
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ



**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Απομόνωση και χαρακτηρισμός του ενζύμου λύαση
του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων,
υπερεκφρασμένο σε βακτήρια *Escherichia coli*.**

Παναγάκου Ιωάννα

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2010

**Απομόνωση και χαρακτηρισμός του ενζύμου λύαση του
υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων, υπερεκφρασμένο σε
βακτήρια *Escherichia coli*.**

ΠΑΝΑΓΑΚΟΥ ΙΩΑΝΝΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : Δ. Φ. ΓΑΝΩΤΑΚΗΣ

**ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΤΟΥ ΓΕΝΙΚΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2010

**Isolation and characterization of the enzyme hydroperoxide
lyase, overexpressed in *Escherichia coli* bacteria.**

PANAGAKOU IOANNA

SUPERVISOR: D. F. GHANOTAKIS

**DEPARTMENT OF CHEMISTRY
UNIVERSITY OF CRETE**

HERAKLION 2010

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ξεκινώντας θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Δ. Γανωτάκη για την ανάθεση του θέματος της παρούσας εργασίας, καθώς και την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε ώστε να μου επιτρέψει να εργαστώ στο εργαστήριο του τα τελευταία τέσσερα χρόνια. Η συνεχής καθοδήγηση, οι πολύτιμες συμβουλές καθώς επίσης και η αμέριστη συμπαράσταση του ήταν καθοριστικές για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γ. Τσιώτη και τον Καθηγητή κ. Κ. Βαρώτση που δέχθηκαν να κρίνουν την παρούσα εργασία.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά παλαιότερα και καινούρια μέλη του εργαστηρίου του κ. Γανωτάκη. Τον Μάρκο Τρικεριώτη, τον Δημήτρη Στεφανάκη και τον Λευτέρη Τουλουπάκη για τις γνώσεις και την εμπειρία που μου παρείχαν όλα αυτά τα χρόνια. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω και τις Ειρήνη Κωστομοίρη, Αριάδνη Παπαδάκη και Εύα Βουρεξάκη καθώς και τα μέλη του εργαστηρίου του κ. Τσιώτη, Αντιγόνη Νικολάκη, Αρβανίτη Κατερίνα και Παπαδιώτη Αναστασία για την συμπαράσταση τους και την βοήθεια τους καθώς και για το ευχάριστο κλίμα που δημιούργησαν κάνοντας τις ώρες στο εργαστήριο να περνούν πραγματικά ευχάριστα.

Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω την Μαρία Αμπράζη, από το εργαστήριο του κ. Κοκκινίδη, για το χρόνο και τις γνώσεις που μου διέθεσε, όσον αφορά την τεχνική του κυκλικού διχρωισμού.

Θα ήταν μεγάλη μου παράλειψη να μην ευχαριστήσω τους φίλους μου από την Αθήνα, τις Παπαγεωργίου Ελίζα, Μπακάμη Μαίρη και Τσιμπλάκη Ελπίδα που με στήριζαν τα τόσα χρόνια που είμαι στο Ηράκλειο και που εξακολουθούν να είναι δίπλα μου παρά την επτάχρονη απουσία μου, καθώς και τους καλούς φίλους που έκανα στο Ηράκλειο, τους Παναγιωτοπούλου Μαριάννα, Παπαδάκη Γιάννα, Κουγιανού Κάλλια, Αλτάνη Νίκη, Ζαούρη Δημήτρη, Παντελοπούλου Μαρία, Κολιαδήμα Κατερίνα, Περράκη Τώνια, Ασκούνη Αλέξανδρο, Κουλουκάκου Μάρθα και Μπίνα Βασίλη οι οποίοι έκαναν την παραμονή μου στο Ηράκλειο ευχάριστη και γεμάτη χαρούμενες στιγμές και αναμνήσεις.

Τέλος και πάνω από όλους και από όλα, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, κυρίως τους γονείς μου Βασίλη και Αναστασία, τον αδερφό μου Γρηγόρη αλλά και την ξαδέρφη μου Μαρία γιατί χωρίς την δικιά τους οικονομική και ηθική στήριξη τίποτα από όλα αυτά που έχω καταφέρει τόσα χρόνια δεν θα είχε γίνει πραγματικότητα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Βιολογικές μεμβράνες.....	1
1.2 Ανασυνδυσασμένοι οργανισμοί και πλασμίδια.....	2
1.3 Το πλασμίδιο ρQE-31.....	3
1.4 Λυάση του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων.....	3
1.5 Πτητικές ενώσεις 6 ατόμων άνθρακα.....	8
1.6 Ανάλυση πρωτεϊνών με κυκλικό διχρωισμό.....	10
1.7 Ανάλυση πρωτεϊνών με φασματοσκοπία μάζας.....	13

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Απομόνωση της λυάσης του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων.....	17
2.1.1 Διαλύματα.....	17
2.1.2 Καλλιέργεια βακτηρίων <i>Escherichia coli</i>	17
2.1.3 Χρωματογραφία συγγένειας.....	19
2.1.4 Διαπίδυση	19
2.1.5 Απομόνωση της HPL.....	20
2.1.6 Μελέτη της δραστηριότητας της HPL.....	21
2.1.7 Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού.....	22
2.1.8 Ηλεκτροφόρηση.....	23
2.1.9 Μέθοδος Bradford.....	25
2.2 Απομόνωση μίας υπεροξειδάσης από φύλλα ελιάς.....	27
2.2.1 Διαλύματα.....	28
2.2.2 Πειραματική διαδικασία.....	28
2.3 Ανάλυση πρωτεϊνών με χρήση κυκλικού διχρωισμού.....	29
2.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων.....	29
2.3.2 Πειραματική διαδικασία.....	30
2.3.3 Επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	30
2.4 Ανάλυση πρωτεϊνών με χρήση φασματοσκοπίας μάζας.....	31

2.4.1 Διαλύματα.....	31
2.4.2 Διαδικασία θρυψινοποίησης.....	31
2.4.3 Προετοιμασία δειγμάτων.....	32
2.4.4 Επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	32
2.5 Αντιμικροβιακές και αντιμυκητιακές ιδιότητες της 2-(E)-εξενάλης και εξανάλης.....	33
2.5.1 Θρεπτικά διαλύματα.....	33
2.5.2 Παρασκευή διαφόρων συγκεντρώσεων 2-(E) εξενάλης και εξανάλης.....	33
2.5.3 Παρασκευή των τριβλύων.....	34
2.5.4 Τεχνική της μεθόδου Bauer-Kirby.....	34
2.6 Αντικαρκινικές ιδιότητες 2-(E)-εξενάλης.....	36
2.6.1 Διαλύματα.....	36
2.6.2 Παρασκευή διαλυμάτων 2-(E)-εξενάλης.....	36
2.6.3 Καλλιέργεια κυττάρων HeLa.....	37
2.6.4 Επώαση των κυττάρων παρουσία ουσιών.....	38
2.6.5 Μέθοδος MTT.....	38
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	39

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Απομόνωση της λύσης του υδροϋπεροξειδίου παρουσία Triton X-100.....	40
3.2 Απομόνωση της λύσης του υδροϋπεροξειδίου οξέων παρουσία Dodecyl Maltoside.....	43
3.3 Μελέτη της λύσης του υδροϋπεροξειδίου με χρήση κυκλικού διχρωισμού.....	46
3.4 Μελέτη της λύσης του υδροϋπροξειδίου με χρήση φασματοσκοπίας μάζας.....	51
3.5 Απομόνωση μίας υπεροξειδάσης από τα φύλλα της ελιάς.....	53
3.6 Αντιμικροβιακές και αντιμυκητιακές ιδιότητες της 2-(E)-εξενάλης και εξανάλης.....	59

3.7 Αντικαρκινικές ιδιότητες της 2-(E)-εξανάλης.....	61
--	----

ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

4.1 Απομόνωση της λύσης του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων.....	63
4.2 Χαρακτηρισμός της HPL με κυκλικό διχρωισμό και φασματοσκοπία μάζας....	63
4.3 Απομόνωση μίας πρωτεΐνης από τα φύλλα της ελιάς.....	64
4.4 Αντιμικροβιακές, αντιμυκητιακές και αντικαρκινικές ιδιότητες της 2-(E)-εξανάλης και εξανάλης.....	64

ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ.....	66
---	-----------

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η λυάση του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων (HPL), αποτελεί σημαντικό παράγοντα του μονοπατιού της λιποξυγενάσης, δηλαδή της αμυντικής δράσης των φυτών ενάντια σε εξωγενείς παράγοντες. Η δράση της λυάσης οδηγεί στην παραγωγή μικρού μοριακού βάρους ενώσεων, μεγάλης σπουδαιότητας για τα φυτά, όπως είναι η 2-(E)-εξενάλη και η εξανάλη. Στην παρούσα εργασία, έγινε προσπάθεια απομόνωσης της πρωτεΐνης, η οποία είναι υπερεκφρασμένη σε βακτήρια *E. coli*, με τη χρήση δύο διαφορετικών μη ιονικών απορρυπαντικών, του Triton X-100 και του Dodecyl maltoside (DM). Από τα αποτελέσματα τις εργασίας, ως καταλληλότερο απορρυπαντικό θεωρείται το DM καθώς επιτρέπει και την περαιτέρω ανάλυση της πρωτεΐνης, με φασματοσκοπικές μεθόδους. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε μελέτη της πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας τις τεχνικές του κυκλικού διχρωισμού και της φασματοσκοπίας μάζας, ενώ έγινε και προσπάθεια απομόνωσης της απευθείας από φύλλα ελιάς. Η πρωτεΐνη που τελικά απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε είναι μια παρόμοια σε δράση πρωτεΐνη, μια υπεροξειδάση.

Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν οι ενώσεις 2-(E)-εξενάλη και η εξανάλη οι οποίες αποτελούν τα παράγωγα της δράσης της λυάσης, ώστε να αποδειχτεί η αντιμικροβιακή, η αντιμυκητιακή και τέλος η αντικαρκινική τους δράση. Παρουσιάστηκε έντονη δράση της 2-(E)-εξενάλης, ενώ αισθητά μειωμένη της εξενάλης.

Λέξεις κλειδιά : Λυάση του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων, *E.coli*, κυκλικός διχρωισμός, φασματοσκοπία μάζας, υπεροξειδάση, 2-(E)-εξενάλη, εξανάλη.

ABSTRACT

Fatty acid hydroperoxide lyase (HPL), is an important factor of the lipoxygenase path, that is the defense system of plants against exogenous factors. HPL's function leads to small molecular weight products, of great importance, such as 2-(E)-hexenal and hexanal. In this work, HPL was isolated from *E. coli* bacteria in which it was cloned, using two different types of nonionic detergents, Triton X-100 and Dodecyl Maltoside (DM). The results of this work showed that, DM is the most appropriate detergent, as it allows further analysis of the protein using spectroscopic techniques. Afterwards, HPL was characterized using circular dichroism and mass spectroscopy, while an attempt isolating the protein directly from olive leaves was carried out. The protein, which was isolated and identified, was a similar in action protein, a peroxidase.

Finally, 2-(E)-hexenal and hexanal, two of the HPL's products, were tested for their antimicrobial, antifungal and anticancer properties. 2-(E)-hexenal has an intense effect, while hexanal is less effective.

Key words: fatty acid hydroperoxide lyase (HPL), *E.coli*, circular dichroism, mass spectroscopy, peroxidase, 2-(E)-hexenal, hexanal.

ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ – ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

DNA : δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

His : Ηστιδίνη

HPL : Λυάση του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων

P450 : οικογένεια κυτοχρωμάτων

CYP74 : μέλος της οικογένειας κυτοχρωμάτων P450

kDa : kilodalton

AOS : Allene Oxide Synthase

LOX : λιποξυγενάση

GRAS : Generally Recognized As Safe

ppm : parts per million

MS : Φασματοσκοπία μάζας

ES : ηλεκτροψεκασμός

MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization

DHB : διυδροβενζοϊκό οξύ

TOF : Time Of Flight

EDTA : αιθυλένο-διάμινο-τετραοξικό οξύ

Na₂HPO₄ : όξινο φωσφορικό νάτριο

Na₂CO₃ : ανθρακικό νάτριο

KH₂PO₄ : δις-όξινο φωσφορικό κάλιο

K₂HPO₄ : μόνο-όξινο φωσφορικό κάλιο

PMSF : φαίνυλο-μέθυλ-σουλφόνυλο-φθορίδιο

DM : dodecyl maltoside

E. coli : βακτήριο *Escherichia coli*

IP TG : ισοπρόπυλ-θειο-γαλακτοπυρανοζίτης

13-HPOD : 13-S-υδροϋπεροξειδιο-9-Z-,11-E-οκταδεκαδιενοϊκό οξύ

Ni-NTA : Ni-Nitrilotriacetic acid

UV-Vis : φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού

TEMED : N, N, N', N' – τετραμέθυλο-διαμίνη

SDS : δωδεκανοθειϊκό νάτριο

APS : υπερθειϊκό αμμώνιο

CBB : Coomassie Brilliant Blue

BSA : αλβουμίνη

DTT : διθειοθρεϊτόλη

PEG : πολυαιθυλενογλυκόλη

(NH₄)₂SO₄ : θειϊκό αμμώνιο

ABS : NH₄HCO₃ (ammonium bicarbonate)

IAA : ιωδοακεταμίδιο

TFA : τρίφθορο οξικό οξύ

ACN : ακετονιτρίλιο

S.cer : μύκητας *Saccharomyces Cerivisiae*

YPD : θρεπτικό υλικό με Yeast extract, peptone, dextrose

FBS : Fetal Bovine Serum

MEM : Modified Eagle's Medium

HBSS : Hank's Buffered Saline Solution

MTT : (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

APX : ασκορβική υπεροξειδάση - ascorbic peroxidase

MDAR : monodehydroascorbate reductase

MDA : monodehydroascorbate

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Βιολογικές μεμβράνες

Οι βιολογικές μεμβράνες είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την ύπαρξη της ζωής με τη μορφή που τη βλέπουμε σήμερα. Κύρια λειτουργία των πρωτεϊνών είναι να διατηρούν το status quo των κυττάρων [1,2], παρεμποδίζοντας την απώλεια ζωτικών συστατικών και την είσοδο βλαβερών ουσιών. Πιστεύεται πως η πρώτη ζωντανή οντότητα προέκυψε όταν πρόδρομα βιομόρια εγκλωβίστηκαν σε μια λιπιδική μεμβράνη σχηματίζοντας έτσι ένα αρχέγονο κύτταρο. Ωστόσο, παράλληλα με τη συγκεκριμένη λειτουργία, οι μεμβράνες πρέπει επίσης να συμμετέχουν σε διεργασίες επιλεκτικής μεταφοράς.

Οι διεργασίες αυτές πραγματοποιούνται μέσω των μεμβρανικών πρωτεϊνών, και συγκεκριμένα των μεμβρανικών καναλιών και αντλιών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την μοριακή και ιοντική σύσταση του κυττάρου. Σημαντικός είναι επίσης ο ρόλος των μεμβρανών στην επικοινωνία του κυττάρου με το περιβάλλον του. Συγκεκριμένες πρωτεΐνες, οι μεμβρανικοί υποδοχείς, λαμβάνουν χημικά μηνύματα από τον εξωκυττάριο χώρο και δίνουν το ανάλογο σήμα για την έναρξη συγκεκριμένων ενδοκυττάρων λειτουργιών.

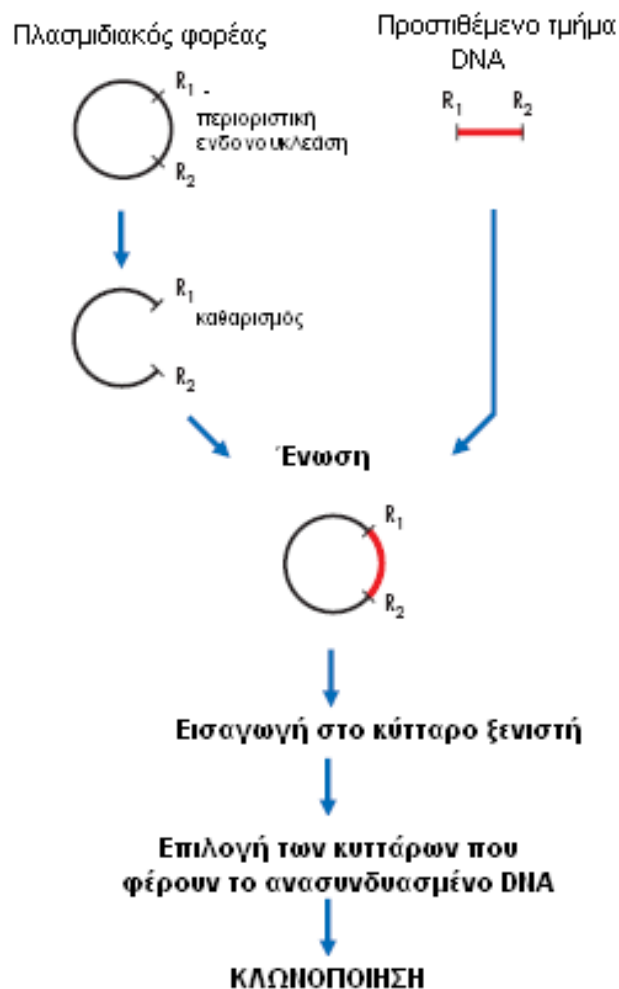
1.2 Ανασυνδυασμένοι οργανισμοί και πλασμίδια

Οι καινοτόμες εργασίες που πραγματοποιήθηκαν στην αρχή της δεκαετίας του 1970, οδήγησε στην ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA. Με την εφαρμογή των τεχνικών του ανασυνδυασμένου DNA, μπορούν να δημιουργηθούν συνδυασμοί από γονίδια διαφορετικά μεταξύ τους, τα οποία στη συνέχεια είναι δυνατόν να κλωνοποιηθούν, δηλαδή να παραχθούν πολλά αντίγραφα. Κατ' αυτόν τον τρόπο αναπαράγονται χρησιμοποιώντας το μηχανισμό σύνθεσης του κυττάρου ξενιστή, συνήθως ενός βακτηριακού κυττάρου [2]. Προκειμένου το ξένο DNA να παραμείνει στο βακτηριακό κύτταρο, χρησιμοποιείται ως φορέας, ένα πλασμίδιο – το πλασμίδιο φορέας (plasmid cloning vector), το οποίο είναι ένα σχετικά μικρό κυκλικό μόριο DNA, μήκους λίγων χιλιάδων ζευγών νουκλεοτιδίων, ικανό να αντιγράφεται μέσα σε ένα βακτήριο. Συνήθως το πλασμίδιο αυτό, περιέχει επιπλέον ένα γονίδιο για κάποια επιλέξιμη ιδιότητα,

όπως η αντοχή στα αντιβιοτικά, που επιτρέπει την ταυτοποίηση των βακτηρίων που έχουν προσλάβει το ανασυνδυασμένο πλασίδιο.

Η διαδικασία της κλωνοποίησης ξεκινάει με τη δράση μιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης, η οποία κόβει το πλασμίδιο σε μία συγκεκριμένη θέση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το γονίδιο που εκφράζει μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη, να συνδέεται ομοιοπολικά με το πλασμιδιακό DNA από την T4 DNA λιγάση. (εικόνα 1)

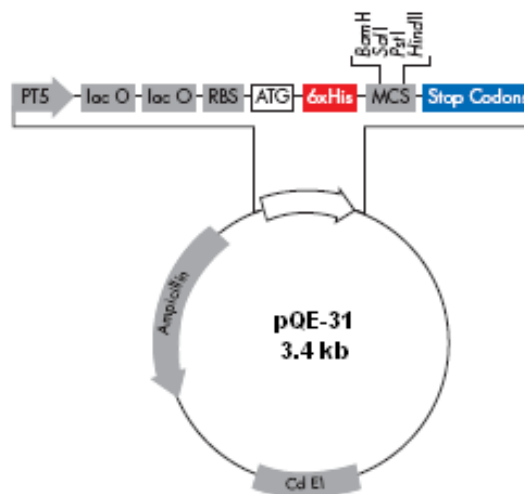
ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ DNA



Εικόνα 1 : Τεχνική του ανασυνδυασμένου DNA.

1.3 Το πλασμίδιο pQE-31

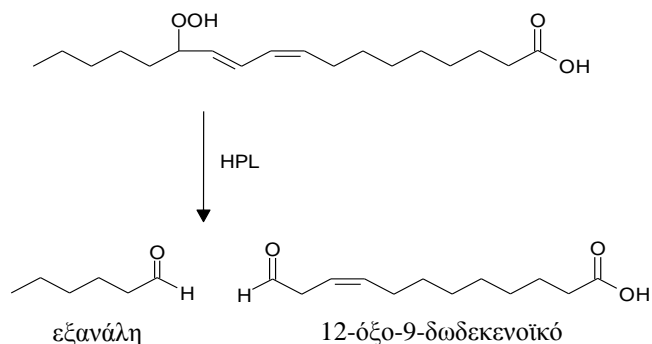
Το πλασμίδιο pQE-31 ανήκει στην κατηγορία των πλασμιδίων pQE, με τα οποία, υψηλά ποσοστά μια πρωτεΐνης μπορούν να εκφραστούν, έπειτα από την προσθήκη σε αυτά, του κατάλληλου γονιδίου που την κωδικοποιεί. Η πρωτεΐνη με τον τρόπο αυτό εκφράζεται παρουσία έξι ιστιδινών, στο N- τελικό ή C-τελικό άκρο της (6xHis tag), με σκοπό την μετέπειτα εύκολη απομόνωση της. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται το πλασμίδιο pQE31.



Εικόνα 2 : Το πλασμίδιο pQE-31.

1.4 Λυάση του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων

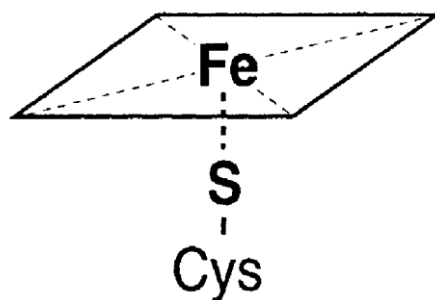
Η λυάση του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων (fatty acid hydroperoxide lyase, HPL ή HPO lyase), είναι ένα ένζυμο που καταλύει την διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων των λιπαρών οξέων στο δεσμό που βρίσκεται μεταξύ του άνθρακα που φέρει την ομάδα του υδροϋπεροξειδίου και του παρακείμενου διπλού trans (E) δεσμού. Συγκεκριμένα η HPL καταλύει τη διάσπαση του λινελαϊκού και του λινολενικού οξέος, δύο πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που φέρουν την υδροϋπερόξυ ομάδα στον C-13 ή στον C-9, παράγοντας αλδεΐδες και ω-οξο-οξέα. [9,10,16,17,18]



Εικόνα 3 : Η αντίδραση που καταλύεται από την λύση των υδροϋπεροξειδίων.

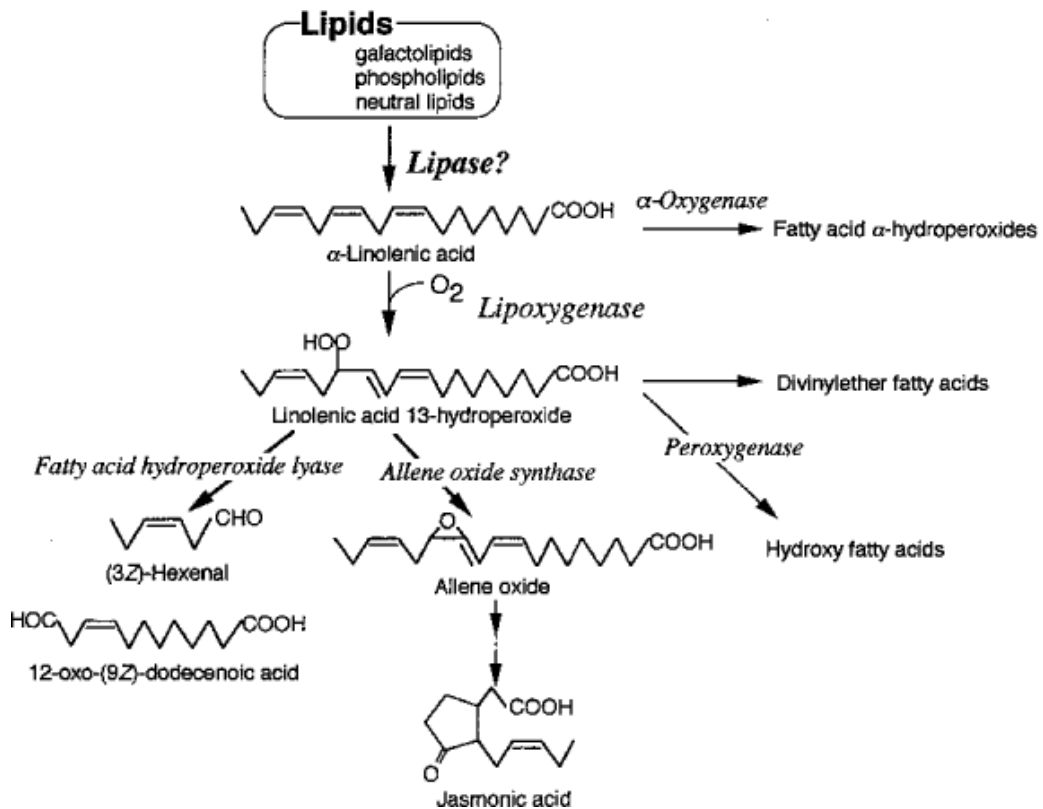
Η HPL έχει απομονωθεί από μία πληθώρα πράσινων φυτών. Πρώτα μελετήθηκε στους καρπούς καρπουζιού [7], στη συνέχεια όμως σε πολλούς ιστούς διαφόρων οργανισμών, όπως τα φύλλα πράσινου τσαγιού [8], την πράσινη πιπεριά [9,10], τα αγγούρια [11], την τομάτα [12], τα φύλλα της τομάτας [13,19], την ελιά [6], καθώς και τα φύλλα αυτής [14].

