 50μl ddH<sub>2</sub>O)
- Επώαση 10 λεπτά στον πάγο



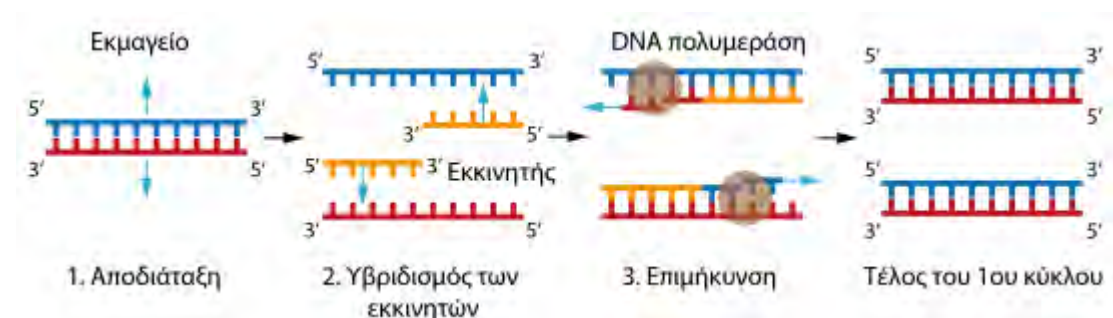
- Vortex και quick spin για 10 δευτερόλεπτα

## 2.3 PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια *in vitro* μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση μίας αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA με ταυτόχρονη επέκταση των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων. Τα βασικά συστατικά για τη διενέργεια της αντίδρασης PCR είναι:

- Θερμοανθεκτική Πολυμεράση του DNA
- Ζεύγος ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων, συμπληρωματικών προς την αλληλουχία προς ενίσχυση
- Δίκλωνη αλληλουχία - στόχος
- Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και ιόντα  $Mg^{+2}$
- Τριφωσφορικά Δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)

Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά (Εικόνα 12):



Εικόνα 12. Τα στάδια της αντίδρασης PCR

**Αποδιάταξη:** Οι δύο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95° C για περίπου 30 sec έως 1 min.

**Υβριδισμός εκκινήτων:** Με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65°C για περίπου 30 sec έως 1 min, οι εκκινήτες υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA.

**Επιμήκυνση:** Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 72° C, τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινήτες εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Η ταχύτητα σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι της τάξης των 1000 bp ανά λεπτό. Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται από 25 έως 35 φορές. Η PCR εκτελείται στον θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler), συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια.

Στην περίπτωση αυτή, ενισχύθηκε ένα τμήμα του 35S υποκινητή του γονιδίου της υδρομυκίνης (γονίδιο επιλογής). Η PCR έγινε με πολυμεράση Taq της Kara Biosystems. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στο Παράρτημα.

**Πίνακας 1. Τα αντιδραστήρια και οι συγκεντρώσεις τους στον τελικό όγκο των 20 μλ.**

Αντιδραστήρια PCR	20μλ αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
10x KaraTaq Buffer με Mg <sup>+2</sup>	2μλ	1x
dNTPs (10mM)	0.4μλ	200μM
Forward εκκινητής (10μM)	0.4μλ	0.2μM
Reverse εκκινητής (10μM)	0.4μλ	0.2μM
Εκμαγείο DNA	1μλ	
KaraTaq® (5U/μλ)	0.08μλ	1U per 50 μλ
ddH <sub>2</sub> O	15.72μλ	

Το πρόγραμμα θερμοκυκλοποίησης φαίνεται στον παρακάτω πίνακα και επαναλήφθηκε για 35 κύκλους:

**Πίνακας 2. Συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης στο θερμικό κυκλοποιητή.**

Συνθήκες ενίσχυσης	Θερμοκρασία [°C]	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95	2min
Αποδιάταξη	95	30sec
Υβριδοποίηση	54	30sec
Επιμήκυνση	72	30sec
Τελική επιμήκυνση	72	2min
	4	∞

## 2.4 Απομόνωση RNA από τις ρίζες του φυτού *T. foenum* – *graecum* με χρήση LiCl (Brusslan & Tobin, 1992)

- Λειοτριβήση του ιστού σε υγρό άζωτο και μεταφορά ~0.2g σκόνης σε σωληνάριο
- Προσθήκη 300μλ extraction διάλυμα και 300μλ διαλύματος PIC
- Ανάμιξη με vortex για 30 δευτερόλεπτα
- Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 17,000g στους 4°C ή σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσεκτική μεταφορά υδατικής φάσης σε νέο σωληνάριο και προσθήκη 300μλ διαλύματος PIC
- Ανάμιξη με vortex για 30 δευτερόλεπτα

- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 17,000g στους 4°C ή σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσεκτική μεταφορά υδατικής φάσης, η οποία περιέχει το DNA και RNA σε νέο σωληνάριο. Το DNA και RNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη 20μl 3M οξικού νατρίου και 200μl ισοπροπανόλης (αναλογία όγκων 0.1:1)
- Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 17,000g στους 4°C ή σε θερμοκρασία δωματίου
- Αφαίρεση του υπερκειμένου
- Αφαίρεση DNA με καθίζηση LiCl. Επαναδιάλυση ιζήματος σε 562.5μL 10T/10E και 87.5μL 8M LiCl και επώαση overnight στους -4°C
- Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 17,000g στους 4°C ή σε θερμοκρασία δωματίου
- Αφαίρεση του υπερκειμένου
- Επαναδιάλυση ιζήματος σε 300μL 70% αιθανόλη
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 11,000g στους 4°C ή σε θερμοκρασία δωματίου
- Επώαση στον πάγκο εργασίας με σκοπό την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης και επαναδιάλυση σε 20μL ddH<sub>2</sub>O

## 2.5 Απομάκρυνση γονιδιωματικού DNA από RNA

Για την απομάκρυνση υπολειμματικού DNA από το RNA, χρησιμοποιήθηκε η Δεοξυριβονουκλεάση I (DNase I®) της Invitrogen στις ποσότητες που φαίνονται στον Πίνακα 3 :

**Πίνακας 3. . Τα αντιδραστήρια στον τελικό όγκο των 10 μl.**

Σε PCR σωληνάρια:	V <sub>TEΛ</sub> = 10μL
10x DNase I Reaction Buffer	1 μL
DNase I	1 μL
RiboLock RNase Inhibitor (40U/L)	0.5 μL
RNA Sample	4.5 μL
ddH <sub>2</sub> O	3 μL

Το πρόγραμμα θερμοκυκλοποίησης φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

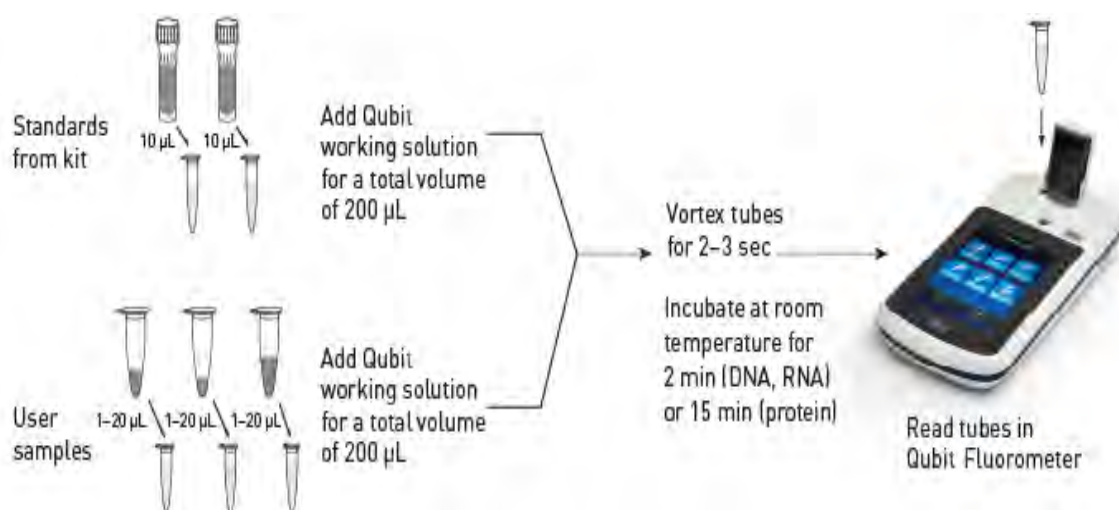
**Πίνακας 4. Συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης στο θερμικό κυκλοποιητή.**

Θερμοκρασία [°C]	Χρόνος
37	30min
65	10min

Παύση του προγράμματος μετά τα 30 λεπτά της δράσης του ενζύμου στους 37 °C, μεταφορά δειγμάτων στον πάγο και προσθήκη 1μL 50mM EDTA για τερματισμό της αντίδρασης και συνέχεια του προγράμματος στους 65 °C για 10 λεπτά με σκοπό την αναστολή της δράσης του ενζύμου.

## 2.6 Ποσοτικοποίηση DNA και RNA με χρήση Qubit®

Η Qubit® της Invitrogen αποτελεί μέθοδος φθοριομετρικής ποσοτικοποίησης DNA, RNA ή πρωτεϊνών με τη χρήση κάθε φορά διαφορετικών kit, όπου περιέχονται 2 Qubit® standards για σχηματισμό πρότυπης καμπύλης, το Qubit® Reagent και Qubit® Buffer για δημιουργία του Qubit® Working Solution. Οι αναλογίες των συστατικών και η διαδικασία μέτρησης απεικονίζεται παρακάτω (Εικόνα 13).

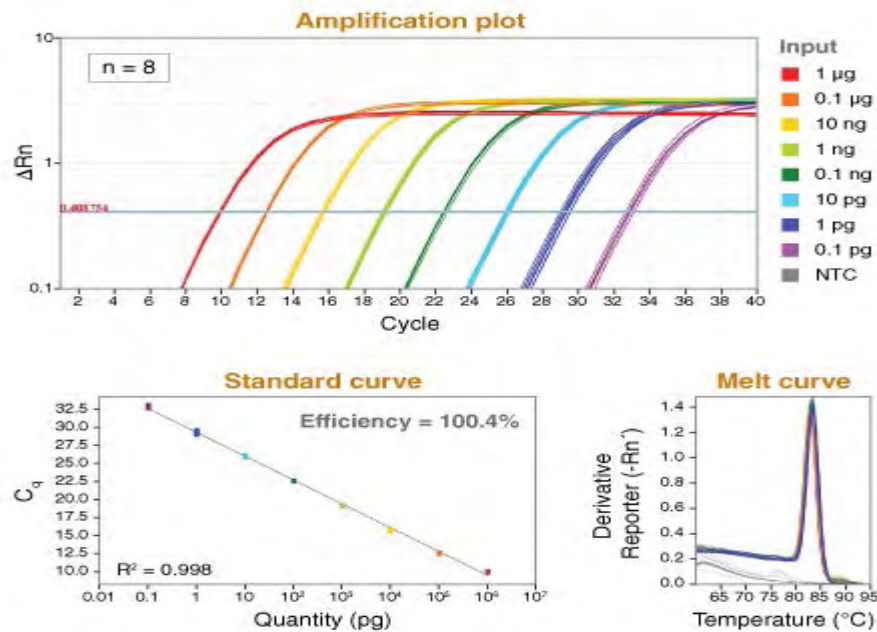


Εικόνα 13. Η διαδικασία ποσοτικοποίησης DNA, RNA με τη μέθοδο Qubit®

## 2.7 Σχετική Real Time-PCR (RT-qPCR) Luna®

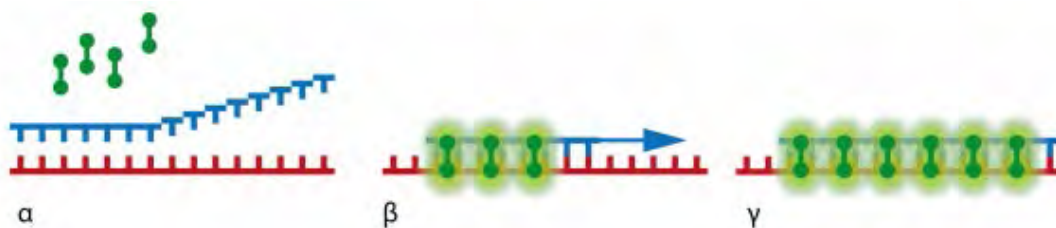
Εκτελείται σε εξειδικευμένα μηχανήματα (θερμικοί κυκλοποιητές πραγματικού χρόνου), εξοπλισμένα με ένα πολύπλοκο σύστημα κατόπτρων και φίλτρων που ποσοτικοποιούν τον φθορισμό που εκπέμπεται από φθορίζουσα χρωστική, καθώς αυτή ενσωματώνεται στα προϊόντα της PCR. Τα δεδομένα συλλέγονται όταν η αντίδραση είναι ακόμη στη φάση της εκθετικής αύξησης. Η σημαντικότερη παράμετρος για την ποσοτικοποίηση είναι η τιμή  $C_t$ , που αντιστοιχεί στον κύκλο κατά τον οποίο ο φθορισμός των προϊόντων της PCR ξεπερνά το βασικό επίπεδο και φτάνει σε συγκεκριμένο ουδό - κατώφλι

(threshold), όπως φαίνεται στην Εικόνα 14. Η κανονικοποίηση με σκοπό την σχετική ποσοτικοποίηση του γονιδίου που μελετάται πραγματοποιείται με τη χρήση ενδογενούς γονιδίου, το είναι ιδιόσυστατα εκφραζόμενο, δηλαδή ανήκει στα γονίδια που είναι απαραίτητα για την κυτταρική λειτουργία και εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και κάτω από οποιαδήποτε περιβαλλοντική συνθήκη.



Εικόνα 14. Γραφική παράσταση της καμπύλης της αντίδρασης της RT-qPCR Luna<sup>®</sup>. Η οριζόντια γραμμή δείχνει το κατώφλι (threshold) στο οποίο ο φθορισμός των προϊόντων της PCR αρχίζει να ξεχωρίζει από το βασικό επίπεδο (baseline). Ο κύκλος στον οποίο συμβαίνει αυτό αποδίδεται με την τιμή Ct, που αντιστοιχεί στον κύκλο κατά τον οποίο ο φθορισμός ξεπερνά το κατώφλι ανίχνευσης.

