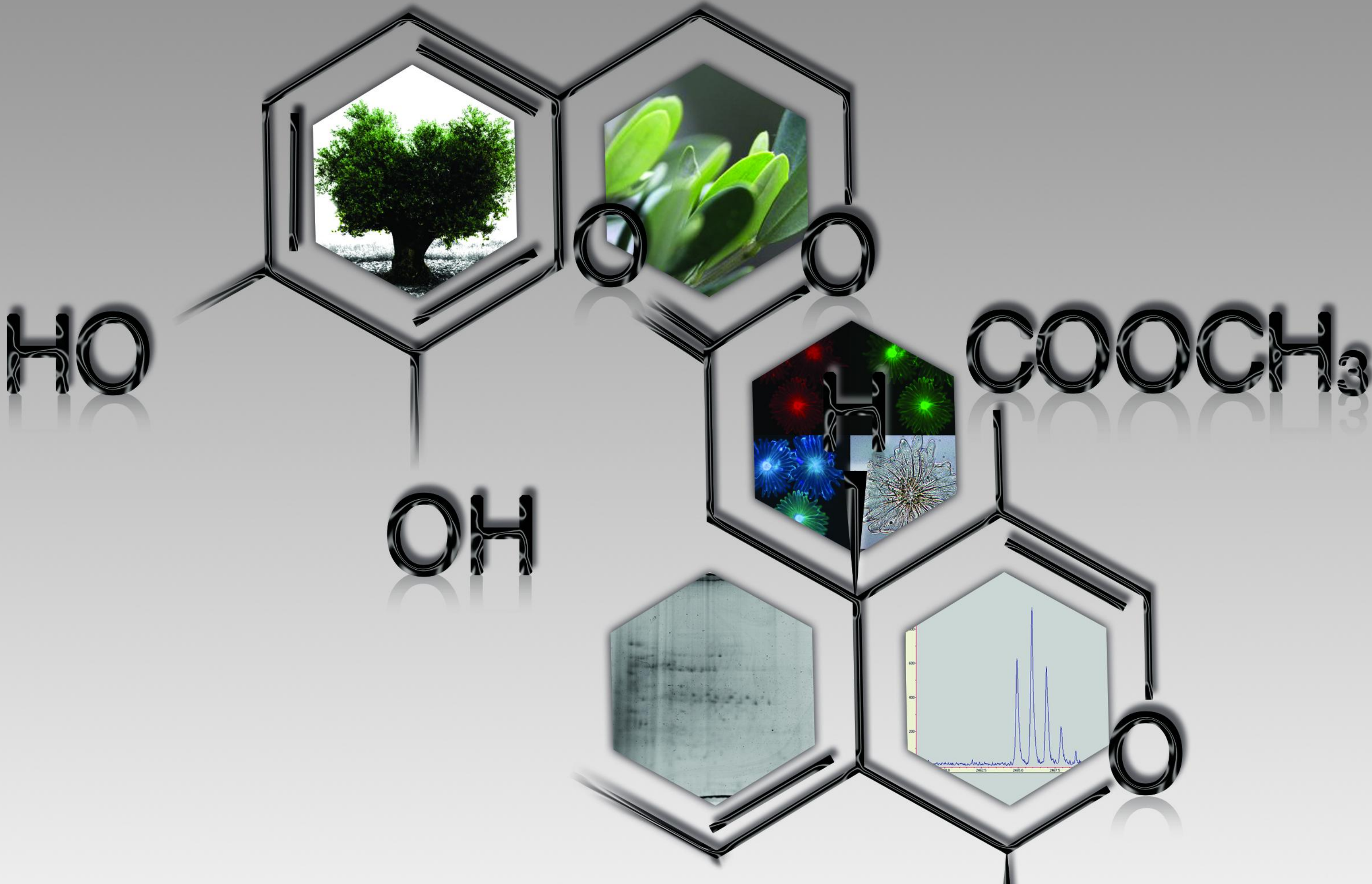
Γεωπονικό Πανεπιστημίο Αθηνών

Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας

Πρωτεομική προσέγγιση στις τρίχες του φύλλου της ελιάς



ΡΟΚΑ ΛΟΥΚΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2013

Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης έγινε με απόφαση της 20ης ΓΣΕΣ του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (5-7-2011), κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική επιτροπή της μελέτης.

Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή

Καθηγητής Χατζόπουλος Πολυδεύκης__________ Επιβλέπων

Επ. Καθηγήτρια Μηλιώνη Δήμητρα____________ Μέλος

Επ. Καθηγητής Ρήγας Σταμάτης_______________ Μέλος

There is no greater sin than having a brilliant idea...
Diego Gambetta

Στην οικογένειά μου και στους φίλους μου

Αντί προλόγου

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών με τίτλο **«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ»** με ειδίκευση στην κατεύθυνση «**Μοριακή Οικολογία και Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών»**

Στα πλαίσια της συγγραφής αυτής της διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν για την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Η εκπόνηση της συγκεκριμένης μελέτης δεν θα είχε πραγματοποιηθεί χωρίς την πολύτιμη συμβολή του καθηγητή Πολυδεύκη Χατζόπουλου. Τον ευχαριστώ θερμά για την ανάθεση της μελέτης αυτής, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και κυρίως για την υπομονή που έκανε καθόλη τη διάρκεια υλοποίησής της. Η συνεχής καθοδήγησή του και οι καταλυτικές συμβουλές του συνέβαλαν ουσιαστικά στην ολοκλήρωση της.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον υποψήφιο διδάκτορα Κουδουνά Κωνσταντίνο για την ουσιαστική και πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών, την αμέριστη συμπαράστασή του καθώς και για τις γνώσεις που μου για τις γνώσεις που του μετέδοσε τόσο σε τεχνικό όσο και σε θεωρητικό επίπεδο για την ολοκλήρωση της ερευνητικής μελέτης και τη συγγραφή αυτής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την επίκουρη καθηγήτρια Μηλιώνη Δήμητρα, και τον επίκουρο καθηγητή Ρήγα Σταμάτη για τις εποικοδομητικές συμβουλές τους και για την αποδοχή αξιολόγησης της παρούσας μελέτης.

Επίσης καταλυτική ήταν και η συμβολή των Δρ. Αντωνία Βλάχου, Δρ. Ιερώνυμου Ζωϊδάκη καθώς και η ομάδα του εργαστηρίου Πρωτεομικής, του τμήματος Βιοτεχνολογίας του Ίδρυματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών χωρίς την συμμετοχή των οποίων δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί η παρούσα μελέτη.

Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Ελαία η Ευρωπαϊκή (Olea Europaea)

Εικόνα 1.1 Ελαιόδεντρο (Olea europaea L)

Η ελιά, *Olea europaea* (L.), ανήκει στην οικογένεια *Oleaceae*, η οποία περιλαμβάνει περισσότερα από 25 γένη, από τα οποία σπουδαιότερα είναι τα *Olea*, *Syringa*, *Forsythia*, *Ligustrum*, *Fraxinus* και *Phillyrea*. Το γένος *Olea* περιλαμβάνει 30-40 διαφορετικά είδη σε όλο τον κόσμο, (Johnson, 1957). Το είδος *Olea europaea (L.)* διακρίνεται στα παρακάτω υποείδη, ανάλογα με τη γεωγραφική τους κατανομή, *europaea* (περιοχή της Μεσογείου), *cuspidata* (Ασία και Νοτιοδυτική Αφρική), *cerasiformis* (Κανάριοι νήσοι) και *laperrinei* (περιοχές στη Σαχάρα) (Green και Wickens, 1989).

Οι καρποί και το ελαιόλαδο, χρησιμοποιούνταν από την αρχαιότητα τόσο για την θρεπτική τους αξία όσο και για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες. 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).

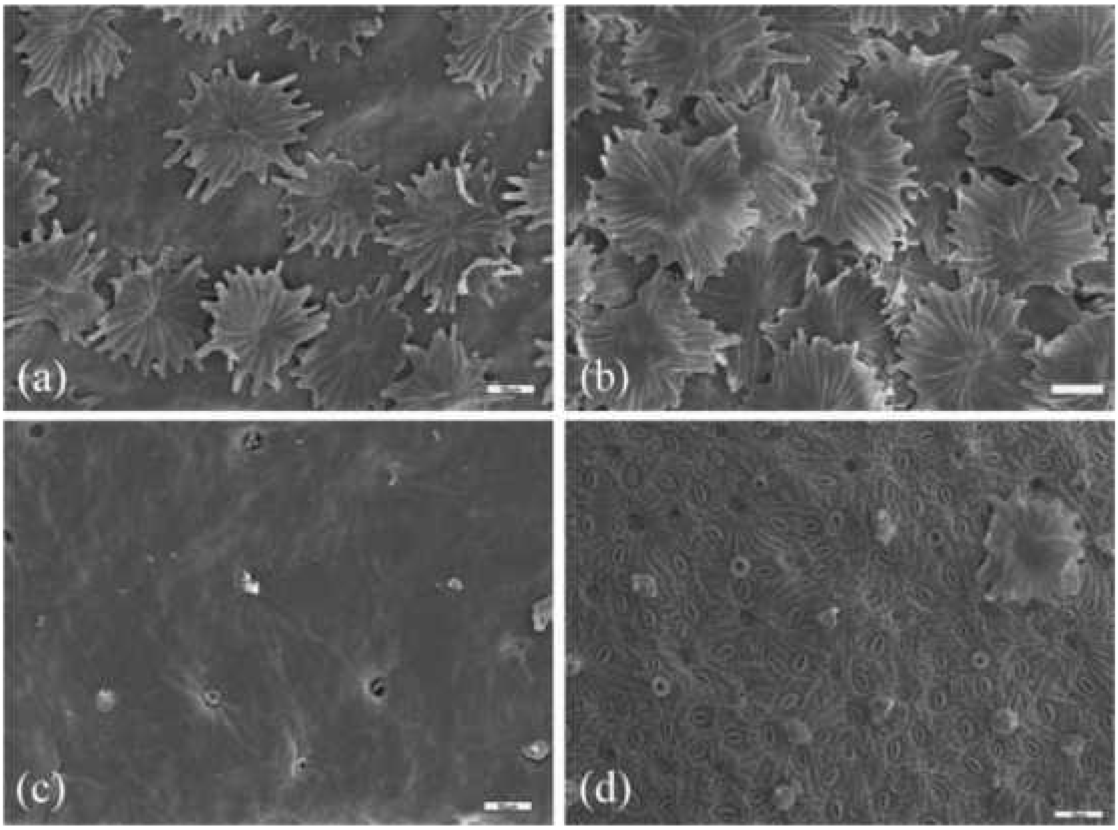
Ορισμένες πολυφαινόλες του ελαιόλαδου όπως οι υδρόφιλες φαινόλες είναι σπάνιες στο φυτικό βασίλειο ενώ άλλες όπως οι βιοφαινόλες και τα σεκοϊριδοειδή (ολευρωπαΐνη) απαντώνται μόνο στα είδη της οικογένειας *Oleaceae* (Iwai *et al*., 2005; Gariboldi *et al*., 1986). Ειδικά η ολευρωπαΐνη, το κύριο βιοφαινολικό συστατικό της ελιάς, προστατεύει από καρδιακές παθήσεις, έχει αντιαρρυθμική δράση, ενισχύει τον μεταβολισμό των λιπιδίων, έχει αντικαρκινική, αντιιική και αντιμικροβιακή δράση (Omar, 2010)

1.1 Τα Φύλλα της Ελιάς

Η ανατομική οργάνωση των φύλλων της ελιάς είναι η χαρακτηριστική των αείφυλλων σκληρόφυλλων της μεσογειακής χλωρίδας, με πυκνά διατεταγμένα και μικρού μεγέθους κύτταρα, περιορισμένους μεσοκυττάριους χώρους και εκτεταμένη εσωτερική ελεύθερη επιφάνεια. Τα φύλλα (Εικ.1.2) είναι βραχύμισχα, επιμήκη, λογχοειδή, λειόχειλα με σκούρο πράσινο στην προσαξονική και ασημί στην αποαξονική επιφάνεια λόγω της ύπαρξης πολυκύτταρων τριχών. Η επάνω επιφάνεια των φύλλων καλύπτεται με χιτίνη, ενώ η κάτω επιφάνεια φέρει τριχώματα σχήματος ομπρέλας και μικρό αριθμό στοματίων, περιορίζοντας έτσι τη διαπνοή στο ελάχιστο, καθιστώντας το δέντρο της ελιάς ξηροφυτικό με δυνατότητα ανάπτυξης σε περιοχές με μέτρια βροχόπτωση.

Εικόνα 1.2 Φύλλα ελιάς (Κορωνέικη)

Τα τριχώματα της προσαξονικής επιφάνειας είναι πολύ λιγότερα και πιο αραιά διατεταγμένα (Karabourniotis G et al., 1998). Η διάταξη των φύλλων είναι κατ’ εναλλαγή σε δύο κάθετες σειρές (Μπαλατσούρας 1994). Η επιδερμίδα είναι μονόστρωμη και καλύπτεται από ισχυρή εφυμενίδα ενώ το πασσαλώδες παρέγχυμα αναπτύσσεται σε 4–5 στρώσεις κυττάρων. Ανάλογο πάχος διαθέτει και η περιοχή του σπογγώδους παρεγχύματος. Στο μεσόφυλλο είναι χαρακτηριστική η παρουσία πολυάριθμων ιδιοβλαστικών σκληρεΐδων μεγάλου μήκους και με παχιά κυτταρικά τοιχώματα. Οι σκληρεΐδες προσδίδουν μηχανική αντοχή ενώ λειτουργούν ως οπτικές ίνες μεταφέροντας φως στα εσωτερικά στρώματα του χλωροφυλλούχου παρεγχύματος (Karabourniotis G. et al., 1994) (Εικ.1.3).



Εικόνα 1.3 Φύλλα ελιάς. Μικρό-φωτογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκόπιου, προσαξονική (a,c) και αποαξονικής (b,d) επιφάνειας του φύλλου. (a,b) φύλλο με τριχώματα (c,d) φύλλα χωρίς τριχώματα.“Nondestructive assessment of leaf chemistry και physiology through spectral reflectance measurements may be misleading when changes in trichome density co-occur” Y. Manetas et all 2004

1.1.2 Τα φύλλα της ελιάς ως πηγή αντιοξειδωτικών

Τα φύλλα της ελιάς χαρακτηρίζονται από την παρουσία απλών φαινολικών οξέων και φαινυλοπροπανοειδών καθώς και άγλυκων αλλά και γλυκοζυλιωμένων παραγώγων φλαβονοειδών (Εικ.1.4). Στον Πίνακα 1 συνοψίζονται οι κυριότερες χημικές δομές των φαινολικών συστατικών που έχουν ανιχνευθεί στα φύλλα. Εκτός από το μεσόφυλλο, ιδιαίτερα πλούσιο σε φλαβονοειδή είναι και το στρώμα των τριχών. Τα φλαβονοειδή των τριχών εντοπίζονται κυρίως στα κυτταρικά τοιχώματα (Karabourniotis G. et al., 1998 ; Pereira A. P et al 2007).

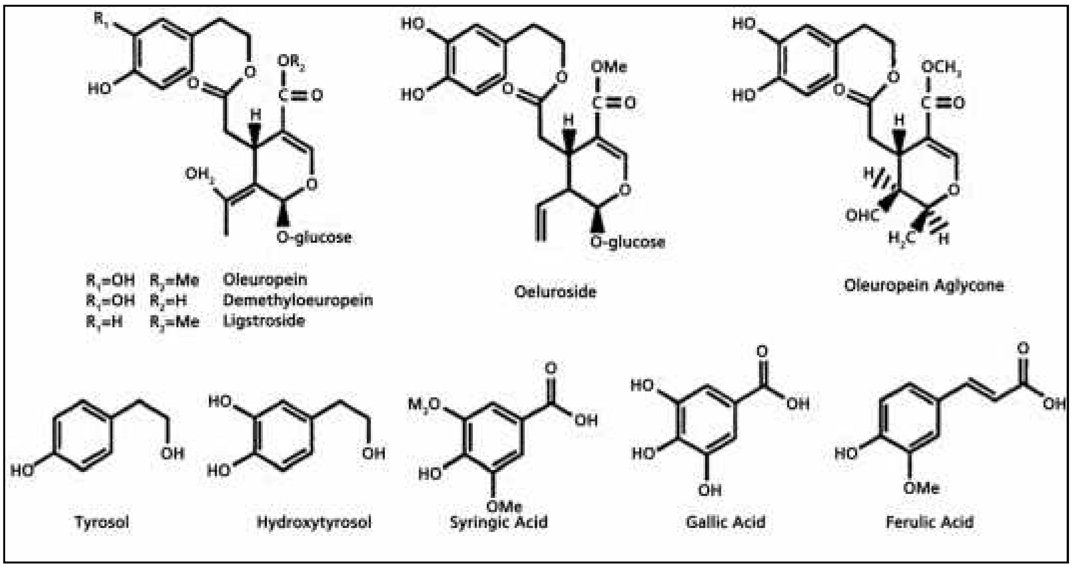
Στα φύλλα ανιχνεύεται και ένας αριθμός φαινολικών σεκοϊριδοειδών με κυριότερο την ολευρωπαΐνη (εστέρας της 2΄–(3΄,4΄–διϋδροξυφαίνυλο–1)–αιθανόλης και της ολεοσιδικής ομάδας). Άλλα σεκοϊριδοειδή με συναφές πρότυπο γλυκοζυλίωσης, τυπικό των ειδών της οικογένειας Oleaceae (αναφερόμενες συλλογικά ως ολεοσίδια) είναι η δεμεθυλ–ολευρωπαΐνη, το λιγστροσίδιο, το βερμπασκοσίδιο και το ολεοροσίδιο (Soler–Rivas C. et al., 2000).

Το εκχύλισμα των φύλλων της ελιάς και η ολευρωπαΐνη, έχει βρεθεί ότι έχουν ισχυρή μικροβιοκτόνο δράση *in vitro* (Ghisalberti 1998,; Walter Jr. et al., 1973). Ειδικότερα το εκχύλισμα έχει βρεθεί ότι είναι αποτελεσματικό *in vitro* κατά πολλών παθογόνων που συμπεριλαμβάνουν τους ιούς της γρίπης, του έρπητα, μύκητες και βακτήρια. Ωστόσο, δεν έχει επαρκώς αποδειχθεί η δραστικότητα *in vivo*. Επίσης έχει βρεθεί αντισυμπληρωματική δράση κάποιων φλαβονοειδών του φύλλου της ελιάς όπως η απιγενίνη και η λουτεολίνη (Pieroni A. et al., 1996).

Τα φύλλα της ελιάς αποτελούν μια άφθονη και φθηνή πρώτη ύλη για την παραλαβή δραστικών συστατικών με φαρμακευτική δράση. Ορισμένες από τις ουσίες που περιέχονται στα φύλλα, όπως η ολευρωπαΐνη και η υδροξυτυροσόλη, υπάρχουν σε μικρότερες ποσότητες και στο ελαιόλαδο, το οποίο όμως λόγω της διατροφικής και οικονομικής του αξίας δεν προσφέρεται για την παραλαβή ουσιών.

Πίνακας 1. Σύνοψη των φαινολικών συστατικών που έχουν ανιχνευθεί στα φύλλα της ελιάς. (Βιβλιογραφική αναφορά στις παρενθέσεις)

Ένωση
Σεκοϊριδοειδή
δεμεθυλολεοροπαΐνη (Ragazzi et al 1973)
υδροξυτυροσόλη (Le Tutour B και Guedon D. 1992.)
λιγστροσίδιο (De Nino A et al 119)
διμεθυλοεστέρας του ολεοσιδίου (De Nino A et al 119)
ολευρωπαΐνη (Ficarra P et al 1991)
ολεοροσίδιο (Kuwajima H et al 1988)
τυροσόλη (Le Tutour B και Guedon D. 1992)
βερμπασκοσίδιο (Ryan D et al 1999)
Φλαβονοειδή
απιγενίνη (Pieroni A, et al 1996)
4΄–Ο–ρουτινοζίτης της απιγενίνης (Pieroni A, et al 1996)
7–Ο–γλυκοζίτης της απιγενίνης (απιγετρίνη) (Pieroni A, et al 1996)
7–Ο–ρουτινοζίτης της απιγενίνης (ισοροϊφολίνη) (Le Tutour B και Guedon D. 1992)
7–Ο–ρουτινοζίτης της εσπερετίνης (εσπεριδίνη) (Ficarra P et al 1991)
κεμπφερόλη (De Laurentis N et al 1998)
λουτεολίνη (Pieroni A, et al 1996)
4΄–Ο–γλυκοζίτης της λουτεολίνης (γιουνκεΐνη) (Pieroni A, et al 1996)
7–Ο–γλυκοζίτης της λουτεολίνης (γλυκολουτεολίνη; λουτεολοσίδιο) (Ficarra P et al 1991)
7–Ο–ρουτινοζίτης της λουτεολίνης (σκολυ(ϊ)μοσίδιο) (Le Tutour B και Guedon D. 1992)
3΄–Ο–μεθυλαιθέρας της λουτεολίνης (χρυσοεριόλη) (Pieroni A, et al 1996)
3΄–Ο–μεθυλαιθέρας–7–Ο–γλυκοζίτης της λουτεολίνης (Pieroni A,et al 1996)
κερκετίνη (De Laurentis N et al 1998)
3–Ο–ραμνοζίτης της κερκετίνης (κερσιτρίνη) (Pieroni A, et al 1996)
3–Ο–ρουτινοζίτης της κερκετίνης (ρουτίνη) (Ficarra P et al 1991)
Φαινολικά οξέα
καφεϊκό οξύ (Le Floch F et al 1998)
χλωρογενικό οξύ (Heimler D et al 1996)
σινναμικό οξύ (Le Floch F et al 1998)
ελενολικό οξύ (Le Floch F et al 1998)
φερουλικό οξύ (Liakopoulos G et al 2001)
ομοβαλινικό οξύ (Le Floch F et al 1998)
υδροξυβενζοϊκό οξύ (Le Floch F et al 1998)
p–κουμαρικό οξύ (Liakopoulos G et al 2001)
προτοκατεχουϊκό οξύ (Le Floch F et al 1998)
σαλικυλικό οξύ (Bryant JP, et al 1983)
συριγγικό οξύ (Bryant JP, et al 1987)



Εικόνα 1.4 Χημικές δομές φαινολικών ενώσεων που έχουν βρεθεί στα φύλα της ελιάς *O. europaea* L. Olea europaea L. leaf extract και derivatives: antioxidant properties. J. Agric. Food Chem Briante, R et al 2002

1.2 Τριχώματα των φυτών

1.2.1 Γενικά

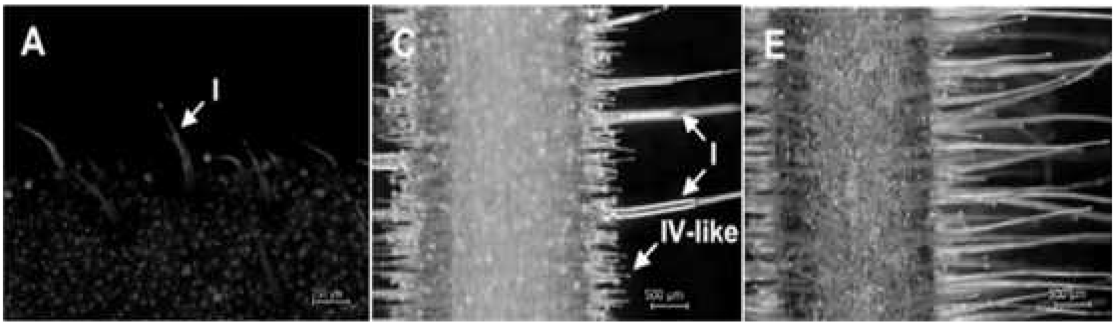
Ο όρος τρίχωμα αποδίδεται σε μονοκύτταρα ή πολυκύτταρα εξαρτήματα, τα οποία προέρχονται αποκλειστικά από επιδερμικά κύτταρα και αναπτύσσονται στην επιφάνεια πολλών φυτικών οργάνων (Εικ.1.5).

Το τρίχωμα δεν απαντάται αποκλειστικά στην εξωτερική επιφάνεια των φυτικών οργάνων. Μπορεί να καλύπτει διαφορετικά όργανα των φυτών τόσο βλαστικά (Manos, 1993; Bini Maleci et al., 1995; Romeis et al., 1999; Rapisarda et al., 2001) όσο κ αναπαραγωγικά (Ascenasao et al., 2005; Gutterman, 1997; Sanchez-Tinoco και Engleman 2004). Ανάλογα με το φυτικό όργανο η λειτουργία του τριχώματος μπορεί να ποικίλει. Ανάλογα με τη θέση του στο φυτό διαχωρίζεται στα υπόγεια και υπέργεια φυτικά τμήματα.

Ανάμεσα στις επιδερμικές αποφύσεις τα τριχώματα αποτελούν από πλευράς δομής και πρότυπου ανάπτυξης μια ενδιάμεση ομάδα μεταξύ των θηλών (papillae) και των προεκβολών (emergences). Τρίχωματα μπορεί να βρεθούν σε όλα τα μέρη του φυτού και να είναι είτε μόνιμα είτε εφήμερα. Ορισμένες μόνιμες τρίχες παραμένουν ζωντανές καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του φυτού ενώ άλλες χάνοντας τον πρωτοπλάστη τους νεκρώνονται.

Στα σημαντικότερα μορφολογικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνονται το μήκος, το πλάτος, η διάμετρος και ο αριθμός των κυττάρων που συγκροτούν τα τριχώματα. Πολλές φορές τα τριχώματα που καλύπτουν το ίδιο όργανο ενός φυτού διαφέρουν σημαντικά στις πιο πάνω διαστάσεις ενώ οι διαφορές είναι ακόμα μεγαλύτερες όταν εξετάζονται διαφορετικά όργανα του φυτού (Uphof,1962) (Εικ.1.8).

Ο αριθμός των κυττάρων που συμμετέχουν στην κατασκευή του τριχώματος ποικίλλει. Ορισμένες τρίχες αποτελούνται από ένα και μόνο κύτταρο (μονοκύτταρες) (π.χ. Μουσμουλιά και Κυδωνιά) ενώ άλλες αποτελούνται από πολλά κύτταρα (πολυκύτταρες).

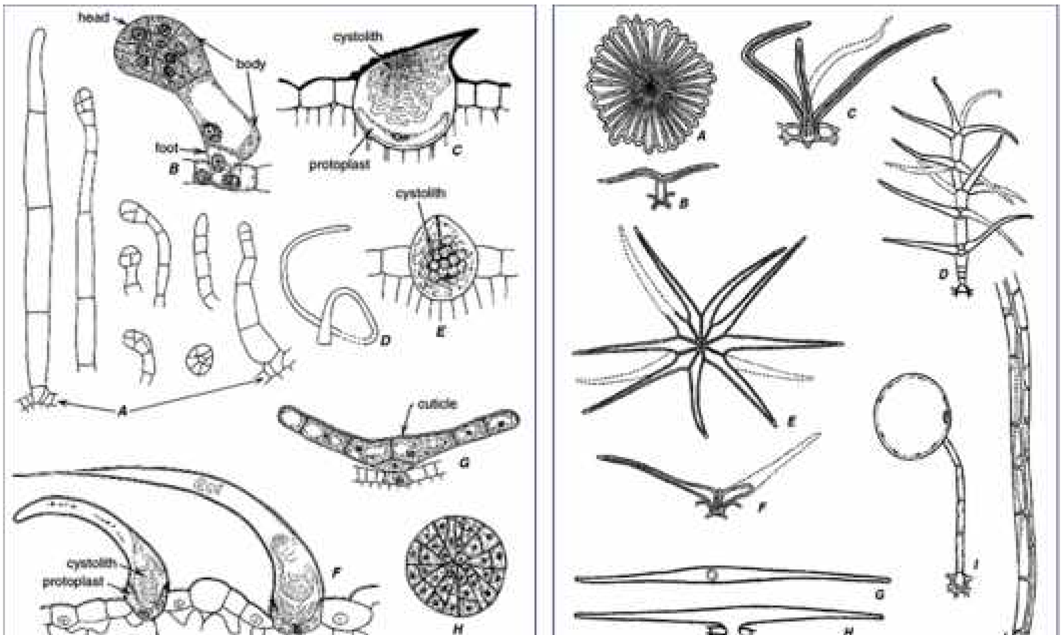


Εικόνα 1.5 Φωτογραφίες σε οπτικό μικροσκόπιο τριχωμάτων, A φύλλου (κάτω επιφάνεια), C μίσχου και E υποκοτύλιου της τομάτας. Η κλίμακα είναι σε 250 μm στην (A), και 500 μm στις (C–E). Τα βέλη δείχνουν διαφορετικούς τύπους τριχών. Distortion of trichome morphology by the hairless mutation of tomato affects leaf surface chemistry. Kang et al 2010.

1.2.2 Μορφολογία των τριχωμάτων

Πολυκύτταρα τριχώματα συναντάμε στην ελιά και στην αριά και αποτελούνται συνήθως από ένα κύτταρο βάσης που στηρίζει το πολυκύτταρο τμήμα της τρίχας. Τα γειτονικά επιδερμικά κύτταρα διαφέρουν από το κύτταρο της βάσης στο μέγεθος, στο σχήμα, στο πάχος του κυτταρικού τοιχώματος ή στο περιεχόμενο τους.

Ακόμα ένα σημαντικό μορφολογικό χαρακτηριστικό είναι η πυκνότητα των τριχωμάτων, δηλαδή ο αριθμός ή το ξηρό βάρος τους ανά μονάδα επιφάνειας. Στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης τους ορισμένα όργανα φέρουν πυκνό στρώμα τριχωμάτων το οποίο συνήθως αποβάλλεται μέχρι την ενηλικίωση τους. Τα τριχώματα της προσαξονικής επιφάνειας απορρίπτονται συνήθως στη διάρκεια της ανάπτυξης του φύλλου ενώ εκείνα της αποαξονικής επιφάνειας παραμένουν (Fahn, 1986; Uphof, 1962; Karabourniotis *et al*, 1994).



Εικόνα 1.6. Τριχώματα **Αριστερά. A**, αδενώδη (με πολυκύτταρες κεφαλές) και μη αδενώδη τρίχες (*Nicotiana*). **B**, μεγενθυμένη αδενώδης τρίχα (*Nicotiana*). **C**, αγκιστροειδής τρίχα με κυστόλιθους (*Humulus*). **D**, μεγάλη περιελιγμένη μονοκύτταρη, και **E**, μικρή τρίχα με κυστόλιθους (*Boebmeria*). **F**, αγκιστροειδής τρίχα με κυστόλιθους (*Cannabis*). **G**, **H**, αδενώδης ασπιδοειδής τρίχα (*Humulus*) σε πλάγια (**G**) και επιφανειακή (**H**) όψη. (A, F,x100; B, D, E, x310; C-G, x245; H, x490) **Δέξια.** Τριχώματα. **A**, **B**, ασπιδοειδές τριχίδιο (*Olea*) σε επιφανειακή (**A**) και πλάγια (**B**) όψη. **C**, θυσσανώδες Αστεροειδες τριχίδιο (*Quercus*). **E**, **F**, Αστεροειδές τριχίδιο (*Sida*) σε επιφανειακή (**E**) και πλάγια (**F**) όψη. **G**, **H**, μονοκύτταρο τριχίδιο με δύο βραχίονες (*Lobularia*) σε επιφανειακή (**G**) και πλάγια (**H**) όψη. **I**, κυστολιθικό τριχίδιο (*Chenopodium*). **J**, τμήμα πολυκύτταρης τρίχας (*Portulaca*). (A-C, I, x210; D-H, J, x105) (Evert, 2006).

Τα κυτταρικά τοιχώματα των τριχωμάτων αποτελούνται από κυτταρίνη και καλύπτονται από εφυμενίδα. Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται εναπόθεση λιγνίνης ενώ αναπτύσσονται και παχιά δευτερογενή τοιχώματα, π.χ. στις τριχώματα του βαμβακιού και της αριάς. Τα τοιχώματα ορισμένων τριχών είναι εμποτισμένα με πυρίτιο ή οξαλικό ασβέστιο (Uphof,1962). Το περιεχόμενο των κυττάρων τους ποικίλλει ανάλογα με τη λειτουργία την οποία προσφέρουν.

1.2.3 Ταξινόμηση τριχωμάτων

Η πολυμορφία των ανατομικών, αλλά και λειτουργικών χαρακτηριστικών των τριχών οδήγησε στη καθιέρωση συστημάτων ταξινόμησης (Solereder, 1908; Hummel και Staesche, 1962; Uphof, 1962; Metcalfe και Chalk, 1979; Fahn, 1991). Απαραίτητη προϋπόθεση για ικανοποιητική περιγραφή και κατάταξη αποτελεί ο συνδυασμός μορφολογικών και ιστολογικών χαρακτηριστικών (Theopald *et al*, 1979) (Εικ.1.8).

Η κατάταξη των τριχωμάτων βασίζεται στα παρακάτω τέσσερα κύρια κριτήρια :

Α**. *Εμφάνιση του τριχώματος (indumentum).***
Ανάλογα με την εικόνα (πυκνότητα, προσανατολισμό των τριχών) και την υφή που έχει το τρίχωμα χρησιμοποιούνται όροι όπως χνουδωτό πυκνό, αραιό, δασύτριχο.

Β. Η μορφολογία του τριχώματος
Τα τριχώματα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με την μορφολογία τους στις εξής κατηγορίες: α) **θηλές (*Papillae*)**, που είναι μικρών διαστάσεων αποφύσεις της επιδερμίδας, οι οποίες αναφέρονται και ως κυστοειδείς τριχώματα, β) **απλά τρίχώματα (*simple, unbranched*)**, μονοκύτταρα ή πολυκύτταρα μη διακλαδιζόμενα και διακρίνονται σε **πεπαχυσμένα** (Thickened), τα οποία είναι τριχώματα με περισσότερες από μία σειρές κυττάρων και τα **λεπτά** (Thin), τα οποία έχουν μονή σειρά κυττάρων. γ) **διακλαδιζόμενα τριχώματα με δύο ως πέντε βραχίονες (*two- to five-armed*)** διαφόρων σχημάτων, δ) **αστεροειδείς τριχώματα (*stellate*)**, έχουν μεγάλο αριθμό βραχιόνων (πάνω από πέντε) και σχήμα αστερία, ε) **ασπιδοειδείς τριχώματα (*scales, or peltate*)**, συνήθως πεπλατυσμένα με δισκοειδή κεφαλή, είναι μονοκύτταρα ή πολυκύτταρα, έμμισχα ή άμισχα και σε ορισμένες περιπτώσεις αδενώδη. Παρουσιάζουν ομοιότητες με τα αστεροειδείς τριχώματα τύπου rotate από τα οποία ο διαχωρισμός είναι πολλές φορές δύσκολος. στ) **τριχώματα δενδρώδους μορφής (*dendritic – branched*)**, διακλαδιζόμενοι βραχίονες γύρω από έναν άξονα, μονοκύτταρα ή πολυκύτταρα, και οι βραχίονες τους τοποθετούνται σε ένα ή περισσότερα επίπεδα. ζ) **τριχώματα εξειδικευμένων τύπων**, όπως είναι τα κνησμώδεις τριχώματα (*stinging*) (Εικ.1.9) και τα κυστολιθικά τριχώματα (*cystolith-containing*) (Εικ.1.6; Theobald *et al.*, 1979).

Γ. Ανατομικές μονάδες στον ίδιο ιστό ή όργανο
Η παρουσία περισσότερων του ενός τύπου τριχωμάτων είναι συνήθης όχι μόνο σε επίπεδο φυτικού είδους αλλά ακόμη και οργάνου (Εικ.1.7). Η συνύπαρξη τριχών με διαφορετικά ανατομικά χαρακτηριστικά αποτελεί ένα πρόσθετο ταξινομικό χαρακτήρα (Carlquist, 1961; Faust και Jones, 1973).

Δ. Ανατομία των τριχωμάτων
Τα ανατομικά χαρακτηριστικά των τριχωμάτων ταξινομούνται ως εξής :

- Αδενώδης ή μη αδενώδης.
- Μονοκύτταρα ή πολυκύτταρα.

- Μονόστρωμα ή πολύστρωμα.
- Ύπαρξη ή όχι επιφανειακών δομών (εξογκώματα, θηλές, ραβδώσεις).
- Παρουσία συσφίξεων ή κρυμμένου τμήματος του κυττάρου.
- Ύπαρξη διαφορετικών ειδών κυττάρων στην ίδια τρίχα (βάση,σώμα, κορυφή).
- Πάχος κυτταρικού τοιχώματος.
- Λιγνινοποίηση κυτταρικών τοιχωμάτων.
- Πάχος εφυμενίδας.
- Παρουσία κυστολίθων ή κρυστάλλων.
- Άλατα πυριτίου ή οξαλικού ασβεστίου στα κυτταρικά τοιχώματα.
- Είδος κυτταρικών συστατικών.

1.2.4 Αδενώδη και μη αδενώδη τριχώματα

Η ικανότητα σύνθεσης και απέκκρισης ουσιών αποτελεί το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό όχι μόνο σε ταξινομικό αλλά και σε ανατομικό και κυρίως λειτουργικό επίπεδο.

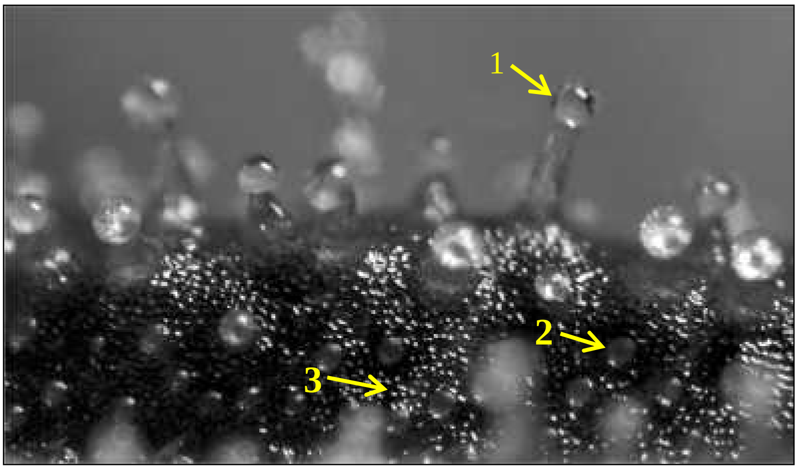
1.2.4.1 Αδενώδη τριχώματα

Τα αδενώδη τριχώματα ή αδένες, αφορούν δομές οι οποίες διατηρούν ενεργό τον πρωτοπλάστη τους και εκκρίνουν ευρύ φάσμα ουσιών, στο οποίο περιλαμβάνονται πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, λιπίδια, αιθέρια έλαια, άλατα, νέκταρ, πρωτεολυτικά ένζυμα, φλαβονοειδή και τερπένια (Peterson και Vermeer,1984; Fahn, 1991). Οι ουσίες οι οποίες απεκκρίνονται από τις δομές αυτές έχουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του φυτού έναντι εχθρών φυτοφάγων και παθογόνων. Ακόμα μια εξίσου σημαντική λειτουργία των ουσιών που εκκρίνονται είναι η προσέλκυση επικονιαστών και διασπορέων σπερμάτων με σημαντική συμβολή στην επικονίαση και αναπαραγωγή του είδους (Fanh, 1991). Δευτερογενείς μεταβολίτες (κυρίως τερπένια και φαινολικές ενώσεις) οι οποίοι απεκκρίνονται χρησιμοποιούνται στην άμυνα των φυτών ως απωθητικά λήψης τροφής με τοξική δράση έναντι εντόμων (Dietmar, 1984; Kelsey *et al*, 1984; Lewin, 1973; Taiz καικαι Zeiger, 1991; Swain, 1977). Απλές φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν σημαντική αλληλοπαθητική δράση, ενώ ορισμένα ισοφλαβονοειδή είναι γνωστά για το ρόλο τους ως φυτοαλεξίνες (Swain, 1977; Taizκαι Zeiger, 1991).

