

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΚΑΙ ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ ΦΥΤΑ: «ΠΡΑΣΙΝΑ ΕΡΓΟΣΤΑΣΙΑ» ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΝΕΩΝ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ

Ά.Κ. Κανελλής, Β. Φαλάρα, Ε. Πατεράκη, Ε. Ιωαννίδη, Φ. Χατζοπούλου, Δ. Παπαευθυμίου, Α. Παπανικολάου, D. Bozic, A. Sarafomourotse & E. Terzή

Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Φαρμακευτικής, Ομάδα Βιοτεχνολογίας Φαρμακευτικών Φυτών, Πανεπιστημιούπολη, 54124, Θεσσαλονίκη

Εισαγωγή

Το γένος *Cistus*

Τα φυτά του γένους *Cistus* είναι πολυετείς σκληρόφυλλοι θάμνοι. Η οικογένεια Cistaceae στην οποία ανήκουν αποτελείται από 7 γένη και 160 περίπου είδη. Το σημαντικότερο κέντρο εξάπλωσής τους είναι οι παραμεσόγειες περιοχές όπου και αποτελούν σημαντικά συστατικά της μακίας βλάστησης. Τέσσερα είδη από αυτά είναι ενδημικά της κρητικής χλωρίδας: το *Cistus creticus* L., το *Cistus monspeliensis* L., το *Cistus parviflorus* L. και το *Cistus salvifolius* L. Το είδος *Cistus creticus* περιλαμβάνει δύο υποείδη, το *Cistus creticus* subsp. *creticus* (Εικ. 1A) (ή *Cistus incanus* subsp. *creticus*), το οποίο παράγει τη χαρακτηριστική ρητίνη «λάδανο» και το *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* (Εικ. 1B), που δεν παράγει ρητίνη σε εκμεταλλεύσιμες ποσότητες.

A. *Cistus creticus* subsp. *creticus*



B. *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*

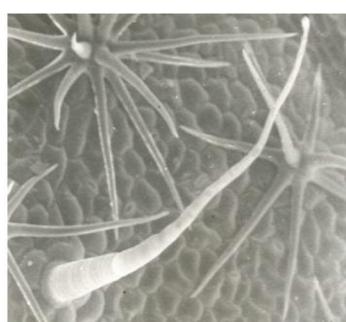


Εικόνα 1. Τα δύο υποείδη *Cistus creticus* subsp. *creticus* (A) και *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* (B).

Το *Cistus creticus* subsp. *creticus* είναι ένα σκληρόφυλλο φυτό που χαρακτηρίζεται από εποχικό διμορφισμό. Το φυτό διανύει τους καλοκαιρινούς μήνες φέροντας μικρά φύλλα, τα οποία μετά το τέλος της περιόδου της ξηρασίας αντικαθίστανται από τα μεγάλα χειμερινά φύλλα. Τα υπέργεια τμήματα του φυτού καλύπτονται από πολυκύτταρα αδενικά τριχώματα καθώς και μονοκύτταρα επιμήκη και σύνθετα αστεροειδή, μη αδενικά τριχώματα, η πυκνότητα των οποίων είναι μεγαλύτερη στα καλοκαιρινά φύλλα (Aronne & De Micco, 2001). Τα αδενικά τριχώματα έχουν σχήμα επίμηκες (100-250 μμ) που καταλήγει σε μία σφαιρική διαμόρφωση διαμέτρου 40-60 μμ (Εικ. 2A). Στα αδενικά τριχώματα των φύλλων παράγεται η χαρακτηριστική

ρητίνη, το «λάδανο» (Εικ. 2B). Τα μη αδενικά τριχώματα θεωρείται ότι συμμετέχουν στη μηχανική άμυνα του φυτού, ενώ στο *Cistus salvifolius* έχει βρεθεί ότι είναι υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση και τη συσσώρευση φλαβονοειδών (Tattini et al., 2007). Σε αντίθεση με το *Cistus creticus* subsp. *creticus*, το υποείδος *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* εμφανίζει κυρίως τα μη αδενικά αστεροειδή τριχώματα. Το αιθέριο έλαιο του φυτού χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα σεσκιτερπενίων (δ-καδινένιο, α-κοπαένιο, βουλνεσόλη, βιβιδιφλορόλη και λεδόλη), ενώ το υποείδος *creticus* κυριαρχείται από τα διτερπένια οξείδιο της μανοόλης και 13-επι-οξείδιο της μανοόλης (Demetzos et al., 1994, Demetzos et al., 1997, Demetzos et al., 2002).

A.



B.



Εικόνα 2. Αδενικά και αστεροειδή τριχώματα από το φυτό *Cistus creticus* subsp. *creticus*. (A): Εικόνα από αδενικά και αστεροειδή τριχώματα από SEM. (B): Εικόνα από στερεοσκόπιο της ρητίνης που εκκρίνεται από τα αδενικά τριχώματα (Falara et al., 2008).

Αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός από τις χαρακτηριστικές διαφορές μεταξύ των δύο υποειδών, μελέτες σε πληθυσμούς του υποειδούς *creticus* από διάφορα μέρη της Κρήτης έδειξαν και μία αξιοσημείωτη χημική ποικιλομορφία ως προς τη σύσταση και την ποσότητα των παραγόμενων αιθερών ελαίων. Αυτό αρχικά θεωρήθηκε ότι ήταν απόρροια των διαφορετικών κλιματολογικών συνθηκών και διαδικασιών προσαρμογής των υποτήλθυσμάν. Μελέτες όμως σε άλλα όγρια φυτά της Κρήτης που παράγουν αιθέρια έλαια όπως η φασκομηλιά (*Salvia fruticosa*) και η ρίγανη (*Origanum vulgare* και *O. onnites*) ανέδειξαν μία μεγάλη γενετική ποικιλομορφία που ήταν αντίστοιχη με τη χημική τους ποικιλομορφία (Skoula et al., 1999, Skoula et al., 2000, Bazina et al., 2002, Gounaris et al., 2002). Τα φυτά όταν μεταφέρθηκαν στο ίδιο καλλιεργητικό περιβάλλον διατήρησαν τη χημική τους ταυτότητα παράγοντας παρόμοια σε σύσταση και ποσότητα αιθέρια έλαια (Skoula et al., 1999).

Η γενετική βάση της χημικής ποικιλομορφίας υποστηρίζεται και από μια πρόσφατη μελέτη, που χαρακτήρισε πληθυσμούς του *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* από την Κρητική και τη Σαρδηνία με μοριακούς δείκτες ISSR και χημική ανάλυση με HS-SPME (Headspace-Solid Phase Micro Extraction). Τα αποτελέσματα έδειξαν μία μεγάλη γενετική ποικιλομορφία που σχετίζονταν με τη διαφοροποίηση στην παραγωγή των αιθερών ελαίων (Paolini et al., 2009).

Εμπορική αξιοποίηση – φαρμακολογικές ιδιότητες

Το ενδιαφέρον για τα είδη του γένους *Cistus* εστιάζεται κυρίως στις αρωματικές και φαρμακολογικές ιδιότητες της ρητίνης και των αιθέριων ελαίων τους. Συγκεκριμένα, η εμπορική εκμετάλλευση του *Cistus creticus* subsp. *creticus* πραγματοποιείται κυρίως στις Σίσες Μυλοποτάμου της Κρήτης όπου η ρητίνη συλλέγεται με παραδοσιακά μηχανικά μέσα από τους λεγόμενους κιστώνες. Σήμερα, το «λάδανο» αποτελεί ένα από τα κυριότερα εξαγώγιμα προϊόντα προς τις Αραβικές χώρες. Οι ποσότητες που εξάγονται από εκεί χρησιμοποιούνται κυρίως στη βιομηχανία των καλλυντικών. Αξίζει να σημειωθεί ότι το «λάδανο» αποτελεί ένα από τα σαράντα συστατικά που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή του Αγίου Μύρου (Δεμέτζος, 1990).

