

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Π.Μ.Σ Βιολογία Συστημάτων

Τμήμα Βιοτεχνολογίας

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**«Δυαδικό σύστημα άμυνας ολευρωπαΐνης/β-γλυκοσιδάσης
της ελιάς και ομοιόσταση μέσα στο κύτταρο»**

Μαργαρίτα Θωμοπούλου

Αθήνα 2016

Επιβλέπων Καθηγητής :
Πολυδεύκης Χατζόπουλος

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Π.Μ.Σ : Βιολογία Συστημάτων

ΤΜΗΜΑ: Βιοτεχνολογία

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**«Δυναμικό σύστημα άμυνας ολευρωπαΐνης/β-γλυκοσιδάσης
της ελιάς και ομοιόσταση μέσα στο κύτταρο»**

Μαργαρίτα Θωμοπούλου

Αθήνα 2016

1

Επιβλέπων Καθηγητής :
Πολυδεύκης Χατζόπουλος

Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης με τίτλο «**Διαδικό σύστημα άμυνας ολεωρωπαΐνης/β-γλυκοσιδάσης της ελιάς και ομοιόσταση μέσα στο κύτταρο**» έγινε με απόφαση της ΓΣΕΣ του τμήματος Βιοτεχνολογίας (13.10.15), κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η τριμελής συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή της μελέτης.

Συμβουλευτικής και Εξεταστική επιτροπή:

Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής (Επιβλέπων)

Άννα Κούρτη, Αν. Καθηγήτρια (Μέλος)

Δήμητρα Μηλιώνη, Επ. Καθηγήτρια (Μέλος)

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία με θέμα, «Δυαδικό σύστημα άμυνας ολευρωπαΐνης/β-γλυκοσιδάσης της ελιάς και ομοιόσταση μέσα στο κύτταρο» αποτελεί το τελευταίο μέρος του μεταπτυχιακού προγράμματος ‘Βιολογία Συστημάτων’ και εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας. Κλείνοντας αυτόν τον κύκλο σπουδών, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω όλους εκείνους που συνέβαλλαν για την ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Πολυδεύκη Χατζόπουλο, όχι μόνο για την καθοδήγηση του όλο αυτό το διάστημα, αλλά και για την καθοριστική συμβολή του στη δημιουργία του καινούργιου προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών του τμήματος Βιοτεχνολογίας, εγκαθιδρύοντας ένα εκσυγχρονισμένο Π.Μ.Σ που προσφέρει γνώσεις απαραίτητες για το τομέα της έρευνας και την εξέλιξη της τεχνολογίας. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω, την Αν. Καθηγήτρια Άννα Κούρτη, την Επ. Καθηγήτρια Δήμητρα Μηλιώνη και τον Επ. Καθηγητή Σταμάτη Ρήγα, που αποτελούν σημαντικό και αναπόσπαστο κομμάτι του εργαστηρίου της Μοριακής Βιολογίας, με τις συμβουλές τους να είναι πάντοτε χρήσιμες. Ιδιαίτερες ευχαριστίες πρέπει να δώσω στον υποψήφιο διδάκτορα Κωνσταντίνο Κουδουνά, που η προσωπική του δουλειά, η αστείρευτη δίψα για γνώση αλλά και η αμέριστη υποστήριξη που μου προσέφερε όλο το διάστημα λειτούργησαν για μένα ως πηγή έμπνευσης βοηθώντας με να εξελιχθώ σε τεχνικό αλλά και θεωρητικό επίπεδο. Το γενικότερο θετικό κλίμα που επικρατεί μέσα στο εργαστήριο, το τελευταίο διάστημα εμπλουτίστηκε, για την ομάδα της ελιάς, με τους προπτυχιακούς φοιτητές, Ελισάβετ Αγγέλη, Ευσταθία Ζευγίτη, Γιώργο Παπακώστα και Ιπποκράτη Λυγίζο, οι οποίοι προσέφεραν χρήσιμη βοήθεια για την ολοκλήρωση της δουλειάς μου. Τέλος, δεν μπορώ να μην ευχαριστήσω την οικογένεια μου, τους φίλους μου, και τον σύντροφο μου Δημήτρη, για την διαρκή τους στήριξη όλα αυτό το διάστημα, υλική και ψυχολογική που για μένα ήταν απαραίτητα εφόδια για την επίτευξη του στόχου μου.

Στην οικογένεια μου

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη	10
Abstract.....	11
1. Εισαγωγή	12
1.1 Δευτερογενής μεταβολισμός	13
1.1.1 Δευτερογενής Μεταβολισμός στην Ελιά (<i>Olea europaea L.</i>).....	14
1.2 Ολευρωπαΐνη.....	16
1.2.1 Βιοσύνθεση και καταβολισμός.....	16
1.2.2 Βιοδραστική λειτουργία της ολευρωπαΐνης	18
1.2.3 Αμυντική δράση της ολευρωπαΐνης στα φυτά	26
1.3 β-Γλυκοσιδάσες.....	29
1.3.1 Ταξινόμηση	29
1.4 Ο ρόλος των GH1 β-γλυκοσιδασών στα φυτά.....	30
1.4.1 Κυτταρικό τοίχωμα.....	31
1.4.2 Μεταγωγή σήματος	32
1.4.3 Δευτερογενή μεταβολισμό	32
1.4.4 Δυναδικό σύστημα άμυνας/ αμυντικός ρόλος των β-γλυκοσιδασών	33
1.5 OeGLU (Koudounas et al ., 2015)	36

1.6	Πρώτη γραμμή άμυνας στα φυτά.....	42
1.7	Σκοπός – Στόχοι Πειράματος	44
2.	<i>Υλικά και Μέθοδοι.....</i>	46
2.1	Φυτικό υλικό	47
2.2	Απομόνωση και Καθαρισμός Νουκλεϊκών Οξέων	48
2.2.1	Απομόνωση ριβονουκλεϊκών οξέων (RNA)	48
2.2.2	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα της Escherichia coli με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης.....	49
2.2.3	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την βοήθεια κολώνας NucleoSpin® Plasmid Easy Pure.....	50
2.2.4	Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης.....	50
2.3	Ανάλυση Νουκλεϊκών Οξέων	51
2.3.1	Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης	51
2.3.2	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων.....	52
2.4	Μοριακοί χειρισμοί	53
2.4.1	Χειρισμός με Dnase.....	53
2.4.2	Σύνθεση cDNA αλυσίδας (RT-PCR, Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) 54	
2.4.3	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	55
2.4.4	PCR Colonies	58

2.4.5	Πέψη νουκλεϊκών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού	59
2.4.6	Ενοποίηση τμημάτων DNA με κολλώδη άκρα (Ligation)	60
2.4.7	Ημι-ποσοτικό RT-PCR (semi-quantitative RT-PCR).....	61
2.5	Βακτήρια κύτταρα και Μετασηματισμός	64
2.5.1	Υγρές και στερεές καλλιέργειες των βακτηρίων	64
2.5.2	Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> με πλασμιδιακό DNA.	64
2.5.4	Αποθήκευση για μεγάλα χρονικά διαστήματα βακτηριακών κυττάρων	66
2.5.5	Παροδικός μετασηματισμός φύλλων καπνού <i>Nicotiana benthamiana</i> (Agroinfiltration).....	66
2.5.6	Πλασμιδιακοί φορείς και φορείς έκφρασης	68
2.6	Μικροσκοπία Φθορισμού	71
2.7	Διαλύματα.....	72
2.7.1	Θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης φυτών	72
2.7.2	Διαλύματα απομόνωσης ριβονουκλεϊκών οξέων	73
2.7.3	Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης	73
2.7.4	Διαλύματα ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων	73
2.7.5	Διαλύματα χειρισμού με Dnase.....	74
2.7.6	Διαλύματα αντίδρασης RT	74

2.7.7	Διαλύματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)	75
2.7.8	Ligation	78
2.7.9	Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τα βακτηριακά κύτταρα	78
3.	<i>Αποτελέσματα</i>	80
3.1	Κατασκευές της β-γλυκοσιδάσης με διαγραφή του προβλεπόμενου NLS (Nuclear Localization Signal) CaMV35S-OeGLUΔNLS-YFP-FLAG/CaMV35S-OeGLUΔNLS-FLAG	81
3.1.1	Ενίσχυση του γονιδίου της β-γλυκοσιδάσης με διαγραφή του NLS	82
3.1.2	Υποκλωνοποίηση του γονιδίου OeGLU/ΔNLS στον πλασμιδιακό φορέα PUC18	83
3.1.3	Υποκλωνοποίηση του YFP στον φορέα PUC18/Forkozak(Mlu)-ΔNLS	86
3.1.4	Κλωνοποίηση των ενθέτων OeGLU-ΔNLS-FLAG και YFP-OeGLU-ΔNLS-FLAG στον δυαδικό φορέα CaMV35S-pGPTV-HPT.	88
3.1.5	Μελέτη παροδικού μετασχηματισμού της κατασκευής YFP-OeGLU-ΔNLS-FLAG σε φύλλα καπνού <i>Nicotiana benthamiana</i>	91
3.2	Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των μονομερών της OeGLU μέσω του Bimolecular fluorescence complementation (BiFC)	93
3.2.1	Υποκλωνοποίηση του γονιδίου της OeGLU στον πλασμιδιακό φορέα PUC18	94
3.2.2	Υποκλωνοποίηση του γονιδίου OeGLU στους δυαδικούς φορείς p.SPYNE και p.SPYCE.....	96
3.2.3	Μικροσκοπική παρατήρηση των p.SPYNE/OeGLU και p.SPYCE/OeGLU σε κύτταρα της επιδερμίδας των φύλλων καπνού.....	98
3.3	<i>In vivo</i> μελέτη του συστήματος Oleuropein/OeGLU στα φύλλα του καπνού <i>Nicotiana benthamiana</i>.....	100

3.3.1	Απομόνωση RNA από τα φύλλα καπνού	100
3.3.2	Χειρισμός δειγμάτων με DnaseI.....	103
3.3.3	Δημιουργία cDNA αλυσίδας.....	105
3.3.4	Semi-quantitative RT-PCR.....	106
4.	<i>Συζήτηση</i>	110
4.1	Η OeGLU τοποθετείται στον πυρήνα	111
4.2	Η OeGLU διαμορφώνει μια τεταρτοταγή δομή μεγάλου μοριακού βάρους.....	114
4.3	Το καρβόξυ άκρο φαίνεται να είναι υπεύθυνο για την τεταρτοταγή δομή του ενζύμου.....	115
4.4	Μη ανίχνευση επαγωγής άμυνας στο ετερόλογο σύστημα του καπνού από την αντίδραση ολευρωπαΐνης/ OeGLU.....	119
5.	<i>Βιβλιογραφία</i>	123

Περίληψη

Η ολευρωπαϊνή είναι το επικρατέστερο σεκοϊριδοειδές στην ελιά (*Olea europaea*), το οποίο εμπλέκεται σε ένα δυαδικό σύστημα άμυνας. Αυτό αποτελείται από μια β-γλυκοσιδάση που απογλυκοζυλιώνει την ολευρωπαϊνή και παράγει ένα τοξικό άγλυκο μόριο με δομή παρόμοια της γλουταραλδεΐδης. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν διάφορα χαρακτηριστικά του ενζύμου OeGLU που κωδικοποιεί για μια αμυντική β-γλυκοσιδάση εξειδικευμένη ως προς την ολευρωπαϊνή. Η ολευρωπαϊνή στην γλυκοζυλιωμένη αδρανή της μορφή βρίσκεται, βάσει βιβλιογραφίας, αποθηκευμένη στο χυμοτόπιο των κυττάρων της ελιάς. Έχει βρεθεί ότι η OeGLU έχει διακριτή υποκυτταρική τοποθέτηση στον πυρήνα των κυττάρων, υποστηρίζοντας έτσι την υπόθεση του δυαδικού συστήματος άμυνας. Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία έγινε διαγραφή του NLS (Nuclear Localization Signal), με αποτέλεσμα το μετάλλαγμα της OeGLU σε σύντηξη με το γονίδιο αναφοράς YFP να τοποθετείται πλέον στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του ετερόλογου συστήματος του φυτού *Nicotiana benthamiana*, επιβεβαιώνοντας την *in silico* ανάλυση. Εν συνεχεία, μελετήθηκε η δυνατότητα των μονομερών του ενζύμου να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω της τεχνικής BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation). Η τεχνική απέδειξε *in vivo* ότι τα μονομερή του ενζύμου OeGLU αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, με αποτέλεσμα τα δύο κομμάτια του GFP των δυαδικών φορέων να έρχονται πολύ κοντά ώστε να ανιχνεύεται φθορισμός στον πυρήνα. Καταληκτικά, χρησιμοποιώντας επίσης το ετερόλογο σύστημα έκφρασης *Nicotiana benthamiana*, έγινε μια προσεγγιστική προσπάθεια προσδιορισμού της δράσης του δυαδικού συστήματος άμυνας Ολευρωπαϊνης/OeGLU *in vivo*. Απώτερος στόχος ήταν να εξεταστεί η πιθανότητα η άγλυκη μορφή της ολευρωπαϊνης να λειτουργεί ως σινιάλο απόκρισης για την ενεργοποίηση της άμυνας του φυτού. Ύστερα από την επαφή ενζύμου υποστρώματος, ακολούθησε ανίχνευση της αύξησης της έκφρασης γονιδίων που επάγονται από την αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) ή σχετίζονται με προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (PCD), μέσω της μεθόδου του ημιποσοτικού RT-PCR (semi-quantitative RT-PCR). Η προσπάθεια προσδιορισμού ήταν ανεπιτυχής υποδηλώνοντας την ανάγκη τελειοποίησης της μεθόδου.

Abstract

« The oleuropein/b-glucosidase dual-defense system of *Olea europaea* and homeostasis within the cell»

Oleuropein, the major secoiridoid compound in olive tree (*Olea europaea*), is involved in a sophisticated two-component defense system, comprising a β -glucosidase enzyme that activates oleuropein into a toxic glutaraldehyde-like structure. The experimental work conducted in the present thesis reports various features of the enzyme OeGLU, which encodes for a defensive b-glucosidase specific for oleuropein. According to the pre-existing literature, when oleuropein is glycosylated becomes inactive and is located in vacuoles. It has been found that OeGLU has distinct subcellular localization in the nucleus of plant cells, which supports the hypothesis of the dual defense system. As part of this project, the NLS (Nuclear Localization Signal) was deleted and therefore, the resulted OeGLU mutant in fusion with the reporter gene YFP is now localized in the cytoplasm of the leaf epidermal cells in the heterologous expression system of *Nicotiana bethmami*, confirming the in silico analysis. Following these results, the BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) method was used to study whether the enzyme's monomers interact with each other. Indeed, the technique proved this hypothesis in vivo, by showing that the interaction between the monomers of OeGLU brings also the two GFP fragments in the two different binary vectors close with each other, resulting in the detection of fluorescence signal inside the cell's nucleus. As a final step of the present thesis, the heterologous system of *N. benthamiana* was used once again in order to test a different approach regarding the action of the dual defense system of OeGLU/Oleuropein. The overall aim was to examine whether the aglycone of Oleuropein can actually act as a signal response towards the plant's defense activation system. The enzyme and the substrate were brought in contact and afterwards, the method of semi-quantitative RT-PCR was used in an attempt to detect gene expression induced either by the hypersensitive response (HR) or associated to programmed cell death (PCD). Unfortunately, the attempt was unsuccessful, suggesting that further improvement of this method is needed.

1. Εισαγωγή

1.1 Δευτερογενής μεταβολισμός

Διακόσια χρόνια σύγχρονης χημείας και βιολογίας έχουν περιγράψει τον σημαντικό ρόλο των πρωτογενών μεταβολιτών σε βασικές ζωτικές λειτουργίες, όπως είναι η κυτταρική διαίρεση, ανάπτυξη, αναπνοή, αποθήκευση και αναπαραγωγή. Ο πρώτος που όρισε τους δευτερογενείς μεταβολίτες και τους διαχώρισε από τους πρωτογενείς ήταν ο A. Kossel το 1891. Τριάντα χρόνια αργότερα σημαντική πρόοδο προς το θεωρητικό υπόβαθρο για τον δευτερογενή μεταβολισμό ήταν το έργο του F.Czarek που “δώρισε” ένα ολόκληρο τόμο για την βιοχημεία των φυτών. Σύμφωνα με τον ίδιο τα προϊόντα του δευτερογενή μεταβολισμού θα μπορούσαν κάλλιστα να προέρχονται από μετατροπές του αζώτου και για αυτό το λόγο τους ονόμασε «δευτερεύουσες τροποποιήσεις», όπως είναι η απαμίνωση. Συγκριτικά με τα κύρια συστατικά των φυτών οι δευτερογενείς μεταβολίτες βρίσκονται σε χαμηλή περιεκτικότητα και αποτελούν μόλις το 1% του συνολικού άνθρακα. Συνήθως αποθηκεύονται σε συγκεκριμένα μέρη των φυτών (ιστοί, όργανα, ειδικά κύτταρα). Στα μέσα του 20^{ου} αιώνα η βελτίωση των αναλυτικών τεχνικών, όπως είναι η χρωματογραφία επέτρεψε την ανακάλυψη όλων και περισσότερων μορίων. Αυτή ήταν η βάση δημιουργίας της Φυτοχημείας (Phytochemistry) (Bourgand et al., 2001).

Χάρη στην βελτίωση των βιοχημικών τεχνικών και με την συμβολή της μοριακής βιολογίας, αναδείχτηκε ο σημαντικός ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών στην προσαρμοστικότητα των φυτών στο περιβάλλον. Η δράση τους έχει χαρακτηριστεί ως αντιμικροβιακή, αντιμυκητιακή, αντι-ική και ως εκ τούτου είναι σε θέση να προστατεύουν τα φυτά από τα παθογόνα. Επίσης παρουσιάζουν τοξικότητα για άλλα φυτά που η βλάστηση τους λειτουργεί ανταγωνιστικά. Επιπλέον απορροφούν μεγάλο μέρος της UV ηλιακής ακτινοβολίας προστατεύοντας τα φύλλα από το φως (Li et al., 1993). Τέλος επιδρούν με ζώα και έντομα είτε αποτρέποντας να γίνουν τα φυτά τροφή, είτε αλληλεπιδρούν θετικά με τον οργανισμό όπως γίνεται με την μηδική στην

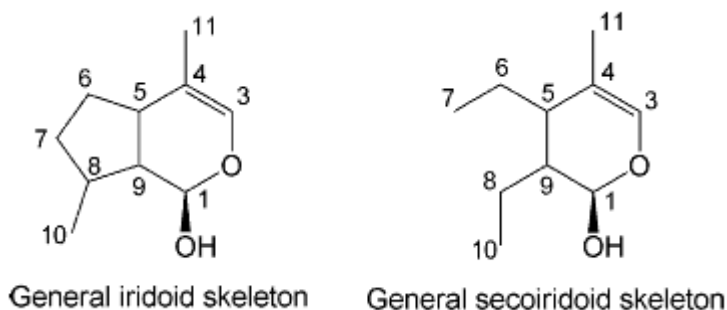
τροφή των βοοειδών που οι δευτερογενείς μεταβολίτες της, επηρεάζουν θετικά τα οιστρογόνα του ζώου, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η γονιμότητα (Torsell, 1997, Harborne, 1999).

Τα παράγωγα του δευτερογενή μεταβολισμού κατατάσσονται σύμφωνα με τα βιοσυνθετικά μονοπάτια από τα οποία παράγονται σε τέσσερης μεγάλες ομάδες: φαινολικά, τερπένια, στεροειδή, αλκαλοειδή. Η πιο διαδομένη ομάδα είναι αυτή των φαινολικών, λόγω της εμπλοκής τους στην βιοσύνθεση λιγνίνης. Ωστόσο άλλες ενώσεις όπως είναι τα αλκαλοειδή, υπάρχουν μόνο σε συγκεκριμένα φυτικά είδη (Bourgaut et al., 2001).

1.1.1 Δευτερογενής Μεταβολισμός στην Ελιά (*Olea europaea L.*)

Η ελιά *Olea europaea L.* ανήκει στην Φυλή Oleae, στην οικογένεια Oleaceae η οποία περιλαμβάνει περίπου 25 γένη και 600 είδη. Μερικά από τα πιο γνωστά γένη της οικογένειας είναι τα *Forsythia*, *Fraxinus*, *Jasminum*, *Ligustrum*, *Olea* και *Syringa*. Τα είδη της οικογένειας Oleaceae απαντώνται κυρίως στην εύκρατη και τροπική Ασία. Είναι φυτά οικονομικής αλλά και αισθητικής σημασία καθώς παρέχουν προϊόντα όπως τρόφιμα, ξυλεία, βρώσιμα έλαια και καλλυντικά, ενώ πολλά από αυτά χρησιμοποιούνται ως καλλωπιστικά φυτά (Obiet et al., 2008). Το είδος *O. europaea* αποτελεί το μοναδικό μεσογειακό δέντρο ελιάς, το οποίο καλλιεργείται για παραγωγή λαδιού και επιτραπέζια κατανάλωση. Στο είδος περιλαμβάνονται περισσότερες από 1000 ποικιλίες παρότι πολλές απ' αυτές είναι πιθανό να προέρχονται από το ίδιο αρχικό γενετικό υλικό.

Χαρακτηριστικό της οικογένειας είναι η παρουσία συγκεκριμένων ενώσεων που είναι γνωστές ως σεκοϊριδοειδή (secoiridoids) και παράγονται από τον δευτερογενή μεταβολισμό των μονοτερπενίων (Mann , 1987). Τα σεκοϊριδοειδή (secoiridoids) προέρχονται από τα ιριδοειδή (iridoids), ύστερα από άνοιγμα του δακτυλίου του κυκλοπεντανίου των ιριδοειδών (Εικόνα 1.1). Η ενδιάμεση ένωση μεταξύ σεκοϊριδοειδών και ιριδοειδών είναι το δεόξυ-λογανικό οξύ (deoxyloganic acid). Μέχρι εκείνο το σημείο το μονοπάτι είναι κοινό στην οικογένεια των Oleaceae, όμως υπάρχουν διαφορές ανάμεσα στα 25 γένη μέσω διακλαδώσεων που προκύπτουν στη βιοσύνθεση μετά το δεόξυ-λαγονικό οξύ για την παραγωγή σεκοϊριδοειδών (Damtoft et al., 1995) . Τα σεκοϊριδοειδή που χαρακτηρίζονται από δομή 8,9-olefinic οροθετούνται ως ολεοσιδικά σεκοϊριδοειδή (oleosidic secoiridoids) ή ολεοσίδια (oleosides). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα ολεοσίδια παρουσιάζουν πολλά φαινολικά προϊόντα σύζευξης που είναι μοναδικά για τα φυτά της οικογένειας των Oleaceae (Obiet et al., 2008).



Εικόνα 1. 1 Γενική δομή ιριδοειδών και σεκοϊριδοειδών (Obiet et al., 2008)

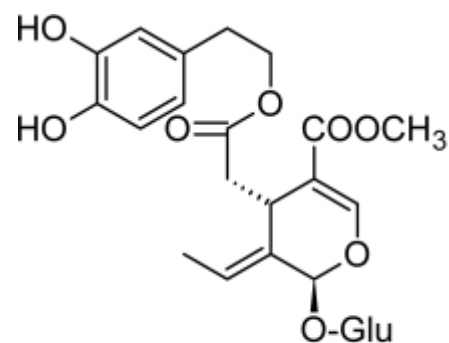
Την τελευταία δεκαετία γίνεται μεγάλη προσπάθεια να βρεθούν νέα ολεοσίδια στην *Olea europaea* με παράλληλο τον βιοχημικό και μοριακό χαρακτηρισμό τους, δεδομένου ότι παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον τόσο κατά την παραγωγή και

αποθήκευση του ελαιόλαδου όσο και ως βιοδραστικά μόρια ωφέλιμα για την υγεία του ανθρώπου. Η ολευρωπαΐνη (oleuropein) και το λιγστροσίδιο (ligstroside) είναι τα πιο σημαντικά ολεοσίδια του γένους *Olea* και είναι εστέρες ελενολικού οξέος με 2-(3,4-διυδροξυφαινολ)-αιθανόλη (υδροξυτυροσόλη) και 2-(4-υδροξυφαινολ)-αιθανόλη (τυροσόλη) αντίστοιχα. Η ολευρωπαΐνη δεν συναντάται μόνο στο γένος *Olea* αλλά και σε πολλά άλλα είδη της οικογένειας Oleaceae, όπως στα *Fraxinus excelsior*, *F. chinensis*, *Syringa josikaea*, *S. vulgaris*, *S. dilatata*, *Ligustrum ovalifolium*, *Jasminum polyanthum* και *Osmanthus asiaticus* (Obiet et al., 2008).

1.2 Ολευρωπαΐνη

1.2.1 Βιοσύνθεση και καταβολισμός

Τα σεκοϊριδοειδή (secoiridoids) προέρχονται ως διακλάδωση του βιοσυνθετικού μονοπατιού του μαβαλονικού οξέος (malvalonic acid) στο σημείο που ενώνεται η σύνθεση των τερπενίων και το μονοπάτι των φαινολοπροπανοειδών (Obied et al., 2008). Παράγωγα των σεκοϊριδοειδών είναι τα ολεοσίδια (βλ παράγραφο 1.1.1). Η ολευρωπαΐνη είναι το πρώτο ολεοσίδιο που ανακαλύφθηκε (Panizzi et al., 1960) και από τότε μελετάται εκτενώς (Εικόνα 1.2). Σύμφωνα με μελέτες η ολευρωπαΐνη είναι ένας εστέρας του ελενολικού οξέος (elenolic acid) μαζί με 3,4-διυδροξυφαινολαιθανόλη (υδροξυτυροσόλη) (3,4-dihydroxyphenylethanol (hydroxytyrosol) με προτεινόμενη πρόδρομη ένωση ένα άλλο ολεοσίδιο, το λιγστροσίδιο



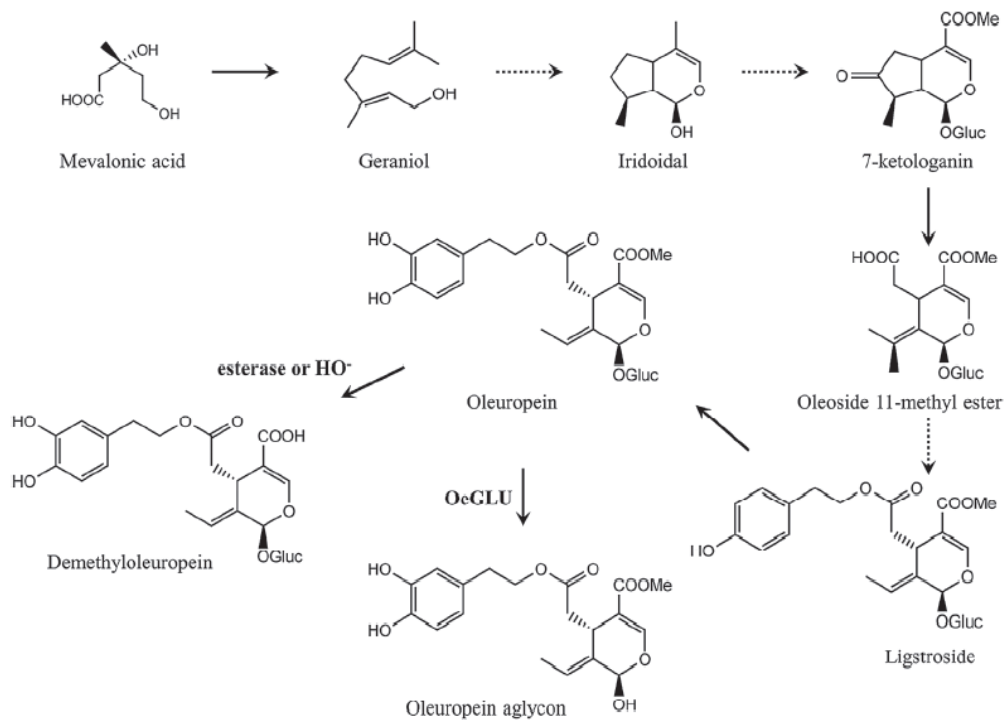
Oleuropein

Εικόνα 1. 2 Ολευρωπαΐνη

(Damtoft et.al, 1993, Riachy et al., 2011a). Η ολευρωπαΐνη ανιχνεύεται σε διάφορα όργανα του δέντρου, φύλλα, ρίζες, φλοιός και καρποί. Όμως έχει βρεθεί ότι η συγκέντρωση της ολευρωπαΐνης φθάνει στα υψηλότερα επίπεδα στους νεαρούς

ανώριμους καρπούς της ελιάς και μειώνεται κατά την ωρίμανση του καρπού (Amiot et al., 1986, Ortega-García and Peragón, 2010).

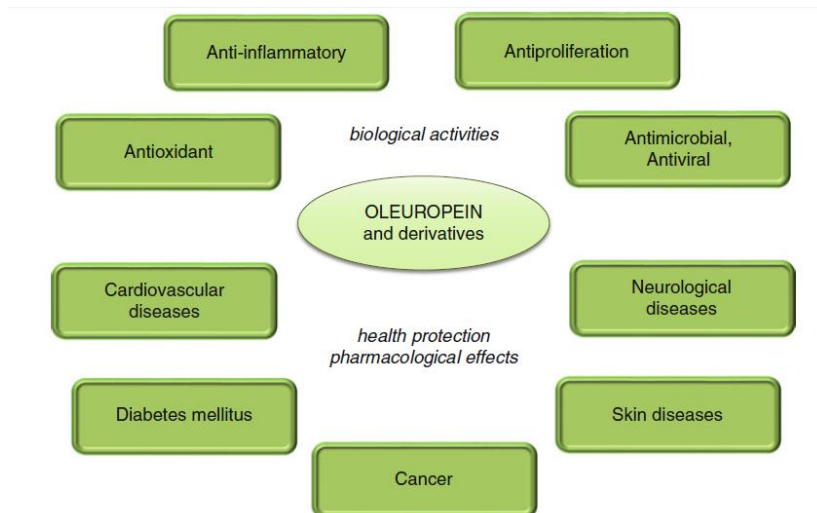
Ο καταβολισμός της ολευρωπαϊνης δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Στο παρθένο ελαιόλαδο και στα παραπροϊόντα των ελαιοτριβείων εμφανίζονται ουσίες όπως η 3,4-DHPEA-EDA που μαρτυρά την χημική ή ενζυματική αποδόμηση των ολεοσιδίων. Για την αποικοδόμηση της ολευρωπαϊνης και άλλων τέτοιων ενώσεων προβλέπεται διάσπαση με ειδικές ενδογενείς εστεράσες ώστε να προκύπτει γλυκοσίδιο του ελενολικού οξέως ή από-μεθύλ-ολευρωπαϊνη (demethyloleuropein). Και οι δύο ουσίες ανιχνεύονται στους ώριμους καρπούς των ελαιόδεντρων. Επίσης είχε προταθεί ότι είναι πιθανόν να υπάρχει ενδογενής β-γλυκοσιδάση που θα μετατρέπει την ολευρωπαϊνη στην άγλυκη της μορφή (Obied et al., 2008). Ως ενδογενές ένζυμο έχει βρεθεί ότι υδρολύει την ολευρωπαϊνη η β-γλυκοσιδάση OeGLU (Koudounas et al., 2015). Προτεινόμενο μονοπάτι βιοσύνθεσης της ολευρωπαϊνης αναφέρεται στην εικόνα 1.3.



Εικόνα 1.3 Προτεινόμενο βιοσυνθετικό μονοπάτι της ολευρωπαΐνης (Obied et al., 2008)

1.2.2 Βιοδραστική λειτουργία της ολευρωπαΐνης

Ύστερα από μελέτες είναι πλέον γνωστό πως η δράση της ολευρωπαΐνης και των παραγώγων της έχουν ιδιαίτερα φαρμακευτική σημασία. Συνοπτικά θεωρούνται ότι οι ουσίες αυτές έχουν αντιοξειδωτική, αντι-ική αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδη δράση κ.α. (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1. 4 Δράση της ολευροπαΐνης και των παραγώγων της έναντι ασθενειών (Bullota et al.,2013)

Αντιοξειδωτική δράση

Η οξείδωση είναι μια φυσιολογική διαδικασία που συμβαίνει κατά την αποθήκευση του παρθένου ελαιόλαδου μέσω της αντίδρασης των λιπαρών οξέων με τον αέρα και έχει σαν αποτέλεσμα αλλοιώσεις σε γεύση και άρωμα. Από την άλλη, η διαδικασία της οξείδωσης που έχει ως παράγωγα ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) επηρεάζει σημαντικά τα βιολογικά συστήματα παρ' ότι αποτελούν φυσιολογικά παραπροϊόντα του μεταβολισμού των οργανισμών (Gallina-Toschi et al., 2005, Bendini et al., 2009). Οι ROS όταν συσσωρευτούν μέσα στα βιολογικά συστήματα έχουν καταστροφικές ιδιότητες για τα κύτταρα λόγω της καταστροφής πρωτεϊνών, λιπαρών οξέων και κυτταρικών μεμβρανών, ακόμα και του DNA. Ενδογενώς υπάρχουν ειδικά ένζυμα που αποτοξινώνουν το σύστημα (δεσμουτάσες, καταλάσες, υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης κ.α.). Όμως όταν το σύστημα δεν μπορεί να ισορροπήσει ακολουθεί καταστροφή των κυττάρων που συμβάλλει στην παθογένεια διαφόρων ασθενειών. Οι πιο σημαντικές από αυτές είναι: η αθηροσκλήρωση, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο σακχαρώδης διαβήτης, το μεταβολικό σύνδρομο, οι δερματικές παθήσεις και οι

νευροεκφυλιστικές παθήσεις. Επιπλέον οι γονιδιοτοξικές επιπτώσεις των ROS έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση καρκίνου (Halliwell , 2007, Durackova´ , 2010).

Οι φαινολικές ουσίες όπως η ολευρωπαΐνη και τα παράγωγα της μπορούν να δρουν ως φυσικά αντιοξειδωτικά με πολλούς τρόπους που προστατεύουν τόσο από τις αλλοιώσεις των τροφίμων όσο και την προστασία της υγείας (Tripoli et al., 2005). Παραδείγματος χάριν, στο λάδι η ολευρωπαΐνη και τα παράγωγα της που είναι υδρόφιλα μόρια καλύπτουν τα υδρόφοβα λιπόφιλα μόρια ώστε να μην έρχονται σε επαφή με τον αέρα και να οξειδώνονται (Porter et al., 1989). Για τον οργανισμό τόσο τα φυσικά όσο και τα τεχνικά αντιοξειδωτικά σχετίζονται με την παρεμπόδιση της οξείδωσης, με την καταστροφή των ενεργών μορφών οξυγόνου αλλά και με την κινητικότητα φαρμάκων για ασθένειες που σχετίζονται με τα ROS. Η ολευρωπαΐνη και τα παράγωγα της καλύπτει και τους τρεις ρόλους μέσω της ικανότητας τους να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των υδροξυλίων των ROS και των φαινολικών τους ριζών (Tripoli et al., 2005).

Αντι-φλεγμονώδης δράση

Η αντι-φλεγμονώδη δράση της ολευρωπαΐνης και της υδροξυτυροσόλης στον άνθρωπο έχει περιγραφεί σε πολλές μελέτες (Omar, 2010, El and Karakaya, 2009, Granados-Principal et al., 2010, Cicerale et al., 2012). Έχει αποδειχθεί ότι η προσθήκη ολευρωπαΐνης ενίσχυσε την δραστηριότητα μακροφάγων που προσπαθούν να επάγουν άμυνα έναντι των βακτηριακών λιποπολυσακχαριτών (LPS). Η αντίδραση αυτή συνοδεύονταν με αύξηση των νιτρικών οξέων και όπως αποδείχθηκε στην συνέχεια με Western blot ανάλυση η προσθήκη της ολευρωπαΐνης επάγει την

έκφραση των νιτρικών οξειδίων (iNOS) μέσα στα μακροφάγα κύτταρα (Visioli et al., 1998). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί, από την μελέτη των, de la Puerta R., et al (1999) ότι η ολευρωπαΐνη επάγει αντι-φλεγμονώδη δράση παρεμποδίζοντας την δραστικότητα της λιποξυγενάσης των λευκοκυττάρων μειώνοντας έτσι την παραγωγή των προφλεγμονωδών μορίων, λευκοτριενίων B4. Παρόμοια δραστηριότητα έχει διαπιστωθεί και για την υδροξυτυροσόλη (Maiuri et al., 2005). Τέλος, μια πρόσφατη μελέτη αποδεικνύει την φαρμακολογική αξία της ολευρωπαΐνης έναντι της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου. Η δράση της αξιολογήθηκε έναντι κολίτιδας που προκλήθηκε σε ποντίκια και συνδέεται με την αναστολή της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με προφλεγμονώδεις πρωτεΐνες (Giner et al., 2011).

Καρδιοαγγειακή προστασία

Για δεκαετίες η έρευνα πάνω στα οφέλη της Μεσογειακής διατροφής τόνιζε την σημασία του ελαιόλαδου στην καρδιοαγγειακή προστασία (Keys A., et al., 1986). Μέχρι πρόσφατα, υπερίσχυε η άποψη ότι αυτό οφείλεται στο ελαϊκό οξύ. Ωστόσο, πλέον πολλοί ερευνητές ανακάλυψαν ότι στο ελαιόλαδο υπάρχουν και άλλα βιοενεργά συστατικά εκτός από το ελαϊκό οξύ ανάμεσα τους η ολευρωπαΐνη και η υδροξυτυροσόλη που έχουν αποδείξει την δράση τους ως αντιοξειδωτικά, καταστολείς της συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων, αγγειοδιασταλτικά και όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα έχουν αντι-φλεγμονώδη δράση (Omar, 2010, El and Karakaya, 2009, Granados-Principal et al., 2010, Cicerale et al., 2012). Όλα τα παραπάνω όπως είναι φανερό καταδεικνύουν για πιο λόγο τέτοιες ουσίες έχουν καρδιοαγγειακή προστασία.

