



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**<<Μελέτη και αξιολόγηση μικροφυκών ως πηγή
προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας>>**



ΜΑΡΙΑΝΝΑ Γ. ΧΑΤΖΗΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Ν. ΛΑΜΠΡΟΥ

ΑΘΗΝΑ, 2017

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**<<Μελέτη και αξιολόγηση μικροφυκών ως πηγή
προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας>>**

ΜΑΡΙΑΝΝΑ Γ. ΧΑΤΖΗΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Ν. ΛΑΜΠΡΟΥ

ΑΘΗΝΑ, 2017

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

<<Μελέτη και αξιολόγηση μικροφυκών ως πηγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας>>

ΜΑΡΙΑΝΝΑ Γ. ΧΑΤΖΗΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων

Λάμπρου Νικόλαος

Καθηγητής Ενζυμικής Τεχνολογίας, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μέλη

Κλώνης Ιωάννης

Καθηγητής Ενζυμικής Τεχνολογίας, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Φλεμετάκης Εμμανουήλ

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας Φυτών και Μικροοργανισμών, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Λάμπρου Νικόλαος, Καθηγητής ΓΠΑ
- Κλώνης Ιωάννης, Καθηγητής ΓΠΑ
- Φλεμετάκης, Εμμανουήλ Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ
- Κίντζιος, Σπυρίδων Καθηγητής ΓΠΑ
- Βόντας Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ
- Μάδεσης Παναγιώτης, Ερευνητής Β', ΕΚΕΤΑ
- Τσιπλάκου Ελένη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη των ακατέργαστων υδατικών εκχυλισμάτων από μικροφύκη *Chlorella sp.*, *Nannochloropsis sp.*, *Tetraselmis sp.* και *Phaeodactylum sp.*. Μια τέτοια μελέτη στοχεύει στην ανάγκη εύρεσης νέων πράσινων πηγών, πλούσιων σε αντιοξειδωτικές ουσίες, ώστε να χρησιμοποιηθούν ως πρώτες ύλες στη βιομηχανία τροφίμων και καλλυντικών. Επιπρόσθετα, μελετήθηκαν ένζυμα GSTs από το γένος *Chlamydomonas* με στόχο την απόκτηση περαιτέρω γνώσεων που σχετίζονται με GSTs από θαλάσσιους οργανισμούς.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε σάρωση οκτώ διαφορετικών στελεχών από μικροφύκη *Chlorella sp.*. Συγκεκριμένα η μελέτη αφορούσε στην αξιολόγηση των ακατέργαστων εκχυλισμάτων ως προς την αντιοξειδωτική ιδιότητα και στη μελέτη της ανασταλτικής ικανότητας ως προς ένζυμα με ιδιαίτερο ενδιαφέρον και άμεση εφαρμογή στον τομέα της κοσμετολογίας. Τα αποτελέσματα της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (μέσω των μη ενζυματικών μεθόδων Frap, ABTS και DPPH) έδειξαν διαφορετικό προφίλ μεταξύ των στελεχών γεγονός που υποδηλώνει μια σημαντική χημική πολυμορφία των αντιοξειδωτικών στα είδη *Chlorella*. Οι διαφοροποιήσεις στην αντιοξειδωτική ικανότητα μεταξύ των στελεχών ίσως να σχετίζεται στη διαφορετική ικανότητα προσαρμογής στις διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης. Υψηλότερη ανασταλτική ισχύ έναντι των ενζύμων τυροσινάση και ελαστάση παρουσίασε το ακατέργαστο εκχύλισμα της *Chlorella minutissima*, με τιμές IC_{50} $23,3 \pm 2,5$ και $29,2 \pm 2,7$ μg αντίστοιχα. Επίσης, το συγκεκριμένο στέλεχος μελετήθηκε υπό διαφορετικές συνθήκες φωτισμού (διαφορετικό μήκος κύματος ακτινοβολίας) και υπό διαφορετική ένταση φωτός (υψηλή, μέτρια και χαμηλή). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δείχνουν ότι τα είδη *Chlorella* εμφανίζουν πολλές ιδιότητες και αποτελούν μια πλούσια πηγή σε αντιοξειδωτικές και αντι-γηραντικές ουσίες, γεγονός που καθιστά τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα αρκετά υποσχόμενα για χρήση ως πρώτη ύλη στη βιομηχανία καλλυντικών.

Στη συνέχεια ακολουθεί η μελέτη σάρωσης τριών διαφορετικών ειδών μικροφυκών: *Nannochloropsis sp.*, *Tetraselmis sp.* και *Phaeodactylum sp.*, τα οποία αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες καταπόνησης (σε συνθήκες φυσιολογικές, υψηλής θερμοκρασίας, υψηλής αλατότητας 5% (w/v) και έλλειψης αζώτου). Τα ακατέργαστα εκχυλίσματα αξιολογήθηκαν ως προς επιλεγμένες ενζυμικές δραστηριότητες (ένζυμα εξαρτώμενα της γλουταθειόνης, περοξειδάσες και σουπεροξειδικές δισμουτάσες) με ιδιαίτερο ενδιαφέρον στο χώρο της βιομηχανίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ακατέργαστα εκχυλίσματα των *Nannochloropsis sp.*, *Tetraselmis sp.* και *Phaeodactylum sp.* εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία στα προσδιοριζόμενα ένζυμα. Η

διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών καταπόνησης πιθανόν να οφείλεται στη διαφορετική προσαρμοστικότητα του εκάστοτε είδους σε αυτές αλλά και στη διαφορετική βιοχημική τους σύσταση.

Με στόχο την κατανόηση του ρόλου των GSTs στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς αλλά και την εύρεση στοιχείων για την ανάπτυξη νέων βιοτεχνολογικών εφαρμογών, ακολούθησε η μελέτη του γονιδιώματος *Chlamidomonas reinhardtii*. Τα αποτελέσματα φανέρωσαν την παρουσία 15 GST-like ενζύμων (*CrGSTs*) τα οποία αναλύθηκαν φυλογενετικά. Τα ισοένζυμα *CrGST10* και *CrGST7*, που φαίνεται να ανήκουν στη *Sigma* τάξη, κλωνοποιήθηκαν, εκφράστηκαν σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli* και προσδιορίστηκε η εκλεκτικότητά τους έναντι ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων. Ακολούθησε μελέτη της δομής και της κινητικής συμπεριφοράς με μοριακή μοντελοποίηση και κατευθυνόμενη μεταλλαξογέννεση. Συγκεκριμένα, επιβεβαιώθηκε ο καταλυτικός ρόλος του αμινοξέος Tyr7 ενώ διερευνήθηκε ο ρόλος του αμινοξέος Trp99 στον προσδιορισμό εξειδίκευσης ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων, στην επίδραση του pH και στη θερμοσταθερότητα.

Η διατριβή ολοκληρώθηκε με την απομόνωση του ενζύμου *CrGST8* από cDNA βιβλιοθήκη *Chlamidomonas*, το οποίο φαίνεται να ανήκει στην τάξη *Theta*. Η υπερέκφραση του ενζύμου *CrGST8* οδήγησε σε ενδοκυτταρική συσσώρευση μερικών αναδιπλωμένων πρωτεϊνών (έγκλειστα σωματίδια). Ακολούθησαν δοκιμές βελτιστοποίησης των συνθηκών έκφρασης με χρήση διαφορετικής συγκέντρωσης IPTG και θερμοκρασίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι συγκεκριμένοι παράγοντες δεν επηρεάζουν στη δημιουργία των συσσωματωμάτων. Στη συνέχεια έγινε χρήση χαοτροπικών ουσιών όπως η ουρία και το χλωρίδιο του γουανιδίου. Με σκοπό τον έλεγχο της επίδρασης μιας ηπιότερης μεθόδου αναδίπλωσης, έγινε δοκιμή διαλυτοποίησης του ενζύμου με χρήση προπανόλης. Θετικά αποτελέσματα παρουσίασαν μόνο οι χαοτροπικές ουσίες και κυρίως η ουρία. Έπειτα πραγματοποιήθηκε μελέτη της εκλεκτικότητας του ενζύμου έναντι διαφορετικών υποστρωμάτων. Το ένζυμο *CrGST8* φαίνεται να εμφανίζει ιδιαίτερη προτίμηση, με φθίνουσα σειρά, για τα υποστρώματα π-νιτροβενζυλ-χλωρίδιο (PNBC) και 2,2-διθειοδιαιθανόλη (HED), 4-χλωρο-7-νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο (NBD-Cl) και 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB). Η επίδραση του pH στην ενζυμική δραστηριότητα του *CrGST8* έδειξε ότι εμφανίζει προτίμηση στην όξινη περιοχή των pH με μέγιστη τιμή στο pH 5,6, ενώ σε pH 7 η ενζυμική δραστηριότητα έχει σχεδόν μηδενιστεί.

Συνοψίζοντας, τα μικροφύκη έχουν κεντρίσει την προσοχή του βιομηχανικού τομέα, με την εφαρμογή τους να απαντάται σε ποικιλία προϊόντων όπως σε τρόφιμα, φάρμακα και καλλυντικά. Η χρήση αντιοξειδωτικών από φυσικές και πράσινες πηγές όπως τα μικροφύκη αντιπροσωπεύει

έναν τομέα που κερδίζει μεγάλο ενδιαφέρον στη διάρκεια του χρόνου με ευρύ φάσμα βιοτεχνολογικών εφαρμογών. Τα ευρήματά μας υπογραμμίζουν ότι τα εκχυλίσματα των ειδών *Chlorella* και κυρίως του στελέχους *Chlorella minutissima*, αντιπροσωπεύουν πολλά υποσχόμενα βιοδραστικά συστατικά με δυνατότητα χρήσης τους ως πρώτες ύλες. Επιπρόσθετα, τα ακατέργαστα υδατικά εκχυλίσματα των *Phaeodactylum sp.*, *Tetraselmis sp.* και *Nannochloropsis sp.* παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ως προς το αντιοξειδωτικό δυναμικό εκφράζοντας μεγάλη χημική ποικιλομορφία αντιοξειδωτικών ουσιών, ενώ οι διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης φαίνεται να επηρεάζουν την έκφραση ενζύμων και αντιοξειδωτικών ουσιών υψηλής προστιθέμενης αξίας. Τέλος, ο χαρακτηρισμός των ενζύμων CrGST10, CrGST7 και CrGST8 από το στέλεχος *Chlamydomonas reinhardtii* και η φυλογενετική ανάλυση έδωσαν πληροφορίες σχετικά με την εξέλιξη της οικογένειας των GSTs και το μηχανισμό δέσμευσης του υποστρώματος και εξειδίκευσης.

Study and Evaluation of microalgae as a source of high value added products

CHATZIKONSTANTINOY MARIANNA

ABSTRACT

Microalgae are an extremely heterogeneous group of organisms. This genetic diversity makes microalgae, a rich source of a vast array of biomolecules with applications in the feed, food, nutritional, cosmetic, pharmaceutical and even fuel industries. The purpose of the present study was the evaluation of selected *Chlorella*, *Nannochloropsis*, *Tetraselmis* and *Phaeodactylum* strains as a source of high value added products.

In the first part of the work, aqueous extracts from eight *Chlorella* strains were evaluated towards selected cosmeceutical properties such as enzymatic and non-enzymatic antioxidant capacity, glutathione content and inhibition potency towards skin regulatory enzymes (tyrosinase and elastase). The results showed that the *Chlorella* strains display wide catalytic diversity with different strains exhibiting quite varied antioxidant enzymatic activities. Enzymatic antioxidant capacity of glutathione reductase, peroxidase, and superoxide dismutase were found in all strains, whereas only *Chlorella minutissima* crude extract displays glutathione transferase activity. Total antioxidant capacity (TAC) measurements, determined by a series of non-enzymatic assays (FRAP, ABTS, DPPH), showed significant variabilities among strains suggesting a large chemical diversity of antioxidants in *Chlorella* species. Finally, *Chlorella minutissima* extract showed high inhibitory activity with IC_{50} 23.3 ± 2.5 and 29.2 ± 2.7 μ g towards tyrosinase and elastase, respectively. These results suggest a potential activity of *Chlorella minutissima* crude extract in controlling skin aging, inflammatory process, and pigmentation.

The second part of the work provides the characterization of the chemical and enzymatic content of three species *Nannochloropsis*, *Phaeodactylum* and *Tetraselmis*, grown under different conditions (high temperature, 5 ‰ salinity and low levels of nitrogen). The results showed that the different culture conditions affect the expression of antioxidant enzymes, proteases and lipases. In addition, the levels of selected metabolites and antioxidant compounds are influenced by the grown conditions. Taken together, these results demonstrate that the engineering of culture conditions of *Nannochloropsis*, *Phaeodactylum* and *Tetraselmis* may provide an efficient approach for metabolic engineering and the production of high added value biomolecules.

Understanding the genetic and molecular basis of the detoxifying mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii* is an important goal towards the development of bioremediation tools for contaminated environments. Glutathione transferases (GSTs, EC 2.5.1.18) are phase II metabolic enzymes that play an important role in the detoxification of xenobiotic compounds. GSTs have been characterized

extensively in land plants and animals but no evidence has yet been reported for their presence in *C. reinhardtii*. A genome survey of *C. reinhardtii* revealed the presence of fifteen GST-like isoenzymes (*CrGSTs*). Comparison by multiple sequence alignment generated a dendrogram, revealing the phylogenetic relationships of *CrGSTs* with other well-characterized GST classes. Notably, we identified sequences that are most closely related to the sigma class enzymes which so far have only been found in animals. Two sigma class related isoenzymes (*CrGST10* and *CrGST7*) were cloned, expressed in *E. coli* and their substrate specificity and kinetic properties were determined towards a range of different xenobiotic substrates. The structural and kinetic features of the enzymes were studied by molecular modelling and site-directed mutagenesis. The catalytic role of active-site residue Tyr7 and the roles of Trp99 in determining substrate specificity and thermostability were investigated. Analysis of GSTs in green algae provides an opportunity to shine light on the roles of GSTs in cellular detoxification mechanism as well as to develop new biotechnological and environmental applications.

In the next part, the functional and catalytic properties of the isoenzyme *CrGST8* was investigated. *CrGST8* belong to the Theta class of GSTs and noticeable lacks the C-terminal helix. *CrGST8* was cloned and expressed in *E. coli*. SDS/PAGE analysis of crude lysates and cell debris showed that the enzyme is overexpression in the form of inclusion bodies. The effect of temperature and IPTG concentration on *CrGST8* expression was evaluated. Different chaotropic agents (urea and/or guanidium chloride) and buffer conditions were assessed towards solubilisation and refolding of *CrGST8*. The results showed that high concentration of urea and Tris buffer containing arginine and GSH provides the appropriate condition for solubilization and refolding of the enzyme. The enzyme was characterized by kinetic analysis, pH evaluation and heat inactivation. These results provide new information into GST diversity and give further insights into the complex regulation and enzymatic functions of this gene super-family.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Μέρος της διδακτορικής διατριβής έχει δημοσιευτεί ως εξής σε επιστημονικά περιοδικά και κεφάλαια σε βιβλία:

M. Chatzikonstantinou, D. Vlachakis, L. Papageorgiou, A.C. Papageorgiou and N.E. Labrou (2017) The Glutathione Transferase Family of *Chlamydomonas reinhardtii*: identification and characterization of novel sigma class-like enzymes. *Algal Research* (revised version submitted).

M. Chatzikonstantinou, A. Kalliampakou, M. Gatzogia, E. Flemetakis, P. Katharios and N.E. Labrou (2017) Comparative analyses and evaluation of the cosmeceutical potential of selected *Chlorella* strains. *J. Applied Phycology*, 1-10.

E. Chronopoulou, K. Kontouri, **M. Chantzikonstantinou**, F. Pouliou, F. Perperopoulou, G. Voulgari, E. Bosmali, I. Axarli, I. Nianiou-Obeidat, P. Madesis, A. Tsaftaris, and N. E. Labrou (2015). Plant glutathione transferases: structure, antioxidant catalytic function and in planta protective role in biotic and abiotic stress, *Current Chemical Biology*, 8, 58-75.

E. Chronopoulou, **M. Chatzikonstantinou**, P. Madesis, I. Nianiou-Obeidat and N.E. Labrou (2013). Structure, function and catalytic properties of human glutathione transferase P1-1. In: Glutathione, structure, function and biotechnological implications (N.E. Labrou & E. Flemetakis, Eds), Nova Publishers, USA, Chapter 9, 187-198.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

F. Perperopoulou, Pouliou, M. **Chantzikonstantinou**, I. Nianiou-Obeidat, P. Madesis, A. Papageorgiou, Y. D. Clonis, N.E. Labrou (2015). Evaluation of catalytic efficiency and substrate promiscuity in glutathione transferases from photosynthetic organisms for bioremediation. 6th European Bioremediation Conference, 30-2 July, 2015, Chania, Greece.

Chatzikonstantinou M. and Labrou N.E. (2012) Algae Enzymes and Proteins in Cosmetics Industry. 63rd Congress of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology. 9-11 November, Heraklion, Crete.

K. Gakos, M. **Chatzikonstantinou** and N. Labrou (2013) Development of Aqueous Two-Phase Partitioning Systems for the Separation of Enzymes and Proteins from Unclarified Algae Extracts. 7th EPSO Conference, 1-4 September 2013, Porto Heli, Greece.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας, του Τμήματος Βιοτεχνολογίας, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Λάμπρου Νικόλαο.

Καθώς η διδακτορική διατριβή αποτέλεσε μια μακροχρόνια και επίπονη διαδικασία, θα ήθελα να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους-αρωγούς σε αυτήν την προσπάθεια.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Λάμπρου Νικόλαο για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε για την άριστη καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές αλλά κυρίως για τη συμπαράσταση που επέδειξε σε πολύ δύσκολες στιγμές της ζωής μου. Πάντα πρόθυμος να ακούσει τους προβληματισμούς και τις απογοητεύσεις μου, να προτείνει τις καλύτερες ανα περίπτωση λύσεις και να μου μεταφέρει τη θετική του ενέργεια και αισιοδοξία. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια, την κατανόηση του για όλες τις απεισκευσίες μου αλλά και για τις ευκαιρίες που μου πρόσφερε ανοίγοντας το δρόμο για την αγορά εργασίας. Επίσης, τον ευχαριστώ θερμά για τις ουσιαστικές διορθώσεις κατά τη συγγραφή της παρούσας μελέτης.

Ο Καθηγητής Κλώνης Ιωάννης, μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής, βοήθησε σημαντικά με τις συμβουλές και τις πολύτιμες παρατηρήσεις του. Τον ευχαριστώ γιατί υπήρξε πάντα πρόθυμος να με συμβουλέψει.

Ο Επίκ. Καθηγητής Φλεμετάκης Μανώλης, μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής, μου έδωσε σημαντική βοήθεια όταν τη χρειάστηκα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπλ. Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής του Γ.Π.Α, Δρ. Ελένη Τσιπλάκου, για την άριστη συνεργασία.

Θέλω επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και στα άλλα μέλη της Επταμελούς Επιτροπής για την πρόθυμη συμμετοχή τους στην εξέταση μου και τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσαν για την ανάγνωση της διατριβής μου.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τη φίλη και συνάδελφο Δρ. Χρονοπούλου Ευαγγελία για την πολύτιμη βοήθεια της όλα αυτά τα χρόνια, τη συμπαράσταση και το φιλικό περιβάλλον συνεργασίας. Υπήρξε δίπλα μου και ήταν πάντα πρόθυμη για επιστημονικές και όχι μόνο συζητήσεις. Επίσης την ευχαριστώ για τη βοήθεια της στη συγγραφή αλλά και την παρουσίαση αυτής της διατριβής, αφιερώνοντας όσο χρόνο χρειαζόταν και όποτε της το ζητούσα.

Θα ήταν παράλειψη μου να μην εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Ευαγγελία Παπά, ΕΤΕΠ του Εργαστηρίου, που μαζί με την Δρ. Χρονοπούλου Ευαγγελία, μου υπέδειξαν τις πρώτες βασικές τεχνικές με ιδιαίτερη υπομονή. Επίσης, την ευχαριστώ για τις ώρες που αφιέρωσε στο να με μυήσει στον όμορφο κόσμο της δημιουργίας καλλυντικών προϊόντων.

Θέλω να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους τους προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές που γνώρισα στο Εργ. Ενζυμικής Τεχνολογίας. Η συναναστροφή μαζί τους με οδήγησε στο να συνειδητοποιήσω πόσο σημαντικό είναι η ύπαρξη της συνεργασίας, της ομαδικότητας αλλά και της φιλίας.

Θερμά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον πατέρα μου, ο οποίος δυστυχώς δεν πρόλαβε να συμμεριστεί τη χαρά και τη συγκίνηση που αισθάνομαι αυτή τη στιγμή. Τον ευχαριστώ για τη συμπαράσταση και υποστήριξη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια, και κυρίως για όλα τα "ναι" που θα έπρεπε να ήταν "όχι".

Το άτομο όμως που θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως είναι ο αδερφός μου, Πρόδρομος. Τον ευχαριστώ για την ενθάρρυνση, την υπομονή, τη βοήθεια και την αισιοδοξία του από την αρχή των φοιτητικών μου χρόνων. Ήταν πάντα εκεί όταν τον χρειαζόμουν, με άκουγε σιωπηλά χωρίς να με κρίνει και με συμβούλευε με αγάπη τόσο σε προσωπικό όσο και σε επαγγελματικό επίπεδο.

Μαριάννα Χατζηκωνσταντίνου

Αθήνα, Μάρτιος 2017

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ΑΙΤC	Ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας
APx	Ασκορβική υπεροξειδάση
BDNB	1-βρωμο-2,4-δινιτροβενζόλιο
BSA	Αλβουμίνη από ορό μόσχου
CDNB	1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο
CuOOH	Υδροϋπεροξειδίο του κουμενίου
EDTA	Αιθυλενοδιαμινο-τετραοξικό οξύ
FDNB	1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο
GPx	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
GRd	Αναγωγή της γλουταθειόνης
GR	Ρεδοκτάση της γλουταθειόνης
GSH	Γλουταθειόνη
GSTs	Μεταφοράς της γλουταθειόνης
HED	2-2-διθειο-διαιθανόλη
HNE	4-υδρόξυ-trans2-ενενάλη
IC₅₀	Συγκέντρωση αναστολέα που προκαλεί 50% αναστολή
IDNB	1-ιωδο-2,4-δινιτροβενζόλιο
IPTG	Ισοπρόπυλ-β-D-θειογαλακτο-πυρανοζίδιο
K_m	Σταθερά Michaelis-Menten
NADP⁺	Φωσφορικό νικοτιναμίδο-αδενο-δινουκλεοτίδιο
NADPH	Φωσφορικό νικοτιναμίδο-αδενο-δινουκλεοτίδιο (ανηγμένο)
NBD-Cl	4-χλωρο-7-νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο
PAGE	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης
PEITC	Ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλ-εστέρας
PNBC	π-νιτροβενζυλ-χλωρίδιο
ROS	Ενεργές μορφές οξυγόνου
SDS	Δωδεκανοθειϊκό νάτριο
TCA	Τριχλωροακετικό οξύ
TEMED	N,N,N',N'-τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη
tert-BuOOH	τ-βουτυλο-υδροϋπεροξειδίο
U(unit)	Ενζυμική μονάδα
V_{max}	Μέγιστη ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ	2
1.1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	2
1.1.2. ΠΡΑΣΙΝΑ ΦΥΚΗ	2
1.1.3. ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ.....	3
1.1.4. ΔΙΑΤΟΜΑ.....	4
1.1.5. ΧΡΥΣΟΦΥΚΗ.....	5
1.1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΕΙΔΩΝ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ.....	6
1.1.6.1. <i>Clorella sp.</i>	6
1.1.6.2. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	7
1.1.6.3. <i>Tetraselmis sp.</i>	9
1.1.6.4. <i>Nannochloropsis sp.</i>	10
1.1.6.5. <i>Phaeodactylum sp.</i>	11
1.1.7. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ.....	12
1.1.8. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ	13
1.1.8.1. ΦΩΣ.....	14
1.1.8.2. ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	16
1.1.8.3. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ.....	16
1.1.8.4. ΑΝΑΔΕΥΣΗ.....	18
1.1.9. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	18
1.1.9.1. ΑΝΟΙΧΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	19
1.1.9.2. ΚΛΕΙΣΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	20
1.1.9.3. ΣΩΛΗΝΟΕΙΔΕΙΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ.....	21
1.1.9.4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ ΜΕ ΕΠΙΠΕΔΕΣ ΠΛΑΚΕΣ.....	22
1.1.10. ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΠΡΟΣΤΙΘΕΜΕΝΗΣ ΑΞΙΑΣ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ.....	23
1.1.11. ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ	23
1.1.11.1. ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΗ	25
1.1.11.1.1. ΕΜΠΟΡΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΩΝ	25
1.1.11.2. ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ	25
1.1.11.3. ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ	26
1.1.11.4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΛΙΠΑΣΜΑΤΑ	26
1.1.11.5. ΒΙΟ-ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ.....	27
1.2. ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΕΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GSTs)	29
1.2.1. ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ (GLUTATHIONE, GSH)	29

1.2.2.	ΡΟΛΟΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ	31
1.2.3.	ΜΕΤΑΦΟΡΑΣΕΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΙΟΝΗΣ (GSTs).....	32
1.2.4.	ΦΥΛΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ GSTs.....	33
1.2.4.1.	ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΕΣ GSTs	36
1.2.4.2.	ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ GSTs.....	37
1.2.4.3.	ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΕΣ-ΜΙΚΡΟΣΩΜΙΚΕΣ GSTs.....	37
1.2.5.	ΔΟΜΗ GSTs.....	39
1.2.6.	ΡΟΛΟΙ ΚΑΙ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ GSTs.....	41
1.2.6.1.	ΝΟΥΚΛΕΟΦΙΛΗ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ	41
1.2.6.2.	ΔΡΑΣΗ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ GPx	42
1.2.6.3.	ΔΡΑΣΗ ΙΣΟΜΕΡΑΣΗΣ	43
1.2.6.4.	ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΑΝΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΘΕΙΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ	43
1.2.6.5.	ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΥΛΙΩΣΗ.....	43
1.2.6.6.	ΛΟΙΠΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....	44
1.2.7.	GSTs ΑΠΟ ΘΑΛΑΣΣΙΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ	44
1.2.8.	ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ GSTS	45
1.2.8.1.	ΓΕΩΠΟΝΙΑ	45
1.2.8.2.	ΙΑΤΡΙΚΗ.....	46
1.2.8.3.	ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	47
1.3.	ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ	48
1.3.1.	ΜΕΘΟΔΟΣ ΛΟΓΙΚΟΥ ΕΝΖΥΜΙΚΟΥ ΑΝΑΣΧΕΛΙΑΣΜΟΥ	48
1.3.2.	ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ	50
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	52
2.1.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ	53
2.1.1.	ΥΛΙΚΑ.....	53
2.1.1.1.	ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	53
2.1.1.2.	ΕΝΖΥΜΑ	54
2.1.1.3.	ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ, KITS ΚΑΙ ΛΟΙΠΑ	54
2.1.2.	ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	55
2.1.2.1.	ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	55
2.1.2.2.	ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA	56
2.1.2.3.	ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	56
2.1.2.4.	ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΕΤΟΥΣΙΩΣΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ SDS	57
2.1.3.	ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	59
2.2.1.	ΜΕΘΟΔΟΙ	59

2.2.1.1.	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (COMPETENT CELLS) DH5a, TURBO, HI-Control™, BL21 (DE3) ΚΑΙ HI-Control BL21(DE3) ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ <i>E. coli</i>	59
2.2.1.2.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΑΛΚΑΛΙΚΗΣ ΛΥΣΗΣ	60
2.2.1.3.	ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	61
2.2.1.4.	ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΟΞΥΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (DNA) ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	61
2.2.1.5.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	62
2.2.1.6.	ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	62
2.2.1.7.	ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΝΕΣΗΣ.....	64
2.2.1.8.	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΒΑΣΕΩΝ DNA ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ..	65
2.2.1.9.	ΕΝΩΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ pEXP5-CT/ΤΟΡΟ ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>E.coli</i> TURBO.....	65
2.2.1.10.	ΕΝΩΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ pETite.	67
2.2.1.11.	ΕΤΕΡΟΛΟΓΟΣ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ GST ΣΕ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>E. coli</i> .	70
2.2.1.12.	ΛΥΣΙΜΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	71
2.2.1.13.	ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ 1,4-ΒΟΥΤΑΝΕΔΙΥΛ-ΔΙΓΛΥΚΙΔΥΛ-ΑΙΘΕΡΑ-GSH-SEPHAROSE-CL6B (BES-GSH).....	71
2.2.1.14.	ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ GSTs ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΣΕ ΣΤΗΛΗ ΜΕ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ BES-GSH ΚΑΙ S-HEXYL ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ	72
2.2.1.15.	ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ ΙΟΝΤΩΝ ΣΕ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ DEAE-SEPHAROSE.....	73
2.2.1.16.	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD (1976).....	75
2.2.1.17.	ΔΙΑΠΙΔΥΣΗ	76
2.2.1.18.	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΕΤΟΥΣΙΩΣΗΣ	77
2.2.1.19.	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΕΤΟΥΣΙΩΣΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΔΩΔΕΚΑΝΟΘΕΠΙΚΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ (SDS).....	78
2.2.1.20.	ΧΡΩΣΗ ΜΕ COOMASSIE BRILLIANT BLUE R-250	79
2.2.1.21.	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ GST ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΝΙΤΡΟΒΕΝΖΟΛΙΟΥ: CDNB, BDNB, IDNB, FDNB, PNBC και NBD-Cl	80
2.2.1.22.	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ GST ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ CuOOH, tBuOOH ΚΑΙ ΒΕΝΖΟΪΚΟ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ	82

2.2.1.23.	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ GST ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 2-2-ΔΙΘΕΙΟΔΙΑΙΘΑΝΟΛΗ (HED)	83
2.2.1.24.	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ GST ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΔΙΪΔΡΟΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ (DHA).....	84
2.2.1.25.	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ GST ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΕΘΑΚΡΙΝΙΚΟ ΟΞΥ (EA).....	85
2.2.1.26.	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ GST ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ trans-4-ΦΑΙΝΥΛΒΟΥΤ-3-ΕΝ-2ΟΝΗ (PBO).....	86
2.2.1.27.	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ GST ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ FLUORODIFEN.....	87
2.2.1.28.	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ GST ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΒΡΩΜΟΣΟΥΛΦΟΦΘΑΛΕΪΝΗ (BSP).....	88
2.2.1.29.	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ GST ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ trans-2-ΕΝΕΝΑΛΗ (HNE).....	88
2.2.1.30.	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ GST ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΙΣΘΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΟΣ ΦΑΙΝΥΛΑΙΘΥΛ-ΕΣΤΕΡΑΣ (ΡΕΙΤC) ΚΑΙ ΙΣΘΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΟΣ ΑΛΛΥΛ-ΕΣΤΕΡΑΣ (ΑΙΤC)	89
2.2.1.31.	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 2,2-ΑΖΙΝΟ-ΔΙΣ-3-ΕΘΥΛΒΕΝΖΟΘΙΑΖΟΛΙΝΗ-6-ΣΟΥΛΦΟΝΙΚΟ ΟΞΥ (ΑΒΤS) .	90
2.2.1.32.	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΚΑΙ ΡΕΔΟΥΚΤΑΣΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ (H ₂ O ₂) ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ (GSSG)	92
2.2.1.33.	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΚΗΣ ΔΙΣΜΟΥΤΑΣΗΣ (SOD) ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΤΗΣ ΞΑΝΘΙΝΗΣ ΚΑΙ ΑΥΤΟ-ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΠΥΡΟΓΑΛΟΛΗΣ.....	93
2.2.1.34.	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΑΝΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΣΙΔΗΡΟΥ (FERRIC REDUCTING ANTIOXIDANT POWER / FRAP).....	95
2.2.1.35.	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕΣΩ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΡΙΖΑΣ 1,1-ΔΙΦΑΙΝΥΛΟ-2-ΠΙΚΡΥΛΟΥΔΡΑΖΥΛΙΟ (DPPH)	97
2.2.1.36.	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΑΒΤS.	99
2.2.1.37.	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΟΛΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ.....	101
2.2.1.38.	ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ FOLIN-CIOCALTEAU.....	103
2.2.1.39.	ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΜΟΝΟΜΕΡΩΝ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΗΣ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΦΡΑΦΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ	104
2.2.1.40.	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΘΡΥΨΙΝΗΣ.....	106

2.2.1.41.	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΧΥΜΟΘΡΥΨΙΝΗΣ	107
2.2.1.42.	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ π-ΝΙΤΡΟΦΑΙΝΥΛ-ΛΑΥΡΙΚΟΥ	108
2.2.1.43.	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ α-ΑΜΥΛΑΣΗΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΑΜΥΛΟΥ	110
2.2.1.44.	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ α-ΓΛΥΚΟΣΙΔΑΣΗΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ π-ΝΙΤΡΟΦΑΙΝΥΛ α-D-ΓΛΥΚΟΠΡΑΝΟΣΙΔΙΟ	113
2.2.1.45.	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗ	114
2.2.1.46.	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΕΛΑΣΤΑΣΗ	116
2.2.1.47.	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΑΚΕΤΥΛΟ-ΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗ	117
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Αξιολόγηση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων ειδών <i>Chlorella</i>.....		119
3.1.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	120
3.2.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	121
3.3.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	123
3.3.1.	ΥΛΙΚΑ.....	123
3.3.2.	ΜΕΘΟΔΟΙ.....	123
3.3.2.1.	ΜΕΛΕΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΚΑΤΕΡΓΑΣΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΕΙΔΩΝ <i>Chlorella</i> ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΤΟΥΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ.....	127
3.3.2.2.	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΩΤΟΣ ΣΤΗΝ ΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΙΔΩΝ <i>Chlorella</i>	128
3.3.2.3.	ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ.....	128
3.3.2.4.	ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	128
3.4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	129
3.4.1.	ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ.....	129
3.4.2.	ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ, ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΥΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ ΤΟΥ <i>Chlorella minutissima</i> ΓΙΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	133
3.4.3.	ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΙΔΩΝ <i>Chlorella</i>	135
3.4.4.	ΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΙΔΩΝ <i>Chlorella</i>	136
3.4.5.	ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΕΝΖΥΜΩΝ ΕΛΑΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗΣ	140
3.4.6.	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΩΤΟΣ ΣΤΗΝ ΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΙΔΩΝ <i>Chlorella</i>	141
3.5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	144

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Αξιολόγηση ενζύμων και μεταβολιτών στα <i>Nannochloropsis sp.</i>, <i>Tetraselmis sp.</i> και <i>Phaeodactylum sp.</i> που αναπτύχθηκαν κάτω από συνθήκες καταπόνησης	149
4.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	150
4.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	151
4.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	154
4.3.1 ΥΛΙΚΑ.....	154
4.3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	154
4.3.2.1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΦΥΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ.....	154
4.3.2.2. ΜΕΛΕΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΚΑΤΕΡΓΑΣΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΡΟΤΕΩΛΥΤΙΚΗ ΤΟΥΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ.....	154
4.3.2.3. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ.....	155
4.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	156
4.2.3. ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ <i>Phaeodactylum sp.</i> , <i>Tetraselmis sp.</i> , <i>Nannochloropsis sp.</i> ...	156
4.2.4. ΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ <i>Phaeodactylum sp.</i> , <i>Tetraselmis sp.</i> και <i>Nannochloropsis sp.</i>	162
4.3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	168
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Η οικογένεια GST από το στέλεχος <i>Chlamidomonas reinhardtii</i>: Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός νέων ενζύμων που ανήκουν στη <i>Sigma</i> τάξη.....	173
5.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	174
5.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	175
5.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	176
5.3.1. ΥΛΙΚΑ.....	176
5.3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ	176
5.3.2.1. ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ <i>CrGST10</i> ΣΤΟΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ <i>PEXP-5-CT/TA TOPO</i> [®]	176
5.3.2.2. ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΝΕΣΗ ΚΟΡΕΣΜΟΥ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ <i>CrGST10</i>	178
5.3.2.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ GSTs	180
5.3.2.4. ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ <i>CrGST7-7</i> , <i>CrGST10-10</i> , ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	180
5.3.2.5. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΕΝΖΥΜΩΝ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΕΝΝΕΙΑΣ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ BES-GSH ΚΑΙ S-HEXYL GSH.....	181
5.3.2.6. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΕΝΖΥΜΩΝ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ ΙΟΝΤΩΝ ΣΕ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ DEAE-SEP HAROSE	181
5.3.2.7. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ GSTs ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΟΦΙΛΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ.....	181

5.3.2.8.	ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ENZYMΩΝ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ	182
5.3.2.9.	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH ΣΤΗΝ ENZYMΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ	183
5.3.2.10.	ΘΕΡΜΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ.....	184
5.3.2.11.	ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ	184
5.4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	187
5.4.1.	ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ENZYMΩΝ <i>CrGTS10</i> ΚΑΙ <i>CrGST7</i>	187
5.4.2.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΤΑ ENZYMA <i>CrGST10</i> ΚΑΙ <i>CrGST7</i> ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΟ ΦΟΡΕΑ PEXP-5 CT/ΤΟΡΟ® ΚΑΙ pETit ANTIΣΤΟΙΧΑ ¹⁹¹	
5.4.3.	ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ENZYMΩΝ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ <i>CrGST10</i> και <i>CrGST7</i>	193
5.4.4.	ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ENZYMΩΝ <i>CrGST10</i> ΚΑΙ <i>CrGST7</i> ΩΣ ΠΡΟΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ GSTs.....	196
5.4.5.	ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ <i>CrGST10</i> ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ CDNB, PEITC ΚΑΙ ΑΙΤC	200
5.4.6.	ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ <i>CrGST7</i> ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ CDNB, NBD-Cl, CuOOH ΚΑΙ PEITC.....	203
5.4.7.	Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ENZYMΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ENZYMΩΝ <i>CrGST10</i> ΚΑΙ <i>CrGST7</i>	205
5.4.8.	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH ΣΤΗΝ ENZYMΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ	207
5.4.9.	ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ENZYMΩΝ <i>CrGST10</i> ΚΑΙ <i>CrGST7</i> ΜΕ ΟΜΟΛΟΓΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΣΗ	208
5.4.10.	ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ	213
5.4.11.	Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗ ΔΟΜΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ	217
5.5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	218
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Η οικογένεια GST από το στέλεχος <i>Chlamidomonas reinhardtii</i>: Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός νέου ενζύμου που ανήκει στη <i>Theta</i> τάξη.....		
6.1.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	225
6.2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	231
6.2.1.	ΥΛΙΚΑ.....	231
6.2.2.	ΜΕΘΟΔΟΙ	231
6.2.2.1.	ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ENZYMOY <i>CrGST8</i> ΣΤΟΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ T7 pETite®	231
6.2.2.2.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ GSTs	233
6.2.2.3.	ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>CrGST8</i> ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ <i>E. coli</i> ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ HI-Control BL21 (DE3)	233

6.2.2.4.	ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ENZYMOY <i>CrGST8</i> ΜΕ ΧΑΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ.....	234
6.2.2.5.	ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ENZYMOY <i>CrGST8</i> ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΕΝΝΕΙΑΣ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ BES-GSH.....	235
6.2.2.6.	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ GSTs ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΩΣ ΠΙΘΑΝΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ.....	236
6.2.2.7.	ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ENZYMOY <i>CrGST8</i> ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ GSH/CDNB	236
6.2.2.8.	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH ΣΤΗΝ ENZYΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΚΟΤΗΤΑ.....	237
6.2.2.9.	ΘΕΡΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΚΑΤΕΡΓΑΣΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ENZYMOY <i>CrGST8</i>	239
6.2.2.10.	ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ	240
6.3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	240
6.3.1.	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ENZYMOY <i>CrGST8</i>	240
6.3.2.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΕΙ ΤΟ ENZYMO <i>CrGST8</i> ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΟ ΦΟΡΕΑ pETite C-his DNA	242
6.3.3.	ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>CrGST8</i> ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ <i>E. coli</i> ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ BL21.....	243
6.3.4.	ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ/ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ENZYMOY <i>CrGST8</i> ΜΕ ΧΑΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ.....	247
6.3.5.	ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ENZYMOY <i>CrGST8</i> ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΕΝΝΕΙΑΣ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ BES-GSH.....	251
6.3.6.	ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ <i>CrGST8</i> ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ CDNB/GSH.....	252
6.3.7.	ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ENZYMOY <i>CrGST8</i> ΤΑ ΠΙΘΑΝΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΤΩΝ GSTs	254
6.3.8.	Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ENZYMOY <i>CrGST8</i>	255
6.3.9.	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ENZYΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ <i>CrGST8</i>	256
6.3.10.	ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ	257
6.4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	259
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	264

Στον αδερφό μου,

Πρόδρομο...

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ



1.1. ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ

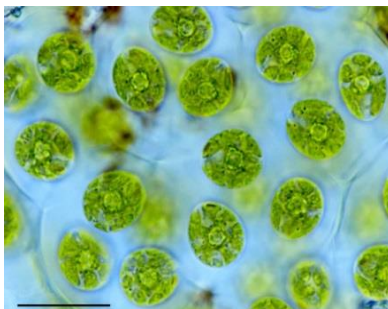
1.1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Τα φύκη αποτελούν μια ομάδα οργανισμών που έχουν την ικανότητα να εκτελούν αποτελεσματικά τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης. Με βάση τη μορφολογία και το μέγεθος, τα φύκη μπορούν να υποδιαιρεθούν και να ταξινομηθούν σε δύο κύριες κατηγορίες: μακροφύκη και μικροφύκη. Τα μακροφύκη αποτελούνται από πολλαπλά κύτταρα που οργανώνονται σε δομές που μοιάζουν με τις ρίζες, τους μίσχους και τα φύλλα των ανώτερων φυτών. Τα μικροφύκη είναι μία εξαιρετικά ποικιλόμορφη ομάδα πρωτογενών παραγωγών και παρουσιάζονται σχεδόν σε όλα τα οικοσυστήματα της Γης όπως σε θαλάσσιο και γλυκό νερό, σε έρημο και άμμο, αλλά και σε ιαματικές πηγές, σε χιόνι και σε πάγο (Tan et al., 2015; Guschina & Harwood, 2006). Αποτελούν αποικιακούς ή μονοκύτταρους οργανισμούς που έχουν συγκεντρώσει την προσοχή και το ενδιαφέρον της βιομηχανίας. Κατηγοριοποιούνται με βάση διάφορα χαρακτηριστικά που αφορούν τη μορφολογία, το χρώμα, τη χημική φύση των προϊόντων που παράγονται για τη φωτοσύνθεση και την οργάνωση των φωτοσυνθετικών μεμβρανών. Οι τέσσερις πιο σημαντικές ομάδες μικροφυκών είναι τα πράσινα φύκη (*Chlorophyceae*), τα μπλε-πράσινα φύκη ή κυανοβακτήρια (*Cyanophyta*), τα διάτομα (*Bacillariophyceae*), και χρυσά φύκη (*Chrysophyceae*) (Bwatanglang et al., 2015; Khan et al., 2009). Σύμφωνα με τις εκτιμήσεις που αναφέρονται από Cardozo et al. περιλαμβάνουν μεταξύ 200.000 και 800.000 είδη, εκ των οποίων περίπου 35.000 μόνο είδη έχουν περιγραφεί (Cardozo et al., 2007). Τα κύρια χαρακτηριστικά των μικροφυκών είναι κυρίως απλές μορφολογικά μορφές που μπορούν εύκολα να παρατηρηθούν κάτω από ένα μικροσκόπιο φωτός. Ανήκουν σε μια διαφορετική ομάδα των προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών με μεγάλη βιολογική ποικιλότητα και παρόμοια πλούσια ποικιλομορφία του μεταβολισμού (Richmond, 2008). Αυτές οι ιδιότητες καθιστούν τα μικροφύκη μια κατάλληλη πηγή ενός ευρέως φάσματος βιοδραστικών μορίων όπως αντιοξειδωτικά, πρωτεΐνες και ένζυμα (Walker et al., 2005).

1.1.2. ΠΡΑΣΙΝΑ ΦΥΚΗ

Αποτελούν μια σημαντική ομάδα φυκών και βρίσκονται σε διάφορα ενδιαιτήματα (Ruiz-Martinez et al., 2016). Τα κύτταρα έχουν συνήθως πράσινο χρώμα λόγω της παρουσίας χρωστικών ουσιών όπως της χλωροφύλλης-a και -b αλλά αυτό μπορεί να

τροποποιείται λόγω της έντονης παρουσίας άλλων χρωστικών όπως β-καροτένιο και ξανθοφύλλες (Béchet et al., 2017). Οι γλωροπλάστες παρουσιάζουν διαφορετική μορφή (δισκοειδής, πλακοειδής, δικτυωτή κ.α.) και χωροταξικότητα στα διαφορετικά είδη. Τα πλαστίδια περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη ενώ τα θυλακοειδή είναι διατεταγμένα σε 3-5 σειρές. Στο στρώμα των πλαστιδίων αποταμιεύεται άμυλο, συχνά γύρω από τα πυρηνοειδή (Xue, 2014).



Εικόνα 1. 1: Κύτταρα *Asteroococcus* (*Chlorophyceae*). Πηγή εικόνας: <http://cfb.unh.edu>.

1.1.3. ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ

Τα κυανοβακτήρια αποτελούν φωτοσυνθετικούς οργανισμούς που κατά την κλασική ταξινόμηση φέρονταν με το όνομα ‘‘κυανοφύκη’’. Πλέον θεωρούνται ως μια ιδιαίτερη συνομοταξία στην επικράτεια (domain) των Βακτηρίων. Αποτελούν μια ομάδα φωτοσυνθετικών προκαρυωτικών που έχουν ικανότητα στην οξυγονογενή ή οξυγονούχο φωτοσύνθεση (Duchoud et al., 2017). Η αρχική τους ονομασία ως μπλε-πράσινα φύκη έγινε κυρίως λόγω του χρώματος που παρουσίαζαν πολλά είδη. Η χρωστική αυτή οφειλόταν στην παρουσία μιας πρωτεΐνης, η οποία χαρακτηρίζει τις χρωστικές τόσο των οργανισμών αυτών όσο και των ερυθρών φυκών (red algae) ή ροδοφύτων (rhodophytes), και ειδικότερα της φυκοκυανίνης (Ledermann et al., 2017). Τα κυανοβακτήρια θεωρούνται ως πιθανοί πρώτοι οργανισμοί στη Γη οι οποίοι μέσω της φωτοσύνθεσης παρείχαν οξυγόνο. Αποτελούν μια αρχέγονη μορφή διότι υπάρχουν απολιθώματα του είδους αυτών που χρονολογούνται πριν από 3,5 δισεκατομμύρια χρόνια. Λόγω του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταρικής οργάνωσης έχουν ομοιότητα με τα «αρνητικά κατά Gram» βακτήρια αλλά διαθέτουν τη φωτοσυνθετική ικανότητα, τις χρωστικές και την οργάνωση θαλλού που χαρακτηρίζουν τα φύκη (Casamatta & Hašler, 2016; Oren, 2014).



Εικόνα 1. 2: Κυανοβακτήρια. Πηγή εικόνας: <http://microbes.arc.nasa.gov/images/>.

1.1.4. ΔΙΑΤΟΜΑ

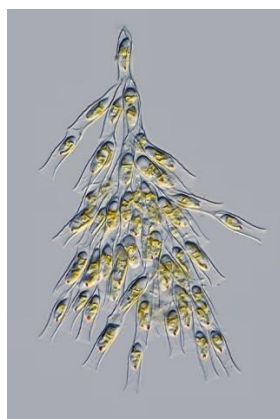
Τα διάτομα ανήκουν στην ομοταξία Βακιλλαριοφύκη (*Bacillariophyceae*) και αποτελούν μια σημαντική ομάδα φυτοπλαγκτικών οργανισμών (Li et al., 2017). Βρίσκονται σε αφθονία τόσο στα θαλάσσια οικοσυστήματα όσο και στα εσωτερικά νερά. Πρόκειται για μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς με κυτταρικό τοίχωμα και αποτελούν αρχέγονη μορφή οργανισμών μιας και χρονολογούνται πριν από 185 εκατομμύρια χρόνια (Medlin, 2017). Ο αριθμός των ειδών που ανήκουν στα διάτομα αν και δεν είναι γνωστός, πιστεύεται ότι υπάρχουν περίπου 100.000 είδη, τα μισά από τα οποία είναι θαλάσσια. Σχηματίζουν αποικίες σε διάφορα σχήματα όπως σε σχήμα αλυσίδας και αστεριού. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της ομάδας είναι το κυτταρικό τοίχωμα το οποίο ως βασικό συστατικό αποτελεί το διοξείδιο του πυριτίου. Οι κοινότητες που σχηματίζονται από τα διάτομα συνήθως χρησιμοποιούνται ως βιολογικοί δείκτες της οικολογικής κατάστασης των υδάτων (Nakon et al., 2014).



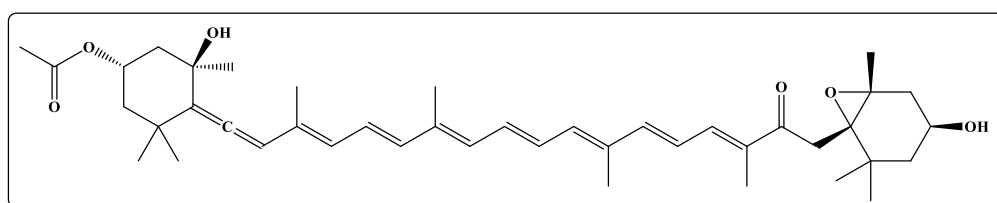
Εικόνα 1. 3: Διάτομο *Pinnularia nobilis* (*Bacillariophyceae*). Πηγή εικόνας: <http://protist.i.hosei.ac.jp/>.

1.1.5. ΧΡΥΣΟΦΥΚΗ

Τα χρυσοφύκη (*Chrysophyceae*) ή χρυσόφυτα (*Chrysophytes*) αποτελούν μια μεγάλη ομάδα φυκών και απαντούν κυρίως σε γλυκά νερά (Klaveness, 2017). Η ομάδα αυτή διαχωρίζεται σύμφωνα με μορφολογικά και μοριακά κριτήρια σε δύο μονοφυλετικούς κλάδους: τα *Chromulinales* και τα *Ochromonadales* (Andersen 2007). Το όνομά τους οφείλεται στον κύριο φωτοσυνθετικό καροτενοειδές τους, τη φυκοξανθίνη (fucoxanthin) (Εικόνα 1. 5) η οποία βρίσκεται συσσωρευμένη στους χλωροπλάστες και δίνει το χαρακτηριστικό καστανό-κίτρινο χρώμα στα κύτταρα του οργανισμού (Εικόνα 1. 4). Επίσης υπάρχει η χρυσολαμιναρίνη (chrysolaminarin), ουσία η οποία αποθηκεύεται στα χυμοτόπια (Necchi, 2016). Ως οργανισμοί χαρακτηρίζονται αυτότροφοι/φωτοσυνθετικοί αλλά ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες μπορεί να μετατραπούν σε ετερότροφους ή μικτότροφους οργανισμούς χάνοντας το χαρακτηριστικό τους χρώμα. Είναι μονοκύτταροι οργανισμοί αλλά μπορούν να σχηματίσουν και αποικίες. Χαρακτηριστικό αποτελεί η ύπαρξη πυριτίου συσσωρευμένο σε ειδικά κυτταρικά κυστίδια (Finkel, 2016; Graham et al., 2009).



Εικόνα 1. 4: *Dinobryon divergens*. Πηγή εικόνας: [http:// www.mikro-foto.de](http://www.mikro-foto.de).



Εικόνα 1. 5: Η χημική δομή της φυκοξανθίνης, καροτενοειδές με χαρακτηριστικό καστανό/κίτρινο χρώμα.

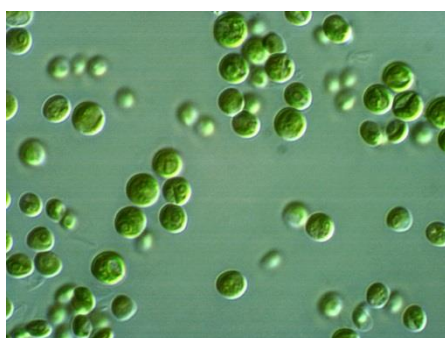
1.1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΕΙΔΩΝ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν και μελετήθηκαν διαφορετικά είδη μικροφυκών. Τα είδη που μελετήθηκαν και περιγράφονται στη συνέχεια είναι τα *Chlorella sp.*, *Chlamydomonas sp.* (*Chlamydomonas reinhardtii*), *Tetraselmis sp.*, *Nannochloropsis sp.* και *Phaeodactylum sp.* (*Phaeodactylum tricorutum*).

1.1.6.1. *Chlorella sp.*

Τα *Chlorella sp.* ανήκουν στην οικογένεια των μονοκύτταρων πράσινων φυκών της τάξης *Chlorococcales* και της οικογένειας *Chlorellaceae*. Προσελκύουν την προσοχή διότι αποτελούν αντικείμενο εκμετάλλευσης σε διάφορους τομείς της βιοτεχνολογίας, συμπεριλαμβανομένων της διατροφής, των φαρμακευτικών προϊόντων, των φαρμακευτικών καλλυντικών, στην επεξεργασία των λυμάτων, στα βιοκαύσιμα και για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας (Usmani et al., 2015; Higgins, 2015; Rajkumar & Yaakob, 2013; Freitas et al., 2015).

Τα *Chlorella sp.* θεωρούνται μια πλούσια πηγή σε ω-3 λιπαρά οξέα, αντιοξειδωτικά, απαραίτητα αμινοξέα και βιταμίνες τα οποία προάγουν την υγεία (Harnedy & Fitzgerald, 2013). Επιπρόσθετα, οι δευτερογενείς μεταβολίτες και τα επιμέρους φυτικά τμήματά τους έχουν ευρέως διερευνηθεί, ενώ βρέθηκε να περιέχουν βιοδραστικές ιδιότητες που σχετίζονται με την προώθηση της καλής υγείας, την αντιγήρανση, το αντιοξειδωτικό και αντικαρκινικό δυναμικό, την ενίσχυση του καρδιαγγειακού συστήματος, καθώς και με νευροπροστατευτικές και αντιφλεγμονώδεις δραστηριότητες (Kim et al., 2014; Itakura et al., 2015).

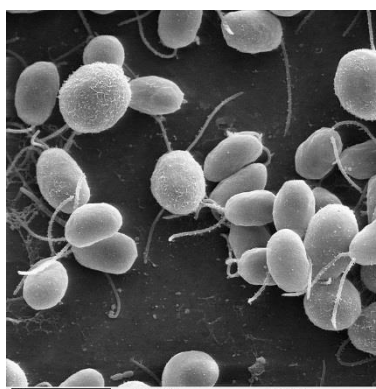


Εικόνα 1. 6: *Chlorella sp.* Πηγή εικόνας: <http://cfb.unh.edu>.

1.1.6.2. *Chlamydomonas reinhardtii*

Το χλαμυδομονάς του Ράινχαρτ είναι ένα μονοκύτταρο, πράσινο μικροφύκος διαμέτρου περίπου 10 μM που κινείται με τη χρήση δύο μαστιγίων. Έχει ένα κυτταρικό τοίχωμα κατασκευασμένο από πλούσιες σε υδροξυπρολίνη γλυκοπρωτεΐνες, ένα μεγάλο κυπελλοειδές χλωροπλάστη, ένα μεγάλο πυρηνοειδές και έναν αισθητήρα φωτός.

Το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* κατοικεί στο χώμα και σε υδροβιότοπους γλυκού νερού. Χρησιμοποιείται κυρίως ως πρότυπος οργανισμός στη βιολογία και έχει ευρύ φάσμα εφαρμογών (Scranton et al., 2015). Όταν υπάρχει αφθονία φωτός, το *C. reinhardtii* μπορεί να αναπτυχθεί σε θρεπτικά μέσα που στερούνται οργανικές πηγές άνθρακα και χημικής ενέργειας, ενώ μπορεί να αναπτύσσεται με επιτυχία στο σκοτάδι όταν τροφοδοτείται με αυτά. Επίσης, το μικροφύκος αυτό παρουσιάζει ενδιαφέρον στον τομέα των βιοφαρμακευτικών (Ramos-Martinez, 2017) αλλά και στον τομέα των βιοκαυσίμων ως μια πηγή παραγωγής υδρογόνου (Torzillo et al., 2014).



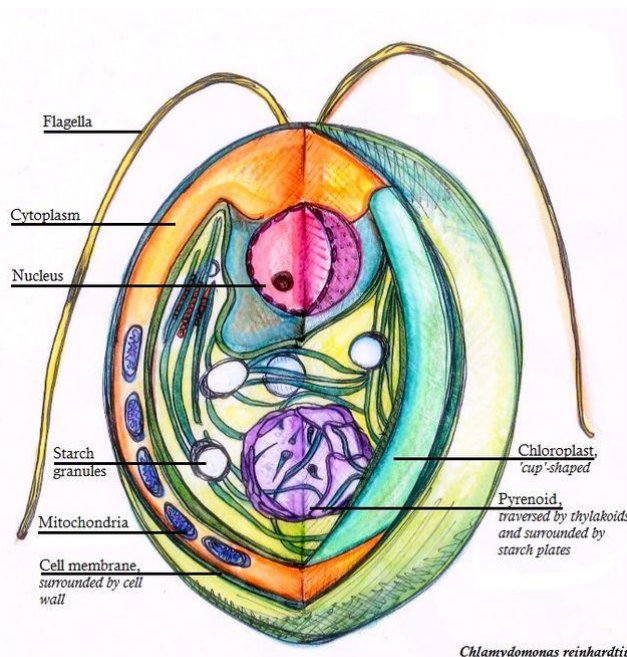
Εικόνα 1. 7: Σάρωση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο κύτταρα μικροφύκους *Chlamydomonas reinhardtii*.
Πηγή εικόνας: <http://remf.dartmouth.edu/imagesindex.html>.

Πρώτη φορά εντοπίστηκε και απομονώθηκε ο άγριος τύπος του *C. reinhardtii*, το στέλεχος c137 (mt +) στη Μασαχουσέτη το 1945 από τον Gilbert M. Smith (Goodenough, 2015). Το είδος έχει περιγραφεί με διάφορους τρόπους: *reinhardi*, *reinhardii* και *reinhardtii*, όλοι όμως αναφέρονται στο ίδιο είδος, *C. reinhardtii* Dangeard (Hemaiswarya et al., 2013).

Τα βλαστικά κύτταρα των ειδών *reinhardtii* είναι απλοειδή με 17 χρωμοσώματα. Υπό συνθήκες έλλειψης αζώτου τα βλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε απλοειδείς

γαμέτες. Υπάρχουν δύο τύποι ζευγαρώματος, ίδιες σε εμφάνιση και είναι γνωστές ως $mt(+)$ και $mt(-)$, κατά την οποία μπορεί να συντήκονται για να σχηματίσουν ένα διπλοειδή ζυγώτη. Ο ζυγώτης δεν είναι μαστιγοφόρος και χρησιμεύει ως μια λανθάνουσα μορφή του είδους του εδάφους. Υπό το φως, το ζυγωτό υφίσταται μείωση και απελευθερώνει τέσσερα απλοειδή, μαστιγοφόρα κύτταρα τα οποία επαναλαμβάνουν τον ίδιο κύκλο ζωής. Υπό ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης, τα κύτταρα μπορούν μερικές φορές να υφίστανται δύο ή τρεις μιτωτικές διαιρέσεις. Έτσι, ένα στάδιο της ανάπτυξης μπορεί να οδηγήσει σε 4 ή 8 θυγατρικά κύτταρα ανά μητρικό κύτταρο. Ο κυτταρικός κύκλος αυτών των μονοκύτταρων πράσινων μικροαλγών, μπορούν να συγχρονιστούν με εναλλασσόμενες περιόδους φως και το σκοτάδι. Η φάση της ανάπτυξης εξαρτάται από το φως, ενώ, μετά από ένα σημείο που ορίζεται ως το σημείο μετάβασης ή δέσμευσης, οι διαδικασίες είναι φως-ανεξάρτητες (Cross & Umen, 2015).

Το γένος *Chlamydomonas* έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη διάφορων πτυχών της εξελικτικής βιολογίας και της οικολογίας. Είναι ένας οργανισμός με πολλά πλεονεκτήματα καθώς πολλαπλασιάζεται γρήγορα, αποτελεί έναν ετερότροφο και προαιρετικά αυτότροφο οργανισμό, αναπαράγεται με αγενή και εγγενή πολλαπλασιασμό και σαν οργανισμός αποτελεί ένα διαθέσιμο πλούτο γενετικών πληροφοριών.



Εικόνα 1. 8: Διατομή του κυττάρου από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*. σε 3D αναπαράσταση. Πηγή εικόνας: <http://en.wikipedia.org/>.

1.1.6.3. *Tetraselmis sp.*

Η *Chlorodendrophyceae* είναι μια μικρή τάξη των πράσινων φυκών που περιλαμβάνει τα γένη *Tetraselmis* και *Scherffelia* (Fučíková et al., 2014). Αν και παραδοσιακά θεωρούνται ως μέλη των *Prasinophytes*, αυτοί οι μονοκύτταροι μαστιγοφόροι οργανισμοί έχουν πολλά κοινά με αρκετά χαρακτηριστικά του πυρήνα των Χλωρόφυτων (*Trebouxiophyceae*, *Ulvophyceae* και *Chlorophyceae*). Αυτή η φυλογενετική σχέση με τον πυρήνα των Χλωρόφυτων έχει επιβεβαιωθεί από μοριακά δεδομένα (Fawley et al., 2000; Marin, 2012). Η κίνηση των οργανισμών του γένους *Tetraselmis* γίνεται με τη βοήθεια τεσσάρων μαστιγίων. Τα κύτταρα καλύπτονται συνήθως από μια θήκη, η οποία είναι ένα λεπτό κυτταρικό τοίχωμα η οποία σχηματίζεται από εξωκυττάρια συγχώνευση των κλιμάκων. Τα μαστίγια καλύπτονται από τριχοφόρα αγγεία και πενταγωνικές κλίμακες (Εικόνα 1. 9). Κάθε κύτταρο αποτελείται από ένα χλωροπλάστη, ένα πυρηνοειδές και έναν αισθητήρα φωτός ενώ η αναπαραγωγική δραστηριότητα παραμένει άγνωστη μέχρι και σήμερα (Arora et al., 2013).



Εικόνα 1. 9: Κύτταρα του είδους *Tetraselmis sp.* όπως φαίνονται σε μικροσκόπιο. Πηγή εικόνας: <http://cfb.unh.edu/phycokey/phycokey.htm>.

Τα περισσότερα στελέχη της τάξης *Chlorodendrophyceae* απαντώνται ως πλαγκτονικοί ή βενθικοί οργανισμοί σε θαλάσσια, και όχι μόνο, περιβάλλοντα. Το γένος *Tetraselmis* περιλαμβάνει 26 αποδεκτά είδη και κάποια από αυτά ζουν είτε ελεύθερα είτε συμβιωτικά στο εσωτερικό θαλάσσιων οργανισμών (φαινόμενο της ενδοσυμβίωσης) (Arora et al., 2013).

Το γένος χρησιμοποιείται ευρέως σε εγκαταστάσεις υδατοκαλλιέργειας ως διατροφή για θαλάσσιους οργανισμούς, όπως μαλάκια ή προνύμφες των γαριδίων (Azma et al., 2011). Επιπλέον, η υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια, δίνει τη δυνατότητα να

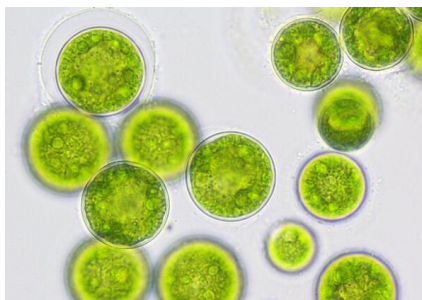
χρησιμοποιηθεί η βιομάζα του *Tetraselmis sp.* στην παραγωγή βιοκαυσίμων (Grierson et al., 2012).

1.1.6.4. *Nannochloropsis sp.*

Το *Nannochloropsis* είναι ένα γένος που περιλαμβάνει 6 γνωστά είδη. Το γένος χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά το 1981 από τον Hibberd (Hibbert, 1981). Αναπτύσσονται κυρίως στο θαλάσσιο περιβάλλον, αλλά μπορεί να εμφανιστούν σε γλυκό και υφάλμυρο νερό. Όλα τα είδη είναι μικρά, σαν ακίνητες σφαίρες τα οποία δεν παρουσιάζουν κανένα διακριτό μορφολογικό χαρακτηριστικό που να μπορούν να διακριθούν σε οπτικό ή ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Ο χαρακτηρισμός γίνεται κυρίως μέσω του γονιδίου *rbcL* και την ανάλυση της αλληλουχίας του 18S rDNA (Taleb et al., 2015).

Τα μικροφύκη *Nannochloropsis sp.* διαφέρουν από συναφή μικροφύκη στο ότι έχουν χλωροφύλλη *a* ενώ στερούνται τη χλωροφύλλη *b* και *c*. Επιπλέον, έχουν τη δυνατότητα να αποθηκεύουν υψηλές συγκεντρώσεις χρωστικών ουσιών όπως η ασταξανθίνη, ζεαξανθίνη και κανθαξανθίνης (Koller et al., 2014). Έχουν απλή δομή διαμέτρου περίπου 2-3 μM .

Τα είδη *Nannochloropsis sp.* θεωρούνται ως μια υποσχόμενη ομάδα μικροφυκών για βιομηχανικές εφαρμογές, λόγω της ικανότητάς τους να συσσωρεύουν υψηλά επίπεδα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Yaoyang et al., 2014). Ορισμένα στελέχη *Nannochloropsis sp.* μπορούν να χρησιμοποιηθούν με κατάλληλους γενετικούς χειρισμούς ώστε να εκτελέσουν ομόλογο ανασυνδυασμό (Carpinelli et al., 2014). Στις μέρες μας, έχουν ευρεία εφαρμογή στο χώρο της βιομηχανίας ζωοτροφών και συγκεκριμένα αποτελούν μια ενεργειακά πλούσια πηγή τροφής για τις προνύμφες των ψαριών και τα τροχόζωα.



Εικόνα 1. 10: Κύτταρα μικροφύκους *Nannochloropsis oculata*. Πηγή εικόνας: https://twitter.com/neoglis_cosmesi.

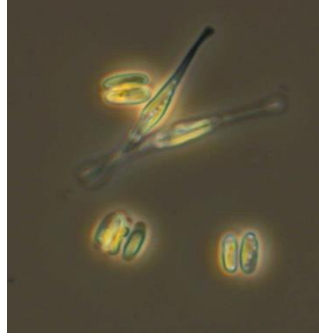
1.1.6.5. *Phaeodactylum* sp.

Το γένος *Phaeodactylum* ανήκει στην οικογένεια των διατόμων και αποτελείται από το στέλεχος *Phaeodactylum tricornutum*. Σε αντίθεση με άλλα διάτομα, το *Phaeodactylum tricornutum* μπορεί να εμφανίζεται με διαφορετικούς μορφότυπους (ατρακτοειδές, τριαδικό, οβάλ), καθώς αλλαγές στο σχήμα του κυττάρου μπορεί να διεγερθούν από τις συνθήκες του περιβάλλοντος (Martino et al., 2007). Η ιδιότητα αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί με σκοπό τη μελέτη της γενετικής βάσης, η οποία είναι υπεύθυνη για τον έλεγχο του σχήματος του κυττάρου και τη μορφογένεση (Tirichine et al., 2014). Χαρακτηριστικό, επίσης, αποτελεί η ικανότητα του συγκεκριμένου είδους να αναπτύσσεται απουσία πυριτίου και να μπορεί να επιβιώσει χωρίς τη πυριτωμένη επιφάνεια του κελύφους.

Μια άλλη ιδιαιτερότητα είναι ότι κατά τη διάρκεια της μονογονικής αναπαραγωγής τα κελύφη δεν φαίνεται να γίνονται μικρότερα. Αυτό επιτρέπει τη συνεχή καλλιέργεια χωρίς την ανάγκη για εγγενή αναπαραγωγή. Μέχρι σήμερα κανένα αποδεικτικό στοιχείο δεν έχει βρεθεί που να υποστηρίζει την αγενή αναπαραγωγή με κυτταρική διαίρεση του συγκεκριμένου είδους. Το *Phaeodactylum tricornutum* μπορεί να θεωρηθεί ένα άτυπο περωτό διάτομο και είναι ένα από τα κυριότερα είδη διατόμων που λειτουργεί ως μοντέλο οργανισμός.

Το *P. tricornutum* είναι ένα από τα δύο διάτομα των οποίων το γονιδίωμα έχει αλληλουχηθεί (το άλλο είναι το *Thalassiosira pseudonana*). Το γονιδίωμα περιέχει περίπου 10% γονίδια προκαρυωτικών οργανισμών, ένα ασυνήθιστα μεγάλο ποσοστό (Buhmann, 2015).

Το *P. tricornutum* έχει αναδειχθεί ως μια πιθανή πηγή ενέργειας από μικροφύκη. Αναπτύσσεται ραγδαία ενώ η αποθήκευση λιπιδίων αποτελεί περίπου το 20-30% του συνολικού ξηρού βάρους των κυττάρων του, υπό τυπικές συνθήκες καλλιέργειας. Χαρακτηριστικό αποτελεί ότι η έλλειψη αζώτου στην διάρκεια παραγωγής βιομάζας, μπορεί να προκαλέσει συσσώρευση λιπιδίων, υποδεικνύοντας πιθανές στρατηγικές για τη βελτίωση παραγωγής βιοντίζελ από μικροφύκη (Levitani et al., 2015).



Εικόνα 1. 11: Το *Phaeodactylum tricornutum* μπορεί να εμφανίζεται με διαφορετικούς μορφότυπους. Πηγή εικόνας: <https://www.wageningenur.nl>.

1.1.7. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες για την επίτευξη οικονομικά και περιβαλλοντικά εφικτή εμπορικής κλίμακας παραγωγή μικροφυκών, είναι η ανάπτυξη οικονομικά αποδοτικών και βιώσιμων συστημάτων καλλιέργειας (Moheimani et al., 2014; Borowitzka, 1996). Ο σχεδιασμός του συστήματος καλλιέργειας επηρεάζει τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν από τα κύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους καθορίζουν την παραγωγικότητα. Η βελτίωση της παραγωγικότητας είναι το κλειδί για την επίτευξη της οικονομικής βιωσιμότητας σε μεγάλη κλίμακα υπαίθριων καλλιεργειών (Duan et al., 2015; Greenwell et al., 2010). Η καλλιέργεια μικροφυκών έχει πραγματοποιηθεί σε φυσικές ανοικτές λίμνες και ποτάμια μέχρι και σε εξαιρετικά πολύπλοκους και ελεγχόμενους φωτο-βιοαντιδραστήρες. Ένας βιοαντιδραστήρας είναι ένα δοχείο μέσα στο οποίο οι ζωντανοί οργανισμοί καλλιεργούνται και πραγματοποιούν βιολογικές μετατροπές (π.χ. παραγωγή βιομάζα ή σχηματισμό προϊόντος) (Apel et al., 2015; Grobbelaar, 2009). Αντιθέτως, σε έναν φώτο-βιοαντιδραστήρα, στον οποίον οι οργανισμοί που λαμβάνουν ενέργεια από το φως, όπως τα φύκια, τα φυτά και ορισμένα μικροβιακά κύτταρα (φωτότροφα), χρησιμοποιούνται για τη διεξαγωγή αντιδράσεων. Κάθε τύπος φωτο-βιοαντιδραστήρα έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, αλλά οι γενικοί στόχοι είναι παρόμοιοι. Κατά το σχεδιασμό των εμπορικών συστημάτων καλλιέργειας μικροφυκών, ο στόχος είναι να επιτευχθεί (Ugwu et al., 2008):

- Βέλτιστη ογκομετρική ή / και επιφανειακή παραγωγικότητα
- Αποδοτική μετατροπή της φωτεινής ενέργειας στο προϊόν
- Συνέπεια και αξιοπιστία της παραγωγής
- Σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας

Αποτελεσματική σχεδίαση του βιοαντιδραστήρα απαιτεί γνώση τόσο της φυσιολογίας των φυκών όσο και τον τρόπο λειτουργίας και τη μηχανική του αντιδραστήρα, όπως οι παράμετροι της υδροδυναμικής και της μεταφοράς μάζας (Ugwu et al., 2008).



Εικόνα 1. 12: Φωτο-βιοαντιδραστήρες για παραγωγή βιομάζας μικροφυκών. Πηγή εικόνας: <http://www.climatetechwiki.org/>.

1.1.8. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΙΚΟΦΥΚΩΝ

Για βέλτιστη ανάπτυξη μικροφυκών, διάφοροι περιβαλλοντικοί παράμετροι (π.χ. η θερμοκρασία, η ένταση φωτός, το pH και οι συγκεντρώσεις των θρεπτικών συστατικών) πρέπει να διατηρούνται, σε ένα στενό εύρος, κατάλληλα ρυθμισμένοι. Το σύστημα του αντιδραστήρα αποτελεί ένα κρίσιμο κομμάτι για την παροχή και διατήρηση ενός ευνοϊκού περιβάλλοντος ανάπτυξης (Tuantet et al., 2015; Pulz, 2001). Ως εκ τούτου, ο σχεδιασμός του αντιδραστήρα απαιτεί γνώση της φυσιολογίας και μορφολογίας των μικροφυκών, τις απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά και την ανοχή σε καταπονήσεις των ειδών που πρόκειται να καλλιεργηθούν. Μερικές από τις προϋποθέσεις για τη σωστή ανάπτυξη μικροφυκών και οι συνέπειες που προκύπτουν από την έλλειψη ή την υπερβολική έκθεση παρατίθενται στον **Πίνακα 1. 1**.

Πίνακας 1. 1: Οι βασικές απαιτήσεις για την ανάπτυξη μικροφυκών σε έναν φωτο-βιοαντιδραστήρα.

Βασικές απαιτήσεις	Έλλειψη	Υπερβολική έκθεση
Φως	Ανεπαρκής φωτοσύνθεση Αργή ανάπτυξη	Αναστολή φωτοσύνθεσης Οξειδωτική βλάβη
Θερμοκρασία	Αργή ανάπτυξη Λήθαργος	Θάνατος
Θρεπτικά Συστατικά	Αναστολή ανάπτυξης	Τοξικότητα
Ανάδευση	Κακή μεταφορά μάζας Καθίζηση βιομάζας Αναερόβιες ζώνες	Στρεσάρισμα Υψηλή χρήση ενέργειας

1.1.8.1. ΦΩΣ

Τα μικροφύκη, ως φωτοτροπικοί οργανισμοί, επηρεάζονται από το φως και γενικότερα από το μήκος κύματος του φωτός (Hartmann et al., 2014). Δυο παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη σε μια καλλιέργεια και ανάπτυξη μικροφυκών είναι η ποιότητα φωτισμού του φάσματος και η ένταση του φωτός (Murata et al., 2007). Η ενέργεια που απορροφάται από τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς εξαρτάται από τη χημική σύσταση των χρωστικών τους (Carvalho et al., 2011). Για παράδειγμα, όλοι οι τύποι χλωροφύλλης (πράσινες χρωστικές) έχουν δύο βασικά μήκη κύματος απορρόφησης: η μπλε ή η πράσινη-μπλε (450-475 nm) και η κόκκινη (630-675 nm). Επομένως η ανάπτυξη των θαλάσσιων μικροφυκών μπορεί να βελτιωθεί υπό τη χρήση της μπλέ ή κόκκινης ακτινοβολίας (Flores-Molina et al., 2014). Επιπρόσθετα, η κατανομή της έντασης ακτινοβολίας θα πρέπει να γίνεται κατά τρόπο ομοιόμορφο πάνω από τη φωτιζόμενη περιοχή του δοχείου καλλιέργειας και με επαρκή ποσότητα της ενεργής φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας (PAR: Photosynthetically Active Radiation) (Lee, 1999). Υπερβολική ένταση της PAR μπορεί να οδηγήσει σε φωτοοξείδωση και φωτοαναστολή, ενώ η μειωμένη ένταση μπορεί να εμποδίσει την πορεία ανάπτυξης (Loera-Quezada et al., 2011) (**Πίνακας 1. 1**).

Το φως είναι ο κύριος περιοριστικός παράγοντας στην καλλιέργεια των φωτοσυνθετικών οργανισμών (Fernandes et al., 2014). Ως εκ τούτου, η ένταση και η χρησιμοποίηση της απόδοσης της παροχής φωτός είναι κρίσιμη στο σχεδιασμό του αντιδραστήρα (Kumar et al., 2010). Η φωτοσυνθετική δραστηριότητα των

μικροφυκών διαφοροποιείται παρουσία διαφορετικής έντασης του φωτός. Σε χαμηλές εντάσεις φωτός, τα κύτταρα είναι ελαφρώς περιορισμένα και το φωτοσυνθετικό ποσοστό αυξάνεται με την αύξηση της ακτινοβολίας. Μόλις τα κύτταρα φτάσουν σε σημείο φωτώ-κορεσμού, ο ρυθμός απορρόφησης των φωτονίων υπερβαίνει το ποσοστό του κύκλου εργασιών των ηλεκτρονίων στο Φωτοσύστημα II (PS II) και δεν υπάρχει περαιτέρω αύξηση του φωτοσυνθετικού ρυθμού με αυξανόμενη ένταση του φωτός. Μόλις η ακτινοβολία αυξάνεται πάνω από ένα ορισμένο σημείο, αρχίζει η αναστολή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Chisti, 2007). Η φωτοσυνθετική δραστηριότητα για τα περισσότερα φύκη φτάνει σε σημείο κορεσμού περίπου στα 1700 έως 2000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, ενώ για μερικά είδη πλαγκτόν το σημείο κορεσμού φαίνεται να είναι σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα ($130 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Η φωτο-αναστολή γίνεται γρήγορα, είναι μια μη αναστρέψιμη καταστροφή και μπορεί να συμβεί μέσα σε λίγα λεπτά και να υπερβαίνει το 50% της συνολικής βλάβης μετά το πέρας των 20 λεπτών (Pulz, 2001).

Η απαίτηση για τη βέλτιστη παροχή φωτός σε όλα τα κύτταρα θέτει περιορισμούς στην γεωμετρία των αντιδραστήρων. Καθώς το φως εισέρχεται σε μια επιφάνεια, απορροφάται και σκεδάζεται από τα κύτταρα, τα αιωρούμενα σωματίδια χρώματος ή χημικών ουσιών, καθώς και από το ίδιο το νερό (Grobbelaar, 2009). Καθώς τα κύτταρα στην επιφάνεια απορροφούν φως, σκιάζουν εκείνα που βρίσκονται κάτω από αυτά. Λόγω αυτής της αμοιβαίας επίδρασης σκίασης, η ένταση του φωτός μειώνεται με το βάθος της καλλιέργειας. Το φως δεν διεισδύει περισσότερο από μερικά εκατοστά μέσα σε μια πυκνή καλλιέργεια μικροφυκών. Έτσι λοιπόν, ο σχεδιασμός του φωτο-βιοαντιδραστήρα βασίζεται στο εμβαδόν επιφάνειας και όχι στον όγκο, όπως στην περίπτωση των ετερότροφων ζυμώσεων, και η αναλογία εμβαδού επιφανείας προς όγκο είναι μία κρίσιμη παράμετρος (Scott et al., 2010).

Τα κύτταρα μικροφυκών μπορούν να εγκλιματιστούν στις υψηλές ή χαμηλές συνθήκες φωτισμού σε διάστημα 10-40 min. Αυτό γίνεται σε μια προσπάθεια εξισορρόπησης της δράση του φωτός και του σκότους στις φωτοσυνθετικές αντιδράσεις. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα ρυθμίζουν την ικανότητα τους για την απορρόφηση του φωτός (π.χ. μέσω της προσαρμογής του αριθμού των PS II κέντρων αντίδρασης ή μέσω συγκέντρωσης χρωστικής), ανάλογα με την ένταση του φωτισμού του περιβάλλοντος. Η έκθεση των κυττάρων από μικροφύκη, σε σύντομες κυκλικές περιόδους φωτός και σκότους, θα μπορούσε να αντισταθμίσει τα αρνητικά φαινόμενα του φωτο-κορεσμού και της αναστολής των φωτοσυνθετικής

δραστηριότητας. Το φαινόμενο αυτό (flashing light effect) μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της παραγωγικότητας σε ορισμένες συχνότητες του φωτός και σκότους (Liao et al., 2014).

1.1.8.2. ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ

Μαζί με την ένταση του φωτός, η θερμοκρασία είναι μία από τις πιο δύσκολες παραμέτρους για τη βελτιστοποίηση των συστημάτων καλλιέργειας σε μεγάλη κλίμακα. Οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας, τόσο καθημερινά όσο και εποχιακά, μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική μείωση της παραγωγικότητας. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης για μικροφύκη διαφέρει μεταξύ των ειδών, αλλά συχνά βρίσκεται στην περιοχή των 20 °C έως 30 °C (Chisti, 2008). Πολλά είδη μπορούν να ανεχθούν θερμοκρασία έως 15 °C χαμηλότερη από το βέλτιστο τους, με μειωμένα ποσοστά ανάπτυξης. Αντιθέτως, μία θερμοκρασία μόνο μερικούς βαθμούς υψηλότερη από τη βέλτιστη μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο (Mata et al., 2010). Η καθαρή απόδοση της φωτοσύνθεσης μειώνεται σε υψηλή θερμοκρασία, ο ρυθμός της αναπνοής αυξάνεται σημαντικά, ενώ η αυξημένη ροή διαμέσου του κύκλου Calvin είναι μέτρια. Αυτό το αποτέλεσμα επιδεινώνεται από το γεγονός ότι το CO₂ γίνεται λιγότερο διαλυτό σε υψηλές θερμοκρασίες, ταχύτερα σε σύγκριση με το O₂ (Giannetto et al., 2015). Η χαμηλή εποχιακά, πρωινή και βραδινή θερμοκρασία μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές απώλειες στην παραγωγικότητα. Χαρακτηριστικά, το 25% της βιομάζας που παράγεται κατά τη διάρκεια της ημέρας μπορεί να χαθεί τη νύχτα λόγω της διαδικασίας της αναπνοής (Chisti, 2007).

Τα κλειστά συστήματα καλλιέργειας σε αντιδραστήρες, απαιτούν σχεδόν πάντα κάποια μορφή ελέγχου της θερμοκρασίας. Συχνά υποφέρουν από την υπερθέρμανση όταν οι θερμοκρασίες στο εσωτερικό του μπορεί να φτάσει πάνω από 50 °C. Για την αποφυγή αυτού του φαινομένου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλάκτες θερμότητας ή συστήματα ψύξης με νερό (Mata et al., 2010).

1.1.8.3. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Η βέλτιστη παροχή θρεπτικών συστατικών, κυρίως άνθρακα, άζωτο και φώσφορος, μαζί με διάφορα άλλα μακρο- και μικρο- θρεπτικά στοιχεία που απαιτούνται για την ανάπτυξη των μικροφυκών, αποτελεί προϋπόθεση για υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης. Ελλείψεις σε οποιοδήποτε θρεπτικό συστατικό μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχές του μεταβολισμού, αλλαγές στη φυσιολογία και μειωμένη παραγωγικότητα (Dineshkumar

et al., 2015). Η παροχή θρεπτικών ουσιών στην καλλιέργεια είναι σχετικά απλή, αλλά η παροχή θρεπτικών συστατικών σε μεμονωμένα κύτταρα εξαρτάται από την αποτελεσματική μεταφορά μάζας, η οποία σχετίζεται με την ανάμειξη και διοχέτευση των αερίων (Grobbelaar, 2009). Οι θρεπτικές ουσίες είναι επίσης ένα σημαντικό κόστος στην καλλιέργεια μικροφυκών. Ως εκ τούτου, ο σχεδιασμός του συστήματος αντιδραστήρα ώστε να επιτρέπει την αποτελεσματική ανακύκλωση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας είναι απαραίτητη (Greenwell et al., 2010).

Τα θρεπτικά συστατικά, με εξαίρεση ο άνθρακας, παρέχονται σε υγρό μέσο ανάπτυξης. Ο άνθρακας είναι ένα σημαντικό συστατικό των κυττάρων (συντά περιλαμβάνει το 50% του ξηρού βάρους) και συνήθως λαμβάνεται από το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) (Chisti, 2007). Η συγκέντρωση του CO₂ στον αέρα (0.04 %v/v) δεν είναι βέλτιστη για την ανάπτυξη μικροφυκών. Για τη βέλτιστη παραγωγικότητα ο εμπλουτισμός με CO₂ πρέπει να παρέχεται, τόσο σε κλειστά όσο και σε ανοιχτά συστήματα καλλιέργειας. Σε περιπτώσεις έλλειψης CO₂, ορισμένα είδη μικροφυκών έχουν την ικανότητα να προμηθευτούν την απαραίτητη συγκέντρωση άνθρακα από μια πηγή οργανικού άνθρακα (π.χ. γλυκόζη) (Shen et al., 2009).

Η απομάκρυνση των τοξικών μεταβολιτών είναι επίσης κρίσιμο στάδιο για την αποτελεσματικότητα της ανάπτυξης και της φωτοσύνθεσης. Υπό συνθήκες υψηλής ακτινοβολίας η παραγωγή οξυγόνου σε κλειστούς φωτο-βιοαντιδραστήρες μπορεί να είναι μέχρι 10 g O₂·m⁻³ min⁻¹. Το μέγιστο επίπεδο διαλυμένου οξυγόνου δεν πρέπει να υπερβαίνει το 400 % του κορεσμού σε σχέση με τον κορεσμένο αέρα της καλλιέργειας (Meier et al., 2015). Η συσσώρευση του O₂ στον αντιδραστήρα μπορεί να ενεργοποιήσει το ένζυμο RuBisCO (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) ώστε να δεσμεύει οξυγόνο αντί του διοξειδίου του άνθρακα, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η φωτοαναπνοή αντί της φωτοσύνθεσης (Shrivastav & Bose, 2015; Dennis et al., 1998). Υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, εκτός από το έντονο φως, οδηγούν στο σχηματισμό ριζών οξυγόνου που έχουν τοξικές επιδράσεις στα κύτταρα προκαλώντας βλάβη της κυτταρικής μεμβράνης (Molina et al., 2001; Pulz, 2001). Πολλά είδη μικροφυκών δεν μπορούν να επιβιώσουν σε υπερ-κορεσμένες συνθήκες O₂ για περισσότερο από 2 έως 3 h. Υψηλές θερμοκρασίες σε συνδυασμό με υψηλή ένταση φωτός εντείνουν τη βλάβη (Street & Cockburn, 2014; Pulse, 2001).

1.1.8.4. ΑΝΑΔΕΥΣΗ

Ο σωστή ανάδευση είναι υψίστης σημασίας σε συστήματα καλλιέργειας μικροφυκών, καθώς συνδέεται άμεσα με άλλες βασικές παραμέτρους, όπως η διάταξη του φωτός, η μεταφορά αερίων και η παροχή θρεπτικών συστατικών. Η καλή ανάδευση διατηρεί τα κύτταρα σε εναιώρημα, εξαλείφει τυχόν θερμικές στρωματώσεις, διασφαλίζει αποτελεσματική κατανομή των θρεπτικών ουσιών, βελτιώνει την ανταλλαγή αερίων, μειώνει την αμοιβαία σκίαση στο κέντρο του αντιδραστήρα και μειώνει τη φωτο-αναστολή στην επιφάνεια (Ugwu et al., 2008).

Μία από τις σημαντικές διαφορές μεταξύ των ανοικτών και κλειστών αντιδραστήρων είναι ο βαθμός στροβιλισμού που μπορεί να επιτευχθεί. Υψηλότεροι βαθμοί στροβιλισμού πιο εύκολα μπορεί να επιτευχθούν σε κλειστούς φωτο-βιοαντιδραστήρες με στενούς σωλήνες ή πλάκες. Σε κλειστούς αντιδραστήρες, η ανάμιξη μπορεί να επιτευχθεί μηχανικά (με άντληση ή ανάδευση) ή με αερισμό μέσω συστημάτων μεταφοράς αερίου (π.χ. σωλήνες και έλικες). Η ανάδευση είναι αποτελεσματική αλλά με υψηλή μηχανική καταπόνηση. Ανάμιξη με έγχυση αερίου είναι σχετικά ήπια και αποτελεσματική και ταυτόχρονα μπορεί να εξυπηρετήσει την κατανομή των θρεπτικών συστατικών, την ανάμιξη της καλλιέργειας και τον έλεγχο του pH.

Η διοχέτευση του CO₂ εντός του πυθμένα των αντιδραστήρων γενικώς ευνοείται, αν και επιτυγχάνει μόνο μέτριες αποδόσεις μεταφοράς (13% έως 20%), λόγω της απώλειας του CO₂ στην ατμόσφαιρα, στη ρύπανση της διάχυσης και σε κακή μεταφορά μάζας (Kumar et al., 2010). Η ανάμιξη πρέπει να είναι σχεδόν συνεχής για την πρόληψη της καθίζησης της βιομάζας (Molina et al., 2001) και μπορεί να αντιπροσωπεύει τη σημαντικότερη εισροή ενέργειας για τη συντήρηση του αντιδραστήρα. Η έντονη ανάδευση μπορεί επίσης να δημιουργήσει διατμητική τάση στα κύτταρα μικροφυκών, ιδιαίτερα σε νηματοειδή ή με ευαίσθητη μορφολογία είδη (Greenwell et al., 2010).

1.1.9. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Μια ευρεία ποικιλία ανοικτών και κλειστών συστημάτων βιοαντιδραστήρων έχουν προταθεί για την καλλιέργεια μικροφυκών, αντανακλώντας την ποικιλομορφία, τη φυσιολογία και τις απαιτήσεις των διαφορετικών ειδών. Ο γενικός στόχος είναι η συνεχής διατήρηση ενός επιθυμητού συστήματος καλλιέργειας κάτω από συνθήκες

για τη βέλτιστη παραγωγικότητα. Σημαντικοί παράγοντες για την επίτευξη των παραπάνω στόχων (Richmond, 2000) είναι:

- Παροχή επαρκούς φωτός, παρά τις καθημερινές και εποχιακές διακυμάνσεις και την πυκνή καλλιέργεια των μικροφυκών.
- Βέλτιστη ανάμιξη και μεταφορά μάζας, αποφεύγοντας βλάβες στα κύτταρα από το φαινόμενο της διατμητικής τάσης.
- Ελαχιστοποίηση της απόκλισης από τη βέλτιστη θερμοκρασία (απαιτεί ψύξη το καλοκαίρι και θέρμανση το χειμώνα).
- Ελαχιστοποίηση του διαλυμένου οξυγόνου.
- Απλός καθαρισμός και συντήρηση.
- Ελαχιστοποίηση των απαιτήσεων εισόδου ενέργειας.
- Ελαχιστοποίηση της χρήσης νερού (π.χ., η εξάτμιση από λίμνες).
- Χαμηλές κεφαλαιουχικές και λειτουργικές δαπάνες ανά μονάδα προϊόντος που έχει συγκομισθεί.

1.1.9.1. ΑΝΟΙΧΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Ιστορικά, η συντριπτική πλειοψηφία των εμπορικών παραγωγών έχει πραγματοποιηθεί σε ανοιχτές δεξαμενές και εξακολουθούν να είναι το πιο ευρέως εφαρμοσμένο σύστημα αντιδραστήρα σε βιομηχανικές διεργασίες μικροφυκών. Τα ανοικτά συστήματα περιλαμβάνουν φυσικά υδάτινα σώματα όπως οριζόντιες ή κυκλικές λίμνες (**Εικόνα 1. 13**). Οι βασικοί περιορισμοί για την ανάπτυξη σε ανοικτές λίμνες είναι ότι είναι αδύνατο να ελεγχθεί η μόλυνση, να κρατηθεί η καλλιέργεια σταθερή και τέλος υπάρχει υψηλό κόστος για τη συγκέντρωση της βιομάζας (Carvalho et al., 2006).



Εικόνα 1. 13: Ανοιχτό σύστημα καλλιέργειας μικροφυκών. Πηγή εικόνας: <http://fashions-cloud.com/pages/a/algae-biofuel-open-pond/>.

1.1.9.2. ΚΛΕΙΣΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Παρά το γεγονός ότι είναι πιο ακριβά σε σύγκριση με τα ανοιχτά συστήματα, η υπόσχεση βελτιωμένων αποδόσεων καθώς και η δυνατότητα ανάπτυξης ενός ευρύτερου φάσματος ειδών, έχει οδηγήσει σε υψηλό ενδιαφέρον η καλλιέργεια σε κλειστούς αντιδραστήρες. Είναι πολύ πιο εύκολο για τον έλεγχο της μόλυνσης και λοιπών περιβαλλοντικών παραμέτρων, επιτρέποντας την καλλιέργεια των πιο ευαίσθητων στελεχών και την επέκταση του δυναμικού εύρους του προϊόντος. Η συγκέντρωση βιομάζας που λαμβάνεται είναι υψηλότερη από ό, τι σε ανοικτά συστήματα, μειώνοντας έτσι το κόστος της συγκομιδής. Ωστόσο, τα κεφάλαια και τα λειτουργικά έξοδα των κλειστών αντιδραστήρων είναι αρκετά υψηλότερα (Carvalho et al., 2006).

Μια μεγάλη ποικιλία σχεδίων από φωτο-βιοαντιδραστήρες έχουν προταθεί αλλά ελάχιστα έχουν εμπορευματοποιηθεί (Greenwell et al., 2010). Τα περισσότερα σχέδια βασίζονται στην αρχή της βελτιστοποίησης της παροχής φωτός, μεγιστοποιώντας την αναλογία χώρου προς τον όγκο, διασφαλίζοντας παράλληλα ένα λογικό όγκο εργασίας, το κόστος των υλικών του αντιδραστήρα, και μοτίβο της ανάμιξης (Carvalho et al., 2006). Ένα από τα κύρια προβλήματα με κλειστούς αντιδραστήρες είναι ο έλεγχος της θερμοκρασίας, και όσο μεγαλύτερη είναι η αναλογία περιοχής προς όγκο, η θερμοκρασία του μέσου επηρεάζεται άμεσα από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Το βέλτιστο μήκος της διαδρομής του φωτός είναι 2 έως 4 cm (Borowitzka, 1999), αλλά οι περισσότεροι κλειστού τύπου αντιδραστήρες έχουν μια μεγαλύτερη διάμετρο για ευκολία ανάμιξης, καθαρισμό, ρύθμιση της θερμοκρασίας καθώς και να αυξήσει τον όγκο εργασίας, μειώνοντας παράλληλα το κόστος των υλικών κατασκευής.

Ένα σημαντικό και συχνά παραλειπόμενο χαρακτηριστικό των κλειστών αντιδραστήρων είναι η ύπαρξη ευκολίας με την οποία μπορούν να καθαρίζονται και να απολυμαίνονται (Chisti, 2007). Η μόλυνση μπορεί να αποφευχθεί σε κλειστούς αντιδραστήρες, αλλά μόνον εφόσον λειτουργούν υπό στείρες συνθήκες, το οποίο προσθέτει στο κόστος παραγωγής (Scott et al., 2010). Λόγω του μεγάλου μεγέθους και εμβαδού της επιφανείας τους, δεν υπάρχει η δυνατότητα αποτελεσματικής αποστείρωσης με τη θερμότητα, απαιτώντας χημική αποστείρωση. Αυτό δεν είναι πάντα 100% αποτελεσματικό και μερικές φορές απαιτείται μεγάλος όγκος αποστειρωμένου ύδατος για να καθαριστεί πλήρως ο χημικός παράγοντας. Οι

περισσότεροι κλειστού τύπου φωτο-βιοαντιδραστήρες δεν πληρούν τις απαιτήσεις καλής πρακτικής παρασκευής για την παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων (Lee, 2001).

Οι πιο κοινοί τύποι φωτο-βιοαντιδραστήρων είναι σωληνοειδείς (Miyamoto et al., 1988; Richmond et al., 1993; Borowitzka, 1996; Vonshak, 1997) ή επίπεδες πλάκες (Hu et al., 1996; Vonshak, 1997).

1.1.9.3. ΣΩΛΗΝΟΕΙΔΕΙΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ

Οι σωληνοειδείς αντιδραστήρες (**Εικόνα 1. 14**) χαρακτηρίζονται από πολύ υψηλή περιοχή ως προς όγκο αναλογίες (ανάλογα με τη διάμετρο του σωλήνα), αλλά και από κακή μεταφορά μάζας, που οδηγεί σε συσσώρευση O_2 και εξάντληση του CO_2 , με αποτέλεσμα τη έναρξη της φωτοαναπνοής, την οξειδωτική βλάβη και τις διαφοροποιήσεις του pH. Οι σωλήνες κατασκευάζονται από πολυαιθυλένιο ή γυαλί. Τα πιο σημαντικά κριτήρια για το υλικό κατασκευής είναι η διαφάνεια ώστε να επιτρέπεται μια καλή διείσδυση του φωτός και το χαμηλό κόστος. Πρόσθετες προκλήσεις/κριτήρια αποτελούν η φωτο-αναστολή, ο έλεγχος της θερμοκρασίας καθώς και ακαθαρσίες που οφείλονται σε κύτταρα προσκολλώνται στο εσωτερικό των τοιχωμάτων του σωλήνα, οδηγώντας σε μειωμένη διείσδυση του φωτός (Michels et al., 2015; Ugwu et al., 2008).

Οι περισσότεροι σωληνοειδείς βιοαντιδραστήρες μπορούν να ταξινομηθούν σε μία από τις τρεις κατηγορίες:

1. Κάθετες αερογέφυρες ή στήλες φυσαλίδων που αποτελούνται από ένα διαυγές κατακόρυφο σωλήνα και η ανάμιξη γίνεται με διασκορπισμό του αερίου από τον πυθμένα.
2. Οριζόντια σωληνοειδή συστήματα που συνήθως στοιβάζονται οριζόντια και συνδέονται με ένα σύστημα μεταφοράς αερίου.
3. Ελικοειδής σωληνοειδείς αντιδραστήρες που αποτελούνται από λεπτό, και εύκαμπτο σωλήνα ο οποίος περιελίσσεται γύρω από ένα κυκλικό πλαίσιο.



Εικόνα 1. 14: Σωληνοειδείς βιοαντιδραστήρες παραγωγής βιομάζας μικροφυκών. Πηγή εικόνας: <http://www.algaeindustrymagazine.com/>.

1.1.9.4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ ΜΕ ΕΠΙΠΕΔΕΣ ΠΛΑΚΕΣ

Οι αντιδραστήρες με επίπεδη πλάκα (**Εικόνα 1. 15**) χαρακτηρίζονται από μια μεγάλη επιφάνεια και ένα χαρακτηριστικό της είναι ότι μειώνει τα επίπεδα O_2 σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα των σωληνοειδών αντιδραστήρων (Ugwu et al., 2008). Η παραγωγικότητα είναι μέγιστη στο ελάχιστο μήκος της διαδρομής του φωτός, αλλά για την επίτευξη της μέγιστης παραγωγής, απαιτείται ο όγκος της καλλιέργειας να διατηρείται σταθερός. Οι συγκεκριμένοι αντιδραστήρες έχουν όγκους εργασίας έως 1000 L (Carvalho et al., 2006), ενώ μπορούν να ρυθμιστούν κάθετα ή υπό γωνία (Huang et al., 2015). Τα πάνελ μπορούν να έχουν μια ανοικτή εξοχή για τη βελτίωση της μεταφοράς αερίου, αν και μια τέτοια ανοικτή ζώνη μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τις συνθήκες αποστείρωσης. Τα κύρια πλεονεκτήματα των αντιδραστήρων με επίπεδη πλάκα είναι η διανομή ομοιόμορφου φωτός, δηλαδή οι αντιδραστήρες μπορούν να τοποθετηθούν σε κατάλληλη κλίση ώστε να διατηρηθεί ο βέλτιστος προσανατολισμός προς τον ήλιο και η μειωμένη ανάγκη για άντληση αερίων, στην περίπτωση που για την καλλιέργεια απαιτεί η χορήγηση αέρα.



Εικόνα 1. 15: Βιοαντιδραστήρες με επίπεδες πλάκες παραγωγής βιομάζας μικροφυκών. Πηγή εικόνας: <http://www.chempuretech.com/renewable-energy-algae-photo-bioreactors.html>.

1.1.10. ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΠΡΟΣΤΙΘΕΜΕΝΗΣ ΑΞΙΑΣ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ

Τα μικροφύκη αντιπροσωπεύουν μια σημαντική πηγή πόρων (Metting, 1996). Η βιοποικιλότητα, η πολυπλοκότητα της χημικής σύνθεσής τους όσο και το φάσμα των βιοχημικών προϊόντων καθιστούν αυτούς τους οργανισμούς εκμεταλλεύσιμους πόρους για την αξιοποίησή τους ως νέα προϊόντα στον τομέα των τροφίμων, των ζωοτροφών, στην φαρμακευτική και την έρευνα βιομηχανίας (Pulz & Gross, 2004). Μέχρι σήμερα έχουν υπάρξει νέα πεδία έρευνας στον τομέα της βιοτεχνολογίας μικροφυκών που να ικανοποιεί τις νέες απαιτήσεις των προϊόντων της βιομηχανίας και των καταναλωτών.

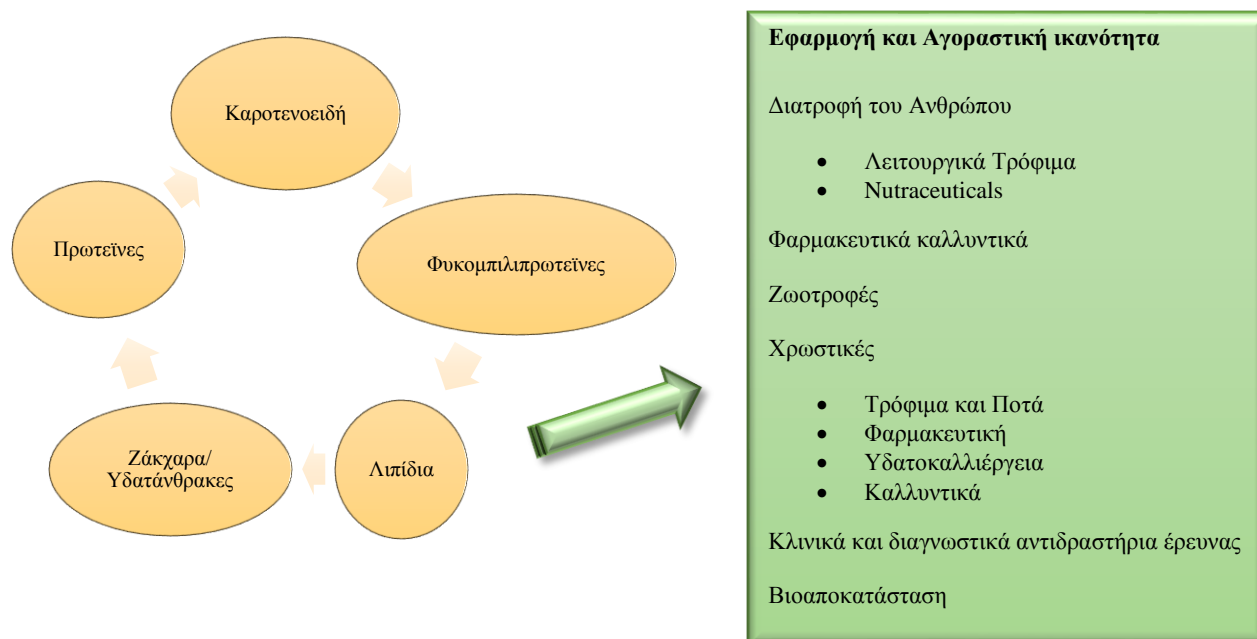
Η χρήση των μικροφυκών ως τροφή για ανθρώπινη κατανάλωση είναι μια μακράιωνη παράδοση. Πάνω από 2.000 χρόνια πριν, οι Κινέζοι διατρέφονταν με φύκη ώστε να επιβιώσουν (Milledge, 2011). Είδη όπως τα *Arthrospira* (σπιρουλίνα) και *Aphanizomenon* έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί εδώ και δεκαετίες ως πηγή τροφής. Παρά την πληθώρα των ιστορικών για χρήση από τον άνθρωπο, η καλλιέργεια μικροφυκών αποτελεί μια αρκετά νέα έρευνα στον τομέα της βιοτεχνολογίας, και η εμπορική χρήση τους είναι ουσιαστικά ανεκμετάλλευτη (Spolaore et al., 2006).

Το ενδιαφέρον για κατανάλωση φυκών ήρθε περίπου στη δεκαετία του 1950, ως αποτέλεσμα της αύξησης του παγκόσμιου πληθυσμού και την πρόβλεψη της ανεπαρκούς προσφοράς πρωτεϊνών προκάλεσε την αναζήτηση εναλλακτικών νέων πηγών (Spolaore et al., 2006). Σήμερα, η χρήση των μικροφυκών για τρόφιμο συνεχίζεται σε πολλά μέρη του κόσμου. Ωστόσο, η μεγάλη κλίμακα παραγωγής με σκοπό την εξάλειψη της θερμιδικής αξίας σε τρόφιμα και έλλειψη πρωτεϊνών δεν έχει πλήρως υλοποιηθεί (Milledge, 2011).

1.1.11. ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

Το πιο σημαντικό προϊόν της βιοτεχνολογίας από μικροφύκη, όσον αφορά τον όγκο της παραγωγής και της οικονομικής αξίας, είναι η παραγωγή βιομάζας (**Πίνακας 1. 2**), η οποία έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στους τομείς των καυσίμων και της ενέργειας. Επίσης, η θρεπτική αξία που τη χαρακτηρίζει οδήγησε στη χρήση της είτε ως ένα συμπλήρωμα διατροφής με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, είτε στην υδατοκαλλιέργεια είτε ως λειτουργικό τρόφιμο (nutraceutical) (Del Campo et al., 2007).

Τα είδη προϊόντων προστιθέμενης αξίας που προέρχονται από τη βιομάζα των μικροφυκών παρουσιάζονται αναλυτικά στην **Εικόνα 1. 16**.



Εικόνα 1. 16: Εφαρμογές βιομάζας μικροφυκών.

Πίνακας 1. 2: Η παγκόσμια παραγωγή βιομάζας μικροφυκών κατάλληλης για εμπορική χρήση.

Είδος	Παραγωγή	Χώρα	Εφαρμογή και Προϊόντα
	(tonnes y ⁻¹ dry weight)		
<i>Spirulina</i>	3.000	Κίνα, Ινδία, ΗΠΑ, Ιαπωνία	Διατροφή ανθρώπων και ζώων, φυκομυλιπρωτεΐνες, καλλυντικά
<i>Chlorella</i>	2.000	Ταϊβάν, Ιαπωνία, Γερμανία	Ανθρώπινη διατροφή, καλλυντικά, υδατοκαλλιέργεια,
<i>Dunaliella</i>	1.200	Αυστραλία, ΗΠΑ, Κίνα, Ισραήλ	Ανθρώπινη διατροφή, καλλυντικά, β-καροτένιο
<i>Nostoc</i>	600	Κίνα	Ανθρώπινη διατροφή
<i>Aphanizomenon</i>	500	ΗΠΑ	Ανθρώπινη διατροφή
<i>Haematococcus</i>	300	ΗΠΑ, Ινδία, Ισραήλ	Υδατοκαλλιέργεια, ασταξανθίνη

Στη συνέχεια αναλύονται μερικά από τα είδη προϊόντων προστιθέμενης αξίας που προέρχονται από τη βιομάζα των μικροφυκών.

1.1.11.1. ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΗ

Τα καροτινοειδή είναι λιποδιαλυτές ενώσεις με χαρακτηριστικό χρώμα που εμφανίζονται σε ανώτερα φυτά, μικροφύκη, καθώς και σε μη φωτοσυνθετικούς οργανισμούς (Del Campo, 2007; Takaichi, 2011). Τα καροτενοειδή συμβάλλουν στην απορρόφηση του φωτός, στη συντήρηση της δομής και της λειτουργίας των φωτοσυνθετικών συμπλόκων στα φυτά και στα μικροφύκη (Goto et al., 2015; Pulz & Gross, 2004). Βρίσκονται σε αφθονία στη φύση και είναι υπεύθυνες για πολλά διαφορετικά χρώματα όπως το κόκκινο, πορτοκαλί, κίτρινο καθώς και το χρώμα των βρώσιμων λαχανικών και φρούτων. Τα μικροφύκη συνδυάζουν τις ιδιότητες των ανώτερων φυτών με ορισμένες ιδιότητες των προκαρυωτικών. Ο συνδυασμός αυτός αντιπροσωπεύει το σκεπτικό για τη χρήση τους στην παραγωγή των καροτενοειδών και άλλων προϊόντων (Guedes et al., 2011). Επιπλέον, η παραγωγή των καροτενοειδών από μικροφύκη μπορεί εύκολα να μεγιστοποιηθεί με σωστό χειρισμό των συνθηκών ανάπτυξης. Υπό ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης, υπάρχει η δυνατότητα παραγωγής υψηλής ποσότητας καροτενοειδών, όπως β-καροτίνη, ασταξανθίνη και κανθαξανθίνη (Orosa et al., 2000).

1.1.11.1.1. ΕΜΠΟΡΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΩΝ

Υπάρχει μεγάλη ζήτηση για εύρεση φυσικών χρωστικών για εφαρμογή και χρήση στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων, και την υδατοκαλλιέργεια. Η χρήση των συνθετικών χρωστικών σε αυτούς τους κλάδους μειώνεται με αργούς ρυθμούς λόγω των τοξικών επιδράσεων τους. Οι χρωστικές ουσίες από μικροάλγη, όπως τα καροτενοειδή, έχουν χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτικές λύσεις των συνθετικών χρωστικών ουσιών σε διάφορες βιομηχανίες (Roso et al., 2015; Dufossé et al., 2005).

Επιπρόσθετα, τα καροτενοειδή έχουν χαρακτηριστεί και προσφάτως χρησιμοποιηθεί ως αντιοξειδωτικά. Εμφανίζουν αντιοξειδωτικές επιδράσεις που φαίνεται να είναι ευεργετικές στην αντιμετώπιση ασθενειών όπως ο καρκίνος, η παχυσαρκία και υπέρταση (Woodside et al., 2015; Inbaraj et al., 2006; Murthy et al., 2005)

1.1.11.2. ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ

Τα θαλάσσια μικροφύκη συμβάλλουν στη δημιουργία εκχυλισμάτων πλούσια σε πρωτεΐνες, βιταμίνες και ανόργανα συστατικά, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να ενσωματωθούν ως δραστικά συστατικά σε μια σειρά καλλυντικών προϊόντων (Saeid

& Chojnacka, 2015; Kim et al., 2008). Εκτός από ουσίες όπως καροτινοειδή, φυκοκυανίνες, και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα μικροφύκη παράγουν ένα σημαντικό αριθμό άλλων ωφέλιμων ενώσεων, ελκυστικό για τους παρασκευαστές καλλυντικών προϊόντων. Τα βασικότερα είδη μικροφυκών που χρησιμοποιούνται είναι: *Spirulina sp.*, *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata*, *Dunaliella salina* και *Anacystis nidulans*.

Οι ενώσεις αυτές διαθέτουν λευκαντικές ιδιότητες με σκοπό την τόνωση της επιδερμίδας, επιδρούν θετικά στη βελτίωση της δομής του δέρματος, δυνατότητες ενίσχυσης στη θεραπεία της σημηγατόρροιας (λιπαρό δέρμα προκαλείται από το υπερβολικό σμήγμα), και αντιφλογιστικές ιδιότητες (Kim et al., 2008). Μέχρι σήμερα έχει δημιουργηθεί μια νέα σειρά προϊόντων για το πρόσωπο και τη φροντίδα του δέρματος, όπως κρέμες αντι-γήρανσης, εντατικής θρέψης και ανανέωσης, προϊόντα αντηλιακής προστασίας και περιποίησης μαλλιών, προϊόντα με μαλακτικές και αντιφλογιστικές ιδιότητες (Balboa et al., 2015; Spolaore et al., 2006; Carlsson et al., 2007).

1.1.11.3. ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Η κατανάλωση των μικροφυκών περιορίζεται σε πολύ λίγα είδη (*Spirulina*, *Chlorella*, και *Dunaliella*). Η αγοραία αξία των προϊόντων πλούσια σε μικροφύκη (υγιεινά τρόφιμα) ανέρχεται σε US \$ 20-25 εκατομμύρια και είναι μακράν η μεγαλύτερη εμπορική εφαρμογή μικροφυκών (Vigani et al., 2015). Η *Spirulina* και *Chlorella* κυριαρχούν στην αγορά μικροφυκών. Η *Spirulina* είναι μια πηγή πρωτεΐνης, συγκρίσιμη με το κρέας και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, η οποία περιέχει επίσης μεγάλες ποσότητες βιταμίνης A και B12 (Freitas et al., 2015).

1.1.11.4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΛΙΠΑΣΜΑΤΑ

Η βιομάζα είναι το βασικό προϊόν της παραγωγής μικροφυκών και έχει διάφορες εφαρμογές. Το τελικό προϊόν της βιομάζας έχει συνήθως πράσινο ή πορτοκαλί χρώμα (Pülz & Gross, 2004). Όπως είναι γνωστό, τα περισσότερα εμπορικά λιπάσματα συνδέονται με το πετρέλαιο. Ωστόσο, η αύξηση της τιμής των καυσίμων επηρεάζει άμεσα και την τιμή κόστους αυτών. Μια οικονομικά αποδοτική και εναλλακτική λύση θα ήταν η χρήση της βιομάζας μικροφυκών ως οργανικό λίπασμα (<http://www.algaewheel.com>). Είδη του γένους *Chlamydomonas* έχουν χρησιμοποιηθεί ως βελτιωτικά εδάφους για τον έλεγχο της διάβρωσης του εδάφους

σε αρδευόμενα εδάφη στη Βόρεια Αμερική (Singh & Nigam, 2014). Η λογική πίσω από τη χρήση μικροφυκών ως βιολογικά λιπάσματα, είναι ότι έχουν τη δυνατότητα να αυξήσουν την ικανότητα δέσμευσης νερού και των μεταλλικών στοιχείων από το εδάφους (Pulz & Gross, 2004).

Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι τα μικροφύκη έχουν τη δυνατότητα να ανακτήσουν τα θρεπτικά συστατικά από τις ροές των αποβλήτων και στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί η βιομάζα τους ως λίπασμα βραδείας αποδέσμευσης (Corpens et al., 2016). Επίσης, η χρήση της *Spirulina platensis* ως βιολογικό λίπασμα φαίνεται να ενισχύει την ανάπτυξη των φυλλώδη λαχανικών, όπως *Eruca sativa*, *Ameranthus gangeticus* *B. rapa ssp. Chinensis* και *Brassica oleracea alboglabra* (Wuang et al., 2016).

Τα μικροφύκη, ως οργανικό λίπασμα, έχουν τη δυνατότητα να αποτρέψουν τις απώλειες θρεπτικών συστατικών μέσω της σταδιακής απελευθέρωσης του νατρίου (N), φωσφόρου (P) και καλίου (K), η οποία είναι εναρμονισμένη με τις απαιτήσεις των φυτών (Mulbry et al., 2007). Εκτός από τα μακροθρεπτικά συστατικά, οι φωτότροφοι μικροοργανισμοί περιέχουν επίσης ιχνοστοιχεία και φυτικές ουσίες που προάγουν την ανάπτυξη όπως φυτοορμόνες, βιταμίνες, καροτενοειδή, αμινοξέα, και αντιμυκητιακές ουσίες (Spolaore et al., 2006). Τα ευεργετικά χαρακτηριστικά της βιομάζας των φωτοτροφικών οργανισμών ως βιο-λιπάσματα, έχουν ήδη αποδειχθεί για τα κυανοβακτήρια, τα αναερόβια φωτότροφα βακτήρια και για τα μακροφύκη (Kobayashi & Kobayashi 1995; Tripathi et al., 2008; Kumari et al., 2011). Η εφαρμογή αυτών των βιο-λιπασμάτων τόνωσε την ανάπτυξη των φυτών και την αύξηση των αποδόσεων στις καλλιέργειες. Επιπλέον, η καλλιέργεια του λωτού και των καρπών τομάτας οδήγησε σε βελτίωση της ποιότητας των φρούτων λόγω της υψηλότερης συγκέντρωσης ζάχαρης και καροτενοειδών που ανιχνεύθηκε (Kobayashi & Kobayashi 1995; Kumari et al., 2011). Αυτό δείχνει ότι τα θρεπτικά συστατικά που ανακτώνται μέσω καλλιέργειας μικροφυκών, μπορούν να ανακυκλωθούν εκ νέου μέσω λιπασμάτων που βασίζονται στη βιομάζα μικροφυκών, με στόχο να βελτιώσει την ποιότητα και την αγοραία αξία των φρούτων και των λαχανικών (Corpens et al., 2016).