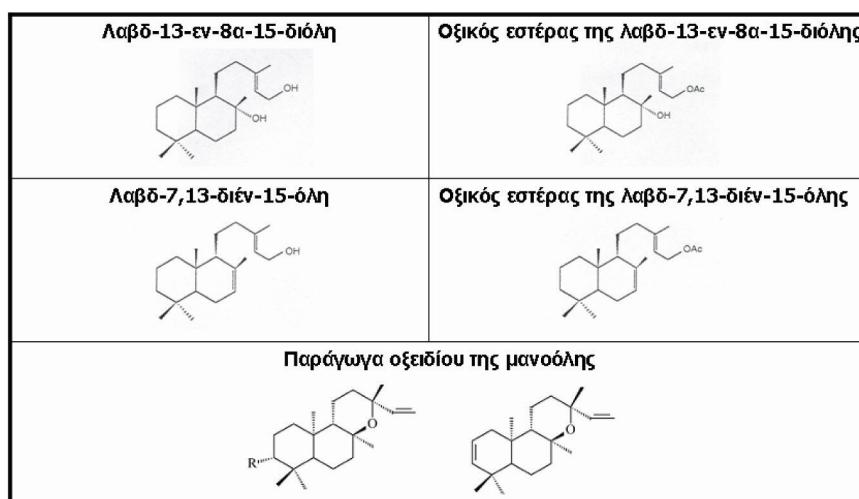
Από αναφορές σε αρχαία κείμενα του Ιπποκράτη, του Ηροδότου και του Διοσκουρίδη προκύπτει ότι οι αρωματικές και φαρμακολογικές ιδιότητες του «λάδανου» ήταν

γνωστές από την αρχαιότητα (Χαβάκη, 1970). Εκχυλίσματα των φυτών *Cistus* παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική, μυοχαλαρωτική, σπασμολυτική και αντιφλεγμονώδη δράση (Attaguile et al., 2000, Angelopoulou et al., 2001, Sadhu et al., 2006).

Το «λάδανο» χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν για την αντιμετώπιση επιδημιών πανώλης με θεαματικά αποτελέσματα, ενώ μελέτες έρχονται να υπογραμμίσουν την αντικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση είτε εκχυλισμάτων των φυτών, είτε απομονωμένων συστατικών τους (Chirkina & Patudin, 1971, Demetzos et al., 1997). Στη λαϊκή θεραπευτική το «λάδανο» έχει χρησιμοποιηθεί για την αναστολή της ανάπτυξης καλοθηθών και καρκινικών όγκων της μήτρας καθώς και για την αντιμετώπιση περιπτώσεων ρινικού πολύποδα και καρκινογόνου έλκους (Δεμέτζος, 1996).

Στα πλαίσια της αξιολόγησης της αντινεοπλασματικής δράσης των συστατικών της ρητίνης, τα λαβδανικά διτερπένια (13E)-λαβδα-13-εν-8α,15-διόλη στην ακετυλιωμένη της μορφή, λαβδαν-14-εν-8,13-διόλη και η σκλαρεόλη [(13R)-λαβδα-14-εν-8,13-διόλη] έδειξαν σημαντική κυτταροστατική δράση *in vitro* αναστέλλοντας την ανάπτυξη τριών ανθρώπινων λευχαιμικών κυτταρικών σειρών (Chinou et al., 1994) (Εικ. 3). Από τα λαβδανικά διτερπένια, η (13E)-λαβδα-13-εν-8α,15-διόλη παρουσίασε ισχυρή κυτταροστατική δράση εναντίον 13 λευχαιμικών ανθρώπινων σειρών (Dimas et al., 1998). Η 3-β-υδροξυ-13-έπι-μανοόλη και ένα ημισυνθετικό παράγωγό της χρησιμοποιήθηκαν με ικανοποιητικά αποτελέσματα εναντίον 13 λευχαιμικών κυτταρικών σειρών και επιχειρήθηκε να διευκρινιστεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου προκαλείται η απόπτωση λευχαιμικών και καρκινικών κυττάρων του μαστού *in vitro* (Dimas et al., 1999). Προέκυψε ότι, η κυτταροστατική δράση των παραπάνω ουσιών οφείλεται στη διακοπή της κυτταρικής διαίρεσης στη φάση G0/1 (Dimas et al., 1999). Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η σκλαρεόλη δραστικά στην αντινεοπλασματική δράση άλλων φαρμακευτικών παρασκευασμάτων, όπως η οξορουσιβική και το ετοποσίδιο εναντίον μίας καρκινικής σειράς μαστικών κυττάρων (Dimas et al., 2006).

Τα λαβδανικά διτερπένια εξαιτίας του λιπόφιλου χαρακτήρα τους ενδέικνυνται για χρήση της λιποσωμιακής τεχνολογίας ως σύστημα χορήγησης σε πειραματόζωα, ενώ πρόσφατα, σχετικές μελέτες οδήγησαν σε ενθαρρυντικά αποτελέσματα. (Kyrikou et al., 2005, Matsingou et al., 2005, Dimas et al., 2006).



Εικόνα 3. Τα λαβδανικά διτερπένια του *Cistus creticus* subsp. *creticus*

Τα τερπένια και η βιοσύνθεσή τους στο φυτικό κύτταρο

Τα τερπενοειδή και ισοπρενοειδή είναι μία ιδιαίτερα σημαντική κατηγορία φυσικών προϊόντων που συνεισφέρουν με περισσότερες από 50.000 ουσίες στη χημική ποικιλότητα των φυτών. Πολλές από αυτές έχουν προσελκύσει το εμπορικό ενδιαφέρον ως αρώματα και προσθετικά αρωμάτων στη βιομηχανία τροφίμων και καλλυντικών, αλλά και ως φαρμακευτικά σκευασμάτα. Ανάμεσα τους ξεχωρίζουν η ταξόλη, ένα διτερπένιο από το δένδρο *Taxus* sp. που χρησιμοποιείται ευρέως στην κλινική πράξη ως ισχυρό αντιεπιλασματικό φάρμακο και η αρτεμισινή, ένα αντιμαλαριακό (ανθελονοσιακό) φάρμακο νέας γενιάς (Ro et al., 2006, Butler & Newman, 2008, Saloustros et al., 2008, Vassay, 2008).

Όλα τα τερπένια συντίθενται από δύο πρόδρομα μόρια με 5 άνθρακες (C-5), το διφωσφορικό ισοπεντεύλιο (IPP) και το ισομερές του διφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP). Τα δομικά αυτά μόρια ενώνονται για να δημιουργήσουν το διφωσφορικό γερανύλιο (GDP, C-10), το διφωσφορικό φαρνεσύλιο (FPP, C-15) και το διφωσφορικό γερανύλ-γερανύλιο (GGDP, C-20), που αποτελούνται ενζυμικά υποστρώματα για το σχηματισμό μονοτερπενίων, σεσκιτερπενίων και διτερπενίων, αντίστοιχα (Phillips et al., 2006). Στο *Cistus creticus* προτείνεται το βιοσυνθετικό μονοπάτι των λαβδανικών διτερπένων που απεικονίζεται στην Εικ. 4. Το στάδιο 1 περιλαμβάνει την κυκλοποίηση του GGDP προς διφωσφορική λαβδ-13-εν-8α-15-διόλη. Στο στάδιο 2 το παραπάνω σταθερό ενδιάμεσο μόριο μπορεί να κυκλοποιηθεί περαιτέρω προς λαβδ-13-εν-8α-15-διόλη, οξείδια της μανοόλης, σκλαρεόλη και λαβδ-7,13-διεν-15-όλη, ενώ στο στάδιο 3 προτείνεται η ακετυλώση της λαβδ-13-εν-8α-15-διόλης μέσω μιας ακετυλοτρανσφεράστης για την παραγωγή του οξικού εστέρα της λαβδ-13-εν-8α-15-διόλης. Παρόμοια μονοπάτια πρέπει να συνθέτουν και τα άλλα λαβδανικά διτερπένια, που αναφέρθηκαν παραπάνω. Όλα τα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις αυτές, όχι μόνο στο *Cistus creticus* αλλά και σε όλα τα αγγειόσπερμα παραμένουν άγνωστα. Τελευταία, έχουν ανακοινωθεί η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός της συνθετάσης της σκλαρεόλης από

Salvia sclarea (Schalk, 2008, Caniard et al., 2012) και η συνθετάση της λαβδ-7,13-διεν-15-όλης από το γυμνόσπερμο *Selaginella moellendorffii* (Mafu et al., 2011).

