

Από τα γονίδια στα αιθέρια έλαια: Μια ολοκληρωμένη προσέγγιση

Αντώνιος Μακρής
Τμήμα Φυσικών Προϊόντων και Βιοτεχνολογίας,
Μεσογειακό Αγρονομικό Ινστιτούτο Χανίων (Μ.Α.Ι.Χ.)
Αλσύλλιον αγροκηπίου, Χανιά 73100

Τα φυτά παράγουν μια τεράστια ποικιλία οργανικών μορίων μικρά μοριακού βάρους που ονομάζονται δευτερογενείς μεταβολίτες από διάφορα βιοσυνθετικά μονοπάτια. Τα τερπενοϊδή και ισοπρενοϊδή συνεισφέρουν περισσότερα από 50,000 μόρια σε αυτή την χημική ποικιλότητα. Πολλά από αυτά παρουσιάζουν εμπορικό ενδιαφέρον ως προσθετικά γεύσης και αρώματος στη βιομηχανία τροφίμων και καλλυντικών, αλλά και για τις φαρμακευτικές τους δράσεις. Ένα τέτοιο μόριο είναι και η ταξόλη, ένα διτερπένιο που παράγεται από το δένδρο Yew και αποτελεί τα τελευταία χρόνια ένα ιδιαίτερα επιτυχημένο αντικαρκινικό φάρμακο.

Τα τερπενοϊδή όπως και όλα τα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού παράγονται από μια σειρά ενζύμων που λειτουργεί σαν αλυσίδα, όπου το προϊόν της μιας αντίδρασης αποτελεί το υπόστρωμα της επόμενης. Οι γνώσεις μας τα τελευταία χρόνια για τα γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα αυτών των βιοσυνθετικών μονοπατιών έχουν κατακόρυφα αυξηθεί. Η μείωση του κόστους χρήσης νέων τεχνολογιών ανάγνωσης του DNA μας επιτρέπει την ανάπτυξη προσεγγίσεων ευρείας κλίμακας όπως αυτή της «Γονιδιωματικής» για την απομόνωση νέων γονιδίων που συμμετέχουν στα βιοσυνθετικά μονοπάτια του δευτερογενούς μεταβολισμού. Στην περίπτωση που οι μεταβολίτες παράγονται σε εξειδικευμένους ιστούς, όπως τα αδενικά τριχίδια στο φασκόμηλο, τότε το σύνολο των γενετικών δεδομένων που αποκομίζει μια γονιδιωματική προσέγγιση προσφέρει επιπρόσθετες πληροφορίες που αφορούν την ανάπτυξη και ομοιόσταση των ιστών αυτών κατά τη διάρκεια της παραγωγής και αποθήκευσης των αιθέριων ελαίων.

Στα πλαίσια του χρηματοδοτούμενου προγράμματος της E.E INTESY αναπτύξαμε μία γονιδιωματική προσέγγιση στην *S. fruticosa* (φασκομηλιά) και *S. pomifera* (πικροφασκομηλιά) για να απομονώσουμε νέα γονίδια βιοσύνθεσης μονοτερπενίων. Ο ιστός που επιλέχθηκε είναι τα αδενικά τριχίδια των φύλλων της φασκομηλιάς, καθώς αυτά θεωρούνται ως τα εργοστάσια παραγωγής και αποθήκευσης τερπενοϊδών. Εφαρμόζοντας μία μεθοδολογία μηχανικής απομάκρυνσης των αδενικών τριχιδίων από τα φύλλα και διαδοχικής διήθησης μέσα από σειρά φίλτρων με μειούμενη διαπερατότητα απομονώθηκε ίζημα ιδιαίτερα εμπλουτισμένο σε αδενικά τριχίδια. Αυτό χρησιμοποιήθηκε ως το πρωτογενές υλικό για την απομόνωση ολικού RNA. Το ολικό RNA περιέχει όλα τα μηνύματα του κυττάρου ως αγγελιοφόρο RNA το οποίο και αποτελεί τον ενδιάμεσο κρίκο μεταξύ των γενετικών πληροφοριών που εμπεριέχονται στα χρωμοσώματα και των πρωτεϊνών που παράγονται ως τελικό αποτέλεσμα. Έτσι, μίας ευρείας κλίμακας ανάγνωση πολλών διαφορετικών αγγελιοφόρων RNA του κυττάρου, που έχουν μετατραπεί σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) για λόγους σταθερότητας, μας παρέχει πληροφορίες για τις πρωτεΐνες που παράγονται σε αυτά.

Η εφαρμογή της μεθοδολογίας αυτής σε 600 cDNA από *S. fruticosa* και 400 cDNA από *S. pomifera* αναγνώρισε έναν αριθμό γονιδίων που ανέρχονται στο 3% του συνόλου και συμμετέχουν στη βιοσύνθεση τερπενοειδών. Σε αυτά περιέχονται και τέσσερα υποψήφια γονίδια βιοσύνθεσης μονοτερπενίων. Τα γονίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν για να παραχθούν τα αντίστοιχα ένζυμα σε βακτήρια *E. coli* και σε σακχαρομύκητα (*Saccharomyces cerevisiae*) και να χρησιμοποιηθούν σε ενζυματικές αντιδράσεις παρουσία υποστρώματος GPP για την παραγωγή και ταυτοποίηση του μονοτερπενίου που παράγεται.

Στόχος του εργαστηρίου μας είναι η τροποποίηση του μεταβολισμού του σακχαρομύκητα, ενός μικροοργανισμού που χρησιμοποιείται για χιλιετίες από τον άνθρωπο σε βιοενζυματικές τροποποιήσεις, ώστε να παράγει σε ικανές ποσότητες αιθέρια έλαια και άλλα τερπένια εμπορικού και φαρμακευτικού ενδιαφέροντος. Οι γνώσεις από αυτή την γονιδιωματική προσέγγιση θα είναι πολύτιμες και για την αξιοποίηση αυτού καθ' αυτού του φυτού, καθώς συνεισφέρει πληθώρα εργαλείων για το χαρακτηρισμό, τη γενετική βελτίωση και επιλογή επιθυμητών χαρακτηριστικών στη φασκομηλιά.