Όπως είναι γνωστό η οξειδωση της χοληστερόλης (LDL) είναι μια από τις βασικές αιτίες για αθηροσκλήρωσεις και γενικότερα αιτία τραυματισμού των αρτηριακών τοιχωμάτων της καρδιάς. Επιπλέον η οξειδωση της χοληστερόλης οδηγεί σε καταστροφή των αυξητικών παραγόντων και αναστολή της χημειοτακτικής έκφρασης των πρωτεϊνών καθώς και την δημιουργία φλεγμονών στο καρδιαγγειακό σύστημα (Packard et al., 2008). Οι Visioli et al το 2002 έδειξαν ότι η ολεωρωπαϊνή και η υδροξυτυροσώλη αναστέλλουν την παραγωγή θειικού χαλκού που προκαλείται από την οξειδωση της χοληστερόλης. Επιπροσθέτως, έχει αναφερθεί η αποτελεσματικότητα της ολεωρωπαϊνης έναντι μυοκαρδίτιδων. Προσθήκη ολεωρωπαϊνης σε απομονωμένο μυοκάρδιο που έχει υποστεί βλάβη και πριν φτάσει στο σημείο της ισχαιμίας έδειξε να μειώνονται ραγδαία τα επίπεδα κινάσης κρεατίνης (βιοχημικός δείκτης κυτταρικής βλάβης) και οξειδασών γλουταθειόνης (δείκτης ότι η καρδιά εκτίθονταν σε ROS) που είναι οι βασικοί βιοδείκτες της αθηροσκλήρωσης. Η δράση αυτή αποδεικνύει την καρδιοπροστατευτική επίδραση της ολεωρωπαϊνης απέναντι σε οξεία στεφανιαία απόφραξη (Manna et al., 2004). Τέλος, η αποτελεσματικότητα της ολεωρωπαϊνης έχει μελετηθεί *in vivo* σε υπερχοληστερολαιμικά κουνέλια και ανακαλύφθηκε ότι η δράση της σχετίζεται με μείωση της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων.

Αντιδιαβητική δράση

Στις αρχές της δεκαετίας του 1990 αναφέρθηκε ο προστατευτικός ρόλος της ολεωρωπαϊνης ως ουσία απομονωμένη από τα φύλλα της ελιάς κατά του διαβήτη (Gonzalez et al., 1992). Σε αυτή τη μελέτη αποδείχθηκε ότι η υπογλυκαιμική επίδραση της ολεωρωπαϊνης ενίσχυε την απελευθέρωση ινσουλίνης που επάγεται από

την γλυκόζη, ενώ παράλληλα ενισχύονταν και η περιφερειακή απορρόφηση της γλυκόζης. Επιπλέον, οι έρευνες δείχνουν ότι μεγάλο πλεονέκτημα αυτών των ουσιών είναι η ισχυρή αντιοξειδωτική τους δράση (Bullota et al., 2013). Οι ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη εμφανίζουν και άλλες νόσους που οφείλονται στις ενεργές μορφές οξυγόνου, όπως είναι, η καταστροφή του αμφιβληστροειδούς που οδηγεί σε απώλεια της όρασης, οι νεφροπάθειες και οι στεφανιαία νόσος (Lean et al., 1999)

Αντικαρκινική δράση

Για πολύ καιρό οι πολυφαινόλες του ελαιόλαδου στην διατροφή θεωρούνταν ότι έχουν προστατευτικό ρόλο έναντι συγκεκριμένων τύπων καρκίνου (La Vecchia C and Bosetti C, 2006). Η ισχυρή δράση της ολεωρωπαΐνης και των παραγώγων της ως αντιοξειδωτικό μέσω της παρεμπόδισης των γονιδιοτοξικών ROS μπορεί να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Έχει αποδειχθεί ότι απομονωμένη ολεωρωπαΐνη και υδροξυτυροσόλη από τα φύλλα της ελιάς παρουσιάζουν σημαντική δράση έναντι χαμηλής συγκέντρωσης καρκινικών κυττάρων του μαστού και της ουροδόχου κύστης μέσω της καταστροφής των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Goulas et al., 2009). Παρόμοια ευρήματα παρουσίασαν και άλλοι ερευνητές που μελετούν ανθρώπινες καρκινικές σειρές (Fabiani et al., 2002, Menendez et al., 2007, Bouallagui et al., 2011, Warleta et al., 2011).

Υπάρχουν πολλά in vitro πειράματα που η αναστολή της ανάπτυξης της ογκογένεσης μέσω ολεωρωπαΐνης και υδροξυτυροσόλης φαίνεται να συνδέεται με:

- Επαγωγή της απόπτωσης (Fabiani et al., 2002).

- Υπερέκφραση των κινασών- αναστολέων p21^{WAF/Cip1} και p27^{Kip1} (Fabiani et al., 2008).
- Αναστολή του πολλαπλασιασμού κυττάρων μέσω της παρεμπόδισης σηματοδοτικών μονοπατιών (Sirianni et al.,2010).
- Αναστολή της αγγειογένεσης κατά την δημιουργία όγκων (Scoditti et al., 2012) κ.α.

Προστασία έναντι των λοιμώξεων

Για χιλιάδες χρόνια, η παραδοσιακή ιατρική χρησιμοποιούσε τα φύλλα της ελιάς για την θεραπεία λοιμώξεων. Τέτοιες προστατευτικές ιδιότητες έχουν επιβεβαιωθεί από μελέτες των τελευταίων δεκαετιών για ουσίες που απομονώνονται από τα φύλλα της ελιάς (Fleming et al.,1973, Aziz et al., 1998 and Bisignan et al., 1999). Η ολευρωπαΐνη και παράγωγα της έχει φανεί ότι λειτουργούν ως αναστολείς της ανάπτυξης απέναντι σε βακτήρια (θετικά και αρνητικά κατά gram), μυκοπλάσματα και τοξοπλάσματα (*Toxoplasma gondii*) (Fleming et al.,1973, Aziz et al., 1998, Bisignano et al., 1999, Furneri et al.,2002 and Jiang et al., 2008). Προς το παρόν, δεν έχει διευκρινιστεί η δράση της ολευρωπαΐνης ως αντιμικροβιακή ουσία παρόλα αυτά αλληλεπίδραση της με μεμβράνες βακτηρίων δείχνει ότι προκαλεί την καταστροφή των πεπτιδογλυκανών. Έχει επίσης προταθεί η παρεμβολή της ουσίας στην πρωτεϊνοσύνθεση των μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα την τροποποίηση αμινοξέων. Τέλος θεωρείται ότι είναι πιθανόν οι ουσίες αυτές να παρουσιάζουν μια μη ειδική αντιμικροβιακή δράση, μέσω διέργεσης της φαγοκυττάρωσης και ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος (Osmar, 2010).

Ακόμα, η αντι-ική δράση της ολευρωπαΐνης έχει προταθεί κατά του ερπητοϊού που ευθύνεται για την λοιμώδη μονοπυρήνωση, του ιού της ηπατίτιδας, του ιού Ρότα (rotavirus) που σχετίζεται με στομαχικές διαταραχές, ρινοϊό βοοειδών, ιός της λευχαιμίας της γάτας κ.α. (Fredrickson, F and S Group , 2000). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη απέναντι στον RSV, ιό του αναπνευστικού συστήματος, που η δράση της ολευρωπαΐνης δεν σχετίζεται με την αντιοξειδωτική της δράση (Ma et al., 2001). Τέλος, έχει αναφερθεί η αναστολή της μετάδοσης από κύτταρο σε κύτταρο του ιού HIV καθώς και η διακοπή της αντιγραφής του ιού HIV in vitro (Lee-Huang et al., 2007 and Bao et al., 2007).

Νευροπροστατευτική δράση

Όπως είναι αναμενόμενο, η ισχυρή αντιοξειδωτική και καρδιοπροστατευτική δράση της ολευρωπαΐνης και των παραγώγων της συμπεριλαμβανομένου της αντιαρτηριοσκληρωτικής και υποχοληστερολαιμικής δράσης, έχουν σαν αποτέλεσμα την προστασία έναντι νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Οι μελέτες εστιάζονται κυρίως γύρω από την νόσο του Alzheimer (AD), διότι υπάρχει στενή σχέση μεταξύ των καρδιαγγειακών παθήσεων που οφείλονται στην συσσώρευση της χοληστερόλης ή του αμυλοειδούς πεπτιδίου βήτα (Ab), για την εμφάνιση της νόσου. Επομένως τέτοιοι μεταβολίτες φαίνεται να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για θεραπευτικούς σκοπούς απέναντι και σε αυτή την ασθένεια (Lukiw, 2012 and Shepardson et al., 2011). Ύστερα από αυτόν τον συσχετισμό, μελέτες απέδειξαν ότι η δράση της ολευρωπαΐνης και της υδροξυτυροσόλης παρεμποδίζει την συγκέντρωση αμυλοειδών πεπτιδίων βήτα (Ab) προστατεύοντας έτσι την τοξικότητα των νευρωνικών

κυττάρων από την συσσώρευση των Ab-πεπτιδίων (Galanakis et al., 2011, Bazoti et al., 2006 and St-Laurent-Thibault et al., 2011). Επιπλέον η παρεμπόδιση φλεγμονών από αυτά τα μόρια μπορούν να σταματήσουν την εκδήλωση της νόσου (Heininger, 1999). Παρόλα αυτά δεν υπάρχουν αντίστοιχες μελέτες για άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως είναι η νόσος του Parkinson, η Σχιζοφρένεια και η Αγγειακή Άνοια (vascular dementia).

Προστασία του δέρματος

Η δράση της ολευρωπαΐνης ως ισχυρό αντιοξειδωτικό, οδήγησε σε μελέτες σχετικά με την προστασία του δέρματος κυρίως ενάντια στην επικίνδυνη ηλιακή ακτινοβολία. Αρχικά, η μελέτη της Budiyanando το 2000 παρουσίασε την προστατευτική δράση του ελαιόλαδου στην φωτοκαρκινογένεση ύστερα από έκθεση ποντικών σε UVB ακτινοβολία και ήταν η αφετηρία για να ακολουθήσει μια σειρά δημοσιεύσεων για την δράση της ολευρωπαΐνης ως προστατευτικό δέρματος. Γενικά έχει δειχθεί ότι αποτελεί ισχυρό αντιοξειδωτικό για το δέρμα καθώς επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως επουλωτικό ύστερα από την δημιουργία εγκαύματος από έκθεση σε UVB ακτινοβολία. Για αυτούς τους λόγους περιέχεται πλέον μαζί με άλλες ουσίες σε πολλά καλλυντικά για το δέρμα (Ancora et al., 2004, Perugini et al., 2008, Kimura and Sumiyoshi, 2009).

1.2.3 Αμυντική δράση της ολευρωπαΐνης στα φυτά

Η ολευρωπαΐνη, όπως περιγράφηκε, αποτελεί πολύ σημαντικό προϊόν του δευτερογενή μεταβολισμού των Oleaceae και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρέως στην

φαρμακοβιομηχανία, ενώ παράλληλα μαζί με τα υπόλοιπα φαινολικά παράγωγα καθορίζουν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του λαδιού. Η ολευρωπαΐνη, όμως έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί μια δραστική αμυντική ουσία και για το ίδιο το φυτό. Σε διάφορες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη βακτηρίων όπως τα *Lactobacillus plantarum* και *Leuconostoc mesenteroides* (Marsilio and Lanza, 1998, Ruiz-Barba et al., 1991), καθώς επίσης μύκητες που ανήκουν στο γένος *Phytophthora* (Del Rio et al., 2000), και τον μύκητα *Verticillium dahliae* (Baidez et al., 2007).

Πρώτη φορά η αμυντική δράση της ουσίας περιγράφηκε στην αγριομυρτιά (*Ligustrum obtusifolium*) από τους Konno et al το 1999 υποστηρίζοντας ότι η ουσία βρίσκεται αποθηκευμένη στα χυμοτόπια των κυττάρων του δέντρου σε γλυκοζυλιωμένη μορφή, και είναι φυσικά διαχωρισμένη από μια ενδογενής β-γλυκοσιδάση που έχει την ικανότητα να απομακρύνει μέσω υδρόλυσης, την γλυκόζη της ολευρωπαΐνης. Όμως ύστερα από καταστροφή του ιστού από οποιαδήποτε αιτία, η διαμερισματοποίηση ενζύμου και μορίου καταστρέφεται με αποτέλεσμα να έρχονται σε επαφή. Η μετατροπή της ολευρωπαΐνης σε άγλυκο, την μετατρέπει σε ένα ισχυρό μόριο με δομή γλουταραλδεΐδη με αποτέλεσμα την δημιουργία συσσωμάτων και μετουσίωσης των γύρω πρωτεϊνών (Lo Scalzo et al., 1994, Konno et al., 1999).

Πέραν από τους μύκητες και τα βακτήρια, η ολευρωπαΐνη αποτελεί ισχυρό αμυντικό συστατικό έναντι των φυτοφάγων ζώων και κυρίως των εντόμων. Αρχικά, ευθύνεται για την πικρή γεύση με αποτέλεσμα να αποτελεί αποτρεπτικό παράγοντα για φυτοφάγα. Θεωρείται ότι η ουσία ενεργοποιείται (άγλυκη μορφή) μέσα στο έντερο των εντόμων είτε γιατί τότε έρχεται σε επαφή με την β-γλυκοσιδάση λόγω καταστροφής των κυττάρων, είτε μπορεί να ενεργοποιηθεί από κάποια β-γλυκοσιδάση του εντόμου (Pankoke et al., 2012). Η πολύ δραστική άγλυκη μορφή

της ολευρωπαϊνης περιέχει έναν ανοικτό δακτύλιο του πυρανίου λόγω της απομάκρυνσης της γλυκόζης. Αυτή η δομή επιτρέπει μια μη ειδική σύνδεση με οποιαδήποτε πρωτεΐνη βρίσκεται γύρω της με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση ενζύμων μέσα στο πεπτικό σύστημα των εντομών και άρα την ανικανότητα καταβολισμού της (Kim et al., 2000 and Dobler et al., 2011). Επιπλέον η μετουσίωση και η συσσωμάτωση των πρωτεϊνών μειώνει την θρεπτική αξία αποτρέποντας έτσι τα φυτοφάγα έντομα (Pentzold et al., 2014).

Υπάρχουν έντομα που έχουν προσαρμοστεί να αντιμετωπίζουν την τοξικότητα της ουσίας. Έχει βρεθεί ότι η παραγωγή σε περίσσεια κάποιων αμινοξέων από τα έντομα μειώνει την τοξικότητα της άγλυκης μορφής. Αρκετές προνύμφες λεπιδοπτέρων και υμενοπτέρων εκκρίνουν εξαιρετικά υψηλές ποσότητες γλυκίνης, β-αλανίνης και αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) στο σωλήνα του εντέρου όταν τρέφονται με φυτά που περιέχουν ολευρωπαϊνη (Konno et al., 1997, 1998, 2010, Konno, Okada & Hirayama, 2001). Αυτά τα αμινοξέα προστατεύουν τα πεπτικά ένζυμα από την δράση της άγλυκης μορφής της ολευρωπαϊνης. Στην ουσία ανταγωνίζονται με το άγλυκο της ολευρωπαϊνης την θέση πρόσδεσης στις πλευρικές αλυσίδες των πρωτεϊνών. Με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η τοξικότητα της ουσίας αφού καταφέρνει σε μικρό ποσοστό να συσσωματώσει και να μετουσιώσει πρωτεΐνες (Konno et al., 2010). Επομένως είναι πιθανό, μεταξύ ποικιλιών καλλιεργήσιμων ελαιόδεντρων η ανθεκτικότητα έναντι των εντόμων να σχετίζεται με τα ποσοστά ολευρωπαϊνης στο φυτό. Δηλαδή πιο ανθεκτικό είναι ένα φυτό που παράγει περισσότερη ολευρωπαϊνη από όσο ένα άλλο, με αποτέλεσμα οι αμυντικοί μηχανισμοί των παθογόνων απέναντι στο άγλυκο μόριο της ολευρωπαϊνης να λειτουργούν με περισσότερη δυσκολία.

1.3 β-Γλυκοσιδάσες

Οι β-γλυκοσιδάσες (β-D-glucopyranoside glucohydrolases E.C 3.2.1.-) βρίσκονται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Είναι ένζυμα που υδρολύουν γλυκοσιδικούς δεσμούς μεταξύ τμημάτων υδατανθράκων και ενός τμήματος άγλυκου προκειμένου να απελευθερώσουν υπολείμματα μη αναγωγικών γλυκοσιδίων από ολιγοσακχαρίτες και γλυκοζίτες. Η δράση τους αυτή, στα ζώα λαμβάνει μέρος στον μεταβολισμό των λιπιδίων και στην μεταγωγή σήματος στον οργανισμό. Στους μικροοργανισμούς έχει σχέση με την μετατροπή της βιομάζας και στα έντομα οι β-γλυκοσιδάσες βρίσκονται στον πεπτικό σωλήνα για τον καταβολισμό των ουσιών που λαμβάνουν μέσω της τροφής (φυτικοί γλυκοζίτες και ολιγοσακχαρίτες). Στα φυτά παρουσιάζουν πιο εκτεταμένη δράση και σχετίζονται με την άμυνα, την λιγνοποίηση του κυτταρικού τοιχώματος, την ενεργοποίηση των φυτοορμονών και την απελευθέρωση αρωματικών ενώσεων (Cairns and Esen, 2010). Όπως είναι φανερό, οι β-γλυκοσιδάσες είναι πολύ σημαντικά ένζυμα με πολλές γεωργικές και βιομηχανικές εφαρμογές και για αυτό το λόγο μελετώνται εκτενώς.

1.3.1 Ταξινόμηση

Ο Henrissat έχει αναπτύξει ένα σύστημα ταξινόμησης για τις υδρολάσες γλυκοσιδίου με βάση την αμινοξική αλληλουχία και την δομική ομοιότητα (Henrissat, 1991, Henrissat and Davies, 1997 and Cantarel et al., 2009). Σε αυτό το σύστημα, τα ένζυμα που έχουν μεγάλες ομοιότητες στην αμινοξική αλληλουχία και συντηρημένα μοτίβα στην γονιδιωματική αλληλουχία κατατάσσονται στην ίδια οικογένεια (family). Τα ένζυμα που χαρακτηρίζονται από διάφορες μελέτες, κατατάσσονται και καταχωρούνται στον ισότοπο <http://www.cazy.org/> (Cantarel et al., 2009). Μέχρι στιγμής έχουν καταχωρηθεί 135 οικογένειες (GH1-135). Οι οικογένειες που έχουν

παρόμοιες δομές καταλυτικού domain και συντηρημένα τα καταλυτικά αμινοξέα, υποδηλώνουν μια κοινή καταγωγή και κοινό καταλυτικό μηχανισμό, για αυτό το λόγο ομαδοποιούνται σε φυλές (Clans, GH A-N) (Henrissat and Davies, 1997 and Cantarel et al., 2009) (Εικόνα 1.5).

GH Family Number

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120

Non-Classified Sequences

GH Classification Statistics

Modules in present families 262738
Non-Classified modules 3887

GH Clans of Related Families

GH-A	(β/α) ₈	1	2	5	10	17	26	30	35	39	42	50	51	53	59	72	79	86	113	128
GH-B	β-jelly roll	7	15																	
GH-C	β-jelly roll	11	12																	
GH-D	(β/α) ₈	27	31	36																
GH-E	6-fold β-propeller	33	34	83	93															
GH-F	5-fold β-propeller	43	62																	
GH-G	(α/α) ₅	37	63																	
GH-H	(β/α) ₈	13	70	77																
GH-I	α+β	24	45	80																
GH-J	5-fold β-propeller	32	68																	
GH-K	(β/α) ₈	18	20	85																
GH-L	(α/α) ₅	15	65	125																
GH-M	(α/α) ₅	8	48																	
GH-N	β-helix	28	49																	

Εικόνα 1.5 <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>

Η μεγαλύτερη κλάση είναι η GHA που περιέχει τις περισσότερες οικογένειες. Η GH1 οικογένεια περιλαμβάνει τον μεγαλύτερο αριθμό χαρακτηρισμένων β-γλυκοσιδασών που ανήκουν στην κλάση A με χαρακτηριστική δομή (b/a)₈-barrel.

1.4 Ο ρόλος των GH1 β-γλυκοσιδασών στα φυτά.

Ο ρόλος των β-γλυκοσιδασών στα φυτά είναι ο πιο εκτεταμένος εν συγκρίσει με τους υπόλοιπους ζωντανούς οργανισμούς. Οι δραστηριότητά τους εμπλέκεται σχεδόν σε

όλες τις βιολογικές λειτουργίες του φυτικού οργανισμού (σηματοδότηση, συμβίωση, μεταβολισμός κυτταρικού τοιχώματος, λιγνοποίηση, δευτερογενής μεταβολισμός των φυτών και απόκριση σε βιοτικό και αβιοτικό stress). Με την εξέλιξη της αλληλούχισης γονιδιωμάτων, έχει βρεθεί ότι τουλάχιστον 40 διαφορετικές β-γλυκοσιδάσες εκφράζονται σε ένα φυτό με πολλές από αυτές να δραστηριοποιούνται στον ίδιο ιστό (Xu et al., 2004). Οι ρόλοι αυτών των ενζύμων φαίνεται πως καθορίζονται, από το υπόστρωμα πάνω στο οποίο δρουν, από τις ιδιαιτερότητες του ιστού που δραστηριοποιούνται, την υποκυτταρική τους τοποθέτηση και τέλος από την αιτία που έρχονται σε επαφή με το υπόστρωμα τους (Cairns and Esen, 2010). Τα φυτά έχουν τον μεγαλύτερο αριθμό πρωτεϊνών μέσα στην GH1 οικογένεια προκειμένου να καλύψουν όλοι αυτή την λειτουργική ποικιλομορφία. Έχουν βρεθεί 48 υποθετικές GH1 β-γλυκοσιδάσες στο *Arabidopsis thaliana* και 40 στην αλληλουχία του γονιδιώματος του ρυζιού (Xu et al, 2004, Orassiri et al., 2006).

1.4.1 Κυτταρικό τοίχωμα

Το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών είναι η μεγαλύτερη δεξαμενή υδατανθράκων στην φύση και αποτελείται από υπολείμματα β-ενωμένων γλυκοσιλίων. Όπως είναι λογικό οι β-γλυκοσιδάσες έχουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του κυτταρικού τοιχώματος. Μάλιστα χαρακτηρίζονται από διπλό ρόλο, δεδομένου ότι συμμετέχουν στην αποδόμηση των ολιγοσακχαριτών κατά τον μεταβολισμό του κυτταρικού τοιχώματος, αλλά παράλληλα απελευθερώνουν συστατικά από γλυκοζίτες προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για την λιγνοποίηση και σταθεροποίηση του δευτερογενούς κυτταρικού τοιχώματος (Cairns and Esen, 2010).

1.4.2 Μεταγωγή σήματος

Έχει βρεθεί ότι πολλές φυτοορμόνες βρίσκονται με μορφή γλυκοζίτη μέσα στα φυτά προκειμένου να μπορούν να αποθηκεύονται. Επομένως προτάθηκε η θεωρία ότι ίσως να υπάρχουν εξειδικευμένες β- γλυκοσιδάσες που θα τις αναγνωρίζουν και μέσω της υδρόλυσης να τις ενεργοποιούν ως άμεση απόκριση σε μια συνθήκη. Πρόσφατα, βρέθηκε στο *Arabidopsis thaliana* μια ειδική β-γλυκοσιδάση του ενδοπλασματικού δικτύου (AtBGLU18, AtBG1) που υδρολύει εστεροποιημένο γλυκοσίλιο αμπισικού οξέος (ABA-GE) όταν το φυτό βρίσκεται σε ξηρασία. Μάλιστα μετάλλαγμα του ενζύμου οδήγησαν σε πρόωρη βλάστηση και ελαττωματικό κλείσιμο των στομάτων και μόνο διαγονιδιακή υπερέκφραση του γονιδίου AtBGLU18 ανέτρεψε τον φαινότυπο και αύξησε τα επίπεδα του ABA ενδογενώς (Lee et al., 2006).

1.4.3 Δευτερογενή μεταβολισμό

Τα γλυκοσίδια κυριαρχούν στα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού. Με την δράση κάποιας ειδικής β-γλυκοσιδάσης παράγονται άλλα μόρια προκειμένου να συνεχιστεί το βιοσυνθετικό μονοπάτι. Αποτέλεσμα όπως περιγράφηκε και σε προηγούμενες ενότητες είναι η παραγωγή χρήσιμων ουσιών για το φυτό, αλλά και για τον άνθρωπο καθώς πολλές από αυτές τις ουσίες χρησιμοποιούνται ως φάρμακα λόγω της βιοδραστικής τους λειτουργία. Ένα παράδειγμα είναι το μόριο της στρικτοσιδίνης (strictosidine), ένα αλκαλοειδές μονοτερπένιο που υδρολύεται από ειδική κυτταροπλασματική β-γλυκοσιδάση προκειμένου να παραχθούν άλλα αλκαλοειδή μονοτερπένια ανάλογα με το φυτό (Stöckigt and Zenk, 1977). Αυτό το ένζυμο έχει μελετηθεί σε πολλά φυτά, μάλιστα στο φυτό *Rauvolfia serpentina* έχει χαρακτηριστεί και η δομή του (Barleben et al., 2007). Μετά την υδρόλυση της στρικτοσιδίνης έχει βρεθεί ότι παράγεται ένα άλλο γλυκοσίδιο η ραουκαφρισίνη

(raucosaffricine) που με την σειρά της θα απογλυκοζιλιωθεί από άλλη ειδική β-γλυκοσιδάση για να παράγει αζμαλίνη (ajmaline) (Warzecha et al., 2000).

1.4.4 Δυαδικό σύστημα άμυνας/ αμυντικός ρόλος των β-γλυκοσιδασών

Ο πιο σημαντικός και εκτεταμένος ρόλος των β-γλυκοσιδασών είναι στην άμυνα των φυτικών οργανισμών. Έχει βρεθεί ότι πολλά από τα γλυκοσίδια που παράγονται από τον δευτερογενή μεταβολισμό, όταν απογλυκοζιλιωθούν από ειδικές β-γλυκοσιδάσες μετατρέπονται σε τοξικά μόρια όπως είναι το κυάνιο (cyanide) (Conn, 1980). Το κυάνιο μετατρέπεται αυθόρμητα σε υδροκυάνιο (HCN), το οποίο μπλοκάρει τη κυτταρική αναπνοή μέσω απενεργοποίησης της οξειδάσης του κυτοχρώματος του μιτοχονδρίου (Nelson, 2006). Οι κυανογόνοι γλυκοζίτες απαντώνται σε μεγάλος εύρος φυτών, τόσο σε μονοκοτυλήδονα όσο και σε δικοτυλήδονα. Σε γενικές γραμμές οι αμυντικοί γλυκοζίτες αποθηκεύονται σε διαφορετικό κύτταρο ή κυτταρικό διαμέρισμα από τις β-γλυκοσιδάσες. Όταν οι β-γλυκοσιδάσες έρθουν σε επαφή και υδρολύσουν το υπόστρωμα τους, απελευθερώνονται τα τοξικά παράγωγα. Οι αμυντικές ουσίες τείνουν να αποθηκεύονται στο χυμοτόπιο ενώ οι β-γλυκοσιδάσες σε αποπλάστες ή πλαστίδια. Στόχος του διαχωρισμού αυτού είναι η βέλτιστη σταθερότητα του συστήματος άμυνας αλλά και η προστασία του φυτού από τις ίδιες τις αμυντικές ενώσεις του. Ο διαχωρισμός της αμυντικής ουσίας και του «ενεργοποιητής» της ονομάζεται δυαδικό σύστημα άμυνας (Morant et al., 2008). Οι πληθώρα τέτοιων αμυντικών γλυκοζιτών και η ευαισθησία της λειτουργίας του συστήματος αιτιολογεί πόσο σημαντική είναι η εξειδίκευση της κάθε β-γλυκοσιδάσης έναντι της ουσίας που αναγνωρίζει. Επομένως όταν το φυτό δέχεται επίθεση από κάποιο παθογόνο ή έντομο και έχει ως αποτέλεσμα να διαρραγεί το φυτικό κύτταρο, τότε ο γλυκοζίτης έρχεται σε επαφή με την ειδική β-γλυκοσιδάση με αποτέλεσμα την μετατροπή του σε κάποια τοξική ουσία. Έχει παρατηρηθεί ότι η συσσώρευση τέτοιων αμυντικών ουσιών συνήθως συγκεντρώνεται σε νεαρά μέρη των φυτών και συνοδεύονται από την αύξηση της έκφρασης των β-γλυκοσιδασών που τις

αναγνωρίζουν, προκειμένου να προστατεύονται τα φυτά σε εύθραυστο στάδιο ανάπτυξης (Sue et al., 2000a,b and Forslund et al., 2004).

Εκτός από τους κυανογόνους γλυκοζίτες που είναι αρκετά διαδεδομένοι στα φυτά, υπάρχουν οι βενζοξαζίνες (Benzoxazinoid glucosides) που συναντιούνται ευρέως στην οικογένεια Poaceae (Niemeyer, 1988), καθώς και σε πολλά δικοτυλήδονα φυτά. Οι βενζοξαζίνες (BxGlc) όταν υδρολυθούν παράγουν τοξικά άγλυκα που στην συνέχεια αυθόρμητα μετατρέπονται σε μυρμιγκικό οξύ και βενζοξαζολίνες (Niemeyer, 1988). Η αμυντική τους δράση έχει αποδειχθεί επιτυχώς απέναντι σε διάφορα έντομα, όπως σε ακρίδες που τρέφονται από τον φλοιό του αραβόσιτου (Givovich et al., 1994, Givovich and Niemeyer, 1995, Cambier et al., 2001) και στο *Agrobacterium tumefaciens* (Sahi et al., 1990). Οι β-γλυκοσιδάσες που είναι υπεύθυνες για την υδρόλυση των BxGlc έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από τον αραβόσιτο, το σιτάρι και την σίκαλη (Cicek and Esen, 1999, Sue et al., 2000a,b, Nikus et al., 2003).

Η βρώμη (*Avena sativa*), αν και φυτό που ανήκει στα *Poaceae* δεν περιέχει βενδοξαζίνες, αλλά χρησιμοποιεί τις σαπωνίνες ως αμυντικά συστατικά. Οι σαπωνίνες είναι ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο ως αμυντικές ουσίες, παρόλα αυτά η βρώμη είναι το μοναδικό δημητριακό που τις περιέχει (Osbourne, 2003). Οι σαπωνίνες παρουσιάζουν απορρυπαντική δράση και έχουν την ικανότητα να καταστρέφουν κυτταρικές μεμβράνες μέσω του σχηματισμού συμπλόκου με στερόλες στην μεμβράνη. Γι' αυτό το λόγο διακρίνονται για την αντιμικροβιακή τους δράση. Λόγω των ιδιοτήτων τους χρησιμοποιούνται εκτενώς στη φαρμακοβιομηχανία για την δημιουργία φαρμάκων, ανοσοανιχνευτών και πρόδρομων ενώσεων στην βιοσύνθεση ορμονών (Francis et al., 2002, Osbourne, 2003). Στη βρώμη συσσωρεύονται δυο μορφές σαπωνίνων. Στις ρίζες περιέχεται η μορφή της σαπωνίνης που ανήκει στα τριτερπενοειδή και αποθηκεύεται σε ενεργή

μονοδεσμοσιδική μορφή (γλυκοζιλιωμένη στον θέση C3). Στα φύλλα της βρώμης απαντάται η μη δραστική δυσδεσμοσιδική μορφή (γλυκοζιλιωμένη στις θέσεις C3 και C26 ή C28) (Osbourne, 1996), η οποία για να γίνει δραστική χρειάζεται τη δράση μιας συγκεκριμένης β-γλυκοσιδάσης (Nisius, 1988). Σε περίπτωση διαταραχής του ιστού, η β-γλυκοσιδάση αυτή υδρολύει αμέσως το β-γλυκοσιδικό δεσμό που καθιστά τη σαπωνίνη βιολογικά ενεργή. Οι β-γλυκοσιδάσες που είναι υπεύθυνες για τη βιολογική ενεργοποίηση των σαπωνίνων των φύλλων ονομάζονται avenocosidases και παρουσιάζουν εξειδίκευση στο β-γλυκοσιδικό δεσμό στη θέση C26 αφήνοντας άθικτους τους β-γλυκοσιδικούς δεσμούς που συνδέουν τα υπολείμματα γλυκόζης στη θέση C3 (Nisius, 1988). Ο μηχανισμός με τον οποίο καταφέρνει το φυτό να κρατάει σε ενεργεί μορφή την σαπωνίνη στην ρίζα, δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί.

Άλλο ένα παράδειγμα της αμυντικής δράσης των β-γλυκοσιδασών και των αμυντικών γλυκοζιτών που χρησιμοποιούν τα φυτά έναντι βιοτικού stress είναι οι γλυκοζινολίτες. Οι γλυκοζινολίτες είναι αμινοξέα, παράγωγα του δευτερογενούς μεταβολισμού που συναντιούνται αποκλειστικά στην τάξη Capparales, η οποία περιέχει φυτά όπως η ελαιοκράμβη, το σινάπι, σε λαχανικά όπως το μπρόκολο και το κουνουπίδι και στο φυτό μοντέλο *Arabidopsis Thaliana* (Halkier and Gershenzon, 2006). Οι γλυκοζινολίτες ενεργοποιούνται ύστερα από υδρόλυση και μετατρέπονται σε ένα ασταθές άγλυκο που αυθόρμητα μετατρέπεται σε άλλες τοξικές ουσίες ανάλογα με τις συνθήκες αντίδρασης (π.χ. pH) και τις πλευρικές αλυσίδες των γλυκοζινολιτών (ισοθειοκυανίνες, επιθειονιτρίλια, νιτρίλια θειοκυανίνες κ.α.) (Rask et al., 2000, Bones and Rossiter, 2006). Η υπο-ομάδα των β-γλυκοσιδασών που υδρολύει τους γλυκοζινολίτες είναι οι β-θειογλυκοζιτικές γλυκοϋδρολάσες και ευρέως γνωστές ως μυροσινάσες (myrosinases).

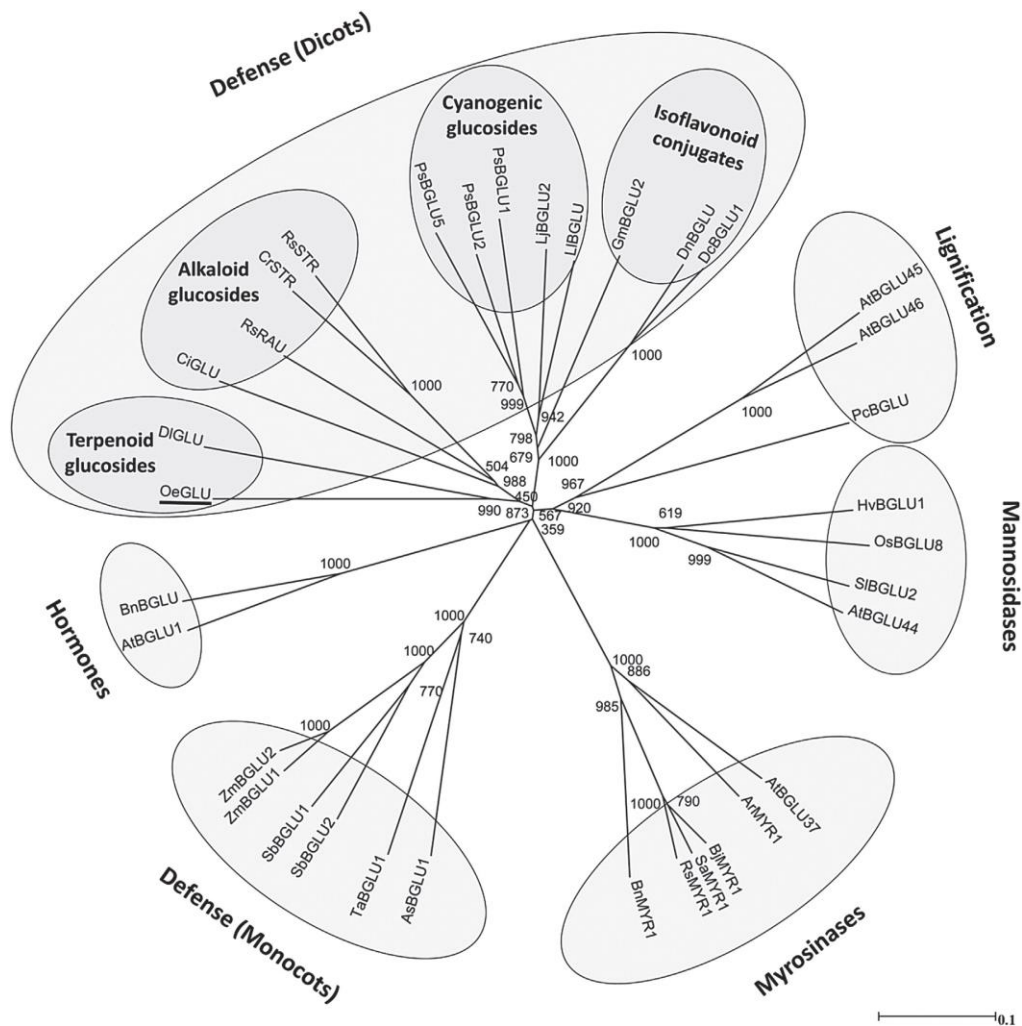
Όπως περιγράφηκε και στην [παράγραφο 1.2.3](#) αμυντικός γλυκοζίτης για τα *Oleaceae* αποτελεί η ολευρωπαΐνη. Η ολευρωπαΐνη σύμφωνα με αναφορές αποθηκεύεται στο

χυμοτόπιο ή στο κυτταρόπλασμα (Konno et al., 1998; Bitonti et al., 2000). Επομένως, η ειδική β-γλυκοσιδάση που υδρολύει την ουσία πρέπει να τοποθετείται σε διαφορετικό διαμέρισμα του κυττάρου προκειμένου να παραμένει το σύστημα σταθερό και να ενεργοποιεί την ουσία μόνο όταν είναι αναγκαίο. Επιπλέον χρειάζεται εξειδίκευση του ενζύμου έναντι της ολευρωπαΐνης ώστε να μην καταβολίζεται από πιθανώς άλλες β-γλυκοσιδάσες που περιέχουν τα φυτά στα Oleaceae (στο ρύζι και στο *A.thaliana* έχουν καταγραφεί πάνω από 40 ένζυμα). Ως ειδική β-γλυκοσιδάση παρουσιάστηκε το 2015 από τους Koudounas et al., η OeGLU που φαίνεται να υποστηρίζει την δράση της στο δυαδικό σύστημα άμυνας.

