

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΠΑΠΑΓΙΑΝΝΙΤΣΗΣ

**Επίδραση φυτικών φαινολών της δίαιτας στη δράση
ενός παράγοντα από ορό εμβρύου μοσχαριού, ο
οποίος αλλάζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες του DNA.**

ΛΑΡΙΣΑ 2005

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΠΑΠΑΓΙΑΝΝΙΤΣΗΣ

Επίδραση φυτικών φαινολών της δίαιτας στη δράση
ενός παράγοντα από ορό εμβρύου μοσχαριού, ο
οποίος αλλάζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες του DNA.

ΛΑΡΙΣΑ 2005



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 4641/1
Ημερ. Εισ.: 7-11-2005
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2005
ΠΑΠ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087862

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΟΥΡΕΤΑΣ – ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΑΓΗΤΗΤΗΣ
- ΑΝΤΩΝΗΣ ΚΗΠΑΡΟΣ – ΔΙΔΑΣΚΩΝ
- ΙΑΣΩΝ ΚΩΣΤΑΡΟΠΟΥΛΟΣ - ΔΙΔΑΣΚΩΝ

Περιεχόμενα:

Περίληψη	Σελ.1
Εισαγωγή	Σελ.2
Πολυφαινόλες	Σελ.2
Γενικά	Σελ.2
Τα φλαβονοειδή και η χημική τους δομή	Σελ.3
Βιοσύνθεση φυτικών πολυφαινολών	Σελ.5
Απορρόφηση και μεταβολισμός των φυτικών πολυφαινολών	Σελ.6
Βιολογική δράση των φυτικών φαινολών	Σελ.9
Μεταλλαξιγόνος δράση των φυτικών φαινολών	Σελ.9
Ελεύθερες ρίζες και αντιοξειδωτική δράση των φυτικών φαινολών	Σελ.11
Αντιμεταλλαξιγόνος δράση των φυτικών πολυφαινολών	Σελ.17
Αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα	Σελ.20
Απόπτωση επαγόμενη από φυτικές πολυφαινόλες	Σελ.20
Πρωτεϊνικοί παράγοντες οι οποίοι αλλάζουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες του DNA	Σελ.21
Σκοπός του πειράματος	Σελ.21
Υλικά	Σελ.23
Δείγμα ορού	Σελ.23
DNA δείγματα	Σελ.24
DNA ladder	Σελ.25
Αντιδραστήρια PCR	Σελ.25
Ένζυμο περιορισμού	Σελ.25
Μέθοδοι	Σελ.25
Καθαρισμός του παράγοντα	Σελ.25
Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών	Σελ.27
Μέτρηση της επίδρασης της συγκέντρωσης του DNA στη δράση του παράγοντα	Σελ.30
Μέτρηση της επίδρασης της συγκέντρωσης του ορού στη δράση του παράγοντα	Σελ.31
Μέτρηση της επίδρασης της συγκέντρωσης του μερικώς καθαρισμένου παράγοντα στη δράση του	Σελ.32
Μέτρηση της επίδρασης της συγκέντρωσης των πολυφαινολών στη δράση του παράγοντα	Σελ.33
Μελέτη της επίδρασης του παράγοντα και των πολυφαινολών στην κινητικότητα του πλασμιδιακού DNA	Σελ.36
Μέτρηση της επίδραση του παράγοντα σε δίκλωνο και μονόκλωνο DNA	Σελ.37
Έλεγχος της δράσης του παράγοντα εάν είναι καταλυτική	Σελ.38
Μελέτη της επίδρασης του παράγοντα και των πολυφαινολών στην διαδικασία της αντιγραφής	Σελ.39
Μελέτη της επίδρασης του παράγοντα και των πολυφαινολών στη δράση των ενζύμων περιορισμού	Σελ.41
Αποτελέσματα	Σελ.43
Βιοχημικές ιδιότητες του παράγοντα στον ορό	Σελ.43
Επίδραση της συγκέντρωσης του DNA στη δράση του παράγοντα	Σελ.43
Επίδραση της συγκέντρωσης του ορού στη δράση του παράγοντα	Σελ.44
Επίδραση της συγκέντρωσης του μερικώς καθαρισμένου παράγοντα στη δράση του	Σελ.45
Επίδραση της συγκέντρωσης των πολυφαινολών στη δράση του παράγοντα	Σελ.46
Επίδραση του καφεϊκού οξέος στη δράση του παράγοντα	Σελ.46
Επίδραση του πρωτοκαχεϊκού οξέος στη δράση του παράγοντα	Σελ.48
Επίδραση του φερολικού οξέος στη δράση του παράγοντα	Σελ.49
Επίδραση του γαλλικού οξέος στη δράση του παράγοντα	Σελ.50
Επίδραση της ρουτίνης στη δράση του παράγοντα	Σελ.51
Μηχανισμός δράσης του παράγοντα	Σελ.52
Επίδραση του παράγοντα και των πολυφαινολών στην κινητικότητα του πλασμιδιακού DNA	Σελ.52
Μπορεί ο παράγοντας να δράσει σε μονόκλωνο DNA;	Σελ.54
Είναι καταλυτική η δράση του παράγοντα;	Σελ.54

Μελέτη του ρόλου του παράγοντα και της επίδρασης των πολυφαινολών σε βασικές διεργασίες των κυττάρων	Σελ.56
Μελέτη της επίδρασης του παράγοντα και των πολυφαινολών στην διαδικασία της αντιγραφής	Σελ.56
Μπορεί η δράση των ενζύμων περιορισμού να επηρεαστεί από την παρουσία του παράγοντα και ποια η επίδραση των πολυφαινολών;	Σελ.57 Σελ.58
Συζήτηση	
Οι πολυφαινόλες αναστέλλουν την δράση του παράγοντα συνδεδεμένες με το DNA	Σελ.58
Διαφορές στη δράση των πολυφαινολών	Σελ.59
Πιθανός μηχανισμός	Σελ.61
Βιβλιογραφία	Σελ.62

Επίδραση φυτικών φαινόλων της δίαιτας στη δράση ενός παράγοντα από ορό εμβρύου μοσχαριού, ο οποίος αλλάζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες του DNA.

Περίληψη

Οι φυτικές φαινόλες, που παρουσιάζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση μπορούν να ληφθούν μέσω των τροφίμων και να βρεθούν στον ορό του αίματος των ζωικών οργανισμών. Στον ορό απελευθερώνονται νουκλεϊνικά οξέα ως προϊόντα νέκρωσης και ως μηνύματα για την δημιουργία φλεγμονής. Έχει αναφερθεί η ύπαρξη ενός παράγοντα σε εμβρυϊκούς ιστούς ο οποίος αλληλεπιδρά με το DNA. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του DNA με συνέπεια να παραμένει διαλυτό σε όξινα περιβάλλοντα *in vitro*. Ο παράγοντας αυτός που απομονώθηκε στα αυγά ιχθύων είναι πρωτεϊνικός, αναστέλλει την αντιγραφή του DNA από την DNA πολυμεράση. Η πρωτεΐνη αυτή υπέστη μερική ανάλυση αλληλουχιών του N-τελικού της άκρου και έδειξε ομοιότητες με μέλη της οικογένειας της α-φετοπρωτεΐνης. Στην συγκεκριμένη μελέτη αναλύθηκε η ύπαρξη του συγκεκριμένου παράγοντα στον εμβρυϊκό ορό μοσχαριού. Ο παράγοντας καθарίστηκε μερικώς με ακετόνη με σκοπό να μελετηθούν οι βιοχημικές του ιδιότητες, ο μηχανισμός δράσης του και η επίδραση του σε βασικές διεργασίες των κυττάρων. Επιπλέον εξετάστηκε η επίδραση 6 πολυφαινόλων στην δραστικότητα του παράγοντα. Από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι ο παράγοντας δεν αντιδρά καταλυτικά αλλά στοιχειομετρικά με το DNA επηρεάζοντας τις φυσικοχημικές του ιδιότητες και την κινητική συμπεριφορά του πλασμιδιακού DNA σε πηκτές αгарόζης. Επίσης βρέθηκε ότι ο παράγοντας παρεμποδίζει την υδρόλυση πλασμιδιακού DNA από ένζυμα περιορισμού και αναστέλλει την διαδικασία της αντιγραφής, ενώ οι πολυφαινόλες αναστέλλουν τη δράση του παράγοντα.

Εισαγωγή

Πολυφαινόλες

Γενικά

Οι πολυφαινόλες, μόρια που περιέχουν δύο ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες, είναι ευρέως κατανεμημένες στο φυτικό βασίλειο και αποτελούν ένα από τα πιο διαδεδομένα συστατικά της δίαιτας των ζώων και των ανθρώπων. Αυτή η ομάδα των φυτικών μεταβολιτών περιέχει περισσότερα από 8000 σύνθετα μόρια, περιλαμβάνοντας τις πιο απλές φαινόλες έως τις πιο πολύπλοκες, τις ταννίνες. Οι πολυφαινόλες μπορούν να διαιρεθούν σε διάφορες κατηγορίες σύμφωνα με την χημική τους δομή [1]. Κάποιες από τις σημαντικότερες κατηγορίες φαίνονται στον πίνακα 1.

Κατηγορία πολυφαινολών	Παράδειγμα
Φαινολικά οξέα	Γαλλικό οξύ, Ταννικό οξύ, Βανίλικό οξύ
Υδροξυκινναμικά οξέα	Φερολικό οξύ, Καφεϊκό οξύ, p-Κουμαρικό οξύ
Κουμαρίνες – Ισοκουμαρίνες	Σκοπολετίνη
Στιλβένια	Ρεσβερατρόλη
Ανθρακινόνες	-
Φλαβονοειδή	Ρουτίνη, Κερκετίνη
Διαρυλεπτάνες	Κουρκουμίνη
Λιγνάνες – Νεολιγνάνες	-
Λιγνίνες	-

Πίνακας 1. Κατηγοριοποίηση των πολυφαινολών σύμφωνα με την χημική τους δομή και ορισμένα παραδείγματα.

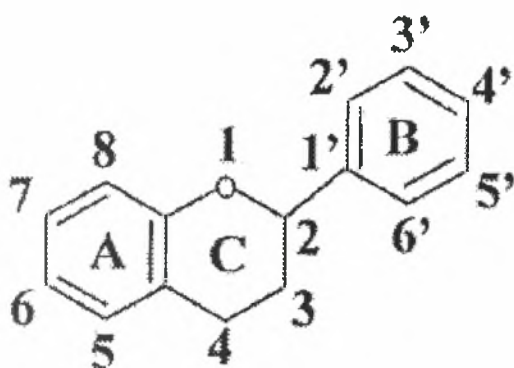
Τα φλαβονοειδή και η χημική τους δομή

Τα φλαβονοειδή είναι η μεγαλύτερη και πιο καλά μελετημένη κατηγορία πολυφαινολών και αποτελούν την κυρία ομάδα χρωστικών που απαντάται στα φυτά (Εικ. 1). Τρόφιμα πλούσια σε φλαβονοειδή είναι τα μήλα, το τσάι, ο καφές και το κρασί. Η ημερήσια λήψη φλαβονοειδών κυμαίνεται μεταξύ των 10-100 mg ανά ημέρα [2, 3]. Από μελέτες έχουν παρατηρηθεί μεγάλες διαφορές στην ημερήσια λήψη φλαβονοειδών μεταξύ των ατόμων διαφορετικών χώρων, οι οποίες οφείλονται στις διαφορετικές διατροφικές συνήθειες [4].

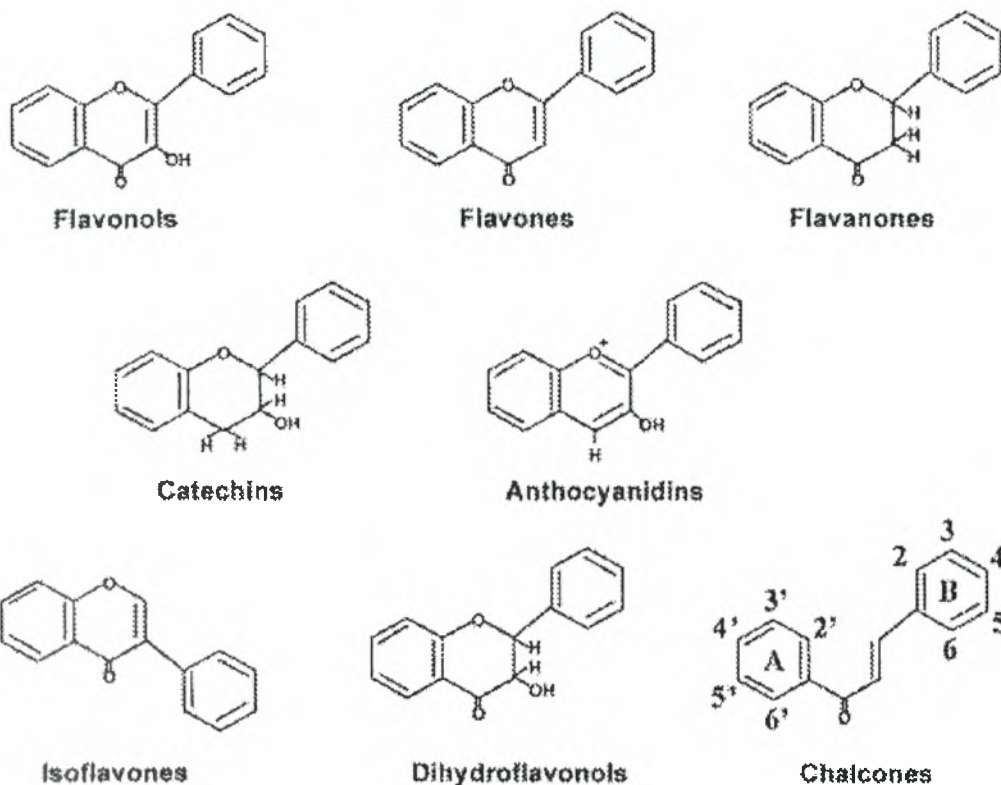
Οι βιοχημικές ιδιότητες των φλαβονοειδών και των μεταβολιτών τους εξαρτώνται από τη χημική τους δομή και τον προσανατολισμό των διάφορων υποκατάστατων στο μόριο. Πάνω από 4000 διαφορετικά μόρια φλαβονοειδών έχουν αναγνωρισθεί, τα οποία μπορούν να ταξινομηθούν σύμφωνα με τη χημική τους δομή στις παρακάτω υποκατηγορίες των φλαβονοειδών: φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβονόνες, κατεχίνες, ανθοκυανιδίνες, ισοφλαβόνες, διυδροφλαβονόλες και χαλκόνες (Εικ. 2). Τα φλαβονοειδή διαφέρουν στην διευθέτηση των υδροξυλικών, μεθοξυλικών, και γλυκοσιδικών πλευρικών τους ομάδων καθώς και στην κλίση μεταξύ των Α και Β δακτυλίων. Τα περισσότερα φλαβονοειδή που υπάρχουν στη φύση είναι γλυκοσυλιωμένα. Η κύρια μονάδα υδατάνθρακα είναι η γλυκόζη, χωρίς όμως να αποκλείεται η παρουσία γαλακτόζης, ξυλόζης ή και αραβινόζης. Η μονάδα του σακχάρου επιτρέπει την απορρόφηση των φλαβονοειδών από τον εντερικό σωλήνα [5].

Τα φλαβονοειδή απαντώνται ως μονομερή, διμερή ή ολιγομερή. Οι πολυμερείς ενώσεις φλαβονοειδών, ονομάζονται ταννίνες και διακρίνονται σε

δύο ομάδες σύμφωνα με τη δομή τους: τις συμπυκνωμένες και τις ικανές να υδρολυθούν. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες (προανθοκυανιδίνες) αποτελούν πολυμερή των φλαβονολών, ενώ οι ικανές να υδρολυθούν αποτελούν πολυμερή του γαλλικού οξέος. Τα μονομερή της κατεχίνης καθώς και του γαλλικού οξέος είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό χηλικών ενώσεων και τη δέσμευση ελευθέρων ριζών, που αποτελούν ιδιότητες των φλαβονοειδών [5].



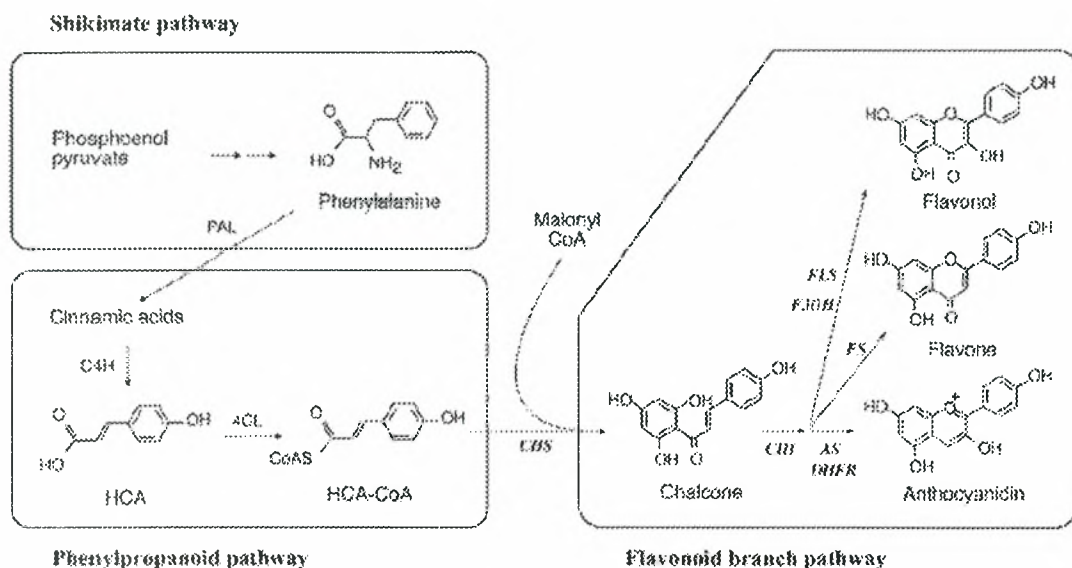
Εικόνα 1. Η βασική δομή των φλαβονοειδών. Οι τρεις φαινολικοί δακτύλιοι A, B, C και το αριθμητικό σύστημα που χρησιμοποιείται για την διάκριση των ανθρακικών θέσεων γύρο από το μόριο.



Εικόνα 2. Οι σημαντικότερες υποκατηγορίες των φλαβονοειδών.

Βιοσύνθεση των φυτικών πολυφαινολών

Τα φαινολικά οξέα αποτελούνται από έναν τουλάχιστον αρωματικό δακτύλιο (C6), ο οποίος μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες. Τα υδροξυκιναμικά οξέα και τα φλαβονοειδή έχουν τον ίδιο βασικό ανθρακικό σκελετό, C6-C3 και C6-C3-C6 αντίστοιχα. Τα υδροξυκιναμικά οξέα και τα φλαβονοειδή παράγονται από φαιυλανίνη, μέσω του μονοπατιού του σικιμικού οξέος, το οποίο αποτελεί ειδικό μονοπάτι για τα φλαβονοειδή (Εικ. 3) [6].



