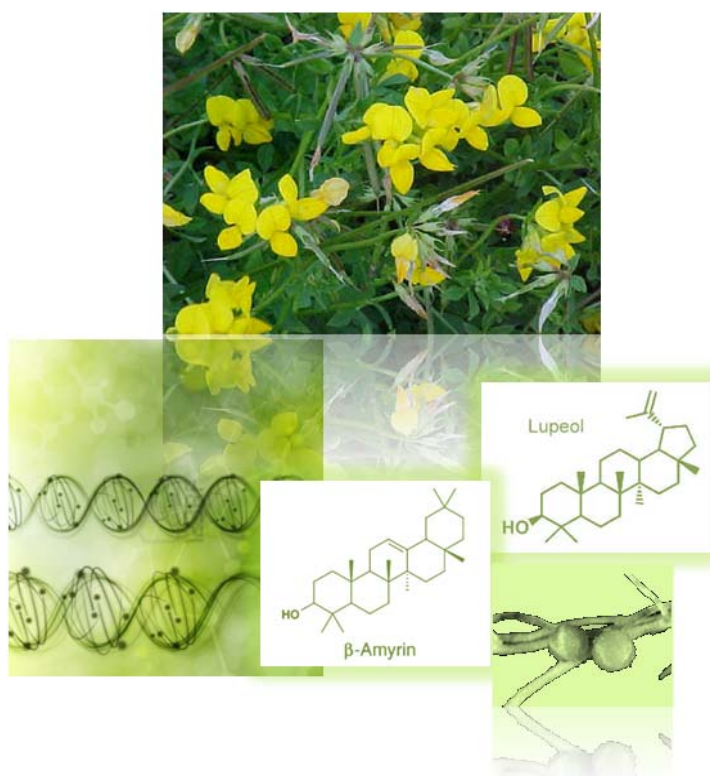


**University of Thessaly**  
Department of Biochemistry and Biotechnology

Afrodite Krokida

***GENOME ORGANIZATION, FUNCTIONAL ANALYSIS OF  
BIOSYNTHETIC GENES AND METABOLIC DIVERSITY OF  
TRITERPENES IN LEGUMES***



**2013**

## Περίληψη

Τα τριτερπένια είναι φυτικοί δευτερογενείς μεταβολίτες που προέρχονται από την κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου από εξειδικευμένα ένζυμα, τις συνθάσες ή κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου. Ο ρόλος της συνθάσης της λουπεόλης, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *OSC3*, καθώς και το προϊόν του, λουπεόλη, διερευνήθηκε σε αναπτυσσόμενες ρίζες και φυμάτια του μοντέλου-ψυχανθούς *Lotus japonicus*. Τα πρότυπα έκφρασης του γονιδίου *OSC3* σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια μη μολυσμένων και μολυσμένων ριζών με το συμβιώτη *Mesorhizobium loti* καθορίστηκαν. Η ιστοειδική έκφραση του γονιδίου *OSC3* καθορίστηκε με *in situ* υβριδισμό. Πραγματοποιήθηκε λειτουργική ανάλυση σε μετασχηματισμένες ρίζες που παρουσίαζαν αποσιώπηση του γονιδίου *OSC3*. Στις μετασχηματισμένες ρίζες καθορίστηκε η απουσία παραγωγής λουπεόλης με GC-MS. Τα μετασχηματισμένα φυτά παρουσίασαν το φαινότυπο της πιο ταχείας φυματιογένεσης σε σύγκριση με τα φυτά – μάρτυρες. Επιπλέον, η έκφραση του γονιδίου *ENOD40*, γονίδιο δείκτης της έναρξης σχηματισμού των καταβολών των φυματίων, αυξήθηκε σημαντικά στα μετασχηματισμένα φυτά. Η εξωγενής παροχή λουπεόλης σε αγρίου τύπου φυτά παρείχε επιπλέον ενδείξεις για τον αρνητικό ρυθμιστικό ρόλο της λουπεόλης στην έκφραση του γονιδίου *ENOD40*. Η βιοσύνθεση της λουπεόλης μπορεί να αποδοθεί αποκλειστικά στο γονίδιο *OSC3*. Λαμβάνοντας όλα αυτά υπόψη, προτείνεται στη λουπεόλη ένας ρόλος στο σχηματισμό των φυματίων μέσω της ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου *ENOD40*. Επιπρόσθετα, τα γονίδια που συμμετέχουν σε μονοπάτια βιοσύνθεσης τριτερπενοειδών οργανώνονται σε γονιδιακές συστοιχίες στα φυτά της βρώμης και του *Arabidopsis thaliana*. Η παρουσία μιας ανάλογης γονιδιακής συστοιχίας στο φυτό *L. japonicus* ταυτοποιήθηκε. Στη γονιδιωματική περιοχή που εδράζεται το γονίδιο της συνθάσης της β-αμυρίνης, εντοπίστηκαν δύο γονίδια του κυτοχρώματος P450 καθώς και μία ρεδοκτάση. Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός της γονιδιακής συστοιχίας πραγματοποιήθηκε με ετερόλογη έκφραση σε φύλλα *Nicotiana benthamiana*. Μια καινούρια δομή τριτερπενοειδούς, η διυδρολουπεόλη, παράγεται από την συνθάση της β-αμυρίνης. Επιπλέον, ένα καινούριο ένζυμο του κυτοχρώματος P450, το CYP71D353, χαρακτηρίστηκε, το οποίο καταλύει το σχηματισμό του 20-hydroxybetulinic acid μέσω τριών διαδοχικών βημάτων οξείδωσης της διυδρολουπεόλης. Τα πρότυπα έκφρασης των γονιδίων μελετήθηκαν σε διαφορετικές αναπτυξιακές και περιβαλλοντικές

συνθήκες. Τα γονίδια της συστοιχίας συν-εκφράζονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυματίων και των ριζών, σε φυτά που υποβλήθηκαν σε καταπονήσεις και σε φυτά που αναπτύχθηκαν παρουσία ορμονών. Ο φυσιολογικός ρόλος της γονιδιακής συστοιχίας στη φυματιογένεση και στην φυτική ανάπτυξη μελετήθηκε σε μετασχηματισμένα φυτά με αποσιώπηση. Επιπλέον, αποκαλύφθηκε ένας μηχανισμός επιγενετικής τροποποίησης που πιθανά εμπλέκεται στη ρύθμιση της γονιδιακής συστοιχίας. Μια γονιδιακή συστοιχία που αποτελείται από λειτουργικά συσχετιζόμενα γονίδια εμπλέκεται στη βιοσύνθεση τριτερπενοειδών στα ψυχανθή και πιθανά εμπλέκεται στη φυτική ανάπτυξη.