



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και  
Βιοτεχνολογίας «ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-  
ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

**ΣΙΑΗΡΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΕΝΗ**

**ΔΡΑΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ  
ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ LATHYRUS LAXIFLORUS ΣΤΗΝ  
ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΟΠΟΪΣΟΜΕΡΑΣΗΣ I**



**ΙΟΥΝΙΟΣ 2012**

Δράση χημικών ενώσεων από εκχυλίσματα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

**Κουρέτας Δημήτριος:** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Λιαδάκη Καλλιόπη:** Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Στάγκος Δημήτριος:** Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## **Ευχαριστίες**

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της κ. Καλλιόπης Λιαδάκη, Λέκτορα Βιοχημικής Φαρμακολογίας, την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τόσο για τη δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω αυτή την εργασία όσο και για την πολύτιμη βοήθειά της, τις συμβουλές της και την καθοδήγησή της σε κάθε στάδιο της εργασίας αυτής. Επίσης, ευχαριστώ τον καθηγητή Φυσιολογίας Ζώων Δημήτριο Κουρέτα, για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή.

Ευχαριστώ θερμά τον κ. Δημήτριο Στάγκο, Λέκτορα Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών και όλη την ομάδα του εργαστηρίου για την άριστη συνεργασία και το ιδιαίτερα φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου για τη βοήθεια και τη συμπαράστασή τους σε κάθε προσπάθειά μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	9
<b>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	10
1.1 Τοποϊσομεράσες	11
1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά και είδη τοποϊσομερασών	11
1.1.2 DNA Τοποϊσομεράση I	14
1.1.2.1. Δομή της DNA τοποϊσομεράσης I	14
1.1.2.2 Δράση της DNA τοποϊσομεράσης I	17
1.1.2.3. Βιολογικές λειτουργίες της DNA Τοποϊσομεράσης I	20
1.1.3. DNA τοποϊσομεράση II	21
1.1.3.1. Δομή της DNA τοποϊσομεράσης II	21
1.1.3.2 Δράση της DNA τοποϊσομεράσης II	23
1.1.3.3 Βιολογικές λειτουργίες της DNA Τοποϊσομεράσης II	24
1.2 Αναστολείς τοποϊσομερασών	25
1.2.1 Αναστολείς της τοποϊσομεράσης I	28
1.2.1.1 Αναστολείς δηλητήρια (poisons) της DNA τοποϊσομεράσης I	28
1.2.1.2 Καταλυτικοί αναστολείς (Suppressors) της DNA τοποϊσομεράσης I	30
1.2.2 Αναστολείς της τοποϊσομεράσης II	30
1.2.2.1 Αναστολείς δηλητήρια (poisons) της DNA τοποϊσομεράσης II	30
1.2.2.2 Καταλυτικοί αναστολείς (Suppressors) της DNA τοποϊσομεράσης II	32
1.3 Πολυφαινόλες	32
1.3.1 Φαινολικά οξέα	34
1.3.2 Φλαβονοειδή	35
1.3.3 Στιλβένια	40
1.3.4 Λιγνάνες	40
1.4 Πολυφαινόλες και καρκίνος	41
1.4.1 Μηχανισμός καρκινογένεσης	41
1.4.2 Φλαβονοειδή ως ρυθμιστές μεταβολικών ενζύμων	42
1.4.3 Φλαβονοειδή ως αναστολείς του κυτταρικού πολλαπλασιασμού	43
1.4.4 Φλαβονοειδή ως αναστολείς του κυτταρικού κύκλου	43
1.4.5 Φλαβονοειδή ως επαγωγείς της κυτταρικής απόπτωσης	44
1.4.6 Αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολικών ενώσεων	45
1.4.7 Αντικαρκινική δράση πολυφαινολικών ενώσεων	46
1.5 Το γένος Lathyrus	47

1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	50
<b>2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>51</b>
2.1 ΥΛΙΚΑ	52
2.1.1 Χημικά αντιδραστήρια	52
2.1.2 Εκχυλίσματα και πολυφαινολικά καθαρά μόρια	52
2.1.3 Αντιδραστήρια απομόνωσης πλασμιδιακού DNA	55
2.1.4 Αντιδραστήρια για την δοκιμή χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA από την τοποϊσομεράση I (wheat germ Topoisomerase I plasmid relaxation assay)	56
2.1.5 Αντιδραστήρια ηλεκτροφόρησης πλασμιδιακού DNA	56
2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ	56
2.2.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	56
2.2.2. Δοκιμή χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA από τοποϊσομεράση I (wheat germ Topoisomerase I relaxation assay)	58
2.2.3 Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA	61
2.3 Υπολογισμοί	62
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>64</b>
3.1. Επίδραση καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων στην ενεργότητα της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου	65
<b>4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>74</b>
<b>5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>80</b>

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

<i>Εικόνα 1: Δομή DNA τοποϊσομεράσης I. α. Οργάνωση δομής της τοποϊσομεράσης I</i>	
<i>β. Δομή του αμινοτελικού άκρου με ανάλυση ακτίνων X</i>	15
<i>Εικόνα 2: Οργάνωση των περιοχών της τοποϊσομεράσης I</i>	16
<i>Εικόνα 3: Καταλυτική δράση της τυροσίνης 723</i>	17
<i>Εικόνα 4: Μηχανισμός δράσης της τοποϊσομεράσης I</i>	18
<i>Εικόνα 5: Πρότυπο δράσης της τοποϊσομεράσης IA</i>	19
<i>Εικόνα 6: Πρότυπο δράσης της τοποϊσομεράσης IB</i>	20
<i>Εικόνα 7: Δομή της DNA τοποϊσομεράσης II</i>	22
<i>Εικόνα 8: Μηχανισμός της DNA τοποϊσομεράσης II</i>	24
<i>Εικόνα 9: Σχηματισμός του συμπλόκου τοποϊσομεράσης- φάρμακου – DNA</i>	28
<i>Εικόνα 10: Αναστολείς δηλητήρια της τοποϊσομεράσης I</i>	30
<i>Εικόνα 11: Αναστολείς δηλητήρια της τοποϊσομεράσης II</i>	32
<i>Εικόνα 12: Χημικές δομές πολυφαινολικών ενώσεων</i>	33
<i>Εικόνα 13: Χημικοί τύποι υδροξυβενζοϊκού και υδροξυκιναμικού οξέος</i>	35
<i>Εικόνα 14: Χημικές δομές φλαβονοειδών</i>	36
<i>Εικόνα 15: Γενική δομή και αρίθμηση των κοινών φλαβονοειδών. Κάθε κατηγορία χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένες πλευρικές ομάδες</i>	37
<i>Εικόνα 16: Χημική δομή κερκετίνης</i>	38
<i>Εικόνα 17: Χημική δομή της κυανιδίνης</i>	39
<i>Εικόνα 18: Χημική δομή της ρεσβερατρόλης</i>	40
<i>Εικόνα 19: Τα τρία στάδια της εξέλιξης του καρκίνου</i>	42
<i>Εικόνα 20: Το φυτό Lathyrus laxiflorus</i>	49
<i>Εικόνα 21: Kaempferol-3-O- rhamnoside</i>	53
<i>Εικόνα 22: Quercetin -3-O- rhamnoside</i>	53
<i>Εικόνα 23: Kaempferol-3-O-rutinoside</i>	53
<i>Εικόνα 24: Quercetin -3-O- rutinoside</i>	54
<i>Εικόνα 25: Caffeic acid</i>	54
<i>Εικόνα 26: Apigenin – 8 – C – a – D – glucopyranoside – 6 – C – a – L – arabinopyranosyl</i>	54
<i>Εικόνα 27: Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης</i>	59
<i>Εικόνα 28: Επίδραση της τοποϊσομεράσης I στο πλασμιδιακό DNA. Η διαμόρφωση που προκύπτει αλλάζει την ηλεκτροφορητική κινητικότητα του μορίου</i>	60

<b>Εικόνα 29:</b> Επίδραση όλων των πολυφαινολικών ενώσεων στην ενεργότητα της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου	66
<b>Εικόνα 30:</b> Επίδραση της ένωσης WA στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου σε συγκεντρώσεις 10, 25, 50, 100 και 200 $\mu\text{M}$ .	67
<b>Εικόνα 31:</b> Επίδραση της ένωσης WWB στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου σε συγκεντρώσεις 0.5, 1, 1.5, 2 και 2.5 $\mu\text{M}$ .	68
<b>Εικόνα 32:</b> Επίδραση της ένωσης WC στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου σε συγκεντρώσεις 1, 1.5, 2, και 2.5 $\mu\text{M}$ .	69
<b>Εικόνα 33:</b> Επίδραση της ένωσης WD στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου σε συγκεντρώσεις 0.05, 0.075, 0.1, 0.5, 1 και 5 $\mu\text{M}$ .	70
<b>Εικόνα 34:</b> Επίδραση της ένωσης WE στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου σε συγκεντρώσεις 0.05, 0.075, 0.1, 0.5, 1 και 5 $\mu\text{M}$ .	71
<b>Εικόνα 35:</b> Επίδραση της ένωσης WH στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου σε συγκεντρώσεις 10, 25, 50, 75, 100 και 200 $\mu\text{M}$ .	72

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1:</b> Υποοικογένειες των DNA τοποϊσομερασών	14
<b>Πίνακας 2:</b> Ονόματα των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα κλάσματα που απομονώθηκαν από το φυτό <i>Lathyrus laxiflorus</i>	65

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

<b>Γράφημα 1:</b> Αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I του σίτου από την ένωση WA σε συγκεντρώσεις 10, 25, 50, 100 και 500 $\mu\text{M}$	67
<b>Γράφημα 2:</b> Αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I του σίτου από την ένωση WWB σε συγκεντρώσεις 0.5, 1, 2, 2.5 και 10 $\mu\text{M}$	68
<b>Γράφημα 3:</b> Αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I του σίτου από την ένωση WC σε συγκεντρώσεις 1, 1.5, 2, 2.5, 5 και 10 $\mu\text{M}$	69
<b>Γράφημα 4:</b> Αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I του σίτου από την ένωση WD σε συγκεντρώσεις 0.05, 0.075, 0.1, 0.5, 1 και 5 $\mu\text{M}$	70
<b>Γράφημα 5:</b> Αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I του σίτου από την ένωση WE σε συγκεντρώσεις 0.05, 0.075, 0.1, 0.5, 1 και 5 $\mu\text{M}$	71

**Γράφημα 6:** Αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I του σίτου από την ένωση WH σε συγκεντρώσεις 10, 25, 50, 75, 100 και 200  $\mu\text{M}$  72

**Γράφημα 7:** Τιμές  $IC_{50}$  των πολυφαινολικών ενώσεων για την ευκαρυωτική τοποϊσομεράση I του σίτου 73



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ψυχανθή ανήκουν στην οικογένεια φυτών *Leguminosae*, που αποτελεί μία ομάδα δικοτυλήδων φυτών με υψηλή διατροφική και οικονομική αξία. Περιέχουν σημαντικές ποσότητες φυτοχημικών μορίων, όπως φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, και λιγνάνες, τα οποία είναι γνωστά για τις αντιοξειδωτικές και χημειοπροστατευτικές τους ιδιότητες. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση πολυφαινολικών ενώσεων, που απομονώθηκαν από το ψυχανθές *Lathyrus laxiflorus*, στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου. Η τοποϊσομεράση I αποτελεί ένζυμο σημαντικό για πολλές κυτταρικές διεργασίες, ενώ είναι ενδεικτική η αυξημένη έκφρασή της στα καρκινικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής έδειξαν ότι η δράση της τοποϊσομεράσης I του σίτου αναστέλλεται από όλες τις πολυφαινολικές ενώσεις που μελετήθηκαν, με τιμές  $IC_{50}$  που κυμαίνονται από 75 nM έως 55  $\mu$ M. Επιπλέον, έγιναν συσχετισμοί μεταξύ της δομής των πολυφαινολικών ενώσεων και της ικανότητας τους να αναστέλλουν την τοποϊσομεράση I. Η ικανότητα αυτών των ενώσεων να δρουν ως καταλυτικοί αναστολείς της τοποϊσομεράσης I τα καθιστά πιθανούς αντικαρκινικούς παράγοντες, δημιουργώντας μελλοντικές προοπτικές στην θεραπεία του καρκίνου.

## SUMMARY

Legumes belong to the *Leguminosae* family, which is a group of dicotyledonous plants with high nutritional and economic value. They contain significant amounts of phytochemicals molecules, such as flavonoids, phenolic acids, and lignans, which are known for their antioxidant and chemoprotective properties. The present study examined the effect of polyphenolic compounds, isolated from *Lathyrus laxiflorus*, on the activity of wheat topoisomerase I. Topoisomerase I is an enzyme important for many cellular processes, and is known to exhibit increased expression in tumor cells. The results of this study show that all the examined polyphenolic compounds inhibited the activity of wheat topoisomerase I, with  $IC_{50}$  values ranging from 75 nM to 55  $\mu$ M. In addition, we were able to make correlations between the structure of phenolic compounds and their ability to inhibit topoisomerase I. The ability of these compounds to act as catalytic inhibitors of topoisomerase I renders them as potential anticancer agents, creating new prospects in the treatment of cancer.

# **1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## 1.1 Τοποϊσομεράσες

### 1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά και είδη τοποϊσομερασών

Η τοπολογία του DNA στο κύτταρο καθορίζεται από ένζυμα που είναι γνωστά ως τοποϊσομεράσες. Τα ένζυμα αυτά είναι απαραίτητα για την αντιγραφή, τη μεταγραφή και τον ανασυνδυασμό του γενετικού υλικού και παίζουν σημαντικό ρόλο στην δομή, τη συμπίκνωση, την αποσυμπύκνωση και τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων (Froelich-Ammon et al., 1995). Λόγω αυτών των ιδιοτήτων οι τοποϊσομεράσες παίζουν σημαντικό ρόλο σε διαδικασίες κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης. Οι DNA τοποϊσομεράσες βρίσκονται σε όλα τα ευκαρυωτικά και προκαρυωτικά κύτταρα, καθώς και σε μερικούς φάγους και ιούς (Roca, 1995). Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον για τις τοποϊσομεράσες έχει αυξηθεί, διότι αποτελούν κύριους κυτταρικούς στόχους για μερικά από τα πιο γνωστά αντιβιοτικά και αντικαρκινικά φάρμακα (Froelich-Ammon et al., 1995).

Η ανάγκη ύπαρξης των τοποϊσομερασών αναγνωρίστηκε πολύ πριν την ανακάλυψή τους. Όταν οι J. Watson και Fr. Crick ανακάλυψαν το μοντέλο της διπλής έλικας του DNA και το δημοσίευσαν το 1953 ανέφεραν ότι θα πρέπει να υπάρχει ένας μηχανισμός που θα μπορεί να λύνει τους κόμπους που προκύπτουν από τα δομικά χαρακτηριστικά του γενετικού υλικού.

Η πρώτη DNA τοποϊσομεράση (Topo I) απομονώθηκε από την *Escherichia coli* το 1971 (Wang, 1971). Το 1972 βρέθηκε η ευκαρυωτική Topo I σε εμβρυϊκά κύτταρα ποντικού και στη συνέχεια το ένζυμο αυτό απομονώθηκε από τη ζύμη αλλά και από άλλα θηλαστικά.

Οι τοποϊσομεράσες είναι απαραίτητα ένζυμα για την κυτταρική επιβίωση, καθώς είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση της σταθερότητας του γενώματος. Ωστόσο, προκειμένου να εκπληρώσουν το σκοπό τους, πρέπει να διασπάσουν τοπικά τη διπλή έλικα. Φυσιολογικά, τα σύμπλοκα τοποϊσομεράσης-γενετικού υλικού που ευθύνονται για τα σπασίματα στο γενετικό υλικό είναι προσωρινά, γρήγορα και διατηρούνται πάντα σε χαμηλά επίπεδα. Συνεπώς δεν προκαλούν αρνητικές επιπτώσεις και εντάσσονται αρμονικά στο σύνολο των λειτουργιών του κυττάρου. Ωστόσο, αν για κάποιο λόγο τα σπασίματα στο DNA δεν αποκατασταθούν ή αν κάποιο άλλο ένζυμο που σχετίζεται άμεσα με τον μεταβολισμό του DNA, όπως η DNA πολυμεράση ή ελικάσες, συγκρουστούν με τα σύμπλοκα αυτά τότε τα σπασίματα στο γενετικό υλικό δεν μπορούν να γεφυρωθούν από τις τοποϊσομεράσες με αποτέλεσμα να ενεργοποιούνται κυτταρικά μονοπάτια επιδιόρθωσης και ανασυνδυασμού. Έτσι,

αυξάνεται η πιθανότητα εμφάνισης ανταλλαγών χρωμοσωμικών τμημάτων μεταξύ αδελφών χρωματίδων, μεταθέσεων, δημιουργίας εκτεταμένων ελλειμμάτων ή και ενθέσεων και γενικά χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Όταν τα πλέον μόνιμα σπασίματα απαντώνται σε ένα μεγάλο μέρος του γενετικού υλικού προκαλούν μία σειρά γεγονότων τα οποία οδηγούν το κύτταρο σε απόπτωση ή νέκρωση (Fortune et al, 2000)

Εξαιτίας αυτής της ιδιαίτερης ικανότητας των τοποϊσομερασών να δρουν, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, ως DNA νουκλεάσες, έχει προταθεί ότι οι παράγοντες που αναστέλλουν τη δράση τους δύνανται να αποτελέσουν αντικαρκινικά φάρμακα. Πράγματι, μέχρι σήμερα δεκάδες μόρια που χρησιμοποιούνται ως βασική θεραπεία σε πολλές μορφές καρκίνου, αποτελούν αναστολείς των τοποϊσομερασών. Τα μόρια αυτά μετά τη χορήγησή τους, στοχεύοντας τα καρκινικά κύτταρα και τις τοποϊσομεράσες που περιέχονται σε αυξημένες ποσότητες σε αυτά, προκαλούν επιπλοκές στη σταθερότητα του γενώματος και οδηγούν τα καρκινικά κύτταρα σε θάνατο.

Οι τοποϊσομεράσες είχαν αρχικά κατηγοριοποιηθεί σε δύο κατηγορίες: τύπου I και II. Όλα τα κύτταρα περιέχουν αυτές τις δύο υψηλά συντηρημένες τάξεις των τοποϊσομερασών, οι οποίες διαφέρουν τόσο στο μηχανισμό όσο και στις φυσικές ιδιότητες. Τα ένζυμα τύπου I, ο οποίος περιλαμβάνει τις βακτηριακές τοποϊσομεράσες I και III καθώς και τις ευκαρυωτικές τοποϊσομεράσες I και III, είναι μονομερή, λειτουργούν χωρίς ενεργειακό συμπαράγοντα και καταλύουν τη χαλάρωση του υπερελικωμένου DNA. Τα ένζυμα τύπου II περιλαμβάνουν την βακτηριακή DNA γυράση, την βακτηριακή τοποϊσομεράση IV καθώς και την ευκαρυωτική τοποϊσομεράση II και χρησιμοποιούν την ενέργεια από την υδρόλυση του ATP για να ρυθμίζουν την τοπολογία του DNA (Froelich-Ammon et al., 1995).

Συνοπτικά, οι τοποϊσομεράσες αλλάζουν την τοπολογική κατάσταση του DNA καταλύοντας μια διεργασία που αποτελείται από τρία βήματα:

1. Διάσπαση του ενός ή και των δύο κλώνων του DNA
2. Πέρασμα ενός τμήματος του DNA διαμέσου του ανοίγματος που δημιουργείται από τη διάσπαση
3. Επανασύνδεση του διασπασμένου DNA

Οι δύο κατηγορίες των τοποϊσομερασών μπορούν να διακριθούν περαιτέρω σε τοποϊσομεράσες τύπου IA, IB, IIA και IIB, με βάση τα λειτουργικά χαρακτηριστικά τους. Συγκεκριμένα, οι Τοπο I διασπούν τον ένα κλώνο του DNA, ενώ οι Τοπο II

διασπούν και τους δύο κλώνους του DNA. Οι Τοπο ΙΑ συνδέονται με το 5' άκρο του διασπασμένου κλώνου, ενώ οι Τοπο ΙΒ συνδέονται στο 3' άκρο του διασπασμένου κλώνου. Οι Τοπο ΙΙΑ δημιουργούν δίκλινα σπασίματα με τέσσερις προεξέχουσες βάσεις (overhangs), ενώ οι Τοπο ΙΙΒ δημιουργούν επίσης δίκλινα σπασίματα στο γενετικό υλικό αλλά με δύο βάσεις προεξέχουσες (overhangs).

Οι τοποϊσομεράσες τύπου Ι, εκτός των Τοπο ΙΑ και ΙΒ, διαθέτουν μία επιπλέον οικογένεια ενζύμων, τις Τοπο ΙC. Αξίζει να σημειωθεί ότι η οικογένεια Τοπο ΙC περιλαμβάνει προς το παρόν μόνο μία ιδιαίτερα ασυνήθιστη τοποϊσομεράση, την Τοπο V, η οποία ανακαλύφθηκε πριν 15 χρόνια σε ένα ειδικό είδος υπερθερμόφιλων μεθανογενών αρχαίων (*Methanopyrus kandleri*) τα οποία αναπτύσσονται ακόμα και σε θερμοκρασία 110° C. Αρχικά, η Τοπο V συμπεριλήφθηκε στις Τοπο ΙΒ, με τις οποίες διέθετε αρκετά κοινά λειτουργικά χαρακτηριστικά. Στη συνέχεια αποδείχθηκε πως η τοποϊσομεράση αυτή δεν είναι ομόλογη με τις Τοπο ΙΒ και για το λόγο αυτό θεωρήθηκε ως το πρωτότυπο ένζυμο μίας νέας οικογένειας τοποϊσομερασών, των Τοπο ΙC.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι από τις αλληλουχίες των ενζύμων καθώς και από τα δομικά τους χαρακτηριστικά, πλέον η κατηγοριοποίηση των τοποϊσομερασών γίνεται βάσει των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ τους, η οποία ωστόσο συμπίπτει και με την αρχική κατηγοριοποίηση βάσει καθαρά των λειτουργικών χαρακτηριστικών τους. Επομένως, συνολικά υπάρχουν 5 διακριτές οικογένειες τοποϊσομερασών, οι οποίες προέρχονται από 5 διακριτά προγονικά ένζυμα. Η κάθε οικογένεια χωρίζεται σε υποοικογένειες και τα ένζυμα που ανήκουν στην ίδια υποοικογένεια παρουσιάζουν πολλές δομικές και λειτουργικές ομοιότητες. Όλα τα ένζυμα που κατατάσσονται στις Τοπο Ι ονομάζονται με μονούς λατινικούς αριθμούς (I, III, V), ενώ τα ένζυμα που ανήκουν στις Τοπο ΙΙ ονομάζονται με ζυγούς λατινικούς αριθμούς (II, IV, VI).