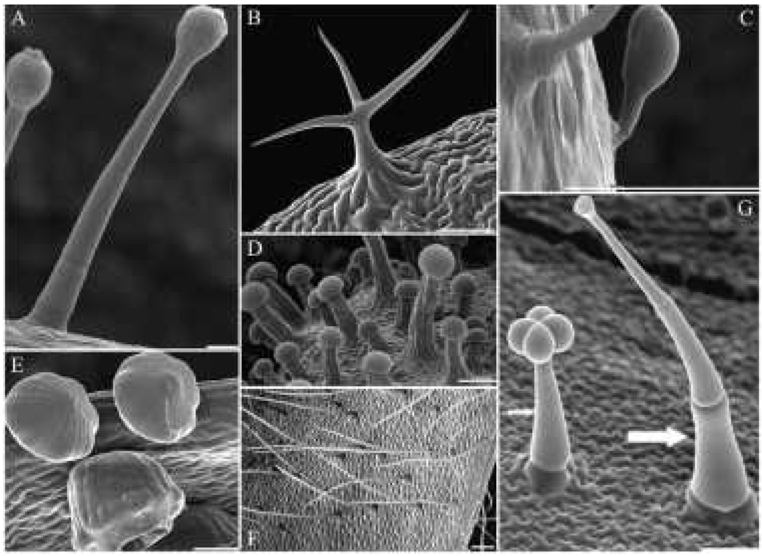
Οι κυριότερες λειτουργιές των αδενωδών τριχωμάτων είναι εξειδικευμένες για την άμυνα του φυτού έναντι κυρίως στα φυτοφάγα

- Τα τριχώματα της οικογένειας Urticaceae και Euphorbiaceae διατρυπούν το δέρμα φυτοφάγων οργανισμών που έρχονται σε επαφή με την επιφάνεια των φύλλων και εκχέουν το περιεχόμενο τους το οποίο προκαλεί κνησμό και ερεθισμό στους ιστούς των φυτοφάγων (Haberland, 1914; Fanh,1979).
- Τριχώματα του είδους Stylosanthes εκκρίνουν κολλώδες έκκριμα στο οποίο παγιδεύονται οι λάρβες του *Boophilus microplus* οι οποίες θανατώνονται σε σύντομο χρονικό διάστημα λόγω της τοξικότητας του εκκρίματος (Wager, 1991).
- Τα τριχώματα του *Nicotiana sp.* εκκρίνουν τοξικές ουσίες έναντι της πράσινης αφίδας.
- Τα τερπένια των αδενωδών τριχών που υπάρχουν στα αρωματικά φυτά παρεμποδίζουν την ανάπτυξη μυκήτων ενώ των τριχωμάτων του *Mentha piperita* δρουν απωθητικά έναντι των λαρβών του εντόμου *Bombyx morii* (Kelsey et al, 1984).

- Τα αδενώδη τριχώματα της τομάτας (*Lycopersicon esculentum*) εκκρίνουν γλυκοζίδια φλαβονοειδών τα οποία παρεμποδίζουν ισχυρά την ανάπτυξη των λαρβών του *Heliothis zea*.
- Φαινολικά εκκρίματα του *Solanum polademium* σχηματίζουν πολυμερή με δράση παρόμοια με αυτή των ταννινών μειώνοντας την πεπτικότητα των τροφών (Kelsey et al, 1984).
- Ένας ακόμα τύπος αδενωδών τριχών εμφανίζεται σε συστάδες (colleters). Οι δομές αυτές εμφανίζονται στη βάση παράφυλλων ή πετάλων και είναι υπεύθυνες για την έκκριση βλεννωδών υλικών. Στην περίπτωση αυτή ικανότητα έκκρισης, παρουσιάζουν συνήθως και τα γειτονικά επιδερμικά κύτταρα.
- Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι αδένες των σαρκοφάγων φυτών, π.χ. του *Pinguicula*. Στο φυτό αυτό υπάρχουν δύο τύποι αδένων, οι έμμισχοι και οι άμισχοι. Οι έμμισχοι εκκρίνουν ένα πολυσακχαρίδιο που χρησιμεύει στην παγίδευση του θηράματος ενώ οι άμισχοι αδένες εκκρίνουν πρωτεολυτικά ένζυμα, τα οποία θανατώνουν το θήραμα και βοηθούν στην προσρόφηση των προϊόντων πέψης.



Εικόνα 1.7 3 ειδών αδενώδη τριχώματα του φυτού cannabis. 1.Bulbous 2.Capitate-Sessile 3.Capitate-Stalked. Cannabis-Science.com



Εικόνα 1.8 Αντιπροσωπευτικές εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου από τριχώματα διαφόρων φυτών. **A** Κάθετη αδενώδης τρίχα από το μίσχο του M. sativa. **B**, Μη αδενώδης τρίχα από φύλλο της ροζέτας του Arabidopsis. **C**, Αναρριχητικά τριχώματα στο μίσχο του M. truncatula. **D**, Πεδίο από αδενώδης τριχώματα στο βράκτιο του Cannabis sativa. **E** Αδενώδης τριχώματα στο βράκτιο του H. lupulus. **F**, Μη αδενώδης τρίχωματα στο φύλλο του M. truncatula. **G**, Τύπος VI (μικρό βέλος) και I (μεγάλο βέλος) τριχωμάτων του S. lycopersicum. Bars = 100 μm. TrichOME: A Comparative Omics Database for Plant Trichomes Dai, X.,et al 2010.

1.2.4.2 Μη αδενώδη τριχώματα

Σε πολλές περιπτώσεις η ωρίμανση των μη αδενωδών τριχωμάτων συνοδεύεται και από νέκρωση των κυττάρων τους και πλήρωση του νεκρού πλέον κυττάρου με αέρα (δημιουργία lumen). Οι επιφάνειες διαφόρων οργάνων των φυτών οφείλουν την ασημί ή λευκή απόχρωση που παρουσιάζουν στην ύπαρξη του αέρα, που έχει διαφορετικό δείκτη διάθλασης απ' ότι τα κυτταρικά τοιχώματα,. Η απώθηση του νερού από τα φυτικά μέρη όταν το τρίχωμα είναι πυκνό λόγω της ύπαρξης του αέρα στα τριχώματα και της εφυμενίδας στην επιφάνεια τους παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον (Uphof,1962).

Η ύπαρξη των μη αδενωδών τριχωμάτων θεωρείται ξηροθερμική προσαρμογή (Fahn, 1991; Uphof, 1962; Johnson, 1975). Τα τριχώματα αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στη βελτίωση του θερμικού ισοζυγίου του ελάσματος και στην αποφυγή απωλειών νερού δίνοντας στα φυτά ορισμένα φυσιολογικά και οικολογικά πλεονεκτήματα, ιδιαίτερα σε ξηρά ή υψηλής ακτινοβολίας περιβάλλοντα (Johnson, 1975; Ehleringer, 1984). Μερικές φορές η απονέκρωση των μη αδενωδών τριχών ολοκληρώνεται πριν από την πλήρη έκπτυξη ελάσματος (*Sorbus*, *Mespilus*, *Salix*). Τα τριχώματα που διαθέτουν παχύτερα κυτταρικά τοιχώματα ζουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από αυτά που έχουν λεπτά. Τα αστεροειδείς τριχώματα τις προσαξονικής επιφάνειας των φύλλων των οικογενειών *Malvaceae*, *Tiliaceae* και του γένους *Quercus* απονεκρώνονται νωρίτερα από εκείνα της αποαξονικής επιφάνειας.

Τα μη αδενώδη τριχώματα μπορούν να χωριστούν στις εξής ομάδες:

1. **Απλά μονοκύτταρά ή πολυκύτταρά μονόστρωμά, μη πεπλατυσμένά τριχώματα**, Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει θηλές (papillae) και κύστες (bladders) γνωστά και ως φλυκταινώδη τριχώματα (vesicular hairs).

2. **Πλακόμορφα (squamiform) τριχώματα**. Είναι πεπλατυσμένά και πολυκύτταρά. Μπορεί να είναι άμισχα οπότε χαρακτηρίζονται ως λεπιοειδείς ή εμμίσχα οπότε ονομάζονται ασπιδοειδείς όπως στο γένος *Olea* ή δενδρώδους μορφής όπως στα Cruciferae).

3. **Διακλαδιζόμενα, πολυκύτταρα τριχώματα** που μπορεί να έχουν μορφή στιλέτου (stellate) (π.χ. στο *Styrax*) ή μορφή πολύφωτου (candelabrum-1ike) (π.χ. στα *Platanus* και *Verbascum*).

4. **Πυκνά, πολύστρωμα, τραχιά τριχώματα** που αποτελούνται, τουλάχιστον στη βάση, από δύο ή περισσότερες παρακείμενες σειρές κυττάρων, όπως στο *Portulaca oleracea*, στο *Schizanthus*, και σε ορισμένα είδη Compositae (Fahn, 1986).

1.2.5 Λειτουργίες τριχωμάτων

Η ύπαρξη των μη αδενωδών τριχών θεωρείται κυρίως ξηροθερμική προσαρμογή (Fahn, 1991; Fahn και Cutler 1992; Uphof, 1962; Johnson, 1975). Οι σημαντικότερες λειτουργίες που έχουν αποδοθεί σε αυτές είναι:

1. Ανάκλαση της ηλιακής ακτινοβολίας και ρύθμιση του θερμικού ισοζυγίου των φύλλων (Ehleninger, 1984; Bongi *et al*, 1987).

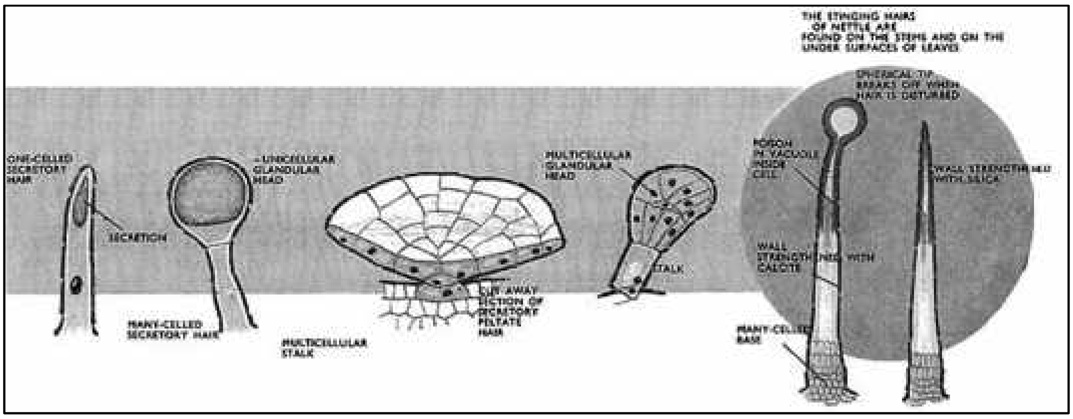
2. Προστασία από έντονες διαπνευστικές απώλειες νερού (Miller, 1931; Nobel, 1983; Fahn και Cutler, 1992).

3. Προστασία των νεαρών κυρίως φύλλων από υψηλής έντασης ορατής ακτινοβολίας (Haberlandt, 1914; Karabourniotis *et al*, 1998).

4. Προστασία φυτών από την υπεριώδη ακτινοβολία (Karabourniotis *et al*, 1992; Skaltsa *et al*, 1994; Grammatikopoulos *et al*, 1994).

5. Προστασία έναντι εχθρών και παθογόνων (Stavrianakou *et al*, 2001). Τα τριχώματα αποτελούν μηχανικό φράγμα έναντι εντόμων (Johnson, 1975; Woodmanκαι Fernadez, 1991) και παθογόνων μικροοργανισμών (Allen *et al*, 1991; Steadman και Saik, 1988).

Η αποτελεσματικότητα της άμυνας σχετίζεται άμεσα με την πυκνότητα των τριχώματων. Τα ώριμα φύλλα πού έχουν χαμηλή πυκνότητα τριχών προσβάλλονται ευκολότερα και συχνότερα από τα νεαρά φύλλα που έχουν υψηλότερη πυκνότητα τριχών (Woodman και Fernadez, 1991; Pillemer και Tingey, 1978). Τα γηραιότερα και με αραιότερο τρίχωμα φύλλα του *Verbascum thapsus* προσβάλλονται πιο συχνά από φυτοφάγους εχθρούς σε σχέση με τα νεαρότερα φύλλα καθώς η αποτελεσματικότητα της μηχανικής θωράκισης των φύλλων διαφοροποιείται με την πάροδο του χρόνου (Woodman και Fernadez, 1991). Ο χαμηλός λόγος C/N και κατά συνέπεια η φτωχή θρεπτική τους αξία είναι ένας επιπλέον λόγος που κάνει τα τριχώματα ως μέσα προστασίας έναντι παθογόνων. Τα κυτταρικά τοιχώματα των τριχωμάτων είναι δύσπεπτα έτσι δεν αποτελούν προσφιλές υπόστρωμα για έντομα και παθογόνα (Uphof, 1962; Steadman και Saik, 1988).



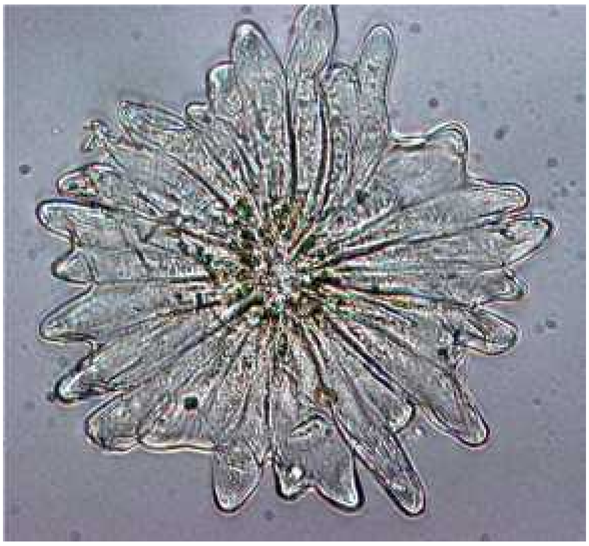
Εικόνα 1.9. Ειδική κατασκευή έχουν οι τρίχες της τσουκνίδας, που είναι λεπτές μυτερές και μοιάζουν με τη βελόνα σύριγγας, από κει εγχέουν το δηλητήριο αμυνόμενη στις επιδρομές των ζώων. daviddarling.info.

Πίνακας 1.3 Γνωστές λειτουργίες τριχωμάτων. (Wagner et al., 2004)

Ιδιότητες / Λειτουργίες	**Τύπος Τριχωμάτων**
Μειωμένη κίνηση εντόμων	Μη Αδενώδη και Αδενώδη
Ρύθμιση θερμοκρασίας	Μη Αδενώδη και Αδενώδη
Προστασία από ηλιακή ακτινοβολία (UV)	Μη Αδενώδη και Αδενώδη
Μειωμένη απώλεια νερού	Μη Αδενώδη και Αδενώδη
Μειωμένη μηχανική απόξεση	Μη Αδενώδη και Αδενώδη
Μειωμένη ενυδάτωση φύλλου	Μη Αδενώδη και Αδενώδη
Μειωμένη φωτοσύνθεση λόγω ανάκλασης	Μη Αδενώδη και Αδενώδη
Επιδερμική ομοιόσταση Ca++	Μη Αδενώδη και Αδενώδη
Αποτροπή εντόμων και φυτοφάγων	Αδενώδη
Ακινητοποίηση εντόμων	Αδενώδη
Προσέλκυση επικονιαστών	Αδενώδη
Έκκριση ιόντων και βαρέων μετάλλων	Αδενώδη
Αλληλοπάθεια	Αδενώδη
Απορρόφηση νερού και θρεπτικών	Μη Αδενώδη

1.2.6 Μη αδενώδη τρίχωμα ελιάς

Τα μη αδενώδη τριχώματα της ελιάς με βάση τα μορφολογικά και ανατομικά χαρακτηριστικά τους κατατάσσονται στα ασπιδοειδή τριχώματα (scales ή peltate hairs) (Fahn, 1991). Πρόκειται για πεπλατυσμένα, έμμισχα, πολυκύτταρα τριχώματα με χαρακτηριστικό σχήμα ασπίδας. Αποτελούνται από ένα κύτταρο βάσης και μια πολυκύτταρη κεφαλή (Εικ.1.9). Το κύτταρο της βάσης είναι βυθισμένο στην επιδερμίδα και συνήθως διαφέρει από τα γειτονικά επιδερμικά κύτταρα στο μέγεθος, στο σχήμα, στο πάχος του κυτταρικού τοιχώματος ή στο περιεχόμενο του. Τα επιδερμικά κύτταρα τα οποία περιβάλλουν το βασικό τμήμα της τρίχας διαφοροποιούνται σε μορφή και μέγεθος και ονομάζονται βοηθητικά κύτταρα. Η ιδιόμορφη συγκρότηση των κυττάρων αυτών είναι ορατή μόνο από το εσωτερικό του φύλλου (Karabourniotis et al, 1995).



Εικόνα 1.9 Μη αδενώδης τρίχα ελιάς Olea Europaea

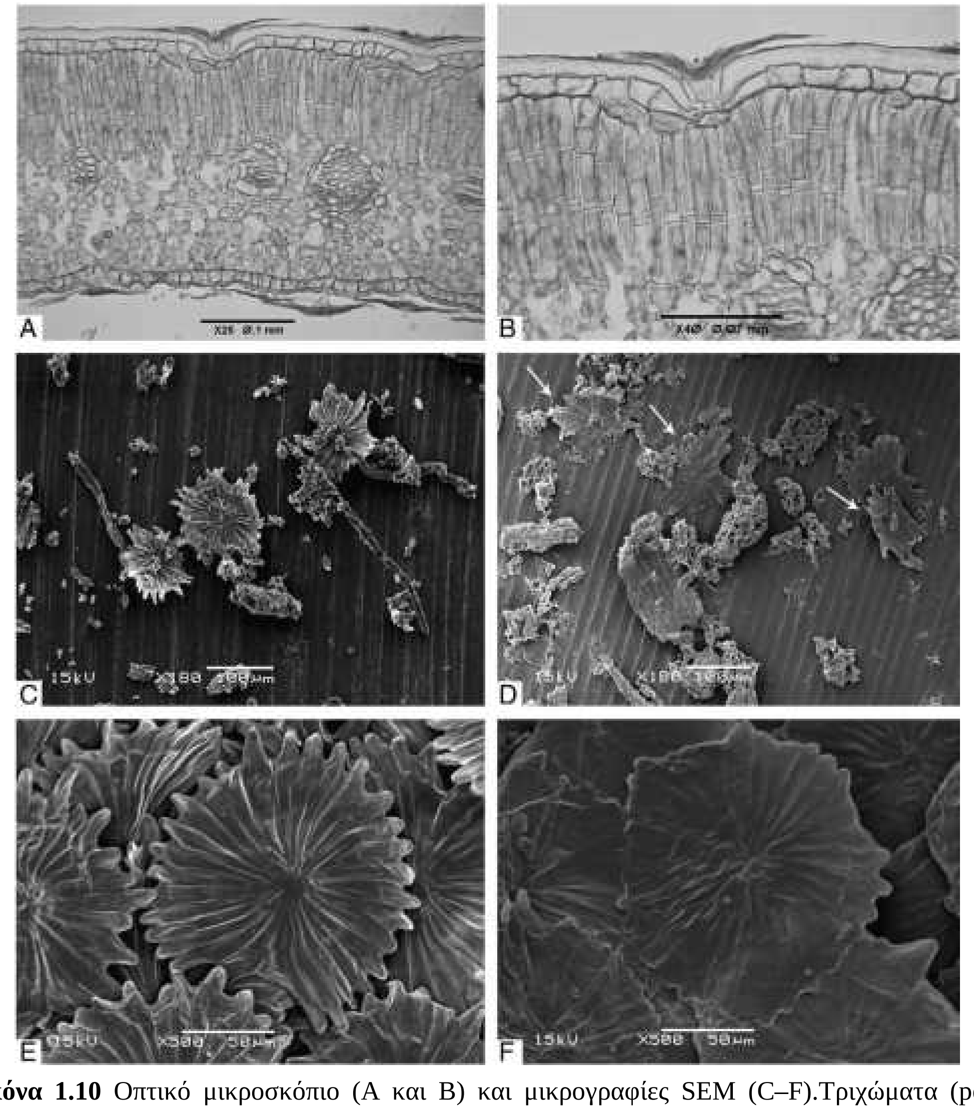
Η μορφολογία του κυττάρου της βάσης είναι χαρακτηριστική των ασπιδοειδών μη αδενωδών τριχωμάτων που παρουσιάζονται σε πολλά είδη της οικογένειας Oleaceae (Uphof, 1962). Στα νεαρά στάδια ανάπτυξης τους, τα μη αδενώδη τριχώματα της ελιάς παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ομοιότητα με τα αδενώδη τριχώματα (Fahn, 1986; Karabourniotis et al., 1996). Η ανάπτυξη των ασπιδοειδών τριχωμάτων περιλαμβάνει το σχηματισμό μιας προεξοχής (papilla) ενός επιδερμικού κυττάρου. Στη συνέχεια δημιουργείται περικλινές τοίχωμα, το οποίο χωρίζει την papilla στο κύτταρο της βάσης και στο τελικό κύτταρο απ’ το οποίο στη συνέχεια θα δημιουργηθεί η πολυκύτταρη κεφαλή της τρίχας (Karabourniotis *et al.*, 1998).

Μετά την ολοκλήρωση της έκπτυξης του ασπιδοειδούς τμήματος, εναποτίθεται σουβερίνη στο κύτταρο της βάσης, και στο κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων της ασπίδας με συνέπεια τη διακοπή της επικοινωνίας του φύλλο. (Fahn, 1986).

Παρατηρήσεις των φύλλων της ελιάς με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης δείχνουν σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις εναποθέσεις υλικών με διαφορετικές κρυσταλλικές δομές. Τα υλικά αυτά είναι γνωστά ως επιεφυμενιδικοί κηροί. Χημικά το στρώμα των κηρών των φύλλων της ελιάς αποτελείται από ομόλογες σειρές n αλκανίων, αλδεϋδών, αλκοολών, ελεύθερων λιπαρών οξέων (κυρίως τριτερπενοειδών) και ακυλιωμένων εστέρων (μεθύλ-φαινύλ-εστέρες).

Τα κυριότερα συστατικά των κηρών των φύλλων της *Olea europaea cvs Coratina και Cipressino* είναι τα πεντακυκλικά τριτερπένια (Bianchi *et al*., 1993).

Όσον αφορά στην πυκνότητα του τριχώματος των φύλλων της ελιάς, μειώνεται τόσο στην προσαξονική όσο και στην αποαξονική επιφάνεια, καθώς το φύλλο αναπτύσσεται. Η μείωση αυτή είναι περισσότερο έντονη στην προσαξονική πλευρά, με αποτέλεσμα τα ώριμα φύλλα να μην έχουν ουσιαστικά τρίχωμα στην επιφάνεια αυτή. Την ίδια τάση, όχι όμως τόσο έντονη, ακολουθεί και η αποαξονική επιφάνεια, η οποία διατηρεί ένα ποσοστό των αρχικών τριχών σε όλη τη ζωή του φύλλου (Karabourniotis *et al.*, 1994; 1995).



Εικόνα 1.10 Οπτικό μικροσκόπιο (A και B) και μικρογραφίες SEM (C–F).Τριχώματα (peltate scales) και φύλλα της Olea europaea subsp. Africana και subsp. europaea. A και B, εγκάρσιες τομές του φύλλου απεικονίζουν τη δομή, τη θέση και την πυκνότητα των τριχωμάτων. C και D, σκόνη φύλλων της subsp. africana (C) και subsp. europaea (D) όπου ξεχωρίζουν εύκολα τα τριχώματα. E και F, επιφάνειες του φύλλου of subsp. Africana δείχνει την χαρακτηριστική επικάλυψη με τριχώματα της αποαξονικής (E) και παραξονικής (F) πλευράς. The ethnobotany and pharmacognosy of Olea europaea subsp. africana (Oleaceae) H.S. Long, et al., 2009

1.3 Πρωτεωμική Ανάλυση

1.3.1 Πρωτεωμική Τεχνολογία

Η τεχνολογία της Πρωτεωμικής (Proteomics) χρησιμοποιείται εδώ και χρόνια (ο όρος Proteomics εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 1994). Αναπτύχθηκε κυρίως λόγω της προόδου της τεχνολογίας οργάνων αυτοματοποιημένης ανάλυσης σε συνδυασμό με τις γνώσεις και τις τεχνικές διαχωρισμού πρωτεϊνών που προϋπήρχαν ως τότε.

Κύριος στόχος της Πρωτεωμικής Ανάλυσης είναι η μελέτη των πρωτεωμάτων, δηλαδή του συνόλου των πρωτεϊνών ενός βιολογικού συστήματος (οργανισμός, όργανο, ιστός, κύτταρο κ.α.), των δομών τους, των αλληλεπιδράσεων, των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και πιο συγκεκριμένα των αλλαγών στα επίπεδα τους και τις τροποποιήσεις τους, ως αποτέλεσμα διαφόρων ασθενειών ή και ποικίλλων περιβαλλοντικών παραγόντων. Οι κλάδοι που ασχολούνται με τη δομή πρωτεϊνών, τη λειτουργία και την έκφραση ονομάζονται αντίστοιχα:

- **Δομική Πρωτεωμική**: Υψηλής ρυθμοαπόδοσης κρυσταλλογραφία ακτινών Χ και φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)
- **Λειτουργική Πρωτεωμική**: Διπλό Υβρίδιο στη ζύμη (Yeast Two-hybrid), Ανάλυση Μοτίβων (Motif Analysis), Ανάλυση Απαλοιφής (Deletion Analysis), Τσιπ Συνδετών (Ligand Chips)
- **Πρωτεωμική Έκφρασης** ή **Αναλυτική Πρωτεωμική**: Ηλεκτροφόρηση, Πρωτεϊνικά τσιπ, DNA τσιπ, Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC), Φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry).

Η κύρια διαφορά της Πρωτεωμικής από τις υπόλοιπες αναλυτικές τεχνικές πρωτεϊνών είναι να αναλύει τις πρωτεΐνες, όχι μία προς μία, αλλά μπορεί να μελετηθεί ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών ταυτοχρόνως με αυτοματοποιημένες μεθόδους. Η ανάπτυξη της πρωτεωμικής οφείλεται αφενός στον τεράστιο όγκο πληροφοριών που προήλθε από την αλληλούχιση γονιδιωμάτων διαφόρων οργανισμών μοντέλων και στην πρόοδο της Γενωμικής (από αυτούς τους τομείς άλλωστε αντλεί πολλά δεδομένα) αφετέρου στην εξέλιξη της φασματομετρίας μάζας, της επιστήμης της πληροφορικής και στην ανάπτυξη εξειδικευμένων λογισμικών.

Η Πρωτεωμική μπορεί να αναλύσει ακριβώς αυτή τη δυναμική προσδιορίζοντας όχι μόνο γονιδιακά προϊόντα, αλλά όπως αναφέρθηκε παραπάνω και την πληθώρα μετατροπών των προϊόντων αυτών (Vlahou A,και Fountoulakis M 2005).

1.3.2 Πρωτεωμική Έκφρασης και τεχνικές πρωτεϊνικού διαχωρισμού

Σκοπός της αναλυτικής πρωτεομικής είναι ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών ενός δείγματος, η αναγνώρισή τους μέσω φασματομετρίας μάζας και η βιοπληροφορική τους ανάλυση. Ο πρωτεϊνικός διαχωρισμός επιτυγχάνεται με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση, χρωματογραφία και SELDI ενώ η αναγνώριση των πρωτεϊνών γίνεται με την φασματομετρία μάζας MALDI-MS ή ESI-MS.

Οι τεχνικές για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών βασίζονται κυρίως στη μεγάλη ποικιλία των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνών. Στη δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το φορτίο τους ($1^{η}$ διάσταση) και το μοριακό τους βάρος ($2^{η}$ διάσταση). Η υγρή χρωματογραφία και το SELDI διαχωρίζουν τις πρωτεΐνες με βάση το μέγεθος, το φορτίο, την υδροφοβικότητα και τις βιοχημικές ιδιότητες αυτών.

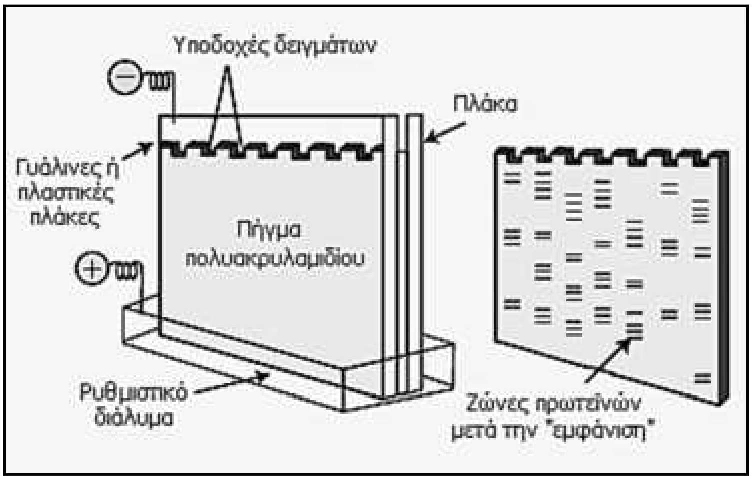
1.3.2.1 Ηλεκτοφόρηση μονής διάστασης

Η τεχνική της ηλεκτροφόρηση βασίζεται στη δυνατότητα μετακίνησης φορτισμένων μορίων μέσα σε ηλεκτρικά πεδία, προσφέρει έναν αναλυτικό τρόπο για να διαχωριστούν πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια όπως DNA και RNA. Η ταχύτητα μετακίνησης (υ) της πρωτεΐνης (ή κάθε μορίου) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z) και το συντελεστή τριβής (f).

$$\upsilon = Ez / f$$

Η ηλεκτροστατική δύναμη Ez που κατευθύνει το φορτισμένο μόριο προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο είναι αντίθετη της τριβής που εμφανίζεται μεταξύ του μορίου που μετακινείται και του μέσου μετακίνησης. Η σταθερά τριβής f εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται, καθώς και από την πυκνότητα του μέσου.

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται σχεδόν πάντα σε πήκτωμα και όχι σε διάλυμα, επειδή το πήκτωμα λειτουργεί ως μοριακός ηθμός καθιστώντας έτσι ευκολότερους τους διαχωρισμούς μορίων κι επιπλέον καταστέλλει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις της θερμοκρασίας, προϋπόθεση απαραίτητη για σωστό διαχωρισμό μορίων. Το πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμίδης που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N μεθυλενο-δις-ακρυλαμίδης (MBA) (Εικ.1.11).



Εικόνα 1.11. Πήκτωμα επίπεδης ηλεκτροφόρησης. Διακρίνεται ο τρόπος «φόρτωσης» των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής καθώς και η συνδεσμολογία της συσκευής.

Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης είναι τα καταλληλότερα για ηλεκτροφόρηση γιατί αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις και σχηματίζονται εύκολα. Επίσης το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμίδης και MBA. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα καθυστερούν. Μόρια ενδιαμέσου μεγέθους μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες.

Ο σχηματισμός του πηκτώματος, με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης και MBA, γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια δύο πολυμεριστικών παραγόντων: του υπερθειϊκού αμμωνίου (ammonium persulfate, APS) και του TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο), το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS. Έτσι σχηματίζεται ένα πλέγμα, με μέγεθος πόρων που κυμαίνεται αφενός ανάλογα με την ολική συγκέντρωση ακρυλαμίδης (%T) και MBA (%C, crosslinker) και, αφετέρου, ανάλογα με τη σχετική συγκέντρωση της MBA ως προς την ακρυλαμίδη. Γενικά πηκτώματα με μικρή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης έχουν μεγαλύτερους πόρους και το αντίστροφο.

1.3.2.2 Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων

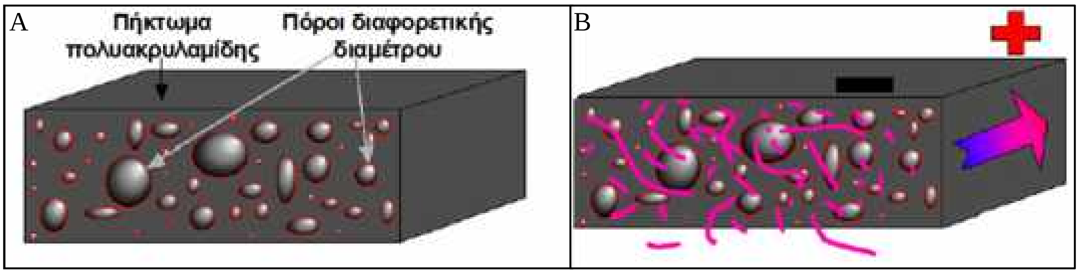
Ένα από τα πρώτα βήματα στην Πρωτεωμική ανάλυση είναι ο διαχωρισμός μείγματος πρωτεϊνών . Η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων είναι το βασικό και κλασικό πλέον εργαλείο για τη σκιαγράφηση του πρωτεωμικού προφίλ βιολογικών δειγμάτων (O’ Farell PH 1975), καθώς παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης χιλιάδων πρωτεϊνών σε κάθε πείραμα ταυτόχρονα. Οι αρχές της τεχνικής θεμελιώθηκαν το 1975.Το πρώτο στάδιο της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης περιλαμβάνει την ισοηλεκτρική εστίαση, τον διαχωρισμό δηλαδή των πρωτεϊνών με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο. Η ισοηλεκτρική εστίαση αποτελεί μία κατάσταση ισορροπίας κατά την οποία υπό την επίδραση ενός ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου οι πρωτεΐνες κινούνται κατά μήκος μίας βαθμιδωτής κλίσης pH σύμφωνα με το φορτίο τους μέχρι να φτάσουν σε εκείνο το σημείο όπου δεν διαθέτουν πια «καθαρό» φορτίο (το αλγεβρικό άθροισμα του φορτίου τους είναι μηδέν) και συνεπώς σταματούν να κινούνται. Αυτή η τιμή του pH καλείται ισοηλεκτρικό σημείο (pI). Αυτό γίνεται διότι οι πρωτεΐνες είναι αμφοτερικά μόρια και το ηλεκτρικό τους φορτίο εξαρτάται από την τιμή του pH του διαλύματος στο οποίο βρίσκονται. Γενικά είναι θετικά φορτισμένες σε pH<pI, ενώ είναι αρνητικά φορτισμένες σε pH>pI. Αν για οποιοδήποτε λόγο κάποια πρωτεΐνη ξεφύγει από το σημείο όπου έχει εστιάσει, τότε αμέσως φορτίζεται και επανέρχεται σε αυτό (Berkelman T, και Stenstedt T).
Η αναλυτική ικανότητα της ισοηλεκτρικής εστίασης καθορίζεται από την εξίσωση του Svensson: DpI = [D[d(pH)/dx]:E[-du/d(pH)]]1/2

DpI: Αναλυτική ικανότητα
D: Συντελεστής διάχυσης της πρωτεΐνης
E: Δύναμη του πεδίου (V/cm)
d(pH)/dx: Βαθμίδωση pH
du/d(pH): Κλίση κινητικότητας

Η αναλυτική ικανότητα επομένως επηρεάζεται από το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος, το οποίο με τη σειρά του επηρεάζει τη διάχυση των πρωτεϊνών, από την κλίση της βαθμίδωσης pH και από την τιμή της εφαρμοζόμενης τάσης του ηλεκτρικού πεδίου.

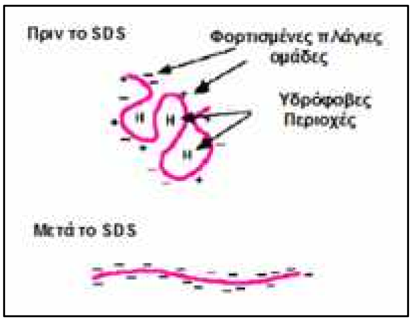
Το δεύτερο στάδιο της ηλεκτροφόρησης 2 διαστάσεων αποτελεί ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με SDS-PAGE. Σε αυτή τη φάση ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το μοριακό τους βάρος και επιτελείται μέσω κάθετης ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου το οποίο διαθέτει την επιθυμητή συγκέντρωση ακρυλαμίδης ανάλογα με τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες (Berkelman T, και Stenstedt T). Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου είναι από τις πλέον συνήθεις τεχνικές διαχωρισμού και προσδιορισμού των φαινομενικών μοριακών βαρών των πρωτεϊνών.

Τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου αποτελούνται από αλυσίδες πολυμερισμένου ακρυλαμιδίου που διασυνδέονται μεταξύ τους με τη βοήθεια του N,N'-methylene bisacrylamide. Ο πολυμερισμός γίνεται με τη βοήθεια υπερθειικού αμμωνίου (APS), το οποίο παρέχει ελεύθερες ρίζες και επιταχύνεται με την προσθήκη TEMED, που καταλύει το σχηματισμό τους. Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πόρων στο πήκτωμα. Το μέγεθος των πόρων καθώς και το αποτελεσματικό εύρος διαχωρισμού του πηκτώματος (Εικ.1.12,Α) εξαρτώνται από τη συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου. Τα πρωτεϊνικά μόρια μικρότερου μεγέθους κινούνται πιο γρήγορα σε σχέση με τα μεγαλύτερα (Εικ.1.12,Β) (Karamessinis MP 2004)



Εικόνα 1.12. Α: Δημιουργία πόρων διαφορετικής διαμέτρου και **Β**: Κινητικότητα πρωτεϊνικών μορίων διαφορετικού μεγέθους σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

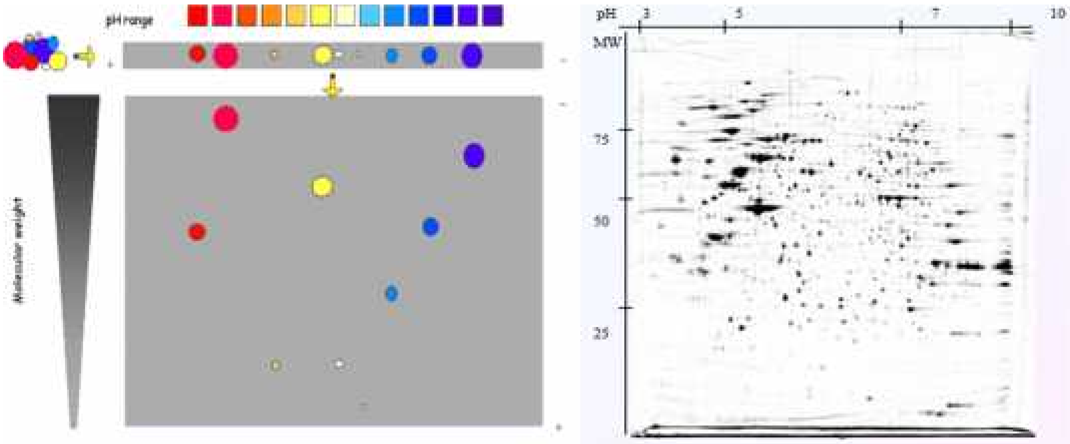
Η ηλεκτροφόρηση γίνεται κάτω από συνθήκες που εξασφαλίζουν την αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις πολυπεπτιδικές υπομονάδες. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται το δωδέκυλο θειικό νάτριο (SDS), ένα ισχυρό ανιονικό απορρυπαντικό μαζί με κάποιον αναγωγικό παράγοντα. Το SDS προσδένεται στα αποδιαταγμένα πολυπεπτίδια σε αναλογία μάζας 1,4:1 και τους προσδίδει αρνητικό φορτίο (Εικ.1.13). Επειδή το ποσοστό του SDS το οποίο προσδένεται είναι ανάλογο του Μ.Β. του πολυπεπτιδίου και ανεξάρτητο της αλληλουχίας του, τα σύμπλοκα SDS-πολυπεπτίδια μετακινούνται στο πήκτωμα υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου σύμφωνα με το μέγεθός τους. Δεν γίνεται προσθήκη SDS στην IHE καθώς στην πρώτη διάσταση οι πρωτεΐνες πρέπει να διαχωριστούν βάσει του ενδογενούς τους pI. Η παρουσία αναγωγικού παράγοντα συνήθως μερκαπτοαιθανόλης, διθειοθρεϊτόλης ή διθειοερυθριτόλης βοηθάει στην αποδιάταξη μίας πρωτεΐνης καταστρέφοντας τους δισουλφιδικούς δεσμούς (Karamessinis MP 2004).



Εικόνα 1.13. Η δράση του SDS στη διαμόρφωση μίας πρωτεΐνης.

