

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ

**« ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΑΤΡ ΩΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ
ΤΗΣ 15-ΛΙΠΟΞΥΓΕΝΑΣΗΣ-1»**

ΜΑΡΙΑ ΒΡΑΧΝΑ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΕΛΕΥΘΕΡΙΑΔΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2024

**UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

BACHELOR THESIS

LABORATORY OF BIOPHYSICAL CHEMISTRY



BACHELOR EDUCATIONAL DEGREE

**« STUDY OF ATP AS A SUBSTRATE OF
15-LIPOXYGENASE-1 »**

MARIA VRACHNA

Bachelor Thesis Supervisor: ELEYTHERIADIS NIKOLAOS

HERAKLION 2024

Εξεταστική Επιτροπή

Ελευθεριάδης Νικόλαος

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Τομέας Βιοχημείας,

Πανεπιστήμιο Κρήτης (Επιβλέπων)

Γανωτάκης Δημήτριος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Τομέας Βιοχημείας,

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοφυσικής Χημείας του τμήματος Χημείας στο Πανεπιστήμιο Κρήτης κατά το χρονικό διάστημα το χειμερινού εξαμήνου 2023-2024.

Με το πέρας της εργασίας μου θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου που συνέβαλλαν σε αυτή και βοήθησαν στην ολοκλήρωση της.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επίκουρο καθηγητή κύριο Ελευθεριάδη Νικόλαο για την εμπιστοσύνη του να με δεχτεί στο εργαστήριο του και να μου αναθέσει το συγκεκριμένο θέμα. Με τις κατατοπιστικές συμβουλές, τις υποδείξεις και την καθοδήγηση του κατάφερα να κατέχω μια ολοκληρωμένη διπλωματική εργασία και να πετύχω τους στόχους μου για την ίδια.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταπτυχιακό φοιτητή Χρήστο Παπαδόπουλο για την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε στο πλαίσιο της εκπόνησης της εργασίας μου καθώς και για την συνεχή βοήθεια, επίβλεψη και κατανόηση που μου έδειξε.

Ακόμη, οφείλω να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέρη του εργαστηρίου, τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Μάνο Γιώτα και Ντανιέλα Σπάχο όπως και την Σεμίνα Κουτσογιάννη για την υποστήριξη τους.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή κύριο Γανωτάκη Δημήτριο που δέχτηκε να αξιολογήσει εξίσου την διπλωματική μου εργασία.

Περίληψη

Η 15-λιποξυγενάση-1 (15-LOX-1) είναι ένα βασικό ένζυμο στα κύτταρα των θηλαστικών, που εμπλέκεται κυρίως στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα του ανοσοποιητικού συστήματος και των επιθηλιακών κυττάρων και στοχεύει σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα όπως το αραχιδονικό και το λινολεϊκό οξύ. Καταλύοντας την οξυγόνωση των λιπαρών οξέων στη 15^η θέση άνθρακα, παράγει παράγωγα υδροϋπεροξυεικοσατετραενοϊκού οξέος (HPETE), που χρησιμεύουν ως πρόδρομα μόρια όπως ως βιοδραστικοί μεσολαβητές λιπιδίων. Η σημασία της 15-LOX-1 εκτείνεται σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένων των φλεγμονών, της αθηροσκλήρωσης, του καρκίνου και των νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Συνολικά, η 15-λιποξυγενάση-1 χαρακτηρίζεται ως ένα πολύπλευρο, σημαντικό ένζυμο για τον μεταβολισμό των λιπιδίων και την κυτταρική φυσιολογία, καθιστώντας το έτσι πρωταρχικό στόχο για θεραπευτικές παρεμβάσεις σε διαφορετικές παθήσεις. Στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία, παρουσιάζεται αρχικά η διαδικασία ετερόλογης έκφρασης και καθαρισμού του ενζύμου και μετέπειτα εξετάζεται η ικανότητα υδρόλυσης του ATP παράγοντας ADP και ανόργανο φώσφορο. Αφού διαπιστώθηκε η υδρόλυση ATP από το ένζυμο και ποσοτικοποιήθηκε, εξετάστηκαν παράγοντες που πιθανώς επηρεάζουν το ποσοστό υδρόλυσης, όπως διαφορετικές συγκεντρώσεις του ATP και του ενζύμου, ο χρόνος επώασης της αντίδρασης και η θερμοκή επώαση του ενζύμου σε διάφορες θερμοκρασίες. Ύστερα, διερευνήθηκε η αναστολή της καταλυτικής υδρόλυσης ATP με τη χρήση δύο αναστολέων και η εξάρτηση της υδρόλυσης ATP υπό την παρουσία υποστρώματος. Τέλος, μελετήθηκε η αντίδραση υδρόλυσης ATP από το ένζυμο υπό την συνύπαρξη τόσο του υποστρώματος του ενζύμου όσο και ενός συναγωνιστικού αναστολέα.

Λέξεις Κλειδιά: 15-Λιποξυγενάση-1, υδρόλυση ATP, ετερόλογη έκφραση, καθαρισμός πρωτεΐνης, ποσοτικοποίηση ATP, παράγοντες που επηρεάζουν την υδρόλυση του ATP.

Abstract

15-Lipoxygenase-1 (15-LOX-1) is a key enzyme in mammalian cells, mainly involved in lipid metabolism. It is located in the cytoplasm of immune and epithelial cells and targets polyunsaturated fatty acids such as arachidonic and linoleic acids. By catalyzing the oxygenation of fatty acids at the 15th carbon position, it produces hydroperoxyacetate tetraenoic acid derivatives (HPETE), which serve as precursors such as lipid bioactive mediators. The importance of 15- LOX-1 extends to various physiological and pathological processes, including inflammation, atherosclerosis, cancer and neurodegenerative diseases. Overall, 15-lipoxygenase-1 is characterized as a multifaceted, important enzyme for lipid metabolism and cellular physiology, thus making it a prime target for therapeutic interventions in different diseases. In this thesis, the heterologous expression and purification process of the enzyme is first presented and then the ability to hydrolyze ATP by ADT and inorganic phosphorus is examined. After the hydrolysis of ATP by the enzyme was established and quantified, factors likely to affect the rate of hydrolysis were examined, such as different concentrations of ATP and enzyme, reaction incubation time and thermal incubation of the enzyme at different temperatures. Then, the inhibition of catalytic ATP hydrolysis using two inhibitors and the dependence of ATP hydrolysis under the presence of substrate were investigated. Finally, the ATP hydrolysis reaction of the enzyme under the coexistence of both the enzyme substrate and a synergistic inhibitor was studied.

Keywords: 15-Lipoxygenase-1, ATP hydrolysis, heterologous expression, protein purification, ATP quantification, factors affecting ATP hydrolysis.

Πίνακας περιεχομένων

Ενότητα 1: Θεωρητική Εισαγωγή.....	6
1.1 Ταξινόμηση Λιποξυγενασών.....	6
1.2 Πολλαπλή καταλυτική δραστηριότητα της 15-λιποξυγενάσης.....	6
1.2.1 Καταλυτικός μηχανισμός της λιποξυγενάσης.....	7
1.2.2 Καταλυτικός μηχανισμός λιποϋδροϋπεροξυγενάσης.....	8
1.2.3 Καταλυτική δραστηριότητα συνθετάσης λευκοτριενίων.....	9
1.3 Υποστρώματα 15-λιποξυγενάσης.....	10
1.3.1 Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.....	10
1.3.2 Φωσφολιπίδια και εστέρες χοληστερόλης.....	11
1.3.3 Βιομεμβράνες και λιποπρωτεΐνες.....	11
1.4 Προϊόντα της 15-λιποξυγενάσης-1.....	12
1.5 Δομή της 15-λιποξυγενάσης-1.....	15
1.5.1 N-τελική επικράτεια της 15-λιποξυγενάσης-1.....	16
1.5.2 C-τελική επικράτεια της 15-λιποξυγενάσης-1.....	16
1.6 Βιολογικός ρόλος της 15-λιποξυγενάσης-1.....	18
1.6.1 Βιοδραστηριότητα της 15-λιποξυγενάσης-1.....	18
1.6.2 Η 15-λιποξυγενάση-1 στην ωρίμανση των δικτυοερυθροκυττάρων.....	19
1.6.3 Η εμπλοκή της 15-λιποξυγενάσης-1 στον κυτταρικό θάνατο.....	19
1.6.4 Βιολογικός ρόλος των προϊόντων της 15-λιποξυγενάσης-1.....	20
1.6.5 Παθολογίες στην οποίες εμπλέκεται η 15-λιποξυγενάση-1.....	23
1.7 Συνθήκες της αντίδρασης οξυγόνωσης λιπαρών οξέων.....	24
Ενότητα 2: Ετερόλογη έκφραση της 15-LOX-1 σε βακτηριακά κύτταρα.....	25
2.1 Πειραματικό μέρος.....	25
2.1.1 Μετασχηματισμός βακτηρίων.....	25
2.1.2 Υγρή προκαλλιέργεια βακτηρίων.....	26
2.1.3 Υγρή καλλιέργεια βακτηρίων.....	26
2.1.4 Συλλογή καλλιέργειας.....	27
2.1.5 Καθαρισμός της 15-λιποξυγενάσης-1.....	29
2.1.6 Προσδιορισμός συνολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford.....	32
2.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	33
2.2.1 Ετερόλογη έκφραση της 15-λιποξυγενάσης-1.....	33
2.2.2 Καθαρισμός της 15-λιποξυγενάσης-1.....	34
2.2.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford.....	35
Ενότητα 3: ATPase Activity της 15-LOX-1.....	37
3.1 Πειραματικό Μέρος.....	37
3.1.1 ATPase Activity Assay.....	37
3.1.2 Προσδιορισμός της ποσότητας ATP που καταναλώνεται από την 15-λιποξυγενάση -1.....	39
3.1.3 Εξάρτηση υδρόλυσης ATP από την συγκέντρωση του ATP.....	40
3.1.4 Αναστολή της ATPase.....	41
3.1.5 Μελέτη της ATPase Activity σε συνάρτηση με τον χρόνο επώασης της αντίδρασης.....	43
3.1.6 Μελέτη της ATPase Activity χρησιμοποιώντας διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης της 15-λιποξυγενάσης-1.....	44
3.1.7 Εξάρτηση της ATPase activity της 15-λιποξυγενάσης-1 από την παρουσία υποστρώματος.....	45

3.1.8 Εξάρτηση της ATPase activity της 15-λιποξυγενάσης-1 από την παρουσία υποστρώματος και ενός συναγωνιστικού αναστολέα.....	49
3.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	51
3.2.1 Υδρόλυση ATP από την 15-LOX-1.....	51
3.2.2 Ποσοτικοποίηση Υδρόλυσης ATP.....	53
3.2.3 Εξάρτηση Υδρόλυσης ATP από την συγκέντρωση του ATP.....	55
3.2.4 Αναστολή της ATPase.....	57
3.2.5 Επίδραση του χρόνου επώασης της αντίδρασης στην υδρόλυση του ATP.....	59
3.2.6 Επίδραση της επώασης του ενζύμου σε διαφορετικές θερμοκρασίες στην καταλυτική αντίδραση.....	60
3.2.7 Υδρόλυση του ATP από την 15-LOX-1 υπό την παρουσία υποστρώματος.....	62
3.2.8 Υδρόλυση του ATP από την 15-λιποξυγενάσης-1 υπό την παρουσία υποστρώματος και ενός συναγωνιστικού αναστολέα.....	64
Βιβλιογραφία.....	66

Ενότητα 1: Θεωρητική Εισαγωγή

1.1 Ταξινόμηση Λιποξυγενασών

Η 15-λιποξυγενάση-1 που μελετάται στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία, αποτελεί μέλος της οικογένειας των λιποξυγενασών. Οι λιποξυγενάσες είναι ένζυμα υπεύθυνα για την καταλυτική διοξυγόνωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, ορισμένων λιποπρωτεϊνών και φωσφολιπιδίων προς τα αντίστοιχα υδροϋπεροξειδιομένα προϊόντα τους.

Τα γονίδια των λιποξυγενασών συναντώνται ευρέως στο ευκαρυωτικό γονιδίωμα και σπανιότερα στο βακτηριακό. Ειδικότερα, στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, χαρτογραφούνται έξι γονίδια λιποξυγενασών εκφράζοντας έξι ισομορφές λιποξυγενάσης. Τα γονίδια αυτά είναι τα ALOX5, ALOX12, ALOX12B, ALOX15, ALOX15B και το ALOX15E ⁱ.

Οι διαφορετικές ισομορφές της λιποξυγενάσης ορίζονται με βάση το υπόστρωμα τους και την θέση που εισάγουν το μόριο του διοξυγόνου. Για παράδειγμα, η 15-λιποξυγενάση, χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα το αραχιδονικό οξύ και το οξυγωνώνει στον 15^ο άνθρακα της αλυσίδας του. Για τον λόγο αυτό ονομάζεται και 15-λιποξυγενάση. Εξάλλως, η 15-λιποξυγενάση μπορεί να υπάρξει σε δύο ισομορφές, την 15-λιποξυγενάση-1 και την 15-λιποξυγενάση-2. Οι δύο αυτές διαφορετικές ισομορφές διαφέρουν κυρίως στην διαφορετική προτίμηση τους στα υποστρώματα και τα προϊόντα που παράγουν ⁱⁱ. Πιο συγκεκριμένα, η 15-λιποξυγενάση-1 προσδένει καλύτερα το λινολεϊκό οξύ παράγοντας το 13-HpODE ενώ η 15-λιποξυγενάση-2 προτιμά το αραχιδονικό οξύ παράγοντας 15-HpETE. Τα ένζυμα αυτά εκφράζονται κυρίως σε μακροφάγα, δικτυοερυθροκύτταρα κατά την διάρκεια της ερυθροποίησης, επιθηλιακά πνευμονικά κύτταρα, κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και σε ορισμένα εγκεφαλικά κύτταρα.

1.2 Πολλαπλή καταλυτική δραστηριότητα της 15-λιποξυγενάσης

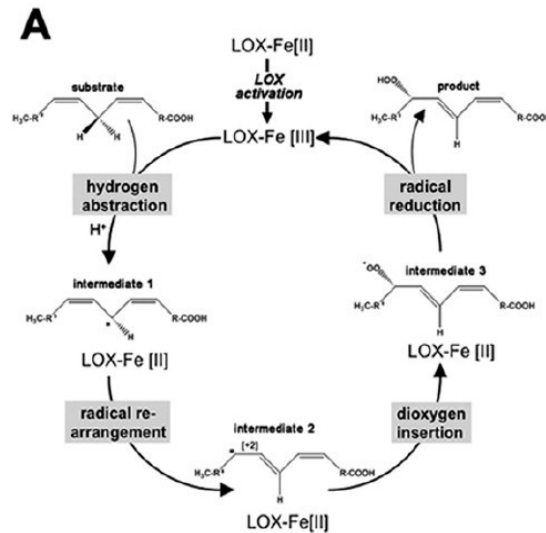
Η 15-λιποξυγενάση έχει την ιδιότητα να καταλύει ένα σύνολο αντιδράσεων σε συγκεκριμένα μόρια αποκτώντας μια πολλαπλή καταλυτική δράση ⁱⁱⁱ. Ειδικότερα, η αντίδραση που χαρακτηρίζει το ένζυμο αυτό είναι η οξυγόνωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων με επακόλουθη παραγωγή των

υδροϋπεροξειδιωμενων προϊόντων τους. Έτσι, το ένζυμο χαρακτηρίζεται ως μια λιπο-υδροϋπεροξειδάση. Μπορεί επίσης να καταλύσει την μετατροπή αυτών των υδροϋπεροξειδιωμένων προϊόντων σε δευτερογενή υδροϋπεροξειδιωμένα προϊόντα τα οποία δρουν ως σηματοδοτικά μόρια. Παρόμοιας λειτουργίας προϊόντα προκύπτουν και όταν η 15-λιποξυγενάση μετατρέπει τα υδροϋπεροξειδία των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία περιέχουν ένα συζυγιακό σύστημα διενίου στο μόριο τους, σε εποξειδία εικοσινοειδών, που φέρουν ένα συζυγιακό σύστημα τριενίου.

◆ 1.2.1 Καταλυτικός μηχανισμός της λιποξυγενάσης

Αρχικά, για να ξεκινήσει η αντίδραση απαιτείται ενεργοποίηση του ενζύμου. Η 15-λιποξυγενάση περιέχει εκτός των άλλων ένα ιόν σιδήρου Fe^{2+} στο ενεργό της κέντρο. Για να χαρακτηριστεί το ένζυμο καταλυτικά ενεργό, ο σίδηρος Fe^{2+} πρέπει να μετατραπεί σε σίδηρο Fe^{3+} μέσω μιας αντίδρασης οξειδωσης που καθιστά την πρωτεΐνη δραστική.

Αφού ενεργοποιηθεί το ένζυμο, είναι ικανό να ξεκινήσει την διαδικασία της οξυγόνωσης του υποστρώματος του, αποσπώντας ως πρώτο βήμα, ένα άτομο υδρογόνου από το δις-αλλυλικό μεθυλένιο του υποστρώματος ^{iv}. Με την απόσπαση αυτή, προκύπτει μια ρίζα στη θέση της απόσπασης η οποία μετατοπίζεται δύο θέσεις πιο μετά, επομένως η ρίζα αναδιατάσσεται στο ενδιάμεσο προϊόν που προέκυψε. Στο επόμενο στάδιο, το μόριο του οξυγόνου καταλαμβάνει μια θέση στο ενεργό κέντρο του ενζύμου ώστε να λάβει χώρα η διοξυγόνωση του ενδιάμεσου. Έτσι δημιουργείται μια ένωση η οποία αποτελείται από μια ρίζα υδροϋπεροξειδίου. Στο τελικό στάδιο της αντίδρασης, η ρίζα υδροϋπεροξειδίου ανάγεται και προκύπτει το τελικό προϊόν, ενώ ταυτόχρονα ο σίδηρος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου οξειδώνεται ξανά και γίνεται τρισθενής (Fe^{3+}) επειδή κατά την διάρκεια της αντίδρασης είχε αναχθεί σε δισθενή (Fe^{2+}).

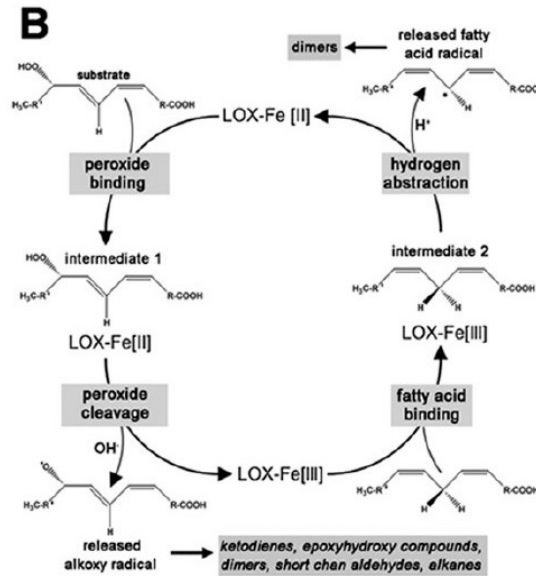


Εικόνα 1: Μηχανισμός αντίδρασης οξυγόνωσης καταλυόμενης από το ένζυμο 15-λιποξυγενάση-1. Επίσης φαίνεται το διαφορετικό σθένος του Fe στα στάδια της αντίδρασης καθώς και η ενεργοποίηση του ενζύμου.

◆ 1.2.2 Καταλυτικός μηχανισμός λιποϋδροϋπεροξυγενάσης

Για την καταλυτική αντίδραση της λιποϋδροϋπεροξυγενάσης, το ένζυμο πρέπει να ενεργοποιηθεί με τον ίδιο τρόπο όπως στην αντίδραση οξυγόνωσης, μέσω δηλαδή μιας αντίδρασης οξειδωσης που θα μετατρέψει τον Fe^{2+} σε Fe^{3+} . Ύστερα από την ενεργοποίηση του ενζύμου και αφού έχει προσδεθεί στο ενεργό του κέντρο ένα μόριο υδροϋπεροξειδίου, πραγματοποιείται ομολυτική διάσπαση του δεσμού του. Η διάσπαση αυτή έχει ως αποτέλεσμα ένα ενδιάμεσο μόριο που αποτελείται από μια αλκόξυ ρίζα και ταυτόχρονα απελευθερώνει μια ρίζα υδροξυλίου. Η ρίζα αυτή είναι ικανή να αντιδράσει με άλλα μόρια και να δημιουργήσει μόρια όπως εποξειδία, αλκάνια, κετοδιένια ακόμα και αλδεϋδες με μικρή αλυσίδα. Επίσης, στο στάδιο αυτό της αντίδρασης, ο σίδηρος (Fe^{2+}) στο ενεργό κέντρο του ενζύμου οξειδώνεται σε τρισθενή σίδηρο (Fe^{3+}). Τέλος, ένα λιπαρό οξύ δεσμεύεται στο ενεργό κέντρο και καταλύεται μια απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου από ένα δις-αλλυλικό μεθυλένιο, ενώ παράλληλα ο σίδηρος ανάγεται. Έτσι σχηματίζεται ένα λιπαρό οξύ που φέρει μια ρίζα πάνω στο άτομο άνθρακα από το οποίο αποσπάστηκε το υδρογόνο.

Το προϊόν αυτό απελευθερώνεται από το ένζυμο και μπορεί πλέον να αντιδράσει με δευτερογενείς ελεύθερες ρίζες προς παραγωγή οξυγονωμένων και μη διμερών λινολεϊκού οξέος.



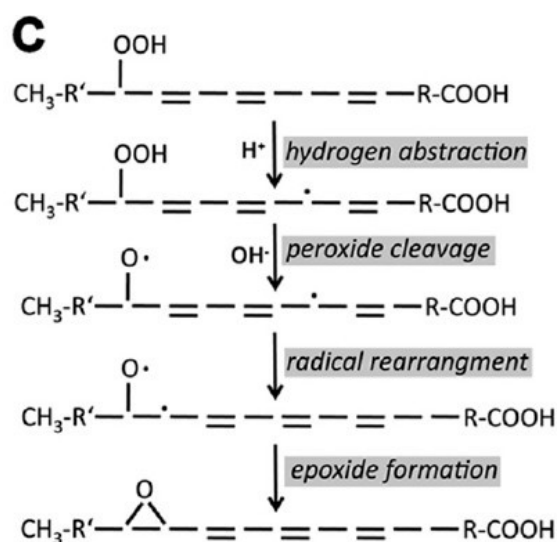
Εικόνα 2: Καταλυτικός μηχανισμός αντίδρασης της λιπούδροϋπεροξυγενάσης.

Αξίζει να τονιστεί ότι η παραπάνω αντίδραση έχει παρατηρηθεί στην 15-λιποξυγενάση που απομονώθηκε από κουνέλι και συμβαίνει κάτω από αναερόβιες συνθήκες καθώς και υπό συνθήκες υποξίας και η μειωμένης παρουσίας λιπαρών οξέων.

♦ 1.2.3 Καταλυτική δραστηριότητα συνθετάσης λευκοτριενίων

Η 15-λιποξυγενάση αποτελεί μια ισομορφή των λιποξυγενασών ικανή να καταλύσει την αντίδραση μετατροπής των υδροϋπεροξειδίων λιπαρών οξέων, σε εποξειδία λευκοτριενίων^ν.

Ο μηχανισμός της αντίδρασης αυτής περιλαμβάνει αρχικά την απόσπαση ενός υδρογόνου από μια δις-αλλυλική μεθυλενομάδα ενός υδροϋπεροξειδίου λιπαρού οξέος που προσδέεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Κατόπιν συμβαίνει μια ομολυτική διάσπαση της υδροϋπεροξειδοομάδας και δημιουργείται ένα λιπαρό οξύ με δύο ρίζες. Το εποξείδιο σχηματίζεται από την σταθεροποίηση της ένωσης αυτής.



Εικόνα 3: Καταλυτικός μηχανισμός συνθετάσης λευκοτριενίων.