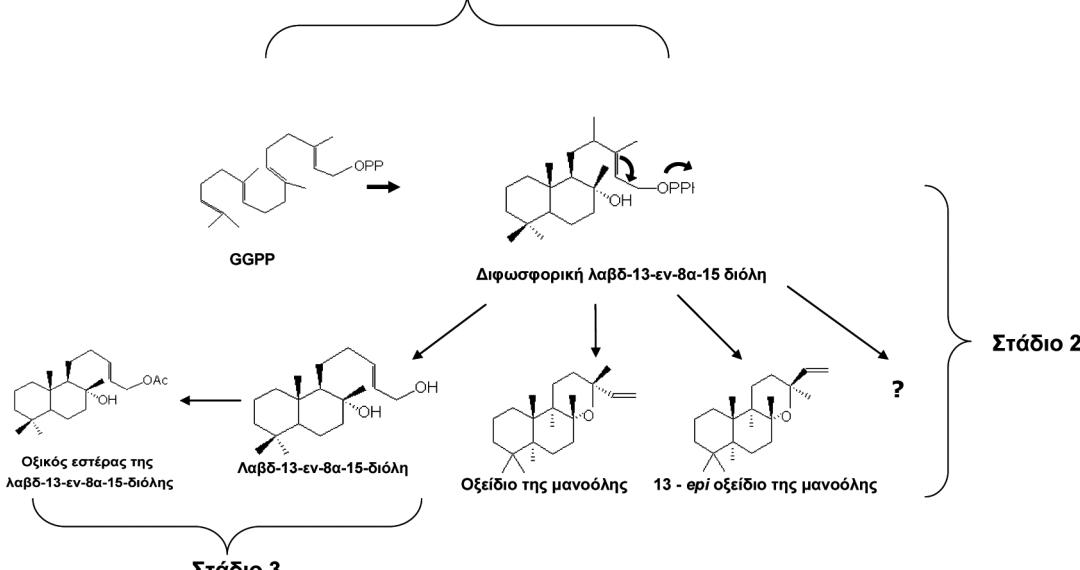
Η χημική ποικιλομορφία που παράγεται από τις τερπενικές συνθετάσεις βασίζεται σε μία κοινή ενζυμική δομή που είναι φυλογενετικά διατηρημένη στους μύκητες και στα φυτά. Η βιοσύνθεση πολλών τερπενίων με φαρμακευτική δράση απαιτεί περαιτέρω εκτεταμένες τροποποιήσεις της βασικής δομής μέσω υδροξυλιώσεων, αναγωγών και προσθήκης προσθετικών ομάδων (McGarvey & Croteau, 1995, Chang & Keasling, 2006). Η κατανόηση της βιοσυνθετικής πολυπλοκότητας και η βελτίωση βιοτεχνολογικών συστημάτων παραγωγής τερπενοειδών είναι ιδιαίτερα σημαντικές στην υπεριήδηση του βασικού εμποδίου της γενικευμένης αξιοποίησης τους που είναι η χαμηλή παραγωγή των βιοδραστικών ουσιών στα φυτά.

Γονιδιωματικές προσεγγίσεις στο δευτερογενή μεταβολισμό

Η λειτουργική γονιδιωματική βασίζεται σε τεχνικές υψηλής απόδοσης (high throughput technics) για τη μελέτη του mRNA (μεταγράφωμα, the transcriptome), των πρωτεϊνών (the proteome) και των μεταβολιτών (the metabolome) σε ένα φυτό γενικά άλλα και στους ιστούς και τα οργανά του ειδικότερα. Σύγχρονες τεχνικές όπως είναι οι τεχνολογίες της αλληλούχισης του DNA (DNA sequencing technologies), οι μικροσυστοιχίες DNA (microarray technologies), οι πρόσφατες βελτιώσεις στη φασματοσκοπία μάζας πρωτεΐνων (protein mass spectrometry) και οι αναλύσεις μεταβολιτών υψηλής απόδοσης (high-throughput metabolite analyses) παρέχουν λεπτομερείς πληροφορίες για τα συνολικά επίπεδα των mRNA, των πρωτεϊνών και των μεταβολιτών στα φυτά. Αυτή η γνώση επιτρέπει στους ερευνητές να εντοπίσουν και να αποκωδικοποιήσουν τις αλλαγές στα γονίδια που εκφράζονται, στις πρωτεΐνες και στους μεταβολίτες των φυτών, να εμπλουτίσουν τη γνώση γύρω από τη ρύθμιση και τα ρυθμιστικά δίκτυα και ακόμη να ανακαλύψουν νέα μεταβολικά μονοπάτια.

Cistus creticus

Στάδιο 1



Εικόνα 4. Προτεινόμενο μονοπάτι της κυκλοποίησης του GGDP προς λαβδανικά διτερπένια στα τριχώματα του *Cistus creticus* subsp. *creticus*. Το Στάδιο 1 περιλαμβάνει την κυκλοποίηση του GGDP προς διφωσφορική λαβδ-13-εν-8α-15-διόλη. Στο Στάδιο 2 το παραπάνω σταθερό ενδιάμεσο μόριο κυκλοποιείται περαιτέρω προς λαβδ-13-εν-8α-διόλη, οξείδια της μανοόλης, σκλαρεόλη και άλλα λαβδανικά διτερπένια. Στο Στάδιο 3 προτείνεται η ακετυλώση της λαβδ-13-εν-8α-15-διόλης μέσω μιας ακετυλοτρανσφεράστης για την παραγωγή του οξικού εστέρα της λαβδ-13-εν-8α-15-διόλης.

Μέχρι σήμερα σε κανένα αρωματικό και φαρμακευτικό φυτό δεν έχει γίνει αλληλουχιστή του γονιδιώματος. Ιδιαίτερα επιτυχημένη εναλλακτική προσέγγιση όμως, που παρέχει πολλές πληροφορίες σχετικά με τα γονίδια που εκφράζονται, είναι η αποτίμηση των εκφραζόμενων αλληλουχιών (Expressed Sequence Tags analysis-ESTs). Αυτές προκύπτουν από την κατασκευή cDNA βιβλιοθηκών από εξειδικευμένους ιστούς πλούσιους σε γονίδια του δευτερογενούς μεταβολισμού. Η προσέγγιση αυτή εφαρμόστηκε με επιτυχία στη μέντα (Lange et al., 2000), στο βασιλικό (Gang et al., 2001), στην τομάτα (Fridman et al., 2005), στο *Cistus creticus* (Falara et al., 2008) και στο φασκόμητλο (*Salvia fruticosa*) (Chatzopoulou et al., 2010). Οι γενετικές πληροφορίες που συλλέγονται είτε περιλαμβάνουν ολόκληρη την αλληλουχία του βιοσυνθετικού γονιδίου ενδιαφέροντος είτε περιέχουν αρκετές πληροφορίες που καθιστούν δυνατή την κλωνοποίησή του. Μέσω αυτής της προσέγγισης απομονώθηκαν από την ερευνητική ομάδα μας αρκετά ένζυμα βιοσύνθεσης τερπενοειδών. Πρόσφατα, εφαρμογές των νέων μεθόδων αλληλουχισης (New Generation Sequencing - NGS) έχουν ανοίξει νέους ορίζοντες στη γενομική και γονιδιωματική ανάλυση, ιδίως ειδών με περιορισμένο αριθμό κατατιθέμενων αλληλουχιών. Η NGS επιτρέπει λόγω του χαμηλού κόστους και της μεγάλης δυνατότητάς της την αλληλουχιση μεγάλου αριθμού mRNA με σχετικά καλή ποιότητα ανάγνωσης και αριθμού βάσεων (Lister et al., 2009) και την αποφυγή κατασκευής cDNA βιβλιοθηκών. Επιπλέον, η ανάλυση των αλληλουχιών με κατάλληλα λογισμικά επιτρέπει τη σύγκριση διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης ή διαφορετικών μεταχειρίσεων σε γονιδιακό επίπεδο (Alagna et al., 2009). Συνεπώς, η σύγκριση μεγάλου αριθμού αλληλουχιών από τα υπό μελέτη είδη μπορεί να επιτρέψει όχι μόνο την αλίευση των βιοσυνθετικών γονιδίων ενδιαφέροντος, αλλά και πιθανώς την απομόνωση γονιδίων που υπεισέρχονται στη διαφοροποίηση των διαφόρων υποειδών (π.χ. *Cistus creticus* subsp. *creticus*, και *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*) ως προς την ικανότητά τους να παράγουν περισσότερη ή λιγότερη ρητίνη.

