

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Βιοτεχνολογίας

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας

Διδακτορική Διατριβή

**Μοριακή και βιοχημική ανάλυση του γονιδίου β-γλυκοσιδάση της
ολευρωπαΐνης στην ανάπτυξη και άμυνα της ελιάς**



Κουδουνάς Κωνσταντίνος

Αθήνα 2016

Εξώφυλλο: Biagio Magliani, <http://goo.gl/IW5xW2>

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής Γ.Π.Α., Τμήμα Βιοτεχνολογίας (Επιβλέπων)
- Ιωάννα Κούρτη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γ.Π.Α., Τμήμα Βιοτεχνολογίας
- Δήμητρα Μηλιώνη, Επίκουρη Καθηγήτρια Γ.Π.Α., Τμήμα Βιοτεχνολογίας

Επταμελής εξεταστική επιτροπή:

- Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής Γ.Π.Α., Τμήμα Βιοτεχνολογίας (Επιβλέπων)
- Κυριάκος Κοτζαμπάσης, Καθηγητής Π.Κ., Τμήμα Βιολογίας
- Ιωάννα Κούρτη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γ.Π.Α., Τμήμα Βιοτεχνολογίας
- Καλλιόπη Παπαδοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Π.Θ., Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
- Δήμητρα Μηλιώνη, Επίκουρη Καθηγήτρια Γ.Π.Α., Τμήμα Βιοτεχνολογίας
- Προκόπιος Μαγιάτης, Επίκουρος Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α., Τμήμα Φαρμακευτικής
- Σταμάτης Ρήγας, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α., Τμήμα Βιοτεχνολογίας

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/1932, άρθρο 202).

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και χρηματοδοτήθηκε από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα μου Καθηγητή Πολυδεύκη Χατζόπουλο για τη συνεχή καθοδήγηση και υποστήριξη του καθ' όλη τη διάρκεια της επιστημονικής μελέτης. Πέρα από την θεωρητική και πρακτική γαλούχηση σε επιστημονικά θέματα, ο τρόπος σκέψης που μου μετέδωσε είναι κάτι που θα με βοηθήσει σε ποικίλες και ετερογενείς προκλήσεις στην ζωή μου.

Επίσης ευχαριστώ τα μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής για τις πολύτιμες συμβουλές κατά την εξέλιξη της διατριβής καθώς και τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Ακόμα, ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου (περαστικούς και «αγκυροβολημένους») ανεξαρτήτως ηλικίας και θέσης καθώς στα μάτια μου καθένας αποτελεί από μια συνιστώσα σε κάτι ισάξιο με δεύτερη οικογένεια. Θα πρωτοτυπήσω και δεν θα αναφερθώ ονομαστικά σε άτομα. Οι άνθρωποι με τους οποίους αλληλεπίδρασα και, πόσω μάλλον, είχα την τιμή να συνεργαστώ γνωρίζουν και εισπράττουν καθημερινά την ευγνωμοσύνη μου εκτός ενός φίλου που έφυγε νωρίς.

Θερμές ευχαριστίες επίσης οφείλω στους φίλους και τις φίλες μου τόσο για την συμπαράσταση τους σε κάθε χαρά και λύπη επαγόμενη από το εργαστηριακό περιβάλλον όπως και την κατανόηση που έδειχναν καθώς όσο εξελισσόταν η διατριβή αυτή, τόσο συρρικνωνόταν ο χρόνος που τους αφιέρωνα.

Τέλος ευχαριστώ τους βασικούς συντελεστές και αφανείς ήρωες όλων αυτό τον καιρό, την οικογένεια μου, για τα υλικά αλλά κυρίως τα ψυχικά εφόδια που μου παρείχαν όσο καιρό θυμάμαι τον εαυτό μου.

Το θέμα της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής ορίστηκε αρχικά με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (Συνεδρία 4^η/14.12.2011) και τροποποιήθηκε στην συνέχεια με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Βιοτεχνολογίας (Συνεδρία 20^η/2.3.2016).

Η υλοποίηση της Διδακτορικής Διατριβής πραγματοποιήθηκε με χρηματοδότηση από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).

Στην οικογένεια &
στους φίλους μου

Περιεχόμενα

Περίληψη	10
Abstract.....	11
1 Εισαγωγή	12
1.1 Η ελιά	12
1.2 Το ελαιόλαδο.....	18
1.3 Βιοσύνθεση και βιομετασχηματισμοί των σεκοϊριδοειδών στην ελιά.....	20
1.4 β-Γλυκοσιδάσες.....	24
1.5 β-Γλυκοσιδάσες και χημική άμυνα	29
1.6 Δυναμικό σύστημα άμυνας της ολευρωπαΐνης	33
1.7 Σκοπός.....	36
2 Υλικά και Μέθοδοι	37
2.1 Φυτικό υλικό	37
2.1.1 Συνθήκες ανάπτυξης φυτών <i>N. benthamiana</i>	37
2.2 Χειρισμοί βακτηριακών κυττάρων.....	37
2.2.1 Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων <i>E.coli</i>	37
2.2.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> με πλασμιδιακό DNA..	38
2.2.3 Προετοιμασία ηλεκτροδεκτικών κυττάρων <i>A. tumefaciens</i>	39
2.2.4 Μετασχηματισμός ηλεκτροδεκτικών κυττάρων <i>A. tumefaciens</i> με πλασμιδιακό DNA	40
2.2.5 Αποθήκευση βακτηριακών στελεχών για μεγάλα χρονικά διαστήματα	41
2.2.6 Ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών σε βακτήρια <i>E. coli</i>	41
2.2.7 Παροδική έκφραση πρωτεϊνών σε φύλλα φυτών <i>N. benthamiana</i> (αγροέγχυση).....	42
2.3 Χειρισμοί νουκλεϊκών οξέων.....	44
2.3.1 Απομόνωση ριβονουκλεϊκών οξέων (RNA) από φυτικό ιστό.....	44
2.3.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από <i>E. coli</i> με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης.....	44
2.3.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την βοήθεια κολώνας	45
2.3.4 Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων (DNA/RNA) σε πηκτή αγαρόζης.....	45
2.3.5 Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης ..	46
2.3.6 Υπολογισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων	46
2.3.7 Χειρισμός με DNase	46

2.3.8	Σύνθεση συμπληρωματικής αλυσίδας μέσω ανάστροφης μεταγραφάσης 47	
2.3.9	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	48
2.3.10	Σχεδιασμός εκκινητών	49
2.3.11	Λιγοποίηση τμημάτων DNA.....	50
2.3.12	Πέψη νουκλεϊκών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού	51
2.4	Χειρισμοί πρωτεϊνών	51
2.4.1	Απομόνωση πρωτεϊνών από καλλιέργεια <i>E. coli</i>	51
2.4.2	Απομόνωση πρωτεϊνών από φυτικούς ιστούς	52
2.4.3	Απομόνωση πρωτεϊνών από πυρήνες φυτών <i>N. benthamiana</i>	52
2.4.4	Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford.....	53
2.4.5	Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE).....	53
2.4.6	Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και ανίχνευση ενζυμικής ενεργότητας (Ζυμόγραμμα)	55
2.4.7	Χρώση με Coommasie Brilliant Blue (CBB staining).....	55
2.4.8	Χρώση με άργυρο (silver staining)	55
2.4.9	Μεταφορά πρωτεϊνών κατά Western.....	56
2.4.10	Ανοσοανίχνευση πολυπεπτιδίου - στόχου	57
2.4.11	Συμπύκνωση πρωτεϊνών με εξαλάτωση (Salting Out)	58
2.4.12	Συμπύκνωση πρωτεϊνών με μεθανόλη/χλωροφόρμιο.....	59
2.4.13	Χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Gel filtration chromatography) .	60
2.4.14	Απομόνωση πρωτεΐνης με ανοσοκατακρήμνιση (Immunoprecipitation) 61	
2.4.15	Ενζυμική αντίδραση με ολευρωπαΐνη	62
2.4.16	Κινητική ενζύμου.....	62
2.5	Χειρισμοί μεταβολιτών	63
2.5.1	Προετοιμασία ολευρωπαΐνης.....	63
2.5.2	Χειρισμός δειγμάτων	63
2.5.3	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	63
2.5.4	Μέτρηση γλυκόζης	64
2.6	Βιοπληροφορική ανάλυση	64
2.7	Διαλύματα	65
2.7.1	Διαλύματα χειρισμού βακτηρίων.....	65

2.7.2	Διαλύματα χειρισμού φυτών.....	65
2.7.3	Διαλύματα απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων και ηλεκτροφόρησης.....	66
2.7.4	Διαλύματα χειρισμού πρωτεϊνών.....	66
2.7.5	Εκκινητές	67
3	Αποτελέσματα.....	69
3.1	Το <i>OeGLU</i> κωδικοποιεί για μια αμυντική GH1 β-γλυκοσιδάση.....	69
3.2	Ετερόλογη έκφραση του <i>OeGLU</i> σε <i>E. coli</i>	74
3.3	Ετερόλογη έκφραση του <i>OeGLU</i> <i>in planta</i>	77
3.4	Το ένζυμο <i>OeGLU</i> υδρολύει την ολευρωπαΐνη.....	79
3.5	Κινητική του ενζύμου <i>OeGLU</i>	83
3.6	<i>In silico</i> τριτοταγής δομή του ενζύμου <i>OeGLU</i> και μοριακή προσκόλληση της ολευρωπαΐνης στο ενεργό κέντρο.....	85
3.7	Υποκυτταρική τοποθέτηση του ενζύμου <i>OeGLU</i>	91
3.8	Τεταρτοταγής δομή του ενζύμου <i>OeGLU</i>	94
3.9	Ανίχνευση της απογλυκοζυλίωσης της ολευρωπαΐνης με ζυμογράμματα....	99
4	Συζήτηση.....	102
5	Βιβλιογραφία	110

Περίληψη

Η ολευρωπαϊνή, το επικρατέστερο σεκοϊριδοειδές στην ελιά (*Olea europaea*), εμπλέκεται σε ένα δυαδικό σύστημα άμυνας που αποτελείται από μια β-γλυκοσιδάση η οποία απογλυκοζυλιώνει την ολευρωπαϊνή παράγοντας ένα τοξικό άγλυκο μόριο με δομή παρόμοια με την γλουταραλδεΐδη. Παρότι ο μηχανισμός άμυνας έχει μελετηθεί αρκετά, δεν έχει χαρακτηριστεί ακόμα κάποια β-γλυκοσιδάση εξειδικευμένη για την ολευρωπαϊνή. Στην παρούσα μελέτη περιγράφεται ο μοριακός χαρακτηρισμός του cDNA του OeGLU που κωδικοποιεί για μια αμυντική β-γλυκοσιδάση εξειδικευμένη για τα τερπενοειδή. Ετερόλογη έκφραση του OeGLU σε *E. coli* δεν οδήγησε σε ενεργό ένζυμο αλλά μέσω *in planta* παροδικής έκφρασης αποδείχθηκε ότι το OeGLU μπορεί να απογλυκοζυλιώσει και να ενεργοποιήσει την ολευρωπαϊνή σε έναν μεταβολίτη με ισχυρή δυνατότητα μαζικής συμπλοκοποίησης και διασύνδεσης πρωτεϊνών. Η *in silico* πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής του ενζύμου και ανάλυση μοριακής προσκόλλησης της ολευρωπαϊνής σε αυτήν έδειξε ότι το OeGLU έχει την χαρακτηριστική $(\beta/\alpha)_8$ TIM barrel δομή και το ενεργό κέντρο αποτελείται από συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα που σχετίζονται με την κατάλυση της αντίδρασης ενώ τα αμινοξέα που είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση του άγλυκου τμήματος είναι μη συντηρημένα. Οι κινητικές παράμετροι του απομονωμένου ενζύμου που υπολογίστηκαν είναι σε συμφωνία με τιμές που έχουν αναφερθεί για απομονωμένες β-γλυκοσιδάσες από τη ελιά που εξειδικευμένα απογλυκοζυλιώνουν την ολευρωπαϊνή. Το ένζυμο OeGLU βρέθηκε να τοποθετείται υποκυτταρικά στον πυρήνα των κυττάρων λόγω σινιάλου πυρηνικής τοποθέτησης (NLS) που βρίσκεται στο C-άκρο και διαγραφή του οποίου οδηγεί σε κυτταροπλασματική τοποθέτηση. Η τεταρτοταγής δομή του ενζύμου βρέθηκε να είναι μεγαλομοριακή και το OeGLU ομοπολυμερίζεται. Η εξάλειψη του NLS οδήγησε επίσης σε δομική μετάλλαξη αφού το ένζυμο ανιχνεύτηκε αποκλειστικά σαν μονομερές με μη μετρήσιμη ενζυμική δραστηριότητα. Το C-άκρο του OeGLU πιθανότατα εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση των μονομερών για την δημιουργία του ομοπολυμερούς, μια βασική προϋπόθεση για την ενεργότητα του ενζύμου. Επίσης αναφέρεται για πρώτη φορά ότι η ενζυμική απογλυκοζυλίωση του OeGLU παράγει φθορισμό, όπως φάνηκε από τα ζυμογράμματα, και με αυτή την μέθοδο είναι εφικτή η εξειδικευμένη ανίχνευση ισοενζύμων του OeGLU.

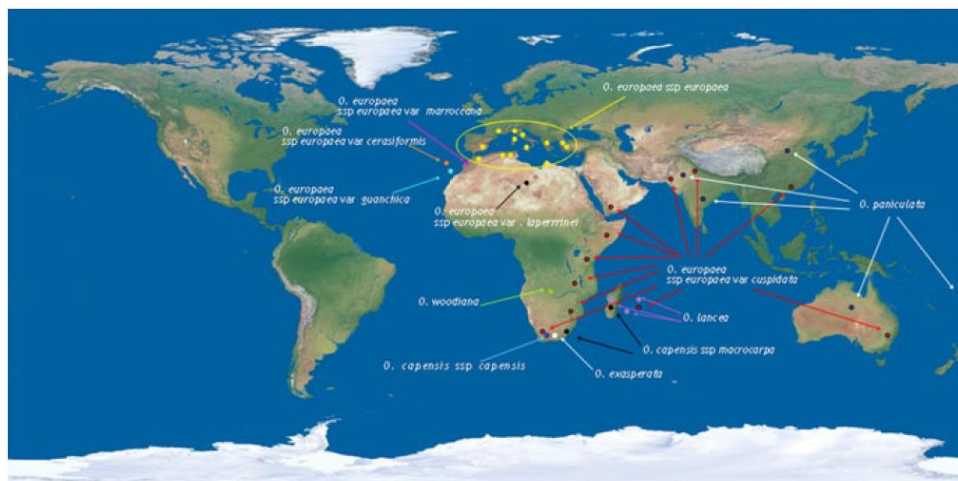
Abstract

Oleuropein, the major secoiridoid compound in olive (*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. Although oleuropein deglycosylation studies have been monitored extensively, an oleuropein β -glucosidase gene has not been characterized as yet. In the present study is reported the molecular characterization of *OeGLU* cDNA from olive encoding a β -glucosidase belonging to the defence-related group of terpenoid-specific glucosidases. Heterologous expression of *OeGLU* in *E. coli* failed to produce an active enzyme but *in planta* recombinant protein expression assays showed that *OeGLU* deglycosylated and activated oleuropein into a strong protein cross-linker. Homology and docking modelling predicted that *OeGLU* has a characteristic $(\beta/\alpha)_8$ TIM barrel conformation and a typical construction of a pocket-shaped substrate recognition domain composed of conserved amino acids supporting the β -glucosidase activity and non-conserved residues associated with aglycon specificity. Kinetic parameters of the purified enzyme came in agreement with reported values of purified oleuropein-specific β -glucosidases from olive. Subcellular localization studies of *OeGLU* proved that the enzyme is localized in the nucleus due to a Nuclear Localization Signal (NLS) located in the C-termini of the enzyme and deletion of the NLS resulted in cytoplasmic localization. The quaternary structure of *OeGLU* *in vivo* is a high molecular weight homomultimer and interestingly deletion of the NLS resulted also in a structural mutation, as the enzyme could be detected in solely monomeric form with null enzymatic activity. The C-termini of *OeGLU* is most likely involved in protein-protein interaction of the monomers for the assembly of the homomultimer, a key factor for the enzymatically active enzyme. Additionally it is reported for the first time that the enzymatic deglycosylation of oleuropein is a fluorogenic reaction as proved by in-gel activity assays (zymograms) and this methodology will help for highly specific screening for isoenzymes of *OeGLU*.

1 Εισαγωγή

1.1 Η ελιά

Το γένος *Olea* ανήκει στην οικογένεια Oleaceae η οποία περιλαμβάνει περίπου 30 γένη και 600 είδη (Jensen et al., 2002) και κατανέμεται σε κάθε ήπειρο (εικόνα 1.1). Είναι γενικά αποδεκτό ότι το γένος *Olea* χωρίζεται στα υπογένη *Tetrapilus* (Ασία), *Paniculatae* (Ασία και Αυστραλία) και *Olea* (άγρια και καλλιεργούμενη ελιά-Αφρική και Ευρώπη). Το υπογένος *Olea* χωρίζεται στους τομείς *Ligustroides* (περίπου 10 είδη) και *Olea* (ένα είδος: *O.europeaea*) των οποίων τα είδη ευδοκούν στην Ανατολική Αφρική και στα Νησιά του Ειρηνικού. Συγκεκριμένα ο τομέας *Olea* απαντάται επίσης δυτικά της Σαχάρας, στις Κανάριες Νήσους και στη Λεκάνη της Μεσογείου (Green, 2002). Στον τομέα *Olea* έχουμε το είδος *O. europaea* L, το μόνο καλλιεργούμενο για παραγωγή ελαιόλαδου και βρώσιμων ελιών όπου περιλαμβάνονται πάνω από 1000 ποικιλίες. Εντός του είδους *O. europaea* L. έχουμε τέσσερα υποείδη: το *O. europaea* ssp. *europaea* (Λεκάνη της Μεσογείου), το *O. europaea* ssp. *laperrinei* (Σαχάρα), το *O. europaea* ssp. *cerasiformis* (Κανάριοι Νήσοι και Μαδέρα) και το *O. europaea* ssp. *cuspidata* (Κίνα, Ινδία, Πακιστάν, Νεπάλ, Ιράν, Αραβική Χερσόνησο και Νοτιοανατολική Αφρική) (Green and Wickens, 1989).



Εικόνα 1.1: Γεωγραφική κατανομή του γένους *Olea*.

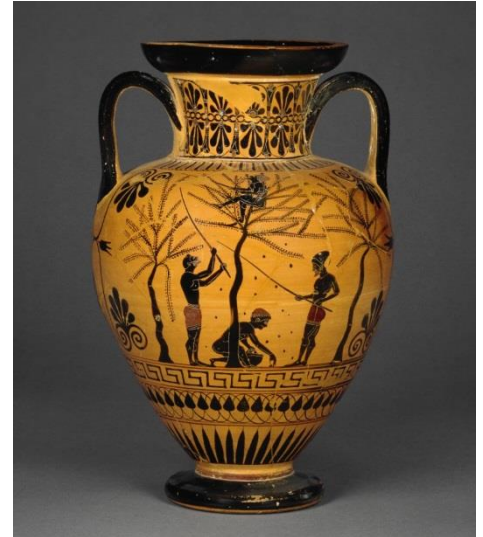
Τα τροπικά και υποτροπικά Αφρο- Ασιατικά είδη όπως τα *Olea chrysophilla* Lam. και *Olea excelsa* Ait πιθανότατα συνείσφεραν στην εξέλιξη της Ευρω-Μεσογειακής ελιάς (*O. europaea* L.) (Zohary, 1994). Η Ευρω-Μεσογειακή ελιά (*O. europaea* L. ssp. *europaea*) περιλαμβάνει την άγρια *oleaster* (var. *sylvestris*) και την καλλιεργούμενη ελιά (var. *sativa*). Μελέτες σε ITS και πλαστιδιακές αλληλουχίες δείχνουν ότι οι περισσότεροι πληθυσμοί *O. europaea* διαφοροποιήθηκαν φυλογενετικά σε πέντε γεωγραφικές ζώνες: α) ισημερινή και νότια Αφρική (ssp. *laperrinei*), β) ανατολική Αφρική και νότια Ασία (ssp. *cuspidata*), γ) ανατολική Μεσόγειο (ssp. *europaea* est), δ) δυτική Μεσόγειο (ssp. *europaea* west), ε) βορειοδυτική Αφρική (ssp. *guancica*, *cerasifomis*, *maroccana*) ωστόσο τα αντιφατικά αποτελέσματα μεταξύ ITS-1 και πλαστιδιακού DNA καθώς και οι ενδο-ITS-1 πολυμορφισμοί προτείνουν ένα πιο δυναμικό βιογεωγραφικό πρότυπο εξάπλωσης (Besnard et al., 2007). Το γεγονός ότι ένα δέντρο μπορεί να ξεπεράσει τα 1000 χρόνια ζωής (εικόνα 1.2) καθώς και το ότι εδώ και αρκετούς αιώνες ο άνθρωπος συνεχώς βελτιώνει ποικιλίες και διασταυρώνει πληθυσμούς (εικόνα 1.3) έχει οδηγήσει στην ύπαρξη μεγάλης γενετικής ποικιλομορφίας εντός του είδους.



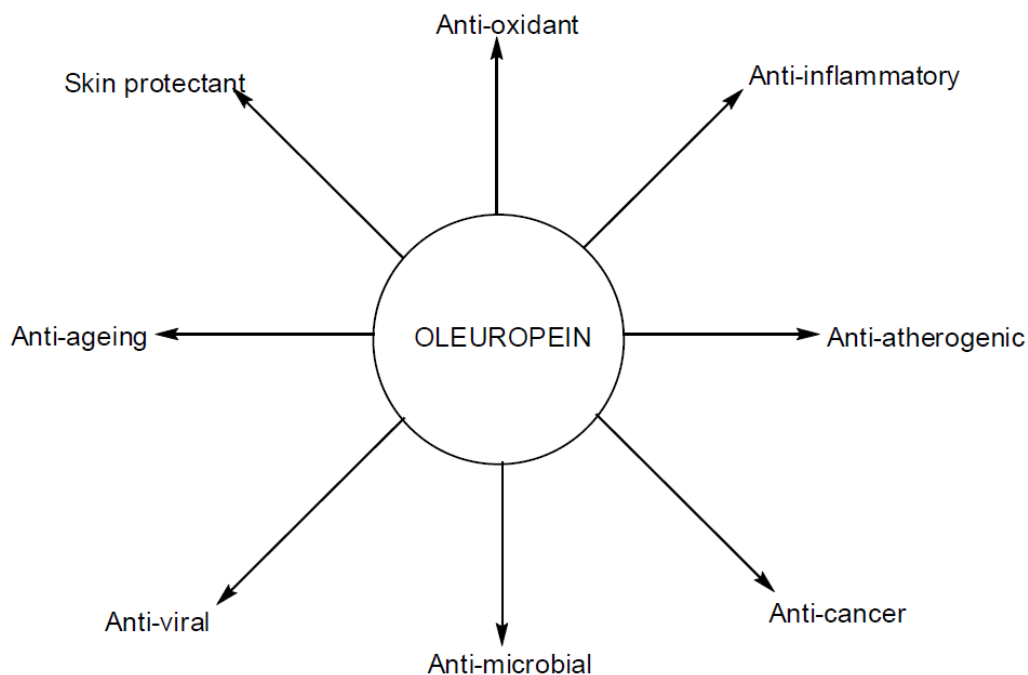
Εικόνα 1.2: Ελαιόδεντρο ηλικίας τουλάχιστον 2.500 ετών.

(Ανω Βούβες, Κρήτη. <http://goo.gl/T18Jma>)

Εικόνα 1.3: Συγκομιδή ελιών το 520 πΧ.
(Λονδίνο, Βρετανικό Μουσείο, B226
<http://goo.gl/dbsS5p>)

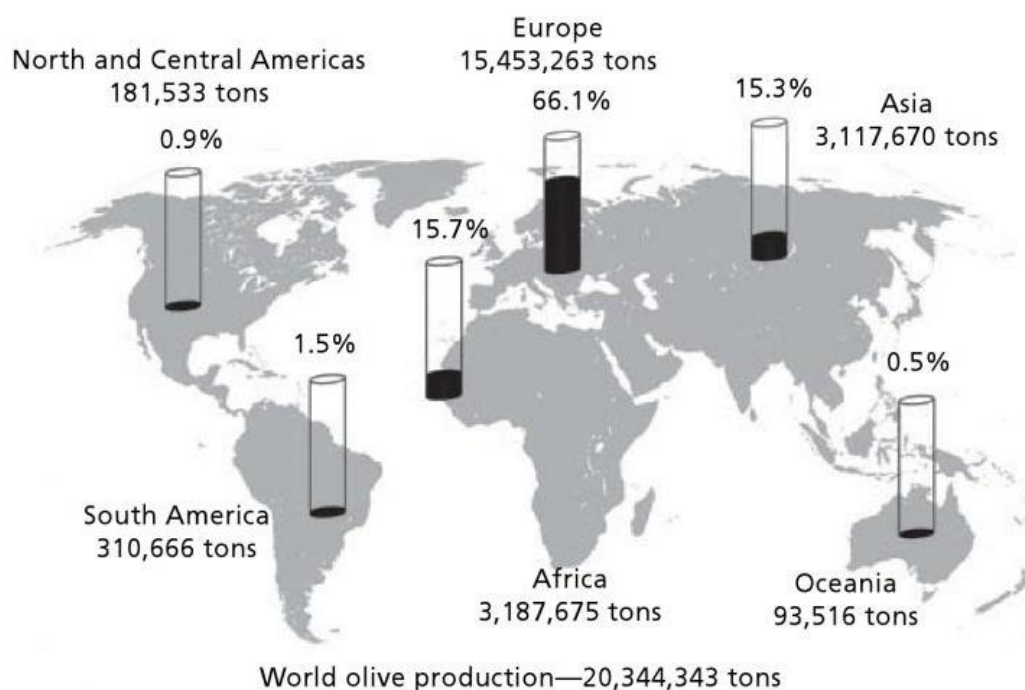


Οι καρποί και το ελαιόλαδο, χρησιμοποιούνταν τόσο για την θρεπτική τους αξία όσο και για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες εδώ και πολλά χρόνια. Έρευνες σε καρπούς, φύλλα και λάδι έχουν δείξει ότι το προφίλ των μεταβολιτών δρα συνεργιστικά μειώνοντας την πιθανότητα εμφάνισης στεφανιαίων καρδιακών παθήσεων, αρκετών τύπων καρκίνου και ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα. (Colomer et al., 2007). Ορισμένες πολυφαινόλες του ελαιόλαδου όπως οι υδρόφιλες φαινόλες είναι σπάνιες στο φυτικό βασίλειο ενώ άλλες όπως οι βιοφαινόλες και τα σεκοϊριδοειδή (ολευρωπαΐνη) απαντώνται μόνο στα είδη της οικογένειας Oleaceae (Obied et al., 2005). Ειδικά η ολευρωπαΐνη, το κύριο βιοφαινολικό συστατικό της ελιάς, προστατεύει από καρδιακές παθήσεις, έχει αντιαρρυθμική δράση, ενισχύει τον μεταβολισμό των λιπιδίων, έχει αντικαρκινική, αντιική και αντιμικροβιακή δράση (Omar, 2010) (εικόνα 1.4).

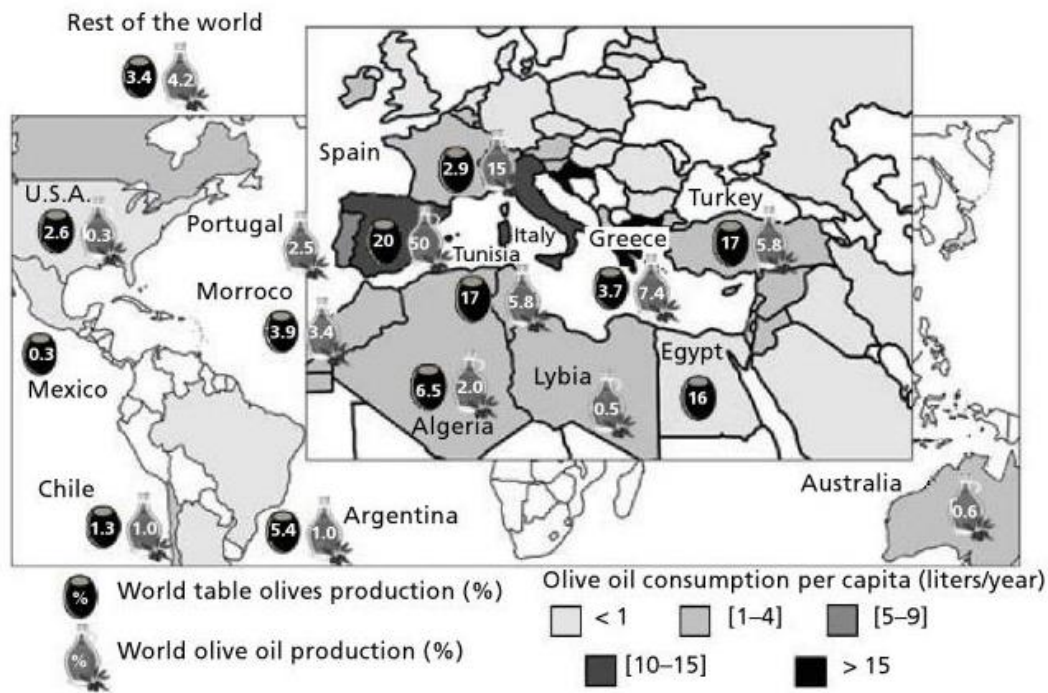


Εικόνα 1.4: Φαρμακευτικές ιδιότητες της ολευρωπαΐνης (Omar, 2010).

Παραδοσιακά η καλλιέργεια της ελιάς ήταν περιορισμένη στην λεκάνη της Μεσογείου ωστόσο τις τελευταίες δεκαετίες έχει επεκταθεί στην Αμερική, στην Αφρική και στην Ωκεανία. Το ενδιαφέρον όλο και περισσότερων χωρών για παραγωγή ελαιολάδου καθώς και η εντατική καλλιέργεια έχει σαν αποτέλεσμα η παραγωγή ελιών να αυξηθεί από 9.000.000 τόνους το 1990 σε 23.000.000 τόνους το 2013 και το ελαιόλαδο πλέον κατέχει την 9^η θέση στην παγκόσμια παραγωγή φυτικών ελαίων (Malheiro et al., 2015). Στην Ευρώπη παράγεται το 66.1%, στην Αφρική το 15.7%, στην Ασία το 15.3%, και σε Αμερική και Ωκεανία μόλις το 2.9% της παγκόσμιας παραγωγής (Εικόνα 1.5). Τις τελευταίες 2.5 δεκαετίες έχει παρατηρηθεί αύξηση 32% και 105% στην κατανάλωση ελαιολάδου και βρώσιμων ελιών αντίστοιχα (Εικόνα 1.6) με την Ελλάδα να είναι η χώρα με την υψηλότερη κατανάλωση ελαιολάδου (17.9L κατά κεφαλήν ετησίως) και την Αλβανία να είναι η χώρα με την υψηλότερη κατανάλωση βρώσιμων ελιών (9.3kg κατά κεφαλήν ετησίως) (Malheiro et al., 2015).



Εικόνα 1.5: Παγκόσμια παραγωγή ελιών το 2013 (Malheiro et al., 2015).



Εικόνα 1.6: Εκτίμηση της παγκόσμιας παραγωγής (%) και κατανάλωσης (λίτρα κατά κεφαλήν ετησίως) ελαιολάδου καθώς και παραγωγής βρώσιμων ελιών (%) για το 2014 (Malheiro et al., 2015).

Η ελιά είναι δέντρο αειθαλές και ανάλογα με την ποικιλία και τις περιβαλλοντικές συνθήκες μπορεί να φτάσει σε ύψος από 3 έως 20 μέτρα, αν και οι περισσότερες ποικιλίες που καλλιεργούνται δεν ξεπερνούν τα 5. Ο κορμός του νεαρού δέντρου είναι λείος και πράσινος αλλά με την πάροδο του χρόνου γίνεται ανομοιόμορφος με διογκώσεις και σκουραίνει. Τα άνθη του είναι μικρά λευκοκίτρινα, 15-30 ανά ανθοταξία σε βλαστούς τρέχοντος έτους. Τα φύλλα είναι μικρά λογχοειδή, διατηρούνται για 3 χρόνια και είναι πλούσια σε ταννίνες. Τόσο στην προσαξονική όσο και στην απαξονική επιφάνεια του φύλλου έχουμε ασπιδοειδή τριχίδια. Ο καρπός είναι δρύπη, σφαιρικός ή ελλειπτικός και αποτελείται από το εξωκάρπιο, το μεσοκάρπιο που είναι και το βρώσιμο μέρος και το ενδοκάρπιο όπου βρίσκεται το έμβryo. Ο ώριμος καρπός είναι μαύρου χρώματος και το μέγεθος του εξαρτάται από την ποικιλία, την γονιμότητα του εδάφους, τον αριθμό καρπών ανά δέντρο, την διαθεσιμότητα νερού και τις καλλιεργητικές τεχνικές. Η παραγωγή καρπών ξεκινάει το 3^ο έτος αλλά η πλήρης απόδοση του δέντρου επιτυγχάνεται μεταξύ 11^{ου} και 12^{ου} έτους για ξηρά εδάφη και μεταξύ 7^{ου} και 8^{ου} έτους για αρδευόμενα. Το ριζικό σύστημα έχει την τάση να αναπτύσσεται οριζόντια παρά κάθετα. Η ελιά είναι ανθεκτική σε αντίξοες συνθήκες και προσαρμόζεται στα περισσότερα είδη εδαφών

ακόμα και σε εδάφη φτωγά που δεν μπορούν να καλλιεργηθούν και είναι ανθεκτική στην ξηρασία (Therios, 2008a).

Η ελιά καλλιεργείται σε πολλές ξηρές ή ημίξηρες περιοχές και παραδοσιακά οι ελαιώνες δεν αρδεύονται αν και η άρδευση ευνοεί την παραγωγή. Οι Μεσογειακές κλιματικές συνθήκες είναι ιδανικές λόγω συχνών βροχοπτώσεων και της θερμοκρασίας. Επίσης παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε υψηλή αλατότητα και γίνονται προσπάθειες για ποικιλίες στις οποίες θα γίνεται χρήση υφάλμυρου νερού (Bouaziz, 1990).

Υπάρχουν πολλές ποικιλίες που διαφοροποιούνται κυρίως στο μέγεθος, το χρώμα, την περιεκτικότητα σε λάδι και λιπαρά οξέα του καρπού κ.α.. Κάποιες είναι μόνο τοπικού ενδιαφέροντος ενώ άλλες κατανέμονται σε μεγαλύτερες εκτάσεις. Κάθε ποικιλία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παραγωγή ελαιολάδου ή βρώσιμων ελιών αν και γενικά οι ελαιοπαραγωγικές έχουν μικρότερο λόγο πολτού : πυρήνα (4-7:1) σε σχέση με τις βρώσιμες (7-10:1) (Therios, 2008b).

Αρκετά γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα κλειδιά για την βιοσύνθεση λιπαρών οξέων και αντιοξειδωτικών καθώς και την τροποποίηση και αποθήκευση των τριακυλογλυκερολών έχουν απομονωθεί. Η έκφραση γονιδίων κατά την ανάπτυξη του καρπού και του εμβρύου καθώς και η παροδική έκφραση σε διάφορους ιστούς επέτρεψε την ταυτοποίηση των πιο σημαντικών για αποθήκευση λιπαρών οξέων. Με την χρήση RAPDs, οι ελληνικές ποικιλίες χωρίζονται σε δυο μεγάλες και μια μικρότερη ομάδες ανάλογα με το μέγεθος των καρπών. Η πρώτη περιλαμβάνει τις βρώσιμες ελιές, η δεύτερη τις ελαιοπαραγωγικές και η τρίτη τις ελιές αγρίου τύπου (Hatzopoulos et al., 2002).

Το περιεχόμενο DNA στον πυρήνα υπολογίστηκε με κυτταρομετρία ροής μεταξύ 2.90 ± 0.020 pg/2C και 3.07 ± 0.018 pg/2C στις καλλιεργούμενες ποικιλίες και 3.19 ± 0.047 pg/2C DNA στην άγρια ελιά δείχνοντας μικρή διαφορά μεταξύ τους (Loureiro et al., 2007). Γενικά τα είδη του γένους *Olea* είναι διπλοειδή με 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων, ωστόσο έχουν βρεθεί και πολυπλοειδή φυτά σε φυσικούς πληθυσμούς των *O. e. ssp. cerasiformis* (τετραπλοειδή) και *maroccana* (εξαπλοειδή). Έχει προταθεί ότι η πολυπλοειδία ευνοήθηκε ως άμυνα στον ομομεικτικό εκφυλισμό (Besnard et al., 2008).

1.2 Το ελαιόλαδο

Αρκετές επιδημιολογικές μελέτες έχουν συνδέσει την Μεσογειακή διατροφή με την μακροζωία λόγω μειωμένης πιθανότητας εμφάνισης χρόνιων και εκφυλιστικών ασθενειών (Tripoli et al., 2005). Παρότι πολλοί παράγοντες μπορεί να συνεισφέρουν στην μακροζωία, είναι γενικώς αποδεκτό ότι το παρθένο ελαιόλαδο αποτελεί βασική συνιστώσα στα πλεονεκτήματα της Μεσογειακής διατροφής (García-González et al., 2008) και αποτελεί την κύρια πηγή πρόσληψης λιπαρών αντικαθιστώντας τα βλαβερά ζωικά λίπη (Huang and Sumprio, 2008).

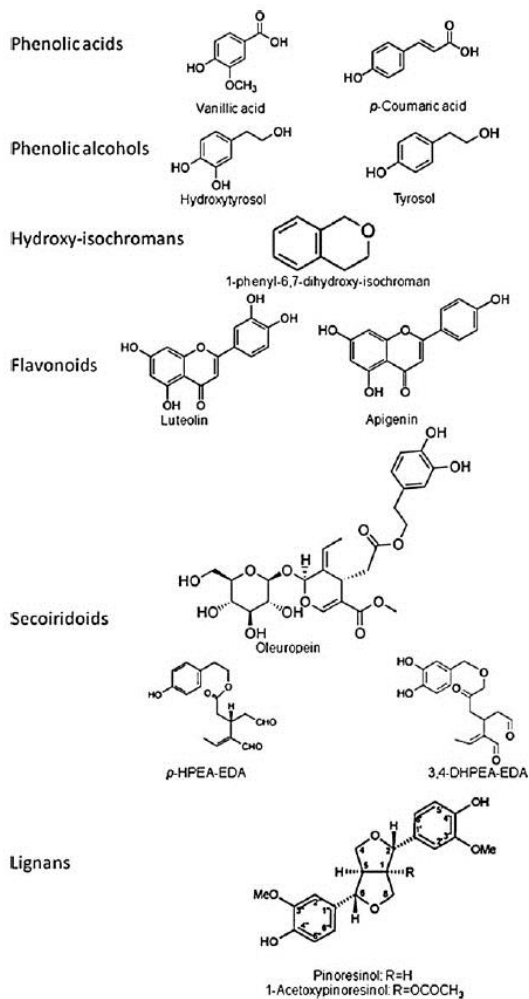
Από χημικής απόψεως, το παρθένο ελαιόλαδο παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια ουσιών. Σε ποσοστό περίπου 98%, αποτελείται κυρίως από τριακυλογλυκερόλες (TAGs), διακυλογλυκερόλες (DAGs), μονοακυλογλυκερόλες (MAGs) καθώς και από ελεύθερα λιπαρά οξέα (Boskou et al., 1996). Βασικό χαρακτηριστικό του ελαιολάδου είναι η υψηλή συγκέντρωση μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (MUFAs), κυρίως στην μορφή ολεϊκού οξέος, τα οποία μειώνουν τον κίνδυνο αρτηριοσκλήρυνσης και προστατεύουν από διάφορους τύπους καρκίνων (Moreno and Mitjavila, 2003). Το υπόλοιπο 2% αποτελείται από περισσότερες από 230 ουσίες που διακρίνονται σε παράγωγα των λιπαρών οξέων όπως τα φωσφολιπίδια, οι κηροί και οι στερολικοί εστέρες, καθώς και από ουσίες μη σχετικές με τα λιπαρά οξέα όπως οι υδρογονάνθρακες, οι αλκοόλες, οι στερόλες, οι πτητικές και αντιοξειδωτικές ουσίες (Boskou et al., 1996). Παρά την μικρή συγκέντρωσή τους, οι ενώσεις αυτές παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ποιότητα και τον χαρακτηρισμό των διαφορετικών ελαιολάδων.

Μια βασική διαφοροποίηση του παρθένου ελαιολάδου με άλλα φυτικά έλαια είναι η υψηλή συγκέντρωση αντιοξειδωτικών μεταβολιτών με επικρατέστερες τις λιπόφιλες και υδρόφιλες φαινόλες. Εκτός της σημαντικότητας τους στην φυσιολογία του φυτού συνεισφέροντας στην άμυνα έναντι παθογόνων (Carluccio et al., 2007), οι ουσίες αυτές είναι καθοριστικής σημασίας για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου καθώς και τα πλεονεκτήματα του στην υγεία (Servili and Montedoro, 2002).

Οι κύριες λιπόφιλες φαινόλες στο ελαιόλαδο είναι οι τοκοφερόλες οι οποίες είναι ετεροκυκλικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους με επικρατέστερη την α-

τοκοφερόλη (90%) ωστόσο απαντώνται και οι β- και γ-τοκοφερόλες (Beltrán et al., 2005). Παρότι τα ποσοστά τοκοφερολών ποικίλουν και εξαρτώνται από τις αγρονομικές συνθήκες, την καλλιεργούμενη ποικιλία και την ωρίμανση του καρπού, η σύσταση σε τοκοφερόλες αποτελεί κριτήριο καθαρότητας του παρθένου ελαιόλαδου. Οι τοκοφερόλες μαζί με άλλες φαινολικές ενώσεις έχουν συνεργιστικό ρόλο στην οξειδωτική σταθερότητα του ελαιόλαδου (Mateos et al., 2003). Άλλες λιπόφιλες ενώσεις που εντοπίζονται στο ελαιόλαδο είναι οι α- και β- χλωροφύλλες και παράγωγα αυτών (α και β-φαιοφυτίνες και φαιοφορβίδια) (Psomiadou and Tsimidou, 2001) καθώς και καροτενοειδή με επικρατέστερα την λουτεΐνη και το β-καροτένιο (Ranalli et al., 2005). Οι συγκέντρωση αυτών των χρωμοφόρων μειώνεται κατά την ωρίμανση του καρπού και η παρουσία τους στο ελαιόλαδο εξαρτάται από τις μετασυλλεκτικές πρακτικές (Psomiadou and Tsimidou, 2001).

Οι υδρόφιλες φαινόλες στο ελαιόλαδο διακρίνονται σε φαινολικά οξέα, φαινολικές αλκοόλες, υδρόξυ-ισοχρωμάνες, φλαβονοειδή, λιγνάνες και σεκοϊριδοειδή (Εικόνα 1.7). Συνολικά οι υδρόφιλες φαινόλες είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την ποιότητα του ελαιόλαδου αφού καθορίζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τον χρόνο ημιζωής του. Μεταξύ αυτών οι λιγνάνες και τα σεκοϊριδοειδή απαντώνται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Στην κατηγορία των φαινολικών οξέων έχουμε κυρίως το καφεϊκό, το p- και ο-κουμαρικό, το σιναπικό και το γαλλικό οξύ. Τα φαινολικά οξέα είναι δευτερογενείς μεταβολίτες με αρωματικό δακτύλιο, απαντώνται σε μεγάλο εύρος φυτών, σχετίζονται με το χρώμα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφών και χρησιμοποιούνται ως πιθανοί δείκτες γεωγραφικής προέλευσης και ποικιλιών ελιάς (Buiarelli et al., 2004; Pancorbo et al., 2005). Στις φαινολικές αλκοόλες έχουμε την υδροξυτυροσόλη (3,4-διυδροξυφαινυλαιθανόλη) και την τυροσόλη (p-υδροξυφαινυλαιθανόλη). Οι αλκοόλες αυτές απαντώνται σε μικρές συγκεντρώσεις στα φρέσκα ελαιόλαδα, ωστόσο το ποσοστό τους αυξάνεται κατά την αποθήκευση των λαδιών λόγω υδρόλυσης των αντίστοιχων πρόδρομων σεκοϊριδοειδών (Brenes et al., 2001). Δύο υδρόξυ-ισοχρωμάνες έχουν εντοπιστεί στο ελαιόλαδο, η 1-φαινυλ-6,7-διυδροξυισοχρωμάνη και η 1-(3'-μεθοξυ-4'-υδροξυ)φαινυλ-6,7-διυδροξυισοχρωμάνη. Σχηματίζονται κατά την εξαγωγή του λαδιού μεταξύ υδροξυτυροσόλης και βενζαλδεϋδης ή βανιλίνης (Bendini et al., 2007). Στα φλαβονοειδή του ελαιόλαδου έχουμε κυρίως την λουτεολίνη και την απιγενίνη (Mateos et al., 2001) και στις λιγνάνες περιλαμβάνονται η πινορεσινόλη και



η ακετοξυπινωρεσινόλη (Servili et al., 2004). Στην κατηγορία των σεκοϊριδοειδών στο ελαιόλαδο έχουμε κυρίως τις άγλυκες μορφές της ολευρωπαΐνης, της απομεθυλολευρωπαΐνης και του λιγκστροσιδίου και παράγωγα αυτών (Servili et al., 2004; Karkoula et al., 2014). Στα σεκοϊριδοειδή αυτά έχει επικεντρωθεί κυρίως η έρευνα καθώς απαντώνται μόνο στην οικογένεια των Oleaceae και έχουν χημειοταξινόμικό (Jensen et al., 2002) και φαρμακευτικό (Bulotta et al., 2013) ενδιαφέρον.

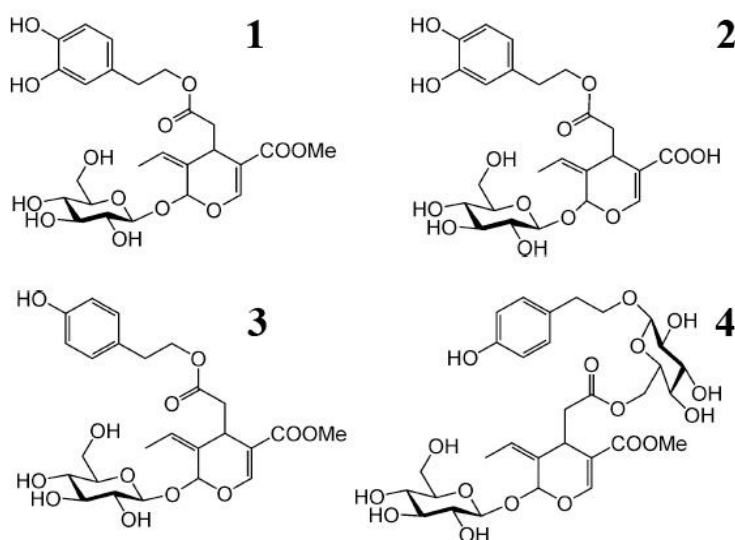
Εικόνα 1.7: Παραδείγματα σημαντικών υδρόφιλων φαινολικών ουσιών που απαντώνται στο παρθένο ελαιόλαδο (El Riachy et al., 2011).

1.3 Βιοσύνθεση και βιομετασχηματισμοί των σεκοϊριδοειδών στην ελιά

Τα ιριδοειδή παράγονται από τα μονοτερπένια και χημικά χαρακτηρίζονται από έναν εξαμελή ετεροκυκλικό δακτύλιο συνδεδεμένο με έναν δακτύλιο κυκλοπεντανίου (Bianco et al., 1999b). Με ενζυμική διάνοιξη του κυκλοπεντανικού δακτυλίου παράγεται η σεκοξυλογανίνη που είναι η πρόδρομη ένωση των σεκοϊριδοειδών. Στα είδη της οικογένειας Oleaceae, τα σεκοϊριδοειδή απαρτίζονται από ένα φαινολικό κατάλοιπο εστεροποιημένο με ένα ολεοσιδικό κατάλοιπο (Obied et al., 2008). Οι ενώσεις αυτές θεωρείται ότι προέρχονται από μια διακλάδωση του μονοπατιού βιοσύνθεσης των φαινυλπροπανοειδών (φαινολικό κατάλοιπο) με τα τερπένια του μονοπατιού βιοσύνθεσης του μεβαλονικού οξέος (ολεοσιδικό κατάλοιπο). Οι ενώσεις που απαρτίζονται από τον γλυκοζίτη του ελενολικού οξέος και από μια εξωκυκλική

ενεργή ομάδα με 8,9-ολεφινικό δεσμό είναι γνωστές σαν ολεοσιδία (Soler-Rivas et al., 2000).

