

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το φυτό *Eruca sativa* (ρόκα) αποτελεί μέλος της οικογένειας των Brassicaceae, που μεταξύ άλλων έχουν ως χαρακτηριστικό την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών που ονομάζονται γλυκοσινολικά οξέα (glucosinolates) (ΓΚΣ). Οι ενώσεις αυτές έχουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες που εκτείνονται από την άμυνα των φυτών έναντι διαφόρων εχθρών και παθογόνων μικροοργανισμών, μέχρι τη χημειοπροφύλαξη στον άνθρωπο.

Το μονοπάτι της βιοσύνθεσής τους είναι γνωστό στο φυτό-μοντέλο *Arabidopsis thaliana*, το οποίο ανήκει στην παραπάνω οικογένεια. Η πλειοψηφία των αλληλουχιών των γονιδίων που συμμετέχουν έχει αποκαλυφθεί, όπως επίσης και ο ρόλος τους.

Στην παρούσα διατριβή απομονώθηκαν αλληλουχίες γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των ΓΚΣ στο φυτό *Eruca sativa*. Αυτό κατέστη δυνατό με *in silico* διερεύνηση των διαθέσιμων αλληλουχιών από άλλα φυτά της ίδιας οικογένειας με σκοπό το σχεδιασμό κατάλληλων εκκινήτων και τη χρήση τους σε αντίδραση PCR. Η τεχνική 5'/3' RACE ολοκλήρωσε το αποτέλεσμα και έτσι εν τέλει απομονώθηκαν 15 αλληλουχίες, 12 από αυτές πλήρους μήκους (full-length) που σχετίζονται με βιοσυνθετικά γονίδια και μεταγραφικούς παράγοντες της βιοσύνθεσης των γλυκοσινολικών οξέων. Στη συνέχεια έγινε κατασκευή φυλογενετικών δέντρων στα οποία χρησιμοποιήθηκε η πρωτεϊνική ακολουθία, όπου οι απομονωθείσες αλληλουχίες συγκρίνονται με άλλες που ανήκουν στην ίδια οικογένεια γονιδίων. Τρεις από τις αλληλουχίες πλήρους μήκους κλωνοποιήθηκαν σε φορείς έκφρασης με σκοπό την απομόνωση της πρωτεΐνης που προκύπτει. Παρατηρήθηκε μεγάλη ομοιότητα νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεταξύ των γονιδίων που απομονώθηκαν και των αντιστίχων τους από άλλα φυτά με τα οποία συγκρίθηκαν. Οι ομοιότητες φτάνουν ακόμα και το 95%, ενώ σε όλες τις περιπτώσεις το ποσοστό είναι πάνω από 85%, ενισχύοντας την υπόθεση για την ταυτότητα των γονιδίων που απομονώθηκαν. Ενδιαφέρον είναι ότι τα ποσοστά ομοιότητας είναι πάντα μεγαλύτερα όταν οι αλληλουχίες με τις οποίες γίνεται η σύγκριση προέρχονται από φυτά του γένους *Brassica*. Επίσης, από τα φυλογενετικά δέντρα που

κατασκευάστηκαν φαίνεται η ομαδοποίηση των γονιδίων μαζί με τα υπόλοιπα της ίδιας οικογένειας στην οποία κατά περίπτωση ανήκουν. Τέλος, η υπερέκφραση των γονιδίων και η απομόνωση της αντίστοιχης πρωτεΐνης δείχνει τη λειτουργικότητα των γονιδίων που απομονώθηκαν.

Για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των ΓΚΣ σχεδιάστηκαν δύο πειραματικές προσεγγίσεις που αφορούν στη χορήγηση αζώτου και θείου (βασικά δομικά στοιχεία των ΓΚΣ) στα φυτά. Στην πρώτη στόχος ήταν να εξεταστεί η περίπτωση που α)το άζωτο, β)το θείο και γ)και τα δυο μαζί είναι μειωμένα καθ'όλη τη διάρκεια ανάπτυξης των φυτών. Στη δεύτερη μελετήθηκε η περίπτωση της συνθήκης μειωμένου θείου μόνο κατά τις πρώτες μέρες της ανάπτυξης των φυτών. Συλλέχθηκαν ιστοί φύλλων και ρίζας από όλες τις περιπτώσεις για εξαγωγή ολικού RNA και κατασκευή cDNA αλυσίδας και μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων με PCR πραγματικού χρόνου (real-time). Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν έδειξαν να επηρεάζουν σημαντικά το μεταγραφικό προφίλ. Στις περισσότερες περιπτώσεις αυτό έδειξε συσχέτισμό με αντίστοιχα δεδομένα μεταβολικού προφίλ.

Εκχυλίσματα από τους ιστούς των φυτών που αναπτύχθηκαν υπό διαφορετικά επίπεδα λίπανσης δοκιμάστηκαν ως προς τη βιολογική τους δράση στην ανάπτυξη καρκινικών κύτταρων των σειρών HeLa, MCF7 και HepG2. Τα περισσότερα εκχυλίσματα παρουσίασαν αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και καταγράφηκε διαφοροποίηση της βιολογικής δράσης των εκχυλισμάτων ανάλογα με τα επίπεδα λίπανσης. Επιπλέον, έγινε κλασμάτωση των εκχυλισμάτων με σκοπό τον εμπλουτισμό τους σε γλυκοσινολικά οξέα και εκ νέου επώαση με κύτταρα των προαναφερθέντων κυτταρικών σειρών. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα εκχυλίσματα διατήρησαν ή αύξησαν την ικανότητα αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης.

#