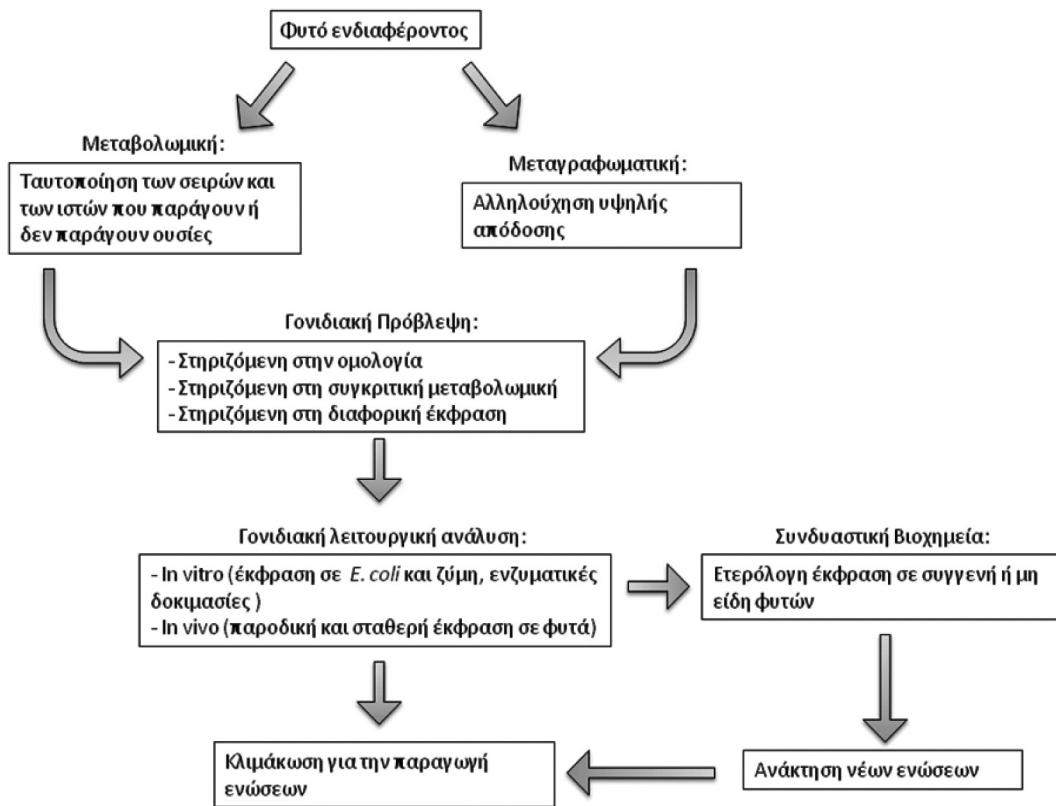
Λειτουργικές γονιδιωματικές προσεγγίσεις έχουν εφαρμοστεί ευρέως τα τελευταία χρόνια για την εξερεύνηση της λειτουργίας των βιολογικών συστημάτων, συμπεριλαμβανομένων των οπωροκηπευτικών, των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών (Sonah et al., 2011). Η προσέγγιση αυτή, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, είναι μονόδρομος ιδίως σε είδη, στα οποία γενωμικά δεδομένα εί-

ναι σπάνια. Προϋπόθεση επιτυχίας θεωρείται η επιλογή του κατάλληλου βιολογικού υλικού, στην προκειμένη περίπτωση το φαρμακευτικό φυτό, το οποίο παράγει δευτερογενείς μεταβολίτες με γνωστή δομή και βιολογική δράση (Εικ. 5).

Αρχικά η μαζική ανάλυση των μεταβολιτών (metabolomics) θα προσδιορίσει την ιστοειδικότητα της παραγωγής των ουσιών ενδιαφέροντος, καθώς και το αναπτυξιακό στάδιο κατά το οποίο παρατηρείται η συσσώρευση των μεταβολιτών. Σε δεύτερο στάδιο, η μαζική ανάλυση μεταγράφων θα οδηγήσει στην παραγωγή μεγάλου αριθμού αλληλουχημένων ακολουθιών που θα αποτυπώνουν τη γονιδιακή έκφραση στο δεδομένο ιστό, τη συγκεκριμένη στιγμή και συνεπώς θα πρέπει να περιέχει τα γονίδια ενδιαφέροντος που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση, μεταφορά και έκκριση των ουσιών στόχων (Εικ. 4). Ακολουθεί η βιοπληροφορική ανάλυση, η επιλογή των πιθανών ακολουθιών και τελικά ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των γονιδίων *in vitro* σε *Escherichia coli* και *Saccharomyces cerevisiae* και *in vivo* σε διαγονιδιακά φυτά. Ετερόλογη έκφραση των απομονωμένων γονιδίων σε άλλα φυτά μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή νέων ουσιών (συνδυαστική βιοχημεία-βιοσύνθεση, combinatorial biosynthesis). Η συνδυαστική βιοσύνθεση είναι ένα καινούργιο εργαλείο για τη δημιουργία νέων πρωτότυπων φυσικών ουσιών και για την παραγωγή σπάνιων και ακριβών φυσικών δραστικών μορίων (Julsing et al., 2006). Η ιδέα βασίζεται στον πιθανό συνδυασμό βιοχημικών μονοπατιών που μπορεί να προκύψει όταν γονίδιο(α) από έναν οργανισμό εκφραστεί(στούν) σε άλλον οργανισμό με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο. Ως αποτέλεσμα ετερογενείς οργανισμοί προμηθεύουν πρόδρομες ουσίες από τον πρωτογενή και δευτερογενή μεταβολισμό τους, οι οποίες μεταβολίζονται σε επιθυμητούς δευτερογενείς μεταβολίτες λόγω της έκφρασης, όπως προαναφέρθηκε, άλλων γονιδίων.

Βιοτεχνολογικές προσεγγίσεις στην παραγωγή τερπενίων φαρμακευτικού ενδιαφέροντος

Η μεγάλη εμπορική σημαντικότητα των τερπενίων έχει οδηγήσει τα τελευταία χρόνια στην ανάπτυξη πλειάδας βιοτεχνολογικών προσεγγίσεων μεταβολικής μηχανικής, ώστε να αυξηθεί η παραγωγή των προϊόντων αυτών με ταυτόχρονη μείωση του κόστους σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας.



Εικόνα 5. Σχεδιάγραμμα της μεθοδολογίας, συμπεριλαμβανομένου του τρόπου με τον οποίο η λειτουργική γονιδιωματική μπορεί να συνεισφέρει στην ενίσχυση της παραγωγής γνωστών και νέων δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτικά κύτταρα.

Τα κυρίαρχα συστήματα βιοτεχνολογικής παραγωγής φυσικών προϊόντων που έχουν αξιοποιηθεί με επιτυχία είναι τα α) μικροβιακά συστήματα *E. coli* και του ευκαρυωτικού σακχαρομύκητα *S. cerevisiae*, β) φυτικές κυτταροκαλλιέργειες και γ) γενετικά τροποποιημένα φυτά. Το κάθε σύστημα προσφέρει ιδιάιτερα πλεονεκτήματα αλλά ταυτόχρονα πάσχει και από κάποια μειονεκτήματα ώστε να καθιστούν την επιλογή τους κατάλληλη ανά συγκεκριμένη περίπτωση του επιθυμητού προϊόντος (Roberts, 2007, Kirby & Keasling, 2009).

Η μεταφορά του βιοσυνθετικού μονοπατιού των τερπενοειδών σε μικροβιακά συστήματα προσφέρει το πλεονέκτημα της περιβαλλοντικά φιλικής χρηματίας, τη χρήση φτηνών πηγών άνθρακα και την ικανότητα εύκολης γενετικής τροποποίησης. Επιπρόσθετα, οι μικροοργανισμοί είναι εύκολα αξιοποιήσιμοι σε παραγωγικές διαδικασίες μεγάλης κλίμακας, έχοντας μικρό χρόνο διπλασιασμού, αντοχή στο μηχανικό στρες κατά τη βιοδύμωση και επιτρέποντας την παραγωγή των τερπενίων να ανεξαρτητοποιηθεί από τη φάση της κυτταρικής διαίρεσης ώστε κορεσμένες καλλιέργειες να συνεχίζουν να παράγουν μεταβολίτες για μεγάλο διάστημα.

Παρόλα τα πλεονεκτήματα, η παραγωγή τερπενίων δεν είναι πάντα εφικτή σε μικροβιακά συστήματα καθώς σε πολλές περιπτώσεις το μονοπάτι βιοσύνθεσης είναι πολύπλοκο και μη χαρακτηρισμένο (Engels et al., 2008). Οι φυτικές κυτταροκαλλιέργειες προσφέρουν μία εναλλακτική περιβαλλοντικά φιλική λύση στην παραγωγή. Αντίθετα με τα φυτά στον αγρό, οι συνθήκες καλλιέργειας και παραγωγής είναι ελεγχόμενες και σύμφωνες με τα αυστηρά πρότυπα της φαρμακοποιίας (Roberts, 2007). Εφαρμογές της μεταβολικής μηχανικής σε κρίσιμους βιοσυνθετικούς κόμβους μπορούν να βελτιώσουν σημαντικά την ποσότητα αλλά και τη σύσταση των παραγόμενων μεταβολιτών. Επιπρόσθετα, καθώς η παραγωγή είναι συνήθως υψηλότερη σε διαφοροποιημένους φυτικούς ιστούς οι γενετικά τροποποιημένες καλλιέργειες θυσανωτών ριζών (hairy root cultures) χρησιμοποιούνται ευρέως (βλέπε παρακάτω)

(Shanks & Morgan, 1999). Η κυτταρική καλλιέργεια του *Taxus sp.* αντιπροσωπεύει μία τέτοια επιτυχημένη εμπορική εφαρμογή καθώς χρησιμοποιείται για την παραγωγή του αντινεοπλασματικού φαρμάκου «paclitaxel» (Zhong, 2002).

