



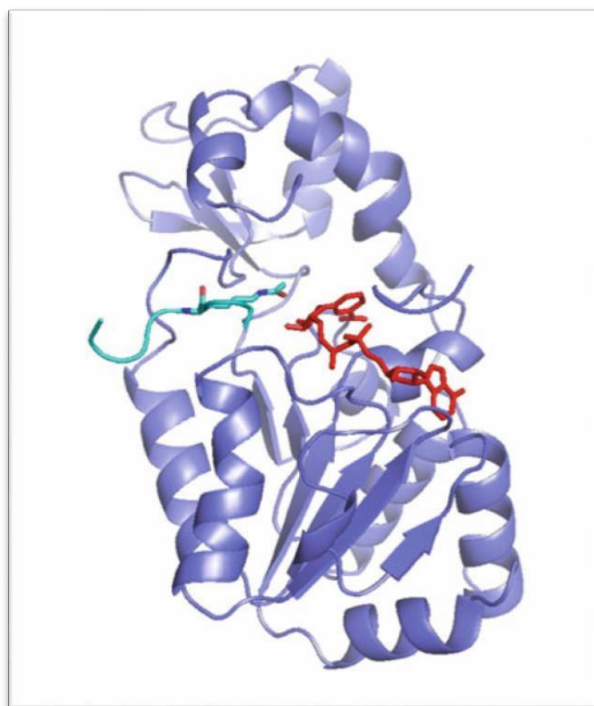
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΜΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα:

**Κλωνοποίηση, έκφραση του ενζύμου SIRT και
μελέτη αλληλεπίδρασης του με βιοδραστικά
εκχυλίσματα**



ΕΛΕΝΗ Ι. ΒΑΣΙΛΟΠΟΥΛΟΥ

Επιβλέπων καθηγητής: Νικόλαος Λάμπρου

Αθήνα, 2018

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΜΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα:

**Κλωνοποίηση, έκφραση του ενζύμου SIRT και
μελέτη αλληλεπίδρασης του με βιοδραστικά
εκχυλίσματα**

ΕΛΕΝΗ Ι. ΒΑΣΙΛΟΠΟΥΛΟΥ

Επιβλέπων καθηγητής: Νικόλαος Λάμπρου

Αθήνα, 2018

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα: Κλωνοποίηση, έκφραση του ενζύμου SIRT και μελέτη αλληλεπίδρασης του με βιοδραστικά εκχυλίσματα

Συγγραφή : Ελένη Ι. Βασιλοπούλου

Επιβλέπων Καθηγητής: Νικόλαος Λάμπρου

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή: Νικόλαος Λάμπρου, Ιωάννης Κλώνης, Σπυρίδων Κίντζιος

Περίληψη

Οι σιρτουίνες (Sirtuins) είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών καλά συντηρημένη, η οποία απαντάται σχεδόν σε όλους τους οργανισμούς. Στα θηλαστικά εντοπίζονται επτά μέλη της οικογένειας, οι SIRT1-7. Οι βασικές λειτουργίες που εκτελούν είναι η αποακετυλώση πρωτεϊνών και η μεταφορά της ADP-ριβόζης, με τη συμμετοχή του συμπαραγόντα NAD⁺. Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, ήταν η μελέτη της αναστολής ή της ενεργοποίησης που επιφέρουν βιοδραστικά εκχυλίσματα φυτών και μικροφυκών, στη δραστηριότητα του ενζύμου SIRT2. Επιπλέον η κλωνοποίηση του γονιδίου που εκφράζει το ένζυμο σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli*, η επαγωγή της έκφρασης του ενζύμου και ο καθαρισμός του. Προκειμένου να επιτευχθεί ο σκοπός αυτός, αρχικά δημιουργήθηκαν εκχυλίσματα, από τους οργανισμούς που επιλέχθηκαν και ελέγχθηκε η επίδραση αυτών στη δραστηριότητα του ενζύμου. Ταυτόχρονα, σε όλα τα εκχυλίσματα που δημιουργήθηκαν, υπολογίστηκε η περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, και η αντιοξειδωτική τους ικανότητα με τις μεθόδους ORAC, FRAP και DPPH•. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχουν εκχυλίσματα που ενεργοποιούν και αναστέλλουν τη δραστηριότητα του ενζύμου. Συγκεκριμένα, τα εκχυλίσματα από ψυχανθή, προκάλεσαν τη μεγαλύτερη ενεργοποίηση στη SIRT2 ενώ αντίθετα, τα εκχυλίσματα από τα φυτά *Hibiscus sp.*, *Taraxacum officinale* και *Crocus sativus*, παρουσίασαν τη μεγαλύτερη αναστολή του ενζύμου. Από τις μετρήσεις που έγιναν, φαίνεται ότι σύμφωνα με τις μεθόδους ORAC, FRAP και DPPH•, τα εκχυλίσματα από *Taraxacum officinale*, *Curcuma longa*, *Crocus sativus*, *Cinnamomum verum* και *Hibiscus sp.* έχουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα ενώ το εκχύλισμα από *Cinnamomum verum* είναι πλούσιο σε φαινολικές ουσίες, όπως υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση του γονιδίου που εκφράζει τη SIRT2 στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO®. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εισήχθη σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. coli* (Stellar) προκειμένου να απομονωθεί το DNA τους και να επιβεβαιωθεί η ένθεση της σωστής αλληλουχίας. Ακολούθως, το ίδιο πλασμίδιο εισήχθη σε εκφραστικά κύτταρα *E. coli* (BL21(DE3) και BL21(DE3) Rosetta), προκειμένου να αναλυθούν οι πρωτεΐνες που εκφράζουν και να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του ενζύμου SIRT2. Τέλος, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός με μεταλλοχηλική χρωματογραφία συγγένειας.

Λέξεις κλειδιά: SIRT2, Βιοδραστικά εκχυλίσματα, Αναστολή, Ενεργοποίηση

Abstract

Sirtuins are a class of NAD⁺-dependent deacetylases, which are highly conserved and have beneficial health effects. They also function as ADP-ribosyltransferases. Members of this family can be detected in almost all organisms, and specifically in mammals, there are seven isoforms, SIRT1-7. The purpose of this research was to study the inhibition or activation that is caused to the enzyme SIRT2, by bioactive extracts from plants and algae. In addition, the cloning of the gene that expresses SIRT2 in bacterial *E.coli* cells, the induction of enzyme expression and finally its purification. In order to achieve this goal, extracts were initially generated from the organisms selected and their effect on enzyme activity was measured. At the same time, in all extracts that were generated, the content of phenolic substances was calculated by the Folin-Ciocalteu method, and their total antioxidant activity was measured by ORAC, FRAP and DPPH• methods. The results showed that there are extracts that activate and extracts that inhibit the activity of the enzyme. In particular, legume extracts caused the highest activation in SIRT2 whereas, on the contrary, extracts from the plants *Hibiscus sp.*, *Taraxacum officinale* and *Crocus sativus* showed the highest inhibition of the enzyme. From the measurements made, it appears that according to the ORAC, FRAP and DPPH• methods, extracts of *Taraxacum officinale*, *Curcuma longa*, *Crocus sativus*, *Cinnamomum verum* and *Hibiscus sp.* have a high antioxidant capacity while the *Cinnamomum verum* extract is rich in phenolic substances, as calculated by the Folin-Ciocalteu method. Following the experimental procedure, the gene expressing SIRT2 was cloned into the plasmid vector pEXP5-CT/TOPO[®]. The recombinant plasmid used to transform eligible *Escherichia coli* bacterial cells, in order to make them produce SIRT2. By isolating and sequencing their DNA, it was possible to confirm the insertion of the correct sequence. Subsequently, the same plasmid used to transform expressing *Escherichia coli* cells (BL21 (DE3) and BL21 (DE3) Rosetta) to analyze the proteins they express and to confirm the existence of the SIRT2 enzyme. Finally, purification by metal ion affinity chromatography was performed.

Keywords: SIRT2, Bioactive extracts, Inhibition, Activation

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Νικόλαου Λάμπρου.

Στον κύριο Λάμπρου οφείλω τις θερμές ευχαριστίες μου που αρχικά με δέχθηκε στο εργαστήριό του για δεύτερη φορά, και με βοήθησε στην επιλογή του θέματος της μεταπτυχιακής μου έρευνας. Επίσης τον ευχαριστώ για την ουσιαστική υποστήριξη που μου έδειξε σε όλη τη διάρκεια αυτής της εργασίας και για τις γνώσεις που με βοήθησε να αποκτήσω, οι οποίες έκαναν το ενδιαφέρον μου ακόμα μεγαλύτερο και με παρακινούν να θέλω να συνεχίσω στον τομέα της έρευνας.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ιωάννη Κλώνη που με προσέλυσε αρχικά στον τομέα της ενζυμολογίας με τις παρουσιάσεις των συναφών προπτυχιακών μαθημάτων. Ακόμα ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Καθηγητή Σπυρίδωνα Κίντζιο που με βοήθησε ουσιαστικά στη διάρκεια της εργασίας μου, αφού μου επέτρεψε να χρησιμοποιήσω τον εξοπλισμό του εργαστηρίου του.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Δρ. Ευαγγελία Χρονοπούλου. Από την πρώτη μέχρι την τελευταία στιγμή ήταν ο άνθρωπος που με βοήθησε σε κάθε στάδιο της εργασίας, τόσο πρακτικά όσο και ψυχολογικά.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Νίκο, τη Φωτεινή και τη Φερενίκη για το όμορφο κλίμα που δημιουργούν στο εργαστήριο και για τη βοήθεια που μου προσέφεραν χωρίς δισταγμό όποτε τη ζήτησα, καθώς επίσης και την Ελισάβετ και τη Χριστίνα με τις οποίες μοιράστηκα κάθε προβληματισμό και κάθε ευχάριστη στιγμή στη διάρκεια της εργασίας.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς και τον αδερφό μου, που είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζουν έμπρακτα σε κάθε επιλογή που κάνω.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1. Ακετυλίωση και αποακετυλίωση πρωτεϊνών	10
1.2.1. Δομή και Τρόπος Λειτουργίας σιρτουινών.....	12
1.2.2. Υποστρώματα των σιρτουινών	15
1.2.3. Μέλη της οικογένειας των σιρτουινών και η υποκυτταρική τοποθεσία τους	16
1.2.4. Μηχανισμοί ρύθμισης των σιρτουινών.....	19
1.2.5. Ασθένειες στις οποίες εμπλέκονται οι σιρτουίνες	20
1.2.6. SIRT2.....	30
1.3. Φυτά και βιοδραστικές ουσίες.....	35
1.3.1. <i>Cicer arietinum</i> (κν. Ρεβίθι).....	35
1.3.2. <i>Phaseolus vulgaris</i> (κν. Φασόλι)	36
1.3.3. <i>Taraxacum officinale</i> (κν. Ταραξάκο)	37
1.3.4. <i>Curcuma longa</i> (κν. Κουρκουμάς)	38
1.3.5. <i>Crocus sativus</i> (κν. Σαφράν).....	39
1.3.6. <i>Hibiscus sp.</i> (κν. Ιβίσκος)	40
1.3.7. <i>Cinamomum verum</i> (κν. Κανέλα)	41
1.3.8. <i>Sesamum indicum</i> (κν. Σουσάμι)	41
1.3.9. Μικροφύκη	42
1.4. Σκοπός της εργασίας	43
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	44
2.1. Υλικά.....	44
2.1.1. Βιολογικά υλικά.....	44
2.1.2. Ένζυμα και πρωτεΐνες.....	44
2.1.3. Ουσίες που μελετήθηκαν	44
2.1.4. Χημικά αντιδραστήρια και λοιπά	45
2.1.5. Εξοπλισμός	46
2.1.6. Προγράμματα ηλεκτρονικού υπολογιστή.....	47
2.1.7. Υαλικά και πλαστικά αναλώσιμα	47
2.2. Μέθοδοι.....	47
2.2.1. Εκχύλιση ουσιών φυτικών ιστών.....	47

2.2.2.	Μέτρηση αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου SIRT2 με χρήση τυποποιημένου εμπορικού πακέτου (SIRT2 Inhibitor Screening Assay Kit) 48	
2.2.3.	Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων.....	50
2.2.4.	Προσδιορισμός ολικών φαινολικών και πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών ουσιών.....	57
2.2.5.	Λυοφιλίωση	59
2.2.6.	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	59
2.2.7.	Ενίσχυση του γονιδίου SIRT2 με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) 61	
2.2.8.	Ενίσχυση του πλασμιδιακού φορέα pEXP5- CT/TOPO® με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	62
2.2.9.	Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA) με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	63
2.2.10.	Ενίσχυση των προϊόντων PCR.....	64
2.2.11.	Ένωση προϊόντων PCR στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO®	65
2.2.12.	Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA.....	65
2.2.13.	Έλεγχος ύπαρξης του γονιδίου της SIRT2 στις αποικίες μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR Colony)	66
2.2.14.	Απομόνωση DNA από κύτταρα <i>E. coli</i>	67
2.2.15.	Αλληλούχιση απομονωμένου DNA.....	68
2.2.16.	Μετασχηματισμός εκφραστικών κυττάρων <i>E. coli</i> BL21(DE3) και Rosetta™(DE3)	68
2.2.17.	Διάρρηξη βακτηριακών κυττάρων με χρήση υπερήχων	69
2.2.18.	Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη χρωματομετρική μέθοδο Bradford (1976)	69
2.2.19.	Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης (SDS-PAGE)	71
2.2.20.	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS).....	71
2.2.21.	Χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250.....	74
2.2.22.	Διαπίδυση.....	74
2.2.23.	Καθαρισμός του ενζύμου SIRT2 που φέρει τον επίτοπο 6 - His με χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή Ni – IDA – αγαρόζης.....	75
2.2.24.	Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με χρήση τριχλωρικού οξέος (TCA).....	77
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	79

3.1.	Υπολογισμός της ενζυμικής αναστολής ή ενεργοποίησης του ενζύμου SIRT2 μέσω τυποποιημένου εμπορικού πακέτου	79
3.2.	Υπολογισμός συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων	85
3.3.	Υπολογισμός ολικών φαινολικών ουσιών των βιοδραστικών εκχυλισμάτων 103	
3.4.	Ενίσχυση του γονιδίου SIRT2 με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) 108	
3.5.	Ενίσχυση του πλασμιδιακού φορέα pEXP5- CT/TOPO® με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	108
3.6.	Κλωνοποίηση και μετασχηματισμός του πλασμιδιακού φορέα pEXP5-CT/TOPO® με το γονίδιο SIRT2	109
3.7.	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τις αποικίες (PCR Colony).....	110
3.8.	Απομόνωση DNA από τις αποικίες και αλληλούχιση.....	111
3.9.	Μετασχηματισμός εκφραστικών κυττάρων <i>E. coli</i> BL21(DE3) και Rosetta™(DE3).....	113
3.10.	Ανάλυση της έκφρασης της SIRT2 με ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης (SDS – PAGE)	113
3.11.	Καθαρισμός του ενζύμου SIRT2 που φέρει τον επίτοπο 6-His με χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή Ni – IDA – αγαρόζης	115
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	119
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	124

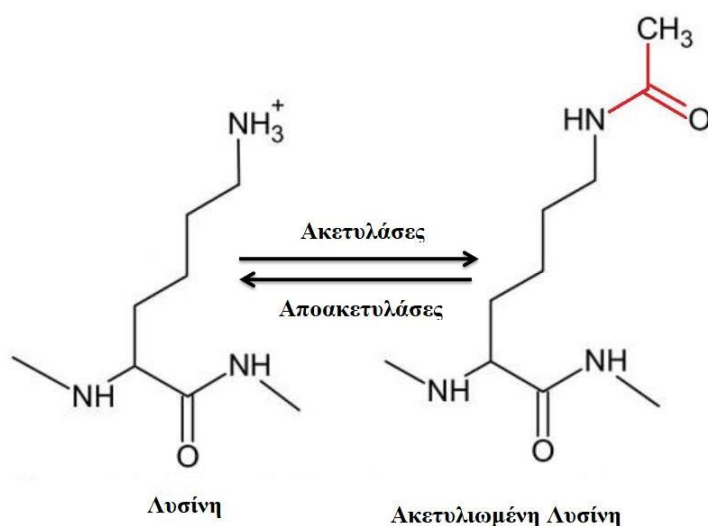
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AAPH	2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride
ABS	Οπτική απορρόφηση
Amp	Αμπικιλίνη
BSA	Αλβουμίνη ορού μόσχου
ddH₂O	δισ-απεσταγμένο νερό
dNTPs	Τριφωσφορικά νουκλεοτίδια
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EDTA	Αιθυλνοδιαμινοτετραοξικό οξύ
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
His	Ιστιδίνη
IDA	Ιμινοδιοξικό οξύ
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactoside
KH₂PO₄	δισ-όξινο φωσφορικό κάλιο
Lys	Λυσίνη
mA	milliampere
MeOH	Μεθανόλη
min	λεπτά
NAD⁺	νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
NaCl	Χλωριούχο νάτριο
Ni	Νικέλιο
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
rpm	Στροφές ανά λεπτό
SDS	Λαουρυλοθειικό νάτριο
SIRT	Σιρτουίνη
SIRT2	Σιρτουίνη 2
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TPTZ	2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine
Zn	Ψευδάργυρος

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ακετυλίωση και αποακετυλίωση πρωτεϊνών

Η προσθήκη ακετυλομάδων σε πρωτεΐνες αποτελεί μια μέθοδο που χρησιμοποιείται ευρέως από τα ευκαρυωτικά κύτταρα για τη ρύθμιση διάφορων λειτουργιών. Στο 85% των πρωτεϊνών, στη διαδικασία της μετάφρασης, προστίθεται στο αμινο-τελικό άκρο μια ακετυλομάδα. Μια λιγότερο συχνή αλλά πιθανών πιο σημαντική μορφή ακετυλίωσης, πραγματοποιείται μετα-μεταφραστικά, στο ε-άκρο των αμινοξικών καταλοίπων λυσίνης στο οποίο μεταφέρεται μια ακετυλομάδα από το ακέτυλο-συνένζυμο-A. Η λυσίνη είναι ένα αμινοξύ θετικά φορτισμένο. Η προσθήκη της ακετυλομάδας στο φορτισμένο άκρο του εξουδετερώνει το φορτίο αυτό, και κατά συνέπεια επηρεάζει τις ηλεκτροστατικές ιδιότητες της πρωτεΐνης στην οποία βρίσκεται.



Εικόνα 1.1: Το αμινοξύ λυσίνη σε κανονική μορφή, με το θετικό φορτίο στο ε-άκρο του και σε ακετυλωμένη μορφή, στην οποία εξουδετερώνεται το φορτίο αυτό.

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε μεγάλο βαθμό στις ιστόνες, που είναι πρωτεΐνες που συνδέονται με το DNA και σχηματίζουν τη θεμελιώδη δομή της χρωματίνης, το νουκλεόσωμα. Το DNA έχει αρνητικό φορτίο ενώ αντίθετα οι ιστόνες είναι πλούσιες σε θετικά φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα (λυσίνη, αργινίνη και ιστοδίνη). Προκειμένου να εκτελεστούν οι διαδικασίες της αντιγραφής και της μεταγραφής είναι απαραίτητη η χαλάρωση του δεσμού του DNA με τις ιστόνες, πράγμα που επιτυγχάνεται με τη μεταβολή του φορτίου των ιστονών. Με τη

διαδικασία αυτή λοιπόν, ενεργοποιείται και ρυθμίζεται η χρωματίνη στις διάφορες μεταβολικές διεργασίες. Έτσι βρέθηκε μια ομάδα ενζύμων η οποία είναι υπεύθυνη για την ακετυλίωση των ιστονών οι HATs (Histone acetyltransferase). Η μεταμεταφραστική προσθήκη ακετυλομάδων σε πρωτεΐνες, και πιο συγκεκριμένα σε ιστόνες, αποτελεί μια διαδικασία που μπορεί να αντιστραφεί. Το ρόλο αυτό έχουν οι αποακετυλάσες ιστονών (HDACs, Histone deacetylases) (Glozak et al., 2005).

1.2. Σιρτουίνες (Sirtuins)

Οι σιρτουίνες (Sirtuins) αποτελούν μια συντηρημένη οικογένεια πρωτεϊνών, με ποικίλες επιδράσεις στην ρύθμιση της κυτταρικής λειτουργίας. Το πρώτο μόριο που αναγνωρίστηκε και ανήκει στην οικογένεια των σιρτουινών είναι το Sir2 (Silent Information Regulator 2, Sir2), το οποίο ανιχνεύθηκε στον οργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* (κν. ζυμομύκητας). Η λειτουργία του ενζύμου έγκειται στη ρύθμιση της σίγασης της έκφρασης γονιδίων μέσω των σημείων πρόσδεσης (mating-type loci), των τελομερών και του ριβοσωμικού DNA στη διαδικασία της μεταγραφής καθώς επίσης και στην αποτροπή της γονιδιακής αστάθειας, η οποία προκαλεί τη γήρανση των κυττάρων. Το ένζυμο αυτό έχει την ιδιότητα να αφαιρεί ακετυλομάδες ή να μεταφέρει ομάδες μονο-ADP-ριβοζυλίων με τη βοήθεια του συμπαραγόνα NAD⁺. Το πεδίο των σιρτουινών έλαβε μεγάλη προσοχή μετά την ανακάλυψη της επίδρασης αυτών στην καθυστέρηση της γήρανσης (Houtkooper, 2016).

Από τότε, μέλη της οικογένειας έχουν βρεθεί σε όλες τις μορφές ζωής, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των φυτών και των ζώων. Στα θηλαστικά έχουν κατηγοριοποιηθεί επτά μέλη της οικογένειας των σιρτουινών, οι SIRT1-7, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο σε ένα καλά συντηρημένο δίκτυο μεταβολικών μονοπατιών τα οποία ελέγχουν και προσαρμόζουν τον οργανισμό ανάλογα με το περιβάλλον, την διαθεσιμότητα της ενέργειας και του κυτταρικού στρες. Ως αποτέλεσμα, οι σιρτουίνες ρυθμίζουν ένα μεγάλο αριθμό τέτοιων μονοπατιών, όπως ο μεταβολισμός της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων, η απόπτωση, η επιδιόρθωση του DNA, η γένεση νευρώνων, η ανταπόκριση σε φλεγμονές, ακόμα και στη ρύθμιση του κερκαδικού ρολογιού των οργανισμών (Haigis & Sinclair, 2011).

Οι ανακαλύψεις σχετικά με τις λειτουργίες στις οποίες εμπλέκονται οι σιρτουίνες, οδήγησε στην προσπάθεια ανακάλυψης των μηχανισμών σύμφωνα με τους οποίους

επιτυγχάνονται τα αποτελέσματα αυτά. Τελικά, η σιρτουίνες περιγράφηκαν ως αποακετυλάσες ιστονών, των οποίων η λειτουργία εξαρτάται από τον παράγοντα NAD (Νικοτιναμίδο-αδενο-δινουκλεοτίδιο), υποδεικνύοντας ότι τα ένζυμα αυτά ενσωματώνουν τα στοιχεία των μεταβολικών μονοπατιών σε μεταγραφικές προσαρμογές. Στα επόμενα χρόνια, έγινε σαφές ότι οι σιρτουίνες πράγματι λειτουργούν ως μεταβολικοί αισθητήρες, αλλά η λειτουργία τους δεν βασίζεται μόνο στην αλληλεπίδραση αυτών με τις ιστόνες, αλλά και στην αλληλεπίδραση με ποικίλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες του μεταβολισμού (Houtkooper, 2016).

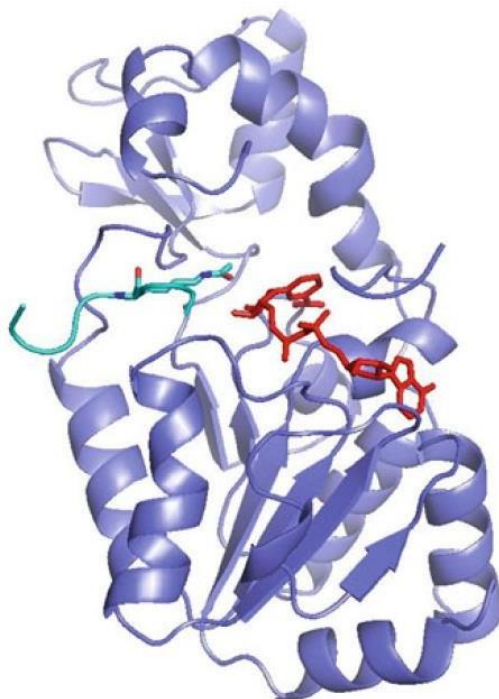
Λαμβάνοντας υπ' όψιν το ρόλο των σιρτουινών στη ρύθμιση του μεταβολισμού, τα ένζυμα αυτά μελετήθηκαν ιδιαίτερα στα πλαίσια των ασθενειών που σχετίζονται με το μεταβολισμό. Μεγαλύτερη προσοχή δόθηκε στο ένζυμο SIRT1, το οποίο προέρχεται από θηλαστικά, μοιάζει περισσότερο με τη Sir2 και συνοψίζει μέλη από τις επτά κατηγορίες στις οποίες χωρίζονται οι σιρτουίνες στα θηλαστικά. Η ανάπτυξη ενεργοποιητών της SIRT1 ώθησε ακόμα περισσότερο το συγκεκριμένο ερευνητικό τομέα, καθώς αυτές οι ουσίες αποτρέπουν τις αρνητικές επιπτώσεις που προκαλούνται από την παχυσαρκία λόγω διατροφής. Αρκετοί διατροφικοί ή φαρμακευτικοί ενεργοποιητές σιρτουινών αποδείχθηκε ότι μπορούν να μετριάσουν τις επιπτώσεις τέτοιων διατροφών του δυτικού κόσμου (Houtkooper, 2016).

1.2.1. Δομή και Τρόπος Λειτουργίας σιρτουινών

Από συγκρίσεις μεταξύ αλληλουχιών που εκφράζουν τις σιρτουίνες καθώς επίσης και από μελέτες της λειτουργίας τους σε διαφορετικά είδη, εξέρχεται το συμπέρασμα, ότι τα ένζυμα αυτά διατηρούν γενικά την βασική τους λειτουργία, ως αποακετυλάσες. Το τμήμα των διαφόρων ισοενζύμων το οποίο είναι περισσότερο συντηρημένο, είναι αυτό της καταλυτικής περιοχής. Το τμήμα αυτό εμπεριέχεται στο κέντρο των περισσότερων γνωστών αλληλουχιών και διαθέτει πλευρικές ακολουθίες οι οποίες εμπλέκονται στην στόχευση, τη μεταφορά και την αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών (Hoff et al., 2006).

Όλες οι σιρτουίνες διαθέτουν μια καλά συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης του συμπαραγόντα NAD⁺, η οποία αποτελείται από περίπου 275 αμινοξικά κατάλοιπα. Η περιοχή αυτή πλαισιώνεται από διαφορετικού μήκους αμινο-τελικές και καρβοξυ-τελικές ακολουθίες, ανάλογα με το είδος της κάθε σιρτουίνης. Οι ακολουθίες αυτές οι οποίες βρίσκονται στα δύο άκρα της ακολουθίας, αποτελούν στόχο για μετα-

μεταφραστικές τροποποιήσεις που επηρεάζουν τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Επίσης οι περιοχές αυτές είναι υπεύθυνες για τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που διαθέτει κάθε μέλος της οικογένειας των σιρτουινών, όπως για παράδειγμα η υποκυτταρική τοποθεσία του, τα υποστρώματα τα οποία αναγνωρίζει και η δραστηριότητα που έχει.



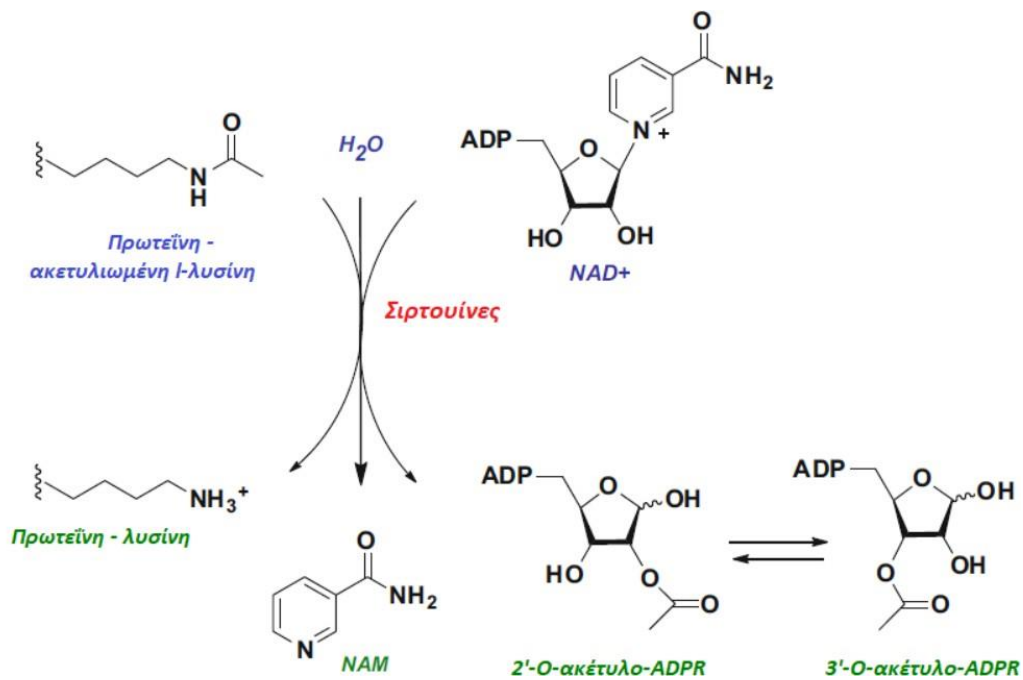
Εικόνα 1.2: Τρισδιάστατη δομή της σιρτουίνης (μοβ). Αποτελείται από ένα πεδίο δέσμευσης ψευδαργύρου στην κορυφή, ένα πεδίο δέσμευσης του συμπαραγόνα NAD^+ , και ένα φάκελο “Rossmann” στο κάτω τμήμα. Στο άνοιγμα στη διεπαφή των δύο μορφολογικών χαρακτηριστικών, που βρίσκεται στη μέση του σχήματος, περιέχεται ο συμπαραάγοντας NAD^+ (κόκκινο) και το υπόστρωμα της ακετυλιωμένης λυσίνης (γαλάζιο).

Το μεγαλύτερο μέρος της καταλυτικής περιοχής των σιρτουινών αποτελείται από μια «τσέπη» στην οποία αναγνωρίζεται και δεσμεύεται το NAD^+ και πρόκειται ουσιαστικά για μια αναδίπλωση που ονομάζεται φάκελος Rossmann (μια δομή χαρακτηριστική για όλες τις πρωτεΐνες που έχουν την ιδιότητα να προσδένουν το NAD^+). Μικρότερο μέρος της καταλυτικής περιοχής καταλαμβάνεται από μια υπομονάδα δέσμευσης ψευδαργύρου η οποία αποτελείται από τρία αντιπαράλληλα β -φύλλα και μια μεταβλητή περιοχή που διαθέτει μια α -έλικα. Η περιοχή που προσδέεται ο συμπαραάγοντας NAD^+ , συνδέει το μικρό τομέα του φακέλου Rossmann και αποτελείται από τέσσερις βρόχους που σχηματίζουν μια εκτεταμένη σχισμή που ενεργεί ως ενεργός θέση του ενζύμου. Τόσο το NAD^+ όσο και η

ακετυλιωμένη λυσίνη, που λειτουργεί ως υπόστρωμα του ενζύμου, προσδένονται στη σιρτουίνη στο σημείο αυτό (Εικόνα 1.2)

Η περιοχή στην οποία προσδένεται το NAD^+ μπορεί να χωριστεί σε τρεις επιμέρους περιοχές: Α) θέση δέσμευσης της αδερίνης και του σακχάρου ριβόζης, Β) θέση δέσμευσης της ριβόζης του νικοτιναμιδίου, Γ) θέση πρόσδεσης χαρακτηριστικών ομάδων του νικοτιναμιδίου. Όταν το υπόστρωμα της ακετυλιωμένης λυσίνης βρίσκεται κοντά στο ένζυμο, το NAD^+ μπορεί να υποβληθεί σε μια αλλαγή διαμόρφωσης φέρνοντας την ομάδα νικοτιναμιδίου κοντά στην θέση Γ όπου μπορεί να διασπαστεί (Kupis et al., 2016).

Το ενεργό κέντρο είναι σχεδιασμένο με τέτοιο τρόπο, ώστε να μπορούν να έρθουν σε επαφή το οξυγόνο της καρβοξυλομάδας της ακετυλιωμένης λυσίνης με την άλφα πλευρά του ανωμερικού άνθρακα του ριβοζιδίου του νικοτιναμιδίου που βρίσκεται στο συμπράγοντα NAD^+ , με σωστή γεωμετρία ώστε να μπορούν να αντιδράσουν. Η αποτελεσματική αυτή σύνδεση, επιταχύνει τη χημική αντίδραση του ακυλ – οξυγόνου με τον ανωμερικό άνθρακα, οδηγώντας έτσι στη διάσπαση του δεσμού του νικοτιναμιδίου του NAD^+ , στη μεταφορά της ADP – ριβόζης στο ακυλ – οξυγόνο και τελικά στην αποακετυλίωση. Η στοιχειομετρία της αντίδρασης παρουσιάζεται αναλυτικά στην Εικόνα 1.3. Παρόλο που έχουν παρατηρηθεί κάποιες ενδιαφέρουσες εξαιρέσεις σε αυτό το γενικό τρόπο λειτουργίας των σιρτουινών, όπως για παράδειγμα η μεταφορά ADP – ριβόζης σε πρωτεϊνικά υποστρώματα ή η ADP – ριβοζυλίωση μικρών πυρηνόφιλων μορίων, η συγκεκριμένη χημική αντίδραση έχει αποδειχθεί ότι συμβαίνει σε ποικίλους οργανισμούς, όπως ο άνθρωπος, τα αρχαιοβακτήρια, τα πρωτόζωα και τα μυκοβακτήρια.



Εικόνα 1.3: Συνήθης στοιχειομετρία της αντίδρασης που πραγματοποιείται. Οι σιρτουΐνες χρησιμοποιούν ως αντιδρώντα τα υποστρώματα, NAD⁺, νερό και μια πρωτεΐνη που διαθέτει ακετυλιωμένη λυσίνη. Μετά την αντίδραση παράγεται νικοτιναμίδιο (NAM), η αποακετυλιωμένη πρωτεΐνη και το μόριο 2'-O-ακέτυλο-ADPR. Στο διάλυμα παρατηρείται μια αυθόρμητη, μη ενζυματική ισορροπία μεταξύ των ισομερών 2'-O-ακέτυλο ADPR και 3'-O-ακέτυλο-ADPR

Πιο συγκεκριμένα οι σιρτουΐνες χρησιμοποιούν ως υποστρώματα τρία μόρια. Ένα ακετυλιωμένο αμινοξικό κατάλοιπο ή μια πρωτεΐνη που διαθέτει ακετυλιωμένο αμινοξύ, τον συμπάροντα NAD⁺ και το νερό. Μετά την κατάλυση της αντίδρασης, δημιουργούνται επίσης τρία προϊόντα. Το αμινοξικό κατάλοιπο το οποίο έχει χάσει την ακετυλομάδα η οποία ήταν ενωμένη σε αυτό, το νικοτιναμίδιο (NAM) και το μόριο 2'-O-ακέτυλο-ADPR. Για τη λειτουργία του τελευταίου δε γνωρίζουμε πολλά πράγματα, αλλά πιθανολογείται ότι λειτουργεί επίσης ως μεταγωγέας σήματος. Αυθόρμητα, κάποια από την ποσότητα του 2'-O-ακέτυλο-ADPR, μετατρέπεται στο ισομερές του, το 3'-O-ακέτυλο-ADPR (Εικόνα 1.3) (Sauve et al., 2001).

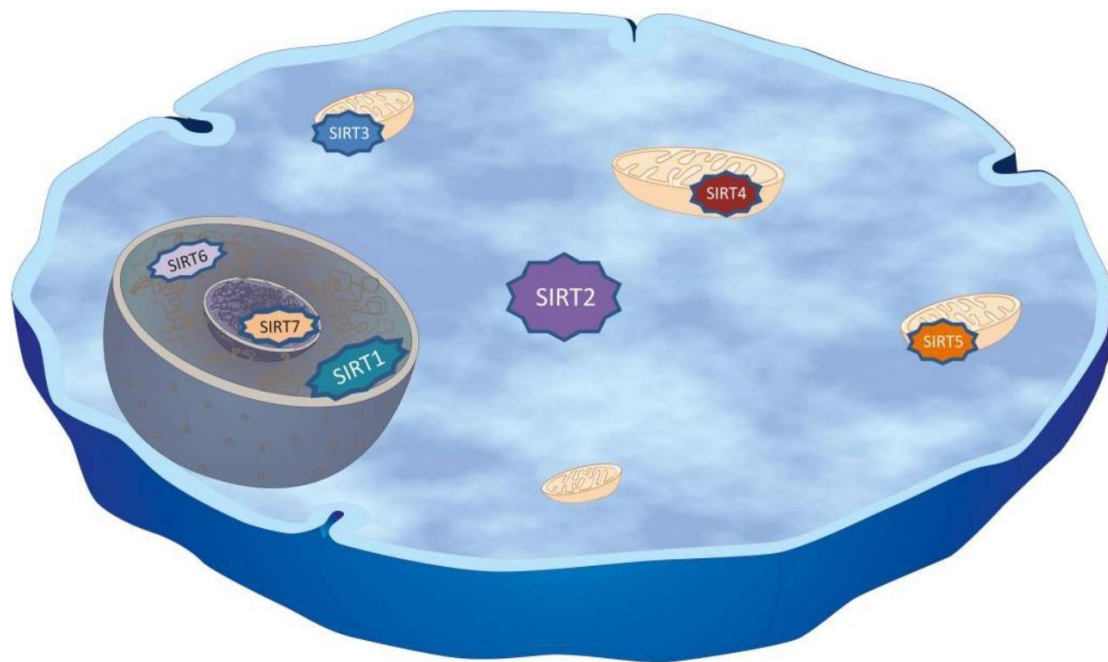
1.2.2. Υποστρώματα των σιρτουϊνών

Τα ένζυμα της οικογένειας των σιρτουϊνών, έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν ένα μεγάλος εύρος διαφορετικών πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρούν. Το πρώτο υπόστρωμα με το οποίο βρέθηκε ότι αλληλεπιδρούν ήταν οι ιστόνες του DNA, οι

οποίες διαμορφώνουν τη δομή της χρωματίνης με διαρκείς ακετυλιώσεις και αποακετυλιώσεις. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην αρχική κατηγοριοποίηση των σιρτουινών ως αποακετυλάσες ιστονών. Παρόλα αυτά, πλέον είναι σαφές ότι η πλειοψηφία των υποστρωμάτων των σιρτουινών δεν είναι οι ιστόνες, αλλά διαφορετικές πρωτεΐνες όπως μεταγραφικοί παράγοντες και ένζυμα τα οποία είναι υπεύθυνα για την προσαρμογή σε επίπεδο κυττάρου. Η παρατήρηση ότι μερικά μέλη της οικογένειας των σιρτουινών περιορίζονται σε υποκυτταρικά διαμερίσματα τα οποία δεν διαθέτουν ιστόνες, οδήγησε στην επανεξέταση του ορισμού που τους είχε αρχικά δοθεί. Τελικά, οι σιρτουίνες περιγράφονται ως αποακετυλάσες της λυσίνης (Houtkooper, 2016). Είναι γεγονός ότι η πιο γνωστή λειτουργία των σιρτουινών είναι η αποακετυλίωση με τη βοήθεια του συμπαράγοντα NAD⁺. Εντούτοις, υπάρχουν παραδείγματα δράσης σε μη ακετυλιωμένα υποστρώματα. Για παράδειγμα, η SIRT5 απομακρύνει τις τροποποιήσεις που δέχονται πρωτεΐνες από παράγοντες όπως το σουκκινύλιο (succinyl) και το γλουταρύλιο (glutaryl) από αμινοξικά κατάλοιπα λυσίνης (Tan et al., 2014 & Yu et al., 2013) ενώ η SIRT6 έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να αποακετυλιώνει μεγάλες αλυσίδες λιπαρών οξέων (Jiang et al., 2013).

1.2.3. Μέλη της οικογένειας των σιρτουινών και η υποκυτταρική τοποθεσία τους

Οι σιρτουίνες αποτελούν μια οικογένεια ενζύμων, τα οποία εντοπίζονται σε όλα τα ταξινομικά φύλα των οργανισμών, με υψηλό βαθμό συντήρησης των γονιδίων που τις εκφράζουν στη διάρκεια της εξέλιξης. Γονίδια που κωδικοποιούν για μέλη της ομάδας των σιρτουινών εντοπίζονται σε πρακτικά όλους τους μονοκύτταρους οργανισμούς, τόσο προκαρυωτικούς (μυκοβακτήρια, ευβακτήρια και αρχαία) όσο και ευκαρυωτικούς (ζύμες και πρωτόζωα). Στους προκαρυώτες, οι σιρτουίνες κωδικοποιούνται κατά κύριο λόγο από μεμονωμένα γονίδια ενώ στους ευκαρυώτες από πολλαπλά. Η ποικιλία των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα αυτά, οδηγεί στην δημιουργία ισομορφών, οι οποίες διαθέτουν διαφοροποιημένες καταλυτικές λειτουργίες που βασίζονται στο υποκυτταρικό διαμέρισμα για το οποίο προορίζονται (Houtkooper, 2016).



Εικόνα 1.4: Υποκυτταρική τοποθεσία των σιρτουινών των θηλαστικών. Τα θηλαστικά διαθέτουν επτά ισοένζυμα σιρτουινών, τις SIRT1-7, οι οποίες έχουν ως κοινό μορφολογικό χαρακτηριστικό το σημείο πρόσδεσης του συμπαραγόντα NAD^+ . Επιπλέον σημαντικές ακολουθίες στο N-τελικό και το C-τελικό άκρο τους, τα διαφοροποιεί με τέτοιο τρόπο ώστε να διαθέτουν διαφορετική υποκυτταρική τοποθέτηση, γεγονός που υποδεικνύει διαφοροποιήσεις στο βιολογικό ρόλο, στα υποστρώματα και στους συμπαραγόντες που θα χρησιμοποιεί κάθε ισοένζυμο (Oliveira et al., 2012).

Στα θηλαστικά, η οικογένεια των σιρτουινών αποτελείται από επτά ισοένζυμα, την σιρτουίνη 1 έως 7 (SIRT1 – SIRT7). Κάθε ένα από τα ισοένζυμα αυτά διαθέτει διαφορετική μορφολογία και εντοπίζεται σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα, ανάλογα με την λειτουργία την οποία επιτελεί, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.3.

Συγκεκριμένα, η SIRT1, η οποία είναι το ισοένζυμο το οποίο έχει μελετηθεί περισσότερο από όλα τα υπόλοιπα, εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων, όπου βοηθάει στη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων όταν αλληλεπιδρά με τις ιστόνες H1, H3 και H4, αλλά μπορεί να μεταφέρεται και στο κυτταρόπλασμα όταν απαιτείται η δράση της σε πρωτεΐνες – στόχους οι οποίοι εντοπίζονται εκεί, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της αναστολής του σήματος της ινσουλίνης (Michishita et al., 2005 & Tanno et al., 2007).

Η SIRT2 αποτελεί το ισοένζυμο που προσομοιάζει περισσότερο από όλα τα υπόλοιπα τη SIRT1 και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, αλλά σε μερικές περιπτώσεις

μεταφέρεται και στον πυρήνα. Η βασική λειτουργία του είναι η αποακετυλίωση των μικροσωληνίσκων τουμπουλίνης (αποακετυλίωση της λυσίνης K40 της α-τουμπουλίνης) και μερικών μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι μεταφέρονται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα του κυττάρου (North et al.,2003 & Jing et al., 2007). Η SIRT2 είναι επίσης απαραίτητη για την έξοδο των κυττάρων από τη φάση της μίτωσης. Στη διάρκεια αυτής, βρίσκεται στη χρωματίνη στον πυρήνα των κυττάρων, και διαθέτει μια δυναμική αλληλεπίδραση με το ανθρώπινο ορθόλογο hMOF ,το οποίο είναι το βασικό ένζυμο που ακετυλιώνει τη λυσίνη K16 της ιστόνης H4. Η αλληλεπίδραση αυτή καταλήγει στη μείωση του ποσοστού των αμινοξικών καταλοίπων λυσίνης (K16) της ιστόνης H4 τα οποία είναι ακετυλιωμένα, καθώς η SIRT2 έχει την ιδιότητα να αφαιρεί την ακετυλομάδα από τη συγκεκριμένη θέση, και με αυτό τον τρόπο υποβοηθείται η μετάβαση από τη φάση G2 στη φάση M της μίτωσης. Αλληλεπιδρά επίσης με τη λυσίνη K56 της ιστόνης H3 (Dryden et al.,2003, Lu et al., 2011, Vaquer et al., 2006). Επιπλέον, η SIRT2 αφαιρώντας την ακετυλομάδα από την κινάση BubR1, συμβάλλει στην εξασφάλιση του σωστού χρωμοσωμικού διαχωρισμού στη διάρκεια της μίτωσης (Lampson & Kapoor, 2005).

Τα ισοένζυμα SIRT3, SIRT4 και SIRT5 εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια, όπου έχουν ρόλο κλειδί στο μεταβολισμό και στην ρύθμιση της χρήσης της ενέργειας που παράγεται (Michishita et al.,2005, He et al., 2012). Τέλος, οι SIRT6 και SIRT7 εντοπίζονται στον πυρήνα των κυττάρων και συγκεκριμένα, στην ετεροχρωματίνη και στις νουκλεόλες (nucleoli), αντίστοιχα. Η SIRT6 συμμετέχει στη ρύθμιση της επιδιόρθωσης του DNA, ενώ η SIRT7 έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχει στη μεταγραφή του rRNA. Παρόλα αυτά, στη διάρκεια της κυτταρικής φάσης G1, αλλά όχι στη φάση S, η SIRT6 εντοπίζεται και στις νουκλεόλες, και σε περίπτωση υπερέκφρασής της επιβραδύνεται η μίτωση (Oliveira et al., 2012, Ardestani & Liang, 2012). Οι λειτουργίες, η υποκυτταρική τοποθεσία και τα υποστρώματα κάθε ενζύμου παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 1.1.

Πίνακας 1.1: Λειτουργίες, υποκυτταρική τοποθεσία και βασικά υποστρώματα τα οποία χρησιμοποιεί κάθε μέλος της οικογένειας των σιρτουινών (Morris, 2013, Houtkooper, 2016).