1.5 OeGLU

Όπως αναφέρει η δημοσίευση των Koudounas et al., 2015 μια cDNA αλληλουχία της β-γλυκοσιδάσης της ολευρωπαΐνης απομονώθηκε από τα φύλλα της ελιάς με την χρήση εκφυλισμένων εκκινητών που κατασκευάστηκαν από συντηρημένες αλληλουχίες γνωστών αμυντικών β-γλυκοσιδασών της GH1 οικογένειας. Το cDNA της β-γλυκοσιδάσης αποτελείται από 1656 ζεύγη βάσεων και κωδικοποιεί για 551 αμινοξέα. Το μέγεθος της πρωτεΐνης υπολογίζεται στα 62,9 kDa με ισοηλεκτρικό σημείο (pI) 6.3. Με την χρήση BLAST πάνω σε γονιδιωματική αλληλουχία που καταχωρήθηκε πρόσφατα στο GenBank από την ποικιλία Ayvalik (accession no: KF623043.1) βρέθηκε ότι το γονίδιο έχει 10 εξώνια και 9 ιντρόνια.

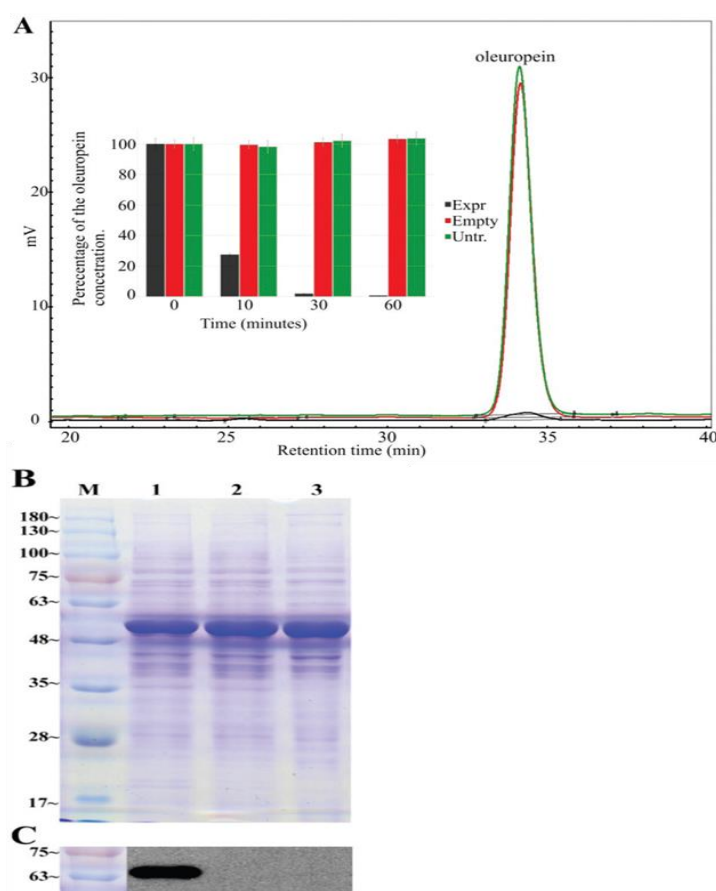
Φυλογενετική ανάλυση με άλλες γνωστές β-γλυκοσιδάσες των φυτών που συμμετέχουν στην άμυνα, στην λιγνοποίηση, μετάδοση σήματος κλπ (βλέπε [παράγραφο 1.4](#)) κατατάσσει την OeGLU στις αμυντικές β-γλυκοσιδάσες των δικοτυλήδων (Εικόνα 1.6)



Εικόνα 1. 6 Φυλογενετικό δέντρο β-γλυκοσιδασών Koudounas et al., 2015. Η β-γλυκοσιδάση της ολεωρωπαίνης είναι υπογραμμισμένη (OeGLU), Koudounas et al., 2015

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.6 η OeGLU ομαδοποιείται με άλλες αμυντικές β-γλυκοσιδάσες που αναγνωρίζουν αμυντικούς γλυκοζίτες ως υπόστρωμα (κυανογόνους γλυκοζίτες, ισοφάνοειδη, αλκαλοειδείς γλυκοζίτες, τερπενοειδή κ.α.). Η δράση τους περιγράφηκε στην [παράγραφο 1.4.4](#).

Με ετερόλογη έκφραση του γονιδίου της OeGLU στο φυτό *Nicotiana benthamiana*, έγινε ανίχνευση της πρωτεΐνης και προσδιορίστηκε το μέγεθος στα ~63kDa. Μέσω HPLC, αποδείχτηκε ότι η ολευρωπαϊνή υδρολύεται με χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο. Στα πρώτα 10 λεπτά της αντίδρασης η ολευρωπαϊνή έχει καταβολιστεί κατά 70% ενώ μετά από 30 λεπτά δεν ανιχνεύεται καθόλου το γλυκοσίδιο, γεγονός που αποδεικνύει ότι η OeGLU κωδικοποιεί για μία β-γλυκοσιδάση που έχει ειδικότητα προς την ολευρωπαϊνή (Εικόνα 1.7).

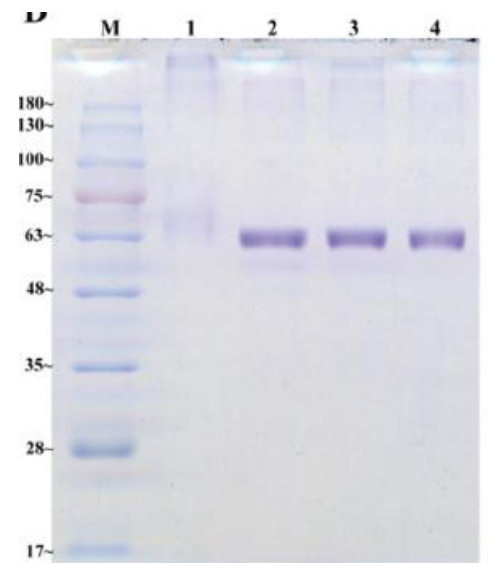


Εικόνα 1. 7 Ετερόλογη έκφραση της OeGlu στο φυτό *N. benthamiana* και δραστηριότητα της β-γλυκοσιδάσης. Στην εικόνα A το χρωματογράφημα δείχνει τα αποτελέσματα του HPLC. Η μαύρη στήλη και γραμμή δείχνει την συγκέντρωση της ολευρωπαϊνης χρονικά ύστερα από αντίδραση με την OeGLU η οποία εκφράστηκε κλωνοποιημένη στον δυαδικό φορέα 35S-pGPTV-HPT και απομονώθηκε από τα φύλλα του καπνού. Οι κόκκινη στήλη δείχνει την αμετάβλητη συγκέντρωση της ολευρωπαϊνης ύστερα από αντίδραση με πρωτεϊνικό εκχύλισμα από τα φύλλα του καπνού που είχε εγχυθεί άδειος ο δυαδικός φορέας 35s-p.GPTV-HPT. Τέλος η πράσινη στήλη και γραμμή αντιπροσωπεύει την αμετάβλητη και πάλι συγκέντρωση της ολευρωπαϊνης ύστερα από πρωτεϊνικό εκχύλισμα από τα φύλλα του καπνού που δεν είχε γίνει κάποιος χειρισμός. Στην εικόνα B βλέπουμε το gel πολυακρυλαμίδης ύστερα από SDS-PAGE που είναι

ακατέργαστη πρωτεΐνη η οποία εξάγεται από τα φύλλα του καπνού. Στην στήλη 1 έχει εκφραστεί η OeGLU στην στήλη 2 είναι με τον άδειο φορέα και στην στήλη 3 είναι απομονωμένες πρωτεΐνες από φύλλα καπνού που δεν έγινε χειρισμός. Στην εικόνα C άνοσο-ανιχνεύεται η πρωτεΐνη OeGLU μόνο στην πρώτη στήλη στα ~63kDa.

Στην εικόνα 1.7 η κόκκινη και η πράσινη στήλη αποδεικνύουν ότι δεν υπάρχει κάποια άλλη ενδογενής β-γλυκοσιδάση που να μπορεί να υδρολύσει την ολευρωπαΐνη στο διάστημα της 1 ώρας.

Με την δράση της OeGLU αποδείχτηκε ότι το άγλυκο της ολευρωπαΐνης λειτουργεί σαν ένας μόριο με δομή γλουταραλδεΐδης που δημιουργεί συσσωματώματα πρωτεϊνών (protein cross-linking agent) όπως έχει περιγραφεί στην αγριομυρτιά (βλέπε [παράγραφο 1.2.3](#)) (Konno et al., 1999). Η επιβεβαίωση ήρθε μέσω μιας ανάλυσης EMSA και ως πρωτεΐνη αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το BSA. Η ενζυματική αντίδραση που έγινε με τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από φύλλα καπνού που περιέχουν την ανασυνδιασμένη OeGLU, έδειξε ότι το BSA σχηματίζει συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η OeGLU όταν υδρολύει την ολευρωπαΐνη την μετατρέπει σε έναν ισχυρό cross-linking παράγοντα (Εικόνα 1.8).



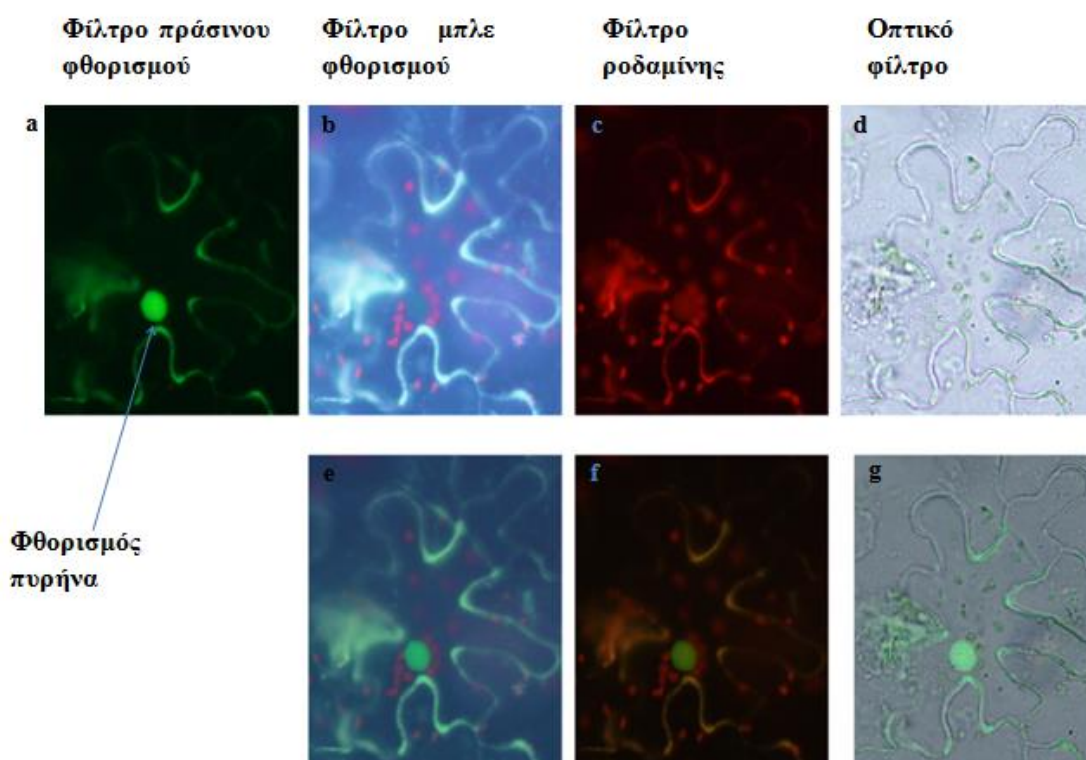
Εικόνα 1. 8 EMSA ανάλυση. 1: έκφραση OeGLU, 2: άδειος φορέας, 3: φύλλο χωρίς χειρισμό, 4: Μόνο BSA (Koudounas et al.,

Ένα ακόμα σημαντικό εύρημα για την β-γλυκοσιδάση της ολευρωπαΐνης είναι η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης του ενζύμου. Με in situ

υβριδισμό βρέθηκε ότι η γονιδιακή έκφραση της OeGLU μεταβάλλεται με το αναπτυξιακό στάδιο του καρπού και την και τον τύπο κυττάρου/ιστού. Πιο συγκεκριμένα βρέθηκε ότι το γονίδιο εκφράζεται σε ωοθήκες ανθήρες και στα μπουμπούκια του άνθους. Είναι γνωστό ότι η ολευρωπαϊνή βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα στα μπουμπούκια, ενώ τα επίπεδα της ρυθμίζονται επίσης ανάλογα με τα αναπτυξιακά στάδια (Malik and Bradford, 2006). Η ολευρωπαϊνή βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα στους νεαρούς καρπούς, αν και η συγκέντρωση της εξαρτάται τόσο από την ποικιλία της ελιάς όσο και από το κλίμα που αναπτύσσεται το δέντρο (Briante et al., 2002, Malik and Bradford 2006, Gutierrez-Rosales et al., 2012). Η συγκέντρωση της σε γενικές γραμμές μειώνεται καθώς ωριμάζει ο καρπός, ενώ δεν ανιχνεύεται πια σχεδόν καθόλου όταν ο καρπός έχει γίνει μαύρος (Bianco et al., 1993, Riachy et al., 2011b). Η OeGLU στα πολύ πρώιμα στάδια ανάπτυξης, βρέθηκε ότι εκφράζεται στην αναπτυσσόμενη σάρκα και στο περισπέρμιο του σπόρου, ενώ απουσίαζε από το έμβρυο και το ενδοσπέρμιο. Ενώ το ανάποδο συμβαίνει στον μεσόκαρπο και όταν το κουκούτσι λιγνοποιείται. Τα επίπεδα της έκφρασης αρχίζουν να ανεβαίνουν και μένουν σε υψηλά επίπεδα όταν ωριμάσει και μαυρίσει ο καρπός. Η απουσία της ολευρωπαϊνής στα τελευταία στάδια ωρίμανσης του καρπού καταδεικνύει την μαζική υδρόλυση της. Γι' αυτό ίσως, κατά της ωρίμανση του καρπού τα κύτταρα υφίστανται μια ξαφνική απόπτωση, (Matteucci et al., 2011), ώστε να έρθει σε επαφή η β-γλυκοσιδάση με την ολευρωπαϊνή. Τα προϊόντα της υδρόλυσης της ολευρωπαϊνής επαναχρησιμοποιούνται στη βιοσύνθεση μεταβολιτών που σχετίζονται με την ωρίμανση του καρπού, όπως είναι τα απογλυκοζυλιωμένα σεκοιριδοειδή και η ελεύθερη γλυκόζη για τη σύνθεση των ανθοκυανινών. Ενώ το άγλυκο της ολευρωπαϊνής διαμορφώνει το αντιοξειδωτικό προφίλ του λαδιού της ελιάς.

Δεν συμβαίνει όμως το ίδιο στα υπόλοιπα μέρη του φυτού, όπως η ρίζα τα φύλλα και η βλαστοί. Τα επίπεδα έκφρασης της OeGLU ακολουθούν την συγκέντρωση της ολευρωπαϊνής που είναι περισσότερη στα νεαρά φύλλα από ότι στα ώριμα και ανιχνεύσιμη σε ικανοποιητικά επίπεδα σε βλαστό και ρίζα. Έτσι και τα

μεταγραφήματα της OeGLU είναι αυξημένα στα φύλλα στο κορυφαίο μερίστωμα του βλαστού και στις άκρες των ριζών. Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν την θεωρία λειτουργίας των αμυντικών β-γλυκοσιδασών μέσω δυαδικού συστήματος άμυνας, όπως έχει βρεθεί και σε άλλους αμυντικούς γλυκοζίτες. Προτιμάται να προστατεύονται τα νεαρά μέρη του φυτού και τα πιο ευάλωτα σημεία σε παθογόνους και έντομα. Εκεί παρατηρείται και η αύξηση της έκφρασης των αμυντικών β-γλυκοσιδασών που είναι σε ετοιμότητα να δράσουν αν παρουσιαστεί θραύση ιστού/κυττάρου (Sue et al., 2000a,b, Forslund, et al., 2004). Επιπλέον το δυαδικό σύστημα άμυνας επιβεβαιώνεται με δεδομένα που δεν έχουν δημοσιευτεί, καθώς το ένζυμο OeGLU τοποθετείται στον πυρήνα των κυττάρων (αδημοσίευτα αποτελέσματα), ενώ η ολευρωπαϊνή στο χυμοτόπιο η κυτταρόπλασμα (Konno et al., 1998; Bitonti et al., 2000) (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1. 9 Υποκυτταρική τοποθέτηση του ενζύμου OeGLU ύστερα από παροδική έκφραση σε φύλλα καπνού *Nicotiana benthamiana*. Διπλωματική εργασία της φοιτήτριας Παρασκευής Τσέρου , «ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ Β-ΓΛΥΚΟΣΙΔΑΣΗΣ ΤΗΣ *OLEA EUROPAEA L.*» , Αθήνα 2014. Εικόνα e= α+β, Εικόνα f=α+C , Εικόνα g=α+d.

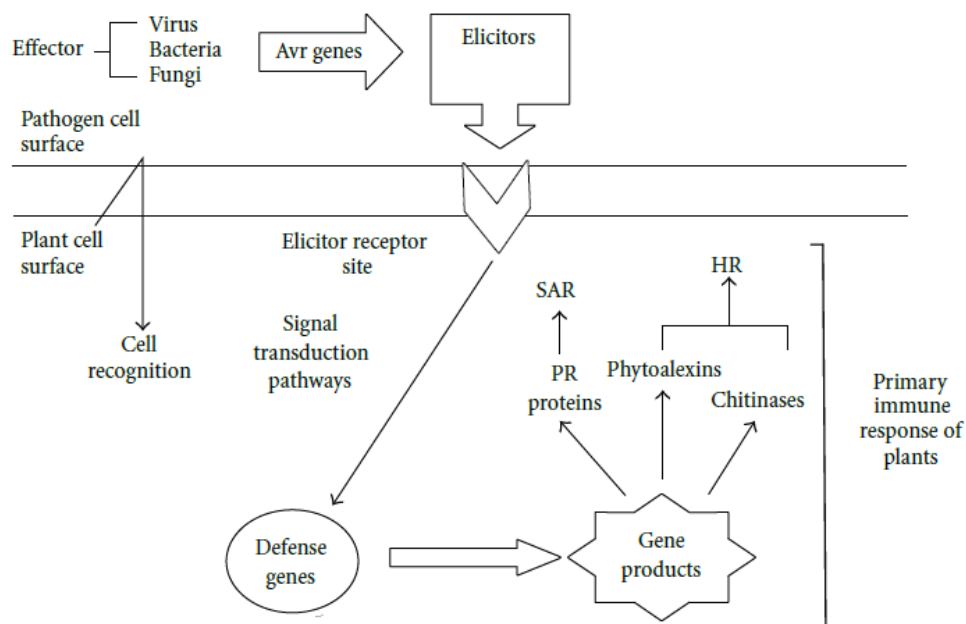
1.6 Πρώτη γραμμή άμυνας στα φυτά

Όπως περιγράφηκε προηγουμένως πολλά είδη φυτών, όπως και η Ελιά, παράγουν ιδιαίτερες ουσίες μέσω του δευτερογενούς μεταβολισμού προκειμένου να ανταποκρίνονται άμεσα και ακαριαία στους εχθρούς που τους επιτίθενται. Εκτός αυτού, όλα τα φυτά διαθέτουν ένα κοινό πολύπλοκο σύστημα προκειμένου να αμυνθούν σε συνθήκες stress που προκαλούνται από βιοτικούς ή αβιοτικούς παράγοντες. Τα φυτά καταφέρνουν να επάγουν άμυνα χωρίς να περιέχουν εξειδικευμένα αμυντικά κύτταρα, που να έχουν την ικανότητα να μετακινούνται μέσα στον οργανισμό, όπως είναι στους οργανισμούς του ζωικού βασιλείου.

Μέσω της συν-εξέλιξης με τους παθογόνους τους τα φυτά έχουν μάθει να αναγνωρίζουν χημικά σιγνάλα των παθογόνων. Στην συνέχεια υπάρχουν φυσικές ενώσεις στα φυτά που ονομάζονται διεγέρτες (elicitors), οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την επαγωγή άμυνας (Gómez-Vásquez et al., 2004). Έχουν χαρακτηριστεί διάφορα μόρια ως elicitors όπως, γλυκοπρωτεΐνες, πολυμερή υδατανθράκων, λιπίδια κ.α. Μόλις ο φυτικός οργανισμός αναγνωρίσει τους διεγέρτες επάγεται μια σύνθετη αμυντική απόκριση. Αυτή η ενεργοποίηση των μονοπατιών μεταγωγής σήματος, οδηγούν στην παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), βιοσύνθεση φυτοαλεξίνης (phytoalexin), ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος με την εναπόθεση καλόζης (callose –glucan polymers), ενεργοποίηση αμυντικών ενζύμων και η συσσώρευση PR πρωτεϊνών (protein resistance), πολλές από τις οποίες έχουν αντιμικροβιακή δράση (Van Loon and Van Strien, 1999). Οι PR πρωτεΐνες είναι διάφορα υδρολυτικά ένζυμα όπως είναι οι χιτινάσες (chitinase) και οι β-1,3 – γλυκανάσες (β-1,3- glucanase) που περιβάλλουν τον ιστό και δρουν ενάντια στο παθογόνο (μύκητα, βακτήριο, έντομο) (Spoel and Dong, 2012). Η άμεση ενεργοποίηση αυτών των μορίων ονομάζεται αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) και έχει σαν αποτέλεσμα συνήθως των προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο

(programmed cell death) κυττάρων που έχουν μολυνθεί από παθογόνους. Συνοπτικά η άμεση απόκριση του φυτού μέσω του HR και του ταχύ θανάτου που ακολουθεί έχει σκοπό την απομόνωση του σημείου που έχει προσβληθεί από τον παθογόνο (Εικόνα 1.10).

Αν και η αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) έχει τοπικό χαρακτήρα, αναπτύσσεται άμυνα σε περιφερειακά τμήματα του φυτού μετά την προσβολή. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται συστηματική επίκτητη αντίσταση (systemic acquired resistance -SAR) και περιγράφηκε πρώτη φορά από τον Ross το 1961. Σύμφωνα με τα πειράματα, ύστερα από μόλυνση φύλλων καπνού σε τοπικό επίπεδο με τον ιο του μωσαϊκού του καπνού TMV, το φυτό μπορούσε να αμυνθεί στην συνέχεια όχι μόνο σε TMV αλλά και σε άλλους παθογόνους για τουλάχιστον 20 μέρες.



Εικόνα 1. 10 Πρωτογενής αμυντική απόκριση του φυτού ύστερα από αλληλεπίδραση με παθογόνο

Όπως είναι φανερό η αντίδραση υπερευαισθησίας είναι μια ταχύτατα αναπτυσσόμενη αντίδραση που στόχο έχει την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του παθογόνου και για το λόγο αυτό οδηγεί σε περιορισμένο κυτταρικό θάνατο. Ορισμένοι ερευνητές έχουν περιγράψει το HR ως μια διαδικασία που μοιάζει με την απόπτωση, την κύρια εκδήλωση προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, που συναντάται σε πολλούς ζωικούς τύπους κυττάρων (Morel and Dangl, 1997), δεδομένου ότι επάγεται η έκφραση αμυντικών γονιδίων ώστε να οδηγείται το κύτταρο σε θάνατο. Το HR είναι ανάλογο με την έμφυτη ανοσοαπόκριση που υπάρχει στο ζωικό βασίλειο καθώς παρέχει αντίσταση στον οργανισμό παρεμποδίζοντας τον παθογόνο να τραφεί και να αποκτήσει ενέργεια από ζωντανά κύτταρα (Kumar et al., 2001).

1.7 Σκοπός – Στόχοι Πειράματος

Η ολευρωπαϊνή πέρα, από τις σημαντικές της ιδιότητες για τον άνθρωπο έχει πολύ σημαντικό ρόλο και για το ίδιο το φυτό. Η ολευρωπαϊνή είναι ένας αμυντικός γλυκοζίτης για τα φυτά της οικογένειας των Oleaceae και όπως έχει περιγραφεί και από τους Konno et al., το 1999 ενεργοποιείται από μια ενδογενή β-γλυκοσιδάση. Η συγκεκριμένη εργασία εστιάζει στον αμυντικό ρόλο της ουσίας μέσα στο φυτό, όταν ενεργοποιείται από την ενδογενή β-γλυκοσιδάση, αλλά και στην μελέτη της ομοιόστασης του ενζύμου εντός του κυττάρου. Στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, οι έρευνες για το δέντρο της ελιάς (*Olea europaea L.*) έχουν εστιάσει τα τελευταία χρόνια στην μελέτη αυτής της ενδογενούς β-γλυκοσιδάσης καθώς και του συστήματος μεταξύ ολευρωπαϊνης και ενζύμου. Το 2015 παρουσιάστηκε η πρώτη δημοσίευση για το ένζυμο της β-γλυκοσιδάσης (OeGLU) (Koudounas et al., 2015).

Αρχικά έγινε μια κατασκευή προκειμένου να διαγραφεί η πληροφορία που στέλνει το ένζυμο στον πυρήνα. Η μελέτη της υποκυτταρικής τοποθέτησης του ενζύμου είναι

πολύ σημαντική για τον χαρακτηρισμό του, αλλά και για τον βιολογικό του ρόλο ως “συνεργάτης” μαζί με την ολευρωπαΐνη στο δυαδικό σύστημα άμυνας για τα φυτά των Oleaceae. Σύμφωνα με την θεωρία το ένζυμο και ο αμυντικός γλυκοζίτης βρίσκονται διαμεσιματοποιημένα/χωρισμένα μέσα στο κύτταρο και έρχονται σε επαφή μόνο όταν διαρραγεί η διαμερισματοποίηση του κυττάρου (Morant et al., 2008). Αυτό συμβαίνει γιατί η άγλυκη μορφή της ολευρωπαΐνης από την OeGLU είναι ένα πολύ τοξικό μόριο με ικανότητα μετουσίωσης και συσσωμάτωσης πρωτεϊνών (Koudounas et al., 2015) και όπως είναι λογικό όταν το φυτό δεν αμύνεται τα δύο αυτά στοιχεία θα πρέπει να είναι χωρισμένα για την φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου (Morant et al., 2008).

Στην συνέχεια μέσω της χρήσης της τεχνικής BiFC (Biomolecular Florescence Complementation) εξετάστηκε κατά πόσο το μονομερές της OeGLU αλληλεπιδρά με τον εαυτό του. Είναι γνωστό πως στα φυτά πολλές β-γλυκοσιδάσες λειτουργούν ως μεγάλα συσσωματώματα, μεγέθους ακόμα και 1500 kDa (Nisius, 1988, Fieldes and Gerhardt, 1994, Falk et al., 1995, Geerlings et al., 2000).

Τέλος, έγινε μια προσπάθεια μελέτης του δυαδικού συστήματος OeGLU/ολευρωπαΐνη *in vivo*. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το ετερόλογο σύστημα του καπνού *Nicotiana benthamiana*. Στον καπνό δεν υπάρχει κάποια ουσία αντίστοιχη της ολευρωπαΐνης, επομένως εκφράζοντας την β-γλυκοσιδάση (OeGLU) και φέρνοντας την σε επαφή με την ολευρωπαΐνη μπορέσαμε να μελετήσουμε τι προκαλεί στο φυτό αυτό το ισχυρό δυαδικό σύστημα άμυνας. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η έκφραση γονιδίων – δεικτών που σχετίζονται με την αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) και τον κυτταρικό θάνατο (cell death).

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Φυτικό υλικό

Στα υπό διερεύνηση ερωτήματα της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν φυτά *Nicotiana benthamiana* που ανήκουν στην οικογένεια των *Solanaceae* και φύλλα από το δέντρο της ελιάς *O. europaea L. ssp. europaea var. Sativa*. Είναι η καλλιεργήσιμη ελαιοπαραγωγό ποικιλία «Κορωνέϊκη» και τα ελαιόδεντρα βρίσκονται στον ελαιώνα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Για την καλλιέργεια του καπνού τα σπόρια ενυδατώνονται για 12 ώρες στους 4°C προκειμένου να σταματήσει ο λήθαργος. Στην συνέχεια αναπτύσσονται σε στερεό υπόστρωμα (θρεπτικό μέσο ανάπτυξης), αφού πρώτα τα σπόρια απολυμανθούν σε 25% διάλυμα χλωρίνης και 0,01% Triton-X. Τα τριβλία στα οποία περιέχονται τα σπέρματα τοποθετούνται σε θάλαμο επώασης φυτών με θερμοκρασία 22° C και φωτοπερίοδο 16 ώρες φως /8 ώρες σκοτάδι. Μετά από την πάροδο 2 εβδομάδων τα φυτά τοποθετούνται σε γλαστράκια με χώμα μέχρι να ολοκληρωθεί ο κύκλος ανάπτυξης τους.

2.2 Απομόνωση και Καθαρισμός Νουκλεϊκών Οξέων

2.2.1 Απομόνωση ριβονουκλεϊκών οξέων (RNA)

- Λειοτριβήση ιστού σε υγρό άζωτο.
- Για κάθε 0,1 gr ιστού προσθέτουμε σε eppendorf 100μL RNA Extraction Buffer και 100μL φαινόλη.
- Έντονη ανάδευση για 1 min (vortex).
- Φυγοκέντρωση για 5min στις 13000 rpm.

(Δημιουργούνται 2 φάσεις, η υδατική είναι πάνω και η οργανική κάτω)

- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο (υδατική φάση) σε καθαρό eppendorf.
- Προσθέτουμε ίσο όγκο φαινόλης και αναδεύουμε έντονα για 1min (vortex).
- Φυγοκέντρωση για 5min στις 13000 rpm.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο (υδατική φάση) σε καθαρό eppendorf.
- Προσθέτουμε ίσο όγκο διαλύματος 1:1 (φαινόλη)/(24:1 χλωροφόρμιο:ισομυλική αλκοόλη).
- Έντονη ανάδευση για 1 min.
- Φυγοκέντρωση για 5min στις 13000 rpm.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο (υδατική φάση) σε καθαρό eppendorf.
- Προσθέτουμε ίσο όγκο διαλύματος 24:1 χλωροφόρμιο:ισομυλική αλκοόλη.
- Έντονη ανάδευση για 1min.
- Φυγοκέντρωση για 5min στις 13000 rpm.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο (υδατική φάση) σε καθαρό eppendorf.
- Προσθέτουμε 2,5 όγκους 100% EtOH (παγωμένη από τους -20°C) και 1/10 του όγκου της υδατικής φάσης CH₃COONa 3M (pH 4,8).
- Αναδεύουμε αργά 20-30 φορές με το χέρι και βάζουμε το eppendorf στους -20°C για 16-18 ώρες (overnight).
- Φυγοκεντρούμε για 20 min στις 13000 rpm στους 4°C.
- Αποχύνουμε το υπερκείμενο και αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει.

- Επαναδιαλύουμε σε αποστειρωμένο ddH₂O.
- Το δείγμα φυλάσσεται στους -80°C.

2.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα της *Escherichia coli* με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης.

- Μονή βακτηριακή αποικία που περιέχει το προς απομόνωση πλασμίδιο, καλλιεργείται σε υγρό μέσο LB στους 37°C για 12 ώρες.
- Από αυτήν την καλλιέργεια μεταφέρουμε 1,5mL σε καθαρό αποστειρωμένο Eppendorf tube.
- Φυγοκέντρωση για 1min στις 13.000 rpm.
- Επανααιωρούμε το βακτηριακό ίζημα σε 200μL διαλύματος P1.
- Προσθέτουμε 200μL από το P2 διάλυμα και το δείγμα ανακινείται ελαφριά μέχρι να γίνει διαυγές.
- Το δείγμα επωάζεται για 3min (αυστηρώς για να αποφευχθεί η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA).
- Προσθέτουμε 200μL διαλύματος P3. Ακολουθεί πιο έντονη ανάδευση.
- Φυγοκέντρωση για 15min στις 13.000rpm.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καθαρό Eppendorf tube.
- Προσθέτουμε τον διπλάσιο όγκο παγωμένης αιθανόλης 100%.
- Το δείγμα επωάζεται για 30min στον πάγκο.
- Φυγοκέντρωση για 10min στις 13000rpm.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και αφού το ίζημα στεγνώσει προστίθενται 30μL ddH₂O.

2.2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την βοήθεια κολώνας NucleoSpin® Plasmid Easy Pure

Όταν απαιτείται το πλασμιδιακό DNA να είναι υψηλής καθαρότητας, ειδικά για την περίπτωση που θέλουμε να σταλεί για αλληλούχιση, η απομόνωση πραγματοποιείται με τη βοήθεια κολώνας NucleoSpin® (Plasmid Easy Pure Kit. Cat No:740727.50) βάσει αναλυτικού πρωτοκόλλου και διαλυμάτων που περιέχει η εταιρεία.

2.2.4 Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης

- Ανάλογα με το μέγεθος του προς απομόνωση κλάσματος DNA προετοιμάζεται πηκτή αγαρόζης με συγκέντρωση 1%w/v.
- Το δείγμα αναλύεται μέσω ηλεκτροφόρησης. Εφόσον ο διαχωρισμός του κλάσματος που πρόκειται να απομονωθεί από τα υπόλοιπα είναι ικανοποιητικός, αφαιρείται η ζώνη που το περικλείει με την βοήθεια ενός κοπιδίου και την χρήση UV ακτινοβολίας (δεν αφήνουμε εκτεθειμένο το κλάσμα στην UV ακτινοβολία για την αποφυγή μεταλλάξεων στην αλληλουχία).
- Το κομμάτι της πηκτής τοποθετείται σε Eppendorf 1,5mL.
- Τοποθετείται στους -80°C για να παγώσει για τουλάχιστον 15min.
- Ακολουθεί απομόνωση DNA με βάση το πρωτόκολλο της NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Kit. Cat No: 740609.50)

2.3 Ανάλυση Νουκλεϊκών Οξέων

2.3.1 Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζη

Η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση είναι μια διαδικασία που αναγκάζει τα μόρια των νουκλεϊκών οξέων να κινηθούν λόγω ηλεκτρικού πεδίου μέσα σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα νουκλεϊκά οξέα δεδομένου ότι είναι αρνητικά φορτισμένα θα κινηθούν προς τον θετικό πόλο και θα διαχωριστούν ανάλογα με το μέγεθος τους. Το μέγεθος (ζεύγη βάσεων) που θέλουμε να αναλύσουμε καθορίζει και την συγκέντρωση της αγαρόζης. Επιθυμητή ποσότητα αγαρόζης τοποθετείται σε κατάλληλο όγκο νερού (w/v) και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για μερικά λεπτά (έως την πλήρη διαύγεια το διαλύματος).

- Στην συνέχεια προστίθεται ποσότητα πυκνού 50X TAE τελικής συγκέντρωσης 1x.
- Στο τέλος προστίθεται η χρωστική του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr, 50μg/ml). Η χρωστική έχει την ικανότητα να προσδέεται μεταξύ των βάσεων των νουκλεϊκών οξέων.
- Η πηκτή τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο συσκευής ηλεκτροφόρησης με την ανάλογη χτένα και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά την στερεοποίηση του πηκτώματος αγαρόζης, αφαιρούνται τα χτενάκια και τοποθετείται το δοχείο-καλούπι στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα (1x TAE + EtBr).
- Τα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται χρωστική (loading dye) τελικής συγκέντρωσης 1x. Η χρωστική επιτρέπει στο δείγμα να καθιζάνει μέσα στα πηγαδάκια που έχουν δημιουργηθεί από την χτένα στην πηκτή, λόγω της παρουσίας σακχαρόζης.

- Κατά την ηλεκτροφόρηση εφαρμόζεται σταθερή τάση 50-120V.
- Το πήκτωμα αγαρόζης εξετάζεται σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

2.3.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων έγινε με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) μέσω την χρήση του φωτόμετρου PerkinElmer . Τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν στα 260nm.