1.3 Υποστρώματα 15-λιποξυγενάσης

◆ 1.3.1 Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα

Η 15-λιποξυγενάση χρησιμοποιεί ως κύρια υποστρώματα για τις καταλυτικές αντιδράσεις της τα ελεύθερα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Πιο συγκεκριμένα, για να δράσουν ως υποστρώματα, τα λιπαρά οξέα θα πρέπει να διαθέτουν εκτεταμένο σύστημα διπλών δεσμών και με μακριά ανθρακική αλυσίδα, από 18 έως 22 άτομα άνθρακα. Τέσσερα από τα πιο συνηθισμένα υποστρώματα της 15-λιποξυγενάσης με αυξημένη πρόσδεση στο ενεργό της κέντρο είναι το αραχιδονικό οξύ (αλυσίδα με 20 άτομα άνθρακα και 4 διπλούς δεσμούς), το λινολεϊκό οξύ (αλυσίδα με 18 άτομα άνθρακα και 3 διπλούς δεσμούς), το εικοσαπεντανοϊκό οξύ και το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ. Το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας καθώς επίσης και η ποσότητα διπλών δεσμών στα λιπαρά οξέα κατέχουν σημαντικό ρόλο στην ικανότητα κατάλυσης τους από το ένζυμο, μιας και τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα δεν αποτελούν υπόστρωμα της 15-λιποξυγενάσης. Αντίθετα, δρουν συναγωνιστικά στο ένζυμο, καταλαμβάνοντας το ενεργό του κέντρο με αποτέλεσμα την αναστολή της λιποξυγενάσης.

Εξίσου σημαντική είναι η απουσία υδρόφιλων ομάδων στο ω-άκρο του λιπαρού οξέως, καθότι

εκείνη παρεμποδίζει την καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου. Όσον αφορά τον τρόπο πρόσδεσης του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο, έχει προταθεί ένας μηχανισμός όπου το λιπαρό οξύ εισέρχεται σε αυτό με το ω-άκρο πρώτο^{vi} και στο τέλος του ενεργού κέντρου βρίσκεται το α-άκρο. Η ομάδα -ΟΟΗ του α-άκρου βρέθηκε να αλληλεπιδρά με ένα κατάλοιπο αργινίνης^{vii} του ενεργού κέντρου σταθεροποιώντας κατά αυτό τον τρόπο το υπόστρωμα και διευκολύνοντας την διαδικασία κατάλυσης.

◆ 1.3.2 Φωσφολιπίδια και εστέρες χοληστερόλης

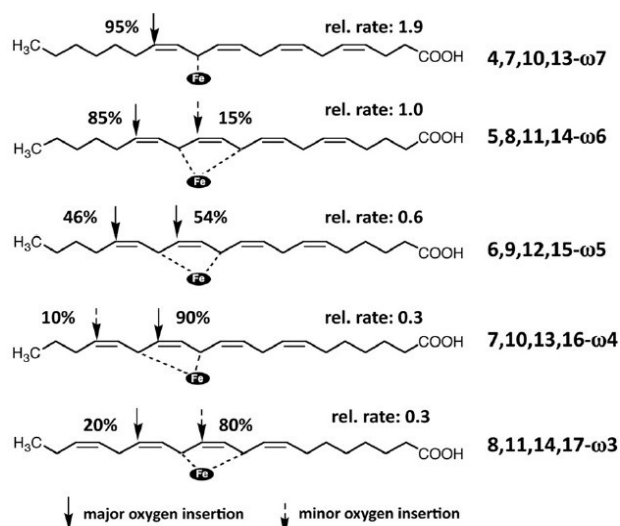
Μελέτες απέδειξαν πως η 15-λιποξυγενάση που απομονώθηκε από το γονιδίωμα κουνελιού είναι ικανή να καταλύει την οξυγόνωση φωσφολιπιδίων^{viii} και εστέρων χοληστερόλης^{ix}. Ήστόσο, ο ρυθμός της καταλυτικής αντίδρασης φαίνεται να είναι σημαντικά μειωμένος όταν τα υποστρώματα είναι τα φωσφολιπίδια ή οι εστέρες χοληστερόλης σε σύγκριση με τα ελεύθερα λιπαρά οξέα. Αυτό συμβαίνει λόγω του ογκώδους σχήματος^x των μορίων αυτών που προκαλούν δυσκολία στην πρόσδεση τους στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, όπως φάνηκε στις κρυσταλλογραφικές μελέτες.

◆ 1.3.3 Βιομεμβράνες και λιποπρωτεΐνες

Η 15-λιποξυγενάση που απομονώθηκε από το γενετικό υλικό του κουνελιού, του γουρουνιού και του ανθρώπου παρουσιάζει επίσης καταλυτική δραστηριότητα όταν τα υποστρώματα της είναι οι βιομεμβράνες και οι λιποπρωτεΐνες^{xi}. Το ένζυμο έχει παρατηρηθεί να εμπλέκεται σε επιπλοκές του οργανισμού όπως η αναιμία^{xii} όταν οξυγονώνει τις λιποπρωτεΐνες που περιέχονται στα μιτοχόνδρια. Επιπλέον, η καταλυτική δράση της λιποξυγενάσης στην λιποπρωτεΐνη LDL προκαλεί παθήσεις όπως η αθηροσκλήρωση^{xiii} μιας και η LDL οξυγονώνεται και συσσωρεύεται στα μακροφάγα καθιστώντας τα αφρώδη κύτταρα.

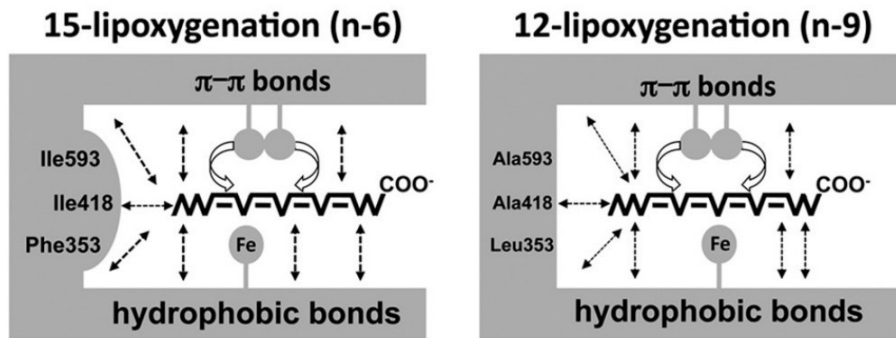
1.4 Προϊόντα της 15-λιποξυγενάσης-1

Η καταλυτική αντίδραση της 15-λιποξυγενάσης-1 με υπόστρωμα ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ ξεκινάει με την απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου από τον n-8 άνθρακα και έπειτα η οξυγόνωση συμβαίνει στον n+6 άνθρακα. Όταν το υπόστρωμα είναι το αραχιδονικό οξύ^{iv}, τα προϊόντα που προκύπτουν είναι το 15-HpETE (15-Hydroxyeicosatetraenoic acid) και το 12-HpETE (12-Hydroxyeicosatetraenoic acid). Η ισομέρεια του προϊόντος εξαρτάται από τα αμινοξέα που την ρυθμίζουν και βρίσκονται στην κατάλληλη θέση του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Από την άλλη πλευρά, όταν το υπόστρωμα είναι το λινολεϊκό οξύ, τα προϊόντα που προκύπτουν είναι κυρίως το 13-HpODE (13-Hydroperoxyoctadeca-dienoic acid) και σπάνια το 9-HpODE^{xiv} (9-Hydroperoxyoctadeca-dienoic acid). Έχει παρατηρηθεί λοιπόν ότι το 9-HpODE δεν παράγεται τόσο συχνά όσο το 13-HpODE λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης στη θέση οξυγόνωσης. Η παρεμπόδιση αυτή προκαλείται από αμινοξέα L596, F174, Q547 του ενεργού κέντρου που δυσκολεύουν την δράση του ιόντος Fe^{3+} και κατ' επέκταση την οξυγόνωση του λιπαρού οξέος στην θέση 9. Επιπλέον, σε ορισμένα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα προϊόντα της κατάλυσης ποικίλουν. Αυτό συμβαίνει διότι το διαφορετικό μήκος της αλυσίδας όπως επίσης και η διαφορετική σειρά των διπλών δεσμών κατά μήκος της αλυσίδας προκαλούν διαφορετική διάταξη και ευθυγράμμιση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. *fiς* αποτέλεσμα, το ιόν σιδήρου στο ενεργό κέντρο βρίσκεται σε κάθε περίπτωση κοντά σε διαφορετικό άτομο άνθρακα και έτσι το κάθε διαφορετικό υπόστρωμα οξυγονώνεται σε διαφορετική θέση. Επομένως προκύπτουν προϊόντα που διαφέρουν ως προς την θέση της οξυγόνωσης τους. Ένα παράδειγμα της εξειδικευμένης αυτής αντίδρασης φαίνεται στην παρακάτω εικόνα όπου η LOX που απομονώθηκε από γονιδίωμα κουνελιού παράγει διαφορετικά προϊόντα του αραχιδονικού οξέος ανάλογα την θέση των διπλών δεσμών.

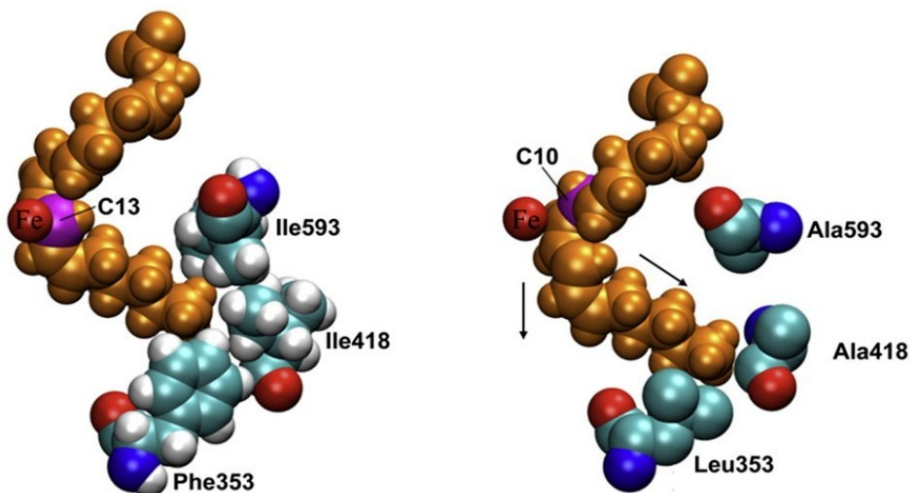


Εικόνα 4: Προϊόντα της καταλυτική αντίδραση οξυγόνωσης από την 15-λιποξυγενάση από γονιδίωμα κουνελιού ανάλογα την θέση των διπλών δεσμών στο αραχιδονικό οξύ.

Ωστόσο, τα προϊόντα που προκύπτουν^{xv} από την καταλυτική αντίδραση παρουσία 15-λιποξυγενάσης, δεν εξαρτώνται μόνο από το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας και την θέση των διπλών δεσμών του υποστρώματος αλλά και από τρία σημαντικά κατάλοιπα αμινοξέων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Ειδικότερα, υπάρχει μια καταλυτική τριάδα αμινοξέων (στο ενεργό κέντρο της λιποξυγενάσης που ρυθμίζουν την ακριβής θέση οξυγόνωσης του υποστρώματος. Τα αμινοξέα αυτά είναι Phe353, η Ile418 και η Ile593^{xvi} και ελέγχουν το βάθος που θα έχει το ενεργό κέντρο ώστε να ευθυγραμμιστεί σε αυτό το υπόστρωμα και κατά συνέπεια την θέση στην ανθρακική αλυσίδα όπου θα πραγματοποιηθεί η οξυγόνωση από τον μη αιματικό σίδηρο. Μελέτες μεταλλάξεων των αμινοξέων της καταλυτικής τριάδας φανέρωσαν την σπουδαιότητα τους στο ενεργό κέντρο μιας και διαφορετικά αμινοξέα της τριάδας αυτής επιφέρουν διαφορετικό βάθος στο ενεργό κέντρο άρα διαφορετική ευθυγράμμιση του υποστρώματος και τελικά διαφορετικό προϊόν (διαφορετική θέση οξυγόνωσης). Πιο συγκεκριμένα, με αλλαγή των αμινοξέων σε αλανίνη, η οποία διαθέτει μικρότερη ανθρακική αλυσίδα παρατηρήθηκε ότι το ένζυμο μετατράπηκε σε 12-λιποξυγενάση καθώς οξυγόνωσε το υπόστρωμα στον άνθρακα 12 αντί για τον άνθρακα 15.



Εικόνα 5: Στην αριστερή εικόνα φαίνεται η θήκη πρόσδεσης του υποστρώματος της ALOX15 με το αραχιδονικό οξύ καθώς και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της. Στην δεξιά εικόνα φαίνεται η θήκη πρόσδεσης υποστρώματος της ALOX15 με το αραχιδονικό οξύ καθώς και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της όταν τα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας έχουν μεταλλαχθεί.



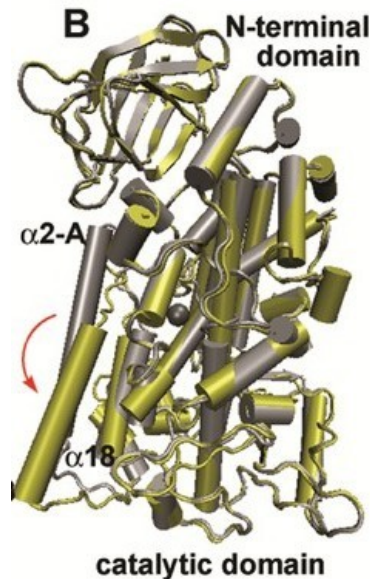
Εικόνα 6: Στην αριστερή εικόνα φαίνεται η διεύθυνση του αραχιδονικού οξέος σε σχέση με τα τρία ογκώδη αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας και με το ιόν σιδήρου. Στην δεξιά εικόνα φαίνεται η διεύθυνση του αραχιδονικού οξέος σε σχέση με τα μεταλλαγμένα μικρότερα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας και με το ιόν σιδήρου.

1.5 Δομή της 15-λιποξυγενάσης-1

Η 15-λιποξυγενάση-1 αποτελείται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα με 662 αμινοξέα και βάρος περίπου 75kDa. Η πολυπεπτιδική αλυσίδα περιέχει 11 κατάλοιπα κυστεΐνης αλλά κανένα δισουλφιδικό δεσμό και το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης είναι 5.5-5.8 ανάλογα τον οργανισμό από τον οποίο απομονώνεται το ένζυμο.

Προς το παρόν, δεν υπάρχουν κρυσταλλογραφικά δεδομένα για την δομή της ανθρώπινης 15-λιποξυγενάσης-1 αλλά υπάρχει η κρυσταλλογραφική δομή για την αντίστοιχη πρωτεΐνη που απομονώθηκε από το γονιδίωμα του κουνελιού^{xvii}. Το ένζυμο αποτελείται από μια ρυθμιστική και μια καταλυτική επικράτεια που βρίσκονται στην N-τελική και C-τελική αντίστοιχα και ενώνονται μεταξύ τους με ένα ευκίνητο ολιγοπεπτίδιο. Οι επικράτειες αυτές κινούνται (ανοίγουν-κλείνουν) ανάλογα το pH και την παρουσία άλατος στο περιβάλλον του ενζύμου.

Επίσης, από τις κρυσταλλογραφικές μελέτες διαπιστώθηκε η ύπαρξη μίγματος δύο διαφορετικών τρισδιάστατων δομών, μια που φέρει έναν αναστολέα μέσα στην θέση πρόσδεσης του υποστρώματος και άλλη μία που είχε άδεια θέση^{xviii}.



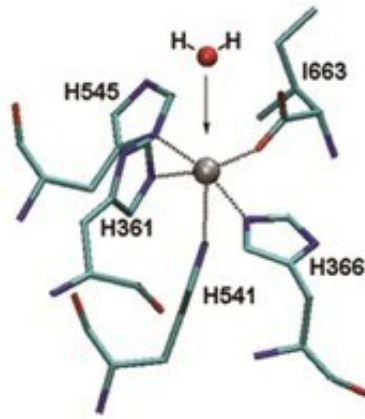
Εικόνα 7: Απεικόνιση των δύο τρισδιάστατων δομών του ενζύμου. Με γκρι χρώμα παρουσιάζεται η δομή απουσία αναστολέα και με κίτρινο χρώμα παρουσία αναστολέα.

◆ 1.5.1 N-τελική επικράτεια της 15-λιποξυγενάσης-1

Η αμινο-τελική επικράτεια του ενζύμου φαίνεται να αποτελείται από 110 αμινοξέα που οργανώνονται σε β-πτυχώσεις. Η επικράτεια αυτή κατέχει ρυθμιστικό ρόλο στην λειτουργία του ενζύμου και συνδέεται με την πρόσδεση του στις μεμβράνες με την βοήθεια ενός συμπαράγοντα Ca^{2+} . Ήστώσο, η πρόσδεση της λιποξυγενάσης στις μεμβράνες δεν διευκολύνεται μόνο από τα αμινοξέα της αμινο-τελικής επικράτειας αλλά και από τα υδρόφοβα αμινοξέα της καταλυτικής επικράτειας^{xix}.

◆ 1.5.2 C-τελική επικράτεια της 15-λιποξυγενάσης-1

Η καρβοξυ-τελική επικράτεια του ενζύμου είναι υπεύθυνη για την καταλυτική του δράση μιας και περιέχει τον μη αιματικό σίδηρο και τους περισσότερους υποκαταστάτες του. Η συγκεκριμένη επικράτεια αποτελείται από ένα σύστημα 21 α-ελίκων με ενδιάμεσες μικρές β-πτυχώσεις. Οι έλικες αυτές δημιουργούν το ενεργό κέντρο του ενζύμου και αποτελούνται από ορισμένα υδρόφοβα αμινοξέα που διευκολύνουν την πρόσδεση του ενζύμου στις μεμβράνες. Δύο από αυτά τα υδρόφοβα αμινοξέα αποτελούν υποκαταστάτες πρώτης τάξης του ιόντος σιδήρου. Όσον αφορά τον μη αιματικό σίδηρο, συναρμόζεται με 6 υποκαταστάτες πρώτης τάξης, σχηματίζοντας ένα οκταεδρικό σύμπλοκο, και συγκεκριμένα με 4 κατάλοιπα ιστιδίνης, 1 κατάλοιπο ισολευκίνης και ένα μόριο νερού. Το μόριο νερού και το ένα αμινοξύ της ιστιδίνης (His541) συναρμόζονται αξονικά στον σίδηρο, ενώ πλευρικά συναρμόζονται τα υπόλοιπα κατάλοιπα ιστιδίνης (His361, His366, His545) και η ισολευκίνη (Ile663).



Εικόνα 8: Απεικόνιση του οκταεδρικού συμπλόκου του μη αιματικού σιδήρου και των υποκαταστάτων του, που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο της 15-λιποξυγενάσης-1.

Επιπλέον, όπως προαναφέρθηκε στην υποενότητα 1.2.1, για να ξεκινήσει η καταλυτική αντίδραση, θα πρέπει να ενεργοποιηθεί ο σίδηρος και από Fe^{2+} να οξειδωθεί σε Fe^{3+} προκειμένου να πραγματοποιηθεί το πρώτο στάδιο της αντίδρασης, δηλαδή η απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου από την n-6 θέση της δις-αλλυλικής μεθυλενομάδας του υποστρώματος. Στην πραγματικότητα, η απόσπαση συμβαίνει από το ανιόν $-\text{OH}$ του συμπλόκου $\text{Fe}-\text{OH}$ που δημιουργείται στα πλαίσια της ενεργοποίησης του μη αιματικού σιδήρου από την απόσπαση ενός κατιόντος H^+ από το μόριο νερού που συναρμόζεται αξονικά στον σίδηρο.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση του οκταεδρικού συμπλόκου του σιδήρου και της ενεργοποίησής του ως $\text{Fe}-\text{OH}$. τις σφαίρες αναπαριστούνται τα αμινοξέα που συναρμόζονται με τον σίδηρο.

Ωστόσο, εκτός από τους υποκαταστάτες πρώτης τάξης, υπάρχουν και υποκαταστάτες δεύτερης τάξης για τον σίδηρο, που σταθεροποιούν το οκταεδρικό σύμπλοκο.

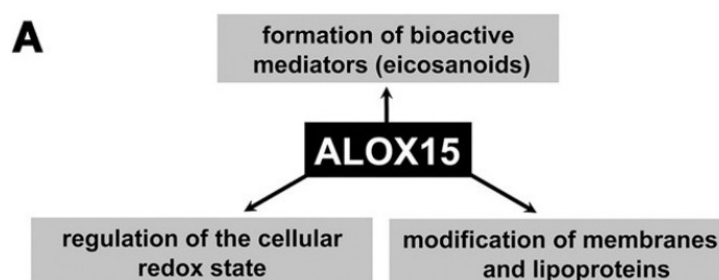
Επίσης, στην καταλυτική επικράτεια και σχεδόν απέναντι από το ιόν σιδήρου λαμβάνει χώρα η θέση πρόσδεσης του οξυγόνου και για την πρόσδεση του στο ενεργό κέντρο είναι απαραίτητη η ύπαρξη του αμινοξέος Lue367.

Τέλος, από τις κρυσταλλογραφικές μελέτες που αφορούν την 15-λιποξυγενάση-1 του κουνελιού, φάνηκε πως η πρόσδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου προκαλεί δομικές αλλαγές στην καρβοξυ-τελική επικράτεια του. Μια από αυτές είναι η μετατόπιση της α -έλικας $\alpha 2$ και μια δεύτερη είναι η αλλαγή της α -έλικας $\alpha 18$, η οποία φέρει μία λευκίνη στην θέση 597 (L597) που περιορίζει τον όγκο της θέσης πρόσδεσης. Έτσι με την πρόσδεση του υποστρώματος σε αυτή $\alpha 18$ μετακινείται μαζί με την λευκίνη αυτή δημιουργώντας μεγαλύτερο **όγκο**^{xviii}.

1.6 Βιολογικός ρόλος της 15-λιποξυγενάσης-1

◆ 1.6.1 Βιοδραστικότητα της 15-λιποξυγενάσης-1

Η ολοκληρωμένη βιοχημική δραστηριότητα της 15-λιποξυγενάσης-1 δεν είναι εξακριβωμένη. Ωστόσο, το ένζυμο συμμετέχει, βάση μελετών, σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια του οργανισμού τροποποιώντας μια ποικιλία υποστρωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, ένζυμα σύνθεσης εικοσανοειδών μορίων όπως όπως οι ισομορφές της λιποξυγενάσης και της κυκλοξυγενάσης, είναι υπεύθυνα για τον σχηματισμό βιοενεργών σηματοδοτικών μορίων όπως οι προσταγλανδίνες, τα λεκοτριένια και οι λιποξίνες. Επίσης, η 15-λιποξυγενάση-1 έχει συσχετιστεί με την τροποποίηση λιπιδίων των βιολογικών μεμβρανών καθώς επίσης και λιποπρωτεϊνών, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην διαδικασία αναδόμησης και ανακατασκευής των μεμβρανών όπως και στον μεταβολισμό των λιπιδίων. Τέλος, σύμφωνα με τις έρευνες, η 15-λιποξυγενάση-1 δρα ως ενδοκυτταρικό υπεροξειδωτικό ένζυμο των λιπαρών οξέων κατέχοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου.



◆ 1.6.2 Η 15-λιποξυγενάση-1 στην ωρίμανση των δικτυοερυθροκυττάρων

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια περιέχουν πολύ μικρές συγκεντρώσεις 15-λιποξυγενάσης-1 σε φυσιολογικές συνθήκες. Ωστόσο, όταν η ερυθροποίηση βρίσκεται σε κρίσιμο στάδιο με επαναλαμβανόμενη αιμορραγία ή με εξαναγκασμένη αιμόλυση, έχει παρατηρηθεί απότομη υπερέκφραση του ενζύμου από δικτυοερυθροκύτταρα.