1.1.11.5. ΒΙΟ-ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

Η χρήση των μικροφυκών για την επεξεργασία αστικών λυμάτων υπήρξε το επίκεντρο της έρευνας και ανάπτυξης για δεκαετίες, δεδομένου ότι έχουν την

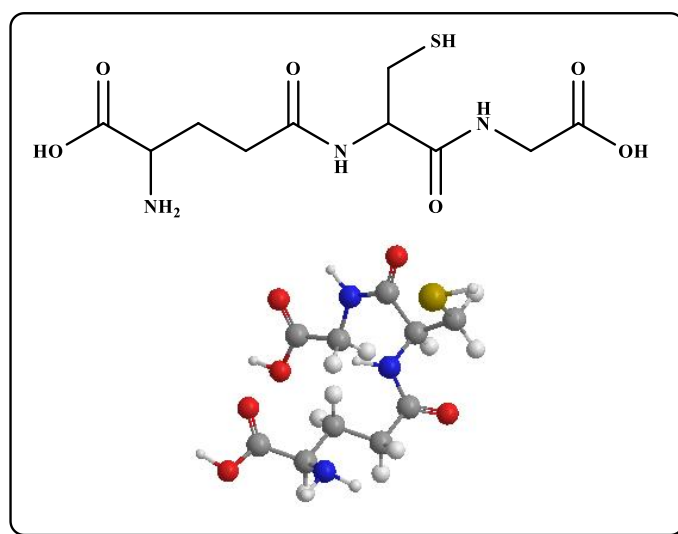
ικανότητα να μεταβολίζουν τα λυμάτων ταχύτερα από τα βακτήρια (Kouzuma & Watanabe, 2015; Nielsen, 2015; Olguín, 2003). Μέσω της φωτοσύνθεσης, τα μικροφύκη μπορούν να αφομοιώσουν νιτρικά και φωσφορικά άλατα καθώς και άλλα θρεπτικά συστατικά που υπάρχουν στα λύματα (<http://www.algaewheel.com>). Επιπλέον, το οξυγόνο που εκπέμπεται από φύκη είναι η κύρια συνεισφορά προς την επεξεργασία των αστικών λυμάτων και βιομηχανικών αποβλήτων. Τα συστήματα επεξεργασίας λυμάτων που βασίζονται σε μικροφύκη για την παραγωγή οξυγόνου, κυριαρχείται από τα χλωροφύκη (*Chlorophytes*) (Shoener et al., 2014).

Συγκεκριμένα, η παρουσία αναδύμενων ρυπαντών (emerging contaminants ή ECs) στο περιβάλλον έχει ήδη προκαλέσει τη δημόσια ευαισθητοποίηση (Murray et al., 2010). Οι ECs χρησιμοποιούνται καθημερινά σε μεγάλες ποσότητες και περιλαμβάνουν μια ευρεία ποικιλία ενώσεων όπως φαρμακευτικές ουσίες, προϊόντα προσωπικής φροντίδας, πλαστικοποιητές, επιβραδυντές φλόγας, επιφανειοδραστικές ουσίες αλλά και ορισμένα φυτοφάρμακα. Οι συμβατικές εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων δεν είναι σχεδιασμένες για τη σωστή αντιμετώπιση αυτού του είδους των ρύπων, όπου πολλές από αυτές τις ενώσεις μπορούν να ασκήσουν οικο-τοξικολογικά προβλήματα, ακόμη και σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις (Carballa et al., 2010; Muñoz et al., 2009; Henry et al. 2008). Πρόσφατα, η μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους de Godos et al. απέδειξε ότι η χρήση συστημάτων μικροφυκών, μπορεί να οδηγήσει στην απομάκρυνση του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη (de Godos et al., 2012). Σε συνέχεια της παραπάνω μελέτης, η ομάδα των Matamoros et al. παρουσίασε τα αποτελέσματα της θετικής επίδρασης της βιομάζας από μικροφύκη *Chlorella sp.* και *Scenedesmus sp.*, στη βιοαποικοδόμηση ουσιών όπως καφεΐνη (caffeine), ιβουπροφένη (ibuprofen), 4-οκτυλφαινόλη (4-octylphenol), tris-φωσφορικό 2-χλωροαιθύλιο [tris(2-chloroethyl) phosphate] και καρβαμαζεπίνη (carbamazepine) (Matamoros et al., 2016).

1.2. ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΕΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GSTs)

1.2.1. ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ (GLUTATHIONE, GSH)

Η γλουταθειόνη γνωστή και ως γλουταθείο, αποτελεί μια οργανική χημική ένωση με σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Είναι ένα τριπεπτίδιο, το μόριο του οποίου αποτελείται από τρία διαφορετικά αμινοξέα: το γλουταμινικό οξύ, τη κυστεΐνη (που περιέχει ένα άτομο θείου στην ένωση) και τη γλυκίνη (L-γ-γλουτάμυλο-L-κυστεΐνυλο-γλυκίνη; L-γ-glutamyl-L-cysteinyl-glycine) (Εικόνα 1. 17).



Εικόνα 1. 17: Χημική και τρισδιάστατη μορφή του μορίου της γλουταθειόνης (GSH).

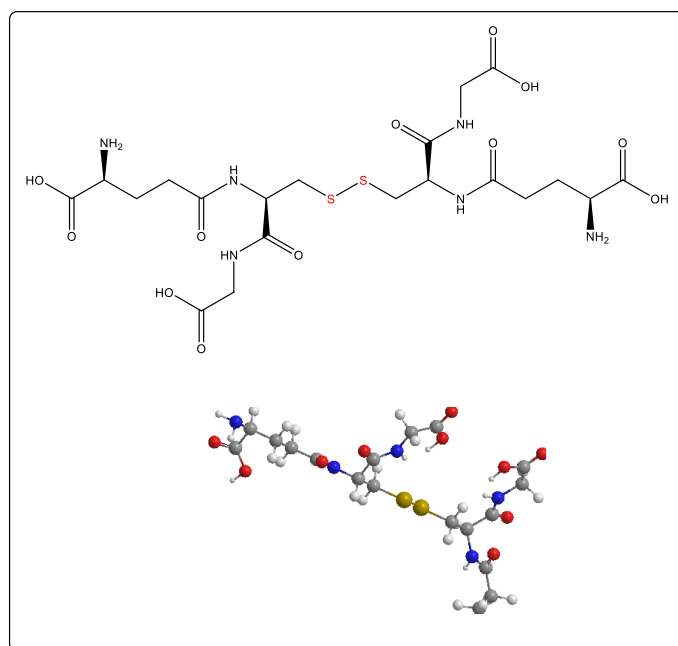
Στα κύτταρα εντοπίζονται σημαντικές ποσότητες μη πρωτεϊνικών θειολών οι οποίες συμμετέχουν σε μοριακές, φυσιολογικές και μεταβολικές λειτουργίες μέσω αντιδράσεων ανταλλαγής θειολών-δισουλφιδίων (Kunert & Foyer, 1993). Οι θειόλες αποτελούν ισχυρά αντιοξειδωτικά και εμπλέκονται στη σύνθεση του DNA και πρωτεϊνών και στην ενεργοποίηση και απενεργοποίηση ενζύμων.

Η γλουταθειόνη εντοπίστηκε και απομονώθηκε το 1921 από τον Hopkins στη ζυθοζύμη και στο ήπαρ των θηλαστικών, όπου και βραβεύτηκε με βραβείο Νόμπελ για τη διαδικασία προετοιμασίας του μορίου τα γλουταθειόνης σε κρυσταλλική δομή (Noctor et al., 2011). Από χημικής άποψης, είναι μία θειόλη και ταυτόχρονα ένα δικαρβονικό οργανικό οξύ. Αυτό το τριπεπτίδιο, με μοριακό βάρος 307.32, σε καθαρή μορφή είναι στερεό με σημείο τήξεως 195°C, πολύ ευδιάλυτο στο νερό αλλά αδιάλυτο στη μεθανόλη και στον διαιθυλαιθέρα. Αποτελεί τη σπουδαιότερη θειόλη που έχει βρεθεί τόσο σε φυτικά και ζωικά κύτταρα όσο και σε αερόβια βακτήρια (π.χ.

E. coli) σε συγκεντρώσεις από 0.5-10 mM (Noctor et al., 2012; Rouhier et al., 2008). Μέσα στους οργανισμούς η γλουταθειόνη υπάρχει σε δύο μορφές: στην ανηγμένη και οξειδωμένη. Αυτό επιτρέπει στο μόριο να συμμετέχει σε φαινόμενα οξειδοαναγωγής και αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες για τη σταθεροποίηση του δυναμικού της οξειδοαναγωγής στα κύτταρα.

Η γλουταθειόνη αποτελεί μια ουσία χρήσιμη για τον ανθρώπινο οργανισμό, την οποία υπάρχει η δυνατότητα σύνθεσης της από τα αμινοξέα που την αποτελούν. Η σουλφυδρολομάδα (SH) της κυστεΐνης λειτουργεί ως δότης πρωτονίων και είναι υπεύθυνη για τη βιολογική της δράση. Η κυστεΐνη, λόγω της περιορισμένης ποσότητας που εμφανίζει ως αμινοξύ, καθορίζει τον ρυθμό της κυτταρικής βιοσύνθεσης της GSH. Ειδικότερα, η βιοσύνθεση του τριπεπτιδίου πραγματοποιείται σε δύο αντιδράσεις, εξαρτώμενες από την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP). Αρχικά συντίθεται η γ-γλουταμυλοκυστεΐνη από το L-γλουταμινικό οξύ και τη κυστεΐνη δια του ενζύμου συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης και ακολουθεί η προσθήκη της γλυκίνη στο C-τελικό άκρο του μορίου της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης από τη δράση του ενζύμου συνθετάση γλουταθειόνης (Lu, 2013; Lushchak, 2012). Βιοσύνθεση της γλουταθειόνης γίνεται σε οργανισμούς όπως τα κυανοβακτήρια και τα πρωτεοβακτήρια, αλλά απουσιάζει σε πολλά άλλα βακτηρίδια. Οι περισσότεροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί συνθέτουν γλουταθειόνη, αλλά μερικοί όχι (τα γένη ψυχανθών *Entamoeba* και *Giardia*). Τα μοναδικά αρχαιοβακτήρια που συνθέτουν γλουταθειόνη είναι τα αλοβακτήρια.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η γλουταθειόνη υπάρχει στην ανηγμένη της μορφή (GSH), η οποία και αντιστοιχεί περισσότερο από 90% της ολικής ποσότητας γλουταθειόνης που μπορεί να βρεθεί σε ένα κύτταρο (Zhang & Forman, 2012). Ένα μικρό ποσοστό, συνήθως λιγότερο από 10%, συναντάται στην πλήρη οξειδωμένη μορφή της (GSSG-δισουλφίδιο της γλουταθειόνης) (**Εικόνα 1. 18**). Αυτή η μορφή προκύπτει ύστερα από την οξείδωση και το σχηματισμό δισουλφιδικής γέφυρας μεταξύ δύο μορίων γλουταθειόνης (Noctor et al., 2011). Επίσης, το μόριο της γλουταθειόνης μπορεί να σχηματίσει δισουλφιδική γέφυρα και με άλλα μόρια με μικρό μοριακό βάρος (π.χ. η ελεύθερη κυστεΐνη, το συνένζυμο A και οι θειολικές ομάδες πρωτεϊνών) (Mendoza-Cózatl et al., 2008).



Εικόνα 1. 18: Η χημική και τρισδιάστατη μορφή του μορίου της γλουταθειόνης στην οξειδωμένη της μορφή.

Η γλουταθειόνη, αποτελεί το πλέον κατάλληλο μόριο για τη διευθέτηση της θειολικής οξειδοαναγωγικής ισορροπίας που εξαρτάται από την αναλογία των θειολών προς τα δισουλφίδια (Dogan Karatas, 2016; Foyer & Noctor, 2011). Η βιολογική κατάσταση ενός κυττάρου σχετίζεται άμεσα με την οξειδοαναγωγική κατάσταση στην οποία βρίσκεται, επομένως ο λόγος GSSG προς GSH αποτελεί ένα σημαντικό δείκτη μιας τέτοιας κατάστασης και εκφράζεται ως αντιοξειδωτικό δυναμικό. Αυξημένος λόγος GSSG προς GSH θεωρείται ένδειξη οξειδωτικού στρες, διότι κυριαρχεί η οξειδωμένη μορφή GSSG (Mishra & Srivastava, 2015; Childs & Gronow, 2016).

1.2.2. ΡΟΛΟΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ

Η γλουταθειόνη είναι ευρέως διαδεδομένη τόσο σε κατώτερους όσο και σε ανώτερους οργανισμούς. Θεωρείται ο σημαντικότερος ρυθμιστής της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής κατάστασης και συμμετέχει στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μέσω της ενεργής σουλφυδρυλομάδας της κυστεΐνης (Mendoza- Cózatl, et al., 2005). *In vitro*, η γλουταθειόνη μπορεί να αντιδράσει άμεσα εξουδετερώνοντας ουσίες όπως η ρίζα υδροξυλίου, το υποχλωριώδες οξύ, το υπεροξυνιτρώδες (peroxynitrite), υπεροξυλικές και αλκοξυλικές ρίζες, ελεύθερες ρίζες. Ανάγει άμεσα το οξειδωμένο ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) μέσω της αναγωγάσης του διϋδροασκορβικού (May et al., 2003). Ταυτόχρονα υπάρχουν ενδείξεις για συμμετοχή στην ανακύκλωση της

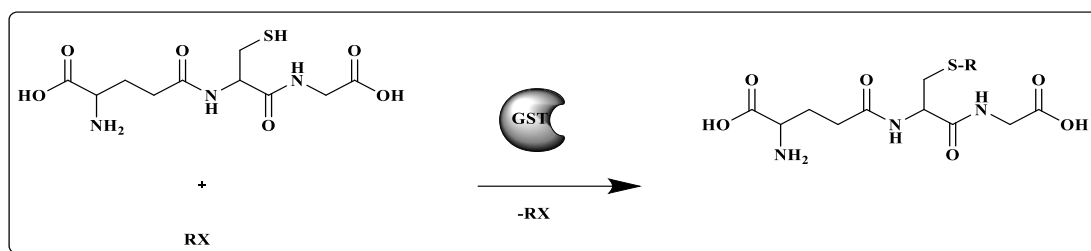
βιταμίνης E σε κάποια συστήματα μεμβρανών (Edwards & Dixon 2005). Εμποδίζει την οξείδωση των -SH ομάδων στις πρωτεΐνες και ρυθμίζει τον κύκλο του μονοξειδίου του αζώτου, που είναι κρίσιμος για τη ζωή. Έχει βρεθεί ότι η GSH αναστέλλει τη δράση της καταλάσης (Sun & Oberley, 1989), ενώ εμπλέκεται και σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως στη μεταγωγή κυτταρικών σημάτων (Khanna-Chopra & Chauhan, 2015).

Σημαντικός ρόλος της γλουταθειόνης στα κύτταρα διότι τα προστατεύει από παραπροϊόντα που προκύπτουν μέσω του κυτταρικού μεταβολισμού (π.χ. α-διακαρβονύλια όπως η μεθυλγλουξάλη). Επίσης, αποτελεί συμπαράγοντα στον καταβολισμό της μεθυλγλουξάλης σε οργανισμούς όπως οι ζύμες και τα θηλαστικά, όπως επίσης συμμετέχει στην αποτοξίνωση ενδογενών τοξικών ενώσεων (π.χ. φορμαλδεΐδη) (Lushchak, 2012; Noctor et al., 2012).

Η γλουταθειόνη κατέχει σημαντικό ρόλο στο φυτικό μεταβολισμό διότι αποτελεί δείκτης καταπονήσεων που οφείλονται σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες (Foyer & Noctor, 2009). Αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά συστατικά της μη-ενζυματικής αντιοξειδωτικής άμυνας και είναι μια ένωση ζωτικής σημασίας για την αποτοξίνωση, την κυτταρική φυσιολογία, το μεταβολισμό των θρεπτικών συστατικών, καθώς και τη ρύθμιση κυτταρικών διεργασιών συμπεριλαμβανομένων της γονιδιακής έκφρασης, την πρωτεϊνική σύνθεση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση, την παραγωγή κυτοκινών, και την ανοσοποιητική απόκριση (Rana et al., 2002; Townsend et al., 2003; Mishra & Srivastava, 2015).

1.2.3. ΜΕΤΑΦΟΡΑΣΕΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΙΟΝΗΣ (GSTs)

Οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης (glutathione S-transferases, GSTs) είναι πολυλειτουργικά ένζυμα που συμμετέχουν στο μηχανισμό αποτοξίνωσης του κυττάρου αδρανοποιώντας εξωγενείς ή ενδογενείς τοξικούς παράγοντες, δημιουργώντας μορφές λιγότερο βλαβερές (Cummins et al., 2013). Συγκεκριμένα, καταλύουν την πυρηνόφιλη προσβολή της GSH στο ηλεκτρονιόφιλο κέντρο μιας ένωσης, όπως την αντίδραση που παρουσιάζεται παρακάτω (**Εικόνα 1. 19**).



Εικόνα 1. 19: Αντίδραση πυρηνόφιλης προσβολής της GSH στο ηλεκτρονιόφιλο κέντρο μιας ένωσης RX. Όπου R: αλειφατική, αρωματική ή ετεροκυκλική ένωση, X: σουλφυδρυλική, νιτρώδες ή ομάδα με αλογόνο, R-GS: προϊόν σύνδεσης της ομάδας R με τη γλουταθειόνη.

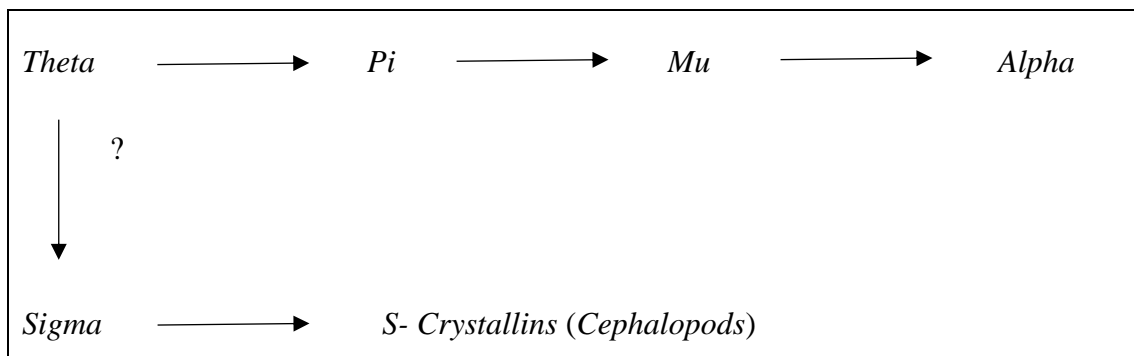
Η επιστημονική έρευνα για τα ένζυμα GSTs είναι πολύ σημαντικές διότι εμπλέκονται στην δημιουργία φαρμάκων για διάφορες ανθρώπινες ασθένειες (Πάρκινσον, Αλσχάϊμερ, καταρράκτης των ματιών, γήρανση, κύρωση του ήπατος, λευχαιμία κτλ.) (Carvalho et al., 2016; Wang, 2015; Sun et al., 2010; Chang et al., 2016; Weich et al., 2016). Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί σχεδόν σε όλους τους οργανισμούς, ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς και απαντούν ως ισοένζυμα (Soranzo et al., 2004; Oztetik, 2015). Οι μεταφοράσεις της γλουταθειόνης είναι γενικά ομο- ή ετεροδιμερή ένζυμα και διακρίνονται σε τρεις οικογένειες: κυτταροπλασματικές, μιτοχονδριακές (*κ* τάξης), τις μεμβρανικές MAPEG. (Chronopoulou & Labrou, 2009; Gill & Tuteja, 2010).

Οι GSTs των φυτών ανακαλύφθηκαν πριν από 40 χρόνια ενώ ελάχιστες μελέτες είχαν πραγματοποιηθεί μέχρι τη δεκαετία του '80, σε αντίθεση με τις GSTs από θηλαστικά, οι οποίες ήταν διαδεδομένες για το ρόλο τους στο μεταβολισμό των φαρμάκων (Cummins et al., 2011). Οι φυτικές GSTs έχουν μελετηθεί πολύ για την ικανότητα που παρουσιάζουν στο να μεταβολίζουν ζιζανιοκτόνα (Moons, 2005). Αυτά τα ένζυμα όμως παρουσιάζουν έλλειψη εξειδίκευσης ως προς τα ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα ενώ μπορούν να λειτουργούν ως καταλύτες σύζευξης με ένα μεγάλο φάσμα ενώσεων, όπως αλκυλο- και αρυλο- αλογονίδια, εποξειδία, υδροϋπεροξειδία, οργανικά νιτρικά άλατα, θεικούς και φωσφορικούς εστέρες (Powles & Yu, 2010).

1.2.4. ΦΥΛΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ GSTs

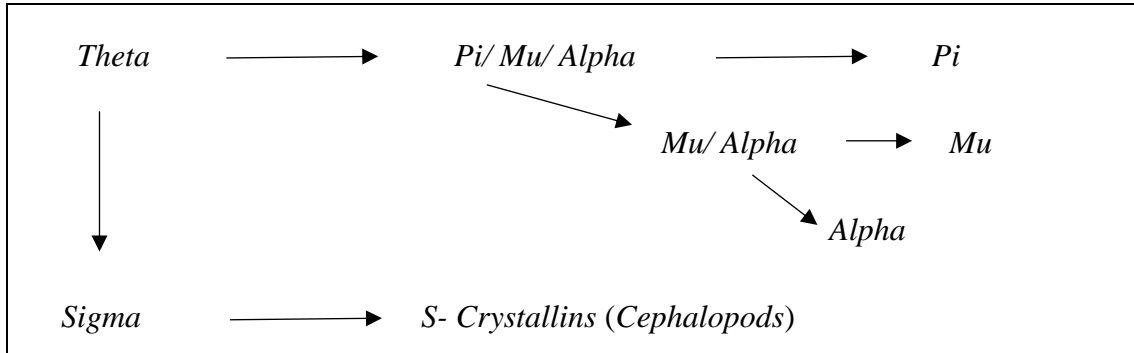
Οι εξελικτικές σχέσεις των κυτταροπλασματικών ισοενζύμων GST έχουν αποτελέσει αντικείμενο έρευνας. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το αρχέτυπο ένζυμο GST ανήκει στη *Theta* τάξη (Buetler & Eaton, 1992; Armstrong et al., 1996; Marrs, 1996; Salinas & Wong, 1999), διότι η *θ* τάξη έχει εμφανιστεί ανάμεσα σε μια μεγάλη ποικιλία

ειδών (βακτήρια, φυτά, θηλαστικά, κ.λπ.) και ταυτόχρονα διαθέτει απλή νουκλεοτιδική αλληλουχία (Toung et al., 1991; Leaver & George, 1995; Armstrong et al., 1996). Η συζήτηση ως προς το ποιες από τις τάξεις των GST απέκλιναν από την αρχέτυπη *Theta* τάξη περιορίζεται σε μερικές προτεινόμενες εξελικτικές πορείες (Buetler & Eaton, 1992; Armstrong et al., 1996; Salinas & Wong, 1999). Σύμφωνα με τους Buetler & Eaton η εξελικτική πορεία των μεμονωμένων τάξεων, όπως είναι γνωστές σήμερα, προέκυψαν από το διπλασιασμό ενός γονιδίου στην αρχέτυπη *Theta* μορφή. Με αυτό τον τρόπο δημιουργήθηκαν οι τάξεις *Pi* και *Mu*, και στη συνέχεια διαμορφώθηκε η *Alpha* τάξη (Buetler & Eaton, 1992). Επίσης, το εξελικτικό μοτίβο που προτάθηκε από τους Buetler & Eaton δεν εξακριβώνει τον τρόπο με τον οποίο προέκυψε η *Sigma* τάξη. Υποστηρίζουν ότι η συγκεκριμένη τάξη μπορεί να αποτελεί το αποτέλεσμα μιας εξελικτικής πορείας στενά συνδεδεμένη με πρώιμους οργανισμούς της *Mu* ή *Alpha* τάξης (Buetler & Eaton, 1992) (Εικόνα 1. 20).



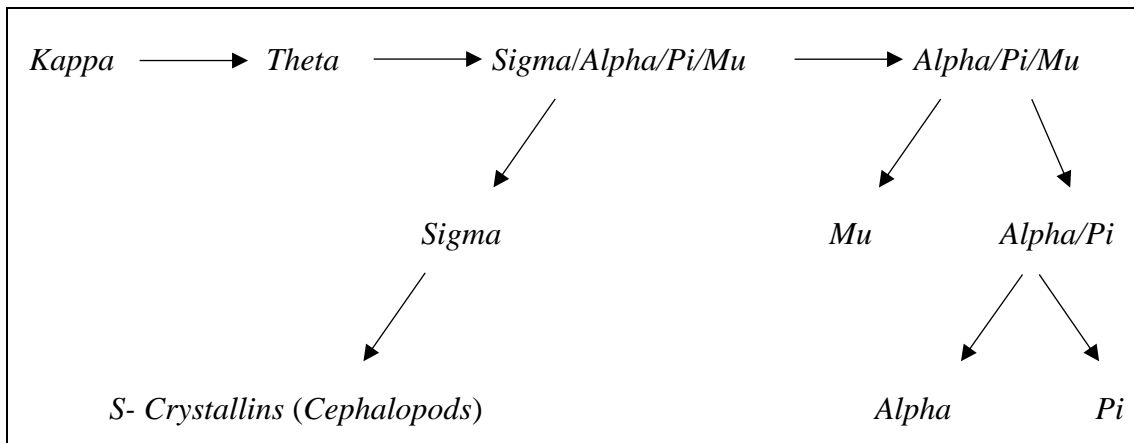
Εικόνα 1. 20: Εξελικτική σχέση μεταξύ των τάξεων *Alpha* (α), *Mu* (μ), *Pi* (π), *Theta* (θ), *S*-κρυστάλλινη, και *Sigma* (σ) όπως προτείνεται από Beutler και Eaton (Buetler & Eaton 1992; Blanchette et al., 2007).

Η εξελικτική πορεία που προτάθηκε από τους Salinas και Wong περιγράφει ότι οι επιμέρους ταξινομήσεις των GST, όπως είναι γνωστές σήμερα, δεν πηγάζουν άμεσα από τη θ τάξη αλλά από μια ενδιάμεση με χαρακτηριστικά των τριών σύγχρονων *Pi*, *Mu* και *Alpha* τάξεων. Επίσης, προτάθηκε ότι η *Sigma* τάξη προέκυψε απευθείας από την αρχέγονη *Theta*. Σύμφωνα με τα παραπάνω, από την ενδιάμεση τάξη αρχικά διαφοροποιήθηκε η *Pi* και στη συνέχεια η *Mu*, αφήνοντας την *Alpha* ως την τελευταία τάξη του εξελικτικού μονοπατιού (Salinas & Wong, 1992) (Εικόνα 1. 21).



Εικόνα 1. 21: Εξελικτική σχέση μεταξύ των τάξεων *Alpha* (α), *Mu* (μ), *Pi* (π), *Theta* (θ), *S*-κρυστάλλινη, και *Sigma* (σ) όπως προτείνεται από Salinas και Wong (Salinas & Wong 1992; Blanchette et al., 2007).

Η εξελικτική πορεία των GSTs που προτάθηκε από τον Armstrong (**Εικόνα 1. 22**), αν και παρόμοια με την εκείνη των Salinas και Wong, διαφοροποιείται. Χαρακτηριστικά, η πρότασή του στηρίχτηκε στις διαφορές της τρισδιάστατης μορφής και των αμινοξικών καταλοίπων. Για παράδειγμα, οι GSTs που ανήκουν στη θ τάξη έχουν ως καταλυτικό αμινοξύ την Tyr. Από την άλλη, η σύγκριση της τρισδιάστατης δομής υποδεικνύει μια σαφή διάκριση μεταξύ των τάξεων *Theta-Sigma* και *Alpha-Mu-Pi*. Οι τρεις τελευταίες τάξεις διαθέτουν ένα μοτίβο γνωστό ως “Κλειδί-κλειδαριά” στη διμερή επιφάνεια όπου το αμινοξικό κατάλοιπο της Phe (Κλειδί) βρίσκεται στη μια υπομονάδα και μια υδρόφοβη περιοχή (Κλειδαριά) η οποία βρίσκεται ανάμεσα σε δυο έλικες της απέναντι υπομονάδας. Το συγκεκριμένο μοτίβο δεν απαντάται στις GSTs των τάξεων *Theta* και *Sigma*. Ο Armstrong (1996) πρότεινε μια εξελικτική πορεία σύμφωνα με την οποία η *Sigma* τάξη δε θα μπορούσε να εξελιχθεί απευθείας από την αρχέγονη *Theta*, δεδομένου ότι η *Sigma* αποτελείται από αμινοξικά κατάλοιπα πιο στενά συνδεδεμένα με την ενδιάμεση τάξη *Sigma/Alpha/Mu/Pi* (Armstrong, 1997). Επίσης, οι Armstrong et al. (1996) πρότειναν ότι ο αρχικός πρόγονος της ευκαρυωτικής *Theta* τάξης αποτελεί η μικροσωμική τάξη *Kappa*, για την οποία ελάχιστα είναι γνωστά. Η *Kappa* προηγείται στην εξελικτική πορεία από τη βακτηριακή τάξη *Theta* (Armstrong, 1996). Η τελευταία διαφοροποίηση της πρότασης του Armstrong από εκείνη των Salinas και Wong αφορά την ενδιάμεση τάξη, όπου αρχικά διαφοροποιείται η *Mu* και ακολουθεί η *Pi* τάξη (Armstrong, 1997; Pemble & Taylor, 1992; Dirr et al., 1994).



Εικόνα 1. 22: Εξελικτική σχέση μεταξύ των τάξεων *Alpha* (α), *Mu* (μ), *Pi* (π), *Theta* (θ), *S*-κρυστάλλινη, *Kappa* (κ) και *Sigma* (σ) όπως προτείνεται από τον Armstrong (Armstrong, 1997; Blanchette et al., 2007).

Η θεωρία των Buetler και Eaton φαίνεται να μη δίνει επαρκεί στοιχεία για το διαχωρισμό των τάξεων GST. Είναι δύσκολο να κατανοηθεί πως οι αρχέγονοι οργανισμοί (κυρίως οι θαλάσσιοι) διαθέτουν δράση GST που ανήκουν σε εξελικτικά νεότερες τάξεις. Ως αποτέλεσμα η εξελικτική πορεία, όπως προτείνεται από τους Beutler και Eaton (1992), μπορεί να μην είναι κατάλληλη για την ταξινόμηση των θαλάσσιων GST. Μια πιο απλοϊκή και πιθανή εξήγηση θα ήταν η ύπαρξη των ενδιάμεσων τάξεων όπως προτείνεται από τους Salinas-Wong (1999) και Armstrong (1997). Όταν τα δεδομένα που συγκεντρώνονται για τα υδρόβια είδη που έχουν χαρακτηριστεί με ανάλυση αλληλουχίας αμινοξέων, εξειδίκευση υποστρώματος, ή ανοσοχημικές ιδιότητες, είναι προφανές ότι η προτεινόμενη εξελικτική πορεία της ενδιάμεσης τάξης είναι η πιο κατάλληλη (Blanchette et al., 2007)

Σήμερα, οι GSTs διακρίνονται σε τρεις διακριτές υπεροικογένειες:

1.2.4.1. ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΕΣ GSTs

Οι κυτταροπλασματικές GSTs αποτελούν την κυριότερη και περισσότερη μελετημένη υπεροικογένεια των μετασφαιρών. Με βάση την αμινοξική και νουκλεοτιδική τους αλληλουχία διαχωρίζονται σε τάξεις. Συγκεκριμένα, σε θηλαστικά εντοπίζονται οι τάξεις *alpha* (α), *mu* (μ), *pi* (π), *theta* (θ), *zeta* (ζ), *omega* (ω), *sigma* (σ), *kappa* (κ) (Mashiyama et al., 2014; Frova, 2003). Οι περισσότερο μελετημένες κυτταροπλασματικές GSTs στα θηλαστικά, είναι οι τάξεις *alpha*, *mu* και *pi* (Dourado et al., 2008). Τάξεις των GSTs έχουν βρεθεί και σε άλλους οργανισμούς. Για παράδειγμα, στα έντομα έχουν βρεθεί οι τάξεις *delta* (δ) και *epsilon* (ϵ), στα φυτά οι τάξεις *phi* (ϕ), *tau* (τ), *lambda* (λ) και η δευδροασκορβική αναγωγή (*DHAR*) (Fornai et al., 2001;

Kjellander et al., 2014) και τέλος στα βακτήρια οι τάξεις *beta* (β) και *chi* (χ). Στα φυτά έχουν βρεθεί, επίσης, εκπρόσωποι των τάξεων *theta* και *zeta* (Hossain et al., 2014). Οι τελευταίες εντοπίζονται κυρίως στα ζώα και στους μύκητες (McGoldrick et al., 2005). Υπάρχει μια συνεχόμενη αύξηση της υπεροικογένειας των κυτταροπλασματικών GSTs λόγω της συνεχούς αύξησης των διαθέσιμων γενετικών πληροφοριών. Τα μέλη που ανήκουν στην ίδια τάξη, παρουσιάζουν νουκλεοτιδική ομολογία μεγαλύτερη από 40-50%, αλλά μικρότερη από 25-30% ομολογία με GSTs άλλων τάξεων (Oakley, 2005).

1.2.4.2. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ GSTs

Τα μέλη που ανήκουν στην υπεροικογένεια των μιτοχονδριακών GSTs, χαρακτηρίζονται από ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό φωσφομυκίνη, το οποίο εμποδίζει τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, μπλοκάροντας το σχηματισμό του N-άκυλο-μουραμικού οξέος. Πρόκειται για ασυνήθιστα ένζυμα που ανήκουν στην κατηγορία των μεταλλοενζύμων (Raza et al., 2002). Φαίνεται να μην παρουσιάζουν καμία ομοιότητα με τις κυτταροπλασματικές GSTs ενώ καταλύουν διαφορετικές κατηγορίες χημικών αντιδράσεων (Morgenstern & Johansson, 2011). Η πρωτοταγή δομή τους δε σχετίζεται με καμία από τις άλλες οικογένειες των GSTs και επίσης δεν καταλύουν την προσθήκη της γλουταθειόνης σε συνήθη ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα (Aniya & Imaizumi, 2011).

1.2.4.3. MEMBRANΙΚΕΣ-ΜΙΚΡΟΣΩΜΙΚΕΣ GSTs

Η θέση στην οποία εντοπίζονται τα μέλη της υπεροικογένειας των μεμβρανικών μικροσωμικών GSTs, όπως αποκαλύπτει και το όνομα, είναι πάνω στις μεμβράνες. Δομικά τα ένζυμα αυτά είναι τριμερή με τρεις μη αλληλοεπιδρούσες ενεργές περιοχές και παρουσιάζουν ομοιότητα με ένζυμα όπως η συνθάση του λευκοτριενίου C4 και η πρωτεΐνη ενεργοποίησης της 5-λιποξυγονάσης (Nebert & Vasiliou, 2004). Διαφέρουν με τις κυτταροπλασματικές GSTs κυρίως ως προς τις ανοσολογικές ιδιότητες ενώ συμμετέχουν στο μεταβολισμό τοξικών ξеноβιοτικών ουσιών. Έχουν μελετηθεί και χαρακτηριστεί περισσότερο στα θηλαστικά τόσο δομικά όσο και λειτουργικά. Τέλος, μέλη των μικροσωμικών GSTs έχουν βρεθεί σε φυτά, σε μύκητες και σε βακτήρια (Guo & Ki, 2014; Vuilleumier & Pagni, 2002).

Πίνακας 1. 3: Ταξινόμηση GSTs από διάφορα είδη οργανισμών.

Οργανισμός	Τάξη
Θηλαστικά	<i>Alpha</i> (α) <i>Mu</i> (μ) <i>Pi</i> (π) <i>Sigma</i> (σ) <i>Theta</i> (θ) <i>Zeta</i> (ζ) <i>Omega</i> (ω)
Φυτά	<i>Theta</i> (θ) <i>Zeta</i> (ζ) <i>Phi</i> (ϕ) <i>Hemerytrin</i> <i>Metaxin</i> <i>GS HQR</i> <i>mPGES2</i> <i>Ure2p</i> <i>EF1Bgamma</i> <i>Tau</i> (τ) <i>Lambda</i> (λ) <i>DHAR</i> <i>TCHQD</i> <i>Iota</i>
Έντομα	<i>Delta</i> (δ) <i>Epsilon</i> (ϵ) <i>Theta</i> (θ) <i>Sigma</i> (σ) <i>Zeta</i> (ζ) <i>Omega</i> (ω)
Βακτήρια	<i>Beta</i> (β) <i>Chi</i> (χ) <i>Theta</i> (θ) <i>Zeta</i> (ζ)
Μύκητες	<i>Alpha</i> (α) <i>M</i> (<i>Mu</i>) <i>Gamma</i> (γ)
Θαλάσσιοι οργανισμοί	<i>Sigma</i> (σ) <i>Omega</i> (ω)

1.2.5. ΔΟΜΗ GSTs

Οι GSTs είναι ένζυμα των 50,000 Da, αποτελούμενα από δύο υπομονάδες μοριακής μάζας 20-28 kDa η καθεμία και σχηματιζόμενα από 250-250 αμινοξικά κατάλοιπα. Μπορεί να είναι είτε ομοδιμερείς (προϊόν που προκύπτει από ένα γονίδιο) είτε ετεροδιμερείς (προϊόν από διαφορετικά γονίδια), με τις τελευταίες να εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι η επαγωγή τους πραγματοποιείται σε συνθήκες καταπόνησης παρουσία ορμονών (Schröder, 2001).

Σε κάθε υπομονάδα του διμερούς υπάρχουν δύο ανεξάρτητες περιοχές δέσμησης υποστρώματος: μια εξειδικευμένη περιοχή (G-θέση) που δεσμεύει τη GSH στο N-τελικό άκρο και μια μη εξειδικευμένη περιοχή (H-θέση) στην οποία δεσμεύονται τα υδρόφοβα ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα στο C-κάρβοξυ τελικό άκρο το οποίο και αποτελεί το ένα τρίτο της πρωτεΐνης (Oakley, 2011). Οι περιοχές αυτές ενώνονται με ένα μικρό ευμετάβλητο τμήμα που φέρει 5-10 κατάλοιπα. Η G- και H- θέση του ενζύμου μπορούν να υφίστανται δομικές ανακατατάξεις, γεγονός που δηλώνει ότι οι υπομονάδες της GST υφίστανται σημαντικές αλλαγές όταν ενώνεται με άλλα υποστρώματα (Kuang et al., 2015). Τα αμινοξικά κατάλοιπα της G-θέσης σε κάποιες τάξεις είναι σε προσβάσιμη θέση (όπως στην α , μ και π) ενώ σε κάποιες άλλες τάξεις δεν είναι αρκετά προσβάσιμη (όπως στη θ και ζ). Σε αυτή τη θέση βρίσκεται το συντηρημένο καταλυτικό αμινοξικό κατάλοιπο που αλληλεπιδρά και ενεργοποιεί τη σουλφυδρυλομάδα της γλουταθειόνης (GSH) με αποτέλεσμα να προκύψει το καταλυτικά ενεργό ανιόν του σουλφυδρυλίου (GS^-) (Labrou et al., 2001; Oakley, 2005; Frova, 2006). Το συγκεκριμένο αμινοξικό κατάλοιπο διαφέρει σημαντικά μεταξύ των τάξεων και απαντά στην "καταλυτική" θηλειά μετά το β_1 έλασμα (Oakley, 2001). Οι τάξεις α , μ , π των θηλαστικών, σ των θηλαστικών και των εντόμων έχουν καταλυτικό αμινοξύ τη Tyr; Οι τάξεις θ και ζ των θηλαστικών, οι τάξεις θ , ζ , φ , τ των φυτών και οι δ , ϵ , θ , ζ των εντόμων έχουν ως καταλυτικό αμινοξύ τη Ser; Η τάξη σ των θηλαστικών, οι τάξεις λ , DHAR και ι των φυτών, σ των εντόμων και β των βακτηρίων έχουν ως καταλυτικό αμινοξύ τη Cys.

Η ανάλυση των κρυσταλλικών δομών έδειξε ότι όταν το καταλυτικό αμινοξύ είναι η Tyr ή η Ser, οι υδροξυλομάδες των συγκεκριμένων αμινοξέων δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με τη σουλφυδρυλομάδα της γλουταθειόνης και προκαλούν το σχηματισμό ενός θειολοανιόντος. Αντίστοιχα το καταλυτικό αμινοξύ Cys οδηγεί σε σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών (Oakley, 2011). Επίσης, η ανάλυση της

κρυσταλλικής δομής διαλυτών GSTs επιβεβαιώνει τη συμμετοχή αρκετών αμινοξικών καταλοίπων του ενεργού κέντρου σε συνδυασμό με ένα συντηρημένο λειτουργικά δίκτυο κατανομής ηλεκτρονίων στο σχηματισμό και σταθεροποίηση του σουλφυδριλοανιόντος (-RS⁻). Χαρακτηριστικά, το αμινοξικό κατάλοιπο Arg18, θετικά φορτισμένο και συντηρημένο σε όλες τις τ τάξεις, φαίνεται να έχει έμμεσο ρόλο στη δέσμευση της GSH και στη σταθεροποίηση της δομής (Acharli et al., 2009).

Η *cis*- προλίνη, ένα αμινοξύ που απαντάται στο τέλος του β_3 ελάσματος της N-τελικής περιοχής των κυτταροπλασματικών και μιτοχονδριακών GSTs, είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση μέσω δεσμών υδρογόνου με τις αμινομάδες της κυστεΐνης της GSH. Η έλικα α_2 εμφανίζει μεγαλύτερη διαφοροποίηση μεταξύ των τάξεων GSTs και ο ρόλος της αφορά στην αλληλεπίδραση των αμινοξικών καταλοίπων της περιοχής με τη γλυκίνη της GSH. Τέλος, η G-θέση διαθέτει θετικά φορτισμένο ηλεκτροστατικό δυναμικό και είναι χαρακτηριστικό όλων των GSTs (Labrou et al., 2001). Σε αντίθεση, η H-θέση εμφανίζει δομική ευελιξία με αποτέλεσμα να προσδένονται ποικιλία ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων με πάνω από έναν προσανατολισμούς (Josephy & Mannervik, 2006).

Για τη δημιουργία της τεταρτοταγούς δομής, οι αλληλεπιδράσεις που πραγματοποιούνται μεταξύ των υπομονάδων είναι οι δεσμοί υδρογόνου, οι γέφυρες άλατος, οι υδρόφιλες/υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και το μοτίβο κλειδί-κλειδαριά το οποίο και συγκρατεί τις υπομονάδες ενωμένες. Συγκεκριμένα, το τελευταίο προκύπτει από την υδρόφοβη αλληλοεπίδραση ενός αρωματικού καταλοίπου της N-περιοχής, το οποίο λειτουργεί ως “κλειδί” και ενσωματώνεται στην “κλειδαριά” που έχουν δημιουργήσει τα κατάλοιπα της C-τελικής περιοχής της άλλης υπομονάδας. Σύμφωνα με την ομάδα του Hayes, στην α τάξη των GSTs, η πλευρική αλυσίδα του καταλοίπου Val50 στην N-τελική περιοχή, έχει το ρόλο του “κλειδιού”, το οποίο “κλειδώνει” σε μια υδρόφοβη κοιλότητα σχηματιζόμενη από τα κατάλοιπα της α_4 και α_5 έλικας στην C-τελική περιοχή της άλλης υπομονάδας (Hayes et al., 2005). Αυτό το μοτίβο είναι χαρακτηριστικό των τάξεων φ , τ , α , μ και π (Hayes et al., 2005). Τυχόν μεταλλάξεις στο αμινοξικό κατάλοιπο “κλειδί” οδηγεί σε δραστικές δομικές ή/και λειτουργικές αλλαγές στο ένζυμο (Sayed et al., 2000; Stenberg et al., 2000).

Ο δεύτερος τύπος αλληλοεπιδράσεων των δυο υπομονάδων βασίζεται στις υδρόφιλες αλληλοεπιδράσεις. Συγκεκριμένα, έρχονται σε επαφή μεταξύ τους μέσω αλληλοεπιδράσεων της N-τελικής περιοχής της μια υπομονάδας με τη C-τελική

περιοχής της άλλης με τη βοήθεια ενός υδρόφιλου καναλιού που διασχίζει το διμερές. Η επαφή των δυο υπομονάδων περιλαμβάνει αρκετά από τα δευτερεύοντα δομικά στοιχεία στα συμπεριλαμβάνονται οι β_4 , α_3 , α_4 και α_5 (Ji et al., 1995). Το μοτίβο αυτό φαίνεται να έχουν οι τάξεις σ (Ji et al., 1995) και θ (Rossjohn et al., 1998) των GSTs. Λόγω αυτής της εξειδίκευσης μεταξύ των υπομονάδων των GSTs, εμποδίζεται η δημιουργία ετεροδιμερών μεταξύ υπομονάδων διαφορετικών τάξεων. (Hayes et al., 2005; Frova, 2006). Ετεροδιμερή μπορεί όμως να σχηματιστούν μεταξύ υπομονάδων ομοίων τάξεων (Dixon & Edwards 2002).

1.2.6. ΡΟΛΟΙ ΚΑΙ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ GSTs

Τα ένζυμα GSTs είναι γνωστά κυρίως ως ένζυμα αποτοξίνωσης (Henderson et al., 2014). Η μεταβολική αποτοξίνωση των ξενοβιοτικών ή των ξένων οργανικών ενώσεων είναι μια γνωστή διαδικασία σε διάφορους οργανισμούς και έχει ευεργετικούς ρόλους στην αποτοξίνωση των διαιτητικών τοξινών και των καρκινογόνων οργανικών ρύπων. Επίσης, είναι πασίγνωστα για το ρόλο τους στην αντίσταση σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα καρκίνου, σε εντομοκτόνα, σε μυκητοκτόνα και σε μικροβιακά αντιβιοτικά (Tesauro et al., 2015). Γενικότερα, όμως, έχει τεκμηριωθεί ένας αριθμός μη καταλυτικών λειτουργιών των GSTs, όπως η ενζυμική αποτοξίνωση μέσω συμπλοκοποίησης με γλουταθειόνη, ο ρόλος των κυττάρων στην οξειδωτική καταπόνηση, η ενδοκυτταρική μεταφορά φυσικών μεταβολιτών από GSTs, η θεραπευτική σήμανση ασθενειών καθώς και η κατάλυση αντιδράσεων βιομετατροπής που εξαρτώνται από τη γλουταθειόνη.

Η χαρακτηριστική δραστηριότητα των GSTs αποτελεί η σύζευξη ηλεκτρονιόφιλων ενώσεων με το τριπεπτίδιο της γλουταθειόνης (GSH). Η σύζευξη αυτή έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της χημικής δραστηριότητας, την αύξηση της διαλυτότητας και τη διευκόλυνση μεταφοράς των ενώσεων αυτών μέσω των μεμβρανών, τον περιορισμό τους στο εσωτερικό του κυττάρου και γενικότερα στον οργανισμό και, σε κάποιες περιπτώσεις, το σχηματισμό δευτερογενών μεταβολιτών (Chronopoulou et al., 2011). Οι διάφοροι ρόλοι των GSTs αναφέρονται στη συνέχεια.

1.2.6.1. ΝΟΥΚΛΕΟΦΙΛΗ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

Η πιο συνήθης ενζυμική δοκιμή για τον έλεγχο δραστηριότητας GST γίνεται με το υπόστρωμα 1-χλώρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB), διότι τα αλογονίδια (οι νιτροομάδες των υποστρωμάτων) αποτελούν ήπια ηλεκτρονιόφιλα και αντιδρούν εύκολα

με τη GSH. Η αντίδραση της νουκλεόφιλης υποκατάστασης γίνεται μέσω της εξουδετέρωσης του βραχύβιου ενδιάμεσου σ-συμπλόκου (Hayes et al., 2005). Σύμφωνα με τους Board & Menon, η αντίδραση δέσμευσης της GSH, πιστεύεται ότι ενεργοποιείται από την αρχική μείωση της pKa της γλουταθειονύλ-θειόλης όταν δεσμεύεται στη G-θέση του ενζύμου. Η μείωση της pKa προάγει την αποπρωτονίωση της θειόλης και έτσι σχηματίζεται το νουκλεόφιλο σουλφιδριλικό ανιόν (RS⁻) (Board & Menon, 2013).

1.2.6.2. ΔΡΑΣΗ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ GPx

Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPxs) ως σημαντικά αντιοξειδωτικά ένζυμα αποτελούν αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας. Είναι σελινο-ένζυμα και ο ρόλος τους είναι η προστασία των κυττάρων από την οξειδωτική καταπόνηση. Καταλύουν την αναγωγή υπεροξειδίων χρησιμοποιώντας τη GSH ως αναγωγικό μέσο (Mills, 1957). Οι GPxs παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες με τις GSTs όσον αφορά τη δομή του ενεργού κέντρου και της θέσης δέσμευσης της GSH (Martin, 1995). Πολλές GSTs έχουν βρεθεί να έχουν δράση υπεροξειδάσης (Board et al., 1997, Eshdat et al., 1997, Chronopoulou et al., 2012b).

Όπως είναι γνωστό, οι GSTs φαίνεται να συνεισφέρουν ενεργά στην ενδοκυττάρια διαδικασία των ιστών (Davydov et al., 2004; Esterbauer et al., 1985) και στον καταβολισμό των αλδευδών που προκύπτουν σε συνθήκες καταπόνησης (Leonarduzzi et al., 2000; Spiteller, 2001). Επομένως, διαφοροποιήσεις στη λειτουργία των GSTs μπορεί να οδηγήσουν σε ευαισθησία ανταπόκρισης ενός οργανισμού στους διάφορους στρεσογόνους παράγοντες κατά τη διάρκεια της γήρανσης (Chen & Yu, 1996).

Η α τάξη αποτελείται από GSTs που παρουσιάζουν δράση υπεροξειδάσης ανάγοντας τα υπεροξείδια από τα λιπαρά οξέα και τα φωσφολιπίδια, ενώ υπάρχει ιδιαίτερη προτίμηση ως προς το υπόστρωμα τη 4-υδροξυ-ενενάλη (4-HNE), προϊόν λιπιδικής υπεροξειδωσης (Yang et al., 2003).

Οι GPxs που συναντώνται στους φυτικούς οργανισμούς διαχωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: οι εξαρτώμενες από το σελήνιο (Se) (Sabeh et al., 1993), οι υπεροξειδάσες γλουταθειόνης φωσφολιπιδίων (PHGPxs) (ανεξάρτητες Se) και οι GSTs με δράση υπεροξειδάσης εξαρτώμενης της GSH (Eshdat et al., 1997).

Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης GPXs (EC 1.11.1.9) απαντούν ευρέως και στα φυτικά κύτταρα και ο ρόλος τους αφορά στην αναγωγή του H₂O₂, των οργανικών και λιπιδιακών υδροϋπεροξειδίων που παράγονται κάτω από συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης (Navrot et al., 2006). Επίσης, φυτικές GSTs των τάξεων φ και τ έχουν βρεθεί να έχουν δράση GPx (Basantani & Srivastava, 2007). Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι GST ένζυμο της τ τάξης από τομάτα φαίνεται να παρουσιάζει υψηλή δράση GPx, η οποία εμποδίζει τη θανατηφόρο επίδραση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax στη ζύμη (Kampranis et al., 2000).

1.2.6.3. ΔΡΑΣΗ ΙΣΟΜΕΡΑΣΗΣ

Τα ένζυμα GST καταλύουν αντιδράσεις ισομερίωσης μέσω μετατόπισης διπλών δεσμών, ενδομοριακών αντιδράσεων οξειδοαναγωγής και μέσω ισομερίσεων *cis-trans* (Deponte, 2013).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα ισομερίωσης μέσω μετατόπισης διπλών δεσμών αποτελεί το ένζυμο GSTA3-3 από τον άνθρωπο (α τάξη), παρουσιάζοντας σημαντική δράση ισομεράσης $\Delta 5$ - $\Delta 4$ με επιλεγμένα κετοστεροειδή (Johansson & Mannervik, 2001). Τα ένζυμα GSTM2-2 και GSTM3-3 καταλύουν αντιδράσεων οξειδοαναγωγής, και συγκεκριμένα καταλύουν την ισομερίωση της προσταγλανδίνης PGH₂ σε συνθάση της προσταγλανδίνης PGE₂ (Beuckmann et al., 2000). Επίσης, GSTs της σ τάξης, καταλύουν την ισομερίωση της PGH₂ σε PGD₂ (Jowsey et al., 2001). Αντιδράσεις ισομερίωσης *cis-trans* πραγματοποιούν τα ένζυμα GSTs της ζ τάξης, με τη συμμετοχή τους στον καταβολισμό της τυροσίνης (Dixon & Edwards, 2006).

1.2.6.4. ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΑΝΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΘΕΙΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ

Η σ τάξη αποτελείται από GSTs που καταλύουν αντιδράσεις αναγωγής και θειομεταφοράς, με τα αμινοξικά κατάλοιπα Cys να παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο (Board & Menon, 2013). Για παράδειγμα, η ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του ένζυμου GSTO1-1 έδειξε ότι το αμινοξικό κατάλοιπο Cys32 σχηματίζει δισουλφιδικό δεσμό με τη γλουταθειόνη (Board & Anders, 2007), όπως επίσης οι GSTs των τάξεων DHAR και λ , λειτουργούν ως θειοτρανσφεράσες (Dixon et al., 2002a).

1.2.6.5. ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΥΛΙΩΣΗ

Η γλουταθειονυλίωση, δηλαδή η δημιουργία αντιστρεπτών δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των πρωτεϊνικών θειολών και της γλουταθειόνης, συνδέεται με την

οξειδωτική καταπόνηση (Board & Menon, 2013; Fratelli et al., 2003) και αποτελεί αντίδραση πρώτη γραμμή άμυνας. Το ένζυμο GSTP1-1, που έχει βρεθεί στον ανθρώπινο οργανισμό, φαίνεται ότι συμμετέχει στον κύκλο της γλουταθειονυλίωσης και ο ρόλος του είναι να καταλύει την αντίδραση πρωτεΐνης –S-γλουταθειονυλίωσης, η οποία μιμείται την κλασική νουκλεόφιλη αντίδραση σύζευξης με GSH (Townsend et al., 2009)

1.2.6.6. ΛΟΙΠΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

Άλλες καταλυτικές λειτουργίες των GSTs αποτελούν η προσθήκη της γλουταθειόνης σε εποξειδία, σε διπλούς δεσμούς άνθρακα και σε ισοθειοκυανικά παράγωγα. Επίσης, τα ένζυμα GSTs έχει και μη καταλυτικό ρόλο, καθώς έχουν την ιδιότητα να δεσμεύουν διάφορες ενώσεις οι οποίες δεν αποτελούν υποστρώματα (όπως αίμη, χολερυθρίνη, ξενοβιοτικά, στεροειδή και αζοχρώματα) (Oakley, 2011). Τέτοια ιδιότητα εμφανίζουν οι GSTs της α τάξης (Hayes & Pulford, 1995), ενώ το ένζυμο GSTF2 από το φυτό *Arabidopsis* φαίνεται να δεσμεύει επιλεκτικά την φυτοαλεξίνη-καμαλεξίνη και την φλαβονόλη quercetin-3-O-rhamnoside (Dixon et al., 2011).

1.2.7. GSTs ΑΠΟ ΘΑΛΑΣΣΙΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

Το υδάτινο περιβάλλον επηρεάζεται από την παρουσία περιβαλλοντικών ξενοβιοτικών ενώσεων. Ένα από τα σημαντικότερα ένζυμα αποτοξίνωσης αυτών των ενώσεων ανήκουν στην τάξη των S-τρανσφερασών της γλουταθειόνης (GSTs). Παρ όλα αυτά, δεν υπάρχουν αρκετά βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τις θαλάσσιες GSTs. Σε γενικές γραμμές, οι μελέτες που υπάρχουν διαθέσιμες για τις θαλάσσιες GSTs, έχουν ως επίκεντρο την ανάμειξή τους στην αντιμετώπιση περιβαλλοντικών ρύπων, όπως τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCB), το διχλωρο-διφαινυλοτριχλωροαιθάνιο (DDT) και τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAH). Αν και τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις μελέτες αυτές μπορούν να παρέχουν μια γενική εικόνα των θαλάσσιων GSTs, υπάρχει ανάγκη για περαιτέρω έρευνα.

Στις τάξεις των μη υδρόβιων GSTs υπάρχει τουλάχιστον ένα μέλος που έχει χαρακτηριστεί πλήρως, σε αντίθεση με τις θαλάσσιες. Μεταξύ της ομάδας των θαλάσσιων GSTs που έχουν μελετηθεί, στην πλειοψηφία τους αφορά κυρίως ψάρια, όπως τα είδη *Dicentrarchus labrax* (Angelucci et al., 2000) και *Pleuronectes platessa* (George & Young, 1988). Μεταξύ των επαρκώς χαρακτηρισμένων θαλάσσιων GSTs,

η *Sigma* τάξη από τον οργανισμό *Ommastrephes sloani pacificus* εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι μελέτες έδειξαν ότι θα μπορούσε να αποτελεί το πρότυπο για μία νέα τάξη GST. Στη συνέχεια, η συγκεκριμένη τάξη ορίστηκε ως η *Sigma*, και η ακολουθία του ενζύμου αποτελεί αρχέτυπο της συγκεκριμένης τάξης (Blanchette, & Singh, 2007). Η GST που απομονώθηκε από το είδος *O. Pacificus* παρουσιάζει μια ιδιαίτερος υψηλή δραστικότητα ως προς το υπόστρωμα CDNB (Ji et al., 1995), γεγονός που παρατηρήθηκε για τη GST που απομονώθηκε από το είδος *Loligo vulgaris* (Harris et al., 1991). Η υψηλή δραστικότητα που εμφανίζουν οι GSTs της *Sigma* τάξης ως προς το συγκεκριμένο υπόστρωμα (CDNB) οφείλεται κυρίως στην ακραία ανοιχτή μορφή της Η-θέσης του ενζύμου, που ταυτόχρονα φαίνεται να παρεμποδίζει την καταλυτική προσθήκη της GSH σε ενόνες ή / και σε εποξειδία (Armstrong et al., 1996). Επιπρόσθετα, η μειωμένη δραστικότητα με ενόνες και εποξειδία μπορεί να αποδοθεί στην έλλειψη ένα ηλεκτρόφιλου υπολειμματος στην αμινοξική θέση 106 (Armstrong et al., 1996).

Η οικογένεια των GST από υδρόβιους οργανισμούς δεν έχει χαρακτηριστεί πλήρως μέχρι σήμερα. Ο περιορισμένος αριθμός των ερευνών που αφορούν στη δομή και στο χαρακτηρισμό των υδρόβιων GST δημιουργεί προβλήματα στην κατηγοριοποίησή τους. Ακόμα και αν ένα σημαντικό μέρος των χαρακτηριστικών τους είναι γνωστό, εξακολουθεί να είναι δύσκολη η ταξινόμησή τους διότι τα δεδομένα αυτά συχνά λαμβάνονται χρησιμοποιώντας την υπάρχουσα ταξινόμηση ως πρότυπο. Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στα χαρακτηριστικά των θαλάσσιων GSTs ως βιοδείκτες. Επομένως, ένα νέο σύστημα ταξινόμησης των θαλάσσιων GSTs θα πρέπει να καθιερωθεί με βάση το ρόλο τους ως βιοδείκτες και αποτοξινωτικούς παράγοντες στο θαλάσσιο περιβάλλον (Blanchette & Singh, 2007).

1.2.8. ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ GSTS

1.2.8.1. ΓΕΩΠΟΝΙΑ

Μελέτες που αφορούν τη δομική ανάλυση των GSTs μπορούν να βοηθήσουν στην ανάπτυξη νέων φυτοπροστατευτικών προϊόντων, τα οποία να αποτοξινώνονται εύκολα από τις φυτικές GSTs. Συγκεκριμένα, η διαφοροποίηση υποστρώματος όπως GSH ή S-π- νιτροφαινυλ-GSH οδηγεί σε αντίστοιχη διαφοροποίηση της κρυσταλλικής δομής και του προσανατολισμού του υποστρώματος (Axarli et al., 2009a, b; Cummins et al., 2011). Επίσης, διαφοροποιήσεις των ενεργών κέντρων σε GSTs ζιζανίων και αγρωστωδών φαίνεται να οδηγούν στη δημιουργία ενώσεων οι οποίες να

λειτουργούν ανασταλτικά για το ένζυμο με εξειδίκευση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ουσία tridiphane, η οποία δρα ως επιλεκτικός συναγωνιστής του ζιζανιοκτόνου ατραζίνη και παρεμποδίζει την ανθεκτικότητα των ζιζανίων (Cummins et al., 2011).

1.2.8.2. ΙΑΤΡΙΚΗ

Οι GSTs αποτελούν ένα ευρύ πεδίο έρευνας που αφορά άμεσα στον τομέα της ιατρικής. Όπως είναι γνωστό, οι περισσότερες καρκινογόνες ουσίες είναι ηλεκτρονιόφιλες, αντιδράσουν άμεσα με το DNA και τις περισσότερες φορές ενεργοποιούνται από το μεταβολισμό του οργανισμού. Αυτές οι ουσίες μπορεί να ανασταλθούν εφόσον αντιδράσουν με την ενδογενή GSH, είτε μέσω κατάλυσης από τις GSTs είτε αυθόρμητα (Josephy & Mannervic, 2006). GSTs που καταλύουν τη δέσμευση καρκινογόνων ουσιών ανήκουν στις τάξεις α , μ και π (Sundberg et al, 1997; Sundberg et al, 1998). Υψηλές συγκεντρώσεις GSH και μεταβολή της έκφρασης των GSTs συνήθως σηματοδοτούν το μετασχηματισμό φυσιολογικών κυττάρων σε κακοήθης μορφές (Mannervic et al., 1987). Για παράδειγμα, σε όγκους έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου GSTP1-1 (Lewis et al., 1989; Kelley et al., 1994), ενώ σε ασθενείς με γλοίωμα (Ali-Osman et al., 1998) και καρκίνο του στομάχου (Fan, 1995) έχει παρατηρηθεί αύξηση των επιπέδων έκφρασης του ενζύμου GSTP1-1 στη διάρκεια εξέλιξης του όγκου. Συνεπώς, η υπερέκφραση της GSTP1-1 στα καρκινικά κύτταρα και κυρίως σε εκείνα που εμφανίζουν χημειοανθεκτικότητα, καθιστά το συγκεκριμένο ένζυμο σημαντικό μοριακό στόχο για τη σχεδίαση νέων φαρμάκων και προ-φαρμάκων που ενεργοποιούνται στοχευμένα στις θέσεις που υπερεκφράζονται (π.χ. καρκινικά κύτταρα) (Rabik & Dolan, 2007).

Επίσης, οι GSTs είναι γνωστές για τη δραστηριότητα σουλφωναμιδάσης, καταλύοντας την υδρόλυση του σουλφωναμιδικού δεσμού (Koeplinger et al., 1999). Η ομάδα Axarli et al. πρότεινε το σχεδιασμό και τη σύνθεση καινοτόμων χημικών παραγώγων σουλφωναμίδης, αποτελούμενα από μια πεπτιδική ομάδα (ανάλογη του πεπτιδίου της βομβεσίνης) η οποία λειτουργεί ως μοριακός οδηγός αναγνώρισης καρκινικών κυττάρων, και ενεργοποιούνται από το ένζυμο GSTA1-1 (*hGSTA1-1*). Ο υποδοχέας της βομβεσίνης των καρκινικών κυττάρων μπορεί να αναγνωρίσει το πεπτίδιο της βομβεσίνης και αφού προηγηθεί η ρήξη του σουλφωναμιδικού δεσμού με τη μεσολάβηση του *hGSTA1-1*, ελευθερώνεται η δομή S-αλκυλ-GSH η οποία και αποτελεί ισχυρό αναστολέα των GSTs (Axarli et al., 2009c).

Τα τελευταία χρόνια, ο σχεδιασμός νέων πεπτιδικών αναλόγων GSH αποτελεί σημαντική στρατηγική ανάπτυξης νέων αναστολέων για τις GSTs και έχει αποδώσει αξιοσημείωτα αποτελέσματα (Bladeren & Ommen, 1991; Mahajan & Atkins, 2005). Ταυτόχρονα, η ανάπτυξη μεθόδων συνθέσεως μη φυσικών αμινοξέων με σκοπό τη χρήση τους ως συστατικά μοριακών σχηματισμών με θεραπευτική δράση αποτελεί έναν τομέα σημαντικής έρευνας (Meschenmoser et al., 2013; Renfrew et al., 2012).

1.2.8.3. ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Τα ένζυμα GST συμβάλουν στην αποκατάσταση του περιβάλλοντος, με χαρακτηριστικό παράδειγμα να αποτελεί η περίπτωση των φαρμακευτικών αποβλήτων παρακεταμόλης. Συγκεκριμένα, η δράση του κυτοχρώματος P450 προκαλεί την οξειδωσή της παρακεταμόλης ώστε να ακολουθήσει η δέσμευσή της από τη GSH μέσω δράσης GST (Huber et al., 2009).

Το ερευνητικό πεδίο των βιοαισθητήρων και των ενζυμικών-βιοαναλύσεων έχουν κερδίσει έντονο ενδιαφέρον τις τελευταίες δύο δεκαετίες διότι έχει αυξηθεί σημαντικά η ανάγκη για οικονομική, γρήγορη κι εύκολη ανάλυση δείγματος (Fragoulaki et al., 2007; Morou et al., 2008; Dowd et al., 2009). Ένας βιοαισθητήρας μπορεί να δώσει άμεσα, γρήγορες ποσοτικές και ποιοτικές πληροφορίες με ταυτόχρονη ανάλυση δειγμάτων, παρέχει στοιχεία υψηλής ακρίβειας και εκλεκτικότητας σε σύγκριση με την κλασική χημεία ενώ ταυτόχρονα είναι ασφαλείς για το περιβάλλον και το χρήστη (Karoli et al., 2008).

Ο βιοαισθητήρας διαθέτει ένα βιολογικό μηχανισμό αναγνώρισης (κυρίως ένζυμο) και μεταδίδει σήμα συνήθως ηλεκτρικό (Phadke, 1992; Sassolas et al., 2012). Ο πρώτος βιοαισθητήρας αναπτύχθηκε το 1962 από τους Clark και Lyons με σκοπό τον προσδιορισμό μορίων γλυκόζης, μέσω ακινητοποίησης του ενζύμου οξειδάσης της γλυκόζης (GOD) (Clark & Lyons, 1962). Τα GSTs λόγω της ικανότητας να καταλύουν αντιδράσεις δέσμευσης της GSH έδωσε τη δυνατότητα για ανάπτυξη βιοαισθητήρων με σκοπό τον προσδιορισμό ζιζανιοκτόνων. Χαρακτηριστικά, για την ανάπτυξη φορητού βιοαισθητήρα οπτικής ίνας προσδιορισμού του φυτοπροστατευτικού προϊόντος ατραζίνη, χρησιμοποιήθηκε το ισοένζυμο GSTI από τον αραβόσιτο (Andreou & Clonis, 2002b).

Σε μια πρόσφατη ερευνά, το ισοένζυμο AaGSTE2-2 από το κουνούπι *Aedes aegypti*, χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου υψηλής εκλεκτικότητας για τον προσδιορισμό του DDT (π, π'-διχλωρο-

διφαινυλοτριγλωροαιθάνιο) (Morou et al., 2008). Παρομοίως, αναπτύχθηκε ένας οπτικός βιοαισθητήρας για τη γρήγορη και υψηλής ευαισθησίας ανίχνευση ύποπτης καρκινογόνο και επικίνδυνης για το υδατικό περιβάλλον ουσίας, της captan (>2 ppm) σε ύδατα (Choi et al., 2003). Το 2007 μια επίσης ενδιαφέρουσα προσέγγιση είναι αυτή των Hasegawa et al οι οποίοι ανέπτυξαν βιοαισθητήρα για την ανίχνευση της ακρυλαμίδης σε αμυλούχα τρόφιμα (Hasegawa et al., 2007).

1.3. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ

Η πρωτεϊνική μηχανική αποτελεί ένα πεδίο της ενζυμικής τεχνολογίας που έχει τραβήξει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών (Gutschner et al., 2016). Μέσω αυτής της τεχνολογίας, μπορεί να γίνει ο σχεδιασμός και η παραγωγή νέων δομών με πιθανόν βελτιωμένες ή ακόμα και νέες δραστηριότητες. Η αλλαγή που μπορεί να προκαλέσει η διαφοροποίηση ενός ή πολλών αμινοξέων ίσως να οδηγήσει στον έλεγχο ή σε επίλυση προβλημάτων ζητημάτων στη βιοτεχνολογία (Yigit et al., 2016; Perczel & Csizmadia, 2003).

Η δημιουργία νέων ενζυμικών δομών μπορεί να επιτευχθεί με τις μεθόδους του λογικού ανασχεδιασμού και της κατευθυνόμενης εξέλιξης. Ο λογικός ανασχεδιασμός βασίζεται στη μετάλλαξη συγκεκριμένων θέσεων αμινοξικών καταλοίπων, με βασική προϋπόθεση να είναι γνωστή η δομή του ενζύμου. Η μέθοδος της κατευθυνόμενης εξέλιξης πραγματοποιείται συνήθως με τεχνικές τυχαίας μεταλλαξογένεσης. Οι νέες δομές επιλέγονται, ελέγχονται και εκείνες με θετικό αποτέλεσμα ταυτοποιούνται. Πολλές φορές απαιτούνται επαναλαμβανόμενοι κύκλοι μετάλλαξης μέχρι να προκύψει ένα νέο ένζυμο με ιδιότητες επιθυμητές. Τέλος, μπορεί να γίνει συνδυασμός των παραπάνω μεθόδων κάνοντας μεταλλαξογένεση μέσω λογικού ανασυνδιασμού του 'αγρίου τύπου' της επιθυμητής πρωτεΐνης (Kotzia et al., 2012). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μετατροπή της αρχικής δραστηριότητας του ενζύμου γλυοξαλάση II σε δράση β-λακταμάση (Park et al., 2006).

1.3.1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΛΟΓΙΚΟΥ ΕΝΖΥΜΙΚΟΥ ΑΝΑΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ

Σκοπός της μεθόδου είναι η ταυτοποίηση και ο προσδιορισμός αμινοξικών καταλοίπων σημαντικών για τη δομή και τη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών. Υπάρχουν αρκετοί τρόποι ανασχεδιασμού των αμινοξικών καταλοίπων και οι απαιτήσεις κατά το σχεδιασμό είναι:

- Η αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης και το εκφραστικό σύστημα αυτής να είναι γνωστά.
- Η σχέση δομής-λειτουργίας της πρωτεΐνης να είναι γνωστή.
- Να υπάρχουν διαθέσιμες και ακριβείς δοκιμές για τον έλεγχο της δραστηριότητας του ενζύμου και τη σύγκριση με τις νέες μορφές.
- Να υπάρχει η δυνατότητα δημιουργίας και πρόβλεψης της δομής ενός ενζύμου, μέσω της βιοπληροφορικής. Έτσι, θα μπορεί να υπάρξει πρόβλεψη για τυχόν διαφορές που μπορεί να δημιουργήσει μια μετάλλαξη
- Να πραγματοποιηθεί γενετικός χειρισμός της νουκλεοτιδικής αλυσίδας του αγρίου τύπου ώστε να προκύψουν νέες μεταλλάξεις έχοντας ως βασικό εργαλείο την αντίδραση PCR (Kotzia et al., 2012).

Ο ανασχεδιασμός ενός ενζύμου μπορεί να πραγματοποιηθεί με μεταλλαξογένεση κορεσμού, με μεταλλάξεις εξαλείψεως και παρεμβολής/συγχώνευσης, και με ανταλλαγή περιοχών. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η μεταλλαξογένεση κορεσμού με αλλαγή συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων (Bachman, 2013). Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου είναι η χρήση συνθετικών πολυμορφικών ολιγονουκλεοτιδίων και στη συνέχεια, με αναδιάταξη, προκύπτουν νέες μεταλλαγμένες μορφές (Sandhya, et al., 2016; Tuna & Woolfson, 2015; Garvey & Matthews, 1990).

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος αποτελεί η μεταλλαξογένεση με PCR. Για παράδειγμα, η μετάλλαξη που προκλήθηκε σε επιλεγμένα αμινοξικά κατάλοιπα στη G-θέση του ενζύμου GSTF1-1, το οποίο απομονώθηκε από τον αραβόσιτο, οδήγησε σε διαφοροποιήσεις των κινητικών παραμέτρων σε σχέση με το pH (Labrou et al., 2004). Επίσης, μετάλλαξη στη θέση 118 (Pe118Phe) του συγκεκριμένου ενζύμου (GSTF1-1) προκάλεσε βελτίωση της εξειδίκευσης του ζιζανιοκτόνου alachlor κατά 4 φορές (Labrou et al., 2005). Επίσης, η μετάλλαξη που προκλήθηκε στο ένζυμο hGSTA1-1 σε 4 διαφορετικές περιοχές (θέσεις 12, 107, 108 και 111) με τα αντίστοιχα αμινοξικά κατάλοιπα του ενζύμου GSTA4-4, αύξησε σημαντικά την καταλυτική δράση. Συγκεκριμένα, μείωσε κατά 20 φορές τη δραστηριότητα ως προς CDNB (Nilsson et al., 2000). Η μετάλλαξη που έγινε σε 5 αμινοξικά κατάλοιπα της H-θέσης του ενζύμου hGSTA2-2, αύξησε τη δράση της ισομεράσης των στεροειδών (Pettersson et al., 2002). Επίσης, η ομάδα των Tofazzal και Yamamoto προκάλεσε μεταλλάξεις σε 3 περιοχές του ενζύμου bmGSTu (Asp103, Ser162 και Ser166) με σκοπό την εύρεση αμινοξικών καταλοίπων που εμπλέκονται στον καταλυτικό μηχανισμό του ενζύμου

(Tofazzal Hossain & Yamamoto, 2015). Αντίστοιχη μελέτη πραγματοποιήθηκε στα αμινοξικά κατάλοιπα Ser11, His52, Glu66 και Phe119 του ενζύμου nI GSTD (Yamamoto et al., 2015).

1.3.2. ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ

Μια εναλλακτική προσέγγιση του λογικού σχεδιασμού αποτελεί η μέθοδος της κατευθυνόμενης εξέλιξης, η οποία προσφέρει τη δυνατότητα βελτίωσης των δομικών και λειτουργικών ιδιοτήτων (σταθερότητα και λειτουργία) των ενζύμων υπό διαφορετικές συνθήκες (pH, αλατότητα, ακραία θερμοκρασία (Roodvelt et al., 2005). Η μέθοδος της κατευθυνόμενης εξέλιξης σε συνδυασμό με την τεχνολογία του ανασυνδιασμένου DNA μπορεί να αποτελέσει την τεχνολογία επιταχυνόμενης πρωτεϊνικής εξέλιξης (Roodveldt et al. 2005; Chatterjee & Yuan, 2006).

Η διαδικασία της κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης περιλαμβάνει τη δημιουργία μιας βιβλιοθήκης μεταλλαγμένων μορφών του υπό μελέτη ενζύμου και επιλογή των καλύτερων μορφών, οι οποίες μπορούν εκ νέου να μπουν σε νέο κύκλο κατευθυνόμενης εξέλιξης. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να βρεθεί η ενζυμική μορφή με τις επιθυμητές ιδιότητες (Arnold, 2001). Η δημιουργία βιβλιοθήκης μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες μεθόδους όπως με τυχαία μεταλλαξογένεση, χρησιμοποιώντας κυρίως error-prone PCR, DNA shuffling, StEP (staggered extension process) και GSSM (gene site saturation mutagenesis) (Labrou, 2010; Kotzia et al., 2012; Axarli et al., 2016)

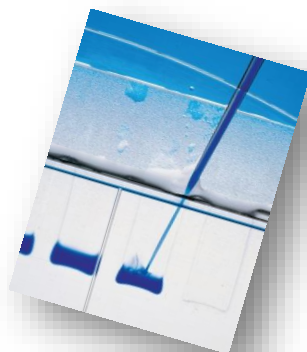
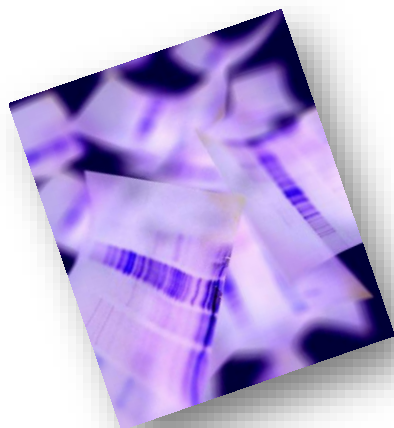
Η διαδικασία της *in vitro* εξέλιξης περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Δημιουργία διαφοροποιημένου γονιδιακού αποθέματος, είτε από φυσική διαφοροποίηση, από λογικό ανασχεδιασμό ή τυχαία μεταλλαξογένεση.
- Ανασυνδυασμός του γονιδιακού αποθέματος ή των προ-επιλογή διαφορετικών γονιδίων.
- Σάρωση *in vivo*, επιλογή ή εφαρμογή αναλυτικών δοκιμών στις μεταλλαγμένες μορφές ώστε να επιλεγεί αυτή με τις επιθυμητές ιδιότητες (Eijsink et al., 2005).

Η κατευθυνόμενη εξέλιξη έχει αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για ένα γρήγορο σχεδιασμό ενζύμων, με ιδιότητες βιοτεχνολογικής και φαρμακευτικής αξίας (Kotzia et al., 2012). Για παράδειγμα, με DNA shuffling των ενζύμων από τους φυτικούς οργανισμούς *P. vulgaris* και *G. max* προέκυψε ένα νέο ένζυμο με ιδιότητες GST και

GPx (Chronopoulou & Labrou, 2016). Η κατευθυνόμενη εξέλιξη έχει χρησιμοποιηθεί για να βελτιώσει τη θερμοσταθερότητα της πεπτιδάσης (Komeda et al., 2003) και τη σταθερότητα (οξειδωτικής και θερμικής) της N-καρβαμλο- D- αμινοξικής πεπτιδο-υδρολάσης (Oh et al., 2002). Επίσης, έχουν προκύψει μεταλλαγμένες μορφές ενζύμων που παρουσιάζουν διαφορετική εξειδίκευση υποστρώματος και στερεοεκλεκτικότητα (Axarli et al., 2016; Tofazzal Hossain & Yamamoto; Alexeeva et al., 2002; Zha et al., 2001; Williams et al., 2003). Η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση της σταθερότητας και διαλυτότητας πρωτεϊνών στο περιβάλλον του ξενιστή, όπως *E. coli*, παρουσιάζοντας καλύτερη έκφραση (Roodveldt et al., 2005).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



2.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

2.1.1. ΥΛΙΚΑ

2.1.1.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pEXP-5 CT/TA-TOPO® και T7 pETite C-His της εταιρίας Invitrogen (USA) και Lucigen (USA) αντίστοιχα. Τα δεκτικά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την επιλογή των γονιδίων ήταν *E. coli* Turbo (high efficiency) της New England Biolabs (UK) και HI-Control™ της Lucigen (USA), ενώ για την έκφραση των γονιδίων έγινε χρήση των *E. coli* BL21(DE3) της Novagen (USA) και HI-Control BL21(DE3) της Lucigen (USA). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τα DH5a της Life technologies (USA). Ακολουθεί πίνακας που συνοψίζει τα στοιχεία που αφορούν τα κύτταρα αυτά.

Πίνακας 2. 1: Στελέχη *E. coli* και γενότυποι αυτών

Στέλεχος <i>E. coli</i>	Γενότυπος
Turbo (High Efficiency)	F' proA+B+lacIq ΔlacZM15 fhuA2 Δ (lac-proAB) glnV galK16 galE15 R (zgb-210::Tn10) TetS end A1 thi-1 Δ (hsdS-mcrB)5
HI-Control™	mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) endA1 recA1 φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 araD139 Δ(ara,leu)7697 galU galK rpsL (StrR) nupG λ – tonA Mini-F lacIq1 (GentR)
BL21(DE3)	fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHIo ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5
HI-Control BL21(DE3)	F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3) Mini-F lacIq1(GentR)
DH5a	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ-

2.1.1.2. ENZYMA

Χρησιμοποιήθηκαν οι πολυμεράσες KAPA Taq DNA (5 Units/ μL) και KAPA HiFi (1 Unit/ μL) της KAPA Biosystems (USA) καθώς και η Accura™ High-Fidelity (2 Unit/ μL) της Lucigen (USA).

2.1.1.3. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ, KITS ΚΑΙ ΛΟΙΠΑ

Τα αντιδραστήρια: 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB, καθαρότητας 98%), 1-βρωμο-2,4-δινιτροβενζόλιο (DBNB, καθαρότητας 98%), 1-ιωδο-2,4-δινιτροβενζόλιο (IDNB, καθαρότητας 97%), 1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο (FDNB καθαρότητα 97%), 1-φθόρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (IDNB, καθαρότητας >99%), *trans*-φαινυλ-3-βουτεν-2-όνη (καθαρότητας 99%), βενζοϊκό υπεροξείδιο (καθαρότητας 75%), π-νιτροβενζολικό χλωρίδιο, *trans*-2-ενενάλη (καθαρότητας >93%), σουλφαναμίδη (καθαρότητας 99%), αλλυλ-ισοθειοκυανικός εστέρας (καθαροτητας 95%), προπυ-ισοθειοκυανικός εστέρας (καθαρότητας 70%), γλουταθειόνη, 1-βουτανεδιυλ-διγλυκιδυλ αιθέρας, δωδεκανοθειϊκό νάτριο (SDS), ακριλαμίδιο (καθαρότητας 99%), αλβουμίνη μόσχου (BSA, fraction V) Trizma-Base, υπερθειϊκό αμμώνιο (καθαρότητας >98%), τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και καναμικίνη, τα υλικά χρωματογραφίας Sepharose CL6B, S-εξυλ-αγαρόζη και DEAE-Sepharose, όλα τα ένζυμα (π.χ. ρεδουκτάση της γλουταθειόνης, οξειδάση της ξανθίνης, σουπεροξειδική δισμουτάση κτλ), πυρογαλόλη (καθαρότητας >99%), Na-βενζόιλ-L-αργινίνη-αιθυλ-εστερ-υδροχλωρίδιο (BAEE), N-βενζόιλ-L-τυροσίνη-αιθυλ-εστερας (BTee), μαλτόζη (καθαρότητας >99%), 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ, σουκρόζη (καθαρότητας >99.5%), π-νιτροφαινυλ-λαουρέιλ (καθαρότητας >98%), π-νιτροφαινυλ-α-D-γλυκοπυροσίδιο (καθαρότητας >98%), υπόστρωμα αμύλου, ασκορβικό οξύ, 2,4,6-τριπυριδυλ-σ-τριαζίνη (TPTZ, καθαρότητας >98%), τριχλωροακετικό οξύ (TCA, 6.1N), τριχλωριούχος σίδηρος (καθαρότητας >98%), 2,2-άζινο-δις-3-εθυλβενζοθειαζολίνη-6-σουλφονικό οξύ (ABTS, καθαρότητας >98%), υπερθειϊκό κάλιο (καθαρότητας >98%), ξανθίνη (καθαρότητας >99.5%), κυτόχρωμα c (καθαρότητας >95%), 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλουδραζυλίου (DPPH), οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG, καθαρότητας >98%) προήλθαν από τον οίκο Sigma-Aldrich (USA). Τα αντιδραστήρια 2,2-διθειοισθανόλη (καθαρότητας 90%), 4-χλωρο-7-νιτροβενζοφουραάνιο (καθαρότητας 98%) και υπεροξείδιο του κουμενίου προήλθαν από την εταιρία Fluka (Germany).

Ο επαγωγέας έκφρασης ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτο-πυρανοζίδιο (IPTG) και NADPH προήλθαν από τις εταιρίες AppliChem (Germany).

Η αгарόζη, οι εκκινητές για την αντίδραση πολυμεράσης, ο δείκτης μοριακών μαζών 1Kb DNA ladder και ο δείκτης μοριακών μαζών Protein Prestained Marker για τις ηλεκτροφορήσεις πρωτεϊνών προήλθαν από την εταιρεία Invitrogen (USA).

Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue (G-250), το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteus, και τα αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας (KH₂PO₄ κτλ.) προήλθαν από την εταιρεία MERC (Germany). Τα αντιδραστήρια που αφορούν ζύμη, πεπτόνη και άγαρ προήλθαν από την εταιρεία Scharlau (Spain).

Τέλος χρησιμοποιήθηκαν τα Kit QIAquick™ Gel Extraction από τον οίκο Qiagen (Germany), MiniPlasmid isolation kit από τον οίκο Macherey-Nagel (Germany), και για τη διαδικασία της κλωνοποίησης τα TOPO®-TA Cloning και Expresso T7 Cloning and Expression System από τους οίκους Life technologies-Invitrogen (USA) και Lucigen (USA) αντίστοιχα.

2.1.2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Στη συνέχεια ακολουθούν αναλυτικά τα βασικά πρωτόκολλα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

2.1.2.1. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Πίνακας 2. 2: Βασικά θρεπτικά διαλύματα.

Θρεπτικό μέσο LB	Θρεπτικό μέσο YT	Θρεπτικό διάλυμα SOC
1 % (w/v) πεπτόνη	0,8 % (w/v) πεπτόνη	2 % (w/v) πεπτόνη
1 % (w/v) NaCl	0,5 % (w/v) NaCl	0,5 % (w/v) εκχύλισμα
0,5 % (w/v) εκχύλισμα	0,5 % (w/v) εκχύλισμα	ζύμης
ζύμης	ζύμης	10 mM NaCl
+ 1,5 % (w/v) άγαρ	+ 1,5 % (w/v) άγαρ	2,5 mM KCL
		10 mM MgCl ₂
		10 mM MgSO ₄
		20 mM γλυκόζη

2.1.2.2. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων

Διάλυμα NaOH/SDS

Τελικός όγκος 3 mL

150 μ L (0,5 M Tris-HCl pH 8)

60 μ L (0,5 M EDTA pH 8)

75 μ L (2 M γλυκόζης)

Τελικός όγκος 5 mL

114 μ L (10 M NaOH)

568 μ L [10% (w/v) SDS]

Διάλυμα RNάσης A

Αρχικά γίνεται διάλυση 10 mg RNάσης A σε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl pH 7,4 και 15 mM NaCl. Ακολουθεί επώαση στους 100 °C για 15 min και αφού πέσει η θερμοκρασία του διαλύματος στους 25 °C αποθηκεύεται στους -20 °C.

Διάλυμα CH₃COONH₄/RNάσης A

Τελικός όγκος 4,5 mL

4,5 mL (7,5 M CH₃COONH₄ pH 7.8)

45 μ L (Διάλυμα RNάσης)

2.1.2.3. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Διάλυμα TB

Ρυθμιστικό διάλυμα pH 6,7

10 mM PIPES

55 mM MnCl₂

15 mM CaCl₂

250 mM KCl

12 M KOH ρυθμιστικό pH

Το διάλυμα αποστειρώνεται με φίλτρο

Διάλυμα CaCl₂ 25 mM και 75 mM

Ρυθμιστικό διάλυμα CaCl₂ 25 mM και 75 mM σε 10 mL Tris-HCl pH 8. Το διάλυμα αποστειρώνεται σε κλίβανο.

2.1.2.4. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΕΤΟΥΣΙΩΣΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ SDS

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων 10x

0,35 M Tris-HCl

1,92 M γλυκίνη

1% (w/v) SDS

Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού

3 M Tris-HCL pH 8,8

Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης

0,5 M Tris-HCl pH 6,8

Διάλυμα ακρυλαμιδίου 40% (w/v)

Παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα 40% (w/v) ακρυλαμιδίου και 0,8% (w/v) N-N'-μεθυλενο-bis-ακρυλαμιδίου. Ακολουθεί φιλτράρισμα και αποθηκεύεται σε σκουρόχρωμο μπουκάλι.

Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων

Τελικός όγκος 9,5 mL

3,55 mL dd H₂O

1,25 mL (0,5 M Tris-HCl pH 6,8)

2,5 mL γλυκερόλη

2 mL [10 % (w/v) SDS]

0,2 mL [0,5 % (w/v) χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης]

Το παραπάνω διάλυμα μοιράζεται σε eppendorf των 950 μL και αποθηκεύεται στους -20 °C. Πριν από τη χρήση γίνεται προσθήκη 25 μL μερκαπτοαιθανόλης και διατηρείται στους 4 °C για 2 εβδομάδες.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΚΑΙ RNA

Ρυθμιστικό διάλυμα TAE 50x

2 M Tris-HCl

5,71 % (v/v) CH₃COOH

10 % (v/v) 0,5 M EDTA pH 8

Το διάλυμα αποστειρώνεται σε κλίβανο και αποθηκεύεται στους 4 °C.

Υδατικό διάλυμα Βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr)

5 mg EtBr/ mL H₂O

Το διάλυμα αποθηκεύεται σε σκουρόχρωμο δοχείο, στους 4 °C.

Διάλυμα πηκτής ηλεκτροφόρησης

DNA

1 % (w/v) αγαρόζη

1 x TAE

4 μL EtBr

RNA

2 % (w/v) αγαρόζη

1x TAE

Το ρυθμιστικό διάλυμα αποστειρώνεται σε κλίβανο. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 4 μL EtBr.

Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης σε πηκτή ηλεκτροφόρησης DNA και RNA

10 mL γλυκερόλης 50 % (v/v)

1 mM EDTA

pH 8

Για την ηλεκτροφόρηση RNA το ρυθμιστικό διάλυμα αποστειρώνεται.

Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης πρωτεϊνών από φυτικό ιστό

20 mM KH₂PO₄

1 mM EDTA

pH 7

2.1.3. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Η ενζυμική δραστηριότητα προσδιορίστηκε σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης-ορατού-υπεριώδους του οίκου Hitachi που φέρει θερμοστατούμενη υποδοχή κυψελίδας. Το μοντέλο είναι U-2000 και οπτικής διαδρομής 10 mm. Για τη διεξαγωγή φασμάτων χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer UV/Vis Lambda 16.

Η ρύθμιση του pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε με το pHμετρο ORION μοντέλο 410A.

Το λύσιμο των κυττάρων (φυτικών και βακτηριακών) έγινε με το σύστημα υπερήχων Sonics & Materials Inc. Vibra Cell 20khz (ultrasound density 18w/ml) ενώ για τη συλλογή των κυττάρων έγινε με τη βοήθεια των φυγόκεντρων Heraeus Instruments Biofuge primo.

Η συσκευή PCR που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρείας PE Applied Biosystems μοντέλο Gene Amp[®] 9700.

Οι ηλεκτροφορήσεις δειγμάτων DNA σε πηκτή αγαρόζης έγιναν με τη χρήση ειδικής συσκευής Biorad μοντέλο MINI-SUB[®] CELL GT. Οι ηλεκτροφορήσεις πρωτεϊνών έγιναν σε αντίστοιχη συσκευή της Biorad μοντέλο MINI PROTEAN[®] Tetran System. Η σύνδεση των δυο συσκευών ήταν σε τροφοδοτικό SP500x T (500 volt, 400 mA) του οίκου Hoefler (USA).

2.2.1. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1.1. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (COMPETENT CELLS) DH5a, TURBO, HI-Control™, BL21 (DE3) ΚΑΙ HI-Control BL21(DE3) ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *E. coli*

Τα στελέχη DH5a, HI-Control™ και TURBO λόγω της υψηλής ικανότητας μετασχηματισμού που έχουν, χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό την αναπαραγωγή και υποκλωνοποίηση πλασμιδίων. Τα στελέχη BL21 (DE3) και HI-Control BL21(DE3) χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση των επιθυμητών γονιδίων. Η διαδικασία της προετοιμασίας ήταν ίδια για όλα τα στελέχη και περιγράφεται στη συνέχεια.

Διαδικασία

Σε τρυβλίο με κατάλληλο θρεπτικό διάλυμα LB ή YT, που περιέχει κατάλληλη συγκέντρωση αντιβιοτικού, αναπτύσσονται αποικίες του επιθυμητού βακτηριακού

στελέχους. Μονή αποικία αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο σε διάστημα 14-16 h στους 37 °C υπό συνεχή ανάδευση. Όγκος των 2 mL από την αρχική καλλιέργεια εμβολιάζεται σε αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο τελικού όγκου 200 mL και ακολουθεί επώαση στους 37 °C μέχρι η οπτική πυκνότητα OD στα 550 nm να είναι περίπου στο 0,6. Στη συνέχεια, η καλλιέργεια επώαζεται στον πάγο για 10 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4500 rpm για 5 min στους 4 °C. Το υπερκείμενο που προκύπτει απομακρύνεται και η πάστα επαναιωρείται σε παγωμένο διάλυμα 25 mM CaCl₂ σε 10 mM Tris-HCL pH 8 όγκου ίσου με το μισό της αρχικής καλλιέργειας και επώαση στους 4 °C για 10 min. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται με επαναιώρηση των κυττάρων σε παγωμένο διάλυμα 75 mM CaCl₂ σε 10 mM Tris-HCL pH 8 όγκου ίσου με το 1/15 της αρχικής καλλιέργειας και επώαση στους 4 °C για 10 min. Προστίθεται γλυκερόλη τελικής συγκέντρωσης 15 % (v/v), ήπια ανάδευση και επώαση στον πάγο για 10 min ακόμα. Τέλος, το αιώρημα μοιράζεται σε κλάσματα σε παγωμένα erpendorf και αποθηκεύονται στους -80 °C.

2.2.1.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΑΛΚΑΛΙΚΗΣ ΛΥΣΗΣ

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε είναι μια παραλλαγή του πρωτοκόλλου που περιγράφεται από τους Birnboim & Doly, 1979. Σύμφωνα με τη μέθοδο, μονή αποικία βακτηριακού στελέχους αναπτύσσεται στους 37 °C σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο με πιθανή παρουσία αντιβιοτικού ως μέσο επιλογής. Η επώαση διαρκεί 12-16 h υπό συνεχή ανάδευση στις 250rpm. Σε erpendorf μεταφέρεται καλλιέργεια όγκου 1,5 mL και τα κύτταρα κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 2 min. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης κυττάρων. Στη συνέχεια προστίθενται 400μL από διάλυμα NaOH/SDS. Έπειτα από προσεκτική ανάμιξη ακολουθεί επώαση στον πάγο για 5 min ακριβώς. Διάλυμα RNάσης A (10 μL/ mL) σε παγωμένο διάλυμα οξικού αμμωνίου (CH₃COONH₄) εισάγεται στο δείγμα και ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση 10min στους 4 °C. Έπειτα από φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 min, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf στο οποίο γίνεται προσθήκη 700 μL ισοπροπανόλης. Μετά από ήπια ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15 min. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται με έντονη ανάδευση σε 1 mL αιθανόλης 70 % (v/v). Έπειτα από φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 min, απομάκρυνσης του υπερκειμένου και εξάτμισης της αιθανόλης σε θερμοκρασία δωματίου, το ίζημα

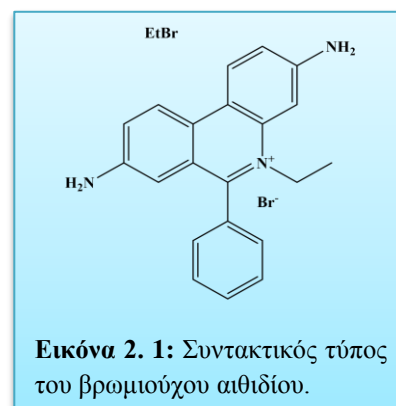
(DNA) επαναδιαλύεται σε 30-50 μL αποστειρωμένο dd H_2O ή σε άλλο διάλυμα έκλυσης DNA.

2.2.1.3. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Σε δεκτικά κύτταρα όγκου 50-100 μL προστίθενται 10-50 ng πλασμιδιακό DNA και ακολουθεί επώαση 30 min στους 4 $^\circ\text{C}$. Ακολουθεί θερμικό σοκ των κυττάρων στους 42 $^\circ\text{C}$ για 90 s, επώαση στους 4 $^\circ\text{C}$ για 5 min και προσθήκη 500 μL θρεπτικό υλικό LB. Έπειτα από επώαση 1 h στους 37 $^\circ\text{C}$ ακολουθεί ήπια φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 2min, απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναιώρηση του ιζήματος σε 100 μL θρεπτικού. Το αιώρημα που προκύπτει επιστρώνεται σε τρυβλία με κατάλληλο θρεπτικό μέσο και αντιβιοτικό ως μέσο επιλογής, συνήθως αμπικιλίνη (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ή καναμυκίνη (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 $^\circ\text{C}$ για 16 h. Σε περίπτωση υγρής καλλιέργειας το δείγμα εμβολιάζεται απευθείας σε φλάσκα με το απαραίτητο αντιβιοτικό.

2.2.1.4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΟΞΥΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (DNA) ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η μέθοδος σε πηκτή αγαρόζης βασίζεται στο διαχωρισμό των νουκλεϊκών οξέων. Η πηκτή αγαρόζης ως ηλεκτροφορητικό υλικό αποτελείται από πυκνό δίκτυο ουδέτερων πολυσακχαριτών των οποίων οι αλυσίδες σχηματίζουν πόρους κατά το σχηματισμό της πηκτής. Διάλυμα αγαρόζης σε υψηλή θερμοκρασία πολυμερίζεται δημιουργώντας ένα κολλοειδές διάλυμα που πήζει σε θερμοκρασία μικρότερη των 45 $^\circ\text{C}$. Η πηκτή αγαρόζης, λόγω των μεγάλων πόρων που σχηματίζονται κατά τον πολυμερισμό, αποτελεί ένα ικανοποιητικό ηλεκτροφορητικό υλικό που δεν εμποδίζει στερεοχημικά την ελεύθερη μετακίνηση των βιομακρομορίων. Στην παρούσα διατριβή η περιεκτικότητα της αγαρόζης για την ηλεκτροφόρηση του DNA είναι 1% (w/v). Η ανίχνευση γίνεται με χρήση του βρωμιούχου αιθιδίου λόγω της ιδιότητας να αλληλοεπιδρά με βάσεις και να φθορίζει σε υπεριώδες φως.



Εικόνα 2. 1: Συντακτικός τύπος του βρωμιούχου αιθιδίου.

Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστίθεται σε διάλυμα 1x TAE και θερμαίνεται ώστε να διαλυθεί πλήρως και γίνει διαυγές. Αφού η θερμοκρασία μειωθεί προστίθεται κατάλληλη συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) (**Εικόνα 2. 1**) σε

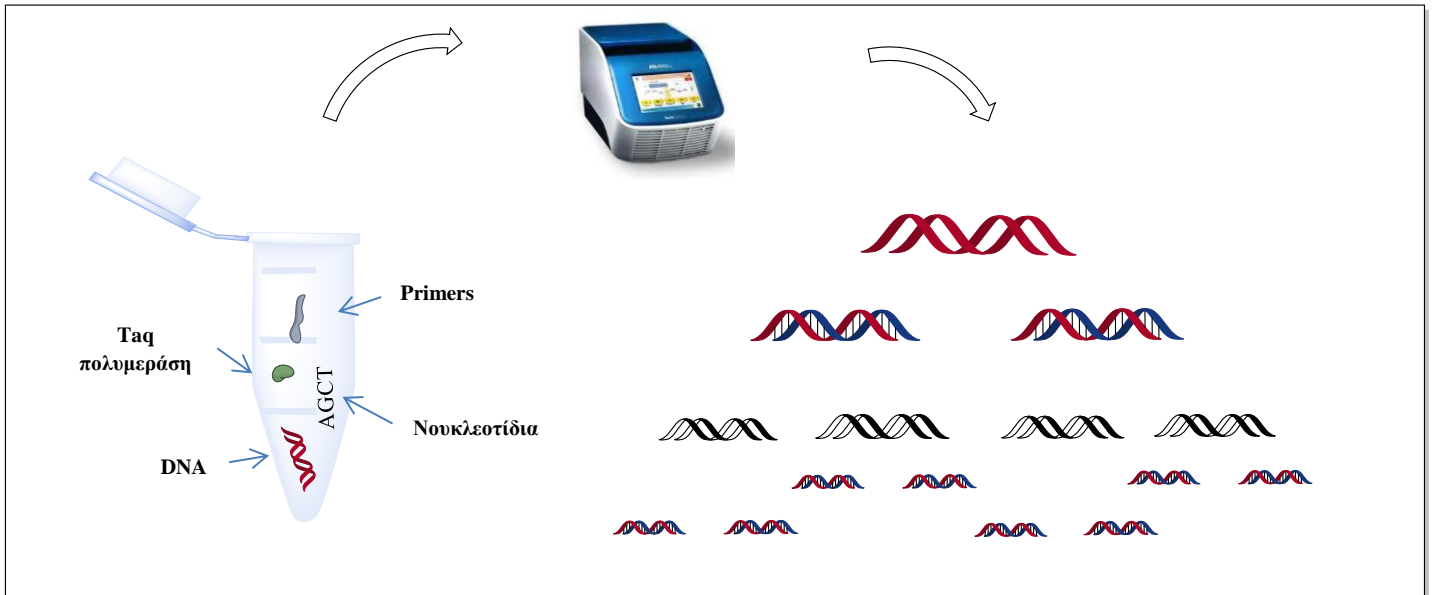
τελική συγκέντρωση 0,5 μg/ mL. Το διάλυμα εισάγεται στο ειδικό δοχείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης, τοποθετείται το ειδικό χτενάκι που δημιουργεί τα ‘‘πηγαδάκια’’ και επωάζεται σε θερμοκρασία για 20 min ώστε το μίγμα να σταθεροποιηθεί. Το δοχείο με την πηκτή τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης η οποία γεμίζεται με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 1x TAE. Στα δείγματα προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (15 μL) και στη συνέχεια τοποθετούνται στα ‘‘πηγαδάκια’’. Τέλος, εφαρμόζεται τάση 80 V κατά μήκος της συσκευής. Ως μοριακοί δείκτες χρησιμοποιήθηκε ο 1 Kb DNA ladder (Invitrogen, USA).

2.2.1.5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Με σκοπό την απομόνωση συγκεκριμένου κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης 1 % (w/v), έπειτα από την ηλεκτροφόρηση, η πηκτή μεταφέρεται σε συσκευή που εκπέμπει υπεριώδες φως. Με τη βοήθεια ξυραφιού αφαιρείται το επιθυμητό τμήμα της πηκτής που φέρει το κλάσμα του DNA και τοποθετείται σε eppendorf. Ο καθαρισμός πραγματοποιείται σύμφωνα με το εμπορικό σκεύασμα QIAquick™ Gel Extraction Kit (Qiagen) και βασίζεται στη μέθοδο προσρόφησης του DNA σε πηκτή πυριτίου (Silica Gel) και χρήσης χαιροτροπικών ουσιών.

2.2.1.6. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή PCR (polymerase chain reaction) είναι μία μέθοδος βιοχημείας και μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA. Η αντίδραση πραγματοποιείται μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών (όπως οι βακτηριοφάγοι και τα βακτήρια *E. coli*). Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζονται συνοπτικά τα στάδια της PCR.



Εικόνα 2. 2: Στάδια που πραγματοποιούνται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Σε ειδικό eppendorf (κατάλληλο για PCR) χωρητικότητας 0,2 mL προστίθενται τα συστατικά που είναι απαραίτητα για την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Ανάλογα με τις απαιτήσεις του κάθε πειράματος, οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται μπορούν να προσαρμοστούν και να τροποποιηθούν. Το μίγμα ανακινείται καλά και στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση (spin). Στο τέλος γίνεται η προσθήκη της Kapa Taq πολυμεράσης.

Πίνακας 2. 3: Συνηθής συνθήκες μιας PCR αντίδρασης.

A. ΑΡΧΙΚΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ

Στους 95 °C για 3 min

B. ΚΥΚΛΟΣ

Αποδιάταξη στους 95 °C για 1 min

Υβριδισμός εκκινητών στους 45 °C για 1 min

Επιμήκυνση στους 45 °C για 1 min

30 κύκλοι

Γ. ΤΕΛΙΚΗ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ

Επιμήκυνση στους 72 °C για 10 min

Τα προϊόντα της PCR αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης και υποκλωνοποιούνται σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα.

Πίνακας 2. 4: Συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν κατά τη μεταλλαξογένεση.

A. ΑΡΧΙΚΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ

Στους 95 °C για 2 min

B. ΚΥΚΛΟΣ

Αποδιάταξη στους 98 °C για 20 s

Υβριδισμός εκκινητών στους 40-52 °C για 30 s

Επιμήκυνση στους 72 °C για 2 min



25 κύκλοι

Γ. ΤΕΛΙΚΗ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ

Επιμήκυνση στους 72 °C για 10 min

2.2.1.7. ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΣΗΣ

Για τη μέθοδο του λογικού ενζυμικού σχεδιασμού ακολουθείται η τεχνική Quick Change-side directed PCR. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τη δημιουργία σημειακών μεταλλάξεων και για την απομάκρυνση ή εισαγωγή ενός ή πολλαπλών αμινοξέων. Η τεχνική γίνεται σε δύο στάδια όπου στο 1^ο στάδιο πραγματοποιείται η αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας συνθετικούς ολιγονουκλεοτιδικούς primers που περιέχουν την επιθυμητή μετάλλαξη και το τελικό προϊόν που προκύπτει είναι ολόκληρο το πλασμίδιο με την επιθυμητή μετάλλαξη. Στο 2^ο στάδιο γίνεται πέψη του μητρικού πλασμιδίου με την ενδονουκλεάση *DpnI*. Η *DpnI* αναγνωρίζοντας την αλληλουχία 5'-Gm⁶ATC-3' υδρολύει μεταξύ των βάσεων A και T δημιουργώντας τυφλά άκρα. Η ενδονουκλεάση αυτή απαιτεί μεθυλιωμένα αμινοξικά κατάλοιπα αδενίνης και γι αυτό μπορεί και υδρολύει μόνο αλληλουχίες που περιέχουν N⁶-μεθυλαδενίνη. Το πλασμίδιο με την επιθυμητή μετάλλαξη δεν περιέχει μεθυλιωμένο DNA και δεν υδρολύεται. Στη συνέχεια το νεοσυντιθέμενο πλασμίδιο μετασχηματίζεται με δεκτικά κύτταρα και οι εγκοπές που υπάρχουν επιδιορθώνονται *in vivo* από τον κυτταρικό μηχανισμό και έτσι προκύπτει ένα μεταλλαγμένο κυκλικό πλασμίδιο (Chronopoulou & Labrou, 2011).

2.2.1.8. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΒΑΣΕΩΝ DNA ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ

Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων πραγματοποιήθηκαν από την εταιρία από την εταιρεία MWG-Biotech AG (Γερμανία). Η μετάφραση των γονιδίων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος Translate (<http://web.expasy.org/translate/>) του διακομιστή μοριακής βιολογίας ExPASy.

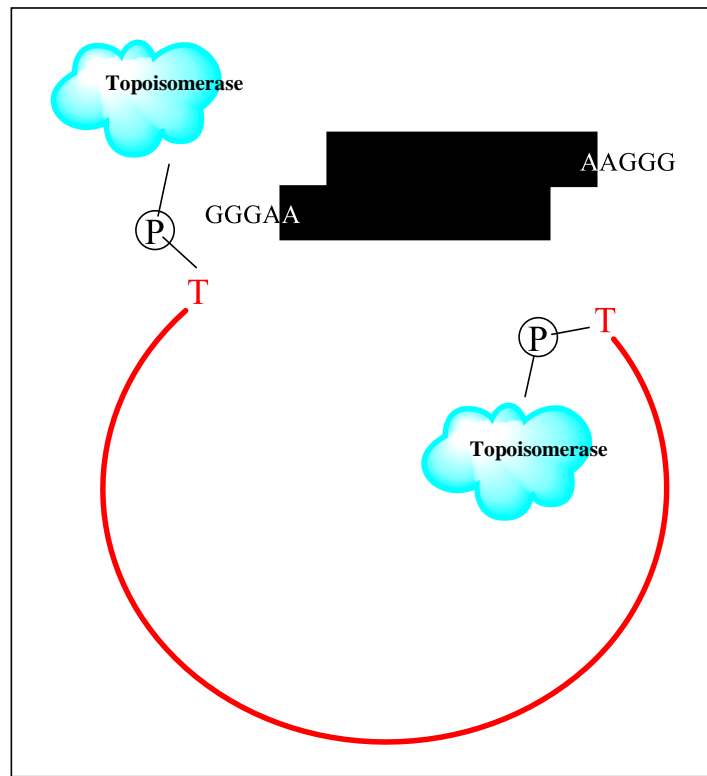
2.2.1.9. ΕΝΩΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ pEXP5-CT/TOPO ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E.coli* TURBO.

Για την αντίδραση της ένωσης του προϊόντος PCR στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO[®] και για τον μετασχηματισμό των δεκτικών κυττάρων *E. coli* Turbo με τα ανασυνδιασμένα πλασμίδια, έγινε χρήση της τεχνολογίας TOPO[®] Cloning, σύμφωνα με τη περιγραφή του βιβλίου οδηγιών pEXP5-CT/TOPO[®]TA kit (Invitrogen, USA). Οι πλασμιδιακοί φορείς TOPO αποτελούν την πιο εξελιγμένη γενιά πλασμιδιακών φορέων. Συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα των φαγοπλασμιδίων σε συνδυασμό με τη δράση του ενζύμου τοποϊσομεράση I η οποία επιταχύνει και διευκολύνει τη διαδικασία κλωνοποίησης καταργώντας σχεδόν την ανάγκη δημιουργίας συμβατών άκρων με τη χρήση των ενδονουκλεασών περιορισμού.

Το ένζυμο τοποϊσομεράση I έχει την ικανότητα να δρα σαν ένζυμο περιορισμού και σαν λιγάση. Ο βιολογικός της ρόλος είναι να «κόβει» και επανενώνει τμήματα DNA. Η τοποϊσομεράση I, που απομονώνεται από τον ιό Vaccinia, αναγνωρίζει την ακολουθία στόχο 5'-(C/T)CCTT-3' και έχει την ικανότητα να δημιουργεί ομοιοπολικό δεσμό με τη φωσφορική ομάδα του νουκλεοτιδίου της θυμίνης στο 3'-άκρο. Το ένζυμο διακόπτει τη συνέχεια της μίας DNA αλυσίδας και επιτρέπει την αποέλιξη του DNA. Στη συνέχεια το ένζυμο λειτουργεί ως λιγάση συνδέοντας τα άκρα στο σημείο του ρήγματος στη DNA αλυσίδα και στη συνέχεια αποδεσμεύεται από αυτή.

Η διαδικασία αντίδρασης για την ένωση του προϊόντος PCR με τον πλασμιδιακό φορέα περιγράφεται ως εξής:

Κατάλοιπο αδενίνης (A) προστίθεται στο 3'-άκρο του PCR προϊόντος ώστε να γίνει η πρόσδεσή του με τον πλασμιδιακό φορέα (**Εικόνα 2. 3**). Για την προσθήκη αναμιγνύονται 10 μL PCR προϊόν με 1 Unit taq πολυμεράσης. Το μίγμα επωάζεται για 10 min στους 72 °C.

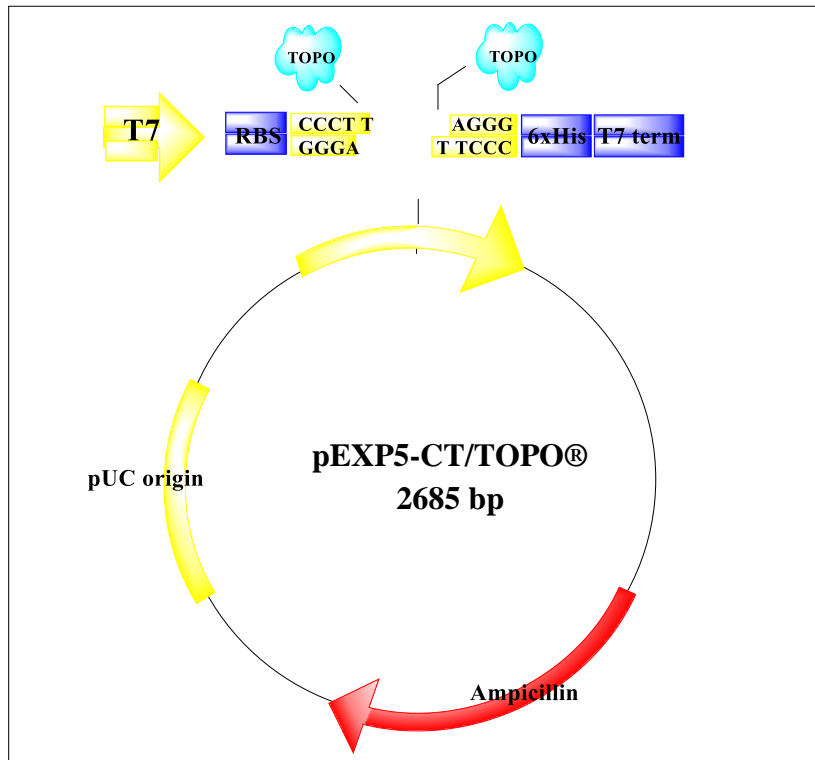


Εικόνα 2. 3: Τρόπος πρόσδεσης του προϊόντος PCR στον πλασμιδιακό φορέα.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται η αντίδραση κλωνοποίησης του προϊόντος PCR στον φορέα πλασμιδίου όπου γίνεται ανάμιξη:

- 1-4 μL προϊόντος
- 1 μL φορέα pEXP5-CT/TOPO[®]
- 1 μL διαλύματος αλάτων (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂)
- Δις-απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι V_{total} της αντίδρασης 6 μL

Το μίγμα αναδεύεται ήπια, επωάζεται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (22-25 °C). Στη συνέχεια ακολουθεί μετασηματισμός των δεκτικών κυττάρων *E. coli* Turbo. Όλη η ποσότητα της αντίδρασης προστίθεται σε 50 μL δεκτικών κυττάρων και αναμιγνύονται με ήπιο τρόπο και επωάζεται σε πάγο για 30 min. Ακολουθεί θερμικό σοκ των κυττάρων στους 42 °C για 1,5 min και μεταφέρονται άμεσα στον πάγο για 3-5 min. Γίνεται προσθήκη 250 mL θρεπτικού διαλύματος SOC και ακολουθεί καλή ανάμιξη. Το μίγμα επωάζεται στους 37 °C για 1 h με συνεχή ανάδευση. Τέλος 100-200 μL επιστρώνονται σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο LB, περιέχοντας ως δείκτη επιλογής το αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 °C για 12-16 h.



Εικόνα 2. 4: Απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα pEXP5-CT/TOPO®.

2.2.1.10. ΕΝΩΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ pETite.