Δύο συστήματα διαλύματος είναι γνωστά στην SDS-PAGE, το συνεχές και το ασυνεχές. Στο πρώτο, τα δείγματα τοποθετούνται στο μοναδικό πήκτωμα στο οποίο γίνεται ο διαχωρισμός. Το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για τα δείγματα, το πήκτωμα και τη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Αντίθετα στο ασυνεχές σύστημα χρησιμοποιούνται διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα ως προς τη σύσταση και το pH στο πήκτωμα και τη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Τα δείγματα τοποθετούνται σε ένα πήκτωμα μεγάλων πόρων, το πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel) το οποίο πολυμερίζεται επάνω σε πήκτωμα μικρότερων πόρων, το πήκτωμα διαχωρισμού (resolving/separating gel). Το κύριο πλεονέκτημα του ασυνεχούς συστήματος είναι ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σχετικά μεγάλοι όγκοι πρωτεϊνικών δειγμάτων στο πήκτωμα διατηρώντας πολύ καλή ανάλυση των συστατικών τους. Αυτό συμβαίνει γιατί οι πρωτεΐνες επιστοιβάζονται κατά τη διάρκεια της μετακίνησής τους υπό την επίδραση ηλεκτρικού φορτίου μέσα από το πήκτωμα επιστοίβαξης σχηματίζοντας μία μικρή ζώνη πριν την είσοδό τους στο πήκτωμα διαχωρισμού. Το συνεχές σύστημα χρησιμοποιείται συχνότερα στην Η2Δ ενώ το ασυνεχές σε άλλες εφαρμογές όπως η ανοσοαποτύπωση κατά Western και ο κλασικός διαχωρισμός πρωτεϊνών με βάση μόνο το Μ.Β. (Karamessinis MP 2004).

A. B.

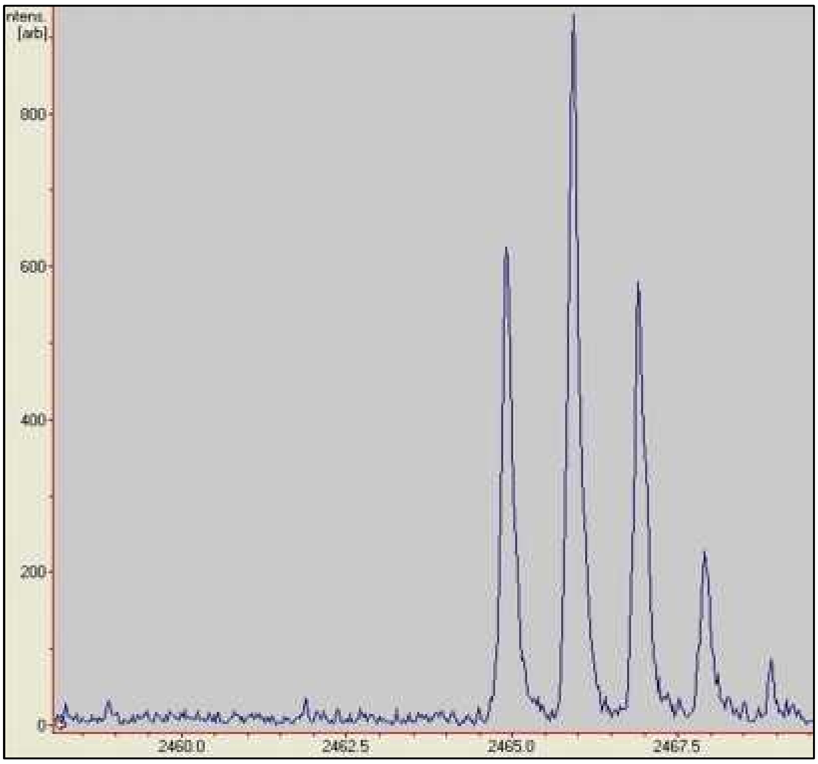


Εικόνα 1.14. Α.: Σχηματική αναπαράσταση της Η2Δ. Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται αρχικά με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο και στη συνέχεια με βάση το μοριακό τους βάρος Β.: Η πραγματική εικόνα ενός πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου με τις πρωτεϊνικές κηλίδες στο τέλος ενός πειράματος Η2Δ.

Στο τέλος της διαδικασίας δημιουργείται μία εικόνα πηκτώματος με διάσπαρτες κηλίδες, κάθε μία από τις οποίες αντιπροσωπεύει μία πρωτεΐνη. Αναφέρεται ο όρος πρωτεΐνη και όχι γονιδιακό προϊόν καθώς πολλές κηλίδες μπορεί να αντιστοιχούν στο ίδιο γονιδιακό προϊόν, αλλά σε διαφορετικές ισομορφές ή και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Εικ.1.14Β).

1.3.2.3 Υγρή χρωματογραφία

Ο διαχωρισμός με χρωματογραφία και κυρίως με υγρή χρωματογραφία συνηθίζεται στην αναλυτική πρωτεωμική και βασίζεται κυρίως στις φυσικοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών. Οι κυριότερες από αυτές οι οποίες λαμβάνονται υπόψη στην υγρή χρωματογραφία είναι το μέγεθος, το φορτίο, η υδροφοβικότητα και οι βιοχημικές ιδιότητες.

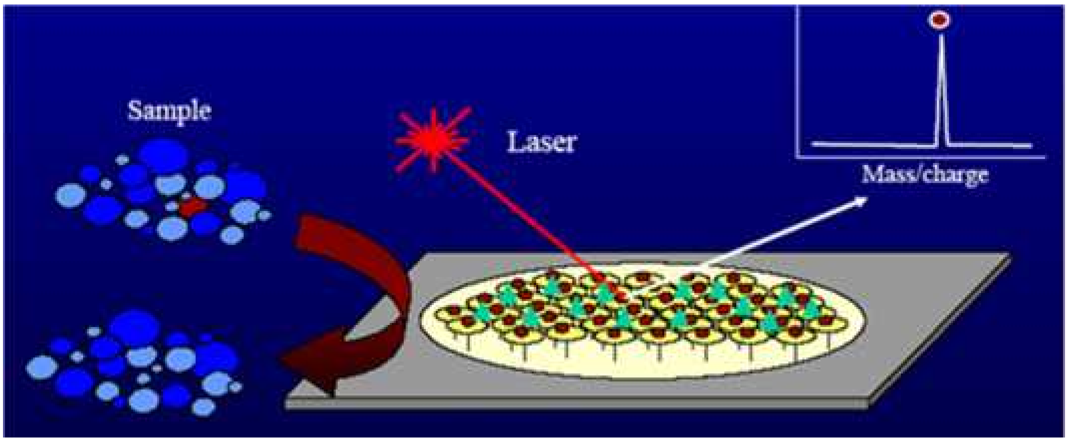


Εικόνα 1.15. Τυπική εικόνα χρωματογραφήματος. Στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η απορρόφηση και στον οριζόντιο ο χρόνος.

Οι συνήθεις πληροφορίες που αντλούνται από ένα χρωματογράφημα (Εικ.1.15) είναι οι ακόλουθες: α) Ο αριθμός των κορυφών που εμφανίζονται σε αυτό παρέχει μία πρώτη εκτίμηση για την πολυπλοκότητα του δείγματος. β) Η θέση των κορυφών σε σχέση με τον χρόνο έκλουσης παρέχει πληροφορίες σχετικά με την ποιοτική σύσταση του δείγματος (σε συσχέτιση με πρότυπα). γ) Η περιοχή που καταλαμβάνει μία κορυφή μπορεί να δώσει πληροφορίες για την σχετική συγκέντρωση των συστατικών του δείγματος. δ) Αν το όλο σύστημα είναι συνδεδεμένο με φασματογράφο μάζας τότε μπορεί να επιτευχθεί και αναγνώριση των πρωτεϊνών (Korfmacher WA 2005). Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί και η τεχνική της πολυδιάστατης χρωματογραφίας η οποία αυξάνει ακόμα περισσότερο την αναλυτική ικανότητα διαχωρισμού πρωτεϊνών και πεπτιδίων.

1.3.2.4 SELDI

Το SELDI (Surface-enhanced laser desorption/ionization) αποτελεί ουσιαστικά μία τεχνική χρωματογραφίας πάνω σε chips. Τα chips αυτά δεσμεύουν τις πρωτεΐνες με διάφορους τρόπους εκμεταλλευόμενα τις χημικές και βιοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών. Έτσι η επιφάνεια των chips μπορεί να είναι υδρόφοβη προκειμένου να δεσμεύει υδρόφοβες πρωτεΐνες, ανιονική, κατιονική ακόμα και ανάμεικτη (πχ: υδρόφοβη και ανιονική), ανάλογα με τις συνθήκες διαχωρισμού που επιδιώκονται. Εκμεταλλευόμενοι τις βιοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών η επιφάνεια των chips μπορεί επίσης να έχει τοποθετημένα πάνω της αντισώματα, DNA, ένζυμα ακόμα και πρωτεϊνικούς υποδοχείς (Tang N et al., 2004) Η τεχνολογία του SELDI-TOF-MS ProteinChip (Εικ.1.16) επιτελείται με τα ακόλουθα βήματα: α) Το δείγμα τοποθετείται απευθείας πάνω στο chip. β) Οι πρωτεΐνες δεσμεύονται στο chip λόγω συγγένειας. γ) Οι πρωτεΐνες που έχουν δεσμευτεί στο chip αναλύονται με φασματομετρία μάζας (MALDI-TOF).



Εικόνα 1.16 Τεχνολογία SELDI-TOF-MS ProteinChip. Το δείγμα μαζί με κάποιο μόριο που απορροφά ενέργεια απλώνεται στο chip. Οι πρωτεΐνες του δείγματος δεσμεύονται σε αυτό λόγω συγγένειας και μέσω ιονισμού που προκαλείται από μία πηγή λέιζερ εξατμίζονται, περνούν στην αέρια φάση και αναλύονται με φασματομετρία μάζας (συνήθως MALDI). Η μεγαλύτερη ποσότητα ενέργειας που μεταφέρεται από το λέιζερ απορροφάται από κατάλληλη ουσία η οποία απλώνεται στο chip μαζί με το δείγμα. Με αυτόν τον τρόπο το δείγμα προφυλάσσεται από εκτεταμένη πρωτεόλυση των βιομορίων του, γεγονός που είναι απευκταίο.

1.3.2.5 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των τεχνικών πρωτεϊνικού διαχωρισμού

Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης είναι ότι αποτελεί μία κλασική και καλά εδραιωμένη μέθοδο, έχει μεγάλη αναλυτική ικανότητα (οπτικοποίηση χιλιάδων πρωτεϊνικών μορφών), συνδυάζεται με μεθόδους επισήμανσης των πρωτεϊνών, προσφέρει δυνατότητα ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων και μπορεί να ανιχνεύσει μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (O’ Farell PH 1975). Οι κυριότεροι περιορισμοί αυτής της μεθόδου έχουν να κάνουν με το γεγονός ότι αποτελεί μία επίπονη διαδικασία, δεν διαθέτει πάντα καλή επαναληψιμότητα, τα ειδικά λογισμικά για την ανάλυση εικόνας πηκτωμάτων, τη σύγκριση και την ποσοτικοποίησή τους επιδέχονται βελτίωσης και τέλος η ανάλυση πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους, ακραίων τιμών pH (ιδιαίτερα όξινων ή βασικών) αλλά και των υδρόφοβων πρωτεϊνών είναι αρκετά δύσκολη.

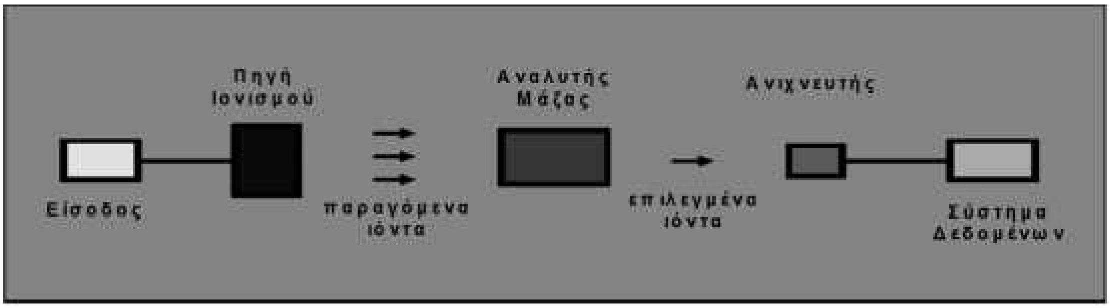
Όσον αφορά την χρωματογραφία τα σημαντικότερα θετικά στοιχεία της εντοπίζονται στη μεγάλη ποικιλία διαθέσιμων ειδών χρωματογραφίας η οποία επιτρέπει την ανάλυση αντίστοιχα μεγάλου αριθμού και είδους πρωτεϊνών. Οι πληροφορίες που παρέχονται από την χρωματογραφία είναι συμπληρωματικές ως προς την Η2Δ. Σε συνδυασμό με μεθόδους επισήμανσης πρωτεϊνών μπορεί να επιτύχει αξιόπιστη ποσοτικοποίηση και τέλος έχουν αναπτυχθεί αυτοματοποιημένα συστήματα αυτής της μεθόδου. Στα μειονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται το γεγονός ότι αποτελεί επίπονη διαδικασία και ειδικά για πειράματα πολυδιάστατης χρωματογραφίας απαιτείται ακριβός εξοπλισμός.

Τέλος, το SELDI συγκεντρώνει αρκετά θετικά στοιχεία καθώς αποτελεί μία σχετικά απλή και γρήγορη μέθοδο ανάλυσης, διαθέτει καλή επαναληψιμότητα, παρουσιάζει καλή αναλυτική ικανότητα για πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους και εφαρμόζεται για την ανάλυση δειγμάτων που δεν έχουν υποστεί κάποια ειδική επεξεργασία. Στα αρνητικά αυτής της μεθόδου περιλαμβάνονται η σχετικά μικρή αναλυτική ικανότητα και το γεγονός ότι η όλη διαδικασία δεν έχει ακόμα εδραιωθεί.

Μία καλή λύση για την επίτευξη μεγάλης αναλυτικής ικανότητας αποτελεί η χρησιμοποίηση συνδυασμού διαφορετικών μεθόδων διαχωρισμού έτσι ώστε να επιτευχθεί και συνδυασμός των δυνατοτήτων τους. Μία τέτοια προσέγγιση σε συνδυασμό με εφαρμογές κλασμάτωσης και εκλεκτικής κατακρήμνισης πρωτεϊνικών μειγμάτων μπορεί να οδηγήσει στην ανίχνευση πρωτεϊνών χαμηλής αφθονίας.

1.3.3 Φασματομετρία Μάζας

Η αναγνώριση των πρωτεϊνών μέσω της φασματομετρίας μάζας έδωσε μεγάλη ώθηση στην πρωτεωμική, σε τέτοιο βαθμό ώστε σήμερα η τελευταία να θεωρείται αλληλένδετη με την φασματομετρία μάζας. Ένας φασματογράφος μάζας αποτελείται από την πηγή ιονισμού, τον αναλυτή μάζας, τον ανιχνευτή και το σύστημα συλλογής των φασματομετρικών δεδομένων (Εικ.1.17).



Εικόνα 1.17. Απεικόνιση των βασικών συστατικών ενός συστήματος φασματομετρίας μάζας.

Το υπό ανάλυση δείγμα εισάγεται στην πηγή ιονισμού του οργάνου μέσα στην οποία τα μόρια του δείγματος ιονίζονται. Αυτό γίνεται γιατί τα ιόντα είναι ευκολότερα στον χειρισμό τους σε σχέση με τα ουδέτερα μόρια. Τα δημιουργούμενα ιόντα οδηγούνται στον αναλυτή μάζας και διαχωρίζονται σύμφωνα με το λόγο μάζα/φορτίο (m/z ratio). Τα διαχωριζόμενα ιόντα ανιχνεύονται με τη μορφή ηλεκτρικού σήματος. Ο αναλυτής και ο ανιχνευτής του φασματογράφου, συνήθως και η πηγή ιονισμού βρίσκονται υπό κενό προκειμένου τα δημιουργούμενα ιόντα να έχουν τη δυνατότητα μετακίνησης από τη μία άκρη του οργάνου ως την άλλη χωρίς να παρεμποδίζονται από μόρια αέρα (Domon B, Aebersold R 2006).

1.3.3.1 Μέθοδοι ιονισμού βιομορίων

Παλαιότερα η μετάβαση ενός μορίου στην αέρια φάση προκειμένου να εισέλθει στον φασματογράφο μάζας γινόταν με θέρμανση. Τα στερεά δείγματα τοποθετούνταν στον φασματογράφο μάζας και θερμαίνονταν απότομα προκειμένου να εξατμιστούν. Αυτή η τεχνική όμως δεν ήταν καθόλου χρήσιμη για μακρομόρια όπως οι πρωτεΐνες, το DNA και διάφορα άλλα πολυμερή. Αυτό συμβαίνει γιατί τα προαναφερόμενα μόρια αποικοδομούνται με τη θέρμανση. Ακόμα και αν ήταν δυνατόν να εισέλθει κάποιο δείγμα στο φασματογράφο μάζας με την παραπάνω μέθοδο έπρεπε να ιονιστεί είτε με σύγκρουση ηλεκτρονίων είτε με χημικές μεθόδους ιονισμού. Αυτές οι μέθοδοι ιονισμού όμως αυξάνουν σημαντικά τον κατακερματισμό των μορίων, σε τέτοιο βαθμό ώστε να μην υπάρχει πλέον επαρκής ποσότητα αναλύτη για να δώσει ένα καλό ιοντικό σήμα.

Σε αυτό το σημείο η λύση δόθηκε από τους John Fenn, Franz Hillenkamp και Michael Karas (Εικ.1.18) με τη θεμελίωση νέων μεθόδων ιονισμού βιομορίων ESI και MALDI.

Εικόνα 1.18. Οι θεμελιωτές των σύγχρονων μεθόδων ιονισμού βιομορίων John Fenn (ESI), Franz Hillenkamp και Michael Karas .

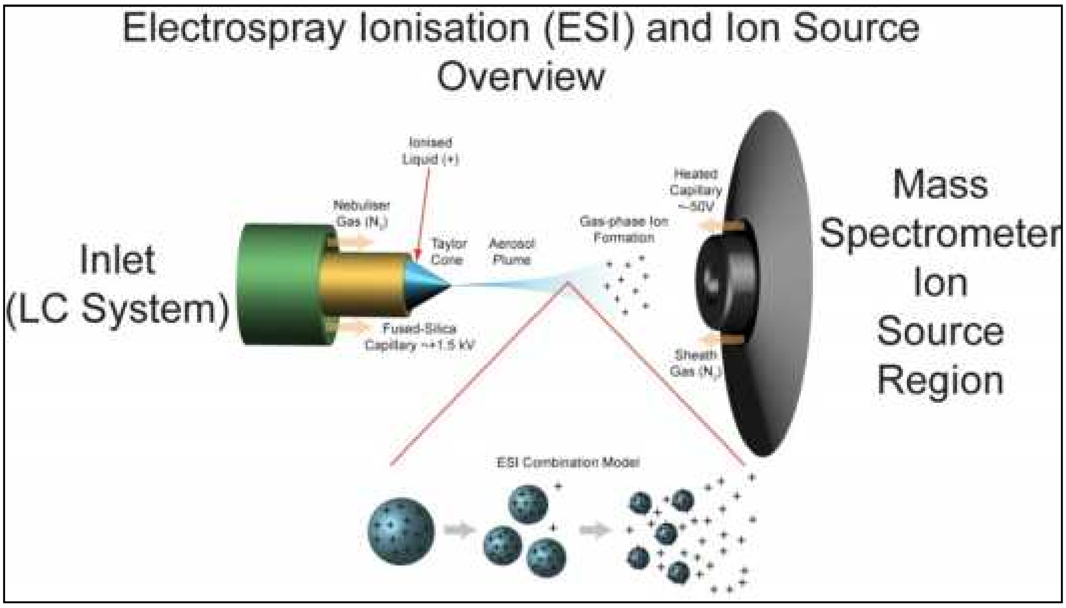
- **ESI**

Ο ιονισμός του αναλύτη γίνεται μέσα σε διάλυμα και η μεταφορά του στην αέρια φάση επιτυγχάνεται με ψεκασμό από ειδική βελόνα σε ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο (Εικ.1.19). Με αυτή τη μέθοδο ιονισμού συνήθως δημιουργούνται ιόντα πολλαπλά φορτισμένα (Fenn JB et al., 1989; Whitehouse CM et al., 1985). Τα Nano-ESI συστήματα έχουν τη δυνατότητα να εισάγουν στο φασματογράφο δείγμα με πολύ μικρή ροή (μικρότερη από 25nL/min).

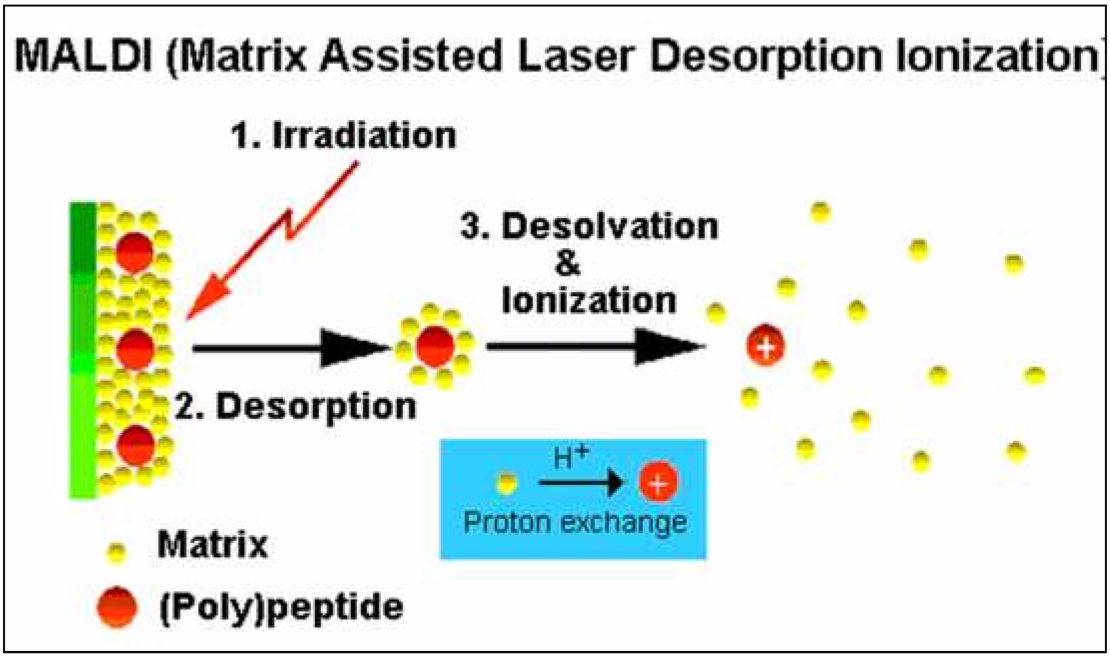
- **MALDI**

Στη μέθοδο αυτή το πρωτεϊνικό δείγμα αναμειγνύεται με ένα μικρό οργανικό μόριο (matrix) το οποίο απορροφά ενέργεια στο μήκος κύματος που εκπέμπει το λέιζερ. Το δείγμα απλώνεται σε ειδική επιφάνεια (plate, chip) και αφήνεται να ξεραθεί. Με την ξήρανση έχουν ήδη αρχίσει να σχηματίζονται οι κρύσταλλοι του μείγματος matrix-πρωτεϊνών. Στη συνέχεια επάγεται ιονισμός από πηγή λέιζερ (συνήθως αζώτου) δημιουργώντας ιόντα τα οποία έχουν κατά κύριο λόγο φορτίο +1 (Hillenkamp F et al., 1991; Karas M et al., 1987) (Εικ.1.20).

Τόσο το MALDI όσο και το ESI αποτελούν ευαίσθητες μεθόδους ιονισμού. Η φασματομετρία μάζας με τη μέθοδο ιονισμού του MALDI συνδυάζεται συνήθως με ανάλυση πρωτεϊνών από δισδιάστατα πηκτώματα και αποτελεί μία πολύ καλά εδραιωμένη μέθοδο. Το MALDI χρησιμοποιείται κυρίως για την ανάλυση απλών πρωτεϊνικών μειγμάτων. Το ESI μπορεί να συνδυαστεί με μεθόδους υγρής χρωματογραφίας. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ ευαίσθητη και προτιμάται για την ανάλυση σύνθετων μειγμάτων.



Εικόνα 1.19. Η διαδικασία του ESI. **lamondlab.com**



Εικόνα 1.20. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου ιονισμού με MALDI.

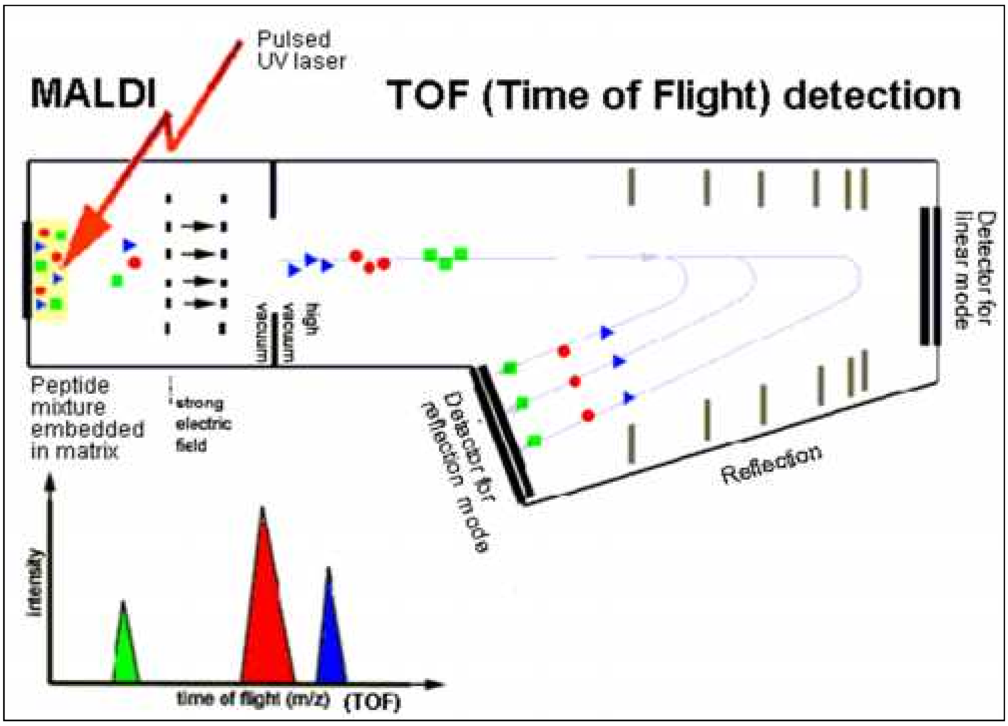
1.3.3.2 Αναλυτές μάζας

Υπάρχουν τρεις τύποι αναλυτών μάζας που χρησιμοποιούνται ευρέως στην Αναλυτική Πρωτεωμική: α) Ο αναλυτής μάζας που μετράει το χρόνο πτήσης των ιόντων (Time of Flight-TOF). β) Το τετράπολο (Quadrupole). γ) Η παγίδα ιόντων (Ion Trap).

- **TOF**

Τα ιόντα «πετούν» από τη μία άκρη του αναλυτή (λίγο μετά την πηγή ιονισμού) ως την άλλη (ανιχνευτής) υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου και κάτω από κενό

(Εικ.1.21). Ο χρόνος που απαιτείται για να διανύσουν αυτή την απόσταση είναι ανάλογος του λόγου μάζα/φορτίο (Hillenkamp F et al., 1991).

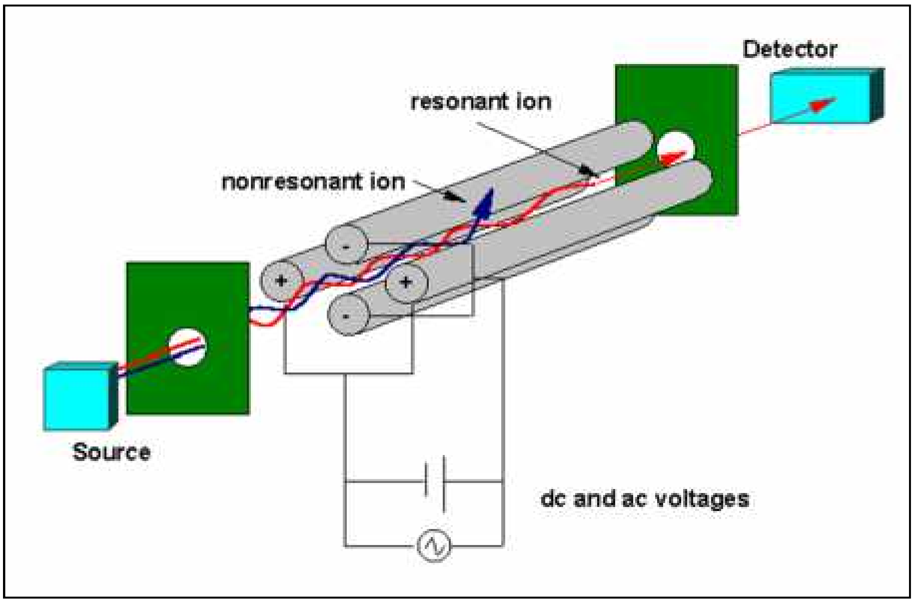


Εικόνα 1.21. Σχηματική αναπαράσταση του αναλυτή μάζας τύπου TOF.

- **Τετράπολο**

Το τετράπολο αποτελείται από τέσσερις μεταλλικές ράβδους οι οποίες είναι τοποθετημένες σε παράλληλη διάταξη. Αυτές οι ράβδοι δημιουργούν μαγνητικό πεδίο το οποίο προκαλεί την κίνηση των ιόντων ανάμεσά τους (Εικ.1.22). Ανάλογα με την τάση, ιόντα με συγκεκριμένο λόγο μάζα/φορτίο περνούν από το τετράπολο (March RE, και Hughes RJ 1989; March RE 1997)

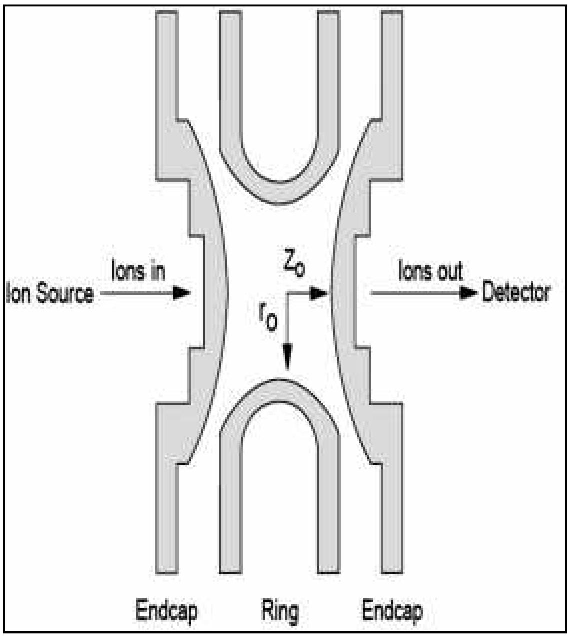
Quadrupole Analyzer



Εικόνα 1.22. Ο αναλυτής μάζας τετράπολο.

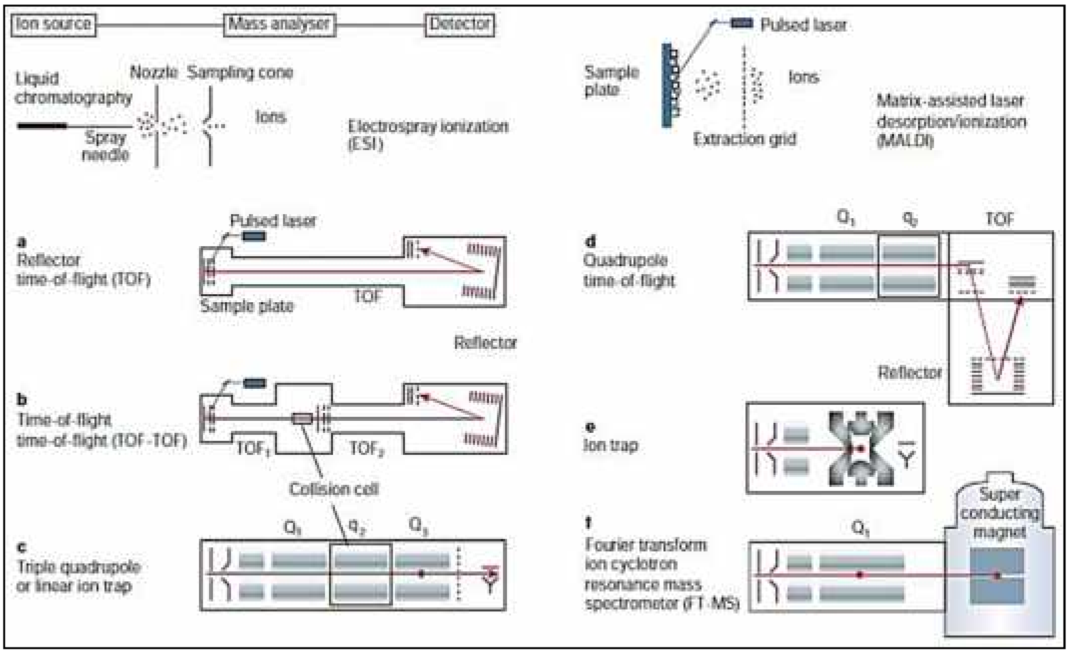
- **Παγίδα ιόντων**

Ο αναλυτής αυτός αποτελείται από ένα επίμηκες και ένα κυκλικό ηλεκτρόδιο. Τα ιόντα παγιδεύονται και φυλάσσονται μέσα σε αυτόν προκειμένου να υποστούν φασματομετρική ανάλυση (March RE 1997) (Εικ.1.23).



Εικόνα 1.23. Ο αναλυτής μάζας τύπου παγίδας ιόντων (Cooks et al 1999).

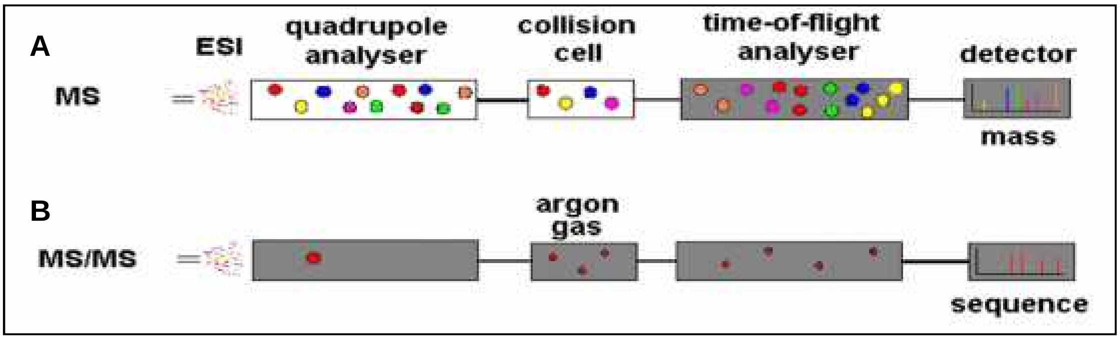
Παραδοσιακά η μέθοδος ιονισμού MALDI συνδυάζεται κυρίως με αναλυτές μάζας τύπου TOF και το ESI με το τετράπολο και τις παγίδες ιόντων. Ο κάθε αναλυτής μάζας που αναφέρθηκε διαθέτει ξεχωριστά πλεονεκτήματα και περιορισμούς όσον αφορά την ανάλυση, ακρίβεια και ευαισθησία. Σήμερα έχουν αναπτυχθεί υβρίδια φασματογράφων μάζας (Εικ.1.24) για την βελτιστοποίηση της τεχνικής της φασματομετρίας μάζας.



Εικόνα 1.24. Διάφορες παραλλαγές φασματογράφων μάζας (Aebersold R, και Mann M 2003)

1.3.3.3 Η τεχνική MS/MS (Tandem MS)

Το MS/MS είναι μία αρκετά πιο ευαίσθητη τεχνική για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών με τη βοήθεια της φασματομετρίας μάζας. Βασική αρχή του MS/MS είναι η περαιτέρω διάσπαση των παραγόμενων από τις πρωτεΐνες πεπτιδίων προκειμένου να επιτευχθεί αλληλούχισή τους (Marzo A, και Bo LD 2007) (Εικ.1.25). Το MS/MS συνδυάζεται ως επί το πλείστον με συστήματα ESI τα οποία είναι συζευγμένα με τετράπολα ή παγίδες ιόντων.



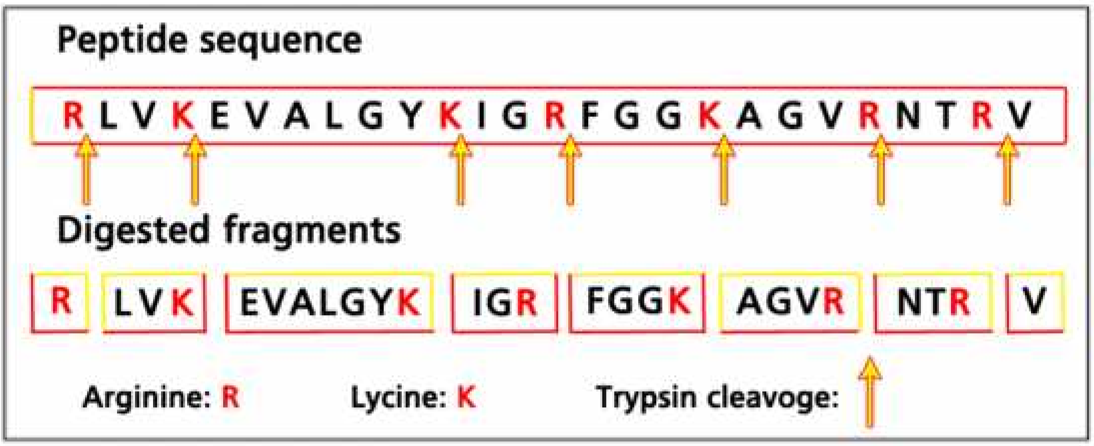
Εικόνα 1.25. Σχηματική απεικόνιση Α.: ενός κλασικού πειράματος φασματομετρίας μάζας και Β.: ενός πειράματος MS/MS. Η πρώτη περίπτωση οδηγεί στη δημιουργία ενός χαρακτηριστικού PMF. Στη δεύτερη περίπτωση επιλέγεται ένα πεπτίδιο για περαιτέρω ανάλυση, διασπάται (συνήθως βομβαρδιζόμενο από μόρια κάποιου αδρανούς αερίου) και στη συνέχεια αναγνωρίζεται η αμινοξική αλληλουχία του.

1.3.3.4 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών μέσω πεπτιδικών χαρτών και φασματομετρίας μάζας

Η αναγνώριση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται μετά από την πέψη τους με ένα πρωτεολυτικό ένζυμο και τα προκύπτοντα πεπτίδια (πεπτιδικός χάρτης) ταυτοποιούνται με φασματομετρία μάζας. Οι πειραματικοί πεπτιδικοί χάρτες (ανάλογοι των χαρτών περιορισμού όταν πέπτεται ένα τμήμα DNA με περιοριστικά ένζυμα) συγκρίνονται με αντίστοιχους θεωρητικούς σε ειδικές βάσεις δεδομένων.

Εν συντομία, στην περίπτωση των 2Δ πηκτωμάτων, οι πρωτεΐνες (μέσα στις κηλίδες πηκτωμάτων που έχουν ήδη εξαχθεί) υφίστανται πέψη (in gel digestion) με θρυψίνη. Η θρυψίνη επιλέγεται διότι η ακετυλιωμένη της μορφή είναι εμπορικά διαθέσιμη (αποφυγή πέψης της πρωτεάσης από την ίδια της την ενεργότητα) και γιατί πέπτει στο καρβοξυτελικό άκρο αργινίνης (R) ή λυσίνης (K), εκτός και αν ακολουθεί προλίνη (P) (Εικ.1.26). Η λυσίνη και η αργινίνη είναι αρκετά κοινά αμινοξέα και αποτελούν το 5% και 6% αντίστοιχα του συνολικού αριθμού αμινοξέων στις πρωτεΐνες των ανώτερων οργανισμών (Kinter M, και Sherman NE).

Η συχνότητα αυτή σημαίνει ότι θεωρητικά υπάρχουν 11 σημεία πέψης για κάθε 100 αμινοξέα σε μία πρωτεϊνική αλληλουχία και τα πεπτίδια θα έχουν μήκος 9 αμινοξέα. Αυτό διευκολύνει ιδιαίτερα τη ΦΜ, ώστε να επιτυγχάνεται μεγαλύτερη ακρίβεια ταυτοποίησης.



Εικόνα 1.26. Πέψη μιας τυχαίας πρωτεϊνικής αλληλουχίας με θρυψίνη. Φαίνονται τα σημεία πέψης καθώς και τα προκύπτοντα πεπτίδια.