Εικόνα 3. Διάγραμμα του μονοπατιού βιοσύνθεσης των φυτικών πολυφαινολών. Τα υδροξυκιναμικά οξέα (HCAs) και τα флаβονοειδή προέρχονται από το κυνναμικό οξύ, το οποίο σχηματίζεται από την φαινυλανίνη μέσω της λύσεως φαινυλαλανινικής αμμωνίας (PAL). Το κυνναμικό οξύ μετατρέπεται σε υδροξυκυκνναμικό οξύ μέσω της cinnamate-4-υδροξυλάσης (C4H) και της ο-μεθυλοτρנסφεράσης. Το ένζυμο 4-κουμαράση: CoA-λιγάση (4CL) καταλύει το σχηματισμό του υδροξυκυκνναμοϋλ-CoA (HCA-CoA), και αυτά τα ενεργοποιημένα ενδιάμεσα χρησιμοποιούνται στη βιοσύνθεση των флаβονοειδών και της λιγνίνης. Η σύνθεση των флаβονοειδών αρχίζει με τη συμπύκνωση του υδροξυκυκνναμοϋλ-CoA με τρία μόρια μαλονυλ-CoA που καταλύεται από τη συνθάση της χαλκόνης (chalcone synthase-CHS). Στην πορεία η χαλκόνη μετατρέπεται σε άλλες υποομάδες των флаβονοειδών, συμπεριλαμβανομένων των флаβονών, флаβονολών και ανθοκυανιδινών μέσω της ισομεράσης της χαλκόνης (CHI), της 3-υδροξυ υδροξυκυκνναμοϋλ-CoA λιγάσης της флаβονόνης (F3OH), της συνθάσης της ισοφλαβονόνης (ISF), της συνθάσης της флаβονής (FS), της συνθάσης της флаβονόλης (FLS), της ρεδοκτάσης της διυδροφλαβονόλης (DHFR) και της συνθάσης της ανθοκυανιδίνης (AS).

Απορρόφηση και μεταβολισμός των φυτικών πολυφαινολών

Για τον προσδιορισμό των βιολογικών επιδράσεων των πολυφαινολών στους οργανισμούς εκτός από τα δομικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ουσιών απαραίτητη είναι η γνώση του τρόπου απορρόφησης, της φαρμακοκινητικής, του τρόπου βιομετασχηματισμού των ουσιών και οι σχετικές δραστηριότητες των μεταβολιτών τους. [7].

Η κινητική απορρόφησης των флаβονοειδών διαφέρει μεταξύ των τροφίμων, εξ' αιτίας της ετερογένειας των σακχάρων και άλλων λειτουργικών ομάδων που βρίσκονται συνδεδεμένες στο σκελετό των флаβονοειδών. Η

απορρόφηση των φλαβονοειδών επίσης εξαρτάται από τη δόση, την τροφή, την δίαιτα που ακολουθεί το άτομο, το φύλο και το είδος των μικροοργανισμών του εντέρου [7].

Σημαντικό ρόλο παίζει και η τοποθεσία απορρόφησης, διαφορετικές τοποθεσίες απορρόφησης σημαίνουν και διαφορετική μεταβολική μοίρα των ρουτινισιδών εναντίον των γλυκοσιδών, καθώς το ήπαρ παίζει σημαντικότερο ρόλο στο μεταβολισμό των φλαβονοειδών που απορροφούνται από το λεπτό έντερο σε αντίθεση με αυτές που απορροφούνται από το παχύ έντερο. Για την υδρόλυση και την απορρόφηση των γλυκοσυλιωμένων φλαβονοειδών είναι απαραίτητη η παρουσία των εντερικών βακτηρίων. Ενώ για την υδρόλυση των μη-γλυκοσυλιωμένων φλαβονοειδών είναι απαραίτητη η συνεισφορά της μικροχλωρίδας του παχέος εντέρου [7].

Εξαιτίας του μοριακού τους μεγέθους, για την απορρόφηση των πολυμερών φλαβονοειδών μέσω του εντερικού επιθηλίου είναι απαραίτητο να προηγηθεί διαχωρισμός σε μικρότερα συστατικά, μικρότερου μοριακού βάρους. Για αυτήν την διαδικασία συνεργάζονται οι εντερικοί μικροοργανισμοί και το χαμηλό γαστρικό pH [7].

Τα μη γλυκοσυλιωμένα φλαβονοειδή είναι υδρόφοβα και μπορούν να περάσουν μέσα από τις βιολογικές μεμβράνες με παθητική διάχυση. Όταν όμως τα φλαβονοειδή φέρουν στο μόριο τους ένα σάκχαρο τότε αυξάνεται η διαλυτότητα τους στο νερό και μειώνεται η δυνατότητα παθητικής διάχυσης μέσω των βιολογικών μεμβρανών. Η απορρόφηση των γλυκοσυλιωμένων φλαβονοειδών στο λεπτό έντερο μέσω μεταφορέων γλυκόζης [8].

Το πρώτο στάδιο του μεταβολισμού των φλαβονοειδών είναι η απογλυκοσυλίωση των γλυκοσυλιωμένων φλαβονοειδών, η οποία είναι απαραίτητη για να συμβεί ο περαιτέρω μεταβολισμός. Η απογλυκοσυλίωση μπορεί να συμβεί είτε εξωτερικά του κυττάρου, στον εντερικό αυλό, είτε στο εσωτερικό των εντερικών κυττάρων μετά τη μεταφορά [8].

Ο μεταβολισμός των φαινολών συνεχίζεται μέσω των ενζύμων μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών της φάσης I ή της φάσης II. Τα ένζυμα του συστήματος P450 συμμετέχουν σε αντιδράσεις υδροξυλίωσης ή απομεθυλίωσης των φλαβονοειδών. Η απομεθυλίωση συμβαίνει μόνο όταν η μεθυλική ομάδα βρίσκεται στην 4' θέση του B δακτυλίου. Ενώ η μεθυλίωση συμβαίνει στην 3' θέση του B καθώς προτιμάται από την κατεχόλ-Ο-μεθυλοτρανσφεράση. Δεν υπάρχουν αποδείξεις για την μεθυλίωση οποιασδήποτε άλλης υδροξυλικής ομάδας των φλαβονοειδών εκτός από την κατεχολική ομάδα του B δακτυλίου [8].

Η σύνδεση με μια γλυκουρονική ομάδα ή θειϊκή ομάδα είναι οι πιθανές μεταβολικές πορείες για την κερκετίνη και το καφεϊκό οξύ. Η σύνδεση είναι μία κοινή αντίδραση αποτοξίνωσης, η οποία αυξάνει την διαλυτότητα και την μοριακή μάζα, που είναι σημαντικά για την απέκκριση στη χολή. Η κυρία πορεία για την απέκκριση των συνδεδεμένων φλαβονολών είναι πιθανόν μέσω της χολής, με αποτέλεσμα την επιστροφή τους στο παχύ έντερο. Τα γλυκουρονίδια δεν μπορούν διαχυθούν παθητικά κατά μήκος του εντέρου λόγω του αρνητικού τους φορτίου σε φυσιολογικό pH. Τα γλυκουρονίδια θα φτάσουν στο κόλον, όπου η εντερική μικροχλωρίδα θα απελευθερώσει την αγλυκόνη. Η υδρόλυση των υδροξυλιωμένων ή εστεροποιημένων φαινολικών σακχάρων συμβαίνει με τη δράση των μικροβιακών β-γλυκοσιδασών,

β-παμνοσιδασών και εστερασών. Η απελευθέρωση της αγλυκόνης συνήθως συνοδεύεται με αποικοδόμηση των φλαβονολών μέσω διάσπασης του δακτυλίου, με αποτέλεσμα τον περαιτέρω μεταβολισμό φλαβονολών σε πιο απλά φαινολικά οξέα. Αυτά τα προϊόντα μπορούν να απορροφηθούν και διαθέτουν βιολογικές δραστηριότητες [8].

Βιολογική δράση των φυτικών πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες δεν φέρουν καμία θρεπτική αξία. Επιπλέον, ορισμένες από αυτές παρουσιάζουν μεταλλαξιγόνες ιδιότητες και παρεμβάλλονται σε σημαντικές βιοχημικές διαδικασίες μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών. Επιπλέον οι πολυφαινόλες διαθέτουν την δυνατότητα να συνδέονται με μακρομόρια όπως οι πρωτεΐνες και οι υδρογονάνθρακες και μειώνουν την ικανότητα πέψης των τροφών. Παρόλα αυτά, πάρα πολλοί ερευνητές έχουν εκφράσει μεγάλο ενδιαφέρον για αυτές καθώς διαθέτουν πολύ χρήσιμες ιδιότητες. Πολλές από αυτές αναγνωρίστηκαν ως ουσίες με αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιοιστρογόνο, αντιμεταλλαξιγόνο και, ή αντικαρκινική δράση παίζοντας σημαντικό ρόλο στην αποφυγή ασθενειών και στην διατήρηση της σταθερότητας του γενώματος [1].

Μεταλλαξιγόνος δράση των φυτικών πολυφαινολών

Από τις 8000 γνωστές πολυφαινόλες μόνο 200 έχουν δοκιμαστεί για μεταλλαξιγόνες ιδιότητες σε απλά βακτηριακά συστήματα. Η πλειονότητα των πολυφαινολών που δοκιμάστηκαν δεν παρουσίαζε μεταλλαξιγόνο δράση ή αν παρουσίαζε, αυτή ήταν πολύ ασθενής [9, 10]. Συγκεκριμένες πολυφαινόλες,

όπως η κερκεΐνη μπορούν και συνδέονται στο DNA, αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να είναι ένας σημαντικός μηχανισμός βακτηριακής μεταλλαξιγένεσης.

- Οξειδωτικά αποτελέσματα των φυτικών πολυφαινολών

Ορισμένα φλαβονοειδή τα οποία θεωρούνταν αντιοξειδωτικά μπορούν να πάρουν μέρος σε προοξειδωτικές αντιδράσεις[11]. Η προοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών οδηγεί στο σχηματισμό μιας υδροξυλικής ρίζας. Οι υδροξυλικές ρίζες ξεκινούν την υπεροξειδωση των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών, και μέσω οξειδωτικών μηχανισμών προκαλούν βλάβες στο DNA, όπως σπασίματα στις αλυσίδες του DNA και τροποποίηση των βάσεων του[13]. Αυτές οι βλάβες του DNA οδηγούν σε διάφορες βιολογικές καταστάσεις όπως καρκινογένεση και γήρανση. Συνήθως είναι απαραίτητες πολύ υψηλές συγκεντρώσεις φλαβονοειδών για να προκληθεί η μεταλλαξιγόνος δράση τους [12]. Επιπλέον, μερικά φλαβονοειδή απαιτούν μεταβολική ενεργοποίηση προκειμένου να καταστούν μεταλλαξιγόνα [10].

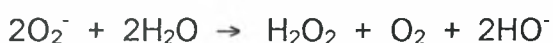
- Αναστολή της δράσης των τοποϊσομερασών

Μια ακόμη δυνατότητα ορισμένων πολυφαινολών είναι να δηλητηριάζουν τη δράση των τοποϊσομερασών. Οι τοποϊσομεράσες είναι ένζυμα τα οποία τεμαχίζουν και έπειτα επανενώνουν τη μία (τοποϊσομεράση I) ή και τις δύο (τοποϊσομεράση II) αλυσίδες του DNA, κατά την διάρκεια της αντιγραφής ή της μεταγραφής, και με αυτόν τον τρόπο επιτρέπεται στις αλυσίδες να περνούν μέσω μιας άλλης. Η αναστολή της δράσης των τοποϊσομερασών μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλαξιγένεση [14]. Πολυφαινόλες, όπως οι ταννίνες, οι κατεχίνες, οι φλαβόνες και οι ίσο-φλαβόνες αλληλεπιδρούν με την τοποϊσομεράση II και παρεμποδίζουν την διαδικασία της επανένωσης των

σπασιμάτων των διπλών αλυσίδων του DNA και ενισχύουν το σχηματισμό συμπλοκών DNA κομματιών – ενζύμων [15]. Αυτή η δράση, οδηγεί στη συσσώρευση DNA σπασιμάτων και μεταλλάξεων. Οι ουσίες αυτές δεν δρουν ως σημειακά μεταλλαξιγόνα αλλά ως δυναμικά μεταλλαξιγόνα, προκαλώντας υψηλό αριθμό σπασμένων και ανασυνδυσασμένων χρωμοσωμάτων σε καλλιέργειες κυττάρων [16].

Ελεύθερες ρίζες και αντιοξειδωτική δράση των φυτικών πολυφαινολών

Ελεύθερη ρίζα είναι κάθε χημική ουσία, η οποία έχει ένα ή περισσότερα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια. Στα πλαίσια του οξειδωτικού στρες οι ελεύθερες ρίζες είναι μικρά μόρια ή ιόντα, τα οποία είναι ενεργά με μικρές ενέργειες ενεργοποίησης και σύντομη διάρκεια ζωής. Το μικρό τους μέγεθος, τους επιτρέπει σε ορισμένα από αυτά να διαπερνούν τις μεμβράνες των κυττάρων. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να θεωρηθούν ως υποσύνολο των ενεργών ριζών του οξυγόνου ή του αζώτου. Το μεγαλύτερο μέρος των ενεργών ειδών του οξυγόνου προέρχεται από προϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού. Το ανιόν του υπεροξειδίου (O_2^-), παράγεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου ως ενδιάμεσο προϊόν της αναπνευστικής αλυσίδας, η οποία προσθέτει ένα μόριο οξυγόνου στο μόριο του νερού. Η αντίδραση προφανώς λαμβάνει χώρα ως εξής [17]:



Εκτός από την παραπάνω αντίδραση, η κύρια πηγή H_2O_2 είναι το οξειδωτικό απαμινάση των βιογενών αμινών που καταλύεται από το ένζυμο οξειδάση των μονοαμινών στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου.

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι οξειδωτικό, παρόλο που δεν είναι ρίζα. Έχει μεγάλη διάρκεια ζωής και μπορεί να διαχυθεί σε μεγάλες αποστάσεις πριν αντιδράσει. Μπορεί να παράγει την πολύ ενεργή υδροξυλική ρίζα μέσω της Fenton αντίδρασης εάν συνδεθεί με κάποιο μεταβατικό μέταλλο [17]



Το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί να δώσει γένεση και σε άλλες ενεργές ρίζες του οξυγόνου όπως το υποχλωρικό οξύ, $HOCl$, μέσω ενζυμικής οξειδωσης των χλωρικών ιόντων



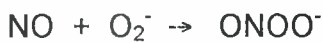
Το $HOCl$ μπορεί να οδηγήσει σε ένα άλλο ισχυρό οξειδωτικό [17]: το μόριο του οξυγόνου με ένα ηλεκτρόνιο στο τροχιακό του, 1O_2 ,



ή την υδροξυλική ρίζα

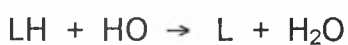


Οι ενεργές ρίζες του αζώτου (NO) παράγονται σε βιολογικούς ιστούς, όπως για παράδειγμα στον ενδοθηλιακό ιστό των αγγείων από την συνθάση των νιτρικών οξειδίων. Στα πλαίσια του οξειδωτικού στρες, η πιο γνωστή αντίδραση της ρίζας των νιτρικών (NO) είναι αυτή με τη ρίζα O_2^-

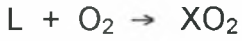


Όταν δύο ρίζες αντιδράσουν, το προϊόν τους θα βρίσκεται σε μία κατάσταση είτε με ένα είτε με τρία ηλεκτρόνια στο τροχιακό του. Στην παρούσα περίπτωση το προϊόν, το peroxynitrite ανιόν, έχει ένα μη συζευγμένο ηλεκτρόνιο στο τροχιακό του [17].

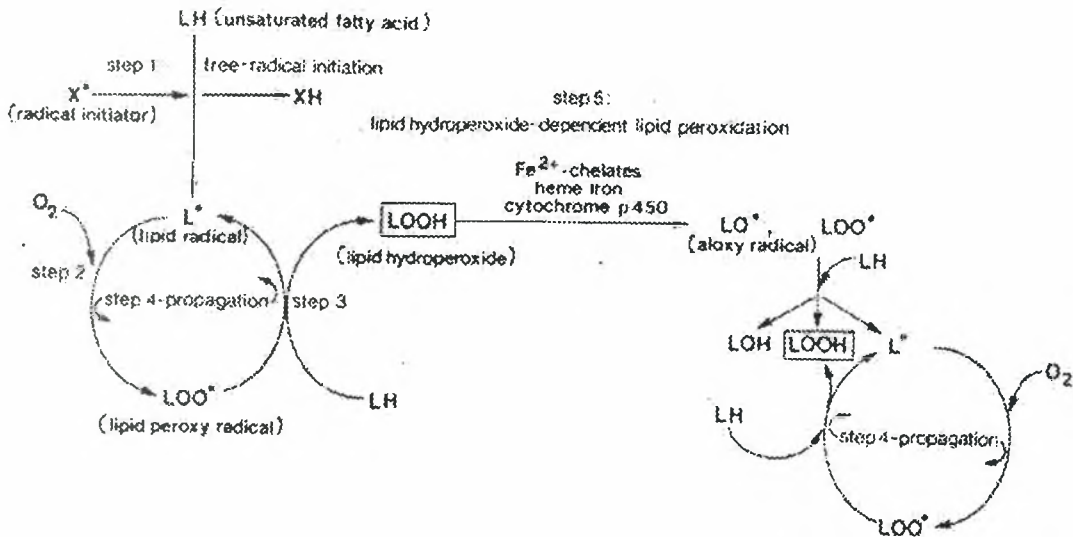
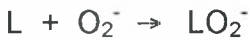
Η υδροξυλική ρίζα θεωρείται η πιο ενεργή μεταξύ των ενεργών ριζών. Έχει μικρή διάρκεια ζωής γι' αυτό και δρα σε πολύ μικρή απόσταση από τον τόπο δημιουργίας του. Το HO μπορεί να ξεκινήσει την υπεροξείδωση των λιπιδίων (Εικ. 4) μέσω αφαίρεσης ενός υδρογόνου από ένα ακόρεστο λιπαρό οξύ (LH)



Το X θα πάρει μέρος σε μία αλυσίδα αντιδράσεων ελεύθερων ριζών



Η αλυσίδα τερματίζεται όταν δύο ρίζες αντιδράσουν μεταξύ τους για να σχηματίσουν ένα σταθερότερο προϊόν



Εικόνα 4. Ο μηχανισμός της υπεροξειδωσης των λιπιδίων από τις ελεύθερες ρίζες. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων συμβαίνει σε χαμηλά επίπεδα στα κύτταρα και τους ιστούς. Το LH συμβολίζει ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων ξεκινά όταν μία ελεύθερη ρίζα αφαιρεί ένα άτομο υδρογόνου από το πολυακόρεστο λιπαρό οξύ, σχηματίζοντας μία λιπιδική ρίζα (L*) (βήμα 1). Η λιπιδική ρίζα αντιδρά με το μόριο του οξυγόνου για το σχηματισμό της υπερόξυ λιπιδικής ρίζας (LOO*) (βήμα 2). Η υπερόξυ λιπιδική ρίζα επιτίθεται σε ένα άλλο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ, σχηματίζοντας μία άλλη λιπιδική ρίζα και μία άλλη υπερόξυ λιπιδική ρίζα (βήμα 3). Η νεοσχηματισμένη λιπιδική ρίζα αντιδρά με ένα άλλο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ συνεχίζοντας τον κύκλο των αλυσιδωτών αντιδράσεων (βήμα 4). Μόλις χαμηλά επίπεδα λιπιδικών υπεροξειδίων γίνουν παρόντα στη λιπιδική μήτρα, ο κυρίως μηχανισμός της υπεροξειδωσης συνεχίζεται με την αποικοδόμηση των υπερόξυ λιπιδίων (βήμα 5) [18].