Για την αντίδραση της ένωσης του προϊόντος PCR στον πλασμιδιακό φορέα pETite C-His DNA και για τον μετασχηματισμό των δεκτικών κυττάρων *E. coli* HI-Control 10G έγινε χρήση της τεχνολογίας Expresso T7 cloning και Expression System της εταιρίας Lucigen (USA) σύμφωνα με τη περιγραφή του βιβλίου οδηγιών Expresso™ T7 Cloning and Expression System kit (Lucigen, USA).

Αποτελεί μια απλή μέθοδος για την ταχεία κλωνοποίηση και έκφραση των 6xHis-πρωτεϊνών. Το σύστημα βασίζεται στο επαγωγίμο σύστημα έκφρασης T7 αλλά παρέχει βελτιωμένο έλεγχο επί της έκφρασης του γονιδίου.

Η διαδικασία κλωνοποίησης του επιθυμητού γονιδίου στον pETite πλασμιδιακό φορέα απαιτεί μια διαφορετική διαδικασία επεξεργασίας του γονιδίου. Αρχικά, γίνεται ενίσχυση του γονιδίου με ειδικούς εκκινητές, των οποίων ένα τμήμα της αλληλουχίας είναι καθορισμένο από την αλληλουχία του φορέα (**Πίνακας 2. 5**). Τα κωδικόνια XXX₂-XXX₈ αντιπροσωπεύουν τα κωδικόνια 2-8 του γονιδίου-στόχου. Τα κωδικόνια XXX_n-XXX_{n-6} αντιπροσωπεύουν τα 7 τελευταία συμπληρωματικά κωδικόνια του επιθυμητού γονιδίου.

Πίνακας 2. 5: Αλληλουχία εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό τη υποκλωνοποίηση γονιδίων σε πλασμιδιακό φορέα pETite της εταιρίας Lucigen (USA).

Εκκινητές	Νουκλεοτιδική αλληλουχία (5'→3')
Forward primer	5'-GAA GGA GAT ATA CAT ATG XXX ₂ XXX ₃ XXX ₄ XXX ₅ XXX ₆ XXX ₇ XXX ₈
Reverse primer	5'-GTG ATG GTG GTG ATG ATG XXX _n XXX _{n-1} XXX _{n-2} XXX _{n-3} XXX _{n-4} XXX _{n-5} XXX _{n-6}

Η διαδικασία αντίδρασης για την ένωση του προϊόντος PCR με τον πλασμιδιακό φορέα περιγράφεται ως εξής:

Για τελικό όγκο της PCR αντίδρασης 50 μ L γίνεται μίξη με 25 μ L διαλύματος πολυμεράσης (2x Accura HF Reaction Buffer), 1 μ L dNTPs (10 mM), 1 μ L από κάθε εκκινητή (**Πίνακας 2. 5**), 2 μ L πλασμιδιακό DNA, 19 μ L δις-απιονισμένο νερό και 1 μ L πολυμεράσης Accura™ High-Fidelity (2 Units).

Ακολουθεί ενίσχυση του γονιδίου με PCR αντίδραση και οι συνθήκες περιγράφονται αναλυτικά στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 2. 6: Στάδια της PCR αντίδρασης για ενίσχυση του πλασμιδιακού DNA με συμπληρωματικά άκρα κατάλληλα για κλωνοποίηση σε πλασμιδιακό φορέα.

A. ΑΡΧΙΚΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ

Στους 94 °C για 30 s

B. ΚΥΚΛΟΣ

Αποδιάταξη στους 94 °C για 15 s

Υβριδισμός εκκινητών στους 60 °C για 15 s

Επιμήκυνση στους 72 °C για 1 min

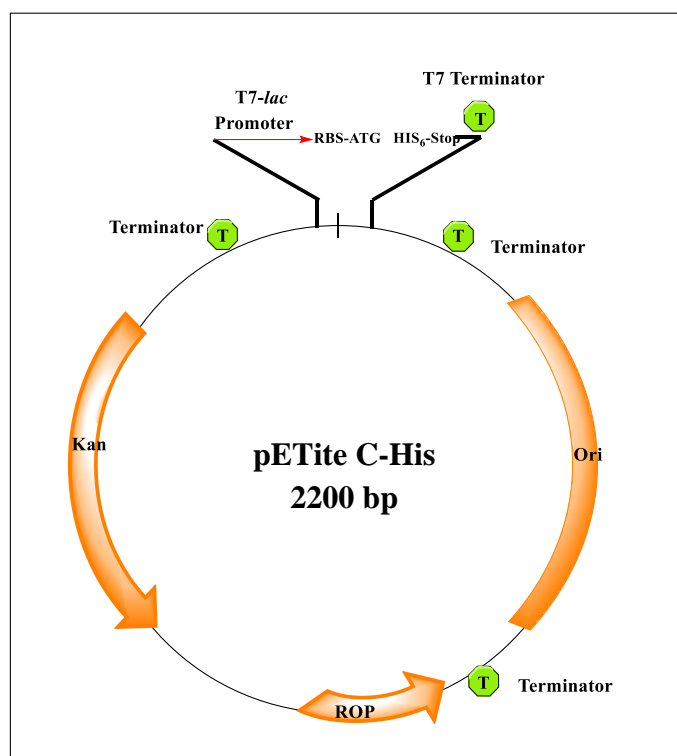
25 κύκλοι

Γ. ΤΕΛΙΚΗ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ

Επιμήκυνση στους 72 °C για 10 min

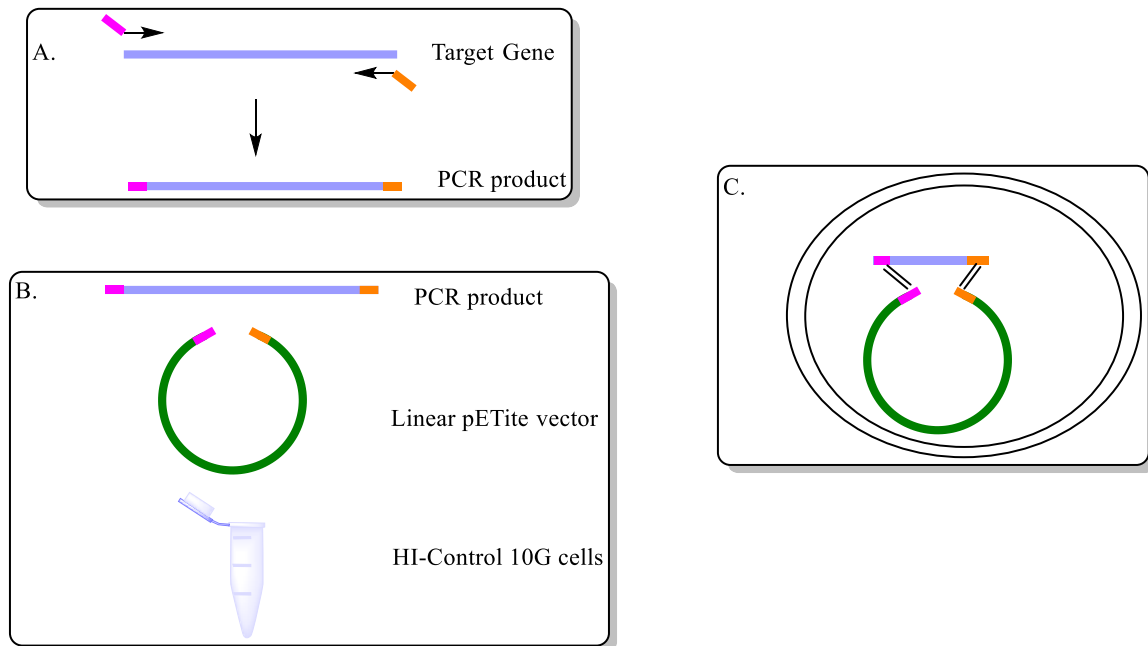
Στη συνέχεια πραγματοποιείται η αντίδραση κλωνοποίησης (**Εικόνα 2. 6**) του προϊόντος PCR στο φορέα πλασμιδίου pETite όπου γίνεται ανάμιξη 36 μ L HI-Control™ δεκτικών κυττάρων με 3 μ L προϊόντος PCR και 1 μ L πλασμιδιακό φορέα (**Εικόνα 2. 5**). Το μίγμα αναμιγνύεται με ήπιο τρόπο και επωάζεται σε πάγο για 30

min. Ακολουθεί θερμικό σοκ των κυττάρων στους 42 °C για 45 s και μεταφέρονται άμεσα στον πάγο για 3-5 min. Γίνεται προσθήκη 960mL κατάλληλου θρεπτικού διαλύματος και ακολουθεί καλή ανάμειξη. Το μίγμα επωάζεται στους 37 °C για 1 h με συνεχή ανάδευση. Ακολουθεί ήπια φυγοκέντρηση 1500 rpm για μερικά δευτερόλεπτα, απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση σε 100 μL κατάλληλο θρεπτικό διάλυμα. Τέλος 100 μL επιστρώνονται σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο YT, περιέχοντας ως δείκτη επιλογής το αντιβιοτικό καναμυκίνη (25 μg/mL). Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 °C για 12-16 h.



Εικόνα 2. 5: Απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα pETite C-His DNA

Το καθορισμένο τμήμα (εκκινητής) του πλασμιδιακού φορέα (Εικόνα 2. 5) περιλαμβάνει ένα κωδικόνιο ATG για να ξεκινήσει η διαδικασία της μετάφρασης.



Εικόνα 2. 6: Κλωνοποίηση με τη χρήση του kit Expresso T7 cloning και Expression System της εταιρείας Lucigen, USA. **A.:** Ενίσχυση του γονιδίου-στόχου με τη χρήση εκκινητών που περιέχουν 18 bp συμπληρωματικών με τα άκρα του πλασμιδιακού φορέα pETite, **B.:** Ανάμιξη του προϊόντος PCR που προέκυψε από το A. μαζί με τον πλασμιδιακό φορέα pETite και των δεκτικών κυττάρων *E. coli* HI-Control 10G, **C.:** Μετασχηματισμός με θερμικό σοκ και επιλογή των ανασυνδυασμένων αποικιών με δείκτη επιλογής το αντιβιοτικό καναμυκίνη.

2.2.1.11. ΕΤΕΡΟΛΟΓΟΣ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ GST ΣΕ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E. coli*.

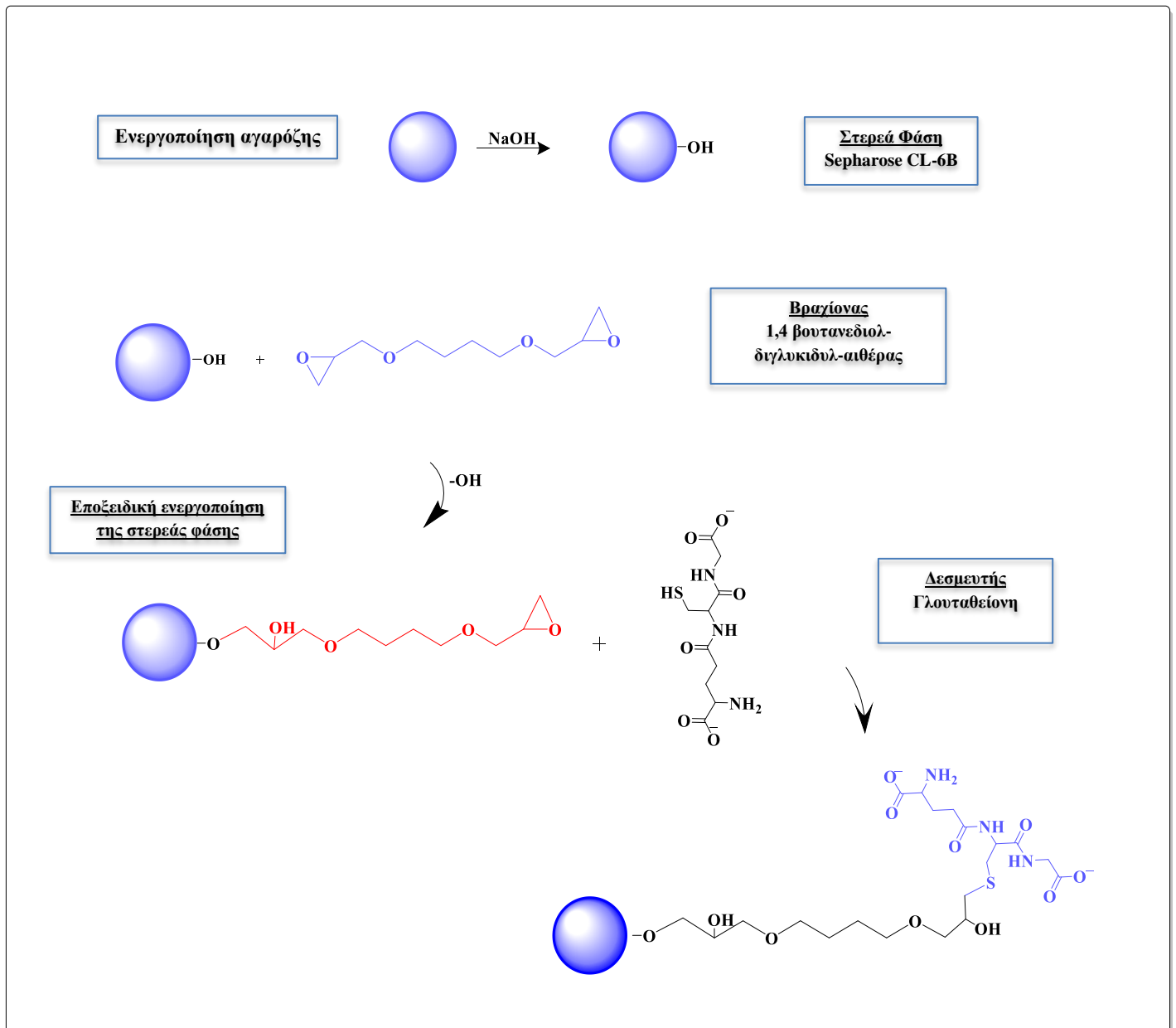
Η έκφραση πραγματοποιήθηκε σε διάφορα στελέχη κυττάρων *E. coli* χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό διάλυμα το LB και ως δείκτη επιλογής το αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Σε κωνική φιάλη που περιέχει 450 mL θρεπτικό υλικό LB, εμβολιάζονται με 50 mL ολονύχτιας καλλιέργειας (12-16 h) κατάλληλων μετασχηματισμένων κύτταρων. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C σε περιστροφικό αναδευτήρα (200-220 rpm) μέχρι η απορρόφηση (ABS_{600nm}) να φτάσει 0,5-0,6 όπου και προστίθεται ο επαγωγέας IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Έπειτα η επώαση συνεχίζεται για 4 h στους 37 °C και φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 20 min. Τα κύτταρα που απομένουν συλλέγονται και φυλάσσονται στους -20 °C.

2.2.1.12. ΛΥΣΙΜΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ

Τα κύτταρα που συλλέχθηκαν κατά τη διαδικασία της ετερόλογης έκφρασης, επαναιωρούνται σε τριπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM KH_2PO_4 pH 7 (διάλυμα εξισορρόπησης στη χρωματογραφία συγγένειας). Η λύση των κυττάρων γίνεται με χρήση υπερήχων διάρκειας 10 s, με τη διαδικασία να επαναλαμβάνεται για 3-4 φορές. Το αιώρημα που προκύπτει φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 5 min και συλλέγεται το υπερκείμενο για περαιτέρω μελέτη.

2.2.1.13. ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ 1,4-ΒΟΥΤΑΝΕΔΙΥΛ-ΔΙΓΛΥΚΙΔΥΛ-ΑΙΘΕΡΑ-GSH-SEPHAROSE-CL6B (BES-GSH)

Σφαιρίδια αγαρόζης (Sephacrose-CL6B) βάρους 15 g πλένονται με 200 mL δις αποιονισμένο νερό, διηθούνται σε ηθμό με αντλία κενού και τοποθετούνται σε falcon. Για την ενεργοποίηση της αγαρόζης γίνεται προσθήκη 19 mL νερού και 1,2 mL NaOH 10 M. Το αιώρημα επώαζεται υπό ήπια ανάδευση για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Στη συνέχεια προστίθενται 3 mL 1,4-βουτανεδιυλδιγλυκιδυλαιθέρα. Ακολουθεί επώαση για άλλες 2 h υπό συνεχή ανάδευση και σε θερμοκρασία 25 °C. Το διάλυμα μεταφέρεται σε φιάλη με πώμα για να μην υδρολυθεί ο αιθέρας και ακολουθεί διήθηση και πλύση με dd H_2O . Η αγαρόζη προστίθεται σε διάλυμα GSH 20 $\mu\text{mol/g}$ αγαρόζης (300 $\mu\text{mol}/15$ g αγαρόζης), το οποίο είναι διαλυμένο σε 1 M ρυθμικού διαλύματος Na_2HPO_4 pH 8 (40 mL). Η αντίδραση πραγματοποιείται για 42 h υπό συνεχή ανάδευση στους 25 °C. Τέλος, ακολουθεί διήθηση και πλύσιμο με dd H_2O με όγκο δεκαπλάσιο του προσροφητή. Η αποθήκευση πραγματοποιείται σε διάλυμα 20 % (v/v) αιθανόλη στους 4 °C. Η διαδικασία φαίνεται στην **Εικόνα 2. 7**.

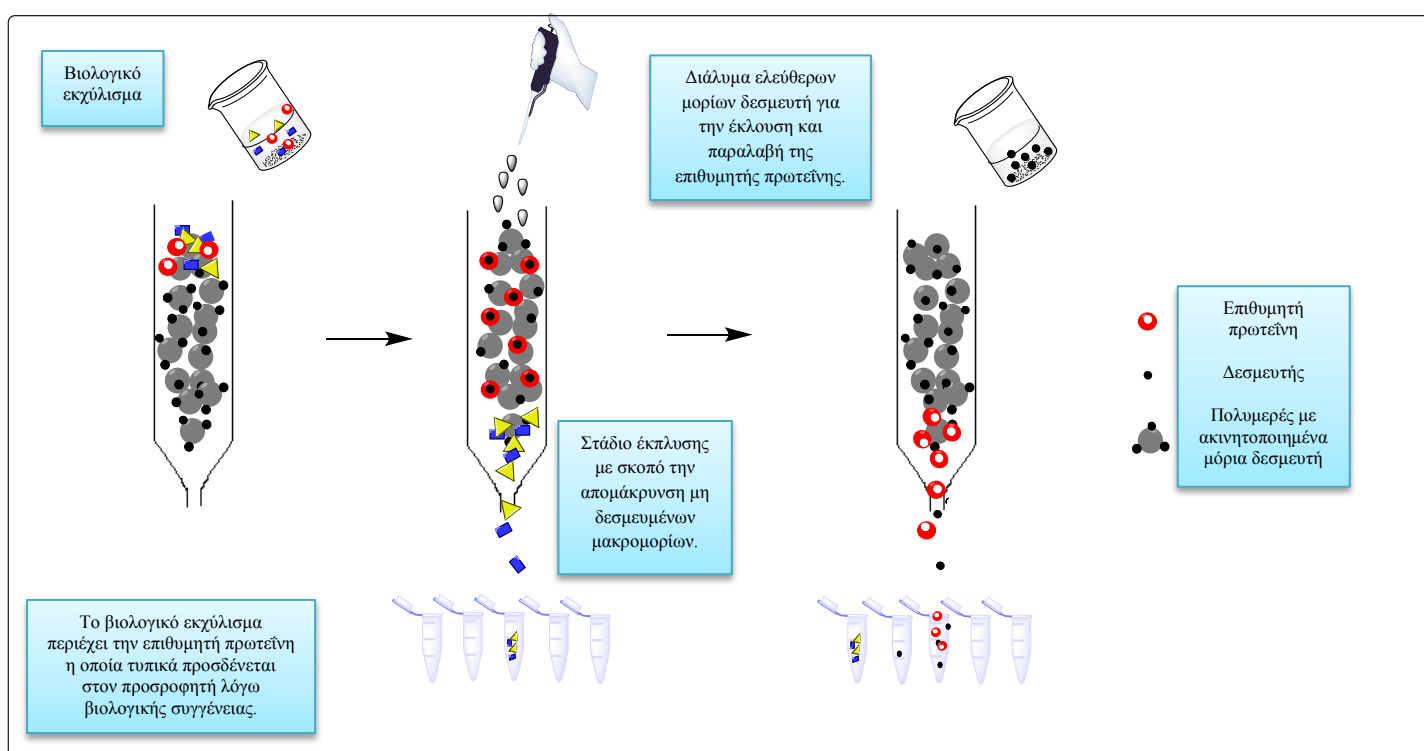


Εικόνα 2. 7: Σύνθεση προσροφητή συγγένειας 1,4-βουτανεδιυλ-διγλυκιδυλ-αιθερα-GSH-σεφαρόζη-CL-6B (BES-GSH) μέσω εποξειδικής ενεργοποίησης της στερεάς φάσης.

2.2.1.14.ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ GSTs ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΣΕ ΣΤΗΛΗ ΜΕ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ BES-GSH ΚΑΙ S-HEXYL ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ

Ο καθαρισμός κάποιων ισοενζύμων GSTs πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία συγγένειας έχοντας ως προσροφητή τον BES-GSH. Η διαδικασία φαίνεται στην **Εικόνα 2. 8**. Ο προσροφητής εισάγεται σε στήλη χρωματογραφίας (1 mL ή 2 mL) και εξισορροπείται με 15 mL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 20 mM KH_2PO_4 pH 7 (διάλυμα εξισορρόπησης) και σε θερμοκρασία 4 °C. Το βιολογικό εκχύλισμα που

προκύπτει από το σπάσιμο μετασχηματισμένων κυττάρων που φέρουν την επιθυμητή πρωτεΐνη/στόχο, φορτώνεται στη στήλη χρωματογραφίας. Λόγω της συγγένειας του δεσμευτή με την πρωτεΐνη/στόχο, η τελευταία ακινητοποιείται στο πολυμερές και ακολουθεί έκπλυση της στήλης με 20 mL διαλύματος εξισορρόπησης ώστε να γίνει η απομάκρυνση των μη δεσμευμένων μακρομορίων. Η παραλαβή του ενζύμου γίνεται μέσω έκλουσης χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM KH_2PO_4 και 10 mM GSH pH 7. Τα μόρια της γλουταθειόνης συναγωνίζονται το σύμπλοκο ένζυμο-δεσμευτή. Ακολουθεί αναγέννηση του χρωματογραφικού υλικού με διάλυμα 10 mL από 0,1 M Tris-HCl και 1 M NaCl pH 8,5, 10 mL 0,1 M CH_3COONa και 1 M NaCl pH 5,5 και τέλος ξέπλυμα με 10 mL dd H_2O .



Εικόνα 2. 8: Αρχή λειτουργίας της χρωματογραφίας συγγένειας.

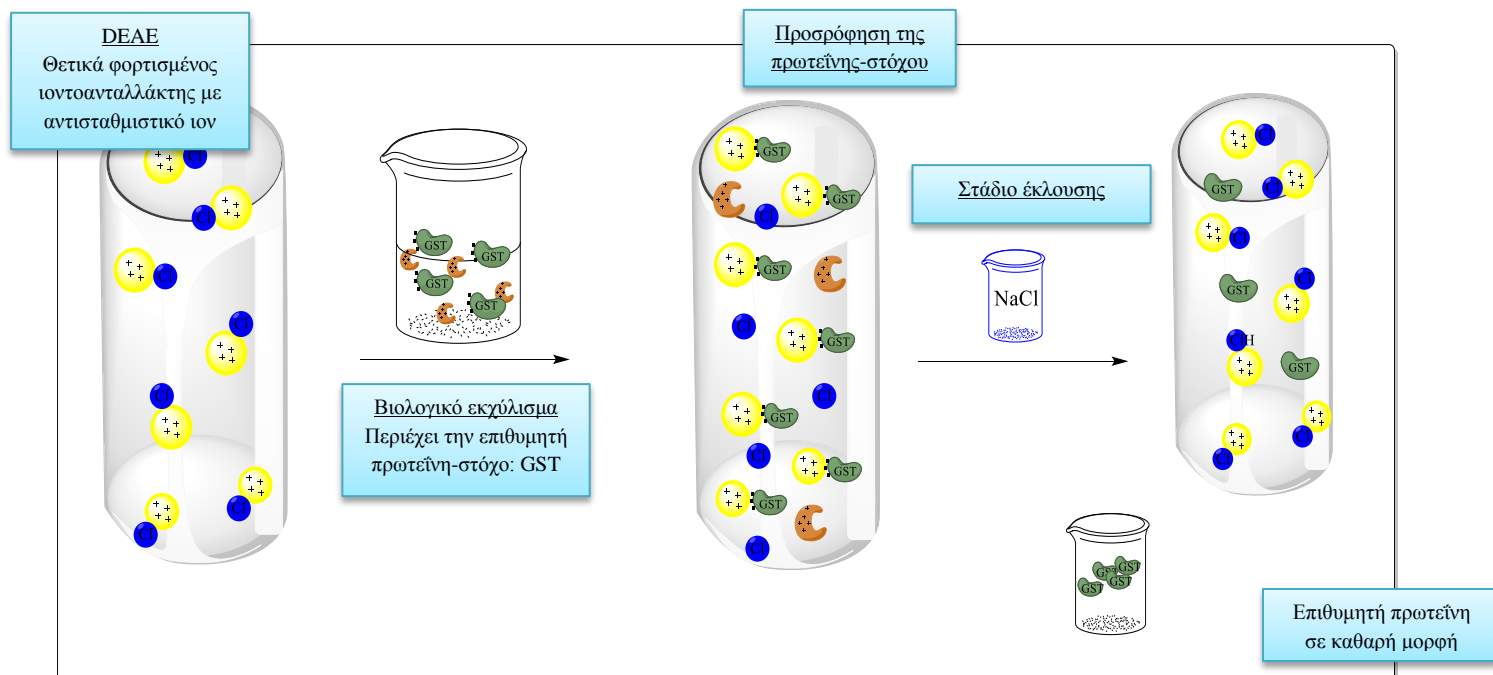
2.2.1.15.ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ ΙΟΝΤΩΝ ΣΕ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ DEAE-SEPHAROSE

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ιονισμένων ουσιών και στηρίζεται στην εκλεκτική επιβράδυνση των ιονισμένων σωματιδίων του μίγματος λόγω της ανταλλαγής τους με ιόντα της στατικής φάσης. Η διαδικασία φαίνεται στην **Εικόνα 2. 9**. Η στατική φάση ή αλλιώς προσροφήτης αποτελείται από πολυμερείς ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους όπως οι ιοντοανταλλάκτες της δεξτράνης

(Sephadex) και της αραρόζης (Sepharose), οι οποίες και διαχωρίζονται σε ανιονανταλλάκτες και σε κατιονανταλλάκτες.

Για τον καθαρισμό κάποιων ισοενζύμων GST της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε Sepharose με θετικά φορτισμένο ιοντοανταλλάκτη, τη DEAE (διαιθυλοαιθυλαμίνη). Ο συγκεκριμένος ιοντοανταλλάκτης φέρει αρνητικά φορτισμένα ιόντα Cl^- (αντισταθμιστικό ιόν) και φαίνεται να είναι εξουδετερωμένος. Τα βιολογικό υλικό που φορτώνεται στον προσροφητή, αποτελείται από πρωτεΐνες με φορτίο αντίθετο από εκείνο του ιοντοανταλλάκτη με αποτέλεσμα να συναγωνίζονται και να απομακρύνουν τα ιόντα Cl^- και να προσδένονται στη χρωματογραφική στήλη. Η διαδικασία φαίνεται στην **Εικόνα 2. 9**.

Ο προσροφητής εισάγεται στη στήλη χρωματογραφίας και εξισορροπείται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (20 mL από 200 mM KH_2PO_4 pH 7 και 30 mL από 20 mM KH_2PO_4 pH 7). Ακολουθεί φόρτωση του βιολογικού εκχυλίσματος που φέρει την πρωτεΐνη-στόχο και ακολουθεί έκπλυση με 10 mL φωσφορικών 20 mM KH_2PO_4 pH 7 με σκοπό την απομάκρυνση των αδέσμευτων ενώσεων. Η έκλυση του ενζύμου πραγματοποιείται με μεταβολή της ιοντικής ισχύς με 4 κλασματώσεις των 4 mL με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (0,05M, 0,1 M, 0,2 M, 0,3 M). Ακολουθεί αναγέννηση με διάλυμα 10 mL από 0,1 M Tris-HCl και 1 M NaCl pH 8,5, 10 mL 0,1 M CH_3COONa και 1 M NaCl pH 5,5 και τέλος ξέπλυμα με 10 mL dd H_2O .



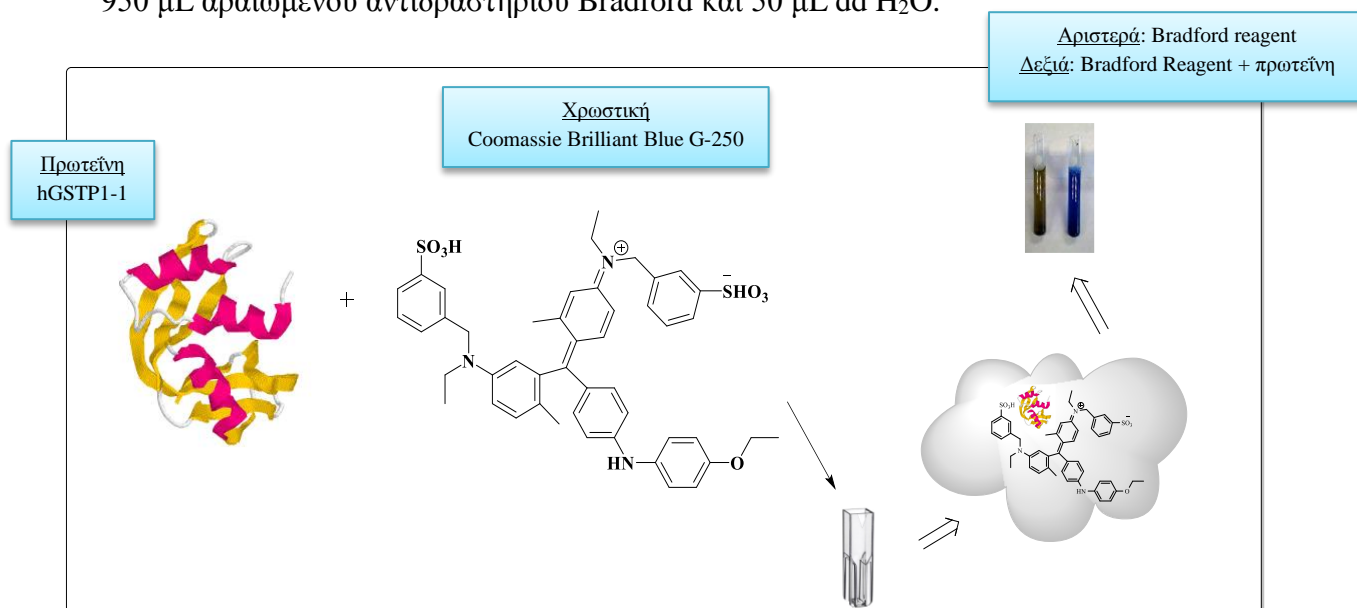
Εικόνα 2. 9: Αρχή λειτουργίας χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής.

2.2.1.16.ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD (1976)

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να αλλάζει χρώμα όταν αλληλοεπιδρά με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον (Εικόνα 2. 10). Η ελεύθερη χρωστική έχει χρώμα καστανό και απορροφά στα 465 nm, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνη-χρωστική είναι γαλάζιο και απορροφά στα 595 nm. Η μέθοδος είναι αξιόπιστη για πρωτεϊνικά δείγματα των οποίων η συγκέντρωση κυμαίνεται από 40-200 µg/ mL.

Αρχικά 100 mg χρωστικής διαλύονται σε 100mL υδατικού διαλύματος μεθανόλης 50% (v/v). Στο διάλυμα προστίθενται 100 mL πυκνού φωσφορικού οξέος 85 % (v/v) και η αποθήκευση γίνεται σε σκοτεινό δοχείο. Το διάλυμα που προκύπτει αποτελεί το πυκνό αντιδραστήριο Bradford, το οποίο διατηρείται στους 25 °C. Για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης το παραπάνω αντιδραστήριο αραιώνεται με νερό σε αναλογία ¼ και το διάλυμα που προκύπτει διατηρείται σε σκοτεινό δοχείο και σε θερμοκρασία 25 °C για 24 h.

Για τον προσδιορισμό αγνώστου δείγματος πρωτεΐνης, σε 950 µL του αραιωμένου αντιδραστηρίου Bradford προστίθενται όγκος πρωτεΐνης κατάλληλης συγκέντρωσης ώστε στην κυβελίδα να υπάρχουν 2-10µg αυτής, ενώ ο μέγιστος όγκος δείγματος να μη ξεπερνάει τα 50 mL. Το μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20-35 min σε σκοτάδι και ακολούθως λαμβάνεται η απορρόφηση στα 595 nm. Ο μάρτυρας 950 µL αραιωμένου αντιδραστηρίου Bradford και 50 µL dd H₂O.



Εικόνα 2. 10: Αρχή λειτουργίας Bradford.

Η απορρόφηση ανάγεται σε συγκέντρωση πρωτεΐνης με βάση πρότυπη καμπύλη αναφοράς από την οποία υπολογίζεται ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης. Η καμπύλη αναφοράς σχεδιάζεται έχοντας ως πρότυπο γνωστές συγκεντρώσεις (4-20 µg) αλβουμίνης από ορό μόσχου. Το stock που χρησιμοποιήθηκε είναι 0,2 mg BSA/ mL. Για τον υπολογισμό των μονάδων mg/ mL χρησιμοποιείται ο τύπος των Beer-Lambert:

$$A=c \cdot e \cdot d$$

A: απορρόφηση

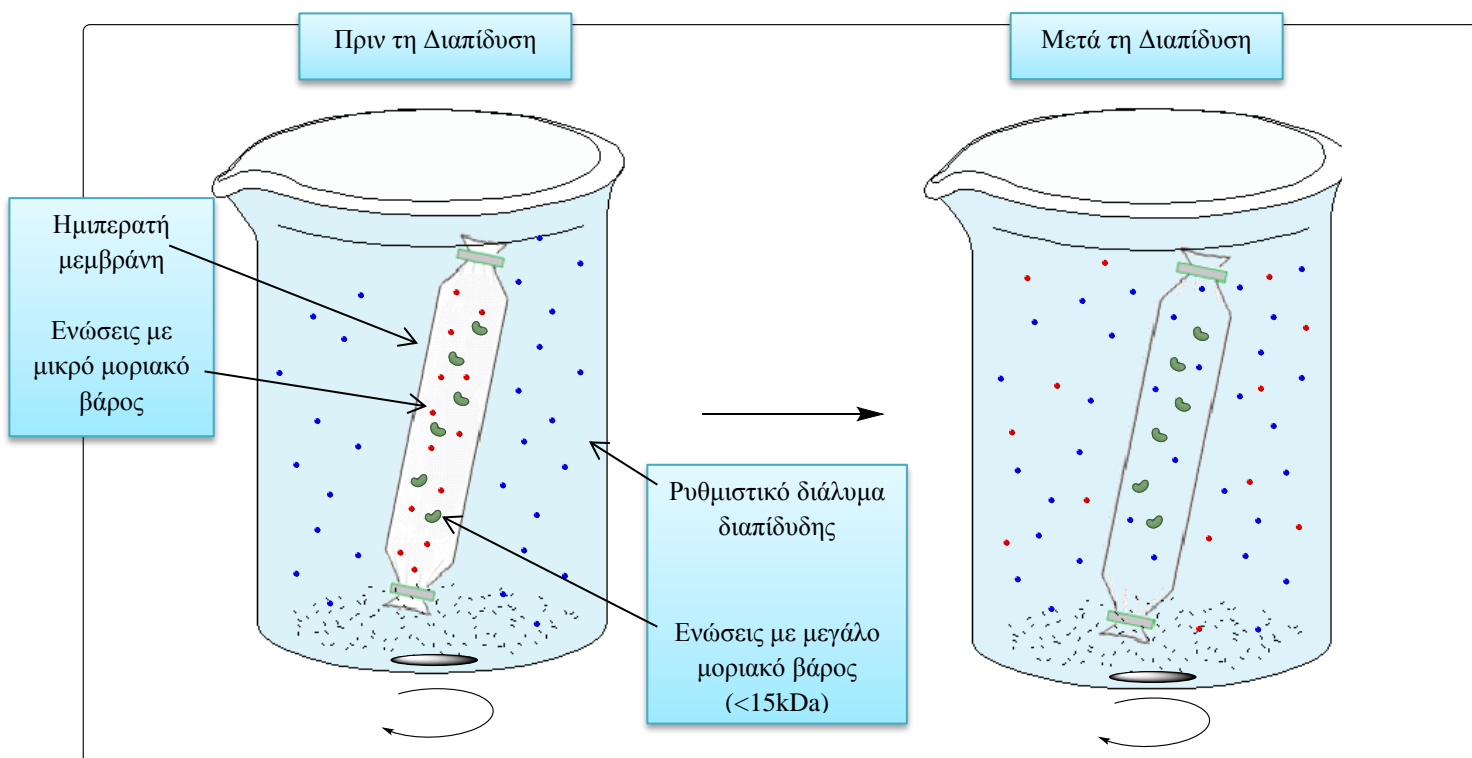
c: συγκέντρωση πρωτεΐνης σε mg/ mL

e: συντελεστής μοριακής απόσβεσης (κλίση της ευθείας από την πρότυπη που προκύπτει από γνωστές συγκεντρώσεις αλβουμίνης)

d: μήκος κυψελίδας 1 cm

2.2.1.17.ΔΙΑΠΙΔΥΣΗ

Το βιολογικό υλικό που φέρει την επιθυμητή πρωτεΐνη, πριν το στάδιο του καθαρισμού υποβάλλεται σε μια πρώτη μορφή καθαρισμού χαμηλού επιπέδου, σε διαπίδυση (**Εικόνα 2. 11**). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα 3-4 L κατάλληλης συγκέντρωσης και pH προκειμένου το βιολογικό υλικό να αποκτήσει την ίδια σύσταση και pH του ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης της χρωματογραφίας που θα ακολουθήσει. Για τη διαπίδυση, χρησιμοποιείται ημιπερατή μεμβράνη κυτταρίνης με όριο αποκλεισμού 12 kDa. Η διαδικασία αυτή διαρκεί 18-24 h και πραγματοποιείται στους 4 °C με ήπια ανάδευση. Επίσης, επιτυγχάνεται και η απομάκρυνση όλων των ενώσεων με μικρό μοριακό βάρος (>12 kDa).



Εικόνα 2. 11: Αρχή λειτουργίας της διαπίδυσης.

2.2.1.18. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΕΤΟΥΣΙΩΣΗΣ

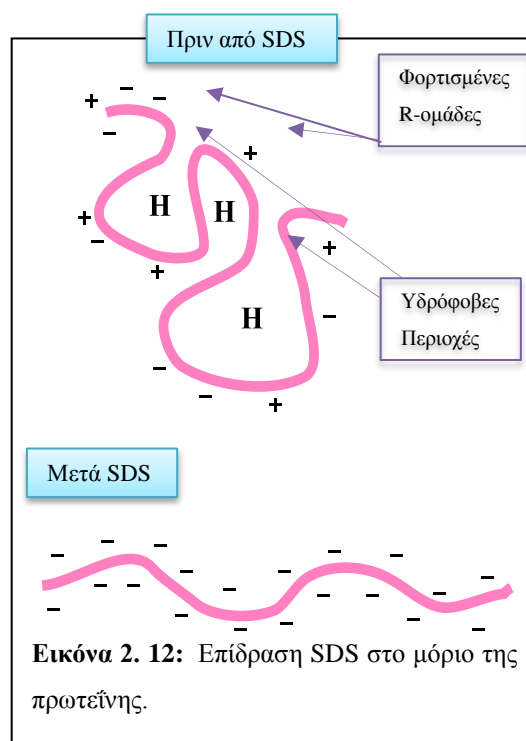
Για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών χρειάζεται πρωτεϊνικό δείγμα συγκέντρωσης περίπου 30-50 μg σε τελικό όγκο 20 μL (μέγιστη χωρητικότητα σε κάθε κανάλι της πηκτής) η οποία υπολογίζεται σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford. Η χαμηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης απαιτεί συμπύκνωση αυτής είτε με λυοφιλίωση είτε με κατακρήμνιση πρωτεϊνών με TCA (τριχλωροακετικό οξύ). Δείγματα με υψηλή συγκέντρωση αλατότητας υποβάλλονται σε διαπίδυση με ρυθμιστικό διάλυμα 25 mM Tris-HCl pH 6,8, όγκου ίσου του πρωτεϊνικού δείγματος x 1000 για 15-20 h.

Σε κάθε δείγμα με την κατάλληλη συγκέντρωση πρωτεΐνης γίνεται προσθήκη 10 μL ρυθμιστικού διαλύματος μετουσίωσης (Laemmli buffer) και 10 μL dd H₂O και ακολουθεί θέρμανση στους 95 °C για 10 min.

2.2.1.19. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΕΤΟΥΣΙΩΣΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΔΩΔΕΚΑΝΟΘΕΠΙΚΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ (SDS)

Η ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο Laemmli (1979) σε ασυνεχές σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων. Η μέθοδος βασίζεται στα σημεία ότι κάθε πρωτεΐνη φέρει θετικά και αρνητικά φορτία λόγω των αμινοξέων της, καθώς και μη πολικές υδρόφοβες περιοχές που βρίσκονται σε απόσταση από το πολικό υδατικό περιβάλλον. Όταν μία πρωτεΐνη επωάζεται με το επιφανειοδραστικό SDS, τότε οι πρωτεΐνες περιβάλλονται από ένα αρνητικό νέφος, το οποίο καταστρέφει τις υδρόφοβες περιοχές και οι πρωτεΐνες αλλάζουν δομή.

Η διαδικασία παρασκευής της πηκτής διαχωρισμού είναι η ακόλουθη: ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (875 μL) αναμειγνύεται με διάλυμα 10 % (w/v) SDS (70 μL) και διάλυμα ακρυλαμιδίου 14 % (w/v). Στη συνέχεια προστίθενται TEMED (6,24 μL) και υπερθειικό αμμώνιο (170 μL από stock 15 mg/ mL). Το μίγμα αραιώνεται με dd H₂O ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει στα 7 mL. Το μίγμα αναδεύεται ελαφρά και εισάγεται στο γυάλινο κάθετο καλούπι και η επιφάνεια καλύπτεται με 1 mL dd H₂O. Ο πολυμερισμός ολοκληρώνεται σε χρονικό διάστημα 20 min. Στη συνέχεια αφαιρείται το νερό και εισάγεται η πηκτή επιστοίβαξης, η παρασκευή της οποίας γίνεται ως εξής: ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης (625 μL) αναμειγνύεται με διάλυμα



10 % (w/v) SDS (50 μL) και διάλυμα ακρυλαμιδίου 4,5 % (w/v). Στη συνέχεια προστίθενται TEMED (6,25 μL) και υπερθειικό αμμώνιο (170 μL από stock 15 mg/ mL). Το μίγμα αραιώνεται με dd H₂O ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει στα 5 mL. Το δείγμα αναδεύεται ελαφρά και εισάγεται στο γυάλινο κάθετο καλούπι. Πριν ξεκινήσει ο πολυμερισμός, εισάγεται στη κορυφή της πηκτής κατάλληλος υποδοχέας (χτένα) ώστε να δημιουργηθούν τα κανάλια-θέσεις εισαγωγής των δειγμάτων. Ο πολυμερισμός ολοκληρώνεται σε περίπου 30 min. Τέλος, γίνεται προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροδίων 10x στη συσκευή και ακολουθεί

ηλεκτροφόρηση για περίπου 1 h σε ένταση 20 mA για κάθε πηκτή. Οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου.

2.2.1.20.ΧΡΩΣΗ ΜΕ COOMASSIE BRILLIANT BLUE R-250

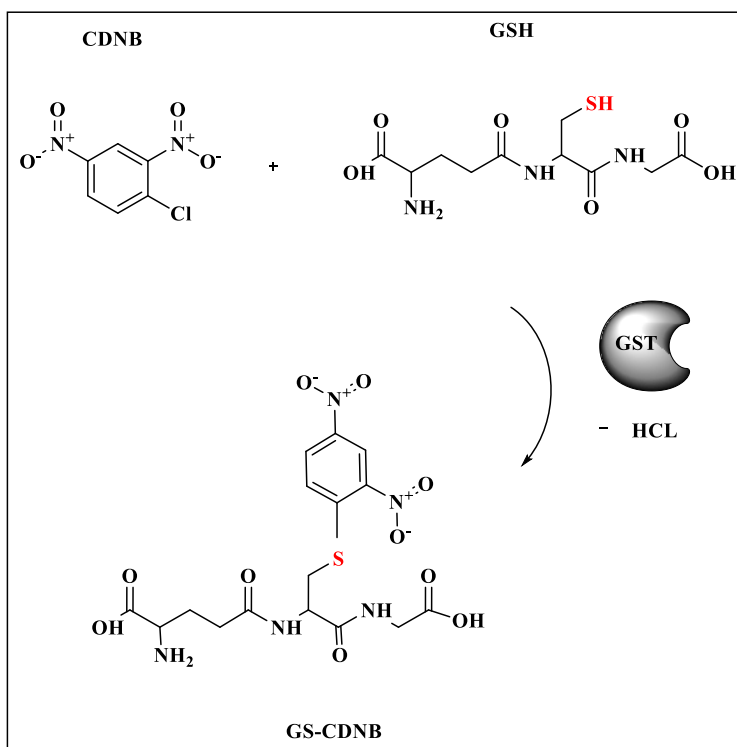
Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί εμβάπτιση της πηκτής σε υδατικό διάλυμα μεθανόλης [45 % (v/v)], οξικού οξέος [7 % (v/v)] και Coomassie Brilliant Blue R-250 [0,2 % (w/v)] για 30 min. Ο αποχρωματισμός της πηκτής πραγματοποιείται σε νερό με χρήση θέρμανσης (έως και βρασμό).

2.2.1.21. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ GST ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΝΙΤΡΟΒΕΝΖΟΛΙΟΥ: CDNB, BDNB, IDNB, FDNB, PNBC και NBD-Cl

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός του ενζύμου GST βασίζεται στον προσδιορισμό της ταχύτητας με τον οποίο σχηματίζεται το σύμπλοκο της γλουταθειόνης με το 1-χλώρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (GS-CDNB). Το GS-CDNB προσδιορίζεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 340 nm. Η απορρόφηση είναι ανάλογη της ενζυμικής δράσης η οποία επιταχύνει τη παρακάτω αντίδραση:

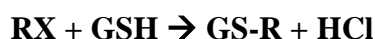


Η παραπάνω αντίδραση πραγματοποιείται με νουκλεόφιλη προσθήκη της σουλφυδρυλομάδας της γλουταθειόνης και τη δημιουργία του συμπλόκου GS-CDNB (Εικόνα 2. 13). Το μίγμα της αντίδρασης έχει όγκο 1 mL και περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου 0,1 M KH_2PO_4 pH 6,5, 2,5 mM GSH και 1 mM υπόστρωμα. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του συμπλόκου GS-CDNB επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του συντελεστή μοριακής απόσβεσης που είναι 9,6 L/mmole·cm.



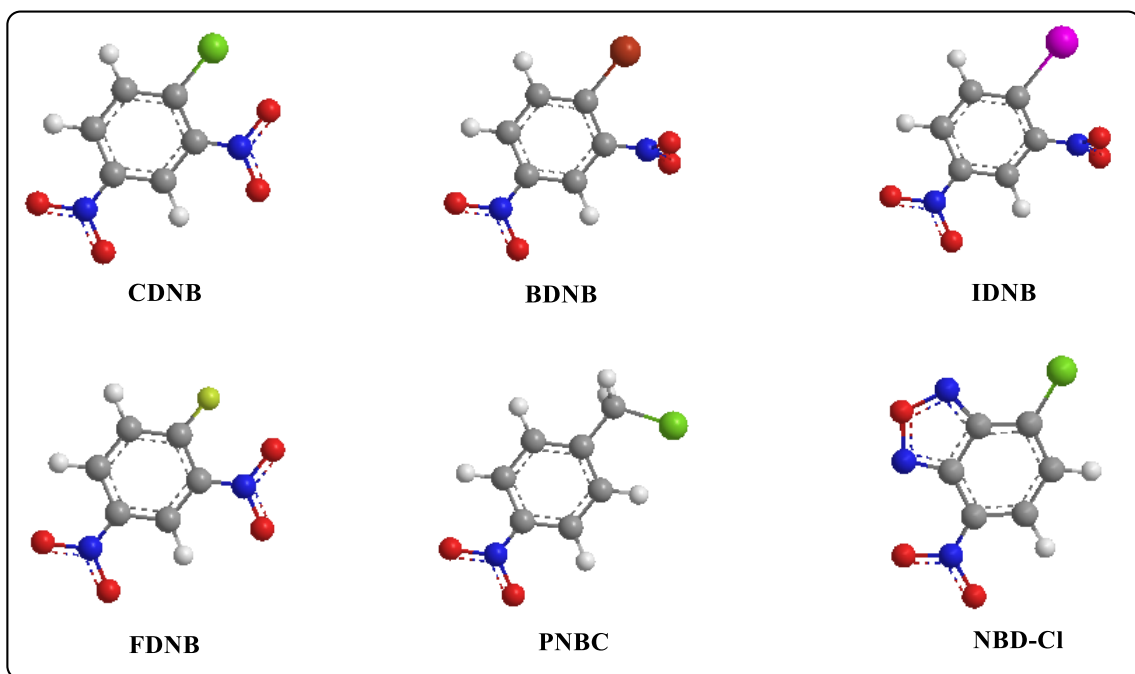
Εικόνα 2. 13: Σχηματισμός συμπλόκου (GS-CDNB) της γλουταθειόνης (GSH) με το 1-χλώρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB).

Η γενική αντίδραση που ακολουθούν τα αλογωμένα παράγωγα του νιτροβενζολίου (Εικόνα 2. 14) 1-ιωδο-2,4-δινιτροβενζόλιο (IDNB), 1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο (FDNB), 1-βρωμο-2,4-δινιτροβενζόλιο (BDNB), π-νιτροβενζυλ-χλωρίδιο (PNBC) και 4-χλωρο-7-νιτροβενζο-1,3-διαζόλιο (NBD-Cl) με το μόριο της γλουταθειόνης (GSH) είναι:



Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας των υποστρώματων CDNB, IDNB, FDNB και BDNB πραγματοποιήθηκε στα 340 nm. Οι πειραματικές συνθήκες ως προς τα υποστρώματα IDNB, FDNB και BDNB είναι ίδιες με τις αντίστοιχες ως προς CDNB.

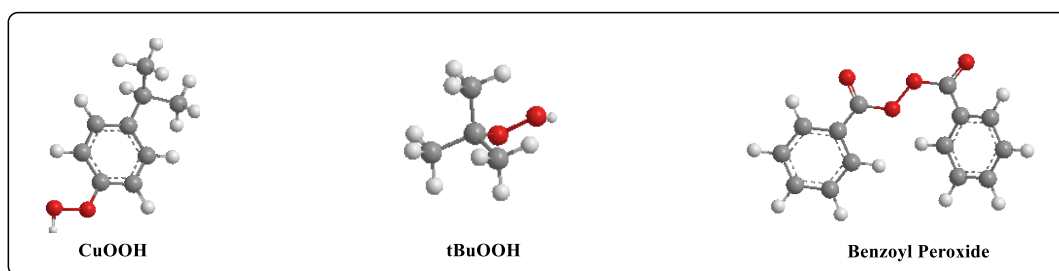
Για το υπόστρωμα PNBC (1 mM) η συγκέντρωση της γλουταθειόνης ανέρχεται στα 5 mM με ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 0,1 M KH_2PO_4 , 1 mM EDTA pH 6,5 ενώ για το υπόστρωμα NBD-Cl (0,2 mM) η γλουταθειόνη έχει τελική συγκέντρωση 0,5 mM με ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 0,1 M CH_3COONa pH 5. Τέλος, ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας GST για τα υποστρώματα PNBC και NBD-Cl πραγματοποιήθηκε στα 310 nm και 420 nm αντίστοιχα.



Εικόνα 2. 14: Οι δομές των αλογωμένων νιτροβενζολίων.

2.2.1.22. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ GST ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ CuOOH, tBuOOH ΚΑΙ ΒΕΝΖΟΪΚΟ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ

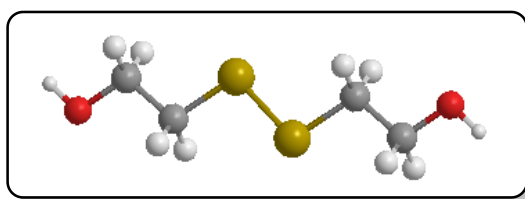
Για τον προσδιορισμό δράσης υπεροξειδάσης με τα βασικά υποστρώματα των GSTs υδροϋπεροξείδιο του κουμενίου (CuOOH), τ-βουτυλο-υδροϋπεροξείδιο (BuOOH) και βενζοϊκό υδροϋπεροξείδιο (Benzoyl Peroxide) (**Εικόνα 2.15**) ακολουθήθηκαν οι μέθοδοι του Tappel 1978. Ο προσδιορισμός γίνεται φωτομετρικά και βασίζεται στη μέτρηση της ταχύτητας μετατροπής του NADPH σε NADP^+ στα 340 nm. Ο ποσοτικός προσδιορισμός επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του συντελεστή μοριακής απόσβεσης που είναι 6,22 L/mmol·cm. Ο τελικός όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης είναι στα 600 μL και περιέχει 1 mM GSH, 2,2 mM NADPH, 1 Unit ρεδουκτάση της γλουταθειόνης και 1,5 mM υπόστρωμα. Το ρυθμιστικό διάλυμα είχε συγκέντρωση 0,1 M KH_2PO_4 , 1 mM EDTA pH 7.



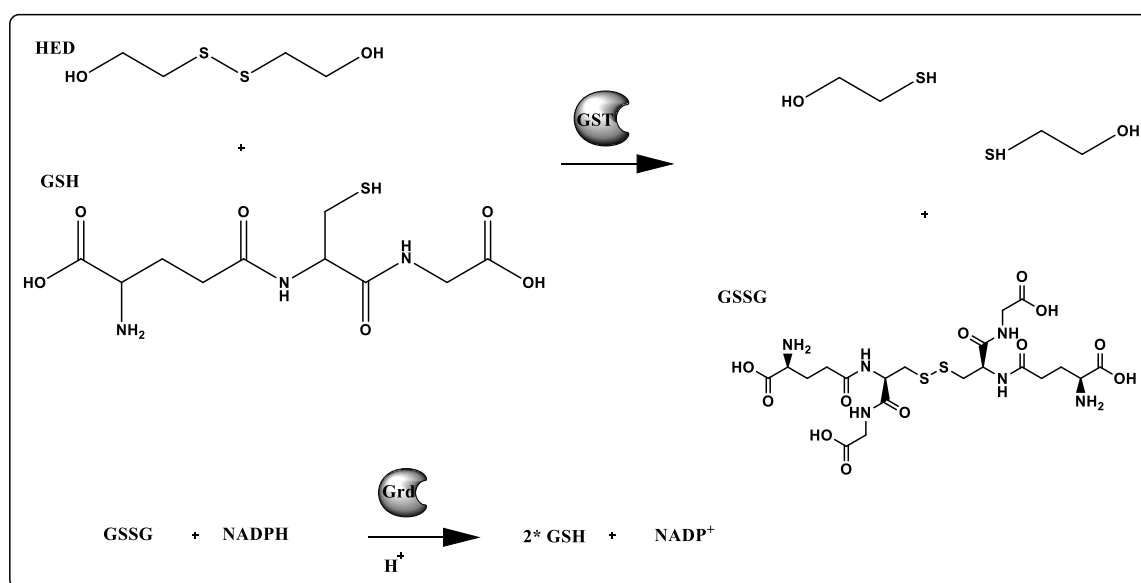
Εικόνα 2. 15: Οι δομές των υποστρωμάτων CuOOH, tBuOOH και Βενζοϊκό υπεροξείδιο για ανίχνευση δράσης υπεροξειδάσης.

2.2.1.23. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ GST ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 2-2-ΔΙΘΕΙΟΔΙΑΙΘΑΝΟΛΗ (HED)

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 1 mL σε ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM Tris-HCl pH 7,8 το οποίο περιέχει 0,5 mM GSH, 2 mM HED (Εικόνα 2. 16), 0,2 mM NADPH και 0,5 Units ρεδουκτάση της γλουταθειόνης. Ο προσδιορισμός γίνεται φωτομετρικά (Εικόνα 2. 17) και βασίζεται στη μέτρηση της ταχύτητας μετατροπής του NADPH σε NADP^+ στα 340 nm, έχοντας ως μοριακό συντελεστή απόσβεσης τη τιμή 6, 33 L/m mol·cm (Wilson et al., 1989).



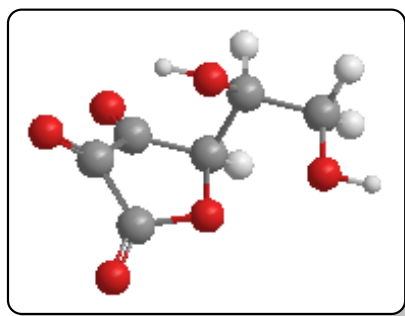
Εικόνα 2. 16: Η δομή του υποστρώματος HED.



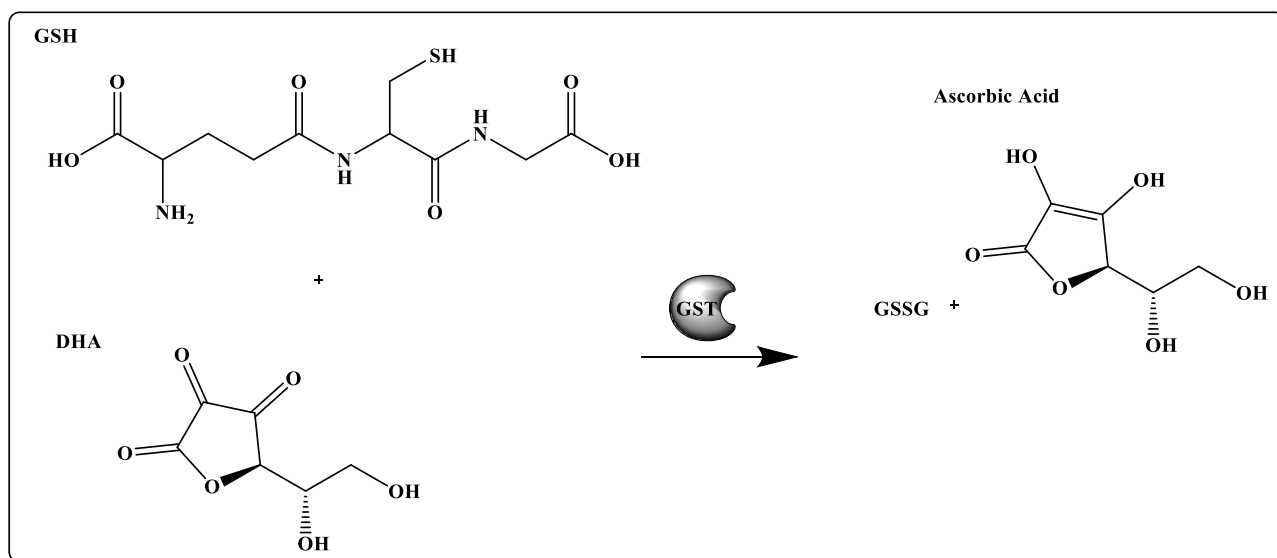
Εικόνα 2. 17: Αντίδραση του υποστρώματος HED με το μόριο της γλουταθειόνης.

2.2.1.24. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ GST ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΔΙΪΔΡΟΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ (DHA)

Το διϋδροασκορβικό οξύ μετατρέπεται σε ασκορβικό οξύ με αντίδραση αναγωγής από το ένζυμο GST (Εικόνα 2. 18 και 2. 19). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιεί την ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης ως δότη ηλεκτρονίων (Mizohata et al., 2001). Ο προσδιορισμός είναι φωτομετρικός στα 265 nm με μοριακό συντελεστή απόσβεσης τη τιμή 6,22 L/m mol·cm. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM KH₂PO₄ pH 8, περιέχοντας 1 mM GSH και 0,25 mM DHA ως υπόστρωμα. Η αντίδραση περιγράφεται από τη σχέση:



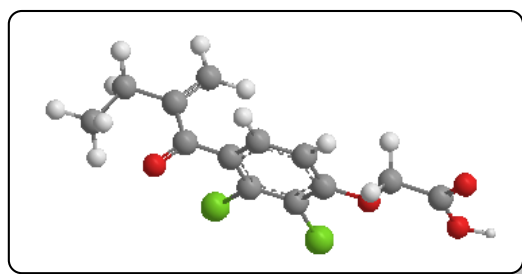
Εικόνα 2. 18: Τρισδιάστατη δομή του υποστρώματος DHA



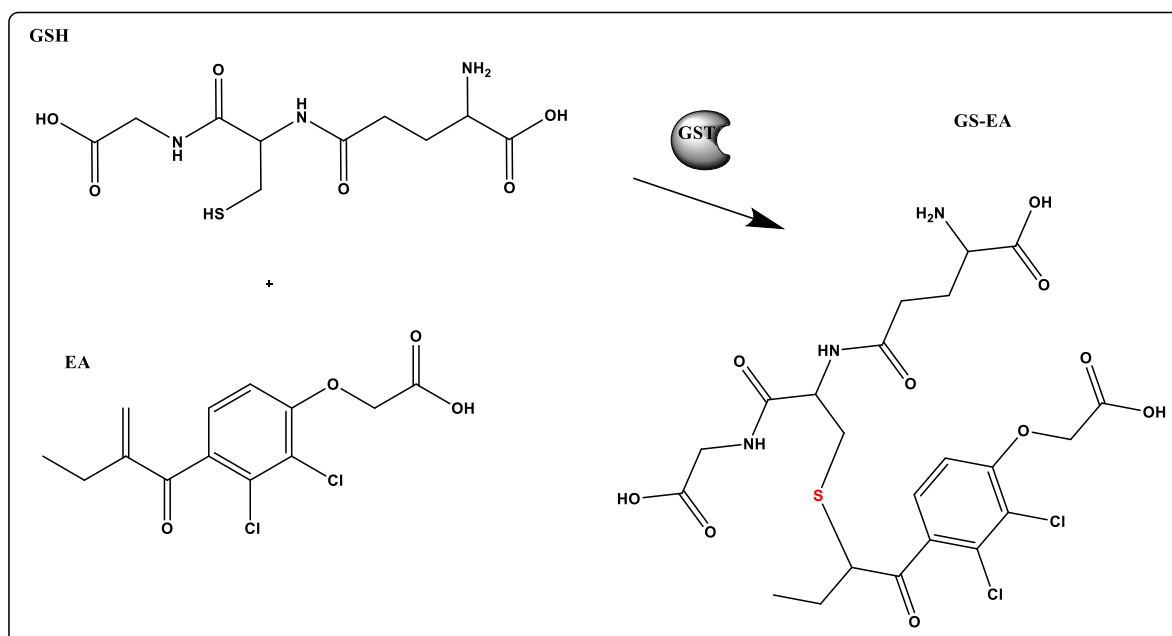
Εικόνα 2. 19: Το υπόστρωμα διϋδροασκορβικό οξύ (DHA) αντιδρά με το μόριο γλουταθειόνης και μετατρέπεται σε ασκορβικό οξύ.

2.2.1.25. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ GST ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΕΘΑΚΡΙΝΙΚΟ ΟΞΥ (EA)

Ο προσδιορισμός δράσης GST ως προς το υπόστρωμα εθακρινικό οξύ γίνεται φωτομετρικά σε μήκος κύματος 270 nm (Εικόνα 2. 20 και 2. 21). Ο προσδιορισμός βασίζεται στην ταχύτητα της αντίδρασης σχηματισμού του συμπλόκου GS-EA (Habig et al., 1974; Satoh, 1995). Το σύμπλοκο GS-EA βασίζεται σε αντίδραση προσθήκης της GSH στο ηλεκτρονιόφιλο κέντρο του εθακρινικού οξέος. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος 0,1 M KH_2PO_4 pH 6,5, περιέχοντας 0,25 mM GSH και 0,2 mM υπόστρωμα. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης είναι 5 L/m mol·cm.



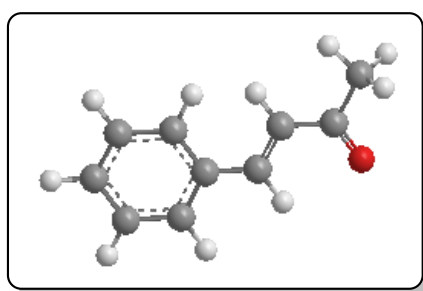
Εικόνα 2. 20: Τρισδιάστατη δομή του υποστρώματος EA.



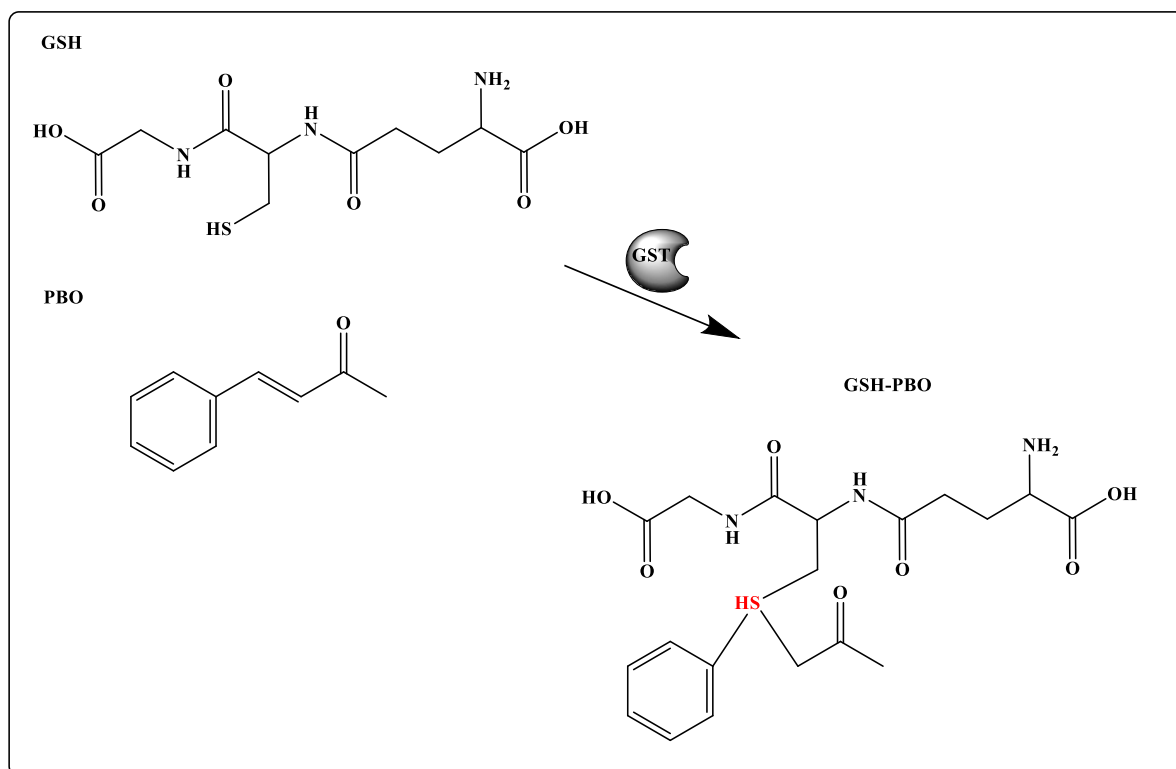
Εικόνα 2. 21: Αντίδραση γλουταθειόνης με το υπόστρωμα εθακρινικό οξύ.

2.2.1.26. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ GST ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ *trans*-4-ΦΑΙΝΥΛΒΟΥΤ-3-ΕΝ-2ΟΝΗ (PBO)

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας GST βασίζεται στην ταχύτητα της αντίδρασης σχηματισμού του συμπλόκου των δυο υποστρωμάτων, και συγκεκριμένα στην ακόρεστη ομάδα του υποστρώματος *trans*-4-φαινυλβουτυλ-3-εν-2-ονη (Habig et al., 1974) (Εικόνα 2. 22 και 2. 23). Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος 0,1 M KH_2PO_4 pH 6,5, περιέχοντας 0,25 mM GSH και 0,05 mM υπόστρωμα. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης είναι $-24,8 \text{ L/ mmol}\cdot\text{cm}$ και ο φωτομετρικός προσδιορισμός πραγματοποιείται στα 290 nm.



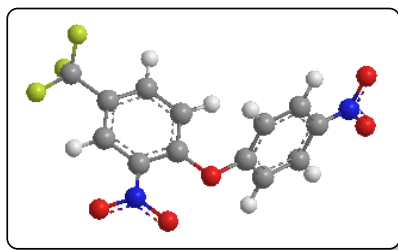
Εικόνα 2. 22: Τρισδιάστατη δομή του υποστρώματος PBO.



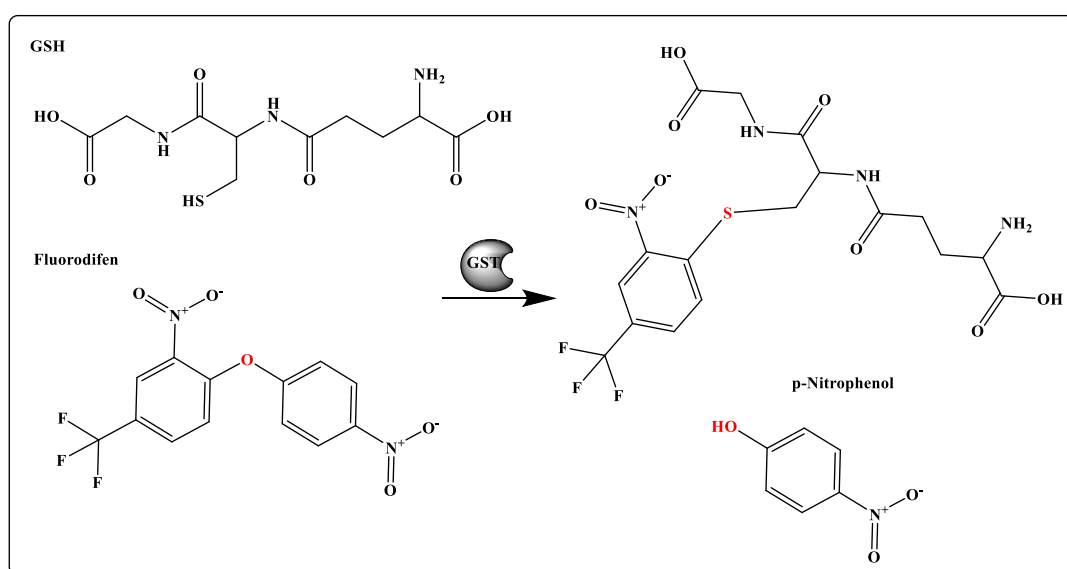
Εικόνα 2. 23: Αντίδραση γλουταθειόνης με το υπόστρωμα PBO.

2.2.1.27. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ GST ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ FLUORODIFEN

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ταχύτητα με την οποία το ένζυμο GST υδρολύει το υπόστρωμα Fluorodifen σε π-νιτροφαινόλη (p-nitrophenol) (Cummins et al., 2011) (Εικόνα 2. 24 και 2. 25). Το μίγμα της αντίδρασης έχει τελικό όγκο 1mL και αποτελείται από το ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M Glycine-NaOH pH 9,5, 0,05 mM υπόστρωμα και 5 mM GSH. Το προϊόν της υδρόλυσης, η π-νιτροφαινόλη, σε αλκαλικό pH (pKa 7.2) αποτελεί ένα χρωμοφόρο το οποίο απορροφά σε μήκος κύματος 410 nm και χρωματίζει το διάλυμα κίτρινο. Το μίγμα του δείγματος και ο μάρτυρας επωάζονται στους 37 °C για 1 h. Η απορρόφηση λαμβάνεται στα 410nm και ο προσδιορισμός γίνεται με βάση το συντελεστή μοριακής απόσβεσης της π-νιτροφαινόλης με τιμή 18,5 L/ mmol·cm.



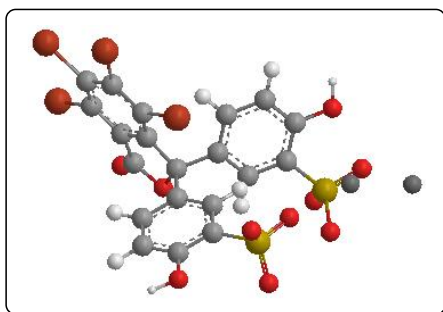
Εικόνα 2. 24: Τρισδιάστατη δομή του υποστρώματος Fluorodifen.



Εικόνα 2. 25: Αντίδραση γλουταθειόνης με το υπόστρωμα Fluorodifen.

2.2.1.28. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ GST ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΒΡΩΜΟΣΟΥΛΦΟΦΘΑΛΕΪΝΗ (BSP)

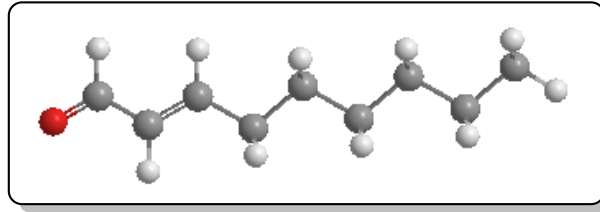
Ο λακτονικός δακτύλιος της βρωμοσουλφοφθαλεΐνης (**Εικόνα 2. 26**) μπορεί να αντιδράσει με τη γλουταθειόνη, να σχηματίσει έναν θειοαιθέρα και με την αντικατάσταση του βρωμίου πάνω στο δακτύλιο του φθαλικού οξέος να σχηματιστεί ένα υδροβρωμικό οξύ (Javitt et al., 1960; Goldstein & Combes 1966). Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1mL και αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M KH_2PO_4 pH 6,5, 0,03 mM υπόστρωμα και 5 mM GSH. Ο προσδιορισμός γίνεται φωτομετρικά στα 330 nm και ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης έχει τιμή 4,5 L/mmole·cm.



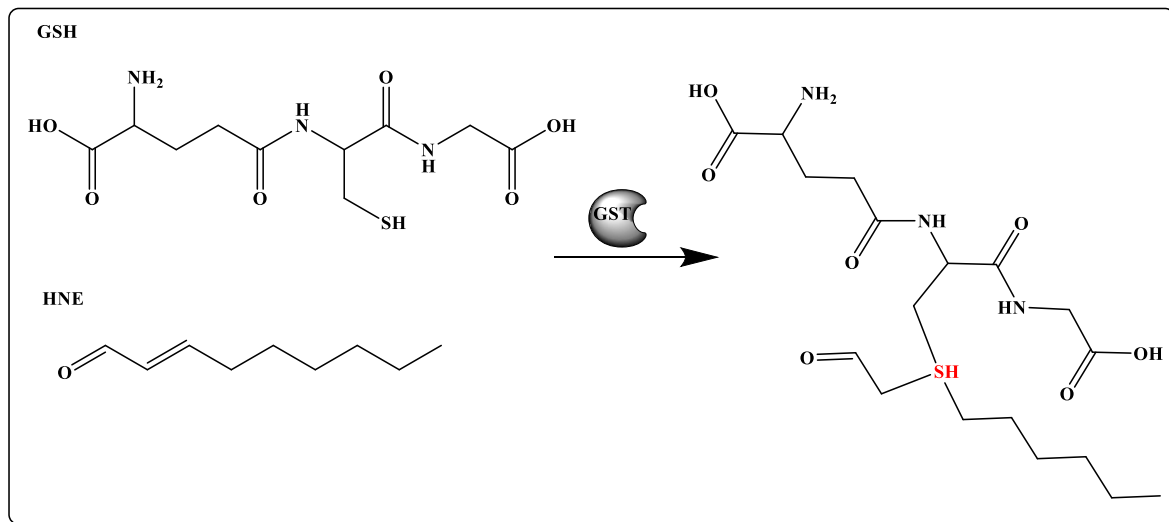
Εικόνα 2. 26: Τρισδιάστατη δομή του υποστρώματος βρωμοσουλφοφθαλεΐνη.

2.2.1.29. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ GST ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ *trans*-2-ENENΑΛΗ (HNE)

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας GST βασίζεται στην αντίδραση προσθήκης του υποστρώματος HNE με τη γλουταθειόνη (Hiratsuka et al., 1994) (**Εικόνες 2.27** και **2.28**). Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 mL και αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M KH_2PO_4 pH 6,5, 0,1 mM υπόστρωμα και 0,5 mM GSH. Ο προσδιορισμός γίνεται φωτομετρικά στα 224 nm και ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης έχει τιμή 13,75 L/mmole·cm.



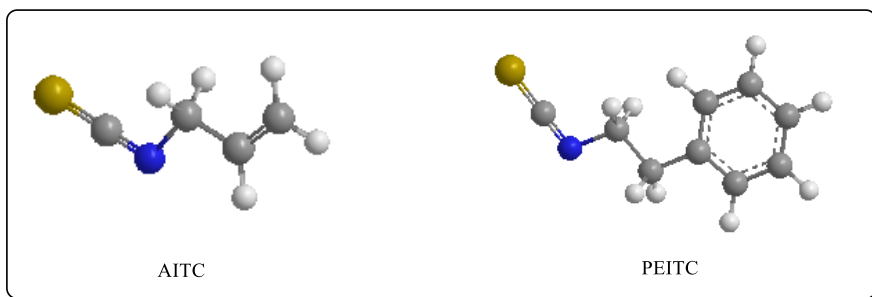
Εικόνα 2. 27: Τρισδιάστατη δομή του υποστρώματος *trans*-2-ενεάλη.



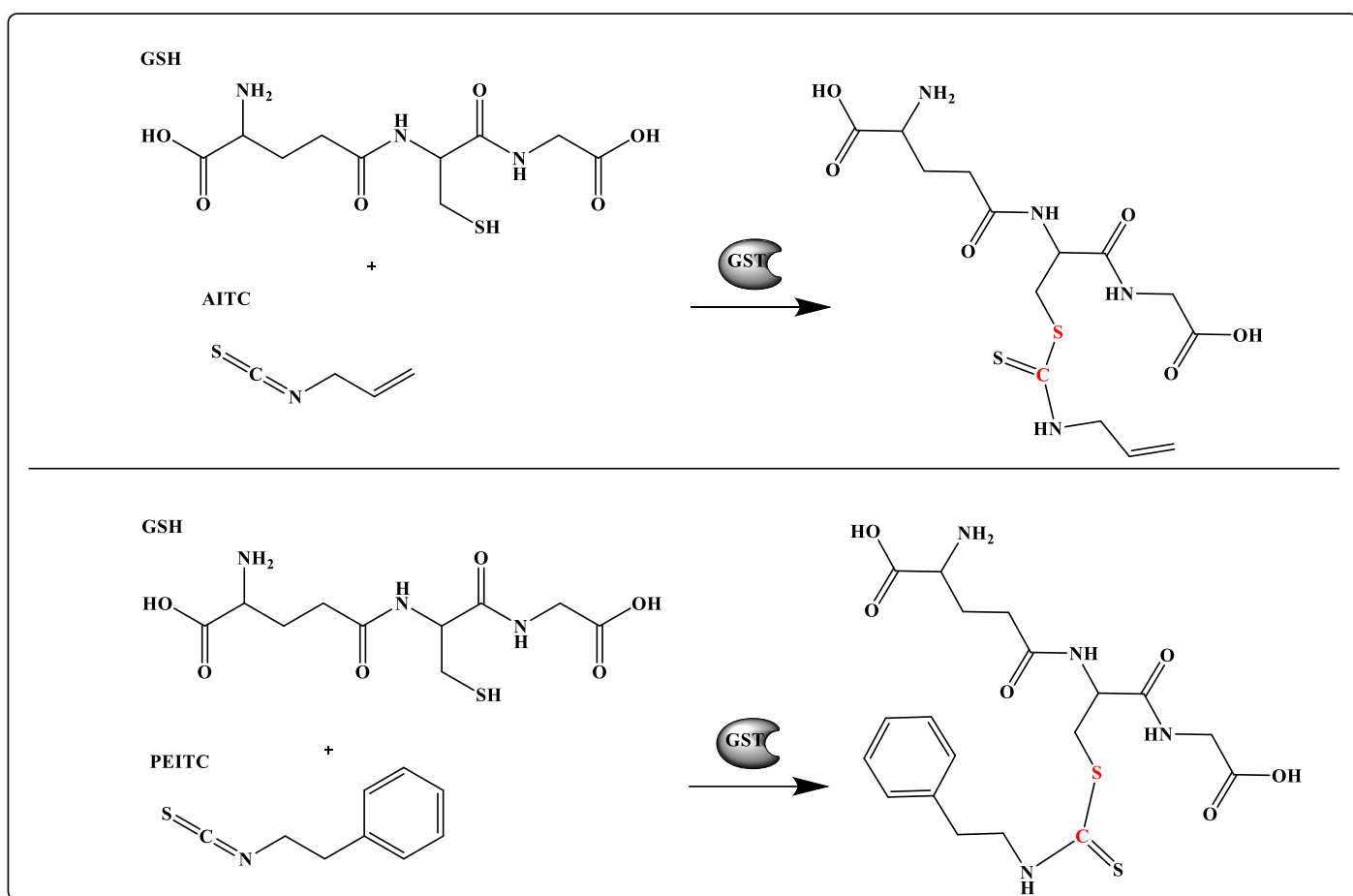
Εικόνα 2. 28: Αντίδραση γλουταθειόνης με το υπόστρωμα *trans*-2-ενεάλη.

2.2.1.30. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ GST ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΟΣ ΦΑΙΝΥΛΛΙΘΥΛ-ΕΣΤΕΡΑΣ (ΡΕΙΤC) ΚΑΙ ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΟΣ ΑΛΛΥΛ-ΕΣΤΕΡΑΣ (ΑΙΤC)

Οι ισοθειοκυανικοί εστέρες έχουν την ικανότητα να δημιουργούν προϊόντα σύζευξης με το μόριο της γλουταθειόνης και να σχηματίζουν διθειοκαρβαμίδια. Τα προϊόντα αυτά μπορεί να οφείλονται τόσο σε ενζυμική ή μη δράση (Meyer et al., 1995) (Εικόνα 2. 29 και 2. 30). Ο προσδιορισμός είναι φωτομετρικός στα 274 nm με μοριακό συντελεστή απόσβεσης τη τιμή 7,45 L/ mmol·cm και 8,89 L/ mmol·cm για ΑΙΤC και ΡΕΙΤC αντίστοιχα. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος 100 mM KH₂PO₄ pH 6.5, περιέχοντας 1 mM GSH και 0,4 mM υπόστρωμα.



Εικόνα 2. 29: Τρισδιάστατη δομή των υποστρωμάτων AITC και PEITC.



Εικόνα 2. 30: Αντίδραση γλουταθειόνης με τα υποστρώματα AITC και PEITC. Η εικόνα σχεδιάστηκε από το πρόγραμμα ChemBio Draw Ultra.

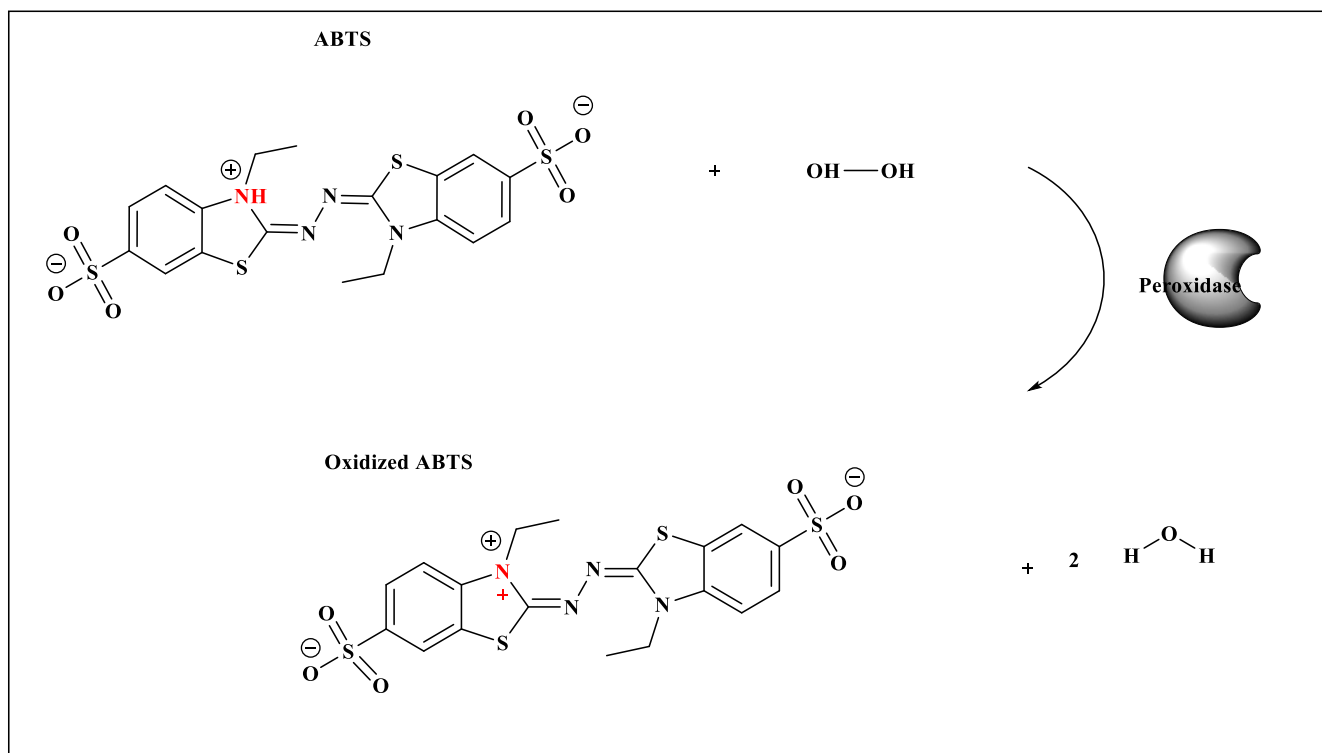
2.2.1.31. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 2,2-AZINO-ΔΙΣ-3-ΕΘΥΛΒΕΝΖΟΘΙΑΖΟΛΙΝΗ-6-ΣΟΥΛΦΟΝΙΚΟ ΟΞΥ (ABTS)

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός του ενζύμου βασίζεται στον προσδιορισμό της ταχύτητας οξείδωσης του 2,2-άζινο-δισ-3-εθυλβενζοθιαζολίνη-6-σουλφονικό οξύ ή

ABTS (**Εικόνα 2. 31**). Το ABTS λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων για την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε όξινο pH μέσα από τη μέτρηση της απορρόφησης στα 402 nm. Η απορρόφηση είναι ανάλογη της ενζυμικής δράσης η οποία επιταχύνει την παρακάτω αντίδραση:



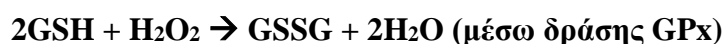
Το μίγμα της αντίδρασης έχει όγκο 1 mL και περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου 100 mM KH_2PO_4 pH 5, 9,1 mM ABTS, 0,3 % (w/w) H_2O_2 και την ανάλογη ποσότητα ενζύμου. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της οξείδωσης του ABTS γίνεται με τη βοήθεια του συντελεστή μοριακής απόσβεσης που είναι 36.8 L/mmole·cm.



Εικόνα 2. 1: Ο μηχανισμός δράσης της περοξειδάσης και ο σχηματισμός οξειδωμένης μορφής του 2,2-άζινο-δις-3-εθυλβενζοθιαζολίνη-6-σουλφονικό οξύ παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου.

2.2.1.32.ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΚΑΙ ΡΕΔΟΥΚΤΑΣΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ (H₂O₂) ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ (GSSG)

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός του ενζύμου βασίζεται στον προσδιορισμό της ταχύτητας μετατροπής του NADPH σε NADP⁺ μέσα από τη μέτρηση της απορρόφησης στα 340nm. Η απορρόφηση είναι ανάλογη της ενζυμικής δράσης η οποία επιταχύνει τη παρακάτω αντίδραση:



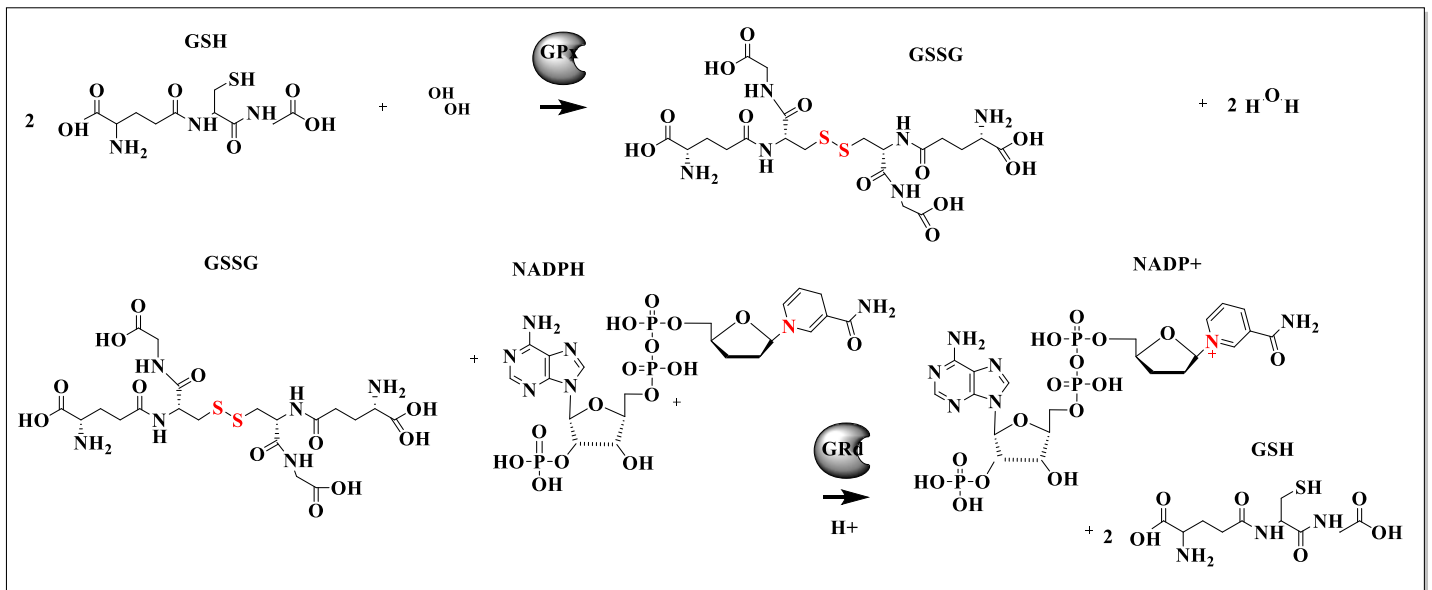
Περοξειδάση της γλουταθειόνης

Το μίγμα της αντίδρασης έχει τελικό όγκο 0,6 mL και περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM KH₂PO₄ – 0,4 mM EDTA pH 7, 1 mM GSH, 0,2 mM NADPH, 1 U ενζύμου ρεδοκτάση της γλουταθειόνης και 0,013 % (w/w) H₂O₂.

Ρεδοκτάση της γλουταθειόνης

Το μίγμα της αντίδρασης έχει τελικό όγκο 1 mL και περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM KH₂PO₄ pH 7) – 3,4 mM EDTA, 0,12 % BSA, 0,1 mM NADPH και 1 mM GSSG.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της μετατροπής του NADPH σε NADP⁺ γίνεται με τη βοήθεια του συντελεστή μοριακής απόσβεσης που είναι 6,22 L/ mmol.cm.

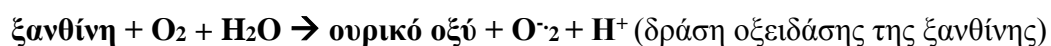
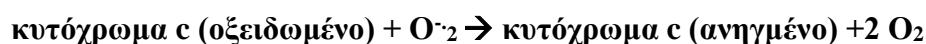


Εικόνα 2. 31: Στάδια της αντίδρασης του υπεροξειδίου με τη γλουταθειόνη.

2.2.1.33. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΚΗΣ ΔΙΣΜΟΥΤΑΣΗΣ (SOD) ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΤΗΣ ΞΑΝΘΙΝΗΣ ΚΑΙ ΑΥΤΟ-ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΠΥΡΟΓΑΛΛΟΗΣ

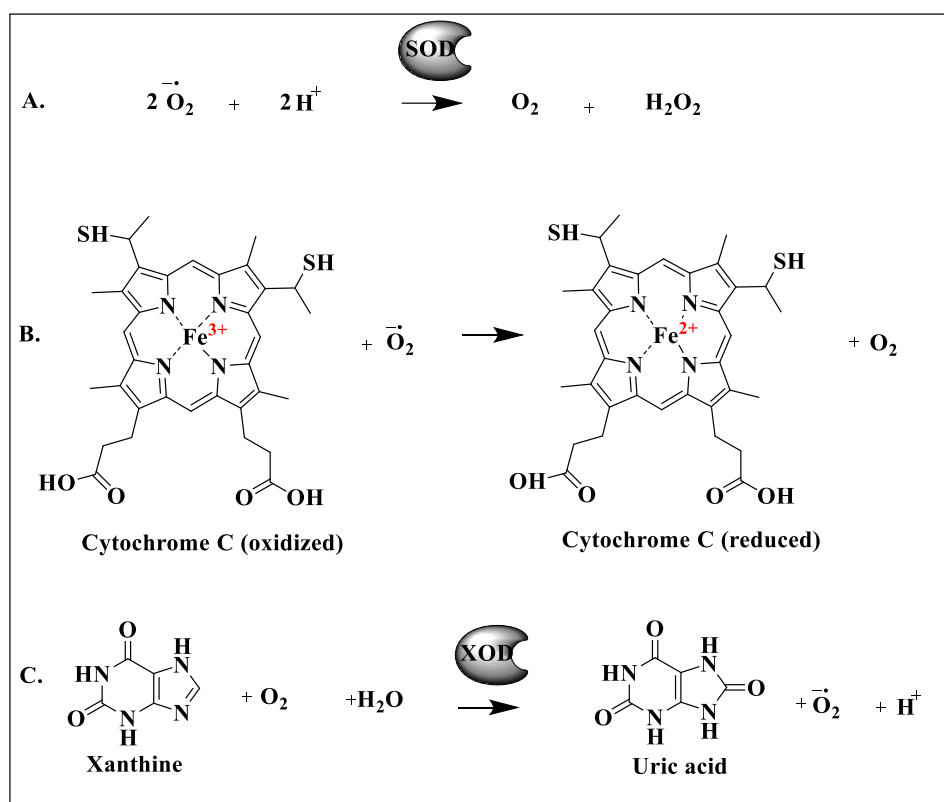
Δράση της SOD μέσω του συστήματος οξειδάσης της ξανθίνης

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός του ενζύμου βασίζεται στον προσδιορισμό της ταχύτητας με την οποία η υπεροξειδική δισμουτάση ανταγωνίζεται με το κυτόχρωμα C για ανιόντα υπεροξειδίου που παράγονται από το σύστημα οξειδάσης της ξανθίνης (Εικόνα 2. 32). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή του ρυθμού μείωσης του κυτοχρώματος C. Ο προσδιορισμός πραγματοποιείται στα 550 nm στους 25 °C. Ο μηχανισμός δράσης της υπεροξειδικής δισμουτάσης υπακούει στην παρακάτω αντίδραση:



Αρχικά παρασκευάζεται ένα μίγμα (reaction cocktail ή RC) τελικού όγκου 25 mL και pH 7,8 το οποίο περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα 216 mM KH_2PO_4 pH 7,8, 0,107 mM EDTA, 0,011 mM κυτόχρωμα c, 0,054 mM ξανθίνη και 5,75 mL δισαπασταγμένο νερό. Το μίγμα της αντίδρασης έχει τελικό όγκο 1 mL και περιέχει reaction cocktail,

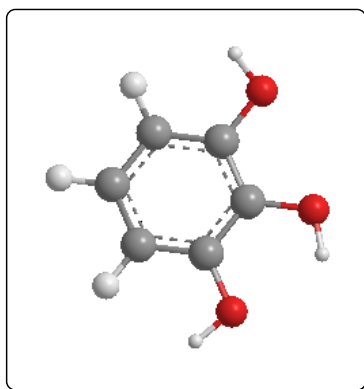
0,00165 U οξειδάση της ξανθίνης (XOD) και κατάλληλη ποσότητα ενζύμου/δείγμα. Ως ενζυμική μονάδα υπεροξειδικής δισμουτάσης ορίζεται το ποσό του ενζύμου το οποίο χρειάζεται για να αναστείλει το ρυθμό αναγωγής του κυτοχρώματος c κατά 50 % στο σύστημα της ξανθίνης, σε pH 7,8 και σε θερμοκρασία 25 °C.



Εικόνα 2. 32: Στάδια αντίδρασης κατά τη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) σύμφωνα με το σύστημα της ξανθίνης.

Δράση της SOD μέσω του συστήματος αυτοοξειδωσης της πυρογαλόλης

Η πυρογαλόλη (**Εικόνα 2. 33**) αυτοοξειδώνεται εύκολα και γρήγορα σε αλκαλικά διαλύματα δημιουργώντας ελεύθερες ενεργές ρίζες. Ο φωτομετρικός προσδιορισμός του ενζύμου βασίζεται στον προσδιορισμό της ταχύτητας με την οποία η υπεροξειδική δισμουτάση αναστέλλει την αυτοοξειδωση της πυρογαλόλης. Ο προσδιορισμός πραγματοποιείται στα 420 nm στους 25 °C. Το μίγμα της αντίδρασης έχει τελικό όγκο 1 mL και περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl – 1 mM EDTA pH 8,2, 0,2 mM πυρογαλόλη και κατάλληλη ποσότητα ενζύμου/δείγματος. Ως ενζυμική μονάδα υπεροξειδικής δισμουτάσης ορίζεται το ποσό του ενζύμου το οποίο χρειάζεται για να αναστείλει το ρυθμό αυτοοξειδωσης της πυρογαλόλης κατά 50 % σε αλκαλικό pH.



Εικόνα 2. 33: Τρισδιάστατη δομή του υποστρώματος Πυρογαλόλη.

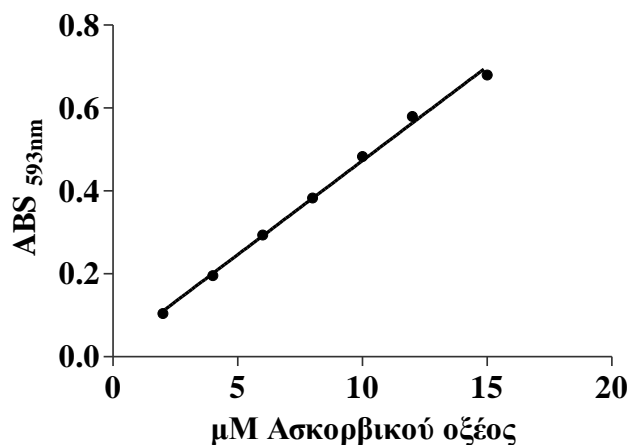
2.2.1.34. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΑΝΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΣΙΔΗΡΟΥ (FERRIC REDUCTING ANTIOXIDANT POWER / FRAP)

Η μέθοδος FRAP βασίζεται σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων (Electron Transfer – ET assays) με το αντιοξειδωτικό να αντιδρά με ένα φθορίζον ή έγχρωμο οξειδωτικό αντιδραστήριο. Σε αυτή την περίπτωση ο φωτομετρικός προσδιορισμός βασίζεται στον προσδιορισμό της ικανότητας του αντιοξειδωτικού να προκαλεί την αναγωγή. Το προϊόν που προκύπτει έχει διαφορετικό χρώμα και ο βαθμός μεταβολής του χρώματος (αύξηση ή ελάττωση της απορρόφησης σε συγκεκριμένο μήκος κύματος) συσχετίζεται με τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού. Η αρχή της μεθόδου FRAP βασίζεται στην αναγωγή του ιόντος Fe(III) προς Fe(II) παρουσία του αντιοξειδωτικού, η δράση του οποίου είναι να λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται μια συνθετική χρωστική, η 2,4,6-τριπυριδύλ-σ-τριαζίνη (2,4,6-tripyridyl-s-triazine, TPTZ), η οποία λειτουργεί ως δείκτης της παρουσίας ιόντων Fe(II) καθώς το σύμπλοκο TPTZ-Fe(III) είναι άχρωμο ενώ το σύμπλοκο TPTZ-Fe(II) έχει χαρακτηριστικό μπλέ χρώμα και απορροφά σε μήκος κύματος 593 nm.

Για την εφαρμογή της μεθόδου αυτή παρασκευάζεται το ενεργό διάλυμα FRAP το οποίο περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου 300 mM CH₃COONa pH 3,6, 10 mM TPTZ και 20 mM FeCl₃ σε αναλογία 10:1:1. Το ενεργό διάλυμα FRAP παρασκευάζεται φρέσκο και διατηρείται στους 37 °C σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης απαιτείται η παρασκευή πρότυπου διαλύματος ασκορβικού οξέος. Οι συγκεντρώσεις του πρότυπου διαλύματος εκφράζονται σε μM, η απορρόφηση των οποίων συσχετίζεται με την

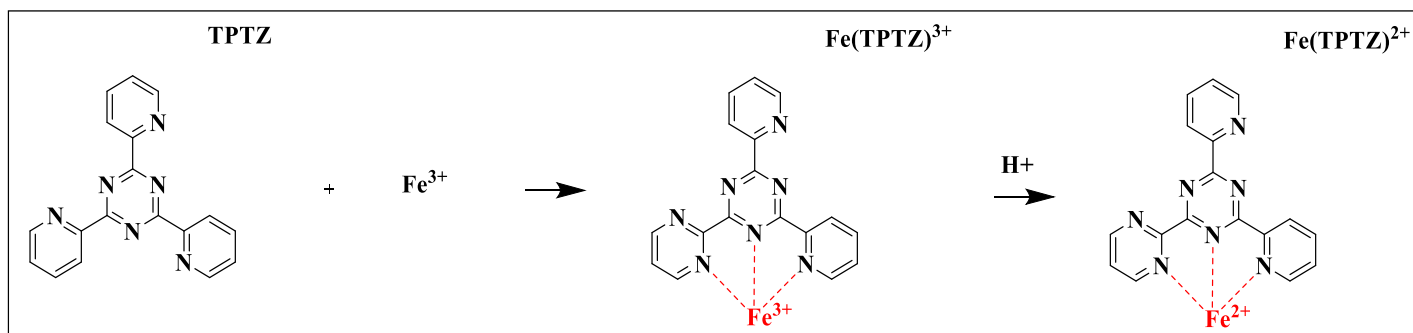
απορρόφηση ισοδύναμων ποσοτήτων εκχυλίσματος των δειγμάτων που θα χρησιμοποιηθούν κατά τη δοκιμή FRAP. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας του δείγματος γίνεται χρήση της εξίσωσης που προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη. Η πρότυπη καμπύλη στην οποία βασίστηκε η παρούσα μελέτη απεικονίζεται στην **Εικόνα 2. 34**.

Πρότυπη Καμπύλη Frap



Εικόνα 2. 34: Πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων ασκορβικού οξέος. Η καμπύλη παρουσιάζει γραμμική σχέση η οποία ορίζεται ως: $y = 0.0453x + 0.0193$, $R_2: 0,99$

Σε κυψελίδα εισάγονται το ενεργό διάλυμα FRAP και το εκχύλισμα των προς μελέτη δειγμάτων (ή πρότυπου διαλύματος). Ακολουθεί γρήγορη ανάδευση και επώαση στους 37 °C για 4 min. Στη συνέχεια γίνεται μέτρηση της απορρόφηση στα 593 nm. Η ταχύτητα της αντίδρασης στα πρώτα δευτερόλεπτα είναι πολύ μεγάλη διότι μόλις το δείγμα έρθει σε επαφή με το ενεργό διάλυμα FRAP το χρώμα του διαλύματος εντός της κυψελίδας γίνεται έντονο μπλε.

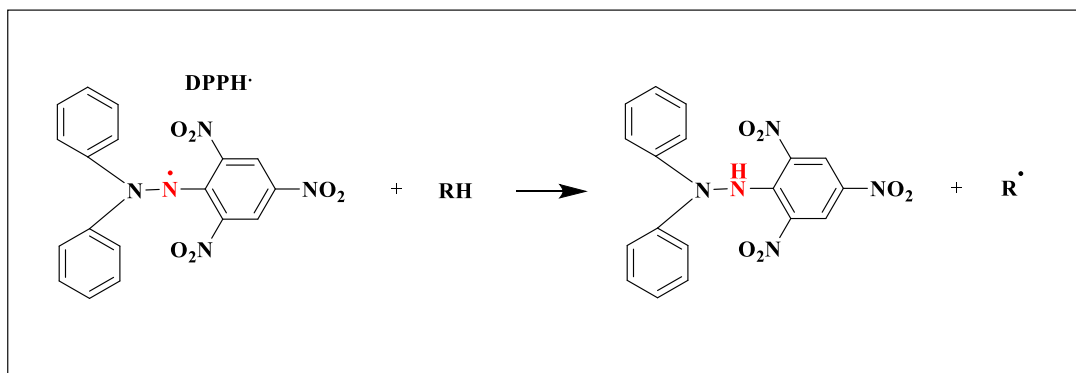


Εικόνα 2. 35: Αντίδραση συμπλοκοποίησης του TPTZ και Fe³⁺ με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός οξειδωτικού, της TPTZ-Fe³⁺, το οποίο συναντάται στο διάλυμα δοκιμής. Με αναγωγή σε όξινες συνθήκες το άχρωμο σύμπλοκο TPTZ-Fe³⁺ μετατρέπεται σε έγχρωμο προϊόν με έντονο μπλε χρώμα.

2.2.1.35. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕΣΩ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΡΙΖΑΣ 1,1-ΔΙΦΑΙΝΥΛΟ-2-ΠΙΚΡΥΛΟΥΔΡΑΖΥΛΙΟ (DPPH)

Το μόριο του 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλουδραζυλίου (DPPH) χαρακτηρίζεται σαν μια σταθερή ελεύθερη ρίζα. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα μιας αντιοξειδωτικής ουσίας να αντιδρά με την ελεύθερη ρίζα DPPH δίνοντας ένα υδρογόνο. Η αντίδραση (Εικόνα 2. 36) αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή του 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλουδραζυλίου σε 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλουδραζίνη με υποβάθμιση του μοβ χρώματος. Η ρίζα R· που δημιουργείται έχει μικρή δραστηριότητα εξαιτίας των δομών συντονισμού. Το DPPH είναι μια από τις λίγες σταθερές και εμπορικά διαθέσιμες οργανικές ρίζες του αζώτου.

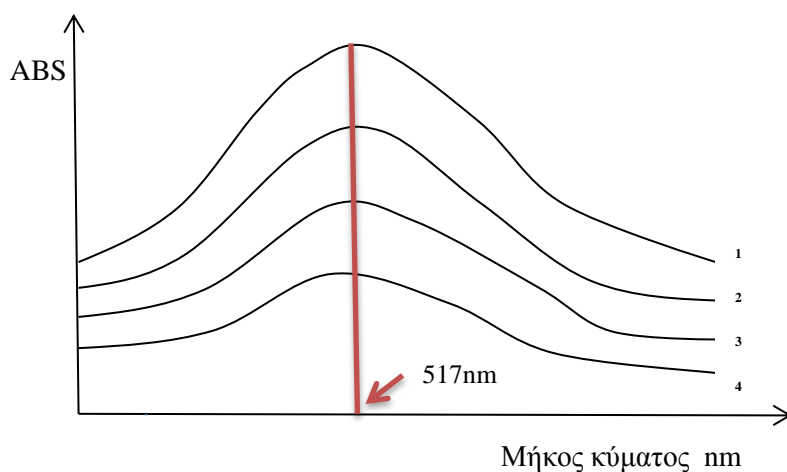
Η ελεύθερη ρίζα DPPH σε διάλυμα μεθανόλης απορροφά στην ορατή περιοχή και συγκεκριμένα στα 517 nm χρωματίζοντας το διάλυμα έντονο μοβ χρώμα. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη σταδιακή μείωση της απορρόφησης σε χρονικό διάστημα 10 min. Η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που προκαλεί μείωση στην αρχική συγκέντρωση DPPH κατά 50 % ορίζεται ως IC₅₀ (Inhibitory Concentration 50%).



Εικόνα 2. 36: Η αντιοξειδωτική ουσία RH αντιδρά με τη ελεύθερη ρίζα DPPH. Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή του 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλουδραζυλίου (DPPH) σε 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλουδραζίνη.

Το μείγμα της αντίδρασης έχει ως τελικό όγκο 1mL και αποτελείται από μεθανολικό διάλυμα 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλουδραζυλίου και η ως προς μελέτη αντιοξειδωτική ουσία. Ως μάρτυρας χρησιμοποιείται μεθανόλη ενώ η αρχική απορρόφηση του μεθανολικού διαλύματος DPPH είναι στο OD:1. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, σε σκοτάδι για 10 min και στη συνέχεια λαμβάνεται η απορρόφηση στα 517 nm (**Εικόνα 2. 37**). Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται με προσθήκη μεγαλύτερου όγκου της αντιοξειδωτικής ένωσης, και καταγράφονται οι απορροφήσεις.

Για τον υπολογισμό της τιμής IC_{50} σχηματίζεται διάγραμμα $ABS = f_{(\mu L \text{ αντιοξειδωτικού})}$ και το σημείο τομής του 50 % του άξονα της απορρόφησης με την ευθεία αντιστοιχεί στη ζητούμενη τιμή του άξονα x.



Εικόνα 2. 37: Απεικόνιση των φασμάτων (ορατή περιοχή) της ελεύθερης ρίζας DPPH με σταδιακή μείωση της απορρόφησης σε χρονικό διάστημα 10min, με τη προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων

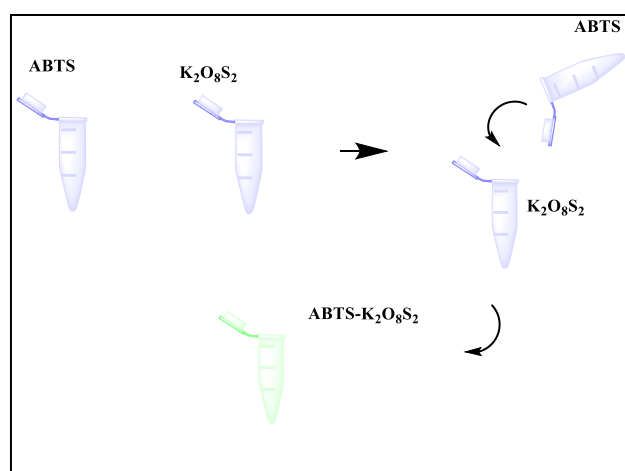
(1, 2, 3 και 4) της αντιοξειδωτικής ουσίας. Στο μήκος κύματος 517 nm παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση της ελεύθερης ρίζας όπου και καταγράφεται.

2.2.1.36. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ABTS

Η ρίζα $ABTSZ^{+}$ (2,2-άζινο-δισ-3-εθυλβενζοθιαζολίνη-6-σουλφονικό οξύ) ανάγεται από μια αντιοξειδωτική ένωση αποσπώντας ένα άτομο υδρογόνου με αποτέλεσμα τη μείωση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 734 nm. Η ρίζα προσδίδει στο διάλυμα έντονο πράσινο χρώμα.

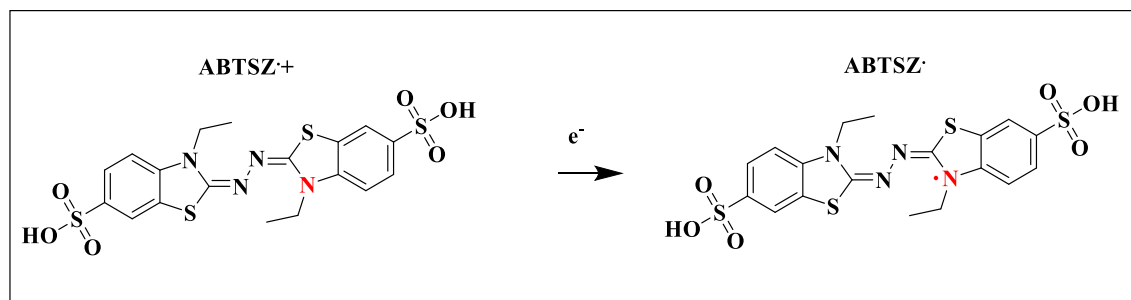
Αρχικά γίνεται παρασκευή υδατικού διαλύματος ABTS ($C_{18}H_{18}N_4O_6S_4 \cdot H_6N_2$) συγκέντρωσης 7 mM και υδατικού διαλύματος $K_2O_8S_2$ (dipotassium oxidooxysulfonyl sulfate) συγκέντρωσης 2,45 mM. Η παρασκευή των δύο αντιδραστηρίων γίνεται σε διαφορετικά φιαλίδια. Η αντίδραση πραγματοποιείται αναμειγνύοντας με μεταφορά του υδατικού διαλύματος ABTS στο υδατικό διάλυμα $K_2O_8S_2$ (Εικόνα 2. 38). Η αντίδραση ($ABTS-K_2O_8S_2$) αρχίζει από τα πρώτα δευτερόλεπτα να είναι εμφανείς με τη σταδιακή μετατροπή του χρώματος από ανοιχτό σε σκούρο πράσινο.

Το διάλυμα παραμένει στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 25 °C από 12 έως 16 h πριν από την πρώτη χρήση. Το διάλυμα διατηρείται για 10 d σε θερμοκρασία δωματίου. Για τη λήψη φάσματος και απορρόφησης πραγματοποιείται αραίωση σε αιθανόλη σε αναλογία που να οδηγεί σε τελική απορρόφηση OD:1.

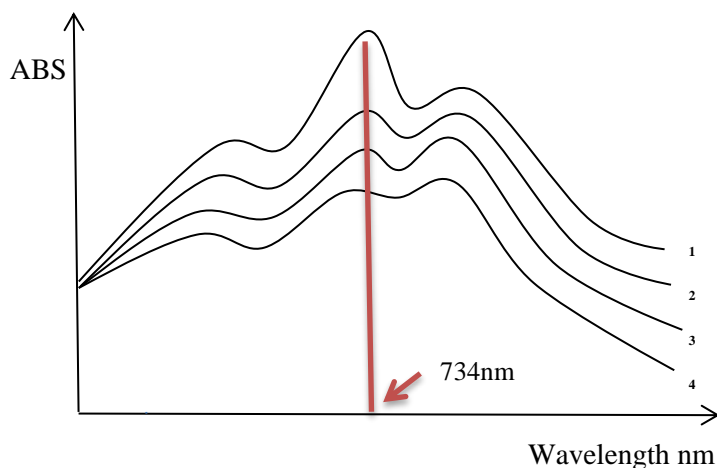


Εικόνα 2. 38: Διαδικασία παρασκευής των υδατικών διαλυμάτων ABTS, $K_2O_8S_2$ και $ABTS-K_2O_8S_2$.

Σε κυβελίδα ακολουθεί επώαση 10 min με το τελικό διάλυμα (ABTS-K₂O₈S₂-EtOH) και το ως προς μελέτη δείγμα στους 25 °C και στη συνέχεια λαμβάνεται απορρόφηση στα 734 nm (Εικόνα 2. 39 και 2. 40). Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται όσες φορές χρειάζεται με προσθήκη μεγαλύτερου όγκου της αντιοξειδωτικής ένωσης και καταγράφονται οι απορροφήσεις. Για τον υπολογισμό της τιμής IC₅₀ σχηματίζεται διάγραμμα ABS= f(μL αντιοξειδωτικού) και το σημείο τομής του 50 % του άξονα της απορρόφησης με την ευθεία, αντιστοιχεί στη ζητούμενη τιμή του άξονα x.