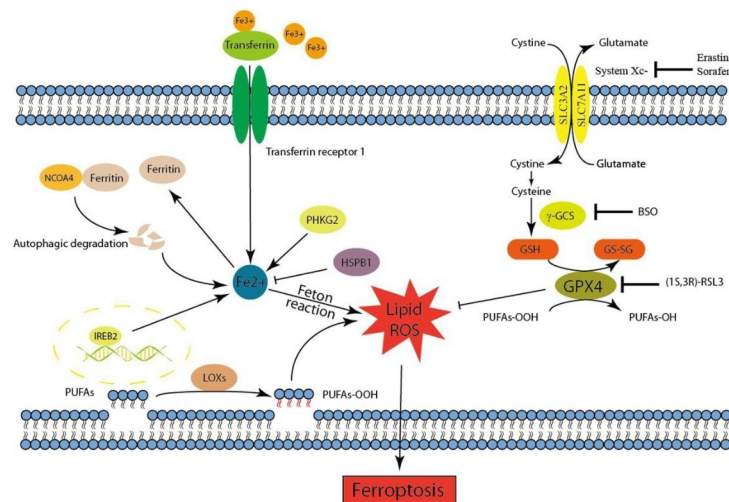
Αξίζει να σημειωθεί ότι το ένζυμο είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμο σε νεαρά δικτυοερυθροκύτταρα του κουνελιού αλλά κατά την *in vitro* ωρίμανση αυτών των κυττάρων, η έκφραση του ενζύμου είναι παράλληλη με την ωρίμανση της κυτταρικής αναπνοής^{xx}. Ειδικότερα, βάσει των *in vitro* μελετών^{xxi}, η 15-λιποξυγενάση-1 που απομονώθηκε από το κουνέλι προσδένεται πάνω στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων και άλλων οργανιδίων καταλύοντας μια αντίδραση υπεροξειδωσής των λιπιδίων τους. Έως αποτέλεσμα της αντίδρασης αυτής, οι μεμβράνες αποκτούν πόρους, επομένως γίνονται πιο διαπερατές σε εξειδικευμένα ένζυμα υπεύθυνα για την επισήμανση των πρωτεϊνών με ουβικιτίνη και σε πρωτεολυτικά ένζυμα του πρωτεασώματος που ώστε να αποικοδομήσουν τις επισημανσμένες πρωτεΐνες.

◆ 1.6.3 Η εμπλοκή της 15-λιποξυγενάσης-1 στον κυτταρικό θάνατο

Ο κυτταρικός θάνατος ενισχύεται από την εμπλοκή της 15-λιποξυγενάσης-1 και των ποικίλων μεταβολικών μέσω τριών μηχανισμών, της απόπτωσης, της αυτοφαγίας και της φερρόπτωσης. Όσον αφορά την απόπτωση, πρόκειται για μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, κυρίως λόγω των αυξημένων επιπέδων οξειδωτικού στρες του κυττάρου. Το αυξημένο οξειδωτικό στρες πυροδοτεί την δράση των 12/15-λιποξυγενασών και εκείνες με την σειρά τους παράγουν μεταβολίτες που ενεργοποιούν το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK, το οποίο προκαλεί την απόπτωση. Επιπλέον, άμεση συνέπεια των αυξημένων επιπέδων οξειδωτικού στρες αποτελεί η μείωση της γλουταθειόνης (GSH), ενός σημαντικού για τον οργανισμό αντιοξειδωτικού μορίου. Έως αποτέλεσμα, ενεργοποιούνται και πάλι οι 12/25-λιποξυγενάσες που ενεργοποιούν έπειτα το μονοπάτι του επαγόμενου παράγοντα απόπτωσης (Apoptosis Induced Factor, AIF), ο οποίος οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο^{xxii}.

Σχετικά με την φερρόπτωση, η προκειμένη αποτελεί ένα διαφορετικό είδος κυτταρικού θανάτου που εξαρτάται από τον μεταβολισμό των ιόντων σιδήρου στο κύτταρο. Πιο συγκεκριμένα, η φερρόπτωση κυριαρχεί παρουσία των αυξημένων δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen

Species, ROS) που προκύπτουν από την υπεράριθμη υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων καθώς και από την συμμετοχή των ιόντων σιδήρου στη διαδικασία παραγωγής τους. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, οι λιποξυγενάσες κατέχουν σημαντικό ρόλο στην δημιουργία των ROS, μιας και υπεροξειδώνουν τα λιπαρά οξέα των μεμβρανών, συμμετέχοντας με αυτόν τον τρόπο στο μονοπάτι της φερρόπτωσης^{xxi}.



Εικόνα 11: Απεικόνιση σηματοδοτικού μονοπατιού της φερρόπτωσης.

◆ 1.6.4 Βιολογικός ρόλος των προϊόντων της 15-λιποξυγενάσης-1

Η 15-λιποξυγενάση-1 προσδένει στο ενεργό της κέντρο μια ποικιλία υποστρωμάτων τα οποία εν τέλει μετατρέπονται σε μεταβολικά σηματοδοτικά μόρια. Πιο συγκεκριμένα, το ένζυμο παρουσιάζει υψηλή συγγένεια πρόσδεσης του λινολεϊκού οξέος στο ενεργό κέντρο με αποτέλεσμα την παραγωγή βιοδραστικών μεταβολιτών. Ως κύριο προϊόν, σχηματίζεται το 13(S)-HpODE και ως δευτερεύον το 9(S)-HpODE τα οποία στην συνέχεια μεταβολίζονται σε 13(S)-HODE και 9(S)-HODE αντίστοιχα. Τα δύο αυτά μόρια ενεργοποιούν διάφορους υποδοχείς^{xxiii} και κατά συνέπεια εμπλέκονται σε ποικίλα μεταβολικά μονοπάτια που αφορούν τον μεταβολισμό των λιπιδίων και την ενεργοποίηση νευρώνων. Τόσο το 13(S)-HODE όσο και το 9(S)-HODE συμβάλουν στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης^{xxiv}.

LA

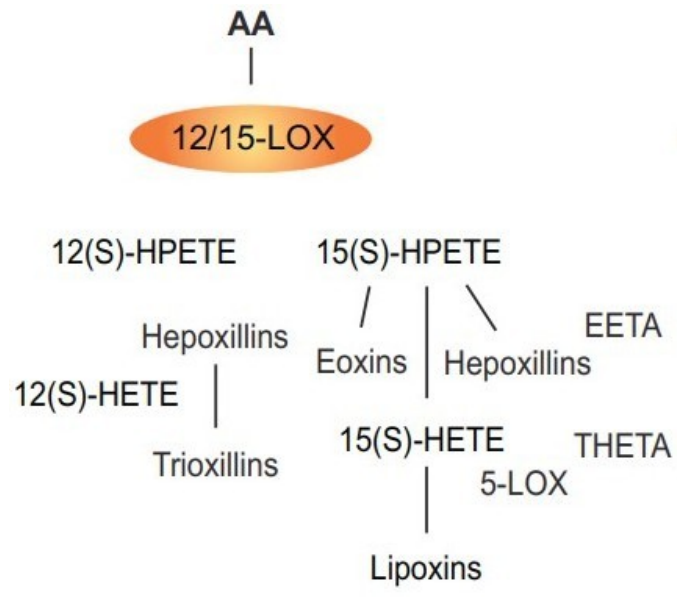
12/15-LOX

13(S)-HPODE

13(S)-HODE

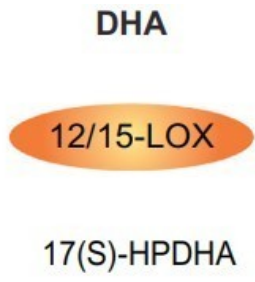
Εικόνα 12: Βιολογικοί
δραστικοί μεταβολίτες
λινολεϊκού οξέος.

Επιπλέον, το αραχιδονικό οξύ είναι ακόμη ένα υπόστρωμα της 15-λιποξυγενάσης-1 με υψηλή συγγένεια πρόσδεσης και τα σηματοδικά μόρια που προκύπτουν ως προϊόντα είναι 15-(S)-HPETE, 12-(S)-HPETE τα οποία μετέπειτα ανάγονται σε 15-(S)-HETE και 12-(S)-HETE αντίστοιχα. Ένας από τους ρόλους των παραπάνω μεταβολικών σηματοδοτικών μορίων είναι να ενεργοποιούν συγκεκριμένους υποδοχείς με την πρόσδεση τους σε αυτούς, όπως τον BLT2 και τον PPAR γ αλλά και να εμπλέκονται ενεργά στον σχηματισμό δραστικών ενώσεων οξυγόνου (ROS). Επιπρόσθετα, τα παραπάνω προϊόντα μεταβολίζονται περαιτέρω σε πιο εξειδικευμένα μόρια όπως είναι οι λιποξίνες, οι υποξίνες, οι εοξίνες, το 8(S)-diHETE, το 15(S)-diHETE, το 5(S)-diHETE, το 15(S)-diHETE και το 15-οξο-εικοσατετραενοϊκό οξύ. Η δράση του κάθε ένα από τους περαιτέρω μεταβολίτες είναι διαφορετική και στοχευμένη. Για παράδειγμα οι λιποξίνες παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη ρόλο και παράλληλα οι εποξίνες ρυθμίζουν τις αντιφλεγμονώδεις αντιδράσεις και την έκκριση ινσουλίνης. Αντίθετα, οι εοξίνες σχετίζονται με την προφλεγμονώδη δράση και ενεργοποιούνται από μια αλλεργική αντίδραση. Επιπλέον, το 12-(S)-HPETE και το 12-(S)-HETE μπορούν να μεταβολιστούν στις εποξιλίνες A3 και B3 οι οποίες στην συνέχεια μετατρέπονται στις τριοξιλίνες A3 και B3 αντίστοιχα. Οι ενώσεις αυτές στοχεύουν στην διαστολή των αγγείων, προωθούν την αντίληψη του πόνου και τελικά επάγουν την έκκριση ινσουλίνης ^{xxii}, ^{xxii}. Ακόμη, είναι γνωστό πως οι μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος συμβάλλουν στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης



Εικόνα 13: Βιολογικοί δραστικοί μεταβολίτες αραχιδονικού οξέος.

Τέλος, η 15-λιποξυγενάση-1 χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα και το εικοσιδιεξανοϊκό οξύ (DHA) που μεταβολίζεται παραπάνω στο μεταβολικό σηματοδοτικό μόριο 15-(S)-υδροξύ-εικοσιδιεξανοϊκό οξύ. Κατόπιν, το παραπάνω μόριο μετατρέπεται ενδεχομένως σε ρεσολβίνη Ds ή σε προτεκτίνη Ds που κατέχουν σημαντικό αντιφλεγμονώδη ρόλο για τον οργανισμό.



Resolvins Protectins

Εικόνα 14: Βιολογικοί δραστικοί μεταβολίτες εικοσιδιεξανοϊκού οξέος.

◆ 1.6.5 Παθογένειες στην οποίες εμπλέκεται η 15-λιποξυγενάση-1

Η 15-λιποξυγενάση-1 έχει συσχετιστεί τόσο με την παθογένεια της φλεγμονής όσο και με την παραγωγή σηματοδοτικών προ-φλεγμονώδων καθώς και αντι-φλεγμονώδων μορίων. Η πολλαπλή αυτή συμμετοχή του ενζύμου σε πολλά διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια αποτελεί αντικείμενο εντατικής έρευνας πολλά χρόνια με σκοπό την ανακάλυψη νέων αναστολέων.

Αρχικά, η 15-λιποξυγενάση-1 εμπλέκεται σε καρδιαγγειακές παθήσεις όπως η υπέρταση και η αθηροσκλήρωση. Πιο συγκεκριμένα, οι μεταβολίτες 15-(S)-HPETE και 15-(S)-HETE σχετίζονται με την διαστολή και την συστολή των αρτηριών και των αγγείων ρυθμίζοντας έτσι την πίεση του αίματος. Ακόμη, το ένζυμο είναι ικανό να οξειδώνει την λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL), γεγονός που επιφέρει την δυσλειτουργία των επιθηλιακών κυττάρων^{xxv} και τελικά την αθηροσκλήρωση.

Επιπλέον, η παθολογία που σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα πολλών ασθενειών του κεντρικού νευρικού συστήματος, μεταξύ των οποίων είναι το εγκεφαλικό, η νόσος Parkinson και Νόσος Alzheimer. Μελέτες αποδεικνύουν ότι οι 12 και 15-ισομορφές της λιποξυγενάσης έχουν συνδεθεί με τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο των νευρώνων^{xxvi} οι οποίοι είναι άμεσα συνδεδεμένοι με το οξειδωτικό στρες καθώς και με την ελάττωση των επιπέδων της γλουταθειόνης^{xxvi, xxvii} που αποτελεί ισχυρό αντιοξειδωτικό του οργανισμού. Συνεπώς, η 15-λιποξυγενάση-1 είναι στενά συνδεδεμένη με τις παθήσεις του εγκεφάλου.

Παράλληλα, η 15-λιποξυγνάση-1 εμπλέκεται μέσω των σηματοδοτικών της προϊόντων σε πολλές ακόμα παθήσεις, όπως οι μεταβολικές διαταραχές για παράδειγμα η παχυσαρκία^{xxviii, xxix} στο διαβήτη^{xxix} και στην καρκινογένεση^{xxx}.

Τέλος, οι διαταραχές και οι παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος προκαλούνται σε ένα βαθμό από την 15-λιποξυγενάση-1 και τους μεταβολίτες της^{xxxi}. Οι παθογένειες αυτές είναι το άσθμα, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD) και η χρόνια βρογχίτιδα. Οι μεταβολίτες του ενζύμου εμπλέκονται στις παραπάνω παθήσεις ρυθμίζοντας την φλεγμονή στα εοσινόφιλα, την μετανάστευση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και την αναδιαμόρφωση της αναπνευστικής οδού. Ειδικότερα, η μετανάστευση των κυττάρων και συγκεκριμένα των δενδριτικών κυττάρων, των T-λεμφοκυττάρων και των μαστοκυττάρων, συμβαίνει από την 15-λιποξυγενάση-1 στα επιθηλιακά κύτταρα της αναπνευστικής οδού. Παράλληλα, το 15-diHETE και το 15-HETE-PE επάγουν την μετανάστευση των εοσινόφιλων^{xxiii}, ενώ η παραγωγή του 15-HETE-PE οδηγεί στην αναδιαμόρφωση του ιστού της αναπνευστικής οδού μέσω της διαφοροποίησης των καλκοειδών κυττάρων προκαλώντας έτσι άσθμα^{xxiii}.

1.7 Συνθήκες της αντίδρασης οξυγόνωσης λιπαρών οξέων

Η οξυγόνωση των λιπαρών οξέων από την 15-λιποξυγενάση-1 παρουσιάζει έντονη εξάρτηση από το pH και η βέλτιστη ενζυμική δραστηριότητα παρατηρήθηκε μεταξύ pH 7.0 και 7.4. Κρυσταλλογραφικές μελέτες της δομής του ενζύμου έδειξαν τέσσερα κατάλοιπα ιστιδίνης να αποτελούν τους υποκαταστάτες 1ης τάξης του σιδήρου που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο της 15-λιποξυγενάσης-1^{xxxii, xxxiii} και επομένως οι μεταβολές του pH ενδεχομένως να επηρεάσουν την ικανότητα πρόσδεσης των υποκαταστατών στο σίδηρο. Ωστόσο, πειραματικές μελέτες επώασης της 15-λιποξυγενάσης-1 που απομονώθηκε από το γονιδίωμα του κουνελιού σε διαφορετικά pH (6.0, 7.4 και 9.0) φανέρωσαν ότι η περιεκτικότητά του ενζύμου σε σίδηρο παρέμεινε αμετάβλητη (85–90%). Οι συγκεκριμένες πειραματικές παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι ο σίδηρος παραμένει σταθερά προσδεμένος στο ένζυμο και ότι η μεταβολή του pH δεν επηρεάζει την περιεκτικότητα σε σίδηρο στην 15-λιποξυγενάση-1.

Όσον αφορά την θερμοκρασία, για την 15-λιποξυγενάση-1 η ευρεία βέλτιστη θερμοκρασία οξυγόνωσης του λινολεϊκού οξέως παρατηρήθηκε μεταξύ 20°C και 35°C^{xxxiv}. Πειραματικές μελέτες για την 15-λιποξυγενάση-1 από το γονιδίωμα κουνελιού^{xxxv} φανέρωσαν πως ελλείπει υποστρώματος, το ένζυμο παραμένει σταθερό για μεγάλα χρονικά διαστήματα μόνο σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (<10 °C). Αντίθετα, σε υψηλότερες θερμοκρασίες (>20 °C) υφίσταται δομικές αλλαγές και απώλεια της καταλυτικής δραστηριότητας^{xxxv}. Ωστόσο, τα πειράματα αναδίπλωσης για το ένζυμο, έδειξαν ότι οι δομικές αλλοιώσεις που προκλήθηκαν από βραχυχρόνια έκθεση στους 30°C ήταν πλήρως αναστρέψιμες. Με περαιτέρω αυξήσεις της θερμοκρασίας όμως, (45°C) προκλήθηκαν μη αναστρέψιμες αλλαγές στη δομή της λιποξυγενάσης^{xxxv}. Τέλος, πρόσθετα πειράματα σε άλλες θερμοκρασίες υπέδειξαν ότι η θερμοκρασία κατά την οποία η 15-λιποξυγενάση-1 χάνει την αντιστρεψιμότητα ήταν περίπου 35°C για αυτό το ένζυμο.

Ενότητα 2: Ετερόλογη έκφραση της 15-LOX-1 σε βακτηριακά κύτταρα

2.1 Πειραματικό μέρος

2.1.1 Μετασχηματισμός βακτηρίων

Για να ξεκινήσει η διαδικασία της έκφρασης της λιποξυγενάσης, ήταν απαραίτητη η εισαγωγή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε βακτηριακά κύτταρα. Στο παρόν πείραμα, τα πλασμίδια pET26b με 89.5 ng/μL φέρουν το γονίδιο που ευθύνεται για την έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, και εισήχθησαν σε κύτταρα βακτηρίων BL21 (DE3). Σε αυτό το σημείο επισημαίνεται ότι τα βακτήρια αυτά είναι χημικώς επεξεργασμένα ώστε οι μεμβράνες τους να είναι διαπερατές στα πλασμίδια που εισέρχονται σε αυτά.

Ακολουθώντας λοιπόν το πρωτόκολλο για την έκφραση της πρωτεΐνης, λήφθηκαν κύτταρα BL21 από τους -80°C και δουλεύοντας στον θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow) υπό αποστειρωμένες συνθήκες, σε 50μL από αυτά προστέθηκαν 3μL από τα πλασμίδια. Τα βακτήρια επώστηκαν σε θερμοκρασία 42°C για 45 δευτερόλεπτα (heat shock) ώστε να ανοίξουν οι πόροι στις μεμβράνες τους και να εισχωρήσουν τα πλασμίδια αποτελεσματικά σε αυτά και κατόπιν εκτέθηκαν για 5 λεπτά σε πάγο ώστε οι πόροι των μεμβρανών να κλείσουν.

Αφού πλέον το γενετικό υλικό (πλασμίδια) έχει εισαχθεί στα βακτήρια, προστίθεται σε αυτά 1ml θρεπτικού υλικού LB (Luria-Bertani medium) και επώστηκαν στους 37°C, που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους, για 1 ώρα στον incubator.

Μετά το πέρας της μίας ώρας, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 13000g για 5-10 λεπτά ώστε να καταβυθιστούν ως ίζημα, ενώ το περισσότερο υπερκείμενο υγρό, περίπου 800μL, αφαιρέθηκε. Ύστερα τα κύτταρα (ίζημα) επαναιωρήθηκαν και τα συμπυκνωμένα πλέον κύτταρα τοποθετήθηκαν σε plate (τρυβλίο) και επωάζονται στους 37°C για 16-18 ώρες.

Σημειώνεται ότι το τρυβλίο στο οποίο απλώθηκαν τα κύτταρα, περιείχε εκτός από θρεπτικό υλικό LB και άγαρ, και αντιβιοτικό καναμυκίνη με συγκέντρωση 50mg/mL. Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν φέρουν γονίδιο του οποίου η έκφραση προσδίδει στα βακτήρια που το έχουν λάβει, ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό. Συνεπώς, αναπτύχθηκαν μόνο τα βακτήρια που έλαβαν πλασμίδιο καθώς επιβίωσαν παρουσία αντιβιοτικού.

2.1.2 Υγρή προκαλλιέργεια βακτηρίων

Η υγρή προκαλλιέργεια είναι το επόμενο βήμα για την έκφραση της λυποξυγενάσης από τα βακτήρια και όλα τα στάδια που θα περιγραφούν πραγματοποιήθηκαν κάτω από αποστειρωμένες συνθήκες, δηλαδή στον θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow) και με αποστειρωμένα σκεύη για την αποφυγή μολύνσεων στην καλλιέργεια.

Αρχικά, σε μία αποστειρωμένη κωνική φιάλη των 100mL, προστίθενται 50mL θρεπτικού υλικού LB όπως και 50μL αντιβιοτικό καναμυκίνη με συγκέντρωση 50mg/mL, στην κάθε μια.

Επίσης, από το τρυβλίο με τα ανεπτυγμένα κύτταρα, συλλέγεται μια μοναδιαία αποικία με τη βοήθεια αποστειρωμένου tip και μεταφέρεται στη φιάλη.

Τέλος, αυτή τοποθετείται στον incubator στους 30°C για όλο το βράδυ με ταυτόχρονη ανάδευση.

2.1.3 Υγρή καλλιέργεια βακτηρίων

Αφού αφαιρεθεί η προκαλλιέργεια από τον incubator, ακολουθούνται τα εξής στάδια για την παρασκευή υγρής καλλιέργειας. Παρασκευαστήκαν δύο καλλιέργειες ώστε να ληφθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα της πρωτεΐνης.

Δουλεύοντας στον θάλαμό νηματικής ροής για να επιτευχθούν στείρες συνθήκες, σε δύο αποστειρωμένες κωνικές φιάλες του ενός λίτρου προστέθηκε 1L θρεπτικό υλικό LB και 1mL καναμυκίνης (50 mg/μL) στην κάθε μια. Έπειτα, προστέθηκε μια ποσότητα κυττάρων από την προκαλλιέργεια η οποία θα ήταν αραιωμένη 100 φορές στην τελική καλλιέργεια. Εφόσον η καλλιέργειες ήταν 1 λίτρο, η ποσότητα της προκαλλιέργειας που λήφθηκε ήταν 10mL για την κάθε μια.

Οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37°C με ανάδευση έως η οπτική πυκνότητα του δείγματος στα 600nm (OD_{600}) να κυμαίνεται μεταξύ 0.6-0.8.

Η τιμή της οπτικής πυκνότητας του δείγματος είναι αντιπροσωπευτική της ανάπτυξης των κυττάρων, της πυκνότητας τους δηλαδή, και όταν αυτή βρίσκεται μεταξύ 0.6-0.8, τα βακτήρια βρίσκονται στην εκθετική τους φάση.

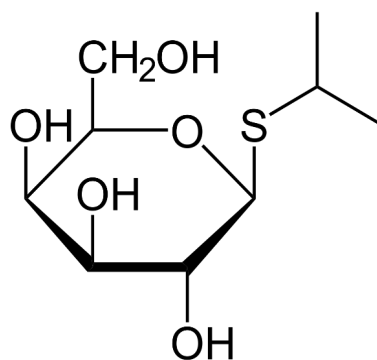
Αφού το OD_{600} έφτασε τα 0.6-0.8, το οποίο μετρήθηκε με φασματόμετρο UV-Vis, και πριν προστεθεί ο επαγωγέας IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) που επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης, απομονώθηκε από την καλλιέργεια 1mL (before induction δείγμα) ώστε να

χρησιμοποιηθεί στην ηλεκτροφόρηση που θα περιγραφεί σε επόμενα στάδια. Το 1mL φυγοκεντρήθηκε στα 13000g για 10 λεπτά. Μετά την φυγοκέντρωση, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα φυλάχτηκε στους -20°C για μετέπειτα χρήση.

Στις καλλιέργειες προστέθηκε ο επαγωγέας IPTG με τελική συγκέντρωση 0,2mM. Ο τρόπος λειτουργίας του IPTG είναι ο εξής, το IPTG προσδένεται στον καταστολέα του οπερονίου της λακτόζης ώστε εκείνος να αλλάζει δομική διαμόρφωση και έτσι να μην μπορεί να συνδεθεί στον χειριστή. Άρα μπορεί να ξεκινήσει η έκφραση των γονιδίων από την RNA πολυμεράση.