Σιρτουίνη	Λειτουργία	Υποκυτταρική τοποθεσία	Υποστρώματα - στόχοι
SIRT1	Αποακετυλίωση	Πυρήνας Κυτταρόπλασμα	FOXO1 ,FOXO3, PGC-1a, p53, NF-κB, Notch, HIF1a, LXR, FXR, SREBP1c, etc
SIRT2	Αποακετυλίωση	Κυτταρόπλασμα Πυρήνας	FOXO1, PEPCK, α-τουμπουλίνη, PAR-3, H4K16
SIRT3	Αποακετυλίωση, ADP-ριβοζυλίωση	Μιτοχόνδρια	OXPHOS complexes ,SOD2, LCAD, HMGCS2, GDH, IDH2, PIP2, ACADL, FOXO3, ACSS2, OTC, GLUD1
SIRT4	ADP-ριβοζυλίωση	Μιτοχόνδρια	GDH
SIRT5	Αποακετυλίωση, Απομαλονυλίωση, Αποσουκινυλίωση	Μιτοχόνδρια	CPS1
SIRT6	ADP-ριβοζυλίωση	Πυρήνας	H3K9, H3K56, NF-κB, DNA πολυμεράση β
SIRT7	Αποακετυλίωση	Πυρήνας	RNA πολυμεράση I

1.2.4. Μηχανισμοί ρύθμισης των σιρτουινών

Οι σιρτουίνες αποτελούν ένζυμα των οποίων η λειτουργία ρυθμίζεται με πολλούς και πολύπλοκους τρόπους στο εσωτερικό των κυττάρων. Ανάλογα με την κατάσταση στην οποία βρίσκεται κάθε φορά ο οργανισμός (π.χ. καταστάσεις οξειδωτικού στρες, περιορισμένη ποσότητα θερμίδων κ.α.), οι αποκρίσεις των συστημάτων στα οποία εμπλέκονται οι σιρτουίνες διαφοροποιούνται. Αρχικά, τα επίπεδα έκφρασης εξαρτώνται από τα επίπεδα της μεταγραφής. Η μεταγραφή των σιρτουινών ρυθμίζεται από πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης διαφορετικών μεταγραφικών παραγόντων. Η λειτουργία των σιρτουινών ρυθμίζεται επίσης σε μετα-μεταφραστικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο, μέσω διαδικασιών φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης. Έχει ακόμη αναφερθεί η ύπαρξη δύο πρωτεϊνών (AROS και DBC1) οι οποίες

προσδένονται στα μόρια της σιρτουίνης, κατά κύριο λόγο στη SIRT1, και επηρεάζουν τον τρόπο λειτουργίας της.

Ένα από τα βασικά υποστρώματα τα οποία χρησιμοποιούνται από τις σιρτουίνες προκειμένου να καταλύσουν οποιαδήποτε αντίδραση, είναι ο συμπαράγοντας NAD^+ , ο οποίος προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Έτσι, η διαθεσιμότητα του παράγοντα αυτού μπορεί να επηρεάζει τη δραστηριότητα των σιρτουινών, καθώς η έλλειψη αυτού δρα ως ένας περιοριστικός παράγοντας. Επίσης, η μετατροπή του NAD^+ σε νικοτιναμίδιο (NAM) μετά την κατάλυση αντίδρασης από τις σιρτουίνες, οδηγεί σε συσσώρευση του NAM. Η συσσώρευση αυτή δρα ανασταλτικά ως προς τη δραστηριότητα των σιρτουινών. Τέλος, η λειτουργία των σιρτουινών ρυθμίζεται από την υποκυτταρική διαμερισματοποίηση, καθώς κάθε ισόενζυμο εντοπίζεται σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα (Houtkooper et al., 2016).

1.2.5. Ασθένειες στις οποίες εμπλέκονται οι σιρτουίνες

1.2.5.1. Παχυσαρκία

Μια από τις βασικές παθήσεις του ανθρώπου στην οποία εμπλέκεται η λειτουργία μελών της οικογένειας των σιρτουινών, είναι η παχυσαρκία. Σε αυτές τις περιπτώσεις η λειτουργία της SIRT1 είναι χαμηλή. Ο μηχανισμός σύμφωνα με τον οποίο λειτουργεί η SIRT1, θα μπορούσε εν μέρει να περιλαμβάνει τον έλεγχο της πρόσληψης τροφής, μέσω του υποθαλάμου του εγκεφάλου. Η διαγραφή του γονιδίου της SIRT1 από ένα νευρωνικό κύτταρο το οποίο αναστέλλει το αίσθημα της πείνας, οδηγεί στην παχυσαρκία, ενώ η διαγραφή του ίδιου γονιδίου από ένα κυτταρικό τύπο, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση του αισθήματος της πείνας, μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του σωματικού βάρους. Για παράδειγμα, η γενετική διαγραφή της SIRT1 στους νευρώνες Ag-RP, οι οποίοι βρίσκονται στον υποθάλαμο του εγκεφάλου και ελέγχουν την όρεξη, σε συνδυασμό με τη διαχείριση του παράγοντα EX527, οποίος προκαλεί αναστολή της SIRT1, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της πρόσληψης τροφής και του σωματικού βάρους. Αντίθετα, η απενεργοποίηση του γονιδίου της SIRT1 στους νευρώνες POMC του υποθαλάμου, οι οποίοι αναστέλλουν το αίσθημα της πείνας, οδηγεί στο φαινόμενο της παχυσαρκίας (Gillum et al., 2010).

Η υπερέκφραση της διαγονιδιακής SIRT1 σε τμήματα του εγκεφάλου όπως ο ιππόκαμπος, ρυθμίζει γονίδια του λευκού λιπώδους ιστού και αυξάνει τη συσσώρευση λίπους (Wu et al., 2011).

Επίσης, στα λιπώδη κύτταρα, η SIRT1 αναστέλλει τη διαφοροποίηση των κυττάρων του ιστού και καταπολεμά τις φλεγμονές, καθώς στοχεύει και αλληλεπιδρά με τους παράγοντες PPAR- γ και NF- κ B. Στις περιπτώσεις όπου η SIRT1 δεν εκφράζεται, θα ήταν πιθανόν αναμενόμενο η συγκέντρωση των δύο παραγόντων να είναι αυξημένη (Xu et al., 2012). Παρόλα αυτά, από έρευνες οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια, φαίνεται ότι στις περιπτώσεις όπου δεν εκφράζεται η SIRT1 παρατηρείται μικρότερο σωματικό βάρος, μικρότερος λιπώδης ιστός, μειωμένη διαφοροποίηση κυττάρων προς λιπώδη κύτταρα, χαμηλότερα ποσοστά λεπτίνης και αντιπονεκτίνης (πεπτίδια τα οποία παράγονται από το λιπώδη ιστό) και άλλες ενδείξεις για το αντίθετο. Είναι πιθανό, λοιπόν, η SIRT1 να ελέγχει τη λειτουργία του λιπώδους ιστού μέσω της ρύθμισης της αγγειογένεσης. Συνεπώς, η SIRT1 καταστέλλει τη μεταγραφή των γονιδίων που προκαλούν φλεγμονές, και έτσι μειώνει το φαινόμενο αυτό στο λιπώδη ιστό (Gillum et al., 2011).

Ο έλεγχος της γλυκόζης και της σύνθεσης λίπους, περιλαμβάνουν λεπτά ζητήματα. Ποντίκια τα οποία δεν εξέφραζαν σε όλο το σώμα τους τη SIRT2 και τράφηκαν με τροφές πλούσιες σε λιπαρά, είχαν την προδιάθεση να αυξάνουν εύκολα το βάρος τους και να συσσωρεύουν τριγλυκερίδια στο ήπαρ. Αντίθετα, ποντίκια τα οποία δεν εξέφραζαν τη SIRT1 επιλεκτικά στο ήπαρ, ήταν πιο δύσκολο να αυξήσουν το βάρος τους, είχαν καλύτερη ανθεκτικότητα στη γλυκόζη και ήταν ανθεκτικά στην ηπατική στεάτωση (Chen et al., 2008).

1.2.5.2. Διαβήτης τύπου 2

Οι σιρτουίνες, και κατά κύριο λόγο η SIRT1, έχει αποδειχθεί ότι έχουν σημαντικούς ρόλους στην ασθένεια του διαβήτη. Για παράδειγμα, διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία είχαν τροποποιηθεί με τέτοιο τρόπο ώστε να υπερεκφράζουν την SIRT1, αποδείχθηκε ότι μπορούν και προλαμβάνουν την ασθένεια, καθώς επίσης και να είναι πιο ανθεκτικά στον διαβήτη που αναπτύσσεται φυσιολογικά λόγω της γήρανσης. Τα ίδια αποτελέσματα προκαλούνται και όταν η SIRT1 ενεργοποιείται χημικά (Bordone et al., 2007). Το NAD⁺ βελτιώνει τον διαβήτη τύπου 2 που προκαλείται από τη γήρανση και από τη διατροφή με τροφές πλούσιες σε λιπαρά, εν μέρει δια μέσου της SIRT1 (Yoshino et al., 2011). Εκτός από τις ενέργειες που μπορούν να γίνουν στο ήπαρ, στους μύς και στα λιποκύτταρα, ο διαβήτης μπορεί να βελτιωθεί με επιδράσεις της SIRT1 στον υποθάλαμο του εγκεφάλου, καθώς αυτό το σημείο αποτελεί το βασικό

ρυθμιστή της διατροφικής συμπεριφοράς και της ανάγκης του οργανισμού σε ενέργεια (Sato et al., 2010). Στην ικανότητα της ρεσβερατρόλης να βελτιώνει την ομοιόσταση της γλυκόζης, εμπεριέχεται ένα μεγάλο τμήμα του μεταβολικού μονοπατιού της SIRT1 στον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου, ο οποίος έχει καθοριστικό ρόλο στην ενσωμάτωση των αποκρίσεων του οργανισμού στις περιφερειακές αλλοιώσεις των θρεπτικών συστατικών και των ορμονών (Knight et al., 2011).

Η SIRT1 έχει αποδειχθεί επίσης, ότι αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη καταστέλλοντας τη φωσφατάση της τυροσύνης PTP1B και αυξάνει την έκκριση της ινσουλίνης καθώς μειώνει τη δράση της μεταφορικής πρωτεΐνης UCP2 (Banks et al., 2008 & Moynihan et al., 2005). Η φαρμακευτική ουσία μετοφομίνη, η οποία αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα φάρμακα ενάντια στον διαβήτη τύπου 2, ενεργοποιεί τη SIRT1 και την κινάση AMPK, ενώ ταυτόχρονα μειώνει την πρωτεΐνη p53, μέσω της αποακετυλίωσής της καθώς αποτελεί έναν από τους στόχους της SIRT1 (Nelson et al., 2012). Ακόμη, η αντίσταση στην ινσουλίνη σε κάποιες περιπτώσεις διαβήτη τύπου 2, από τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού τροφών, είναι πιθανό να προκαλείται λόγω της μείωσης που επέρχεται στα επίπεδα της SIRT1 λόγω οξειδωσης (Uribarri et al., 2011).

Στο ήπαρ, τα επίπεδα της SIRT1, επηρεάζονται από τα μικρά RNA miR-34a και miR-93, είτε άμεσα μέσω της καταστολής του mRNA που την εκφράζει είτε έμμεσα μέσω της επίδρασης που έχουν στον μεταγραφικό παράγοντα sp1, ο οποίος επηρεάζει την έκφραση του ενζύμου. Η υπερέκφραση τέτοιων μικρών RNA, η οποία δημιουργείται σε μεγαλύτερες ηλικίες, αναστέλλει την έκκριση της ινσουλίνης ή προκαλεί ανθεκτικότητα σε αυτή. Συνεπώς, η μείωση των επιπέδων τους μπορεί να βοηθήσει στη θεραπεία της αντίστασης στην ινσουλίνη σε περιπτώσεις διαβήτη (Li et al., 2011).

Τέλος, Από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε αρουραίους οι οποίοι είχαν διαβήτη, παρατηρήθηκε ότι ο περιορισμός της διατροφής μέσω της αύξησης της συγκέντρωσης της SIRT1, βελτιώνει τα τραύματα που δημιουργούνται στα νεφρά (Kitada et al., 2011). Η SIRT1 εντείνει εν μέρει την προστατευτική ιδιότητα της ρεσβερατρόλης στα μιτοχόνδρια των νεφρικών κυττάρων, και με αυτό τον τρόπο μειώνει το οξειδωτικό στρες και παρέχει μια πιθανή θεραπεία για τη διαβητική νεφροπάθεια (Xu et al., 2012). Έχει παρατηρηθεί ότι τόσο το NAD⁺ όσο και η

ρεσβερατρόλη και η ραπαμυκίνη, μπορούν να αντιταχθούν στη γήρανση των μεσαγγειακών νεφρικών κυττάρων, μέσω της δράσης της SIRT1 (Zhang et al., 2012).

1.2.5.3. Καρδιαγγειακές παθήσεις

Μια ακόμα κατηγορία παθήσεων την οποία επηρεάζει η οικογένεια των σιρτουινών, και κατά κύριο λόγο το ισοένζυμο SIRT1, είναι οι παθήσεις του καρδιαγγειακού συστήματος. Οι άνθρωποι οι οποίοι περιορίζουν το ποσό των θερμίδων τις οποίες καταναλώνουν καθημερινά, παρουσιάζουν μικρότερες πιθανότητες βλάβης του συστήματος αυτού. Συγκεκριμένα, σε περιπτώσεις θερμιδικού περιορισμού, εξαιτίας της αύξησης των επιπέδων της SIRT1, αποακετυλιώνεται και κατά συνέπεια ενεργοποιείται το ένζυμο eNOS, το οποίο βρίσκεται στο ενδοθήλιο των αγγείων και ευθύνεται για την παραγωγή νιτρικού οξέος. Το νιτρικό οξύ που παράγεται τελικά προστατεύει τα αγγεία. Το γεγονός αυτό μπορεί να συμβάλλει στην ικανότητα της ρεσβερατρόλης να μειώνει τη συστολική πίεση (Oellerich & Potente, 2012, Nisoli et al., 2005).

Η SIRT1 εμπλέκεται επίσης στην προστασία του οργανισμού ενάντια στην αθηροσκλήρωση (βλάβη στις αρτηρίες από την εναπόθεση λιπιδίων). Από έρευνες σε ποντίκια, παρατηρήθηκε ότι σε περιπτώσεις υπερέκφρασης της SIRT1 ή σε περιπτώσεις στις οποίες χορηγήθηκε ρεσβερατρόλη, η συσσώρευση βλαβερών λιπιδίων με την πάροδο του χρόνου δεν ήταν τόσο εκτεταμένη. Ο μηχανισμός που επηρεάζεται και σε αυτή την περίπτωση είναι η ενεργοποίηση του ενζύμου eNOS (Stein & Matter, 2011). Επίσης, στο μηχανισμό προστασίας εμπεριέχεται και η μείωση του σχηματισμού μακροφάγων κυττάρων (Stein et al., 2011).

Η αγγειακή αναδιαμόρφωση η οποία προκαλείται σε περιπτώσεις υπέρτασης, φαίνεται πως εμπεριέχει τη δράση του ισοενζύμου SIRT2. Το ένζυμο αυτό αποακετυλιώνει τους μικροσωληνίσκους, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο στην ανακατανομή των ενδοθηλιακών κυττάρων, ως αποτέλεσμα της ύπαρξης της αγγειοτενσίνης II και της μηχανικής έκτασης που δημιουργείται (Hashimoto-Komatsu et al., 2011). Στην προστασία των αγγείων, φαίνεται πως συμμετέχει και η SIRT1, μέσω της αναστολής της έκφρασης του υποδοχέα της αγγειοτενσίνης II, του AGTR1. Όταν ο υποδοχέας δεν εκφράζεται, μειώνεται η καταστροφή των οργάνων λόγω οξειδωσης ενώ αυξάνονται τα επίπεδα του ισοενζύμου SIRT3 (Miyazaki et al., 2008).

Σε περιπτώσεις στέρησης της επαρκούς ποσότητας οξυγόνου σε κάποιο τμήμα του οργανισμού, η πυρηνική SIRT1 παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση των κυττάρων στη ζωή. Σε αυτές τις περιπτώσεις τα επίπεδα της έκφρασης και της δραστηριότητας του ενζύμου αυξάνονται, επηρεάζοντας τους μεταγραφικούς παράγοντες HIF (Hypoxia- inducible factors). Τον ίδιο μηχανισμό επηρεάζουν οι SIRT6 και SIRT3 στον πυρήνα και στα μιτοχόνδρια, αντίστοιχα (Chen et al., 2011).

Η SIRT1 προστατεύει επίσης τα κύτταρα του ενδοθηλίου από την πρόωρη γήρανση που προκαλείται από οξειδωτικό στρες, και από καρδιαγγειοπάθειες εξαιτίας της γήρανσης (Ota et al., 2008, Zhou et al., 2011). Ένας άλλος τρόπος με τον οποίο η SIRT1 εμπλέκεται στην προστασία ενάντια στις καρδιαγγειακές παθήσεις, και συγκεκριμένα στην αθηροσκλήρωση (συσσώρευση λιπιδίων στο εσωτερικό των αγγείων με ταυτόχρονη σκλήρυνση αυτών), είναι μέσω των επιδράσεων που έχει στα λιπίδια και τη γλυκόζη καθώς επίσης και στο μεταβολισμό που πραγματοποιείται στο ήπαρ. Με τους μηχανισμούς στους οποίους εμπλέκεται παρεμποδίζει τη σύνθεση λιπιδίων και χοληστερόλης (Li et al., 2007).

Οι σιρτουίνες έχουν θετικές επιπτώσεις και στην καρδιά. Για παράδειγμα, η υπερέκφραση της SIRT1 προστατεύει την καρδιά από την παθολογική καρδιακή υπερτροφία (Planavila et al., 2011). Η ενεργοποίηση της SIRT1 από τη ρεσβερατρόλη, βελτιώνει τη συστολική ικανότητα της καρδιάς, καθώς επίσης και τη λειτουργία της αριστερής κοιλίας, σε περιπτώσεις αιμορραγίας (Jian et al., 2012). Η καρδιακή ανεπάρκεια μετά από έμφραγμα, σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα του ισοενζύμου SIRT3. Η ίδια πρωτεΐνη είναι ικανή να παρεμποδίσει την καρδιακή υπερτροφία, μέσω της μιτοχονδριακής ομοιόστασης και των πρωτεϊνών που μεσολαβούν στον ενεργειακό μεταβολισμό και στην απόκριση στο οξειδοαναγωγικό στρες των μιτοχονδρίων (Sack, 2012). Έχει αποδειχθεί επίσης ότι η υπερέκφραση του ισοενζύμου SIRT6, μπορεί να καταστείλει την υπερτροφία των κυττάρων της καρδιάς, η οποία προκαλείται από την αγγειοτενσίνη II (Yu et al., 2012). Σε διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία δεν εκφράζουν το ισοένζυμο SIRT7, παρατηρούνται φαινόμενα καρδιακής υπερτροφίας, καρδιομυοπάθειας και μειωμένου χρόνου ζωής.

1.2.5.4. Νευροεκφυλιστικές ασθένειες

Τα μέλη της οικογένειας των σιρτουινών φαίνεται πως εμπλέκονται και σε ποικίλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, οι οποίες εμφανίζονται με τη γήρανση. Η παρακμή των

γνώσεων ενός ανθρώπου που παρατηρείται με τη γήρανση, μπορεί να αντιμετωπιστεί με την ενεργοποίηση των σιρτουινών (Morris, 2013).

Η SIRT1 βελτιώνει την διαδικασία της μάθησης και τη μνήμη στα ποντίκια. Η έκφραση του ενζύμου στον υποθάλαμο του εγκεφάλου παίζει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες αυτές, μέσω της συμμετοχής του στο σχηματισμό των δενδριτών των νευρώνων και στην τελική πολυπλοκότητά τους, καθώς και στο μήκος που θα διαθέτει ο κάθε κλάδος. Το συγκεκριμένο ένζυμο συμμετέχει στην προστασία από ασθένειες όπως το Parkinson, η άνοια, η τοξικότητα των νευρώνων από τις πρωτεΐνες prion 106-126 και την ασθένεια Huntington (Gao et al., 2010, Michan et al., 2010).

Η βασικότερη νευροεκφυλιστική ασθένεια είναι η νόσος Alzheimer. Σε οργανισμούς μοντέλα τα οποία είχαν αυτή την πάθηση, η ενεργοποίηση της SIRT1 εμπόδισε τον εκφυλισμό των αξόνων και των νευρώνων. Πιθανές αιτίες της ασθένειας αυτής είναι η τοξικότητα που προκαλούν στους νευρώνες του εγκεφάλου τα β - αμυλοειδή, και τα συσσωματώματα που δημιουργούνται από τις πρωτεΐνες tau. Η SIRT1 μπορεί να προστατέψει τον οργανισμό από τα δύο αυτά στοιχεία, είτε αναστέλλοντας το παράγοντα NF- κ B που μεταφέρει το σήμα στην πρώτη περίπτωση, είτε αποακετυλιώνοντας τις πρωτεΐνες tau παρεμποδίζοντας την ικανότητά τους να δημιουργούν συσσωματώματα (Kim et al., 2004, Min et al., 2010). Είναι πιθανό, λοιπόν, η ενεργοποίηση της SIRT1 στις περιοχές του εγκεφάλου να μπορεί να αποτρέψει την εμφάνιση ή να καθυστερήσει την εξέλιξη της νόσου.

Η απώλεια νευρώνων με την ηλικία παρατηρείται επίσης στην αμυοτροφική πλάγια σκλήρυνση (amyotrophic lateral sclerosis, ALS). Η SIRT1 είναι ικανή να προστατεύσει τους νευρώνες, μέσω της ρεσβερατρόλης, σύμφωνα με πειράματα σε κύτταρα που είχαν την ασθένεια αυτή (Kim et al., 2007). Σε μοντέλα ποντικών τα οποία είχαν την ασθένεια Huntington, η υπερέκφραση του ενζύμου SIRT1 βελτίωσε την κατάσταση των νευρώνων του εγκεφάλου και ενίσχυσε τις πιθανότητες επιβίωσης του οργανισμού (Jeong et al., 2011).

Το ισοένζυμο SIRT2 είναι αυτό που βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στον εγκέφαλο. Προσπάθειες αύξησης των επιπέδων έκφρασή του έχουν αποδειχθεί τοξικές για τους νευρώνες του εγκεφάλου, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα αύξησης της συγκέντρωσης της SIRT1. Από μελέτες σε κύτταρα από ποντίκια και από *Drosophila*, φαίνεται ότι η αναστολή της λειτουργίας της SIRT2 μπορεί να

χρησιμοποιηθεί ως θεραπεία σε περιπτώσεις Parkinson και Huntington (Liu et al., 2012).

Η SIRT2 θα μπορούσε να έχει ανεπιθύμητες επιπτώσεις στα νεύρα, αναστέλλοντας την αυτοφαγική συμπεριφορά που προκαλείται από τα λυσοσώματα, αυξάνοντας τη συσσώρευση και τη δημιουργία συσσωματωμάτων β-αμυλοειδών και άλλων πρωτεϊνών, καθιστώντας έτσι τα κύτταρα πιο ευπαθή στις κυτταροτοξικές επιδράσεις τους. Συνεπώς, η SIRT2 θα μπορούσε να αποτελεί έναν πολύτιμο θεραπευτικό στόχο για μια πληθώρα νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Gal et al., 2012).

1.2.5.5. Καρκίνος

Υπάρχουν αμφιβολίες ως προς τη συμμετοχή των σιρτουϊνών σε φαινόμενα καρκινογένεσης. Εξαιτίας όμως της πολυπλοκότητας των μηχανισμών λειτουργίας τους, δεν είναι ακόμα απόλυτα σαφές ποιος ακριβώς θα μπορούσε να είναι ο ρόλος τους σε περιπτώσεις καρκίνου. Γενικά, φαίνεται πως τα ισοένζυμα SIRT2 και SIRT6 μπορούν να λειτουργούν ως καταστολείς των όγκων, ενώ ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες η SIRT1 μπορεί να λειτουργεί είτε ως καταστολέας ενός όγκου είτε ως ογκογενετικός παράγοντας (Bosch-Presegue & Vaquero, 2011).

SIRT1

Η SIRT1 υερεκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου του ανθρώπινου οργανισμού, και μπορεί να έχει ρόλο καταστολής των στοιχείων που αντιστέκονται στην ανάπτυξη όγκων, και κατά συνέπεια να προωθεί την ανάπτυξη της ασθένειας. Αυξημένη έκφραση του συγκεκριμένου ενζύμου έχει παρατηρηθεί σε διάφορες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού, του προστάτη, του παχέος εντέρου, σε καρκινώματα σε κύτταρα του ήπατος, σε καρκίνο στο πάγκρεας και του δέρματος, καθώς επίσης και σε περιπτώσεις οξείας μυελοειδούς λευχαιμίας. Το γεγονός αυτό δεν αποδεικνύει απαραίτητα την συμμετοχή του ενζύμου στην ασθένεια, αλλά υποδεικνύει την πιθανή ύπαρξη συσχέτισης. Επίσης δεν είναι σαφές αν η υπερέκφραση που παρατηρείται είναι η αιτία ή ένα από τα αποτελέσματα της εμφάνισης όγκων (Morris, 2013).

Γνωρίζουμε ότι η SIRT1 είναι η πιο πιθανή αιτία της απώλειας των ακετυλομάδων από τη λυσίνη K16 της ιστόνης H4 και της προσθήκης μεθλομάδων στη λυσίνη K20 της ίδιας ιστόνης. Μια πιθανή αιτία της αυξημένης έκφρασης της SIRT1 στις περιπτώσεις καρκίνου είναι η απώλεια ενός μεταγραφικού καταστολέα, όπως ο p53

(Fraga et al., 2005). Γενικά, αλληλεπιδρά με διάφορα μόρια στο εσωτερικό των καρκινικών κυττάρων, προκαλώντας με τον τρόπο αυτό τροποποιήσεις στη λειτουργία τους. Ένα ακόμα ενδιαφέρον σημείο είναι ότι στα καρκινικά κύτταρα, το συγκεκριμένο ένζυμο αντί να βρίσκεται κατά κύριο λόγο στον πυρήνα, εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Αυτή η έντονη αλλαγή της υποκυτταρικής τοποθεσίας της SIRT1, βασίζεται στην αύξηση της σταθερότητάς της, ως αποτέλεσμα της σηματοδότησης που δέχτηκε από τον υποδοχέα PI3K/IGF-1. Η παρουσία του ενζύμου στο κυτταρόπλασμα φαίνεται πως συμβάλλει σημαντικά στην ειδική για τον καρκίνο λειτουργία του (Byles et al., 2010).

Από την άλλη, υπάρχουν και αρκετές *in vivo* ενδείξεις για την κατασταλτική ως προς τον καρκίνο λειτουργία της SIRT1. Συγκεκριμένα, καταστέλλει την ανάπτυξη όγκων στο λεπτό και το παχύ έντερο, στο ήπαρ, στις ωοθήκες και στην ουροδόχο κύστη. Από μελέτες σε ποντίκια παρατηρήθηκε επίσης ότι προστατεύει από τον καρκίνο του μαστού (Firestein et al., 2008). Επίσης, η ρεσβερατρόλη μέσω της αλληλεπίδρασης με τη SIRT1 αποδεικνύεται ότι έχει αντικαρκινική δράση.

Στηρίζοντας την υπόθεση ότι η αύξηση των επιπέδων της SIRT1 είναι το αποτέλεσμα και όχι η αιτία του καρκίνου, τότε δεδομένης της ικανότητας του ενζύμου να καθυστερεί τη γήρανση και τον κυτταρικό θάνατο, θα μπορούσε να εξέλθει το συμπέρασμα ότι κάποιοι καρκινικοί όγκοι «εθίζονται» στην SIRT1 (Bosch-Presegue & Vaquero, 2011).

SIRT2

Οι περισσότερες ενδείξεις που υπάρχουν μέχρι στιγμής, δείχνουν ότι η SIRT2 δρα ως καταστολέας όγκων. Ο προστατευτικός ρόλος της ενάντια στον καρκίνο υποστηρίζεται από το γεγονός ότι ελέγχει τη μίτωση και σε περιπτώσεις στρες, πράγμα που ωθεί στο συμπέρασμα ότι οι ενεργοποιητές της SIRT2 θα μπορούσαν να έχουν αντικαρκινική δράση (Bosch-Presegue & Vaquero, 2011).

Στα γλοιώματα (πρωτοπαθείς όγκοι στον εγκέφαλο), η SIRT2 εκφράζεται σε χαμηλότερα επίπεδα, καθώς η ύπαρξή της παρεμποδίζει το σχηματισμό κυτταρικών αποικιών. Τα επίπεδα της έκφρασής της είναι επίσης χαμηλότερα σε περιπτώσεις οισοφαγικών και γαστρικών αδενοκαρκινομάτων. Επίσης, σε περιπτώσεις μελανώματος, έχει ανακαλυφθεί μια μετάλλαξη στο ενεργό κέντρο της SIRT2, η οποία απενεργοποιεί το ένζυμο. Η ικανότητα του συγκεκριμένου ενζύμου να δρα ως

καταστολέας ανάπτυξης καρκινικών όγκων υποστηρίζεται από πείραμα που έγινε σε ποντίκια. Αρσενικά ποντίκια που δεν την εξέφραζαν ανέπτυξαν ηπατοκυτταρικά καρκινικά κύτταρα, ενώ θηλυκά ποντίκια με την ίδια μετάλλαξη ανέπτυξαν όγκους στο μαστό. Επιπλέον, σε καρκινώματα μαστού στον άνθρωπο τα επίπεδα της SIRT2 είναι μειωμένα. Η απώλεια της SIRT2 οδηγεί στην αύξηση των παραγόντων που ρυθμίζουν τη μίτωση. Μια ακόμα απόδειξη της θετικής λειτουργίας του ενζύμου αποτελεί το γεγονός της υπερακετυλίωσης του σημείου στόχου της, της λυσίνης K53 της ιστόνης H3 στα καρκινικά κύτταρα.

Μια περίπτωση που αντιτίθεται στις παραπάνω ενδείξεις, είναι η περίπτωση της οξείας μυελοειδούς λευχαιμίας, όπου τα επίπεδα έκφρασης της SIRT2 αυξάνονται και βοηθούν την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων (Dan et al., 2011).

SIRT3

Η μιτοχονδριακή σιρτουίνη SIRT3 ρυθμίζει το μεταβολισμό και την απόκριση στο οξειδωτικό στρες. Υπάρχουν ενδείξεις που υποστηρίζουν ότι το ισοένζυμο αυτό, δρα ως ένας μιτοχονδριακός καταστολέας όγκων. Η μείωση των επιπέδων της SIRT3 οδηγεί στην αύξηση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS), γεγονός το οποίο αυξάνει τη σταθερότητα στο μεταγραφικό παράγοντα HIF-a (Hypoxia inducible factor-a), και κατά συνέπεια αυξάνεται η έκφραση των γονιδίων τα οποία ρυθμίζονται από αυτόν, ο μεταβολισμός επαναπρογραμματίζεται προς την κατεύθυνση της γλυκόλυσης, και προωθείται ο σχηματισμός όγκων. Το αν τελικά η SIRT3 λειτουργεί ως καταστολέας όγκων ή ως ενεργοποιητής είναι αμφιλεγόμενο, καθώς υπάρχουν ενδείξεις που υποστηρίζουν και τις δύο πλευρές. Για παράδειγμα, τα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου σε περιπτώσεις καρκίνου του μαστού μειώνονται υποδεικνύοντας την κατασταλτική λειτουργία του, ενώ αντίθετα σε περίπτωση κακοήθειας στους λεμφαδένες, τα επίπεδά του αυξάνονται (Kim et al., 2010). Η ικανότητα της SIRT3 να προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες, βασίζεται στην αναστολή της μιτοχονδριακής πρωτεΐνης IDH2, η οποία αποτελεί έναν από τους βασικότερους παράγοντες για τη δημιουργία καρκίνου (Yu et al., 2012).

SIRT4

Η βλάβες των κυττάρων του δέρματος που προκαλούνται από την ηλιακή ακτινοβολία επάγουν την έκφραση των SIRT1 και SIRT4. Στη συνέχεια όλες οι σιρτουίνες μειώνονται και συσσωρεύεται μόνο η SIRT4. Στο πλακώδες καρκίνωμα

του δέρματος, η έκφραση των γονιδίων και των επτά σιρτουινών αυξάνονται (Benavente et al., 2012).

SIRT6

Η SIRT6 φαίνεται πως διαθέτει κατασταλτικό ως προς τη δημιουργία όγκων ρόλο. Αποακετυλιώνει τη λυσίνη που βρίσκεται στις θέσεις 9 και 56 της ιστόνης H3, και συμμετέχει στην αποκατάσταση DNA, όταν καταστρέφεται η δομή της διπλής έλικας. Η λυσίνη K56 της ιστόνης H3 βρίσκεται σε υπερακετυλιωμένη μορφή σε περιπτώσεις καρκίνου του δέρματος, του μαστού, του ήπατος και του παχέος εντέρου. Η επαγωγή της υπερέκφρασης της SIRT6 σε ποικίλες μορφές καρκινικών κυττάρων οδηγεί στην μαζική απόπτωση αυτών (McCord et al., 2009, Das et al., 2009).

SIRT7

Τα επίπεδα της SIRT7 σε περιπτώσεις καρκίνου του μαστού, των λεμφαδένων και του θυρεοειδούς είναι γενικά αυξημένα. Αν και η SIRT7 δε φαίνεται να συμμετέχει στο σχηματισμό των καρκινικών όγκων, είναι σημαντική για τη διατήρησή τους. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της ιδιότητάς της να αφαιρεί την ακετυλομάδα από τη λυσίνη K18 της ιστόνης H3. Επίσης, σε περιπτώσεις μείωσής της, εμποδίζεται σημαντικά ο σχηματισμός όγκων (Barber et al., 2012).

Γενικά, λοιπόν, είναι αμφιλεγόμενος ο ρόλος των σιρτουινών στον καρκίνο. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η SIRT1 προστατεύει τα κύτταρα σε περιπτώσεις στρες. Προκειμένου να το επιτύχει αυτό, έχει την ιδιότητα να επάγει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, να επιδιορθώνει το DNA και να αναστέλλει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Αλλά, κάτω από ακραίες καταστάσεις, οι σιρτουίνες 1, 2 και 3, προστατεύουν τον οργανισμό προκαλώντας τη γήρανση των κυττάρων και την απόπτωσή τους. Όταν η SIRT1 υπερεκφράζεται, αναστέλλει την γήρανση που προκαλείται από την ογκογένεση, ενώ η αναστολή της οδηγεί σε συγκράτηση της ανάπτυξης, που μοιάζει με γήρανση. Συνεπώς, φαίνεται ότι αν η κατάσταση στρες είναι χρόνια ή τα επίπεδα της αλλοίωσης των κυττάρων ξεπεράσουν ένα συγκεκριμένο όριο, τότε η SIRT1 μπορεί να προκαλέσει τη γήρανση τους. Αλλά όταν αυτές οι καταστάσεις συνδυάζονται με απώλεια ενός καταστολέα όγκων ή κάποιου άλλου σημαντικού παράγοντα, τότε επικρατεί αστάθεια η οποία προκαλεί την υπερέκφραση του ενζύμου πάνω από ένα κρίσιμο όριο. Με τη διέγερση

της κυτταρικής ανάπτυξης και την αναστολή της απόπτωσης, αυτό το γεγονός θα συνέβαλλε στη δημιουργία όγκων (Wang et al., 2007).

1.2.5.6. Φλεγμονώδης αρθρίτιδα

Αν και ο ρόλος των σιρτουινών στις φλεγμονές είναι γνωστός, πρόσφατα ανακαλύφθηκε η συμμετοχή τους και σε οξείες φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Το γεγονός αυτό προϋποθέτει την αλλαγή της αυξημένης γλυκόλυσης σε αύξηση της οξειδωσης λιπαρών οξέων καθώς η πρόιμη φλεγμονή μετατρέπεται περά στο επόμενο στάδιο. Η SIRT6 μειώνει τη γλυκόλυση, ενώ η SIRT1 αυξάνει την οξειδωση των λιπαρών οξέων (Liu et al., 2012).

Η χρόνια φλεγμονή εκτός από το γεγονός ότι είναι ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά των αυτοάνοσων ασθενειών, είναι επίσης ένα από τα χαρακτηριστικά των ασθενειών που προκαλούνται με τη γήρανση. Η SIRT1 καταστέλλει τόσο την έμφυτη όσο και την επίκτητη ανοσία. Η SIRT1 υπερεκφράζεται επίσης σε ινοβλάστες αρθρικού ιστού ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα και φαίνεται να συνεισφέρει στην παραγωγή κυτοκίνης πριν τη δημιουργία των φλεγμονών (Niederer et al., 2012).

1.2.5.7. Οστεοπόρωση

Η ενεργοποίηση της SIRT1 από τη ρεσβερατρόλη προάγει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα RUNX2 σε μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα, ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Επίσης υπερεκφράζεται η οστεοκαλσίνη και λειώνεται η έκφραση της λεπτίνης. Τα γεγονότα αυτά οδηγούν σε αυθόρμητη οστεογένεση, καθώς τα βλαστοκύτταρα μετατρέπονται σε οστεοβλάστες. Η SIRT1 συμβάλλει στη διατήρηση των βλαστοκυττάρων και ρυθμίζει την οστική μάζα. Έτσι, φαίνεται ότι το συγκεκριμένο ένζυμο μπορεί να βοηθήσει στην αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης με διάφορους τρόπους (Morris et al., 2013).

1.2.6. SIRT2

Το ισοένζυμο SIRT2 της οικογένειας των σιρτουινών, αποτελεί ένα κατά κύριο λόγο κυτταροπλασματικό ένζυμο. Έχει αποδειχθεί μέσα από μελέτες, ότι το ισοένζυμο αυτό εντοπίζεται σε μεγαλύτερες ποσότητες στα λιποκύτταρα, αλλά επίσης εκφράζεται σε μεγάλα ποσοστά στον εγκέφαλο και στο νευρικό σύστημα, τόσο στα νευρικά όσο και στα νευρογλοιακά κύτταρα (Polito et al., 2017). Η πρώτη ένδειξη για

το ρόλο της SIRT2 αφορούσε τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, καθώς όπως και σε *in vitro* μοντέλα, η υπερέκφραση της SIRT2 καθυστερούσε τη διαδικασία της μίτωσης. Για την επίτευξη αυτής της λειτουργίας είναι πιθανό η SIRT2 να μην στοχεύει σε ιστονικούς στόχους. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι το ένζυμο αυτό, μπορεί και ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο μέσω της ακετυλίωσης του μιτωτικού παράγοντα BubR1, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι η ρύθμιση της ακετυλίωσης στις ιστόνες δεν σχετίζεται με τη διαδικασία της μίτωσης, καθώς έχει αναφερθεί ότι η αποακετυλίωση της λυσίνης K16 της ιστόνης H4 επηρεάζει την κατάσταση της χρωματίνης (Suematsu et al., 2014).

1.2.6.1. Λειτουργία και υποστρώματα του κυτταροπλασματικού ισοενζύμου SIRT2

Το ισοένζυμο SIRT2 έχει αποδειχθεί ότι εδράζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων και μερικές φορές περνάει στον πυρήνα προκειμένου να επιτελέσει συγκεκριμένους βιολογικούς σκοπούς. Στο κυτταρόπλασμα, αντιδρά με τα τους μεταγραφικούς παράγοντες FOXO1 και FOXO3, αφαιρώντας τις ακετυλομάδες που είναι συνδεδεμένες σε αυτούς. Με αυτό τον τρόπο συμμετέχει στις ποικίλες διαδικασίες οι οποίες ρυθμίζονται από τα συγκεκριμένα μόρια (Wang & Tong, 2009, Wang et al., 2007).

Η υπερέκφραση της SIRT2 καθυστερεί τη διαδικασία του κυτταρικού κύκλου. Δημιουργεί συσσωματώματα με τους μικροσωληνίσκους στο κυτταρόπλασμα, όπου αποακετυλιώνει μόρια της α-τουμπουλίνης. Στη διάρκεια της μίτωσης τα επίπεδα της SIRT2 αυξάνονται. Παροδικά, το ισοένζυμο αυτό μεταφέρεται στον πυρήνα του κυττάρου στη διάρκεια της μετάβασης από τη φάση G2 στη φάση M του κυτταρικού κύκλου, όπου αποακετυλιώνει την λυσίνη 16 της ιστόνης H4, συμμετέχοντας με αυτό τον τρόπο στη συμπύκνωση της χρωματίνης στη διάρκεια της μετάφρασης. Το συγκεκριμένο ισοένζυμο αποακετυλιώνει επίσης την ιστόνη H3. Τα γεγονότα αυτά υποδεικνύουν ότι η SIRT2 εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (Dryden et al., 2003, North et al., 2003, Vaquer et al, 2006, Inoue et al., 2007).

Ένας ιδιαίτερος στόχος του ισοενζύμου SIRT2 είναι η μεταφοράση του ακετυλίου p300. Η ακετυλίωση του ενζύμου p300 από το ίδιο το μόριο αποτελεί ένα σημείο ελέγχου της λειτουργίας του στη διάρκεια της μεταγραφής. Η αποακετυλίωση ενός αμινοξικού κατάλοιπου λυσίνης της καταλυτικής περιοχής του ενζύμου από τη

SIRT2, αποκαθιστά την ικανότητα δέσμευσης του, και έτσι επηρεάζει τη λειτουργία του ενζύμου. Με τη σειρά του, το ένζυμο p300 μπορεί και ακετυλιώνει τη SIRT2, μειώνοντας έτσι την ανασταλτική δράση που διαθέτει σε μόρια όπως ο μεταγραφικός παράγοντας p53 (Black et al., 2008, Han et al., 2008).

Η SIRT2 έχει επίσης την ιδιότητα να προσδένεται στις ισομορφές β και γ των ευκαρυωτικών πρωτεϊνών 14-3-3, οι οποίες εμπλέκονται στον έλεγχο διάφορων μορίων μεταγωγής σήματος, όπως οι κινάσες, οι φωσφατάσες και οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της SIRT2 και των πρωτεϊνών 14-3-3β/γ, ενισχύει την αποακετυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα p53 από τη SIRT2, και με αυτό τον τρόπο μειώνεται η επίδραση του στη διαδικασία της μεταγραφής (Jin et al., 2008, Fu et al., 2000). Ένας ακόμα μεταγραφικός παράγοντας με τον οποίο φαίνεται πως προσδένεται η SIRT2 είναι ο HOXA10, αν και ο βιολογικός ρόλος αυτής της αλληλεπίδρασης δεν είναι ακόμα σαφής (Bae et al., 2004, Morris, 2013).

Με την αποακετυλίωση της υπομονάδας p65 του πυρηνικού παράγοντα NF-κB, η SIRT2 συμμετέχει στη ρύθμιση όλων των γονιδίων των οποίων η έκφραση εξαρτάται από το συγκεκριμένο μόριο. Σταθεροποιεί επίσης το ένζυμο PEPCK μέσω της διαδικασίας της αποακετυλίωσης, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη μείωση της ταχύτητας της γλυκονεογένεσης (σύνθεση της γλυκόζης από μη υδατανθρακικές πηγές) (Jiang et al., 2011). Η SIRT2 επηρεάζει ακόμα τη διαδικασία μυελίνωσης των νευρωνικών κυττάρων Schwann, καθώς αποακετυλιώνει την πρωτεΐνη PAR-3 (Beirowski et al., 2011). Τα υποστρώματα και οι ουσίες με τις οποίες αλληλεπιδρά η SIRT2, καθώς και ο βιολογικός ρόλος που επιτελείται σε κάθε περίπτωση, παρουσιάζεται αναλυτικά στον Πίνακα 1.2.

Πίνακας 1.2: Υποστρώματα και ουσίες με τις οποίες αλληλεπιδρά το ένζυμο SIRT2 και ο βιολογικός τους ρόλος στο κύτταρο (Oliveira et al., 2012)

Υπόστρωμα-Ουσία με την οποία αλληλεπιδρά	Είδος αλληλεπίδρασης	Βιολογικός ρόλος
α-τουμπουλίνη	Υπόστρωμα (αποακετυλίωση Lys-40)	Διαφοροποίηση Κυτταροσκελετού και Δενδρογλοιώματος
Ιστονίνη H3	Υπόστρωμα (αποακετυλίωση Lys-56)	Ρύθμιση κυτταρικού κύκλου
Ιστονίνη H4	Υπόστρωμα (αποακετυλίωση Lys-16)	Ρύθμιση κυτταρικού κύκλου
FOXO1	Υπόστρωμα (αποακετυλίωση καταλοίπων Lys κοντά στη Ser-253)	Διαφοροποίηση λιποκυττάρων
FOXO3	Υπόστρωμα	Ρύθμιση οξειδωτικού στρες, και απόπτωση κυττάρων
Par-3	Υπόστρωμα (αποακετυλίωση Lys-831,848,881,1327)	Τροποποίηση της περιφερειακής μυελίνωσης
P300	Υπόστρωμα (αποακετυλίωση διάφορων καταλοίπων Lys)	Ρύθμιση της αυτοακετυλίωσης του p300
PEPCK1	Υπόστρωμα	Ρύθμιση της γλυκόζης του αίματος
p65	Υπόστρωμα (αποακετυλίωση της Lys-310)	Ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων που εξαρτώνται από τον παράγοντα NF-κB
HOXA10	Συμπαράγοντας	Άγνωστο
HDAC6	Συμπαράγοντας	Δυναμική κυτταροσκελετού
14-3-3β/γ	Συμπαράγοντες	Μείωση δραστηριότητας της πρωτεΐνης p53
CDK1, κυκλίνη E/CDK2, κυκλίνη A/CDK2, p35/CDK5	Φωσφουλίωση της SIRT2 στα κατάλοιπα Ser-331,-368	Αναστολή της καταλυτικής λειτουργίας της SIRT2

* *Lys*: Λυσίνη, *Ser*: Σερίνη, *P300*: ιστονική ακετυλοτρανσφεράση ac-P300, *CDK1*, κυκλίνη *E/CDK2*, κυκλίνη *A/CDK2*, *p35/CDK5*: Σύμπλοκα κινασών, *HDAC6*: Αποακετυλάση ιστονίνης 6, *NF-κB*: Πυρηνικός παράγοντας κB, *PEPCK1*: καρβοξυκινάση του φωσφοπυροβικού οξέος 1, *p53*: πρωτεΐνη καταστολή όγκων.

1.2.6.2. Ασθένειες στις οποίες εμπλέκεται η SIRT2.

Ρόλος της SIRT2 σε μεταβολικά σύνδρομα

Με τον όρο μεταβολικό σύνδρομο γίνεται αναφορά σε καταστάσεις όπως η παχυσαρκία, η αντίσταση στην ινσουλίνη, η υπέρταση και η αυξημένη περιεκτικότητα του αίματος σε λιπαρά οξέα. Η ύπαρξη των καταστάσεων αυτών αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης σοβαρών ασθενειών, ενώ η παχυσαρκία συνδέεται με μείωση στο προσδόκιμο ζωής.

Η SIRT2 είναι το ισοένζυμο το οποίο βρίσκεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στον λιπώδη ιστό, γεγονός το οποίο υποδεικνύει τη σύνδεση που μπορεί να υπάρχει μεταξύ της SIRT2 και της λειτουργίας του ιστού αυτού. Σε συνδυασμό με την παρατήρηση η SIRT2 μειώνει τα λιποκύτταρα, προωθείται η υπόθεση ότι η πρωτεΐνη αυτή συμμετέχει στη ρύθμιση της περίσσειας λίπους. Έτσι, μόρια τα οποία ενεργοποιούν την SIRT2 θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως συστατικά θεραπευτικών σκευασμάτων κατά της παχυσαρκίας και γενικότερα κατά του μεταβολικού συνδρόμου (Oliveira et al., 2012).

Ρόλος της SIRT2 στον καρκίνο

Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ιδιότητα να διαιρούνται και να μεγαλώνουν με ανεξέλεγκτο ρυθμό. Ένα κοινό σημείο σε όλους τους τύπους καρκίνου είναι η παρουσία μεταλλαγμένων πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για τη διαφοροποίηση αυτή. Έχουν γίνει πολλές μελέτες προσπαθώντας να ερευνηθεί το κατά πόσο η SIRT2 λειτουργεί ως μια από αυτές τις πρωτεΐνες και κατά συνέπεια να έχει ρόλο στην δημιουργία όγκων. Έχει παρατηρηθεί ότι σε περιπτώσεις γλοιωμάτων, μελανωμάτων και καρκινωμάτων στη στομαχική κοιλότητα τα επίπεδα έκφρασης της SIRT2 είναι μειωμένα, εξαιτίας της διαγραφής του γονιδίου που την εκφράζει. Έχουν αναφερθεί περιπτώσεις στις οποίες η SIRT2 λειτουργεί ως καταστολέας ανάπτυξης όγκων καθώς προκαλεί απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Το σίγουρο είναι ότι μέχρι στιγμής έχει αποδειχθεί διπλός ρόλος της SIRT2 στην ασθένεια του καρκίνου και απαιτούνται περισσότερες έρευνες προκειμένου να αποσαφηνιστεί η λειτουργία της και να χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία ή την πρόληψη της ασθένειας (Oliveira et al., 2012).