Οι μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές, όπως το SYBR Green I, παρουσιάζουν ελάχιστο ή μηδενικό φθορισμό όταν είναι ελεύθερες στο διάλυμα και φθορίζουν όταν ενσωματώνονται στη μικρή αύλακα των δίκλωνων μορίων DNA. Κατά την σχετική RT-qPCR πραγματοποιείται μέτρηση φθορισμού σε κάθε κύκλο μετά το τέλος της επιμήκυνσης των μορίων DNA. Όσο περισσότερα δίκλιωνα PCR προϊόντα παράγονται τόσο περισσότερο αυξάνει ο φθορισμός που καταγράφεται από το μηχάνημα (Winer et al., 1999).



Εικόνα 15. Μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές. Οι μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές, με γνωστότερη το SYBR Green I, ενσωματώνονται στο δίκλινο μόριο dsDNA καθώς αυτό συντίθεται και φθορίζουν μόνο όταν είναι συνδεδεμένες.

Αυτό που διαφοροποιεί μια απλή qPCR από την Luna® Universal One-Step RT-qPCR είναι ότι πραγματοποιείται αντίστροφη μεταγραφή (άρα σύνθεση cDNA) στην ίδια αντίδραση πριν ξεκινήσει η ενίσχυση του τμήματος, απαλλάσσοντας έτσι από τη διαδικασία δημιουργίας cDNA σε προηγούμενο ξεχωριστό στάδιο.

Η αντίδραση περιλαμβάνει τα εξής:

**Πίνακας 5. Τα αντιδραστήρια στον τελικό όγκο των 10 μλ.**

Αντιδραστήρια RT-qPCR Luna®	10μL αντίδραση	Τελική Συγκέντρωση
Luna® Universal One-Step Reaction Mix (2x)	5μL	1x
Luna® WarmStart® RT Enzyme Mix (20x)	0.5μL	1x
Forward εκκινητής (10μM)	0.4μL	0.4μM
Reverse εκκινητής(10μM)	0.4μL	0.4μM
Εκμαγείο RNA	1μL	≤ 1μg
Nuclease-free Water	2.7μL	

Το πρόγραμμα θερμοκυκλοποίησης φαίνεται στον παρακάτω πίνακα και επαναλήφθηκε για 40 κύκλους:

**Πίνακας 6. Συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης στο θερμικό κυκλοποιητή.**

Συνθήκες ενίσχυσης	Θερμοκρασία [°C]	Χρόνος
Αντίστροφη Μεταγραφή	55	10min
Αρχική αποδιάταξη	95	1min
Αποδιάταξη	95	10sec
Επιμήκυνση	60	30sec
Melt Curve	65 μέχρι 95	Προσαύξηση 0.5C για 0:05

Οι αλληλουχίες των εκκινητών των γονιδίων που ελέγχθηκαν αναγράφονται στο Παράρτημα. Το ενδογενές γονίδιο που χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την κανονικοποίηση της έκφρασης ήταν το γονίδιο του παράγοντα επιμήκυνσης 1-α (*EF1-α*). Η ανάλυση δεδομένων έγινε σύμφωνα με την μέθοδο  $\Delta\Delta C_t$ , με όλα τα δεδομένα να εκφράζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SD (standard deviation- τυπική απόκλιση) μετά την κανονικοποίηση(Livak & Schmittgen, 2001).

## 2.8 Εκχύλιση σαπωνινών

- Λειοτρίβηση ιστού και μεταφορά ~100mg σκόνης σε σωληνάριο



- Προσθήκη 300μL διαλύτη 80% MeOH :1% φορμικό οξύ : 19% dH<sub>2</sub>O (w/v)(αναλογία βάρους ιστού-όγκος διαλύτη 1mg:3μL)
- Ανάμιξη με vortex για 30 δευτερόλεπτα
- Περαιτέρω διάσπαση ιστών/κυττάρων με υπερήχους (sonication) για 20 λεπτά
- Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 20,000g στους 4°C
- Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο σωληνάριο
- Φιλτράρισμα (φίλτρα με διάμετρο πόρου 0.22μm) και μεταφορά σε LC φιαλίδιο
- Speed – vac για εξάτμιση του διαλύτη

Στη συνέχεια, σε κάθε φιαλίδιο προστέθηκαν 100μL MeOH για την επαναδιαλυτοποίηση του δείγματος με σκοπό την εκτέλεση Χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας και καθοδικών τεχνικών μεταβολικής ανάλυσης (metabolite profiling).

## 2.9 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC)

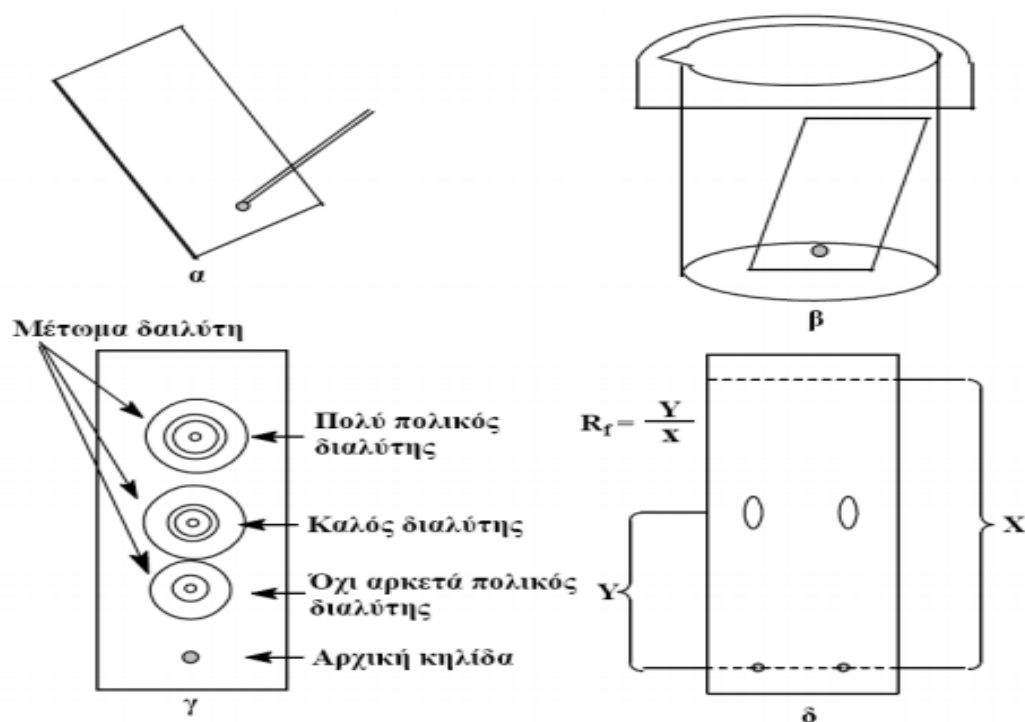
Η χρωματογραφία είναι μια διαχωριστική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, τον καθαρισμό και την ταυτοποίηση πολλών χημικών ουσιών κυρίως οργανικού και βιολογικού ενδιαφέροντος. Σε όλες τις χρωματογραφικές τεχνικές διακρίνονται 2 φάσεις, η στατική φάση πάνω στην οποία συγκρατούνται τα προς διαχωρισμό συστατικά και η κινούμενη φάση με την οποία επιτυγχάνεται η μετατόπιση των συστατικών πάνω στην στατική φάση(Stahl, 2014).

Η Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας ή TLC (Thin Layer Chromatography), ανήκει στην κατηγορία της χρωματογραφίας προσρόφησης, όπου η στατική φάση είναι ένα στερεό προσροφητικό και η κινητή φάση υγρό, με το χαρακτηριστικό οι πιο πολικές ουσίες να μετακινούνται γρηγορότερα από τις λιγότερο πολικές. Τα χρησιμοποιούμενα προσροφητικά είναι λεπτότατα με αντιπροσωπευτική διάμετρο κόκκων ~40Å και αναμιγνύονται με γύψο.

Η ταχύτητα με την οποία μετακινούνται οι ουσίες στην TLC είναι ανάλογη της πολικότητας του διαλύτη και αντιστρόφως ανάλογη της δραστηρότητας των χρησιμοποιούμενων προσροφητικών. Προκειμένου να συγκρίνουμε τα χρωματογραφήματα TLC δύο άγνωστων ουσιών με σκοπό την ταυτοποίησή τους, ορίζουμε τον συντελεστή επιβράδυνσης  $R_f$  (Retention factor) σαν το λόγο της απόστασης  $Y$  που διήνυσε η ουσία προς την απόσταση  $X$  που διήνυσε ο διαλύτης. Παρόλο που για κάθε ένωση ο  $R_f$  είναι σταθερός με τη φυσική σημασία του όρου, πρέπει να γίνει αντιληπτό ότι η τιμή του εξαρτάται από το είδος και το πάχος του προσροφητικού, τη θερμοκρασία, το είδος του

διαλύτη, ακόμη και από το βαθμό κορεσμού της ατμόσφαιρας του θαλάμου ανάπτυξης (Stochmal et al., 2008).

Το προσροφητικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το διοξείδιο του πυριτίου SiO<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich® TLC silica gel plates), που αποτέλεσε την στατική φάση και ως κινούμενη φάση χρησιμοποιήθηκε ο διαλύτης χλωροφόρμιο : μεθανόλη : απεσταγμένο νερό (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:dH<sub>2</sub>O) σε αναλογία 70:44:10 (v/v) και ο διαλύτης MeOH. Τα εκχυλίσματα επαναδιαλύθηκαν σε 100μL MeOH και φορτώθηκαν στο TLC plate με χρήση σύριγγας μικρολίτρων Hamilton. Η εμφάνιση του χρωματογραφήματος έγινε με ψεκασμό της πλάκας με το διάλυμα Οξικό οξύ : Θειικό οξύ : p-Ανισαλδεΰδη (CH<sub>3</sub>COOH:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>) σε αναλογία 96:2:2 και θέρμανση στους 110-150°C το οποίο καταστρέφει τις ενώσεις του μίγματος. Σχεδόν όλες οι οργανικές ουσίες εκτός των κορεσμένων υδρογονανθράκων, απανθρακώνονται και γίνονται έτσι ορατές (Waksmundzka-Hajnos et al., 2008).



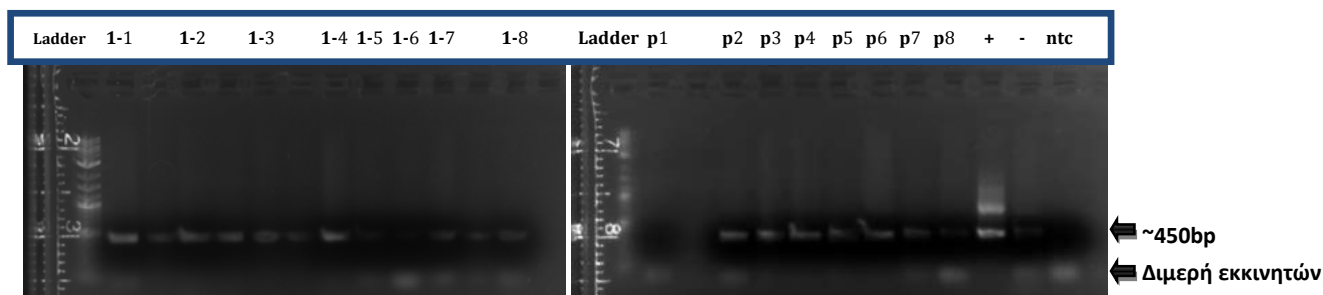
Εικόνα 16. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. (α) Κηλίδωση πλάκας (β) Ανάπτυξη χρωματογραφήματος (γ) Δοκιμή έυρεσης του κατάλληλου διαλύτη (δ) Προσδιορισμός του R<sub>f</sub>



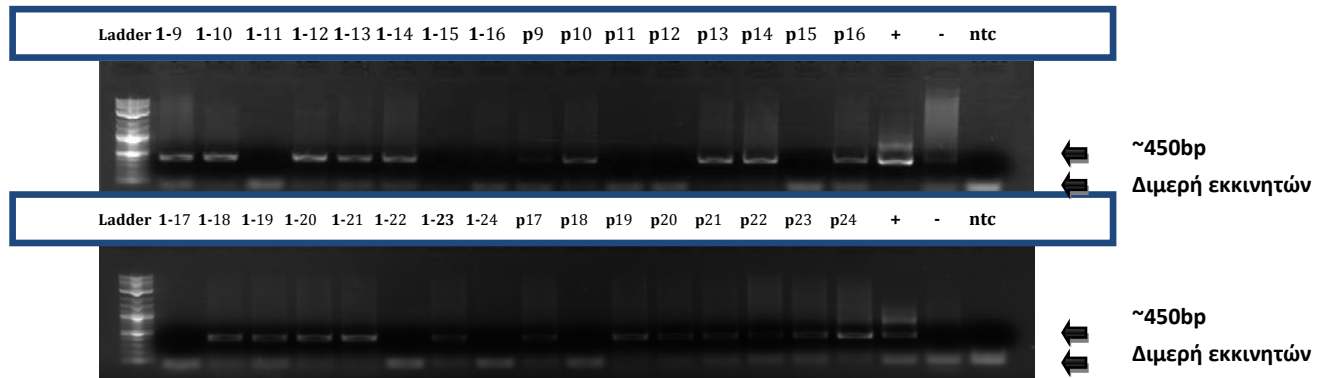
### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Επιβεβαίωση του μετασχηματισμού *hairy roots* σε φυτά *Trigonella foenum-graecum*