Μετά την πέψη, τα πεπτίδια ταυτοποιούνται με ΦΜ καθώς οι παρατηρούμενες πεπτιδικές μάζες συσχετίζονται με πεπτιδικά αποτυπώματα (peptide fingerprints-λίστα πεπτιδίων που έχει προκύψει από τη θεωρητική πέψη μίας πρωτεΐνης και εμφανίζονται με συγκεκριμένα πρότυπα στο φάσμα πέψης της) μέσω μηχανών αναζήτησης/αλγορίθμων (Εικ.1.27). Η παραπάνω διαδικασία είναι γνωστή και ως Peptide Mass Fingerprinting (PMF). Ένα φάσμα μάζας πεπτιδικού μείγματος που προκύπτει από την πέψη μίας πρωτεΐνης από συγκεκριμένο ένζυμο παρέχει τόσο μεγάλη ειδικότητα στο αποτέλεσμα, που συχνά είναι δυνατό να γίνει ταυτοποίηση μίας πρωτεΐνης από αυτή και μόνο την πληροφορία.

Εικόνα 1.27. Στο κάτω μέρος της εικόνας παρατηρείται το θεωρητικό φάσμα πέψης (καταχωρημένο σε βάση δεδομένων) μίας πρωτεΐνης και στο πάνω μέρος το πειραματικό. Το δεύτερο συσχετίζεται και συγκρίνεται με το πρώτο με ειδικούς αλγόριθμους, ώστε να ταυτοποιηθεί το μόριο που αναζητείται. www.matrixscience.com

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών στην Πρωτεωμική Ανάλυση είναι η φσματομετρία μάζας τύπου MALDI (Lahm HW. και Langen H 2000, ; Karas M. και Hillenkamp F 1988). Η μέθοδος αυτή είναι αρκετά ευαίσθητη, απαιτεί μικρές ποσότητες δείγματος και μπορεί άνετα να χρησιμοποιηθεί για πειράματα υψηλής ρυθμοαπόδοσης (Görg A et al 2004).

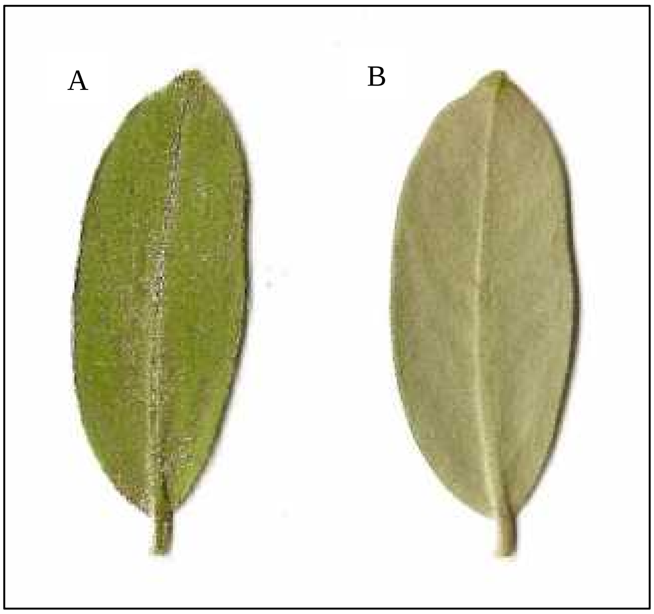
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτικός ιστός

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε προέρχεται από την ελιά *O. europaea* L. *ssp. europaea var. sativa*, καλλιεργήσιμης ελαιοπαραγωγού ποικιλίας «Κορωνέικη». Η συλλογή του τριχώματος των φύλλων της ελιάς έγινε από ελαιόδεντρο που βρίσκεται στον ελαιώνα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Συλλέχτηκαν νεαρά αναπτυσσόμενα φύλλα.

2.1.2 Απομόνωση Ιστού

Η απομόνωση του τριχώματος των φύλλων έγινε με την βοήθεια ξυραφιού από την απαξονική επιφάνεια, πολύ προσεκτικά ώστε να μην παρασύρονται άλλα κύτταρα της επιδερμίδας του φύλλου. Η συλλογή του ιστού έγινε σε διάστημα 2 μηνών σταδιακά αποθηκεύοντας τον ιστό στους -80°C Συνολικά απομονώθηκαν 6g ιστού.



Εικόνα 2.1. Νεαρό φύλλο ελιάς (απαξονική επιφάνεια) A: χωρίς τριχώματα B: με τριχώματα

2.2 Απομόνωση πρωτεϊνών

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου που περιγράφεται *από τους* ***Wang W. et al 2003.»***

2.2.1 Πρωτόκολλα απομόνωσης πρωτεϊνών

Πρωτόκολλο απομόνωσης (Phenol/SDS)

- Λειοτρίβιση 6g ιστού με υγρό άζωτο με 10%w/w quartz sand.
- Προσθήκη 3 όγκων κρύας (-20^{o}C) ακετόνης 100%
- Έντονη ανάμιξη του δείγματος και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 10.500rpm στους 4°C
- Αφαίρεση του υπερκείμενου
- Επανάληψη του παραπάνω βήματος 2 φορές
- Αφήνεται ο ιστός να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 1,5g ιστού σε σωλήνα falcon των 50mL
- Προσθήκη 25ml διαλύματος απομόνωσης πρωτεϊνών και ίσου όγκου φαινόλης
- Έντονη ανάμιξη για 5 λεπτά
- Φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 10.500rpm
- Μεταφορά της φαινολικής φάσης σε σωλήνα corex
- Προσθήκη 7 όγκων διαλύματος μεθανόλης
- Τοποθέτηση των σωλήνων corex στους -20°C για 2 ώρες
- Φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 10.500rpm
- Αφαίρεση του υπερκείμενου
- Προσθήκη 4mL διαλύματος μεθανόλης και επαναδιάλυση ιζήματος
- Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 10.500rpm
- Αφαίρεση του υπερκείμενου
- Επανάληψη του βήματος
- Προσθήκη 4mL κρύας (-20^{o}C) ακετόνης 80% και επαναδιάλυση ιζήματος
- Φυγοκέντρηση για 20λεπτά στις 10.500rpm
- Αφαίρεση του υπερκείμενου
- Επανάληψη του βήματος
- Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου
- Χρησιμοποίηση ιζήματος για ανάλυση ή αποθήκευση στους -80°C

Πρωτόκολλο απομόνωσης (με υπέρηχους για τη λύση κυττάρων)

- 215mg ιστού τοποθετήθηκαν σε falcon
- Προσθήκη 4 όγκων κρύας (-20^{o}C) ακετόνης 100%
- Έντονη ανάμιξη του δείγματος και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 10.500rpm στους 4°C
- Αφαίρεση του υπερκείμενου
- Επανάληψη του βήματος 2 φορές
- Αφήνεται ο ιστός να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου

- Προσθήκη 7ml SDS sonication buffer
- Λύση κυττάρων με υπέρηχους (sonication)
- Προσθήκη 7ml φαινόλης pH 8
- Έντονη ανάμιξη του δείγματος και φυγοκέντρηση για 10λεπτά στις 10.500rpm
- Μεταφορά της φαινολικής φάσης σε νέο falcon ~2,5ml
- Προσθήκη 4 όγκων διαλύματος μεθανόλης
- Τοποθέτηση των falcon στους -20°C για 30 λεπτά
- Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 10.500rpm
- Αφαίρεση του υπερκείμενου
- Προσθήκη 2ml διαλύματος μεθανόλης και επαναδιάλυση ιζήματος
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 10.500rpm
- Αφαίρεση του υπερκείμενου
- Επανάληψη του βήματος
- Προσθήκη 2ml κρύας (-20^{o}C) ακετόνης 80% και επαναδιάλυση ιζήματος
- Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 10.500rpm
- Αφαίρεση του υπερκείμενου
- Επανάληψη του βήματος
- Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου
- Χρησιμοποίηση ιζήματος για ανάλυση ή αποθήκευση στους -80°C

Πρωτόκολλο απομόνωσης (TCA/ακετόνη)

- 100μl ιστού τοποθετήθηκαν σε eppendorf
- Προσθήκη 1ml διαλύματος TCA/ακετόνη 10%
- Τοποθέτηση των eppendorfs στους -20°C για 1 ώρα
- Φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 13.000rpm στους 4°C
- Αφαίρεση υπερκειμένου
- Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου
- Επαναδιάλυση ιζήματος σε διάλυμα KCl 50mm
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000rpm στους 4°C
- Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο eppendorf
- Προσθήκη 10 όγκων διαλύματος TCA10%
- Τοποθέτηση των eppendorfs στους -20°C ~ 16ώρες
- Φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 13.000rpm στους 4°C
- Αφαίρεση υπερκειμένου
- Προσθήκη 4ml κρύας (-20^{o}C) ακετόνης 80% και επανδιάλυση ιζήματος
- Φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 10.500rpm
- Αφαίρεση του υπερκείμενου
- Επανάληψη του βήματος
- Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου
- Χρησιμοποίηση ιζήματος για ανάλυση ή αποθήκευση στους -80°C

Διαλύματα

Διάλυμα Εκχύλισης Πρωτεϊνών (Extraction buffer)

30% sucrose (Fluka),
2% SDS (Scharlau)
0.1M Tris-HCl pH 7,4, (Fluka)
5% 2-mercaptoethanol (Sigma)
2,5mM EDTA (Scharlau)

SDS Sonication buffer

30% sucrose
2% SDS
0.1M Tris-HCl pH 8.0
10mM 2-mercaptoethanol
2,5mM EDTA

Διάλυμα TCA/ακετόνης

10%TCA (Riele de Haen) σε ακετόνη (Scharlau)
0,07% β-mercaptoethanol

Διάλυμα Χλωριούχου Καλίου (KCl)
100mm Tris-HCL pH 6,8
50mm KCl
0,01% Triton-x

2.2.2 Ποσοτικοποίηση πρωτεινών

Μέθοδος Braford

Η μέθοδος Bradford στηρίζεται στη σύνδεση της χρωστικής ουσίας Coomassie blue G-250 στην πρωτεΐνη. Μελέτες έδειξαν ότι η ελεύθερη χρωστική ουσία μπορεί να υπάρξει σε τρεις διαφορετικές ιοντικές μορφές για τις οποίες η τιμή pKa είναι 1.15, 1.82 και 12.4. Από τις τρεις διαφορετικές μορφές τις χρωστικής ουσίας που υπερισχύουν στην όξινη συμπεριφορά του αντιδραστηρίου, οι πιο κατιονικές κόκκινες και πράσινες μορφές έχουν τα μέγιστα απορροφητικότητας σε 470 nm και 650 nm αντίστοιχα.

Αντίθετα η πιο ανιονική μπλε μορφή της χρωστικής ουσίας που συνδέεται στην πρωτεΐνη, έχει ένα μέγιστο απορροφητικότητας στα 595 nm. Κατά συνέπεια η ποσότητα τις πρωτεΐνης μπορεί να υπολογισθεί με τον καθορισμό του ποσού της χρωστικής ουσίας στην μπλε ιοντική μορφή. Αυτό επιτυγχάνεται με μέτρηση απορροφητικότητας του διαλύματος στα 595 nm. (Kruger 1994).

standard	BSA (C)	BSA (V)	Bradford reagent
1	0mg/ml	10 μl	1 ml
2	0.2mg/ml	10 μl	1 ml
3	0.4mg/ml	10 μl	1 ml
4	0.6mg/ml	10 μl	1 ml
5	0.8mg/ml	10 μl	1 ml
6	1mg/ml	10 μl	1 ml

Εφαρμογή μεθόδου

• Μετρήθηκε ποσότητα δείγματος 2μl + 18μl H_2O

• Ακολουθεί προσθήκη 1 ml αντιδραστηρίου Bradford και ανάδευση.

• Η μέτρηση της απορρόφησης γίνεται μετά από 5 λεπτά και εώς 45 λεπτά στα 595 nm

Διαλύματα

Αναμείχθηκε 1 μέρος από το stock διάλυμα BRADFORD (BioRad) σε 4 μέρη απιονισμένο νερό. Το διάλυμα διατηρήθηκε στους $4^{o}C$ σε αδιαφανή φιάλη.

BSA (αλβουμίνη ορού βοός)

Χρησιμοποιήθηκε stock διάλυμα (BioRad) συγκέντρωσης 10mg/mL στο οποίο έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις για να δημιουργηθούν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις των πρότυπων δειγμάτων.

2.3 Ανάλυση πρωτεϊνών σε SDS-PAGE

2.3.1 Ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης μονής διάστασης.

Η ανάλυση των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους μέγεθος γίνεται με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE).

- Το πήκτωμα διαχωρισμού καθώς και το πήκτωμα επιστοίβασης παρασκευάζεται σύμφωνα με τον πίνακα 2.1.
- Το μείγμα του πηκτώματος διαχωρισμού τοποθετείται ανάμεσα στα τζάμια της συσκευής ηλεκτροφόρησης και αφού προστεθεί λίγο νερό, ώστε να γίνει επίπεδη η επιφάνεια της πηκτής και να διευκολυνθεί ο πολυμερισμός αφήνεται για περίπου 30 λεπτά για να πολυμεριστεί.
- Μετά τον πλήρη πολυμερισμό του πηκτώματος διαχωρισμού αφαιρείται το νερό και προστίθεται το πήκτωμα επιστοίβασης και η χτένα.
- Όταν πολυμεριστεί το πήκτωμα επιστοίβασης μετά από 30 λεπτά περίπου η χτένα αφαιρείται προσεκτικά και η πηκτή τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- Στη συσκευή προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X και ξεπλένονται τα πηγαδάκια από τα υπολείμματα πολυακρυλαμίδης.
- Τα δείγματα των πρωτεϊνών φορτώνονται στα πηγαδάκια της πηκτής και ηλεκτροφορούνται στα 16-20mA ανά πηκτή.

- Η ηλεκτροφόρηση ολοκληρώνεται όταν η χρωστική φτάσει στο κατώτερο σημείο της πηκτής.
- Αν είναι επιθυμητή η χρώση των πρωτεϊνών μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί χρώση με Coommasie ή άργυρο.

Πίνακας 2.1

Σύσταση πηκτής πολυακρυλαμίδης για 10ml main gel ανάλογα με την τελική συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης			
	8%	10%	12%
H2O	4,6ml	4ml	3,3ml
30% πολυακρυλαμιδη	2,7ml	3,3ml	4ml
1,5M Tris pH 8.8	2,5ml	2,5ml	2,5ml
10% SDS	0,1ml	0,1ml	0,1ml
10% APS	0,1ml	0,1ml	0,1ml
TEMED	0,006ml	0,004ml	0,004ml
Σύσταση πηκτής πολυακρυλαμίδης για 5ml stacking gel 5% τελική συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης			
	5%		
H2O	3,4ml		
30% πολυακρυλαμιδη	0,83ml		
1,5M Tris pH 8.8	0,63ml		
10% SDS	0,05ml		
10% APS	0,05ml		
TEMED	0,005ml		

Τα πρωτεινικά δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν με τη mini protean® 3 system της Bio Rad και η πηγή ρεύματος Microcomputer electrophoresis power supply Consort E865

Χρώση με Coommasie

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα χρώσης Coommasie Brilliant Blue R250 για 30-60 λεπτά σε συνεχή ανακίνηση. Στη συνέχεια αφαιρείται η περίσσεια του διαλύματος χρώσης και η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα αποχρωματισμού σε θερμοκρασία δωματίου σε συνεχή ανακίνηση. Το διάλυμα αποχρωματισμού αντικαθίσταται 3 φορές κάθε 20 λεπτά περίπου.

Χρώση με άργυρο.

- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηχτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα σταθεροποίησης (Fixing solution) για 60 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση.
- Προστίθεται το διάλυμα αργύρου για 15 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση.
- Στη συνέχεια το διάλυμα αργύρου απομακρύνεται και ακολουθούν τρία ξεπλύματα με ddH_2O 5 λεπτά το καθένα.
- Στη συνέχεια προστίθεται το διάλυμα εμφάνισης (Developing solution), το οποίο αφήνεται έως ότου αρχίσουν να εμφανίζονται ζώνες πρωτεϊνών στην πηχτή.
- Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη διαλύματος παύσης (Stop developing solution).
- Απομακρύνεται το διάλυμα παύσης και προστίθεται διάλυμα σταθεροποίησης για 15 λεπτά υπό συνεχής ανάδευση

Διαλύματα

Διάλυμα μετουσίωσης δειγμάτων (2× sample buffer):
100 mM Tris – HCl pH 6,8
4% SDS
10% β–μερκαπτοαιθανόλη
0.2% κυανούν της βρωμοφαινόλης
20% γλυκερόλη

Σύσταση πηκτής πολυακρυλαμίδης
Μητρικό διάλυμα ακρυλαμίδης: 29,2% ακρυλαμίδη (acrylamide), 0,8% δις–ακρυλαμίδη (bis–acrylamide).
Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος διαχωρισμού (resolving gel buffer): 1.5 M Tris–HCl pH 8.8 (Lower Tris).
Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος επιστοίβασης (stacking gel buffer): 0.5 M Tris–HCl pH 6.8 (Upper Tris).
Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tank Buffer): 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS.
10% διάλυμα ammonium per sulfate (APS)
20% διάλυμα SDS
50% διάλυμα γλυκερόλης
Temed

Διάλυμα χρώσης με Coomasie.
40% μεθανόλη (CH_4O), 10% οξικού οξέος (CH3COOH) 0,1% Coomasie Brilliant Blue R250.
Διάλυμα αποχρωματισμού.
30% μεθανόλη (CH_4O), 10% οξικού οξέος (CH3COOH).

Διαλύματα χρώσης αργύρου

Διάλυμα σταθεροποίησης A(Fixation Solution).
50% μεθανόλη (CH_4O), 0,1% φορμαλδεΰδη 38% (CH_2O)
Διάλυμα χρώσης με άργυρο (Sensitizing Solution).
1% Καυστικού Νατρίου (NaOH) 7,56%, 25% αμμωνία (NH3)
Διάλυμα αργύρου
1% $AgNO_3$ 4,7M (w/v)
Διάλυμα εμφάνισης (Developing Solution).
2,5% (w/v) Κιτρικό οξύ ($C_6H_8O_7$), 0.05% (v/v) φορμαλδεϋδη (CH_2O).
Διάλυμα παύσης (Stop Developing Solution).
45% μεθανόλη (CH_4O), 2% οξικό οξύ (CH3COOH)
Διάλυμα σταθεροποίησης B (Fixation Solution).
40% μεθανόλη(CH_4O)

2.3.2 Ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης δύο διαστάσεων.

Διαχωρισμός πρωτεϊνών με ισοηλεκτρική εστίαση (1η διάσταση)

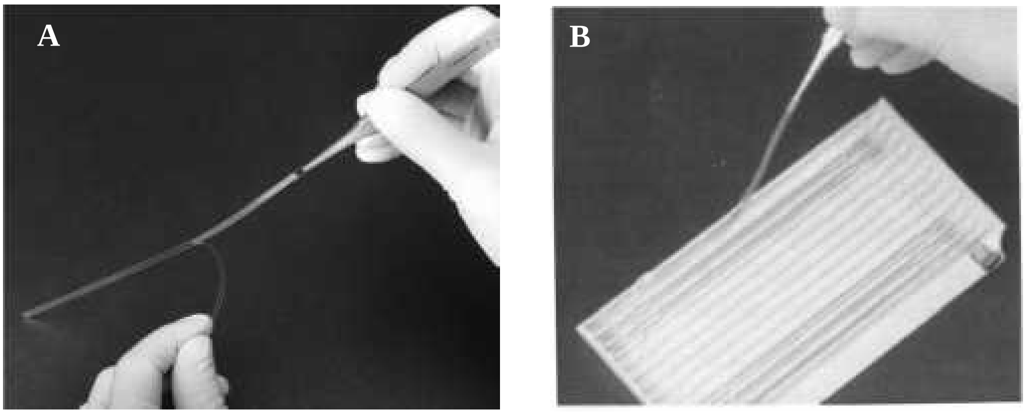
Για τον διαχωρισμό αυτό χρησιμοποιούνται Ταινίες Ακινητοποιημένης Κλίσης pH (ΤΑΚ) (Immobilized pH Gradient Strips ή IPG Strips) (Bjellqvist et al. 1982). Η διαβαθμισμένη κλίμακα pH επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση μίας λεπτής επιμήκους πλαστικής ταινίας στη μία πλευρά της οποίας υπάρχει πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Στο πήκτωμα αυτό έχουν ενσωματωθεί με ομοιοπολικούς δεσμούς, όξινες και βασικές ομάδες χημικών ουσιών (CH_2=CH-CO-NH-R, όπου R είναι μία ασθενής όξινη ή βασική ομάδα) που ονομάζονται acrylamido buffers, οι οποίες δημιουργούν ακινητοποιημένη διαβάθμιση pH.

Υπάρχουν 2 διαφορετικές μέθοδοι για την πραγματοποίηση της πρώτης διάστασης. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι ΤΑΚ, είναι εμπορικά διαθέσιμες σε ξηρή μορφή (Dry Strips), στην πρώτη μέθοδο (*Non Cup Loading Method*) ενυδατώνονται με το διάλυμα το οποίο περιέχει το δείγμα (διάλυμα λύσης). Η όλη διαδικασία επιτελείται μέσα στη συσκευή Ισο-Ηλεκτρικής Εστίασης (ΙΗΕ). Στη δεύτερη μέθοδο οι ΤΑΚ ενυδατώνονται εκτός συσκευής, σε ειδικό σκαφίδιο χρησιμοποιώντας ειδικό διάλυμα ενυδάτωσης (rehydration buffer) και ολονύχτια επώαση σε αυτό. Μόνο η ισοηλεκτρική εστίαση επιτελείται μέσα στην ειδική συσκευή με τα δείγματα να φορτώνονται στις δύο άκρες της ΤΑΚ σε ειδικά cups (*Cup Loading Method*).

Θεωρητικά, η πρώτη μέθοδος εμφανίζει πλεονεκτήματα, όπως το ότι μπορούν να φορτωθούν μεγαλύτερες ποσότητες ολικών πρωτεϊνών και πιο αραιά δείγματα (μέγιστος όγκος δείγματος στην πρώτη μέθοδο έως 400μl για ΤΑΚ 17-18cm και έως 125μl για ΤΑΚ 7cm ενώ στη δεύτερη 250-300μl για ΤΑΚ 17-18cm και 50-100μl για

ΤΑΚ 7cm). Επειδή δεν υπάρχει διακριτό σημείο φορτώματος αποφεύγεται ο σχηματισμός κατακρημνισμάτων και το δείγμα προσροφάται απευθείας πάνω στην ΤΑΚ, αποφεύγοντας τις απώλειες που παρατηρούνται ορισμένες φορές λόγω διαρροής από τα cups. Εντούτοις, υπάρχουν περιπτώσεις που κάποιος μπορεί να προτιμήσει να φορτώσει τα δείγματα κατόπιν της Η ενυδάτωση των ΤΑΚ πριν το φόρτωμα των δειγμάτων χρησιμοποιείται κυρίως (*Cup Loading Method*): α) Αν υπάρχει πρόβλημα λόγω πρωτεόλυσης ή και πρωτεϊνικών μετατροπών, η ολονύχτια επώαση για ενυδάτωση ενδείκνυται με το δείγμα παρόν. β) Για καλύτερα αποτελέσματα επιτυγχάνονται ιδίως στην περιοχή pH 6-11, όταν το δείγμα φορτώνεται στην άνοδο σε ειδικό cup (Berkelman και Stenstedt 1998). Τις περισσότερες φορές όμως η επιλογή μεθόδου γίνεται εμπειρικά ανάλογα με τις εκάστοτε πειραματικές συνθήκες.

NON CUP LOADING METHOD: Χρησιμοποιήθηκε ειδικό σκαφίδιο με παράλληλα αυλάκια στα δυο άκρα των οποίων ήταν εφαρμοσμένα ηλεκτρόδια. Κάθε δείγμα φορτώθηκε απευθείας και κατά μήκος σε κάθε αυλάκι. Η ολική ποσότητα πρωτεΐνης υπολογίστηκε να είναι από 600μg έως 2mg σε 300μl διαλύματος λύσης για τις ΤΑΚ των 18cm ενώ για τις ΤΑΚ των 7cm η πρωτεΐνη υπολογίστηκε να είναι από 75μg έως 800μg σε 150μl διαλύματος λύσης. Στη συνέχεια η ΤΑΚ εφαρμόστηκε με την πλευρά του πηκτώματος να εφάπτεται στο διάλυμα λύσης (gel side down) (Εικ.2.3) που περιείχε το δείγμα. Το θετικό ηλεκτρόδιο βρισκόταν στην όξινη πλευρά της και το αρνητικό στη βασική. Πάνω από τις ΤΑΚ και καθ’ όλο το μήκος τους απλώθηκε mineral oil, για να την αποφυγή εξάτμισης του διαλύματος κατά τη διάρκεια της ΙΗΕ.



Εικόνα 2.3. Α) Απομάκρυνση της προστατευτικής ταινίας από το πήκτωμα της ΤΑΚ Β)Τοποθέτηση της ΤΑΚ με την πλευρά του πηκτώματος προς τον πυθμένα του σκαφιδίου όπου έχει τοποθετηθεί το δείγμα(gel side down) (Garfin 2001).

Το σκαφίδιο τοποθετήθηκε στη συσκευή ΙΗΕ και εφαρμόστηκε το παρακάτω πρόγραμμα:

Non cup loading

ΤΑΚ 18cm	ΤΑΚ 7cm
Rehydration: 50Volts, 16 hrs	Rehydration: 50Volts, 12 hrs
Focusing temperature: 20^{o}C	Focusing temperature: 20^{o}C

Step 1: 250Volts, rapid 2hrs
Step 2: 5.000Volts, linear 24hrs
Step 3: 5.000Volts, rapid 24hrs
Step 4: 500Volts, rapid 48 hrs
Current: 99μA/gel

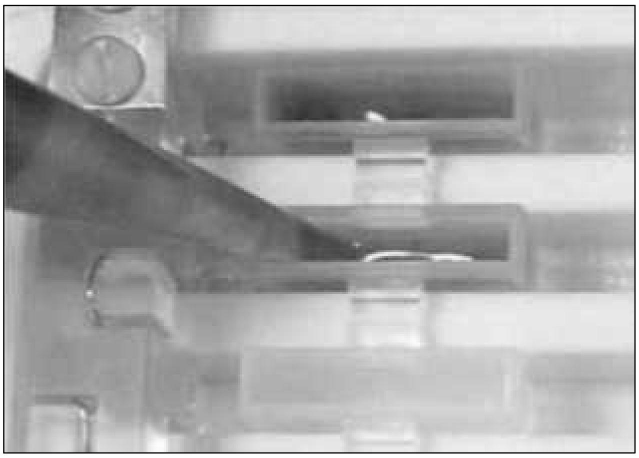
Step 1: 300Volts, rapid 3hrs
Step 2: 4.000Volts, linear 5hrs
Step 3: 4000Volts, rapid 12.500vhrs
Step 4: 100volts, rapid 48hrs
Current: 99μA/gel

Η ενυδάτωση των ΤΑΚ επιτελέστηκε για 12 ώρες σε σταθερή τάση 50 Volts μέσα στη συσκευή. Σε όλα τα υπόλοιπα βήματα η τάση αυξήθηκε είτε εκθετικά (Steps 1,3,4 για τις ΤΑΚ των 18cm και των 7cm) είτε γραμμικά (Step 2). Οι υψηλές τάσεις είναι απαραίτητες για την όσο το δυνατό καλύτερη εστίαση των πρωτεϊνών.

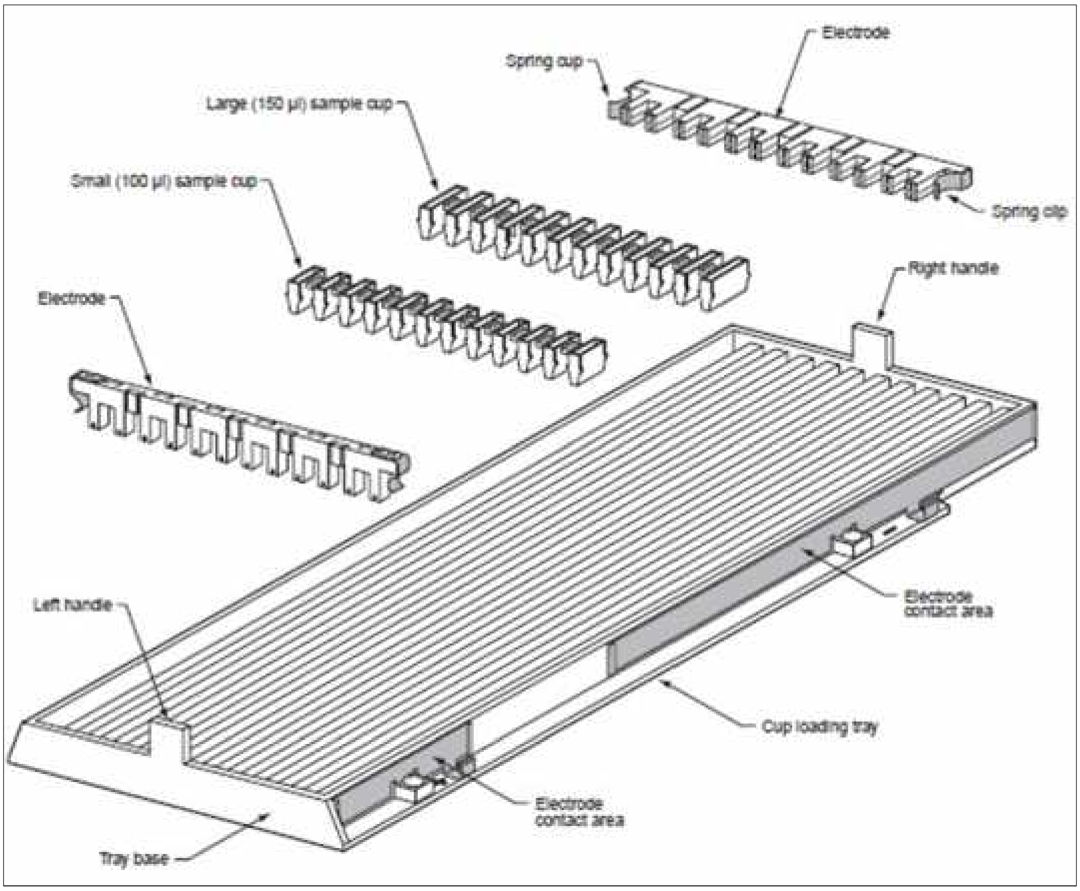
Μετά το πέρας των 12 ωρών ενυδάτωσης των ΤΑΚ, ανασηκώθηκαν ελαφρά με λαβίδες τα σημεία επαφής τους με τα ηλεκτρόδια και τοποθετήθηκαν κάτω από αυτές υγρά χαρτάκια, έτσι ώστε να παρεμβάλλονται ανάμεσα σε αυτές και τα ηλεκτρόδια. Η προσθήκη αυτή είναι απαραίτητη, για να αποφευχθεί η συσσώρευση αλάτων και κρυστάλλων ουρίας στα ηλεκτρόδια κατά τη διάρκεια της ΙΗΕ. Στο τέταρτο βήμα, η ΙΗΕ μπορούσε να σταματήσει οποιαδήποτε στιγμή εφόσον είχε ξεπεραστεί το όριο των 100.000 βολτοωρών (Vhrs).

CUP LOADING METHOD: Προηγήθηκε η ενυδάτωση των αποξηραμένων ΤΑΚ, χρησιμοποιώντας ένα διάλυμα ενυδάτωσης, σε ειδικό σκαφίδιο (παρόμοιο με αυτό που περιγράφτηκε στην non cup loading method, χωρίς όμως τα ηλεκτρόδια) έξω από τη συσκευή ΙΗΕ (Εικ.2.5). Οι ΤΑΚ διαβρέχτηκαν με mineral oil και αφέθηκαν για 12-18 ώρες. Μετά το πέρας της διαδικασίας οι ταινίες ήταν έτοιμες προς χρήση και το πήκτωμά τους είχε πλέον πάχος περίπου 3mm (Kinter και Sherman 2000).

Οι ΤΑΚ τοποθετήθηκαν σε σκαφίδιο, που δε διέθετε ηλεκτρόδια, με την πλευρά του πηκτώματος προς τα πάνω (gel side up). Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν τα ειδικά χαρτάκια στις άκρες, με τέτοιο τρόπο ώστε μισή επιφάνεια από το καθένα εφαπτόταν με το πήκτωμα και η άλλη μισή ήταν έξω από αυτό.



Εικόνα 2.4. Φόρτωση δείγματος στα πλαστικά cups .(Garfin 2001).



Εικόνα 2.5. Σκαφίδιο κι εξαρτήματα για την μέθοδο ηλεκτροφόρησης cup loading.

Δύο σειρές ηλεκτροδίων τοποθετήθηκαν, μία στην αρχή της όξινης και μία στο τέλος της βασικής περιοχής της ΤΑΚ, φροντίζοντας, ώστε τα ηλεκτρόδια να εφάπτονταν στην περιοχή του πηκτώματος που καλυπτόταν από τα χαρτάκια και στο ειδικό έλασμα που τα ένωνε με τους πόλους της συσκευής IHE. Κατόπιν τοποθετήθηκαν τα πλαστικά cups (Εικ.2.4), ένα σε κάθε άκρη της κάθε ΤΑΚ. Τα cups τοποθετήθηκαν πολύ κοντά στα ηλεκτρόδια, δεν εφάπτονταν όμως με αυτά ή με τα υποκείμενα χαρτάκια. Η στεγανότητα των cups δοκιμάστηκε με mineral oil και αφού διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχε διαρροή, διαβρέχτηκε με mineral oil ολόκληρη η επιφάνεια των ΤΑΚ.

Στις ΤΑΚ των 18cm φορτώθηκε δείγμα το οποίο περιείχε από 600μg πρωτεΐνης έως 2mg σε 300μl διαλύματος λύσης. Από αυτά τοποθετήθηκαν 150μl στο cup πλησίον του αρνητικού πόλου και 150μl στο cup πλησίον του θετικού πόλου. Στις ΤΑΚ των 7cm φορτώθηκε δείγμα το οποίο περιείχε έως 800μg πρωτεΐνης σε 150μl διαλύματος λύσης. Στο cup πλησίον του αρνητικού πόλου τοποθετήθηκαν 75μl και στο cup πλησίον του θετικού πόλου 75μl.

Το σκαφίδιο τοποθετήθηκε στη συσκευή IHE και εφαρμόστηκε το παρακάτω πρόγραμμα:

Cup loading

TAK 18cm	TAK 7cm
Focusing temperature: 20^{o}C	Focusing temperature: 20^{o}C
Step 1: 300Volts, rapid 3hrs	Step 1: 300Volts, rapid 3hrs
Step 2: 5.000Volts, linear 24hrs	Step 2: 4.000Volts, linear 5hrs
Step 3: 5.000Volts, rapid 24hrs	Step 3: 4000Volts, rapid 12.500vhrs
Step 4: 500Volts, rapid 48 hour	Step 2: 100Volts, rapid 48hrs
Current: 99μA/gel	Current: 99μA/gel

Στο σημείο αυτό και αφού είχε τελειώσει η ΙΗΕ, οι ΤΑΚ αφαιρούνταν από τη συσκευή και μπορούσαν να αποθηκευτούν στους -20^{o}C έως και για 3 μήνες, μέσα σε τρυβλία σφραγισμένα με parafilm. Από αυτό το σημείο και πέρα η πορεία ήταν κοινή είτε είχε χρησιμοποιηθεί η non cup loading method είτε η cup loading method.

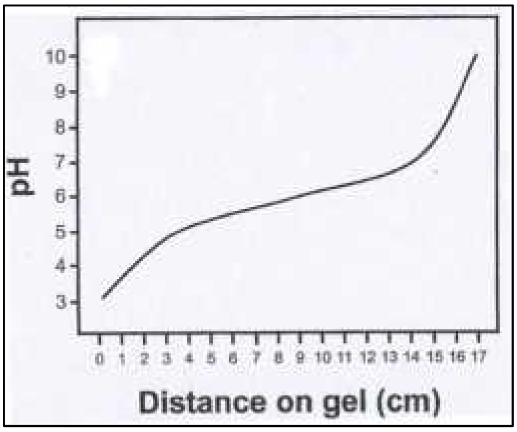
Διαλύματα

Sample Buffer ή Διάλυμα Λύσης:

Ουρία (AppliChem) 7M. Ρητίνη (BioRad).
Θειουρία (Fluka) 2M. CHAPS (Fluka) 4%(w/v).
DTE ή 1,4 Dithioerythritol (Fluka) 1%(w/v).
IPG buffer για strips (BioRad) pH 3-10 και 4-7 0,2%(v/v).
Κυανό της βρωμοφαινόλης (Fluka) 0,5%(w/v) σε αιθανόλη.

Ταινίες Ακινητοποιημένης Κλίσης pH

Για τα πειράματα σχεδιασμού πρωτεομικών χαρτών αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν Ready Dry Strips pH 3-10 NL18cm, Ο κωδικός NL αναφέρεται στο γεγονός ότι η κλίση pH στις εν λόγω ΤΑΚ δεν είναι γραμμική σε όλο το μήκος τους. Η περιοχή pH από 4-7 είναι πιο ευρεία καθώς εκεί εστιάζουν οι περισσότερες γνωστές πρωτεΐνες (Εικ.2.6).



Εικόνα 2.6. Ενδεικτική κλίση pH σε μία ΤΑΚ με εύρος pH 3-10. Η σιγμοειδής γραμμή έχει μικρότερη κλίση στη μεσαία περιοχή, όπου φαίνεται να εστιάζουν οι περισσότερες γνωστές πρωτεΐνες (Berkelman και Stenstedt 1998).

Mineral Oil (BioRad)

Χρησιμοποιήθηκε για να αποφευχθεί η εξάτμιση του διαλύματος ενυδάτωσης του δείγματος (non cup loading method και cup loading method) αλλά και για να αποφευχθεί η υπερβολική αύξηση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της ΙΗΕ.

Rehydration Buffer

Το διάλυμα αυτό ήταν όμοιο με το διάλυμα λύσης (sample buffer), που αναφέρθηκε παραπάνω με τις εξής διαφορές: **α)** περιείχε Ουρία 8M αντί για 7M, **β)** δεν περιείχε καθόλου Θειουρία

Εξισορρόπηση των ΤΑΚ

Με τη διαδικασία της εξισορρόπησης επιτυγχάνεται η αναγωγή (μέσω διθειοερυθριτόλης - DTE) και αλκυλίωση (μέσω Ιωδοακεταμιδίου) των εστιασμένων πρωτεϊνών. Το γεγονός αυτό είναι απαραίτητο πριν πραγματοποιηθεί η δεύτερη διάσταση. Επίσης, στο τέλος της επεξεργασίας οι ΤΑΚ καθίστανται κορεσμένες σε SDS, κάτι που είναι απαραίτητο για να προσδώσει αρνητικά φορτία στις εστιασμένες πρωτεΐνες. Το stock διάλυμα εξισορρόπησης (equilibration buffer) ετοιμάζεται και διατηρείται στους -20^{o}C σε aliquots των 50mL μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Η διαδικασία της εξισορρόπησης των ΤΑΚ έγινε ως εξής:

- Προετοιμάστηκε το διάλυμα εξισορρόπησης Ι, με την προσθήκη DTE στο stock διάλυμα.
- Οι ΤΑΚ τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο με την πλευρά του πηκτώματος προς το εσωτερικό του τρυβλίου. Προστέθηκαν 10ml και 20ml equilibration buffer I σε κάθε ΤΑΚ 7cm και 18cm αντίστοιχα και επωάστηκαν για 15 λεπτά για τα strips των 18cm και 10 λεπτά για τα strips των 7cm με συνεχόμενη κυκλική ανακίνηση.
- Προετοιμάστηκε το δεύτερο διάλυμα εξισορρόπησης, προσθέτοντας ιωδοακεταμίδιο στο stock διάλυμα.
- Απομακρύνθηκε το equilibration buffer I και Προστέθηκαν 10ml και 20ml equilibration buffer II σε κάθε ΤΑΚ 7cm και 18cm αντίστοιχα και επωάστηκαν για 15 λεπτά για τα strips των 18cm και 10 λεπτά για τα strips των 7cm με συνεχόμενη κυκλική ανακίνηση.
- Απομακρύνθηκε και το δεύτερο διάλυμα εξισορρόπησης και αφαιρέθηκε η περίσσειά του από τις ΤΑΚ ακουμπώντας το ένα άκρο τους σε νωπό διηθητικό χαρτί. Οι ΤΑΚ ήταν πλέον έτοιμες να φορτωθούν σε πηκτώματα SDS πολυακρυλαμιδίου.

Διαλύματα

Διάλυμα Εξισορρόπησης (Equilibration stock buffer)
Ουρία (AppliChem) 6M.
Tris-HCl pH 8,8 (BioRad) 50mM
Γλυκερόλη (Panreac) 30%(v/v)
SDS (BioRad) 2%(v/v).