Η HPL από πιπεριά πρόκειται για μία ομοτριμερή πρωτεΐνη, όπου αποτελείται από 480 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 55 kDa [9,10,13]. Είναι μια πρωτεΐνη που εμφανίζει μεγάλη ομολογία με την οικογένεια των κυτοχρωμάτων P450 (CYP74) [4,5,15]. Όπως και τα κυτοχρώματα P450, έτσι και η HPL, είναι μία αιμοπρωτεΐνη, η οποία φέρει μια πρωτοαίμη IX ως προσθετική ομάδα. Η αμινοξική αλληλουχία έδειξε 40% ομολογία με την Allene oxide synthase (AOS), μέλος της οικογένειας των κυτοχρωμάτων (CYP74A). Όπως η AOS έτσι και η HPL (CYP74B) προσδένει την αίμη χρησιμοποιώντας μια κυστεΐνη, και δεν απαιτούν μοριακό οξυγόνο ή κάποιον άλλο αναγωγικό παράγοντα για να δράσουν. Αυτό συμβαίνει διότι δεν ενεργοποιούν το μοριακό οξυγόνο αλλά την ομάδα του υδροϋπεροξειδίου η οποία είναι ανηγμένη κατά $2e^-$ σε σχέση με το μοριακό οξυγόνο.



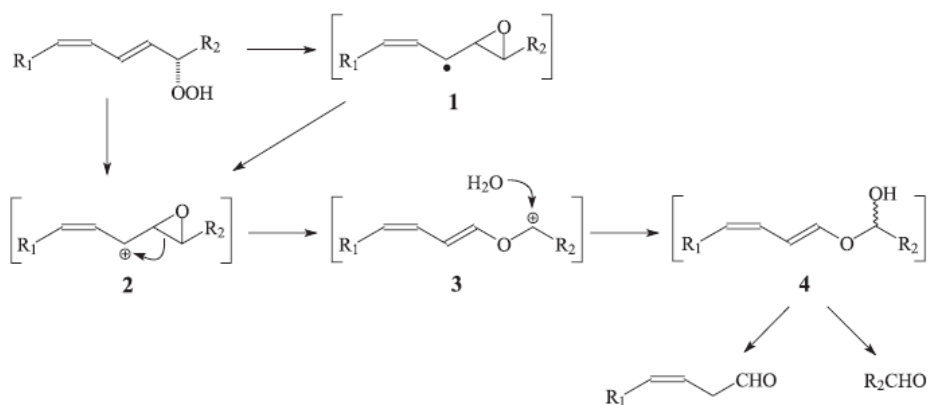
Εικόνα 4 : Σύνδεση του Fe της αίμης με την κυστεΐνη.

Η HPL ανήκει στο μεταβολικό μονοπάτι της λιποξυγενάσης (lipoxygenase LOX) [9,10,16,17,18]. Η μεταβολική οδός της λιποξυγενάσης ξεκινά με την μετατροπή των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων από τη ίδια προς τα αντίστοιχα υδροϋπεροξειδία τους, καταλύοντας την προσθήκη ενός υδροϋπεροξειδίου στην θέση 9 ή στη θέση 13 του λιπαρού οξέος. Το μονοπάτι συνεχίζεται με το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων από μεγάλο αριθμό ενζύμων, μεταξύ αυτών και η HPL, προς μικρού μοριακού βάρους ενώσεις, κυρίως αλδεΐδες και ω-οξο-οξέα, μεγάλης σπουδαιότητας για τα φυτά, που ονομάζονται οξυλιπίνες. Μεταξύ των ουσιών που παράγονται είναι το ιασμονικό οξύ (jasmonate) και το 12-οξο-9-(E)-δωδεκανοϊκό οξύ, το οποίο είναι πρόδρομος της ορμόνης τραυματίνης. Έχει βρεθεί ότι τα παράγωγα της δράσης της HPL έχουν έντονες αντιμικροβιακές και αντιμυκητιακές ιδιότητες [16], όπως επίσης και αντικαρκινική δράση [20]. Τέλος, οι ενώσεις αυτές είναι υπεύθυνες και για το χαρακτηριστικό άρωμα των πράσινων φυτών (green odor) [16].



Εικόνα 5 : Μεταβολικό μονοπάτι της λιποξυγενάσης.

Μέχρι πρότινος, ο μηχανισμός δράσης της HPL πιστευόταν ότι περιλαμβάνει μια σειρά ενδιάμεσων προσδεμένα στο ένζυμο [17]. Κατά την πορεία αυτή, μια επόξυ ρίζα (1) ή ένα κατιόν (2) παράγονται από τη διάσπαση του δεσμού O-O του υδροϋπεροξειδίου, και υφίστανται αναδιάταξη προς σχηματισμό ενός βινυλικού κατιόντος ενός αιθέρα (3), το οποίο κατόπιν ηλεκτρονιόφιλης προσβολής από το νερό δημιουργεί μια ημιακετάλη (4), η οποία εν τέλει διασπάται, δίνοντας τα τελικά προϊόντα. Η διαδικασία αυτή παρουσιάζεται και στην παρακάτω εικόνα.

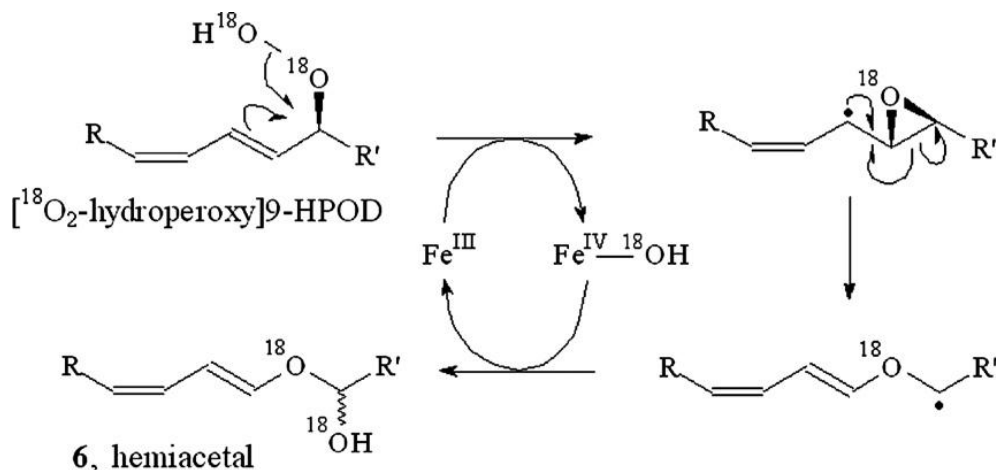


Εικόνα 6 : Μηχανισμός δράσης της HPL μέσω ριζών.

Σε πιο πρόσφατες μελέτες [18], αποδείχτηκε ότι το κύριο παράγωγο της δράσης της HPL είναι η ημιακετάλη στην οποία εμπεριέχονται τα οξυγόνα που προέρχονται από το υδροϋπεροξειδίο, προτείνοντας έτσι έναν ομολυτικό μηχανισμό, ο οποίος περιλαμβάνει μια εποξυ-αλλυλική ρίζα.

Σύμφωνα με αυτόν τον μηχανισμό δράσης, ο δεσμός O-O του υδροϋπεροξειδίου ομολύεται παράγοντας μια αλκόξυ ρίζα, η οποία επαναδιατάσσεται προς μια εποξυ-αλλυλική ρίζα, ενώ ο σίδηρος μεταβαίνει από την οξειδωτική κατάσταση +3 στην κατάσταση +2 (συγκεκριμένα είναι $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{-OH}$). Η ομολυτική διάσπαση του δεσμού C-C και η ταυτόχρονη μεταφορά της ρίζας του -OH, ολοκληρώνει τον σχηματισμό της ημιακετάλης (εικόνα 7).

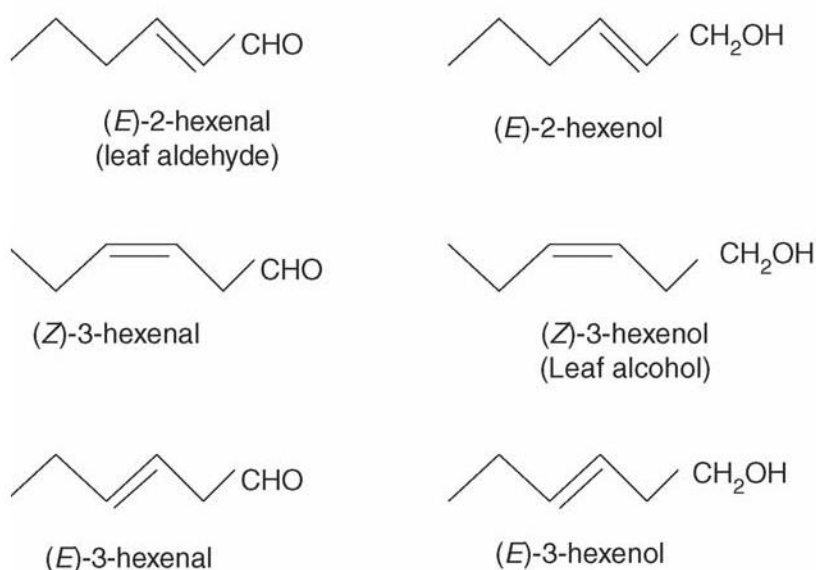
Οι αλδεΐδες που παράγονται, λοιπόν, από τη δράση της HPL, είναι παράγωγα της ημιακετάλης εξαιτίας της υψηλής της αστάθειας (χρόνος ημιζωής στους 0 °C, 20 δευτερόλεπτα) [18]. Επιπλέον η διάσπαση της ημιακετάλης δεν παράγει απευθείας δύο μόρια αλδεΐδας, αλλά ένα μόριο αλδεΐδας και ένα μόριο ενόλης, το οποίο είναι και ιδιαίτερα σταθερό (χρόνος ημιζωής στους 0 °C, 180 δευτερόλεπτα).



Εικόνα 7 : Αποδεκτός μηχανισμός δράσης της HPL.

1.5 Πτητικές ενώσεις έξι ατόμων άνθρακα

Το φρέσκο άρωμα που αναδύεται από τα πράσινα φύλλα, είναι γνωστό με το όνομα green – odor [16,20]. Το άρωμα αυτό αποτελείται από οκτώ πτητικές ενώσεις και βιο-συντίθεται από το λινολενικό και το λινολεϊκό οξύ, μέσω των αντίστοιχων υδροϋπεροξειδίων τους. Οι οκτώ αυτές πτητικές ενώσεις, είναι τέσσερις αλειφατικές αλκοόλες με έξι άτομα άνθρακα (n-εξανόλη, 2-(E)-, 3-(Z)- και 3-(E)-εξανόλη) και οι τέσσερις αντίστοιχες αλδεΐδες (n-εξανάλη, 2-(E)-, 3-(Z)- και 3-(E)-εξανάλη) [16] (εικόνα 8).



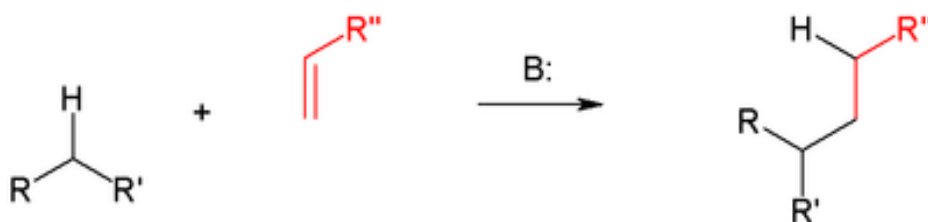
Εικόνα 8 : Οι 6 από τις 8 αρωματικές ενώσεις των πράσινων φυτών.

Είναι γνωστό ότι οι ενώσεις αυτές, κατέχουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες λειτουργίες, όπως η μεταφορά ουσιών μεταξύ φυτών (αλληλοπάθεια), μεταξύ φυτών και εντόμων (φερορμόνες), μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών (φυτοκτόνα) και τέλος μεταξύ φυτών και ανθρώπων (αρωματοθεραπεία).

Από την αρχαιότητα είναι γνωστές οι αντισηπτικές ιδιότητες βοτάνων και μπαχαρικών, καθώς και αρωματικών φυτών, οι οποίες σήμερα έχει βρεθεί ότι οφείλονται στις ενώσεις αυτές. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από την ερευνητική ομάδα του Kubo et al [21], οι κορεσμένες και ακόρεστες αλδεΐδες, οι οποίες προέρχονται από τους καρπούς της ελιάς, εμφανίζουν ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα, με παρόμοια δραστηριότητα εναντίον των Gram-αρνητικών και Gram-θετικών βακτηρίων. Η βακτηριοκτόνος και βακτηριοστατική τους δράση, καθώς και

το γεγονός ότι έχουν χαρακτηριστεί ως ασφαλείς – GRAS (Generally Recognized As Safe) - τις καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμες ως πρόσθετα τροφίμων και ποτών [20,23]. Χαρακτηριστικό είναι ότι η 2-(E)-εξενάλη χρησιμοποιείται ήδη σαν πρόσθετο σε πολλά τρόφιμα, κυρίως ως ενισχυτικό γεύσης. Έχει βρεθεί σε 80 διαφορετικούς τύπους φαγώσιμων, όπως π.χ στον χυμό μήλου (σε συγκέντρωση 18 ppm), στο μαύρο τσάι (σε συγκέντρωση 25 ppm) [25], όπως επίσης και σε φρούτα όπως η μπανάνα (σε συγκέντρωση 40 και 34 ppm).

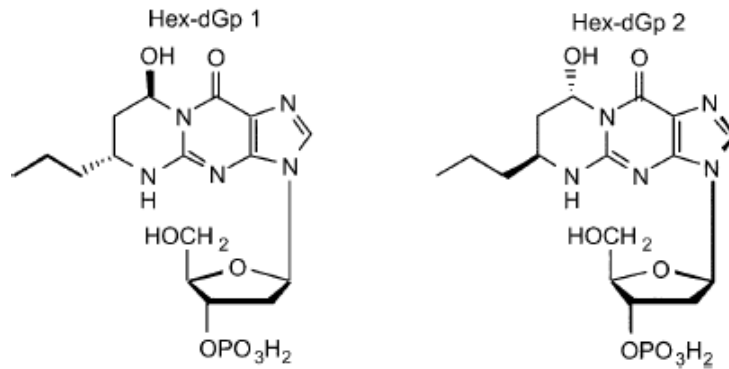
Ο ακριβής μηχανισμός δράσης των ενώσεων αυτών δεν είναι ακόμη απολύτως γνωστός, με μόνη εξαίρεση την 2-(E)-εξενάλη. Η 2-(E)-εξενάλη περνά μέσω παθητικής διάχυσης δια μέσου της μεμβράνης. Όταν βρίσκεται μέσα στο κύτταρο το α,β-ακόρεστο τμήμα της αντιδρά με βιολογικής σημασίας πυρηνόφιλες ομάδες. Οι πυρηνόφιλες αυτές ομάδες, είναι σουλφυδρύλ-ομάδες και πραγματοποιούνται κυρίως 1,4-προσθήκες, πάνω στον διπλό δεσμό, σύμφωνα με τον μηχανισμό της αντίδρασης Michael (εικόνα 9) [22,26]



Εικόνα 9 : Μηχανισμός προσθήκης κατά Michael.

Η διαρροή συγκεκριμένων ιόντων εξαιτίας της δράσης τέτοιων μορίων στην κυτταρική μεμβράνη, έχει δραματικά αποτελέσματα στην πρωτονιοκίνητη δύναμη, με αποτέλεσμα τη μείωση του ενδοκυττάριου ATP, καθώς και τη μείωση της συνολικής δραστηριότητας των μικροβιακών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου και του μεταβολισμού [28].

Όσον αφορά το DNA, η 2-(E)-εξενάλη, όπως και άλλες α,β- ακόρεστες καρβονυλο-ενώσεις, σχηματίζει εξωκυκλικά παράγωγα 1,N² –προπανοδεοξυγουανοσίνης (εικόνα 10) [27,29].



Εικόνα 10 : Παράγωγα του DNA που σχηματίζονται από 2-(E)-εξενάλη.

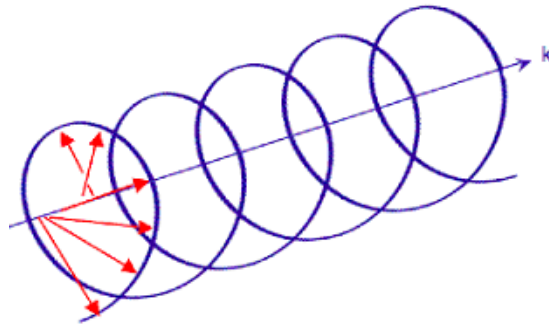
Καθώς η βιοδραστικότητα πολλών ενώσεων που προσδίδουν άρωμα στα φυτά, εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τον διαχωρισμό τους από την πλασματική μεμβράνη, σημαντικό ρόλο στην τοξικότητα τους αποδίδει η τάση ατμών τους. Συνεπώς, οι παράγοντες που μπορούν να αυξήσουν την τάση ατμών των ουσιών αυτών, όπως η θερμοκρασία, μπορούν να συμβάλλουν στην αύξηση της τοξικότητας τους, με το να ενισχύουν την διαλυτότητα τους στην κυτταρική μεμβράνη. Η μικροβιοκτόνος δράση της εξανάλης και της 2-(E)-εξενάλης, εξαρτάται από την τάση ατμών τους και κατά συνέπεια από την θερμοκρασία. Αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί στην αύξηση της τάσης ατμών ενός μορίου, με αποτέλεσμα αυτό να περνάει πιο γρήγορα στην αέρια φάση και να αυξάνεται η μικροβιοκτόνος και η μυκητοκτόνος δράση του [30,31,32,33]. Παρ' όλα αυτά, μικρά υδρόφοβα μόρια, όπως είναι οι αλδεΐδες με έξι άτομα άνθρακα, μπορούν να εισέλθουν απευθείας, μέσω πορινών, σε βαθύτερα τμήματα των Gram-αρνητικών βακτηρίων, χωρίς καμία διαφοροποίηση στην διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης. Το γεγονός αυτό, προσδίδει μία επιπλέον ιδιότητα στις ενώσεις αυτές, ώστε να θεωρηθούν αντιμικροβιακοί παράγοντες στα τρόφιμα, εναντίον και τον Gram-αρνητικών βακτηρίων [33].

1.6 Ανάλυση πρωτεϊνών με κυκλικό διχρωισμό

Ως κυκλικός διχρωισμός, ορίζεται η άνιση απορρόφηση του αριστερόστροφου ή δεξιόστροφου κυκλικά πολωμένου φωτός [34,35,36].

Μια ακτίνα φωτός αποτελείται από χρονικά εξαρτώμενα ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία. Καθώς το φως περνάει μέσα από κατάλληλα πρίσματα ή φίλτρα

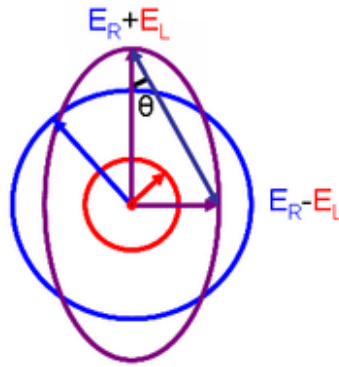
πολώνεται, με αποτέλεσμα το ηλεκτρικό του πεδίο, E , να ταλαντώνεται ημιτονοειδώς. Αν το ημιτονοειδές κύμα, μπορούσε να ειδωθεί από μπροστά, τότε θα μπορούσε να απεικονισθεί ως το άθροισμα δύο διανυσμάτων ίσου μήκους, τα οποία σχηματίζουν κύκλους, εκ των οποίων ο ένας κινείται δεξιόστροφα, E_R , και ο άλλος αριστερόστροφα, E_L (εικόνα 11).



Εικόνα 11 : Κυκλικά πολωμένο φως.

Τα δύο αυτά κυκλικά πολωμένα κύματα έχουν φυσική υπόσταση. Βρίσκονται 90° εκτός φάσης το ένα από το άλλο και μπορούν να διαχωριστούν χρησιμοποιώντας μια ποικιλία πρισμάτων και ηλεκτρονικών συσκευών, οι οποίες εκμεταλλεύονται το φαινόμενο του Rockel.

Όταν ασύμμετρα μόρια αλληλεπιδράσουν με το φως, μπορεί να απορροφήσουν δεξιόστροφο ή αριστερόστροφο κυκλικά πολωμένο φως σε διαφορετική ένταση, με αποτέλεσμα να έχουν διαφορετικές ενδείξεις της διάθλασης των δύο κυμάτων. Το αποτέλεσμα είναι ότι το επίπεδο του φωτός στρέφεται και η προσθήκη στο διάνυσμα είτε του E_R , είτε του E_L , οδηγεί στη δημιουργία ενός διανύσματος ελλειψοειδούς τροχιάς, από όπου προήλθε και ο όρος του ελλειπτικά πολωμένου φωτός (εικόνα 12) [34].

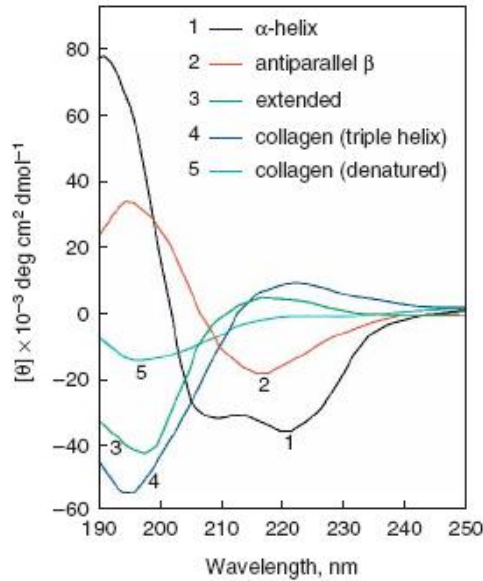


Εικόνα 12 : Ελλειπτικά πολωμένο φως.

Η διαφορετική απορρόφηση των δυο αυτών συστατικών προκαλεί το φαινόμενο του κυκλικού διχρωισμού. Ο κυκλικός διχρωισμός καταγράφεται είτε σε μονάδες ΔE , όπου ΔE είναι η διαφορά μεταξύ του E_R και του E_L , είτε σε βαθμούς ελλειπτικότητας, η οποία ορίζεται ως η γωνία της οποίας η εφαπτόμενη είναι ο λόγος του μικρότερου προς το μεγαλύτερο άξονα της έλλειψης. Συμβολίζεται με θ , και ισούται με $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$, όπου $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1} = 3,298 \Delta E$.

Ο κυκλικός διχρωισμός, είναι μια εξαιρετική μέθοδος προσδιορισμού της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών [34,36]. Οι οπτικά, ενεργές ομάδες στις πρωτεΐνες είναι οι πεπτιδικό δεσμοί της κύριας αλυσίδας και οι αρωματικές πλευρικές αλυσίδες. Οι πεπτιδικό δεσμοί απορροφούν το πολωμένο φως στην περιοχή του άπω-υπεριώδους (far UV, 240-180nm), ενώ οι αρωματικές πλευρικές αλυσίδες απορροφούν στο εγγύς-υπεριώδες (near UV, 320 -260nm).

Όταν οι πρωτεΐνες είναι πλήρως αναδιπλωμένες, εμφανίζουν ασύμμετρα δομικά στοιχεία, όπως α -έλικες και β -επιφάνειες, τα οποία έχουν και τα χαρακτηριστικά τους φάσματα. Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες που αποτελούνται κυρίως από α -έλικα εμφανίζουν δύο αρνητικές κορυφές στα 222 και 208 nm και μία θετική στα 193 nm, ενώ πρωτεΐνες με καλά καθορισμένες β - επιφάνειες, εμφανίζουν μία αρνητική κορυφή στα 218 nm και μία θετική στα 195 nm (εικόνα 13).