Σε ορισμένα ένζυμα έχουν δοθεί και ειδικές ονομασίες όπως συμβαίνει με την βακτηριακή Τοπο ΙΑ, η οποία αναφέρεται ως ω πρωτεΐνη, με την βακτηριακή Τοπο ΙΙΑ, η οποία αναφέρεται ως γυράση, και με μία ασυνήθιστη Τοπο ΙΑ που αναφέρεται ως αντίστροφη γυράση. Με την ονομασία γυράση δίνεται έμφαση στην ικανότητα του ενζύμου να εισάγει αρνητικές υπερελικώσεις, ενώ στην περίπτωση της αντίστροφης γυράσης, δίνεται έμφαση στην ικανότητα του ενζύμου να εισάγει θετικές υπερελικώσεις (Forterre et al, 2009).

Υποοικογένεια	Αντιπροσωπευτικά μέλη
IA	Βακτηριακές DNA τοποϊσομεράσες I και III DNA τοποϊσομεράση III της ζύμης DNA τοποϊσομεράσες IIIα and IIIβ της <i>Drosophila melanogaster</i> DNA τοποϊσομεράσες IIIα and IIIβ των θηλαστικών
IB	Ευκαρυωτική DNA τοποϊσομεράση I Μιτοχονδριακή DNA τοποϊσομεράση I των θηλαστικών Τοποϊσομεράση του ιού Pox
IIA	Βακτηριακή γυράση, DNA τοποϊσομεράση IV DNA τοποϊσομεράση του φάγου T4 DNA τοποϊσομεράση II της ζύμης DNA τοποϊσομεράση II της <i>Drosophila melanogaster</i> DNA τοποϊσομεράσες IIα and IIβ των θηλαστικών
IIB	DNA τοποϊσομεράση VI του <i>Sulfolobus shibatae</i>

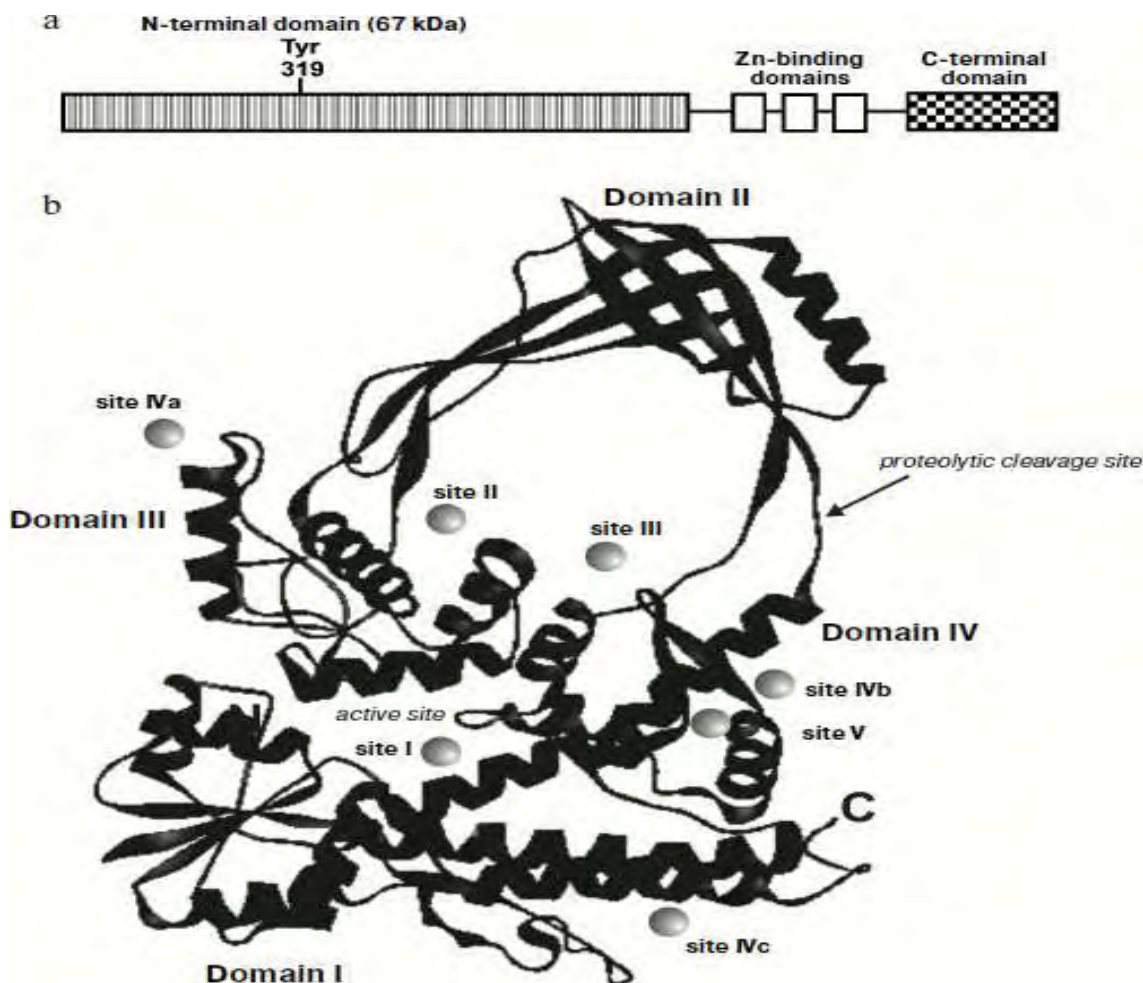
**Πίνακας 1:** Υποοικογένειες των DNA τοποϊσομερασών

## 1.1.2 DNA Τοποϊσομεράση I

### 1.1.2.1. Δομή της DNA τοποϊσομεράσης I.

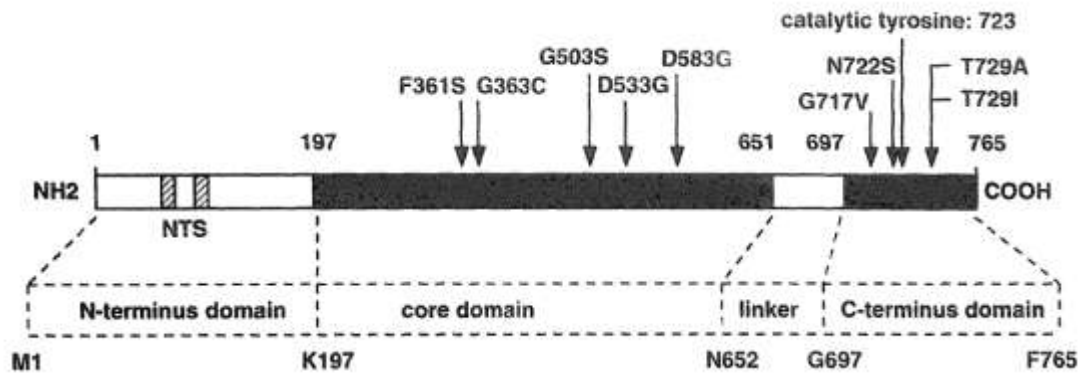
Η DNA τοποϊσομεράση I προκαλεί παροδικά μονόκλωνα σπασίματα στην αλυσίδα του DNA, μέσα από τα οποία περνούν άλλες αλυσίδες DNA. Με την δράση αυτή η τοποϊσομεράση χαλαρώνει το DNA, μια διαδικασία που είναι απαραίτητη σε σημαντικές διεργασίες όπως την αντιγραφή, μεταγραφή και συμπύκνωση της χρωματίνης.

Η τοποϊσομεράση I είναι μια μονομερής πρωτεΐνη μεγέθους 100 kDa και κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που χαρτογραφείται στη περιοχή 20q12-13.2. Το ένζυμο είναι κυρίως συγκεντρωμένο στον πυρηνίσκο και σχετίζεται με μεταγραφικά ενεργές περιοχές του γενόματος. Βρίσκεται επίσης στο πυρηνόπλασμα και δεν εμφανίζει διακυμάνσεις κατά την διάρκεια των φάσεων του κυτταρικού κύκλου (Cummings et al., 1993). Αποτελείται από τέσσερις δομικές περιοχές, οι οποίες διατάσσονται γύρω από μία κεντρική κοιλότητα διαμέτρου 20 Å<sup>0</sup>: μία α/β Rossmann-fold (περιοχή I), μία μικρή β-barrel (περιοχή II) και δύο περιοχές (III και IV), οι οποίες διπλώνονται με παρόμοιο τρόπο με την πρωτεΐνη (CAP) που βρέθηκε στην *E. coli*. Το κατάλοιπο τυροσίνης που είναι υπεύθυνο για την διάσπαση του DNA βρίσκεται στην περιοχή III (Εικόνα 1) (Berger et al., 1998).



**Εικόνα 1:** Δομή DNA τοποϊσομεράσης I. α. Οργάνωση δομής της τοποϊσομεράσης I β. Δομή του αμινοτελικού άκρου με ανάλυση ακτίνων X

Η τοποϊσομεράση I είναι οργανωμένη σε τέσσερις διαφορετικές περιοχές. Στη δομή της πρωτεΐνης διακρίνεται η αμινο-τελική περιοχή (N-terminus domain), η οποία είναι ευαίσθητη στην πρωτεόλυση και είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση του ενζύμου με άλλες πρωτεΐνες. Η πυρηνική περιοχή (core domain) περιλαμβάνει ένα τμήμα 54 kDa, το οποίο είναι ανθεκτικό στην πρωτεόλυση και είναι ικανό να συνδέεται σε υπερελικωμένο DNA. Η συνδετική περιοχή (linker domain), η οποία είναι μικρή, είναι θετικά φορτισμένη και η απαλοιφή της δεν επηρεάζει την δράση του ενζύμου. Η καρβοξυ-τελική περιοχή (C terminus domain) περιέχει την καταλυτική τυροσίνη στη θέση 723, τα κατάλοιπα γλυκίνης στις θέσεις 713 έως 717, τα οποία εμπλέκονται στην κατάλυση αλλά όχι στην σύνδεση με την πυρηνική περιοχή, ενώ τα τελευταία 5 κατάλοιπα της περιοχής είναι σημαντικά για το διμερισμό με την πυρηνική περιοχή (Pommier, 1998).



**Εικόνα 2:** Οργάνωση των περιοχών της τοποϊσομεράσης I

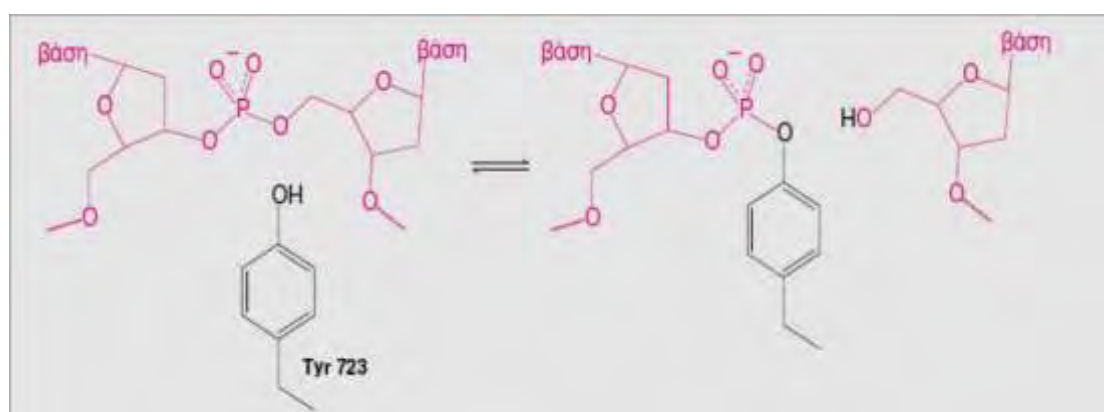
Τα μέλη της οικογένειας των τοποϊσομεράσες τύπου IA εμφανίζουν μεγάλη ομολογία σε βακτήρια, αρχαία και ευκαρυώτες, γεγονός που υποδηλώνει ομοιότητες στη δομή αλλά και στον τρόπο δράσης τους (Corbett et al, 2004). Τα ένζυμα τύπου IA έχουν τυπικά μοριακό βάρος 67 kDa και διαθέτουν μία χαρακτηριστική δακτυλιοειδή δομή η οποία συγκροτείται από τέσσερις διακριτές επικράτειες. Η δομή αυτή ανακαλύφθηκε αρχικά στην Topo I του βακτηρίου *E.coli* (Lima et al, 1994).

Οι τοποϊσομεράσες τύπου IB έχουν ταυτοποιηθεί σε ευκαρυώτες, ιούς και βακτήρια αλλά όχι σε αρχαία. Οι ευκαρυωτικές Topo IB είναι μεγάλες πρωτεΐνες με μοριακό βάρος περίπου 90 kDa, ενώ στα βακτήρια και στους ιούς έχουν μέσο μοριακό βάρος 36 kDa. Παρά τις διαφορές τους στο μέγεθος όλα τα ένζυμα τύπου IB διαθέτουν παρόμοιες δομές γύρω από τις ενεργές τους περιοχές και έχουν όμοιο τρόπο δράσης (Corbett et al, 2004). Συγκεκριμένα, όλες οι τοποϊσομεράσες τύπου IB περιέχουν μία εξαιρετικά συντηρημένη πεντάδα καταλοίπων (τυροσίνη, αργινίνη, αργινίνη, λυσίνη και ιστιδίνη/ασπαραγίνη) τα οποία σχηματίζουν με πανομοιότυπο τρόπο την ενεργή περιοχή του ενζύμου. Στις ευκαρυωτικές τοποϊσομεράσες τύπου IB, ο πυρήνας του ενζύμου (core domain) και η καρβοξυτελική περιοχή σχηματίζουν ένα πλήρως λειτουργικό ένζυμο (Stewart et al, 1996). Οι δύο αυτές επικράτειες συνδέονται μέσω της περιοχής συνδέτη (linker region) η οποία αποτελείται από δύο μεγάλες έλικες (Εικόνα 2). Η καρβοξυτελική περιοχή μάλιστα περιέχει το καταλυτικό και συντηρημένο κατάλοιπο τυροσίνης, ενώ τα υπόλοιπα συντηρημένα αμινοξέα της πεντάδας βρίσκονται στον πυρήνα (Baker et al., 2009).



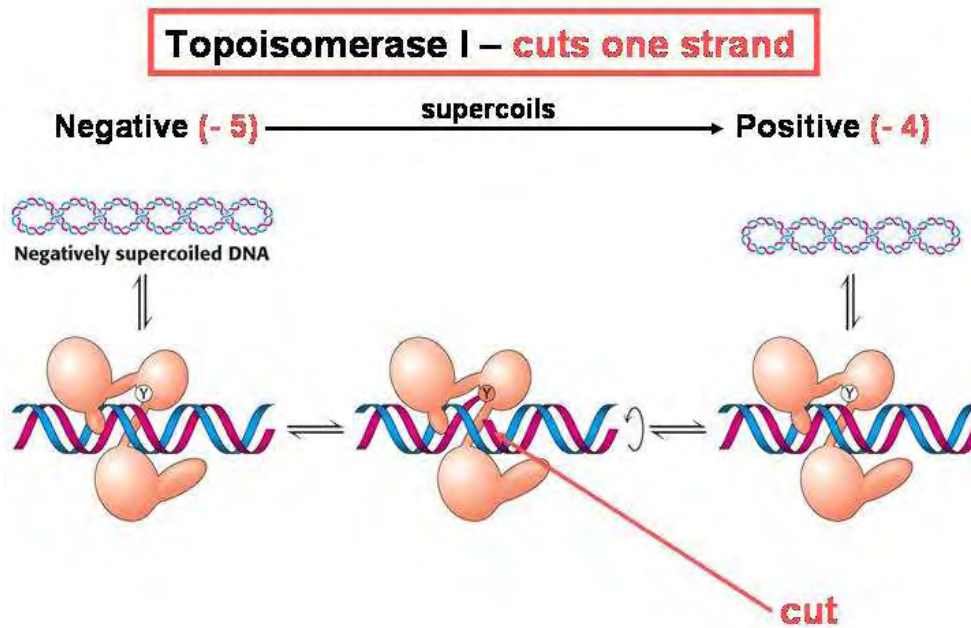
### 1.1.2.2 Δράση της DNA τοποϊσομεράσης I.

Η χαλάρωση αρνητικά υπερελικωμένων μορίων DNA ακολουθεί την πορεία που απεικονίζεται στις Εικόνες 3 και 4. Αρχικά, το μόριο του DNA προσδένεται στο εσωτερικό της κοιλότητας της τοποϊσομεράσης. Κατόπιν, η υδροξυλική ομάδα της τυροσίνης 723 προσβάλλει μια φωσφορική ομάδα στον ένα κλώνο του κορμού του DNA για να σχηματίσει έναν φωσφοδιεστερικό σύνδεσμο μεταξύ του ενζύμου και του DNA, διασπώντας στη συνέχεια το DNA και ελευθερώνοντας μια ελεύθερη 5'-υδροξυλική ομάδα.



**Εικόνα 3:** Καταλυτική δράση της τυροσίνης 723

Με τη διάσπαση του κορμού του ενός κλώνου, το DNA μπορεί τώρα να περιστραφεί γύρω από τον κλώνο που δεν έχει διασπαστεί, ωθούμενο από την ελευθέρωση της ενέργειας που είχε αποθηκευθεί με την υπερελίκωση. Η περιστροφή του DNA ξετυλίγει τα υπερελικωμένα τμήματα. Το ένζυμο ελέγχει το ξετύλιγμα ώστε να μην γίνεται γρήγορα. Η ελεύθερη υδροξυλική ομάδα του DNA προσβάλλει το κατάλοιπο της φωσφοτυροσίνης ανασυνδέοντας τον κομμένο κλώνο και ελευθερώνοντας την τυροσίνη. Το DNA είναι τότε ελεύθερο να αποσυνδεθεί από το ένζυμο. Με τον τρόπο αυτό, η αντιστρεπτή διάσπαση του ενός κλώνου του DNA επιτρέπει ελεγχόμενη περιστροφή για τη μερική χαλάρωση του υπερελικωμένου DNA (Βιοχημεία II, 2005) (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4:** Μηχανισμός δράσης της τοποϊσομεράσης I. Με τη δέσμευσή της στο DNA η τοποϊσομεράση I διασπά τον ένα κλώνο μέσω ενός καταλοίπου τυροσίνης (Y) προσβάλλοντας ένα φωσφορικό. Μόλις διασπαστεί ο κλώνος, περιστρέφεται κατά έναν ελεγχόμενο τρόπο γύρω από τον κλώνο που δεν έχει διασπαστεί. Η αντίδραση συμπληρώνεται με την επανασύνδεση του κλώνου που έχει διασπαστεί. Η διεργασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη μερική ή πλήρη χαλάρωση ενός υπερελικωμένου πλασμιδίου.

Οι δύο υποοικογένειες της τοποϊσομεράσης I, IA και IB, δρουν με διαφορετικό μηχανισμό (Leppard et al., 2005).

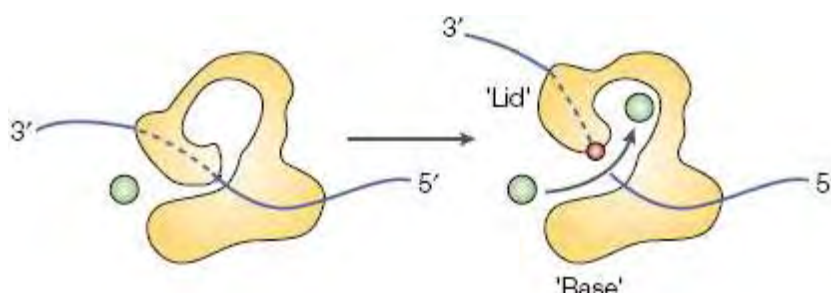
#### Υποοικογένεια IA

Η αφαίρεση αρνητικών υπερελικώσεων από την τοποϊσομεράση IA προϋποθέτει το τοπικό ξετύλιγμα της διπλής έλικας του DNA, προκειμένου να μπορέσει το ένζυμο να προκαλέσει ρήγμα στη μια αλυσίδα του DNA. Η ικανότητα του ενζύμου να ξετυλίγει το δίκλωνο DNA μειώνεται όσο λιγότερο αρνητικά υπερελικωμένο είναι το DNA, γι' αυτό και η ικανότητα του ενζύμου μειώνεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Η τοποϊσομεράση IA μπορεί να δράσει και σε θετικά υπερελικωμένο DNA, εφόσον προϋπάρχει μια μονόκλωνη περιοχή. Επιπρόσθετα, η τοποϊσομεράση IA είναι ικανή να καταλύει το πέρασμα μιας διπλής έλικας DNA μέσα από μια άλλη, αν η μια

αλυσίδα περιέχει μια εγκοπή ή κενό, προκαλώντας μια προσωρινή θραύση απέναντι από το σημείο εγκοπής.

Οι τοποϊσομεράσες τύπου ΙΑ φαίνεται να καταλύουν το πέρασμα της αλυσίδας του DNA μέσω ενός μηχανισμού “γέφυρας”, κατά το οποίο τα άκρα του DNA, που δημιουργούνται από τη δράση της τοποϊσομεράσης ΙΑ, συνδέονται κατά κάποιο τρόπο μεταξύ τους, καθώς το ένζυμο δημιουργεί μια γέφυρα ανάμεσα τους. Με αυτόν τον τρόπο οι κινήσεις του συμπλόκου, το οποίο σχηματίζεται από το ένζυμο και τα άκρα του DNA, μεσολαβούν στο άνοιγμα και κλείσιμο της πύλης και το πέρασμα της αλυσίδας του DNA από αυτήν. Κατά το παροδικό σπάσιμο της DNA αλυσίδας από την τοποϊσομεράση ΙΑ το 5' άκρο της σπασμένης DNA αλυσίδας είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο στην ενεργή περιοχή της τυροσίνης και το 3' άκρο είναι μη ομοιοπολικά συνδεδεμένο στη βάση (base) του ενζύμου.

Απομακρύνοντας την καμπί (lid) ανοίγει η πύλη στο DNA για το πέρασμα της άλλης αλυσίδας (Εικόνα 5). Η δεύτερη αλυσίδα πρέπει να περάσει από την κεντρική κοιλότητα του ενζύμου πριν την επανασύνδεση της σπασμένης αλυσίδας (Wang et al, 2002).