Σε περίπου 300mL απιονισμένο νερό προστέθηκε η ουρία και αναδεύτηκε μέχρι να διαλυτοποιηθεί πλήρως. Προστέθηκε μία μικρή ποσότητα ρητίνης και ακολούθησε διήθηση σε χάρτινο ηθμό. Στο διήθημα προστέθηκαν υπό συνεχή ανάδευση και όλα τα υπόλοιπα συστατικά, μέχρι να διαλυτοποιηθούν πλήρως.

Διάλυμα Εξισορρόπησης (Equilibration buffer) I

Παρασκευάστηκε προσθέτοντας στο equilibration stock buffer DTE (Fluka) 0,5%(w/v) (30mM).

Διάλυμα Εξισορρόπησης (Equilibration buffer) II

Παρασκευάστηκε προσθέτοντας στο equilibration stock buffer ιωδοακεταμίδιο (Fluka) 4,32%(w/v) (230mM).

Η δεύτερη διάσταση (SDS–PAGE)

Ετοιμάστηκαν πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου διαστάσεων (Πλάτος × Ύψος × Πάχος) 16cm × 18cm × 1,5mm (για μεγάλα πηκτώματα), 7,5cm × 10cm × 1,5mm (για μικρά πηκτώματα) και περιεκτικότητας 12% σε πολυακρυλαμίδιο.

Ετοιμάστηκαν τόσα πηκτώματα, όσες και οι ΤΑΚ που υπήρχαν από την πρώτη διάσταση. Στη συνέχεια και αφού έγινε ο πολυμερισμός των πηκτωμάτων, τοποθετήθηκαν οι ΤΑΚ με τη μεγάλη διάστασή τους παράλληλη στην πάνω επιφάνεια του πηκτώματος και από πάνω προστέθηκε αγαρόζη 0,5% σε 1x TGS, η οποία περιείχε χρωστική (κυανό της βρωμοφαινόλης), ώστε να ήταν εφικτή η παρακολούθηση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης κατά την πορεία της.

Οι κασέτες με τα πηκτώματα τοποθετήθηκαν στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία προηγουμένως είχε προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Η διαδικασία της ολονύχτιας ηλεκτροφόρησης διήρκησε 12-15 περίπου ώρες με σταθερή ένταση ρεύματος 6mA/πήκτωμα και 4-5 περίπου ώρες με σταθερή ένταση ρεύματος 40mA/πήκτωμα όταν πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της ημέρας. Στο εξωτερικό τμήμα των κασετών κυκλοφορούσε κρύο νερό που περνούσε μέσα από συσκευή ψύξης και ανακυκλωνόταν. Με αυτό τον τρόπο ψύχονταν τα πηκτώματα και προστατεύονταν από την αύξηση της θερμοκρασίας που μπορούσε να προκληθεί από τη συνεχή ροή ρεύματος. Η ηλεκτροφόρηση σταματούσε μόλις το μέτωπο της χρωστικής έφτανε σε απόσταση 1mm από τη βάση του πηκτώματος.

Μετά το τέλος της διαδικασίας, τα πηκτώματα επωάστηκαν υπό συνεχή ελαφρά ανάδευση για 2 ώρες σε διάλυμα μονιμοποίησης (200mL διαλύματος στα μεγάλα πηκτώματα και 100mL διαλύματος στα μικρά πηκτώματα), ώστε οι πρωτεΐνες να μονιμοποιηθούν πάνω σε αυτά και να μη διαχυθούν μετά τις διαδικασίες που ακολουθούσαν (Kinter και Sherman 2000). Στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν υπό ολονύχτια ανάδευση σε διάλυμα χρωστικής Coomassie Colloidal Blue (200mL διαλύματος στα μεγάλα πηκτώματα και 100mL διαλύματος στα μικρά πηκτώματα). Η χρωστική αυτή προσδένεται στοιχειομετρικά πάνω στα πρωτεϊνικά μόρια. Το γεγονός αυτό δίνει ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα όταν υπάρχει ενδιαφέρον να εξεταστούν ποσοτικές διαφορές συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε διαφορετικά δείγματα. Η περίσσεια χρωστικής αφαιρέθηκε με ξεπλύματα των πηκτωμάτων με απιονισμένο νερό. Στο τέλος της διαδικασίας ήταν ορατή η κλασσική εικόνα ενός πηκτώματος με τις πρωτεϊνικές κηλίδες πλέον εμφανείς.

Διαλύματα

Πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου
Η ποσότητα του διαλύματος καθορίστηκε από τις διαστάσεις του πηκτώματος και τον αριθμό των πηκτωμάτων που επρόκειτο να παρασκευαστούν. Ενδεικτικά ένα πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου περιεκτικότητας 12% σε ακρυλαμίδη, είχε την ακόλουθη σύσταση:
Acrylamide/piperazine–di–acrylamide (37,5:1 w/v) (Biosolve): 12%
Tris-HCl pH 8,8 (BioRad): 0,375M
SDS (BioRad): 0,1%(v/v)
Ammonium persulfate (Fluka): 0,05%(v/v)
TEMED (AppliChem): 0,05%(v/v)

Τοποθετήθηκε νερό πάνω από κάθε γεμάτη, με μη πολυμερισμένο διάλυμα, κασέτα ώστε να αποφευχθεί η επαφή του διαλύματος με το οξυγόνο του αέρα και να επιτελεστεί γρηγορότερα ο πολυμερισμός.

Αγαρόζη
Παρασκευάστηκε 0,5%(w/v) αγαρόζη (Sigma) σε 1x TGS (το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης δηλαδή που περιγράφεται παρακάτω). Προστέθηκαν και λίγες σταγόνες κυανό της βρωμοφαινόλης. Η αγαρόζη διατηρήθηκε στους 4°C. Πριν από κάθε χρήση θερμάνθηκε πρώτα σε φούρνο μικροκυμάτων, ώστε να περιέλθει σε υγρή μορφή. Με τη στερεοποίησή της πάνω από τις ΤΑΚ, τις σταθεροποιούσε ώστε να μην μπορούν να μετακινηθούν, όταν η κασέτα βυθιζόταν στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (TGS).

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης *(TGS)*
Αραιώθηκε το εμπορικά διαθέσιμο TGS 10x (BioRad) σε τελική συγκέντρωση 1x. Το TGS 1x περιείχε: Tris-HCl 25mM pH 8,3, γλυκίνη 192mM, SDS 0,1%(v/v).

Διάλυμα Μονιμοποίησης για Coomassie Colloidal Blue stain
Μεθανόλη (Sigma) 30%(v/v)
Οξικό οξύ (Panreac) 10%(v/v)

Η κολλοειδής βαφή Coomassie Colloidal Blue έχει το πλεονέκτημα ότι δεν βάφει τίποτα άλλο εκτός από πρωτεΐνες, συνεπώς δεν απαιτείται η διαδικασία destaining. Είναι συμβατή για ανάλυση των πρωτεϊνικών κηλίδων από τον φασματογράφο μάζας και επίσης είναι αρκετά πιο ευαίσθητη από την κλασική βαφή Coomassie Blue (κάθε βαμμένη πρωτεϊνική κηλίδα είναι ποσότητας από 0,2-1pmol) (Kinter και Sherman 2000).

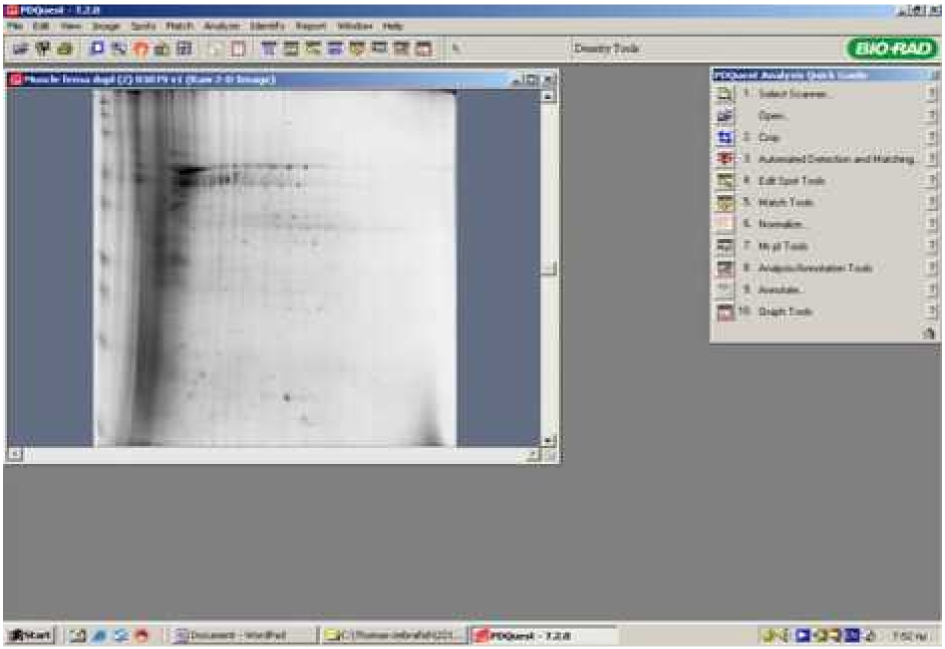
2.3.2.1 Ανάλυση εικόνας δισδιάστατων πηκτωμάτων

Μετά τη βαφή με Coomassie Colloidal Blue τα πηκτώματα είχαν πλέον εμφανείς τις πρωτεϊνικές κηλίδες. Σε κάθε πείραμα υπήρχαν τουλάχιστον δύο δισδιάστατα πηκτώματα (duplicates) για κάθε δείγμα, τα οποία «έτρεχαν» παράλληλα, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η επαναληψιμότητα στο πείραμα.

Τα πηκτώματα 2Δ σαρώθηκαν σε σαρωτή-πυκνοτόμετρο (scanner– densitometer) και η εικόνα υψηλής ανάλυσης που λήφθηκε αποθηκεύτηκε για περαιτέρω επεξεργασία (Εικ. 2.7).

Η ανάλυση των εικόνων των πηκτωμάτων 2Δ έγινε σε υπολογιστή που διαθέτει το κατάλληλο λογισμικό (Εικ.2.7) όπως το PDQuest 2D-Gel analysis Software v. 7.2.0. είναι αναπόσπαστο κομμάτι της διαδικασίας που ακολουθεί την Η2Δ και αυτό γιατί έτσι: α) Αποθηκεύεται μεγάλος αριθμός πειραματικών δεδομένων εικόνας (όντας η Η2Δ τεχνική υψηλής ρυθμοαπόδοσης) β) Επιτυγχάνεται ταχεία και ενδελεχής ανάλυση της πειραματικής πληροφορίας γ) Δημιουργούνται βάσεις δεδομένων 2Δ πηκτωμάτων (Garfin 2001).

Τα 2Δ πηκτώματα, μετά τη σάρωση τοποθετήθηκαν σε ειδικές νάιλον σακούλες μαζί με μία μικρή ποσότητα απιονισμένου νερού και αποθηκεύτηκαν στους 4°C.



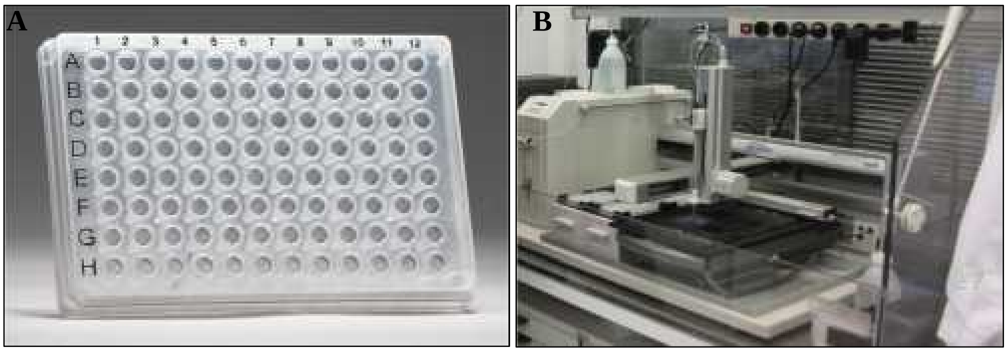
Εικόνα 2.7. Τυπική εικόνα δισδιάστατου πηκτώματος έτοιμο προς ανάλυση ή αποθήκευση.

Σαρωτής-Πυκνοτόμετρο
Μοντέλο GS800 Calibrated Densitometer (BioRad)

Λογισμικό ψηφιακής επεξεργασίας δισδιάστατων πηκτωμάτων και ποσοτικοποίησης κηλίδων (Image analysis)
PDQuest 2D-Gel analysis Software v. 7.2.0.(BioRad)

2.4 Εξαγωγή πρωτεϊνικών κηλίδων από τα δις-διάστατα πηκτώματα

Τα προς ανάλυση πηκτώματα τοποθετήθηκαν σε ρομποτικό μηχάνημα (Εικ.2.8) εξαγωγής κηλίδων όπου σαρώθηκαν και υπέστησαν αυτόματη οπτική αναγνώριση των πρωτεϊνικών κηλίδων. Δουλεύοντας με το λογισμικό, τέθηκαν οι παράμετροι για βελτιστοποίηση της επιλογής κηλίδων, αφαίρεση του «θορύβου» και των ψευδών κηλίδων και αρίθμησής τους. Τα δεδομένα εισάχθηκαν στον υπολογιστή και δόθηκε η εντολή στον ρομποτικό βραχίονα για την έναρξη της διαδικασίας. Εξήχθηκε μία προς μία κάθε κηλίδα και τοποθετήθηκε σε συγκεκριμένα πηγαδάκια σε 96-well microtiter plate. Συνεπώς, στο αρχείο που δημιουργήθηκε αποθηκεύτηκε η πληροφορία για το που ακριβώς είχε τοποθετηθεί κάθε κηλίδα.



Εικόνα 2.8. A) 96-well microtiter plate **B)**Η ρομποτική διάταξη (Gel Picker) που χρησιμοποιήθηκε. Από αριστερά διακρίνουμε την κεντρική μονάδα, τις θέσεις τοποθέτησης των, τον σαρωτή πάνω στον οποίο τοποθετείται το 2Δ πήκτωμα, και τον ρομποτικό βραχίονα που έχει τη δυνατότητα να κινείται προς τις 3 διαστάσεις Bruker Daltonics Proteineer SpII (Bruker Daltonics)

Λογισμικά ψηφιακής δημιουργίας εικόνας και επεξεργασίας των ψηφιακών εικόνων των 2Δ πηκτωμάτων στη ρομποτική διάταξη εξαγωγής κηλίδων SPControl 3 και Melanie 4

Εικόνα 2.9. Τα λογισμικά: SPControl3(δεξιά) και Melanie4 (αριστερά) που χρησιμοποιήθηκαν στη ρομποτική διάταξη εξαγωγής κηλίδων

2.4.1 Ταυτοποίηση των διαχωρισμένων πρωτεϊνών με Φασματομετρία Μάζας (PMF)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε μετά την εξαγωγή των πρωτεϊνικών κηλίδων από τα πηκτώματα 2Δ ήταν η εξης:

Αποχρωματισμός κηλίδων και πέψη των περιεχόμενων πρωτεϊνών.

- Απομακρύνθηκε όσο νερό υπήρχε μέσα σε κάθε πηγαδάκι του 96-well microtiter plate, ώστε να μείνει μόνο το κομμάτι του πηκτώματος
- Προστέθηκαν 150μl destaining solution υπό συνεχή ανάδευση για 15 λεπτά

- Επαναλήφθηκε το $2^{ο}$ στάδιο αφού αφαιρέθηκε το υπάρχον destaining solution. Ο πλήρης αποχρωματισμός των κηλίδων, είναι απαραίτητος καθώς η βαφή Coomassie μπορεί να αναστείλει τη δράση της θρυψίνης.
- Προστέθηκαν 150μl υπερκάθαρο νερό, αφού προηγουμένως απομακρύνθηκε το destaining solution και έγινε ανάδευση για 5 λεπτά.
- Απομακρύνθηκε το υπερκάθαρο νερό και στη συνέχεια προστέθηκαν 150μl όξινου ανθρακικού αμμώνιου υπό συνεχή ανάδευση για 5 λεπτά.
- Αφαιρέθηκε το όξινο ανθρακικό αμμώνιο και στη συνέχεια τοποθετήθηκε το 96-well microtiter plate σε συσκευή speed vac για 45 λεπτά περίπου, ώστε να αποξηρανθούν οι κηλίδες.
- Προστέθηκαν 3 μl διαλύματος θρυψίνης (30ng) σε κάθε αποξηραμένο κομμάτι πηκτώματος και αφέθηκε σε σκοτεινό σημείο σε θερμοκρασία δωματίου και με κάποια σχετική υγρασία όλη νύχτα.

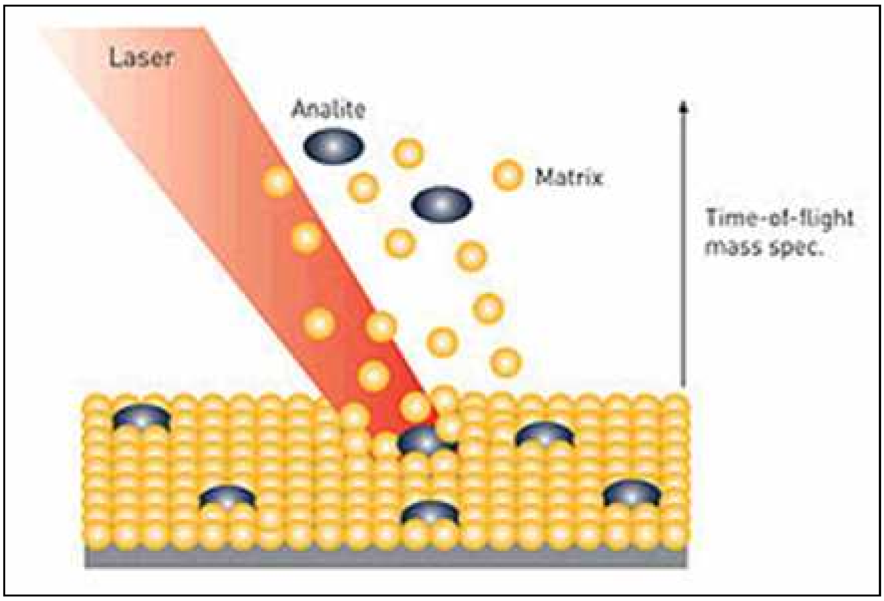
Προετοιμασία των κηλίδων για εισαγωγή στον φασματογράφο μάζας

- Μετά την ολονύχτια επώαση με θρυψίνη, προστέθηκαν 10μl extraction solution σε κάθε κηλίδα και αφέθηκαν για 10 λεπτά υπό ανάδευση. Με το extraction solution τα πεπτίδια που προέκυψαν από την πέψη εκχυλίστηκαν από το κομμάτι του πηκτώματος και διαλυτοποιήθηκαν.
- Σε 10 mL μητρικού διαλύματος (matrix) αναμείχθηκαν 10μl διαλύματος βραδυκινίνης και 5μl διαλύματος ACTH. Η βραδυκινίνη και η ACTH (calibration standards) προστέθηκαν για να καλιμπραριστεί ο φασματογράφος.
- Προστέθηκαν σε κάθε θέση της πλάκας 1μl από το matrix μαζί με τα calibration standards (στα σημεία όπου προστέθηκε προηγουμένως το δείγμα). Η πλάκα αφέθηκε σε σκοτεινό σημείο για να στεγνώσει.
- Η πλάκα τοποθετήθηκε στο φασματογράφο μάζας.
- Καλιμπράρισμα (flex control) πλάκας (Εικ. 2.12)

Τα πεπτίδια που προέκυψαν από την πέψη των πρωτεϊνικών μορίων διαλυτοποιήθηκαν σε ένα διάλυμα ουσίας που απορροφά ενέργεια στο μήκος κύματος που παράγει η πηγή λέιζερ (μήτρα) και τοποθετείται πάνω σε πλάκα (Εικ.2.10), για να εισαχθεί στο Φασματογράφο μάζας. Καθώς το μείγμα ξηραίνεται πάνω στην πλάκα, η μήτρα σχημάτισε κρυστάλλους και τα πεπτίδια ενσωματώθηκαν σε αυτούς. Κατόπιν, παλμοί διάρκειας λίγων νανοδευτερολέπτων από υπεριώδες λέιζερ (συνήθως λέιζερ Αζώτου με μήκος κύματος 337 nm) βομβάρδισαν την πλάκα, με αποτέλεσμα να εξατμιστούν (Εκρόφηση) από αυτή μικρές ποσότητες από τη μήτρα και τα περιεχόμενα πεπτίδια μεταφέρθηκαν στην αέρια φάση (Εικ.2.11). Ο ιονισμός έλαβε χώρα με πρωτονίωση (ένα πρωτόνιο σε κάθε πεπτίδιο) στο όξινο περιβάλλον της μήτρας, η οποία βοήθησε επίσης στο να απορροφήσει το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας από το λέιζερ, ώστε να αποφευχθεί ο ανεπιθύμητος κατακερματισμός των βιομορίων.

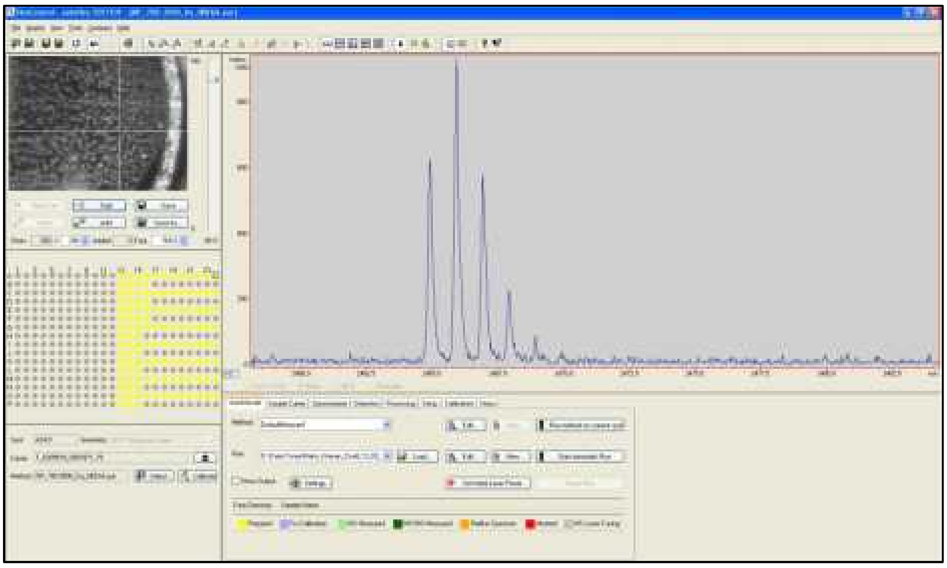
Εικόνα 2.10. Τοποθέτηση δειγμάτων σε ειδική πλάκα πριν την εισαγωγή στον φασματογράφο. Ανάμιξη ένωσης - μήτρας και πολυμερούς σε κατάλληλο διαλύτη*.(Cmatrix = 100 x Cpolymer. Δημιουργία ομογενούς κρυστάλλου με ομοιόμορφή διασπορά μορίων πολυμερούς.

Τα προκύπτοντα πεπτίδια-ιόντα είχαν πλέον το καθένα μία χαρακτηριστική τιμή μάζα/φορτίο (mass/charge ratio ή m/z). Στη συνέχεια επιταχύνθηκαν υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου (περίπου 20KV) και οδηγήθηκαν στον ανιχνευτή. Ο χρόνος (Χρόνος Πτήσης), από το σημείο επίδρασης του ηλεκτρικού πεδίου μέχρι τον ανιχνευτή ήταν μοναδικός για κάθε πεπτίδιο εφόσον είχαν χαρακτηριστικό λόγο m/z (τα πεπτίδια με μεγάλο m/z έφτασαν αργότερα από αυτά με μικρό) (Εικ.2.13). Με τον τρόπο αυτό διαφορετικά πεπτίδια έφτασαν σε διαφορετικούς χρόνους στον ανιχνευτή και έτσι προέκυψε το φάσμα, που αποτέλεσε και το αποτύπωμα της πέψης (Peptide Mass Fingerprint) (Εικ.2.14)

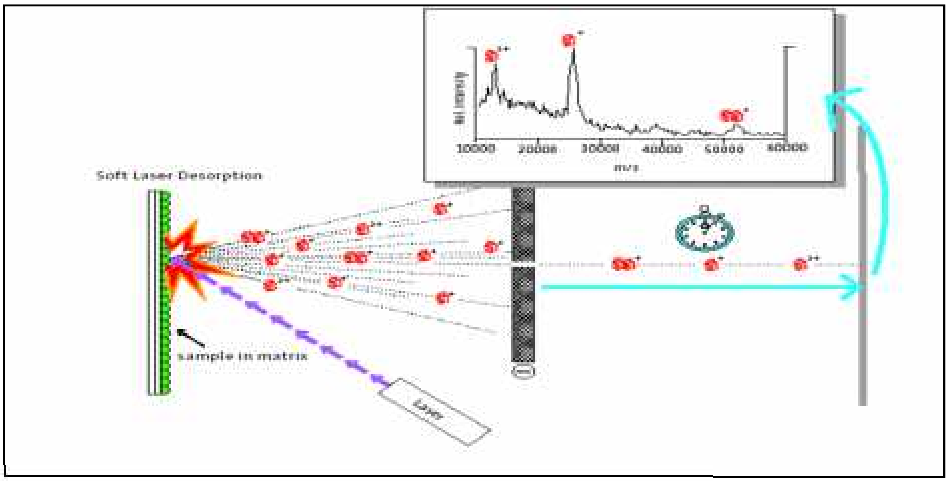


Εικόνα 2.11. Το βήμα της εκρόφησης/ιονισμού μήτρας και μείγματος πέψης. Με πορτοκαλί χρώμα συμβολίζονται τα μόρια της μήτρας και με μαύρο τα πεπτίδια.

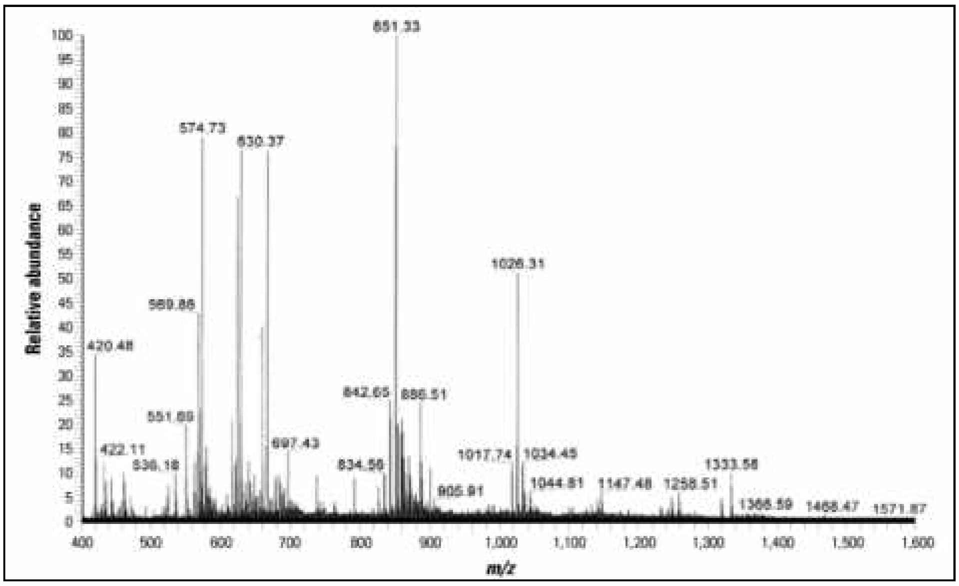
Ο χειρισμός του φασματογράφου έγινε από εξειδικευμένο τεχνικό επιστήμονα του εργαστηρίου (Δρ.Κωνσταντίνος Βουγάς) και τα αποτελέσματα μετά από τη σύγκριση με τις βάσεις δεδομένων λήφθηκαν σε αρχεία excel.



Εικόνα 2.12 Maldi-TOF Flex control



Εικόνα 2.13. Σχηματική αναπαράσταση του MALDI–TOF

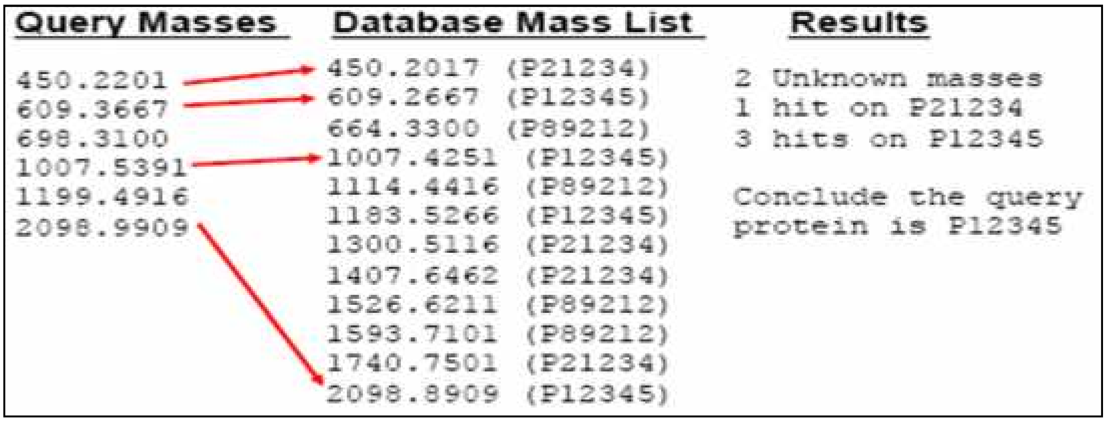


Εικόνα 2.14. Χαρακτηριστικό πεπτιδικό αποτύπωμα (χάρτης) μετά από πέψη με θρυψίνη. Στον άξονα x φαίνονται οι τιμές m/z και στον άξονα y οι τιμές της σχετικής αφθονίας. Κάθε πεπτίδιο αντιπροσωπεύεται από μία κάθετη στον άξονα x γραμμή και από έναν αριθμό. Ο αριθμός αυτός είναι η παρατηρούμενη μάζα (Calculated mass) η οποία χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση κάθε πεπτιδίου

Μετά τη δημιουργία των PMF χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι αλγόριθμοι που μπορούσαν να επιτύχουν την ταυτοποίηση ακόμη και όταν η πέψη δεν ήταν πλήρης (στις παραμέτρους επιτράπηκαν έως και 1 χαμένο σημείο πέψης) και όταν υπήρχε μικρός αριθμός προκυπτόντων πεπτιδίων.

Αν μία πρωτεΐνη μελετάται και αναφέρεται για πρώτη φορά, τότε τα πειράματα αλληλούχισης και ταυτοποίησής της εγκαθιδρύουν τη μοναδικότητά της, βρίσκοντας μία μοναδική αμινοξική αλληλουχία (de novo ταυτοποίηση). Αν άλλοι επιστήμονες έχουν μελετήσει μία δεδομένη πρωτεΐνη προηγουμένως, τότε τα αντίστοιχα πειράματα συνδέουν την πρωτεΐνη που αναζητείται μέσω ταιριάσματος ολόκληρων αμινοξικών αλληλουχιών πεπτιδίων. Με την παραπάνω μέθοδο δεν ταυτοποιείται μία πρωτεΐνη κάνοντας de novo ταυτοποίηση. Άλλωστε, ο πεπτιδικός χάρτης-αποτύπωμα δεν δίνει πληροφορία από μόνος του για την πρωτεΐνη η οποία υπέστη την πέψη. Σε αυτό το σημείο μεγάλη είναι η συμβολή των βάσεων δεδομένων στις οποίες πρωτεΐνες από αρκετούς οργανισμούς έχουν υποστεί πέψη in silico και έχουν υπολογιστεί οι θεωρητικές πεπτιδικές μάζες των προκυπτόντων πεπτιδίων (Εικ.2.15).

Η εισαγωγή δεδομένων από τη Φασματομετρία Μάζας και η σύγκριση τους με αυτά που υπάρχουν σε αυτές τις βάσεις, οδηγεί στην ταυτοποίηση της πρωτεΐνης που αναζητείται.

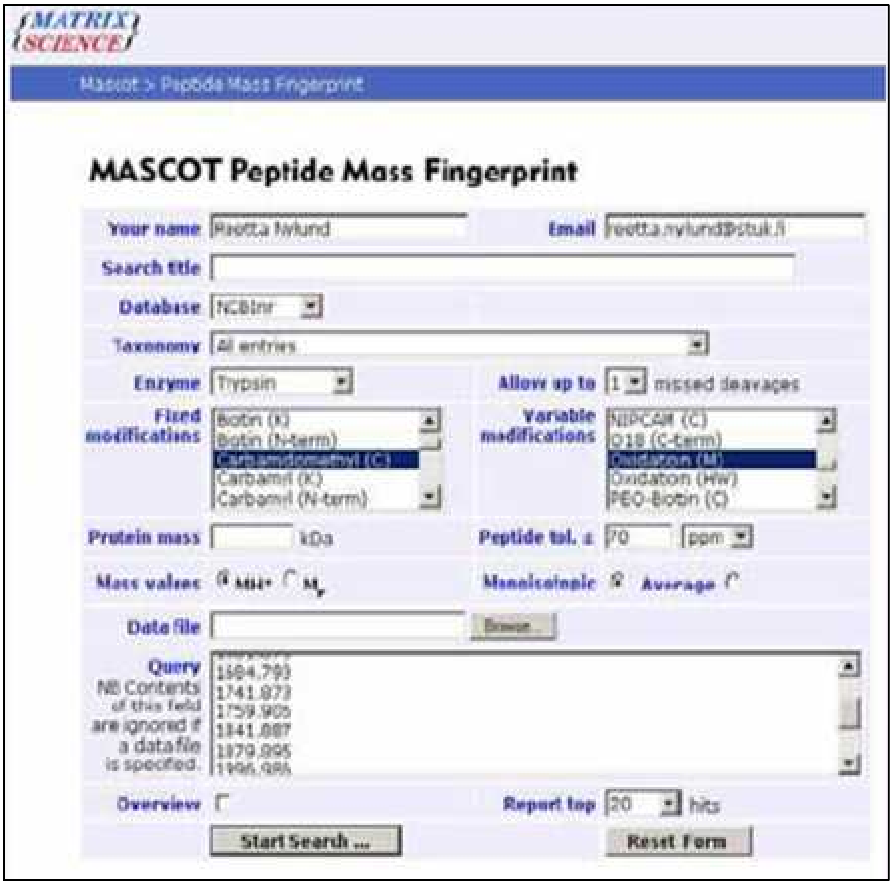


Εικόνα 2.15. Σύγκριση των θεωρητικών πεπτιδικών μαζών με αυτές που υπάρχουν σε βάσεις δεδομένων. www.matrixscience.com

2.4.2 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών μέσω αναζήτησης στις βάσεις δεδομένων

Η ανάπτυξη λογισμικών για τη διερεύνηση μη ταυτοποιημένων φασμάτων πεπτιδίων σε βάσεις πεπτιδικών ή και νουκλεοτιδικών αλληλουχιών έδωσε νέα ώθηση στην Τεχνολογία της Πρωτεομικής. Η χρήση αλγορίθμων όπως η MASCOT (Εικ.2.16) συνδυαζόμενη με τη σημαντικότατη αύξηση στις διαθέσιμες πηγές γενωμικής πληροφορίας έκανε την ταυτοποίηση των φασμάτων από τη φασματομετρία μάζας ρουτίνα. Χωρίς την ανάπτυξη λογισμικών έρευνας σε βάσεις δεδομένων δεν θα ήταν εφικτό να αποφευχθεί η ανάλυση μίας πρωτεΐνης σε κάθε πείραμα και να μεταβεί σε αυτό που σήμερα αποκαλείται τεχνολογία υψηλής ρυθμοαπόδοσης (MacCoss MJ 2005).

Επειδή οι αλγόριθμοι αναζητήσεως στις βάσεις δεδομένων λειτουργούν στο επίπεδο του πεπτιδίου, χρειάζεται επιπλέον λογισμικό για την in silico ένωση αυτών των μικρών πεπτιδικών αλληλουχιών σε πρωτεϊνικές αλληλουχίες. Η διαδικασία αυτή περιπλέκεται από την ταυτοποίηση μη-μοναδικών πεπτιδικών αλληλουχιών παρόντων σε περισσότερες από μία πρωτεΐνες και τη δημιουργία μεγάλων πεδίων δεδομένων, τα οποία περιέχουν μοναδικά πεπτίδια για ένα μεγάλο εύρος βεβαιότητας. Συνεπώς, τα υπολογιστικά αυτά προγράμματα έχουν τη δύσκολη εργασία να φιλτράρουν τα δεδομένα από τον φασματογράφο από όλο το θόρυβο και να υποδεικνύουν το μικρότερο δυνατό αριθμό πρωτεϊνικών αλληλουχιών που μπορούν να «χτιστούν» από τις ταυτοποιημένες αλληλουχίες πεπτιδίων (MacCoss MJ 2005).

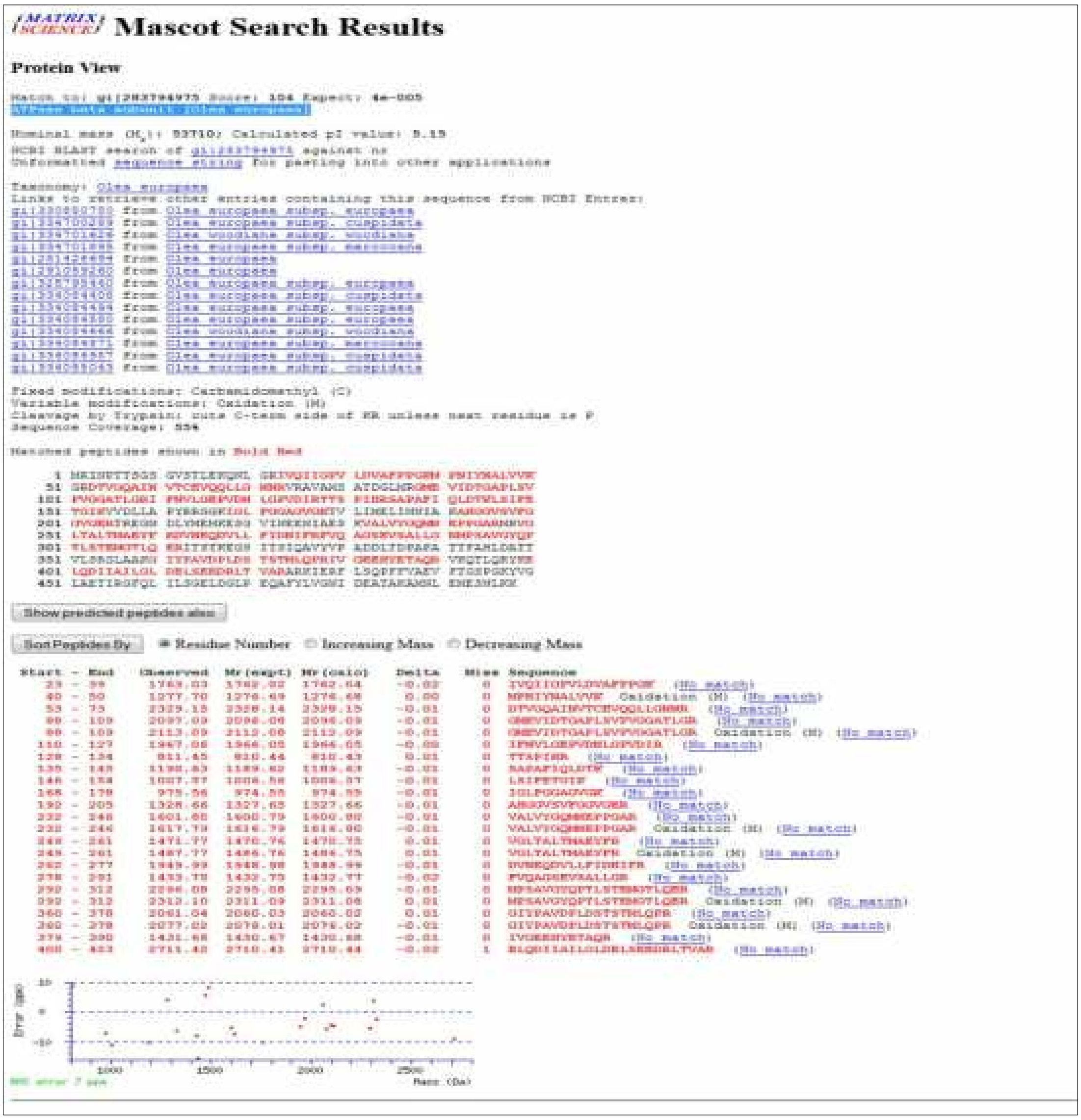


Εικόνα 2.16. Ενδεικτική φόρμα (Mascot) στην οποία τίθενται οι παράμετροι για τη σύγκριση θεωρητικών και πειραματικών πεπτιδικών χαρτών. Διακρίνονται τα πεδία: βάση δεδομένων όπου γίνεται η έρευνα, ταξινομική κατηγορία από όπου προέρχεται το δείγμα προς ανάλυση, ένζυμο πέψης, κ.α. www.matrixscience.com

Η όλη παραπάνω διαδικασία έγινε αυτόματα μέσω μίας μακροεντολής του λογισμικού που ελέγχει τη δραστηριότητα του φασματογράφου μάζας. Αφού λήφθηκε ο πεπτιδικός χάρτης κάθε κηλίδας, η εντολή αυτή συνέδεσε το λογισμικό με τη βάση δεδομένων της Mascot (Perkins DN 1999)(www.matrixscience.com), στην οποία κατηγοριοποιούνται χιλιάδες πεπτιδικοί χάρτες από πολλά είδη οργανισμών. Μετά τη σύγκριση θεωρητικών (in silico) και παρατηρούμενων (πειραματικών) πεπτιδικών χαρτών επιτελέστηκε η ταυτοποίηση της πρωτεΐνης που υπήρχε στην αποκομμένη από το 2Δ πήκτωμα κηλίδα.