Εικόνα 13 : Χαρακτηριστικά φάσματα κυκλικού διχρωισμού διάφορων δευτεροταγών δομών.

Επιπρόσθετα, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τη μελέτη της συμπεριφοράς μιας πρωτεΐνης κατά την θερμική, ή χημική της αποδιάταξη και επαναδιάταξη [35]. Όταν οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται, χάνουν την καλά οργανωμένη δομή τους και οι κορυφές στο φάσμα του κυκλικού διχρωισμού, μεταβάλλονται. Κάποιες πρωτεΐνες κατά την αποδιάταξη τους περνούν από την αναδιπλωμένη κατευθείαν στη αποδιεταγμένη μορφή τους (two states unfolding) και εμφανίζουν φάσμα χωρίς κορυφές, ενώ κάποιες άλλες πρωτεΐνες αποδιατάσσονται σταδιακά περνώντας από ενδιάμεσες δομές, μερικώς αναδιπλωμένες, και εμφανίζουν ως φάσμα μία μονοτονική καμπύλη, χωρίς καμία διακριτή μεταφορά από την αναδιπλωμένη κατάσταση στη μετουσιωμένη.

Οι αλλαγές σε ένα φάσμα κυκλικού διχρωισμού, συναρτήσει της θερμοκρασίας, σε χαρακτηριστικά μήκη κύματος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να καθοριστεί η θερμοδυναμική της αποδιάταξης της πρωτεΐνης.

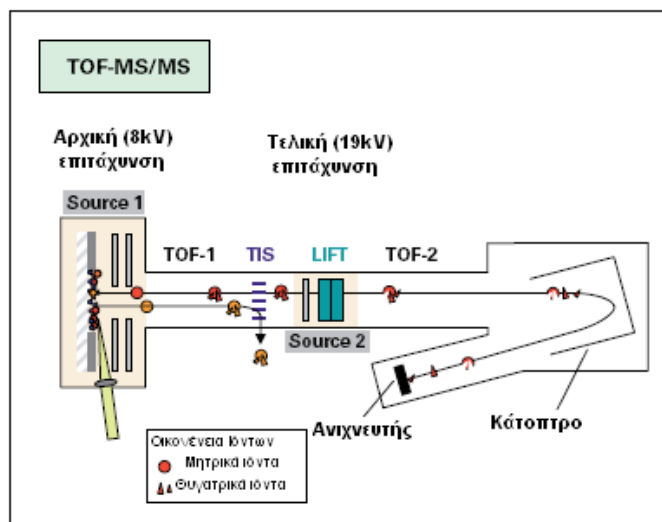
1.7 Ανάλυση πρωτεϊνών με φασματοσκοπία μάζας

Η φασματοσκοπία μάζας (MS) είναι μια εξελισσόμενη τεχνική που εμφανίστηκε στις αρχές του προηγούμενου αιώνα. Ανάμεσα στις αναλυτικές τεχνικές η MS έχει ξεχωριστή θέση λόγω του ότι μετράει μία φυσική ιδιότητα των μορίων, τη μάζα τους, με πολύ μεγάλη ακρίβεια. Η φασματοσκοπία μάζας άργησε

να βρει εφαρμογή στα βιολογικά συστήματα κυρίως λόγω της δυνατότητας ανάλυσης μόνο-φορτισμένων και πτητικών μορίων. Τα βιομόρια είναι μεγάλα και πολικά μόρια που δεν μεταφέρονται και δεν ιονίζονται εύκολα στην αέρια φάση. Ο ηλεκτροψεκασμός (ES) και η απόπτωση με laser υποβοηθούμενη από υπόστρωμα (MALDI) [38,39] είναι οι τεχνικές ιονισμού στις οποίες οφείλεται η επιτυχημένη χρήση της φασματοσκοπίας μάζας σε βιολογικά μόρια.

Στη μέθοδο του MALDI, για να δημιουργηθεί η απαραίτητη αέρια φάση, τα πρωτονιομένα βιομόρια και μεγάλη ποσότητα υποστρώματος συνκρυσταλλώνονται με μόρια του αναλύτη πάνω σε μία μεταλλική επιφάνεια. Στη συνέχεια οι κρύσταλλοι ακτινοβολούνται από παλμό laser, συνήθως αζώτου με μήκος κύματος 337 nm. Το υπόστρωμα είναι συνήθως ένα μικρό οργανικό μόριο που εμφανίζει απορρόφηση στο μήκος κύματος του laser που χρησιμοποιείται. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα υποστρώματα είναι το διυδροξυβενζοϊκό οξύ (DHB). Τα υποστρώματα διαφέρουν στην ενέργεια που μεταφέρουν στο βιομόριο κατά την απόπτωση και τον ιονισμό και έτσι καθορίζουν το βαθμό θραυσματοποίησης του αναλύτη. Η ένταση του σήματος εξαρτάται από την ποσότητα των πεπτιδίων στον κρύσταλλο, την δυνατότητα του βιομορίου να προσλάβει ή να δώσει ένα πρωτόνιο κατά τη διαδικασία της απόπτωσης και ένα μεγάλο αριθμό άλλων παραγόντων. Για το λόγο αυτό είναι δύσκολη η αντιστοιχία της κορυφής του πεπτιδίου με την ποσότητα του δείγματος που αναλύεται.

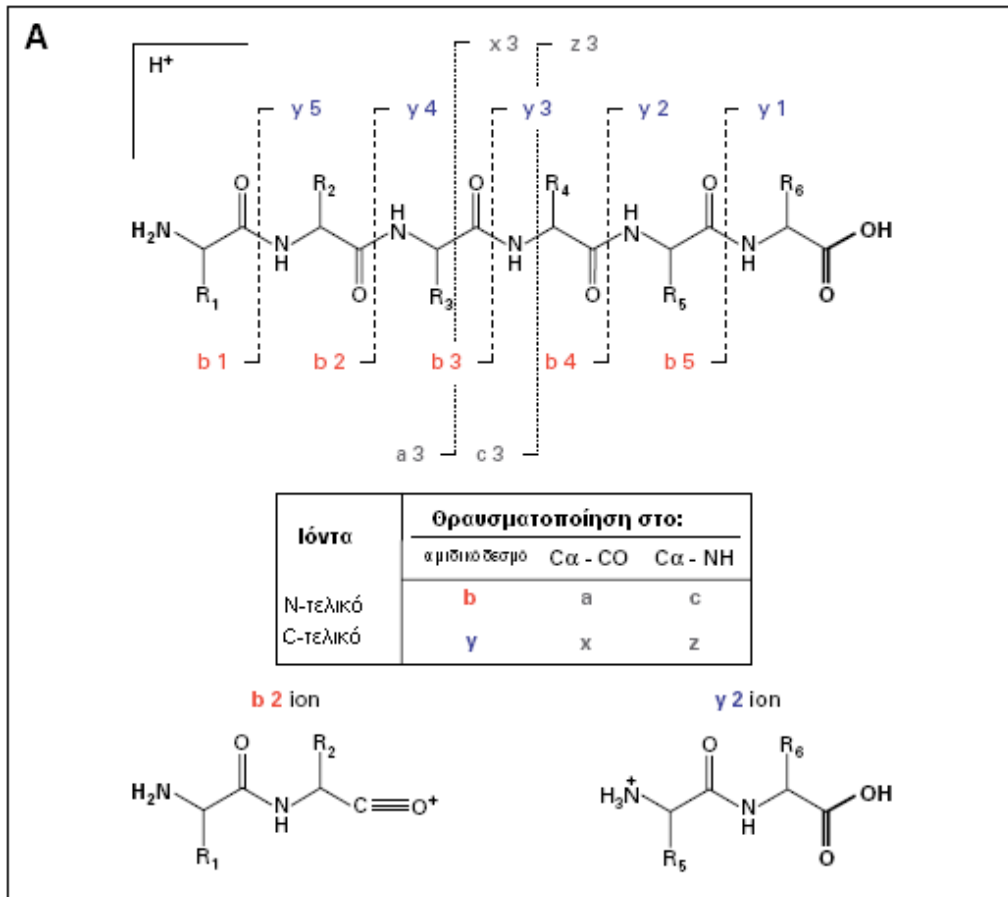
Τρεις είναι οι βασικές αρχές διαχωρισμού μαζών: ο διαχωρισμός στηριζόμενος στο χρόνο πτήσης των ιόντων (time of flight, TOF), ο διαχωρισμός από τετραπολικό ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται από μεταλλικές ράβδους (quatropole MS), ή από επιλεκτική εισαγωγή ιόντων σε τρισδιάστατο πεδίο παγίδευσης (ion trap). Για δομική ανάλυση, όπως ο προσδιορισμός αλληλουχίας αμινοξέων των πεπτιδίων, χρησιμοποιείται φασματοσκοπία μάζας σε σειρά (MS/MS), η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί εφαρμόζοντας δύο φορές την ίδια αρχή διαχωρισμού των ιόντων ή συνδυάζοντας δύο διαφορετικές αρχές.



Εικόνα 14 : Οργανολογία του TOF–MS/MS.

Για τη μέθοδο MS/MS, δύο TOF αναλυτές μαζών είναι διαδοχικά τοποθετημένοι, έτσι ώστε το ιόν που επιθυμούμε να αναλυθεί, να επιλεγθεί και να διασπαστεί. Τα μητρικά ιόντα επιταχύνονται αρχικά με ένα σχετικά μικρό δυναμικό (8kV), με αποτέλεσμα να έχουν ένα αρκετά μεγάλο χρόνο πτήσης, της τάξης των 10 – 20 μ s, μέσα στον TOF-1 αναλυτή, κατά τη διάρκεια του οποίου δημιουργούνται τα θυγατρικά ιόντα με αυθόρμητη θραυσματοποίηση [3,40]. Τα μητρικά και τα θυγατρικά ιόντα αποτελούν μία «οικογένεια ιόντων». Ένας επιλογέας ιόντων χρόνου (Timed Ion Selector – TIS), επιλέγει την «οικογένεια», κλείνοντας το δυναμικό κατά το πέρασμα της, ενώ άλλες οικογένειες ανακλώνται. Έπειτα, η «οικογένεια ιόντων», εισέρχεται στη συσκευή LIFT, στην οποία επιταχύνεται περαιτέρω (19kV). Κατ' αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του μητρικού από τα θυγατρικά ιόντα (εικόνα 14).

Η θραυσματοποίηση, μπορεί να συμβεί σε διάφορες θέσεις στην πολυπεπτιδική αλυσίδα, δημιουργώντας διαφορετικού τύπου ιόντα, με το φορτίο να παραμένει στο αμινο-τελικό ή το καρβόξυ-τελικό άκρο [3,40]. Η δράση της θρυψίνης, δημιουργεί πεπτίδια που φέρουν ως καρβόξυ-τελικά άκρα κατάλοιπα αργινίνης ή λυσίνης. Έτσι τα πεπτίδια ξεκινάνε με μάζες $y_1 = 147$ (λυσίνη) ή 175 (αργινίνη). Η διαφορά μάζας του επόμενου y_2 ιόντος αντιστοιχεί στο επόμενο αμινοξύ (εικόνα 15).



Εικόνα 15 : Θραυσματοποίηση πεπτιδίων στην τεχνική MS/MS.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΛΥΑΣΗΣ ΤΟΥ ΥΔΡΟΪΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ

2.1.1 Διαλύματα

1. Θρεπτικό μέσο T.B. :12gr/L Bacto-peptone, 24gr/L Bacto-yeast extract, 5mL/L gLycerol, 100mL/L αποστειρωμένου διαλύματος με 0,17M KH_2PO_4 και 0,72M K_2HPO_4 .
2. Διάλυμα Διάσπασης (lysis buffer) : 50mM Tris-Cl , pH 8,0, 1mM EDTA, 0,1M NaCl, 0,1mM PMSF, 1mg/mL lysozyme.
3. Διάλυμα διαλυτοποίησης : 50mM NaH_2PO_4 , pH 7,0, 1M NaCl, 0,5% v/v Triton X-100, 0,1mM PMSF.
4. Διάλυμα έκπλυσης : 50mM NaH_2PO_4 , pH 7,0, 1M NaCl, 0,2% v/v Triton X-100.
5. Διαλύματα έκλουσης με Triton X-100 : 50mM Na_2HPO_4 , pH 7,0, 1M NaCl, 0.2% v/v Triton X-100, και 10mM, 20mM, 30mM και 200mM ιμιδαζολίου.
6. Διαλύματα έκλουσης με Dodecyl Maltoside (DM) : 50mM Na_2HPO_4 , pH 7,0, 1M NaCl, 0,05% w/v DM και 200mM ιμιδαζολίου.

2.1.2 Καλλιέργεια βακτηρίων *Escherichia coli*

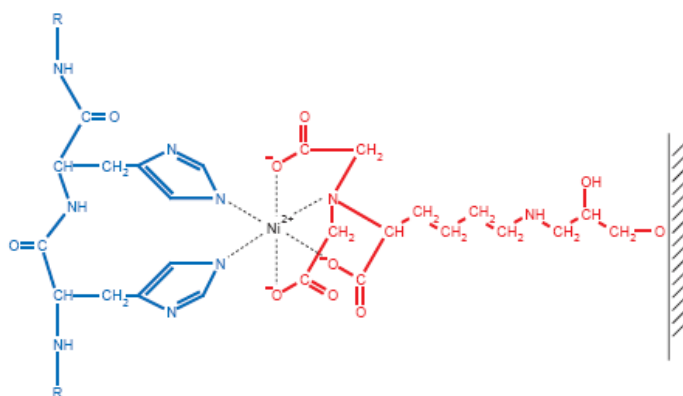
Σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό υλικό (TB medium), στο οποίο προστίθενται αμπικιλίνη (50μg/mL) και καναμικίνη (25μg/mL), προστίθενται 100μL βακτηρίων *E. coli* τα οποία περιέχουν το πλασμίδιο pQE31 με το cDNA του ενζύμου HPL από πιπεριά. Η αμπικιλίνη και η καναμικίνη είναι αντιβιοτικά τα οποία τοποθετούνται με σκοπό την θανάτωση βακτηρίων που δεν εκφράζουν το βακτήριο που μας ενδιαφέρει. Τα κύτταρα αναπτύσσονται με ανάδευση στους 36 °C για 16 ώρες και στη συνέχεια αραιώνονται σε μεγαλύτερες καλλιέργειες (αραίωση 1:10) και αφήνονται υπό ανάδευση για άλλες 8 ώρες. Η θερμοκρασία μειώνεται στους 16°C με σκοπό να σταματήσει η ανάπτυξη των βακτηρίων. Η επαγωγή της πρωτεΐνης πραγματοποιείται με προσθήκη 1mM IPTG και επώαση

στους 20°C για 22 ώρες. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στα 4000g για 15 λεπτά (Φυγόκεντρος Heraeus Suprafuge 22, ρότορας HFA 14.29).

2.1.3 Χρωματογραφία συγγένειας

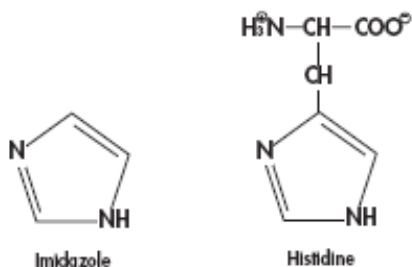
Οι διεργασίες με στήλες αποτελούν τις πιο αποτελεσματικές και εύχρηστες μεθόδους καθαρισμού των πρωτεϊνών [1,2]. Στις περισσότερες διεργασίες με στήλες, οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν διαφορετικού βαθμού πρόσδεση με τη στερεά φάση της στήλης, ενώ και η μεταβολή του ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης τις κάνει να εκλούνται με διαφορετικές ταχύτητες, οι οποίες εξαρτώνται από το βαθμό συγγένειας τους προς το υλικό της στήλης.

Η χρωματογραφία συγγένειας χρησιμοποιεί χημικές ομάδες που εμφανίζουν μια ειδική συγγένεια πρόσδεσης προς τις πρωτεΐνες που αναζητούνται. Πολλά ένζυμα προσδένονται εκλεκτικά σε ορισμένους συμπαράγοντες, και ο διαχωρισμός τους από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες μπορεί να επιτευχθεί από μια στήλη που περιέχει καθηλωμένο κάποιο από αυτούς τους συμπαράγοντες. Καθώς το μίγμα περνά από τη στήλη, οι πρωτεΐνες που εμφανίζουν επιλεκτική συγγένεια για τον εκάστοτε καθηλωμένο συμπαράγοντα, προσδένονται σε αυτόν. Αργότερα, η προσδεμένη πρωτεΐνη, μπορεί να εκλουσθεί με ένα διάλυμα το οποίο περιέχει αυτόν τον συμπαράγοντα. Για παράδειγμα, η προσθήκη έξι ιστιδινών στο άκρο μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας έχει ως αποτέλεσμα να δεσμεύεται η πρωτεΐνη στο σύμπλοκο Ni-NTA της κολόνας. Συγκεκριμένα σε κάθε άτομο του νικελίου δεσμεύονται δύο ιστιδίνες σχηματίζοντας οκταεδρικό σύμπλοκο.



Εικόνα 16 : Αλληλεπίδραση των ιστιδινών μιας πρωτεΐνης και του Ni της κολόνας.

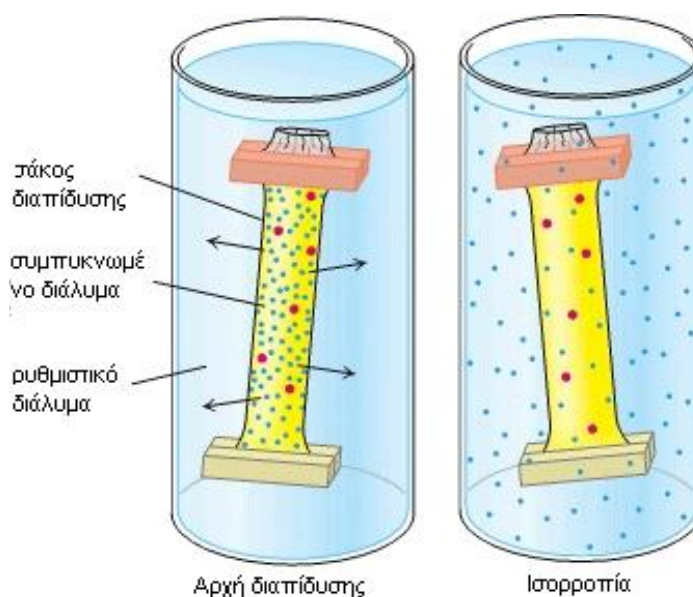
Στην συνέχεια η απομάκρυνση των πρωτεϊνών που φέρουν ιστοδίνες, απομακρύνονται από την στήλη, χρησιμοποιώντας διάλυμα που περιέχει ιμιδαζόλιο, ώστε να δεσμευτεί αυτό στο υλικό της στήλης και να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες.



Εικόνα 17 : Το μόριο της Ιστιδίνης και του ιμιδαζολίου.

2.1.4 Διαπίδυση

Οι πρωτεΐνες είναι δυνατόν να διαχωριστούν από μικρότερα μόρια με τη μέθοδο της διαπίδυσης (dialysis) μέσα από μια ημιδιαπερατή μεμβράνη, όπως η μεμβράνη κυτταρίνης με πόρους [1]. Τα μόρια που έχουν διαστάσεις σημαντικά μεγαλύτερες από τη διάμετρο των πόρων διατηρούνται μέσα στο σάκο διαπίδυσης, ενώ τα μικρότερα μόρια και ιόντα περνούν από τους πόρους της μεμβράνης και εμφανίζονται στο διάλυμα εκτός σάκου. Η τεχνική αυτή, η οποία είναι χρήσιμη για την απομάκρυνση αλάτων ή άλλων μικρών μορίων, παρουσιάζεται στην εικόνα 18.



Εικόνα 18 : Αρχή της διαπίδυσης.

Καθώς η HPL απομακρύνεται από τη στήλη με διάλυμα 200mM ιμιδαζολίου, καθίσταται απαραίτητη η απομάκρυνση του με την τεχνική της διαπίδυσης διότι το ιμιδαζόλιο συναρμόζεται στο σίδηρο της αίμης της HPL και την καθιστά ανενεργή [9].

2.1.5 Απομόνωση της λυάσης του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων

Τα κύτταρα από *E. coli* επαναιωρούνται σε διάλυμα διάσπασης σε αναλογία 3mL διαλύματος ανά γραμμάριο κυττάρων. Στο διάλυμα διάσπασης περιέχεται λυσοζύμη της οποίας η δράση είναι η διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος και PMSF το οποίο αναστέλλει τη δράση των πρωτεασών άρα και την ενδεχόμενη διάσπαση των πρωτεϊνών. Το μίγμα ομογενοποιείται και τοποθετείται στους -80 °C για 10 περίπου λεπτά και στη συνέχεια σε υδατόλουτρο στους 37 °C. Αφού ξεπαγώσει, σπάζονται τα κυτταρικά τοιχώματα με χρήση υπερήχων στους 4°C. Τα υπολείμματα των βακτηρίων καθιζάνουν με φυγοκέντρηση στα 10.000g για 15 λεπτά (φυγόκεντρος Hereaus Suprafuge 22, ρότορας HFA 21.94). Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης, φυγοκεντρείται εκ νέου στα 160.000g για 1 ώρα στους 4°C (φυγόκεντρος Sorvall Ultra 80, ρότορας Sorvall T-865). Το ίζημα της φυγοκέντρησης αποτελεί το μεμβρανικό κλάσμα των κυττάρων. Οι μεμβράνες επαναιωρούνται σε διάλυμα διαλυτοποίησης. Το διάλυμα ομογενοποιείται και αφήνεται για επώαση υπό ανάδευση για 1 ώρα. Στη συνέχεια ακολουθεί

φυγοκέντρωση για 1 ώρα στα 160.000g και στους 4°C (φυγόκεντρος Sorvall Ultra 80, ρότορας Sorvall T-865). Η υδατοδιαλυτή μορφή της πρωτεΐνης λαμβάνεται στο υπερκείμενο. Το υπερκείμενο φιλτράρεται σε ηθμό με μέγεθος πόρων 0,2 μm, και εισέρχεται στην στήλη συγγένειας μετάλλου, Ni-IDA agarose, αφού προηγουμένως έχει εξισορροπηθεί με διάλυμα διαλυτοποίησης. Στη συνέχεια ακολουθούν οι διαδοχικές εκπλύσεις με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου. Η έκλυση της πρωτεΐνης γίνεται σε συγκέντρωση ιμιδαζολίου 200mM.

Στην περίπτωση της απομόνωσης της HPL χρησιμοποιώντας το απορροπτικό Dodecyl Maltoside (DM), αντί του απορροπτικού Triton X-100, η διαδικασία παραμένει η ίδια με τη μόνη αλλαγή να παρουσιάζεται στην περίπτωση της απομάκρυνσης της πρωτεΐνης από την στήλη χρωματογραφίας. Αφού γίνουν οι εκπλύσεις με διαλύματα με αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου, η στήλη εξισορροπείται με διάλυμα το οποίο περιέχει 0,05% DM w/v και στη συνέχεια η πρωτεΐνη απομακρύνεται με διάλυμα συγκέντρωσης ιμιδαζολίου 200mM.

Τέλος, για την απομάκρυνση του ιμιδαζολίου από την HPL με διαπίδυση, το διάλυμα της HPL τοποθετείται μέσα στην ημιδιαπερατή μεμβράνη και έπειτα τοποθετούνται σε διάλυμα όμοιας σύστασης με το διάλυμα στο οποίο είναι διαλυτοποιημένη (διάλυμα έκπλυσης). Αφήνεται υπό ανάδευση στους 6 °C. Στη συνέχεια ανανεώνεται το διάλυμα και αφήνεται υπό ανάδευση για διάστημα μιας νύχτας στην ίδια θερμοκρασία.

2.1.6 Μελέτη της δραστηριότητας της HPL

Η δραστηριότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε στους 25 °C μετρώντας την μείωση της απορρόφησης στα 234 nm λόγω της διάσπασης του δεσμού C-C που οδηγεί στην εξαφάνιση του συζυγιακού συστήματος στο 13-υπεροξειδίο του λινελαϊκού οξέος (13-HPOD).

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με συνεχή ανάδευση σε κυψελίδα Quartz που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Na₂HPO₄, 1M NaCl και pH 7,0 στο οποίο έχουν προστεθεί 20μL HPL και 20μL 13-HPOD. Ο συντελεστής απόσβεσης του 13-HPOD είναι 25000 M⁻¹ και ως μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας (1 Unit) ορίστηκε η ποσότητα της HPO lyase που προκαλεί την κατανάλωση ενός μM υποστρώματος ανά λεπτό στους 25 °C.