Εάν τέτοιες αντιδράσεις πάρουν μέρος ανεξέλεγκτα, το αποτέλεσμα θα είναι η δομική καταστροφή των πρωτεϊνών, η αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας και η παρεμπόδιση των ρυθμιστικών λειτουργιών και ο κυτταρικός θάνατος. Υπάρχουν όμως αμυντικοί μηχανισμοί, οι οποίοι καταστέλλουν τη δράση αυτών των δηλητηριωδών αντιδράσεων. Τα αντιοξειδωτικά μπορεί να είναι ενζυμικής φύσεως, όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) ή μη-ενζυμικής. Στα αντιοξειδωτικά μη ενζυμικής φύσεως ανήκουν και οι φυτικές πολυφαινόλες. Τα αντιοξειδωτικά αντιδρούν με τα οξειδωτικά πριν τα οξειδωτικά αντιδράσουν με κάποια σημαντικά βιομόρια.

Οι ελεύθερες ρίζες και άλλες ενεργές ρίζες χρησιμεύουν σε φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού. Για παράδειγμα, τα NO είναι σημαντικά στη ρύθμιση της πίεσης του αίματος και ως νευροδιαβιβαστές. Τα HOCl πολεμούν τις μικροβιακές μολύνσεις. Στα υγιή κύτταρα υπάρχει ισορροπία μεταξύ των ενεργών ριζών και των αντιοξειδωτικών και το οξειδωτικό στρες μπορεί να ερμηνευθεί ως η ανισορροπία μεταξύ των οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών υπέρ των οξειδωτικών. Υψηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικών από τα κανονικά μπορούν ομοίως να έχουν αρνητικά αποτελέσματα στα κύτταρα.

Στην περίπτωση όμως που οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί δεν καταφέρνουν να καταστείλουν πλήρως τα οξειδωτικά, τότε υπάρχει συσσώρευση αποτελεσμάτων στην διάρκεια ζωής ενός είδους λόγω της οξειδωτικής καταστροφής. Αυτό οδηγεί στη γένεση μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό DNA με αποτέλεσμα την μειωμένη σωστή λειτουργία των κυττάρων και το θάνατο [17].

Το πιο χρησιμοποιούμενο χαρακτηριστικό των πολυφαινολών για την πώληση τους ως διαιτητικά συμπληρώματα είναι αυτό της προστασία τους ενάντια της οξειδωτικής καταστροφής. Από επιδημιολογικές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η λήψη υψηλών συγκεντρώσεων ορισμένων φυτικών πολυφαινολών μπορεί να προστατεύσει από την οξείδωση των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών καθώς και από την οξειδωτική καταστροφή του DNA. Η πρώτη περίπτωση μπορεί να μειώσει τον αριθμό θανάτων από καρδιόπαθειες ενώ η δεύτερη περίπτωση οδηγεί σε μείωση των περιπτώσεων του καρκίνου και της γενετικής αστάθειας [19].

Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών οφείλεται κυρίως στην ικανότητα τους να καθαρίζουν τον οργανισμό από τις ελεύθερες ρίζες. Δηλαδή αντιδρούν με το οξειδωτικό προτού αυτό αντιδράσει με κάποιο σημαντικό βιομόριο. Είναι γνωστό ότι οι πολυφαινόλες μπορούν να συνδεθούν σε ένζυμα, σε μεταφορείς ορμονών και DNA, να δεσμεύσουν μεταλλικά ιόντα όπως Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} και Mg^{2+} δημιουργώντας χηλικές ενώσεις, να καταλύσουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων και να δεσμεύσουν ελεύθερες ρίζες. Η ικανότητα των πολυφαινολών να δημιουργούν χηλικές ενώσεις μετάλλων και να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες εξηγεί πολλές από τις περιπτώσεις της αντιοξειδωτικής τους δράσης [20].

Οι πολυφαινόλες προστατεύουν από την οξείδωση των λιπιδίων και άλλων μορίων, προσφέροντας ένα άτομο υδρογόνου στις ρίζες, ως εξής:



Οι ενδιάμεσες φαινοξυλικές ρίζες που σχηματίζονται είναι σχετικά σταθερές αλλά επίσης δρουν ως καθαριστές των ελευθέρων ριζών αντιδρώντας με αυτές.



Γενικά, η αποτελεσματικότητα των φυτικών πολυφαινολών στη προστασία από το οξειδωτικό στρες εξαρτάται από την ικανότητα τους να αντιδρούν με ελεύθερες ρίζες και από την ικανότητα των φαινοξυλικών ριζών να αντιδρούν με σημαντικά βιομόρια.

Όμως, πέρα από τη δυνατότητα της δέσμευσης των ελευθέρων ριζών, ορισμένες πολυφαινόλες μπορούν να δράσουν αντιοξειδωτικά, ενεργοποιώντας ένζυμα τα οποία εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση, ή καταστέλλοντας ένζυμα με οξειδωτική δράση. Επάγουν τα ένζυμα της φάσης II όπως την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), η οποία ενισχύει την έκκριση οξειδωτικών ριζών ή επάγουν την ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η μεταλλοθειονίνη. Οι πολυφαινόλες επίσης αναστέλλουν τη δράση του κυτοχρώματος P450 ή άλλων ενζύμων, όπως η κυκλοεξυγονάση και η λιποεξυγονάση που έχουν οξειδωτική δράση [19].

Αντιμεταλλαξιγόνος δράση των φυτικών πολυφαινολών

Υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός αναφορών, οι οποίες υποδεικνύουν την αντιμεταλλαξιγόνο δράση των πολυφαινολών, η οποία εξαρτάται από τη σχέση δομής και δράσης [21,22,23]. Η αντιμεταλλαξιγόνος δράση μιας

πολυφαινόλης εξαρτάται όχι μόνο από τη χημική φύση του μορίου, αλλά και από τον οργανισμό στον οποίο χορηγείται η υπό μελέτη πολυφαινόλη, αν ήταν παρούσα στον οργανισμό πριν, κατά την διάρκεια ή μετά την έκθεση. Πολλές από τις πολυφαινόλες που δρουν ως αντιμεταλλαξιγόνα, μπορούν να δράσουν και ως συμμεταλλαξιγόνα. Για παράδειγμα, η βανιλίνη και το ταννικό οξύ παρουσιάζουν αντιμεταλλαξιγόνο δράση σε ένα τεστ ποντικών, ενώ σε ένα τεστ με ζύμες το ταννικό οξύ επίσης παρουσίαζε αντιμεταλλαξιγόνα αποτελέσματα, ενώ η βανιλίνη δρούσε ως συμμεταλλαξιγόνο [24,25].

Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί μέσω των οποίων οι πολυφαινόλες δρουν και προκαλούν τα αντιμεταλλαξιγόνα αποτελέσματα:

- Επίδραση στη σύνθεση του DNA

Οι πολυφαινόλες μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά τη σύνθεση του DNA είτε άμεσα είτε έμμεσα. Η επίδραση αυτή παρατηρείται σε καρκινικά κύτταρα, ενώ στα αντίστοιχα φυσιολογικά τους δεν παρατηρείται [26]. Ο μηχανισμός δράσης δεν είναι γνωστός.

- Επίδραση στην επιδιόρθωση του DNA

Μερικές από τις πολυφαινόλες, κυρίως οι πιο απλές, έχουν παρατηρηθεί να παρουσιάζουν αντιμεταλλαξιγόνο δράση τροποποιώντας την DNA αντιγραφή, την DNA επιδιόρθωση ύστερα από τραυματισμό [27]. Συγκεκριμένες πολυφαινόλες μπορούν και επηρεάζουν άμεσα την δράση των DNA επιδιορθωτικών ενζύμων, τροποποιώντας την έκφραση των γονιδίων. Η μυρεκετίνη έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει την έκφραση ενός ενζύμου που αφαιρεί τα προϊόντα των μεταλλαξιγόνων οξειδωτικών [28].

- Επίδραση στη δέσμευση μεταλλαξιγόνων στο DNA

Είναι περιορισμένος ο αριθμός των μελετών πάνω σε αυτό το αντικείμενο. Ένα τέτοιο παράδειγμα αναστολής του σχηματισμού συμπλεγμάτων DNA αποτελεί το ελλαγικό οξύ, το οποίο εμποδίζει την μεταλλαξιγόνο δράση της Ν-νιτρόζο-μεθυλοουρίας αναστέλλοντας την μεθυλίωση της θέσης O⁶ της γουανίνης, μέσω της αλληλεπίδρασης του ελλαγικού οξέος με το DNA λόγω συγγένειας [29].

- Αναστολή της τοποϊσομεράσης

Το ελλαγικό οξύ αποτελεί ισχυρό αναστολέα των τοποϊσομερασών I και II, καθώς εμποδίζει το σχηματισμό σταθερού συμπλέγματος μεταξύ του ενζύμου και του DNA. Άρα, δρα ανταγωνιστικά [30].

- Επίδραση στη νιτροσυλίωση

Αν και μερικές πολυφαινόλες μπορούν να ενισχύσουν την νιτροσυλίωση, άλλες εμφανίζονται να αναστέλλουν την διαδικασία αυτή. Το γαλλικό και το ταννικό οξύ εμποδίζουν τη νιτροσυλίωση και την παραγωγή μορίων με άζωτο. Αυτά τα μόρια έχουν αποδειχθεί ότι έχουν καρκινογόνο δράση σε ζώα [31]. Τα νιτρώδη και τα νιτρικά είναι μόρια που προάγουν τον σχηματισμό τέτοιων μορίων. Η αντίδραση συμβαίνει στο στομάχι, όπου το pH είναι χαμηλό. Οι πολυφαινόλες αναστέλλουν την παραγωγή μορίων με άζωτο μέσω μεταβολής του pH ή αλληλεπίδρασης του μεταλλαξιγόνου με το αντιμεταλλαξιγόνο (πολυφαινόλη) [32].

Αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα

Οι χρόνιες φλεγμονές μπορούν να οδηγήσουν σε γενετική αστάθεια. Αυτό συμβαίνει διότι στις χρόνιες φλεγμονές η αυξημένη παραγωγή NO οδηγεί σε παραγωγή υπεροξειδίου του αζώτου, που είναι πηγή οξειδωτικής καταστροφής του DNA και των λιποπρωτεϊνών αλλά και των αλδεϋδών και των εποξειδίων [33]. Διάφορες φυτικές πολυφαινόλες επηρεάζουν την λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος [34]. Μπορούν να επηρεάσουν την εκκριτική διαδικασία, την μιτογένεση, την αλληλεπίδραση των κυττάρων με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της έκφρασης μορίων και λειτουργιών. Μερικές από αυτές τις πολυφαινόλες αλληλεπιδρούν άμεσα με τις κυτοκίνες και τους υποδοχείς των κυτοκινών.

Απόπτωση επαγόμενη από φυτικές πολυφαινόλες

Η απόπτωση είναι ο προγραμματισμένος θάνατος που εξασφαλίζει ότι τα γενετικά τραυματισμένα κύτταρα δεν θα επιβιώσουν για να δώσουν απογόνους. Σύμφωνα με αυτήν την υπόθεση η απόπτωση δρα ως ένας προστατευτικός μηχανισμός ενάντια στη γενετική αστάθεια, αφού τα υψηλά επίπεδα απόπτωσης σημαίνουν χαμηλό επίπεδο επιδιόρθωσης των μεταλλάξεων [16]. Οι πολυφαινόλες που εξετάστηκαν βρέθηκε ότι σε ορισμένες συγκεντρώσεις επάγουν την απόπτωση. Για παράδειγμα, διάφορα φλαβονοειδή αναστέλλουν την αύξηση και οδηγούν στην εξαφάνιση ολόκληρων καλλιιεργειών από κύτταρα με όγκο σε συγκεντρώσεις από 1-100 mM [35,36]. Η επαγωγή της απόπτωσης από τα φλαβονοειδή οφείλεται στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος-C στο κυτόπλασμα, από τη δράση της προκασπάσης-9 και της κασπάσης-3 [36]. Η δυναμική των φλαβονοειδών να επάγουν την απόπτωση εξαρτάται από τον αριθμό των υδροξυλομάδων στο

δεύτερο φαινολικό δακτύλιο. Η επαγωγή της απόπτωσης εξαρτάται πέρα από τη δομή των πολυφαινολών αλλά και από το είδος των κυττάρων, στα οποία χορηγούνται.

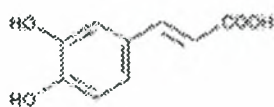
Πρωτεϊνικοί παράγοντες οι οποίοι αλλάζουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες του DNA

Επιστημονικές έρευνες αναφέρουν ότι ορισμένες πρωτεΐνες του ορού από ανθρώπινο έμβρυο αλλά και από έμβρυα ζώων αναστέλλουν την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων σε όξινα διαλύματα [37,38,39]. Αυτές οι πρωτεΐνες συνδέονται με τα νουκλεϊκά οξέα και ρυθμίζουν την ενύδρωση των μορίων του DNA και του RNA καταλήγοντας σε μία αύξηση της διαλυτότητας τους σε όξινα περιβάλλοντα [37,39]. Η πρωτεΐνη αυτή απομονώθηκε από όρο ανθρώπου και βρέθηκε ότι η δράση της είναι αυξημένη στον ορό καρκινοπαθών και στον ορό ποντικών, οι οποίοι φέρουν όγκους [41]. Επιπλέον οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν με το DNA και παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της αντιγραφής και της μεταγραφής του DNA, και ρυθμίζουν τους μοριακούς μηχανισμούς της κυτταρικής διαφοροποίησης και της εξέλιξης [37,40]. Ακόμη, πιθανολογείται ότι η πρωτεΐνη αυτή από τα αυγά Μενδόλης έχει ομόλογες αλληλουχίες αμινοξέων με μέλη της οικογένειας των α-φετοπρωτεϊνών [42].

Σκοπός του πειράματος

Κατά την διάρκεια αυτής της ερευνητικής προσπάθειας αναλύθηκε η ύπαρξη παράγοντα (πρωτεΐνης) με παρόμοιες ιδιότητες στον ορό του εμβρύου

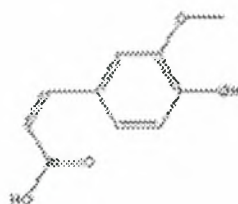
μοσχαριού, ο οποίος να μπορεί να αναστέλλει την όξινη κατακρήμνιση του DNA. Ο παράγοντας καθαρίστηκε μερικώς με ακετόνη με σκοπό να μελετηθούν οι βιοχημικές του παράμετροι, και βρέθηκε ότι η δράση του παρουσιάζει πρώτης τάξης αντίδραση μέχρι μία συγκέντρωση DNA, ενώ μετά οδηγείται σε μηδενική. Ακολούθως εξετάστηκε η επίδραση της συγκέντρωσης συγκεκριμένων πολυφαινολών (Εικ. 5) στην δραστικότητα του παράγοντα στον ορό αλλά και στον μερικά καθαρισμένο παράγοντα και παρατηρήθηκε η αναστολή της δράσης του. Επίσης μελετήθηκε ο μηχανισμός δράσης του παράγοντα, μέσω του οποίου προστατεύει το DNA από κατακρήμνιση σε όξινο περιβάλλον. Τέλος, ελέγχθηκε ο ρόλος του παράγοντα, και η επίδραση των πολυφαινολών σε βασικές διεργασίες των κυττάρων, όπως την αντιγραφή του DNA και την υδρόλυση του από περιοριστικά ένζυμα.



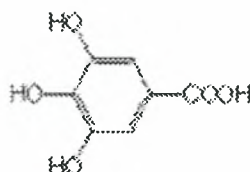
Καφεϊκό οξύ



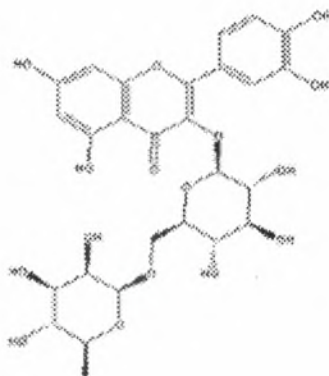
Πρωτοκαχεϊκό οξύ



Φερούλικό οξύ



Γαλλικό οξύ



Ρουτίνη

Εικόνα 5. Οι χημικές δομές των φυτικών πολυφαινολών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων.

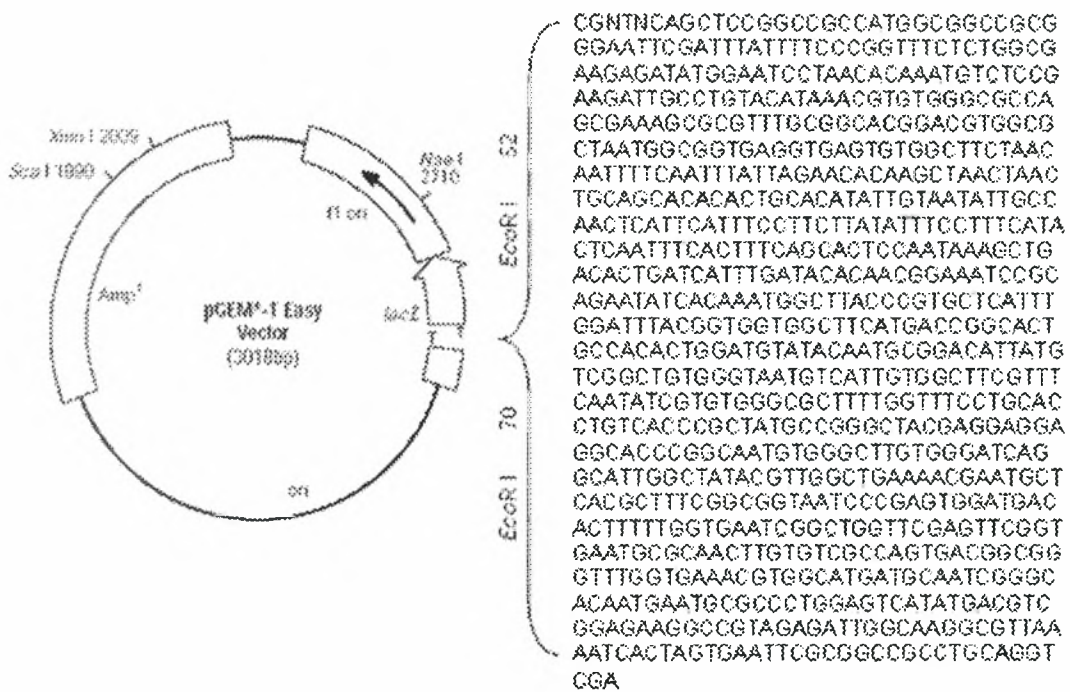
Υλικά

Δείγμα ορού

Ο ορός εμβρύου μοσχαριού που χρησιμοποιήθηκε ήταν από την εταιρία Biochrom.

DNA δείγματα

Χρησιμοποιήθηκε DNA από όρχεις σολομού από την εταιρία Sigma. Επίσης χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακό DNA pGEM 3-Z easy Vector από την εταιρία Promega, το οποίο είχε παρασκευαστεί και μας είχε παραχωρηθεί από τον κ. Ιωαννίδη. Τέλος χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA δάκου, το οποίο μας παραχωρήθηκε από τον Δρ κ. Μαθιόπουλο, καθώς πλασμιδιακό DNA pGEM Vector (Εικ. 6), στο οποίο είχε εισαχθεί το εξώνιο 3-4 στην περιοχή όπου υδρολύει το ένζυμο περιορισμού EcoR I και το οποίο επίσης μας είχε παραχωρηθεί από Δρ κ. Μαθιόπουλο.



Εικόνα 6. Το πλασμίδιο pGEM -T Easy Vector και η αλληλουχία που έχει εισαχθεί στην περιοχή που υδρολύει το ένζυμο περιορισμού EcoRI. Η αλληλουχία η οποία είχε εισαχθεί ήταν μεγέθους 80 bp.