Εικόνα 2. 39: Η αντίδραση κατά την οποία η ρίζα ABTSZ.+ (2,2-άζινο-δισ-3-εθυλβενζοθιαζολίνη-6-σουλφονικό οξύ) ανάγεται από μια αντιοξειδωτική ένωση αποσπώντας της ένα άτομο υδρογόνου.

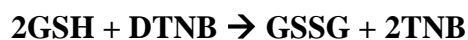


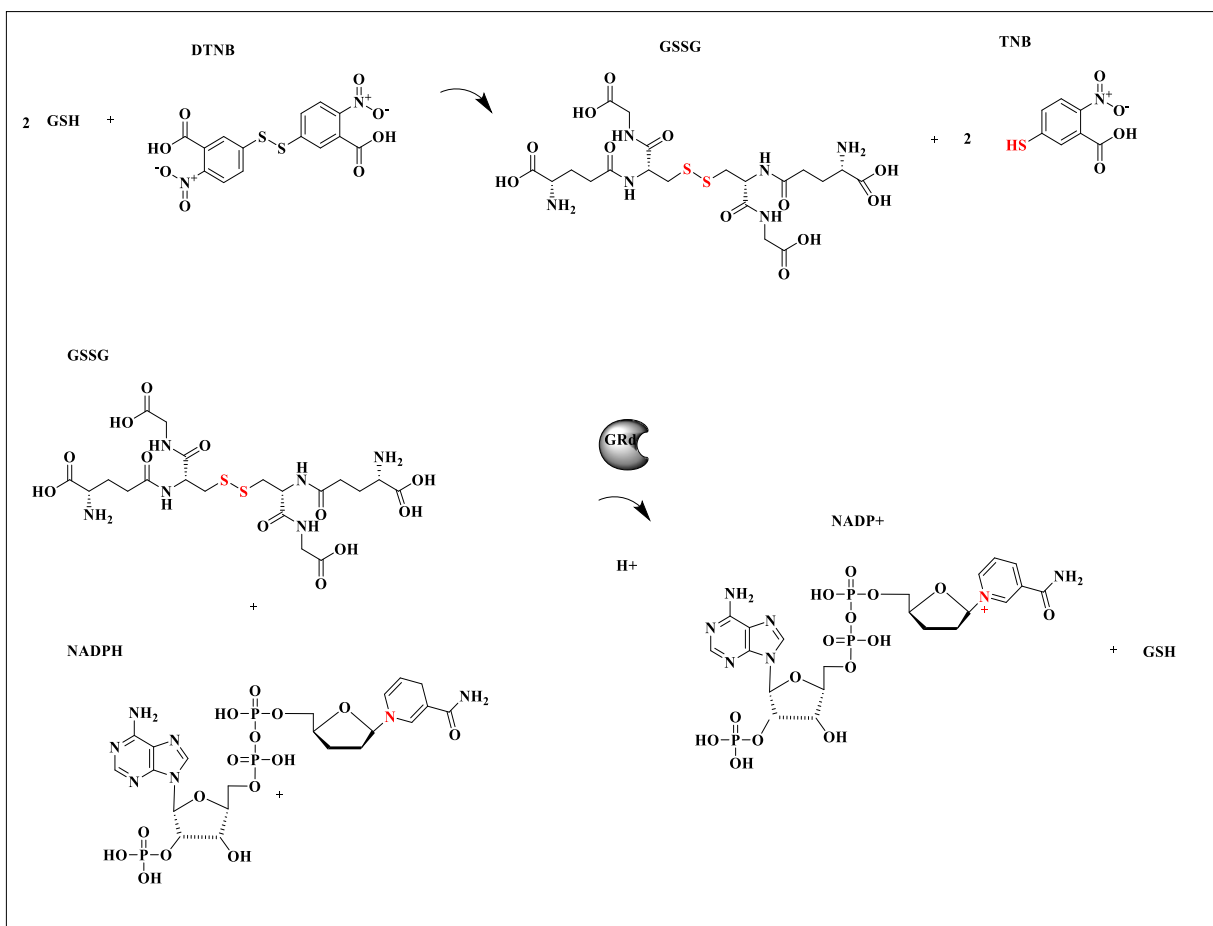
Εικόνα 2. 40: Απεικόνιση των φασμάτων (ορατή περιοχή) του αντιδραστηρίου ABTS-K₂O₈S₂ με σταδιακή μείωση της απορρόφησης σε χρονικό διάστημα 10 min, με τη προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων (1, 2, 3 και 4) της αντιοξειδωτικής ουσίας. Στο μήκος κύματος 734 nm παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση της ελεύθερης ρίζας όπου και καταγράφεται.

2.2.1.37. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΟΛΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο (L-γ-γλουτάμυλο-L-κυστεΐνυλο-γλυκίνη) και αποτελεί τη σπουδαιότερη θειόλη που έχει βρεθεί στα κύτταρα. Σε κανονικές συνθήκες η γλουταθειόνη υπάρχει σε ανηγμένη μορφή (GSH) που αντιστοιχεί στο 90-95 % της ολικής ποσότητας γλουταθειόνης. Ένα μικρό ποσοστό συναντάται και στην πλήρη οξειδωμένη μορφή της (GSSG - δισουλφίδιο της γλουταθειόνης). Η δοκιμή της γλουταθειόνης (glutathione assay) αποτελεί μια γρήγορη και άμεση μέθοδο για τον φωτομετρικό προσδιορισμό της ολικής συγκέντρωσης γλουταθειόνης (GSH και GSSG) σε ένα βιολογικό σύστημα. Η μέθοδος βασίζεται στην ταχύτητα μετατροπής του NADPH σε NADP⁺ όπου στη συγκεκριμένη περίπτωση περιγράφεται ως την καταλυτική δράση της GSH να προκαλεί αναγωγή του DTNB μετατρέποντας το σε TNB ενώ η οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης που προκύπτει (GSSG) να μετατρέπεται σε ανηγμένη με τη βοήθεια του NADPH. Το προϊόν που προκύπτει, το TNB (Εικόνα 2. 41).

Ο μηχανισμός δράσης βασίζεται στις παρακάτω αντιδράσεις:



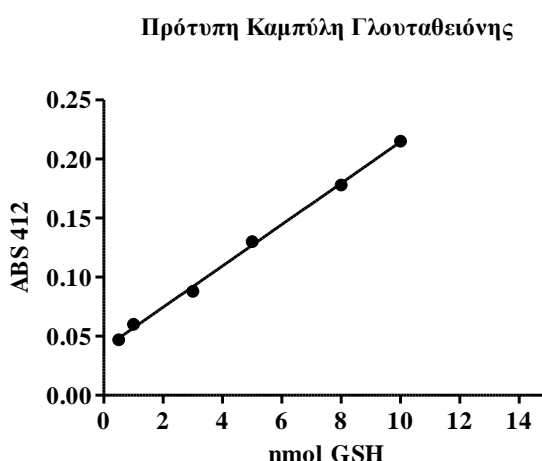


Εικόνα 2. 41: Απεικονίζεται ο μηχανισμός κατά το δοκιμή της γλουταθειόνης.

Το βασικό μίγμα της αντίδρασης (working solution) περιέχει 8 mL ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM KH₂PO₄ pH 7- 1 mM EDTA, 228 μL 5-σουλφοσαλικυλικό οξύ (1,5 mg DTNB/ mL DMSO) και 245,2 μL ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (6 Units/ mL). Το βασικό μίγμα μπορεί να διατηρηθεί ως 3 h σε θερμοκρασία δωματίου. Επίσης παρασκευάζεται διάλυμα τριχλωροακετικού οξέος 5 % TCA και NADPH (0,16 mg/ mL).

Σε κυψελίδα του 1 mL προστίθενται 450 μL από το βασικό μίγμα και 30-x μL 5% TCA. Το x αντιπροσωπεύει τον όγκο του δείγματος που θα μελετηθεί. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min και στη συνέχεια προστίθενται 150 μL NADPH. Η αντίδραση αρχίζει από τα πρώτα δευτερόλεπτα να είναι εμφανείς με τη σταδιακή μετατροπή του χρώματος από ανοιχτό σε σκούρο κίτρινο χρώμα. Το κίτρινο χρώμα οφείλεται σε μόρια TNB που παράγονται από τις οξειδωαναγωγικές αντιδράσεις του συστήματος. Η παραγωγή του προϊόντος TNB μετράται φασματοφωτομετρικά για 5min σε μήκος κύματος 412 nm. Για τον ποσοτικό

προσδιορισμό της ολικής γλουταθειόνης χρησιμοποιείται ο συντελεστής απόσβεσης ϵ ο οποίος προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων γλουταθειόνης. Για το σκοπό των πειραμάτων τα παρούσας μελέτης η πρότυπη καμπύλη (Εικόνα 2. 42) παρασκευάστηκε χρησιμοποιώντας γνωστές συγκεντρώσεις γλουταθειόνης της τάξεως 0,1-10 nmol. Μεγαλύτερες ποσότητες γλουταθειόνης προκαλούν κορεσμό του συστήματος διότι το NADPH δεν επαρκεί για την ολική οξείδωση της. Για τον υπολογισμό της ολικής συγκέντρωσης γλουταθειόνης γίνεται χρήση της εξίσωσης που προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη.



Εικόνα 2. 42: Πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων γλουταθειόνης σε nmol. Η καμπύλη παρουσιάζει γραμμική σχέση η οποία ορίζεται ως: $y = 0,0175x + 0,0395$.

2.2.1.38. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ FOLIN-CIICALTEAU

Για τον προσδιορισμό της ολικής συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένη η μέθοδος των Folin-Ciocalteu (Folin & Ciocalteu 1927). Με αυτή τη μέθοδο γίνεται η ανίχνευση του συνόλου των υδροξυφαινυλομάδων που περιέχεται σε ένα δείγμα χωρίς να γίνεται διαχωρισμός μεταξύ των μονομερών, διμερών και μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι τα φαινολικά συστατικά ενός δείγματος σε αλκαλικό περιβάλλον δίνουν ένα έντονο μπλε χρώμα. Η χρωματική αλλαγή οφείλεται στην αναγωγή των ετεροπολυμερών ιόντων του φωσφομολυβδενικού και του φωσφοβολφραμικού οξέος, βασικά συστατικά του

αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Ο προσδιορισμός πραγματοποιείται στα 765 nm στους 25 °C.

Σε κυβελίδα του 1 mL προστίθενται δις απιονισμένο νερό, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (50 μL) και το ως προ μελέτη δείγμα. Μετά το πέρας 7 min γίνεται προσθήκη ανθρακικού νατρίου [τελική συγκέντρωση 3,75 % (ww)]. Ακολουθεί επώαση 2 h σε σκοτάδι και μέτρηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 765 nm.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών είναι γίνεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης γνωστών συγκεντρώσεων γαλλικού οξέος (**Εικόνα 2. 43**).



Εικόνα 2. 43: Πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων γαλλικού οξέως εκφρασμένο σε μg. Η καμπύλη παρουσιάζει γραμμική σχέση η οποία ορίζεται ως: $y = 0,1102x + 0,0378$.

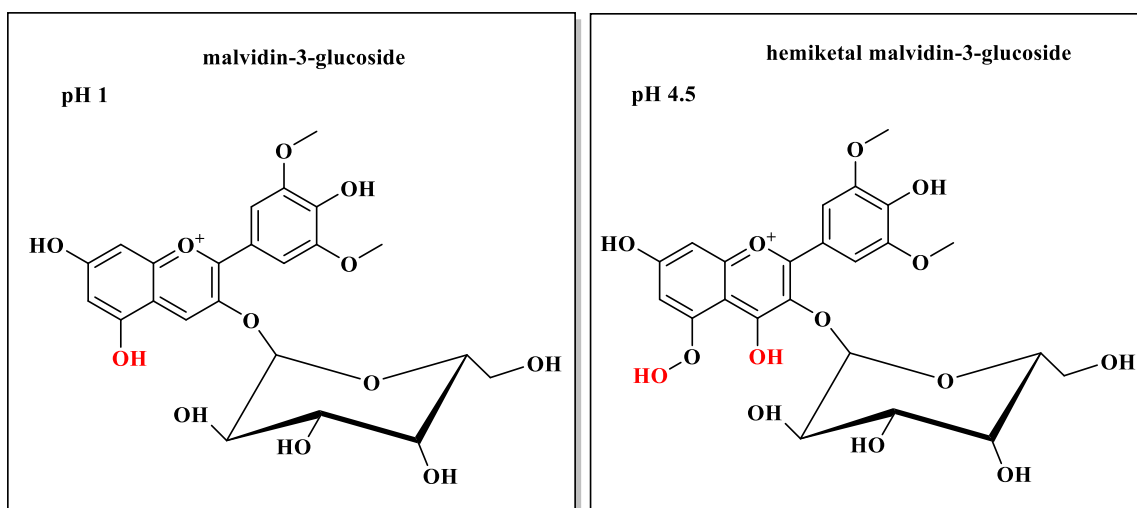
2.2.1.39. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΜΟΝΟΜΕΡΩΝ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΗΣ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΦΡΑΦΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ

Οι ανθοκυανίνες αποτελούν γλυκοσίδες πολυ-ύδροξυ και πολυ-μέθοξυ παράγωγα του 2-φαινυλοβενζοπυριλίου και είναι υπεύθυνες για το μπλε, μωβ και κόκκινο χρώμα πολλών φρούτων, λαχανικών και φυτών. Ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός για τα μονομερή των ανθοκυανών μπορεί να γίνει μέσω φασματοσκοπικών μεθόδων.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην αλλαγή της δομής του χρωμοφόρου της ανθοκυανίνης λόγω διαφορετικού pH. Συγκεκριμένα τα μονομερή της χρωστικής παρουσιάζουν δομικό μετασχηματισμό σε διαφορετικά pH ο οποίος εκδηλώνεται με εντυπωσιακές αλλαγές στο φάσμα απορρόφησης. Το πρωτόκολλο που περιγράφεται αποτελεί μια τροποποιημένη μέθοδο από Sondheimer και Kertesz (Sondheimer &

Kertesz, 1948). Οι τιμές των pH που χρησιμοποιούνται είναι το pH 1 και 4,5 σε pH 1 το χρωμοφόρο μετασχηματίζεται σε έγχρωμη μορφή οξωνίου ενώ σε pH 4,5 έχει τη μορφή ακετάλης (άχρωμο προϊόν). Οι απορροφήσεις που καταγράφονται συσχετίζονται με τη συγκέντρωση του χρωμοφόρου των ως προς μελέτη δειγμάτων. Τα πολυμερή των ανθοκυανών που έχουν υποστεί δομικό μετασχηματισμό παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη χρωματική αλλαγή παρουσία διαφορετικών pH ενώ δεν είναι δυνατή η καταμέτρηση τους διότι απορροφούν εξίσου σε pH 1 και pH 4,5.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των μονομερών του χρωμοφόρου πρέπει να γίνει αρχικά η λήψη φάσματος και να καταγραφεί η απορρόφηση όπου το ως προς μελέτη δείγμα παρουσιάζει τη μέγιστη και ελάχιστη τιμή. Επίσης χρησιμοποιείται το μοριακό βάρος (Mr) και ο συντελεστής απόσβεσης (e) της κύριας ανθοκυανίνης του δείγματος. Για παράδειγμα η κύρια ανθοκυανίνη που βρίσκεται στο κρασί είναι το γλυκοζίδιο της μαλβιδίνης (malvidin-3-glucoside, Mr: 493,2, $e = 28\ 000\ \text{L}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$). Σε ακατέργαστο εκχύλισμα η περιεκτικότητα σε ανθοκυανίνες μπορεί να ποικίλει επομένως να δυσκολεύει την σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων λόγω δυσκολίας στην επιλογή του σωστού μοριακού βάρους και συντελεστή απόσβεσης. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης η έκφραση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση του γλυκοζιδίου της μαλβιδίνης, η οποία αποτελεί την πιο διαδεδομένη ανθοκυανίνη στη φύση.



Εικόνα 2. 44: Χημική δομή του γλυκιδίου της μαβιδίνης σε διαφορετικά pH. Σε pH 1 το χρωμοφόρο μετασχηματίζεται σε έγχρωμη μορφή οξωνίου ενώ σε pH 4,5 έχει τη μορφή ακετάλης (άχρωμο προϊόν).

Σε κυψελίδα του 1 mL προστίθεται τελικός όγκος δείγματος έως 20 % και ρυθμιστικό διάλυμα 25 mM KCl pH 1. Αναμονή για 15 min και λήψη φάσματος στην περιοχή

του ορατού (400-700 nm). Επίσης καταγράφεται η απορρόφηση που παρουσιάζει τη μέγιστη και ελάχιστη τιμή (ABS_{max} και ABS_{min}). Ως μάρτυρας χρησιμοποιείται το νερό. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος 0,4 M $C_2H_3NaO_2$).

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ανθοκυανών χρησιμοποιείται η εξίσωση:

$$mg \text{ μονομερών ανθοκυανίνης/mL} = A * Mr * df / e$$

Όπου:

$$A = (A_{max} - A_{700nm})_{pH 1} - (A_{max} - A_{700nm})_{pH 4,5}$$

Df= αραίωση δείγματος στην κυψελίδα

$$Mr = 449,2$$

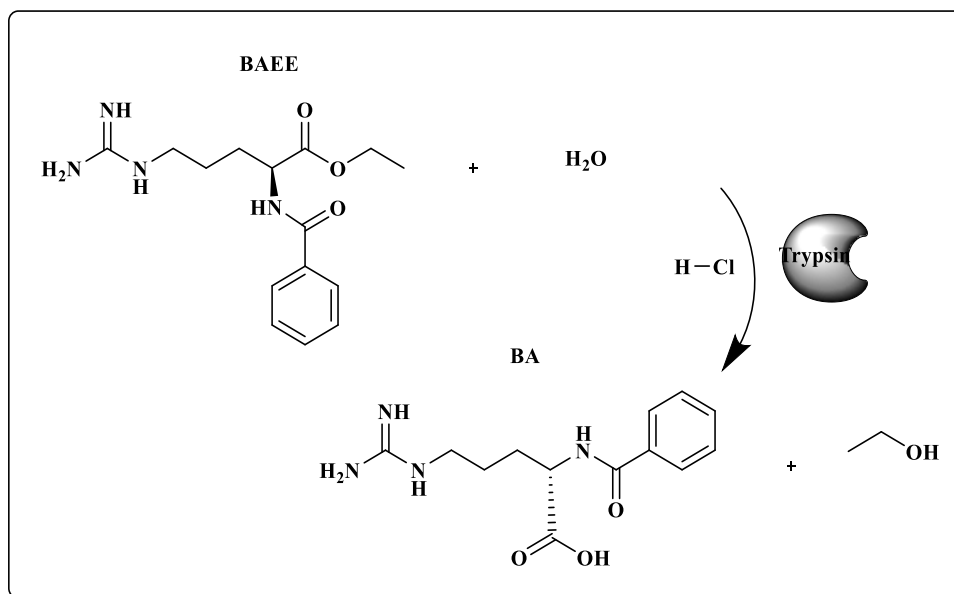
$$e = 28\,000 \text{ L}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$$

2.2.1.40. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΘΡΥΨΙΝΗΣ

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ταχύτητα υδρόλυσης του υποστρώματος βενζύλ-L-αργινίνη-αιθυλ-εστερ-υδροχλωρίδιο (Benzoyl-L-arginine-ethyl-ester-hydrochloride ή BAEE) σε βενζύλ-L-αργινίνη (Benzoyl-L-arginine ή BA) το οποίο απορροφά στην υπεριώδη περιοχή με μέγιστη απορρόφηση στα 253 nm.

Η απορρόφηση είναι ανάλογη της ενζυμικής δράσης η οποία περιγράφεται από την αντίδραση:





Εικόνα 2. 45: Υδρόλυση του υποστρώματος BAEE παρουσία του ενζύμου θρυψίνη σε BA (Benzoyl-L-arginine) και αιθανόλη.

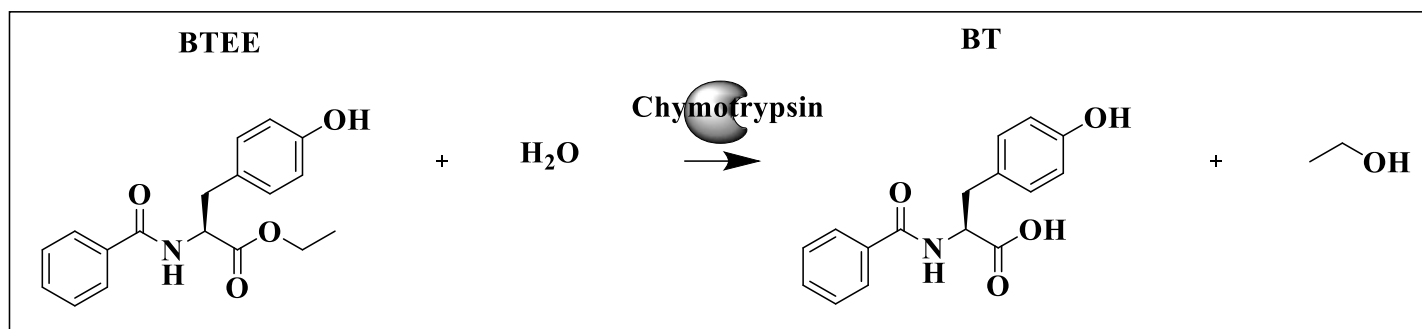
Το μίγμα της αντίδρασης έχει τελικό όγκο 1 mL. Ο μάρτυρας περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα 67 mM NaH_2PO_4 pH 7,6 και 0,23 mM BAEE (βενζούλ-L-αργινίνη-αιθυλεστερ-υδροχλωρίδιο). Τι μίγμα της αντίδρασης που αφορά το εξεταζόμενο δείγμα περιέχει 0,23 mM BAEE – x, όπου x ο όγκος του εξεταζόμενου δείγματος σε μL . 1 BAEE Unit θρυψίνης προκαλεί μεταβολή της ΔA_{253} κατά 0,001 ανά min.

2.2.1.41. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΧΥΜΟΘΡΥΨΙΝΗΣ

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ταχύτητα υδρόλυσης του υποστρώματος αιθυλεστεράς της N-βενζούλ-L-τυροσίνης (N-Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester ή BTEE) σε N-βενζόθλ-L-τυροσίνη (N-Benzoyl-L-tyrosine ή BT) το οποίο απορροφά στην υπεριώδη περιοχή με μέγιστη απορρόφηση στα 256 nm.

Η απορρόφηση είναι ανάλογη της ενζυμικής δράσης η οποία περιγράφεται από την αντίδραση:



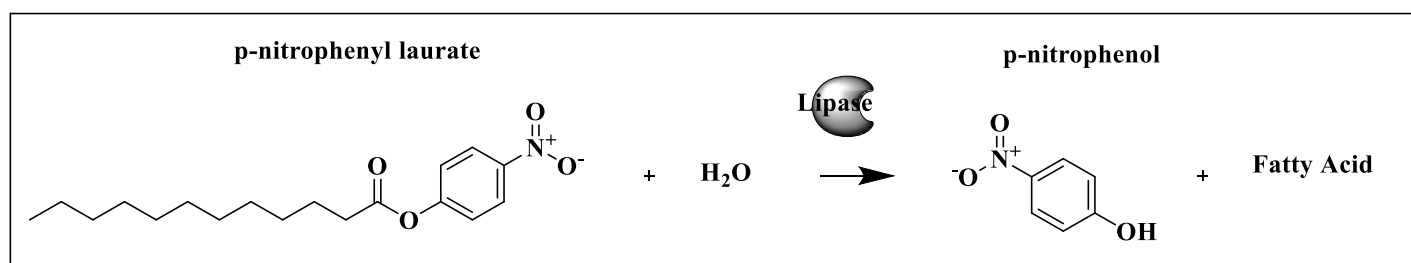


Εικόνα 2. 46: Υδρόλυση του υποστρώματος αιθυλεστέρας της N-βενζύουλ-L-τυροσίνης (BTEE) σε BT.

Το μίγμα της αντίδρασης έχει όγκο 1 mL. Ο μάρτυρας περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα 80 mM Tris-HCL pH 7,8, 0,55 mM BAEE, 0,054 M CaCl₂ και 0,033 mM HCL. Το μίγμα της αντίδρασης που αφορά το εξεταζόμενο δείγμα περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα 80 mM Tris-HCL pH 7,8, 0,55 mM BAEE, 0,054 M CaCl₂ και κατάλληλη ποσότητα ενζύμου. Ως μονάδα μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας έχει οριστεί το Unit. Συγκεκριμένα η μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας χυμοθριψίνης ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που υδρολύει 1 μmole του υποστρώματος BTEE σε 1 min. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό χρησιμοποιείται ο συντελεστής απόσβεσης του BTEE $\epsilon = 0,964 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$.

2.2.1.42. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ π-ΝΙΤΡΟΦΑΙΝΥΛ-ΛΑΥΡΙΚΟΥ

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ταχύτητα με την οποία η λιπάση υδρολύει το υπόστρωμα π-νιτροφαινυλ-λαυρικού (p-nitrophenyl laurate) σε π-νιτροφαινόλη (p-nitrophenol).

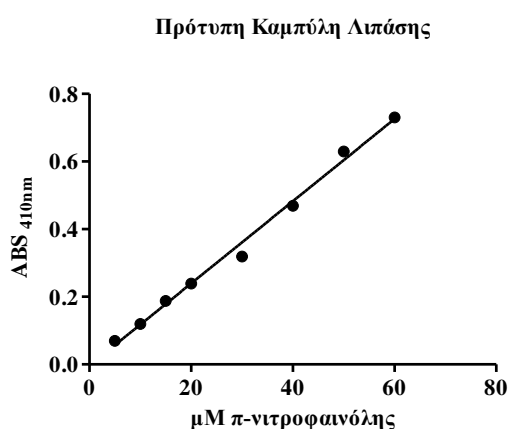


Εικόνα 2. 47: Υδρόλυση του υποστρώματος π-νιτροφαινυλ-λαυρικού (p-nitrophenyl laurate) σε π-νιτροφαινόλη (p-nitrophenol) και λιπαρό οξύ.

Το μίγμα της αντίδρασης έχει τελικό όγκο 0,6 mL και αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M Tris-HCl, 175 μM π-νιτροφαινυλ-λαυρικό διάλυμα υποστρώματος pH 8,2 και από κατάλληλη ποσότητα ενζύμου. Το προϊόν της υδρόλυσης σε αλκαλικό pH (pKa 7,2), η π-νιτροφαινόλη, αποτελεί ένα χρωμοφόρο που απορροφά σε μήκος κύματος 410 nm και χρωματίζει το διάλυμα κίτρινο.

Το διάλυμα υποστρώματος αποτελείται από 2,02 mg π-νιτροφαινυλ-λαυρικού, 2,55 mg SDS, 0,15 g Triton X100 και 15 mL δις απιονισμένο νερό. Το παραπάνω μίγμα θερμαίνεται στους 65 °C για 15 min και διατηρείται στους 4 °C έως 3 d. Ο μάρτυρας αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M Tris-HCl 175 μM π-νιτροφαινυλ-λαουρεϊτ διάλυμα υποστρώματος pH 8,2 και 100 μL ddH₂O.

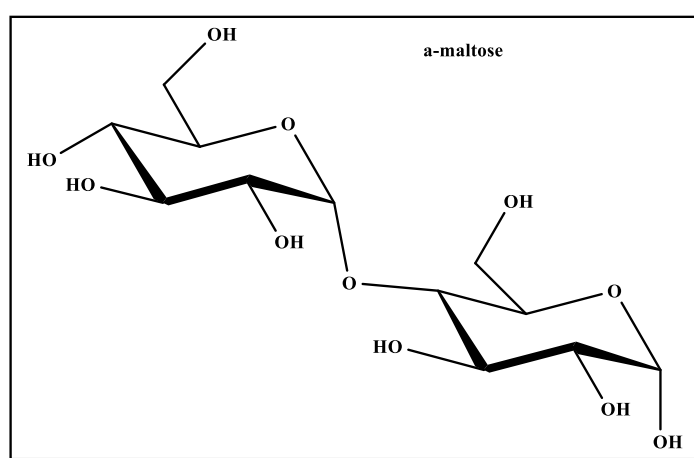
Για τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστηριότητας απαιτείται η δημιουργία πρότυπης καμπύλης γνωστών συγκεντρώσεων π-νιτροφαινόλης, όπου αποτελεί το προϊόν της υδρόλυσης, και εκφράζεται σε μM (Εικόνα 2. 48). Ο συντελεστής απόσβεσης που χρησιμοποιείται είναι η κλίση της ευθείας από την πρότυπη καμπύλη. Στην παρούσα μελέτη η κλίση της ευθείας είναι $\epsilon = 0.0122$.



Εικόνα 2. 48: Πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων π-νιτροφαινόλης εκφρασμένο σε μM. Η καμπύλη παρουσιάζει γραμμική σχέση η οποία ορίζεται ως: $y = 0.0122x - 0.004$.

2.2.1.43. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ α -ΑΜΥΛΑΣΗΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΑΜΥΛΟΥ

Η α -αμυλάση αποτελεί ένζυμο που υδρολύει α -γλυκοσιδικούς δεσμούς που απαντώνται στο άμυλο. Τα προϊόντα υδρόλυσης έχουν α -διαμόρφωση. Συγκεκριμένα, καταλύει την υδρόλυση των εσωτερικών α -1,4-γλυκοσιδικών δεσμών σε πολυσακχαρίτες που περιέχουν 3 ή περισσότερα μόρια α -1,4-D γλυκόζης αποδίδοντας ένα μίγμα από μαλτόζη και γλυκόζη. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ταχύτητα με την οποία η α -αμυλάση διασπά γλυκοσιδικούς δεσμούς δημιουργώντας μικρότερα μόρια σακχάρων.



Εικόνα 2. 49: Μόριο Μαλτόζης α -διαμόρφωσης.

Η διαδικασία του πειράματος έχει ως εξής: χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα αμύλου 1% (w/v) σε διάλυμα φωσφορικού και χλωριούχου νατρίου (20 mM NaH_2PO_4 , 6,7 mM NaCl pH 6.9), και ακολουθεί βρασμός για 15 min. Για τη χρωστική παρασκευάζονται δυο διαφορετικά διαλύματα Α. και Β. Για το διάλυμα Α. χρησιμοποιείται κατάλληλη ποσότητα τρυγικού καλίου και υδροξείδιο του νατρίου (12 g τρυγικού καλίου και 8 mL από 2 M NaOH). Για το διάλυμα Β. χρησιμοποιείται κατάλληλη ποσότητα 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ (96 mM $\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$) με χρήση ήπιας θέρμανσης και ανάδευσης. Για την παρασκευή της χρωστικής γίνεται ενσωμάτωση 8 mL διαλύματος Α σε 20 mL διαλύματος Β και αραίωση με 40 mL ddH_2O . Το τελικό μίγμα της χρωστικής αποθηκεύεται σε σκουρόχρωμο μπουκάλι και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για έξι μήνες.

Η διαδικασία της μελέτης αποτελείται από τα εξής στάδια:

Στάδιο 1

Μάρτυρας: 110 μL ρυθμιστικού διαλύματος 1% (w/v) αμύλου

Δείγμα: 110 μL ρυθμιστικού διαλύματος 1% (w/v) αμύλου με 50 μL δείγματος

Το ως προς μελέτη δείγμα και ο μάρτυρας επωάζονται με το διάλυμα 1% (w/v) αμύλου για χρονικό διάστημα 3 min σε θερμοκρασία δωματίου.

Στάδιο 2

Μάρτυρας: 110 μL χρωστική και 50 μL δείγμα

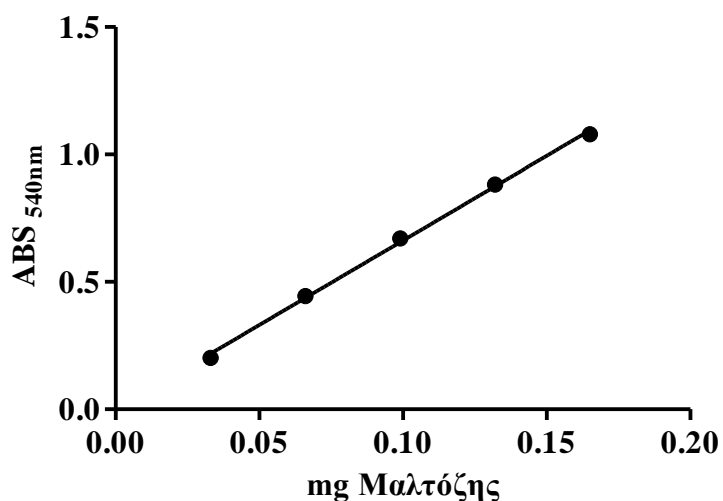
Δείγμα: 110 μL χρωστική

Το ως προς μελέτη δείγμα και ο μάρτυρας επωάζονται στους 100 °C για χρονικό διάστημα 15 min. Ακολουθεί ψύξη σε πάγο για 5 min. Τέλος, γίνεται αραίωση με 1 mL ddH₂O μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm.

Η δραστηριότητα της α -αμυλάσης υπολογίζεται με βάση τη συγκέντρωση μαλτόζης στο ως προς μελέτη δείγμα (**Εικόνα 2. 49**). Για το σκοπό αυτό δημιουργείται πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων μαλτόζης. Οι συγκεντρώσεις του πρότυπου διαλύματος εκφράζονται σε mg μορίων μαλτόζης που προκύπτουν ενζυματικά από τη διάσπαση του αμύλου (**Εικόνα 2. 50**). Η συγκέντρωση μαλτόζης συσχετίζεται με την απορρόφηση του ως προς μελέτη δείγματος για την ανίχνευση δράσης α -αμυλάσης.

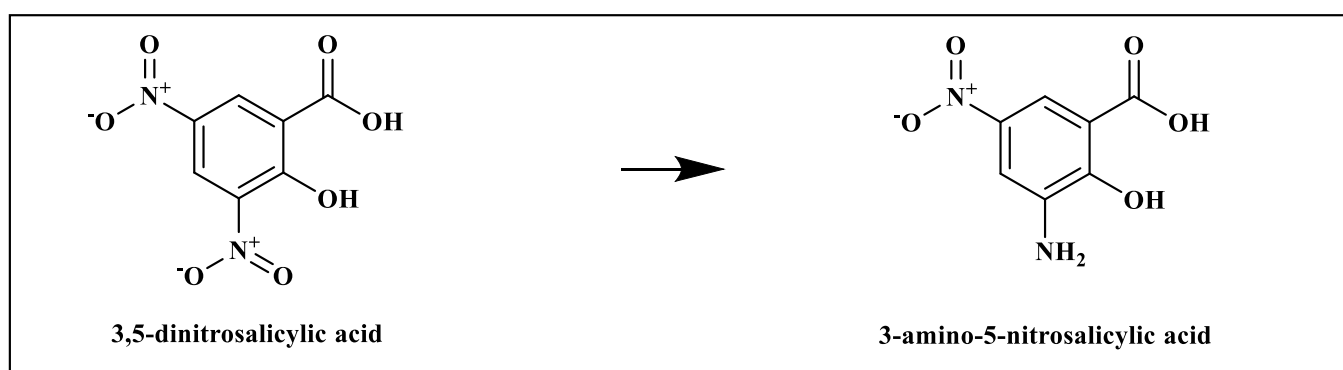
Η διαδικασία υπολογισμού της πρότυπης περιλαμβάνει την παρασκευή πρότυπου υδατικού διαλύματος 0,2 % (w/v) μαλτόζης. Ο όγκος της αντίδρασης είναι 3mL και αποτελείται από διαφορετικές συγκεντρώσεις μαλτόζης, ddH₂O και 1 mL χρωστικής. Ακολουθεί βρασμός για 15 min, ψύξη σε πάγο για 5 min, προσθήκη 9 mL ddH₂O και λαμβάνεται απορρόφηση στα 540 nm.

Πρότυπη Καμπύλη α-Αμυλάσης



Εικόνα 2. 50: Πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων μαλτόζης εκφρασμένο σε mg. Η καμπύλη παρουσιάζει γραμμική σχέση η οποία ορίζεται ως: $y = 6.6394x - 0.0015$.

Η συγκέντρωση της μαλτόζης ποσοτικοποιείται με τη βοήθεια του χρωστικού διαλύματος που περιγράφεται παραπάνω, συγκεκριμένα από την αναγωγή του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος σε 3-άμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ (**Εικόνα 2. 51**). Η αντίδραση πραγματοποιείται με μετατροπή του χρώματος από κίτρινο σε κόκκινο, με την ένταση του κόκκινου χρώματος να υποδηλώνει τη συγκέντρωση μορίων μαλτόζης στο δείγμα, με μέτρηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 540 nm.



Εικόνα 2. 51: Αντίδραση αναγωγής του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος σε 3-άμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ με αποτέλεσμα της μετατροπής του χρώματος από κίτρινο σε κόκκινο. Η ένταση της αλλαγής συσχετίζεται με τη συγκέντρωση μορίων μαλτόζης στο δείγμα.

Για τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστηριότητας χρησιμοποιείται η εξίσωση:

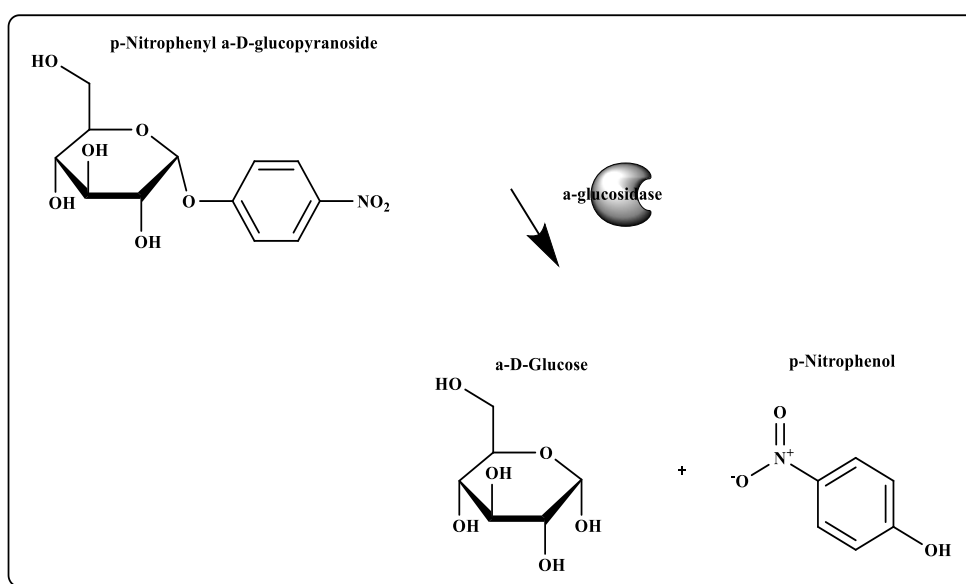
$$\text{Units/ mL} = \text{mg}_{\text{μαλτόζης}} * \text{df} / \text{V}_{\text{δείγματος}}$$

df= συντελεστής αραίωσης

Μια μονάδα ενζύμου (1 Unit) θα απελευθερώσει 1 mg μαλτόζης από το άμυλο μετά από επώαση 3 min σε pH 6,9 σε θερμοκρασία 20 °C.

2.2.1.44. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ α -ΓΛΥΚΟΣΙΔΑΣΗΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ π -ΝΙΤΡΟΦΑΙΝΥΛ α -D- ΓΛΥΚΟΠΙΡΑΝΟΣΙΔΙΟ

Η α -γλυκοσιδάση είναι μία γλυκοσιδάση (ένζυμο της κατηγορίας των υδρολασών) που δρά στους δεσμούς α -1,4 και αποικοδομεί το άμυλο και τους δισακχαρίτες σε μόρια α -γλυκόζης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ταχύτητα του ενζύμου να υδρολύει το υποστρώμα π -νιτροφαινυλ α -D- γλυκοπιρανοσίδιο και την παραγωγή ενός χρωμοφόρου προϊόντος, την π -νιτροφαινόλη, η οποία απορροφά σε μήκος κύματος 410 nm και χρωματίζει το διάλυμα κίτρινο (Εικόνα 2. 52).



Εικόνα 2. 52: Η αντίδραση υδρόλυσης του υποστρώματος π -νιτροφαινυλ α -D- γλυκοπιρανοσίδιο από το ένζυμο α -γλυκοσιδάση και η παραγωγή των προϊόντων α -D- γλυκόζη και π -νιτροφαινόλη.

Για τον προσδιορισμό απαιτείται η δημιουργία των εξής διαλυμάτων:

- A. Ρυθμιστικό διάλυμα 67 mM KH_2PO_4 pH 6.8
- B. Υδατικό διάλυμα 3 mM GSH
- C. Υδατικό διάλυμα 10 mM π-νιτροφαινυλ α-D- γλυκοπιρανοσίδιο (PNP-Gluc)
- D. Υδατικό διάλυμα 100 mM ανθρακικού νατρίου (NaCarb)

Η διαδικασία της μελέτης αποτελείται από τα εξής στάδια:

Διάλυμα αντίδρασης

Μάρτυρας: 290 μL A -x, όπου x το εξεταζόμενο δείγμα και 10 μL B

Δείγμα: 265 μL A -x, όπου x το εξεταζόμενο δείγμα και 10 μL B και 25 μL C

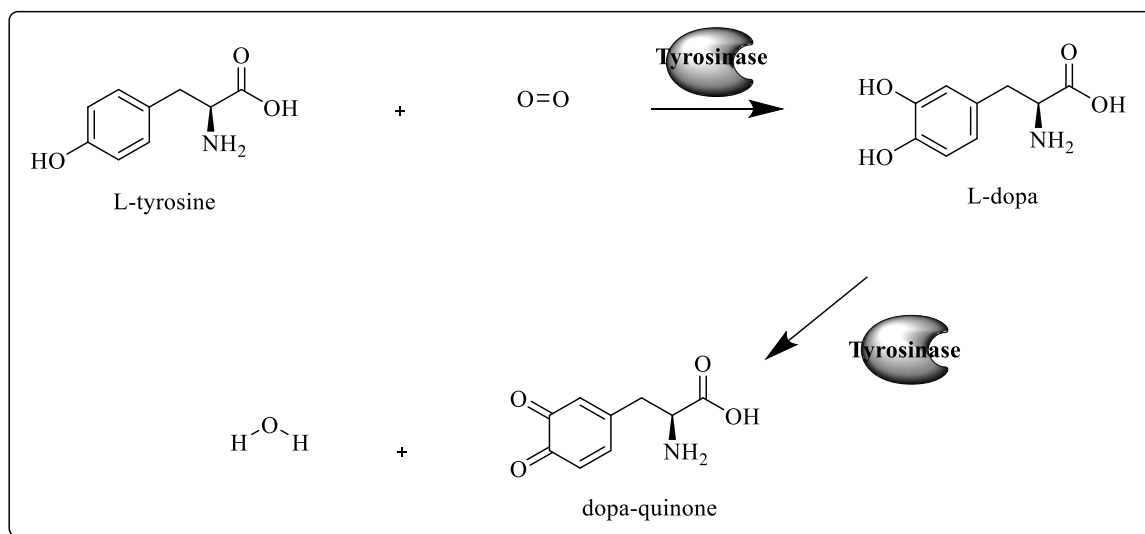
Το ως προς μελέτη δείγμα και ο μάρτυρας επωάζονται στους 37 °C για 20 min. Η αντίδραση σταματάει με ενσωμάτωση 800 μL διαλύματος D σε 200 μL Διάλυμα αντίδρασης. Ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 410 nm.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της δράσης α-γλυκοσιδάσης χρησιμοποιείται ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της π-νιτροφαινόλης στα 410 nm είναι 18.3 L/mmole·cm. Μια ενζυμική μονάδα α-γλυκοσιδάσης θα απελευθερώσει 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ D-γλυκόζης από το υπόστρωμα π-νιτροφαινυλ α-D- γλυκοπιρανοσίδιο σε pH 6,8 στους 37 °C.

2.2.1.45. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗ

Η τυροσινάση, ως μεταλλοένζυμο, αποτελεί μια μονο-οξυγενάση που περιέχει χαλκό στο ενεργό της κέντρο και είναι ευρέως διαδεδομένη στη φύση. Αποτελεί το ένζυμο-κλειδί που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της μελανίνης, μετατρέποντας διαδοχικά το αμινοξύ L-τυροσίνη σε L-dopa (ο-διφαινόλη) και στη συνέχεια σε ο-ντοπακινόνη. Η τελευταία μετατρέπεται γρήγορα σε ντοπαχρώμα, του οποίου ο πολυμερισμός οδηγεί στο σχηματισμό της μελανίνης (**Εικόνα 2. 53**). Η μελανίνη καθορίζει το χρώμα του δέρματος και των μαλλιών ενώ ταυτόχρονα προστατεύει από την υπεριώδη ακτινοβολία. Η υπερπαραγωγή και η συσσώρευση της μελανίνης στο δέρμα μπορεί να οδηγήσει σε δυσχρωμίες (Lante & Tinello, 2015). Έχει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση της νευρομελανίνης στον ανθρώπινο εγκέφαλο καθώς και στον νευροεκφυλισμό που σχετίζεται με νόσο του Parkinson. Ταυτόχρονα είναι υπεύθυνη

για την ανεπιθύμητη ενζυμική αμαύρωση στα φρούτα και στα λαχανικά. Η τυροσινάση αποτελεί ένα ένζυμο-στόχο που αφορά άμεσα τη βιομηχανία των φαρμάκων, των καλλυντικών και των τροφίμων (Ya et al., 2015).

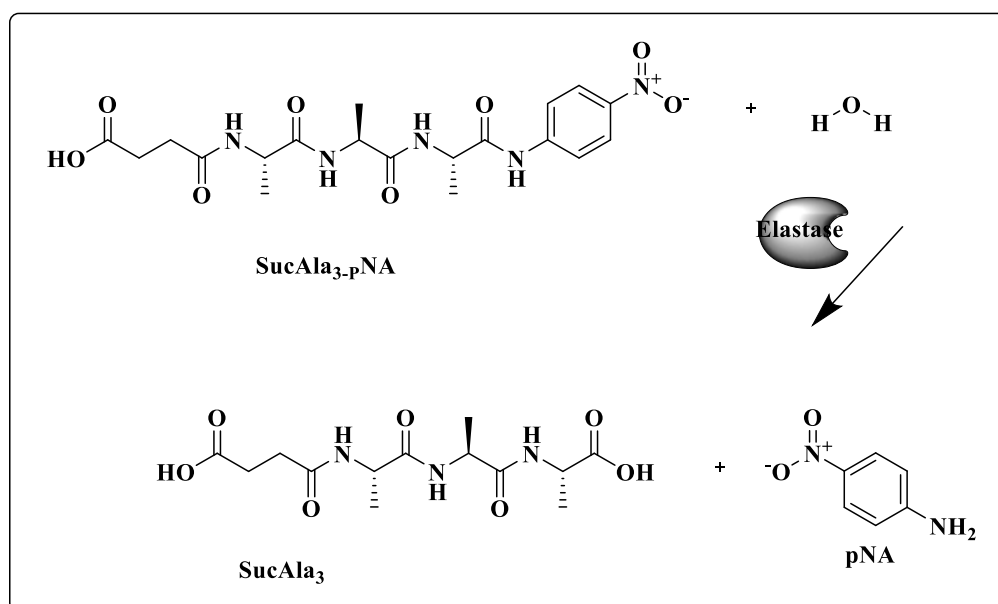


Εικόνα 2. 53: Βιοσύνθεση της μελανίνης με οξείδωση του αμινοξέος τυροσίνης από το ένζυμο τυροσινάση και παραγωγή της ουσίας L-dopa.

Ο προσδιορισμός της αναστολής του ενζύμου τυροσινάση απαιτεί τη δημιουργία του ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM KH_2PO_4 pH 6,5 και του διαλύματος 1 mM L-tyrosine. Ακολουθεί η δημιουργία ενός μίγματος (A) που αποτελείται από 9 mM H_2O , 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος και 10 mL διαλύματος L-τυροσίνης. Ο φωτομετρικός προσδιορισμός πραγματοποιείται στα 475 nm στους 25 °C. Το μίγμα της αντίδρασης έχει τελικό όγκο 600 μL και περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα A, 20 Units τυροσινάσης και κατάλληλη συγκέντρωση δείγματος. Ο υπολογισμός της αναστολής του ενζύμου υπολογίζεται με τη μορφή της τιμής IC_{50} που εκφράζει τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που προκαλεί 50% αναστολή στο ένζυμο τυροσινάση.

2.2.1.46. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΕΛΑΣΤΑΣΗ

Η ελαστίνη αποτελεί μια πρωτεΐνη του συνδετικού ιστού και είναι υπεύθυνη για την ελαστικότητα του δέρματος. Το μοναδικό ένζυμο που μπορεί να αποδομήσει τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη ονομάζεται ελαστάση. Η αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου στα κύτταρα μπορεί να οφείλεται τόσο στην ηλικία όσο και στην έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, οδηγώντας στη γήρανση του δέρματος. Η ανάγκη για εύρεση νέων φυτικών πηγών με ικανότητα να δρουν ανασταλτικά στη δράση της ελαστάσης αποτελεί επιτακτική ανάγκη για τους τομείς της φαρμακευτικής και καλλυντικής βιομηχανίας.



Εικόνα 2. 54: Η αντίδρασης υδρόλυσης του υποστρώματος SucAla₃-pNA από το ένζυμο ελαστάση.

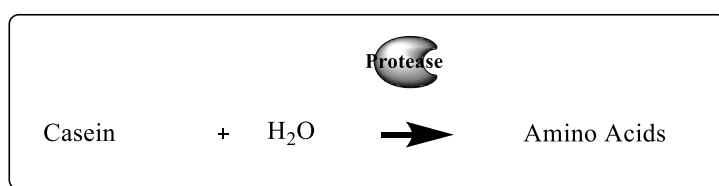
Ο φωτομετρικός προσδιορισμός πραγματοποιείται στα 410 nm στους 25 °C. Το μίγμα της αντίδρασης έχει τελικό όγκο 600μL και περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM Tris-HCl - pH 8, 0,15 mM υποστρώματος SucAla₃-PNA, 0,013 Units ελαστάσης και κατάλληλη συγκέντρωση δείγματος. Ο υπολογισμός της αναστολή του ενζύμου γίνεται με τη μορφή της τιμής IC₅₀, η οποία εκφράζει τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που προκαλεί 50% αναστολή στο ένζυμο ελαστάση.

2.2.1.47. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΑΚΕΤΥΛΟ-ΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗ

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός πραγματοποιείται στα 412 nm στους 25 °C. Το μίγμα της αντίδρασης έχει τελικό όγκο 1 mL και περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M KH_2PO_4 με 10 mM 5,5'-διθιο-μπις- (2-νιτροβενζοϊκό οξύ) DTNB pH 8, 0,129 mg του υποστρώματος ιωδιούχο ακετυλοθειοχολίνη και κατάλληλη συγκέντρωση δείγματος. Ο υπολογισμός της αναστολή του ενζύμου γίνεται με τη μορφή της τιμής IC_{50} , η οποία εκφράζει τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που προκαλεί 50% αναστολή στο ένζυμο ακετυλο-χολινεστεράση.

2.2.1.48. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΠΡΩΤΕΑΣΗ

Οι πρωτεάσες αποτελούν ένζυμα που διασπούν πεπτιδικούς δεσμούς. Όταν η πρωτεάση διασπάσει την καζεΐνη (βασικό υπόστρωμα), το αμινοξύ τυροσίνη απελευθερώνεται μαζί με άλλα αμινοξέα και πεπτιδικά θραύσματα. Το αντιδραστήριο Folin - Ciocalteus αντιδρά πρωτίστως με τα ελεύθερα αμινοξικά κατάλοιπα της ελεύθερης τυροσίνης και ως αποτέλεσμα της αντίδρασης αποτελεί η παραγωγή ενός χρωμοφόρου μπλε χρώματος, το οποίο μπορεί να προσδιορστεί ποσοτικά με φωτομετρικές δοκιμές. Όσο περισσότερη τυροσίνη απελευθερώνεται από την καζεΐνη, τόσο περισσότερα χρωμοφόρα παράγονται και τόσο ισχυρότερη είναι η δραστικότητα της πρωτεάσης.



Εικόνα 2. 55: Αντίδραση διάσπασης της καζεΐνης από πρωτεάση.

Η διαδικασία της μελέτης αποτελείται από τα εξής στάδια:

Στάδιο 1

Μάρτυρας: 750 μL ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM K_2HPO_4 , 0,65% καζεΐνη, pH 7,5

Δείγμα: 750 μL ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM K_2HPO_4 , 0,65% καζεΐνη, pH 7,5 με 150 μL δείγματος

Το ως προς μελέτη δείγμα και ο μάρτυρας επωάζονται για 10 min στους 37°C. Στη συνέχεια προστίθενται 750 μL 110mM TCA και κατάλληλη συγκέντρωση δείγματος ή πρότυπο πρωτεάσης. Ακολουθεί ανάδευση, επώαση στους 37°C για 30min και φιλτράρισμα.

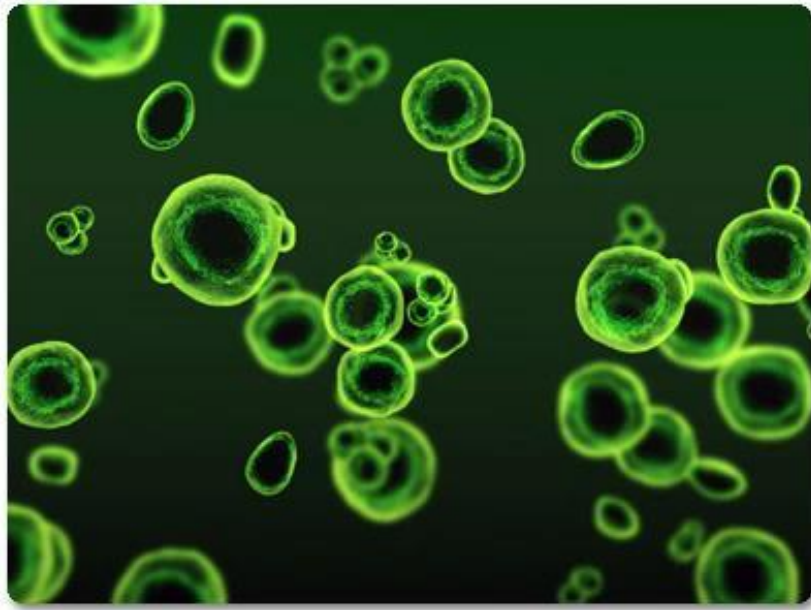
Στάδιο 2

Μάρτυρας/ Δείγμα: 400 μL δείγμα από το **Στάδιο 1**, 1mL Na_2CO_3 και 200 μL του ανιδραστηρίου Folin-Ciocalteu

Το ως προς μελέτη δείγμα και ο μάρτυρας επωάζονται στους 37 °C για χρονικό διάστημα 30 min. Ακολουθεί ψύξη σε πάγο για 5 min. Τέλος, μέτρηση της απορρόφησης στα 660 nm.

Η δραστηριότητα της πρωτεάσης υπολογίζεται με βάση τη συγκέντρωση της L-τυροσίνης στο ως προς μελέτη δείγμα. Για το σκοπό αυτό δημιουργείται πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων L-τυροσίνης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Αξιολόγηση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων ειδών *Chlorella*



3.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζεται η μελέτη στην οποία πραγματοποιήθηκε η σάρωση οκτώ διαφορετικών στελεχών από μικροφύκη του γένους *Chlorella* και συγκεκριμένα των ειδών *Chlorella vulgaris*, *Chlorella vulgaris fo. viridis*, *Chlorella emersonii*, *Chlorella emersonii var. globosa*, *Chlorella saccharophila var. ellipsoidea* και *Chlorella minutissima*. Η σάρωση αφορούσε στην αξιολόγηση των ακατέργαστων εκχυλισμάτων ως προς επιλεγμένες δραστηριότητες με ιδιαίτερο ενδιαφέρον ειδικά για το χώρο της κοσμετολογίας. Συγκεκριμένα έγινε μελέτη των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων με ενζυμικές και μη ενζυμικές δοκιμές καθώς και τη μελέτη της αναστολής ενζύμων που αποτελούν στόχους στην κοσμετολογία. Τα αποτελέσματα προσδιορισμού της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητάς (Total Antioxidant Capacity ή TAC) δείχνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ αυτών των στελεχών γεγονός που υποδηλώνει μια μεγάλη χημική πολυμορφία των αντιοξειδωτικών στα είδη *Chlorella*. Η διαφοροποίηση στην ενζυμική και μη ενζυμική αντιοξειδωτική ικανότητα που παρατηρήθηκε μεταξύ των στελεχών θα μπορούσε να σχετίζεται με τη διαφορετική ικανότητα προσαρμογής τους κάτω από διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης. Το εκχύλισμα της *Chlorella minutissima* έδειξε υψηλή ανασταλτική ισχύ έναντι των ενζύμων ελαστάση και τυροσινάση, γεγονός που υποδηλώνει τη πιθανή χρήση του εκχυλίσματος στον έλεγχο της γήρανσης, της χρώσης και της φλεγμονής του δέρματος. Ακολούθησε η μελέτη της επίδρασης του φωτισμού στις παραπάνω ιδιότητες. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε το ακατέργαστο εκχύλισμα του είδους *Chlorella minutissima*, έπειτα από καλλιέργειες ανεπτυγμένες υπό διαφορετικές συνθήκες φωτισμού (διαφορετικό μήκος κύματος ακτινοβολίας) και υπό διαφορετική ένταση φωτός (υψηλή, μέτρια και χαμηλή). Στο σύνολό τους τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τα είδη *Chlorella* μπορούν να προσφέρουν πολλά υποσχόμενα εκχυλίσματα, πλούσια σε αντιοξειδωτικές και αντι-γηραντικές ουσίες, συστατικά με μεγάλο ενδιαφέρον για χρήση ως πρώτη ύλη στη βιομηχανία καλλυντικών.

3.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια η ανάγκη για περιορισμό στη χρήση συνθετικών αντιοξειδωτικών που χρησιμοποιούνται σε καθημερινή βάση, όπως είδη κατανάλωσης από τον ανθρώπινο οργανισμό, συντηρητικά, φαρμακευτικά προϊόντα και πρόσθετα τροφίμων, οδηγεί σε ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για εύρεση νέων πηγών αντιοξειδωτικών ουσιών φυτικής προέλευσης (Hudek et al., 2014).

Τα μικροφύκη αποτελούν μικροσκοπικούς οργανισμούς, με πλούσιο περιεχόμενο σε βιοδραστικές ουσίες οι οποίες μπορούν να αξιοποιηθούν για ανθρώπινη κατανάλωση καθώς και για περαιτέρω χρήση σε βιομηχανίες φαρμάκων και κοσμετολογίας. Είναι ευρέως γνωστό ότι τα φυτά έχουν μελετηθεί ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση και το αντιοξειδωτικό μηχανισμό που διαθέτουν ενώ παρόμοιες μελέτες σε μικροάλγη είναι αρκετά περιορισμένες (Shanab et al., 2012; Shalaby et al., 2010).

Το περιεχόμενο των μικροφυκών σε μεταβολίτες και βιοδραστικές ουσίες αποτελεί σημαντικό κίνητρο για έρευνα διότι πολλά από αυτά τα συστατικά μπορούν να απομονωθούν ή και να συντεθούν στο εργαστήριο (Choochote et al., 2013; Zhang et al., 2007). Αυτές οι χημικές ουσίες αναμένεται να συντεθούν από τον ίδιο τον οργανισμό υπό συνθήκες στρες και χαμηλού ρυθμού ανάπτυξης με αποτέλεσμα την απελευθέρωσή τους σε αρκετά μεγάλη συγκέντρωση (Shalaby et al., 2010). Τα μικροφύκη ζουν σε οικοτόπους υπό συνθήκες υψηλής ηλιακής ακτινοβολίας και έχουν αναπτύξει ένα ενζυματικό και μη-ενζυματικό αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα που μπορεί να συμβάλλει στην ικανότητά τους για προσαρμογή στο οξειδωτικό στρες. Αυτή η ιδιότητα παρέχει τη βάση για την εκμετάλλευση των *Chlorella* ως μια πηγή χαμηλού κόστους των φυσικών αντιοξειδωτικών (Plaza et al., 2008; Ibañez & Cifuentes, 2013).

Η γήρανση του δέρματος αποτελεί μια αργή και περίπλοκη διαδικασία εγγενών και εξωγενών παραγόντων (Yaar, 2006). Κατά τη διάρκεια της γήρανσης στο δέρμα προκαλούνται πολλές αλλαγές, μεταξύ των οποίων είναι η λέπτυνση, η ξηρότητα, η χαλάρωση, η ευθραυστότητα, οι διευρυμένοι πόρους, οι λεπτές γραμμές και οι ρυτίδες (Nagaratnam et al., 2016). Η ενδογενής γήρανση αναφέρεται κυρίως στην υποβάθμιση της ποιότητας και της απώλειας της ελαστικότητας του δέρματος, ενώ η εξωγενής γήρανση προκύπτει από την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και χαρακτηρίζεται από υποβάθμιση της δερματικής εξωκυττάριας μήτρας (ECM) και της

κερατινοκυτταρικής δυσπλασίας στην επιδερμίδα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ρυτίδων, τη χαλαρότητα και τη μελάγχρωση κυττάρων. Το δέρμα διαθέτει φυσικούς αντιοξειδωτικούς παράγοντες που μπορούν να παρεμποδίσουν τις ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) και την αποφυγή της αποσταθεροποίησης των δερματικών κυττάρων (Kammeyer & Luiten, 2015). Όταν όμως το ποσοστό των ROS είναι αυξημένο κυρίως λόγω έκθεσης στην υπεριώδη ακτινοβολία, η άμυνα του οργανισμού δεν επαρκεί. Έτσι λοιπόν, το οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικές βλάβες και να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο μέσω αποπτωτικών ή νεκρωτικών διεργασιών και αυτό γίνεται αισθητό με το σχηματισμό των ρυτίδων και την ξηροδερμία (Mitchell, 2016). Η λεύκανση του δέρματος αποτελεί μια κοινή πρακτική σε όλο τον κόσμο, ιδιαίτερα στην Ασία (Li et al., 2008). Στην ασιατική κουλτούρα το άσπρο δέρμα θεωρείται σημάδι ομορφιάς και ως εκ τούτου τα προϊόντα με λευκαντικές ιδιότητες αντιπροσωπεύουν ένα μεγάλο μερίδιο της αγοράς φυσικών καλλυντικών στην περιοχή αυτή, με ισχυρή ανάπτυξη να αναμένεται στα επόμενα χρόνια και σε πολλές περιοχές της Ευρώπης.

3.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.3.1. ΥΛΙΚΑ

Όλα τα χημικά, τα διαλύματα, τα ένζυμα αλλά και τα υποστρώματα ενζύμων έχουν προμηθευτεί από τη Sigma-Aldrich (USA). Τα είδη *Chlorella* ήταν μια ευγενή χορηγία από τον οργανισμό Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) στα πλαίσια του προγράμματος ASSEMBLE Marine Project network. Το στέλεχος *Chlorella minutissima* και η αντίστοιχη βιομάζα επίδρασης φωτισμού στην ανάπτυξη ήταν μια ευγενική χορηγία του Καθηγητή Κ. Κοτσάμπαση, Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

3.3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα διάφορα είδη *Chlorella* από τον οργανισμό CCAP (**Πίνακας 3. 1**) και το στέλεχος *Chlorella minutissima* καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλο θρεπτικό διάλυμα σύμφωνα με τις συστάσεις του οργανισμού Culture Collection of Algae and Protozoa (<http://www.ccap.ac.uk/>), (**Πίνακας 3. 2, 3. 3, 3. 4 και 3. 5**). Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε έναν ειδικό θάλαμο κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες σχετικής υγρασίας (65 %) και θερμοκρασίας (35 °C), με συνεχή ανάδευση και φωτισμό (24 h). Μετά την καλλιέργεια, τα κύτταρα μικροφυκών συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 10 min και η κυτταρική πάστα ομογενοποιήθηκε με ένα κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (0,1 M KH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 6) με τη χρήση υπερήχων (20 s x 5 φορές). Το μίγμα στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στις 10.000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε χωρίς επιπλέον επεξεργασία. Τα κύτταρα που συλλέχθηκαν αλλά δεν χρησιμοποιήθηκαν για άμεση μελέτη αποθηκεύτηκαν στους -20 °C. Τα στελέχη *Chlorella* που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται αναλυτικά στον **Πίνακα 3. 1**.

Πίνακας 3. 1: Στελέχη *Chlorella* που παραχωρήθηκαν από τον οργανισμό CCAP (<http://www.ccap.ac.uk/>) και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Κωδικός (CCAP 211/)	Όνομα στελέχους
70	<i>Chlorella sp.</i>
12	<i>Chlorella vulgaris fo. Viridis</i>
79	<i>Chlorella vulgaris</i>
80	<i>Chlorella vulgaris</i>
11B	<i>Chlorella vulgaris</i>
8C	<i>Chlorella emersonii var. globosa</i>
11N	<i>Chlorella emersonii</i>

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά διαλύματα 3N-BBM+V (Πίνακας 3. 2), το Bristol με προσθήκη πεπτόνης (Πίνακας 3. 3), το θρεπτικό διάλυμα F₂ με περιεκτικότητα 25 ‰ NaCl (Πίνακας 3. 4) και το θρεπτικό διάλυμα Bristol σε συνδυασμό με το θρεπτικό F₂ σε σκόνη (Πίνακας 3. 5). Σκοπός ήταν να βρεθεί το καταλληλότερο θρεπτικό διάλυμα για την ικανοποιητική ανάπτυξη ενός από τα στελέχη *Chlorella*, της *Chlorella minutissima*. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι το θρεπτικό που φαίνεται να ενισχύει την ανάπτυξη του συγκεκριμένου στελέχους είναι το θρεπτικό διάλυμα Bristol με την προσθήκη πεπτόνης. Τα υπόλοιπα θρεπτικά διαλύματα που μελετήθηκαν φαίνεται να μη συμβάλουν θετικά στην ανάπτυξη της *Chlorella minutissima*.

Πίνακας 3. 2: Περιγραφή του θρεπτικού διαλύματος 3N-BBM+V, Bold's Basal Medium with 3-fold Nitrogen and Vitamins, modified (Stein et al., 1973) για την καλλιέργεια των ειδών *Chlorella*.

Θρεπτικά Στοιχεία	Stock/ L	Ποσότητα από Stock στο θρεπτικό/ L
NaNO ₃	25 g	30 mL
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,5 g	10 mL
NaCl	0,5 g	10 mL
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	7,5 g	10 mL
KH ₂ PO ₄	17,5 g	10 mL
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,5 g	10 mL
Ιχνοστοιχεία (1)		6 mL
Na ₂ EDTA	0,75 g	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	97 mg	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	41 mg	
ZnCl ₂ ·6H ₂ O	5 mg	

CoCl ₂ ·6H ₂ O	2 mg	
Na ₂ Mo ₄ ·2H ₂ O	4 mg	
Θρεπτικό Βιταμινών	Stock/ 100 mL	
Βιταμίνη Β1 (thiaminhydrochloride)	0,12 g	1 mL
Βιταμίνη Β12 (cyanocobalamin)	1 mg	1 mL

Πίνακας 3. 3: Περιγραφή της σύστασης του θρεπτικού διαλύματος Bristol με προσθήκη πεπτόνης (τροποποίηση από Bold, 1949) για την καλλιέργεια του στελέχους *Chlorella minutissima*.

Θρεπτικά Στοιχεία	Stock/ L	Ποσότητα από Stock στο θρεπτικό/ L
NaNO ₃	25 g	10 mL
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,5 g	10 mL
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,5 g	10 mL
K ₂ HPO ₄	7,5 g	10 mL
KH ₂ PO ₄	17,5 g	10 mL
NaCl	2,5 g	10 mL
Πεπτόνη	-	1 g
Άγαρ (για στερεή καλλιέργεια)	-	18 g

Πίνακας 3. 4: Περιγραφή του θρεπτικού διαλύματος F₂ με 25 ‰ NaCl σύμφωνα με τους Guillard RRL και Ryther JH (1962) για την καλλιέργεια του στελέχους *Chlorella minutissima*.

Θρεπτικά Στοιχεία (1)	Stock/ L
Na ₂ EDTA	4,16 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	3,15 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,01 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,022 g

CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,01 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,18 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,006 g

Θρεπτικό Βιταμινών (2)	Stock/ L
Βιταμίνη B12 (cyanocobalamin)	0,5 mg
Βιταμίνη B1 (Thiamine HCL/Biotin)	0,1 g

Θρεπτικό Διάλυμα F ₂ (3)	L
NaNO ₃	0,075 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,00565 g
(1)	1 mL
(2)	1 mL

Τελικό Θρεπτικό διάλυμα F ₂ με 25 ‰ NaCl	1 L
H ₂ O	974 mL
NaCl	25 g
(3)	1 mL
+ Άγαρ (σε περίπτωση στερεής καλλιέργειας)	18 g

Πίνακας 3. 5: Περιγραφή του θρεπτικού διαλύματος Bristol σε συνδυασμό με το θρεπτικό F₂ σε σκόνη για την καλλιέργεια του στελέχους *Chlorella minutissima*.

Θρεπτικά Στοιχεία	Stock/ L	Ποσότητα από Stock στο θρεπτικό/ L
NaNO ₃	25 g	10 mL
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,5 g	10 mL
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,5 g	10 mL
K ₂ HPO ₄	7,5 g	10 mL
KH ₂ PO ₄	17,5 g	10 mL
NaCl	2,5 g	10 mL
F ₂ (σκόνη)	-	0,1 g
Άγαρ (για στερεή καλλιέργεια)	-	18 g

Οι παραπάνω χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε ασηπτικές συνθήκες με χρήση του θαλάμου νηματικής ροής. Τα διαλύματα των θρεπτικών παρασκευάζονται με χρήση δις-απεσταγμένου νερού, αγωγιμότητας 15μS/ cm και αποστειρώνονται στο αυτόκαυστο για 20 min στους 121 °C και 2,1 atm. Το διάλυμα με τις βιταμίνες αποστειρώνεται με τη χρήση φίλτρου 0,2 μm. Σε περίπτωση προμήθειας του θρεπτικού F₂ σε σκόνη, χρησιμοποιείται 0,1 g/ L για την παρασκευή του τελικού θρεπτικού διαλύματος.

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό διάλυμα F₂ σε σκόνη διαλυμένο σε αποστειρωμένο και δις-απιονισμένο νερό σε αναλογία 0,1 g/ L. Στη συνέχεια ακολούθησε στείρωση με φίλτρο διαμέτρου 0,2 μm. Τα stock διαλύματα διατηρούνται στους 4 °C για 1 μήνα.

3.3.2.1. ΜΕΛΕΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΚΑΤΕΡΓΑΣΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΕΙΔΩΝ *Chlorella* ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΤΟΥΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ

Η μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας πραγματοποιήθηκε με μια σειρά ενζυματικών και μη ενζυματικών δοκιμών, που αφορούν στο φωτομετρικό προσδιορισμό του ακατέργαστου εκχυλίσματος των ειδών *Chlorella* για την ανίχνευση του αντιοξειδωτικού δυναμικού. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ανίχνευση δράσης ως προς τα ένζυμα τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) (§ 2.2.1.21), περοξειδάση της γλουταθειόνης (GP), ρεδοκτάση της γλουταθειόνης (GR), περοξειδάσης (Px) (§ 2.2.1.22) και υπεροξειδικής δισμουτάσης μέσω του συστήματος αυτοοξειδωσης της πυρογαλόλης (SOD) (§ 2.2.1.33). Για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας πραγματοποιήθηκαν οι μέθοδοι DPPH (§ 2.2.1.35), ABTS (§ 2.2.1.36) και FRAP (§ 2.2.1.34), ενώ για τον προσδιορισμό της ολικής συγκέντρωσης γλουταθειόνης στο ακατέργαστο φυτικό εκχύλισμα πραγματοποιήθηκε ενζυμικός προσδιορισμός της γλουταθειόνης (§ 2.2.1.37). Επίσης, μελετήθηκε η ανασταλτική ισχύ του ακατέργαστου εκχυλίσματος των ειδών *Chlorella* κατά των ενζύμων ελαστάση (§ 2.2.1.46) και τυροσινάση (§ 2.2.1.45).

3.3.2.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΩΤΟΣ ΣΤΗΝ ΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΙΔΩΝ *Chlorella*

Με σκοπό τον περαιτέρω έλεγχο των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των υδατικών εκχυλισμάτων *Chlorella* ακολούθησε η μελέτη της επίδρασης του φωτισμού σε συνθήκες ανάπτυξης που αφορούν σε διαφορετικό μήκος κύματος ακτινοβολίας και σε διαφορετική ένταση φωτός. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Chlorella minutissima* λόγω της ιδιαίτερα υψηλής αντιοξειδωτικής ικανότητας που φαίνεται να παρουσιάζει. Οι συνθήκες ανάπτυξης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3. 6** και ο έλεγχος που πραγματοποιήθηκε αφορούσε την ανίχνευση της ενζυματικής δραστηριότητας ως προς GST (§ 2.2.1.21), GPx και GR (§ 2.2.1.22) καθώς και στον υπολογισμό ολικής συγκέντρωσης γλουταθειόνης (GSH/GSSG) (§ 2.2.1.37).

Πίνακας 3. 6: Συνθήκες φωτισμού ως προς τη μονοχρωματική ακτινοβολία και ένταση του φωτός για την ανάπτυξη και καλλιέργεια του στελέχους *Chlorella minutissima*.

Συνθήκες Φωτισμού

Μονοχρωματική Ακτινοβολία	Ένταση Ακτινοβολίας
WL (white light)	HL (high light)
RL (red light)	ML (medium light)
BL (blue light)	HL (high light)
DL (dark light)	

3.3.2.3. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1976) χρησιμοποιώντας αλβουμίνη μόσχου (BSA) για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης (§ 2.2.1.16).

3.3.2.4. ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η εύρεση ομόλογων αλληλουχιών για τα ένζυμα GST, GPx, GR, Peroxidase και SOD που έχουν βρεθεί για το γένος *Chlorella* και συγκεκριμένα για το είδος *Chlorella variabilis*. Η διαδικασία εύρεσης έγινε μέσω του

προγράμματος pBLAST του διαδικτυακού τόπου NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Οι αλληλουχίες που βρέθηκαν ευθυγραμμίστηκαν με το πρόγραμμα ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Για την απεικόνιση της ευθυγράμμισης των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ESPript 3.0 (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript/index.php>).

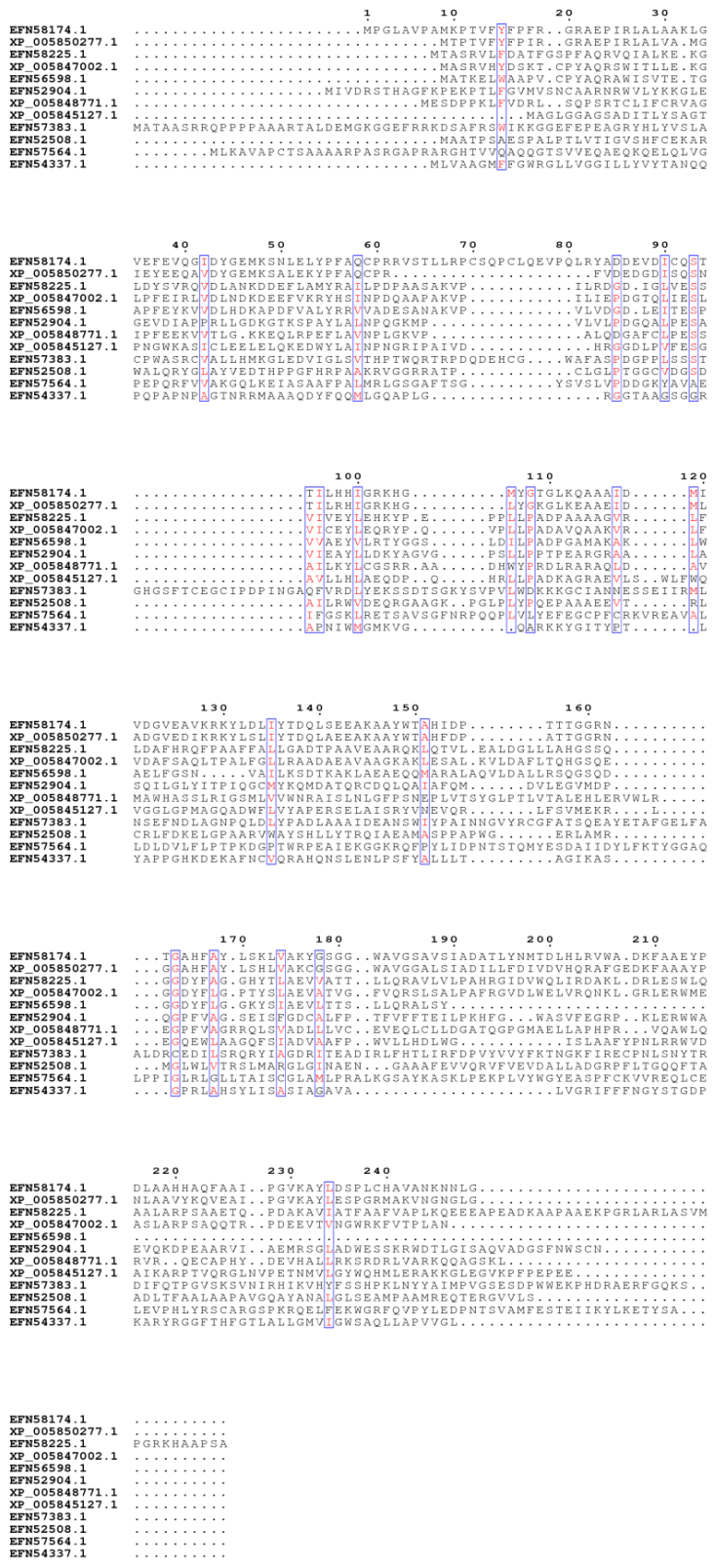
3.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.4.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ENZYMΩΝ

Η παρούσα μελέτη ξεκίνησε με τον έλεγχο ύπαρξης ενδεικτικών αλληλομόρφων αλληλουχιών που αφορούν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα για το γένος *Chlorella*. Στόχος αποτέλεσε η αρχική αξιολόγηση της *Chlorella* ως προς το ενζυμικό αντιοξειδωτικό σύστημα που πιθανόν να εμφανίζει. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η εύρεση ενδεικτικών αλληλουχιών των ισοενζύμων τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), περοξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GR) και υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD). Πραγματοποιήθηκε πολλαπλή στοίχιση αμινοξέων (Εικόνα 3. 1, 3. 2, 3. 3 και 3. 4). Οι αμινοξικές αλληλούχίες προέκυψαν έχοντας ως πρότυπο το γένος *Chlorella* και είδους *Chlorella variabilis*. Η επιλογή του συγκεκριμένου είδους έγινε διότι το γονιδίωμα του *Chlorella variabilis* έχει χαρακτηριστεί και μελετηθεί με μεγαλύτερη λεπτομέρεια (Blanc et al., 2010). Η ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ClustalW (ClustalW, Thompson et al., 1994). Οι εικόνες δημιουργήθηκαν από το ESPript (Gouet et al., 1999) και οι σκιασμένες περιοχές είναι οι συντηρημένες.

Η παραπάνω διαδικασία μας φανέρωσε ότι το γένος *Chlorella* φαίνεται να διαθέτει πλούσιο ενζυμικό αντιοξειδωτικό περιεχόμενο επιβεβαιώνοντας τα βιβλιογραφικά δεδομένα.

Εικόνα 3. 1: Αμινοξική ευθυγράμμιση (ClustalW, Thompson et al., 1994) ισοενζύμων τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) που έχουν βρεθεί στο είδος *Chlorella variabilis*.



```

      1      10      20
EFN58186.1 .....M DINGHEMPLADLAGKVTV I VN .....
EFN52049.1 .....M DR ..... YKGKVL L I N .....
EFN60096.1 MLAMQGS CVRHACGVSYHSRAPRSRP L VRAAAEDQPHEASGRRRA V LAGGALLGGLL LPR
EFN56130.1 .....M GNLVSF TTPKCEATNYH Q L SA .....
EFN59589.1 .....M GQCGSSPQLSSPAQSFYD L R E .....

      30      40      50
EFN58186.1 .....V ASQC GYTD ..... A N Y K G L Q ..... T A Y A R Y Q D F C L E
EFN52049.1 .....V ASAC GFT ..... P Q Y T E M T ..... E L Y N K V A A K C L E
EFN60096.1 VGGGGAA S AAGAGTSS IYDLSAAMEERDVALSK Y R Q V V L V M V A S A T L Y E K R R D G F T
EFN56130.1 .....L D I D K Q P V D ..... F S S L D K V V L V V . N E F V L H E K V A D Q G L V
EFN59589.1 .....L D I D K H D I D ..... F A Q E F K G ..... Q D F A L L M E E V G S R C F T

      60      70      80      90      100
EFN58186.1 I I A E P G N C A R R R P C P A L P R O T P A L P S P F A T E R Y A A T . F P L M A K V D V N G E H Q H P V F A M L K A
EFN52049.1 V I A E P G N C G G S Q . . . E P G S N S E I K S . F A . E R K G F K . G P M F A K T D V N G S E A E P L F T L K N
EFN60096.1 I I A E P G N C G G G Q . . . A P G S S Q E E R D . F A R K K F G L D E L E V Y D K I E V N G P G T H P L Y R V L K R
EFN56130.1 I Q A E P G N C F A S . . . Q E P G S N E E I K Q F A A H G F K G L . . . L M D K I N V N G S C A S P V Y N G L K V
EFN59589.1 I I A L P T N Q E M P G H . R L E P G T P E A I K A F M R S R N E R G V . . . V T D K V A N V R G S S P V I N E L K V

      110      120      130      140      150      160
EFN58186.1 N R P A . . . . . P P G R Q Q G D L A W N F E K E L V D R G E R A I K R Y G S G A Q Q E T N F D H H L A L F S S
EFN52049.1 Q Q . . . . . P G L L T S D I K W N F T K E L V D R S C N V V K R Y G S T T T F M A I E A D I K A L L . . .
EFN60096.1 Q Q P I S Q P S S P P P P G E P G R I E W N Y T K E L V D R D C V A R K R F K P A F D P L E F E A D V R L L L A G K D
EFN56130.1 A S . . . . . S D T S P I M W N F A K E I V K R D C T V A G R F G P R T S P C S L E P Q L Q E C I N . . .
EFN59589.1 A S . . . . . G N T D P I P W P Y T K A L V G R D C R V Y G E Y M P R S R P A R Q E A S I V Q L I E E G E

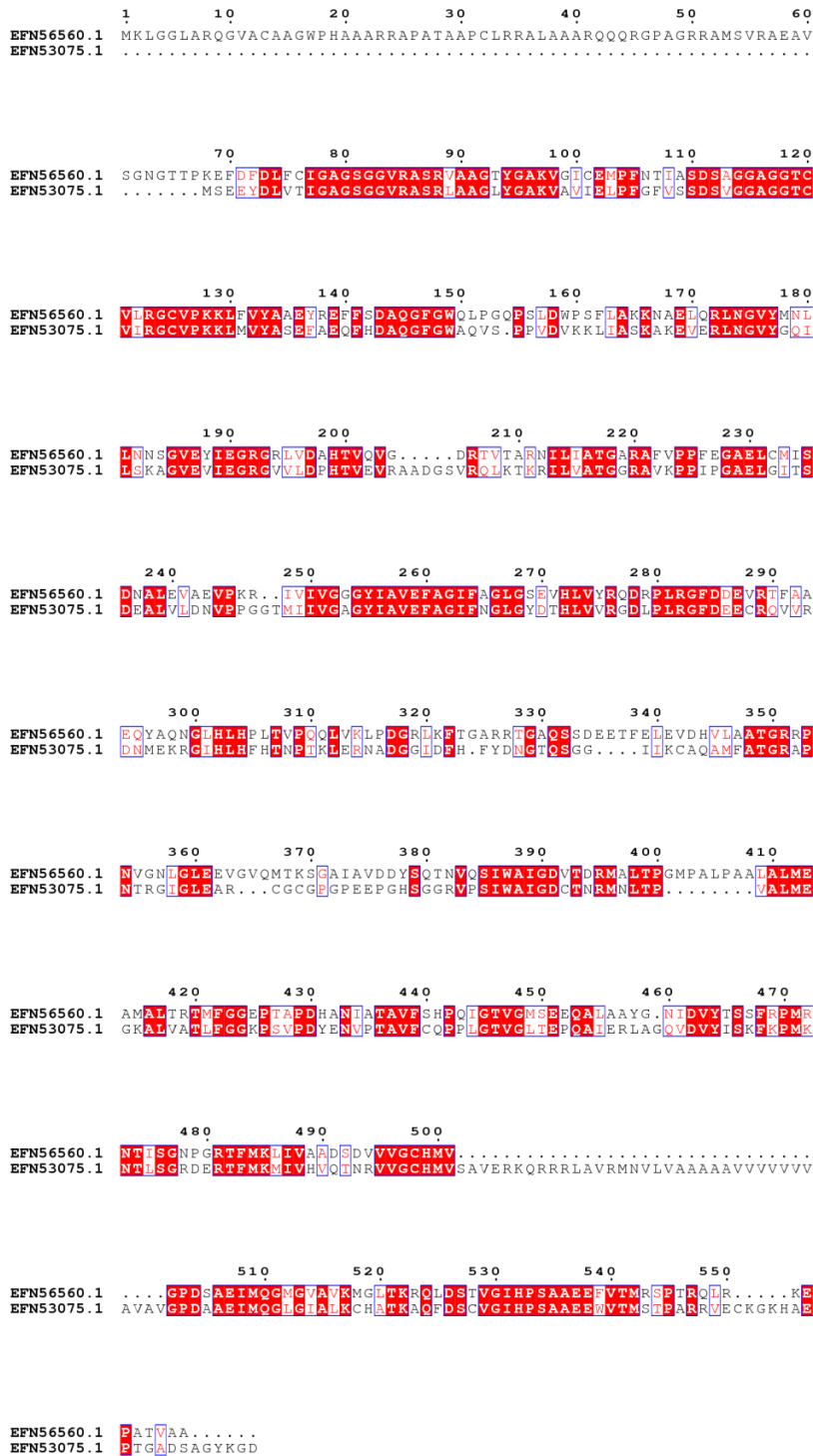
      170
EFN58186.1 P P S P P P P L P P S L Q T . . . . .
EFN52049.1 . . . . .
EFN60096.1 P L P S E C I M H P G R M V C K V D I . . . . .
EFN56130.1 . . . . . A A A P . . . . .
EFN59589.1 A K A A V S A A E G V G V A P G E H D I M L G T W M A A G K M M H R H R P E D D V L P S Q V H K L H Q P G D G T V A A

EFN58186.1 .....
EFN52049.1 .....
EFN60096.1 .....
EFN56130.1 .....
EFN59589.1 P P P A Q H L P V Q A K V G S E P A D T P A G C

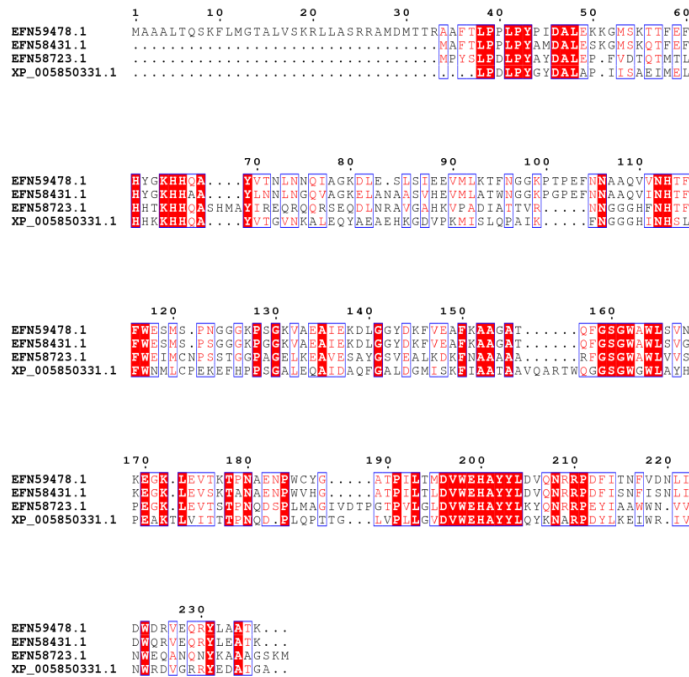
```

Εικόνα 3. 2: Αμινοξική αλληλούχιση (ClustalW, Thompson et al. 1994) ισοενζύμων περοξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) που έχουν βρεθεί στο είδος *Chlorella variabilis*.

Εικόνα 3. 3: Αμινοξική αλληλούχηση (ClustalW, Thompson et al., 1994) ισοενζύμων ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης (GR) που έχουν βρεθεί στο είδος *Chlorella variabilis*.



Εικόνα 3. 4: Αμινοξική ευθυγράμμιση (ClustalW, Thompson et al., 1994) ισοενζύμων σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) που έχουν βρεθεί στο είδος *Chlorella variabilis*.

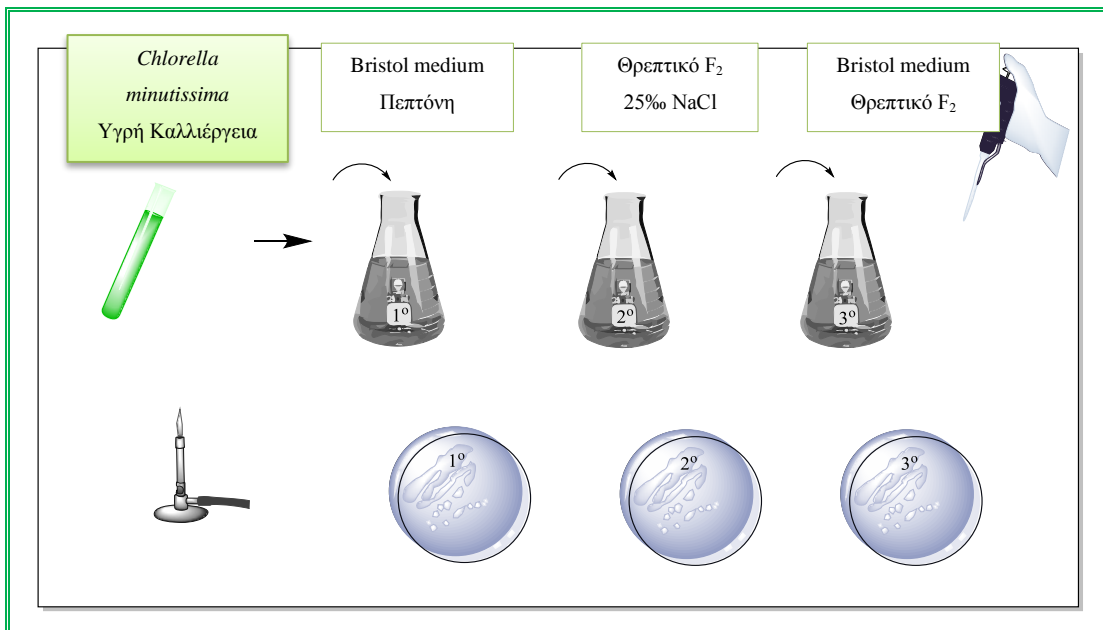


Με σκοπό την περαιτέρω μελέτη του αντιοξειδωτικού περιεχομένου των *Chlorella* *sp.*, ακολούθησε μελέτη σε ένα εύρος ακατέργαστων υδατικών εκχυλισμάτων, προερχόμενα από διαφορετικά στελέχη *Chlorella* ώστε να κατανοηθεί περισσότερο η βιολογική δράση και η βιοχημεία τους.

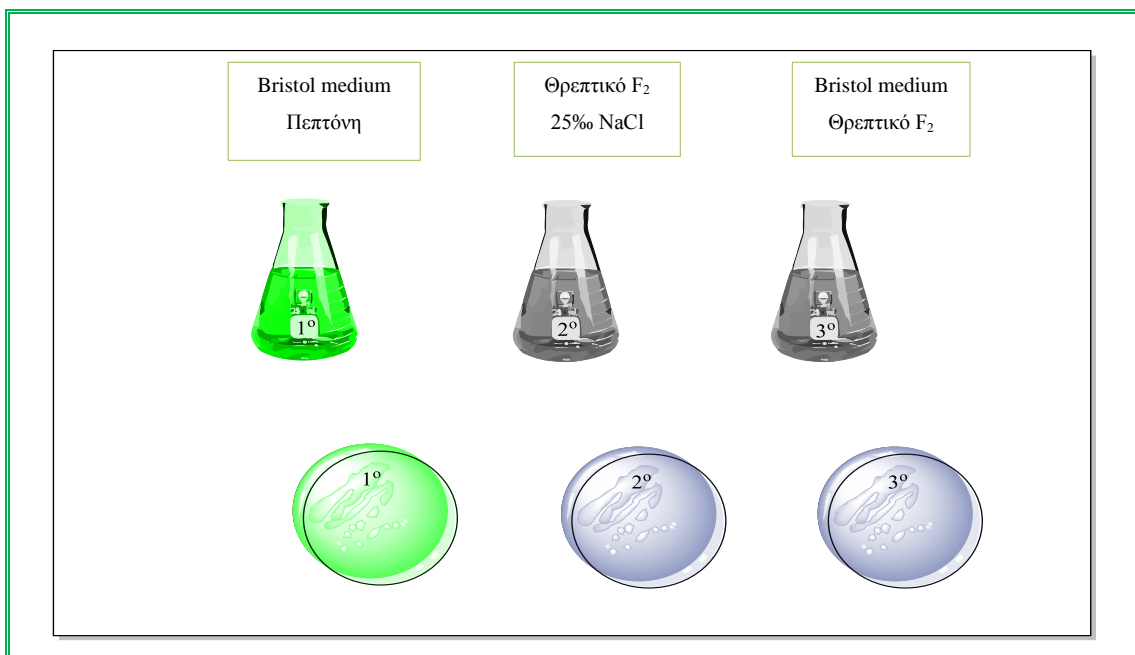
3.4.2. ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ, ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΥΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ ΤΟΥ *Chlorella minutissima* ΓΙΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Ένα από τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για βιοχημική ανάλυση ήταν το υδατικό εκχύλισμα της *Chlorella minutissima*. Με σκοπό την ανακαλλιέργεια της προηγήθηκε μελέτη για την εύρεση του καταλληλότερου θρεπτικού διαλύματος. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά θρεπτικά διαλύματα και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συνοπτικά στις **Εικόνες 3. 5** και **3. 6** που ακολουθούν. Η σύσταση των θρεπτικών διαλυμάτων περιγράφονται αναλυτικά στους **Πίνακες 3. 3, 3. 4** και **3. 5**. Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν τόσο σε υγρές όσο και στερεές καλλιέργειες. Η επώαση ολοκληρώθηκε σε διάρκεια 10 ημερών με συνεχή ανάδευση και φωτισμό σε ειδικό θάλαμο ανάπτυξης. Το πράσινο χρώμα απεικονίζει την ικανοποιητική ανάπτυξη των κυττάρων της *Chlorella minutissima*, ισοδυναμώντας με την επιλογή

του καταλληλότερου θρεπτικού διαλύματος. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το θρεπτικό διάλυμα Bristol με προσθήκη πεπτόνης έδωσε το επιθυμητό αποτέλεσμα.



Εικόνα 3. 5: Σχηματική απεικόνιση των χειρισμών που πραγματοποιήθηκαν για επιλογή του καταλληλότερου θρεπτικού υλικού με σκοπό την καλλιέργεια και την ικανοποιητική ανάπτυξη του εγχώριου είδους *Chlorella minutissima*.



Εικόνα 3. 6: Σχηματική απεικόνιση των χειρισμών που πραγματοποιήθηκαν για επιλογή του καταλληλότερου θρεπτικού υλικού με σκοπό την καλλιέργεια και την ικανοποιητική ανάπτυξη του εγχώριου είδους *Chlorella minutissima*.

3.4.3. ENZYMIKH ANAΛYΣH EIDΩN *Chlorella*

Έπειτα από τον έλεγχο για την εύρεση ενδεικτικών αλληλομόρφων που αφορούν αντιοξειδωτικά ένζυμα και την επιτυχή ανακαλλιέργεια της *Chlorella minutissima*, η μελέτη συνεχίστηκε με την ενζυμική ανάλυση των στελεχών. Συγκεκριμένα, έγιναν ενζυματικές δοκιμές που αφορούν στον έλεγχο των ακατέργαστων εκχυλισμάτων των ειδών *Chlorella* ως προς τη δράση μεταφοράς, περοξειδάσης και ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης (GST, GPx, GR), περοξειδάσης (POX) και σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD). Η ειδική ενζυμική δραστηριότητα εκφράζεται ως Units ανά mg πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στη συνέχεια (Πίνακας 3. 7 και Εικόνα 3. 7). Αναλυτικά οι μέθοδοι περιγράφονται στις παραγράφους § 2.2.1.21., § 2.2.1.22., § 2.2.1.34. αντίστοιχα.

Πίνακας 3. 7: Αποτελέσματα ειδικής δραστηριότητας της αντιοξειδωτικής δράσης των ακατέργαστων εκχυλισμάτων των ειδών *Chlorella*. MA: Μη ανιχνεύσιμη ενζυμική δραστηριότητα.

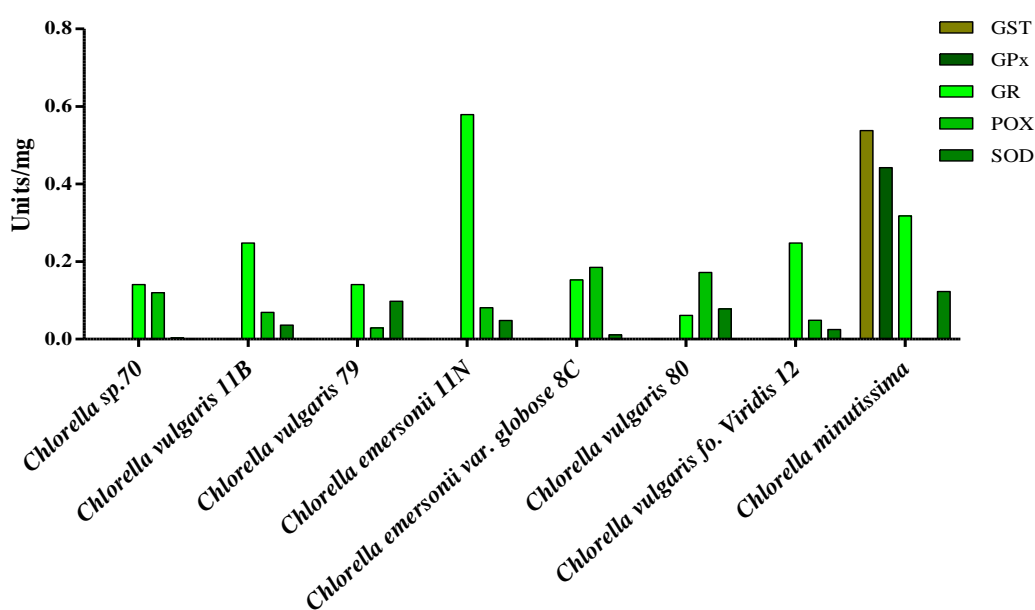
Ένζυμο	Ειδική Δραστηριότητα (Units/ mg πρωτεΐνης)							
	70	11B	79	11N	8C	80	12	<i>Chlorella minutissima</i>
GST	MA	MA	MA	MA	MA	MA	MA	0,538
GPx	MA	MA	MA	MA	MA	MA	MA	0,442
GR	0,141	0,248	0,141	0,579	0,153	0,061	0,248	0,318
POX	0,12	0,069	0,029	0,081	0,185	0,172	0,049	MA
SOD	0,0035	0,036	0,098	0,048	0,0108	0,078	0,025	0,123

Τα αποτελέσματα (Πίνακας 3. 7) έδειξαν ότι τα επιλεγμένα είδη *Chlorella* εμφανίζουν μεγάλη αντιοξειδωτική καταλυτική ποικιλομορφία, με τα διαφορετικά στελέχη να δείχνουν ποικιλία στην ενζυματική τους δραστηριότητα. Χαρακτηριστικό αποτελεί πως κανένα ακατέργαστο εκχύλισμα, με εξαίρεση της *Chlorella minutissima* δεν έδειξε ανιχνεύσιμη δραστηριότητα ως προς GPx και GST.

Μεταξύ των αντιοξειδωτικών ενζύμων που μελετήθηκαν, βρέθηκαν υψηλά επίπεδα δράσης της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης (GR) και της υπεροξειδάσης (POX). Ειδικότερα, η *Chlorella emersonii* 11N παρουσιάζει την υψηλότερη δραστηριότητα GR με ειδική δραστηριότητα στα 0,579 Units/ mg ενώ η *Chlorella vulgaris* 80 τη χαμηλότερη (0,061 Units/ mg), σε σύγκριση πάντα με τα υπόλοιπα είδη. Ο έλεγχος των στελεχών *Chlorella* ως προς τη δράση υπεροξειδάσης (POX) μας έδωσε

αποτελέσματα υψηλής δραστηριότητας στα εκχυλίσματα *Chlorella emersonii* var. *Globosa* 8C και *Chlorella vulgaris* 80 με μονάδες 0,185 Units/ mg και 0,172 Units/ mg αντίστοιχα.

Η δραστηριότητα της SOD στα εκχυλίσματα των ειδών *Chlorella* ήταν σχετικά χαμηλή και κυμαινόμενη μεταξύ 0,0035 στη *Chlorella* sp. 70-0,123 Units/ mg στη *Chlorella minutissima*. Η ειδική δραστηριότητα της SOD στα εκχυλίσματα *Chlorella* ήταν σχετικά χαμηλή και κυμαινόμενη μεταξύ 0,0035, στη *Chlorella* sp. 70, έως και 0,123 Units/ mg στη *Chlorella minutissima*. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται αναλυτικότερα στην **Εικόνα 3. 7**.



Εικόνα 3. 7: Αποτελέσματα της ειδικής δραστηριότητας της αντιοξειδωτικής δράσης των ακατέργαστων εκχυλισμάτων των ειδών *Chlorella*.

3.4.4. ΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΙΔΩΝ *Chlorella*

Στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων στο ακατέργαστο εκχύλισμα των ειδών *Chlorella*. Ειδικότερα, το ολικό αντιοξειδωτικό δυναμικό αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τις μη ενζυματικές δοκιμές ABTS (§ 2.2.1.36) με χρήση του υποστρώματος 2,2-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) (Leong & Shui 2002; Miller & Rice-Evans 1997) (§ 2.2.1.36), DPPH (§ 2.2.1.35) με υπόστρωμα 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Brand-Williams et al. 1995), και FRAP (§ 2.2.1.34) με υπόστρωμα ferric reducing antioxidant power (Benzie & Strain 1999;

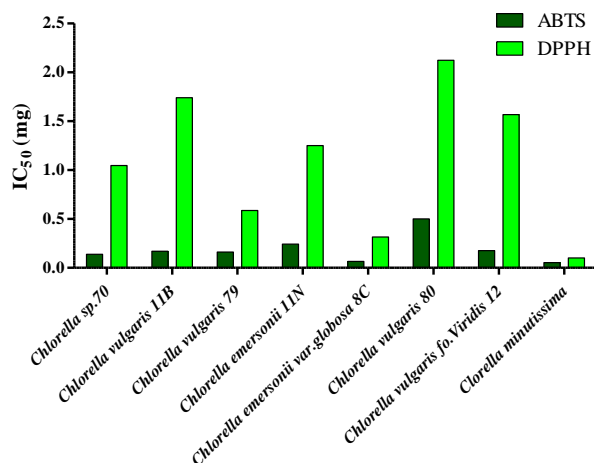
Jiménez-Escrig et al. 2001). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στη συνέχεια (Πίνακας 3. 8 και Εικόνα 3. 8).

Πίνακας 3. 8: Οι τιμές IC₅₀ όπως προέκυψαν από τις μη ενζυματικές μεθόδους ABTS και DPPH εκφρασμένες ως προς mg ξηρού βάρους των ειδών *Chlorella*. Αποτελέσματα της δοκιμής FRAP με τις τιμές να εκφράζονται ως μM ασκορβικού οξέος/mg πρωτεΐνης.

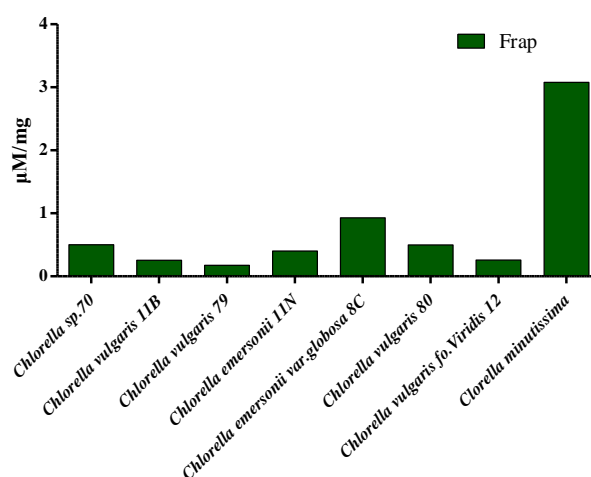
Ακατέργαστο εκχύλισμα μικροάλγης	ABTS IC₅₀ (mg)	DPPH IC₅₀ (mg)	FRAP (μM/mg)
<i>Chlorella sp.70</i>	0,138	1,046	0,5
<i>Chlorella vulgaris 11B</i>	0,169	1,74	0,256
<i>Chlorella vulgaris 79</i>	0,161	0,586	0,175
<i>Chlorella emersonii 11N</i>	0,242	1,25	0,402
<i>Chlorella emersonii var. globose 8C</i>	0,065	0,316	0,927
<i>Chlorella vulgaris 80</i>	0,5	2,123	0,498
<i>Chlorella vulgaris fo. Viridis 12</i>	0,177	1,568	0,261
<i>Chlorella minutissima</i>	0,0537	0,101	3,078

Τα αποτελέσματα (Πίνακας 3. 8) έδειξαν ότι τα εκχύλιμα *Chlorella* παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ως προς το ολικό αντιοξειδωτικό δυναμικό, υποδεικνύοντας μεγάλη χημική ποικιλομορφία αντιοξειδωτικών μεταξύ των διαφορετικών ειδών *Chlorella*. Για παράδειγμα, το εκχύλισμα της *Chlorella minutissima* έχει την υψηλότερη DPPH τιμή, ενώ εκείνο της *Chlorella vulgaris* τη χαμηλότερη και με τιμές IC₅₀ στα 0,101 mg και 2,123 mg ξηρού βάρους αντίστοιχα. Για την πειραματική δοκιμή με ABTS, τα αποτελέσματα ήταν περισσότερο κανονικοποιημένα μεταξύ των διαφορετικών στελεχών. Το εκχύλισμα της *Chlorella minutissima* έδειξε την υψηλότερη δράση σάρωσης ABTS με IC₅₀ 0,0537 mg ξηρού βάρους. Αυτή η τιμή ABTS που παρατηρήθηκε για τη *Chlorella minutissima* είναι σε συμφωνία με την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα που μετρήθηκε με τη δοκιμή της FRAP. Τα υπόλοιπα εκχύλιμα έδειξαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές FRAP.

A.



B.

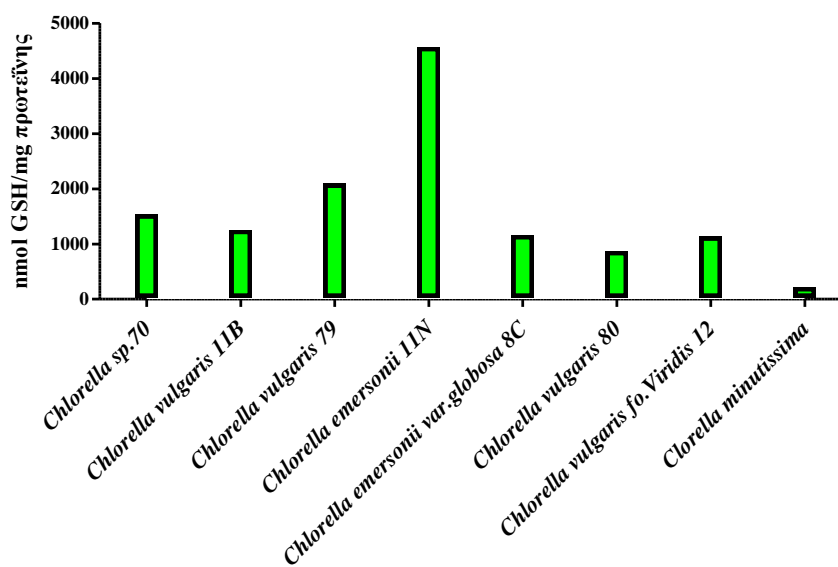


Εικόνα 3. 8: Α. Διάγραμμα που απεικονίζει τις τιμές IC₅₀ (Inhibitory Concentration 50 %), δηλαδή τη συγκέντρωση του ακατέργαστου εκχυλίσματος μικροφυκών προκαλεί μείωση στην αρχική συγκέντρωση της ρίζας κατά 50 %. Η τιμή IC₅₀ εκφράζεται ως προς mg ξηρού βάρους. Β. Αποτελέσματα της δοκιμής FRAP με τις τιμές να εκφράζονται ως μM ασκορβικού οξέος/mg ξηρού βάρους. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα GraphPad Prism 5.

Το τριπεπτιδίο της γλουταθειόνης (GSH) αποτελεί την κύρια ελεύθερη θειόλη που απαντάται στα περισσότερα ζωντανά κύτταρα και συμβάλλει σημαντικά στο σύνολο της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Λόγω της ευρείας κατανομής της GSH και της εμφανής συμμετοχής της σε ένα πλήθος βιολογικών λειτουργιών ως αντιοξειδωτικό συστατικό, προσδιορίστηκε η ολική περιεκτικότητα της γλουταθειόνης (GSH και GSSG) στα εκχυλίσματα των ειδών *Chlorella* (Πίνακας 3. 9 και Εικόνα 3. 9). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το υψηλότερο επίπεδο ολικής γλουταθειόνης (GSH/GSSG) βρέθηκε στο εκχύλισμα της *Chlorella emersonii 11N*, της *Chlorella vulgaris 79* και της *Chlorella vulgaris 70* με ειδική δραστηριότητα στα 4565, 2089 και 1532 nmol GSH ανά mg πρωτεΐνης αντίστοιχα.

Πίνακας 3. 9: Προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης γλουταθειόνης σε ακατέργαστα εκχυλίσματα *Chlorella*.

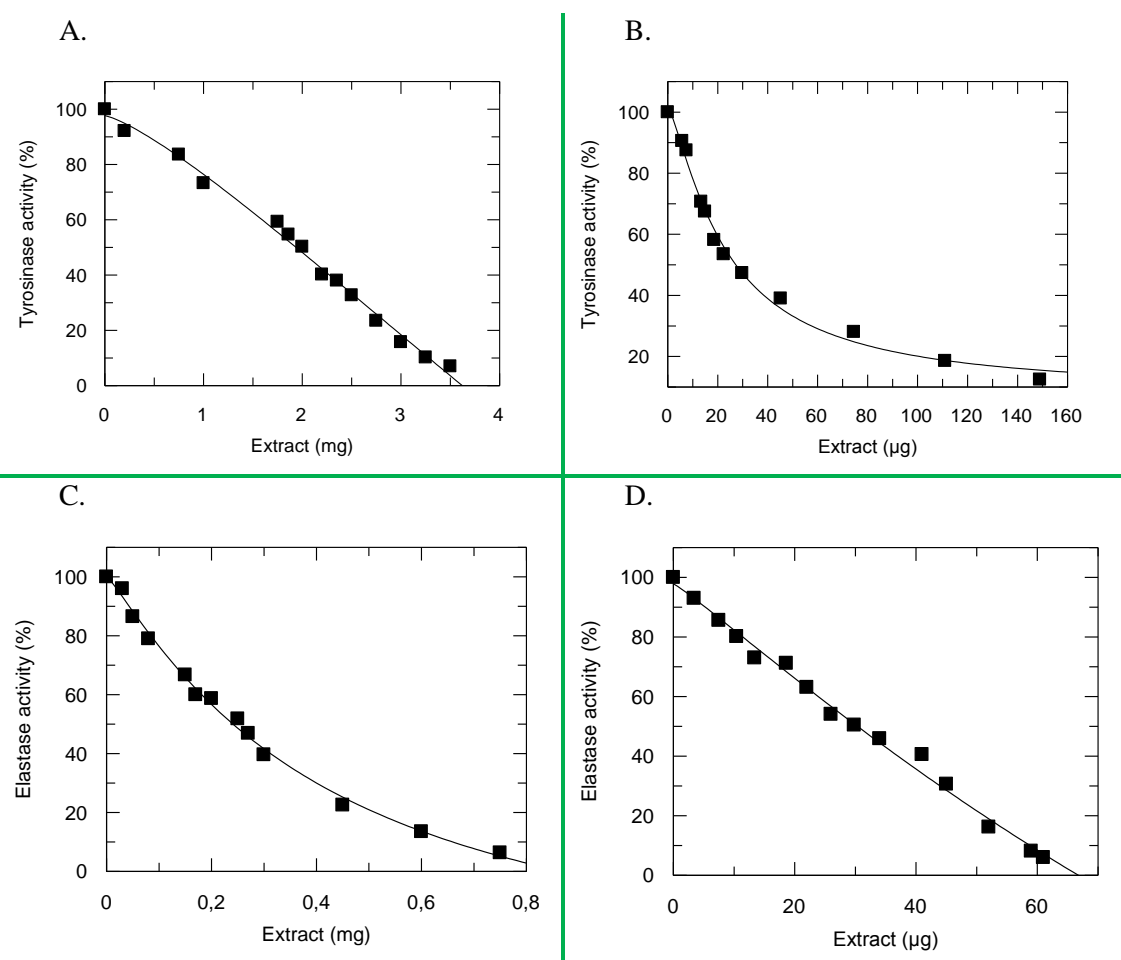
Ακατέργαστο εκχύλισμα μικροφυκών	nmol GSH/ mg πρωτεΐνης
<i>Chlorella</i> sp.70	1532
<i>Chlorella vulgaris</i> 11B	1250
<i>Chlorella vulgaris</i> 79	2089
<i>Chlorella emersonii</i> 11N	4565
<i>Chlorella emersonii</i> var. <i>globosa</i> 8C	1157
<i>Chlorella vulgaris</i> 80	868
<i>Chlorella vulgaris</i> fo. <i>Viridis</i> 12	1133
<i>Chlorella minutissima</i>	215



Εικόνα 3. 9: Ολική συγκέντρωση γλουταθειόνης στα ακατέργαστα εκχυλίσματα των ειδών *Chlorella* εκφρασμένη ως nmol GSH/ mg ολικής πρωτεΐνης.

3.4.5. ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΕΝΖΥΜΩΝ ΕΛΑΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗΣ

Τα αποτελέσματα στην παρούσα μελέτη αποκαλύπτουν ότι τα εκχυλίσματα των *Chlorella minutissima* και *Chlorella emersonii* 11N εμφανίστηκαν να έχουν την υψηλότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα. Έτσι λοιπόν, επιλέχθησαν για περαιτέρω μελέτη με στόχο την αξιολόγηση τους ως προς την ανασταλτική τους δράση έναντι δύο ένζυμων άμεσα συνδεδεμένων με τον τομέα της κοσμετολογίας: της τυροσινάσης και ελαστάσης. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα διαγράμματα της εξαρτώμενης από τη συγκέντρωση αναστολής των δυο ενζύμων από τα εκχυλίσματα των δύο ειδών *Chlorella* (Εικόνα 3. 10).