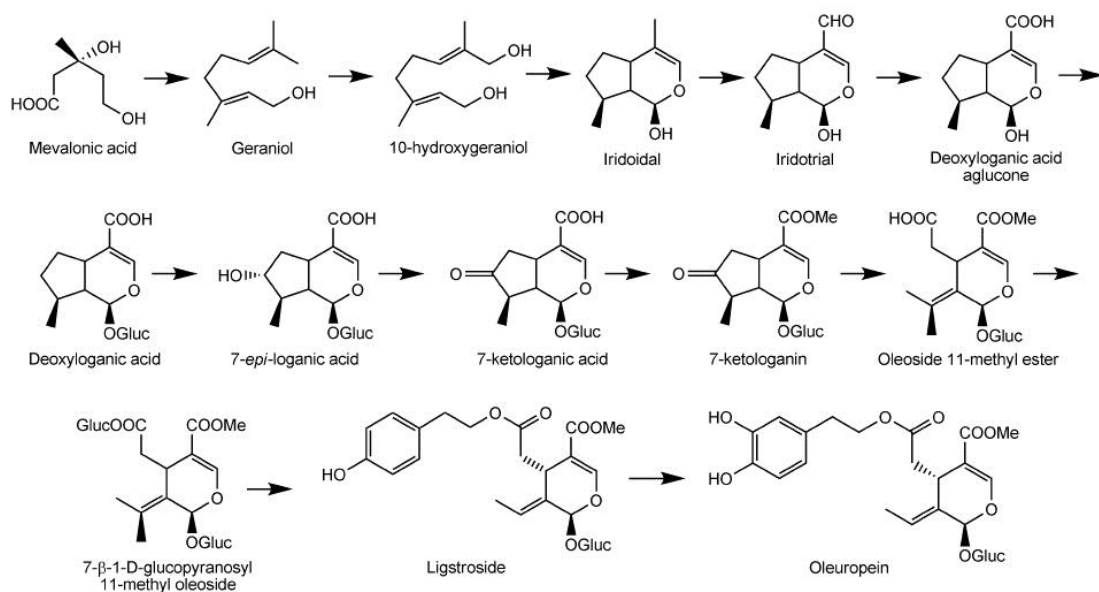
Το επικρατέστερο σεκοϊριδοειδές στην ελιά είναι η ολευρωπαΐνη η οποία είναι εστέρας του γλυκοσιδίου του ελενολικού οξέος με την υδροξυτυροσόλη (3,4-διυδρόξυφαινυλαιθανόλη) και απαντάται σε διάφορα μέρη του φυτού όπως τα φύλλα, τον καρπό και τη ρίζα (Amiot et al., 1986; Ortega-Garcia and Peragon, 2010). Η συγκέντρωση του μεταβολίτη αυτού φτάνει έως και 14% του ξηρού βάρους στους νεαρούς καρπούς (Amiot et al., 1986). Η συγκέντρωση της ολευρωπαΐνης στον καρπό εξαρτάται από το στάδιο ωρίμανσης. Στα νεαρά στάδια ανάπτυξης η συγκέντρωση της ολευρωπαΐνης είναι υψηλή, αλλά καθώς ο καρπός ωριμάζει μειώνεται σταδιακά καταλήγοντας σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα όταν ο καρπός είναι μαύρος. Αντίθετη πορεία ακολουθεί στα φύλλα του δέντρου (Ranalli et al., 2006). Άλλα σημαντικά σεκοϊριδοειδή που απαντώνται στην ελιά σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις είναι η απομεθυλολευρωπαΐνη (οξικό παράγωγο της ολευρωπαΐνης), το λιγκστροσίδιο (εστέρας γλυκοσιδίου του ελενολικού οξέος και τυροσόλης), και το νουζενίδιο (Εικόνα 1.8). Με εξαίρεση το νουζενίδιο που απαντάται αποκλειστικά στον σπόρο, τα υπόλοιπα σεκοϊριδοειδή έχουν εντοπιστεί σε όλα τα μέρη του καρπού ωστόσο η μεταξύ τους συγκέντρωση παρουσιάζει διακυμάνσεις αναλόγως της ποικιλίας και του σταδίου ωρίμανσης του καρπού (Soler-Rivas et al., 2000).



Εικόνα 1.8: Τα κυριότερα σεκοϊριδοειδή που απαντώνται στην ελιά.

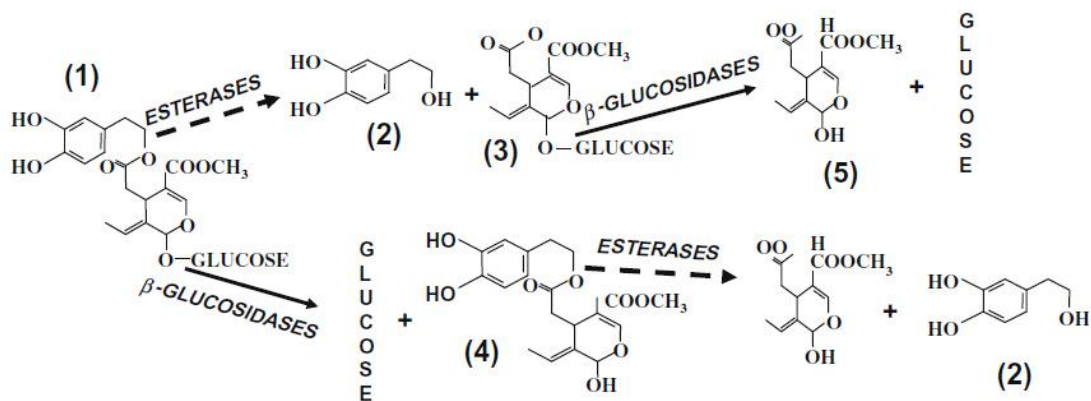
Απεικονίζονται οι δομές της ολευρωπαΐνης (1), της απομεθυλολευρωπαΐνης (2), του λιγκστροσιδίου (3) και του νουζενιδίου (4).

Στα περισσότερα φυτά που συνθέτουν ιριδοειδή, η βιοσύνθεση τους γίνεται μέσω της σεκολογανίνης (πχ τάξη Gentianales και τάξη Cornales) και πειράματα στην ελιά με ραδιοσημασμένους πρόδρομους μεταβολίτες είχαν καταλήξει ότι και στα φυτά της οικογένειας Oleaceae ακολουθείται το ίδιο μονοπάτι βιοσύνθεσης της ολευρωπαΐνης μέσω της σεκολογανίνης (Inouye et al., 1974). Αυτά τα αποτελέσματα αργότερα αμφισβητήθηκαν λόγω χαμηλής ενσωμάτωσης της ραδιοσημασμένης σεκολογανίνης σε ολευρωπαΐνη (0.34%) και αποδόθηκαν στην αδυναμία εξωγενούς πρόσληψης μεταβολιτών από την ελιά. Πειράματα σε άλλα είδη της οικογένειας Oleaceae (γέννη *Fraxinus* και *Syringa*), με μεγαλύτερη ικανότητα υδροπονικής απορρόφησης ραδιοσημασμένων ουσιών, έδειξαν ότι βασικοί πρόδρομοι μεταβολίτες στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των σεκοϊριδοειδών στην οικογένεια Oleaceae είναι η 7-επιλογανίνη και το 7-επιλογανικό οξύ αναδεικνύοντας την διαφορετικότητα στον αναβολισμό των ουσιών αυτών εντός της οικογένειας Oleaceae σε σχέση με άλλες οικογένειες όπου απαντώνται σεκοϊριδοειδή (Damtoft et al., 1993; Jensen et al., 2002). Το κοινώς αποδεκτό προτεινόμενο μονοπάτι βιοσύνθεσης της ολευρωπαΐνης απεικονίζεται στην Εικόνα 1.9. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι δευτεριωμένα πρόδρομα ιριδοειδή μπορούν να απορροφηθούν από κάλλους ελιάς και να παραχθεί ολευρωπαΐνη επομένως αυτή η τεχνική θα συνεισφέρει στην αποσαφήνιση του μονοπατιού (Serrilli et al., 2015).



Εικόνα 1.9: Προτεινόμενο μονοπάτι βιοσύνθεσης της ολευρωπαΐνης (Obied et al., 2008).

Στον *in vivo* καταβολισμό των σεκοϊριδοειδών εμπλέκονται εστεράσες και β-γλυκοσιδάσες (Εικόνα 1.10). Κατά το στάδιο της μαύρης ωρίμανσης του καρπού η συγκέντρωση της ολευρωπαΐνης μειώνεται και παρατηρείται αύξηση συγκέντρωσης της απομεθυλολευρωπαΐνης καθώς και του γλυκοσιδίου του ελενολικού οξέος πιθανότατα λόγω δράσης εστερασών. Η ποσοτική μείωση της ολευρωπαΐνης συμβαδίζει με την ποσοτική αύξηση γλυκοσιδίου του ελενολικού οξέος (Gutierrez-Rosales et al., 2010). Πέρα από τον καταβολισμό μέσω εστερασών, η ολευρωπαΐνη υδρολύεται μέσω β-γλυκοσιδάσης στην άγλυκη ολευρωπαΐνη (3,4-DHPEA-EA), και στην συνέχεια πιθανότητα μέσω δράσης μεθυλεστεράσης προκύπτει η ολεασίνη (3,4-DHPEA-EDA) (Gutierrez-Rosales et al., 2012). Η ολεασίνη φαίνεται να είναι προϊόν του καταβολισμού της ολευρωπαΐνης και όχι της απομεθυλολευρωπαΐνης όπως είχε προταθεί παλιότερα αφού σε ποικιλίες με μικρή συγκέντρωση απομεθυλολευρωπαΐνης απαντάται υψηλή συγκέντρωση ολεασίνης (Romero-Segura et al., 2012). Αντίστοιχα με υδρόλυση του λιγκστροσιδίου προκύπτει το άγλυκο λιγκστροσίδιο (p-HPEA-EA) και εν συνεχεία η ολεοκανθάλη (p-HPEA-EDA) (Gutierrez-Rosales et al., 2012). Οι άγλυκες μορφές της ολευρωπαΐνης και του λιγκστροσιδίου καθώς και η ολεασίνη και η ολεοκανθάλη αποτελούν τα κύρια σεκοϊριδοειδή που απαντώνται στο ελαιόλαδο και οι συγκεντρώσεις τους παρουσιάζουν έντονη διακύμανση μεταξύ των ποικιλιών (Karkoula et al., 2012, 2014).



Εικόνα 1.10: Ένζυμα που εμπλέκονται στον καταβολισμό της ολευρωπαΐνης (Segovia-Bravo et al., 2009). Οι αριθμημένοι μεταβολίτες είναι η ολευρωπαΐνη (1), η υδροξυτυροσόλη (2), γλυκοσίδιο του ελενολικού οξέος (3), άγλυκη ολευρωπαΐνη (4) και ελενολικό οξύ (5).

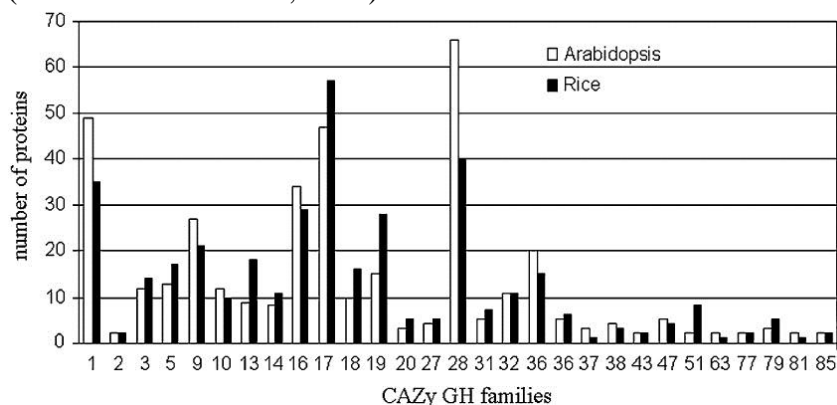
Λόγω της υψηλής ζήτησης για ελαιόλαδα καλής ποιότητας με υψηλή συγκέντρωση φαινολικών, το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει εστιαστεί στους βιοχημικούς παράγοντες που εμπλέκονται στην εξαγωγή λαδιού από τους καρπούς. Η θράυση των καρπών και η επακόλουθη μάλαξη (συγκερασμός ελαιοσωμάτων με ανάδευση) έχει σαν αποτέλεσμα οι φαινολικές ουσίες να έρχονται σε επαφή με ενδογενείς οξειδοαναγωγάσες όπως οι υπεροξειδάσες (POX) και οι πολυφαινολοξειδάσες (PPO) καθώς και β-γλυκοσιδάσες (Obied et al., 2008; Clodoneo et al., 2014). Παρότι οι οξειδωμένες μορφές των φαινολικών ουσιών που παράγονται από τις οξειδοαναγωγάσες επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου (García-Rodríguez et al., 2015), είναι γενικά αποδεκτό ότι η απογλυκοζυλίωση των σεκοϊριδοειδών από εξειδικευμένες β-γλυκοσιδάσες είναι η αρχική και καθοριστικής σημασίας ενζυμική αντίδραση που καθορίζει την χημική σύσταση του παρθένου ελαιολάδου σε αντιοξειδωτικές ουσίες (Romero-Segura et al., 2012; Hbaieb et al., 2015).

1.4 β-Γλυκοσιδάσες

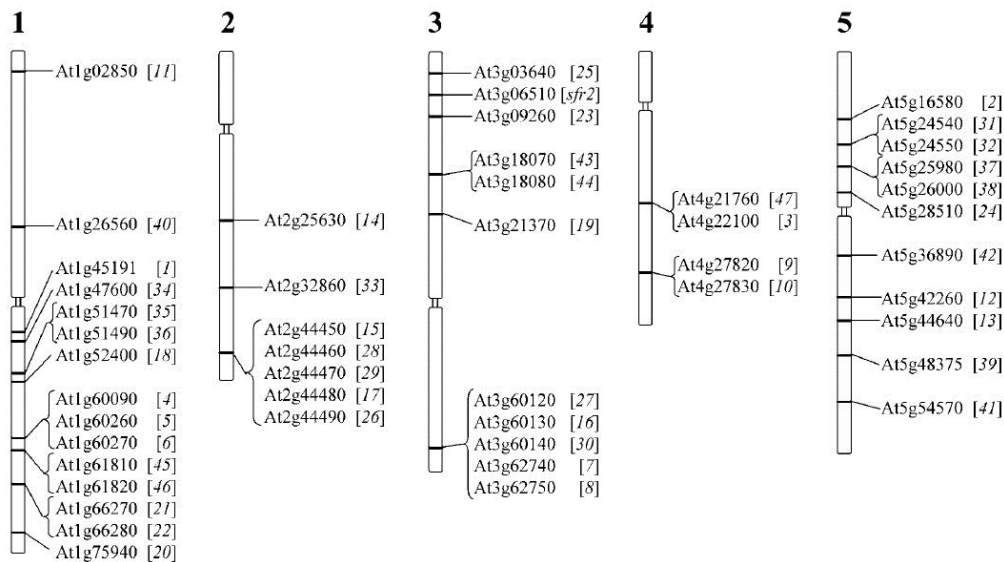
Οι β-γλυκοσιδάσες (EC 3.2.1.21) είναι ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση γλυκοσιδικών δεσμών ελευθερώνοντας μη-αναγωγικά κατάλοιπα από γλυκοσίδια και ολιγοσακχαρίτες. Απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς (Ευκαρυώτες, Ευβακτήρια και Αρχαία) και εμπλέκονται σε ποικίλες βιολογικές διεργασίες. Στα θηλαστικά, τα ένζυμα αυτά σχετίζονται κυρίως με τον μεταβολισμό γλυκολιπιδίων (Butters, 2007), στα έντομα με την πέψη ολιγοσακχαριτών και φυτικών γλυκοσιδίων που προσλαμβάνονται μέσω τροφής (Ferreira et al., 2001; Zagrobelny et al., 2008), ενώ στους μικροοργανισμούς με την μετατροπή βιομάζας και την αποικοδόμηση κυτταρίνης (Doi and Kosugi, 2004; Gilbert et al., 2008). Ωστόσο μεγαλύτερο εύρος λειτουργιών επιτελούν στο φυτικό βασίλειο όπου εμπλέκονται στην σύνθεση πρόδρομων μορίων απαραίτητων για την λιγνινοποίηση των κυτταρικών τοιχωμάτων (Escamilla-Treviño et al., 2006), στην αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος στο

ενδοσπέρμιο κατά την βλάστηση (Leah et al., 1995), στην ενεργοποίηση φυτορμονών (Lee et al., 2006), στην απελευθέρωση πτητικών μορίων-σινιάλων από τα άνθη ή άλλα μέρη του φυτού (Mattiacci et al., 1995; Reuveni et al., 1999) καθώς και στην ενεργοποίηση αμυντικών δευτερογενών μεταβολιτών (Halkier and Gershenzon, 2006; Zagrobelny et al., 2008).

Λόγω μεγάλης ετερογένειας έχει υιοθετηθεί το ακόλουθο σύστημα ταξινόμησης (Henrissat, 1991; Henrissat and Davies, 1997; Cantarel et al., 2009). Οι γλυκο-υδρολάσες (Glycoside Hydrolases, GHs) με μεγάλη αμινοξική ομολογία και συντηρημένα αμινοξικά μοτίβα ομαδοποιούνται σε οικογένειες. Μέχρι σήμερα υπάρχουν 135 οικογένειες (GH1 έως GH135). Οι οικογένειες που έχουν δομικές ομοιότητες στο ενεργό κέντρο και συντηρημένα καταλυτικά αμινοξέα ομαδοποιούνται σε φυλές (Clans). Αντίστοιχα λοιπόν υπάρχουν 14 φυλές (GH-A έως GH-N). Πολυπληθέστερη φυλή είναι η GH-A η οποία περιλαμβάνει 19 οικογένειες (www.cazy.org). Όπως ήταν αναμενόμενο λόγω πληθώρας λειτουργιών και επιβεβαιώθηκε με την αλληλούχιση διαφόρων γονιδιωμάτων, στα φυτά απαντώνται αρκετές οικογενειες και πολλά μέλη από κάθε οικογένεια. Από τις 29 οικογένειες, πολυπληθέστερες είναι οι GH1 (εξω-1,4-β-γλυκανάσες), GH17 (ενδο-1,3-β-γλυκανάσες) και GH28 (εξω/ενδο β-γλυκανάσες) (Εικόνα 1.11). Μέλη της οικογένειας GH1 εμπλέκονται στην άμυνα, την σηματοδότηση και τον μεταβολισμό συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος. Μέλη της οικογένειας GH17 εμπλέκονται στην άμυνα, την ωρίμανση της γύρης, την κυτταρική διαίρεση, την βλάστηση του σπόρου και την άνθηση. Μέλη της οικογένειας GH28 εμπλέκονται στην υδρόλυση συστατικών της πηκτίνης (Minic, 2008). Η οικογένεια GH1 περιλαμβάνει τα περισσότερα χαρακτηρισμένα μέλη και σε αυτήν κατατάσσονται 48 γονίδια και 8 ψευδογονίδια από το *Arabidopsis thaliana* (Εικόνα 1.12) (Xu et al., 2004), 38 γονίδια και 2 ψευδογονίδια από το *Oryza sativa* (Opassiri et al., 2006) και 26 γονίδια από το *Zea mays* (Gómez-Anduro et al., 2011).



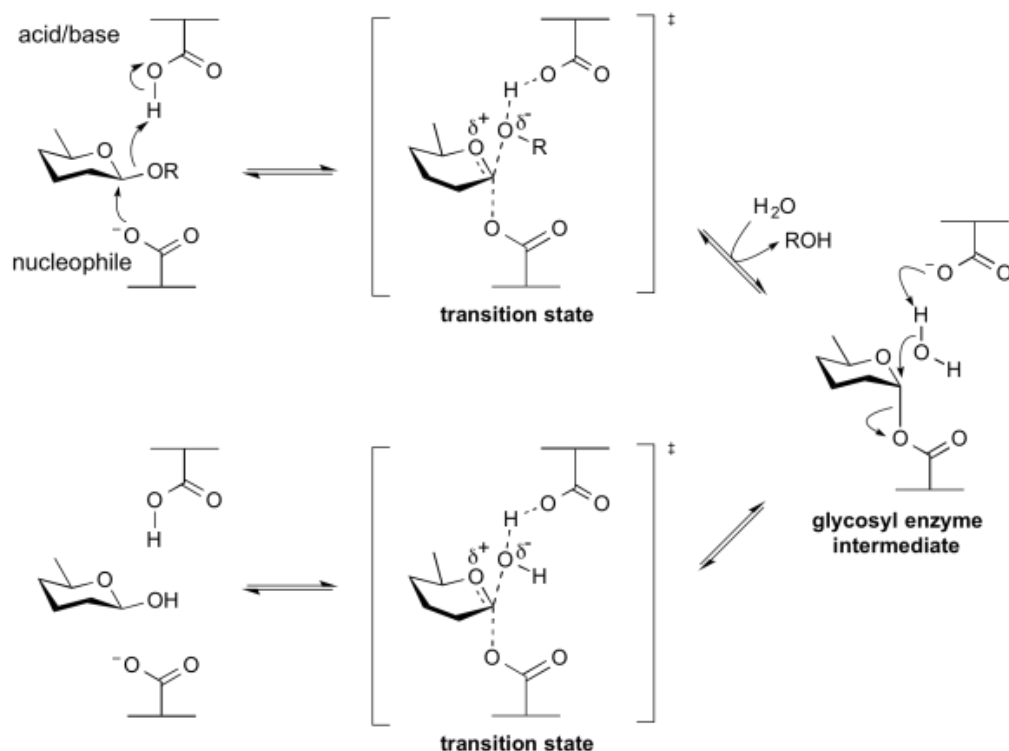
Εικόνα 1.11: Κατανομή των GH οικογενειών στα γονιδιώματα του *A. thaliana* και του *O. sativa* (Minic, 2008).



Εικόνα 1.12: Χρωμοσωμικές θέσεις των μελών της οικογένειας GH1 στο γονιδίωμα του *A. thaliana* (Xu et al., 2004).

Η τριτοταγής δομή των β-γλυκοσιδασών της οικογένειας GH1 αποτελείται από έναν κεντρικό πυρήνα 8 συστραμμένων β-πτυχωτών επιφανειών οι οποίες τοποθετούνται η μια δίπλα στην άλλη και συνδέονται μέσω 8 α-ελίκων που βρίσκονται στο εξωτερικό του πυρήνα (Henrissat and Davies, 1997). Η δομή αυτή είναι γνωστή σαν $(\beta/a)_8$ TIM barrel. Τα πιο συντηρημένα μοτίβα εντός της οικογένειας GH1 είναι το T(F/L/M)NEP και Y(I/V)TENG στα καρβόξυ-άκρα των β4 και β7 αλυσίδων του πυρήνα αντίστοιχα. Τα δυο γλουταμινικά οξέα (E) των μοτίβων αυτών είναι τα καταλυτικά αμινοξέα του ενεργού κέντρου (Barrett et al., 1995; Wang et al., 1995; Wiesmann et al., 1995). Ο μηχανισμός κατάλυσης της απόγλυκοζυλίωσης γίνεται σε δύο στάδια (Εικόνα 1.13). Στο πρώτο στάδιο το γλουταμινικό οξύ του μοτίβου Y(I/V)TENG δρα σαν δέκτης πρωτονίου (βάση) υποκαθιστώντας το άγλυκο τμήμα του μεταβολίτη και σχηματίζοντας ένα ενδιάμεσο σύμπλοκο γλυκόζης-ενζύμου. Ταυτόχρονα το γλουταμινικό οξύ του μοτίβου T(F/L/M)NEP δρα σαν οξύ πρωτονιώνοντας το οξυγόνο της γλυκόζης με αποτέλεσμα να κοπεί ο δεσμός και να απελευθερωθεί το άγλυκο τμήμα του μεταβολίτη. Στο δεύτερο στάδιο, το δεύτερο γλουταμινικό οξύ όντας πλέον ανιόν δρα σαν βάση

αφαιρώντας ένα πρωτόνιο από ένα μόριο νερού και το παραγόμενο υδροξύλιο υποκαθιστά την γλυκόζη από το πρώτο γλουταμινικό οξύ. Έτσι ελευθερώνεται ένα μόριο γλυκόζης και τα δυο γλουταμινικά οξέα αναγεννώνται (Davies and Henrissat, 1995).



Εικόνα 1.13: Μηχανισμός κατάλυσης της απογλυκοζυλίωσης από ένζυμο της οικογένειας GH1. Το γλουταμινικό οξύ του συντηρημένου μοτίβου TFNEP δρα σαν γενικό οξύ/βάση ενώ το γλουταμινικό οξύ του μοτίβου I/VTENG δρα σαν νουκλεόφιλο (www.cazy.org).

Πέρα από την τριτοταγή δομή των μελών της GH1 οικογένειας και τα δυο καταλυτικά αμινοξέα, υψηλή συντήρηση παρουσιάζουν και τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου που σχετίζονται με την πρόσδεση της γλυκόζης (Barrett et al., 1995; Burmeister et al., 1997). Ωστόσο υψηλή ετερογένεια απαντάται στα αμινοξέα του ενεργού κέντρου που σχετίζονται με την αναγνώριση του άγλυκου τμήματος του μεταβολίτη που υδρολύουν αν και αυτά βρίσκονται σε συντηρημένες θέσεις (Cicek et al., 2000; Czjzek et al., 2000; Czjzek et al., 2001; Verdoucq et al., 2003). Τα αμινοξέα αυτά προσδίδουν υψηλή εκλεκτικότητα στα υποστρώματα με αποτέλεσμα μια β-γλυκοσιδάση να μπορεί να απογλυκοζυλιώσει ορισμένα μόνο υποστρώματα με

παρόμοια δομή. Παρότι οι γλυκοζυλιωμένοι μεταβολίτες σε ένα φυτό υπερτερούν κατά πολύ του αριθμού των γονιδίων που κωδικοποιούν για β-γλυκοσιδάσες και στις περισσότερες περιπτώσεις τα ένζυμα αυτά υδρολύουν ευρύ φάσμα μεταβολιτών, υπάρχουν παραδείγματα ενζύμων που απογλυκοζυλιώνουν έναν μεταβολίτη και όχι κάποιον δομικά κοντινό του. Ένα τέτοιο παράδειγμα έχει περιγραφεί στο φυτό *Rauwolfia serpentina* (Apocynaceae) όπου τα αλκαλοειδή στρικτοσιδίνη και ραουκαφρισίνη είναι υποστρώματα διαφορετικών β-γλυκοσιδασών και η β-γλυκοσιδάση της στρικτοσιδίνης δεν μπορεί να απογλυκοζυλιώσει την ραουκαφρισίνη ενώ η β-γλυκοσιδάση της ραουκαφρισίνης έχει περίπου 1% σχετική δραστηριότητα με την στρικτοσιδίνη σε σύγκριση με την ραουκαφρισίνη (Xia et al., 2012).

Ένα άλλο χαρακτηριστικό της οικογένειας GH1 όπου παρατηρείται μεγάλη παραλλακτικότητα είναι η τεταρτοταγής δομή των ενζύμων. Οι κυανογενείς β-γλυκοσιδάσες για παράδειγμα απαντώνται ως μονομερή (Li et al., 1992), ως διμερή (Barrett et al., 1995), ως τετραμερή (Hösel et al., 1987) και ως δεκαμερή (Fan and Conn, 1985) ενώ η δημιουργία ομο- και ετερο- εξαμερών δομών στις β-γλυκοσιδάσες των γλυκοσιδίων του υδροξαμικού οξέος είναι προϋπόθεση για να είναι λειτουργικά το ένζυμο (Sue et al., 2006). Επίσης σε κάποιους γονότυπους του *Zea mays* (Poaceae) έχει εντοπιστεί μια πρωτεΐνη 35kDa (BGAF) η οποία εμπλέκεται εξειδικευμένα στον πολυμερισμό των β-γλυκοσιδασών ZmGLU1 και ZmGLU2 αλλά δεν μπορεί να πολυμερίσει την ομόλογη β-γλυκοσιδάση SbDhr1 από το *Sorghum bicolor* (Poaceae) (Blanchard et al., 2001). Παρά λοιπόν την μεγάλη ομοιότητα των β-γλυκοσιδασών σε πρωτοταγές, δευτεροταγές και τριτοταγές επίπεδο οι παραλλαγές των ενεργών ενζυμικών δομών σε τεταρτοταγές επίπεδο είναι μεγάλες και υποδηλώνουν αυστηρή ρύθμιση και εξελικτική προσαρμογή.

Προκειμένου να χαρακτηριστεί ένα ένζυμο ως προς τα υποστρώματα που υδρολύει και τις παραμέτρους που επηρεάζουν την δραστηριότητα, είναι απαραίτητη η κλωνοποίηση του cDNA και η έκφραση του σε ένα ετερόλογο σύστημα. Έτσι παρακάμπτονται τα προβλήματα κατά τον καθαρισμό του ενζύμου από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα του οργανισμού, πιθανώς λόγω χαμηλής έκφρασης, καθώς και αλληλεπικαλυπτόμενες δραστηριότητες μεταξύ ισοενζύμων που δύσκολα διαχωρίζονται. Το πιο διαδεδομένο ετερόλογο σύστημα έκφρασης είναι το

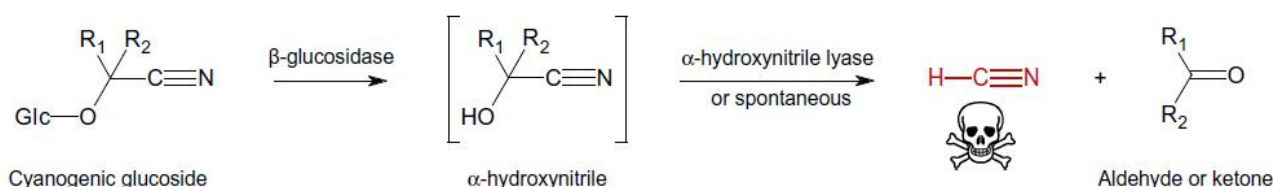
Escherichia coli μέσω του οποίου έχουν χαρακτηριστεί πληθώρα φυτικών β-γλυκοσιδασών της οικογένειας GH1 (Cicek and Esen, 1999; Zouhar et al., 1999; Geerlings et al., 2000; Warzecha et al., 2000). Στην βιβλιογραφία όμως υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις όπου απαιτούνται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στα ενζύμα αυτά και συνεπώς δεν είναι εφικτή η έκφραση λειτουργικής πρωτεΐνης σε προκαρυωτικά συστήματα. Επικρατέστερο εναλλακτικό σύστημα έκφρασης είναι η ζύμη *Pichia pastoris* όπου έχουν εκφραστεί αρκετές φυτικές β-γλυκοσιδάσες (Zhou et al., 2002; Escamilla-Treviño et al., 2006). Ωστόσο και στο σύστημα αυτό μπορεί να προκύψουν προβλήματα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων ή «θορύβου» από ενδογενείς β-γλυκοσιδάσες που δυσκολεύουν την απομόνωση του ενζύμου (Toonkool et al., 2006; Ahn et al., 2010). Γενικά η δραστηριότητα του εκφραζόμενου ενζύμου σε μικροβιακά συστήματα μπορεί να παρουσιάζει μικρές αλλά υπαρκτές διαφορές με την απομονωμένη φυσική πρωτεΐνη (Himeno et al., 2013). Άλλες προσεγγίσεις που έχουν γίνει είναι η ετερόλογη έκφραση σε κυτταρικές σειρές εντόμων έπειτα από διαμόλυνση με βακουλοϊό (Saino et al., 2008; Ahn et al., 2010), σε σταθερά μετασχηματισμένα φυτά (Kiran et al., 2006; Morant et al., 2008b) ή σε φυτά που εκφράζουν παροδικά τα ένζυμα σε θυσανώδεις ρίζες (Shi and Lindemann, 2006), έπειτα από βομβαρδισμό (Nielsen et al., 2006) ή αγροέγχυση (del Cueto et al., 2014; Koudounas et al., 2015; Mageroy et al., 2015).

1.5 β-Γλυκοσιδάσες και χημική άμυνα

Ο δευτερογενής μεταβολισμός είναι ένα εξελικτικό πλεονέκτημα που επιτρέπει στους οργανισμούς να αντιμετωπίσουν τις (α)βιοτικές προκλήσεις με τις οποίες θα έρθουν αντιμέτωποι κατά την διάρκεια της ζωής τους. Μια εντυπωσιακή ποικιλία των μεταβολιτών αυτών απαντάται στο φυτικό βασίλειο και συχνά τα προϊόντα του μεταβολισμού αυτού έχουν περιορισμένη ή ακόμα και αποκλειστική κατανομή σε συγκεκριμένες οικογένειες, γένη ή είδη. Κλασσικό παράδειγμα είναι οι αμυντικοί μεταβολίτες των φυτών (φυτοαντισιπίνες) οι οποίοι βιοσυνθέτονται και αποθηκεύονται ως αδρανή γλυκοζυλιωμένα μόρια. Η γλυκοζυλίωση σταθεροποιεί χημικά τα μόρια αυτά, αυξάνει την διαλυτότητα τους και ευνοείται έτσι η αποθήκευση και μεταφορά τους (Jones and Vogt, 2001). Η δραστική μορφή των μεταβολιτών αυτών, που συνήθως είναι αποθηκευμένοι στα χυμοτόπια των κυττάρων

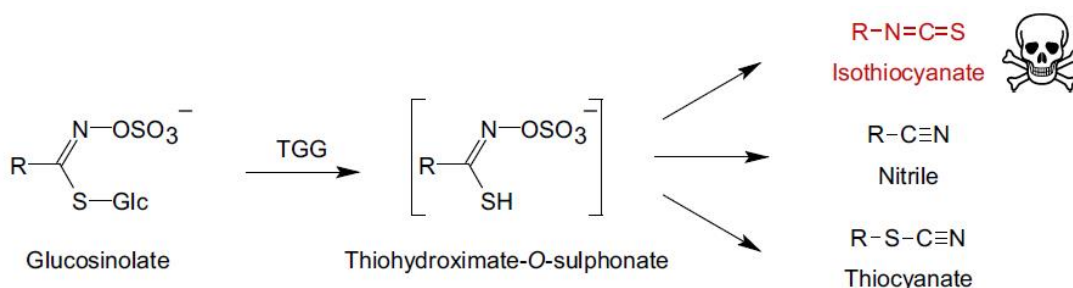
(Gruhnert et al., 1994), παράγεται έπειτα από ενζυμική υδρόλυση από εξειδικευμένες β-γλυκοσιδάσες οι οποίες είναι αποθηκευμένες σε διακριτό υποκυτταρικό διαμέρισμα. Τα δυο αυτά φυτικά συστατικά (ένζυμο και μεταβολίτης) έρχονται σε επαφή κατά την ρήξη των κυττάρων λόγω επίθεσης από κάποιο παθογόνο, και παράγεται έτσι η τοξική άγλυκη μορφή του μεταβολίτη. Τέτοια συστήματα άμυνας είναι γνωστά σαν δυαδικά συστήματα και ακολουθούν τέσσερα καλά χαρακτηρισμένα παραδείγματα.

Τα κυανογόνα γλυκοσίδια απαντώνται σε περισσότερα από 2650 είδη φυτών από 130 οικογένειες μεταξύ των οποίων οι φτέρες, τα γυμνόσπερμα και τα αγγειόσπερμα (Bak et al., 2006). Μετά από καταστροφή των κυττάρων τα γλυκοσίδια αυτά υδρολύονται από εξειδικευμένες β-γλυκοσιδάσες (Εικόνα 1.14) (Gleadow and Møller, 2014), παράγεται ένα ασταθές άγλυκο μόριο και στην συνέχεια ελευθερώνεται υδροκυάνιο (HCN) το οποίο επηρεάζει την αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Leavesley et al., 2008). Υποκυτταρικά τα γλυκοσίδια αυτά είναι αποθηκευμένα στα χυμοτόπια (Gruhnert et al., 1994) ενώ οι β-γλυκοσιδάσες που τα απογλυκοζυλιώνουν ανάλογα το είδος απαντώνται στον αποπλαστικό χώρο, στον χλωροπλάστη, στο κυτταρόπλασμα ή είναι προσδεμένες στο κυτταρικό τοίχωμα (Gleadow and Møller, 2014). Γνωστά παραδείγματα είναι το ζευγάρι δουρίνης/δουρινάσης από το *Sorghum bicolor* (Cicek et al., 2000), το ζευγάρι λιναμαρίνης/λιναμαράσης στο *Trifolium repens* (Olsen et al., 2007) καθώς και το ζευγάρι προυνασίνη/υδρολάση της προυνασίνης από το *Prunus dulcis* (Sánchez-Pérez et al., 2012). Η συγκέντρωση των μεταβολιτών αυτών καθώς και η έκφραση των αντίστοιχων β-γλυκοσιδασών συνήθως εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης και είναι υψηλότερη στα νεαρά φυτά και όργανα του φυτού όπου υπάρχει υψηλή ανάγκη για προστασία από παθογόνους οργανισμούς (Forslund et al., 2004).



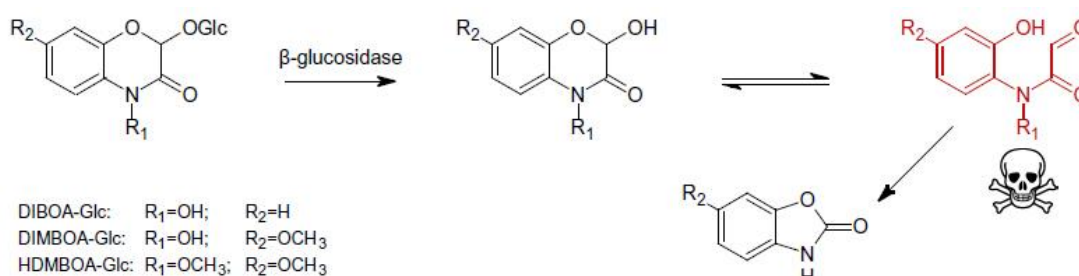
Εικόνα 1.14: Απλοποιημένο σχήμα υδρόλυσης των κυανογόνων γλυκοσιδίων (Piasecka et al., 2015).

Τα θειογλυκοσίδια είναι αμυντικοί δευτερογενείς μεταβολίτες που απαντώνται αποκλειστικά στην τάξη Brassicales, με εξαίρεση το γένος *Drypetes*, όπου περιλαμβάνονται σημαντικές για τον άνθρωπο καλλιέργειες της οικογένειας Brassicaceae (λάχανο, κουνουπίδι, μπρόκολο, σινάπι, χρένο, κ.α.) καθώς και το φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana* (Halkier and Gershenzon, 2006). Τα θειογλυκοσίδια ομοιάζουν δομικά και βιοσυνθετικά με τα κυανογόνα γλυκοσίδια και θεωρείται ότι έχουν εξελιχθεί από αυτά με βασική διαφορά ότι η γλυκόζη είναι συνδεδεμένη με θειολική ομάδα. Η ενζυμική υδρόλυση της γλυκόζης οδηγεί στην παραγωγή ασταθών άγλυκων μεταβολιτών με υψηλή τοξικότητα όπως τα (ισο)θειοκυανίδια και τα (επι)θειονιτρίλια (Εικόνα 1.15) (Bones and Rossiter, 2006). Την αντίδραση αυτή επιτελούν μια υποκατηγορία των GH1 β-γλυκοσιδασών, οι β-θειογλυκοσιδάσες γνωστές και ως μυροσινάσες των οποίων χαρακτηριστικό είναι ότι το καταλυτικό γλουταμινικό οξύ (E) από το συντηρημένο μοτίβο TFNEP έχει υποκατασταθεί με γλουταμίνη (απαντάται ως TFNQP) (Burmeister et al., 1997). Στο *Arabidopsis thaliana* υπάρχουν έξι γονίδια που κωδικοποιούν για μυροσινάσες, ωστόσο μόνο δύο ένζυμα, τα TGG1 και TGG2 είναι υπεύθυνα για την απογλυκοζυλίωση των θειογλυκοσιδίων (Barth and Jander, 2006). Οι μυροσινάσες και τα θειογλυκοσίδια διαχωρίζονται σε κυτταρικό επίπεδο με τα μεν ένζυμα να απαντώνται σε εξειδικευμένα κύτταρα μυροσίνης ενώ τα θειογλυκοσίδια συσσωρεύονται στα χυμοτόπια κυττάρων που γειτνιάζουν με τα κύτταρα μυροσίνης (Andréasson et al., 2001; Wittstock and Burow, 2010). Κατά την καταστροφή των ιστών τα ένζυμα υδrolύουν μαζικά τα θειογλυκοσίδια και παράγονται οι αμυντικοί μεταβολίτες υψηλής τοξικότητας για τα παθογόνα (Hopkins et al., 2009; Brown and Hampton, 2011).



Εικόνα 1.15: Απλοποιημένο σχήμα υδρόλυσης των θειογλυκοσιδίων (Piasecka et al., 2015).

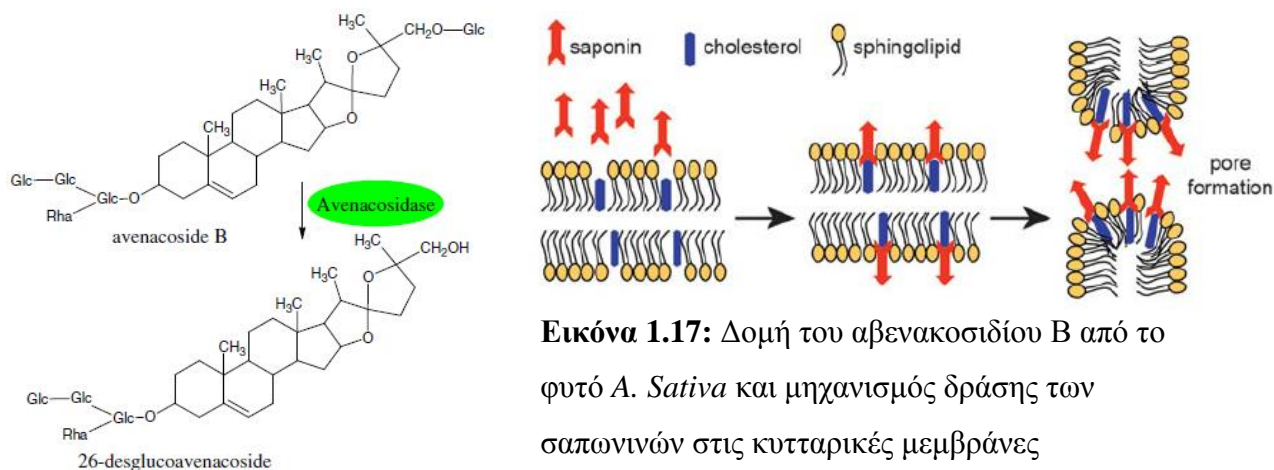
Τα γλυκοσίδια του υδροξαμικού οξέος (βενζοξαζινοειδή) είναι αμυντικοί μεταβολίτες που απαντώνται κυρίως στην οικογένεια Poaceae καθώς και σε ελάχιστα είδη δικότυλων, συσσωρεύονται στα χυμοτόπια, παρέχουν άμυνα έναντι βακτηρίων, μυκήτων, εντόμων και έχουν αλληλοπαθητική δράση (Niemeyer, 1988; Sicker et al., 2000; Dick et al., 2012). Επικρατέστερες μορφές είναι 2,4-διυδροξυ-1,4-βενζοξαζιν-3-όνη (DIBOA) και η 2,4-διυδροξυ-7-μέθοξυ-1,4-βενζοξαζιν-3-όνη (DIMBOA). Οι άγλυκες μορφές προκύπτουν έπειτα από ρήξη των κυττάρων και την επακόλουθη υδρόλυση από εξειδικευμένες β-γλυκοσιδάσες (Εικόνα 1.16). Τέτοια ένζυμα έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί στο *Zea mays* (Cicek and Esen, 1999), στο *Secale cereale* (Nikus et al., 2003) και στο *Triticum aestivum* (Sue et al., 2006). Τα ένζυμα αυτά τοποθετούνται κυρίως στα πλαστίδια (Nikus et al., 2001). Αξίζει να σημειωθεί ότι έχουν βρεθεί δυο ισοένζυμα στο *Zea mays* (ZmGLU1-2) και τρία στο *Triticum aestivum* (TaGLU1a-c) που υδρολύουν εξειδικευμένα το γλυκοσίδιο του DIMBOA, ωστόσο παρουσιάζεται διαφορεική ρύθμιση της έκφρασης τους σε μεταγραφικό επίπεδο (Cicek and Esen, 1999; Sue et al., 2006). Η βιοδραστική άγλυκη μορφή του DIMBOA μειώνει τα επίπεδα γλουταθειόνης προκαλώντας μη αντιστρεπτή αδρανοποίηση των ενζύμων που στο ενεργό κέντρο έχουν κατάλοιπα κυστεΐνης και επιφέροντας τοξικά αποτελέσματα στους θηρευτές και τα παθογόνα (Dixon et al., 2012).



Εικόνα 1.16: Απλοποιημένο σχήμα υδρόλυσης των βενζοξαζινοειδών (Piasecka et al., 2015).

Οι σαπωνίνες είναι γλυκοσίδια των στεροειδών ή των τριτερπενοειδών με μεγάλη διασπορά ανάμεσα στα φυτικά είδη (Faizal and Geelen, 2013; Moses et al., 2014). Χαρακτηριστικά παραδείγματα με αντιμικροβιακή δράση είναι η α-τοματίνη στα είδη της οικογένειας Solanaceae (Bouarab et al., 2002) καθώς και οι αβενασίνες και τα αβενακοσίδια ειδών του γένους *Avena* (Haralampidis et al., 2001; Mylona et

al., 2008). Οι αβενασίνες συσσωρεύονται στα χυμοτόπια της ρίζας του φυτού στην βιοδραστική τους μορφή (μονοδεσμοσιδική, γλυκοζυλιωμένη στην θέση C3) και δεν είναι γνωστό πως προστατεύεται το φυτό από αυτές, ενώ τα αβενακοσίδια συσσωρεύονται στα χυμοτόπια των φύλλων του φυτού στην ανενεργή τους μορφή (δυδεσμοσιδική, γλυκοζυλιωμένη στις θέσεις C3 και C26) (Osbourn, 1996). Η μετατροπή των αβενακοσιδίων στην βιοδραστική τους μορφή γίνεται έπειτα από καταστροφή των κυττάρων και υδρόλυση της γλυκόζης στην θέση C26 από εξειδικευμένες πλαστιδιακές β-γλυκοσιδάσες, γνωστές ως αβενακοσιδάσες (Nisius, 1988; Kim et al., 2000). Στην βιοδραστική τους μορφή οι σαπωνίνες, προσδένονται στις στερόλες και τα γλυκολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης δημιουργώντας πόρους και επιφέροντας κυτταρικό θάνατο (Εικόνα 1.17) (Faizal and Geelen, 2013; Moses et al., 2014).

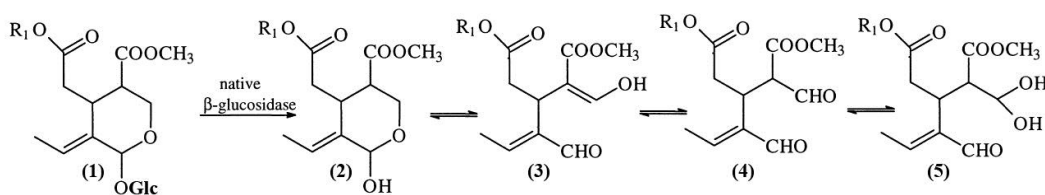


Εικόνα 1.17: Δομή του αβενακοσιδίου B από το φυτό *A. Sativa* και μηχανισμός δράσης των σαπωνινών στις κυτταρικές μεμβράνες (Moses et al., 2014).