DNA ladder

Ο DNA μάρτυρας μοριακών μεγεθών που χρησιμοποιήθηκε, ήταν από την εταιρία Fermentas.

Αντιδραστήρια PCR

Η Taq πολυμεράση, τα ολιγονουκλεοτίδια, οι εκκινητές 3F και 4R, το $MgCl_2$ και το buffer 10x που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, ήταν από την εταιρία Fermentas.

Ένζυμο περιορισμού

Το ένζυμο περιορισμού EcoR I καθώς και το buffer 10x που χρησιμοποιήθηκε ήταν από την εταιρία Promega.

Μέθοδοι

Καθαρισμός του παράγοντα

Για τον καθαρισμό του παράγοντα από τις διάφορες πρωτεΐνες, οι οποίες περιέχονται στον ορό του εμβρύου μοσχαριού, ακολουθήθηκε η παρακάτω μέθοδος καθαρισμού. Σε 5 ml ορού προστέθηκαν 10 ml Buffer A (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 0.9%) και ομογενοποιήθηκαν. Αυτό αποτέλεσε το αρχικό διάλυμα. Το αρχικό διάλυμα χωρίστηκε σε τρεις διαφορετικούς δοκιμαστικούς σωλήνες στους οποίους προστέθηκαν από 5 ml του αρχικού διαλύματός και 5

ml ψυχρής ακετόνης. Το διάλυμα ακετόνης προστέθηκε σταγόνα-σταγόνα στους 4°C, ενώ παρατηρήθηκε ο σχηματισμός ενός θολού διαλύματος. Αυτά αποτέλεσαν το διάλυμα κλάσματος 1. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες με το διάλυμα κλάσματος 1 φυγοκεντρήθηκαν στα 12000 g για 15 λεπτά στους 4°C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και τοποθετήθηκε σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες. Ενώ το ίζημα κάθε δοκιμαστικού σωλήνα επαναιωρήθηκε σε 3 ml Buffer A και 3 ml γλυκερόλης και αποθηκεύτηκε στους -20°C. Στους νέους δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκε σταγόνα-σταγόνα από 1 ml ακετόνης. Αυτό αποτέλεσε το διάλυμα κλάσματος 1.2. Στη συνέχεια το διάλυμα κλάσματος 1.2 φυγοκεντρήθηκε σε 12000 g για 15 λεπτά στους 4°C και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Το υπερκείμενο τοποθετήθηκε σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες, στους οποίους προστέθηκε 1.5 ml ακετόνης σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα σταγόνα-σταγόνα. Αυτό αποτέλεσε το διάλυμα κλάσματος 1.5. Ενώ το ίζημα κάθε δοκιμαστικού σωλήνα επαναιωρήθηκε σε 3 ml Buffer A και 3 ml γλυκερόλης και αποθηκεύτηκε. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες με το διάλυμα κλάσματος 1.5 φυγοκεντρήθηκαν σε 12000 g για 15 λεπτά στους 4°C. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και τοποθετήθηκε σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες. Ενώ το ίζημα κάθε δοκιμαστικού σωλήνα επαναιωρήθηκε σε 3 ml Buffer A και 3 ml γλυκερόλης και αποθηκεύτηκε. Στους νέους δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκε από 1.5 ml ακετόνης. Αυτό αποτέλεσε το κλάσμα 1.8. οι δοκιμαστικοί σωλήνες με το διάλυμα κλάσματος 1.8 φυγοκεντρήθηκαν σε 12000 g για 15 λεπτά στους 4°C. Μετά το τέλος τη φυγοκέντρωσης απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 3 ml Buffer A και 3 ml γλυκερόλης και αποθηκεύτηκε.

Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών (Μέθοδος Bradford)

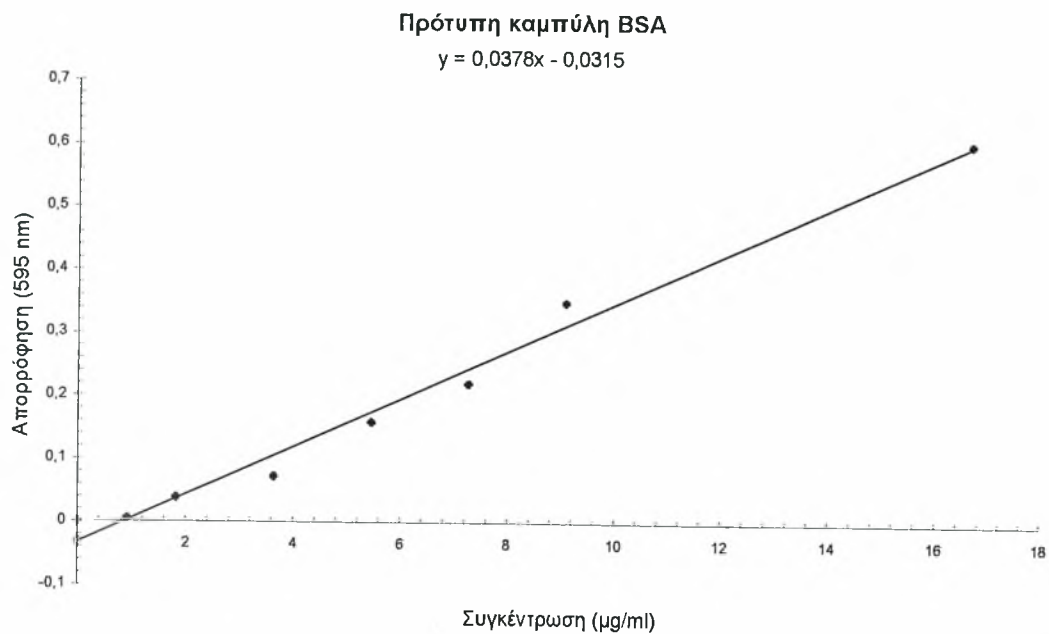
Η μέθοδος Bradford είναι μία απλή μέθοδος προσδιορισμού της συγκέντρωσης πρωτεϊνών ενός δείγματος. Η αρχή λειτουργία της μεθόδου βασίζεται στη παρατήρηση της μέγιστης απορρόφησης ενός όξινού διαλύματος, το οποίο δημιουργείται από τη σύνδεση του Coomassie Brilliant Blue G-250 με τις πρωτεΐνες του δείγματος. Τόσο οι υδρόφοβες όσο και οι ιονικές αλληλεπιδράσεις σταθεροποιούν το ανιόν της βαφής, προκαλώντας την αλλαγή του χρώματος. Το Coomassie απορροφά στα 595nm. Η συγκέντρωση πρωτεϊνών του δείγματος καθορίζεται από τη πρότυπη καμπύλη απορρόφησης της μεθόδου, η οποία κατασκευάζεται με τη χρήση μιας σειράς πρωτεϊνικών προτύπων. Η αλβουμίνη από ορό μοσχαριού (BSA) είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη πρωτεΐνη ως πρότυπο [43].

Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιήθηκε για να βρεθεί το ποσό των πρωτεϊνών που υπάρχουν στα κλάσματα του μερικώς καθαρισμένου ορού. Παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα που περιείχαν ορό εμβρύου μοσχαριού (100 μg πρωτεϊνών/ml) και αντιδραστήριο Bradford. Επιπλέον παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα, τα οποία περιείχαν τα διάφορα κλάσματα του μερικώς καθαρισμένου ορού (κλάσμα 1, κλάσμα 1.2, κλάσμα 1.5, κλάσμα 1.8). Στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφησή τους στα 595nm. Στον πίνακα 2 φαίνεται το πρωτόκολλο του πειράματος.

Eppendorf	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
H₂O (μl)	100	90	80	60	40	20	-	-	50	50	50	50	50
Ορός εμβρύου μοσχαριού (1:100) (μl)	-	10	20	40	60	80	100	200	50	-	-	-	-
Κλάσμα 1 (1:100) (μl)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50	-	-	-
Κλάσμα 1.2 (1:10) (μl)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50	-	-
Κλάσμα 1.5 (1:10) (μl)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50	-
Κλάσμα 1.8 (1:10) (μl)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50
Αντιδραστήριο Bradford (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Πίνακας 2. Πρωτόκολλο της μεθόδου Bradford.

Η Εικ. 7 δείχνει την πρότυπη καμπύλη που προέκυψε από την μέθοδο Bradford. Στον άξονα των τετμημένων τοποθετείται η συγκέντρωση (μg/ml) του ορού του εμβρύου μοσχαριού στην κάθε κυβέττα, ενώ στον άξονα των τεταγμένων η απορρόφηση που έδειξαν τα διαλύματα κατά τη φωτομέτρηση τους.



Εικόνα 7. Πρότυπη καμπύλη της μεθόδου Bradford.

Στον πίνακα 3 φαίνονται τα αποτελέσματα του καθαρισμού του παράγοντα.

	μg πρωτεΐνης	Ειδική δραστηριότητα (μg DNA/μg πρωτ.)	Συνολικές μονάδες (μg DNA)
Ορός	111,9	6,254	699,823
Κλάσμα 1	37,6	57,186	2150,194
Κλάσμα 1,2	7,8	28,525	222,495
Κλάσμα 1,5	4,2	216,671	910,018
Κλάσμα 1,8	1,1	161,367	177,504
Σύνολο		470,003	

Πίνακας 3. Αποτελέσματα του καθαρισμού του παράγοντα.

Μέτρηση της επίδρασης της συγκέντρωσης του DNA στη δράση του παράγοντα

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης της συγκέντρωσης του DNA στη δράση του παράγοντα ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα των 0.5 ml, τα οποία περιείχαν διαφορετικές ποσότητες DNA (2.5 mg/ml) και όρο (746.5 μg πρωτεϊνών/ml) σταθερής ποσότητας, σε θερμοκρασία 4°C. Αφού αναδεύτηκαν, αφέθηκαν για 30 s. Στη συνέχεια προστέθηκε στο καθένα 0.5ml 10%(w/v) κρύου τριχλωρικού οξικού οξέος (TCA). Αφού αναδεύτηκαν, φυγοκεντρήθηκαν στα 10000 g για 10 λεπτά στους 4°C. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η απορρόφηση του υπερκείμενου από ένα

Hitachi UV σπρεκτοφωτόμετρο στα 260 nm. Για κάθε συγκέντρωση DNA παρασκευάζονταν και το αντίστοιχο τυφλό του, από το οποίο έλειπε η ποσότητα του ορού. Πριν από κάθε μέτρηση πρώτα μηδενιζόταν το σπρεκτοφωτόμετρο με τη χρήση του τυφλού και στη συνέχεια λαμβανόταν η τιμή της απορρόφησης του δείγματος. Η δράση εκφράζεται ως μικρογραμμάρια του DNA τα οποία παρέμειναν διαλυτά παρουσία του τριχλωρικού οξικού οξέος ανά μικρογραμμάρια των πρωτεϊνών. Στο πίνακα 4 φαίνεται το πρωτόκολλο του πειράματος.

Eppendorf	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
H ₂ O (μl)	500	470	490	460	480	450	450	420	440	410	420	390	400	370
DNA (μl)	0	0	10	10	20	20	50	50	60	60	80	80	100	100
Ορός εμβρύου μοσχαριού (μl)	-	30	-	30	-	30	-	30	-	30	-	30	-	30
TCA (μl)	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500

Πίνακας 4. Πρωτόκολλο της μελέτης της επίδρασης της συγκέντρωσης του DNA στη δράση του παράγοντα.

Μέτρηση της επίδρασης της συγκέντρωσης του ορού στη δράση του παράγοντα

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης της συγκέντρωσης του ορού στη δράση του παράγοντα ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα των 0.5 ml, τα οποία περιείχαν σταθερή ποσότητα DNA (2.5 mg/ml) και όρο (746.5 μg πρωτεϊνών/ml) διαφόρων ποσοτήτων, σε

θερμοκρασία 4°C. Αφού αναδεύτηκαν, αφέθηκαν για 30 s. Στη συνέχεια προστέθηκε στο καθένα 0.5ml 10%(w/v) κρύου τριχλωρικού οξικού οξέος (TCA). Αφού αναδεύτηκαν, φυγοκεντρήθηκαν σε 10000 g για 10 λεπτά στους 4°C. Και τέλος προσδιορίστηκε η απορρόφηση του υπερκείμενου στα 260 nm. Στον πίνακα 5 φαίνεται το πρωτόκολλο του πειράματος.

Eppendorf	1	2	3	4	5	6	7
H₂O (μl)	440	430	420	400	360	320	280
DNA (μl)	60	60	60	60	60	60	60
Ορός εμβρύου μοσχαριού (μl)	-	10	20	40	80	120	160
TCA (μl)	500	500	500	500	500	500	500

Πίνακας 5. Πρωτόκολλο της μελέτης της επίδρασης της συγκέντρωσης του ορού στη δράση του παράγοντα.

Μέτρηση της επίδρασης της συγκέντρωσης του μερικώς καθαρισμένου παράγοντα στη δράση του

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης της συγκέντρωσης του μερικώς καθαρισμένου παράγοντα στη δράση του ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία. Παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα των 0.5 ml, τα οποία περιείχαν σταθερής ποσότητας DNA (2.5 mg/ml) και διαφορές ποσότητες καθαρισμένου παράγοντα (κλάσματος 1.5) (83.73 μg πρωτεϊνών/ml), σε θερμοκρασία 4°C. Αφού αναδεύτηκαν, αφέθηκαν για 30 s. Στη συνέχεια προστέθηκε στο καθένα 0.5ml 10%(w/v) κρύου τριχλωρικού οξικού οξέος (TCA). Αφού αναδεύτηκαν, φυγοκεντρήθηκαν σε 10000 g για 10 λεπτά στους 4°C. Και τέλος

προσδιορίστηκε η απορρόφηση του υπερκείμενου από ένα Hitachi UV σπρεκτοφωτόμετρο στα 260 nm. Στον πίνακα 6 ακολουθεί το πρωτόκολλο του πειράματος.

Eppendorf	1	2	3	4	5
H₂O (μl)	440	390	340	290	240
DNA (μl)	60	60	60	60	60
Μερικώς καθαρισμένος παράγοντας (μl)	-	50	100	150	200
TCA (μl)	500	500	500	500	500

Πίνακας 6. Πρωτόκολλο της μελέτης της επίδρασης της συγκέντρωσης του μερικώς καθαρισμένου παράγοντα στη δράση του.

Μέτρηση της επίδρασης της συγκέντρωσης των πολυφαινολών στη δράση του παράγοντα

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης της συγκέντρωσης των πολυφαινολών στη δράση του παράγοντα, παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα των 0.5 ml, τα οποία περιείχαν DNA (2.5 mg/ml) σταθερής ποσότητας, την ανάλογη πολυφαινόλη (1000 μM) σε διάφορες ποσότητες και όρο (746.5 μg πρωτεϊνών/ml) σταθερής ποσότητας, σε θερμοκρασία 4°C. Ενώ για τον προσδιορισμό της επίδρασης της συγκέντρωσης των πολυφαινολών στη δράση του μερικώς καθαρισμένου παράγοντα υδατικά διαλύματα των 0,5 ml, τα οποία περιείχαν DNA (2.5 mg/ml) σταθερής ποσότητας, την ανάλογη πολυφαινόλη (1000 μM) σε διάφορες ποσότητες και μερικώς καθαρισμένο

παράγοντα (κλάσματος 1.5) (83.73 μg πρωτεϊνών/ml) σταθερής ποσότητας, σε θερμοκρασία 4°C. Αφού αναδεύτηκαν, αφέθηκαν για 30 s. Στη συνέχεια προστέθηκε στο καθένα 0.5ml 10%(w/v) κρύου τριχλωρικού οξικού οξέος (TCA). Αφού αναδεύτηκαν, φυγοκεντρήθηκαν σε 10000 g στους 4°C για 10 λεπτά. Η απορρόφηση του υπερκείμενου προσδιορίστηκε από ένα Hitachi UV σπρεκτοφωτόμετρο στα 260 nm. Για κάθε συγκέντρωση πολυφαινόλης παρασκευάζονταν και το αντίστοιχο τυφλό του, από το οποίο έλειπε η ποσότητα του ορού ή ποσότητα του μερικώς καθαρισμένου παράγοντα. Αυτό γινόταν επειδή οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν δύο περιοχές μέγιστης απορρόφησης στην υπεριώδη και ορατή περιοχή. Η πρώτη περιοχή βρίσκεται μεταξύ των 320-385 nm και η δεύτερη περιοχή μεταξύ των 250-285 nm [65]. Η ύπαρξη της δεύτερης αυτής περιοχής επηρέαζε την τιμή της απορρόφησης των δειγμάτων. Για τον λόγο αυτό ως δράση του παράγοντα λαμβανόταν η διαφορά της τιμής της απορρόφησης των δειγμάτων από την τιμή της απορρόφησης του αντίστοιχου τυφλού. Στους πίνακες 7 και 8 φαίνονται τα πρωτόκολλα των πειραμάτων που περιγράφηκαν παραπάνω.

Eppendorf	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
H ₂ O (μl)	440	280	410	250	380	220	320	160	200	40	160	-
DNA (μl)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Πολυφαινόλη (μl)	-	-	30	30	60	60	120	120	240	240	280	280
Ορός εμβρύου μοσχαριού (μl)	-	160	-	160	-	160	-	160	-	160	-	160
TCA (μl)	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500

Πίνακας 7. Πρωτόκολλο του πειράματος μελέτης της επίδρασης της συγκέντρωσης των πολυφαινολών στη δράση του παράγοντα.

Eppendorf	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
H ₂ O (μl)	440	430	410	400	380	370	320	310	200	190	10	-
DNA (μl)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Πολυφαινόλη (μl)	-	-	30	30	60	60	120	120	240	240	480	480
Μερικώς καθαρισμένος παράγοντας (μl)	-	10	-	10	-	10	-	10	-	10	-	10
TCA (μl)	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500

Πίνακας 8. Πρωτόκολλο του πειράματος μελέτης της επίδρασης της συγκέντρωσης των πολυφαινολών στη δράση του μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα.

Μελέτη της επίδρασης του παράγοντα και των πολυφαινολών στην κινητικότητα του πλασμιδιακού DNA

Για την μελέτη της επίδρασης του παράγοντα και των πολυφαινολών στην κινητικότητα του πλασμιδιακού DNA ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: κατασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα των 12 μl τα οποία περιείχαν πλασμιδιακό DNA pGEM 3-Z vector (50 ng/μl) σταθερής ποσότητας, την ανάλογη πολυφαινόλη (1 μM) σταθερής ποσότητας, μερικώς καθαρισμένο παράγοντα (κλάσματος 1.5) (0,142341 ng πρωτεϊνών/μl) και ειδική βαφή. Επίσης παρασκευάστηκαν και οι αντίστοιχοι μάρτυρες. Αφού αναδεύτηκαν στη συνέχεια ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% υπό την επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος 100 V. Επιπλέον ηλεκτροφορήθηκε και ένα δείγμα το οποίο περιείχε 2 μl ladder από την εταιρία Fermentas και ειδική βαφή. Μετά το πέρας της ηλεκτροφορήσεως, η πηκτή της αγαρόζης βάφτηκε σε υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 0.05% για 30 λεπτά, στη συνέχεια ξεβάφτηκε σε νερό για 30 λεπτά και παρατηρήθηκε σε μηχανήμα υπεριώδους ακτινοβολίας. Στον πίνακα 9 φαίνεται το πρωτόκολλο του πειράματος.