Εφαρμογές της λειτουργικής γονιδιωματικής ανάλυσης στο *Cistus creticus* subsp. *creticus*

Βασικός στόχος της ομάδας μας παράλληλα με την εξερεύνηση του μηχανισμού μορφογένεσης των αδενικών τριχωμάτων, είναι η αποκρυπτογράφηση των μηχανισμών, σε μοριακό επίπεδο, που συμμετέχουν, ρυθμίζουν και ελέγχουν τη συσσώρευση των δευτερογενών μεταβολιτών στα αδενικά τριχώματα του *C. creticus* subsp. *creticus*. Αντικείμενο μελέτης είναι και η αύξηση των επιπέδων των λαβδανικών διτερπενίων στα αδενικά τριχώματα. Θα πρέπει να σημειωθεί πως όταν η ομάδα μας άρχισε να ασχολείται ερευνητικά με τη λαδανιά δεν υπήρχαν αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία πάνω σε θέματα μοριακής βιοτεχνολογίας για το είδος αυτό.

Αρχικά, αναπτύχθηκε ένα πρωτόκολλο απομόνωσης βιολογικά ενεργών νουκλεϊκών οξέων από ιστούς του κρητικού λάδανου (Pateraki & Kanellis, 2004). Ακολούθως, επιλέχθηκαν γονίδια που βρίσκονται σε κομβικά σημεία στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των τερπενίων και θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μονοπατιού. Τα γονίδια αυτά ήταν η αναγωγάστη του 3-ύδροξυ-3-μέθυλογλουταρούλ-CoA (HMGR), η συνθετάση της 5-φωσφορικής-1-δεοξυ-1-D-ξυλουλόζης (DXS), η αναγωγάστη της 5-φωσφορικής-1-δεοξυ-1-D-ξυλουλόζης (DXR) και η συνθετάση του πυροφωσφορικού γερανυλγερανούλιου (GGPPS) (Εικ. 6). Απομονώθηκαν ένα πλήρες cDNA που κωδικοποιούσε την *CcDXR* και δύο πλήρη cDNAs που αντιστοιχούσαν στην *G-GPPS* του λάδανου (*CcGGPPS1* και *CcGGPPS2*). Τα *CcHMGR* και *CcDXS* cDNAs προέκυψαν από την EST ανάλυση από cDNA βιβλιοθήκη κατασκευασμένη από RNA που έχει απομονωθεί από τριχώματα φύλλων του *C. creticus*. Η λειτουργικότητα των *GGPPS* cDNAs επιβεβαιώθηκε μετά από

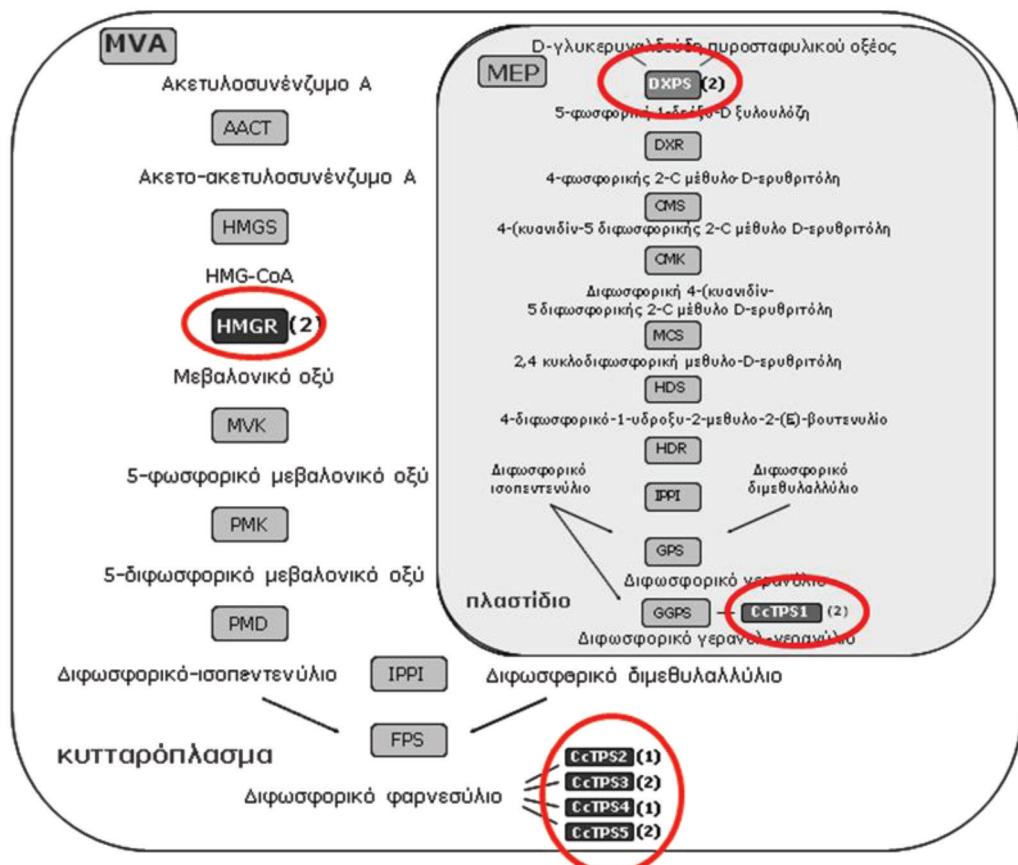
την έκφρασή τους σε κύτταρα ζύμης (Pateraki & Kanellis, 2008).

Ωστόσο, η κύρια μεθοδολογία που ακολουθήθηκε από το εργαστήριό μας στα μέσα της δεκαετίας του 2000 προκειμένου να απομονωθούν γονίδια που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση των λαβδανικών διτερπενίων ήταν η Expression Sequence Tag (EST) ανάλυση. Αυτή περιελάμβανε αρχικά την κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης, στη συνέχεια την αλληλούχηση τυχαία επιλεγμένων κλώνων και τέλος τη βιοπληροφορική ανάλυση και κατηγοριοποίηση των εκφράζομενων αλληλουχιών ως προς την πιθανή λειτουργία τους. Ο ιστός που αναλύθηκε ήταν τα αδενικά τριχώματα του φυτού *C. creticus* subsp. *creticus*, που απομονώθηκαν από πολύ μικρά (0.5 εκ.), μικρά (1-2 εκ.) και μεσαία (2-3 εκ.) φύλλα σε αναλογία 1:2:1. Στην αναλογία αυτή καταλήξαμε εξαιτίας προηγούμενης ανάλυσης που αφορούσε τη μέτρηση της συγκέντρωσης λαβδανικών διτερπενίων σε απομονωμένο ιστό τριχώματων από πολύ μικρά (0.5 εκ.), μικρά (1-2 εκ.), μεσαία (2-3 εκ.) και μεγάλα φύλλα (3-4 εκ.). Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα, η μέγιστη συγκέντρωση παρατηρήθηκε στα μικρά φύλλα (80μg/gr αρχικού ιστού) και μειώθηκε σταδιακά στα επόμενα δύο στάδια ανάπτυξης των φύλλων.

Αντίστροφη εικόνα παρουσίασε η συσσώρευση των σεσκιτερπενίων, που έλαβε τις μέγιστες τιμές της στα μεσαία και μεγάλα φύλλα, αλλά πάντοτε σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα λαβδανικά διτερπένια (Falara et al., 2008). Άλλα διτερπένια παρατηρήθηκαν μόνο στα εκχυλίσματα πολύ μικρών φύλλων σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα λαβδανικά διτερπένια. Η ύπαρξη μεταγράφων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση τερπενίων και ιδίως διτερπενίων καθώς και φλαβονοειδών ήταν αναμε-

νόμενη, αφού αποτελούν τα κύρια συστατικά της ρητίνης των αδενικών τριχώματων του φυτού. Συμπερασματικά, ο ιστός μέγιστης συσσώρευσης λαβδανικών διτερπενίων είναι τα αδενικά τριχώματα των μικρών φύλλων μεγέθους 1-2εκ., ο οποίος και επιλέχθηκε ως η κύρια πηγή μεταγραφών για την κατασκευή της cDNA βιβλιοθήκης.