1.6 Διαδικασία άμυνας της ολευρωπαΐνης

Η ολευρωπαΐνη είναι ένα σεκοϊριδοειδές το οποίο όπως άλλα ιριδοειδή στην γλυκοζυλιωμένη μορφή δεν είναι βιοδραστικό (Kubo et al., 1985; Ishiguro et al., 1986; Bianco et al., 1999b). Η απογλυκοζυλίωση γίνεται από εξειδικευμένη ενδογενή β-γλυκοσιδάση και προκύπτουν τα βιοδραστικά παράγωγα. Πειράματα όπου μέσω πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) ανιχνεύονται τα προϊόντα της ενζυμικής υδρόλυσης της ολευρωπαΐνης, έχουν αναδείξει ότι η άγλυκη μορφή είναι ένα ιδιαίτερα ασταθές μόριο από το οποίο προκύπτουν ισομερείς μορφές. Αυτά τα

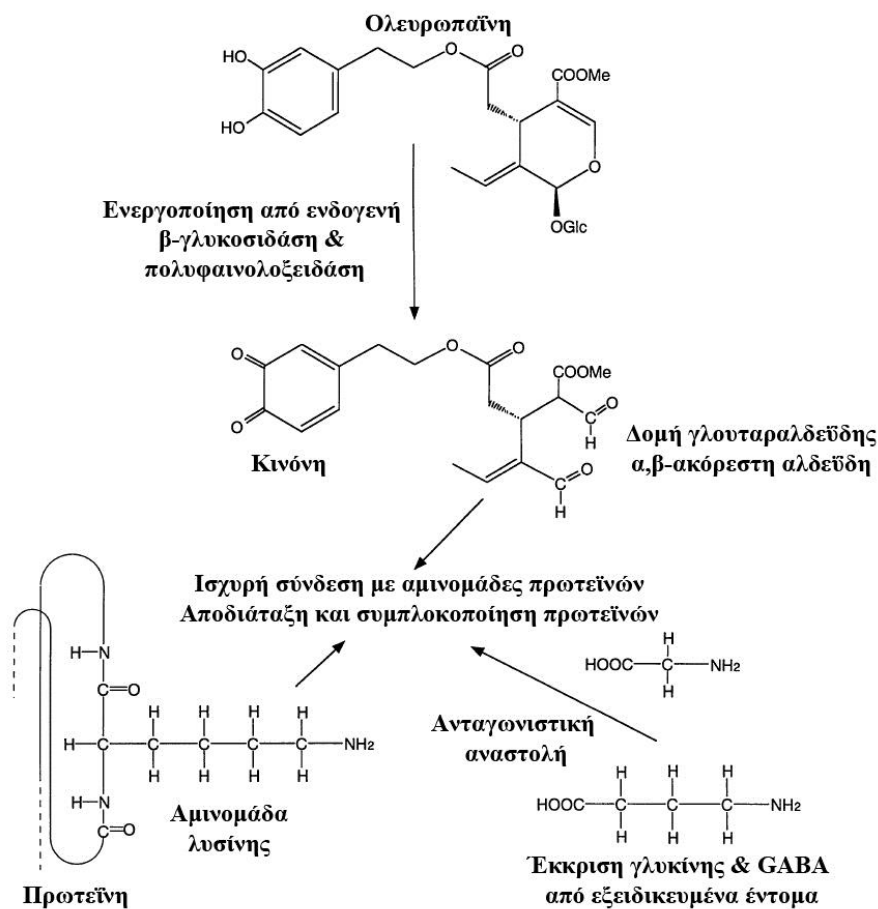
αποτελέσματα επιβεβαιώνονται τόσο έπειτα από υδρόλυση με πρωτεϊνικό εκχύλισμα του φυτού όσο και με απομονωμένη β-γλυκοσιδάση από την αμυγδαλιά (Carpasso et al., 1997; Bianco et al., 1999a; Guiso and Marra, 2005). Σε υδάτινα διαλύματα η αφαίρεση της γλυκόζης (oleuropein aglycone) εκθέτει τον ημιακεταλικό άνθρακα με αποτέλεσμα να έχουμε διάνοιξη του δακτυλίου και να προκύπτουν επικρατέστερα τρεις αλδεϋδικές μορφές (ολευρωπαϊνδιάλη, ενολική ολευρωπαϊνδιάλη, διένυδρη ολευρωπαϊνδιάλη) (Εικόνα 1.18) (Uccella, 2000; Bianco and Ramunno, 2006).



Εικόνα 1.18: Απογλυκοζύλιωση της ολευρωπαΐνης και επικρατέστερες διαμορφώσεις του άγλυκου μεταβολίτη. Οι μεταβολίτες που απεικονίζονται είναι η ολευρωπαΐνη (1), η άγλυκη ολευρωπαΐνη (2), ενολική ολευρωπαϊνδιάλη (3), ολευρωπαϊνδιάλη (4) και διένυδρη ολευρωπαϊνδιάλη (ολεομισσιονάλη) (5). R1 = υδροξυτυροσόλη (Uccella, 2000; Diamantakos et al., 2015).

Οι αλδεϋδικές αυτές μορφές είναι ιδιαίτερα ηλεκτρονιόφιλες λόγω δομής α,β ακόρεστης αλδεϋδης με δράση παρόμοια με αυτή της γλουταραλδεϋδης όπου έχουμε ομοιοπολική πρόσδεση στην αμινομάδα των αμινοξέων (κυρίως λυσίνη). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να προκαλείται αποδιάταξη και μαζική διασύνδεση μεταξύ των πρωτεϊνών δημιουργώντας μεγαλομοριακά σύμπλοκα (Εικόνα 1.19). Το σύστημα αυτό περιγράφηκε πρώτη φορά στο φυτό *Ligustrum obtusifolium* (Oleaceae) το οποίο επίσης βιοσυνθέτει ολευρωπαΐνη και η απογλυκοζύλιωση της από εξειδικευμένη β-γλυκοσιδάση, μετά από καταστροφή των κυττάρων, οδηγεί στην παραγωγή του βιοδραστικού άγλυκου μεταβολίτη (Konno et al., 1999). Το αποτέλεσμα είναι να μειώνεται η θρεπτική αξία του ιστού και να επηρεάζονται τα ένζυμα των παθογόνων (Konno et al., 1997). Εκτός από δράση εξειδικευμένης β-γλυκοσιδάσης, μετά από ρήξη των κυττάρων έχουμε και δράση πολυφαινολοξειδάσης η οποία δημιουργεί δομή κινόνης στο φαινολικό κατάλοιπο της ολευρωπαΐνης. Οι κινόνες παρουσιάζουν επίσης δράση αποδιάταξης και συμπλοκοποίησης πρωτεϊνών σε άλλους μεταβολίτες,

ωστόσο στην περίπτωση της ολευρωπαΐνης η απογλυκοζυλίωση και όχι η οξείδωση είναι η βασική αντίδραση παραγωγής του βιοδραστικού μεταβολίτη (Konno et al., 1999). Μεταγενέστερα αναφέρθηκε αντίστοιχος μηχανισμός άμυνας και σε άλλους μεταβολίτες όπως η αυκουμπίνη (ιριδοειδές) και η στρικτοσιδίνη (αλκαλοειδές του ινδολίου) από διαφορετικές οικογένειες φυτών (Guirimand et al., 2010; Pankoke et al., 2013). Αξίζει να σημειωθεί ότι έντομα που θρέφονται με φυτά που βιοσυνθέτουν ολευρωπαΐνη εκκρίνουν εξαιρετικά μεγάλες ποσότητες γλυκίνης, β-αλανίνης και γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) ώστε να καταστείλουν την άμυνα του φυτού (Konno et al., 2010). Επίσης πρόσφατα αποδείχτηκε ότι συμβιωτικά βακτήρια του δάκου της ελιάς (*Bactrocera oleae*) εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα του εντόμου στην ολευρωπαΐνη χωρίς όμως να είναι γνωστός ο μηχανισμός με τον οποίο παρακάμπτεται η άμυνα του φυτού (Ben-Yosef et al., 2015).



Εικόνα 1.19: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού δράσης της ολευρωπαΐνης (Konno et al., 2010).

1.7 Σκοπός

Παρότι ο μηχανισμός με τον οποίο η ολευρωπαΐνη λειτουργεί σαν αμυντικός μεταβολίτης έπειτα από την απογλυκοζυλίωση της από εξειδικευμένη β-γλυκοσιδάση έχει περιγραφεί (Konno et al., 1999), δεν έχει απομονωθεί και χαρακτηριστεί κάποιο γονίδιο που να κωδικοποιεί για ένα τέτοιο ένζυμο από κανένα μέλος της οικογένειας Oleaceae. Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η απομόνωση και η ετερόλογη έκφραση μιας β-γλυκοσιδάσης από την ελιά, ικανής για την ενεργοποίηση-καταβολισμό της ολευρωπαΐνης καθώς και ο προσδιορισμός της βιοχημικής δραστηρότητας, της κινητικής και του μηχανισμού δράσης του συγκεκριμένου ενζύμου. Η ενζυμική αντίδραση αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική τόσο για την άμυνα του φυτού όσο και για την σύνθεση του ελαιολάδου σε σεκοϊριδοειδή (Gutierrez-Rosales et al., 2012; Hbaieb et al., 2015) λόγω παραγωγής μιας άκρως βιοδραστικής ουσίας, της άγλυκης ολευρωπαΐνης.

2 Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Φυτικό υλικό

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε φυτικό υλικό από ελαιόδεντρο *Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *sativa*, καλλιεργήσιμης ελαιοπαραγωγού ποικιλίας «Κορωνέικη» που βρίσκεται στον ελαιώνα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Επίσης χρησιμοποιήθηκε υλικό από φυτά *Nicotiana benthamiana* (Solanaceae) που αναπτύσσονται σε θάλαμο επώασης φυτών.

2.1.1 Συνθήκες ανάπτυξης φυτών *N. benthamiana*

Για την καλλιέργεια του καπνού τα σπόρια ενυδατώνονται για 12 ώρες στους 4 °C προκειμένου να διακοπεί ο λήθαργος. Στην συνέχεια μεταφέρονται κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε στερεό υπόστρωμα (θρεπτικό μέσο ανάπτυξης MS), αφού πρώτα απολυμανθούν με διάλυμα 25% χλωρίνης και 0,01% Triton-X. Τα τρυβλία 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 μεταφέρονται από τα τρυβλία σε γλαστράκια με χώμα.

2.2 Χειρισμοί βακτηριακών κυττάρων

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια του είδους *Escherichia coli* και συγκεκριμένα τα στελέχη DH5α και BL21(DE3). Το στέλεχος DH5α χρησιμοποιήθηκε για όλες τις πειραματικές διαδικασίες δημιουργίας των κατασκευών ενώ το στέλεχος BL21(DE3) χρησιμοποιήθηκε για την ετερόλογη έκφραση. Επίσης η αροέγχυση έγινε με το στέλεχος C58C1 του είδους *Agrobacterium tumefaciens* που φέρει το μη ογκογόνο Ti πλασμίδιο pGV3101.

2.2.1 Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων *E.coli*

- Μονή αποικία κατάλληλου βακτηριακού στελέχους αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB για 12 ώρες στους 37 °C.

- 2ml από την αρχική καλλιέργεια μεταφέρονται σε κωνική φιάλη που περιέχει 200ml θρεπτικού μέσου LB. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37 °C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητά της φτάσει $O.D_{550} = 0,5$.
- Η καλλιέργεια τοποθετείται για 15 λεπτά στον πάγο και τα βακτηριακά κύτταρα κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση για 5min στις 5000 στροφές/λεπτό στους 4 °C.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε μισό όγκο του αρχικού, παγωμένου διαλύματος 25mM CaCl₂, 10mM Tris-HCl pH 8.0
- Επαναλαμβάνεται ο ίδιος τρόπος κατακρήμνισης.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε παγωμένο διάλυμα 75mM CaCl₂, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 15% γλυκερόλης σε όγκο ίσο με το 1/15 του αρχικού της βακτηριακής καλλιέργειας (13,5 ml).
- Το επαναιώρημα μοιράζεται σε erpendorfs ανά 200μL, και καταψύχεται αμέσως με τη βοήθεια υγρού αζώτου.
- Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80 °C.

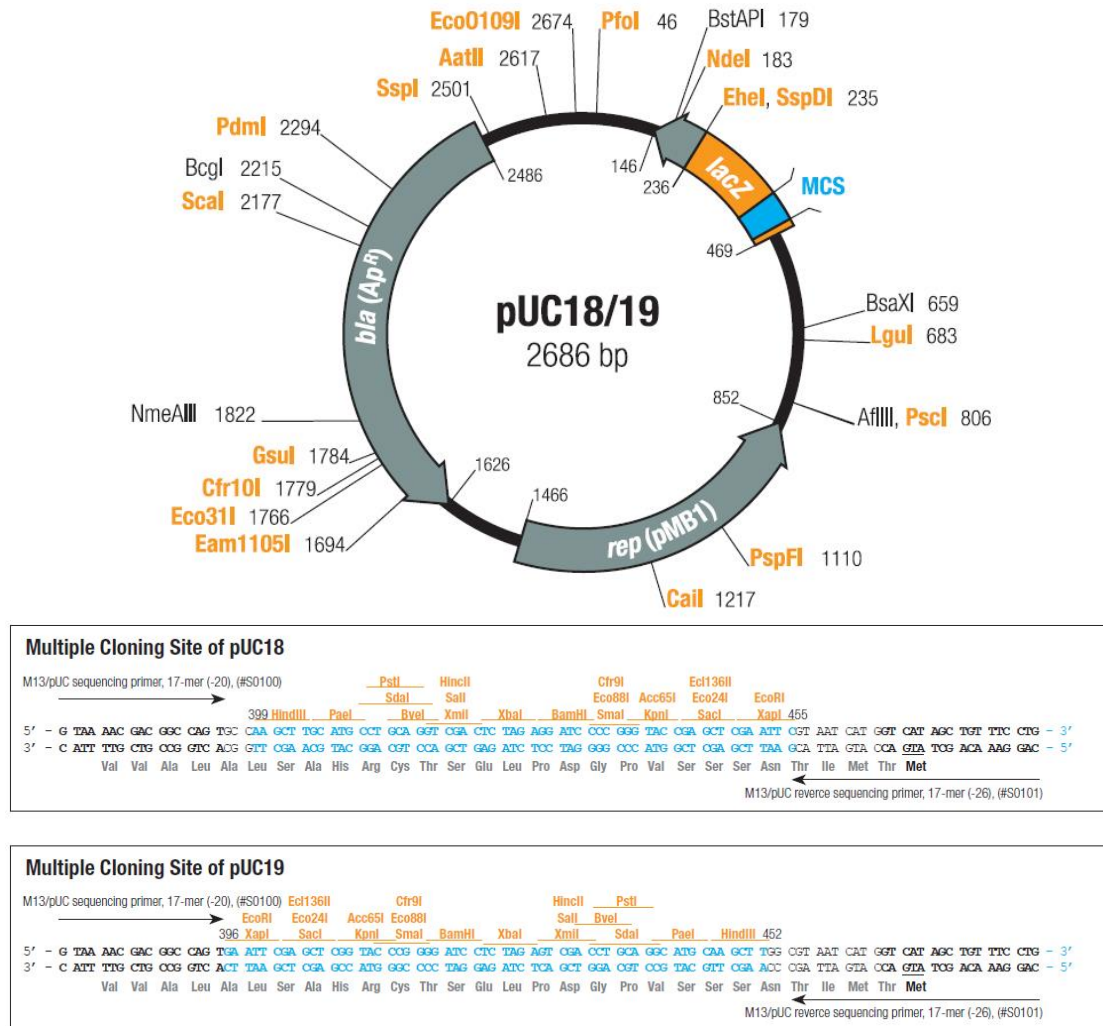
2.2.2 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* με πλασμιδιακό DNA

- Τα δεκτικά κύτταρα (200 μl) αναμιγνύονται με 10-50ng πλασμιδιακού DNA και το μείγμα επωάζεται στον πάγο για 30 λεπτά.
- Ακολουθεί θερμικό σοκ του δείγματος για 2 λεπτά στους 42-43 °C.
- Προστίθεται 1,3mL θρεπτικό LB στο Eppendorf και ακολουθεί επώαση 37 °C για 1 ώρα (χωρίς ανάδευση).
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13000rpm για 30 δευτερόλεπτα.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναιωρείται ελαφρώς σε 100-200 μL LB.

Το δείγμα επιστρώνεται σε στερεό θρεπτικό μέσο LB παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού. Σε περίπτωση χρήσης πλασμιδιακού φορέα που φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, όπως τα pUC18/19 (Εικόνα 2.1) υπάρχει δυνατότητα επιλογής μπλε/άσπρων αποικιών. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη στο θρεπτικό μέσο του χρωμοφόρου υποστρώματος X-gal και του παράγοντα IPTG που δρα σαν επαγωγέας του υποκινητή του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης, λίγο πριν την επίστρωση των

δειγμάτων. Χρησιμοποιείται 50μL/τρουβλίο X-GAL (20mg/mL) και 5μL/τρουβλίο IPTG (200mg/mL).

- Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 °C για 12-16 ώρες.



Εικόνα 2.1: Οι πλασμιδιακοί φορείς pUC18/19 και οι θέσεις που περιέχονται στους αντίστοιχους πολυσυνδέτες.

2.2.3 Προετοιμασία ηλεκτροδεκτικών κυττάρων *A. tumefaciens*

- Μονή αποικία κατάλληλου βακτηριακού στελέχους αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB για 16 ώρες στους 28 °C.
- 1ml από την αρχική καλλιέργεια μεταφέρονται σε κωνική φιάλη που περιέχει 100ml θρεπτικού μέσου LB. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 28 °C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητά της φτάσει $O.D_{550} = 0,5$.

- Η καλλιέργεια τοποθετείται για 15 λεπτά στον πάγο και τα βακτηριακά κύτταρα κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση για 5min στις 3500 στροφές/λεπτό στους 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε παγωμένο διάλυμα 10% γλυκερόλης, ίσου όγκου του αρχικού και επαναλαμβάνεται ο ίδιος τρόπος κατακρήμνισης.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε παγωμένο διάλυμα 10% γλυκερόλης, 1/2 του όγκου του αρχικού και επαναλαμβάνεται ο ίδιος τρόπος κατακρήμνισης.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε παγωμένο διάλυμα 10% γλυκερόλης, 1/50 του όγκου του αρχικού και επαναλαμβάνεται ο ίδιος τρόπος κατακρήμνισης.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε παγωμένο διάλυμα 10% γλυκερόλης, 1/100 του όγκου του αρχικού, το επαναιώρημα μοιράζεται σε eppendorfs ανά 40μL και καταψύχεται αμέσως με τη βοήθεια υγρού αζώτου.
- Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80 °C.

2.2.4 Μετασχηματισμός ηλεκτροδεκτικών κυττάρων *A. tumefaciens* με πλασμιδιακό DNA

- Σε 40μL των δεκτικών κυττάρων προστίθενται 10-50ng πλασμιδιακού DNA και αναμιγνύονται ελαφρώς.
- Το δείγμα επωάζεται στον πάγο για 1 λεπτό.
- Το δείγμα μεταφέρεται σε παγωμένη κυβέττα ηλεκτρισμού με απόσταση ηλεκτροδίων 0.1cm και τοποθετείται στο μηχάνημα της BioRad Gene PulserII.
- Πραγματοποιείται εφαρμογή ηλεκτρικού παλμού. Οι παράμετροι για το συγκεκριμένο σύστημα είναι: χωρητικότητα 25μF, αντίσταση 400Ω ή 600Ω και ηλεκτρικό πεδίο 1,8kV. Ο χρόνος παράδοσης του παλμού συνήθως δεν ξεπερνάει τα 5msec.
- Αμέσως προστίθεται 1mL θρεπτικού LB στην κυβέττα και το δείγμα μεταφέρεται σε eppendorf.
- Τα κύτταρα επωάζονται για 3 ώρες στους 28 °C (χωρίς ανάδευση).
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 10000rpm και επαναδιαλύεται το ίζημα σε 100-200μL θρεπτικού μέσου LB.

- Ολόκληρη η ποσότητα του δείγματος επιστρώνεται σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο LB, που περιέχει τα κατάλληλα αντιβιοτικά για την επιλογή του *A. tumefaciens*, του πλασμιδίου Ti και του δυναδικού πλασμιδιακού φορέα.
- Τα τρυβλία επωάζονται στους 28 °C για 36-48 ώρες.

2.2.5 Αποθήκευση βακτηριακών στελεχών για μεγάλα χρονικά διαστήματα

Μονή αποικία βακτηριακού στελέχους, το οποίο πρόκειται να αποθηκευθεί, αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών στους 37 °C για 12 ώρες για το *Escherichia coli* ή στους 28 °C για 24 ώρες για το *Agrobacterium tumefaciens*.

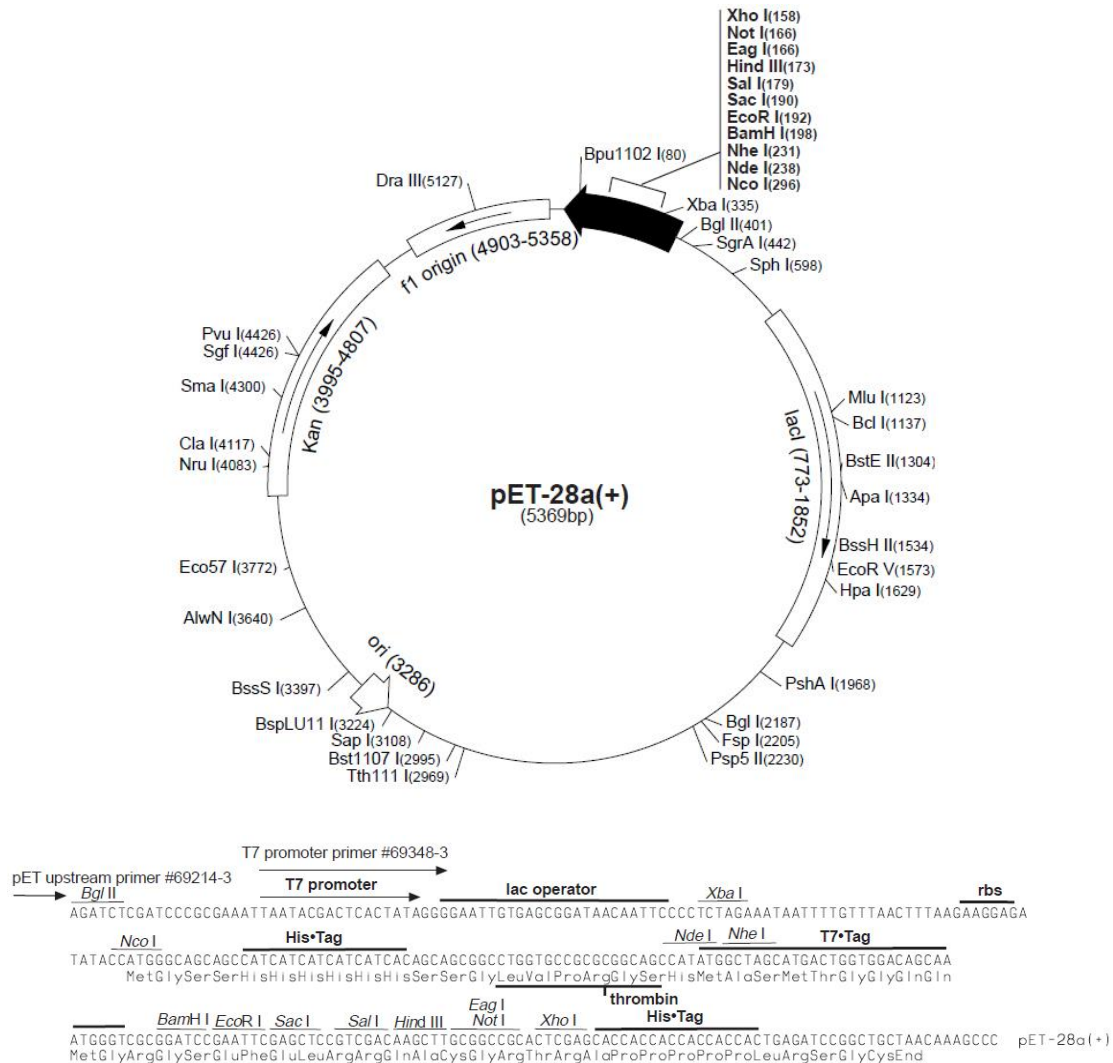
- Σε φιαλίδιο erppendorf μεταφέρονται 600μl από την επιθυμητή καλλιέργεια.
- Προστίθενται 300μl αποστειρωμένης γλυκερόλης 99%.
- Το δείγμα αναμειγνύεται μέχρι να ομογενοποιηθούν οι δύο φάσεις και καταψύχεται ακαριαία με τη βοήθεια υγρού αζώτου.
- Το δείγμα αποθηκεύεται στους -80 °C.

2.2.6 Ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών σε βακτήρια *E. coli*

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ετερόλογης έκφρασης pET (Novagen) όπου οι κατασκευές προς έκφραση είναι υπό τον έλεγχο προαγωγέα που αναγνωρίζεται μόνο από την T7 RNA πολυμεράση με αποτέλεσμα η έκφραση να επάγεται αυστηρά και μόνο μετά την προσθήκη IPTG (Studier et al., 1990).

- Μονή αποικία βακτηριακού στελέχους BL21(DE3) που φέρει το πλασμίδιο pET28a (Εικόνα 2.2) με την προς έκφραση κατασκευή, μεταφέρεται σε υγρό θρεπτικό LB με κατάλληλο αντιβιοτικό και η καλλιέργεια επωάζεται στους 37 °C για 16 ώρες.
- Ακολουθεί ανακαλλιέργεια με αραιώση 1/100 και η επώαση γίνεται στους 28 °C.
- Όταν η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας στα 550nm είναι ίση με 0,5 προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM, αμέσως συλλέγεται 1 mL δείγμα της καλλιέργειας (T₀) και συνεχίζεται η επώαση στους 28 °C.
- Δείγματα συλλέγονται ανά 1 ώρα και κάθε δείγμα φυγοκεντρείται για 1' στις 13.000 στροφές. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το βακτηριακό ίζημα

μπορεί είτε να αποθηκευτεί στους -80°C , είτε να επαναιωρηθεί σε κατάλληλο διάλυμα απομόνωσης πρωτεϊνών.



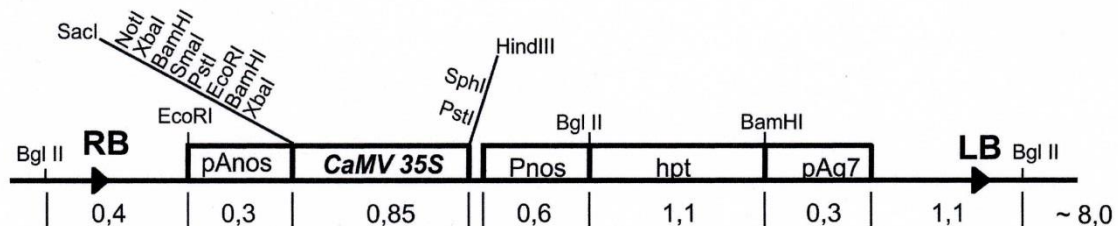
Εικόνα 2.2: Ο πλασμιδιακός φορέας pET28a.

2.2.7 Παροδική έκφραση πρωτεϊνών σε φύλλα φυτών *N. benthamiana* (αγροέγχυση)

Χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *A. tumefaciens* C58C1 που φέρει το μη ογκογόνο T1 πλασμίδιο pGV3101 και το οποίο μετασχηματίστηκε με ένα τροποποιημένο πλασμίδιο pGPTV-HPT (Becker et al., 1992). Στο πλασμίδιο αυτό έχει γίνει αντικατάσταση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την β-γλυκουρονιδάση με τον προαγωγέα CaMV 35S από το πλασμίδιο pBI221. Το πλασμίδιο (εικόνα 2.3) παραχωρήθηκε ευγενικά από τον υποψήφιο διδάκτορα Ντικράν Τσιτσεκιάν. Κατά την αγροέγχυση η καλλιέργεια που φέρει την επιθυμητή κατασκευή αναμιγνύεται με μια άλλη καλλιέργεια που φέρει την κατασκευή pBIN61/35S-p19. Η πρωτεΐνη P19

καταστέλλει τον μηχανισμό μετα-μεταγραφικής γονιδιακής αποσιώπησης του φυτού (Voinnet et al., 2003).

- 1,5 mL υγρής καλλιέργειας τοποθετείται σε erpendorf και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 3.500 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και ξεπλένεται προσεκτικά το ίζημα με 500 μ L Dilution Buffer.
- 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 κατασκευής-P19 που πρέπει να αναμιχθούν και ο όγκος συμπληρώνεται με Dilution buffer. Στο τέλος προστίθεται ακετοσυριγκόνη σε τελική συγκέντρωση 150 μ M.
- 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 ομοιόμορφα στην κάτω επιφάνεια του φύλλου του καπνού όπως φαίνεται στο βίντεο <https://goo.gl/XHkOGK>.
- Μετά το πέρας των 3 ημερών συνήθως τα φύλλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για απομόνωση πρωτεϊνών, μικροσκοπική παρατήρηση ή να αποθηκευτούν στους -80 °C έπειτα από λειοτρίβηση με υγρό άζωτο.



Εικόνα 2.3: T-DNA περιοχή του πλασμιδιακού φορέα pGPTV-35S.

2.3 Χειρισμοί νουκλεϊκών οξέων

2.3.1 Απομόνωση ριβονουκλεϊκών οξέων (RNA) από φυτικό ιστό

- Φρέσκο φυτικό υλικό ομογενοποιείται παρουσία υγρού αζώτου σε κατάλληλο γουδί λειοτρίβησης.
- Για κάθε 0,1 gr ιστού προστίθεται σε erpendorf 100μL RNA Extraction Buffer και 100μL Φαινόλη (pH =8).
- Έντονη ανάδευση για 1 min (vortex).
- Φυγοκέντρηση για 5min στις 13000 rpm.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό erpendorf, προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης και το δείγμα αναδεύεται έντονα για 1min.
- Φυγοκέντρηση για 5min στις 13000 rpm.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό erpendorf και προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος 1:1 (φαινόλη)/(24:1 χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη).
- Έντονη ανάδευση για 1 min.
- Φυγοκέντρηση για 5min στις 13000 rpm.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό erpendorf και προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος 24:1 χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη.
- Έντονη ανάδευση για 1min.
- Φυγοκέντρηση για 5min στις 13000 rpm.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό erpendorf και προστίθενται 2,5 όγκοι 100% παγωμένης (-20 °C) αιθανόλης και 1/10 του όγκου της υδάτινης φάσης CH₃COONa 3M (pH 4,8).
- Το δείγμα αναδεύεται ελαφρώς και επωάζεται στους -20 °C για 16-18 ώρες.
- Φυγοκέντρηση για 20 min στις 13000 rpm στους 4 °C.
- Το υπερκείμενο αποχύνεται και αφού στεγνώσει το ίζημα επαναδιαλύεται σε αποστειρωμένο ddH₂O.
- Το δείγμα φυλάσσεται στους -80 °C.

2.3.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από *E. coli* με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης

- Μονή βακτηριακή αποικία που περιέχει το προς απομόνωση πλασμίδιο, καλλιεργείται παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού σε υγρό θρεπτικό LB στους 37 °C για 16 ώρες.

- 1,5mL μεταφέρεται σε αποστειρωμένο eppendorf.
- Φυγοκέντρηση για 1min στις 13.000 rpm.
- Το υπερκείμενο αποχύνεται και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται προσεκτικά σε 200μL διαλύματος P1.
- Προστίθενται 200μL διαλύματος P2 και το δείγμα ανακινείται ελαφρώς μέχρι να γίνει διαυγές.
- Το δείγμα επωάζεται έως 5min, στη συνέχεια προστίθενται 200μL διαλύματος P3 και ανακινείται ελαφρώς.
- Φυγοκέντρηση για 15min στις 13.000rpm.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε αποστειρωμένο eppendorf και προστίθενται 2 όγκοι αιθανόλης 100%.
- Το δείγμα επωάζεται για 30min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση για 10min στις 13000rpm.
- Το υπερκείμενο αποχύνεται και αφού στεγνώσει το ίζημα επαναδιαλύεται σε 20-30μL αποστειρωμένο ddH₂O.

2.3.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την βοήθεια κολώννας

Σε περίπτωση που απαιτείται απομόνωση πλασμιδιακού DNA υψηλής καθαρότητας όπως όταν το πλασμίδιο θα αλληλουχιθεί ή θα χρησιμοποιηθεί για ηλεκτροπόρωση, η απομόνωση γίνεται με χρήση του kit NucleoSpin Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel).

2.3.4 Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων (DNA/RNA) σε πηκτή αγαρόζης

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης (συνήθως 0.8 έως 3%) προστίθεται σε διάλυμα 1x TAE.
- Το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη.
- Προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0,5μg/mL.
- Το διάλυμα αποχύνεται σε κατάλληλο δοχείο συσκευής ηλεκτροφόρησης με την ανάλογη χτένα και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά την στερεοποίηση του πηκτώματος αγαρόζης, αφαιρούνται οι χτένες και τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα (1x TAE με 0,5μg/mL EtBr).

- Στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται χρωστική (loading dye) τελικής συγκέντρωσης 1x.
- Κατά την ηλεκτροφόρηση εφαρμόζεται σταθερή τάση 50-120V που ποικίλλει ανάλογα με την επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού, το μέγεθος της πηκτής και την περιεκτικότητά της σε αγαρόζη.
- Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης εξετάζεται σε υπεριώδη ακτινοβολία.

2.3.5 Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης

Σε περίπτωση που απαιτείται διαχωρισμός ενός κλάσματος DNA από τα υπόλοιπα, όπως για παράδειγμα του προϊόντος μιας αντίδρασης PCR από τα διμερή των εκκινητών ή κάποιου συγκεκριμένου προϊόντος μιας πέψης με ένζυμα περιορισμού από τα υπόλοιπα τμήματα τότε μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης το προϊόν επιθυμητού μεγέθους κόβεται με την χρήση νυστεριού και στην συνέχεια γίνεται έκλουση του από την αγαρόζη με χρήση του kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

2.3.6 Υπολογισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων γίνεται με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων στα 240nm, 260nm και 280nm σε φωτόμετρο. Η συγκέντρωση υπολογίζεται με βάση την τιμή στα 260nm και τον τύπο των Beer-Lambert:

$$C \left(\frac{\mu g}{mL} \right) = a * \frac{OD_{260}}{\lambda} * DF$$

Όπου α είναι η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων όταν $O.D_{260}=1$ και συγκεκριμένα για δείγματα DNA, $a=50\mu g/mL$ ενώ για RNA, $a=40\mu g/mL$, DF είναι ο συντελεστής αραίωσης του δείγματος και λ το βήμα της κυβέτας. Η καθαρότητα του δείγματος από προσμίξεις με πρωτεΐνες, σάκχαρα και πολυφαινολικά παράγωγα εκτιμάται με τους λόγους OD_{260}/OD_{280} και OD_{260}/OD_{240} οι οποίοι καλό είναι να κυμαίνονται μεταξύ 1,8 και 2,0.

2.3.7 Χειρισμός με DNase

Η αντίδραση πραγματοποιείται στην κεφαλή συσκευής PCR.

Νουκλεϊκά οξέα	5-15 µg
RQ1 Buffer (10X)	10 µL
RQ1 DNase (1 U/µL)	5 µL
RNase Out (40 U/µL)	1 µL
Τελικός όγκος	100 µL

- Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37 °C για 1 ώρα.
- Μετά την λήξη της αντίδρασης, ο όγκος του διαλύματος αραιώνεται με ddH₂O σε τελικό όγκο 400 µL και στην συνέχεια ακολουθεί καθαρισμός του RNA με 1:1 (φαινόλη)/(24:1 χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη), κατακρήμνιση με αιθανόλη και εκ νέου ηλεκτροφόρηση και φωτομέτρηση του δείγματος.

2.3.8 Σύνθεση συμπληρωματικής αλυσίδας μέσω ανάστροφης μεταγραφάσης

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε δυο στάδια (1st & 2nd Step) στην κεφαλή συσκευής PCR.

1st Step	
RNA	1,5 µg
Oligo(dT)₁₇ (25mM)	2 µL
dNTPs (10mM)	1 µL
Τελικός όγκος	12 µL

- Το διάλυμα τοποθετείται για 5' στους 65 °C.
- Μετά τα 5' το Eppendorf τοποθετείται στον πάγο και προστίθενται:

2nd Step	
First Strand Buffer (5X)	4 µL
DTT 100mM	2 µL
RNase Out (40 U/µL)	1 µL
SuperScript II RT (200 U/µL)	1 µL
Τελικός όγκος	20 µL

- Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 42 °C για 1 ώρα.
- Ακολουθεί αδρανοποίηση του ενζύμου με επώαση στους 70 °C για 15 λεπτά.
- Το διάλυμα αραιώνεται 4 έως 5 φορές με ddH₂O και μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατευθείαν σαν μήτρα για αντίδραση PCR ή να αποθηκευτεί στους ή -80 °C.

2.3.9 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Όταν η αντίδραση στοχεύει σε διαγνωστική ενίσχυση κάποιας περιοχής από gDNA, πλασμιδίου ή ss-cDNA, χρησιμοποιείται η DreamTaq DNA polymerase ενώ όταν το προϊόν πρόκειται να κλωνοποιηθεί σε κάποιο φορέα χρησιμοποιείται η Phusion High-Fidelity DNA Polymerase. Η δεύτερη λόγω δράσης 3'→5' εξωνουκλεάσης (proofreading) έχει 50 φορές μικρότερη πιθανότητα λάθους (4.4×10^{-7} ανά ζ.β.) σε σχέση με την DreamTaq και το προϊόν έχει τυφλά άκρα επομένως μπορεί να κλωνοποιηθεί σε φορέα που έχει υποστεί πέψη με κάποιο ένζυμο που αφήνει τυφλά άκρα (πχ pUC19/SmaI).

Ακολουθεί ένα τυπικό πρωτόκολλο αντίδρασης PCR

- Σε αποστειρωμένο eppendorf προστίθενται:

Συστατικά Αντίδρασης	Όγκος	Τελικές Συγκεντρώσεις
Phusion HF Buffer (5X)	5 μL	1X
dNTPs (2mM)	2,5 μL	200 μM
Ορθός εκκινητής (5μM)	2,5 μL	0.5 μM
Ανάστροφος εκκινητής (5μM)	2,5 μL	0.5 μM
Phusion HF DNA Polymerase (2 U/μL)	0,25 μL	0.02 U/μl
Μήτρα*	1-3 μL	1 pg έως 125 ng
Τελικός όγκος	25 μL	

* Στα 25 μL αντίδρασης, η μήτρα κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 25ng και 125ng για gDNA, μεταξύ 1pg και 5ng για πλασμιδιακό DNA και σε περίπτωση ss-cDNA δεν πρέπει να ξεπερνάει το 10% του τελικού όγκου της αντίδρασης.

- Το διάλυμα τοποθετείται στην συσκευή PCR στην οποία έχει ήδη αποθηκευτεί το επιθυμητό πρόγραμμα.
- Ανάλογα τον επιθυμητό προϊόν προσαρμόζεται το πρόγραμμα όπου τυπικά αποτελείται από τα εξής βήματα:

	Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος
1	Αρχική Αποδιάταξη	94 °C	2 min
2	Αποδιάταξη	94 °C	30 sec
3	Υβριδισμός εκκινητών*	45 - 72 °C	30 sec
4	Επιμήκυνση**	72 °C	30sec έως 1min/kb
5	Επανάληψη των βημάτων 2 έως 4 για 20-35 κύκλους***		
6	Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 min

* Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών προσαρμόζεται αναλόγως το T_m τους και συνήθως είναι 2 °C κάτω του μικρότερου T_m από το ζευγάρι που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί.

** Ο χρόνος επιμήκυνσης εξαρτάται από το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος και από την ταχύτητα πολυμερισμού του ενζύμου που θα χρησιμοποιηθεί.

*** Ο αριθμός των κύκλων πρέπει να είναι χαμηλός (20-25 ή και χαμηλότερα) σε περίπτωση που το προϊόν πρόκειται να κλωνοποιηθεί ώστε να είναι ελάχιστη η πιθανότητα μετάλλαξης.

2.3.10 Σχεδιασμός εκκινητών

Οι εκκινητές σχεδιάζονται αναλόγως του στόχου και του επιθυμητού προϊόντος με την ελάχιστη δυνατή πιθανότητα δημιουργίας cis/trans διμερών και φουρκετών. Μέσω αυτών μπορούν να δημιουργηθούν μεταλλάξεις ή προϊόντα που φέρουν για παράδειγμα επιθυμητές θέσεις οι οποίες αναγνωρίζονται από ενζύμα περιορισμού και δεν υπάρχουν στην αρχική ακολουθία ώστε να είναι εφικτή η κατευθυνόμενη κλωνοποίηση, η μετέπειτα υποκλωνοποίηση ενθέσεων κτλ.

Ακολουθούν μερικοί κανόνες για τον σχεδιασμό εκκινητών:

- Το μήκος του κάθε εκκινητή κυμαίνεται μεταξύ 18-32 βάσεων.
- Το GC% του εκκινητή να είναι κοντά στο 50% και να μην υπερβαίνει το 55%.
- Το T_m του εκκινητή να είναι μεταξύ 50 και 65 °C και ιδανικά 57 έως 62 °C.
- Στα πρώτα και στα τελευταία 5 νουκλεοτίδια να υπάρχουν 2-3 βάσεις G ή C.
- Τα T_m s του ζεύγους να είναι όσο το δυνατόν πιο κοντά.

- Οι εκκινητές ελέγχονται ώστε να αποφεύγονται όσο είναι δυνατό cis-διμερή, trans-διμερή και φουρκέτες.
- Το Tm του κάθε εκκινητή υπολογίζεται από τον τύπο:

$$T_m = 69.3 + 0.42*(GC \%) - 650/L, \text{ όπου } L = \text{μήκος εκκινητή}$$

2.3.11 Λιγοποίηση τμημάτων DNA

Μέσω του ενζύμου T4 DNA Ligase είναι εφικτή η λιγοποίηση τμημάτων DNA είτε με τυφλά είτε με κολλώδη άκρα αρκεί να είναι συμπληρωματικά. Τυπικά μια αντίδραση λιγοποίησης αποτελείται από τα εξής:

Linear plasmid	20 έως 100 ng*
Insert DNA	ng που χρειάζονται ώστε να υπάρχει 3:1 (συνήθως) μοριακή αναλογία σε σχέση με το πλασμίδιο**
T4 DNA Ligase Buffer (10X)	2 μL
T4 DNA Ligase (5 Weiss U/μL)	0,2μL ή 1μL***
50% PEG 4000	2 μL****
Total	20 μL

* Ανάλογα το μέγεθος του πλασμιδίου και την ποιότητα των δεκτικών κυττάρων στα οποία θα γίνει ο μετασχηματισμός.

** Υπολογίζεται από τον τύπο:

$$ng \text{ of insert} = (ng \text{ of vector}) * \frac{kb \text{ size of insert}}{kb \text{ size of vector}} * \left(\text{molar ratio of } \frac{\text{insert}}{\text{vector}} \right)$$

*** Στην περίπτωση τυφλών άκρων προστίθεται 1μL ενώ σε κολλώδη 0,2μL.

**** Προστίθεται μόνο στην περίπτωση λιγοποίησης τμημάτων με τυφλά άκρα.

- Η αντίδραση επωάζεται στους 16 °C για 4 ώρες ή ο/ν.
- Αμέσως μετά η αντίδραση μπορεί είτε να χρησιμοποιηθεί για μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων είτε να αποθηκευτεί στους 4 °C για μικρό χρονικό διάστημα.

2.3.12 Πέψη νουκλεϊκών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Μια τυπική πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες αποτελείται από τα εξής:

DNA	1 μg
Ένζυμο περιορισμού (20U/μL)	1 μL *
Buffer (10X)	3 μL
BSA (10X)	3 μL **
Τελικός όγκος	30 μL

* Σε περίπτωση διπλής πέψης, η συνολική ποσότητα ενζύμων δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από το 10% του τελικού όγκου της αντίδρασης.

** Προστίθεται εάν αναφέρεται στις οδηγίες χρήσης του ενζύμου.

- Η αντίδραση πραγματοποιείται στην θερμοκρασία που αναγράφεται στις οδηγίες χρήσης του ενζύμου (συνήθως 37 °C) για 1,5 ώρα.
- Η αντίδραση μπορεί είτε να ηλεκτροφορηθεί για ανάλυση των αποτελεσμάτων, είτε να αποθηκευτεί στους -20 °C.

2.4 Χειρισμοί πρωτεϊνών

2.4.1 Απομόνωση πρωτεϊνών από καλλιέργεια *E. coli*

- Βακτηριακό ίζημα από 1 mL καλλιέργεια στην οποία έχει γίνει επαγωγή της έκφρασης με IPTG, επαναδιαλύεται σε 250 μL Extraction Buffer.
- Στη συνέχεια ακολουθεί διάρρηξη των κυττάρων με υπερήχους σε χαμηλή θερμοκρασία.
- Οι ρυθμίσεις για την συσκευή Sonic Ruptor 400 (OMNI International) με την κεφαλή Micro Tip (OR-T-156) είναι 20% power, 20% pulser για 8 min.
- Το 1/3 του αιωρήματος μεταφέρεται σε άλλο eppendorf και αποτελεί το δείγμα με τις ολικές πρωτεΐνες (total).
- Το υπόλοιπο φυγοκεντρείται στις 13.000rpm για 10min στους 4 °C.

- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε άλλο eppendorf και αποτελεί το κλάσμα με τις υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες (supernatant), ενώ το ίζημα επαναδιαλύεται σε ίσο όγκο με το υπερκείμενο και αποτελεί το αδιάλυτο κλάσμα (pellet).

2.4.2 Απομόνωση πρωτεϊνών από φυτικούς ιστούς

- Ιστός φρέσκος ή λειοτριβημένος μεταφέρεται σε eppendorf και ομογενοποιείται σε αναλογία 100 mg ιστού σε 100 μ L Extraction Buffer με έντονη ανάδευση για 2 min. Σε περίπτωση φρέσκου ιστού προηγείται πολτοποίηση του ιστού εντός του Extraction Buffer με micropestle για eppendorfs.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 10.000 rpm για 10 min στους 4 °C.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε άλλο eppendorf και αποτελεί το υδατοδιαλυτό πρωτεϊνικό κλάσμα.

2.4.3 Απομόνωση πρωτεϊνών από πυρήνες φυτών *N. benthamiana*

Με το πρωτόκολλο αυτό διαχωρίζονται επιλεκτικά οι πυρήνες από τα υπόλοιπα μέρη του κυττάρου (Bowler et al., 2004).

- Φυτικός ιστός ομογενοποιείται με υγρό άζωτο. Περίπου 2 gr του λειοτριβημένου ιστού μεταφέρονται σε falcon και προστίθενται 30 mL παγωμένου διαλύματος NEB1.
- Το δείγμα αναμιγνύεται ελαφρώς.
- Το διάλυμα φιλτράρεται μέσω Miracloth και συλλέγεται δείγμα από το αιώρημα (input).
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στα 1900g για 20min στους 4 °C.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και το ίζημα επαναιωρείται σε 1 mL NEB2 0,5 % Triton X-100.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στα 1900g για 20min στους 4 °C.
- Το υπερκείμενο συλλέγεται και αποτελεί το κυτταροπλασματικό κλάσμα. Το ίζημα επαναιωρείται σε 0.3 mL NEB2 0,15 % Triton X-100 και στη συνέχεια επιστοιβάζεται προσεκτικά σε 0.5 mL NEB3. Το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 16000g για 45min στους 4 °C.
- Το τελευταίο βήμα επαναλαμβάνεται έως ότου το ίζημα δεν είναι πρασινωπό.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 0.06 mL NEB1 χωρίς σουκρόζη και αποτελεί το πυρηνικό κλάσμα.

- Σε κάθε δείγμα που συλλέχθηκε, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα SDS Loading Buffer και θερμαίνονται για 5 min στους 90 °C.
- Ακολούθως τα δείγματα αναλύονται μέσω SDS-PAGE και η καθαρότητα τους ελέγχεται με Western blot χρησιμοποιώντας κατάλληλα αντισώματα.

2.4.4 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford

- Από πυκνό διάλυμα BSA 100X (10 mg/mL), δημιουργείται αραιώση 1X (0.1 mg/mL) σε τελικό όγκο 0,75 mL.
- Σε eppendorfs προστίθενται τα εξής:

BSA 1X	0 μL	10 μL	25 μL	50 μL	75 μL	100 μL
ddH₂O	100 μL	90 μL	75 μL	50 μL	25 μL	0 μL
Bradford Solution 1X	900 μL	900 μL	900 μL	900 μL	900 μL	900 μL
Τελικός όγκος	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Τελική συγκέντρωση BSA	0 μg	1 μg	2.5 μg	5 μg	7.5 μg	10 μg

- Επίσης δημιουργούνται δυαδικές αραιώσεις από τα άγνωστα πρωτεϊνικά δείγματα που πρόκειται να ποσοτικοποιηθούν (πχ 1/2, 1/4 κτλ) και ακολούθως προστίθενται 95 μL ddH₂O και 900 μL Bradford Solution 1X σε 5 μL του κάθε δείγματος.
- Το Bradford Solution προστίθεται τελευταίο, τα δείγματα επωάζονται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και αμέσως καταγράφεται η οπτική απορρόφηση όλων των δειγμάτων στα 595 nm.
- Βάσει των τιμών απορρόφησης των δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης (BSA) δημιουργείται πρότυπη καμπύλη αναφοράς και από αυτήν υπολογίζεται η συγκέντρωση των αγνώστων δειγμάτων.