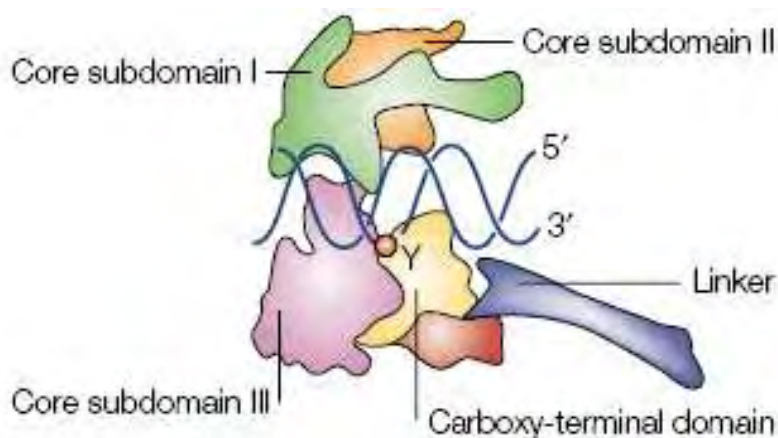


**Εικόνα 5:**Πρότυπο δράσης της τοποϊσομεράσης ΙΑ

### Υποοικογένεια IB

Οι τοποϊσομεράσες IB είναι ικανές να αφαιρούν τόσο θετικές όσο και αρνητικές υπερελικώσεις από το DNA. Έχει βρεθεί ότι ο τρόπος δράσης τους αφορά ένα μηχανισμό περιστροφής της αλυσίδας του DNA και όχι μηχανισμό γεφύρωσης, όπως συμβαίνει με τις τοποϊσομεράσες τύπου ΙΑ. Όταν η τοποϊσομεράση IB προκαλεί κάποιο ρήγμα στη μια αλυσίδα του δίκλωνου DNA χωρίζει το DNA σε δύο τμήματα και μόνο το τμήμα το οποίο βρίσκεται ανοδικά από το σημείο εγκοπής (3' άκρο), είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με το ένζυμο. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του δίκλωνου τμήματος του DNA, που βρίσκεται καθοδικά από το σημείο εγκοπής και

του ενζύμου είναι κυρίως ιονικής φύσης και γι' αυτό το λόγο τα τμήματα αυτά έχουν την δυνατότητα να περιστραφούν (Εικόνα 6). Η περιστροφή αυτή επιτρέπει πολλαπλά περάσματα αλυσίδων για κάθε κύκλο πρόκλησης ρήγματος και επανένωσης των αλυσίδων του DNA (Wang et al, 2002). Με το μηχανισμό της περιστροφής η τοποϊσομεράση αφαιρεί τις υπερελικώσεις ταχύτατα, χωρίς να υπάρχει καθυστέρηση στη διαδικασία της αντιγραφής ή της μεταγραφής.



**Εικόνα 6:** Πρότυπο δράσης της τοποϊσομεράσης IB

### 1.1.2.3. Βιολογικές λειτουργίες της DNA Τοποϊσομεράσης I

Η ικανότητα της τοποϊσομεράσης να ελέγχει τις υπερελικώσεις είναι πολύ σημαντική για τα κύτταρα ιδιαίτερα σε διεργασίες μεταβολισμού του DNA, όπως αυτές της αντιγραφής, της μεταγραφής και του ανασυνδυασμού του DNA. Κατά τη διάρκεια της αντιγραφής, καθώς εξελίσσεται το ξετύλιγμα του DNA, θετικές υπερελικώσεις συσσωρεύονται στο τμήμα του DNA που δεν έχει αντιγραφεί. Απουσία της τοποϊσομεράσης I η διχάλα της αντιγραφής θα παγιδευόταν, εξαιτίας της αλλαγής της διαμόρφωσης του DNA, γεγονός που θα οδηγούσε στην καθυστέρηση ή ακόμα και στη διακοπή της αντιγραφής.

Επιπλέον έχει βρεθεί ότι η τοποϊσομεράση I συμμετέχει και στη μεταγραφή, κατά την οποία συνδέεται σε τμήματα του DNA τα οποία είναι ενεργά, όπως τα γονίδια της RNA πολυμεράσης I και II και το γονίδιο c-fos, και αφαιρεί τις υπερελικώσεις που δημιουργούνται. Έχει βρεθεί μάλιστα ότι η τοποϊσομεράση I αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη TBP (TATA binding protein) και συμμετέχει στην έναρξη της μεταγραφής. Συνεπώς η τοποϊσομεράση I καταστέλλει τη μεταγραφή απουσία ενός ενεργοποιητή, ενώ την προωθεί παρουσία ενός ενεργοποιητή σε γονίδια τα οποία περιέχουν την αλληλουχία TATA.

Η δραστικότητα της τοποϊσομεράσης I είναι σημαντική στη διαδικασία ανασυνδυασμού του DNA, καθώς έχει δείχθει ότι η τοποϊσομεράση I μπορεί να προκαλέσει μη ομόλογο ανασυνδυασμό ανάμεσα σε εξωγενές DNA και το σύμπλοκο ενζύμου-DNA, ενώ είναι ικανή να δημιουργεί και να λύνει τις δομές Holiday, οι οποίες δημιουργούνται κατά τον ανασυνδυασμό του DNA (Pommier et al., 1998).

### **1.1.3 DNA τοποϊσομεράση II**

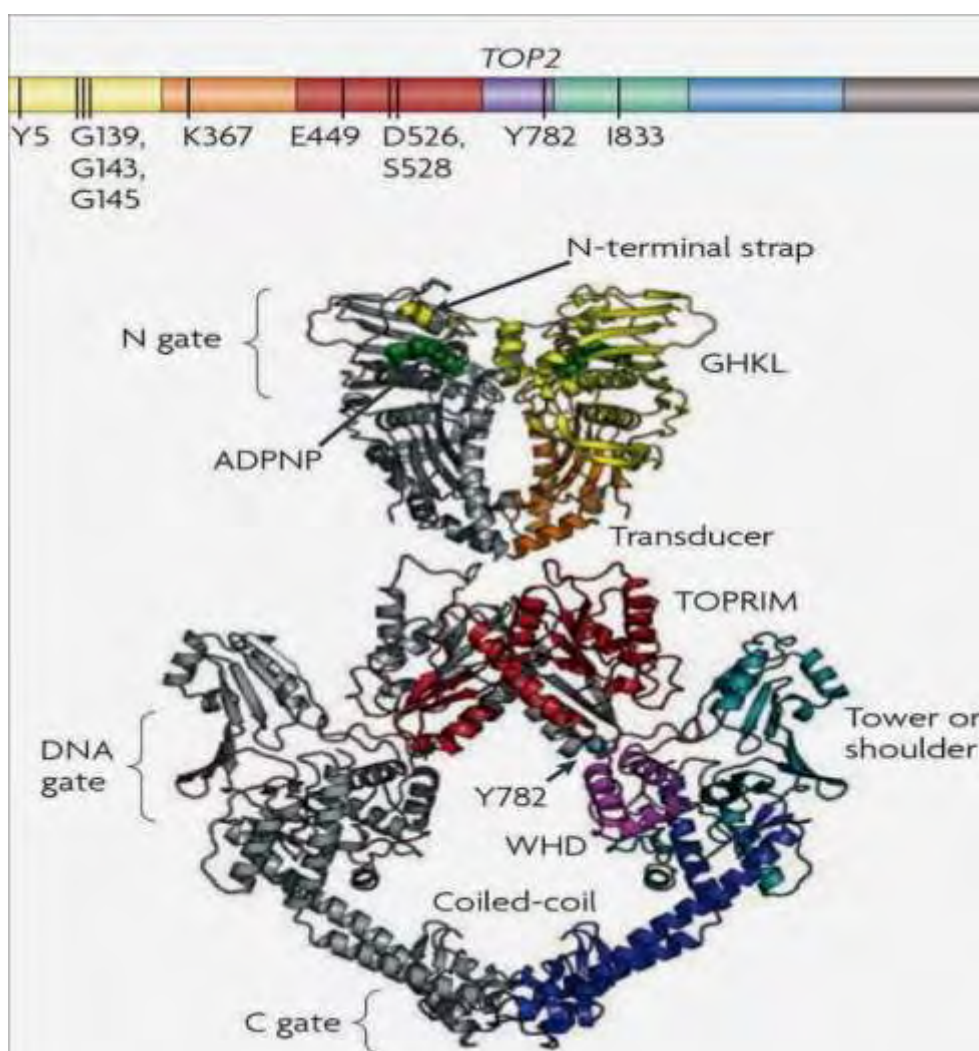
#### **1.1.3.1 Δομή της DNA τοποϊσομεράσης II**

Η τοποϊσομεράση II είναι ένα υψηλά συντηρημένο ένζυμο και αποτελεί αποτέλεσμα της συγχώνευσης των A- και B-υπομονάδων της βακτηριακής DNA γυράσης. Έχει μία A<sub>2</sub> διμερή δομή, ενώ το βακτηριακό ένζυμο έχει μία A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> τετραμερή διάταξη (Benedetti et al., 1999). Το ένζυμο διαθέτει μια περιοχή σύνδεσης στο DNA, που είναι διμερής, και μία περιοχή σύνδεσης του ATP στο αμινοτελικό άκρο (Berger et al., 1998), η οποία περιλαμβάνει μια GHKL πύκνωση που συναντάται σε ποικίλες ATPάσες (Nitiss et al. 2009). Η τοποϊσομεράση II διαθέτει δράση ATPάσης, η οποία είναι απαραίτητη για την πλήρη ενζυμική δραστικότητα (Berger et al., 1998). Το καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης δεν είναι συντηρημένο μεταξύ των τοποϊσομερασών II διαφορετικών ειδών, ούτε μεταξύ των ισομορφών α και β. Πιθανόν, το καρβοξυ-τελικό άκρο να είναι απαραίτητο για τον πυρηνικό εντοπισμό, τη ρύθμιση της δραστικότητας και για τις αλληλεπιδράσεις του ενζύμου με άλλα πρωτεϊνικά μόρια. Το καρβοξυ-τελικό άκρο της ATPάσης καταλήγει στην περιοχή μετατροπέα (transducer), η οποία είναι σημαντική για την σύνδεση και υδρόλυση του ATP. Μία ακόμα σημαντική περιοχή του μορίου είναι η TOPRIM, η οποία τοποθετείται μακριά από τη θέση της ενεργής τυροσίνης και συμμετέχει στη διάσπαση του DNA. Όμως κατά τη διάρκεια της διάσπασης και επανασύνδεσης, η περιοχή TOPRIM και η τυροσίνη του ενεργού κέντρου έρχονται κοντά και αλληλεπιδρούν. Η τυροσίνη του ενεργού κέντρου αποτελεί μέρος μίας περιοχής που είναι όμοια με την καταβολική ενεργή πρωτεΐνη (CAP-like domain). Δίπλα στην τυροσίνη του ενεργού κέντρου βρίσκεται μία περιοχή «πύργος» η οποία οδηγεί σε μια μακριά υπερελίκωση (coiled coil), που καταλήγει στην διασύνδεση των υπομονάδων του διμερούς (Εικόνα 7) (Nitiss, 2009).

Οι δύο ισομορφές του ενζύμου έχουν βρεθεί σε σπονδυλωτά, αλλά όχι σε κατώτερους ευκαρυώτες. Η α μορφή είναι μία ομοδιμερής πρωτεΐνη 170 kDa, κωδικοποιείται από ένα αντίγραφο ενός γονιδίου που βρίσκεται στο χρωμόσωμα



17q21-22 και εντοπίζεται στο πυρηνόπλασμα. Η β μορφή έχει μοριακό βάρος 180 kDa, έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 3p24 και εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρηνίσκο (Cummings et al., 1993). Η β μορφή έχει βρεθεί ότι υποβάλλεται σε εναλλακτικό μάτισμα. Το μεγαλύτερο σε μήκος, αλλά λιγότερο άφθονο ΙΙβ-2 mRNA κωδικοποιεί πέντε επιπλέον αμινοξέα (Thr-Leu-Phe-Asp-Gln) μετά την Val-23, τα οποία ματίζονται και προκύπτει το mRNA ΙΙβ-1, το οποίο έχει μικρότερο μήκος και είναι πιο άφθονο. Το κομμάτι το οποίο απομακρύνεται δεν φαίνεται να επηρεάζει την δραστηριότητα του ενζύμου, αλλά είναι άγνωστο αν η παρουσία ή η απουσία του πεπτιδίου επιδρά στην κυτταρική τοπολογία του ενζύμου ή στην αλληλεπίδραση του με άλλα κυτταρικά μόρια (Wang, 1996).



**Εικόνα 7:** Δομή της DNA τοποϊσομεράσης II

### 1.1.3.2 Δράση της DNA τοποϊσομεράσης II

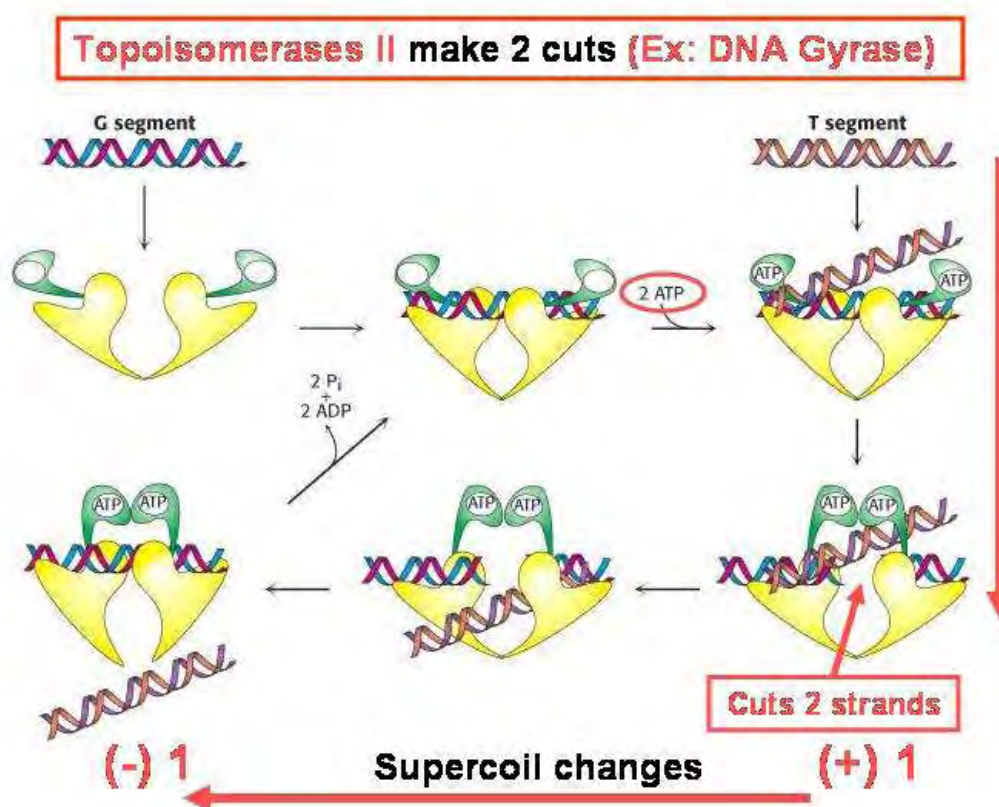
Η τοποϊσομεράση II αλλάζει τον αριθμό συνδέσεων του DNA και χωρίζεται σε δύο κατηγορίες την τοποϊσομεράση IIα και IIβ. Σε αντίθεση με την τοποϊσομεράση I, η τοποϊσομεράση II προκαλεί ρήξη και στους δύο κλώνους του DNA και καταλύει το πέρασμα ενός άλλου δίκλωνου τμήματος DNA μέσα από το σημείο εγκοπής. Η ιδιότητα της τοποϊσομεράσης II να προκαλεί δίκλωνες ρήξεις στο DNA την καθιστά ικανή να συμμετέχει σε πολυπλοκότερες διεργασίες, όπου συμμετέχουν τμήματα DNA τα οποία μπορεί να είναι είτε γραμμικά είτε κυκλικά (Cummins et al., 1993). Οι τοποϊσομεράσες τύπου II διαθέτουν παρόμοιο μηχανισμό δράσης παρά το γεγονός ότι εμφανίζουν αρκετές δομικές διαφορές.

Ένα υπερσπειρωμένο μόριο, σε αντίθεση με το χαλαρό τοποϊσομερές του, είναι πεισμένο με ροπή στρέψης. Επομένως η υπερσπείρωση απαιτεί την κατανάλωση ενέργειας. Οι τοποϊσομεράσες τύπου II συνδέουν τη δέσμευση και υδρόλυση του ATP με το κατευθυνόμενο πέρασμα μιας διπλής έλικας DNA μέσα από μια άλλη η οποία έχει διασπαστεί προσωρινά. Τα ένζυμα αυτά έχουν μερικά κοινά χαρακτηριστικά με τις τοποϊσομεράσες τύπου I.

Η τοποϊσομεράση τύπου II των ζυμομυκήτων είναι ένα διμερές σχήματος καρδιάς με μια μεγάλη κεντρική κοιλότητα. Η κοιλότητα αυτή έχει πύλες τόσο στην κορυφή όσο και στη βάση της, οι οποίες είναι κρίσιμες για τη δράση της τοποϊσομεράσης. Η αντίδραση αρχίζει με τη δέσμευση μιας διπλής έλικας (που στο εξής θα αναφέρεται ως τμήμα G, από το gate = πύλη) στο ένζυμο (Εικόνα 8). Ο κάθε κλώνος τοποθετείται δίπλα από ένα κατάλοιπο τυροσίνης, ένα από κάθε μονομερές, ικανό να σχηματίζει μια ομοιοπολική σύνδεση με τον κορμό του DNA. Το σύμπλοκο αυτό στη συνέχεια συνδέει χαλαρά μια δεύτερη διπλή έλικα DNA (που στο εξής θα αναφέρεται ως τμήμα T, από το transported = μεταφερόμενο). Κάθε μονομερές του ενζύμου έχει μια δομική περιοχή που δεσμεύει ATP, η δέσμευση της οποίας οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιάταξης που ευνοεί το πλησίασμα των δύο δομικών περιοχών. Καθώς οι δύο αυτές περιοχές προσεγγίζουν η μία την άλλη, εγκλωβίζουν το δεσμευμένο τμήμα T. Η αλλαγή της στερεοδιάταξης επιβάλλει επίσης τον διαχωρισμό και τη διάσπαση των δύο κλώνων του τμήματος G. Κάθε κλώνος συνδέεται με το ένζυμο διά μέσου ενός συνδέσμου. Σε αντίθεση με τα ένζυμα τύπου I, οι τοποϊσομεράσες τύπου II δεσμεύουν το DNA σφιχτά έτσι ώστε να μην μπορεί να περιστρέφεται. Τότε το τμήμα T περνά διαμέσου του διασπασμένου τμήματος G στη μεγάλη κεντρική κοιλότητα. Η επανασύνδεση του τμήματος G οδηγεί στην

ελευθέρωση του τμήματος T μέσω της πύλης στη βάση του ενζύμου. Η υδρόλυση της ATP και η ελευθέρωση της ADP και του ορθοφωσφορικού επιτρέπουν στις δομικές περιοχές δέσμησης ATP να χωρίζουν, προετοιμάζοντας το ένζυμο να δεσμεύσει ένα άλλο τμήμα T. Η όλη διεργασία οδηγεί σε μείωση του αριθμού συνδέσεων κατά δύο μονάδες.

Επομένως, ο βαθμός υπερελίκωσης του DNA καθορίζεται από τις αντίθετες δράσεις δύο ενζύμων. Αρνητικά υπερελικομένα τμήματα εισάγονται από την τοποϊσομεράση II και χαλαρώνουν από την τοποϊσομεράση I. Οι ποσότητες των ενζύμων αυτών και οι δραστηρότητές τους ρυθμίζονται για τη διατήρηση ενός κατάλληλου βαθμού αρνητικής υπερελίκωσης (Βιοχημεία II, 2005).



*Εικόνα 8: Μηχανισμός της DNA τοποϊσομεράσης II*

### 1.1.3.3 Βιολογικές λειτουργίες της DNA Τοποϊσομεράσης II

Ένας σημαντικός ρόλος των DNA τοποϊσομερασών είναι η επίλυση τοπολογικών προβλημάτων στο DNA, τα οποία δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της αντιγραφής. Απουσία της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης το ξετύλιγμα της μητρικής αλυσίδας



του DNA οδηγεί στη συσσώρευση θετικών υπερελικώσεων στο τμήμα του DNA που βρίσκεται καθοδικά από την διχάλα αντιγραφής. Αυτές οι θετικές υπερελικώσεις που δημιουργούνται είναι δυνατόν να αφαιρεθούν τόσο από την τοποϊσομεράση I όσο και από την τοποϊσομεράση II. Η δράση της τοποϊσομεράσης II ωστόσο είναι απαραίτητη στην περίπτωση που υπάρχουν δύο διχάλες αντιγραφής, οι οποίες συναντώνται κατά την εξέλιξη της διαδικασίας της αντιγραφής.

Η τοποϊσομεράση II συμμετέχει και στη διαδικασία της μεταγραφής. Η RNA πολυμεράση γλιστρώντας πάνω στο DNA δημιουργεί θετικές υπερελικώσεις καθοδικά από το σύμπλοκο μεταγραφής και αρνητικές υπερελικώσεις ανοδικά από το σημείο δράσης της. Είναι επομένως κατανοητό ότι η παρουσία της τοποϊσομεράσης II είναι απαραίτητη για την επιμήκυνση της μεταγραφής. Έχειδειχθεί ότι η τοποϊσομεράση IIβ αλληλεπιδρά με τους υποκινητές ως μέρος ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου και ότι η ενεργότητα του ενζύμου απαιτείται για την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι το σύμπλοκο πρωτεϊνών που αλληλεπιδρά με τους υποκινητές περιλαμβάνει επιδιορθωτικά ένζυμα, τα οποία δεν φαίνεται να συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του ρήγματος που προκαλείται από την τοποϊσομεράση IIβ.

Σημαντική είναι η δραστηριότητα της τοποϊσομεράσης II για τη διατήρηση της δομής των χρωμοσωμάτων, καθώς και για τη συμπύκνωση της χρωματίνης. Έχει ταυτοποιηθεί ένα χρωμοσωμικό σύμπλεγμα που περιλαμβάνει την τοποϊσομεράση IIα και ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο συμπύκνωσης, το οποίο είναι σημαντικό για την ένωση και το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων (Nitiss et al., 2009).

Η συμμετοχή της τοποϊσομεράσης II στη συμπύκνωση της χρωματίνης είναι σημαντική εφόσον κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εμφανίζονται τοπολογικές αλλαγές στο DNA, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν στη δημιουργία υπερελικώσεων στην αλυσίδα του DNA. Πειράματα σε *Drosophila* και κύτταρα θηλαστικών έχουν δείξει ότι η αναστολή του ενζύμου αναστέλλει το τελικό στάδιο της συμπύκνωσης του χρωμοσώματος. Τα κύτταρα που εισέρχονται στον κυτταρικό κύκλο στα οποία δεν έχει ολοκληρωθεί η συμπύκνωση και ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων εμφανίζουν πολυπλοειδία και οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο (Wang, 1996).