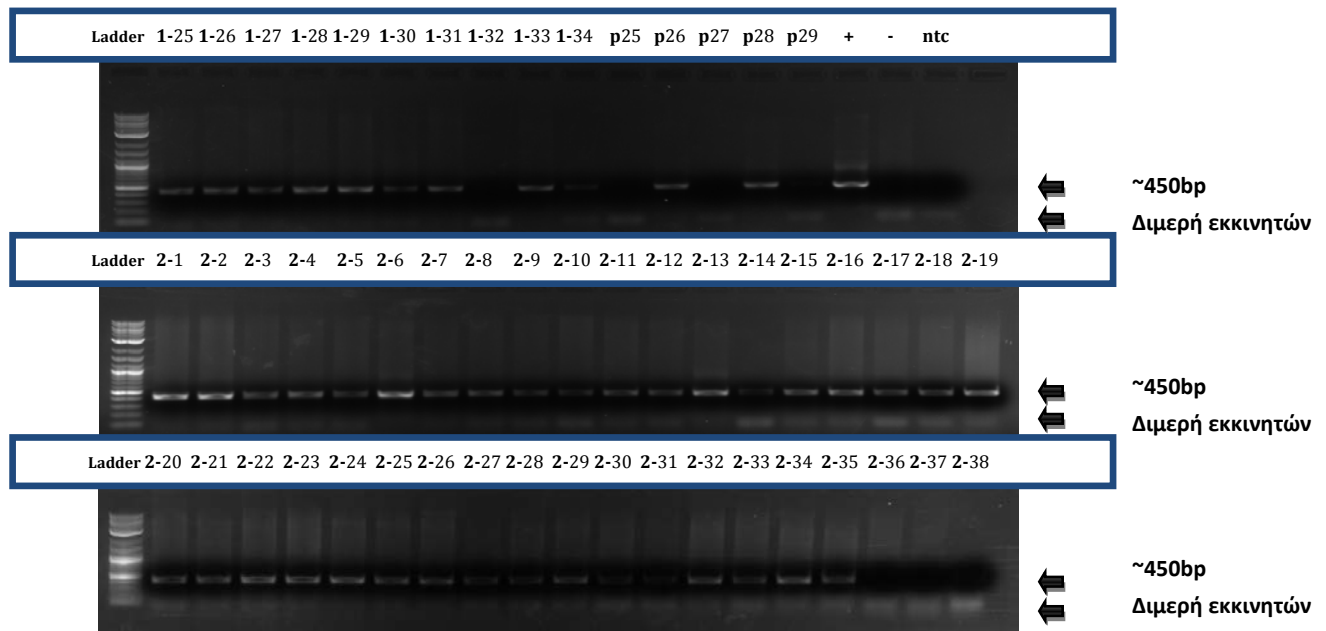
Από τις 3 ομάδες φυτών που μολύνθηκαν με αγροβακτήριο (φυτά μολυσμένα με κατασκευές υπερέκφρασης TSAR1, TSAR2 και φυτά μάρτυρες με μη ανασυνδυασμένο pUBI, δηλαδή χωρίς να περιέχουν καμία από τις κωδικές αλληλουχίες των γονιδίων *TSAR1*, *TSAR2*) έγινε δειγματοληψία ριζών φυτών ηλικίας 40 ημερών. Για τους αρνητικούς μάρτυρες μη-μετασχηματισμένου ιστού (WT1, 2, 3, 4) έγινε δειγματοληψία φύλλων, εφόσον με το πρωτόκολλο *hairy roots*, ο βλαστός και τα φύλλα δεν μετασχηματίζονται. Από αυτούς τους ιστούς **απομονώθηκε DNA** με την μέθοδο CTAB. Στη συνέχεια διεξήχθη **PCR** στα δείγματα αυτά με στόχο την αναγνώριση των μετασχηματισμένων φυτών, χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για τον υποκινητή CaMV 35S που ελέγχει την έκφραση του γονιδίου επιλογής. Τα προϊόντα της PCR φορτώθηκαν σε πηκτική αγαρόζη περιεκτικότητας 1%, όπως φαίνεται στις εικόνες που ακολουθούν (Εικόνες 17, 18, 19). Μέσω της PCR επιβεβαιώθηκε ο μετασχηματισμός των φυτών τα οποία έδωσαν προϊόν ίδιο με το θετικό μάρτυρα (+, άδειο απομονωμένο φορέα pUB-GW-Hyg), το οποίο δεν ανιχνεύθηκε στο no-template κοντρόλ (ntc), ούτε σε αγρίου τύπου ιστούς (-, WT). Η παρουσία της ζώνης προϊόντος στις 450bp περίπου υποδηλώνει την ύπαρξη του υποκινητή CaMV 35S, κατ' επέκταση και την ύπαρξη των κωδικών αλληλουχιών των γονιδίων *TSAR1*, *TSAR2* και συνεπώς την επιτυχία του μετασχηματισμού με την κατασκευή T-DNA.



Εικόνα 17. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR ανίχνευσης T-DNA. Δείγματα TSAR1 1-8 (1-1, 1-2, κ.λπ., pUB-TSAR1-Hyg), δείγματα pUBI 1-8 (p1, p2, κ.λπ., μη ανασυνδυασμένο pUBI), θετικός μάρτυρας (+, pUB-GW-Hyg), αρνητικός μάρτυρας (-, WT1) και no-template μάρτυρας (ntc). Τα συγκεκριμένα πηγαδάκια ήταν ρηγά και για το λόγο αυτό κατά το φόρτωμα κάποια δείγματα ξεχύθηκαν και σε διπλανό πηγαδάκι.



Εικόνα 18. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR ανίχνευσης T-DNA. Δείγματα TSAR1 9-24 (1-9, 1-10, κ.λπ., pUB-TSAR1-Hyg), δείγματα pUBI 9-16 (p9, p10, κ.λπ., μη ανασυνδυασμένο pUBI), θετικός μάρτυρας (+, pUB-GW-Hyg), αρνητικός μάρτυρας (-, WT2 και WT3 αντίστοιχα) και no-template μάρτυρας (ntc).



Εικόνα 19. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR ανίχνευσης T-DNA. Δείγματα TSAR1 25-34 (1-25, 1-26, κ.λπ., pUB-TSAR1-Hyg), δείγματα TSAR2 1-38 (2-1, 2-2, κ.λπ., pUB-TSAR2-Hyg), δείγματα pUBI 25-29 (p25, p26, κ.λπ., μη ανασυνδυασμένο pUBI), θετικός μάρτυρας (+, pUB-GW-Hyg), αρνητικός μάρτυρας (-, WT4) και no-template μάρτυρας (ntc).

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7) φαίνεται ο αριθμός των φυτών που ελέγχθηκαν για την παρουσία του 35S υποκινητή (και άρα του T-DNA) και ο συνολικός αριθμός των φυτών που ήταν τελικά μετασηματισμένα με κάθε κατασκευή. Από τα αποτελέσματα αυτά είναι προφανές ότι, από τα 34 δείγματα που μολύνθηκαν με το μετασηματισμένο με T-DNA που περιέχει το TSAR1 *A. rhizogenes*, στα 28 ήταν επιτυχής ο μετασηματισμός, εφόσον σε αυτά ήταν θετική η PCR. Αντίστοιχα, από τα 38 δείγματα που μολύνθηκαν με το μετασηματισμένο με T-DNA που περιέχει το άδειο *A. rhizogenes*, στα 36 ήταν επιτυχής ο μετασηματισμός και από τα 29 δείγματα που μολύνθηκαν με το

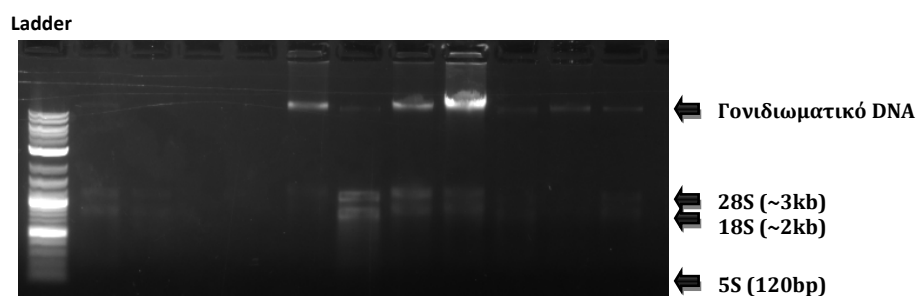
μετασηματισμένο με μη ανασυνδυασμένο T-DNA *A. rhizogenes*, στα 21 ανιχνεύτηκε ζώνη προϊόντος από την PCR.

Πίνακας 7. Τα δείγματα ελέγχθηκαν για την παρουσία του 35S υποκινιτή του γονιδίου της υγρομυκίνης (HygR)

Μετασηματισμένες σειρές	Αριθμός δειγμάτων που ελέγχθηκαν	Αριθμός μετασηματισμένων φυτών (θετικά στην PCR)	Ποσοστό μετασηματισμού
TSAR1	34	28	82.3%
TSAR2	38	36	94.7%
pUBI control	29	21	72.4%

### 3.2 Απομόνωση RNA από τις ρίζες του φυτού *Trigonella foenun-graecum*

Με βάση τις PCR που πραγματοποιήθηκαν προηγουμένως, επιλέχθηκαν τα μετασηματισμένα φυτά, στα οποία και ακολούθησε λειοτρίβηση, **απομόνωση RNA** και απομάκρυνση του γονιδιωματικού DNA με χρήση DNάσης. Η ποσοτικοποίηση του RNA που απομονώθηκε επιτελέστηκε με την φθορισμομετρική μέθοδο Qubit. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 20), παρουσιάζεται μια ενδεικτική πηκτή αγαρόζης περιεκτικότητας 0.8%, όπου απεικονίζεται η ύπαρξη γενωμικού DNA (πριν τη χρήση DNάσης), καθώς και η παρουσία των 28S, 18S και 5S ριβοσωμικού RNA.



Εικόνα 20. Πηκτή αγαρόζης 0.8% με ενδεικτικά κάποια δείγματα μετά την απομόνωση RNA. Η επιτυχής απομόνωση RNA φαίνεται από την ορατότητα των 2 ζωνών στις 3kb και 2kb (28S και 18S αντίστοιχα).

### 3.3 Πειράματα σχετικής RT-PCR (RT-qPCR)

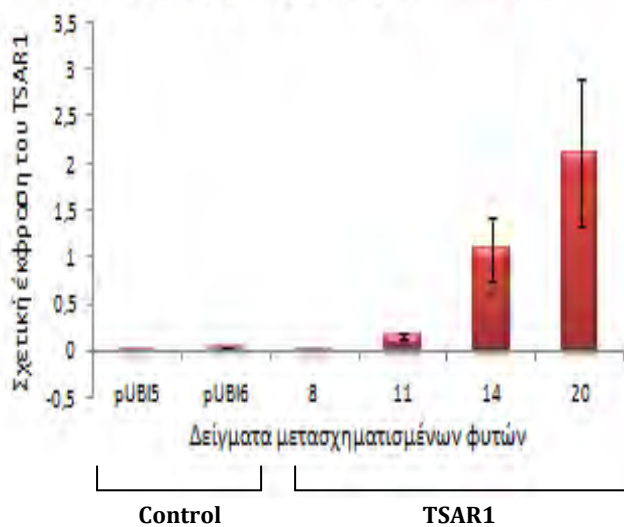
Για την ανάλυση διαφορών στη **μεταγραφική δραστηριότητα** των μετασχηματισμένων φυτών *Trigonella foenum-graecum* πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου, για ανίχνευση και σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης μεταγράφων με χρήση εκκινητών κατάλληλων εκκινητών. Αρχικά, ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *TSAR1*, *TSAR2* στα επιβεβαιωμένα από την προηγούμενη PCR μετασχηματισμένα φυτά για την επαλήθευση υπερέκφρασης των γονιδίων αυτών. Στην συνέχεια, προκειμένου να ελεγχθεί η επίδραση της ετερόλογης έκφρασης *TSAR*, εξετάστηκαν με qPCR τα πιο αντιπροσωπευτικά γονίδια που συμμετέχουν στο μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος, 2 γονίδια-κλειδιά, με το 1<sup>ο</sup> να αφορά την πρώιμη ρύθμιση του μονοπατιού βιοσύνθεσης τριτερπενίων και στερολών (*HMGR*) και το 2<sup>ο</sup> την κατεύθυνση του μονοπατιού προς παραγωγή κυκλοαρτενόλης και στη συνέχεια άλλων στερολών (*CAS*).

Το ενδογενές γονίδιο που χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την κανονικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων-στόχων ήταν το γονίδιο του παράγοντα επιμήκυνσης της μετάφρασης 1-α (***EF1-α***) (Wang et al., 2012). Το γονίδιο αυτό είναι ιδιόσυστατα εκφραζόμενο, δηλαδή ανήκει στα γονίδια που είναι απαραίτητα για την κυτταρική λειτουργία και εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και κάτω από οποιαδήποτε περιβαλλοντική συνθήκη. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να αποτελέσει δείκτη της ποσότητας του συνολικού RNA/cDNA που υπάρχει σε κάθε δείγμα (Mandel et al., 1995).

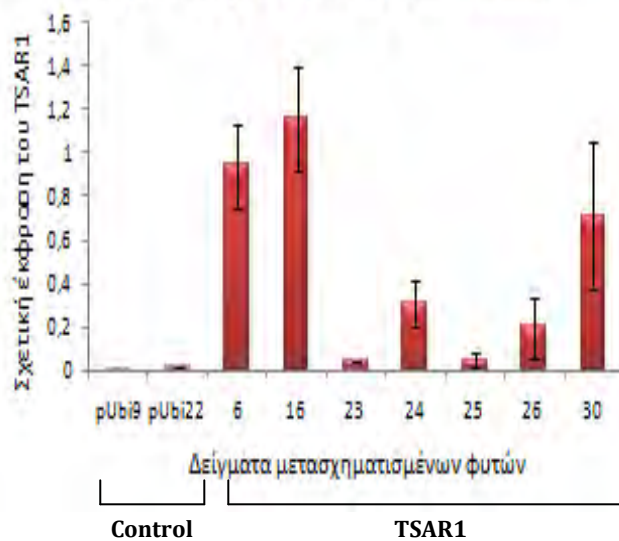
Επειδή η θέση ένθεσης του T-DNA από το *A. rhizogenes* στο *T. foenum-graecum* δεν μπορεί να προβλεφθεί, αρχικά μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων *TSAR1* και *TSAR2* στα μετασχηματισμένα φυτά ώστε να βρεθούν οι σειρές στις οποίες οι κατασκευές είχαν εισαχθεί σε ενεργά μεταγραφικές περιοχές με αποτέλεσμα τα γονίδια αυτά να εκφράζονται.

Στις Εικόνες 21 και 22 φαίνεται η σχετική έκφραση των γονιδίων *TSAR1* και *TSAR2* σε 11 και 7 σειρές αντίστοιχα σε σύγκριση με φυτά μάρτυρες pUBI. Από τα 11 δείγματα *TSAR1*, στα δείγματα 6, 11, 14, 16, 20, 24, 26, 30 φαίνεται ξεκάθαρα η έκφραση του γονιδίου *TSAR1*. Παρόμοια, από τα δείγματα *TSAR2*, στα 16, 17, 21 είναι διακριτή η έκφραση του γονιδίου *TSAR2*. Αντιθέτως, όπως αναμένεται, τα δείγματα μάρτυρες pUBI που είναι μετασχηματισμένα με T-DNA από το οποίο απουσιάζει η κωδική αλληλουχία των μεταγραφικών παραγόντων, παρουσιάζουν μηδενική σχετική έκφραση.