Ρόλος της SIRT2 στο κεντρικό νευρικό σύστημα

Στα κύτταρα του εγκεφάλου εκφράζονται και τα επτά μέλη της οικογένειας των σιρτουινών. Παρόλα αυτά η SIRT2 εκφράζεται σε μεγαλύτερες ποσότητες και ο ρόλος της δεν είναι ακόμη απόλυτα κατανοητός. Εκφράζεται σχεδόν σε όλα τα κύτταρα του εγκεφάλου ενώ πρωταρχικά εντοπίζεται στα κύτταρα που παράγουν τη μυελίνη του κεντρικού νευρικού συστήματος, τους ολιγοδενδρίτες. Συνεπώς, το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει στραφεί στη συμμετοχή του συγκεκριμένου ισοενζύμου σε διάφορες νευροεκφυλιστικές παθήσεις.

Οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες επηρεάζουν κατά κύριο λόγο τον μεγαλύτερο σε ηλικία πληθυσμό. Ένα κοινό σημάδι για αρκετές από αυτές τις ασθένειες είναι η παρουσία μη φυσιολογικών συσσωματωμάτων πρωτεϊνών στον εγκέφαλο, που περιέχουν λανθασμένης μορφής πρωτεΐνες. Η SIRT2 έχει συνδεθεί ακόμα, με την συσσωμάτωση των πρωτεϊνών α-συνουκλεΐνη (*α-synuclein*) και χαντικτίνη (*huntingtin*) οι οποίες συνδέονται με τις νόσους Parkinson και Huntington, αντίστοιχα. Επίσης, η SIRT2 σχετίζεται έμμεσα με τις κυτταρικές διεργασίες που εμπλέκονται στην παθολογία και τη φυσιολογία των νευροεκφυλιστικών διαταραχών, δηλαδή την αυτοφαγία, το οξειδωτικό στρες και την ύπαρξη φλεγμονών (Oliveira et al., 2012).

Γενικά, λοιπόν, είναι απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη της λειτουργίας της SIRT2, προκειμένου να εξακριβωθεί ο τρόπος που συμμετέχει στις ασθένειες που επέρχονται με τη γήρανση, προκειμένου να μπορέσουν να αντιμετωπιστούν ή και να προληφθούν οι ασθένειες αυτές.

1.3. Φυτά και βιοδραστικές ουσίες

1.3.1. *Cicer arietinum* (κν. Ρεβίθι)

Το ρεβίθι ανήκει στην κατηγορία των ψυχανθών και αποτελεί ένα από τα βρώσιμα όσπρια, παίζοντας σημαντικό ρόλο στη διατροφή του ανθρώπου παγκοσμίως από τα αρχαία χρόνια. Ο καρπός του φυτού αποτελεί σημαντική πηγή φυτικών



ινών, υδατανθράκων και πρωτεϊνών, ενώ διαθέτει λιπαρά οξέα (π.χ. λινολεϊκό και ολεϊκό οξύ), βιταμίνες (π.χ. ριβοφλαβίνη, νιασίνη, βιταμίνη Α), στερόλες (π.χ. β-σιτοστερόλη) και ιχνοστοιχεία (π.χ. Κ, Ca, Mg, Ρ) σε μικρότερες ποσότητες. Στην σύσταση του καρπού του εντοπίζονται επιπλέον βιοδραστικές ουσίες. Αρχικά, εντοπίζονται φυτικά καροτενοειδή, τα οποία αποτελούν υδατοδιαλυτές αντιοξειδωτικές ουσίες που ευθύνονται για το ανοιχτό χρώμα των διάφορων τμημάτων του φυτού. Τα καροτενοειδή διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τις ξανθοφύλλες και τα καροτένια. Οι ξανθοφύλλες είναι οξυγονωμένα καροτενοειδή που περιλαμβάνουν μόρια όπως η βιολαξανθίνη και η ζεαξανθίνη, ενώ τα καροτένια είναι μη οξυγονωμένα καροτενοειδή όπως το α-καροτένιο και το λυκοπένιο. Στους καρπούς του ρεβιθιού εντοπίζονται ακόμα φαινολικές ενώσεις όπως οι ισοφλαβόνες. Συγκεκριμένα εντοπίζονται μόρια βιοχανίνης (5,7-διυδροξυ-4'μεθοξυισοφλαβόνης) και φορμονονετίνης (7-υδροξυ-4'-μεθοξυισοφλαβόνης).

Τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί ότι η κατανάλωση του συγκεκριμένου καρπού έχει ευεργετικά αποτελέσματα για την υγεία του ανθρώπου, μέσω των βιοδραστικών ουσιών που διαθέτει, όπως οι φαινόλες, οι ολιγοσακχαρίτες, οι στερόλες και διάφορα μόρια που μπορεί να λειτουργούν ως αναστολείς ενζύμων. Τα στοιχεία αυτά είναι πιθανό να βοηθούν στην μείωση του κινδύνου προσβολής από χρόνιες παθήσεις. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι τα συστατικά του καρπού αυτού του φυτού βοηθούν στη ρύθμιση της χοληστερόλης και της πίεσης του αίματος, στις καρδιαγγειακές και στεφανιαίες παθήσεις, στον διαβήτη και σε περιπτώσεις καρκίνου. Επίσης διαθέτουν ουσίες που σχετίζονται με τη διαδικασία της γήρανσης, προστατεύουν την σωστή λειτουργία της όρασης και τη σωστή ανάπτυξη του σκελετικού συστήματος (Jukanti et al., 2012).

1.3.2. *Phaseolus vulgaris* (κν. Φασόλι)

Το φασόλι ανήκει στην κατηγορία των ψυχανθών (οικ. *Fabaceae*) και αποτελεί ένα από τα πιο δημοφιλή όσπρια. Κατάγεται από την ήπειρο της Αμερικής και αποτελεί τη σημαντικότερη πηγή πρωτεϊνών στη διατροφή των ανθρώπων σε χώρες της



Λατινικής Αμερικής και της Αφρικής. Υπάρχουν πολλές ποικιλίες φασολιού, στις οποίες το μέγεθος και το χρώμα του καρπού διαφέρουν. Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες μελέτες αναφέρονται στο φυτό αυτό, καθώς έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει ουσίες οι οποίες είναι ευεργετικές για την υγεία του ανθρώπου, όπως φυτικές ίνες, πολυφαινόλες, λεκτίνες, ακόρεστα λιπαρά οξέα, αναστολείς της θρυψίνης, φυτικό οξύ κ.α. Τα συστατικά αυτά φαίνεται ότι έχουν σημαντικές βιολογικές λειτουργίες στον οργανισμό όπως η αντιοξειδωτική και αντικαρκινική τους δράση και η παρεμπόδιση της μεταλλαξιγένεσης και του πολλαπλασιασμού μετασχηματισμένων κυττάρων.

Συγκεκριμένα, οι καρποί του φασολιού περιέχουν πολυφαινολικές ενώσεις οι οποίες καθορίζουν και το χρώμα του καρπού. Η βασική κατηγορία πολυφαινολών είναι τα φλαβονοειδή, όπως οι προανθοκυανιδίνες, οι γλυκοζίτες φλαβόνης, οι ανθοκυανίνες και οι τανίνες. Εμπεριέχουν ακόμα σημαντικές ποσότητες από λεκτίνες, όπως η φυτοαιμαγλουτίνη, που αποτελούν γλυκοκοπρωτεΐνες οι οποίες συνθέτουν ένα ετερογενές σύνολο πρωτεϊνών ανθεκτικών στην πρωτεόλυση που συμβαίνει στο στομάχι. Παρατηρούνται επίσης πολυαμίνες όπως η σπερμιδίνη, η σπερμίνη και η πουτρεσκίνη. Το θρεπτικό στοιχείο το οποίο βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα είναι οι υδατάνθρακες οι οποίοι μπορεί να φτάνουν το 55-65% της ξηρής μάζας και αποτελούνται από αμυλώδεις και μη-αμυλώδεις πολυσακχαρίτες, καθώς και από σημαντικούς μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες και ολιγοσακχαρίτες. Η συμμετοχή τους στη διατροφή είναι σημαντική καθώς συνδέονται με μείωση της χοληστερίνης, παχυσαρκίας και διαβήτη τύπου 2, ενώ επιπλέον μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου (Guevara-González & Torres-Pacheco, 2006).

1.3.3. *Taraxacum officinale* (κν. Ταραξάκο)

Το ταραξάκο είναι φυτό της οικογένειας *Asteraceae* και υπάγεται στην κατηγορία των φαρμακευτικών φυτών. Τμήματα του φυτού χρησιμοποιούνται σε διάφορες περιοχές του πλανήτη προκειμένου να θεραπεύσουν παθήσεις. Για παράδειγμα, η ρίζα του φυτού χρησιμοποιείται για την καλή



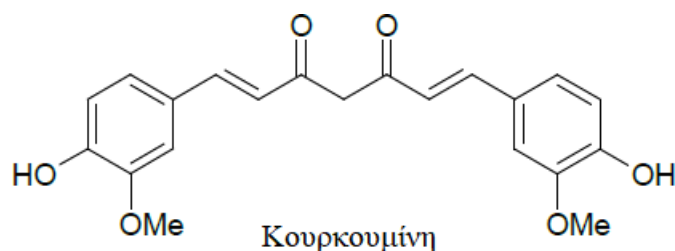
λειτουργία του πεπτικού συστήματος, υποβοηθώντας την πέψη και τη λειτουργία του ήπατος, ενώ τα φύλλα του χρησιμοποιούνται ως διουρητικά. Τα φύλλα του φυτού είναι πλούσια σε φυτικές ίνες, σίδηρο, ασβέστιο, μαγνήσιο, φώσφορο, βιταμίνη Α και C, καθώς και σε θυαμίνη και ριβοφλαβίνη οι οποίες ανήκουν στο σύμπλεγμα των πρωτεϊνών Β. Περιέχουν ακόμα σεσκιτερπένια, τα οποία είναι υπεύθυνα για την πικρή γεύση του ταραξάκου. Από φυτοχημικές αναλύσεις ως προς τις κατηγορίες των βιοδραστικών ουσιών που υπάρχουν στο φυτό, βγαίνει το συμπέρασμα ότι υπάρχουν ποσότητες από τανίνες, σαπωνίνες, φλαβονοειδή, τερπενοειδή, γλυκοσίδια, φαινόλες και αλκαλοειδή (Mir et al., 2013).

1.3.4. *Curcuma longa* (κν. Κουρκουμάς)

Ο κουρκουμάς είναι φυτό το οποίο ανήκει στην οικογένεια *Zingiberaceae*. Το γένος περιλαμβάνει 70 γνωστά είδη που χρησιμοποιούνται από τα αρχαία χρόνια ως μπαχαρικό, συντηρητικό φαγητού και ουσία που



προσδίδει το χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα. Το είδος *Curcuma longa* φύεται σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές ανά τον κόσμο. Έχει επίσης αναφερθεί ότι το φυτό αυτό διαθέτει φαρμακευτικές ιδιότητες, όπως αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή ή αντιφλεγμονώδη δράση και αποτρέπει την ανάπτυξη καρκίνου. Ακόμη, βοηθά στην αντιμετώπιση του διαβήτη, στην διατήρηση της πυκνότητας του αίματος, και στην τόνωση του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα βασικά βιοδραστικά προϊόντα τα οποία εμπεριέχονται στο φυτό ανήκουν στις κατηγορίες των τερπενοειδών, των φλαβονοειδών και των φαινολών σε μεγάλες ποσότητες. Ανιχνεύονται επίσης μικρότερες ποσότητες ταννινών, αλκαλοειδών, σαπωνινών και στεροειδών. Από αυτά, η πιο σημαντική κατηγορία είναι τα κουρκουμινοειδή, τα οποία αποτελούν φυσικές φαινόλες οι οποίες προσδίδουν το χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα στο φυτό και έχουν προστατευτικές δράσεις (Abdel-Lateef et al., 2016).



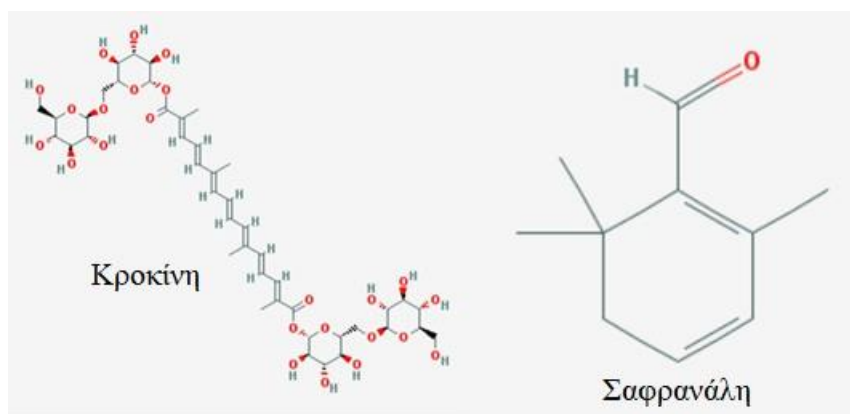
Εικόνα 1.5: Χημικός τύπος της κουρκουμίνης, του βασικού βιοδραστικού προϊόντος που εμπεριέχεται στο φυτό *Curcuma longa*.

1.3.5. *Crocus sativus* (κν. Σαφράν)

Το σαφράν είναι ένα από τα πιο σημαντικά φαρμακευτικά φυτά και ανήκει στην οικογένεια *Iridaceae* η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για τις αρωματικές και χρωστικές ιδιότητες των φυτών της. Μπορεί να καλλιεργηθεί σε χώρες όπως η Ελλάδα, το Ιράν, το Μαρόκο, η Ινδία, η



Ισπανία και η Ιταλία. Οι φαρμακευτικές ουσίες που διαθέτει έχουν πολύ σημαντικές αντιοξειδωτικές ικανότητες οι οποίες είναι απαραίτητες στον οργανισμό, προκειμένου να εξαλειφθούν οι επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες, οι οποίες ενδέχεται να οδηγήσουν σε σημαντικές ασθένειες όπως οι νευροεκφυλιστικές νόσοι Alzheimer's και Parkinson's, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο διαβήτης τύπου 2 ή ακόμα και ο καρκίνος. Τα τμήματα του φυτού τα οποία χρησιμοποιούνται είναι οι στήμονες και το άνθος, τα οποία έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν ένα μεγάλο εύρος βιοδραστικών ουσιών. Οι βασικές αντιοξειδωτικές ουσίες του κρόκου είναι τα καροτενοειδή κροκίνη, πικροκροκίνη και σαφρανάλη. Εκτός από αυτά, στα εκχυλίσματα του φυτού περιέχονται επιπλέον καροτενοειδή, όπως το λυκοπένιο και η ζεαξανθίνη, φλαβόνες και φαινόλες. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα συστατικά από το εκχύλισμα του σαφράν μπορούν να λειτουργούν ως πιθανό φάρμακο για διάφορες ασθένειες ή ως συμπληρώματα διατροφής (Rahaiee et al.,2014).



Εικόνα 1.6: Οι δύο βασικές βιοδραστικές ουσίες του φυτού *Crocus sativus*, κροκίνη και σαφρανάλη.

1.3.6. *Hibiscus sp.* (κν. Ιβίσκος)

Ο ιβίσκος είναι ένα μονοετές φυτό το οποίο κατάγεται από την Ασία και ανήκει στην οικογένεια *Malvaceae*. Τα άνθη, τα φύλλα και οι ρίζες του χρησιμοποιούνται ευρέως ως αφέψημα, ενώ ταυτόχρονα χρησιμοποιείται και ως φαρμακευτικό φυτό για την



καταπολέμηση της υπέρτασης, της παραγωγής χοληστερίνης και της ανάπτυξης καρκινικών όγκων. Τα εκχυλίσματα του φυτού έχουν επίσης αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση εξαιτίας των βιοδραστικών συστατικών τους όπως οι ανθοκυανίνες (π.χ. γλυκοσίδιο της 3-δελφινιδίνης, γλυκοσίδιο της 3-κυανιδίνης), φλαβονοειδή (π.χ. γκοσσυπετίνη και κερσετίνη), τα οργανικά οξέα (π.χ. κιτρικό και υδροξυκιτρικό οξύ) και οι πολυσακχαρίτες. Οι φαρμακευτικές και διατροφικές ιδιότητες που προσδίδουν τα μόρια αυτά στον ιβίσκο, το καθιστούν ένα φυτό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία φαρμάκων και τροφίμων, ως φυσικό πρόσθετο (Jabeura et al., 2017).

1.3.7. *Cinamomum verum* (κν. Κανέλα)

Το φυτό της κανέλας ανήκει στην οικογένεια *Lauraceae* και αποτελεί ένα αρωματικό φυτό. Χρησιμοποιείται από τα αρχαία χρόνια για φαρμακευτικούς και διατροφικούς λόγους, ενώ στη συνέχεια εξαιτίας των



ευχάριστων ιδιοτήτων της χρησιμοποιήθηκε και σε καλλυντικά. Ο τόπος καταγωγής του φυτού είναι η Σρι Λάνκα και η Ινδία. Το φυτό έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε έλαια και άλλες βιοδραστικές φαινολικές ουσίες, όπως η κινναμαλδεΐδη, το κινναμωνικό οξύ και η ευγενόλη. Υπάρχουν ενδείξεις ότι βοηθάει στη θεραπεία ασθενειών όπως ο διαβήτης το Alzheimer και το Parkinson. Επίσης διαθέτει αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδη δράση και έχει χρησιμοποιηθεί προκειμένου να ελεγχθεί η περιεκτικότητα γλυκόζης στο αίμα (Andrade et al., 2016).

1.3.8. *Sesamum indicum* (κν. Σουσάμι)

Το σουσάμι προέρχεται από σπόρους του φυτού *Sesamum indicum* της οικογένειας *Pedaliaceae* και αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα φυτά παραγωγής ελαίων. Υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τις επιδράσεις του σουσαμιού στην υγεία, καθώς υπάρχουν



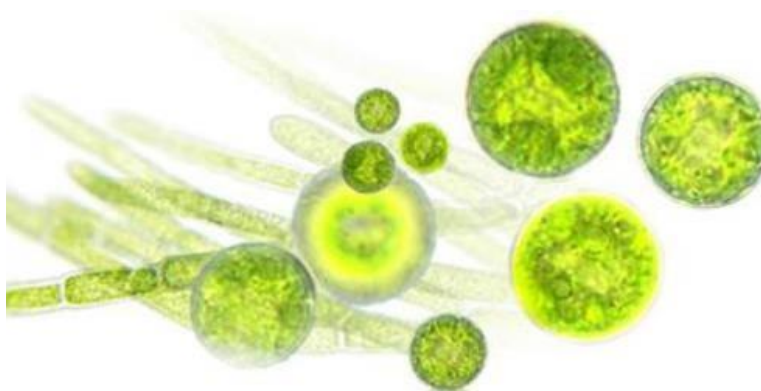
ενδείξεις ότι μπορεί να λειτουργεί ευεργετικά στη μείωση της χοληστερίνης, στη μείωση του κινδύνου καρδιοπάθειας, αρθροσκλήρυνσης και των ασθενειών που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες. Ακόμα διαθέτει αντιφλεγμονώδη δράση και εμποδίζει τη δημιουργία μεταλλάξεων. Οι ιδιότητες αυτές θεωρείται σε ολόένα και μεγαλύτερο βαθμό, ότι προέρχονται από τις ουσίες σεσαμίνη, σεσαμολίνη, σεσαμόλη

και σεσαμινόλη, οι οποίες υπάρχουν ειδικά στο φυτό αυτό. Επιπλέον, οι σπόροι σουσαμιού περιέχουν φαινολικές ουσίες, όπως φερουλικό οξύ, και το π-κουμαρικό οξύ (Bodoira et al., 2017).

1.3.9. Μικροφύκη

Μια κατηγορία οργανισμών η οποία έχει προσελκύσει τα ενδιαφέρον πολλών ερευνητών είναι τα μικροφύκη.

Υπάρχουν πολλά γένη μικροφυκών



όπως για παράδειγμα τα *Phaeodactylum*, *Tetraselmis*, *Nannochloropsis*, *Porphyridium*, *Cryptocodinium*, *Odontella*, *Pavlova*, *Porphyridium*, *Cryptocodinium*, *Schizochytrium*, *Isochrysis*, *Haematococcus*. Οι ιδιότητες που έχουν εφαρμόζονται σε διάφορους τομείς, όπως για παράδειγμα στη διατροφή του ανθρώπου και των υδατοκαλλιεργειών ως βιολογικά λιπάσματα ή στη διαχείριση των αποβλήτων ως αντιαλγικοί και αντιαλλεργικοί παράγοντες. Ένας άλλος όμως τομέας πολύ σημαντικός, είναι οι εφαρμογές που έχουν ουσίες που παράγονται από τα μικροφύκη, όπως για παράδειγμα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, στερόλες, χρωστικές, πρωτεΐνες και ένζυμα, βιταμίνες κ.α. στην υγεία του ανθρώπου.

Έχει αποδειχθεί ότι κάθε γένος έχει διαφορετικές ευεγερτικές ιδιότητες στην υγεία. Ανάλογα με το γένος, λοιπόν, και τις βιοδραστικές ουσίες που το κάθε ένα εμπεριέχει, μπορεί να διαθέτουν αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή λειτουργία, καθυστερούν τη διαδικασία της γήρανσης, εντείνουν την ανάπτυξη του εγκεφάλου, βοηθούν στην διατήρηση της σωστής πυκνότητας του αίματος και μειώνουν τη χοληστερίνη. Επίσης χρησιμοποιούνται ως συμπληρώματα διατροφής. Οι κατηγορίες των ενώσεων που διαθέτουν είναι απαραίτητα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, στερόλες, χρωστικές ουσίες καθώς και διάφορες πρωτεΐνες και ένζυμα (Filomena et al., 2013).

1.4. Σκοπός της εργασίας

Στη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή εργασία, μελετήθηκε η επίδραση βιοδραστικών εκχυλισμάτων που προέρχονται από φυτά και μικροφύκη, στην δραστικότητα του ενζύμου SIRT2. Επιπλέον, μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων αυτών και η περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ενώσεις. Τέλος, σε δεκτικά και εκφραστικά κύτταρα κλωνοποιήθηκε το γονίδιο που εκφράζει τη SIRT2 προκειμένου να αναλυθεί η διαδικασία και να καθαριστεί το ένζυμο. Οι χειρισμοί αυτοί μπορούν να βοηθήσουν στην ανακάλυψη συστατικών των εκχυλισμάτων, τα οποία επηρεάζουν το ένζυμο, καταστέλλοντας ή ενεργοποιώντας τη λειτουργία του. Το γεγονός αυτό έχει μεγάλη σημασία, καθώς γνωρίζουμε ότι οι σιρτουίνες εμπλέκονται σε διάφορες παθήσεις του ανθρώπινου οργανισμού, όπως για παράδειγμα οι διαδικασίες της γήρανσης, ο διαβήτης τύπου 2, οι νευροεκφυλιστικές νόσοι και ο καρκίνος, και ανάλογα με τα δεδομένα κάθε περίπτωσης, η αύξηση ή η μείωση των επιπέδων των ενεργών ενζύμων θα μπορούσε να βοηθήσει στη θεραπεία ή την πρόληψη των ασθενειών αυτών. Τα αποτελέσματα της έρευνας, λοιπόν, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στο σχεδιασμό φαρμάκων και καλλυντικών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Υλικά

2.1.1. Βιολογικά υλικά

Στη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, έχοντας ως στόχο την κλωνοποίηση και την έκφραση του γονιδίου της SIRT2, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pEXP5-CT/TOPO® της εταιρίας Invitrogen, στον οποίο κλωνοποιήθηκε το γονίδιο επιλογής. Ακόμη, χρησιμοποιήθηκαν τα δεκτικά κύτταρα *E. coli* Stellar της εταιρίας Takara τα οποία αρχικά μετασχηματίστηκαν και εξέφρασαν το γονίδιο αυτό. Στη συνέχεια, προκειμένου να επιτευχθεί έκφραση μεγαλύτερης κλίμακας της πρωτεΐνης SIRT2, χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον τα εκφραστικά κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) και Rosetta™(DE3), τα οποία προήλθαν από την εταιρία Novagen. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η αμπικιλίνη (100 mg/mL) για τα πρώτα, και ο συνδυασμός αμπικιλίνης και χλωραμφενικόλης (33 mg/mL) για τα δύο επόμενα.

2.1.2. Ένζυμα και πρωτεΐνες

Στη διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε το μίγμα Clone AMP HiFi PCR Premix, της εταιρίας Takara Bio (Η.Π.Α.) και η KAPA Taq πολυμεράση από τον οίκο KAPA Biosystems (Η.Π.Α.). Επιπλέον για την ενίσχυση των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε το μίγμα Cloning Enhancer (Takara Bio, Η.Π.Α.).

2.1.3. Ουσίες που μελετήθηκαν

Στη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας μελετήθηκαν φυτικά εκχυλίσματα προκειμένου να ελεγχθεί η αλληλεπίδραση που παρουσίαζαν με το ένζυμο SIRT2. Τα φυτά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1:

Πίνακας 2.3: Προέλευση εκχυλισμάτων που δημιουργήθηκαν κατά την πορεία της πειραματικής διαδικασίας.

ΕΙΔΟΣ ΦΥΤΟΥ	ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ	ΛΑΤΙΝΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΤΜΗΜΑ-ΜΟΡΦΗ	ΕΙΔΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ
Όσπρια	Ρεβίθι	<i>Cicer arietinum</i>	Καρπός	Φωσφορικό /Μεθανολικό
	Φασόλι	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Καρπός	Φωσφορικό /Μεθανολικό
Βότανα	Ιβίσκος	<i>Hibiscus sp.</i>	Άθος	Μεθανολικό
	Κουρκουμάς	<i>Curcuma longa</i>	Σκόνη από ρίζα	Μεθανολικό
	Σαφράν	<i>Crocus sativus</i>	Στήμονες	Φωσφορικό /Μεθανολικό
	Κανέλα	<i>Cinnamomum verum</i>	Σκόνη από φλοιό	Φωσφορικό
	Ταραξάκο	<i>Taraxacum officinale</i>	Φύλλα	Μεθανολικό
	Σουσάμι	<i>Sesamum indicum</i>	Καρπός	Φωσφορικό
Φύκη	<i>Phaeodactylum sp.</i>	<i>Phaeodactylum sp.</i>	Λυοφιλιωμένα κύτταρα	Φωσφορικό/Μεθανολικό
	<i>Tetraselmis sp.</i>	<i>Tetraselmis sp.</i>		Φωσφορικό/Μεθανολικό
	<i>Nannochloropsis sp.</i>	<i>Nannochloropsis sp.</i>		Φωσφορικό

2.1.4. Χημικά αντιδραστήρια και λοιπά

Στη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια:

Για τα θρεπτικά διαλύματα βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα ζύμης, πεπτόνη, χλωριούχο νάτριο (NaCl) και άγαρ. Για τα διαλύματα εκχύλισης δις – όξινο φωσφορικό κάλιο (KH₂PO₄) και Μεθανόλη (MeOH). Τα αντιβιοτικά αμικιλίνη και χλωραμφενικόλη. Για τις μετρήσεις στα εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν ο τριχλωριούχος σίδηρος (FeCl₃), η 2,4,6-τριπυριδιλο-S-τριαζίνη (TPTZ), ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου (CH₃COONa), το ασκορβικό οξύ, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, το γαλλικό οξύ, ανθρακικό νάτριο (Na₂CO₃), τα αντιδραστήρια Trolox (6-υδροξύ - 2,5,7,8 – τετραμεθυλοχρωμανο – 2 - καρβοξυλικό οξύ), 2,2' – Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) και 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), η χρωστική fluorescein, η αλβουμίνη ορού μόσχου (BSA).

Ακόμα χρησιμοποιήθηκαν αγαρόζη, γλυκερόλη, TEMED, δωδεκανοθειικό νάτριο (SDS), υπερθειικό αμμώνιο (APS), ακρυλαμίδα, μερκαπταιθανόλη, το ρυθμιστικό

Trizma – Base, ο επαγωγέας έκφρασης ισοπροπυλο-β-θειογαλακτο-πυρανοζίδιο (IPTG) και η χρωστική Coomassie Brilliant Blue (G-250).

Οι εκκινητές της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, συντέθηκαν και καθαρίστηκαν στην Eurofins (Αυστρία). Κατά την ηλεκτροφόρηση του DNA χρησιμοποιήθηκε ο μοριακός δείκτης 1Kb DNA ladder, και κατά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών ο δείκτης μοριακών μαζών BlueStar Prestained Protein Marker της εταιρίας Nippon Genetics (Ιαπωνία).

Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν τα εμπορικά πακέτα (Kits) SIRT2 Inhibitor Screening Assay Kit (Sigma-Aldrich, Η.Π.Α.), In-Fusion ® HD Cloning Kit (Takara Bio, Η.Π.Α.) και NucleoSpin Plasmid (Macherey – Nagel).

2.1.5. Εξοπλισμός

- Για τη ζύγιση των αντιδραστηρίων, των φυτικών ιστών και των υποστρωμάτων χρησιμοποιήθηκαν ο φαρμακευτικός ζυγός METTLER PM2500 και ο αναλυτικός ζυγός METTLER AT261.
- Η μέτρηση του pH πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του pH – μέτρου ORION 410A
- Η ταχεία ανακίνηση διαλυμάτων έγινε με τη χρήση Vortex mixer της εταιρίας Stuart (μοντέλο SA8).
- Για τη διάλυση αντιδραστηρίων προκειμένου να δημιουργηθούν διαλύματα χρησιμοποιήθηκε επίσης η συσκευή υπερήχων (Ultra Sonik) της εταιρίας NEY (μοντέλο 28H).
- Για τη φυγοκέντριση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η φυγόκεντρος erppendorf Heraeus primo της εταιρίας Biofuge.
- Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε με φασματοφωτόμετρο Lambda – Bio, ορατού - υπεριώδους (UV/Vis), μονής δέσμης της εταιρίας Perkin – Elmer.
- Ως υδατόλουτρο χρησιμοποιήθηκε συσκευή της εταιρίας Stuart.
- Συσκευή επώασης βακτηριακών καλλιεργειών.
- Φθορισμόμετρο με υποδοχή πλακέτας τύπου ELISA.
- Συσκευή για την πραγματοποίηση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

- Συσκευή λυοφιλίωσης.
- Θάλαμος αποστείρωσης.
- Μηχανικές πιπέτες (Gilson).

2.1.6. Προγράμματα ηλεκτρονικού υπολογιστή

- Microsoft Excel
- GraphPad Prism 7.00

2.1.7. Υαλικά και πλαστικά αναλώσιμα

- Πλαστικά ακρορύγχια (tips), (Greiner Bio-one)
- Πλαστικά σωληνάρια erpendorfs (1,5 και 2 ml), (Greiner)
- Πλαστικές κυβέτες μιας χρήσεως (Greiner Bio-one)
- Πλαστικοί σωλήνες των 15 ml (Falcon)
- Μembrάνες διαπίδυσης (Spectrum)
- Τρυβλία Petri
- Κωνικές φιάλες και δοχεία
- Γουδί και γουδοχέρι
- Σπάτουλες

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Εκχύλιση ουσιών φυτικών ιστών

A) Εκχύλιση με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH₂PO₄)

Ο πρώτος τρόπος εκχύλισης ουσιών από φυτικά δείγματα, που χρησιμοποιήθηκε στη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, συμπεριλάμβανε τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH₂PO₄), συγκέντρωσης 20mM με pH = 7. Η διαδικασία εκχύλισης που ακολουθήθηκε για κάθε ένα από τα δείγματα αποτελείτο από τα παρακάτω βήματα:

- ✓ Μέτρηση συγκεκριμένης ποσότητας φυτικού ιστού σε ζυγό ακριβείας.
- ✓ Μεταφορά της ποσότητας αυτής του φυτικού ιστού στο γουδί και προσθήκη τριπλάσιου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος KH₂PO₄.

- ✓ Σύνθλιψη του φυτικού ιστού με το γουδοχέρι προκειμένου να πολτοποιηθεί και να γίνει μια ενιαία μάζα με το ρυθμιστικό διάλυμα (σε περίπτωση που το διάλυμα ήταν ιδιαίτερα παχύρευστο προστέθηκε επιπλέον ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος).
- ✓ Μεταφορά του μίγματος σε erpendorf των 2mL με τη χρήση σπάτουλας.
- ✓ Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 13.000 rpm για 6 λεπτά.
- ✓ Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα erpendorf των 2mL.
- ✓ Αποθήκευση των φωσφορικών εκχυλισμάτων στους -20°C .

B) Εκχύλιση με χρήση διαλύματος μεθανόλης/νερού (MeOH/ ddH₂O)

Ο δεύτερος τρόπος εκχύλισης ουσιών από φυτικά δείγματα, που χρησιμοποιήθηκε στη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, συμπεριλάμβανε τη χρήση μίγματος μεθανόλης με νερό, ως διαλύτη. Η αναλογία με την οποία κατασκευάστηκε το μίγμα ήταν 70% (v/v) μεθανόλη (MeOH) και 30% (v/v) δις – απιονισμένο νερό (ddH₂O). Η διαδικασία εκχύλισης που ακολουθήθηκε για κάθε ένα από τα δείγματα, αποτελείτο από τα παρακάτω βήματα:

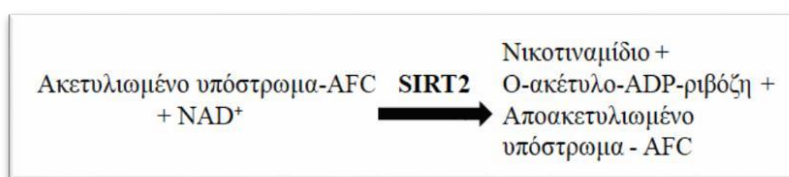
- ✓ Μέτρηση συγκεκριμένης ποσότητας φυτικού ιστού σε ζυγό ακριβείας.
- ✓ Σύνθλιψη των τμημάτων του φυτικού ιστού με το γουδοχέρι.
- ✓ Μεταφορά των τμημάτων φυτικού ιστού σε γυάλινο δοχείο και προσθήκη τριπλάσιου όγκου διαλύματος εκχύλισης.
- ✓ Κλείσιμο του δοχείου και τύλιγμα αυτού με αλουμινόχαρτο προς αποφυγή της διάβρωσης λόγω φωτός.
- ✓ Τοποθέτηση των δοχείων σε πάγο και ήπια ανάδευση αυτών για μισή ώρα.
- ✓ Μεταφορά του μίγματος σε erpendorf (2mL).
- ✓ Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 13.000 rpm για 6 λεπτά.
- ✓ Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο erpendorf (2mL).
- ✓ Αποθήκευση των μεθανολικών εκχυλισμάτων στους -20°C .

2.2.2. Μέτρηση αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου SIRT2 με χρήση τυποποιημένου εμπορικού πακέτου (SIRT2 Inhibitor Screening Assay Kit)

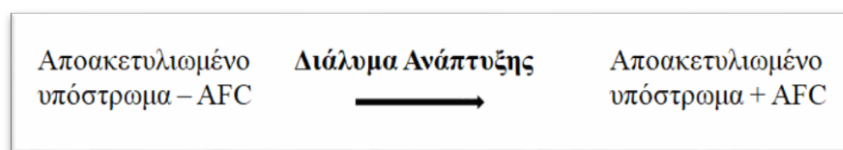
Στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε, χρησιμοποιήθηκε το τυποποιημένο εμπορικό πακέτο *SIRT2 Inhibitor Screening Assay Kit*, της εταιρίας Sigma – Aldrich, η χρήση

του οποίου επιτρέπει την εύρεση πιθανών αναστολέων ή ενεργοποιητών του ενζύμου SIRT2. Ακόμη, για τις απαραίτητες μετρήσεις, χρησιμοποιήθηκε μια μαύρη πλακέτα τύπου ELISA και ένα φθορισμόμετρο.

Συγκεκριμένα, σε μια θέση της πλακέτας, τοποθετήθηκε αρχικά συγκεκριμένη ποσότητα ενζύμου SIRT2 και ρυθμιστικού διαλύματος, και αφέθηκε να επωαστεί για 5 λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια προστέθηκε το διάλυμα που συμπεριλαμβάνει το υπόστρωμα και το συμπράγοντα NAD⁺. Το μίγμα αφέθηκε να επωαστεί για 60 λεπτά στο σκοτάδι στους 37°C. Με τον τρόπο αυτό εκτελέστηκε το πρώτο βήμα της αντίδρασης, στο οποίο το ακετυλιωμένο υπόστρωμα που φέρει ταυτόχρονα και μια χρωμοφόρο ομάδα (AFC), αποακετυλιώθηκε με τη δράση του ενζύμου SIRT2, παρουσία του συμπράγοντα Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (NAD⁺). Μετά το πέρας της αντίδρασης παράχθηκαν νικοτιναμίδιο, Ο-ακετυλο-ADP-ριβόζη και το αποακετυλιωμένο υπόστρωμα που φέρει ακόμα τη φθορίζουσα ομάδα.



Στη συνέχεια, προστέθηκε στη θέση της πλακέτας συγκεκριμένη ποσότητα διαλύματος ανάπτυξης, και το μίγμα αφέθηκε να επωαστεί εκ νέου για 10 λεπτά στους 37°C σε συνθήκες σκότους. Με τον τρόπο αυτό εκτελέστηκε το δεύτερο βήμα της αντίδρασης, στο οποίο το διάλυμα ανάπτυξης, προκάλεσε την απελευθέρωση της φθορίζουσας ομάδας από το αποακετυλιωμένο υπόστρωμα.



Η φθορίζουσα ομάδα που παράγεται μετά το πέρας και των δύο βημάτων της αντίδρασης μπορεί να ανιχνευθεί στα μήκη κύματος Excitation/Emission = 395/541 nm.

Στην περίπτωση που υπάρχει στο μίγμα ένας αναστολέας της λειτουργίας του ενζύμου SIRT2, η αποακετυλίωση θα εμποδιστεί, αποτρέποντας την αποκοπή του υποστρώματος και κατ'επέκταση την απελευθέρωση της φθορίζουσας ομάδας. Για

την πραγματοποίηση του ελέγχου αν μια ουσία αποτελεί αναστολέα ή ενεργοποιητή του ενζύμου, η ουσία προστίθεται στο πρώτο βήμα της αντίδρασης.

Για την ποσοτικοποίηση της αναστολής ή της ενεργοποίησης που υπάρχει κάθε φορά καταγράφονται κάθε φορά δύο τιμές απορρόφησης στη διάρκεια του πειράματος. Μια στο τέλος του πρώτου βήματος (R_0) και μια στο τέλος του δεύτερου βήματος (R_1). Επίσης χρησιμοποιείται και πάντα μια αντίδραση μάρτυρας (control), στην οποία δεν προστίθεται καθόλου ποσότητα αναστολέα (EC). Για τον υπολογισμό της αναστολής ή ενεργοποίησης επί τα εκατό χρησιμοποιείται ο Τύπος 1:

$$\% \text{ Αναστολή} = [(\Delta\text{RFU EC} - \Delta\text{RFU S}) / \Delta\text{RFU EC}] \times 100\% \quad (1)$$

Όπου:

$\Delta\text{RFU EC}$: Διαφορά μετρήσεων απορρόφησης του μάρτυρα ($R_{1\text{EC}} - R_{0\text{EC}}$)

$\Delta\text{RFU S}$: Διαφορά μετρήσεων απορρόφησης του δείγματος ($R_{1\text{S}} - R_{0\text{S}}$)

Σε περίπτωση που η επί τα εκατό αναστολή είναι αρνητική, σημαίνει ότι το εκχύλισμα που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη αντίδραση προκαλεί ενεργοποίηση της ενζυμικής δραστηριότητας.

2.2.3. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων

A) Προσδιορισμός συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο ORAC

Για τη μέτρηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων στη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*). Πρόκειται για μια γρήγορη και αποτελεσματική μέθοδο που εφαρμόζεται για μετρήσεις σε διατροφικά και φαρμακευτικά προϊόντα καθώς και σε τρόφιμα.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη μέτρηση της οξείδωσης που προκαλείται στις ελεύθερες ρίζες μιας φθορίζουσας ουσίας, μέσω της αλλαγής στην ένταση του φθορισμού της, με τη χρήση ενός φθορισμόμετρου. Όσο περισσότερο οξειδώνονται οι ελεύθερες ρίζες της χρωστικής λόγω του εκχυλίσματος το οποίο υπάρχει και συμμετέχει στην αντίδραση, τόσο μειώνεται και η τιμή του φθορισμού που μετράται.

Κατά την εκτέλεση της μεθόδου καταγράφονται διαδοχικές μετρήσεις (time scan), οι οποίες δημιουργούν μια καμπύλη που στην πορεία της αντίδρασης προσεγγίζει τον άξονα x καθώς μειώνεται η ένταση του φθορισμού και τελικά μηδενίζει. Ο χρόνος και ο ρυθμός με τον οποίο θα φτάσει η καμπύλη τον άξονα, εξαρτάται από την αντιοξειδωτική ικανότητα του διαλύματος της αντίδρασης. Υπολογίζοντας το εμβαδόν που σχηματίζεται στην περιοχή κάτω από την καμπύλη (Area Under Curve, AUC) και αφαιρώντας τις τιμές απορρόφησης ενός διαλύματος μάρτυρα (control), βρίσκεται τελικά το τελικό εμβαδόν που αντιστοιχεί στην αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Συγκρίνοντάς το εμβαδό αυτό με μια πρότυπη καμπύλη, είναι δυνατή η αναγωγή του σε περιεκτικότητα αντιοξειδωτικών ουσιών του κάθε εκχυλίσματος (Gillespie et al., 2007).

Για την εκτέλεση της μεθόδου είναι απαραίτητα τα εξής διαλύματα:

1) Ρυθμιστικό διάλυμα:

Φωσφορικό κάλιο, συγκέντρωσης 75 mM και pH=7.

2) Χρωστική Fluorescein (Sigma):

Αρχικά, προετοιμάστηκε ένα διάλυμα stock, συγκέντρωσης 4,2 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (75 mM, pH=7). Ο συνολικός όγκος χωρίστηκε σε μικρότερα κλάσματα και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία -80°C και σε συνθήκες σκότους. Πριν από κάθε πείραμα, προετοιμάστηκε εκ νέου ένα διάλυμα χρωστικής, στο οποίο το πυκνό διάλυμα που είχε αποθηκευτεί αραιώνεται σε συγκέντρωση 4,2 μM με το ίδιο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα. Συγκεκριμένα 2μL πυκνής χρωστικής διαλύθηκαν σε 2mL ρυθμιστικού διαλύματος. Κατά τη διάρκεια του πειράματος διατηρείτο σε σκοτεινό δοχείο στον πάγο.

3) AAPH: 2,2'-A-Azobis-2-methyl-propanimidamide, dihydrochloride (Cayman Chemical):

Σε 10 mL φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (75 mM, pH=7), διαλύθηκαν 0,4g AAPH, προκειμένου να δημιουργηθεί διάλυμα συγκέντρωσης 150 mM. Κατά τη διάρκεια του πειράματος διατηρείτο σε σκοτεινό δοχείο στον πάγο για μέγιστη διάρκεια 8 ωρών.

Για τη δημιουργία της πρότυπης είναι επίσης απαραίτητο το εξής διάλυμα:

4) Trolox: 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid(Calbiochem):

Χρήση για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης. Προετοιμάστηκε ένα stock διάλυμα Trolox, συγκέντρωσης 20 mM, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (75mM, pH=7). Η συνολική ποσότητα του διαλύματος διαιρέθηκε σε μικρότερα κλάσματα τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -80°C, σε συνθήκες σκότους. Πριν από την εκτέλεση του πειράματος, δημιουργήθηκε από το stock διάλυμα, ένα νέο αραιωμένο διάλυμα Trolox, συγκέντρωσης 2 mM.

Η ακριβής διαδικασία που ακολουθήθηκε για τις μετρήσεις στα δείγματα και για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης συνοψίζεται στα παρακάτω βήματα:

Σε κυψελίδα τελικού όγκου 4 mL, προστέθηκαν 3,494 mL φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα και 6μL χρωστικής ουσίας συγκέντρωσης 4,2 μM. Στη συνέχεια προστέθηκε δείγμα ή ποσότητα διαλύματος trolox (στην περίπτωση της πρότυπης καμπύλης), όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.2:

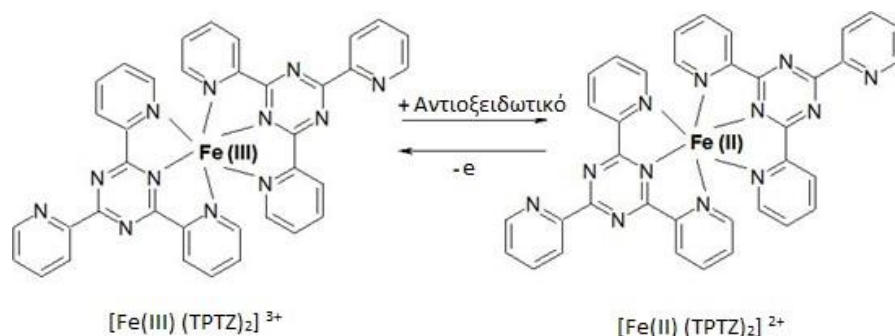
Πίνακας 2.4: Ποσότητες φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος, χρωστικής ουσίας και διαλύματος trolox ή δείγματος που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης και τις μετρήσεις των δειγμάτων αντίστοιχα.

	Μάρτυρας	Δείγμα	Διάλυμα Trolox (2mM) για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης				
			1	2	3	4	5
Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (75mM, pH=7) (μL)	3.494	3.494 - X	3.493,5	3.493	3.492	3.491	3.489
Χρωστική ουσία (μL)	6	6	6	6	6	6	6
Trolox (2mM) (μL)	-	-	0,5	1	2	3	5
Δείγμα (μL)	-	X	-	-	-	-	-
Τελικός όγκος (mL)	4	4	4	4	4	4	4

Στη συνέχεια, η κυψελίδα επώαστηκε σε υδατόλουτρο, στους 37°C για 10 λεπτά. Μετά το πέρας του χρόνου προστέθηκαν 500 μL διαλύματος AAPH και ξεκίνησε αμέσως η ανάγνωση του φθορισμού του διαλύματος για περίπου 40 λεπτά (μέχρις ότου η καμπύλη που δημιουργείται να φτάσει στον άξονα x). Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν τα μήκη κύματος Excitation/Emission = 485/530nm.

B) Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο FRAP

Η μέθοδος FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), είναι επίσης μια γρήγορη και απλή μέθοδος προσδιορισμού της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων. Εφαρμόστηκε αρχικά σε πλάσμα αίματος, αλλά στη συνέχεια οι εφαρμογές της επεκτάθηκαν και σε άλλα βιολογικά υλικά. Βασίζεται στην αναγωγή του συμπλόκου του τρισθενούς σιδήρου (Fe^{3+}) με το αντιδραστήριο TPTZ (2,4,6-τριπυριδιλο-s-τριαζίνη), εξαιτίας των αντιοξειδωτικών παραγόντων του εκχυλίσματος. Μετά την αναγωγή, δημιουργείται το σύμπλοκο Fe^{2+} - TPTZ, το οποίο έχει έντονο μπλε χρώμα. Η μεταβολή στο χρώμα του διαλύματος, αντικατοπτρίζει την αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Όσο πιο έντονο είναι το μπλε χρώμα, τόσο μεγαλύτερη και η αντιοξειδωτική ικανότητα. Η μέτρηση της απορρόφησης γίνεται στα 593 nm και εκφράζεται ποσοτικά σε σχέση με μια πρότυπη καμπύλη (Benzie & Strain, 1996).