Το υπόστρωμα 13-HPOD (13-S-hydroperoxy-9-Z,11-E-octa-decadienoic acid), παρασκευάστηκε με τη χρήση της soybean LOX. Σε σφαιρική φιάλη αναμίχθηκαν περίπου 10mg λινελαϊκού οξέως με 5mL διαλύματος 0,1M βορικού, pH 9,0. Το μίγμα τέθηκε σε ανάδευση με παράλληλη διοχέτευση οξυγόνου διατηρώντας την θερμοκρασία στους 0 °C. Η έναρξη της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 4 mg LOX. Όταν η αντίδραση ολοκληρώθηκε, το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στο pH 4,0 με προσθήκη HCl. Το διάλυμα κορέστηκε με NaCl και το μίγμα εκχειλίστηκε τρεις φορές με 5mL διαιθυλαιθέρα. Η οργανική στιβάδα εκπλύθηκε με νερό, ξηράνθηκε με άνυδρο θειικό νάτριο και συμπυκνώθηκε. Το υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 2mL αιθανόλης και καταψύχθηκε στους -20 °C.

2.1.7 Φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού

Στην φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού (UV-Vis) μελετούνται οι αλληλεπιδράσεις της ύλης με ακτινοβολία στην περιοχή του υπεριώδους (200-400nm) και του ορατού (400-800nm). Τα τμήματα του μορίου που είναι υπεύθυνα για την απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας λέγονται χρωμοφόρα και η εμφάνιση των ταινιών απορρόφησης σε ένα φάσμα, είναι ενδεικτική της ύπαρξής τους. Η συγκέντρωση της ουσίας που απορροφά συνδέεται γραμμικά με την απορρόφηση σύμφωνα με την εξίσωση, η οποία αποτελεί την μαθηματική έκφραση του νόμου των Lambert – Beer :

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

όπου A, η απορρόφηση της ουσίας, b, το μήκος διαδρομής της ακτινοβολίας, c, η συγκέντρωση της ουσίας και ε , η γραμμομοριακή απορροφητικότητα, η οποία εκφράζεται σε mol/L.

Ο φασματοσκοπικός προσδιορισμός της HPL έγινε στο εύρος 350 – 750nm και για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο AMINCO DW 2000 διπλής δέσμης.

2.1.8 Ηλεκτροφόρηση

Το φαινόμενο, κατά το οποίο ένα μόριο με καθαρό φορτίο θα μετακινηθεί σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, ονομάζεται ηλεκτροφόρηση [1,2,4]. Η ηλεκτροφόρηση πηκτώματος είναι ο καλύτερος τρόπος για την ανάλυση μιγμάτων και την εκτίμηση της καθαρότητας τους.

Η ταχύτητα μετακίνησης (u) μιας πρωτεΐνης σε ένα ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο μιας πρωτεΐνης (z) και το συντελεστή τριβής (f).

$$u = \frac{E \cdot z}{f}$$

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σχεδόν πάντοτε σε πηκτή, διότι η πηκτή λειτουργεί ως μοριακός ηθμός που ενισχύει το διαχωρισμό. Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής μετακινούνται εύκολα δια μέσου αυτής, ενώ τα μεγάλα μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε μια λεπτή πλάκα πολυακρυλαμιδίου. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου είναι αποτέλεσμα συμπολυμερισμού ακρυλαμιδίου με N,N μεθύλενο-δισ-ακρυλαμίδιο. Τα συστατικά αυτά είναι σταθερά από μόνα τους αλλά πολυμερίζονται γρήγορα με την προσθήκη ενός συστήματος που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες, της μορφής $S_2O_8^{2-} \rightarrow 2SO_4^{\cdot-}$. [1,4] Η ουσία που προκαλεί τη δημιουργία ελευθέρων ριζών είναι το υπερθειικό αμμώνιο (APS) και η διάδοση των ριζών γίνεται από τον καταλύτη N,N-τετραμέθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED). Στην αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται το δωδεκακυλο-θειικό νάτριο (SDS), ένα ανιονικό απορρυπαντικό, το οποίο καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας πρωτεΐνης.

Οι πρωτεΐνες στοιβάζονται στην πηκτή στοιβάξης (stacking gel), η οποία περιέχει 6% (w/v) ακρυλαμίδιο/ δισ-ακρυλαμίδιο και διαχωρίζονται στην πηκτή διαχωρισμού (running gel), η οποία περιέχει 15% (w/v) ακρυλαμίδιο/ δισ-ακρυλαμίδιο και 6M ουρία. Τα δείγματα πριν την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση αναμιγνύονται με ίσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος μετουσίωσης (Sample buffer) και θερμαίνονται στους 50°C για 20 – 30 λεπτά.

Η χρώση των πρωτεϊνών γίνεται είτε με Coomassie Brilliant Blue είτε με χρωστική αργύρου (silver staining). Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή TV100Y SCIE-

PLAS και οι συνθήκες κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ήταν 35mA η ένταση του ρεύματος και 200V το δυναμικό.

Η χρώση με διάλυμα Coomassie Brilliant Blue (CBB) χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό πρωτεϊνών.

Διαδικασία:

Αρχικά, προστίθεται στην πηκτή διάλυμα χρώσης, το οποίο αποτελείται από 45% (v/v) μεθανόλη, 10% (v/v) οξικό οξύ, 45% (v/v) νερό και 0,1% (w/v) CBB και παραμένει υπό ανάδευση για μία περίπου ώρα. Έπειτα το διάλυμα χρώσης απομακρύνεται και προστίθεται το διάλυμα αποχρωματισμού. Η πηκτή παραμένει υπό ανάδευση μέχρι την απομάκρυνση του διαλύματος, όταν είναι πλέον ορατές μόνο οι πρωτεΐνες. Τέλος η πηκτή διατηρείται σε διάλυμα 5% (v/v) οξικού οξέος

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν αναλύονται στους παρακάτω πίνακες

Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης	
150mM	Tris-HCl, pH=7.0
0,09% w/v	Serva blue G
30% v/v	γλυκερόλη
12% w/v	SDS
6% v/v	B- μερκαπτοαιθανόλη

Διάλυμα ανόδου (10x)	
1M	Tris-base, pH=8,9

Διάλυμα κάθόδου (10x)	
1M	Tris-base, pH 8,25
1M	Tricine
1%	SDS

Διάλυμα πηκτής στοίβαξης	
4,125% w/v	Ακρυλαμίδιο – δις ακρυλαμίδιο
0,75M	Tris-HCl, pH=6,8
0,001% v/v	APS
0,075%	SDS
0,07% v/v	TEMED

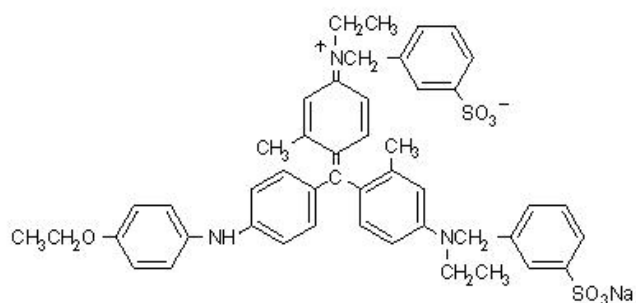
Διάλυμα πηκτής διαχωρισμού	
16,5% w/v	Ακρυλαμίδιο – δις ακρυλαμίδιο
1M	Tris-HCl, pH=6,8
0,1%	SDS
0,001% v/v	APS
0,07% v/v	TEMED
6M	Ουρία

2.1.9 Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford είναι μια αναλυτική τεχνική μέτρησης της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών [42]. Για να υπολογιστεί η συγκέντρωση μιας πρωτεΐνης, χρησιμοποιείται μια άλλη γνωστή συγκέντρωσης πρωτεΐνη, με την βοήθεια της οποίας κατασκευάζεται γραφικά, μια πρότυπη καμπύλη. Αναλυτικότερα, το διάλυμα “working solution”, προστίθεται σε αρκετά δείγματα της γνωστής πρωτεΐνης (BSA), και λαμβάνονται οι απορροφήσεις σε μήκος κύματος 595nm. Στην συνέχεια κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη, στον κατακόρυφο άξονα της οποίας είναι η απορρόφηση ενώ στον οριζόντιο άξονα αντιστοιχεί ο όγκος της πρωτεΐνης (μL) που χρησιμοποιήθηκε (ο οποίος αντιστοιχεί σε συγκέντρωση μg/mL). Ακολουθεί η λήψη των απορροφήσεων στο ίδιο μήκος κύματος των διαλυμάτων της προς μέτρηση πρωτεΐνης αυξάνοντας σταδιακά τον όγκο.

Ο συσχετισμός της απορρόφησης στα 595nm με την συγκέντρωση της πρωτεΐνης οφείλεται στον δεσμό που δημιουργείται μεταξύ της πρωτεΐνης και του

Serva Blue G. Ο δεσμός του Serva Blue G με μια πρωτεΐνη προκαλεί μια μετατόπιση της απορρόφησης της βαφής από τα 465nm στα 595nm.



Εικόνα 19 : Η χρωστική Serva Blue G.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται στην μέθοδο Bradford, παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

Stock Διάλυμα Bradford	
100mL	95% v/v αιθανόλης
200mL	88%v/v φωσφορικού οξέος
350mg	Serva Blue G

Διάλυμα εργασίας Bradfod	
425mL	H ₂ O
15mL	95% v/v αιθανόλης
30mL	88% v/v φωσφορικού οξέος
30mL	Bradford stock solution

2.2 Απομόνωση μίας υπεροξειδάσης από φύλλα ελιάς

Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος, ήταν η απομόνωση της λυάσης του υδροϋπεροξειδίου απευθείας από τα φύλλα της ελιάς και ο χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης.

2.2.1 Διαλύματα

1. Διάλυμα άλεσης : 50mM Na₂HPO₄, pH 6,7, 3mM EDTA, 3mM dithiothreitol (DTT). 0,5% v/v Triton X-100 και 0,1 mM PMSF.
2. Διάλυμα πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG 6000) 60% w/v.
3. Διάλυμα επαναιώρησης : 20mM Tris-HCl, pH 9,0, 0,5% v/v Triton X-100, 0,1 mM β-μερκαπτοαιθανόλη.

2.2.2 Διαδικασία

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην εργασία των Fauconnier et al. [13]. 170g φύλλα ελιάς καθαρίζονται και ξεπλένονται με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια αλέθονται με το διάλυμα άλεσης σε μίξερ. Ακολουθεί φιλτράρισμα με τέσσερα φύλλα γάζας και το διήθημα φυγοκεντρείται στα 7000g για 10 λεπτά (φυγόκεντρος Hereaus Suprafuge 22, ρότορας HFA 21.94). Το υπερκείμενο αφήνεται για επώαση, υπό ανάδευση, στους 4 °C για μιάμιση ώρα. Έπειτα φυγοκεντρείται στα 26000g για 20 λεπτά (φυγόκεντρος Hereaus Suprafuge 22, ρότορας HFA 21.94). Στο υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης, προστίθεται διάλυμα PEG σε τελική συγκέντρωση 7% v/v. Αφήνεται για μισάωρη επώαση στους 4 °C και φυγοκεντρείται στα 26000g για άλλα 20 λεπτά.

Η διαδικασία προσθήκης PEG επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές στις ίδιες συνθήκες, με αυξημένη τη συγκέντρωση της στα 23% v/v.

Τέλος τα ιζήματα που ελήφθησαν από τις δύο προσθήκες της PEG 23% v/v, επαναιωρούνται, φυλάσσονται και δοκιμάζονται για την παρουσία της λυάσης. Το διάλυμα από τη δεύτερη προσθήκη PEG φυγοκεντρείται μία επιπλέον φορά στα 26000g για 20 λεπτά, με σκοπό να καθιζάνει η περίσσεια της πολυαιθυλενογλυκόλης που επαναιωρήθηκε μαζί με την πρωτεΐνη.

Χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης έγινε με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, φασματοσκοπία ορατού και φασματοσκοπία μάζας (mass spectroscopy).

2.3 Ανάλυση πρωτεϊνών με χρήση κυκλικού διχρωισμού

2.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Για την αξιόπιστη εξαγωγή συμπερασμάτων θα πρέπει να τηρούνται κάποιες βασικές αρχές, όπως οι εξής:

α. Ο λόγος σήμα/ θόρυβος (signal noise ratio, S/N) θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν υψηλότερος. Αυτό επιτυγχάνεται αρχικά με τη χρήση κατάλληλου πρωτεϊνικού διαλύματος. Τα συνήθη ρυθμιστικά διαλύματα απορροφούν αρκετά έντονα στο άπω-υπεριώδες με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του λόγου S/N. Έτσι, είναι αναγκαία η επιλογή του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος. Ο λόγος S/N επηρεάζεται και από τις διάφορες παραμέτρους, που χρησιμοποιούνται κατά τη μέτρηση των φασμάτων. Για το λόγο αυτό ορισμένα ιόντα, όπως είναι το χλώριο (Cl⁻), είναι απαγορευτικά στη χρήση καθώς ανεβάζουν πολύ γρήγορα τον λόγο S/N.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το διάλυμα της HPL, μεταξύ άλλων περιέχει και 1M NaCl, οπότε είναι απαραίτητη η διαδικασία της διαπίδυσης, για να απομακρυνθεί το Cl⁻.

β. Τα φάσματα των πρωτεϊνών θα πρέπει να περιλαμβάνουν αρκετή πληροφορία, δηλαδή οι μετρήσεις να περιλαμβάνουν τιμές σε, όσο το δυνατόν, χαμηλές περιοχές του άπω-υπεριώδους. Για το λόγο αυτό, αποδεκτές τιμές συγκεντρώσεων είναι από 0,1 έως 0,5 mg/mL, αν και η πλέον καταλληλότερη συγκέντρωση είναι περίπου 0,3 mg/mL. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης υπολογίζεται με τη μέθοδο Bradford και γίνονται οι κατάλληλες αραιώσεις.

2.3.2 Πειραματική διαδικασία

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο J-810 της Jasco. Για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας χρησιμοποιήθηκε το PTC-423S/L Peltier Type Temperature Control System της Jasco. Η ροή του αζώτου (απαραίτητο για την καλή λειτουργία του φασματοφωτομέτρου, καθώς απομακρύνει το O₂ από τα

εσωτερικά συστήματά του) ήταν 3-5 L/min. Η ανάλυση των φασμάτων έγινε με τα προγράμματα Spectra Analysis και Interval Analysis της Jasco. Οι μετρήσεις έγιναν σε κυψελίδα μήκους 0,1cm και τα πρωτεϊνικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν συγκέντρωση 0,3 mg/mL σε 50mM PO₄⁻, pH 7,0, 0,05% w/v DM.

Λαμβάνεται ένα φάσμα σε εύρος 190 – 260 nm, ανά 5 °C, ξεκινώντας από τους 10 °C και καταλήγοντας στους 80 °C. Παράλληλα καταγράφεται και η ένδειξη στα 222 nm, ως παράγοντας ένδειξης αποδιάταξης της πρωτεΐνης.

2.3.3 Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Τα δεδομένα του φάσματος, μετατρέπονται έτσι ώστε οι μονάδες απορρόφησης να είναι της μορφής θ, δηλαδή μοριακής ελλειπτικότητας και στη συνέχεια επεξεργάζονται με τη βοήθεια των προγραμμάτων SELCON 3, CDSSTR και CONTINLL. Αρχικά τα δεδομένα προετοιμάζονται με τη βοήθεια του προγράμματος CRDATA, έτσι ώστε να είναι σε κατάλληλη μορφή επεξεργασίας από τα παραπάνω προγράμματα. Όλα τα παραπάνω προγράμματα ανήκουν στο πακέτο επεξεργασίας δεδομένων, για φάσματα κυκλικού διχρωισμού, διαθέσιμο στο διαδίκτυο, **CDpro**.

2.4 Ανάλυση πρωτεϊνών με χρήση φασματοσκοπίας μάζας

2.4.1 Διαλύματα

1. Κολλοειδής χρώση Coomasie : 17% w/v (NH₄)₂SO₄, 30% v/v μεθανόλη, 0,5% v/v οξικό οξύ, 0,1% w/v coomasie blue.
2. Διάλυμα αποχρωματισμού - DestSol : 50% v/v ACN
3. Ρυθμιστικό A - ABS : 50mM NH₄HCO₃
4. Διάλυμα 1 : 10mM DTT, 50mM NH₄HCO₃
5. Διάλυμα 2 : 55mM IAA, 50mM NH₄HCO₃
6. Ρυθμιστικό B : 10mM ABS, 10% v/v ACN
7. Ρυθμιστικό Γ : 50% v/v ACN, 0,1% v/v TFA.
8. Διάλυμα μήτρας : 8,33 mg/mL α-κυάνο-4-υδρόξυ-κινναμικό οξύ.

Όλα τα παραπάνω διαλύματα έχουν προετοιμαστεί με nanopure νερό (dd H₂O), με σκοπό να μην επηρεάσουν «ξένα» ιόντα τις μετρήσεις.

2.4.2 Διαδικασία θρυψινοποίησης.

Η διαδικασία που περιγράφεται αποτελεί μία παραλλαγή του πρωτοκόλλου του Schevchenko [41].

Τα σίγματα των πρωτεϊνών αποκόπηκαν από τις πηκτές και αποχρωματίστηκαν με διαδοχικές 15λεπτες πλύσεις εναλλάσσοντας το DestSol και το ABS. Η διαδικασία επαναλήφθηκε δύο με τρεις φορές ανάλογα την ένταση του χρώματος των σιγμάτων. Στη συνέχεια ακολουθεί αναγωγή των πρωτεϊνών της πηκτής η οποία γίνεται με επώαση των πηκτών σε Διάλυμα 1, για 45 λεπτά στους 56 °C. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε αλκυλίωση των πηκτών με επώαση με το Διάλυμα 2, για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Τα κομμάτια της πηκτής ξεπλύθηκαν τρεις φορές με DestSol και Ρυθμιστικό Α εναλλάξ για 15 λεπτά κάθε φορά, επί τρεις φορές. Στη συνέχεια, στα κομμάτια της πηκτής προστέθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα της πρωτεόλυσης το οποίο περιείχε περίπου 20 μg θρυψίνης αραιωμένη με το ρυθμιστικό Β και αφέθηκαν υπό ανάδευση στους 40 °C, για διάστημα 14 – 16 ωρών. Μετά το πέρας της θρυψινοποίησης, το διάλυμα από κάθε δείγμα απομακρύνεται και τοποθετείται σε καινούριο και καθαρό erpendorf. Στα κομμάτια της πηκτής τοποθετείται dd H₂O και ξεπλένονται για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο προστίθεται στο προηγούμενο και τα κομμάτια της πηκτής ξεπλένονται για 20 λεπτά με DestSol. Το υπερκείμενο προστίθεται στο προηγούμενο, ενώ στα κομμάτια της πηκτής προστίθεται διάλυμα Γ για 20 λεπτά. Τα υπερκείμενα ενώνονται, παγώνονται ακαριαία με τη χρήση υγρού αζώτου και ξηραίνονται σε φυγοκεντρικό ξηραντήρα για 4 – 5 ώρες περίπου.

2.4.3 Προετοιμασία δειγμάτων

Τα ξηρά δείγματα, μετά την πρωτεόλυση, επαναδιαλύθηκαν σε 7μL 50% v/v ACN. 1μL από κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε πλακίδιο MALDI και προστέθηκε 1 μL διαλύματος μήτρας, α-κυάνο-4-υδροξύ-κινναμικό οξύ. Τα δείγματα αφέθηκαν να ξηραθούν σε θερμοκρασία δωματίου και το πλακίδιο τοποθετήθηκε στο φασματογράφο μάζας ultrafleXtreme MALDI - TOF/TOF mass spectrometer της Bruker.

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με ένταση laser 19% - 71%, 25 kV τάση επιτάχυνσης, 0 ns καθυστέρηση και πύλη χαμηλού μοριακού βάρους 500 Da. Χρησιμοποιήθηκε ένα laser αζώτου με μήκος κύματος 337 nm και συχνότητα 200 Hz. Ο ανακλαστήρας τέθηκε στην κατάσταση ανάλυσης θετικών ιόντων και ελήφθησαν φάσματα με εύρος μαζών από 500-4000 Da.

2.4.4 Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Τα φάσματα λήφθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος *flexcontrol* version 3.3 (Bruker Daltonics) και η επεξεργασία τους πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα *flexanalysis* version 3.3 (Bruker Daltonics). Εν συνεχεία, το πρόγραμμα *BioTools* version 3.2 (Sequence editor version) χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων για τα πράσινα φυτά στο NCBI και τη μηχανή αναζήτησης Mascot δείχνει την ομολογία της πρωτεΐνης σε σχέση με άλλες ήδη γνωστές. Το περιθώριο λάθους στην μηχανή αναζήτησης ορίστηκε σε ± 20 ppm, με περιθώριο απώλειας μίας μόνο αποκοπής της θρυψίνης σε οξειδωμένη μεθειονίνη και καρβαμιδομεθυλωμένη κυστεΐνη.

2.5 Αντιμικροβιακές και αντιμυκητιακές ιδιότητες της 2-(E)-εξενάλης και εξανάλης

2.5.1 Θρεπτικά διαλύματα

Χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό διάλυμα LB για το βακτήριο *Escherichia coli InvaF1* (10 gr/L πεπτόνη, 5 gr/L yeast extract, 5 gr/L NaCl) και το θρεπτικό διάλυμα YPD για τους μύκητες *Saccharomyces cerevisiae pNAY1* (1% w/v yeast extract, 2% w/v πεπτόνη, 2% w/v δεξτρόζη) Για την παρασκευή των τρυβλίων απαιτείται επιπλέον προσθήκη 1,5% w/v άγαρ. Τα θρεπτικά διαλύματα καθώς και όλα τα προς χρήση σκεύη αποστειρώνονται.

2.5.2 Παρασκευή διαφόρων συγκεντρώσεων 2-(E)-εξενάλης και εξανάλης

Η 2-(E)-εξενάλη και η εξανάλη αγοράστηκαν από την Aldrich και είναι σε ποσοστό καθαρότητας 98%. Η αραίωση τους έγινε με 50% DMSO. Είναι απαραίτητο να είναι η γνωστή η ποσότητα κάθε ουσίας, όταν αυτή τοποθετείται στον δίσκο αναστολής, και για αυτό το λόγο υπολογίστηκαν τα μg των δύο ουσιών ανάλογα την συγκέντρωσή τους. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται οι ποσότητες αυτές.

Ποσότητες 2-(E)-εξενάλης :

2-(E)-εξενάλης (μL)	μg
15	12,7
12	10,1
10	8,5
7,5	6,3
5	4,2
2	1,7

Ποσότητες εξανάλης :

εξανάλης (μL)	μg
20	16,7
15	12,5
10	8,3
5	4,2
2	1,7

2.5.3 Παρασκευή των τρυβλίων

Το πάχος του άγαρ στα τρυβλία είναι καθοριστικός παράγοντας για τη διαμόρφωση της ζώνης αναστολής. Η διάχυση του αντιβιοτικού γίνεται σε 3 διευθύνσεις, εκτός αν το πάχος του υλικού είναι πολύ μικρό οπότε πολύ γρήγορα

(όταν η πυκνότητα του αντιβιοτικού στον πυθμένα είναι η ίδια όπως στην επιφάνεια) γίνεται σε 2 διευθύνσεις, με αποτέλεσμα να διαμορφώνεται τελικά ζώνη αναστολής με μεγαλύτερη διάμετρο. Ενώ όταν το πάχος του θρεπτικού υλικού είναι μεγαλύτερο από 4 mm γίνεται μεγαλύτερη διάχυση του αντιβιοτικού προς το βάθος, με αποτέλεσμα μικρότερες ζώνες αναστολής. Κατά συνέπεια, πρέπει η επιφάνειά τους να είναι ομοιόμορφη και το πάχος του υλικού να είναι περίπου 4 mm. Απαιτούνται 25 mL υλικού για τρυβλία εσωτερικής διαμέτρου 9 cm, ώστε το πάχος να είναι το επιθυμητό.

2.5.4 Τεχνική της μεθόδου Bauer-Kirby

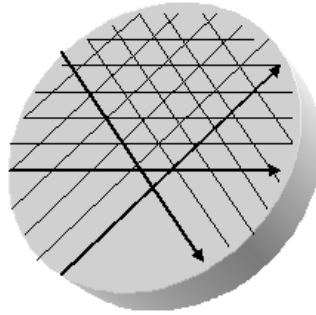
1. Λαμβάνεται με κρίκο μικρό τμήμα από 4-5 αποικίες καθαρού καλλιέργηματος του εκάστοτε μικροοργανισμού και τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα με 4 mL κατάλληλου θρεπτικού.