### Ετερόλογη έκφραση του TSAR1

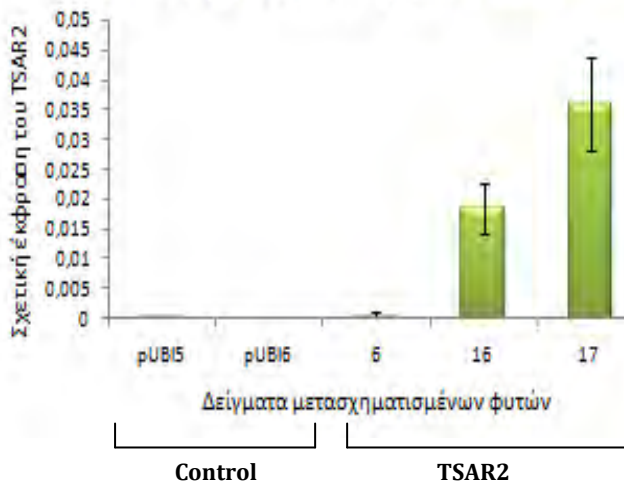


### Ετερόλογη έκφραση του TSAR1

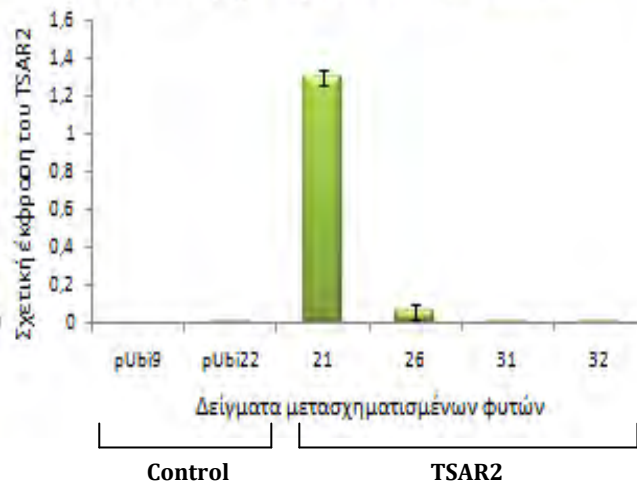


Εικόνα 21. Ανάλυση δεδομένων RT-qPCR για το γονίδιο TSAR1 σε 2 (διαφορετικές σε κάθε γράφημα) σειρές φυτών control pUBI και 11 σειρές TSAR1 μετασηματισμένων φυτών (δείγματα 6-30). Για κάθε δείγμα, η τιμή που απεικονίζεται είναι η μέση τιμή  $\pm$ SD 2 τεχνικών επαναλήψεων.

### Ετερόλογη έκφραση του TSAR2



### Ετερόλογη έκφραση του TSAR2



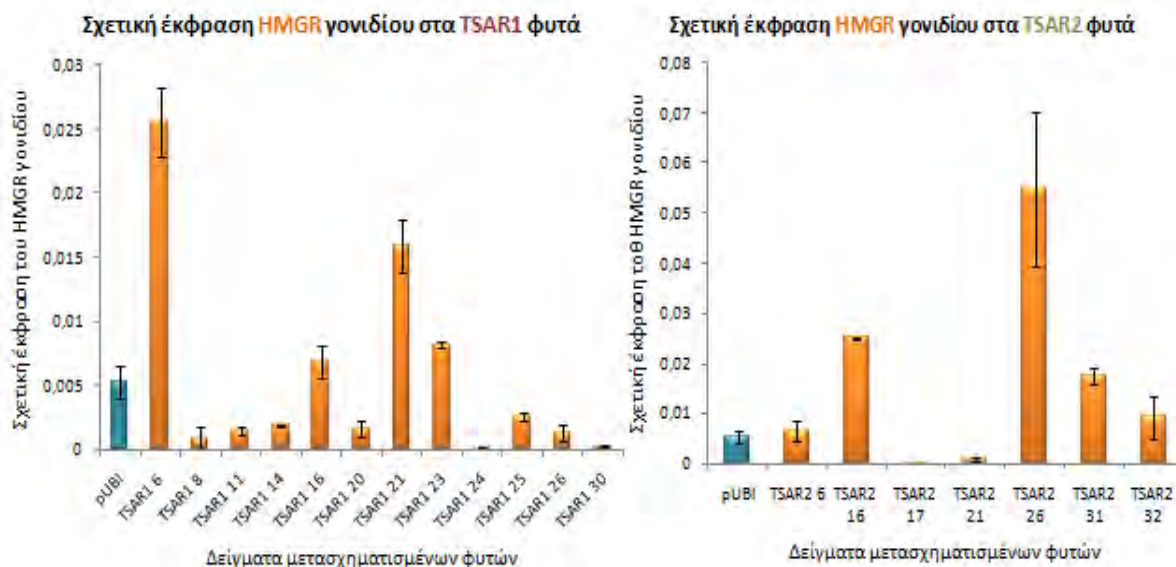
Εικόνα 22. Ανάλυση δεδομένων RT-qPCR για το γονίδιο TSAR2 σε 2 (διαφορετικές σε κάθε γράφημα) σειρές φυτών control pUBI και 7 σειρές TSAR2 μετασηματισμένων φυτών (δείγματα 6-32). Για κάθε δείγμα, η τιμή που απεικονίζεται είναι η μέση τιμή  $\pm$ SD 2 τεχνικών επαναλήψεων.

Εφόσον αποδείχθηκε ότι σε σχέση με τα control φυτά, υπάρχουν μετασηματισμένα φυτά που δείχνουν ξεκάθαρα ετερόλογη έκφραση των TSAR1 και TSAR2, τέθηκε το ερώτημα αν τελικά τα μετάγραφα αυτά παράγουν στη συνέχεια λειτουργικές πρωτεΐνες, δηλαδή ενεργούς μεταγραφικούς παράγοντες που είναι ικανοί να ρυθμίσουν την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση τριτερπενίων/στερολών στην *Trigonella foenum-*



*graecum*. Έτσι ελέγχθηκε εάν οι TSAR1 και TSAR2 μπορούν να ενεργοποιήσουν το γονίδιο **HMGR** (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase) το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο που ελέγχει τη ροή μεταβολιτών στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των τριτερπενίων, σχηματίζοντας το πρόδρομο μόριό τους, μεβαλονικό οξύ και το γονίδιο **CAS** (Cycloartenol Synthase), το οποίο κωδικοποιεί μια κυκλάση του οξειδοσκουαλενίου, την συνθάση της κυκλοαρτενόλης που οδηγεί στην παραγωγή στερολών.

Για την κανονικοποίηση της έκφρασης χρησιμοποιήθηκε και στις 2 περιπτώσεις ο παράγοντας επιμήκυνσης 1-α (**EF1-α**), και ζεύγη εκκινητών ειδικά για τα γονίδια *HMGR* και *CAS* αντίστοιχα. Στα επίπεδα έκφρασης του *HMGR* διακρίνεται μια αρνητική ρύθμιση (downregulation) στα 6 από τα 8 φυτά που φαίνεται να εκφράζουν ετερόλογα τον TSAR1 μεταγραφικό παράγοντα (Εικόνα 21 και 23) και στα 2 από τα 3 φυτά που φαίνεται να εκφράζουν ετερόλογα τον TSAR2 μεταγραφικό παράγοντα. Πιο συγκεκριμένα, στα δείγματα TSAR1-6, 11, 14, 16, 20, 24, 26, 30 όπου παρατηρείται υπερέκφραση του *TSAR1* (Εικόνα 21), βλέπουμε μια καταστολή έκφρασης στο γονίδιο *HMGR* σε 6 από τα από αυτά τα 8 δείγματα, τα TSAR1-11, 14, 20, 24, 26, 30, συγκρινόμενα με το μέσο όρο επιπέδων έκφρασης των δειγμάτων μαρτύρων *rUBI* (μπλε στήλη; Εικόνα 23). Αντίστοιχα, στα TSAR2-16, 17, 21 δείγματα που υπερεκφράζουν το *TSAR2* (Εικόνα 22) φαίνεται πως τα TSAR2-17, 21, εμφανίζουν μειωμένη έκφραση του *HMGR* σε σχέση με το μέσο όρο επιπέδων έκφρασης των *rUBI* δειγμάτων (μπλε στήλη; Εικόνα 23).

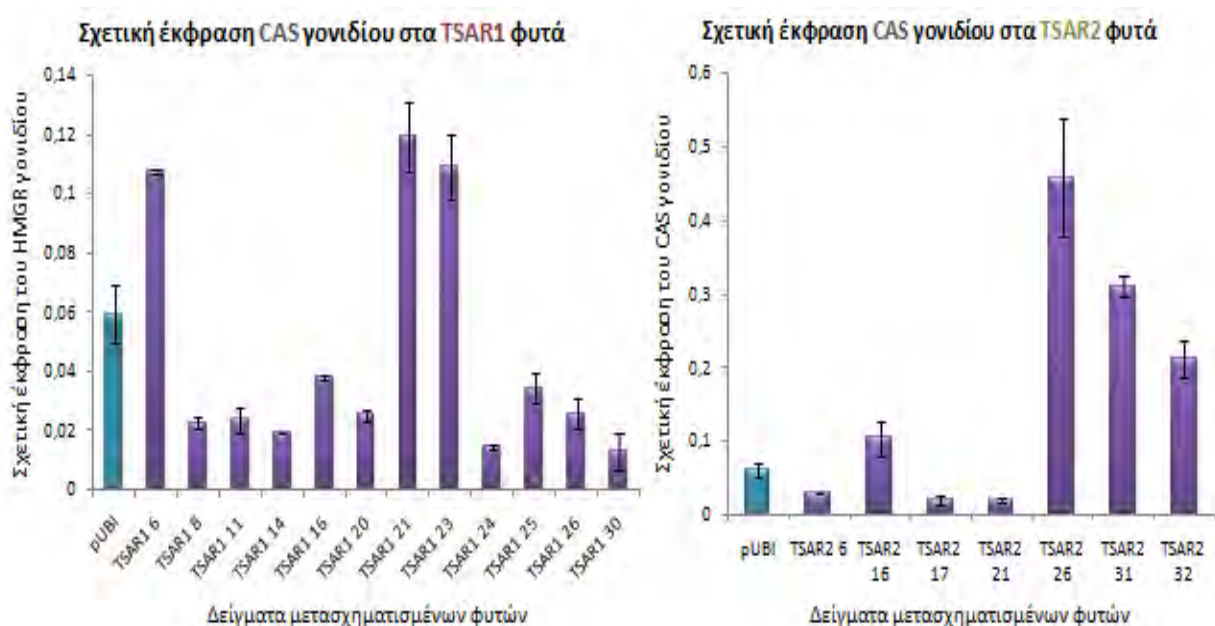


**Εικόνα 23.** Ανάλυση δεδομένων RT-qPCR για τη σχετική έκφραση του γονιδίου *HMGR* σε 12 σειρές TSAR1 και 7 σειρές TSAR2 μετασχηματισμένων φυτών (πορτοκαλί στήλες). Η μπλε στήλη αναπαριστά τον μέσο όρο σχετικής έκφρασης των μαρτύρων *rUBI* φυτών. Για κάθε δείγμα, η τιμή που απεικονίζεται είναι η μέση τιμή  $\pm$ SD 2 τεχνικών επαναλήψεων.

Επιπρόσθετα, η RT-qPCR για τον έλεγχο έκφρασης του *CAS* γονιδίου έδωσε αποτελέσματα που ακολουθούν **παρόμοιο μοτίβο** με εκείνο του *HMGR* γονιδίου (Εικόνα 24). Πιο αναλυτικά, στα TSAR1 φυτά τα δείγματα TSAR1-6, 11, 14, 16, 20, 24, 26, 30 όπου παρατηρείται υπερέκφραση του *TSAR1* (Εικόνα 21), διακρίνεται μια μειωμένη έκφραση στο γονίδιο *CAS* σε 7 από τα από αυτά τα 8

δείγματα, τα TSAR1-11, 14, 16, 20, 24, 26, 30, συγκρινόμενα με το μέσο όρο επιπέδων έκφρασης των δειγμάτων μαρτύρων *rUBI* (μπλε στήλη; Εικόνα 24). Αντίστοιχα, από τα TSAR2-16, 17, 21 δείγματα που υπερεκφράζουν το *TSAR2* (Εικόνα 22) φαίνεται πως τα TSAR2-17, 21, εμφανίζουν μειωμένη έκφραση του *CAS* σε σχέση με το μέσο όρο επιπέδων έκφρασης των *rUBI* δειγμάτων (μπλε στήλη; Εικόνα 24).

Συνεπώς, το αξιοσημείωτο που παρατηρείται εδώ είναι πως στην πλειοψηφία των φυτών που έχει αποδειχθεί ότι υπερεκφράζουν το *TSAR1* ή το *TSAR2*, καταστέλλεται τόσο η έκφραση του *HMGR*, όσο και του *CAS* γονιδίου.