Η ένωση αυτή είναι είναι ανάλογη της αλλολακτόζης με την διαφορά ότι η πρώτη δεν μεταβολίζεται από τα βακτήρια λόγω της ύπαρξης ενός δεσμού θείου που τα βακτήρια αδυνατούν να επεξεργαστούν.

Οι καλλιέργειες επώαστηκαν για 16-18 ώρες στους 18-20°C με σκοπό την έκφραση της πρωτεΐνης.



Εικόνα 15: Το μόριο του επαγωγέα IPTG.

2.1.4 Συλλογή καλλιέργειας

Μετά την ολοκλήρωση της επώασης στους 18-20°C, τα κύτταρα περιείχαν την εκφρασμένη πλέον πρωτεΐνη. Πριν από την συλλογή των καλλιεργειών, συλλέχθηκε από αυτές 1mL (after induction δείγμα) που φυγοκεντρήθηκε στα 13000g για 5 λεπτά. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο, και το ίζημα, δηλαδή τα κύτταρα που συλλέχθηκαν, αποθηκεύτηκε στους -20°C για να χρησιμοποιηθεί στην ηλεκτροφόρηση που θα περιγραφεί σε επόμενα στάδια.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε μέτρηση του OD₆₀₀ και επειδή η τιμή του ήταν 4, δηλαδή πολύ πυκνή από βακτηριακά κύτταρα καλλιέργειας, το δείγμα αραιώθηκε 10 φορές. Έτσι, προστέθηκαν 900μL θρεπτικού υλικού LB και 100μL από την καλλιέργεια ώστε η τιμή του να γίνει 0.4.

Ξεκινώντας λοιπόν την συλλογή της συνολικής καλλιέργειας, είναι απαραίτητο να φυγοκεντρηθεί ώστε να καταβυθιστούν ως ίζημα τα κύτταρα. Έτσι, η καλλιέργεια μοιράστηκε σε δοχεία των 250ml και φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά στους 4°C στα 8000g. Το υπερκείμενο που προέκυψε απορρίφθηκε ενώ το ίζημα επαναιωρήθηκε σε μικρό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM HEPES, 50 mM NaCl με pH 7.50. Τα επαναιωρωμένα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε ένα προ-ζυγισμένο falcon. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των κυττάρων από την οποία απορρίφθηκε το υπερκείμενο υγρό. Τα κύτταρα που έμειναν ζυγίστηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Η ποσότητα των κυττάρων που λήφθηκε ήταν 6g.

Το επόμενο βήμα ήταν να απελευθερωθούν όλες οι πρωτεΐνες που εκφράστηκαν στα κύτταρα, μαζί με την 15-LOX-1. Για να ξεκινήσει το σπάσιμο των κυττάρων, θα έπρεπε αυτά να επαναιωρηθούν σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM HEPES, 50mM NaCl, 2mM PMSF και 5mM DTT. Αυτό το διάλυμα αποτέλεσε το διάλυμα για το σπάσιμο των κυττάρων (lysis buffer). Το PMSF χρησιμοποιήθηκε επειδή λειτουργεί ως αναστολέας πρωτεασών και το DTT ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών.

Για την λύση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν υπέρηχοι με επαναλαμβανόμενα κύματα υψηλής συχνότητας. Πραγματοποιήθηκαν 8-10 κύκλοι των 40 παλμών και 2 λεπτών παύση. Επίσης, κατά την διάρκεια της λύσης, τα κύτταρα βρίσκονταν μέσα σε πάγο και νερό ώστε να παραμένουν σε κρύο περιβάλλον. Αφού έσπασαν, μεταφέρθηκαν στη φυγόκεντρο για 45 λεπτά στα 13000g στους 4°C. Το υπερκείμενο υγρό που αποτελούσε το κυτταρόλυμα, αποθηκεύτηκε σε falcon στον πάγο για την μετέπειτα επεξεργασία του καθαρισμού της πρωτεΐνης.

2.1.5 Καθαρισμός της 15-λιποξυγενάσης-1

◆ Χρωματογραφία Συγγένειας

Για την απομόνωση της καθαρής 15-LOX-1 από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες που απελευθερώθηκαν στο κυτταρόλυμα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της χρωματογραφίας συγγένειας. Η χρωματογραφία συγγένειας πραγματοποιήθηκε με την χρήση στήλης με πληρωτικό υλικό το NEBExpress@ Ni Resin και όγκο αυτού 2ml 50% αραιωμένο. Η μέθοδος αυτή επιλέχθηκε για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης διότι η 15-LOX-1 έχει την ικανότητα να συγκρατείται στο πληρωτικό υλικό λόγω της ύπαρξης μιας αλυσίδας 6 αμινοξέων ιστιδίνης στο N- τελικό άκρο της.

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρειάστηκαν και η σύσταση τους φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1: Ρυθμιστικά διαλύματα για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης

Buffer A	Buffer B	Buffer E (elution)
50mM HEPES	50mM HEPES	50mM HEPES
300mM NaCl	50mM NaCl	50mM NaCl
5mM ιμιδαζόλιο	5mM ιμιδαζόλιο	200mM ιμιδαζόλιο
10% Γλυκερόλη	10% Γλυκερόλη	10% Γλυκερόλη

Αρχικά, η στήλη ξεπλύθηκε με άφθονο απιονισμένο νερό και το πληρωτικό υλικό εξισορροπήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα A, 10 όγκους στήλης.

Έπειτα, προστέθηκε το κυτταρόλυμα το οποίο προηγουμένως είχε φιλτραριστεί με φίλτρο 0.22μm για να μην συσσωρευτούν στην στήλη ακαθαρσίες. Η στήλη σφραγίστηκε από τα δύο άκρα της και τοποθετήθηκε σε rocker/shaker για 1 ώρα για ανάδευση. Ανά 10-15 λεπτά ανακινούνταν χειροκίνητα ώστε το κυτταρόλυμα να εμποτιστεί σε όλη την έκταση του πληρωτικού υλικού.

Μετά το πέρας της μίας ώρας, μεταφερθήκαμε στο cold room (5-6°C). Το κυτταρόλυμα αφέθηκε από τη στήλη, και αφού συλλέχθηκε, ξαναπεράστηκε από αυτή. Συλλέχθηκε σε falcon και αποτέλεσε πλέον το flowthrough.

Στη συνέχεια, περάστηκαν από τη στήλη 10mL ρυθμιστικού διαλύματος A (X10 όγκος πληρωτικού υλικού) και συλλέχθηκαν σε falcon αποτελώντας το wash 1 δείγμα. Με αυτό το τρόπο εκλούστηκαν οι πρωτεΐνες που δεν κατακρατούνται στο πληρωτικό υλικό. Κατόπιν, η στήλη

εκπλύθηκε με 10mL ρυθμικού διαλύματος B (X10 όγκος πληρωτικού υλικού) και συλλέχθηκε και αυτό σε άλλο falcon που αποτέλεσε το δείγμα wash 2.

Για τις τελικές εκπλύσεις (elutions) χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα E σε όγκο 10mL(X10 όγκος πληρωτικού υλικού). Ανά 2-3 mL το δείγμα συλλεγόταν σε διαφορετικά falcons που αποτέλεσαν τα elution 1, 2, 3, 4.

Τα κλάσματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν μετέπειτα σε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE με σκοπό να διαπιστωθεί αν η πρωτεΐνη μας ήταν καθαρισμένη και σε ποια κλάσματα έκλυσης βρισκόταν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση και πιο καθαρή. Τα κλάσματα αυτά όπως φαίνεται και από την εικόνα 16 ήταν τα elutions 2,3,4 τα οποία εν τέλει συμπυκνώθηκαν σε ένα falcon όλα μαζί. Αυτά υποβλήθηκαν σε μέθοδο Bradford για να βρεθεί η συνολική συγκέντρωση πρωτεΐνης σε αυτά.

Το τελευταίο βήμα, ήταν η απομάκρυνση του ιμιδαζολίου από τα κλάσματα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της διαπίδυσης (dialysis). Τα κλάσματα τοποθετήθηκαν σε μεμβράνη κυτταρίνης η οποία ενεργοποιήθηκε παρουσία νερού. Η μεμβράνη αυτή διαθέτει πόρους οι οποίοι δεν επιτρέπουν στην πρωτεΐνη να τους διαπεράσει λόγω μεγάλου μοριακού βάρους. Όμως, όταν υπάρχει διαφορά συγκέντρωσης μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης, τα μόρια στην πλευρά της μεγαλύτερης συγκέντρωσης θα μεταπηδήσουν στην άλλη πλευρά της μεμβράνης με σκοπό την εξισορρόπηση της συγκέντρωσης. Συνεπώς, τα μόρια του ιμιδαζολίου που υπάρχουν στο εσωτερικό της μεμβράνης οδηγούνται στο εξωτερικό όταν η μεμβράνη αυτή τοποθετηθεί σε μεγάλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 50% γλυκερόλη, με pH 7.50. Η ύπαρξη της γλυκερόλης είναι ζωτικής σημασίας για την πρωτεΐνη. Αποτρέπει την δημιουργία δεσμών υδρογόνου του νερού ώστε να μην σχηματιστεί κρυσταλλικός πάγος γύρω από την πρωτεΐνη και αλλοιωθεί η δομή της. Στο τέλος, μεμβράνη τοποθετείται στο διάλυμα αυτό 16-18 ώρες σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία (5°C στο cold room).

Την επόμενη μέρα, συλλέχθηκε το εσωτερικό της μεμβράνης και υπολογίστηκε 3.5mL.

◆ Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Όλα τα δείγματα που προέκυψαν από την χρωματογραφία, φορτώθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου για να πραγματοποιηθεί αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από την πηκτή συσσώρευσης (stacking) και την πηκτή διαχωρισμού (resolving). Οι διαφορές τους είναι η διαφορετική περιεκτικότητα σε πολυακρυλαμίδιο και το διαφορετικό pH που έχουν.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των δύο πηκτών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια παρασκευής 2 gel για την πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Αντιδραστήρια	Πηκτή Συσσώρευσης (4%)	Πηκτή Διαχωρισμού(12%)
<i>Απιονισμένο H₂O</i>	2,5mL	4mL
<i>ABmix (Acrylamide-bis Acrylamide)</i>	0,5mL	5mL
<i>Buffer Tris-HCl (1.5M, pH 8.8 / 0.4 %SDS)</i>	-	3mL
<i>Buffer Tris-HCl (0.5M, pH 6.8 / 0.4 % SDS)</i>	1mL	-
<i>APS</i>	40 μL	80 μL
<i>TEMED</i>	4 μL	8 μL

Αρχικά αναμείχθηκαν τα αντιδραστήρια για την πηκτή διαχωρισμού και τοποθετήθηκαν ανάμεσα στα πλακίδια της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Στη συνέχεια ακολούθησε ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου για τον σχηματισμό του πολυακρυλαμιδίου (πηκτή). Κατόπιν αναμείχθηκαν και τα αντιδραστήρια για την πηκτή συσσώρευσης και τοποθετήθηκαν πάνω στο resolving με ειδικό χτενάκι για τον σχηματισμό των πηγαδιών. Αφού δημιουργηθεί η πηκτή συσσώρευσης τότε η πηκτή ήταν έτοιμη για να φορτώσει τα δείγματα.

Πριν τοποθετηθούν στα πηγάδια της πηκτής, τα δείγματα επεξεργάστηκαν με sample buffer, που αποτελείται από SDS και μερκαπτοαιθανόλη. Το SDS είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό, και έχει την ιδιότητα να προσδένεται στις υδρόφοβες περιοχές των πρωτεϊνών ώστε να τους προσδίδει αρνητικό φορτίο. Η μερκαπτοαιθανόλη ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών και σε συνδυασμό με το SDS χρησιμοποιείται για την ολική αποδιάταξη τους. Έπειτα τα δείγματα επώαστηκαν για 10 λεπτά στους 90°C και φορτώθηκαν στην πηκτή. Η συσκευή γεμίστηκε με running buffer (250mM Tris, 1.93M γλυκερόλη, 1% SDS) και η ηλεκτροφόρηση αφέθηκε να τρέξει για 45-60 λεπτά στα 200 Volt.

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή συσσώρευσης απομακρύνθηκε από την πηκτή διαχωρισμού και η δεύτερη τοποθετείται σε χρωστική Coomassie Brilliant Blue R350 με μεθανόλη, οξικό οξύ και απιονισμένο νερό για μια ώρα με συνεχή ανάδευση ώστε να βαφτεί. Έπειτα επώαζεται σε διάλυμα μεθανόλης, οξικού οξέος και νερού ώστε να αποχρωματιστεί και να παραμείνουν ευδιάκριτες μόνο οι μπάντες με τις πρωτεΐνες.

2.1.6 Προσδιορισμός συνολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford

Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας της πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα. Βασίζεται στην αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με την χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250. Ειδικότερα, όταν η χρωστική βρεθεί όξινο περιβάλλον με πρωτεΐνη, επειδή έχει αρνητικό φορτίο, μπορεί να αλληλεπιδράσει με θετικά φορτισμένα αμινοξέα των πρωτεϊνών, όπως η ιστιδίνη, η αργινίνη και η λυσίνη. Επομένως, δημιουργείται σύμπλοκο με χρώμα μπλε και εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 595nm.

Έτσι, για να προσδιοριστεί η συνολική συγκέντρωση της πρωτεΐνης, δημιουργείται μια καμπύλη αναφοράς από πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις διαλύματος BSA (Bovine Serum Albumin, Bovine γ -globulin), οι οποίες είναι 0.1mg/ μ L, 0.2mg/ μ L, 0.3mg/ μ L, 0.4mg/ μ L, 0.5mg/ μ L. Χρησιμοποιήθηκε και δείγμα χωρίς BSA για καλύτερη κατανομή των σημείων στην καμπύλη.

Επομένως, 200 μ L διαλύματος Bradford (περιέχει την χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250, αιθανόλη και φωσφορικό οξύ) αναμίχθηκαν με 15 μ L κάθε δείγματος της BSA. Το ίδιο συνέβη και με το δείγμα πρωτεΐνης όπου δημιουργήθηκαν δύο ίδια μίγματα δείγματος και διαλύματος Bradford για μεγαλύτερη επαναληψιμότητα μετρήσεων. Για την μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ένα πιάτο 96-θέσεων (96 well microplate Greiner Bio-one) το οποίο μεταφέρθηκε στην συσκευή ανάγνωσης.

2.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση

2.2.1 Ετερόλογη έκφραση της 15-λιπολυξενάσης-1

Κατά τη διαδικασία της έκφρασης της πρωτεΐνης, στο στάδιο της υγρής καλλιέργειας των βακτηριακών κυττάρων (υποενότητα 2.1.3), οι τιμές οπτικής πυκνότητας (OD_{600}) των δειγμάτων που λήφθηκαν από τις δύο καλλιέργειες πριν και μετά τον επαγωγέα IPTG ήταν οι εξής:

Πίνακας 3: Τιμές OD_{600} για τις δύο καλλιέργειες πριν και μετά την επαγωγή με IPTG

Δείγμα	OD_{600} πριν την επαγωγή	OD_{600} μετά την επαγωγή
Καλλιέργεια Α	0.59	4
Καλλιέργεια Β	0.78	4.5

Έπειτα, τα δείγματα αυτά που συλλέχθηκαν πριν και μετά την προσθήκη του επαγωγέα IPTG (before induction και after induction αντίστοιχα) φυγοκεντρήθηκαν για να διαχωριστεί το ίζημα και το υπερκείμενο υγρό. Το ίζημα που αποτελεί τα κύτταρα, επαναιωρήθηκε με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM HEPES, 50 mM NaCl με pH 7,50 και κατεργάστηκε με σκοπό την λύση των κυττάρων. Αφού ολοκληρώθηκε η λύση των κυττάρων, το δείγμα που προέκυψε, φυγοκεντρήθηκε και σε αυτή την περίπτωση συλλέχθηκε τόσο το υπερκείμενο υγρό όσο και το ίζημα τα οποία αναλύθηκαν σε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Από την εικόνα της πηκτής ηλεκτροφόρησης φάνηκε πως τα δείγματα του ιζήματος μετά την επαγωγή έχουν μεγάλη ποσότητα 15-λιποξυγενάσης-1 τόσο για την Α όσο και για την Β καλλιέργεια. Επιπλέον, στα δείγματα από το υπερκείμενο υγρό μετά την λύση των κυττάρων περιείχαν σχεδόν ίδια ποσότητα πρωτεΐνης σε σύγκριση με τα δείγματα ιζήματος. Αυτό συνεπάγεται ότι δεν χάθηκε μεγάλη ποσότητας ενζύμου που καταβυθίστηκε ως ίζημα μαζί με τις μεμβράνες των κυττάρων.

2.2.2 Καθαρισμός της 15-λιποξυγενάσης-1

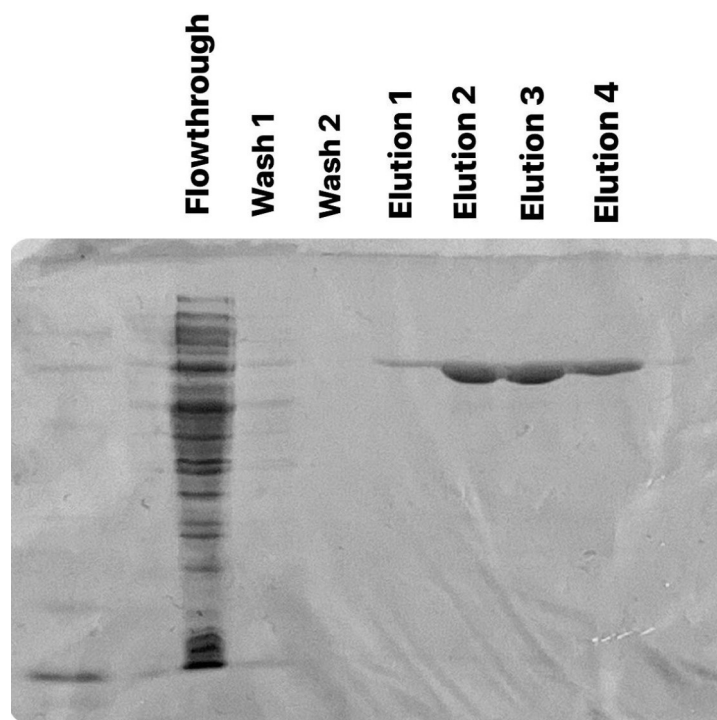
Ύστερα από την χρωματογραφία συγγένειας και την συλλογή όλων των κλασμάτων από την στήλη διαχωρισμού, τα δείγματα φορτώθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου αφού πρώτα επεξεργάστηκαν με τον τρόπο που φαίνεται στον πίνακα 4. Επίσης, στην πηκτή προστέθηκε στο πρώτο πηγάδι το δείγμα του marker, το οποίο αποτελείται από ένα πλήθος πρωτεϊνών και χρησιμοποιείται ως οδηγός για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους και μεγέθους της πρωτεΐνης που μελετάται.

Πίνακας 4: Τα δείγματα και η σύσταση τους στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Δείγμα	Σύνθεση του δείγματος
Marker	20μL
Flowthrough	35μL δείγματος + 35μL sample buffer 2x
Wash 1	35μL δείγματος + 35μL sample buffer 2x
Wash 2	35μL δείγματος + 35μL sample buffer 2x
Elution 1	35μL δείγματος + 35μL sample buffer 2x
Elution 2	35μL δείγματος + 35μL sample buffer 2x
Elution 3	35μL δείγματος + 35μL sample buffer 2x
Elution 4	35μL δείγματος + 35μL sample buffer 2x

Η εικόνα της πηκτής που προέκυψε μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης καθώς και η σειρά τοποθέτησης των δειγμάτων, φαίνονται στην εικόνα 16. Είναι διακριτή η ύπαρξη πολλών διαφορετικού μεγέθους πρωτεϊνών στο κυτταρόλυμα, μιας και το πηγάδι του δείγματος flowthrough αποτελείται από ποικίλες μπάντες. Ωστόσο, η σύγκριση των πηγαδιών που αποτελούν τις εκπλύσεις 1 και 2, δηλαδή το wash 1 και 2, φανερώνουν τον πολύ αποτελεσματικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών που συγκρατούνται στη στήλη από εκείνες που παρασύρονται από τα ρυθμιστικά διαλύματα A και B. Παρατηρείται μάλιστα πως κατά τη δεύτερη έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα B (wash 2) δεν παρασύρθηκε καμία άλλη πρωτεΐνη εφόσον είχαν διαχωριστεί πλήρως από την πρώτη έκπλυση. Στα τελευταία πηγάδια της πηκτής απεικονίζονται τα elutions 1,2,3 και 4 που προέκυψαν από την έκπλυση της στήλης με το ρυθμιστικό διάλυμα E το οποίο περιείχε αυξημένη συγκέντρωση ιμιδαζολίου για την απομάκρυνση της 15-λιποξυγενάσης-1. Φαίνεται λοιπόν η ύπαρξη της 15-λιποξυγενάσης-1 και στα 4 τελευταία πηγάδια της πηκτής με την μεγαλύτερη ποσότητα της να εντοπίζεται στα elutions 2,3 και 4 λόγω των εντονότερων μπαντών. Η πρωτεΐνη εμφανίζεται στο αναμενόμενο ύψος της πηκτής, περίπου στα 75kDa. Τέλος, γίνεται αντιληπτή η ύπαρξη επιπλέον

πρωτεϊνών χαμηλότερα από τις μπάντες της 15-λιποξυγενάσης-1 στα elutions 1-4, γεγονός που φανερώνει την έκλυση μερικών ακόμα πρωτεϊνών αλλά σε μικρότερη ποσότητα (πιο αχνές μπάντες). Τα δείγματα των elution 2,3 και 4 φυλάσσονται για την μετέπειτα επεξεργασία τους και την απομάκρυνση του ιμιδαζολίου από αυτά (υποενότητα 2.1.5).



Εικόνα 16: Πηκτή πολυακρυλαμίδιου μετά την ηλεκτροφόρηση.

2.2.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford

Αφού ακολουθήθηκε όλη η πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε στην υποενότητα 2.1.6 για τον ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτεΐνης, λήφθηκαν οι εξής τιμές απορρόφησης για κάθε δείγμα BSA, για το δείγμα χωρίς BSA και για τα δείγματα της πρωτεΐνης προς ανάλυση:

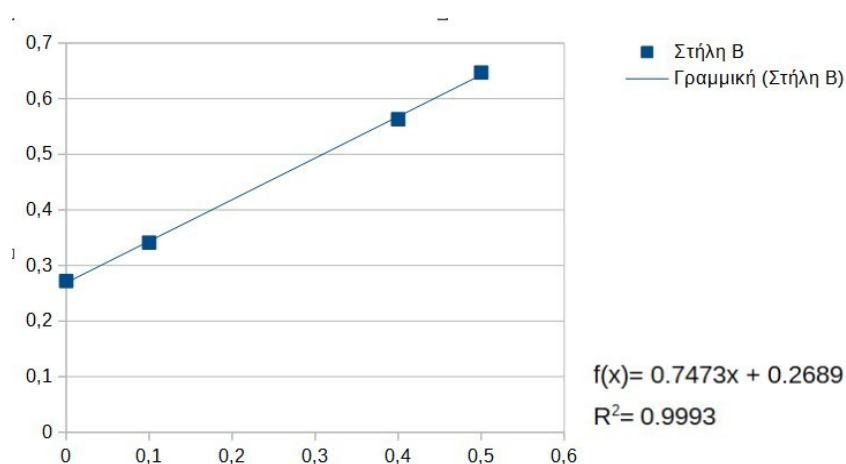
Πίνακας 5: Τιμές απορρόφησης των δειγμάτων BSA και του δείγματος προς ανάλυση στα 595 nm.

Δείγμα (15μL)	Απορρόφηση
Blank	0,272
0.1μg/mL	0,341
0.2μg/mL	0,000

0.3μg/mL	0,000
0.4μg/mL	0,563
0.5μg/mL	0,647
Δείγμα προς ανάλυση	0,608
Δείγμα προς ανάλυση	0,654

Ο μέσος όρος απορρόφησης για τα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν **0.631**.