Διαδρομή	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
H ₂ O (μl)	-	8	5	5	2	5	2	5	2	5	2	5	2
DNA (μl) (ladder)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Πολυφαινόλη (μl)	-	-	-	Καφεϊκό οξύ		Πρωτοκαχεϊκό οξύ		Φερολικό οξύ		Γαλλικό οξύ		Ρουτίνη	
				3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Μερικώς καθαρισμένος παράγοντας (μl)	-	-	3	-	3	-	3	-	3	-	3	-	3
Ειδική βαφή (μl)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Πίνακας 9. Πρωτόκολλο του πειράματος μελέτης της επίδρασης του παράγοντα και των πολυφαινολών στην κινητικότητα του πλασμιδιακού DNA.

Μέτρηση της δράσης του παράγοντα σε δίκλωνο και μονόκλωνο DNA

Για τον έλεγχο της υπόθεσης εάν ο παράγοντας μπορεί να δράσει τόσο σε δίκλωνο όσο και σε μονόκλωνο DNA ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: δίκλωνο DNA θερμάνθηκε στους 98°C για 10 λεπτά ώστε να επέλθει το σπάσιμο των υδρόφοβων δεσμών και το δίκλωνο DNA να μετατραπεί σε μονόκλωνο. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα των 0.5 ml,

τα οποία περιείχαν δίκλωνο ή μονόκλωνο DNA (2.5 mg/ml) και όρο (745.6 μg πρωτεϊνών/ml), σε θερμοκρασία 4°C. Αφού αναδεύτηκαν, αφέθηκαν για 30 s. Στη συνέχεια προστέθηκε στο καθένα 0.5ml 10%(w/v) κρύου τριχλωρικού οξικού οξέος (TCA). Αφού αναδεύτηκαν, φυγοκεντρήθηκαν σε 10000 g στους 4°C για 10 λεπτά. Η απορρόφηση του υπερκείμενου προσδιορίστηκε από ένα Hitachi UV σπρεκτοφωτόμετρο στα 260 nm. Στον πίνακα 10 φαίνεται το πρωτόκολλο του πειράματος.

Eppendorf	1	2
H₂O (μl)	420	420
DNA (μl)	Δίκλωνο	Μονόκλωνο
	50	50
Ορός εμβρύου μωσχαριού (μl)	30	30
TCA (μl)	500	500

Πίνακας 10. Πρωτόκολλο του πειράματος μελέτης της δράσης του παράγοντα σε μονόκλωνο DNA.

Έλεγχος της δράσης του παράγοντα εάν είναι καταλυτική

Για την εξέταση του ερωτήματος εάν η δράση του παράγοντα είναι καταλυτική, παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα των 12 μl τα οποία περιείχαν πλασμιδιακό DNA pGEM 3-Z vector (50 ng/μl) και μερικώς καθαρισμένο παράγοντα (κλάσματος 1.5) (0,142341 ng πρωτεϊνών/μl) και ειδική βαφή. Τα δείγματα αφέθηκαν για διαφορετικούς χρόνους επώασης στους 37°C και στη

συνέχεια τοποθετήθηκαν σε πάγο με σκοπό να σταματήσει η δράση του παράγοντα. Στη συνέχεια ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 0.7% υπό την επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος 100 V. Μετά το πέρας της ηλεκτροφορήσεως, η πηκτή της αγαρόζης βάφτηκε σε υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 0.05% για 30 λεπτά, στη συνέχεια ξεβάφτηκε σε νερό για 30 λεπτά και παρατηρήθηκε σε μηχανήμα υπεριώδους ακτινοβολίας. Στον πίνακα 11 φαίνεται το πρωτόκολλο του πειράματος.

Διαδρομή	1	2	3	4	5	6
H ₂ O (μl)	8	5	5	5	5	5
DNA (μl)	2	2	2	2	2	2
Μερικώς καθαρισμένος παράγοντας (μl)	-	3	3	3	3	3
Ειδική βαφή (μl)	2	2	2	2	2	2
Χρόνος επώασης (min)	-	5	10	20	40	60

Πίνακας 11. Πρωτόκολλο του πειράματος ελέγχου εάν η δράση του παράγοντα είναι καταλυτική.

Μελέτη της επίδρασης του παράγοντα και των πολυφαινολών στην διαδικασία της αντιγραφής

Για την μελέτη της επίδρασης του παράγοντα και των πολυφαινολών στην διαδικασία της αντιγραφής ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία. Παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα των 25 μl τα οποία περιείχαν γενωμικό

DNA δάκου (10 ng/μl), την ανάλογη πολυφαινόλη (1 μM), και μερικώς καθαρισμένο παράγοντα (κλάσματος 1.5) (0,142341 ng πρωτεϊνών/μl) σταθερής ποσότητας και 13 μl αντιδραστηρίων PCR [2.5 μl buffer 10x, 1.5 μl MgCl₂, 2 μl ολιγονουκλεοτιδίων, 1 μl εκκινητών 3F (10 pmol/μl), 1 μl εκκινητών 4R (10 pmol/μl) και 0.2 μl Taq πολυμεράσης (5 u/μl) από την εταιρία Fermentas]. Επιπλέον παρασκευάστηκαν και οι αντίστοιχοι μάρτυρες των δειγμάτων. Αφού αναδεύτηκαν στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε συσκευή αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης όπου ακολούθησε η αντίδραση σύμφωνα με τις παρακάτω συνθήκες: ένας κύκλος των 4 λεπτών στους 94°C, 29 κύκλοι οι οποίοι περιλαμβάνουν, 30 s στους 94°C, 30 s στους 52°C και 1 λεπτό στους 72°C, και τέλος ένας κύκλος των 10 λεπτών στους 72°C. Σε 10 μl από τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης προστέθηκε από 2 μl ειδικής βαφής και ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% υπό την επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος 100 V. Στην πηκτή της αγαρόζης ηλεκτροφορήθηκε και ένα δείγμα το οποίο περιείχε 2 μl ladder με 2 μl βαφής. Μετά το πέρας της ηλεκτροφορήσεως η πηκτή της αγαρόζης βάφτηκε σε υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 0.05% για 30 λεπτά, στη συνέχεια ξεβάφτηκε σε νερό για 30 λεπτά και παρατηρήθηκε σε μηχανήμα υπεριώδους ακτινοβολίας. Στον πίνακα 12 φαίνεται το πρωτόκολλο του πειράματος.

Διαδρομή	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
H ₂ O (μl)	-	8	8	5	2	5	2	5	2	5	2	5	2
DNA (μl) (ladder)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Πολυφαινόλη (μl)	-	-	-	Καφεϊκό οξύ		Πρωτοκαχεϊκό οξύ		Φερολικό οξύ		Γαλλικό οξύ		Ρουτίνη	
				3	3	3	3	3	3	3	3		
Μερικώς καθαρισμένος παράγοντας (μl)	-	-	3	-	3	-	3	-	3	-	3	-	3
Ειδική βαφή (μl)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Πίνακας 12. Πρωτόκολλο του πειράματος μελέτης της επίδρασης του παράγοντα και των πολυφαινολών στην διαδικασία της αντιγραφής.

Μελέτη της επίδρασης του παράγοντα και των πολυφαινολών στη δράση των ενζύμων περιορισμού

Παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα των 10 μl τα οποία περιείχαν πλασμιδιακό DNA pGEM Vector (200 ng/μl), στο οποίο είχε εισαχθεί το εξώνιο 3-4 στην περιοχή όπου υδρολύει το ένζυμο περιορισμού EcoR I, την ανάλογη πολυφαινόλη (1 μM), μερικώς καθαρισμένο παράγοντα (κλάσματος 1.5) (0,142341ng πρωτεϊνών/μl), 1 μl buffer 10x και 0.1 μl περιοριστικού ενζύμου

EcoR I (10 u/μl). Επιπλέον παρασκευάστηκαν και οι αντίστοιχοι μάρτυρες των δειγμάτων. Τα δείγματα αναδεύτηκαν και επωάστηκαν για 1 ώρα στους 37°C για να δράσει το ένζυμο περιορισμού. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε πάγο με σκοπό να σταματήσει η δράση του ενζύμου και αφού προστέθηκε στα δείγματα από 2 μl ειδικής βαφής, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% υπό την επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος 100 V. Στην πηκτή της αγαρόζης ηλεκτροφορήθηκε και ένα δείγμα το οποίο περιείχε 2 μl ladder με 2 μl βαφής. Μετά το πέρας της ηλεκτροφορήσεως η πηκτή της αγαρόζης βάφτηκε σε υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 0.05% για 30 λεπτά, στη συνέχεια ξεβάφτηκε σε νερό για 30 λεπτά και παρατηρήθηκε σε μηχανήμα υπεριώδους ακτινοβολίας. Στον πίνακα 13 φαίνεται το πρωτόκολλο του πειράματος.

Διαδρομή	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
H ₂ O (μl)	-	9	7.9	6	4.9	1.9	4.9	1.9	4.9	1.9	4.9	1.9	4.9	1.9	4.9
DNA (μl)	2 (ladder)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Πολυφαινόλη (μl)	-	-	-	-	-	Καφεϊκό οξύ		Πρωτοκα χεικό οξύ		Φερολικό οξύ		Γαλλικό οξύ		Ρουτίνη	
						3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Μερικώς καθαρισμένος παράγοντας (μl)	-	-	-	3	3	3	-	3	-	3	-	3	-	3	-
EcoR I + buffer (μl)	-	-	1.1	-	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
Ειδική βαφή (μl)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Πίνακας 13. Πρωτόκολλο του πειράματος μελέτης της επίδρασης του παράγοντα και των πολυφαινολών στη δράση του ενζύμου περιορισμού EcoR I.

Αποτελέσματα

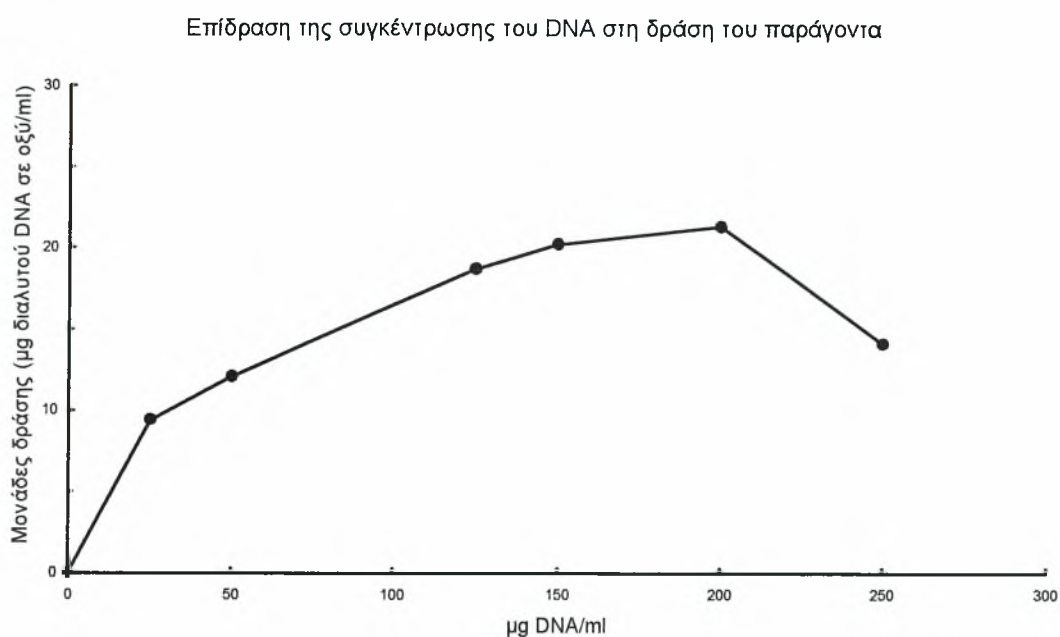
Βιοχημικές ιδιότητες του παράγοντα στον ορό

Επίδραση της συγκέντρωσης του DNA στη δράση του παράγοντα

Αρχικά, ελέγχθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του DNA στη δράση συγκεκριμένης ποσότητας του παράγοντα, ο οποίος βρίσκεται μέσα στον ορό.

Τα πειράματα αυτά έγιναν με σκοπό την επιλογή της κατάλληλης

συγκέντρωσης DNA με βάση την οποία θα ήταν δυνατό να γίνουν πειράματα σε ασφαλή πλαίσια ανάλυσης. Για το σκοπό αυτό υπολογίστηκαν οι μονάδες δράσης του παράγοντα, υπολογίζοντας την οπτική απορρόφηση στα 260 nm του DNA που παρέμεινε διαλυτό στο TCA μετά την δράση του παράγοντα, σύμφωνα με τη μεθοδολογία που φαίνεται στο κεφάλαιο Μέθοδοι. Στην Εικ. 7 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης της συγκέντρωσης του DNA στη δράση του παράγοντα.

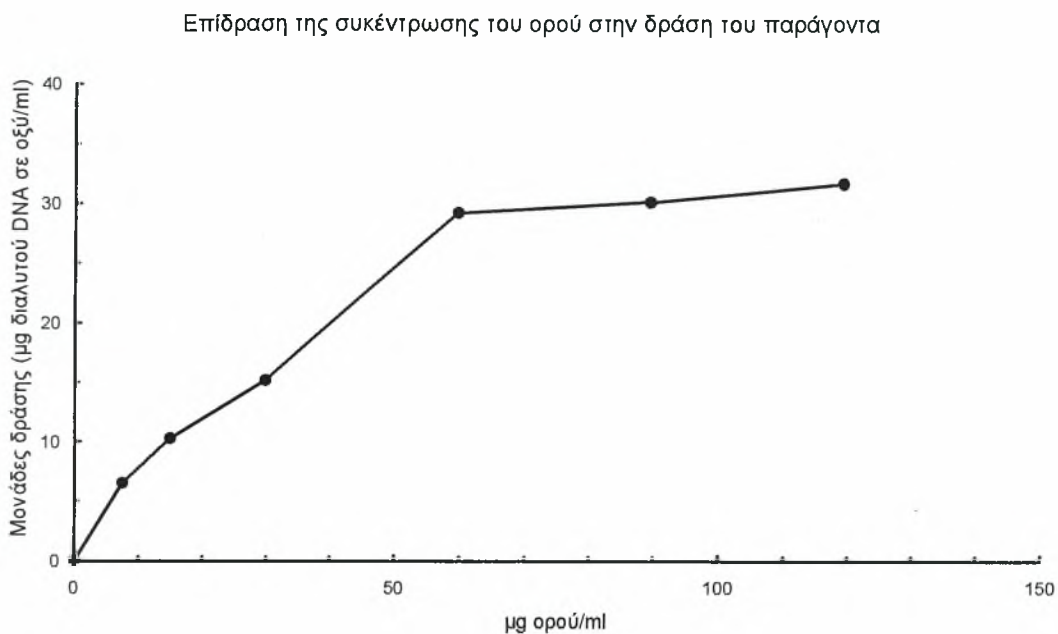


Εικόνα 7. Επίδραση της συγκέντρωσης του DNA στη δράση του παράγοντα.

Επίδραση της συγκέντρωσης του ορού στη δράση του παράγοντα

Στη συνέχεια δοκιμάστηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του ορού στη δράση του παράγοντα, ο οποίος βρίσκεται μέσα στον ορό. Χρησιμοποιώντας τα προηγούμενα αποτελέσματα επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η συγκέντρωση των 150 µg/ml DNA έτσι ώστε η απορρόφηση στα 260 nm του διαλυτοποιημένου από τον παράγοντα DNA να είναι μεγαλύτερη από $0.3 \text{ } \overset{\text{A}}{\text{A}}_{260}$,

γεγονός που εξασφαλίζει σταθερότερες και εγκυρότερες τιμές απορρόφησης, επειδή ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNA είναι αρκετά υψηλός και θα μπορούσε να εισάγει σφάλματα με την μεθοδολογία που ακολουθήθηκε. Στην Εικ. 8 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης της συγκέντρωσης του ορού στη δράση του παράγοντα.

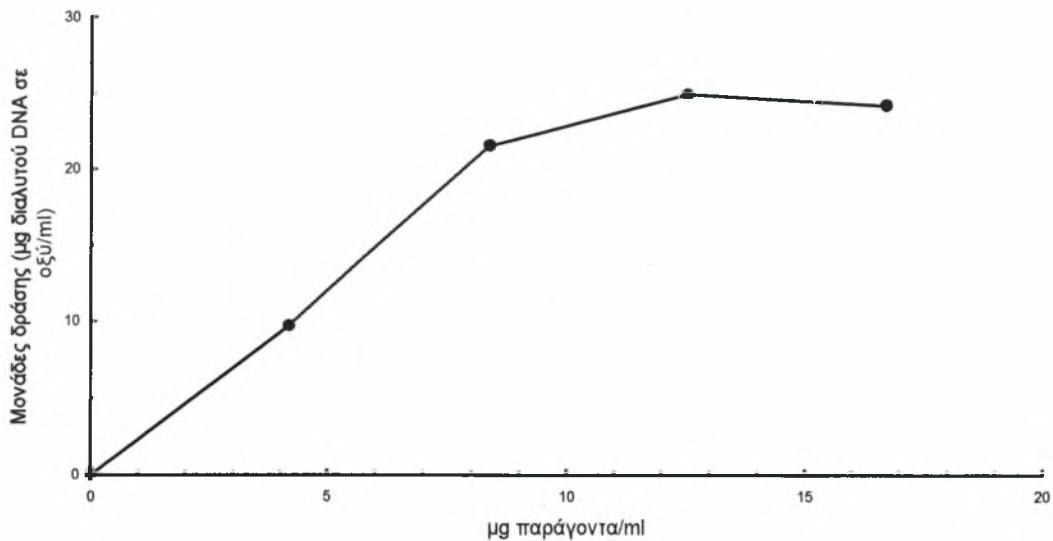


Εικόνα 8. Επίδραση της συγκέντρωσης του ορού στη δράση του παράγοντα.

Επίδραση της συγκέντρωσης του μερικώς καθαρισμένου παράγοντα στην δράση του.

Χρησιμοποιώντας την ίδια συγκέντρωση DNA ακολουθήθηκε η ίδια δοκιμασία και για το κλάσμα 1.5 του μερικώς καθαρισμένου παράγοντα. Στην Εικ. 9 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης της συγκέντρωσης του μερικώς καθαρισμένου παράγοντα στη δράση του.

Επίδραση της συγκέντρωσης του μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα στην δράση του



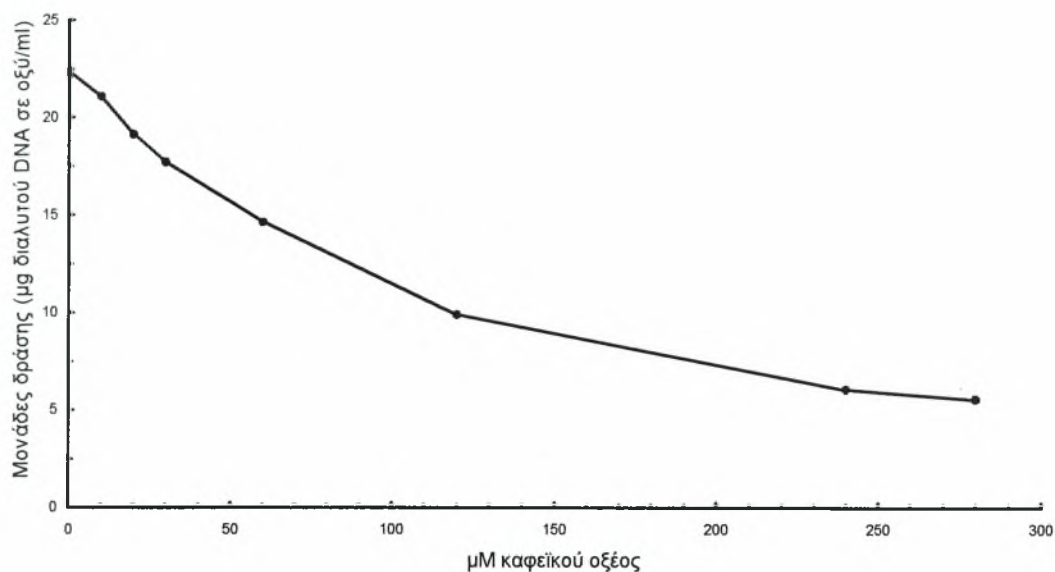
Εικόνα 9. Επίδραση της συγκέντρωσης του μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα στη δράση του.