2. Ο ζωμός επωάζεται στους 35-37°C για 24 ώρες στην περίπτωση του βακτηρίου *E.coli* και 48 ώρες στην περίπτωση του μύκητα *S.cerivisiae*. Η θολερότητα της καλλιέργειας στο τέλος της επώασης πρέπει να είναι ίση του πρότυπου θολωσιμετρικού διαλύματος McFarland No 0,5, η οποία αντιστοιχεί σε πυκνότητα κυττάρων ίση με 1×10^5 κύτταρα/ mL.

1. Προσαρμόζεται η θολερότητα του καλλιέργηματος με φυσιολογικό ορό, σύμφωνα με το πρότυπο McFarland 0,5 το οποίο αποτελείται από 0,5mL 0,048M $BaCl_2$ και 99,5mL 1% v/v H_2SO_4 . Η αραιώση γίνεται αρχικά λαμβάνοντας 1 mL του καλλιέργηματος και αναμιγνύοντας το με 1 mL φυσιολογικό ορό. Αν κρίνεται απαραίτητο, πραγματοποιείται περαιτέρω προσαρμογή της θολερότητας.

4. Στη συνέχεια, εμβαπτίζεται βαμβακοφόρος στυλεός στο καλλιέργημα.

5. Η τοποθέτηση του ενοφθαλμίσματος γίνεται με επίστρωση προς τρεις διευθύνσεις (εικόνα 20). Γίνεται κατ' αυτόν τον τρόπο για να επιτευχθεί η συρρέουσα ανάπτυξη του βακτηρίου ή του μύκητα. Τέλος, γίνεται και μια επιπλέον επίστρωση κυκλικής φοράς, κατά την περίμετρο του τρυβλίου.



Εικόνα 20 : Τρόποι επίστρωσης του ενοφθαλμίσματος στα τρυβλία.

6. Μετά την παρέλευση 5-15', τοποθετούνται οι δίσκοι αντιβιοτικών, οι οποίοι προηγουμένως έχουν αποστειρωθεί και στους οποίους έχει τοποθετηθεί η επιθυμητή ποσότητα της ουσίας που εξετάζεται. Τα τρυβλία τοποθετούνται για επώαση στους 37 °C. Εκτός από τους δίσκους που είναι εμποτισμένοι με την επιθυμητή ουσία, παρασκευάζεται και σειρά δίσκων που είναι εμποτισμένοι με τα κατάλληλα αντιβιοτικά (θετικοί μάρτυρες). Οι μάρτυρες είναι, 10 μ L διαλύματος Ampicillin 50 mg/mL (η τελική ποσότητα αμπικιλίνης είναι 0,5 mg) και 10 μ L διαλύματος Miconazole 1 mg/mL (η τελική ποσότητα μικοναζόλης είναι 0,01 mg). Οι δίσκοι αυτοί θα χρησιμοποιηθούν ως θετικοί μάρτυρες, δηλαδή ως μάρτυρες που σχηματίζουν ξεκάθαρες ζώνες αναστολής στα τρυβλία με τους μικροοργανισμούς *E.coli* και *S.cer.*, αντίστοιχα. Ως αρνητικός μάρτυρας και στις δύο περιπτώσεις, χρησιμοποιείται δίσκος, ο οποίος δεν έχει εμποτιστεί με τίποτα και κατά συνέπεια δεν θα εμφανίσει καμία αναστολή στα στελέχη που αναπτύσσονται.

7. Με το πέρας των 24 ή 48 ωρών μετρώνται τα αποτελέσματα. Η μέτρηση γίνεται ακριβώς μέχρι το πλησιέστερο χιλιοστό. Σαν όριο της ζώνης αναστολής θεωρείται το σημείο όπου δεν παρατηρείται μικροβιακή ανάπτυξη με γυμνό μάτι.

2.6 Αντικαρκινικές ιδιότητες της 2-(E)-εξενάλης

2.6.1 Διαλύματα

1. Θρεπτικό διάλυμα MEM : 10 % v/v FBS και 2,0mM γλουταμίνη, 0,15 % w/v NaHCO₃, 1,0mM πυροσταφυλικό νάτριο και 0,1mM μη απαραίτητα αμινοξέα.
2. Διάλυμα HBSS 10x : 4 gr/L KCl, 0.6gt/L KH₂PO₄, 80gr/L NaCl, 0.621gr/L Na₂HPO₄·2H₂O
3. Διάλυμα θρυψίνης : 0,25% v/v θρυψίνη σε διάλυμα HBSS

2.6.2 Παρασκευή διαλυμάτων 2-(E)-εξενάλης

Όπως και στην περίπτωση των αντιμικροβιακών και αντιμυκητιακών ιδιοτήτων, έτσι και τον προσδιορισμό των αντικαρκινικών ιδιοτήτων της 2-(E)-εξενάλης, ήταν απαραίτητο να είναι γνωστή η ακριβής συγκέντρωση της ουσίας. Πρέπει να σημειωθεί ότι σε κάθε πηγαδάκι, τοποθετήθηκαν 20 μL της εκάστοτε συγκέντρωσης της εξενάλης, σε συνολικό όγκο 800 μL, συνεπώς η συγκέντρωση της ουσίας ήταν σαφώς μικρότερη από το διάλυμα που χρησιμοποιούταν. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι συγκεντρώσεις αυτές.

Συγκέντρωση διαλύματος 2-(E)-εξενάλης (mM)	Πραγματική συγκέντρωση στα 800μL (μM)
5	0,125
10	0,25
15	0,375
20	0,5
25	0,625
30	0,75
35	0,875
40	1

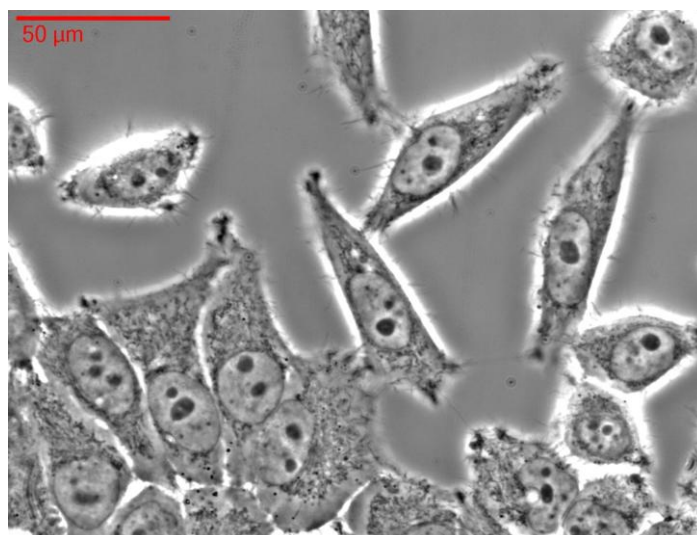
45	1,125
50	1,25
55	1,375
60	1,5
65	1,625
70	1,75

Ως μάρτυρας θεωρείται η μηδενική συγκέντρωση της 2-(E)-εξενάλης.

2.6.3 Καλλιέργεια κυττάρων HeLa

Τα κύτταρα HeLa, είναι μία από τις παλαιότερες και ευρέως χρησιμοποιούμενες κυτταρικές σειρές. Η σειρά προήλθε από καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας, από την ασθενή Henrietta Lacks, η οποία τελικά απεβίωσε το 1951, λόγω του καρκίνου.

Ένα mL το οποίο περιέχει περίπου 10^5 κύτταρα, τοποθετείται σε φλάσκα επιφάνειας 25 cm^2 , μαζί με επιπλέον 7 mL θρεπτικού διαλύματος και αφήνεται για επώαση σε συνθήκες $37 \text{ }^\circ\text{C}$ και 5% CO_2 , για διάστημα μίας μέρας περίπου ή όσο χρειαστεί αναγκαίο. Όταν τα κύτταρα έχουν αναπτυχθεί και έχουν καλύψει την επιφάνεια της φλάσκας (εικόνα 21), τότε το θρεπτικό απορρίπτεται και τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές με 5 mL διαλύματος HBSS. Έπειτα τα κύτταρα αποκολλώνται από την επιφάνεια της φλάσκας, με τη χρήση 2 mL θρυψίνης. Στο διάλυμα προστίθενται 5mL θρεπτικού διαλύματος και το αιώρημα φυγοκεντρείται στα 400g για δύο λεπτά περίπου. Αφού μετρηθεί η πυκνότητα των κυττάρων χρησιμοποιώντας τη πλάκα , Neubauer το αιώρημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε για ανακαλλιέργεια είτε σε περαιτέρω εφαρμογές.



Εικόνα 21 : Μονοστιβάδα κυττάρων HeLa.

2.6.4 Επώαση των κυττάρων παρουσία των ουσιών.

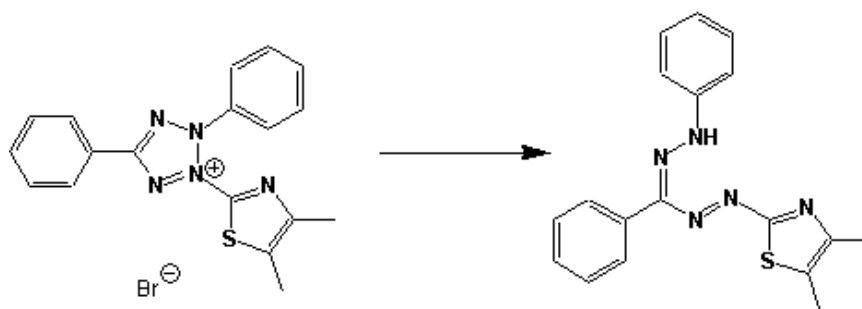
Αφού μετρηθεί η πυκνότητα των κυττάρων, τοποθετείται η κατάλληλη ποσότητα αυτών σε κάθε μία εκ των 24 θέσεων, έτσι ώστε μέσα σε κάθε θέση να υπάρχουν $3 \cdot 10^4$ κύτταρα/mL. Προστίθεται θρεπτικό υλικό σε τελικό όγκο 800μL. Τα κύτταρα αφήνονται για επώαση μία μέρα, με σκοπό να αναπτυχθούν μέσα σε κάθε θέση. Στη συνέχεια, με προσοχή απορρίπτεται το θρεπτικό υλικό και προστίθεται εκ νέου θρεπτικό μαζί με την προς εξέταση ουσία σε τελικό όγκο 800μL.

Σε κάθε θέση τοποθετήθηκαν 20μL της εκάστοτε συγκέντρωσης της εξετάζουσας, και 780μL θρεπτικό υλικό. Αφήνονται για 24h ή 48h επώαση.

2.6.5 Μέθοδος MTT

Η μέθοδος MTT στηρίζεται στο διαχωρισμό του κίτρινου άλατος του τετραζολίου (MTT), προς αδιάλυτους σκούρους μωβ κρυστάλλους φορμαζάνης (εικόνα 22). Ο διαχωρισμός αυτός, γίνεται μόνο από τα ζωντανά κύτταρα, και συγκεκριμένα από το ένζυμο σουκινική δεϋδρογονάση στα μιτοχόνδρια των κυττάρων [43,44,45]. Οι αδιάλυτοι κρύσταλλοι φορμαζάνης διαλύονται στην ισοπροπανόλη ή άλλο οργανικό διαλύτη (π.χ. DMSO). Η οπτική πυκνότητα του διαλυμένου υλικού μετράται φασματοφωτομετρικά λόγω απορρόφησης της βαφής

(μωβ χρώμα), η οποία αντιστοιχεί στον αριθμό των **ζωντανών** κυττάρων στο διάλυμα.



Εικόνα 22 : Μετατροπή του άλατος του τετραζολίου σε κρυστάλλους φορμαζάνης.

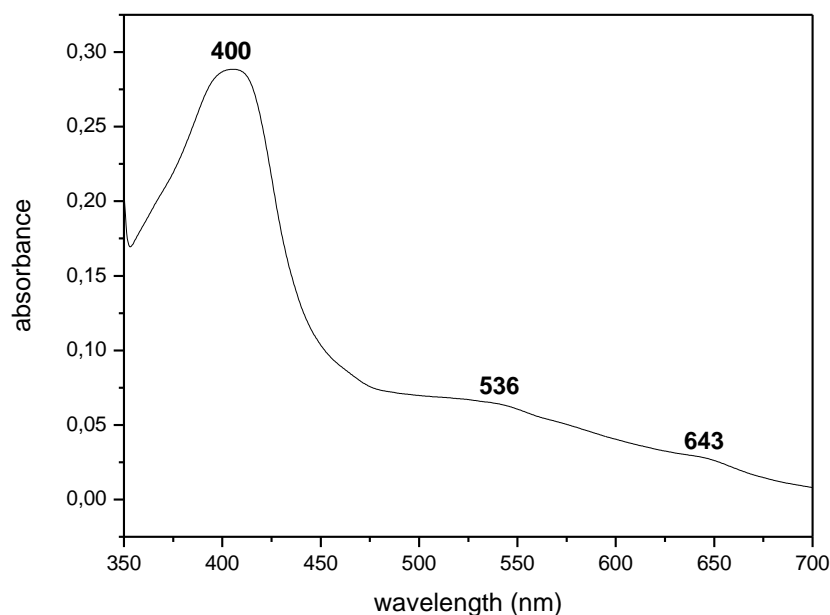
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η εύρεση των κατάλληλων συνθηκών απομόνωσης της πρωτεΐνης λυάσης του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων, καθώς και ο χαρακτηρισμός αυτής με διάφορες μεθόδους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά απορρυπαντικά για τον καθαρισμό και την απομόνωση της πρωτεΐνης κατά τη χρωματογραφία συγγένειας καθώς και διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές για τον χαρακτηρισμό της, μεταξύ αυτών και η φασματοσκοπία μάζας, καθώς και ο κυκλικός διχρωισμός. Εκτός από την υπερεκφρασμένη σε βακτήρια πρωτεΐνη, στόχος είναι και η απομόνωση της πρωτεΐνης απευθείας από τα φύλλα της ελιάς. Τέλος, ένας επιπλέον στόχος της παρούσας εργασίας είναι η απόδειξη της ισχύος των αντιμικροβιακών, αντιμυκητιακών και αντικαρκινικών ιδιοτήτων των παραγώγων της δράσης του ενζύμου.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

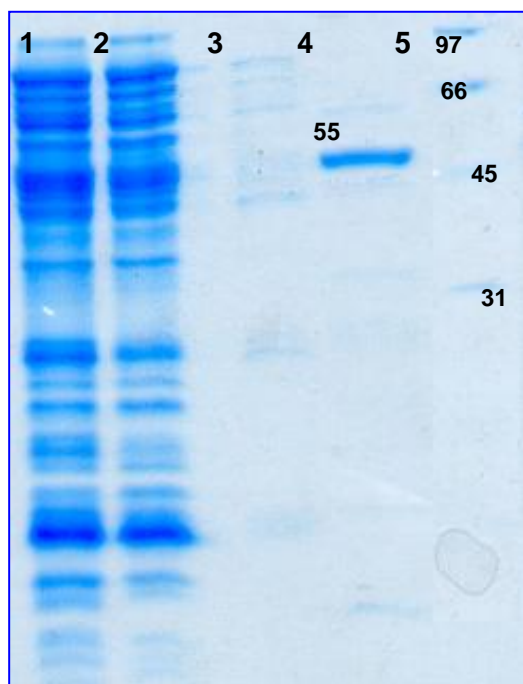
3.1 Απομόνωση της λυάσης του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων παρουσία Triton X-100

1. Ο χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης έγινε με λήψη φάσματος στην περιοχή του ορατού και συγκεκριμένα σε εύρος 350 – 700 nm. Το φάσμα λαμβάνεται χρησιμοποιώντας ως τυφλό διάλυμα με 50mM Na₂HPO₄, 1M NaCl, pH 7,0, 0.2% (v/v) Triton X-100. Είναι εμφανής η χαρακτηριστική κορυφή Soret της HPL στα 400 nm (θεωρητική τιμή στα 393nm [9]), λόγω της αίμης ενώ εμφανίζεται και η μπάντα α στα 536nm (θεωρητική τιμή στα 540nm [9]). Η ταινία μεταφοράς φορτίου εμφανίζεται στα 643nm (θεωρητική τιμή στα 640nm [9]) και είναι χαρακτηριστική της κατάστασης υψηλού spin του σιδήρου. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται το φάσμα της λυάσης του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων. Παρουσία του απορρυπαντικού Triton X-100, ήταν αδύνατος ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Παρ' όλα αυτά θεωρώντας ότι η πρωτεΐνη έχει συντελεστή απορρόφησης 100 cm⁻¹ mM⁻¹, όπως όλες οι αιμοπρωτεΐνες, τότε μπορούμε να πούμε ότι η HPL έχει συγκέντρωση περίπου **1,6 mg/mL**.



Εικόνα 23 : Φάσμα της λύσεως σε Triton X-100 σε εύρος 350-700 nm.

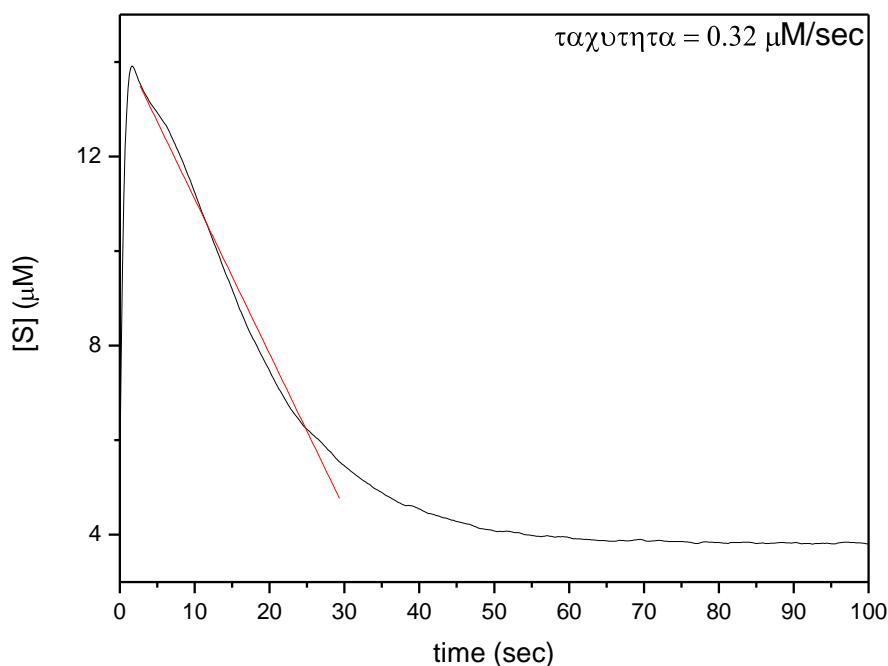
2. Επιπλέον χρησιμοποιώντας αποδιατακτική SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη καθαρίστηκε και απομονώθηκε επιτυχώς και έχει μοριακό βάρος περίπου 55 kDa. Στη συνέχεια εμφανίζεται η εικόνα από μία πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Στη θέση 1 βρίσκεται το πρωτεϊνικό μείγμα μετά τη διάσπαση των μεμβρανών και στη θέση 2 το μείγμα των πρωτεϊνών που δεν συγκρατείται από την κολόνα. Στην θέση 3 εμφανίζεται η έκπλυση με διάλυμα ιμιδαζολίου 10 mM, ενώ στην θέση 4 είναι εμφανής η καθαρή πρωτεΐνη, HPL, η οποία απομακρύνθηκε από την κολόνα με χρήση διαλύματος ιμιδαζολίου 200 mM. Τέλος στη θέση 5, βρίσκεται μείγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, με βάρη 97, 66, 45, 31, 21,5, 14,5 kDa (marker).



Θέση στο gel	Δείγμα
1	crude
2	flow through
3	Ιμιδαζόλιο 10mM
4	HPL
5	Marker

Εικόνα 24 : Πηκτή πολυακρυλαμιδίου, απομόνωσης της HPL με Triton X-100.

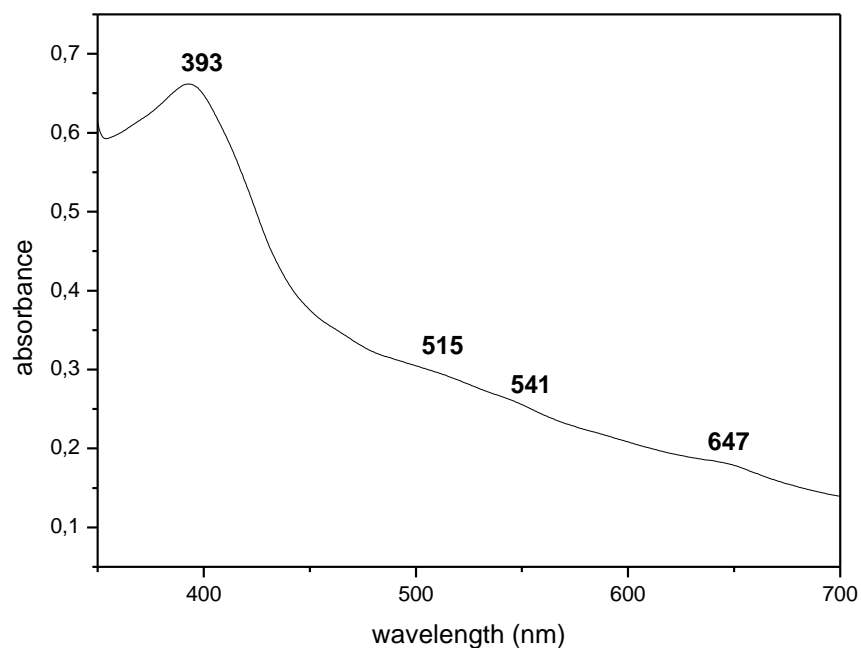
3. Τέλος, μετρήθηκε η δραστικότητα της λύσης. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η μείωση της απορρόφησης στα 234 nm, όπου βρίσκεται η χαρακτηριστική κορυφή του 13-HPOD. Μείωση της απορρόφησης συνεπάγεται και διάσπαση του υποστρώματος στα προϊόντα του. Η δραστικότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε στους 25 °C και η απορρόφηση μετατράπηκε σε μονάδες συγκέντρωσης υποστρώματος ([S]), χρησιμοποιώντας τον συντελεστή απόσβεσης του 13-HPOD, ο οποίος είναι $25000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Η αντίδραση χρειάζεται μέγιστο χρόνο 180 δευτερόλεπτα για να ολοκληρωθεί, αν και συνήθως μέχρι τα 90 δευτερόλεπτα έχει ολοκληρωθεί. Από την κλίση της ευθείας υπολογίζεται η ταχύτητα της αντίδρασης, η οποία στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι **0,32 $\mu\text{M}/\text{sec}$**



Εικόνα 25 : Διάγραμμα κινητικής της λύσης σε Triton X-100.

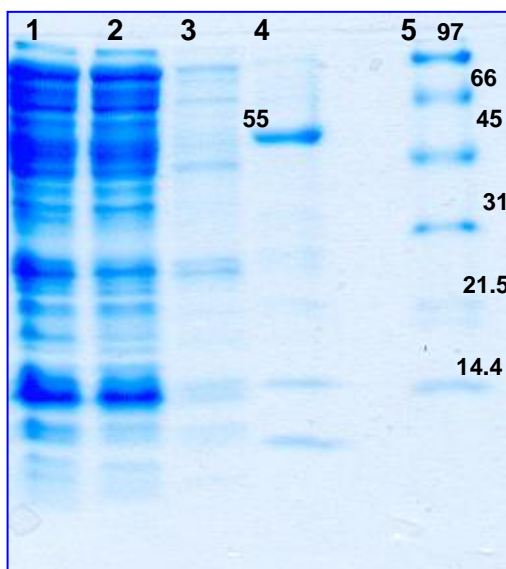
3.2 Απομόνωση της λύσης ου υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων παρουσία Dodecyl Maltoside (DM)

1. Η απομόνωση της λύσης παρουσία 0,05% w/v dodecyl maltoside (DM) δεν παρουσίασε ιδιαίτερες διαφορές σε σχέση με την περίπτωση του Triton X-100. Το φάσμα ήταν παρόμοιο, όπως και η δραστηριότητα της λύσης η οποία δεν μεταβάλλεται. Το φάσμα απορρόφησης λήφθηκε χρησιμοποιώντας ως τυφλό διάλυμα με 50mM PO_4^{2-} , pH 8,0, 1M NaCl και 0,05% w/v DM. Είναι εμφανής η χαρακτηριστική κορυφή Soret της HPL στα 393nm ενώ εμφανίζονται τόσο η μπάντα α και β στα 541nm (θεωρητική τιμή στα 540nm) και 515nm αντίστοιχα (θεωρητική τιμή στα 512nm). Η ταινία μεταφοράς φορτίου εμφανίζεται στα 647nm (θεωρητική τιμή στα 640nm). Παρακάτω ακολουθεί το φάσμα της λύσης παρουσία DM σε εύρος 350 – 700 nm. Στην περίπτωση του απορρυπαντικού DM, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford, ήταν δυνατός καθώς το απορρυπαντικό αυτό δεν επηρεάζει τη χρωστική. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν **1 mg/mL**.