Η συγκέντρωση υπολογίζεται από τον τύπο Beer-Lambert:

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = \text{OD}_{260} * a * \text{DF}$$

Όπου a ορίζεται ως η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων που παρατηρείται όταν $\text{O.D}_{260}=1$ και συγκεκριμένα για δείγματα DNA, $a=50\mu\text{g/mL}$ ενώ για RNA, $a=40\mu\text{g/mL}$, DF είναι ο συντελεστής αραίωσης και ισούται με την αραίωση που έχει πραγματοποιηθεί για να γίνει η φωτομέτρηση.

Όμως εκτός από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης είναι εξίσου σημαντικό να γνωρίζουμε και την καθαρότητα του δείγματος ως προς τις πρωτεΐνες και τα φαινολικά παράγωγα. Οι πρωτεΐνες προσδιορίζονται μέσω φωτόμετρου στα 280nm λόγω της παρουσίας της τρυπτοφάνης ενώ τα φαινολικά παράγωγα στα 240 nm. Επομένως οι λόγοι $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ και $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{240}$ αντιπροσωπεύουν την καθαρότητα του διαλύματος ως προς τις πρωτεΐνες και τα φαινολικά αντίστοιχα. Ο ιδανικός λόγος πρέπει να πλησιάζει το 2 και στις δύο περιπτώσεις για το RNA.

2.4 Μοριακοί χειρισμοί

2.4.1 Χειρισμός με Dnase

Είναι πολύ σημαντικό να απομακρυνθεί το DNA που απομονώνεται μαζί με το RNA

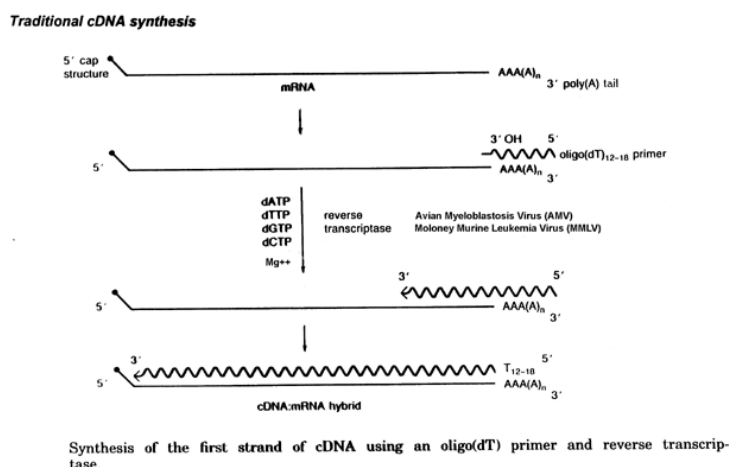
- Η αντίδραση γίνεται σε eppendorf για PCR.

Leafs (<i>N. benthamiana</i>)	
Nucleic Acids	4μg
RQ1 buffer	10
RQ1 Dnase (1u/μL)	2
Rnase Out	1
dd H ₂ O	until 100μL
Total	100

- 1ώρα στους 37°C.
- Προσθέτουμε 1unit ενζύμου (RQ1 Dnase) και αφήνουμε την αντίδραση για άλλα 30 min.
- Ανεβάζουμε τον όγκο στα 500μL.
- Ακολουθεί καθαρισμός με φαινόλη/SEVAG, καθίζηση με αιθανόλη ανάλυση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης και προσδιορισμός της συγκέντρωσης όπως περιγράφηκε παραπάνω ([παράγραφο 2.2.1](#)).

2.4.2 Σύνθεση cDNA αλυσίδας (RT-PCR, Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

Η σύνθεση της πρώτης αλυσίδας cDNA γίνεται με την χρήση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse transcriptase- RTII). Το ένζυμο έχει την ικανότητα να μεταγράψει το σύνολο των μορίων mRNA σε μονόκλινα DNA με αποτέλεσμα μόρια CDNA εκ των οποίων η μία αλυσίδα είναι RNA αλληλουχία και η δεύτερη DNA. Για να ξεκινήσει την μεταγραφή η RT χρησιμοποιούμε έναν oligo(dT) εκκινητή ο οποίος υβριδίζει στην poly A⁺ ουρά των μορίων mRNA(εικόνα 2.1).



Εικόνα 2. 1 Αναπαράσταση της σύνθεσης της πρώτης αλυσίδας του cDNA

- Η αντίδραση της RT γίνεται σε 2 βήματα (RT STEP1/ RT STEP2)
- Προετοιμάζουμε το Step1 σε αποστειρωμένο eppendorf.

STEP 1	
RNA	0,5μg
25mM OligoT7	2 μL

10mM dNTPs	1μL
dd H₂O	Until 12 μL
Total	12μL

- Ανακατεύουμε ελαφρά και κάνουμε spin στην φυγόκεντρο.
- Επωάζουμε στους 65°C για 6 λεπτά στο μηχάνημα της PCR.
- Τοποθετούμε τα Eppendorfs στον πάγο.

Το Step1 πραγματοποιείται στους 65°C για να γίνει αποδιάταξη της δευτεροταγούς δομής του mRNA. Η αντίστροφη μεταγραφή (RT) είναι πολύ ευαίσθητο ένζυμο και λειτουργεί αυστηρά στους 42°C, για αυτό τον λόγο γίνεται ξεχωριστά το Step 2 της αντίδρασης.

- Για το Step2 προσθέτουμε τα ακόλουθα στα Eppendorfs.

STEP 2	
Fs buffer 5x	4μL
DTT 0,1M	2μL
Rnase out	1μL
SSII/RT	1μL
Total	20μL

- Πιπετάρουμε ελαφρά και επωάζουμε στους 42°C για 1 ώρα.
- Τέλος η αντίδραση αδρανοποιείται με επώαση στους 70°C για 15 λεπτά.
- Τα δείγματα αραιώνονται 1/3 και φυλάσσονται στους -20°C.

2.4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Στην συγκεκριμένη εργασία έγινε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με δύο διαφορετικά ένζυμα, ανάλογα με την ενίσχυση που θέλαμε να κάνουμε και για

τον λόγο που θα χρησιμοποιούσαμε στην συνέχεια τα κλάσματα. Για την ενίσχυση τμημάτων DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθούν σε κάποιο φορέα χρησιμοποιήθηκε η Phusion High-Fidelity DNA Polymerase της Thermo Scientific. Ενώ για την ενίσχυση τμημάτων DNA για την εξακρίβωση έκφρασης γονιδίου χρησιμοποιήθηκε η DreamTaq DNA Polymerase της Thermo Scientific.

- Ένα τυπικό πρωτόκολλο για την Phusion High-Fidelity DNA Polymerase είναι:

Συστατικά Αντίδρασης	Πυκνό Διάλυμα	Όγκος Διαλυμάτων	Τελικές Συγκεντρώσεις
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης PCR	5x	5μL	1x
dNTPs	2mM	2,5μL	200μM
Ορθός εκκινητής	5μM	2,5μL	500nM
Ανάστροφος εκκινητής	5μM	2,5μL	500nM
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	2.000 units/mL	0,3μL	1units /50μL PCR
DNA	X	2μL	<250ng
ddH ₂ O		Up to 25μL	
Total		25μL	

- Το ρυθμιστικό διάλυμα της PCR περιέχει Mg₂Cl₂. Η παρουσία Mg⁺⁺ είναι πολύ σημαντική για την δράση της Phusion High-Fidelity DNA Polymerase.

Το τελικό Mg^{++} στην αντίδραση πρέπει να είναι 1,5mM και παραπάνω συγκέντρωση μπορεί να δημιουργήσει πρόβλημα στην αποδιάταξη του DNA ή μη εκλεκτική πρόσδεση των εκκινητών.

- Η Phusion® HF έχει την ικανότητα επιδιόρθωσης λαθών κατά τον πολυμερισμό του DNA (proof-reading activity), μειώνοντας σημαντικά την πιθανότητα λάθους κατά την ενίσχυση των επιθυμητών τμημάτων.
- Κάθε ένα από τα συστατικά της αντίδρασης τοποθετούνται σε PCR tubes χωρητικότητας 0,2mL.
- Μια τυπική αλυσιδωτή αντίδραση της Phusion High-Fidelity DNA Polymerase είναι:

Επανάληψη βημάτων	
1x	Αποδιάταξη της μήτρας DNA : 94°C for 2min
20-40 times	Αποδιάταξη της μήτρας DNA: 94°C for 30 sec Υβριδισμός εκκινητών : $T_m^{(1)}$ for 30 sec Επιμήκυνση : 72°C for 2min ⁽²⁾
1x	Τελική επιμήκυνση προϊόντος: 72 °C for 10 min
1x	12°C forever

(1) Η θερμοκρασία υβριδισμού (annealing) εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης (melting temperature, T_m) των εκκινητών. Το T_m του κάθε εκκινητή υπολογίζεται από τον τύπο: $69.3 + 0.41*(GC\%) - (650/ l)$, όπου l = αριθμός βάσεων εκκινητή που θα υβριδίσουν με την αλληλουχία (κατά την κατασκευή των εκκινητών υπάρχει η δυνατότητα πρόσθεσης και επιπλέον βάσεων όπως θέσεων για την αναγνώριση ενζύμων περιορισμού, επίτοπο κ.α. τα οποία δεν

υπολογίζονται στο T_m). Συνήθως η θερμοκρασία annealing ορίζεται 2-3 βαθμούς χαμηλότερα από το μικρότερο T_m .

(2) Ο χρόνος της επιμήκυνσης (extension) εξαρτάται από την ταχύτητα πολυμερισμού της DNA πολυμεράσης που χρησιμοποιείται και από το μέγεθος του ενισχυόμενου τμήματος DNA. Η Phusion High-Fidelity DNA Polymerase χρειάζεται 30 sec για την αντιγραφή 1000 βάσεων DNA.

- Ένα τυπικό πρωτόκολλο για την DreamTaq DNA polymerase δεν αλλάζει από αυτό της Phusion High-Fidelity DNA Polymerase. Οι μόνες διαφορές είναι χρειάζεται 1min για την επιμήκυνση 1000 βάσεων DNA.
- Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία όσο αφορά την αλληλουχία τους, τα γονίδια που ενισχύουν και τα T_m παρουσιάζονται στον πίνακα 2.1.

2.4.4 PCR Colonies

Η τεχνική της colonies PCR χρησιμοποιείται ευρύτατα προκειμένου να εξετάζονται γρήγορα βακτηριακές αποικίες για το αν περιέχουν πλασμίδια με την επιθυμητή ένθεση. Μέσω αυτής της μεθόδου εξαλείφεται η ανάγκη για καλλιέργεια μεμονωμένων αποικιών και η προετοιμασία τους για ανάλυση πλασμιδιακού DNA. Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Μονή αποικία μεταφέρεται και διαλύεται μεμονωμένα σε PCR tubes που περιέχει 15μL H_2O .
- Από κάθε αποικία διαλυμένη σε H_2O λαμβάνονται 3 μL και τοποθετούνται σε νέα PCR tubes ανά 5, με αποτέλεσμα να έχουμε PCR tubes με 15μL τελικό όγκο από 5 διαφορετικές βακτηριακές αποικίες (ανεξάρτητα γεγονότα κλωνοποιήσεων).
- Απ' τα 15 μL που περιέχονται σε κάθε eppendorf μεταφέρονται 2 μL σε PCR tubes, τα οποία λειτουργούν ως μήτρα για την αντίδραση ενίσχυσης.

- Μέσω κατάλληλα σχεδιασμένων εκκινητών ανιχνεύεται η ύπαρξη της ένθεσης και εφόσον είναι εφικτό και η διεύθυνση με την οποία έχει κλωνοποιηθεί.

Για αυτήν την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε η DreamTaq DNA polymerase. Μετά το τέλος της PCR τα αποτελέσματα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης και έτσι μπορούμε να δούμε ποια πεντάδα αποικιών είναι θετική (δίνει προϊόν στην αντίδραση). Στην συνέχεια οι αποικίες αυτές καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσω LB για την περαιτέρω ανάλυση του πλασμιδιακού DNA και την εύρεση των σωστών κλώνων.

2.4.5 Πέψη νουκλεϊκών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Οι πέψεις με ενδονουκλεάσες περιορισμού χρησιμοποιήθηκαν επανειλημμένως στην συγκεκριμένη πειραματική εργασία τόσο για την κλωνοποίηση τμημάτων DNA στα κατάλληλα πλασμίδια όσο και την ταυτοποίηση αυτών για τον σωστό ανασυνδυασμό τους (φορά εισαγόμενου DNA τμήματος, αριθμός ενθέσεων κλπ.). Εφόσον χρειαστεί, προσθέτουμε την αντίστοιχη αλληλουχία που αναγνωρίζει συγκεκριμένη ενδονουκλεάση, στους εκκινητές. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την πρόσθεση της θέσης αναγνώρισης κατά την PCR, με πλεονέκτημα την πιο εύκολη κλωνοποίηση των κλασμάτων DNA μέσα στα πλασμίδια. Οι αντιδράσεις έγιναν σε τελικό όγκο 30μL.

- Σε Eppendorf tube τοποθετείται ποσότητα DNA που κρίνεται ως αρκετή για να κοπεί μαζί με το ένζυμο περιορισμού (New England Biolabs και Takara) και το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα.
- Ύστερα από ελαφρύ vortex και φυγοκέντρηση η αντίδραση επωάζεται στην κατάλληλη θερμοκρασία η οποία εξαρτάται από το ένζυμο που χρησιμοποιείται. Συνήθως απαιτούνται 37°C για 1:30 ώρα.

- Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη εργασία είναι:

Όνομασία Ενζύμου	Αλληλουχία
BamHI	5'... GGATCC...3' 3'... CCTAGG...5'
XbaI	5'... TCTAGA...3' 3'... AGATCT...5'
XhoI	5'... CTCGAG...3' 3'... GAGCTC...5'
SacI	5'... GAGCTC...3' 3'... CTCGAG...5'
NotI	5'... GCGGCCGC...3' 3'... CGCCGGCG...5'
HindIII	5'... AAGCTT...3' 3'... TTCGAA...5'
KpnI	5'... GGTACC...3' 3'... CCATGG...5'
BglII	5'... AGATCT...3' 3'... TCTAGA...5'
MluI	5'... ACGCGT...3' 3'... TGCGCA...5'

2.4.6 Ενοποίηση τμημάτων DNA με κολλώδη άκρα (Ligation)

Η διαδικασία ενοποίησης στηρίζεται στην ιδιότητα της T4 DNA λιγάσης να αναγνωρίζει άκρα και να συνδέει τμήματα με συμπληρωματικά (5' ή 3' προεξέχοντα) ή τυφλά άκρα. Οι χρησιμοποιούμενη πλασμιδιακοί φορείς καθίστανται γραμμικοί μετά από πέψη με ένζυμα περιορισμού, οπότε είναι δυνατή η ενοποίηση τους με κατάλληλο τμήμα DNA μέσω της λιγάσης. Ο πλασμιδιακός φορέας καθώς και το κλάσμα DNA, του οποίου η κλωνοποίηση επιδιώκεται απομονώνονται και καθαρίζονται από gel αгарόζης όπως περιγράφηκε στην [παράγραφο 2.2.4](#) “Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από gel αгарόζης”. Στην συνέχεια μέσω ηλεκτροφόρησης μέρους των νουκλεϊκών οξέων και με την χρήση Ladder

(generuler #SM0331 της Thermo Scientific) προσδιορίζεται η συγκέντρωση τους ώστε να υπολογιστούν οι ποσότητες πλασμιδίου και κλάσματος DNA που θα ενωθούν με την T₄ λιγάση.

- Οι ποσότητες που θα συμμετάσχουν στη αντίδραση υπολογίζονται από τον τύπο:

$$\frac{\text{ng of vector} \times \text{kb size of insert}}{\text{kb size of vector}} \times \text{insert: vector molar ratio (3:1 or 5:1)}$$

= ng of insert

- Μια τυπική αντίδραση με T₄ λιγάση περιέχει:

Linear Vector	20 ng
Insert DNA	3:1 or 5:1 molar ratio over vector
10X DNA Ligase buffer	2μL
T ₄ DNA Ligase	1 u
PEG(4000, 50%)	2
ddH ₂ O	Up to 20 μL
Total	20μL

- Αφού αναμιχθούν καλά όλα η αντίδραση επωάζεται από τους 16-22°C για 4-12 ώρες.

2.4.7 Ημι-ποσοτικό RT-PCR (semi-quantitative RT-PCR)

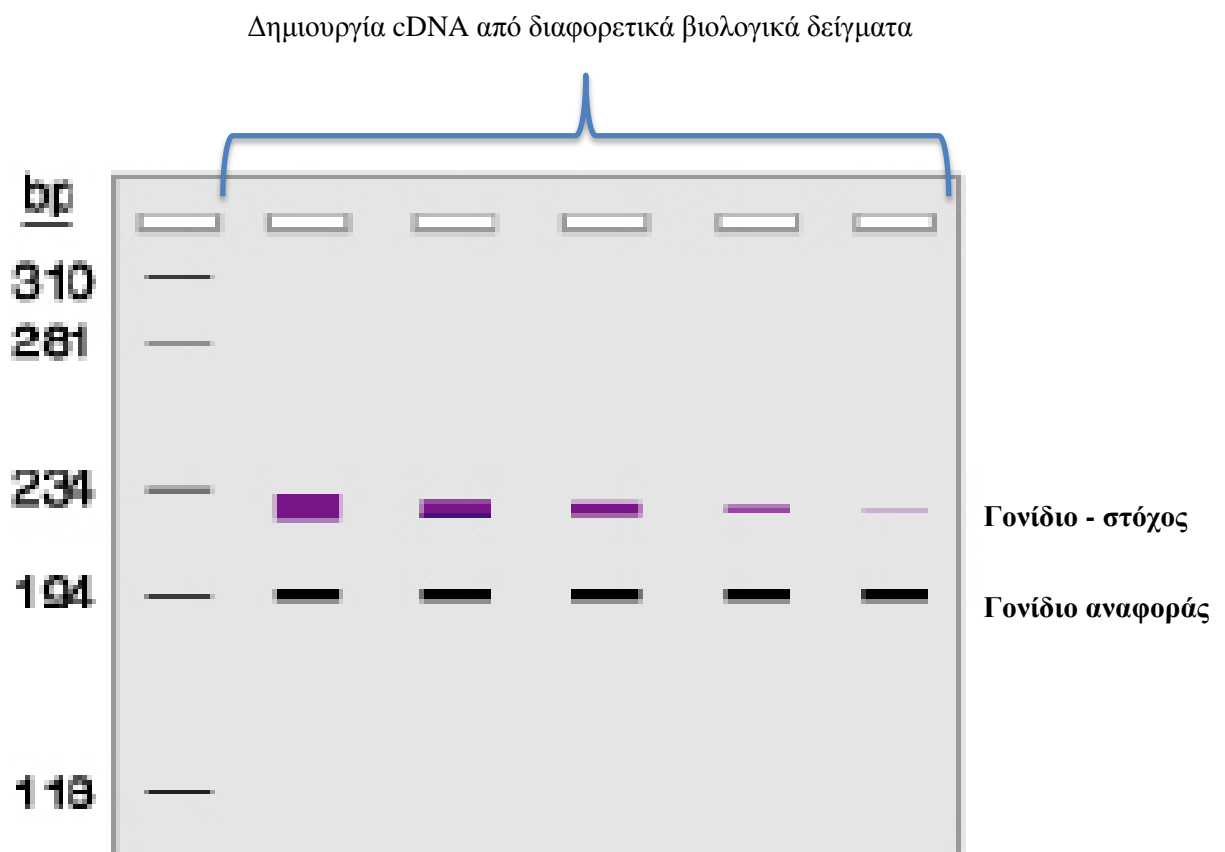
Η τεχνική RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction), αποτελεί την πλέον ευαίσθητη, από τις διαθέσιμες σήμερα μεθόδους, για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση μορίων RNA. Η τεχνική RT-PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί

αποτελεσματικά για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων RNA στόχων, από πολύ μικρότερα αρχικά δείγματα. Στην πράξη, η τεχνική είναι τόσο ευαίσθητη ώστε να επιτρέπει την ανίχνευση σπάνιων mRNA ακόμα και σε ολικό RNA που έχει απομονωθεί από μοναδικό κύτταρο. Στην συγκεκριμένη παράγραφο θα γίνει μια προσπάθεια να περιγραφεί μια από τις εφαρμογές της μεθόδου, το ημι-ποσοτικό PCR. Η διαδικασία της αντίδρασης περιγράφηκε στην [παράγραφο 2.4.2](#) “Σύνθεση cDNA αλυσίδας (RT)”.

Σημαντικό βήμα αυτής της PCR είναι η ποσοτικοποίηση της αρχικής μήτρας του PCR διότι παίρνουμε ως παραδοχή ότι η συγκέντρωση των προϊόντων της PCR μετά από συγκεκριμένο αριθμό κύκλων ενίσχυσης, εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση της αρχικής μήτρας. Στο τέλος τα επίπεδα mRNA μπορούν να συγκριθούν με συγκεκριμένα επίπεδα mRNA αναφοράς.

Στην συγκεκριμένη πειραματική εργασία προσπαθήσαμε να γίνει η σχετική εκτίμηση της έκφρασης ίδιων γονιδίων ανάμεσα σε διαφορετικά βιολογικά δείγματα (διαφορετικά χρονικά στάδια μετά την επαγωγή stress). Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιείτε ένα γονίδιο του οποίου τα επίπεδα έκφρασης δεν μεταβάλλονται μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων RNA (house keeping genes). Με τον τρόπο αυτό, ρυθμίζεται η ποσότητα του cDNA η οποία θα χρησιμοποιηθεί σε κάθε αντίδραση, έτσι ώστε να λαμβάνεται σταθερή ποσότητα από το προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου αναφοράς. Η διαδικασία αυτή μας επιτρέπει να συμπεραίνουμε ότι τυχόν διαφορές στην ποσότητα του προϊόντος ενίσχυσης του μεταγραφήματος στόχου, οφείλονται στη διαφορική έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου στα διαφορετικά δείγματα και όχι σε διαφορετικές ποσότητες ολικού cDNA που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της ακτίνης, το οποίο εκφράζεται σταθερά μέσα στα φυτικά κύτταρα λόγω τους σημαντικού ρόλου στον κυτταροσκελετό των κυττάρων. Οι αντιδράσεις των PCR τόσο των μεταγραφημάτων στόχων όσο και του γονιδίου αναφοράς πρέπει να τερματίζουν ενόσω ακόμα η συσσώρευση των προϊόντων ενίσχυσης βρίσκεται στην εκθετική

φάση. Σε αντίθετη περίπτωση οι διαφορές στην συσσώρευση προϊόντων που οφείλονται στην αρχική διαφορετική συγκέντρωση της αρχικής μήτρας, εξομαλύνονται με την είσοδο των αντιδράσεων στην στατική φάση και επομένως τα αποτελέσματα δεν είναι αληθινά. Μετά τις PCRs τα αποτελέσματα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης (εικόνα 2.2). Επομένως στην εικόνα 2.2 θα ισχυριζόμασταν ότι το γονίδιο-στόχος στο 1^ο δείγμα εκφράζεται πιο πολύ στις αντίστοιχες συνθήκες συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα.



Εικόνα 2. 2 semi-quantitative PCR

2.5 Βακτήρια κύτταρα και Μετασχηματισμός

Στην διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικά είδη βακτηρίων, το βακτήριο της *Escherichia coli*, το στέλεχος DH5a το οποίο παρουσιάζει υψηλή ικανότητα μετασχηματισμού και το στέλεχος *Agrobacterium tumefaciens* GV3101.

2.5.1 Υγρές και στερεές καλλιέργειες των βακτηρίων

Τα βακτήρια μεγαλώνουν σε υγρά ή στερεά θρεπτικά μέσα LB με την προσθήκη των κατάλληλων αντιβιοτικών τα οποία εξαρτώνται από τα πλασμίδια που μεταφέρουν και τους προσδίδουν την αντίστοιχη ανθεκτικότητα. Τα *E.coli* αναπτύσσονται στους 37°C και χρειάζονται 12 ώρες ενώ τα *A.tumefaciens* αναπτύσσονται στους 28°C και χρειάζονται 24 ώρες. Στις υγρές καλλιέργειες είναι χρήσιμο να σταματάμε την ανάπτυξη όταν τα βακτήρια βρίσκονται στην εκθετική φάση.

2.5.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli* με πλασμιδιακό DNA

- Τα 200μL δεκτικών κυττάρων DH5a τα οποία έχουν ξεπαγώσει από τους -80°C αναμιγνύονται με το μείγμα του Ligation ([παράγραφος 2.4.6](#)) σε καθαρό Eppendorf tube.
- Το μείγμα επωάζεται στον πάγο για 30 λεπτά.
- Ακολουθεί θερμικό σοκ του δείγματος για 3 λεπτά στους 42°C αυστηρώς.

- Προστίθεται θρεπτικό LB στο tube και αφήνονται τα κύτταρα για ανάκαμψη στους 37°C για 1 ώρα.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13000rpm για 30 δευτερόλεπτα.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται ελαφρώς σε 100-200 μ L LB.
- Το δείγμα επιστρώνεται σε στερεό θρεπτικό μέσο LB. Σε περίπτωση χρήσης πλασμιδιακού φορέα που φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης υπάρχει δυνατότητα επιλογής μπλε/άσπρων αποικιών. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη στο θρεπτικό μέσω X-gal και του παράγοντα IPTG που δρα σαν επαγωγέας του υποκινητή του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης, λίγο πριν την επίστρωση των δειγμάτων. Επομένως αν η αντίδραση της ενοποίησης των επιθυμητών κλασμάτων DNA πλασμιδίου δεν είναι επιτυχημένη, θα αναπτυχθούν μπλε αποικίες.
- Τα τριβλία επωάζονται στους 37°C για 12-16 ώρες.

2.5.3 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens* με ηλεκτροπόρωση

- Τα 40 μ L των δεκτικών κυττάρων GV3101 προστίθενται πλασμιδιακό DNA που έχει απομονωθεί από κύτταρα *E.coli* μέσω κολώνας ΚΙΤ ([παράγραφος 2.2.3](#)) και αναμιγνύονται ελαφρώς. Για να επιτύχει η διαδικασία είναι σημαντικό να μην περιέχονται στο DNA άλατα και για αυτό το λόγο προτιμάται απομόνωση πλασμιδίου με ΚΙΤ. Εναλλακτικά στην απομόνωση με αλκαλική λύση κάνουμε δεκαδικές αραιώσεις στο δείγμα πριν το transformation.
- Αφήνουμε το Eppendorf για 5 λεπτά στον πάγο.
- Μεταφέρουμε το μείγμα σε παγωμένη κυβέττα διαμέτρου 0,2cm και τοποθετείται στο μηχάνημα της BioRad Gene PulserII.
- Πραγματοποιείται εφαρμογή ηλεκτρικού παλμού. Οι παράμετροι για το συγκεκριμένο σύστημα είναι: χωρητικότητα 25 μ F, αντίσταση 400 Ω ή 600 Ω και ηλεκτρικό πεδίο 1,8kV χρονικής διάρκειας 8-12msec.

- Στην συνέχεια με ταχύτητα προσθέτουμε LB στην κυβέτα και μεταφέρουμε όλο το μείγμα σε καθαρό Eppendorf tube.
- Τα κύτταρα για να ανακάμψουν από το stress επωάζονται για 3 ώρες στους 28°C και ανακινούνται ανά 30 λεπτά.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 10000rpm και επαναδιαλύεται το ίζημα σε 100-200μL θρεπτικού μέσου LB.
- Ολόκληρη η ποσότητα του δείγματος επιστρώνεται σε τριβλίο με θρεπτικό μέσο LB, που περιέχει ως μέσο επιλογής κατάλληλα αντιβιοτικά για την επιλογή του *Agrobacterium* , του πλασμιδίου Ti και του δυαδικού πλασμιδιακού φορέα.
- Μονές αποικίες βακτηρίων θα εμφανιστούν μετά από 48 ώρες, ύστερα από επώαση στους 28°C.

2.5.4 Αποθήκευση για μεγάλα χρονικά διαστήματα βακτηριακών κυττάρων

Μονή αποικία βακτηριακού στελέχους, το οποίο πρόκειται να αποθηκευθεί, αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB (παρουσία των ανάλογων αντιβιοτικών) στους 37°C για 12 ώρες για το *Escherichia coli* και στους 28°C για 24 ώρες όσον αφορά το *Agrobacterium tumefaciens*.

- Σε φιαλίδιο eppendorf μεταφέρονται 600μl από την επιθυμητή καλλιέργεια.
- Προστίθενται 300μl αποστειρωμένης γλυκερόλης 99%.
- Το δείγμα αναμειγνύεται έντονα μέχρι να ομογενοποιηθούν οι δύο φάσεις.
- Τέλος, αποθηκεύεται στους -80°C.

2.5.5 Παροδικός μετασχηματισμός φύλλων καπνού *Nicotiana benthamiana* (Agroinfiltration)

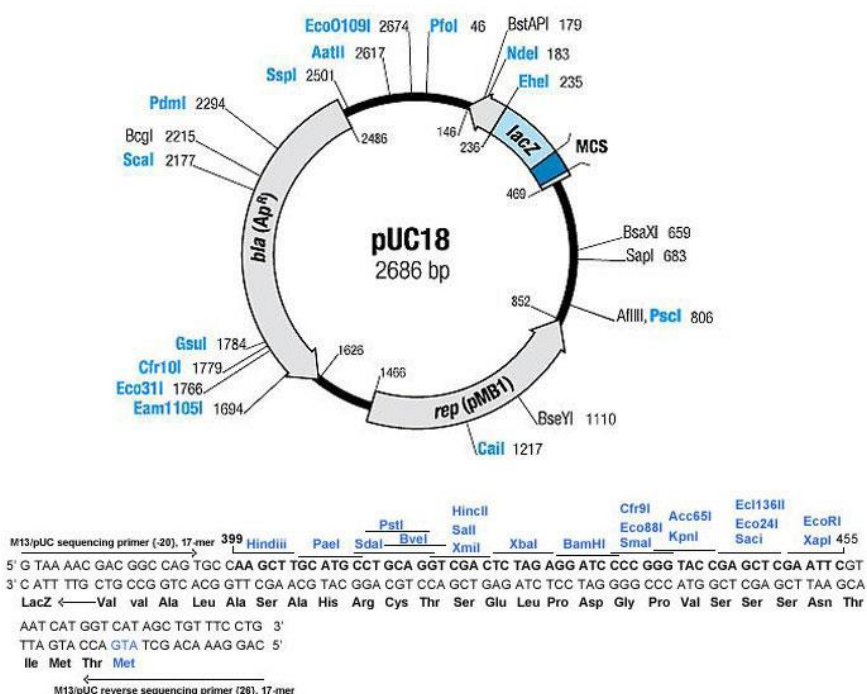
Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο δημιουργούνται διαλύματα για να διαχυθούν στο κάτω μέρος των φύλλων με την χρήση σύριγγας. Εκτός από τις κατασκευές που θέλουμε να μετασχηματίσουμε τα φύλλα καπνού χρησιμοποιείται και άλλη μια κατασκευή που ονομάζεται P19. Ο ρόλος αυτών των βακτηρίων είναι να απενεργοποιούν την άμυνα του φυτού ώστε να επιτρέψουν στο δικό μας ξένο διαγονίδιο να μετασχηματίσει το φυτό (O.Vionnet *et al* 2002).

Διαδικασία:

- 1,5 mL υγρής καλλιέργειας τοποθετείται σε erpendorf και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 3.600 στροφές/λεπτό.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και ξεπλένεται προσεκτικά το ίζημα με 500 μ L Dilution Buffer χωρίς να διαλυθεί το ίζημα,
- Τα κύτταρα επαναιωρούνται με Dilution Buffer προσεκτικά χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες. Χρησιμοποιείται όση ποσότητα διαλύματος θεωρείται αναγκαία ώστε τα κύτταρα να είναι αρκετά συμπυκνωμένα.
- Τα κύτταρα κάθε κατασκευής αραιώνονται 1:50 και φωτομετρούνται στα 600nm.
- Κατασκευή ενέσεων: Μέσω των αποτελεσμάτων της φωτομέτρησης των αραιωμένων βακτηριακών διαλυμάτων, υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των πυκνών. Στο τελικό διάλυμα πρέπει οι κατασκευές (constructs) να έχουν οπτική πυκνότητα (O.D) 0,7 ενώ το P19 1. Κατ' επέκταση υπολογίζονται οι ποσότητες construct-p19 που πρέπει να αναμιχθούν και ο όγκος συμπληρώνεται με Dilution buffer. Στο τέλος προστίθενται acetosyringone σε αναλογία 1,5 μ L/mL ένεσης.
- Τα διαλύματα αφήνονται για 3 ώρες στους 28°C.
- Με το πέρας των 3 ωρών πραγματοποιείται η έγχυση των αγροβακτηρίων με τη βοήθεια σύριγγας (χωρίς τη βελόνα) σε φύλλα καπνού. Η έγχυση των αγροβακτηρίων γίνεται στην κάτω επιφάνεια του φύλλου του καπνού.
- Τα φύλλα στα οποία πραγματοποιήθηκε έγχυση βακτηρίων μαρκάρονται με κλωστή.
- Μετά το πέρας των 3 ημερών συνήθως παρατηρείται η έκφραση των διαγονιδίων στα φύλλα του καπνού.

2.5.6 Πλασμιδιακοί φορείς και φορείς έκφρασης

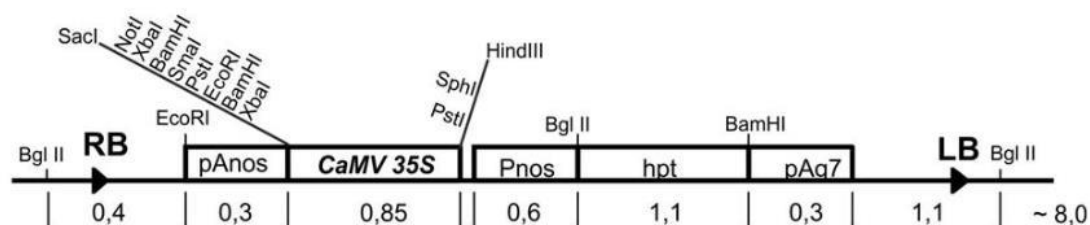
Σε όλα τα πρώτα στάδια υποκλωνοποιήσεων χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pUC18. Έχει μέγεθος 2.686 ζεύγη βάσεων, γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμικικίνη και το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης που επιτρέπει την επιλογή μπλε/άσπρων αποικιών για την επιβεβαίωση κλωνοποίησης του κλάσματος DNA που μας ενδιαφέρει ([παράγραφος 2.5.2](#)) (εικόνα 2.3).



Εικόνα 2. 3 Πλασμιδιακός φορέας PUC18 και η αλληλουχία του πολυσυνδέτη

Για την έκφραση του γονιδίου της β-γλυκοσιδάσης στα κύτταρα του καπνού είτε για να εξεταστεί ενζυμική δραστηριότητα είτε για την παρατήρηση του γονιδίου με μικροσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιήθηκε ο δυαδικός φορέας 35S-pGPTV-hpt. Ο φορέας αυτός επιτρέπει την καθολική έκφραση του γονιδίου της OeGLU λόγω της παρουσίας του προαγωγέα CaMV35S που έχει απομονωθεί από τον ιό του

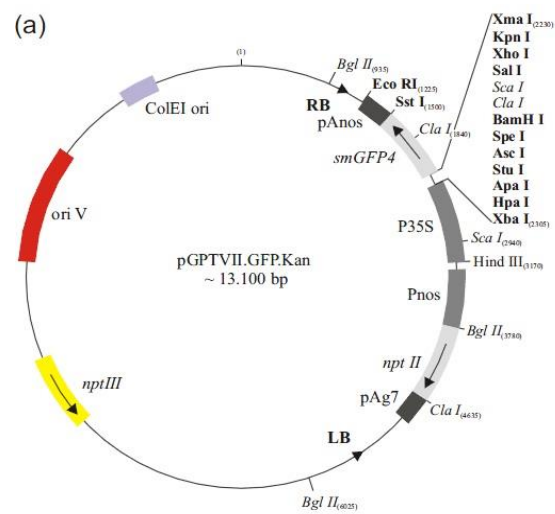
μωουσαϊκού του κουνουπιδιού. Επιπλέον περιέχει γονίδιο που του δίνει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη. Στην εικόνα 2.4 παρουσιάζεται η περιοχή μεταξύ των συνοριακών του φορέα (T-DNA περιοχή).