Επίδραση της συγκέντρωσης των πολυφαινολών στη δράση του παράγοντα

Επίδραση του καφεϊκού οξέος στη δράση του παράγοντα

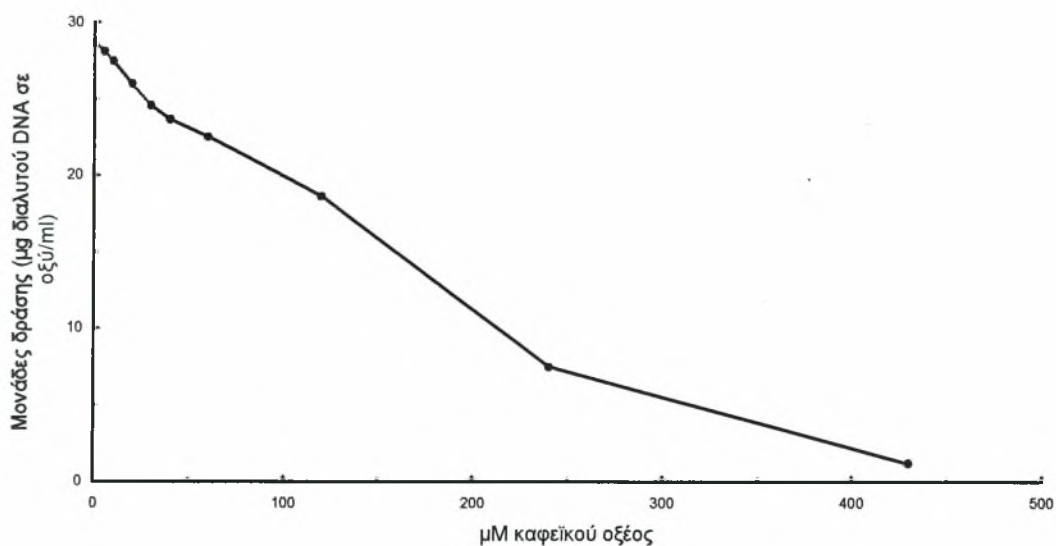
Στη συνέχεια εξετάστηκε η επίδραση της συγκέντρωσης των φυτικών φαινολών της δίαιτας στη δράση του παράγοντα είτε στον ορό είτε στο μερικά καθαρισμένο κλάσμα ακετόνης 1.5. Στις εικόνες 10 και 11 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης της συγκέντρωσης του καφεϊκού οξέος στη δράση του παράγοντα και στη δράση του μερικώς καθαρισμένου παράγοντα αντίστοιχα.

Επίδραση της συγκέντρωσης του καφεϊκού οξέος στη δράση του παράγοντα



Εικόνα 10. Επίδραση της συγκέντρωσης του καφεϊκού οξέος στη δράση του παράγοντα.

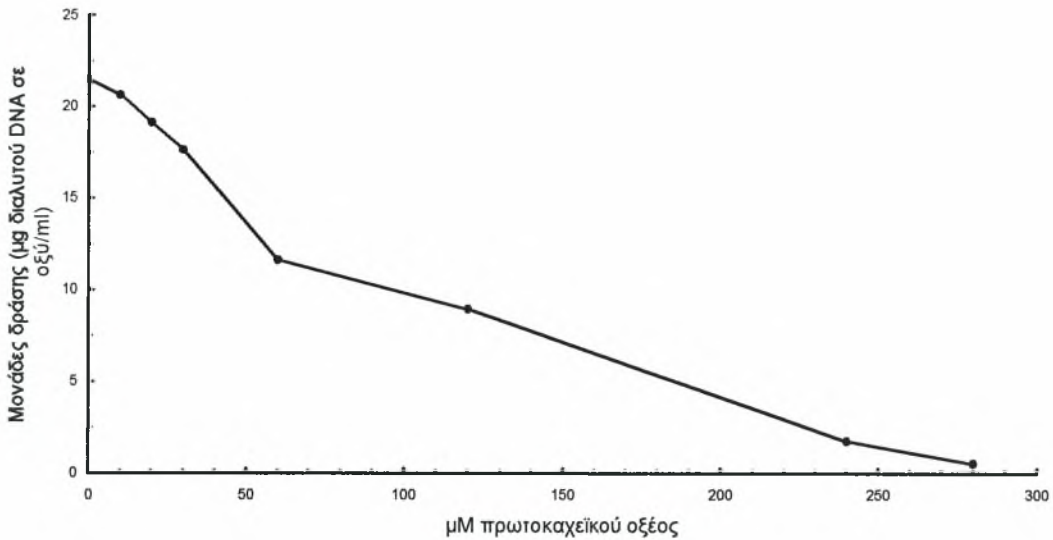
Επίδραση της συγκέντρωσης του καφεϊκού οξέος στη δράση του μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα



Εικόνα 11. Επίδραση της συγκέντρωσης του καφεϊκού οξέος στη δράση του μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα.

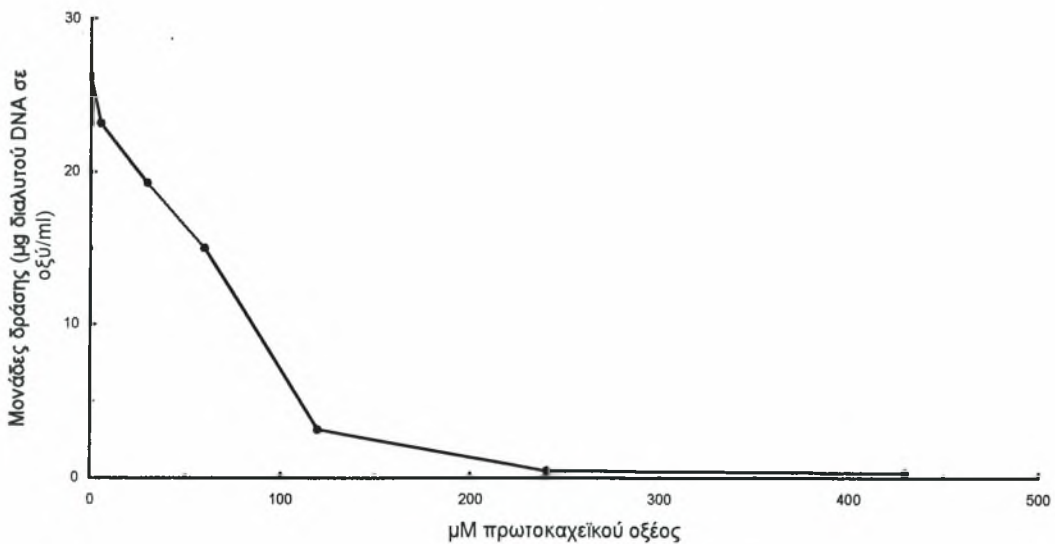
Επίδραση του πρωτοκαχειού οξέος στη δράση του παράγοντα

Επίδραση της συγκέντρωσης του πρωτοκαχειού οξέος στη δράση του παράγοντα



Εικόνα 12. Επίδραση της συγκέντρωσης του πρωτοκαχειού οξέος στη δράση του παράγοντα.

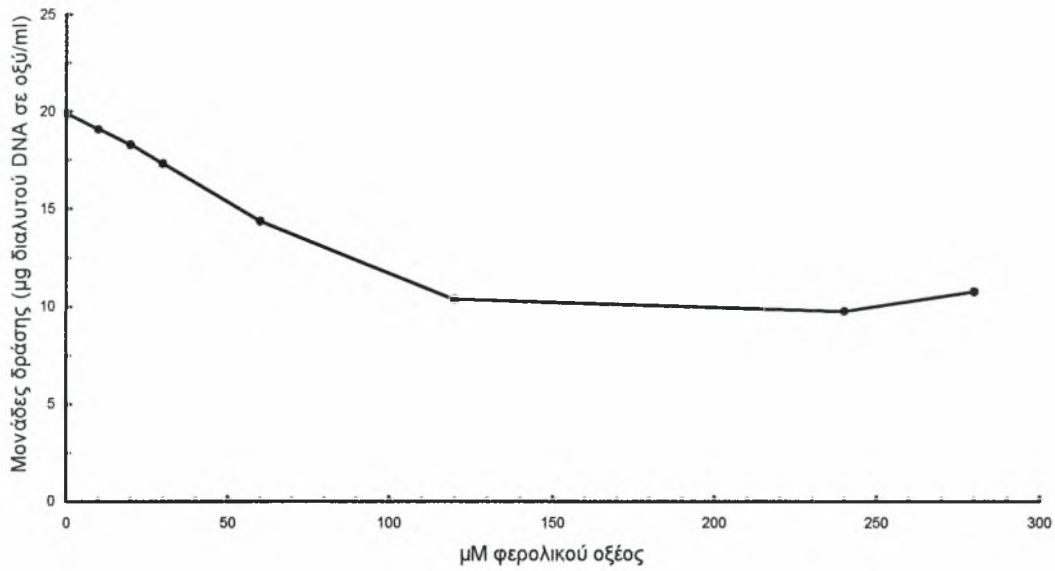
Επίδραση της συγκέντρωσης του πρωτοκαχειού οξέος στη δράση του μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα



Εικόνα 13. Επίδραση της συγκέντρωσης του πρωτοκαχειού οξέος στη δράση του μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα.

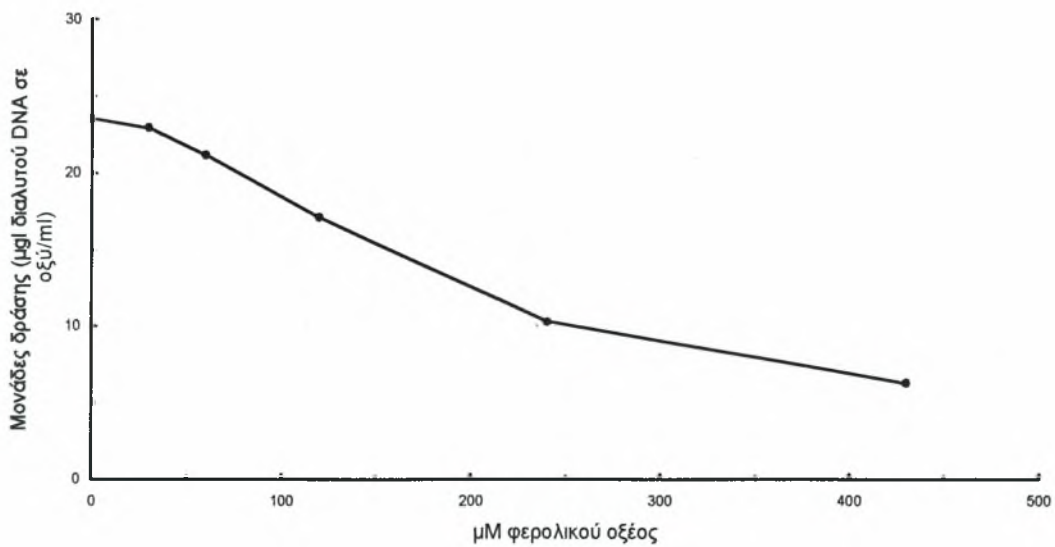
Επίδραση του φερολικού οξέος στη δράση του παράγοντα

Επίδραση της συγκέντρωσης του φερολικού οξέος στη δράση του παράγοντα



Εικόνα 14. Επίδραση της συγκέντρωσης του φερολικού οξέος στη δράση του παράγοντα.

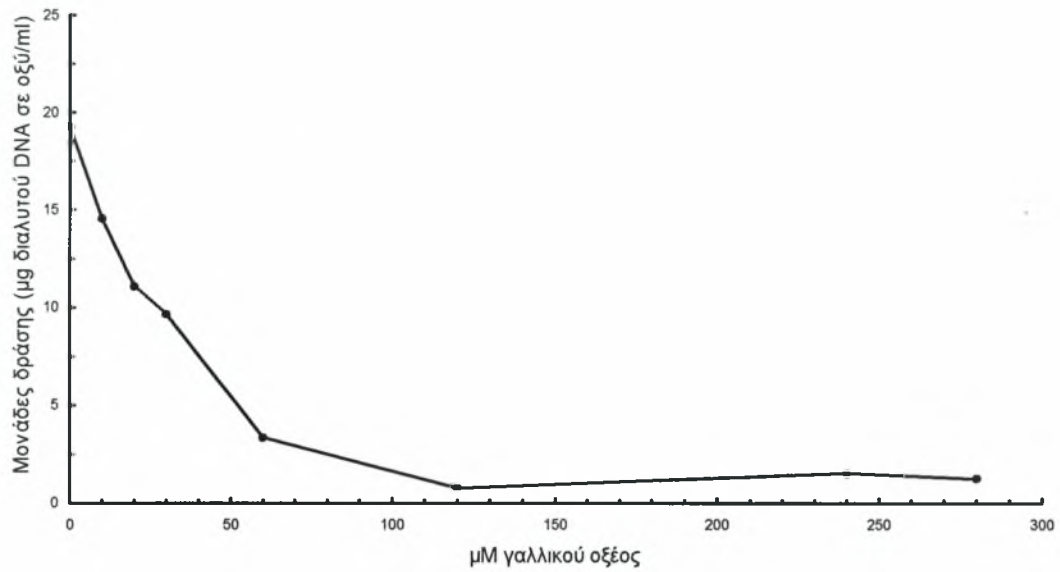
Επίδραση της συγκέντρωσης του φερολικού οξέος στη δράση του μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα



Εικόνα 14. Επίδραση της συγκέντρωσης του φερολικού οξέος στη δράση του μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα.

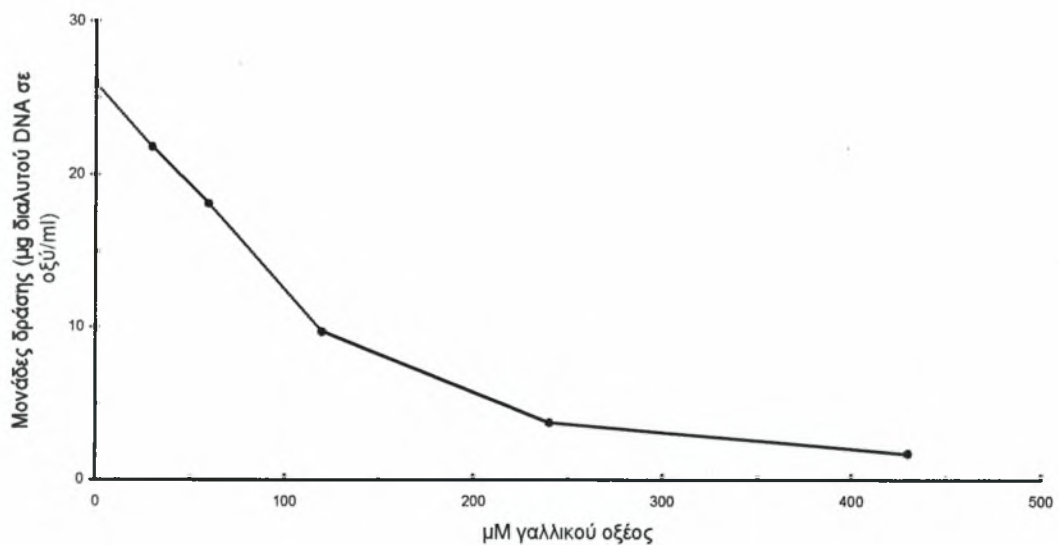
Επίδραση του γαλλικού οξέος στη δράση του παράγοντα

Επίδραση της συγκέντρωσης του γαλλικού οξέος στη δράση του παράγοντα



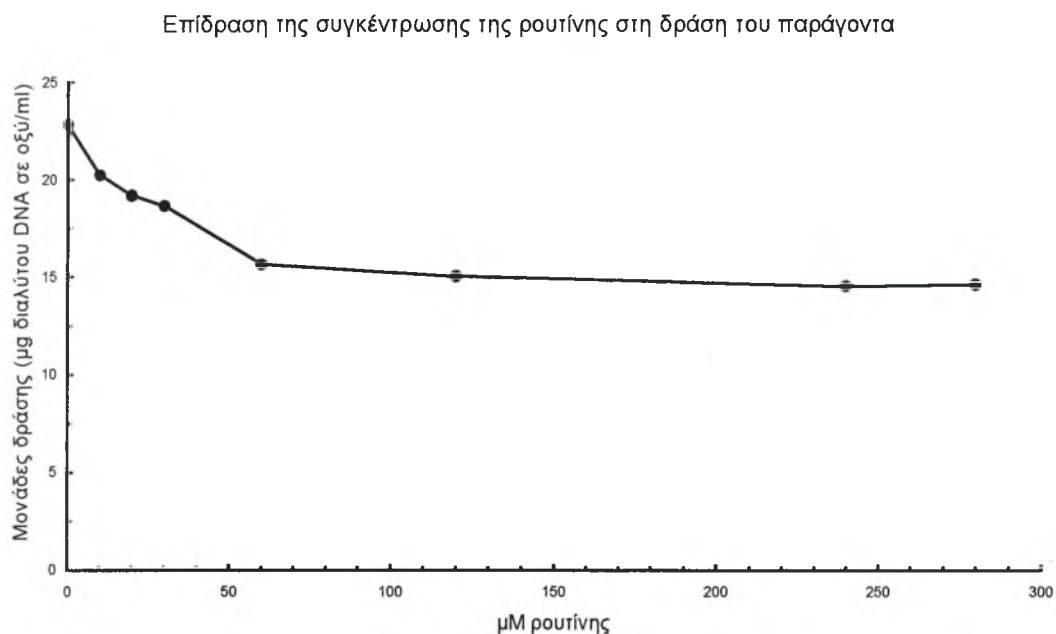
Εικόνα 16. Επίδραση της συγκέντρωσης του γαλλικού οξέος στη δράση του παράγοντα.

Επίδραση της συγκέντρωσης του γαλλικού οξέος στη δράση του μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα

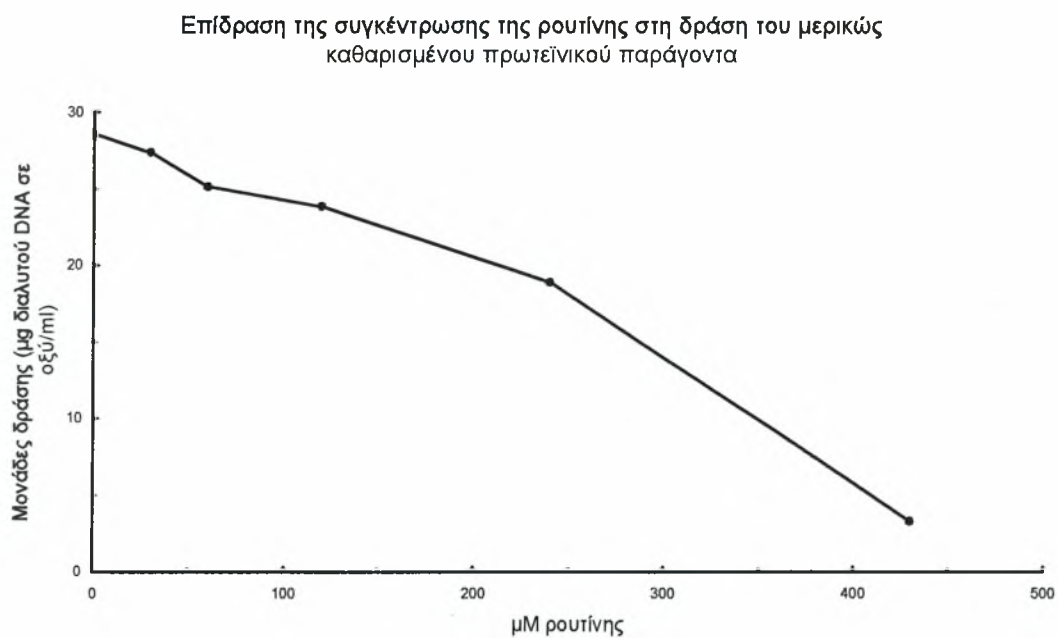


Εικόνα 17. Επίδραση της συγκέντρωσης του γαλλικού οξέος στη δράση του μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα.