Εικόνα 2.7: Το σύμπλοκο Fe^{3+} - TPTZ μετατρέπεται σε σύμπλοκο Fe^{2+} - TPTZ, με τη δράση των αντιοξειδωτικών παραγόντων των εκχυλισμάτων και αντίστροφα.

Για την εκτέλεση της μεθόδου χρησιμοποιούνται τα παρακάτω διαλύματα:

- Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου (CH_3COONa) συγκέντρωσης 300 mM και $\text{pH}=6$.
- Διάλυμα τριχλωριούχου σιδήρου (FeCl_3) συγκέντρωσης 20 mM, διαλυμένο στο ρυθμιστικό διάλυμα.
- Διάλυμα 2,4,6-τριπυριδιλο-s-τριαζίνης (TPTZ) συγκέντρωσης 10 mM, διαλυμένο σε 40 mM υδροχλώριο (HCl).

Τα τρία διαλύματα αναμιγνύονται σε αναλογία 10:1:1 (10mL ρυθμιστικού διαλύματος, 1mL τριχλωριούχος σίδηρος, 1mL διαλύματος TPTZ). Το τελικό διάλυμα πρέπει να έχει χρώμα ελαφρώς πορτοκαλί.

Συγκεκριμένα σε κάθε κυψελίδα προστίθενται τα αντιδραστήρια που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3:

Πίνακας 2.5: Ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο FRAP.

Αντιδραστήριο	Μάρτυρας (μL)	Δείγμα (μL)	Τυφλό (μL)
FRAP	980	980	-
Εκχύλισμα	-	X	X
ddH ₂ O	20	20 - X	1000 - X
Σύνολο	1000	1000	1000

Μετά την προσθήκη των αντιδραστηρίων στις κυψελίδες, όλα τα δείγματα επωάζονται για 5 λεπτά στους 25°C και σε συνθήκες σκότους. Εξαίρεση αποτελούν τα εκχυλίσματα που προέρχονται από φύκη, τα οποία επωάζονται για 3 λεπτά. Στη συνέχεια μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση που παρουσίαζαν στα 593 nm.

Σημείωση: Στην περίπτωση των φωσφορικών εκχυλισμάτων από ρεβίθι και φασόλι παρατηρήθηκε η παρουσία ιζήματος το οποίο επέφερε λάθος μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης. Για πιο αξιόπιστα αποτελέσματα πριν από τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης προηγήθηκε φυγοκέντρηση στις 9.000 rpm για 2 λεπτά και μεταφορά του υπερκειμένου σε κυψελίδα, προς φωτομέτρηση.

Για το σχηματισμό της πρότυπης καμπύλης δημιουργήθηκε stock διάλυμα ασκορβικού οξέος, συγκέντρωσης 1 mM. Χρησιμοποιώντας διαφορετικές ποσότητες από το διάλυμα αυτό, δημιουργήθηκαν επτά κυψελίδες με συγκεντρώσεις 0,2,4,6,10,14 και 18 μL/mL ασκορβικού οξέος αντίστοιχα. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.4.

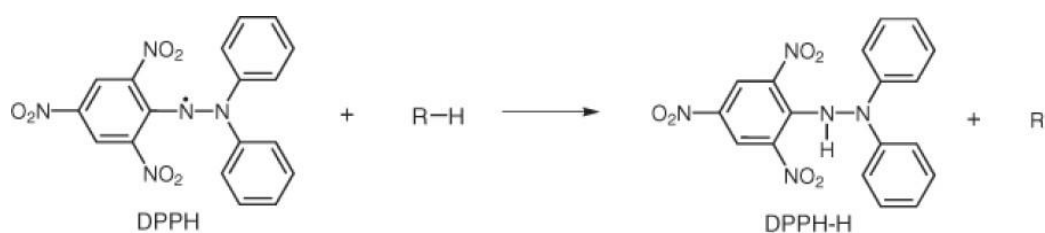
Πίνακας 2.6: Ποσότητες αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης ασκορβικού οξέος για το προσδιορισμό της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε αντιοξειδωτικές ουσίες με τη μέθοδο FRAP.

Αντιδραστήριο	Μάρτυρας (μL)	1 (μL)	2 (μL)	3 (μL)	4 (μL)	5 (μL)	6 (μL)
FRAP	980	980	980	980	980	980	980
Ασκορβικό οξύ	0	2	4	6	10	14	18
ddH₂O	20	18	16	14	10	6	2
Σύνολο	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Σημείωση: Δημιουργήθηκαν 2 πρότυπες καμπύλες. Μια στην οποία τα δείγματα αφέθηκαν να επωαστούν για 3 λεπτά, και μια στην οποία αφέθηκαν 5 λεπτά. Για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας κάθε εκχυλίσματος χρησιμοποιείται η πρότυπη καμπύλη με τον ανάλογο χρόνο επώασης.

Γ) Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•

Μια γρήγορη, απλή και φθηνή μέθοδος προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων, εμπεριέχει το αντιδραστήριο 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Το αντιδραστήριο αυτό ελέγχει το κατά πόσο τα συστατικά του εκχυλίσματος μπορούν να δρουν ως απενεργοποιητές ελευθέρων ριζών ή δότες κατιόντων υδρογόνου. Αξιολογεί δηλαδή, την αντιοξειδωτική ικανότητά τους, βασισόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή αζωτούχα ρίζα 1,1 διφαινυλ-2πικρυλυδραζύλιο (DPPH•).



Εικόνα 2.8: Το σύμπλοκο DPPH, το οποίο παρουσία αντιοξειδωτικής ουσίας ανάγεται σε DPPH-H

Συγκεκριμένα, η μέθοδος βασίζεται στην αναγωγή του DPPH, το οποίο είναι μια σταθερή ελεύθερη ρίζα. Το αντιδραστήριο αυτό έχει χρώμα ιώδες και μέγιστη απορρόφηση στα 517 nm. Όταν τα αντιοξειδωτικά μόρια του εκχυλίσματος

αντιδράσουν με το DPPH, εξαιτίας της παρουσίας των υδρογονοκατιόντων, μετατρέπεται στην ανηγμένη του μορφή (DPPH-H). Όταν το αντιδραστήριο ανάγεται, το χρώμα του αλλάζει από ιώδες σε κίτρινο, ανάλογα με τον αριθμό των ελεύθερων ηλεκτρονίων που δεσμεύονται. Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο, μεταβολή, που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 517nm (Kedare S.B. & Singh R.P., 2011).

Για την εκτέλεση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε ένα διάλυμα του αντιδραστηρίου DPPH, το οποίο περιείχε 0,04 mg/mL. Η διάλυση πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα μεθανόλης με ddH₂O (80% v/v) και η διατήρησή του στη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας ήταν σε σκοτεινό δοχείο, στον πάγο.

Για κάθε εκχύλισμα πραγματοποιήθηκαν πολλές μετρήσεις, προκειμένου να δημιουργηθεί μια καμπύλη. Στην καμπύλη αυτή απεικονίζεται η επί τα εκατό ποσότητα των ελευθέρων ριζών που ανάχθηκαν μέσω των αντιοξειδωτικών ουσιών του εκχυλίσματος, προς τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά. Με αυτό τον τρόπο αναζητήθηκε η ποσότητα του εκχυλίσματος, η οποία είναι ικανή να μειώσει στο μισό το ποσοστό των ελευθέρων ριζών DPPH που υπάρχουν στην κυψελίδα (IC₅₀).

Συγκεκριμένα, για κάθε εκχύλισμα, σε κυψελίδα όγκου 1 mL προστέθηκαν τα αντιδραστήρια όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.5:

Πίνακας 2.7: Ποσότητες αντιδρατηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τις μετρήσεις της αντιοξειδωτικής ικανότητας κάθε εκχυλίσματος με τη μέθοδο DPPH. Ψ: Η ποσότητα του διαλύματος DPPH που χρησιμοποιήθηκε προκειμένου η οπτική απορρόφηση του μάρτυρα να βρίσκεται στα όρια 0,7 – 0,8. X: Η ποσότητα εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά προκειμένου να δημιουργηθεί η καμπύλη IC₅₀.

Αντιδραστήριο	Μάρτυρας (μL)	Δείγμα (μL)	Τυφλό (μL)
DPPH	Ψ	Ψ	-
Εκχύλισμα	-	X	X
MeOH	1000 - Ψ	1000 - X - Ψ	1000 - X
Σύνολο	1000	1000	1000

Μετά την προσθήκη των αντιδραστηρίων, τα δείγματα σκεπάζονται με πάραφιλμ προς αποφυγή της εξάτμισης, και επωάζονται για 10 λεπτά στους 25°C, σε συνθήκες

σκότους. Στη συνέχεια, μετράται η οπτική απορρόφηση των διαλυμάτων, σε φωτόμετρο μονής δέσμης, στα 517 nm.

Σημείωση: Η ποσότητα του διαλύματος DPPH που χρησιμοποιήθηκε, εξαρτάται από την οπτική απορρόφηση του μάρτυρα. Η απορρόφηση αυτή θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 0,7 – 0,8. Η ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα ήταν 700 – 750μL.

2.2.4. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών και πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών ουσιών.

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών αντιοξειδωτικών ουσιών κάθε εκχυλίσματος πραγματοποιείται με τη χρωματομετρική δοκιμή Folin-Ciocalteu (F-C). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην μεταφορά ηλεκτρονίων σε αλκαλικό περιβάλλον από τις λειτουργικές υδροξυ-ομάδες των φαινολικών ενώσεων, σε σύμπλοκα του φωσφομολυβδαινικού/ φωσφοβολφραμικού οξέως του αντιδραστηρίου. Τα σύμπλοκα που δημιουργούνται μετά την επώαση έχουν μπλέ χρώμα, σε αντίθεση με το αρχικό χρώμα του αντιδραστηρίου που είναι το κίτρινο. Τα σύμπλοκα αυτά προσδιορίζονται φωτομετρικά στα 765 nm. Το αντιδραστήριο αντιδρά όχι μόνο με τις φαινολικές ενώσεις, αλλά και με άλλους αναγωγικούς παράγοντες που υπάρχουν στο δείγμα. Συνεπώς μπορεί να υπολογιστεί η συνολική αναγωγική ικανότητά του (Scalbert A. et al., 1989).

Ο προσδιορισμός του ολικού φαινολικού περιεχομένου γίνεται με βάση μια πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος, η οποία δημιουργείται με εύρος συγκεντρώσεων 50-250mM. Έτσι η συγκέντρωση εκφράζεται ως ισοδύναμο γαλλικού οξέος (mg GAEs/g φυτικού ιστού).

Για την εκτέλεση του πειράματος χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu , και ένα διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) συγκέντρωσης 25% (w/v).

Συγκεκριμένα σε erppendorf εισάγονται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.6:

Πίνακας 2.8: Ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας σε κάθε κυψελίδα προκειμένου να μετρηθεί η ολική περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε φαινολικές ουσίες με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu.

Αντιδραστήριο	Μάρτυρας (μL)	Τυφλό (μL)	Δείγμα (μL)
Folin - Ciocalteu	50	-	50
ddH₂O	900	950 - X	900 - X
Εκχύλισμα	-	X	X
<i>Ανάδευση και επώαση στο σκοτάδι για 5' στους 25°C</i>			
Na₂CO₃	50	50	50
Σύνολο	1000	1000	1000

Η ποσότητα του εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε εξαρτάται από την τιμή της οπτικής απορρόφησης που θα ληφθεί στην πορεία. Η τιμή αυτή θα πρέπει να είναι μέσα στα όρια της πρότυπης καμπύλης αναφοράς, προκειμένου να μπορεί να αναχθεί σε περιεκτικότητα σε φαινόλες με ακρίβεια.

Στη συνέχεια, τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) για 1 ώρα σε συνθήκες σκότους. Μετά το πέρας του χρόνου ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 8.00 στροφές το λεπτό για 7 λεπτά, προκειμένου να κατακαθίσει τυχόν ίζημα που θα μπορούσε να έχει δημιουργηθεί στη διάρκεια της επώασης. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε κυψελίδα και μετρήθηκε η οπτική του απορρόφηση στα 765 nm.

Για την πρότυπη καμπύλη διαλύονται 0,05gr γαλλικού οξέος σε 5mL αιθανόλης και προστίθεται ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο των 50mL. Άρα δημιουργείται διάλυμα συγκέντρωσης 1mg/mL. Με αραιώση 1:10 διαθέτουμε το τελικό στοκ διάλυμα συγκέντρωσης 0,1 mg/mL. Οι ποσότητες όλων των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης φαίνονται στον Πίνακα 2.7:

Πίνακας 2.9: Ποσότητες αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην δημιουργία πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος, για τον προσδιορισμό ολικών φαινολών και πολυφαινολών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

Αντιδραστήριο	Μάρτυρας (μL)	1 (μL)	2 (μL)	3 (μL)	4 (μL)	5 (μL)	6 (μL)	7 (μL)
Folin - Ciocalteu	50	50	50	50	50	50	50	50
ddH₂O	900	895	890	880	860	850	840	820
Γαλλικό οξύ	0	5	10	20	40	50	60	80
<i>Ανάδευση και επώαση στο σκοτάδι για 5' στους 25°C</i>								
Na₂CO₃	50	50	50	50	50	50	50	50
Σύνολο	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

2.2.5. Λυοφιλίωση

Με τη διαδικασία της λυοφιλίωσης, από διαλύματα τα οποία έχουν πρώτα παγώσει σε θερμοκρασία -80°C , αφαιρείται όλη η υγρή φάση με τη διαδικασία της εξάχνωσης, σε κρύες συνθήκες υποπίεσης. Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία εφαρμόστηκε προκειμένου να αποξηρανθούν τα εκχυλίσματα, ώστε να μπορεί να υπολογιστεί το ποσό της ξηρής μάζας που διέθεταν. Σε erpendorf των οποίων το βάρος έχει υπολογιστεί, μεταφέρθηκε συγκεκριμένη ποσότητα εκχυλίσματος, και αφέθηκε σε θερμοκρασία -80°C προκειμένου να παγώσουν. Στη συνέχεια ανοίχθηκαν στο καπάκι του erpendorf τρεις μικρές τρύπες και τοποθετήθηκαν σε σφαιρική φιάλη στη συσκευή λυοφιλίωσης η οποία είχε προψυχθεί σε θερμοκρασίες μεταξύ -50°C και -80°C . Τα δείγματα αφεθηκαν στη συσκευή σε συνθήκες χαμηλής πίεσης, μέχρις ότου ολόκληρη η υγρή φάση των εκχυλισμάτων να εξαχνωθεί, αφήνοντας μόνο τα στερεά τμήματα τους. Τέλος, ζυγίζεται το κάθε erpendorf μετά τη διαδικασία της λυοφιλίωσης, και υπολογίζεται η διαφορά του βάρους του πριν και μετά, το οποίο αντιστοιχεί στο βάρος της ξηρής μάζας που περιείχε η συγκεκριμένη ποσότητα του κάθε εκχυλίσματος.

2.2.6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια επαναστατική μέθοδος η οποία ανακαλύφθηκε από τον Kary Mullis και βοήθησε στη ραγδαία πρόοδο των βιολογικών επιστημών. Βασίζεται στην ικανότητα της DNA πολυμεράσης να

συνθέτει ένα νέο κλώνο DNA, συμπληρωματικό με αυτόν που υπάρχει. Εξαιτίας της ιδιότητας του ενζύμου να προσθέτει νουκλεοτίδια μόνο εφόσον υπάρχει μια ελεύθερη ομάδα OH-, είναι απαραίτητη η ύπαρξη και ενός εκκινητή στον οποίο θα προστεθεί το πρώτο νουκλεοτίδιο. Το γεγονός αυτό μας επιτρέπει την ενίσχυση συγκεκριμένου τμήματος DNA.

Στη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, ένα τμήμα DNA θερμαίνεται και αποδιατάσσεται (σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών αζωτούχων βάσεων). Στη συνέχεια υβριδίζουν οι εκκινητές στα συμπληρωματικά σημεία του τμήματος του DNA, και αρχίζει η επιμήκυνση του νέου κλώνου που συντίθεται μέσω της DNA-πολυμεράσης. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται και με αυτό τον τρόπο ενισχύεται το DNA στόχος.

Ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος σε κάθε περίπτωση, προσαρμόστηκαν τόσο οι συγκεντρώσεις των συστατικών της αντίδρασης όσο και οι συνθήκες στις οποίες αυτό πραγματοποιήθηκε.

Τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα ήταν:

- ✓ CloneAMP™ HiFi PCR premix (περιέχει dNTPs, DNA πολυμεράση και ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης, Takara)
- ✓ Εκκινητής (forward)
- ✓ Εκκινητής (Reverse)
- ✓ Αρχικό τμήμα DNA (DNA Template)
- ✓ Αποστειρωμένο ddH₂O

Σε eppendorf χωρητικότητας 0,2mL κατάλληλο για PCR, προστίθενται όλα τα συστατικά της αντίδρασης, εκτός από το διάλυμα που περιέχει την DNA-πολυμεράση. Τα συστατικά αναμιγνύονται και ακολουθεί ήπια φυγοκέντρηση (spin) προκειμένου ολόκληρη η ποσότητα να βρεθεί στον πυθμένα του eppendorf. Στη συνέχεια προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα από το CloneAMP™ HiFi PCR premix, και το eppendorf τοποθετείται στη συσκευή της PCR προκειμένου να ξεκινήσει η διαδικασία.

2.2.7. Ενίσχυση του γονιδίου SIRT2 με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Προκειμένου να ενισχυθεί το γονίδιο SIRT2 χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές οι οποίοι ενίσχυαν το γονίδιο ενώ ταυτόχρονα του προσέθεταν άκρα έτσι ώστε να μπορεί να κλωνοποιηθεί στη συνέχεια στο πλασμίδιο pEXP5-CT/TOPO[®]. Στην αντίδραση τελικού όγκου 50μL, χρησιμοποιήθηκαν 10 pmole από κάθε έναν εκκινητή. Για την ενίσχυση του γονιδίου χρησιμοποιήθηκε το έτοιμο μίγμα CloneAmp[™] HiFi PCR Premix της εταιρίας Takara, το οποίο εμπεριέχει πολυμεράση, κάθε ένα από τα τέσσερα dNTPs και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για την αντίδραση. Οι ακριβείς συνθήκες της αντίδρασης παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.8.

Πίνακας 2.10: Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ενίσχυση του γονιδίου SIRT2. Το στάδιο 2 επαναλήφθηκε 30 φορές.

Συνθήκες Αντίδρασης PCR		
Στάδια	Χρόνος	Θερμοκρασία
1. Αρχική αποδιάταξη	4 λεπτά	94 °C
2.1. Αποδιάταξη	10 δευτερόλεπτα	98 °C
2.2. Υβριδισμός	15 δευτερόλεπτα	67 °C
2.3. Επιμήκυνση	20 δευτερόλεπτα	72 °C
3. Τελική επιμήκυνση	7 λεπτά	72 °C

Μετά την ολοκλήρωση της PCR ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v), προκειμένου να αναλυθεί το προϊόν της αντίδρασης, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.9. Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία ενίσχυσης του γονιδίου της SIRT2 παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.9:

Πίνακας 2.11: Νουκλεοτιδικές ακολουθίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία ενίσχυσης του γονιδίου SIRT2.

Εκκινητές	Νουκλεοτιδική Αλληλουχία Εκκινητών
REVSIRT2 (CT-TOPO)	5' - GTG-ATG-ATG-ACC-CTT-CTG-GGG-TTT-CTC-CCT-CTC-TGT - 3'
FORSIRT2 (CT-TOPO)	3' - GAA-GGA-GAT-ACC-CTT-ATG-CAG-AGC-GAA-CGC-TGT - 5'

2.2.8. Ενίσχυση του πλασμιδιακού φορέα pEXP5- CT/TOPO® με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Προκειμένου να ενισχυθεί ο πλασμιδιακός φορέας pEXP5- CT/TOPO® χρησιμοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές έτσι ώστε να ενισχυθεί το πλασμίδιο με τέτοιο τρόπο ώστε να προστεθούν παράλληλα άκρα, συμπληρωματικά με το ενισχυμένο γονίδιο SIRT2. Στην αντίδραση τελικού όγκου 50μL, χρησιμοποιήθηκαν 15 pmole από κάθε έναν εκκινητή. Για την ενίσχυση του γονιδίου χρησιμοποιήθηκε το έτοιμο μίγμα CloneAmp™ HiFi PCR Premix της εταιρίας Takara, το οποίο εμπεριέχει πολυμεράση, κάθε ένα από τα τέσσερα dNTPs και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για την αντίδραση. Οι ακριβείς συνθήκες της αντίδρασης παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.10.

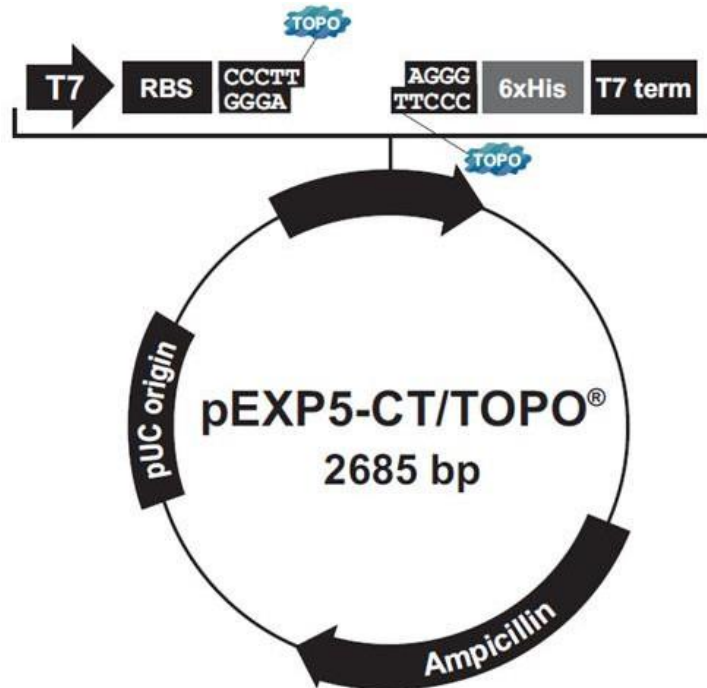
Πίνακας 2.12: Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ενίσχυση του πλασμιδιακού φορέα pEXP5- CT/TOPO®. Το στάδιο 2 επαναλήφθηκε 30 φορές.

Συνθήκες Αντίδρασης PCR		
Στάδια	Χρόνος	Θερμοκρασία
1. Αρχική αποδιάταξη	4 λεπτά	94 °C
2.1. Αποδιάταξη	10 δευτερόλεπτα	98 °C
2.2. Υβριδισμός	15 δευτερόλεπτα	54 °C
2.3. Επιμήκυνση	2 λεπτά	72 °C
3. Τελική επιμήκυνση	10 λεπτά	72 °C

Μετά την ολοκλήρωση της PCR ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v), προκειμένου να αναλυθεί το προϊόν της αντίδρασης, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.9. Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία ενίσχυσης του πλασμιδιακού φορέα pEXP5-CT/TOPO®, παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.11:

Πίνακας 2.13: Νουκλεοτιδικές ακολουθίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία ενίσχυσης του πλασμιδιακού φορέα pEXP5-CT/TOPO®.

Εκκινητές	Νουκλεοτιδική Αλληλουχία Εκκινητών
FORWARD CT-TOPO	5' - AAG-GGT-CAT-CAT-CAC-CAT-CAC - 3'
REVERSE CT-TOPO	3' - AAG-GGT-ATC-TCC-TTC-TTA-AAG-TT- 5'



Εικόνα 2.9: Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα pEXP5-CT/TOPO®

2.2.9. Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA) με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός και η ανάλυση των τμημάτων DNA που εμπεριέχονται σε ένα δείγμα χρησιμοποιείται η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Ο διαχωρισμός τους γίνεται με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωση των διαφορετικών τμημάτων. Η συγκέντρωση της αγαρόζης στην πηκτή που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν 1%. Επιπλέον, στην πηκτή προστέθηκε χρωστική ουσία, η οποία έχει την ιδιότητα να αλληλεπιδρά με τις αζωτούχες βάσεις του DNA και να προκαλεί τον φθορισμό τους σε συνθήκες υπεριώδους ακτινοβολίας, προκειμένου να ανιχνευθούν τα μόρια του DNA.

Συγκεκριμένα, σε κωνική φιάλη προστέθηκαν 49 ml ddH₂O, 1ml 50xTAE και 0,5 gr αγαρόζης. Η φιάλη αυτή θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να λιώσουν και να ομογενοποιηθούν πλήρως τα συστατικά. Στη συνέχεια αφέθηκε λίγο προκειμένου να μειωθεί η θερμοκρασία του και μεταφέρθηκε στο ειδικό δοχείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Αμέσως μετά τη μεταφορά, προστέθηκαν 3,5μL χρωστικής ουσίας, το διάλυμα αναμίχθηκε και τοποθετήθηκε το ειδικό χτενάκι για τη δημιουργία των εσοχών («πηγαδάκια») όπου θα εισαχθεί το δείγμα στη συνέχεια. Η πηκτή αφέθηκε

να στερεοποιηθεί για περίπου 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) και μεταφέρθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου προστέθηκαν τα δείγματα που επρόκειτο να διαχωριστούν, αφού πρώτα είχαν αναμιχθεί με κατάλληλη χρωστική. Στη συσκευή προστέθηκαν ακόμα 300ml ρυθμιστικού διαλύματος 1xTAE και εφαρμόστηκε συνεχής τάση 80V για περίπου 30 λεπτά μέχρι να διαχωριστούν κατάλληλα τα δείγματα. Στην πρώτη εσοχή που δημιουργείται, προστέθηκαν 5μL του μοριακού δείκτη. Στη διάρκεια του συγκεκριμένου πειράματος, ως μοριακός δείκτης για το μέγεθος των τμημάτων DNA, χρησιμοποιήθηκε ο 1kb DNA ladder.

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ηλεκτροφόρηση DNA:

Ρυθμιστικό διάλυμα TAE 50X

- ✓ 2M Trizma base
- ✓ 5,71% v/v CH₃COOH
- ✓ 10% v/v 0,5M EDTA (pH=8).

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

Διάλυμα πηκτής ηλεκτροφόρησης (DNA)

- ✓ 1% αγαρόζη
- ✓ 1X TAE
- ✓ 3,5 μL χρωστικής.

2.2.10. Ενίσχυση των προϊόντων PCR

Μετά τη διαδικασία της ανάλυσης των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, εντοπίστηκε μια ευκρινής ζώνη σε κάθε περίπτωση. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την επιτυχία της μεθόδου, καθώς στο διάλυμα υπήρχε και στις δύο περιπτώσεις μόνο το τμήμα DNA που θέλαμε να ενισχύσουμε. Εξαιτίας αυτού του γεγονότος, επιλέχθηκε η συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας με τη χρήση του αντιδραστηρίου Cloning Enhancer (Takara) αντί της διαδικασίας της εξαγωγής DNA από την πηκτή αγαρόζης, όπως περιγράφεται στο βιβλίο οδηγιών In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio, Η.Π.Α.).

Συγκεκριμένα, σε δύο αποστειρωμένα eppendorf χωρητικότητας 0,2 mL, μεταφέρθηκαν 5μL προϊόντος της PCR από την SIRT2 και τον πλασμιδιακό φορέα

pEXP5-CT/TOPO[®], αντίστοιχα. Σε κάθε eppendorf προστέθηκαν επιπλέον 2μL από το αντιδραστήριο Cloning Enhancer. Τα δείγματα επωάστηκαν σε συσκευή PCR για 20 λεπτά στους 37°C, και στη συνέχεια για 15 λεπτά στους 80°C. Τέλος τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε πάγο και ακολούθησε η διαδικασία της κλωνοποίησης.

2.2.11. Ένωση προϊόντων PCR στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO[®]

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της υποκλωνοποίησης, χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα που είχαν προηγουμένως ενισχυθεί σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.2.10. Η ένωση του ενισχυμένου γονιδίου της SIRT2 στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO[®], πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου In – Fusion HD Enzyme (Takara Bio). Σε αποστειρωμένο eppendorf χωρητικότητας 0,2 mL, προστέθηκαν τα εξής:

- ✓ 2μL In – Fusion HD Enzyme
- ✓ 2μL ενισχυμένου προϊόντος PCR του γονιδίου SIRT2
- ✓ 4μL ενισχυμένου προϊόντος PCR γραμμικού πλασμιδιακού φορέα (περίπου 100 ng)
- ✓ 2μL αποστειρωμένο ddH₂O

Το μίγμα επωάστηκε σε συσκευή PCR για 15 λεπτά στους 50°C, και στη συνέχεια μεταφέρθηκε στον πάγο προκειμένου να ακολουθήσει η διαδικασία του μετασχηματισμού δεκτικών κυττάρων.

2.2.12. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA

Για τη διαδικασία του μετασχηματισμού χρησιμοποιήθηκαν δεκτικά κύτταρα *E. coli* Stellar της εταιρίας Takara Bio. Τα κύτταρα αυτά είχαν διατηρηθεί στους -80°C και αφέθηκαν να ξεπαγώσουν ομαλά σε πάγο. Στη συνέχεια αναμίχθηκαν ελαφρά και μεταφέρθηκαν 50μl εξ αυτών σε αποστειρωμένο δοχείο falcon των 15ml. Στα κύτταρα αυτά προστέθηκαν 4μl από το μίγμα που είχε προέλθει από την κλωνοποίηση που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.11. Το δοχείο αφέθηκε στον πάγο για 30 λεπτά. Αμέσως μετά προκλήθηκε θερμικό σοκ στους 42°C για ακριβώς 45 δευτερόλεπτα και επαναφορά στον πάγο για 2 λεπτά. Ακολούθως, μεταφέρθηκε μέσα στο δοχείο falcon θρεπτικό υλικό SOC (Takara Bio) μέχρι τον τελικό όγκο των 500μl, το οποίο είχε προθερμανθεί στους 37°C. Τα κύτταρα με το θρεπτικό υλικό

επωάστηκαν στους 37°C με ανάδευση στις 180 στροφές/λεπτό για μια ώρα. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν 50μl από αυτά σε τρυβλίο Petri το οποίο διέθετε θρεπτικό υλικό LB με αντιβιοτικό αμπικιλίνη (100 mg/mL). Το υπόλοιπο διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 10.000 στροφές/λεπτό, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και επαναδιαλύθηκαν ήπια σε 100μl θρεπτικού διαλύματος SOC. Η ποσότητα αυτή στρώθηκε σε νέο τρυβλίο με το ίδιο αντιβιοτικό. Τα τρυβλία αφέθηκαν να επωαστούν για 12 – 16 ώρες στους 37°C προκειμένου να αναπτυχθούν βακτηριακές αποικίες.

Προκειμένου να ελεγχθεί η δραστικότητα των κυττάρων *E. coli* Stellar, πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία, με τη διαφορά ότι αντί για μετασχηματισμένο πλασμιδιακό φορέα, χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο PUC 19. Η εμφάνιση αποικιών στα ανάλογα τρυβλία υποδεικνύει την σωστή λειτουργία των κυττάρων.

Θρεπτικό μέσο LB:

- ✓ 1% (w/v) πεπτόνη
- ✓ 1% (w/v) NaCl
- ✓ 0,5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης.

Αν είναι επιθυμητή η πήξη του μέσου για τη δημιουργία τρυβλίων προστίθεται ακόμη 1,5% (w/v) άγαρ.

2.2.13. Έλεγχος ύπαρξης του γονιδίου της SIRT2 στις αποικίες μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR Colony)

Μετά τη διαδικασία του μετασχηματισμού δεκτικών κυττάρων, παρατηρήθηκαν στα τρυβλία αποικίες. Ο έλεγχος του μετασχηματισμού και της σωστής εισαγωγής του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου στα βακτηριακά κύτταρα, πραγματοποιείται με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα εξής συστατικά:

- ✓ KAPA Taq πολυμεράση (Invitrogen)
- ✓ 10 X KAPA Taq ρυθμιστικό διάλυμα
- ✓ 10 mM dNTPs
- ✓ 10 pmole εκκινητή Forward T7 του πλασμιδιακού φορέα
- ✓ 10 pmole εκκινητή Reverse του γονιδίου SIRT2
- ✓ Αποστειρωμένο ddH₂O, μέχρι τον τελικό όγκο των 50 μL

Ως γενετικό υλικό μήτρα, χρησιμοποιήθηκε υλικό από μεμονωμένες αποικίες από το τριβλίο με τα μετασχηματισμένα κύτταρα (επιλέχθηκαν τυχαία πέντε αποικίες). Με τη χρήση ενός εκκινητή από τον πλασμιδιακό φορέα και τον αντίστροφο από τη SIRT2, μπορούμε να βεβαιωθούμε ότι θα ενισχυθεί μέσω της διαδικασίας της PCR το γονίδιο που μας ενδιαφέρει, μόνο στην περίπτωση στην οποία θα έχει προηγουμένως εισαχθεί σωστά μέσα στο αρχικό βακτήριο που δημιούργησε την αποικία. Ο έλεγχος για τυχόν πατρικό DNA (DNA από το αρχικό πλασμίδιο), πραγματοποιήθηκε και πάλι με τη διαδικασία της PCR, μόνο που αντί για εκκινητή του γονιδίου SIRT2 χρησιμοποιήθηκε εκκινητής του γονιδίου που προϋπήρχε. Οι ακριβείς συνθήκες της αντίδρασης παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.12.

Πίνακας 2.14: Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τον έλεγχο του μετασχηματισμού (PCR Colony). Το στάδιο 2 επαναλήφθηκε 30 φορές.

Συνθήκες Αντίδρασης PCR		
Στάδια	Χρόνος	Θερμοκρασία
1. Αρχική αποδιάταξη	5 λεπτά	95 °C
2.1. Αποδιάταξη	30 δευτερόλεπτα	95 °C
2.2. Υβριδισμός	30 δευτερόλεπτα	57 °C
2.3. Επιμήκυνση	1,5 λεπτά	72 °C
3. Τελική επιμήκυνση	10 λεπτά	72 °C

Στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v) προκειμένου να αναλυθεί το αποτέλεσμα της αντίδρασης.

2.2.14. Απομόνωση DNA από κύτταρα *E. coli*

Μετά τη διαδικασία ελέγχου για την ένθεση του επιθυμητού γονιδίου της SIRT2 σε δεκτικά κύτταρα, επιλέχθηκαν δύο αποικίες στις οποίες το σήμα από την PCR ήταν σωστό και δημιουργήθηκαν υγρές καλλιέργειες. Σε δύο αποστειρωμένα δοχεία falcon των 50 mL, τα οποία περιείχαν 10 mL θρεπτικό διάλυμα LB και 10 μL αντιβιοτικού αμπικιλίνης (100 mg/mL), εμβολιάστηκε υλικό από τις αντίστοιχες αποικίες του τριβλίου. Τα δοχεία αυτά αφέθηκαν να επωαστούν στους 37°C για 16 ώρες προκειμένου να πολλαπλασιαστούν τα ανασυνδυασμένα βακτήρια.

Μετά το πέρας του χρόνου, τα 10 mL υγρής καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκαν στις 13.000 rpm για 2 λεπτά, δημιουργώντας τελικά 2 eppendorf για κάθε αποικία, με ίση ποσότητα πάστας κυττάρων, αφού απορρίφθηκε το υπερκείμενο σε κάθε περίπτωση.

Στη συνέχεια απομονώθηκε DNA από το ένα εκ των δύο erpendorf κάθε αποικίας με τη χρήση του τυποποιημένου σκευάσματος NucleoSpin Plasmid της εταιρίας Machery – Nagel, όπως περιγράφεται στο βιβλίο οδηγιών. Με αυτό τον τρόπο στο τέλος διαθέταμε 30μL καθαρού DNA από τις δύο αποικίες. Τμήμα της ποσότητας αυτής (7μL), αναλύθηκαν εκ νέου σε πηκτή αγαρόζης (1% w/v) προκειμένου να επαληθεύσουμε την ύπαρξη του επιθυμητού γονιδίου.

2.2.15. Αλληλούχιση απομονωμένου DNA

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αλληλούχιση των τμημάτων DNA των ανασυνδυασμένων βακτηρίων, προετοιμάστηκαν δύο erpendorf (ένα για κάθε αποικία). Σε αποστειρωμένο erpendorf προστέθηκαν 9μL καθαρού DNA, που προήλθε από τη διαδικασία απομόνωσης που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.14., και 6μL αποστειρωμένο ddH₂O. Τα δείγματα αυτά αλληλουχήθηκαν στις εταιρίες Lab Supplies και CEMIA.

2.2.16. Μετασηματισμός εκφραστικών κυττάρων *E. coli* BL21(DE3) και Rosetta™(DE3)

Μετά την επαλήθευση της σωστής ένθεσης του επιθυμητού γονιδίου της SIRT2 στα βακτηριακά κύτταρα Stellar, επαναλήφθηκε η διαδικασία του μετασηματισμού σε εκφραστικά κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) και Rosetta™(DE3) όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.12. Για το μετασηματισμό προστέθηκαν 2,2μL DNA SIRT2 (απομόνωση με το NucleoSpin Plasmid kit) και 2,2μL πλασμιδιακό DNA, προκειμένου να υπάρχουν δείγματα μάρτυρες.

Τα μετασηματισμένα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε κωνικές φιάλες που περιείχαν 25mL αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB και τα ανάλογα αντιβιοτικά σε κάθε περίπτωση (αμπικιλίνη – 100 mg/mL ή χλωραμφενικόλη – 33 mg/mL). Οι προκαλλιέργειες επώαστηκαν στους 37°C με ανάδευση στις 180 rpm για 16 ώρες.

Ταυτόχρονα, σε τρία αποστειρωμένα δοχεία falcon των 50mL που περιείχαν 10mL θρεπτικού υλικού και τα αντίστοιχα αντιβιοτικά, μεταφέρθηκαν 50μL μη μετασηματισμένων κυττάρων κάθε κατηγορίας αντίστοιχα, προκειμένου να ελεγχθούν τυχόν επιμολύνσεις των κυττάρων. Στα δοχεία αυτά, μετά τη διαδικασία της επώασης, αναμένεται να μην έχει αναπτυχθεί κάποια βακτηριακή καλλιέργεια.

Μετά το πέρας των 16 ωρών, 500μL από κάθε προκαλλιέργεια μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένο erpendorf. Στα erpendorf αυτά προστέθηκαν ακόμα 500μL αποστειρωμένης γλυκερόλης, και διατηρήθηκαν στους -80°C. Η υπόλοιπη ποσότητα από κάθε προκαλλιέργεια, μεταφέρθηκε σε νέα αποστειρωμένη κωνική φιάλη που διαθέτε 250mL θρεπτικού υλικού με τα κατάλληλα αντιβιοτικά και επώαστηκε στους 37°C με ανάδευση στις 180 rpm, μέχρις ότου η οπτική απορρόφηση του μίγματος να φτάσει στο 0,6. Στο σημείο αυτό προστέθηκαν 59,5 mg IPTG, προκειμένου να επαχθεί η πρωτεϊνική έκφραση και να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων. Οι καλλιέργειες συνέχισαν να επωάζονται για 4 ώρες και στη συνέχεια όλη η ποσότητα φυκοκεντρήθηκε στις 8.000 rpm για 10 λεπτά σε φυγόκεντρο που είχε προψυχθεί στους 4°C. Η πάστα των κυττάρων φυλάχθηκε στους -20°C.

2.2.17. Διάρρηξη βακτηριακών κυττάρων με χρήση υπερήχων

Σε έξι erpendorf χωρητικότητας 2mL, μεταφέρθηκαν 100 mg κυτταρικής πάστας από κάθε είδος κυττάρων *E. coli* (BL21(DE3) και Rosetta™(DE3)). Στα erpendorf προστέθηκε ακόμα τριπλάσιος όγκος (300μL) ρυθμιστικού διαλύματος δις – όξινου φωσφορικού καλίου (KH₂PO₄) συγκέντρωσης 20 mM με pH=7. Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν με χρήση της συσκευής vortex και διασπάστηκαν με συσκευή υπερήχων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 5 λεπτά, προκειμένου να επιτευχθεί διαχωρισμός των κυτταρικών θραυσμάτων. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε κάθε φορά σε νέο erpendorf και το υποκείμενο φυλάχθηκε στους -20°C. Στα έξι δείγματα (τρία μετασηματισμένα με πλασμίδιο που έφερε το γονίδιο της SIRT2 και τρία μετασηματισμένα με πλασμίδιο που δε διαθέτε το συγκεκριμένο γονίδιο), πραγματοποιήθηκε μέτρηση της συνολικής περιεκτικότητάς τους σε πρωτεΐνες, με τη μέθοδο Bradford και ακολούθησε η ανάλυσή τους σε πηκτή SDS – PAGE.

2.2.18. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη χρωματομετρική μέθοδο Bradford (1976)

Η μέτρηση Bradford είναι μια σύντομη, ευαίσθητη και σχετικά ακριβής μέθοδος προσδιορισμού της συνολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης που υπάρχει σε ένα δείγμα. Βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να αλλάζει χρώμα, όταν αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον. Η ελεύθερη χρωστική

έχει χρώμα καστανό και απορροφά στα 465nm, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνη-χρωστική είναι γαλάζιο και απορροφά στα 595nm. Η μέθοδος αυτή είναι αξιόπιστη σε πρωτεϊνικά δείγματα των οποίων η συγκέντρωση κυμαίνεται από 0,04 mg/mL έως 0,20 mg/mL (40-200 µg/mL) (Kruger, 1994).

Η χρωστική (100 mg) διαλύεται σε 100 mL πυκνού φωσφορικού οξέος (85% w/v) και στη συνέχεια προστίθενται 100 mL υδατικού διαλύματος μεθανόλης (50% v/v). Τα συστατικά αναμιγνύονται σε σκουρόχρωμο δοχείο, απαερώνονται σε υπερήχους και φυλάσσονται σε σκοτεινό μέρος θερμοκρασίας δωματίου. Το μίγμα αυτό αποτελεί το πυκνό αντιδραστήριο Bradford (stock solution). Για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης το πυκνό διάλυμα χρωστικής αραιώνεται με νερό σε αναλογία 1/5 (1 μέρος χρωστικής και 4 μέρη ddH₂O). Το αραιωμένο διάλυμα μπορεί να διατηρηθεί σε σκοτεινό δοχείο και μέρος για 24 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου.

Με το πυκνό διάλυμα χρωστικής που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης των δειγμάτων, σχεδιάζεται αρχικά μια πρότυπη καμπύλη σύμφωνα με γνωστές συγκεντρώσεις αλβουμίνης από ορό μόσχου (BSA). Από τη γραφική απεικόνιση των απορροφήσεων σε σχέση με τις γνωστές συγκεντρώσεις BSA, δημιουργείται μια κανονικοποιημένη ευθεία, της οποίας η κλίση αποτελεί τον συντελεστή απόσβεσης (ϵ). Ανάλογα με την απορρόφηση του δείγματος, υπολογίζεται η συγκέντρωσή του, σύμφωνα με τον συντελεστή απόσβεσης της πρότυπης.

Η διαδικασία αναλυτικά έχει ως εξής. Σε καθαρές κυψελίδες προστίθεται αραιωμένο διάλυμα χρωστικής (950µL), δείγμα πρωτεΐνης και νερό (ddH₂O) σε αναλογίες τέτοιες ώστε η πρωτεϊνική συγκέντρωση να είναι μέσα στα όρια ευαισθησίας της μεθόδου και ο τελικός όγκος της κυψελίδας να είναι 1mL. Τα δείγματα επωάζονται σε σκοτάδι για 20 λεπτά (όσο επώαστηκαν και τα δείγματα τις πρότυπης καμπύλης), και στη συνέχεια μετράται η απορρόφηση που έχουν στα 595nm, έχοντας ως μάρτυρα αναφοράς (control) μια κυψελίδα που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από το πρωτεϊνικό δείγμα. Ο ποσοτικός προσδιορισμός τους γίνεται σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$C = \frac{ABS \cdot V_{\text{τελ}}}{\varepsilon \times l \cdot V_{\text{δειγμ}}} \times \text{αραιώση}$$

Όπου:

C : Πρωτεϊνική συγκέντρωση του δείγματος (mg/mL)

ABS : Οπτική απορρόφηση του δείγματος

ε : Συντελεστής απόσβεσης (απορρόφησης) ($\text{mL mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

l : οπτική διαδρομή (πλάτος κυψελίδας) (cm)

V_{τελ} : Τελικός όγκος της κυψελίδας (mL)

V_{δειγμ}: Όγκος του πρωτεϊνικού δείγματος (μL)

2.2.19. Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης (SDS-PAGE)

Για τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης κάτω από συνθήκες μετουσίωσης, κάθε πρωτεϊνικό δείγμα προετοιμάστηκε με την προσθήκη 10 – 15 μL ρυθμιστικού διαλύματος μετουσίωσης και ακολούθησε θέρμανση στους 95°C για 5 λεπτά. Ο τελικός όγκος του δείγματος που μπορεί να προστεθεί σε εσοχή της πηκτής είναι 15-20 μL . Στον όγκο αυτό θα πρέπει να περιέχονται 30 – 50 μg πρωτεΐνης, ποσότητα που εκτιμάται με τη μέθοδο Bradford.

Σε περίπτωση που τα πρωτεϊνικά δείγματα, τα οποία θέλαμε να αναλύσουμε είχαν χαμηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης, πριν την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος μετουσίωσης, συμπηκνώθηκαν είτε με λυοφιλίωση (§2.2.5) είτε με κατακρήμνιση με τριγλωρικό οξύ (TCA) (§2.2.24). Ακόμη, δείγματα τα οποία είχαν αυξημένη συγκέντρωση αλάτων υποβλήθηκαν σε διαπίδυση σε 4 L νερού με 100 μL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-Base 10mM, pH=6,8.

2.2.20. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS)

Προκειμένου να ελεγχθεί και να αναλυθεί το επίπεδο της πρωτεϊνικής έκφρασης σε κάθε βακτηριακό στέλεχος, εφαρμόστηκε η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, παρουσία SDS, σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970). Χρησιμοποιήθηκε ασυνεχές σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων, με διαφορετικές

συγκεντρώσεις ακρυλαμιδίου στην πηκτή διαχωρισμού και την πηκτή επιστοιβαξής. Συγκεκριμένα οι συγκεντρώσεις ήταν 12,5% (w/v) και 4,5% (w/v), αντίστοιχα.

Η διαδικασία παρασκευής έχει ως εξής:

Πηκτή διαχωρισμού:

Για τη δημιουργία της πρώτης πηκτής, αναμιγνύονται αρχικά 875μL ρυθμιστικού διαλύματος πηκτής διαχωρισμού, με 70μL διαλύματος SDS και 2.200μL διαλύματος ακρυλαμιδίου (40%). Στη συνέχεια αραιώνεται με την προσθήκη 3.670μL ddH₂O και προστίθενται ακόμα 170μL διαλύματος υπερθειϊκού αμμωνίου και 6,25μL TEMED. Το μίγμα αναδεύεται ελαφρώς και εισάγεται άμεσα στο γυάλινο κάθετο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Η επιφάνεια καλύπτεται με 1mL ddH₂O και το μίγμα αφήνεται να πολυμεριστεί για περίπου 30 λεπτά, στους 25°C. Μετά το πέρας του χρόνου, το επιφανειακό νερό αφαιρείται ώστε να προστεθεί το μίγμα της πηκτής επιστοιβαξής.