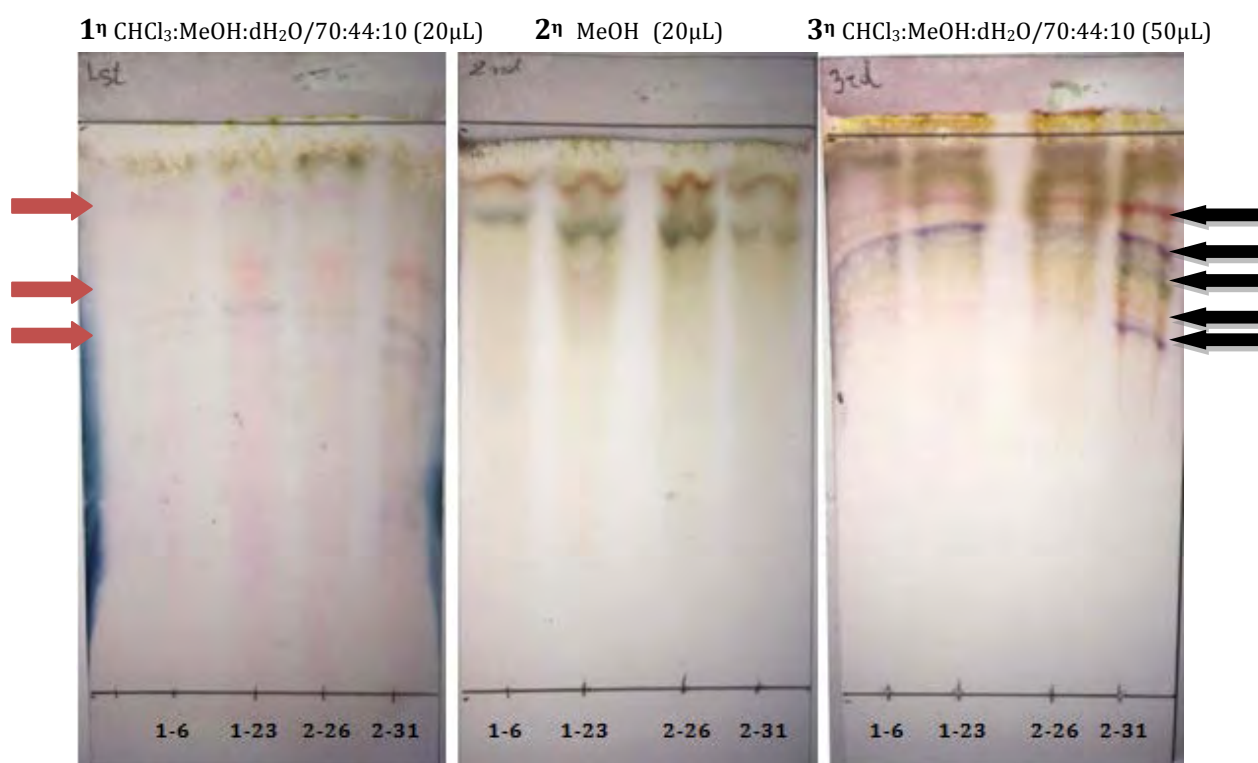
Εικόνα 24. Ανάλυση δεδομένων RT-qPCR για τη σχετική έκφραση του γονιδίου *CAS* σε 12 σειρές *TSAR1* και 7 σειρές *TSAR2* μετασηματισμένων φυτών (μωβ στήλες). Η μπλε στήλη αναπαριστά τον μέσο όρο σχετικής έκφρασης των μαρτύρων *rUBI* φυτών. Για κάθε δείγμα, η τιμή που απεικονίζεται είναι η μέση τιμή  $\pm$ SD 2 τεχνικών επαναλήψεων.

### 3.4 Εκχύλιση σαπωνινών και Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας

Η εκχύλιση σαπωνινών και η χρήση τους για την διεξαγωγή χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας είχε ως σκοπό τον σχηματισμό μιας εικόνας σχετικά με την ποικιλία των ουσιών που περιέχονται στα μετασηματισμένα *T. foenum - graecum* φυτά. Δηλαδή αποτελεί μια ποιοτική προσέγγιση του μεταβολικού προφίλ της *Τριγωνέλλας*, και πιο συγκεκριμένα του προτύπου του μεταβολισμού που οδηγεί στην παραγωγή σαπωνινών. Εφόσον δεν υπήρχε άμεσα διαθέσιμος κάποιος μεταβολίτης-αναφορά από το συγκεκριμένο φυτό, δεν είναι δυνατή η διεξαγωγή συμπερασμάτων που αφορούν την ταυτότητα των μεταβολιτών που διακρίνονται στις διάφορες ζώνες.

Στο συγκεκριμένο στάδιο πειραματιστήκαμε, αλλάζοντας κάθε φορά είτε τον διαλύτη της κινούμενης φάσης είτε τον όγκο δείγματος που φορτώνουμε

στην πλάκα TLC (στατική φάση). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 15 στην 1<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> περίπτωση φορτώθηκαν 20μL και 50μL εκχυλίσματος αντίστοιχα, με κινούμενη φάση τον διαλύτη χλωροφόρμιο : μεθανόλη : απεσταγμένο νερό (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:dH<sub>2</sub>O) σε αναλογία όγκων 70:44:10. Σε αντίθεση, στην 2<sup>η</sup> περίπτωση φορτώθηκαν 20μL εκχυλίσματος με κινούμενη φάση τον διαλύτη MeOH. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα TSAR1-6, TSAR1-23 και TSAR2-26, TSAR2-31, τα οποία παρουσίαζαν τη μεγαλύτερη συσσώρευση TSAR1,2 μεταγράφων. Στην 1<sup>η</sup> περίπτωση πιθανώς το φόρτωμα των 20μL δεν ήταν ικανό να δώσει σαφείς έντονες ζώνες. Παρόλα αυτά, ορισμένες ζώνες απουσιάζουν από κάποια δείγματα (κόκκινα βέλη). Στην 2<sup>η</sup> περίπτωση, η χρήση της μεθανόλης ως κινητή φάση φαίνεται να "ώθησε" τις ουσίες να κινηθούν πιο γρήγορα και άρα να μην διαχωριστούν εντελώς, εφόσον η μεθανόλη πρόκειται για έναν ισχυρά πολικό διαλύτη. Γίνεται αντιληπτό ότι ο πιο ξεκάθαρος διαχωρισμός έγινε στην 3<sup>η</sup> περίπτωση όπου σχεδόν σε όλα τα δείγματα, απεικονίζονται σε ζώνες  $\geq 5$  διαφορετικές ουσίες, ενώ κάποιες ποιοτικές διαφορές (μαύρα βέλη) πρέπει να ελεγχθούν περαιτέρω με ποσοτικές αναλυτικές μεθόδους ανάλυσης μεταβολικού προφίλ/περιεχομένου.



Εικόνα 25. Πλάκες TLC: 1<sup>η</sup> 20μL εκχυλίσματος με κινητή φάση CHCl<sub>3</sub>:MeOH:dH<sub>2</sub>O σε αναλογία όγκων 70:44:10. 2<sup>η</sup> 20μL εκχυλίσματος με κινητή φάση MeOH. 3<sup>η</sup> 50μL εκχυλίσματος με κινητή φάση CHCl<sub>3</sub>:MeOH:dH<sub>2</sub>O σε αναλογία 70:44:10. Σε κάθε TLC plate φορτώθηκαν τα δείγματα TSAR1-6, TSAR1-23 και TSAR2-26, TSAR2-31.



# Συμπεράσματα - Συζήτηση

---

Τα φυτά του είδους *M. truncatula* φαίνεται να συσσωρεύουν τριτερπενοειδείς σαπωνίνες (TSs) ως μείγματα συγκεκριμένων ιστών δεκάδων διαφορετικών TSs. Εκτός από αυτή τη συστατική συσσώρευση που προκαλείται, η επαγωγή βιοσύνθεσης TSs παρατηρείται συχνά στην απόκριση σε επίθεση από φυτοφάγα ζώα ή σε προσβολή από παθογόνα (Gholami et al., 2014). Η επαγωγή βιοσύνθεσης TS επιτελείται και υπό συνθήκες καταπόνησης, όπου μεσολαβείται από συντονισμένη μεταγραφική ενεργοποίηση ολόκληρου του μονοπατιού βιοσύνθεσης TSs (Broeckling et al., 2005; Pollier et al., 2013; Suzuki et al., 2005). Στην επαγωγή αυτή, κρίσιμο ρόλο φαίνεται να παίζει το ιασμονικό οξύ (JA). Ωστόσο, οι μεταγραφικοί παράγοντες που ενεργοποιούν την συντονισμένη μεταγραφική ενεργοποίηση των βιοσυνθετικών γονιδίων TSs μετά την επαγωγή από JA έχουν παραμείνει άγνωστοι.

Στην πραγματικότητα, μόνο λίγοι μεταγραφικοί παράγοντες που συμμετέχουν εξειδικευμένα στη βιοσύνθεση τερπενίων στα φυτά έχουν ταυτοποιηθεί. Ο μεταγραφικός παράγοντας με βασική δομή έλικα-βρόγχος-έλικα MYC2, επίσης γνωστός ως κύριος στη σηματοδότηση JA (Kazan and Manners, 2013), και τα ομόλογα του έχουν αποδειχθεί ότι παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης των σεσκιτερπενίων στο *Arabidopsis thaliana*, τη ντομάτα (*Solanum lycopersicum*), και το *Artemisia annua* (Hong et al., 2012; Ji et al., 2014; Spyropoulou et al., 2014). Επίσης, δύο ακόμη μεταγραφικοί παράγοντες της ίδιας δομής, που φαίνεται να μην σχετίζονται με τον MYC2, Bl (Bitter leaf) και Bt (Bitter fruit), βρέθηκαν ότι ρυθμίζουν τη συσσώρευση τριτερπενίων στο αγγούρι (*Cucumis sativus*; Shang et al., 2014). Ο Mertens κ.α ταυτοποίησαν δύο μεταγραφικούς παράγοντες, TSAR1 και TSAR2, που φαίνεται ότι επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση τερπενίων σε πολύ πρώιμα στάδια (γονίδιο *HMGR*). Ακόμη, σε μετέπειτα στάδιο του μονοπατιού, αποδείχθηκε ότι οι *MtTSARs* δεν επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων βιοσύνθεσης στερολών, επισημαίνοντας τον εξειδικευμένο τους ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού των τριτερπενίων στο *M. truncatula* (Mertens et al., 2016).

Όσον αφορά το φυτό *T. foenum - graecum*, το οποίο συσσωρεύει τόσο τριτερπένια όσο και στεροειδείς σαπωνίνες (A. Basu et al., 2014; Ciura et al., 2017; Vrancheva et al., 2016), παρόλο που και οι δύο ομάδες φυτών TSAR1 και TSAR2 εμφάνισαν μεγάλο ποσοστό μετασχηματισμού (88.3% για τα TSAR1, 94.7% για τα TSAR2), δεν φαίνεται να ακολουθείται το ίδιο πρότυπο και στην μεταγραφική δραστηριότητα των εν λόγω μεταγραφικών παραγόντων, όπως στο *M. truncatula*. Πιο συγκεκριμένα, 66.6% των TSAR1 φυτών και 42.8% των TSAR2 φυτών παρουσίασαν ξεκάθαρη ετερόλογη έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων *MtTSAR1* και *MtTSAR2* σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου pUBI (Εικόνες 21, 22). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι, εφόσον η κατασκευή εισέρχεται τυχαία στο γονιδίωμα του φυτού είναι πιθανό η εισαγωγή του να έγινε σε περιοχή χαμηλής μεταγραφικής ενεργότητας, όπου η χρωματίνη περιελίσσεται σφιχτά γύρω από τις ιστόνες με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας συμπαγούς δομής και την αδυναμία πρόσβασης από την πολυμεράση του RNA και τα αντίστοιχα ρυθμιστικά στοιχεία. Αυτή η συμπαγής δομή που οδηγεί και

σε απουσία μεταγραφικής δραστηριότητας μπορεί να υφίσταται είτε λόγω της φυσιολογικής συσπείρωσης του DNA σε ορισμένες περιοχές (κεντρομερή, τελομερή) είτε λόγω επιγενετικών τροποποιήσεων στο DNA, όπως η μεθυλίωση κυτοσίνης.

Η ετερόλογη έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων TSAR1 και TSAR2 στο *T. foenum - graecum* φαίνεται να επιφέρει αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης τόσο σε πρώιμο στάδιο-κλειδί του μονοπατιού βιοσύνθεσης τερπενίων, μέχρι την παραγωγή 2,3-οξειδοσκουαλενίου (2,3-OS), όσο και σε μετέπειτα πιο εξειδικευμένο στάδιο της κυκλοποίησης του οξειδοσκουαλενίου προς τριτερπενοειδείς σκελετούς και των καθοδικών τροποποιήσεών τους (Εικόνες 5 και 8). Από το ακέτυλ-CoA έως το 2,3-OS η βιοσύνθεση στερολών και τριτερπενίων αποτελεί κοινό μονοπάτι, με διαφορά στις κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου OSCs και τις καθοδικές τροποποιήσεις.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι *MtTSAR1* και *MtTSAR2* τόσο στο *M. truncatula* όσο και στο συγγενικό ψυχανθές *L. japonicus* (Mertens et al., 2016; Φωτεινή Δημάκου - πτυχιακή BSc, 2017) έδειξαν να επάγουν την έκφραση του γονιδίου *HMGR*. Βάση της συγγένειας των φυτών θα περιμέναμε ίσως να παρατηρηθεί μια επαγωγίμη μεταγραφική δραστηριότητα στο γονίδιο *HMGR* και σε άλλα γονίδια μέχρι την παραγωγή του οξειδοσκουαλενίου, ή ενδεχομένως καμία επίδραση. Δεν φαίνεται, όμως, να συμβαίνει το ίδιο στο *T. foenum - graecum* πιθανώς διότι οι μεταγραφικοί παράγοντες, εκφραζόμενοι ετερόλογα, δεν δρουν με την ίδια αποδοτικότητα και ακρίβεια με τους αντίστοιχους ενδογενείς παράγοντες. Βέβαια, θα περιμέναμε από τη στιγμή που τα τρία αυτά φυτά είναι τόσο συγγενικά μεταξύ τους, γονίδια που κωδικοποιούν θεμελιώδεις πρωτεΐνες όπως ένζυμα που καταλύουν βασικές βιολογικές διαδικασίες να παραμείνουν ουσιαστικά σταθερά και να συσσωρεύουν ελάχιστες διαφοροποιήσεις. Ακόμη και αν αυτό ισχύει για τις κωδικές αλληλουχίες τέτοιων γονιδίων, δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι για τα ρυθμιστικά στοιχεία της μεταγραφής των γονιδίων αυτών. Με αυτό τον τρόπο, λοιπόν, μπορούμε να υποθέσουμε ότι το *T. foenum - graecum* έχει διαφοροποιηθεί εξελικτικά όσον αφορά των ρυθμιστικών στοιχείων της μεταγραφής. Ακόμη είναι πιθανό να υπάρχουν και άλλα γονίδια που να κωδικοποιούν βασικά ένζυμα του μονοπατιού με εξειδικευμένο, για το *T. foenum - graecum*, τρόπο.

Παρατηρώντας τις αναλύσεις των RT-qPCR, όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης του *HMGR* διακρίνεται μια αρνητική ρύθμιση (downregulation) στα 6 από τα 8 φυτά που φαίνεται να εκφράζουν ετερόλογα τον TSAR1 μεταγραφικό παράγοντα (Εικόνες 21 και 23) και στα 2 από τα 3 φυτά που φαίνεται να εκφράζουν ετερόλογα τον TSAR2 μεταγραφικό παράγοντα (Εικόνες 22 και 23). Συνεπώς, μπορούμε να υποθέσουμε μια ανταγωνιστική συμπεριφορά μεταξύ των ετερόλογων μεταγραφικών παραγόντων TSAR1 και TSAR2 και των ενδογενών μεταγραφικών παραγόντων.