## **1.2 Αναστολείς τοποϊσομερασών**

Οι τοποϊσομεράσες είναι ένζυμα ικανά να αλλάζουν την τοπολογία του DNA με αποτέλεσμα να συμμετέχουν σε πολλές διεργασίες που αφορούν το μεταβολισμό του

DNA, όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή, ο ανασυνδυασμός του DNA και η συμπίκνωση της χρωματίνης (Webb et al., 2003). Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες η πιθανότητα εμφάνισης μεταλλάξεων, παρεμβολών, ελλείψεων και χρωμοσωμικών ανωμαλιών είναι δυνατόν να αυξάνεται με αποτέλεσμα τη δημιουργία σοβαρών βλαβών στο DNA, που πιθανότατα να οδηγήσουν στην εμφάνιση καρκίνου. Έχει βρεθεί ότι στα καρκινικά κύτταρα οι τοποϊσομεράσες βρίσκονται σε αυξημένα επίπεδα, καθώς τα κύτταρα αυτά πολλαπλασιάζονται με γρήγορους ρυθμούς. Με βάση το γεγονός ότι οι τοποϊσομεράσες αποτελούν σημαντικά ένζυμα για την αντιγραφή και τη σταθερότητα του γενετικού υλικού έχουν αποτελέσει στόχο για την ανακάλυψη και τον σχεδιασμό αντικαρκινικών φαρμάκων. Συνεπώς οι παράγοντες που αναστέλλουν τη δράση τόσο της τοποϊσομεράσης I όσο και της τοποϊσομεράσης II έχουν καθιερωθεί ως σημαντικοί αντικαρκινικοί παράγοντες (Froelich-Ammon et al., 1995).

Η αναστολή των τοποϊσομερασών μπορεί να επιτευχθεί με δύο διαφορετικούς τρόπους, με αποτέλεσμα οι αναστολείς των ενζύμων να χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τους αναστολείς τάξης I και αναστολείς τάξης II. Οι αναστολείς τάξης I ή αναστολείς δηλητήρια (poison) συνδέονται στο σύμπλοκο ενζύμου-DNA και το σταθεροποιούν, με αποτέλεσμα να εμποδίζουν την επανένωση των αλυσίδων του DNA. Οι αναστολείς τάξης II ή καταλυτικοί αναστολείς μπορούν να συνδεθούν είτε στο ένζυμο είτε στο DNA, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η σύνδεση της τοποϊσομεράσης στο DNA (Chowdhury et al., 2002).

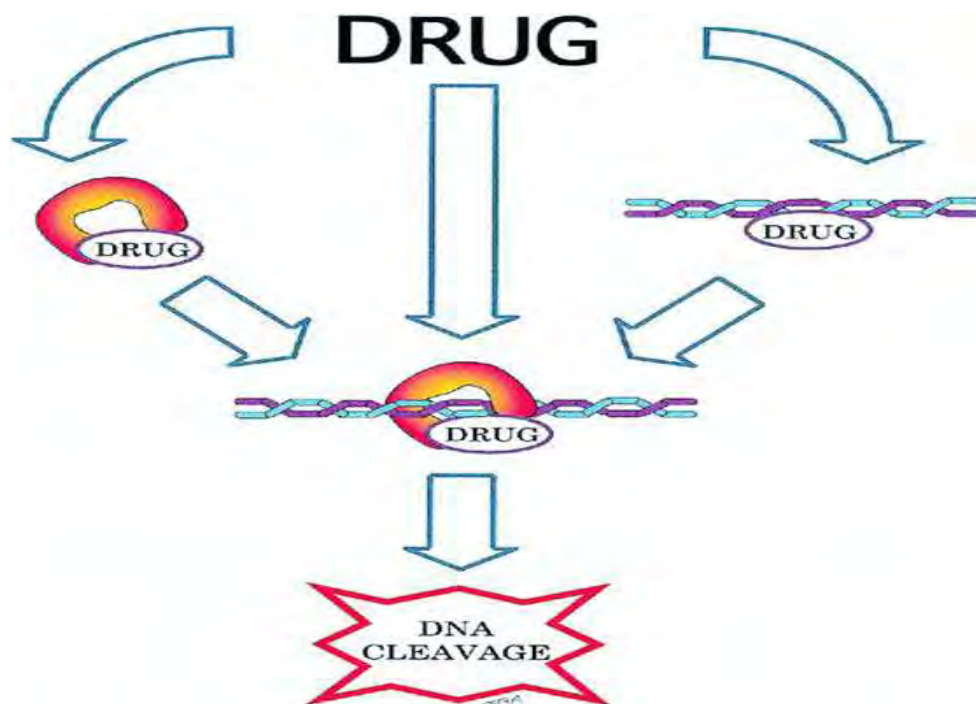
Οι αναστολείς που δρουν ως δηλητήρια (poison) χρησιμοποιούν δύο διαφορετικούς μηχανισμούς με τους οποίους καταστέλλουν την ενεργότητα των ενζύμων. Οι αναστολείς της τοποϊσομεράσης I σταθεροποιούν ένα ομοιοπολικό δεσμό ανάμεσα σε ένα κατάλοιπο τυροσίνης του ενζύμου και το 5' άκρο της αλυσίδας του DNA, ενώ οι αναστολείς της τοποϊσομεράσης II σταθεροποιούν ένα ομοιοπολικό δεσμό ανάμεσα στην τυροσίνη του ενζύμου και το 3' άκρο της αλυσίδας του DNA (Cummings et al., 1993).

Οι αναστολείς-δηλητήρια των τοποϊσομερασών αν και σε υψηλές συγκεντρώσεις αναστέλλουν τις ενζυμικές δραστηριότητες (όπως για παράδειγμα την υδρόλυση του ATP και το πέραςμα της αλυσίδας), πρέπει να διαφοροποιούνται από τους καταλυτικούς αναστολείς της τοποϊσομεράσης, οι οποίοι δρουν μπλοκάροντας την συνολική καταλυτική δραστηριότητα. Η διάκριση ανάμεσα στις δύο αυτές κατηγορίες αναστολέων βασίζεται σε κυτταροτοξικά κριτήρια. Τα υψηλά επίπεδα

τοποϊσομεράσης καθιστούν τα κύτταρα ευαίσθητα στους αναστολείς δηλητήρια και ανθεκτικά στους καταλυτικούς αναστολείς, ενώ τα χαμηλά επίπεδα του ενζύμου καθιστούν τα κύτταρα ανθεκτικά στους αναστολείς δηλητήρια, αλλά ευαίσθητα στους καταλυτικούς αναστολείς. Μάλιστα όσο πιο υψηλή είναι η συγκέντρωση του ενζύμου, τόσο πιο ισχυρή και θανατηφόρα η δράση των μορίων που ανήκουν στους αναστολείς δηλητήρια (Froelich-Ammon et al., 1995).

Το σύμπλοκο τοποϊσομεράσης-DNA-αναστολέα μπορεί να σχηματιστεί με τρεις διαφορετικούς τρόπους. Το φάρμακο είτε συνδέεται πρώτα στην τοποϊσομεράση και μετά δημιουργείται το σύμπλοκο με το DNA, είτε συνδέεται στο DNA και μετά δημιουργείται το σύμπλοκο με την τοποϊσομεράση. Εναλλακτικά, δημιουργείται πρώτα το σύμπλοκο τοποϊσομεράσης-DNA και κατόπιν συνδέεται το φάρμακο (Εικόνα 9) (Froelich-Ammon et al., 1995).

Στη θεραπεία κατά του καρκίνου χρησιμοποιούνται φάρμακα που στοχεύουν τόσο στην τοποϊσομεράση I όσο και στην τοποϊσομεράση II. Ωστόσο κάθε είδος φαρμάκου χρησιμοποιείται για διαφορετικούς τύπους καρκίνου, ανάλογα με την τοποϊσομεράση που στοχεύει και τον τρόπο δράσης του. Για παράδειγμα τα φάρμακα που στοχεύουν στην τοποϊσομεράση I, όπως η καμπτοθεκίνη και η τοποτεκάνη, είναι αποτελεσματικά απέναντι σε αργά αναπτυσσόμενους όγκους, στους οποίους η ποσότητα της τοποϊσομεράσης I είναι παρόμοια με αυτή που εκφράζεται στους πιο γρήγορα αναπτυσσόμενους όγκους. Αντίθετα φάρμακα που στοχεύουν στην τοποϊσομεράση II, όπως η ετοποσίδη και η τενιποσίδη, είναι χρήσιμα για γρήγορα αναπτυσσόμενους όγκους, οι οποίοι εκφράζουν μεγάλες ποσότητες του ενζύμου (Constantinou et al., 1995).



**Εικόνα 9:** Σχηματισμός του συμπλόκου τοποϊσομεράσης- φάρμακου – DNA.

## 1.2.1 Αναστολείς της τοποϊσομεράσης I

### 1.2.1.1 Αναστολείς δηλητήρια (poisons) της DNA τοποϊσομεράσης I

Αναστολείς της τοποϊσομεράσης I είναι η καμπτοθεκίνη (CPT) και τα παράγωγά της (Εικόνα 10). Είναι ένα φυσικό αλκαλοειδές που απομονώθηκε για πρώτη φορά στο κινέζικο δέντρο *Camptotheca acuminata*. Η καμπτοθεκίνη και πιο συγκεκριμένα το φυτικό ισομερές της ένωσης αυτής αποδείχθηκε ότι μπορεί να δράσει ως αναστολέας δηλητήριο της τοποϊσομεράσης I. Επιπλέον μελέτες έδειξαν ότι γενετικά τροποποιημένες ζύμες στις οποίες έχει γίνει αποσιώπηση του γονιδίου της τοποϊσομεράσης I είναι ανθεκτικές στην καμπτοθεκίνη, αλλά και κύτταρα με ανθεκτικότητα στην ένωση αυτή εμφανίζουν μεταλλάξεις στο ίδιο γονίδιο (Pommier, 2009).

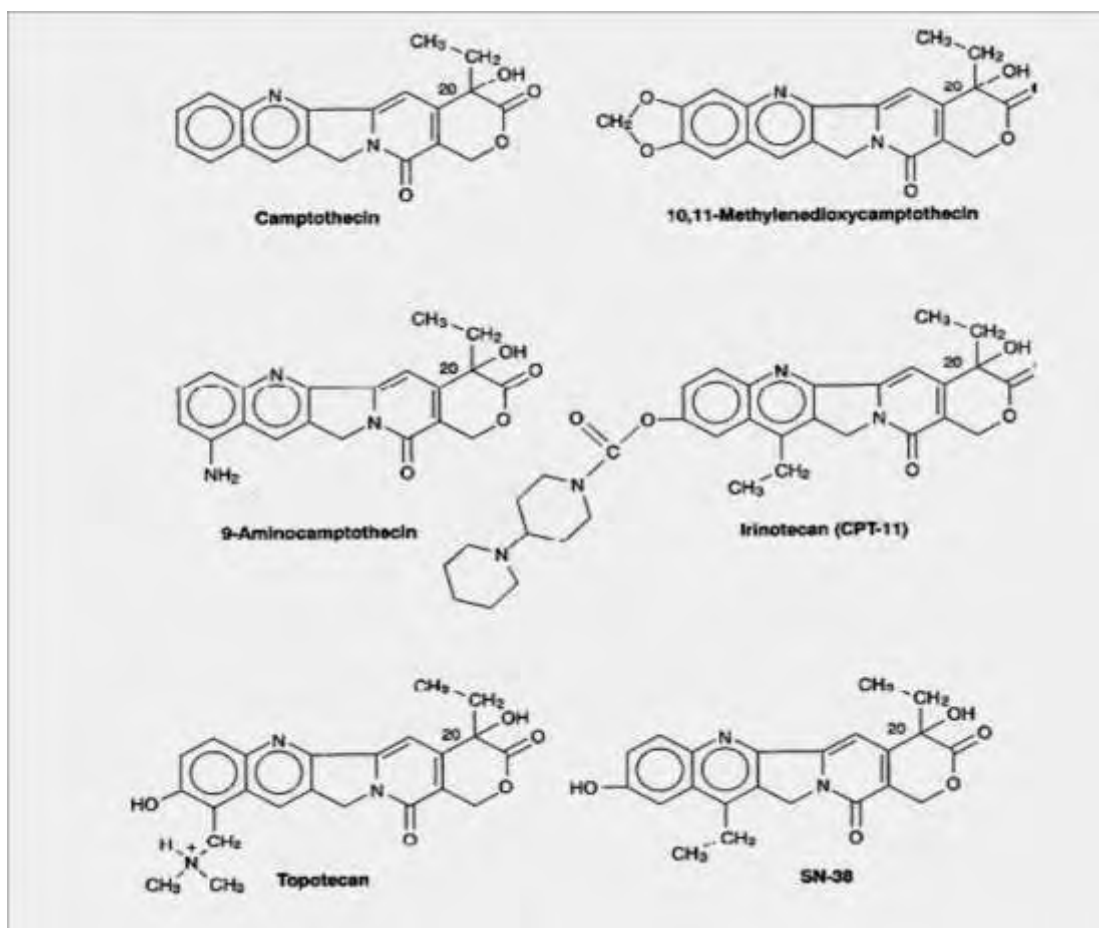
Ο τρόπος δράσης της καμπτοθεκίνης είναι αντιπροσωπευτικός μίας ολόκληρης κατηγορίας αναστολέων οι οποίοι δρουν ως δηλητήρια. Τα μόρια αυτά ουσιαστικά σταθεροποιούν τον ομοιοπολικό δεσμό στο σύμπλοκο DNA-τοποϊσομεράσης I, αυξάνοντας τη θετική υπερελίκωση στο γενετικό υλικό άρα και την τάση στρέψης (Hsiang et al, 1985, Dexheimer et al, 2008). Η καμπτοθεκίνη είναι δραστική μόνο εναντίον της κύριας αντιπροσωπευτικής τοποϊσομεράσης των

ευκαρυωτών, της Τοπο IB. Το ίδιο ισχύει για σχεδόν όλους τους αναστολείς που χρησιμοποιούνται ως αντικαρκινικά φάρμακα, οι οποίοι στοχεύουν επιλεκτικά τις Τοπο IB. Αντίθετα, αν και οι Τοπο IA αποτελούν εξίσου ελκυστικούς στόχους δεν φαίνεται να υπάρχουν γνωστά μόρια που να αναστέλλουν επιλεκτικά αυτήν την οικογένεια ενζύμων (Baker et al, 2009).

Τα ανάλογα της καμπτοθεκίνης, τα οποία εφαρμόζονται στην θεραπεία του καρκίνου είναι η τοποτεκάνη και η ιρινοτεκάνη και χαρακτηρίζονται από μια πεντακυκλική δομή. Η τοποτεκάνη είναι ημισυνθετική και αποτελεί υδροδιαλυτό παράγωγο της καμπτοθεκίνης. Αναστέλλει τη δράση της τοποϊσομεράσης I, η οποία δημιουργεί αναστρέψιμα ρήγματα της απλής έλικας του DNA και με αυτό τον τρόπο επιτρέπει τη συνέχιση της διαδικασίας της αντιγραφής του DNA. Η τοποτεκάνη αναστέλλει αυτή την διαδικασία μέσα από την σύνδεσή της με το σύμπλοκο DNA-τοποϊσομεράση I, με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Η ιρινοτεκάνη είναι ημισυνθετική και αποτελεί υδατοδιαλυτό παράγωγο της καμπτοθεκίνης. Η ιρινοτεκάνη και ο δραστικός της μεταβολίτης SN-38 δεσμεύονται από το σύμπλεγμα τοποϊσομεράσης I-DNA και αναστέλλουν την αναδίπλωση της έλικας του DNA, με αποτέλεσμα πρόκληση ρηγμάτων της διπλής έλικας και επακόλουθο κυτταρικό θάνατο.

Η καμπτοθεκίνη και τα παράγωγά της παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα αντικαρκινικών δραστηριοτήτων. Συγκεκριμένα η καμπτοθεκίνη εμφανίζει αντικαρκινικές ιδιότητες έναντι συμπαγών όγκων, κυρίως αναστέλλοντας τη δράση της τοποϊσομεράσης I, και χρησιμοποιείται σαν θεραπεία για τον καρκίνο του παγκρέατος και του παχέος εντέρου, ενώ τα παράγωγά της δρουν ως θεραπεία για τον καρκίνο του πνεύμονα, του ήπατος και του προστάτη (Baikar & Malpathak, 2010). Δύο ακόμα ενώσεις που αποτελούν παράγωγα της καμπτοθεκίνης είναι η γιματεκάνη και η μπελοτεκάνη, οι οποίες βρίσκονται σε διάφορες φάσεις κλινικών δοκιμών.

Τέλος, έχουν ταυτοποιηθεί αναστολείς της τοποϊσομεράσης I, οι οποίοι δεν ανήκουν στις καμπτοθεκίνες, όπως η 9-αμινοκαμπτοθεκίνη (9-AC), οι ινδονοϊσοκινολίνες (indenoisoquinolines), οι ινδολοκαρμπαζόλες (indolacarbazoles), τα βενζοανθρακένια (benzoanthracene), οι βενζιμιδαζόλες (benzimidazoles) και οι φαινανθριδίνες (phenanthridines) (Pommier et al., 1998).



*Εικόνα 10: Αναστολείς δηλητήρια της τοποϊσομεράσης I*

#### 1.2.1.2 Καταλυτικοί αναστολείς (Suppressors) της DNA τοποϊσομεράσης I

Στους καταλυτικούς αναστολείς της τοποϊσομεράσης I ανήκουν μόρια που συνδέονται στο DNA και καταστέλλουν τη δημιουργία ρήγματος στην αλυσίδα του DNA παρεμποδίζοντας την πρόσδεση των τοποϊσομερασών τύπου I. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η δοξορουμικίνη, η ακλακινόμικίνη A (aclacinomycin), το TAN-1518 A και B και η δισταμικίνη. Η αποτελεσματικότητα των μορίων αυτών είναι εμφανής σε μεγάλες συγκεντρώσεις και φαίνεται ότι σχετίζεται με την ικανότητα τους να συνδέονται στο DNA (Pommier et al., 1998).

### 1.2.2 Αναστολείς της τοποϊσομεράσης II

#### 1.2.2.1 Αναστολείς δηλητήρια (poisons) της DNA τοποϊσομεράσης II

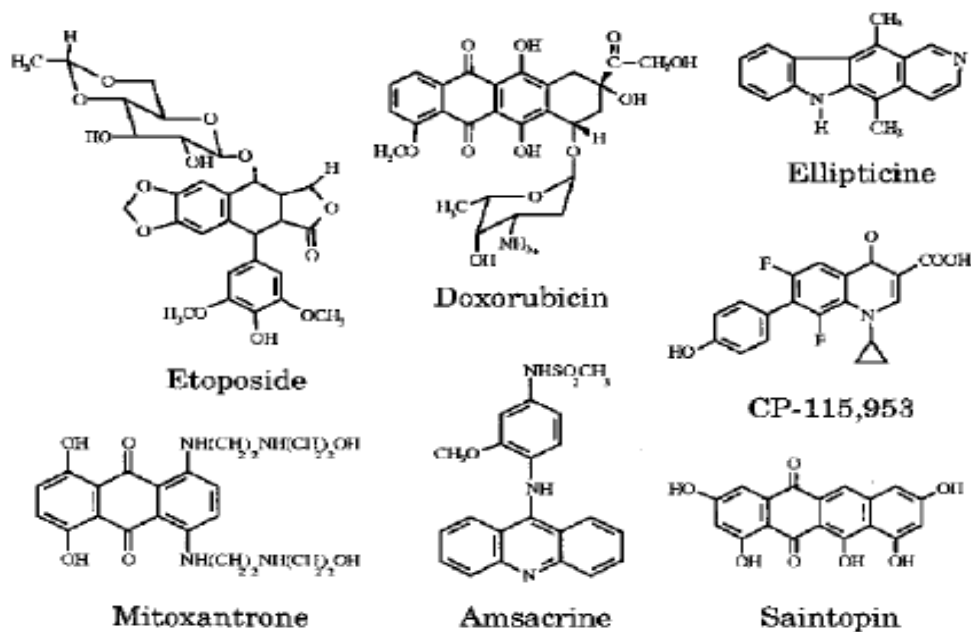
Οι αναστολείς δηλητήρια των τοποϊσομερασών χωρίζονται σε μόρια που παρεμβάλλονται στο DNA και σε μόρια τα οποία δεν παρεμβάλλονται και δεν αλληλεπιδρούν με το DNA. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν μόρια, όπως οι

ανθρακυκλίνες, η μιτοξανδρόνη και η αμσακρίνη, τα οποία ενσωματώνονται στη θέση διάσπασης. Πολλά από τα μόρια αυτής της κατηγορίας, πέρα από την δράση τους στην τοποϊσομεράση II, έχουν και άλλες ποικίλες επιδράσεις στα κύτταρα, όπως η παραγωγή ελευθέρων ριζών και βλάβες στις μεμβράνες. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν μόρια που κυρίως δρουν έναντι της προκαρυωτικής τοποϊσομεράσης II, όπως η ετοποσίδη και η τενιποσίδη και αλληλεπιδρούν αποκλειστικά με την πρωτεΐνη, παγιδεύοντας την στο διασπασίμο σύμπλοκο (Nitiss, 2009).

Αναστολείς της τοποϊσομεράσης II αποτελούν και φάρμακα όπως η σαϊντοπίνη, η ελλιπτική και το μόριο CP-115,953, μια κινολόνη που εμφανίζει μεγαλύτερη ικανότητα αναστολής της τοποϊσομεράσης II από την ετοποσίδη (Εικόνα 11). Οι κινολόνες αποτελούν μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες φαρμάκων, καθώς έχει βρεθεί ότι μπορούν να επιδρούν τόσο σε ευκαρυωτικούς όσο και σε προκαρυωτικούς οργανισμούς (Froelich-Ammon et al., 1995).

Ο μηχανισμός δράσης του κάθε φαρμάκου είναι διαφορετικός. Η ετοποσίδη, η οποία ανήκει στις επιποδοφυλλοτοξίνες, σταθεροποιεί το σύμπλοκο της τοποϊσομεράσης II με το DNA. Η δοξορουβικήνη, που ανήκει στις ανθρακυκλίνες, συνδέεται με την πυρηνική χρωματίνη σχηματίζοντας ένα τριαδικό σύμπλεγμα με την τοποϊσομεράση II και το DNA που προκαλεί διάσπαση του κλώνου. Η ελλιπτική προκαλεί είτε την αποσύνδεση της τοποϊσομεράσης, είτε τον σχηματισμό του συμπλόκου τοποϊσομεράσης II-DNA που δημιουργεί συνεχόμενα σπασίματα. Τέλος, η αμσακρίνη επιδρά στους δεσμούς αδεΐνης-θυμίνης στο DNA του κυττάρου, ενώ παράλληλα αναστέλει τη δράση της τοποϊσομεράσης II, Η κυτταροτοξικότητά της είναι μεγάλη κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου, όταν τα επίπεδα της τοποϊσομεράσης είναι χαμηλά (Wang et al., 1997).