Εικόνα 3. 10: Ανασταλτική δράση των ακατέργαστων εκχυλισμάτων *Chlorella emersonii* 11N (A) και *Chlorella minutissima* (B) για τη δραστηριότητα της τυροσινάσης. Ανασταλτική δράση της *Chlorella emersonii* 11N (C) και *Chlorella minutissima* (D) για δραστηριότητα της ελαστάσης.

Η Εικόνα 3. 10 απεικονίζει την εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση αναστολή της τυροσινάσης από τα εκχυλίσματα μικροφυκών. Οι τιμές IC_{50} μετρήθηκαν ίσες με $23,3 \pm 2,5 \mu\text{g}$ και $7,06 \pm 1,1 \text{mg}$ ξηρού βάρους για τα εκχυλίσματα *Chlorella minutissima* και *Chlorella emersonii* 11N αντίστοιχα. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι

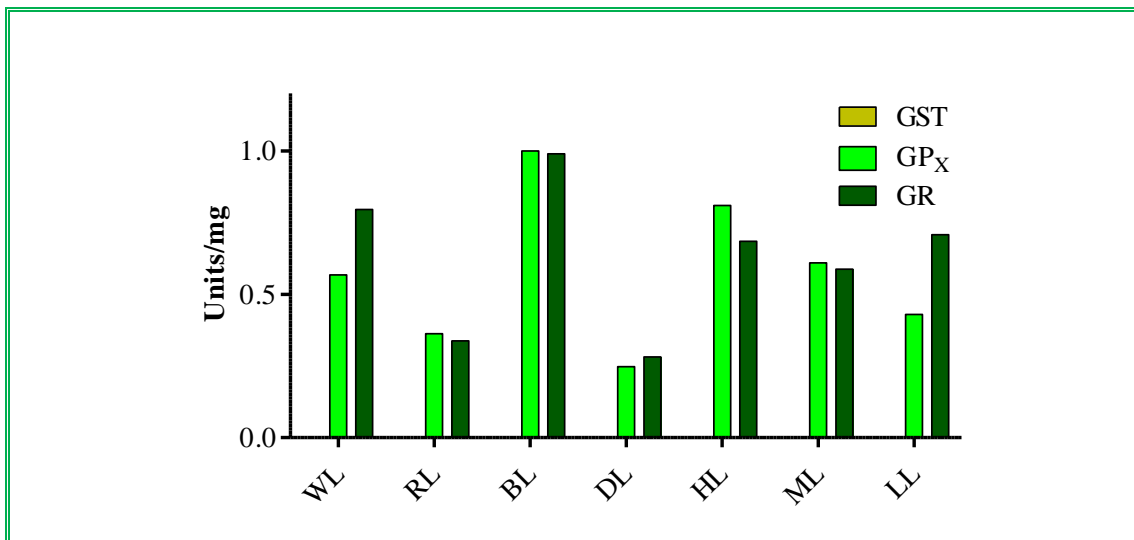
το υδατικό εκχύλισμα της *Chlorella minutissima* εμφανίζει >300-φορές υψηλότερη ισχύ ανασταλτικής δράσης σε σύγκριση με το εκχύλισμα *Chlorella emersonii* 11N, γεγονός που υποδηλώνει ότι η πρώτη μπορεί να είναι μια πιθανή νέα πηγή για τους αναστολείς αντι-τυροσινάσης. Επίσης, τα εκχυλίσματα της *Chlorella minutissima* και *Chlorella emersonii* 11N αξιολογήθηκαν επίσης για την ανασταλτική τους δράση ως προς την ελαστάση. Η τιμή IC₅₀ μετρήθηκε ίση με 29,2 ± 2,7 µg και 0,42 ± 0,05 mg για τα εκχυλίσματα της *Chlorella minutissima* και *Chlorella emersonii* 11N αντίστοιχα. Παρόμοια, όπως και στην περίπτωση της τυροσινάσης, το υδατικό εκχύλισμα της *Chlorella minutissima* εμφανίζει την υψηλότερη δραστηριότητα αναστολής (> περίπου 14 φορές) σε σύγκριση με το εκχύλισμα της *Chlorella emersonii* 11N.

3.4.6. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΩΤΟΣ ΣΤΗΝ ΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΙΔΩΝ *Chlorella*

Από τη μελέτη που προηγήθηκε στο παρόν κεφάλαιο φαίνεται πως το υδατικό εκχύλισμα του στελέχους *Chlorella minutissima* εμφανίζει καλές αντιοξειδωτικές ιδιότητες σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη *Chlorella*. Θέλοντας να έχουμε μια καλύτερη εικόνα σχετικά με το αντιοξειδωτικό της δυναμικό, ακολούθησε η μελέτη επίδρασης του φωτός κατά τη διάρκεια ανάπτυξης και πως μπορεί να επηρεάσει τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του στελέχους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στη συνέχεια (Πίνακας 3. 10, Εικόνα 3. 11 και 3. 12).

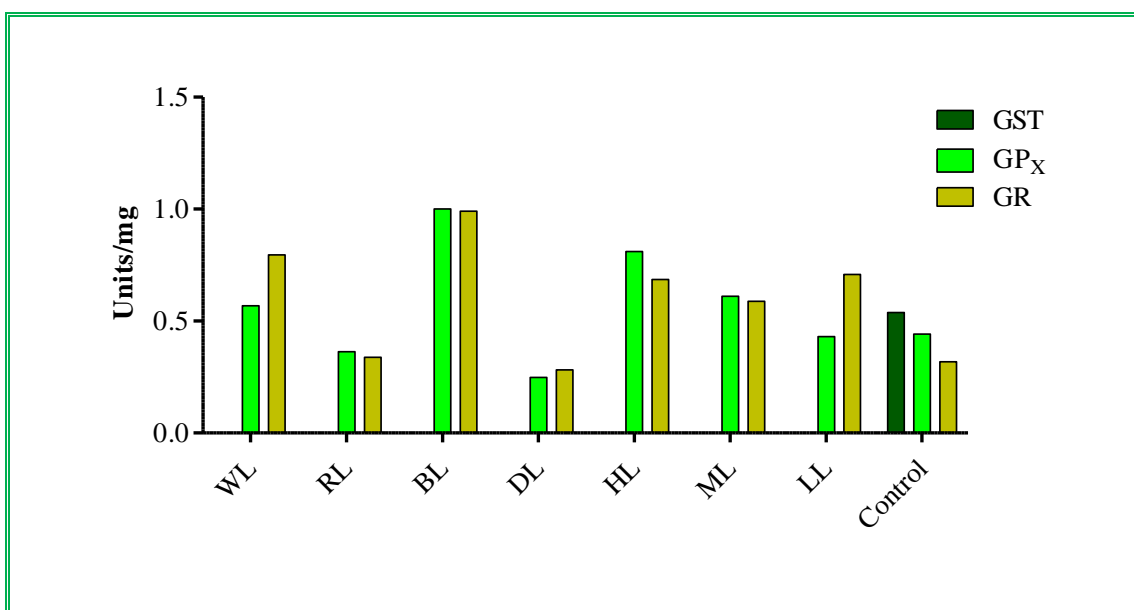
Πίνακας 3. 10: Αποτελέσματα ειδικής δραστηριότητας της αντιοξειδωτικής δράσης του ακατέργαστου εκχυλίσματος της *Chlorella minutissima* όπως αυτά διαμορφώθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες φωτός. MA: μη ανιχνεύσιμη ενζυμική δραστηριότητα.

Ένζυμο	Ειδική Δραστηριότητα (Units/ mg πρωτεΐνης)						
	WL	RL	BL	DL	HL	ML	LL
GST	MA	MA	MA	MA	MA	MA	MA
GPx	0,568	0,363	1	0,248	0,810	0,61	0,43
GR	0,796	0,338	0,99	0,282	0,685	0,588	0,708



Εικόνα 3. 11: Αποτελέσματα ειδικής δραστηριότητας της αντιοξειδωτικής δράσης του ακατέργαστου εκχυλίσματος της *Chlorella minutissima* όπως αυτά διαμορφώθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες φωτός.

Για την καλύτερη αξιολόγηση των παραπάνω ιδιοτήτων, δημιουργήθηκε ένα διάγραμμα που συγκρίνει τα αντίστοιχα αποτελέσματα της *Chlorella minutissima* η οποία αναπτύχθηκε υπό φυσιολογικές συνθήκες (Control).



Εικόνα 3. 12: Σύγκριση αποτελεσμάτων της ειδικής δραστηριότητας της αντιοξειδωτικής δράσης του ακατέργαστου εκχυλίσματος της *Chlorella minutissima* όπως αυτά διαμορφώθηκαν σε φυσιολογικές και διαφορετικές συνθήκες φωτός (μονοχρωματικής ακτινοβολίας και έντασης).

Τα αποτελέσματα της **Εικόνα 3. 12** μας δείχνουν πως η επίδραση του φωτός μπορεί να επιδράσει άμεσα στο αντιοξειδωτικό δυναμικό της *Chlorella minutissima*. Συγκεκριμένα, η μπλε μονοχρωματική ακτινοβολία φαίνεται να ενισχύει περισσότερο την αντιοξειδωτική δράση της *C.minutissima* ως προς τη δράση GPx και GR με

ειδική δραστηριότητα να υπολογίζεται στα 1 και 0,99 Units/ mg πρωτεΐνης. Χαρακτηριστικό αποτελεί το γεγονός ότι η επίδραση του φωτός φαίνεται να μειώνει τη δραστηριότητα του εκχυλίσματος ως προς τη δράση GST σε επίπεδα μη ανιχνεύσιμα, ενώ υπό φυσιολογικές συνθήκες η ειδική δραστηριότητα είχε υπολογιστεί στα 0,538 Units/ mg. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν επίσης ότι η επίδραση υψηλής έντασης φωτισμού (HL) αυξάνει τα επίπεδα δράσης της GPx ενώ η επίδραση της χαμηλής έντασης (LL) φαίνεται να βελτιώνει τη δράση της GR, με ειδική δραστηριότητα στα 0,810 και 0,708 Units/ mg αντίστοιχα.

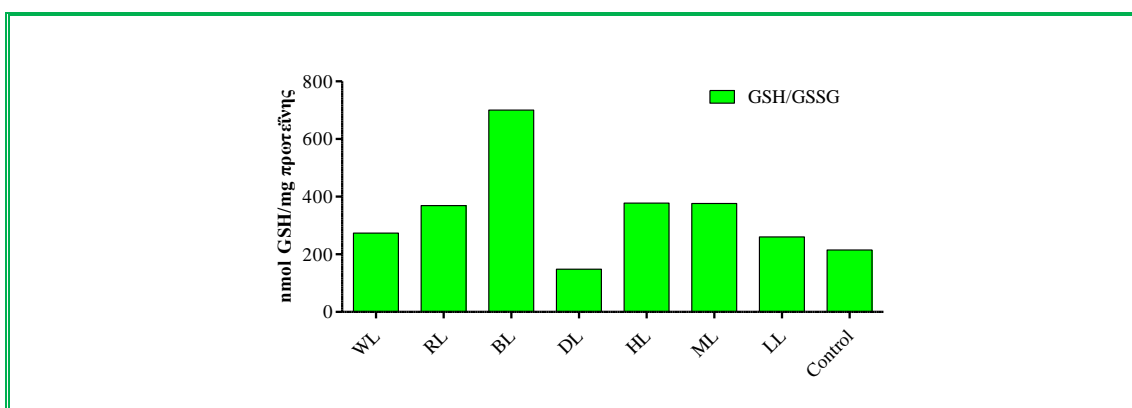
Τέλος, ακολούθησε πειραματική διαδικασία που αφορούσε την επίδραση του φωτός στην ολική συγκέντρωση της γλουταθειόνης στο εκχύλισμα της *C.minutissima* (Πίνακας 3. 11 και Εικόνα 3. 13).

Πίνακας 3. 11: Προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης γλουταθειόνης στο ακατέργαστο εκχύλισμα της *Chlorella minutissima* όπως αυτά διαμορφώθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες φωτός.

Ειδική Δραστηριότητα (Units/ mg πρωτεΐνης)

	WL	RL	BL	DL	HL	ML	LL
<i>nmol GSH/ mg πρωτεΐνης</i>	273,9	369	700	148,46	377,4	376	260,3

Για την καλύτερη αξιολόγηση των παραπάνω ιδιοτήτων η εικόνα που ακολουθεί απεικονίζει τα αποτελέσματα της σύγκρισης των ακατέργαστων εκχυλισμάτων της *Chlorella minutissima*, κύτταρα της οποίας αναπτύχθηκαν υπό φυσιολογικές (Control) και διαφορετικές συνθήκες φωτός.



Εικόνα 3. 13: Σύγκριση αποτελεσμάτων της ειδικής δραστηριότητας της ολικής συγκέντρωσης γλουταθειόνης του ακατέργαστου εκχυλίσματος της *Chlorella minutissima* όπως αυτά διαμορφώθηκαν σε φυσιολογικές και διαφορετικές συνθήκες φωτός (μονοχρωματικής ακτινοβολίας και έντασης).

Από τα αποτελέσματα παρατηρούμε ότι η μπλε μονοχρωματική ακτινοβολία (BL) και η χαμηλή ένταση (LL) του φωτός φαίνεται να ενισχύουν την ολική συγκέντρωση γλουταθειόνης στα κύτταρα της *C. minutissima*, σε σύγκριση με τις control συνθήκες. Συγκεκριμένα η BL αύξησε τη συγκέντρωση της ολικής συγκέντρωσης GSH κατά 3,25 φορές περίπου σε σχέση με τις συνθήκες control. Όσον αφορά την ένταση του φωτός, φαίνεται να αυξάνει την ολική συγκέντρωση GSH χωρίς μεγάλη διακύμανση, από 1,2 έως και 1,75 φορές περίπου.

3.5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια, τα μικροφύκη λόγω των πολύτιμων βιοδραστικών συστατικών τους έχουν κεντρίσει την προσοχή του βιομηχανικού τομέα, με την εφαρμογή τους σε ποικιλία προϊόντων όπως σε βιοκαύσιμα, τρόφιμα, φάρμακα και καλλυντικά (Wang et al., 2015, Dillon, et al., 2015). Στο παρόν κεφάλαιο πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των ειδών *Chlorella* με σκοπό την καλλυντική τους κυρίως χρήση.

Τα μικροφύκη αποτελούνται από έναν πλούσιο ενζυμικό αντιοξειδωτικό μηχανισμό άμυνας ο οποίος αποτελείται κυρίως από υπεροξειδάσες, δισμουτάσες υπεροξειδίου και ένζυμα εξαρτώμενα από τη γλουταθειόνη, όπως ρεδοκτάσες γλουταθειόνης, τρανσφεράσες της γλουταθειόνης και υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης.

Ένα ένζυμο που φαίνεται να παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στο χώρο της κοσμετολογίας είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) η οποία παρέχει προστασία έναντι στην τοξικότητα που εμφανίζουν οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS), όπως το υπεροξειδικό ανιόν το οποίο σχηματίζεται από τον αερόβιο μεταβολισμό. Στο εσωτερικό του κυττάρου, οι δισμουτάσες του υπεροξειδίου (SODs) αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας κατά των ROS και ως εκ τούτου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην καταπολέμηση του ελεύθερων ριζών και της τοξικότητας που προκαλείται (Zeinali et al., 2015). Επιπρόσθετο παράδειγμα αποτελεί το τριπεπτίδιο της γλουταθειόνης (GSH). Η γλουταθειόνη, ως η κύρια ελεύθερη θειόλη συμβάλλει σημαντικά στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Aoyama & Nakaki, 2015). Επίσης, έχει βρεθεί να εμπλέκεται σε διάφορα είδη των αβιοτικών και βιοτικών παραγόντων καταπόνησης (Diaz-Vivancos et al., 2015) αλλά και σε πολλές βιολογικές διεργασίες όπως στην αποτοξίνωση των ξеноβιοτικών και στην απομάκρυνση των υδροϋπεροξειδίων (Wang et al., 2015).

Βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με το ενζυμικό αντιοξειδωτικό δυναμικό των ειδών *Chorella* δεν υπάρχουν διαθέσιμες. Αντίθετα, αντίστοιχες μελέτες που αφορούν την αξιολόγηση του αντιοξειδωτικού δυναμικού έχουν πραγματοποιηθεί σε ποικιλία συνθηκών ανάπτυξης, όπως παρουσία αβιοτικών παραγόντων. Για παράδειγμα, η υψηλή συγκέντρωση ιχνοστοιχείων όπως ο σίδηρος φαίνεται να ενισχύει την αντιοξειδωτική ικανότητα της *Chlorella emersonii* KJ725233 ως προς τη δράση της σουπεροξειδικής δισμουτάσης και περοξειδάσης. Συγκεκριμένα υπήρξε αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας κατά 45,69 % παρουσίας 0,1 μM σιδήρου (Sawant et al., 2016).

Σε γενικές γραμμές, η γλουταθειόνη θεωρείται το πιο σημαντικό μέσο αποθήκευσης της ανηγμένης μορφής θείου και επηρεάζεται άμεσα σε συνθήκες έλλειψης του συγκεκριμένου ιχνοστοιχείου. Μια επίσης πρόσφατη έρευνα (Salbitani et al., 2015) αφορούσε στη συμπεριφορά του αντιοξειδωτικού συστήματος της *Chlorella sorokiniana* σε συνθήκες ανεπάρκειας θείου (S), όπου τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση στην ολική συγκέντρωση γλουταθειόνης στα κύτταρα κατά <10 % σε σχέση με εκείνα που η ανάπτυξή τους πραγματοποιήθηκε παρουσία S. Η μείωση αυτή στα κύτταρα της *Chlorella sorokiniana* είναι αναμενόμενη διότι σε συνθήκες έλλειψης του θείου η συγκέντρωση της Cys μειώνεται, το οποίο και αποτελεί πρόδρομη ουσία της γλουταθειόνης. Σε συνθήκες έλλειψης του συγκεκριμένου ιχνοστοιχείου προκαλείται μείωση του λόγου GSG/ GSSG γιατί η σύνθεση της γλουταθειόνης είναι περιορισμένη και επίσης τα προϊόντα αποδόμησης χρησιμοποιούνται για την απόκτηση του αμινοξέως Cys. (Salbitani et al., 2015; Carfagna et al., 2011). Συμπερασματικά, φαίνεται ότι το ακατέργαστο εκχύλισμα των ειδών *Chlorella* διαθέτει μια ποικιλία αντιοξειδωτικών ουσιών και ισχυρού ενζυμικού δυναμικού, τα οποία όμως βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα ανίχνευσης όταν η ανάπτυξη πραγματοποιείται υπό φυσιολογικές συνθήκες.

Η χημική ποικιλομορφία των αντιοξειδωτικών ουσιών καθιστά δύσκολο το διαχωρισμό και την ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των επιμέρους ενώσεων από τα κύτταρα της μικροάλλης. Ως εκ τούτου, το σύνολο της αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) ως μια ολοκληρωμένη παράμετρο των αντιοξειδωτικών που υπάρχουν σε ένα πολύπλοκο βιολογικό δείγμα έχει περισσότερη σημασία (Bartosz, 2010; Beretta & Fascino, 2010). Αυτή η παράμετρος λαμβάνει υπόψη όλες τις συνεργιστικές και αθροιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γνωστών και αγνώστων ενώσεων που υπάρχουν στο δείγμα. Αρκετές μέθοδοι έχουν

αναπτυχθεί για τη μέτρηση της TAC σε βιολογικά δείγματα (Bartosz, 2010), όπως οι μέθοδοι ABTS, DPPH και FRAP.

Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί από διάφορες ερευνητικές ομάδες ως προς τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής δυνατότητας στα είδη *Chlorella*, είναι αρκετά περιορισμένες. Για παράδειγμα, σύμφωνα με τους Li et al., στην προσπάθεια τους να ανιχνεύσουν νέες και φτηνές πηγές αντιοξειδωτικών πραγματοποίησαν σάρωση σε επιλεγμένα είδη μικροφυκών συμπεριλαμβανομένου κάποιων μελών *Chlorella*. Το αποτέλεσμα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, σύμφωνα με τη μέθοδο ABTS, σε υδατικά εκχυλίσματα των συγκεκριμένων ειδών υπολογίστηκε με εύρος τιμών 0,01-7,49 $\mu\text{mol Trolox/g}$ ξηρού βάρους (Li et al., 2007). Επίσης, σε υδατικό εκχύλισμα *Chlorella vulgaris* έχει ανιχνευτεί αντιοξειδωτική δράση ως προς τη μέθοδο ABTS στα $31,06 \pm 4,00 \mu\text{mol Trolox/g}$ ξηρού βάρους (Hajimahmoodi et al., 2010). Παρομοίως, η διαθέσιμη βιβλιογραφία για χρήση της μεθόδου DPPH σε υδατικά εκχυλίσματα *Chlorella* είναι ακόμα πιο ελάχιστη. Η ομάδα του Wu et al., για παράδειγμα, υπολόγισε την αντιοξειδωτική ικανότητα της *Chlorella vulgaris* ως προς τη μέθοδο DPPH να έχει τιμή IC_{50} $14,04 \pm 1,06 \mu\text{mol}$ ασκορβικού οξέως /mg ξηρού βάρους (Wu et al., 2005).

Οι αναστολείς της τυροσινάσης και της ελαστάσης χρησιμοποιούνται ευρέως σε δερματολογικές θεραπείες και στα καλλυντικά ως αντιρυτιδικές ουσίες και παράγοντες με λευκαντικές ιδιότητες του δέρματος (Kim & Uyama 2005; Kamagaju et al., 2013; Kim et al., 2012; Lee et al., 1999; Thring et al., 2009). Η τυροσινάση είναι ένα ένζυμο κλειδί στη βιοσύνθεση της μελανίνης, η οποία εμπλέκεται στον καθορισμό του χρώματος του δέρματος των θηλαστικών και των μαλλιών (Kim & Uyama, 2005; Kamagaju et al., 2013; Kim et al., 2012). Επίσης διάφορες δερματολογικές διαταραχές προκύπτουν από τη συσσώρευση υπερβολικού επιπέδου της επιδερμικής μελάγχρωσης.

Η ελαστάση από την άλλη, είναι το μόνο ένζυμο που είναι ικανό να διασπά την ελαστίνη, μία αδιάλυτη ελαστική ινώδης πρωτεΐνη η οποία μαζί με το κολλαγόνο καθορίζει τις μηχανικές ιδιότητες του συνδετικού ιστού (Antonicelli et al., 2007). Η απώλεια της ελαστίνης είναι ένα σημαντικό γεγονός και δημιουργεί ορατά σημάδια της γήρανσης (ρυτίδες, χαλάρωση) στο δέρμα. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η γήρανση του δέρματος και η δημιουργία ρητίδων είναι αποτελέσματα που συσχετίζονται σημαντικά με τη δραστικότητα ελαστάσης (Imokawa et al., 2015;

Imokawa & Ishida, 2015). Λόγω του μείζον ρόλου της ελαστάσης στη φλεγμονώδη διαδικασία, η αναστολή της με χρήση εκχυλισμάτων από μικροφύκη, υποδεικνύουν τη χρήση της *Chlorella minutissima* ως ενεργό συστατικό σε καλλυντικά προϊόντα που στοχεύουν την ερεθισμένη, άτονη και / ή γηρασμένη επιδερμίδα (Henriksen 2014).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, μελέτες που αφορούν τη δράση των εκχυλισμάτων *Chlorella* ως αναστολείς των παραπάνω ενζύμων είναι ελάχιστες. Η ομάδα του Matsukawa et al., πραγματοποίησε έρευνα για την αξιολόγηση των εκχυλισμάτων από 100 διαφορετικά είδη μικροάλγης ως αναστολείς της τυροσινάσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ελάχιστα των υδατικών εκχυλισμάτων παρουσίασαν τέτοια δράση, μεταξύ των οποίων ήταν το κυανοβακτήριο *Synechococcus sp.*. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι το μεθανολικό εκχύλισμα στελέχους *Chlorella sp.* προκάλεσε 55% μείωση της δράσης του ενζύμου τυροσινάσης ενώ σε άλλα στελέχη *Chlorella* τα επίπεδα της αναστολής ήταν μικρά. Παρόμοια εικόνα, με σαφή χαμηλότερη δράση αναστολέα τυροσινάσης, παρουσίασαν τα υδατικά εκχυλίσματα *Chlorella*, γεγονός αναμενόμενο διότι η μεθανόλη προκαλεί υψηλότερα επίπεδα εκχύλισης βιοδραστικών συστατικών (Matsukawa et al., 1997). Σε μια άλλη μελέτη, υδατικό διάλυμα *Chlorella stigmatophora* χρησιμοποιήθηκε ως πιθανός αναστολέας του ενζύμου ελαστάση. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το συγκεκριμένο εκχύλισμα (1 mg ξηρού βάρους/ mL) προκάλεσε αναστολή της ελαστάσης κατά 39 % (Guzman et al., 2001). Τα βιβλιογραφικά αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με τα δικά μας καθώς το εκχύλισμα *Chlorella minutissima* προκάλεσε μείωση της δράσης των ενζύμων τυροσινάση και ελαστάση.

Το φως είναι γνωστό ότι επηρεάζει την ενδοκυτταρική συγκέντρωση θειολών (κυστεΐνης και γλουταθειόνης) και το περισσότερο από το 90 % των μη-πρωτεϊνικών θειολών της μικροάλγης και των βακτηρίων (Choi et al., 2013; Dupont et al., 2004). Βιβλιογραφικές μελέτες που αφορούν στην επίδραση του φωτός στο ενζυμικό αντιοξειδωτικό δυναμικό των ειδών *Chlorella* δεν είναι διαθέσιμες. Αντίστοιχες μελέτες όμως έχουν πραγματοποιηθεί σε πολυκύτταρους οργανισμούς όπως στα φυτά. Για παράδειγμα, το ενζυμικό δυναμικό και η ολική συγκέντρωση γλουταθειόνης που ανιχνεύτηκε στο εκχύλισμα του *Triticum aestivum L.* φαίνεται να επηρεάζονται από την ένταση του φωτός, με αυξημένη ενζυμική δράση να εμφανίζεται σε συνθήκες που επικρατεί η υψηλή ένταση ακτινοβολίας (Dong et al., 2014; Mishra et al., 1995), αποτελέσματα που έρχονται σε συμφωνία με τα δικά μας.

Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας και η μεταβολή του λόγου της ολικής γλουταθειόνης στα κύτταρα, αποτελούν μια προσαρμοστική απόκριση των φυτών σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ενεργών μορφών οξυγόνου που δημιουργούνται σε συνθήκες που επικρατούν υψηλότερες εντάσεις φωτός.

Είναι γνωστό ότι ο μεταβολισμός και η ανάπτυξη της μικροάλγης μπορεί να ρυθμιστεί εκτός από την ένταση του φωτός και από το μήκος κύματος της ηλιακής ακτινοβολίας (Abu-Ghosh et al., 2016; Michael et al., 2015). Μια ερευνητική ομάδα μελέτησε την επίδραση διαφόρων μηκών κύματος του φωτός στο αντιοξειδωτικό σύστημα των θαλάσσιων κυανοβακτηρίων, και συγκεκριμένα του *Synechococcus sp.* Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μπλε μονοχρωματική ακτινοβολία προκάλεσε αύξηση της συγκέντρωσης των ROS και του H₂O₂ σε όλη τη διάρκεια επώασης (Choi et al., 2013). Το τελευταίο μπορεί να συσχετιστεί άμεσα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας διότι παρουσία μπλε ακτινοβολίας παρατηρήθηκε αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και ολικής συγκέντρωσης γλουταθειόνης.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι το εκχύλισμα της *Chlorella minutissima* εμφανίζει μια υψηλή αντιοξειδωτική δραστηριότητα και στις δύο αξιολογήσεις, ενζυματικές και μη ενζυματικές, και αποτελεί μια πλούσια πηγή γλουταθειόνης. Επιπλέον, παρουσιάζει υψηλή ανασταλτική δραστηριότητα έναντι της ελαστάσης και τυροσινάσης, γεγονός που υποδηλώνει μια πιθανή εφαρμογή στον έλεγχο της γήρανσης του δέρματος, στη φλεγμονή. Επίσης, με χρήση υψηλής έντασης φωτός και μπλε μονοχρωματικής ακτινοβολίας υπάρχει η δυνατότητα αύξησης της ενζυμικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και των αντιοξειδωτικών συστατικών.

Τα ευρήματά μας υπογραμμίζουν ότι τα εκχυλίσματα *Chlorella*, και κυρίως της *Chlorella minutissima*, αντιπροσωπεύουν πολλά υποσχόμενα βιοδραστικά συστατικά με τη δυνατότητα χρήσης τους ως πρώτες ύλες στη βιομηχανία καλλυντικών και τροφίμων. Η ανάπτυξη νέων προϊόντων από φυσικές «πράσινες» πηγές, όπως τα φύκια, αντιπροσωπεύει σημαντικές δυνατότητες στον τομέα της δημιουργίας και παραγωγής προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Αξιολόγηση ενζύμων και μεταβολιτών στα *Nannochloropsis sp.*, *Tetraselmis sp.* και *Phaeodactylum sp.* που αναπτύχθηκαν κάτω από συνθήκες καταπόνησης



4.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζεται η μελέτη αξιολόγησης τριών διαφορετικών ειδών από μικροφύκη *Nannochloropsis sp.*, *Tetraselmis sp.* και *Phaeodactylum sp.*, τα οποία αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες καταπόνησης. Η αξιολόγηση αφορά στον προσδιορισμό επιλεγμένων μεταβολιτών (ολικά αντιοξειδωτικά, γλουταθειόνης και φαινολικά) και ενζύμων όπως πρωτεάσες, λιπάσες και αντιοξειδωτικά ένζυμα με ιδιαίτερο ενδιαφέρον στο χώρο της βιομηχανίας.

Τα εκχυλίσματα των *Nannochloropsis sp.*, *Tetraselmis sp.* και *Phaeodactylum sp.* προήλθαν έπειτα από διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης και καταπόνησης [υψηλή θερμοκρασία, υψηλή αλατότητα (5 % w/v) και η έλλειψη αζώτου]. Επίσης ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε και υπό φυσιολογικές συνθήκες.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι τα *Nannochloropsis sp.*, *Tetraselmis sp.* και *Phaeodactylum sp.* εμφανίζουν διαφορετικά επίπεδα δραστηριότητας σε πρωτεολυτικά, λιπολυτικά και αντιοξειδωτικά ένζυμα και μεταβολίτες (ολικά αντιοξειδωτικά, γλουταθειόνης και φαινολικά). Η διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης θα μπορούσε να οφείλεται στη διαφορετική προσαρμοστικότητα του εκάστοτε είδους σε αυτές. Επίσης, οι συνθήκες ανάπτυξης επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο τα προς μελέτη δείγματα, γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στη διαφορετική γενετική και βιοχημική τους σύσταση.

4.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η βιομάζα των μικροφυκών είναι αρκετά πολύπλοκη και περιλαμβάνει πολλά διαφορετικά συστατικά τα οποία δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς σε σχέση με εκείνα της χερσαίας βιομάζας. Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι τα μικροφύκη έχουν αναδειχθεί ως μια μεγάλη και πλούσια πηγή μεταβολιτών με μοναδικές δομές και ιδιότητες και με τη χρήση τους διευρύνεται σε πολλούς τομείς της βιομηχανίας (Raja et al., 2014).

Η χημική σύνθεση των μικροφυκών είναι εξαιρετικά μεταβλητή μεταξύ και εντός των ίδιων ειδών και αυτό μπορεί να οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες ανάπτυξης των ειδών όπως η εποχικότητα, τα θρεπτικά συστατικά, η θερμοκρασία, η φωτοπερίοδος, η αλατότητα, η πηγή άνθρακα, η ένταση και το χρώμα του φωτός (Richmond, 1986; Renaud et al., 1999; Kula et al., 2014). Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές ερευνητικές προσπάθειες που επικεντρώνονται σε μονάδες καλλιέργειας μικροφυκών και συγκεκριμένα στις συνθήκες ανάπτυξης που θα πρέπει να εφαρμοστούν. Μελέτες έχουν δείξει ότι η σύσταση των κυττάρων από μικροφύκη που αναπτύσσονται σε βέλτιστες συνθήκες, παρουσιάζει ομοιότητες μεταξύ των διαφόρων ειδών (Parsons et al., 1961). Η ομοιότητα αυτή αφορά σε περιεκτικότητα του ακατέργαστου εκχυλίσματος σε πρωτεΐνες, λιπίδια και υδατάνθρακες (Ördög et al., 2012). Για μεμονωμένα είδη όμως η κυτταρική σύσταση μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας και ανάπτυξης. Οι συνθήκες του περιβάλλοντος ανάπτυξης όπως η θερμοκρασία, η περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά και η αλατότητα μπορούν να επηρεάσουν όχι μόνο τη φωτοσύνθεση και την παραγωγικότητα της βιομάζας αλλά και τον κυτταρικό μεταβολισμό.

Η θερμοκρασία αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την κυτταρική βιοχημική σύσταση στα μικροφύκη. Έχει διαπιστωθεί ότι η θερμοκρασία στην οποία γίνεται η ανάπτυξη της καλλιέργειας επηρεάζει όχι μόνο την περιεκτικότητα των κυττάρων σε άνθρακα και άζωτο αλλά και το μέγεθος αυτών. Συγκεκριμένα, στη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης το μέγεθος των κυττάρων και η περιεκτικότητά τους στα παραπάνω στοιχεία είναι η ελάχιστη δυνατή, ενώ σε συνθήκες καταπόνησης, παρατηρείται αύξηση (Huseby et al., 2013).

Το άζωτο, η περιεκτικότητά του οποίου αποτελεί το 7-10% του συνολικού ξηρού βάρους, είναι ένα απαραίτητο συστατικό για όλες τις δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες των κυττάρων στα μικροφύκη. Σε συνθήκες όπου τα επίπεδα του αζώτου

είναι επαρκή, τα μικροφύκη έχουν περιορισμένη δυνατότητα παραγωγής ειδικών συστατικών αποθήκευσης του αζώτου γεγονός που φαίνεται να οδηγεί σε μείωση της φωτοσυνθετικής ικανότητας. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο άνθρακας που είναι άμεσα διαθέσιμος χρησιμοποιείται για τη σύνθεση λιπιδίων και υδατανθράκων (Griffiths et al., 2012).

Τα διάφορα είδη μικροφυκών διαφέρουν ως προς την προσαρμοστικότητα τους στην αλατότητα η οποία εξαρτάται από το βαθμό ανοχής τους. Υπάρχουν δυο κατηγορίες, τα αλόφιλα και τα αλοανθεκτικά. Και στις δύο περιπτώσεις τα κύτταρα προάγουν την παραγωγή μεταβολιτών που θα προσδώσουν προστασία από το φαινόμενο της όσμωσης. Διαφορετικές συγκεντρώσεις αλατότητας [% (w/w) NaCl] φαίνεται να επηρεάζουν πολλαπλές βιοχημικές και φυσιολογικές λειτουργίες όπως η ανάπτυξη των κυττάρων και η παραγωγή λιπιδίων. Ελάχιστες έρευνες όμως έχουν πραγματοποιηθεί όσον αφορά την επίδραση της αλατότητας σε είδη μικροφυκών (Affenzeller et al., 2009).

Τα ένζυμα αποτελούν μια νέα υποσχόμενη πηγή για χρήση στη φαρμακοβιομηχανία, στη κοσμετολογία και στη διατροφή. Μέχρι πρόσφατα η κύρια πηγή απομόνωσης ενζύμων ήταν ζωική, ενώ το πιθανό πλεονέκτημα που μπορεί να υπάρχει με τη χρησιμοποίηση ενζύμων από μια νέα πράσινη πηγή, όπως τα μικροφύ, έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον για περαιτέρω ερευνητικές δραστηριότητες (Wijesinghe et al., 2013).

Μια ομάδα ενζύμων, τα πεπτικά, με μεγάλο ερευνητικό και τεχνολογικό ενδιαφέρον αποτελεί εκείνη που συμμετέχει στη διάσπαση χημικών ενώσεων μέσω της ρύθμισης της ταχύτητας με την οποία διεξάγεται η κάθε μεταβολική διαδικασία. Η ομάδα αυτή αποτελείται από τρεις μεγάλες κατηγορίες (Palmer et al., 2007).

Ένζυμα που διασπών πρωτεΐνες (Πρωτεολυτικά)

Τα ένζυμα που διασπών πρωτεΐνες ονομάζονται πρωτεολυτικά και εμπλέκονται αποκλειστικά στην πέψη των πρωτεϊνών. Κάποια από αυτά είναι η πρωτεάση, η πεψίνη, η θρυψίνη, η παγκρεατίνη και η χυμοθρυψίνη.

Ένζυμα που διασπών Λίπη (Λιπάσες)

Η λιπάση είναι ένα ένζυμο υπεύθυνο για τη διάσπαση των τριγλυκεριδίων της τροφής και ιδιαίτερα εκείνων που περιέχουν λιπαρά οξέα μεγάλου μοριακού βάρους, σε

λιπαρά οξέα και γλυκερόλη ώστε να είναι δυνατή η απορρόφησή τους από τον εντερικό βλεννογόνο.

Ένζυμα που διασπούν Υδατάνθρακες

Η αμυλάση αποτελεί το κύριο ένζυμο που χρησιμοποιείται για τη διάσπαση των υδατανθράκων. Εκτός από αυτά τα βασικά ένζυμα υδρολασών που αναφέρθηκαν, υπάρχει μια ολόκληρη σειρά συμπληρωματικών ενζύμων που συνεργάζονται για να παράγουν τα κατάλληλα τελικά προϊόντα.

4.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.3.1 ΥΛΙΚΑ

Όλα τα υλικά, τα διαλύματα, τα ένζυμα και τα υποστρώματα ενζύμων έχουν προμηθευτεί από το Sigma-Aldrich (USA). Τα είδη *Phaeodactylum sp.*, *Tetraselmis sp.* και *Nannochloropsis sp.* ήταν μια ευγενική χορηγία του Fitoplancton Marino, Ισπανία.

4.3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

4.3.2.1.ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΦΥΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Λυοφιλωμένα κύτταρα, αφού ζυγιστούν και γίνει η καταγραφή του βάρους, εκχυλίζονται με χρήση υπερήχων (20s x 5φορές) σε διάλυμα τετραπλάσιου όγκου σε σχέση με το αρχικό βάρος τους. Το βασικό ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης αποτελείται από 0,1 M KH_2PO_4 , 1 mM EDTA σε pH 6. Τροποποιήσεις στο βασικό ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης πραγματοποιήθηκε στη μελέτη δράσης της α-αμυλάσης (20 mM NaH_2PO_4 , 6,7 mM NaCl σε pH 6,9), της λιπάσης (0,1 M Tris-HCL σε pH 8,2), της χυμοθριψίνης (80 mM Tris-HCL σε pH 7,8) και της θρυψίνης (67 mM NaH_2PO_4 σε pH 7,6). Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση του μίγματος στις 13000 rpm για 10 min στους 4 °C. Έγινε συλλογή του υπερκειμένου και προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας ως προς τη μελέτη της αντιοξειδωτικής και πρωτεολυτικής δράσης καθώς και του συνολικού αντιοξειδωτικού δυναμικού. Τα κύτταρα που συλλέχθηκαν αλλά δεν χρησιμοποιήθηκαν για άμεση μελέτη αποθηκεύτηκαν στους -20 °C.

4.3.2.2.ΜΕΛΕΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΚΑΤΕΡΓΑΣΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΡΟΤΕΩΛΥΤΙΚΗ ΤΟΥΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ

Φωτομετρικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν στα ακατέργαστα εκχυλίσματα του γένους *Tetraselmis*, *Nannochloropsis* και *Phaeodactylum* ώστε να μελετηθεί η εκλεκτικότητα και η δραστηριότητα ως προς την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) (§ 2.2.1.21), τη περοξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), τη ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GR) και της περοξειδάσης (POX) (§ 2.2.1.32). Η ενζυμική δραστηριότητα για την ανίχνευση πιθανής πρωτεολυτικής ιδιότητας μελετήθηκε ως

προς τα ένζυμα θρυψίνη (Trypsin) (§ 2.2.1.40), χυμοθρυψίνη (Chymotrypsin) (§ 2.2.1.41), πρωτεάση (Protease) (2.2.1.48) και λιπάση (Lipase) (§ 2.2.1.42). Επίσης μελετήθηκε η χρήση των εκχυλισμάτων ως πιθανοί αναστολείς των ενζύμων α-αμυλάση (§ 2.2.1.43) και ακετυλο-χολινεστεράση (2.2.1.47). Για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των ακατέργαστων εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκαν οι μέθοδοι ABTS (§ 2.2.1.36), DPPH (§ 2.2.1.35) και FRAP (§ 2.2.1.34). Επίσης, προσδιορίστηκε η ολική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών (§ 2.2.1.38) και η ολική συγκέντρωση γλουταθειόνης (§ 2.2.1.37).

4.3.2.3.ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1976) (§ 2.2.1.16) χρησιμοποιώντας αλβουμίνη μόσχου (BSA) για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης.

4.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.2.3. ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ *Phaeodactylum sp.*, *Tetraselmis sp.*, *Nannochloropsis sp.*

Η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης ολοκληρώθηκε με ενζυματικές δοκιμές που αφορούν στον έλεγχο των εκχυλισμάτων *Phaeodactylum sp.*, *Tetraselmis sp.* και *Nannochloropsis sp.* ως προς τη δράση τρανσφεράσης, περοξειδάσης και ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης (GST, GPx, GR) και περοξειδάσης (POX). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στη συνέχεια (**Πίνακας 4. 1** και **Εικόνα 4. 1**).

Πίνακας 4. 1: Ειδική δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων των ακατέργαστων εκχυλισμάτων των ειδών *Phaeodactylum sp.*, *Nannochloropsis sp.* και *Tetraselmis sp.*. Οι συνθήκες ανάπτυξης των μικροφυκών είναι οι εξής: **C:** Μάρτυρας/Φυσιολογικές συνθήκες, **T:** Υψηλή θερμοκρασία, **N:** Έλλειψη αζώτου, **S:** 5 ‰ (w/v) Αλατότητα. **MA:** Μη ανιχνεύσιμο.

A.

Phaeodactylum sp.

Ειδική Δραστηριότητα
(Units/ mg πρωτεΐνης)

Ένζυμο	Control (C)	Temperature (T)	Nitrogen (N)	Salt (S)
GST	0,048	0,037	0,079	0,104
GPx	1,29	2,75	1,352	1,393
GR	MA	MA	MA	0,149
POX	0,0099	MA	0,025	MA

B.

Nannochloropsis sp.

Ειδική Δραστηριότητα
(Units /mg πρωτεΐνης)

Ένζυμο	Control (C)	Temperature (T)	Nitrogen (N)	Salt (S)
GST	0,003	MA	0,03	0,0032
GPx	0,207	0,175	0,402	0,263
GR	0,018	0,021	0,061	0,091
POX	0,105	0,083	0,143	0,091

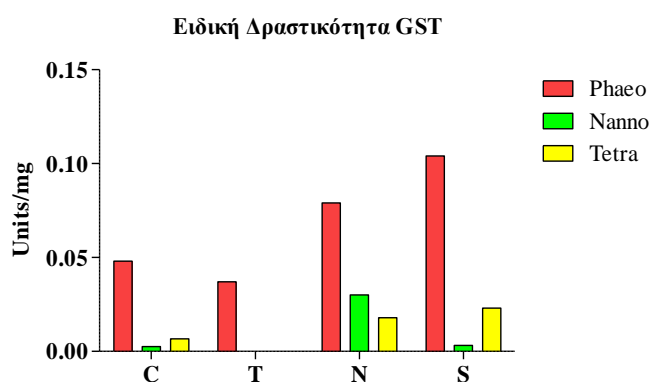
Γ.

*Tetraselmis sp.*Ειδική Δραστικότητα
(Units/ mg πρωτεΐνης)

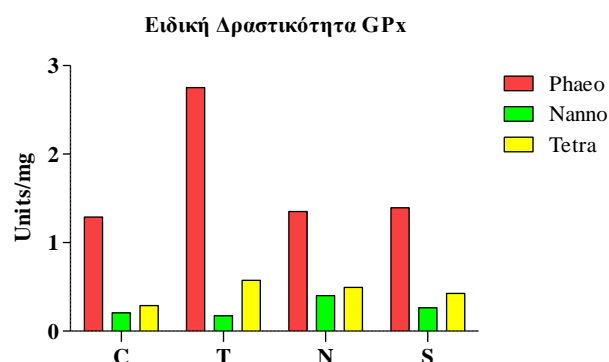
Ένζυμο	Control (C)	Temperature (T)	Nitrogen (N)	Salt (S)
<i>GST</i>	0,0067	MA	0,0179	0,023
<i>GPx</i>	0,29	0,575	0,493	0,427
<i>GR</i>	0,075	0,187	0,501	0,482
<i>POX</i>	0,0027	0,059	0,094	MA

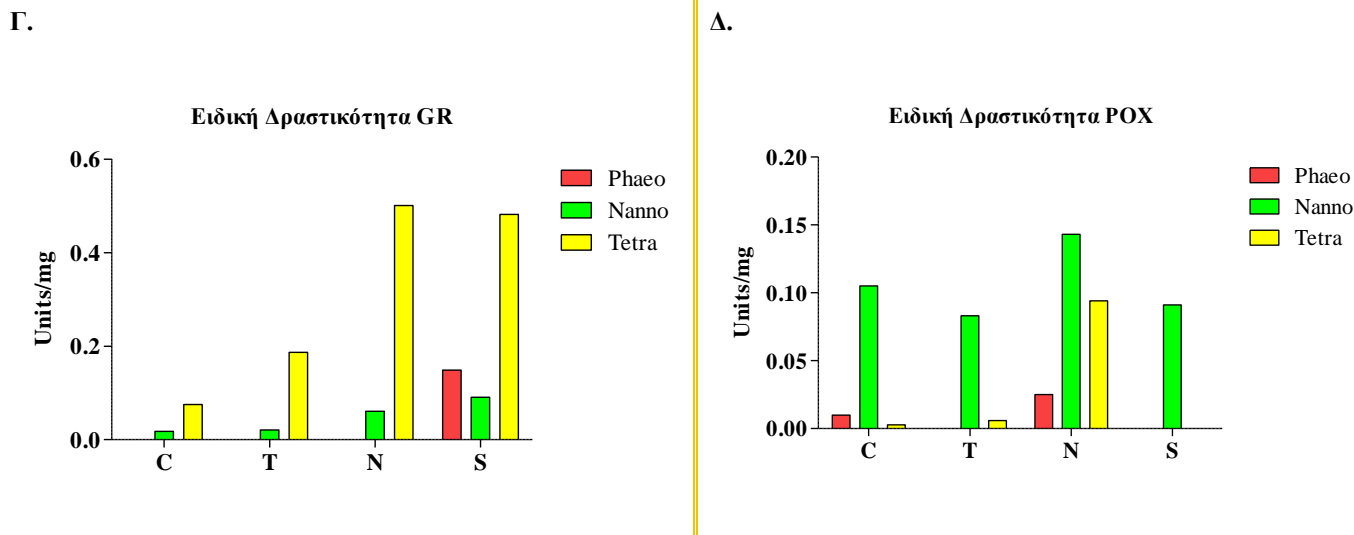
Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 4. 1 παρατηρούμε ότι υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία τόσο μεταξύ των γενών όσο και μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης του ίδιου γένους. Συγκεκριμένα, το ακατέργαστο εκχύλισμα του *Phaeodactylum* παρουσιάζει μεγαλύτερη ειδική δραστικότητα ως προς *GST* και *GPx*, με μέγιστη σε συνθήκες υψηλής αλατότητας (0,104 Units/ mg) και θερμοκρασίας (2,75 Units/ mg) αντίστοιχα. Όσον αφορά το *Tetraselmis sp.*, παρουσιάζει υψηλότερη δραστικότητά *GR* στις συνθήκες ανάπτυξης με υψηλή αλατότητα (0,501 Units/ mg) και θερμοκρασία (0,482 Units/ mg). Τέλος, το ακατέργαστο εκχύλισμα του *Nannochloropsis sp.* εμφανίζει τη μεγαλύτερη δραστικότητα ως προς *POX* σε όλες τις συνθήκες ανάπτυξης με μέγιστη σε απουσία αζώτου (0,143 Units/ mg). Ακολουθεί η Εικόνα 4. 1 στην οποία απεικονίζονται τα παραπάνω αποτελέσματα.

A.



B.





Εικόνα 4. 1: Αποτελέσματα αντιοξειδωτικών ενζύμων των ακατέργαστων εκχυλισμάτων *Phaeodactylum sp.*, *Tetraselmis sp.* και *Nannochloropsis sp.* **A:** Ειδική δραστικότητα GST. **B:** Ειδική δραστικότητα GPx. **Γ:** Ειδική δραστικότητα GR. **Δ:** Ειδική δραστικότητα POX. Οι συνθήκες ανάπτυξης των μικροφυκών είναι οι εξής: **C:** Μάρτυρας/Φυσιολογικές συνθήκες, **T:** Υψηλή θερμοκρασία, **N:** Έλλειψη αζώτου, **S:** 5 ‰ (w/v) Αλατότητα.

Ακολούθησε μελέτη για την ανίχνευση πιθανών αναστολέων του ενζύμου α-αμυλάσης και ακετυλο-χολινεστεράσης (AChE) (Πίνακας 4. 2 και Εικόνα 4. 2). Οι τιμές IC₅₀ απεικονίζουν τη συγκέντρωση ακατέργαστου εκχυλίσματος μικροάλγης, σε mg ξηρού βάρους, που προκαλεί μείωση της ενζυμικής δράσης κατά 50 %.

Τα εκχυλίσματα *Tetraselmis sp.* και *Nannochloropsis sp.* φαίνεται να μην αποτελούν πιθανούς αναστολείς του ενζύμου AChE διότι δεν ανιχνεύθηκε αναστολή. Επίσης, το εκχύλισμα *Phaeodactylum sp.* φαίνεται να μην αναστέλλει το ένζυμο α-αμυλάση.

Πίνακας 4. 2: Αποτελέσματα IC₅₀ της ανασταλτικής δράσης των ακατέργαστων εκχυλισμάτων των *Phaeodactylum sp.* (A), *Nannochloropsis sp.* (B) και *Tetraselmis sp.* (Γ). Οι συνθήκες ανάπτυξης των μικροφυκών είναι οι εξής: C: Μάρτυρας/Φυσιολογικές συνθήκες, T: Υψηλή θερμοκρασία, N: Έλλειψη αζώτου, S: 5 ‰ (w/v) Αλατότητα.

A.

Ένζυμο	IC ₅₀ (mg)			
	Control (C)	Temperature (T)	Nitrogen (N)	Salt (S)
<i>Acetylcholinesterase</i>	1,569	0,75	0,508	1,702

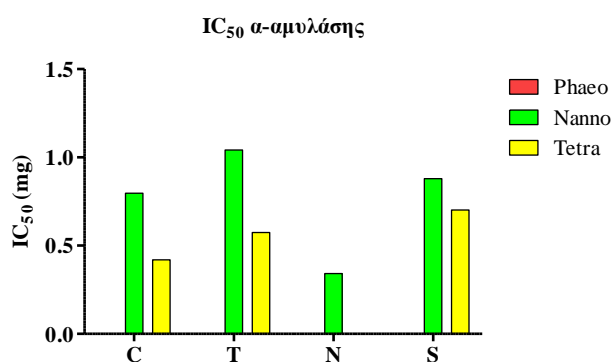
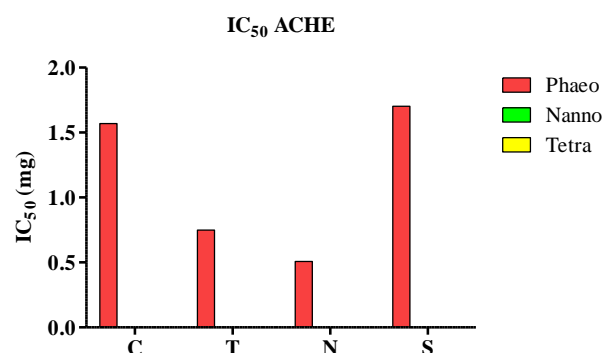
B.*Nannochloropsis sp.*IC₅₀ (mg)

Ένζυμο	Control (C)	Temperature (T)	Nitrogen (N)	Salt (S)
<i>a- amylase</i>	0,797	1,042	0,348	0,88

Γ.*Tetraselmis sp.*IC₅₀ (mg)

Ένζυμο	Control (C)	Temperature (T)	Nitrogen (N)	Salt (S)
<i>a- amylase</i>	0,419	0,574	MA	0,702

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η επίδραση των διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης πιθανόν επηρεάζει τη σύσταση των εκχυλισμάτων και την παρουσία αναστολέων των συγκεκριμένων ενζύμων. Το *Phaeodactylum sp.* παρουσιάζει τιμή IC₅₀ (0,508 mg ξηρού βάρους) ως προς AChE περίπου 3,35 φορές μικρότερη σε συνθήκες ανάπτυξης με ανεπάρκεια αζώτου σε σύγκριση με την τιμή IC₅₀ (1,702 mg ξηρού βάρους) σε συνθήκες υψηλής αλατότητας. Πιθανοί αναστολείς της α-αμυλάσης φαίνεται να αποτελούν τα υδατικά εκχυλίσματα των *Nannochloropsis sp.* και *Tetraselmis sp.* με εύρος τιμών IC₅₀ 0,797-1,042 mg και 0,419-0,702 mg ξηρού βάρους αντίστοιχα, και στο εκχύλισμα του τελευταίου να μην ανιχνεύεται δράση αναστολέα όταν έχει αναπτυχθεί σε συνθήκες έλλειψης αζώτου.

A.**B.**

Εικόνα 4. 2: Αποτελέσματα IC₅₀ της ανασταλτικής δράσης των ακατέργαστων εκχυλισμάτων *Phaeodactylum sp.*, *Nannochloropsis sp.* και *Tetraselmis sp.*. Οι συνθήκες ανάπτυξης των μικροφυκών

είναι οι εξής: **C**: Μάρτυρας/Φυσιολογικές συνθήκες, **T**: Υψηλή θερμοκρασία, **N**: Έλλειψη αζώτου, **S**: 5 % (w/ v) Αλατότητα ως προς **A**. α-αμυλάσης και **B**. AChE.

Στη συνέχεια τα ακατέργαστα εκχυλίσματα μελετήθηκαν ως προς την πρωτεολυτική δράση που πιθανόν να εμφανίζουν. Οι ενζυματικές δοκιμές αφορούν στον έλεγχο των εκχυλισμάτων ως προς τη δράση χυμοθρυψίνης, θρυψίνης, πρωτεάσης και λιπάσης (**Πίνακας 4. 3** και **Εικόνα 4. 3**).

Τα αποτελέσματα των δοκιμών έδειξαν ότι σε ορισμένα ακατέργαστα εκχυλίσματα των *Phaeodactylum sp.*, *Nannochloropsis sp.* και *Tetraselmis sp.* δεν ανιχνεύτηκε δράση πρωτεολυτικών ενζύμων. Συγκεκριμένα, δράση χυμοθρυψίνης και λιπάσης δεν ανιχνεύτηκε για καμία από τις συνθήκες ανάπτυξης του *Phaeodactylum sp.*, ενώ για το *Nannochloropsis sp.* παρουσιάστηκε δράση θρυψίνης.

Πίνακας 4. 3: Αποτελέσματα ειδικής δραστηριότητας της πρωτεολυτικής δράσης των ακατέργαστων εκχυλισμάτων *Phaeodactylum sp.* (**A**), *Nannochloropsis sp.* (**B**) και *Tetraselmis sp.* (**Γ**). Οι συνθήκες ανάπτυξης των μικροφυκών είναι οι εξής: C: Μάρτυρας/Φυσιολογικές συνθήκες, T: Υψηλή θερμοκρασία, N: Έλλειψη αζώτου, S: 5 % (w/ v) Αλατότητα. MA: μη ανιχνεύσιμη ενζυμική δραστηριότητα.

A.

Phaeodactylum sp.

Ειδική Δραστηριότητα
(Units/ mg πρωτεΐνης*)

Ένζυμο	Control (C)	Temperature (T)	Nitrogen (N)	Salt (S)
<i>Trypsin</i> *(BAEE Units/mg)	735	366	582	379
<i>Protease</i>	1,12	MA	1,322	1,713

B.

Nannochloropsis sp.

Ειδική Δραστηριότητα
(Units/ mg πρωτεΐνης)

Ένζυμο	Control (C)	Temperature (T)	Nitrogen (N)	Salt (S)
<i>Chymotrypsin</i>	1,116	1,165	1,591	1,348
<i>Protease</i>	11,08	15,49	30,67	8,76
<i>Lipase</i>	MA	6,29	MA	4,95

Γ.

Tetraselmis sp.

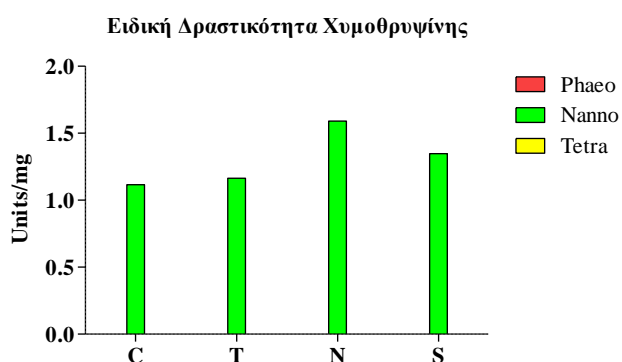
Ειδική Δραστικότητα
(Units/ mg πρωτεΐνης*)

Ένζυμο	Control (C)	Temperature (T)	Nitrogen (N)	Salt (S)
<i>Trypsin</i> *(BAEE Units/mg)	12,5	16,7	24,59	24,13
<i>Lipase</i>	0,47	0,68	0,63	MA

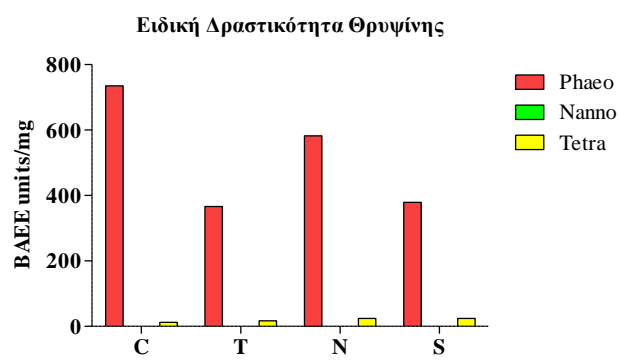
Η μελέτη της πρωτεολυτικής δράσης μεταξύ των διαφορετικών ειδών παρουσίασε ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές. Χαρακτηριστικό αποτελεί το γεγονός ότι το εκχύλισμα του *Nannochloropsis sp.* παρουσίασε την υψηλότερη δράση χυμοθρυψίνης, πρωτεάσης και λιπάσης. Συγκεκριμένα, ως προς χυμοθρυψίνη η ειδική δραστικότητα έχει εύρος 1,116-1,591 Units/ mg, ως προς πρωτεάση 8,76-30,67 Units/ mg και ως προς λιπάση 4,95-6,29 Units/ mg. Σε αντίθεση, το *Phaeodactylum sp.* φαίνεται να εμφανίζει μεγαλύτερη ειδική δραστικότητα ως προς θρυψίνη με εύρος τιμών 366-735 BAEE Units/ mg ενώ δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη δράση ως προς τα υπόλοιπα ένζυμα. Η μελέτη του εκχυλίσματος *Tetraselmis sp.* παρουσίασε χαμηλή δραστικότητα ως προς τη πρωτεολυτική του δράση, με μέγιστη να εμφανίζεται ως προς θρυψίνη (εύρος ειδικής δραστικότητας 12,5-24,59 BAEE Units/ mg).

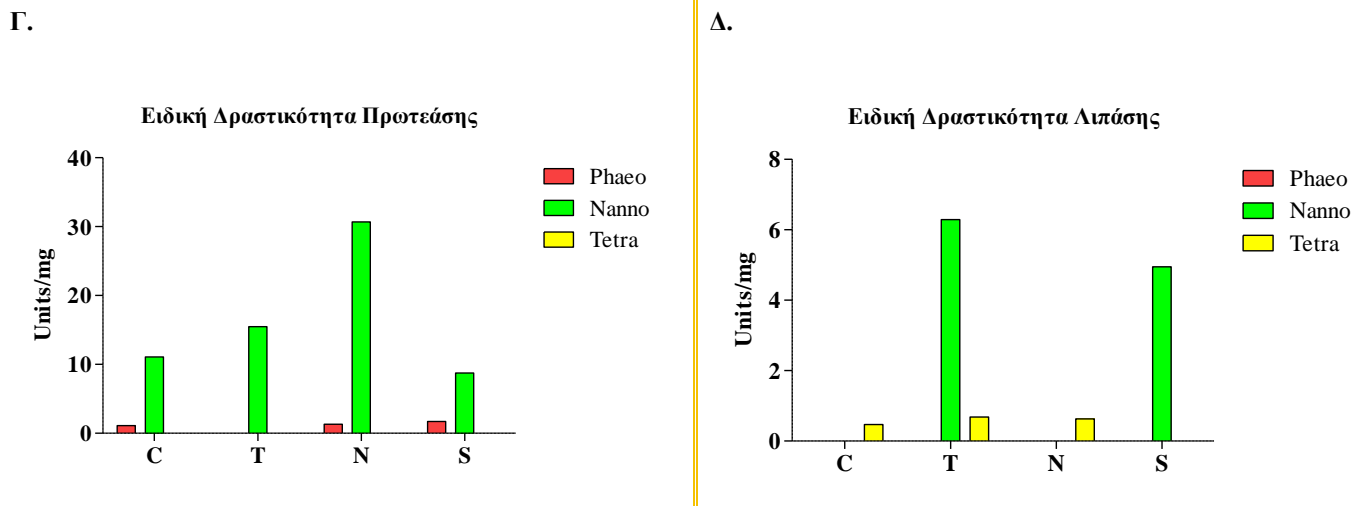
Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο στη μελέτη των αντιοξειδωτικών ενζυμων όσο και της πρωτεολυτικής δράσης, μεγαλύτερη ειδική δραστικότητα φαίνεται να παρουσιάζεται στις συνθήκες ανάπτυξης που επικρατεί η έλλειψη αζώτου και υψηλή αλατότητα.

A.



B.





Εικόνα 4. 3: Αποτελέσματα της πρωτεολυτικής δράσης των ακατέργαστων εκχυλισμάτων *Phaeodactylum sp.*, *Tetraselmis sp.* και *Nannochloropsis sp.* **A:** Ειδική δραστικότητα χυμοθριψίνης (Units/ mg). **B:** Ειδική δραστικότητα θρυψίνης (BAEE Units/ mg). **Γ:** Ειδική δραστικότητα πρωτεάσης (Units/ mg). **Δ:** Ειδική δραστικότητα λιπάσης (Units/ mg). Οι συνθήκες ανάπτυξης των μικροφυκών είναι οι εξής: **C:** Μάρτυρας/Φυσιολογικές συνθήκες, **T:** Υψηλή θερμοκρασία, **N:** Έλλειψη αζώτου, **S:** 5 ‰ (w/ v) Αλατότητα.

4.2.4. ΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ *Phaeodactylum sp.*, *Tetraselmis sp.* και *Nannochloropsis sp.*

Ακολούθησε μελέτη για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των ακατέργαστων εκχυλισμάτων *Phaeodactylum sp.*, *Tetraselmis sp.* και *Nannochloropsis sp.*. Η αξιολόγηση έγινε με τις μη ενζυματικές μεθόδους ABTS, DPPH και FRAP (Πίνακας 4. 4. και Εικόνα 4. 4.). Οι διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης των στελεχών είναι οι εξής: **C:** Μάρτυρας/ Φυσιολογικές συνθήκες, **T:** Υψηλή θερμοκρασία, **N:** Έλλειψη αζώτου, **S:** 5 ‰ (w/ v) Αλατότητα.

Πίνακας 4. 4: Οι τιμές IC₅₀ όπως προέκυψαν από τις μεθόδους ABTS και DPPH εκφρασμένες ως προς τη ξηρή μάζα των ειδών *Phaeodactylum sp.*, *Tetraselmis sp.* και *Nannochloropsis sp.*. Αποτελέσματα της δοκιμής FRAP με τις τιμές να εκφράζονται ως μM ασκορβικού οξέος/ mg πρωτεΐνης. Οι συνθήκες ανάπτυξης των μικροφυκών είναι οι εξής: **C:** Μάρτυρας/Φυσιολογικές συνθήκες, **T:** Υψηλή θερμοκρασία, **N:** Έλλειψη αζώτου, **S:** 5 ‰ (w/ v) Αλατότητα.

A.

Phaeodactylum sp.

	Control (C)	Temperature (T)	Nitrogen (N)	Salt (S)
ABTS (IC ₅₀ mg)	1,837	0,779	1,534	2,32
FRAP (μM/ mg)	2,44	9,63	6,93	3,17

B.

Nannochloropsis sp.

	Control (C)	Temperature (T)	Nitrogen (N)	Salt (S)
ABTS (IC ₅₀ mg)	0,108	0,138	0,379	0,163
FRAP (μM/ mg)	1,55	2,68	2,65	2,66

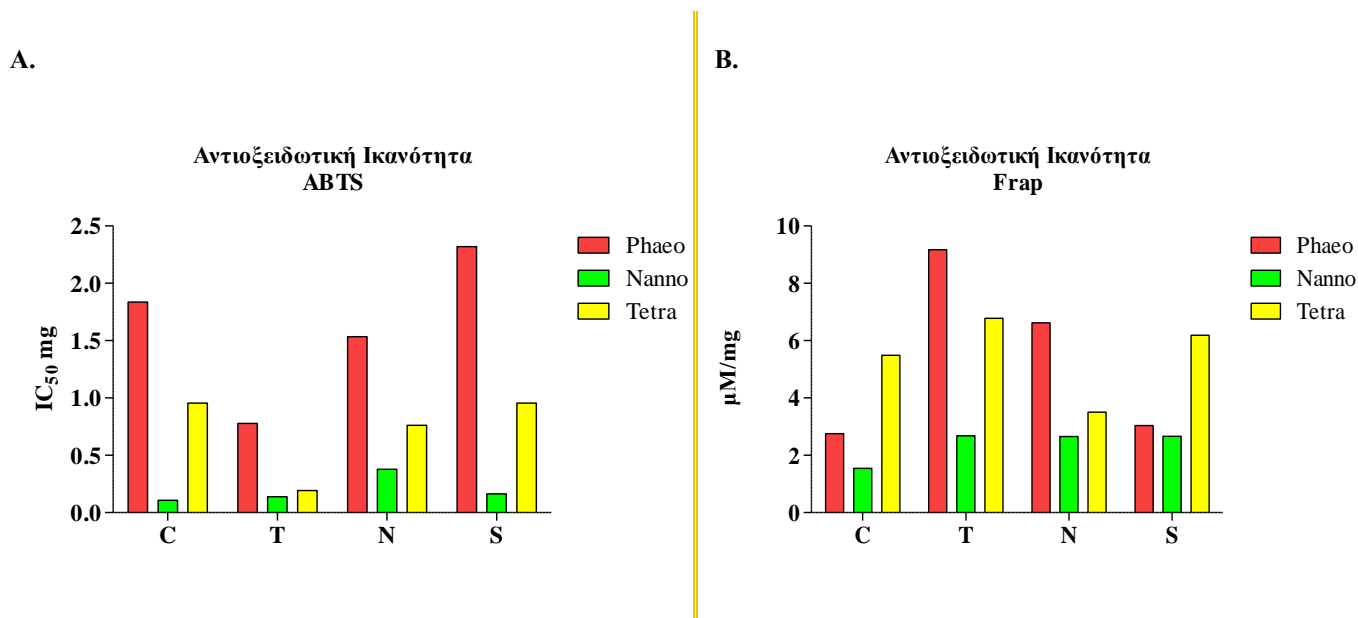
Γ.

Tetraselmis sp.

	Control (C)	Temperature (T)	Nitrogen (N)	Salt (S)
ABTS (IC ₅₀ μL)	0,955	0,192	0,762	0,956
FRAP (μM/ mg)	5,49	6,78	3,502	6,19

Τα αποτελέσματα (**Πίνακας 4. 4**) έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα *Phaeodactylum sp.*, *Tetraselmis sp.* και *Nannochloropsis sp.* παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ως προς την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, γεγονός που εκφράζει μεγάλη χημική ποικιλομορφία αντιοξειδωτικών ουσιών. Πιο συγκεκριμένα, υψηλότερη ABTS τιμή εμφανίζει το εκχύλισμα *Nannochloropsis* σε όλες τις συνθήκες ανάπτυξης, με εύρος τιμών IC₅₀ (0,108-0,379 mg ξηρού βάρους), ενώ εκείνο του *Phaeodactylum* το χαμηλότερο εύρος τιμών IC₅₀ (0,772-2,32 mg ξηρού βάρους). Χαρακτηριστικό αποτελεί το γεγονός ότι κανένα εκχύλισμα δεν παρουσίασε δράση έναντι του DPPH. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην **Εικόνα 4. 4**. Τα αποτελέσματα ως προς την ανίχνευση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με εφαρμογή της μεθόδου FRAP έδειξαν

ότι την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα εμφανίζεται στο εκχύλισμα *Phaeodactylum sp.* για τη συνθήκη ανάπτυξης με υψηλή θερμοκρασία, με ειδική τιμή 9,63 μM / mg πρωτεΐνης. Παρομοίως, το ίδιο φαίνεται να ισχύει για τα εκχυλίσματα *Nannochloropsis sp.* και *Tetraselmis sp.* με ειδικές τιμές Frap στα 2,68 και 6,78 μM / mg πρωτεΐνης αντίστοιχα.



Εικόνα 4. 4: **A.** Το διάγραμμα απεικονίζει τις τιμές IC_{50} (Inhibitory Concentration 50 %), δηλαδή τη συγκέντρωση του ακατέργαστου εκχυλίσματος μικροφυκών προκαλεί μείωση στην αρχική συγκέντρωση της ρίζας κατά 50 %. Η τιμή IC_{50} εκφράζεται ως προς mg ξηρού βάρους. **B.** Αποτελέσματα της δοκιμής FRAP με τις τιμές να εκφράζονται ως μM ασκορβικού οξέος/mg πρωτεΐνης. Οι συνθήκες ανάπτυξης των μικροφυκών είναι οι εξής: **C:** Μάρτυρας/Φυσιολογικές συνθήκες, **T:** Υψηλή θερμοκρασία, **N:** Έλλειψη αζώτου, **S:** 5 ‰ (w/ v) Αλατότητα. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα GraphPad Prism 5.

Στη συνέχεια έγινε υπολογισμός της ολικής συγκέντρωσης γλουταθειόνης, οξειδωμένης και μη μορφής. Χαρακτηριστικό αποτελεί ότι στο εκχύλισμα *Phaeodactylum sp.* δεν ανιχνεύτηκε συγκέντρωση γλουταθειόνης για καμία συνθήκη ανάπτυξης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στη συνέχεια (**Πίνακας 4. 5** και **Εικόνα 4. 5 A.**).

Πίνακας 4. 5: Προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης γλουταθειόνης σε ακατέργαστα εκχύλισματα *Nannochloropsis sp.* (A) και *Tetraselmis sp.* (B). Οι συνθήκες ανάπτυξης των μικροφυκών είναι οι εξής: C: Μάρτυρας/Φυσιολογικές συνθήκες, T: Υψηλή θερμοκρασία, N: Έλλειψη αζώτου, S: 5 ‰ (w/v) Αλατότητα.

A.

Nannochloropsis sp.

	Control (C)	Temperature (T)	Nitrogen (N)	Salt (S)
nmol GSH/ mg πρωτεΐνης	936	183	1179	690

B.

Tetraselmis sp.

	Control (C)	Temperature (T)	Nitrogen (N)	Salt (S)
nmol GSH/ mg πρωτεΐνης	305	166	367	628

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι το εκχύλισμα *Nannochloropsis sp.* παρουσιάζει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολική γλουταθειόνη (GSH/GSSG) για τη συνθήκη έλλειψης αζώτου (1179 nmol GSH/ mg πρωτεΐνης) και σε φυσιολογικές συνθήκες (936 nmol GSH/ mg πρωτεΐνης). Τα αποτελέσματα που αφορούν στο εκχύλισμα *Tetraselmis sp.* έδειξαν χαμηλότερες τιμές ολικής συγκέντρωσης γλουταθειόνης με μέγιστη να εμφανίζεται ως προς τη συνθήκη ανάπτυξης με υψηλή αλατότητα (628 nmol GSH/ mg πρωτεΐνης). Ανιχνεύσιμη δράση δεν εντοπίστηκε με χρήση του εκχυλίσματος *Phaeodactylum sp.*

Ακολούθησε ο προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης φαινολικών εκφρασμένη ως προς μg γαλλικού οξέως ανά mg πρωτεΐνης (Πίνακας 4. 6 και Εικόνα 4. 5 B.).

Πίνακας 4. 6: Προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης φαινολικών στα ακατέργαστα εκχύλισματα των *Phaeodactylum sp.* (Α), *Tetraselmis sp.* (Β) και *Nannochloropsis sp.* (Γ). Οι συνθήκες ανάπτυξης των μικροφυκών είναι οι εξής: **C:** Μάρτυρας/Φυσιολογικές συνθήκες, **T:** Υψηλή θερμοκρασία, **N:** Έλλειψη αζώτου, **S:** 5 ‰ (w/ v) Αλατότητα. MA: Μη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση.

Α.

Phaeodactylum sp.

	Control (C)	Temperature (T)	Nitrogen (N)	Salt (S)
Φαινολικά (γαλλικό οξύ/ mg πρωτεΐνης)	1,46	1,47	1,56	1,53

Β.

Nannochloropsis sp.

	Control (C)	Temperature (T)	Nitrogen (N)	Salt (S)
Φαινολικά (γαλλικό οξύ/ mg πρωτεΐνης)	1,04	1,68	0,71	1,24

Γ.

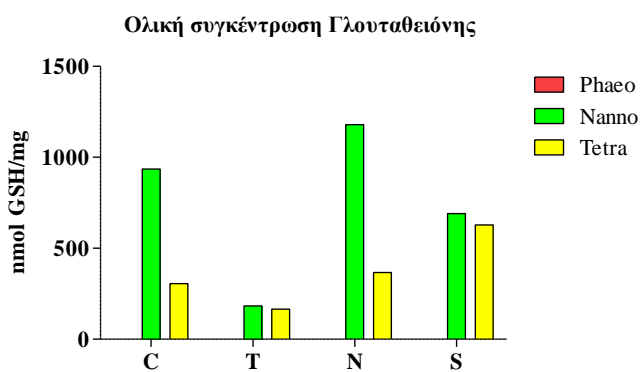
Tetraselmis sp.

	Control (C)	Temperature (T)	Nitrogen (N)	Salt (S)
Φαινολικά (γαλλικό οξύ/ mg πρωτεΐνης)	3,42	MA	8,13	11,62

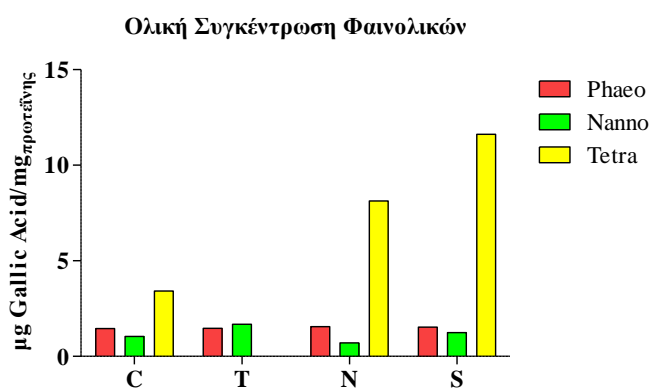
Από τα αποτελέσματα του **Πίνακα 4. 6** φαίνεται ότι το εκχύλισμα *Tetraselmis sp.* παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ολική συγκέντρωση φαινολικών ως προς τη συνθήκη ανάπτυξης με υψηλή αλατότητα. Τα αποτελέσματα για το εκχύλισμα *Nannochloropsis* ήταν περισσότερο κανονικοποιημένα μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης, τόσο ως προς την ολική συγκέντρωση φαινολικών με εύρος τιμών 0,71-1,68 μg γαλλικού οξέως ανά mg και 0,02-0,058 mg_{μονομερών}/ mg πρωτεΐνης αντίστοιχα. Όσον αφορά το εκχύλισμα *Phaeodactylum*, παρουσίασε ίδια εικόνα με το *Nannochloropsis* ως την ολική συγκέντρωση φαινολικών.

Στην **Εικόνα 4. 5** που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν στην ολική συγκέντρωση γλουταθειόνης και φαινολικών ουσιών.

A.



B.



Εικόνα 4. 5: Ολική συγκέντρωση γλουταθειόνης (**A**) (nmol GSH/ mg πρωτεΐνης), ολική συγκέντρωση φαινολικών (**B**) (µg γαλλικού οξέος/ mg πρωτεΐνης) στο ακατέργαστο εκχύλισμα μικροάλγης για τα *Nannochloropsis sp.*, *Tetraselmis sp.* και *Phaeodactylum tricornutum* που έχουν αναπτυχθεί υπό διαφορετικές συνθήκες καταπόνησης. Οι διαφορετικές συνθήκες είναι οι εξής: **C:** Μάρτυρας/Φυσιολογικές συνθήκες, **T:** Υψηλή θερμοκρασία, **N:** Έλλειψη αζώτου, **S:** 5% (w/ v) Αλατότητα.

4.3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα μικροφύκη για να γίνουν μια οικονομικά βιώσιμη πηγή αντιοξειδωτικών είναι σημαντικό να μεγιστοποιηθεί η περιεκτικότητα των αντιοξειδωτικών στη βιομάζα τους (Goiris et al., 2015). Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της θρεπτικής καταπόνησης και της θερμοκρασίας στη ρύθμιση του αντιοξειδωτικού περιεχομένου των μικροφυκών. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση επιλεγμένων ενζύμων και μεταβολιτών των *Nannochloropsis sp.*, *Tetraselmis sp.* και *Phaeodactylum sp.* υπό διαφορετικές συνθήκες καταπόνησης. Όπως είναι γνωστό, οι βιοχημικές προσαρμογές που πραγματοποιούνται παρουσία αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης σε φυτικούς οργανισμούς περιλαμβάνουν διάφορες αλλαγές στη βιοχημεία του κυττάρου. Αυτές οι αλλαγές περιλαμβάνουν την εξέλιξη νέων μεταβολικών οδών, τη συσσώρευση μεταβολιτών χαμηλού μοριακού βάρους, τη σύνθεση ειδικών πρωτεϊνών και μηχανισμούς αποτοξίνωσης (Bajguz, 2010).

Μελέτες που αφορούν στα αντιοξειδωτικά ένζυμα των *Nannochloropsis sp.*, *Tetraselmis sp.* και *Phaeodactylum sp.* αλλά και η επίδραση του θρεπτικού στρες σε αυτό είναι σπάνιες. Αντιθέτως, έχουν γίνει κάποιες αναφορές σχετικά με την επίδραση των μετάλλων στο ενζυμικό αντιοξειδωτικό δυναμικό. Για παράδειγμα, ο χαλκός είναι ένα βασικό ιχνοστοιχείο για τα φυτά και τα άγλη και αποτελεί ένα συστατικό πολλών πρωτεϊνών και ενζύμων που εμπλέκονται σε μια ποικιλία μεταβολικών οδών. Ωστόσο, όταν βρίσκεται σε περίσσεια ο χαλκός μπορεί να εμπλακεί σε πολυάριθμες φυσιολογικές διαδικασίες και έτσι να αποτελέσει πολύ τοξικό για τα κύτταρα (Ytuela, 2009).

Συγκεκριμένα, η προσθήκη ποσότητας χαλκού έδειξε να αυξάνει κατά 33 % τη δραστηριότητα της GR στο εκχύλισμα *Phaeodactylum tricornutum* (Morelli & Scarano, 2004), ενώ η ανάπτυξη του *Nannochloropsis oculata* παρουσία 10 μM Cd προκάλεσε όχι μόνο την αύξηση της συγκέντρωσης H_2O_2 περίπου 33 % αλλά αύξησε και τη δραστηριότητα της GPX περίπου 4 φορές σε σύγκριση με τις συνθήκες control (Lee & Shin, 2003). Αντίστοιχη μελέτη έχει πραγματοποιηθεί για το στέλεχος *Tetraselmis gracilis* με τα αποτελέσματα να δείχνουν κατά 41 % και 107 % αύξηση της SOD παρουσία 1,5 και 3 ppm Cd, σε σχέση απουσίας του μετάλλου (Okamoto et al., 1996). Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, οι συνθήκες που προκαλούν αβιοτική καταπόνηση επηρεάζουν άμεσα το ενζυμικό αντιοξειδωτικό σύστημα.

Η α-αμυλάση αποτελεί ένα ένζυμο που διασπά το άμυλο σε γλυκόζη και η αναστολή του έχει μελετηθεί ως μια μέθοδος ελέγχου των επιπέδων σακχάρου στο αίμα (Ali et al., 2006). Συγκεκριμένα καταλύει την υδρόλυση του α-(1,4) -γλυκοζιτικού δεσμού και παράγει μαλτόζη και γλυκόζη από άμυλο (Søgaard et al., 1993). Εντοπίζεται στο σάλιο και εκκρίνεται κυρίως στο λεπτό έντερο. Με την αναστολή του ενζύμου, η απορρόφηση της γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος μπορεί να καθυστερήσει και ως εκ τούτου να βελτιωθούν τα συμπτώματα του Τύπου II διαβήτη όπως η υπεργλυκαιμία (Kim et al., 2014). Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει προσπάθειες για την εύρεση πιθανών αναστολέων α-αμυλάσης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα τρόφιμα ή ως συμπληρώματα διατροφής. Ενώ υπάρχει διαθέσιμη βιβλιογραφία για αναστολείς α-αμυλάσης από μακροφυκη, δεν υπάρχει καμία αναφορά σχετικά με τη χρήση μικροφυκών. Σύμφωνα με τους Lordan et al., τα υδατικά και αιθανολικά εκχυλίσματα του *Ascophyllum nodosum* παρουσίασαν την ισχυρότερη αναστολή α-αμυλάσης με τιμές IC₅₀ 53,6 και 44,7μg αντίστοιχα (Lordan et al., 2013). Επίσης, σύμφωνα με τους Senthil et al. το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα από τα στελέχη *Gracillaria gracilis*, *Chondrococcus hornemanni* και *Padina gymnospora* έδειξε αναστολή του ενζύμου α-αμυλάση κατά 81 %, 94 % και 71 % αντίστοιχα σε συγκέντρωση 300 μg (Senthil et al., 2013). Οι βιβλιογραφικές αναφορές σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φαίνεται να ενισχύει τη χρήση των υδατικών εκχυλισμάτων *Nannochloropsis sp.*, *Tetraselmis sp.* και *Phaeodactylum sp.* ως πιθανούς αναστολείς του ενζύμου καθώς και τη χρήση τους στον τομέα των συμπληρωμάτων διατροφής.

Η Ακετυλοχολίνη (ACh) είναι ένα μόριο που δρα ως νευροδιαβιβαστής και η έλλειψη της οδηγεί σε εγκεφαλικές βλάβες και είναι ένας παράγοντας για την γεροντική άνοια και τη νόσο Αλτσχάιμερ (AD). Η ακετυλοχολινεστεράση (AChE) θεωρείται ότι είναι το επικεφαλής ένζυμο που εμπλέκεται στην υδρόλυση ACh, καθώς επίσης και στην ανάπτυξη της νόσου AD. Σύμφωνα με την χολινεργική υπόθεση, η αποκατάσταση των επιπέδων ACh, οι οποίες προοδευτικά χάνονται κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της AD, είναι ικανή να καθυστερήσει την απώλεια της γνωστικής λειτουργίας (Custódio et al., 2012). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι οι αναστολείς της AChE ανακουφίζουν νευροψυχιατρικά συμπτώματα σε ασθενείς με AD, και παρέχουν ευεργετικά αποτελέσματα επί της γνωστικής ικανότητας αυξάνοντας τα επίπεδα ACh εντός της συναπτικής περιοχής (Filho et al., 2006).

Αναφορές σχετικά με αναστολείς AChE από τους θαλάσσιους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς είναι ιδιαίτερα σπάνιες. Κάποιες έρευνες έχουν αναφερθεί σχετικά με τα γένη *Sargassum* και *Gracilaria* (Choi et al., 2007; Natarajan et al., 2009). Η ερευνητική ομάδα του Custódio (Custódio et al., 2012) μελέτησε τη χρήση μικροάλγης ως πιθανούς αναστολείς της AChE. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι η εκχύλιση των στελεχών *Nannochloropsis oculata* και *Tetraselmis chuii* με εξάνιο προκάλεσε αναστολή του ενζύμου, σε σχέση με τα αντίστοιχα που προέκυψαν με εκχύλιση μεθανόλης. Όπως είναι γνωστό οι οργανικοί διαλύτες εκχυλίζουν πλήθος βιοχημικών ουσιών σε σύγκριση με τα υδατικά διαλύματα. Παρ' όλα αυτά, η συγκεκριμένη μελέτη επιβεβαιώνει τα δικά μας αποτελέσματα φανερώνοντας ότι τα εκχυλίσματα μικροάλγης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί αναστολείς της AChE.

Επίσης, μελέτες που αφορούν στην ανίχνευση δράσης πρωτεολυτικών ενζύμων σε μικροφύκη είναι ελάχιστες. Σύμφωνα με τους Berges και Falkowski, μελετήθηκε η επίδραση έλλειψης αζώτου σε εκχυλίσματα του *Thalassiosira weissflogii* (διάτομο) και της *Dunaliella tertiolecta* (χλωρόφυτο) ως προς δράση πρωτεάσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση της δραστηριότητας της πρωτεάσης και στα δύο είδη, 12 φορές για το διάτομο αλλά μόνο 4 φορές για το χλωρόφυτο (Berges & Falkowski, 1998). Τα αποτελέσματα της παραπάνω έρευνας σε συνδυασμό με τα δικά μας φαίνεται να επιβεβαιώνουν τη πιθανή χρήση εκχυλισμάτων μικροάλγης ως μια πιθανή πλούσια πηγή πρωτεολυτικών ενζύμων. Παρόλο που αυτά τα ένζυμα παράγονται φυσιολογικά από την πέψη της τροφής, η αύξηση της ηλικίας ή λόγω ασθένειας το πεπτικό σύστημα μπορεί να γίνει λιγότερο αποτελεσματικό και οι ποσότητες των ενζύμων που παράγονται ενδέχεται να μην είναι ικανοποιητικές. Η έλλειψη των πρωτεολυτικών ενζύμων μπορούν να οδηγήσουν σε πεπτικά προβλήματα όπως είναι ο τυμπανισμός και η τροφική δυσανεξία.

Μελέτες που αφορούν στην επίδραση του θρεπτικού στρες και της υψηλής θερμοκρασίας στην αντιοξειδωτική χωρητικότητα με μη ενζυματικές μεθόδους για τα *Phaeodactylum sp.*, *Nannochloropsis sp.* και *Tetraselmis sp.* είναι ελάχιστες. Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη, τα στελέχη *Phaeodactylum tricornutum* και *Tetraselmis suecica* μελετήθηκαν ως προς την ολική συγκέντρωση φαινολικών και το αντιοξειδωτικό χωρητικότητα μέσω της μεθόδου ABTS και υπό συνθήκες έλλειψης αζώτου (N) (Goiris et al., 2015). Τα αποτελέσματα έδειξαν χαμηλότερο αντιοξειδωτικό δυναμικό σε σύγκριση με τις φυσιολογικές συνθήκες, γεγονός που

έρχεται σε συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα. Σχετικά όμως με τα φαινολικά, η μελέτη μας έδειξε ότι η έλλειψη αζώτου φαίνεται να προκάλεσε την αύξηση της συγκέντρωσης φαινολικών σε *Phaeodactylum sp.* και *Tetraselmis sp.*, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τη συμπεριφορά των χερσαίων φυτών (Lillo και Ruoff, 2008) και των μακροφυκών (Arnold et al., 1995), με την περιεκτικότητα των φαινολών τυπικά να αυξάνει ως απόκριση στο θρεπτικό στρες. Παρόλα αυτά η γνώση σχετικά με το ρόλο και την ταυτότητα των πολυφαινολών στα μικροφύκη είναι περιορισμένη και υπάρχει ανάγκη για περαιτέρω έρευνα σχετικά με αυτή την κατηγορία αυτών των μεταβολιτών.

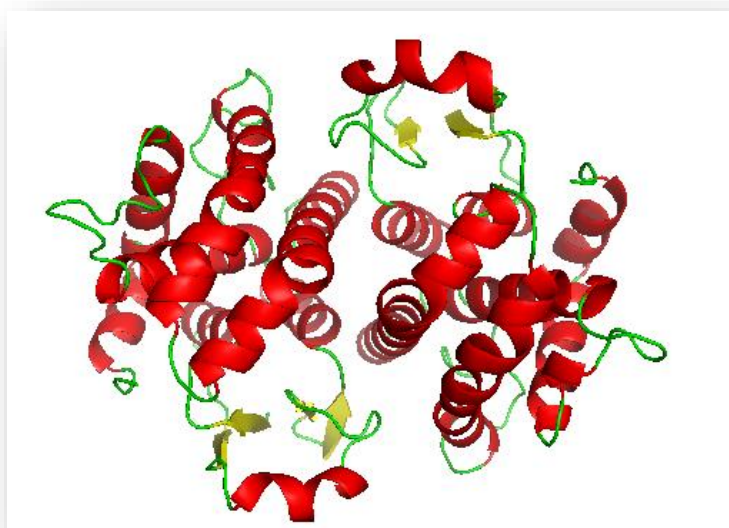
Επίσης η συγκεκριμένη ομάδα είχε μελετήσει στο παρελθόν τη συνολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα με τη μέθοδο FRAP καθώς και την ολική συγκέντρωση φαινολικών σε υδατικά/αιθανολικά εκχυλίσματα διαφορετικών μικροφυκών. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση φαινολικών για τα στελέχη *Nannochloropsis oculata*, *Nannochloropsis sp.*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis suecica* και *Tetraselmis sp.* υπολογίστηκε στα $2,04 \pm 0,35$, $1,39 \pm 0,20$, $3,75 \pm 0,46$, $1,71 \pm 0,57$ και $3,74 \pm 0,10$ mg GAE/g ξηρού βάρους; ενώ οι τιμές FRAP ήταν στα $40,68 \pm 1,61$, $40,80 \pm 1,05$, $89,70 \pm 1,43$, $11,35 \pm 0,56$ και $46,58 \pm 0,60$ $\mu\text{mol trolox/ g}$ ξηρού βάρους (Goiris et al., 2012).

Αναφορές σχετικά με τον υπολογισμό της ολικής συγκέντρωσης γλουταθειόνης στα ως προς μελέτη είδη και συνθήκες του παρόντος κεφαλαίου, δεν είναι διαθέσιμες. Οι Chen et al. όμως, μελέτησαν την επίδραση μικροκυμάτων στην ολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα του *Nannochloropsis oculata*. Η επίδραση της συγκεκριμένης ακτινοβολίας προκάλεσε μικρή αύξηση της γλουταθειόνης (GSH) κατά 7,6 % επιβεβαιώνοντας ότι η μεταβολή της συγκέντρωσής της στα κύτταρα ενισχύει το αντιοξειδωτικό μηχανισμό (Chen et al., 2010). Μια άλλη ομάδα μελέτησε την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων καδμίου στη συγκέντρωση γλουταθειόνης του *Tetraselmis suecica*, όπου παρατηρήθηκε μέγιστη αύξηση GSH μόνο σε κύτταρα που εκτέθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις καδμίου (15 και 30 mg/ L) (Pérez-Rama et al., 2006). Στην παρούσα μελέτη, η συγκέντρωση της ολικής γλουταθειόνης φαίνεται να διαφοροποιείται ανάλογα με τις συνθήκες καταπόνησης που επικρατούν στα ως μικροφύκη γεγονός που επιβεβαιώνεται και βιβλιογραφικά.

Τα ευρήματά μας υπογραμμίζουν ότι τα εκχυλίσματα *Phaeodactylum sp.*, *Nannochloropsis sp.* και *Tetraselmis sp.* αποτελούν μια πλούσια πηγή βιοδραστικών

συστατικών με τη δυνατότητα χρήσης τους ως πρώτες ύλες σε κλάδους της βιομηχανίας που αφορούν τα τρόφιμα, τα συμπληρώματα διατροφής και τη κοσμετολογία. Η χρήση αντιοξειδωτικών από φυσικές και πράσινες πηγές, όπως τα μικροφύκη, αντιπροσωπεύει έναν τομέα που κερδίζει μεγάλο ενδιαφέρον στη διάρκεια του χρόνου με ευρεία εφαρμογών στην ανάπτυξη νέων προϊόντων.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Η οικογένεια GST από το
στέλεχος *Chlamidomonas reinhardtii*:
Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός νέων ενζύμων
που ανήκουν στη *Sigma* τάξη**



5.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης ή GSTs (EC 2.5.1.15) έχουν χαρακτηριστεί εκτενώς τόσο σε φυτά όσο και σε θηλαστικά. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα που να αποδεικνύουν την παρουσία τους στο πρότυπο οργανισμό μικροάλγης *Chlamidomonas reinhardtii*. Η μελέτη του γονιδιώματος του *Chlamidomonas reinhardtii* αποκάλυψε την παρουσία 15 αλληλουχιών με χαρακτηριστικά GSTs (CrGSTs). Η σύγκριση της αμινοξικής αλληλούχισης οδήγησε στη δημιουργία ενός δενδογράμματος που έδειξε τις φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ αυτών. Συγκεκριμένα, υπάρχουν δύο αλληλουχίες "ορφανές" που δεν ανήκουν σε καμία αναγνωρισμένη τάξη των GSTs και τρία ισοένζυμα που φαίνεται να έχουν στενή σχέση με τη *Sigma* τάξη, η οποία έχει εντοπιστεί μέχρι σήμερα μόνο σε σπονδυλωτούς και ασπόνδυλους οργανισμούς. Τα ισοένζυμα που έχουν στενή σχέση με τη *Sigma* τάξη και μελετήθηκαν στο παρόν κεφάλαιο (CrGST10 και CrGST7) κλωνοποιήθηκαν, εκφράστηκαν σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli* και μελετήθηκε η εκλεκτικότητά τους έναντι ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων. Τα δομικά χαρακτηριστικά και η κινητική συμπεριφορά των ισοενζύμων αυτών μελετήθηκαν με μοριακή μοντελοποίηση και κατευθυνόμενη μεταλλαξογέννεση (site-directed mutagenesis). Ο καταλυτικός ρόλος του αμινοξέος Tyr7 επιβεβαιώθηκε ενώ διερευνήθηκε η θέση-κλειδί του αμινοξέος Trp99 και ο ρόλος του στον προσδιορισμό εξειδίκευσης υποστρωμάτων, επίδρασης pH και θερμοσταθερότητας. Η συγκεκριμένη μελέτη και η ανάλυση των GSTs που κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα *Chlamidomonas reinhardtii*, επιτρέπει τη μελέτη του ρόλου και των φυλογενετικών σχέσεων των GSTs στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς αλλά ταυτόχρονα δίνει νέα στοιχεία για την ανάπτυξη νέων βιοτεχνολογικών εφαρμογών.

5.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης (glutathione transferase, EC 2.5.1.18) αποτελούν ένζυμα που εμπλέκονται σε μηχανισμούς αποτοξίνωσης και αποικοδόμησης τοξικών ουσιών και υδρόφοβων υποστρωμάτων (Herve et al., 2008). Αυτά τα ένζυμα έχουν βρεθεί σχεδόν σε όλους τους τύπους των οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των φυτών, των ζώων, των νηματωδών και βακτηρίων και διαχωρίζονται σε διάφορες τάξεις σύμφωνα με την ομολογία που παρουσιάζουν. Σήμερα οι αναγνωρισμένες τάξεις κυτταροπλασματικών GSTs που απαντώνται στα θηλαστικά είναι οι *Alpha*, *Mu*, *Omega*, *Pi*, *Sigma*, *Theta* και *Zeta*. Οι GSTs που ανήκουν στις δυο τελευταίες τάξεις έχουν επίσης εντοπιστεί σε φυτά και σε άλλους οργανισμούς. Άλλες ξεχωριστές τάξεις έχουν εντοπιστεί σε έντομα (*Delta* και *Epsilon*), σε φυτά (*Lamda*, *Phi* και *Tau*) ή σε προκαρυωτικά κύτταρα (*Beta*) (Chronopoulou et al., 2014). Από τις παραπάνω τάξεις, η *Sigma* τάξη είναι ευρέως διαδεδομένη στη φύση με ισοένζυμα που απαντώνται τόσο σε σπονδυλωτούς όσο και σε ασπόνδυλους οργανισμούς (Bae et al., 2016). Φυλογενετική ανάλυση των τάξεων των GSTs έδειξε ότι στη *Sigma* τάξη ανήκει η πρωτεύιμη S-κρυσταλλίνη που βρέθηκε σε θαλάσσιους οργανισμούς (Tomarev & Zinoviena, 1988; Buetler & Eaton, 1992) με βάση την υψηλή ενζυμική δραστηριότητα που εμφάνισε ως προς το υπόστρωμα CDNB (Ji et al., 1995). Σύμφωνα λοιπόν με το φυλογενετικό δέντρο, η *Sigma* τάξη φαίνεται να ομαδοποιείται πιο στενά με τις τάξεις *Alpha*, *Mu* και *Pi* και συγκεκριμένα να αποτελεί την προέκταση της *Mu* και *Pi* τάξεις, οι οποίες πιθανόν και να προήλθαν από την *Alpha* τάξη (Pearson, 2005). Έτσι λοιπόν, *Sigma* τάξη απαντάται σε οργανισμούς όπως ο άνθρωπος, το ποντίκι, το κοτόπουλο, οι σκώληκες και τα έντομα. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν ουσιαστικές αναφορές επί των μοριακών χαρακτηριστικών των GSTs από άγλη (μάκροαγλη και μικροάγλη) κυρίως λόγω της έλλειψης των πληροφοριών του γονιδιώματος σε αυτούς τους οργανισμούς (Herve et al., 2008).

5.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.3.1. ΥΛΙΚΑ

Όλα τα χημικά, τα διαλύματα, τα ένζυμα αλλά και τα υποστρώματα ενζύμων έχουν προμηθευτεί από τη Sigma-Aldrich (USA). Οι cDNA βιβλιοθήκες *Chlamidomonas* προμηθεύτηκαν από το πανεπιστήμιο της Μινεσότα (<http://chlamycollection.org/>). Τα κιτ απομόνωσης pCR[®]T7/CT-TOPO[®] kit και pETite[™] N-His kit προμηθεύτηκαν από την Invitrogen, (USA) και Lucigen. Οι πολυμεράσες Kapa Taq and Kapa HiFi DNA από την εταιρεία Kapa Biosystems (USA), ενώ τα κιτ απομόνωσης πλασμιδιακού DNA και καθαρισμού των προϊόντων της PCR αντίδρασης από την QIAGEN, (UK).

5.3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

5.3.2.1. ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ CrGST10 ΣΤΟΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ PEXP-5-CT/TA TOPO[®]

Οι βιβλιοθήκες cDNA (Lab A, B, C, D) δημιουργήθηκαν από κύτταρα μικροάλγης *Chlamidomonas reinhardtii* που βρίσκονταν στα μέσα της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης σε TAP θρεπτικό διάλυμα στο φως (Lab A) και στο σκοτάδι (Lab B), σε HS θρεπτικό διάλυμα παρουσία 5 % CO₂ (Lab C) και σε φυσιολογικά επίπεδα CO₂ (Lab D). Οι βιβλιοθήκες είχαν τίτλο ενίσχυσης (amplification titer) 1,8 x 10⁷ (Lab A), 1 x 10⁶ (Lab B), 5 x 10⁵ (Lab C) και 4,5 x 10⁶ (Lab D). Τα cDNA που εκφράζουν τα ένζυμα CrGST10 και CrGST7 απομονώθηκαν με PCR. Η αντίδραση που πραγματοποιήθηκε για το ισοένζυμο CrGST10 έχει τελικό όγκο 50 μL και περιέχει: 3 μL μήτρα από τη cDNA βιβλιοθήκη, 0,5 mM από κάθε ένα dNTPs, 5 μL 10 x taq διάλυμα πολυμεράσης, 0,16 pmol από κάθε εκκινητή και 1 Unit KAPA taq πολυμεράσης. Για το ισοένζυμο CrGST7 οι συνθήκες διαφοροποιούνται ως εξής: 3 μL μήτρα από τη cDNA βιβλιοθήκη, 0,2 mM από κάθε ένα dNTPs, 10 μL 5 x KAPA HiFi διάλυμα πολυμεράσης, 0,2 pmol από κάθε εκκινητή και 1 Unit KAPA HiFi πολυμεράσης.

Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR και οι εκκινητές παρουσιάζονται στη συνέχεια (Πίνακας 5. 1 και 5. 2).

Το προϊόν της αντίδρασης PCR αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 1 % (w/v), στο οποίο παρατηρήθηκε μια ζώνη μεγέθους στα 657 bp (*CrGST10*) και 654 bp (*CrGST7*) όπου αντιστοιχεί στο μέγεθος του κάθε γονιδίου.

Στη συνέχεια ακολούθησαν δύο διαφορετικοί τρόποι κλωνοποίησης. Στη διαδικασία που αφορά στο *CrGST10*, έγινε η εισαγωγή του γονιδίου σε πλασμιδιακό φορέα T7 pEXP-5 CT/TA-TOPO[®], το οποίο προέρχεται από το Kit της Invitrogen (pEXP-5 CT/TA-TOPO[®]), ακολούθησε μετασχηματισμός των κυττάρων *E. coli* Turbo με το ανασυνδιασμένο γονίδιο και επίστρωση των μετασχηματισμένων κύτταρων σε τρυβλία petri με θρεπτικό διάλυμα LB (δείκτης επιλογής το αντιβιοτικό αμπικιλίνη 100 µg/ mL). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν μη μετασχηματισμένα κύτταρα ενώ ως θετικός μετασχηματισμένα κύτταρα με το φορέα PUC19.

Αντίστοιχα, το cDNA του γονιδίου *CrGST7* χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε διαδικασία PCR με χρήση εκκινητών (Πίνακας 5. 2) κατάλληλα διαμορφωμένων ώστε να ακολουθήσει υποκλωνοποίηση του γονιδίου σε πλασμιδιακό φορέα T7 pETite της εταιρίας Lucigen και μετασχηματισμός σε κύτταρα *E. coli* BL21 της ίδιας εταιρίας.. Τα θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για τις υγρές και στερεές καλλιέργειες ήταν το YT με δείκτη επιλογής το αντιβιοτικό καναμυκίνη (30 µg/ mL).

Από την παραπάνω διαδικασία αναπτύχθηκε ένας αριθμός αποικιών. Η ανάπτυξη των αποικιών πραγματοποιήθηκε, για *CrGST10*, σε υγρό θρεπτικό διάλυμα LB με δείκτη επιλογής το αντιβιοτικό αμπικιλίνη και, για *CrGST7*, σε υγρό θρεπτικό διάλυμα YT με δείκτη επιλογής το αντιβιοτικό καναμυκίνη. Ακολούθησε έλεγχος της έκφρασης των μετασχηματισμένων κυττάρων σε μικρή κλίμακα (§ 2.2.1.11) και προσδιορισμός της ενζυμικής δράσης με χρήση του υποστρώματος CDNB (§ 2.2.1.21). Ο κλώνος με το υψηλότερο επίπεδο έκφρασης απομονώθηκε, καθαρίστηκε το πλασμίδιο και αλληλουχήθηκε. Το πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό κυττάρων *E. coli* BL21 με σκοπό να μελετηθεί εκτενέστερα.

Πίνακας 5. 1: Στάδια της PCR αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκαν.

A. ΑΡΧΙΚΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ	
Στους 95 °C για 3 min	
B. ΚΥΚΛΟΣ	
Αποδιάταξη στους 95 °C για 1 min	30 κύκλοι
Υβριδισμός εκκινητών στους 45 °C για 1 min	
Επιμήκυνση στους 45 °C για 1 min	
Γ. ΤΕΛΙΚΗ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ	
Επιμήκυνση στους 72 °C για 10 min	

Πίνακας 5. 2: Αλληλουχία εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό την απομόνωση των γονιδίων *CrGST10* και *CrGST7* από cDNA βιβλιοθήκη *Chlamidomonas reinhardtii*.

Εκκινητές	Νουκλεοτιδική αλληλουχία (5'→3')
GST10F	ATGGCCCCCAAGCTGTATTAT
GST10R	TTACGCGTCTGGCCGGAACGC
GST7CIF	GAA GGA GAT ATA CAT ATG CCT CTC AAG CTG CAC
GST7CIR	GTG ATG GTG GTG ATG ATG TTA TCA GGG GTC AGG CTT GTA

5.3.2.2. ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΝΕΣΗ ΚΟΡΕΣΜΟΥ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ *CrGST10*

Για τη μεταλλαξογέννεση κορεσμού χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Quick Change PCR (§ 2.2.1.7) με σκοπό την εισαγωγή μεταλλάξεων στη θέση Tyr7 και Trp99 στο ένζυμο αγρίου τύπου *CrGST10*, το οποίο απομονώθηκε από τη μικροάλγη του γένους *Chlamidomonas*. Για το σκοπό αυτό, κατά το σχεδιασμό των εκκινητών το κωδικόνιο της Tyr9 αντικαταστάθηκε από το κωδικόνιο της φαινυλαλανίνης (Πίνακας 5. 3, A.) και το κωδικόνιο της Trp99 με την αλληλουχία NNN (όπου NNN αντιστοιχεί σε αλληλουχίες με όλους τους συνδυασμούς νουκλεοτιδίων) (Πίνακας 5. 3, B.). Οι

εκκινητές που σχεδιάστηκαν για τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Πίνακας 5. 3: Μεταλλαξογόνοι εκκινητές για την εισαγωγή μεταλλάξεων στο CrGST10.

Εκκινητές	Νουκλεοτιδική αλληλουχία (5'→3')
A.	
F Primer 15	5'-AAGCTGTATTTYTTTGCCATT-3'
R Primer 15	5'-AATGGCAAARAATACAGCTT-3'
B.	
F Primer 109	5'-CAGGACGTCNNNGATGCCACC-3'
R Primer 109	5'-GGTGGCATCNNNGACGTCCTG-3'

Η PCR που πραγματοποιήθηκε ήταν τελικού όγκου 50 μ L και περιείχε 8pmol από κάθε εκκινητή, 10 μ L από 5 x διαλύματος Pfu DNA πολυμεράσης, 1 μ L από 0,2 mM dNTPs, 1,6-2,4 ng πλασμιδιακό DNA αγρίου τύπου, 1 Unit Pfu DNA πολυμεράση και αποστειρωμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο. Το πρόγραμμα της PCR περιγράφεται στον **Πίνακα 5. 4** που ακολουθεί.

Πίνακας 5. 4: Στάδια της PCR αντίδρασης για την εισαγωγή μεταλλάξεων στη θέση Tyr7 και Trp99 του ενζύμου CrGST10.

A. ΑΡΧΙΚΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ	
Στους 95 °C για 2 min	
B. ΚΥΚΛΟΣ	
Αποδιάταξη στους 98 °C για 20 s	
<u>Υβριδισμός εκκινητών</u>	
40 °C για 30 s (Μετάλλαξη Tyr7)	25 κύκλοι
52 °C για 30s (Μετάλλαξη Trp99)	

Επιμήκυνση στους 72 °C για 2 min

Γ. ΤΕΛΙΚΗ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ

Επιμήκυνση στους 72 °C για 10 min

Το προϊόν της παραπάνω αντίδρασης PCR ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτική αгарόζης 1 % (w/v) και υποβλήθηκε σε πέψη με την ενδονουκλεάση *DpnI*. Η διαδικασία της πέψης πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 15 μL με περιεχόμενο: 12 μL προϊόν από την παραπάνω αντίδραση PCR, 1,5 μL *DpnI* (15 Units) και 1,5 μL από 10 x διάλυμα ενδονουκλεάσης. Ακολούθησε ήπια ανάδευση και επώαση στους 37 °C για 1 h. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε με αδρανοποίηση της ενδονουκλεάσης επωάζοντας το μίγμα στους 80 °C για 20 min. Στη συνέχεια έγινε μετασχηματισμός σε κύτταρα *E. coli* DH5α χρησιμοποιώντας το προϊόν της πέψης με *DpnI* σε αναλογία 12 μL / 100 μL κύτταρα. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας του μετασχηματισμού το υλικό στρώθηκε σε τρυβλίο με αμικικιλίνη (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και ακολούθησε επιλογή αποικιών για την απομόνωση μεταλλαγμένων κλώνων.

5.3.2.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ GSTs

Για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA των γονιδίων αγρίου τύπου και εκείνων που προέκυψαν από τη μεταλλαξογέννεση κορεσμού, χρησιμοποιήθηκε kit απομόνωσης από την QIAGEN, (UK) με σκοπό την επίτευξη της μέγιστης καθαρότητας για τη σωστή αλληλούχιση τους. Για εκ νέου απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης (§ 2.2.1.2.).

5.3.2.4. ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ CrGST7-7, CrGST10-10, ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ *E. coli* BL21 (DE3)

Πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός των κυττάρων *E. coli* BL21 (DE3) με το ανασυνδιασμένο DNA του πλασμιδίου pT7CrGST10 και pT7CrGST7 και στη συνέχεια η καλλιέργεια και η ανάπτυξη αυτών σε θρεπτικό υλικό LB και YT παρουσία του αντιβιοτικού αμικικιλίνη (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και καναμυκίνη (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) αντίστοιχα. Η επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων έγινε με τη χρήση του IPTG (1 mM), το οποίο ενσωματώθηκε στην υγρή καλλιέργεια μόλις η απορρόφηση στα 600 nm έφτασε 0,6. Η επώαση διήρκεσε 4 h και στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση στις

8000 rpm στους 4 °C για 20 min. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για την ετερόλογη έκφραση των μεταλλαγμένων μορφών του αγρίου τύπου CrGST10.

5.3.2.5. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ENZYMΩΝ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ BES-GSH ΚΑΙ S-HEXYL GSH

Για τον καθαρισμό των ενζύμων αγρίου τύπου (CrGST10 και CrGST7) και της μετάλλαξης Tyr7Phe που αφορά στο γονίδιο CrGST10, αρχικά πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων σε υπερήχους (5 επαναλήψεις των 10 s) με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος δισόξινου φωσφορικού καλίου (20 mM KH₂PO₄ pH 7) σε όγκο τριπλάσιο του αρχικού βάρους. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (13000 rpm για 10 min) και προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας (σύστημα GSH-CDNB) και του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου (μέθοδος Bradford, § 2.2.1.16) στο υπερκείμενο που προέκυψε.

Στη συνέχεια έγινε καθαρισμός των ενζύμων CrGST10 και CrGST7 σε στήλη με χρωματογραφία συγγένειας στον προσροφητή 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρας-GSH-Sepharose-CL6B (BES-GSH) (§ 2.2.1.14) και του ενζύμου που φέρει τη μετάλλαξη Tyr7Phe σε στήλη χρωματογραφίας συγγένειας με δεσμευτή την S-hexyl GSH (§ 2.2.1.14). Η καθαρότητα των εκλούσεων και το επίπεδο της πρωτεϊνικής έκφρασης ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (12,5 % και 14 % SDS-PAGE) υπό συνθήκες μετουσίωσης (§ 2.2.1.18).

5.3.2.6. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ENZYMΩΝ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ ΙΟΝΤΩΝ ΣΕ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ DEAE-SEPHAROSE

Για τον καθαρισμό των ενζύμων που φέρουν τις μεταλλάξεις Trp99Ala και Trp99Leu, χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων σε προσροφητή DEAE-Sepahrose (§ 2.2.1.15). Η καθαρότητα των εκλούσεων και το επίπεδο της πρωτεϊνικής έκφρασης ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (14 % SDS-PAGE) υπό συνθήκες μετουσίωσης (§ 2.2.1.18).

5.3.2.7. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ GSTs ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΟΦΙΛΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Πραγματοποιήθηκε φωτομετρικός προσδιορισμός δράσης GSTs με πιθανά υποστρώματα τα παράγωγα του 1-αλογονο-2,4-δινιτροβενζολίου (CDNB, FDNB,

BDNB, IDNB) (§ 2.2.1.21) και του fluorodifen (§ 2.2.1.27) (Skopelitou *et al.* 2011, Axarli *et al.*, 2009a). Για τη μελέτη δράσης ως προς υπεροξειδάση χρησιμοποιήθηκαν τα πιθανά υποστρώματα υπεροξειδίου (CuOOH, tert-BuOOH και benzoyl peroxide) (§ 2.2.1.22). Επίσης μελετήθηκαν οι ουσίες: 2,2 διθειοδιαιθανόλη (HED) (§ 2.2.1.23), διϋδροασκορβικό οξύ (§ 2.2.1.24), εθακρινικό οξύ (EA) (§ 2.2.1.25), trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2όνη (PBO) (§ 2.2.1.26), βρωμοσουλφοφθαλεΐνη (BSP) (§ 2.2.1.28), trans-2-ενάλης (HNE) (§ 2.2.1.29) και οι ισοθειοκυανικοί εστέρες (PEITC και AITC) (§ 2.2.1.30). Τα ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα διαλυτοποιήθηκαν σε αιθανόλη ή σε ακετόνη σε ένα εύρος τελικής συγκέντρωσης 2-5 % (v/v). Οι τιμές της καταλυτικής σταθεράς k_{cat} υπολογίστηκαν με δεδομένο την ύπαρξη ενός ενεργού κέντρου ανά υπομονάδα. Μια μονάδα (Unit) ενζυμικής δραστηριότητας ορίστηκε η ποσότητα εκείνη του ενζύμου που καταλύει την μετατροπή 1 μmol υποστρώματος ανά min. Η ειδική δραστηριότητα έχει εκφραστεί σε $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ πρωτεΐνης.

5.3.2.8. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ENZYMΩΝ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ

Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη του CrGST10 χρησιμοποιώντας τα υποστρώματα CDNB, PEITC και AITC στους 37 °C. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε σαν μεταβαλλόμενη συγκέντρωση η GSH με τελικό όγκο μίγματος στο 1mL. Η κυψελίδα περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M KH_2PO_4 pH 6,5, GSH διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,02-3 mM) και ένα από τα παρακάτω υποστρώματα:

- 1 mM CDNB
- 0,4 mM AITC
- 0,4 mM PEITC

Στη συνέχεια έγινε κινητική μελέτη με σταθερή τη συγκέντρωση γλουταθειόνης (2,5 mM) και μεταβαλλόμενες τις συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων:

- 0,05-2,5 mM CDNB
- 0,02-2 mM AITC
- 0,02-1 mM PEITC

Όσον αφορά το ένζυμο CrGST7, η κινητική μελέτη του πραγματοποιήθηκε ως προς τα υποστρώματα CDNB, PEITC, NBD-Cl, CuOOH στους 37 °C. Στην περίπτωση του συστήματος GSH-NBD-Cl, η κυψελίδα τελικού όγκου 1 mL περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M CH_3COONa pH 5 και:

- σταθερή συγκέντρωση GSH (0,5 mM) και μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις NBD-Cl (0,02-0,35 mM)
- σταθερή συγκέντρωση NBD-Cl (0,2 mM) και μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις GSH (0,01-1,5 mM)

Για το σύστημα GSH-CuOOH, στην κυψελίδα του 1 mL περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M KH₂PO₄ - 1 mM EDTA pH 7, 0,2 mM NADPH, 1 μL ρεδοκτάση της γλουταθειόνης (1 Units) και:

- σταθερή συγκέντρωση GSH (1mM) και μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις CuOOH (0,01-1,5 mM)
- σταθερή συγκέντρωση CuOOH (1,5 mM) και μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις GSH (0,08-1,5 mM)

Οι συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων CDNB και PEITC, ως σταθεροί παράγοντες των αντίστοιχων συστημάτων με γλουταθειόνη, παραμένουν σταθερές όπως αναλύθηκαν παραπάνω ενώ τα πλαίσια των συγκεντρώσεων της γλουταθειόνης καλύπτουν ένα εύρος 0,01-2,5 mM.