2.4.5 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Με την τεχνική αυτή οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους μέγεθος.

- Κάθε πηκτή αποτελείται από 2 διακριτά gels τα οποία επιστοιβάζονται με την εξής σειρά:
- Αρχικά προετοιμάζεται το Resolving gel ως εξής:

Resolving Gel 10% (5 mL) *	
ddH₂O	1.9 mL
30% Acrylamide (29:1 mix)	1.7 mL
1.5M This-HCL pH 8.8	1.3 mL
SDS 10%	50 μ L
APS 10%	50 μ L
TEMED	2 μ L

* Το ποσοστό της ακρυλαμίδης προσαρμόζεται ανάλογα με το εύρος μεγεθών στο οποίο επιθυμείται μεγαλύτερη ανάλυση. Συνήθως κυμαίνεται από 6 έως 14%.

- Το resolving gel αποχύνεται προσεκτικά. Περίπου 3.5-4 mL είναι αρκετά για τζάμια που απέχουν 0.75mm. Ο υπόλοιπος όγκος καλύπτεται προσεκτικά με ddH₂O. Ο πολυμερισμός του Resolving gel χρειάζεται περίπου 30 min.
- Ακολούθως προετοιμάζεται το Stacking gel ως εξής:

Stacking Gel 5% (3 mL)	
ddH₂O	2.1 mL
30% Acrylamide (29:1 mix)	0.5 mL
1M This-HCL pH 6.8	0.38 mL
SDS 10%	30 μ L
APS 10%	30 μ L
TEMED	3 μ L

- Αφού έχει πολυμεριστεί το Resolving gel, αφαιρείται το νερό, και αποχύνεται προσεκτικά το Stacking gel και η χτένα.
- Ο πολυμερισμός του Stacking gel χρειάζεται περίπου 20 min και αφού ολοκληρωθεί, η συσκευή μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- Προστίθεται 1X ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης, αφαιρείται η χτένα και ξεπλένονται τα πηγάδια.
- Τα δείγματα θερμαίνονται για 5 min στους 90 °C, φορτώνονται στα πηγάδια και ηλεκτροφορούνται στα 15-25 mA.
- Η ηλεκτροφόρηση διακόπτεται λίγο πριν η χρωστική φτάσει στο κατώτερο σημείο του Resolving gel.

2.4.6 Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και ανίχνευση ενζυμικής ενεργότητας (Ζυμόγραμμα)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται με σκοπό να εντοπιστεί το αποτέλεσμα μιας ενζυμικής αντίδρασης έπειτα από διαχωρισμό των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση. Προκειμένου να παραμείνουν ενεργά τα ένζυμα, η ηλεκτροφόρηση λαμβάνει χώρα όπως αναφέρθηκε προηγουμένως στην περίπτωση της αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης, με την διαφορά ότι δεν προστίθεται SDS και β-μερκαπταιθανόλη σε κανένα διάλυμα (Running Buffer, Stacking Gel, Resolving Gel και SDS Loading Buffer)*. Επίσης τα δείγματα δεν θερμαίνονται πριν την ηλεκτροφόρηση. Η ηλεκτροφόρηση λαμβάνει χώρα όπως περιγράφηκε στα 15 mA ώστε να μην ανέβει η θερμοκρασία του gel.

- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το Resolving Gel αφαιρείται προσεκτικά και ξεπλένεται τουλάχιστον 10 φορές με 25 mL διαλύματος 150 mM CH_3COONa pH 5.5.
- Το gel επωάζεται για 10 min σε 150 mM CH_3COONa pH 5.5 που περιέχει 1.5 mM MUGlc (4-methylumbelliferyl- β -d-glucopyranoside) ή ολευρωπαΐνη. Για οικονομία του μεταβολίτη, η επώαση μπορεί να γίνει με ένα κομμάτι Whatman που έχει εμβαπτιστεί στο συγκεκριμένο buffer.
- Η ανίχνευση φθορισμού γίνεται στην τράπεζα UV.

* Στην παρούσα μελέτη τα ζυμογράμματα έγιναν απουσία SDS και β-μερκαπταιθανόλης μόνο στο SDS Loading Buffer.

2.4.7 Χρώση με Coomassie Brilliant Blue (CBB staining)

Προκειμένου να οπτικοποιηθεί το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης το Resolving gel εξάγεται προσεκτικά από τα τζάμια και εμβαπτίζεται σε διάλυμα χρώσης για τουλάχιστον 20 min σε συνεχή ήπια ανακίνηση. Ακολούθως αφαιρείται το διάλυμα χρώσης και η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα αποχρωματισμού σε συνεχή ήπια ανακίνηση. Ανά 15-20 min το διάλυμα αποχρωματισμού αντικαθίσταται έως ότου η εικόνα του gel είναι ικανοποιητική.

2.4.8 Χρώση με άργυρο (silver staining)

Εναλλακτικά από την χρώση με CBB, οι πρωτεϊνικές ζώνες μπορούν να οπτικοποιηθούν μετά από χρώση με άργυρο. Παρότι είναι πιο χρονοβόρο

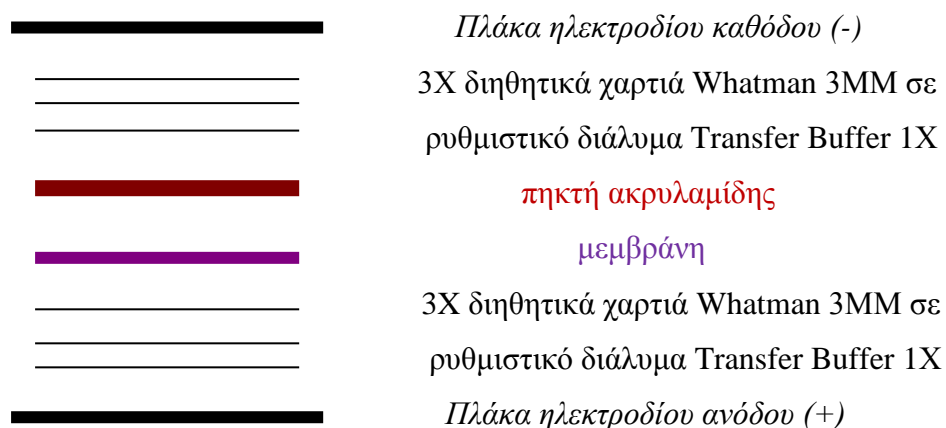
πρωτόκολλο σε σχέση με την χρώση CBB, προσφέρει τουλάχιστον 50 φορές μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα.

- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το Resolving gel εξάγεται προσεκτικά από τα τζάμια και εμβαπτίζεται σε διάλυμα σταθεροποίησης (Fixing solution) για 60 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση.
- Προστίθεται το διάλυμα αργύρου (Staining solution) για 15 λεπτά υπό συνεχή ήπια ανάδευση.
- Στη συνέχεια το διάλυμα αργύρου απομακρύνεται και ακολουθούν τρία ξεπλύματα με ddH₂O για 5 min το καθένα.
- Ακολούθως προστίθεται το διάλυμα εμφάνισης (Developing solution), το οποίο αφήνεται έως ότου αρχίσουν να εμφανίζονται ζώνες πρωτεϊνών στην πηκτή.
- Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη διαλύματος παύσης (Stop solution).
- Απομακρύνεται το διάλυμα παύσης και προστίθεται διάλυμα σταθεροποίησης για 15 λεπτά.

2.4.9 Μεταφορά πρωτεϊνών κατά Western

- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το Resolving gel εξάγεται προσεκτικά από τα τζάμια και τοποθετείται για 15 min στο ρυθμιστικό διάλυμα Transfer Buffer 1X, με συνεχή ήπια ανάδευση.
- Κόβονται διηθητικά χαρτιά Whatman στις διαστάσεις της πηκτής και εμβαπτίζονται στο ρυθμιστικό διάλυμα Transfer Buffer 1X.
- Κόβεται ένα κομμάτι μεμβράνης PVDF στις διαστάσεις της πηκτής και εμβαπτίζεται σε μεθανόλη 100% για 30 sec.
- Εμβαπτίζεται η μεμβράνη στο ρυθμιστικό διάλυμα Transfer Buffer 1X για 15 min, με συνεχή ήπια ανάδευση.
- Στη συνέχεια συναρμολογούνται τα επιμέρους συστατικά για τη μεταφορά, σύμφωνα με την Εικόνα 2.4 και λαμβάνει χώρα η μεταφορά για 45* min σε σταθερή τάση 10V.

* Ο χρόνος μεταφοράς προσαρμόζεται αναλόγως του μεγέθους της προς ανάλυση πρωτεΐνης, της % συγκέντρωσης της ακρυλαμίδης και του εμβαδού της επιφάνειας της πηκτής.



Εικόνα 2.4: Σχηματική απεικόνιση της κατασκευής για την μεταφορά πρωτεϊνών κατά Western.

2.4.10 Ανοσοανίχνευση πολυπεπτιδίου - στόχου

- Μετά το τέλος της μεταφοράς, η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε TBST.
- Αφού εξαχθεί από το TBST καλύπτεται με Blocking Solution για 1 τουλάχιστον ώρα.
- Το Blocking Solution απομακρύνεται, η μεμβράνη ξεπλένεται με TBST και προστίθεται πρωτογενές αντίσωμα διαλυμένο σε Blocking Solution, στην κατάλληλη αραιώση, για τουλάχιστον 1.5 ώρα.
- Το πρωτογενές αντίσωμα απομακρύνεται και η μεμβράνη ξεπλένεται 3 φορές με TBST για 10 min.
- Προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα διαλυμένο σε Blocking Solution και αφήνεται για 45 min.
- Απομακρύνεται το διάλυμα του δευτερογενούς αντισώματος και η μεμβράνη ξεπλένεται 3 φορές με TBST για 10 min.
- Σε σκοτεινό θάλαμο αναμιγνύονται ίσες ποσότητες από τα διαλύματα A και B του Luminol Reagent. Χρησιμοποιείται τελικός όγκος 0.125ml/cm^2 μεμβράνης (περίπου 1.5 ml ανά μεμβράνη).
- Απομακρύνεται το TBST και προστίθεται Luminol reagent στην πρωτεϊνική πλευρά της μεμβράνης. Επωάζεται για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απομακρύνεται η περίσσεια του διαλύματος

- Ερμητικά τυλίγεται η μεμβράνη, με την πρωτεϊνική πλευρά προς τα πάνω, μέσα σε πλαστική μεμβράνη (plastic wrap) με προσοχή ώστε να μη σχηματιστούν φυσαλίδες ή ρυτίδες.
- Τοποθετείται η τυλιγμένη μεμβράνη, με την πρωτεϊνική πλευρά προς τα πάνω, στο χαρτί υποστήριξης και τοποθετείται στην κασέτα εμφάνισης φιλμ.
- Σε σκοτεινό θάλαμο, εκτίθεται η μεμβράνη για 2-10min στο φιλμ και στη συνέχεια εμφανίζεται το φιλμ σύμφωνα με πρότυπα πρωτόκολλα εμφάνισης φιλμ (developer - water - fixer solution). Ο χρόνος έκθεσης μπορεί να αυξηθεί εάν είναι απαραίτητο.

2.4.11 Συμπύκνωση πρωτεϊνών με εξαλάτωση (Salting Out)

Ένας αρκετά διαδεδομένος τρόπος κατακρήμνισης των πρωτεϊνών είναι η έκθεση τους σε υψηλή συγκέντρωση $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (θειικό αμμώνιο). Λόγω του ότι το θειικό αμμώνιο είναι ισχυρός ηλεκτρολύτης, απομακρύνονται μόρια H_2O από τις πρωτεΐνες με αποτέλεσμα να μειώνεται η διαλυτότητα τους και να κατακρημνίζονται (Burgess, 2009).

- Ζυγίζεται η απαραίτητη ποσότητα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ που θα χρειαστεί ώστε το πρωτεϊνικό διάλυμα να έρθει σε 55%* κορεσμό.
- Η σκόνη προστίθεται πολύ αργά στο διάλυμα υπό συνεχή ήπια ανάδευση στους 4 °C.
- Μόλις προστεθεί όλη η ποσότητα, το διάλυμα αναδεύεται ήπια για 30 min στους 4 °C.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται για 10 min στις 10.000 rpm στους 4 °C.
- Αποχύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο και το πρωτεϊνικό ίζημα επαναδιαλύεται σε επιθυμητό όγκο.

* Το ποσοστό κορεσμού που απαιτείται είναι διαφορετικό για κάθε πρωτεΐνη και πρέπει να υπολογιστεί ανά περίπτωση (Burgess, 2009). Η ποσότητα που απαιτείται για δεδομένο όγκο και επιθυμητό κορεσμό υπολογίζεται εύκολα μέσω προγράμματος <http://goo.gl/GheURV> .

Στην παρούσα μελέτη, πρωτεϊνικό εκχύλισμα συνολικού όγκου 12 mL από φύλλα καπνού που είχε γίνει αγροέγχυση με το *OeGLU* κατακρημνίστηκαν με θειικό αμμώνιο σε 55% κορεσμό. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 3 mL Extraction Buffer και η

περίσσεια θειικού αμμωνίου αφαιρέθηκε με μεμβράνη διαπίδυσης υπό συνεχή ήπια ανάδευση στους 4 °C για 16 ώρες σε 1.5L Extraction Buffer. Το βήμα αυτό επαναλήφθηκε για άλλες 3 ώρες με 1.5L φρέσκου Extraction Buffer. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα τοποθετούνται σε ημιπερατές μεμβράνες κυτταρίνης της εταιρείας Sigma (Cat. Nr D9777-100FT).

2.4.12 Συμπύκνωση πρωτεϊνών με μεθανόλη/χλωροφόρμιο

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως για υδατοδιαλυτές αλλά και υδρόφοβες πρωτεΐνες και δεν επηρεάζεται η απόδοση της από άλατα, αποδιατακτικούς παράγοντες, σύσταση διαλυμάτων κτλ. Το ποσοστό ανάκτησης των πρωτεϊνών είναι της τάξεως του 90-100% για πρωτεϊνικά διαλύματα 40-120 µg σε 0.1 ml (Wessel and Flügge, 1984).

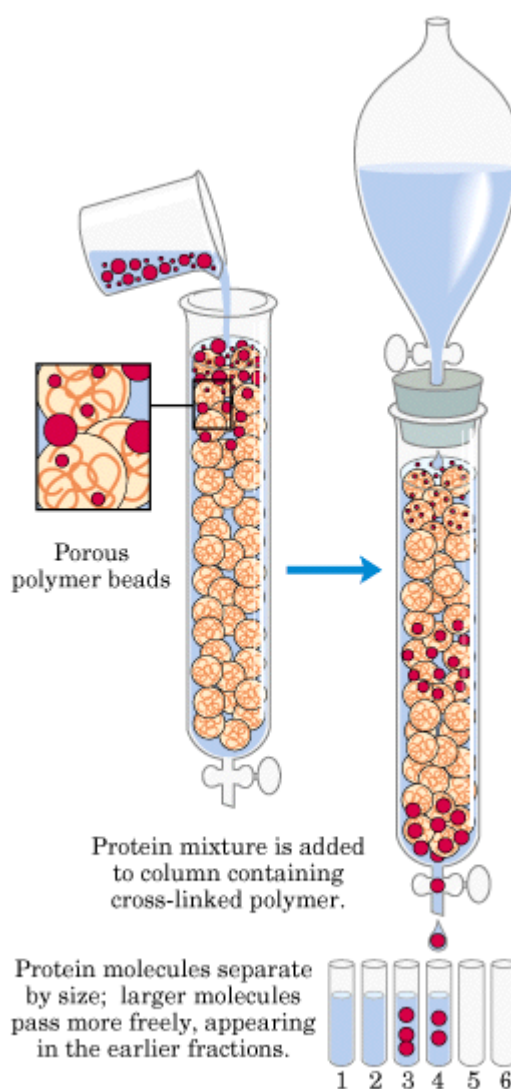
- Σε 150 µL* πρωτεϊνικού δείγματος προστίθενται 600 µL μεθανόλης.
- Έντονη ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 13.000rpm για 10 sec.
- Προστίθενται 150 µL χλωροφόρμιο, το δείγμα αναδεύεται έντονα και ακολούθως φυγοκεντρείται στις 13.000rpm για 10 sec.
- Προστίθενται 450 µL ddH₂O, το δείγμα αναδεύεται έντονα και ακολούθως φυγοκεντρείται στις 13.000rpm για 1 min.
- Αφαιρείται προσεκτικά η άνω φάση.
- Προστίθενται 450 µL μεθανόλης στην κάτω φάση, το δείγμα αναδεύεται και ακολούθως φυγοκεντρείται στις 13.000rpm για 2 min.
- Το υπερκείμενο αποχύνεται και το πρωτεϊνικό ίζημα αφού στεγνώσει επαναδιαλύεται σε 30 µL Extraction Buffer.

* Ο όγκος είναι ενδεικτικός και μπορεί να αλλάξει αρκεί να τηρηθούν οι αναλογίες με τους διαλύτες.

2.4.13 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Gel filtration chromatography)

Με την τεχνική αυτή διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες με βάση το μέγεθος τους καθώς κινούνται εντός του πορώδους υλικού (στατική φάση). Όσο μεγαλύτερο μέγεθος έχει μια πρωτεΐνη τόσο ταχύτερα εκλύεται (Εικόνα 2.5). Βαθμονομώντας μια δεδομένη στήλη με πρωτεΐνες γνωστών μοριακών μεγεθών, είναι εφικτός ο υπολογισμός του μοριακού μεγέθους μιας άγνωστης γνωρίζοντας τον όγκο έκλυσης.

Εικόνα 2.5: Σχηματική αναπαράσταση της αρχής διαχωρισμού.



Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η στήλη Sephacryl S-300 HR (GE Healthcare Bio-Sciences).

- Η στήλη πακετάρεται με το πορώδες υλικό πολύ αργά με σταθερή ροή ώστε να μην δημιουργηθούν θύλακες αέρα ή συσσωματώματα ή διπλά μέτωπα. Το πορώδες υλικό αφήνεται αρκετές ώρες να καθιζάνει.
- Καταγράφονται οι διαστάσεις της στατικής φάσης (Bed volume) και η στήλη τοποθετείται στους 4 °C.
- Η στήλη ξεπλένεται με τουλάχιστον 2 όγκους Extraction Buffer και έπειτα καταγράφεται η ροή της.
- Ο όγκος κάθε δείγματος προς ανάλυση πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1–4% του όγκου της στατικής φάσης.
- Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι εξής πρωτεΐνες γνωστού μοριακού μεγέθους για την τιτλοδότηση της στήλης:

Name	Sigma cat.nr.	Molecular Mass
Blue Dextran	D4772	2,000 kDa
Apo ferritin	A3660	443 kDa
Alcohol Dehydrogenase	A8656	150 kDa
Bovine Serum Albumin	A8531	66 kDa

- Ο όγκος που καταλαμβάνει η κινητή φάση εντός της στατικής φάσης (κενός χώρος) ορίζεται ως Void Volume (V_0) και ισούται με τον όγκο έκλουσης του Blue Dextran.
- Ο όγκος έκλουσης κάθε πρωτεΐνης (V_e) προσδιορίζεται συλλέγοντας κλάσματα του 1 ml αμέσως μετά την εφαρμογή του δείγματος στην κορυφή της στήλης, και καταγράφοντας την απορρόφηση αυτών στα 280nm.
- Δημιουργείται γραφική παράσταση με τις λογαριθμικές τιμές των μοριακών μεγεθών σε σχέση με τον λόγο V_e/V_0 για κάθε πρωτεΐνη. Με βάση αυτή την γραφική παράσταση μπορεί να προσδιοριστεί το μέγεθος μιας άγνωστης πρωτεΐνης γνωρίζοντας τον όγκο έκλουσης της.
- Η στήλη αποθηκεύεται σε διάλυμα 20% αιθανόλης.

Στην παρούσα μελέτη η ροή της στήλης ήταν ίση με 0.33mL/min και φορτώθηκε 1,67 mL δείγματος μετά την μεμβράνη διαπίδυσης.

2.4.14 Απομόνωση πρωτεΐνης με ανοσοκατακρήμνιση (Immunoprecipitation)

Η ανοσοκατακρήμνιση είναι μια τεχνική εκλεκτικής απομόνωσης πρωτεϊνών ή πρωτεϊνικών συμπλόκων (συν-ανοσοκατακρήμνιση) που φέρουν κάποιον επίτοπο λόγω αναγνώρισης από ακινητοποιημένα αντισώματα. Στην παρούσα μελέτη έγινε χρήση του κιτ FLAGIPT1 (Sigma) το οποίο περιλαμβάνει το μονοκλωνικό αντίσωμα Anti-FLAG M2 ακινητοποιημένο σε σφαιρίδια αγαρόζης και το οποίο αναγνωρίζει το οκταπεπτίδιο FLAG (N'-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C').

- 40 μ L από το διάλυμα σφαιριδίων αγαρόζης που περιέχει το αντίσωμα μεταφέρεται σε αποστειρωμένο eppendorf και φυγοκεντρείται στα 5.000g για 30 sec.
- Το υπερκείμενο αποχύνεται προσεκτικά και τα σφαιρίδια ξεπλένονται πέντε φορές με 0.5 mL Wash Buffer 1X.

- Τα σφαιρίδια επωάζονται με 200-1000 μL από πρωτεϊνικό εκχύλισμα που περιέχει την επιθυμητή πρωτεΐνη προς καθαρισμό. Ο όγκος εξαρτάται από τα εκτιμώμενα επίπεδα έκφρασης του πεπτιδίου-στόχου.
- Το διάλυμα επωάζεται στους 4°C υπό συνεχή ήπια ανάδευση για 2 ώρες.
- Το διάλυμα μεταφέρεται σε κολώνα και αφού καθιζάνουν τα σφαιρίδια, ξεπλένονται με 0.5 mL Wash Buffer 1X.
- Τα σφαιρίδια ξεπλένονται με 100 μL FLAG Elution Buffer 3X.
- Αμέσως συλλέγονται δείγματα και τα κλάσματα αναλύονται για την παρουσία του πεπτιδίου στόχου.

Στην παρούσα μελέτη πρωτεϊνικό εκχύλισμα συνολικού όγκου 6mL επωάστηκε με 150 μL σφαιριδίων για 16 ώρες. Η έκλουση έγινε με 500 μL FLAG Elution Buffer 3X.

2.4.15 Ενζυμική αντίδραση με ολευρωπαΐνη

Σε αποστειρωμένο erpendorf προστίθενται τα εξής:

Πυκνά διαλύματα	Ποσότητα	Τελική συγκέντρωση
Πρωτεϊνικό εκχύλισμα	20 μg	2 μg
Ολευρωπαΐνη (15 mM)	33.33 μL	5 mM
BSA (0.5%)	10 μL	0.05%
CH_3COONa 1.5M pH 5,5	10 μL	150 mM
Συνολικός όγκος	100 μL	

Η αντίδραση επωάζεται για επιθυμητό χρόνο στους 37°C και στην συνέχεια τερματίζεται με προσθήκη ίσου όγκου 100% μεθανόλης.

2.4.16 Κινητική ενζύμου

Η κινητική του ενζύμου σε διάφορες θερμοκρασίες εξετάστηκε επωάζοντας 20 μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος φυτών *N. benthamiana* που εκφράζουν το ένζυμο OeGLU σε θερμοκρασιακό εύρος 23 έως 55°C για 30 min σε 150 mM CH_3COONa pH 5.5. Αντίστοιχα η κινητική σε διάφορα pH εξετάστηκε επωάζοντας 20 μg σε εύρος τιμών pH 4 έως 7 για 30 min στους 37°C . Οι διαφορετικές τιμές pH προέκυψαν μετά από ανάμειξη διαλυμάτων CH_3COONa , Na_2HPO_4 και NaH_2PO_4 σε τελική συγκέντρωση 150 mM. Οι σταθερές K_m και V_{max} υπολογίστηκαν επωάζοντας 20 ng του απομονωμένου ενζύμου με ολευρωπαΐνη σε εύρος συγκεντρώσεων 0.01 έως 5.5 mM και με χρήση του προγράμματος Prism (GraphPad Software Inc.).

2.5 Χειρισμοί μεταβολιτών

2.5.1 Προετοιμασία ολευρωπαΐνης

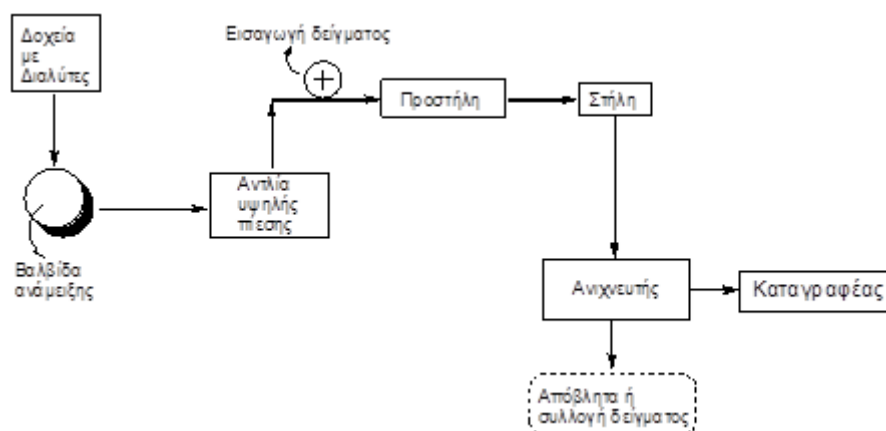
Κατάλληλη ποσότητα ολευρωπαΐνης (Extrasynthese) διαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα ddH₂O ώστε να προκύψει διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 15 mM. Μετά από έντονη ανάδευση και αφού το διάλυμα γίνει διαυγές, το δείγμα με την βοήθεια σύριγγας διαπερνάται από φίλτρο 0.2μm, διαμοιράζεται σε erpendorfs και φυλάσσεται στους -20 °C.

2.5.2 Χειρισμός δειγμάτων

Κάθε ενζυμική αντίδραση αφού τερματιστεί με προσθήκη ίσου όγκου μεθανόλης, φυγοκεντρείται στις 13.000rpm για 1 min. Όγκος 30 μL από το υπερκείμενο μεταφέρεται σε αποστειρωμένο erpendorf και στην συνέχεια προστίθενται 870 μL διαλύματος ddH₂O/μεθανόλης (40:60). Το δείγμα αναμιγνύεται ήπια και αποθηκεύεται στους -20 °C ή αναλύεται μέσω HPLC.

2.5.3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι μια τεχνική αναλυτικής χημείας μέσω της οποίας μπορούν να διαχωριστούν και να ποσοτικοποιηθούν ουσίες από ένα δείγμα. Ο διαχωρισμός γίνεται λόγω διαφορεικής κατανομής κάθε ουσίας μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης εντός μιας χρωματογραφικής στήλης. Στατική φάση είναι το υλικό πλήρωσης της στήλης και κινητή φάση είναι το υγρό που κινείται διαμέσου της στήλης. Τα βασικά μέρη ενός οργάνου HPLC φαίνονται στην Εικόνα 2.6.



Εικόνα 2.6: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης ενός οργάνου HPLC.

Στην παρούσα μελέτη, η ποσότητα γλυκοζυλιωμένης ολευρωπαΐνης μετρήθηκε μέσω ενός συστήματος της Jasco (Tokyo) εξοπλισμένο με την αντλία PU-2089, τον

ανιχνευτή UV-2070 και την στήλη ανάστροφης φάσης Discovery HS C18 (5 μm , 24 cm, 4.6 mm) της Supelco. Η ροή της κινητής φάσης ήταν 0.5 mL/min και η ανίχνευση της ουσίας έγινε στα 254 nm. Η κινητή φάση αποτελείτο από τον διαλύτη A (ddH₂O με 1% CH₃COOH) και τον διαλύτη B (μεθανόλη 100%) και η έκλουση έγινε με ισοκρατική ροή 60:40 (A:B) για 40 min και στην συνέχεια βαθμιδωτή ροή έως 30:70 (A:B) εντός 5 min.

2.5.4 Μέτρηση γλυκόζης

Η παραγόμενη γλυκόζη μετά την απογλυκοζυλίωση της ολευρωπαΐνης μετρήθηκε με την βοήθεια κιτ μέτρησης γλυκόζης (Boehringer Mannheim, Cat. Nr. 10 139 106 035). Το κιτ βασίζεται στην παραγωγή NADPH μετά από διαδοχική δράση των ενζύμων εξοκινάση (HK) και αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6P-DH) στην γλυκόζη. Η μέτρηση του NADPH γίνεται στα 340nm και είναι στοιχειομετρική με την αρχική ποσότητα γλυκόζης στο δείγμα.

2.6 Βιοπληροφορική ανάλυση

Μέσω της βάσης δεδομένων CAZy (<http://www.cazy.org>) ανακτήθηκαν αμινοξικές ακολουθίες από χαρακτηρισμένες φυτικές β -γλυκοσιδάσες της οικογένειας GH1. Η πολλαπλή ευθυγράμμιση των ακολουθιών έγινε μέσω του προγράμματος ClustalX v. 1.83 (<http://www.clustal.org>) και η γραφική απεικόνιση του αποτελέσματος μέσω του προγράμματος ESPript (<http://esript.ibcp.fr>). Από την πολλαπλή ευθυγράμμιση δημιουργήθηκε το φυλογενετικό δέντρο με την μέθοδο “Neighbour-Joining” μέσω του PHYLIP (Phylogeny Inference Package, v. 3.65) με 1000 επαναλήψεις ανά θέση. Η γραφική απεικόνιση του δέντρου έγινε με το πρόγραμμα Dendroscope 3 (<http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software>). Η πρόβλεψη της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης OeGLU (NCBI accession nr. AAL93619) έγινε ab initio με την εφαρμογή Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) με ενεργή την επιλογή «Intensive Modelling Mode». Το αποτέλεσμα της πρόβλεψης μαζί με την τρισδιάστατη δομή της ολευρωπαΐνης (PubChem CID: 5281544) χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση της θέσης μοριακής προσκόλλησης (molecular docking) με το πρόγραμμα Molegro Virtual Docker (Molegro ApS). Δισδιάστατες και τρισδιάστατες απεικονίσεις του αποτελέσματος έγιναν με το πρόγραμμα LigPlot⁺ (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus>) και PyMOL (<http://www.pymol.org>) αντίστοιχα. Η ανάλυση υποκυτταρικής τοποθέτησης της πρωτεΐνης OeGLU έγινε με τα προγράμματα cNLS Mapper (<http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp>) και PSORT (<http://psort.org>).

2.7 Διαλύματα

2.7.1 Διαλύματα χειρισμού βακτηρίων

Θρεπτικό μέσο LB: 0,5% (w/v) Εκχύλισμα ζύμης, 1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Πεπτόνη. Στην περίπτωση στερεού θρεπτικού μέσου προστίθεται 1,4% (w/v) άγαρ.

IPTG: 200mg/ml isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside σε ddH₂O. Αποθηκεύεται στους -20 °C. Χρησιμοποιείται 5 μL/τρυβλίο.

X-GAL: 20mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside σε διμεθυλφορμαμίδιο (DMFO). Αποθηκεύεται στους -20 °C. Χρησιμοποιείται 50μL/τρυβλίο.

25mM CaCl₂: 25mM CaCl₂, 10mM Tris-HCl pH 8.0.

75mM CaCl₂: 75mM CaCl₂, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 15% Glycerol.

Διάλυμα RNase A (50 Kunitz U/mg): 10mg/ml σε 10mM Tris-HCl pH 7.4, 15mM NaCl. Βρασμός του διαλύματος για 15min. Διακοπή για 20min και επανάληψη βρασμού. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

Διάλυμα P1: 50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0 και 100μg/ml RNase A.

Διάλυμα P2: 0.2N NaOH, 1% SDS (w/v).

Διάλυμα P3: 3M/5M CH₃COOK/CH₃COOH : Σε 60ml 5M CH₃COOK προστίθενται 11,5ml CH₃COOH και 28,5ml ddH₂O.

Dilution Buffer: 10mM MES pH 5.6 , 10mM MgCl₂.

Induction Buffer: 10mM MES pH 5.6, 10mM MgCl₂, 150 μM ακετοσυρινγκόνη.

Αντιβιοτικά:

Αμπικιλίνη (1000X): 100mg/ml σε ddH₂O. Φυλάσσεται στους -20 °C.

Καναμυκίνη (1000X): 50mg/ml σε ddH₂O. Φυλάσσεται στους -20 °C.

Τζενταμυκίνη (1000X): 50mg/ml σε ddH₂O. Φυλάσσεται στους -20 °C.

Ριφαμυκίνη (100X): 5mg/ml σε μεθανόλη. Φυλάσσεται στους -20 °C.

2.7.2 Διαλύματα χειρισμού φυτών

Θρεπτικό μέσο ½ MS: 1% Σουκρόζη, 0.22% MS (Including vitamins), 0.05% MES. Το pH ρυθμίζεται με KOH έως το 5.7. Στο τέλος προστίθεται 0.3% phytigel.

Διάλυμα αποστείρωσης: 25% χλωρίνη, 0,01% Triton-X.

2.7.3 Διαλύματα απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων και ηλεκτροφόρησης

RNA Extraction Buffer: 100mM Tris-HCL pH 9.5, 0.5% SDS.

SEVAG: 24:1 (χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη).

TAE (50X): 242gr/lit Tris-base, 100ml/lit 0,5M EDTA pH 8,0, 57ml/lit CH₃COOH.

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

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

2.7.4 Διαλύματα χειρισμού πρωτεϊνών

Extraction Buffer: 100 mM Tris-HCL pH 8.8, 100 mM EDTA, 1 mM PMSF, 100 mM KCL, 10 mM Na₂SO₃, 100 mM Glycine.

NEB1: 0.4 M sucrose, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 5 mM β-mercaptoethanol και 1 mM PMSF.

NEB2: 0.25 M sucrose, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100, 5 mM β-mercaptoethanol και 1 mM PMSF.

NEB3: 1.7M sucrose, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM MgCl₂, 0.15% Triton X-100, 5 mM β-mercaptoethanol και 1 mM PMSF.

SDS Loading Buffer 2X: 100mM Tris-HCL pH 6.8, 4% SDS, 0.2% Bromophenol Blue, 20% Glycerol, 10% β-mercaptoethanol.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1X): 25mM Tris-base, 250mM Glycine, 0.1% SDS.

BSA 100X: 10 mg/mL Bovine serum albumin.

Bradford Solution 5X: 0.05% Coomassie Brilliant Blue G-250, 42.5% H₃PO₄, 25% Μεθανόλη.

30% Acrylamide: 29:1 (acrylamide:bis-acrylamide).

10% APS: 1g ammonium persulfate σε 10ml H₂O.

PMSF (100X): 17,43mg Phenylmethylsulfonyl fluoride σε 1mL ισοπροπανόλης

CBB Staining Solution: 40% Μεθανόλη, 10% CH₃COOH, 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250.

CBB Destaining Solution: 30% Μεθανόλη, 10% CH₃COOH.

Fixing solution: 50% Μεθανόλη, 0.038% φορμαλδεΰδη.

Staining solution: 0.0756% NaOH, 207.2 mM NH₄OH, 47mM AgNO₃.

Developing solution: 0.005% κιτρικό οξύ, 0.02% φορμαλδεΐδη.

Stop solution: 45% Μεθανόλη, 2% CH₃COOH.

Διάλυμα Σταθεροποίησης: 30% Μεθανόλη.

Transfer Buffer (10X): 480mM Tris-Base, 390mM Glycine, 0.375% SDS. Στο 1X προστίθεται μεθανόλη σε τελική συγκέντρωση 20%.

TBST (1X): 10mM Tris-HCL pH 8, 150mM NaCl, 0.1% Tween-20.

Blocking Solution (1X): 10mM Tris-HCL pH 8, 150mM NaCl, 0.1% Tween-20, 5% Dry Milk.

Developer: 220ml/lit Kodak GBX developer.

Fixer: 220ml/lit Kodak GBX fixer and replenisher.

2.7.5 Εκκινήτες

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι εκκινήτες:

Εκκινήτες	Ακολουθία (5' - 3')
ForKozak	CTCCCACCATGTTAGATATCCAAAGCAACGCCTGAC
RevFLAG	TATCAATCCTTGTAGTCCTTGTATCGTCATCCTTGTAGTCGGTGCTGCCTCTAAGCC
RevMluIStop	CCTCTAACGCGTGGTGCTGCCTCTAAGCCTTTTACGA
ForKozakMluI	CTCCCACCATGTTAACGCGTGATATCCAAAGCAACGCCTGAC
RevStop	CCTCTAGGTGCTGCCTCTAAGCCTTTTACGA
Δ NLS-FLAG	TATCAATCCTTGTAGTCCTTGTATCGTCATCCTTGTAGTCGGTTTCAGATTTTTCAGGTTTCATTCTTCAATGG
RevSPLT (XhoI)	CAACTCGAGGGTGCTGCCTCTAAGCCTTTTACGAC
Δ NLS-SPLIT	GACTCGAGGGTTTCAGATTTTTCAGGTTTCATTCTTCAATGG
EXPF1	CCACCAGAGCTCAGCGGATCCACCAACTGAC
EXPR	AGCGGAAGCTTGGTGCTGCCTCTAAGCCTTTTACGA
Κατασκευή	Συνδυασμός εκκινήτων
OeGLU (<i>E. coli</i>)	EXPF1 με EXPR
OeGLU (<i>N. benthamiana</i>)	ForKozak με RevFLAG
OeGLU-YFP	ForKozak με RevMluIStop
YFP-OeGLU	ForKozakMluI με RevStop
YFP-OeGLU- Δ NLS	ForKozakMluI με Δ NLS-FLAG
OeGLU- Δ NLS	ForKozak με Δ NLS-FLAG
OeGLU-YFP ^N OeGLU-YFP ^C	ForKozak με RevSPLT (XhoI)
Δ NLS-YFP ^N Δ NLS-YFP ^C	ForKozak με Δ NLS-SPLIT

Οι υπογραμμισμένες ακολουθίες είναι: ακολουθία Kozak (ForKozak, ForKozakMluI), επίτοπος FLAG (RevFLAG, ΔNLS-FLAG), θέση αναγνώρισης *MluI* (ForKozakMluI, RevMluIStop), θέση αναγνώρισης *SacI* (EXPR1), θέση αναγνώρισης *HindIII* (EXPR), θέση αναγνώρισης *XhoI* (RevSPLT, ΔNLS-SPLIT).

3 Αποτελέσματα

3.1 Το *OeGLU* κωδικοποιεί για μια αμυντική GH1 β-γλυκοσιδάση

Από το εργαστήριο μας είχε απομονωθεί ένα cDNA (*OeGLU*) (Gazis and Hatzopoulos, 2002) συνολικού μήκους 1902 bp με ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο 1656 bp που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 551 αμινοξέων μεγέθους 62.9 kDa. Η αλληλουχία αυτή έχει κατατεθεί στην GenBank με κωδικούς AY083162 (νουκλεοτιδική ακολουθία) και AAL93619 (αμινοξική ακολουθία). Ο αντίστοιχος κωδικός της αμινοξικής ακολουθίας για την βάση της UniProt είναι Q8GVD0. Η πρωτεϊνική ακολουθία, περιέχει στο αμινοτελικό άκρο ένα μοτίβο χαρακτηριστικό των β-γλυκοσιδασών της οικογένειας GH1 (Prosite PS00653: F-x-[FYWM]-[GSTA]-x-[GSTA]-x-[GSTA](2)-[FYNH]-[NQ]-x-E-x-[GSTA]) μεταξύ των αμινοξέων 42 και 56 (FvFGaAtASYQvEgA).

Με την βοήθεια του αλγορίθμου BlastX, προσδιορίστηκαν οι 10 πρωτεϊνικές ακολουθίες με μεγαλύτερη ομοιότητα στην βάση δεδομένων nr (non-redundant protein sequences) οι οποίες παρουσιάζονται στον πίνακα 3.1.

Description	Organism	E-Value	Accession number
OeGLU	<i>Olea europaea</i>	0	Q8GVD0.1
hypothetical protein	<i>Erythranthe guttata</i>	0	EYU27265.1
putative strictosidine beta-D-glucosidase	<i>Camptotheca acuminata</i>	0	AES93119.1
raucaffricine beta-glucosidase	<i>Rauvolfia serpentina</i>	1e-179	Q9SPP9.1
hypothetical protein	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1e-175	ESW22399.1
predicted protein	<i>Hordeum vulgare</i>	2e-174	BAK01899.1
hypothetical protein	<i>Oryza sativa</i>	6e-174	EEC80501.1
glycoside hydrolase family 1 protein	<i>Medicago truncatula</i>	6e-173	AES67733.1
beta-D-glucoside glucohydrolase	<i>Lotus japonicus</i>	1e-172	AGS43007.1
strictosidine beta-glucosidase	<i>Rauvolfia verticillata</i>	1e-172	AFI71457.1

Πίνακας 3.1: Αποτέλεσμα blastx της ακολουθίας *OeGLU* στην βάση nr.

Προκειμένου να γίνει μια πρώτη εκτίμηση του πιθανού λειτουργικού ρόλου της εκφραζόμενης πρωτεΐνης OeGLU, δημιουργήθηκε ένα φυλογενετικό δέντρο με χαρακτηρισμένες φυτικές β-γλυκοσιδάσες της οικογένειας GH1. Οι ακολουθίες ανακτήθηκαν από την βάση δεδομένων CAZy (www.cazy.org) και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.

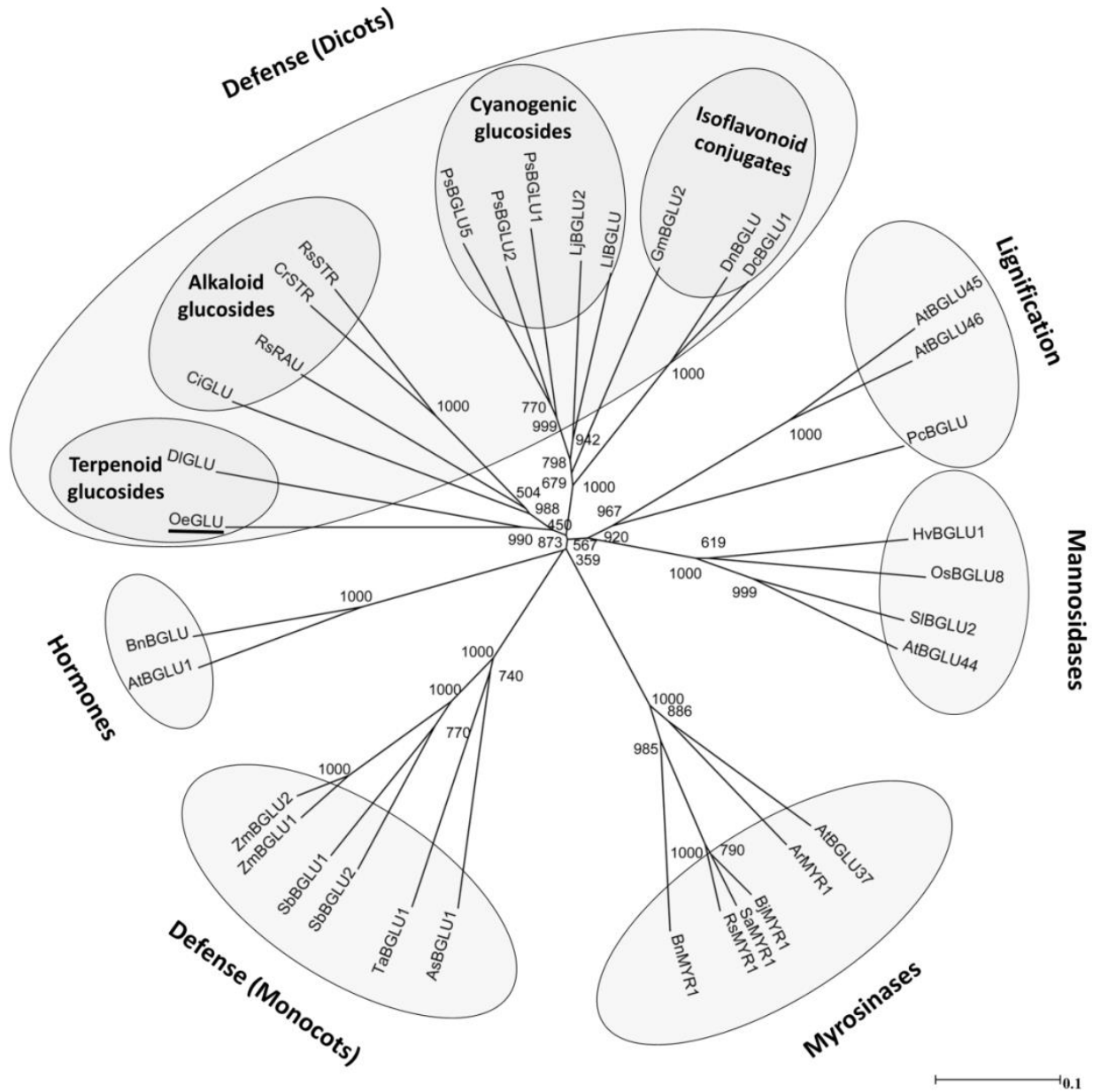
Protein Name	Accession number	Species	Function
ArMYR1	AY822710.1 Q5PXX2	<i>Armoracia rusticana</i>	Myrosinase
AsBGLU1	CAA55196.1 Q38786	<i>Avena sativa</i>	β-glucosidase I
AtBGLU1	AAF22295.1 Q9SE50	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ER β-glucosidase / ABA-β-glucosidase
AtBGLU37	AAK28645.1 Q9C5C2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Myrosinase
AtBGLU44	AAM61427.1 Q9LV33	<i>Arabidopsis thaliana</i>	β-mannosidase / β-glucosidase
AtBGLU45	AAC28501.1 Q80689	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Monolignol β-glucosidase
AtBGLU46	AAC28502.1 Q80690	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Monolignol β-glucosidase
BjMYR1	CAA11412.1 Q9ZP01	<i>Brassica juncea</i>	Myrosinase
BnBGLU	CAA57913.1 Q42618	<i>Brassica napus</i>	zeatin β-glucosidase
BnMYR1	CAA79989.2 Q9STD7	<i>Brassica napus</i>	Myrosinase
CiGLU	BAH02544.1 B6ZKM3	<i>Carapichea ipecacuanha</i>	Ipecoside β-glucosidase
CrSTR	AAF28800.1 Q9M7N7	<i>Catharanthus roseus</i>	Strictosidine β-glucosidase
DcBGLU1	AAF04007.1 Q9SPK3	<i>Dalbergia cochinchinensis</i>	Dalcochinin β-glucosidase
DiGLU	CAB38854.2 Q9ZPB6	<i>Digitalis lanata</i>	Cardenolide 16'-O- glucohydrolase
DnBGLU	AAV34606.1 Q5UB04	<i>Dalbergia nigrescens</i>	Isoflavonoid 7-O-β-apiosyl-β- glucose β-glycosidase
GmBGLU2	BAF34333.1 Q08IT7	<i>Glycine max</i>	Isoflavone conjugate-specific β- glucosidase
HvBGLU1	AAA87339.1 Q40025	<i>Hordeum vulgare</i>	β-mannosidase / β-glucosidase
LjBGLU2	ACD65510.1 B2ZUU1	<i>Lotus japonicus</i>	Hydroxynitrile β-glucosidase
LIBGLU	ABY48758.1 A9Z0X2	<i>Leucaena leucocephala</i>	Hydroxynitrile glucoside- cleaving β-glucosidase
OeGLU	AAL93619.1 Q8GVDO	<i>Olea europaea</i>	β-glucosidase

OsBGLU8	AAS07251.1 Q75I94	<i>Oryza sativa</i>	β -glucosidase
PcBGLU	AAC69619.1 Q9ZT64	<i>Pinus contorta</i>	Monolignol β -glucosidase
PsBGLU1	AAA93234.2 Q40984	<i>Prunus serotina</i>	Amygdalin β -glucosidase I
PsBGLU2	AAL07435.1 Q945I3	<i>Prunus serotina</i>	Prunasin hydrolase isoform PH A
PsBGLU5	AAL35324.1 Q8W594	<i>Prunus serotina</i>	Prunasin hydrolase isoform PH C
RsSTR	CAC83098.1 Q8GU20	<i>Rauvolfia serpentina</i>	Strictosidine β -glucosidase
RsRAU	AAF03675.1 Q9SPP9	<i>Rauvolfia serpentina</i>	Raucaffricine β -glucosidase
RsMYR1	BAB17226.1 Q9FXR1	<i>Raphanus sativus</i>	Myrosinase
SaMYR1	CAA42534.1 P29092	<i>Sinapis alba</i>	Myrosinase
SbBGLU1	AAC49177.1 Q41290	<i>Sorghum bicolor</i>	Cyanogenic β -glucosidase (dhurrinase 1)
SbBGLU2	AAK49119.1 Q93XR2	<i>Sorghum bicolor</i>	Cyanogenic β -glucosidase (dhurrinase-2)
SIBGLU2	AAL37719.1 Q8VWL8	<i>Solanum lycopersicum</i>	β -mannosidase
TaBGLU1	BAE92259.1 Q1XH05	<i>Triticum aestivum</i>	β -glucosidase
ZmBGLU1	CAA52293.1 P49235	<i>Zea mays</i>	β -glucosidase 1
ZmBGLU2	AAD09850.1 Q41761	<i>Zea mays</i>	β -glucosidase 2

Πίνακας 3.2: Αμινοξικές ακολουθίες χαρακτηρισμένων β -γλυκοσιδασών της οικογένειας GH1 που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία φυλογενετικού δέντρου.