Στην εικόνα 17 απεικονίζεται η καμπύλη αναφοράς απορροφήσεων για τα δείγματα BSA και τα δείγματα προς ανάλυση.



Εικόνα 17: Καμπύλη αναφοράς απορρόφησης των πρότυπων διαλυμάτων BSA συναρτήσει των συγκεντρώσεών τους.

Η εξίσωση της ευθείας είναι $A=0.7473 \cdot C + 0.2689$

Αντικαθιστούμε τον μέσο όρο απορρόφησης των δειγμάτων προς ανάλυση ($A=0.631$) στην εξίσωση της ευθείας και προκύπτει η συγκέντρωση της καθαρισμένης πρωτεΐνης ίση με **$C=1.94\text{mg/mL}$** .

Επίσης, η τιμή του R^2 ισούται 0.9993, γεγονός που υποδηλώνει την πολύ καλή προσαρμογή των δεδομένων.

Ενότητα 3: ATPase Activity της 15-LOX-1

3.1 Πειραματικό Μέρος

Μια ευρεία κατηγορία ενζύμων είναι οι ATPases. Οι ATPases είναι από τις πιο άφθονες πρωτεΐνες που υπάρχουν, με ποικίλες λειτουργίες που εμπλέκονται σχεδόν σε κάθε κυτταρική οδό. Συναντώνται σε βακτήρια, φυτά (χλωροπλάστες) και ευκαρυώτες (μιτοχόνδρια) και συγκεκριμένα εντοπίζονται στο σύμπλεγμα Golgi, στα ενδοσώματα, στα λυσοσώματα και στα κενοτόπια. Ο ρόλος των συγκεκριμένων ενζύμων είναι η σύνδεση τους με μια αντλία πρωτονίων και ύστερα η κατάλυση και η υδρόλυση ενός φωσφορικού δεσμού που υπάρχει στην τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) προς σχηματισμό διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP) και ορθοφωσφορικού (Pi). Η ενέργεια που απελευθερώνεται από τη διάσπαση του φωσφορικού δεσμού χρησιμοποιείται μετέπειτα για την εκτέλεση των κυτταρικών αντιδράσεων.

Τα παρακάτω πειράματα διεξήχθησαν με σκοπό την διερεύνηση καύσης ATP από την 15-λιποξυγενάση-1 και των παραγόντων που την επηρεάζουν.

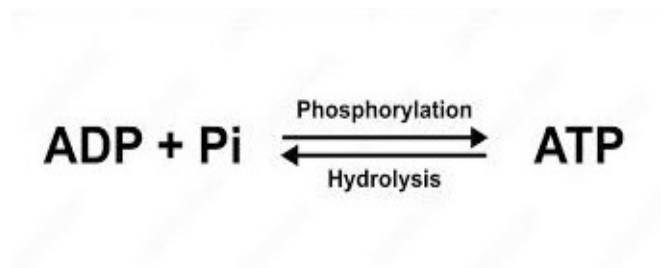
3.1.1 ATPase Activity Assay

Ο σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος είναι η διαπίστωση καύσης ATP από την 15-λιποξυγενάση-1 όταν εκείνη βρίσκεται σε διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα serial dilution. Πιο συγκεκριμένα, σε διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις του ενζύμου διερευνήθηκε η δυνατότητα καύσης ATP από το ένζυμο και σε ποια συγκέντρωση του συναντάται το μεγαλύτερο ποσοστό καύσης ATP.

Γενικά το ATP χρησιμοποιείται ως καύσιμο σε πολλές διαδικασίες των ζώντων οργανισμών όπως αυτές που περιλαμβάνουν μεταφορά ιόντων, μυϊκή σύσπαση, διάδοση νευρικών παλμών, φωσφορυλίωση ενός υποστρώματος και χημική σύνθεση.

Για τον προσδιορισμό της πιθανότητας και της ποσότητας καύσης ATP από την λιποξυγενάση, χρησιμοποιήθηκε εκτός των άλλων, το αντιδραστήριο Reagent Green Malachite. Η δράση του στηρίζεται στην αλληλεπίδραση του με το ορθοφωσφορικό (Pi) που απελευθερώνεται κατά την

υδρόλυση του ATP σχηματίζοντας ένα πράσινο σύμπλοκο μολυβδαινίου που απορροφά στο ορατό. Οι μετρήσεις της απορρόφησης του συμπλόκου αυτού στα 660nm φανερώνουν την υδρόλυση του ATP και την παραγωγή μορίων ορθοφωσφορικού αν η πρωτεΐνη το χρησιμοποιεί ως καύσιμο.



Εικόνα 18: Σύνθεση και υδρόλυση ATP με την παραγωγή ενός μορίου ορθοφωσφορικού P_i που αλληλεπιδρά με το Reagent Green Malachite.

Πειραματική Διαδικασία

Από την μέθοδο Bradford προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του ενζύμου ίση με 1.94mg/mL. Με τις απαραίτητες μετατροπές αυτή η συγκέντρωση ισούται με 25.97 μM .

Για το serial dilution, χρησιμοποιήθηκε ένα ένα πιάτο 96-θέσεων (96 well microplate Greiner) και συνολικά 15 πηγάδια από αυτό καθώς οι μετρήσεις απορρόφησης έγιναν σε τριπλέτες για μεγαλύτερη ακρίβεια και επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Στο κάθε πηγάδι της πρώτης τριπλέτας τοποθετήθηκαν 10 μL του ενζύμου με συγκέντρωση 6.4 μM . Στις επόμενες 3 τριπλέτες τοποθετήθηκαν σε κάθε πηγάδι από 5 μL διαλύματος BB1X (0.05M HEPES, 0.05M NaCl, 5mM MgCl, pH=8) και ξεκίνησε το serial dilution. Τελικά από τις αραιώσεις του serial dilution, προέκυψαν οι συγκεντρώσεις του ενζύμου 3.2 μM , 1.6 μM και 0.8 μM . Η πέμπτη και τελευταία τριπλέτα αποτελούσε το τυφλό δείγμα (blank) χωρίς ποσότητα ενζύμου στην οποία δε έγινε serial dilution. Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία του serial dilution, σε κάθε ένα πηγάδι από τα 15 προστέθηκαν επιπλέον 2 μL διαλύματος BB 1X και 5 μL διαλύματος master mix το οποίο αποτελείται από 0.02M DTT, 0.02M ATP, διάλυμα BB 10X (0.5M HEPES, 0.5M NaCl, 50mM MgCl, pH=8) και μια ποσότητα nanopure νερού.

Στη συνέχεια, το πιάτο 96 θέσεων τοποθετήθηκε στους 37°C για 25 λεπτά. Αφού ολοκληρώθηκε αυτή η επώαση, το πιάτο αφέθηκε για 5 λεπτά στους 4°C για να σταματήσει η αντίδραση του ενζύμου με το ATP και προστέθηκαν 192μL Reagent Green Malachite σε κάθε πηγάδι.

Για την παρασκευή του αντιδραστήριου Reagent Green Malachite αναμείχθηκαν 5mL από το stock με 25μL Triton X 20% με ανάδευση σε ποτήρι ζέσης.

Τέλος, αφού πέρασαν 5 λεπτά μετά την προσθήκη του Reagent Green Malachite, προστέθηκαν 24μL κιτρικού οξέως 37% σε κάθε πηγάδι και το πιάτο αφέθηκε 40 λεπτά σε ηρεμία.

Με το πέρας των 40 λεπτών, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 660nm.

3.1.2 Προσδιορισμός της ποσότητας ATP που καταναλώνεται από την 15-λιποξυγενάση -1

Αφού επιβεβαιώθηκε πειραματικά η ATPase activity της 15-λιποξυγενάσης-1, το επόμενο βήμα ήταν ο προσδιορισμός της ποσότητας του ATP το οποίο χρησιμοποιείται από το ένζυμο ως καύσιμο. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ορισμένες συγκεντρώσεις από διαλύματα φωσφορικών σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-NaCl με pH=8 για την δημιουργία καμπύλης αναφοράς. Από την καμπύλη αναφοράς, και με βάση την δεδομένη εξίσωση της, γίνεται ο προσδιορισμός της ποσότητας των φωσφορικών που καταναλώνονται από την 15-λιποξυγενάση-1.

Πειραματική Διαδικασία

Αρχικά παρασκευάστηκαν σε διαφορετικά δοχεία eppendorf, τα διαλύματα φωσφορικών με τις ακόλουθες συγκεντρώσεις:

Πίνακας 6: Σύσταση των πρότυπων διαλυμάτων φωσφορικών

nmoles Pi/50μL	Διάλυμα φωσφορικών από το stock (μL)	Ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris-Cl Ph=8 (μL)
0.65	20	980
1.3	40	960
2.6	80	920
5.2	160	840

8.45	260	740
10.4	320	680
13	400	600
16.25	500	500

Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε το διάλυμα της 15-λιποξυγενάσης-1 που χρησιμοποιήθηκε με συγκέντρωση 6.4μM και έπειτα το master mix (0.02M DTT, 0.02M ATP, ρυθμιστικό διάλυμα BB 10X και μια ποσότητα nanopure νερού) .

Ακολούθως, σε ένα πιάτο 96 θέσεων (96 well microplate Greiner), και δουλεύοντας με συνολικό όγκο αντίδρασης 12μL και σε τριπλέτες ώστε να επιτευχθούν τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα, τοποθετήθηκαν στην πρώτη τριπλέτα πηγαδιών, 5μL από το ένζυμο με συγκέντρωση 6.4μM, 2μL διαλύματος BB1X (0.05M HEPES, 0.05M NaCl, 5mM MgCl, pH=8) και 5μL διαλύματος master mix. Στην διπλανή τριπλέτα πηγαδιών, τοποθετήθηκαν 7μL BB1X και 5μL master mix. Η τριπλέτα αυτή αποτέλεσε το τυφλό δείγμα (blank). Το πιάτο αφέθηκε για 25 λεπτά στις βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης, δηλαδή στους 37°C και κατόπιν ψύχθηκε απότομα στους 4°C ώστε να τερματίσει η αντίδραση υδρόλυσης του ATP.

Το επόμενο βήμα ήταν η τοποθέτηση 12μL από τα διαλύματα φωσφορικών σε κάθε μία από τις επόμενες τριπλέτες από τα αντίστοιχα διαλύματα τους στα eppendorf, κατά αύξουσα σειρά συγκεντρώσεων. Στην τελευταία τριπλέτα πηγαδιών δημιουργήθηκε ένα ακόμη τυφλό δείγμα το οποίο αποτελούταν μόνο από 12μL ρυθμιστικού διαλύματος 0.05M HEPES, 0.05M NaCl pH=8. Τέλος, σε όλα τα πηγάδια προστέθηκαν 192μL Reagent Green Malachite και 24μL διαλύματος κιτρικού οξέος 24% και το πιάτο αφέθηκε σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά.

Μετά το πέρας των 40 λεπτών, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 660nm και κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς από τις τιμές των απορροφήσεων των διαλυμάτων φωσφορικών. Από την εξίσωση της καμπύλης που προέκυψε, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του ATP που καίγεται από το ένζυμο.

3.1.3 Εξάρτηση υδρόλυσης ATP από την συγκέντρωση του ATP

Στο συγκεκριμένο πείραμα εξετάστηκε η ATPase activity της 15-LOX-1 υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις ATP, δηλαδή η παραγωγή ορθοφωσφορικών, σε συνάρτηση με την συγκέντρωση του ATP. Για την εκτέλεση του πειράματος παρασκευάστηκαν διαλύματα master mix με διαφορετικές συγκεντρώσεις ATP στο κάθε ένα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση της απορρόφησης των ορθοφωσφορικών.

Πειραματική Διαδικασία

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα διαφορετικά διαλύματα master mix με συγκεντρώσεις ATP 0.1M, 0.5M, 0.025M, 0.02M, 0.012M και 0.006M. Στη συνέχεια, σε ένα πιάτο 96 θέσεων και δουλεύοντας σε τριπλέτες τοποθετήθηκαν σε κάθε πηγάδι από 5μL του ενζύμου με συγκέντρωση 6.4μM, 2μL διαλύματος BB1X και 5μL από τα διαφορετικά master mix αλλά σε διαφορετική τριπλέτα κάθε φορά. Επομένως, στον τελικό όγκο αντίδρασης οι συγκεντρώσεις του ATP ήταν 5mM, 2.5mM, 1.2mM, 1mM, 0.6mM και 0.3mM. Επίσης, δημιουργήθηκαν τα τυφλά δείγματα (blanks) τα οποία αποτελούνταν μόνο από 7μL BB1X (0.05M HEPES, 0.05M NaCl, 5mM MgCl, pH=8) και από 5μL από το κάθε διαφορετικό διάλυμα master mix στην κάθε τριπλέτα. Το πιάτο αφέθηκε για 25 λεπτά στις βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης, δηλαδή στους 37°C και κατόπιν ψύχθηκε απότομα στους 4°C για 5 λεπτά ώστε να τερματίσει η αντίδραση υδρόλυσης του ATP. Τέλος, σε όλα τα πηγάδια προστέθηκαν 192μL Reagent Green Malachite και μετά από 5 λεπτά προστέθηκαν 24μL κιτρικού οξέος 37% στο κάθε πηγάδι. Το πιάτο αφέθηκε σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά. Μετά το πέρας των 40 λεπτών, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 660nm.

3.1.4 Αναστολή της ATPase

Ένα ακόμη πείραμα που πραγματοποιήθηκε για την μελέτη της 15-λιποξυγενάσης-1 και την ιδιότητα της ως ATPase, ήταν η αναστολή της ATPase. Όπως και στα προηγούμενα πειράματα της ATPase, έτσι και στο συγκεκριμένο, ο προσδιορισμός της αναστολής έγινε με την χρήση του αντιδραστηρίου Reagent Green Malachite και τις μετρήσεις απορρόφησης στο ορατό φάσμα (660nm) του συμπλόκου που σχηματίζεται, όπως εξηγήθηκε στην υποενότητα 3.1. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί αναστολείς σε διάφορες συγκεντρώσεις, η ένωση Rose

Bengal και ο συναγωνιστικός αναστολέας ThioLOX. Η ένωση Rose Bengal είναι γνωστός αναστολέας για τις ATPάσες οπότε χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την διερεύνηση αναστολής της 15-LOX-1. Ο τελευταίος αναστολέας είναι γνωστό ότι αναστέλλει την καταλυτική υπεροξυγόνωση του λινολεϊκού οξέος επομένως χρησιμοποιήθηκε για να διαπιστωθεί αν εμποδίζει εξίσου και την υδρόλυση του ATP από το συγκεκριμένο ένζυμο. Λαμβάνοντας τις μετρήσεις απορρόφησης του συμπλόκου Reagent Green Malachite- ορθοφωσφορικού, μπορεί να εξαχθεί συμπέρασμα σχετικά με την αναστολή από την εκάστοτε συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προστίθεται κάθε φορά στο ένζυμο όπως και για το ποσοστό αναστολής. Στις περιπτώσεις που δεν παρατηρείται σημαντική απορρόφηση στα 660nm, δεν σχηματίζεται σύμπλοκο εφόσον δεν παράγονται μόρια ορθοφωσφορικού επομένως ο αναστολέας περιορίζει την υδρόλυση του ATP και κατά συνέπεια αναστέλλει την δράση της ATPase.

Πειραματική Διαδικασία

Για την έναρξη του πειράματος επιλέχθηκε η συγκέντρωση του ενζύμου με την οποία θα πραγματοποιούταν το πείραμα. Η συγκέντρωση αυτή ήταν 6.4μM στην οποία, η κινητική του ενζύμου παρακολουθείται εύκολα και για τον λόγο αυτό επιλέγεται για τις πειραματικές διαδικασίες. Στη συνέχεια, δημιουργήθηκαν οι διαφορετικές συγκεντρώσεις των αναστολέων έτσι ώστε να διαπιστωθεί σε ποια συγκέντρωση τους περιορίζουν περισσότερο την δράση του ενζύμου. Παρασκευάστηκαν τρία διαφορετικά διαλύματα με τον ίδιο αναστολέα κάθε φορά με την μέθοδο serial dilution σε συγκεντρώσεις 100μM, 50μM και 25μM.

Κατόπιν, σε ένα πιάτο 96 θέσεων (96 well microplate Greiner), και δουλεύοντας με συνολικό όγκο αντίδρασης 12μL και σε τριπλέτες ώστε να επιτευχθούν τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα, τοποθετήθηκαν σε όλα τα πηγάδια της πρώτης τριπλέτας, 5μL ενζύμου με συγκέντρωση 6.4μM και 2μL διαλύματος BB 1X (0.05M HEPES, 0.05M NaCl, 5mM MgCl, pH=8). Τα πηγάδια αυτά αποτελούν το positive control δείγμα, δεν περιέχουν δηλαδή αναστολέα αλλά περιέχουν μόνο το ένζυμο και το ATP. Έτσι καθίσταται δυνατή η σύγκριση μεταξύ των πηγαδιών αυτών αλλά και των υπολοίπων με αναστολέα. Από την ένταση του χρώματος και τις τιμές των απορροφήσεων εξάγεται το συμπέρασμα σχετικά με την αναστολή.

Το επόμενο βήμα είναι η προσθήκη των δύο αναστολέων με την μεγαλύτερη συγκέντρωση (100μM) στην επόμενες τριπλέτες και ύστερα η προσθήκη των αναστολέων με συγκέντρωση 50μM και 25μM στις παρακάτω τριπλέτες πηγαδιών. Επίσης, προστέθηκε και το ένζυμο σε ποσότητα 5μL. Η τελευταία τριπλέτα πηγαδιών αποτέλεσε το τυφλό δείγμα (blank) και περιείχε 7μL BB1X

και 0.1μL DMSO. Το DMSO προστίθεται επιπλέον και σε όλα τα υπόλοιπα πηγάδια διότι ο αναστολέας που χρησιμοποιήθηκε βρίσκεται σε διάλυμα DMSO και για τον λόγο αυτό πρέπει να προστεθεί σε όλα τα πηγάδια η ίδια ποσότητα ώστε να μην υπάρχει διαφορά στην απορρόφηση. Πιο συγκεκριμένα, μπορεί να παρατηρηθεί αναστολή στα πηγάδια με τον αναστολέα η οποία όμως να μην οφείλεται σε αυτόν αλλά στο DMSO που ως οργανικός διαλύτης επηρεάζει όλες τις πρωτεΐνες αποσταθεροποιώντας τις.

Τέλος, προστέθηκαν 5μL διαλύματος master mix σε όλα τα πηγάδια και το πιάτο αφέθηκε στους 37°C για 25 λεπτά. Αφού ολοκληρώθηκε αυτή η επώαση, το πιάτο έμεινε για 5 λεπτά στους 4°C για να σταματήσει η αντίδραση του ενζύμου με το ATP και προστέθηκαν 192μL Reagent Green Malachite σε κάθε πηγάδι. Αφού πέρασαν 5 λεπτά μετά την προσθήκη του Reagent Green Malachite, προστέθηκαν 24μL κιτρικού οξέως 37% σε κάθε πηγάδι και το πιάτο αφέθηκε 40 λεπτά σε ηρεμία.

Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 660nm.

3.1.5 Μελέτη της ATPase Activity σε συνάρτηση με τον χρόνο επώασης της αντίδρασης

Το επόμενο πείραμα ήταν η μελέτη της αντίδρασης υδρόλυσης του ATP σε σχέση με τον χρόνο επώασης της στους 37°C. Για το σκοπό αυτό, η αντίδραση επώαστηκε για διαφορετικούς χρόνους έτσι ώστε να συγκριθεί η απορρόφηση του συμπλόκου με τα μόρια ορθοφωσφορικού που παράγονται με το πέρασμα του χρόνου. Κατά συνέπεια, εξάγεται συμπέρασμα για επίδραση του χρόνου στην υδρόλυση του ATP από την 15-λιποξυγενάση-1.

Πειραματική Διαδικασία

Σε ένα πιάτο 96 θέσεων (96 well microplate Greiner), και δουλεύοντας με συνολικό όγκο αντίδρασης 12μL και σε τριπλέτες ώστε να επιτευχθούν τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα, τοποθετήθηκαν στην πρώτη τριπλέτα πηγαδιών, 5μL από το ένζυμο με συγκέντρωση 6.4μM, 2μL διαλύματος BB1X (0.05M HEPES, 0.05M NaCl, 5mM MgCl, pH=8) και 5μL διαλύματος master mix. Το πιάτο αφέθηκε για 25 λεπτά στους 37°C και κατόπιν στη διπλανή τριπλέτα τοποθετήθηκαν οι ίδιες ακριβώς ποσότητες ενζύμου και διαλυμάτων BB1X και master mix. Ακολούθησε επώαση

για τα επόμενα 25 λεπτά στις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας και η διαδικασία επαναλήφθηκε έως η αρχική τριπλέτα πηγαδιών να έχει επωαστεί συνολικά 3 ώρες στους 37°C. Επίσης, για κάθε τριπλέτα που δημιουργήθηκε ανά 25 λεπτά, παρασκευάστηκε και το αντίστοιχο τυφλό δείγμα (blank) που αποτελούταν από 7 μL διαλύματος BB1X και από 5 μL από το διάλυμα master mix. Επομένως, από τους διαφορετικούς χρόνους επώασης, προέκυψε ότι η πρώτη αντίδραση επώαστηκε για 3 ώρες, η δεύτερη για 2.5 ώρες, η τρίτη για 2 ώρες, η τέταρτη για 1.5 ώρες, η πέμπτη για 1 ώρα και η έκτη για μισή ώρα. Τέλος, σε όλα τα πηγάδια προστέθηκαν 192 μL Reagent Green Malachite και μετά από 5 λεπτά προστέθηκαν 24 μL κιτρικού οξέος 37% στο κάθε πηγάδι. Το πιάτο αφέθηκε σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά.

Μετά το πέρας των 40 λεπτών, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 660nm.

3.1.6 Μελέτη της ATPase Activity χρησιμοποιώντας διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης της 15-λιποξυγενάσης-1

Συνεχίζοντας την μελέτη για την υδρόλυση του ATP από την 15-λιποξυγενάση-1, εξετάστηκε η υδρόλυση ATP από το ένζυμο όταν το ίδιο επωάζεται για το ίδιο χρονικό διάστημα σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Με τον τρόπο αυτό θα αποφανθεί αν πρόκειται για ενζυμική ή μη ενζυμική αντίδραση και σε ποια θερμοκρασία αδρανοποιείται η πρωτεΐνη. Για τη διεξαγωγή του πειράματος δημιουργήθηκαν διαφορετικά διαλύματα ενζύμου που θερμάνθηκαν σε θερμοκρασίες των 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C και 90°C αντίστοιχα και εξετάστηκε η δραστηριότητα τους όσον αφορά την υδρόλυση του ATP. Είναι γεγονός πως κάθε ένζυμο έχει την μέγιστη δραστηριότητα σε μια ορισμένη θερμοκρασία. Η αλλαγή της θερμοκρασίας της αντίδρασης, ή όπως στο παρόν πείραμα, η επώαση του ενζύμου σε θερμοκρασία διαφορετική από την βέλτιστη, έχει ως αποτέλεσμα την δομική αλλοίωση της πρωτεΐνης και την απώλεια δραστηριότητας της (μετουσίωση).