Στην επικείμενη EST ανάλυση παρήχθησαν 2022 αλληλουχίες υψηλής ποιότητας (Falara et al., 2008). Ακολούθησαν συγκριτικές αναλύσεις BLAST (wwwblast.ncbi.nlm.nih.org), MIPS FunCat (*A. thaliana*) (www.mips.org) από τις οποίες προέκυψαν 29 ESTs που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση τερπενίων και φλαβονοειδών. Τα τριχώματα, λόγω της θέσης τους στο φύλλο, βρίσκονται εκτεθειμένα στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Έτσι, η συντριπτική πλειοψηφία των γονιδίων που εντοπίστηκαν και χαρακτηρίστηκαν στον ιστό των τριχώματων του *C. creticus* subsp. *creticus* σχετίζονται με αμυντικούς και αποτοξινωτικούς μηχανισμούς. Τα ESTs που κωδικοποιούν για ένζυμα της βιοσυνθετικής οδού των τερπενίων περιελάμβαναν έξι κλώνους που παρουσιάζουν σημαντική ομολογία με τα γονίδια συνθετασών σεσκιτερπενίων (μεταξύ τους η συνθετάση του γερμακρενίου B, όπως χαρακτηρίστηκε λειτουργικά στη συνέχεια), δύο με συνθετάση διτερπενίου και τριών με αυτά ενζύμων που λειτουργούν στα αρχικά στάδια της βιοσύνθεσης των τερπενίων: τη συνθετάση της 5-φωσφορικής-1-δεόξυ-D-ξυλουλόζης και την αναγωγάση του 3-υδρόξυ-3-μεθυλ-γλουτάρουλ-συνενζύμου A (Εικ. 6). Ακολούθησε λειτουργικός χαρακτηρισμός των πέντε συνθετασών τερπενίων καθώς και μελέτη γονιδιακής έκφρασης συνθετασών διτερπενίων και σεσκιτερπενίων σε διάφορους ιστούς και υπό διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες.



Εικόνα 6. Μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης τερπενίων. Με κόκκινο κύκλο επισημαίνονται οι πέντε τερπενικές συνθετάσεις καθώς και τα γονίδια HMGR και DXPS που χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά από την ομάδα μας (από Falara et al., 2008).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η έκφραση των παραπάνω γονιδίων σε διάφορους ιστούς του φυτού και μετά από διάφορες μεταχειρίσεις. Από τις παραπάνω μελέτες προέκυψε ότι τα γονίδια αυτά παρουσιάζουν μεταξύ τους διαφορετικό πρότυπο έκφρασης και ακόμη ότι τα δύο CcGGPPS γονίδια εκφράζονται διαφορετικά κάτω από όλες σχεδόν τις συνθήκες που μελετήθηκαν. Η έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων δεν μεταβάλλεται σημαντικά μέσα στην διάρκεια ενός έτους ή μίας ημέρας, ενώ φαίνεται να ελέγχεται αναπτυξιακά τουλάχιστον στα φύλλα. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα επίπεδα των mRNAs τους ήταν σημαντικά υψηλότερα στα αδενικά τριχώματα, που είχαν απομονωθεί από φύλλα του φυτού σε σχέση με τα ολικά φύλλα. Ακόμη παρατηρήθηκε παροδική αύξηση των mRNAs μετά από τις αβιοτικές καταπονήσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία όπως ήταν η ξηρασία, υψηλές θερμοκρασίες και μηχανικός τραυματισμός ενώ αύξηση παρατηρήθηκε και μετά από προσθήκη ιασμονικού οξέος (Falara et al., 2010, Pateraki & Kanellis, 2010). Οι καταπονήσεις αυτές και ιδίως ο μηχανικός τραυματισμός προκάλεσε τη σύγχρονη σύνθεση και των αντίστοιχων μεταβολιτών (Falara et al., 2010).

Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των πέντε τερπενικών συνθετασών του *C. creticus* subsp. *creticus* (Εικ. 6) επιβεβαίωσε τον κανόνα ότι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η καταλυτική τους δράση οδηγεί στην παραγωγή ενός μίγματος από προϊόντα, ένα εκ των οποίων είναι το κυρίαρχο και δίνει τελικά το όνομά του στο αντίστοιχο ένζυμο. Στην περίπτωση του *C. creticus* subsp. *creticus* προέκυψε ότι η CcTPS2 χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα διφωσφορικό φαρνεσύλιο (FPP) και οδηγεί στην παραγωγή του β-καρυοφυλλενίου ως κύριο προϊόν, και α-καρυοφυλλενίου ως δευτερεύον, οπότε ονομάστηκε συνθετάση β-καρυοφυλλενίου. Η CcTPS3 με υπόστρωμα FPP, οδηγεί στην παραγωγή του κυρίως προϊόντος, β-φαρνεσενίου, και του δευτερεύοντος, α-φαρνεσενίου και μπορεί να ονομαστεί συνθετάση β-φαρνεσενίου. Η CcTPS4 παρουσίασε εξειδίκευση για το υπόστρωμα FPP και οδήγησε στη δημιουργία γερμακρενίου B, ως κύριου προϊόντος, γεγονός που την καθιστά συνθετάση γερμακρενίου B. Η εξειδίκευση της αντίδρασης της CcTPS5 με υπόστρωμα FPP, ως προς την παραγωγή του κύριου προϊόντος, της νερολιδόλης και των δευτερεύοντων προϊόντων α και β φαρνεσενίου, επιτρέπει την ονομασία της CcTPS5 ως συνθετάση νερολιδόλης.

Στη cDNA βιβλιοθήκη από τα τριχώματα του φυτού, όπως προαναφέρθηκε, εντοπίστηκαν δύο πανομοιότυποι κλώνοι που παρουσίαζαν σημαντική ομοιότητα με συνθετάση διφωσφορικού κοπαλαλύου σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας. Το πλήρους μήκους ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο του αντίστοιχου γονιδίου κλωνοποιήθηκε σε προκαρυωτικό φορέα έκφρασης προκειμένου να παραχθεί η αντίστοιχη καθαρή πρωτεΐνη και να πραγματοποιηθεί ο λειτουργικός χαρακτηρισμός της με προσδιορισμό με αέρια χρωματογραφία συνδεδεμένη με φασματογράφο μάζας των προϊόντων της καταλυτικής της δράσης σε υπόστρωμα διφωσφορικό γερανυλ-γερανύλιο. Η αντίδραση μετά από μεταχείριση των προϊόντων της αντίδρασης με φωσφατάση έδωσε ένα προϊόν δομής λαβδανικού διτερπενίου, που αντιστοιχεί στη διφωσφορική λαβδ-13-εν-8α-15-διόλη (Falara et al., 2010). Συνεπώς, το ένζυμο αυτό είναι μια συνθετάση της διφωσφορικής κοπαλ-8-όλης (CcCLS) (Εικ. 4), που καταλύει την παραγωγή μιας ενδιάμεσης ουσίας στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των λαβδανικών διτερπενίων, που περιέχουν οξυγόνο, είναι άφθονα στη ρητίνη του *C. creticus* subsp. *creticus* και έχουν αντικαρκινική δραστικότητα (Falara et al., 2010). Στη συνέχεια, τα τελικά λαβδανικά διτερπένια σχηματίζονται από τις αντίστοιχες συνθετάσες διτερπενίων, π.χ. συνθετάσες των λαβδ-13-εν-8α-15-διόλης, οξειδίων της μανούλης, σκλαρεόλης και λαβδ-7,13-διεν-15-όλης. Παραπέρα, ακετυλοτρανσφεράσες καταλύουν τη βιοσύνθεση του οξικού εστέρα της λαβδ-13-εν-8α-15-διόλης και λαβδ-7,13-διεν-15-όλης (Εικ. 4). Επιβεβαι-

ώνεται λοιπόν, η υπόθεση ενός ενδιάμεσου φωσφορυλιωμένου προϊόντος που κυκλοποιείται περαιτέρω από συνθετάσες λαβδανικών διτερπενίων και οδηγεί στο σχηματισμό εξειδικευμένων διτερπενίων λαβδανικού τύπου. Πρόκειται για την πρώτη χαρακτηρισμένη κυκλάση που σχετίζεται με τη βιοσύνθεση αυτής της κατηγορίας των λαβδανικών διτερπενίων, ανοίγοντας το δρόμο για την διερεύνηση της βιοσύνθεσης αυτής της κατηγορίας των ουσιών. Τρέχουσες μελέτες στην ομάδα μας ασχολούνται με το λειτουργικό χαρακτηρισμό υποψηφίων γονιδίων από *Cistus creticus* που κωδικοποιούν για νέες συνθετάσες και ακετυλοτρανσφεράσες λαβδανικών διτερπενίων.