Στο φυλογενετικό δέντρο που προέκυψε, τα ένζυμα κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με την λειτουργία τους σε πέντε κατηγορίες (Εικόνα 3.1). Τις αμυντικές β -γλυκοσιδάσες (όπου τα μονοκότυλα ομαδοποιούνται ανεξάρτητα από τα δικότυλα), τις β -γλυκοσιδάσες που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση ορμονών, τις β -γλυκοσιδάσες που σχετίζονται με την λιγνινοποίηση, τις μυροσινάσες (θειο- β -γλυκοσιδάσες) και τις β -μαννοσιδάσες. Εντός του κλάδου των ενζύμων που εμπλέκονται στην άμυνα των δικότυλων, παρατηρήθηκε περαιτέρω ομαδοποίηση αναλόγως της κατηγορίας των αμυντικών γλυκοσιδίων που εξειδικευμένα τα ένζυμα απογλυκοζυλιώνουν. Οι β -γλυκοσιδάσες ομαδοποιούνται σε αυτές που υδρολύουν ισοφλαβονοειδή, κυανογόνα γλυκοσίδια, αλκαλοειδή και τερπενοειδή. Το OeGLU ομαδοποιήθηκε στις αμυντικές β -γλυκοσιδάσες και συγκεκριμένα μαζί την β -

γλυκοσιδάση του καρδενολιδίου (DIGLU) από το φυτό *Digitalis lanata* (Plantaginaceae).



Εικόνα 3.1: Φυλογενετικό δέντρο χαρακτηρισμένων φυτικών β-γλυκοσιδασών της οικογένειας GH1. Οι τιμές σε κάθε διακλάδωση αντιστοιχούν στις επαναλήψεις μετά από 1000 μεταθέσεις. Η μπάρα ισούται με 0.1 αμινοξικές υποκαταστάσεις ανά θέση.

Τα αποτελέσματα της πολλαπλής ευθυγράμμισης των ακολουθιών του φυλογενετικού δέντρου παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 3.3. Παρότι το OeGLU είχε μεγαλύτερη ομοιότητα με την β-γλυκοσιδάση της ραουκαφρισίνης του

φυτού *Rauwolfia serpentina* (RsRAU), τοποθετήθηκε μαζί με το DIGLU λόγω μεγαλύτερου ποσοστού αμινοξέων ευθυγραμμισμένων με κενά.

	OeGLU	DIGLU	RsRAU	DnBGLU	PsBGLU1	AtBGLU46	OsBGLU8	SaMYR1	SbBGLU1	AtBGLU1
OeGLU	551	41%	45%	42%	40%	36%	35%	33%	36%	37%
	0	58%	64%	57%	58%	51%	49%	50%	51%	52%
	0	18%	7%	8%	9%	11%	16%	11%	14%	8%
DIGLU	274	642	39%	34%	36%	29%	32%	30%	28%	28%
	386	0	53%	48%	58%	43%	44%	44%	42%	42%
	125	0	18%	24%	20%	25%	23%	23%	28%	25%
RsRAU	259	259	540	43%	47%	38%	38%	36%	34%	37%
	369	348	0	62%	64%	53%	54%	53%	50%	54%
	45	120	0	11%	9%	11%	15%	11%	15%	10%
DnBGLU	243	231	248	531	53%	39%	40%	39%	39%	41%
	327	322	352	0	67%	54%	54%	56%	54%	55%
	50	161	63	0	5%	9%	13%	7%	9%	5%
PsBGLU1	236	241	273	298	553	36%	41%	40%	37%	39%
	336	344	368	377	0	55%	56%	57%	52%	55%
	54	139	55	30	0	11%	10%	7%	11%	8%
AtBGLU46	206	198	213	216	207	516	38%	32%	32%	31%
	293	290	301	301	313	0	55%	49%	47%	47%
	65	166	64	51	63	0	12%	12%	13%	9%
OsBGLU8	218	220	229	241	244	221	568	32%	31%	33%
	305	309	327	319	332	320	0	47%	45%	47%
	103	164	96	81	59	72	0	12%	16%	16%
SaMYR1	197	207	210	222	231	185	192	544	32%	35%
	296	301	305	317	328	279	281	0	48%	51%
	69	156	66	39	41	68	76	0	11%	9%
SbBGLU1	216	202	209	225	220	190	196	194	565	35%
	309	301	300	314	313	277	282	284	0	48%
	84	197	95	54	68	77	105	67	0	10%
AtBGLU1	209	188	213	228	224	173	201	198	202	528
	295	287	306	305	315	261	283	292	279	0
	47	168	62	31	49	54	98	54	61	0

Πίνακας 3.3: Αποτελέσματα της πολλαπλής ευθυγράμμισης του OeGLU με επιλεγμένες ακολουθίες από το φυλογενετικό δέντρο. Επιλέχθηκαν τέσσερα ένζυμα από τον κλάδο των αμυντικών β-γλυκοσιδασών (ένα από κάθε υποκατηγορία) και ένα ένζυμο από κάθε άλλο κλάδο. Ο πρώτος αριθμός δηλώνει ίδια αμινοξέα μεταξύ των δυο ακολουθιών, ο δεύτερος δηλώνει παρόμοια αμινοξέα ή συντηρημένες υποκαταστάσεις και ο τρίτος τα αμινοξικά κατάλοιπα που είναι ευθυγραμμισμένα με κενό χαρακτήρα. Κάθε αριθμός παρατίθεται ως απόλυτη τιμή ή ποσοστό εκατέρωθεν της διαγωνίου. Οι τιμές της διαγωνίου είναι το μέγεθος της πρωτεΐνης.

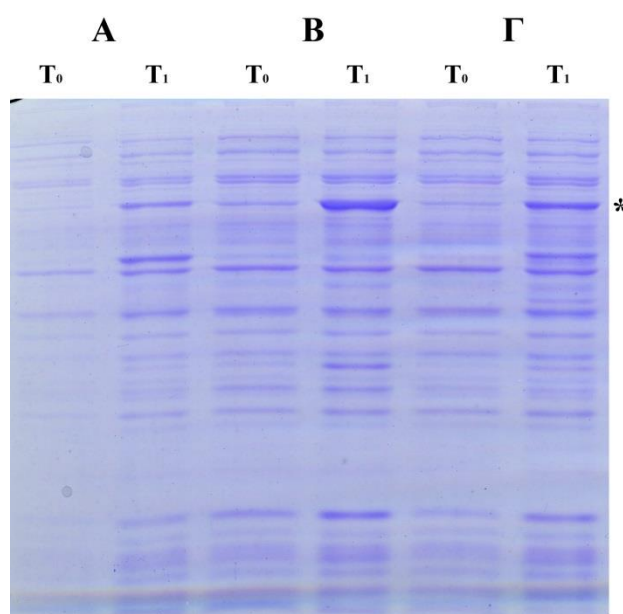
Σύμφωνα με το φυλογενετικό δέντρο, πιθανώς οι β-γλυκοσιδάσες που υδρολύουν αλκαλοειδή και οι β-γλυκοσιδάσες που υδρολύουν τερπενοειδή να έχουν εξελιχθεί από κάποιο κοινό αρχέγονο γονίδιο αφού είναι διαχωρισμένες από τις β-γλυκοσιδάσες που υδρολύουν κυανογόνα και ισοφλαβονοειδή γλυκοσίδια.

3.2 Ετερόλογη έκφραση του OeGLU σε *E. coli*

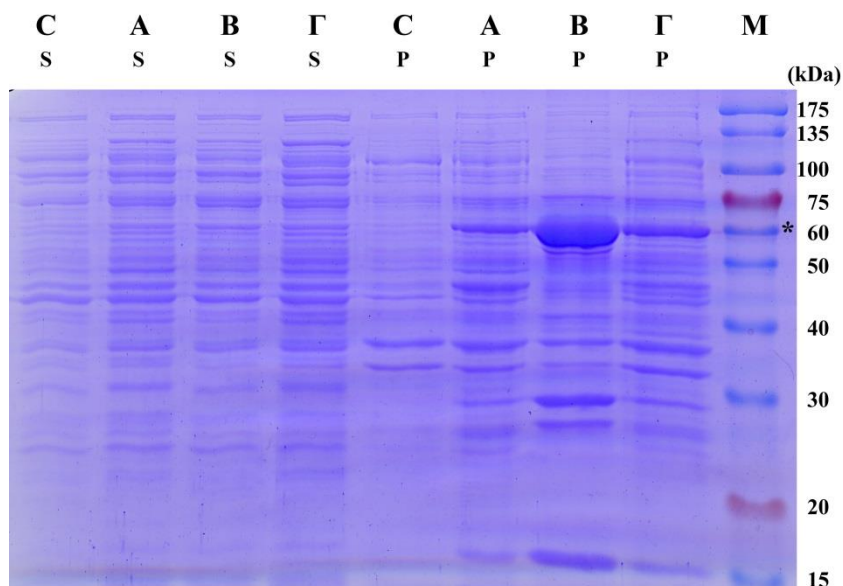
Προκειμένου να παραχθεί ετερόλογα το ένζυμο, το cDNA του OeGLU ενισχύθηκε από RNA απομονωμένο από νεαρά φύλλα ελιάς με τους εκκινητές EXPF1 και EXPR οι οποίοι ενσωματώνουν θέσεις αναγνώρισης για τα ένζυμα περιορισμού *SacI* και *HindIII* αντίστοιχα. Το προϊόν κλωνοποιήθηκε σε πλασμίδιο pUC19 που είχε υποστεί πέψη με το ένζυμο *SmaI*. Επιλέχθηκε θετικός κλώνος, η κατασκευή επιβεβαιώθηκε με αλληλούχιση και στην συνέχεια η ένθεση κλωνοποιήθηκε στις θέσεις *SacI* και *HindIII* του πλασμιδίου pET28a. Με το τελικό πλασμίδιο μετασηματίστηκαν δεκτικά κύτταρα BL21 (DE3) και επιλέχθηκαν τρεις αποικίες για περαιτέρω ανάλυση.

Αρχικά έγινε ηλεκτροφόρηση των ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από τις τρεις καλλιέργειες σε δυο διαφορετικούς χρόνους ($T_0=0\text{hrs}$ και $T_1=2\text{hrs}$) ώστε να εκτιμηθεί η πιθανή διαφορά στην έκφραση μεταξύ τους. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 3.2.

Εικόνα 3.2: Ολικό πρωτεϊνικό προφίλ τριών αποικιών (A, B & Γ) σε δυο διαφορετικούς χρόνους ($T_0=0\text{hrs}$ & $T_1=2\text{hrs}$) μετά την επαγωγή της έκφρασης. Η πιθανή πρωτεΐνη (OeGLU) έχει σημειωθεί με αστερίσκο δεξιά της εικόνας. Συνθήκες επαγωγής της έκφρασης: 2hrs στους 28 °C παρουσία IPTG 1mM.

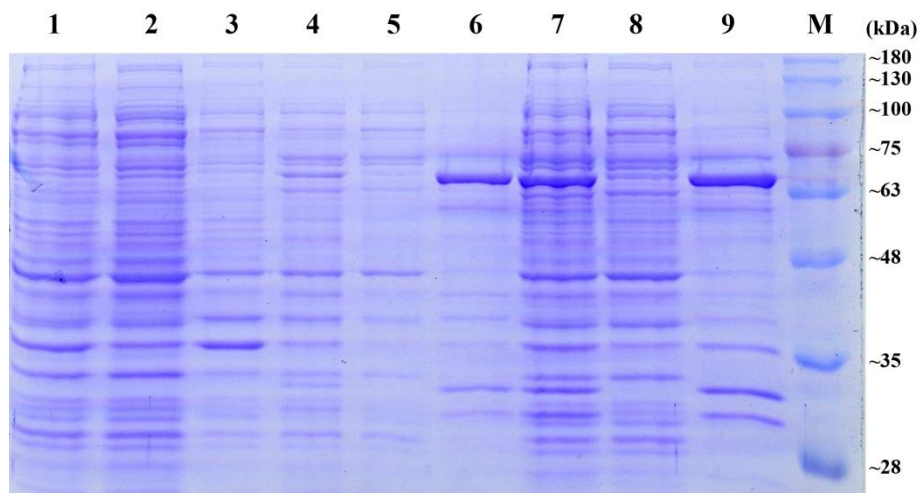


Στη συνέχεια έγινε λύση των κυττάρων με υπέρηχους ώστε να ελεγχθεί κατά πόσο η παραγόμενη πρωτεΐνη εντοπίζεται στο υδατοδιαλυτό (supernatant) ή στο αδιάλυτο πρωτεϊνικό κλάσμα (pellet). Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για καλλιέργεια μετασηματισμένη με πλασμίδιο pET28a που δεν φέρει ένθεση (Control). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης φαίνονται στις Εικόνα 3.3.



Εικόνα 3.3: Υδατοδιαλυτό (S) και αδιάλυτο (P) πρωτεϊνικό κλάσμα από τρεις καλλιέργειες που εκφράζουν την πρωτεΐνη OeGLU (A, B & Γ) καθώς και καλλιέργεια μετασχηματισμένη με άδειο πλασμίδιο (C) μετά από επαγωγή της έκφρασης για 4hrs στους 28 °C. Στα δεξιά παρατίθενται τα μεγέθη που αντιστοιχίζονται στις ζώνες του Marker (M). Η OeGLU (~63kDa) έχει σημειωθεί στα δεξιά με αστερίσκο.

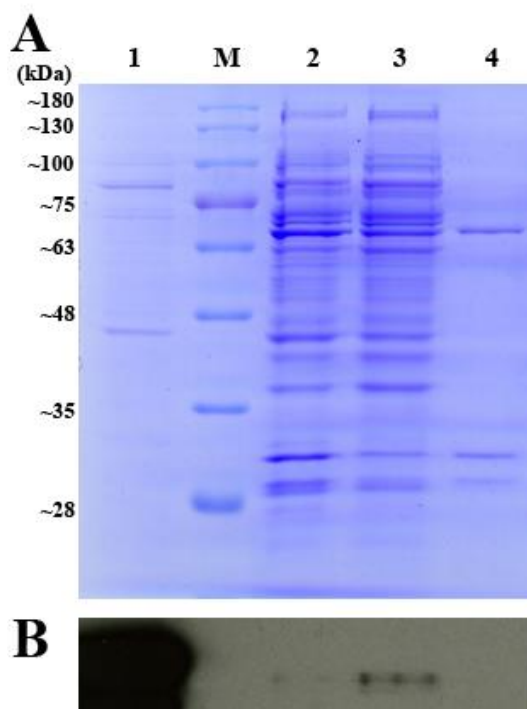
Από την ανάλυση αυτή έγινε αντιληπτό ότι η εκφραζόμενη πρωτεΐνη εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στο αδιάλυτο πρωτεϊνικό κλάσμα. Προκειμένου να αυξηθεί η ποσότητα ενζύμου που εντοπίζεται στο υδατοδιαλυτό κλάσμα σε σχέση με το αδιάλυτο έγιναν δοκιμές με παραλλαγές του τρόπου επαγωγής της έκφρασης. Συγκεκριμένα μειώθηκε η ποσότητα του IPTG, μειώθηκε η θερμοκρασία ανάπτυξης της καλλιέργειας κατά την επαγωγή και προστέθηκαν ωσμολύτες στο θρεπτικό μέσο. Κάθε παραλλαγή έγινε τόσο ξεχωριστά όσο και σε συνδυασμό.. Κανένας χειρισμός όμως δεν έδωσε ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Ενδεικτικά παρατίθεται η Εικόνα 3.4.



Εικόνα 3.4: Ολικές πρωτεΐνες (πηγάδια 1, 4 και 7), υδατοδιαλυτό κλάσμα (πηγάδια 2, 5 και 8) και αδιάλυτο κλάσμα (πηγάδια 3, 6 και 9) από καλλιέργειες που δεν περιέχουν ένθεση (πηγάδια 1-3) ή εκφράζουν το ένζυμο OeGLU (~63kDa) (πηγάδια 4-9) παρουσία (πηγάδια 1-3 και 7-8) ή απουσία (πηγάδια 4-6) σορβιτόλης (660mM) στο θρεπτικό μέσο. Η επαγωγή της έκφρασης έγινε με 0.1mM IPTG για 2hrs στους 28 °C.

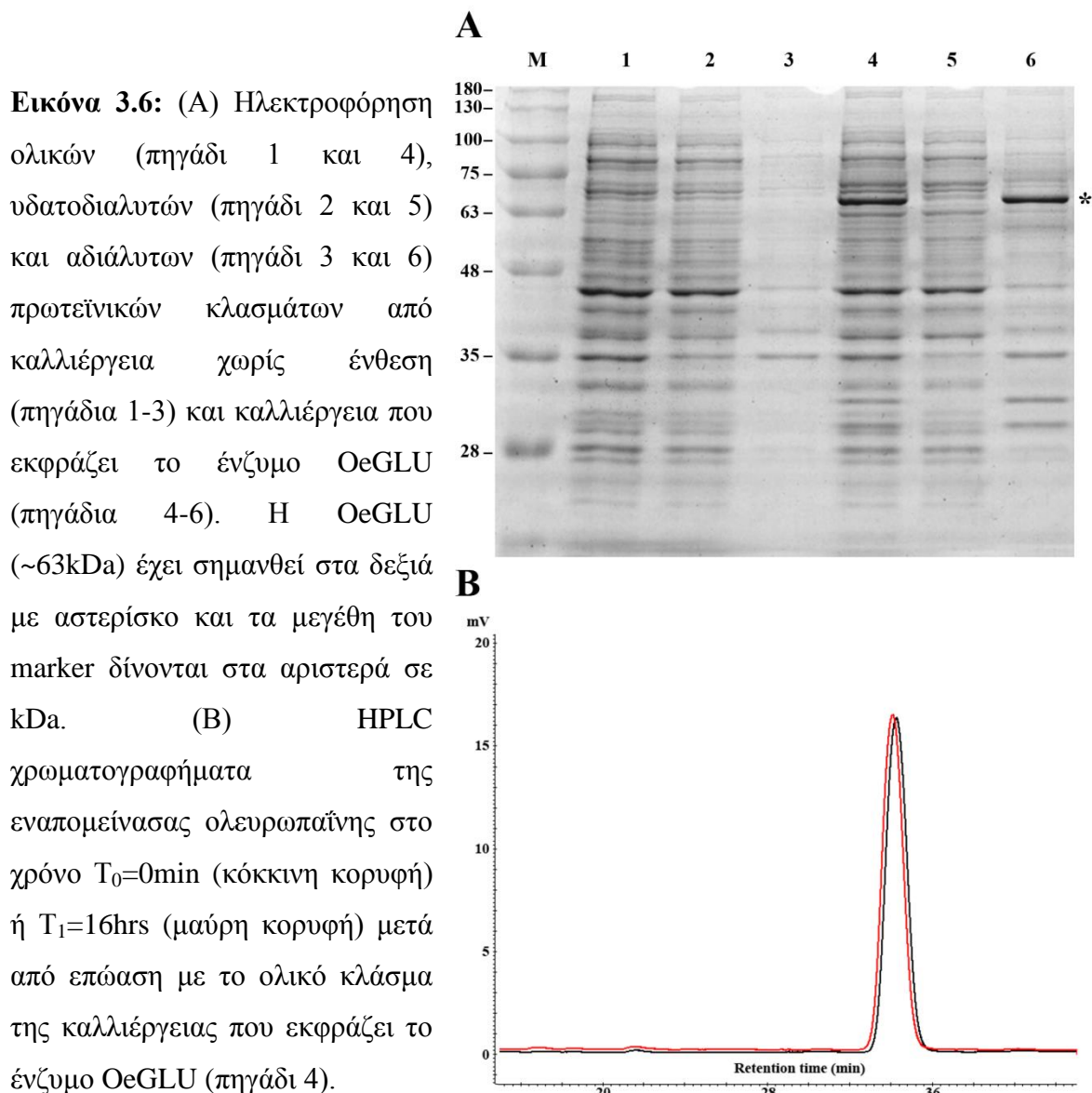
Προκειμένου να διερευνηθεί πιθανή ύπαρξη έστω μικρής ποσότητας του εκφραζόμενου ενζύμου στο υδατοδιαλυτό πρωτεϊνικό κλάσμα, ακολούθησε ανοσοανίχνευση της εκφραζόμενης πρωτεΐνης με αντίσωμα anti-HIS μιας και το πλασμίδιο pET28a προσθέτει επίτοπο έξι ιστιδινών (6xHis). Αξίζει να σημειωθεί ότι η OeGLU ήταν οριακά εφικτό να εντοπιστεί στο ολικό κλάσμα καθώς και στο υδατοδιαλυτό κλάσμα μόνο μετά από υπερέκθεση του φιλμ ενώ η πρωτεΐνη παρότι είναι σε μεγάλη ποσότητα στο αδιάλυτο κλάσμα (όπως αποδεικνύεται από την χρώση της πηκτής με Coommasie) δεν ανοσοανιχνεύεται (Εικόνα 3.5). Αυτό το αποτέλεσμα δηλώνει ότι η εκφραζόμενη πρωτεΐνη ταχύτατα αδιαλυτοποιείται πιθανότητα με τον σχηματισμό έγκλειστων σωμάτων ή/και τροποποιείται.

Εικόνα 3.5: Χρώση με Coommasie (A) και ανοσοανίχνευση (B) με anti-His μετά από μεταφορά κατά Western. Ηλεκτροφόρηση υδατοδιαλυτού (πηγάδια 1 και 3), ολικού (πηγάδι 2) και αδιάλυτου (πηγάδι 4) πρωτεϊνικού κλάσματος από καλλιέργεια που εκφράζει το OeGLU (πηγάδια 2-4) και καλλιέργειας που εκφράζει πρωτεΐνη με επίτοπο 6xHis (πηγάδι 1). Η καλλιέργεια αυτή χρησιμοποιήθηκε ως θετικό control για την ανοσοανίχνευση με anti-His.



Παρά το γεγονός ότι ανιχνεύεται ελάχιστη ποσότητα στο ολικό και στο υδατοδιαλυτό πρωτεϊνικό κλάσμα, έγινε έλεγχος των επί μέρους κλασμάτων για πιθανή υδρόλυση της ολευρωπαΐνης με HPLC. Καμία δραστηριότητα

απόγλυκοζυλίωσης δεν ήταν εφικτό να μετρηθεί ούτε μετά από επώαση για 16hrs στους 37 °C (Εικόνα 3.6). Πιθανότατα λοιπόν η παραγόμενη πρωτεΐνη σε προκαρυωτικό σύστημα να μην είναι λειτουργική.



3.3 Ετερόλογη έκφραση του OeGLU *in planta*

Προκειμένου να παραχθεί λειτουργική πρωτεΐνη και δεδομένου ότι πιθανές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που απαιτούνται θα ήταν δυνατό να πραγματοποιηθούν σε ένα φυτικό κύτταρο, επιχειρήθηκε η παροδική έκφραση του ενζύμου σε φύλλα φυτών *N. benthamiana* με την μέθοδο της αagroέγχυσης. Εκτός

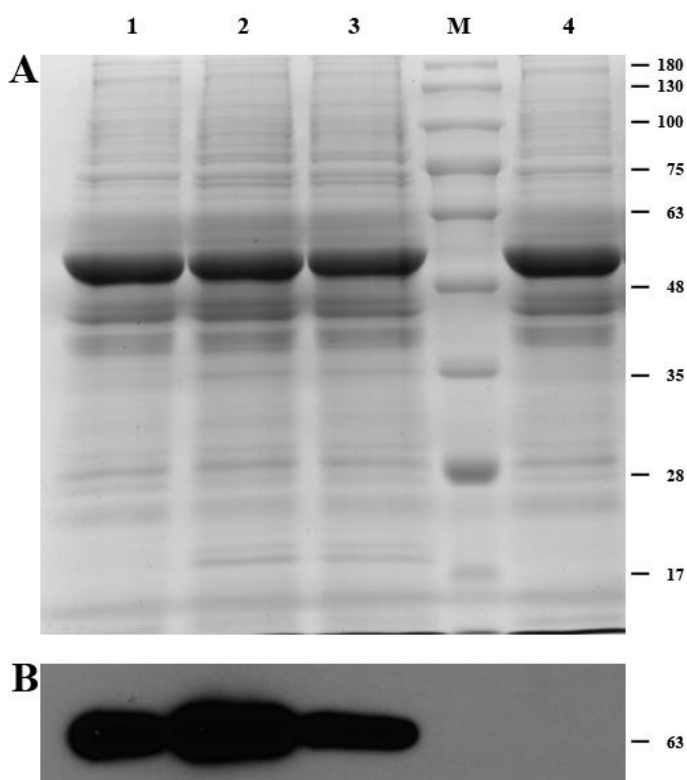
αυτού, λόγω του ότι ο καπνός δεν παράγει ολευρωπαΐνη, πιθανή υδρόλυση του μεταβολίτη από ενδογενείς β-γλυκοσιδάσες αναμένεται να είναι ελάχιστη.

Για τον σκοπό αυτό το cDNA του OeGLU ενισχύθηκε από RNA απομονωμένο από νεαρά φύλλα ελιάς με τους εκκινητές ForKozak και RevFLAG οι οποίοι προσθέτουν την ισχυρή ακολουθία Kozak (ccaccAUG) και τον επίτοπο FLAG αντίστοιχα. Το προϊόν κλωνοποιήθηκε σε πλασμίδιο pUC19 που είχε υποστεί πέψη με το ένζυμο *Sma*I. Επιλέχθηκε θετικός κλώνος, η κατασκευή επιβεβαιώθηκε με αλληλούχιση και στην συνέχεια η ένθεση κλωνοποιήθηκε στις θέσεις *Xba*I και *Sac*I του πλασμιδίου pGPTV-35S (Εικόνα 3.6). Ηλεκτροδεκτικά κύτταρα *A. tumefaciens* C58C1 μετασηματίστηκαν με την τελική κατασκευή (pGPTV/35S-OeGLU-FLAG) καθώς και με πλασμίδιο χωρίς ένθεση (Control).



Εικόνα 3.6: Σχηματική απεικόνιση της κατασκευής pGPTV/35S-OeGLU-FLAG. Το cDNA που κωδικοποιεί για το ένζυμο OeGLU είναι υπό τον έλεγχο του προαγωγέα 35S του CaMV, η έναρξη της μετάφρασης ενισχύθηκε με την προσθήκη της ισχυρής ακολουθίας Kozak (ccaccAUG), ο επίτοπος FLAG (DYKDDDDKDYKD) προστέθηκε στο C' άκρο της πρωτεΐνης και στο τέλος η ληκτική ακολουθία της συνθάσης της νοπαλίνης από το *A. tumefaciens* (pAnos).

Αρχικά ελέγχθηκε η παρουσία της εκφραζόμενης πρωτεΐνης με ανοσοανίχνευση στις 3, 6 και 9 ημέρες μετά την αγροέγχυση (days post infiltration, dpi) ώστε να ελεγχθεί το χρονικό παράθυρο εντός του οποίου το ένζυμο εκφράζεται (Εικόνα 3.7). Από την ανάλυση αυτή παρατηρήθηκε ότι η εκφραζόμενη πρωτεΐνη ανοσοανιχνεύεται και στις τρεις χρονικές στιγμές που αναλύθηκαν με μέγιστη έκφραση στις 6dpi.



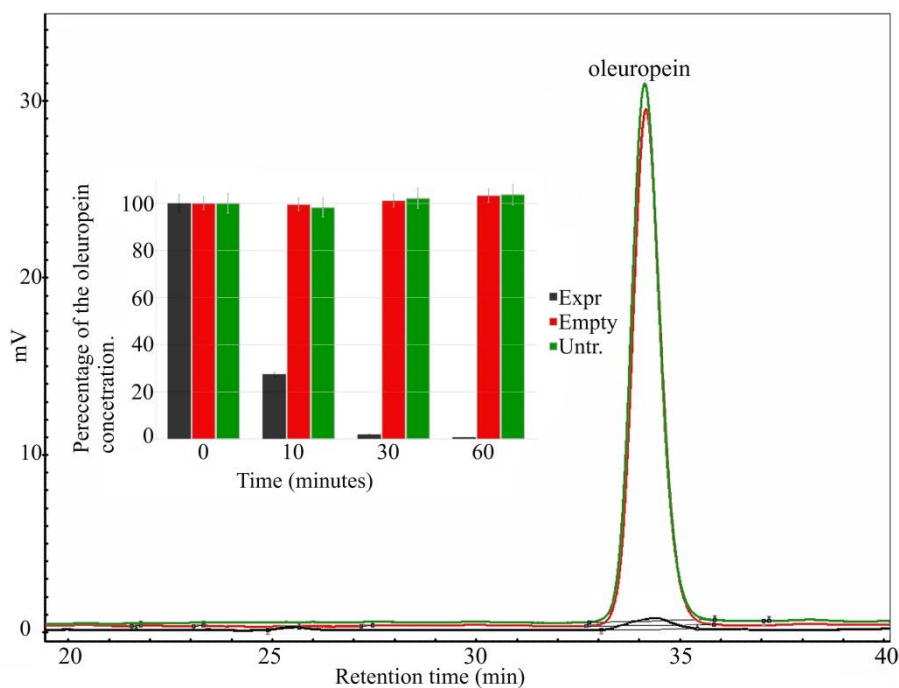
Εικόνα 3.7: SDS-PAGE και ανοσοανίχνευση της εκφραζόμενης πρωτεΐνης OeGLU μετά από μεταφορά κατά Western. (A) Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα (10 µg/πηγάδι) από φύλλα καπνού στις 3 (πηγάδι 1), στις 6 (πηγάδι 2) και στις 9 (πηγάδι 3) ημέρες μετά από αγροέγχυση με το πλασμίδιο pGPTV/35S-OeGLU-FLAG καθώς και από φύλλα που δεν έχουν υποστεί αγροέγχυση (πηγάδι 4). (B) Ανοσοανίχνευση με το αντίσωμα anti-FLAG. Σήμα παρατηρήθηκε μόνο στα φυτά που έχουν υποστεί αγροέγχυση και στο αναμενομενο μέγεθος (~63kDa). Τα μοριακά μεγέθη παρατίθενται δεξιά της εικόνας σε kDa.

3.4 Το ένζυμο OeGLU υδρολύει την ολευρωπαΐνη

Προκειμένου να ελεγχθεί η δυνατότητα απογλυκοζυλίωσης της ολευρωπαΐνης από το *in planta* εκφραζόμενο ένζυμο OeGLU, πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από φυτά που είχαν υποστεί αγροέγχυση είτε με την κατασκευή pGPTV/35S-OeGLU-FLAG είτε με την κατασκευή pGPTV/35S (άδειο πλασμίδιο) καθώς και από φύλλα χωρίς χειρισμό (Untreated) ποσοτικοποιήθηκαν και στη συνέχεια 20µg από κάθε δείγμα επωάστηκαν με ολευρωπαΐνη. Σε διάφορους χρόνους ελέγχθηκε η ποσότητα άθικτης (γλυκοζυλιωμένης) ολευρωπαΐνης μέσω HPLC (Εικόνα 3.8).

Εικόνα 3.8:

Χρωματογραφήματα που απεικονίζουν την ποσότητα ολευρωπαΐνης μετά από 60min αντίδραση με πρωτεϊνικό εκχύλισμα από φυτά χωρίς αγροέγχυση (πράσινο) ή που έχουν αγροεγχυθεί είτε με την κατασκευή pGPTV/35S (κόκκινο) είτε με την κατασκευή pGPTV/35S-OeGLU-

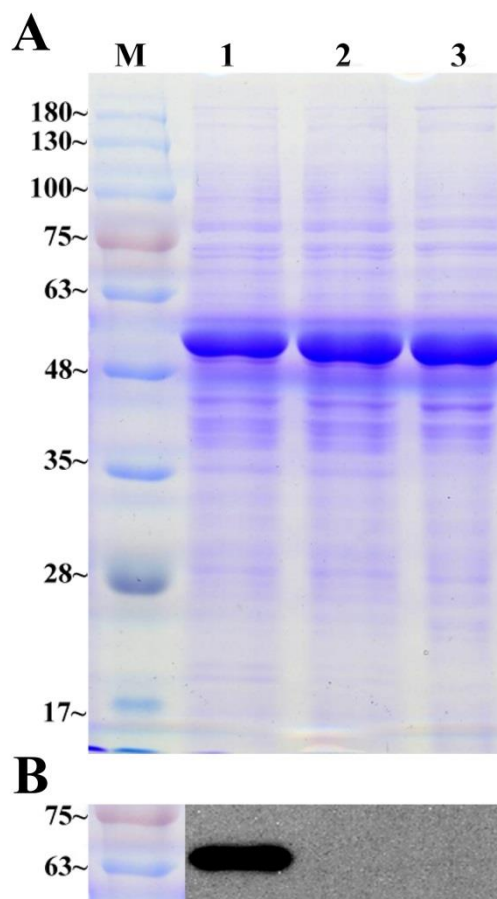


FLAG (μαύρο). Η ποσότητα της ολευρωπαΐνης εκφραζόμενη σαν % της ποσότητας από αντίδραση χωρίς πρωτεϊνικό εκχύλισμα (Blank) στους χρόνους 0, 10, 30 και 60min παρατίθεται στο εσωτερικό της εικόνας.

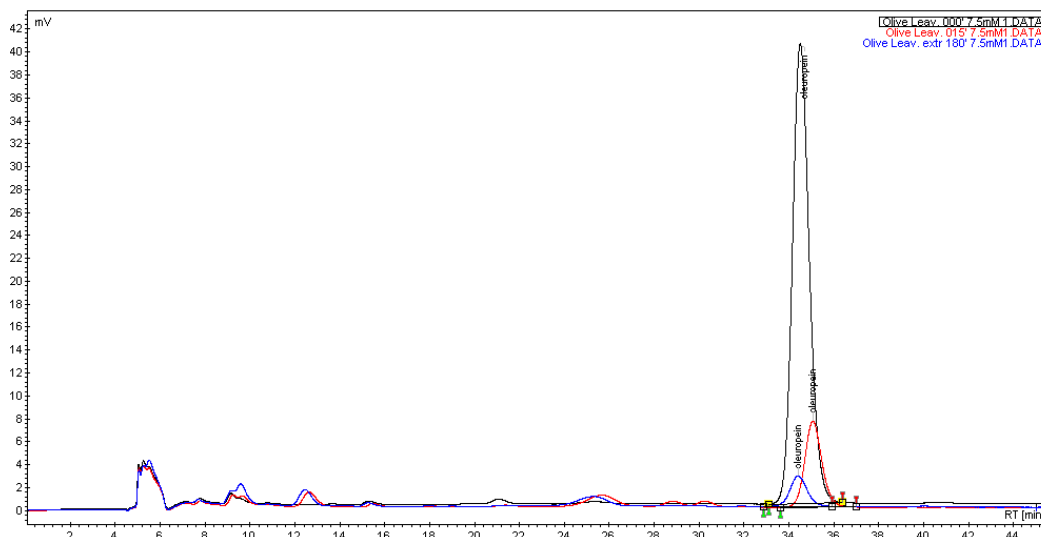
Τόσο το δείγμα από φυτά που δεν έχουν υποστεί αγροέγχυση όσο και το δείγμα από φυτά που έχουν μετασχηματιστεί με άδειο πλασμίδιο δεν παρουσίασαν ενζυμική ενεργότητα έναντι της ολευρωπαΐνης αφού μέχρι και 1 ώρα επώασης της αντίδρασης δεν έδειξε διαφορά στην ποσότητα ολευρωπαΐνης. Αντίθετα το δείγμα από φυτά που εκφράζουν το ένζυμο OeGLU, παρουσίασε ενζυμική δραστηριότητα έναντι της ολευρωπαΐνης και συγκεκριμένα μέσα σε 10 min η συγκέντρωση του μεταβολίτη μειώθηκε κατά 70% και μετά από 60 min ο ποσότητα του μεταβολίτη ήταν μη ανιχνεύσιμη. Αυτό το αποτέλεσμα δηλώνει ότι απογλυκοζυλίωση της ολευρωπαΐνης οφείλεται στην εκφραζόμενη πρωτεΐνη OeGLU αφού ο καπνός δεν έχει κάποια ενδογενή β-γλυκοσιδάση που να αναγνωρίζει την ολευρωπαΐνη ως υπόστρωμα. Επίσης η αγροέγχυση δεν προκάλεσε επαγωγή κάποια αμυντικής β-γλυκοσιδάσης ικανής για απογλυκοζυλίωση της ουσίας. Οι ισοποσότητες των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τις ενζυμικές αντιδράσεις καθώς και η ανοσοανίχνευση του OeGLU παρατίθενται στην Εικόνα 3.9.

Εικόνα 3.9: (A) SDS-PAGE πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (10μg/πηγάδι) από φυτά που έχουν αγροεγχυθεί είτε με την κατασκευή pGPTV/35S-OeGLU-FLAG (πηγάδι 1) είτε με την κατασκευή pGPTV/35S (πηγάδι 2) καθώς και φυτών που δεν έχουν υποστεί αγροέγχυση (πηγάδι 3). (B) Ανοσοανίχνευση του εκφραζόμενου ενζύμου OeGLU με anti-FLAG. Τα μοριακά μεγέθη παρατίθενται αριστερά της εικόνας σε kDa.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η άγλυκη μορφή της



ολευρωπαΐνης δεν έδωσε κάποια άλλη κορυφή στο χρωματογράφημα HPLC. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε επωάζοντας την ολευρωπαΐνη με πρωτεϊνικό εκχύλισμα από νεαρά φύλλα ελιάς (Εικόνα 3.10). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η απογλυκοζυλίωση της ουσίας οδηγεί στην παραγωγή ασταθούς μορίου με δομή α,β ακόρεστης αλδεΐδης και με δράση παρόμοια με αυτή της γλουταραλδεΐδης. Η απουσία κορυφής της άγλυκης μορφής στο HPLC έχει αναφερθεί ξανά (Konno et al., 1999).



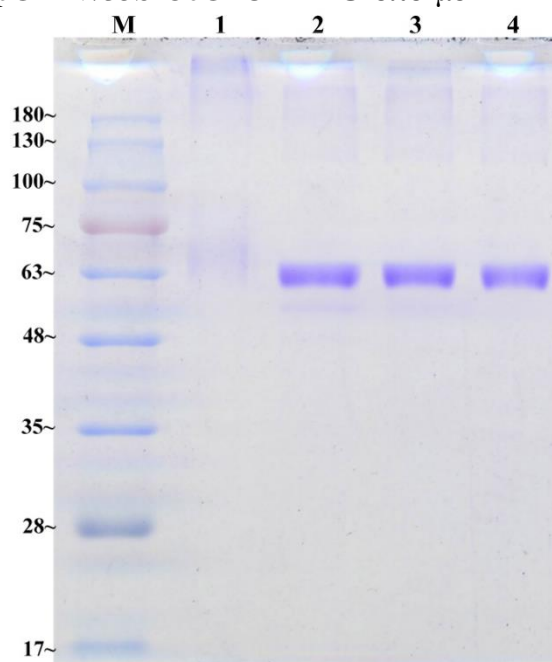
Εικόνα 3.10: Χρωματογραφήματα ολευρωπαΐνης (7.5mM) μετά από επώαση με πρωτεϊνικό εκχύλισμα από νεαρά φύλλα ελιάς (5μg) στους χρόνους 0min (μαύρη κορυφή), 15min (κόκκινη κορυφή) και 180min (μπλε κορυφή). Η ανιχνεύσιμη ολευρωπαΐνη μειώθηκε κατά 80.8% και κατά 93.1% εντός 15min και 180min αντίδρασης αντίστοιχα.

Προκειμένου λοιπόν να αποδειχθεί έμμεσα η παραγωγή της άγλυκης μορφής έγιναν δυο ανεξάρτητες προσεγγίσεις. Στην πρώτη μετρήθηκε η παραγωγή γλυκόζης στις προαναφερθείσες αντιδράσεις (Πίνακας 3.4) και στην δεύτερη ηλεκτροφορήθηκαν τα υπερκείμενα των συγκεκριμένων αντιδράσεων (Εικόνα 3.11) ώστε να ελεγχθεί ο πιθανός πολυμερισμός της πρωτεΐνης BSA που υπήρχε στην αντίδραση μιας και η παραγωγή του άγλυκου μεταβολίτη έχει σαν αποτέλεσμα την μαζική συμπλοκοποίηση των πρωτεϊνών. Η δεύτερη προσέγγιση είναι γνωστή σαν Δοκιμασία Μετατόπισης Ηλεκτροφορητικής Κινητικότητας (Electrophoretic Mobility Shift Assay – EMSA) και έχει ήδη εφαρμοστεί σε μεταβολίτες όπως η στρικτοσιδίνη (αλκαλοειδές του ινδολίου) και η αυκουμπίνη (ιριδοειδές) με παρόμοια δράση με την ολευρωπαΐνη (Guirimand et al., 2010; Pankoke et al., 2013).

Αντίδραση	Απογλυκοζυλίωση (%) *
Ολευρωπαΐνη και εκχύλισμα χωρίς OeGLU	7.8 ± 6.3
Ολευρωπαΐνη και εκχύλισμα με OeGLU	95.3 ± 5.4

Πίνακας 3.4: Ποσοστό απογλυκοζυλίωσης μετά από μέτρηση της παραγόμενης γλυκόζης σε ενζυμικές αντιδράσεις με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από φύλλα καπνού που έχουν αgroεγχυθεί είτε με την κατασκευή pGPTV/35S-OeGLU-FLAG είτε με την κατασκευή pGPTV/35S. * Mean±SD (n=3).

Εικόνα 3.11: EMSA ανάλυση των υπερκειμένων από ενζυμική αντίδραση με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από φυτά που έχουν αgroεγχυθεί με τις κατασκευές pGPTV/35S-OeGLU-FLAG (πηγάδι 1), pGPTV/35S (πηγάδι 2), από φυτά που δεν έχουν αgroεγχυθεί (πηγάδι 3) και από αντίδραση χωρίς πρωτεϊνικό εκχύλισμα (πηγάδι 4). Τα μοριακά μεγέθη παρατίθενται αριστερά της εικόνας σε kDa.



Τα δυο αυτά αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το ένζυμο OeGLU αφαιρεί το μόριο γλυκόζης από την ολευρωπαΐνη αφού η μετρήσιμη γλυκόζη στις αντιδράσεις με πρωτεϊνικό εκχύλισμα που δεν εκφράζει το OeGLU είναι αμελητέα (Πίνακας 3.4) καθώς και το παραγόμενο άγλυκο μόριο είναι βιοδραστικά ενεργό αφού η πρωτεΐνη BSA (~66kDa) εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά σαν μεγαλομοριακό σύμπλοκο που οριακά μπόρεσε να εισέλθει στο Resolving Gel μόνο στην ενζυμική αντίδραση με πρωτεϊνικό εκχύλισμα φυτών που εκφράζουν το OeGLU (Εικόνα 3.11).

Προκειμένου να ελεγχθεί η εκλεκτικότητα του ενζύμου OeGLU ως προς την ολευρωπαΐνη, αναλύθηκε η ενζυμική δραστηριότητα μεταξύ άλλων δυο γλυκοσιδίων, της ρουτίνης και της λουτεολίνης (Πίνακας 3.5). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η σχετική ενεργότητα του ενζύμου ήταν κάτω του 10% στην περίπτωση της λουτεολίνης και κάτω του 2% στην περίπτωση της ρουτίνης. Συνεπώς το ένζυμο

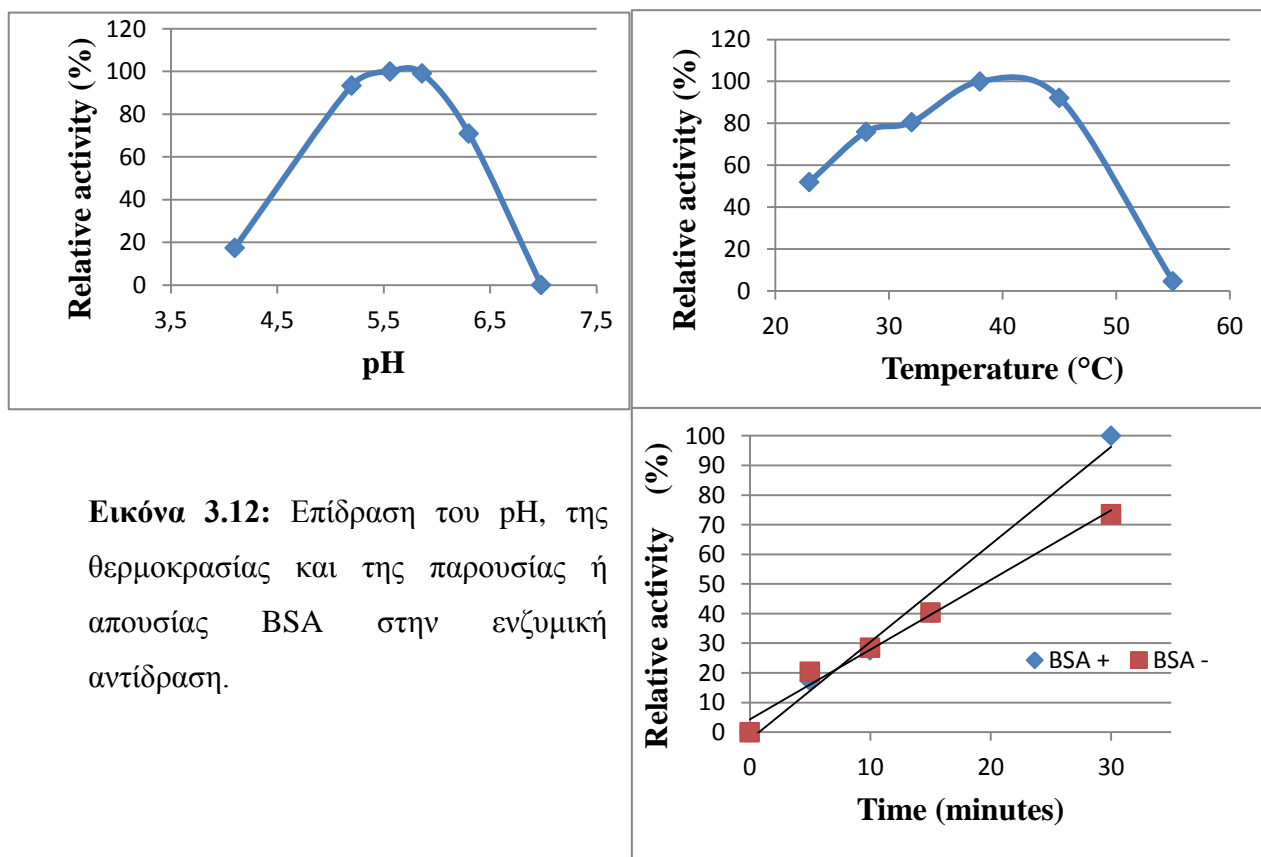
OeGLU είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένο ως προς την απογλυκοζυλίωση της ολευρωπαΐνης.

Υπόστρωμα	Σχετική ενεργότητα (%) *
Ολευρωπαΐνη	100
Ρουτίνη	1.8 ± 0.1
Λουτεολίνη	7.9 ± 3.6

Πίνακας 3.5: Ενεργότητα β-γλυκοσιδάσης από το ετερόλογα εκφραζόμενο ένζυμο OeGLU σε φύλλα καπνού. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν για 1hr στους 37 °C παρουσία 50μM αντίστοιχου υποστρώματος. *Mean±SD (n=3).