Πηκτή επιστοιβαξής:

Για τη δημιουργία της πηκτής, αναμιγνύονται αρχικά 625μL ρυθμιστικού διαλύματος πηκτής επιστοιβαξής, 50μL διαλύματος SDS, 475μL διαλύματος ακρυλαμιδίου (40%) και αραιώνονται με την προσθήκη 3.600μL νερού. Στη συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη 250μL υπερθειϊκού αμμωνίου και 6,25μL TEMED. Το μίγμα αναδεύεται ελαφρώς και εισάγεται άμεσα στο γυάλινο κάθετο καλούπι, πάνω από την πηκτή διαχωρισμού. Ακολούθως τοποθετείται το ειδικό «χτενάκι» ώστε να δημιουργηθούν οι εσοχές («πηγαδάκια») στα οποία εισάγονται τα δείγματα. Ο πολυμερισμός ολοκληρώνεται και σε αυτή την περίπτωση σε περίπου 30 λεπτά, στους 25°C.

Στη συνέχεια, στη συσκευή ηλεκτροφόρησης προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων 10X και τα ανάλογα δείγματα. Η συσκευή συνδέεται με το τροφοδοτικό για μιαμιση ώρα σε ένταση 20 mA για κάθε πηκτή.

Κάθε πρωτεϊνικό δείγμα το οποίο πρόκειται να αναλυθεί με το σύστημα αυτό, αναμιγνύεται πριν την τοποθέτησή του στην πηκτή επιστοιβαξής, με ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων. Σε κάθε θέση της πηκτής φορτώθηκαν 50 ng πρωτεΐνης (υπολογισμός μέσω της μεθόδου Bradford).

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στη διάρκεια της πειραματικής πορείας για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε συνθήκες μετουσίωσης, παρουσία SDS, ήταν τα εξής:

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων 10X

Το διάλυμα αποτελείται από

- 0,25 M Tris
- 1,92 M γλυκίνη
- 1% SDS (w/v), pH=8,3

Για την Παρασκευή διαλύματος όγκου 1 λίτρου, αναμιγνύονται 30,3 g Tris-base, 144g γλυκίνη και 10g SDS.

Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού

Το διάλυμα αποτελείται από 3 M Tris-Cl με pH=8,8

Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοιβαξης

Το διάλυμα αποτελείται από 0,5 M Tris-Cl με pH=6,8

Διάλυμα ακρυλαμίδιου

Για την παρασκευή του διαλύματος ακολουθείται ο παρακάτω τύπος:

$$T\% = (\text{g ακρυλαμίδης} + \text{g δις- ακρυλαμίδης}) / \text{συνολικό όγκο (mL)}$$

Έτσι για την παρασκευή διαλύματος ακρυλαμίδης 30%, αναμιγνύονται 0,42 mol (30g) ακρυλαμίδιου και 0,8 g (5,2 mol) N,N'-μεθυλενο-bis- ακρυλαμίδιου, σε 100mL ddH₂O. Το διάλυμα φιλτράρεται με διηθητικό χαρτί και φυλάσσεται σε σκοτεινόχρωμο δοχείο στους 4°C.

Διάλυμα SDS:

Το διάλυμα αποτελείται από 10% (w/v) SDS

Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (Ammonium persulfate)

Το διάλυμα αποτελείται από 1,5% (w/v) υπερθειικό αμμώνιο σε ddH₂O. Παρασκευάζεται εκ νέου σε κάθε νέο πείραμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών.

Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων

Το διάλυμα αποτελείται από:

- 0,125 M Tris-Cl, pH=6.8
- 4% (w/v) SDS
- 20% (v/v) γλυκερόλη
- 10% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη
- 0,02% (w/v) χρωστική (μπλε της βρωμοφαινόλης)

2.2.21. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250

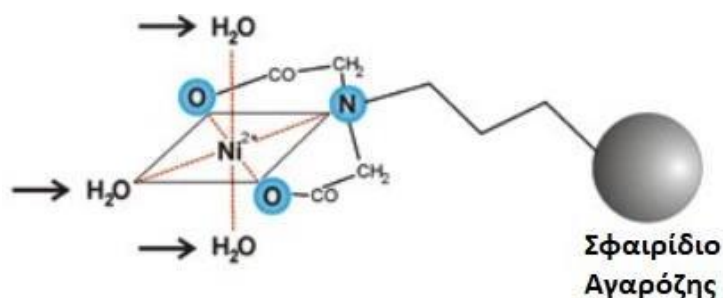
Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολουθεί εμβάπτιση της πηκτής σε υδατικό διάλυμα που περιέχει μεθανόλη (45% v/v), οξικό οξύ (7% v/v) και την χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250 (0.25-1% w/v) προκειμένου να χρωματιστούν τα σημεία της πηκτής που περιέχουν πρωτεϊνικό δείγμα. Η επώαση έγινε για περίπου 20 λεπτά. Για τον αποχρωματισμό της πηκτής ακολούθησε αρχικά εμβάπτιση στο υδατικό διάλυμα αποχρωματισμού I, το οποίο περιέχει μεθανόλη (50% v/v) και οξικό οξύ (10% v/v) για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε δεύτερη εμβάπτιση στο υδατικό διάλυμα αποχρωματισμού II το οποίο περιείχε μεθανόλη (5% v/v) και οξικό οξύ (7% v/v). Η πηκτή αφήνεται να διατηρηθεί μέσα στο τελευταίο διάλυμα αποχρωματισμού.

2.2.22. Διαπίδυση

Μετά τη διάρρηξη των κυττάρων και πριν τη διαδικασία του καθαρισμού, το κυτταρικό εκχύλισμα υπόκειται στην διαδικασία της διαπίδυσης. Το εκχύλισμα αρχικά τοποθετείται μέσα σε ημιπερατή μεμβράνη, με όριο αποκλεισμού 12kDa (Sigma-Aldrich, Η.Π.Α.). Στη συνέχεια η μεμβράνη αυτή αφήνεται για 18-24 ώρες σε θερμοκρασία 4°C, μέσα σε δοχείο που περιέχει 4 L ρυθμιστικού διαλύματος όξινου φωσφορικού νατρίου (Na_2HPO_4 50 mM, pH=8). Λόγω ώσμωσης, υλικά μεγέθους μικρότερου των 12kDa θα περάσουν από το βιολογικό υλικό στο ρυθμιστικό διάλυμα, διαμέσου της ημιπερατής μεμβράνης. Οι πρωτεΐνες έχουν μεγαλύτερο μέγεθος και δεν θα περάσουν από τη μεμβράνη και θα μείνουν στο το δείγμα. Με τον τρόπο αυτό εφαρμόζεται στο δείγμα μια πρώτη μορφή καθαρισμού σύμφωνα με το μέγεθος των σωματιδίων.

2.2.23. Καθαρισμός του ενζύμου SIRT2 που φέρει τον επίτοπο 6 - His με χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή Ni – IDA – αγαρόζης

Στη παρούσα μελέτη, τα ένζυμα που δημιουργήθηκαν στα ανασυνδυασμένα πλασμίδια, διέθεταν στο καρβοξυ – τελικό άκρο τους έξι ιστιδίνες (6His-Tag) και για τον καθαρισμό τους χρησιμοποιήθηκε μεταλλοχηλική χρωματογραφία, εκμεταλλευόμενοι την ιδιότητα της ιστιδίνης, όταν βρίσκεται στην επιφάνεια ενός ενζύμου, να συμπεριφέρεται ως δότης ηλεκτρονίων προς το μεταλλοϊόν δέκτη Ni^{2+} . Στη συγκεκριμένη χρωματογραφία, πάνω στο χρωματογραφικό υλικό βρίσκονταν ομοιοπολικά συνδεδεμένη η χηλιποιητική ένωση, ιμινοδιοξικό οξύ. Το ιμινοδιοξικό οξύ συγκρατούσε ισχυρά το μεταλλοκατιόν Ni^{2+} , μέσω δεσμών συναρμογής. Στο δεσμό αυτό μετέχουν τα καρβοξυλικά οξυγόνα και το άζωτο, ενώ οι υπόλοιπες θέσεις του μεταλλοκατιόντος καταλήφθηκαν προσωρινά από μόρια νερού (Κλώνης Ι., 2007).



Εικόνα 2.10: Τρόπος δέσμευσης της χηλιποιητικής ένωσης (ιμινοδιοξικό οξύ) η οποία διαθέτει δεσμευμένο το μεταλλοκατιόν Ni^{2+} στο χρωματογραφικό υλικό. Στη δημιουργία του δεσμού συμμετέχουν τα καρβοξυλικά οξυγόνα και το άζωτο. Οι υπόλοιπες θέσεις του μεταλλοκατιόντος, οι οποίες καλύπτονται με μόρια νερού, αποτελούν το σημείο στόχο, στο οποίο προσδένονται στη συνέχεια τα αμινοξικά κατάλοιπα της ιστιδίνης από την ενζυμική επιφάνεια.

Τα αμινοξικά κατάλοιπα της ιστιδίνης αλληλεπιδρούν με τις θέσεις του μεταλλοκατιόντος οι οποίες καταλαμβάνονται από μόρια νερού, οδηγώντας στην προσρόφηση του ενζύμου. Η έκλουση του ενζύμου, στη συγκεκριμένη εργασία, πραγματοποιήθηκε με ιμιδαζόλιο, άλας το οποίο λειτουργεί συναγωνιστικά με την ιστιδίνη στο σύμπλοκο ένζυμο-μεταλλοκατιόν, προκαλώντας με αυτό τον τρόπο την

απελευθέρωση του ενζύμου. Τέλος, η αναγέννηση της στήλης πραγματοποιήθηκε με 5 mL EDTA συγκέντρωσης 0,1 M και 10 mL νερού.

Πιο συγκεκριμένα, λοιπόν, για τη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας, επιλέχθηκαν τα βακτηριακά στελέχη BL21(DE3) και BL21(DE3) Rosetta, προκειμένου να καθαριστούν. Κυτταρική πάστα (περίπου 1g), επαναδιαλύθηκε σε τριπλάσιο όγκο (περίπου 3mL) διαλύματος εξισορρόπησης (υδατικό διάλυμα όξινου φωσφορικού νατρίου Na_2HPO_4 50mM, pH=8 και 300mM NaCl). Ακολούθησε λύση των κυττάρων με χρήση της συσκευής υπερήχων και φυγοκέντρηση του τελικού εναιωρήματος στις 13.000 rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και μετρήθηκε η συνολική περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνες με τη μέθοδο Bradford.

Στη συνέχεια, ακολούθησε η διαδικασία του καθαρισμού. Χρησιμοποιήθηκε στήλη χρωματογραφίας συγγένειας, με προσροφητή 1,5 mL ιμινοδιοξικό οξύ (Ni-IDA-Agarose). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται αναλυτικά στα παρακάτω βήματα:

- ✓ Ξέπλυμα της στήλης με 15 mL ddH₂O.
- ✓ Προσθήκη 5 mL διαλύματος χλωριούχου νικελίου ($\text{H}_2\text{O} \cdot \text{NiCl}_2$).
- ✓ Έκπλυση της στήλης με 10 mL ddH₂O, προκειμένου να απομακρυνθεί ότι δεν προσροφήθηκε
- ✓ Έκπλυση της στήλης με 10 mL διαλύματος εξισορρόπησης, προκειμένου να απομακρυνθούν οι αδέσμευτες ενώσεις.
- ✓ Κλείσιμο της στήλης ώστε να μην διέρχεται το περιεχόμενο και φόρτωμα του βιολογικού υλικού που προήλθε από την κυτταρική πάστα. Αφέθηκε σταθερό για 10 λεπτά. Στη συνέχεια το πόμα ανοίχθηκε και συλλέχθηκε το υλικό που είχε περάσει από τη στήλη σε δοχείο falcon.
- ✓ Έκπλυση με 10 ml (2 mL επί 5 φορές) με διάλυμα εξισορρόπησης. Συλλογή του διαλύματος σε eppendorf.
- ✓ Έκπλυση με 6 mL (2 mL επί 3 φορές) με το διάλυμα έκπλυσης I.
- ✓ Έκπλυση με 6 mL (2 mL επί 3 φορές) με το διάλυμα έκπλυσης II.
- ✓ Έκπλυση με 8 mL (2 mL επί 4 φορές) με το διάλυμα έκπλυσης III.
- ✓ Έκπλυση των πρωτεϊνών διαδοχικά με τα διαλύματα έκπλυσης I έως VI
- ✓ Αναγέννηση της στήλης με 5 mL EDTA
- ✓ Τελική έκπλυση με 10 mL ddH₂O.

Η περιεκτικότητα των εκλούσεων σε πρωτεΐνη εκτιμήθηκε με τη μέθοδο Bradford (§2.2.18) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (12,5% SDS-PAGE) κάτω από συνθήκες μετουσίωσης (§ 2.2.20).

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία του καθαρισμού ήταν:

Διάλυμα εξισορρόπησης (Lysis buffer, pH = 8)

- 50mM Na₂HPO₄
- 300mM NaCl
- 10mM ιμιδαζόλιο

Διάλυμα έκπλυσης I (Wash buffer I, pH=8)

- 50mM Na₂HPO₄
- 300mM NaCl

Διάλυμα έκπλυσης II (Wash buffer II)

- 20% γλυκερόλη

Διάλυμα έκπλυσης III (Wash buffer III, pH=6,3)

- 50mM Na₂HPO₄
- 300mM NaCl

Υδατικό διάλυμα χλωριούχου νικελίου (H₂O·NiCl₂, 5mg/mL)

Διάλυμα αναγέννησης (0,1 M EDTA)

Διαλύματα εκλούσεων(I έως VI, pH=8)

- 50mM Na₂HPO₄
- 300mM NaCl
- Ιμιδαζόλιο σε συγκεντρώσεις 20, 50, 100, 200, 250 και 350mM

2.2.24. Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με χρήση τριχλωρικού οξέος (TCA)

Η μέθοδος της κατακρήμνισης με τριχλωρικό οξύ χρησιμοποιείται ευρέως προκειμένου να συμπυκνωθούν πρωτεϊνικά δείγματα ή να απομακρυνθούν συστατικά, όπως τα άλατα, τα οποία παρεμποδίζουν διαδικασίες όπως η

ηλεκτροφόρηση SDS – PAGE. Οι εκλούσεις που προήλθαν από τη διαδικασία του καθαρισμού, είχαν χαμηλή συγκέντρωση σε πρωτεΐνες. Για τη συμπύκνωση και την απομάκρυνση αλάτων ιμιδαζολίου από τα δείγματα, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία (Luis Sanchez, 2001) :

- ✓ Προσθήκη υποτετραπλάσιου όγκου TCA (100% v/v) από τον όγκο κάθε έκλουσης και παραμονή τους στον πάγο για 20 λεπτά
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 9 λεπτά
- ✓ Απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 150 μ L «παγωμένης» ακετόνης
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 8 λεπτά
- ✓ Απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 150 μ L «παγωμένης» ακετόνης
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 8 λεπτά
- ✓ Τοποθέτηση του δείγματος στους 95°C για 5-8 λεπτά, ώστε να εξατμιστεί η ακετόνη

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Υπολογισμός της ενζυμικής αναστολής ή ενεργοποίησης του ενζύμου SIRT2 μέσω τυποποιημένου εμπορικού πακέτου.

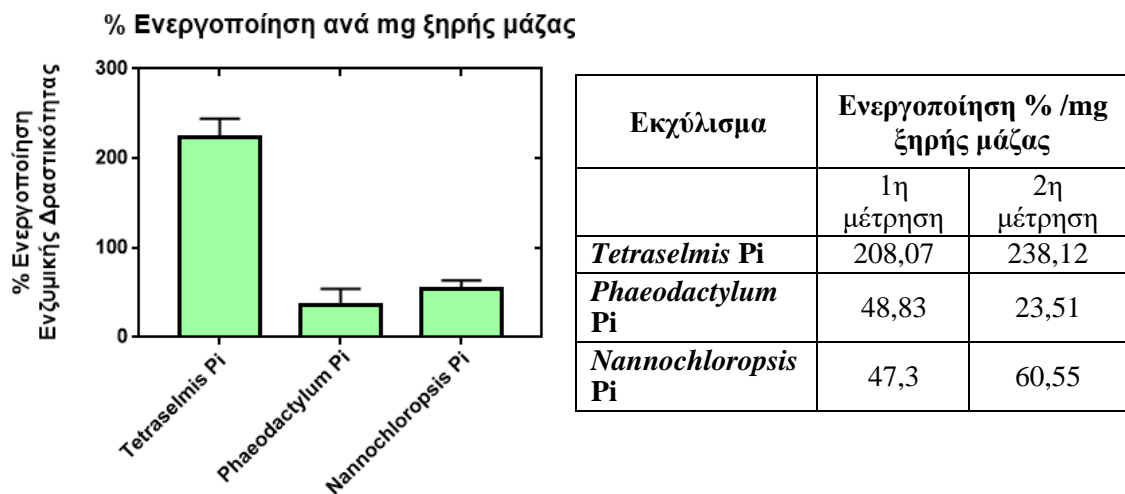
Στη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, επιχειρήσαμε να υπολογίσουμε την επίδραση που έχουν εκχυλίσματα με βιοδραστικές ουσίες, στη δραστικότητα του ενζύμου σιρτουίνη 2 (SIRT2). Για την επίτευξη αυτού του σκοπού χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό πακέτο *SIRT2 Inhibitor Screening Assay Kit*, της εταιρίας Sigma – Aldrich. Ακολουθώντας τις οδηγίες από το πρωτόκολλο, τα κατάλληλα διαλύματα του πακέτου αναμίχθηκαν σε μια μαύρη πλακέτα τύπου ELISA (96 θέσεων), και μετρήθηκε ο φθορισμός με τη χρήση φθορισμόμετρου, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.2.

Σε τελικό όγκο 100μL, μετρήθηκε η επίδραση που είχαν στη δραστικότητα του ενζύμου, 45μL βιοδραστικού εκχυλίσματος. Για κάθε ένα εκχύλισμα υπολογίστηκε ο φθορισμός που έχει στα συγκεκριμένα μήκη κύματος (Excitation/Emission = 395/541 nm), και η τιμή αυτή αφαιρέθηκε κάθε φορά από τη συνολική μέτρηση του φθορισμού, προκειμένου να υπολογιστεί καθαρά η μεταβολή που προκαλείται από τη διαφορά στη δραστικότητα του ενζύμου.

Επίδραση μικροφυκών

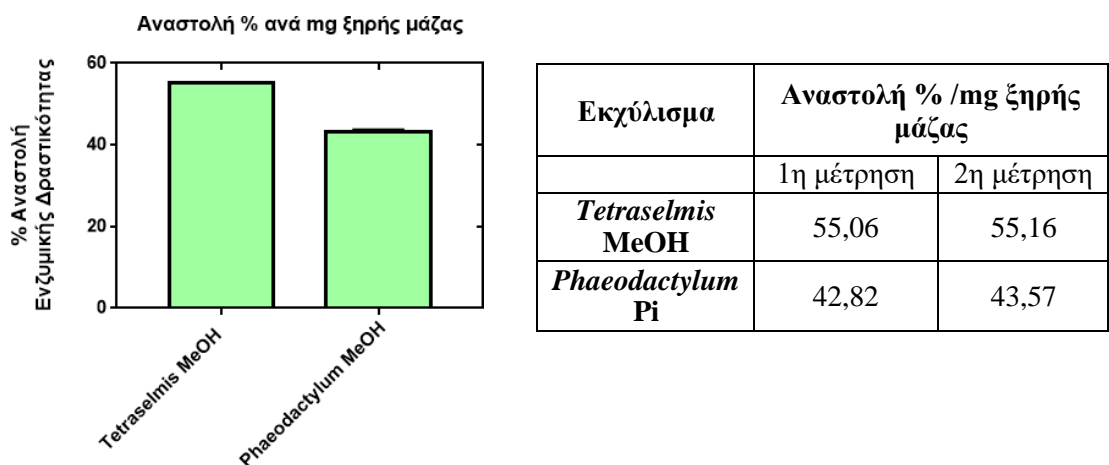
Αρχικά, ελέγχθηκαν μικροφύκη από τρία διαφορετικά γένη ως προς την αναστολή ή την ενεργοποίηση που προκαλούν στο ένζυμο SIRT2. Τα γένη αυτά ήταν τα *Phaeodactylum*, *Tetraselmis* και *Nannochloropsis*. Από τα δύο πρώτα δημιουργήθηκαν τόσο φωσφορικά όσο και μεθανολικά εκχυλίσματα, ενώ από το είδος *Nannochloropsis* δημιουργήθηκε μόνο μεθανολικό εκχύλισμα, με τρόπο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 3.1 και 3.2.

Παρατηρήθηκε ότι στην περίπτωση των εκχυλισμάτων από μικροφύκη, εκείνα που είχαν ως μέσο εκχύλισης, υδατικό διάλυμα δις – όξινου φωσφορικού καλίου (20 mM, pH=7), προκάλεσαν ενεργοποίηση στη SIRT2. Επίσης, ποσοτικά φαίνεται ότι το εκχύλισμα από το μικροφύκος *Tetraselmis*, ενεργοποιεί σε μεγαλύτερο βαθμό το ένζυμο σε σχέση με τα δύο άλλα (Διάγραμμα 3.1).



Διάγραμμα 3.1: Παρουσίαση της ενεργοποίησης % της δραστηριότητας του ενζύμου SIRT2, η οποία παρατηρείται μετά από αλληλεπίδραση με βιοδραστικά εκχυλίσματα μικροφυκών, που είχαν ως μέσο εκχύλισης υδατικό διάλυμα δις – όξινου φωσφορικού καλίου (20 mM, pH=7).

Αντίθετα, παρατηρήθηκε ότι τα εκχυλίσματα από μικροφύκη τα οποία είχαν ως μέσο εκχύλισης διάλυμα μεθανόλης – νερού (70:30 v/v), προκάλεσαν αναστολή στην ενζυμική δραστηριότητα της SIRT2 (Διάγραμμα 3.2).

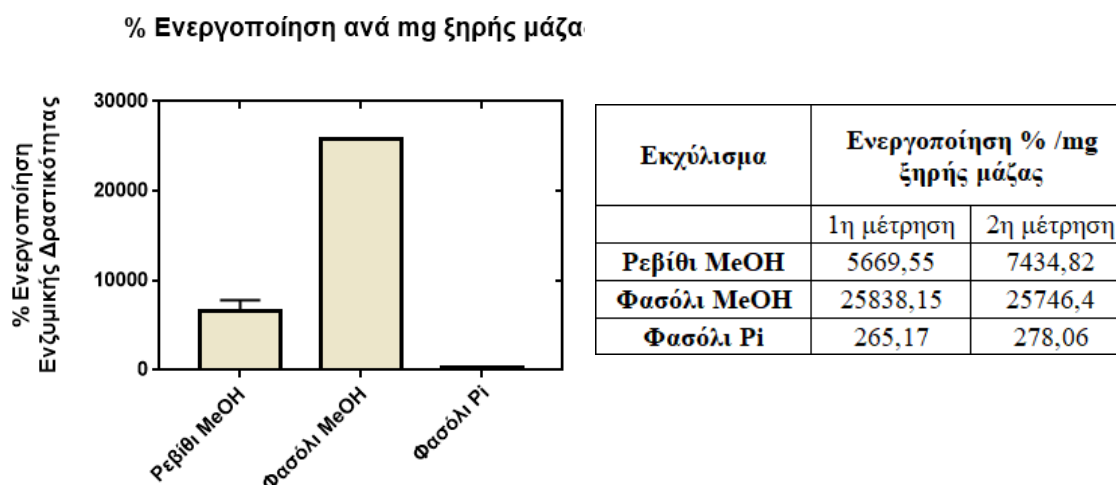


Διάγραμμα 3.2: Παρουσίαση της ενεργοποίησης % της δραστηριότητας του ενζύμου SIRT2, η οποία παρατηρείται μετά από αλληλεπίδραση με βιοδραστικά εκχυλίσματα μικροφυκών, που είχαν ως μέσο εκχύλισης διάλυμα μεθανόλης – νερού σε αναλογία 70:30 v/v.

Επίδραση ψυχανθών

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η αναστολή ή η ενεργοποίηση που προκαλούν στο ένζυμο SIRT2, εκχυλίσματα από σπόρους ψυχανθών. Συγκεκριμένα δημιουργήθηκαν εκχυλίσματα από *Phaseolus vulgaris* (κν. φασόλι) και *Cicer arietinum* (κν. ρεβίθι), χρησιμοποιώντας ως εκχυλιστικό μέσο υδατικό διάλυμα δις – όξινου φωσφορικού καλίου (20 mM, pH=7) και μίγμα μεθανόλης – νερού με αναλογία 70:30 (v/v), όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.

Στο Διάγραμμα 3.3, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης που είχαν τα εκχυλίσματα αυτά στην ενζυμική δραστικότητα της SIRT2:

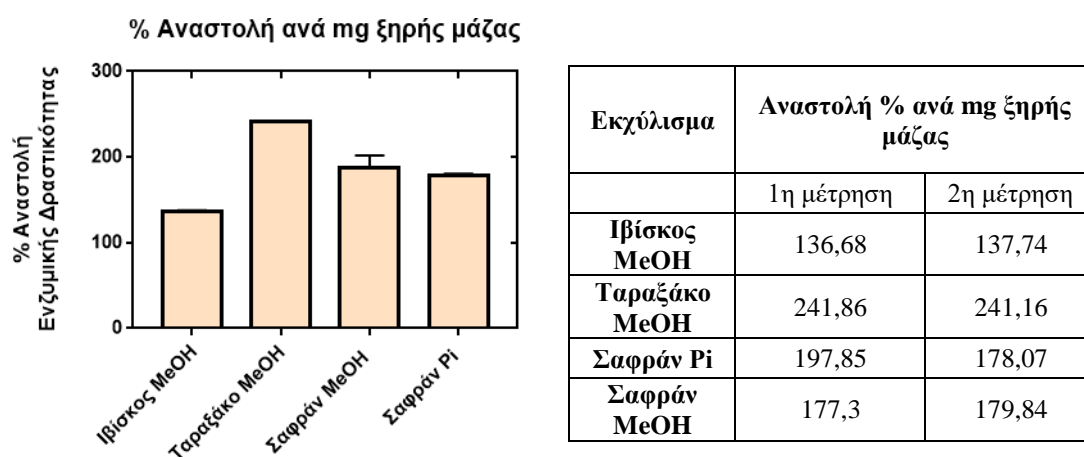


Διάγραμμα 3.3: Παρουσίαση της ενεργοποίησης % της δραστικότητας του ενζύμου SIRT2, η οποία παρατηρείται μετά από αλληλεπίδραση με βιοδραστικά εκχυλίσματα ψυχανθών, που είχαν ως μέσο εκχύλισης διάλυμα μεθανόλης – νερού σε αναλογία 70:30 v/v και KH_2PO_4 (20mM, pH=7).

Παρατηρείται, ότι τόσο τα μεθανολικά όσο και τα φωσφορικά εκχυλίσματα, προκαλούν ενεργοποίηση της ενζυμικής δραστικότητας της SIRT2. Πιο συγκεκριμένα, τα μεθανολικά εκχυλίσματα φαίνεται ότι ενεργοποιούν σε μεγαλύτερο βαθμό το ένζυμο σε σχέση με τα φωσφορικά, με το μεθανολικό εκχύλισμα από φασόλι να επιδεικνύει την μεγαλύτερη ενεργοποίηση.

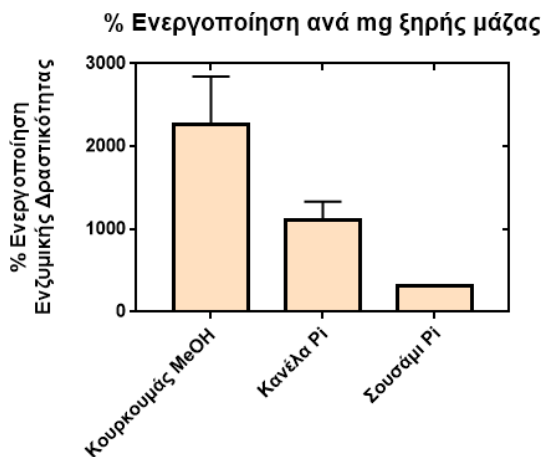
Επίδραση λοιπών φυτικών εκχυλισμάτων

Τέλος, ελέγχθηκε η αναστολή ή η ενεργοποίηση που προκαλείται στο ένζυμο SIRT2 από βιοδραστικά εκχυλίσματα των φυτών *Hibiscus sp.* (κν. ιβίσκος), *Curcuma longa* (κν. κουρκουμάς), *Crocus sativus* (κν. σαφράν), *Cinnamomum verum* (κν. κανέλα), *Taraxacum officinale* (κν. ταραξάκο) και *Sesamum indicum* (κν. σουσάμι). Δημιουργήθηκαν εκχυλίσματα με δύο διαλύτες. Με υδατικό διάλυμα δις – όξινου φωσφορικού καλίου (20 mM, pH=7) και με διάλυμα μεθανόλης – νερού με αναλογία 70:30 (v/v), με τους αντίστοιχους τρόπους που περιγράφονται στην παράγραφο 2.2.1. Στα Διαγράμματα 3.4. και 3.5. παρουσιάζονται γραφικά τα αποτελέσματα των μετρήσεων.



Διάγραμμα 3.4: Παρουσίαση της αναστολής % της δραστηκότητας του ενζύμου SIRT2, η οποία παρατηρείται μετά από αλληλεπίδραση με βιοδραστικά εκχυλίσματα φυτών, που είχαν ως μέσο εκχύλισης διάλυμα μεθανόλης – νερού σε αναλογία 70:30 % (v/v) και υδατικό διάλυμα KH_2PO_4 (20mM, pH=7).

Από τα αποτελέσματα που μετρήθηκαν, παρατηρείται ότι τα εκχυλίσματα από τα φυτά *Hibiscus sp* και *Taraxacum officinale* που είχαν ως εκχυλιστικό μέσο το διάλυμα μεθανόλης – νερού, προκαλούν αναστολή της δραστηκότητας του ενζύμου SIRT2, με το εκχύλισμα από ταραξάκο να υπερτερεί ποσοτικά έναντι του ιβίσκου. Επίσης, τόσο το μεθανολικό όσο και το φωσφορικό εκχύλισμα που προέρχονταν από το φυτό *Crocus sativus*, προκαλούν αναστολή της ενζυμικής δραστηκότητας. Η ένταση της αναστολής αυτής δε διαφέρει σημαντικά στα διαφορετικά εκχυλίσματα.

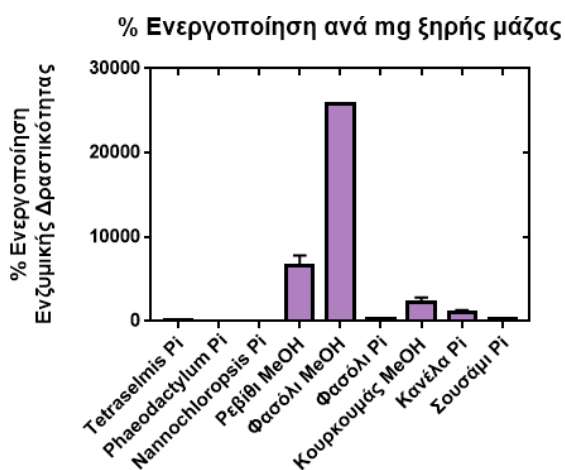


Εκχύλισμα	Ενεργοποίηση % /mg ξηρής μάζας	
	1η μέτρηση	2η μέτρηση
Κουρκουμάς MeOH	2672,96	1843,91
Κανέλα Pi	956,96	1268,1
Σουσάμι Pi	308,88	310,61

Διάγραμμα 3.5: Παρουσίαση της ενεργοποίησης % της δραστικότητας του ενζύμου SIRT2, η οποία παρατηρείται μετά από αλληλεπίδραση με βιοδραστικά εκχυλίσματα φυτών, που είχαν ως μέσο εκχύλισης διάλυμα μεθανόλης – νερού σε αναλογία 70:30 % (v/v) και υδατικό διάλυμα KH_2PO_4 (20 mM, pH=7).

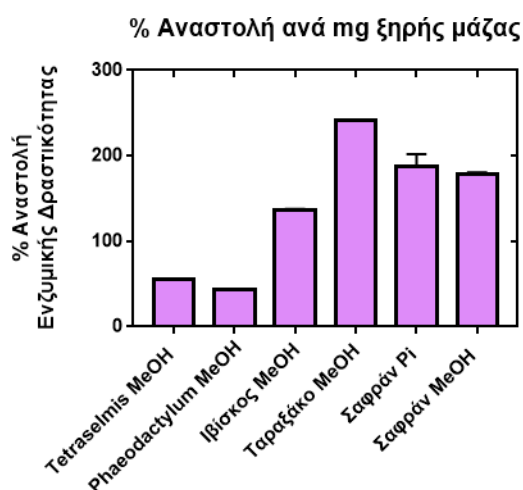
Κάποια από τα εκχυλίσματα που δημιουργήθηκαν, φαίνεται πως προκαλούν ενεργοποίηση της ενζυμικής δραστικότητας του ενζύμου SIRT2. Συγκεκριμένα, το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Curcuma longa*, και τα εκχυλίσματα με φωσφορικό κάλιο των φυτών *Cinnamotum verum* και *Sesamum indicum*. Παρατηρείται ότι το μεθανολικό εκχύλισμα από κουρκουμά, προκαλεί ποσοτικά μεγαλύτερη αναστολή σε σχέση με τα δύο άλλα εκχυλίσματα.

Στα Διαγράμματα 3.6 και 3.7 παρουσιάζονται συνολικά όλα τα εκχυλίσματα που δημιουργούν ενεργοποίηση και αναστολή αντίστοιχα. Παρατηρείται ότι στα εκχυλίσματα που προκαλούν ενεργοποίηση της δραστικότητας του ενζύμου SIRT2, ξεχωρίζει κατά πολύ αυτό που προέρχεται από φασόλι, και είχε ως εκχυλιστικό μέσο διάλυμα μεθανόλης – νερού. Ακολουθούν τα εκχυλίσματα από ρεβίθι και κουρκουμά, τα οποία επίσης δημιουργήθηκαν με το ίδιο εκχυλιστικό μέσο. Ως προς τα βιοδραστικά εκχυλίσματα που προκαλούν αναστολή της ενζυμικής δραστικότητας της SIRT2, παρατηρείται μικρότερη διακύμανση. Τη μεγαλύτερη αναστολή προκαλεί το μεθανολικό εκχύλισμα από το φυτό ταραξάκο, και ακολουθούν το μεθανολικό και το φωσφορικό εκχύλισμα από σαφράν.



Εκχύλισμα	Ενεργοποίηση % ανά mg ξηρής μάζας	
	1 ^η μέτρηση	2 ^η μέτρηση
Tetraselmis Pi	208,07	238,12
Phaeodactylum Pi	48,83	23,51
Nannochloropsis Pi	47,3	60,55
Ρεβίθι MeOH	5669,55	7434,82
Φασόλι MeOH	25838,15	25746,4
Φασόλι Pi	265,17	278,06
Κουρκουμάς MeOH	2672,96	1843,91
Κανέλα Pi	956,96	1268,1
Σουσάμι Pi	308,88	310,61

Διάγραμμα 3.6: Παρουσίαση της ενεργοποίησης % της δραστηριότητας του ενζύμου SIRT2, η οποία προκαλείται μετά από αλληλεπίδραση με βιοδραστικά εκχυλίσματα φυτών, που είχαν ως μέσο εκχύλισης διάλυμα μεθανόλης – νερού σε αναλογία 70:30 % (v/v) ή υδατικό διάλυμα KH_2PO_4 (20 mM, pH=7).



Εκχύλισμα	Αναστολή % ανά mg ξηρής μάζας	
	1η μέτρηση	2η μέτρηση
Tetra MeOH	55,06	55,16
Phaeo Pi	42,82	43,57
Ιβίσκος MeOH	136,68	137,74
Ταραξάκο MeOH	241,86	241,16
Σαφράν Pi	197,85	178,07
Σαφράν MeOH	177,3	179,84

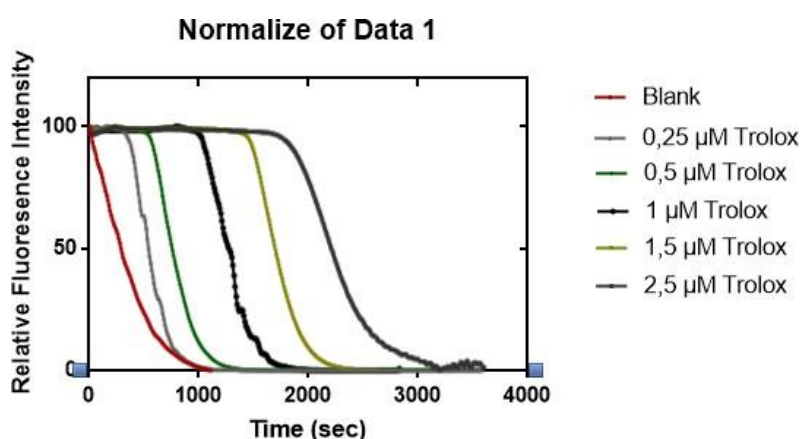
Διάγραμμα 3.7: Παρουσίαση της αναστολής % της δραστηριότητας του ενζύμου SIRT2, η οποία προκαλείται μετά από αλληλεπίδραση με βιοδραστικά εκχυλίσματα φυτών, που είχαν ως μέσο εκχύλισης διάλυμα μεθανόλης – νερού σε αναλογία 70:30 % (v/v) ή υδατικό διάλυμα KH_2PO_4 (20 mM, pH=7).

3.2. Υπολογισμός συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων

Στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε όλα τα βιοδραστικά εκχυλίσματα που δημιουργήθηκαν, προκειμένου να προσδιοριστεί η συνολική αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Πραγματοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές μετρήσεις: α) η μέθοδος ORAC, β) η μέθοδος FRAP και γ) η μέθοδος που χρησιμοποιεί την ελεύθερη ρίζα DPPH•, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.3.

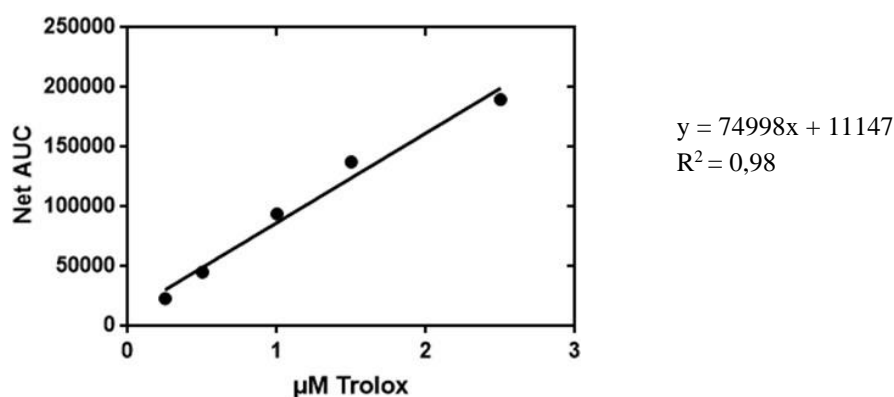
α) Υπολογισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ORAC

Η μέθοδος ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), προσδιορίζει τη μείωση της έντασης του φθορισμού που παρουσιάζει ένα δείγμα, ποσό ανάλογο της ποσότητας μιας φθορίζουσας ουσίας (fluorescein) η οποία οξειδώνεται. Ουσιαστικά, μετράται η ικανότητα των βιοδραστικών εκχυλισμάτων να λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίων, οξειδώνοντας με τον τρόπο αυτό τη φθορίζουσα ουσία. Η μέτρηση για κάθε ένα εκχύλισμα πραγματοποιείται σε διάρκεια περίπου 40 λεπτών. Οι διαδοχικές μετρήσεις οι οποίες σημειώνονται δημιουργούν μια καμπύλη. Με τη βοήθεια του προγράμματος GraphPad Prism 7, είμαστε σε θέση να υπολογίσουμε το εμβαδόν κάτω από την κάθε καμπύλη (Area Under Curve, AUC). Το εμβαδόν αυτό με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης που παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.8, υποδεικνύει τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα.



Διάγραμμα 3.8: Πρότυπο διάγραμμα που παρουσιάζει τις καμπύλες μείωσης του φθορισμού της ουσίας fluorescein, μετά από την αλληλεπίδρασή της με συγκεκριμένες συγκεντρώσεις του αντιδραστηρίου Trolox, στη διάρκεια του χρόνου.

Μετά τον υπολογισμό του εμβαδού για κάθε μια από τις καμπύλες δημιουργείται τελικά η πρότυπη καμπύλη που παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.9:

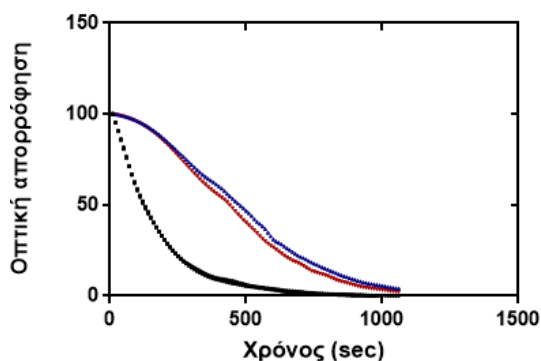


Διάγραμμα 3.9: Πρότυπη καμπύλη που παρουσιάζει την εξάρτηση της συγκέντρωσης του αντιδραστηρίου Trolox (μM) με το αντίστοιχο εμβαδό που δημιουργείται κάτω από την καμπύλη (Net AUC).

Η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε βιοδραστικού εκχυλίσματος, υπολογίζεται ως ισοδύναμα μM Trolox σε κάθε δείγμα. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτός ο σκοπός, υπολογίζεται το εμβαδόν που δημιουργείται κάτω από την καμπύλη για κάθε ένα εκχύλισμα, με δύο επαναλήψεις. Από την τιμή αυτή, αφαιρείται το εμβαδόν που δημιουργείται από την απορρόφηση του καθαρού δείγματος στην ίδια συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε και για τις μετρήσεις (Blank). Στη συνέχεια, μετράται η ξηρή μάζα που περιέχει η ποσότητα των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση με λυοφιώση (§ 2.2.5.), και υπολογίζεται η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εκχυλίσματος ως ισοδύναμα μM Trolox ανά mg ξηρής μάζας εκχυλίσματος, σύμφωνα με τις πρότυπες καμπύλες.

Τα αποτελέσματα για κάθε ένα από τα εκχυλίσματα που δημιουργήθηκαν, εμφανίζονται αρχικά στη μορφή που παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.10. Σε κάθε περίπτωση αφαιρείται από το εμβαδόν που δημιουργεί η καμπύλη της απορρόφησης του δείγματος στη διάρκεια του χρόνου, το εμβαδόν που δημιουργεί η καμπύλη της απορρόφησης του μάρτυρα στη διάρκεια του χρόνου. Η τιμή αυτή αποτελεί το δίχτυ (net), του οποίου το μέγεθος μετατρέπεται σε μM Trolox ανά mg ξηρής μάζας, σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη. Ενδεικτικά χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα από το μεθανολικό εκχύλισμα ιβίσκου για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων.

ORAC - *Hibiscus sp.* (κν. Ιβίσκος) MeOH

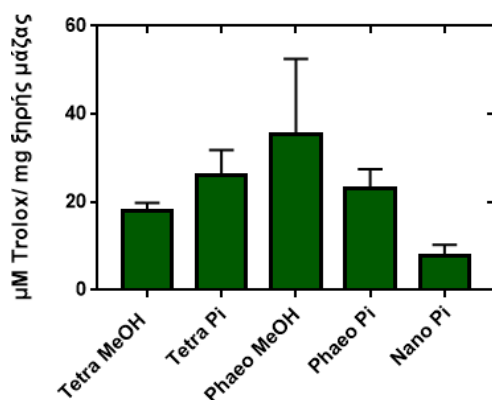


Διάγραμμα 3.10: Παράδειγμα εμφάνισης αποτελεσμάτων από τη μέθοδο ORAC. Μαύρη γραμμή: Απορρόφηση μάρτυρα στη διάρκεια του χρόνου, Κόκκινη & Μπλε γραμμή: Δύο επαναλήψεις μέτρησης της απορρόφησης του δείγματος (μεθανολικό εκχύλισμα ιβίσκου) στη διάρκεια του χρόνου.

Μικροφύκη

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί που αφορούσαν την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων που είχαν δημιουργηθεί από φύκη. Συγκεκριμένα μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων από φύκη *Tetraselmis*, *Phaeodactylum* και *Nannochloropsis*, τα οποία δημιουργήθηκαν έχοντας ως εκχυλιστικό μέσο διάλυμα μεθανόλης – νερού (70:30 v/v) και εκχυλίσματα από φύκη *Tetraselmis* και *Phaeodactylum* τα οποία είχαν ως εκχυλιστικό μέσο υδατικό διάλυμα δις – όξινου φωσφορικού καλίου (20 mM, pH=7). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σχηματικά στο Διάγραμμα 3.10.

Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων από φύκη - ORAC



Εκχύλισμα	μM Trolox ανά mg ξηρής μάζας εκχυλίσματος	
	1 ^η μέτρηση	2 ^η μέτρηση
<i>Tetraselmis</i> MeOH	16,536	19,271
<i>Tetraselmis</i> Pi	21,987	30,152
<i>Phaeodactylum</i> MeOH	47,459	23,049
<i>Phaeodactylum</i> Pi	26,202	20,092
<i>Nannochloropsis</i> Pi	6,129	9,548

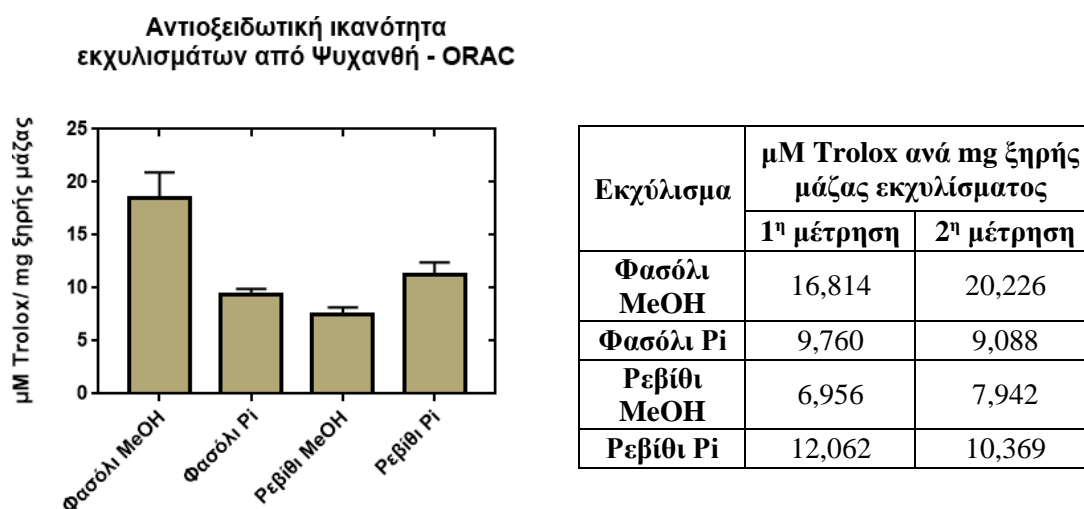
Διάγραμμα 3.11: Παρουσίαση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των βιοδραστικών εκχυλισμάτων φυκών, τα οποία είχαν ως εκχυλιστικό μέσο διάλυμα μεθανόλης – νερού ή φωσφορικό διάλυμα KH_2PO_4 (20 mM, pH=7). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ισοδύναμα μM Trolox ανά mg ξηρής μάζας εκχυλίσματος, σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη.