Εικόνα 26 : Φάσμα της λύσης σε απορρυπαντικό DM σε εύρος 350-750 nm.

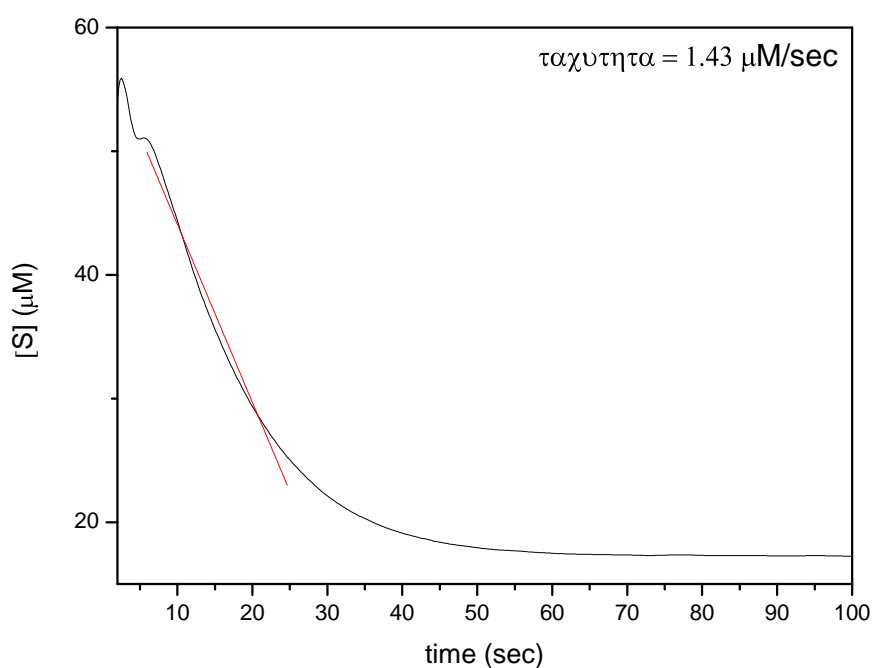
2. Παρόμοια ήταν και η πηκτή πολυακρυλαμιδίου, όπου είναι εμφανές ότι η λύση καθαρίστηκε και απομονώθηκε με επιτυχία. Στη θέση 1 βρίσκεται το πρωτεϊνικό μίγμα έπειτα από το σπάσιμο των μεμβρανών και στη θέση 2, το διάλυμα των πρωτεϊνών που δεν συγκρατείται από την κολόνα. Στη θέση 3 εμφανίζεται η έκπλυση με διάλυμα ιμιδαζολίου 10 mM. Στη θέση 4 βρίσκεται η απομονωμένη HPL. Τέλος στη θέση 5 βρίσκεται μείγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (marker).



Θέση στο gel	Δείγμα
1	crude
2	flow through
3	Ιμιδαζόλιο 10mM
4	HPL σε DM
5	marker

Εικόνα 27: Πηκτή πολυακρυλαμίδιου, απομόνωσης της HPL με DM.

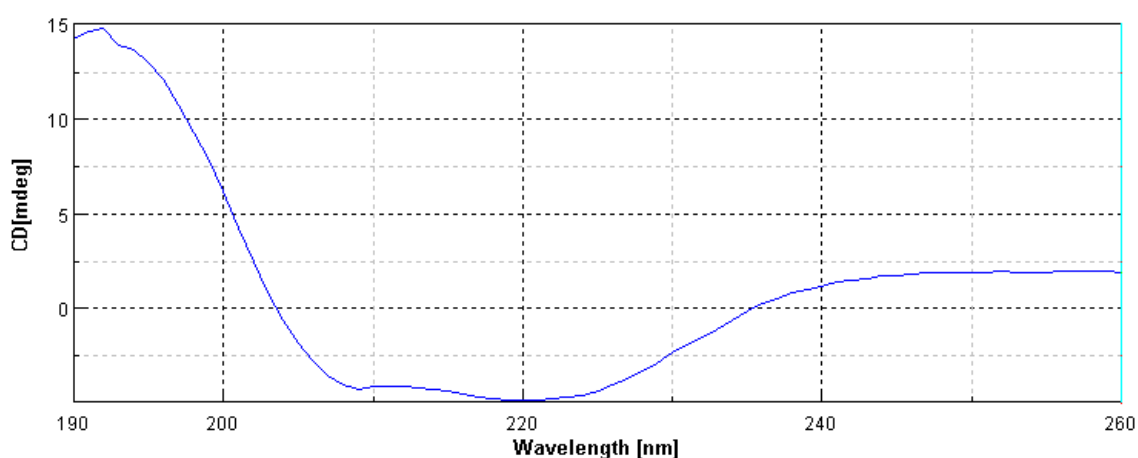
3. Τέλος, έγινε και μέτρηση της δραστηρότητας της λύσης, με τον ίδιο τρόπο όπως στην περίπτωση του Triton X-100. Στη συνέχεια ακολουθεί το διάγραμμα κινητικής. Η δραστηρότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε στους 25 °C και η απορρόφηση μετατράπηκε σε μονάδες συγκέντρωσης υποστρώματος ([S]), χρησιμοποιώντας τον συντελεστή απόσβεσης του 13-HPOD.



Εικόνα 28 : Διάγραμμα κινητικής της λύσης σε DM.

3.3 Μελέτη της λυάσης του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων με κυκλικό διχρωισμό

Αρχικά λήφθηκε φάσμα κυκλικού διχρωισμού της πρωτεΐνης σε διάφορες συγκεντρώσεις προκειμένου να προσδιορισθεί η δευτεροταγής δομή της. Όλα τα φάσματα εμφανίζουν εικόνα ανάλογη με αυτή παρακάτω, όπου η συγκέντρωση είναι 0,2 mg/mL σε 50mM PO_4^{2-} , 0,05% w/v DM (υπολογισμένο με τη μέθοδο Bradford). Το φάσμα εμφανίζει δύο αρνητικές κορυφές στα 220 και 208 nm και μία θετική στα 193 nm (εικόνα 29).



Εικόνα 29 : Φάσμα κυκλικού διχρωισμού της HPL.

Η εικόνα αυτή ταιριάζει με τα θεωρητικά δεδομένα τα οποία παρουσιάζονται και στη δουλειά της Santiago-Gomez et al. [37] και τα οποία προήλθαν από την μέθοδο Predator (εικόνα 30) και GOR (διαθέσιμα στο διαδίκτυο ως μέρος του πακέτου ανάλυσης δομής πρωτεϊνών ANTHEPROT) και τα οποία δίνουν αποτελέσματα σύμφωνα με τα οποία η HPL αποτελείται από 33% α-έλικα, 18% β-επιφάνεια, 7% στροφή και 42% coil.

```

1  MIPIMSSAPLSTATPISLPVRKIPGSYGFPILGPLWDRDLDYNWFQKLPDF 50
-----
51  FSEKRYEKYNS TVFRITNVPPCFPFPLGVHPNVAVLDVKSFAHLFDMEIVE 100
    _EEEE_ _EEEE_ _HHHHHEEE_
101 KANVLVGDFTHP SVVYTGDMRVCAYLDTSEPKHTQIKNFSLDILKRSSKTM 150
    _EEEE_ _EEEE_ _EEEE_ _HHHH_
151 VPTLVKELDTLFGTFESDL SKSKSASLLPALQKFLPNFFSLTFLGADPSA 200
    _EEEE_ _EEEE_ _HHHHHHHHHHHEEE_
201 SPEIANS GFAYLDAULAIQLAPTV SICVLQPLEEIFVHSFSYPYFLVRGG 250
    _HHHHHHHHHH_ _EEEE_ _HHHHHEEE_ _EEEE_
251 YEKLKFKVSEAKEVLT RAQTDFQLTEQEA IHNLLFILGFNAFGGFTIFL 300
    _HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH_ _HHHHHHHHHHHHHHHHHH_ _EEEE_
301 FTLLGNL GDEKNAEMQEKLRKEVREKVGTINQENLSPESVREMELVQS FVY 350
    _HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH_ _HHHHHHHHHHHHHHHHHH_
351 ESLRLSP PVPSQYARAFKDFMLSSHDSVYE IKKGELLCGYQPLVMKDPKV 400
    _HH_ _HHHHHHHHHHHH_ _EEEE_ _EE_ _EE_
401 FDEPEKFMLERF TKEKGE LLNYL FWSNGPQTGRPTESNKQCAA KDAVTL 450
    _HHHHHHHHHHHHHHHHHHHEEE_ _HHHHHHHHHHHHHHHHHH_
451 TASLIVAYIFQKYDSV SFS SGLTSVKKAC 480
    _HHHHHHHHHHHH_ _EE_

```

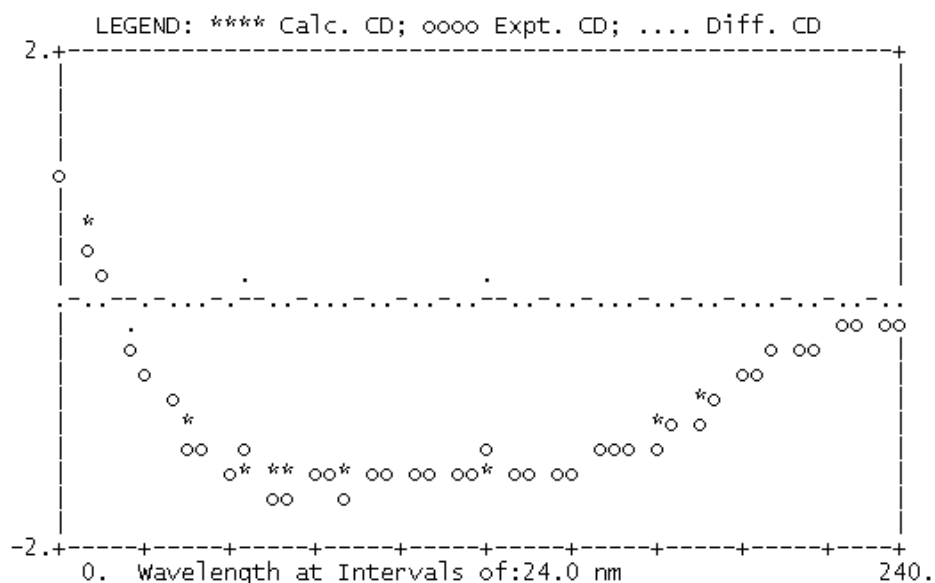
Εικόνα 30 : Θεωρητική δευτεροταγής δομή της HPL βάσει του προγράμματος Predator, όπου Η αντιστοιχεί σε α-έλικα, Ε σε β-επιφάνεια και – σε στροφή.

Παρ’ όλα αυτά έγινε στατιστική ανάλυση των δεδομένων των φασμάτων του κυκλικού διχρωισμού με τα προγράμματα Selcon 3, Continll και CDsstr (παράγραφος 2.3.3). Σύμφωνα με τα προγράμματα αυτά, η πειραματική τιμή των ποσοστών διαφέρει. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα στατιστικά αποτελέσματα των τριών προγραμμάτων καθώς και ο μέσος όρος αυτών. Η στήλη RMSD (root mean square deviation), αντιστοιχεί στο κατά πόσο οι πειραματικές τιμές συμπίπτουν με τις τιμές των τριών προγραμμάτων. Για να θεωρούνται αξιόπιστα τα αποτελέσματα που δίνει το κάθε πρόγραμμα θα πρέπει η τιμή RMSD (exp-calc) να είναι μικρότερη του 1.

	A-έλικα	B-επιφάνεια	Στροφή	Unordered	RMSD
Selcon3	7,3%	34,3%	22,5%	33,5%	0,386
Continll	17,7%	30,6%	21,1%	30,5%	0,071
CDsstr	15,6%	33,3%	21,7%	29,4%	0,119
Μέσος όρος	13,53%	32,73%	21,76%	31,13%	

Οι πειραματικές τιμές της εργασίας αυτής για τη δευτεροταγή δομή της HPL, είναι **13,53% α-έλικα**, **32,73% β-επιφάνεια**, **21,76% στροφή** και **31,13% unordered**. Οι τιμές αυτές διαφέρουν ελάχιστα από τις πειραματικές τιμές της Santiago-Gomez et al. οι οποίες είναι 13% α-έλικα, 29% β-επιφάνεια, 5% στροφή και 53% random coil σε 0,2% (v/v) Triton X-100. [37].

Στη παρακάτω εικόνα (εικόνα 31) φαίνεται πως το πρόγραμμα ανάλυσης Continll, συσχετίζει τις πειραματικές τιμές με τις τιμές των βάσεων δεδομένων του. Με * συμβολίζεται η τιμή που χρησιμοποιεί το πρόγραμμα και με ° οι πειραματικές τιμές, όπως έχουν προέλθει από ένα φάσμα κυκλικού διχρωισμού. Όταν συμπίπτουν οι πειραματικές με τις θεωρητικές τιμές, όπως και στην παρακάτω περίπτωση, τότε το αποτέλεσμα είναι το καλύτερο δυνατό.

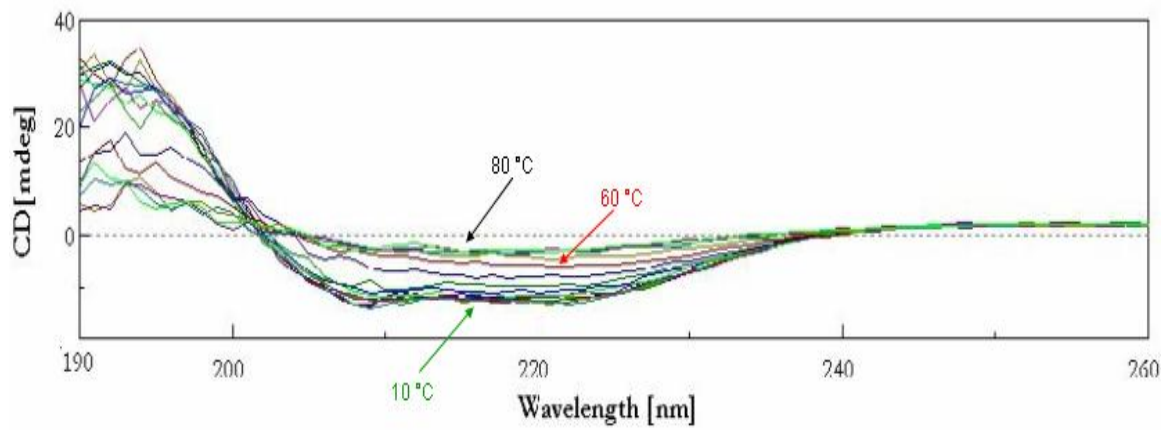


Εικόνα 31 : Συσχέτιση πειραματικών τιμών με τη βάση δεδομένων του προγράμματος Continll.

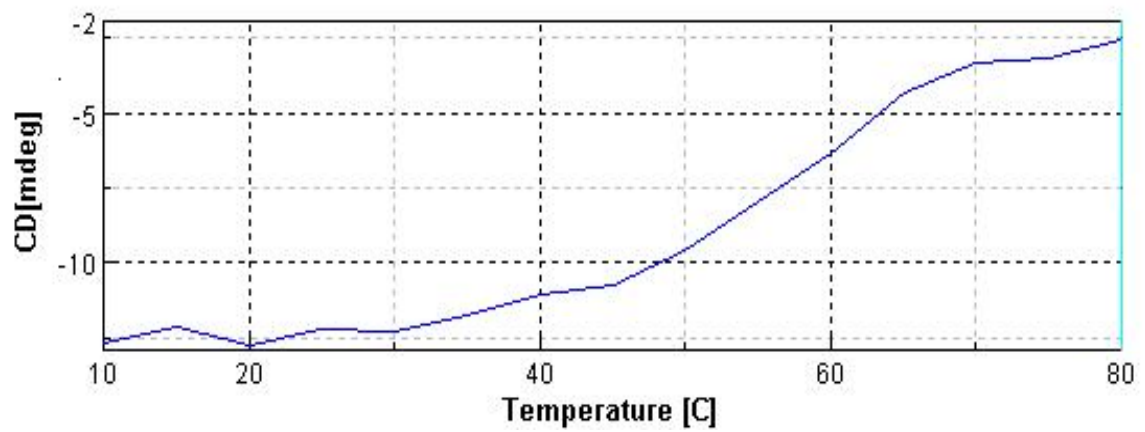
Επιπλέον τα προγράμματα αυτά είναι δυνατόν να εκτιμήσουν τα συνολικά μήκη των α-ελίκων και των β-επιφανειών στην πρωτεΐνη, τα οποία και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα :

	Μήκος α-ελίκων	Μήκος Β-επιφανειών
Selcon3	9,518 A	8,225 A
ContinII	7,443 A	5,958 A
CDsstr	7,182 A	6,047 A
Μέσος όρος	8,048 A	6,743 A

Τέλος, εκτός από το απλό φάσμα κυκλικού διχρωισμού της πρωτεΐνης, με σκοπό την πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής, λήφθηκε και φάσμα αυτής σε εύρος θερμοκρασιών. Συγκεκριμένα, από 10 °C έως 80 °C ανά 10 °C με ταχύτητα 80 °C/h (εικόνα 32). Παράλληλα, γινόταν συνεχής μέτρηση του φάσματος στα 222 nm, καθώς το συγκεκριμένο μήκος κύματος είναι χαρακτηριστικό για την α-έλικα και χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση της μετουσίωσης της πρωτεΐνης (εικόνα 33). Μελετώντας το φάσμα της HPL στο εύρος των θερμοκρασιών είναι εμφανές ότι η πρωτεΐνη έχει πολλά ενδιάμεσα. Μέχρι περίπου τους 40 °C η πρωτεΐνη αλλοιώνεται αλλά δεν αποδιατάσσεται πλήρως. Το διάγραμμα της πρωτεΐνης στα 222 nm καταγράφεται ως μονοτονική καμπύλη, χωρίς καμία διακριτή μεταφορά από την αναδιπλωμένη κατάσταση στη μετουσιωμένη. Η μορφή αυτού του φάσματος είναι χαρακτηριστική για τα μόρια που βρίσκονται σε “molten globule” κατάσταση και δεν επιτρέπει την ανάλυσή του για εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη θερμοκρασία αποδιάταξης της πρωτεΐνης. Παρ’ όλα αυτά, από τη μορφή του φάσματος στο εύρος των θερμοκρασιών, φαίνεται πως η πρωτεΐνη αποδιατάσσεται πλήρως μετά τους 60 °C (εικόνα 32).



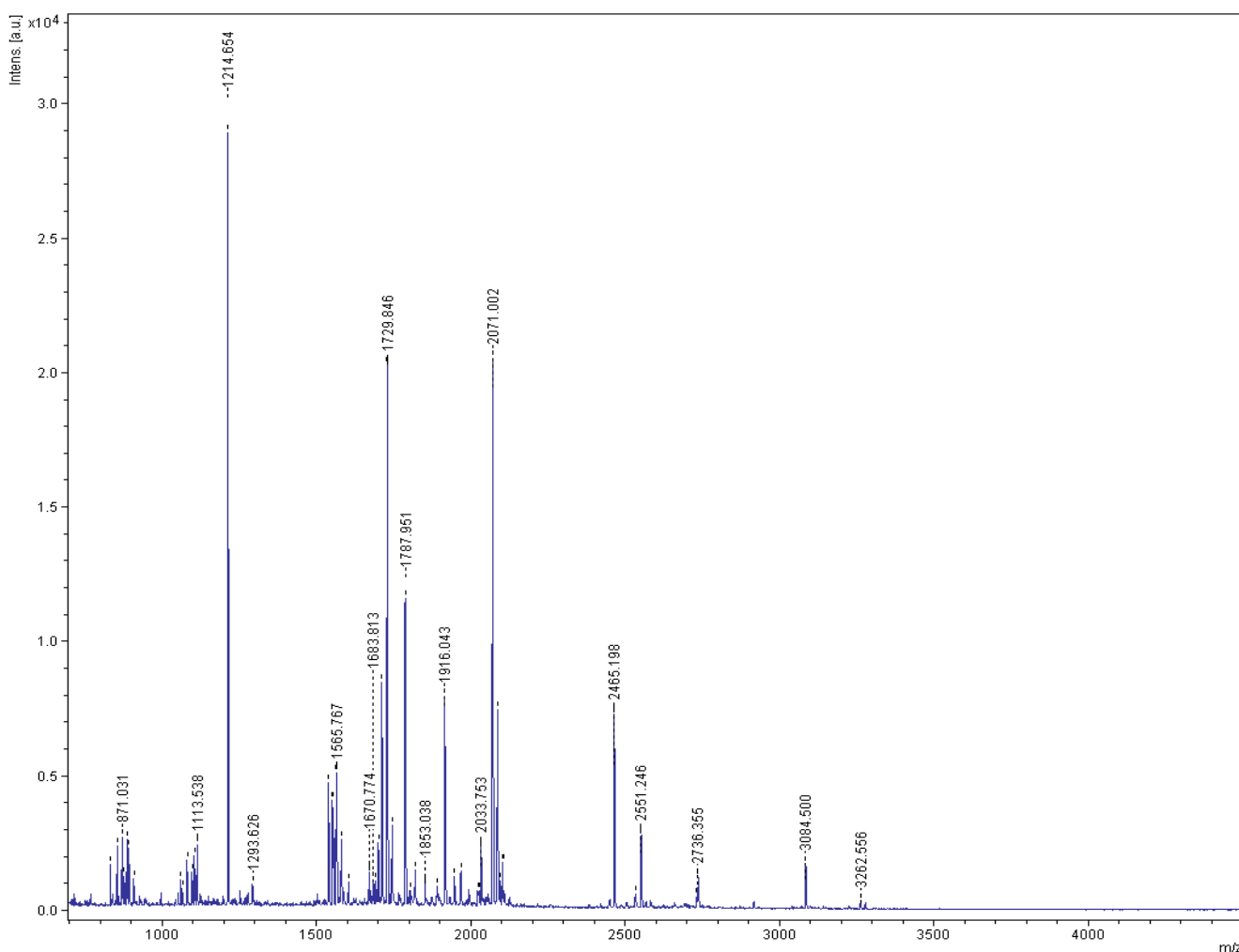
Εικόνα 32 : Φάσμα κυκλικού διχρωισμού της λύσης σε εύρος θερμοκρασιών.



Εικόνα 33 : Διάγραμμα της θερμικής μετουσίωσης της λύσης.