Το άλλο γονίδιο για το οποίο ελέγχθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα μετά την ετερόλογη έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων *MtTSAR1* *MtTSAR2* ήταν το γονίδιο της συνθάσης της κυκλοαρτενόλης (CAS). Το ένζυμο αυτό είναι βασικό για την διακλάδωση του μονοπατιού παραγωγής τερπενίων και στερολών στρέφοντας την οδό προς παραγωγή στερεοειδών σαπωνινών, όπως η διοσγενίνη (Εικόνα 8). Σύμφωνα με τους Mertens et al., οι TSAR1 και TSAR2 ενεργοποιούν όλα τα πρώιμα γονίδια της οδού του μεβαλονικού οξέος, χωρίς

όμως να επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων βιοσύνθεσης στερολών. Παρόλα αυτά, η ετερόλογη έκφρασή τους στο *T. foenum - graecum* έχει αντίκτυπο στη μεταγραφική ενεργότητα του γονιδίου *CAS* με παρόμοιο μοτίβο με αυτό στο γονίδιο *HMGR*. Είναι φανερή και σε αυτή την περίπτωση η ανταγωνιστική δράση μεταξύ ενδογενών και ετερόλογων μεταγραφικών παραγόντων, με 7 από τα 8 φυτά που φαίνεται να εκφράζουν ετερόλογα τον TSAR1 μεταγραφικό παράγοντα (Εικόνες 21 και 24) και 2 από τα 3 φυτά που φαίνεται να εκφράζουν ετερόλογα τον TSAR2 μεταγραφικό παράγοντα (Εικόνες 22 και 24) να απεικονίζουν αυτό το πρότυπο.

Έχει ήδη παρατηρηθεί στο παρελθόν αντίστοιχη συμπεριφορά, όπως απεδείχθη με την αναστολή βιοσύνθεσης φαινολικού οξέος και λιγνίνης λόγω της ετερόλογης έκφρασης σε καπνό δύο μεταγραφικών παραγόντων Myb (Myb308 και Myb305) που προέρχονταν από το φυτό *Antirrhinum* (Tamagnone et al., 1998). Θεωρείται ότι αυτό είναι το αποτέλεσμα ανταγωνισμού για πρόσδεση στο DNA μεταξύ ενδογενών και ετερόλογων μεταγραφικών παραγόντων, με τους τελευταίους να προσδένονται ασθενέστερα. Ωστόσο, δεδομένης της υψηλής έκφρασης των ετερόλογων μεταγραφικών παραγόντων TSARs ακόμη και ασθενείς αλληλεπιδράσεις σε θέσεις πρόσδεσης στο DNA θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν σημαντικά την πρόσδεση και λειτουργία ενδογενών μεταγραφικών παραγόντων. Επίσης, έχει αποδειχθεί άμεση πρωτεϊνική αλληλεπίδραση μεταξύ μεταγραφικών παραγόντων (Jackson et al., 1992). Πιθανότατα συντηρημένες περιοχές της δομής MYB (HLH) των TSARs, οι οποίες φυσιολογικά ευθύνονται για αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες (Ambawat et al., 2013; Feller et al., 2011), να οδηγούν σε μη λειτουργική αλληλεπίδραση με ενδογενείς μεταγραφικούς παράγοντες στις μετασχηματισμένες ρίζες του *T. foenum-graecum*.

Δεδομένα που θα μπορούσαν να διαλευκάνουν καλύτερα τις επιρροές αυτών των ετερόλογων μεταγραφικών παραγόντων στο μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος, αποτελούν τα αποτελέσματα από την υγρή και αέρια χρωματογραφία που εκκρεμούν. Με τη βοήθεια των αναλύσεων αυτών θα έχουμε μια πιο ξεκάθαρη εικόνα για το πώς και πόσο επηρεάζουν οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες τη βιοσύνθεση τερπενίων και σε ποιο στάδιο φαίνεται να δρουν. Επιπλέον, από τις TLC που πραγματοποιήθηκαν έγινε κατανοητό ότι υπήρχε μια ποικιλία ενώσεων-ζωνών, η οποία όμως δεν φάνηκε να απεικονίζει επαναλαμβανόμενο πρότυπο σε κάθε δείγμα (Εικόνα 25). Πιο συγκεκριμένα, σε κάποια δείγματα διαφαίνονται ζώνες που απουσιάζουν από άλλα δείγματα, και αυτό ερμηνεύεται ως διαφορετικό μίγμα μεταβολιτών – σαπωνινών. Για να οδηγηθούμε σε ένα ξεκάθαρο συμπέρασμα για το αν οι διαφορές αυτές απορρέουν από τον μετασχηματισμό των φυτών με τους μεταγραφικούς παράγοντες *MtTSAR1* και *MtTSAR2* είναι απαραίτητη και η μελέτη άλλων γονιδίων που συμμετέχουν στο συγκεκριμένο μονοπάτι του μεταβολισμού, ιδιαίτερα γονιδίων βιοσύνθεσης των τριτερπενίων. Ιδανικά θα ελεγχόταν η έκφραση επιπλέον γονιδίων που εμπλέκονται τόσο στην βιοσύνθεση τόσο του 2,3-οξειδοσκουαλενίου από μεβαλονικό οξύ, όσο και κυκλασών του οξειδοσκουαλενίου και τροποποιητικών ενζύμων που εμπλέκονται στον σχηματισμό τριτερπενίων και σαπωνινών τους. Τέτοια γονίδια είναι πολύ πιο πιθανό να επηρεάζονται από την ετερόλογη έκφραση των *MtTSARs* απ' ότι γονίδια βιοσύνθεσης στερολών. Ωστόσο, δεδομένου ότι δεν

υπάρχει διαθέσιμο το γονιδίωμα του *T. foenum-graecum*, ελέγχθηκαν πρώτα αυτά τα γονίδια (*HMGR* και *CAS*) τα οποία έχουν ήδη αναγνωρισθεί σε πειράματα RNA αλληλούχισης του φυτού. Παράλληλα επιχειρείται εντοπισμός και ταυτοποίηση επιπλέον πιθανών γονιδίων σ' αυτές τις βάσεις δεδομένων. Τέλος, οι αναλύσεις των χρωματογραφιών θα συμβάλλουν στην διευκρίνιση της ταυτότητας της κάθε ουσίας που απεικονίζεται σε κάθε δείγμα στην TLC και θα βοηθήσει σε αναδρομικό εντοπισμό γονιδίων που πιθανών να επάγονται από την ετερόλογη έκφραση των *MtTSARs*.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η ετερόλογη έκφραση των *MtTSAR1* και *MtTSAR2* στο *T. foenum - graecum* παρουσιάζει σε ένα σημαντικό ποσοστό των μετασχηματισμένων φυτών μια κατασταλτική ρύθμιση τουλάχιστον δύο γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος, γεγονός που δημιουργεί ερωτήματα σχετικά με το πόσο διαφέρουν στην ρύθμιση και απόκριση βασικών μεταβολικών οδών δύο τόσο συγγενικά φυτά. Για το λόγο αυτό θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί περαιτέρω η επίδραση αυτών των κύριων, για το μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος, μεταγραφικών παραγόντων τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μεταβολικό επίπεδο και να διερευνηθούν συλλογές δεδομένων RNA αλληλούχισης (RNA-seq datasets) του *T. foenum graecum* για την αναζήτηση ενδογενών TSAR-like μεταγραφικών παραγόντων που θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές με στόχο τον εμπλουτισμό του μεταβολικού περιεχομένου του φυτού.

# Βιβλιογραφία

---

- Abe, I. (1993). Enzymatic Cyclization of Squalene and Oxidosqualene to Sterols and Triterpenes, (Table I), 2189–2206.
- Aharoni, A. (2003). Terpenoid Metabolism in Wild-Type and Transgenic Arabidopsis Plants. *The Plant Cell Online*, 15(12), 2866–2884. <https://doi.org/10.1105/tpc.016253>
- Ahmad, A., Alghamdi, S. S., Mahmood, K., & Afzal, M. (2016). Fenugreek a multipurpose crop: Potentialities and improvements. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(2), 300–310. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.09.015>
- Ambawat, S., Sharma, P., Yadav, N. R., & Yadav, R. C. (2013). MYB transcription factor genes as regulators for plant responses : an overview, 19(September), 307–321. <https://doi.org/10.1007/s12298-013-0179-1>
- Augustin, J. M., Kuzina, V., Andersen, S. B., & Bak, S. (2011). Phytochemistry Molecular activities , biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, 72(6), 435–457. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.015>
- Avato, P., Bucci, R., Tava, A., Vitali, C., Rosato, A., Bialy, Z., & Jurzysta, M. (2006). Antimicrobial Activity of Saponins from Medicago sp .: Structure-Activity Relationship, 457(April 2005), 454–457.
- Basu, A., Basu, S. K., Kumar, A., Sharma, M., Chalghoumi, R., Hedi, A., ... Cetzal-Ix, W. (2014). Fenugreek (Trigonella Foenum-Graecum L.), A Potential New Crop For Latin America. *American Journal of Social Issues and Humanities*, 4(3), 145–162.
- Basu, S. K., Thesis, A., & Science, M. O. F. (2006). L .) in the Canadian Prairies.
- Baumann, E., Stoya, G., Vo, A., Richter, W., Lemke, C., & Linss, W. (2000). Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure, 35.
- Broeckling, C. D., Huhman, D. V., Farag, M. A., Smith, J. T., May, G. D., Mendes, P., ... Sumner, L. W. (2005). Metabolic profiling of Medicago truncatula cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 56(410), 323–336. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri058>
- Bruneton J, 1995 Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants, Paris: Lavoisier Publishing. pp. 915
- Brusslan, J. A., & Tobin, E. M. (1992). Light-independent developmental regulation of cab gene expression in Arabidopsis thaliana seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(16), 7791–7795. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.16.7791>
- Burke, C., & Croteau, R. (2002). Interaction with the small subunit of geranyl diphosphate synthase modifies the chain length specificity of geranylgeranyl diphosphate synthase to produce geranyl diphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 277(5), 3141–3149. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105900200>
- Carrie, C., Murcha, A. E. M. W., Millar, A. E. H., Smith, S. M., & Whelan, A. J. (2007). Nine 3-ketoacyl-CoA thiolases ( KATs ) and acetoacetyl-CoA thiolases ( ACATs ) encoded by five

- genes in *Arabidopsis thaliana* are targeted either to peroxisomes or cytosol but not to mitochondria, 97–108. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-9075-1>
- Chaudhary, S., Chaudhary, P. S., Chikara, S. K., Sharma, M. C., & Iriti, M. (2018). Review on Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) and its important secondary metabolite diosgenin. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(1), 22–31. <https://doi.org/10.15835/nbha46110996>
- Chaudhary, S., Chikara, S. K., Sharma, M. C., Chaudhary, A., Syed, B. A., Chaudhary, P. S., ... Iriti, M. (2015). Elicitation of diosgenin production in *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seedlings by methyl jasmonate. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 29889–29899. <https://doi.org/10.3390/ijms161226208>
- Chen, F., Tholl, D., Bohlmann, J., & Pichersky, E. (2011). The family of terpene synthases in plants: A mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant Journal*, 66(1), 212–229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04520.x>
- Chwalek, M., Lalun, N., Bobichon, H., Plé, K., & Voutquenne-nazabadioko, L. (2006). Structure – activity relationships of some hederagenin diglycosides : Haemolysis , cytotoxicity and apoptosis induction, 1760, 1418–1427. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.05.004>
- Cinatl, J., Morgenstern, B., Bauer, G., Chandra, P., Rabenau, H., & Doerr, H. W. (2003). Glycyrrhizin , an active component of liquorice roots , and replication of SARS-associated coronavirus Progression of cerebral white matter lesions : 6-year results of the Austrian Stroke Prevention Study, 361(C), 2045–2046.
- Cirioni, J., & Bach, T. J. (2007). A serine involved in actin-dependent subcellular localization of a stress-induced tobacco BY-2 hydroxymethylglutaryl-CoA reductase isoform, 581, 5295–5299. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.10.023>
- Ciura, J., Szeliga, M., Grzesik, M., & Tyrka, M. (2017). Changes in fenugreek transcriptome induced by methyl jasmonate and steroid precursors revealed by RNA-Seq. *Genomics*, (September), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.10.006>
- Crane, C., Wright, E., Dixon, R. A., & Wang, Z. Y. (2006). Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens*-transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. *Planta*, 223(6), 1344–1354. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0268-2>
- Cunillera, N., Boronat, A., & Ferrer, A. (1997). The *Arabidopsis thaliana* FPS1 gene generates a novel mRNA that encodes a mitochondrial farnesyl-diphosphate synthase isoform. *Journal of Biological Chemistry*, 272(24), 15381–15388. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.24.15381>
- E. J. Corey\*, SEIICHI P. T. MATSUDA\*, A. B. B. (1993). Isolation of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding cycloartenol synthase by functional expression in a yeast mutant lacking lanosterol synthase by the use of a chromatographic screen, 90(December), 11628–11632.
- Feller, A., Machemer, K., Braun, E. L., & Grotewold, E. (2011). Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors, 94–116. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04459.x>