Επίδραση της ρουτίνης στη δράση του παράγοντα



Εικόνα 18. Επίδραση της συγκέντρωσης του ρουτίνης στη δράση του παράγοντα.

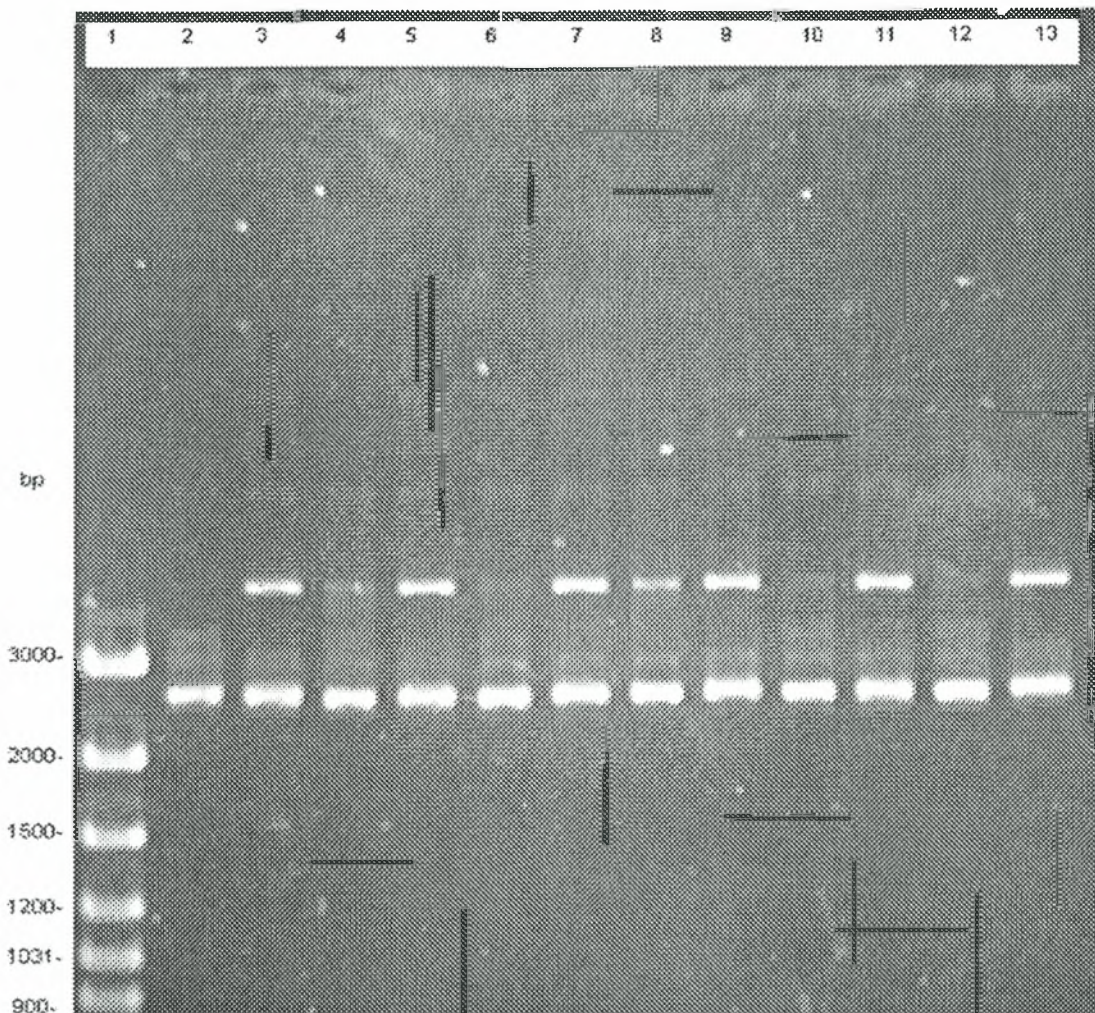


Εικόνα 19. Επίδραση της συγκέντρωσης του ρουτίνης στη δράση του μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα.

Μηχανισμός δράσης του παράγοντα

Επίδραση του παράγοντα και των πολυφαινολών στην κινητικότητα του πλασμιδιακού DNA

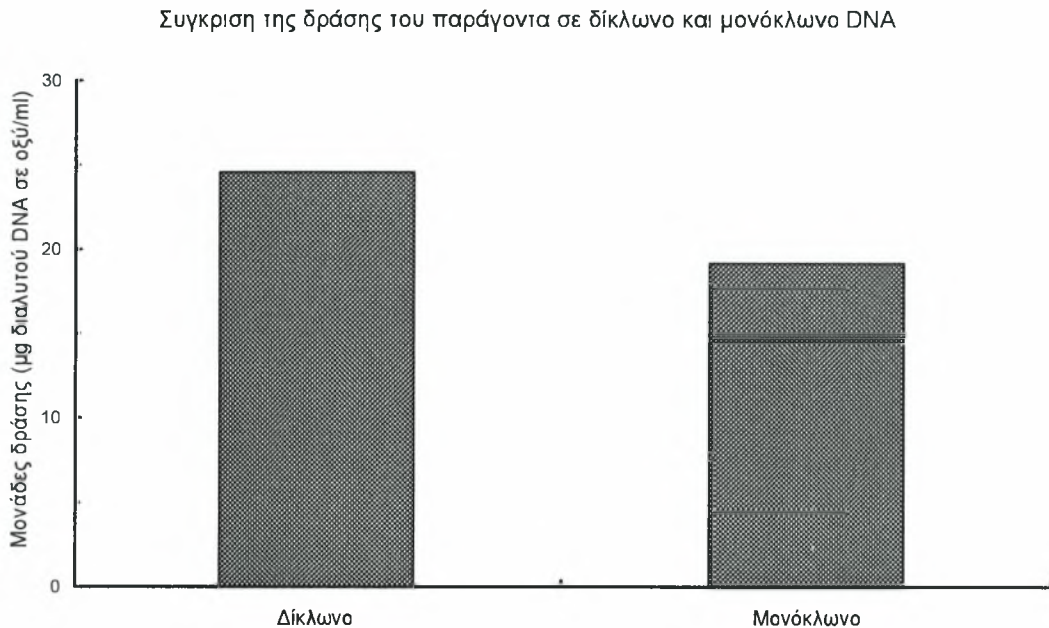
Το επόμενο ερώτημα το οποίο προσπαθήθηκε να απαντηθεί ήταν εάν ο παράγοντας συνδέεται στο DNA και αλλάζει την διαμόρφωση του και με αυτό τον τρόπο μπορεί και το διατηρεί διαλυτό σε όξινο περιβάλλον, καθώς και η επίδραση των πολυφαινολών στη δράση αυτή. Ένας καλός τρόπος για να ελεγχθεί εάν ισχύει αυτή η υπόθεση ήταν να εξεταστεί η επίδραση του παράγοντα και των πολυφαινολών στην κινητικότητα του πλασμιδιακού DNA σε πηκτή αгарόζης. Στην Εικ. 20 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης του παράγοντα και των πολυφαινολών στην κινητικότητα του πλασμιδιακού DNA.



Εικόνα 20. Επίδραση του μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα και των πολυφαινολών στη κινητικότητα του δίκλωνου κυκλικού μορίου DNA. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%, υπό την επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος 100V. Τα δείγματα περιέχουν: Διαδρομή 1 – 2μl ladder Fermentas #SM0321. Διαδρομή 2 – 2μl (50ng/μl) πλασμιδίου pGEM 3-Z vector και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Διαδρομή 3 – 2μl πλασμιδίου, 3μl (0,142341ng/μl) μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα (κλάσματος 1.5) και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Διαδρομή 4 – 2μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) καφεϊκού οξέος και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο. Διαδρομή 5 – 2μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) καφεϊκού οξέος, 3μl μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Διαδρομή 6 – 2μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) πρωτοκαχεϊκού οξέος και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο. Διαδρομή 7 – 2μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) πρωτοκαχεϊκού οξέος, 3μl μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Διαδρομή 8 – 2μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) φερολικού οξέος και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο. Διαδρομή 9 – 2μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) φερολικού οξέος, 3μl μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Διαδρομή 10 – 2μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) γαλλικού οξέος και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο. Διαδρομή 11 – 2μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) γαλλικού οξέος, 3μl μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Διαδρομή 12 – 2μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) ρουτίνης και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Διαδρομή 13 – 2μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) ρουτίνης, 3μl μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl.

Μπορεί ο παράγοντας να δράσει σε μονόκλωνο DNA;

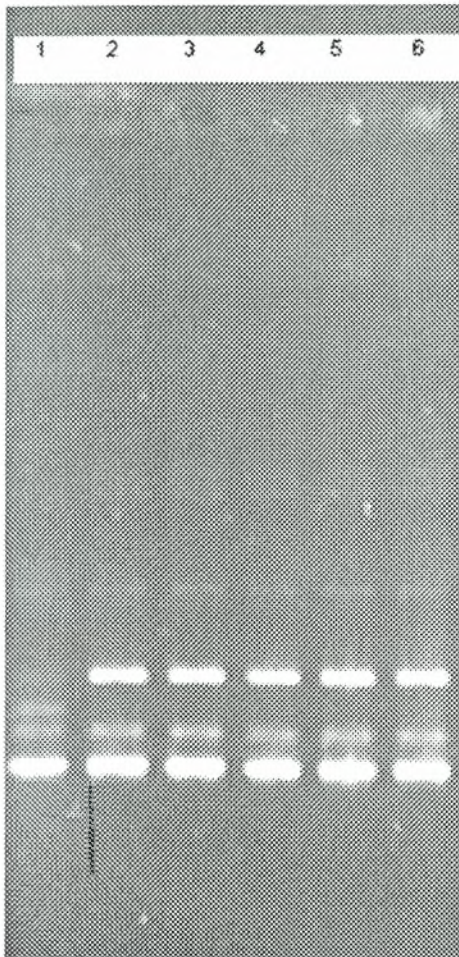
Για το σκοπό αυτό ελέγχθηκε εάν ο παράγοντας μπορεί να διατηρήσει το μονόκλωνο DNA διαλυτό σε όξινο περιβάλλον. Στην Εικ. 21 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της δράσης του παράγοντα σε δίκλωνο και μονόκλωνο DNA.



Εικόνα 21. Ο παράγοντας αλληλεπιδρά και με μονόκλωνο DNA και το διατηρεί διαλυτό σε όξινο περιβάλλον.

Είναι καταλυτική η δράση του παράγοντα;

Για αυτό το σκοπό πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα στο οποίο θα μπορούσε να ελεγχθεί εάν η ικανότητα του παράγοντα να αλλάζει την κινητικότητα του DNA είναι εξαρτώμενη από το χρόνο επώασης του πλασμιδιακού DNA μαζί με τον παράγοντα. Στην Εικ. 22 απεικονίζονται τα αποτελέσματα του πειράματος.

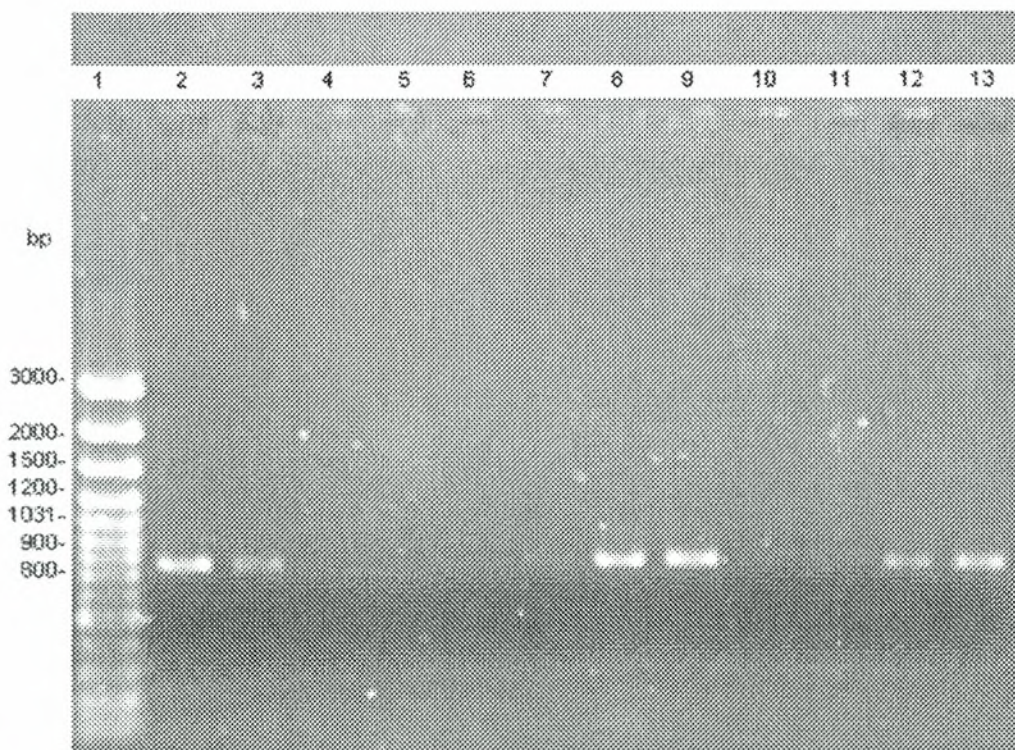


Εικόνα 22. Επίδραση του χρόνου επώασης του μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα στη δράση του. - Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0,7%, υπό την επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος 100V. Τα δείγματα περιέχουν: Διαδρομή 1 – 2μl (50ng/μl) πλασμιδίου pGEM 3-Z Vector και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Διαδρομή 2 – 2μl πλασμιδίου, 3μl (0,142341ng/μl) μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα (κλάσματος 1.5) και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Ύστερα από επώαση για 5 λεπτά. Διαδρομή 3 – 2μl πλασμιδίου, 3μl μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Ύστερα από επώαση για 10 λεπτά. Διαδρομή 4 – 2μl πλασμιδίου, 3μl μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Ύστερα από επώαση για 20 λεπτά. Διαδρομή 5 – 2μl πλασμιδίου, 3μl μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Ύστερα από επώαση για 40 λεπτά. Διαδρομή 6 – 2μl πλασμιδίου, 3μl μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Ύστερα από επώαση για 1 ώρα.

Μελέτη του ρόλου του παράγοντα και της επίδρασης των πολυφαινολών σε βασικές διεργασίες των κυττάρων

Μελέτη της επίδρασης του παράγοντα και των πολυφαινολών στην διαδικασία της αντιγραφής του DNA.

Το τμήμα του DNA που ενισχύθηκε από την διαδικασία της αντιγραφής ήταν μεγέθους 800 bp. Στην Εικ. 23 φαίνονται τα αποτελέσματα του πειράματος ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 1%.

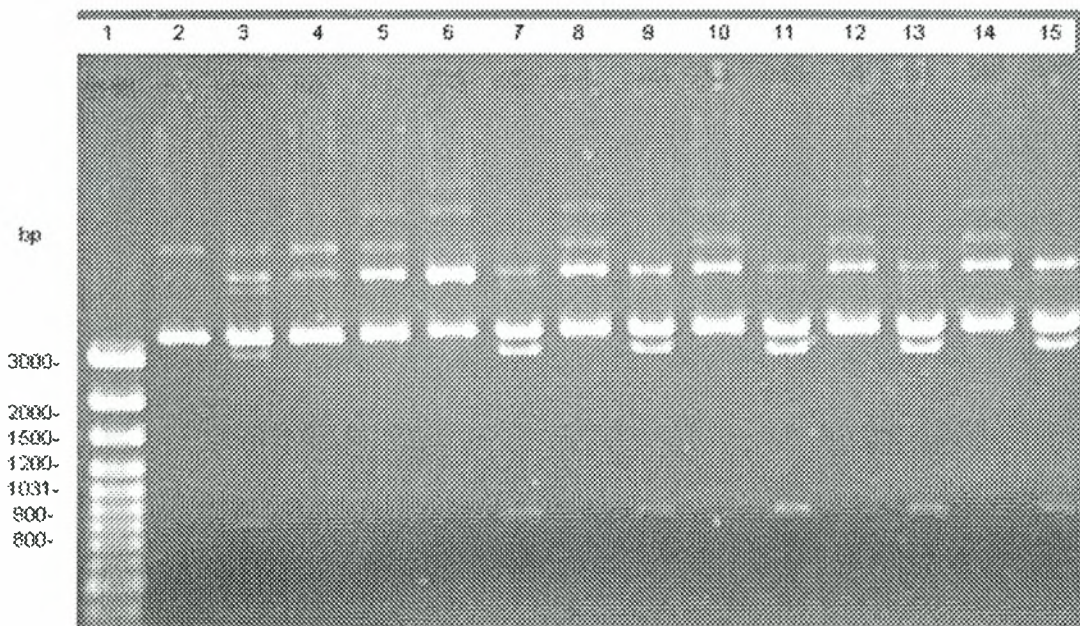


Εικόνα 23. Επίδραση του μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα και των πολυφαινολών στην αντιγραφή. - Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 1%, υπό την επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος 100V. Τα δείγματα περιέχουν 10 μl προϊόντα αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, τα δείγματα περιέχουν: Διαδρομή 1 – 2μl ladder Fermentas #SM0321. Διαδρομή 2 – 2μl (10ng/μl) genomic DNA Δάκου. Διαδρομή 3 – 2μl πλασμιδίου και 3μl (0,142341ng/μl) μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα (κλάσματος 1.5). Διαδρομή 4 – 2μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) καφεϊκού οξέος. Διαδρομή 5 - 2μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) καφεϊκού οξέος και 3 μl μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα. Διαδρομή 6 –2μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) πρωτοκαχεϊκού οξέος. Διαδρομή 7 – 2μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) πρωτοκαχεϊκού οξέος και 3 μl μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα. Διαδρομή 8 – 2μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) φερολικού οξέος. Διαδρομή 9 – 2μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) φερολικού οξέος και 3 μl μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα. Διαδρομή 10 – 2μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) γαλλικού οξέος. Διαδρομή 11 – 2μl

πλασμιδίου, 3μl (1μM) γαλλικού οξέος και 3 μl μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα. Διαδρομή 12 – 2μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) ρουτίνης. Διαδρομή 13 – 2μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) ρουτίνης και 3 μl μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα.

Μπορεί η δράση των ενζύμων περιορισμού να επηρεαστεί από την παρουσία του παράγοντα και ποια η επίδραση των πολυφαινολών;

Το EcoR I υδρολύει σε δύο σημεία το πλασμίδιο και δίνει δύο ευθύγραμμα τμήματα. Στην Εικ. 24 φαίνονται τα αποτελέσματα της πέψης του πλασμιδίου με το ένζυμο περιορισμού EcoR I ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%.