3.5 Κινητική του ενζύμου OeGLU

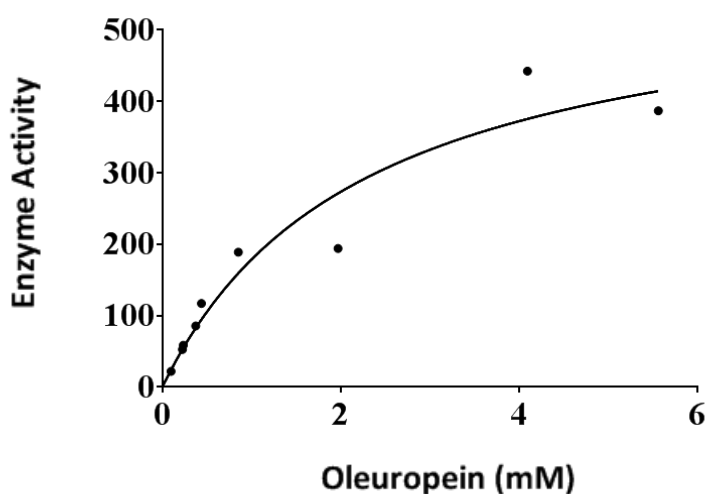
Προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες της ενζυμικής αντίδρασης, ελέγχθηκε η επίδραση τριών παραμέτρων στην ικανότητα απογλυκοζυλίωσης της ολευρωπαΐνης. Πιο συγκεκριμένα δοκιμάστηκαν διαφορετικές θερμοκρασίες, διαφορετικά pH καθώς και η επίπτωση της παρουσίας ή μη BSA πρωτεΐνης στην αντίδραση (Εικόνα 3.12).



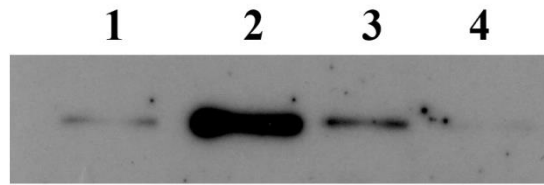
Εικόνα 3.12: Επίδραση του pH, της θερμοκρασίας και της παρουσίας ή απουσίας BSA στην ενζυμική αντίδραση.

Από την αποτελέσματα φάνηκε ότι απογλυκοζυλίωση της ολευρωπαΐνης από το OeGLU είναι αποδοτική εντός ενός στενού εύρους τιμών pH με μέγιστη ενεργότητα στο pH=5.5 πάνω από το οποίο η σχετική ενεργότητα μειώνεται ραγδαία. Αντίθετα το θερμοκρασιακό εύρος στο οποίο το ένζυμο έχει σχετική ενεργότητα πάνω από 50% ήταν μεγάλο (23 °C έως 45 °C) ωστόσο πάνω από τους 45 °C η ενεργότητα μειώθηκε ακαριαία. Η μέγιστη ενεργότητα μετρήθηκε στους 37 °C. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η σχετική ενεργότητα του ενζύμου δεν επηρεάστηκε από την παρουσία ή μη πρωτεΐνης BSA στην αντίδραση για τις χρονικές στιγμές έως 15min που δοκιμάστηκαν, ωστόσο στα 30min το OeGLU έχασε περισσότερο από το 25% της αρχικής του ενεργότητας απουσία BSA. Αυτό το αποτέλεσμα δηλώνει ότι η παραγόμενη άγλυκη ολευρωπαΐνη από έναν βαθμό και μετά προκαλεί αναστολή στο ένζυμο επηρεάζοντας την ενεργότητα του ενζύμου λόγω μαζικής συμπλοκοποίησης.

Στη συνέχεια προκειμένου να χαρακτηριστούν οι κινητικές παράμετροι του ενζύμου ως προς την ολευρωπαΐνη, το ένζυμο απομονώθηκε μέσω ανοσοκατακρήμνισης από φύλλα καπνού που εκφράζουν παροδικά το OeGLU και επώαστηκε με διαδοχικές αραιώσεις υποστρώματος. Από την καμπύλη των Michaelis-Menten που προέκυψε (Εικόνα 3.13), υπολογίστηκε ότι η σταθερά Michaelis-Menten (K_m) είναι ίση με 2.26mM και η μέγιστη ταχύτητα αντίδρασης (V_{max}) ισούται με 410U/mg. Η ανοσοανίχνευση των κλασμάτων της χρωματογραφίας ανοσοκατακρήμνισης παρατίθεται στην Εικόνα 3.14.



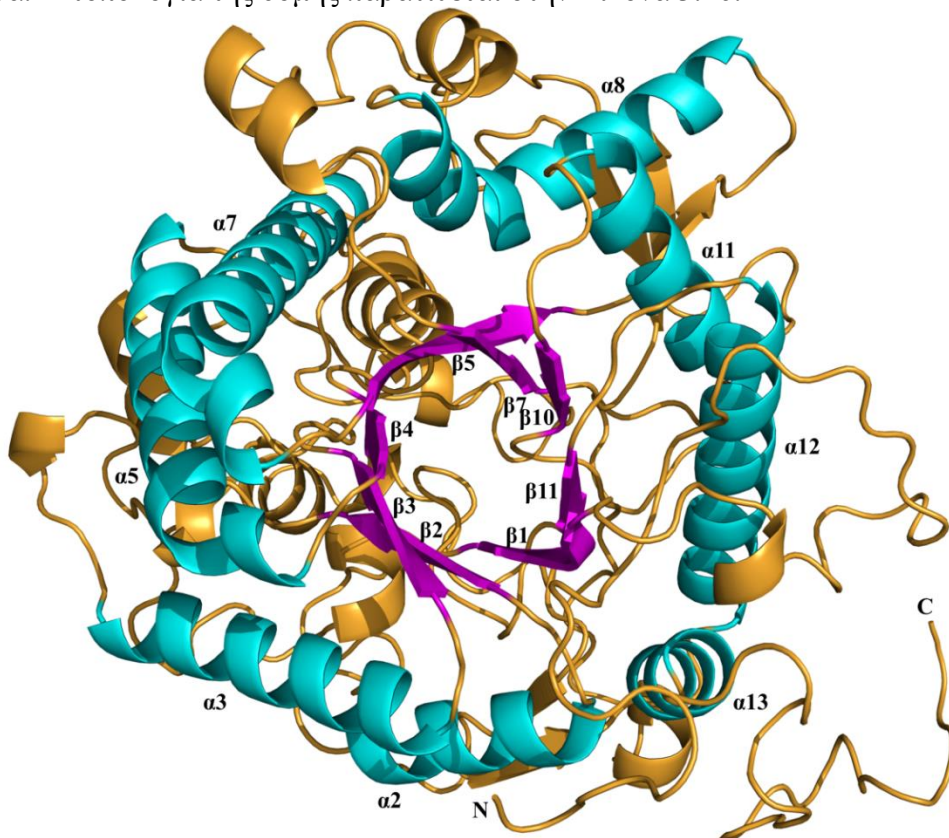
Εικόνα 3.13: Καμπύλη Michaelis-Menten του ενζύμου OeGLU με την ολευρωπαΐνη.



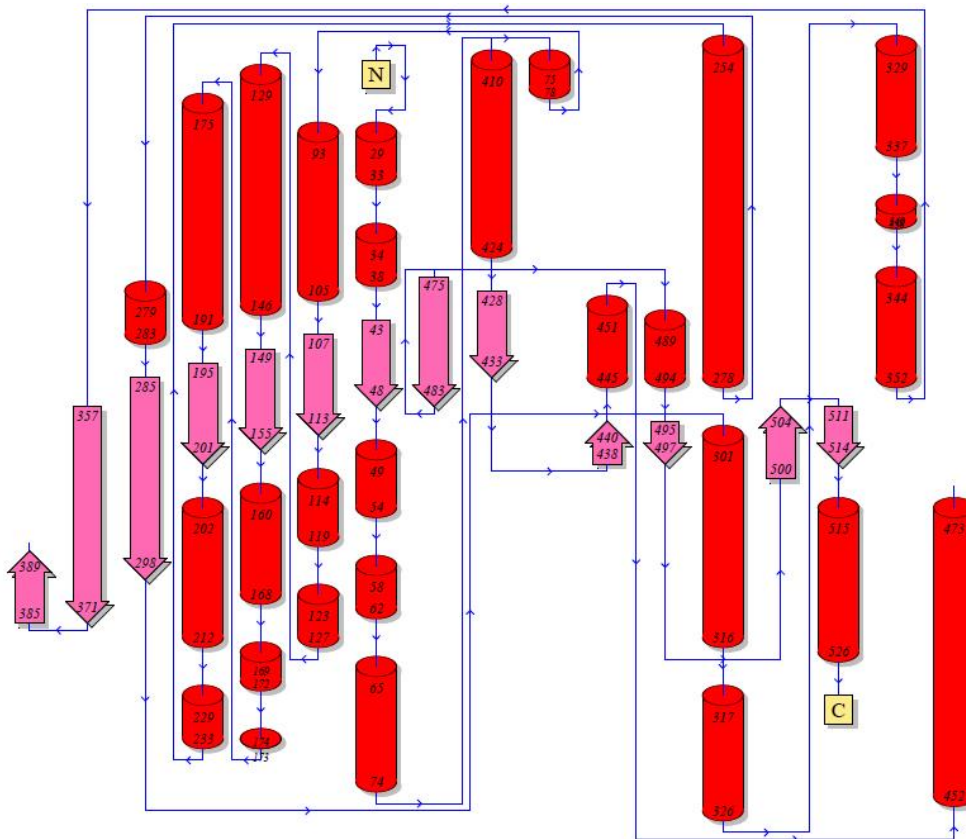
Εικόνα 3.14: Ανοσοανίχνευση των κλασμάτων της χρωματογραφίας ανοσοκατακρήμνισης με αντίσωμα anti-FLAG. Το απομονωμένο ένζυμο OeGLU (3ng και 15ng, πηγάδι 1 και 2 αντίστοιχα) από φύλλα φυτών *N. benthamiana* που εκφράζουν το OeGLU (πηγάδι 3, 10μg – Input) και το αντίστοιχο κλάσμα που δεν προσδέθηκε στα σφαιρίδια (πηγάδι 4, 10μg – Eluent).

3.6 In silico τριτοταγής δομή του ενζύμου OeGLU και μοριακή προσκόλληση της ολευρωπαΐνης στο ενεργό κέντρο

Με απώτερο σκοπό να προσδιοριστούν τα αμινοξέα τα οποία αποτελούν το ενεργό κέντρο του ενζύμου OeGLU και είναι σε επαφή με την ολευρωπαΐνη, δημιουργήθηκε in silico η τριτοταγής δομή του ενζύμου με βάση το πρόγραμμα Phyre2 (Kelley et al., 2015). Το αποτέλεσμα της ανάλυσης (Εικόνα 3.15) έδειξε ότι το OeGLU φέρει την δομή $(\beta/\alpha)_8$ TIM barrel δομή, χαρακτηριστική για τις β-γλυκοσιδάσες της GH1 οικογένειας. Η δομή αυτή αποτελείται από έναν κεντρικό πυρήνα 8 συστραμμένων β-πτυχωτών επιφανειών οι οποίες τοποθετούνται η μια δίπλα στην άλλη και συνδέονται μέσω 8 α-ελίκων που βρίσκονται στο εξωτερικό του πυρήνα. Η τοπολογία της δομής παρατίθεται στην Εικόνα 3.16.

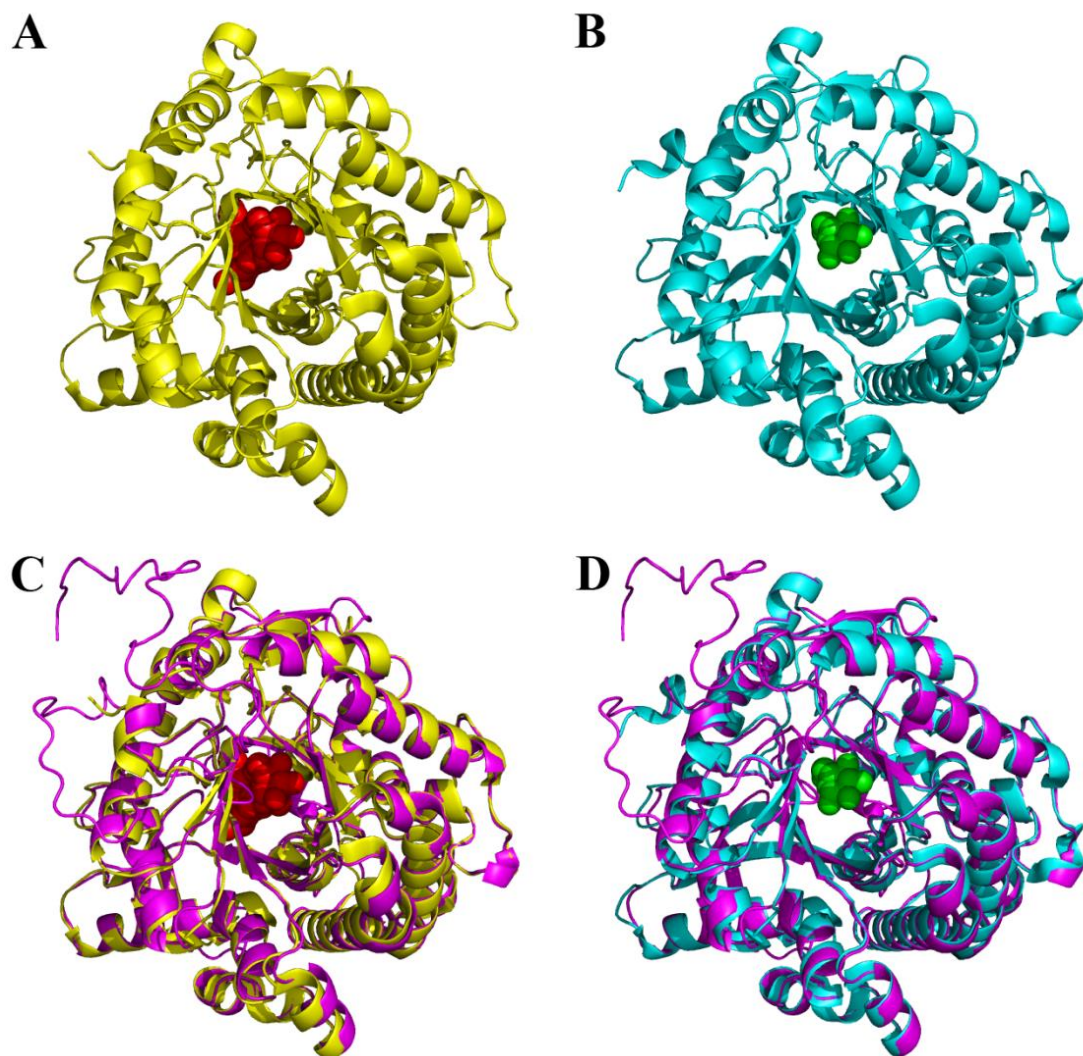


Εικόνα 3.15: In silico πρόβλεψη της 3D δομής του ενζύμου OeGLU. Οι 8 α-έλικες και οι 8 β-πτυχωτές επιφάνειες που αποτελούν τον πυρήνα της $(\beta/\alpha)_8$ TIM barrel δομής, είναι χρωματισμένες γαλάζιες και μωβ αντίστοιχα. Οι περαιτέρω έλικες, επιφάνειες καθώς και οι ενδιάμεσοι βρόχοι είναι καφέ. Τα αμινοξικά άκρα έχουν σημειωθεί.



Εικόνα 3.16: Τοπολογία της 3D δομής. Με κόκκινο σημαίνονται οι α-έλικες και με μωβ οι β-πτυχωτές επιφάνειες. Η αρίθμηση αναφέρεται στα αντίστοιχα αμινοξέα.

Προκειμένου να αξιολογηθεί το αποτέλεσμα της πρόβλεψης της τρισδιάστατης δομής, έγινε υπέρθεση του OeGLU με τις αποσαφηνισμένες μέσω κρυσταλλογραφίας τρισδιάστατες δομές δυο αμυντικών β-γλυκοσιδασών (Εικόνα 3.17). Οι δομές μεταξύ των τριών ενζύμων φάνηκε ότι είναι σε σχεδόν ίδιες συνεπώς η τρισδιάστατη πρόβλεψη είναι ακριβής.



Εικόνα 3.17: Σύγκριση της προβλεπόμενης 3D δομής του ενζύμου με τις λυμένες δομές δυο άλλων ενζύμων της οικογένειας GH1. (A) β-Γλυκοσιδάση της στρικτοσιδίνης (RsSTR) (κίτρινο) με την στρικτοσιδίνη (κόκκινο) (PDB code: 2JF6:B) (Barleben et al., 2007). (B) β-Γλυκοσιδάση της ραουκαφρισίνης (RsRAU) (κυανό) με την γλυκόζη (πράσινο) (PDB code: 4ATL:A) (Xia et al., 2013). Υπέρθηση της δομής του OeGLU (μωβ) με την δομή του RsSTR και την στρικτοσιδίνη (C) ή με την δομή του RsRAU και την γλυκόζη.

Στη συνέχεια έγινε πολλαπλή στοίχιση των αμινοξικών ακολουθιών του ενζύμου OeGLU με τα πέντε ένζυμα τα οποία είναι φυλογενετικά πιο κοντά (Εικόνα 3.1). Σκοπός ήταν να εντοπιστούν οι θέσεις καθώς και ομοιότητες ή διαφορές στα αμινοξέα τα οποία είναι γνωστά ότι αποτελούν το ενεργό κέντρο αυτών. Από την πολλαπλή στοίχιση (Εικόνα 3.18), φάνηκε ότι τα δυο καταλυτικά γλουταμινικά οξέα (E) είναι σε συντηρημένες θέσεις, τα περισσότερα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με το μόριο γλυκόζης των μεταβολιτών είναι όμοια ενώ διαφορές παρατηρούνται στα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με το άγλυκο τμήμα των αντίστοιχων μεταβολιτών.

RsSTR η1 $\xrightarrow{\beta 1}$

```

OeGLU 1 MDIQSNVLTITISGSTPTDTSNGQAAKSTKER.....IKRSDFPSDFVFCAAT
RsSTR 1 .....MDNTQAEPLVVAIVPKPNASTEHTN.....SHLIPVTRSKIVVHRRDFPQDFVFCAGG
RsRAU 1 .....MATQSS.....AVIDSNDATR.....ISRSDFPADFTMGTGS
CiGLU 1 .....MSSVLP.....TPVLPPTGRN.....INRGHFDDDFVFCAGT
DlGLU 1 .....MTNESNHTDHNVTTRASFNFSNG.....EKVFGSAT
CrSTR 1 .....MGSKDDQSLVVAISFAAEPGNHNSVPIFFAYPSIPIQPRKHNKPIVHRRDFPSDFVFCAGG

```

RsSTR α1 $\xrightarrow{\beta 2}$ α4

```

OeGLU 49 ASYQVEGAWNFGGKGMNSNDYFTQSQPGGTSDFSNGTATIDHYNMFKDDVVVVMKGLKAYRFSFSWPRIT
RsSTR 54 SAYQCEGAYNEGNRGPSTWDTFTQSRSPAKTSDGNSGNQAINCYHMYKEDIKIMKQTLGLESYRFSFSWSRV
RsRAU 33 SAYQCEGAYNEGNRGPSTWDTFTQSRSPAKTSDGNSGNQAINCYHMYKEDIKIMKQTLGLESYRFSFSWSRV
CiGLU 33 SAYQCEGAYNEGNRGPSTWDTFTQSRSPAKTSDGNSGNQAINCYHMYKEDIKIMKQTLGLESYRFSFSWSRV
DlGLU 32 SAYQCEGAYNEGNRGPSTWDTFTQSRSPAKTSDGNSGNQAINCYHMYKEDIKIMKQTLGLESYRFSFSWSRV
CrSTR 62 SAYQCEGAYNEGNRGPSTWDTFTQSRSPAKTSDGNSGNQAINCYHMYKEDIKIMKQTLGLESYRFSFSWSRV

```

RsSTR α5 $\xrightarrow{\beta 3}$ α7

```

OeGLU 119 LPPGRLCHGVSKGCVQFYNDLIDALLAADTEPYITFFHWDHPQALEDEYGGFLH..ERVVKDFIYESEIC
RsSTR 124 LPPGRLAAGVGNKGVKPYHDFIDELLANGIKPVSITFFHWDHPQALEDEYGGFLS..HRIVDDFCEYAEFC
RsRAU 103 LPPGRLSGGVNKEGINYNNLIDGELLANGIKPVSITFFHWDHPQALEDEYGGFLS..PRIVDDFCEYAEFC
CiGLU 103 LPPGRLINAGLNQEGIKYNNLIDELLANGIKPVSITFFHWDHPQALEDEYGGFLS..DKIVDDFRCEYAEFC
DlGLU 102 LPPGRLSTGVNKEGIKYNNLIDAIIAEQMOPYITFFHWDHPQALEDEYGGFLDKDKRIVEHFRDYAEFC
CrSTR 132 LPPGNLSGAVNKGKPYHDFIDELLANGIKPVSITFFHWDHPQALEDEYGGFLS..DRIVDDFCEYAEFC

```

RsSTR η4 $\xrightarrow{\beta 4}$ α8

```

OeGLU 187 FWEFGDRVKYWIITLNFPWTFVQGYVAAGAFPNNRQVTPKDTETETQKHARLHRG.....GGKLLAA
RsSTR 192 FWEFGDKIKYWIITFNPHFAVNGYALGFAPGRGGKGSPEHVNHPVQHRCSVAPQCI.....
RsRAU 171 FWEFGDRVKHWITLNFPTFSVHGAYATGLYAPGRGRITSPHEVNHPVQHRCSVAPQCI.....
CiGLU 171 FWEFGDRVKHWITLNFPESSYSN.FFGVAYDTPPKAHALKASRLVPTVARPSKPVRF.....
DlGLU 172 FWEFGDRVKHWITLNFASVYTVGQVYVNGTCCPGRGASAPSDMALQTAEBILRNRTLSTILDAIGSQIAIE
CrSTR 200 FWEFGDKVKYWIITFNPHFYVAGSYATGFAPGRGGAD.....

```

RsSTR

```

OeGLU 247 FK.....Y
RsSTR 230 .....DE
RsRAU 230 .....CST
CiGLU 229 .....AST
DlGLU 242 LKDIKELIYTLIPNNKDLISKPHIEEFVKNIIEVVLKQKCPQLVDFIVDILQSFHVDYKRTGMARACSN
CrSTR 238 .....GK

```

RsSTR α9 $\xrightarrow{\beta 5}$ α11

```

OeGLU 250 GNPGT...EPYKVAHNLILCHHAAVDIYRTKYQESOGGKTIITNCISWNEFLTDS.QEDKDAARFGNDF
RsSTR 232 GDPAT...EPYVVTNHLILAHAAAVEEYRNKFKQCEGEGTIGIVLNSMWMPEPLS.DVQADIDAQKRALDF
RsRAU 233 GNPGT...EPYVVTNHLILAHAAAVEEYRNKFKQCEGEGTIGISHATQWMEPWDENSASDVEAAARALDF
CiGLU 232 ADPGTITADQVYKVGHNLLLAHAAAIQVYRDKFOQNTQEGTIGMALVTQWMPNLNENPAAASRAFDF
DlGLU 312 GDPGT...EPYIVAHNLILAHAAAVRYKTKFOAYQGGKIGMTNNTYYLPYDEKYHDDVEASKRGVDF
CrSTR 240 GEPGT...EPYIATHNLLLSHRAAVEYVRKNEQKQEGEIGIVLNSMWMPEPLN.ETKEDIDARBRGLDF

```

RsSTR α12 $\xrightarrow{\beta 7}$ α16

```

OeGLU 315 MLGWFLVPPVVTGEPYPSMKIKYVGDRLPKFSEKEERLVKGSYDFLGNYYTSTYTSDDPTKPT..IDS.YYF
RsSTR 297 MLGWFLVPLTTGDPYKSMRELVKGRRLPKFSSADDSKLLKGCYDFIGMNYTTATVYVTVNAVKSNS..EKLSYE
RsRAU 299 MLGWFMPEITSGDYPKSMKKFVGSRLPKFSSADDSKLLKGSYDFVGLNYYTASVYVTVNAVKSNS..EKLSYE
CiGLU 302 KFGWFMQPLITGEPYKSMRQLLGRRLPKFSTPDQKLLIGSYDYVGVNYYTATVYVTVNAVKSNS..EKLSYE
DlGLU 378 MLYWFVPIVITGEPYKSMRQVGSRLPKFSTVEEEMVVRGSYDFLGNYYTATVYVTVNAVKSNS..EKLSYE
CrSTR 305 MLGWFLVPLTTGEPYKSMRALVGSRLPKFSTVEVSEKLTIGCYDFIGMNYTTATVYVTVNAVKSNS..EKLSYE

```

RsSTR β9 $\xrightarrow{\beta 10}$ α17 $\xrightarrow{\beta 12}$ β13

```

OeGLU 382 TDSHTKTKT...SHERNKVPIGAQAG.SDWLYIVVWGIYRVMVDMKKRYND...PVIYVITENGVDEVN
RsSTR 365 TDGQVTK...TFERNQKPIGHALY.GGQHVVPWGLYKLLVYTKETVHV...PVIYVITENGVDEVN
RsRAU 369 TDIHVTY...ETDRNGVPIGQSG.SDWLLIYVPEGIRKILVYTKETVHV...PVIYVITENGVDEVN
CiGLU 371 TDSDGNY...TDSKDGVLIGPLAG.PAWLLINIVREGIYHVLQDIDKENYED...PVIYVITENGVDEVN
DlGLU 446 SDMGVLS...TPTRGGVPIGICQGGWYIYVREGLYLILILEMTNKFKDKNDQG...PVIYVITENGVDEVN
CrSTR 372 TDARLNKNIYVVKVDGKRVIRIGEPICY.GGQHVVPWGLYKLLVYTKETVHV...PVIYVITENGVDEVN

```

RsSTR α18 $\xrightarrow{\beta 14}$ η6 $\xrightarrow{\beta 15}$

```

OeGLU 441 .....DRSKTSTFAIKDDIRITHYHGBHLIYLRLLAMDQGVNVKGYFIWSLFDNFENLACFSVRFVGM
RsSTR 424 .....KTKILLSEARRDABRTDYHQBHLASVVRDAIDDGVNVKGYFVWSLFDNFENLACFSVRFVGM
RsRAU 428 .....NNTLLSEARRDKMLKYLQDHIFNVQRAMNDGVNVKGYFVWSLFDNFENLACFSVRFVGM
CiGLU 430 .....DTAKTLEARRVDITRLHYLDQDHLKVLVEARHOGVVRVQGYLVWSLMDNWELRAGYTRFGLI
DlGLU 511 .....NTTFTVCEARYDPTRVLYHNDHLWYLKKAAMEDGVNLKGYFIWSLFDNFENLACFSVRFVGM
CrSTR 436 RTNILLTEGKTNILTEARRDKIRVDFLQSLASVVRDAIDDGVNVKGYFVWSLFDNFENLACFSVRFVGM

```

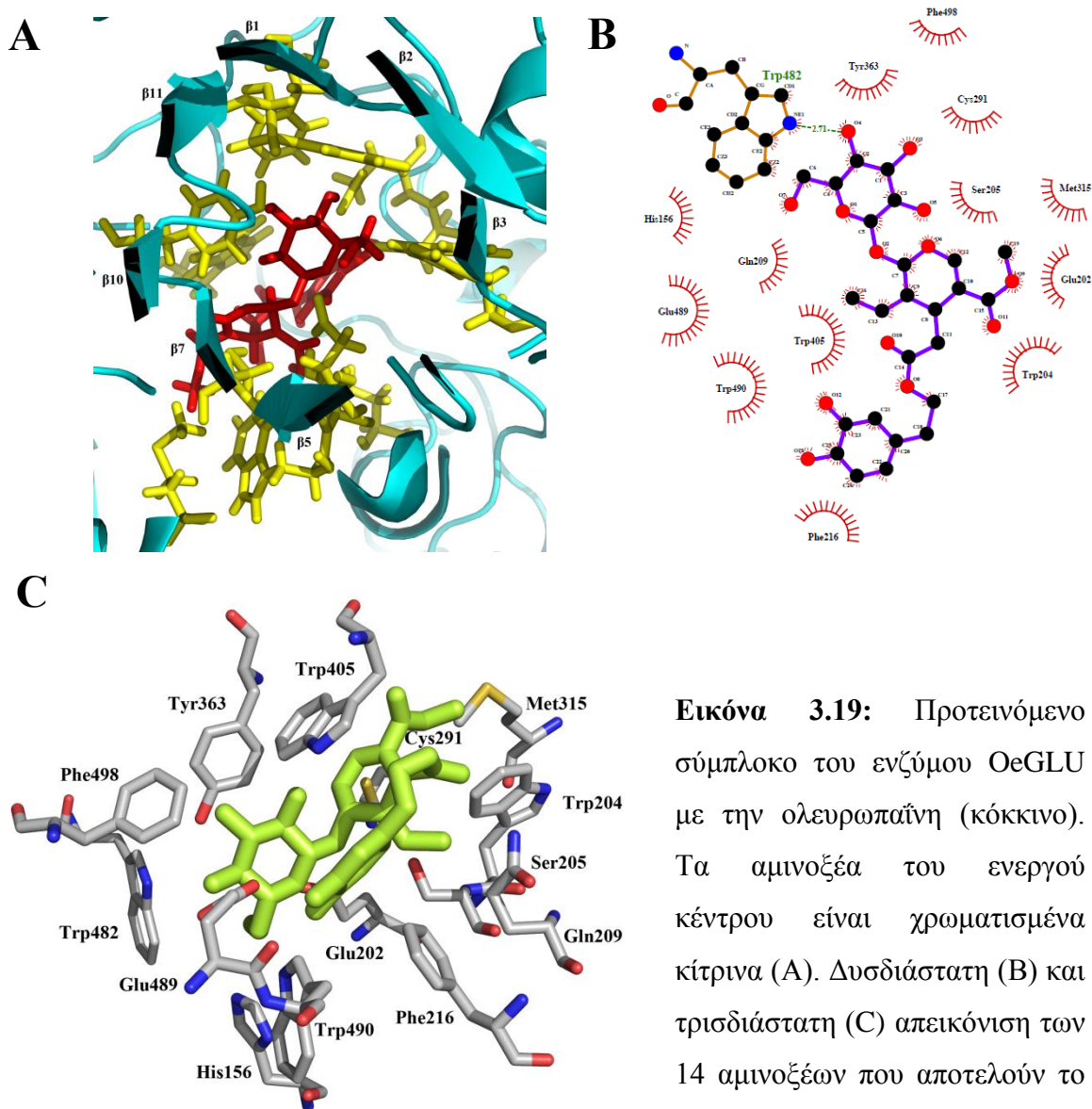

			β16		β17		α20																																																														
			→	TTT	→	QQQQQQQQ	QQQ																																																														
RsSTR																																																																					
OeGLU	502	Y	V	D	Y	A	N	G	R	Y	T	R	L	P	K	R	S	A	V	W	W	R	N	F	L	T	K	F	T	A	V	P	L	K	N	E	P	E	K	S	E	D	R	R	K	R	L	R	G	S	T																
RsSTR	485	H	V	D	Y	K	S	..	F	E	R	Y	P	K	D	S	A	I	W	Y	K	N	F	I	A	G	K	S	T	T	S	P	A	K	R	..	R	E	E	E	A	Q	V	E	L	V	K	R	Q	K	T																
RsRAU	489	H	V	D	Y	N	D	N	F	A	R	Y	P	K	D	S	A	V	L	M	N	S	F	H	K	N	I	S	K	L	P	A	V	K	R	S	I	R	E	D	D	E	E	Q	V	S	S	K	R	L	R	K															
CiGLU	491	H	V	D	Y	N	N	F	A	R	Y	P	K	D	S	A	I	W	F	R	N	A	F	H	K	R	L	R	I	H	V	N	K	A	R	P	Q	E	D	D	G	A	F	D	T	P	R	K	R	L	R	K	Y														
DlGLU	572	Y	V	D	F	V	N	G	Q	Y	T	R	Y	P	K	S	A	L	W	T	N	F	L	H	D	V	Q	E	L	K	V	P	D	T	S	N	V	T	N	K	R	S	R	N	T	E	E	E	N	A	T	A	K	K	P	K	N	T	S	V	N	S	L	G	F	L	D	N	L
CrSTR	506	H	V	D	Y	K	T	..	F	Q	R	Y	P	K	D	S	A	I	W	Y	K	N	F	I	S	E	G	F	V	T	N	T	A	K	K	R	F	E	E	D	K	L	V	E	L	V	K	Q	K	Y																	

RsSTR				
OeGLU		.		
RsSTR		.		
RsRAU		.		
CiGLU		.		
DlGLU	642	D		
CrSTR		.		

Εικόνα 3.18: Πολλαπλή στοίχιση επιλεγμένων αμινοξικών ακολουθιών από το φυλογενετικό δέντρο (Εικόνα 3.1). RsSTR: β-γλυκοσιδάση της στρικτοσιδίνης από το *Rauwolfia serpentina* (Q8GU20), CrSTR: β-γλυκοσιδάση της στρικτοσιδίνης από το *Catharanthus roseus* (Q9M7N7), RsRAU: β-γλυκοσιδάση της ραουκαφρισίνης από το *Rauwolfia serpentina* (Q9SPP9), CiGLU: β-γλυκοσιδάση του ιπεκοσιδίου από το *Carapichea ipecacuanha* (B6ZKM3), OeGLU: β-γλυκοσιδάση της ολευρωπαΐνης από το *Olea europaea* (Q8GVD0), DlGLU: β-γλυκοσιδάση του καρδενολιδίου από το *Digitalis lanata* (Q9ZPB6). Τα αμινοξικά κατάλοιπα σε κόκκινο φόντο είναι συντηρημένα, τα αμινοξικά κατάλοιπα με κόκκινα γράμματα είναι ομόλογα και αυτά που πλαισιώνονται από μπλε κουτιά είναι όμοια. Τα δυο καταλυτικά γλουταμινικά οξέα (E) που βρίσκονται στα καρβόξυ-άκρα των β4 και β12 πτυχωτών επιφανειών (β4 και β7 αντίστοιχα της δομής β-βαρελιού) έχουν σημειωθεί με κυανό χρώμα. Τα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με το μόριο γλυκόζης των αντίστοιχων μεταβολιτών έχουν σημειωθεί με πράσινο χρώμα ενώ τα αμινοξέα που εμπλέκονται στην αναγνώριση του άγλυκου τμήματος της στρικτοσιδίνης και της ραουκαφρισίνης για τα ένζυμα RsSTR και RsRAU αντίστοιχα, έχουν σημειωθεί με κίτρινο χρώμα. Τα οριζόντια βέλη άνωθεν των ακολουθιών δηλώνουν β-πτυχωτή επιφάνεια και οι έλικες δηλώνουν α-έλικες της κρυσταλλογραφημένης δομής του RsSTR (PDB: 2JF7).

Στη συνέχεια έγινε μοριακή προσκόλληση (molecular docking) της 3D δομής της ολευρωπαΐνης (PubChem CID: 5281544) στην 3D δομή του ενζύμου OeGLU. Από τις δέκα προτεινόμενες πόζες συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος, μια ταίριαξε απόλυτα με τις εκτιμώμενες θέσεις των αμινοξέων που θα αποτελούν το ενεργό κέντρο του ενζύμου σύμφωνα με τη Εικόνα 3.18. Σύμφωνα με την ανάλυση λοιπόν, το ενεργό κέντρο του ενζύμου αποτελείται από 14 αμινοξικά κατάλοιπα (Εικόνα

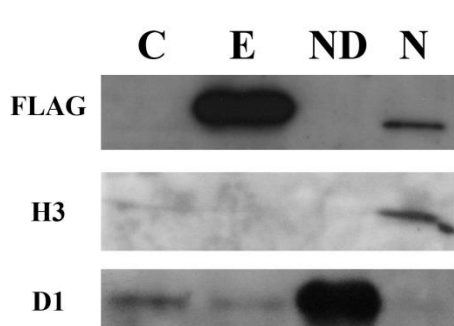
3.19). Τα αμινοξέα His156, Glu202, Trp482, Glu489 και Trp490 του OeGLU πιθανότατα εμπλέκονται στην πρόσδεση του μορίου γλυκόζης της ολευρωπαΐνης και βρίσκονται σε αντίστοιχες θέσεις σε σχέση με τα ένζυμα RsRAU και RsSTR. Ωστόσο με εξαίρεση τα αμινοξέα Met315, Tyr363 και Trp405 που είναι συντηρημένα, τα αμινοξέα Trp204, Ser205, Gln209, Phe216, Cys291 και Phe498 του OeGLU πιθανότατα εμπλέκονται στην αναγνώριση του άγλυκου τμήματος της ολευρωπαΐνης και στις θέσεις αυτές παρουσιάζεται παραλλακτικότητα μεταξύ των ενζύμων.



3.7 Υποκυτταρική τοποθέτηση του ενζύμου OeGLU

Σημαντική παράμετρος στο δυαδικό σύστημα άμυνας ολευρωπαΐνης/OeGLU είναι η διακριτή υποκυτταρική τοποθέτηση των δυο συστατικών (ένζυμο – μεταβολίτης) ώστε η μαζική παραγωγή του βιοδραστικού άγλυκου μεταβολίτη να γίνεται μόνο μετά από ρήξη των κυττάρων. Η ολευρωπαΐνη αποθηκεύεται στην αδρανή (γλυκοζυλιωμένη) μορφή στα χυμοτόπια ή στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων (Konno et al., 1998; Bitonti et al., 2000). In silico ανάλυση της αμινοξικής ακολουθίας του OeGLU, προέβλεψε ότι το ένζυμο τοποθετείται υποκυτταρικά στον πυρήνα λόγω ύπαρξης σινιάλου πυρηνικής τοποθέτησης (Nuclear Localization Signal - NLS) στα αμινοξέα 542–550 (DRRKLRGS).

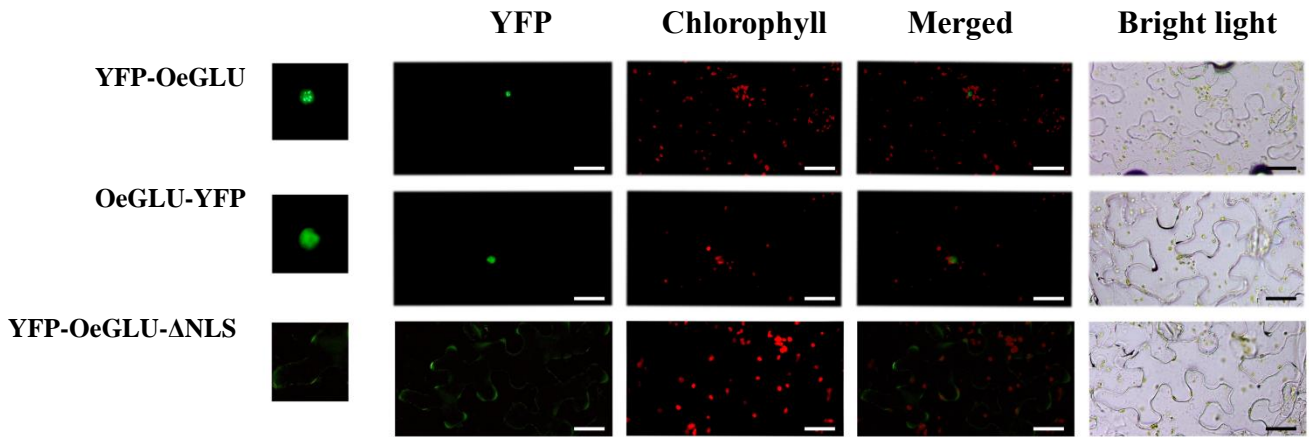
Προκειμένου να επαληθευτεί η πρόβλεψη, έγινε υποκυτταρική κλασμάτωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από φύλλα καπνού που εκφράζουν παροδικά το OeGLU (Εικόνα 3.20). Η ανοσοανίχνευση των επιμέρους κλασμάτων μετά από μεταφορά κατά Western επιβεβαίωσε την πυρηνική τοποθέτηση του ενζύμου αφού σήμα με το πρωτογενές αντίσωμα anti-FLAG (επίτοπος OeGLU) (sc-807, Santa Cruz Biotechnology) ανιχνεύθηκε μόνο στο πυρηνικό κλάσμα. Η αρτιότητα των κλασμάτων επιβεβαιώθηκε με τα πρωτογενή αντισώματα anti-H3 (πυρηνικός δείκτης) (#4499, Cell Signaling Technology) και an anti-D1 (χλωροπλαστικός δείκτης) (Zhang et al., 1999).



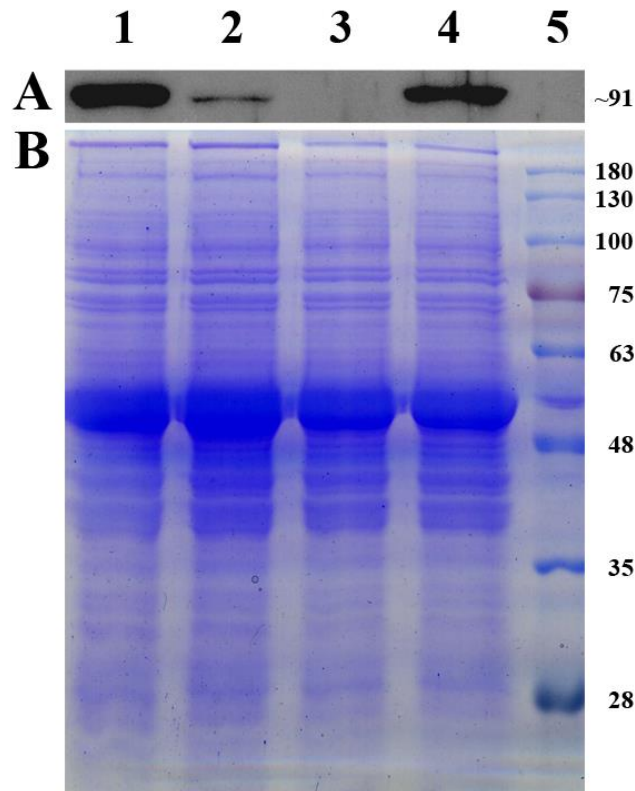
Εικόνα 3.20: Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από φύλλα καπνού που έχουν υποστεί αγραέγχυση είτε με την κατασκευή pGPTV/35S (C) είτε με την κατασκευή pGPTV/35S-OeGLU-FLAG (E) και το αντίστοιχο μη-πυρηνικό (ND) ή πυρηνικό (N) κλάσμα του (E). Τα ίδια πρωτεϊνικά δείγματα ανοσοανιχνεύτηκαν είτε με το anti-FLAG (επίτοπος OeGLU), είτε με το anti-histone H3 (πυρηνικός δείκτης) είτε με το anti-D1 (χλωροπλαστικός δείκτης) πρωτογενές αντίσωμα.

Δεδομένου ότι η *in silico* πρόβλεψη για πυρηνική τοποθέτηση του OeGLU ήταν ακριβής, και προκειμένου να οπτικοποιηθεί το αποτέλεσμα με μια πιο ευαίσθητη τεχνική, δημιουργήθηκαν τρεις χμαιοικές κατασκευές του ενζύμου σε σύντηξη με την φθορίζουσα πρωτεΐνη YFP (Yellow Fluorescent Protein). Δημιουργήθηκε λοιπόν μια κατασκευή στην οποία η πρωτεΐνη YFP είναι στο C-άκρο του OeGLU (YFP-OeGLU) με τους εκκινητές ForKozakMluI και RevStop, μια κατασκευή στην οποία η πρωτεΐνη YFP είναι στο N-άκρο του OeGLU (OeGLU-YFP) με τους εκκινητές ForKozak και RevMluIStop, καθώς και μια κατασκευή στην οποία η πρωτεΐνη YFP είναι στο C-άκρο του OeGLU και γίνεται εξάλειψη του σινιάλου πυρηνικής τοποθέτησης NLS (YFP-OeGLU- Δ NLS) με τους εκκινητές ForKozakMluI με Δ NLS-FLAG. Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR κλωνοποιήθηκαν σε πλασμίδιο pUC18 που είχε υποστεί πέψη με το ένζυμο *Sma*I. Επιλέχθηκαν θετικοί κλώνοι, οι κατασκευές επιβεβαιώθηκαν με αλληλούχιση και στην συνέχεια υποκλωνοποιήθηκε στην θέση *Mlu*I η αλληλουχία που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη YFP. Οι τελικές χμαιοικές κατασκευές κλωνοποιήθηκαν στις θέσεις *Xba*I και *Sac*I του πλασμιδίου pGPTV-35S.

Η πυρηνική τοποθέτηση του ενζύμου OeGLU επιβεβαιώθηκε με την μικροσκοπική ανάλυση επιδερμικών κυττάρων από φύλλα καπνού στα οποία είχαν αγροεγχυθεί οι αντίστοιχες κατασκευές (Εικόνα 3.21). Συγκεκριμένα τόσο η κατασκευή *OeGLU-YFP* όσο και η κατασκευή *YFP-OeGLU* τοποθετήθηκαν στον πυρήνα δίνοντας φθορισμό ενώ η εξάλειψη του σινιάλου NLS στην κατασκευή *YFP-OeGLU- Δ NLS* οδήγησε σε κυτταροπλασματική τοποθέτηση του OeGLU με διάχυτο φθορισμό. Συνεπώς η πρόβλεψη της αλληλουχίας NLS ήταν ακριβής και τα αμινοξέα αυτά είναι αναγκαία για την είσοδο του OeGLU στον πυρήνα. Η ακεραιότητα των τριών κατασκευών του OeGLU (~63kDa) με το YFP (~28 kDa) επιβεβαιώθηκε μέσω Western με το πρωτογενές αντίσωμα anti-GFP (sc8334, Santa Cruz Biotechnology) και όπως ήταν αναμενόμενο ανοσοανιχνεύτηκε μια ζώνη στα ~91kDa (εικόνα 3.22).



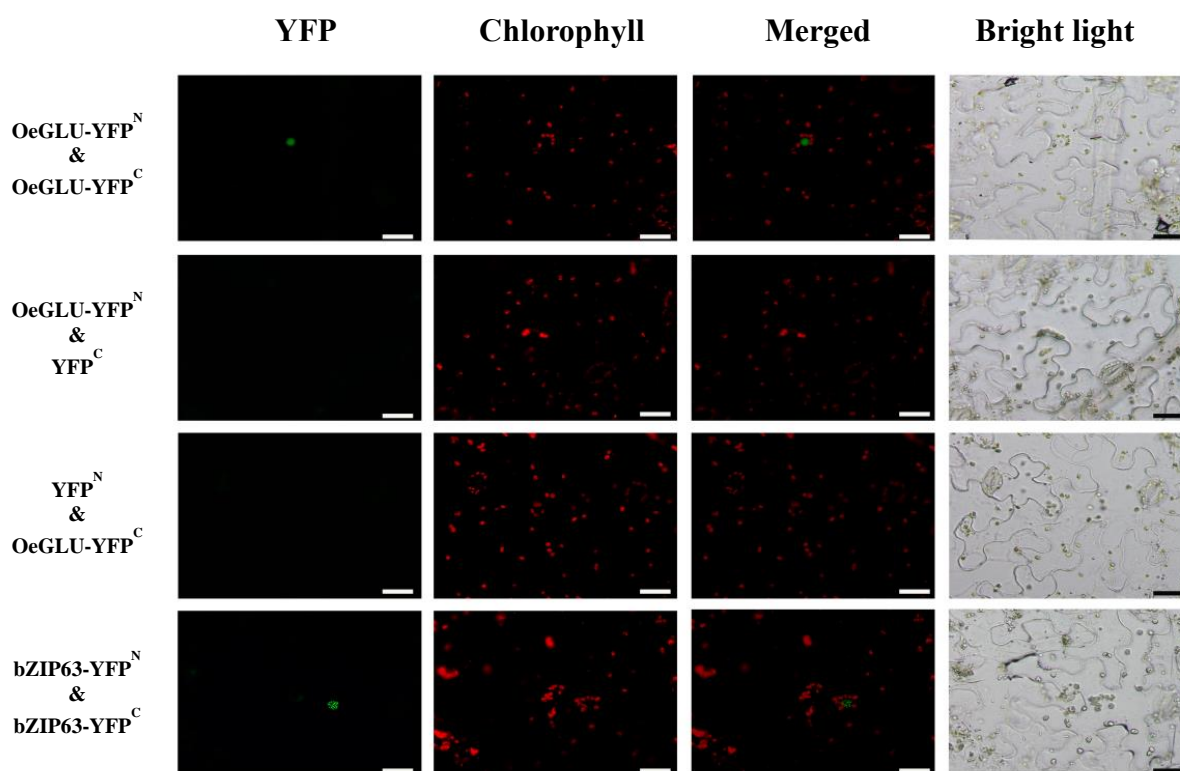
Εικόνα 3.21: Μικροσκοπία φθορισμού επιδερμικών κυττάρων καπνού *N. benthamiana* έπειτα από αgroέγχυση με τις αντίστοιχες χημεικτές κατασκευές του OeGLU με το YFP. Τα ίδια κύτταρα φωτογραφήθηκαν στα αντίστοιχα φίλτρα. Η πρώτη στήλη απεικονίζει σε μεγέθυνση τους πυρήνες της δεύτερης στήλης. Κλίμακα = 25μm.