Πειραματική Διαδικασία

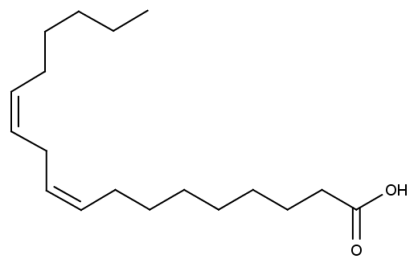
Αρχικά παρασκευάστηκαν τα επτά δείγματα ενζύμου με συγκέντρωση 6.4 μM , ένα για κάθε διαφορετική θερμοκρασία επώασης. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στο thermoblock με το κάθε

δείγμα σε διαφορετική θερμοκρασία για 1 ώρα (60°C , 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C και 90°C) με σκοπό την πιθανή μετουσίωση του ενζύμου και την απώλεια της καταλυτικής του δραστηριότητας ανάλογα την θερμοκρασία. Στη συνέχεια, σε πιάτο 96 θέσεων (96 well microplate Greiner), και δουλεύοντας με συνολικό όγκο αντίδρασης 12μL και σε τριπλέτες, τοποθετήθηκαν στην πρώτη τριπλέτα πηγαδιών (positive control), 5μL από το ενεργό ένζυμο με συγκέντρωση 6.4μM, 2μL διαλύματος BB1X (0.05M HEPES, 0.05M NaCl, 5mM MgCl, pH=8) και 5μL διαλύματος master mix. Το πιάτο αφέθηκε για 25 λεπτά στους 37°C για επώαση. Αφού πέρασαν τα 25 λεπτά, στις επόμενες τριπλέτες τοποθετήθηκαν 5μL από τα ανενεργά ένζυμα, 2μL διαλύματος BB1X και 5μL διαλύματος master mix. Επίσης, παρασκευάστηκε τριπλέτα τυφλού δείγματος που αποτελούνταν από 7μL διαλύματος BB1X και από 5μL από το διάλυμα master mix. Κατόπιν, το πιάτο επώαστηκε στην θερμοκρασία που κάθε φορά απενεργοποιήθηκε το ένζυμο, για 25 λεπτά και έπειτα αφέθηκε για μερικά λεπτά στους 4°C για να διακοπεί η αντίδραση. Τέλος, σε όλα τα πηγάδια προστέθηκαν 192μL Reagent Green Malachite και μετά από 5 λεπτά προστέθηκαν 24μL κιτρικού οξέος 37% στο κάθε πηγάδι. Το πιάτο αφέθηκε σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά.

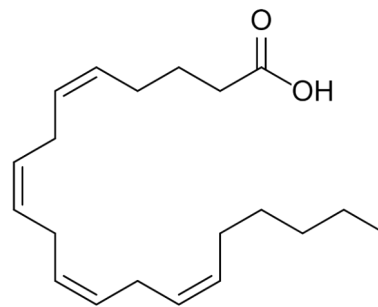
Μετά το πέρας των 40 λεπτών, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 660nm.

3.1.7 Εξάρτηση της ATPase activity της 15-λιποξυγενάσης-1 από την παρουσία υποστρώματος

Ύστερα από τα παραπάνω πειράματα, η μελέτη για την υδρόλυση του ATP από την 15-λιποξυγενάση-1, εστιάστηκε στην εξάρτηση της ATPase παρουσία και απουσία του υποστρώματος του ενζύμου. Η μελέτη αυτής της εξάρτησης είναι σημαντική για την διερεύνηση της ύπαρξης αλλοστερικού φαινομένου μεταξύ των υπομονάδων. Πιο συγκεκριμένα, το υπόστρωμα προστέθηκε στην αντίδραση ώστε να διευκρινιστεί η πιθανότητα συνεργασίας και αλληλεπίδρασης του ενεργού κέντρου με την υπομονάδα που ελέγχει την πρόσδεση και την υδρόλυση του ATP. Η ύπαρξη αλλοστερικού φαινομένου ενδεχομένως να έχει ως αποτέλεσμα την μεταβολή της απελευθερωμένης ποσότητας των ορθοφωσφορικών και συνεπώς και την μεταβολή των απορροφήσεων του συμπλόκου μολυβδαινίου και ανόργανων φωσφορικών ως αποτέλεσμα της επικοινωνίας των υπομονάδων. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το λινολεϊκό οξύ (Linoleic Acid- LA) και το αραχιδονικό οξύ (Arachidonic Acid- AA) σε συγκεντρώσεις 10μM και 20μM το κάθε ένα. Παράλληλα, εξετάστηκε η συνύπαρξη του υποστρώματος με διαφορετικές συγκεντρώσεις ATP για να διαπιστωθεί αν η συγκέντρωση του τελευταίου επηρεάζει διαφορετικά την αντίδραση.



Εικόνα 20: Λινολεϊκό Οξύ



Εικόνα 19: Αραχιδονικό Οξύ

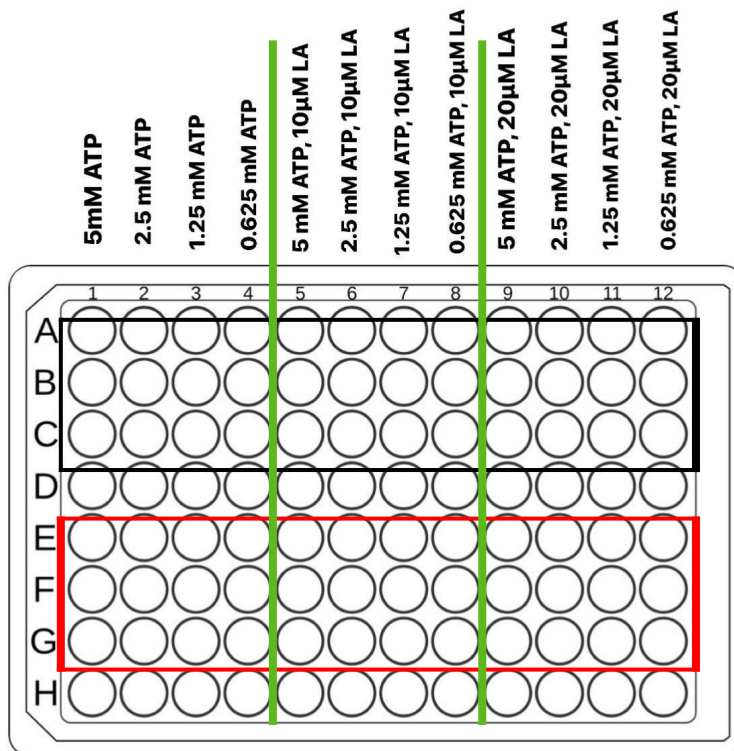
Πειραματική Διαδικασία

Αρχικά παρασκευάστηκε το διάλυμα του ενζύμου με συγκέντρωση 6.4μM από το οποίο προστέθηκαν 5μL σε όλα τα πηγάδια εκτός του τυφλού δείγματος, και τα διαφορετικά διαλύματα master mix με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις ATP.

Πίνακας 7: Απεικόνιση των συγκεντρώσεων ATP στο κάθε διάλυμα master mix

Συγκέντρωση ATP	Master Mix 1	Master Mix 2	Master Mix 3	Master Mix 4
ATP	0.1M	0.05M	0.025M	0.012M

Ύστερα από αραιώσεις, οι τελικές συγκεντρώσεις του ATP στον τελικό όγκο αντίδρασης ήταν 5mM, 2.5mM, 1.25mM και 0.625mM αντίστοιχα. Στη συνέχεια, σε πιάτο 96 θέσεων (96 well microplate Greiner), και δουλεύοντας με συνολικό όγκο αντίδρασης 12μL και σε τριπλέτες, τοποθετήθηκαν τα δείγματα με τον παρακάτω τρόπο.



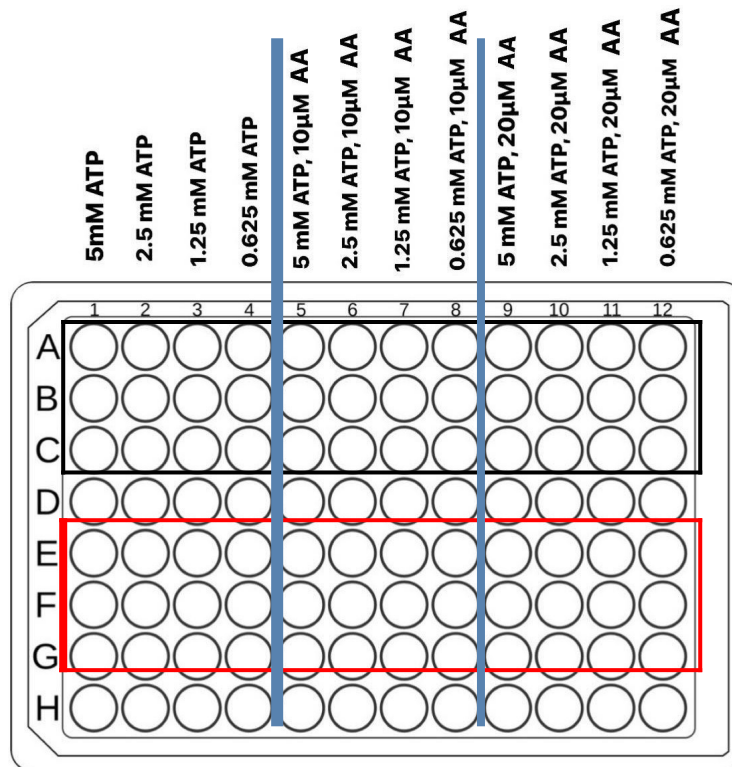
Τυφλά Δείγματα

Σε κάθε πηγάδι προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος BB1X (0.05M HEPES, 0.05M NaCl, 5mM MgCl, pH=8) ώστε να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος αντίδρασης 12μL, και 5μL διαλύματος master mix με την σειρά που φαίνεται στην παραπάνω εικόνα, συμπεριλαμβανομένων και των τυφλών δειγμάτων. Ακολούθησε η προσθήκη 2μL λινολεϊκού οξέος σε όλα τα πηγάδια 5-8 σε τελική συγκέντρωση 10μM και σε όλα τα πηγάδια 9-12 σε συγκέντρωση 20μM. Το πιάτο αφέθηκε για 25 λεπτά στις βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης, δηλαδή στους 37°C και κατόπιν ψύχθηκε απότομα στους 4°C για 5 λεπτά ώστε να τερματίσει η αντίδραση υδρόλυσης του ATP. Τέλος, σε όλα τα πηγάδια προστέθηκαν 192μL Reagent Green Malachite και μετά από 5 λεπτά προστέθηκαν 24μL κιτρικού οξέος 37% στο κάθε πηγάδι. Το πιάτο αφέθηκε σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά.

Μετά το πέρας των 40 λεπτών, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 660nm.

Ακριβώς η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε για την παρακολούθηση της αντίδρασης με υπόστρωμα του ενζύμου αυτή τη φορά το αραχιδονικό οξύ. Η μόνη διαφορά στα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η αντικατάσταση του λινολεϊκού οξέος από το αραχιδονικό οξύ σε

ακριβώς ίδιες ποσότητες και συγκεντρώσεις. Επομένως, ο τρόπος τοποθέτησης των δειγμάτων σε αυτή την περίπτωση ήταν ο εξής:



Τυφλά Δείγματα

Το πιάτο αφέθηκε για 25 λεπτά στους 37°C και κατόπιν ψύχθηκε απότομα στους 4°C για 5 λεπτά ώστε να τερματίσει η αντίδραση υδρόλυσης του ATP. Τέλος, σε όλα τα πηγάδια προστέθηκαν 192μL Reagent Green Malachite και μετά από 5 λεπτά προστέθηκαν 24μL κιτρικού οξέος 37% στο κάθε πηγάδι. Το πιάτο αφέθηκε σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά.

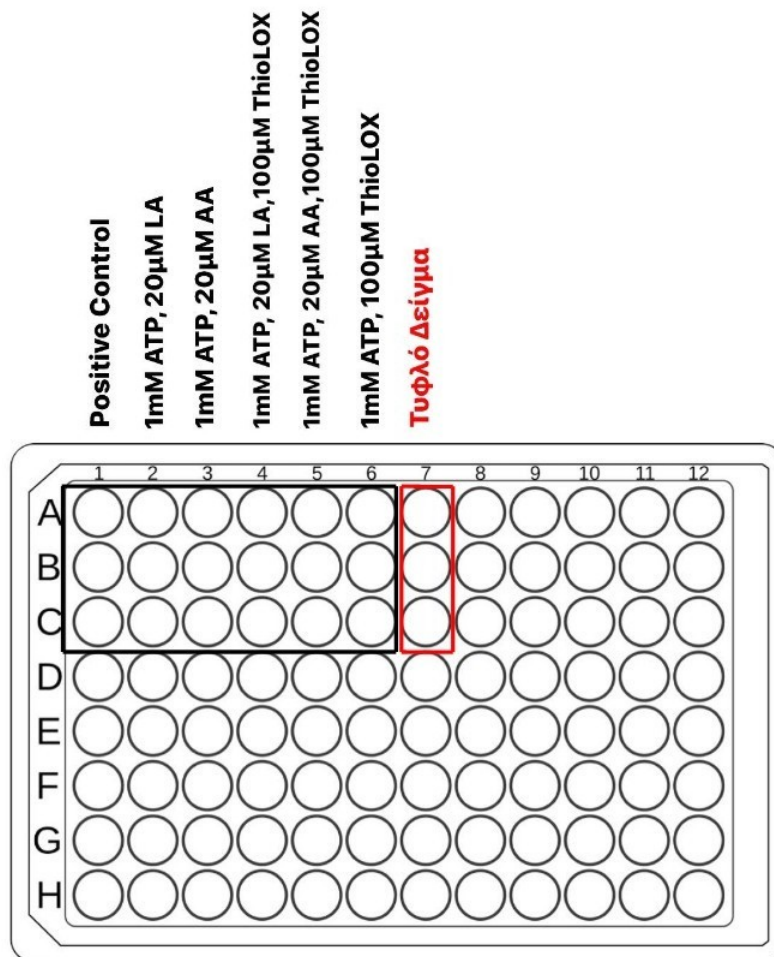
Μετά το πέρας των 40 λεπτών, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 660nm.

3.1.8 Εξάρτηση της ATPase activity της 15-λιποξυγενάσης-1 από την παρουσία υποστρώματος και ενός συναγωνιστικού αναστολέα

Ολοκληρώνοντας την διερεύνηση της καταλυτικής υδρόλυσης ATP από την 15-λιποξυγενάση-1, εξετάστηκε η συνύπαρξη ενός υποστρώματος του ενζύμου, με ATP και έναν συναγωνιστικό αναστολέα. Στόχος του συγκεκριμένου πειράματος ήταν να αποφανθεί η πιθανότητα ύπαρξης αλλοστερικού φαινομένου μεταξύ των υπομονάδων του ενζύμου που προσδέουν το υπόστρωμα του (ενεργό κέντρο) αλλά και το ATP. ως αλλοστερικό φαινόμενο περιγράφεται η επικοινωνία μεταξύ υπομονάδων μιας πρωτεΐνης και συγκεκριμένα οι αλλαγές στη δομή ή και στη λειτουργία μιας υπομονάδας με την πρόσδεση ενός μορίου σε μια διαφορετική υπομονάδα. Για την πραγματοποίηση του συγκεκριμένου πειράματος χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά υποστρώματα του ενζύμου, το λινολεϊκό οξύ (LA) και το αραχιδονικό οξύ (AA) και ως συναγωνιστικός αναστολέας, η ένωση ThioLOX. Ουσιαστικά εξετάστηκε η επίδραση προσθήκης του συναγωνιστικού αναστολέα ThioLOX, στην πρόσδεση του υποστρώματος στο ενζύμου και πώς η συνύπαρξη των δύο αυτών μορίων επηρεάζει την υδρόλυση του ATP από την 15-λιποξυγενάση-1.

Πειραματική Διαδικασία

Αρχικά παρασκευάστηκε το διάλυμα του ενζύμου με συγκέντρωση 6.4μM που προστέθηκαν 5μL από αυτό σε όλα τα πηγάδια εκτός του τυφλού δείγματος, και το διάλυμα master mix με συγκέντρωση ATP 0.02M. Ύστερα από αραιώσεις, η τελική συγκέντρωση του ATP στον τελικό όγκο αντίδρασης ήταν 1mM. Επίσης, παρασκευάστηκαν τα διαλύματα λινολεϊκού (LA) και αραχιδονικού οξέος (AA) σε DMSO και διάλυμα HEPES-NaCl 50mM, με συγκέντρωση 240μM ώστε η τελική τους συγκέντρωση στην αντίδραση να ισούται με 20μM. Τέλος, παρασκευάστηκε το διάλυμα του συναγωνιστικού αναστολέα ThioLOX σε διαλύτη αιθανόλη 96% με τελική συγκέντρωση στην αντίδραση 100μM. Στη συνέχεια, σε πιάτο 96 θέσεων (96 well microplate Greiner), και δουλεύοντας με συνολικό όγκο αντίδρασης 12μL και σε τριπλέτες, τοποθετήθηκαν τα δείγματα με τον παρακάτω τρόπο.



Στο σημείο αυτό επισημαίνεται πως στα πηγάδια 4,5 και 6 της παραπάνω εικόνας, μετά την προσθήκη του ενζύμου σε συγκέντρωση 6.4μM, προηγήθηκε η προσθήκη 1μL από τον συναγωνιστικό αναστολέα ThioLOX (100μM) με σκοπό την επώαση τους σε θερμοκρασία δωματίου για 10-15 λεπτά. Ως γνωστόν, ένας συναγωνιστικός αναστολέας συναγωνίζεται την πρόσδεση του στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, με το υπόστρωμα. Έτσι, στην επώαση αυτή, ο αναστολέας προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου ώστε να εμποδίσει την πρόσδεση του λινολεϊκού ή του αραχιδονικού οξέος σε αυτό. Αφού ολοκληρώθηκε η επώαση του ενζύμου με τον συναγωνιστικό αναστολέα, προστέθηκε σε όλα τα πηγάδια η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος BB1X (0.05M HEPES, 0.05M NaCl, 5mM MgCl, pH=8) ώστε ο τελικός όγκος να ισούται με 12μL και 5μL διαλύματος master mix. Τέλος, στα πηγάδια 2 και 4 προστέθηκε 1μL λινολεϊκού οξέος ενώ στα πηγάδια 3 και 5 προστέθηκε 1μL αραχιδονικού οξέος. Τα πηγάδια 2 και 3 δημιουργήθηκαν με σκοπό την σύγκριση των αποτελεσμάτων τους με τα πηγάδια 4 και 5 που περιείχαν και ThioLOX. Το πιάτο αφήθηκε για 25 λεπτά στις βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης, δηλαδή στους 37°C και κατόπιν ψύχθηκε απότομα στους 4°C για 5 λεπτά ώστε να τερματίσει η αντίδραση υδρόλυσης του

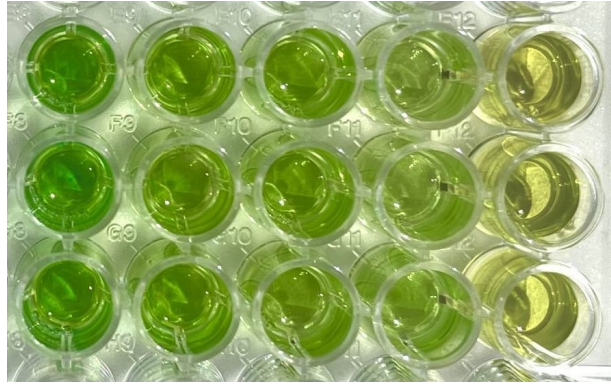
ATP. Τέλος, σε όλα τα πηγάδια προστέθηκαν 192μL Reagent Green Malachite και μετά από 5 λεπτά προστέθηκαν 24μL κιτρικού οξέος 37% στο κάθε πηγάδι. Το πιάτο αφέθηκε σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά.

Μετά το πέρας των 40 λεπτών, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 660nm.

3.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση

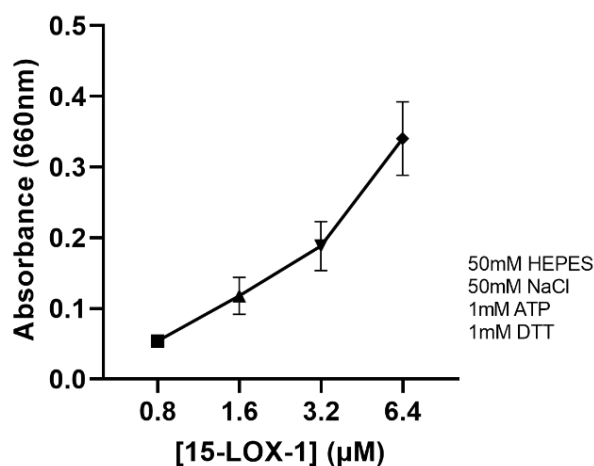
3.2.1 Υδρόλυση ATP από την 15-LOX-1

Από τα πειράματα Activity Assay διαπιστώθηκε η υδρόλυση ATP από το ένζυμο. Όπως επισημάνθηκε και στην υποενότητα 3.1.1, το αντιδραστήριο Malachite Green που χρησιμοποιείται, σχηματίζει ένα πράσινο σύμπλοκο μολυβδαινίου το οποίο απορροφά στο ορατό όταν αλληλεπιδράσει με το ορθοφωσφορικό (Pi) που απελευθερώνεται κατά την υδρόλυση του ATP. Οι μετρήσεις απορρόφησης της αντίδρασης καθώς και η οπτική παρατήρηση της φανέρωσαν τον σχηματισμό του συγκεκριμένου συμπλόκου και κατά συνέπεια την υδρόλυση ATP από την 15-LOX-1. Πιο συγκεκριμένα, το Reagent Green Malachite έχει κίτρινο χρώμα, και όταν προστέθηκε ποσότητα του σε αντίδραση, το χρώμα μετατράπηκε σε πράσινο. Η ένταση του χρώματος εξαρτάται από την ποσότητα των μορίων ορθοφωσφορικού η οποία με τη σειρά της είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ενζύμου. Συνεπώς, οι διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις ενζύμου θα εμφανίζουν διαφορετικές απορροφήσεις, με την μεγαλύτερη απορρόφηση να προκύπτει με συγκέντρωση λιποξυγενάσης 6.4μM.



Εικόνα 21: Απεικόνιση της αντίδρασης υδρόλυσης ATP με διαφορετική συγκέντρωση ενζύμου ανά κάθετη τριπλέτα. Οι συγκεντρώσεις απεικονίζονται από τα αριστερά προς τα δεξιά κατά φθίνουσα σειρά, με την τελευταία τριπλέτα να αποτελεί το τυφλό δείγμα.

Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα, υπάρχει διαβάθμιση του χρώματος. Στην πρώτη τριπλέτα το ένζυμο βρίσκεται σε συγκέντρωση $6.4\mu\text{M}$ και τα πηγάδια περιέχουν τη μεγαλύτερη ποσότητα μορίων P_i μιας και το χρώμα είναι σκούρο πράσινο. Η δεύτερη τριπλέτα περιέχει λιγότερη ποσότητα μορίων P_i και πιο ελαφρύ χρώμα αφού το η συγκέντρωση της πρωτεΐνης έχει υποδιπλασιαστεί σε $3.2\mu\text{M}$. Με κάθε επόμενο υποδιπλασιασμό της συγκέντρωσης $1.6\mu\text{M}$ και $0.8\mu\text{M}$ το χρώμα εξασθενεί εμφανώς λόγω του μικρότερου ποσοστού υδρόλυσης ATP. Η πέμπτη τριπλέτα δεν περιέχει ένζυμο αφού αποτελεί το τυφλό δείγμα και έχει το κίτρινο χρώμα του Reagent Green Malachite. Συμπερασματικά, η 15-λιποξυγενάση-1 έχει την ικανότητα να δρα ως ATPase.



Εικόνα 22: Διαγραμματική αναπαράσταση του πειράματος με διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις της 15-LOX-1. Παρατηρείται η αύξηση της απορρόφησης με την αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου.