## TOPOISOMERASE II



*Εικόνα 11: Αναστολείς δηλητήρια της τοποϊσομεράσης II*

### 1.2.2.2 Καταλυτικοί αναστολείς (Suppressors) της DNA τοποϊσομεράσης II

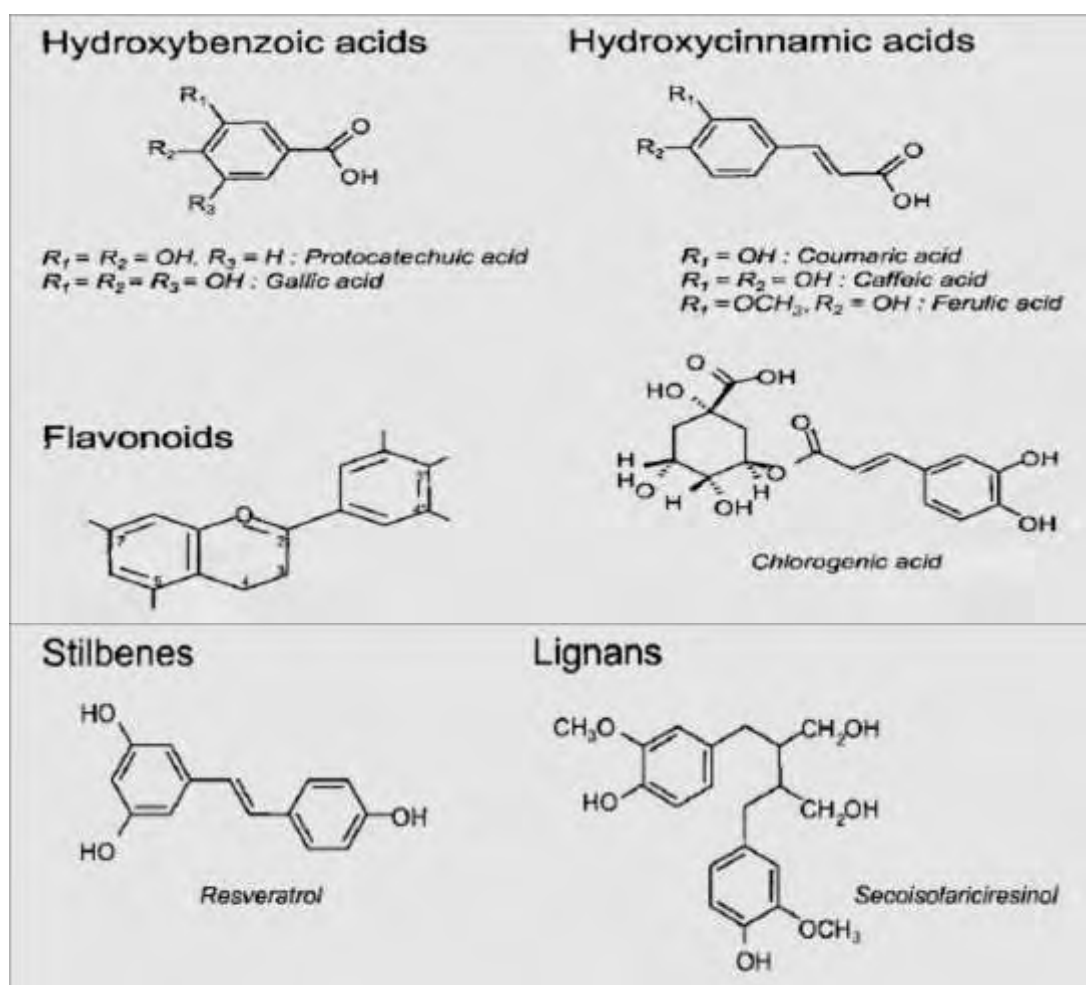
Οι καταλυτικοί αναστολείς των Τορο II αλληλεπιδρούν κυρίως με την αμινο-τελική περιοχή του ενζύμου, η οποία διαθέτει ενεργότητα ΑΤΡάσης, λειτουργώντας ως μη συναγωνιστικοί ανταγωνιστές του ΑΤΡ. Σε αντίθεση με τους αναστολείς-δηλητήρια (poison) οι παράγοντες αυτοί επιδρούν στην καταλυτική ενεργότητα του ενζύμου, χωρίς όμως να εμποδίζουν την πρόκληση ρήγματος στο DNA. Έχει βρεθεί από μελέτες σε προκαρυωτικούς οργανισμούς ότι ουσίες όπως η νοβομιοκίνη και η κουμερμυκίνη αποτελούν καταλυτικούς αναστολείς της τοποϊσομεράσης II, καθώς παρεμβαίνουν και εμποδίζουν την πρόσδεση του ΑΤΡ, με αποτέλεσμα το ένζυμο να μην ενεργοποιείται. Καταλυτικοί αναστολείς έχουν βρεθεί και για την ευκαρυωτική τοποϊσομεράση II όπως είναι το μόριο ICRF-193, η σταυροσπορίνη και η μιτινδομίδα (mitindomide) (Fortune et al., 1998).

### 1.3 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες αποτελούν μια μεγάλη ομάδα φυτικών συστατικών, τα οποία συναντώνται κυρίως στο κυτταρικό τοίχωμα. Θεωρούνται πολύ σημαντικές ενώσεις με σπουδαία αντιοξειδωτική δράση, όπως επίσης και χημειοπροστατευτική δράση



έναντι διάφορων τύπων καρκίνων. Είναι σύνθετες ενώσεις αποτελούμενες από δύο ή περισσότερους φαινολικούς δακτυλίους, οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ταξινόμησή τους και είναι δυνατόν να κατηγοριοποιηθούν σε περισσότερους από δέκα τύπους, ανάλογα με τη χημική δομή τους. Οι κύριες ομάδες πολυφαινόλων είναι τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα, οι φαινολικές αλκοόλες, τα στυλβένια και οι λιγνάνες (D' Archivio et al., 2007) (Εικόνα 12). Τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στυλβένια και οι λιγνάνες είναι από τις πιο άφθονες φυτικές πολυφαινόλες, από τις οποίες τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα καταλαμβάνουν το 60% και 30% αντίστοιχα των συνολικών καταναλισκόμενων πολυφαινόλων (Nichenametla et al., 2006).



**Εικόνα 12:** Χημικές δομές πολυφαινολικών ενώσεων.

Έχει καθιερωθεί ότι οι πολυφαινόλες εμφανίζουν πολλαπλές ευεργετικές δράσεις και συγκεκριμένα διαθέτουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις,

αντιαλλεργικές και αντικαρκινικές ιδιότητες και επιπλέον αναστέλλουν τη διαδικασία της μεταλλαξιγένεσης και αυτήν της οστεοκλασίας που μπορεί να οδηγήσει στην οστεοπόρωση. Ως αντιοξειδωτικές ουσίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία από το οξειδωτικό στρες, καθώς είναι ικανές να εξουδετερώνουν τις δραστικές ελεύθερες ρίζες, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν βλάβες σε DNA, λιπίδια και κυτταρικές πρωτεΐνες (Cantero et al., 2006).

Τροφές πλούσιες σε πολυφαινόλες αποτελούν τα φρούτα, τα λαχανικά, το κρασί, το τσάι, ο καφές, το κακάο, τα δημητριακά, το ελαιόλαδο και τα όσπρια. Έχει βρεθεί ότι η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε πολυφαινόλες μειώνει την πιθανότητα ανάπτυξης καρδιοαγγειακών παθήσεων, διαβήτη και νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Scalbert et al., 2005).

### **1.3.1 Φαινολικά οξέα**

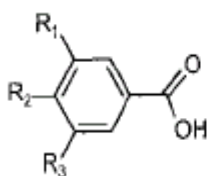
Τα φαινολικά οξέα είναι οι πιο άφθονες πολυφαινόλες των φυτών και παράγονται από τα υδροξυβενζοϊκά ή τα υδροξυκινναμικά οξέα (Εικόνα 13) . Στα παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού οξέος συγκαταλέγονται το γαλλικό οξύ, το βανιλλικό οξύ, το προκατεχοϊκό οξύ και το συρινγικό οξύ. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, όπως το γαλλικό οξύ, βρίσκονται σε λίγα εδώδιμα φυτά και σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, εκτός από κάποια κόκκινα φρούτα. Το τσάι αποτελεί τη βασική πηγή πρόσληψης γαλλικού οξέος. Στα παράγωγα του υδροξυκινναμικού οξέος συγκαταλέγονται το κουμαρικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και το φερουλικό οξύ. Τα υδροξυκινναμικά οξέα υπάρχουν κυρίως ως εστέρες με καρβοξυλικά οξέα ή γλυκόζη και τα υδροξυβενζοϊκά οξέα υπάρχουν ως γλυκοσίδια (Nichenametla et al., 2006). Τα υδροξυκινναμικά οξέα απαντώνται σε όλα τα μέρη των φυτών και οι υψηλότερες συγκεντρώσεις τους είναι πιθανότατα στα εξωτερικά μέρη των φυτών. Οι συγκεντρώσεις των οξέων μειώνονται κατά την ωρίμανση, αλλά η συνολική τους ποσότητα αυξάνεται καθώς το φρούτο αυξάνεται σε μέγεθος.

Έχει βρεθεί ότι τα φαινολικά οξέα έχουν ισχυρή αντικαρκινική και αντιοξειδωτική δράση. Πιθανοί χημειοπροστατευτικοί μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται από τα φαινολικά οξέα είναι η αναστολή της πρόσληψης και ενεργοποίησης του καρκινογόνου, αδρανοποίηση του καρκινογόνου, παρεμπόδιση της πρόσδεσης του καρκινογόνου στο DNA καθώς και ενίσχυση της πιστότητας των επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA. Ως αντιοξειδωτικά τα φαινολικά οξέα δρουν

εξουδετερώνοντας τις δραστικές ηλεκτρόφιλες ρίζες και τις ρίζες του οξυγόνου και αναστέλλοντας το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος.

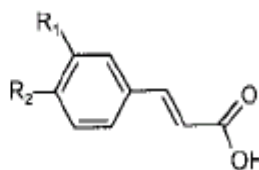
Ένας σημαντικός παράγοντας για τα πιθανά πλεονεκτήματα των φαινολικών οξέων στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων είναι η βιοδιαθεσιμότητα αυτών των μορίων. Έχει βρεθεί σε μοντέλα επιμύων ότι το καφεϊκό κα το χλωρογενικό οξύ απορροφώνται από το λεπτό έντερο. Στον άνθρωπο έχει αναφερθεί ότι περισσότερο από το 95% του καφεϊκού οξέος και περισσότερο από το 33% του χλωρογενικού οξέος απορροφώνται από το λεπτό έντερο. Τα δύο αυτά οξέα πιθανώς υπόκεινται σε εκτεταμένο μεταβολισμό μετά την απορρόφηση, παρόλο που τα δεδομένα για τον μεταβολισμό τους στο ανθρώπινο σώμα είναι σπάνια. Όσον αφορά το φερουλικό οξύ, φαίνεται ότι διαχέεται παθητικά διαμέσου του εντέρου. Εντούτοις, μία *in vitro* μελέτη έχει δείξει ότι το φερουλικό οξύ μπορεί να μεταφερθεί διαμέσου του εντέρου από ένα σύστημα μονοκαρβοξυλικών μεταφορέων (Nichenametla et al., 2006).

### Hydroxybenzoic acids



$R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$  : Protocatechuic acid  
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$  : Gallic acid

### Hydroxycinnamic acids



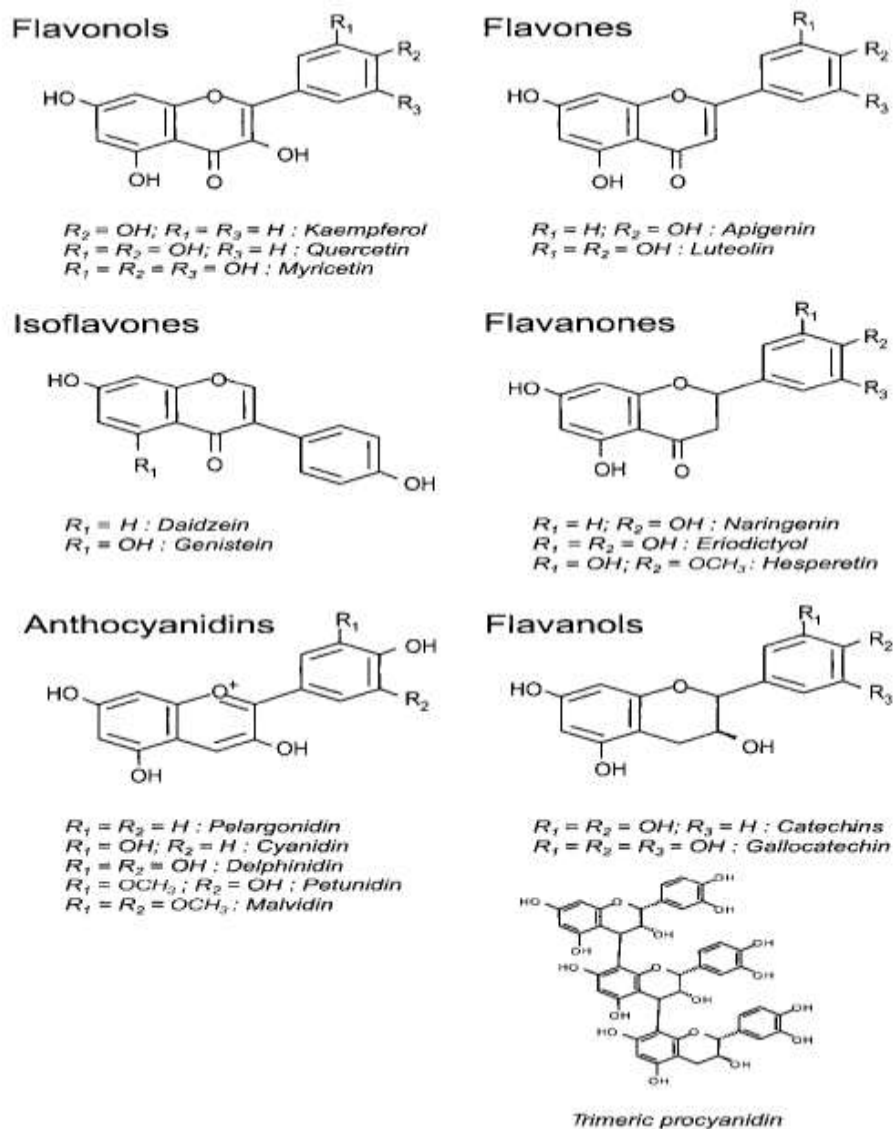
$R_1 = \text{OH}$  : Coumaric acid  
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$  : Caffeic acid  
 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OH}$  : Ferulic acid

**Εικόνα 13:** Χημικοί τύποι υδροξυβενζοϊκού και υδροξυκινναμικού οξέος.

### 1.3.2 Φλαβονοειδή

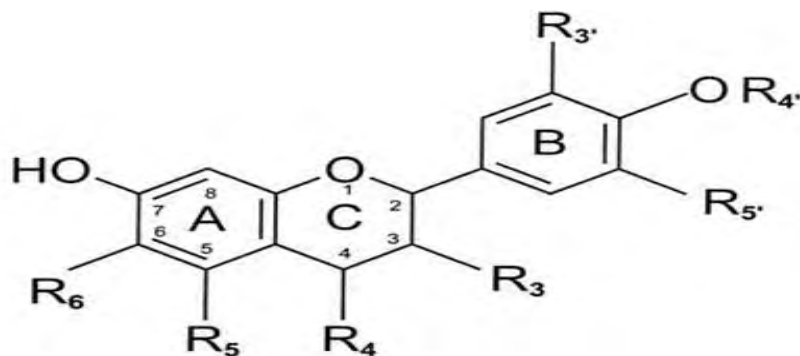
Τα φλαβονοειδή είναι μικρού μοριακού βάρους πολυφαινολικές ενώσεις που κυριαρχούν στο φυτικό βασίλειο. Αυτές οι πολυφαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν ποικιλία χημικών δομών και βρίσκονται στα λαχανικά, στα φρούτα, στους σπόρους, στον φλοιό των δέντρων, στις ρίζες, στους στήμονες, στα άνθη των φυτών και στο κρασί και είναι ικανά να προσφέρουν σε αυτά προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία, από παθογόνους μικροοργανισμούς, καθώς και από τα φυτοφάγα ζώα (Heim et al., 2002). Αυτή η ομάδα των δευτερογενών μεταβολιτών διαθέτει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών λειτουργιών. Τα φλαβονοειδή ταξινομούνται σε διάφορες

υποκατηγορίες όπως είναι τα ισοφλαβονοειδή, οι χαλκόνες, οι φλαβανόνες, οι φλαβόνες, οι δυϋδροφλαβονόλες, οι φλαβονόλες, οι ανθοκυανίνες και οι κατεχίνες (Εικόνα 14).



**Εικόνα 14:** Χημικές δομές φλαβονοειδών

Η βασική δομή των φλαβονοειδών αποτελείται από ένα φλαβονικό πυρήνα με δύο βενζολικούς δακτυλίους Α και Β που συνδέονται με έναν ετεροκυκλικό πυρανικό C δακτύλιο (Baikar, Malpathak, 2010), ο οποίος ανάλογα με το βαθμό οξείδωσής του γίνεται η αιτία της ταξινόμησης των φλαβονοειδών (Nichenametla et al., 2006) (Εικόνα 15).



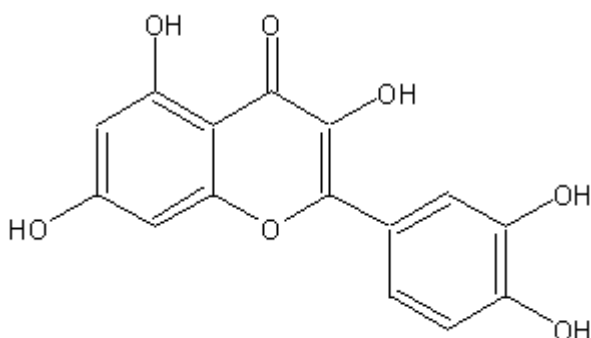
**Εικόνα 15:** Γενική δομή και αρίθμηση των κοινών φλαβονοειδών. Κάθε κατηγορία χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένες πλευρικές ομάδες.

Μελέτες *in vivo* και *in vitro* έδειξαν ότι τα φλαβονοειδή επηρεάζουν τον μεταβολισμό, έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και συμβάλλουν στην προστασία ενάντια του καρκίνου. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι τα φλαβονοειδή αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυτταρικών σειρών, μπλοκάρουν την συνέχιση του κυτταρικού κύκλου, όταν αυτό είναι απαραίτητο και εμπλέκονται στη διαδικασία της απόπτωσης (Ren et al., 2003).

### Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες είναι η πιο διαδεδομένη υποκατηγορία των φλαβονοειδών. Απαντώνται στα τρόφιμα και σε ποικίλα επίπεδα σε διάφορα φρούτα. Οι κύριες πηγές πρόσληψης των φλαβονολών είναι τα κρεμμύδια, το λάχανο, το πράσο, το μπρόκολο και τα βατόμουρα. Επίσης, το τσάι και το κόκκινο κρασί συγκαταλέγονται στα τρόφιμα με την υψηλότερη συγκέντρωση φλαβονολών. Η μυρικετίνη, η κερκετίνη και η καιμπερόλη είναι τα πιο αντιπροσωπευτικά μόρια στο φυτικό βασίλειο, ενώ μόνο ένας περιορισμένος αριθμός φρούτων και λαχανικών περιέχει τις δομικά συγγενείς φλαβόνες, απιγενίνη και λουτεολίνη. Μελέτες *in vitro* προτείνουν ότι η κερκετίνη (Εικόνα 16) δρα παρεμποδίζοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την ανάπτυξή τους σταματώντας τον κυτταρικό κύκλο. Στους φυτικούς ιστούς οι φλαβονόλες και οι φλαβόνες βρίσκονται συνδεδεμένες με σάκχαρα, κυρίως με γλυκόζη, ραμνόζη και ρουτινόζη (Nichenametla et al., 2006). Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η βιοσύνθεση αυτών των μορίων διεγείρεται από την ηλιακή ακτινοβολία και αυτό οδηγεί στη συσσώρευσή τους στο εξωτερικό και υπέργειο τμήμα των φυτών. Μάλιστα, διαφορές στη συγκέντρωση των φλαβονολών μπορούν

να παρουσιαστούν ακόμα και σε φρούτα του ίδιου φυτού ή και σε διαφορετικές πλευρές του ίδιου φρούτου λόγω διαφορετικής έκθεσης στο ηλιακό φως.



**Εικόνα 16:** Χημική δομή κερκετίνης.

### Φλαβόνες

Οι φλαβόνες απαντώνται σε χαμηλότερο βαθμό από ότι οι φλαβονόλες σε φρούτα και λαχανικά. Οι κυριότερες φλαβόνες είναι τα γλυκοσίδια της λουτεολίνης και της απιγενίνης. Ο μαϊντανός και το σέλινο είναι οι κυριότερες πηγές πρόσληψης των φλαβονών. Ωστόσο, η συγκεκριμένη υποκατηγορία φλαβονοειδών απαντάται και σε ορισμένα φρούτα και μάλιστα ο φλοιός των φρούτων αυτών φαίνεται να περιέχει ιδιαίτερα μεγάλες ποσότητες πολυμεθοξυλιωμένων ( $CH_3O-$ ) φλαβονών, όπως έχει παρατηρηθεί στο μανταρίνι (Manach et al., 2004).

### Φλαβανόνες

Οι φλαβανόνες βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις μόνο στα εσπεριδοειδή. Απαντώνται επίσης στις ντομάτες αλλά και σε ορισμένα αρωματικά φυτά, όπως είναι η μέντα. Τα κυριότερα μόρια είναι η ναριγενίνη στο γκρέιπφρουτ, η εσπεριδίνη στα πορτοκάλια και η εριοδικτυόλη στα λεμόνια (Manach et al., 2004).