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 3.10, παρατηρείται ότι το μεθανολικό εκχύλισμα που προέρχεται από το φύκος *Phaeodactylum* έχει τη μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα, μετρημένη σε ισοδύναμα μM Trolox ανά mg ξηρής μάζας εκχυλίσματος. σύμφωνα με τη μέθοδο ORAC. Αντίθετα, το φωσφορικό εκχύλισμα από το φύκος *Nano*, διαθέτει τη μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Ψυχανθή

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των βιοδραστικών εκχυλισμάτων που είχαν δημιουργηθεί από τα ψυχανθή *Phaseolus vulgaris* (κν. φασόλι) και *Cicer arietinum* (κν. ρεβίθι), και είχαν ως εκχυλιστικά μέσα διάλυμα μεθανόλης νερού και διάλυμα δις – όξινου φωσφορικού καλίου (§ 2.2.1.).

Σύμφωνα με τις μετρήσεις που παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.11, παρατηρείται ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα κυμαίνεται μεταξύ 18,52 (μεθανολικό εκχύλισμα που προέρχεται από φασόλι) και 7,449 (μεθανολικό εκχύλισμα που προέρχεται από ρεβίθι) μM Trolox ανά mg ξηρής μάζας.

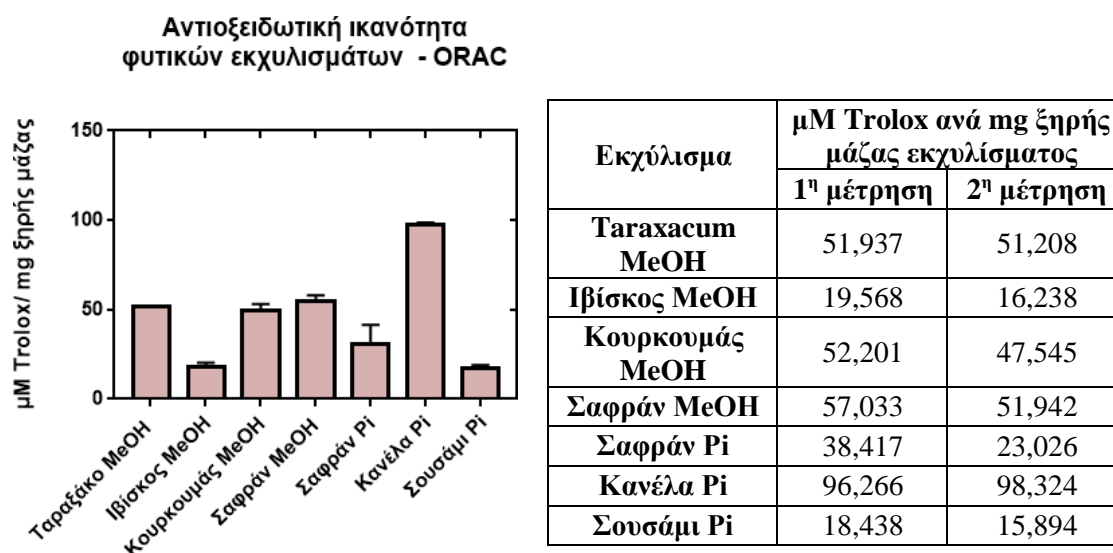


Διάγραμμα 3.12 Παρουσίαση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των βιοδραστικών εκχυλισμάτων ψυχανθρών, τα οποία είχαν ως εκχυλιστικό μέσο διάλυμα μεθανόλης – νερού ή φωσφορικό διάλυμα KH_2PO_4 (20 mM, pH=7). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ισοδύναμα μM Trolox ανά mg ξηρής μάζας εκχυλίσματος, σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη.

Λοιπά φυτικά εκχυλίσματα

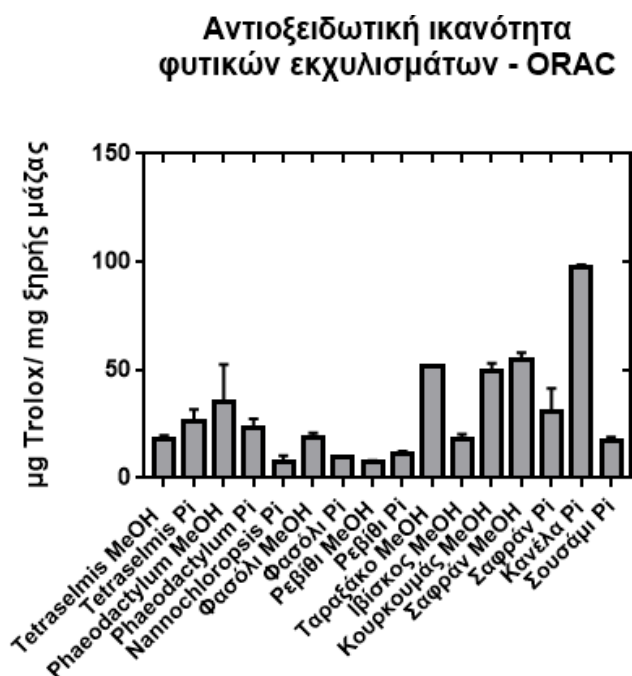
Τέλος, η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα μετρήθηκε με τη μέθοδο ORAC και για τα εκχυλίσματα που είχαν δημιουργηθεί από τα φυτά *Hibiscus sp.* (κν. ιβίσκος), *Curcuma longa* (κν. κουρκουμάς), *Crocus sativus* (κν. σαφράν), *Cinnamomum verum* (κν. κανέλα), *Taraxacum officinale* (κν. ταραξάκο) και *Sesamum indicum* (κν. σουσάμι). Τα εκχυλίσματα δημιουργήθηκαν έχοντας ως εκχυλιστικά μέσα είτε διάλυμα μεθανόλης – νερού, είτε διάλυμα δις – όξινου φωσφορικού καλίου (§ 2.2.1.).

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.12. Παρατηρείται ότι από τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα, το μεθανολικό εκχύλισμα από ιβίσκο, καθώς και τα φωσφορικά εκχυλίσματα από σαφράν και σουσάμι, παρουσιάζουν τη μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, όπως αυτή μετράται με τη μέθοδο ORAC. Τα μεθανολικά εκχυλίσματα που προέρχονται από ταραξάκο, κουρκουμά και σαφράν διαθέτουν μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα που κυμαίνεται λίγο πάνω από 50μM Trolox ανά mg ξηρής μάζας. Τέλος, το εκχύλισμα που προέρχεται από κανέλα και δημιουργήθηκε με εκχυλιστικό μέσο διάλυμα δις – όξινου φωσφορικού καλίου, παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα (97,295 μM Trolox/ mg ξηρής μάζας).



Διάγραμμα 3.13: Παρουσίαση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των βιοδραστικών εκχυλισμάτων φυτών, τα οποία είχαν ως εκχυλιστικό μέσο διάλυμα μεθανόλης – νερού ή φωσφορικό διάλυμα KH_2PO_4 (20 mM, pH=7). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ισοδύναμα μM Trolox ανά mg ξηρής μάζας εκχυλίσματος, σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη.

Στο Διάγραμμα 3.13, παρουσιάζονται συνολικά τα αποτελέσματα των μετρήσεων της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων, όπως υπολογίστηκε με τη μέθοδο RAC. Παρατηρείται γενικά διακύμανση των τιμών που κυμαίνεται από 7,449 (μεθανολικό εκχύλισμα από ρεβίθι), μέχρι 97,295 (φωσφορικό εκχύλισμα από κανέλα) μM Trolox ανά mg ξηρής μάζας. Δεν παρατηρείται κάποιο σαφές μοτίβο που να περιγράφει το μέγεθος της αντιοξειδωτικής ικανότητας σύμφωνα με τον τρόπο εκχύλισης. Συνολικά, το φωσφορικό εκχύλισμα κανέλας αρχικά και τα μεθανολικά εκχυλίσματα από ταραξάκο, κουρκουμά και σαφράν στη συνέχεια, παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες τιμές αντιοξειδωτικής ικανότητας, εκφρασμένες σε ισοδύναμα μM Trolox, όπως αυτές μετρήθηκαν με τη μέθοδο ORAC (§ 2.2.3.).

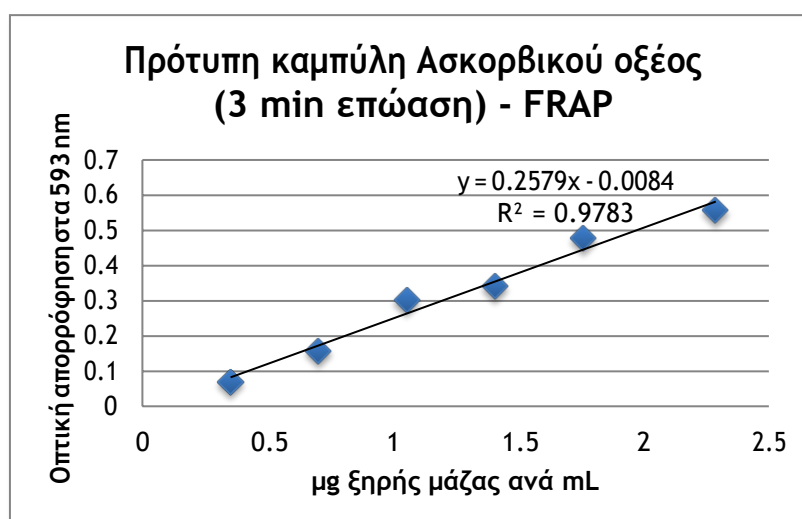


Διάγραμμα 3.14: Παρουσίαση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των βιοδραστικών εκχυλισμάτων που δημιουργήθηκαν στη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, τα οποία είχαν ως εκχυλιστικό μέσο διάλυμα μεθανόλης – νερού ή φωσφορικό διάλυμα KH_2PO_4 (20 mM, pH=7). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ισοδύναμα μM Trolox ανά mg ξηρής μάζας εκχυλίσματος, σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη.

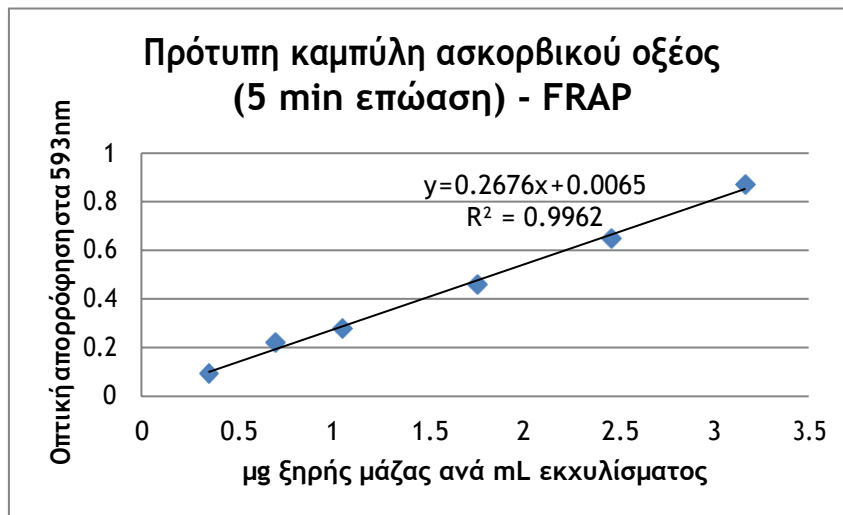
β) Υπολογισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP

Η δεύτερη μέθοδος η οποία χρησιμοποιήθηκε στη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας προκειμένου να υπολογιστεί η αντιοξειδωτική ικανότητα των βιοδραστικών εκχυλισμάτων, ήταν η μέθοδος FRAP. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αναγωγή του συμπλόκου του τρισθενούς σιδήρου με το αντιδραστήριο TPTZ από τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες των εκχυλισμάτων. Το ανηγμένο σύμπλοκο αποκτά μπλε χρώμα, το οποίο μετράται με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου. Η μεταβολή της οπτικής απορρόφησης αντικατοπτρίζει την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων (§2.2.3.).

Προκειμένου να επιτευχθεί η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, κατασκευάστηκαν αρχικά δύο πρότυπες καμπύλες, σύμφωνα με απορροφήσεις που μετρήθηκαν σε διαλύματα με γνωστές συγκεντρώσεις ασκορβικού οξέος. Η μια πρότυπη καμπύλη κατασκευάστηκε με διαλύματα τα οποία είχαν επωαστεί στο σκοτάδι, στους 25°C για 3 min, και χρησιμοποιήθηκε στην ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των μικροφυκών, ενώ η δεύτερη καμπύλη κατασκευάστηκε από διαλύματα τα οποία επώαστηκαν στις ίδιες συνθήκες για 5 min, και χρησιμοποιήθηκε στην ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υπόλοιπων εκχυλισμάτων.



Διάγραμμα 3.15: Πρότυπη καμπύλη υπολογισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP η οποία κατασκευάστηκε σύμφωνα με την οπτική απορρόφηση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης ασκορβικού οξέος, στα 593nm για χρόνο επώασης 3 min.

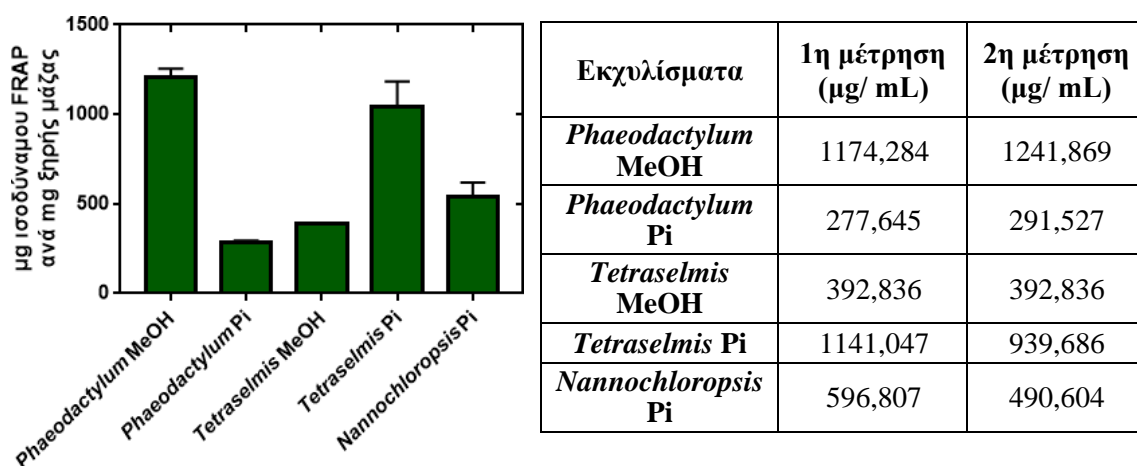


Διάγραμμα 3.16: Πρότυπη καμπύλη υπολογισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP η οποία κατασκευάστηκε σύμφωνα με την οπτική απορρόφηση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης ασκορβικού οξέος, στα 593nm για χρόνο επώασης 5 min.

Μικροφύκη

Αρχικά, ελέγχθηκε με τη μέθοδο FRAP η περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικές ουσίες, σε εκχυλίσματα από τα μικροφύκη *Phaeodactylum*, *Tetraselmis* και *Nannochloropsis*. Τα εκχυλίσματα είχαν δημιουργηθεί έχοντας ως εκχυλιστικό μέσο είτε διάλυμα μεθανόλης – νερού (70:30% v/v), είτε υδατικό διάλυμα δις – όξινου φωσφορικού καλίου, και δημιουργήθηκαν με τρόπο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1. Ο υπολογισμός της περιεκτικότητάς τους σε αντιοξειδωτικές ουσίες πραγματοποιήθηκε με βάση την πρότυπη καμπύλη η οποία παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.15, καθώς στη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας τα δείγματα αφέθηκαν να επωαστούν για 3 λεπτά στο σκοτάδι, στους 25°C. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.17.

Σύμφωνα με το διάγραμμα αυτό, παρατηρείται ότι το μεθανολικό εκχύλισμα από το μικροφύκος *Phaeodactylum* και το φωσφορικό εκχύλισμα από το μικροφύκος *Tetraselmis* έχουν την μεγαλύτερη συγκριτικά τιμή FRAP, 1208,076 μg/mg και 1040,366 μg/mg αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα τρία εκχυλίσματα έχουν περίπου τη μισή τιμή FRAP (φωσφορικό εκχύλισμα από το μικροφύκος *Nannochloropsis*) ή μικρότερη (φωσφορικό εκχύλισμα από το μικροφύκος *Phaeodactylum* και μεθανολικό εκχύλισμα από το μικροφύκος *Tetraselmis*).

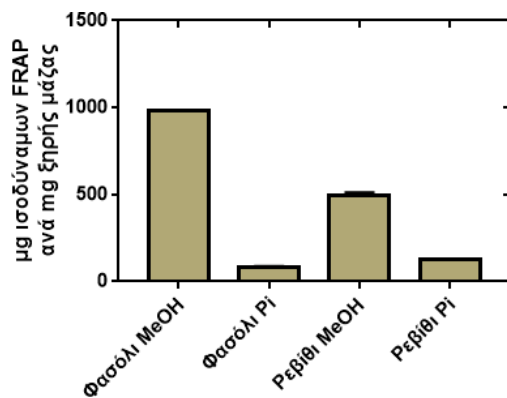


Διάγραμμα 3.17: Παρουσίαση της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων από φύκη σε αντιοξειδωτικές ουσίες, σύμφωνα με τη μέθοδο FRAP. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μg ισοδύναμων FRAP ανά mg ξηρής μάζας εκχυλίσματος.

Ψυχανθή

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικές ουσίες σε εκχυλίσματα από τα ψυχανθή *Phaseolus vulgaris* (κν. φασόλι) και *Cicer arietinum* (κν. ρεβίθι), με τη μέθοδο FRAP. Τα εκχυλίσματα είχαν δημιουργηθεί έχοντας ως εκχυλιστικό μέσο είτε διάλυμα μεθανόλης – νερού (70:30% v/v), είτε υδατικό διάλυμα δις – όξινου φωσφορικού καλίου, και δημιουργήθηκαν με τρόπο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1. Η ποσοτικοποίηση της περιεκτικότητας σε αντιοξειδωτικές ουσίες πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη η οποία παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.16, καθώς στη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, τα δείγματα επώαστηκαν για 5 λεπτά στο σκοτάδι στους 25°C. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.18.

Σύμφωνα με την εικόνα που παρουσιάζεται στο διάγραμμα αυτό, παρατηρείται ότι τα μεθανολικά εκχυλίσματα τόσο από το φυτό *Phaseolus vulgaris*, όσο και από το φυτό *Cicer arietinum* παρουσιάζουν μεγαλύτερη τιμή FRAP από τα αντίστοιχα φωσφορικά εκχυλίσματα των ίδιων φυτών (983,146 μg/mg έναντι 82,238 μg/mg για το φασόλι και 495,578 μg/mg έναντι 127,231 μg/mg για το ρεβίθι).



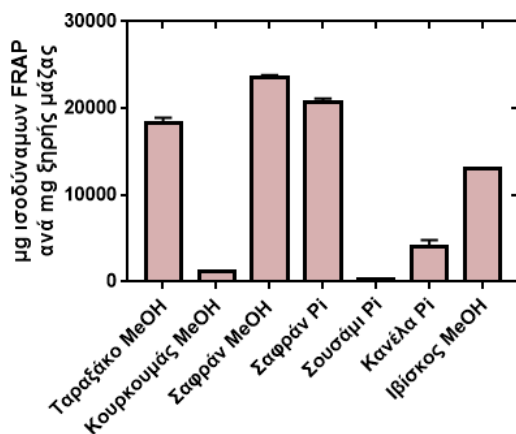
Εκχυλίσματα	1η μέτρηση (μg/ mL)	2η μέτρηση (μg/ mL)
Φασόλι MeOH	981,636	984,656
Φασόλι Pi	86,004	78,473
Ρεβίθι MeOH	506,971	484,186
Ρεβίθι Pi	125,028	129,434

Διάγραμμα 3.18: Παρουσίαση της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων από ψυχανθή σε αντιοξειδωτικές ουσίες, σύμφωνα με τη μέθοδο FRAP. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μg ισοδύναμων FRAP ανά mg ξηρής μάζας εκχυλίσματος.

Λοιπά φυτικά εκχυλίσματα

Τέλος, υπολογίστηκε η περιεκτικότητα των υπόλοιπων φυτικών εκχυλισμάτων σε αντιοξειδωτικές ουσίες σύμφωνα με τη μέθοδο FRAP. Συγκεκριμένα δημιουργήθηκαν εκχυλίσματα από τα φυτά *Hibiscus sp.* (κν. ιβίσκος), *Curcuma longa* (κν. κουρκουμάς), *Crocus sativus* (κν. σαφράν), *Cinnamomum verum* (κν. κανέλα), *Taraxacum officinale* (κν. ταραξάκο) και *Sesamum indicum* (κν. σουσάμι) με εκχυλιστικό μέσο είτε διάλυμα μεθανόλης – νερού (70:30 % v/v), είτε υδατικό διάλυμα δις όξινου φωσφορικού καλίου (20 mM, pH=7), όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη που παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.16, καθώς στη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας τα δείγματα επωάστηκαν για 5 min στο σκοτάδι στους 25°C. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.19.

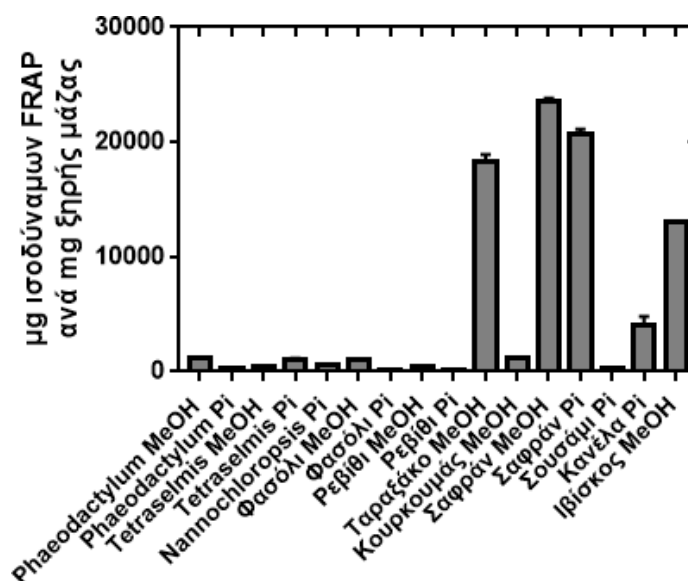
Σύμφωνα με το διάγραμμα αυτό, παρατηρείται ότι τα μεθανολικά εκχυλίσματα από τα φυτά *Taraxacum officinale*, *Crocus sativus* και *Hibiscus sp.* καθώς και το φωσφορικό εκχύλισμα από το φυτό *Crocus sativus*, έχουν την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικές ουσίες, σύμφωνα με τη μέθοδο FRAP, η οποία υπολογίστηκε σε 18303,21 μg/mg, 23595,1 μg/mg, 13023,27 μg/mg και 20708.24 μg/mg, αντίστοιχα. Το μεθανολικό εκχύλισμα από το φυτό *Curcuma longa*, καθώς και τα φωσφορικά εκχυλίσματα από τα φυτά *Cinnamomum verum* και *Sesamum indicum*, παρουσιάζουν αισθητά μικρότερη περιεκτικότητα αντιοξειδωτικών ουσιών.



Εκχυλίσματα	1η μέτρηση (μg/ mL)	2η μέτρηση (μg/ mL)
Ταραξάκο MeOH	18726,592	17879,82
Κουρκουμάς MeOH	1220,249	1211,619
Σαφράν MeOH	23756,712	23433,49
Σαφράν Ρι	20410,994	21005,49
Σουσάμι Ρι	260,254	286,9464
Κανέλα Ρι	4569,288	3430,712
Ιβίσκος MeOH	13013,224	13033,31

Διάγραμμα 3.19: Παρουσίαση της περιεκτικότητας των υπόλοιπων φυτικών εκχυλισμάτων σε αντιοξειδωτικές ουσίες, σύμφωνα με τη μέθοδο FRAP. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μg ισοδύναμων FRAP ανά mg ξηρής μάζας εκχυλίσματος

Τέλος, στο Διάγραμμα 3.20, παρουσιάζεται συνολικά η τιμή FRAP όλων των εκχυλισμάτων που δημιουργήθηκαν.



Διάγραμμα 3.20: Παρουσίαση της περιεκτικότητας των φυτικών εκχυλισμάτων σε αντιοξειδωτικές ουσίες, σύμφωνα με τη μέθοδο FRAP. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μg ισοδύναμων FRAP ανά mg ξηρής μάζας εκχυλίσματος.

Από το διάγραμμα αυτό παρατηρείται ότι τα μεθανολικά εκχυλίσματα τα οποία προέρχονται από τα φυτά *Taraxacum officinale*, *Crocus sativus* και *Hibiscus sp.* καθώς και το φωσφορικό εκχύλισμα από το φυτό *Crocus sativus*, έχουν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικές ουσίες, διαφέροντας σημαντικά από όλα τα υπόλοιπα, όπως μετράται με τη μέθοδο FRAP.

γ) Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο που χρησιμοποιεί την ελεύθερη ρίζα DPPH•

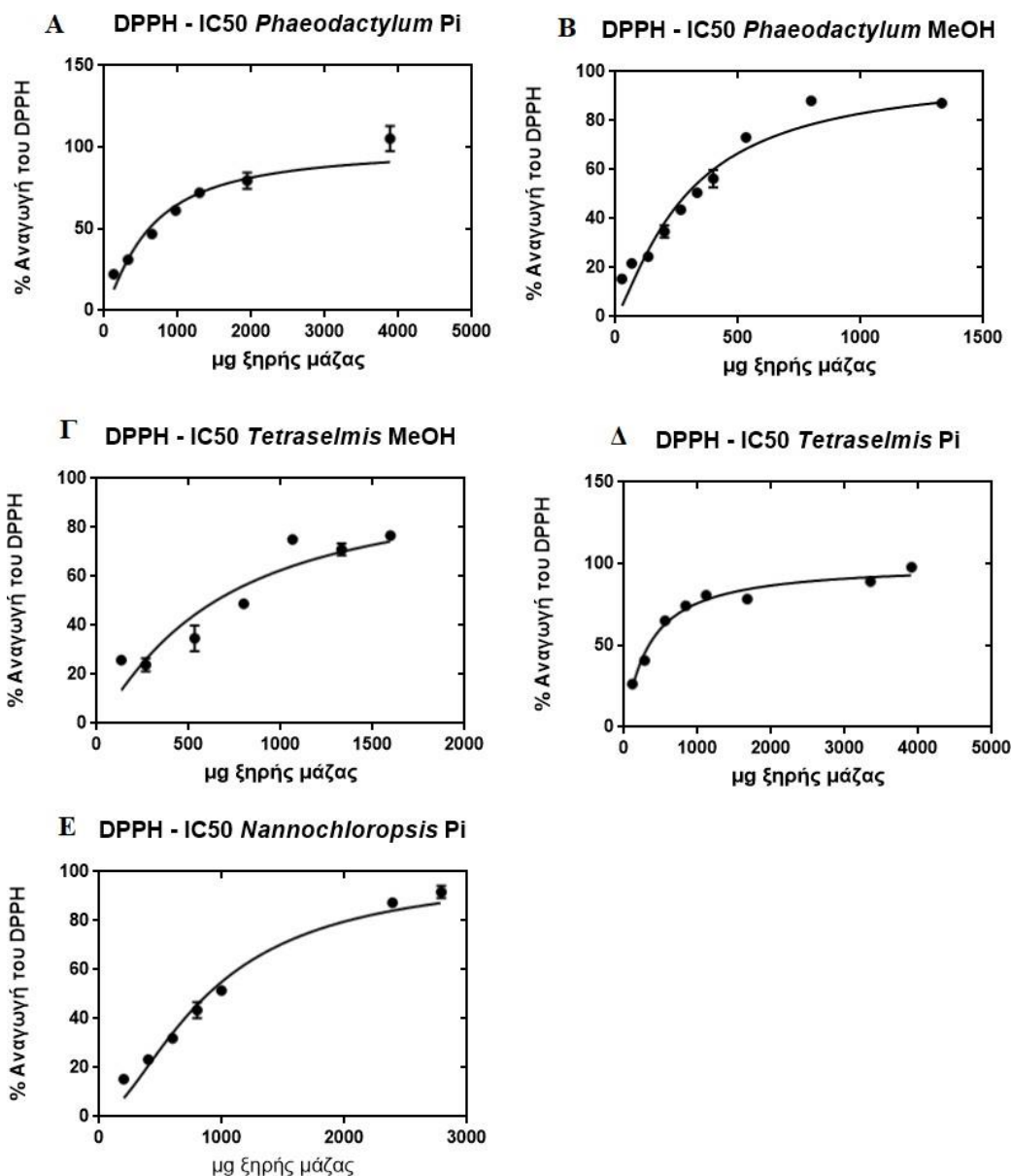
Η τρίτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας προκειμένου να υπολογιστεί η αντιοξειδωτική ικανότητα των βιοδραστικών εκχυλισμάτων, ήταν η μέθοδος που χρησιμοποιεί την ελεύθερη ρίζα DPPH•. Με τη μέθοδο αυτή ελέγχεται το κατά πόσο τα συστατικά των εκχυλισμάτων έχουν την ιδιότητα να λειτουργούν ως δότες κατιόντων υδρογόνου, αλλάζοντας το φορτίο των ελευθέρων ριζών. Η αλλαγή αυτή προκαλεί αλλαγή στο χρώμα του διαλύματος της κυψελίδας, καθώς το ιώδες χρώμα του αντιδραστηρίου μετατρέπεται σταδιακά σε κίτρινο, ανάλογα με τη συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ουσίας (§2.2.3.).

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, για κάθε εκχύλισμα, μετρήθηκε η απορρόφηση που είχαν τα δείγματα για διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων. Με τις μετρήσεις αυτές δημιουργήθηκαν καμπύλες όπως παρουσιάζονται στο Διάγραμμα, σύμφωνα με τις οποίες είναι δυνατόν να υπολογιστεί η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που προκαλεί αναγωγή της μισής ποσότητας DPPH που υπάρχει στην κυψελίδα (IC50).

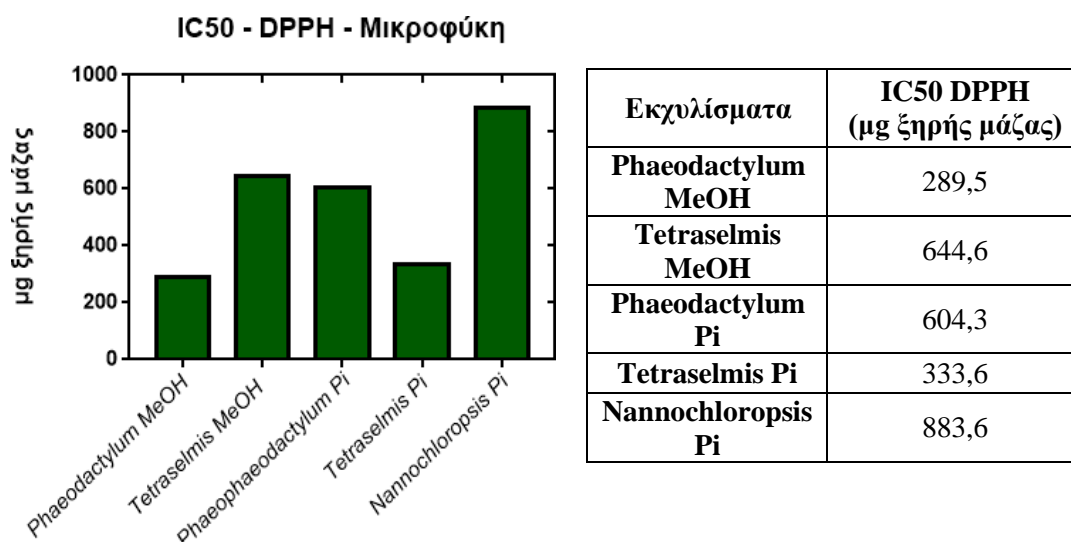
Μικροφύκη

Αρχικά μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων από μικροφύκη, τα οποία είχαν δημιουργηθεί έχοντας ως εκχυλιστικό μέσο διάλυμα μεθανόλης – νερού (70:30 % v/v) ή υδατικό διάλυμα δις – όξινου φωσφορικού καλίου (20 mM, pH=7). Συγκεκριμένα μετρήθηκε η ποσότητα ξηρής μάζας η οποία μειώνει στο μισό την ποσότητα του DPPH•, καθώς αυτό έχει αναχθεί σε DPPH-H. Οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα GraphPad Prism 7.

Στο Διάγραμμα 3.21, παρουσιάζονται αναλυτικά οι καμπύλες που σχηματίστηκαν για κάθε ένα από τα πέντε εκχυλίσματα που προέρχονται από μικροφύκη.



Διάγραμμα 3.21: Παρουσίαση του ποσοστού του αντιδραστηρίου DPPH που ανάγεται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων που προέρχονται από μικροφύκη. A: IC50 για το φωσφορικό εκχύλισμα από, B: IC50 για το φωσφορικό εκχύλισμα από *Phaeodactylum*, Γ: IC50 για το μεθανολικό εκχύλισμα από *Tetraselmis*, Δ: IC50 για το μεθανολικό εκχύλισμα από *Tetraselmis*, Ε: IC50 για το φωσφορικό εκχύλισμα από *Nannochloropsis*. Σύμφωνα με την καμπύλη αυτή υπολογίζεται η ποσότητα ξηρής μάζας εκχυλίσματος η οποία μειώνει στο μισό τις ελεύθερες ρίζες DPPH σε κάθε περίπτωση.



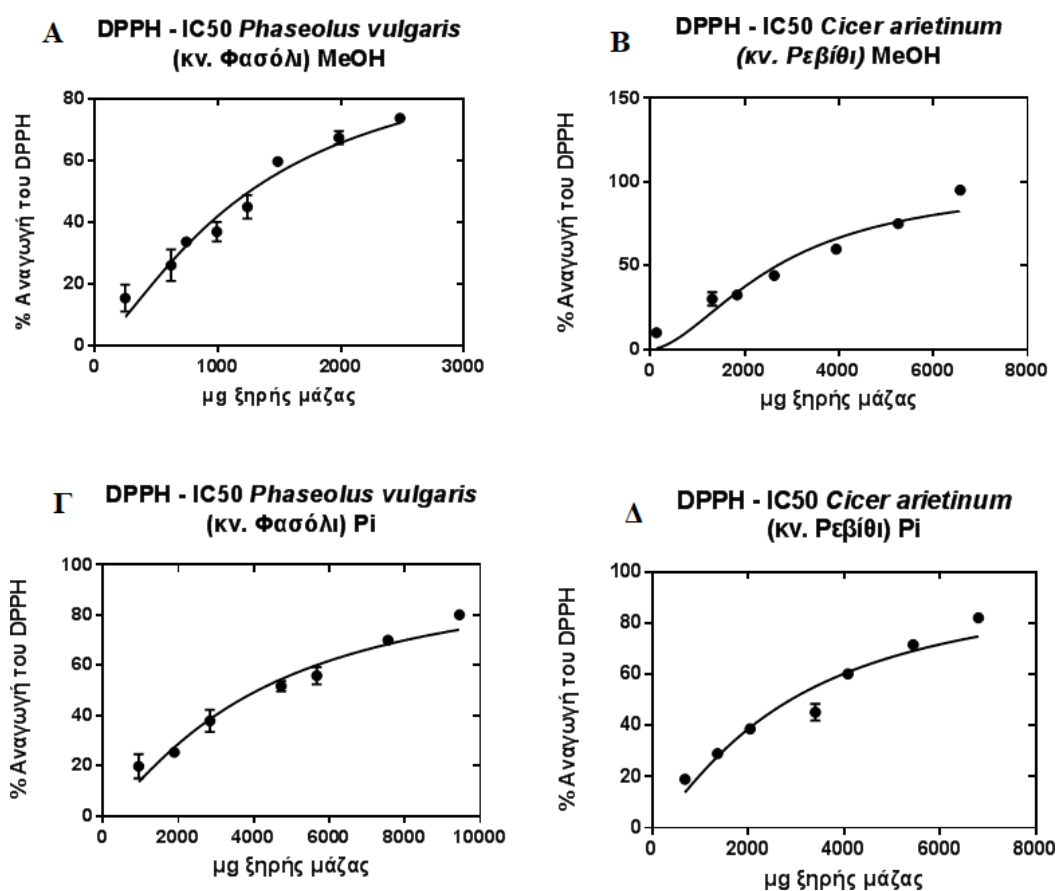
Διάγραμμα 3.22: Παρουσίαση των ποσοτήτων των εκχυλισμάτων από μικροφύκη (μg ξηρής μάζας), τα οποία μειώνουν στο μισό το ποσοστό των ελευθέρων ριζών DPPH σε κάθε περίπτωση (IC50).

Από τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στο Διάγραμμα 3.22 παρατηρείται ότι τα εκχυλίσματα που προέρχονται από μικροφύκη έχουν παρόμοια αντιοξειδωτική ικανότητα. Όπως αυτή μετράται με τη μέθοδο που χρησιμοποιεί το αντιδραστήριο DPPH. Συγκεκριμένα, οι ποσότητες ξηρής μάζας από τα διαφορετικά εκχυλίσματα, οι οποίες μειώνουν στο μισό το ποσοστό των ελευθέρων ριζών DPPH, και συνεπώς αντικατοπτρίζουν την ικανότητα των εκχυλισμάτων να απελευθερώνουν κατιόντα υδρογόνου και άρα να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, κυμαίνονται από 289,5 μg (μεθανολικό εκχύλισμα από το φύκος *Phaeodactylum*) μέχρι 883,6 μg (φωσφορικό εκχύλισμα από το φύκος *Nannochloropsis*).

Ψυχανθή

Στη συνέχεια μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα με τη μέθοδο που χρησιμοποιεί το αντιδραστήριο DPPH, για εκχυλίσματα από τα φυτά *Phaseolus vulgaris* και *Cicer arietinum*, τα οποία είχαν δημιουργηθεί έχοντας ως εκχυλιστικό μέσο διάλυμα μεθανόλης – νερού (70:30 % v/v) ή υδατικό διάλυμα δις-όξινου φωσφορικού καλίου (20 mM, pH=7). Συγκεκριμένα μετρήθηκε η ικανότητά των εκχυλισμάτων να χάνουν κατιόντα υδρογόνου και συνεπώς να ανάγουν την ελεύθερη ρίζα DPPH• σε DPPH – H. Για κάθε ένα από τα εκχυλίσματα δημιουργήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος GraphPad Prism 7 ένα διάγραμμα που απεικονίζει την καμπύλη η

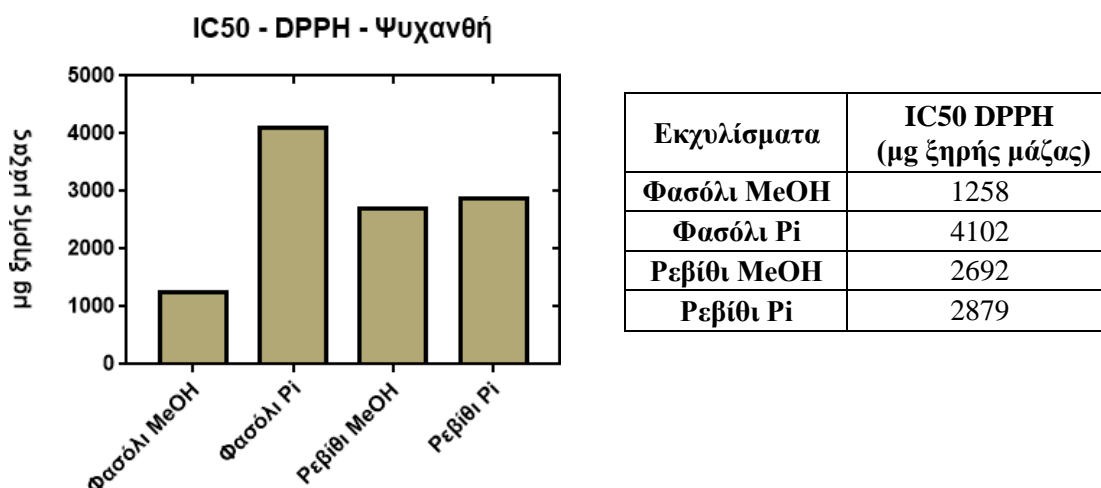
οποία δημιουργείται από την αναστολή η οποία προκαλείται από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος.



Διάγραμμα 3.23: Παρουσίαση του ποσοστού του αντιδραστηρίου DPPH που ανάγεται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων που προέρχονται από ψυχανθή. A: IC50 για το μεθανολικό εκχύλισμα από *Phaseolus vulgaris*, B: IC50 για το μεθανολικό εκχύλισμα από *Cicer arietinum*, Γ: IC50 για το φωσφορικό εκχύλισμα από *Phaseolus vulgaris*, Δ: IC50 για το φωσφορικό εκχύλισμα από *Cicer arietinum*. Σύμφωνα με την καμπύλη αυτή υπολογίζεται η ποσότητα ξηρής μάζας εκχυλίσματος η οποία μειώνει στο μισό τις ελεύθερες ρίζες DPPH σε κάθε περίπτωση.

Σύμφωνα με τις καμπύλες αυτές, προσεγγίζεται τελικά η ποσότητα ξηρής μάζας για κάθε εκχύλισμα, η οποία είναι ικανή να μειώσει στο μισό την ποσότητα του αντιδραστηρίου DPPH το οποίο βρίσκεται σε μορφή ελεύθερης ρίζας. Τα αποτελέσματα αυτά για τα ψυχανθή παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.24. Παρατηρείται ότι μεγαλύτερη ποσότητα ξηρής μάζας εκχυλίσματος για τη μείωση του ποσοστού των ελευθέρων ριζών DPPH, απαιτείται στην περίπτωση του φωσφορικού διαλύματος από φασόλι (4102 μγ), ενώ η μικρότερη απαιτείται στην περίπτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος από φασόλι (1258 μγ). Ως προς το ρεβίθι,

τόσο το μεθανολικό όσο και το φωσφορικό εκχύλισμα παρουσιάζουν παρόμοια αντιοξειδωτική ικανότητα καθώς απαιτούνται 2692 μg και 2879 μg ξηρής μάζας αντίστοιχα από το κάθε ένα προκειμένου να μειωθεί στο μισό το ποσοστό των ελευθέρων ριζών DPPH.

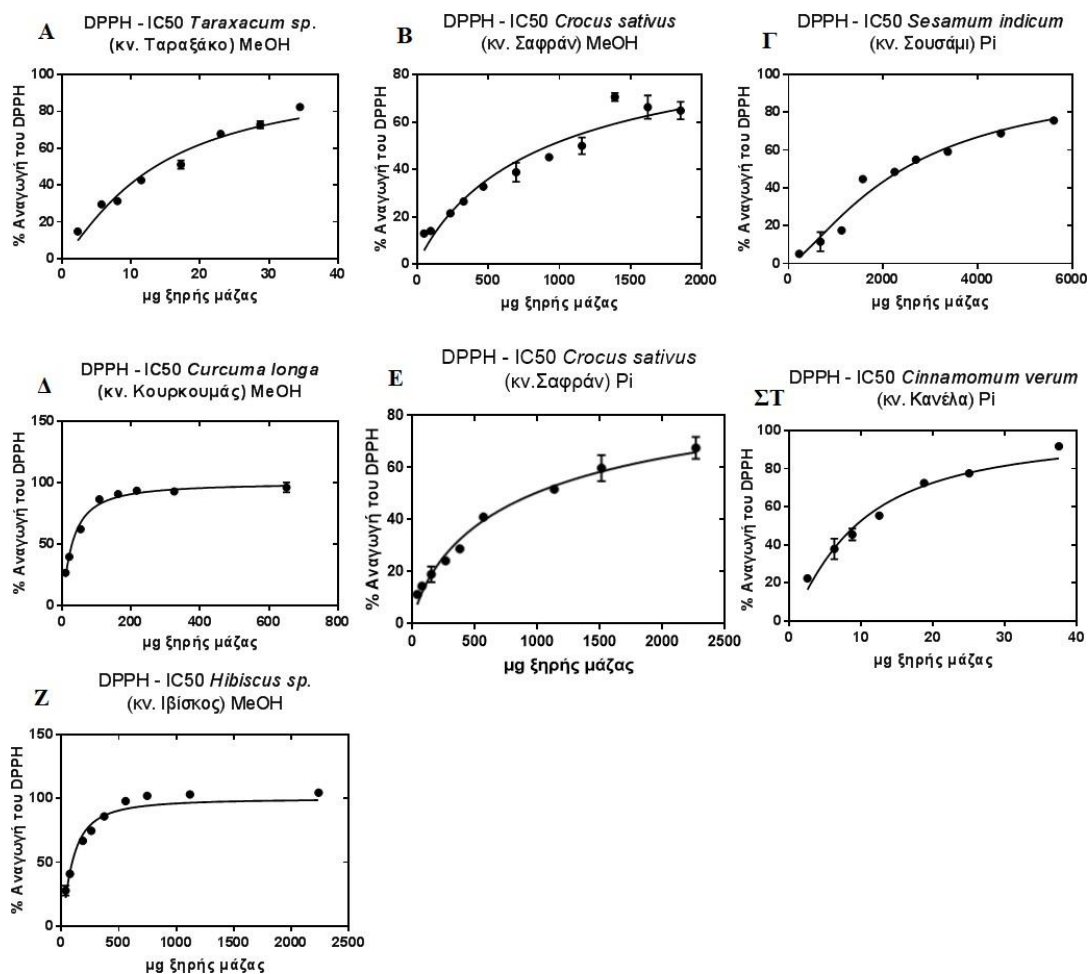


Διάγραμμα 3.24: Παρουσίαση των ποσοτήτων των εκχυλισμάτων από ψυχανθή (μg ξηρής μάζας), τα οποία μειώνουν στο μισό το ποσοστό των ελευθέρων ριζών DPPH σε κάθε περίπτωση (IC50).

Λοιπά φυτικά εκχυλίσματα

Τέλος μελετήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα με τη μέθοδο που χρησιμοποιεί το αντιδραστήριο DPPH \bullet , για φυτικά εκχυλίσματα από τα φυτά *Hibiscus sp.* (κν. ιβίσκος), *Curcuma longa* (κν. κουρκουμάς), *Crocus sativus* (κν. σαφράν), *Cinnamomum verum* (κν. κανέλα), *Taraxacum officinale* (κν. ταραξάκο) και *Sesamum indicum* (κν. σουσάμι). Τα εκχυλίσματα δημιουργήθηκαν έχοντας ως εκχυλιστικά μέσα είτε διάλυμα μεθανόλης – νερού, είτε διάλυμα δις – όξινου φωσφορικού καλίου (§ 2.2.1.).

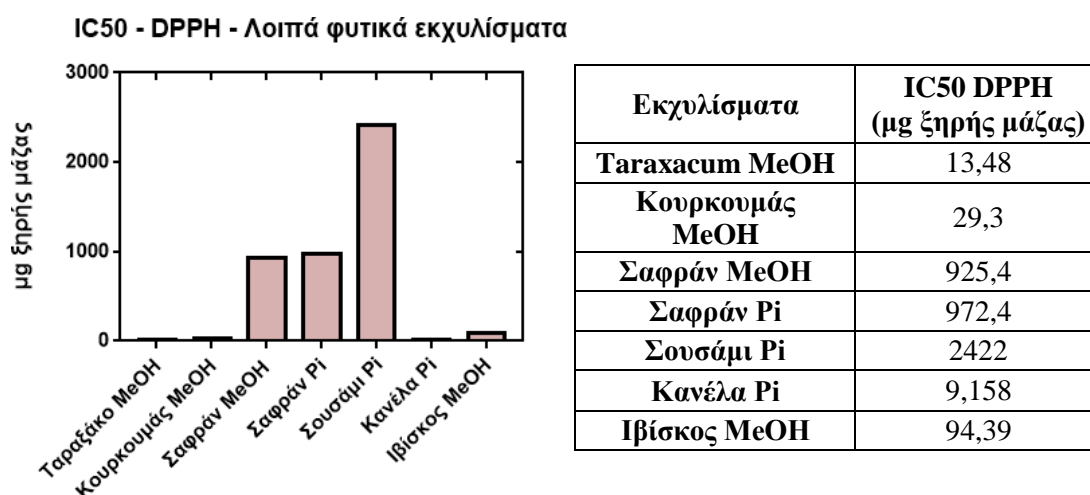
Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, έτσι και σε αυτά τα εκχυλίσματα δημιουργήθηκαν καμπύλες οι οποίες απεικόνιζαν το ποσοστό των ελευθέρων ριζών DPPH οι οποίες είχαν αναχθεί σε DPPH-H μετά την αλληλεπίδρασή τους με διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών εκχυλισμάτων. Οι καμπύλες οι οποίες δημιουργήθηκαν παρουσιάζονται αναλυτικά στο Διάγραμμα 3.25.