Συμπεράσματα και Μελλοντικές Εφαρμογές

Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι τα αδενικά τριχώματα του *C. creticus* subsp. *creticus* είναι οι κατασκευές των φύλλων, που περιέχουν όλο το βιοχημικό και μοριακό μηχανισμό (μικρά εργοστάσια), που παράγουν τις ουσίες με φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Μέρος του μηχανισμού αυτού έχει ήδη εξερευνηθεί, όπως ήδη παρουσιάστηκε. Παραπέρα, παράλληλα ευρήματα θέτουν τη βάση για την κατανόηση του μηχανισμού μορφογένεσης των αδενικών τριχωμάτων στο ίδιο φυτό (Ιωαννίδη, 2009). Αθροιστικά τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με άλλες τρέχουσες μελέτες στην ομάδα μας πάνω στο κρητικό φασκόμηλο (*Salvia fruticosa*) και στο δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*) θα μας βοηθήσουν, αρχικά να εξερευνήσουμε τα βιοχημικά μονοπάτια που βιοσυνθέτουν τις πολύτιμες αυτές ουσίες. Στη συνέχεια υπερέκφραση τους σε φυτά καπνού θα πιστοποιήσει τη λειτουργικότητά τους *in vivo* και επίσης τη δυνατότητα να αξιοποιηθούν ως μοριακοί δείκτες για μελλοντική επιλογή κλώνων και γενικότερα στη γενετική βελτίωση των ήδη υπαρχόντων πληθυσμών λαδανιάς στην Κρήτη ως προς την υψηλή παραγωγή λαβδανικών διτερπενίων.

Μη-εδώδιμα φυτά, με μερικές εξαιρέσεις όπως π.χ. ο καπνός, έχουν μελετηθεί ελάχιστα από γενετική ή φυσιολογική άποψη. Οι σύγχρονες προσεγγίσεις της μεταβολικής και γονιδιωματικής μπορούν να κάνουν δυνατή τη μελέτη των ιδιαιτεροτήτων των φυτών αυτών, όπως π.χ. παραγωγή βιοδραστικών μορίων σε μοριακό επίπεδο και συνεπώς να συνεισφέρουν στη βελτίωση της παραγωγικότητας και βιοποικιλότητας. Η εξερευνήση βιοχημικών μονοπατιών που οδηγούν στη βιοσύνθεση λαβδανικών διτερπενίων στη λαδανιά, θα μας δώσει τη δυνατότητα ανάπτυξης εναλλακτικών και βελτιωμένων μεθόδων παραγωγής στο σακχαρομύκητα και στον καπνό.

Η ανάλυση, η απομόνωση και η ταυτοποίηση βιοδραστικών ουσιών από τη λαδανιά θα δώσει τη δυνατότητα εξερεύνησης νέων μορίων με ποικιλία δράσεων (π.χ. αντιϊκή ή νευροπροστατευτική δράση). Τα μόρια αυτά μπορεί να εμπλουτιστούν με την εφαρμογή της συνδυαστικής βιοσύνθεσης (combinatorial biosynthesis) στο καπνό. Επίσης, ο έλεγχος της βιολογικής δράσης των νέων ουσιών θα συμβάλλει στην κατανόηση της σχέσης δομής-δράσης (SARs structure-activity relationships) των μορίων αυτών και συνεπώς στη δυνατότητα σχεδιασμού και σύνθεσης νέων περισσότερο βιοδραστικών μορίων.

Σημειώνουμε επίσης ότι το λάδανο έχει ήδη προσελκύσει το ενδιαφέρον μεγάλων ελληνικών εταιρειών αρωματικών-φαρμακευτικών προϊόντων και καλλυντικών και η ρητίνη του χρησιμοποιείται ήδη σε ορισμένα από τα προϊόντα αυτά. Πιστεύουμε ότι η προοπτική της βελτίωσης του *Cistus creticus* subsp. *creticus* θα συμβάλλει στη βελτίωση της ανταγωνιστικότητας του κλάδου των ελληνικών φαρμακευτικών και κοσμητολογικών εταιρειών με την απόκτηση όχι μόνο τεχνογνωσίας αλλά και τη δημιουργία τεχνολογικής υποδομής για την αξιοποίηση ενός πολύ σημαντικού γένους της ελληνικής χλωρίδας. Με την εισαγωγή της καλλιέργειας νέων βελτιωμένων φυτών η τοπική παραγωγή δε θα έχει πλέον ως μοναδικό στόχο την περιορισμένη εμ-

βέλειας παραδοσιακή αρωματοποιία αλλά και την παραγωγή φαρμακευτικών ουσιών υψηλής πρόσθετης αξίας. Τονίζουμε ότι η χώρα μας πρέπει να εκμεταλλευθεί την προνομιακή γεωγραφική της θέση, η οποία της έχει χαρίσει ένα μεγάλο αριθμό αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών. Δυστυχώς αυτή η πλούσια πηγή βιολογικής ποικιλότητας μένει ανεκμετάλλευτη ή προσεγγίζεται περιστασιακά και ερασιτεχνικά. Η στροφή προς μία επιστημονική προσέγγιση μπορεί να αλλάξει ριζικά αυτό το τοπίο. Η Ελλάδα υστερεί στον τομέα αυτό, ο οποίος ανθεί στις υπόλοιπες χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης και των Ηνωμένων Πολιτειών και γι' αυτόν το λόγο η πολιτεία οφείλει να δώσει κίνητρα στην επιστημονική και την επιχειρηματική κοινότητα να αναπτυχθεί και προς αυτήν την κατεύθυνση.

Ευχαριστίες

Τα αποτελέσματα που αναφέρονται χρηματοδοτήθηκαν από ερευνητικά προγράμματα της Γενικής Γραμματείας Έρευνας και Τεχνολογίας στον επιστημονικό υπεύθυνο της Ομάδας (GR-USA-033, ΠΕΝΕΔ 99ED 637, ΠΕΝΕΔ 2001-01ED416, ΠΕΝΕΔ 875-03ED).

Βιβλιογραφία

- Alagna, F., D'Agostino, N., Torchia, L., Servili, M., Rao, R., Pietrella, M., et al. 2009. Comparative 454 pyrosequencing of transcripts from two olive genotypes during fruit development. *BMC Genomics* 10:399.
- Angelopoulou, D., Demetzos, C., Dimas, C., Perdetzoglou, D. and Loukis, A. 2001. Essential oils and hexane extracts from leaves and fruits of *Cistus monspeliensis*. Cytotoxic activity of ent-13-epi-manoyl oxide and its isomers. *Planta Med.* 67:168-171.
- Aronne, G. and De Micco, V. 2001. Seasonal Dimorphism in the Mediterranean *Cistus incanus* L. subsp. *incanus*. *Ann. Bot.* 87:789-794.
- Attaguile, G., Russo, A., Campisi, A., Savoca, F., Acquaviva, R., Ragusa, N., et al. 2000. Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. *Cell Biol. Toxicol.* 16:83-90.
- Bazina, E., Makris, A., Vender, C. and Skoula, M. 2002. Genetic and Chemical Relations Among Selected Clones of *Salvia officinalis*. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants.* 9:269-274.
- Butler, M.S. and Newman, D.J. 2008. Mother Nature's gifts to diseases of man: the impact of natural products on anti-infective, anticholesteremics and anticancer drug discovery. p. 3-44. In: F. Petersen and R. Amstutz (eds.), *Progress in Drug Research*, Vol. 65, Issue 1, Birkhäuser Verlag AG, Basel.
- Caniard, A., Zerbe, P., Legrand, S., Cohade, A., Valot, N., Magnard, J.-L., Bohlmann, J. and Legendre, L. 2012. Discovery and functional characterization of two diterpene synthases for sclareol biosynthesis in *Salvia sclarea* (L.) and their relevance for perfumemanufacture. *BMC Plant Biol.* 12:119.
- Chang, M.C. and Keasling, J.D. 2006. Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. *Nat Chem Biol.* 2:674-681.
- Chatzopoulou, F.M., Makris, A.M., Argiriou, A., Degenhardt, J. and Kanellis, A.K. 2010. EST analysis and annotation of transcripts derived from a trichome-specific cDNA library from *Salvia fruticosa*. *Plant Cell Rep.* 29:523-534.
- Chinou, I., Demetzos, C., Harvala, C., Roussakis, C. and Verbist, J.F. 1994. Cytotoxic and antibacterial labdane-type diterpenes from the aerial parts of *Cistus incanus* subsp. *creticus*. *Planta Med.* 60:34-36.
- Chirkina, N.N. and Patudin, A.V. 1971. Antimicrobial properties of essential oils and aromatic resins from species of the genus *Cistus* L. cultivated in the Crimea. *Nauchnye doklady vysshei shkoly Biologicheskie nauki.* 11:100-103.
- Demetzos, C., Anastasaki, T. and Perdetzoglou, D. 2002. A chemometric interpopulation study of the essential oils of *Cistus creticus* L. growing in Crete (Greece). *Z. Naturforsch. C.* 57:89-94.
- Demetzos, C., Katerinopoulos, H., Kouvarakis, A., Stratigakis, N., Loukis, A. Ekonomakis, C., et al. 1997. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*. *Planta Med.* 63:477-479.
- Demetzos, C., Mitaku, S., Couladis, M., Harvala, C. and Kokkinopoulos, D. 1994. Natural Metabolites of ent-13-epi-Manoyl Oxide and Other Cytotoxic Diterpenes from the Resin «LADANO» of *Cistus creticus*. *Planta Med.* 60:590-591.
- Dimas, K., Demetzos, C., Marsellos, M., Sotiriadou, R., Malamas, M. and Kokkinopoulos, D. 1998. Cytotoxic activity of labdane type diterpenes against human leukemic cell lines in vitro. *Planta Med.* 64:208-211.
- Dimas, K., Kokkinopoulos, D., Demetzos, C., Vaos, B., Marsellos, M., Malamas, M., et al. 1999. The effect of sclareol on growth and cell cycle progression of human leukemic cell lines. *Leukemia Res.* 23:217-234.
- Dimas, K., Papadaki, M., Tsimplouli, C., Hatziantoniou, S., Alevizopoulos, K., Pantazis, P., et al. 2006. Labd-14-ene-8,13-diol (sclareol) induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells and enhances the activity of anti-cancer drugs. *Biomed Pharmacother.* 60:127-133.
- Engels, B., Dahm, P. and Jennewein, S. 2008. Metabolic engineering of taxadiene biosynthesis in yeast as a first step towards Taxol (Paclitaxel) production. *Metab. Eng.* 10:201-206.
- Falara, V., Fotopoulos, V., Margaritis, T., Anastasaki, T., Pateraki, I., Bosabalidis, A.M., Kafetzopoulos, D., Demetzos, C., Pichersky, E. and Kanellis, A.K. 2008. Transcriptome analysis approaches for the isolation of trichome-specific genes from the medicinal plant *Cistus creticus* subsp. *creticus*. *Plant Mol. Biol.* 68:633-651.
- Falara, V., Pichersky, E. and Kanellis, A.K. 2010. A copal-8-ol diphosphate synthase from the angiosperm *Cistus creticus* subsp. *creticus* is a putative key enzyme for the formation of pharmacologically active, oxygen-containing labdane-type diterpenes. *Plant Physiol.* 154:301-310.
- Fridman, E., Wang, J., Iijima, Y., Froehlich, J.E., Gang, D.R., Ohrogge, J., et al. 2005. Metabolic, genomic, and biochemical analyses of glandular trichomes from the wild tomato species *Lycopersicon hirsutum* identify a key enzyme in the biosynthesis of methylketones. *Plant Cell.* 17:1252-1267.
- Gang, D.R., Wang, J., Dudareva, N., Nam, K.H., Simon, J.E., Lewinsohn, E., et al. 2001. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. *Plant Physiol.* 125:539-555.
- Gounaris, Y., Skoula, M., Fournarakis, C., Drakakaki, G. and Makris, A. 2002. Comparison of essential oils and genetic relationship of *Origanum X intercedens* to its parental taxa in the island of Crete. *Biochem. Syst. Ecol.* 30:249-258.
- Julsing, M.K., Koulman, A., Woerdenbag, H.J., Quax, W.J. and Kayser, O. 2006. Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites. *Biomol. Eng.* 23:265-279.