Εικόνα 3.22: Ανοσοανίχνευση μετά από μεταφορά κατά Western (A) και χρώση CBB (B) πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (10μg) από φυτά *N. benthamiana* που εκφράζουν τις κατασκευές OeGLU-YFP (Πηγάδι 1), YFP-OeGLU (Πηγάδι 2), Control (Πηγάδι 3) και YFP-OeGLU-ΔNLS (Πηγάδι 4). Τα μοριακά μεγέθη (Πηγάδι 5) παρατίθενται στα δεξιά της εικόνας σε kDa.

3.8 Τεταρτοταγής δομή του ενζύμου OeGLU

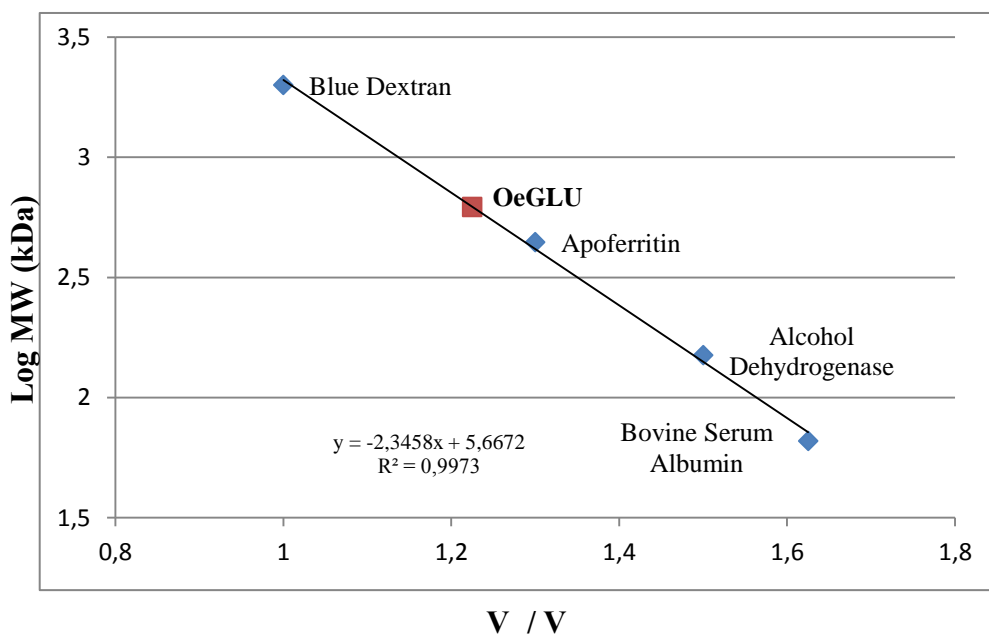
Προκειμένου να διερευνηθεί η τεταρτοταγής δομή του ενζύμου OeGLU, εξετάστηκε αρχικά το κατά πόσο δυο μονομερή του ενζύμου έχουν την δυνατότητα να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω της τεχνικής BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation). Η τεχνική BiFC είναι ένα αξιόπιστο εργαλείο που επιτρέπει την μελέτη αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών (Walter et al., 2004). Το cDNA του OeGLU ενισχύθηκε με τους εκκινήτες ForKozak και RevSPLT και το προϊόν PCR κλωνοποιήθηκε σε πλασμίδιο pUC18 που είχε υποστεί πέψη με το ένζυμο *Sma*I. Επιλέχθηκε θετικός κλώνος, οι κατασκευή επιβεβαιώθηκε με αλληλούχιση και στην συνέχεια κλωνοποιήθηκε στις θέσεις *Xba*I και *Xho*I των πλασμιδίων pSPYNE και pSPYCE ώστε να δημιουργηθούν οι κατασκευές OeGLU-YFP^N και OeGLU-YFP^C αντίστοιχα.



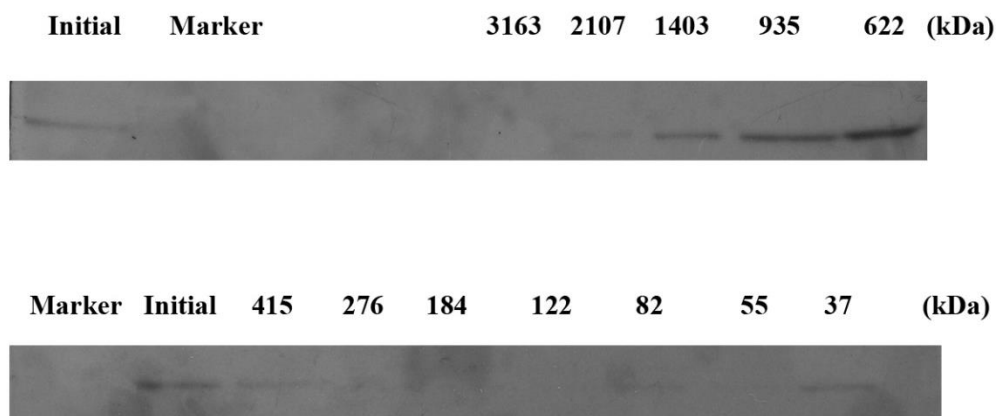
Εικόνα 3.23: Ανάλυση BiFC του διμερισμού του OeGLU σε επιδερμικά κύτταρα φύλλων καπνού που έχουν υποστεί αγροέγχυση με το συνδυασμό καλλιεργείων που αναγράφεται αριστερά της εικόνας. Σαν θετικό control χρησιμοποιήθηκε το bZIP63. Κλίμακα = 25μm, YFP^N (aa 1-155) και YFP^C (aa 156-239).

Η ανάλυση BiFC (Εικόνα 3.23) έδειξε ότι σήμα φθορισμού λόγω ανασύστασης των δυο τμημάτων του YFP, έχουμε μόνο στην περίπτωση που έχει γίνει αγροέγχυση των κατασκευών OeGLU-YFP^N και OeGLU-YFP^C συνεπώς δυο μονομερή του ενζύμου OeGLU έχουν φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ τους και το ένζυμο OeGLU είναι τουλάχιστον διμερές. Όπως ήταν αναμενόμενο το σήμα φθορισμού εντοπίστηκε στον πυρήνα των κυττάρων.

Στην συνέχεια ακολούθησε χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Gel Filtration Chromatography) σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα φυτών καπνού που εκφράζουν παροδικά το ένζυμο OeGLU ώστε να προσδιοριστεί εάν το ένζυμο, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, είναι ομοδιμερές ή ομοπολυμερές αντικατροπίζοντας τη τεταρτοταγή δομή του ενζύμου. Αρχικά η στήλη χρωματογραφίας βαθμονομήθηκε με πρωτεΐνες γνωστού μοριακού μεγέθους (Εικόνα 3.24) και στην συνέχεια έγινε ανοσοανίχνευση των κλασμάτων που διαχωρίστηκαν στην στήλη (Εικόνα 3.25). Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι το ένζυμο OeGLU (~63kDa) απαντάται ως πολυμερές in planta και επικρατέστερα ανοσοανιχνεύτηκε στο κλάσμα των 622kDa. Συνεπώς το OeGLU πιθανότατα ομοπολυμερίζεται σχηματίζοντας δεκαμερή.

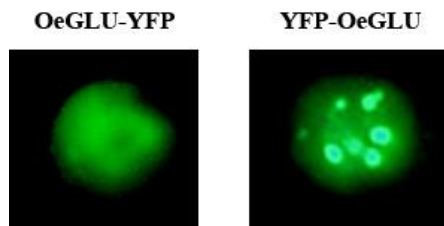


Εικόνα 3.24: Γραφική παράσταση βαθμονόμησης της στήλης που χρησιμοποιήθηκε για την χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Η βαθμονόμηση έγινε με τα ακόλουθα πρότυπα: Blue Dextran (2,000 kDa), Apoferritin (443 kDa), Alcohol Dehydrogenase (150 kDa), Bovine Serum Albumin (66 kDa). V_e , elution volume; V_o , void volume.

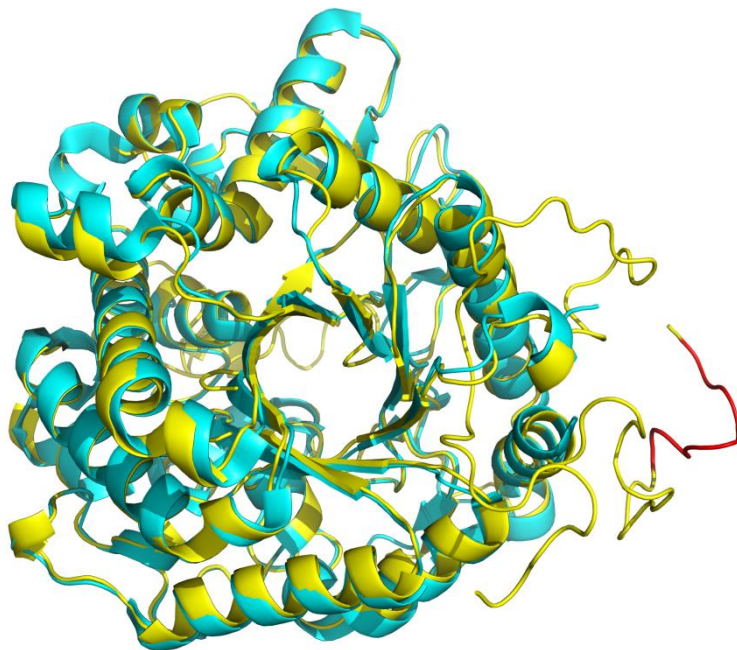


Εικόνα 3.25: Ανοσοανίχνευση μετά από μεταφορά κατά Western των κλασμάτων που προέκυψαν από την χρωματογραφία μοριακής διήθησης πρωτεϊνικού εκχυλίσματος καπνού που εκφράζει παροδικά το ένζυμο OeGLU (Initial). Οι αριθμοί πάνω από κάθε φιλμ αντιστοιχούν στα μοριακά μεγέθη (kDa) των αντίστοιχων κλασμάτων όπως υπολογίστηκαν από την εξίσωση βαθμονόμησης της στήλης (Εικόνα 3.24).

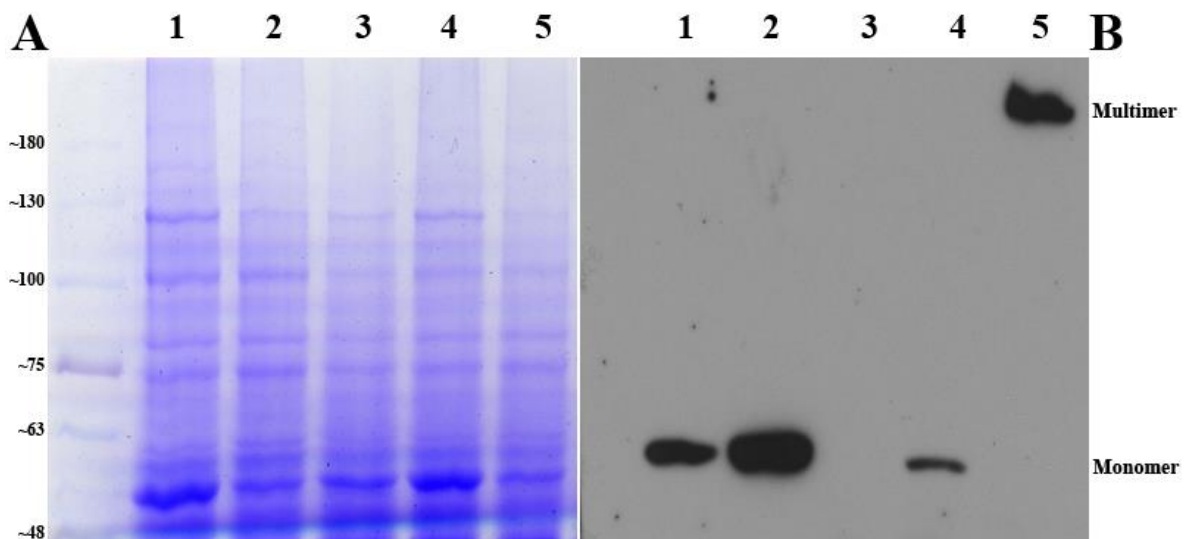
Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι μεταξύ των κατασκευών OeGLU-YFP και YFP-OeGLU παρατηρήθηκε επανειλημμένα διαφορά στο πρότυπο φθορισμού. Παρότι και οι δυο κατασκευές επιβεβαίωσαν ότι υποκυτταρικά το ένζυμο τοποθετείται στον πυρήνα, στην κατασκευή OeGLU-YFP όπου έχει γίνει σύντηξη του YFP στο C-άκρο του OeGLU, το πρότυπο φθορισμού ήταν διάχυτο ενώ στην κατασκευή YFP-OeGLU όπου έχει γίνει σύντηξη του YFP στο N-άκρο του OeGLU, το πρότυπο φθορισμού ήταν στικτό (Εικόνα 3.26). Το αποτέλεσμα αυτό έχει επίσης παρατηρηθεί, με μικροσκοπία φθορισμού, στην β-γλυκοσιδάση της στρικτοσιδίνης από το φυτό *Catharanthus roseus* και η ερμηνεία ήταν ότι το C-άκρο του ενζύμου πρέπει να είναι προσβάσιμο ώστε το ένζυμο να αποκτήσει την σωστή τεταρτοταγή δομή στον πυρήνα (Guirimand et al., 2010). Λόγω του ότι το NLS του OeGLU βρίσκεται στα 9 προτελευταία αμινοξέα του C-άκρου και δεδομένου ότι τα αμινοξέα αυτά είναι εκτός της $(\beta/\alpha)_8$ TIM barrel δομής του ενζύμου (Εικόνα 3.27), διερευνήθηκε το κατά πόσο η μετάλλαξη εξάλειψης του σινιάλου NLS στην κατασκευή OeGLU-ΔNLS θα μπορούσε να επηρεάσει την τεταρτοταγή δομή του ενζύμου OeGLU. Για να διερευνηθεί το ερώτημα έγινε ανοσοανίχνευση των κατασκευών χωρίς τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα να προθερμανθούν (Εικόνα 3.28).



Εικόνα 3.26: Μεγέθυνση των πυρήνων από τα κύτταρα που έχουν αgroεgchuθεί με τις αντίστοιχες κατασκευές της Εικόνας 3.21.



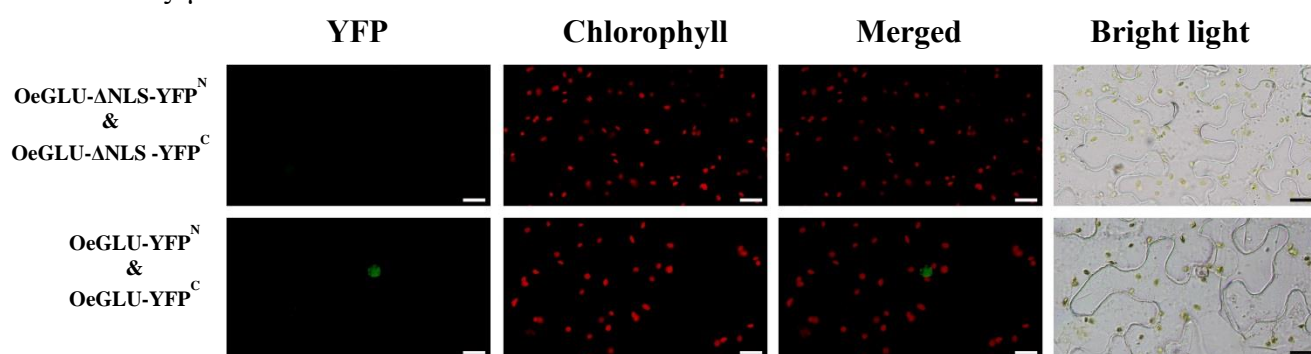
Εικόνα 3.27: Υπέρθωση της προβλεπόμενης τριτοταγούς δομής του OeGLU (κίτρινο) με την κρυσταλλογραφημένη δομή της β-γλυκοσιδάσης της στρικτοσιδίνης (γαλάζιο) (PDB code 2JF7) (Barleben et al., 2007). Τα εννέα αμινοξέα που αποτελούν το σινιάλο πυρηνικής τοποθέτησης (NLS) στο C-άκρο του OeGLU έχουν σημειωθεί με κόκκινο.



Εικόνα 3.28: CBB χρώση (A) και ανοσοανίχνευση με anti-FLAG μετά από μεταφορά κατά Western (B) πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (10μg) από καπνό που εκφράζει την κατασκευή OeGLU-ΔNLS (Πηγάδι 1 & 4), OeGLU (Πηγάδι 2 & 5) ή Control (Πηγάδι 3). Τα δείγματα είτε υπέστησαν θερμικό σοκ (θερμάνθηκαν) για την πλήρη αποδιάταξη της δομής στους 90 °C για 5min (Πηγάδι 1 & 2), είτε δεν

θερμάνθηκαν (Πηγάδι 3 έως 5) πριν την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (6%). Αριστερά του (A) παρατίθενται τα μοριακά μεγέθη σε kDa.

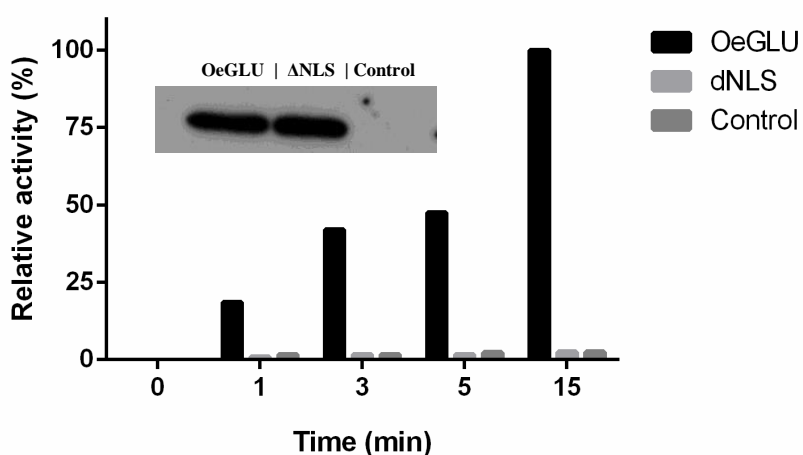
Από την ανάλυση αυτή (Εικόνα 3.28) προέκυψε ότι η μετάλλαξη εξάλειψης του NLS επηρεάζει δραματικά την τεταρτοταγή διαμόρφωση του ενζύμου OeGLU. Συγκεκριμένα παρότι η κατασκευή OeGLU ανοσοανιχνεύεται αποκλειστικά στην πολυμερή διαμόρφωση, η κατασκευή OeGLU-ΔNLS ανοσοανιχνεύεται αποκλειστικά σαν μονομερές στα δείγματα τα οποία δεν υπέστησαν αποδιάταξη με θέρμανση πριν την ηλεκτροφόρηση. Προκειμένου να υποστηριχτεί περαιτέρω το αποτέλεσμα αυτό, έγινε ανάλυση BiFC με την κατασκευή OeGLU-ΔNLS και δεν ήταν εφικτός ο εντοπισμός φθορισμού στο κυτταρόπλασμα λόγω ανασύστασης του YFP (Εικόνα 3.29). Συνεπώς δυο μονομερή του OeGLU-ΔNLS δεν μπορούν να αλληλεπιδράσουν. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την σημαντικότητα του C-άκρου του OeGLU στην τεταρτοταγή δομή του ενζύμου και δηλώνουν ότι είτε το ένζυμο για να πολυμεριστεί απαιτείται πρώτα η είσοδος του στον πυρήνα σαν μονομερές, είτε ότι το NLS είναι τμήμα ενός σιναλού συμπλοκοποίησης που βρίσκεται στο C-άκρο του ενζύμου.



Εικόνα 3.29: Ανάλυση BiFC του διμερισμού του OeGLU-ΔNLS και του OeGLU σε επιδερμικά κύτταρα φύλλων καπνού που έχουν υποστεί αγραέγχυση με το συνδυασμό καλλιεργειών που αναγράφεται αριστερά της εικόνας. Κλίμακα = 25μm, YFP^N (aa 1-155) και YFP^C (aa 156-239).

Δεδομένου ότι το NLS του ενζύμου είναι εκτός του προτεινόμενου ενεργού κέντρου του OeGLU (Εικόνα 3.19) καθώς και ότι δεν είναι μέρος της βασικής (β/α)₈ TIM barrel τριτοταγούς δομής (Εικόνα 3.27) διερευνήθηκε το κατά η μετάλλαξη ΔNLS που οδηγεί σε μονομερή τεταρτοταγή διαμόρφωση, επηρεάζει και την δραστηριότητα του ενζύμου (Εικόνα 3.30). Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι παρότι οι κατασκευές OeGLU και OeGLU-ΔNLS εκφράζονται σε ισοποσότητες, όπως

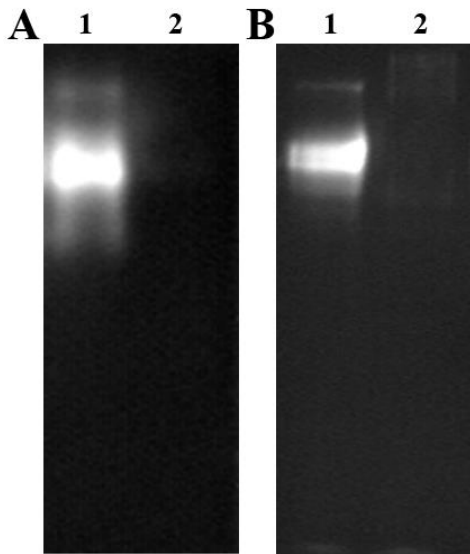
αποδεικνύεται με την ανοσοανίχνευση κατά Western, η απογλυκοζυλίωση της ολευρωπαΐνης είναι μη μετρήσιμη στην περίπτωση της κατασκευής OeGLU-ΔNLS όπως και στο Control. Επομένως η μετάλλαξη ΔNLS οδηγεί σε μη λειτουργικό ένζυμο και κατ'επέκταση η τεταρτοταγής πολυμερισμένη διαμόρφωση του OeGLU είναι βασική προϋπόθεση ώστε το ένζυμο να είναι λειτουργικό.



Εικόνα 3.30: Σχετική ενεργότητα ως προς την απογλυκοζυλίωση της ολευρωπαΐνης μεταξύ των κατασκευών OeGLU, OeGLU-ΔNLS και του Control.

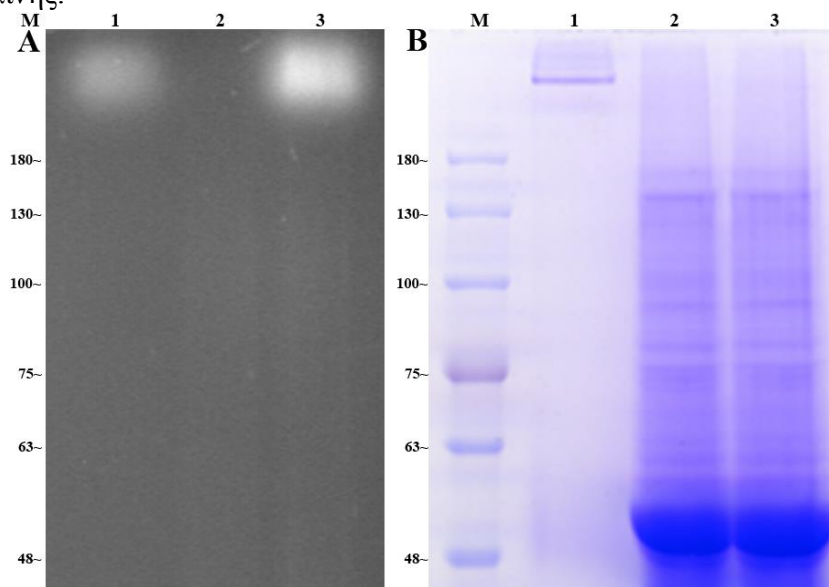
3.9 Ανίχνευση της απογλυκοζυλίωσης της ολευρωπαΐνης με ζυμογράμματα

Δεδομένου ότι η γλυκοζυλιωμένη μορφή της ολευρωπαΐνης είναι ένας μεταβολίτης που δεν φθορίζει υπό UV ακτινοβολία (Obied et al., 2007), διερευνήθηκε η πιθανότητα ανίχνευσης της απογλυκοζυλίωσης με ζυμόγραμμα ώστε να συγκριθεί το ένζυμο OeGLU με άλλες ενδογενείς β-γλυκοσιδάσες της ελιάς που πιθανώς υδρολύουν την ολευρωπαΐνη. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε αρχικά απομονωμένη β-γλυκοσιδάση της αμυγδαλιάς, ένα εμπορικά διαθέσιμο ένζυμο που χρησιμοποιείται συχνά για την παραγωγή άγλυκης ολευρωπαΐνης (Carasso et al., 1997). Το αποτέλεσμα ήταν εντυπωσιακό καθώς το ίδιο πρότυπο φθορισμού που προέκυψε όταν η πηκτή πολυακρυλαμίδης επώαστηκε με την ουσία MUGlc (4-methylumbelliferyl-β-d-glucopyranoside) η οποία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ενζυμικής δραστηριότητας β-γλυκοσιδάσης, προέκυψε και όταν η πηκτή επώαστηκε με ολευρωπαΐνη (Εικόνα 3.31). Σήμα φθορισμού δεν ανιχνεύτηκε στα δείγματα που είχαν υποστεί θέρμανση πριν την ηλεκτροφόρηση συνεπώς το σήμα οφείλεται στην ενζυμική απογλυκοζυλίωση της ολευρωπαΐνης.



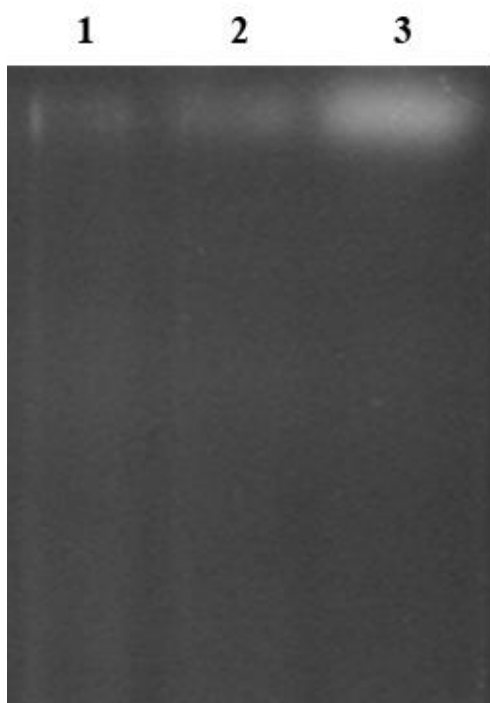
Εικόνα 3.31: Ανίχνευση της απογλυκοζυλίωσης της ολευρωπαΐνης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Τα ζυμογράμματα προέκυψαν μετά από επώαση της πηκτής με 1.5mM MUGlc (A) ή 3mM ολευρωπαΐνης (B). Σε κάθε πηγάδι ηλεκτροφορήθηκαν 10μg β-γλυκοσιδάσης της αμυγδαλιάς και τα δείγματα είτε δεν θερμάνθηκαν (Πηγάδι 1) είτε θερμάνθηκαν στους 90 °C για 5min (Πηγάδι 2) πριν την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή συγκέντρωσης 10%.

Συνεπώς η απογλυκοζυλίωση της ολευρωπαΐνης είναι μια αντίδραση που παράγει φθορισμό και στην συνέχεια η ίδια τεχνική εφαρμόστηκε σε πρωτεϊνικά εκχύλισμα από καπνό που είτε εκφράζουν παροδικά το OeGLU είτε έχουν αγροεγχυθεί με καλλιέργειες που φέρουν άδειο πλασμίδιο pGPTV-35S (Control) καθώς και πρωτεϊνικό εκχύλισμα από μεσοκάρπιο ελιάς (Εικόνα 3.32). Όπως ήταν αναμενόμενο στο δείγμα με εκχύλισμα από καπνό που είχε αγροεγχυθεί με άδειο πλασμίδιο δεν ανιχνεύθηκε σήμα. Ωστόσο τόσο το δείγμα από καπνό που εκφράζει παροδικά το OeGLU όσο και το δείγμα από μεσοκάρπιο ελιάς, παρουσίασαν ακριβώς το ίδιο πρότυπο φθορισμού που αντιστοιχίζεται στην πολυμερή διαμόρφωση του OeGLU. Αυτό το αποτέλεσμα δηλώνει ότι το ένζυμο OeGLU είναι η μόνη β-γλυκοσιδάση από την ελιά εξειδικευμένη για την απογλυκοζυλίωση της ολευρωπαΐνης.



Εικόνα 3.32: Ανίχνευση της απογλυκοζυλίωσης της ολευρωπαΐνης σε πηκτική πολυακρυλαμίδης (A) και χρώση CBB (B). Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από μεσοκάρπιο ελιάς στις 17 εβδομάδες μετά την άνθηση (Πηγάδι 1, 2.5μg), από καπνό που έχει γίνει αγρόεγχυση με το βακτήρια που φέρουν το πλασμίδιο pGPTV-35S (Πηγάδι 2, 25μg) ή από καπνό που έχει γίνει αγρόεγχυση με βακτήρια που φέρουν το πλασμίδιο pGPTV-35S-OeGLU ηλκτροφορήθηκαν σε πηκτική πολυακρυλαμίδης (7%) και στην συνέχεια επώαστηκαν με 1.5mM ολευρωπαΐνης. Τα μοριακά μεγέθη παρατίθενται αριστερά σε kDa.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η δραστηριότητα του ενζύμου OeGLU δεν επηρεάστηκε από την παρουσία SDS και β-μερκαπτοεθανόλης στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλκτροφόρησης (Εικόνα 3.33). Παρότι αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να φαίνεται αντιφατικό με τις αρχές της ζυμογραφίας, είναι γνωστό ότι αρκετές φυτικές β-γλυκοσιδάσες έχουν συμπαγή τεταρτοταγή δομή και τα ένζυμα αυτά παραμένουν ενεργά παρουσία έως 3.2% SDS και 5% β-μερκαπτοεθανόλη (Esen and Gungor, 1991) ή παρουσιάζουν ακόμα και αυξημένη ενεργότητα παρουσία αναγωγικών παραγόντων (Esen, 1992; Odoux et al., 2003).



Εικόνα 3.33: Ανίχνευση της απογλυκοζυλίωσης της ολευρωπαΐνης σε πηκτική πολυακρυλαμίδης παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων. Ηλκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 10% πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από καπνό που εκφράζει παροδικά το OeGLU (25μg), απουσία SDS και β-μερκαπτοεθανόλης (Πηγάδι 1), παρουσία 0.5% SDS (Πηγάδι 2) ή παρουσία 0.5% SDS και 0.2% β-μερκαπτοεθανόλης (Πηγάδι 3).

4 Συζήτηση

Η εξελικτική πίεση που ασκείται λόγω αλληλεπιδράσεων των φυτών με φυτοφάγους οργανισμούς έχει οδηγήσει τα μεν φυτά να θωρακιστούν με γλυκοζυλιωμένους αμυντικούς δευτερογενείς μεταβολίτες που ενεργοποιούνται από εξειδικευμένες ενδογενείς β-γλυκοσιδάσες παρέχοντας ισχυρά οπλοστάσια απέναντι σε ευρύ φάσμα παθογόνων (Morant et al., 2008a) αλλά από την άλλη έχει οδηγήσει στην ύπαρξη προσαρμοσμένων παθογόνων ικανών να προσπερνούν αυτά τα δυαδικά συστήματα άμυνας (Pentzold et al., 2014; Ben-Yosef et al., 2015). Προκειμένου να αποφευχθεί η αυτοτοξικότητα, οι μεταβολίτες αυτοί αποθηκεύονται σε διακριτά υποκυτταρικά διαμερίσματα από τις β-γλυκοσιδάσες που τα απογλυκοζυλιώνουν και η μαζική παραγωγή του βιοδραστικού άγλυκου μεταβολίτη γίνεται μετά από ρήξη της κυτταρικής δομής. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αμυντικών μεταβολιτών που ενεργοποιούνται από εξειδικευμένες β-γλυκοσιδάσες είναι τα κυανογόνα γλυκοσίδια (Gleadow and Møller, 2014), τα θειογλυκοσίδια (Halkier and Gershenzon, 2006), τα γλυκοσίδια του υδροξαμικού οξέος (βενζοξαζινοειδή) (Sicker et al., 2000) και τα αβενακοσίδια (Nisius, 1988).

Τα ολεοσίδια είναι μια υποκατηγορία των σεκοϊριδοειδών που απαντώνται αποκλειστικά στην οικογένεια Oleaceae και η ολευρωπαΐνη είναι το επικρατέστερο σεκοϊριδοειδές στην ελιά (*O. europaea*) στο οποίο έχει προσανατολιστεί η έρευνα λόγω του ότι εμπλέκεται στην άμυνα του φυτού αλλά και έχει ιδιαίτερο φαρμακευτικό ενδιαφέρον (Konno et al., 1999; Soler-Rivas et al., 2000; Bulotta et al., 2013). Ο μηχανισμός άμυνας της ολευρωπαΐνης έχει περιγραφεί στο φυτό *Ligustrum obtusifolium* (Oleaceae) και η απογλυκοζυλίωση της από ενδογενή β-γλυκοσιδάση οδηγεί στην παραγωγή του βιοδραστικού άγλυκου μεταβολίτη με δομή α,β ακόρεστης αλδεΐδης και δράση παρόμοια με αυτή της γλουταραλδεΐδης (Konno et al., 1999). Η άγλυκη μορφή προσδένεται ομοιοπολικά στην αμινομάδα των αμινοξέων οδηγώντας σε μαζική διασύνδεση μεταξύ των πρωτεϊνών και την δημιουργία μεγαλομοριακών συμπλόκων. Με αυτό τον τρόπο μειώνεται η θρεπτική αξία του ιστού και επηρεάζεται η φυσιολογία των παθογόνων (Konno et al., 1997; Konno et al., 1999).

Παρότι ο μηχανισμός άμυνας είναι γνωστός, δεν έχει περιγραφεί σε κανένα μέλος της οικογένειας Oleaceae κάποιο γονίδιο ή cDNA το οποίο να κωδικοποιεί για μια β-γλυκοσιδάση ικανή για την ενεργοποίηση της ολευρωπαΐνης. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, περιγράφεται η ετερόλογη έκφραση και ο μοριακός χαρακτηρισμός του ενζύμου OeGLU (Q8GVD0), μιας GH1 β-γλυκοσιδάσης της ελιάς που απογλυκοζυλιώνει και συνεπώς ενεργοποιεί την ολευρωπαΐνη (Koudounas et al., 2015). Αυτή η ενζυμική αντίδραση εκτός από μεγάλη συνεισφορά στην άμυνα του φυτού, είναι και η αρχική και καθοριστικής σημασίας αντίδραση που επηρεάζει την ποιότητα του ελαιολάδου σε παράγωγα σεκοϊριδοειδών στα οποία ανάγονται αρκετές από τις ευεργετικές, για τον άνθρωπο, ιδιότητες αυτού (Obied et al., 2008; Romero-Segura et al., 2012; Hbaieb et al., 2015).

Η φυλογενετική ανάλυση της αμινοξικής ακολουθίας του OeGLU έδειξε ότι το ένζυμο κατατάσσεται στις αμυντικές GH1 β-γλυκοσιδάσες και συγκεκριμένα ομαδοποιείται με ένζυμα που υδρολύουν αλκαλοειδή του ινδολίου (στρικτοσιδίνη και ραουκαφρισίνη), αλκαλοειδή της ισοκινολίνης (ιπεκοσίδιο) και στεροειδή γλυκοσίδια (καρδενολίδιο). Το OeGLU έχει μεγαλύτερη ομοιότητα με την β-γλυκοσιδάση του καρδενολιδίου από το φυτό *Digitalis lanata*. Πολλαπλή στοίχιση αυτών των αμινοξικών ακολουθιών καθώς και *in silico* μοριακή προσκόλληση της ολευρωπαΐνης στο OeGLU έδειξε ότι το ένζυμο περιέχει όλα τα συντηρημένα μοτίβα και αμινοξέα που εμπλέκονται στην αναγνώριση και υδρόλυση του μορίου γλυκόζης από την ολευρωπαΐνη. Ωστόσο μικρή συντήρηση παρατηρήθηκε σε αμινοξέα που εντοπίζονται στο προτεινόμενο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου και είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση του άγλυκου τμήματος της ολευρωπαΐνης όπως τα Trp204, Ser205, Gln209, Phe216, Cys291, και Phe498 σε σχέση με τα αμινοξέα στις αντίστοιχες θέσεις των άλλων ενζύμων. Το αποτέλεσμα αυτό δηλώνει ότι τα ένζυμα RsRAU, RsSTR και OeGLU έχουν υψηλή εκλεκτικότητα ως προς τα γλυκοσίδια που αναγνωρίζουν και υδρολύουν. Είναι γνωστό ότι η β-γλυκοσιδάση της ραουκαφρισίνης (EC 3.2.1.125) και η β-γλυκοσιδάση της στρικτοσιδίνης (EC 3.2.1.105) είναι δυο ένζυμα του φυτού *Rauvolfia serpentina* τα οποία παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση ως προς τα υποστρώματα τους και συγκεκριμένα η β-γλυκοσιδάση της στρικτοσιδίνης δεν μπορεί να απογλυκοζυλιώσει την ραουκαφρισίνη ενώ η β-γλυκοσιδάση της ραουκαφρισίνης έχει περίπου 1% σχετική δραστηριότητα με την στρικτοσιδίνη σε σύγκριση με την ραουκαφρισίνη (Barleben et

al., 2007; Xia et al., 2012). Η υψηλή εξειδίκευση των μελών της GH1 οικογένειας οφείλεται στα αμινοξέα που αναγνωρίζουν το άγλυκο τμήμα των υποστρωμάτων τους (Hösel and Conn, 1982; Seshadri et al., 2009).

In silico ανάλυση της αμινοξικής ακολουθίας του OeGLU έδειξε ότι υπάρχει NLS (Nuclear Localization Signal). Τρεις ανεξάρτητες προσεγγίσεις (υποκυτταρική κλασμάτωση, μικροσκοπία φθορισμού σε χημεικές κατασκευές με YFP και ανάλυση BiFC) απέδειξαν ότι υποκυτταρικά το ένζυμο OeGLU τοποθετείται στον πυρήνα και διαγραφή του σινιάλου πυρηνικής τοποθέτησης (NLS) οδηγεί σε κυτταροπλασματική τοποθέτηση του. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η πρωτεϊνική ακολουθία δεν περιέχει NES (Nuclear Export Signal). Έτσι το κύτταρο που παράγει την πρωτεΐνη την οδηγεί στον πυρήνα μέσω του NLS όμως δεν μπορεί η πρωτεΐνη που έχει εισέλθει στον πυρήνα να εξέλθει παρά μόνο μετά από ρήξη. Δυο πολύ κοντινές εξειδικευμένες β-γλυκοσιδάσες, η β-γλυκοσιδάση της στρικτοσιδίνης και η β-γλυκοσιδάση της ραουκαφρισίνης, οι οποίες εμπλέκονται στην απογλυκοζυλίωση αλκαλοειδών καθώς και μια αμυντική β-γλυκοσιδάση εξειδικευμένη για φλαβονοειδή έχουν επίσης αποδειχθεί ότι τοποθετούνται υποκυτταρικά στον πυρήνα των κυττάρων μέσω κατασκευών με GFP (Naoumkina et al., 2007; Guirimand et al., 2010). Επίσης ισχυρή δραστηριότητα β-γλυκοσιδάσης μέσω in situ χρώσης έχει παρατηρηθεί στον πυρήνα κυττάρων από καρπό ελιάς (Mazzuca et al., 2006) και η δραστηριότητα αυτή επάγεται έντονα σε κύτταρα που περιβάλλουν σημεία προσβολής (Spadafora et al., 2008). Η πυρηνική τοποθέτηση του ενζύμου ικανοποιεί την συνθήκη διακριτής υποκυτταρικής τοποθέτησης των δυαδικών συστημάτων άμυνας (ένζυμο – μεταβολίτης), αφού η ολευρωπαΐνη αποθηκεύεται στην αδρανή γλυκοζυλιωμένη μορφή στο χυμοτόπιο ή στο κυτταρόπλασμα (Konno et al., 1998; Bitonti et al., 2000). Αξίζει να σημειωθεί ότι πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει ότι ένζυμα που σχετίζονται τόσο με τον αναβολισμό (Saslowsky et al., 2005) όσο και με τον καταβολισμό (Stavrinides et al., 2015) εξειδικευμένων δευτερογενών μεταβολιτών τοποθετούνται υποκυτταρικά στον πυρήνα συνεπώς ο φυτικός πυρήνας φαίνεται να συμμετέχει ενεργά, αν και μέχρι στιγμής υποεκτιμημένα, στην βιοσύνθεση και στην αποικοδόμηση δευτερογενών μεταβολιτών.

Προκειμένου να ελεγχθεί η δυνατότητα του ενζύμου OeGLU να υδρολύσει και συνεπώς να ενεργοποιήσει την ολευρωπαΐνη, σύμφωνα με το δυαδικό σύστημα

άμυνας ολευρωπαΐνης/β-γλυκοσιδάσης που έχει προταθεί (Konno et al., 1999), έγινε ετερόλογη έκφραση του ενζύμου και ενεργότητα εντοπίστηκε μόνο μετά από παροδική έκφραση σε φύλλα φυτών *N. benthamiana* μέσω του πρωτόκολλου της αγραέγχυσης. Πολυάριθμες προσπάθειες για παραγωγή ενεργού OeGLU σε *Escherichia coli* απέτυχαν. Πιθανότατα αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το ένζυμο OeGLU χρειάζεται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ώστε να καταστεί ενεργό. Η έλλειψη μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων έχει αναφερθεί ότι είναι ο λόγος που δεν ήταν εφικτή η ανίχνευση ενζυμικής δραστηριότητας σε τρεις β-γλυκοσιδάσες του *Arabidopsis thaliana* που εκφράστηκαν σε *E. coli* και ζύμη (Ahn et al., 2010). Επίσης συγκρίσιμη ενζυμική δραστηριότητα της ετερόλογα εκφραζόμενης β-γλυκοσιδάσης του καρδενολιδίου με το φυσικά απομονωμένο ένζυμο από το φυτό *Digitalis lanata* ήταν εφικτή μόνο μετά από έκφραση του ενζύμου σε θυσανώδεις ρίζες (Shi and Lindemann, 2006).

Η ετερόλογη έκφραση του OeGLU σε φύλλα καπνού ανοσοανιχνεύθηκε στο αναμενόμενο μέγεθος και πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τα φύλλα αυτά είχαν την δυνατότητα να απογλυκοζυλιώσουν την ολευρωπαΐνη και να μειωθεί η συγκέντρωση της χρονοεξαρτώμενα. Η ενζυμική δραστηριότητα του OeGLU ήταν ιδιαίτερα εξειδικευμένη ως προς την ολευρωπαΐνη σε σχέση με άλλα γλυκοσίδια που δοκιμάστηκαν. Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από φύλλα που είχε γίνει αγραέγχυση με βακτήρια που φέρουν το πλασμίδιο χωρίς ένθεση, δεν είχαν την δυνατότητα υδρόλυσης της ολευρωπαΐνης στους χρόνους ενζυμικής αντίδρασης που ελέγχθηκαν συνεπώς απαιτείται δραστηριότητα εξειδικευμένης β-γλυκοσιδάσης για την απογλυκοζυλίωση του μεταβολίτη, όπως έχει ήδη προταθεί (Gutierrez-Rosales et al., 2010, 2012). Το ένζυμο OeGLU φαίνεται να πληροί τα κριτήρια για μια σχετιζόμενη με άμυνα β-γλυκοσιδάση αφού υδρολύει την ολευρωπαΐνη παράγοντας τον βιοδραστικό άγλυκο μεταβολίτη που οδηγεί στην μαζική διασύνδεση των πρωτεϊνών. Το αποτέλεσμα από την ανάλυση EMSA έδειξε ότι η πρωτεΐνη BSA εντοπίζεται σαν μεγαλομοριακά συσσωματώματα λόγω της ικανότητας της άγλυκης ολευρωπαΐνης, που παράγεται από το OeGLU, να δρα σαν διασυνδέτης μεταξύ των αμινοξέων. Πρόσφατες τρανσκριπτομικές και πρωτεομικές μελέτες έδειξαν αύξηση της έκφρασης του OeGLU σε καρπούς που έχουν προσβληθεί από τον δάκο (*Bactrocera oleae*) (Corrado et al., 2012) ή από το ενδοφυτικό *Pseudomonas fluorescens* στις

ρίζες του φυτού (Schilirò et al., 2012) αναδεικνύοντας τον συμμετοχή του ενζύμου στην άμυνα.

Το απομονωμένο ένζυμο από φυτά καπνού που εκφράζουν παροδικά το OeGLU επέδειξε μεγάλη συγγένεια για την ολευρωπαΐνη με την σταθερά Michaelis-Menten (K_m) να είναι ίση με 2.26 mM. Αυτό το αποτέλεσμα είναι σε συμφωνία με άλλες δημοσιεύσεις που περιγράφουν φυσικά απομονωμένες β-γλυκοσιδάσες από το φυτό και συγκεκριμένα η σταθερά K_m για την ολευρωπαΐνη έχει αναφερθεί να είναι ίση με 2.78 mM (Gutierrez-Rosales et al., 2012) και 3.8 mM (Romero-Segura et al., 2009). Το αποτέλεσμα δείχνει ότι η ετερόλογη έκφραση του OeGLU δεν επηρεάζει την τριτοταγή/τεταρτοταγή δομή του ενζύμου ούτε και την ενζυμική και καταλυτική δραστηριότητα του. Το *in planta* ετερόλογα εκφρασμένο ένζυμο OeGLU, λοιπόν έχει συγκρίσιμη συγγένεια για την ολευρωπαΐνη με άλλες αναφορές και σίγουρα μεγαλύτερη συγγένεια από την β-γλυκοσιδάση της αμυγδαλιάς με τιμή K_m για το συγκεκριμένο υπόστρωμα ίση με 4.66 mM (Carasso et al., 1997). Το βέλτιστο pH και η βέλτιστη θερμοκρασία για την ενζυμική αντίδραση βρέθηκαν να είναι ίσα με 5.5 και 37 °C αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά επίσης συμφωνούν με δημοσιεύσεις όπου μελετάται η κινητική φυσικά απομονωμένων β-γλυκοσιδασών από την ελιά (Romero-Segura et al., 2009; Kara et al., 2011). Συνεπώς το cDNA του OeGLU που εκφράζεται στον καπνό οδηγεί στην παραγωγή ενεργού ενζύμου με παρόμοια βιοχημικά χαρακτηριστικά με την ενδογενή β-γλυκοσιδάση της ελιάς που είναι υπεύθυνη για την απογλυκοζυλίωση της ολευρωπαΐνης. Επίσης φάνηκε ότι παρότι η παρουσία πρωτεΐνης BSA στο διάλυμα όπου λαμβάνει χώρα η αντίδραση είναι σημαντική ώστε το ένζυμο OeGLU να παραμείνει ενεργό για μεγάλα χρονικά διαστήματα, η ενεργότητα του ενζύμου μειώθηκε λιγότερο από 30%. Αυτό το αποτέλεσμα δηλώνει ότι αν και η παραγόμενη άγλυκη μορφή της ολευρωπαΐνης προκαλεί μαζική διασύνδεση και συμπλοκοποίηση των πρωτεϊνών (Konno et al., 1999; Koudounas et al., 2015) το ένζυμο OeGLU παραμένει ενεργό πιθανώς λόγω της μεγαλομοριακής *in vivo* τεταρτοταγούς δομής του.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η τεταρτοταγής δομή του ενζύμου OeGLU, εξετάστηκε αρχικά το κατά πόσο δυο μονομερή του ενζύμου μπορούν να αλληλεπιδράσουν μέσω της τεχνικής BiFC (Walter et al., 2004). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι όντως δυο μονομερή του OeGLU έχουν φυσική επαφή αφού εντοπίστηκε φθορισμός λόγω ανασύστασης του YFP στον πυρήνα των

κυττάρων καπνού και συνεπώς το OeGLU είναι τουλάχιστον ομοδιμερές. Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από καπνό που εκφράζουν παροδικά το OeGLU έδειξε ότι in planta το OeGLU εντοπίζεται επικρατέστερα ως μεγαλομοριακό σύμπλοκο μεγέθους 622kDa. Αρκετές φυτικές β-γλυκοσιδάσες έχουν βρεθεί να σχηματίζουν υπερμοριακές δομές έως 1,500kDa (Nisius, 1988; Fieldes and Gerhardt, 1994; Falk et al., 1995; Geerlings et al., 2000). Δεδομένου ότι το OeGLU εκφράστηκε στον καπνό όπου δεν παράγεται ολευρωπαΐνη και σύμφωνα με τα ζυμογράμματα (Koudounas et al., 2015) είχε το ίδιο μοριακό μέγεθος με την ενδογενή β-γλυκοσιδάση από ιστό ελιάς, το συμπέρασμα είναι ότι το OeGLU αυτόνομα ομοπολυμερίζεται και η μεγαλομοριακή διαμόρφωση δεν οφείλεται στην πιθανή μαζική συμπλοκοποίηση λόγω παραγωγής άγλυκης ολευρωπαΐνης κατά την απομόνωση πρωτεϊνών. Εναλλακτικά κοινοί ή/και εξειδικευμένοι μηχανισμοί/παράγοντες συμπλοκοποίησης που πιθανώς είναι παρόντες στον πυρήνα κυττάρων του καπνού θα μπορούσαν να πολυμερίσουν το OeGLU. Αυτή η περίπτωση όμως είναι λιγότερη πιθανή καθώς η πολύ κοντινή β-γλυκοσιδάση της στρικτοσιδίνης θεωρείται ότι είναι ομοπολυμερές (Geerlings et al., 2000). Έχει προταθεί ότι οι μεγαλομοριακές τεταρτοταγείς διαμορφώσεις των β-γλυκοσιδασών ενισχύουν την ενζυμική δραστηριότητα (Kim and Kim, 1998; Lee et al., 2006).