3.2.2 Ποσοτικοποίηση Υδρόλυσης ATP

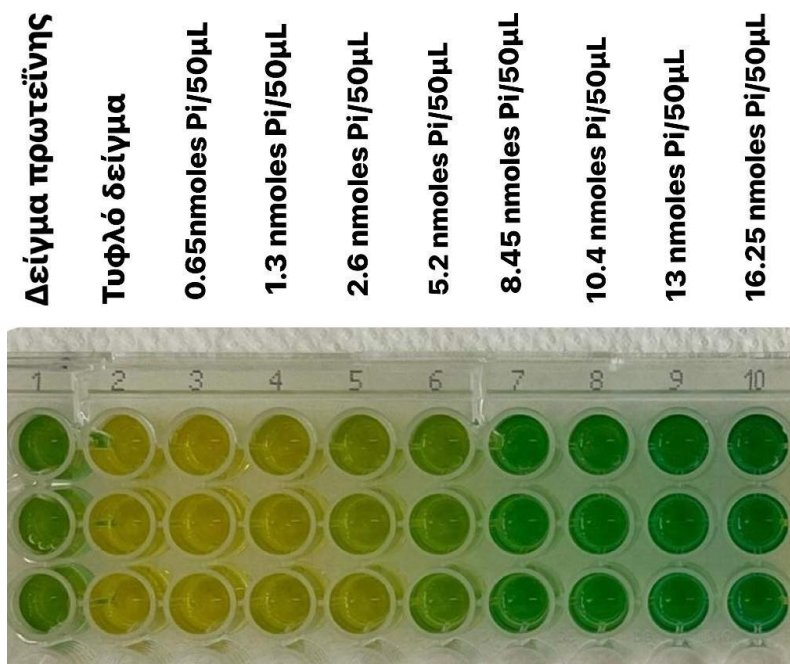
Εφόσον επιβεβαιώθηκε η δράση του ενζύμου ως ATPase, το επόμενο βήμα ήταν ο προσδιορισμός της ποσότητας ATP που υδρολύεται κατά την αντίδραση, η οποία προσδιορίζεται από την συγκέντρωση μορίων Pi που απελευθερώνονται. Από το πείραμα που περιγράφηκε στην υποενότητα 3.1.2, δημιουργήθηκε καμπύλη αναφοράς με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων φωσφορικών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Πίνακας 8: Τιμές απορρόφησης των πρότυπων διαλυμάτων φωσφορικών

Πρότυπα διαλύματα φωσφορικών (nmoles Pi/50μL)	Απορρόφηση
0.0	0.087
0.65	-
1.3	0.121
2.6	-
5.2	-
8.45	0.507

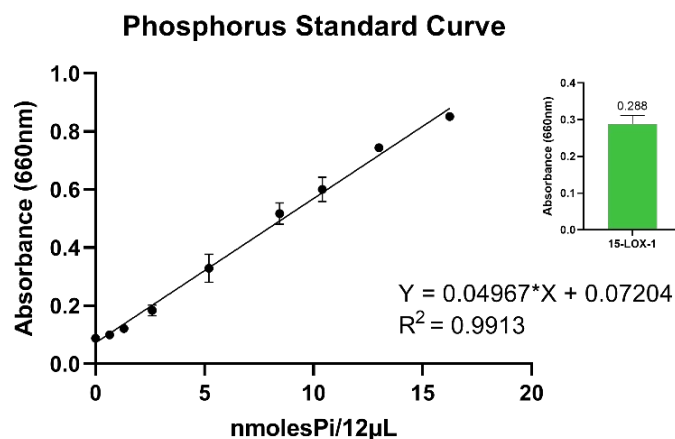
10.4	0.601
13	0.744
16.25	0.851

Στην εικόνα 22 που παρουσιάζεται παρακάτω, απεικονίζεται η διαβάθμιση του χρώματος της αντίδρασης σχηματισμού του συμπλόκου μολυβδαινίου και μορίων ορθοφωσφορικού. Είναι εμφανές ότι όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα των μορίων Pi στο διάλυμα, τόσο πιο έντονο το πράσινο χρώμα εξαιτίας του σχηματισμού περισσότερων συμπλόκων. Στην πρώτη τριπλέτα πηγαδιών φαίνεται το χρώμα της αντίδρασης υδρόλυσης του ATP σε συγκέντρωση 1mM που καταλύεται από την 15-λιποξυγενάση-1 σε συγκέντρωση 6.4μM.



Εικόνα 23: Διαβάθμιση χρώματος αντίδρασης ανάλογα με την συγκέντρωση των πρότυπων διαλυμάτων φωσφορικών. Στο πρώτο πηγάδι φαίνεται το χρώμα της αντίδρασης υδρόλυσης ATP από το ένζυμο .

Ο μέσος όρος της απορρόφησης από το δείγμα ενζύμου σε συγκέντρωση 6.4μM είναι 0.288.



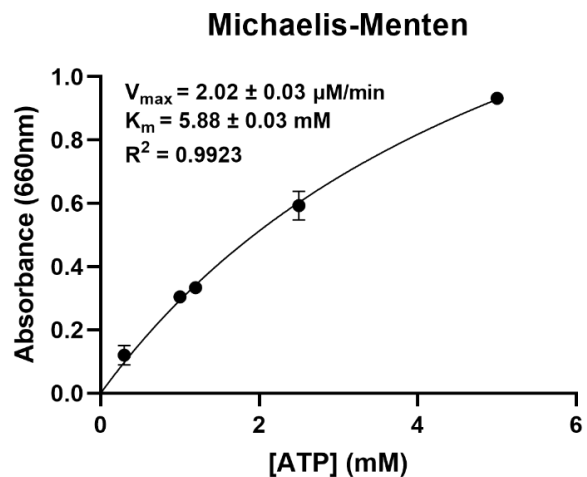
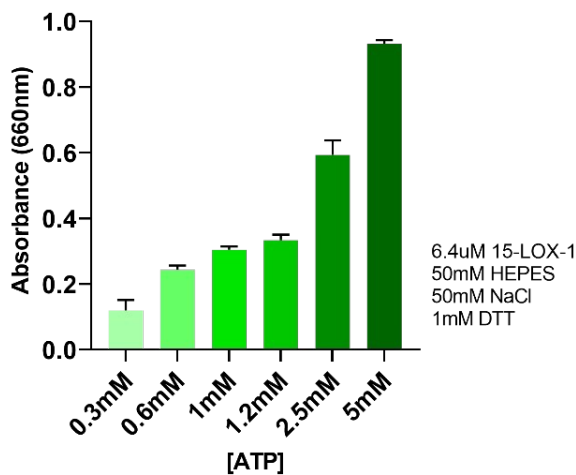
Εικόνα 24: Καμπύλη αναφοράς από τα πρότυπα διαλύματα φωσφορικών.

Η εξίσωση της ευθείας είναι $Y=0.04967x + 0.07204$

Από την παραπάνω καμπύλη αναφοράς και αντικαθιστώντας την μέση τιμή απορρόφησης του ενζύμου στην εξίσωση της ευθείας προκύπτει πως η συνολική ποσότητα ορθοφωσφορικών που απελευθερώνονται από την αντίδραση είναι **4.355 ± 0.008 nmolesPi/12µL**.

3.2.3 Εξάρτηση Υδρόλυσης ATP από την συγκέντρωση του ATP

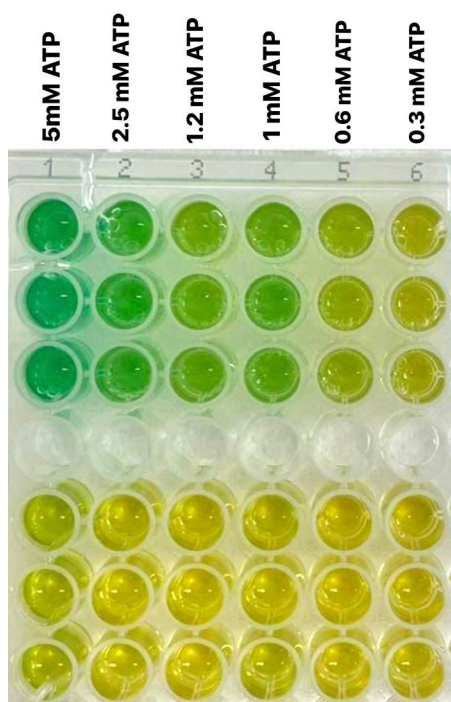
Η ικανότητα της 15-λιποξυγενάσης-1 να δρα ως ATPase εξαρτάται άμεσα από την συγκέντρωση του ATP που υπάρχει διαθέσιμο στο πηγάδι της αντίδρασης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του σχετικού πειράματος 3.1.3, τα οποία απεικονίζονται διαγραμματικά στην εικόνα 25, η αυξανόμενη συγκέντρωση ATP προκαλεί μεγαλύτερο ποσοστό υδρόλυσης του ίδιου. Πιο συγκεκριμένα, όσο πιο άφθονο είναι το ATP, δηλαδή σε συγκέντρωση 5mM σε 12µL αντίδρασης, τόσα περισσότερα μόρια από αυτό προσδένονται στην ειδική θέση πρόσδεσης στο ένζυμο με συνέπεια την υδρόλυση τους και την παραγωγή αυξανόμενης ποσότητας μορίων Pi. Ως αποτέλεσμα της παραπάνω αναλογίας, η απορρόφηση του συμπλόκου μολυβδαινίου και ορθοφωσφορικών αυξάνεται γραμμικά με την αυξανόμενη συγκέντρωση του νουκλεοτιδίου.



Εικόνα 25: Διαγραμματική απεικόνιση της αύξησης της απορρόφησης συναρτήσει της αυξανόμενης συγκέντρωσης ATP. Εικόνα 26: Διάγραμμα κινητικής Michaelis-Menten της συναρτήσει της αυξανόμενης συγκέντρωσης ATP.

Επιπλέον, από το διάγραμμα Michaelis-Menten εξάγεται η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης ίση με $V_{max}=2.02 \pm 0.03 \mu\text{M}/\text{min}$ καθώς και η $K_m= 5.88 \pm 0.03\text{mM}$. Η τιμή της K_m ισούται με την συγκέντρωση του υποστρώματος όταν η αντίδραση εξελίσσεται με ταχύτητα $V_{max}/2$ και υποδηλώνει την συγγένεια του ενζύμου για το υπόστρωμα του. Όσο χαμηλότερη είναι η τιμή της σταθεράς K_m , τόσο μεγαλύτερη είναι η δραστικότητα και η αποτελεσματικότητα του ενζύμου σε μικρότερη συγκέντρωση υποστρώματος. Ακόμη, ο λόγος k_{cat}/K_m ισούται με $0.402 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ και αποτελεί την σταθερά ταχύτητας δεύτερης τάξης όταν το ένζυμο είναι σχεδόν ελεύθερο σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση υποστρώματος. Τέλος, η τιμή του $R^2=0.9923$ υποδηλώνει την καλή προσαρμογή των αποτελεσμάτων στο διάγραμμα.

Επιπλέον, στην εικόνα 27 παρουσιάζεται η διαβάθμιση του χρώματος της καταλυτικής αντίδρασης υδρόλυσης ATP από το ένζυμο. Ειδικότερα, παρατηρείται εντονότερο πράσινο χρώμα όταν το ένζυμο υδρολύει το μεγαλύτερης συγκέντρωσης 5mM ATP μιας και σε αυτή τη περίπτωση παράγονται περισσότερα μόρια P_i άρα σχηματίζονται και περισσότερα σύμπλοκα μολυβδαινίου και ορθοφωσφορικών. Με την μείωση της συγκέντρωσης του ATP το χρώμα εξασθενεί και τείνει στο κίτρινο εφόσον η παραγωγή συμπλόκου είναι μειωμένη. Τέλος, κάτω από τα πηγάδια της αντίδρασης υδρόλυσης, παρατίθενται και τα αντίστοιχα τυφλά δείγματα για κάθε διαφορετικής συγκέντρωσης ATP διάλυμα master mix που χρησιμοποιήθηκε. Γίνεται αντιληπτό από οπτική παρατήρηση πως ανεξάρτητα από την συγκέντρωση του ATP, όλα τα τυφλά δείγματα έχουν το ίδιο χρώμα. Αυτό οφείλεται στην έλλειψη ενζύμου από τα συγκεκριμένα πηγάδια και επομένως την αδυναμία υδρόλυσης του νουκλεοτιδίου.

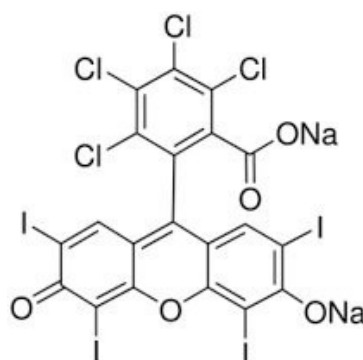
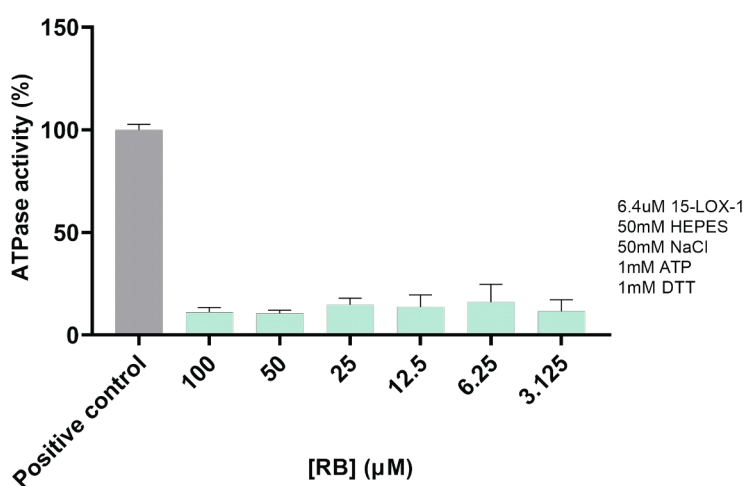


Εικόνα 27: Διαβάθμιση χρώματος της αντίδρασης υδρόλυσης ATP από την 15-LOX-1 ανάλογα με την συγκέντρωση ATP που προστίθεται. Κάτω από κάθε αντίδραση υδρόλυσης φαίνεται το αντίστοιχο τυφλό δείγμα με την ίδια συγκέντρωση ATP.

3.2.4 Αναστολή της ATPase

Η χρήση ενώσεων αναστολέων στην αντίδραση υδρόλυσης ATP από την 15-λιποξυγενάση-1 πραγματοποιήθηκε με σκοπό την διερεύνηση σχηματισμού του συμπλόκου μολυβδαινίου και ορθοφωσφορικών υπό την επίδραση των αναστολέων. Ο πρώτος αναστολέας που εξετάστηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ήταν η ένωση Rose Bengal. Από τις πειραματικές μετρήσεις και την σύγκριση των τιμών απορρόφησης των πηγαδιών με αναστολέα με το πηγάδι που δεν περιείχε ποσότητα του τελευταίου (positive control) εξάγεται το εξής συμπέρασμα: σύμφωνα με το σχετικό διάγραμμα που φαίνεται στην εικόνα 28, η πολυκυκλική αρωματική ένωση Rose Bengal παρεμποδίζει την αντίδραση υδρόλυσης ATP από το ένζυμο. Ειδικότερα, γίνεται αντιληπτό πως η ένωση σε οποιαδήποτε συγκέντρωση που εξετάστηκε (100μM, 50μM, 25μM, 12.5μM, 6.25μM και

3.125 μ M) ανέστειλε τον σχηματισμό συμπλόκου μολυβδαινίου και Pi διότι παρατηρείται μεγάλη μείωση της ενζυμικής ενεργότητας. Το ένζυμο δεν είναι δραστικό ούτε στο 20% της αρχικής του ενεργότητας και έτσι δεν μπορεί να υδρολύσει μόρια ATP με συνέπεια το χρώμα της αντίδρασης να παραμένει κίτρινο, όπως δηλαδή το αρχικό χρώμα του Reagent Green Malachite. Ωστόσο, σε συγκέντρωση 25 μ M και 6.25 μ M, η ένωση Rose Bengal φαίνεται να αναστέλλει λιγότερο την ενζυμική ενεργότητα αλλά λαμβάνοντας υπόψιν και την επίδραση των υπόλοιπων συγκεντρώσεων παρατηρείται πολύ μικρή διαφορά αναστολής.

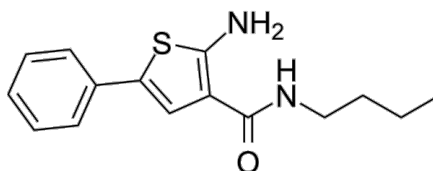
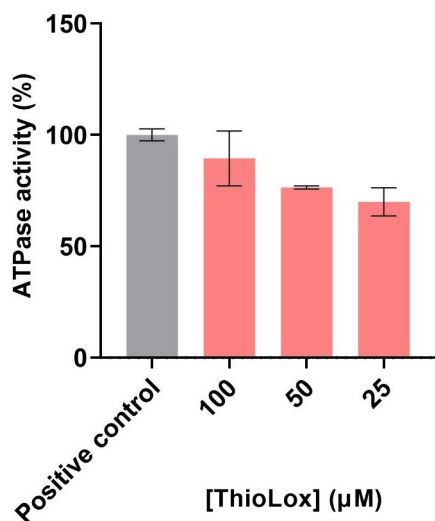


Εικόνα 29: Η ένωση Rose Bengal

Εικόνα 28: Διαγραμματική απεικόνιση αναστολής της ενζυμικής ενεργότητας της 15-LOX-1 από την ένωση Rose Bengal.

Σε αντίθεση με την επίδραση της ένωσης Rose Bengal στην ATPase ιδιότητα της 15-λιποξυγενάσης-1, ο συναγωνιστικός αναστολέας ThioLOX, δεν προκάλεσε αναστολή της καταλυτικής υδρόλυσης του ATP. Η ένωση εξετάστηκε σε συγκεντρώσεις 100 μ M, 50 μ M και 25 μ M και διαπιστώθηκε πως η αντίδραση υδρόλυσης πραγματοποιείται κανονικά σε συγκέντρωση αναστολέα 100 μ M μιας και η ενζυμική ενεργότητα παραμένει σχεδόν ίδια με την αρχική, δηλαδή εκείνη του positive control. Ωστόσο, όταν ο αναστολέας προστέθηκε σε συγκέντρωση 50 μ M και ύστερα 25 μ M, παρατηρήθηκε μικρή μείωση της ενζυμικής ενεργότητας παρόλο που η ένωση βρίσκεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Συνολικά όμως, η προσθήκη του συγκεκριμένου

συναγωνιστικού αναστολέα δεν επιδρά ανασταλτικά στην ενζυμική αντίδραση υδρόλυσης του ATP από την λιποξυγενάση. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στο παρακάτω διάγραμμα.



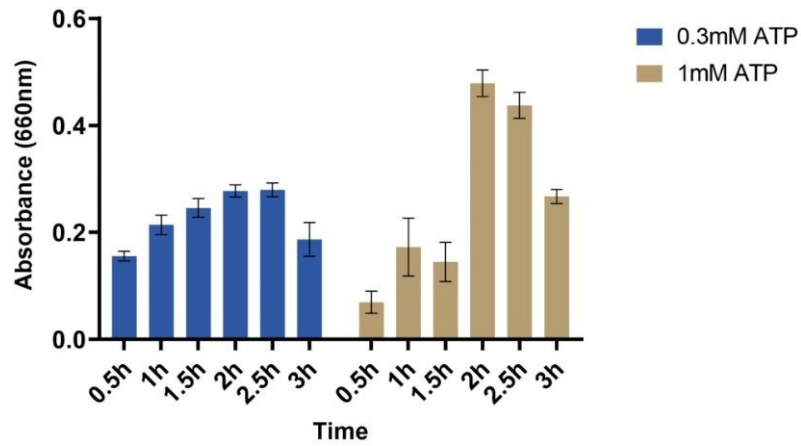
Εικόνα 31: Η ένωση ThioLOX

Εικόνα 30: Διαγραμματική απεικόνιση αναστολής της ενζυμικής ενεργότητας 15-LOX-1 από την ένωση ThioLOX.

3.2.5 Επίδραση του χρόνου επώασης της αντίδρασης στην υδρόλυση του ATP

Η επώαση της αντίδρασης για διαφορετικούς χρόνους φανέρωσε την διαφορετική ποσότητα μορίων ορθοφωσφορικών που παράγονται από την υδρόλυση του ATP. Πιο συγκεκριμένα, η αντίδραση αφέθηκε στους 37°C για 30 λεπτά, 1h, 1.5h, 2h, 2.5h και 3h και παρατηρήθηκε αύξηση της απορρόφησης με την αύξηση του χρόνου επώασης. Σύμφωνα με την αριστερή πλευρά του διαγράμματος που παρουσιάζεται στην εικόνα 32, η απορρόφηση του συμπλόκου μολυβδαινίου και ορθοφωσφορικών αυξάνεται όταν η αντίδραση αφήνεται στους 37°C για 30 λεπτά επώασης έως τις 2.5 ώρες. Παρατηρείται ότι μέχρι και τις 2.5 ώρες, το ένζυμο σταθεροποιείται και στις 2 και 2.5 ώρες η αντίδραση φτάνει στη μέγιστη απορρόφηση περίπου 0.3. Έπειτα όμως τις 2.5 ώρες επώασης στην ίδια θερμοκρασία, φαίνεται πως το ένζυμο χάνει την δραστικότητα του με αποτέλεσμα την μείωση παραγωγής μορίων Pi και του συμπλόκου, και επομένως και την μείωση της απορρόφησης.

Έπεται ότι το χρώμα της αντίδρασης έως και τις 2.5 ώρες επώασης γίνεται πιο έντονο πράσινο ανά μισή ώρα ενώ με το πέρας των 2.5 ωρών, εξασθενεί και τείνει στο κίτρινο. Τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψαν με τη χρήση 0.3mM ATP.



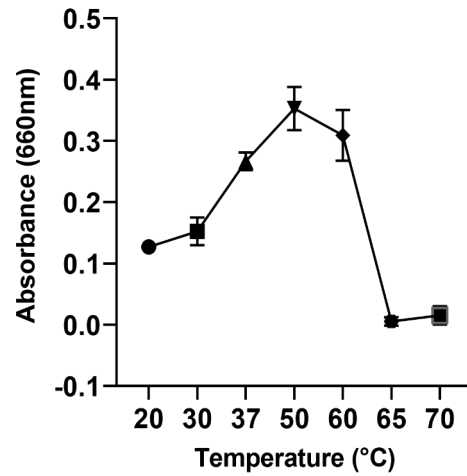
Εικόνα 32: Διαγραμματική απεικόνιση απορρόφησης του συμπλόκου μολυβδαινίου και μορίων Pi σε συνάρτηση με τον χρόνο επώασης και την συγκέντρωση ATP που χρησιμοποιήθηκε.

Παράλληλα εξετάστηκε και η χρήση μεγαλύτερης συγκέντρωσης ATP 1mM για την υδρόλυση του ως συνάρτηση του χρόνου επώασης. Επαναλήψιμα αποτελέσματα μετρήσεων που απεικονίζονται διαγραμματικά στην δεξιά πλευρά της εικόνας 32, φανέρωσαν πως η αύξηση της συγκέντρωσης ATP προκάλεσε αυξημένο ποσοστό υδρόλυσης του από το ένζυμο μόνο στις 2 και 2.5 ώρες επώασης της αντίδρασης. Αυτό φαίνεται από την μεγάλη αύξηση της απορρόφησης του συμπλόκου μολυβδαινίου και Pi περίπου στο 0.5. Η παρατήρηση αυτή δεν συμβαδίζει με τα αποτελέσματα των πειραμάτων όταν χρησιμοποιήθηκε χαμηλότερη συγκέντρωση μιας και δεν γίνεται αντιληπτή κάποια αύξηση της απορρόφησης του συμπλόκου με το πέρας του χρόνου επώασης. Ήστοςο, μετά τις 2.5 ώρες επώασης, η ενζυμική δραστηριότητα μειώνεται αισθητά όπως και όταν χρησιμοποιήθηκε ATP σε συγκέντρωση 0.3mM.