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στατιστικά μέσω προγράμματος, ώστε να προσδιοριστεί μία παράμετρος που ονομάζεται «Ακρίβεια Μάζας Πεπτιδίου» (Peptide Mass Accuracy), η οποία ορίζεται ως η σχετική απόκλιση της θεωρητικής από την παρατηρούμενη στο φασματογράφο μάζα. Αυτή η σχετική απόκλιση υπολογίζεται ως η απόλυτη απόκλιση διαιρούμενη με την παρατηρούμενη μάζα του πεπτιδίου και συχνά μετράται σε μέρη ανά εκατομμύριο (ppm) (Kinter και Sherman 2000) (Εικ.2.17).

Το στατιστικό όριο για την ταυτοποίηση πεπτιδίων τέθηκε στα 35ppm. Επιπρόσθετα, για να προσδιοριστεί η ταυτότητα μίας πρωτεΐνης, έπρεπε να ταυτοποιηθούν τουλάχιστον 3-4 πεπτίδια αυτής (Matching peptides limit).



Εικόνα 2.17. Αναλυτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων από έρευνα στη βάση δεδομένων για την ταυτοποίηση μίας πρωτεΐνης. Διακρίνεται η αλληλουχία του μορίου και με κόκκινα γράμματα είναι τα πεπτίδια που ταυτοποιήθηκαν από τον φασματογράφο. Στατιστικά στοιχεία για κάθε πεπτίδιο παρουσιάζονται αμέσως από κάτω και επίσης παρατηρείται το διάγραμμα όπου υπολογίζεται η στατιστική παράμετρος: «Ακρίβεια Μάζας πεπτιδίου».

Διαλύματα

Destaining Solution

NH_4HCO_3 (Fluka): 50mM

Ακετονιτρίλιο (Sigma): 30%(v/v)

Υπερκάθαρο νερό BIOCHROM

Διάλυμα θρυψίνης
Θρυψίνη (Roche): 10ng/μl
NH_4HCO_3 (Fluka): 10mM
Extraction Solution
Ακετονιτρίλιο (Sigma): 50%(v/v)
TFA (Merck): 0,1%(v/v)

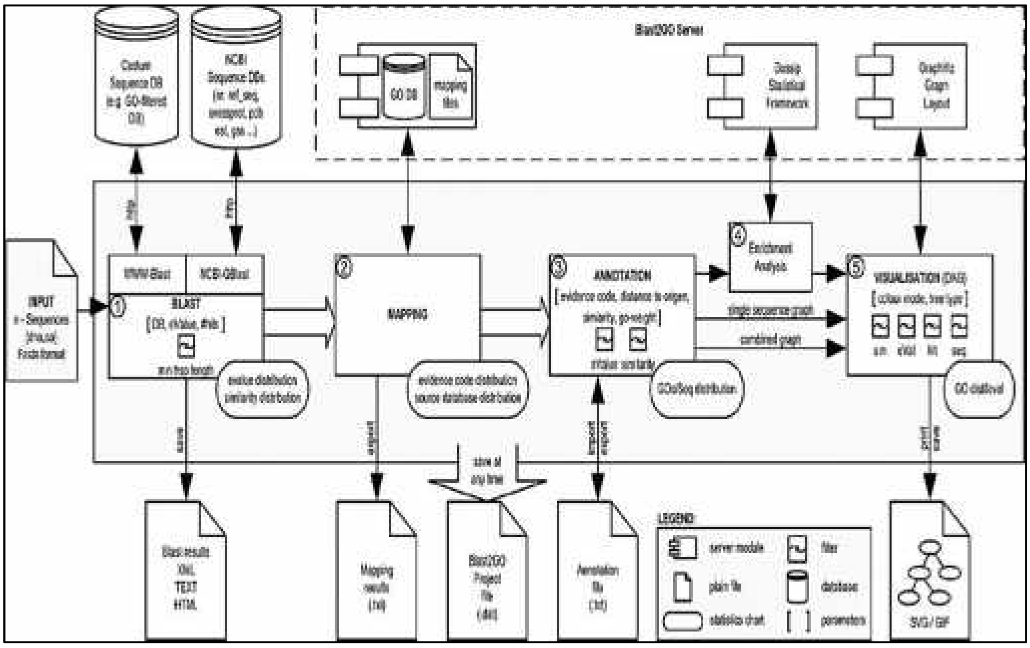
Matrix
α–cyano–4–hydroxycinnamic acid (Sigma): 0,025%(v/v)
Stock διαλύματα βραδυκινίνης και ACTH
SIGMA

Target plates
AnchorChip^{TM} (Bruker Daltonics).
Τα target plates διαθέτουν υδρόφοβη επιφάνεια, αφενός για να βοηθήσουν στην πιο γρήγορη κρυστάλλωση του δείγματος, αφετέρου για να συγκεντρωθεί αυτό σε μία συγκεκριμένη μικρή επιφάνεια.

Φασματογράφος Μάζας
Bruker Ultraflex MALDI TOF

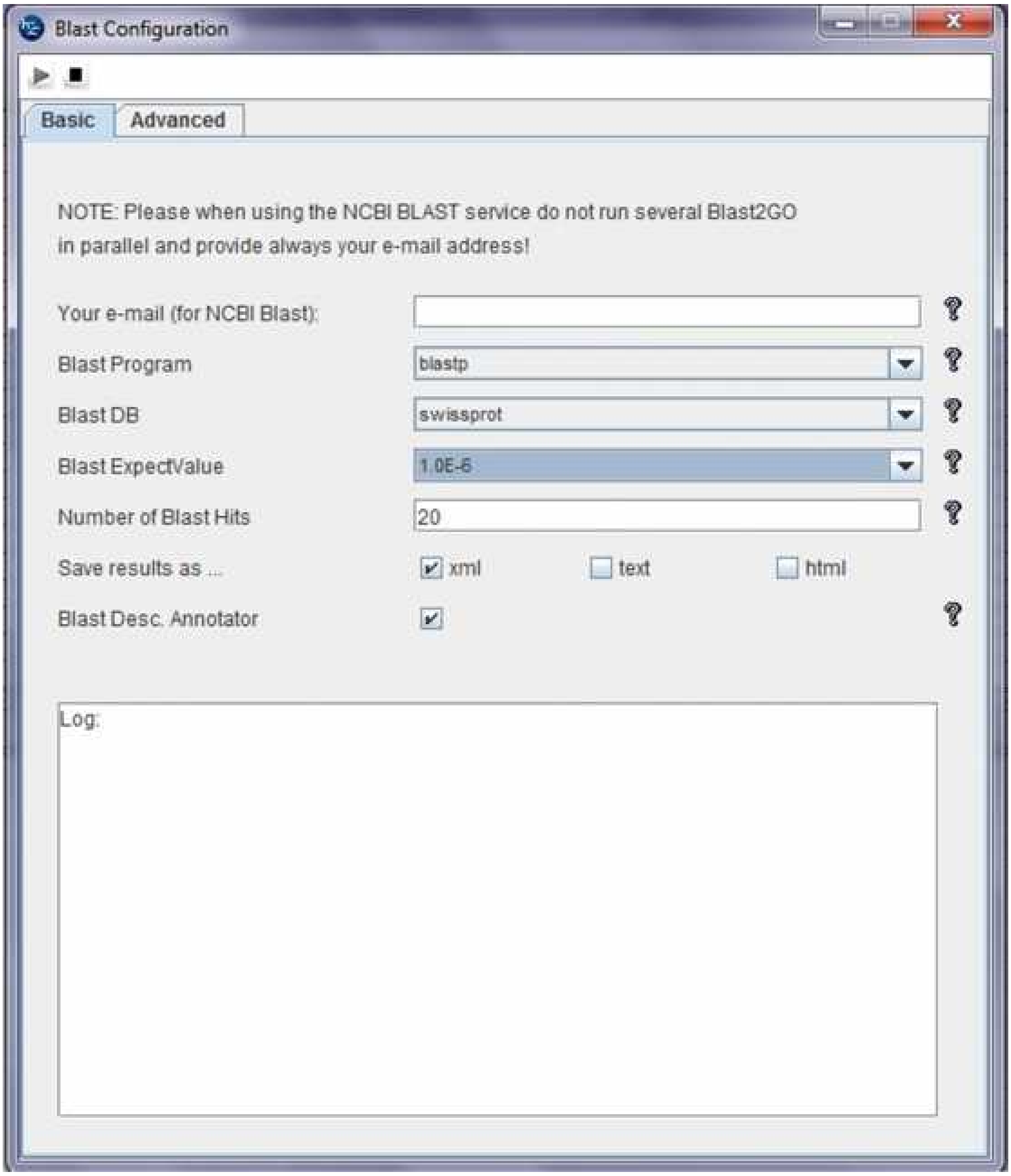
2.5 Βιοπληροφορική ανάλυση

Τα δεδομένα λήφθηκαν σε μορφή txt. Το κάθε spot αντιστοιχούσε σε ένα accession number το οποίο αναζητήθηκε στην NCBI (protein) ώστε να φτιαχτεί ένα αρχείο multi fasta. Η λειτουργική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε στην πλατφόρμα Blast2go (Götz et al, 2008).



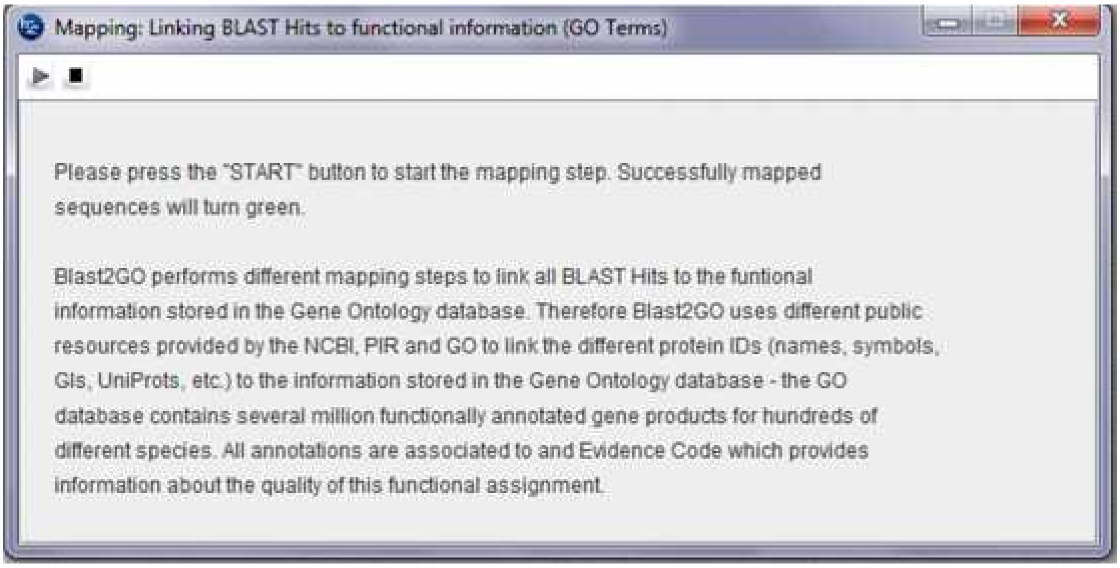
Εικόνα 2.18 Σχηματική αναπαράσταση της εφαρμογής Blast2GO

Το αρχείο fasta φορτώθηκε στην εφαρμογή και έγινε blast με τις ρυθμίσεις όπως φαίνονται στην εικόνα 2.20.



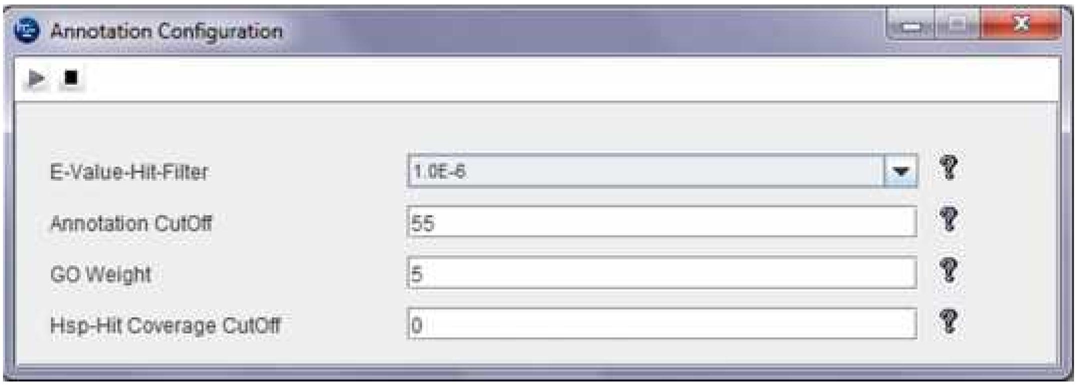
Εικόνα 2.20 Ρυθμίσεις run Blast step.

Στη συνέχεια ακολούθησε η χαρτογράφηση (mapping) των αποτελεσμάτων. Σε αυτό το βήμα γίνεται ανάκτηση όλων των χαρακτηρισμών (Gene Ontology terms, GO terms) που έχουν αντιστοιχηθεί στα γονίδια που επέστρεψαν σαν αποτέλεσμα στο blast (Εικ 2.21). Για κάθε ακολουθία μπορούν να συσχετιστούν από κανένα έως πολλά GO terms.



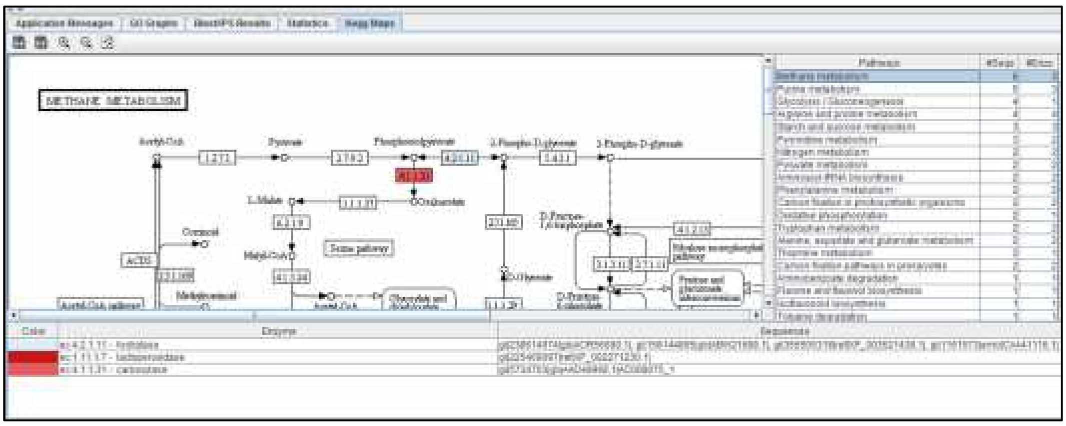
Εικόνα 2.21 Mapping step.

Στην συνέχεια, ακολούθησε το βήμα του Annotation. Εδώ επιλέγονται αυστηρά τα GO terms που ανακτήθηκαν στο βήμα του Mapping και αντιστοιχίζονται στις αλληλουχίες. Η επιλογή γίνεται με βάση τον πιο εξειδικευμένο χαρακτηρισμό εντός ενός εύρους αξιοπιστίας. Οι παράμετροι ορίστηκαν ως εξής:



Εικόνα 2.22 Ρυθμίσεις για το annotation step.

Στην συνέχεια έγινε φόρτωμα μεταβολικών χαρτών από το KEGG για τους κωδικούς ενζύμων που βρέθηκαν στα αποτελέσματα του annotation.

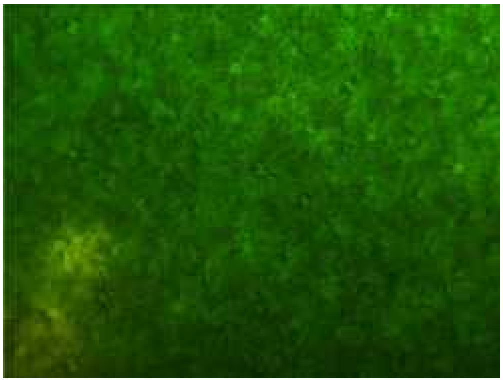


Εικόνα 2.23 Load kegg pathways.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

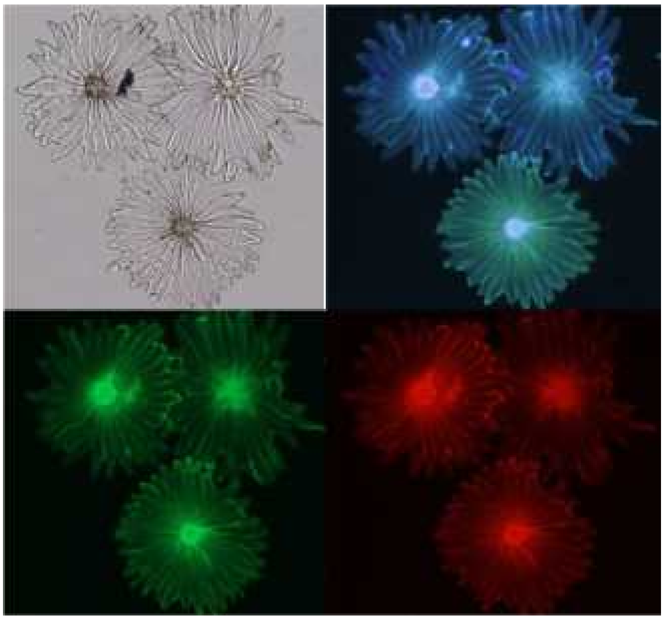
3.1 Απεικόνιση φύλλου κ τριχωμάτων και απομόνωση ιστού

Η απομόνωση του ιστού έγινε με τη βοήθεια ξυραφιού τα τριχώματα συλλέχτηκαν σε eppendorf και είτε προχώρησαν στην απομόνωση πρωτεϊνών είτε αποθηκευτήκαν στους -80°C.



Εικόνα 3.1 Απαξονική επιφάνεια νεαρού φύλου ελιάς πριν την απομόνωση του τριχώματος.

Εικόνα 3.2 Απαξονική επιφάνεια νεαρού φύλου ελιάς μετά την απομόνωση του τριχώματος.



Εικόνα 3.3 Μη αδενώδης τριχώματα του φύλλου της ελιάς ορατό και UV φάσμα με διάφορα φίλτρα

3.2 Απομόνωση πρωτεϊνών των τριχωμάτων

Η απομόνωση πρωτεϊνών από τις τρίχες των φύλλων της ελιάς, αποδείχτηκε δύσκολη υπόθεση καθώς η ποσότητα πρωτεΐνης που μπορούσε να απομονωθεί κάθε φορά ήταν μικρή και η καθαρότητα των δειγμάτων δεν ήταν τόσο καλή πιθανότατα λόγω πολλών συστατικών που παρεμποδίζουν τη διαδικασία απομόνωσης όπως είναι τα φαινολικά συστατικά.

Δοκιμάστηκαν αρκετά πρωτόκολλα απομόνωσης πρωτεϊνών μέχρι να καταλήξουμε στο βέλτιστο το οποίο αναγράφεται αναλυτικά στα υλικά και μέθοδοι.

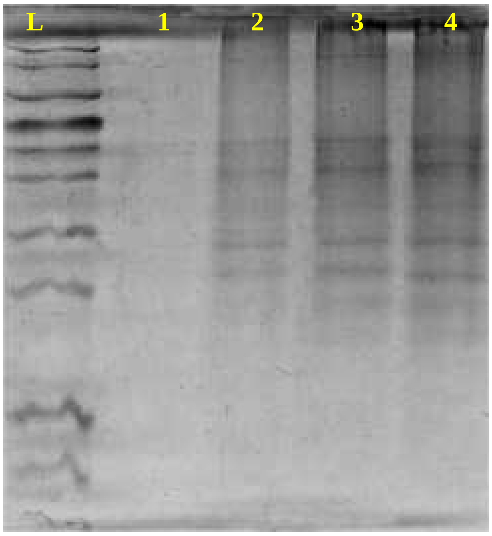
Το πρωτόκολλο χωρίζεται σε 2 τμήματα τα οποία είναι τα εξής

Α) Λύση κυττάρων

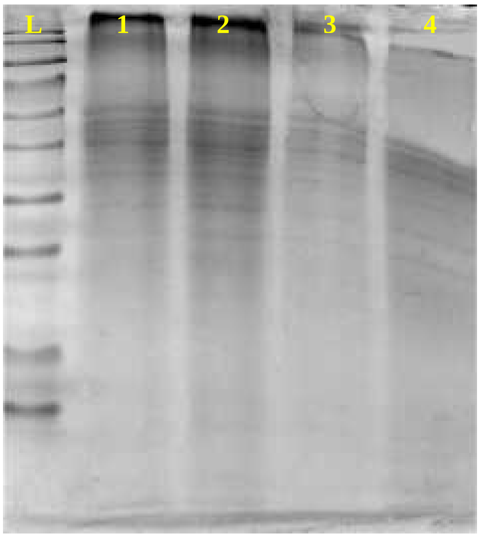
Β) Απομόνωση και Καθίζηση πρωτεϊνών

Α) Λύση κυττάρων

Η πρώτη επιλογή για τη λύση κυττάρων ήταν με τη βοήθεια υπερήχων (sonication) όπου πραγματοποιήθηκε πειραματισμός με συνθήκες διαφορετικής διάρκειας και έντασης.

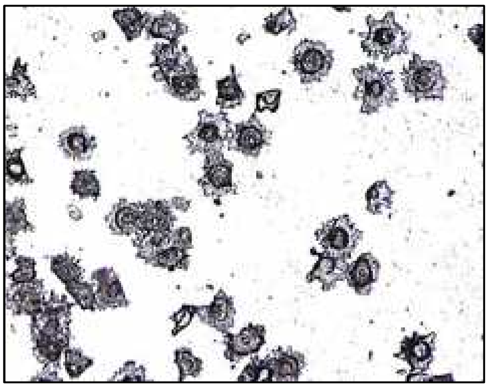


Εικόνα 3.4 χρώση CBB
Lane 1 20% power - 25% Pulse - 8 min
Lane 2 Χωρίς υπέρηχους χρήση εμβόλου
Lane 3 20% power - 25% Pulse - 8 min
Lane 4 30% power - 20% Pulser - 15 min

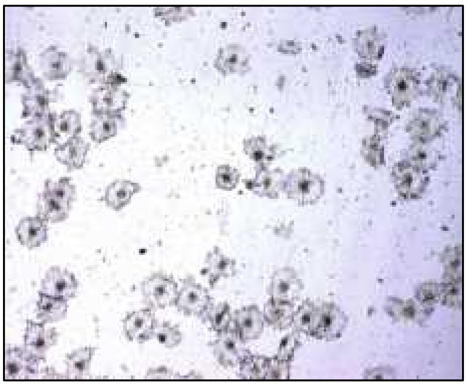


Εικόνα 3.5 χρώση CBB
Lane 1 25% power - 25% Pulse - 8 min
Lane 2 Χωρίς υπέρηχους χρήση εμβόλου
Lane 3 20% power - 20% Pulse - 12 min
Lane 4 20% power - 25% Pulser -10 min

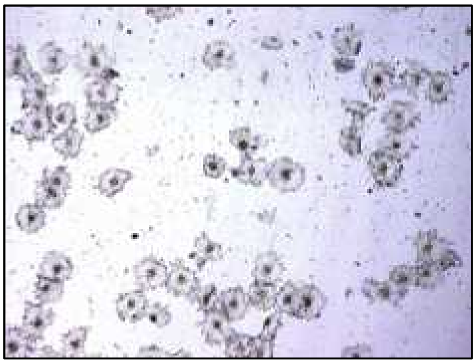
Αυτός ο τρόπος λύσης των κυττάρων (sonication) εγκαταλείφθηκε καθώς το πρωτεϊνικό προφίλ δεν αντιστοιχούσε με τις συνθήκες και την ποσότητα ιστού, γεγονός που αποδείχτηκε και μετά από μικροσκοπική παρατήρηση όπου φάνηκε οτι το μεγαλύτερο ποσοστό των τριχωμάτων παρέμεινε άθικτο (εικ. 3.6 ως 3.9).



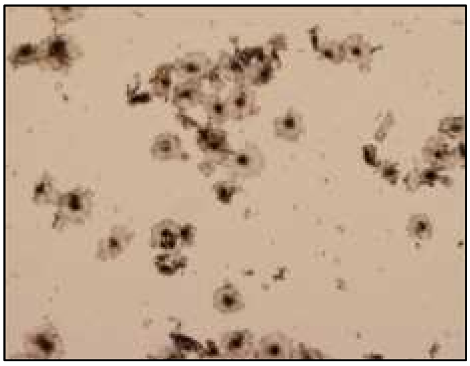
Εικόνα 3.6 Τριχώματα μετά από 5 λεπτά sonication σε TCA/acetone



Εικόνα 3.7 Τριχώματα μετά από 15 λεπτά sonication σε TCA/acetone



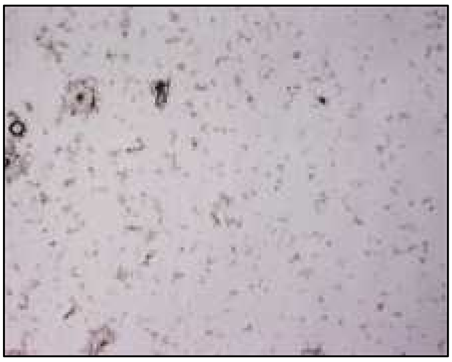
Εικόνα 3.8 Τριχώματα μετά από 5 λεπτά sonication σε sonication buffer



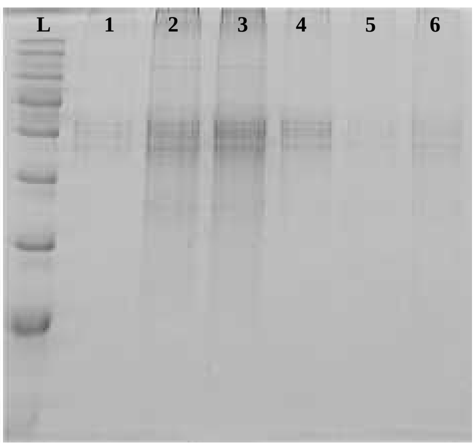
Εικόνα 3.9 Τριχώματα μετά από 15 λεπτά sonication σε sonication buffer

Η δεύτερη επιλογή για τη λύση κυττάρων ήταν με άζωτο +/- άμμο (quartz sand)

Εικόνα 3.10 Τριχώματα μετά από κονιορτοποίηση με άζωτο



Εικόνα 3.11 Τριχώματα μετά από κονιορτοποίηση με άζωτο και άμμο

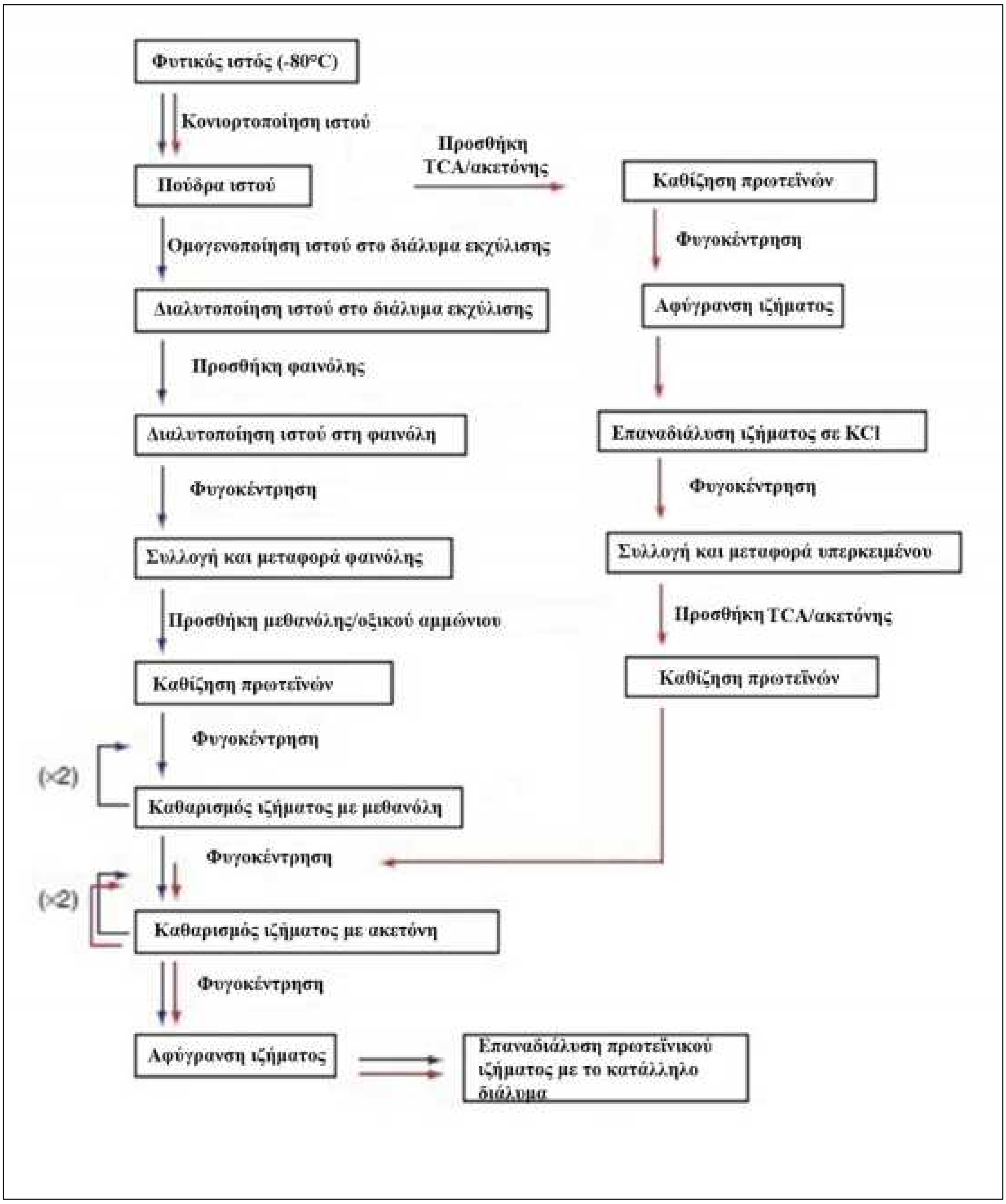


Εικόνα 3.12 Κονιορτοποίηση ιστού με άζωτο και άμμο στα πηγάδια 1-2-3 με υπέρηχους στα 4-5-6

Καταλήξαμε στη λύση κυττάρων με υγρό άζωτο και άμμο 10%w/w του ιστού.

Β) Απομόνωση και Καθίζηση πρωτεϊνών

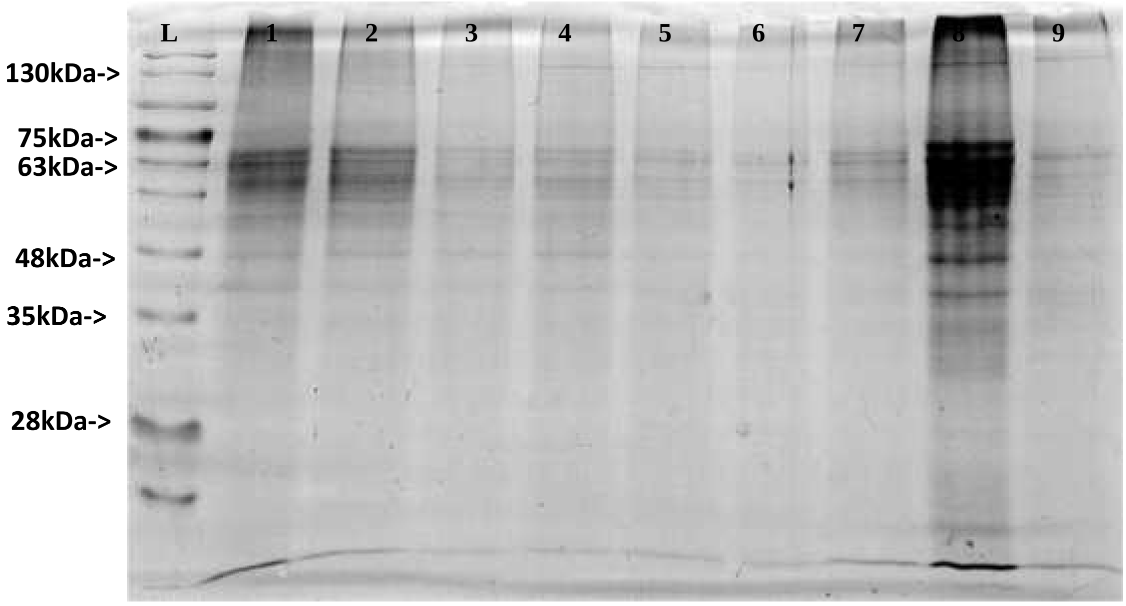
Πρωτόκολλα απομόνωσης
Τα κύρια πρωτόκολλα με τα οποία πειραματιστήκαμε ήταν Phenol/sds και TCA/acetone με διάφορες παραλλαγές και προσθήκες ώστε να βρεθεί το βέλτιστο.



Σχήμα 1. Πρωτόκολλα απομόνωσης πρωτεϊνών

Ακολουθούν ενδεικτικές δοκιμές πηκτών πολύ-ακρυλαμίδης με παραλλαγές στα κυρίως πρωτόκολλα.

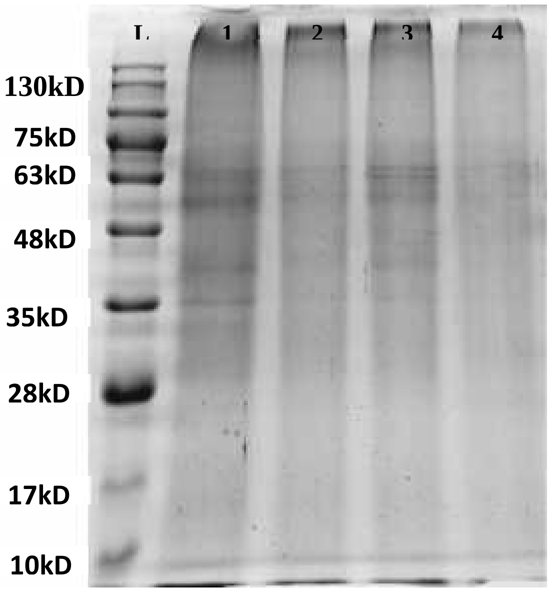
Δοκιμή με αναστολείς πρωτεασών στο διάλυμα εκχύλισης και διαφορετικά διαλύματα για την καθίζηση των πρωτεϊνών



Εικόνα 3.13 χρώση CBB
Pmsf και benzamidine στα δείγματα 3-4-5-6-9
Καθίζηση πρωτεϊνών με μεθανόλη/οξικό αμμώνιο στα lanes 1-2-3-4-8
Καθίζηση πρωτεϊνών με TCA/ακετόνη στα δείγματα 5-6-7-9

Καλύτερη απομόνωση βάση της εικόνας δίνει η απομόνωση με phenol/sds, η καθίζηση πρωτεϊνών με μεθανόλη /οξικό αμμώνιο και η μη χρήση αναστολέων πρωτεασών.