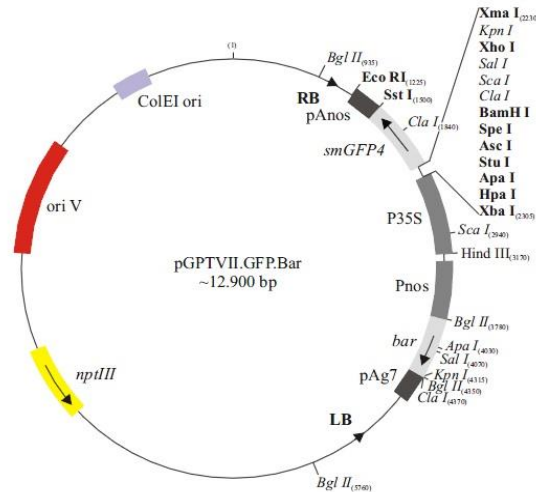
Εικόνα 2. 4 T-DNA περιοχή του δυαδικός φορέας 35S-pGPTV-HPT

Τέλος χρησιμοποιήθηκαν άλλοι 2 πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης που επιτρέπουν την οπτικοποίηση μέσω μικροσκοπίας φθορισμού αλληλεπίδραση πρωτεϊνών, ο pSPYNE και ο pSPYCE (εικόνες 2.5 και 2.6). Η τεχνική αυτή ονομάζεται BiFC (bimolecular fluorescence complementation). Οι πλασμιδιακοί φορείς που κατασκευάστηκαν για αυτού του είδους τις αναλύσεις, έχουν κλωνοποιημένο μισό γονίδιο που κωδικοποιεί για την φθορίζουσα πρωτεΐνη YFP ο καθένας. Με αποτέλεσμα ο pSPYNE να επιτρέπει την έκφραση του N-τελικού άκρου της πρωτεΐνης και 155 αμινοξέα της ακόμα, ενώ ο pSPYCE 86 αμινοξέα και το C-τελικό άκρο της φθορίζουσας πρωτεΐνης. Επομένως οι πρωτεΐνες στόχοι που θα κλωνοποιηθούν στον εκάστοτε πλασμιδιακό φορέα σε ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο με το διαιρεμένο(split) YFP μπορούν να εξεταστούν αν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω παρατήρησης *in vivo* σε ζωντανά κύτταρα λόγω του φθορισμού που θα εκπέμπει η πρωτεΐνη YFP (M. Walter *et al*, 2004). Η διαδικασία αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι τα κλάσματα της πρωτεΐνης του YFP όταν έρθουν πολύ κοντά παίρνουν την στερεοδομή που χρειάζεται ώστε να δώσουν φθορισμό. Επιπλέον στους συγκεκριμένους δυαδικούς φορείς περιέχεται το c-myc (pSPYNE) ή HA (pSPYCE) επίτοπο που επιτρέπει την ανίχνευση της εκφραζόμενης πρωτεΐνης στόχο που έχει συντηγηθεί σε εκχυλίσματα κυττάρων, καθώς και τον 35S ισχυρο προαγωγέα που επιτρέπει την καθολική έκφραση των κλωνοποιημένων πρωτεϊνών. Τέλος η επιλογή

των βακτηρίων που φέρουν τα συγκεκριμένα πλασμίδια γίνεται μέσω καναμυκίνης λόγω της ύπαρξης τους αντίστοιχου γονιδίου σε αυτούς τους φορείς.



Εικόνα 2. 5 p.SPYNE



Εικόνα 2. 6 p.SPYCE

2.6 Μικροσκοπία Φθορισμού

Για την εξέταση των δειγμάτων του παροδικού μετασχηματισμού χρησιμοποιείται το μικροσκόπιο Olympus BX-50 (Tokyo, Japan) εξοπλισμένο με φθορισμό και ποικιλία φίλτρων. Ο φθορισμός πρωτεΐνης-μάρτυρα YFP, εντοπίστηκε με το φίλτρο filter #41017, Endow GFP Bandpass Emission Filter (Chroma Technology Corp., Battleboro, USA). Για τον φθορισμό χλωροφύλλης στις επιδερμίδες φύλλων *N. benthamiana*, χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο ροδαμίνης U-MSWG (Olympus, Tokyo, Japan). Επίσης χρησιμοποιήθηκε και το φίλτρο Nomarski για τη φωτογράφιση των δειγμάτων σε πραγματικές συνθήκες. Οι φωτογραφίες λήφθηκαν με την κάμερα Olympus DP71 και αποθηκεύτηκα με τη βοήθεια του προγράμματος Cell^A (Olympus Soft Imaging Solutions, Germany). Η επεξεργασία των φωτογραφιών έγινε με το πρόγραμμα Adobe Photoshop CS5 (version 12.0).

2.7 Διαλύματα

2.7.1 Θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης φυτών

Ingredients	Quantities (g per 100mL)
MS (including vitamins, DUCHEFA)	0,22
D - Sucrose	1
MES - monohydrate	0,05
Agarose/Phytigel	0,6/ 0,3
ddH ₂ O	Up to 100mL

- MS: αποτελεί μίγμα μικροστοιχείων και βιταμινών που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των φυτών.
- Σουκρόζη: συνιστά την πηγή των απαραίτητων υδατανθράκων.
- MES: χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση του pH του θρεπτικού διαλύματος.
- Αγαρόζη/ Phytigel: αποτελεί το σταθεροποιητικό μέσο του υποστρώματος.

Η τελική ρύθμιση της τιμής του pH= 5,7 του υποστρώματος πραγματοποιείται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος KOH 1N και μέτρηση με pHμετρο, μετά την ομογενοποίηση των υπόλοιπων συστατικών, εξαιρουμένου του στεροποιητικού μέσου. Το θρεπτικό αποστειρώνεται σε θερμοκρασία 120°C και πίεση 1,5 atm για περίπου 20 λεπτά. Στη συνέχεια αφήνεται να πέσει η θερμοκρασία του, τοποθετείται σε τρυβλία petri με χρήση απαγωγού νηματικής ροής, όπου επικρατούν ασηπτικές συνθήκες, και φυλάσσεται στους 4°C.

2.7.2 Διαλύματα απομόνωσης ριβονουκλεϊκών οξέων

- **RNA extraction Buffer:** 100 mM Tris-HCL (pH = 9.5), 0.5% SDS w/v
- **Sevag:** (24 : 1 χλωροφόρμιο – ισοαμυλική αλκοόλη)
- **Φαινόλη** (pH 8.0)

2.7.3 Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης

- **P1** ρυθμιστικό διάλυμα επαναιώρησης: 50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0 και 100μg/ml RNάση.
- **P2** ρυθμιστικό διάλυμα λύσης: 0.2M NaOH, SDS 1% (w/v).
- **P3-** 3M/5M CH₃COOK: 60ml 5M οξικού καλίου pH 4.8-5.2 αναμιγνύονται με 11,5ml οξικού οξέος και 28,5ml ddH₂O.

2.7.4 Διαλύματα ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων

Πηκτή αγαρόζης 1%

- 1g Αγαρόζης
- 2ml 1xTAE
- 5μl βρωμιούχου αιθιδίου
- 98ml ddH₂O

Τελικός όγκος 100ml

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης

- 20ml 1xTAE
- 50μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr)
- 980ml ddH₂O

Τελικός όγκος 1000ml

TAE (50x) : 100ml από 0.5M EDTA pH=8, 57ml CH₃COOH, 242gr Tris base σε τελικό όγκο 1 lt

EtBr : 10mg/ml (φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο δοχείο)

Loading dye 6x: 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 40% (w/v) sucrose

2.7.5 Διαλύματα χειρισμού με Dnase

RQ1 RNase-Free DNase (1u/μl)

- Storage Buffer: 10mM HEPES (pH 7.5), 50% (v/v) glycerol, 10mM CaCl₂, 10mM MgCl₂

RQ1 DNase Reaction Buffer (10X)

- 400mM Tris-HCL (pH 8.0)
- 100mM MgSO₄
- 10mM CaCl₂

2.7.6 Διαλύματα αντίδρασης RT

SuperscriptTM Reverse Transcriptase (200u/μl)

- Storage Buffer: 20mM Tris-HCL (pH 7.5), 100mM NaCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 0.01% (v/v) NP-40, 50% (v/v) glycerol

5X First-Strand Buffer

- 250 mM Tris (pH 8.3)
- 15 mM MgCl₂
- 375 mM KCl

DTT (dithiothreitol, 0.1M)

RNase Out (40u/ μl)

- Storage Buffer: 20mM Tris-HCL (pH 8.0), 50mM KCl, 0.5mM EDTA, 8mM DTT, 50% (v/v) glycerol

2.7.7 Διαλύματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

dNTPs: Παρασκευάζεται 2mM διάλυμα dNTPs με ανάμιξη ίσων όγκων από τα stocks διαλύματα 100Mm dATP, dTTP, dCTP, dGTP.

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε όλη την πειραματική διαδικασία

Γονίδιο	Όνομα	Αλληλουχία 5'→3'	Tm°C
	T17XhoI	GTCGACCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	
OeGLU	ForKozak	CTCCCACCATGTTAGATATCCAAAGCAACGTCCTGAC	61,2
	ForKozakMluI	CTCCCACCATGTTAacgcgtGATATCCAAAGCAACGTCCT GAC	

	RevSPLIT	CAACTCGAGGGTGCTGCCTCTAAGCCTTTTACGAC	66,56
	dNLS-FLAG	TATCAATCCTTGTAGTCCTTGTGCATCGTCATCCTTGTAG TCGGTTTCAGATTTTTCAGGTTTCATTCTTCAATGG	61,56
YFP	YFP-LON-FOR	A A A C G C G T G G A G G T G G A G G T G G A G C T G	
	YFP-LON-REV	A A C G C G T G G C C C C A G C G G C C G C A G C A G	
Actin	Actin 2 (For)	AAGATGACCCAAATCATGTTTGAGAC	60°
	Actin 3 (Rev)	ACGACCTTGATCTTCATGCTGC	
HSR203J	NtHSR203-Fw	TGTGTCAGCCATGCTGATTGGT	60
	NtHSR203-Rv	GTTCTAGCTCCGATTTGCTCCGAT	
PR1	NtPR1A-Fw	TGCTAAGGCTGTTGAGATGTGGGTC	63
	NtPR1A-Rv	ACTGAACCCTAGCACATCCAACACG	
PR2	Nt-PR2-Fw	CGTTTAGGAACGATGCTAGG	55
	Nt-PR2-Rv	GAACCATCTTGTACCACCAC	
PR3	NtPR3-Fw	GCCATAGGAGTGGACCTGCTAAAC	58
	NtPR3-Rv	AAAAGACCTCTGGTTGCCGC	
PR5	NtPR5-Fw	TGCAACTTTGATGGTGCTGG	58
	NtPR5-Rv	CCGTGACATTTTCCAGGACC	
PAL	NtPAL-Fw	TCCCCTTGTCTACATTGCTGGTT	60
	NtPAL-Rv	TCAATTTGTCCGGGGTGATGCTTC	

CCoAOMT	NtCCo-Fw	ACACCCTATGGAATGGATCA	55
	NtCCo-Rv	CCTTGTTGAGTTCCAATACGA	
HIN1	NtHIN1-Fw	CTGCAACCCATGTAGCTGTC	55
	NtHIN1-Rv	GGTCGAAGAACGAGCCATAG	
RBOHA	NbRBOHA-Fw	CTGCTCAGGGCTGACGAAAACACCAAGAAA	61
	NbRBOHA-Rv	AGTACTCTTTCTCCTTTTCGGAGAAATCTT	
RBOHB	NbRBOHB-Fw	TTTCTCTGAGGTTTGCCAGCCACCACCTAA	58
	NbRBOHB-Rv	GCCTTCATGTTGTTGACAATGTCTTTAACA	
CDM1	NbCDM1-Fw	TTTCTTGCCTCCTATTTTAAACCTT	61
	NbCDM1-Rv	TCAATTTTCCAAACAGTGGATTTAT	

Phusion HF DNA Polymerase (2u/ µl)

- Storage Buffer: 20mM Tris-HCL (pH 7.4), 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 100mM KCl, 0.5% Tween 20, 0.5% Nonidet P40, 200µg/ml BSA, 50% (v/v) glycerol

Phusion HF Buffer (5X)

- 7.5 mM MgCl₂

DreamTaq DNA Polymerase (5u/µL)

- Storage Buffer: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 100 mM KCl, 0.5% (v/v) Nonidet P40, 0.5% (v/v) Tween 20 and 50% (v/v) glycerol.

DreamTaq Buffer

- 20 mM MgCl₂

2.7.8 Ligation

T₄ DNA Ligase Takara (2,8 weiss units/μL)

- Storage Buffer: 10 mM Tris-HCl (pH7.5), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50% Glycerol

10X T₄ DNA Ligase Takara Buffer

- 660 mM Tris-HCl, pH7.6, 66 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 1 mM ATP

2.7.9 Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τα βακτηριακά κύτταρα

Θρεπτικό μέσο LB υγρό και στερεό

- Θρεπτικό μέσο LB: εκχύλισμα ζύμης 0,5% (w/v), πεπτόνη 1% (w/v), NaCl 1% (w/v). Για στερεό θρεπτικό μέσο, προστίθεται και άγαρ 1.4% (w/v).

Αντιβιοτικά

- Ampicillin (αμπικιλίνη): 100mg/ml σε ddH₂O. Φυλάσσεται στους -20°C.
- Kanamycin (καναμυκίνη): 50mg/ml σε ddH₂O. Φυλάσσεται στους -20°C.
- Gentamicin (τζενταμυκίνη): 50mg/ml σε ddH₂O. Φυλάσσεται στους -20°C.
- Rifampicin (ριφαμπικίνη): 25mg/ml σε μεθανόλη. Φυλάσσεται στους -20°C.

X-gal

20 mg/ml X-gal σε DMFO. Αποθηκεύεται στους -20°C.

IPTG

200 mg/ml IPTG σε H₂O. Αποθηκεύεται στους -20°C.

Agroinfiltration

- Dilution buffer: 10 mM MgCl₂, 10 mM MES, pH: 5.6.
- Ακετοσυριγκόνη: το πυκνό διάλυμα ακετοσυριγκόνης έχει συγκέντρωση 100 mM και φυλάσσεται στους -20 °C.

3. Αποτελέσματα

3.1 Κατασκευές της β-γλυκοσιδάσης με διαγραφή του προβλεπόμενου NLS (Nuclear Localization Signal)

Στην διπλωματική εργασία της Παρασκευής Τσέρου “Υποκυτταρική τοποθέτηση του ενζύμου β-γλυκοσιδάσης της *Olea europaea L.*” (Εργ. Μορ. Βιολ., Γ.Π.Α, Αθήνα 2014) αποδείχθηκε ότι η υποκυτταρική τοποθέτηση του γονιδίου είναι ο πυρήνας. Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, η *in silico* ανάλυση της αμινοξικής ακολουθίας του OeGLU μέσω του προγράμματος [cNLS Mapper](#), προβλέπει ότι υπάρχει σινιάλο πυρηνικής τοποθέτησης (Nuclear Localization Signal - NLS) μεταξύ των αμινοξέων 542–550 (DRRKRLRGS), στο καρβοξυλιακό-άκρο του ενζύμου (εικόνα 3.1). Για τον έλεγχο της υπόθεσης, επιλέξαμε να γίνουν δύο ανεξάρτητες κατασκευές για το μετάλλαγμα της OeGLU, στις οποίες έγινε διαγραφή της περιοχής που κωδικοποιεί για το NLS. Η μία γίνεται σε σύντηξη με την φθορίζουσα πρωτεΐνη YFP, που θα επιτρέπει την παρατήρηση της υποκυτταρικής τοποθέτησης μέσα στο κύτταρο μέσω μικροσκοπίας φθορισμού. Στην δεύτερη δεν θα προστεθεί η φθορίζουσα πρωτεΐνη ώστε η κατασκευή να χρησιμοποιηθεί για ενζυμικές αντιδράσεις και άλλου είδους πειράματα χωρίς το πρόσθετο βάρος του YFP (~28kDa). Και οι δύο κατασκευές στο καρβοξυλιακό άκρο φέρουν τον επίτοπο FLAG που επιτρέπει να γίνει ανοσοανίχνευση της πρωτεΐνη. Τα διαγονίδια βρίσκονται υπό τον έλεγχο του καθολικού προαγωγέα CaMV35S(Εικόνα3.7)

cNLS Mapper Result

Predicted NLSs in query sequence	
MDIQSNVLTITSGSTPTDTSSNGQAAKSTKERIKRSDFFPSDFVFGAATAS	50
YQVEGAWNEGKGMNSNDYFTQSQPGGISDFSNGTIAIDHYNMFKDDVVV	100
MKKLGLKAYRFSLSWPRI LPGGRLCHGVSKEGVQFYNDLIDALLAADIEP	150
YITIFHWDIPQCLQLEYGGFLHERVVKDFIEYSEICFWFEGDRVKYWITL	200
NEPWSFTVQGYVAGAFP PNRGVT PKDTEETQKHARLHRGGKLLAAFYKYG	250
NPGTEPYKVAHNLI LCHAHAVDIYRTKYQESQGGKIGITNCISWNEPLTD	300
SQEDKDAATRGNDFMLGWFE PVVTGEYPESMIKYVGDRLPKFSEKEEKL	350
VKGSYDFLGINYTSTYTSDDPTKPTTDSYFTDSHTKTSHERNKVPIGAQ	400
AGSDWLYIVPWGIYRVMVDMKKRYNDFVIYITENGVDENVDKSKTSTEAL	450
KDDIRIHQHQLYLYLKLAMDQGVNVKGYFIWSLFDNFEWAAGFSVRFV	500
MYVDYANGRYTRLPKRSVWWRNFLT KPTAVPLKNEPEKSEDRRKRLRGS	550
T	551

Predicted monopartite NLS		
Pos.	Sequence	Score
542	DRRKRLRGS	7.5

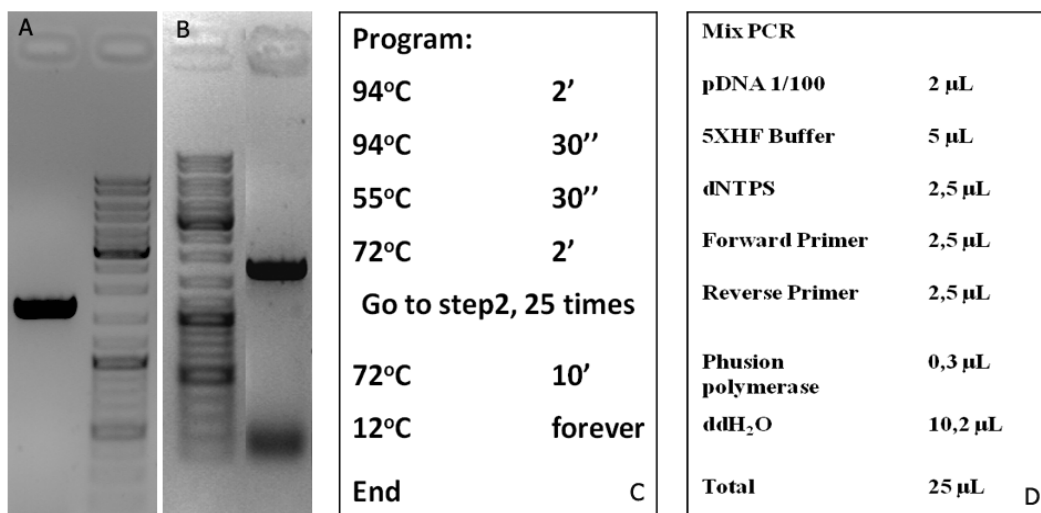
Predicted bipartite NLS		
Pos.	Sequence	Score
522	RNFLT KPTAVPLKNEPEKSEDRRKRLRGS	6.4

Εικόνα 3. 1 In silico ανάλυση μέσω του προγράμματος NLS Mapper

3.1.1 Ενίσχυση του γονιδίου της β-γλυκοσιδάσης με διαγραφή του NLS

Το γονίδιο της β-γλυκοσιδάσης ενισχύθηκε μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης από πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από τον κλώνο PUC18/For(MluI)-RevStop -όπως είχε δημιουργηθεί- (Παρασκευή Τσέρου, Αθήνα 2014). Στο πλασμίδιο pUC18 είναι κλωνοποιημένο cDNA της OeGLU με τροποποιημένο το Kozak για την ενίσχυση της έκφρασης του στα ετερόλογα συστήματα και έχει μέγεθος 1653bp. Τα ζευγάρια των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα Forkozak/ Δ NLS-FLAG και Forkozak(MluI)/ Δ NLS-

FLAG αντίστοιχα (Πίνακας 2.1). Η αντίδραση της PCR έγινε σε αραιωμένο πλασμιδιακό DNA 1/100 (Εικόνα 3.2).



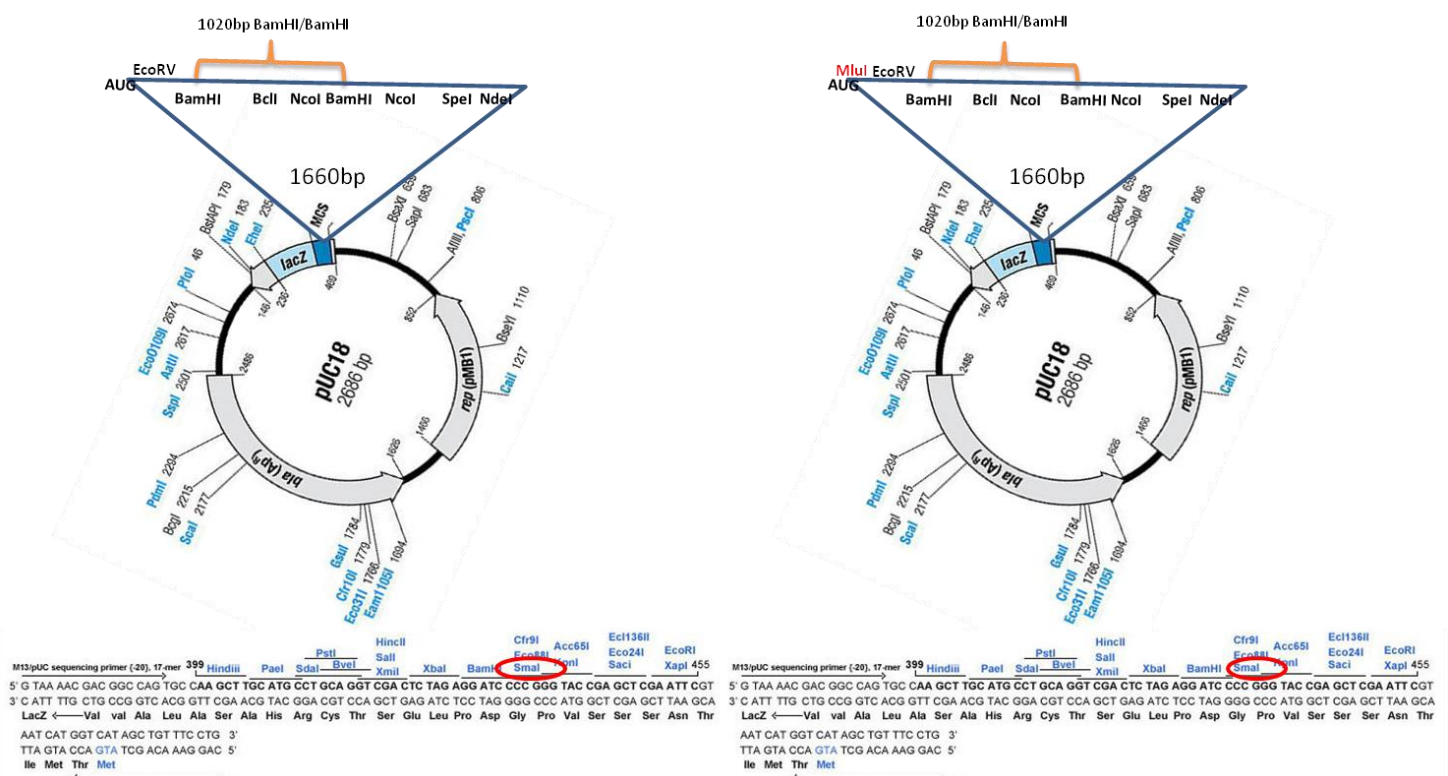
Εικόνα 3. 2 Ενίσχυση του γονιδίου της OeGLU με διαγραφή του NLS. Στις εικόνες A και B είναι εικόνα των προϊόντων της PCR Forkozak/ΔNLS-FLAG και Forkozak(MluI)/ΔNLS-FLAG αντίστοιχα (1% agarose gel). Στην εικόνα C βλέπουμε το αναλυτικό πρόγραμμα της PCR και στην D τα συστατικά της αντίδρασης.

Στο δεύτερο προϊόν της αντίδρασης (Εικόνα B 3.1) στο γονίδιο προστέθηκε μια θέση περιορισμού, η MluI, μέσω του Forward Primer που θα επιτρέψει στην συνέχεια της δημιουργίας της κατασκευής να συντηχθεί το YFP με το γονίδιο OeGLU/ΔNLS στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο.

3.1.2 Κλωνοποίηση του γονιδίου OeGLU/ΔNLS στον πλασμιδιακό φορέα PUC18

Τα προϊόντα της αντίδρασης (Εικόνα 3.2) αφού απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν από το gel αгарόζης κλωνοποιήθηκαν στην θέση SmaI του γραμμικού ύστερα από πέψη pUC18 μέσω της αντίδρασης ligation. Κατά τον μετασχηματισμό των *E.coli*

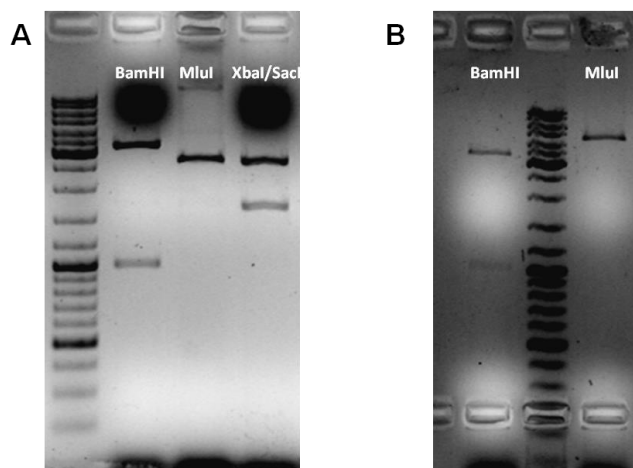
κυττάρων προστέθηκε στο θρεπτικό μέσω LB^{Amp} Xgal/IPTG που μας επέτρεψε την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων, μέσω του συστήματος της β-γαλακτοσιδάσης. Στην συνέχεια επιλέχθηκαν και καλλιεργήθηκαν μονές αποικίες θετικά μετασχηματισμένες σε υγρό θρεπτικό μέσο LB^{Amp} (ανεξάρτητα γεγονότα μετασχηματισμού), ώστε μέσω της απομόνωσης του πλασμιδιακού DNA και με την χρήση κατάλληλων ενζύμων περιορισμού να επιλεχθούν οι σωστοί κλώνοι (μονός αριθμός ένθεσης και σωστή φορά). Η επιθυμητή φορά και θέση κλωνοποίησης των δύο ενθέσεων παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3. 3 Περιγραφική απεικόνιση της κλωνοποίησης των δύο ενθέσεων στον pUC18 με την επιθυμητή φορά. Αριστερά απεικονίζεται η ένθεση με την πρόσθετη θέση MluI. Με κόκκινο έχει σημειωθεί η θέση που έχει κλωνοποιηθεί η ένθεση.

Η πέψη που μας επιτρέπει να εξακριβώσουμε την επιθυμητή φορά της ένθεσης αλλά και τον αριθμό των ενθέσεων έγινε με τη χρήση του ενζύμου BamHI. Η διπλή θέση αναγνώρισης μέσα στο γονίδιο αλλά και η θέση πάνω στον πολυσυνδέτη του pUC18 είναι οι λόγοι που μία πέψη επέτρεψε την επιλογή του σωστού κλώνου. Στην

συνέχεια επιλέχθηκε να γίνει πέψη με την MluI ώστε να εξακριβωθεί η εισαγωγή της θέσης με τον Primer καθώς και η διπλή πέψη XbaI/SacI που θα χρησιμοποιηθεί στην συνέχεια της κλωνοποίησης για την εισαγωγή του γονιδίου στον CaMV35S-pGPTV-HPT (Εικόνα 3.4).

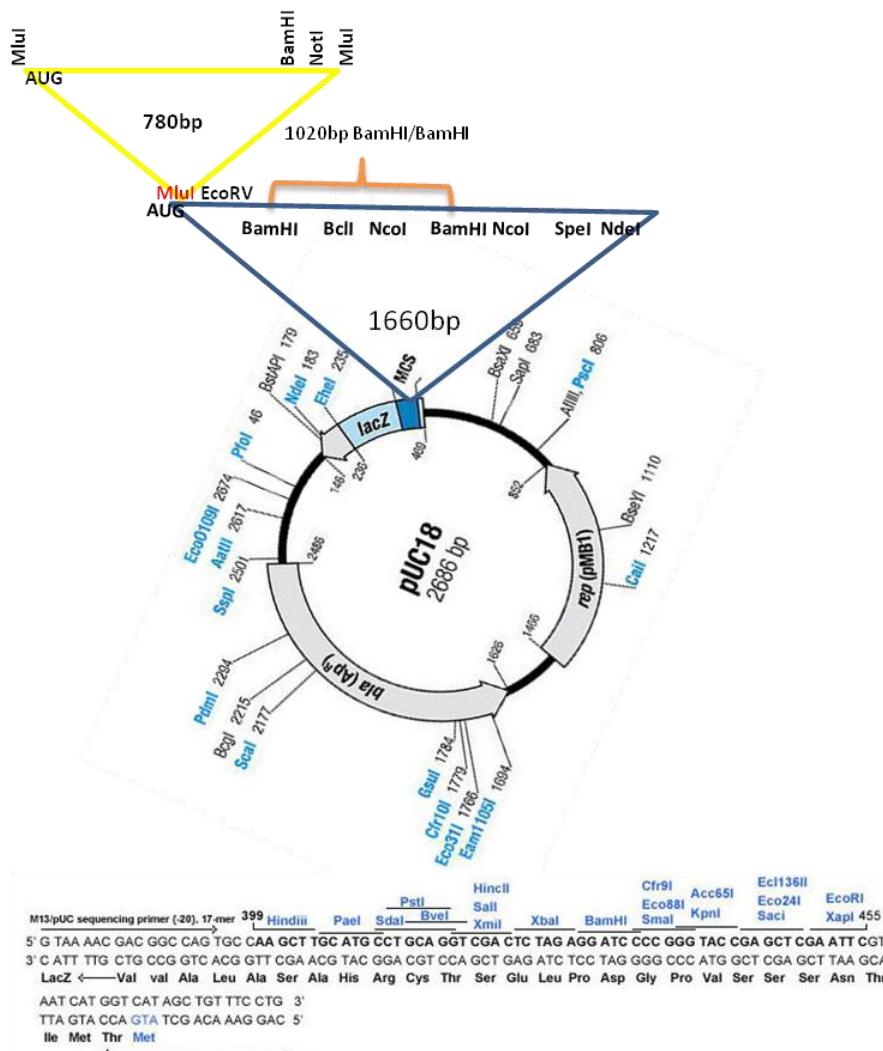


Εικόνα 3. 4 Τελικές πέψεις για την επιβεβαίωση των σωστών κλώνων. Στην εικόνα A βλέπουμε τις πέψεις επιβεβαίωσης του κλώνου pUC18/Forkozak-ΔNLS. Στην εικόνα B απεικονίζεται η επιβεβαίωση του κλώνου pUC18/Forkozak(MluI)-ΔNLS μέσω της πέψης BamHI που είναι ακριβώς η ίδια με την εικόνα A (1% agarose gel)

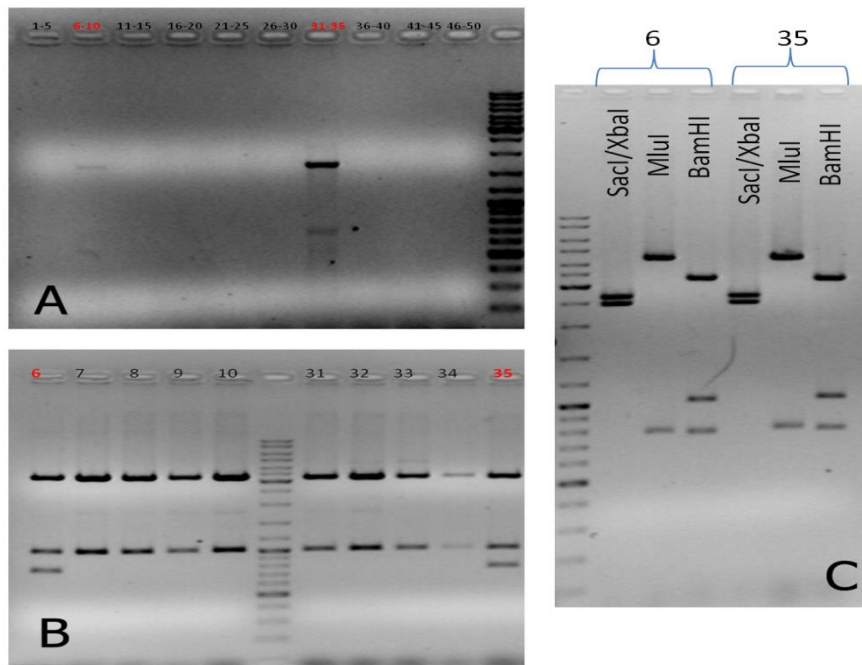
Στην εικόνα 3.4 A η πρώτη πέψη δείχνει την φορά και τον αριθμό ενθέσεων, επομένως δίνει 1020 bp που προκύπτουν από την διπλή θέση αναγνώρισης μέσα στο γονίδιο και 3300 bp από το υπόλοιπο γονίδιο και πλασμιδιακό DNA, η πέψη με MluI δίνει άκοπο διότι δεν έχει προστεθεί αλλά επαληθεύει ότι δεν έχουν μπερδευτεί οι κλώνοι (PUC18/Forkozak-ΔNLS και PUC18/Forkozak(MluI)-ΔNLS) και η διπλή πέψη XbaI/SacI αφορά θέσεις που βρίσκονται πάνω στο πλασμίδιο και θα χρησιμοποιηθούν στην συνέχεια της κλωνοποίησης. Στη εικόνα 3.4 B με την πέψη MluI δημιουργείται γραμμικό μόριο στις 4360bp (πλασμίδιο + γονίδιο) και επιβεβαιώνει ότι η θέση έχει προστεθεί μέσω του εκκινητή.

3.1.3 Υποκλωνοποίηση του YFP στο pUC18/Forkozak(Mlu)-ΔNLS

Παράλληλα, η πρωτεΐνη YFP απομονώθηκε με τη διαδικασία της πέψης με το ένζυμο MluI και από τον φορέα pUC19, στον οποίο βρισκόταν κλωνοποιημένη με άκρα MluI. Η ίδια πέψη πραγματοποιήθηκε και στον φορέα pUC18 που περιείχε το γονίδιο, με αποτέλεσμα να γίνει γραμμικό μόριο. Σε επόμενο στάδιο, τα δύο κομμάτια με συμπληρωματικά άκρα MluI που προέκυψαν, ενοποιήθηκαν με ligation. Η κατασκευή που προκύπτει περιγράφεται στην εικόνα 3.5. Η ένθεση του YFP έχει τυχαία φορά, όμως εμείς επιθυμούμε να έχει συγκεκριμένη φορά δεδομένου ότι κλωνοποιείται στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με την OeGLU και θέλουμε να εκφράζονται και τα δύο γονίδια ταυτόχρονα (Εικόνα 3.5). Για αυτό το λόγο μετά το μετασχηματισμό των *E.coli* κυττάρων εξετάσαμε μεγάλο αριθμό αποικιών μέσω PCR colonies. Στην συνέχεια ακολούθησαν διαγνωστικές πέψεις για να επιλεγεί ο σωστός κλώνος (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.5 Περιγραφική απεικόνιση της κλωνοποίησης του γονιδίου YFP στο πλασμίδιο pUC18/Forkozak(MluI)-ΔNLS με την επιθυμητή φορά.

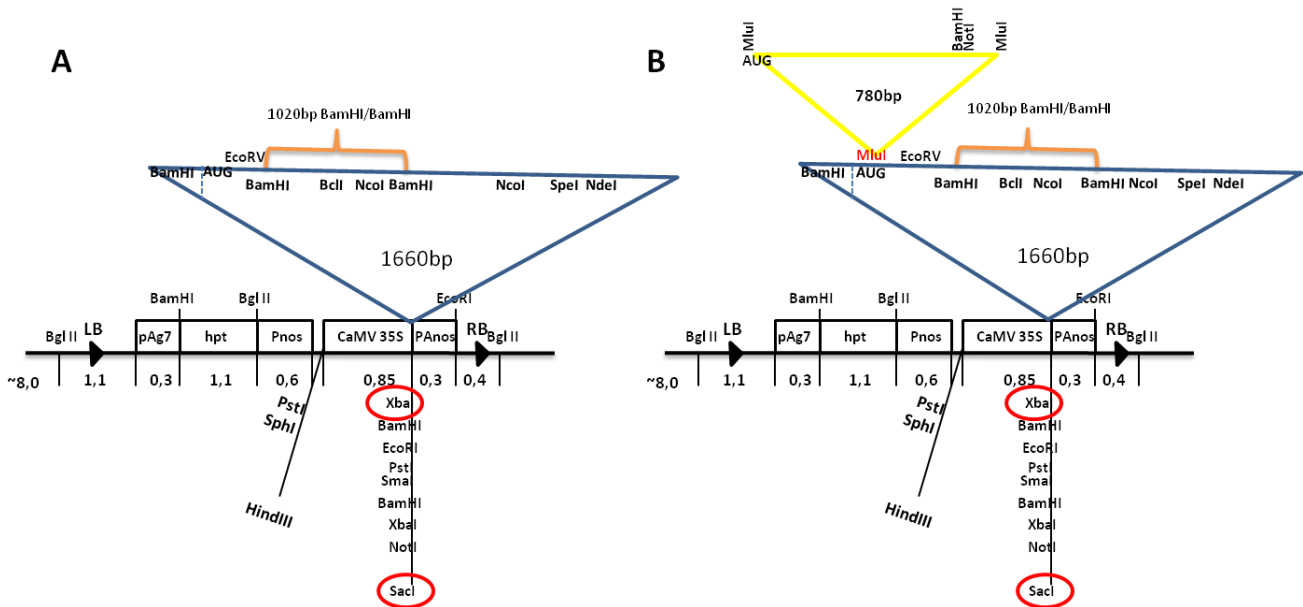


Εικόνα 3. 6 Υποκλωνοποίηση του YFP στον φορέα pUC18/Forkozak(MluI)-ΔNLSFLAG. Στην εικόνα A φαίνονται 2 θετικές πεντάδες μετά από την PCR colonies, η 1-6 και η 31-35 από τις συνολικά 50 αποικίες που εξετάστηκαν μέσω της μεθόδου. Στην εικόνα B είναι η πρώτη διαγνωστική πέψη με BamHI ώστε βρεθούν οι σωστοί κλώνοι με θετικούς τον 6 και τον 35. Στην εικόνα C παρουσιάζονται οι τελικές πέψεις για κάθε κλώνο ξεχωριστά με τα ένζυμα MluI, BamHI και η διπλή πέψη SacI/XbaI (1% agarose gels).