3.2.6 Επίδραση της επώασης του ενζύμου σε διαφορετικές θερμοκρασίες στην καταλυτική αντίδραση

Έπειτα από επώαση του ενζύμου σε διαφορετικές θερμοκρασίες και την μετέπειτα χρήση του για την καταλυτική αντίδραση υδρόλυσης του ATP εξάγεται το παρακάτω συμπέρασμα. Η καταλυτική αντίδραση υδρόλυσης του ATP από την 15-λιποξυγενάση-1 είναι καθαρά ενζυμική μιας και η αύξηση της θερμοκρασίας επώασης του ενζύμου προκαλεί μείωση της απορρόφησης του συμπλόκου μολυβδαινίου και μορίων ορθοφωσφορικού. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στο διάγραμμα της εικόνας 33, παρατηρείται πως η επώαση του ενζύμου μέχρι και τους 50 °C επιδρά θετικά στην υδρόλυση του ATP μιας και αυξάνει τον σχηματισμό μορίων Pi και συνεπώς την απορρόφηση του συμπλόκου. Μάλιστα, στους 50°C, η ενζυμική δραστηριότητα είναι η μέγιστη δυνατή με την απορρόφηση του συμπλόκου να προσεγγίζει το 0.4. Ήστοςο, με την περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας επώασης της πρωτεΐνης πάνω από 50°C, η απορρόφηση φθίνει αισθητά λόγω των λιγότερων μορίων ορθοφωσφορικού που παράγονται. Πιθανότατα το ένζυμο χάνει την καταλυτική του δραστηριότητα και μετουσιώνεται λόγω υψηλής θερμοκρασίας με αποτέλεσμα να μην είναι ικανό να προσδέσει μεγάλη ποσότητα μορίων ATP για να τα υδρολύσει. Τα αποτελέσματα αυτά μας επιτρέπουν να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο μη ενζυμικής αντίδρασης υδρόλυσης του ATP αφού στη περίπτωση αυτή θα έπρεπε η αύξηση της θερμοκρασίας να αυξάνει τον ρυθμό υδρόλυσης του ATP, την παραγωγή μορίων Pi και τέλος την απορρόφηση. Εφόσον όμως η απορρόφηση του συμπλόκου δεν εξαρτάται γραμμικά από την αύξηση της θερμοκρασίας, η

αντίδραση υδρόλυσης είναι ενζυμική και δεν πρόκειται για κάποια τυχαία υδρόλυση του νουκλεοτιδίου λόγω της θερμοκρασίας.



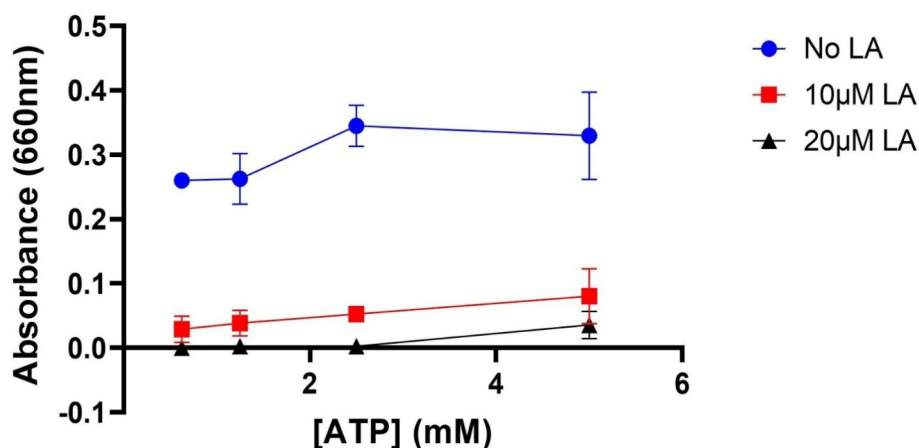
Εικόνα 33: Διαγραμματική απεικόνιση της απορρόφησης συναρτήσει της θερμοκρασίας επώασης της 15-LOX-1 πριν την υδρόλυση του ATP.

3.2.7 Υδρόλυση του ATP από την 15-LOX-1 υπό την παρουσία υποστρώματος

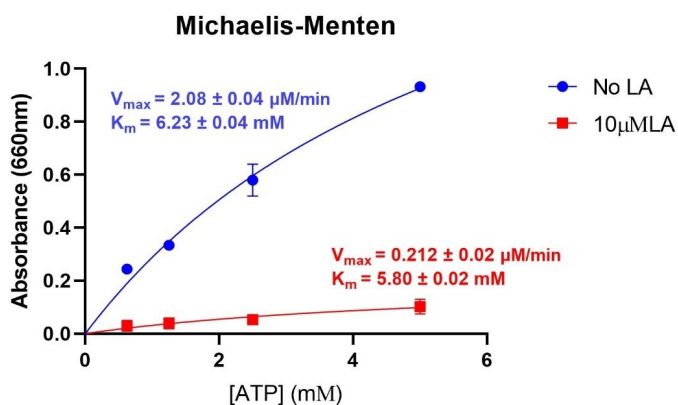
Πριν την διερεύνηση της επίδρασης της ύπαρξης υποστρώματος στην καταλυτική αντίδραση υδρόλυσης, εξετάστηκε για ακόμη μια φορά η εξάρτηση της απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης του ATP. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα της εικόνας 34, η αυξανόμενη συγκέντρωση του ATP από τα 0.625mM στα 5mM στον τελικό όγκο αντίδρασης, αυξάνει την παραγωγή μορίων Pi από την υδρόλυση του νουκλεοτιδίου. Έτσι, σχηματίζονται ολοένα και περισσότερα σύμπλοκα μολυβδαινίου και ορθοφωσφορικών που απορροφούν στα 660nm με αποτέλεσμα την αύξηση της απορρόφησης. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται διαγραμματικά με μπλε χρώμα στο διάγραμμα και συμβαδίζουν με εκείνα του πειράματος 3.1.3.

Επίσης, η προσθήκη 10μM λινολεϊκού οξέος, μεταβάλλει αισθητά τα αποτελέσματα αφού το ποσοστό υδρόλυσης του ATP μειώνεται δραματικά. Ειδικότερα, όπως φαίνεται από την κόκκινη γραμμή του διαγράμματος 34, η προσθήκη λινολεϊκού οξέος μειώνει την υδρόλυση του ATP από την 15-λιποξυγενάση-1 με αποτέλεσμα την ορατή μείωση παραγωγής μορίων Pi άρα και συμπλόκων μολυβδαινίου-Pi. Τα αποτελέσματα αυτά αποτυπώνονται με την ελάττωση της απορρόφησης από τα 0.25 περίπου στο μηδέν για μικρές συγκεντρώσεις ATP (0.625 mM , 1.2mM) και από 0.35 στα 0.05 για υψηλότερες συγκεντρώσεις ATP (2.5mM, 5mM).

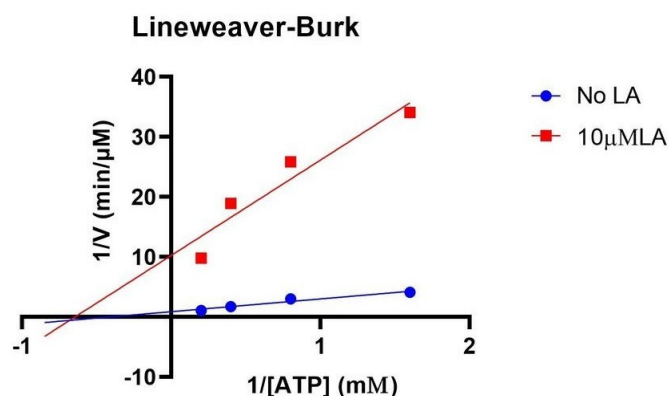
Τέλος, ο διπλασιασμός της συγκέντρωσης του λινολεϊκού οξέος στα 20μM, προκάλεσε σχεδόν ολική απώλεια της υδρόλυσης του ATP μιας και σε χαμηλές συγκεντρώσεις του νουκλεοτιδίου, η απορρόφηση ισούταν με μηδέν και για συγκέντρωση ATP 5mM η απορρόφηση ήταν σχεδόν μηδαμινή, λιγότερο δηλαδή από 0.05.



Εικόνα 34: Διαγραμματική απεικόνιση της απορρόφησης συναρτήσει της παρουσίας και απουσίας λινολεϊκού οξέος κατά αύξουσα συγκέντρωση ATP.



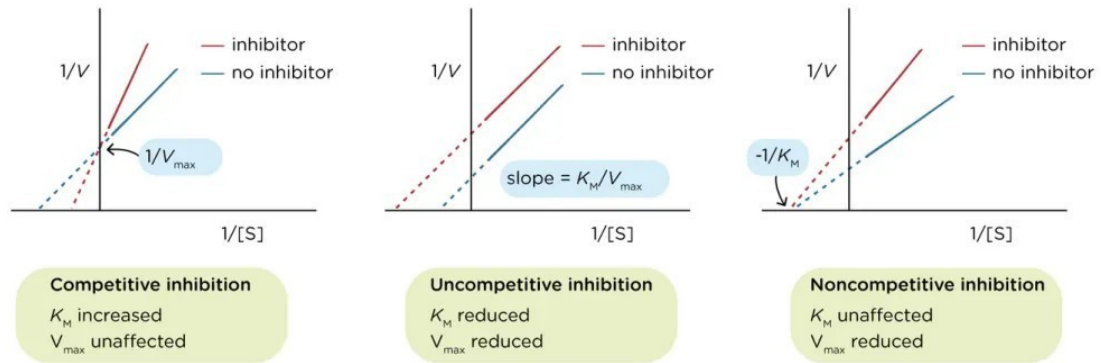
Εικόνα 35: Διάγραμμα κινητικής Michaelis-Menten παρουσία και απουσία λινολεϊκού οξέος συναρτήσει της αυξανόμενης συγκέντρωσης ATP.



Εικόνα 36: Διάγραμμα κινητικής Lineweaver-Burk παρουσία και απουσία λινολεϊκού οξέος συναρτήσει της αυξανόμενης συγκέντρωσης ATP.

Από το διάγραμμα κινητικής Michaelis-Menten που φαίνεται στην εικόνα 35, εξάγεται η τιμή της $K_m = 6.23 \pm 0.04 \text{ mM}$ και της $V_{max} = 2.08 \pm 0.04 \mu\text{M}/\text{min}$. Επίσης, από το διάγραμμα κινητικής Lineweaver-Burk παρατηρείται πως η παρουσία και η απουσία του λινολεϊκού οξέος δεν διαφοροποιούν την K_m εφόσον η τεταγμένη στον άξονα x'x παραμένει αμετάβλητη. Το γεγονός αυτό δίνει την εικόνα πως το λινολεϊκό οξύ συμπεριφέρεται όπως ένας μη-συναγωνιστικός αναστολέας. Επίσης, από την διαφοροποίηση της τεταγμένης στον άξονα y'y, η τιμή της V_{max} μεταβάλλεται με την προσθήκη του λινολεϊκού οξέος, γεγονός που προκαλείται και με την προσθήκη ενός μη-συναγωνιστικού αναστολέα στην αντίδραση. Στην εικόνα 37 καθίσταται δυνατή η σύγκριση του διαγράμματος 36 με το διάγραμμα κινητικής Lineweaver-Burk ενός μη-συναγωνιστικού αναστολέα.

The Lineweaver-Burk plots for inhibition



Εικόνα 37: Διαγράμματα κινητικής Lineweaver-Burk των τριών τύπων αναστολέων. Το διάγραμμα του μη συναγωνιστικού αναστολέα φαίνεται στα δεξιά της εικόνας.

Συμπερασματικά, από τις παραπάνω παρατηρήσεις πιθανολογείται πως η προσθήκη λινολεϊκού οξέος στην αντίδραση, προκαλεί ελάττωση της καταλυτικής δραστηριότητας της ATPase που διαθέτει η 15-λιποξυγενάση-1. Το συγκεκριμένο υπόστρωμα μάλλον ευθύνεται για δομικές αλλαγές που συμβαίνουν στην θέση πρόσδεσης ATP στο ένζυμο με αποτέλεσμα το νουκλεοτίδιο να αδυνατεί να προσδεθεί επιτυχώς στην κατάλληλη περιοχή πρόσδεσης. Έτσι, το ποσοστό υδρόλυσης του ATP μειώνεται σημαντικά όπως και η παραγωγή μορίων ορθοφωσφορικών και συνεπώς η απορρόφηση στα 660nm.

Τέλος, σημειώνεται ότι για την κατασκευή των διαγραμμάτων Michaelis-Menten και Lineweaver-Burk αλλά και για την μελέτη της επαναληψιμότητας του πειράματος εξάρτησης της υδρόλυσης του ATP από το λινολεϊκό οξύ, χρησιμοποιήθηκε το λινολεϊκό οξύ σε συγκέντρωση 10 μ M. Αυτό συνέβη λόγω της καλύτερης παρακολούθησης της αντίδρασης και εφαρμογής των δεδομένων στα διαγράμματα.

3.2.8 Υδρόλυση του ATP από την 15-λιποξυγενάσης-1 υπό την παρουσία υποστρώματος και ενός συναγωνιστικού αναστολέα

Όπως αναφέρθηκε στην υποενότητα 3.1.8, το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε με σκοπό την εξέταση ύπαρξης επικοινωνίας των υπομονάδων που προσδέουν το υπόστρωμα του ενζύμου (ενεργό κέντρο) και το ATP. Από τα αποτελέσματα του πειράματος 3.1.7, βρέθηκε πως η πρόσδεση του λινολεϊκού οξέος, δηλαδή του υποστρώματος του ενζύμου, στο ενεργό του κέντρο μειώνει δραματικά την υδρόλυση του ATP από την 15-λιποξυγενάση-1. Έτσι, η προσθήκη ενός συναγωνιστικού αναστολέα, στην συγκεκριμένη περίπτωση της ένωσης ThioLOX, θα απέτρεπε την πρόσδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο μιας και θα το καταλάμβανε ο ίδιος ο αναστολέας. Επομένως, εφόσον το υπόστρωμα δεν θα ήταν προσδεδεμένο στο ενεργό κέντρο, δε θα εμπόδιζε την πρόσδεση του ATP στην κατάλληλη περιοχή και άρα την υδρόλυση του. Δοκιμάστηκε τόσο το λινολεϊκό όσο και το αραχιδονικό οξύ για υπόστρωμα σε συνδυασμό με τον συναγωνιστικό αναστολέα.

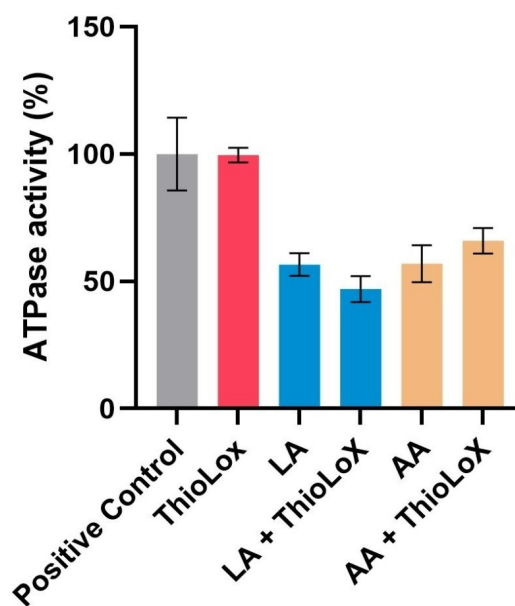
Ωστόσο, τα πειραματικά αποτελέσματα απέρριψαν την παραπάνω υπόθεση για την επαναφορά της ATPase ιδιότητας του ενζύμου με την χρήση συναγωνιστικού αναστολέα.

Αρχικά διαπιστώθηκε για ακόμη μια φορά, από την σύγκριση του positive control με τα πηγάδια που περιείχαν ATP, ένζυμο και αναστολέα, ότι η ένωση ThioLOX δεν δρα ανασταλτικά έναντι της καταλυτικής υδρόλυσης ATP από την 15-λιποξυγενάση-1. Η διαπίστωση αυτή αποτυπώνεται με το ίδιο ύψος των πρώτων δύο μπαρών της εικόνας 38, που υποδηλώνει το ίδιο ποσοστό ενεργότητας της ATPάσης με την παρουσία ή την απουσία του συναγωνιστικού αναστολέα. Το αποτέλεσμα αυτό συμβαδίζει και με τα αποτελέσματα του πειράματος 3.1.4 στο οποίο εξετάστηκε η αναστολή της ATPάσης και από το διάγραμμα της εικόνας 29.

Επιπλέον, παρατηρείται ξανά, όπως και από τα αποτελέσματα του πειράματος 3.1.7, η μείωση της ATPase ενεργότητας της 15-λιποξυγενάσης-1 με την προσθήκη υποστρώματος τόσο λινολεϊκού όσο και αραχιδονικού οξέος αυτή τη φορά στην αντίδραση. Τα υποστρώματα εμποδίζουν την πρόσδεση ATP στο ένζυμο με αποτέλεσμα την διαφορά της ενεργότητας και το μειωμένο ποσοστό που απεικονίζουν οι μπάρες με LA (προσθήκη λινολεϊκού οξέος) και AA (προσθήκη αραχιδονικού οξέος) περίπου στο 50% της αρχικής (positive control).

Από την παρατήρηση των στηλών LA+ThioLOX και AA+ThioLOX, δηλαδή από την αντίδραση που πραγματοποιήθηκε όταν στο πηγάδι προστέθηκε ο αναστολέας μαζί με λινολεϊκό και αραχιδονικό οξύ αντίστοιχα, διαπιστώθηκε πως δεν ανακτήθηκε η ενεργότητα της ATPάσης. Το

ποσοστό ενεργότητας του ενζύμου για την καταλυτική αντίδραση υδρόλυσης του ATP παραμένει ελαττωμένο και μάλιστα λιγότερο από το 50% της αρχικής ενεργότητας όταν συνυπάρχει το λινολεϊκό οξύ με τον αναστολέα. Αντίθετα, η προσθήκη αραχιδονικού οξέος και του ThioLOX στο ίδιο πηγάδι αυξάνει ελάχιστα την ενζυμική ενεργότητα της ΑΤΡάσης λίγο παραπάνω από 50% της αρχικής. Τα αποτελέσματα αυτά δεν συμβαδίζουν με την υπόθεση που έγινε για να πραγματοποιηθεί το συγκεκριμένο πείραμα και δεν έχουν εξηγηθεί μέχρι στιγμής. Επομένως, δεν παρατηρείται αλλοστερικό φαινόμενο μεταξύ της υπομονάδας που περιέχει το ενεργό κέντρο και εκείνης με την θέση πρόσδεσης του ATP.



Εικόνα 38: Διαγραμματική αναπαράσταση του ποσοστού ενζυμικής ενεργότητας της ΑΤΡάσης σε σύγκριση με την συνύπαρξη υποστρώματος και αναστολέα.

Βιβλιογραφία

- i Snodgrass, Ryan G., and Bernhard Brüne. "Regulation and functions of 15-lipoxygenases in human macrophages." *Frontiers in pharmacology* 10 (2019): 719.
- ii Soler, Jordi, et al. "How can linoleic acid be the preferential substrate of the enzyme 15-lipoxygenase-1? A QM/MM approach." *The Journal of Physical Chemistry B* 120.8 (2016): 1950-1960.
- iii Schewe, Tankred. "15-lipoxygenase-1: a prooxidant enzyme." (2002): 365-374.
- iv Ivanov, Igor, et al. "Molecular enzymology of lipoxygenases." *Archives of biochemistry and biophysics* 503.2 (2010): 161-174.
- v Brash, Alan R., et al. "Mechanistic studies of the dioxygenase and leukotriene synthase activities of the porcine leukocyte 12S-lipoxygenase." *Archives of biochemistry and biophysics* 273.2 (1989): 414-422.
- vi Walther, Matthias, et al. "Alterations of lipoxygenase specificity by targeted substrate modification and site-directed mutagenesis." *Chemistry & Biology* 8.8 (2001): 779-790.
- vii Gan, Qing-Fen, et al. "Defining the arachidonic acid binding site of human 15-lipoxygenase: molecular modeling and mutagenesis." *Journal of Biological Chemistry* 271.41 (1996): 25412-25418.
- viii Schewe, T., et al. "A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria." *FEBS letters* 60.1 (1975): 149-152.
- ix Belkner, Jutta, et al. "The oxygenation of cholesterol esters by the reticulocyte lipoxygenase." *FEBS letters* 279.1 (1991): 110-114.
- x Garreta, Albert, et al. "Structure and interaction with phospholipids of a prokaryotic lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa*." *The FASEB Journal* 27.12 (2013): 4811.
- xi BELKNER, Jutta, et al. "Oxygenation of lipoproteins by mammalian lipoxygenases." *European journal of biochemistry* 213.1 (1993): 251-261.
- xii Rapoport, S. M., and T. Schewe. "The maturational breakdown of mitochondria in reticulocytes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* 864.3-4 (1986): 471-495.
- xiii Ivanov, Igor, Hartmut Kuhn, and Dagmar Heydeck. "Structural and functional biology of arachidonic acid 15-lipoxygenase-1 (ALOX15)." *Gene* 573.1 (2015): 1-32.

- xiv Suardíaz, Reynier, et al. "Regio-and Stereospecificity in the Oxygenation of Arachidonic Acid Catalyzed by Leu597 Mutants of Rabbit 15-Lipoxygenase: A QM/MM Study." *ChemPhysChem* 15.11 (2014): 2303-2310.
- xv Kühn, H., H. Sprecher, and A. R. Brash. "On singular or dual positional specificity of lipoxygenases. The number of chiral products varies with alignment of methylene groups at the active site of the enzyme." *Journal of Biological Chemistry* 265.27 (1990): 16300-16305.
- xvi Pekárová, Mária, et al. "Mutagenesis of triad determinants of rat Alox15 alters the specificity of fatty acid and phospholipid oxygenation." *Archives of biochemistry and biophysics* 571 (2015): 50-57.
- xvii Sloane, David L., et al. "Purification and crystallization of 15-lipoxygenase from rabbit reticulocytes." *Biochemical and biophysical research communications* 173.2 (1990): 507-513.
- xviii Choi, Jongkeun, et al. "Conformational flexibility in mammalian 15S-lipoxygenase: reinterpretation of the crystallographic data." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 70.3 (2008): 1023-1032.
- xix Walther, Matthias, et al. "The N-terminal β -barrel domain of mammalian lipoxygenases including mouse 5-lipoxygenase is not essential for catalytic activity and membrane binding but exhibits regulatory functions." *Archives of biochemistry and biophysics* 516.1 (2011): 1-9.
- xx Höhne, M., et al. "In vitro maturation of rabbit reticulocytes. III. Response of lipoxygenase." *Biomedica biochimica acta* 42.9 (1983): 1129-1134.
- xxi Kuhn, Hartmut, et al. "Oxygenation of biological membranes by the pure reticulocyte lipoxygenase." *Journal of Biological Chemistry* 265.30 (1990): 18351-18361.
- xxii Li, Qiu-Qi, et al. "12/15 lipoxygenase: a crucial enzyme in diverse types of cell death." *Neurochemistry International* 118 (2018): 34-41.
- xxiii Huang, Jannet T., et al. "Interleukin-4-dependent production of PPAR- γ ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase." *Nature* 400.6742 (1999): 378-382.
- xxiv Singh, Nikhlesh K., and Gadiparthi N. Rao. "Emerging role of 12/15-Lipoxygenase (ALOX15) in human pathologies." *Progress in lipid research* 73 (2019): 28-45.
- xxv Nagy, Laszlo, et al. "Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ ." *Cell* 93.2 (1998): 229-240.
- xxvi Canals, Santiago, et al. "Nitric oxide triggers the toxicity due to glutathione depletion in midbrain cultures through 12-lipoxygenase." *Journal of Biological Chemistry* 278.24 (2003): 21542-21549.

- xxvii Li, Yonghong, Pamela Maher, and David Schubert. "A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion." *Neuron* 19.2 (1997): 453-463.
- xxviii Nunemaker, Craig S., et al. "12-Lipoxygenase-knockout mice are resistant to inflammatory effects of obesity induced by Western diet." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 295.5 (2008): E1065-E1075.
- xxix Lieb, David C., et al. "Adipose tissue 12/15 lipoxygenase pathway in human obesity and diabetes." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 99.9 (2014): E1713-E1720.
- xxx Pidgeon, Graham P., et al. "Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival." *Cancer and Metastasis Reviews* 26 (2007): 503-524.
- xxxi Xu, Xu, et al. "Arachidonic acid 15-lipoxygenase: effects of its expression, metabolites, and genetic and epigenetic variations on airway inflammation." *Allergy, Asthma & Immunology Research* 13.5 (2021): 684.
- xxxii Gillmor, Sarah A., et al. "The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity." *Nature structural biology* 4.12 (1997): 1003-1009.
- xxxiii KUBAN, Ralf Jürgen, et al. "The iron ligand sphere geometry of mammalian 15-lipoxygenases." *Biochemical Journal* 332.1 (1998): 237-242.
- xxxiv Segraves, Erika N., and Theodore R. Holman. "Kinetic investigations of the rate-limiting step in human 12- and 15-lipoxygenase." *Biochemistry* 42.18 (2003): 5236-5243.
- xxxv Mei, Giampiero, et al. "Structural properties of plant and mammalian lipoxygenases. Temperature-dependent conformational alterations and membrane binding ability." *Biochemistry* 47.35 (2008): 9234-9242.