Δοκιμάστηκαν διαφορετικά διαλύματα απομόνωσης και ιστός από νεαρά και ώριμα φύλλα



Εικόνα 3.14

Διαλυμα 1 στα lanes 1και 2

Διάλυμα 2 στα lanes 3 και 4

Τριχώματα από νεαρά φύλλα στα πηγάδια 1 και 3

Τριχώματα από νεαρά φύλλα στα πηγάδια 2 και 4

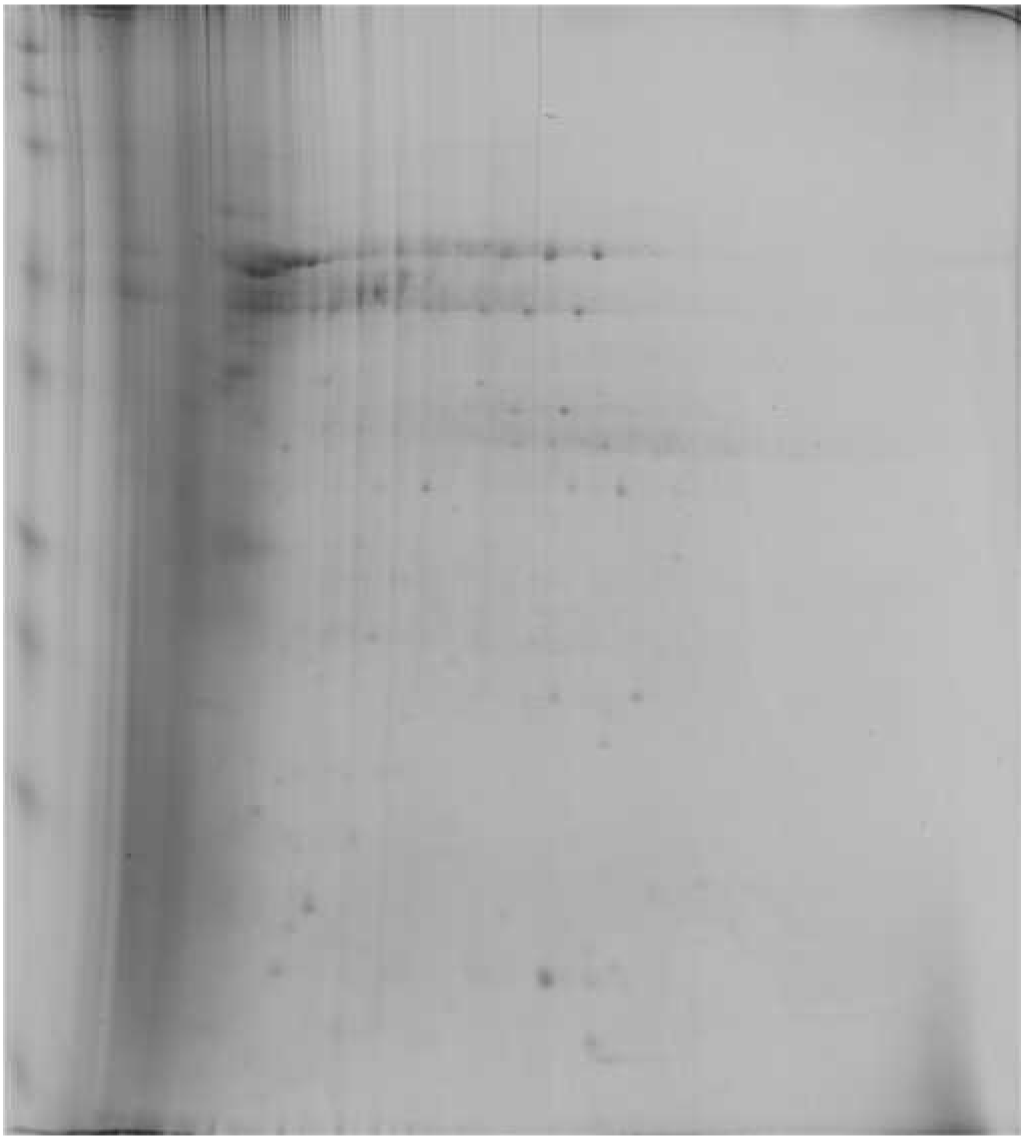
Buffer 1
0,2M Tris HCl pH 7,4
4%SDS
50mM EDTA
10% b-mercaptoethanol
1% pvpp
*60% sucrose

Buffer 2
0,5M Tris HCl pH 7,4
0,1M KCl
50mM EDTA
2% b-mercaptoethanol
0,7M Sucrose

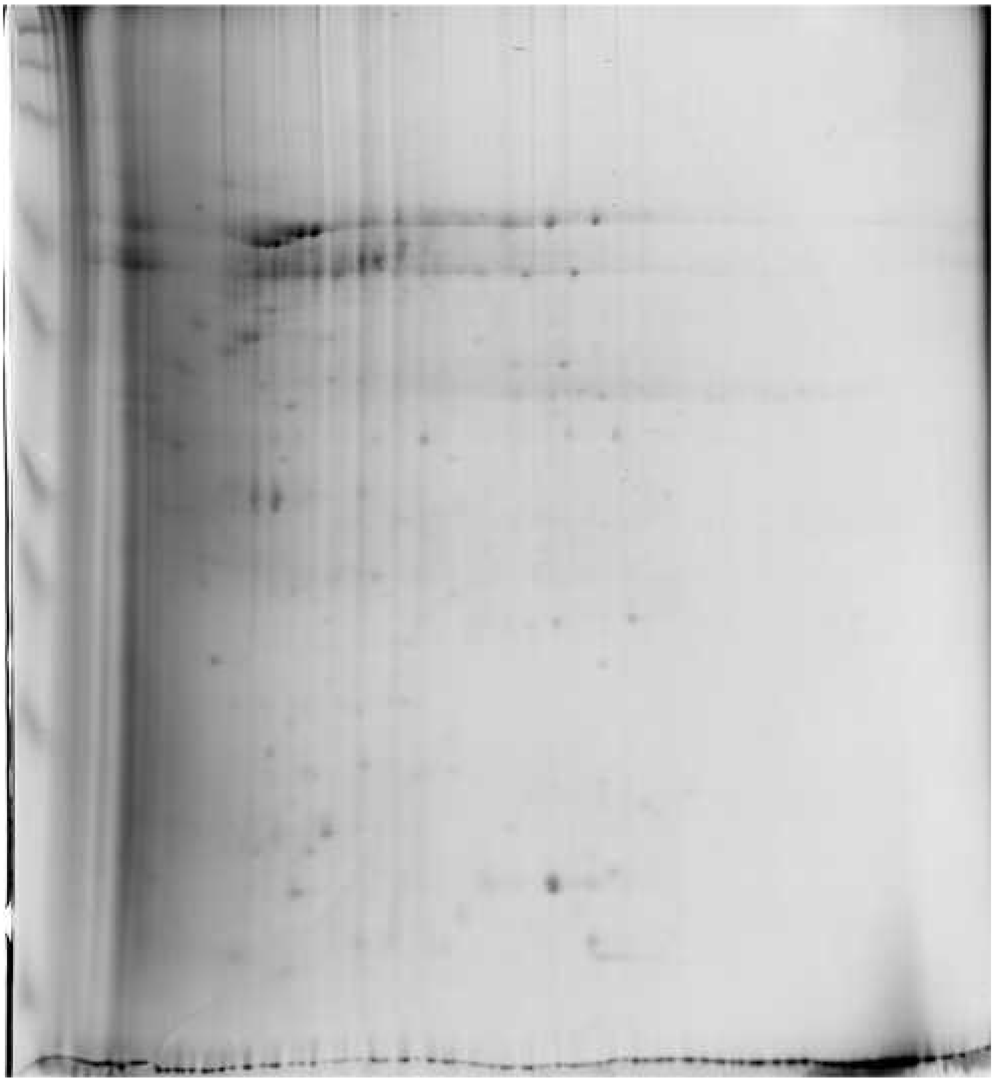
Καλύτερη απομόνωση βάση της εικόνας δίνουν τα τριχώματα από νεαρά φύλλα καθώς και η χρήση του 2ου διαλύματος εκχύλισης

Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων

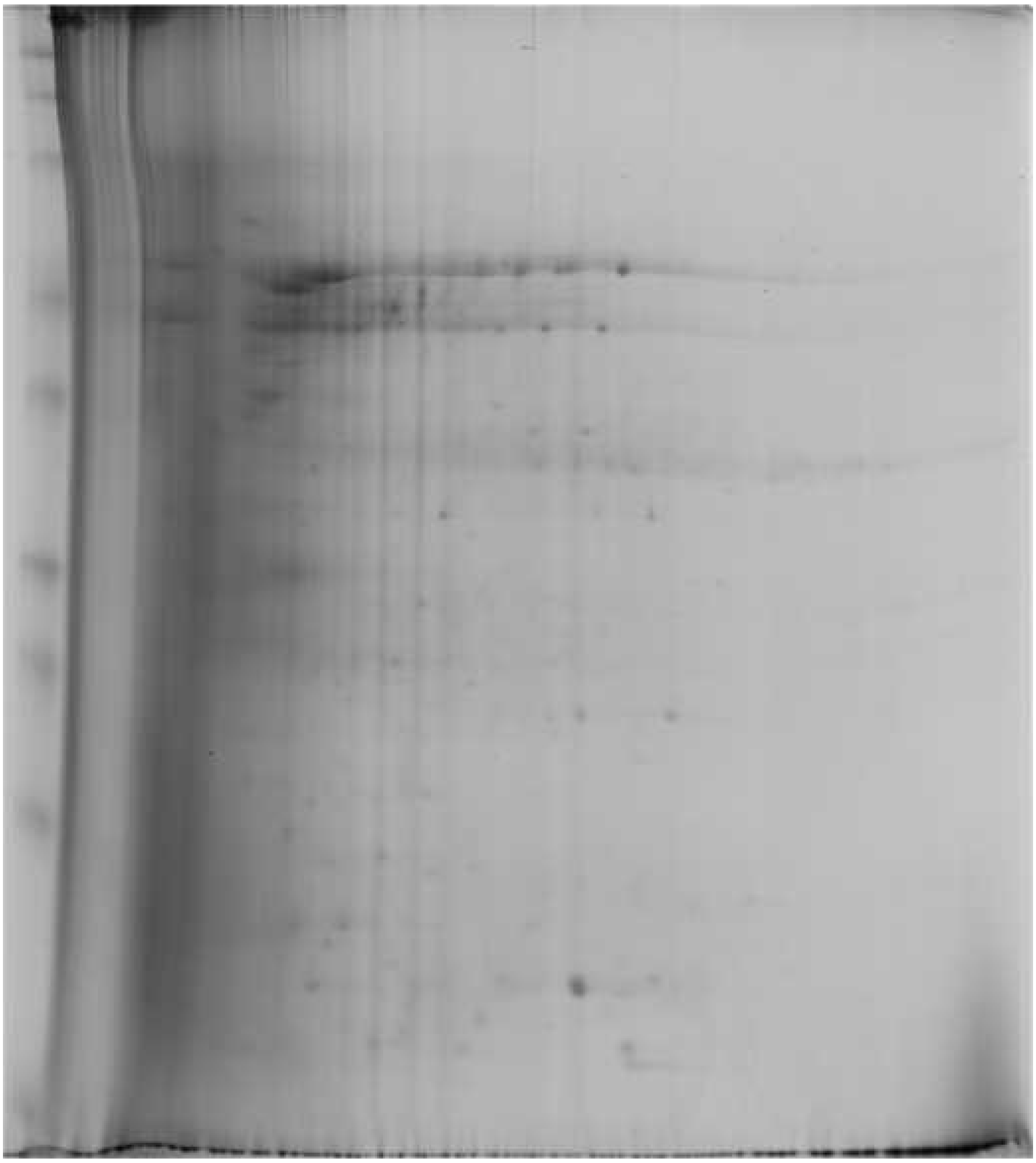
Στην ηλεκτροφόρηση 2 διαστάσεων



Εικόνα 3.15 Maxi gel 18cm 0,8mg πρωτεΐνης. 1η διάσταση: σε ΤΑΚ 3-10NL 2η διάσταση: 12% ακρυλαμίδη χρώση CBB



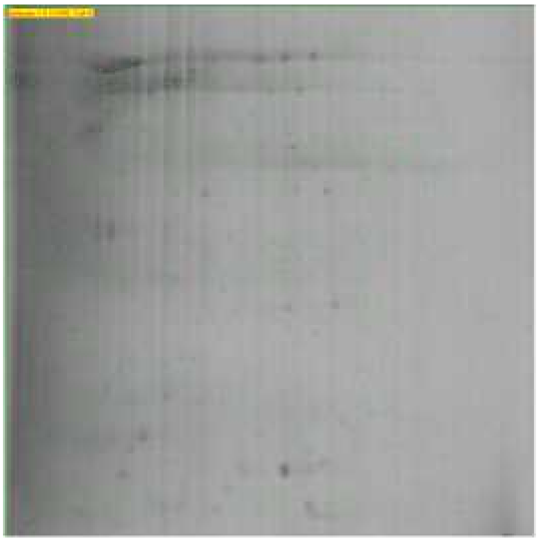
Εικόνα 3.16 Maxi gel 18cm 1,4mg πρωτεΐνης 1η διάσταση: σε ΤΑΚ 3-10NL 18cm 2η διάσταση: 12% ακρυλαμίδη χρώση CBB



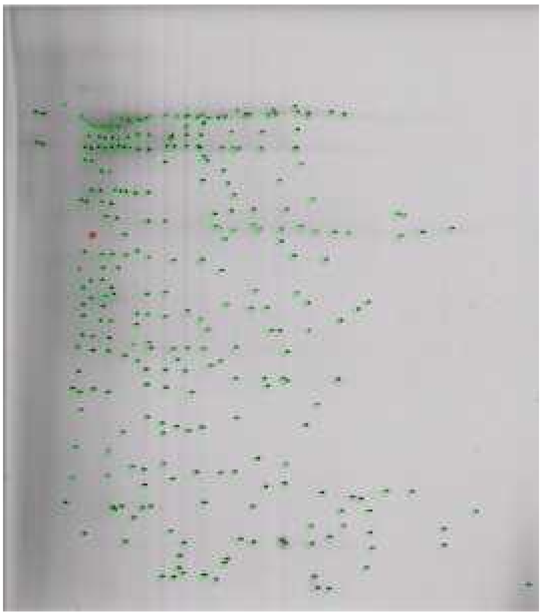
Εικόνα 3.17 Maxi gel 18cm 2mg πρωτεΐνης 1η διάσταση: σε TAK 3-10NL 18cm 2η διάσταση: 12% ακρυλαμίδη χρώση CBB

Εικόνες από τις επιλεγμένες για εξαγωγή πρωτεϊνικές κηλίδες των 3 πηκτών

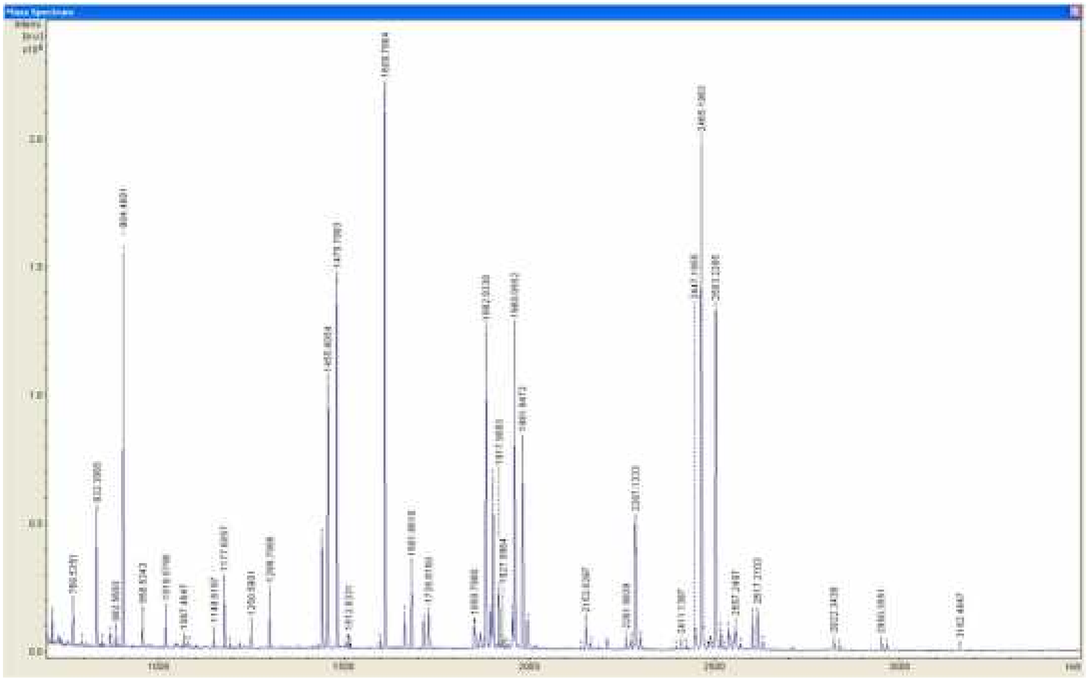
Εικόνα 3.18 0,8mg πρωτεΐνης



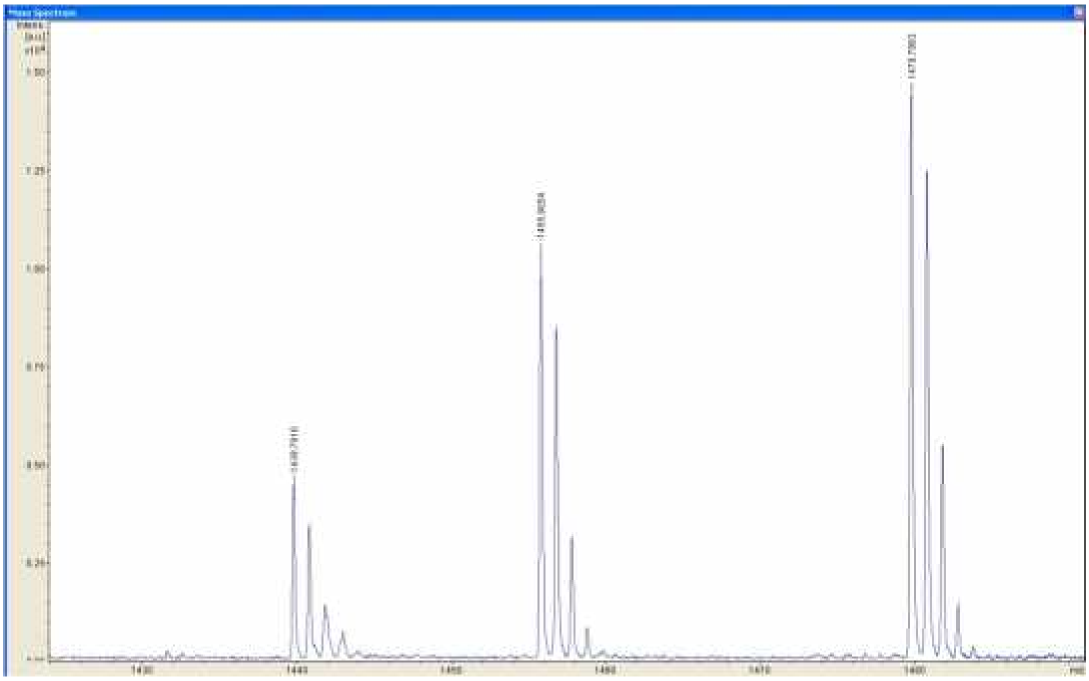
Εικόνα 3.19 1,4mg πρωτεΐνης



Εικόνα 3.20 2mg πρωτεΐνης



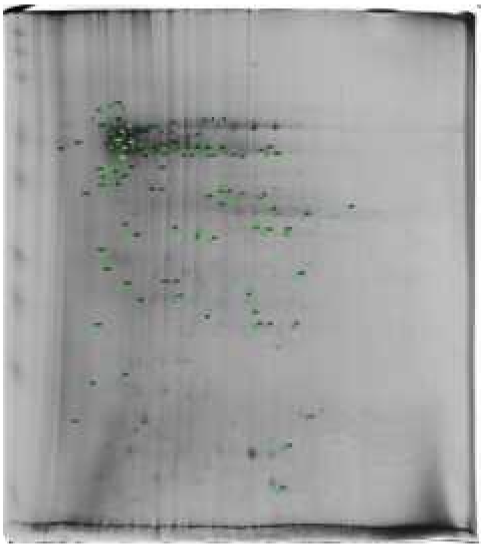
Εικόνα 3.21 Τυπικό ms/spectrum.



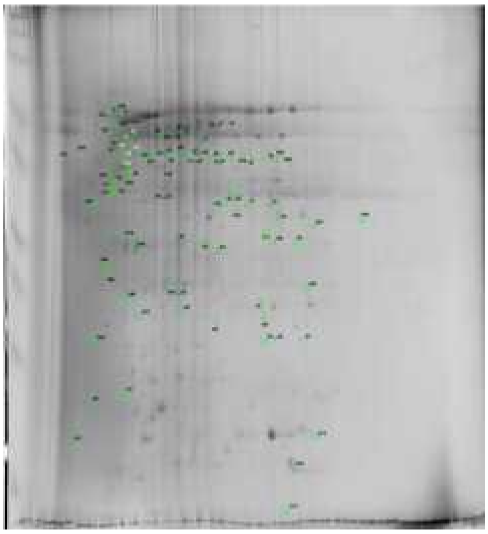
Εικόνα 3.22 Τυπικό ms/spectrumσε μεγέθυνση.

Παρατηρείται υψηλή διακριτική ικανότητα του οργάνου όπου στη μεγέθυνση φαίνεται ότι κάθε πεπτιδική μορφή είναι ομάδα κορυφών με διαφορά μάζας 1 dalton που ανταποκρίνονται στην αναλογία ατόμων άνθρακα 12-13 όπως αυτή απαντάται στη φύση.

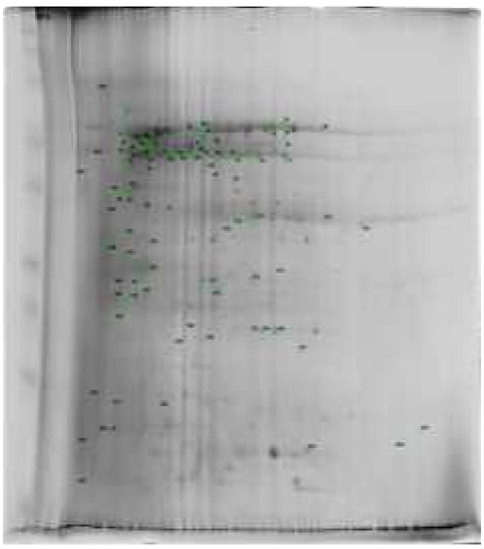
Εικόνες από τις επιλεγμένες πρωτεϊνικές κηλίδες που ταυτοποιήθηκαν



Εικόνα 3.23 0,8mg πρωτεΐνης

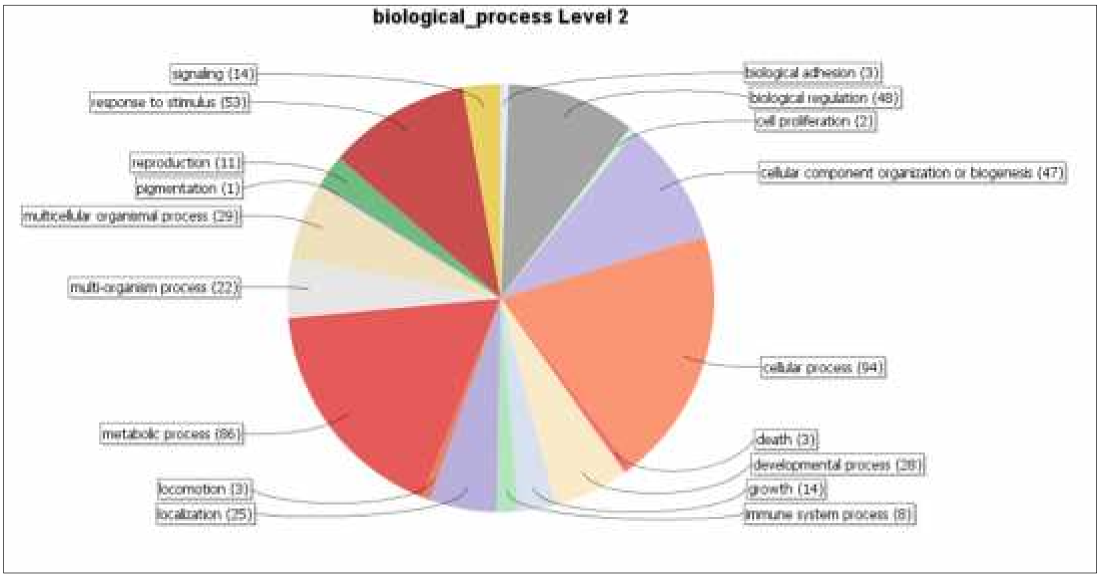


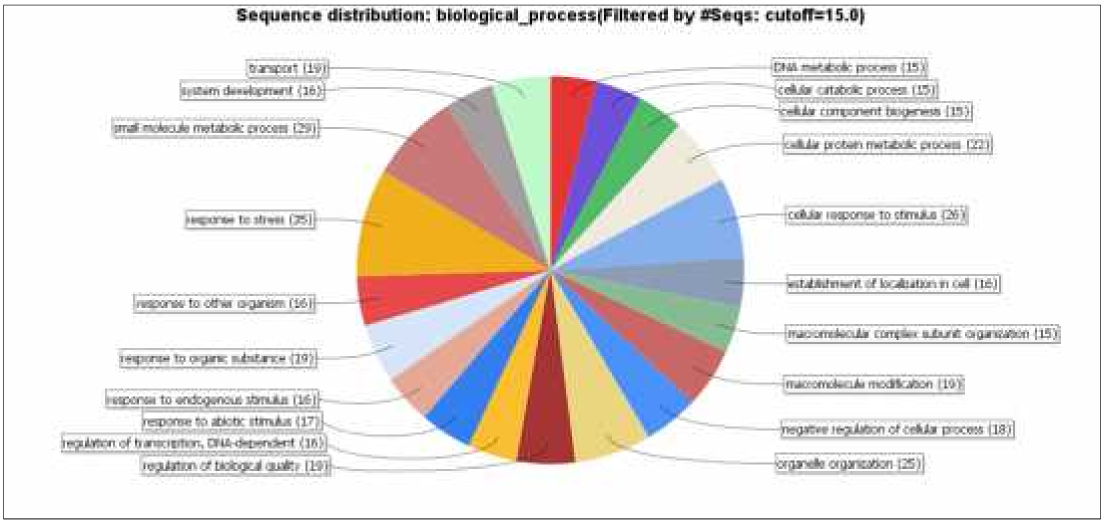
Εικόνα 3.24 1,4mg πρωτεΐνης



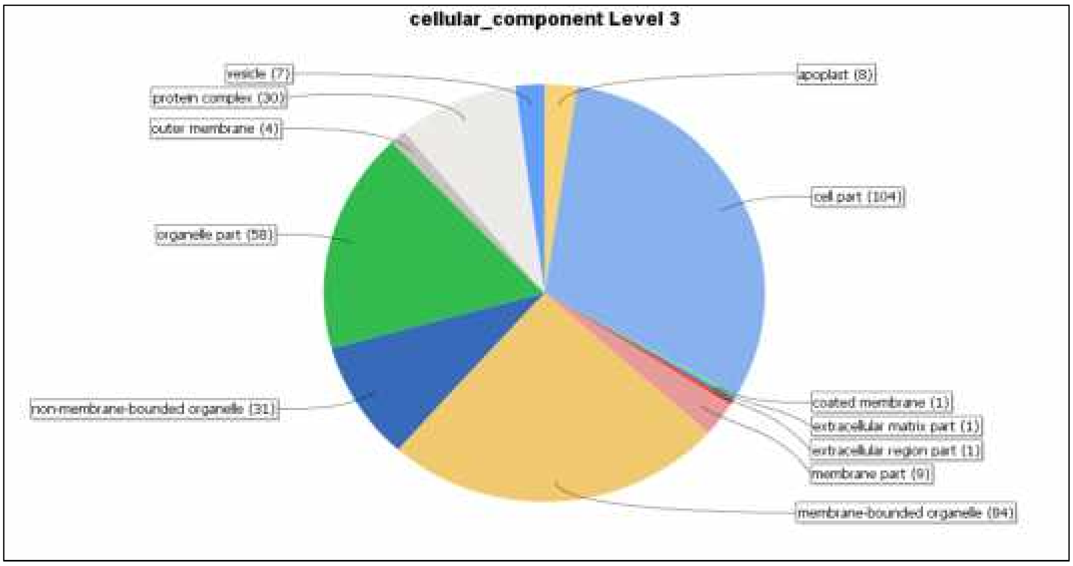
Εικόνα 3.25 2mg πρωτεΐνης

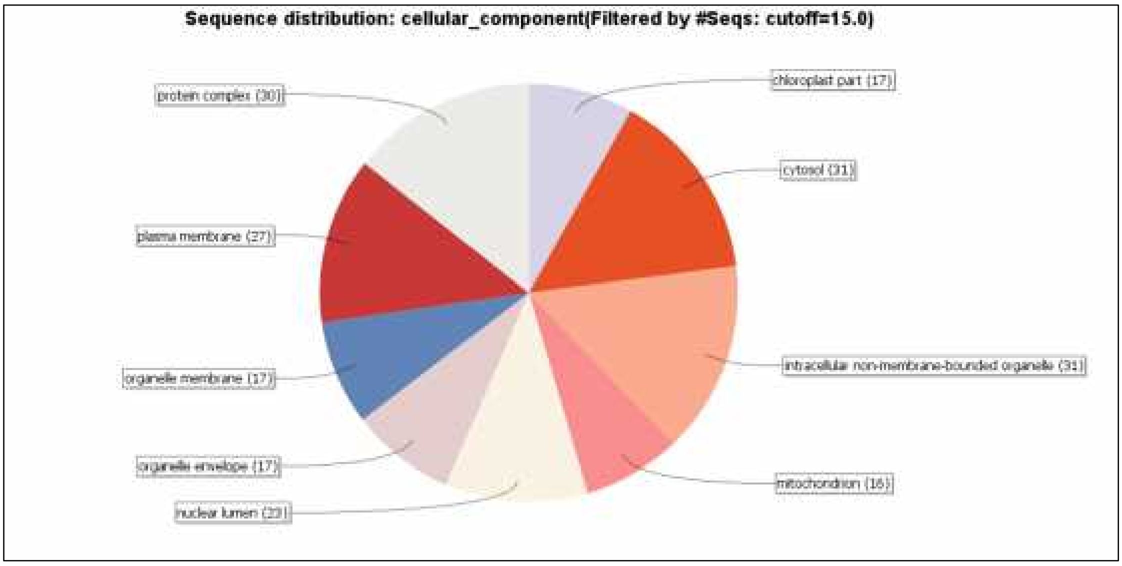
Βιολογική Διεργασία



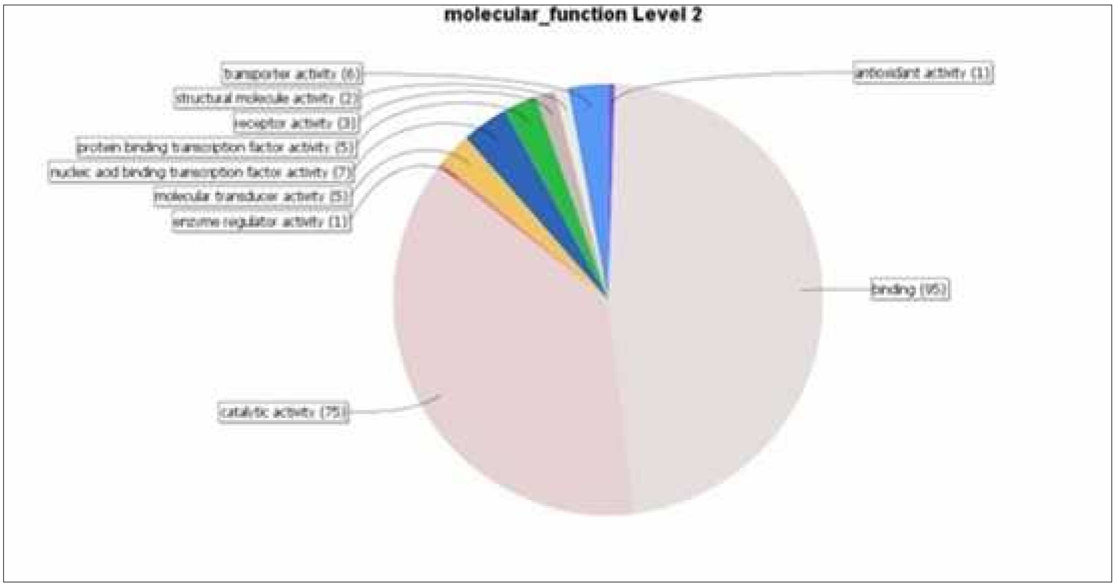


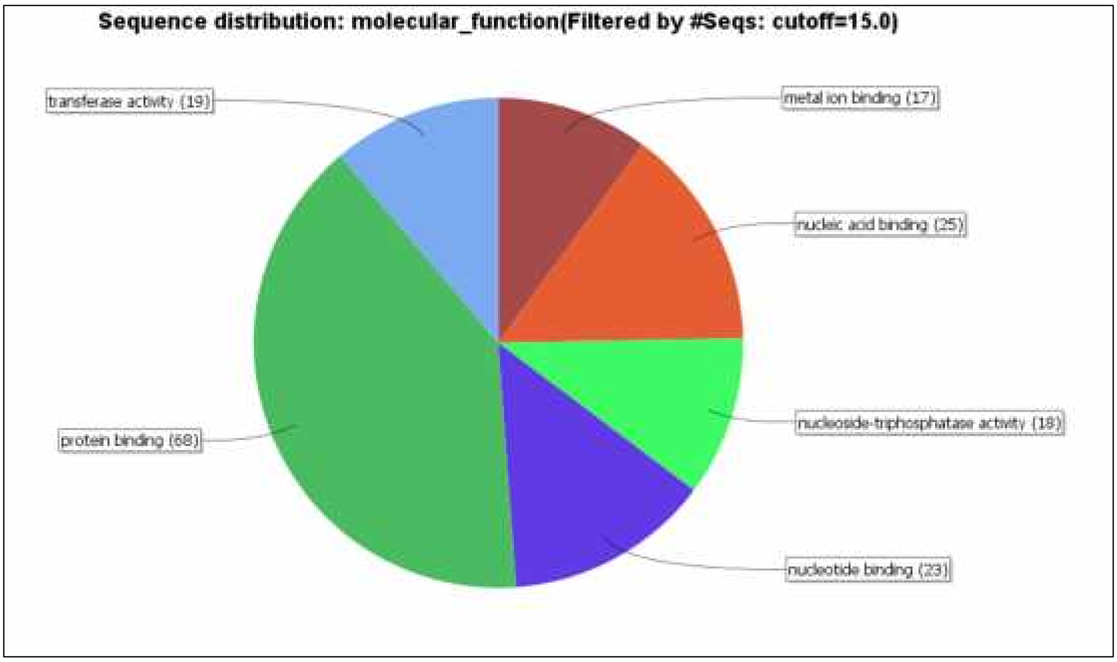
Ενδοκυτταρικά Συστατικά





Μοριακή Λειτουργία





Οι κωδικοί των ενζύμων (EC numbers) που αντιστοιχήθηκαν στις αλληλουχίες, εμπλέκονται στα παρακάτω μονοπάτια σύμφωνα με την βάση δεδομένων KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

Pathway	No
Amino Acid Metabolism	
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	2
Arginine and proline metabolism	4
Phenylalanine metabolism	2
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	1
Lysine degradation	1
Tryptophan metabolism	2
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	1
Metabolism of other Amino Acids	
Glutathione metabolism	1
Translation	
Aminoacyl-Trna biosynthesis	2
Nucleotide Metabolism	
Pyrimidine metabolism	2
Pyruvate metabolism	2
Lipid Metabolism	
Fatty acid elongation	1
Fatty acid metabolism	1
Primary bile acid biosynthesis	2
Metabolism of terpenoids and polyketides	
Geraniol degradation	1
Biosynthesis of other Secondary Metabolites	
Flavone and flavonol biosynthesis	1
Flavonoid biosynthesis	3
Indole alkaloid biosynthesis	1
Isoflavonoid biosynthesis	1
Isoquinoline alkaloid biosynthesis	1
Phenylpropanoid biosynthesis	1
Xenobiotics Biodegradation and Metabolism	
Drug metabolism - cytochrome P450	1
Toluene degradation	1
Aminobenzoate degradation	1
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	1
Styrene degradation	1
Caprolactam degradation	1
Metabolism of cofactors and vitamins	
Thiamine metabolism	2
Porphyrin and chlorophyll metabolism	1
Carbohydrate metabolism	
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	1
Butanoate metabolism	1
Glycolysis / Gluconeogenesis	1
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	1
Pyruvate metabolism	2
Pentose and glucuronate interconversions	1
Starch and sucrose metabolism	3
Energy metabolism	
Methane metabolism	3
Nitrogen metabolism	2
Oxidative phosphorylation	1
Carbon fixation in photosynthetic organisms	2
Carbon fixation pathways in prokaryotes	2

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πρωτεομική προσέγγιση στα τριχώματα του φύλλου ενός μη μοντέλου φυτού και πιο συγκεκριμένα δέντρου όπως η ελιά, αποδείχτηκε δύσκολη υπόθεση καθώς πολύ λίγα δεδομένα είναι γνωστά για το γονιδίωμα και το πρωτέομά της καθώς επίσης οι βάσεις δεδομένων στερούνται πληροφοριών.

Προκειμένου να προσεγγίσουμε το πρωτεομικό προφίλ των τριχωμάτων απομονωθήκαν πρωτεΐνες με phenol/SDS και η καθίζηση των πρωτεϊνών έγινε με methanol/ammonium acetate 0,1M. Οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν σε πηκτές ακρυλαμίδης μονής και διπλής διάστασης (1D και 2D αντίστοιχα) και χαρακτηρίστηκαν με τη μέθοδο MALDI-TOF. Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το Blast2go και η βάση δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε ήταν η swissprot. Η SwissProt (Bairoch και Apweiler 2000) αποτελεί μια ΒΔ πρωτεϊνικών ακολουθιών η οποία παρέχει υψηλή ποιότητα μη αυτοματοποιημένου σχολιασμού, περιορισμένο αριθμό πλεονασμού χωρίς επικαλύψεις και διασύνδεση με άλλες βάσεις δεδομένων.

Αρκετά ήταν τα αποτελέσματα που μας οδηγούν στο ότι ο ιστός αν και απομονωμένος από το φύλλο συνεχίζει να παίζει ενεργό ρόλο για το φυτό.

Το τρίχωμα των φύλλων της ελιάς σχετίζεται με την ανθεκτικότητα σε βιοτική και αβιοτική καταπόνηση. Ο οπτικός ρόλος του τριχώματος αποδίδεται στην εναπόθεση φαινολικών ουσιών, κυρίως φλαβονοειδών, στα κυτταρικά τοιχώματα των τριχωμάτων κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης των φύλλων.

Βιοτική – Αβιοτική Καταπόνηση

Το spot 49 αντιστοιχήθηκε στην πρωτεΐνη ενολάση που έχει ως ομόλογό του στο *Arabidopsis thaliana* (At2g36530) την LOS2 που λειτουργεί ως μεταγραφικός καταστολέας και σχετίζεται με την απόκριση του ιστού στο κρύο (Lee *et al*, 2002).

Το spot 70 αντιστοιχήθηκε στην πρωτεϊνάση της κυστεΐνης RD19 η οποία στο *Arabidopsis thaliana* (At4g39090) έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με την αμυντική απόκριση ενάντια στα βακτήρια και ανθεκτικότητα στην αφυδάτωση (Bernoux, M. Et al 2008 & Coupe, S. A et al 2003)

Το spot 73 αντιστοιχεί στην acyl-binding protein έχει ως ομόλογο του στο *Arabidopsis thaliana* (At1g31812) το ACBP6 που σχετίζεται με απόκριση σε καταπόνηση, αντίσταση σε βαρέα μέταλλα, οξειδωτική καταπόνηση, ανθεκτικότητα σε πάγο, και αντίσταση στην παθογένεια (Xiao, S. Et al 2011)

Το spot 74 αντιστοιχήθηκε στη glutathione S-transferase 16 που ως ομόλογο στο *Arabidopsis thaliana* έχει το ATGSTF3 (At2g02930) το οποίο συμμετέχει στη ρύθμιση της δέσμευσης και μεταφοράς των σχετικών με την άμυνα ενώσεων στα φυτά.(David, P. D. et al 2011)

Το spot 167 που αντιστοιχεί στην E3 ubiquitin-protein ligase PUB23 που έχει ως ομόλογο στο *Arabidopsis thaliana* το ATPUB23 (At2g35930) που συμμετέχει στην απόκριση υδατικής καταπόνησης και λειτουργεί σαν αρνητικός ρυθμιστής του μηχανισμού ανοσίας που ενεργοποιείται μέσο των μικρών μορίων σχετιζόμενα με παθογόνα. (PAMP) (Seo, Dong Hye, et al. 2012 & Trujillo, M. et al. 2008)

Ο ιστός, παίζει σημαντικό ρόλο στη βελτίωση του θερμικού ισοζυγίου του ελάσματος και στην αποφυγή απωλειών νερού προστατεύοντάς τα έτσι σε ξηρά κλίματα ή υψηλής ακτινοβολίας (υπεριώδη και ορατή) περιβάλλοντα.

Το spot 19 αντιστοιχεί στην transcription adapter ada2 που ομόλογό του έχει στο *Arabidopsis thaliana* το ADA2b (At4g16420) (transcription adapter) που σχετίζεται με την αβιοτική καταπόνηση όσο αναφορά την ανθεκτικότητα στην αλατότητα, την ξηρασία και στις χαμηλές θερμοκρασίες. Επίσης το ADA2b αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη PROPORZ 1 η οποία απαιτείται για τη διαμόρφωση ακετυλιωμένης ιστόνης ως απόκριση στην αυξίνη. (Anzola, J. M et al 2010 & Vlachonasios, K. et al 2011)

Η εναπόθεση των φαινολικών ουσιών στα κυτταρικά τοιχώματα των τριχών δημιουργεί ένα χημικά αντίξοο περιβάλλον αποτρέποντας τη διείσδυση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών στο εσωτερικό του μεσοφύλλου καθώς επίσης συνδέεται με αυξημένη ανθεκτικότητα των φυτών έναντι προσβολών εντόμων αφού αποτελούν μηχανικό φράγμα. Η φτωχή θρεπτική τους αξία είναι ένα πρόσθετο μέσο προστασίας έναντι εντόμων.

Το spot 134 αντιστοιχεί στην disease resistance protein RPS5 του *Arabidopsis thaliana* (At1g12220) εμπλέκεται στην άμυνα ενάντια του βακτηρίου *Pseudomonas syringae.* (DeYoung, B. J. et al. 2012)

Το spot 42 αντιστοιχεί στην resistance to *Pseudomonas syringae* protein 3 (RPM1) του *Arabidopsis thaliana* (At3g07040) εμπλέκεται στην άμυνα ενάντια του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* (Rose, L. et al. 2012)

Το spot 180 αντιστοιχεί στην Pathogenesis related (PR)-3 chitinase 6 που ομολογό του στο *Arabidopsis thaliana* έχει το ATHCHIB (At3g12500) που σχετίζεται με το AaORA, ένα εξειδικευμένο στα τριχώματα μεταγραφικό παράγοντα AP2/ERF που είναι θετικός ρυθμιστής στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της αρτεμισινίνης και παρουσιάζει ανθεκτικότητα ενάντια στο *Botrytis cinerea.*

Δευτερογενής Μεταβολισμός

Το spot 63 αντιστοιχήθηκε στην πρωτεϊνη flavanone 3-hydroxylase, έχει ως ομόλογό του το F3΄H του *Arabidopsis thaliana* (At3g51240) το οποίο καταλύει τη σύνθεση του διυδροκαεμπφερόλης κοινή πρόδρομη ένωση για τις τρεις κατηγορίες των 3-υδροξυ-φλαβονοειδή τις φλαβονόλες, τις ανθοκυανίνες, και προανθοκυανιδίνες, επίσης κωδικοποιεί ένζυμα για την ενεργοποίηση της σύνθεσης φλαβονοειδών στα φυτά (Owens, D. et al 2008).

Ενεργός βρέθηκε και ο δευτερογενής μεταβολισμός, πιο συγκεκριμένα στα μονοπάτια βιοσύνθεσης φλαβονοειδών και της βιοσύνθεσης αλκαλοειδών ισοκινολίνης. Από το μονοπάτι των φλαβονοειδών βρήκαμε το F3’H με E.C. 1.14.11.9 και στο μονοπάτι των αλκαλοειδών το (RS)-norcoclaurine 6-O-methyltransferase με E.C. 2.1.1.128.