Η πειραματική διαδικασία ολοκληρώθηκε έπειτα από τρεις επαναλήψεις και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων. Η επεξεργασία έγινε με ανάλυση μη γραφικής παλινδρόμησης σύμφωνα με την εξίσωση των Michaelis-Menten στο πρόγραμμα Grafit 4 (Erithacus Software Ltd., Version 4) και GraphPad Prism 5. Στις περιπτώσεις που οι καμπύλες δεν συμφωνούν με την εξίσωση του Michaelis-Menten για την τιμή V_{max} , έγινε προσδιορισμός της τιμής $S_{0.5}$ ($S_{0.5}$ αποτελεί τη συγκέντρωση του υποστρώματος όπου η ταχύτητα είναι στο 50 % της V_{max} : $v=0.5V_{max}$). Ο συντελεστής Hill n_H υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση Hill:

Εξίσωση 5. 1: Εξίσωση Hill.

$$v = \frac{V_{max} [S]^{n_H}}{S_{0.5}^{n_H} + [S]^{n_H}}$$

5.3.2.9. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH ΣΤΗΝ ENZYMΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Η μελέτη εξάρτησης της ταχύτητας από το pH πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M KH₂PO₄ σε εύρος pH 5,5-8,5. Ο υπολογισμός των pH-εξαρτώμενων βαθμών ιονισμού έγινε με προσαρμογή των αποτελεσμάτων στην **Εξίσωση 5. 2:**

$$u = \frac{C}{1 + [H^+] / K_{a1} + K_{a2} / [H^+]}$$

Όπου u η ταχύτητα της αντίδρασης, C (pH-independent rate), $[H^+]$ η συγκέντρωση των ιόντων υδρογόνου, K_{a1} και K_{a2} οι σταθερές ιονισμού των όξινων και βασικών ειδών (ionization constants of the acid and base species). Οι τιμές pK_a υπολογίστηκαν από το πρόγραμμα GraFit (Erithacus Software Ltd.).

5.3.2.10. ΘΕΡΜΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ

Μελετήθηκε η θερμοσταθερότητα των ενζύμων CrGST7, CrGST10 και των μεταλλάξεων του τελευταίου της μορφής Trp99Leu και Trp99Ala σε εύρος που περιλάμβανε θερμοκρασίες από 30 °C έως 70 °C. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός σε χρωματογραφία συγγένειας (WT ένζυμα) και ιοντοανταλλαγής σε στήλη DEAE (Trp99Leu και Trp99Ala) με σκοπό την παραλαβή της καθαρής μορφής των παραπάνω. Η μελέτη της θερμικής σταθερότητας του CrGST7 πραγματοποιήθηκε σε μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασίας: 4 °C, 25 °C, 37 °C και 55 °C.

5.3.2.11. ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ

Πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός πρωτεϊνικών αλληλουχιών GSTs με υψηλή ομολογία. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με τον Δρ. Δ. Βλαχάκη. Τα δεδομένα των αλληλουχιών για CrGSTs και άλλων ειδών GSTs συλλέχθηκαν από τη βάση δεδομένων NCBI (National Center for Biotechnology Information) και Protein Data Bank (PDB) (Berman et al., 2000). Για τον σκοπό της παρούσας μελέτης δημιουργήθηκαν δύο ξεχωριστά σύνολα δεδομένων. Το πρώτο σύνολο δεδομένων αποτελείται από 30 GSTs, στο οποίο συμμετέχουν 15 CrGSTs (**Πίνακας 5. 5**) και 14 αντιπροσωπευτικά μέλη για κάθε μια από τις 14 γνωστές τάξεις GST. Στο δεύτερο σύνολο δεδομένων, 48 GSTs της *Sigma* τάξης συλλέχθηκαν από κρυσταλλογραφικές δομές ακτινών X, συμπεριλαμβανομένων των CrGST7 και CrGST10. Και τα δύο σύνολα δεδομένων ευθυγραμμίστηκαν χρησιμοποιώντας προοδευτικές μεθόδους. Η ευθυγράμμιση πολλαπλών αλληλουχιών εκτελέστηκε με το πρόγραμμα Jalview (Waterhouse et al., 2009) και τα διατηρημένα υπολείμματα έγιναν ορατά με ένα

λογότυπο-γράφημα (Parageorgiou et al., 2016) (**Εικόνα 5. 23**). Στη συνέχεια, η συνεχή πολλαπλή ευθυγράμμιση ακολουθίας ελέγχθηκε με ProtTest (Abascal et al., 2005), προκειμένου να εκτιμηθεί η καταλληλότερη μορφή του μοντέλου. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μια φυλογενετική ανάλυση με χρήση της μεθόδου UPGMA (Nei et al., 1983) και οπτικοποίηση με χρήση της μεθόδου MEGA (MEGA circle option). Οι Bootstrap αναλύσεις (100 ψευδο-επαναλήψεις) διεξήχθησαν για να δοκιμαστεί η αξιοπιστία των δέντρων (**Εικόνα 5. 1** και **5. 2**) που δημιουργήθηκαν.

Ο αλγόριθμος blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των καλύτερων κρυσταλλικών δομών για τη χρήση τους ως πρότυπα για τη μοριακή μοντελοποίηση (Berman et al., 2000). Η επιλογή των πρότυπων δομών για τα ένζυμα CrGST7 και CrGST10 στηρίχτηκε τόσο στην αμινοξική ομοιότητα όσο και σε δομικά κριτήρια, τα οποία αξιολογούν την τρισδιάστατη διαμορφωτική ποιότητα για κάθε PDB αρχείο (Parageorgiou et al., 2014). Η δομή GST από τον οργανισμό *Rattus norvegicus* (Kanaoka et al., 1997) (κωδικός PDB: 1PD2) επιλέχθηκε ως πρότυπο και για τα δύο ένζυμα (CrGST7 και CrGST10), καθώς αυτή η δομή πρωτεΐνης ανήκει στην ίδια τάξη GST και φαίνεται να ακολουθεί το ίδιο εξελικτικό μονοπάτι (μικρή εξελικτική απόσταση), με αποτέλεσμα να παρουσιάζει την υψηλότερη ομολογία και αμινοξική ομοιότητα. Οι μετρήσεις της ομοιότητας μεταξύ των αλληλουχιών επιβεβαίωσαν ότι θα πρέπει να ακολουθήσει μια προσέγγιση μοριακής μοντελοποίησης. Επειδή η C-τελική περιοχή δεν είναι συντηρημένη και εμφανίζονται διαγραφές και προσθήκες αμινοξικών καταλοίπων, παρουσιάζει δομικές διαφοροποιήσεις. Παρόλα αυτά, κατασκευάστηκαν 3D μοντέλα τα οποία είναι αξιόπιστα για τη N-τελική περιοχή, ενώ η C-τελική περιοχή θα πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή σε μελλοντικά *in silico* πειράματα.

Οι υπολογισμοί και οι οπτικές κατασκευές που έγιναν για τη μοριακή μοντελοποίηση πραγματοποιήθηκαν με χρήση του Molecular Operating Environment (MOE) (Vilar et al., 2008) έκδοσης 2013.08, λογισμικό που αναπτύχθηκε από την Chemical Group Computing (Montreal, Canada). Τα δύο μοντέλα των CrGSTs αρχικά τοποθετήθηκαν επάλληλα και στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Swiss Pdb viewer (4.1.0), ακολούθησε σύγκριση με τις πρότυπες δομές (Guex & Peitsch, 1997) (**Εικόνα 5. 21**). Επιπλέον, τα μοντέλα αξιολογήθηκαν ως προς τη γεωμετρία τους με το πρόγραμμα MOE και η απεικόνιση έγινε τους με το πρότυπο PROCHECK. Η συμβατότητα των δύο μοντέλων GSTs με τη δική τους αμινοξική αλληλουχία

εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Verify3D (Eisenberg et al., 1997). Για κάθε μοντέλο δημιουργήθηκε μια δομή, η οποία βασίστηκε στο 3D περιβάλλον και στη τοποθεσία (Vlachakis et al., 2013). Το αποτέλεσμα ήταν ότι κανένα αμινοξικό κατάλοιπο με κακή γεωμετρία δεν περιλήφθηκε στις δομικές και συντηρημένες περιοχές των GST μοντέλων που δημιουργήθηκαν. Επίσης, πραγματοποιήθηκε ελαχιστοποίηση της ενέργειας σε μια προσπάθεια να απομακρυνθούν τυχόν γεωμετρικά υπολείμματα, χρησιμοποιώντας το δυναμικό πεδίο Amber99 το οποίο περιλαμβάνεται στο MOE (Vilar et al., 2008). Τα μοντέλα στη συνέχεια ενυδατώθηκαν (SPC) σε οκτάεδρο δοχείο διαστάσεων 7 Å. Η μοριακή δυναμική πραγματοποιήθηκαν στα 300 K, στη 1 atm με 2 FS μέγεθος βήματος για 100ns, χρησιμοποιώντας το σύνολο NVT σε 1 κανονικό περιβάλλον (NVT σημαίνει ο αριθμός ατόμων, όγκου και της θερμοκρασίας που παραμένουν σταθερά σε όλη τη διάρκεια των υπολογισμών).

5.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

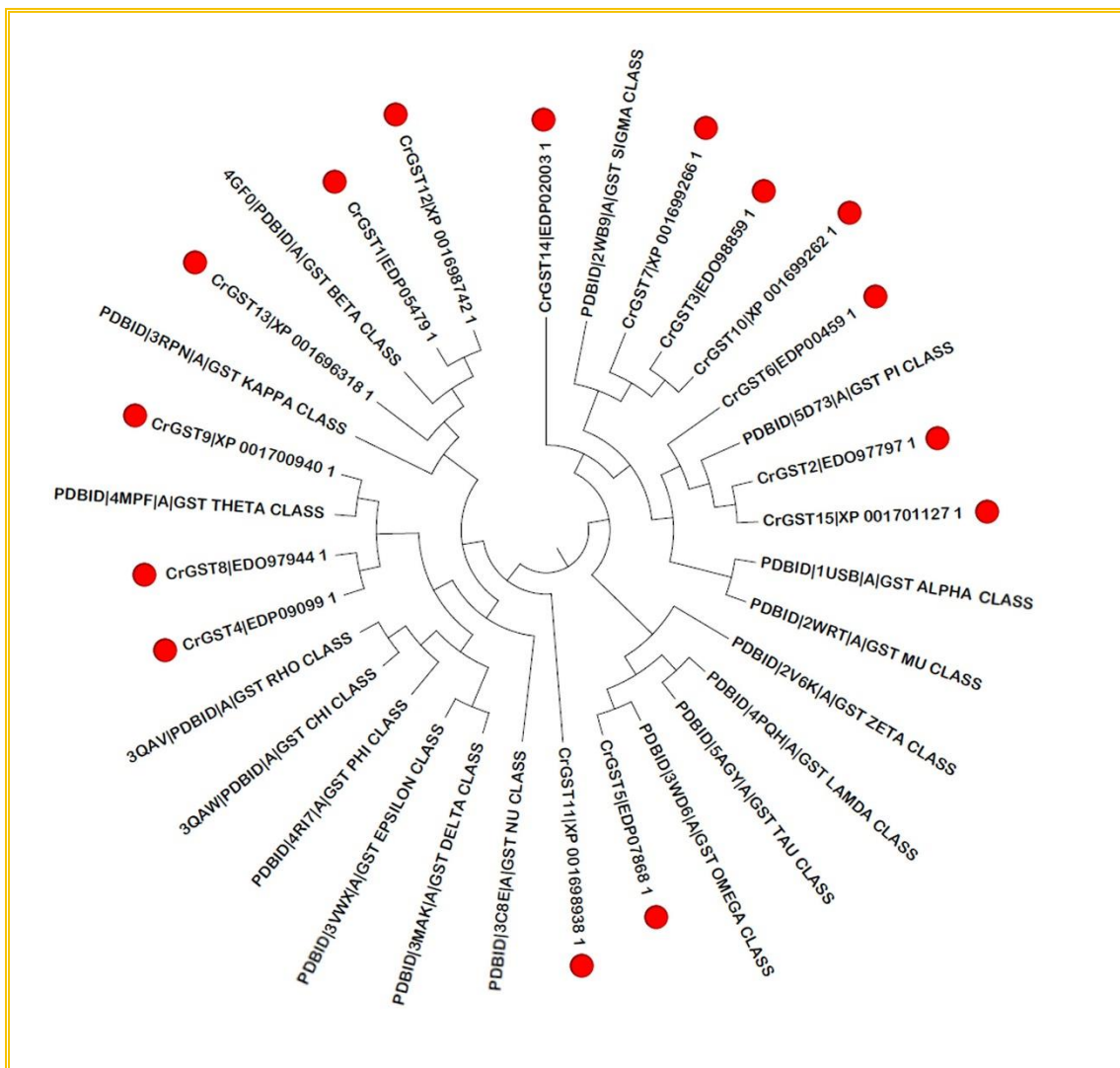
5.4.1. ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ENZYMΩΝ CrGST10 ΚΑΙ CrGST7

Με σκοπό τον προσδιορισμό των GST αλληλουχιών από το στέλεχος *Chlamidomonas reinhardtii*, ακολούθησε μελέτη βιοπληροφορικής ανάλυσης. Η βάση δεδομένων έδωσε 15 πιθανές GST πρωτεϊνικές αλληλουχίες (CrGSTs) που εμφανίζουν πολλά από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της συγκεκριμένης οικογένειας ενζύμων. Στον **Πίνακα 5. 5** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάκτησης στη βάση δεδομένων NEBI.

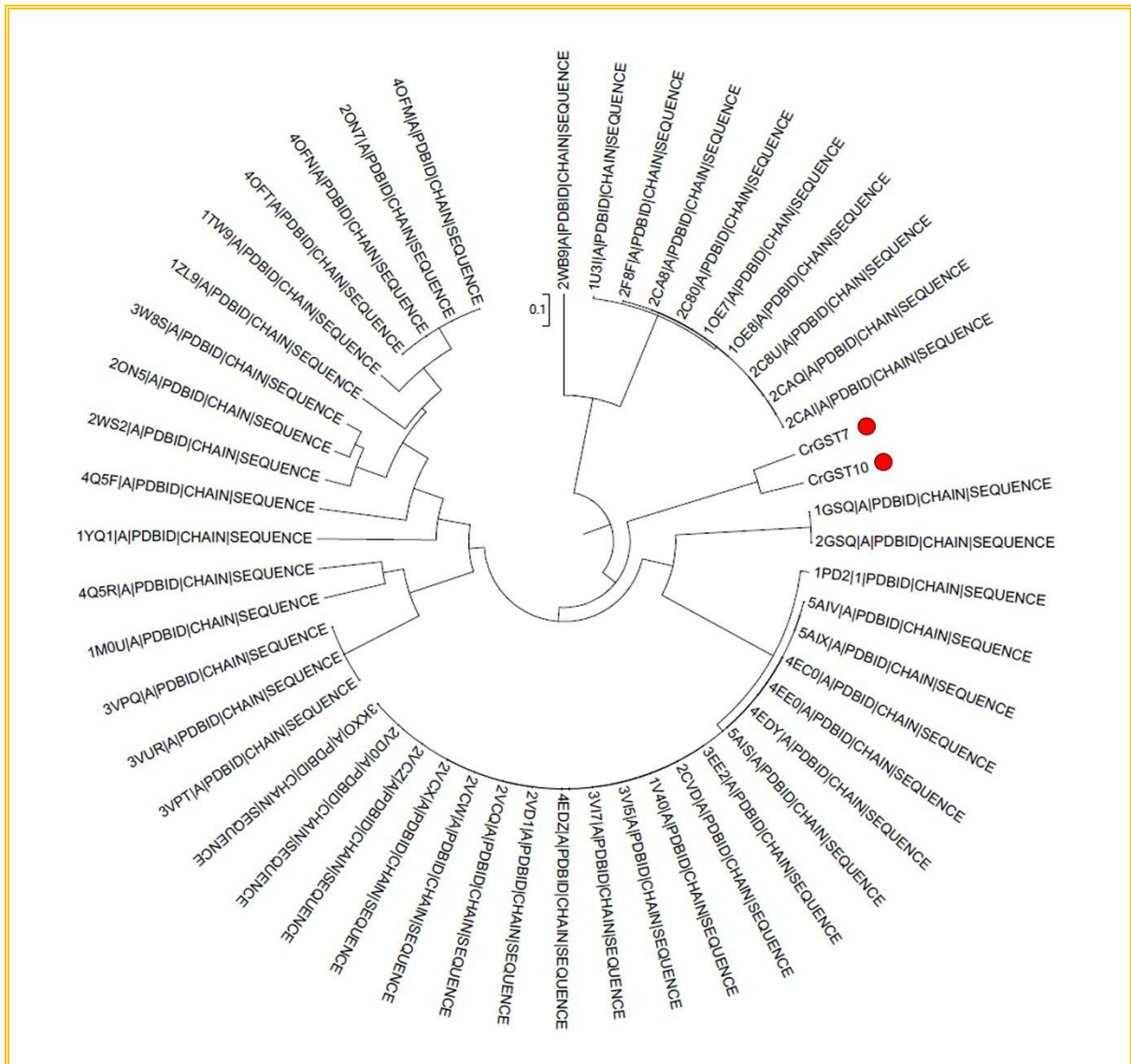
Πραγματοποιήθηκαν δύο φυλογενετικές αναλύσεις (ένα για κάθε σύνολο δεδομένων), ώστε να εξεταστεί η γενετική σχέση μεταξύ των CrGSTs και να γίνει εφικτό η περαιτέρω κατάταξη εντός των τάξεων της υπεροικογένειας GST (**Εικόνα 5. 1**). Στην **Εικόνα 5. 2** παρουσιάζεται το δεύτερο σύνολο δεδομένων που αφορά στη φυλογενετική ανάλυση των GSTs που σχετίζονται με τη *Sigma* τάξη. Στην **Εικόνα 5. 3** παρουσιάζεται η αμινοξική αλληλούχιση των GSTs που ανήκουν στη *Sigma* τάξη των GSTs. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ένζυμα CrGST7 και CrGST10 παρουσιάζουν μικρή ομοιότητα αλληλουχίας (**Εικόνα 5. 4**) όταν συγκρίνονται με αντίστοιχες GSTs της *Sigma* τάξης που εντοπίζονται σε θηλαστικά, έντομα και φυτά. Παρά όμως τη μικρή ομοιότητα που εμφανίζεται, η ευθυγράμμιση των GST αλληλουχιών έδειξε αρκετά συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα.

Πίνακας 5. 5: Η οικογένεια GST από *Chlamidomonas reinhardtii* (CrGSTs).

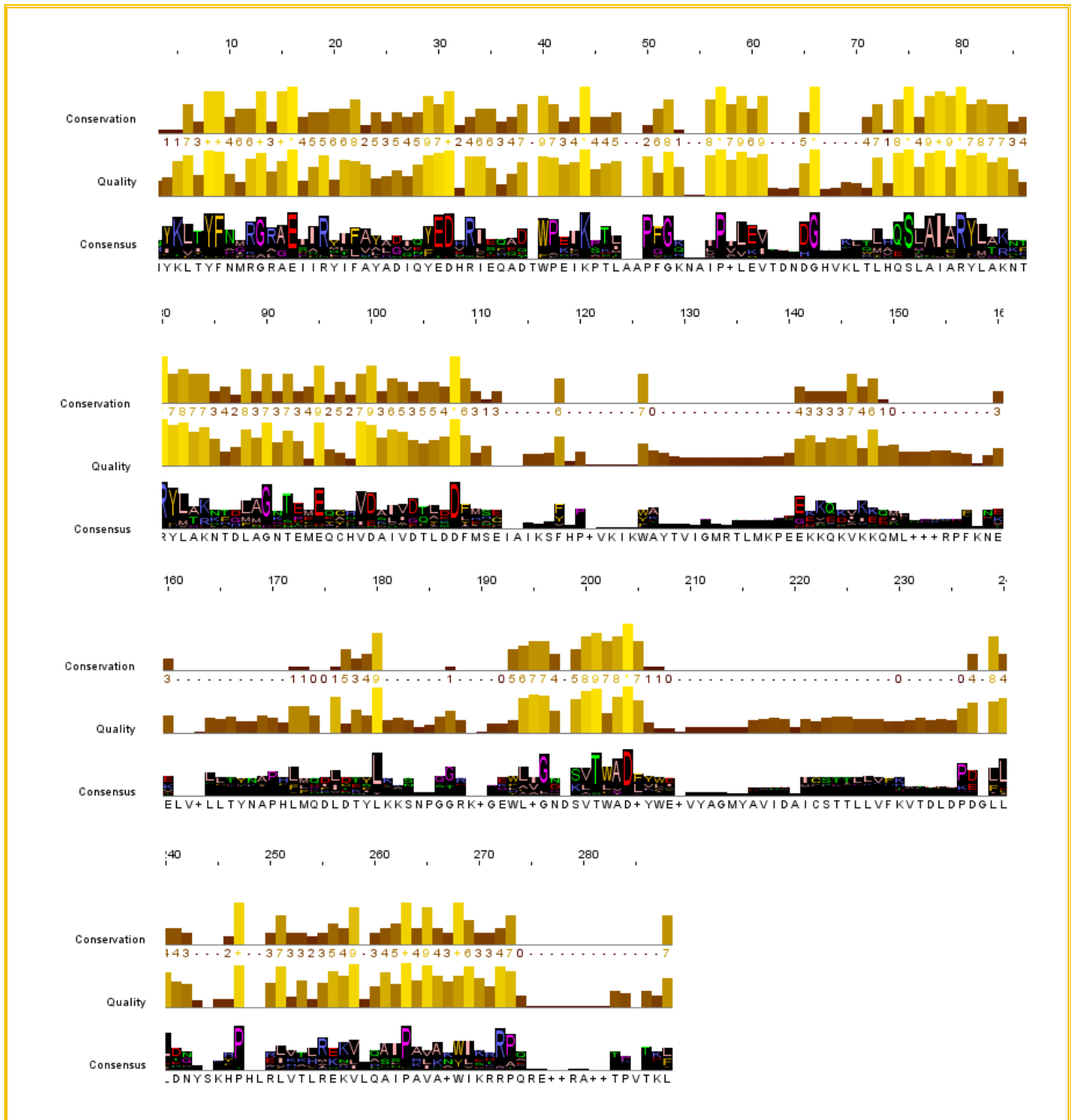
A/A	Αριθμός Πρόσβασης	Ένζυμο
1	EDP05479_1	CrGST1
2	EDO97797_1	CrGST2
3	EDO98859_1	CrGST3
4	EDP09099_1	CrGST4
5	EDP07868_1	CrGST5
6	EDP00459_1	CrGST6
7	XP_001699266_1	CrGST7
8	EDO97944_1	CrGST8
9	XP_001700940_1	CrGST9
10	XP_001699262_1	CrGST10
11	XP_001698938_1	CrGST11
12	XP_001698742_1	CrGST12
13	XP_001696318_1	CrGST13
14	EDP02003_1	CrGST14
15	XP_001701127_1	CrGST15



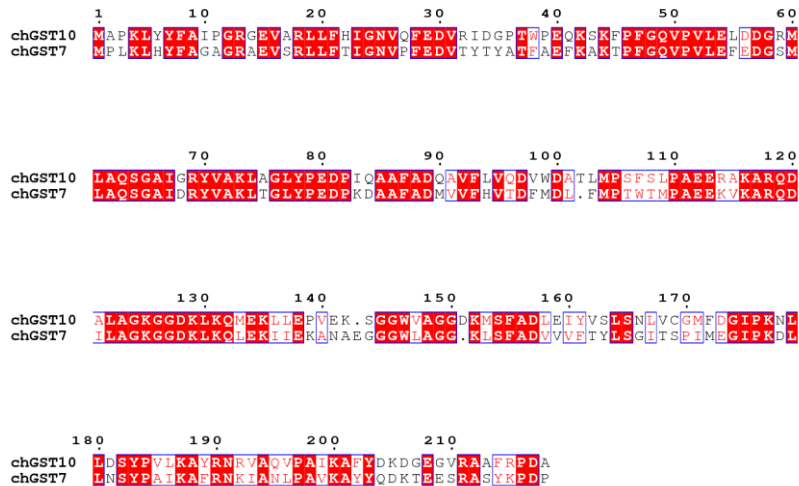
Εικόνα 5. 1: Φυλογενετική ανάλυση για το πρώτο σύνολο δεδομένων. Το δέντρο κατασκευάστηκε από Matlab Bioinformatics Toolbox και οπτικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την επιλογή MEGA circle. Η μέθοδος Jukes-Cantor χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό αποστάσεων μεταξύ των αλληλουχιών και η μέθοδος UPGMA (Unweighted Pair Group Method Average) για τη σύνδεση των κόμβων του δένδρου.



Εικόνα 5. 2: Η φυλογενετική ανάλυση των GSTs που σχετίζονται με τη *Sigma* τάξη (Δεύτερο σύνολο δεδομένων). Το δέντρο κατασκευάστηκε από Matlab Bioinformatics Toolbox και οπτικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την επιλογή MEGA circle. Η μέθοδος Jukes-Cantor χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό αποστάσεων μεταξύ των αλληλουχιών και η μέθοδος UPGMA (Unweighted Pair Group Method Average) για τη σύνδεση των κόμβων δένδρου.



Εικόνα 5. 3: Η συναινετική αλληλουχία (consensus sequence) βασισμένη στην πολλαπλή ευθυγράμμιση αλληλουχιών των ενζύμων που σχετίζονται με τη *Sigma* τάξη των GST (δεύτερο σύνολο δεδομένων) και σε παραμέτρων όπως η ποιότητα και η συντήρηση των αμινοξέων. Η consensus αλληλουχία διεξήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Jalview.



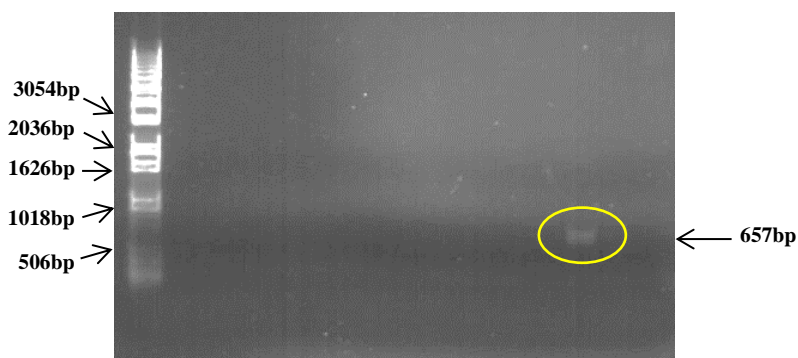
Εικόνα 5. 4: Αμινοξική του αλληλουχία των δύο ενζύμων *CrGST10* και *CrGST7* από *Chlamidomonas reinhardtii* σε μορφή στοίχισης μέσω του προγράμματος ClustalW.

5.4.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ *CrGST10* ΚΑΙ *CrGST7* ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΟ ΦΟΡΕΑ PEXP-5 CT/ΤΟΡΟ® ΚΑΙ pETit ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ

Τα αποτελέσματα της νουκλεοτιδικής αλληλούχισης (**Εικόνα 5. 4**) έδειξαν ότι το ένζυμο *CrGST10* αποτελείται από 657 bp, κωδικοποιώντας ένα πολυπετίδιο 218 αμινοξέων. Το μοριακό βάρος είναι 24895,83 και το ισοηλεκτρικό σημείο pI 5,34. Για το ένζυμο *CrGST7* τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αποτελείται από 654bp και κωδικοποιούν πολυπετίδιο των 217 αμινοξέων, έχοντας μοριακό βάρος 23937,54 και ισοηλεκτρικό σημείο pI 5,52.

Απομόνωση γονιδίου *CrGST10-10*

Τέσσερις βιβλιοθήκες cDNA (Lab A, B, C, D) χρησιμοποιήθηκαν από κύτταρα μικροάλγης *Chlamidomonas reinhardtii* (στα μέσα της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης) αναπτυγμένα σε διαφορετικά θρεπτικά διαλύματα: TAP θρεπτικό διάλυμα στο φως (Lab A) και στο σκοτάδι (Lab B), σε HS θρεπτικό διάλυμα παρουσία 5% CO₂ (Lab C) και σε φυσιολογικά επίπεδα CO₂ (Lab D). Κάθε βιβλιοθήκη ήταν ενσωματωμένη σε βακτηριοφάγο Lambda ZAP II. Συγκεκριμένα έγινε σάρωση της κάθε βιβλιοθήκης με 10 αντιδράσεις PCR στη σειρά. Το προϊόν που προέκυψε αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v) (**Εικόνα 5. 5**).

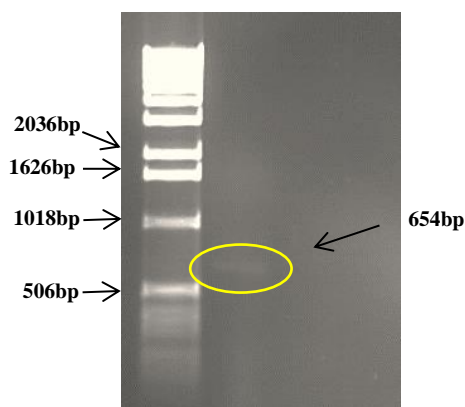


Εικόνα 5. 5: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR που προέκυψαν από τη σάρωση μιας βιβλιοθήκης σε πηκτή αгарόζης [1% (w/v)]. Σκοπός ήταν η ανίχνευση του γονιδίου *CrGST10* χρησιμοποιώντας τους εκκινητές GST10F και GST10R. Ως δείκτης μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο 1 Kb DNA ladder (Invitrogen).

Στη συνέχεια ακολούθησε η εισαγωγή του γονιδίου *CrGST10* σε πλασμιδιακό φορέα T7 pEXP-5 CT/TA-TOPO® και μετασχηματισμός των κυττάρων *E. coli* Turbo με το ανασυνδιασμένο γονίδιο. Ακολούθησε η επίστρωση αυτών σε τρυβλία petri με θρεπτικό μέσο LB/άγαρ και ως δείκτης επιλογής το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (100 µg/mL). Από αυτή τη διαδικασία προέκυψαν αποικίες από τις οποίες επιλέχθηκε εκείνη με την καλύτερη καταλυτική δραστηριότητα, το πλασμιδιακό DNA της οποίας αλληλουχήθηκε για την επιβεβαίωση του γονιδίου.

Απομόνωση γονιδίου *CrGST7*

Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε για την απομόνωση του γονιδίου *CrGST7* και την κλωνοποίησή του σε πλασμιδιακό φορέα διαφοροποιήθηκε στα εξής σημεία: οι συνθήκες αντίδρασης PCR ήταν διαφορετικές λόγω χρήσης διαφορετικής πολυμεράσης (KAPA HiFi), η κλωνοποίηση πραγματοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα T7 pETite της εταιρίας Lucigen και μετασχηματισμός σε κύτταρα *E. coli* BL21 της ίδιας εταιρίας και τέλος, το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για τις ανάγκες του πειράματος ήταν το YT με δείκτη επιλογής το αντιβιοτικό καναμυκίνη (30µg/mL).



Εικόνα 5. 6: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος της αντίδρασης PCR σε πηκτή αγαρόζης [1 % (w/v)] για την ανίχνευση του γονιδίου *CrGST7* χρησιμοποιώντας τους primers GST7F και GST7R. Ως δείκτης μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο 1 Kb DNA ladder (Invitrogen).

5.4.3. ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ENZYMΩΝ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ *CrGST10* και *CrGST7*

Αρχικά πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός των εκφραστικών κυττάρων *E. coli* BL21 (DE3) με τα πλασμιδιακά DNA pT7*CrGST10* και pT7*CrGST7* και ακολούθησε έκφραση στους 37 °C παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού και του προαγωγέα IPTG. Ακολούθησε διαπίδυση του ακατέργαστου εκχυλίσματος που προέκυψε μετά τη λύση των κυττάρων και φόρτωση αυτού σε προσροφητή χρωματογραφίας συγγένειας. Στον **Πίνακα 5. 6** παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης των ενζύμων *CrGST10* και *CrGST7* καθώς και η ειδική δραστηριότητα χρησιμοποιώντας το υπόστρωμα CDNB, ενώ στον **Πίνακα 5. 7** τα αποτελέσματα του καθαρισμού των ακατέργαστων εκχυλισμάτων με χρωματογραφία συγγένειας και δεσμευτή τη BES-GSH.

Πίνακας 5. 5: Επίπεδα έκφρασης των ισοενζύμων και η ειδική δραστηριότητα των ακατέργαστων εκχυλισμάτων.

Ισοένζυμο	Κυτταρική ποσότητα g/ 500mL καλλιέργειας	Ειδική δραστηριότητα (Units/mg)
<i>CrGST10</i>	0.76	5.3
<i>CrGST7</i>	1.123	13.4

Παρατηρούμε ότι η ειδική δραστηριότητα του ακατέργαστου εκχυλίσματος για *CrGST7* είναι σχεδόν 3 φορές μεγαλύτερη (13,4 Units/ mg) με την αντίστοιχη του *CrGST10* που εμφανίζεται στα 5,3 Units/ mg. Επίσης, η κυτταρική ποσότητα που

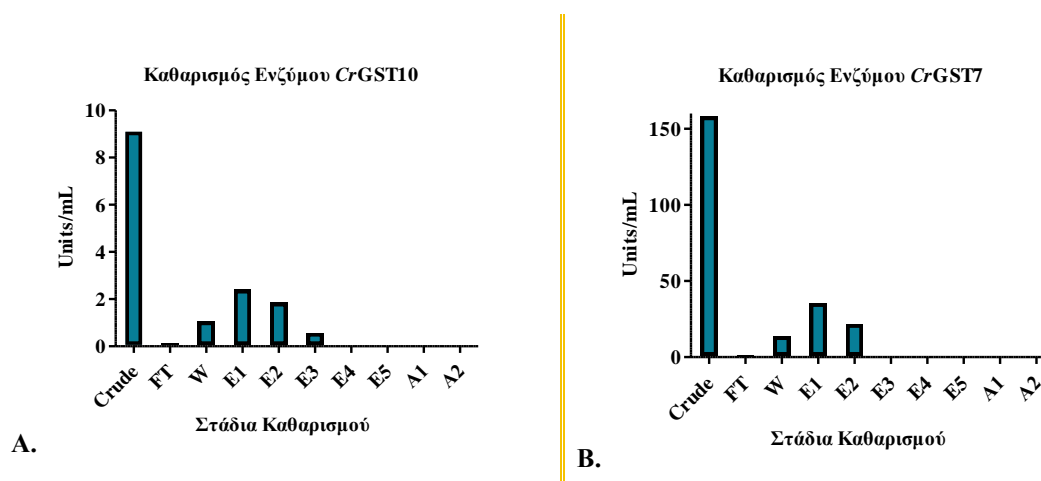
προέκυψε από την έκφραση των ενζύμων είναι 0,76 και 1,123 g/ 500mL καλλιέργειας για CrGST10 και CrGST7 αντίστοιχα.

Πίνακας 5. 6: Αποτελέσματα από τη χρωματογραφία συγγένειας για τα ένζυμα CrGST10 και CrGST7.

Ισοένζυμο	Απόδοση Καθαρισμού %	Καθαρισμός	Ειδική δραστηριότητα (Units/ mg)
CrGST10	40,9	4,26	22,6
CrGST7	22,4	2,61	20,46

Οι αποδόσεις των καθαρισμών εμφανίζουν διαφορές, με μεγαλύτερη να εμφανίζεται για CrGST10 (40,9 %) ενώ για CrGST7 η απόδοση είναι 22,4 %. Το ένζυμο CrGST10 καθαρίστηκε 4,26 φορές ενώ το CrGST7 2,61 φορές. Τέλος, η καθαρή μορφή των ενζύμων με την οποία ολοκληρώθηκε η παρούσα μελέτη παρουσιάζουν παραπλήσια ειδική δραστηριότητα ως προς CDNB.

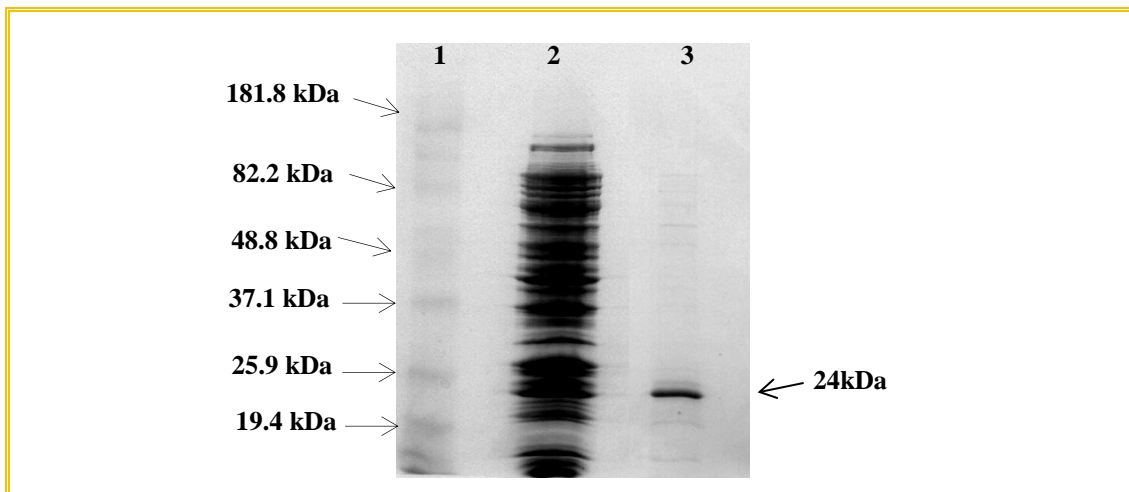
Αναλυτικά στην **Εικόνα 5. 7** παρουσιάζονται σε σχεδιάγραμμα οι καθαρισμοί των δύο ισοενζύμων (CrGST10 και CrGST7) όπως αυτά προέκυψαν από τις διαδικασίες που προαναφέρθηκαν παραπάνω. Επίσης, στην **Εικόνα 5. 8** και **5. 9** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών.



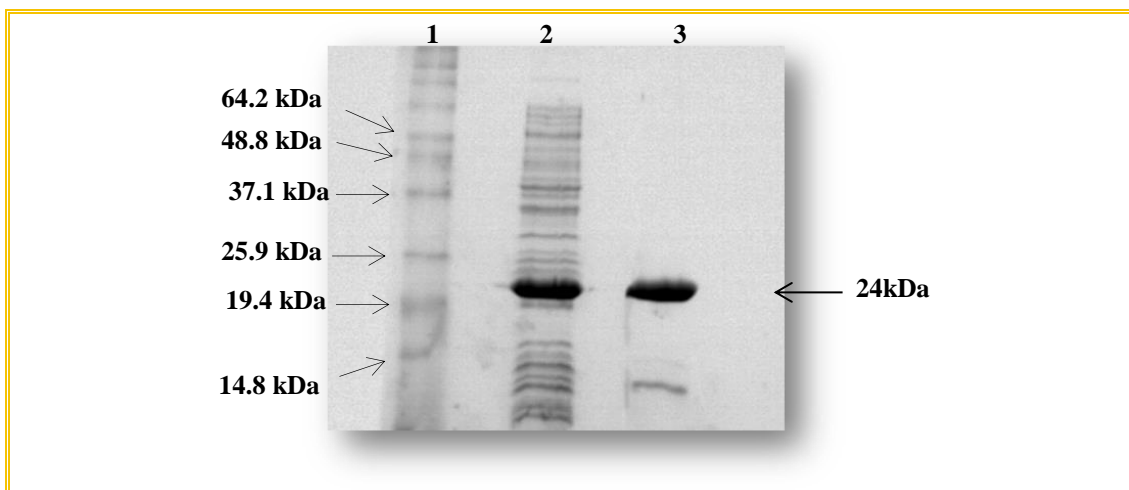
Εικόνα 5. 7: Χρωματογράφημα καθαρισμού των ενζύμων A. CrGST10 και B. CrGST7 σε στήλη χρωματογραφία συγγένειας τον προσροφητή 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρας-GSH-Sepharose-CL6B (BES-GSH). Crude: Ακατέργαστο εκχύλισμα A. CrGST10-10 και B. CrGST7-7. FT: Έκλυση αδέσμευτων μορίων που προέρχονται από το ακατέργαστο εκχύλισμα (Flow Through). W: Έκπλυση της στήλης συγγένειας με ρυθμιστικό διάλυμα για την απομάκρυνση αδέσμευτων μορίων που προέρχονται από το ακατέργαστο εκχύλισμα (Washes). E1-E5: Σταδιακή έκλυση της επιθυμητής πρωτεΐνης η οποία τυπικά είχε προσροφηθεί στη στήλη με ρυθμιστικό διάλυμα που εξασθενεί την ισχύ

αναγνώρισης με τον προσροφητή. A1-A2: Αναγέννηση του προσροφητή BES-GSH για τυχόν υπολείμματα δεσμευμένων μορίων-ενζύμων.

Παρατηρούμε ότι η καλύτερη έκλουση για τα *CrGST10* και *CrGST7* αποτελεί η E1 με ενζυμική δραστηριότητα να υπολογίζεται 22,6 και 20,6 Units/ mg αντίστοιχα.



Εικόνα 5. 8: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (12,5 % πολυακρυλαμίδιο) παρουσία SDS και σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970) για το ένζυμο *CrGST10*. Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με χρώση με Coomassie Brilliant BlueR-250. **Θέση 1:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα του μάρτυρα. **Θέση 2:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα ακατέργαστου εκχυλίσματος μετασχηματισμένων κυττάρων που φέρουν το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο *CrGST10*. **Θέση 3:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα του καθαρού ενζύμου *CrGST10* που παραλήφθηκε μετά από χρωματογραφία συγγένειας.

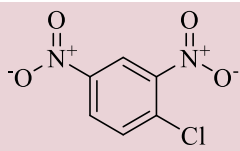
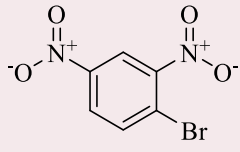
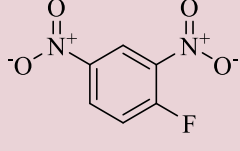
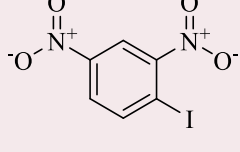
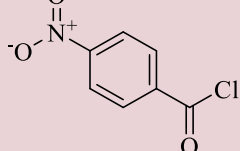

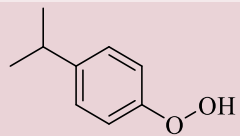


Εικόνα 5. 9: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (14 % πολυακρυλαμίδιο) παρουσία SDS και σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970) για το ένζυμο *CrGST7*. Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με χρώση με Coomassie Brilliant BlueR-250. **Θέση 1:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα του μάρτυρα. **Θέση 2:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα ακατέργαστου εκχυλίσματος μετασχηματισμένων κυττάρων που φέρουν το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο *CrGST7*. **Θέση 3:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα του καθαρού ενζύμου *CrGST7* που παραλήφθηκε μετά από χρωματογραφία συγγένειας.

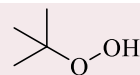
5.4.4. ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ CrGST10 ΚΑΙ CrGST7 ΩΣ ΠΡΟΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ GSTs

Ακολούθησαν φωτομετρικές δοκιμές με σκοπό τη μελέτη της εκλεκτικότητας των ενζύμων χρησιμοποιώντας διαφορετικά υποστρώματα. Ο Πίνακας 5. 8 παρουσιάζει το πλήθος των υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν και τη χημική δομή αυτών. Στην Εικόνα 5. 10 και στον Πίνακα 5. 9 φαίνονται τα αποτελέσματα προσδιορισμού της ειδικής δραστηριότητας των CrGST10 και CrGST7 ως προς τα διαφορετικά υποστρώματα.

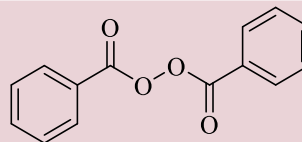
Πίνακας 5. 7: Η ονομασία και η δομή των επιλεγμένων υποστρωμάτων GST που μελετήθηκαν.

Υποστρώματα	Δομή
1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB)	
1-βρωμο-2,4-δινιτροβενζόλιο (BDNB)	
1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο (FDNB)	
1-ιοδω-2,4-δινιτροβενζόλιο (IDNB)	
π-νιτροβενζυλ-χλωρίδιο (PNBC)	
4-χλωρο-7-νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο (NBD-chl)	
υδροϋπεροξειδίου του κουμενίου (CuOOH)	

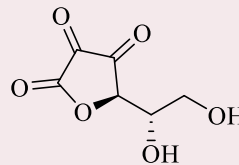
τ-βουτυλο-υδροϋπεροξειδιο (tBuOOH)



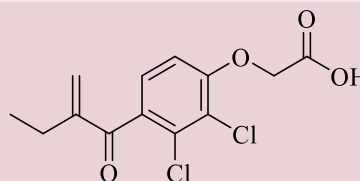
βενζοϊκό υδροϋπεροξειδιο



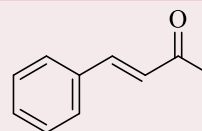
διϋδροασκορβικό οξύ (DHA)



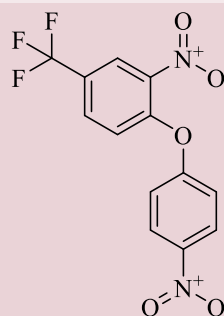
εθακρινικό οξύ (EA)



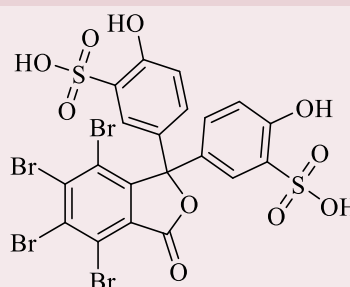
trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη (PBO)



Fluorodifen



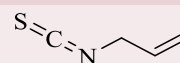
βρωμοσουλφοφθαλεΐνη (BSP)



trans-2-ενενάλη

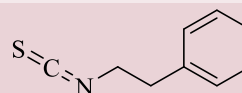


ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας



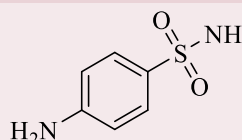
(AITC)

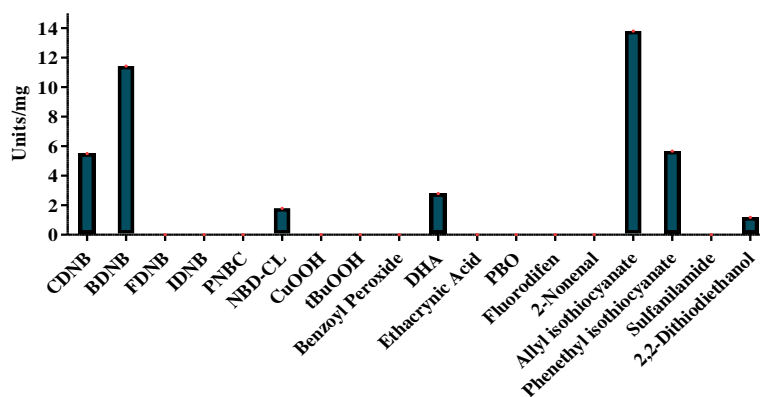
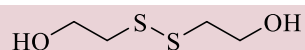
ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλ-εστέρας



(PEITC)

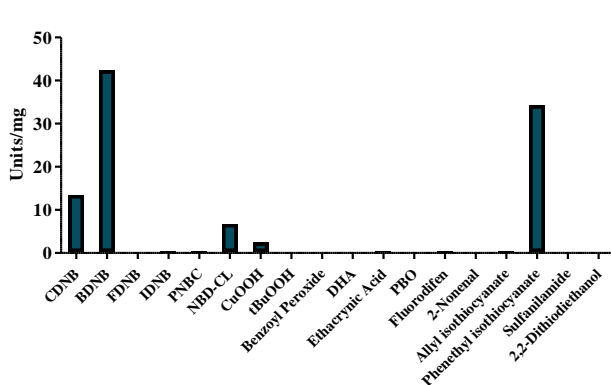
Σουλφανιλαμίδη



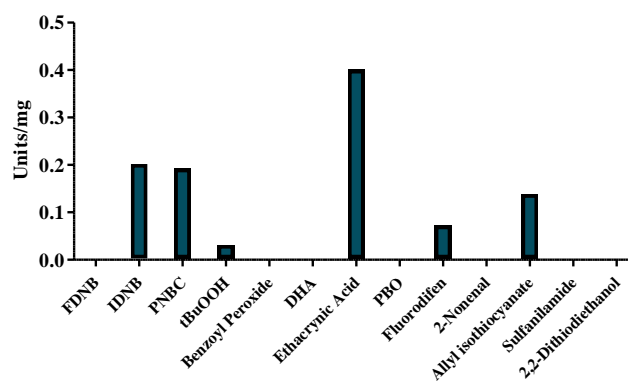


A.

Υποστρώματα



Υποστρώματα








Υποστρώματα

B.

Εικόνα 5. 10: Γραφική απεικόνιση της ειδικής δραστηριότητας των ενζύμων **A.** *CrGST10* και **B.** *CrGST7* ως προς επιλεγμένα υποστρώματα GST.

Ακολουθεί συγκεντρωτικός πίνακας με τα αποτελέσματα της ειδικής δραστηριότητας για *CrGST10* και *CrGST7* για τα διάφορα υποστρώματα. Το ένζυμο *CrGST10* καθαρίστηκε 4,26 φορές ενώ το *CrGST7* 2,61 φορές.

Πίνακας 5. 8: Γραφική απεικόνιση της ειδικής δραστηριότητας των ενζύμων **A.** CrGST10 και **B.** CrGST7 ως προς επιλεγμένα υποστρώματα GST.

Υποστρώματα	CrGST10 (Units/ mg)	CrGST7 (Units/ mg)
1-γλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB)	5,51	13,4
1-βρωμο-2,4-δινιτροβενζόλιο (BDNB)	11,43 	42,27 
1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο (FDNB)	MA	MA
1-ιοδω-2,4-δινιτροβενζόλιο (IDNB)	MA	0,202
π-νιτροβενζυλ-γλωρίδιο (PNBC)	MA	0,192
4-γλωρο-7-νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο (NBD-chl)	1,799	6,695 
υδροϋπεροξειδίο του κουμενίου (CuOOH)	MA	2,34
τ-βουτυλο-υδροϋπεροξειδίο (tBuOOH)	MA	0,031
βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίο	MA	MA
διϋδροασκορβικό οξύ (DHA)	2,79	MA
εθακρινικό οξύ (EA)	MA	0.4
trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη (PBO)	MA	MA
Fluorodifen	MA	MA
βρωμοσουλφοφθαλεΐνη (BSP)	MA	MA
trans-2-ενενάλη	MA	MA
ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας (AITC)	13,8 	0,138
Ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλ-εστέρας (PEITC)	5,67	34,2 
Σουλφαναμίδη	MA	MA
2,2-διθειοδιαθανόλη	1,176	MA

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και τα δυο ένζυμα καταλύουν ένα εύρος αντιδράσεων παρουσιάζοντας διαφορετική όμως εξειδίκευση ως προς τα επιλεγμένα υποστρώματα, με το CrGST7 να καταλύει μεγαλύτερο εύρος ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων σε σύγκριση με το ChGST10 (Πίνακας 5. 9). Συγκεκριμένα, το CrGST10 εμφάνιζε ενζυμική δραστηριότητα ως προς 7 μόνο ηλεκτρονιόφιλα υπόστρωματα, περιλαμβανομένου τις αλογονούχες αρωματικές ενώσεις (CDNB, BDNB, NBD-Chl). Καμία ανιχνεύσιμη δραστηριότητα δεν εντοπίστηκε ως προς τα α-β-ακόρεστα καρβονύλια και τα οργανικά υδροϋπεροξειδία, όπως υδροϋπεροξειδίο του κουμενίου, τ-βουτυλ-υδροϋπεροξειδίο και υπεροξειδίο του βενζολίου. Από την άλλη πλευρά,

υψηλή δραστηριότητα παρατηρήθηκε έναντι οργανικών ισοθειοκυανικών ενώσεων όπως το ισοθειοκυανικό αλλύλιο (AITC) και ισοθειοκυανικό φαιναιθύλιο (PEITC).

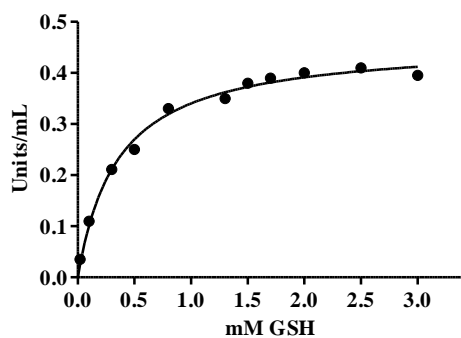
Αναλυτικότερα, ιδιαίτερη προτίμηση φαίνεται να εμφανίζεται ως προς τις αλογονομένες αρωματικές ενώσεις CDNB (5,51 και 13,4 Units/ mg), BDNB (11,43 και 42,27 Units/ mg), τα ισοθειοκυανικά AITC (13,8 και 0,138 Units/ mg) και PEITC (5,67 και 34,2 Units/ mg) για *CrGST10* και *CrGST7* αντίστοιχα. Για το *CrGST7* ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εξειδίκευσή του ως προς το υπόστρωμα υπεροξειδίου του κουμηνίου (CuOOH) με ειδική δραστηριότητα ίση με 2,34 Units/ mg. Επιπρόσθετα, το ένζυμο *CrGST7* φαίνεται να εμφανίζει δράση με υποστρώματα με τα οποία το *CrGST10* δεν εμφανίζει. Τέτοιου είδους υποστρώματα είναι το Fluorodifen, το *tert*-βουτυλο-υδροϋπεροξειδίου (tBuOOH) το εθακρινικό οξύ (EA) και το π-νιτροβενζυλ-γλωρίδιο (PNBC).

5.4.5. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ *CrGST10* ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ CDNB, PEITC ΚΑΙ AITC

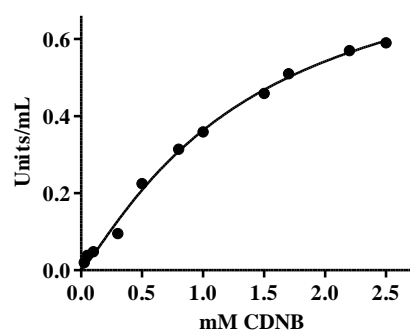
Η ενζυμική κινητική μελετά τους παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης, η μελέτη της οποίας δίνει πολλά συμπεράσματα για το μηχανισμό της αντίδρασης, τη σειρά με την οποία τα υποστρώματα ενώνονται ή απομακρύνονται από το ένζυμο και τη χημική φύση του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος. Με τη μέθοδο αυτή υπολογίζονται επίσης βασικές κινητικές σταθερές και από αυτές γίνεται η εκτίμηση για την ενδοκυτταρική συγκέντρωση διαφόρων μεταβολιτών, τη φυσιολογική φορά κάθε αντίδρασης καθώς και για τους *in vivo* ρυθμιστές των ενζυμικών αντιδράσεων (Clonis, 1997).

Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη του ενζύμου *CrGST10* ως προς τα υποστρώματα CDNB/GSH (Εικόνα 5. 11), AITC/GSH (Εικόνα 5. 12) και PEITC/GSH (Εικόνα 5. 13) στους 37 °C και προσδιορίστηκαν οι τιμές k_{cat} και K_m (Πίνακας 5. 10).

1.

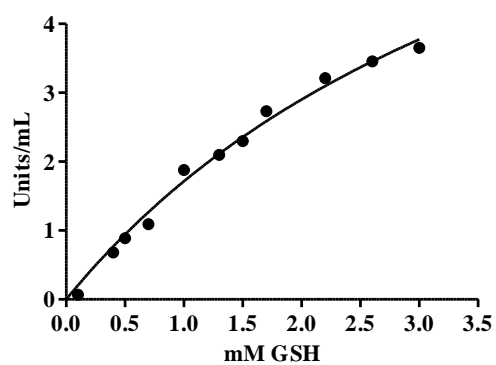


2.

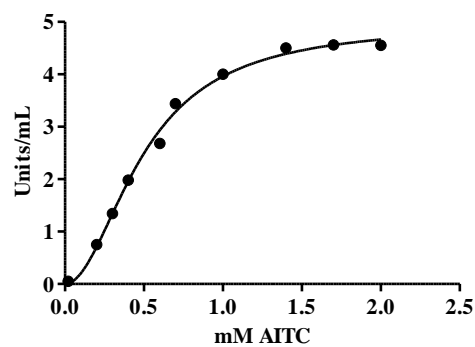


Εικόνα 5. 11: 1. Κινητική ανάλυση του ενζύμου *CrGST10* έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα τη GSH (0,02-3 mM). 2: Κινητική ανάλυση του ενζύμου *CrGST10* έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το CDNB (0,05-2,5 mM).

1.

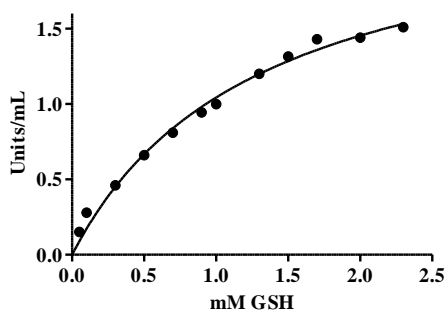


2.

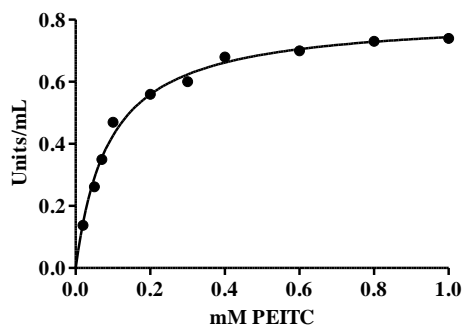


Εικόνα 5. 12: 1. Κινητική ανάλυση του ενζύμου *CrGST10* έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα τη GSH (0,01-3 mM). 2. Κινητική ανάλυση του ενζύμου *CrGST10* έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το AITC (0,02-2 mM).

1.



2.



Εικόνα 5. 13: 1. Κινητική ανάλυση του ενζύμου CrGST10 έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα GSH (0,05-2,3 mM). **2:** Κινητική ανάλυση του ενζύμου CrGST10 έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το PEITC (0,02-1 mM).

Πίνακας 5. 9: Αποτελέσματα της κινητικής ανάλυσης του ενζύμου CrGST10 ως προς τα συστήματα GSH/CDNB, GSH/AITC, GSH/PEITC.

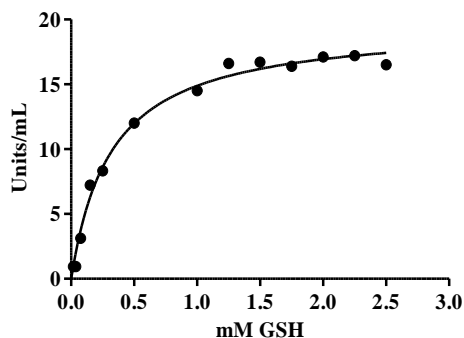
	K_m or $S_{0,5}$ (mM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$)	n_H
GSH/CDNB				
GSH	0,32 ± 0,03	8,15 ± 1,12	25,5	-
CDNB	1,41 ± 0,37		-	1,19 ± 0,14
GSH/AITC				
GSH	4,52 ± 0,91	55,6 ± 7,8	12,3	
AITC	9,19 ± 0,04		-	2,30 ± 0,20
GSH/PEITC				
GSH	1,29 ± 0,17	28,3 ± 1,78	21,9	-
PEITC	0,09 ± 0,01		314,4	-

Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Όσον αφορά το σύστημα GSH/CDNB και GSH/AITC (**Εικόνα 5. 11** και **5. 12**), παρατηρούμε ότι έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το CDNB και AITC, το ένζυμο δεν ακολουθεί την κλασική κινητική Michaelis-Menten. Παρατηρείται σιγμοειδής εξάρτηση του υποστρώματος εκφράζοντας θετική συνέργεια μεταξύ των δύο Η-θέσεων της συντηρημένης περιοχής του ομοδιμερούς ενζύμου (n_H : 1,19 ± 0,14 και 2,30 ± 0,20 αντίστοιχα). Από την άλλη, όταν χρησιμοποιήθηκε ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα τη GSH, η εξάρτηση παρουσίασε υπερβολή που ακολουθεί την εξίσωση των Michaelis-Menten. Ως προς το σύστημα GSH/ PEITC (**Εικόνα 5. 13**) η κινητική συμπεριφορά ακολουθούσε αυτή των Michael-Menten. Η τιμή K_m μας έδειξε ότι για τα συστήματα GSH/ CDNB και GSH/ AITC το ένζυμο παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια ως προς το υπόστρωμα της γλουταθειόνης, ενώ για το GSH/PEITC χαμηλότερη K_m παρουσιάζεται για το ηλεκτρονιόφιλο υπόστρωμα PEITC. Υψηλότερη σταθερά εξειδικεύσεως k_{cat}/K_m ως προς τη GSH παρουσίασε το σύστημα PEITC.

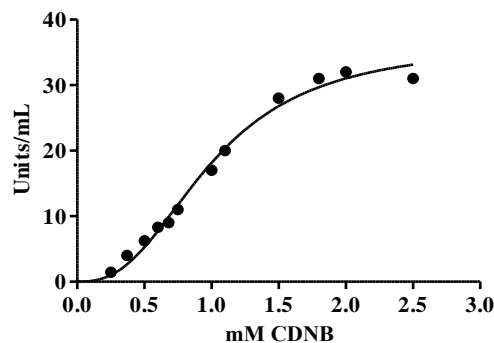
5.4.6. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ CrGST7 ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ CDNB, NBD-Cl, CuOOH ΚΑΙ PEITC

Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη ως προς τα υποστρώματα GSH/ CDNB (Εικόνα 5. 14), GSH/ NBD-Cl (Εικόνα 5. 15), GSH/ CuOOH (Εικόνα 5. 16) και GSH/ PEITC (Εικόνα 5. 17) στους 37 °C και προσδιορίστηκαν οι τιμές k_{cat} , K_m (Πίνακας 5. 11).

1.

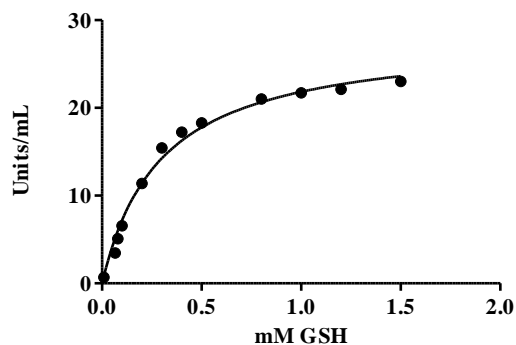


2.

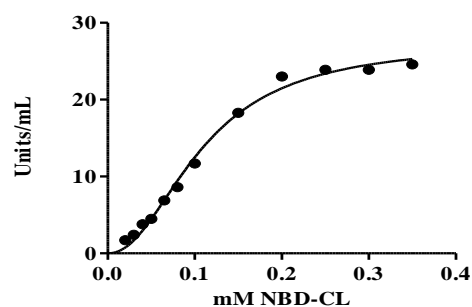


Εικόνα 5. 14: 1. Κινητική ανάλυση του ενζύμου CrGST7 έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα τη GSH (0,018-2,5 mM). 2. Κινητική ανάλυση του ενζύμου CrGST7 έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το CDNB (0,25-2,5 mM).

1.

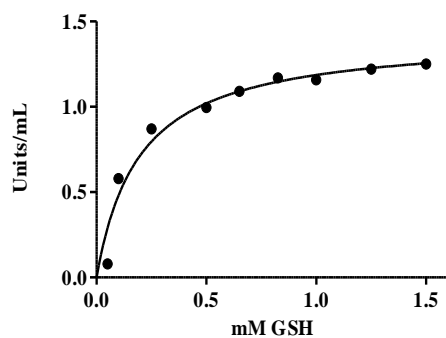


2.

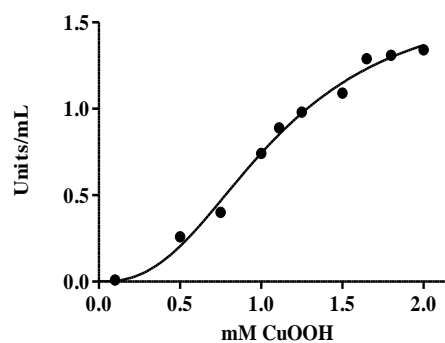


Εικόνα 5. 15: 1. Κινητική ανάλυση του ενζύμου CrGST7 έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα τη GSH (0,01-1,5 mM). 2. Κινητική ανάλυση του ενζύμου CrGST7 έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το NBD-Cl (0,02-0,35 mM).

1.

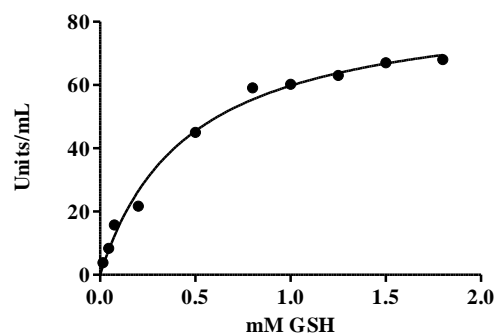


2.

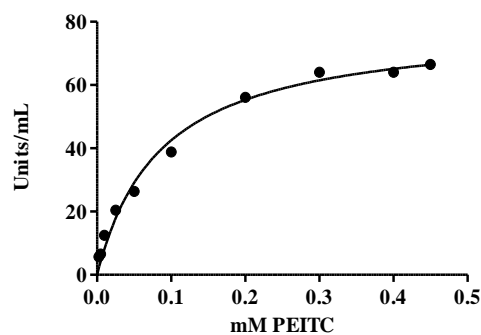


Εικόνα 5. 16: 1. Κινητική ανάλυση του ενζύμου *CrGST7* έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα τη GSH (0,08-1,5 mM). 2. Κινητική ανάλυση του ενζύμου *CrGST7* έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το CuOOH (0,01-2 mM).

1.



2.



Εικόνα 5. 17: 1. Κινητική ανάλυση του ενζύμου *CrGST7* έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα τη GSH (0,015-1,8 mM). 2. Κινητική ανάλυση του ενζύμου *CrGST7* έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το PEITC (0,0025-0,45 mM).

Πίνακας 5. 10: Αποτελέσματα της κινητικής ανάλυσης του ενζύμου *CrGST7* ως προς τα συστήματα GSH/ CDNB, GSH/ NBD-Cl, GSH/ CuOOH και GSH/ PEITC.

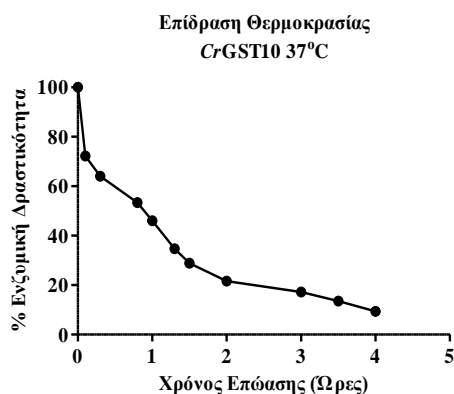
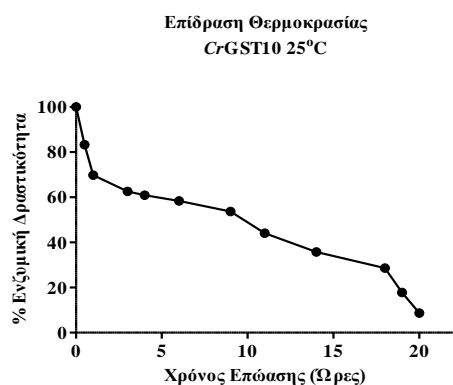
	K_m or $S_{0,5}$ (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ min ⁻¹)	n_H
CDNB/GSH				
GSH	0,31 ± 0,03	69 ± 4,8	222,5	-
CDNB	1 ± 0,17		-	2,55 ± 0,28
NBD-Cl/GSH				
GSH	0,29 ± 0,031	27 ± 1,45	8,8	-
NBD-Cl	0,01 ± 0,001		-	2,10 ± 0,28
CuOOH/GSH				
GSH	0,19 ± 0,05	0,37 ± 0,037	1,9	-
CuOOH	1,24 ± 0,26		-	2,52 ± 0,37
PEITC/GSH				
GSH	0,46 ± 0,065	270,3 ± 12,67	587,6	-
PEITC	0,082 ± 0,01		3.296,3	-

Η κινητική συμπεριφορά του *CrGST7* μπορεί να χαρακτηριστεί παρόμοια με εκείνη του ενζύμου *CrGST10*. Έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το CDNB, το NBD-Cl και το CuOOH, το *CrGST7* δεν ακολουθεί την κινητική μηχανική των Michaelis-Menten και εμφανίζει σιγμοειδή εξάρτηση με n_H : 2,55 ± 0,28, 2,10 ± 0,28 και 2,52 ± 0,28 αντίστοιχα. Για το σύστημα GSH/ PEITC, και στις δυο περιπτώσεις μεταβαλλόμενων υποστρωμάτων παρατηρήθηκε εξάρτηση υπερβολής η οποία και υπακούει στην εξίσωση των Michaelis-Menten. Η τιμή K_m μας έδειξε ότι για τα συστήματα GSH/CDNB και GSH/CuOOH το ένζυμο παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια ως προς το υπόστρωμα της γλουταθειόνης, ενώ για τα υπόλοιπα συστήματα η προτίμηση φαίνεται να είναι αρκετά μεγαλύτερη για τα ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα NBD-Cl και PEITC. Το σύστημα GSH/ PEITC παρουσίασε υψηλότερη σταθερά εξειδικεύσεως k_{cat}/K_m ως προς τη GSH (587,5 mM⁻¹min⁻¹) και συγκεκριμένα 26-φορές υψηλότερη από την αντίστοιχη του *CrGST10*.

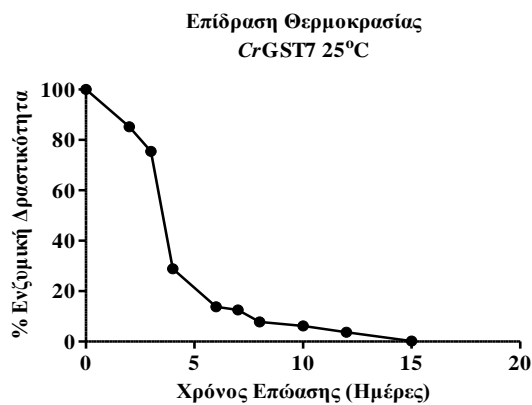
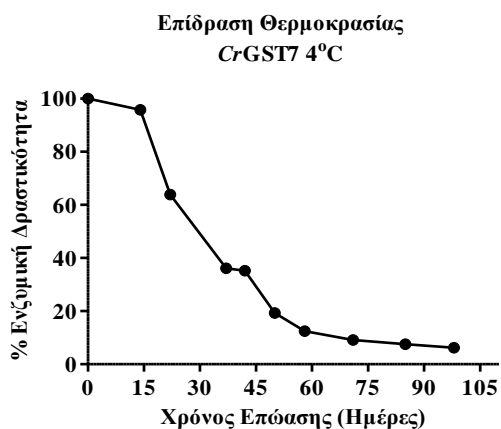
5.4.7. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ *CrGST10* ΚΑΙ *CrGST7*

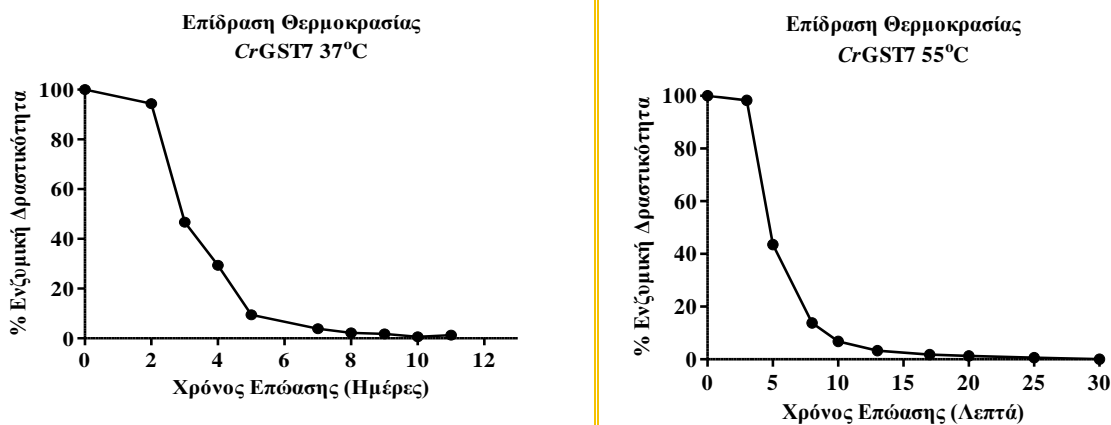
Με σκοπό τον έλεγχο της δομικής σταθερότητας των ενζύμων *CrGST10* και *CrGST7* ακολούθησε κινητική μελέτη της θερμικής αδρανοποίησης σε ένα εύρος

διαφορετικών θερμοκρασιών. Στην **Εικόνα 5. 18** παρουσιάζεται η επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική δραστηριότητα στους 25 °C και 37 °C για το ένζυμο CrGST10. Η επώαση διήρκησε 20 h στους 25 °C και 4 h στους 37 °C, με τη δραστηριότητα του ενζύμου να μειώνεται κάτω από 10 %. Η κινητική μελέτη της θερμικής αδρανοποίησης του ενζύμου CrGST7 πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασίες 4 °C, 25 °C, 37 °C και 55 °C (**Εικόνα 5. 19**).



Εικόνα 5. 18: Επίδραση της θερμοκρασίας (25 °C και 37 °C) στην ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου CrGST10.





Εικόνα 5. 19: Επίδραση της θερμοκρασίας (4 °C, 25 °C, 37 °C και 55 °C) στην ενζυμική δραστικότητα του ενζύμου CrGST7.

Το ένζυμο CrGST10 φαίνεται να παρουσιάζει χαμηλότερη θερμοσταθερότητα σε σύγκριση με το CrGST7.

5.4.8. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ

Το pH αποτελεί έναν παράγοντα που συνήθως επηρεάζει σημαντικά τη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης. Τα ένζυμα αποτελούνται από ιονιζόμενες ομάδες με διαφορετική σημασία και λειτουργία, επομένως το pH είναι δυνατόν να μεταβάλλει τα εξής:

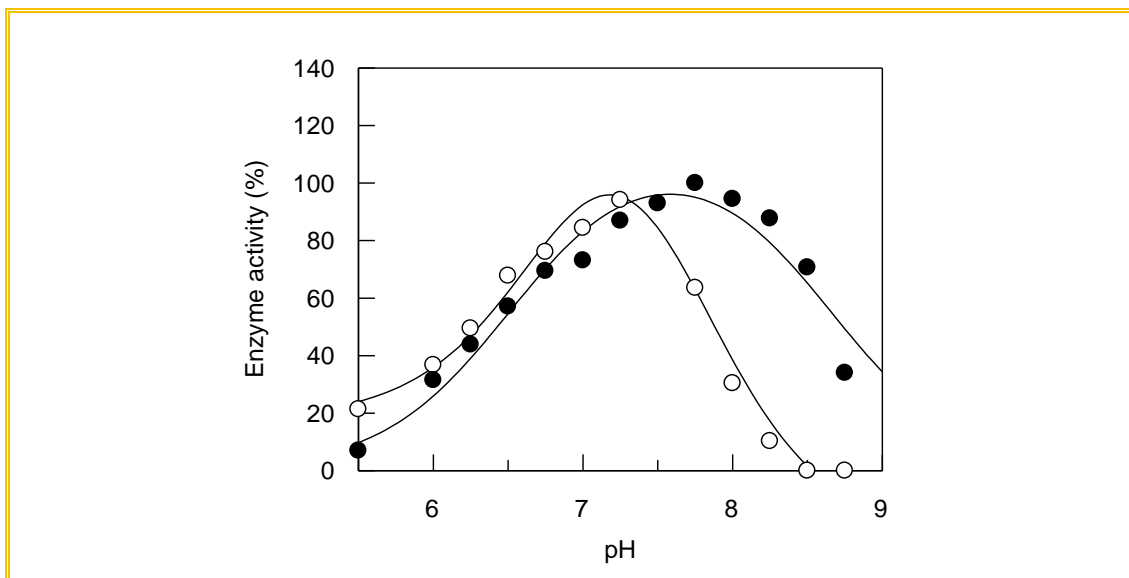
Τη χημική κατάσταση (βαθμό ιονισμού) αμινοξικών καταλοίπων:

- της ενεργής περιοχής
- των καταλοίπων που επηρεάζουν τη δέσμευση του υποστρώματος και άλλων μορίων στο ένζυμο
- των αμινοξικών καταλοίπων που επηρεάζουν τη στερεοδιάταξη του ενζυμικού μορίου συνολικά
- των υποστρωμάτων

Κάθε ένζυμο έχει το δικό του άριστο ή βέλτιστο pH στο οποίο εμφανίζει τη μέγιστη ταχύτητα αντίδρασης στις συγκεκριμένες συνθήκες. Στην παρούσα μελέτη καθαρές μορφές των ενζύμων GSTs αγρίου τύπου CrGST10 και CrGST7 μελετήθηκαν ως προς την επίδραση του pH στην ενζυμική τους δραστικότητα.

Η εξάρτηση από το pH από τη V_{max} για τα ένζυμα CrGST10 και CrGST7 διερευνήθηκε σε μια προσπάθεια σύγκρισης των ιδιοτήτων των ιονιζόμενων ομάδων

κατά τη διάρκεια δέσμευσης και κατάλυσης του υποστρώματος. Η εξάρτηση της V_{max} από το pH προσδιορίστηκε σε εύρος τιμών pH 5,5 ως 8,7 (Εικόνα 5. 20). Το ένζυμο CrGST10 παρουσίασε ένα βέλτιστο pH μεταξύ 7,5 και 8,0, ενώ για το ένζυμο CrGST7 σε pH 7,75. Η προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στην Εξίσωση 2 έδωσε τιμές $pK_{a1}= 6,5 \pm 0,2$ και $pK_{a2}= 8,6 \pm 0,20$ για το ένζυμο CrGST7, ενώ για το ένζυμο CrGST10 τιμές $pK_{a1}= 6,6 \pm 0,2$ και $pK_{a2}= 7,5 \pm 0,10$.

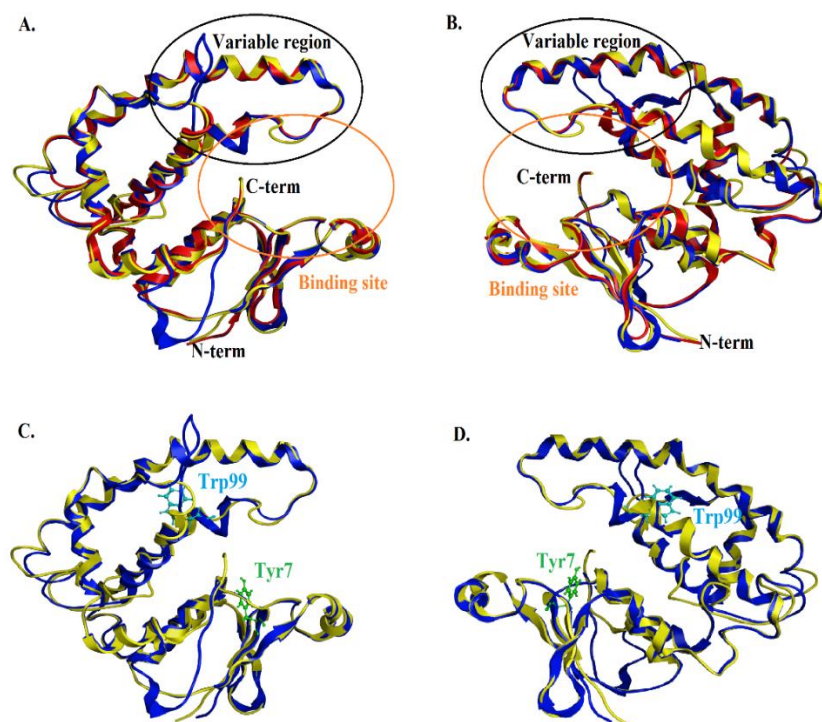


Εικόνα 5. 20: Η εξάρτηση της V_{max} από το pH ως προς το σύστημα CDNB/ GSH, αντίδραση που καταλύεται από τα ένζυμα CrGST10 (○) και CrGST7 (●).

5.4.9. ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ CrGST10 ΚΑΙ CrGST7 ΜΕ ΟΜΟΛΟΓΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΣΗ

Σε μια προσπάθεια βαθύτερης κατανόησης των καταλυτικών και δομικών ιδιοτήτων των CrGST10 και CrGST7, τα ένζυμα υποβλήθηκαν σε δομική ανάλυση με ομόλογη μοντελοποίηση. Η αναζήτηση ομόλογων αλληλουχιών GST αποκάλυψε ότι τα CrGSTS7 και CrGSTS10 παρουσιάζουν την υψηλότερη ομολογία αλληλουχίας με GSTs από τον οργανισμό *Necator americanus* (Asojo et al., 2007) (κωδικός PDB: 2ON5), *Heligmosomoides polygyrus* (Schuller et al., 2005) (κωδικός PDB 1TW9) και *Rattus norvegicus* (Kanaoka et al., 1997) (κωδικός PDB: 1PD2) με ομοιότητα αλληλουχίας περίπου 33%, με τα δύο εκ των οποίων να είναι μέλη της *Sigma* τάξης των GSTs. Η πιο κατάλληλη κρυσταλλική δομή με βάση την πλήρη φυλογενετική ανάλυση για τα CrGST7 και CrGST10 βρέθηκε να είναι η GST από τον οργανισμό *Rattus norvegicus* (κωδικός PDB: 1PD2). Η συνολική RMSD μεταξύ των μοντέλων

CrGST7 και *CrGST10* και της κρυσταλλικής δομής της GST από *Rattus norvegicus* είναι 0,894Å (Εικόνα 5. 21: C και D).



Εικόνα 5. 21: Σύγκριση δομών μεταξύ τριών ενζύμων. **Κόκκινο:** κρυσταλλική δομή GST από *Rattus norvegicus* (PDB code: 1PD2); **Κίτρινο:** ομόλογο μοντέλο για *CrGST7*; **Μπλε:** ομόλογο μοντέλο για *CrGST10*. (A και B) Σύγκριση μοριακών μοντέλων *CrGST7* και *CrGST10* με το πρότυπο μοντέλο GST από *Rattus norvegicus*. (C και D) Μεταλλαγμένες δομές στις θέσεις Tyr7 και Trp 99 στα μοριακά μοντέλα που δημιουργήθηκαν για *CrGST10* και *CrGST7*.

Πίνακας 5. 11: Πληροφορίες σχετικά με τα μοντέλα και τα πρότυπα για *CrGST*.

A/A	GST	GST CLASS	PDB CODE	Crystal Resolution	Identities	Positives	Gaps
1	<i>CrGST7</i>	<i>Sigma</i>	1PD2	2,3 Å	33 %	48 %	7 %
2	<i>CrGST10</i>	<i>Sigma</i>	1PD2	2,3 Å	30 %	49 %	6 %

Με βάση τα διαθέσιμα ομόλογα μοντέλα για το ένζυμο *CrGST10*, δύο αμινοξικά κατάλοιπα (Tyr7 και Trp99, **Εικόνα 5. 23**), επιλέχθηκαν για την αξιολόγηση της συμβολής τους στην πρόσδεση των υποστρωμάτων και στην ενζυμική κατάλυση, με τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση. Η ανάλυση των δομών για *CrGST10* και *CrGST7* έδειξε ότι η Tyr7 αποτελεί ένα σημαντικό καταλυτικά αμινοξικό κατάλοιπο. Η Tyr7 εντοπίζεται να είναι συντηρημένη σε όλες τις αμινοξικές αλληλουχίες που μελετήθηκαν (**Εικόνα 5. 3**) και εντοπίζεται στο τέλος της α1-sheet περιοχής με το

υδροξύλιο της πλευρικής της ομάδας να εντοπίζεται στη μεγάλη κοιλότητα πρόσδεσης του υποστρώματος. Είναι γνωστό ότι οι GSTs της *Sigma* τάξης έχουν υψηλά συντηρημένο το αμινοξικό καταλυτικό της Tyr (Wilce and Parker, 1994) στο N-τελικό άκρο. Η φαινόλη της πλευρική αλυσίδας του Tyr7 ενεργοποιεί το μόριο της GSH μέσω μιας αλληλεπίδρασης δεσμού υδρογόνου με το υδροξύλιο της N-τελικής περιοχής, σταθεροποιώντας τη βασική πυρηνόφιλη θειόλη, η οποία εμφανίζει υψηλή δραστηριότητα. Η θέση πρόσδεσης της GSH (G-θέση) σχηματίζεται από την αρχή του ελίκων H1, H2 και H3 στη N-τελική περιοχή, και τα κύρια κατάλοιπα που εμπλέκονται στο σχηματισμό της G-θέσης είναι Tyr7, Ser64, Arg13 και Asp97. Το μοτίβο SNAIL/TRAIL (Pemble et al., 1996) στην N-τελική περιοχή που είναι παρόν στις περισσότερες τάξεις των GST και συμβάλλει στην πρόσδεση των πολικών λειτουργικών ομάδων της GSH-θέσης, διατηρείται εν μέρει στα ένζυμα CrGST10 και CrGST7 (αμινοξικά κατάλοιπα 64-67).

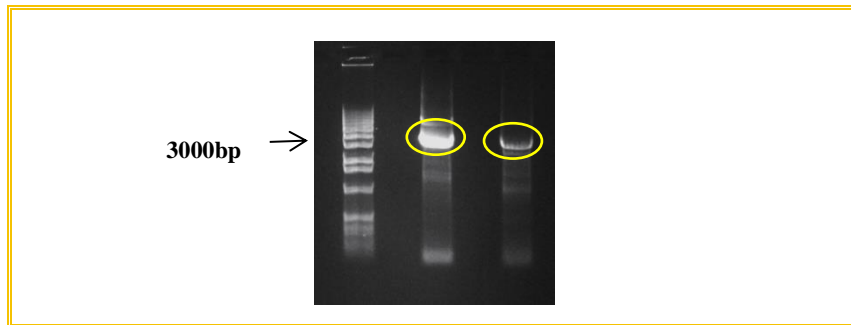
Η C-τελική περιοχή των κυτταροπλασματικών GST περιέχει ένα αυστηρά συντηρημένο μοτίβο γνωστό ως N-capping box (Ser Thr-Xaa-Xaa-Asp), στην αρχή της α6-έλικας στον υδρόφοβο κορμό του μορίου (Cocco et al., 2001; Aceto et al. 1997). Στις GSTs το συγκεκριμένο μοτίβο εμπλέκεται στο σχηματισμό της α6-έλικας, με κρίσιμο δομικό και λειτουργικό ρόλο και είναι απαραίτητο για την αναδίπλωση των GST. Το μοτίβο N-capping box στα CrGST10 και CrGST7 (Ser-Phe-Ala-Asp) σχηματίζει μια κρίσιμη αλληλεπίδραση ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ της ομάδας υδροξυλίου της Ser154 με Asp157.

Οι H-θέσεις των CrGST10 και CrGST7 παρουσιάζουν μια μοναδική δομή η οποία είναι δομημένη κυρίως από τα υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα της H3 α-έλικας, (Trp99), του N-τελικού άκρου και της H2 α-έλικας. Η χαμηλή ομοιότητα της αλληλουχίας αντικατοπτρίζει μια μοναδική δομή η οποία εξηγεί τις παρατηρούμενες διαφορές ως προς την εξειδίκευση των υποστρωμάτων. Η Trp99 έχει κεντρική θέση στο εύκαμπτο τμήμα της H3 α-έλικας και εμπλέκεται σε μια π-π αρωματική αλληλεπίδραση με τα ξενοβιοτικά υποστρώματα. Επίσης, η Trp99 αποτελεί ένα συντηρημένο αμινοξικό κατάλοιπο της *Sigma* τάξης των GSTs, βρίσκεται κοντά στο ανώτατο όριο της κεντρικής κοιλότητας και πιθανώς να συμμετέχει στην αναγνώριση του υποστρώματος επηρεάζοντας το μέγεθος και τη μορφή της H-θέσης.

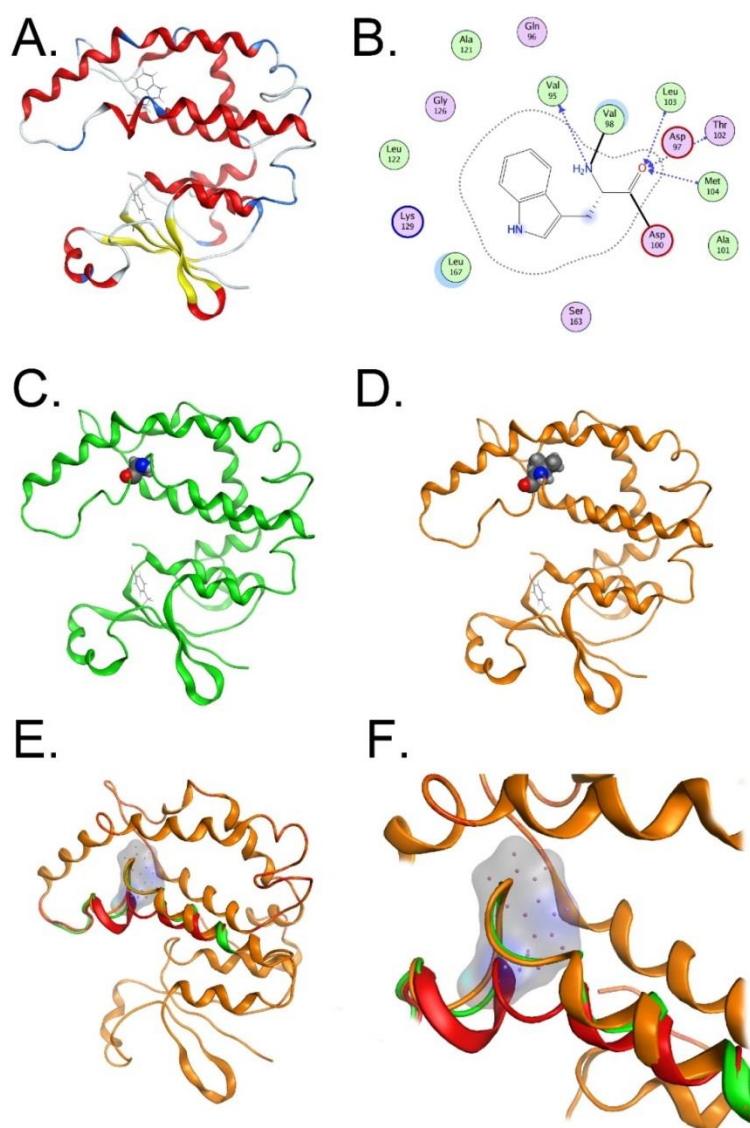
Η δομική ανάλυση του μοντέλου CrGST10 έδειξε ότι Trp99 είναι αμινοξικό κατάλοιπο-κλειδί για την ενζυμική κατάλυση και δέσμευση του υποστρώματος. Ο

σημαντικότερος ρόλος του οφείλεται στην ογκώδη αρωματική πλευρική αλυσίδα, η οποία καταλαμβάνει / γεμίζει το 3D χώρο του πυρήνα της πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, η Trp99 συγκρατεί τις δύο γειτονικές α-έλικες στη βέλτιστη απόσταση, σταθεροποιώντας έτσι τη συνολική δομή του ενζύμου. *In silico*, τα μοντέλα GST των μεταλλαγμένων μορφών Trp99Ala και Trp99Leu υποβλήθηκαν σε "έξαντλητικές" προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι λόγω της έλλειψης της ογκώδους πλευρικής αλυσίδας και οι μορφές έχουν επιτρέψει στις έλικες τους να προσεγγίσουν η μια την άλλη (**Εικόνα 5. 23: E-F**). Ως αποτέλεσμα, η διαμόρφωση του μεταβλητού τομέα έλικα-βρόχος-έλικα έχει διακοπεί διότι η απόσταση μεταξύ των δύο α-ελίκων έχει μειωθεί. Κατά συνέπεια, ο διαθέσιμος χώρος διαμόρφωσης της δέσμευσης του υποστρώματος είναι μεγαλύτερος και δομικά δεν υποστηρίζεται διότι η α-έλικα έχει πλέον απομακρυνθεί. Αναμφισβήτητα, αυτή η διαμορφωτική αλλαγή "δυσκολεύει" τη φιλοξενία του υποστρώματος καθώς η εντροπία του συστήματος έχει πλέον αυξηθεί και το ένζυμο πρέπει να υποβληθεί σε διαμορφωτικές αλλαγές προκειμένου να επαναπροσδιοριστεί η καταλυτική θέση και να υπάρξει αποτελεσματική επεξεργασία του υποστρώματος.

Αναλυτικότερα, έχοντας ως μήτρα το πλασμιδιακό DNA pT7CrGST10 του ενζύμου CrGST10, χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι του λογικού σχεδιασμού και της κατευθυνόμενης εξέλιξης με σκοπό την κατευθυνόμενη μετάλλαξη στη θέση 7 του αμινοξικού καταλοίπου της Tyr και της θέσης 99 του αμινοξικού καταλοίπου της Trp αντίστοιχα. Για το σκοπό αυτό έγινε χρήση της μεθόδου Quik Change PCR – site directed. Οι συνθήκες PCR και οι εκκινήτες που επιλέχθηκαν αναλύονται στα Υλικά και Μέθοδοι του παρόντος κεφαλαίου (§ 5.3.2.2.) Στην **Εικόνα 5. 22** παρουσιάζονται τα προϊόντα της PCR αντίδρασης κατά το 1^ο στάδιο της μεταλλαξογένεσης κορεσμού, δηλαδή πριν τη δράση της *Dpn1*. Στη συνέχεια ακολουθεί μετασχηματισμός σε κύτταρα *E. coli* του στελέχους DH5α και Turbo χρησιμοποιώντας το προϊόν της πέψης με την ενδονουκlease και στρώσιμο σε τρυβλία με αμικικιλίνη κατάλληλης συγκέντρωσης. Από τις αποικίες που προέκυψαν, επιλέχθηκαν 4 για τη μετάλλαξη στη θέση 7, ενώ για τις μεταλλάξεις στη θέση 99 επιλέχθηκαν 8 στο σύνολο. Αφού προηγήθηκαν προκαλλιέργειες και μελέτη της ενζυμικής δραστηριότητας ακολούθησε πλασμιδιακή απομόνωση DNA και νουκλεοτιδική αλληλούχιση.



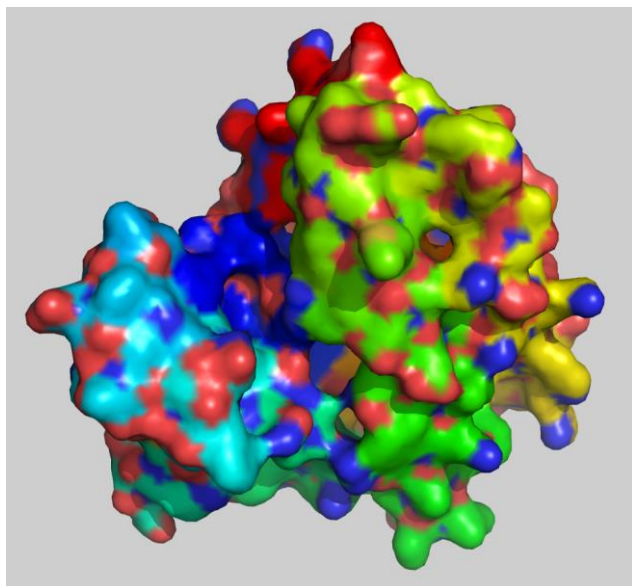
Εικόνα 5. 22: Τα προϊόντα της Quick Change-site directed PCR αντίδρασης. Ως δείκτης μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο 1Kb DNA ladder (Invitrogen). **1:** Μάρτυρας, **2:** Προϊόν της αντίδρασης με τη μέθοδο Quick change που αφορά τη μετάλλαξη Tyr7, **3:** Προϊόν της αντίδρασης με τη μέθοδο Quick change που αφορά τη μετάλλαξη Tyr99.



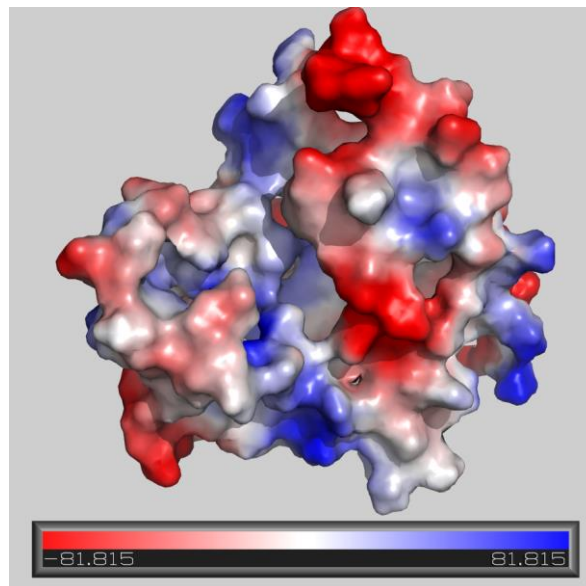
Εικόνα 5. 23: Τρισδιάστατη αναπαράσταση της δομής του ενζύμου C7GST10 και των μεταλλαγμένων μορφών με ομόλογη μοντελοποίηση. **A.** Η 3D δομή του ενζύμου C7GST10. **B.** Η 3D διαμόρφωση του χώρου που καταλαμβάνεται από το αμινοξικό κατάλοιπο Tyr99. **C.** Το μοντέλο της μεταλλαγμένης

μορφής Trp99Ala. **D.** Το μοντέλο της μεταλλαγμένης μορφής Trp99Leu. **E-F.** Δομική επαλληλία των δομών A, C και D. Ο χώρος που καταλαμβάνεται από Trp99 φαίνεται ως αναπαράσταση σύννεφου. Είναι σαφές ότι τα λιγότερο ογκώδη αμινοξικά κατάλοιπα Ala και Leu έχουν επιτρέψει το σύνολο της α-έλικας να στραφεί προς τα πάνω, μεταβάλλοντας έτσι τη γεωμετρία της θέσης δέσμησης υποστρώματος.

A.



B.



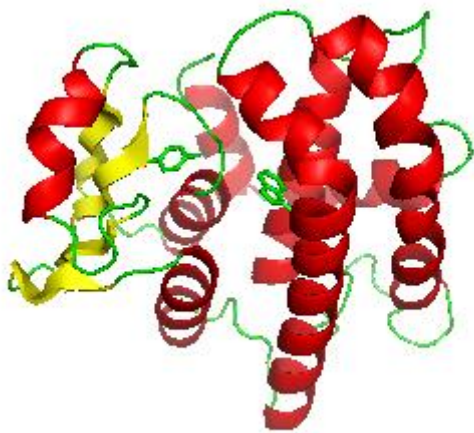
Εικόνα 5. 24: **A.** Απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής του CrGST10 στη μορφή Van der Waals σφαιρών. **B.** Ανάλυση επιφάνειας Coulombic δυνάμεων του CrGST10. Στην επιφάνεια ηλεκτροστατικού δυναμικού απεικονίζονται με λευκό χρώμα οι ουδέτερες περιοχές, με μπλέ οι θετικά φορτισμένες και με κόκκινο οι αρνητικά φορτισμένες.

5.4.10. ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ

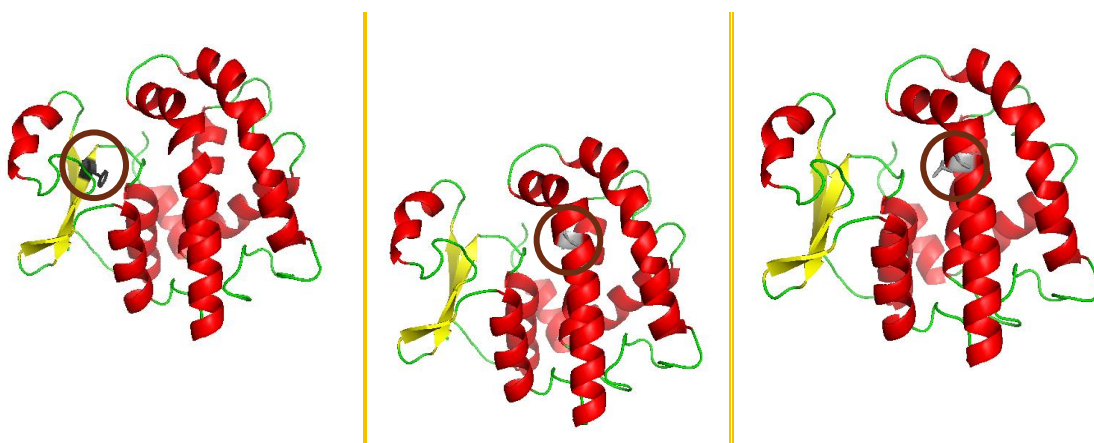
Το αμινοξικό κατάλοιπο Trp99 μεταλλάχθηκε σε Ala και Leu (**Εικόνα 5. 25**). Οι μεταλλάξεις Trp99Ala και Trp99Leu εκφράστηκαν σε κύτταρα *E. coli*, καθαρίστηκαν και ακολούθησε μελέτη της ενζυμικής δραστηριότητας έναντι επιλεγμένων υποστρωμάτων. Το στέλεχος *E. coli* που χρησιμοποιήθηκε για κάθε νέα μεταλλαγμένη μορφή ήταν BL21 (DE3). Η Tyr7 μεταλλάχθηκε σε Phe, ακολούθησε έκφραση και καθαρισμός της μεταλλαγμένης μορφής Tyr7Phe και υποβλήθηκε σε μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μεταλλαγμένο ένζυμο εμφανίζει μια δραματική μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας (> 95%), επιβεβαιώνοντας ότι Tyr7 είναι απολύτως απαραίτητη για την καταλυτική δραστηριότητα. Επίσης, η μορφή Tyr7Phe παρουσίασε χαμηλά επίπεδα έκφρασης,

πιθανόν λόγω αποσταθεροποίησης της πρωτεΐνης. Στην **Εικόνα 5. 25** παρουσιάζεται η τρισδιάστατη δομή του ενζύμου CrGST10 και τα αμινοξικά κατάλοιπα Trp99 και Tyr7, με ομόλογη μοντελοποίηση.

A.



B.



Εικόνα 5. 25: Τρισδιάστατη αναπαράσταση της δομής του ενζύμου CrGST10 με τα αμινοξικά κατάλοιπα Trp99 και Tyr7 έπειτα από ομόλογη μοντελοποίηση (**A.**) και οι μεταλλάξεις που προέκυψαν, Tyr7Phe, Trp99Ala και Trp99Leu (**B.**).

Ακολουθεί ο **Πίνακας 5. 13** στον οποίο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της έκφρασης των μεταλλαγμένων μορφών στη θέση 99.

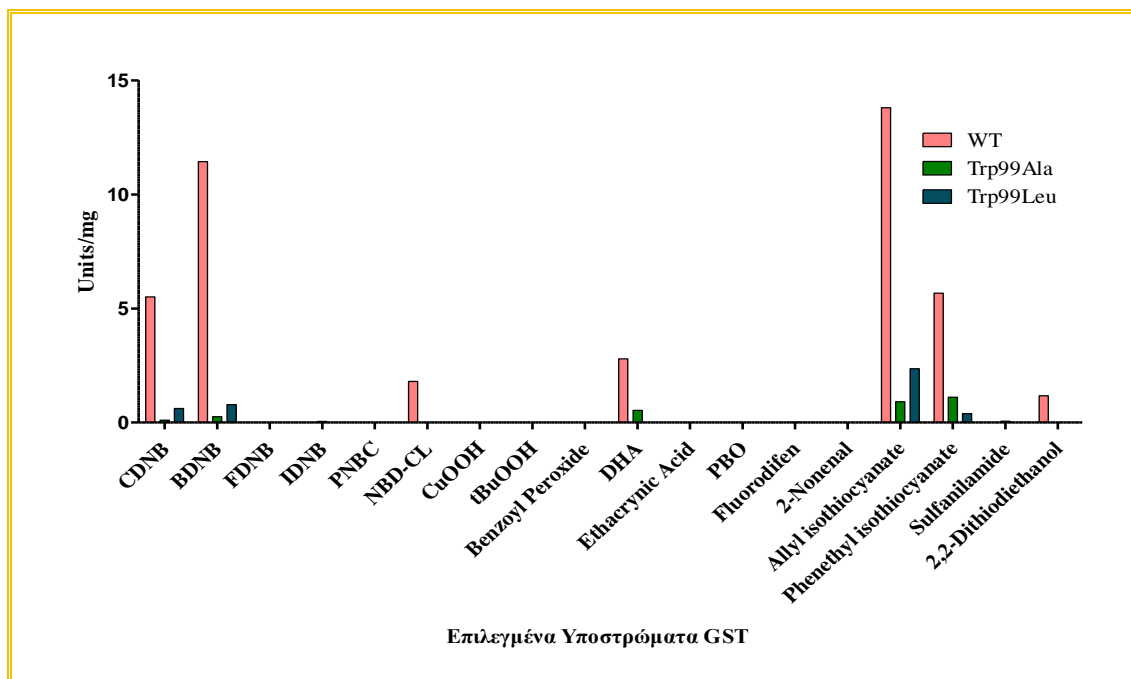
Πίνακας 5. 12: Επίπεδα έκφρασης και η ειδική δραστηριότητα του ακατέργαστου εκχυλίσματος για τις μορφές Tyr7Phe, Trp99Ala και Trp99Leu.

Ισοένζυμο	Κυτταρική ποσότητα g/ 500 mL καλλιέργειας	Ειδική δραστηριότητα crude (Units/ mg)
Tyr7Phe	0,50	0,0054
Trp99Ala	0,62	0,049
Trp99Leu	0,59	0,36

Μετά την έκφραση, οι νέες μορφές καθαρίστηκαν με διαφορετικές χρωματογραφικές τεχνικές. Η μορφή Tyr7Phe καθαρίστηκε με χρωματογραφία συγγένειας έχοντας ως προσροφητή την S-εξυλ-γλουταθειόνη. Οι μορφές Trp99Ala, Trp99Leu καθαρίστηκαν με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής με προσροφητή τον DEAE. Ο καθαρισμός της μορφής Tyr7Phe παρουσίασε υψηλότερη απόδοση κατά 4,2 και 8,4 φορές σε σύγκριση με Trp99Ala και Trp99Leu αντίστοιχα, ενώ καθαρίστηκε 352 φορές.

ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΤΩΝ GSTs

Ακολούθησαν φωτομετρικές δοκιμές των μεταλλαγμένων μορφών Trp99Leu και Trp99Ala ως προς επιλεγμένα υποστρώματα των GSTs και σύγκριση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα του αγρίου τύπου. Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 5. 26** έδειξαν ότι και οι δύο μεταλλάγματα εμφανίζουν χαμηλότερη ειδική δραστηριότητα έναντι όλων των επιλεγμένων υποστρωμάτων σε σύγκριση με το ένζυμο άγριου τύπου, υποδηλώνοντας ότι το αμινοξικό κατάλοιπο Trp99 παίζει σημαντικό ρόλο στην κατάλυση επηρεάζοντας την εκλεκτικότητα ως προς διαφορετικά υποστρώματα.



Εικόνα 5. 26: Φωτομετρικές δοκιμές των νέων μορφών Trp99Leu και Trp99Ala ως προς επιλεγμένα υποστρώματα GST και σύγκριση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα του CrGST10 αγρίου τύπου (WT).

Ακολουθεί πίνακας (Πίνακας 5. 14) με τα αποτελέσματα της ειδικής δραστηριότητας.

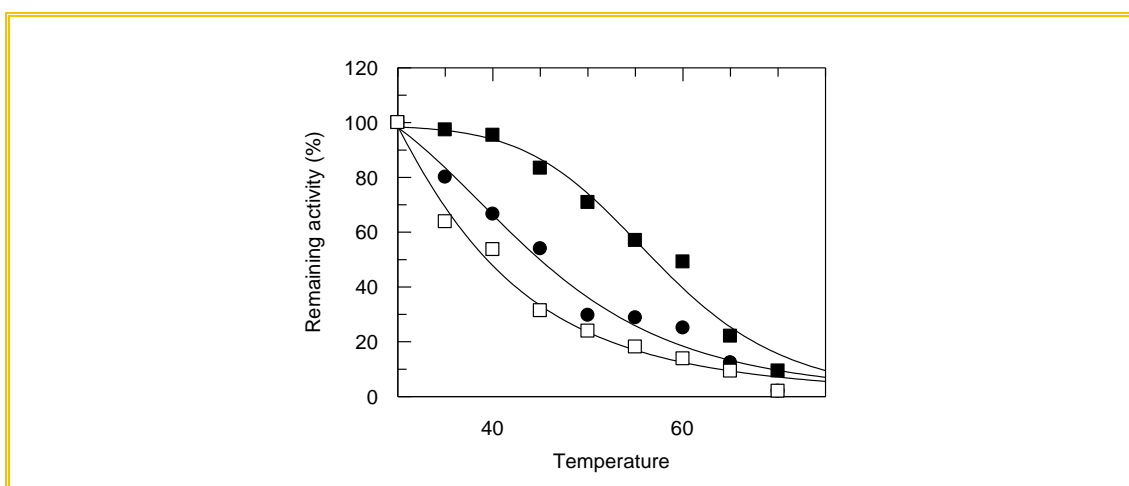
Πίνακας 5. 13: Ειδική δραστηριότητα του ενζύμου CrGST10 και των μορφών Trp99Ala και Trp99Leu ως προς τα διαφορετικά υποστρώματα. MA: μη ανιχνεύσιμη ενζυμική δραστηριότητα.

Υποστρώματα	CrGST10 (Units/ mg)	Trp99Leu (Units/ mg)	Trp99Ala (Units/ mg)
1-γλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB)	5,51	0,616	0,106
1-βρωμο-2,4-δινιτροβενζόλιο (BDNB)	11,43	0,79	0,26
1-φοθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο (FDNB)	MA	MA	MA
1-ιοδω-2,4-δινιτροβενζόλιο (IDNB)	MA	MA	0,046
π-νιτροβενζυλ-γλωρίδιο (PNBC)	MA	MA	MA
4-γλωρο-7-νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο (NBD-chl)	1,799	MA	MA
υδροϋπεροξειδίο του κουμενίου (CuOOH)	MA	MA	MA
τ-βουτυλο-υδροϋπεροξειδίο (tBuOOH)	MA	MA	MA
βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίο	MA	MA	MA
διϋδροασκορβικό οξύ (DHA)	2,79	MA	0,531
εθακρινικό οξύ (EA)	MA	MA	MA
trans-4-Phenyl-3-buten-2-one (PBO)	MA	MA	MA
trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη (PBO)	MA	MA	0,014

Fluorodifen	MA	MA	MA
βρωμοσουλφοφθαλεΐνη (BSP)	MA	MA	MA
<i>trans</i> -2-ενενάλη	13,8	2,36	0,912
ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας (AITC)	5,67	0,392	1,107
ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλ-εστέρας (PEITC)	MA	MA	MA
Σουλφανιλαμίδη	1,176	MA	MA

5.4.11. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗ ΔΟΜΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν μελέτες που αφορούν στην επίδραση της θερμοκρασίας (Εικόνα 5.29) στη δομική σταθερότητα του ενζύμου CrGST10 και των μορφών Trp99Ala και Trp99Leu με σκοπό την αξιολόγηση της συμβολής της Trp99 στη δομική σταθερότητα.



Εικόνα 5. 27: Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου CrGST10 (■) και των μεταλλαγμένων μορφών Trp99Ala (○) και Trp99Leu (□). Οι μετρήσεις έγιναν εφόσον προηγήθηκε επώαση 5min σε διάφορες θερμοκρασίες.

Τα προφίλ αδρανοποίησης (Εικόνα 5. 27) επέτρεψε τον προσδιορισμό της T_m , δηλαδή η θερμοκρασία στην οποία η αρχική δραστηριότητα του ενζύμου περιορίζεται στο μισό (50 %). Οι τιμές προσδιορίστηκαν ίσες με 56,3 °C, 47,5 °C και 43,09 °C για τον άγριο τύπο και τις μορφές Trp99Ala και Trp99Leu αντίστοιχα. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η θέση Trp99 πιθανόν να επηρεάζει τη θερμοσταθερότητα του

ενζύμου, διότι οι μεταλλαγμένες μορφές εμφάνισαν χαμηλότερη θερμοσταθερότητα, περίπου 15.6% και 9.28% για Trp99Ala και Trp99Leu αντίστοιχα.

5.5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο παρόν κεφάλαιο πραγματοποιήθηκε απομόνωση δυο ενζύμων, των CrGST10 και CrGST7 από cDNA βιβλιοθήκη *Chlamydomonas reinhardtii*. Τα δύο ένζυμα φαίνεται να έχουν στενή σχέση με τη *Sigma* τάξη των GSTs, γεγονός ιδιαίτερο διότι δεν έχει επιβεβαιωθεί βιβλιογραφικά η ύπαρξη της συγκεκριμένης τάξης σε θαλάσσια μικροφύκη.

Προκειμένου να προσδιοριστούν οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν τα ένζυμα των GST σε *Chlamydomonas reinhardtii*, πραγματοποιήθηκε προσέγγιση βιοπληροφορικής ανάλυσης. Καθ' όλη τη βιόσφαιρα, η υπερ-οικογένεια των κυτταροπλασματικών GSTs περιλαμβάνει περισσότερες από 13.000 αλληλουχίες (Kanaoka et al., 1997). Αυτές οι αλληλουχίες ταξινομούνται σε περισσότερες από 16 διακριτές κατηγορίες. Μεταξύ αυτών, οι GSTs σε ευκαρυωτικούς φωτοσυνθετικούς οργανισμούς ομαδοποιούνται σε 14 διαφορετικές κατηγορίες (Kanaoka et al., 1997). Πληροφορίες από μελέτες σε γονιδιώματα δείχνουν ότι GSTs υπάρχουν σε μεγάλους αριθμούς σε μικροφύκη. Το γονιδίωμα του *Chlamydomonas reinhardtii* εξετάστηκε ως προς αλληλουχίες που να επιβεβαιώνουν την παρουσία GST μοτίβων. Η αναζήτηση στη βάση δεδομένων επέτρεψε την ταυτοποίηση των 15 πρωτεϊνικών αλληλουχιών (Πίνακας 5. 5) που εμφανίζουν πολλά από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα των GSTs.