- Kirby, J. and Keasling, J.D. 2009. Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60:335-355.
- Kyrikou, I., Georgopoulos, A., Hatziantoniou, S., Mavromoustakos, T. and Demetzos, C. 2005. A comparative study of the effects of cholesterol and sclareol, a bioactive labdane type diterpene, on phospholipid bilayers. *Chem. Phys. Lipids* 133:125-134.
- Lange, B.M., Wildung, M.R., Stauber, E.J., Sanchez, C., Pouchnik, D. and Croteau, R. 2000. Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:2934-2939.
- Lister, R., Gregory, B.D. and Ecker, J.R. 2009. Next is now: new technologies for sequencing of genomes, transcriptomes, and beyond. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12:107-118.
- Mafu, S., Hillwig, M.L. and Peters, R.J. 2011. A novel labda-7,13e-dien-15-ol-producing bifunctional diterpene synthase from *Selaginella moellendorffii*. *ChemBioChem.* 12:1984-1987.
- Matsingou, C., Hatziantoniou, S., Georgopoulos, A., Dimas, K., Terzis, A. and Demetzos, C. 2005. Labdane-type diterpenes: thermal effects on phospholipid bilayers, incorporation into liposomes and biological activity. *Chem. Phys. Lipids* 138:1-11.
- McGarvey, D.J. and Croteau, R. 1995. Terpenoid metabolism. *Plant Cell* 7:1015-1026.
- Paolini, J., Falchi, A., Quilichini, Y., Desjober, J.M., Cian, M.C., Varesi, L. et al. 2009. Morphological, chemical and genetic differentiation of two subspecies of *Cistus creticus* L. (*C. creticus* subsp. *eriocephalus* and *C. creticus* subsp. *coriscus*). *Phytochemistry* 70:1146-1160.
- Pateraki, I. and Kanellis, A.K. 2004. Isolation of high-quality nucleic acids from *Cistus creticus* ssp. *creticus* and other medicinal plants. *Analytical Biochemistry* 328:90-92.
- Pateraki, I. and Kanellis, A.K. 2008. Isolation and functional analysis of two *Cistus creticus* cDNAs encoding geranyl-geranyl diphosphate synthase. *Phytochemistry* 69:1641-1652.
- Pateraki, I. and Kanellis, A.K. 2010. Stress and developmental responses of terpenoid biosynthetic genes in *Cistus creticus* subsp. *creticus*. *Plant Cell Rep.* 29:629-641.
- Phillips, D.R., Rasberry, J.M., Bartel, B. and Matsuda, S.P. 2006. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9:305-314.
- Ro, D.K., Paradise, E.M., Ouellet, M., Fisher, K.J., Newman, K.L., Ndungu, J.M., et al. 2006. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* 440:940-943.
- Roberts, S.C. 2007. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nat. Chem. Biol.* 3:387-395.
- Sadhu, S.K., Okuyama, E., Fujimoto, H., Ishibashi, M. and Yesilada, E. 2006. Prostaglandin inhibitory and antioxidant components of *Cistus laurifolius*, a Turkish medicinal plant. *J. Ethnopharmacol.* 108:371-378.
- Saloustros, E., Mavroudis, D. and Georgoulas, V. 2008. Paclitaxel and docetaxel in the treatment of breast cancer. *Expert Opin. Pharmacol.* 9:2603-2616.
- Schalk, M., Firmenich, S.A., 2008. Method for producing sclareol. Geneva, Switzerland. Patent application WO2009/095366 A1.
- Shanks, J.V. and Morgan, J. 1999. Plant 'hairy root' culture. *Curr. Opin. Biotech.* 10:151-155.
- Skoula, M., Abbes, J.E. and Johnson, C.B. 2000. Genetic variation of volatiles and rosmarinic acid in populations of *Salvia fruticosa* mill growing in Crete. *Biochem. Syst. Ecol.* 28:551-561.
- Skoula, M., El-Hilali, I. and Makris, A. 1999. Evaluation of the genetic diversity in *Salvia fruticosa* clones using RAPD markers and comparison with the chemotypic profiles. *Biochem. Syst. Ecol.* 27:559-568.
- Sonah, H., Deshmukh, R.K., Singh, V.P., Gupta, D.K., Singh, N.K. and Sharma, T.R. 2011. Genomic resources in horticultural crops: status, utility and challenges. *Biotechnol. Adv.* 29:199-209.
- Tattini, M., Matteini, P., Saracini, E., Traversi, M.L., Giordano, C. and Agati, G. 2007. Morphology and biochemistry of non-glandular trichomes in *Cistus salvifolius* L. leaves growing in extreme habitats of the Mediterranean basin. *Plant Biol.* 9:411-419.
- Vasey, P.A. 2008. Ovarian cancer: front-line standard treatment in 2008. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 19, Suppl 7:vii61-6.
- Zhong, J. 2002. Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. *J. Biosci. Bioeng.* 94:591-599.
- Δεμέτζος, K. 1990. Μελέτη χημικών συστατικών του φυτού *Cistus incanus* subsp. *creticus*. Φαρμακευτικό Τμήμα, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- Δεμέτζος, K. 1996. Η χημική σύσταση και η φαρμακολογική δράση της ριτίνης λάδανο. Το Κρητικό Λάδανο, Διήμερο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο της ελληνικής Εταιρείας Εθνοφαρμακολογίας, Μπαλλί Ρεθύμνου.
- Ιωαννίδη, E. 2009. Μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τη δημιουργία και τη διαφοροποίηση των τριχωμάτων στα φύλλα του *Cistus creticus* subsp. *creticus*. Διδακτορική διατριβή, Αριστοτελείο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακολογίας-Φαρμακογνωσίας.
- Χαβάκη, I.E. 1970. Τα φυτά και Βότανα της Κρήτης. Εκδόσεις Ζήτα, Αθήνα.