Κατά την διαδικασία του PCR colonies χρησιμοποιήθηκαν οι εκκνητές YFP-LONFOR και ο 5Sp1 (Πίνακας 2.1) που ενισχύουν την αλληλουχία του YFP μαζί με το γονίδιο της OeGLU (~1730bp). Κατά την τεχνική αυτή προκύπτουν μόνο 2 πεντάδες που δείχνουν να έχει ενισχυθεί το κομμάτι (Εικόνα 3.6 A). Απουσία του προϊόντος κατά την PCR αποδεικνύει, είτε την μη ένθεση του YFP, είτε την αντίθετη φορά. Στην συνέχεια για να εξακριβωθεί ποιός από τους 10 κλώνους έχει το YFP με την επιθυμητή φορά επιλέχθηκε να γίνει πέψη με την ενδονουκλεάση BamHI που αναγνωρίζει μία θέση μέσα στην αλληλουχία του YFP, δύο μέσα στο γονίδιο και μία

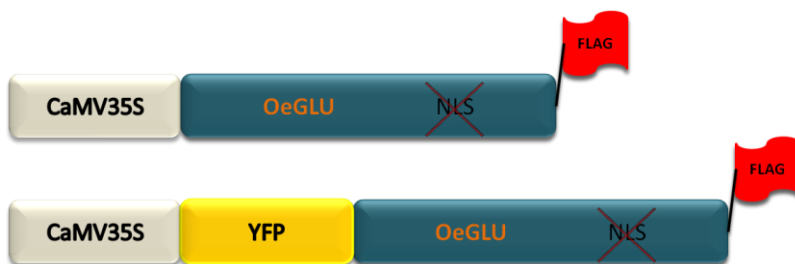
πάνω στο πλασμίδιο (Εικόνα 3.5). Επομένως προκύπτει μια μπάντα 740bp που προέρχεται από την θέση πάνω στον φορέα και στο YFP, μία στις 1020bp από τις δύο θέσεις πάνω στην OeGLU και μία στις 3300bp που είναι το μέγεθος του φορέα μαζί με το υπόλοιπο γονίδιο (Εικόνα 3.6B). Στην συνέχεια έγιναν και άλλες πέψεις για να εξακριβωθεί αν οι κλώνοι 6 και 35 είναι σωστοί για την συνέχεια της κατασκευής. Γι' αυτό τον λόγο επιλέχθηκε να γίνει η διπλή πέψη με XbaI/SacI που θα είναι και ο τρόπος που θα απομονωθεί και θα εισαχθεί στον δυαδικό φορέα (~2440bp +2700bp plasmid). Η πέψη με MluI δείχνει ότι έχει γίνει ένθεση του YFP και η BamHI εξηγήθηκε προηγουμένως (Εικόνα 3.6 C).

3.1.4 Κλωνοποίηση των ενθέτων OeGLU-ΔNLS-FLAG και YFP-OeGLU-ΔNLS-FLAG στον δυαδικό φορέα CaMV35S-pGPTV-HPT.

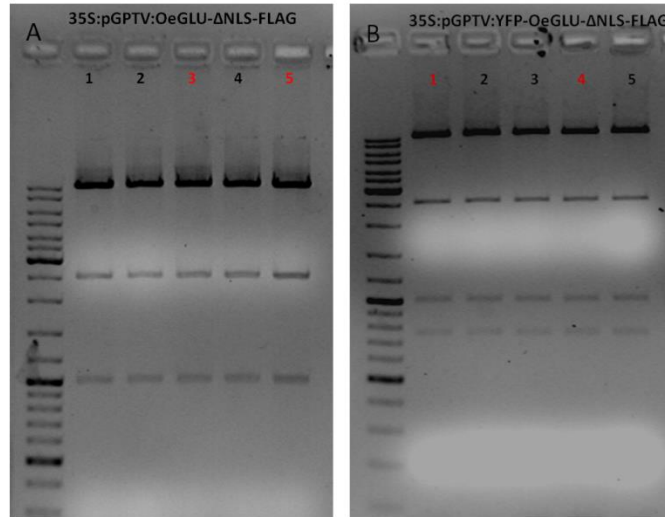


Εικόνα 3. 7 Περιγραφική απεικόνιση του γονιδίου OeGLU-ΔNLS-FLAG κλωνοποιημένο στον δυαδικό φορέα CaMV35S-pGPTV-HPT. Στην Α εικόνα κλωνοποιήθηκε χωρίς το YFP ενώ στην Β εικόνα με το YFP στις θέσεις SacI/XbaI που είναι σημασμένες με κόκκινο. Και οι δύο κατασκευές φέρουν μια έξτρα θέση αναγνώρισης BamHI από τον φορέα ρUC18.

Στο τελευταίο βήμα των κατασκευών τα γονίδια (OeGLU-ΔNLS-FLAG και YFP-OeGLU-ΔNLS-FLAG) απομονώνονται από του φορείς PUC18 με διπλή πέψη SacI/XbaI και αφού αναλυθούν σε 1% agarose gel καθαρίζονται με την μέθοδο του gel extraction. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τον CaMV35S-pGPTV-HPT. Επομένως τα κομμάτια έχουν πλέον συμπληρωματικά άκρα, ενώνονται με την διαδικασία του ligation, CaMV35S-pGPTV-HPT μαζί OeGLU-ΔNLS-FLAG και CaMV35S-pGPTV-HPT με YFP- OeGLU-ΔNLS-FLAG αντίστοιχα (Εικόνα 3.7). Στο τελευταίο βήμα η φορά του ενθέτου είναι συγκεκριμένη λόγω της χρήσης δύο διαφορετικών ενζύμων για την δημιουργία συμπληρωματικών άκρων. Κλωνοποιήθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να βρίσκονται υπό τον έλεγχο του καθολικού προαγωγές CaMV35S. Στην συνέχεια έγινε έλεγχος με τη χρήση του ενζύμου BamHI για την επιλογή των ιδανικών κλώνων (Εικόνα 3.9). Η τελικές κατασκευές απεικονίζονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3.8).



Εικόνα 3. 8 Σχηματική απεικόνιση των τελικών κατασκευών



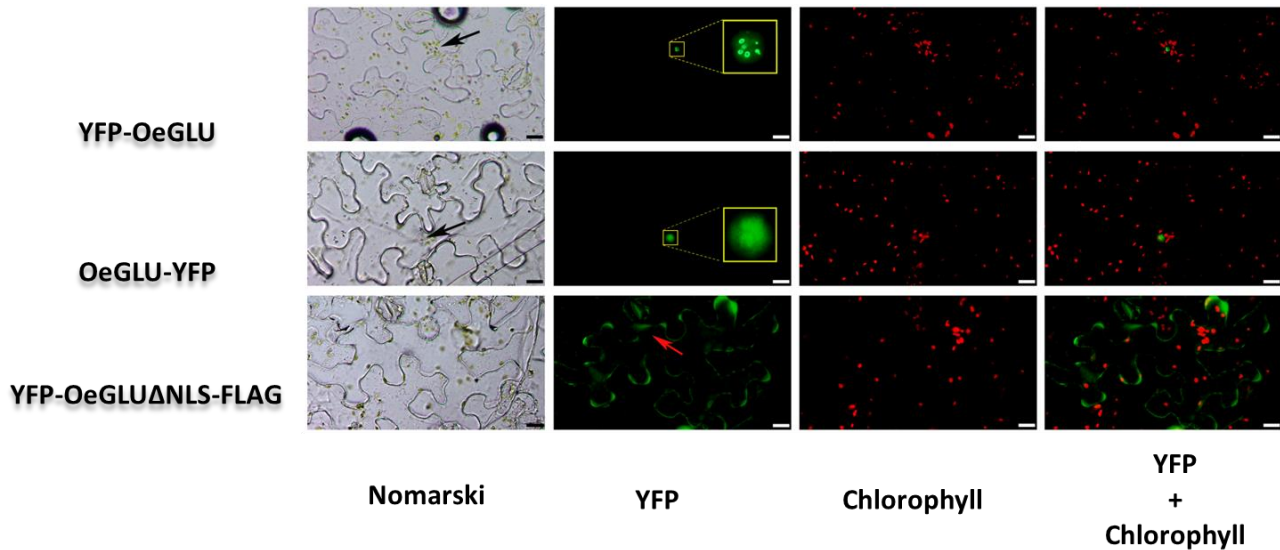
Εικόνα 3. 9 Τελικές διαγνωστικές πέψεις για την επιλογή των κλώνων. Με κόκκινα νούμερα είναι οι κλώνοι που επιλέχθηκαν.

Το γεγονός ότι η περιοριστική ενδονουκλεάση BamHI κόβει αρκετές φορές μέσα στις κατασκευές, την κατέστησε ιδανικό ένζυμο για την επιλογή των κλώνων. Στην εικόνα 3.7 A για την κατασκευή 35S:pGPTV:OeGLU-ΔNLS-FLAG το ένζυμο αναγνωρίζει τέσσερις διαφορετικές θέσεις, οι τρεις είναι μέσα στο ένθετο και μία πάνω στον δυαδικό φορέα. Τα αποτελέσματα της πέψης είναι τρία κλάσματα, ένα στα 1020 bp που προκύπτουν από τις δύο θέσεις αναγνώρισης μέσα στην β-γλυκοσιδάση, μία στα ~2550 bp που προκύπτει από την θέση που προέρχεται από τον PUC18 και του δυαδικού φορέα και τέλος μια μπάντα στα 9400bp που είναι κομμάτι του υπόλοιπου γονιδίου μαζί με τον δυαδικό φορέα που απέμεινε (Εικόνα 3.7A). Στην εικόνα 3.7B παρατηρούμε ότι στην κατασκευή με το YFP περιέχεται μια έξτρα θέση αναγνώρισης στο τέλος της αλληλουχίας του YFP. Επομένως όπως επαληθεύεται και στην εικόνα 3.9B προκύπτει μια έξτρα μπάντα στα 750bp, ενώ τα υπόλοιπα κομμάτια είναι ίδια με την προηγούμενη εικόνα.

3.1.5 Μελέτη παροδικού μετασχηματισμού της κατασκευής YFP-OeGLU-ΔNLS-FLAG σε φύλλα καπνού *Nicotiana benthamiana*.

Αφού έγινε η επιλογή των επιθυμητών κλώνων και η προετοιμασία των ηλεκτροδεκτικών αγροβακτηρίων ακολούθησε ο μετασχηματισμός των αγροβακτηρίων με τις πλασμιδιακές κατασκευές μέσω της τεχνικής της ηλεκτροπόρωσης. Η ανάπτυξη των μετασχηματισμένων βακτηρίων έγινε σε θρεπτικό υλικό LB με τριπλή επιλογή (καναμουκίνη, ριφαμπικίνη, τζενταμυκίνη) στους 28°C για 2 ημέρες. Ακολούθως επιλέχθηκαν μονές αποικίες, μεταφέρθηκαν σε 5ml υγρού θρεπτικού LB με τριπλή επιλογή, επώαστηκαν στους 28° C για 2 ημέρες και πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλοι χειρισμοί έτσι ώστε ακολουθήσει «εισαγωγή» των μετασχηματισμένων βακτηρίων σε φύλλα καπνού (agroinfiltration).

Χρησιμοποιήθηκαν φυτά καπνού *Nicotiana benthamiana*, τα οποία είχαν αναπτυχθεί κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (Υλικά και Μέθοδοι) και επιλέχθηκαν τα φύλλα εκείνα που είχαν το επιθυμητό μέγεθος προκειμένου να ενεθεί το διάλυμα των μετασχηματισμένων αγροβακτηρίων. Στην συνέχεια παρασκευάσματα της επιδερμίδας των φύλλων παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο. Μαζί με την κατασκευή YFP-OeGLU-ΔNLS-FLAG έγινε παροδικός μετασχηματισμός και με τις κατασκευές OeGLU-YFP και YFP-OeGLU που είχαν εξεταστεί στην διπλωματική εργασία της Παρασκευής Τσέρου. Μέσω της διαδικασίας αυτής αποκτούμε συνολική εικόνα της τοποθέτησης του ενζύμου μέσα στο κύτταρο (Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3. 10 Υποκυτταρική τοποθέτηση του γονιδίου της β-γλυκοσιδάσης και του μεταλλάγματος της. Τα μαύρα βέλη αποδεικνύουν τον πυρήνα, ενώ το κόκκινο βέλη την διάχυση του γονιδίου στο κυτταρόπλασμα. (Bar 50μm)

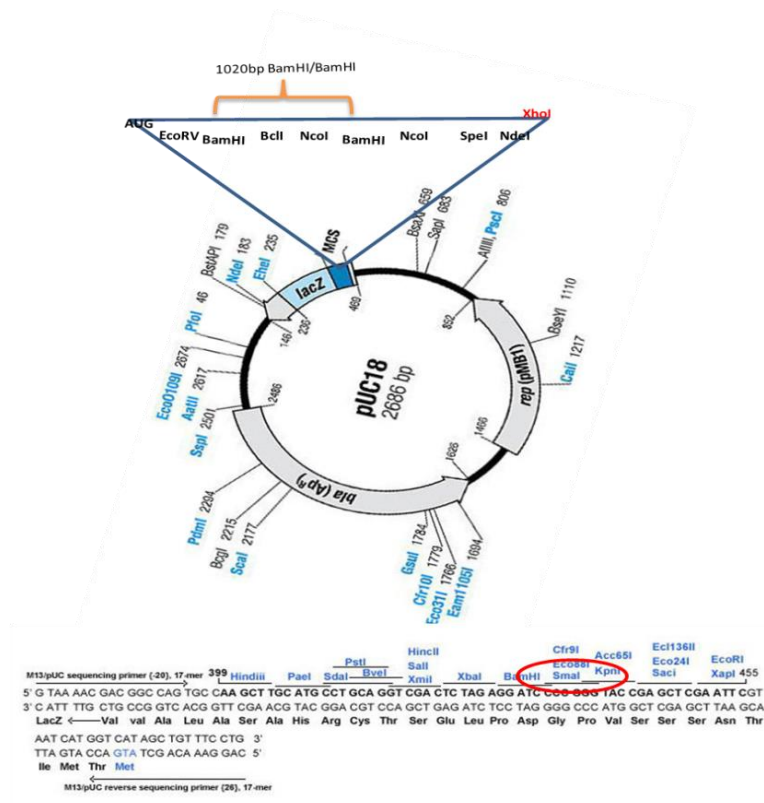
Στην εικόνα 3.10 παρατηρείται η υποκυτταρική τοποθέτηση το γονιδίου της β-γλυκοσιδάσης OeGLU στα φύλλα του καπνού *Nicotiana benthamiana* ύστερα από παροδικό μετασχηματισμό. Όπως έχει ήδη δεχθεί το γονίδιο υπό φυσιολογικές συνθήκες τοποθετείται στον πυρήνα (Κατασκευές YFP-OeGLU/OeGLU-YFP). Όμως ύστερα από την διαγραφή των αμινοξέων DRRKRLRGS που αποτελεί το προβλεπόμενο NLS το γονίδιο δεν μπορεί αν εισέλθει στον πυρήνα. Το σήμα διαχέεται μέσα στο κύτταρο ή περιγράφει το κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων, χαρακτηριστικό το ότι το ένζυμο εγκλωβίζεται στο κυτταρόπλασμα. Επίσης παρατηρούμε στην εικόνα 3.10 ότι όταν το γονίδιο αναφοράς βρίσκεται μπροστά από την β-γλυκοσιδάση το σήμα που παρουσιάζεται μέσα στον πυρήνα είναι στικτό σαν να δημιουργούνται συσσωματώματα στο εσωτερικό του πυρήνα, ενώ όταν το γονίδιο αναφοράς είναι μετά το ένζυμο το σήμα είναι διάχυτο στον πυρήνα.

3.2 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των μονομερών της OeGLU μέσω του Bimolecular fluorescence complementation (BiFC)

Σε πολλά φυτά είναι γνωστό ότι οι β-γλυκοσιδάσες σχηματίζουν μεγάλα συσσωματώματα 1500 kDa προκειμένου να γίνουν δραστικές έναντι του υποστρώματος τους (Nisius, 1988; Fieldes and Gerhardt, 1994; Falk *et al.*, 1995; Geerlings *et al.*, 2000). Επομένως για να εξετάσουμε την τεταρτοταγή δομή της OeGLU και κατά πόσο το μονομερές αλληλεπιδρά με τον εαυτό του χρησιμοποιήσαμε το σύστημα BiFC. Η ανάλυση BiFC είναι ένα αξιόπιστο εργαλείο για την μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών (Walter *et al.*, 2004). Για την δημιουργία των δύο κατασκευών, αρχικά το γονίδιο της OeGLU ενισχύθηκε μέσω της PCR από τον κλώνο pUC18/For(MluI)-RevStop -όπως είχε δημιουργηθεί στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας “Υποκυτταρική τοποθέτηση του ενζύμου β-γλυκοσιδάσης της *Olea europaea L.*” (Παρασκευή Τσέρου, Αθήνα 2014)- με τους εκκινητές ForKozak και RevSPLIT και κλωνοποιήθηκε στην θέση SmaI του φορέα PUC18. Στην συνέχεια το γονίδιο κλωνοποιήθηκε στη θέση XbaI/XhoI σε δύο διαφορετικούς φορείς, τον p.SPYNE και το p.SPYCE που φέρουν διαιρεμένο το YFP^N και το YFP^C αντίστοιχα. Οι δομή και λειτουργία των δύο δυαδικών φορέων περιγράφηκε στα υλικά και τις μεθόδους (παράγραφος 2.5.6). Το γονίδιο εισέρχεται με τέτοιο τρόπο στους δυαδικούς φορείς ώστε να είναι στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με τα τμήματα του YFP που υπάρχουν μέσα στους φορείς. Οι τελικές κατασκευές μετασημάτισαν *Agrobacterium tumefaciens* το στέλεχος C58C1 Rif^R μέσω της μεθόδου της ηλεκτροπόρωσης. Τέλος, έγινε παροδικός μετασηματισμός σε φυτά *Nicotiana benthamiana* μέσω agroinfiltration με ταυτόχρονη έγχυση και των δύο κατασκευών στο κάτω μέρος των φύλλων του καπνού, ηλικίας 4 εβδομάδων. Μετά την πάροδο τριών ημερών επιδερμίδα του φύλλου παρατηρήθηκε σε μικροσκόπιο φθορισμού.

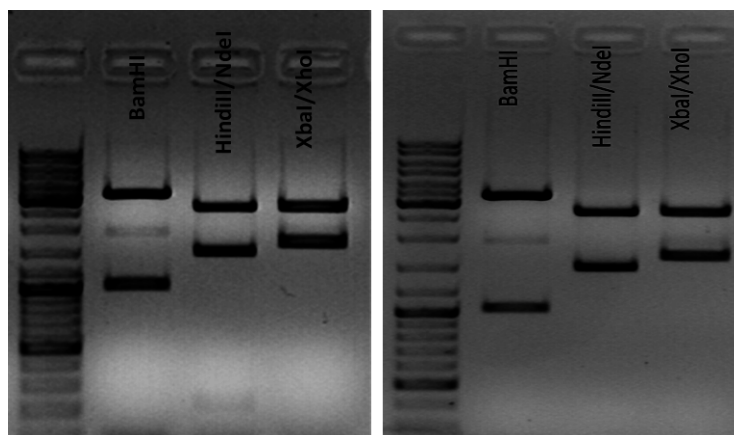
3.2.1 Κλωνοποίηση του γονιδίου της OeGLU στον πλασμιδιακό φορέα pUC18

Σχηματική απεικόνιση αυτού βήματος για την δημιουργία της κατασκευής παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3.11). Η ενίσχυση του γονιδίου από τον κλώνο pUC18/For(MluI)-RevSTOP έγινε με την χρήση των εκκινητών ForKozak και RevSPLIT (Πίνακας 2.1). Κατά την ενίσχυση του γονιδίου προστίθεται μία θέση περιορισμού XhoI ώστε να κλωνοποιηθεί στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με τα τμήματα του YFP στους τελικούς φορείς.



Εικόνα 3. 11 Σχηματική απεικόνιση της εισαγωγής της OeGLU στον φορέα pUC18. Η εισαγωγή του γονιδίου έγινε στην θέση SmaI που είναι σημασμένη με κόκκινο. Στο 3' άκρο του γονιδίου έχει προστεθεί μια έξτρα θέση XhoI.

Στην συνέχεια όπως περιγράφηκε και στην [παράγραφο 3.1.2](#) το προϊόν της αντίδρασης κλωνοποιείται στην θέση SmaI του pUC18 και πλασμιδιακό DNA αποικιών ελέγχεται για την φορά και τον αριθμό ενθέσεων ώστε να επιλεγεί ο κατάλληλος κλώνος (Εικόνα 3.11)

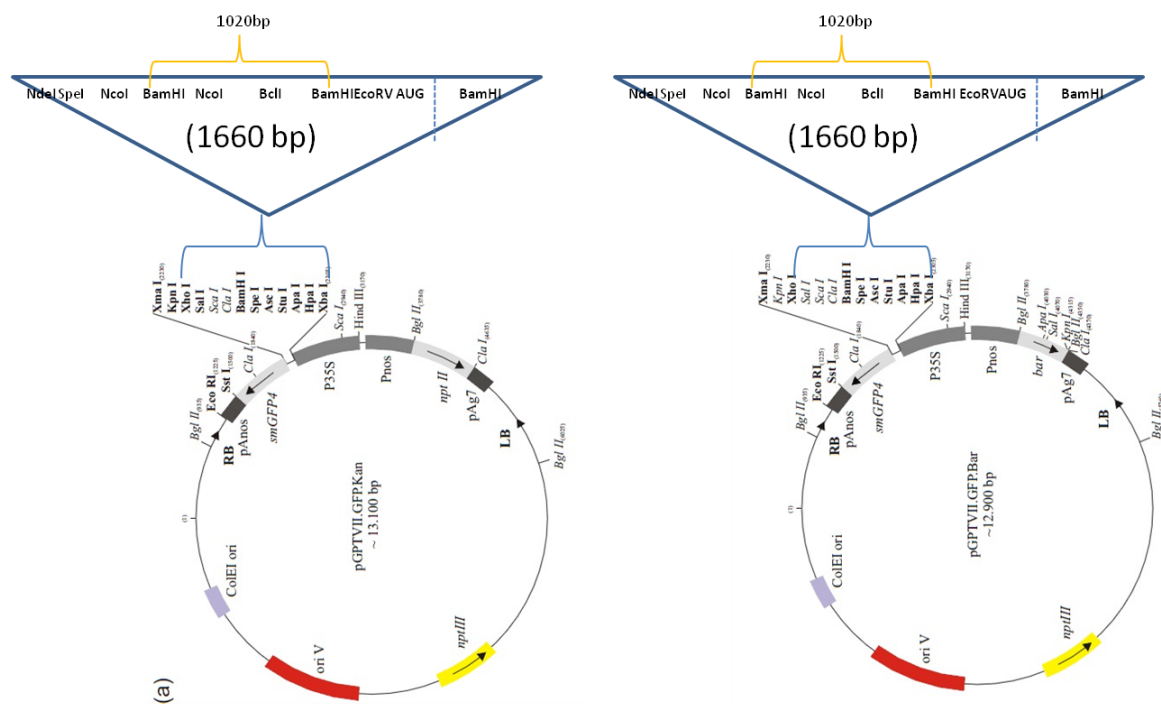


Εικόνα 3. 12 Τελικές διαγνωστικές πέψεις για την ταυτοποίηση του κλώνου pUC18/ForKozak-RevSPLIT(XhoI)(15μL, 1% agarose gel). Και οι δύο εικόνες είναι ο ίδιος κλώνος σε διαφορετικές χρονικές στιγμές κατά την ανάλυση του στην πηκτή αγαρόζης. •

Για την επαλήθευση του κλώνου επιλέχθηκε να γίνει διαγνωστική πέψη αρχικά με το ένζυμο BamHI που αναγνωρίζει δύο θέσεις μέσα στο γονίδιο και μία πάνω στον πολυσυνδέτη του πλασμιδίου (Εικόνα 3.11). Η πέψη δίνει δύο κλάσματα DNA μεγέθους 1020bp και 3300bp (Εικόνα 3.12). Η έξτρα μπάντα που εμφανίζεται είναι άκοπο πλασμίδιο, που λόγω υπερελικομένης διαμόρφωσης αναλύεται σε πιο μικρό μέγεθος από το αναμενόμενο στο τζελ αγαρόζης. Στην συνέχεια για την ορθότητα του κλώνου επιλέχθηκε διπλή διαγνωστική πέψη με τα ένζυμα HindIII και NdeI. Το ένζυμο NdeI κόβει μία φορά στο τέλος του γονιδίου και μία πάνω στο πλασμίδιο έξω από τον πολυσυνδέτη, ενώ η HindIII στην αρχή του πολυσυνδέτη (Εικόνα 3.11). Τα μεγέθη που προκύπτουν είναι μία μπάντα στις 200 βάσεις από την NdeI και την HindIII πάνω στο πλασμίδιο (εικόνα 3.12 αριστερά), μία μπάντα 1450bp και μία μπάντα στις 2800 βάσεις που είναι ο υπόλοιπος φορέας μαζί με το εναπομείναν

γονίδιο (Εικόνα 3.12). Τέλος, η διπλή πέψη με XbaI/ XhoI επιβεβαιώνει την εισαγωγή της θέσης περιορισμού XhoI από τον εκκινητή, ενώ ταυτόχρονα ελέγχεται, ο τρόπος με τον οποίο θα απομονωθεί εκ νέου από τον pUC18 για να κλωνοποιηθεί στους τελικούς φορείς. Τα αποτελέσματα της πέψης συμφωνούν με την εικόνα 3.11 δεδομένου ότι προκύπτει ένα κομμάτι στο μέγεθος του γονιδίου (~1600bp) και ένα κομμάτι στο μέγεθος του pUC18 (~2700bp) (Εικόνα 3.12).

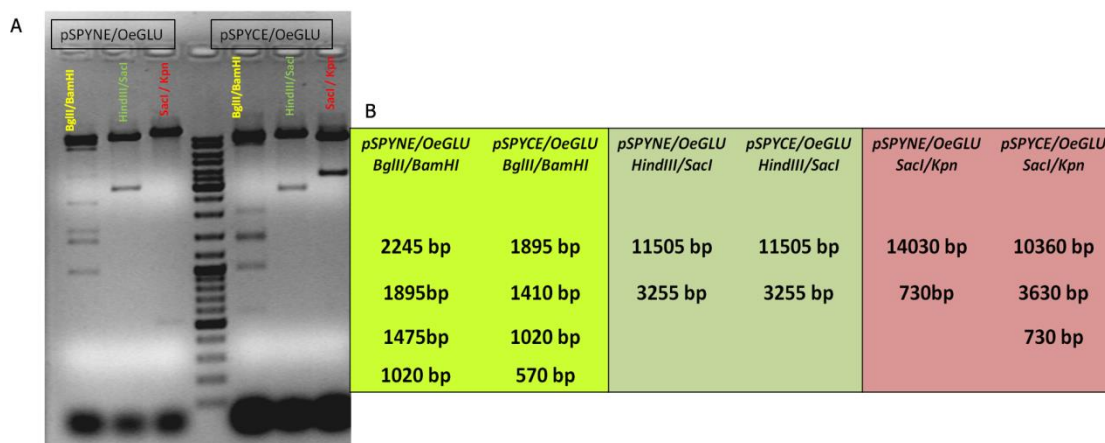
3.2.2 Κλωνοποίηση του γονιδίου OeGLU στους δυαδικούς φορείς p.SPYNE και p.SPYCE.



Εικόνα 3. 13 Περιγραφική απεικόνιση της κλωνοποίησης στους δυαδικούς φορείς p.SPYNE (δεξιά) και p.SPYCE (αριστερά)

Στο τελευταίο βήμα των κλωνοποιήσεων το γονίδιο απομονώνεται από τον pUC18 με την χρήση των ενζύμων XbaI/XhoI, αναλύεται σε gel αгарόζης και το DNA

απομονώνεται από εκεί ώστε να ενοποιηθεί με τους φορείς p.SPYNE και p.SPYCE αντίστοιχα, για τους οποίους έχει ακολουθηθεί η ίδια διαδικασία. Η φορά της ένθεσης είναι συγκεκριμένη, αφού τα συμπληρωματικά άκρα δημιουργούνται με διαφορετικά ένζυμα περιορισμού (XbaI και XhoI). Οι δύο φορείς είναι εξαιρετικά ίδιοι και διαφέρουν μόνο σε κάποιες θέσεις περιορισμού. Στην εικόνα 3.14 παρουσιάζονται οι τελικές πέψεις των επιλεγμένων κλώνων.



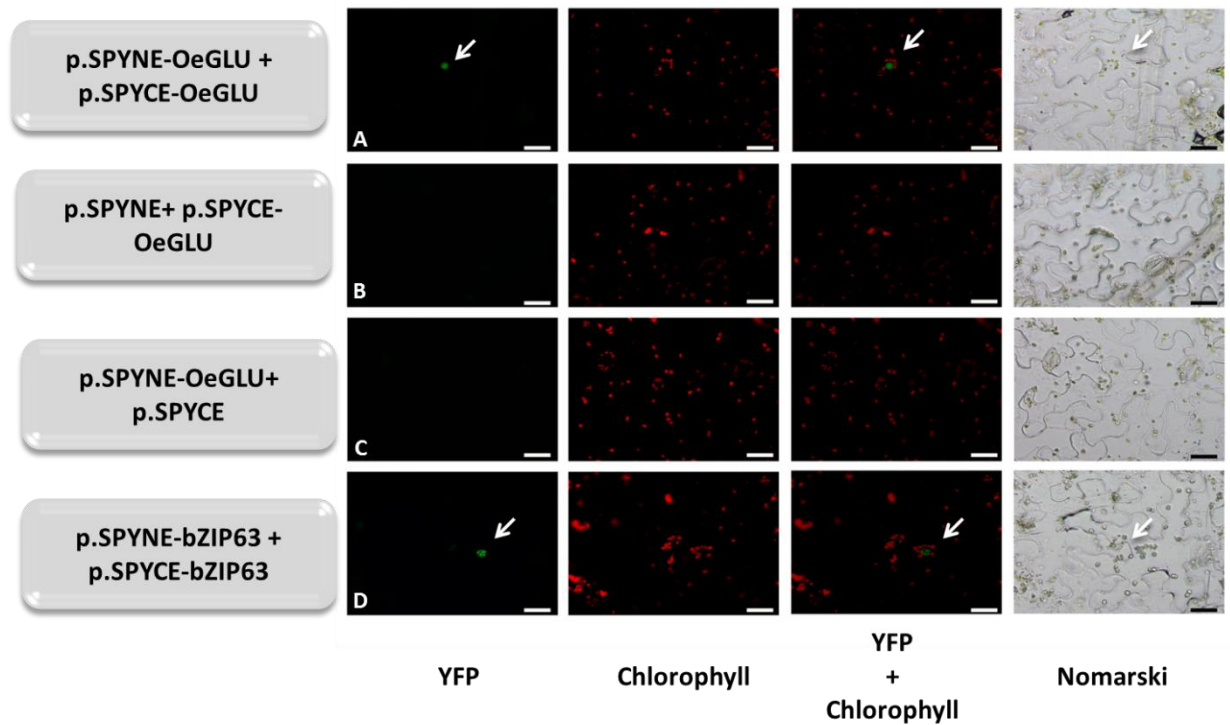
Εικόνα 3. 14 Τελικές διαγνωστικές πέψεις για την ταυτοποίηση των κλώνων. Στην Εικόνα Α βλέπουμε το gel ανάλυσης των νουκλεϊκών οξέων ύστερα από την διαδικασία των πέψεων (1% agarose gel). Στην εικόνα Β παρουσιάζει ο πίνακας με τα αναμενόμενα μεγέθη σε κάθε περίπτωση.

Τα αναμενόμενα μεγέθη της εικόνα 3.14 Β υπολογίστηκαν βάσει των δεδομένων που δίνουν για τους δύο δυαδικούς φορείς στην δημοσίευση Walter *et al*, 2004. Παρόλα αυτά τα αποτελέσματα των πέψεων δεν συμφωνούν απόλυτα (Εικόνα 3.14 Β), όμως είναι επαρκή για να επιβεβαιώσουν την ορθότητα των κλώνων και για να τους ξεχωρίσουμε.

3.2.3 Μικροσκοπική παρατήρηση των p.SPYNE/OeGLU και p.SPYCE/OeGLU σε κύτταρα της επιδερμίδας των φύλλων καπνού.

Ύστερα από τον μετασχηματισμόν του στελέχους C58C1 Rif^R του *Agrobacterium tumefaciens* με τις κατασκευές, ακολουθήθηκε η διαδικασία του Agrobacterium infiltration που οι δύο δυαδικοί φορείς μόλυναν ταυτόχρονα τις επιφάνειες των φύλλων προκειμένου να διερευνηθούν πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο φορέων. Όμως για να αποδειχθεί ότι ο φθορισμός που εμφανίζεται προέρχεται λόγω της αλληλεπίδρασης των μονομερών της OeGLU μετασχηματίστηκαν αγροβακτηρίδια με άδειους τους φορείς p.SPYNE και p.SPYCE και ενέθηκαν στα φύλλα του καπνού προκειμένου να αποδειχθεί ότι οι φορείς δεν μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους και να δώσουν φθορισμό. Θετικό control της διαδικασίας αποτέλεσαν οι κατασκευές p.SPYNE/bZIP63 και p.SPYCE/bZIP63, οι οποίες παρέχονται από τους ίδιους που κατασκεύασαν τους φορείς. Το γονίδιο bZIP63 κωδικοποιεί για έναν μεταγραφικό παράγοντα και είναι γνωστό ότι ομοδιμερίζεται και τοποθετείται στον πυρήνα. Επομένως οι ενέσεις που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω:

- ✓ **p.SPYNE/OeGLU + p.SPYCE/OeGLU**
- ✓ **p.SPYNE + p.SPYCE/OeGLU**
- ✓ **p.SPYNE/OeGLU + p.SPYCE**
- ✓ **p.SPYNE/bZIP63 + p.SPYCE/bZIP63**



Εικόνα 3. 15 Απεικόνιση της αλληλεπίδρασης των μονομερών του γονιδίου της OeGLU μέσω τις μεθόδου BiFC. Στην εικόνα A αναπαριστάτε ο φθορισμός που προέρχεται από την αλληλεπίδραση των μονομερών της β-γλυκοσιδάσης. Στις εικόνες B και C η απουσία φθορισμού αποδεικνύεται πως οι φορείς δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Και στην εικόνα D βλέπουμε τον φθορισμό της αλληλεπίδρασης των bZIP63 που επιβεβαιώνει την λειτουργικότητα του συστήματος. (Bar 50μm)

Στην εικόνα 3.15 A αποδεικνύεται ότι η πρωτεΐνη της OeGLU ομοδιμερίζεται ώστε τα δύο μέρη του YFP να έρθουν πολύ κοντά και να δώσουν φθορισμό μέσω της χρήσης UV ακτινοβολίας στο μικροσκόπιο φθορισμού. Το σύμπλοκο που δημιουργείται τοποθετείται στον πυρήνα όπως έχει ήδη αποδειχθεί για την υποκυτταρική τοποθέτηση του γονιδίου (Εικόνα 3.10). Αυτό ενισχύει την θεωρία ότι οι β-γλυκοσιδάσες συνήθως δομούνται σε συσσωματώματα μέσα στα φυτά για να δράσουν. Με την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία προσδιορίστηκε ότι τουλάχιστον αλληλεπιδρούν. Στις εικόνες 3.15 B και C αποδεικνύεται ότι οι φορείς δεν μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους και να δώσουν φθορισμό, γεγονός που ενισχύει ότι ο φθορισμός της OeGLU στην εικόνα 3.15 A είναι πραγματικός.

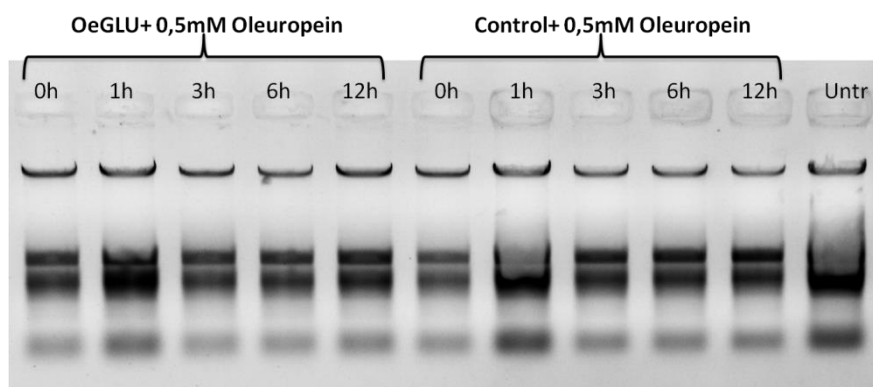
Τέλος, στην εικόνα 3,15 D με τον φθορισμό των μεταγραφικών παραγόντων bZIP63 αποδεικνύουμε ότι η τεχνική είναι λειτουργική και αποτελεί ένας αξιόπιστο τρόπο της αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών.