### Ισοφλαβονοειδή

Τα ισοφλαβονοειδή έχουν πολλές δομικές ομοιότητες με τα οιστρογόνα και κατατάσσονται στα φυτοοιστρογόνα λόγω της ικανότητας σύνδεσης σε οιστρογονικούς υποδοχείς. Τα ισοφλαβονοειδή περιέχονται σχεδόν αποκλειστικά στα όσπρια. Συγκεκριμένα, η σόγια και τα επεξεργασμένα παράγωγά της αποτελούν τις βασικές πηγές πρόσληψης φλαβονοειδών και περιέχουν τα τρία κυριότερα μόρια αυτής της υποκατηγορίας: την γενιστεΐνη (genistein), την ντεΐζεΐνη (daidzein), την

γλυκιτεΐνη(glycitein). Οι φλαβονόλες αυτές απαντώνται σε μη γλυκοσυλιωμένη μορφή αλλά πιο συχνά συζευγμένες με γλυκόζη (Manach et al., 2004).

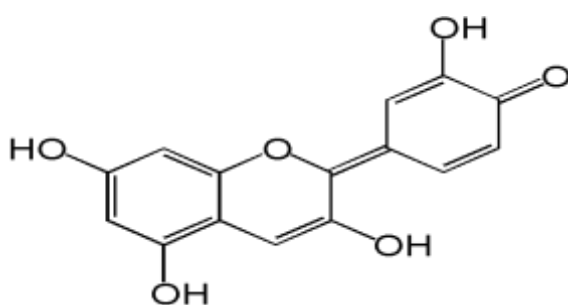
#### Φλαβανόλες

Οι φλαβανόλες απαντώνται ως μονομερή (κατεχίνες) και ως πολυμερή (προανθοκυανιδίνες). Οι κατεχίνες βρίσκονται σε κάποια φρούτα όπως τα κεράσια και τα βερίκοκα, στο κόκκινο κρασί, στο πράσινο τσάι και στη σοκολάτα. Τα δύο τελευταία αποτελούν την πλουσιότερη πηγή κατεχινών.

Τα πολυμερή αποτελούν μία ομάδα μορίων που αναφέρονται ως προανθοκυανιδίνες ή ταννίνες και είναι διμερή, ολιγομερή ή πολυμερή κατεχινών. Οι προανθοκυανιδίνες είναι υπεύθυνες για τον στυφό χαρακτήρα των φρούτων όπως των σταφυλιών και των μήλων, των ποτών, όπως του κρασιού, της μπύρας, του χυμού των μήλων και του τσαγιού αλλά και για την πικρή γεύση της σοκολάτας. Αξίζει να αναφερθεί ότι αυτή η στυφότητα αλλάζει κατά την ωρίμανση των φρούτων και συχνά εξαφανίζεται όταν τα φρούτα ωριμάσουν πλήρως (Manach et al., 2004).

#### Ανθοκυανίνες

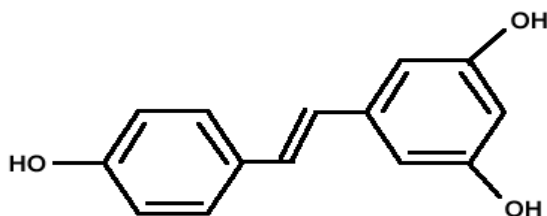
Οι ανθοκυανίνες είναι χρωστικές που εντοπίζονται στον επιδερμικό ιστό των φυτών και των φρούτων και τους προσδίδουν ροζ, κόκκινο, μπλε ή μωβ χρώμα. Υπάρχουν σε διάφορες χημικές μορφές, με χρώμα και χωρίς χρώμα, ανάλογα με το pH στο οποίο βρίσκονται. Παρόλο που είναι πολύ ασταθείς στη μη γλυκοζυλιωμένη μορφή (ανθοκυανιδίνες), όταν βρίσκονται στα φυτά παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο pH, στο φως και στις οξειδωτικές συνθήκες. Οι ανθοκυανίνες συναντώνται στο κόκκινο κρασί και σε λαχανικά όπως οι μελιτζάνες, το λάχανο, τα φασόλια, τα κρεμμύδια και τα ραπανάκια. Ο κυριότερος εκπρόσωπος της ομάδας αυτής είναι η κυανιδίνη (Εικόνα 17) (Manach et al., 2004).



**Εικόνα 17:** Χημική δομή της κυανιδίνης

### 1.3.3 Στιλβένια

Τα στιλβένια συναντώνται σε μικρές ποσότητες στη διατροφή. Ο χαρακτηριστικός τους εκπρόσωπος είναι η ρεσβερατρόλη, η οποία βρίσκεται στο κρασί, στα μούρα και στα σταφύλια σε ελεύθερη ή γλυκοζυλιωμένη μορφή (Εικόνα 18). Μελέτες απορρόφησης έχουν δείξει ότι η ρεσβερατρόλη μεταφέρεται μέσω του λεπτού εντέρου ως γλυκουρονίδιο. Επιπλέον εμφανίζει οιστρογονική δράση και μπορεί να λειτουργήσει ως ανοσοκατασταλτικός, αλλά και ως παράγοντας που προάγει ανοσολογικές απαντήσεις (Nichenamelta et al., 2006). Έχει βρεθεί ότι τα στιλβένια προστατεύουν τα φυτά από την υπερϊώδη ακτινοβολία και τις ασθένειες και εμποδίζουν ιικές ή μικροβιακές εισβολές (Baikar et al., 2010).



*Εικόνα 18: Χημική δομή της ρεσβερατρόλης.*

### 1.3.4 Λιγνάνες

Οι λιγνάνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών που παράγονται από τον οξειδωτικό διμερισμό δύο φαινυλπροπανοειδών μονάδων. Στη φύση υπάρχουν συνήθως σε ελεύθερη μορφή, αλλά απαντώνται και σε γλυκοζυλιωμένες μορφές. Ο λιναρόσπορος είναι η κυριότερη διατροφική πηγή πρόσληψης των λιγνάνων. Αξίζει να σημειωθεί πως η μικροχλωρίδα του εντέρου μεταβολίζει τις λιγνάνες σε εντεροδιόλη και εντερολακτόνη. Επιπλέον οι λιγνάνες είναι παρούσες σε πολλά φυτά που είναι πλούσια σε φυτικές ίνες, όπως είναι στα δημητριακά, στο σιτάρι, στο κριθάρι, στη βρόμη, στα όσπρια, στα σπαράγγια, στο σκόρδο, στο μπρόκολο και στα καρότα (Manach et al., 2004).



## 1.4 Πολυφαινόλες και καρκίνος

### 1.4.1 Μηχανισμός καρκινογένεσης

Υπάρχουν διάφορα μοντέλα πειραματικής καρκινογένεσης, καθώς ποικίλοι περιβαλλοντικοί, χημικοί και μεταβολικοί παράγοντες παίζουν ρόλο στη μετατροπή του φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό. Η διαδικασία της καρκινογένεσης περιλαμβάνει διάφορα στάδια κατά τα οποία:

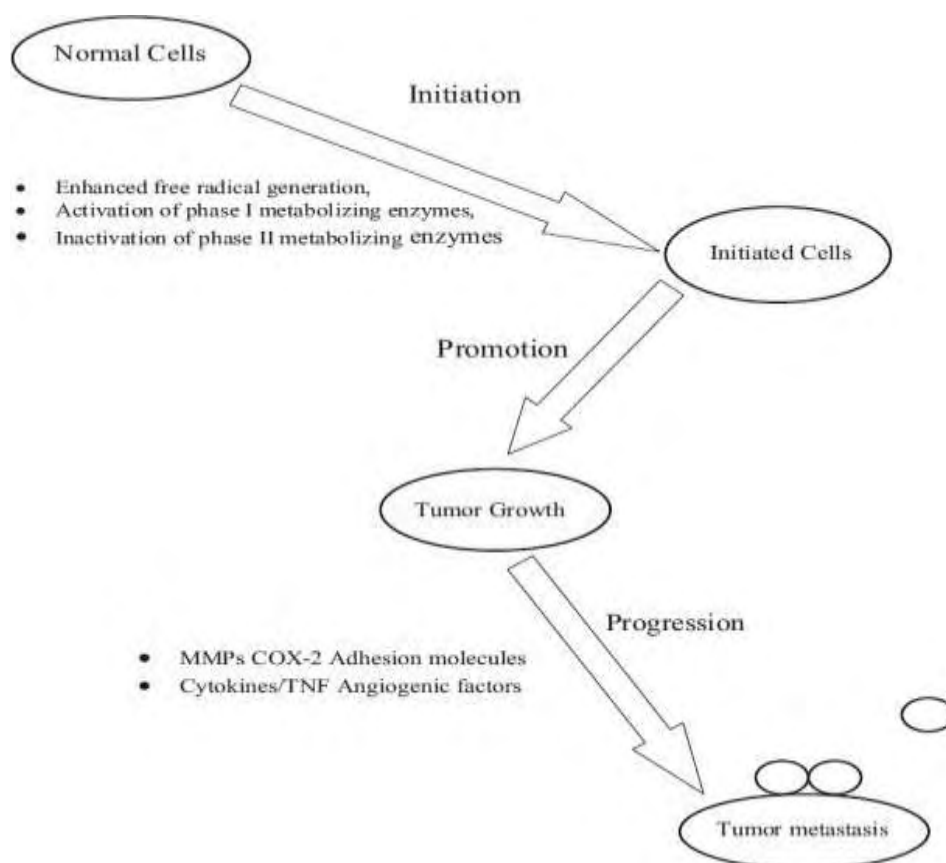
- 1) το γενετικό υλικό του κυττάρου τροποποιείται, μέσω μεθυλίωσης ή οξειδωσης των βάσεων του DNA, είτε με τη δημιουργία σημειακών μεταλλάξεων είτε με την προσθήκη βάσεων
- 2) τα ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA τροποποιούνται και αδρανοποιούνται
- 3) ο μηχανισμός της κυτταρικής απόπτωσης τροποποιείται ή/και καθίσταται ανενεργός
- 4) εκφράζονται διάφορα γονίδια (ογκογονίδια), τα οποία τροποποιούν τους μηχανισμούς διαβίβασης του σήματος
- 5) καθώς εξελίσσεται η καρκινική νόσος οι ανωτέρω μηχανισμοί αυτοτροφοδοτούνται και ενισχύονται.

Έτσι, η καρκινική νόσος θεωρείται ότι είναι μια πολυπαραγοντική συνάνθρωση παραγόντων και μηχανισμών, οι οποίοι οδηγούν στον άναρχο και απρογραμματιστό πολλαπλασιασμό των κυττάρων ενός ιστού.

Ο σχηματισμός των καρκινικών κυττάρων περιλαμβάνει τρία στάδια, που στηρίζονται σε διαφορετικούς μηχανισμούς εξέλιξης (Εικόνα 19):

1. Στο πρώτο στάδιο ή στάδιο έναρξης (initiation) περιβαλλοντικοί παράγοντες προκαλούν μία ή και περισσότερες μεταλλάξεις ή μικρές ελλείψεις σε γονίδια, τα οποία ελέγχουν τη διαδικασία της καρκινογένεσης.
2. Το δεύτερο στάδιο ή στάδιο προαγωγής (promotion) είναι μεγαλύτερο σε διάρκεια από το στάδιο της έναρξης και χαρακτηρίζεται από την απορρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία φυσιολογικά ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Τα γονίδια που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο είναι συχνά μεταλλαγμένα σε καρκίνους στον άνθρωπο. Οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν σε ένα συνεχή πολλαπλασιασμό των μεταλλαγμένων κυττάρων, που ξεπερνά τον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών.
3. Το τρίτο στάδιο ή στάδιο προόδου (progression) είναι η τελική φάση της ογκογένεσης και χαρακτηρίζεται από γενετικές αλλαγές στον καρυότυπο των κυττάρων λόγω της συσσώρευσης μεταλλαγμένων γονιδίων που οδηγεί σε

χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Η αγγειογένεση παρέχει στα κακοήθη κύτταρα οξυγόνο και τις απαραίτητες θρεπτικές ουσίες με αποτέλεσμα τη μετατροπή των προκαρκινικών κυττάρων σε νεοπλάσματα που χαρακτηρίζονται από αυξημένη διεισδυτικότητα και ικανότητα μετάστασης (Chahar et al., 2011).



**Εικόνα 19:** Τα τρία στάδια της εξέλιξης του καρκίνου

#### 1.4.2 Φλαβονοειδή ως ρυθμιστές μεταβολικών ενζύμων

Μελέτες *in vitro* και *in vivo* έχουν δείξει ότι κάποια φλαβονοειδή ρυθμίζουν με διάφορους μηχανισμούς τον μεταβολισμό των καρκινογόνων, συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στην προστασία από τον καρκίνο.

Ένας σημαντικός μηχανισμός δράσης των φλαβονοειδών αποτελεί η αναστολή της δραστηριότητας των ενζύμων της Φάσης I του μεταβολισμού. Τα ένζυμα της Φάσης I σε πολλές περιπτώσεις μεταβολίζουν προκαρκινικά μόρια σε δραστικά ενδιάμεσα μόρια. Τα δραστικά ενδιάμεσα μόρια μπορούν και αλληλεπιδρούν με πυρηνόφιλα μόρια του κυττάρου δημιουργώντας ελεύθερες ρίζες και κατ' επέκταση προκαλούν καρκινογένεση. Συγκεκριμένα, τα φλαβονοειδή έχει

δειχθεί ότι αναστέλλουν τη δράση διαφόρων ισοενζύμων του κυτοχρώματος P450, όπως τα CYP1A1 και CYP1A2.

Ένας δεύτερος σημαντικός μηχανισμός δράσης των φλαβονοειδών είναι η ενεργοποίηση των ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού, όπως η τρανσφεράση της γλουταθειόνης. Τα ένζυμα της φάσης II αποτοξινώνουν και αυξάνουν την υδροφιλικότητα σε πιθανά καρκινογόνα μόρια, αυξάνοντας το ρυθμό απομάκρυνσής τους από τον οργανισμό (Ren et al., 2003).

#### **1.4.3 Φλαβονοειδή ως αναστολείς του κυτταρικού πολλαπλασιασμού**

Η απορύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα για την ανίχνευση νεοπλασιών. Η προστασία από τον καρκίνο είναι στενά συνδεδεμένη με την αναστολή ή την καθυστέρηση του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού. *In vitro* πειράματα αποδεικνύουν ότι τα περισσότερα φλαβονοειδή αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε πολλά είδη καρκινικών κυτταρικών σειρών, ενώ δεν επιδρούν σε υγιή κύτταρα.

Η αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης παίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση των πολυαμινών, η οποία σχετίζεται άμεσα με τη σύνθεση του DNA και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε διάφορους ιστούς. Η παραγωγή του συγκεκριμένου ενζύμου επάγεται από υποκινητές (promoters) που απαντώνται σε καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο, έχειδειχθεί ότι διάφορα φλαβονοειδή μπορούν να αναστείλλουν την αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης, αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο τη σύνθεση των πρωτεϊνών και του DNA.

Επιπλέον, τα φλαβονοειδή είναι αποτελεσματικά στην αναστολή διαφόρων ενζύμων που συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος όπως η πρωτεϊνική κινάση C, η πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης και η φωσφατιδυλοϊνοσιτολική 3-κινάση, αλλά και ένζυμα υπεύθυνα για τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Ren et al., 2003).

#### **1.4.4 Φλαβονοειδή ως αναστολείς του κυτταρικού κύκλου**

Διάφορα μιτογόνα σήματα ωθούν τα κύτταρα να ξεκινήσουν μια σειρά από συντονισμένα βήματα ώστε να διεξαχθεί και να ολοκληρωθεί ο κυτταρικός κύκλος. Η σύνθεση του DNA, η οποία πραγματοποιείται στη φάση S, και ο διαχωρισμός των θυγατρικών κυττάρων, που πραγματοποιείται στη φάση M, αποτελούν τα κυριότερα σημεία του κυτταρικού κύκλου. Το διάστημα μεταξύ των φάσεων S και

Μ είναι γνωστό ως φάση G2. Στη φάση αυτή δίνεται στα κύτταρα ο απαιτούμενος χρόνος προκειμένου να διορθωθούν πιθανά λάθη, τα οποία συνέβησαν κατά τον διπλασιασμό του DNA, έτσι ώστε τα λάθη αυτά να μη μεταφερθούν στα θυγατρικά κύτταρα. Αντίθετα, η φάση G1 αντιπροσωπεύει το διάστημα μεταξύ των φάσεων Μ και S, στο οποίο το κύτταρο προετοιμάζεται προκειμένου να διπλασιαστεί.

Οι CDKs (κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνες) αποτελούν ένζυμα που διαδραματίζουν έναν πολύ σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Οποιαδήποτε μεταβολή ή απορύθμιση της δραστηριότητας των CDKs αποτελεί παθογόνο χαρακτηριστικό και σχετίζεται με νεοπλασματικές καταστάσεις. Μεταλλάξεις είτε στα γονίδια των CDKs, είτε στα γονίδια των αναστολέων των μορίων αυτών, οι οποίες οδηγούν στην υπερενεργοποίηση των CDKs έχουν συσχετιστεί με διάφορους τύπους καρκίνου. Για αυτό το λόγο μόρια που λειτουργούν ως αναστολείς των CDKs θα είχαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως θεραπευτικοί παράγοντες κατά του καρκίνου.

Έχειδειχθεί ότι διάφορα φλαβονοειδή, όπως η γενιστεΐνη, η κερκετίνη, η ντεζεΐνη και η καιμπφερόλη διαταράσσουν τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (μετάβαση G1/S και G2/M) σε καλλιέργειες καρκινικών κυτταρικών σειρών (Ren et al., 2003).

#### **1.4.5 Φλαβονοειδή ως επαγωγείς της κυτταρικής απόπτωσης**

Η απόπτωση είναι ένας τύπος κυτταρικού θανάτου που παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ενός ιστού, καθώς περιορίζει την ανάπτυξη κατεστραμμένων ή ανεπιθύμητων κυττάρων. Η απόπτωση ρυθμίζεται από πολλά γονίδια, τα οποία προέρχονται είτε από τον εξωκυττάριο χώρο είτε από το εσωτερικό του κυττάρου. Η απόπτωση πραγματοποιείται από την ενεργοποίηση πολλαπλών πρωτεασών οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους.

Η απορύθμιση της απόπτωσης οδηγεί στην ογκογένεση, καθώς αν το κύτταρο που θα έπρεπε να οδηγηθεί σε θάνατο επιβιώσει, ενδέχεται να διαιωνίσει μεταλλάξεις που σταδιακά θα οδηγήσουν στη δημιουργία καρκινικών κυττάρων. Για το λόγο αυτό, οι περισσότερες χημειοθεραπείες στοχεύουν στην επαγωγή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων στόχων.

Έχει αποδειχθεί ότι τα φλαβονοειδή επάγουν το αποπτωτικό μονοπάτι σε ορισμένες καρκινικές σειρές, αλλά δεν έχουν την ίδια επίδραση σε φυσιολογικά κύτταρα. Οι ακριβείς μηχανισμοί αυτής της δράσης δεν είναι απόλυτα γνωστοί.

Ωστόσο, είναι γνωστό ότι ορισμένα φλαβονοειδή καταστέλλουν την έκφραση των γονιδίων της κυτταρικής επιβίωσης Bcl-2 και Bcl-X(L), ενεργοποιούν ενδονουκλεάσες, απελευθερώνουν από τα μιτοχόνδρια το κυτόχρωμα c με συνέπεια την ενεργοποίηση των κασπασών 9 και 3, οι οποίες συμμετέχουν ενεργά στην απόπτωση των κυττάρων και τέλος αναστέλλουν τη δράση των τοποϊσομερασών τύπου I και II (Ren et al., 2003).

#### **1.4.6 Αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολικών ενώσεων**

Οι διαιτητικές πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή αποτελούν τα πλέον φυσικά αντιοξειδωτικά στη διατροφή του ανθρώπου και είναι ευρέως διαδεδομένα συστατικά των φρούτων, των λαχανικών, των δημητριακών, του έξτρα παρθένου ελαιολάδου, των οσπρίων, της σοκολάτας και των ροφημάτων, όπως το τσάι, ο καφές και το κρασί (Manach et al., 2004). Οι πολυφαινόλες, ως αντιοξειδωτικά, προστατεύουν τα κυτταρικά συστατικά (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια μεμβρανών) από οξειδωτικές βλάβες. Έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται από διάφορους παράγοντες, όπως το κάπνισμα, η ατμοσφαιρική ρύπανση, η φλεγμονή και οι μεταβολικές αντιδράσεις.

*In vivo* μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι φλαβονόλες, οι φλαβόνες, τα φαινολικά οξέα (όπως το φερουλικό οξύ) και οι ανθοκυανίνες διαθέτουν σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, οι οποίες βασίζονται στην ικανότητα απομάκρυνσης των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Ren et al., 2003). Ενδεικτικά, μελέτες σε κυτταρικές σειρές έχουν δείξει ότι η κερκετίνη και η καιμπφερόλη μπορούν να αυξήσουν τα επίπεδα της γλουταθειόνης σε ποσοστό μέχρι και 50%, και η μυρικετίνη δρα προστατευτικά έναντι των ριζών υπεροξειδίου. Τέλος, πολλές μελέτες περιγράφουν την αντιοξειδωτική δράση των ανθοκυανινών, οι οποίες είναι πιο ισχυρά αντιοξειδωτικά μόρια σε σχέση με τη βιταμίνες C και E. Η αντιοξειδωτική ικανότητα πολλών φρούτων εξαρτάται από το περιεχόμενό τους σε ανθοκυανίνες και υπάρχουν μελέτες που αναφέρονται στην δράση εκχυλισμάτων που προέρχονται από μούρα έναντι ριζών οξυγόνου (Nichenametla et al., 2006).

#### 1.4.7 Αντικαρκινική δράση πολυφαινολικών ενώσεων

Πολλές μελέτες εξετάζουν τις επιδράσεις των πολυφαινολικών μορίων σε καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιώντας τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* συστήματα. Οι μελέτες που αφορούν φαινολικά οξέα έχουν παρουσιάσει διαφορούμενα αποτελέσματα. Αναλυτικά, έχει αποδειχθεί ότι το φερουλικό και το χλωρογενικό οξύ αναστέλλουν τη δραστηριότητα του κυτοχρώματος P450, ενός ενζυμικού συστήματος το οποίο μπορεί να ενεργοποιήσει ή να απενεργοποιήσει την διαδικασία της καρκινογένεσης. Επίσης, τα φαινολικά οξέα αναστέλλουν ή επάγουν διάφορα ένζυμα, γεγονός που μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη του καρκίνου. Για παράδειγμα, επίμυες που εκτέθηκαν σε 1% φερουλικό οξύ παρουσίασαν σημαντική αύξηση στην δραστηριότητα του ενζύμου UDP-γλυκουρονικής τρανσφεράσης, που ανήκει στα ένζυμα των αντιδράσεων της Φάσης II του μεταβολισμού. Επιπλέον, η επαγωγή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων, η αναστολή των μεταλλάξεων, η αντιμεταστατική δραστηριότητα και η ρύθμιση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος αποτελούν μηχανισμούς μέσω των οποίων ασκείται η αντικαρκινική δράση αυτών των μορίων. Εντούτοις, έχουν αναφερθεί και μελέτες στις οποίες τα μόρια αυτά φαίνεται ότι προωθούν την καρκινογένεση, κάτι που πιθανόν να οφείλεται στις βλάβες που προκαλούνται στο DNA από την παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Συμπερασματικά, κάποιες μελέτες υποδεικνύουν την αντικαρκινική δράση των φαινολικών οξέων, ενώ άλλες συμπεραίνουν την επαγωγή της καρκινογένεσης. Τα διαφορετικά αυτά συμπεράσματα πιθανόν οφείλονται στον διαφορετικό σχεδιασμό των πειραματικών συνθηκών.