Η φυλογένεση των ενζύμων GST, σε γενικές γραμμές, είναι πολύπλοκη. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η δραστηριότητα των GST έχει προκύψει ανεξάρτητα, για τουλάχιστον τέσσερις φορές στη διάρκεια της εξέλιξης, δημιουργώντας τέσσερις διαφορετικές GST οικογένειες: κυτταροπλασματική, μικροσωμική, μιτοχονδριακή, και βακτηριακή (Allocati et al. 2008). Η φυλογενετική ανάλυση του πρώτου συνόλου δεδομένων (Εικόνα 5. 1) δείχνει την εξελικτική απόσταση ανάμεσα στις τάξεις *Alpha*, *Pi*, *Mu* και *Sigma*, η οποία είναι σαφώς διαχωρισμένη σε ένα μονοφυλετικό κλάδο. Στον ίδιο κλάδο φαίνεται να ανήκουν τα ένζυμα CrGST2, CrGST3, CrGST6, CrGST7, CrGST10 και CrGST15. Επιπλέον, τα CrGST3, CrGST7 και CrGST10 είναι στενά συνδεδεμένα με τα ένζυμα της *Sigma* τάξης, χαρακτηριστική για σπονδυλωτούς και ασπόνδυλους οργανισμούς, ενώ τα μέλη της *Alpha*, *Pi* και *Mu* των GST βρίσκονται μόνο σε σπονδυλωτούς οργανισμούς (Jowsey, et al., 2001). Τα ένζυμα που ανήκουν

στην *Alpha* τάξη είναι τα παλαιότερα μέλη αυτού του κλάδου. Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχουν φυλογενετικά στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι τα συγκεκριμένα ένζυμα χάθηκαν αργότερα από τους ασπόνδυλους οργανισμούς (Herve et al., 2008). Το ένζυμο CrGST14 αποτελεί ένα ξεχωριστό κλάδο που θα μπορούσε να έχει εξελιχθεί ανεξάρτητα από τις GST τάξεις *Alpha*, *Mi*, *Sigma* και *Pi* εφόσον προηγήθηκε η πρόωμη απόκλιση του από μια προγονική πρωτεΐνη.

Η *Sigma* τάξη φαίνεται να είναι μία από τις πιο πρωτόγονες μορφές των GST. Σύμφωνα με τη C. Frova (Frova, 2006), η διαφοροποίηση των μελών της *Sigma* τάξης ήταν πολύ πριν από εκείνη των μελών των *Alpha*, *Mu* και *Pi* τάξεων, εξελίσσοντας διακριτές λειτουργικές ιδιότητες. Η εμφάνιση αλληλουχιών που συνδέονται στενά με GSTs της *Sigma* τάξης σε φύκη, μικροφύκη και οωμύκητες, υποστηρίζει την υπόθεση ότι ολόκληρη η *Sigma* τάξη προέκυψε πριν από το διαχωρισμό των ευκαρυωτικών οργανισμών και η εκτεταμένη διαφοροποίησή τους έγινε αργότερα με διαχωρισμό σε διαφορετικά εξελικτικά μονοπάτια (Hervé, et al., 2008; Flanagan & Smythe, 2011; Ji et al., 1995). Η φυλογενετική ανάλυση και η πολλαπλή ευθυγράμμιση των αλληλουχιών τους (Εικόνα 5. 2 και 5. 3) έδειξαν ότι τα ένζυμα CrGST7 και CrGST10 παρουσιάζουν μικρή ομοιότητα αλληλουχίας όταν συγκρίνονται με αντίστοιχες GSTs της *Sigma* τάξης σε θηλαστικά, έντομα και φυτά. Παρά τη μικρή ομοιότητα που εμφανίζεται εντός των GSTs της *Sigma*, η ολοκληρωμένη πολλαπλή ευθυγράμμιση των αλληλουχιών έδειξε αρκετά συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα, αμετάβλητα στη διάρκεια του χρόνου, τα οποία αποτελούν αμινοξικά κατάλοιπα - κλειδιά για τη λειτουργία των ενζύμων (Sheehan et al., 2001) (Εικόνα 5. 3). Η υψηλή συντήρηση της N-τελικής περιοχής και οι διαφοροποιήσεις του C-τελικού άκρου επιβεβαιώνουν ότι η προτίμηση σύνδεσης υποστρώματος για ένα GST ένζυμο αποτελεί ζωτικής σημασίας για την εξέλιξή του και η καθοδήγηση πραγματοποιείται από τα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα του N-τελικού άκρου.

Το ένζυμο CrGST5 πιθανόν να μοιράζεται ένα κοινό πρόγονο με GST της *Omega* τάξης. Από την άλλη πλευρά, το CrGST11 σχηματίζει ένα χωριστό κλάδο παρουσιάζοντας μια πιο ανεξάρτητη εξελικτική ιστορία. Τα ισοένζυμα CrGST4, CrGST8, και CrGST9 είναι πιο σχετικά με τις GST της *Theta* τάξης. Αυτά τα ένζυμα παρουσιάζουν διαφορετικές εξελικτικές πορείες μεταξύ τους, με το ένζυμο CrGST9 όμως να σχετίζεται περισσότερο με τη *Theta* τάξη. Επίσης, τα ένζυμα CrGST1 και CrGST12 φαίνεται να μοιράζονται έναν κοινό πρόγονο με τα μέλη της *Beta* τάξης,

παρόλο που αποτελούν ένα ξεχωριστό κλάδο και δείχνουν μια πιο ανεξάρτητη εξελικτική ιστορία. Τέλος, το ένζυμο CrGST11 και CrGST14 αποτελούν ξεχωριστούς κλάδους παρουσιάζοντας μια πιο ανεξάρτητη εξελικτική ιστορία. Συγκεκριμένα, δεν έχουν ταξινομηθεί σε κάποια από τις γνωστές τάξεις GSTs και πιθανότατα να ανήκουν σε νέα κατηγορία, διακριτή από τις ήδη χαρακτηρισμένες GSTs

Για περαιτέρω μελέτη των ενζύμων CrGST10 και CrGST7, ακολούθησε κλωνοποίηση, έκφραση και καθαρισμός των ανασυνδιασμένων ενζύμων. Τα δύο ένζυμα καταλύουν ένα εύρος αντιδράσεων παρουσιάζοντας διαφορετική εξειδίκευση ως προς τα πιθανά υποστρώματα των GSTs. Χαρακτηριστικά, και τα δύο ένζυμα εμφάνισαν υψηλή δραστηριότητα έναντι των οργανικών ισοθειοκυανικών ενώσεων όπως το ισοθειοκυανικό αλλύλιο (AITC) και ισοθειοκυανικό φαιναιθύλιο (PEITC). Συγκεκριμένα, τα CrGST10 και CrGST7 καταλύουν την προσθήκη της θειολικής ομάδας της GSH στο ηλεκτρονιόφιλο κεντρικό άνθρακα της ισοθειοκυανικής ομάδας (χρησιμοποιώντας είτε AITC είτε PEITC) σχηματίζοντας διθειο-καρβαμικά [R-NH-C(=S)-SG] (Chronopoulou et al., 2012). Το αλφατικό AITC φαίνεται να αποτελεί καλύτερο υπόστρωμα σε σύγκριση με το ογκωδέστερο PEITC. Ταυτόχρονα, με PEITC ως υπόστρωμα το ένζυμο εμφανίζει την υψηλότερη καταλυτική αποτελεσματικότητα (k_{cat} / K_m). Αυτό υποδηλώνει ότι τα ισοθειοκυανικά πιθανόν να αντιπροσωπεύουν μια ομάδα ενώσεων που μπορεί να αποτελούν «φυσικά» υποστρώματα για τα CrGST10 και CrGST7 ένζυμα *in vivo*. Τα ισοθειοκυανικά βρίσκονται σε αφθονία σε μια ποικιλία βρώσιμων λαχανικών (Kolm et al., 1995). Ειδικά, το AITC διαδραματίζει κύριο ρόλο στην άμυνα έναντι φυτοφάγων οργανισμών, τα οποία είναι γνωστά για τις βλαβερές συνέπειες για το ίδιο το φυτό, και αποθηκεύεται με τη μορφή της γλυκοζινόλης η οποία είναι ακίνδυνη (Agrawal & Kurashige, 2003; Chronopoulou et al., 2012).

Μια διαφορετική εικόνα εξειδίκευσης υποστρώματος παρατηρήθηκε για ένζυμο CrGST7. Το συγκεκριμένο παρουσιάζει ευρύτερη εξειδίκευση υποστρωμάτων και ανιχνεύτηκε δραστηριότητα έναντι δέκα από τα δεκαενέα υποστρώματα που μελετήθηκαν. Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι το CrGST7, σε αντίθεση με CrGST10, εμφανίζει υψηλή δραστηριότητα υδροϋπεροξειδάσης. Βιβλιογραφικά, παρόμοια αποτελέσματα φαίνεται να εμφανίζουν οι GSTs της *Sigma* τάξης από διαφορετικούς οργανισμούς. Χαρακτηριστικά μπορεί να αναφερθεί παραδείγματα

οργανισμών όπως ο άνθρωπος και αρουραίος (Jowsey et al., 2001, Kanaoka et al., 2000), η όρνιθα (Thomson et al., 1998) και ο βάτραχος (Carletti et al., 2003), οι θαλάσσιοι οργανισμοί όπως το καλαμάρι (Harris et al., 1991) και τα κωπήποδα (Lee et al., 2007) με τις GSTs τους να παρουσιάζουν εξειδίκευση σχεδόν αποκλειστικά για το υπόστρωμα CDNB. Το ίδιο παρατηρείται και για τους νηματώδεις του γένους *Taeni* (TsMoGST) και σε οργανισμούς όπως οι κάμπιες των πεύκων, οι μεταξοσκώληκες και οι γαιοσκώληκες, όπου GSTs που ανήκουν στη *Sigma* τάξη έχουν απομονωθεί (HcGST, BmGSTS1 και LrGSTS αντίστοιχα) παρουσιάζουν δραστηριότητα μόνο ως προς CDNB, χωρίς να εμφανίζουν ιδιαίτερη εξειδίκευση προς τα υπόλοιπα υποστρώματα (Liebau et al., 1996, Yamamoto et al., 2007, Yamamoto et al., 2006, LaCourse et al., 2009). Επίσης, υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα που επιβεβαιώνουν την εκλεκτικότητα της *Sigma* τάξης των GSTs ως προς τα υποστρώματα εθακρινικό οξύ και π-νιτροβενζυλ-γλωρίδιο (PNBC) από τον οργανισμό *Drosophila* (DmGST2) (Agianian et al., 2003).

Η κινητική μελέτη των CrGST10 και CrGST7 εμφάνισε μια ιδιαίτερη κινητική συμπεριφορά, υπακούοντας είτε την εξίσωση Michaelis-Menten είτε τη σιγμοειδής εξάρτηση. Βιβλιογραφικά, η τιμή της k_{cat} ως προς το υπόστρωμα CDNB εμπίπτει στο εύρος k_{cat} τιμών της *Sigma* τάξης των GSTs ($8,15 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$). Για παράδειγμα, η GST από το καλαμάρι *Ommastrephes sloani pacificus* εμφανίζει $k_{cat} 48 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$ (Ji et al., 1995), ενώ η αντίστοιχη τιμή για *O. pacificus* S-crystallin SL11 είναι αρκετά χαμηλότερη με $k_{cat} 13,8 \text{ min}^{-1}$ (Ji et al., 1995).

Η θετική συνέργεια ως προς το μεγαλύτερο μέρος των ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη έχει πολλές πιθανές εξηγήσεις (Ricci et al., 1995; Bello et al., 1995; Labrou et al., 2001). Για παράδειγμα, το ένζυμο μπορεί να εμφανίζει τυχαία αλληλοδιάδοχη κινητική συμπεριφορά (Labrou et al., 2001). Ένα διμερές ένζυμο, το οποίο έχει δύο ανεξάρτητες υπομονάδες και δύο υποστρώματα ενδέχεται, υπό ορισμένες συνθήκες, να παρουσιάζει μια θετική συνέργεια σε περίπτωση που ακολουθήσει το μηχανισμό τυχαίας διαδοχής (Segel, 1975). Χαρακτηριστικά, η μη Michaelian κινητική συμπεριφορά των GSTs από τον οργανισμό *Lucilia cuprina* (Caccuri et al., 1997) και οι GSTs από ποντίκι M1-1, M1-2 και A3-3 (Ivanetich et al., 1990; Jakobson et al., 1979), οφείλεται στον Bi-Bi μηχανισμό τυχαίας διαδοχής. Μια άλλη πηγή της φαινομενικής συνέργειας μπορεί να είναι η αλλαγή ισορροπίας του μονομερούς-διμερούς εξαιτίας του υποστρώματος,

όπως παρατηρείται στο ένζυμο GST από τον οργανισμό *Plasmodium falciparum* (Liebau et al., 2009). Η τρίτη πιθανότητα είναι το υπόστρωμα (CDNB ή AITC) να συνδέεται στην πρώτη υπομονάδα, προκαλώντας μια διαμορφωτική αλλαγή στην δεύτερη υπομονάδα και ως εκ τούτου να εμφανίζεται μια αυξημένη συγγένεια με το υπόστρωμα (Ricci et al., 1995; Lo et al., 1995; McManus et al., 2011).

Ακολούθησε μελέτη επίδρασης του pH στην ενζυμική δραστηριότητα των CrGST10 και CrGST7. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ιδιαίτερη προτίμηση στην αλκαλική περιοχή pH. Προτίμηση σε αλκαλικά pH παρουσιάζεται και σε άλλες GSTs που ανήκουν στη *Sigma* τάξη. Συγκεκριμένα, το ένζυμο TJ-GST-S, από τον οργανισμό *Tigriopus japonicus*, έδειξε βέλτιστη ενζυμική δραστηριότητα περιοχή pH μεταξύ 7,5 και 8 (Lee et al., 2007), ενώ η GST-S από το γαιοσκώληκα *Hyphantria cunea* έδειξε επίσης βέλτιστο pH περίπου 8 και χαρακτηριστικά στην ακραία αλκαλική τιμή pH 10 η ενζυμική του δραστηριότητα ήταν πολύ υψηλή ξεπερνώντας το 50 % (Yamamoto et al., 2007).

Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι η κατάλυση των GSTs βασίζεται στην ικανότητά τους να μειώνουν το pK_a της θειόλικής ομάδας της δεσμευμένης GSH, ενισχύοντας έτσι τον πυρηνόφιλο χαρακτήρα της (Kong et al., 1992; Axarli et al., 2009; Deponte, 2013). Για τις GSTs της *Sigma* τάξης αυτό επιτυγχάνεται από το αμινοξικό κατάλοιπο Tyr7, της οποίας το υδροξυλίο της πλευρικής αλυσίδας σχηματίζει ένα δεσμό υδρογόνου με την -SH ομάδα της GSH (Kong et al., 1992). Πιθανώς, η πρώτη pK_a που παρατηρείται σε όξινο pH (pK_{a1}) αντανακλά τον ιονισμό της -SH ομάδας της δεσμευμένης GSH. Η μείωση της V_{max} σε αλκαλικό pH (pK_{a2}) υποδηλώνει την ύπαρξη ενός τουλάχιστον πρωτονιωμένου αμινοξικού καταλοίπου (πιθανώς Lys ή Cys) που εμπλέκεται στη δέσμευση και στην κατάλυση των υποστρωμάτων.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης του pH και της θερμοκρασίας με σκοπό να προσδιοριστεί ο ρόλος του αμινοξικού καταλοίπου Trp99 στη δομική σταθερότητα. Η μεταβολή του βέλτιστου pH και η μείωση της T_m υποδηλώνουν μια σημαντική συμβολή της Trp99 στο pH και στη θερμική σταθερότητα του ενζύμου. Η δομική ανάλυση του μοντέλου CrGST10 υποδηλώνει ότι η Trp99 συμβάλλει στη συνολική αναδίπλωση και στη σταθερότητα, συμμετέχοντας στη 3D διαμόρφωση του χώρου μεταξύ των δύο α-ελίκων με το διατηρεί τη βέλτιστη απόσταση. Οι δυο μεταλλαγμένες μορφές Trp99Ala και Trp99Leu έχουν χάσει αυτό το σημαντικό χαρακτηριστικό και ως εκ τούτου είναι δομικά πιο ασταθή και εμφανίζοντας

μεγαλύτερη εντροπία. Είναι αυτονόητο ότι η απώλεια μια τέτοιας θέσης-κλειδί στο εσωτερικό της πρωτεΐνης, θα οδηγήσει σε πιο ασταθή μεταλλαγμένη δομή GST.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα μελέτη, περιγράφεται ο χαρακτηρισμός των ενζύμων CrGST10 και CrGST7 από τον οργανισμό *Chlamydomonas reinhardtii*. Επιπλέον, ασχοληθήκαμε με θέματα που αφορούν το λειτουργικό ρόλο των δύο αμινοξικών υπολειμμάτων (Tyr7 και Trp99) εφαρμόζοντας κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση. Πρακτικά, αναλύοντας το ρόλο αυτών των καταλοίπων στον καταλυτικό μηχανισμό του ενζύμου, έδωσε μια σημαντική συμβολή στην κατανόηση του μηχανισμού δέσμευσης και εξειδίκευσης του υποστρώματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Η οικογένεια GST από το στέλεχος *Chlamidomonas reinhardtii*: Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός



6.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στον παρόν κεφάλαιο απομονώθηκε από cDNA βιβλιοθήκη *Chlamidomonas* ένζυμο της οικογένειας των GSTs, το CrGST8. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό αποτελεί το γεγονός ότι το συγκεκριμένο ένζυμο φαίνεται να ανήκει στην τάξη *Theta*. Η υπερέκφραση του ενζύμου CrGST8 οδήγησε σε ενδοκυτταρική συσσώρευση συσσωματωμάτων γνωστά ως έγκλειστα σωματίδια. Αρχικά έγινε προσπάθεια βελτιστοποίησης των συνθηκών έκφρασης με χρήση διαφορετικής συγκέντρωσης του επαγωγέα ισοπροπυλοθειογαλακτοζίτη (IPTG) και της θερμοκρασίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι συγκεκριμένοι παράγοντες επηρεάζουν ελάχιστα τα επίπεδα έκφρασης και το σχηματισμό πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων του CrGST8. Η μελέτη συνεχίστηκε με στόχο τη διαλυτοποίηση και αναδίπλωση του ενζύμου με χρήση χαοτροπικών ουσιών όπως η ουρία και το χλωρίδιο του γουανιδίου. Επίσης έγινε δοκιμή αναγέννησης του ενζύμου με χρήση ακυλικής αλκοόλης, της προπανόλης με σκοπό τον έλεγχο της επίδρασης μιας ηπιότερης μεθόδου αναδίπλωσης. Θετική επίδραση στη διαλυτοποίηση του CrGST8 είχαν μόνο οι χαοτροπικές ουσίες και κυρίως η ουρία. Η υψηλή συγκέντρωση προπανόλης αντιθέτως, οδήγησε σε μη επιθυμητά αποτελέσματα ενισχύοντας το σχηματισμό πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων κατά τη διάρκεια της αναδίπλωσης. Έπειτα από την επιτυχημένη προσπάθεια αναδίπλωσης, πραγματοποιήθηκε μελέτη της εκλεκτικότητας του ενζύμου έναντι διαφορετικών υποστρωμάτων. Το ένζυμο CrGST8 φαίνεται να εμφανίζει ιδιαίτερη προτίμηση για τα υποστρώματα π-νιτροβενζυλ-χλωρίδιο (PNBC) και 2,2-διθειοδιαιθανόλη (HED), 4-χλωρο-7-νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο (NBD-Cl) και 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB). Επίσης μελετήθηκε η επίδραση του pH στην ενζυμική δραστηριότητα του CrGST8. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι το CrGST8 έχει μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα στην όξινη περιοχή των pH με μέγιστη τιμή να εμφανίζεται στο pH 5,6. Χαρακτηριστικά, η ενζυμική δραστηριότητα έχει σχεδόν μηδενιστεί σε pH 7, ένα πολύ ιδιαίτερο γεγονός για την οικογένεια των GSTs.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η οικογένεια των ενζύμων GSTs (τρανσφερασών γλουταθειόνης) φιλοξενεί πολυλειτουργικές πρωτεΐνες με εκπροσώπους σε όλους τους οργανισμούς που χρησιμοποιούν οξυγόνο και εκπροσωπούν όλα τα βασίλεια. Τα περισσότερο χαρακτηρισμένα ένζυμα των GSTs είναι αυτά των θηλαστικών και συνήθως αποτελούν ένζυμα αποτοξίνωσης. Σε θαλάσσιους οργανισμούς, όπως τα μικροάλγη, ελάχιστα είναι γνωστά για τα συγκεκριμένα ένζυμα. Στην παρούσα μελέτη απομονώθηκε το ένζυμο CrGST8, το οποίο φαίνεται να ανήκει στην τάξη των GSTs, τη *Theta*, η οποία πρόσφατα ανιχνεύτηκε και μελετήθηκε για πρώτη φορά στα κυανοβακτήρια (Wiktelius et al., 2007).

Ο μεταβολισμός της γλουταθειόνης είναι ένα αρχαίο χαρακτηριστικό στην ιστορία της ζωής και χρονολογείται από την περίοδο που η ατμόσφαιρα αποτελούταν μόνο από οξυγόνο (Vuilleumier et al., 1997; Fahey et al., 1991). Η GSH και οι οικογένεια των GSTs πιστεύεται ότι δημιουργήθηκαν ως μια απάντηση στη συνεχή αύξηση της συγκέντρωσης του οξυγόνου η οποία και οδήγησε στις ενεργές μορφές του (reactive oxygen species). Τα κυανοβακτήρια είναι οι πρώτοι οργανισμοί που εισήγαγαν το οξυγόνο στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό και όπως είναι γνωστό, έχουν υψηλές συγκεντρώσεις γλουταθειόνης (GSH) στο κυτταρόπλασμά τους (Fahey et al., 1991) υποδεικνύοντας έτσι την παρουσία ενζύμων που τη χρησιμοποιούν. Τα κυανοβακτήρια φαίνεται να αποτελούν από τους πρώτους οργανισμούς που φιλοξενούν τα ένζυμα των GSTs. Πράγματι, όλα τα γνωστά γονιδιώματα από κυανοβακτήρια περιέχουν γονίδια που χαρακτηρίζονται ως GST, καθώς και άλλες GSH-εξαρτώμενες πρωτεΐνες. Τα ένζυμα GSTs που ανήκουν στη *Theta* τάξη παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Η αμινοξική τους αλληλουχία είναι μικρότερη σε σχέση με τις είδη μελετημένες GSTs ενώ η μελέτη τους είναι αρκετά περιορισμένη.

Η υπερ-έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε *E. coli* συχνά μπορεί να οδηγήσει σε ενδοκυτταρική συσσώρευση μερικώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών σε συσσωματώματα που ονομάζονται έγκλειστα σωμάτια (inclusion bodies) (Ferrer-Miralles et al., 2011; Singh et al., 2015). Τα συσσωματώματα πρωτεϊνών μπορούν να διαλυθούν με χρήση υψηλής συγκέντρωσης χυατροπικών παραγόντων και στη συνέχεια να αναδιπλωθούν στη φυσική τους κατάσταση χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές αναδίπλωσης (Martínez-Alonso et al., 2009). Η διαλυτοποίηση των

συσσωματώματων με χαοτροπικές ουσίες οδηγεί σε τυχαία δομική διαμόρφωση της πρωτεΐνης εκθέτοντας τις υδρόφοβες περιοχές της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Αυτό όμως έχει ως αποτέλεσμα να ενισχύει την πρωτεϊνική συσσωμάτωση κατά τη διάρκεια της αναδίπλωσης, οδηγώντας έτσι σε ανάκτηση λιγότερο λειτουργικών βιοδραστικών πρωτεϊνών. Είναι ευρέως γνωστό ότι οι πρωτεΐνες στα έγκλειστα σωματίδια απαντώνται στη φυσική τους κατάσταση, δηλαδή στη δευτεροταγή δομή τους (Przybycien et al., 1994; Ami et al., 2006; Ventura & Villaverde, 2006). Ηπιότεροι μέθοδοι διαλυτοποίησης των πρωτεϊνών που βρίσκονται σε έγκλειστα σωματίδια μπορεί να προστατέψουν τη δευτεροταγή δομή οδηγώντας σε μείωση της πιθανότητας για συσσωμάτωση κατά το στάδιο της αναδίπλωσης και γενική βελτίωση στην ανάκτηση των βιοδραστικών πρωτεϊνών (Carvajal et al., 2011). Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων μεθόδων περιλαμβάνουν την εφαρμογή υψηλής πίεσης (200 MPa) παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης μετουσιωτικών παραγόντων (John et al., 1999; Lee et al., 2006), τη χρήση υψηλών τιμών pH (Patra et al., 2000; Raina et al., 2004; Patra et al., 2000; Heiker et al., 2010) και ουσιών όπως η L-αργινίνη (Tsumoto et al., 2003; Umetsu et al., 2005) και το λάουρετ γλουταμικό (lauryl glutamate) (Kudou et al., 2011).

Επίσης, έχουν μελετηθεί εκτενώς οι αλληλεπιδράσεις μορίων πρωτεΐνης με οργανικούς διαλύτες όπως οι αλκοόλες (Roccatano et al., 2002; Halim et al., 2014), με τα αποτελέσματα να δείχνουν ότι οι οργανικοί διαλύτες μπορούν να προάγουν το σχηματισμό της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών, τόσο σε φυσικές όσο και σε μη-φυσικές καταστάσεις (Singh et al., 2012). Συγκεκριμένα, οι αλκυλικές αλκοόλες σε υψηλή συγκέντρωση φαίνεται να έχουν την ικανότητα να προάγουν το σχηματισμό έλικας (Ghosh et al., 2015) αλλά και να προκαλούν μετουσίωση στις πρωτεΐνες (Schaller et al., 2015) αποσταθεροποιώντας την τριτοταγή δομή τους χωρίς όμως να επηρεάζουν τη δευτεροταγή δομή (Feng et al., 2014).

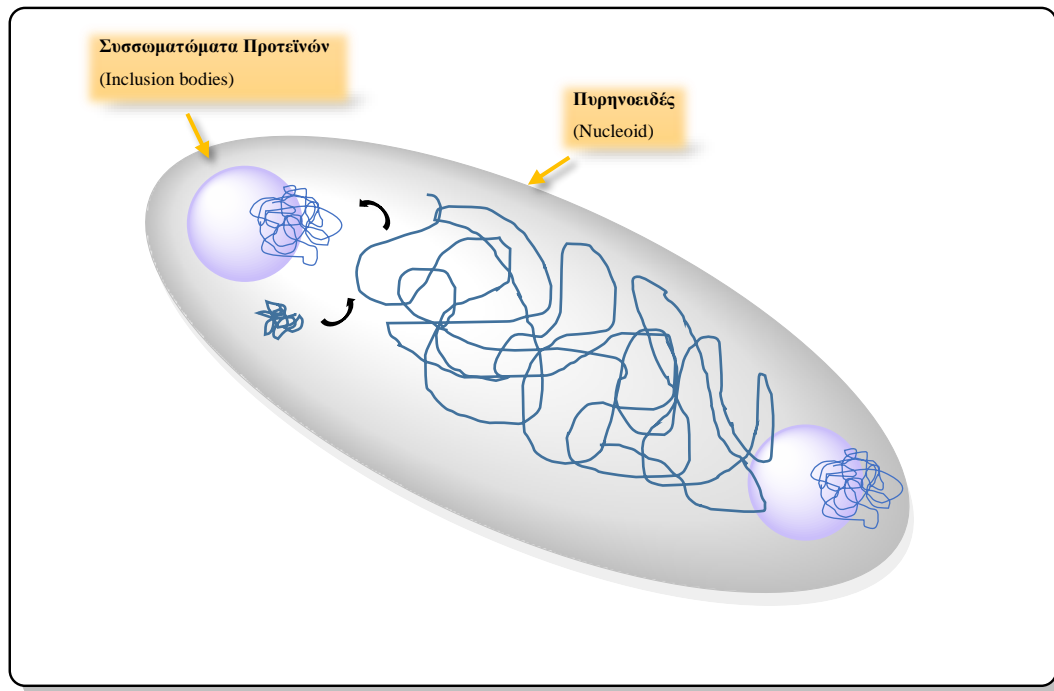
Αναλυτικότερα, τα έγκλειστα σωματίδια αποτελούν πυρηνικά ή κυτταροπλασματικά συσσωματώματα κυρίως πρωτεϊνών. Σχεδόν αποκλειστικά περιέχουν υπερ-εκφρασμένα μόρια πρωτεΐνης, αλλά σαν σύσταση μπορεί να αποτελεί λίγη πρωτεΐνη του ξενιστή, ριβοσωμικά συστατικά ή θραύσματα του DNA/RNA του. Η συσσωμάτωση σε έγκλειστα σωματίδια φαίνεται να είναι μια διαδικασία αναστρέψιμη (Winkler et al., 2010).

Έχει προταθεί ότι τα έγκλειστα σωμάτια αποτελούν δυναμικές δομές που σχηματίζονται από μία ασύμμετρη ισορροπία μεταξύ υδατοδιαλυτών και μη πρωτεϊνών από *E.coli*. Έρευνες έχουν δείξει ότι ο σχηματισμός έγκλειστων σωματίων λαμβάνει χώρα ως ένα αποτέλεσμα ενδοκυτταρικής συσσώρευσης μερικώς αναδιπλωμένων εκφρασμένων πρωτεϊνών που συσσωματώνονται μέσω μη-ομοιοπολικών υδρόφοβων, ιοντικών αλληλεπιδράσεων ή/και συνδυασμό αυτών.

Τα έγκλειστα σωμάτια αποτελούν πυκνά σωματίδια συσσωματωμένης πρωτεΐνης που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και στους χώρους του περιπλάσματος του βακτηρίου/ξενιστή *E.coli*, κατά τη διάρκεια της υπερ-έκφρασης μιας ετερόλογης πρωτεΐνης. Είναι γενικά παραδεκτό ότι η έκφραση υψηλού επιπέδου μιας μη-φυσικής πρωτεΐνης (μεγαλύτερη από 2% της κυτταρικής πρωτεΐνης) και υδρόφοβων πρωτεϊνών, να αποτελούν περισσότερο επιρρεπής στο να οδηγηθούν σε δημιουργία συσσωματωμάτων, με τη μορφή των έγκλειστων σωματίων (Laloux & Jacobs-Wagner, 2014).

Στην περίπτωση των πρωτεϊνών που έχουν δισουλφιδικούς δεσμούς, ο σχηματισμός συσσωματωμάτων ως έγκλειστα σωμάτια αναμένεται, διότι το αναγωγικό περιβάλλον του βακτηριακού κυτοσολίου αναστέλλει το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Η διάμετρος των σφαιρικών βακτηριακών σωμάτων εγκλεισμού κυμαίνεται στα 0.5-1.3μ και τα συσσωματώματα πρωτεΐνης έχουν άμορφη ή παρακρυσταλλικά φύση, ανάλογα με την περιοχή που σχηματίστηκαν. Τα έγκλειστα σωμάτια έχουν υψηλότερη πυκνότητα (~ 1.3mg/mL) σε σύγκριση με πολλά από τα κυτταρικά συστατικά, και έτσι μπορεί εύκολα να διαχωριστούν με φυγοκέντρηση υψηλής ταχύτητας μετά τη διάσπαση των κυττάρων. Παρόλο αυτά, αποτελούν μορφές πολύ ενυδατωμένες και έχουν μια πορώδη αρχιτεκτονική (Kuwada et al., 2015).

Σε βακτήρια *E. coli*, κακώς αναδιπλωμένες πρωτεΐνες συσσωρεύονται σε έγκλειστα σωμάτια τα οποία σχηματίζονται παθητικά στους πόλους του κυττάρου. Η διεργασία αυτή ευνοείται ενεργειακά εκτός της περιοχής του πυρηνοειδούς εξαιτίας των επιπτώσεων του όγκου αποκλεισμού (Keramati et al., 2015). Έτσι, μεγάλες συστάδες πρωτεϊνών (inclusion bodies) μπορούν να ταξινομηθούν παθητικά στους πόλους με μια διαδικασία που ονομάζεται πυρηνοειδής απόφραξη (nucleoid occlusion) (**Εικόνα 6.1**).

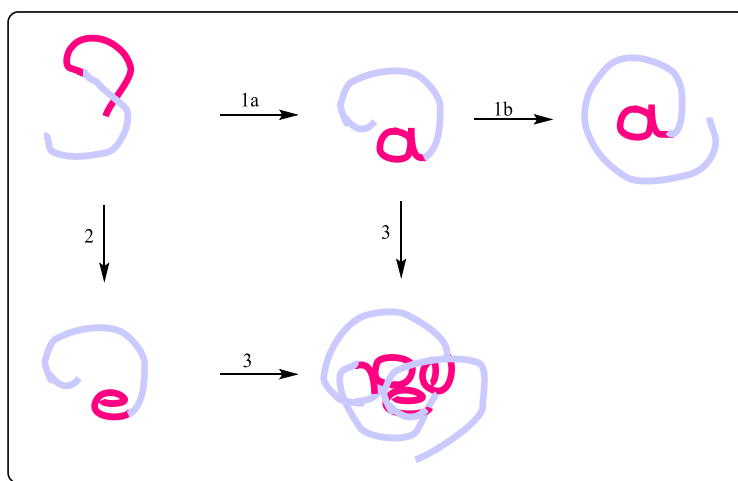


Εικόνα 6. 1: Δομή βακτηρίου *E. coli* που αφορά τη διαδικασία δημιουργίας πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων στους πόλους του κυττάρου λόγω πυρηνοειδής απόφραξης.

Ένας υψηλός βαθμός καθαρισμού της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης μπορεί να επιτευχθεί με απομόνωση των σωμάτων εγκλεισμού. Τα έγκλειστα σωμάτια γενικά ανακτώνται με φυγοκέντρηση χαμηλής ταχύτητας των βακτηριακών κυττάρων που διασπάστηκαν μηχανικά με υπερήχους (Ferrer-Miralles et al., 2015). Αποτελούνται από υδρόφοβες πρωτεΐνες, όπως πρωτεΐνες του περιβλήματος των κυττάρων ή της εξωτερικής μεμβράνης. Οι τελευταίες, δεν αποτελούν μέρος των συσσωματωμάτων αλλά κατά τη διάρκεια αναδίπλωσης της επιθυμητής πρωτεΐνης γίνονται ανεπιθύμητες προσμίξεις. Επεξεργασία με διάλυμα λυσοζύμης-EDTA πριν από την κυτταρική ομογενοποίηση διευκολύνει τη διάρρηξη των κυττάρων. Προσθήκη απορρυπαντικών όπως το Triton X-100 ή/και χαμηλές συγκεντρώσεις χυαοτροπικών ενώσεων, είτε πριν από τη μηχανική θραύση των κυττάρων είτε για το πλύσιμο των έγκλειστων συσσωματωμάτων, επιτρέπουν την απομάκρυνση μη επιθυμητών πρωτεϊνών (Singh et al., 2015).

Μετά την απομόνωση τους, τα έγκλειστα σωμάτια συνήθως διαλυτοποιούνται με υψηλές συγκεντρώσεις χυαοτροπικών παραγόντων όπως υδροχλωρικό γουανιδίνιο ή ουρία. Αν και ακριβό, το υδροχλωρικό γουανιδίνιο προτιμάται λόγω των υψηλών χυαοτροπικών ιδιοτήτων του. Το διάλυμα ουρίας μπορεί να περιέχει και αυθόρμητα να προκαλέσει την παραγωγή κυανικού η οποία ίσως να οδηγήσει σε καρβαμυλίωση,

δηλαδή με αντικατάσταση δραστικών υδρογόνων των ομάδων $-NH_2$, $-NH$ και $-SH$ με την ομάδα CH_3NHCOO^- (El-Gamal et al., 2014; Hagel, et al., 1971). Επιπλέον, η διαλυτοποίηση των έγκλειστων σωμάτων με ουρία εξαρτάται από το βέλτιστο pH της κάθε πρωτεΐνης. Υπάρχουν επίσης αναφορές ότι έγκλειστα σώματα μπορούν να διαλυτοποιηθούν με ακραίες τιμές pH, παρουσία ή απουσία χαμηλών συγκεντρώσεων μετουσιωτικών παραγόντων. Ωστόσο, οι ακραίες τιμές pH μπορεί να οδηγήσουν σε μη αναστρέψιμες τροποποιήσεις της πρωτεΐνης όπως αποαμίδωση και αλκαλική αποθείωση των καταλοίπων κυστεΐνης (Baneyx & Mujacic, 2004). Τέλος, τα έγκλειστα σώματα μπορούν να διαλυθούν με διαφορετικούς τύπους απορρυπαντικών, χαμηλές συγκεντρώσεις μετουσιωτικών ουσιών ή ακόμη και με τη χρήση της αργινίνης. Η τελευταία, εμποδίζει το σχηματισμό συσσωμάτων με την ενίσχυση της διαλυτότητας των ενδιάμεσων αναδιπλωμένων μορφών, πιθανώς με θωράκιση των υδρόφοβων περιοχών. Εκτός από τον παράγοντα διαλυτοποίησης, η παρουσία χαμηλού μοριακού βάρους αντιδραστηρίων θειόλης, όπως διθειοθρεϊτόλη (DTT), 2-μερκαπτοαιθανόλη ή γλουταθειόνη, απαιτείται γενικότερα. Αυτές οι ουσίες θα μειώσουν τους μη ενσωματωμένους δισουλφιδικούς δεσμούς που πιθανώς σχηματίζονται από την οξείδωση του αέρα κατά τη διάρκεια της διάσπασης των κυττάρων και ταυτόχρονα θα σταθεροποιήσουν τα μόρια της κυστεΐνης στην ανηγμένη μορφή της (Hrabárová et al., 2015).



Εικόνα 6. 2: Απλοποιημένο μοντέλο σωστής αναδίπλωσης σε σχέση με κακή αναδίπλωση και συσσωμάτωση. Η σωστή πορεία αναδίπλωσης των πρωτεϊνών (1) συχνά ανταγωνίζεται με την κακή αναδίπλωση (2) και συσσωμάτωση (3). Η συσσωμάτωση λαμβάνει χώρα μεταξύ των ενδιάμεσων μορφών αναδίπλωσης, μέσω των εκτεθειμένων υδρόφοβων περιοχών τους (ανοιχτό μωβ γραμμές: υδρόφιλα μέρη πρωτεΐνης, φούξια γραμμές: υδρόφοβες περιοχές), (Vallejo & Rinas, 2004).

6.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.2.1. ΥΛΙΚΑ


Όλα τα χημικά, τα διαλύματα, τα ένζυμα αλλά και τα υποστρώματα ενζύμων έχουν προμηθευτεί από τη Sigma-Aldrich (USA). Οι cDNA βιβλιοθήκες *Chlamidomonas* προμηθεύτηκαν από το πανεπιστήμιο της Μινεσότα (<http://chlamycollection.org/>). Τα κιτ απομόνωσης pCR[®]T7/CT-TOPO[®] kit και pETite[™] N-His kit προμηθεύτηκαν από την Invitrogen, (USA) και Lucigen. Οι πολυμεράσες Kapa Taq and Kapa HiFi DNA από την εταιρεία Kapa Biosystems (USA), ενώ τα κιτ απομόνωσης πλασμιδιακού DNA και καθαρισμού των προϊόντων της PCR αντίδρασης από την QIAGEN, (UK).

6.2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

6.2.2.1. ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ *CrGST8* ΣΤΟΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ T7 pETite[®]

Οι βιβλιοθήκες cDNA (Lab A, B, C, D) δημιουργήθηκαν από κύτταρα μικροάλγης *Chlamidomonas reinhardtii* που βρίσκονταν στα μέσα της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης σε TAP θρεπτικό διάλυμα στο φως (Lab A) και στο σκοτάδι (Lab B), σε HS θρεπτικό διάλυμα παρουσία 5 % CO₂ (Lab C) και σε φυσιολογικά επίπεδα CO₂ (Lab D). Οι βιβλιοθήκες είχαν τίτλο ενίσχυσης (amplification titer) 1,8 x 10⁷ (Lab A), 1 x 10⁶ (Lab B), 5 x 10⁵ (Lab C) και 4,5 x 10⁶ (Lab D). Η αντίδραση PCR που πραγματοποιήθηκε για το ισοένζυμο *CrGST8* έχει τελικό όγκο 50 μL και περιέχει: 3 μL μήτρα από μια cDNA βιβλιοθήκη, 0,2 mM από κάθε ένα dNTPs, 10 μL 5 X KAPA HiFi διάλυμα πολυμεράσης, 0,2 pmol από κάθε εκκινητή και 1 Unit KAPA HiFi πολυμεράσης. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR και οι εκκινητές παρουσιάζονται στη συνέχεια (Πίνακας 6. 1 και 6. 2).

Πίνακας 6. 1: Στάδια της PCR αντίδρασης για την απομόνωση του ενζύμου *CrGST8*.

A. ΑΡΧΙΚΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ	
Στους 95 °C για 2 min	
B. ΚΥΚΛΟΣ	
Αποδιάταξη στους 98 °C για 20 s	
Υβριδισμός εκκινητών στους 54 °C για 30 s	
Επιμήκυνση στους 72 °C για 1 min	
Γ. ΤΕΛΙΚΗ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ	
Επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min	

Πίνακας 6. 2: Αλληλουχία εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό την απομόνωση του γονιδίου *CrGST8* από cDNA βιβλιοθήκη *Chlamidomonas reinhardtii*.

Εκκινητές	Νουκλεοτιδική αλληλουχία (5'→3')
GST8F	ATGAAGCTGTACTCCAACCCTGCGTCTC
GST8R	TCACCGCTTCATGTAGGCCTGGACG

Το προϊόν της αντίδρασης PCR αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1 % (w/v), στο οποίο παρατηρήθηκε μια ζώνη μεγέθους 516 bp όπου αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μέγεθος του κάθε γονιδίου.

Χρησιμοποιώντας το πλασμιδιακό DNA του γονιδίου *CrGST8* ως μήτρα, ακολούθησε αντίδραση PCR με χρήση κατάλληλα διαμορφωμένων εκκινητών ώστε να ακολουθήσει υποκλωνοποίηση του γονιδίου σε πλασμιδιακό φορέα T7 pETite της εταιρίας Lucigen και μετασχηματισμός σε κύτταρα *E. coli* HI-Control BL21 (DE3).

Τα θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για τις υγρές και στερεές καλλιέργειες ήταν το YT με δείκτη επιλογής το αντιβιοτικό καναμυκίνη (30 µg/ mL).

Πίνακας 6. 3: Αλληλουχία εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό τη υποκλωνοποίηση του γονιδίου *CrGST8* σε πλασμιδιακό φορέα pETite της εταιρίας Lucigen.

Εκκινητές	Νουκλεοτιδική αλληλουχία (5'→3')
GST8CIF	GAA GGA GAT ATA CAT ATG AAG CTG TAC TCC AAC CCT GCG TCT C
GST8CIR	GTG ATG GTG GTG ATG ATG TCA CCG CTT CAT GTA GGC CTG GAC G

Από την παραπάνω διαδικασία αναπτύχθηκαν επτά αποικίες. Ακολούθησε έκφραση των μετασηματισμένων κυττάρων σε μικρή κλίμακα και μελέτη ως προς την ενζυμική τους δραστηριότητα με χρήση του υποστρώματος CDNB. Επιλέχθηκαν οι δύο καλύτεροι κλώνοι, αλληλουχήθηκαν και εκφράστηκαν σε κύτταρα *E. coli* HI-Control BL21 (DE3) με σκοπό το ένζυμο *CrGST8* να μελετηθεί εκτενέστερα.

6.2.2.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ GSTs

Για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA του γονιδίου *CrGST8*, χρησιμοποιήθηκε kit απομόνωσης πλασμιδιακού DNA του οίκου Macherey-Nagel με σκοπό την επίτευξη της μέγιστης καθαρότητας για τη σωστή αλληλούχιση του στην εταιρία Cemia. Για εκ νέου απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης (§ 2.2.1.2.).

6.2.2.3. ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *CrGST8* ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ *E. coli* ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ HI-Control BL21 (DE3)

Πραγματοποιήθηκε μετασηματισμός κυττάρων *E. coli* HI-Control BL21 (DE3) με το ανασυνδιασμένο DNA του πλασμιδίου pT7GST8 και στη συνέχεια ακολούθησε καλλιέργεια και ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο YT παρουσία του αντιβιοτικού καναμυκίνη (30 µg/ mL). Η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου έγινε με τη χρήση IPTG (1 mM), το οποίο ενσωματώθηκε στην υγρή καλλιέργεια μόλις η απορρόφηση στα 600 nm έφτασε 0,6. Η επώαση διήρκησε 4 h και στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση στις 8000rpm στους 4 °C για 20 min. Για λόγους βελτίωσης της

έκφρασης του γονιδίου *CrGST8*, η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε διαφοροποιώντας τη θερμοκρασία και τη συγκέντρωση του IPTG. Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6. 4**.

Πίνακας 6. 4: Συνθήκες για τη βελτίωση της έκφρασης.

Θερμοκρασία έκφρασης	IPTG
37 °C	1 mM
18 °C	0 mM
	0,1 mM
	1 mM
25 °C	0 mM
	0,1 mM
	1 mM

6.2.2.4. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ENZYMOY *CrGST8* ΜΕ ΧΑΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Το ένζυμο *CrGST8* παρουσίασε μια ιδιαίτερη συμπεριφορά μετά την ετερόλογη έκφρασή του σε σχέση με τα ένζυμα GSTs που μελετήθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο. Η ιδιαίτερη συμπεριφορά αφορά στο σχηματισμό έγκλειστων σωματίων (inclusion bodies). Υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις όπου όταν μια ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη υπερ-εκφράζεται μπορεί να οδηγήσει σε ενδοκυτταρική συσσώρευση μερικώς αναδιπλωμένης πρωτεΐνης σε συσσωματώματα που ονομάζονται έγκλειστα σωματίδια. Αρχικά, η προσέγγιση για τον καθαρισμό/αναγέννηση του συγκεκριμένου ενζύμου πραγματοποιήθηκε με χρήση τριών διαφορετικών διαλυμάτων για τη λύση των κυττάρων.

Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων Α (Μέθοδος Α)

50 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 6 M χλωρίδιο του γανιδίου, pH 8

Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων Β (Μέθοδος Β)

50 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 8 M ουρία pH 8

Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων Γ (Μέθοδος Γ)

50 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 6 M προπανόλη, 2 M ουρία, 10 % σουκρόζη, pH 8

Η λύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με υπερήχους (10 επαναλήψεις των 30 s) κάνοντας χρήση ρυθμιστικού διαλύματος Α, Β και Γ. Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 45 min και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15 min. Η διαδικασία αναδίπλωσης της πρωτεΐνης με σκοπό την ενεργή αποκατάστασή της πραγματοποιήθηκε με γρήγορη/απότομη αναδίπλωση, με απευθείας αραίωση του υπερκείμενου με το ρυθμιστικό διάλυμα. Το υπερκείμενο που προκύπτει από την παραπάνω διαδικασία αραιώνεται 10 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα αναδίπλωσης που περιέχει 50 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 1 mM αργινίνη, 1 mM γλουταθειόνη, 0,5 % EDTA και 10 % σουκρόζη σε pH 8.

Ακολουθεί επώαση για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου και μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας με το σύστημα CDNB/ GSH. Για περαιτέρω μελέτη πραγματοποιείται το στάδιο της διαπίδωσης σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM K₂HPO₄ pH 7 για 1 h στους 4 °C.

6.2.2.5. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ENZYMOY CrGST8 ME ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ BES-GSH

Ένας εναλλακτικός τρόπος καθαρισμού του ενζύμου CrGST8 πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία συγγένειας έχοντας ως προσροφητή την BES-GSH. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων σε υπερήχους (5 επαναλήψεις των 10 s) με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος δισόξινου φωσφορικού καλίου (20 mM KH₂PO₄ pH 7) σε όγκο τριπλάσιο του αρχικού βάρους. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (13000 rpm για 10 min) και προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας (σύστημα GSH-CDNB) (§ 2.2.1.21.) και πρωτεΐνης (μέθοδος Bradford) (§ 2.2.1.16.) στο υπερκείμενο που προέκυψε. Ακολούθησε διαπίδωση (§ 2.2.1.17.) σε διάλυμα φωσφορικών 20 mM KH₂PO₄ pH 7 για 16 h και επαναπροσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του CrGST8 με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας με προσροφητή 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρα GSH-Sepharose-CL6B (BES-GSH). Όσες πρωτεΐνες δε δεσμεύονται στην στήλη, απομακρύνονται με 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης 20mM KH₂PO₄ pH 7. Οι εκλούσεις του CrGST8 που προσδέθηκαν στη στήλη έγιναν με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης με περιεκτικότητα 10 mM γλουταθειόνης. Η μέθοδος της χρωματογραφίας συγγένειας περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο § 2.2.1.14.. Για τον έλεγχο της καθαρότητας των εκλούσεων και του επίπεδου

έκφρασης πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (14 % SDS-PAGE) υπό συνθήκες μετουσίωσης (§ 2.2.1.19.).

6.2.2.6. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ GSTs ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΩΣ ΠΙΘΑΝΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Πραγματοποιήθηκε φωτομετρικός προσδιορισμός δράσης GSTs με πιθανά υποστρώματα τα παράγωγα του 1-αλογονο-2,4-δινιτροβενζολίου (CDNB, FDNB, BDNB, IDNB) και του fluorodifen (Skopelitou et al., 2011; Axarli et al., 2009a), οι οποίες περιγράφονται αναλυτικά στις παραγράφους § 2.2.1.21. και § 2.2.1.27.. Για τη μελέτη δράσης ως προς υπεροξειδάση χρησιμοποιήθηκαν τα πιθανά υποστρώματα υπεροξειδίου (CuOOH, tert-BuOOH και benzoyl peroxide) και οι φωτομετρικές δοκιμές περιγράφονται αναλυτικά στη παράγραφο § 2.2.1.22. Επίσης μελετήθηκαν οι ουσίες: 2,2 διθειοδιαιθανόλη (HED), διϋδροασκορβικό οξύ, εθακρινικό οξύ (EA), trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2όνη (BPO), βρωμοσουλφοφθαλεΐνη (BSP), trans-2-ενάλης (HNE) και οι ισοθειοκυανικοί εστέρες (PEITC και AITC), με τις δοκιμές να περιγράφονται αναλυτικά στις παραγράφους § 2.2.1.23., § 2.2.1.24., § 2.2.1.25., § 2.2.1.26., § 2.2.1.28., § 2.2.1.29. και § 2.2.1.30..

Για τη διαλυτοποίηση των ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων χρησιμοποιήθηκαν είτε η αιθανόλη είτε η ακετόνη σε ένα εύρος τελικής συγκέντρωσης 2-5 % (v/v). Οι τιμές της καταλυτικής σταθεράς k_{cat} υπολογίστηκαν με δεδομένο την ύπαρξη ενός ενεργού κέντρου ανά υπομονάδα. Μια μονάδα (Unit) ενζυμικής δραστηριότητας ορίστηκε η ποσότητα εκείνη του ενζύμου που καταλύει την μετατροπή 1μmol υποστρώματος ανά min. Η ειδική δραστηριότητα έχει εκφραστεί σε μmol/ min/ mg πρωτεΐνης.

6.2.2.7. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ENZYMOY CrGST8 ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ GSH/ CDNB

Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη του CrGST8 ως προς το υπόστρωμα CDNB στους 37 °C. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε σαν μεταβαλλόμενη συγκέντρωση η GSH με τελικό όγκο μίγματος στο 1 mL. Η κυβελίδα περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M KH₂PO₄ pH 6,5, GSH διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,3-2,65 mM) και το υπόστρωμα CDNB σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Στη συνέχεια έγινε κινητική μελέτη με σταθερή τη συγκέντρωση γλουταθειόνης (2,5 mM) και μεταβαλλόμενες τις συγκεντρώσεις του CDNB (0,1-1,25).

Η πειραματική διαδικασία ολοκληρώθηκε έπειτα από τρεις επαναλήψεις και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων. Η επεξεργασία έγινε με ανάλυση μη γραφικής παλινδρόμησης σύμφωνα με την εξίσωση των Michaelis-Menten στο πρόγραμμα Grafit 4 (Erithacus Software Ltd., Version 4) και GraphPad Prism 5. Στις περιπτώσεις που οι καμπύλες δεν ακολουθούν την εξίσωση του Michaelis-Menten για την τιμή V_{max} , έγινε προσδιορισμός της τιμής $S_{0.5}$ ($S_{0.5}$ αποτελεί τη συγκέντρωση του υποστρώματος όπου η ταχύτητα είναι στο 50 % της V_{max} : $v=0.5V_{max}$). Ο συντελεστής Hill n_H υπολογίστηκε σύμφωνα με την **Εξίσωση 6. 1**.

Εξίσωση 6. 1: Εξίσωση Hill.

$$v = \frac{V_{max} [S]^{n_H}}{S_{0.5}^{n_H} + [S]^{n_H}}$$

6.2.2.8. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH ΣΤΗΝ ENZYΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΚΟΤΗΤΑ

Όπως έχει αναφερθεί στο προηγούμενο κεφάλαιο, το pH αποτελεί έναν παράγοντα που μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης. Συνοπτικά, το pH είναι δυνατόν να μεταβάλλει τη χημική κατάσταση (βαθμό ιονισμού) αμινοξικών καταλοίπων της ενεργής περιοχής, των καταλοίπων που επηρεάζουν τη δέσμευση του υποστρώματος αλλά και άλλων μορίων στο ένζυμο, καθώς και των αμινοξικών καταλοίπων που επηρεάζουν τη στερεοδιάταξη του ενζυμικού μορίου στο σύνολο αλλά και των υποστρωμάτων. Κάθε ένζυμο έχει το δικό του άριστο ή βέλτιστο pH στο οποίο εμφανίζει τη μέγιστη ταχύτητα αντίδρασης στις συγκεκριμένες συνθήκες.

Οι συνθήκες pH που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη ήταν διαφοροποιημένες σε σχέση με εκείνες που έγιναν για τη μελέτη των γονιδίων *CrGST10* και *CrGST7*. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα κιτρικού οξέος ($C_6H_8O_7$), δι-φωσφορικού νατρίου (Na_2HPO_4) και φωσφορικού νατρίου (NaH_2PO_4) σε κατάλληλες συγκεντρώσεις.

Αναλυτικότερα, με σκοπό τη μελέτη χαμηλών τίτλων pH, 0,1 M κιτρικό οξύ (x) και 0,2 M δι-φωσφορικού νατρίου (y) χρησιμοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα (**Πίνακας 6. 5**).

Πίνακας 6. 5: Ρυθμιστικά διαλύματα κιτρικού οξέος και δι-φωσφορικού νατρίου που χρησιμοποιήθηκαν.

pH	X mL 0,1 M-Citric Acid	Y mL 0,2 M-Na ₂ HPO ₄
4,2	58,60	41,4
4,4	55,90	44,10
4,6	53,25	46,75
4,8	50,70	49,30
5,0	48,50	51,50
5,2	46,40	53,60
5,4	44,25	55,75
5,6	42,00	58,00
5,8	39,55	60,45
6,0	36,85	63,15
6,2	33,90	66,10
6,4	30,75	69,25
6,6	27,25	72,75
6,8	22,75	77,25
7,0	17,65	82,35
7,2	13,05	86,95
7,4	9,15	90,85
7,6	6,35	93,65

Με σκοπό τη μελέτη υψηλότερων τιμών pH, 0,2 M δι-φωσφορικού νατρίου (x) και 0,2 M φωσφορικού νατρίου (y) χρησιμοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα (Πίνακας 6. 6).

Πίνακας 6. 6: Ρυθμιστικά διαλύματα δι-φωσφορικού και φωσφορικού νατρίου που χρησιμοποιήθηκαν.

pH	X mL 0,2 M Na ₂ HPO ₄	Y mL 0,2 M-NaH ₂ PO ₄
5,8	4,0	46,0
6,0	6,15	43,85
6,2	9,25	40,75
6,4	13,25	36,75
6,6	18,75	31,25
6,8	24,5	25,5
7,0	30,5	19,5
7,2	36,0	14,0
7,4	40,5	9,5
7,6	43,5	6,5

7,8	45,75	4,25
8,0	47,35	2,65

6.2.2.9. ΘΕΡΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΚΑΤΕΡΓΑΣΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ CrGST8

Για περαιτέρω διερεύνηση και μελέτη της ενζυμικής δράσης του CrGST8, πραγματοποιήθηκε μελέτη επίδρασης της θερμοκρασίας στην καταλυτική αντίδραση. Πειραματικά, οι δύο απλούστερες θερμοδυναμικές προσεγγίσεις περιγράφονται από τους μαθηματικούς τύπους του Eyring και Arrhenius οι οποίοι προκύπτουν κατά βάση από τις θεμελιώδεις αρχές που διέπουν μια χημική αντίδραση. Συγκεκριμένα, για να μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας στην k_{cat} της αντίδρασης σύζευξης με CDNB, τα αποτελέσματα της ενζυμικής δραστηριότητας αναλύθηκαν με γραφική παράσταση του λογαρίθμου της ενζυμικής δραστηριότητας σε σχέση με το αντίστροφο της απόλυτης θερμοκρασίας και προσαρμόζονται στην **Εξίσωση 6. 2** (Oakes et al., 2003):

Εξίσωση 6. 2: Εξίσωση Arrhenius.

$$\log k_{cat} = \log Z - \frac{E_a}{2.303RT}$$

Όπου E_a είναι η ενέργεια ενεργοποίησης, R η παγκόσμια σταθερά των αερίων (8.314 J/molK) και Z (preexponential factor).

Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δραστηριότητας προσαρμόστηκαν στην εξίσωση Eyring και σε μια τροποποιημένη μορφή της συγκεκριμένης εξίσωσης (Fan et al., 2000). Σύμφωνα με τη θεωρία της μεταβατικής κατάστασης κατά Eyring, η εξάρτηση από τη θερμοκρασία της σταθεράς k_{cat} δίνεται από την **Εξίσωση 6. 3** (Fan et al., 2000; Kong et al., 2003):

Εξίσωση 6. 3: Εξίσωση Eyring.

$$k_{cat} = \frac{k_{\beta}T}{h} e^{-\left(\frac{\Delta G^{\ddagger}}{RT}\right)} = \frac{k_{\beta}T}{h} e^{-\left(\frac{\Delta H^{\ddagger}}{RT} - \frac{\Delta S^{\ddagger}}{R}\right)}$$

Όπου k_{β} είναι η σταθερά του Boltzmann, h η σταθερά του Planck, R η παγκόσμια σταθερά των αερίων, ενώ ΔG^{\ddagger} , ΔH^{\ddagger} και ΔS^{\ddagger} είναι η ελεύθερη ενέργεια, η ενθαλπία

και η εντροπία του συστήματος. Τα αποτελέσματα της ενζυμικής αντίδρασης αναλύθηκαν με γραφική παράσταση του λογαρίθμου k_{cat}/T σε σχέση με το αντίστροφο της απόλυτης θερμοκρασίας και προσαρμόζονται στην εξίσωση Eyring.

Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M K_2HPO_4 pH 6,5. Ακολούθησε επώαση του ρυθμιστικού διαλύματος σε διαφορετικές θερμοκρασίες (25-65 °C) και ακολούθησε φωτομετρικός προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας.

6.2.2.10. ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ

Μέσω του προγράμματος pBLAST (Altschul et al., 1990) του διαδικτυακού τόπου NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) πραγματοποιήθηκε η εύρεση ομόλογων αμινοξικών αλληλουχιών των GSTs από διάφορους οργανισμούς. Οι αλληλουχίες που βρέθηκαν ευθυγραμμίστηκαν με το πρόγραμμα ClustalW (Thompson et al., 2002) χρησιμοποιώντας το BLOSUM62 ως scoring matrix (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Για την απεικόνιση της ευθυγράμμισης των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ESPript 3.0 (<http://espript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/index.php>) και το πρόγραμμα Geneious v5.5 (Drummond et al., 2011). Για τη δημιουργία των φυλογενετικών δέντρων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα PhyloDendron (D.G. Gilbert version 0.8d), (<http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/treepriprint-form.html>). Το ομόλογο μοντέλο του CrGST8 δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα Swiss Model (Biasini et al., 2014). Η δομή που χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο για τη δημιουργία του μοντέλου φαίνεται στον Πίνακα 6. 19. Η απεικόνιση έγινε με χρήση του προγράμματος PyMOL (<http://www.pymol.org/>) (DeLano 2002).

6.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.3.1. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ENZYMOY CrGST8

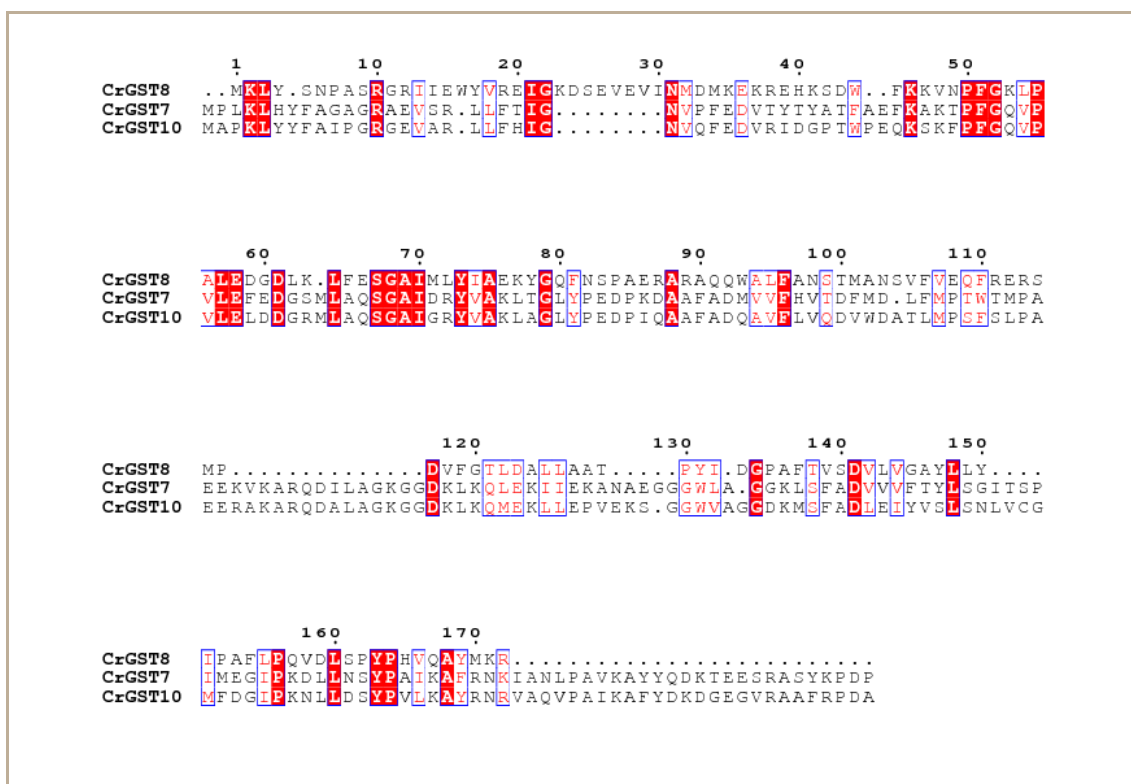
Στο παρόν κεφάλαιο απομονώθηκε το ένζυμο CrGST8 από το στέλεχος *Chlamydomonas reinhardtii*. Το CrGST8 φαίνεται να αποτελεί μια πρωτεΐνη μικρότερου μεγέθους σε σύγκριση με τις αντίστοιχες GSTs. Επίσης, ανήκει στη Theta τάξη της οικογένειας των GSTs.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε νουκλεοτιδική αλληλούχιση η οποία έδειξε ότι το CrGST8 αποτελείται από 516 bp και κωδικοποιεί ένα πολυπεπτίδιο 177 αμινοξέων. Το μοριακό βάρος είναι 19623,55 και το ισοηλεκτρικό σημείο pI 5,52. Η αλληλουχία των αμινοξέων φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6. 7).

Πίνακας 6. 7: Αμινοξική αλληλουχία του ενζύμου CrGST8.

MKLYSNPASR	GRIIEWYVRE	IGKDSEVEVI	NMDMKEKREH
KSDWFKKVN	FGKLPALD	DLKLFESGAI	MLYIAEKYGG
FNSPAERARA	QQWALFANST	MANSVFVEQF	RERSMPDVF
TLDALLAATP	YIDGPAFTVS	DVLVGAYLLY	IPAFLPQVDL
SPYPHVQAYM	KR		

Στο προηγούμενο κεφάλαιο πραγματοποιήθηκε απομόνωση των ενζύμων CrGST10 και CrGST7 από τον ίδιο οργανισμό, *Chlamydomonas reinhardtii*. Με σκοπό την εύρεση ομολογίας των συγκεκριμένων ενζύμων με το CrGST8 πραγματοποιήθηκε αμινοξική στοίχιση των αλληλουχιών με το πρόγραμμα ClustalW (Thompson et al., 1994) (Εικόνα 6. 3). Στον Πίνακα 6. 8 παρουσιάζεται η ποσοστιαία ομοιότητα της αμινοξικής τους ακολουθίας



Εικόνα 6. 3: Αμινοξική στοίχιση των ενζύμων CrGST10, CrGST7 και CrGST8, του είδους *Chlamydomonas reinhardtii*, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ClustalW.

Πίνακας 6. 8: Αμινοξική ομοιότητα που εμφανίζουν τα ισοένζυμα GSTs που απομονώθηκαν από *Chlamydomonas reinhardtii*.

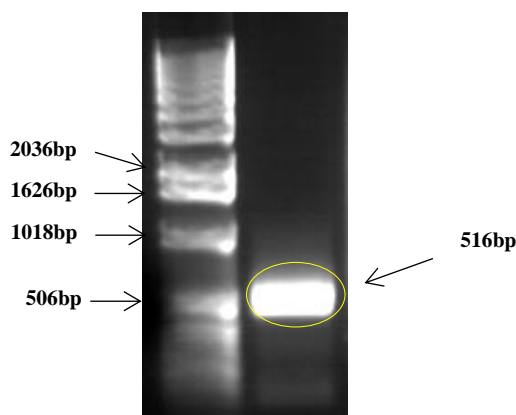
Ισοένζυμα GSTs	Ομοιότητα (%)
<i>CrGST10</i> : <i>CrGST7</i> →	58,53
<i>CrGST10</i> : <i>CrGST8</i> →	18,02
<i>CrGST7</i> : <i>CrGST8</i> →	14,53

Παρατηρούμε ότι τα ένζυμα *CrGST10* και *CrGST7* παρουσιάζουν ομοιότητα 58,53% γεγονός λογικό διότι ανήκουν στην ίδια τάξη, τη *Sigma*. Αντιθέτως, η ομοιότητα που εμφανίζεται μεταξύ αυτών των ενζύμων και του *CrGST8* είναι 18,02 και 15,53% για *CrGST10* και *CrGST7* αντίστοιχα. Το μικρό ποσοστό ομοιότητας οφείλεται στη διαφορετική τάξη στην οποία ανήκουν.

6.3.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΕΙ ΤΟ ΕΝΖΥΜΟ *CrGST8* ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΟ ΦΟΡΕΑ pETite C-his DNA

Απομόνωση γονιδίου *CrGST8*

Βιβλιοθήκες cDNA (A, B, C, D), όπου προήλθαν από μικροάλγη *Chlamydomonas reinhardtii*, η οποία αναπτύχθηκε σε 4 διαφορετικές συνθήκες καταπόνησης (Πίνακας 6. 11), χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του γονιδίου του ενζύμου *CrGST8* με την αντίδραση PCR. Κάθε βιβλιοθήκη ήταν ενσωματωμένη σε βακτηριοφάγο Lambda ZAP II (Stratagene). Ο βακτηριοφάγος είναι ενσωματωμένος σε κύτταρα *E. coli* XL1 Blue MRF (Stratagene). Το προϊόν που προέκυψε αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1 % (w/v) και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η απομόνωση πραγματοποιήθηκε από τη βιβλιοθήκη C. Στην παράγραφο § 6.3.2.1. περιγράφονται αναλυτικά οι συνθήκες και οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν. Στην **Εικόνα 6. 4** φαίνεται το προϊόν που προέκυψε από την PCR αντίδραση.



Εικόνα 6. 4: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR που προέκυψαν από τη σάρωση cDNA βιβλιοθήκης σε πηκτή αгарόζης (1% w/v) για την ανίχνευση του γονιδίου *CrGST8* χρησιμοποιώντας τους primers GST8F και GST8R. Ως δείκτης μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο 1Kb DNA ladder (Invitrogen).

Ακολούθησε κλωνοποίηση σε πλασμιδιακό φορέα T7 pETite C-his της εταιρίας Lucigen, με εισαγωγή του γονιδίου *CrGST8* και μετασχηματισμός σε κύτταρα *E. coli* HI-Control BL21 (DE3) της ίδιας εταιρίας. Τα μετασχηματισμένα κύτταρων επιστρώθηκαν σε τρίλια Petri με θρεπτικό υλικό το YT και με δείκτη επιλογής το αντιβιοτικό καναμυκίνη (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Οι αποικίες που σχηματίστηκαν ήταν τέσσερις, ακολούθησε απομόνωση πλασμιδιακού DNA με kit απομόνωσης DNA το οποίο και υποβλήθηκε σε νουκλεοτιδική αλληλούχιση.

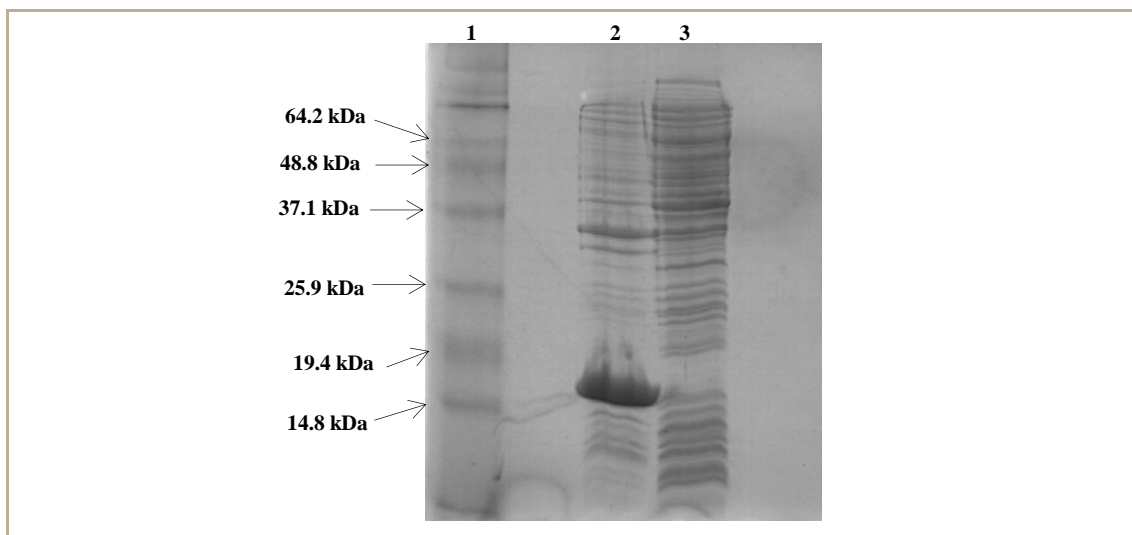
6.3.3. ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *CrGST8* ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ *E. coli* ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ BL21

Αρχικά πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός των εκφραστικών κυττάρων *E. coli* BL21 (DE3) με το πλασμιδιακό DNA του *CrGST8* και ακολούθησε έκφραση στους 37 °C παρουσία 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ καναμυκίνης και του προαγωγέα 1 mM IPTG. Στον **Πίνακα 6. 9** φαίνονται τα επίπεδα έκφρασης, η ενζυμική (Units/ mL) και η ειδική δραστηριότητα (Units/ mg πρωτεΐνης) του *CrGST8*.

Πίνακας 6. 9: Επίπεδα έκφρασης του *CrGST8* και η ειδική δραστηριότητα του ακατέργαστου εκχυλίσματος ως προς CDNB. Η έκφραση πραγματοποιήθηκε στους 37 °C παρουσία 1 mM IPTG.

Κυτταρική ποσότητα/ 500 mL καλλιέργεια	Πρωτεΐνη (mg/ mL)	Ενζυμική δραστηριότητα (Units/ mL)	Ειδική δραστηριότητα (Units/ mg)
0,88	0,93	0,063	0,067

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η ενζυμική δραστηριότητα του CrGST8 ως προς το υπόστρωμα CDNB φαίνεται να είναι στα 0,063 Units/ mL εκχυλίσματος, αρκετά χαμηλή από την αναμενόμενη. Με σκοπό τον έλεγχο του επιπέδου έκφρασης του ενζύμου, έγινε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS (**Εικόνα 6. 5**).



Εικόνα 6. 5: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (14 % πολυακρυλαμίδιο) παρουσία SDS και σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970). Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με χρώση με Coomassie Brilliant BlueR-250. **Θέση 1:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα του μάρτυρα Benchmark (Invitrogen). **Θέση 2:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα μετασχηματισμένων κυττάρων μη υδατικού κλάσματος (inclusion bodies) **Θέση 3:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα υδατικού κλάσματος μετασχηματισμένων κυττάρων που φέρουν το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο CrGST8.

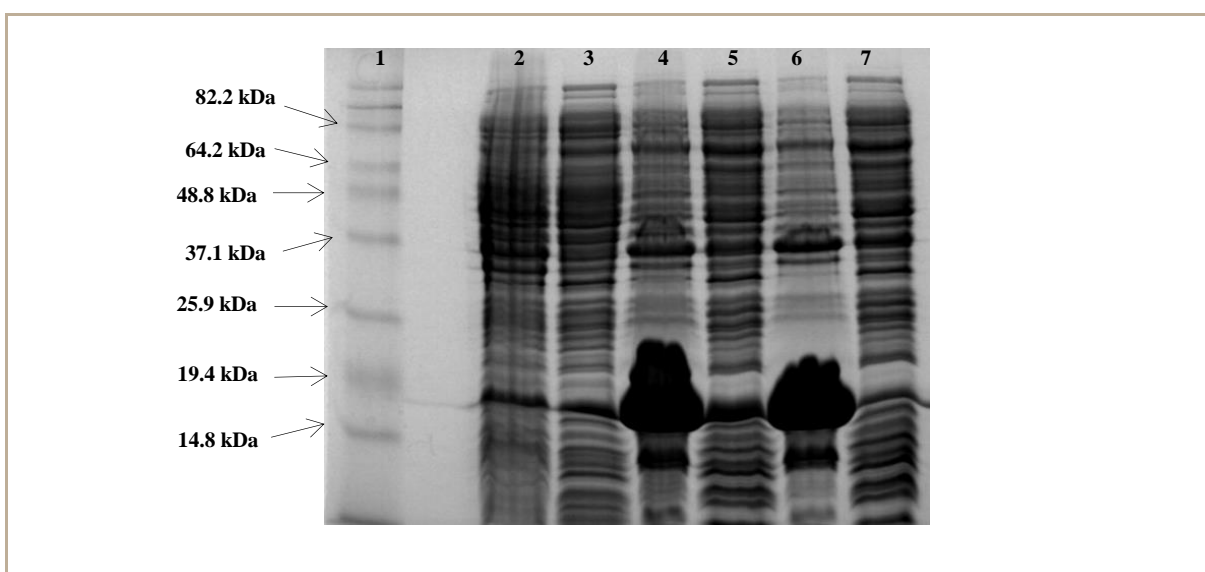
Από την παραπάνω εικόνα είναι προφανές ότι το ένζυμο CrGST8 ενώ υπερ-εκφράζεται δεν είναι βιολογικά διαθέσιμο για μελέτη. Βρίσκεται εγκλωβισμένο σε ενδοκυτταρικά συσσωματώματα γνωστά και ως έγκλειστα σωμάτια.

Αρχικά η μελέτη επικεντρώθηκε σε τρόπους βελτίωσης της έκφρασης του CrGST8, η οποία αφορούσε σε τροποποιήσεις της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης του IPTG κατά το στάδιο επαγωγής της έκφρασης. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε έκφραση του CrGST8 στους 25 °C (**Πίνακας 6. 10** και **Εικόνα 6. 6**) και 18 °C (**Πίνακας 6. 11** και **Εικόνα 6. 7**) παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης IPTG (0 mM, 0,1 mM, 1 mM).

Στη συνέχεια, το υπερκείμενο που προήλθε από τη λύση των μετασχηματισμένων κυττάρων μελετήθηκε ενζυμικά με το σύστημα GSH/CDNB και τα επίπεδα έκφρασης εκλέχθηκαν με ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.

Πίνακας 6. 10: Συνθήκες μελέτης έκφρασης για το ένζυμο *CrGST8* σε θερμοκρασία 25 °C παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων IPTG (0, 0,1, 1 mM). Αποτελέσματα της έκφρασης ως προς πρωτεϊνικό περιεχόμενο, ενζυμικής και ειδικής δραστηριότητας.

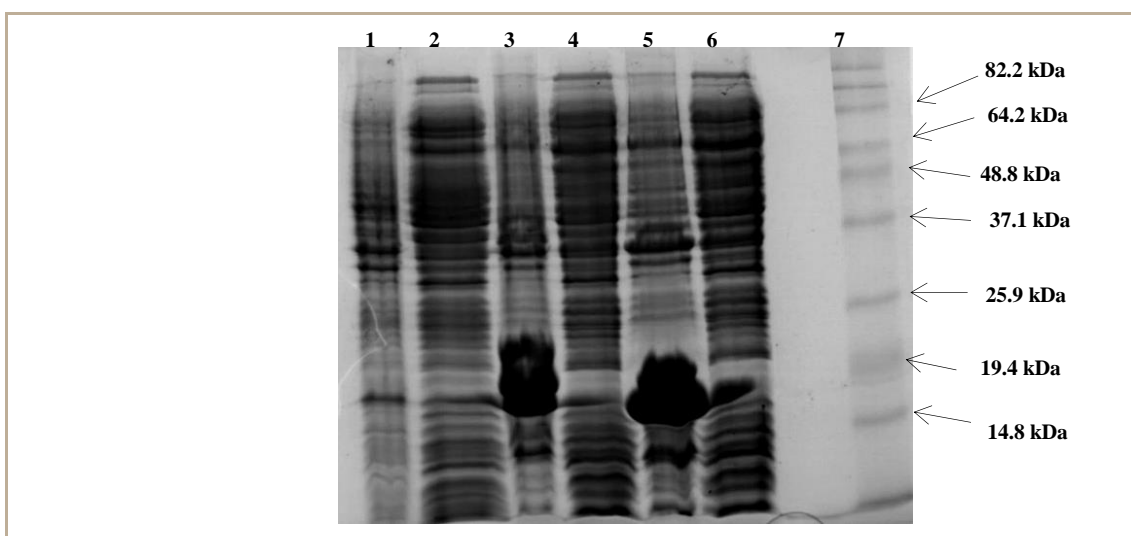
IPTG (mM)	Ενζυμική δραστηριότητα (Units/ mL)	Πρωτεΐνη (mg/ mL)	Ειδική δραστηριότητα (Units/ mg)
0	0,14	1,53	0,091
0,1	0,069	1,2	0,057
1	0,139	1,044	0,134



Εικόνα 6. 6: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιο (14 % πολυακρυλαμίδιο) παρουσία SDS και σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970). Η έκφραση πραγματοποιήθηκε στους 25 °C υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG (0 mM, 0,1 mM, 1 mM). Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με χρώση με Coomassie Brilliant BlueR-250. **Θέση 1:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα του μάρτυρα Benchmark (Invitrogen). **Θέση 2:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα μετασχηματισμένων κυττάρων μη υδατοδιαλυτού κλάσματος (insoluble fraction) που προέκυψε από έκφραση παρουσίας 0 mM IPTG. **Θέση 3:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα υδατοδιαλυτού κλάσματος μετασχηματισμένων κυττάρων που φέρουν το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο *CrGST8* (0 mM IPTG). **Θέση 4:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα μετασχηματισμένων κυττάρων μη υδατοδιαλυτού κλάσματος (insoluble fraction) που προέκυψε από έκφραση παρουσίας 0,1 mM IPTG. **Θέση 5:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα υδατοδιαλυτού κλάσματος μετασχηματισμένων κυττάρων που φέρουν το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο *CrGST8* (0,1 mM IPTG). **Θέση 6:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα μετασχηματισμένων κυττάρων μη υδατοδιαλυτού κλάσματος (insoluble fraction) που προέκυψε από έκφραση παρουσίας 1 mM IPTG. **Θέση 7:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα υδατοδιαλυτού κλάσματος μετασχηματισμένων κυττάρων που φέρουν το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο *CrGST8* (1 mM IPTG).

Πίνακας 6. 11: Συνθήκες μελέτης έκφρασης για το ένζυμο CrGST8 σε θερμοκρασία 18 °C παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων IPTG (0, 0,1, 1 mM). Αποτελέσματα της έκφρασης ως προς πρωτεϊνικό περιεχόμενο, ενζυμικής και ειδικής δραστηριότητας.

IPTG (mM)	Ενζυμική δραστηριότητα (Units/ mL)	Πρωτεΐνη (mg/ mL)	Ειδική δραστηριότητα (Units/ mg)
0	0,102	1,11	0,092
0,1	0,079	1,088	0,073
1	0,063	1,098	0,067



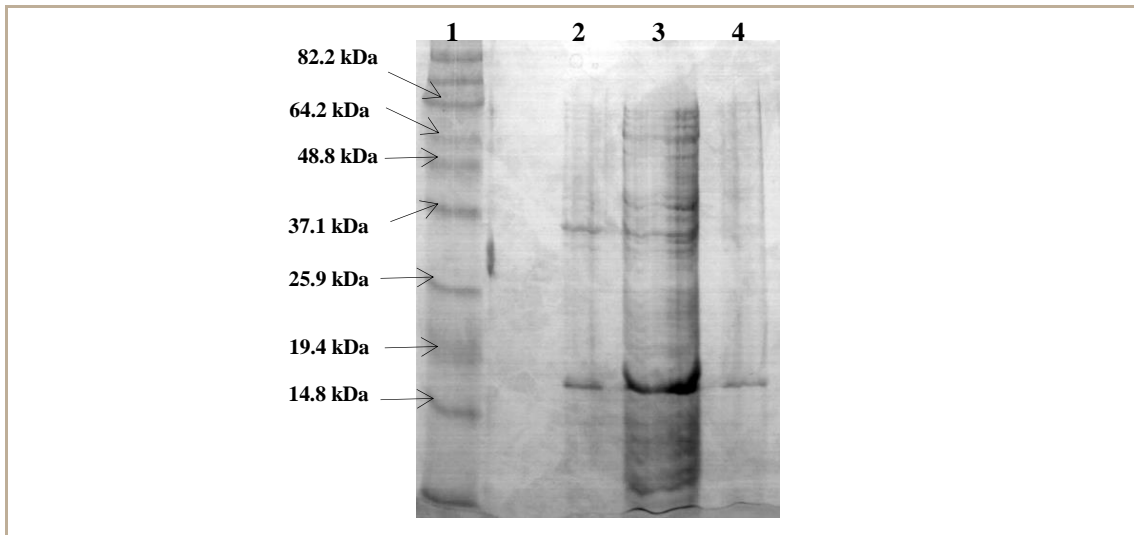
Εικόνα 6. 7: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιο (14 % πολυακρυλαμίδιο) παρουσία SDS και σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970). Η έκφραση πραγματοποιήθηκε στους 18 °C υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG (0 mM, 0,1 mM, 1 mM). Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με χρώση με Coomassie Brilliant BlueR-250. **Θέση 1:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα μετασχηματισμένων κυττάρων μη υδατοδιαλυτού κλάσματος (insoluble fraction) που προέκυψε από έκφραση παρουσίας 0 mM IPTG. **Θέση 2:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα υδατοδιαλυτού κλάσματος μετασχηματισμένων κυττάρων που φέρουν το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο CrGST8 (0 mM IPTG). **Θέση 3:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα μετασχηματισμένων κυττάρων μη υδατοδιαλυτού κλάσματος (insoluble fraction) που προέκυψε από έκφραση παρουσίας 0,1 mM IPTG. **Θέση 4:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα υδατοδιαλυτού κλάσματος μετασχηματισμένων κυττάρων που φέρουν το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο CrGST8 (0,1 mM IPTG). **Θέση 5:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα μετασχηματισμένων κυττάρων μη υδατοδιαλυτού κλάσματος (insoluble fraction) που προέκυψε από έκφραση παρουσίας 1 mM IPTG. **Θέση 6:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα ακατέργαστου εκχυλίσματος μετασχηματισμένων κυττάρων που φέρουν το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο CrGST8 (1 mM IPTG). **Θέση 7:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα του μάρτυρα Benchmark (Invitrogen).

Από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών γίνεται ξεκάθαρο ότι το ένζυμο CrGST8 υπερ-εκφράζεται παρουσία του απαγωγέα IPTG (0,1 mM και 1 mM) δίνοντας μια έντονη ζώνη στην περιοχή των 19 kDa. Απουσία IPTG δεν παρατηρείται καμιά ιδιαίτερη έκφραση του ενζύμου. Επίσης, η θερμοκρασία (18 °C και 25 °C) φαίνεται να μην επηρεάζει την έκφραση του επιθυμητού ενζύμου.

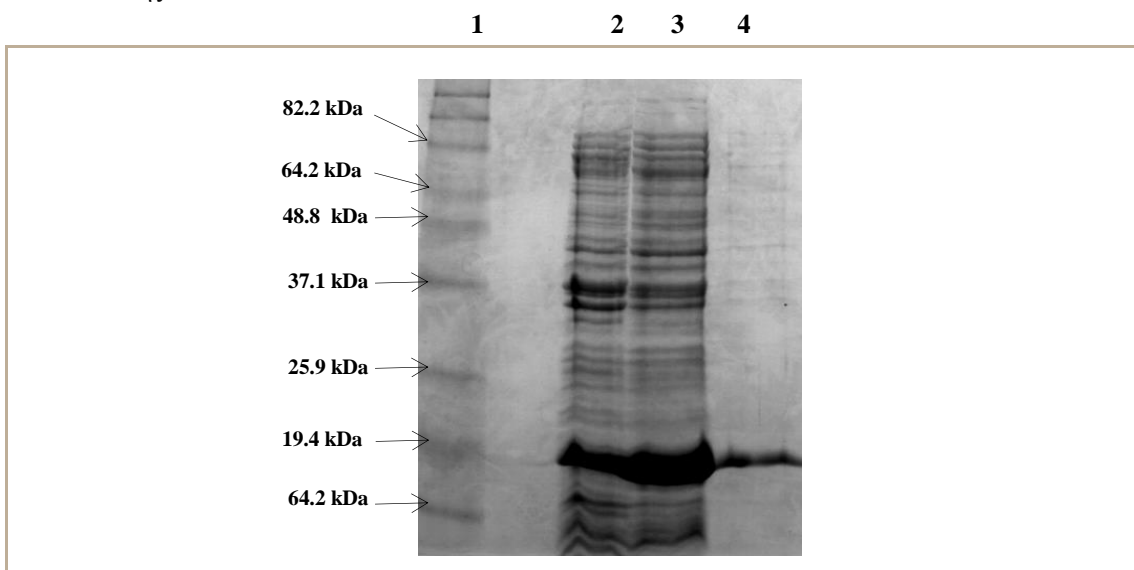
6.3.4. ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ/ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΕΝΖΥΜΟΥ CrGST8 ΜΕ ΧΑΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Με σκοπό την αύξηση βιοδιαθεσιμότητας και την αναγέννηση του CrGST8, έγινε μελέτη καθαρισμού με χρήση χαοτροπικών ουσιών. Αρχικά πραγματοποιήθηκε λύση μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων *E.coli* που φέρουν την ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη με διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα (**Μέθοδος Α, Β, Γ**) που περιέχουν χαοτροπικές ουσίες όπως η ουρία, το χλωριούχο γουανίδιο και η προπανόλη. Η διαδικασία χειρισμού των δειγμάτων περιγράφεται αναλυτικά στα Υλικά και Μέθοδοι της παραγράφου § 6.3.

Στη **Μέθοδο Α** χρησιμοποιήθηκε λύση βακτηριακών κυττάρων σε υπερήχους με ρυθμιστικό διάλυμα περιεκτικότητας 50 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 6 M χλωριούχο γουανίδιο σε pH 8. Στη **Μέθοδο Β** και **Γ** τα ρυθμιστικά διαλύματα αποτελούνταν από 50 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 8M ουρία σε pH 8 και 50 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 6 M προπανόλη, 2 M ουρία, 10 % (w/v) σουκρόζη σε pH 8, αντίστοιχα. Στο υπερκείμενο που προέκυψε έπειτα από φυγοκέντρηση, ακολούθησε απευθείας αραιώση (10x) με ρυθμιστικό διάλυμα αναδίπλωσης περιεκτικότητας 50 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 1 mM αργινίνη, 1 mM γλουταθειόνη, 0,5 % (w/v) EDTA και 10 % (w/v) σουκρόζη σε pH 8. Με σκοπό τον έλεγχο της διαλυτοποίησης του CrGST8, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης παρουσιάζονται στις **Εικόνες 6. 8** (Μέθοδος Α), **6. 9** (Μέθοδος Β) και **6. 10** (Μέθοδος Γ).

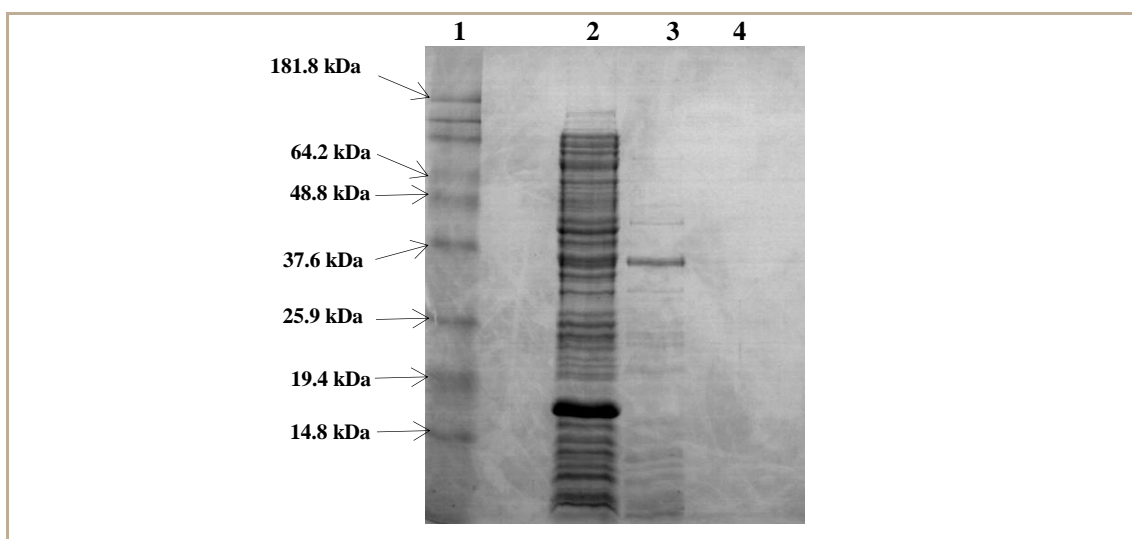


Εικόνα 6. 8: Μέθοδος Α. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (14 % w/v πολυακρυλαμίδιο) παρουσία SDS και σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970) . **Θέση 1:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα του μάρτυρα Benchmark (Invitrogen). **Θέση 2:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα μετασχηματισμένων κυττάρων μη υδατοδιαλυτού κλάσματος (insoluble fraction) μετά από τη λύση των κυττάρων. **Θέση 3:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα υδατοδιαλυτού κλάσματος μετασχηματισμένων κυττάρων που φέρουν το ένζυμο CrGST8 όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται υπό την επίδραση της υψηλής συγκέντρωσης της χαοτροπικής ουσίας. **Θέση 4:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα υδατοδιαλυτού κλάσματος μετασχηματισμένων κυττάρων που φέρουν το ένζυμο CrGST8 μετά το στάδιο της αναδίπλωσης.



Εικόνα 6. 9: Μέθοδος Β. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (14 % w/v πολυακρυλαμίδιο) παρουσία SDS και σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970). **Θέση 1:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα του μάρτυρα Benchmark (Invitrogen). **Θέση 2:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα μετασχηματισμένων κυττάρων μη υδατοδιαλυτού κλάσματος (insoluble fraction) μετά από τη λύση των κυττάρων. **Θέση 3:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα υδατοδιαλυτού κλάσματος μετασχηματισμένων κυττάρων που φέρουν το ένζυμο CrGST8 όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται υπό την επίδραση της υψηλής συγκέντρωσης της χαοτροπικής ουσίας. **Θέση 4:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα υδατοδιαλυτού

κλάσματος μετασηματισμένων κυττάρων που φέρουν το ένζυμο CrGST8 μετά το στάδιο της αναδίπλωσης.

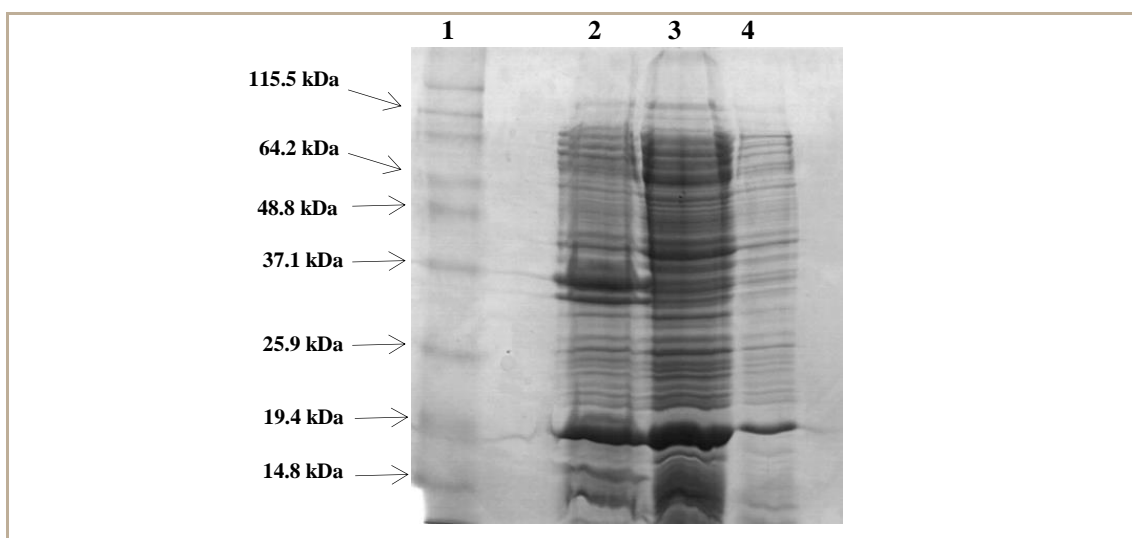


Εικόνα 6. 10: Μέθοδος Γ. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (14 % w/v πολυακρυλαμίδιο) παρουσία SDS και σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970). **Θέση 1:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα του μάρτυρα Benchmark (Invitrogen). **Θέση 2:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα μετασηματισμένων κυττάρων μη υδατοδιαλυτού κλάσματος (insoluble fraction) μετά από τη λύση των κυττάρων. **Θέση 3:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα υδατοδιαλυτού κλάσματος μετασηματισμένων κυττάρων που φέρουν το ένζυμο CrGST8 όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται υπό την επίδραση της υψηλής συγκέντρωσης της χαοτροπικής ουσίας. **Θέση 4:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα υδατοδιαλυτού κλάσματος μετασηματισμένων κυττάρων που φέρουν το ένζυμο CrGST8 μετά το στάδιο της αναδίπλωσης.

Από την **Εικόνα 6. 8** και **6. 9** παρατηρούμε ότι η χρήση των χαοτροπικών ουσιών όπως το χλωρίδιο του γουανιδίου και η ουρία παίζουν σημαντικό ρόλο για την αναγέννηση του CrGST8 από τα έγκλειστα σωμάτια. Το ένζυμο μπορεί να θεωρηθεί πλέον διαλυτοποιημένο και φαίνεται να απαντάται σε αρκετά καθαρή μορφή στο υπερκείμενο (**Εικόνα 6. 8, Θέση 4; Εικόνα 6. 9, Θέση 4**) ώστε να υπάρχει δυνατότητα περαιτέρω μελέτης.

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης της **Μεθόδου Γ** (**Εικόνα 6. 10**) φανέρωσαν ότι η προπανόλη σε συνδυασμό με μικρή συγκέντρωση ουρίας δεν βελτιώνει τη διαλυτοποίηση του CrGST8. Φαίνεται όμως να λειτουργεί ως ένα εκλεκτικό στάδιο καθαρισμού. Με σκοπό τη διερεύνηση κατά πόσο η **Μέθοδος Γ** αποτελεί ένα αρχικό στάδιο καθαρισμού του CrGST8, ακολούθησε ένας διαφορετικός τρόπος προσέγγισης της **Μεθόδου Γ**. Συγκεκριμένα, η αρχική λύση των κυττάρων έγινε με χρήση ρυθμιστικού διαλυτός 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 6 M προπανόλη, 2 M ουρία, 10 % (w/v) σουκρόζη σε pH 8. Ακολούθησε επώαση για 30 min στον πάγο και

φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και ακολούθησε εκ νέου λύση βακτηριακών κυττάρων με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 8 M ουρία σε pH 8 και φυγοκέντρωση. Το υπερκείμενο που προέκυψε από την παραπάνω διαδικασία αραιώθηκε 10 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα αναδίπλωσης (refolding buffer) 50 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 1 mM αργινίνη, 1 mM γλουταθειόνη, 0,5 % (w/v) EDTA, 10 % (w/v) σουκρόζη, pH 8. Η διαδικασία αναδίπλωσης πραγματοποιήθηκε με γρήγορη/απότομη αναδίπλωση, με απευθείας αραιώση του υπερκειμένου με το ρυθμιστικό διάλυμα. Ακολούθησε επώαση για 1 h και για τον έλεγχο της διαλυτοποίησης του CrGST8 έγινε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 6. 11**.



Εικόνα 6. 11: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιο (14 % w/v πολυακρυλαμίδιο) παρουσία SDS και σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970). **Θέση 1:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα του μάρτυρα Benchmark (Invitrogen). **Θέση 2:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα μετασχηματισμένων κυττάρων μη υδατοδιαλυτού κλάσματος (insoluble fraction) μετά από τη λύση των κυττάρων. **Θέση 3:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα υδατοδιαλυτού κλάσματος μετασχηματισμένων κυττάρων που φέρουν το ένζυμο CrGST8 όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται υπό την επίδραση της υψηλής συγκέντρωσης της χαοτροπικής ουσίας. **Θέση 4:** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα υδατοδιαλυτού κλάσματος μετασχηματισμένων κυττάρων που φέρουν το ένζυμο CrGST8 μετά το στάδιο της αναδίπλωσης.

Από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης (**Εικόνα 6. 11**), η **Μέθοδος Γ** δεν φαίνεται να αποτελεί εκλεκτικό στάδιο καθαρισμού του CrGST8 διότι φαίνεται να μην παρουσιάζεται σημαντική βελτίωση της διαλυτοποίησης του ενζύμου.

Στα υπερκείμενα των Μεθόδων Α, Β και Γ (**Εικόνα 6. 8, Θέση 4; Εικόνα 6. 9, Θέση 4; Εικόνα 6. 10, Θέση 4**) και της τροποποιημένης Μεθόδου Γ (**Εικόνα 6. 11, Θέση 4**)

ακολούθησε μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας με το σύστημα GSH/ CDNB (Πίνακας 6. 12).

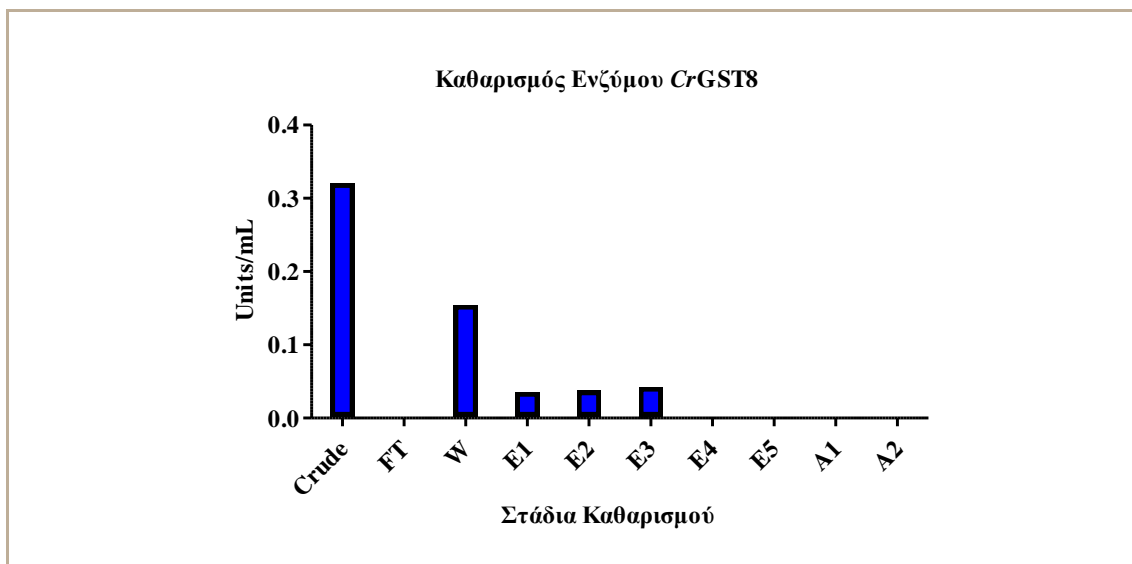
Πίνακας 6. 12: Αποτελέσματα ενζυμικής δραστηριότητας από της Μεθόδους Α, Β, Γ και τροποποιημένης μεθόδου Γ, έπειτα από τις δοκιμές διαλυτοποίησης του ενζύμου CrGST8 από τα έγκλειστα σωματίδια (inclusion boddies). MA: Μη ανιχνεύσιμη ενζυμική δράση.

Χαοτροπικές Ουσίες	Ενζυμική Δραστηριότητα (Units/ mL)
Μέθοδος Α	
6M Χλωριούχο Γουανίδιο	0,057
Μέθοδος Β	
8M Ουρία	0,078
Μέθοδος Γ	
6M Προπανόλη	MA
2M Ουρία	
Τροποποιημένη Μέθοδος Γ	
8M ουρία	0,035

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, ο χειρισμός με τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα διαλυτοποίησης του CrGST8 από τα έγκλειστα σωματίδια δόθηκε με τη χρήση υψηλής συγκέντρωσης ουρίας (8M) στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης των κυττάρων, με ενζυμική δραστηριότητα στα 0,078 Units/ mL.

6.3.5. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ENZYMOY CrGST8 ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ BES-GSH

Με σκοπό την περαιτέρω μελέτη του CrGST8 ακολούθησε καθαρισμός του ενζύμου με χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή BES-GSH (§ 2.2.1.14.). Εφόσον προηγήθηκε η λύση των κυττάρων (§ 2.2.1.12.), διαπίδυση (§ 2.2.1.17.) σε 4 L ρυθμιστικού διαλύματος 20mM KH₂PO₄ pH 7 και υπολογισμός ειδικής δραστηριότητας (§ 2.2.1.21.), το υδατικό κλάσμα μετασηματισμένων κυττάρων φορτώθηκε σε κολώνα με προσροφητή BES-GSH. Ακολούθησαν τα στάδια της χρωματογραφίας συγγένειας (§ 2.2.1.14.) και υπολογίστηκε ότι η απόδοση του καθαρισμού ήταν 13,12 %, ενώ το ένζυμο καθαρίστηκε 2,93 φορές. Τα αποτελέσματα του καθαρισμού απεικονίζονται στη συνέχεια (Εικόνα 6. 12).

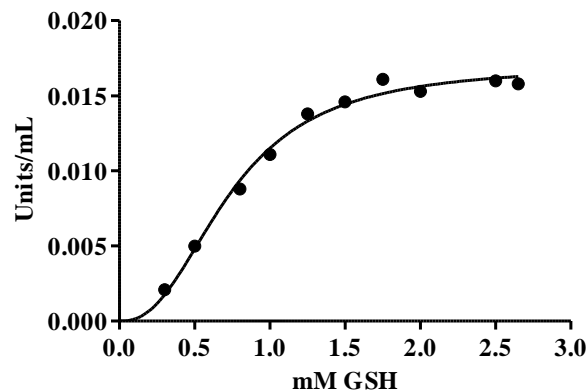
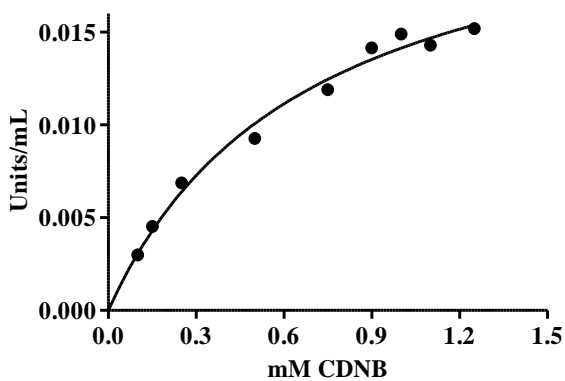


Εικόνα 6. 12: Χρωματογράφημα καθαρισμού του ενζύμου CrGST8 σε στήλη με χρωματογραφία συγγένειας τον προσροφητή 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρας-GSH-Sepharose-CL6B (BES-GSH). **Crude:** Ακατέργαστο εκχύλισμα αγρίου τύπου για το γονίδιο CrGST8. **FT:** Έκλουση αδέσμευτων μορίων που προέρχονται από το ακατέργαστο εκχύλισμα (Flow Through). **W:** Έκπλυση της στήλης συγγένειας με ρυθμιστικό διάλυμα για την απομάκρυνση αδέσμευτων μορίων που προέρχονται από το ακατέργαστο εκχύλισμα (Washes). **E1-E5:** Σταδιακή έκλουση της επιθυμητής πρωτεΐνης η οποία τυπικά είχε προσροφηθεί στη στήλη με ρυθμιστικό διάλυμα που εξασθενεί την ισχύ αναγνώρισης με τον προσροφητή. **A1-A2:** Αναγέννηση του προσροφητή BES-GSH για τυχόν υπολείμματα δεσμευμένων μορίων.

Παρατηρούμε ότι η καλύτερη έκλουση είναι η E3, η οποία έχει ειδική δραστηριότητα 0,042 Units/ mg και ακολουθούν οι εκλούσεις E2 και E1 με μονάδες 0,037 και 0,035 Units/ mg πρωτεΐνης αντίστοιχα.

6.3.6. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ CrGST8 ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ CDNB/GSH

Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη ως προς το σύστημα CDNB/ GSH στους 37 °C και προσδιορίστηκαν οι τιμές k_{cat} και K_m σύμφωνα με την εξίσωση Michael-Menten. Για την ολοκλήρωση της μελέτης χρησιμοποιήθηκε η καθαρή μορφή ενζύμου που προέκυψε έπειτα από τη χρωματογραφία συγγένειας. Τα αποτελέσματα της κινητικής μελέτης παρουσιάζονται στην **Εικόνα 6. 13**.



Εικόνα 6. 13: Κινητική ανάλυση του ενζύμου CrGST8 έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα τη GSH (0,3-2,65 mM). 2: Κινητική ανάλυση του ενζύμου CrGST8 έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το CDNB (0,1-1,25 mM).

Στη συνέχεια έγινε υπολογισμός των τιμών K_m (mM), k_{cat} (min^{-1}) και k_{cat}/K_m (Πίνακας 6. 13).

Πίνακας 6. 13: Αποτελέσματα της κινητικής ανάλυσης του ενζύμου CrGST8 ως προς τα συστήματα CDNB/ GSH.

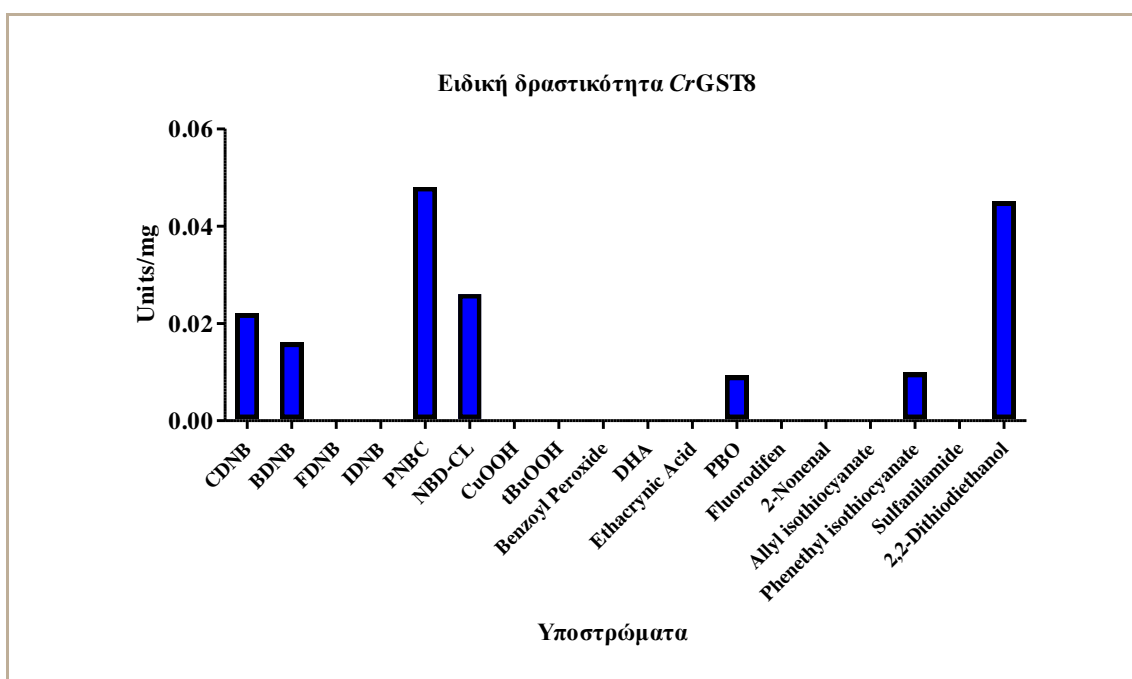
Σύστημα	K_m (mM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$)	n_H
GSH	0,479 $\pm 0,079$	2.8 $\pm 0,1$	5,845 $\pm 1,38$	2,41 $\pm 0,25$
CDNB	0,680 $\pm 0,11$	12,8 $\pm 0,3$	18,82 $\pm 4,16$	-

Η κινητική μελέτη ως προς το σύστημα CDNB/ GSH πραγματοποιήθηκε με καθαρή μορφή του CrGST8, όπως αυτή προέκυψε από τη χρωματογραφία συγγένειας. Από την **Εικόνα 6. 13** παρατηρούμε ότι έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα τη GSH το ένζυμο δεν ακολουθεί υπερβολική κινητική. Παρατηρείται σιγμοειδής εξάρτηση από τη συγκέντρωση του υποστρώματος εκφράζοντας θετική συνέργεια μεταξύ των δύο G-θέσεων της συντηρημένης περιοχής του ομοδιμερούς ενζύμου (n_H : $2,41 \pm 0,25$). Από την άλλη, όταν χρησιμοποιήθηκε ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το

CDNB, η εξάρτηση παρουσιάστηκε υπερβολική που ακολουθεί την εξίσωση των Michaelis-Menten. Η τιμή K_m μας έδειξε ότι για το σύστημα CDNB/ GSH το ένζυμο παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια ως προς τη γλουταθειόνη. Αντιθέτως, υψηλότερη σταθερά εξειδικεύσεως k_{cat}/K_m μεταξύ των δυο υποστρωμάτων εμφανίζεται ως προς το CDNB ($18,82 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$).

6.3.7. ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ CrGST8 ΤΑ ΠΙΘΑΝΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΤΩΝ GSTs

Ακολούθησαν φωτομετρικές δοκιμές με σκοπό τη μελέτη του ενζύμου CrGST8 ως προς τη δραστηριότητα και εκλεκτικότητα τους, όπως για παράδειγμα δράση μεταφοράσης γλουταθειόνης, υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και διϋδροασκορβικής ρεδοκτάσης. Η μορφή του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη προέκυψε από τη **Μέθοδο Β** (§ 6.2.3.4), με χρήση υψηλής συγκέντρωσης ουρίας (8M). Το πλήθος και οι χημικές δομές των υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στην παράγραφο § 5.4.4., **Πίνακας 5. 8**. Τα αποτελέσματα της ειδικής δραστηριότητας του CrGST8 έναντι διαφορετικών υποστρωμάτων παρουσιάζονται στην **Εικόνα 6. 14**.



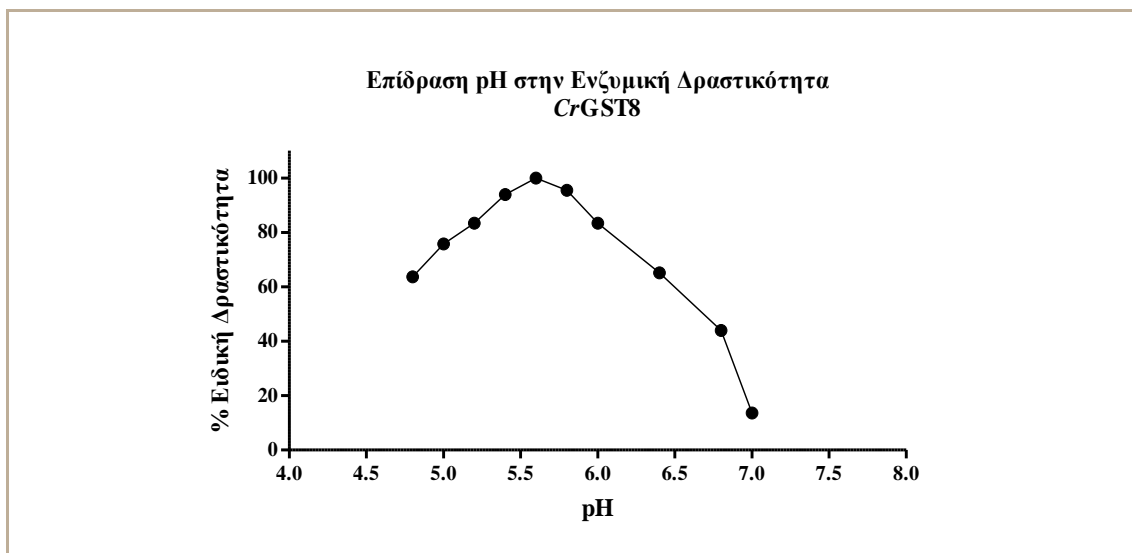
Εικόνα 6. 14: Γραφική απεικόνιση της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου CrGST8 έναντι διαφορετικών υποστρωμάτων.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι το CrGST8 καταλύει ένα περιορισμένο εύρος αντιδράσεων. Η δοκιμή του CrGST8 ως προς δράση θειοτρονσφεράσης με το

υπόστρωμα 2,2 διθειοδιαιθανόλη (HED) έδωσε ειδική δραστικότητα 0,045 Units/ mg. Συγκεκριμένα, η ανίχνευση δράσης θειοτρανσφεράσης πιθανόν να φανερώνει ότι το CrGST8 έχει σημαντικό βιολογικό ρόλο. Ακολουθούν τα υποστρώματα 4-χλωρο-7-νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο (NBD-cl) και 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) με ειδική δραστικότητα 0,026 και 0,022 Units/ mg αντίστοιχα. Επίσης, το CrGST8 φαίνεται να καταλύει την αντίδραση προσθήκης της θειόλης της GSH στο ηλεκτρονιόφιλο κεντρικό άνθρακα της ισοθειοκυανικής ομάδας του υποστρώματος ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλ-εστέρας (PEITC), ενώ δεν ανιχνεύεται δράση έναντι του ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας (AITC). Τέλος, χαρακτηριστικό αποτελεί η μη ανιχνεύσιμη δράση ως προς υπεροξειδάση εξαρτώμενης από τη γλουταθειόνη χρησιμοποιώντας τα υποστρώματα υδροϋπεροξειδίου του κουμινίου (CuOOH), τ-βουτυλο-υδροϋπεροξειδίου (tBuOOH) και βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίου, αλλά και έναντι λοιπών οργανικών ενώσεων όπως τους διφαινολικούς αιθέρες (fuorodifen) και τα αλκένια-υποστρώματα trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη (PBO) και trans-2-ενενάλη.