Διάγραμμα 3.25: Παρουσίαση του ποσοστού του αντιδραστηρίου DPPH που ανάγεται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων που προέρχονται από φυτικά εκχυλίσματα. Α: IC₅₀ για το μεθανολικό εκχύλισμα από το φυτό *Taraxacum sp.* Β: IC₅₀ για το μεθανολικό εκχύλισμα από το φυτό *Crocus sativus*, Γ: IC₅₀ για το φωσφορικό εκχύλισμα από το φυτό *Sesamum indicum*, Δ: IC₅₀ για το μεθανολικό εκχύλισμα από το φυτό *Curcuma longa*, Ε: IC₅₀ για το φωσφορικό εκχύλισμα από το φυτό *Crocus sativus*, ΣΤ: IC₅₀ για το φωσφορικό εκχύλισμα από το φυτό *Cinnamomum verum*, Ζ: IC₅₀ για το μεθανολικό εκχύλισμα από το φυτό *Hibiscus sp.* Σύμφωνα με την καμπύλη αυτή υπολογίζεται η ποσότητα ξηρής μάζας εκχυλίσματος η οποία μειώνει στο μισό τις ελεύθερες ρίζες DPPH σε κάθε περίπτωση.

Σύμφωνα με τις καμπύλες αυτές, προσεγγίζεται τελικά η ποσότητα ξηρής μάζας για κάθε εκχύλισμα, η οποία είναι ικανή να μειώσει στο μισό την ποσότητα του αντιδραστηρίου DPPH το οποίο βρίσκεται σε μορφή ελεύθερης ρίζας. Τα αποτελέσματα αυτά για κάθε εκχύλισμα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.26. Παρατηρείται ότι τα μεθανολικά εκχυλίσματα από ταραξάκο, κουρκουμά, και ιβίσκο, καθώς και το φωσφορικό εκχύλισμα από κανέλα, παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, καθώς απαιτείται μικρή ποσότητα ξηρής μάζας (13,48 μg,

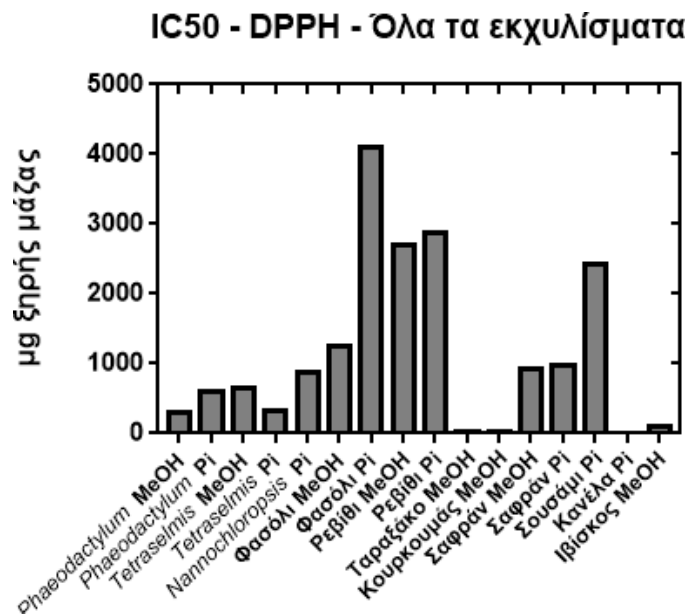
29,3 μg , 94,39 μg και 9,158 μg αντίστοιχα) προκειμένου να μειωθεί στο μισό το ποσοστό των ελευθέρων ριζών DPPH. Ως προς το σαφράν, τόσο το μεθανολικό όσο και το φωσφορικό εκχύλισμα παρουσιάζουν παρόμοιες τιμές IC50 (925,4 μg και 972,4 μg αντίστοιχα). Τέλος το φωσφορικό εκχύλισμα από σουσάμι φαίνεται να διαθέτει την μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα, καθώς απαιτούνται 2422 μg ξηρής μάζας προκειμένου να μειωθεί στο μισό το ποσοστό των ελευθέρων ριζών DPPH.



Διάγραμμα 3.26: Παρουσίαση των ποσοτήτων των φυτικών εκχυλισμάτων (μg ξηρής μάζας), τα οποία μειώνουν στο μισό το ποσοστό των ελευθέρων ριζών DPPH σε κάθε περίπτωση (IC50).

Τέλος, στο Διάγραμμα 3.27, παρουσιάζονται συνολικά οι ποσότητες κάθε εκχυλίσματος που απαιτούνται προκειμένου να μειωθεί στο μισό το ποσοστό των ελευθέρων ριζών DPPH (IC50).

Παρατηρείται ότι τα εκχυλίσματα τα οποία με αυτή τη μέθοδο φαίνεται να έχουν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα ανά μg ξηρής μάζας είναι τα μεθανολικά εκχυλίσματα από ταραξάκο, κουρκουμά και ιβίσκο, καθώς και το φωσφορικό εκχύλισμα από κανέλα. Αντίθετα, τα εκχυλίσματα τα οποία φαίνεται να παρουσιάζουν τη μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μέθοδο είναι τα φωσφορικά εκχυλίσματα από φασόλι, ρεβίθι και σουσάμι καθώς επίσης και το μεθανολικό εκχύλισμα από ρεβίθι. Τα υπόλοιπα εκχυλίσματα κυμαίνονται μεταξύ αυτών.

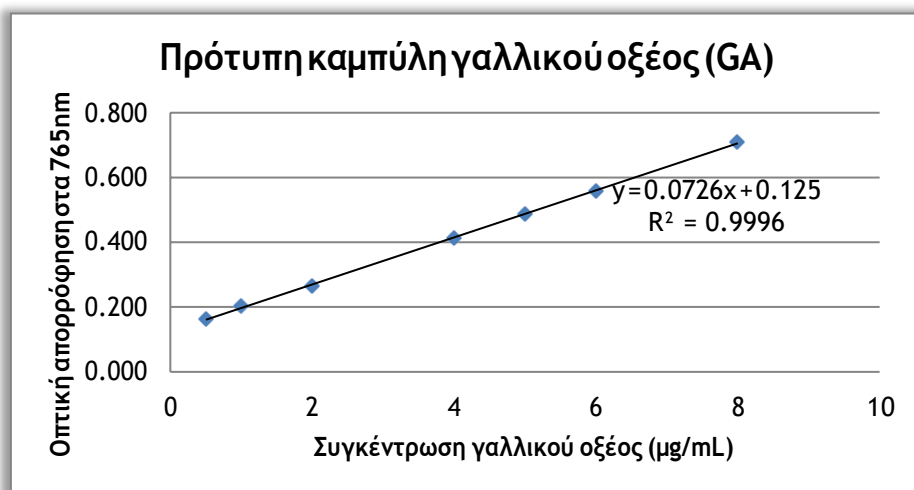


Διάγραμμα 3.27: Παρουσίαση των ποσοτήτων των εκχυλισμάτων (μg ξηρής μάζας), τα οποία μειώνουν στο μισό το ποσοστό των ελευθέρων ριζών DPPH σε κάθε περίπτωση (IC50).

3.3. Υπολογισμός ολικών φαινολικών ουσιών των βιοδραστικών εκχυλισμάτων

Στη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών και πολυφαινολικών ουσιών που εμπεριέχονταν σε κάθε εκχύλισμα το οποίο δημιουργήθηκε, με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι σε αλκαλικό περιβάλλον μεταφέρονται ηλεκτρόνια από τις ενεργές υδροξυ – ομάδες των φαινολικών ενώσεων σε σύμπλοκα του φωσφομολυβδαινικού/ φωσφοβολφραμικού οξέως του αντιδραστηρίου. Η μεταφορά αυτή προκαλεί αλλαγή στο χρώμα του διαλύματος από κίτρινο σε μπλε, μεταβολή η οποία μετράται ως οπτική απορρόφηση με χρήση φασματοφωστόμετρου (§2.2.4.).

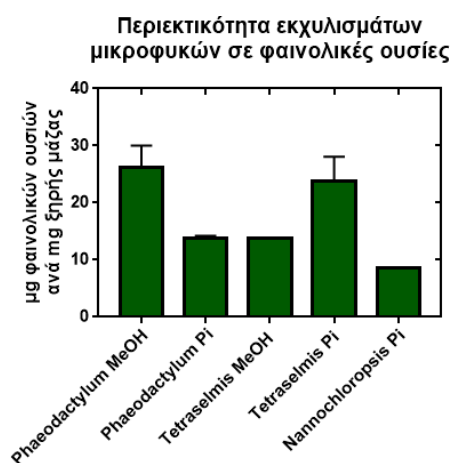
Προκειμένου να προσδιοριστεί ποσοτικά η περιεκτικότητα κάθε εκχυλίσματος σε φαινολικές ουσίες, κατασκευάστηκε αρχικά μια πρότυπη καμπύλη, με σημεία που αντιστοιχούν στην οπτική απορρόφηση η οποία μετρήθηκε σε διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης γαλλικού οξέος (Διάγραμμα 3.28). Σύμφωνα με αυτή, η άγνωστη περιεκτικότητα προσδιορίζεται σε κάθε περίπτωση, ως ισοδύναμο γαλλικού οξέος.



Διάγραμμα 3.28: Πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων γαλλικού οξέος.

Μικροφύκη

Αρχικά, υπολογίστηκε η περιεκτικότητα σε φαινολικές και πολυφαινολικές ουσίες, των εκχυλισμάτων που είχαν προέλθει από μικροφύκη. Τα εκχυλίσματα αυτά δημιουργήθηκαν έχοντας ως εκχυλιστικό μέσο είτε διάλυμα μεθανόλης – νερού (70:30 % v/v), είτε υδατικό διάλυμα δις – όξινου φωσφορικού καλίου (20 mM, pH=7)(§2.2.1.). Συγκεκριμένα υπολογίστηκε η ποσότητα φαινολικών ενώσεων σε μg, η οποία εμπεριέχεται σε 1 mg ξηρής μάζας εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.29.



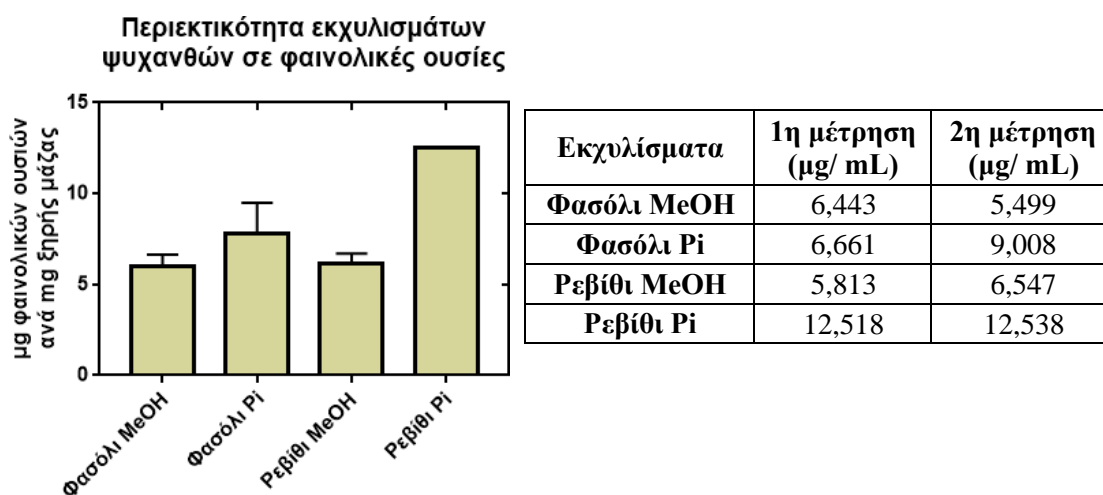
Εκχυλίσματα	1η μέτρηση (μg/ mL)	2η μέτρηση (μg/ mL)
<i>Phaeodactylum</i> MeOH	28,895	23,406
<i>Phaeodactylum</i> Pi	13,359	14,083
<i>Tetraselmis</i> MeOH	13,774	13,774
<i>Tetraselmis</i> Pi	20,933	26,857
<i>Nannochloropsis</i> Pi	8,538	8,641

Διάγραμμα 3.29: Παρουσίαση της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων από μικροφύκη σε φαινόλες και πολυφαινόλες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μg φαινολικών ενώσεων ανά mg ξηρής μάζας εκχυλίσματος.

Σύμφωνα με τις μετρήσεις, παρατηρείται ότι το μεθανολικό εκχύλισμα από το μικροφύκος *Phaeodactylum* καθώς επίσης και το φωσφορικό εκχύλισμα από το μικροφύκος *Tetraselmis*, φαίνεται να έχουν ελαφρώς μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες καθώς οι τιμές αυτών κατά μέσο όρο είναι 26,15 και 23,895 μg φαινολών/mg ξηρής μάζας, αντίστοιχα. Το φωσφορικό εκχύλισμα από το μικροφύκος *Phaeodactylum* καθώς επίσης και το μεθανολικό εκχύλισμα από το μικροφύκος *Tetraselmis*, έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε φαινόλες (13,721 και 13,774 μg/mg). Τέλος το φωσφορικό εκχύλισμα από το μικροφύκος *Nannochloropsis*, έχει ελαφρώς μικρότερη περιεκτικότητα (8,589 μg/mg).

Ψυχανθή

Στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας, υπολογίστηκε η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων τα οποία είχαν σχηματιστεί από ψυχανθή, σε φαινολικές και πολυφαινολικές ενώσεις με τη μέθοδο που χρησιμοποιεί το αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu. Τα εκχυλίσματα δημιουργήθηκαν έχοντας ως εκχυλιστικό μέσο είτε διάλυμα μεθανόλης – νερού (70:30 %v/v), είτε υδατικό διάλυμα δις – όξινου φωσφορικού καλίου (20 mM, pH=7) (§2.2.1.). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.30. το οποίο δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα GraphPad Prism 7.



Διάγραμμα 3.30: Παρουσίαση της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων από ψυχανθή σε φαινόλες και πολυφαινόλες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μg φαινολικών ενώσεων ανά mg ξηρής μάζας εκχυλίσματος.

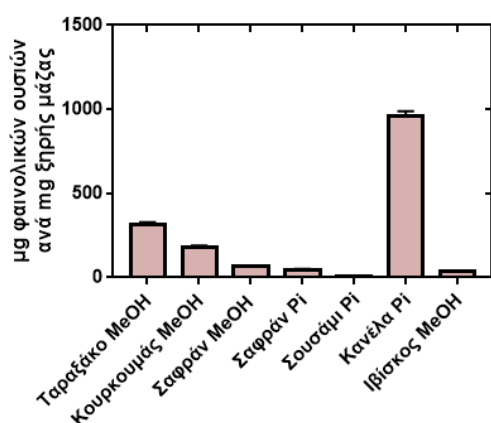
Σύμφωνα με τις μετρήσεις, παρατηρείται ότι από τα τέσσερα εκχυλίσματα από ψυχανθή, αυτό που παρουσιάζει μια μικρή διαφοροποίηση και περιέχει μεγαλύτερη

ποσότητα φαινολών και πολυφαινολών ανά mg ξηρής μάζας, είναι το φωσφορικό εκχύλισμα από ρεβίθι (12,528 μg φαινολών ανά mg ξηρής μάζας). Τα υπόλοιπα τρία εκχυλίσματα, παρουσιάζουν μικρή διακύμανση και περιέχουν περίπου τη μισή ποσότητα φαινολών. Συγκεκριμένα το μεθανολικό εκχύλισμα από φασόλι περιέχει 5,97 μg/mg, το φωσφορικό εκχύλισμα από φασόλι περιέχει 7,83 μg/mg και τέλος το μεθανολικό εκχύλισμα από ρεβίθι περιέχει 6,18 μg/mg.

Λοιπά φυτικά εκχυλίσματα

Τέλος, στη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας υπολογίστηκε η περιεκτικότητα σε φαινόλες και πολυφαινόλες από εκχυλίσματα των φυτών *Hibiscus sp.* (κν. ιβίσκος), *Curcuma longa* (κν. κουρκουμάς), *Crocus sativus* (κν. σαφράν), *Cinnamomum verum* (κν. κανέλα), *Taraxacum officinale* (κν. ταραξάκο) και *Sesamum indicum* (κν. σουσάμι), τα οποία δημιουργήθηκαν με εκχυλιστικό μέσο είτε διάλυμα μεθανόλης – νερού (70:30 % v/v), είτε υδατικό διάλυμα δις – όξινου φωσφορικού καλίου (20mM, pH=7) (§2.2.1.). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στο Διάγραμμα 3.31, το οποίο δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα GraphPad Prism 7.

Περιεκτικότητα λοιπών εκχυλισμάτων σε φαινολικές ουσίες



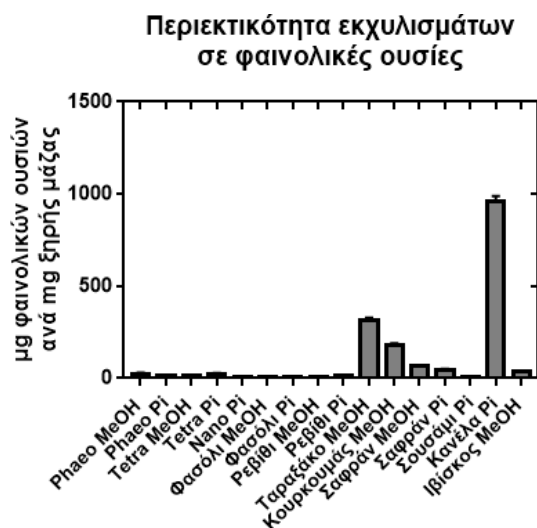
Εκχύλισμα	1η μέτρηση (μg/ mL)	2η μέτρηση (μg/ mL)
Ταραξάκο MeOH	302,874	324,787
Κουρκουμάς MeOH	174,557	187,886
Σαφράν MeOH	66,270	62,407
Σαφράν Pi	41,905	50,104
Σουσάμι Pi	8,344	9,326
Κανέλα Pi	937,528	979,739
Ιβίσκος MeOH	37,482	38,220

Διάγραμμα 3.31: Παρουσίαση της περιεκτικότητας των φυτικών εκχυλισμάτων σε φαινόλες και πολυφαινόλες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μg φαινολικών ενώσεων ανά mg ξηρής μάζας εκχυλίσματος.

Σύμφωνα με το διάγραμμα, παρατηρείται ότι το φωσφορικό εκχύλισμα από το φυτό *Cinnamomum verum* έχει ιδιαίτερα αυξημένα ποσοστά φαινολών και πολυφαινολών (958,633 μg/mg), διαφέροντας σε μεγάλο βαθμό από τα υπόλοιπα. Ακολουθούν με φθίνουσα σειρά το μεθανολικό εκχύλισμα από το φυτό *Taraxacum officinale*

(313,830 $\mu\text{g}/\text{mg}$), το μεθανολικό εκχύλισμα από το φυτό *Curcuma longa* (181,222 $\mu\text{g}/\text{mg}$), το μεθανολικό εκχύλισμα από το φυτό *Crocus sativus* (64,339 $\mu\text{g}/\text{mg}$), το φωσφορικό εκχύλισμα από το ίδιο φυτό (46,005 $\mu\text{g}/\text{mg}$), το μεθανολικό εκχύλισμα από το φυτό *Hibiscus sp.* (37,851 $\mu\text{g}/\text{mg}$) και τέλος το φωσφορικό εκχύλισμα από το φυτό *Sesamum indicum* (8,835 $\mu\text{g}/\text{mg}$).

Τέλος, στο Διάγραμμα 3.32, παρουσιάζεται η συνολική εικόνα της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων τα οποία δημιουργήθηκαν στη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, σε φαινόλες και πολυφαινόλες. Παρατηρείται ότι το εκχύλισμα από το φυτό *Cinnamomum verum* είναι αυτό με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα, διαφέροντας σημαντικά από όλα τα υπόλοιπα εκχυλίσματα. Ακολουθεί το μεθανολικό εκχύλισμα από το φυτό *Taraxacum officinale*, το οποίο περιέχει φαινολικά στοιχεία σε ποσοστό που φτάνει το ένα τρίτο της περιεκτικότητας του *Cinnamomum verum*. Τέλος τα μεθανολικά εκχυλίσματα από τα φυτά *Curcuma longa*, *Crocus sativus* και *Hibiscus sp.*, καθώς και το φωσφορικό εκχύλισμα από το φυτό *Crocus sativus*, φαίνεται πως παρουσιάζουν μια σχετικά αυξημένη περιεκτικότητα σε φαινόλες. Τόσο τα μεθανολικά όσο και τα φωσφορικά εκχυλίσματα από μικροφύκη και ψυχανθή, διέθεταν ιδιαίτερως χαμηλά ποσοστά φαινολικών ουσιών.

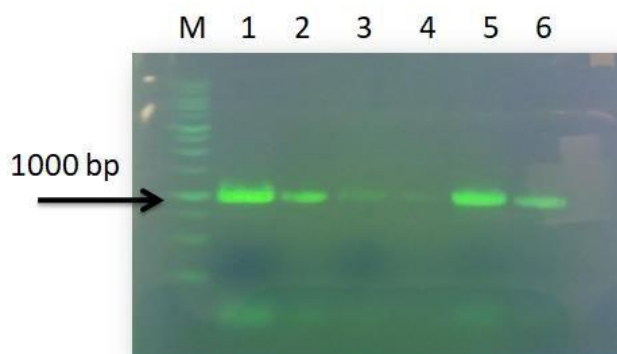


Διάγραμμα 3.32: Παρουσίαση της περιεκτικότητας όλων των φυτικών εκχυλισμάτων σε φαινόλες και πολυφαινόλες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mg φαινολικών ενώσεων ανά mg ξηρής μάζας εκχυλίσματος.

3.4. Ενίσχυση του γονιδίου SIRT2 με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας, επιχειρήθηκε να μελετηθεί η έκφραση και ο καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας του ενζύμου SIRT2. Για το σκοπό αυτό αρχικά το γονίδιο που εκφράζει τη SIRT2, ενισχύθηκε με τη διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Ο τρόπος με τον οποίο ενισχύθηκε ήταν με ταυτόχρονη επιμήκυνση των άκρων του, έτσι ώστε αυτά να είναι συμπληρωματικά με τα αντίστοιχα άκρα τα οποία θα προστεθούν στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5 - CT/TOPO[®], προκειμένου να ακολουθήσει η διαδικασία της κλωνοποίησης. Οι αλληλουχίες των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και τα ακριβή συστατικά και οι συνθήκες της αντίδρασης, παρουσιάζονται αναλυτικά στην παράγραφο 2.2.7.

Μετά την ολοκλήρωση της PCR ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v), προκειμένου να αναλυθεί το προϊόν της αντίδρασης. Σε κάθε θέση της πηκτής χρησιμοποιήθηκαν 25μL δείγματος από την PCR με 1,5μL χρωστικής και παρατηρήθηκε μια ευκρινής ζώνη μεγέθους περίπου 800bp η οποία αντιστοιχεί στο μέγεθος του γονιδίου SIRT2. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.1.



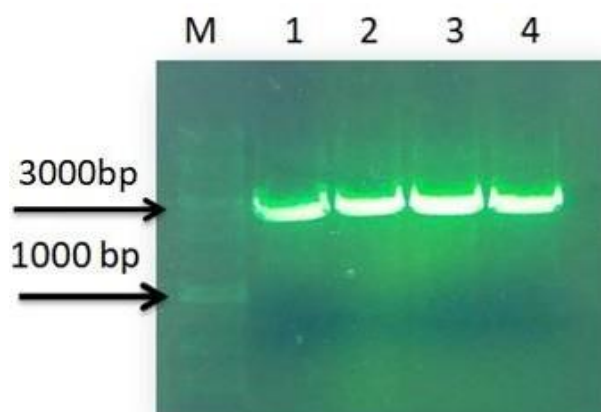
Εικόνα 3.11: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της αντίδρασης PCR σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v), για την ενίσχυση του γονιδίου SIRT2 M: Μάρτυρας μεγέθους γενετικού υλικού (1kb DNA Ladder). 1,2,3,4,5,6: Γενετικό υλικό του γονιδίου SIRT2 μεγέθους περίπου 800bp.

3.5. Ενίσχυση του πλασμιδιακού φορέα pEXP5- CT/TOPO[®] με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Στη συνέχεια, ενισχύθηκε με τη διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, ο πλασμιδιακός φορέας pEXP5 - CT/TOPO[®]. Οι ενισχυτές που χρησιμοποιήθηκαν ενίσχυαν το πλασμίδιο με ταυτόχρονη προσθήκη μερικών ακόμα

νουκλεοτιδίων στα άκρα, προκειμένου να μπορεί να κλωνοποιηθεί μέσα σε αυτό το γονίδιο SIRT2, το οποίο είχε επίσης επιμηκυνθεί με ανάλογο τρόπο (§2.2.7.). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς επίσης και τα ακριβή συστατικά και συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στην πορεία της αντίδρασης παρουσιάζονται στην παράγραφο 2.2.8.

Μετά την ολοκλήρωση της PCR ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v), προκειμένου να αναλυθεί το προϊόν της αντίδρασης. Σε κάθε θέση της πηκτής χρησιμοποιήθηκαν 25μL δείγματος από την PCR με 1,5μL χρωστικής και παρατηρήθηκε μια ευκρινής ζώνη (Εικόνα 3.2) με μέγεθος κοντά στα 3000bp, το οποίο αντιστοιχεί στο μέγεθος του πλασμιδίου.



Εικόνα 3.12: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της αντίδρασης PCR σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v) για τον πλασμιδιακό φορέα pEXP5- CT/TOPO[®]. M: Μάρτυρας για το μέγεθος του γενετικού υλικού (1kb DNA Ladder). 1,2,3,4: Πλασμιδιακός φορέας μεγέθους κοντά στα 3000 bp.

3.6. Κλωνοποίηση και μετασηματισμός του πλασμιδιακού φορέα pEXP5-CT/TOPO[®] με το γονίδιο SIRT2

Μετά τη διαδικασία της PCR για το γονίδιο SIRT2 και για τον πλασμιδιακό φορέα pEXP5 – CT/TOPO[®] , ακολούθησε η κατεργασία με το αντιδραστήριο Cloning Enhancer της εταιρίας Takara Bio, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.10. Ο λόγος που επιλέχθηκε αυτή η μέθοδος ήταν η ύπαρξη μιας ευδιάκριτης ζώνης DNA και στις δύο περιπτώσεις, γεγονός που εξασφαλίζει ότι τελικά θα κλωνοποιηθεί αποκλειστικά και μόνο το γενετικό υλικό που είναι επιθυμητό.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση του γονιδίου στο πλασμίδιο, με τη χρήση του αντιδραστηρίου In Fusion HD Enzyme Premix (Takara Bio) (§2.2.11.), και ο μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* Stellar που παρέχονταν επίσης από την εταιρία (§2.2.12.). Τα μετασχηματισμένα πλέον κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία Petri, τα οποία περιείχαν θρεπτικό υλικό LB με άγαρ και επιπλέον αμπικιλίνη (100 mg/mL) ως αντιβιοτικό. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Stellar τα οποία είχαν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο PUC19, το οποίο παρέχει επίσης ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη.

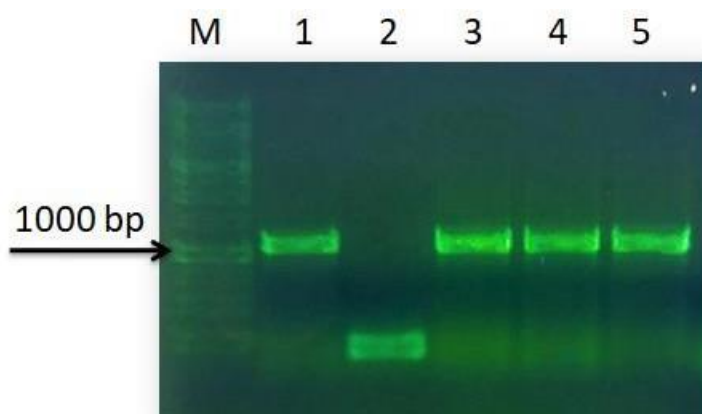
Μετά από 13 ώρες επώασης στους 37°C, παρατηρήθηκε η ανάπτυξη βακτηριακών αποικιών σε όλες τις περιπτώσεις.

3.7. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τις αποικίες (PCR Colony)

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του επιθυμητού γενετικού υλικού στα βακτήρια που αναπτύσσονται στις αποικίες, ακολουθήθηκε η διαδικασία της PCR. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε ως εκκινητής F (Forward SIRT2 primer), εκείνος που αντιστοιχεί στο γονίδιο SIRT2 και ως εκκινητής R (T7 Reverse primer), εκείνος που αντιστοιχεί στο πλασμίδιο, σε ίσες ποσότητες (10 pmol). Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η KAPA Taq πολυμεράση. Ως γενετικό υλικό μήτρα, χρησιμοποιήθηκε υλικό από μεμονωμένες αποικίες από το τριβλίο με τα μετασχηματισμένα κύτταρα (επιλέχθηκαν τυχαία πέντε αποικίες). Ο έλεγχος για τυχόν πατρικό DNA (DNA από το αρχικό πλασμίδιο), πραγματοποιήθηκε και πάλι με τη διαδικασία της PCR, μόνο που αντί για εκκινητή του γονιδίου SIRT2 χρησιμοποιήθηκε εκκινητής του γονιδίου που προϋπήρχε. Οι ακριβείς ποσότητες αντιδραστηρίων και οι συνθήκες της αντίδρασης παρουσιάζονται αναλυτικά στην παράγραφο 2.2.13.

Στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v) στο προϊόν της PCR, προκειμένου να αναλυθεί το αποτέλεσμα της αντίδρασης. Στην πηκτή ηλεκτροφόρησης φαίνεται ότι υπάρχει μια ζώνη σε κάθε θέση στις τέσσερις από τις πέντε αποικίες, η οποία αντιστοιχεί στο γονίδιο που μας ενδιαφέρει σύμφωνα με το μέγεθος του DNA (περίπου 800bp). Επίσης δεν παρουσιάζεται καμία ζώνη στο προϊόν της PCR στην οποία χρησιμοποιήθηκε εκκινητής του γονιδίου που προϋπήρχε στον πλασμιδιακό φορέα, πράγμα που επιβεβαιώνει ότι δεν έχει διατηρηθεί το προηγούμενο γενετικό υλικό στις συγκεκριμένες αποικίες. Σε κάθε θέση εισήχθησαν

10μL προϊόντος PCR μαζί με 1μL χρωστικής ουσίας. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.3:



Εικόνα 3.13: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος αντίδρασης PCR σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v) για τον έλεγχο του μετασχηματισμού. Σε κάθε θέση αντιστοιχούν 10μL δείγματος από την PCR με 1μL χρωστικής ουσίας. M: μάρτυρας μεγέθους τμήματος γενετικού υλικού (1kb DNA Ladder). 1,3,4,5 : Γενετικό υλικό από διαφορετικές αποικίες στις οποίες παρατηρείται μια ευδιάκριτη ζώνη DNA κοντά στα 800bp. Επιτυχημένος μετασχηματισμός. 2: Μια ζώνη μεγαλύτερου και συνεπώς όχι επιθυμητού DNA.

3.8. Απομόνωση DNA από τις αποικίες και αλληλούχιση

Στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας ακολούθησε απομόνωση DNA από τις αποικίες στις οποίες με τη μέθοδο της PCR είχαν ανιχνευθεί τμήματα DNA που είχαν ενισχυθεί από τους κατάλληλους εκκινητές και είχαν μέγεθος το οποίο ήταν κοντά στο αναμενόμενο (περίπου 800 bp), όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.14.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του επιθυμητού γονιδίου στις αποικίες που δημιουργήθηκαν, ακολούθησε αλληλούχιση του DNA το οποίο είχε απομονωθεί από αυτές. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν δύο αλληλουχίσεις, μια με κατεύθυνση 5' – 3' και μια με κατεύθυνση 3' – 5' στο ίδιο τμήμα DNA, ούτως ώστε να διασφαλιστεί η αλληλουχία στο τμήμα DNA το οποίο εισήχθη στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5 – CT/TOPO®. Η μετάφραση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε αμινοξέα πραγματοποιήθηκε στον ιστότοπο ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>) και η ταυτοποίηση της με τη χρήση του Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση με την αμινοξική ακολουθία της SIRT2 που υπάρχει στο σύστημα, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ακρίβεια της αλληλούχησης, με τη βοήθεια του T-coffee (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.4 και 3.5.

Αμινοξική ακολουθία SIRT2 μετά από αλληλούχιση (327 αμινοξέα):

```
MQSERCRRVICLVGAGISTSAGIPDFRSPSTGLYDNLEKYHLPYPEAIFEISYFKKH
PEPFFALAKELYPGQFKPTICHYFMRLLLKDKGLLLRCYTQNIIDTLERIAGLEQEDLV
EAHGTFYTSHCVSASCRHEYPLSWMKEKIFSEVTPKCEDCQSLVKPDIVFFGESLPA
RFFSCMQSDFLKVDLLLVMGTSLQVQPFASLISKAPLSTPRLINKEKAGQSDPFLG
MIMGLGGGMDFDKSKAYRDVAWLGECDQGCLALAEELLGWKKLEDLVRRREHASIDAQ
SGAGVNPSTASPKKSPPPAKDEARTTEREKRPQKGHHHHHH
```

Εικόνα 3.14: Αμινοξική ακολουθία που κωδικοποιείται από το τμήμα DNA το οποίο εισήχθη στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5 – CT/TOPO®, όπως προκύπτει μετά από μετάφραση.

```
NP_036369.2      MAEPDPSHPLETQAGKVQEAQSDSDSEGGAGGEADMDFLRNLFSTLS
SIRTUIN2__Colony_5_  -----

NP_036369.2      LGSQKERLLDELTEGVARYMQSERCRRVICLVGAGISTSAGIPDFRSP
SIRTUIN2__Colony_5_  -----MQSERCRRVICLVGAGISTSAGIPDFRSP
                        *****

NP_036369.2      TGLYDNLEKYHLPYPEAIFEISYFKKHPEPFFALAKELYPGQFKPTICHY
SIRTUIN2__Colony_5_  TGLYDNLEKYHLPYPEAIFEISYFKKHPEPFFALAKELYPGQFKPTICHY
                        *****

NP_036369.2      FMRLLLKDKGLLLRCYTQNIIDTLERIAGLEQEDLVEAHGTFYTSHCVSASC
SIRTUIN2__Colony_5_  FMRLLLKDKGLLLRCYTQNIIDTLERIAGLEQEDLVEAHGTFYTSHCVSASC
                        *****

NP_036369.2      RHEYPLSWMKEKIFSEVTPKCEDCQSLVKPDIVFFGESLPARFFSCMQSD
SIRTUIN2__Colony_5_  RHEYPLSWMKEKIFSEVTPKCEDCQSLVKPDIVFFGESLPARFFSCMQSD
                        *****

NP_036369.2      FLKVDLLLVMGTSLQVQPFASLISKAPLSTPRLINKEKAGQSDPFLGMI
SIRTUIN2__Colony_5_  FLKVDLLLVMGTSLQVQPFASLISKAPLSTPRLINKEKAGQSDPFLGMI
                        *****

NP_036369.2      MGLGGGMDFDKSKAYRDVAWLGECDQGCLALAEELLGWKKLEDLVRRREHA
SIRTUIN2__Colony_5_  MGLGGGMDFDKSKAYRDVAWLGECDQGCLALAEELLGWKKLEDLVRRREHA
                        *****

NP_036369.2      SIDAQSGAGVNPSTASPKKSPPPAKDEARTTEREKRPQ-----
SIRTUIN2__Colony_5_  SIDAQSGAGVNPSTASPKKSPPPAKDEARTTEREKRPQKGHHHHHH
                        *****
```

Εικόνα 3.15: Ευθυγράμμιση της αμινοξικής ακολουθίας η οποία προήλθε από την αλληλούχηση, με τη γνωστή αμινοξική ακολουθία για την πρωτεΐνη Sirtuin 2.

Παρατηρείται ότι η ακολουθία που αλληλουχήθηκε έχει πλήρη ταύτιση με το μεγαλύτερο τμήμα της γνωστής πρωτεΐνης (327 αμινοξέα). Επιπλέον, στο καρβόξυ – τελικό άκρο της έχουν προσθεθεί έξι ιστιδίνες (6-His Tag). Οι ιστιδίνες αυτές στην άκρη της πρωτεΐνης θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια στη διαδικασία του καθαρισμού.

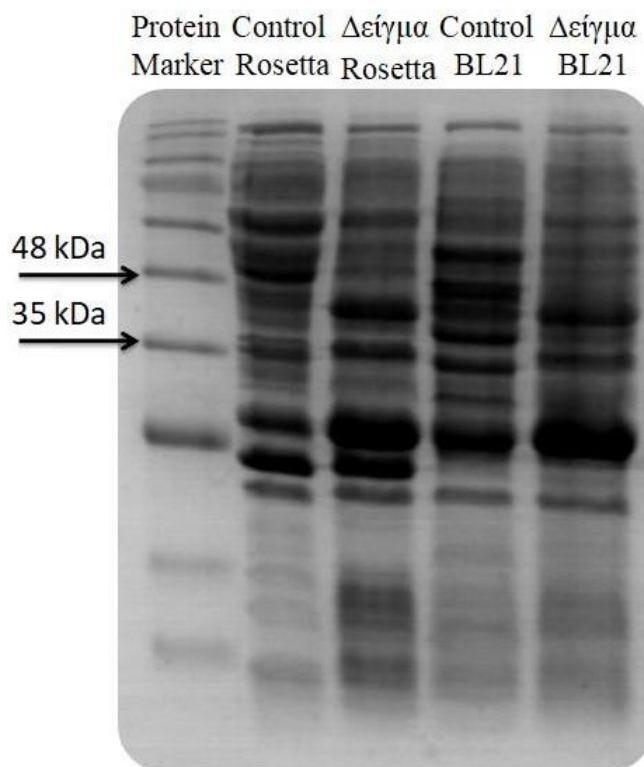
3.9. Μετασχηματισμός εκφραστικών κυττάρων *E. coli* BL21(DE3) και Rosetta™(DE3)

Στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας, αφού επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη του επιθυμητού γονιδίου που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη SIRT2 στα δεκτικά κύτταρα *E. coli* Stellar, ακολούθησε μετασχηματισμός δύο ειδών εκφραστικών κυττάρων *E. coli*, των BL21(DE3) και Rosetta™(DE3) (§2.2.16). Ακολούθως επάχθηκε η πρωτεϊνική έκφραση στα βακτήρια αυτά, με χρήση του αντιδραστηρίου IPTG. Η ποσότητα των καλλιιεργειών φυγοκεντρήθηκε και τελικά διαθέταμε κυτταρική πάστα για κάθε ένα από τα τρία στελέχη.

Ακολούθησε διάρρηξη της κυτταρικής πάστας για κάθε στέλεχος με χρήση υπερήχων (§2.2.17), φυγοκέντρηση και μέτρηση της περιεκτικότητάς τους σε πρωτεΐνες με τη χρωματομετρική μέθοδο Bradford (§2.2.18).

3.10. Ανάλυση της έκφρασης της SIRT2 με ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης (SDS – PAGE)

Μετά την μέτρηση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη για κάθε ένα από τα βακτηριακά στελέχη BL21(DE3) και BL21(DE3) Rosetta, ακολούθησε ανάλυση αυτών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS), κάτω από συνθήκες μετουσίωσης, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.19. Η ανάλυση αυτή διαχωρίζει σε πηκτή τις πρωτεΐνες με βάση το μέγεθός τους. Προκειμένου να ελεγχθεί η έκφραση της επιπλέον επιθυμητής πρωτεΐνης SIRT2 στα βακτήρια, χρησιμοποιήθηκε ένας μάρτυρας για κάθε στέλεχος. Συγκεκριμένα ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια βακτηριακά στελέχη, τα οποία είχαν μετασχηματιστεί ακολουθώντας ακριβώς την ίδια διαδικασία, με μόνη διαφορά ότι ο πλασμιδιακός φορέας pEXP5 – CT/TOPO® με τον οποίο είχαν μετασχηματιστεί δεν διέθετε το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη SIRT2. Σε κάθε θέση δείγματος της πηκτής αναλύθηκε βιολογικό εκχύλισμα με περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες 50ng.



Εικόνα 3.16: Ανάλυση πρωτεϊνών που προέρχονται από διάρρηξη βακτηριακών κυττάρων *E.coli* BL21 (DE3) και Rosetta™(DE3), με ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης (SDS – PAGE). Στην πρώτη στήλη αναλύθηκε ο μάρτυρας Protein Marker (Nippon Genetics), στη δεύτερη και τρίτη στήλη αναλύθηκαν ο μάρτυρας και το δείγμα αντίστοιχα που προέρχονται από το βακτηριακό στέλεχος Rosetta™(DE3) ενώ στην τέταρτη και την πέμπτη στήλη ο μάρτυρας και το δείγμα αντίστοιχα που προέρχονται από το βακτηριακό στέλεχος BL21 (DE3).

Η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει γνωρίζουμε μέσω του εργαλείου ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/), ότι διαθέτει μοριακό βάρος 36.697,14 Da. Σύμφωνα με την Εικόνα 3.6, η οποία παρουσιάζει την ανάλυση πρωτεϊνών για τα δύο βακτηριακά στελέχη και τους μάρτυρες αυτών, και σε συνδυασμό με την πληροφορία για το αναμενόμενο μοριακό βάρος, εντοπίζεται μια διαφοροποίηση ανάμεσα στους μάρτυρες και τα δείγματα, η οποία εμφανίζεται ως πιο έντονη ζώνη μεταξύ των 35 και των 48 kDa. Η πιο έντονη αυτή ζώνη υποδεικνύει την ύπαρξη μεγαλύτερης ποσότητας πρωτεΐνης αυτού του μοριακού μεγέθους. Η διαφοροποίηση αυτή παρατηρείται τόσο στα κύτταρα BL21 (DE3) όσο και στα κύτταρα Rosetta™(DE3).

Επιπλέον αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες των βακτηριακών θραυσμάτων και των κυτταρικών μεμβρανών. Σε αυτή την περίπτωση δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση μεταξύ των μαρτύρων και των δειγμάτων, γεγονός το

οποίο ενίσχυσε την άποψη ότι η το ένζυμο που μας ενδιαφέρει βρίσκεται στο κυτταρικό εκχύλισμα. Στη συνέχεια θα ακολουθήσει η διαδικασία του καθαρισμού του κυτταρικού εκχυλίσματος που προέρχεται από τα δύο βακτηριακά στελέχη.

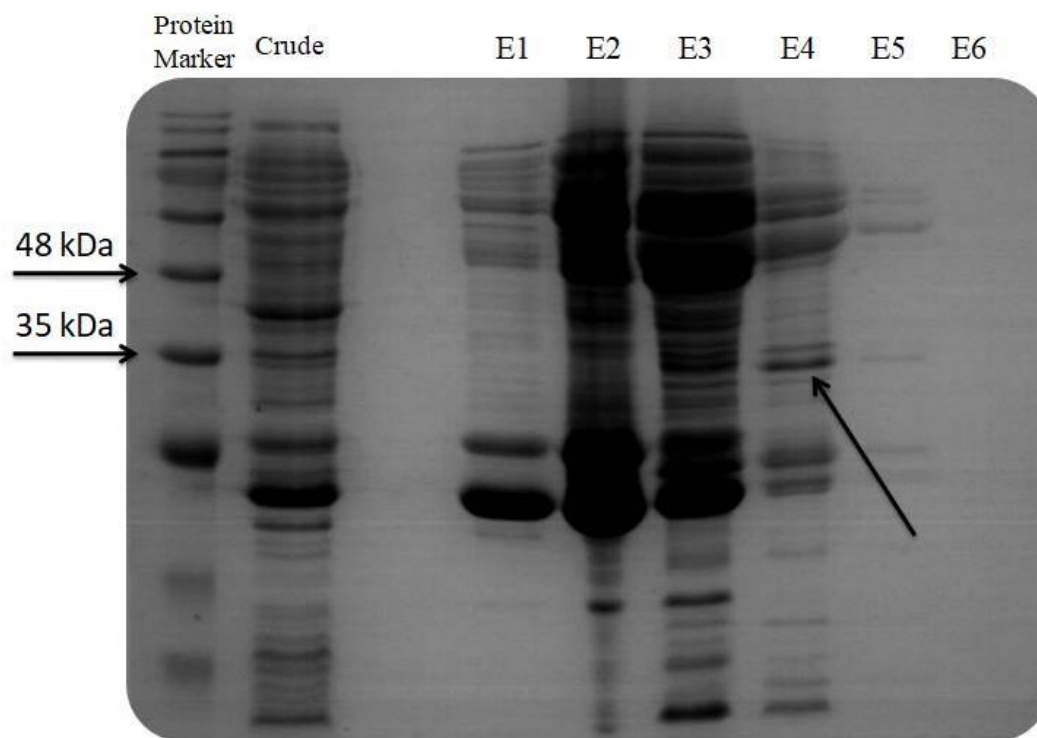
3.11. Καθαρισμός του ενζύμου SIRT2 που φέρει τον επίτοπο 6-His με χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή Ni – IDA – αγαρόζης

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του ενζύμου SIRT2 στα κυτταρικά εκχυλίσματα που προέρχονταν από τα μετασχηματισμένα βακτήρια *E. coli* BL21 (DE3) και Rosetta™(DE3), πραγματοποιήθηκε καθαρισμός τους σε στήλη χρωματογραφίας συγγένειας με προσροφητή ιμινοδιοξικό οξύ, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.23. Στη διάρκεια του καθαρισμού, δημιουργήθηκαν έξι εκλούσεις πρωτεϊνών, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν με διαλύματα διαφορετικής συγκέντρωσης ιμιδαζολίου (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl και ιμιδαζόλιο σε συγκεντρώσεις 20, 50, 100, 200, 250 και 300 mM). Στις εκλούσεις αυτές, πραγματοποιήθηκε διαπίδυση σε 4 λίτρα H₂O με 100μL ρυθμιστικού διαλύματος πηκτής επιστοίβαξης (0,5 M Tris-Cl με pH=6,8) για 18 ώρες. Στη συνέχεια, μετρήθηκε με τη μέθοδο Bradford (§2.2.18.) η περιεκτικότητά των δειγμάτων σε πρωτεΐνη και ακολούθησε η λυοφιλίωσή τους, προκειμένου να απομακρυνθεί το νερό που υπήρχε. Όταν τα δείγματα ήταν πλέον ξηρά, προστέθηκαν σε αυτά 10μL ρυθμιστικού διαλύματος μετουσίωσης και 10μL ddH₂O, και θερμάνθηκαν στους 95°C για 5 λεπτά, προκειμένου να ακολουθήσει η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης.

A) Καθαρισμός του ενζύμου SIRT2 από κυτταρικό εκχύλισμα που προέρχεται από το βακτηριακό στέλεχος Rosetta™(DE3).