- Flammang, A. M., Cifone, M. A., Erexson, G. L., & Stankowski, L. F. (2004). Genotoxicity testing of a fenugreek extract. *Food and Chemical Toxicology*, 42(11), 1769–1775. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.07.003>
- Friedman. (2006). Potato Glycoalkaloids and Metabolites : Roles in the Plant and in the Diet.
- Gholami, A., Geyter, N. De, Pollier, J., & Goossens, A. (2014). Natural product biosynthesis in *Medicago* species. <https://doi.org/10.1039/c3np70104b>
- Ginzberg, I., Tokuhisa, J. G., & Veilleux, R. E. (2009). Potato Steroidal Glycoalkaloids : Biosynthesis and Genetic Manipulation, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s11540-008-9103-4>
- Glauert A. M., Dingle J. T., L. J. A. (1962). © 1962 Nature Publishing Group. *Nature*, 196, 952–953.
- Güçlü-Üstündag, & Mazza. (2007). Saponins : Properties , Applications and Processing Saponins : Properties , Applications, (January 2013), 37–41. <https://doi.org/10.1080/10408390600698197>
- Hemmerlin, A., Rivera, S. B., Erickson, H. K., & Poulter, C. D. (2003). Enzymes encoded by the farnesyl diphosphate synthase gene family in the Big Sagebrush *Artemisia tridentata* ssp. *spiciformis*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(34), 32132–32140. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213045200>
- Hong, G.-J., Xue, X.-Y., Mao, Y.-B., Wang, L.-J., & Chen, X.-Y. (2012). *Arabidopsis* MYC2 Interacts with DELLA Proteins in Regulating Sesquiterpene Synthase Gene Expression. *The Plant Cell*, 24(6), 2635–2648. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.098749>
- Hsieh, M. H., Chang, C. Y., Hsu, S. J., & Chen, J. J. (2008). Chloroplast localization of methylerythritol 4-phosphate pathway enzymes and regulation of mitochondrial genes in *ispD* and *ispE* albino mutants in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 66(6), 663–673. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9297-5>
- Hu, Z.-B., & Du, M. (2006). Hairy Root and Its Application in Plant Genetic Engineering. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48(2), 121–127. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2006.00121.x>
- Huhman. (2005). Quantification of Saponins in Aerial and Subterranean Tissues of *Medicago truncatula*, 1914–1920.
- Itkin, M. (2014). Biosynthesis of Antinutritional, 175(2013). <https://doi.org/10.1126/science.1240230>
- Iturbe-ormaeche, I., Haralampidis, K., Papadopoulou, K., & Osbourn, A. E. (2003). Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*, 731–743.
- Ji, Y., Xiao, J., Shen, Y., Ma, D., Li, Z., Pu, G., ... Wang, H. (2014). Cloning and characterization of *AabHLH1*, a bHLH transcription factor that positively regulates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *Plant and Cell Physiology*, 55(9), 1592–1604. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu090>
- Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R., & He, X. (2014). Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of*

*Pharmacy and Pharmacology*, 2(July 2014), 377–392. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(96\)82199-7](https://doi.org/10.1016/0300-9084(96)82199-7)

Kahn, R. A., and Durst, F., 2000, Function and evolution of plant cytochrome P450. *Recent Adv. Phytochem.* 34, 151–189

Kharkwal.Harsha., Panthari.Preeti., Kant., P. M., Harendra., K., Chandra, K. A., & Datt., J. D. (2012). Foaming Glycosides : a Review. *IOSR Journal of Pharmacy*, 2(5), 23–28. <https://doi.org/10.9790/3013-25202328>

Król, S. K., B, M. B. K., Rivero-müller, A., & Stepulak, A. (2015). Comprehensive Review on Betulin As A Potent Anti-cancer Agent Comprehensive Review on Betulin as a Potent Anticancer Agent, (December 2014). <https://doi.org/10.1155/2015/584189>

Kuzina, V., Ekstrøm, C. T., Andersen, S. B., Nielsen, J. K., Olsen, C. E., & Bak, S. (2009). Identification of Defense Compounds in *Barbarea vulgaris* against the Herbivore *Phyllotreta nemorum* by an, 151(December), 1977–1990. <https://doi.org/10.1104/pp.109.136952>

Lee, S., Wong, P., Cheah, S., & Mustafa, M. R. (2011). Alpha-Tomatine Induces Apoptosis and Inhibits Nuclear Factor-Kappa B Activation on Human Prostatic, 6(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018915>

Leivar Pablo, S., Trelease, R. N., Lo, C., Leivar, P., Boronat, A., Campos, N., ... Ferna, X. (2005). Subcellular Localization of Arabidopsis, 137(January), 57–69. <https://doi.org/10.1104/pp.104.050245>

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method, 408, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Loreto, F., Dicke, M., Schnitzler, J., & Turlings, T. C. J. (2014). Plant volatiles and the environment, 1905–1908. <https://doi.org/10.1111/pce.12369>

Maekawa, T., Kusakabe, M., Shimoda, Y., Sato, S., Tabata, S., Murooka, Y., & Hayashi, M. (2008). Polyubiquitin Promoter-Based Binary Vectors for Overexpression and Gene Silencing in *Lotus japonicus*, 21(4), 375–382.

Mandel, T., Fleming, a J., Krähenbühl, R., & Kuhlemeier, C. (1995). Definition of constitutive gene expression in plants: the translation initiation factor 4A gene as a model. *Plant Molecular Biology*, 29(5), 995–1004. <https://doi.org/10.1007/BF00014972>

Markus Lange, B., & Ahkami, A. (2013). Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes-current status and future opportunities. *Plant Biotechnology Journal*, 11(2), 169–196. <https://doi.org/10.1111/pbi.12022>

Martín, S., & Briones. (1999). Industrial Uses and Sustainable Supply of *Quillaja saponaria* (Rosaceae) Saponins Author (s) : Ricardo San Martín and Reinaldo Briones Published by : Springer on behalf of New York Botanical Garden Press Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/4256204>, 53(3), 302–311.

Mehrafarin, A., Rezazadeh, S., Naghdi Badi, H., Noormohammadi, G., Zand, E., & Qaderi, A. (2011). A review on biology, cultivation and biotechnology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) as a valuable medicinal plant and multipurpose. *Journal of*

*Medicinal Plants*, 10(37), 6–24.

- Mertens, J., Pollier, J., Vanden Bossche, R., Lopez-Vidriero, I., Franco-Zorrilla, J. M., & Goossens, A. (2016). The bHLH Transcription Factors TSAR1 and TSAR2 Regulate Triterpene Saponin Biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 170(1), 194–210. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01645>
- Morrissey, J. P., & Osbourn, A. E. (1999). Fungal Resistance to Plant Antibiotics as a Mechanism of Pathogenesis, 63(3), 708–724.
- Moses, T., Papadopoulou, K. K., & Osbourn, A. (2014). Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(6), 439–462. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.953628>
- Moses, T., Pollier, J., Thevelein, J. M., & Goossens, A. (2013). Tansley Review Bioengineering of plant ( tri ) terpenoids : from metabolic engineering of plants to synthetic biology in vivo and in vitro, 27–43.
- Musende, A. G., Eberding, A. A., Wood, A. C., Adomat, A. H., Fazli, L., William, A. A. H. A., & Marcel, J. A. (2009). Pre-clinical evaluation of Rh2 in PC-3 human xenograft model for prostate cancer in vivo : formulation , pharmacokinetics , biodistribution and efficacy, 1085–1095. <https://doi.org/10.1007/s00280-009-0965-1>
- Nagegowda, D. A., Ramalingam, A. S., & Bach, A. T. J. (2005). Brassica juncea HMG-CoA synthase : localization of mRNA and protein, 844–856. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-1497-5>
- Okada, K., Saito, T., Nakagawa, T., Kawamukai, M., & Kamiya, Y. (2000). Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 122(April), 1045–1056. <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1045>
- Osbourn, A. (2010). Gene Clusters for Secondary Metabolic Pathways : An Emerging Theme in Plant Biology 1, 154(October), 531–535. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161315>
- Petropoulos, G. A., 2002. Fenugreek: The genus *Trigonella*. Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles, Taylor & Francis
- Pollier, J., Moses, T., González-Guzmán, M., De Geyter, N., Lippens, S., Bossche, R. Vanden, ... Goossens, A. (2013). The protein quality control system manages plant defence compound synthesis. *Nature*, 504(7478), 148–152. <https://doi.org/10.1038/nature12685>
- Sallaud, C., Rontein, D., Onillon, S., Jabes, F., Duffe, P., Giacalone, C., ... Tissier, A. (2009). A Novel Pathway for Sesquiterpene Biosynthesis from Z,Z-Farnesyl Pyrophosphate in the Wild Tomato Solanum habrochaites. *The Plant Cell Online*, 21(1), 301–317. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.057885>
- Sang, W., & Gun, D. (2008). The Combination Effect of Korean Red Ginseng Saponins with Kanamycin and Cefotaxime against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus, 31(8), 1614–1617.
- Sanmiya, K., Ueno, O., Matsuoka, M., & Yamamoto, N. (1999). Localization of farnesyl diphosphate synthase in chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 40(3), 348–354.

<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029549>

- Sapir-Mir, M., Mett, A., Belausov, E., Tal-Meshulam, S., Frydman, A., Gidoni, D., & Eyal, Y. (2008). Peroxisomal Localization of Arabidopsis Isopentenyl Diphosphate Isomerases Suggests That Part of the Plant Isoprenoid Mevalonic Acid Pathway Is Compartmentalized to Peroxisomes. *Plant Physiology*, *148*(3), 1219–1228. <https://doi.org/10.1104/pp.108.127951>
- Saurabh Bhatia Kiran SharmaRandhir Dahiya Tanmoy Bera (2015), *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* 1st Edition, Academic Press, ISBN 9780128022214
- Savithamma, N., & Rao, M. (2011). Screening of Medicinal Plants for Secondary Metabolites. *Middle-East Journal of Scientific*, *8*(3), 579–584. Retrieved from [http://idosi.org/mejsr/mejsr8\(3\)11/6.pdf](http://idosi.org/mejsr/mejsr8(3)11/6.pdf)
- Seeman, P., & Cheng, D. (1973). STRUCTURE OF M E M B R A N E HOLES IN OSMOTIC AND SAPONIN HEMOLYSIS The Fixation of the Transient Holes in the Open Position Freeze-Etch Procedure Structure of Membrane tloles in Osmotic Hemolysis Hemolysis by Saponin, *56*.
- Shahabzadeh, Z., Heidari, B., & Hafez, R. F. (2013). Induction of Transgenic Hairy Roots in *Trigonella foenum-graceum* Co-cultivated with *Agrobacterium rhizogenes* Harboring a GFP Gene, *2013*(10), 263–268.
- Shang, Y., Ma, Y., Zhou, Y., Zhang, H., Duan, L., Chen, H., ... Huang, S. (2014). Biosynthesis, regulation, and domestication of bitterness in cucumber. *Science*, *346*(6213), 1084–1088. <https://doi.org/10.1126/science.1259215>
- Simkin, A. J., Guirimand, G., Papon, N., Courdavault, V., Thabet, I., Ginis, O., ... Clastre, M. (2011). Peroxisomal localisation of the final steps of the mevalonic acid pathway in planta. *Planta*, *234*(5), 903–914. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1444-6>
- Sitthithaworn, W., Kojima, N., Viroonchatapan, E., Suh, D. Y., Iwanami, N., Hayashi, T., ... Sankawa, U. (2001). Geranylgeranyl diphosphate synthase from *Scoparia dulcis* and *Croton sublyratus*. Plastid localization and conversion to a farnesyl diphosphate synthase by mutagenesis. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, *49*(2), 197–202. <https://doi.org/10.1248/cpb.49.197>
- Spyropoulou, E. A., Haring, M. A., & Schuurink, R. C. (2014). RNA sequencing on *Solanum lycopersicum* trichomes identifies transcription factors that activate terpene synthase promoters. *BMC Genomics*, *15*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-402>
- Stahl, E. (2014). *Thin-Layer Chromatography. Igarss 2014*. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Stamp, N. (2003). Out Of The Quagmire Of Plant Defense Hypotheses. *The Quarterly Review of Biology*, *78*(1), 23–55. <https://doi.org/10.1086/367580>
- Stochmal, A., Oleszek, W., & Kapusta, I. (2008). TLC of Triterpenes (Including Saponins), (May 2014). <https://doi.org/10.1201/9781420046786.ch20>
- Suire, C., Bouvier, F., Backhaus, R. A., Be, D., Bonneau, M., Camara, B., ... Camara, B. (2000). Cellular localization of isoprenoid biosynthetic enzymes in *Marchantia polymorpha*.

- Uncovering a new role of oil bodies. *Plant Physiology*, 124(3), 971–978.  
<https://doi.org/10.1104/pp.124.3.971>
- Sun, H., Xie, Y., & Ye, Y. (2009). Advances in saponin-based adjuvants, 27, 1787–1796.  
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.091>
- Sutter, V. De, Vanderhaeghen, R., Tilleman, S., Lammertyn, F., Vanhoutte, I., Karimi, M., ... Hilson, P. (2005). Exploration of jasmonate signalling via automated and standardized transient expression assays in tobacco cells, 1065–1076.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02586.x>
- Suzuki, H., Achnine, L., Xu, R., Matsuda, S. P. T., & Dixon, R. A. (2002). A genomics approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*, 1033–1048.
- Suzuki, H., Reddy, M. S. S., Naoumkina, M., Aziz, N., May, G. D., Huhman, D. V., ... Dixon, R. A. (2005). Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic re-programming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula*. *Planta*, 220(5), 696–707. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1387-2>
- Szakiel, A., & Pa, C. (2011). Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants, 471–491. <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9177-x>
- Tamagnone, Merida, Parr, Mackay, Cullanez-Macia, Roberts, & Martin. (1998). The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. *The Plant Cell*, 10(2), 135–154. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.2.135>
- Thabet, I., Guirimand, G., Guihur, A., Lanoue, A., Courdavault, V., Papon, N., ... Clastre, M. (2012). Characterization and subcellular localization of geranylgeranyl diphosphate synthase from *Catharanthus roseus*. *Molecular Biology Reports*, 39(3), 3235–3243.  
<https://doi.org/10.1007/s11033-011-1091-9>
- Thimmappa, R., Geisler, K., Louveau, T., Maille, P. O., & Osbourn, A. (2014). Triterpene Biosynthesis in Plants. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120229>
- Tholl, D. (2015). Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 123(July 2015), 127–141.  
<https://doi.org/10.1007/10>
- Tholl, D., Croteau, R., & Gershenzon, J. (2001). Partial purification and characterization of the short-chain prenyltransferases, geranyl diphosphate synthase and farnesyl diphosphate synthase, from *Abies grandis* (grand fir). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 386(2), 233–242. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2212>
- Turner, G., Gershenzon, J., Nielson, E. E., Froehlich, J. E., & Croteau, R. (1999). Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. *Plant Physiology*, 120(3), 879–886.  
<https://doi.org/10.1104/pp.120.3.879>
- Uemura, T., Hirai, S., Mizoguchi, N., Goto, T., Lee, J., Taketani, K., ... Kawada, T. (2010). Diosgenin present in fenugreek improves glucose metabolism by promoting adipocyte differentiation and inhibiting inflammation in adipose tissues, 1596–1608.  
<https://doi.org/10.1002/mnfr.200900609>