6.3.8. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ENZYMOY CrGST8

Το pH εμφανίζει σημαντικό ρόλο στη στερεοδιάταξη και στη συγγένεια του ενζύμου με το υπόστρωμα αλλά και με άλλα μόρια (Κλώνης, 2007), γεγονός που καθιστά τη μελέτη επίδρασης του pH στην ενζυμική δραστικότητα απαραίτητη. Στην παρούσα μελέτη, οι συνθήκες pH που χρησιμοποιήθηκαν ήταν διαφοροποιημένες σε σχέση με εκείνες που έγιναν για την αντίστοιχη μελέτη των ενζύμων CrGST10 και CrGST7. Στους Πίνακες 6. 5 και 6. 6 (§ 6.3.2.8.) παρουσιάζονται οι συνθήκες μελέτης. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στην εικόνα που ακολουθεί.



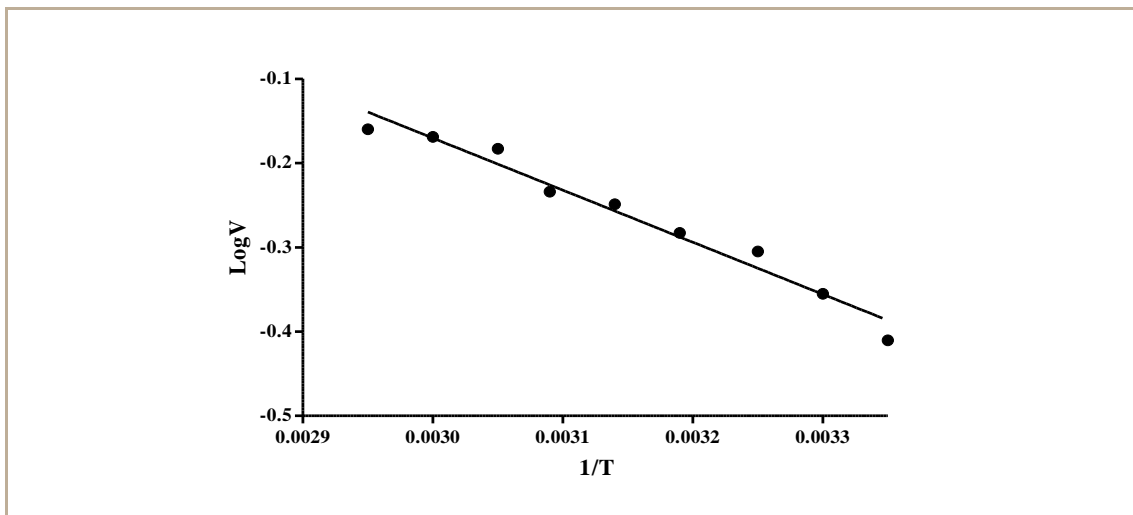
Εικόνα 6. 15: Μελέτη της επίδρασης του pH στην ενζυμική δραστικότητα του ενζύμου *CrGST8*.

Από την **Εικόνα 6. 15** γίνεται αντιληπτό ότι το ένζυμο *CrGST8* παρουσιάζει βέλτιστη δράση σε όξινα pH, με τη μέγιστη ενζυμική δραστικότητα να παρουσιάζεται στο pH 5,6. Η καθαρή μορφή του ενζύμου *CrGST8* προέκυψε έπειτα από το χειρισμό καθαρισμού που περιγράφεται στη **Μέθοδο Β** της παραγράφου § 6.3.2.4.).

6.3.9. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ *CrGST8*

Για περαιτέρω διερεύνηση της ενζυμικής δράσης του *CrGST8*, πραγματοποιήθηκε μελέτη επίδρασης της θερμοκρασίας στη δραστικότητα του ενζύμου. Λόγω δυσκολίας αναγέννησης και καθαρισμού του ενζύμου, χρησιμοποιήθηκε το ακατέργαστο εκχύλισμα.

Η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει σε σημαντικό βαθμό την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης διότι επιδρά στη σταθερότητα και στη στερεοδομή του ενζύμου, τη διαλυτότητα των αντιδρώντων, την ιοντική ισχύ κτλ. Πειραματικά, οι δύο απλούστερες θερμοδυναμικές προσεγγίσεις περιγράφονται από τους μαθηματικούς τύπους του Eyring (**Εξίσωση 6. 1**) και Arrhenius (**Εξίσωση 6. 2**) οι οποίοι προκύπτουν κατά βάση από τις θεμελιώδεις αρχές που διέπουν μια χημική αντίδραση. Ειδικότερα, η εξίσωση του Arrhenius περιγράφει την επίδραση της θερμοκρασίας στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης (**Εικόνα 6. 16**).



Εικόνα 6. 16: Θερμοδυναμική μελέτη του ακατέργαστου εκχυλίσματος του ενζύμου *CrGST8* κατά Arrhenius.

Από την εξίσωση του Arrhenius υπολογίστηκε η ενέργεια ενεργοποίησης 5,136 KJ/mol.

6.3.10. ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ

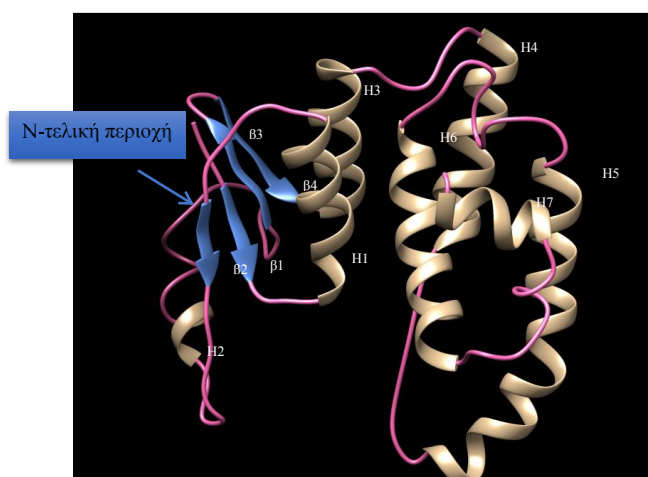
Για να κατανοηθούν καλύτερα οι καταλυτικές και δομικές ιδιότητες του ενζύμου *CrGST8* προσδιορίστηκε η δομή του με μοριακή μοντελοποίηση. Η τρισδιάστατη δομή του βασίστηκε σε δομή GST που έχει προσδιοριστεί κρυσταλλογραφικά μέσω ακτινών X (**Πίνακας 6. 14**) από τα βακτήριο *E. coli*.

Κάθε μονομερές αποτελείται από την N-τελική περιοχή και από την C-τελική περιοχή η οποία αποτελείται από τις α-έλικες. Χαρακτηριστικό του ενζύμου *CrGST8* που είναι ότι η C-τελική περιοχή αποτελείται από μικρότερο αριθμό αμινοξικών καταλοίπων. Η N-τελική περιοχή είναι μια α/β δομή με τοπολογία πτυχών βαβαββα με το β3 έλασμα να είναι αντιπαράλληλο των β1, β2 και β4. Το γεγονός αυτό δημιουργεί μια δεξιόστροφη β-πτυχωτή επιφάνεια γύρω από την οποία υπάρχουν τρεις α- έλικες. Στο τέλος της H3 έλικας υπάρχει ένας σύνδεσμος ο οποίος ενώνει τα δύο τελικά άκρα, την N- και C- περιοχή. Η C- περιοχή αποτελείται από μια δεσμίδα 3 ελίκων (H4, H5, H6). Σε σύγκριση με τις δομές ενζύμων GSTs που ανήκουν στη φ και τ τάξη, ο αριθμός των ελασμάτων στο κέντρο της C- τελικής περιοχής είναι μια δεσμίδα έξι ελίκων. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου *CrGST8* αποτελεί μια μεγάλη κοιλότητα στην οποία και δεσμεύεται το μόριο της γλουταθειόνης. Η κοιλότητα αυτή τοποθετείται σε πολική περιοχή μεταξύ της αρχής των ελίκων H1, H2 και H3 στο N-τελικό άκρο (**Εικόνα 6. 17**).

Πίνακας 6. 14: Κρυσταλλική δομή η οποία χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπο για την ομόλογη μοντελοποίηση του CrGST8.

Ένζυμο	Κωδικοί PDB	Είδος οργανισμού	Ομοιότητα (%)
CrGST8	4ikh	<i>Pseudomonas protegens</i>	31,36

A



B



Εικόνα 6. 17: Μοντέλο τριτοταγής δομής του ενζύμου CrGST8 (A: υπομονάδα, B: διμερές) με τη βοήθεια της μοριακής μοντελοποίησης. Οι έλικες είναι χρωματισμένες με καφέ χρώμα και τα β-ελάσματα με μπλε χρώμα. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα PyMOL (DeLano, 2002) σύμφωνα με το πρότυπο 4ikh από τον οργανισμό *Pseudomonas protegens*.

6.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα GSTs αποτελούν μια πολυλειτουργική ομάδα πρωτεϊνών εκ των οποίων τα ένζυμα των θηλαστικών είναι τα καλύτερα χαρακτηρισμένα. Ελάχιστες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό το χαρακτηρισμό ενζύμων από θαλάσσιους οργανισμούς όπως η μικροάλγη. Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζεται η μελέτη και ο χαρακτηρισμός μιας GST από τη *Theta* τάξη. Οι ιδιότητες που παρουσιάζει δεν έχουν παρατηρηθεί στο παρελθόν σε ευκαρυωτικά ένζυμα της οικογένειας των τρανφερασών.

Οι GSTs μπορούν να διαχωριστούν τουλάχιστον σε τέσσερις οικογένειες πρωτεϊνών, κυτταροπλασμικές, μιτοχονδριακές, μικροσωμικές και πρωτεΐνες με ανθεκτικότητα στη βακτηριακή φωσφομυκίνη (bacterial-fosfomycin-resistance proteins) (Allocati et al., 2009). Οι κυτταρολασμικές GSTs μπορούν να διαχωριστούν εκτενέστερα σε τάξεις με διαφορετικά κριτήρια, όπως την εκλεκτικότητα σε υποστρώματα, την ευαισθησία σε αναστολείς καθώς και της αμινοξικής αλληλουχίας (Hayes et al., 2005). Όσον αφορά την ομοιότητα στην αμινοξική αλληλουχία, οι GSTs που εμφανίζουν ομοιότητα μεγαλύτερη από 30% αποτελούν την ίδια τάξη, ενώ εκείνες με ομοιότητα μικρότερη από 30% ανήκουν σε διαφορετικές τάξεις (Sheehan et al., 2001; Salinas & Wong, 1999). Οι τάξεις των κυτταροπλασματικών GSTs έχουν χωριστεί στις ακόλουθες κατηγορίες: *mu*, *alpha*, *pi*, *theta*, *sigma*, *zeta*, και *omega*. Άλλες κατηγορίες περιλαμβάνουν *nu* (νηματώδεις σκώληκες), *lambda*, *phi* και *tau* (φυτά), *beta* (προκαρυώτες), *delta*, *epsilon*, *iota* και *Chi* (βακτήρια και έντομα) (Mannervik et al., 1985; Neufeind et al., 1996; Wikteliuss & Stenberg, 2007; Torres-Rivera & Landa, 2008).

Οι GSTs της *Theta* τάξης εμφανίζουν ένα αμινοξικό κατάλοιπο προλίνης στη θέση 53 του N-τελικού άκρου, το οποίο αποτελεί ένα συντηρημένο αμινοξύ των κυτταροπλασματικών GSTs που εντοπίζονται στα κυανοβακτήρια. Το συγκεκριμένο αμινοξύ βρίσκεται στη β-στροφή, και συγκεκριμένα στη βάση της G-θέσης, γεγονός που της προσδίδει πιθανό σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση και σταθερότητα της συγκεκριμένης θέσης (Allocati et al., 1999). Το αμινοξικό κατάλοιπο ισολευκίνης στη θέση 68, συχνά προηγείται του αμινοξικού καταλοίπου της αλανίνης και αποτελεί, όπως η Pro-53, χαρακτηριστικό GST μοτίβο I (αμινοξικά κατάλοιπα 49-73 σε TeGST και SeGST). Επίσης απαντάται και το μοτίβο II (αμινοξικά κατάλοιπα 130-147 σε TeGST και 129-146 σε SeGST). Το μοτίβο II συμβολίζεται ως κουτί N-κάλυψης,

βασική υδρόφοβη περιοχή και είναι ζωτικής σημασίας για την αναδίπλωση των GSTs (Koonin et al., 1994; Pandey et al., 2015). Το τελευταίο έχει εντοπιστεί σε ισοένζυμα GSTs του ανθρώπινου οργανισμού (Dragani et al., 1997; Stenberg et al., 2000; Cocco et al. 2001) και των βακτηρίων (Gilmartin & Dowling, 2005). Το ασπαρτικό οξύ (aspartate-140) πιθανώς να συμμετέχει στη σταθεροποίηση και δομική σταθερότητα των GSTs (Allocati et al., 2006). Η αμινοξική στοίχιση υποστηρίζει επίσης ότι τα κατάλοιπα αυτά διατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, λόγω της συμμετοχής τους στην αναδίπλωση και τη σταθερότητα των κυτταροπλασματικών GSTs (Kaplan et al., 1997). Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι το CrGST8, όπως τα TeGST, SeGST και sll0067 δεν έχουν αμινοξικά κατάλοιπα κυστεΐνης στη N-τελική περιοχή. Για παράδειγμα, η κυστεΐνη εμπλέκεται στην κατάλυση και δέσμευση της γλουταθειόνης στο ένζυμο PmGST B1-1, το οποίο φαίνεται να έχει διαφοροποιηθεί κατά τη διάρκεια της εξέλιξης από τις κυανοβακτηριακές GSTs της *Chi* τάξης (TeGST, SeGST και sll0067) (Wikteliuss & Stenberg, 2007; Pandey et al., 2015).

Με σκοπό τη μελέτη του CrGST8, πραγματοποιήθηκε ετερόλογη έκφραση του ενζύμου σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli*. Η υπερέκφραση του ενζύμου οδήγησε σε ένα φαινόμενο γνωστό και ως έγκλειστα σωματίδια (inclusion bodies). Το ένζυμο, σε μορφή συσσωματώματος με άλλες πρωτεΐνες, δεν αποτελεί μορφή ενεργή και βιοδιαθέσιμη. Έρευνες έχουν δείξει ότι η τροποποίηση των συνθηκών έκφρασης και η επίδραση χαοτροπικών παραγόντων κατά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων, μπορεί να οδηγήσουν σε αναγέννηση της επιθυμητής πρωτεΐνης και αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας. Στο παρόν κεφάλαιο, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η διαφοροποίηση των συνθηκών έκφρασης που αφορούν τον επαγωγέα και τη θερμοκρασία, δεν περιορίζουν το φαινόμενο των έγκλειστων σωματίων (**Εικόνα 6. 6** και **Εικόνα 6. 7**). Αντιθέτως, η επίδραση των χαοτροπικών ουσιών, όπως η ουρία και το χλώριδιο του γουανιδίου, αύξησαν τη βιοδιαθεσιμότητα του ChGST8 (**Εικόνα 6. 8** και **Εικόνα 6. 9**) και επιτράπηκε η μελέτη του, αφού πρώτα έχει προηγηθεί το στάδιο της αναδίπλωσης. Επίσης, έγινε δοκιμή μιας ηπιότερης μεθόδου αναγέννησης της πρωτεΐνης και συγκεκριμένα με χρήση της προπανόλης. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι ακυλικές αλκοόλες έχουν την ιδιότητα να βοηθούν στην αναγέννηση της πρωτεΐνης από τα συσσωματώματα, χωρίς τα αρνητικά αποτελέσματα της μετουσιωτικής ουρίας. Τα αποτελέσματα για το CrGST8 έδειξαν να μη βελτιώνει την αναδίπλωση της πρωτεΐνης, αντιθέτως φαίνεται να ενισχύει τη συσσωμάτωση (**Εικόνα 6. 11**).

Η μελέτη της ενζυμικής δραστηριότητας του CrGST8 έναντι διαφορετικών υποστρωμάτων των GSTs (**Εικόνα 6. 14**) έδειξε ότι το ένζυμο φαίνεται να καταλύει περιορισμένη ποικιλία υποστρωμάτων όπως για παράδειγμα το π-νιτροβενζυλ-χλωρίδιο (PNBC), τη 2,2-διθειοδιαιθανόλη (HED), το 1-βρωμο-2,4-δινιτροβενζόλιο (BDNB) και τον ισοθειοκυανικό φαινυλαιθυλ-εστέρα (PEITC). Αντίστοιχη μελέτη GSTs ενζύμων που ανήκουν στη *Chi* τάξη, και μοναδική μέχρι σήμερα, αφορούν τα ένζυμα που απομονώθηκαν από τα κυανοβακτήρια *Thermosynechococcus elongatus* (TeGST) και *Synechococcus elongatus* (SeGST). Συγκεκριμένα, τα ένζυμα TeGST και SeGST, παρουσιάζουν ειδική δραστηριότητα ως προς NBD-Cl 0,15 και 0,27 Units/mg, ενώ ως προς CDNB 0,14 και 0,17 Units/mg αντίστοιχα. Επίσης, το CrGST8 παρουσίασε δραστηριότητα ως προς το υπόστρωμα PEITC. Η ειδική δραστηριότητα για τα ένζυμα TeGST και SeGST είναι 33 και 102 Units/mg (Wikteliuss & Stenberg, 2007). Σε μια άλλη μελέτη, το ένζυμο sll0067 GST το οποίο απομονώθηκε από το κυανοβακτήριο *Synechocystis* PCC 6803 και ανήκει στη *Chi* τάξη, εμφάνισε ιδιαίτερη προτίμηση στο ισοθειοκυανικό φαινυλαιθυλ-εστέρα με ειδική δραστηριότητα 43,66 Units/mg ενώ για CDNB 4,62 Units/mg (Pandey et al., 2015).

Ακολούθησε κινητική μελέτη του CrGST8 ως προς το σύστημα CDNB/GSH (**Εικόνα 6. 13**). Το ένζυμο εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια ως προς τη γλουταθειόνη με K_m $0,479 \pm 0,079$ mM. Ως προς CDNB η K_m υπολογίστηκε $0,680 \pm 0,11$ mM. Μελέτες που αφορούν στην κινητική μελέτη της *chi* τάξη των GSTs είναι ελάχιστες. Η συγκεκριμένη τάξη φαίνεται να αποτελείται από ένζυμα που παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς τα ισοθειοκυανικά υποστρώματα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα αποτελέσματα της κινητικής μελέτης ως προς το σύστημα GSH/PITC για την κυανοβακτηριακή GST sll0067 από *E. coli*, έδωσε K_m^{GSH} $0,919 \pm 0,18$ mM και K_m^{PITC} $0,319 \pm 0,033$ mM; k_{cat}^{GSH} $8,97 \pm 0,48$ s⁻¹ και k_{cat}^{PITC} $15,15 \pm 0,58$ s⁻¹ (Pandey et al., 2015). Επίσης, μια άλλη ερευνητική ομάδα πραγματοποίησε κινητική ανάλυση ως προς το σύστημα GSH/ PEITC των ενζύμων TeGST και SeGST που ανήκουν στη *Chi* τάξη των GSTs. Συγκεκριμένα, υπολογίστηκαν οι τιμές K_m ως προς το υπόστρωμα GSH: $0,16 \pm 0,019$ mM και $0,75 \pm 0,090$ mM και οι τιμές K_m ως προς το υπόστρωμα PITC: $0,047 \pm 0,011$ mM και $0,084 \pm 0,014$ mM αντίστοιχα (Wikteliuss & Stenberg, 2007).

Αντίστοιχες μελέτες που αφορούν την κινητική ανάλυση των GSTs ως προς το σύστημα CDNB/ GSH είναι βιβλιογραφικά διαθέσιμες. Αναφορικά, η κινητική

μελέτη του GmGSTU10-10 από *Glycine max* έδωσε k_m $67,9 \pm 4,5 \mu\text{M}$ ως προς GSH και $280 \pm 22,2 \mu\text{M}$ ως προς CDNB (Skopelitou et al., 2015). Παρομοίως, στις μικροσωμικές GSTs 2 (MGST2) από τον οργανισμό *Bulinus truncatus*, υπολογίστηκε τιμή k_m $1030 \pm 110 \mu\text{M}$ ως προς GSH και $200 \pm 20 \mu\text{M}$ ως προς CDNB (Ahmad et al., 2013).

Η μελέτη επίδρασης του pH στην ενζυμική δραστηριότητα του CrGST8 (**Εικόνα 6. 15**) έδειξε μια ιδιαίτερη προτίμηση του ενζύμου για τα όξινα pH, με τη μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα να παρουσιάζεται στην τιμή pH 5,6, ενώ σε pH 7 η δραστηριότητα φαίνεται να είναι μηδενική. Αντίστοιχες μελέτες που αφορούν την επίδραση του pH στην ενζυμική δραστηριότητα των GSTs φαίνεται να παρουσιάζουν ποικιλομορφία. Η μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα των ενζύμων RpGSTμ, RpGSTς και RpGSTθ από τον οργανισμό *Ruditapes philippinarum* εμφανίστηκε σε pH 7-8, 7,5-8,5 και 5,5-6,5 αντίστοιχα (Bathige et al., 2014; Umasuthan et al., 2012; Revathy et al., 2012). Επίσης, μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα σε αλκαλικά pH παρουσίασαν GSTs όπως το ένζυμο GSTM από τον οργανισμό *Thais clavigera* (pH 7,5-9) και το HdGSTM1 από *Haliotis discus discus* (pH 7-9) (Rhee et al., 2008). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελεί το ένζυμο sll0067 (*Chi* τάξη) από *Synechocystis PCC 6803*, το οποίο φαίνεται να παρουσιάζει μεγάλη σταθερότητα σε ένα εύρος τιμών pH 2-11, όπου βιβλιογραφικά ίσως να αποτελεί την πρώτη GST που εμφανίζει ένα τόσο ευρύ φάσμα δομικής σταθερότητας που σχετίζεται με το pH (Pandey et al., 2015).

Για περαιτέρω διερεύνηση της ενζυμικής δράσης του CrGST8 πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας. Λόγω δυσκολίας καθαρισμού του ενζύμου, χρησιμοποιήθηκε ακατέργαστο εκχύλισμα. Αντιδράσεις με υψηλή ενέργεια ενεργοποίησης (μεγάλη κλίση) είναι θερμοκρασιακά ευαίσθητες, ενώ με χαμηλή ενέργεια ενεργοποίησης παρουσιάζουν μικρότερη θερμοκρασιακή εξάρτηση. Από την εξίσωση του Arrhenius υπολογίστηκε η ενέργεια ενεργοποίησης στα 5,136 KJ/ mol ή 1,227 Kcal/ mol (**Εικόνα 6. 16**). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η ενέργεια ενεργοποίησης E_a για τα ένζυμα GSTs κυμαίνεται σε ένα μικρό εύρος τιμών. Συγκεκριμένα, η E_a υπολογίστηκε για GST που απομονώθηκε από τον οργανισμό *Triatoma infestans* 0,0148 kcal/ mol (Wood et al., 1986) και από *Mucor mucedo* 1,42 kcal/ mol (Hamed et al., 2005). Από το σαλιγκάρι *Bulinus truncatus* απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν δυο ισοένζυμα, τα GST₂ και GST₃, με ενέργεια ενεργοποίησης E_a να υπολογίζεται στα 1,826 και 3,435 kcal/ mol αντίστοιχα (Abdalla et al., 2006).

Τέλος, για το ένζυμο GmGSTU10-10 από τον οργανισμό *Glycine max* η E_a ήταν 4,565 kcal/ mol (Skopelitou et al., 2015).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abascal, F., Zardoya, R., & Posada, D. (2005). ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, 21(9), 2104-2105.

Abdalla, A. M., El-Mogy, M., Farid, N. M., & El-Sharabasy, M. (2006). Two glutathione S-transferase isoenzymes purified from *Bulinus truncatus* (Gastropoda: Planorbidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 143(1), 76-84.

Abu-Ghosh, S., Fixler, D., Dubinsky, Z., & Iluz, D. (2016). Flashing light in microalgae biotechnology. *Bioresource technology*, 203, 357-363.

Aceto, A., Dragani, B., Melino, S., Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., & Petruzzelli, R. (1997). Identification of an N-capping box that affects the alpha 6-helix propensity in glutathione S-transferase superfamily proteins: a role for an invariant aspartic residue. *The Biochemical journal*, 322, 229-234.

Affenzeller, M. J., Darehshouri, A., Andosch, A., Lütz, C., & Lütz-Meindl, U. (2009). Salt stress-induced cell death in the unicellular green alga *Micrasterias denticulata*. *Journal of experimental botany*, 60(3), 939-954.

Agianian, B., Tucker, P. A., Schouten, A., Leonard, K., Bullard, B., & Gros, P. (2003). Structure of a Drosophila sigma class glutathione S-transferase reveals a novel active site topography suited for lipid peroxidation products. *Journal of molecular biology*, 326(1), 151-165.

Agrawal, A. A., & Kurashige, N. S. (2003). A role for isothiocyanates in plant resistance against the specialist herbivore *Pieris rapae*. *Journal of chemical ecology*, 29(6), 1403-1415.

Ahmad, S., Niegowski, D., Wetterholm, A., Haeggström, J. Z., Morgenstern, R., & Rinaldo-Matthis, A. (2013). Catalytic characterization of human microsomal glutathione S-transferase 2: identification of rate-limiting steps. *Biochemistry*, 52(10), 1755-1764.

Alexeeva, M., Enright, A., Dawson, M.J., Mahmoudian, M., Turner, N.J. (2002). Deracemisation of α -methylbenzylamine using an enzyme obtained by in vitro evolution. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41, 3177–3180.

Allocati, N., Federici, L., Masulli, M., & Di Ilio, C. (2009). Glutathione transferases in bacteria. *Febs Journal*, 276(1), 58-75.

Allocati, N., Masulli, M., Pietracupa, M., Federici, L., & Di Ilio, C. (2006). Evolutionarily conserved structural motifs in bacterial GST (glutathione S-transferase) are involved in protein folding and stability. *Biochemical Journal*, 394(1), 11-17.

Allocati, N., Casalone, E., Masulli, M., Ceccarelli, I., Carletti, E., Parker, M. W., & Di Ilio, C. (1999). Functional analysis of the evolutionarily conserved proline 53 residue in *Proteus mirabilis* glutathione transferase B1-1. *FEBS letters*, 445(2-3), 347-350.

Ali, H., Houghton, P. J., & Soumyanath, A. (2006). α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of ethnopharmacology*, 107(3), 449-455.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.

Amaro, H. M., Guedes, A., & Malcata, F. X. (2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, 88(10), 3402-3410.

Ami, D., Natalello, A., Taylor, G., Tonon, G., & Doglia, S. M. (2006). Structural analysis of protein inclusion bodies by Fourier transform infrared microspectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1764(4), 793-799.

Andreou, V.G., Clonis, Y.D. (2002b). Novel fiber-optic biosensor based on immobilized glutathione S-transferase and sol-gel entrapped bromocresol green for the determination of atrazine. *Anal. Chim. Acta* 460, 151-161.

Angelucci, S., Sacchetta, P., Moio, P., Melino, S., Petruzzelli, R., Gervasi, P., & Di Ilio, C. (2000). Purification and characterization of glutathione transferases from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver. *Archives of biochemistry and biophysics*, 373(2), 435-441.

Aniya, Y., & Imaizumi, N. (2011). Mitochondrial glutathione transferases involving a new function for membrane permeability transition pore regulation. *Drug metabolism reviews*, 43(2), 292-299.

- Antonicelli, F., Bellon, G., Debelle, L., & Hornebeck, W.** (2007). Elastin-Elastases and Inflamm-Aging. *Current topics in developmental biology*, 79, 99-155.
- Aoyama, K., & Nakaki, T.** (2015). Glutathione in cellular redox homeostasis: Association with the excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1). *Molecules*, 20(5), 8742-8758.
- Apel, A. C., & Weuster-Botz, D.** (2015). Engineering solutions for open microalgae mass cultivation and realistic indoor simulation of outdoor environments. *Bioprocess and biosystems engineering*, 1-14.
- Armstrong, R. N.** (1997). Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chemical research in toxicology*, 10(1), 2-18.
- Armstrong, R. N., Chen, J. I. H. O. I. S. G., Johnson, W. W., Parsons, J. A. M. E. S., Ji, X. I. N. H. U. A., Gilliland, G. L., ... & Piatigorsky, J. O. R. A. M.** (1996). Structure, mechanism, and evolution of class Mu and Sigma glutathione-S-transferases. *Glutathione S-transferases: Structure, Function and Clinical Implications*, Vermeulen NPE, Mulder, GJ, Nieuwenhuyse H, Peters WHM, van Bladeren PJ, eds.(London: Taylor and Francis) pp, 13-22.
- Arnold, F.H.** (2001). Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature*. 409, 253-257.
- Arnold, T. M., Tanner, C. E., & Hatch, W. I.** (1995). Phenotypic variation in polyphenolic content of the tropical brown alga *Lobophora variegata* as a function of nitrogen availability. *Marine ecology progress series*. Oldendorf, 123(1), 177-183.
- Arora, M., Anil, A. C., Leliaert, F., Delany, J., & Mesbahi, E.** (2013). *Tetraselmis indica* (*Chlorodendrophyceae, Chlorophyta*), a new species isolated from salt pans in Goa, India. *European Journal of Phycology*, 48(1), 61-78.
- Asojo, O. A., Homma, K., Sedlacek, M., Ngamelue, M., Goud, G. N., Zhan, B., ... & Hotez, P. J.** (2007). X-ray structures of Na-GST-1 and Na-GST-2 two glutathione S-transferase from the human hookworm *Necator americanus*. *BMC structural biology*, 7(1), 1.
- Axarli, I., Muleta, A. W., Vlachakis, D., Kossida, S., Kotzia, G., Maltezos, A., ... & Labrou, N. E.** (2016). Directed evolution of Tau class glutathione transferases

reveals a site that regulates catalytic efficiency and masks co-operativity. *Biochemical Journal*, 473(5), 559-570.

Axarli, I., Dhavala, P., Papageorgiou, A. C., & Labrou, N. E. (2009a). Crystallographic and functional characterization of the fluorodifen-inducible glutathione transferase from *Glycine max* reveals an active site topography suited for diphenylether herbicides and a novel L-site. *Journal of molecular biology*, 385(3), 984-1002.

Axarli, I., Dhavala, P., Papageorgiou, A. C., & Labrou, N. E. (2009b). Crystal structure of *Glycine max* glutathione transferase in complex with glutathione: investigation of the mechanism operating by the Tau class glutathione transferases. *Biochemical Journal*, 422(2), 247-256

Axarli I., Labrou N.E., Petrou C., Kordopatis P., Rassias N., Clonis Y.D. (2009c). Sulphonamide-based bombesin prodrug analogues for glutathione S-transferase, useful in targeted cancer chemotherapy. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 2009-2016.

Azma, M., Mohamed, M. S., Mohamad, R., Rahim, R. A., & Ariff, A. B. (2011). Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 53(2), 187-195.

Bachman, J. (2013). Site-Directed Mutagenesis. *Laboratory Methods in Enzymology: DNA*, 529, 241-248.

Bae, Y. A., Kim, J. G., & Kong, Y. (2016). Phylogenetic characterization of *Clonorchis sinensis* proteins homologous to the sigma-class glutathione transferase and their differential expression profiles. *Molecular and biochemical parasitology*, 206(1), 46-55.

Bajguz, A. (2010). An enhancing effect of exogenous brassinolide on the growth and antioxidant activity in *Chlorella vulgaris* cultures under heavy metals stress. *Environmental and Experimental Botany*, 68(2), 175-179.

Balboa, E. M., Conde, E., Soto, M. L., Pérez-Armada, L., & Domínguez, H. (2015). Cosmetics from Marine Sources. In *Hb25_Springer Handbook of Marine Biotechnology* (pp. 1015-1042). Springer Berlin Heidelberg.

- Baneyx, F., & Mujacic, M.** (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature biotechnology*, 22(11), 1399-1408.
- Bartosz, G.** (2010). Non-enzymatic antioxidant capacity assays: limitations of use in biomedicine. *Free radical research*, 44(7), 711-720.
- Basantani, M., & Srivastava, A.** (2007). Plant glutathione transferases-a decade falls short. *Botany*, 85(5), 443-456.
- Bathige, S. D. N. K., Umasuthan, N., Revathy, K. S., Lee, Y., Kim, S., Cho, M. Y., ... & Lee, J.** (2014). A mu class glutathione S-transferase from Manila clam *Ruditapes philippinarum* (RpGST μ): Cloning, mRNA expression, and conjugation assays. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 162, 85-95.
- Béchet, Q., Moussion, P., & Bernard, O.** (2017). Calibration of a productivity model for the microalgae *Dunaliella salina* accounting for light and temperature. *Algal Research*, 21, 156-160.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J.** (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Beretta, G., & Facino, R. M.** (2010). Recent advances in the assessment of the antioxidant capacity of pharmaceutical drugs: from in vitro to in vivo evidence. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 398(1), 67-75.
- Berges, J. A., & Falkowski, P. G.** (1998). Physiological stress and cell death in marine phytoplankton: induction of proteases in response to nitrogen or light limitation. *Limnology and Oceanography*, 43(1), 129-135.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., ... & Bourne, P. E.** (2000). The protein data bank. *Nucleic acids research*, 28(1), 235-242.
- Beuckmann, C. T., Fujimori, K., Urade, Y., & Hayaishi, O.** (2000). Identification of mu-class glutathione transferases M2-2 and M3-3 as cytosolic prostaglandin E synthases in the human brain. *Neurochemical research*, 25(5), 733-738.

- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., ... & Schwede, T.** (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic acids research*, gku340.
- Bimboim, H. C., & Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7(6), 1513-1523.
- Bladeren, P.J.V., Ommen, B.V.** (1991). The inhibition of glutathione S-transferases: mechanisms, toxic consequences and therapeutic benefits. *Pharmac. Ther.* 51, 35—46.
- Blanc, G., Duncan, G., Agarkova, I., Borodovsky, M., Gurnon, J., Kuo, A., ... & Van Etten, J. L.** (2010). The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex. *The Plant Cell Online*, 22(9), 2943-2955.
- Blanchette, B., Feng, X., & Singh, B. R.** (2007). Marine glutathione S-transferases. *Marine biotechnology*, 9(5), 513-542.
- Board, P. G., & Menon, D.** (2013). Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(5), 3267-3288.
- Bold, H. C.** (1949). The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama*, sp. nov. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 101-108.
- Borowitzka, M. A.** (1996). Closed algal photobioreactors: design considerations for large-scale systems. *Journal of Marine Biotechnology*, 4(4), 185-191.
- Borowitzka, M.** (1999). Commercial production of microalgae: Ponds, tanks, and fermenters. *Progress in Industrial Microbiology*, 70: 313–321.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Buhmann, M. T.** (2015). Interactions between diatoms and bacteria in laboratory biofilm model communities (Doctoral dissertation).

Buetler, T. M., & Eaton, D. L. (1992). Glutathione S-transferases: Amino acid sequence comparison, classification and phylogenetic relationship. *Journal of Environmental Science & Health Part C*, 10(2), 181-203.

Bwatanglang, I. B., Faruq, M., Gupta, A. K., & Yusof, N. A. (2015). Algae-Derived Biomass for Sustainable and Renewable Biofuel Production. In *Agricultural Biomass Based Potential Materials* (pp. 341-373). Springer International Publishing.

Caccuri, A. M., Antonini, G., Nicotra, M., Battistoni, A., Lo, B. M., Board, P. G., ... & Ricci, G. (1997). Catalytic mechanism and role of hydroxyl residues in the active site of theta class glutathione S-transferases. Investigation of Ser-9 and Tyr-113 in a glutathione S-transferase from the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *The Journal of biological chemistry*, 272(47), 29681.

Cao, S., Zhang, X., Fan, X., Qiao, H., Liang, C., Xu, D., ... & Ye, N. (2013). Phylogeny and characterisation of *Nannochloropsis oceanica* var. *sinensis* var. *nov.* (*Eustigmatophyceae*), a new oleaginous alga from China. *Phycologia*, 52(6), 573-577.

Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M., Llompарт, M., García-Jares, C., Rodríguez, I., ... & Ternes, T. (2004). Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water research*, 38(12), 2918-2926.

Cardozo, K. H., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcão, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., ... & Pinto, E. (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(1), 60-78.

Carfagna, S., Salbitani, G., Vona, V., & Esposito, S. (2011). Changes in cysteine and O-acetyl-l-serine levels in the microalga *Chlorella sorokiniana* in response to the S-nutritional status. *Journal of plant physiology*, 168(18), 2188-2195.

Carletti, E., Luca, A. D., Urbani, A., Sacchetta, P., & Ilio, C. D. (2003). Sigma-class glutathione transferase from *Xenopus laevis*: molecular cloning, expression, and site-directed mutagenesis. *Archives of biochemistry and biophysics*, 419(2), 214-221.

Carlsson, A.S., Van Beilen, J.B., Möller, R., and Clayton, D. (2007). Micro- and macro- algae: Utility for industrial applications. In *EPOBIO: Realising Economic Potential of Sustainable Resources—Bioproducts from Non-Food Crops*. Diana

Bowles (Ed.), CPL Press, Tall Gables, The Sydings, Speen, Newbury, Berks RG14 1RZ, UK.6–131

Carvalho, A. N., Marques, C., Guedes, R. C., Castro-Caldas, M., Rodrigues, E., Horssen, J., & Gama, M. J. (2016). S-Glutathionylation of Keap1: a new role for glutathione S-transferase pi in neuronal protection. *FEBS letters*, 590(10), 1455-1466.

Carvajal, P., Gibert, J., Campos, N., Lopera, O., Barbera, E., Torné, J. M., & Santos, M. (2011). Activity of maize transglutaminase overexpressed in *Escherichia coli* inclusion bodies: an alternative to protein refolding. *Biotechnology progress*, 27(1), 232-240. ISO 6

Carvalho, A. P., Silva, S. O., Baptista, J. M., & Malcata, F. X. (2011). Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(5), 1275-1288.

Carvalho, A., Meireles, L., and Malcata, F. (2006). Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology Progress*, 22: 1490–1506.

Casamatta, D. A., & Hašler, P. (2016). Blue-Green Algae (Cyanobacteria) in Rivers. In *River Algae* (pp. 5-34). Springer International Publishing.

Ceccoli, J., Costello, B., & Pillai, S. (2012). U.S. Patent No. 8,202,519. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Chang, Y. C., Liu, F. P., Ma, X., Li, M. M., Li, R., Li, C. W., ... & Zhao, C. W. (2016). Glutathione S-transferase A1—a sensitive marker of alcoholic injury on primary hepatocytes. *Human & experimental toxicology*, 0960327116650013.

Chatterjee, R., Yuan, L. (2006). Directed evolution of metabolic pathways. *Trends Biotechnol.* 24, 28–38.

Chen, C. Y., Kao, P. C., Tsai, C. J., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2013). Engineering strategies for simultaneous enhancement of C-phycocyanin production and CO₂ fixation with *Spirulina platensis*. *Bioresource technology*, 145, 307-312.

Chen, B., Yu, Y., & Huang, J. (2010, June). Effect of microwave radiation on the antioxidant responses of *Nannochloropsis oculata*. In *Bioinformatics and Biomedical Engineering (iCBBE), 2010 4th International Conference on* (pp. 1-5). IEEE.

- Chisti, Y.** (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, 26: 12
- Chisti, Y.** (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25(3), 294-306.
- Choi, C. Y., Kim, N. N., Shin, H. S., Park, H. G., Cheon, S. G., & Kil, G. S.** (2013). The effect of various wavelengths of light from light-emitting diodes on the antioxidant system of marine cyanobacteria, *Synechococcus sp.* *Molecular & Cellular Toxicology*, 9(3), 295-302.
- Choi, B. W., Ryu, G., Park, S. H., Kim, E. S., Shin, J., Roh, S. S., ... & Lee, B. H.** (2007). Anticholinesterase activity of plastoquinones from *Sargassum sagamianum*: lead compounds for Alzheimer's disease therapy. *Phytotherapy Research*, 21(5), 423-426.
- Chronopoulou, E., & Labrou, N. E.** (2016). Protein engineering of glutathione transferase for the development of optical biosensor to detect xenobiotics.
- Clark, L. C., & Lyons, C.** (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of sciences*, 102(1), 29-45.
- Clonis Y.D.** (1997), *Enzyme Biotechnology*, Crete University Press, Heraklio, Crete, Greece.
- Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., & Del Borghi, M.** (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(6), 1146-1151.
- Coppens, J., Grunert, O., Van Den Hende, S., Vanhoutte, I., Boon, N., Haesaert, G., & De Gelder, L.** (2016). The use of microalgae as a high-value organic slow-release fertilizer results in tomatoes with increased carotenoid and sugar levels. *Journal of Applied Phycology*, 1-11.
- Childs, S., Haroune, N., Williams, L., & Gronow, M.** (2016). Determination of cellular glutathione: glutathione disulfide ratio in prostate cancer cells by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 1437, 67-73.

- Choochote, W., Suklampoo, L., & Ochaikul, D.** (2013). Evaluation of antioxidant capacities of green microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 1-6.
- Chronopoulou, E., Madesis, P., Asimakopoulou, B., Platis, D., Tsaftaris, A., & Labrou, N. E.** (2012). Catalytic and structural diversity of the fluazifop-inducible glutathione transferases from *Phaseolus vulgaris*. *Planta*, 235(6), 1253-1269
- Chronopoulou, E., Madesis, P., Tsaftaris, A., & Labrou, N. E.** (2014). Cloning and Characterization of a Biotic-Stress-Inducible Glutathione Transferase from *Phaseolus vulgaris*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(2), 595-609.
- Chronopoulou, E. G., & Labrou, N. E.** (2011). Site-saturation Mutagenesis: A Powerful Tool for Structure-Based Design of Combinatorial Mutation Libraries. *Current Protocols in Protein Science*, 26-6.
- Cocco, R., Stenberg, G., Dragani, B., Principe, D. R., Paludi, D., Mannervik, B., & Aceto, A.** (2001). The folding and stability of human alpha class glutathione transferase A1-1 depend on distinct roles of a conserved N-capping box and hydrophobic staple motif. *Journal of Biological Chemistry*, 276(34), 32177-32183.
- Cross, F. R., & Umen, J. G.** (2015). The *Chlamydomonas* cell cycle. *The Plant Journal*.
- Cummins, I., Dixon, D. P., Freitag-Pohl, S., Skipsey, M., & Edwards, R.** (2011). Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. *Drug metabolism reviews*, 43(2), 266-280.
- Cummins, I., Wortley, D. J., Sabbadin, F., He, Z., Coxon, C. R., Straker, H. E., ... & Edwards, R.** (2013). Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(15), 5812-5817.
- Custódio, L., Justo, T., Silvestre, L., Barradas, A., Duarte, C. V., Pereira, H., ... & Varela, J.** (2012). Microalgae of different phyla display antioxidant, metal chelating and acetylcholinesterase inhibitory activities. *Food Chemistry*, 131(1), 134-140.

- Davydov, V. V., Dobaeva, N. M., & Bozhkov, A. I.** (2004). Possible role of alteration of aldehyde's scavenger enzymes during aging. *Experimental gerontology*, 39(1), 11-16.
- De Godos, I., Muñoz, R., & Guieysse, B.** (2012). Tetracycline removal during wastewater treatment in high-rate algal ponds. *Journal of hazardous materials*, 229, 446-449.
- Del Campo, J.A., Garcia-Gonzalez, M., and Guerrero, M.G.** (2007). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74: 1163–1174.
- DeLano, W. L.** (2002). Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter On Protein Crystallography*, 40.
- Dennis, D., Turpin, D., Lefebvre, D., and Layzell, D.** (1998). *Plant Metabolism*, 2nd ed., Singapore: Longman.
- Deponte, M.** (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(5), 3217-3266.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., ... & Gascuel, O.** (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic acids research*, 36(suppl 2), W465-W469.
- Diaz-Vivancos, P., de Simone, A., Kiddle, G., & Foyer, C. H.** (2015). Glutathione–linking cell proliferation to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 1154-1164.
- Dillon, H. F., Zaman, A., Day, A. G., & Coragliotti, A.** (2015). U.S. Patent No. 8,932,652. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Dineshkumar, R., Dhanarajan, G., Dash, S. K., & Sen, R.** (2015). An advanced hybrid medium optimization strategy for the enhanced productivity of lutein in *Chlorella minutissima*. *Algal Research*, 7, 24-32.
- Dirr, H., Reinemer, P., & Huber, R.** (1994). X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. *European Journal of Biochemistry*, 220(3), 645-661.

Dixon, D. P., Laphorn, A., & Edwards, R. (2002). Plant glutathione transferases. *Genome Biol*, 3(3), 3004-1. **Dixon, D. P., & Edwards, R.** (2006). Enzymes of tyrosine catabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant science*, 171(3), 360-366.

Dixon, D. P., Davis, B. G., & Edwards, R. (2002a). Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(34), 30859-30869.

Dogan, H., Coteli, E., & Karatas, F. (2016). Determination of Glutathione, Selenium, and Malondialdehyde in Different Edible Mushroom Species. *Biological trace element research*, 1-5.

Dong, C., Fu, Y., Liu, G., & Liu, H. (2014). Low light intensity effects on the growth, photosynthetic characteristics, antioxidant capacity, yield and quality of wheat (*Triticum aestivum L.*) at different growth stages in BLSS. *Advances in Space Research*, 53(11), 1557-1566.

Dowd, A.J., Steven, A., Morou, E., Hemingway, J., Vontas, J., Paine, M.J.I. (2009). A simple glutathione transferase-based colorimetric endpoint assay for insecticide detection. *Enzyme Microb. Technol.* 45, 164-168.

Dragani, B., Stenberg, G., Melino, S., Petruzzelli, R., Mannervik, B., & Aceto, A. (1997). The Conserved N-capping Box in the Hydrophobic Core of Glutathione S-Transferase P1-1 is essential for refolding identification of a buried and conserved hydrogen bond important for protein stability. *Journal of Biological Chemistry*, 272(41), 25518-25523.

Drummond, A. J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Duran, C., ... & Moir, R. (2011). *Geneious v5*. 4.

Du, J., Li, L., Ding, X., Hu, H., Lu, Y., & Zhou, S. (2013). Isolation and characterization of a novel cyanophycin synthetase from a deep-sea sediment metagenomic library. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(19), 8619-8628.

Duan, P., Wang, B., & Xu, Y. (2015). Catalytic hydrothermal upgrading of crude bio-oils produced from different thermo-chemical conversion routes of microalgae. *Bioresource technology*, 186, 58-66.

- Duchoud, F., Chuang, D. S., & Liao, J. C.** (2017). Cyanobacteria as a Host Organism. *Industrial Biotechnology: Microorganisms*, 581-604.
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S.M., Blanc, P., Chidambara Murthy, K.N., and Ravishankar, G.A.** (2005). Microorganisms and microalgae as pigments for food use: A scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science and Technology*, 16: 389–406.
- Dupont, C. L., Goepfert, T. J., Lo, P., Wei, L., & Ahner, B. A.** (2004). Diurnal cycling of glutathione in marine phytoplankton: Field and culture studies. *Limnology and oceanography*, 49, 991-996.
- Edwards, R., & Dixon, D. P.** (2005). Plant glutathione transferases. *Methods in enzymology*, 401, 169-186.
- Eijsink, V.G.H., Gåseidnes, S., Borchert, T.V., van den Burg, B.** (2005). Directed evolution of enzyme stability. *Biomol. Eng.* 22, 21–30.
- Eisenberg, D., Lüthy, R., & Bowie, J. U.** (1997). VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods in enzymology*, 277, 396.
- El-Gamal, D., Rao, S. P., Holzer, M., Hallström, S., Haybaeck, J., Gauster, M., ... & Marsche, G.** (2014). The urea decomposition product cyanate promotes endothelial dysfunction. *Kidney international*, 86(5), 923-931.
- Eshdat, Y., Holland, D., Faltin, Z., & Ben-Hayyim, G.** (1997). Plant glutathione peroxidases. *Physiologia Plantarum*, 100(2), 234-240.
- Esterbauer, H., Zollner, H., & Lang, J.** (1985). Metabolism of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by isolated hepatocytes and by liver cytosolic fractions. *Biochemical Journal*, 228(2), 363-373.
- Fahey, R. C., & Sundquist, A. R.** (1991). Evolution of glutathione metabolism. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 64(1), 53.
- Fan, Y. X., McPhie, P., & Miles, E. W.** (2000). Regulation of tryptophan synthase by temperature, monovalent cations, and an allosteric ligand. Evidence from Arrhenius plots, absorption spectra, and primary kinetic isotope effects. *Biochemistry*, 39(16), 4692-4703.

- Fawley, M. W., Yun, Y., & Qin, M.** (2000). Phylogenetic analyses of 18S rDNA sequences reveal a new coccoid lineage of the Prasinophyceae (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 36(2), 387-393.
- Feng, Y., Xu, Q., Yang, T., Sun, E., Li, J., Shi, D., & Wu, D.** (2014). A novel self-cleavage system for production of soluble recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, 99, 64-69.
- Fernandes, B. D., Mota, A., Oliveira, J. M., Ferreira, A., Dragone, G., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A.** (2014). Determination of light distribution profile and microalgae cells flow pattern in column photobioreactors.
- Ferrer-Miralles, N., Saccardo, P., Corchero, J. L., Xu, Z., & García-Fruitós, E.** (2015). General Introduction: Recombinant Protein Production and Purification of Insoluble Proteins. In *Insoluble Proteins* (pp. 1-24). Springer New York.
- Filho, J. M., Medeiros, K. C. P., Diniz, M. D. F. F., Batista, L. M., Athayde-Filho, P. F., Silva, M. S., ... & Quintans-Júnior, L. J.** (2006). Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(2), 258-285.
- Finkel, Z. V.** (2016). Silicification in the microalgae. In *The Physiology of Microalgae* (pp. 289-300). Springer International Publishing.
- Flanagan, J. U., & Smythe, M. L.** (2011). Sigma-class glutathione transferases. *Drug Metabolism Reviews*, 43(2), 194-214.
- Flores-Molina, M. R., Thomas, D., Lovazzano, C., Núñez, A., Zapata, J., Kumar, M., ... & Contreras-Porcia, L.** (2014). Desiccation stress in intertidal seaweeds: Effects on morphology, antioxidant responses and photosynthetic performance. *Aquatic Botany*, 113, 90-99.
- Folin, O., & Ciocalteu, V.** (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 73(2), 627-650.
- Fornai, F., Piaggi, S., Gesi, M., Saviozzi, M., Lenzi, P., Paparelli, A., & Casini, A. F.** (2001). Subcellular localization of a glutathione-dependent dehydroascorbate reductase within specific rat brain regions. *Neuroscience*, 104(1), 15-31.

- Foyer, C. H., & Noctor, G.** (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & redox signaling*, 11(4), 861-905.
- Fournier, D., Bride, J. M., Poirie, M., Berge, J. B., & Plapp, F. W.** (1992). Insect glutathione S-transferases. Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides. *Journal of Biological Chemistry*, 267(3), 1840-1845.
- Fragoulaki, M., Labrou, N., & Clonis, Y.** (2007). Optoelectronic determination of the herbicide alachlor using recombinant glutathione S-transferase. *Journal of Biotechnology*, 131(2), S128.
- Franklin, S.E., and Mayfield, S.P.** (2005). Recent developments in the production of human therapeutic proteins in eukaryotic algae. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 5: 225–235.
- Freitas, A. C., Pereira, L., Rodrigues, D., Carvalho, A. P., Panteleitchouk, T., Gomes, A. M., & Duarte, A. C.** (2015). Marine Functional Foods. In *Springer Handbook of Marine Biotechnology* (pp. 969-994). Springer Berlin Heidelberg.
- Frova, C.** (2006). Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomolecular engineering*, 23(4), 149-169.
- Frova, C.** (2003). The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. *Physiologia plantarum*, 119(4), 469-479.
- Fučíková, K., Leliaert, F., Cooper, E. D., Škaloud, P., D'hondt, S., De Clerck, O., ... & Verbruggen, H.** (2014). New phylogenetic hypotheses for the core Chlorophyta based on chloroplast sequence data. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2, 63.
- Garvey, E. P., & Matthews, C. R.** (1990). Site-directed mutagenesis and its application to protein folding. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, 14, 37.
- George, S. G., & Young, P.** (1988). Purification and properties of plaice liver cytosolic glutathione-S-transferases. *Marine Environmental Research*, 24(1), 93-96.
- Ghosh, D., Singh, P. K., Sahay, S., Jha, N. N., Jacob, R. S., Sen, S., ... & Maji, S. K.** (2015). Structure based aggregation studies reveal the presence of helix-rich intermediate during [agr]-Synuclein aggregation. *Scientific reports*, 5.

Giannetto, M. J., Retotar, A., Rismani-Yazdi, H., & Peccia, J. (2015). Using carbon dioxide to maintain an elevated oleaginous microalga concentration in mixed-culture photo-bioreactors. *Bioresource technology*, 185, 178-184.

Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.

Gilmartin, N., Ryan, D., & Dowling, D. N. (2005). Analysis of the C-terminal domain of *Burkholderia sp.* strain LB400 BphK reveals a conserved motif that affects catalytic activity. *FEMS Microbiology letters*, 249(1), 23-30.

Gimpel, J. A., Hyun, J. S., Schoepp, N. G., & Mayfield, S. P. (2015). Production of recombinant proteins in microalgae at pilot greenhouse scale. *Biotechnology and bioengineering*, 112(2), 339-345.

Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., & De Cooman, L. (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of applied phycology*, 24(6), 1477-1486.

Goiris, K., Van Colen, W., Wilches, I., León-Tamariz, F., De Cooman, L., & Muylaert, K. (2015). Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. *Algal Research*, 7, 51-57.

Goldstein, J., & Combes, B. (1966). Spectrophotometric assay of the liver enzyme that catalyzes sulfobromophthalein-glutathione conjugation. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 67(5), 863.

Goodenough, U. (2015). Historical perspective on *Chlamydomonas* as a model for basic research: 1950–1970. *The Plant Journal*.

Greenwell, H. C., Laurens, L. M. L., Shields, R. J., Lovitt, R. W., & Flynn, K. J. (2009). Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of the Royal Society Interface*, rsif20090322.

Grierson, S., Strezov, V., Bray, S., Mummacari, R., Danh, L. T., & Foster, N. (2011). Assessment of bio-oil extraction from *Tetraselmis chui* microalgae comparing supercritical CO₂, solvent extraction, and thermal processing. *Energy & Fuels*, 26(1), 248-255.

- Griffiths, M. J., van Hille, R. P., & Harrison, S. T.** (2012). Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *Journal of Applied Phycology*, 24(5), 989-1001.
- Grobbelaar, J. U.** (2000). Physiological and technological considerations for optimising mass algal cultures. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5), 201-206.
- Goto, M., Kanda, H., & Machmudah, S.** (2015). Extraction of carotenoids and lipids from algae by supercritical CO₂ and subcritical dimethyl ether. *The Journal of Supercritical Fluids*, 96, 245-251.
- Gouet, P., Courcelle, E., & Stuart, D. I.** (1999). ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics*, 15(4), 305-308.
- Guedes, A.C., Amaro, H.M., and Malcata, F.X.** (2011). Microalgae as sources of carotenoids. *Marine Drugs*, 9: 625–644.
- Guex, N., & Peitsch, M. C.** (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *electrophoresis*, 18(15), 2714-2723.
- Guillard, R., & Ryther, J.** (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana Hustedt*, and *Detonula confervacea* (cleve) Gran. *Canadian journal of microbiology*, 8, 229.
- Guo, R., Ebenezer, V., & Ki, J. S.** (2014). PmMGST3, a novel microsomal glutathione S-transferase gene in the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*, is a potential biomarker of oxidative stress. *Gene*, 546(2), 378-385.
- Guschina, I. A., & Harwood, J. L.** (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in lipid research*, 45(2), 160-186.
- Gutschner, T., Hämmerle, M., Genovese, G., Draetta, G. F., & Chin, L.** (2016). Cas9 protein engineering for cell cycle-specific genome editing to enhance homology directed repair. *Cancer Research*, 76(14 Supplement), 71-71.
- Guzman, S., Gato, A., & Calleja, J. M.** (2001). Antiinflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytotherapy Research*, 15(3), 224-230.

Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.

Hagel, P., Gerding, J. J. T., Fieggen, W., & Bloemendal, H. (1971). Cyanate formation in solutions of urea: I. Calculation of cyanate concentrations at different temperature and pH. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 243(3), 366-373.

Halim, A. A. A., Zaroog, M. S., Kadir, H. A., & Tayyab, S. (2014). Alcohol-induced structural transitions in the acid-denatured *Bacillus licheniformis* α -amylase. *Journal of Saudi Chemical Society*. ISO 690

Hamed, R. R., Abu-Shady, M. R., El-Beih, F. M., Abdalla, A., & Afifi, O. M. (2005). Purification and Characterization of a Glutathione S-transferase from *Mucor mucedo*. *Polish Journal of Microbiology*, 54(2), 153.

Hamed, I., Özogul, F., Özogul, Y., & Regenstein, J. M. (2015). Marine Bioactive Compounds and Their Health Benefits: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4), 446-465.

Harnedy, P. A., & Fitzgerald, R. J. (2013). Bioactive proteins and peptides from macroalgae, fish, shellfish and marine processing waste. *Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications*, 5-39.

Harris, J., Coles, B., Meyer, D. J., & Ketterer, B. (1991). The isolation and characterization of the major glutathione S-transferase from the squid *Loligo vulgaris*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 98(4), 511-515.

Hartmann, P., Béchet, Q., & Bernard, O. (2014). The effect of photosynthesis time scales on microalgae productivity. *Bioprocess and biosystems engineering*, 37(1), 17-25.

Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 51-88.

Heiker, J. T., Klötting, N., Blüher, M., & Beck-Sickinger, A. G. (2010). Access to gram scale amounts of functional globular adiponectin from E. coli inclusion bodies

by alkaline-shock solubilization. Biochemical and biophysical research communications, 398(1), 32-37.

Hemaiswarya, S., Raja, R., Ravikumar, R., & Carvalho, I. S. (2013). 3 Microalgae Taxonomy and Breeding. Biofuel Crops: Production, Physiology and Genetics, 44.

Henderson, C. J., McLaren, A. W., & Wolf, C. R. (2014). In vivo regulation of human glutathione transferase GSTP by chemopreventive agents. Cancer research, 74(16), 4378-4387.

Henriksen, P. A. (2014). The potential of neutrophil elastase inhibitors as anti-inflammatory therapies. Current opinion in hematology, 21(1), 23-28.

Henry, T. B., & Black, M. C. (2008). Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor) in western mosquitofish. Archives of environmental contamination and toxicology, 54(2), 325-330.

Herve, C., de Franco, P., Groisillier, A., Tonon, T., & Boyen, C. (2008). New members of the glutathione transferase family discovered in red and brown algae. Biochem. J, 412, 535-544.

Hibberd, D. J. (1981). Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes *Eustigmatophyceae* and *Tribophyceae* (synonym *Xanthophyceae*). Botanical Journal of the Linnean Society, 82(2), 93-119.

Higgins, B. T. (2015, April). Cofactor symbiosis enhances growth and biofuel production in *Chlorella*. In 37th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Simb.

Hiratsuka, A., Okada, T., Nishiyama, T., Fujikawa, M., Ogura, K., Okuda, H., & Watabe, T. (1994). Novel theta class glutathione S-transferases Yrs-Yrs' and Yrs'-Yrs' in rat liver cytosol: their potent activity toward 5-sulfoxymethylchrysene, a reactive metabolite of the carcinogen 5-hydroxymethylchrysene. Biochemical and biophysical research communications, 202(1), 278-284.

Hossain, M. T., Yamada, N., & Yamamoto, K. (2014). Glutathione-Binding Site of a *Bombyx mori* Theta-Class Glutathione Transferase. PloS one, 9(5), e97740.

Hrabárová, E., Achbergerová, L., & Nahálka, J. (2015). Insoluble Protein Applications: The Use of Bacterial Inclusion Bodies as Biocatalysts. In *Insoluble Proteins* (pp. 411-422). Springer New York.

Hu, Q., Guterman, H., and Richmond, A. (1996). A flat inclined modular photobioreactor for outdoor mass cultivation of photoautotrophs. *Biotechnology and Bioengineering*, 51: 51–60.

Huang, J., Feng, F., Wan, M., Ying, J., Li, Y., Qu, X., ... & Li, W. (2015). Improving performance of flat-plate photobioreactors by installation of novel internal mixers optimized with computational fluid dynamics. *Bioresource technology*, 182, 151-159.

Huber, C., Bartha, B., Harpaintner, R., & Schröder, P. (2009). Metabolism of acetaminophen (paracetamol) in plants—two independent pathways result in the formation of a glutathione and a glucose conjugate. *Environmental Science and Pollution Research*, 16(2), 206-213.

Hudek, K., Davis, L. C., Ibbini, J., & Erickson, L. (2014). Commercial Products from Algae. In *Algal Biorefineries* (pp. 275-295). Springer Netherlands.

Huseby, S., Degerlund, M., Eriksen, G. K., Ingebrigtsen, R. A., Eilertsen, H. C., & Hansen, E. (2013). Chemical Diversity as a Function of Temperature in Six Northern Diatom Species. *Marine drugs*, 11(11), 4232-4245.

Ibañez, E., & Cifuentes, A. (2013). Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(4), 703-709.

Imokawa, G., & Ishida, K. (2015). Biological mechanisms underlying the ultraviolet radiation-induced formation of skin wrinkling and sagging I: reduced skin elasticity, highly associated with enhanced dermal elastase activity, triggers wrinkling and sagging. *International journal of molecular sciences*, 16(4), 7753-7775.

Inbaraj, B.S., Chien, J.T., and Chen, B.H. (2006). Improved high performance liquid chromatographic method determination of carotenoids in the microalga *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Chromatography A*, 1102: 193–199.

Imokawa, G., Nakajima, H., & Ishida, K. (2015). Biological mechanisms underlying the ultraviolet radiation-induced formation of skin wrinkling and sagging II: over-expression of neprilysin plays an essential role. *International journal of molecular sciences*, 16(4), 7776-7795.

Itakura, H., Kobayashi, M., & Nakamura, S. (2015). *Chlorella* ingestion suppresses resistin and related genes' expression in peripheral blood cells of borderline diabetics. *Clinical Nutrition ESPEN*, 10(3), e95-e101.

Ivanetich, K. M., & Santi, D. V. (1990). Bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase in protozoa. *The FASEB Journal*, 4(6), 1591-1597.

Jakobson, I. N. G. A., Warholm, M., & Mannervik, B. (1979). Multiple inhibition of glutathione S-transferase A from rat liver by glutathione derivatives: kinetic analysis supporting a steady-state random sequential mechanism. *Biochemical Journal*, 177(3), 861-868.

Ji, X., von Rosenvinge, E. C., Johnson, W. W., Tomarev, S. I., Piatigorsky, J., Armstrong, R. N., & Gilliland, G. L. (1995). Three-dimensional structure, catalytic properties, and evolution of a sigma class glutathione transferase from squid, a progenitor of the lens S-crystallins of cephalopods. *Biochemistry*, 34(16), 5317-5328.

Ji, X., von Rosenvinge, E. C., Johnson, W. W., Tomarev, S. I., Piatigorsky, J., Armstrong, R. N., & Gilliland, G. L. (1995). Three-dimensional structure, catalytic properties, and evolution of a sigma class glutathione transferase from squid, a progenitor of the lens S-crystallins of cephalopods. *Biochemistry*, 34(16), 5317-5328.

Javitt, N. B., Wheeler, H. O., Baker, K. J., Ramos, O. L., & Bradley, S. E. (1960). The intrahepatic conjugation of sulfobromophthalein and glutathione in the dog. *The Journal of clinical investigation*, 39(10), 1570-1577.

Jiménez-Escrig, A., Rincón, M., Pulido, R., & Saura-Calixto, F. (2001). Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5489-5493.

Johansson, A. S., & Mannervik, B. (2001). Human glutathione transferase A3-3, a highly efficient catalyst of double-bond isomerization in the biosynthetic pathway of steroid hormones. *Journal of Biological Chemistry*, 276(35), 33061-33065

John, R. J. S., Carpenter, J. F., & Randolph, T. W. (1999). High pressure fosters protein refolding from aggregates at high concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(23), 13029-13033.

Josephy, P. D., & Mannervik, B. (2006). *Molecular toxicology*. Oxford University Press on Demand.

Jowsey, I., Thomson, A., Flanagan, J., Murdock, P., Moore, G., Meyer, D., ... & Hayes, J. (2001). Mammalian class Sigma glutathione S-transferases: catalytic properties and tissue-specific expression of human and rat GSH-dependent prostaglandin D2 synthases. *Biochem. J*, 359, 507-516.

Kamagaju, L., Morandini, R., Bizuru, E., Nyetera, P., Nduwayezu, J. B., Stévigny, C., ... & Duez, P. (2013). Tyrosinase modulation by five Rwandese herbal medicines traditionally used for skin treatment. *Journal of ethnopharmacology*, 146(3), 824-834.

Kammeyer, A., & Luiten, R. M. (2015). Oxidation events and skin aging. *Ageing research reviews*, 21, 16-29.

Kampranis, S. C., Damianova, R., Atallah, M., Toby, G., Kondi, G., Tsihliis, P. N., & Makris, A. M. (2000). A novel plant glutathione S-transferase/peroxidase suppresses Bax lethality in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 275(38), 29207-29216.

Kanaoka, Y., Ago, H., Inagaki, E., Nanayama, T., Miyano, M., Kikuno, R., ... & Hayaishi, O. (1997). Cloning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin D synthase. *Cell*, 90(6), 1085-1095.

Kanaoka, Y., Ago, H., Inagaki, E., Nanayama, T., Miyano, M., Kikuno, R., ... & Hayaishi, O. (1997). Cloning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin D synthase. *Cell*, 90(6), 1085-1095.

Kanaoka, Y., Fujimori, K., Kikuno, R., Sakaguchi, Y., Urade, Y., & Hayaishi, O. (2000). Structure and chromosomal localization of human and mouse genes for

hematopoietic prostaglandin D synthase. *European Journal of Biochemistry*, 267(11), 3315-3322.

Kaplan, W., Erhardt, J., Sluis-Cremer, N., Dirr, H., Hüsler, P., & Klump, H. (1997). Conformational stability of pGEX-expressed *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase: A detoxification enzyme and fusion-protein affinity tag. *Protein Science*, 6(2), 399-406.

Kapoli, P., Axarli, I.A., Platis, D., Fragoulaki, M., Paine, M., Hemingway, J., Vontas, J., Labrou, N.E. (2008) Engineering sensitive glutathione transferase for the detection of xenobiotics. *Biosens Bioelectron* 24, 498-503

Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*, 10(6), 845-858.

Kelley, M. K., Engqvist-Goldstein, A., Montali, J. A., Wheatley, J. B., Schmidt, D. E., & Kauvar, L. M. (1994). Variability of glutathione S-transferase isoenzyme patterns in matched normal and cancer human breast tissue. *Biochemical Journal*, 304(3), 843-848.

Keramati, M. R., Wasnik, V., Ping, L., Das, D., & Emberly, E. (2015). Confinement-dependent localization of diffusing aggregates in cellular geometries. *Physical Review E*, 91(1), 012705.

Khan, S. A., Hussain, M. Z., Prasad, S., & Banerjee, U. C. (2009). Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(9), 2361-2372. Robert A. Andersen; 2007; Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics; CRC Press; chapter:15; pages:285-311

Khanna-Chopra, R., & Chauhan, S. (2015). Wheat cultivars differing in heat tolerance show a differential response to oxidative stress during monocarpic senescence under high temperature stress. *Protoplasma*, 1-11.

Kim, K. A., Cha, K. H., Choi, S. J., Pan, C. H., & Jung, S. H. (2014). The Extract of *Chlorella vulgaris* Protects Transformed Retinal Ganglion Cells from Oxidative Stress-induced Cells Death. *Journal of Food Biochemistry*, 38(2), 129-139.

- Kim, K. T., Rioux, L. E., & Turgeon, S. L.** (2014). Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry*, 98, 27-33.
- Kim, M., Park, J., Song, K., Kim, H. G., Koh, J. S., & Boo, Y. C.** (2012). Screening of plant extracts for human tyrosinase inhibiting effects. *International journal of cosmetic science*, 34(2), 202-208.
- Kim, S., Ravichandran, Y.D., Khan, S.B., and Kim, Y.T.** (2008) Prospective of the cosmoceuticals derived from marine organisms. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13: 511–523.
- Kim, Y. J., & Uyama, H.** (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62(15), 1707-1723.
- Kjellander, M., Mazari, A. M., Boman, M., Mannervik, B., & Johansson, G.** (2014). Glutathione transferases immobilized on nanoporous alumina: Flow system kinetics, screening, and stability. *Analytical biochemistry*, 446, 59-63.
- Klaveness, D.** (2017). *Hydrurus foetidus* (*Chrysophyceae*)—an inland macroalga with potential. *Journal of Applied Phycology*, 1-7.
- Kobayashi, M., & Kobayashi, M.** (1995). Waste remediation and treatment using anoxygenic phototrophic bacteria. In *Anoxygenic photosynthetic bacteria* (pp. 1269-1282). Springer Netherlands.
- Koeplinger, K. A., Zhao, Z., Peterson, T., Leone, J. W., Schwende, F. S., Heinrikson, R. L., & Tomasselli, A. G.** (1999). Activated sulfonamides are cleaved by glutathione-S-transferases. *Drug metabolism and disposition*, 27(9), 986-991.
- Koller, M., Muhr, A., & Braunegg, G.** (2014). Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research*, 6, 52-63.
- Kolm, R. H., Danielson, U. H., Zhang, Y. U. E. S. H. E. N. G., Talalay, P., & Mannervik, B.** (1995). Isothiocyanates as substrates for human glutathione transferases: structure-activity studies. *Biochemical Journal*, 311(2), 453-459.

Komeda, H., Ishikawa, N., Asano, Y. (2003). Enhancement of the thermostability and catalytic activity of D-stereospecific amino acid amidase from *Ochrobactrum anthropi* SV3 by directed evolution. *J. Mol. Catal. B. Enz.* 21, 283–290

Kong, K. H., Takasu, K., Inoue, H., & Takahashi, K. (1992). Tyrosine-7 in human class Pi glutathione S-transferase is important for lowering the pK_a of the thiol group of glutathione in the enzyme-glutathione complex. *Biochemical and biophysical research communications*, 184(1), 194-197.

Koonin, E. V., Tatusov, R. L., Altschul, S. F., Bryant, S. H., Mushegian, A. R., Bork, P., & Valencia, A. (1994). Eukaryotic translation elongation factor 1 γ contains a glutathione transferase domain—Study of a diverse, ancient protein super family using motif search and structural modeling. *Protein Science*, 3(11), 2045-2055.

Kotzia, G. A., Platis, D., Axarli, I. A., Chronopoulou, E. G., Karamitros, C., & Labrou, N. E. (2012). Biocatalysis, enzyme engineering and biotechnology. *Food Biochemistry and Food Processing*, 125.

Kudou, M., Yumioka, R., Ejima, D., Arakawa, T., & Tsumoto, K. (2011). A novel protein refolding system using lauroyl-l-glutamate as a solubilizing detergent and arginine as a folding assisting agent. *Protein expression and purification*, 75(1), 46-54.

Kula, M., Rys, M., Mozdzeń, K., & Skoczowski, A. (2014). Metabolic activity, the chemical composition of biomass and photosynthetic activity of *Chlorella vulgaris* under different light spectra in photobioreactors. *Engineering in Life Sciences*, 14(1), 57-67.

Kumari, R., Kaur, I., & Bhatnagar, A. K. (2011). Effect of aqueous extract of *Sargassum johnstonii* Setchell & Gardner on growth, yield and quality of *Lycopersicon esculentum* Mill. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 623-633.

Kouzuma, A., & Watanabe, K. (2015). Exploring the potential of algae/bacteria interactions. *Current opinion in biotechnology*, 33, 125-129.

Kuang, Q., Purhonen, P., Ålander, J., Svensson, R., Hoogland, V., Winerdal, J., ... & Hebert, H. (2015). A refined atomic model for microsomal glutathione transferase 1 from electron crystallography.

Kuwada, N. J., Traxler, B., & Wiggins, P. A. (2015). Genome-scale quantitative characterization of bacterial protein localization dynamics throughout the cell cycle. *Molecular microbiology*, 95(1), 64-79.

LaCourse, E. J., Hernandez-Viadel, M., Jefferies, J. R., Svendsen, C., Spurgeon, D. J., Barrett, J., ... & Brophy, P. M. (2009). Glutathione transferase (GST) as a candidate molecular-based biomarker for soil toxin exposure in the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Environmental Pollution*, 157(8), 2459-2469.

Labrou, N.E. (2010). Random mutagenesis methods for in vitro directed enzyme evolution. *Curr. Protein Pept. Sci.* 11, 91-100.

Labrou, N.E., Kotzia, G.A., Clonis, Y.D. (2004). Engineering the xenobiotic substrate specificity of maize glutathione S-transferase I. *Protein Eng. Des. Sel.* 17, 741-748.

Labrou, N. E., Mello, L. V., & Clonis, Y. D. (2001). Functional and structural roles of the glutathione-binding residues in maize (*Zea mays*) glutathione S-transferase I. *Biochemical Journal*, 358(1), 101-110.

Laloux, G., & Jacobs-Wagner, C. (2014). How do bacteria localize proteins to the cell pole?. *Journal of cell science*, 127(1), 11-19.

Lante, A., & Tinello, F. (2015). Citrus hydrosols as useful by-products for tyrosinase inhibition. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27, 154-159.

Leaver, M. J., & George, S. G. (1995). Structure of the plaice glutathione S-transferase A gene. *Marine Environmental Research*, 39(1), 33-37.

Ledermann, B., Aras, M., & Frankenberg-Dinkel, N. (2017). Biosynthesis of Cyanobacterial Light-Harvesting Pigments and Their Assembly into Phycobiliproteins. In *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes* (pp. 305-340). Springer International Publishing.

Lee, Y. M., Lee, K. W., Park, H., Park, H. G., Raisuddin, S., Ahn, I. Y., & Lee, J. S. (2007). Sequence, biochemical characteristics and expression of a novel Sigma-class of glutathione S-transferase from the intertidal copepod, *Tigriopus japonicas* with a possible role in antioxidant defense. *Chemosphere*, 69(6), 893-902.

- Lee, S. H., Carpenter, J. F., Chang, B. S., Randolph, T. W., & Kim, Y. S.** (2006). Effects of solutes on solubilization and refolding of proteins from inclusion bodies with high hydrostatic pressure. *Protein science*, 15(2), 304-313.
- Lee, M. Y., & Shin, H. W.** (2003). Cadmium-induced changes in antioxidant enzymes from the marine alga *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Applied Phycology*, 15(1), 13-19.
- Lee, K. K., Kim, J. H., Cho, J. J., & Choi, J. D.** (1999). Inhibitory Effects of 150 Plant Extracts on Elastase Activity, and Their Anti-inflammatory Effects. *International journal of cosmetic science*, 21(2), 71-82.
- Lee, C. G.** (1999). Calculation of light penetration depth in photobioreactors. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 4(1), 78-81.
- Leonarduzzi, G., Arkan, M. C., Başağa, H., Chiarpotto, E., Sevanian, A., & Poli, G.** (2000). Lipid oxidation products in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(9), 1370-1378.
- Leong, L. P., & Shui, G.** (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food chemistry*, 76(1), 69-75.
- Levitan, O., Dinamarca, J., Zelzion, E., Lun, D. S., Guerra, L. T., Kim, M. K., ... & Falkowski, P. G.** (2015). Remodeling of intermediate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* under nitrogen stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(2), 412-417.
- Lewis, A.D., Forrester, L.M., Hajes, J.D., Wareing, C.J., Carmichael, J., Harris, A.L., Mooghen, M., Wolf, C.R.** (1989). Glutathione S-transferase isoenzymes n human tumours and tumour derived cell lines. *Br. J. Cancer*. 60, 327-331.
- Liao, Q., Li, L., Chen, R., & Zhu, X.** (2014). A novel photobioreactor generating the light/dark cycle to improve microalgae cultivation. *Bioresource technology*, 161, 186-191.
- Li, H. B., Cheng, K. W., Wong, C. C., Fan, K. W., Chen, F., & Jiang, Y.** (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry*, 102(3), 771-776.

Li, Y., Boonprakob, A., Gaonkar, C. C., Kooistra, W. H., Lange, C. B., Hernández-Becerril, D., ... & Lundholm, N. (2017). Diversity in the Globally Distributed Diatom Genus *Chaetoceros* (*Bacillariophyceae*): Three New Species from Warm-Temperate Waters. *PloS one*, 12(1), e0168887.

Liebau, E., Dawood, K. F., Fabrini, R., Fischer-Riepe, L., Perbandt, M., Stella, L., ... & Ricci, G. (2009). Tetramerization and cooperativity in *Plasmodium falciparum* glutathione S-transferase are mediated by atypic loop 113–119. *Journal of Biological Chemistry*, 284(33), 22133-22139.

Liebau, E., Wildenburg, G., Brophy, P. M., Walter, R. D., & Henkle-Dührsen, K. (1996). Biochemical analysis, gene structure and localization of the 24 kDa glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus*. *Molecular and biochemical parasitology*, 80(1), 27-39.

Lillo, C., Lea, U. S., & Ruoff, P. (2008). Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant, cell & environment*, 31(5), 587-601.

Lo, B. M., Battistoni, A., Mazzetti, A. P., Board, P. G., Muramatsu, M., Federici, G., & Ricci, G. (1995). Site-directed mutagenesis of human glutathione transferase P1-1. Spectral, kinetic, and structural properties of Cys-47 and Lys-54 mutants. *The Journal of biological chemistry*, 270(3), 1249.

Loera-Quezada, M. M., Angeles, G., & Olguín, E. J. (2011). Effect of irradiance on the cell density, size and lipid accumulation of *Neochloris oleoabundans*. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal*, 2, 81-92.

Lordan, S., Smyth, T. J., Soler-Vila, A., Stanton, C., & Ross, R. P. (2013). The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. *Food chemistry*, 141(3), 2170-2176.

Lu, S. C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(5), 3143-3153.

Lushchak, V. I. (2012). Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *Journal of amino acids*, 2012.

Mahajan, S., & Atkins, W. M. (2005). The chemistry and biology of inhibitors and pro-drugs targeted to glutathione S-transferases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62(11), 1221-1233.

Marin, B. (2012). Nested in the *Chlorellales* or independent class? Phylogeny and classification of the *Pedinophyceae* (*Viridiplantae*) revealed by molecular phylogenetic analyses of complete nuclear and plastid-encoded rRNA operons. *Protist*, 163(5), 778-805.

Marrs, K. A. (1996). The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual review of plant biology*, 47(1), 127-158.

Mata, T.M., Martins, A., and Caetano, N.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 217–232. Matamoros, V., Uggetti, E., García, J., & Bayona,

Matamoros, V., Uggetti, E., García, J., & Bayona, J. M. (2016). Assessment of the mechanisms involved in the removal of emerging contaminants by microalgae from wastewater: a laboratory scale study. *Journal of hazardous materials*, 301, 197-205.

Martínez-Alonso, M., González-Montalbán, N., García-Fruitós, E., & Villaverde, A. (2009). Learning about protein solubility from bacterial inclusion bodies. *Microbial cell factories*, 8(1), 4.

Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jensson, H., Tahir, M. K., Warholm, M., & Jörnvall, H. (1985). Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(21), 7202-7206.

Mannervik, B., Castro, V. M., Danielson, U. H., Tahir, N. K., Hansson, J., Ringborg, U. (1987). Expression of class pi glutathione transferase in human malignant melanoma cells. *Carcinogenesis*, 8, 1929-1932.

Masaki, H. (2010). Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *Journal of dermatological science*, 58(2), 85-90.

Mashiyama, S. T., Malabanan, M. M., Akiva, E., Bhosle, R., Branch, M. C., Hillerich, B., ... & Babbitt, P. C. (2014). Large-scale determination of sequence,

structure, and function relationships in cytosolic glutathione transferases across the biosphere. *PLoS biology*, 12(4), e1001843.

Mathieu-Rivet, E., Kiefer-Meyer, M. C., Vanier, G., Ovide, C., Burel, C., Lerouge, P., & Bardor, M. (2014). Protein N-glycosylation in eukaryotic microalgae and its impact on the production of nuclear expressed biopharmaceuticals. *Frontiers in plant science*, 5.

Matsukawa, R., Dubinsky, Z., Masaki, K., Takeuchi, T., & Karube, I. (1997). Enzymatic screening of microalgae as a potential source of natural antioxidants. *Applied biochemistry and biotechnology*, 66(3), 239-247.

Mazzetti, A. P., Fiorile, M. C., Primavera, A., & Bello, M. L. (2015). Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. *Neurochemistry international*, 82, 10-18.

McGoldrick, S., O'Sullivan, S. M., & Sheehan, D. (2005). Glutathione transferase-like proteins encoded in genomes of yeasts and fungi: insights into evolution of a multifunctional protein superfamily. *Fems microbiology letters*, 242(1), 1-12.

McManus, G., Costa, M., Canals, A., Coll, M., & Mantle, T. J. (2011). Site-directed mutagenesis of mouse glutathione transferase P1-1 unlocks masked cooperativity, introduces a novel mechanism for 'ping pong' kinetic behaviour, and provides further structural evidence for participation of a water molecule in proton abstraction from glutathione. *FEBS Journal*, 278(2), 273-281.

Medlin, L. K. (2017). Evolution of the diatoms: IX. Two datasets resolving monophyletic Classes of diatoms are used to explore the validity of adding short clone library sequences to the analysis. *European Journal of Phycology*, 1-14.

Meier, L., Pérez, R., Azócar, L., Rivas, M., & Jeison, D. (2015). Photosynthetic CO₂ uptake by microalgae: An attractive tool for biogas upgrading. *Biomass and Bioenergy*, 73, 102-109.

Mendoza-Cózatl, D., Loza-Tavera, H., Hernández-Navarro, A., & Moreno-Sánchez, R. (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS microbiology reviews*, 29(4), 653-671.

Mendoza-Cózatl, D. G., Springer, F., Torpey, J. W., Komives, E. A., Kehr, J., & Schroeder, J. I. (2008). Identification of high levels of phytochelatin, glutathione

and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *The Plant Journal*, 54(2), 249-259.

Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., ... & Mittag, M. (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 318(5848), 245-250.

Meschenmoser, K., Kim, Y., Franken, S., Nowak, M., Feldmann, G., Bendas, G., ... & Schmidt-Wolf, I. G. (2013). Targeting cancer with a bi-functional peptide: in vitro and in vivo results. *In Vivo*, 27(4), 431-442.

Metting, Jr., F.B. (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology*, 17: 477–489.

Meyer, D. J., Crease, D. J., & Ketterer, B. (1995). Forward and reverse catalysis and product sequestration by human glutathione S-transferases in the reaction of GSH with dietary aralkyl isothiocyanates. *Biochem. J*, 306, 565-569.

Michael, C., del Ninno, M., Gross, M., & Wen, Z. (2015). Use of wavelength-selective optical light filters for enhanced microalgal growth in different algal cultivation systems. *Bioresource technology*, 179, 473-482.

Michels, M. H., van der Goot, A. J., Vermuë, M. H., & Wijffels, R. H. (2015). Cultivation of shear stress sensitive and tolerant microalgal species in a tubular photobioreactor equipped with a centrifugal pump. *Journal of Applied Phycology*, 1-10.

Mills, G. C. (1957). Hemoglobin catabolism I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *Journal of Biological Chemistry*, 229(1), 189-197.

Milledge, J.J. (2011). Commercial application of microalgae other than as biofuels: A brief review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 10: 31–41.

Miller, N. J., & Rice-Evans, C. A. (1997). The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry*, 60(3), 331-337.

- Mishra, N. P., Fatma, T., & Singhal, G. S.** (1995). Development of antioxidative defense system of wheat seedlings in response to high light. *Physiologia Plantarum*, 95(1), 77-82.
- Mishra, V., & Srivastava, N.** (2015). Organophosphate pesticides-induced changes in the redox status of rat tissues and protective effects of antioxidant vitamins. *Environmental toxicology*, 30(4), 472-482.
- Mitchell, C. L.** (2016). Oxidative stress and the skin. *Textbook of Oxidative Stress and Antioxidant Protection: The Science of Free Radical Biology and Disease*.
- Mizohata, E., Kumei, M., Matsumura, H., Shimaoka, T., Miyake, C., Inoue, T., ... & Kai, Y.** (2001). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of glutathione-dependent dehydroascorbate reductase from spinach chloroplasts. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 57(11), 1726-1728.
- Moheimani, N. R., Parlevliet, D., McHenry, M. P., Bahri, P. A., & de Boer, K.** (2015). Past, Present and Future of Microalgae Cultivation Developments. In *Biomass and Biofuels from Microalgae* (pp. 1-18). Springer International Publishing.
- Molina, E., Fernández, J., Ación, F. G., & Chisti, Y.** (2001). Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of biotechnology*, 92(2), 113-131.
- Moody, J. W., McGinty, C. M., & Quinn, J. C.** (2014). Global evaluation of biofuel potential from microalgae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201321652.
- Moons, A.** (2005). Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs). *Vitamins & Hormones*, 72, 155-202.
- Morelli, E., & Scarano, G.** (2004). Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Science*, 167(2), 289-296.
- Morgenstern, R., Zhang, J., & Johansson, K.** (2011). Microsomal glutathione transferase 1: mechanism and functional roles. *Drug metabolism reviews*, 43(2), 300-306.

- Morou, E., Ismail, H. M., Dowd, A. J., Hemingway, J., Labrou, N., Paine, M., & Vontas, J.** (2008). A dehydrochlorinase-based pH change assay for determination of DDT in sprayed surfaces. *Analytical biochemistry*, 378(1), 60-64.
- Mulbry, W., Kondrad, S., & Pizarro, C.** (2007). Biofertilizers from algal treatment of dairy and swine manure effluents: characterization of algal biomass as a slow release fertilizer. *Journal of vegetable science*, 12(4), 107-125.
- Muñoz, I., López-Doval, J. C., Ricart, M., Villagrasa, M., Brix, R., Geiszinger, A., ... & Sabater, S.** (2009). Bridging levels of pharmaceuticals in river water with biological community structure in the Llobregat river basin (northeast Spain). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(12), 2706-2714.
- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y., & Allakhverdiev, S. I.** (2007). Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1767(6), 414-421.
- Murray, K. E., Thomas, S. M., & Bodour, A. A.** (2010). Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. *Environmental Pollution*, 158(12), 3462-3471.
- Nagaratnam, N., Nagaratnam, K., & Cheuk, G.** (2016). Skin Disorders in the Elderly. In *Diseases in the Elderly* (pp. 215-226). Springer International Publishing.
- Nakov, T., Theriot, E. C., & Alverson, A. J.** (2014). Using phylogeny to model cell size evolution in marine and freshwater diatoms. *Limnology and Oceanography*, 59(1), 79-86.
- Natarajan, S., Shanmugiahthevar, K. P., & Kasi, P. D.** (2009). Cholinesterase inhibitors from *Sargassum* and *Gracilaria gracilis*: seaweeds inhabiting South Indian coastal areas (Hare Island, Gulf of Mannar). *Natural product research*, 23(4), 355-369.
- Navrot, N., Collin, V., Gualberto, J., Gelhaye, E., Hirasawa, M., Rey, P., ... & Rouhier, N.** (2006). Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology*, 142(4), 1364-1379.
- Nebert, D. W., & Vasiliou, V.** (2004). Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Hum Genomics*, 1(6), 460-464.

- Necchi Jr, O.** (2016). Heterokonts (*Xanthophyceae* and *Chrysophyceae*) in Rivers. In *River Algae* (pp. 153-158). Springer International Publishing.
- Nei, M., Tajima, F., & Taten, Y.** (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*, 19(2), 153-170.
- Neufeind, T., Reinemer, P., & Bieseler, B.** (1996). Plant glutathione S-transferases and herbicide detoxification. *Biological chemistry*, 378(3-4), 199-205.
- Nielsen, A.** (2015). Treatment of wastewater with microalgae under mixotrophic growth: A focus on removal of DOC from municipal and industrial wastewater.
- Nilsson, L. O., Gustafsson, A., & Mannervik, B.** (2000). Redesign of substrate-selectivity determining modules of glutathione transferase A1-1 installs high catalytic efficiency with toxic alkenal products of lipid peroxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(17), 9408-9412.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y. I., Neukermans, J., MARQUEZ-GARCIA, B. E. L. E. N., ... & Foyer, C. H.** (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell & Environment*, 35(2), 454-484.
- Noctor, G., Queval, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., & Foyer, C. H.** (2011). Glutathione. *The Arabidopsis Book*, 9(1), 1-32.
- Oakes, J., Nguyen, T., & Britt, B.** (2003). Arrhenius analysis of the electrophorus electricus acetylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of acetylthiocholine. *Protein and peptide letters*, 10(3), 321-324.
- Oakley, A.** (2011). Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug metabolism reviews*, 43(2), 138-151.
- Oakley, A. J.** (2005). Glutathione transferases: new functions. *Current opinion in structural biology*, 15(6), 716-723.
- Oh, K.H., Nam, S.H., Kim, H.S.** (2002). Improvement of oxidative and thermostability of N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase by directed evolution. *Protein Eng.* 15, 689-695.

- Okamoto, O. K., Asano, C. S., Aidar, E., & Colepicolo, P.** (1996). Effects of cadmium on growth and superoxide dismutase activity of the marine microalga *Tetraselmis gracilis*. *Journal of Philosophy*, 32.
- Olaizola, M.** (2003). Commercial development of microalgal biotechnology: From the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*, 20: 459–466.
- Ördög, V., Stirk, W. A., Bálint, P., van Staden, J., & Lovász, C.** (2012). Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *Journal of Applied Phycology*, 24(4), 907-914.
- Olguín, E.J.** (2003). Phycoremediation: Key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnology Advances*, 22: 81–91.
- Oren, A.** (2014). Cyanobacteria: biology, ecology and evolution. *Stress Biology of Cyanobacteria: Molecular Mechanisms to Cellular Responses*. Wiley, New York, 3-20.
- Orosa, M., Torres, E., Fidalgo, P., and Abalde, J.** (2000). Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. *Journal of Applied Phycology*, 12: 553–556.
- Oztetik, E.** (2015). Biomarkers of ecotoxicological oxidative stress in an urban environment: using evergreen plant in industrial areas. *Ecotoxicology*, 24(4), 903-914.
- Palmer, T., & Bonner, P. L.** (2007). *Enzymes: biochemistry, biotechnology, clinical chemistry*. Elsevier.
- Panda, A. K.** (2000). Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, 18(2), 182-192.
- Pandey, T., Singh, S. K., Chhetri, G., Tripathi, T., & Singh, A. K.** (2015). Characterization of a highly pH Stable Chi-Class Glutathione S-Transferase from *Synechocystis* PCC 6803. *PloS one*, 10(5), e0126811.
- Papageorgiou, L., Loukatou, S., Koumandou, V. L., Makalowski, W., Megalooikonomou, V., Vlachakis, D., & Kossida, S.** (2014). Structural models for the design of novel antiviral agents against Greek Goat Encephalitis. *PeerJ*, 2, e664.

Papageorgiou, L., Loukatou, S., Sofia, K., Maroulis, D., & Vlachakis, D. (2016). An updated evolutionary study of Flaviviridae NS3 helicase and NS5 RNA-dependent RNA polymerase reveals novel invariable motifs as potential pharmacological targets. *Molecular BioSystems*.

Parsons, T. R., Stephens, K., & Strickland, J. D. H. (1961). On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 18(6), 1001-1016

Patra, A. K., Gahlay, G. K., Reddy, B. V. V., Gupta, S. K., & Panda, A. K. (2000). Refolding, structural transition and spermatozoa-binding of recombinant bonnet monkey (*Macaca radiata*) zona pellucida glycoprotein-C expressed in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 267(24), 7075-7081.

Pearson, W. R. (2005). Phylogenies of glutathione transferase families. *Methods in enzymology*, 401, 186-204.

Perczel, A., Csizmadia I.G. (2003). The amide linkage. Ab initio conformational analysis of protein-subunits: a case-study of the serine diamide model. Chapter 13. P. 409. John Wiley & Sons, Inc.

Pemble, S. E., & Taylor, J. B. (1992). An evolutionary perspective on glutathione transferases inferred from class-theta glutathione transferase cDNA sequences. *Biochemical Journal*, 287(3), 957-963.

Pérez-Rama, M., Vaamonde, E. T., & Alonso, J. A. (2006). Composition and production of thiol constituents induced by cadmium in the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Environmental toxicology and chemistry*, 25(1), 128-136.

Pettersson, P.L., Johansson, A.S., Mannervik, B. (2002). Translocation of human glutathione transferase A2-2 with peroxidase activity into an efficient steroid isomerase. *J. Biol. Chem.* 277, 30019-30022.

Phadke, R. S. (1992). Biosensors and enzyme immobilized electrodes. *Biosystems*, 27(4), 203-206.

Plaza, M., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2008). In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science & Technology*, 19(1), 31-39.

- Powles, S. B., & Yu, Q.** (2010). Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annual review of plant biology*, 61, 317-347.
- Przybycien, T. M., Dunn, J. P., Valax, P., & Georgiou, G.** (1994). Secondary structure characterization of β -lactamase inclusion bodies. *Protein engineering*, 7(1), 131-136.
- Pulz, O., and Gross, W.** (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65: 635–648.
- Pulz, O.** (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 57(3), 287-293.
- Rabik, C. A., & Dolan, M. E.** (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer treatment reviews*, 33(1), 9-23.
- Rana, S. V. S., Allen, T., & Singh, R.** (2002). Inevitable glutathione, then and now. *Indian journal of experimental biology*, 40(6), 706-716.
- Raja, R., Shanmugam, H., Ganesan, V., & Carvalho, I. S.** (2014). Biomass from Microalgae: An Overview. *Oceanography*, 2(118), 2.
- Rajkumar, R., & Yaakob, Z.** (2013). 2 The Biology of Microalgae. *Biotechnological Applications of Microalgae: Biodiesel and Value-Added Products*, 7.
- Raina, K., Panda, A. K., Ali, M. M., & Talwar, G. P.** (2004). Purification, refolding, and characterization of recombinant LHRH-T multimer. *Protein expression and purification*, 37(1), 8-17.
- Ramos-Martinez, E. M., Fimognari, L., & Sakuragi, Y.** (2017). High yield secretion of recombinant proteins from the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnology Journal*.
- Ranson, H., Rossiter, L., Orтели, F., Jensen, B., Wang, X., Roth, C., ... & Hemingway, J.** (2001). Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem. J*, 359, 295-304.

Renaud, S. M., Thinh, L. V., & Parry, D. L. (1999). The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*, 170(2), 147-159.

Renfrew, P. D., Choi, E. J., Bonneau, R., & Kuhlman, B. (2012). Incorporation of noncanonical amino acids into Rosetta and use in computational protein-peptide interface design. *PLoS One*, 7(3), e32637.

Revathy, K. S., Umasuthan, N., Lee, Y., Choi, C. Y., Whang, I., & Lee, J. (2012). First molluscan theta-class Glutathione S-Transferase: Identification, cloning, characterization and transcriptional analysis post immune challenges. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 162(1), 10-23.

Rhee, J. S., Raisuddin, S., Hwang, D. S., Horiguchi, T., Cho, H. S., & Lee, J. S. (2008). A Mu-class glutathione S-transferase (GSTM) from the rock shell *Thais clavigera*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 148(3), 195-203.

Ricci, G., Lo, B. M., Caccurri, A. M., Pastore, A., Nuccetelli, M., Parker, M. W., & Federici, G. (1995). Site-directed mutagenesis of human glutathione transferase P1-1. Mutation of Cys-47 induces a positive cooperativity in glutathione transferase P1-1. *The Journal of biological chemistry*, 270(3), 1243..

Richmond, A. (Ed.). (2008). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. John Wiley & Sons..

Richmond, A., Boussiba, S., Vonshak, A., and Kopel, R. (1993). A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors. *Journal of Applied Phycology*, 5: 327–332.

Robert, X., & Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic acids research*, 42(W1), W320-W324.

Roccatano, D., Colombo, G., Fioroni, M., & Mark, A. E. (2002). Mechanism by which 2, 2, 2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: a molecular dynamics study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(19), 12179-12184.

- Rodriguez-Garcia, I., & Guil-Guerrero, J. L.** (2008). Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. *Food chemistry*, 108(3), 1023-1026.
- Roso, G. R., Queiroz, M. I., Streit, N. M., Menezes, C. R. D., & Zepka, L. Q.** (2015). The Bioeconomy of Microalgal Carotenoid-Rich Oleoresins Produced in Agroindustrial Biorefineries. *J Chem Eng Process Technol*, 6, 218.
- Rouhier, N., Lemaire, S. D., & Jacquot, J. P.** (2008). The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 143-166.
- Roodveldt, C., Aharoni, A., Tawfiket, D.S.** (2005). Directed evolution of proteins for heterologous expression and stability. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 50–56.
- Ruiz-Martinez, A., Serralta, J., Seco, A., & Ferrer, J.** (2016). Behavior of mixed *Chlorophyceae* cultures under prolonged dark exposure. Respiration rate modeling. *Ecological Engineering*, 91, 265-269.
- Sabeh, F., Wright, T., & Norton, S. J.** (1992). Purification and characterization of a glutathione peroxidase from the Aloe vera plant. *Enzyme & protein*, 47(2), 92-98.
- Saeid, A., & Chojnacka, K.** (2015). Algae Biomass as a Raw Material for Production of Algal Extracts. *Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications*, 179-188.
- Salbitani, G., Vona, V., Bottone, C., Petriccione, M., & Carfagna, S.** (2015). Sulfur Deprivation Results in Oxidative Perturbation in *Chlorella sorokiniana* (211/8k). *Plant and Cell Physiology*, 56(5), 897-905.
- Salinas, A. E., & Wong, M. G.** (1999). Glutathione S-transferases-a review. *Current medicinal chemistry*, 6(4), 279-310.
- Sassolas, A., Blum, L. J., & Leca-Bouvier, B. D.** (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology advances*, 30(3), 489-511.
- Satoh, K.** (1995). The high non-enzymatic conjugation rates of some glutathione S-transferase (GST) substrates at high glutathione concentrations. *Carcinogenesis*, 16(4), 869-874.

Sawant, S. S., Murkute, P., Bhagwat, A. M., & Mane, V. K. (2016) Effect of Copper on the generation time and antioxidant potential of a novel isolate of *Chlorella emersonii* KJ725233. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(3).

Sayed, Y., Wallace, L. A., & Dirr, H. W. (2000). The hydrophobic lock-and-key intersubunit motif of glutathione transferase A1-1: implications for catalysis, ligandin function and stability. *FEBS letters*, 465(2-3), 169-172.

Schaller, A., Connors, N. K., Dwyer, M. D., Oelmeier, S. A., Hubbuch, J., & Middelberg, A. P. (2015). Computational study of elements of stability of a four-helix bundle protein biosurfactant. *Journal of computer-aided molecular design*, 29(1), 47-58.

Schröder, P. (2001). The role of glutathione and glutathione S-transferases in plant reaction and adaptation to xenobiotics. In *Significance of Glutathione to Plant Adaptation to the Environment* (pp. 155-183). Springer Netherlands.

Schuller, D. J., Liu, Q., Kriksunov, I. A., Campbell, A. M., Barrett, J., Brophy, P. M., & Hao, Q. (2005). Crystal structure of a new class of glutathione transferase from the model human hookworm nematode *Heligmosomoides polygyrus*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 61(4), 1024-1031.

Scranton, M. A., Ostrand, J. T., Fields, F. J., & Mayfield, S. P. (2015). *Chlamydomonas* as a model for biofuels and bio-products production. *The Plant Journal*, 82(3), 523-531.

Scott, S. A., Davey, M. P., Dennis, J. S., Horst, I., Howe, C. J., Lea-Smith, D. J., & Smith, A. G. (2010). Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current opinion in biotechnology*, 21(3), 277-286.

Segel, I. H. (1975). *Enzyme kinetics* (Vol. 957). Wiley, New York.

Senthil, S. L., Kumar, T. V., Geetharamani, D., & Maruthupandi, T. (2013). Screening of seaweeds collected from Southeast Coastal area of India for α -amylase inhibitory activity, antioxidant activity and biocompatibility. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5, 240-244.

- Sheehan, D., Meade, G., & Foley, V. M.** (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, 360(1), 1-16.
- Shen, Y., Yuan, W., Pei, Z. J., Wu, Q., & Mao, E.** (2009). Microalgae mass production methods. *Transactions of the ASABE*, 52(4), 1275-1287.
- Singh, S. M., & Panda, A. K.** (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of bioscience and bioengineering*, 99(4), 303-310.
- Singh, S. M., Sharma, A., Upadhyay, A. K., Singh, A., Garg, L. C., & Panda, A. K.** (2012). Solubilization of inclusion body proteins using n-propanol and its refolding into bioactive form. *Protein expression and purification*, 81(1), 75-82.
- Singh, A., & Nigam, P. S.** (2014). Microbial biofuels production. *Microbial Biotechnology: Progress and Trends*, 155.
- Singh, A., Upadhyay, V., & Panda, A. K.** (2015). Solubilization and Refolding of Inclusion Body Proteins. In *Insoluble Proteins* (pp. 283-291). Springer New York.
- Singhal, S. S., Singh, S. P., Singhal, P., Horne, D., Singhal, J., & Awasthi, S.** (2015). Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. *Toxicology and applied pharmacology*, 289(3), 361-370.
- Shalaby, E. A., Shanab, S. M., & Singh, V.** (2010). Salt stress enhancement of antioxidant and antiviral efficiency of *Spirulina platensis*. *J Med Plants Res*, 4(24), 2622-2632
- Shanab, S. M., Mostafa, S. S., Shalaby, E. A., & Mahmoud, G. I.** (2012). Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2(8), 608-615.
- Shoener, B. D., Bradley, I. M., Cusick, R. D., & Guest, J. S.** (2014). Energy positive domestic wastewater treatment: the roles of anaerobic and phototrophic technologies. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 16(6), 1204-1222.
- Shriwastav, A., & Bose, P.** (2015). Algal growth in photo-bioreactors: Impact of illumination strategy and nutrient availability. *Ecological Engineering*, 77, 202-215.

- Skopelitou, K., Muleta, A. W., Papageorgiou, A. C., Chronopoulou, E., & Labrou, N. E.** (2015). Catalytic features and crystal structure of a tau class glutathione transferase from *Glycine max* specifically upregulated in response to soybean mosaic virus infections. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1854(2), 166-177.
- Sondheimer, E., & Kertesz, Z. I.** (1948). Anthocyanin pigments. *Analytical Chemistry*, 20(3), 245-248.
- Søgaard, M., Abe, J. I., Martin-Eauclaire, M. F., & Svensson, B.** (1993). α -Amylases: structure and function. *Carbohydrate polymers*, 21(2), 137-146.
- Soranzo, N., Gorla, M. S., Mizzi, L., De Toma, G., & Frova, C.** (2004). Organisation and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family. *Molecular genetics and genomics*, 271(5), 511-521.
- Specht, E., Miyake-Stoner, S., and Mayfield, S.** (2010). Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. *Biotechnology Letters*, 32: 1373–1383.
- Spiteller, G.** (2001). Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases. *Experimental gerontology*, 36(9), 1425-1457.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A.** (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(2), 87-96.
- Stenberg, G., Dragani, B., Cocco, R., Mannervik, B., & Aceto, A.** (2000). A conserved “hydrophobic staple motif” plays a crucial role in the refolding of human glutathione transferase P1-1. *Journal of Biological Chemistry*, 275(14), 10421-10428.
- Stein, J. R., Hellebust, J. A., & Craigie, J. S.** (1973). *Handbook of Phycological Methods: Physiological And Biochemical Methods (Vol. 2)*. Cambridge University Press.
- Street, H. E., & Cockburn, W.** (2014). *Plant metabolism*. Elsevier.
- Sun, Y., & Oberley, L. W.** (1989). The inhibition of catalase by glutathione. *Free Radical Biology and Medicine*, 7(6), 595-602.

Sun, L., Xi, B., Yu, L., Gao, X. C., Shi, D. J., Yan, Y. K., ... & Wang, C. (2010). Association of glutathione S-transferases polymorphisms (GSTM1 and GSTT1) with senile cataract: a meta-analysis. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(12), 6381-6386.

Sundberg, K., Widersten, M., Seidel, A., Mannervik, B., Jernstrom, B. (1997). Glutathione conjugation of bay- and fjord-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by glutathione transferases M1-1 and P1-1. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 1221-1227.

Sundberg, K., Johansson, A.S., Stenberg, G., Widersten, M., Seidel, A., Mannervik, B., Jernstrom, B. (1998). Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* 19, 433-436.

Takaichi, S. (2011). Carotenoids in algae: Distributions, biosyntheses and functions, *Marine Drugs*, 9: 1101–1118.

Taleb, A., Pruvost, J., Legrand, J., Marec, H., Le-Gouic, B., Mirabella, B., ... & Takache, H. (2015). Development and validation of a screening procedure of microalgae for biodiesel production: Application to the genus of marine microalgae *Nannochloropsis*. *Bioresource technology*, 177, 224-232.

Tan, C. H., Show, P. L., Chang, J. S., Ling, T. C., & Lan, J. C. W. (2015). Novel approaches of producing bioenergies from microalgae: A recent review. *Biotechnology advances*.

Tappel, A. L. (1978). Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Methods in enzymology*, 52, 506.

Teo, C. L., Atta, M., Bukhari, A., Taisir, M., Yusuf, A. M., & Idris, A. (2014). Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths. *Bioresource technology*, 162, 38-44.

Tesauro, M., Nisticò, S., Noce, A., Tarantino, A., Marrone, G., Costa, A., ... & Di Daniele, N. (2015). The possible role of glutathione-S-transferase activity in diabetic nephropathy. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 28(1), 129-133.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680.

Thomson, A., Meyer, D., & Hayes, J. (1998). Sequence, catalytic properties and expression of chicken glutathione-dependent prostaglandin D2 synthase, a novel class Sigma glutathione S-transferase. *Biochem. J*, 333, 317-325.

Thompson, J. D., Gibson, T., & Higgins, D. G. (2002). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current protocols in bioinformatics*, 2-3.

Thring, T. S., Hili, P., & Naughton, D. P. (2009). Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9(1), 1.

Tirichine, L., Lin, X., Thomas, Y., Lombard, B., Loew, D., & Bowler, C. (2014). *Marine Genomics*.

Tofazzal Hossain, M. D., & Yamamoto, K. (2015). Structural insight into the active site of a *Bombyx mori* unclassified glutathione transferase. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 79(6), 989-991.

Tomarev, S. I., & Zinovieva, R. D. (1988). Squid major lens polypeptides are homologous to glutathione S-transferases subunits.

Torres-Rivera, A., & Landa, A. (2008). Cooperative kinetics of the recombinant glutathione transferase of *Taenia solium* and characterization of the enzyme. *Archives of biochemistry and biophysics*, 477(2), 372-378.

Torzillo, G., Scoma, A., Faraloni, C., & Giannelli, L. (2014). Advances in the biotechnology of hydrogen production with the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Critical reviews in biotechnology*, (0), 1-12.

Toung, Y. P. S., Hsieh, T. S., & Tu, C. P. D. (1991). The *Drosophila* glutathione S-transferase 1-1 is encoded by an intronless gene at 87B. *Biochemical and biophysical research communications*, 178(3), 1205-1211.

Townsend, D. M., Tew, K. D., & Tapiero, H. (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57(3), 145-155.

Townsend, D. M., Manevich, Y., He, L., Hutchens, S., Pazoles, C. J., & Tew, K. D. (2009). Novel role for glutathione S-transferase π regulator of protein S-glutathionylation following oxidative and nitrosative stress. *Journal of biological chemistry*, 284(1), 436-445.

Tripathi, R. D., Dwivedi, S., Shukla, M. K., Mishra, S., Srivastava, S., Singh, R., ... & Gupta, D. K. (2008). Role of blue green algae biofertilizer in ameliorating the nitrogen demand and fly-ash stress to the growth and yield of rice (*Oryza sativa* L.) plants. *Chemosphere*, 70(10), 1919-1929.

Tsumoto, K., Umetsu, M., Kumagai, I., Ejima, D., & Arakawa, T. (2003). Solubilization of active green fluorescent protein from insoluble particles by guanidine and arginine. *Biochemical and biophysical research communications*, 312(4), 1383-1386.

Tuantet, K., Temmink, H., Zeeman, G., Janssen, M., Wijffels, R. H., & Buisman, C. J. (2014). Nutrient removal and microalgal biomass production on urine in a short light-path photobioreactor. *Water research*, 55, 162-174.

Tuna, M., & Woolfson, D. N. (2015). engineering protein Folding and Stability. *Phage Display In Biotechnology and Drug Discovery*, 275.

Ugwu, C. U., Aoyagi, H., & Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource technology*, 99(10), 4021-4028.

Ummalyma, S. B., & Sukumaran, R. K. (2014). Cultivation of microalgae in dairy effluent for oil production and removal of organic pollution load. *Bioresource technology*, 165, 295-301.

Umasuthan, N., Revathy, K. S., Lee, Y., Whang, I., Choi, C. Y., & Lee, J. (2012). A novel molluscan sigma-like glutathione S-transferase from Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: Cloning, characterization and transcriptional profiling. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 155(4), 539-550.

Umetsu, M., Tsumoto, K., Nitta, S., Adschiri, T., Ejima, D., Arakawa, T., & Kumagai, I. (2005). Nondenaturing solubilization of β 2 microglobulin from inclusion bodies by L-arginine. *Biochemical and biophysical research communications*, 328(1), 189-197.

- Usmani, M. A., Toppo, K., Nayaka, S., Suseela, M. R., & Sheikh, S.** (2015). Role of algae in sustainable Food, Health and Nutritional Security: An Overview.
- Vallejo, L. F., & Rinas, U.** (2004). Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories*, 3(1), 11.
- Ventura, S., & Villaverde, A.** (2006). Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends in biotechnology*, 24(4), 179-185.
- Vlachakis, D., Tsiliki, G., Pavlopoulou, A., Roubelakis, M. G., Tsaniras, S. C., & Kossida, S.** (2013). Antiviral stratagems against HIV-1 using RNA interference (RNAi) technology. *Evolutionary Bioinformatics*, 9.
- Vigani, M., Parisi, C., Rodriguez-Cerezo, E., Barbosa, M. J., Sijtsma, L., Ploeg, M., & Enzing, C.** (2015). Food and feed products from micro-algae: Market opportunities and challenges for the EU. *Trends in Food Science & Technology*.
- Vilar, S., Cozza, G., & Moro, S.** (2008). Medicinal chemistry and the molecular operating environment (MOE): application of QSAR and molecular docking to drug discovery. *Current topics in medicinal chemistry*, 8(18), 1555-1572.
- Vonshak, A.** (1997). *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology*, London: Taylor & Francis.
- Vuilleumier, S.** (1997). Bacterial glutathione S-transferases: what are they good for?. *Journal of Bacteriology*, 179(5), 1431.
- Vuilleumier, S., & Pagni, M.** (2002). The elusive roles of bacterial glutathione S-transferases: new lessons from genomes. *Applied microbiology and biotechnology*, 58(2), 138-146.
- Walker, T. L., Purton, S., Becker, D. K., & Collet, C.** (2005). Microalgae as bioreactors. *Plant cell reports*, 24(11), 629-641.
- Wan, Q., Whang, I., & Lee, J.** (2008). Molecular characterization of mu class glutathione-S-transferase from disk abalone (*Haliotis discus discus*), a potential biomarker of endocrine-disrupting chemicals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 150(2), 187-199.

- Wang, H. M. D., Chen, C. C., Huynh, P., & Chang, J. S.** (2015). Exploring the potential of using algae in cosmetics. *Bioresource technology*, 184, 355-362.
- Wang, T.** (2015). Glutathione S-transferases variants as risk factors in Alzheimer's disease. *Neurological Sciences*, 36(10), 1785-1792.
- Wang, Y., Zhang, C., Xin, Y., Guo, T., Lu, S., & Kong, J.** (2015). Identification of a Novel Dye-Decolorizing Peroxidase, EfeB, Translocated by a Twin-Arginine Translocation System in *Streptococcus thermophilus* CGMCC 7.179. *Applied and environmental microbiology*, 81(18), 6108-6119.
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M., & Barton, G. J.** (2009). Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189-1191.
- Weich, N., Ferri, C., Moiraghi, B., Bengió, R., Giere, I., Pavlovsky, C., ... & Fundia, A. F.** (2016). GSTM1 and GSTP1, but not GSTT1 genetic polymorphisms are associated with chronic myeloid leukemia risk and treatment response. *Cancer Epidemiology*, 44, 16-21.
- Wikteliu, E., & Stenberg, G.** (2007). Novel class of glutathione transferases from cyanobacteria exhibit high catalytic activities towards naturally occurring isothiocyanates. *Biochem. J*, 406, 115-123.
- Wilce, M. C., & Parker, M. W.** (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1205(1), 1-18.
- Williams, G.J., Domann, S., Nelson, A., Berry, A.** (2003). Modifying the stereochemistry of an enzyme-catalyzed reaction by directed evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 3143–3148.
- Wilson, S. R., Zucker, P. A., Huang, R. R. C., & Spector, A.** (1989). Development of synthetic compounds with glutathione peroxidase activity. *Journal of the American Chemical Society*, 111(15), 5936-5939.
- Winkler, J., Seybert, A., König, L., Pruggnaller, S., Haselmann, U., Sourjik, V., ... & Bukau, B.** (2010). Quantitative and spatio-temporal features of protein

aggregation in *Escherichia coli* and consequences on protein quality control and cellular ageing. The EMBO journal, 29(5), 910-923.

Wood, E., Casabe, N., Melgar, F., & Zerba, E. (1986). Distribution and properties of glutathione S-transferase from *T. infestans*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 84(4), 607-617.

Woodside, J. V., McGrath, A. J., Lyner, N., & McKinley, M. C. (2015). Carotenoids and health in older people. Maturitas, 80(1), 63-68.

Wuang, S. C., Khin, M. C., Chua, P. Q. D., & Luo, Y. D. (2016). Use of Spirulina biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers. Algal Research, 15, 59-64.

Xue, C. (2014). An Examination of the Phylogenetic Diversity of Green Algae (*Chlorophyceae*). That Symbiose with Spotted Salamanders (*Ambystoma maculatum*) in the Egg Stage.

Ya, W., Chun-Meng, Z., Tao, G., Yi-Lin, Z., & Ping, Z. (2015). Preliminary screening of 44 plant extracts for anti-tyrosinase and antioxidant activities. Pakistan journal of pharmaceutical sciences, 28(5), 1737-1744.

Yamamoto, K., Fujii, H., Aso, Y., Banno, Y., & Koga, K. (2007). Expression and characterization of a sigma-class glutathione S-transferase of the fall webworm, *Hyphantria cunea*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 71(2), 553-560.

Yamamoto, K., Zhang, P. B., Banno, Y., & Fujii, H. (2006). Identification of a sigma-class glutathione-S-transferase from the silkworm, *Bombyx mori*. Journal of Applied Entomology, 130(9-10), 515-522.

Yamamoto, K., Higashiura, A., Hossain, M. T., Yamada, N., Shiotsuki, T., & Nakagawa, A. (2015). Structural characterization of the catalytic site of a *Nilaparvata lugens* delta-class glutathione transferase. Archives of biochemistry and biophysics, 566, 36-42.

Yang, Y., Sharma, R., Sharma, A., Awasthi, S., & Awasthi, Y. C. (2002). Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. Acta biochimica Polonica, 50(2), 319-336.

Yaoyang, X. U., & Boeing, W. J. (2014). Modeling maximum lipid productivity of microalgae: Review and next step. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 32, 29-39.

Yigit, S., Dinjaski, N., Kaplan, D. L., Luo, M. L., Leenay, R. T., & Beisel, C. L. (2016). Biotalysis, Protein Engineering, and Nanobiotechnology. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(5).

Yruela, I. (2009). Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology*, 36(15), 409-430.

Zha, D., Wilensek, S., Hermes, M., Jaegerb, K.E., Reetz, M.T. (2001). Complete reversal of enantioselectivity of an enzyme catalysed reaction by directed evolution. *Chem. Commun.*, 2664–2665.

Zhang, H., & Forman, H. J. (2012, September). Glutathione synthesis and its role in redox signaling. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 23, No. 7, pp. 722-728). Academic Press.