3.3 *In vivo* μελέτη του συστήματος Oleuropein/OeGLU στα φύλλα του καπνού *Nicotiana benthamiana*.

Προκειμένου να μελετηθεί η υπό διερεύνηση υπόθεση για την επαγωγή αντίδρασης υπεραισθησίας (HR), έγινε παροδικός μετασχηματισμός σε φύλλα καπνού μιας χημιαρικής κατασκευής όπου έχει γίνει σύντηξη του γονιδίου της β-γλυκοσιδάσης (OeGLU) με τον καθολικό προαγωγέα 35S του ιού CaMV, όπως έχει ήδη χρησιμοποιηθεί και σε προηγούμενα πειράματα (Koudounas *et al.*, 2015). Ύστερα από 3 μέρες που έχει ταυτοποιηθεί πως υπάρχει αυξημένη έκφραση του διαγονιδίου έγινε ένεση με 0,5mM ολευρωπαϊνης στα ίδια φύλλα. Συγκεκριμένα απομονώθηκε RNA στις 0h,1h,3h,6h,12h και μέσω ημι-ποσοτικό RT-PCR (semi-quantitative RT-PCR) μελετήθηκε η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Ως control έγιναν οι ίδιοι χειρισμοί στα φύλλα καπνού με την χρήση άδειου δυαδικού φορέα 35S- pGPTV-HPT.

3.3.1 Απομόνωση RNA από τα φύλλα καπνού

Ύστερα από τον χειρισμό των φύλλων του καπνού με το ένζυμο της OeGLU και της ολευρωπαϊνης, καθώς και των control φύλλων απομονώθηκε RNA όπως περιγράφεται στην ενότητα υλικά και μεθόδους (Παράγραφος 2.2.1). Τα αποτελέσματα της απομόνωσης παρουσιάζονται στην εικόνα 3.16.



Εικόνα 3. 16 RNA δειγμάτων

Στην συνέχεια προσδιορίστηκε η ποσότητα και η ποιότητα του RNA που απομονώθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.2. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Δείγματα	μg/mL	260/280	260/240	Total (μg)
Expression OeGLU + 0,5mM Oleuropein				
0h	572	1,73	2,04	12
1h	874	1,70	1,95	18,3
3h	679	1,70	1,96	14,2
6h	429	1,57	2,08	9

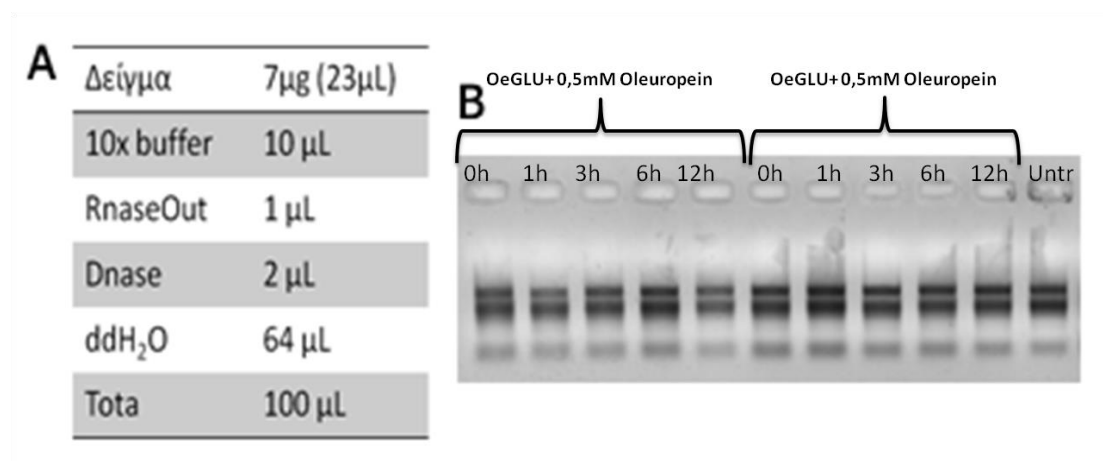
12h	695	1,63	1,70	14,6
Empty vector + 0,5mM Oleuropein				
0h Control	492	1,58	1,92	10,3
1h	1318	1,70	1,77	26,7
3h	356	1,58	1,93	7,5
6h	673	1,57	1,56	14
12h	695	1,54	1,69	14
Untreated Leafs	1677	1,70	1,59	35,2

Πίνακας 3. 1 Προσδιορισμός ποσότητας και ποιότητας RNA

Ο προσδιορισμός της ποσότητας και ποιότητας είναι σημαντικός προκειμένου να υπολογιστούν οι ποσότητες που πρέπει να προστεθούν κατά την αντίδραση με την DnaseI, ώστε να απομακρυνθεί η ποσότητα του DNA και να μείνει μόνο το RNA από κάθε δείγμα (Παράγραφος 2.4.1). Οι λόγοι των απορροφήσεων 260nm/280nm και 260nm/240nm δείχνουν την καθαρότητα των δειγμάτων ως προς τις πρωτεΐνες και των φαινολικών ουσιών αντίστοιχα. Ιδανικά αυτοί οι λόγοι θα έπρεπε να πλησιάζουν το 2, όμως θεωρήθηκαν ανεκτοί για την συνέχεια του πειράματος.

3.3.2 Χειρισμός δειγμάτων με DNaseI

Πριν την σύνδεση της cDNA αλυσίδας μέσω RT είναι σημαντικό να απομακρυνθεί το DNA. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιείται το ένζυμο της DnaseI. Στην αντίδραση υπολογίστηκε να προστεθεί η ίδια ποσότητα RNA για όλα τα δείγματα ώστε να είναι όσο πιο κοντά γίνεται σε ποσότητες των RNA των δειγμάτων μετά τον χειρισμό. Το γεγονός αυτό βοηθά στην συνέχεια του πειράματος ώστε να διευκολύνει την αντίδραση semi-quantitative PCR. Η αντίδραση και το αποτέλεσμα της διαδικασίας παρουσιάζεται στην παρακάτω Εικόνα.



Εικόνα 3. 17 DnaseI treatment. Στην εικόνα A περιγράφονται τα συστατικά της αντίδρασης και στην εικόνα B είναι τα RNA δείγματα μετά την DnaseI.

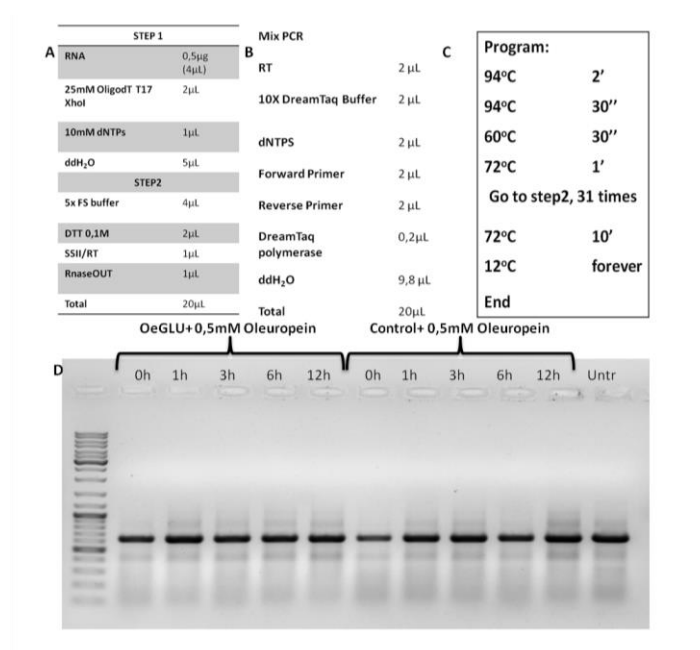
Μετά την αντίδραση τα δείγματα καθαρίζονται με φαινόλη/SEVAG για να απομακρυνθεί το ένζυμο (Παράγραφος 2.4.1) και (Πίνακας 3.2)

Δείγματα	μg/mL	260/280	260/240	Total (μg)
Expression OeGLU + 0,5mM Oleuropein				
0h	169,2	1,57	1,48	3
1h	172,4	1,49	1,64	3,1
3h	166,4	1,48	1,5	2,9
6h	200	1,5	1,17	3,6
12h	145,2	1,55	1,07	2,6
Empty vector + 0,5mM Oleuropein				
0h Control	202,4	1,47	1,49	3,6
1h	233,2	1,55	1,52	3
3h	152,8	1,52	1,33	2,9
6h	163,6	1,48	1,38	2,9
12h	123,6	1,5	1,47	2,2
Untreated Leafs	135,6	1,5	1,44	2,4

Πίνακας 3. 2 Υπολογισμός ποσότητας και ποιότητας RNA μετά τον χειρισμό με Dnasel.

3.3.3 Δημιουργία cDNA αλυσίδας.

Για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης χρησιμοποιήθηκαν 0,5μg μήτρα RNA για όλα τα δείγματα. Η αντίδραση γίνεται σε δύο βήματα όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.4.2. Για να ξεκινήσει την μεταγραφή η RT χρησιμοποιούμε έναν Oligo(dT) (Πίνακας 2.1) εκκινητή ο οποίος υβριδίζει στην poly A⁺ ουρά των μορίων mRNA. Ύστερα από 1ώρα επώασης στους 42°C στο μηχάνημα της PCR το RT αραιώθηκε 4 φορές με ddH₂O. Προκειμένου να εξεταστεί αν η αντίδραση δούλεψε μπαίνει η πρώτη PCR με μήτρα το RT του κάθε δείγματος και ενισχύεται το house keeping γονίδιο της ακτίνης. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται είναι ο Actin2 και Actin3 (Πίνακας 2.1).



Εικόνα 3. 18 Δημιουργία cDNA αλυσίδας και PCR ακτίνης. Στην εικόνα A απεικονίζεται η αντίδραση για την αντίστροφη μεταγραφή των mRNAs. Στις εικόνες B και C παρουσιάζονται η αντίδραση και το πρόγραμμα της

πρώτης διαγνωστικής PCR για την λειτουργικότητα των RT. Στην εικόνα D είναι το αποτέλεσμα της ενίσχυσης του γονιδίου της ακτίνης (~650 bp) για όλα τα δείγματα (1% agarose gel).

Κατά την διαδικασία της δημιουργίας πρώτης αλυσίδας cDNA έγινε χρήση του reverse εκκινήτη Oligo(dT) με αποτέλεσμα να γίνει αντίστροφη μεταγραφή για όλα τα mRNAs που υπήρχαν την δεδομένη στιγμή στο απομονωμένο RNA των δειγμάτων. Η αντίδραση παρουσιάζεται στην εικόνα 3.18 A. Στην συνέχεια έγινε μια πρώτη PCR για να ενισχυθεί το γονίδιο της ακτίνης που είναι δεδομένο ότι εκφράζεται σταθερά σε όλα τα δείγματα ως house keeping γονίδιο. Επομένως το αποτέλεσμα της PCR δείχνει ότι το RT είναι λειτουργικό ώστε να χρησιμοποιηθεί στην συνέχεια του πειράματος (Εικόνα 3.18 D).

3.3.4 Semi-quantitative RT-PCR

Όλη αυτή η διαδικασία που περιγράφηκε στην ενότητα 3.3 στόχο είχε την μελέτη της αντίδρασης του φυτού απέναντι στο σύστημα Oleuropein/OeGLU. Η διαδικασία του semi-quantitative PCR όπως περιγράφηκε και στην παράγραφο 2.4.7 έχει ως στόχο την ανίχνευση αύξησης της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την αντίδραση του φυτού στην μετατροπή της oleuropein σε άγλυκη μορφή. Βάσει της θεωρίας η άγλυκη ολευρωπαΐνη που έχει καταβολιστεί από την OeGLU είναι ένα πάρα πολύ δραστικό μόριο που προκαλεί την μετουσίωση και συσσωμάτωση των πρωτεϊνών που βρίσκονται γύρω της. Η άγλυκη μορφή της ουσίας είναι το ίδιο τοξική και καταστρεπτική και για το φυτικό κύτταρο. Το γεγονός αυτό μπορεί να λειτουργήσει ως σινιάλο για την απόκριση εκτεταμένης άμυνας στο φυτό. Η μελέτη αυτού του συστήματος *in vivo* στο δέντρο της ελιάς είναι αδύνατη, για αυτό το λόγο μεταφέρθηκε στο ετερόλογο σύστημα του καπνού *Nicotiana benthamiana*.

Ένα από τα πιο καλά μελετημένα συστήματα απόκρισης σε stress στα φυτά είναι η αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) και αποτελεί το πρώτο βήμα άμυνας μέσα στο φυτό. Στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, μέσω του semi-quantitative PCR ψάχνουμε να βρούμε τυχόν αύξηση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με το HR και γενικότερα με τον κυτταρικό θάνατο. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που ενισχύουν γονίδια δείκτες για την επαγωγή άμυνας και παρουσιάζονται στον πίνακα 3.3.

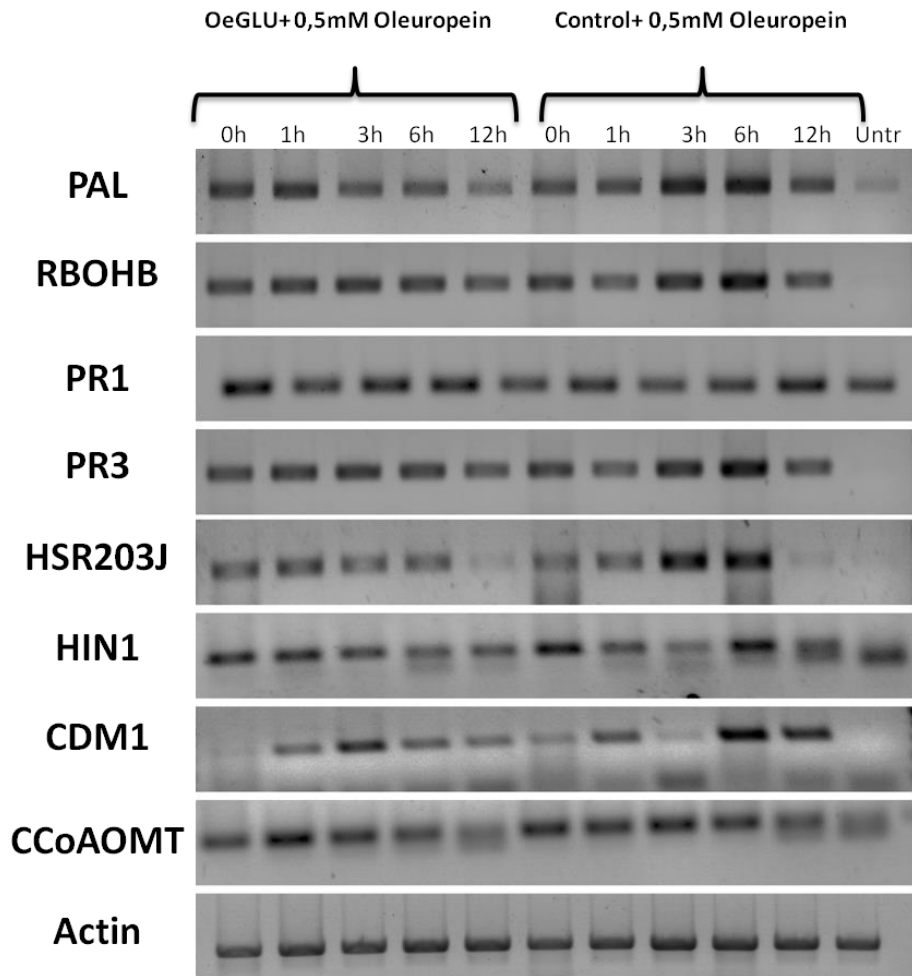
Genes	Role in tobacco	References
CDM1 (nicotiana glutinosa-cell death marker1)	Συνδέεται με κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από παθογόνο και είναι ανεξάρτητο μονοπάτι από την επαγωγή άμυνας (HR). Δεν επάγεται σε άλλες νεκρωτικές κηλίδες από γήρανση ή stress κατάψυξης κλπ. Εντοπίζεται κυρίως στο σημείο της βλάβης.	Mi Chung Suh et al., 2003
HSR203J	Γονίδιο που σχετίζεται με κυτταρικό θάνατο, η έκφραση του είναι αποτέλεσμα της αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR)	Pontier D., et al., 1994
PR1 (defense related)	Αμυντική πρωτεΐνη με αντιμυκητοκτόνα δράση.	S Ebrahim., et al., 2011
PR3 (defense related)	Αμυντική πρωτεΐνη που δρα καταστρέφοντας την χιτίνη που υπάρχει άφθονη στα έντομα	S Ebrahim., et al., 2011
PAL	Βιοσύνθεση φυτοαλεξίνης	B Schuster and J Rétey, 1995
CcoAOMT	Γονίδιο που σχετίζεται με την λιγνοποίηση κυτταρικού τοιχώματος	Martz F., et al., 1998

RBOHB	Οξειδάση	Hirofumi Yoshioka, et al., 2003
HIN1	Γονίδιο που σχετίζεται με κυτταρικό θάνατο	Gopalan S., et al., 1996

Πίνακας 3. 3 Βιολογικός ρόλος γονιδίων στόχων

Αρχικά έγινε ενίσχυση του γονιδίου της ακτίνης χρησιμοποιώντας διαφορετική ποσότητα μήτρας από κάθε δείγμα τέτοια ώστε μετά την PCR το προϊόν της ακτίνης για όλα τα δείγματα να φαίνεται σε ίσο-ποσότητες (Εικόνα 3.19). Με αυτό τον τρόπο μπορούμε να συμπεραίνουμε ότι τυχόν διαφορές στην ποσότητα του προϊόντος ενίσχυσης του μεταγραφώματος στόχου, οφείλονται στη διαφορετική έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου στα διαφορετικά δείγματα και όχι σε διαφορετικές ποσότητες ολικού cDNA που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση.

Για την ενίσχυση των γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που περιγράφονται στον πίνακα 2.1. Πριν τις τελικές δοκιμές ελέγχθηκαν πόσοι κύκλοι ενίσχυσης χρειάζονται για κάθε γονίδιο ώστε η συσσώρευση των προϊόντων να βρίσκεται σε εκθετική φάση. Τότε το αποτέλεσμα που δείχνει το agarose gel θεωρείται αξιόπιστο. Σε αντίθετη περίπτωση οι διαφορές στην συσσώρευση προϊόντων που οφείλονται στην αρχική διαφορετική συγκέντρωση της αρχικής μήτρας, εξομαλύνονται με την είσοδο των αντιδράσεων στην στατική φάση και επομένως τα αποτελέσματα δεν είναι αληθινά. Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων παρουσιάζονται στην εικόνα 3.19.



Εικόνα 3. 19 Αποτελέσματα semi-quantitative PCR για την επαγωγή άμυνας. (1,5% agarose gel)

Όπως παρατηρούμε και από την εικόνα 3.19 δεν φαίνεται να υπάρχει καμία αξιόλογη επαγωγή έκφρασης των γονιδίων δεικτών είτε για την αντίδραση υπερευαισθησίας είτε για τον κυτταρικό θάνατο.

4. Συζήτηση

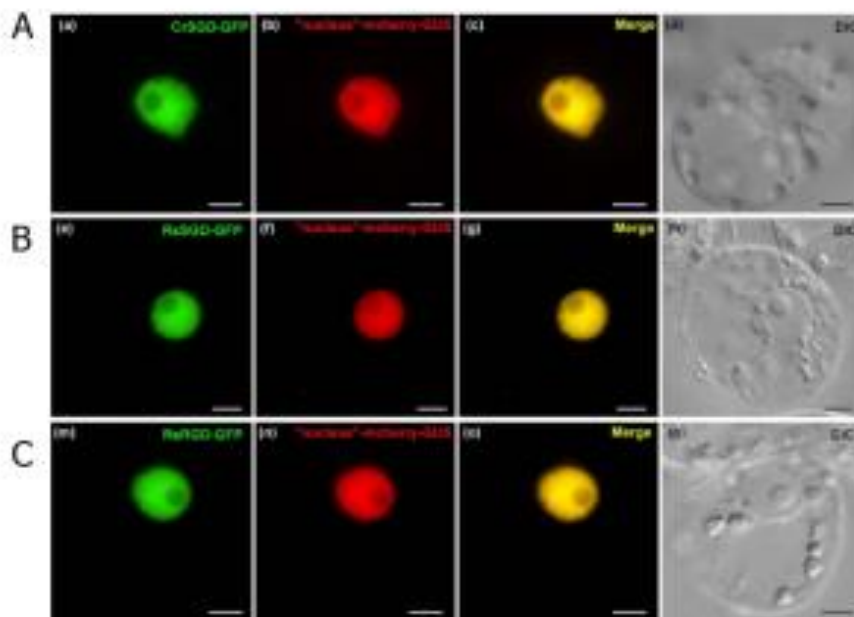
Πολλά φυτά προκειμένου να προστατευθούν κυρίως από έντομα αλλά και από παθογόνα διαθέτουν αμυντικούς γλυκοζίτες οι οποίοι ενεργοποιούνται σε τοξικά μόρια ύστερα από την υδρόλυση τους από ειδικές β-γλυκοσιδάσες (Morant et al., 2008). Για την οικογένεια των Oleaceae αμυντικός γλυκοζίτης αποτελεί η ολευρωπαΐνη, που είναι ένα ολεοσίδιο προϊόν του δευτερογενή μεταβολισμού των σεκοϊριδοειδών. Η ουσία εκτός από την ισχυρή αμυντική δράση στα φυτά είναι ιδιαίτερος γνωστή για τις φαρμακευτικές της ιδιότητες (Bulotta S., et al., 2013). Ως ενδογενής β-γλυκοσιδάση της Ελιάς που έχει την ικανότητα να μετατρέπει την ολευρωπαΐνη σε τοξικό άγλυκο μόριο με ιδιότητες δομής γλουταραλδεΐδης, παρουσιάστηκε το 2015 το γονίδιο OeGLU (Koudounas K., et al., 2015). Στην συγκεκριμένη εργασία συνεχίζεται η μελέτη του ενζύμου σε μοριακό επίπεδο, καθώς επίσης, έγινε και μια προσπάθεια αιτιολόγησης της βιολογικής λειτουργίας του δυαδικού συστήματος άμυνας OeGLU/ολευρωπαΐνης στο ετερόλογο σύστημα του καπνού *Nicotiana benthamiana*.

4.1 Η OeGLU τοποθετείται στον πυρήνα

Στην συγκεκριμένη εργασία 3 ανεξάρτητες κατασκευές επιβεβαιώνουν ότι η τοποθέτηση του ενζύμου είναι στον πυρήνα μέσω μικροσκοπίας φθορισμού (YFP-OeGLU, OeGLU-YFP και οι κατασκευές για την τεχνική BiFC), στις εικόνες 3.9 και 3.14. Βάσει της θεωρίας, η ολευρωπαΐνη ως αμυντικός γλυκοζίτης για την ελιά βρίσκεται διαχωρισμένος από το ένζυμο που την καταβολίζει και την «ενεργοποιεί», συμμετέχοντας στο δυαδικό σύστημα άμυνας όπως το έχει προσδιορίσει ο Morant το 2008. Η βιβλιογραφία αναφέρει πως η ολευρωπαΐνη τοποθετείται στο κυτταρόπλασμα ή στο χυμοτόπιο (Konno et al., 1998; Bitonti et al., 2000), επομένως η τοποθέτηση της OeGLU στον πυρήνα (Εικόνα 3.9) ενισχύει την υπόθεση ότι είναι βασικός εταίρος του δυαδικού συστήματος άμυνας. Αυτός ο διαχωρισμός επιτρέπει την παραγωγή τοξικής άγλυκης ολευρωπαΐνης μόνο όταν διαρραγεί το κύτταρο και

όχι υπό φυσιολογικές συνθήκες. Σε *in silico* ανάλυση είχε προβλεφθεί ότι υπάρχει αμινοξική αλληλουχία (NLS) που επιτρέπει την είσοδο της πρωτεΐνης στον πυρήνα μεταξύ του 542^{ου} και 550^{ου} αμινοξέος (DRRKRLRGS). Η *in silico* ανάλυση επιβεβαιώθηκε με την σύντηξη της αλληλουχίας του γονιδίου χωρίς την περιοχή που κωδικοποιεί για το NLS, με το γονίδιο αναφοράς YFP. Η κατασκευή YFP-OeGLUΔNLS-FLAG εντοπίζεται υποκυτταρικά στο κυτταρόπλασμα εν αντιθέσει με τις κατασκευές YFP-OeGLU και OeGLU-YFP που τοποθετούνται στον πυρήνα, ύστερα από Agroinfiltration στα φύλλα καπνού *Nicotiana benthamiana* (Εικόνα 3.9). Η διαγραφή του NLS οδήγησε σε διάχυτο πρότυπο φθορισμού στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου υποδεικνύοντας ότι η αλληλουχία αυτή είναι απαραίτητη ώστε να τοποθετηθεί το ένζυμο στον πυρήνα.

Έχουν βρεθεί και άλλες β-γλυκοσιδάσες που συμμετέχουν σε δυαδικά συστήματα άμυνας όπως η OeGLU, να τοποθετούνται υποκυτταρικά στον πυρήνα. Τέτοια παραδείγματα είναι οι ειδικές β-γλυκοσιδάσες έναντι αμυντικών γλυκοζιτών και ουσιών του δευτερογενή μεταβολισμού, της οικογένειας **Aporcynaceae**. Η ταυτοποίηση έγινε μέσω σύντηξης με το GFP για τις β-γλυκοσιδάσες που υδρολύουν την στρικτοσιδίνη (strictosidine) στα φυτά *C. roseus* και *R. serpentina* (CrSGD και RsSGD αντίστοιχα) και την β-γλυκοσιδάση (RsRGD) που υδρολύει την ραουκαφρισίνη (raucaffricine) στο φυτό *R. serpentina* (Guirimand et al., 2010) (Εικόνα 4.1). Επιπλέον με την ίδιο τρόπο έχει βρεθεί και πυρηνική τοποθέτηση της β-γλυκοσιδάσης από το φυτό *Medicago truncatula* που εμπλέκεται στο δευτερογενή μεταβολισμό των φλαβονοειδών (flavonoids) (Naoumkina et al., 2007).



Εικόνα 4. 1 Αμυντικές β-γλυκοσιδάσες στην οικογένεια των *Asteraceae* με υποκυτταρική τοποθέτηση τον πυρήνα. Στις εικόνες A και B βλέπουμε τις β-γλυκοσιδάσες που υδρολύουν την στρικτοσιδίνη στα φυτά *C.roseus* και *R.serpetina* αντίστοιχα. Στην εικόνα C, βλέπουμε την β-γλυκοσιδάση που υδρολύει την ραουκαφρισίνη στο φυτό *R.serpetina* (Bar 10μm) (Guirimand et al., 2010).

Η τοποθέτηση του ενζύμου στον πυρήνα έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που είναι έως τώρα είναι γνωστά για την β-γλυκοσιδάση της ολευρωπαΐνης τα οποία υποστηρίζουν, ότι είναι πιθανό το ένζυμο να τοποθετείται στον χλωροπλάστη (Mazzuca et al., 2006). Στην συγκεκριμένη εργασία, σε **in situ** ανάλυση σε κύτταρα του καρπού της Ελιάς με χρήση ολευρωπαΐνης εξωγενώς προκειμένου να υπάρχει για το ένζυμο ανταγωνισμός υποστρώματος, οδήγησε στους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι η ειδική β-γλυκοσιδάση εντοπίζεται στους χλωροπλάστες αν και παρατηρήθηκε ισχυρή δραστηριότητα του ενζύμου και στον πυρήνα. Παρόλα αυτά σε άλλη μελέτη με **in situ** χρώση για την δραστηριότητα β-γλυκοσιδάσης σε καρπό στον οποίο μιμήθηκαν την επίθεση εντόμου με την χρήση βελόνας, ανιχνεύεται δραστηριότητα β-γλυκοσιδάσης στον πυρήνα (Spadafora et al., 2008). Συνεπώς, στην συγκεκριμένη εργασία μαζί με τα αποτελέσματα της Π. Τσέρου (Αθήνα, 2014)(Εικόνα 1.9), είναι η

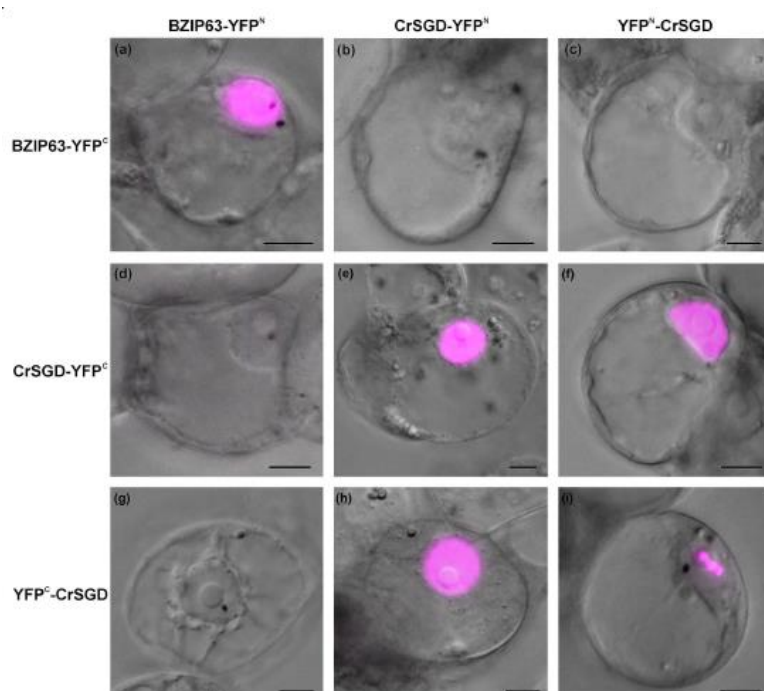
πρώτη φορά που με την χρήση γονιδίου αναφοράς γίνεται η εξακρίβωση της τοποθέτησης ειδικής β-γλυκοσιδάσης, που έχει αποδειχθεί η δραστηριότητα της έναντι της ολευρωπαΐνης (Koudounas K., et al., 2015).

4.2 Τα μονομερή της OeGLU αλληλεπιδρούν στον πυρήνα.

Μέσω της Biomolecular fluorescence complementation (BiFC) ανάλυσης παρατηρήθηκε φθορισμός στον πυρήνα των κυττάρων του καπνού, όπως και το θετικό control της μεθόδου bzir63 (Εικόνα 3.14). Ο φθορισμός αυτός υποδηλώνει ότι η τεταρτοταγή δομή της OeGLU αποτελείται από μονομερή που αλληλεπιδρούν. Ο φθορισμός προέρχεται λόγω σύντηξης του ενζύμου με το N-τελικό άκρο του YFP και αντίστοιχα με το C-τελικό άκρο του YFP σε δύο διαφορετικούς δυαδικούς φορείς. Λόγω της αλληλεπίδρασης των μονομερών της OeGLU τα δύο μέρη της πρωτεΐνης YFP έρχονται τόσο κοντά, ώστε να αποκτήσει την κανονική της τεταρτοταγή δομή και να εκπέμπει φθορισμό μέσω UV ακτινοβολίας. Στην Εικόνα 3.14 η συν-έκφραση της OeGLU συντηγμένη με το μισό YFP μαζί με άδειο φορέα που φέρνει το άλλο μισό μέρος της πρωτεΐνης αναφοράς δεν δίνει φθορισμό, υποδηλώνοντας ότι ο φθορισμός είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης των μονομερών. Η μέθοδος δεν μπορεί να μας προσδιορίσει το τελικό μέγεθος που παίρνει η τεταρτοταγής δομή του ενζύμου, παρά μόνο ότι για την δράση του γίνεται αλληλεπίδραση των μονομερών του. Για τον προσδιορισμό του τελικού μεγέθους χρειάζονται άλλες αναλύσεις.

Είναι γνωστό πως στα φυτά οι β-γλυκοσιδάσες που ανήκουν κυρίως στην GH1 οικογένεια φαίνεται να δομούνται σε διμερή, τετραμερή, εξαμερή αλλά και μεγάλα συσσωματώματα (Cairns J.R.K. and Esen A., 2010). Η παραλλακτικότητα της τεταρτοταγούς δομής ίσως να βοηθά στην εξειδίκευση της λειτουργικής τους ποικιλομορφίας έναντι των υποστρωμάτων, παρόλο που σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής υπάρχουν μεγάλες ομοιότητες μεταξύ των β-γλυκοσιδασών της GH1

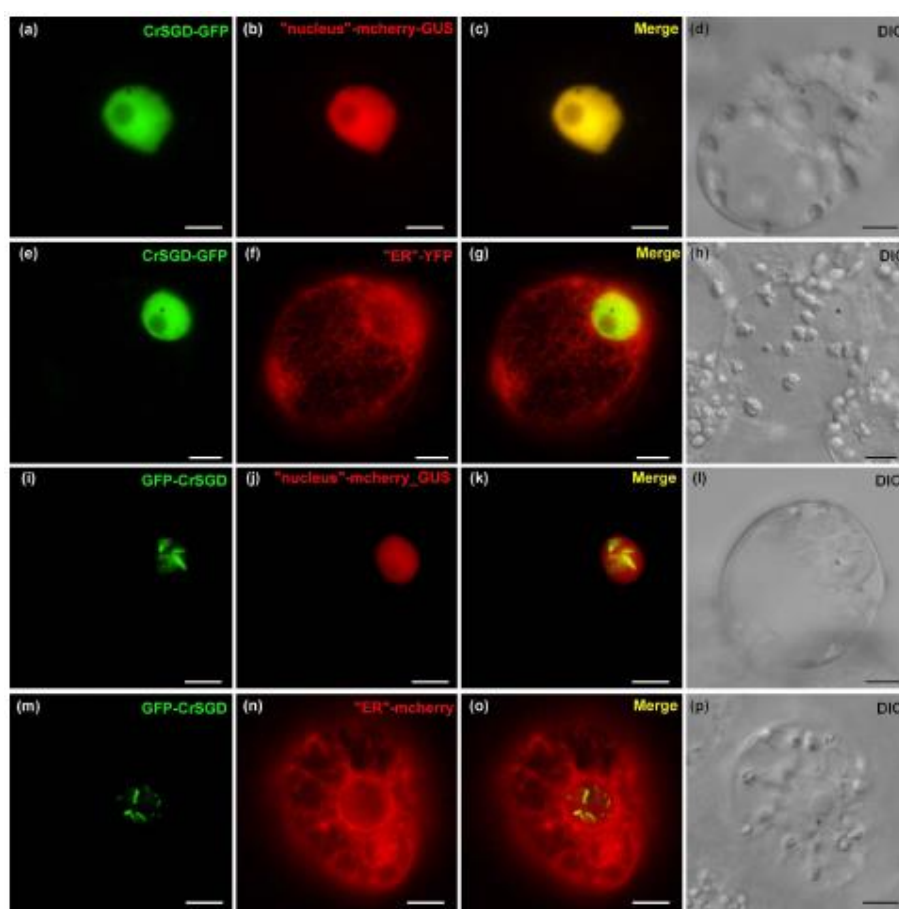
οικογένειας. Ίδια αποτελέσματα με την ανάλυση BiFC έδειξε και η β-γλυκοσιδάση της στρικοσιδίνης (CrSGD) του φυτού *C. roseus* (Εικόνα 4.2). Είναι δεδομένο, πως αφού η ανάλυση BiFC της OeGLU έγινε σε ετερόλογο σύστημα που δεν περιέχεται η ολευρωπαΐνη, η αλληλεπίδραση που υφίσταται το ένζυμο δεν έχει σχέση με το άγλυκο της ουσίας αλλά χρειάζεται για την δραστικότητα του ενζύμου. Ακόμα και αν δεν είναι γνωστό το τελικό μέγεθος της πρωτεΐνης, είναι λογικό να υποθέσουμε ότι μια τέτοια δομή είναι σταθερή έναντι της δράσης του άγλυκου της ολευρωπαΐνης μετά την υδρόλυση της.



Εικόνα 4. 2 BiFC ανάλυση για την β-γλυκοσιδάση της στρικοσιδίνης (CrSGD) που συντηγμένη στο N-τελικό η στο C-τελικό άκρο με κλάσμα του YFP είναι σε θέση να αλληλεπιδρά μόνο με τον εαυτό της. Η συν-έκφραση των κατασκευών έγινε σε κύτταρα του *C. roseus*. Bar 10μm. (Guirimand et al., 2010).