- Vaidya, K., Ghosh, A., Kumar, V., Chaudhary, S., Srivastava, N., Katudia, K., ... Chikara, S. K. (2013). De Novo Transcriptome Sequencing in *L.* to Identify Genes Involved in the Biosynthesis of Diosgenin. *The Plant Genome*, 6(2), 0. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2012.08.0021>
- Verpoorte, R. (1998). Exploration of nature's chemodiversity: The role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today*, 3(5), 232–238. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(97\)01167-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(97)01167-7)
- Vincken, J., Heng, L., Groot, A. De, & Gruppen, H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom, 68, 275–297. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.10.008>
- Vrancheva, R., Dincheva, I., & Badjakov, I. (2016). GS-MS based metabolite profile of different trademarks of fenugreek GS-MS based metabolite profile of different trademarks of fenugreek, (December 2015), 2008–2012. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1817.6086>
- Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J., & Kowalska, T. (2008). Thin layer chromatography in phytochemistry. *Chromatographic Science Series*, (99), xxii, 874 p. <https://doi.org/10.1201/9781420046786>
- Waller. (n.d.). AJ-200515119-124.
- Wang, Y., Alonso, A. P., Wilkerson, C. G., & Keegstra, K. (2012). Deep EST profiling of developing fenugreek endosperm to investigate galactomannan biosynthesis and its regulation. *Plant Molecular Biology*, 79(3), 243–258. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9909-y>
- Wani, S. A., & Kumar, P. (2018). Fenugreek: A review on its nutraceutical properties and utilization in various food products. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(2), 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.01.007>
- Winer, J., Jung, C. K. S., Shackel, I., & Williams, P. M. (1999). Development and Validation of Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction for Monitoring Gene Expression in Cardiac Myocytes in Vitro. *Analytical Biochemistry*, 270(1), 41–49. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4085>
- Wink M., Taylor & Francis (1999) Functions of Plant Secondary Metabolites and Their Exploitation in Biotechnology, Annual Plant Reviews, Volume 3, ISBN: 978-1-405-18528-8
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1), 3–19. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00300-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00300-5)
- Young, N. D., Mudge, J., & Ellis, T. H. N. (2003). Legume genomes: More than peas in a pod. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(2), 199–204. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00006-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00006-2)



# Παράρτημα

---

## I. Κωδική αλληλουχία του γονιδίου *TSAR1*

>KM409647.1 *Medicago truncatula* triterpene saponin activating regulator 1 (TSAR1) mRNA, complete cds  
ATGGAGGATTCACCTGGAAAATTTGATTTCTTATATGGAAATGGAAGATGATGTGATC  
TTGAATCAAAGTAGCACCACCACATTTGATGAGCAAGAGTTTCTCAAAGATATCATC  
CTTGAAGAACCAGAATGTATTGAACTCTCTTCTTATCTTTGTTCCAATAAAACCAA  
GACAATAGTACAACATAATTAATGTTGAAGGTGATGCTACTAGCCCCACAAATAGT  
ATTTTGTCTTTGATGAGACAAGTTTATTTTGTGGTGATTATGAGAATGTTGAAACA  
AACACAAAAGTAATAACTCCAACCAATCAAGTCTTTGGAAAGATCTTGTGTTAGT  
TCTCCAGCCACATACCTTCTATCTTTTGGTAACTCAAGTATTGAACCAATCATTGAAC  
CAATGTCACATAAACTAAAAGAAGGACAGATGAATCAAGGGGGGTGAAGGAAGCA  
ACAAAGAAGGTTAGAAGATCATGTGAGACAGTACAAGATCATTTGATGGCTGAGAGG  
AAAAGGAGAAGGGAATTAAGTGAAGATATCATAGCACTTTCAGCCATGATACCTGGC  
TTGAAAAAGATGGACAAGTGTATGTACTTAGCGAAGCTGTGAATTACACAAAACAG  
CTTCAAAGCGCATTAAAGAATTGGAGAATCAAACAAAGATAGCAAACCAAATCCA  
GCAATATTCAAGTGGAAATCTCAAGTTTCATCAAATAAAAAGAAGTCCTCAGAATCA  
CTGCTCGAGGTTGAAGCTAGAGTCAAAGAAAAGGAAGTACTCATCAGAATTCATTGT  
GAGAAGCAAAAAGACATAGTGCTCAAATACATGAATTGCTTGAAAAGTTCAATATC  
ACTATAACAAGTAGTAGCATGTTACCATTTGGTGATTCTATTCTTGTAAATCAACATT  
TGTGCTCAGATGGATGAAGAAGACAGCATGACCATGGATGACCTTGTGGAAAATCTG  
AGAAAATATCTATTGGAAACTCATGAGAGTACTTGTGA

## II. Αλληλουχία αμινοξέων του μεταγραφικού παράγοντα *TSAR1*

>XP\_003624235.1 transcription factor bHLH18 [*Medicago truncatula*]  
MEDSLENLISYMEMEDDVILNQSSTTTFDEQEFLKDIILEEPECIELSSYLCSNKTKDNS  
TTIINVEGDATSPTNSILSFDETSLFCGDYENVETNHKSNNNSIKSLERSCVSSPATYLL  
SFGNSSIEPIEPMSHKTKRRTDESRGVKEATKKVRRSCETVQDHLMAERKRRRELTE  
NIIALSAMIPGLKMDKCYVLSEAVNYTKQLQKRIKELENQNKDSKPNPAIFKWKSQV  
SSNKKKSSLESLEVEARVKEKEVLIRIHCEKQKDIVLKIHELLEKFNITITSSMLPFGDSI  
LVINICAQMDEEDSMTMDDLVENLRKYLLETHESYL

### *III. Κωδική αλληλουχία του γονιδίου TSAR2*

>KR349466.1 *Medicago truncatula* triterpene saponin activating regulator 2 (TSAR2) mRNA, complete cds  
ATGGAGGAAATCAACAACCTCAGCTATGAAAGTATCATCATCAATCAGCAGCTGGTTA  
TCTGATTTGGAAATGGACGAATACAATATATTTGCTGAGGAATGCAACCTTAATTTTC  
CTTGATGCTGATGTGGGAGGGTTTCTTTCAAATGACATATCTAATGTATTTCAAGAA  
CAAAACAAACAACAATGTTTATCTTTGGGGTCCACTTTTCATGAAACAATTGATAAT  
AGTGACAAAAACAATGAATCTCTTTCTCCATCTTTTCAGTTTCAAGTTCATCTTTTG  
ACAACCCCCCAAATTCATCCCCTACTAACTCAAAAAGAGAATATTGAAACAATACCAT  
TGTCTCCAACCGATTTGGAAAATATGAATCACTCAACAGAAACCTCAAAAGGGTCAT  
TGAAAATAAAAAGTTGAAAACAAAACCTCAAAAAGCAAAAGGCCACGTGCTCATG  
GTAGAGATCACATCATGGCTGAGAGAAATCGAAGAGAGAACTCACCCAAAGCTTCA  
TTGCTCTTGACGCTCTTGTTCCTAACCTTAAGAAGATGGATAAACTATCTGTACTAA  
TTGACACTATCAAATACATGAAAGAGCTTAAAAATCGTTTGGAAGATGTGGAAGAAC  
AAAACAAGAAAACAAAAAATAATCATCGACCAAACCATGCCTATGCAGCGATGAAG  
ATTCGTCATCATGTGAGGATAACATTGAATGTGTTGTTGGTTCACCATTTCAAGTGG  
AAGCAAGAGTGTTAGGAAAACAAGTGTGATTCGGATCCAATGCAAGGAGCATAAGG  
GGCTTCTGGTTAAAATTATGGTCGAAATTCAAAAATTTCAACTATTTGTTGTCAATA  
ACAGTGTCTTACCCTTTGGAGATTCTACGCTCGACATTACCATCATTGCTCAGTTGGG  
TGAAGGGTACAACCTTGAGCATAAAGGAACCTTGTAAGAACGTACGCATGGCATTATT  
GAAGTTTACGTCATCATAA

### *IV. Αλληλουχία αμινοξέων του μεταγραφικού παράγοντα TSAR2*

>ALH07115.1 triterpene saponin activating regulator 2 [*Medicago truncatula*]  
MEEINNSAMKVSSSISSWLSDLEMDEYNIFAEECNLNFLDADVGGFLSNDISNVFQEQ  
NKQQCLSLGSTFHETIDNSDKNNESLSPSFQFQVPSFDNPPNSSPTNSKENIETIPLSPT  
DLENMNHSTETSKGSLENKKLETKTSKSKRPRAHGRDHIMAERNRREKLTQSFIALA  
ALVPLKMKMDKLSVLIDTIKYMKELKNRLEDVEEQNKKTKKKSSTKPCLCSEDESSSC  
EDNIECVVGSFPQVEARVLGKQVLIRIQCKEHLKLLVKIMVEIQKFQLFVVNNSVLPFG  
DSTLDITIAQLGEGYNLSIKELVKNVRMALLKFTSS

V. TAE 50x για τις ηλεκτροφορήσεις (αραίωση σε TAE 1X)

TAE 50x (1L)	
Tris base (MW:121.14)	242g
Acetic Acid (MW:60.05)	57.1mL
EDTA (MW:372.24)	18.6g
dH <sub>2</sub> O	μέχρι το 1L
pH 8	

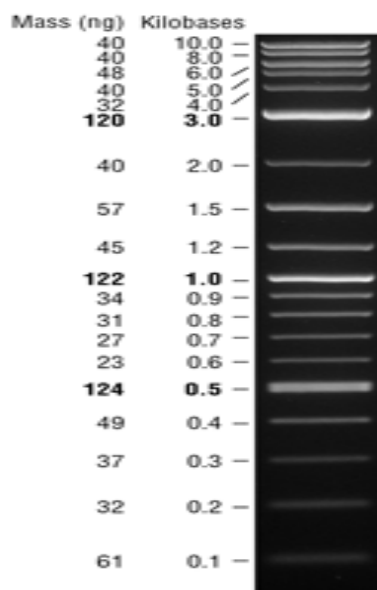
VI. 6x DNA Loading Dye

Total 10mL	
Glycerol	5mL
50x TAE	200μL
Bromophenol blue	25mg
ddH <sub>2</sub> O	4.8mL
Αποθήκευση στους -20°C	

VII. 2x RNA Loading Dye

Formamide	95%
SDS	0.025%
0.5mM EDTA	
Bromophenol blue	0.025%
Xylene cyanol	0.025%
Αποθήκευση στους -20°C	

VIII. 2-Log DNA Ladder (0.1 – 10kb) New England BioLabs



### IX. Διάλυμα CTAB για την απομόνωση DNA

CTAB ρυθμιστικό διάλυμα
100mM Tris-HCl (pH 8)
20mM EDTA
1.4M NaCl
2% w/v CTAB
1% PVP Mr 40,000

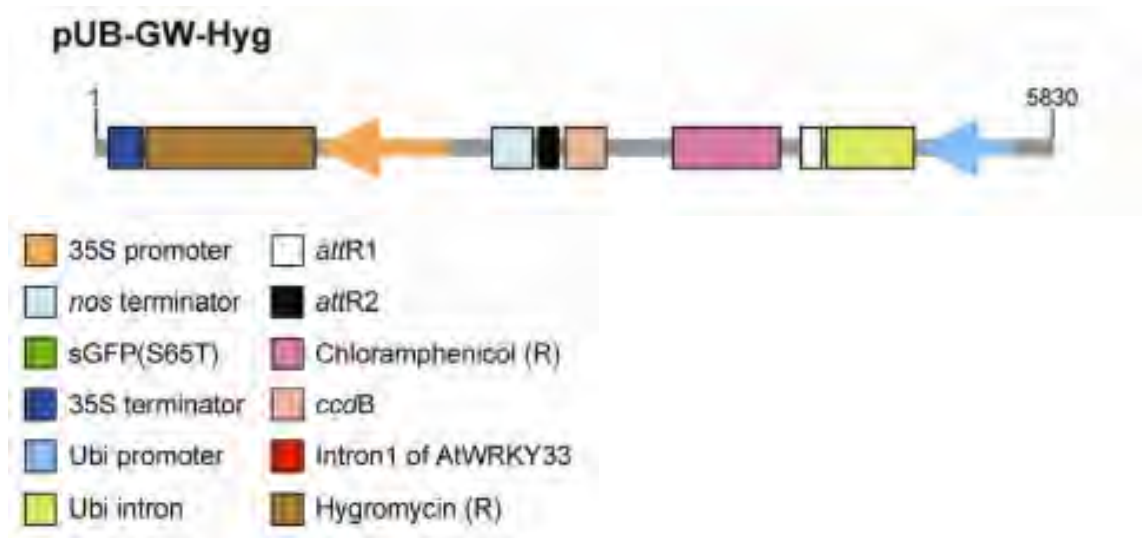
### X. Διαλύματα για την απομόνωση RNA

	Αποθήκευση	
Extraction buffer	50mM Tris-HCL pH 8.3 150mM NaCl 10mM EDTA 1% Lauryl sarcosine	RT
P.I.C.	Phenol/Isoamyl alcohol/ Chloroform 24:1:24	4°C
3M Sodium acetate pH 5.2		RT
Isopropanol		RT
10T10E	10mM Tris pH 8.3/10mM EDTA	RT
8M LiCl (MW 42.39)		RT
70% Ethanol		RT

### XI. Αλληλουχίες εκκινητών για την PCR και τις RT-qPCR

	Ονομασία	Αλληλουχία 5' προς 3'	Στόχος
PCR εκκινητές	35S_F	TGTGATAACATGGTGGAGCA	Υποκινητής 35S
	35S_R	GGTGATTTTCAGCGTGTCTC	
RT-qPCR εκκινητές	qTfgEF1-a_F	ATGGGAAAAGAAAAGATTCATAT	Παράγοντας Επιμήκυνσης 1-α
	qTfgEF1-a_R	GTCTC(A/C)ACAACCATGGGCTTGGT	
	qMtTSAR1_F	TGTGGTGATTATGAGAATGTTGA	TSAR1
	qMtTSAR1_R	AAGGTATGTGGCTGGAGAA	
	qMtTSAR2_F	TCAGTTTCAAGTTCCATCTT	TSAR2
	qMtTSAR2_R	AATCGGTTGGAGACAATG	
	qTfgHMGR_F	AGGTCATGGCTGAGGTGAAC	HMGR
	qTfgHMGR_R	TCCATCTCTTGGCTGCTCTC	
qTfgCAS_F	AACAGACGAGCATCAAAAAGGAGA	CAS	
qTfgCAS_R	GCAAACCCACCCACCATC		

## XII. Πλασμιδιακός φορέας και ένθεμα



(Φωτεινή Δημάκου - πτυχιακή BSc, TBB-ΠΘ, 2017; Maekawa et al., 2008)