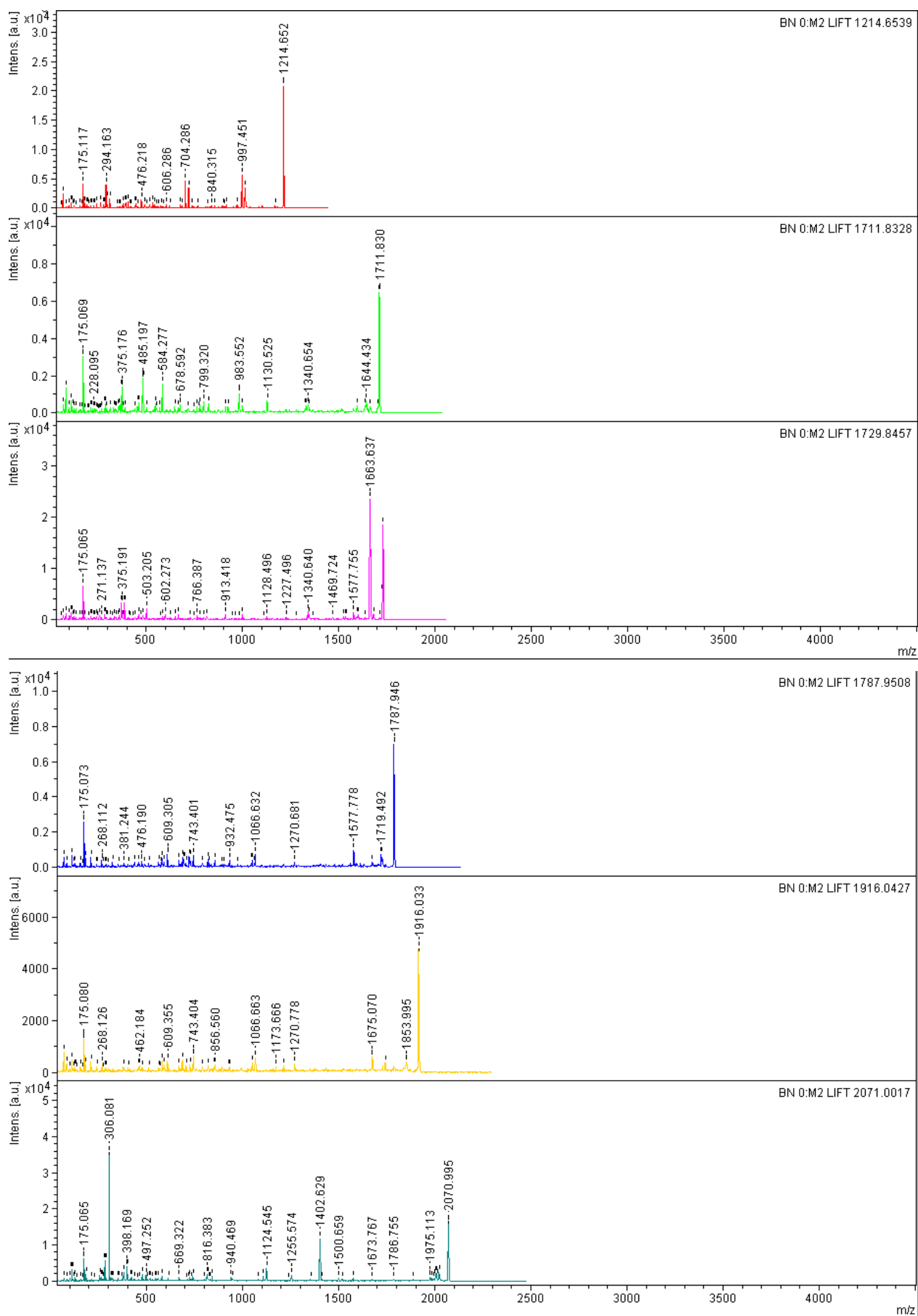
3.4 Μελέτη της λυάσης του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων με φασματοσκοπία μάζας

Αρχικά λήφθηκε το φάσμα μάζας της λυάσης η οποία είναι υπερεκφρασμένη σε βακτήρια *Escherichia coli*. Το φάσμα μάζας παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 34).



Εικόνα 34 : MS φάσμα της HPL

Από το παραπάνω φάσμα επιλέχθηκαν τα πεπτίδια με μάζα 1214.6539, 1711.8327, 1729.8457, 1787.9508, 1916.0428, 2071.002 , για να διασπαστούν περαιτέρω (MS/MS). Στη συνέχεια παρατίθενται τα MS/MS φάσματα (εικόνα 35)



Εικόνα 35 : MS/MS φάσματα των πεπτιδίων της λύσης.

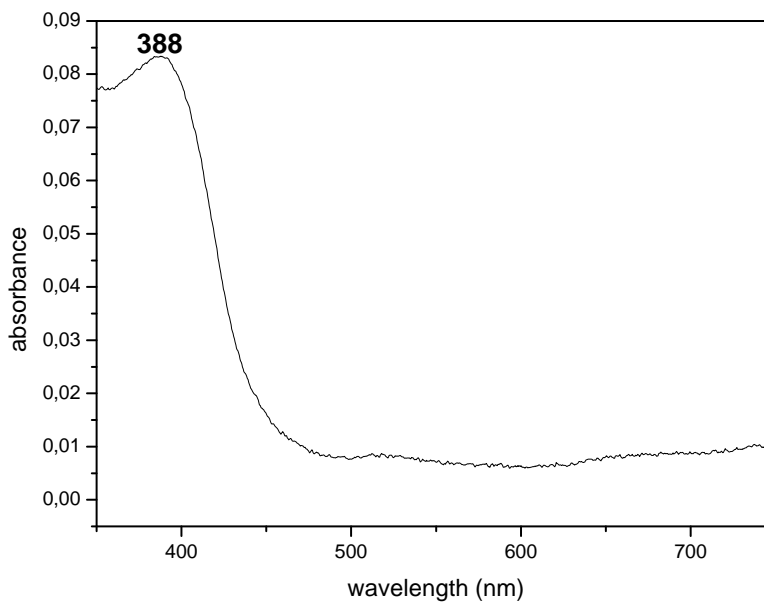
Η μηχανή αναζήτησης Mascot χρησιμοποίησε όλα τα φάσματα των πεπτιδίων και τα αντίστοιχα αμινοξέα τους, πλην του 1711.8327, και έβγαλε με σκορ 487, ότι η πρωτεΐνη που αναλύθηκε είναι η λύαση του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων από πιπεριά (*Capsicum annuum*). Τα αμινοξέα που προέκυψαν από τα πεπτίδια φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πεπτίδιο	Σκορ	Αλληλουχία
1214.6539	83	LSPPVPSQYAR
1729.8457	109	EMELVQSFVYESLR
1787.9508	96	IPGSYGFLLGPLWDR
1916.0427	82	KIPGSYGFLLGPLWDR
2071.0017	117	ANVLVGDFMPSVVYTGDMR

3.5 Απομόνωση μιας υπεροξειδάσης από τα φύλλα της ελιάς

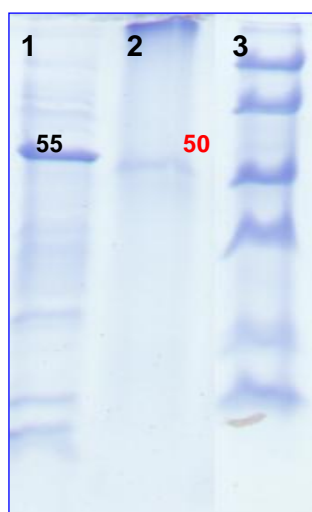
Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 2.2, έγινε προσπάθεια απομόνωσης της λύασης του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων από τα φύλλα της ελιάς. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε παρουσία του απορρυπαντικού Triton X-100. Πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης καθώς και μελέτη αυτής με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση. Τέλος πραγματοποιήθηκε και χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης με χρήση φασματοσκοπίας μάζας.

1. Η φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού σε εύρος κύματος 350-750 nm έδειξε μια κορυφή στα 388 nm, γεγονός που υποδεικνύει ότι πρόκειται για μια αιμοπρωτεΐνη με την κορυφή αυτή να αποτελεί την Soret κορυφή της. Στη συνέχεια ακολουθεί το φάσμα υπεριώδους-ορατού της πρωτεΐνης αυτής.



Εικόνα 36 : Φάσμα υπεριώδους-ορατού της πρωτεΐνης που απομονώθηκε από φύλλα ελιάς.

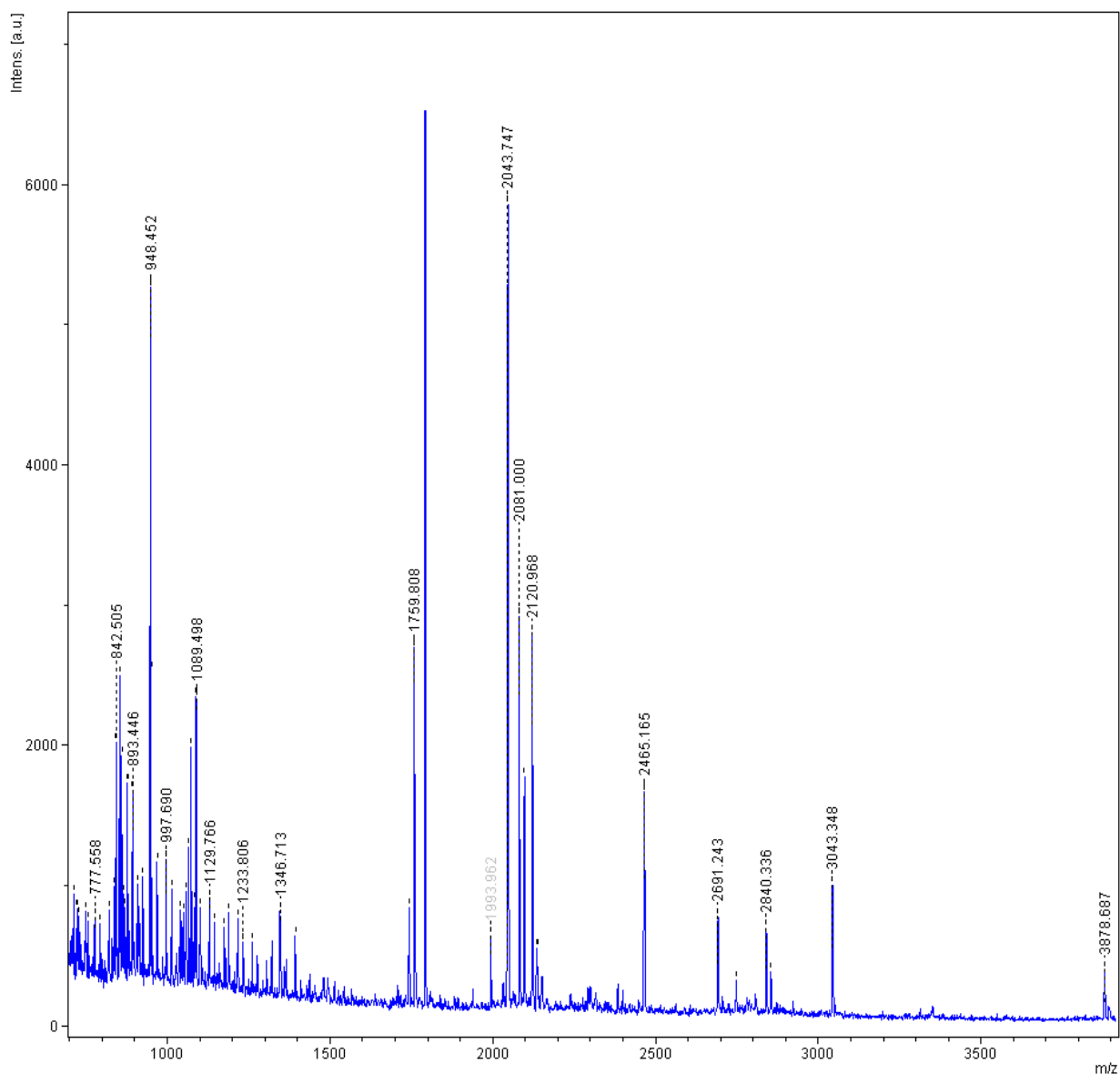
2. Στη συνέχεια η πρωτεΐνη μελετήθηκε με τη χρήση αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου έδειξε ότι η εν λόγω πρωτεΐνη είναι μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος παρόμοιο με αυτό της λύασης του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων (55kDa). Υπολογίζεται ότι το μοριακό βάρος αυτής της πρωτεΐνης είναι περίπου 50 kDa. Στη θέση 1 βρίσκεται λύαση του υδροϋπεροξειδίου απομονωμένη και καθαρισμένη, και χρησιμοποιείται ως δείκτης. Στη θέση 2 βρίσκεται η υπεροξειδάση και τέλος στη θέση 3 βρίσκεται μείγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (marker).



Θέση στο gel	Δείγμα
1	HPL
2	υπεροξειδάση
3	marker

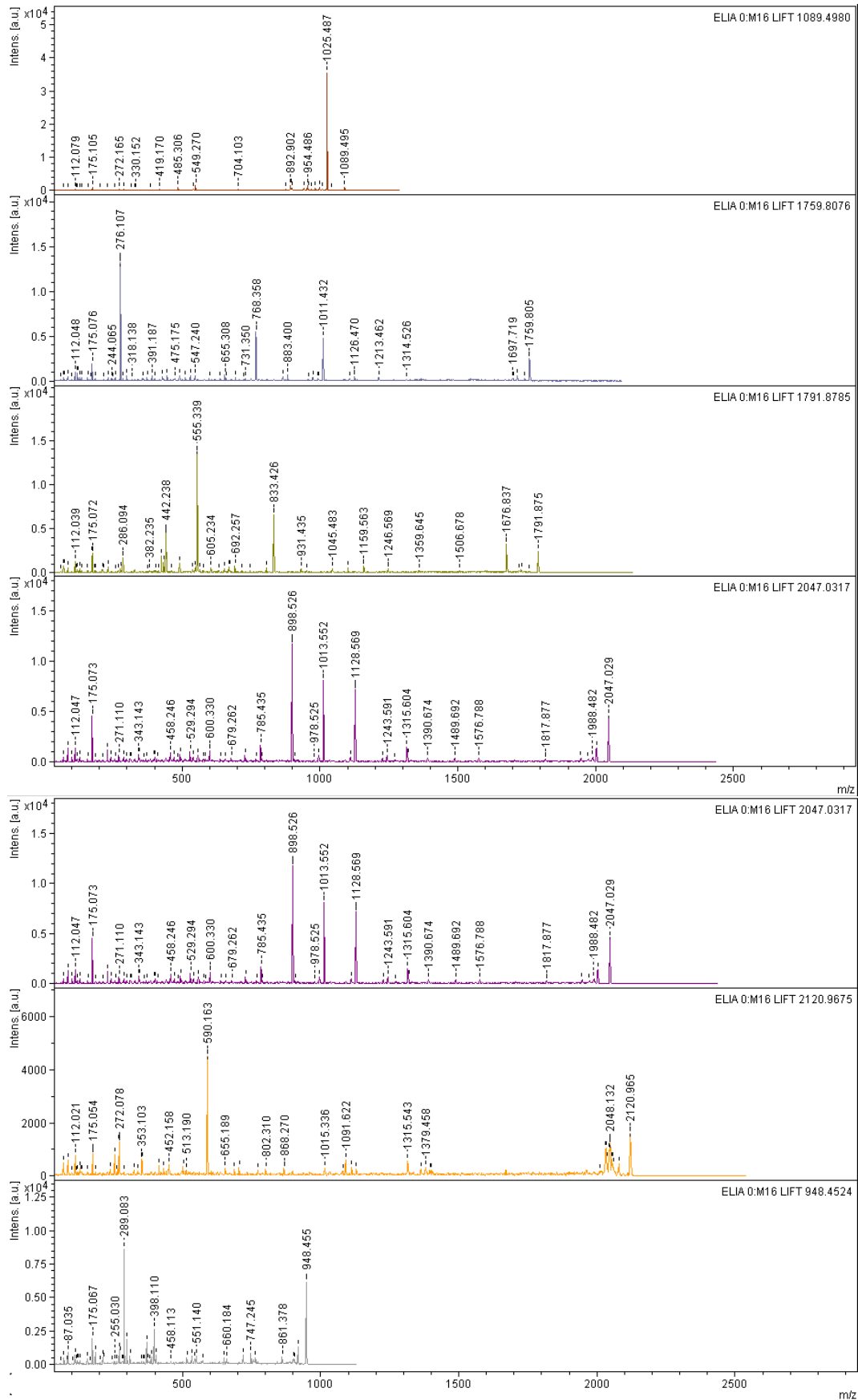
Εικόνα 37 : Πηκτή πολυακρυλαμιδίου της υπεροξειδάσης.

3. Τέλος έγινε ταυτοποίηση της πρωτεΐνης με χρήση φασματοσκοπίας μάζας. Αρχικά λήφθηκε το φάσμα μάζας της πρωτεΐνης από τα φύλλα της ελιάς. Το φάσμα μάζας παρουσιάζεται παρακάτω (εικόνα 38). Από τις κορυφές του φάσματος επιλέχθηκαν τα πεπτίδια με μάζα 1089.4980, 1759.8076, 1791.8785, 2047.9675, 2120.9675, 948.4524 για να διασπαστούν περαιτέρω (MS/MS). Το πεπτίδιο με μάζα 2465.1650 δεν χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση διότι είναι ένας από τους εσωτερικούς βαθμονομητές που χρησιμοποιούνται.



Εικόνα 38 : MS φάσμα της πρωτεΐνης που απομονώθηκε από τα φύλλα της ελιάς.

Στη συνέχεια ακολουθούν τα MS/MS φάσματα της πρωτεΐνης.



Εικόνα 39 : MS/MS φάσματα της πρωτεΐνης που απομονώθηκε από τα φύλλα της ελιάς.

Η μηχανή αναζήτησης Mascot χρησιμοποίησε από όλα τα φάσματα των πεπτιδίων και τα αντίστοιχα αμινοξέα τους, μόνο τα πεπτίδια με μάζα 1089.4980 και 1759.8076 και έδειξε με σκορ 124 ότι η πρωτεΐνη που αναλύθηκε είναι η Peroxidase 12 precursor, παρόμοια όπως στον οργανισμό *Ricinus communis*. Τα αμινοξέα που προέκυψαν από τα πεπτίδια φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πεπτίδιο	Σκορ	Αλληλουχία
1089.4980	16	YYVDLMNR
1759.8076	108	QGLFTSDQDLTYDTR

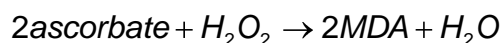
Παρ' όλο που αρχικός σκοπός ήταν η απομόνωση της λυάσης του υδροϋπεροξειδίου, τελικά η πρωτεΐνη που απομονώθηκε δεν ήταν αυτή, αλλά όπως φάνηκε με τη χρήση φασματοσκοπίας μάζας επρόκειτο για την πρωτεΐνη υπεροξειδάση.

Η πρώτη υπεροξειδάση που απομονώθηκε, προήλθε από τα φύλλα του οργανισμού *Brassica Napus* (ελαιοκράμβη) και εμφανίζει πολλές ομοιότητες με την Horseradish peroxidase (HRP) [47].

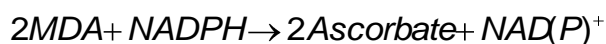
Στους σπόρους του φυτού Ρίκινος ο κοινός (*Ricinus communis*) η υπεροξειδάση, μαζί με άλλες μικρού μοριακού βάρους ενώσεις, όπως το ασκορβικό οξύ, η γλουταθειόνη, η α-τοκοφερόλη, αλλά και ένζυμα όπως οι καταλάσες, αποτελούν ένα αμυντικό σύστημα εναντίον της οξειδωσης που προκαλείται από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (O_2^-) και από υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2). Μέχρι πρότινος η διάσπαση του H_2O_2 αποδιδόταν αποκλειστικά στη δράση των καταλασών, παρ' όλα αυτά η απομόνωση μιας ασκορβικής υπεροξειδάσης (ascorbic peroxidase - APX) από τους καρπούς της κολοκύθας, απέδειξε ότι οι καταλάσες δεν είναι τα μοναδικά ένζυμα που συμμετέχουν [47]. Όπως λοιπόν η δράση της λυάσης του υδροϋπεροξειδίου είναι προστατευτική προς τα φυτά, διασπώντας τα υδροϋπεροξειδία των λιπαρών οξέων προς δημιουργία ενώσεων σημαντικών για την άμυνα του φυτού, έτσι και η υπεροξειδάση προστατεύει τον οργανισμό από τη δράση του υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Η ασκορβική υπεροξειδάση, υπάρχει σε τρία διακριτά ισoenζυμα, ένα εξ αυτών βρίσκεται στο κυτοσόλιο, ενώ τα άλλα στους χλωροπλάστες ένα στο στρώμα και το άλλο στις θυλακοειδείς μεμβράνες. Δρουν ως συλλέκτες H₂O₂, εις βάρος του ασκορβικού, προστατεύοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τα φυτικά κύτταρα από τα καταστροφικά αποτελέσματα του H₂O₂, καθώς αυτό, ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, αναστέλλει τη δράση ενζύμων, όπως η 1,6- διφοσφορική φρουκτόζη [48]. Όλα τα ισoenζυμα είναι αιμοπρωτεΐνες, οι οποίες φέρουν ως προσθετική ομάδα την πρωτοαίμη IX, ενώ το ένζυμο μπορεί να υπάρξει είτε ως μονομερές είτε ως διμερές. Συγκρίνοντας την υπεροξειδάση, με την λυάση, συμπεραίνεται ότι και οι δύο πρωτεΐνες είναι μεμβρανικές και αιμοπρωτεΐνες που φέρουν την πρωτοαίμη IX ως προσθετική ομάδα. Όπως είναι φυσικό και οι δύο πρωτεΐνες δρουν μεταβάλλοντας την οξειδωτική κατάσταση του σιδήρου της αίμης από Fe⁺³ σε Fe⁺⁴-OH η λυάση, και Fe⁺⁴=O η υπεροξειδάση.

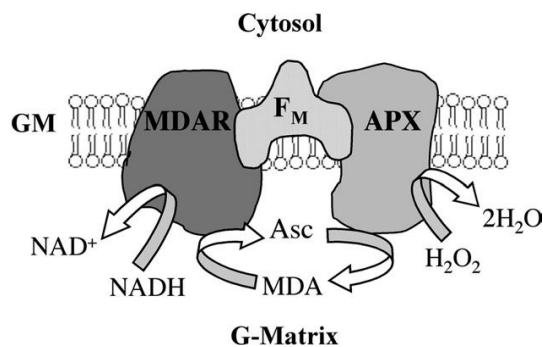
Η δράση του ενζύμου APX περιγράφεται από την παρακάτω εξίσωση.



Κύριο παράγωγο της δράσης της APX, είναι το monodehydroascorbate (MDA), το οποίο μπορεί να μετατραπεί πάλι σε ασκορβικό από το ένζυμο monodehydroascorbate reductase (MDAR). Έτσι, συνολικά, η APX καταναλώνει H₂O₂ καταναλώνοντας ασκορβικό, ενώ η MDAR επαναφέρει το ασκορβικό καταναλώνοντας NADPH [47]. Η δράση των δύο ενζύμων περιγράφεται από την παρακάτω εξίσωση :



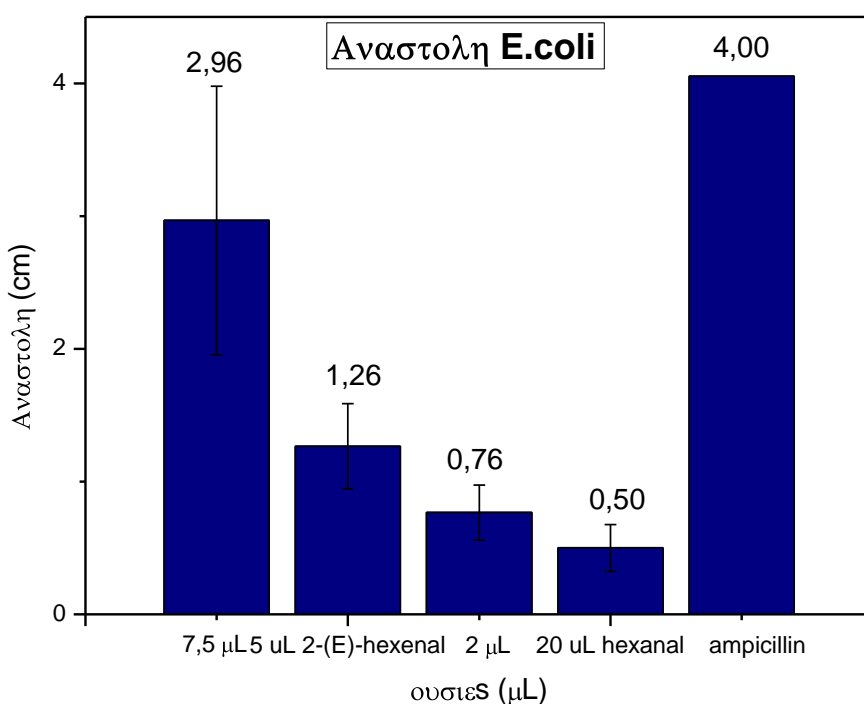
Η APX και η MDAR, συνδέονται μεταξύ τους μέσω ενός τρίτου μεμβρανικού τμήματος, απαραίτητο ώστε να αλληλεπιδρούν τόσο οι υδρόφοβες, όσο και οι ενεργές περιοχές των δύο πρωτεϊνών (εικόνα 40).



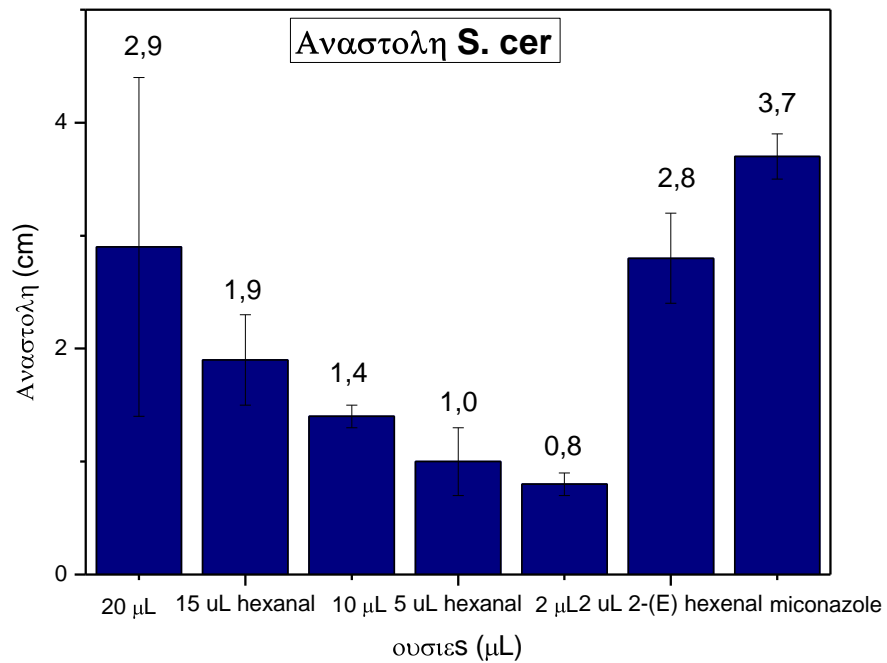
Εικόνα 40 : Αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών APX και MDAR.