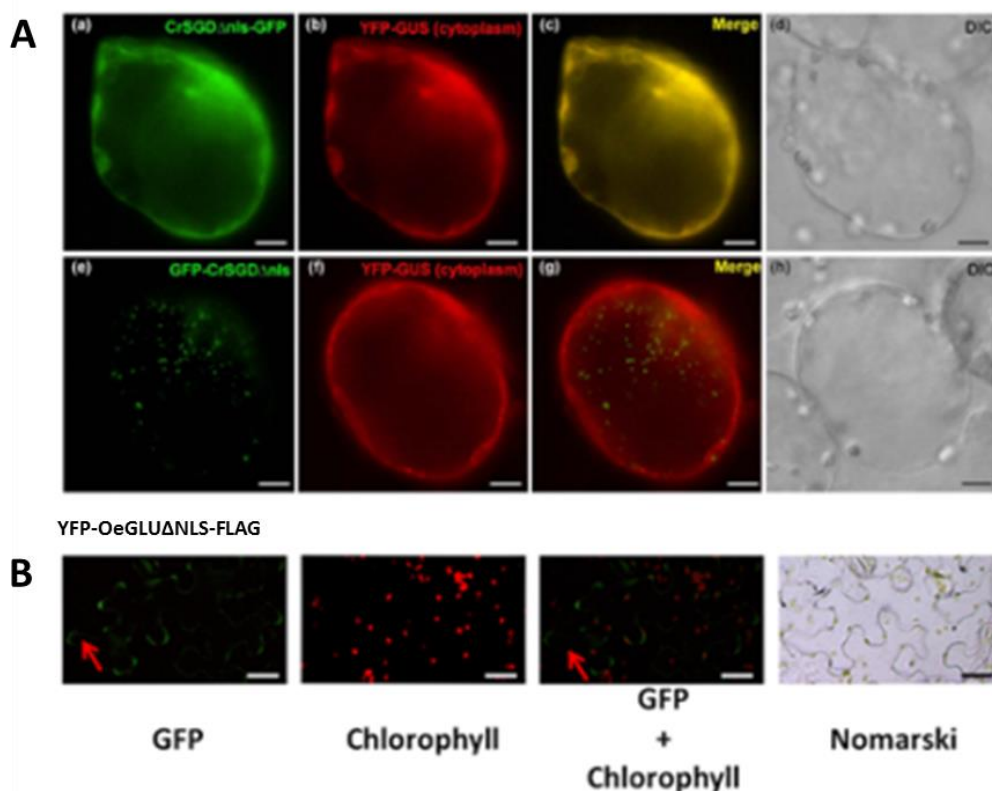
4.3 Το καρβόξυ άκρο φαίνεται να είναι υπεύθυνο για την τεταρτοταγή δομή του ενζύμου.

Επανειλημμένος παρατηρήσαμε διαφορετικό πρότυπο φθορισμού στον πυρήνα ανάμεσα στις κατασκευές YFP-OeGLU και OeGLU-YFP. Όταν οι πρωτεΐνη αναφοράς βρίσκεται μπροστά από την β-γλυκοσιδάση το σήμα στον πυρήνα παρουσιάζει στικτές διαμορφώσεις, ενώ όταν το YFP έχει συντηχθεί στο C-τελικό άκρο του ενζύμου παρουσιάζει διάχυτο πρότυπο φθορισμού (Εικόνα 3.9). Η εικόνα αυτή μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η θέση του γονιδίου αναφοράς επηρεάζει την τεταρτοταγή δομή της OeGLU. Τα ίδια αποτελέσματα επιβεβαιώνονται για ακόμη μια φορά στην β-γλυκοσιδάση της στρικτοσιδίνης, ύστερα από σταθερό μετασχηματισμό στο φυτό *C. roseus* (Εικόνα 4.3) (Guirimand et al., 2010).



Εικόνα 4. 3 Διαφορετικό σήμα φθορισμού ύστερα από σύντηξη του GFP στο N-τελικό και C-τελικό άκρο της β-γλυκοσιδάσης της στρικτοσιδίνης (CrSGD) ύστερα από μόνιμο μετασχηματισμό στο φυτό *C. roseus* (Guirimand et al., 2010) (bar 10μm)

Παρόμοιο πρότυπο φθορισμού παρατηρήθηκε και όταν διέγραψαν την αμινοξική αλληλουχία που στέλνει το ένζυμο στον πυρήνα (NLS)(Εικόνα 4.4) (Guirimand et al., 2010). Η αλληλουχία που κωδικοποιεί για το NLS βρίσκεται στο καρβόξυ-άκρο του ενζύμου όπως και στην OeGLU (παράγραφος 3.1). Τα δεδομένα τις έρευνας για τους Guirimand et al οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι για την διαμόρφωση της τεταρτοταγής δομής του ενζύμου ευθύνεται το C-τελικό άκρο του και επηρεάζεται όταν ενώνεται με το GFP (μεγέθους 28 kDa). Εν αντιθέσει, η εικόνα φθορισμού για το ένζυμο OeGLU στην κατασκευή YFP-OeGLUΔNLS-FLAG είναι διαφορετική, διότι δεν παρατηρείται η στικτή διαμόρφωση του φθορισμού αλλά διάχυτος φθορισμός στο κυτταρόπλασμα παρόλο που το YFP βρίσκεται στο N-τελικό άκρο και θεωρητικά δεν επηρεάζεται το C-τελικό άκρο του ενζύμου.



Εικόνα 4. 4 Σύγκριση φθορισμού ανάμεσα στην CrSGD-ΔNLS και στην OeGLU-ΔNLS. Στην εικόνα A παρουσιάζεται η τοποθέτηση της CrSGD με διαγραμμένο το πεπτίδιο NLS που στέλνει το ένζυμο στον πυρήνα

ύστερα από μόνιμο μετασχηματισμό στα κύτταρα του φυτού *C. roseus*. Στην εικόνα Aa το γονίδιο αναφοράς βρίσκεται στο καρβόξυ- άκρο του ενζύμου ενώ στην εικόνα Ae στο άμινο-άκρο του ενζύμου (Guirmand et al., 2010)(Bar 10μm). Στην εικόνα B φαίνεται ο φθορισμός της OeGLU με διαγραμμένο το NLS ύστερα από παροδικό μετασχηματισμό στα κύτταρα του φυτού *N. bethmamiiana*. (Bar 50μm).

Επομένως, το διαφορετικό πρότυπο φθορισμού στις κατασκευές YFP-OeGLU και OeGLU-YFP συμφωνεί με τα δεδομένα της β-γλυκοσιδάσης για το φυτό *C. roseus* και με την υπόθεση ότι το καρβόξυ άκρο ευθύνεται για την τεταρτοταγή δομή του ενζύμου. Όμως ενώ το YFP φαίνεται πως επηρεάζει το καρβόξυ άκρο της OeGLU και άρα και την μορφή του σήματος στον πυρήνα, στην κατασκευή YFP-OeGLUΔNLS-FLAG φαίνεται ότι η διαγραφή 9 αμινοξέων από το καρβόξυ άκρο επηρεάζουν την τεταρτοταγή δομή του ενζύμου και όχι το γονίδιο αναφοράς. Επομένως, μπορούμε να υποθέσουμε ότι το NLS είναι σημαντικό για την διαμόρφωση της τεταρτοταγής δομής του ενζύμου, είτε γιατί η τεταρτοταγής δομή διαμορφώνεται στον πυρήνα, είτε γιατί τα 9 αυτά αμινοξέα είναι σημαντικά για την ένωση των μονομερών η οποία παρουσιάζεται στην παράγραφο 3.2.

Για να αποδειχθεί αυτή η υπόθεση χρειάζονται παραπάνω πειράματα. Ένας εύκολος τρόπος επιβεβαίωσης είναι η ανάλυση BiFC με αρνητικό αποτέλεσμα. Στους φορείς pSPYNE και pSPYCE θα κλωνοποιηθεί το μετάλλαγμα του ενζύμου, OeGLU-ΔNLS. Αν δεν υπάρχει φθορισμός αποδεικνύεται άμεσα ότι το NLS είναι σημαντικό στοιχείο για την διαμόρφωση της τεταρτοταγής δομής του ενζύμου. Ένας άλλος τρόπος για να αποδείξουμε αυτήν θεωρία είναι μέσω SDS-PAGE με ανοσοανίχνευση του επιτόπου FLAG στη κατασκευή OeGLU-FLAG (Koudounas et al., 2015) και στις κατασκευές OeGLU-ΔNLS-FLAG, YFP-OeGLU-ΔNLS-FLAG (παράγραφος 3.1) χωρίς να γίνει θέρμανση των πρωτεϊνών που καταστρέφει την τεταρτοταγής δομή. **Αν η υπόθεση μας είναι σωστή το OeGLU-FLAG θα παρουσιάζει μια διαμόρφωση σε μεγαλομοριακό βάρος και τα άλλα δύο στο μέγεθος των μονομερών.**

4.4 Μη ανίχνευση επαγωγής άμυνας στο ετερόλογο σύστημα του καπνού από την αντίδραση ολευρωπαϊνης/ OeGLU

Οι Konno et al το 1999 περιέγραψαν για πρώτη φορά την ισχυρή αμυντική δράση της ολευρωπαϊνης. Ύστερα από την υδρόλυση της, μετατρέπεται σ' ένα πολύ τοξικό μόριο που έχει την ικανότητα να συμπλοκοποιεί και να μετουσιώνει αυθαίρετα, πρωτεΐνες. Βάσει των δεδομένων, αυτό συμβαίνει μετά από επίθεση εντόμου ή παθογόνου που διασπά τον ιστό και κατ' επέκταση απελευθερώνει τη β-γλυκοσιδάση που υδρολύει την ολευρωπαϊνη, με αποτέλεσμα ένζυμο και υπόστρωμα να έρθουν σε επαφή. Η δράση της ουσίας είναι περισσότερο μελετημένη στα έντομα που καταναλώνουν τον καρπό της ελιάς και έχει ως αποτέλεσμα την φραγή του πεπτικού τους συστήματος.

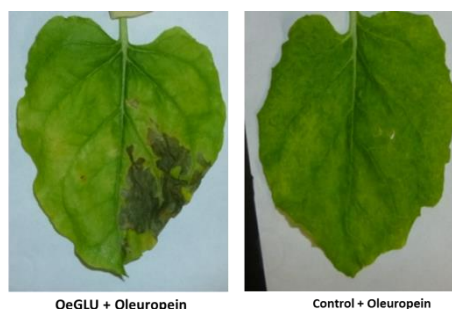
Το 2008 σε μια μελέτη των Spadafora et al, μιμήθηκαν την επίθεση των εντόμων στον ελαιόκαρπο μέσω παρακέντησης του καρπού. Τα αποτελέσματα τους έδειξαν πως 20 λεπτά μετά το τρύπημα παρατηρείται έντονη δραστηριότητα β-γλυκοσιδάσης η οποία συνοδεύεται με ισχυρή δράση υπεροξειδασών (POX), η οποία επεκτείνεται σε μεγαλύτερο εύρος κυττάρων και για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από αυτό της β-γλυκοσιδάσης. Οι ερευνητές συσχετίζουν την δράση των υπεροξειδασών με παραγωγή άλλων ουσιών όπως είναι τα φλαβονοειδή ή λιγνίνη τα οποία συμμετέχουν στην αμυντική απόκριση του φυτού έναντι της προσβολής εντόμων. Αν και, στην συγκεκριμένη δουλειά δεν συσχετίζεται η δράση της β-γλυκοσιδάσης με υδρόλυση της ολευρωπαϊνης παρόλα αυτά συνοδεύεται βάσει των ερευνητών από γενικότερη αμυντική απόκριση του φυτού.

Είναι γνωστό, πως πέρα από τους ιδιαίτερους μεταβολίτες που διαθέτουν πολλά είδη φυτών για να ενισχύσουν το οπλοστάσιο τους έναντι των εχθρών τους, φέρουν και ένα συντηρημένο σύστημα άμυνας το οποίο ενεργοποιείται σε κάθε μορφή stress. Το

σύστημα αυτό, διαχωρίζεται ανάμεσα σε μια άμεση απόκριση (Αντίδραση Υπερευαισθησίας-HR) και σε μια μεταγενέστερη που διατηρείται σε όλα τα μέρη του φυτού για ένα μικρό χρονικό διάστημα (συστημική επίκτητη αντίδραση –SAR). Καινούργια δεδομένα δείχνουν πως το φυτό είναι πιθανό να δημιουργεί ένα είδος μνήμης με στόχο να ανταποκρίνεται πιο γρήγορα στους πιο συχνούς τους εχθρούς (S.H. Spoel and X. Dong, 2012). Μέσω του συστήματος αυτού, στόχος των φυτών είναι η άμεση παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών, η απομόνωση της προσβεβλημένης περιοχής μέσω προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και η ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος των κυττάρων που δεν έχουν προσβληθεί (Van Loon L. C. and Van Strien E. A., 1999).

Η ενζυμική αντίδραση της OeGLU έναντι της ολευρωπαΐνης οδηγεί στην μετατροπή της ουσίας σε ένα ισχυρό μόριο με δομή γλουταραλδεϋδης που έχει την ικανότητα να δημιουργεί συσσωματώματα πρωτεϊνών.

Συνεπώς, η υδρόλυση της ουσίας είναι καταστροφική και για το ίδιο το φυτό. Επομένως το ίδιο το φυτό δέχεται ένα ισχυρό σοκ κατά την επίθεση ενός παθογόνου. Επεξεργαζόμενοι όλα αυτά τα δεδομένα και



αποδεικνύοντας πως η OeGLU υδρολύει την ολευρωπαΐνη, θελήσαμε να διερευνήσουμε κατά πόσο η αντίδραση αυτή, εκτός από

Εικόνα 4. 5 Νεκρωτική κηλίδα σε φύλλα καπνού που δημιουργείται από την αντίδραση την υδρόλυση της OeGlu (δεξιά).

αμυντική, λειτουργεί και ως σινιάλο-απόκριση για την ελιά. Δηλαδή, αν η νέκρωση που προκαλείται στα φυτικά κύτταρα θα μπορούσε να επάγει κάποια μορφή άμυνας (HR or Programmed Cell Death). Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο ετερόλογο σύστημα του καπνού *N. benthamiana*. Επιπλέον η ολευρωπαΐνη δεν αποτελεί προϊόν του δευτερογενή μεταβολισμού του. Η παροδική έκφραση της OeGLU και εν συνεχεία ένεση με τον μεταβολίτη δημιούργησε νεκρωτικές κηλίδες στο φυτό (εικόνα 4.5), ύστερα από την πάροδο 7-10 ημερών, γεγονός που αποδεικνύει πως μπορεί να υπάρξει αντίδραση της OeGLU και της ολευρωπαΐνης μέσα στο φυτό του καπνού. Στην συνέχεια, μέσω ημιποσοτικού rt PCR, εξετάσαμε

(Εικόνα 3.18). Στην ουσία η αύξηση που παρατηρείται στις 3 πρώτες ώρες εμφανίζεται και στις Control συνθήκες, όπου τα φυτά δέχθηκαν αγροέγχυση με άδειο πλασμιδιακό φορέα, ενώ απουσιάζει από το φύλλο που δεν δέχεται χειρισμό με αγροβακτηρίο. Επομένως η οποιαδήποτε έκφραση που εμφανίζεται οφείλεται στον χειρισμό και όχι στην αντίδραση ανάμεσα στην β-γλυκοσιδάση και στην ολευρωπαΐνη. Είναι πιθανόν, ο χειρισμός με ένεση που γίνεται για την έγχυση του *A. tumefaciens* και στην συνέχεια η ένεση για την έγχυση της ολευρωπαΐνης να ενεργοποιούν το σύστημα άμυνας του φυτού, λόγω τραυματισμού του ιστού. Μια λύση για την αποφυγή του τραυματισμού του φύλλου θα μπορούσε να είναι ο μόνιμος μετασχηματισμός του καπνού με το γονίδιο της OeGLU υπό την καθοδήγηση ενός καθολικού προαγωγέα, που θα εξασφάλιζε την σταθερή έκφραση του γονιδίου σε όλα τα μέρη του φυτού.

Όμως αν αφαιρέσουμε τον θόρυβο που δημιουργείται από την τεχνική, υποδεικνύεται ότι δεν υπάρχει αντίδραση ανάμεσα στην OeGLU και την ολευρωπαΐνη, μέσα στο χρονικό παράθυρο που μελετήσαμε το φαινόμενο της επαγωγής άμυνας. Τα αποτελέσματα του πειράματος, ίσως να αιτιολογούνται από τις μη ιδανικές συνθήκες που πιθανώς να επικρατούν στο εσωτερικό των κυττάρων του καπνού για την δράση του ενζύμου. Όπως έχει περιγραφεί στην διδακτορική διατριβή του Κωνσταντίνου Κουδουνά (Αθήνα, 2016) οι βέλτιστες συνθήκες για την ενζυμική αντίδραση ώστε να απογλυκοζυλιωθεί η ολευρωπαΐνη είναι pH 5,5 και θερμοκρασία 37°C. Επιπλέον το ένζυμο όπως αποδείχθηκε από τις κατασκευές YFP-OeGLU και OeGLU-YFP, τοποθετείται στον πυρήνα των κυττάρων, ενώ η ολευρωπαΐνη από την βιβλιογραφία είναι γνωστό πως αποθηκεύεται στο κυτταρόπλασμα ή στο χυμοτόπιο. Όλοι αυτοί οι παράμετροι ίσως να υποδεικνύουν την τυχαιότητα ή την καθυστέρηση της αντίδρασης ανάμεσα στην ολευρωπαΐνη και στην OeGLU στο ετερόλογο σύστημα του καπνού. Παρόλα αυτά η βελτίωση της διαδικασίας και η επίτευξη του πειράματος θα μπορούσε να δώσει χρήσιμα συμπεράσματα για την λειτουργία της άμυνας στο φυτό της ελιάς και για άλλα φυτικά συστήματα που χρησιμοποιούν τέτοιου είδους αμυντικές ουσίες.

5. Βιβλιογραφία

- **Amiot M. J., et al.,** (1986) *Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation*, J. Agric. Food Chem.,34: 823–826
- **Ancora C., et al.,** (2004) *Evaluation of cosmetic efficacy of oleuropein*. Symposium on the new frontiers of dermo-cosmetology: efficacy, stability and safety. Dissertation, university of Rome
- **Aziz NH., et al.,** (1998) *Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds*. Microbios 93: 43–54
- **Baidez A. G., et al.,** (2007) *Dysfunctionality of the Xylem in Olea europaea L. Plants Associated with the Infection Process by Verticillium dahliae Kleb. Role of Phenolic Compounds in Plant Defense Mechanism*. J. Agric. Food Chem., 55 (9): 3373–3377
- **Bao J., et al.,** (2007) *Computational study of bindings of olive leaf extract (OLE) to HIV-1 fusion protein gp41*. FEBS Lett 581: 2737–2742
- **Barleben L., et al.,** (2007) *Molecular architecture of strictosidine glucosidase: the gateway to the biosynthesis of the monoterpene indole alkaloid family*. Plant Cell 19: 2886–2897
- **Bazoti FN., et al.,** (2006) *Noncovalent Interaction between Amyloid- β -Peptide (1–40) and Oleuropein studied by electrospray ionization mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom 17: 568–575
- **Bendini A., et al.,** (2009) *Stability of the sensory quality of virgin olive oil during storage: an overview*. Ital J Food Sci 21:389–406
- **Bianco A, et al.,**(1993) *Isolation of cornoside from Olea europaea and its transformation into halleridone*. Phytochemistry 32: 455–457.
- **Bisignano G et al** (1999) *On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol*. J Pharm Pharmacol 51: 971–974
- **Bitonti M., et al.,** (2000) *Biomolecular Characterisation and Histological Distribution of Biophenols in Green Mature Fruit of Olea europaea Cassanese cv*. In IV International Symposium on Olive Growing 586: 515-519.
- **Bones A.M., Rossiter J.T.,** (2006) *The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates*. Phytochemistry 67: 1053–1067
- **Bouallagui Z., et al.,** (2011) *Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells*. Food. Chem. Toxicol. 49:179–184
- **Bourgaud F., et al.,** (2001) *Production of plant secondary metabolites: a historical perspective*. Plant Science 161: 839-851.
- **Briante R, et al .,** (2002) *Changes in phenolic and enzymatic activities content during fruit ripening in two Italian cultivars of Olea europaea L*. Plant Science 162:791–798.
- **Budiyanto A., et al.,** (2000) *Protective effect of topically applied olive oil against photocarcinogenesis following UVB exposure of mice*. Carcinogenesis 21:2085–2090
- **Bulotta S., et al.,** (2013). *Biological activity of oleuropein and its derivatives*, In: Ramawat KG, Mérillon JM, eds. Natural products . Berlin/Heidelberg: Springer, 3605–3638.

- **Cairns J.R.K. and Esen A.,** (2010) *β -Glucosidases*. Cell. Mol. Life Sci. 67:3389–3405
- **Cambier V., et al.,** (2001) *Effects of 1,4-benzoxazin-3-one derivatives from maize on survival and fecundity of *Metopolophium dirhodum* (Walker) on artificial diet*. J. Chem. Ecol. 27: 359–370.
- **Cantarel B.L., et al.,** (2009) *The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics*. Nucleic Acids Res 37:233–238
- **Cicek M., Esen, A.,** (1999) *Expression of soluble and catalytically active plant (monocot) beta-glucosidases in *E. coli**. Biotechnol. Bioeng. 63: 392–400.
- **Cicerale S., et al.,** (2012) *Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil*. Curr. Opin. Biotechnol. 23:129–135
- **Conn E.E.,** (1980) *Cyanogenic Compounds*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 31: 433–451.
- **Czapek F.,** (1921) *Spezielle Biochemie*. Biochemie der Pflanzen vol. 3, G. Fischer Jena, , p. 369.
- **Damtoft et al.,** (1993) *Biosynthesis of secoiridoid glucosides in Oleaceae*, Phytochemistry, 34: 1291–1299
- **Damtoft S., et al.,** (1995) Phytochemistry 40.
- **de la Puerta R., et al.,** (1999) *Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil*. Biochem. Pharmacol. 57: 445–449
- **Dobler S., et al.,** (2011). *Coping with toxic plant compounds—the insect’s perspective on iridoid glycosides and cardenolides*. Phytochemistry 72: 1593–1604.
- **Durackova’ Z.,** (2010) *Some current insights into oxidative stress*. Physiol Res 59: 459–469
- **Ebrahim S., et al.,** (2011) *Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism*. Sci Against Microb Pathog
- **El SN, Karakaya S** (2009) *Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health*. Nutr. Rev. 67:632–638
- **Fabiani R., et al.,** (2002) *Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis*. Eur.J. Cancer. Prev. 11: 351–358
- **Fabiani R., et al.,** (2008) *Inhibition of cell cycle progression by hydroxytyrosol is associated with upregulation of cyclin-dependent protein kinase inhibitors p21(WAF1/Cip1) and p27(Kip1) and with induction of differentiation in HL60 cells*. J. Nutr. 138: 42–48
- **Fleming H.P., et al.,** (1973) *Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives*. Appl Microbiol 26: 777–782
- **Forslund K., et al.,** (2004) *Biosynthesis of the nitrile glucosides rhodiocyanoside A and D and the cyanogenic glucosides lotaustralin and linamarin in *Lotus japonicus**. Plant Physiol. 135: 71–84.
- **Francis G., et al.,** (2002) *The biological action of saponins in animal systems: a review*. Brit. J. Nutr. 88: 587–605.

- **Fredrickson WR, F and S Group** (2000) *Inc method and composition for antiviral therapy with olive leaves*. U.S. Patent 6 117:884
- **Furneri PM., et al.**, (2002) *In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein*. Int J Antimicrob Agents 20: 293–296
- **Galanakis PA., et al.**, (2011) *Study of the interaction between the amyloid beta peptide (1-40) and antioxidant compounds by nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Biopolymers 96: 316–327
- **Gallina-Toschi T., et al.**, (2005) *Oxidative stability and phenolic content of virgin olive oil: an analytical approach by traditional and high resolution techniques*. J Sep Sci 28: 859–870
- **Giner E., et al.**, (2011) *Oleuropein ameliorates acute colitis in mice*. J. Agric. Food. Chem. 59(24): 12882–12892
- **Givovich A., et al.**, (1994) *Presence of a hydroxamic acid glucoside in wheat phloem sap, and its consequences for performance of Rhopalosiphum padi (L) (Homoptera, Aphididae)*. J. Chem. Ecol. 20: 1923–1930.
- **Givovich, A., Niemeyer, H.M.**, (1995) *Comparison of the effect of hydroxamic acids from wheat on 5 species of cereal aphids*. Entomol. Exp. Appl. 74:115-119.
- **Gómez-Vásquez R., et al.**, (2004) *Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and peroxidases in elicitor-challenged cassava (Manihot esculenta) suspension cells and leaves*. Annals of Botany 94: 87–97.
- **Gonzalez M., et al.**, (1992) *Hypoglycemic activity of olive leaf*. Planta. Med. 58:513–515
- **Gopolan S., et al.**, (1996) *hrp gene-dependent induction of hinI: a plant gene activated rapidly by both harpins and the avrPto gene-mediated signal*. The plant journal 10: 591-600
- **Goulas V., et al.**, (2009) *Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells*. Mol. Nutr. Food. Res 53:600–608
- **Granados-Principal S., et al.**, (2010) *Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials*. Nutr. Rev. 68:191–206
- **Gutierrez-Rosales F., et al.**, (2012) *β -Glucosidase involvement in the formation and transformation of oleuropein during the growth and development of olive fruits (Olea europaea L. cv. Arbequina) grown under different farming practices*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60: 4348–4358.
- **Halkier B.A., Gershenzon J.**, (2006) *Biology and biochemistry of glucosinolates*. Annu. Rev. Plant Biol. 57: 303–333.
- **Halliwell B.**, (2007) *Oxidative stress and cancer: have we moved forward?* Biochem. J. 401:1–11
- **Harborne J.B.**, (1999) *Classes and functions of secondary products*, in: N.J. Walton, D.E. Brown (Eds.), *Chemicals from Plants, Perspectives on Secondary Plant Products*. Imperial College Press 1–25.
- **Heininger K.**, (1999) *A unifying hypothesis of Alzheimer's disease. II. Pathophysiological processes*. Hum Psychopharmacol Clin Exp 14:525–581

- **Henrissat B.**, (1991) *A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities*. *Biochem J* 280:309–316
- **Henrissat B., Davies G.**, (1997) *Structural and sequence-based classification of glycosyl hydrolases*. *Curr Opin Struct Biol* 7:637–644
- **Hirofumi Yoshioka, et al.**, (2003) *Nicotiana benthamiana gp91phox Homologs NbrbohA and NbrbohB Participate in H₂O₂ Accumulation and Resistance to Phytophthora infestans*. *The Plant Cell* 15: 706-718
- **Jiang JH., et al.**, (2008) *Anti-toxoplasmosis effects of oleuropein isolated from Fraxinus rhychophylla*. *Biol Pharm Bull* 31:2273–2276
- **Keys A., et al.**, (1986) *The diet and 15-year death rate in the seven countries study*. *Am.J. Epidemiol.* 124:903–915
- **Kim D.-H., et al.**, (2000). *Mechanism of covalent adduct formation of aucubin to proteins*. *Toxicology Letters* 114: 181–188.
- **Kimura Y., Sumiyoshi M.**, (2009) *Olive leaf extract and its main component oleuropein prevent chronic ultraviolet B radiation-induced skin damage and carcinogenesis in hairless mice*. *J Nutr* 139:2079–2086
- **Konno K., et al.**, (1997). *Glycine in digestive juice: a strategy of herbivorous insects against chemical defense of host plants*. *Journal of insect physiology* 43: 217-224.
- **Konno K., et al.**, (1998). *Glycine protects against strong protein-denaturing activity of oleuropein. A phenolic compound in privet leaves*. *J Chem Ecol* 24: 735-751.
- **Konno K., et al.**, (1999). *Enzymatic activation of oleuropein: a protein crosslinker used as a chemical defense in the privet tree*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 9159–9164.
- **Konno K., et al.**, (2001). *Selective secretion of free glycine, a neutralizer against a plant defense chemical, in the digestive juice of the privet moth larvae*. *Journal of Insect Physiology* 47: 1451–1457.
- **Konno K., et al.**, (2010). *GABA, β -alanine and glycine in the digestive juice of privet-specialist insects: convergent adaptive traits against plant iridoids*. *Journal of Chemical Ecology* 36: 983–991.
- **Kossel A.**, (1891) *Über die Chemische Zusammensetzung der Zelle*, *Archiv für Physiologie* 181–186.
- **Koudounas K., et al.**, (2015) *A defence-related Olea europaea β -glucosidase hydrolyses and activates oleuropein into a potent protein cross-linking agent*, *J. Exp. Bot.* 66 : 2093-2106.
- **Kumar J., et al.**, (2001) *A compromised Mlo pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus Bipolaris sorokiniana (teleomorph: Cochliobolus sativus) and its toxins*. *Phytopathology*91: 127–133.
- **La Vecchia C., Bosetti C.**, (2006) *Diet and cancer risk in Mediterranean countries: open issue*. *Public Health Nutr* 9:1077–1082
- **Lean ME., et al.**, (1999) *Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA*. *Diabetes* 48:176–181
- **Lee KH, et al.**, (2006) *Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid*. *Cell* 126:1109–1120

- **Lee-Huang S., et al.**, (2007) *Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part I. Integrase inhibition*. *Biochem Biophys Res Commun* 354:872–878
- **Li J., et al.**, (1993) *Arabidopsis mutants are hypersensitive to UV-B radiation*. *Plant Cell* 5:1 71–179.
- **Lo Scalzo R., et al.**, (1994). *Olea europaea chemicals repellent to Dacus oleae females*. *Journal of Chemical Ecology* 20: 1813–1823
- **Lukiw WJ.**, (2012) *Amyloid beta (Ab) peptide modulators and other current treatment strategies for Alzheimer's disease (AD)*. *Exp Opin Emerg Drugs*. doi:10.1517/14728214.2012.672559
- **Ma SC., et al.**, (2001) *In vitro evaluation of secoiridoid glucosides from the fruits of Ligustrum lucidum as antiviral agents*. *Chem Pharm Bull* 49:1471–1473
- **Maiuri MC., et al.**, (2005) *Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil, prevents macrophage activation*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 371:457–465
- **Malik NS, Bradford JM.**, (2006) *Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives*. *Scientia Horticulturae* 110: 274–278.
- **Mann J.**, (1987) *Modern methods for the introduction of fluorine into organic molecules: an approach to compounds with altered chemical and biological activities*. *Chem. Soc. Rev* 16: 381-436
- **Manna C., et al.**, (2004) *Oleuropein prevents oxidative myocardial injury by ischemia and reperfusion*. *J. Nutr. Biochem.* 15:461–468
- **Marsilio, V., Lanza B.**, (1998) *Characterisation of an oleuropein degrading strain of Lactobacillus plantarum. Combined effects of compounds present in olive fermenting brines (phenols, glucose and NaCl) on bacterial activity*. *J. Sci. Food Agric.* 76: 520-524.
- **Martz F., et al.**, (1998) *cDNA cloning, substrate specificity and expression study of tobacco caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, a lignin biosynthetic enzyme*. *Plant Molecular Biology* 36: 427-437
- **Menendez JA., et al.**, (2007) *Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin™) in HER2-overexpressing breast cancer cells*. *BMC Cancer* 7:80
- **Mi Chung Suh et al.**, (2003) *Expression of a novel tobacco gene, NgCDM1, is preferentially associated with pathogen-induced cell death*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62: 227-235
- **Morant A. V., et al.**, (2008) *β-Glucosidases as detonators of plant chemical defense*. *Phytochemistry* 69: 1795–1813
- **Morel J. B. and Dangl J. L.** (1997) *The hypersensitive response and the induction of cell death in plants* *Cell Death and Differentiation* 4:671–683.
- **Nelson L.**, (2006) *Acute cyanide toxicity: mechanisms and manifestations*. *J. Emerg. Nurs.* 32: S8–S11.
- **Niemeyer H.M.**, (1988) *Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-Benzoxazin-3-Ones), defense chemicals in the gramineae*. *Phytochemistry* 27:3349–3358.

- **Nikus J., et al.,** (2003) *Cloning of a plastidic rye (Secale cereale) beta-glucosidase cDNA and its expression in Escherichia coli.* *Physiol. Plant* 118:337–345.
- **Nisius A.,** (1988) *The stromacenter in avena plastids – an aggregation of beta-glucosidase responsible for the activation of oat leaf saponins.* *Planta* 173: 474–481.
- **Obied, et al.,** (2008) *Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from Olea europaea L.* *Natural Product Reports*, 25: 1167-1179 DOI: 10.1039/b719736e
- **Omar SH.,** (2010) *Oleuropein in olive and its pharmacological effects.* *Sci. Pharm.* 78:133–154
- **Opassiri R., et al.,** (2006) *Analysis of rice glycosyl hydrolase family 1 and expression of Os4bglu12 b-glucosidase.* *BMC Plant Biol* 6:33
- **Ortega-García F, Peragón J.** (2010) *HPLC analysis of oleuropein, hydroxytyrosol, and tyrosol in stems and roots of Olea europaea L. cv. Picual during ripening,* *J. Agric. Food Chem.* 90: 2295–2300.
- **Osbourn A.,** (1996) *Saponins and plant defence – a soap story.* *Trends Plant Sci.* 1:4–9.
- **Osbourn A.E.,** (2003) *Saponins in cereals.* *Phytochemistry* 62, 1–4
- **Packard RRS., et al.,** (2008) *Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction.* *Clin. Chem.* 54:24–38
- **Panizzi ,et al.,** (1960) *Chemical structure of oleuropein, bitter glucoside of olive with hypotensive activity* *Gazz. Chim. Ital.,* 90: 1449-1485.
- **Pankoke, H., et al.,** (2012). *The interplay between toxinreleasing β -glucosidase and plant iridoid glycosides impairs larval development in a generalist caterpillar, Grammia incorrupta (Arctiidae).* *Insect Biochemistry and Molecular Biology.*
- **Pentzold S., et al.,** (2014). *How insects overcome two-component plant chemical defence: plant β -glucosidases as the main target for herbivore adaptation.* *Biological Reviews* 89: 531-551.
- **Perugini P., et al.,** (2008) *Efficacy of oleuropein against UVB irradiation: preliminary evaluation.* *Int J Cosmet Sci* 30:113–120
- **Pontier D., et al.,** (1994) *hsr203J, a tobacco gene whose activation is rapid, highly localized and specific for incompatible plant/pathogen interactions.* *The Plant Journal* 5: 507-521
- **Porter WL., et al.,** (1989) *Use of polyamide oxidative fluorescence test on lipid emulsions: contrast in relative effectiveness of antioxidants in bulk versus dispersed systems.* *J. Agric. Food. Chem.* 37:615–624
- **Riachy EL., et al.,** (2011a) *Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 1: Hydrophilic phenols: A key factor for virgin olive oil quality,* *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113: 678-691
- **Ross A. F.** (1961) *Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants.* *Virology* 14: 340–358.
- **Ruiz-Barba, J. L. et al.,** (1991) *Bactericidal action of oleuropein extracted from green olives against Lactobacillus plantarum.* *Lett. Appl. Microbiol.* 12Q 65-68.

- **Sahi S.V., et al.,** (1990) *Corn metabolites affect growth and virulence of Agrobacterium tumefaciens.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 3879–3883.
- **Sang-Keun Oh., et al.,** (2006) *Insight into Types I and II nonhost resistance using expression patterns of defense-related genes in tobacco.* Planta 223: 1101-1107
- **Schuster B and Rétey J,** (1995) *The mechanism of action of phenylalanine ammonia-lyase: the role of prosthetic dehydroalanine.* PNAS 92: 8433-8437
- **Scoditti E., et al.,** (2012) *Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: a potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer.* Arch Biochem Biophys (in press). <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2012.05.003>
- **Shepardson NE., et al.,** (2011) *Cholesterol level and statin use in Alzheimer disease: I. Review of epidemiological and preclinical studies.* Arch Neurol 68:1385–1392
- **Sirianni R., et al.,** (2010) *Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation.* Mol. Nutr. Food. Res. 54:833–840
- **Spoel S H., Dong X.,** (2012) *How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells.* Nat Rev Immunol 12:89-100
- **St-Laurent-Thibault C., et al.,** (2011) *Tyrosol and hydroxytyrosol, two main components of olive oil, protect N2a cells against amyloid- β -induced toxicity. Involvement of the NF- κ B signaling.* Curr Alzheimer Res 8:543–551
- **Stöckigt J., Zenk MH.,** (1977) *Strictosidine (isovincoside): the key intermediate in the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids.* J Chem Soc Chem Commun 1977:646–648
- **Sue et al.,** (2000a) *Purification and characterization of a β -glucosidase from rye (*Secale cereale* L.) seedlings.* Plant Sci. 155:67–74.
- **Sue et al.,** (2000b) *Purification and characterization of a hydroxamic acid glucoside β -glucosidase from wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings.* Planta 210:432–438.
- **Torssell K.B.G.,** (1997) *Chemical ecology,* in: K.B.G. Torssell (Ed.), *Natural Product Chemistry, A Mechanistic Biosynthetic and Ecological Approach.* Swedish Pharmaceutical Press 42–79.
- **Tripoli E., et al.,** (2005) *The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health.* Nutr. Res. Rev. 18:98–112
- **Van Loon L. C. and Van Strien E. A.,**(1999) *The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins.* Physiological and Molecular Plant Pathology 55: 85–97.
- **Visioli F., et al.,** (1998) *The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings.* Nutr Rev 56:142–147
- **Visioli F., et al.,** (2002) *Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil.* Med. Res. Rev. 22:65–75

- **Walter M., et al.,** (2004) *Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation*. *The Plant Journal* 40: 428-438
- **Warleta F., et al.,** (2011) *Hydroxytyrosol protects against oxidative DNA damage in human breast cells*. *Nutrients* 3:839–857
- **Xu Z., et al** (2004) *Functional genomic analysis of Arabidopsis thaliana glycoside hydrolase family 1*. *Plant Mol Biol* 55:343–367
- **Κουδουνάς Κ.** (2016) *Μοριακή δικτύωση στην ανάπτυξη φυτών*. Διδακτορική Μελέτη.
- **Τσέρου, Π.** (2014). *Υποκυτταρική τοποθέτηση του ενζύμου β-γλυκοσιδάσης της *Olea europaea L.** Πτυχιακή μελέτη