Υπάρχουν μελέτες που αναφέρονται στην αντικαρκινική δράση των φλαβονοειδών και κυρίως σε μία υποομάδα τους, τις φλαβονόλες. Οι φλαβονόλες ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο, την ανάπτυξη των κυττάρων και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, γεγονός που αποτελεί ένα σημαντικό αντικαρκινικό μηχανισμό. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η κερκετίνη, μόριο που αναστέλλει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου σε καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7, μέσω προσωρινής συσσώρευσης στη φάση M, παύση στη φάση G2 και επαγωγή απόπτωσης. Γενικά, η κερκετίνη θεωρείται ένα μη καρκινογόνο μόριο. Εντούτοις, έχει αναφερθεί μια μελέτη σε ποντίκια όπου η χορήγηση 0.1% κερκετίνης για 58 εβδομάδες οδήγησε στην εμφάνιση καρκίνου στην κύστη και στο έντερο, γεγονός που δηλώνει ότι στην συγκεκριμένη περίπτωση η κερκετίνη επάγει τον σχηματισμό καρκίνου.

Οι ανθοκυανίνες αποτελούν μια από τις ομάδες των φλαβονοειδών, οι οποίες έχουν μελετηθεί για τις βιολογικές και χημειοπροστατευτικές τους ιδιότητες. Η αντιοξειδωτική τους δραστηριότητα που παρουσιάζεται σε πολλά *in vitro* πειράματα, φαίνεται να είναι η σημαντικότερη ιδιότητα που επιτρέπει τη χρήση τους σαν μόρια για την πρόληψη του καρκίνου. Οι αντικαρκινικές ιδιότητες των ανθοκυανινών παρουσιάζονται και σε *in vivo* μελέτες, όπου εμφανίζουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα κυρίως έναντι στον καρκίνο του δέρματος. Οι ανθοκυανίνες πέρα από την άμεση αντιοξειδωτική τους δράση μπορούν και έμμεσα να συμμετέχουν στην πρόληψη του καρκίνου (Nichenametla et al., 2006).

Τα στυλβένια αποτελούν μια ακόμα υποομάδα των φλαβονοειδών που εμφανίζει αντικαρκινική δράση. Σε συνδυασμό με *in vitro* μελέτες η αντικαρκινική δράση των στυλβενίων έχει αποδειχθεί και από *in vivo* μελέτες, όπου τα στυλβένια και κυρίως η ρεσβερατρόλη, είναι δραστικά σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου, όπως στον καρκίνο του εντέρου, του δέρματος και του οισοφάγου (Nichenametla et al., 2006).

Τέλος, οι πολυφαινολικές ενώσεις (φλαβονοειδή, κατεχίνες, κλπ) που περιέχονται στο τσάι έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν την καρκινογένεση και τη δημιουργία όγκων σε διαφορετικά όργανα. Μερικά παράγωγα των πολυφαινολών επηρεάζουν την ενζυμική δραστηριότητα και διάφορα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, με αποτέλεσμα την καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την ενίσχυση της απόπτωσης, καθώς και την αγγειογένεση με τελικό σκοπό την καταστολή ανάπτυξης της νόσου (Davalli et al., 2012).

### 1.5 Το γένος *Lathyrus*

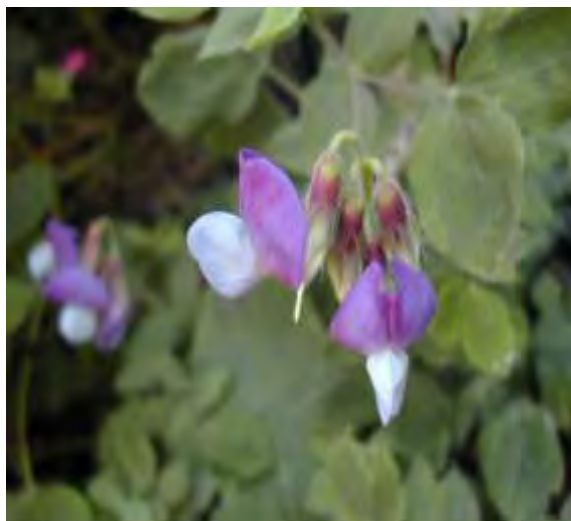
Το γένος *Lathyrus* είναι μία από τις σημαντικότερες ομάδες φυτών της οικογένειας *Leguminosae*. Αποτελείται από περίπου 187 είδη και υποείδη και είναι διαδεδομένα στην περιοχή της Μεσογείου, την Κεντρική και Ανατολική Ασία. Τα είδη του γένους αυτού χρησιμοποιούνται ως καρποδοτικά και ως κτηνοτροφικά φυτά. Το είδος *Lathyrus sativus* είναι το κοινό εδώδιμο λαθούρι. Είναι ετήσιο ποώδες φυτό, καλλιεργούμενο για τα σπέρματά του, τα οποία φέρονται στο εμπόριο με το όνομα «φάβα». Χρησιμοποιείται είτε ως κτηνιατρικό φυτό, είτε για την παραγωγή εδώδιμων λαθουριών. Το είδος *Lathyrus laxiflorus subsp laxiflorus* αποτελεί ένα άγριο είδος λαθουριού. Είναι αναρριχώμενο φυτό, με βράκτια φύλλα, μωβ άνθος και καρπό χέδρωπα. Το είδος *Lathyrus Clymenus* διαφέρει από το *Lathyrus sativus*, φύεται μόνο

στο Σαντορίνη και παράγει τη χαρακτηριστική φάβα Σαντορίνης (Spanou et al., 2010).

Το *Lathyrus laxiflorus* είναι φυτό πλούσιο σε φλαβονοειδή και συγκεκριμένα σε γλυκοζιτικά παράγωγα της κερκετίνης και της καιμπφερόλης. Τα φλαβονοειδή αυτά αποτελούν δύο από τους πιο κοινούς αντιπροσώπους της κατηγορίας, οι οποίοι φημίζονται για τις σπουδαίες βιολογικές και φαρμακολογικές δράσεις τους. Ειδικότερα, το *Lathyrus laxiflorus* (φύλλα, καρποί και βλαστοί) αποτελείται από 3-O-ραμνοσυλ-κερκετίνη (quercetin-3-O-rhamnoside), 3-O-ρουτινοσυλ-κερκετίνη (quercetin-3-O-rutinoside), 3-O-γλυκοσυλ-κερκετίνη (quercetin-3-O-glucoside), 3-O-ραμνοσυλ-καιμπφερόλη (kaempferol-3-O-rhamnoside), 3-O-ρουτινοσυλ-καιμπφερόλη (kaempferon-3-O-rutinoside) (Harborne, 1971). Επιπλέον, περιέχει ένα τριγλυκοσίδιο της καιμπφερόλης (kaempferol-3-O-[6-O-(3-O-rhamnopyranose) rhamnopyranose] galactopyranose) και καφεϊκό οξύ σε ελεύθερη μορφή.

Ένα άλλο χαρακτηριστικό της φυτοχημικής δομής του *Lathyrus laxiflorus* είναι η ύπαρξη προανθοκυανιδών στα φύλλα του, ουσιών που δεν αναφέρονται σε κανένα άλλο είδος του γένους *Lathyrus*. Επίσης, στους σπόρους του περιέχει λουτεολίνη και συγκεκριμένα το γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης (luteolin-7-glucuronide) και ακόρεστα οξέα όπως λινολεϊκό και λινολενικό σε ποσοστό 16,5%. Το ολεϊκό οξύ που υπάρχει στο *Lathyrus laxiflorus* υπολογίζεται περίπου σε ποσοστό 30,4%. Τέλος, στο *Lathyrus laxiflorus* έχει ταυτοποιηθεί η φλαβόνη απιγενίνη σε γλυκοσυλιωμένη μορφή (apigenin-6-C-a-L-arabinopyranose-8-C-b-D-glycopyranose).





**Εικόνα 20:** Το φυτό *Lathyrus laxiflorus*

## 1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της μελέτης των βιολογικών ιδιοτήτων φυτικών εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν από ψυχανθή (μέλη της οικογένειας *Leguminosae*) με έμφαση στις χημειοπροστατευτικές τους ιδιότητες. Συνολικά μελετήθηκε η δράση έξι καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων, οι οποίες απομονώθηκαν από το φυτό *Lathyrus laxiflorus*, στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου. Η τοποϊσομεράση I αποτελεί σημαντικό ένζυμο που συμμετέχει σε ζωτικές κυτταρικές λειτουργίες (αντιγραφή, μεταγραφή, σταθερότητα γενετικού υλικού) και έχει παρατηρηθεί ότι εμφανίζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε καρκινικά κύτταρα. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ταυτοποίηση ενώσεων που δρουν ως αναστολείς της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I, οι οποίες θα αποτελέσουν εν δυνάμει χημειοθεραπευτικούς και αντικαρκινικούς παράγοντες.

## **2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 2.1 ΥΛΙΚΑ

### 2.1.1 Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των εταιρειών Sigma (Γερμανία) (αμπικιλίνη-ampicilin, SDS, οξικό κάλιο-potassium acetate, RNase-RNάση, βορικό οξύ-boric acid), Merck (Γερμανία) (Tris, NaOH, οξικό οξύ, ισοπροπανόλη, αιθανόλη, HCl, βρωμιούχο αιθίδιο-ethidium bromide), Applichem (Γερμανία) (DTT-DiThioThreitol, αγαρόζη), Panreac (Ισπανία) (NaCl, γλυκόζη, EDTA, γλυκερόλη) Scharlau (Ισπανία) (LB Broth), Research Organics (Η.Π.Α) (κυανό της βρωμοφαινόλης-bromophenol blue).

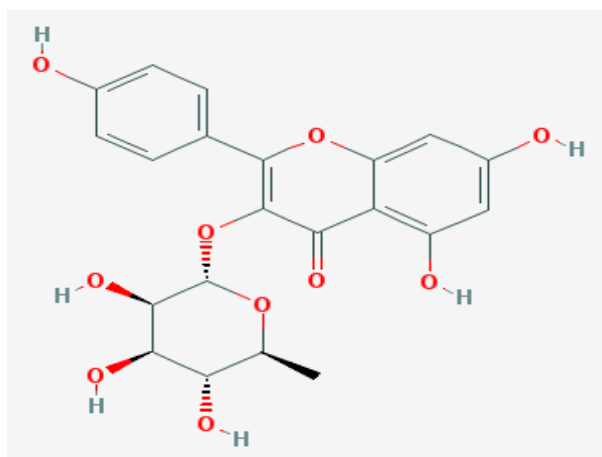
### 2.1.2 Εκχυλίσματα και πολυφαινολικά καθαρά μόρια

Τα πολυφαινολικά καθαρά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από το ποώδες φυτό *Lathyrus laxiflorus subsp laxiflorus*. Η απομόνωση και η επεξεργασία των φυτικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκαν στο τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

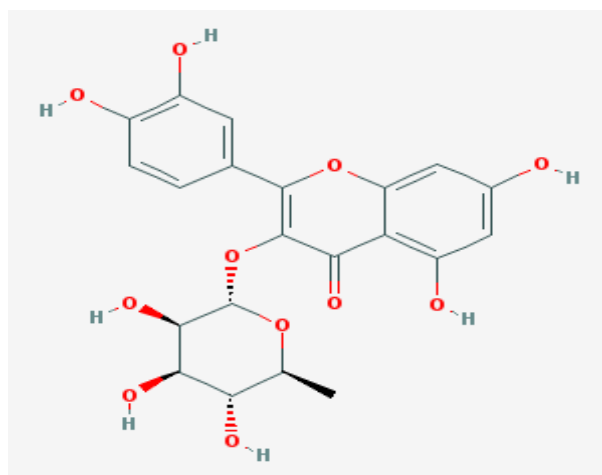
Απομονώθηκαν τα παρακάτω καθαρά πολυφαινολικά μόρια:

1. Kaempferol-3-O- rhamnoside
2. Quercetin -3-O- rhamnoside
3. Kaempferol-3-O-rutinoside
4. Quercetin -3-O- rutinoside
5. Caffeic acid
6. Apigenin-8-c-a-D-glycopyranoside-6-c-a-L-arabinopyranosyl

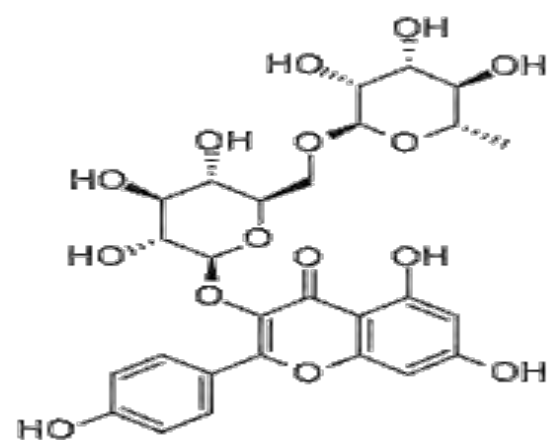
Οι δομές των μορίων απεικονίζονται στις εικόνες 21-26



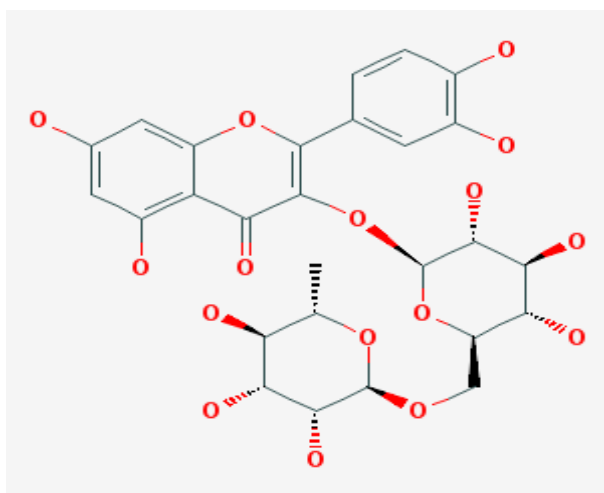
*Εικόνα 21: Kaempferol-3-O- rhamnoside*



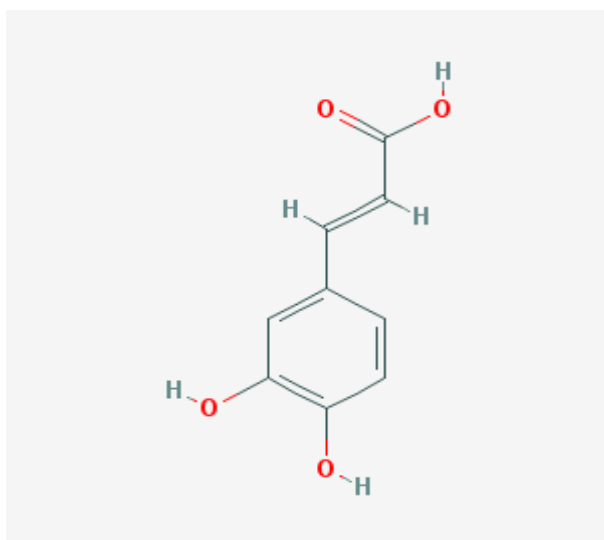
*Εικόνα 22: Quercetin -3-O- rhamnoside*



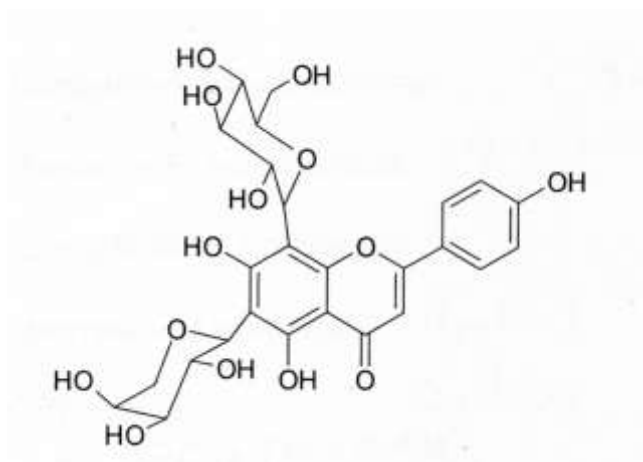
*Εικόνα 23: Kaempferol-3-O-rutinoside*



**Εικόνα 24:** Quercetin -3-O- rutinoside



**Εικόνα 25:** Caffeic acid



**Εικόνα 26:** Apigenin – 8 – C – α – D – glucopyranoside – 6 – C – α – L – arabinopyranosyl

### 2.1.3 Αντιδραστήρια απομόνωσης πλασμιδιακού DNA

- Διάλυμα I (Sol I): 50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-Cl (pH 8), 10 mM EDTA (pH 8). Παρασκευάζεται μια μέρα πριν την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, αποστειρώνεται και συντηρείται στους 4° C. Η γλυκόζη συντελεί στη διατήρηση της ωσμωτικότητας, ώστε να αποφευχθεί το σπάσιμο των βακτηριακών κυττάρων. Το Tris-Cl είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα. Το EDTA δεσμεύει τα δισθενή μέταλλα όπως τα κατιόντα  $Mg^{++}$ . Η απομάκρυνση των κατιόντων αποσταθεροποιεί την κυτταρική μεμβράνη και αναστέλλει την αποικοδόμηση του DNA από DNAάσες.
- Διάλυμα II (Sol II): NaOH 0,2 N, SDS 1%. Παρασκευάζεται την ημέρα της απομόνωσης του πλασμιδιακού DNA. Το διάλυμα αυτό προκαλεί λύση των κυττάρων. Το SDS είναι ένα απορρυπαντικό που μετουσιώνει τις μεμβρανικές πρωτεΐνες σχηματίζοντας πόρους στη μεμβράνη. Το NaOH χαλαρώνει το κυτταρικό τοίχωμα, απελευθερώνει το πλασμιδιακό DNA και κομματιάζει το χρωμοσωμικό DNA.
- Διάλυμα III (Sol III): 60 ml διάλυμα οξικού καλίου (5M), 11,5 ml οξικό οξύ σε τελικό όγκο 100 ml. Παρασκευάζεται μια ημέρα πριν την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου. Με την προσθήκη του διαλύματος γίνεται διαχωρισμός του πλασμιδιακού DNA από τα υπόλοιπα στοιχεία του κυττάρου. Η προσθήκη οξικού καλίου έχει σαν αποτέλεσμα την καθίζηση του χρωμοσωμικού DNA, που πλέον είναι μονόκλωνο και ελαφρύτερο, καθώς τα μεγάλα κομμάτια μονόκλωνου DNA παραμένουν αδιάλυτα λόγω της μεγάλης αλατότητας.
- Διάλυμα TE: 10 mM Tris-Cl (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8) σε διπλά απιονισμένο νερό.
- Θρεπτικό μέσο βακτηριακής καλλιέργειας: 1,5 g LB broth και 1g NaCl διαλύονται σε 100 ml διπλά απιονισμένου νερού και ακολουθεί υγρή αποστείρωση στους 120° C για 20 λεπτά.
- RNάση (συγκέντρωση 10 mg/ml)
- Αμικικιλίνη συγκέντρωσης 100 mg/ml. Το διάλυμα της αμικικιλίνης μετά την παρασκευή του αποστειρώνεται με φιλτράρισμα μέσω πόρων 0,45  $\mu$ M και διατηρείται σε -20° C.
- Ισοπροπανόλη
- Διάλυμα αιθανόλης 70% σε διπλά απιονισμένο νερό.

#### **2.1.4 Αντιδραστήρια για την δοκιμή χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA από την τοποϊσομεράση I (wheat germ Topoisomerase I plasmid relaxation assay)**

- Ένζυμο Τοποϊσομεράση I από σπόρο σίτου (wheat germ topoisomerase I, Promega-H.P.A)
- Διάλυμα A: 20 mM DTT. Μετά την παρασκευή του το διάλυμα αποστειρώνεται με φιλτράρισμα μέσω πόρων 0,45  $\mu$ M και διατηρείται σε -20° C.
- Διάλυμα B: 50% γλυκερόλη σε διπλά απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αποστειρώνεται μετά την παρασκευή του και διατηρείται στους 4° C.
- Διάλυμα Γ (20X): 1 M Tris-HCl (pH 7.5), 1 M NaCl, 2 mM EDTA. Το διάλυμα αποστειρώνεται μετά την παρασκευή του και διατηρείται στους 4° C.
- Διάλυμα αραίωσης του ενζύμου (Enzyme dilution buffer): 20% γλυκερόλη, 1 mM dTT, 1X διάλυμα Γ.
- Διάλυμα φόρτωσης (loading buffer): 30% γλυκερόλη, 0,25% κυανό της βρωμοφαινόλης σε διπλά απιονισμένο νερό.

#### **2.1.5 Αντιδραστήρια ηλεκτροφόρησης πλασμιδιακού DNA**

- Αγαρόζη
- Βρωμιούχο αιθίδιο συγκέντρωσης 10 mg/ml
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης: 1X TBE (10 mM Tris-Cl, 90 mM βορικό οξύ, 0,5 mM EDTA pH 8)

### **2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **2.2.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA**

Η αλκαλική λύση είναι μια μέθοδος απομόνωσης κυκλικού πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα. Χρησιμοποιείται ευρέως γιατί αποτελεί μια γρήγορη και αξιόπιστη τεχνική απομόνωσης DNA από κύτταρα. Σε κάποιες περιπτώσεις, όταν αυτό απαιτείται, μπορεί να ακολουθήσει περαιτέρω επεξεργασία με σκοπό την αύξηση της καθαρότητας του DNA.

Το πλασμιδιακό DNA απομονώθηκε από βακτηριακά κύτταρα *E.coli* τα οποία είχαν προηγουμένως μετασχηματιστεί με το πλασμιδιακό DNA Bluescript-SK+. Τα βακτήρια διατηρούνται στους -80° C ως απόθεμα (stock) παρουσία γλυκερόλης (η γλυκερόλη ως κρυοπροστατευτικό μέσο συμβάλλει στην αποφυγή λύσης των κυττάρων με τις απότομες αλλαγές της θερμοκρασίας).