Τα φλαβονοειδή παίζουν άμεσα ρόλο στην άμυνα απέναντι σε οξειδωτική καταπόνηση, καθώς η δομή τους επιτρέπει την αντίδραση με ηλεκτρόνια και την σταθεροποίηση τους (Blokhina et al., 2003). Συσσώρευση φλαβονοειδών γλυκοσιδίων έχει παρατηρηθεί στα τριχώματα του Phyllyrea latifolia (Oleaceae) (Tattini and Gucci, 1999).

Τα αλκαλοειδή έχουν μειωμένη εκπροσώπηση ανάμεσα στους εξειδικευμένους μεταβολίτες που βρίσκονται στα αδενώδη τριχώματα. Δεν έχουν υπάρξει αναφορές σχετικά με την de novo σύνθεση των αλκαλοειδών στα αδενώδη τριχώματα. Στα είδη καπνού είναι γνωστό ότι περιέχουν τοξίνες, νικοτίνη και συσχετιζόμενα αλκαλοειδή. Η νικοτίνη, η οποία συνθέτει στην ρίζα τα αλκαλοειδή κι από κει μεταφέρονται στα υπέργεια τμήματα συμπεριλαμβανομένου των τριχωμάτων κι από αυτά περνάνε στα φυτοφάγα.(Schilmiller, A. L., et al. 2008). Μεταγραφές συσχετιζόμενες με τα αλκαλοειδή έχουν βρεθεί στους εξής τύπους τριχωμάτων VII, I, IV και VI του είδους Solanum. (McDowell, E. T., et al. 2011)

5 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ελιά είναι ένα από τα σημαντικότερα οπωροφόρα δέντρα στην ιστορία της Ανατολικής Μεσογείου καθώς και ένας πολύ σημαντικός οικονομικός παράγοντας λόγω της υψηλής διατροφικής ποιότητας του ελαιόλαδου. Πλήθος ερευνητικών αποτελεσμάτων έχει συσχετίσει την κατανάλωση ελαιολάδου με την μείωση των καρδιαγγειακών νοσημάτων και του καρκίνου του μαστού. Αυτό είναι κυρίως αποτέλεσμα των λιπαρών οξέων που περιέχονται στο ελαιόλαδο και των θρεπτικών αξιών του που το καθιστούν εξαιρετικό για την ανθρώπινη διατροφή. Ωστόσο, ένας αριθμός διαφορετικών μορίων όπως οι δευτερογενείς μεταβολίτες προσθέτουν εξαιρετική αξία στο ελαιόλαδο. Οι μεταβολίτες αυτοί είναι στερόλες, τοκοφερόλες, καροτενοειδεί, βιοφαινόλες κ.α. καθιστώντας το προτεινόμενο ως αντιοξειδωτικό.

Τα τριχώματα των φύλλων της ελιάς αποτελούν εξειδικευμένα είδη κυττάρων και είναι γνωστό ότι περιέχουν φαινόλες και δευτερογενείς μεταβολίτες. Προκειμένου να έχουμε μια ολιστική προσέγγιση και να εξακριβώσουμε το πρωτέομα του διαφοροποιημένου αυτού ιστού απομονώσαμε πρωτεΐνες. Πραγματοποιήθηκαν διαφορετικοί τρόποι εκχύλισης πρωτεϊνών. Η εκχύλιση με φαινόλη και η καθίζηση με μεθανόλη/οξικό αμμώνιο έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα. Οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν με την μέθοδο 2-D και ταυτοποιήθηκαν με το MALDI-TOF. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπήρξαν ένζυμα που εμπλέκονταν στο βιοχημικό μονοπάτι παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών καθώς και μεταγραφικοί παράγοντες ρύθμισης των βιοχημικών δικτύων και κυτταρικής διαφοροποίησης.

ABSTRACT

Olive (Olea europaea L.) is one of the most important fruit crop trees in the history of Eastern Mediterranean. Olive is among the most economically important fruit crops because of the high quality oil. A number of results have correlated the olive oil consumption with the reduction of cardiovascular diseases and the breast cancer. This mainly results from its fatty acid composition, of olive oil and its nutritional or nutraceutical values which makes it exceptional in human diet content. However, a number of different molecules like secondary metabolites provide an additional and exceptional value to the olive oil. This is composed of sterols, tocopherols, carotenoids, biophenols, etc. which are making it antioxidant.

Leaf trichomes are specialized cell types known to have a number of phenols and secondary metabolites. In order to establish a holistic approach to verify the proteome of this highly differentiated cell type, we have isolated proteins. Different protein extraction protocols were used and the phenol extraction with methanol ammonium acetate precipitation gave the best results. Proteins were analysed using 2-D and annotated using MALDI-TOF method. The results showed that a number of enzymes involved in biochemical networks producing secondary metabolites are present. Different transcriptional factors regulating the biochemical networks and cell differentiation were also detected.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Aebersold R, Mann M**. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003) 422:198-207
2. **Amelunxen, F.** 1964. Elektronen mikroskopische untersuchungen an den drusenhaaren von Mentha piperita. Planta med. 12: 121-139.
3. **Anzola, J. M.**, Sieberer, T., Ortbauer, M., Butt, H., Korbei, B., Weinhofer, I., & Luschnig, C. (2010). Putative Arabidopsis transcriptional adaptor protein (PROPORZ1) is required to modulate histone acetylation in response to auxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(22), 10308-10313.
4. **Ascensao L**, Francisco A, Cotrim H, Pais MS. 2005 Comparative structure of the labellum in *Ophrys fusca* and *O. lutea (Orchidaceae).* Amer. J. Bot. 92. 1059-1067
5. **Berkelman T, Stenstedt T.** 1998 2D electrophoresis, Using immobilized pH gradients, Principles and Methods. *Amersham Biosciences*
6. **Bernoux, M.**, Timmers, T., Jauneau, A., Brière, C., de Wit, P. J., Marco, Y., & Deslandes, L. (2008). RD19, an Arabidopsis cysteine protease required for RRS1-R–mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the Ralstonia solanacearum PopP2 effector. *The Plant Cell Online*, *20*(8), 2252-2264.
7. **Bianchi G.**, Vlahov G., Anglani C. and Murelli C., (1993). Epicuticular wax of olive leaves. Phytochemistry 32 (1) : 49 – 52
8. **Bini Maleci L**, Pinetti A, Servettaz O. 1995 Micromorphological and phytochemical characters of the two subspecies of Teucrium flavum (Labiatae) from the Italian flora. Flora. 190. 237-242.
9. **Bjellqvist B**, Ek K, Righetti PG, Gianozzo E, Görg A, Westermeier R, Postel W: Isoelectric focusing in immobilized pH gradients : principles, methodology and some applications. J Biochem Biophys Methods 6: 1982 317-339
10. **Bongi, G.,** Mencuccini, M. and Fontanazza, G. 1987. phtosynthesis of olive leaves: effect of light flux density, leaf age, temperature, peltates, and H2O vapor pressure deficit on gas exchange. J. Amer. Soc. Hort. Sience 112(1): 143-148.
11. **Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248–254
12. **Briante, R**.; Patumi, M.; Terenziani, S.; Bismuto, E.; Febbraio, F.; Nucci, R. Olea europaea L. leaf extract and derivatives: antioxidant properties. J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 4934–4940
13. **Bryant** JP, Chapin III FS and Klein RD. 1983. Carbon / nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. OIKOS, 40: 357–368
14. **Bryant JP**, Chapin III FS, Reichardt P and Clausen T. 1987. Responses of winter chemical defense in Alaska paper birch and green alder to manipulation of plant carbon- nutrient balance. Oecologia, 72: 510–514
15. **Carlquist, S.** 1961. Comparative Plant Anatomy. Holt,Rinehart and Winston, New York.
16. **Chazau-Gillig, S**. The civilization of the olive tree and cereals.Olive. 53-12 (1994)
17. **Cooks RG**, Chen G, Wong P, Wollnik H.1997 Ion Trap Mass Spectrometry. *Encl Appl Phys* 19:289-297
18. **Coupe, S. A**., Sinclair, B. K., Watson, L. M., Heyes, J. A., & Eason, J. R. (2003). Identification of dehydration-responsive cysteine proteases during post-harvest senescence of broccoli florets. *Journal of experimental botany*, *54*(384), 1045-1056.
19. **Davis and Hedge Festschrift**. Edinburgh Universitty Press, Edinburgh, UK, pp 287–299
20. **David, P. D**., Jonathan, D. S., & Robert, E. (2011). The Arabidopsis phi class glutathione transferase AtGSTF2: binding and regulation by biologically active heterocyclic ligands. *Biochemical Journal*, *438*(1), 63-70.
21. **De Laurentis N**, Stefanizzi L, Milillo M–A and Tantillo G. 1998. Flavonoids from leaves of Olea europaea L. cultivars. Annales Pharmaceutiques Francaises, 56: 268–273
22. **De Nino A**, Lombardo N, Perri E, Procopio A, Raffaelli A and Sindona G. 1997. Direct identification of phenolic glucosides from olive leaf extracts by atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry. Journal of Mass Spectrometry, 32: 533–541

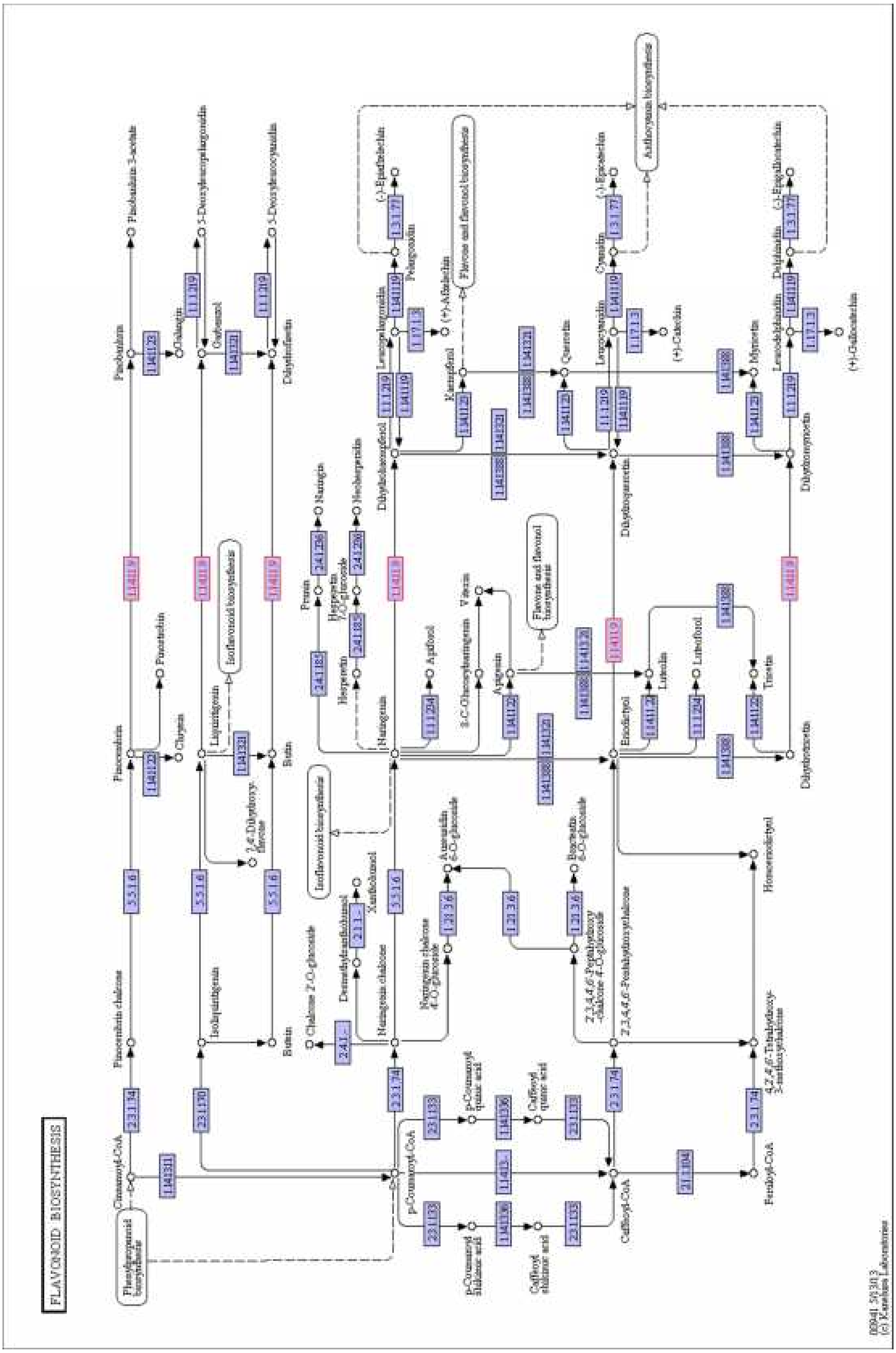
23. **DeYoung, B. J.**, Qi, D., Kim, S. H., Burke, T. P., & Innes, R. W. (2012). Activation of a plant nucleotide binding-leucine rich repeat disease resistance protein by a modified self protein. Cellular Microbiology, 14(7), 1071-1084.
24. **Dietmar, H.B. 1984.** Plant trichomes-structure and ultrastructure: general terminology, taxonomic applications and aspects of trichome bacteria interaction in leaf tips of Dioscorea. In: Biology and Chemistry of plant trichomes. Plenum Press, New York. pp. 1-21.
25. **Domon B**, Aebersold R. Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science* (2006) 312:212-217
26. **Ehleringer, J.R.** 1984. Ecology and ecophysiology of leaf pubescence in north american desert plants. In: Biology and Chemistry of plant trichomes (eds. E. Rodriguez, P.L. Healy and I. Mehta), 113-132. Plenus Press, New York.
27. **Esau, K.** 1965. Plant Anatomy. John Wiley and sons, New York.
28. **Evert , R. F.** 2006 . Esau's plant anatomy. Wiley, Hoboken, New Jersey, USA
29. **Fahn, A.** 1979. Secretory tissues in plants. Academic press. London.
30. **Fahn, A**. 1986. Structure and functional properties of trichomes of xeromorfic leaves. Ann. Bot. 57: 631-637.
31. **Fahn, A**. 1991. Plant Anatomy. Pergamon press, Oxford
32. **Fahn, A. and Cutler, D.F**. 1992. Xerophytes. In: encyclopedia of plant anatomy, Gebruder Borntraeger, Berlin.
33. **Fahn, A**. **and Shimony, C.** 1977 Development of glandular and non-glandular leaf hairs of Aviceniiia marnia (Forskal) Vierh. Bot. J. Linn. Soc. 74, 37–46.
34. **Faust W,Z. and Jones, S.B.** 1973. The systematic value of trichome complements in the North American group of Vernonia (Compositae). Rhodora 75: 517-528.
35. **Fenn JB**, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989 246:64-71
36. **Ficarra P**, Ficarra R, De Pasquale A, Monforte MT and Calabrò ML. 1991. HPLC analysis of oleuropein and some flavonoids in leaf and bud of Oea europaea L. Il Pharmaco, 46: 803– l
37. **Fiorino, P. and F. Nizzi Griffi**, The spread of olive farming. Olive. 44-9 (1992)
38. **Fountoulakis M.** Applications of proteomics technologies in the investigation of the brain. *Mass Spectrom Rev* 2004 4:231-58
39. **Furr Y, Mahlberg PG.** 1981. Histochemical analysis of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sati*.*a*. *Journal of Natural Products* (*Lloydia*) 44: 153±159.
40. **Garfin, D.,** Heerdt, L. (Eds.), 2-D Electrophoresis for proteomics: A Methods and Product Manual. Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA 2001, pp. 25–27.
41. **Gariboldi P,** Jommi G and Verotta L. 1986. Secoiridoids from Olea europaea. L Phytochemistry, 25: 865–869
42. **Görg A**, Weiss W, Dunn MJ. Current 2-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* (2004) 4:3665-3685
43. **Green PS**, 2002 A revision of Olea L. (*Oleaceae*). Kew Bull 57:91–140
44. **Green PS., Wickens GE**., 1989 The *Olea europaea* complex. In: Tan K (ed) The Davis and Hedge Festschrift. Edinburgh Universitty Press, Edinburgh, UK, pp 287–299
45. **Gutterman, Y**., 1997. Daylength affecting flowering and seed morphology of Spergularia diandra occurring in the Negev Desert, Israel. Journal of Arid Environments. 37, 611–622.
46. **Haberland, G.** 1914. Physiological Plant Anatomy. Mcmillan, London
47. **Harborne JB and Green PS**. 1980. A chemotaxonomic survey of flavonoids in leaves of the Oleaceae. Botanical Journal of the Linnean Sociey, 81: 155–167
48. **Heimler D**, Cimato A, Alessandri S, Sani G and Pieroni A. 1996. Seasonal trend of flavonoids in olive (Olea europaea L.) leaves. Agricultura Mediterranea, 126: 205–209
49. **Heimler D**, Pieroni A, Tattini M and Cimato A. 1992. Determination of flavonoids, flavonoid glycosides and biflavonoids in (Olea europaea L). leaves. Chromatographia, 33: 369–373
50. **Hillenkamp F**, Karas M, Beavis RC, Chait BT. Matrix-Assisted Laser/Desorption Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers. *Anal Chem* (1991) 63:1193A-1203A
51. **Huber LA.** Is proteomics heading in the wrong direction? *Nature* 2003 4:74-80
52. **Inamdar JA**, Patel KS, Patel RC. 1973 Studies on plasmodesmata in the trichomes and leaf epidermis of some Asclepiadaceae. Ann. Bot. 37. 657-60.

53. **Johnson LAS**. 1957. A review of the family Oleaceae. Contributions from the New South Wales National Herbarium 2: 397–418.
54. **Karabourniotis G**, Kofidis G, Fasseas C, Liakoura V and Drossopoulos I. 1998. Polyphenol deposition in leaf hairs of Olea europaea (Oleaceae) and Quercus ilex (Fagaceae). American Journal of Botany, 85: 1007–1012
55. **Karabourniotis G**, Papastergiou N, Kabanopoulou E and Fasseas C. 1994. Foliar sclereids of Olea europaea may function as optical fibres. Canadian Jounal of Botany, 72: 330–336
56. **Karamessinis MP.** Modulation of cell matrix interactions in diabetic nephropathy. *Ph.D. Thesis* 2004
57. **Karas M**, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F. Matrix-Assisted Ultraviolet Laser Desorption of Non-Volatile Compounds. *Int J Mass Spectrom Ion Processes* 1987 78:53-68
58. **Karas M, Hillenkamp F.** Laser ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. *Anal Chem* 1988 60:22993201
59. **Kelsey, G.R.,** Reynolds, W.G. and Rodrigez, E. 1984. The chemistry of biologically active constituents secreted and stored in lant glandular trichomes. In: Biology and Chemistry of plant trichomes. (Rodriguez, e., healey, p., mehta, i., eds.) Plenum Press, New York pp. 187-241.
60. **Kinter M, Sherman NE.** 2000 Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry. *ISBN 0-471-32249-0*
61. **Korfmacher WA.** Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. *Drug Discov Today* 2005 10:1357-67
62. **Kruger, Nicholas J.** "The Bradford method for protein quantitation." *Basic protein and peptide protocols*. Humana Press, 1994. 9-15.
63. **Kuwajima H**, Uemura T, Takaishi K, Inoue K and Inoue H. 1988. A secoiridoid glucoside from Olea europaea. Phytochemistry, 27: 1757– 1759
64. **Laemmli, UK.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 (5259):680-685.
65. **Lahm HW, Langen H**. Mass Spectrometry: a tool for the identification of proteins separated by gels. *Electrophoresis* 2000 21:2105-2114
66. **Le Floch F**, Tena MT, Ríos A, and Valcárcel M. 1998. Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves. Talanta, 46: 1123–1130
67. **Le Tutour B and Guedon D**. 1992. Antioxidative activities of Olea europaea and related phenolic compounds. Phytochemistry, 31: 1173–1178
68. **Lewin, D.A.1973.** The role of trichomes in plant defence. Quart. Rev. Biol. 48: 3-12.
69. **Liakopoulos G**, Stavrianakou S and Karabourniotis G. 2001. Analysis of epicuticular phenolics of Prunus persica and Olea europaea leaves: Evidence for the chemical origin of the UV – induced blue fluorescence of stomata. Annals of Botany, 87: 641–648
70. **Loukas, M. and C.B. Krimbas**, 1983 History of olive cultivars based on their genetic distances. J. Hort. Science. 58-121.
71. **Lee, H.,** Guo, Y., Ohta, M., Xiong, L., Stevenson, B., & Zhu, J. K. (2002). LOS2, a genetic locus required for cold-responsive gene transcription encodes a bi-functional enolase. *Science Signaling*, *21*(11), 2692.
72. **Li, W., Dai**, L., & Wang, G. L. (2012). PUB13, a U-box/ARM E3 ligase, regulates plant defense, cell death, and flowering time. *Plant Signaling & Behavior*, *7*(8), 898-900.
73. **MacCoss MJ** 2005 Computational analysis of shotgun proteomics data. Curr Opin Chem Biol 9:88-94
74. **Manos** P.S. 1993 Foliar trichome variation in Quercus section Protobalanus (Fagaceae). SIDA 15(3): 391-403
75. **March RE, Hughes RJ.** Quadrupole Storage Mass Spectrometry. *Wiley* (1989)
76. **March RE**. An introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *J Mass Spectrom* 1997 32:351-369
77. **Marzo A, Bo LD.** Tandem mass spectrometry (LC-MS-MS): a predominant role in bioassays for pharmacokinetic studies. *Arzneimittelforschung* 2007 57:122-8

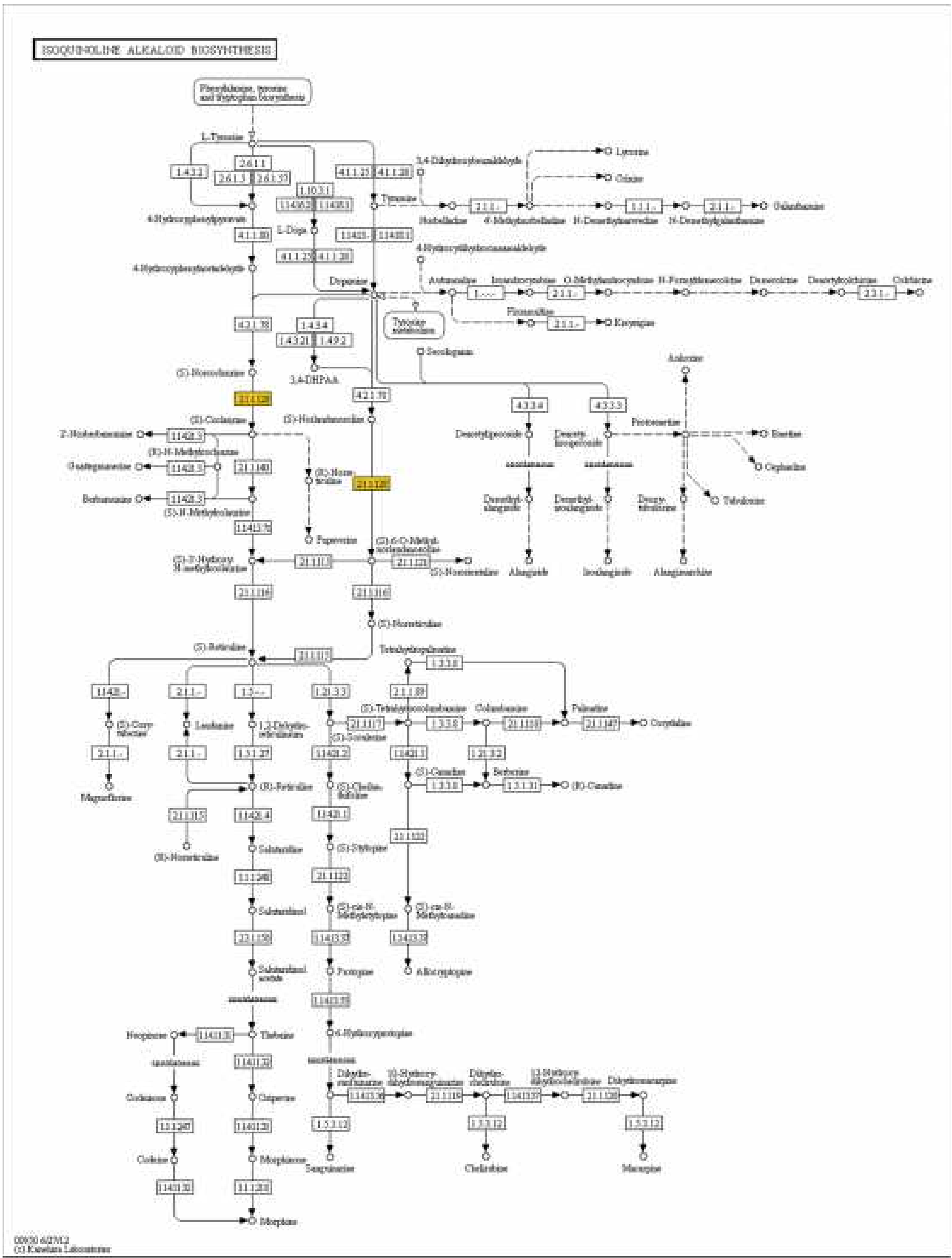
78. **McDowell, E. T.,** Kapteyn, J., Schmidt, A., Li, C., Kang, J. H., Descour, A., ... & Gang, D. R. (2011). Comparative functional genomic analysis of Solanum glandular trichome types. Plant physiology, 155(1), 524-539.
79. **Metcalfe, C.R. and Chalk, l**. 1979. Anatomy of the dicotyledons. Vol 1. 2nd edn. Clarendon Press. Oxford
80. **Miller, C.E.** 1931. Plant Physiology. McGraw-Hill book company, inc, New York. pp.342-344
81. **Nenhuis, C. and Bartlhott, W.** 1997. The tree leaf surfase; structure and function. In: Trees-Constributions to Modern Tree physiology (Rennenberg, H., Eschrich, W. and Ziegler, H. eds.) Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands. pp.3-18.
82. **Nobel, P.S.** 1983. Biophysical Plant Physiology and Ecology. Freeman and co., San Fransisco
83. **O' Farell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.** *J Biol Chemistry* 1975 250:4007
84. **Owens, D.** K., Crosby, K. C., Runac, J., Howard, B. A., & Winkel, B. S. (2008). Biochemical and genetic characterization of< i> Arabidopsis</i> flavanone 3β-hydroxylase. *Plant Physiology and Biochemistry*, *46*(10), 833-843.
85. **Pereira A. P.,** Ferreira I. C.F.R., Marcelino F., Valentao P., Andrade P. B., Seabra R., Estevinho L., Bento A., and Pereira J. A. 2007 Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (Olea europapea L. Cv. Cobrançosa) Leaves Molecules 12, 1153-1162
86. **Perkins DN**, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrel JS 1999 Probability–based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. Electrophoresis 20:3551-3567
87. **Peterson, R.L. and Vermeer, J.** 1984. Histochemistry of trichomes. In: Biology and Chemistry of Plant trichomes. Plenum Press, New York. pp.71-94.
88. **Pieroni A**, Heimler D, Pieters L, van Poel B and Vlietinck AJ. 1996. In vitro anti – complementary activity of flavonoids from olive (Olea europaea L.) leaves. Pharmazie, 51: 765–767
89. **Ragazzi E**, Veronese G and Guiotto A. 1973. Demetiloleoeuropeina, nuovo glucoside isolato da olive mature. Annalytica Chimica, 63: 13–15
90. **Rapisarda, A**., Galati, E.M., Tzakou, O., Flores, M., Miceli, N., 2001. *Nepeta sibthorpii* Bentham (Lamiaceae): micromorphological analysis of leaves and flowers. Il Farmaco 56, 413–415.
91. **Romeis, J**., Babendreier, D., Wackers, F. L., and Shanower, G. 2005. Habitat and plant specificity of Trichogramma egg parasitoids - Underlying mechanisms and implications. Basic Appl. Ecol. 3:215–236.
92. **Romeis, J**., Shanower, T. G., & Peter, A. J. (1999a). Trichomes of pigeonpea (Cajanus cajan (L.) Millsp.) and two wild Cajanus spp. Crop Science, 39, 564–569.
93. **Rose, L.**, Atwell, S., Grant, M., & Holub, E. B. (2012). Parallel loss-of-function at the RPM1 bacterial resistance locus in Arabidopsis thaliana. Frontiers in plant science, 3.
94. **Ryan D**, Antolovich M, Prenzler P, Robards K, Lavee S 2002. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europapea* L. Scientia Horticulturae vol 92: 147–176
95. **Ryan D**, Robards K, Prenzler P, Jardine D, Herlt T and Antonovich M. 1999. Liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric detection of phenolic compounds from Olea europaea. Journal of Chromatography A, 855: 529–537
96. **Sànches-Tinoco, M. Y. & M. Engleman**. 2004. Seed coat anatomy of Ceratozamia Mexicana (Cycadales). The Botanical Review 70: 24–38.
97. **Schilmiller, A. L.,** Last, R. L., & Pichersky, E. (2008). Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. The Plant Journal, 54(4), 702-711.
98. **Seo, D. H.**, Ryu, M. Y., Jammes, F., Hwang, J. H., Turek, M., Kang, B. G., ... & Kim, W. T. (2012). Roles of Four Arabidopsis U-Box E3 Ubiquitin Ligases in Negative Regulation of Abscisic Acid-Mediated Drought Stress Responses. Plant physiology, 160(1), 556-568.
99. **Soler–Rivas C**, Espin JC and Wichers HJ. 2000. Oleuropein and related compounds. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80: 1013– 1023
100. **Soreder, H**. 1908 Systematic Anatomy of the Dicotyledons. Stuttgart: Ferdinand Enke, pp 1211

101. **Swain, T.** 1977. Secondary compounds as protective agents. Ann. Rev. Plant Physiol. 28: 479-501.
102. **Taiz, L. and Zieger, E.** 1991. Plant Physiology. Bengamin/ Cummings Publ. Co. Inc., Redwood City.
103. **Tang N**, Tornatore P, Weinberger SR. Current Developments in SELDI Affinity Technology. *Mass Spec Rev* (2004) 23:34-44
104. **Theobald W.L.,** J. L. Krahulik and R. C. Rollins, 1979 Trichome description and classification. In: Anatomy of the Dicotyledons, 2nd ed., vol. I, Systematic Anatomy of Leaf and Stem, with a Brief History of the Subject, pp. 40–53, C. R. Metcalfe and L. Chalk. Clarendon Press, Oxford
105. **Trujillo, M.**, Ichimura, K., Casais, C., & Shirasu, K. (2008). Negative Regulation of PAMP-Triggered Immunity by an E3 Ubiquitin Ligase. Current Biology, 18, 1396-1401.
106. **Uphof JC Th, Hummel K. 1962.** Plant hairs. In: Zimmerman W, Ozenda PG, eds. *Encyclopedia of plant anatomy*. Bd. 4, Teil 5. Berlin: Gebruder Borntraeger
107. **Vlachonasios, K. E.**, Kaldis, A., Nikoloudi, A., & Tsementzi, D. (2011). The role of transcriptional coactivator ADA2b in Arabidopsis abiotic stress responses. *Plant Signaling & Behavior*, *6*(10), 1475-1478.
108. **Vlahou A, Fountoulakis M.** What does it mean to identify a protein in proteomics. *Journal of chromatography B* 2005 814:11-19
109. **Wager G.J.** 1991. Secretory gradular trichomes: more than just hairs. Plant Physiol. 96: 675-679
110. **Whitehouse CM**, Dreyer RN, Yamashita M, Fenn JB. Electrospray interface for LCMS. *Anal Chem* 1985 57:675-679
111. **Xiao, S.**, & Chye, M. L. (2011). New roles for acyl-CoA-binding proteins (ACBPs) in plant development, stress responses and lipid metabolism. *Progress in lipid research*, *50*(2), 141-151.
112. **Δροσόπουλος, Β.Ι.** 1992. Η Μορφολογια και η Ανατομία των Φυτών. Αθήνα: Εκδόσεις Γ.Π.Α.
113. **Μπαλατσούρας ΓΔ**. 1994. Το ελαιόδενδρο. Τόμος Ι, Αθήνα: Εκδόσεις Πελεκάνος
114. **Dai, X.,** Wang, G., Yang, D.S., Tang, Y., Broun, P., Marks, M.D., Sumner, L.W., Dixon, R.A., and Zhao, P.X. (2010). TrichOME comparative omics database for plant trichomes. Plant Physiol. 152:44–54
115. **Kang, J. H.**, Shi, F., Jones, A. D., Marks, M. D., & Howe, G. A. (2010). Distortion of trichome morphology by the hairless mutation of tomato affects leaf surface chemistry. *Journal of experimental botany*, *61*(4), 1053-1064.

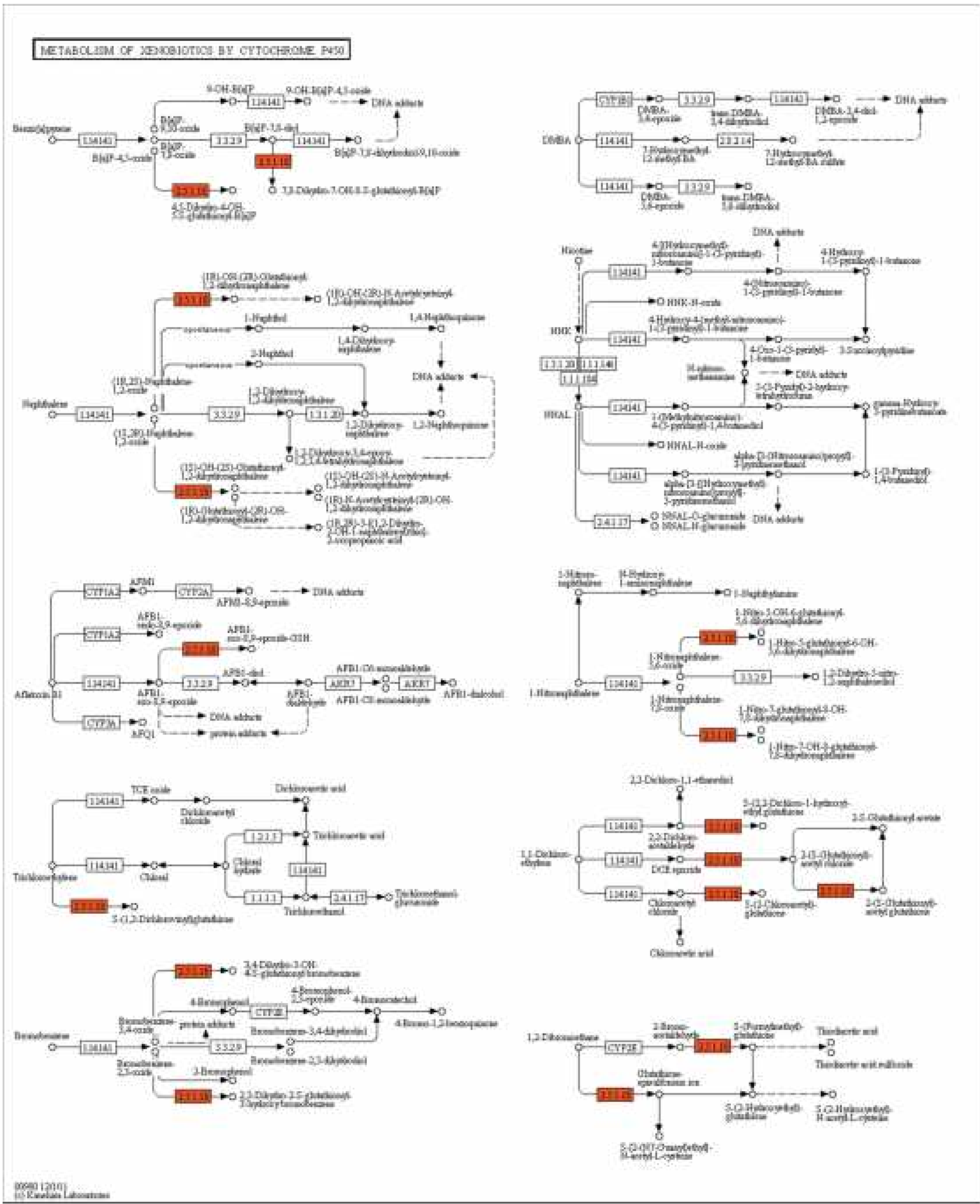
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



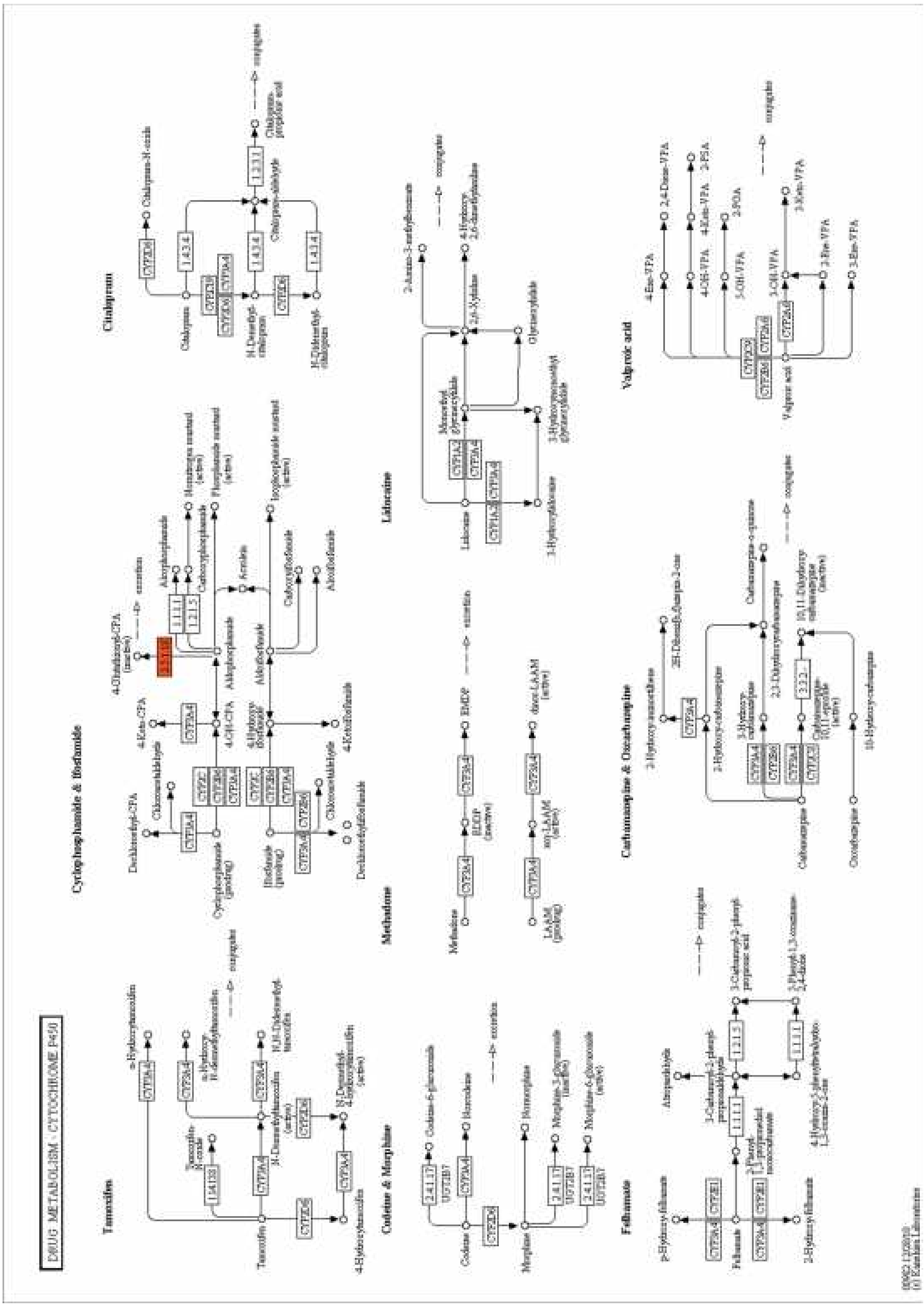
Εικόνα 7.1



Εικόνα 7.2



Εικόνα 7.3


DRUG METABOLISM - CYTOCHROME P450
Tamoxifen
Cyclophosphamide & ifosfamide
Citalopram
Codeine & Morphine
Methadone
Lidocaine
Felbamate
Carbamazepine & Oxcarbazepine
Valproic acid

Εικόνα 7.4