3.6 Αντιμικροβιακές και αντιμυκητιακές ιδιότητες της 2-(E)-εξενάλης και εξανάλης

Όσον αφορά τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των δύο ουσιών πρέπει να σημειωθεί ότι η δράση της 2-(E)-εξενάλης ήταν σαφώς εντονότερη από αυτή της εξανάλης. Συγκεκριμένα η ζώνη αναστολής για τα 20, 15 και 10 μL , ξεπερνούσε την επιφάνεια του τρυβλίου, ενώ η εξανάλη παρουσίασε ζώνη αναστολής μόνο στα 20 μL ουσίας και αυτή μικρή. Στην περίπτωση των μυκήτων όμως και οι δύο ουσίες ήταν ιδιαίτερα δραστικές. Η 2-(E)-εξενάλη εμφάνισε ορατή ζώνη αναστολής μόνο στα 2 μL , ενώ η εξανάλη σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων. Παρακάτω παρουσιάζονται τα γραφήματα αναστολής των ουσιών.

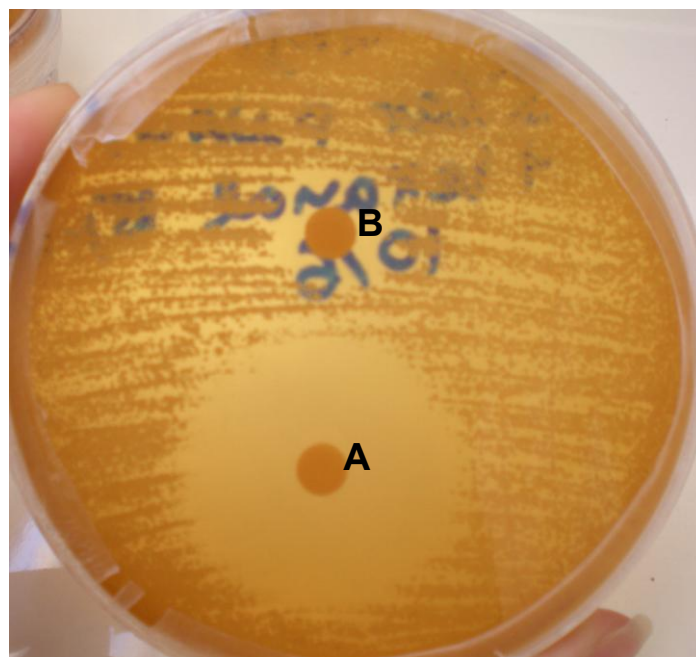


Εικόνα 41 : Αναστολή των βακτηρίων *E.coli* παρουσία των προς εξέταση ουσιών.



Εικόνα 42 : Αναστολή των μυκήτων *S. cer* παρουσία των προς εξέταση ουσιών.

Στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 43) εμφανίζεται ενδεικτικά ένα τριβλίο στο οποίο έχουν αναπτυχθεί μύκητες *Saccharomyces cerevisiae* και οι δίσκοι αναστολής έχουν εμποτιστεί με 15 μL εξανάλης (δίσκος Β) και 10 μL μικοναζόλης (δίσκος Α)

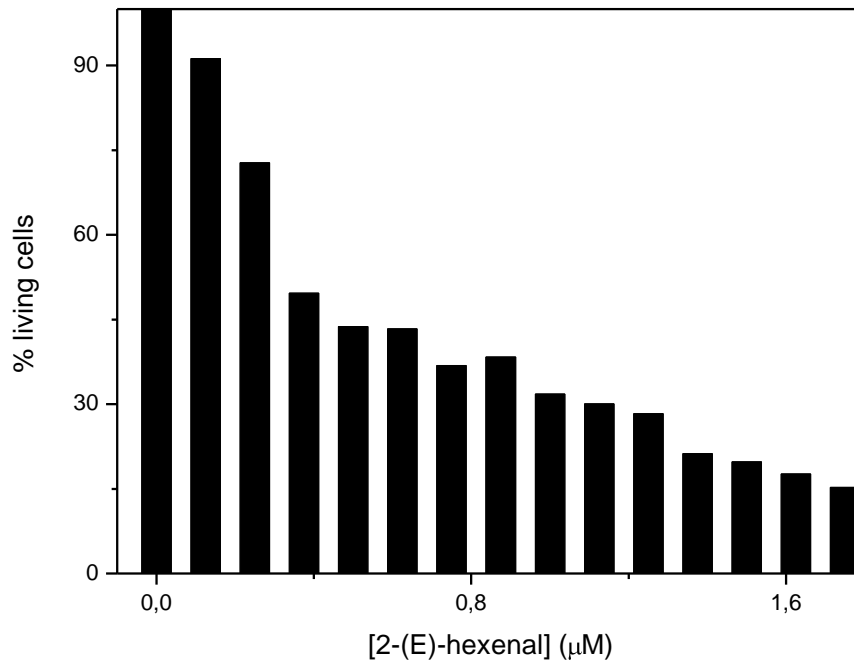


Εικόνα 43 : Τριβλίο με μύκητες *S. cer* παρουσία 15 μL εξανάλης (δίσκος Β) και 10 μL μικοναζόλης (δίσκος Α).

3.7 Αντικαρκινικές ιδιότητες 2-(E)-εξενάλης

Και οι δύο ουσίες εξετάστηκαν για τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες, ωστόσο η εξανάλη και σε μεγάλες συγκεντρώσεις δεν είχε δράση, σε αντίθεση με την 2-(E)-εξενάλη που είχε έντονη κυτταροτοξική δράση. Η δράση της ξεκινά, όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 2.6.2 ξεκινά από τα 0,125 μM , ενώ στα 1,75 μM πλέον δεν υπάρχουν ζωντανά κύτταρα. Παρακάτω παρουσιάζονται οι τιμές και το γράφημα της μεταβολής του αριθμού των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με τη συγκέντρωση της 2-(E)-εξενάλης.

[2-(E)-εξενάλης] στα 800μL (μM)	Μέσος όρος απορροφήσεων στα 556nm	% Ποσοστό ζωντανών κυττάρων
0 (μάρτυρας)	0,4972	100
0,125	0,4536	91,23
0,25	0,3619	72,79
0,375	0,2471	49,70
0,5	0,2175	43,75
0,625	0,2156	43,36
0,75	0,1831	36,83
0,875	0,1907	38,35
1	0,158	31,78
1,125	0,1496	30,09
1,25	0,1409	28,34
1,375	0,1057	21,26
1,5	0,0984	19,80
1,625	0,0876	17,62
1,75	0,0758	15,24



Εικόνα 44 : Αναστολή των κυττάρων HeLa, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων 2-(E)-εξενάλης

Από το παραπάνω διάγραμμα (εικόνα 44) είναι εμφανές ότι η IC_{50} της 2-(E)-εξενάλης, δηλαδή η συγκέντρωση στην οποία το 50% των κυττάρων είναι ζωντανά είναι τα 0,247 μM περίπου.

$$IC_{50} = 0,247 \mu\text{M}.$$

4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

4.1 Απομόνωση της λυάσης του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων

Και στις δύο περιπτώσεις των μη ιονικών απορρυπαντικών (Triton X-100 και DM), η πρωτεΐνη καθαρίστηκε και απομονώθηκε με μεγάλη επιτυχία, όπως φάνηκε από τις πηκτές πολυακρυλαμίδιου. Στην περίπτωση του Triton X-100 η συγκέντρωση της HPL ήταν 1,6 mg/mL ενώ στην περίπτωση του DM 1,0 mg/mL. Από τα φάσματα υπεριώδους-ορατού, παρατηρείται ότι η απομόνωση με το DM, ήταν σαφώς περισσότερο επιτυχημένη, καθώς όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές της πρωτεΐνης ήταν διακριτές και περισσότερο κοντά στις θεωρητικές. Επιπλέον, ο ρυθμός κατανάλωσης του υποστρώματος 13-HPOD ήταν μεγαλύτερος στην περίπτωση του DM (1,43 $\mu\text{M}/\text{sec}$) από ότι στην περίπτωση του Triton X-100 (0,32 $\mu\text{M}/\text{sec}$). Αξίζει να σημειωθεί ότι, το Triton X-100, όντας πολυμερές, εμφανίζει κορυφές στην υπεριώδη περιοχή, γεγονός που το καθιστά απαγορευτικό για μεθόδους όπως είναι η μέθοδος Bradford, ο κυκλικός διχρωσμός ακόμη και η λήψη φάσματος IR. Συνεπώς το DM, αποτελεί τον ιδανικότερο παράγοντα απομόνωσης της πρωτεΐνης, με μόνο απαγορευτικό την τιμή του.

4.2 Χαρακτηρισμός της λυάσης του υδροϋπεροξειδίου με κυκλικό διχρωσμό και φασματοσκοπία μάζας

Η παρουσία του DM, επέτρεψε την μελέτη της HPL με διάφορες μεθόδους, μεταξύ αυτών και ο κυκλικός διχρωσμός. Κατά τη μελέτη της πρωτεΐνης βρέθηκε, σε αντίθεση με τα θεωρητικά δεδομένα, ότι η πρωτεΐνη αποτελείται κατά κύριο λόγο από β -επιφάνειες και σε μικρότερο ποσοστό από α -έλικες. Συγκεκριμένα τα ποσοστά είναι τα εξής : 13.53% α -έλικα, 32.73% β -επιφάνεια, 21.76% στροφή και 31.13% unordered. Επιπλέον υπολογίστηκε ότι η HPL φέρει συνολικό μήκος α -ελίκων 8,048 Å, και συνολικό μήκος β -επιφανειών 6,743 Å. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 60 °C, η πρωτεΐνη αποδιατάσσεται. Παρουσία Triton X-100, ήταν αδύνατη η λήψη φάσματος κυκλικού διχρωσμού, εξαιτίας της απορρόφησης του πολυμερούς στην υπεριώδη περιοχή.

Όσον αφορά τον χαρακτηρισμό της HPL με φασματοσκοπία μάζας, χαρακτηρίστηκαν τμήματα της αλληλουχίας της, έπειτα από θρυψινοποίηση, τα οποία επέτρεψαν και την ταυτοποίηση της από την μηχανή αναζήτησης Mascot. Τα πεπτίδια που χαρακτηρίστηκαν αποτελούνται από τα εξής αμινοξέα: LSPVPSQYAR, EMELVQSFVYESLR, IPGSYGFLLGPLWDR, ANVLVGDFMPSVVYTGDMR, KIPGSYGFLLGPLWDR.

4.3 Απομόνωση μίας πρωτεΐνης από τα φύλλα της ελιάς

Παρ' όλο που αρχικός στόχος της εργασίας ήταν να απομονωθεί η HPL από τα φύλλα της ελιάς, η διαδικασία απομόνωσης, η οποία έγινε παρουσία του απορρυπαντικού Triton X-100, οδήγησε στην απομόνωση μίας άλλης πρωτεΐνης συγγενικής με την HPL, της ασκορβικής υπεροξειδάσης (APX – ascorbic peroxidase). Η φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού έδειξε ότι πρόκειται για μία αιμοπρωτεΐνη, η οποία φέρει τη Soret κορυφή της στα 388 nm και η ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου ότι έχει μοριακό βάρος περίπου 40 kDa. Χρησιμοποιώντας την τεχνική της φασματοσκοπίας μάζας, έγινε ταυτοποίηση της APX από τη μηχανή αναζήτησης Mascot, χρησιμοποιώντας τα πεπτίδια που αποτελούνται από τα εξής αμινοξέα : QGLFTSDQDLYTDTR, YYVDLMNR.

4.4 Αντιμικροβιακές, αντιμυκητιακές και αντικαρκινικές ιδιότητες της 2-(E)-εξενάλης και εξανάλης

Από όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, είναι εμφανής η εντονότερη δράση της 2-(E)-εξενάλης έναντι της εξανάλης. Η πρώτη εμφανίζει έντονη αντιβακτηριακή δράση ενώ η δεύτερη σχεδόν ελάχιστη. Χαρακτηριστικό είναι ότι η αντιβακτηριακή δράση της 2-(E)-εξενάλης είναι τόσο έντονη, ώστε να είναι εμφανής από τα 7,5 μL και κάτω, ενώ παραπάνω ποσότητες εμφανίζουν ζώνη αναστολής μεγαλύτερη της διαμέτρου του τριβλύου. Στην περίπτωση των μυκήτων η εξανάλη έχει έντονη δράση, η οποία όμως εξακολουθεί να είναι μικρότερη έναντι των αντίστοιχων ποσοτήτων της 2-(E)-εξενάλης. Τέλος στην περίπτωση των αντικαρκινικών ιδιοτήτων, η εξανάλη εμφανίζει μηδενική δράση, σε αντίθεση με την 2-(E)-εξενάλη της οποίας η δράση είναι εντονότατη ακόμη και σε πολύ μικρές ποσότητες. Σε συγκέντρωση 2-(E)-εξενάλης μόλις 0,125 μM, το ποσοστό των ζωντανών

κυττάρων μειώνεται απευθείας κατά 10%, ενώ σε συγκέντρωση μόλις 1,75 μM , τα ζωντανά κύτταρα είναι πλέον ελάχιστα.

5. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Μετά την επιτυχημένη απομόνωση της πρωτεΐνης, λύσης του υδροϋπεροξειδίου, ένας μελλοντικός στόχος είναι η ακινητοποίηση της σε κάποιον φορέα. Η ακινητοποίηση ενός ενζύμου μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στη σταθεροποίησή του. Ένα ένζυμο θεωρείται ακινητοποιημένο όταν η κινητικότητα του περιορίζεται με τεχνητό τρόπο ενώ παράλληλα διατηρείται η δραστηκότητά του. Η ακινητοποίηση επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους όπως φυσική προσρόφηση ή ομοιοπολική πρόσδεση σε κάποιο στερεό φορέα, παγίδευση εντός πολυμερούς ή ημιπερατής μεμβράνης και διαμοριακή διασύνδεση των ενζύμων μεταξύ τους. Η πιο συνηθισμένη μέθοδος για τη σταθεροποίηση μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης είναι η εισαγωγή της σε μια ακινητοποιημένη διπλοστοιβάδα λιπιδίων. Είναι δυνατόν όμως να γίνει προσπάθεια ακινητοποίησης της πρωτεΐνης σε φορείς όπως τα στοιβαγμένα διπλά υδροξειδία (*Layered Double Hydroxides, LDH*), και τα αλγινικά σφαιρίδια (alginate beads).

Η απομόνωση της υπεροξειδάσης από τα φύλλα ελιάς, ανοίγει καινούριους στόχους στην περαιτέρω μελέτη της πρωτεΐνης αυτής. Μελλοντικός στόχος, είναι η απομόνωση της σε ικανοποιητικές ποσότητες και ο χαρακτηρισμός της με διάφορες φασματοσκοπικές μεθόδους. Η σχέση της και η αλληλεπίδραση της με άλλες πρωτεΐνες είναι μια επιπλέον μελέτη που μπορεί να πραγματοποιηθεί. Καθώς η συγκεκριμένη πρωτεΐνη έχει απομονωθεί από φύλλα βαμβακιού, σπανακιού καθώς και ελαιοκράμβης, αλλά όχι από φύλλα ελιάς, η απομόνωση και η ανάλυση της είναι ένας δελεαστικός στόχος.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Stryer L., Berg J.M., Tymoczko J.L., Βιοχημεία Τόμος Ι, *Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης*, **2005**.
- [2] Alberts, Bray, Johnson, Ralf, Roberts, Walter, Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας, *Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης*, **2000**
- [3] Simpson Richard, Proteins and Proteomics – a laboratory manual, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, **2003**
- [4] Hunte C., von Jagow G. And Schagger H., Membrane Protein Purification and crystallization – a practical guide, *Academic Press*, **2003**, second edition
- [5] Lieber C. Daniel, Introduction to Proteomics – Tools for the new Biology, *Humana Press*, **2002**
- [6] Salas J., Sanchez J., Hydroperoxide lyase from olive (*olea europaea*) fruits, *Plant science*, **1999**, 143, p. 19-26.
- [7] Vick B.A., Zimemerman D.C., Lipoxygenase and hydroperoxide lyase in watermelon seedlings, *Plant Physiology*, **1976**, 57, p. 780-788.
- [8] Matsui K., Toyota H., Kajiwara T., Kakuno T., Hatanaka A., Fatty acid hydroperoxide, cleaving enzyme, hydroperoxide lyase, from tea leaves, *Phytochemistry*, **1991**, 30, p. 2109-2113.
- [9] Psylinakis E., Davoras E.M., Ioannidis N., Trikeriotis M., Petrouleas V., Ghanotakis D.F., Isolation and spectroscopic characterization of a recombinant bell pepper hydroperoxide lyase, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2001**, 1533, p. 119-127.
- [10] Matsui K., Shibutani M., Hase T., Kajiwara T., Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B), *FEBS letters*, **1996**, 394, p. 21-24.
- [11] Hornostaj A.R., Robinson D.S., Purification of hydroperoxide lyase from cucumbers, *Food Chemistry*, **1999**, 66, p. 173-180.
- [12] Riley J.C.M., Willemot C., Thopson J.E., Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in ripening tomato fruit., *Postharvest Biology and Technology*, **1996**, 7, p. 97-107.
- [13] Fauconnier M., Perez A.G., Sanz C. and Marlier M., Purification and Characterization of Tomato Leaf (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Hydroperoxide Lyase, *J. Agric. Food Chem*, **1997**, 45, p. 4232-4236.

- [14] Akacha N.B., Gargouri M., Enzymatic synthesis of green notes with hydroperoxide lyase from olive leaves and alcohol dehydrogenase from yeast in liquid/gas reactor, *Process Biochemistry*, **2009**, p.
- [15] Nam W., Cytochrome P450, *Comprehensive Coordination Chemistry II*, **2004**, p.281-307.
- [16] Matsui K., Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism, *Current Opinion in Plant Biology*, **2006**, 9, p. 274-280
- [17] Grechkin A.N., Hamberg M., The “heterolytic hydroperoxide lyase” is an isomerase producing a short-lived fatty acid hemiacetal, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2004**, 1636, p. 47-58.
- [18] Grechkin A.N., Bruhlmann F., Mukhtarova L.S., Gogolev Y.V., Hamberg M., Hydroperoxide lyases (CYP74C and CYP74B) catalyze the hemolytic isomerization of fatty acid hydroperoxides into hemiacetals, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2006**, 1761, p. 1419-1428.
- [19]. Suurmeijer C. N.S.P, Perez-Gilabert M., van Unen D-J., van der Hijden H. T.W.M, Veldink G.A., Vliegthart J. F.G., Purification, stabilization and characterization of tomato fatty acid hydroperoxide lyase, *Phytochemistry*, **2000**, 53, p. 177-185
- [20] Lanciotti R., Gianotti A., Patrignani F., Belletti N., Guerzoni M.E., Gardini F., Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits, *Trends in Food Science & Technology*, **2003**, 15, p. 201-208.
- [21] Kubo A., Lunde S., Kubo I., Antimicrobial activity of the Olive oil flavor compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1995**, 43, p. 1629-1633
- [22] Kubo I., Fujita K., Kubo A., Nihei K., Lunde C.S., Modes of antifungal actions of (2E)-alkenals against *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51 (14), p. 3951-3957
- [23] Newberne P., Smith R.L., Doull J., Feron V.J., Goodman J.I., Murno I.C., Portoghese P.S., Wagner B.M., Weil C.S., Adams T.B., Halagga J.B., GRAS flavouring substances, *Food Technology*, **2000**, 54, p 66-83
- [24] Nakamura S., Hatanaka A., Green-leaf-derived C6-Aroma compounds with potent antibacterial action that act on both Gram-negative and Gram-positive bacteria, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, p 7639-7644

- [25] Skobeleva N.I., Bezzubov A.A., Petrova T.A., Bokuchava M.A., Aroma-forming substances in black tea, *Applied Biochemistry and Microbiology*, **1979**, 15, p. 682-687
- [26] Kubo I., Fujita K., Naturally occurring anti-Salmonella agents, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49, p. 5750-5754.
- [27] Dittberner U., Eisenbrand G., Zankl H., Genotoxic effects of the α,β -unsaturated aldehydes 2-trans butenal, 2-trans-hexenal and 2-trans, 6-cis-nonadienal, *Mutation Research*, **1995**, 335, p. 259-265
- [28] Poolman B., Driessen A.J., Konings W.N., Regulation of solute transport in streptococci by external and internal pH values, *Microbiological Reviews*, **1987**, 51, p 498-508
- [29] Eder E., Schuler D., An approach to cancer risk assessment of the food constituent 2-hexenal on the basis of 1,N²-propanodeoxyguanosine adducts of 2-hexenal in vivo, *Archives of Toxicology*, **2000**, 75, p. 642-648
- [30] Gardini F., Lanciotti R., Guerzoni M.E., Effects of (E)-2-hexenal on the growth of *Aspergillus flavus* in relation to its concentration, temperature and water activity, *Letters in Applied Microbiology*, **2001**, 33, p. 50-55
- [31] Guerzoni M.E., Lanciotti R., Sinigaglia M., Anese M., Lericci C.R., Influence of some selected ions on system water activity, and on ethanol vapour pressure and its inhibitory action on *Saccharomyces cerevisiae*, *Canadian Journal of Microbiology*, **1994**, 40, p. 1051-1056
- [32] Caccioni D.R.L., Gardini F., Lanciotti R., Guerzoni M.E., Antifungal activity of natural volatile compounds in relation to their vapour pressure, *Sciences des Aliments*, **1997**, 17, p. 21-34
- [33] Helandre I.M., von Wright A., Matilla-Sandholm T.M., Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria, *Trends in Food Science and Technology*, **1997**, 8, p. 146-150
- [34] Greenfield N.J., Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure, *Nature Protocols*, **2006**, 1 (6), p. 2876-2890
- [35] Greenfield N.J., Using circular dichroism collected as function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions, *Nature protocols*, **2006**, 1 (6), p. 2527-2535

- [36] Keiderling T.A., Protein and peptide secondary structure and conformational determination with vibrational circular dichroism, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2002**, 6, p. 682-688.
- [37] Mirna P.S-G., Kermasha S., Nicaud J-M., Belina J-M., Husson F., Predicted secondary structure of hydroperoxide lyase from green bell pepper cloned in the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Journal of Molecular catalysis B : Enzymatic*, **2010**, 65, p. 63-67.
- [38] Karas M, Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.*, **1988**, 60, p. 2299-301.
- [39] Tanaka K., Yutaka I., Satoshi A., Yoshikazu Y. and Tamio Y., Protein and Polymer Analyses up to m/z 100,000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry : Rcm*, **1988**, 2, p. 151-153.
- [40] Hufnagel P., Rabus R., Mass spectrometric identification of proteins in complex post-genomic projects, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **2006**, 11, p. 53-81.
- [41] Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J.V., Mann M., In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes, *Nature Protocols*, **2006**, 1 (6), p. 2856-2860.
- [42] Bradford M., .A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, **1975**, 72, p. 248-254.
- [43] Mosmann T., Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *Journal of Immunological Methods*, **1983**, 65, p. 55-63
- [44] Slater T.F., Sawyer B., Strauli U., Studies on succinate-tetrazolium reductase systems III. Points of coupling of four different tetrazolium salts, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1963**, 77, 383-393
- [45] Petty R.D., Sutherland L.S., Hunter E.M., Cree I.A., Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number, *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, **1995**, 10, p. 29-34.
- [46] Karyotou K., Donaldson R. P., Ascorbate peroxidase, a scavenger of hydrogen peroxide in glyoxysomal membranes, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2005**, 434, p. 248-257.

- [47] Wu W., Lu J., Wei Y., Wang J., Lin J., Cao S., Sun X., Tang K., Isolation and characterization of the first putative peroxidase from oilseed rape (*Brassica napus*) which is highly homologous to HRPC, *Biosciences Reports*, **2006**, 26, p. 263-280.
- [48] Ishikawa T., Takeda T., Shigeoka S., Purification and characterization of cytosolic ascorbate peroxidase from komatsuna (*Brassica rapa*), *Plant Science*, **1996**, 120, p. 11 – 18.