Στη διάρκεια του καθαρισμού του κυτταρικού εκχυλίσματος από τα βακτήρια Rosetta™(DE3), δημιουργήθηκαν έξι εκλούσεις οι οποίες αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (12,5% SDS – PAGE) κάτω από συνθήκες μετουσίωσης. Στην θέση της πηκτής στην οποία αναλύθηκε το κυτταρικό εκχύλισμα πριν τον καθαρισμό, τοποθετήθηκε ποσότητα η οποία περιείχε 50ng πρωτεΐνης. Στις υπόλοιπες θέσεις αναλύθηκε όλη η ποσότητα που είχε προκύψει από την διαπίδυση και τη λυοφιλίωση. Στην Εικόνα 3.7, παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης. Το ένζυμο που μας ενδιαφέρει υπολογίζεται ότι έχει μοριακό βάρος ίσο με 36,697 kDa. Παρατηρούμε, λοιπόν, ότι υπάρχει μια ζώνη σε αυτό το σημείο της πηκτής, η οποία παρουσιάζεται πιο έντονη στην έκλουση 4 και

σημειώνεται με βέλος πάνω στην εικόνα. Ποσότητα αυτού παρουσιάζεται και στις εκλούσεις 3 και 5, με τη διαφορά ότι στη μεν έκλουση 3 οι ποσότητες των υπόλοιπων πρωτεϊνών είναι αρκετά μεγάλες, καθώς υπάρχουν αρκετές ακόμα ζώνες με πιο έντονο σήμα, στη δε έκλουση 5, το σήμα της επιθυμητής πρωτεΐνης είναι αρκετά πιο ασθενές.

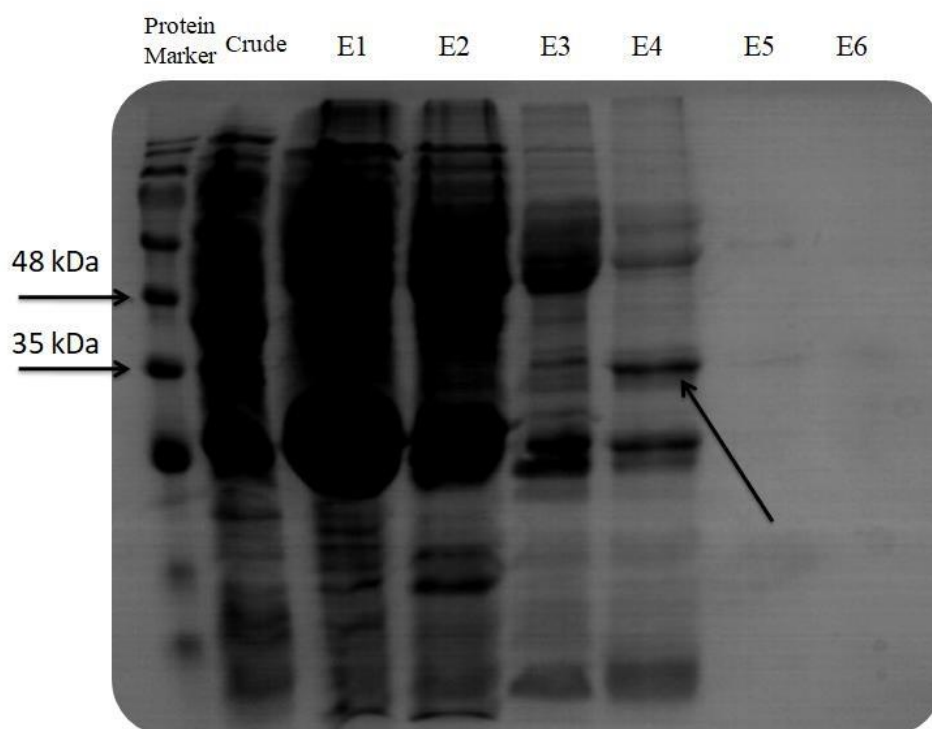


Εικόνα 3.17: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (12,5% SDS – PAGE) για τις εκλούσεις που προέρχονται από καθαρισμό του κυτταρικού εκχυλίσματος από τα βακτηριακά κύτταρα *E. coli* Rosetta™(DE3). Στην πρώτη στήλη αναλύθηκε ο μάρτυρας μοριακών μαζών Protein Marker (Nippon Genetics). Στη δεύτερη στήλη αναλύθηκε το κυτταρικό εκχύλισμα πριν τον καθαρισμό (Crude). Στις επόμενες στήλες αναλύθηκαν με τη σειρά οι εκλούσεις που προέκυψαν από τον καθαρισμό του ενζύμου, με διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου. Συγκεκριμένα οι εκλούσεις E1 έως E6 περιείχαν συγκεντρώσεις 20, 50, 100, 200, 250 και 350mM αντίστοιχα. Με βέλος σημειώνεται η ζώνη που αντιστοιχεί στο επιθυμητό ένζυμο SIRT2.

B) Καθαρισμός του ενζύμου SIRT2 από κυτταρικό εκχύλισμα που προέρχεται από το βακτηριακό στέλεχος BL21 (DE3).

Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για κυτταρικό εκχύλισμα το οποίο προερχόταν από μετασχηματισμένα βακτήρια *E. coli* BL21 (DE3). Τα κύτταρα είχαν μετασχηματιστεί με πλασμιδιακό φορέα που έφερε το επιθυμητό γονίδιο που κωδικοποιεί για τη SIRT2 και είχε επαχθεί η έκφραση των πρωτεϊνών τους. Στη διάρκεια του καθαρισμού του

κυτταρικού εκχυλίσματος που προέκυψε, δημιουργήθηκαν και σε αυτή την περίπτωση έξι εκλούσεις, οι οποίες αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (12,5% SDS – PAGE), κάτω από συνθήκες μετουσίωσης. Στην θέση της πηκτής στην οποία αναλύθηκε το κυτταρικό εκχύλισμα πριν τον καθαρισμό, τοποθετήθηκε ποσότητα η οποία περιείχε 50ng πρωτεΐνης. Στις υπόλοιπες θέσεις αναλύθηκε όλη η ποσότητα που είχε προκύψει από την διαπίδυση και τη λυοφιλίωση. Στην Εικόνα 3.8, παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης. Το ένζυμο που μας ενδιαφέρει υπολογίζεται ότι έχει μοριακό βάρος ίσο με 36,697 kDa.



Εικόνα 3.18: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (12,5% SDS – PAGE) για τις εκλούσεις που προέρχονται από καθαρισμό του κυτταρικού εκχυλίσματος από τα βακτηριακά κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3). Στην πρώτη στήλη αναλύθηκε ο μάρτυρας μοριακών μαζών Protein Marker (Nippon Genetics). Στη δεύτερη στήλη αναλύθηκε το κυτταρικό εκχύλισμα πριν τον καθαρισμό (Crude). Στις επόμενες στήλες αναλύθηκαν με τη σειρά οι εκλούσεις που προέκυψαν από τον καθαρισμό του ενζύμου, με διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου. Συγκεκριμένα οι εκλούσεις E1 έως E6 περιείχαν συγκεντρώσεις 20, 50, 100, 200, 250 και 350mM αντίστοιχα. Με βέλος σημειώνεται η ζώνη η οποία αντιστοιχεί στο επιθυμητό ένζυμο SIRT2.

Παρατηρούμε, λοιπόν, ότι υπάρχει μια ζώνη σε αυτό το σημείο της πηκτής, η οποία παρουσιάζεται πιο έντονη στην Έκλουση 4 και σημειώνεται με βέλος πάνω στην εικόνα. Ποσότητα αυτού παρουσιάζεται και στις εκλούσεις 3 και 5, με τη διαφορά ότι στη μεν έκλουση 3 οι ποσότητες των υπόλοιπων πρωτεϊνών είναι αρκετά μεγάλες,

καθώς υπάρχουν αρκετές ακόμα ζώνες με πιο έντονο σήμα, στη δε έκλουση 5, το σήμα της επιθυμητής πρωτεΐνης είναι αρκετά πιο ασθενές.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η SIRT2 αποτελεί ένα ισοένζυμο της οικογένειας των σιρτουινών. Είναι κατά κύριο λόγο κυτταροπλασματικό ένζυμο το οποίο σε κάποιες περιπτώσεις δρα και στον πυρήνα των κυττάρων. Η βασική του λειτουργία είναι η αποακετύλωση των αμινοξικών καταλοίπων λυσίνης στους μικροσωληνίσκους τουμπουλίνης, ενώ στον πυρήνα πραγματοποιεί έμμεσα την ίδια διαδικασία στις λυσίνες των ιστονών H3 και H4 (North et al., 2003). Εκτός από τις συγκεκριμένες αυτές λειτουργίες, αλληλεπιδρά με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες και πρωτεΐνες στο εσωτερικό του κυττάρου και κατά συνέπεια εμπλέκεται σε μονοπάτια επιδιόρθωσης του DNA, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στην απόπτωση, στο μεταβολισμό και στη γήρανση (de Oliveira et al.2012). Η πολυπλοκότητα των λειτουργιών του ενζύμου, έχει αποδειχθεί ότι το καθιστά ικανό να εμπλέκεται σε διάφορες κυτταρικές δυσλειτουργίες, και κατ' επέκταση στην εμφάνιση διάφορων παθήσεων του ανθρώπινου οργανισμού, όπως ο διαβήτης τύπου 2, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, οι νευροεκφυλιστικές νόσοι και ο καρκίνος (Jing et al., 2007).

Ανάλογα με την κατάσταση στην οποία βρίσκεται κάθε φορά ο οργανισμός, και τη δυσλειτουργία την οποία εμφανίζει, παρατηρείται αύξηση ή μείωση των επιπέδων έκφρασης του ισοενζύμου SIRT2. Η επαναφορά των επιπέδων έκφρασης στα φυσιολογικά επίπεδα, ή η αντίστοιχη αύξηση ή μείωση ανάλογα με τις ανάγκες, θα μπορούσε να αποτελέσει μια αποτελεσματική μέθοδο θεραπείας ή πρόληψης των ασθενειών αυτών. Ακόμη, επειδή η SIRT2 εμπλέκεται στη διαδικασία της γήρανσης και επηρεάζεται από το οξειδωτικό στρες των κυττάρων, θα μπορούσε να αποτελέσει στόχο σχεδιασμού αντιγηραντικών καλλυντικών του δέρματος. (Morris et al., 2013)

Στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, μελετήθηκε η επίδραση εκχυλισμάτων από φυτά και μικροφύκη, στη δραστηριότητα του ισοενζύμου SIRT2 που ανήκει στην οικογένεια των σιρτουινών. Τα εκχυλίσματα είχαν δημιουργηθεί με τη χρήση δύο εκχυλιστικών μέσων: α) Υδατικό διάλυμα δις-όξινου φωσφορικού καλίου συγκέντρωσης 20 mM με pH=7, β) Διάλυμα μεθανόλης/νερού σε αναλογία 70:30. Οι οργανισμοί από τους οποίους επιλέχθηκε να δημιουργηθούν τα εκχυλίσματα ήταν τα μικροφύκη των γενών *Phaeodactylum*, *Tetraselmis* και *Nannochloropsis*, τα ψυχανθή *Cicer arietinum* (κν.ρεβίθι) και *Phaseolus vulgaris* (κν.φασόλι) και τα βότανα *Hibiscus sp.* (κν.ιβίσκος), *Crocus sativus* (κν.σαφραν),

Curcuma longa (κν.κουρκουμάς), *Cinnamomum verum* (κν.κανέλα), *Taraxacum officinale* (κν.ταραξάκο) και *Sesamum indicum* (κν.σουσάμι).

Από τα αποτελέσματα (Πίνακας 4.1) φαίνεται ότι υπάρχουν εκχυλίσματα που ενεργοποιούν και εκχυλίσματα που καταστέλλουν τη δραστηριότητα του ενζύμου. Το εκχύλισμα από καρπούς φασολιού το οποίο δημιουργήθηκε με εκχυλιστικό μέσο διάλυμα μεθανόλης/νερού, παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ενεργοποίηση στο ένζυμο. Οι καρποί του φασολιού είναι πλούσιοι σε φαινολικά στοιχεία και ειδικά σε ανθοκυανίνες και φλαβονόλες, οι οποίες έχουν πολύπλοκη λειτουργία στον οργανισμό και έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν λειτουργίες όπως η μνήμη (Gómez-Pinilla, 2008). Γενικά τα φλαβονοειδή βελτιώνουν τη λειτουργία του εγκεφάλου, και στη διαδικασία αυτή ενδέχεται να εμπλέκεται η αλληλεπίδρασή τους με πρωτεΐνες όπως η SIRT2, καθώς λειτουργούν ως ενεργοποιητές του συγκεκριμένου ενζύμου (Jayasena et al., 2013). Μεγάλη ενεργοποίηση παρατηρείται επίσης από τα εκχυλίσματα ρεβιθίου και κουρκουμά που είχαν το ίδιο εκχυλιστικό μέσο, και από το εκχύλισμα κανέλας το οποίο δημιουργήθηκε με εκχυλιστικό μέσο διάλυμα KH_2PO_4 . Σύμφωνα με τους Feng et al, 2016, ισοβλαβόνες που εμπεριέχονται στον καρπό από ρεβίθι επηρεάζουν την πρωτεΐνη PPAR γ , η οποία αλληλεπιδρά με τη SIRT2 στο εσωτερικό των κυττάρων. Έρευνες πάνω στην αλληλεπίδραση ουσιών του κουρκουμά, όπως η κουρκουμίνη με τη SIRT2 σε κύτταρα του εγκεφάλου έχουν δείξει τα αντίθετα αποτελέσματα (Keskin-Aktan A, et al 2018), πράγμα που μπορεί να οφείλεται στην ιστοειδική έκφραση της πρωτεΐνης και στην αλληλεπίδρασή της με τους υπόλοιπους παράγοντες που εντοπίζονται στο περιβάλλον του ιστού. Μικρότερη ενεργοποίηση παρατηρείται από τα εκχυλίσματα από τα τρία γένη μικροφυκών (*Phaeodactylum*, *Tetraselmis* και *Nannochloropsis*) και από τους καρπούς του φασολιού και του σουσαμιού, τα οποία είχαν δημιουργηθεί με εκχυλιστικό μέσο διάλυμα KH_2PO_4 . Ως προς την αναστολή, το μεθανολικό εκχύλισμα από φύλλα ταραξάκου και τα εκχυλίσματα με τα δύο εκχυλιστικά μέσα από τους στήμονες του σαφράν, παρουσίασαν την μεγαλύτερη αναστολή της δραστηριότητας της SIRT2. Σύμφωνα με τους Colitti και Stefanon, 2016, εκχυλίσματα από φύλλα ταραξάκου έχουν μεγάλη επίδραση στη διαδικασία της απόπτωσης και μειώνουν διαφοροποίηση των κυττάρων σε λιπώδη κύτταρα, γεγονότα τα οποία συνδέονται με τη δράση της SIRT2. Τα μεθανολικά εκχυλίσματα του ιβίσκου και των μικροφυκών *Tetraselmis* και *Phaeodactylum*, ανέστειλαν επίσης τη λειτουργία του ενζύμου σε μικρότερο βαθμό.

Τα διαφορετικά εκχυλιστικά μέσα λειτουργούν διαφορετικά ως προς τις ουσίες που εκχυλίζονται σε κάθε περίπτωση από ένα φυτικό ιστό, γεγονός που υποστηρίζει τις διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται στις ιδιότητες των εκχυλισμάτων του ίδιο οργανισμού που έχουν δημιουργηθεί με διαφορετικά εκχυλιστικά μέσα (Amin et al., 2012).

Πίνακας 4.1: Διαχωρισμός των εκχυλισμάτων που αυξάνουν και αυτών που μειώνουν τη δραστηριότητα του ενζύμου SIRT2.

Εκχύλισμα	Ενεργοποίηση του ενζύμου SIRT2	Εκχύλισμα	Αναστολή του ενζύμου SIRT2
<i>Tetraselmis</i> Pi	+	<i>Tetraselmis</i> MeOH	-
<i>Phaeodactylum</i> Pi	+	<i>Phaeodactylum</i> MeOH	-
<i>Nannochloropsis</i> Pi	+	Ιβίσκος MeOH	-
Ρεβίθι MeOH	++	Ταραξάκο MeOH	--
Φασόλι MeOH	+++	Σαφράν Pi	--
Φασόλι Pi	+	Σαφράν MeOH	--
Κουρκουμάς MeOH	++		
Κανέλα Pi	++		
Σουσάμι Pi	+		

Η εύρεση φυσικών εκχυλισμάτων από μικροφύκη και φυτά, τα οποία ενεργοποιούν ή αναστέλλουν τη εκλεκτικά τη λειτουργία του ενζύμου έχει ιδιαίτερη σημασία. Γνωρίζουμε ότι μικρά μόρια μπορούν να συλλέγονται από φυτικούς οργανισμούς και να επηρεάζουν τη δραστηριότητα της SIRT2. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ρεσβερατρόλη, η οποία προέρχεται από τη φλούδα των σταφυλιών και λειτουργεί ως ενεργοποιητής για τη SIRT2 (McCubrey et al., 2017). Οι γνώσεις αυτές σε συνδυασμό με τις γνώσεις στον τρόπο λειτουργίας του ενζύμου μέσα στον οργανισμό, θα μπορούσαν οδηγήσουν στην παρασκευή φαρμακευτικών ή και καλλυντικών σκευασμάτων, τα οποία θα δρουν αποτελεσματικά στα ανθρώπινα κύτταρα. Επιπλέον, ο σχεδιασμός φαρμάκων και καλλυντικών από φυσικές ουσίες που προέρχονται από αυτούς τους οργανισμούς, αποτελεί αρχικά μια πιθανώς πιο ασφαλή επιλογή σε σχέση με τα συνθετικά φάρμακα. Ακόμη, οι οργανισμοί από τους οποίους προέρχονται μπορούν να βρεθούν εύκολα ή να καλλιεργηθούν για το σκοπό αυτό, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο το κόστος και τα επίπεδα δυσκολίας στην παραγωγή του σκευάσματος (Feng et al., 2016). Το σίγουρο είναι ότι δε γνωρίζουμε

ακόμα πλήρως τους μηχανισμούς στους οποίους εμπλέκεται η SIRT2 και τα μόρια με τα οποία αλληλεπιδρά. Συνεπώς, απαιτείται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να αποσαφηνιστούν τα άγνωστα σημεία και να γίνει πιο στοχευμένη η παρασκευή φαρμάκων.

Στη συνέχεια, μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα σε όλα τα εκχυλίσματα που δημιουργήθηκαν με τις μεθόδους ORAC, FRAP και DPPH (§2.2.3). Η μέθοδος ORAC υπολογίζει την αντιοξειδωτική ικανότητα ως ισοδύναμα μM Trolox ανά mg ξηρής μάζας εκχυλίσματος. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, το εκχύλισμα κανέλας που δημιουργήθηκε με φωσφορικό διάλυμα KH_2PO_4 , είχε την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Ακολουθούν τα μεθανολικά εκχυλίσματα από το ταραξάκο, τον κουρκουμά και το σαφράν.

Η μέθοδος FRAP υπολογίζει την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων σύμφωνα με μια πρότυπη καμπύλη ασκορβικού οξέος και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα FRAP ανά mg ξηρής μάζας εκχυλίσματος. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, τα εκχυλίσματα που δημιουργήθηκαν και με τα δύο εκχυλιστικά μέσα από τους στήμονες του φυτού σαφράν, φαίνεται ότι παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα εκφρασμένη ως ισοδύναμο FRAP. Επίσης, τα μεθανολικά εκχυλίσματα από ταραξάκο και ιβίσκο είχαν επίσης αυξημένη τιμή FRAP.

Τέλος, η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων υπολογίστηκε με τη μέθοδο που χρησιμοποιεί το αντιδραστήριο DPPH. Δημιουργήθηκε για κάθε εκχύλισμα μια καμπύλη IC50 με μέτρηση απορρόφησης για διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος. Αυτό είχε ως στόχο την εύρεση της τιμής η οποία μειώνει στο μισό το ποσοστό των ελεύθερων ριζών DPPH \cdot , και κατά συνέπεια αντιπροσωπεύει την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων (Kedare & Singh, 2011). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα μεθανολικά εκχυλίσματα από ταραξάκο, κουρκουμά και ιβίσκο, καθώς επίσης και το φωσφορικό εκχύλισμα κανέλας, είχαν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Για κάθε εκχύλισμα μετρήθηκε ακόμα το περιεχόμενο τους σε φαινολικές ενώσεις με τη μέθοδο που χρησιμοποιεί το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.4. Η περιεκτικότητα αυτή υπολογίζεται με βάση μια πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος και εκφράζεται σε μg φαινολικών ουσιών ανά mg ξηρής

μάζας εκχυλίσματος. Από τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας προκύπτει ότι το εκχύλισμα από κανέλα που είχε δημιουργηθεί με εκχυλιστικό μέσο διάλυμα KH_2PO_4 , είχε τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες. Ακολουθούν τα μεθανολικά εκχυλίσματα από ταραξάκο και κουρκουμά. Από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, φαίνεται ότι οι πολυφαινόλες βρίσκονται σε πολλούς φυτικούς ιστούς και έχουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα (Pulido et al., 2000).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση του γονιδίου που εκφράζει το ισοένζυμο SIRT2 στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO[®]. Το πλασμίδιο αυτό εισήχθη αρχικά σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. coli* (Stellar) προκειμένου να απομονωθεί το DNA τους και να επιβεβαιωθεί η ένθεση της σωστής αλληλουχίας. Μετά το προσδιορισμό της ακολουθίας, τα μετασχηματισμένα πλασμίδια εισήχθησαν σε εκφραστικά κύτταρα *E. coli* (BL21(DE3) και BL21(DE3) Rosetta), προκειμένου να αναλυθούν οι πρωτεΐνες που εκφράζονται και να επιβεβαιωθεί η έκφραση του ενζύμου SIRT2. Τέλος, ακολούθησε καθαρισμός του ενζύμου με χρωματογραφία συγγένειας ο οποίος δεν είχε απόλυτη επιτυχία καθώς το ένζυμο δεν απομονώθηκε εντελώς σε κάποια από τις εκλούσεις. Στην έκλουση 4, που πραγματοποιήθηκε με διάλυμα ιμιδαζολίου συγκέντρωσης 200 mM, η ζώνη του ενζύμου παρουσιάζεται ευκρινέστερα από τις υπόλοιπες, αλλά στην ίδια έκλουση εμφανίζονται ακόμα μερικές πρωτεϊνικές ζώνες. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η διαδικασία θα μπορούσε να τροποποιηθεί προκειμένου να έχει μεγαλύτερη επιτυχία.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdel-Lateef E, Mahmoud F, Hammam O, El-Ahwany E, El-Wakil E, Kandil S, Abu Taleb H, El-Sayed M, Hassenein H. (2016), Bioactive chemical constituents of *Curcuma longa* L. rhizomes extract inhibit the growth of human hepatoma cell line (HepG2), *Acta Pharm.* 66 (2016) 387–398.
- Andrade M., Ribeiro-Santos R., Melo R.N., Sanches-Silva A. (2016), Bioactive compounds of cinnamon – a valuable aromatic plant for packaging. *International Conference on Safety and Innovation in Food Packaging.*
- Ardestani P.M., Liang F. (2012), Sub-cellular localization, expression and functions of Sirt6 during the cell cycle in HeLa cells. *Nucleus* 3:442–451.
- Bae N.S., Swanson M.J., Vassilev A., Howard B.H. (2004), Human histone deacetylase SIRT2 interacts with the homeobox transcription factor HOXA10. *J. Biochem.* 135:695–700.
- Banks A.S., Kon N., Knight C., Matsumoto M., Gutierrez-Juarez R., Rossetti L., Gu W., Accili D. (2008), SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab.* 8:333–341.
- Barber M.F., Michishita-Kioi E., Xi Y., Tasselli L., Kioi M., Moqtaderi Z., Tennen R.I., Paredes S., Young N.L., Chen K., Struhl K., Garcia B.A., Gozani O., Li W., Chua K.F. (2012), SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. *Nature* 487:114–118.
- Beirowski B., Gustin J., Armour S.M., Yamamoto H., Viader A., North B. J., Michań S., Baloh R.H., Golden J.P., Schmidt R.E., Sinclair D.A., Auwerx J., Milbrandt J. (2011), Sir-two-homolog2 (Sirt2) modulates peripheral myelination through polarity protein Par-3/a typical protein kinase C (aPKC) signaling. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* 108:E952–E961.
- Benavente C.A., Schnell S.A., Jacobson E.L. (2012), Effects of niacin restriction on sirtuin and PARP responses to photodamage in human skin. *PLoS One* 7:e42276.
- Benzie I.F.F. and Strain J.J. (1996), The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay, *Analytical Biochemistry* 239, 70–76.

- Black J.C., Mosley A., Kitada T., Washburn M., Carey M. (2008), The SIRT2 deacetylase regulates auto acetylation of p300. *Mol. Cell* 32:449–455.
- Bodoira R, Velez A., Andreatta A.E., Martínez M., Maestri D., (2017), Extraction of bioactive compounds from sesame (*Sesamum indicum* L.) defatted seeds using water and ethanol under sub-critical conditions , *Food Chemistry* : S0308-8146(17)30897.
- Bosch-Presegue L., Vaquero A. (2011) The dual role of sirtuins in cancer. *Genes Cancer* 2:648–662.
- Bordone L., Cohen D., Robinson A., Motta M.C., van Veen E., Czapik A., Steele A.D., Crowe H., Marmor S., Luo J., Gu W., Guarente L. (2007), SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell* 6:759–767.
- Byles V., Chmielewski L.K., Wang J., Zhu L., Forman L.W., Faller D.V., Dai Y. (2010), Aberrant cytoplasm localization and protein stability of SIRT1 is regulated by PI3K/IGF-1R signaling in human cancer cells. *Int. J.Biol.Sci.* 6:599–612.
- Chen D., Bruno J., Easlou E., Lin S.J., Cheng H.L., Alt F.W., Guarente L. (2008), Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction. *Genes Dev.* 22:1753–1757.
- Chen R., Dioum E.M., Hogg R.T., Gerard R.D., Garcia J.A. (2011), Hypoxia increases sirtuin 1 expression in a hypoxia-inducible factor-dependent manner. *J. Biol.Chem.* 286:13869–13878.
- Colitti Monica & Stefanon Bruno, (2016), Different anti-adipogenic effects of bio-compounds on primary visceral pre-adipocytes and adipocytes, *EXCLI J.* 2016; 15: 362–377.
- Dan L., Klimenkova O., Klimiankou M., Klusman J.H., van den Heuvel-Eibrink M.M., Reinhardt D., Welte K., Skokowa J. (2011), The role of sirtuin 2 activation by nicotinamide phosphoribosyltransferase in the aberrant proliferation and survival of myeloid leukemia cells. *Haematologica* 97:551–559.
- Das C., Lucia M.S., Hansen K.C., Tyler J.K. (2009), CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. *Nature* 459:113–117.

- Dryden S.C., Nahhas F.A., Nowak J.E., Goustin A.S., Tainsky M.A. (2003), Role for human SIRT2 NAD-dependent deacetylase activity in control of mitotic exit in the cell cycle. *Mol. Cell.Biol.* 23:3173–3185.
- Feng Shi, Reuss Laura and Wang Yu (2016), Potential of Natural Products in the Inhibition of Adipogenesis through Regulation of PPAR Expression and/or Its Transcriptional Activity, *Molecules* 2016, 21, 1278.
- Filomena Maria, de Jesus Raposo, RuiManuel Santos Costa de Morais, AlcinaMaria Miranda Bernardo deMorais , Health applications of bioactive compounds from marine microalgae, *Life Sciences* 93 (2013) 479–486
- Firestein R., Blander G., Michan S., Oberdoerffer P., Ogino S., Campbell J., Bhimavarapu A., Luikenhuis S., de Cabo R., Fuchs C., Hahn W. C., Guarente D.A., Sinclair D.A. (2008), The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. *PLoS One* 3:e2020.
- Fontana L., Meyer T.E., Klein S., Holloszy J.O. (2004), Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* 101:6659–6663.
- Fraga M.F., Ballestar E., Villar-Garea A., Boix-Chornet M., Espada J., Schotta G., Bonaldi T., Haydon C., Ropero S., Petrie K., Iyer N.G., Perez-Rosado A., Calvo E., Lopez J.A., Cano A., Calasanz M.J., Colomer D., Piris M.A., Ahn N., Imhof A., Caldas C., Jenuwein T., Esteller M. (2005), Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat. Genet.* 37:391–400.
- Fu H., Subramanian R.R., Masters S.C.(2000), 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu. Rev.Pharmacol.Toxicol.* 40:617–647.
- Gal J., Bang Y., Choi H.J. (2012), SIRT2 interferes with autophagy-mediated degradation of protein aggregates in neuronal cells under proteasome inhibition. *Neurochem. Int* Dec:61(7):992-1000.
- Gao J., Wang W.Y., Mao Y.W., Graff J., Guan J.S., Pan L., Mak G., Kim D., Su S.C., Tsai L. (2010), A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature* 466:1105–1109.
- Gillespie, K.M., Chae, J.M., & Ainsworth, E.A. (2007), Rapid measurement of total antioxidant capacity in plants, *Nature Protocols* Vol 2, No 4.

- Gillum M.P., Erion D.M., Shulman G.I. (2010), Sirtuin-1 regulation of mammalian metabolism. *Trends Mol.Med.* 17:8–13.
- Gillum M.P., Kotas M.E., Erion D.M., Kursawe R., Chatterjee P., Nead K. T., Muise E.S., Hsiao J.J., Frederick D.W., Yonemitsu S., Banks A.S., Qiang L., Bhanot S., Olefsky J.M., Sears D.D., Caprio S., Shulman G.I.(2011), SirT1 regulates adipose tissue inflammation. *Diabetes* 60:3235–3245.
- Glozak Michele A., Sengupta Nilanjan, Zhang Xiaohong, Seto Edward, (2005), Acetylation and deacetylation of non-histone proteins, *DNA. Gene* 363 :15–23.
- Gómez-Pinilla Fernando (2008), Brain foods: the effects of nutrients on brain function, *Nat Rev Neurosci.* Jul; 9(7): 568–578.
- Guevara-González R.G. & Torres-Pacheco I. (2006), Bioactive components in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*, 2006: 217- 236.
- Haigis C. M., Sinclair A. D., (2011), *Handbook of the Biology of Aging* (Seventh Edition), Academic Press, Chapter 11, Pages 243–274.
- Han Y., Jin Y.H., Kim Y.J., Kang B.Y., Choi H.J., Kim,D.W., Yeo C.Y., Lee K. Y (2008), Acetylation of Sirt2 by p300 attenuates its deacetylase activity. *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 375:576–580.
- Hashimoto-Komatsu A., Hirase T., Asaka M., Node K. (2011), Angiotensin II induces microtubulere organization mediated by a deacetylase SIRT2 in endothelial cells. *Hypertens. Res.* 34:949–956.
- He W., Newman J.C., Wang M.Z., Ho L., Verdin E. (2012), Mitochondrial sirtuins: regulators of protein acylation and metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.*, August16,2012.
- Hoff KG, Avalos JL, Sens K, Wolberger C (2006), Insights into the sirtuin mechanism from ternary complexes containing NAD⁺ and acetylated peptide. *Structure* 14:1231–1240.
- Houtkooper H. Riekelt (2016), *Sirtuins, Proteins and cell regulation*, Springer, vol 10.
- Inoue T., Hiratsuka M., Osaki M., Oshimura M. (2007), The molecular biology of mammalian SIRT proteins: SIRT2 in cell cycle regulation. *Cell Cycle* 6:1011–1108.

- Jabeura I., Pereira E., Barrosa L., Calhelha C.R., Soković M., Oliveira P.P.B., Ferreira I. (2017), *Hibiscus sabdariffa* L. as a source of nutrients, bioactive compounds and colouring agents, *Food Research International*, S0963-9969(17)30413-1.
- Jayasena T., Poljak A., Smythe G., Braidya N., Münch G., Sachdeva P. (2013), The role of polyphenols in the modulation of sirtuins and other pathways involved in Alzheimer's disease, *Ageing Research Reviews* Vol 12, 4 :867-883.
- Jeong H., Cohen D.E., Cui L., Supinski A., Savas J.N., Mazzulli J.R., Yates J., Bordone L., Guarente L., Krainc D. (2011), Sirt1 mediates neuroprotection from mutant hunting in by activation of the TORC1 and CREB transcriptional pathway. *Nat. Med* 18:159–165.
- Jian B.Y.S., Chaudry I.H., Raju R. (2012), Resveratrol improves cardiac contractility following trauma-hemorrhage by modulating Sirt1. *Mol. Med.* 18:209–214.
- Jiang H, Khan S, Wang Y, Charron G, He B, Sebastian C, Du J, Kim R, Ge E, Mostoslavsky R et al (2013), SIRT6 regulates TNF-alpha secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine. *Nature* 496:110–113.
- Jiang W., Wang S., Xiao M., Lin Y., Zhou L., Lei Q., Xiong Y., Guan K.L., Zhao S. (2011), Acetylation regulates gluconeogenesis by promoting PEPCCK1 degradation via recruiting the UBR5 ubiquitinligase. *Mol. Cell* 43:33–44.
- Jin Y.H., Kim Y.J., Kim D.W., Baek K.H., Kang B.Y., Yeo C.Y., Lee K.Y. (2008), Sirt2 interacts with 14-3-3 b/g and down-regulates the activity of p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 368:690–695.
- Jing E., Gesta S., Kahn C.R., (2007), SIRT2 regulates adipocyte differentiation through FoxO1 acetylation/deacetylation. *Cell Metab.* 6:105–114.
- Jukanti A.K., Gaur P.M., Gowda C.L.L., Chibbar R. N. (2012), Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review, *British Journal of Nutrition* (2012), 108, S11–S26.
- Kedare Sagar B. & R. P. Singh (2011), Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, *J. Food Science Technol*, 48(4):412–422.

- Keskin-Aktan A , Akbulut K.G., Yazici-Mutlu Ç. , Sonugur G., Ocal M., Akbulut H. (2018), The effects of melatonin and curcumin on the expression of SIRT2, Bcl-2 and Bax in the hippocampus of adult rats, *Brain Res Bull.* Mar;137:306-310.
- Kim H.S., Patel K., Muldoon-Jacobs K., Bisht K.S., Aykin-Burns N., Pennington J.D., vanderMeer R., Nguyen P., Savage J., Owens K.M., Vassilopoulos A., Ozden O., Park S.H., Singh K.K., Abdulkadir S.A., Spitz D. R., Deng C.X., Gius D. (2010), SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell* 17:41–52.
- Kim D., Nguyen M.D., Dobbin M.M., Fischer A., Sananbenesi F., Rodgers J. T., Delalle I., Baur J.A., Sui G., Armour S.M., Puigserver P., Sinclair D. A., Tsai L.H. (2007), SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer’s disease and amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J* 26:3169–3179.
- Kitada M., Takeda A., Nagai T., Ito H., Kanasaki K., Koya D. (2011), Dietary restriction ameliorates diabetic nephropathy through anti-inflammatory effects and regulation of the autophagy via restoration of Sirt1 in diabetic Wistar fatty (fa/fa) rats: a model of type 2 diabetes. *Exp. Diabetes Res* 2011:908185.
- Knight C.M., Gutierrez-Juarez R., Lam T.K., Arrieta-Cruz I., Huang L., Schwartz G., Barzilai N., Rossetti L. (2011), Mediobasal hypothalamic SIRT1 is essential for resveratrol’s effects on insulin action in rats. *Diabetes* 60:2691–2700.
- Kruger J.N. (1994), The Bradford Method for Protein Quantitation. *Methods in Molecular Biology*, volume 32, chapter 3, Basic protein and peptide protocols, Human Press, Totowa Ney Jersey.
- Kupis Wioleta, Pałyga Jan, Tomal Ewa, Niewiadomska Ewa (2016). The role of sirtuins in cellular homeostasis. *J Physiol Biochem* 72:371–380.
- Laemmli U.K. (1970), Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature* volume 227, pages680–685.
- Lampson M.A., Kapoor T.M. (2005), The human mitotic checkpoint protein BubR1 regulates chromosome-spindle attachments. *Nat.CellBiol.* 7:93–98.

- Li N., Muthusamy S., Liang R., Sarojini H., Wang E. (2011), Increased expression of miR-34a and miR-93 in rat liver during aging, and their impact on the expression of Mgst1 and Sirt1. *Mech. Ageing Dev* 132:75–85.
- Li X., Zhang S., Blander G., Tse J.G., Krieger M., Guarente L.(2007), SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol. Cell* 28:91–106.
- Liu L., Arun A., Ellis L., Peritore C., Donmez G. (2012), Sirtuin 2 (SIRT2) enhances 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)-induced nigrostriatal damage via deacetylating Forkhead box O3a (Foxo3a) and activating Bim. *J. Biol.Chem* 287:32307–32311.
- Liu T.F., Vachharajani V.T., Yoza B.K., McCall (2012), C.E.NAD⁺-dependent sirtuins 1 and 6 coordinate a switch from glucose to fatty acid oxidation during the acute inflammatory response. *J. Biol.Chem.* 287:25758–25769
- Lu L., Li L., Lv X., Wu X.S., Liu D.P., Liang C.C. (2011), Modulations of hMOF auto acetylation by SIRT1 regulate hMOF recruitment and activities on the chromatin. *Cell Res.* 21:1182–1195.
- McCord R.A., Michishita E., Hong T., Berber E., Boxer L.D., Kusumoto R., Guan S., Shi X., Gozani O., Burlingame A.L., Bohr V.A., Chua K.F. (2009), SIRT6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. *Aging (AlbanyNY)* 1:109–121.
- McCubrey J., Lertpiriyapong K., Steelman L., Abrams L.S., Yang L.V., Ramiro M. Murata^{1,4}, Pedro L. Rosalen⁵, Aurora Scalisi⁶, Luca M. Neri⁷, Lucio Cocco⁸, Stefano Ratti⁸, Alberto M. Martelli⁸, Piotr Laidler⁹, Joanna Dulińska-Litewka⁹, Dariusz Rakus¹⁰, Agnieszka Gizak¹⁰, Paolo Lombardi¹¹, Ferdinando Nicoletti¹², Saverio Candido¹², Massimo Libra¹², Giuseppe Montalto^{13,14}, Melchiorre Cervello¹⁴ (2017), Effects of resveratrol, curcumin, berberine and other nutraceuticals on aging, cancer development, cancer stem cells and microRNAs, *Aging* 2017, Vol 9.
- Michan S., Li Y., Chou M.M., Parrella E., Ge H., Long J.M., Allard J.S., Lewis K., Miller M., Xu W., Mervis R.F., Chen J., Guerin K.I., Smith L.E., McBurney M.W., Sinclair D.A., Baudry M., deCabo R., Longo V.D. (2010), SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 30:9695–9707.

- Michishita E., Park J.Y., Burneskis J.M., Barrett J.C., Horikawa I., (2005), Evolutionarily conserved and non conserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol. Biol.Cell* 16:4623–4635; 2005.
- Min S.W., Cho S.H., Zhou Y., Schroeder S., Haroutunian V., Seeley W.W., Huang E.J., Shen Y., Masliah E., Mukherjee C., Meyers D., Cole P.A., Ott M., Gan L. (2010), Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. *Neuron* 67:953–966.
- Mir A.M., Sawhney S.S., Jassal M.M.S., (2013), Qualitative and quantitative analysis of phytochemicals of *Taraxacum officinale*, *Wudpecker Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol. 2(1), pp. 001 – 005.
- Miyazaki R., Ichiki T., Hashimoto T., Inanaga, K., Imayama I., Sadoshima J., Sunagawa K. (2008), SIRT1, a longevity gene, downregulates angiotensin II type 1 receptor expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28:1263–1269.
- Morris J. Brian (2013), Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging, *Free Radical Biology and Medicine* 56 :133–171.
- Moynihan K.A., Grimm A.A., Plueger M.M., Bernal-Mizrachi E., Ford E., Cras-Meneur C., Permutt M.A., Imai S. (2005), Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metab.* 2:105–117.
- Nelson L.E., Valentine R.J., Cacicedo J.M., Gauthier M.S., Ido Y., Ruderman N.B. (2012), A novel inverse relationship between metformin-triggered AMPK-SIRT1 signaling and p53 protein abundance in high glucose exposed HepG2 cells. *Am. J.Physiol.CellPhysiol* 303:C4–C13.
- Niederer F., Ospelt C., Brentano F., Hottiger M.O., Gay R.E., Gay S., Detmar M., Kyburz D. (2011), SIRT1 overexpression in the rheumatoid arthritis synovium contributes to proinflammatory cytokine production and apoptosis resistance. *Ann. Rheum.Dis.* 70:1866–1873.
- Nisoli E., Tonello C., Cardile A., Cozzi V., Bracale R., Tedesco L., Falcone S., Valerio A., Cantoni O., Clementi E., Moncada S., Carruba M.O. (2005), Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* 310:314–317.

- North B.J., Marshall B.L., Borra M.T., Denu J.M., Verdin E. (2003), The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol. Cell* 11:437–444.
- Oellerich M.F., Potente M. (2012), FOXOs and sirtuins in vascular growth, maintenance, and aging. *Circ. Res.* 110:1238–1251.
- Oliveira Rita Machado, Sarkander Jana, Kazantsev Aleksey, Outeiro Tiago Fleming, (2012), SIRT2 as a Therapeutic Target for Age-Related Disorders, *Front Pharmacol.* 2012; 3: 82.
- Ota H., Eto M., Kano M.R., Ogawa S., Iijima K., Akishita M., Ouchi Y. (2008), Cilostazol inhibits oxidative stress-induced premature senescence via upregulation of Sirt1 in human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28:1634–1639.
- Planavila A., Iglesias R., Giralt M., Villarroya F. (2011), Sirt1 acts in association with PPARα to protect the heart from hypertrophy, metabolic dysregulation, and inflammation. *Cardiovasc. Res.* 90:276–284.
- Polito L., Biella G., Albani D., (2017), Sirtuin Modulation as Novel Neuroprotective Strategy for Alzheimer's Disease, *Neuroprotection in Alzheimer's Disease*, Chapter 8, Pages 149–173.
- Pulido Raquel, Bravo Laura, Saura-Calixto Fulgencio (2000), Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay, *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 3396–3402.
- Rahaiee S., Moini S., Hashemi M., Shojaosadati S.A., (2014), Evaluation of antioxidant activities of bioactive compounds and various extracts obtained from saffron (*Crocus sativus* L.): a review, *J Food Sci Technol.*
- Sack M.N. (2012), The role of SIRT3 in mitochondrial homeostasis and cardiac adaptation to hypertrophy and aging. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52:520–525.
- Sauve AA, Celic I, Avalos J, Deng H, Boeke JD, Schramm VL (2001), Chemistry of gene silencing: the mechanism of NAD⁺-dependent deacetylation reactions. *Biochemistry* 40:15456–15463.
- Satoh A., Brace C.S., Ben-Josef G., West T., Wozniak D.F., Holtzman D. M., Herzog E.D., Imai S. (2010), SIRT1 promotes the central adaptive response to

diet restriction through activation of the dorsomedial and lateral nuclei of the hypothalamus. *J. Neurosci.* 30:10220–10232.

- Scalbert, A., B. Monties, G. Janin (1989), Tannins in Wood: Comparison of different estimation methods. *J. Agric. Food Chem.* 37: 1324-1329.
- Stein S., Lohmann C., Schafer N., Hofmann J., Rohrer L., Besler C., Rothgiesser K.M., Becher B., Hottiger M.O., Boren J., McBurney M.W., Landmesser U., Luscher T.F., Matter C.M. (2011), SIRT1 decreases Lox-1-mediated foam cell formation in atherogenesis. *Eur. Heart J.* 31:2301–2309.
- Stein S., Matter C.M. (2011), Protective roles of SIRT1 in atherosclerosis. *Cell Cycle* 10:640–647.
- Tan M, Peng C, Anderson KA, Chhoy P, Xie Z, Dai L, Park J, Chen Y, Huang H, Zhang Y et al (2014), Lysine glutarylation is a protein posttranslational modification regulated by SIRT5. *Cell Metab* 19:605–617.
- Tanno M., Sakamoto J., Miura T., Shimamoto K., Horio Y., (2007), Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *J. Biol. Chem.* 282:6823–6832.
- Uribarri J., Cai W., Ramdas M., Goodman S., Pyzik R., Chen X., Zhu L., Striker G.E., Vlassara H. (2011), Restriction of advanced glycation end products improves insulin resistance in human type 2 diabetes: potential role of AGER1 and SIRT1. *Diabetes Care* 34:1610–1616.
- Vakhrusheva O., Smolka C., Gajawada P., Kostin S., Boettger T., Kubin T., Braun T., Bober E.(2008), Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circ. Res.* 102:703–710.
- Vaquer A., Scher M.B., Lee D.H., Sutton A., Cheng H.L., Alt F.W., Serrano L., Sternglanz R., Reinberg D. (2006), SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4Lys16 during mitosis. *Genes Dev.* 20:1256–1261.
- Wang F., Nguyen M., Qin F.X., Tong Q. (2007), SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction. *Aging Cell* 6:505–514.
- Wang F., Tong Q. (2009), SIRT2 suppresses adipocyte differentiation by deacetylating FOXO1 and enhancing FOXO1's repressive interaction with PPAR γ . *Mol. Biol. Cell* 20:801–808.

- Wu D., Qiu Y., Gao X., Yuan X.B., Zhai Q. (2011), Overexpression of SIRT1 in mouse forebrain impairs lipid/glucose metabolism and motor function. *PLoS One* 6:e21759.
- Xu F., Burk D., Gao Z., Yin J., Zhang X., Weng J., Ye J. (2012), Angiogenic deficiency and adipose tissue dysfunction are associated with macrophage malfunction in SIRT1^{-/-} mice. *Endocrinology* 153:1706–1716.
- Xu Y., Nie L., Yin Y.G., Tang J.L., Zhou J.Y., Li D.D., Zhou S.W. (2012), Resveratrol protects against hyperglycemia-induced oxidative damage to mitochondria by activating SIRT1 in rat mesangial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 259:395–401.
- Yoshino J., Mills K.F., Yoon M.J., Imai S. (2011), Nicotinamide mononucleotide, a key NAD⁺ intermediate, treats the pathophysiology of diet and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab.* 14:528–536.
- Yu S.S., Cai Y., Ye, J.T., Pi R.B., Chen S.R., Liu P.Q., Shen X.Y., Ji Y. (2012), Sirtuin 6 protects cardiomyocytes from hypertrophy in vitro via inhibition of NF-κB-dependent transcriptional activity. *Br. J. Pharmacol.* February 15, 2012.
- Yu J, Sadhukhan S, Noriega LG, Moullan N, He B, Weiss RS, Lin H, Schoonjans K, Auwerx J (2013), Metabolic characterization of a Sirt5 deficient mouse model. *Sci Rep* 3:2806.
- Yu W., Dittenhafer-Reed K.E., Denu J.M. (2010), SIRT3 protein deacetylates isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) and regulates mitochondrial redox status. *J. Biol. Chem.* 287:14078–14086.
- Zhang S., Cai G., Fu B., Liu W., Zhuo L., Sun L., Liu F., Chen X. (2012), SIRT1 is required for the effects of rapamycin on high glucose-inducing mesangial cells senescence. *Mech. Ageing Dev.* 133:387–400.
- Zhou S., Chen H.Z., Wan Y.Z., Zhang Q.J., Wei Y.S., Huang S., Liu J.J., Lu Y.B., Zhang Z.Q., Yang R.F., Zhang R., Cai H., Liu D.P., Liang C.C. (2011), Repression of P66Shc expression by SIRT1 contributes to the prevention of hyperglycemia-induced endothelial dysfunction. *Circ. Res.* 109:639–648.
- Κλώνης Ι. (2007), *Ενζυμολογία, εκδόσεις Εμβryo, Κεφ 4.5, σελ 80.*