Εικόνα 24. Επίδραση του μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα και των πολυφαινολών στη δράση του περιοριστικού ενζύμου EcoR I. - Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%, υπό την επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος 100V. Τα δείγματα τα οποία περιέχουν περιοριστικά ένζυμα έχουν υποστεί πέψη για 1 ώρα στους 37 °C. Τα δείγματα περιέχουν: Διαδρομή 1 – 2μl ladder Fermentas #SM0321. Διαδρομή 2 – 1μl (200ng/μl) πλασμιδίου pGEM Vector, στο οποίο είχε εισαχθεί το εξώνιο 3-4 στην περιοχή όπου υδρολύει το ένζυμο περιορισμού EcoR I και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Διαδρομή 3 – 1μl πλασμιδίου, 1μl buffer 10x, 0,1μl περιοριστικού ενζύμου EcoR I, και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Διαδρομή 4 – 1μl πλασμιδίου, 3μl (0,142341ng/μl) μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα (κλάσματος 1.5) και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Διαδρομή 5 – 1μl πλασμιδίου, 3μl μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα, 1μl buffer 10x, 0,1μl περιοριστικού ενζύμου EcoR I, και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Διαδρομή 6 – 1μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) καφεϊκού οξέος, 3 μl μερικώς

καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα, 1μl buffer 10x, 0,1μl περιοριστικού ενζύμου EcoR I και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Διαδρομή 7 – 1μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) καφεϊκού οξέος, 1μl buffer 10x, 0,1μl περιοριστικού ενζύμου EcoR I και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Διαδρομή 8 – 1μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) πρωτοκαχεϊκού οξέος, 3 μl μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα, 1μl buffer 10x, 0,1μl περιοριστικού ενζύμου EcoR I και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Διαδρομή 9 – 1μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) πρωτοκαχεϊκού οξέος, 1μl buffer 10x, 0,1μl περιοριστικού ενζύμου EcoR I και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Διαδρομή 10 – 1μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) φερολικού οξέος, 3 μl μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα, 1μl buffer 10x, 0,1μl περιοριστικού ενζύμου EcoR I και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Διαδρομή 11 – 1μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) φερολικού οξέος, 1μl buffer 10x, 0,1μl περιοριστικού ενζύμου EcoR I και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Διαδρομή 12 – 1μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) γαλλικού οξέος, 3 μl μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα, 1μl buffer 10x, 0,1μl περιοριστικού ενζύμου EcoR I και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Διαδρομή 13 – 1μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) γαλλικού οξέος, 1μl buffer 10x, 0,1μl περιοριστικού ενζύμου EcoR I και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Διαδρομή 14 – 1μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) ρουτίνης, 3 μl μερικώς καθαρισμένου πρωτεϊνικού παράγοντα, 1μl buffer 10x, 0,1μl περιοριστικού ενζύμου EcoR I και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl. Διαδρομή 15 – 1μl πλασμιδίου, 3μl (1μM) ρουτίνης, 1μl buffer 10x, 0,1μl περιοριστικού ενζύμου EcoR I και απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 10μl.

Συζήτηση

Οι πολυφαινόλες αναστέλλουν την δράση του παράγοντα

συνδεόμενες στο DNA

Όπως σε άλλους εμβρυικούς ιστούς έτσι και στον ορό εμβρύου μοσχαριού υπάρχει ένας πρωτεϊνικός παράγοντας, ο οποίος αλληλεπιδρά με το DNA. Είναι φανερό ότι ο παράγοντας δεν αντιδρά καταλυτικά αλλά στοιχειομετρικά με το DNA. Το γεγονός αυτό υποστηρίζεται από το γεγονός ότι η δράση του δεν είναι χρονοεξαρτώμενη. Επίσης, είναι φανερό ότι ο παράγοντας συνδέεται με το DNA αλλάζοντας την φυσικοχημική του συμπεριφορά. Καθιστά το DNA διαλυτό σε οξύ παρά το γεγονός ότι το καθαρό DNA δεν είναι διαλυτό σε χαμηλά pH κυρίως γιατί οι φωσφορικές του ομάδες δεν είναι φορτισμένες σε pH χαμηλότερα του 4.0. Επιπρόσθετα, αλλοιώνει την κινητική συμπεριφορά του πλασμιδιακού DNA σε πηκτές αγαρόζης, γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει είτε την αλλαγή του μεγέθους του πλασμιδίου με την δημιουργία

συμπλοκών του DNA με τον παράγοντα, ή την αλλαγή της δομή του πλασμιδίου και ως εκ τούτου την διαφορετική του κινητικότητα.

Οι πολυφαινόλες, γνωστές για την αντιοξειδωτική τους δράση, αναστέλλουν την δράση του παράγοντα κυρίως γιατί συνδέονται και αυτές στο DNA αλλάζοντας την διαμόρφωση του. Έτσι παρουσία πολυφαινολών παρατηρείται μείωση του DNA που παραμένει διαλυτό σε όξινο περιβάλλον. Έτσι οι πολυφαινόλες απουσία παράγοντα επιταχύνουν την δράση των ενζύμων περιορισμού γεγονός που υποδηλώνει την αλλαγή στη διαμόρφωση του πλασμιδίου και την ευκολότερη σύνδεση των ενζύμων αυτών. Το γεγονός ότι η παρουσία του παράγοντα αναστέλλει την δράση των ενζύμων περιορισμού ακόμη και παρουσία πολυφαινολών δηλώνει ότι οι θέσεις σύνδεσης του παράγοντα είναι διαφορετικές από τις αντίστοιχες των πολυφαινολών.

Διαφορές στην δράση των πολυφαινολών

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων γίνεται φανερό ότι όλες οι πολυφαινόλες δεν επηρεάζουν με τον ίδιο τρόπο τη δράση του παράγοντα. Παρατηρήθηκε ότι αναστέλλουν σε διαφορετικό ποσοστό την προστατεύοντα δράση του παράγοντα στο DNA από κατακρήμνιση σε όξινο περιβάλλον. Μεγαλύτερη αναστολή από τις πολυφαινόλες παρουσίαζε το πρωτοκαχεϊκό οξύ με ποσοστό 97.4% στον ορό και 98.8% στο κλάσμα του μερικώς καθαρισμένου παράγοντα και το γαλλικό οξύ με ποσοστά 93.5% στον ορό και 93.5% στο κλάσμα του μερικώς καθαρισμένου παράγοντα. Το καφεϊκό οξύ παρουσίαζε ποσοστό αναστολής 75.1% στον ορό και 95.8% στο κλάσμα του μερικώς καθαρισμένου παράγοντα. Το φερολικό οξύ ανέστειλε 46.0% στον

ορό και 73.3% στο κλάσμα του μερικώς καθαρισμένου παράγοντα τη δράση του παράγοντα. Τέλος η ρουτίνη ανέστειλε 36.0% στον ορό και 88.4% στον κλάσμα του μερικώς καθαρισμένου παράγοντα τη δράση του παράγοντα. Τα ποσοστά αναστολής αναφέρονται για συγκεντρώσεις των πολυφαινολών 280μM και 430μM στον ορό και στο κλάσμα αντίστοιχα. Από τα παραπάνω ποσοστά αναστολής παρατηρείται ότι η αναστολή αυξανόταν σημαντικά στον μερικά καθαρισμένο παράγοντα. Αυτό υποδεικνύει ότι από τον μερικά καθαρισμένο παράγοντα έλειπαν ορισμένες ουσίες, οι οποίες παρεμπόδιζαν τις πολυφαινόλες να συνδεθούν στο DNA, να αλλάξουν την διαμόρφωση του, και να αναστείλουν την δράση του παράγοντα.

Η παρατήρηση ότι οι πολυφαινόλες δεν δρουν με τον ίδιο τρόπο ενισχύεται από τα αποτελέσματα των πειραμάτων για την μελέτη της επίδρασης του παράγοντα στην κινητικότητα του DNA. Ο παράγοντας επιβράδυνε την κινητική συμπεριφορά του πλασμιδιακού DNA σε πηκτές αγαρόζης, ενώ με παρόμοιο τρόπο δρούσαν και οι πολυφαινόλες. Παρουσία του παράγοντα και των πολυφαινολών παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ενίσχυση των επιβραδυμένων μορφών του πλασμιδιακού του DNA. Οι πολυφαινόλες πάλι δεν δρούσαν με όμοιο τρόπο, μεγαλύτερη ενίσχυση των επιβραδυμένων μορφών παρουσίαζε το φερολικό οξύ (εικόνα 20 διαδρομές 8 και 9), ενώ οι υπόλοιπες πολυφαινόλες παρουσίαζαν μικρότερη δράση. Καθώς οι πολυφαινόλες συνδέονταν στο DNA και άλλαζαν τη διαμόρφωση του με διαφορετικό τρόπο η κάθε μία, θα επηρέαζαν και με διαφορετικό τρόπο την δράση των ενζύμων περιορισμού. Την μεγαλύτερη ενίσχυση της δράσης του ενζύμου περιορισμού το φερολικό οξύ (εικόνα 24 διαδρομή 11) ενώ τη μικρότερη η ρουτίνη (εικόνα 24 διαδρομή 11).

Επιπλέον ενδείξεις για το διαφορετικό τρόπο δράσης των πολυφαινολών προκύπτουν και από τα αποτελέσματα των αλυσιδωτών αντιδράσεων της πολυμεράσης (PCR). Το καφεϊκό οξύ και το γαλλικό οξύ αναστέλλουν πλήρως την PCR απουσία και παρουσία του παράγοντα (εικόνα 23 διαδρομές 4, 5, 10 και 11). Το πρωτοκαχειϊκό οξύ αναστέλλει πλήρως την PCR απουσία του παράγοντα (εικόνα 23 διαδρομή 6), ενώ παρουσία του παράγοντα παρατηρείται μικρή ποσότητα του ενισχυμένου τμήματος (εικόνα 23 διαδρομή 7). Ενώ η ρουτίνη αναστέλλει μερικά την διαδικασία της αντιγραφής, παρουσία του παράγοντα η αναστολή ενισχύεται (εικόνα 18 διαδρομές 12 και 13). Στην περίπτωση του φερολικού οξέος η διαδικασία της αντιγραφής απουσία και παρουσία του παράγοντα δεν επηρεάζεται (εικόνα 23 διαδρομές 8 και 9). Από τις παραπάνω διαφορές στην επίδραση των πολυφαινολών στις διάφορες εργαστηριακές δοκιμασίες οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η κάθε μία πολυφαινόλη αντιδρά διαφορετικά στις διάφορες πειραματικές συνθήκες και επηρεάζει με διαφορετικό την δράση του παράγοντα.

Πιθανός μηχανισμός

Από τα παραπάνω πειράματα είναι φανερό ότι και ο παράγοντας αλλά και οι πολυφαινόλες συνδέονται στο DNA. Οι μεν πολυφαινόλες συνδεόμενες αλλάζουν την διαμόρφωση του DNA καθιστώντας το πιο εύκολα προσεγγίσιμο από τα ένζυμα περιορισμού και έτσι πιο εύκολα υδρολυόμενο. Ο παράγοντας συνδέεται και αυτός αλλάζοντας κυρίως το αλγεβρικό άθροισμα των φορτίων του έτσι ώστε να καθίσταται διαλυτό στο οξύ. Το γεγονός αυτό μπορεί να προκαλεί αναστολή της δράσης των ενζύμων περιορισμού αλλά και αναστολή του αναδιπλασιασμού του DNA.

Βιβλιογραφία

- [1] L. Bravo. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr.Rev.*56 (1998) 317-333.
- [2] D. Lairon, Mj. Amiot. Flavonoids in food and natural antioxidants in wine. *Curr. Opin. Lipidol.* 10 (1999) 23-28.
- [3] MGL. Hertog, EJM. Feskens, PCH. Hollman, MB. Katan, D. Kromhout. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet* 342 (1993) 1007-1011.
- [4] MGL. Hertog, D. Kromhout, C. Aravanis et al. Flavonoid intake and long term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch. Intern Med.* 155 (1995) 381-386.
- [5] N.C. Cook and S. Samman. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* 7 (1996) 66-76.
- [6] Y. Sakihama, Michael F. Cohen, Stephen C. Grace, H. Yamasaki. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177 (2002) 67-80.
- [7] Kelly E. Heim, Anthony R. Tagliaferro, Dennis J. Bodilya. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13 (2002) 572-584.
- [8] G. Williamson, A. J. Day, G. W. Plumd and D. Couteau, Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochemical Society Transactons* 28 (2000) 18-22.

- [9] L.F. Bjeldanes, G.W. Chang, Mutagenic activity of quercetin and related compounds, *Science* 197 (1997) 577-578.
- [10] M. Nagao, N. Morita, T. Yahagi, M. Shimizu, M. Kuroyanagi, M. Fukuoka, K. Yoshihira, S. Natori, T. Fujino, T. Sugimura, Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds, *Environ. Mutagen.* 3 (1981) 401-419.
- [11] H. Oshima, Y. Yoshie, S. Auriol, I. Gilibert, Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion, *Free Rad. Biol. Med.* 25 (1998) 1057-1065.
- [12] H. Szymusiak, B. Tyrakowska, I.M. Rietjens, N. Cenas, Pro-oxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure activity relationships, *FEBS Lett.* 462 (1999) 392-396
- [13] S.C. Sahu , G.C. Gray, Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and narigenin in isolated rat liver nuclei, *Food Chem. Toxicol.* 35 (1997) 443-447.
- [14] L.R. Ferguson, B.C. Baguley, Topoisomerase II enzymes and mutagenicity, *Environ. Mol. Mutagen.* 24 (1994) 245-261.
- [15] C.A. Austin, S. Patel, K. Ono, H. Nakane, L.M. Fisher, Site-specific DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase induced by novel flavone and catechin derivatives, *Biochem. J.* 282 (1992) 883-889.
- [16] L.R. Ferguson, G. Whiteside, K.M. Holdaway, B.C. Baguley, Application of fluorescence in situ hybridisation to studying the relationship between cytotoxicity, chromosomal aberrations and changes in chromosome number after treatment with topoisomerase II inhibitor, amsacrine, *Environ. Mol. Mutagen.* 27 (1996) 255-262.

- [17] Svend J. Knak Jensen. Oxidative stress and free radicals. *Journal of molecular structure* 666-667 (2003) 387-392.
- [18] C. Mylonas and D. Kouretas. Lipid peroxidation and tissue damage. *In vivo* 13 (1999) 295-310.
- [19] Lynnete R. Ferguson. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research* 475 (2001) 89-111.
- [20] Saskia A. B. E. van Acker, Georgette Plemper van Balen, Dirk-Jan van den Berg, Aalt Bast and Wim J. F. van der Vijgh. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochemical Pharmacology* 56 (1998) 935-943.
- [21] M.Y. Heo, K.S. Yu, K.H. Kim, W.W. Au, Anticlastogenic effect of flavonoids against mutagen-induced micronuclei in mice, *Mutat. Res.* 284 (1994) 243-249.
- [22] H. Hayatsu, N. Inada, T. Kakutani, S. Arimoto, T. Negishi, K. Mori, T. Okuda, I. Sakata, Suppression of genotoxicity of carcinogens by (-)epigallocatechin gallate, *Prev Med.* 21 (1992) 370-376.
- [23] F.T. Hatch, F.C. Lightstone, M.E. Colvin, Quantitative structure-activity relationship of flavonoids for inhibition of heterocyclic amine mutagenicity, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 279-299.
- [24] H. Imanishi, Y.F. Sasaki, K. Matsumoto, M. Watanabe, T. Ohta, Y. Shirasu, K. Tutikawa, Suppression of 6-TG-resistant mutations in V-79 cells and receive spot formations in mice by vanillin, *Mutat. Res.* 243 (1990) 151-158.

- [25] Y.F. Sasaki, K. Matsumoto, H. Imanishi, M. Watanabe, T. Ohta, Y. Shirasu, K. Tutikawa, In vivo anticlastogenic and antimutagenic effects of tannic acid in mice, *Mutat. Res.* 244 (1990) 43-47.
- [26] S. Uddin, M.A. Choudhry, Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the DNA synthesis of human leukemia cells, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 36 (3) (1995) 545-550.
- [27] T. Ohta, Modification of genotoxicity by naturally occurring flavorings and their derivatives, *Crit Rev. Toxicol.* 23 (1993) 127-146.
- [28] V. Abalea, J. Cillard, M.P. Dubos, O. Sergent, P. Cillard, I. Movel, Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures, *Free Rad. Biol. Med.* 26 (1999) 1457-1466.
- [29] R. Dixit, B. Gold, Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mutagenicity and DNA methylation by ellagic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83 (1986) 8039-8043.
- [30] A. Constantinou, G.D. Stoner, R. Metha, K. Rao, C. Ryan, R. Moon. The dietary anticancer agent ellagic acid is a potent inhibitor of DNA topoisomerases in vitro. *Nutr. Cancer* 23 (1995) 121-130.
- [31] B. Pignatelli, M. Friesen, E.A. Walker. The role of phenols in catalysis of nitrosamine formation, in: E.A. Walker, I. Gričič, M. Castegnaro, M. Borzsonyi (Eds.), *N-Nitroso Compounds: Analysis, Formation and Occurrence*, IARC Scientific Publications, Vol 31, Lyon 1980, pp. 95-110. *Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993) 2690-2694.

- [32] M. G. L. Hertog, E. J. M. Feskens, P.C. H. Hollman, M.B. Katan, D. Kromhout. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zypthen elderly study. *Lancet* 342 (1993) 1007-1011.
- [33] H. Bartch, N. Frank, Blocking the endogenous formation of N-nitroso compounds and related carcinogens, IARC Scientific Publications (lyon) 139 (1996) 189-201.
- [34] E. Middleton Jr, C. Kandaswami, Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions, *Biochem. Pharma.* 43 (1992) 1167-1179.
- [35] M. Ricther, R. Eberman, B. Marian, Quercetin-induced apoptosis in colorectal tumor cells: possible role of EGF receptor signalling, *Nutr. Cancer* 34 (1999) 88-99.
- [36] I.K. Wang, S.Y. Lin-Shiau, J.K. Lin, Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome-c release and activate of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells, *Eur. J. Cancer* 35 (1999) 1517-1525.
- [37] O. Antonoglou, J.G. Georgatsos, Studies on a glycoprotein of fetal calf serum that proteins nucleic acids precipitation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 136 (1971) 1360-1365.
- [38] D. Kouretas, O. Antonoglou, Ribonucleases protect RNA from acid precipitation. *Cell Mol. Biol.* 43 (1997) 1181-1190.
- [39] D. Kouretas, A. Papageorgiou, O. Antonoglou, Increased protective activity against acid precipitation of poly(U) in the serum of tumor-bearing mice. *Anticancer Res.* 8 (1988) 1307-1312.

- [40] Tunis M and Weinfield H, Interactions of glycoproteins with nucleic acids. *Arch Biochem Biophys* 87 (1960) 210-216.
- [41] D. Kouretas, J. Vaitopoulos, P. Petropoulos, O. Antonoglou, Characterization of the protein protecting RNA from acid precipitation and its evaluation as tumor marker in gastrointestinal and gynecological cancer. *Oncol. Rep.* 2 (1995) 1107-1113.
- [42] D. Kouretas, Z. Mamuris, C. Stamatis, A. Rodriguez-Burgos, V. Tsamis, C. Neofitou, Isolation and characterization of a protein from *Mendole* (*Spicara maena*) eggs that bind to DNA and inhibits its replication as well its acid precipitation. *In vivo.* 15 (2001) 49-52.
- [43] MM. Bradford. A rapid and sensitive for the quantification of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1976) 248-254.