Αρκετά εντυπωσιακό αποτέλεσμα ήταν το γεγονός ότι η μετάλλαξη εξάλειψης του σινιάλου NLS, το οποίο βρίσκεται στα εννιά προτελευταία αμινοξέα του C-άκρου του OeGLU οδήγησε σε δραματική αλλαγή της τεταρτοταγούς δομής. Συγκεκριμένα παρότι η κατασκευή OeGLU ανοσοανιχνεύεται αποκλειστικά στην πολυμερή διαμόρφωση, η κατασκευή OeGLU-ΔNLS ανοσοανιχνεύεται αποκλειστικά σαν μονομερές. Πιθανότατα το NLS είναι τμήμα ενός σινιάλου συμπλοκοποίησης που βρίσκεται στο C-άκρο του OeGLU. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται περαιτέρω και από το γεγονός ότι ανάλυση BiFC της κατασκευής *OeGLU-ΔNLS* δεν έδωσε φθορισμό στο κυτταρόπλασμα συνεπώς δυο μονομερή του OeGLU-ΔNLS δεν είχαν φυσική αλληλεπίδραση. Η σημαντικότητα του C-άκρου του OeGLU στην τεταρτοταγή διαμόρφωση επιβεβαιώνεται και από το διαφορετικό πρότυπο φθορισμού μεταξύ των κατασκευών *OeGLU-YFP* και *YFP-OeGLU* στον πυρήνα. Στην κατασκευή *YFP-OeGLU* όπου έχει γίνει σύντηξη του YFP στο N-άκρο του OeGLU, το πρότυπο φθορισμού ήταν στικτό γεγονός που αποτελεί ένδειξη της

συμπλοκοποίησης και μεγαλομοριακής τεταρτοταγούς διαμόρφωσης του OeGLU στον πυρήνα ενώ στην κατασκευή *OeGLU-YFP* το παραπάνω πρότυπο φθορισμού δεν παρατηρήθηκε και αντιθέτως ο φθορισμός ήταν διάχυτος στον πυρήνα πιθανότατα λόγω του ότι η σύντηξη του YFP στο C-άκρο του OeGLU αλλάζει την τριτοταγή διαμόρφωση του C-άκρου επηρεάζοντας την αλληλεπίδραση των μονομερών. Έχει προταθεί, μέσω χημικών κατασκευών με YFP, ότι το C-άκρο της β-γλυκοσιδάσης της στρικτοσιδίνης εμπλέκεται στην τεταρτοταγή διαμόρφωση του μεγαλομοριακού ενζύμου (Guirimand et al., 2010). Έτσι η πρωτεΐνη οδηγείται στον πυρήνα λόγω του NLS και συμπλοκοποιείται (ομοπολυμερές) καθιστώντας αδύνατη την εξαγωγή της από τον πυρήνα, διότι δεν έχει NES αλλά και λόγω της μεγαλομοριακής δομής του με μέγεθος πολύ μεγαλύτερο από το όριο των βιοπολυμερών (40 kDa) που μπορούν να διέλθουν μέσω του πυρηνικού πόρου παθητικά (Freitas and Cunha, 2009). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι ένα τόσο πολύ δραστικό-αμυντικό σύστημα είναι αυστηρά διαμερισματοποιημένο για την αποφυγή οποιασδήποτε αυτοκαταστροφής όταν το κύτταρο βρίσκεται κάτω από φυσιολογικές-λειτουργικές συνθήκες (μεσόφυλλικό κύτταρο ή φωτοσυνθετικό κύτταρο του μεσοκαρπίου (Koudounas et al., 2015).

Η μετάλλαξη εξάλειψης του NLS στην κατασκευή OeGLU-ΔNLS πέρα από δομική μετάλλαξη η οποία οδηγεί σε μονομερή διαμόρφωση του ενζύμου, επηρέασε δραματικά και την ενεργότητα του ενζύμου αφού η δυνατότητα απογλυκοζυλίωσης της ολευρωπαΐνης ήταν μη μετρήσιμη. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το NLS είναι εκτός της βασικής (β/α)₈ TIM barrel τριτοταγούς δομής του ενζύμου καθώς και ότι κανένα από τα αμινοξέα που υπολογίστηκαν μέσω μοντελοποίησης ότι αποτελούν το ενεργό κέντρο του ενζύμου δεν είναι κοντά στο NLS, η μετάλλαξη εξάλειψης του NLS είτε οδηγεί σε μη λειτουργικό ένζυμο είτε η παραγόμενη άγλυκη ολευρωπαΐνη καθιλώνει ακαριαία την ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου. Δεδομένου ότι η ενεργότητα του OeGLU δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα από την άγλυκη ολευρωπαΐνη, όπως φάνηκε από τις μετρήσεις παρουσία ή απουσία BSA στην ενζυμική αντίδραση, πιθανώς η πολυμερής τεταρτοταγής διαμόρφωση του ενζύμου να είναι απαραίτητη προϋπόθεση ώστε το ένζυμο να είναι ανθεκτικό στο προϊόν της αντίδρασης που καταλύει. Ένα αρκετά παρόμοιο σενάριο έχει περιγραφεί στην αμυντική β-γλυκοσιδάση του DIMBOA από το φυτό *Triticum aestivum* (Sue et al., 2006). Το ένζυμο αυτό σχηματίζει ομο- και έτερο- εξαμερή και στην μονομερή διαμόρφωση δεν είναι

λειτουργικό. Μετάλλαξη υποκατάστασης των 25 αμινοξέων από το N-άκρο του με τα αντίστοιχα αμινοξέα του ομόλογου ενζύμου από το *Zea mays*, το οποίο απαντάται ως διμερές, οδήγησε σε αποκλειστικά διμερή διαμόρφωση των χιμαιρικών ενζύμων με οριακά μετρήσιμη δραστικότητα με το φυσικό υπόστρωμα DIMBOA. Συνεπώς τα άκρα των β-γλυκοσιδασών φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην τεταρτοταγή διαμόρφωση των ενζύμων ελέγχοντας την αυστηρά και εκτός αυτού η σωστή τεταρτοταγής δομή είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ενζυμική δραστικότητα.

Η ανίχνευση ενζυμικής δραστικότητας μέσω ζυμογραμμάτων είναι μια αξιόπιστη τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό πληθώρας αντιδράσεων (Gabriel and Gersten, 1992) και εάν συνδυαστεί με κάποιο εξειδικευμένο υπόστρωμα τότε είναι εφικτή η άμεση ανίχνευση εξειδικευμένων ενζύμων από ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (Luijendijk et al., 1996). Η γλυκοζυλιωμένη ολευρωπαΐνη είναι μια μη φθορίζουσα ουσία (Obied et al., 2007) αλλά η απογλυκοζυλίωση της από εξειδικευμένη β-γλυκοσιδάση οδηγεί στην παραγωγή φθορισμού όπως φάνηκε από τα ζυμογράμματα. Το πρότυπο φθορισμού μεταξύ πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από φύλλα καπνού που εκφράζουν παροδικά το OeGLU και πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από καρπό ελιάς ήταν ίδια αποτέλεσμα που δηλώνει ότι το ένζυμο OeGLU είναι η βασική β-γλυκοσιδάση που εξειδικευμένα απογλυκοζυλιώνει την ολευρωπαΐνη. Το γεγονός ότι η αντίδραση αυτή παράγει φθορισμό δεν έχει αναφερθεί ξανά στην βιβλιογραφία και σαν τεχνική επιτρέπει την εξαιρετικά εξειδικευμένη ανίχνευση ισοενζύμων μεταξύ μελών της οικογένειας Oleaceae, την εύκολη ανάλυση πρωτεϊνικών κλασμάτων κατά τα στάδια απομόνωσης και καθαρισμού ισοενζύμων καθώς και την άμεση και γρήγορη σάρωση μικροοργανισμών που υδρολύουν την ολευρωπαΐνη, ένα πεδίο έντονου ενδιαφέροντος για το βιολογικό ξεπίκρισμα των ελιών και άλλες βιοτεχνολογικές χρήσεις (Ciafardini et al., 1994; Arroyo-Lopez et al., 2012).

5 Βιβλιογραφία

- Ahn, Y.O., Shimizu, B.-i., Sakata, K., Gantulga, D., Zhou, Z., Bevan, D.R., and Esen, A.** (2010). Scopolin-hydrolyzing β -glucosidases in roots of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **51**, 132-143.
- Amiot, M.J., Fleuriot, A., and Macheix, J.J.** (1986). Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of agricultural and food chemistry* **34**, 823-826.
- Andréasson, E., Jørgensen, L.B., Höglund, A.-S., Rask, L., and Meijer, J.** (2001). Different Myrosinase and Idioblast Distribution in Arabidopsis and Brassica napus. *Plant physiology* **127**, 1750-1763.
- Arroyo-Lopez, F.N., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Rodriguez-Gomez, F., Jimenez-Diaz, R., Garcia-Garcia, P., Querol, A., and Garrido-Fernandez, A.** (2012). Yeasts in table olive processing: desirable or spoilage microorganisms? *International journal of food microbiology* **160**, 42-49.
- Bak, S., Paquette, S., Morant, M., Morant, A., Saito, S., Bjarnholt, N., Zagrobelny, M., Jørgensen, K., Osmani, S., Simonsen, H., Pérez, R., van Heeswijck, T., Jørgensen, B., and Møller, B.** (2006). Cyanogenic glycosides: a case study for evolution and application of cytochromes P450. *Phytochemistry Reviews* **5**, 309-329.
- Barleben, L., Panjkar, S., Ruppert, M., Koepke, J., and Stöckigt, J.** (2007). Molecular Architecture of Strictosidine Glucosidase: The Gateway to the Biosynthesis of the Monoterpenoid Indole Alkaloid Family. *The Plant cell* **19**, 2886-2897.
- Barrett, T., Suresh, C., Tolley, S.P., Dodson, E., and Hughes, M.** (1995). The crystal structure of a cyanogenic β -glucosidase from white clover, a family 1 glycosyl hydrolase. *Structure* **3**, 951-960.
- Barth, C., and Jander, G.** (2006). Arabidopsis myrosinases TGG1 and TGG2 have redundant function in glucosinolate breakdown and insect defense. *The Plant Journal* **46**, 549-562.
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J., and Masterson, R.** (1992). New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant molecular biology* **20**, 1195-1197.
- Beltrán, G., Aguilera, M.P., Rio, C.D., Sanchez, S., and Martinez, L.** (2005). Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils. *Food Chem.* **89**, 207-215.
- Ben-Yosef, M., Pasternak, Z., Jurkevitch, E., and Yuval, B.** (2015). Symbiotic bacteria enable olive fly larvae to overcome host defences.
- Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A.M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., and Lercker, G.** (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils: A survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules* **12**, 1679-1719.
- Besnard, G., Henry, P., Wille, L., Cooke, D., and Chapuis, E.** (2007). On the origin of the invasive olives (*Olea europaea* L., Oleaceae). *Heredity* **99**, 608-619.
- Besnard, G., Garcia-Verdugo, C., De Casas, R.R., Treier, U.A., Galland, N., and Vargas, P.** (2008). Polyploidy in the olive complex (*Olea europaea*): Evidence

- from flow cytometry and nuclear microsatellite analyses. *Annals of botany* **101**, 25-30.
- Bianco, A., and Ramunno, A.** (2006). The Chemistry of *Olea Europaea*. In *Studies in Natural Products Chemistry*, R. Atta ur, ed (Elsevier), pp. 859-903.
- Bianco, A.D., Piperno, A., Romeo, G., and Uccella, N.** (1999a). NMR Experiments of Oleuropein Biomimetic Hydrolysis. *Journal of agricultural and food chemistry* **47**, 3665-3668.
- Bianco, A.D., Muzzalupo, I., Piperno, A., Romeo, G., and Uccella, N.** (1999b). Bioactive derivatives of oleuropein from olive fruits. *Journal of agricultural and food chemistry* **47**, 3531-3534.
- Bitonti, M., Chiappetta, A., Innocenti, A., and Uccella, N.** (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, pp. 515-519.
- Blanchard, D.J., Cicek, M., Chen, J.L., and Esen, A.** (2001). Identification of beta-glucosidase aggregating factor (BGAF) and mapping of BGAF binding regions on maize beta-glucosidase. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 11895-11901.
- Bones, A.M., and Rossiter, J.T.** (2006). The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry* **67**, 1053-1067.
- Boskou, D., Blekas, G., and Tsimidou, M.** (1996). Olive oil composition. *Olive oil: Chemistry and technology* **1996**, 52-83.
- Bouarab, K., Melton, R., Peart, J., Baulcombe, D., and Osbourn, A.** (2002). A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature* **418**, 889-892.
- Bouaziz, E.** (1990). Behaviour of some olive varieties irrigated with brackish water and grown intensively in the central part of Tunisia. In *Acta Horticulturae*, pp. 247-249.
- Bowler, C., Benvenuto, G., Laflamme, P., Molino, D., Probst, A.V., Tariq, M., and Paszkowski, J.** (2004). Chromatin techniques for plant cells. *The Plant Journal* **39**, 776-789.
- Brenes, M., García, A., García, P., and Garrido, A.** (2001). Acid hydrolysis of secoiridoid aglycons during storage of virgin olive oil. *Journal of agricultural and food chemistry* **49**, 5609-5614.
- Brown, K.K., and Hampton, M.B.** (2011). Biological targets of isothiocyanates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1810**, 888-894.
- Buiarelli, F., Berardino, S.D.I., Coccioli, F., Jasionowska, R., and Russo, M.V.** (2004). Determination of phenolic acids in olive oil by capillary electrophoresis. *Ann. Chim.* **94**, 699-705.
- Bulotta, S., Oliverio, M., Russo, D., and Procopio, A.** (2013). Biological activity of oleuropein and its derivatives. In *Natural Products* (Springer), pp. 3605-3638.
- Burgess, R.R.** (2009). Protein Precipitation Techniques. In *Methods in Enzymology*, R.B. Richard and P.D. Murray, eds (Academic Press), pp. 331-342.
- Burmeister, W.P., Cottaz, S., Driguez, H., Iori, R., Palmieri, S., and Henrissat, B.** (1997). The crystal structures of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. *Structure* **5**, 663-675.
- Butters, T.D.** (2007). Gaucher disease. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 412-418.

- Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., and Henrissat, B.** (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* **37**, D233-D238.
- Capasso, R., Evidente, A., Visca, C., Gianfreda, L., Maremonti, M., and Greco, G.** (1997). Production of glucose and bioactive aglycone by chemical and enzymatic hydrolysis of purified oleuropein from *Olea Europea*. *Applied biochemistry and biotechnology* **61**, 365-377.
- Carluccio, M.A., Massaro, M., Scoditti, E., and De Caterina, R.** (2007). Vasculoprotective potential of olive oil components. *Mol. Nutr. Food Res.* **51**, 1225-1234.
- Ciafardini, G., Marsilio, V., Lanza, B., and Pozzi, N.** (1994). Hydrolysis of Oleuropein by *Lactobacillus plantarum* Strains Associated with Olive Fermentation. *Applied and environmental microbiology* **60**, 4142-4147.
- Cicek, M., and Esen, A.** (1999). Expression of soluble and catalytically active plant (monocot) β -glucosidases in *E. coli*. *Biotechnology and Bioengineering* **63**, 392-400.
- Cicek, M., Blanchard, D., Bevan, D.R., and Esen, A.** (2000). The aglycone specificity-determining sites are different in 2, 4-dihydroxy-7-methoxy-1, 4-benzoxazin-3-one (DIMBOA)-glucosidase (maize β -glucosidase) and dhurrinase (sorghum β -glucosidase). *Journal of Biological Chemistry* **275**, 20002-20011.
- Clodoveo, M.L., Hbaieb, R.H., Kotti, F., Mugnozza, G.S., and Gargouri, M.** (2014). Mechanical Strategies to Increase Nutritional and Sensory Quality of Virgin Olive Oil by Modulating the Endogenous Enzyme Activities. *Compr. Rev. Food. Sci. Food Saf.* **13**, 135-154.
- Colomer, R., Moreno-Nogueira, J.M., Garcia-Luna, P.P., Garcia-Peris, P., Garcia-de-Lorenzo, A., Zarazaga, A., Quecedo, L., del Llano, J., Usan, L., and Casimiro, C.** (2007). n-3 Fatty acids, cancer and cachexia: a systematic review of the literature. *Br. J. Nutr.* **97**, 823-831.
- Corrado, G., Alagna, F., Rocco, M., Renzone, G., Varricchio, P., Coppola, V., Coppola, M., Garonna, A., Baldoni, L., Scaloni, A., and Rao, R.** (2012). Molecular interactions between the olive and the fruit fly *Bactrocera oleae*. *Bmc Plant Biol* **12**, 1-17.
- Czjzek, M., Cicek, M., Zamboni, V., Bevan, D.R., Henrissat, B., and Esen, A.** (2000). The mechanism of substrate (aglycone) specificity in beta-glucosidases is revealed by crystal structures of mutant maize beta-glucosidase-DIMBOA, -DIMBOAGlc, and -dhurrin complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 13555-13560.
- Czjzek, M., Cicek, M., Zamboni, V., Burmeister, W., Bevan, D., Henrissat, B., and Esen, A.** (2001). Crystal structure of a monocotyledon (maize ZMGlu1) β -glucosidase and a model of its complex with p-nitrophenyl β -D-thioglucoside. *Biochem. J* **354**, 37-46.
- Damtoft, S., Franzyk, H., and Jensen, S.R.** (1993). Biosynthesis of secoiridoid glucosides in Oleaceae. *Phytochemistry* **34**, 1291-1299.
- Davies, G., and Henrissat, B.** (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**, 853-859.
- del Cueto, J., Dicenta, F., Jørgensen, K., Møller, B.L., and Sánchez-Pérez, R.** (2014). Identification and characterization of prunasin hydrolases in sweet and bitter almonds and their expression in *Nicotiana benthamiana* plants

- (International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium), pp. 83-89.
- Diamantakos, P., Velkou, A., Killday, K.B., Gimisis, T., Melliou, E., and Magiatis, P.** (2015). Oleokoronal and oleomissional: new major phenolic ingredients of extra virgin olive oil. *Olivae* **122**, 22 - 33.
- Dick, R., Rattei, T., Haslbeck, M., Schwab, W., Gierl, A., and Frey, M.** (2012). Comparative Analysis of Benzoxazinoid Biosynthesis in Monocots and Dicots: Independent Recruitment of Stabilization and Activation Functions. *The Plant cell* **24**, 915-928.
- Dixon, D.P., Sellars, J.D., Kenwright, A.M., and Steel, P.G.** (2012). The maize benzoxazinone DIMBOA reacts with glutathione and other thiols to form spirocyclic adducts. *Phytochemistry* **77**, 171-178.
- Doi, R.H., and Kosugi, A.** (2004). Cellulosomes: Plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 541-551.
- El Riachy, M., Priego-Capote, F., León, L., Rallo, L., and Luque de Castro, M.D.** (2011). Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 1: Hydrophilic phenols: A key factor for virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology* **113**, 678-691.
- Escamilla-Treviño, L.L., Chen, W., Card, M.L., Shih, M.-C., Cheng, C.-L., and Poulton, J.E.** (2006). *Arabidopsis thaliana* β -Glucosidases BGLU45 and BGLU46 hydrolyse monolignol glucosides. *Phytochemistry* **67**, 1651-1660.
- Esen, A.** (1992). Purification and Partial Characterization of Maize (*Zea mays* L.) beta-Glucosidase. *Plant physiology* **98**, 174-182.
- Esen, A., and Gungor, G.** (1991). Detection of beta-glucosidase activity on sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels. *Applied and theoretical electrophoresis : the official journal of the International Electrophoresis Society* **2**, 63-69.
- Faizal, A., and Geelen, D.** (2013). Saponins and their role in biological processes in plants. *Phytochemistry Reviews* **12**, 877-893.
- Falk, A., Taipalensuu, J., Ek, B., Lenman, M., and Rask, L.** (1995). Characterization of rapeseed myrosinase-binding protein. *Planta* **195**, 387-395.
- Fan, T.W.M., and Conn, E.E.** (1985). Isolation and characterization of two cyanogenic β -glucosidases from flax seeds. *Archives of biochemistry and biophysics* **243**, 361-373.
- Ferreira, A.H.P., Marana, S.R., Terra, W.R., and Ferreira, C.** (2001). Purification, molecular cloning, and properties of a beta-glycosidase isolated from midgut lumen of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**, 1065-1076.
- Fieldes, M.A., and Gerhardt, K.E.** (1994). An examination of the beta-glucosidase (linamarase) banding pattern in flax seedlings using Ferguson plots and sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* **15**, 654-661.
- Forslund, K., Morant, M., Jørgensen, B., Olsen, C.E., Asamizu, E., Sato, S., Tabata, S., and Bak, S.** (2004). Biosynthesis of the Nitrile Glucosides Rhodiocyanoside A and D and the Cyanogenic Glucosides Lotaustralin and Linamarin in *Lotus japonicus*. *Plant physiology* **135**, 71-84.
- Freitas, N., and Cunha, C.** (2009). Mechanisms and Signals for the Nuclear Import of Proteins. *Current Genomics* **10**, 550-557.
- Gabriel, O., and Gersten, D.M.** (1992). Staining for enzymatic activity after gel electrophoresis, I. *Analytical biochemistry* **203**, 1-21.

- García-González, D.L., Aparicio-Ruiz, R., and Aparicio, R.** (2008). Virgin olive oil - Chemical implications on quality and health. *European Journal of Lipid Science and Technology* **110**, 602-607.
- García-Rodríguez, R., Romero-Segura, C., Sanz, C., and Pérez, A.G.** (2015). Modulating oxidoreductase activity modifies the phenolic content of virgin olive oil. *Food Chem.* **171**, 364-369.
- Gazis, F., and Hatzopoulos, P.** (2002). Direct submission, accession number AY083162.
- Geerlings, A., Ibanez, M.M., Memelink, J., van Der Heijden, R., and Verpoorte, R.** (2000). Molecular cloning and analysis of strictosidine beta-D-glucosidase, an enzyme in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *The Journal of biological chemistry* **275**, 3051-3056.
- Gilbert, H.J., Stalbrand, H., and Brumer, H.** (2008). How the walls come crumbling down: recent structural biochemistry of plant polysaccharide degradation. *Current opinion in plant biology* **11**, 338-348.
- Gleadow, R.M., and Møller, B.L.** (2014). Cyanogenic Glycosides: Synthesis, Physiology, and Phenotypic Plasticity. *Annu. Rev. Plant Biol.* **65**, 155-185.
- Gómez-Anduro, G., Ceniceros-Ojeda, E., Casados-Vázquez, L., Bencivenni, C., Sierra-Beltrán, A., Murillo-Amador, B., and Tiessen, A.** (2011). Genome-wide analysis of the beta-glucosidase gene family in maize (*Zea mays* L. var B73). *Plant molecular biology* **77**, 159-183.
- Green, P., and Wickens, G.** (1989). *The Olea europaea complex (The Davis and Hedge Festschrift: plant taxonomy, phylogeography and related subjects.* Edinburgh, University Press).
- Green, P.S.** (2002). A revision of *Olea* L. (Oleaceae). *Kew Bulletin* **57**, 91-140.
- Gruhnert, C., Biehl, B., and Selmar, D.** (1994). Compartmentation of cyanogenic glucosides and their degrading enzymes. *Planta* **195**, 36-42.
- Guirimand, G., Courdavault, V., Lanoue, A., Mahroug, S., Guihur, A., Blanc, N., Giglioli-Guivarc'h, N., St-Pierre, B., and Burlat, V.** (2010). Strictosidine activation in Apocynaceae: towards a "nuclear time bomb"? *Bmc Plant Biol* **10**, 182.
- Guiso, M., and Marra, C.** (2005). Highlights in Oleuropein Aglycone structure. *Natural Product Research* **19**, 105-109.
- Gutierrez-Rosales, F., Romero, M.P., Casanovas, M., Motilva, M.J., and Minguez-Mosquera, M.I.** (2010). Metabolites Involved in Oleuropein Accumulation and Degradation in Fruits of *Olea europaea* L.: Hojiblanca and Arbequina Varieties. *Journal of agricultural and food chemistry* **58**, 12924-12933.
- Gutierrez-Rosales, F., Romero, M.P., Casanovas, M., Motilva, M.J., and Minguez-Mosquera, M.I.** (2012). beta-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., and Gershenzon, J.** (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 303-333.
- Haralampidis, K., Bryan, G., Qi, X., Papadopoulou, K., Bakht, S., Melton, R., and Osbourn, A.** (2001). A new class of oxidosqualene cyclases directs synthesis of antimicrobial phytoprotectants in monocots. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America **98**, 13431-13436.
- Hatzopoulos, P., Banilas, G., Giannoulia, K., Gazis, F., Nikoloudakis, N., Milloni, D., and Haralampidis, K.** (2002). Breeding, molecular markers and molecular biology of the olive tree. *European Journal of Lipid Science and Technology* **104**, 574-586.
- Hbaieb, R.H., Kotti, F., García-Rodríguez, R., Gargouri, M., Sanz, C., and Pérez, A.G.** (2015). Monitoring endogenous enzymes during olive fruit ripening and storage: Correlation with virgin olive oil phenolic profiles. *Food Chem.* **174**, 240-247.
- Henrissat, B.** (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J* **280**, 309-316.
- Henrissat, B., and Davies, G.** (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current opinion in structural biology* **7**, 637-644.
- Himeno, N., Saburi, W., Wakuta, S., Takeda, R., Matsuura, H., Nabeta, K., Sansenya, S., Ketudat Cairns, J.R., Mori, H., Imai, R., and Matsui, H.** (2013). Identification of Rice β -Glucosidase with High Hydrolytic Activity towards Salicylic Acid β -D-Glucoside. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **77**, 934-939.
- Hopkins, R.J., Dam, N.M.v., and Loon, J.J.A.v.** (2009). Role of Glucosinolates in Insect-Plant Relationships and Multitrophic Interactions. *Annual Review of Entomology* **54**, 57-83.
- Hösel, W., and Conn, E.E.** (1982). The aglycone specificity of plant β -glycosidases. *Trends in Biochemical Sciences* **7**, 219-221.
- Hösel, W., Tober, I., Eklund, S.H., and Conn, E.E.** (1987). Characterization of β -glucosidases with high specificity for the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) moench seedlings. *Archives of biochemistry and biophysics* **252**, 152-162.
- Huang, C.L., and Sumpio, B.E.** (2008). Olive Oil, the Mediterranean Diet, and Cardiovascular Health. *J. Am. Coll. Surg.* **207**, 407-416.
- Inouye, H., Ueda, S., Inoue, K., and Takeda, Y.** (1974). Studies on Monoterpene Glucosides and Related Natural Products. XXIII. Biosynthesis of the Secoiridoid Glucosides, Gentiopicroside, Morroniside, Oleuropein, and Jasminin. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* **22**, 676-686.
- Ishiguro, K., Yamaki, M., Takagi, S., Ikeda, Y., Kawakami, K., Ito, K., and Nose, T.** (1986). Studies on Iridoid-Related Compounds. IV. : Antitumor Activity of Iridoid Aglycones. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* **34**, 2375-2379.
- Jensen, S.R., Franzyk, H., and Wallander, E.** (2002). Chemotaxonomy of the Oleaceae: iridoids as taxonomic markers. *Phytochemistry* **60**, 213-231.
- Jones, P., and Vogt, T.** (2001). Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* **213**, 164-174.
- Kara, H.E., Sinan, S., and Turan, Y.** (2011). Purification of beta-glucosidase from olive (*Olea europaea* L.) fruit tissue with specifically designed hydrophobic interaction chromatography and characterization of the purified enzyme. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **879**, 1507-1512.
- Karkoula, E., Skantzari, A., Melliou, E., and Magiatis, P.** (2012). Direct Measurement of Oleocanthal and Oleacein Levels in Olive Oil by Quantitative ¹H NMR. Establishment of a New Index for the Characterization of Extra

- Virgin Olive Oils. *Journal of agricultural and food chemistry* **60**, 11696-11703.
- Karkoula, E., Skantzari, A., Melliou, E., and Magiatis, P.** (2014). Quantitative Measurement of Major Secoiridoid Derivatives in Olive Oil Using qNMR. Proof of the Artificial Formation of Aldehydic Oleuropein and Ligstroside Aglycon Isomers. *Journal of agricultural and food chemistry* **62**, 600-607.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J.E.** (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protocols* **10**, 845-858.
- Kim, Y.-W., Kang, K.-S., Kim, S.-Y., and Kim, I.-S.** (2000). Formation of fibrillar multimers of oat β -glucosidase isoenzymes is mediated by the As-Glu1 monomer1. *Journal of Molecular Biology* **303**, 831-842.
- Kim, Y.W., and Kim, I.S.** (1998). Subunit composition and oligomer stability of oat beta-glucosidase isozymes. *Biochimica et biophysica acta* **1388**, 457-464.
- Kiran, N.S., Polanská, L., Fohlerová, R., Mazura, P., Válková, M., Šmeral, M., Zouhar, J., Malbeck, J., Dobrev, P.I., Macháčková, I., and Brzobohatý, B.** (2006). Ectopic over-expression of the maize β -glucosidase Zm-p60.1 perturbs cytokinin homeostasis in transgenic tobacco. *Journal of experimental botany* **57**, 985-996.
- Konno, K., Hirayama, C., and Shinbo, H.** (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., Yasui, H., Hirayama, C., and Shinbo, H.** (1998). Glycine protects against strong protein-denaturing activity of oleuropein. A phenolic compound in privet leaves. *J Chem Ecol* **24**, 735-751.
- Konno, K., Hirayama, C., Yasui, H., and Nakamura, M.** (1999). Enzymatic activation of oleuropein: a protein crosslinker used as a chemical defense in the privet tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 9159-9164.
- Konno, K., Hirayama, C., Yasui, H., Okada, S., Sugimura, M., Yukuhiro, F., Tamura, Y., Hattori, M., Shinbo, H., and Nakamura, M.** (2010). GABA, β -Alanine and Glycine in the Digestive Juice of Privet-Specialist Insects: Convergent Adaptive Traits Against Plant Iridoids. *J Chem Ecol* **36**, 983-991.
- Koudounas, K., Banilas, G., Michaelidis, C., Demoliou, C., Rigas, S., and Hatzopoulos, P.** (2015). A defence-related *Olea europaea* β -glucosidase hydrolyses and activates oleuropein into a potent protein cross-linking agent. *Journal of experimental botany* **66**, 2093-2106.
- Kubo, I., Matsumoto, A., and Takase, I.** (1985). A multichemical defense mechanism of bitter olive *Olea europaea* (oleaceae). *J Chem Ecol* **11**, 251-263.
- Leah, R., Kigel, J., Svendsen, I., and Mundy, J.** (1995). Biochemical and molecular characterization of a barley seed β -glucosidase. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 15789-15797.
- Leavesley, H.B., Li, L., Prabhakaran, K., Borowitz, J.L., and Isom, G.E.** (2008). Interaction of Cyanide and Nitric Oxide with Cytochrome c Oxidase: Implications for Acute Cyanide Toxicity. *Toxicological Sciences* **101**, 101-111.
- Lee, K.H., Piao, H.L., Kim, H.Y., Choi, S.M., Jiang, F., Hartung, W., Hwang, I., Kwak, J.M., Lee, I.J., and Hwang, I.** (2006). Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell* **126**, 1109-1120.

- Li, C.P., Swain, E., and Poulton, J.E.** (1992). Prunus serotina Amygdalin Hydrolase and Prunasin Hydrolase Purification, N-Terminal Sequencing, and Antibody Production. *Plant physiology* **100**, 282-290.
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Costa, A., and Santos, C.** (2007). Nuclear DNA content estimations in wild olive (*Olea europaea* L. ssp *europaea* var. *sylvestris* Brot.) and Portuguese cultivars of *O-europaea* using flow cytometry. *Genet. Resour. Crop Evol.* **54**, 21-25.
- Luijendijk, T., Stevens, L., and Verpoorte, R.** (1996). Reaction for the localization of strictosidine glucosidase activity on polyacrylamide gels. *Phytochemical Analysis* **7**, 16-19.
- Mageroy, M.H., Parent, G., Germanos, G., Giguère, I., Delvas, N., Maaroufi, H., Bauce, É., Bohlmann, J., and Mackay, J.J.** (2015). Expression of the β -glucosidase gene Pg β glu-1 underpins natural resistance of white spruce against spruce budworm. *The Plant Journal* **81**, 68-80.
- Malheiro, R., Rodrigues, N., and Pereira, J.A.** (2015). Olive Oil Phenolic Composition as Affected by Geographic Origin, Olive Cultivar, and Cultivation Systems. *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents* **1**, 93.
- Mateos, R., Domínguez, M.M., Espartero, J.L., and Cert, A.** (2003). Antioxidant Effect of Phenolic Compounds, α -Tocopherol, and Other Minor Components in Virgin Olive Oil. *Journal of agricultural and food chemistry* **51**, 7170-7175.
- Mateos, R., Espartero, J.L., Trujillo, M., Ríos, J.J., León-Camacho, M., Alcludia, F., and Cert, A.** (2001). Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *Journal of agricultural and food chemistry* **49**, 2185-2192.
- Mattiacci, L., Dicke, M., and Posthumus, M.A.** (1995). beta-Glucosidase: an elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 2036-2040.
- Mazucca, S., Spadafora, A., and Innocenti, A.M.** (2006). Cell and tissue localization of beta-glucosidase during the ripening of olive fruit (*Olea europaea*) by in situ activity assay. *Plant Sci* **171**, 726-733.
- Minic, Z.** (2008). Physiological roles of plant glycoside hydrolases. *Planta* **227**, 723-740.
- Morant, A.V., Jørgensen, K., Jørgensen, C., Paquette, S.M., Sánchez-Pérez, R., Møller, B.L., and Bak, S.** (2008a). β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry* **69**, 1795-1813.
- Morant, A.V., Bjarnholt, N., Kragh, M.E., Kjærgaard, C.H., Jørgensen, K., Paquette, S.M., Piotrowski, M., Imberty, A., Olsen, C.E., Møller, B.L., and Bak, S.** (2008b). The β -Glucosidases Responsible for Bioactivation of Hydroxynitrile Glucosides in *Lotus japonicus*. *Plant physiology* **147**, 1072-1091.
- Moreno, J.J., and Mitjavila, M.T.** (2003). The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis (Review). *J. Nutr. Biochem.* **14**, 182-195.
- Moses, T., Papadopoulou, K.K., and Osbourn, A.** (2014). Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Crit Rev Biochem Mol* **49**, 439-462.
- Mylona, P., Owatworakit, A., Papadopoulou, K., Jenner, H., Qin, B., Findlay, K., Hill, L., Qi, X., Bakht, S., Melton, R., and Osbourn, A.** (2008). Sad3 and

- Sad4 Are Required for Saponin Biosynthesis and Root Development in Oat. *The Plant cell* **20**, 201-212.
- Naoumkina, M., Farag, M.A., Sumner, L.W., Tang, Y., Liu, C.J., and Dixon, R.A.** (2007). Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 17909-17915.
- Nielsen, K., Hrmova, M., Nielsen, J., Forslund, K., Ebert, S., Olsen, C., Fincher, G., and Møller, B.** (2006). Reconstitution of cyanogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) and its implications for resistance against the barley powdery mildew fungus. *Planta* **223**, 1010-1023.
- Niemeyer, H.M.** (1988). Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the gramineae. *Phytochemistry* **27**, 3349-3358.
- Nikus, J., Daniel, G., and Jonsson, L.M.V.** (2001). Subcellular localization of β -glucosidase in rye, maize and wheat seedlings. *Physiol Plantarum* **111**, 466-472.
- Nikus, J., Esen, A., and Jonsson, L.M.V.** (2003). Cloning of a plastidic rye (*Secale cereale*) β -glucosidase cDNA and its expression in *Escherichia coli*. *Physiol Plantarum* **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, H.K., Bedgood, D.R., Jr., Prenzler, P.D., and Robards, K.** (2007). Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography. *Analytica chimica acta* **603**, 176-189.
- Obied, H.K., Allen, M.S., Bedgood, D.R., Prenzler, P.D., Robards, K., and Stockmann, R.** (2005). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of agricultural and food chemistry* **53**, 823-837.
- Obied, H.K., Prenzler, P.D., Ryan, D., Servili, M., Taticchi, A., Esposto, S., and Robards, K.** (2008). Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L. *Natural product reports* **25**, 1167-1179.
- Odoux, E., Chauwin, A., and Brillouet, J.M.** (2003). Purification and characterization of vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews) beta-D-glucosidase. *Journal of agricultural and food chemistry* **51**, 3168-3173.
- Olsen, K.M., Sutherland, B.L., and Small, L.L.** (2007). Molecular evolution of the Li/li chemical defence polymorphism in white clover (*Trifolium repens* L.). *Molecular Ecology* **16**, 4180-4193.
- Omar, S.H.** (2010). Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia pharmaceutica* **78**, 133-154.
- Opassiri, R., Pomthong, B., Onkoksoong, T., Akiyama, T., Esen, A., and Cairns, J.R.K.** (2006). Analysis of rice glycosyl hydrolase family I and expression of Os4bglu12 beta-glucosidase. *Bmc Plant Biol* **6**, 19.
- Ortega-Garcia, F., and Peragon, J.** (2010). HPLC analysis of oleuropein, hydroxytyrosol, and tyrosol in stems and roots of *Olea europaea* L. cv. Picual during ripening. *J Sci Food Agric* **90**, 2295-2300.
- Osborn, A.** (1996). Saponins and plant defence — a soap story. *Trends in plant science* **1**, 4-9.
- Pancorbo, A.C., Carretero, A.S., and Gutiérrez, A.F.** (2005). Co-electroosmotic capillary eletrophoresis determination of phenolic acids in commercial olive oil. *J. Sep. Sci.* **28**, 925-934.

- Pankoke, H., Buschmann, T., and Müller, C.** (2013). Role of plant β -glucosidases in the dual defense system of iridoid glycosides and their hydrolyzing enzymes in *Plantago lanceolata* and *Plantago major*. *Phytochemistry* **94**, 99-107.
- Pentzold, S., Zagrobelny, M., Rook, F., and Bak, S.** (2014). How insects overcome two-component plant chemical defence: plant β -glucosidases as the main target for herbivore adaptation. *Biological Reviews* **89**, 531-551.
- Piasecka, A., Jedrzejczak-Rey, N., and Bednarek, P.** (2015). Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. *New Phytologist* **206**, 948-964.
- Psomiadou, E., and Tsimidou, M.** (2001). Pigments in Greek virgin olive oils: Occurrence and levels. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**, 640-647.
- Ranalli, A., Malfatti, A., Lucera, L., Contento, S., and Sotiriou, E.** (2005). Effects of processing techniques on the natural colourings and the other functional constituents in virgin olive oil. *Food Res. Int.* **38**, 873-878.
- Ranalli, A., Contento, S., Lucera, L., Di Febo, M., Marchegiani, D., and Di Fonzo, V.** (2006). Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea* L.). *Journal of agricultural and food chemistry* **54**, 434-440.
- Reuveni, M., Sagi, Z., Evmor, D., and Hetzroni, A.** (1999). β -Glucosidase activity is involved in scent production in *Narcissus* flowers. *Plant Sci* **147**, 19-24.
- Romero-Segura, C., Sanz, C., and Perez, A.G.** (2009). Purification and characterization of an olive fruit beta-glucosidase involved in the biosynthesis of virgin olive oil phenolics. *Journal of agricultural and food chemistry* **57**, 7983-7988.
- Romero-Segura, C., García-Rodríguez, R., Sánchez-Ortiz, A., Sanz, C., and Pérez, A.G.** (2012). The role of olive β -glucosidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil. *Food Res. Int.* **45**, 191-196.
- Saino, H., Mizutani, M., Hiratake, J., and Sakata, K.** (2008). Expression and Biochemical Characterization of β -Primeverosidase and Application of β -Primeverosylamidine to Affinity Purification. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **72**, 376-383.
- Sánchez-Pérez, R., Belmonte, F.S., Borch, J., Dicenta, F., Møller, B.L., and Jørgensen, K.** (2012). Prunasin Hydrolases during Fruit Development in Sweet and Bitter Almonds. *Plant physiology* **158**, 1916-1932.
- Saslowsky, D.E., Warek, U., and Winkel, B.S.J.** (2005). Nuclear Localization of Flavonoid Enzymes in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 23735-23740.
- Schilirò, E., Ferrara, M., Nigro, F., and Mercado-Blanco, J.** (2012). Genetic Responses Induced in Olive Roots upon Colonization by the Biocontrol Endophytic Bacterium *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *PloS one* **7**, e48646.
- Segovia-Bravo, K.A., Jarén-Galán, M., García-García, P., and Garrido-Fernández, A.** (2009). Browning reactions in olives: Mechanism and polyphenols involved. *Food Chem.* **114**, 1380-1385.
- Serrilli, A.M., Maggi, A., Casagrande, V., and Bianco, A.** (2015). Synthesis of deuterium-labelled substrates for the study of oleuropein biosynthesis in *Olea europaea* callus cultures. *Natural Product Research*, 1-9.

- Servili, M., and Montedoro, G.** (2002). Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology* **104**, 602-613.
- Servili, M., Selvaggini, R., Esposito, S., Taticchi, A., Montedoro, G., and Morozzi, G.** (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: Agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J. Chromatogr. A* **1054**, 113-127.
- Seshadri, S., Akiyama, T., Opassiri, R., Kuaprasert, B., and Cairns, J.K.** (2009). Structural and Enzymatic Characterization of Os3BGlu6, a Rice β -Glucosidase Hydrolyzing Hydrophobic Glycosides and (1 \rightarrow 3)- and (1 \rightarrow 2)-Linked Disaccharides. *Plant physiology* **151**, 47-58.
- Shi, H.-P., and Lindemann, P.** (2006). Expression of recombinant *Digitalis lanata* EHRH. cardenolide 16'-O-glucohydrolase in *Cucumis sativus* L. hairy roots. *Plant cell reports* **25**, 1193-1198.
- Sicker, D., Frey, M., Schulz, M., and Gierl, A.** (2000). Role of natural benzoxazinones in the survival strategy of plants. In *International Review of Cytology* (Academic Press), pp. 319-346.
- Soler-Rivas, C., Espín, J.C., and Wichers, H.J.** (2000). Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 1013-1023.
- Spadafora, A., Mazzuca, S., Chiappetta, F.F., Parise, A., Perri, E., and Innocenti, A.M.** (2008). Oleuropein-specific- β -glucosidase activity marks the early response of olive fruits (*Olea europaea*) to mimed insect attack. *Agricultural sciences in China* **7**, 703-712.
- Stavrinides, A., Tatsis, Evangelos C., Foureau, E., Caputi, L., Kellner, F., Courdavault, V., and O'Connor, Sarah E.** (2015). Unlocking the Diversity of Alkaloids in *Catharanthus roseus*: Nuclear Localization Suggests Metabolic Channeling in Secondary Metabolism. *Chemistry & Biology* **22**, 336-341.
- Studier, W.F., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W.** (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. In *Methods in Enzymology* (Academic Press), pp. 60-89.
- Sue, M., Yamazaki, K., Yajima, S., Nomura, T., Matsukawa, T., Iwamura, H., and Miyamoto, T.** (2006). Molecular and structural characterization of hexameric beta-D-glucosidases in wheat and rye. *Plant physiology* **141**, 1237-1247.
- Therios, I.** (2008a). *Morphology and taxonomy of the olive.* (Wallingford, UK: Cabi).
- Therios, I.** (2008b). Olive varieties. *Olives*, 255-270.
- Toonkool, P., Metheenukul, P., Sujiwattanarat, P., Paiboon, P., Tongtubtim, N., Ketudat-Cairns, M., Ketudat-Cairns, J., and Svasti, J.** (2006). Expression and purification of dalcochinase, a β -glucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre, in yeast and bacterial hosts. *Protein Expression and Purification* **48**, 195-204.
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., and La Guardia, M.** (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition research reviews* **18**, 98-112.
- Uccella, N.** (2000). Olive biophenols: biomolecular characterization, distribution and phytoalexin histochemical localization in the drupes. *Trends in Food Science & Technology* **11**, 315-327.

- Verdoucq, L., Czjzek, M., Moriniere, J., Bevan, D.R., and Esen, A.** (2003). Mutational and structural analysis of aglycone specificity in maize and sorghum beta-glucosidases. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 25055-25062.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., and Baulcombe, D.** (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal* **33**, 949-956.
- Walter, M., Chaban, C., Schutze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Nake, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K., and Kudla, J.** (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **40**, 428-438.
- Wang, Q., Trimbur, D., Graham, R., Warren, R., and Withers, S.** (1995). Identification of the Acid/Base Catalyst in *Agrobacterium faecalis*. beta-Glucosidase by Kinetic Analysis of Mutants. *Biochemistry* **34**, 14554-14562.
- Warzecha, H., Gerasimenko, I., Kutchan, T.M., and Stöckigt, J.** (2000). Molecular cloning and functional bacterial expression of a plant glucosidase specifically involved in alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry* **54**, 657-666.
- Wessel, D., and Flügge, U.I.** (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical biochemistry* **138**, 141-143.
- Wiesmann, C., Beste, G., Hengstenberg, W., and Schulz, G.E.** (1995). The three-dimensional structure of 6-phospho- β -galactosidase from *Lactococcus lactis*. *Structure* **3**, 961-968.
- Wittstock, U., and Burow, M.** (2010). Glucosinolate Breakdown in Arabidopsis: Mechanism, Regulation and Biological Significance. *The Arabidopsis Book*, e0134.
- Xia, L., Rajendran, C., Ruppert, M., Panjekar, S., Wang, M., and Stoeckigt, J.** (2013). High speed X-ray analysis of plant enzymes at room temperature. *Phytochemistry* **91**, 88-92.
- Xia, L., Ruppert, M., Wang, M., Panjekar, S., Lin, H., Rajendran, C., Barleben, L., and Stockigt, J.** (2012). Structures of alkaloid biosynthetic glucosidases decode substrate specificity. *ACS chemical biology* **7**, 226-234.
- Xu, Z.W., Escamilla-Trevino, L.L., Zeng, L.H., Lalgondar, M., Bevan, D.R., Winkel, B.S.J., Mohamed, A., Cheng, C.L., Shih, M.C., Poulton, J.E., and Esen, A.** (2004). Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1. *Plant molecular biology* **55**, 343-367.
- Zagrobelny, M., Bak, S., and Moller, B.L.** (2008). Cyanogenesis in plants and arthropods. *Phytochemistry* **69**, 1457-1468.
- Zhang, L., Paakkarinen, V., van Wijk, K.J., and Aro, E.M.** (1999). Co-translational assembly of the D1 protein into photosystem II. *The Journal of biological chemistry* **274**, 16062-16067.
- Zhou, J.M., Hartmann, S., Shepherd, B.K., and Poulton, J.E.** (2002). Investigation of the microheterogeneity and aglycone specificity-conferring residues of black cherry prunasin hydrolases. *Plant physiology* **129**, 1252-1264.
- Zohary, D.** (1994). The wild genetic resources of the cultivated olive. In *Acta Horticulturae*, S. Lavee and I. Klein, eds, pp. 62-65.
- Zouhar, J., Nanak, E., and Brzobohatý, B.** (1999). Expression, Single-Step Purification, and Matrix-Assisted Refolding of a Maize Cytokinin Glucoside-Specific β -Glucosidase. *Protein Expression and Purification* **17**, 153-162.