Το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των βακτηρίων αποστειρώθηκε στους 120° C με υγρή αποστείρωση για 20 λεπτά και ακολούθησε προσθήκη διαλύματος αμπικιλίνης (σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml). Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν 100 ml θρεπτικού μέσου. Αρχικά, 3 ml από το θρεπτικό μέσο επιμολύνθηκαν με βακτήρια *E.coli* που έφεραν το πλασμιδιακό DNA Bluescript-SK+ και αναπτύχθηκαν περίπου για 4-6 ώρες, μέχρι η καλλιέργεια να φθάσει στο εκθετικό στάδιο ανάπτυξης. Στη συνέχεια η καλλιέργεια μεταφέρθηκε στο υπόλοιπο θρεπτικό μέσο και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 37° C για 12-13 ώρες με συνεχή ανάδευση (210 στροφές).

Η συνολική καλλιέργεια χωρίστηκε σε δύο σωληνάρια falcon των 50 ml, τα οποία φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά στις 4.000 στροφές στους 4° C. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου το ίζημα επαναδιαλύεται σε 4 ml Διαλύματος I (Sol I) ανά 50 ml καλλιέργειας.. Για να αποφευχθεί η ισχυρή πίεση κατά το σπάσιμο των κυττάρων η διάλυση του ιζήματος γίνεται αρχικά με χρήση πιπέτας Gilson και ακολουθεί μία έντονη, αλλά σύντομη ανάδευση (vortex). Τα δείγματα επωάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη 8 ml Διαλύματος II (Sol II) ανά 50 ml καλλιέργειας και ακολούθησε σύντομη και ήπια ανάδευση. Η ανάδευση είναι ήπια γιατί στην αντίθετη περίπτωση οι πόροι, λόγω του SDS, γίνονται μεγαλύτεροι και απομονώνεται και χρωμοσωμικό DNA μαζί με το πλασμιδιακό. Επειδή το διάλυμα είναι πολύ αλκαλικό, το πλασμιδιακό DNA χαλαρώνει από την υπερελικωμένη διαμόρφωση στην ανοιχτή κυκλική, γι' αυτό αμέσως μόλις διαυγάσει προστίθεται το επόμενο διάλυμα. Χρησιμοποιήθηκαν 6 ml Διαλύματος III (Sol III) ανά 50 ml καλλιέργειας και ακολούθησε έντονη ανάδευση (vortex) ώστε να γίνει ομοιογενές το διάλυμα και επώαση για 7-8 λεπτά σε πάγο.

Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά στις 5.000 στροφές στους 4° C και ακολούθησε συλλογή του υπερκειμένου και επανάληψη της προηγούμενης φυγοκέντρωσης. Τελικώς το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καινούριο σωλήνα με ταυτόχρονη μέτρηση του όγκου του. Ακολούθησε προσθήκη παγωμένης ισοπροπανόλης (σε όγκο που αναλογεί στο 60% του όγκου του υπερκειμένου) και έντονη ανάδευση του δείγματος. Η ισοπροπανόλη προστίθεται για την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA και του RNA. Τα δείγματα επώαστηκαν για 3-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά στις 5.000 στροφές στους 4° C και το ίζημα ξεπλύθηκε με διάλυμα παγωμένης αιθανόλης 70% (σε όγκο που

αναλογεί στο 50% του όγκου του δείγματος) και ισχυρή ανάδευση. Η αιθανόλη χρησιμοποιείται για τον περαιτέρω καθαρισμό του πλασμιδιακού DNA.

Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά στις 5.000 στροφές στους 4° C και μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου το ίζημα τοποθετήθηκε σε κλίβανο 37° C για να στεγνώσει. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα TE (1.5 ml διαλύματος ανά 50 ml καλλιέργειας), στο οποίο προστέθηκε ένζυμο RNάση (σε τελική συγκέντρωση 10μg/ml) για τη διάσπαση του RNA.

Η εκτίμηση της καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA έγινε με φωτομέτρηση σε φωτόμετρο Hitachi U 1500. Συγκεκριμένα υπολογίστηκε ο λόγος της απορρόφησης στα 260 nm προς την απορρόφηση στα 280 nm (το DNA απορροφά με μέγιστο σε μήκος κύματος 260 nm και οι πρωτεΐνες απορροφούν σε μήκος κύματος 280 nm). Όταν ο λόγος των απορροφήσεων είναι μεγαλύτερος από την τιμή 1.8 το DNA του πλασμιδίου θεωρείται υψηλής καθαρότητας.

Η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA υπολογίστηκε βάσει του τύπου:

*Συγκέντρωση (μg/ml) = Απορρόφηση σε 260 nm x 50 x συντελεστής αραιώσης του δείγματος*

Η εκτίμηση των διαμορφώσεων του πλασμιδιακού DNA έγινε μετά από ηλεκτροφόρηση σε 1% πήκτωμα αгарόζης. Το πλασμίδιο διατηρείται στους -20° C, αφού έχει πραγματοποιηθεί διαχωρισμός του σε μικρότερες ποσότητες (aliquots), δεδομένου ότι το συχνό ξεπάγωμα μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της υπερελικωμένης διαμόρφωσης.

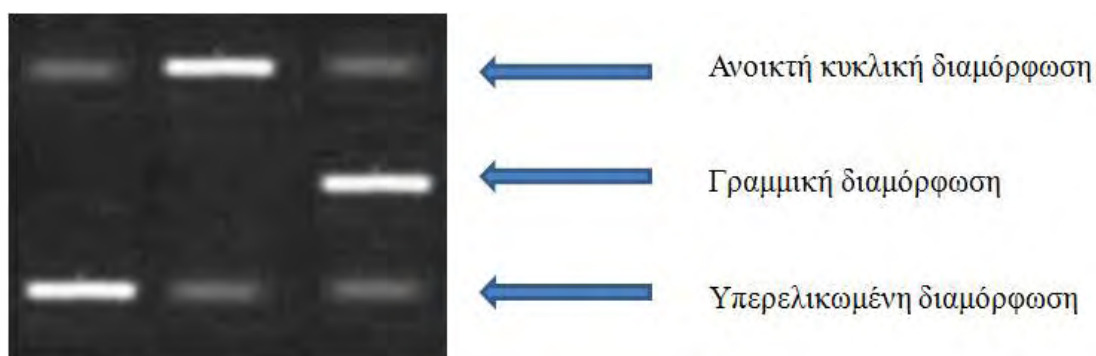
### **2.2.2. Δοκιμή χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA από τοποϊσομεράση I (wheat germ Topoisomerase I relaxation assay).**

Η μέθοδος στηρίζεται στην ικανότητα της τοποϊσομεράσης να προκαλεί μονόκλωνα σπασίματα στο πλασμιδιακό DNA, το οποίο αποτελεί πρότυπο γενετικού υλικού που μας επιτρέπει να εκτιμήσουμε τη δράση των αναστολέων των τοποϊσομερασών. Το πλασμιδιακό DNA είναι ένα κυκλικό δίκλωνο DNA, το οποίο φυσιολογικά απαντάται κυρίως στα βακτήρια και ανάλογα με την διαμόρφωση του εμφανίζει διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε ένα πήκτωμα αгарόζης. Το πλασμιδιακό DNA απαντάται στις ακόλουθες διαμορφώσεις:

1. Την υπερελικωμένη διαμόρφωση, στην οποία το πλασμίδιο είναι άθικτο και αποτελεί και την πιο συμπαγή του μορφή

2. Την ανοιχτή κυκλική, στην οποία το πλασμίδιο μεταβαίνει όταν προκαλούνται μονόκλωνα σπασίματα
3. Την γραμμική διαμόρφωση, στην οποία μεταβαίνει το πλασμίδιο όταν φέρει δίκλωνα σπασίματα

Οι διαμορφώσεις αυτές τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα σε ένα πήκτωμα ηλεκτροφόρησης. Η υπερελικωμένη διαμόρφωση του DNA είναι η πιο συμπαγής και έχει την ικανότητα να διαπερνά τους πόρους της αгарόζης με μεγαλύτερη ταχύτητα και συνεπώς διανύει μεγαλύτερη απόσταση στο πήκτωμα της αгарόζης. Η δράση της τοποϊσομεράσης I στο πλασμιδιακό DNA προκαλεί μονόκλωνα σπασίματα στην υπερελικωμένη διαμόρφωση του DNA, με αποτέλεσμα αυτό να μεταβαίνει στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση. Η ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση κινείται πιο αργά από την υπερελικωμένη διαμόρφωση διαμέσου των πόρων της αгарόζης, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται ψηλότερα από την υπερελικωμένη μορφή στο πήκτωμα της αгарόζης μετά από την ηλεκτροφόρηση. Τέλος, η γραμμική διαμόρφωση εμφανίζεται ανάμεσα στην ανοιχτή κυκλική και στην υπερελικωμένη διαμόρφωση, λόγω του ότι μπορεί να διαπεράσει τους πόρους της αгарόζης γρηγορότερα από ότι η ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση (Εικόνα 27).

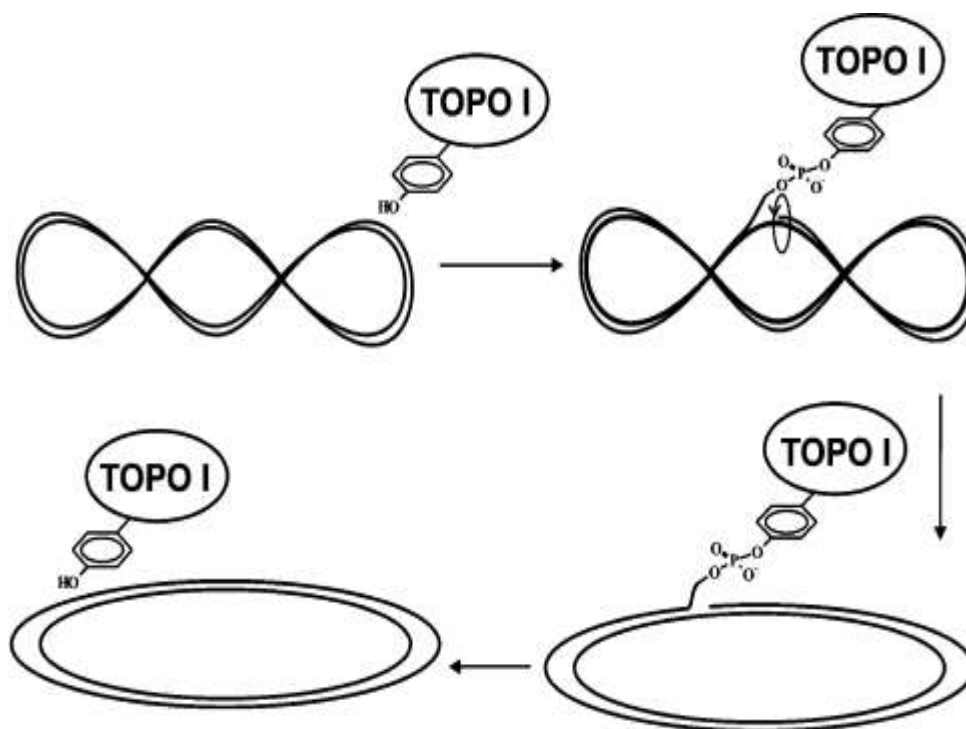


**Εικόνα 27:** Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε τιτλοδότηση του ενζύμου. Ο λόγος που πραγματοποιείται η τιτλοδότηση είναι για να καθοριστεί η μικρότερη ποσότητα (units) του ενζύμου που απαιτείται ώστε το 90% της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδίου να μετατραπεί στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση λόγω του μονόκλωνου σπασίματος που προκαλεί το ένζυμο (Εικόνα 28). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι υπήρξε διαφορά στην ενζυμική ενεργότητα ανάλογα με την παρτίδα του ενζύμου

(stock) του παρασκευαστή και για το λόγο αυτό σε ορισμένες αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν 1.3 units, 1.5 units και 1.66 units ενζύμου.

Τα εκχυλίσματα εξετάστηκαν αρχικά σε μία υψηλή ενδεικτική συγκέντρωση (500  $\mu\text{M}$ ) για την εύρεση πιθανών αναστολέων του ενζύμου. Τα εκχυλίσματα που ανέστειλαν την ενεργότητα τοποϊσομεράσης I εξετάστηκαν περαιτέρω σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 0.05-200  $\mu\text{M}$  (ανάλογα με την περίπτωση) για τον υπολογισμό των τιμών  $IC_{50}$  (Inhibitory Concentration). Η τιμή  $IC_{50}$  εκφράζει την συγκέντρωση του αναστολέα, στην οποία παρατηρείται 50% αναστολή στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I.



**Εικόνα 28:** Επίδραση της τοποϊσομεράσης I στο πλασμιδιακό DNA. Η διαμόρφωση που προκύπτει αλλάζει την ηλεκτροφορητική κινητικότητα του μορίου.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε διάλυμα 20% γλυκερόλης, 1mM dTT, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA (reaction buffer) σε τελικό όγκο 20  $\mu\text{l}$ . Κάθε αντίδραση περιείχε 1  $\mu\text{g}$  Bluescript SK+ και 1.3-1.66 unit της τοποϊσομεράσης I, ανάλογα με την παρτίδα του ενζύμου, όπως προαναφέρθηκε. Αξίζει να σημειωθεί ότι για συγκεκριμένες αντιδράσεις ήταν απαραίτητη η αραίωση του ενζύμου, η οποία πραγματοποιήθηκε στο διάλυμα αραίωσης (enzyme dilution

buffer). Κάθε αντίδραση περιελάμβανε τα εξής δείγματα: α) τον αρνητικό μάρτυρα δηλαδή το πλασμιδιακό DNA, β) το θετικό μάρτυρα δηλαδή το πλασμιδιακό DNA με το ένζυμο, και γ) τα δείγματα που περιείχαν πλασμιδιακό DNA, ένζυμο και τα υπό εξέταση μόρια σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Τα δείγματα επώστηκαν στους 37° C για μία ώρα, και η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη 5 μl διαλύματος φόρτωσης (loading buffer). Αξίζει να σημειωθεί ότι η παρουσία γλυκερόλης στο διάλυμα φόρτωσης αυξάνει την πυκνότητα των δειγμάτων ώστε να καθιζήσουν στα πηγαδάκια του πηκτώματος και η παρουσία του κυανού της βρωμοφαινόλης μας επιτρέπει λόγω χρώματος να παρακολουθήσουμε την πορεία της ηλεκτροφόρησης,

### **2.2.3 Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA**

Τα μόρια DNA είναι ομοιόμορφα αρνητικά φορτισμένα, λόγω του ιονισμού των φωσφορικών τους ομάδων. Έτσι, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου σε οριζόντιο πήκτωμα αγαρόζης (φυσικός πολυσακχαρίτης), τα μόρια DNA μετακινούνται προς το θετικό πόλο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς το μέγεθος τους (McDonell et al 1977, Southern 1979). Η μετακίνηση των μορίων DNA σε ένα πήκτωμα αγαρόζης επηρεάζεται από παραμέτρους όπως το μέγεθος των πόρων (συγκέντρωση) του πηκτώματος, την εφαρμοζόμενη διαφορά δυναμικού, το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης και την διαμόρφωση των νουκλεϊκών οξέων. Η οπτικοποίηση της θέσης μετακίνησης των μορίων DNA πραγματοποιείται με την έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία (260-360 nm), λόγω της ενσωμάτωσης πορτοκαλοκόκκινης φθορίζουσας χρωστικής (βρωμιούχο αιθίδιο) ανάμεσα στις αζωτούχες βάσεις της διπλής έλικας του DNA. Η μέθοδος παρέχει υψηλή ανάλυση και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση, το διαχωρισμό και την απομόνωση μορίων DNA με βάση το μέγεθος τους. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αναλυτικούς ή παρασκευαστικούς σκοπούς.

Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 0.8%. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα TBE, αρχικά στα 60 V και στη συνέχεια στα 100 V για περίπου 45 λεπτά. Ακολούθως το πήκτωμα της αγαρόζης χρωματίστηκε σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (τελικής συγκέντρωσης 0,5 μg/ml) για 30 λεπτά με συνεχή ανάδευση και στη συνέχεια αποχρωματίστηκε για 30 λεπτά σε 250 ml διπλά απιονισμένο νερό. Για την οπτικοποίηση του DNA το πήκτωμα φωτογραφίστηκε υπό υπεριώδες φως (UV) και οι εικόνες αποθηκεύθηκαν

με το πρόγραμμα Alpha View (Alpha Innotech, San Leandro, California). Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

### 2.3 Υπολογισμοί

Η επεξεργασία των φωτογραφιών των πηκτωμάτων έγινε με το πρόγραμμα Gel-Pro. Σε κάθε περίπτωση υπολογίζονταν τα ποσοστά της υπερελικωμένης και της ανοιχτής κυκλικής διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA, μετά την επίδραση των αναστολέων, βάσει της οπτικής πυκνότητάς τους. Από τις τιμές που προέκυπταν, το επί της εκατό (%) ποσοστό αναστολής υπολογιζόταν με τον εξής τύπο:

$$\% \text{αναστολής} = \frac{S_p - S}{S_p - S_o} \times 100$$

όπου

$S_p$ : αντιπροσωπεύει το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής στο θετικό μάρτυρα, ο οποίος περιείχε το πλασμιδιακό DNA και το ένζυμο στη συγκέντρωση που έχει χρησιμοποιηθεί για όλα τα δείγματα του συγκεκριμένου πειράματος.

$S_o$ : αντιπροσωπεύει το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής στον αρνητικό μάρτυρα, ο οποίος περιέχει μόνο το πλασμιδιακό DNA και

$S$ : αντιπροσωπεύει το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής σε κάθε δείγμα, το οποίο περιείχε πλασμιδιακό DNA, ένζυμο και συγκεκριμένη ποσότητα του υπό εξέταση μορίου.

Τα ποσοστά αναστολής για το κάθε εξεταζόμενο μόριο μετρήθηκαν τουλάχιστον σε τρία ανεξάρτητα πειράματα. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα ανάλυσης Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 13.0. Για τη στατιστική ανάλυση υπολογίζονταν αρχικά οι παράμετροι της περιγραφικής στατιστικής που είναι η μέση τιμή (mean), η τυπική απόκλιση (standard deviation) και το τυπικό σφάλμα (standard error). Η ανεξάρτητη μεταβλητή ήταν οι συγκεντρώσεις των καθαρών ενώσεων.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μέσω ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα, 1-way ANOVA. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0.05$ . Στα γραφήματα των αποτελεσμάτων παρουσιάζονται μόνο οι στατιστικά σημαντικές τιμές.

Για την σύγκριση της ανασταλτικής δράσης των υπό εξέταση μορίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία προσδιορίστηκε η τιμή  $IC_{50}$  για το κάθε μόριο. Η τιμή  $IC_{50}$  (Inhibitory Concentration) αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του μορίου-αναστολέα, στην οποία παρατηρείται 50% αναστολή στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I. Συνεπώς, μόρια με μικρές τιμές  $IC_{50}$  αποτελούν ισχυρούς αναστολείς της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I.

### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**



### 3.1. Επίδραση καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων στην ενεργότητα της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου

Συνολικά μελετήθηκαν έξι πολυφαινολικές ενώσεις που απομονώθηκαν από το φυτό *Lathyrus laxiflorus* των οποίων η ονοματολογία, ο χημικός τύπος και τα μοριακά βάρη δίνονται στον Πίνακα 2. Αρχικά εξετάστηκε η δράση των ενώσεων αυτών στην ενδεικτική υψηλή συγκέντρωση των 500  $\mu\text{M}$ , προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι ενώσεις που μπορούν να δράσουν ως αναστολείς της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I (Εικόνα 28). Καθώς όλες οι ενώσεις ανέστειλαν πλήρως την ενεργότητα του ενζύμου, η κάθε ένωση μελετήθηκε στη συνέχεια σε ένα διαφορετικό εύρος μικρότερων συγκεντρώσεων (που κυμάνθηκε μεταξύ των 0,05  $\mu\text{M}$  και 500  $\mu\text{M}$ ), ανάλογα με την περίπτωση, με απώτερο σκοπό τον υπολογισμό της τιμής  $\text{IC}_{50}$  για κάθε ένωση.

**Πίνακας 2:** Ονόματα των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα κλάσματα που απομονώθηκαν από το φυτό *Lathyrus laxiflorus*

Σύμβολο ένωσης	Όνομα ένωσης	Μοριακό Βάρος	Χημικός τύπος
WA	Kaempferol-3-O-rhamnoside	432,38	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$
WWB	Quercetin-3-O-rhamnoside	448,38	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$
WC	Kaempferol-3-O-rutinoside	594,52	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{12}$
WD	Quercetin-3-O-rutinoside	611	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$
WE	Caffeic acid-καφεϊκό οξύ	180,16	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$
WH	Apigenin-8-c-a-D-glycopyranoside- 6-c-a-L-arabinopyranosyl	564,50	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$

Όλες οι ενώσεις εξετάστηκαν στη συγκέντρωση των 500  $\mu\text{M}$  και εμφάνισαν πλήρη αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I (σε ποσοστό 100%) (Εικόνα 29).

1      2      3      4      5      6      7      8



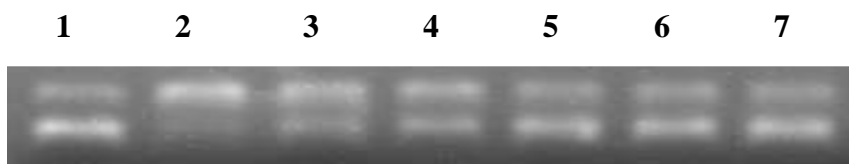
- 1 : 1  $\mu$ g πλασμιδίου χωρίς ένζυμο (αρνητικός μάρτυρας)
- 2 : 1  $\mu$ g πλασμιδίου + 1.42 units ενζύμου (θετικός μάρτυρας)
- 3 : 1  $\mu$ g πλασμιδίου + 1.42 units ενζύμου + WA (500  $\mu$ M)
- 4 : 1  $\mu$ g πλασμιδίου + 1.42 units ενζύμου + WWB (500  $\mu$ M)
- 5 : 1  $\mu$ g πλασμιδίου + 1.42 units ενζύμου + WC (500  $\mu$ M)
- 6 : 1  $\mu$ g πλασμιδίου + 1.42 units ενζύμου + WD (500  $\mu$ M)
- 7 : 1  $\mu$ g πλασμιδίου + 1.42 units ενζύμου + WE (500  $\mu$ M)
- 8 : 1  $\mu$ g πλασμιδίου + 1.42 units ενζύμου + WH (500  $\mu$ M)

**Εικόνα 29:** Επίδραση όλων των πολυφαινολικών ενώσεων στην ενεργότητα της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου

#### Ένωση WA (kaempferol-3-O-rhamnoside)

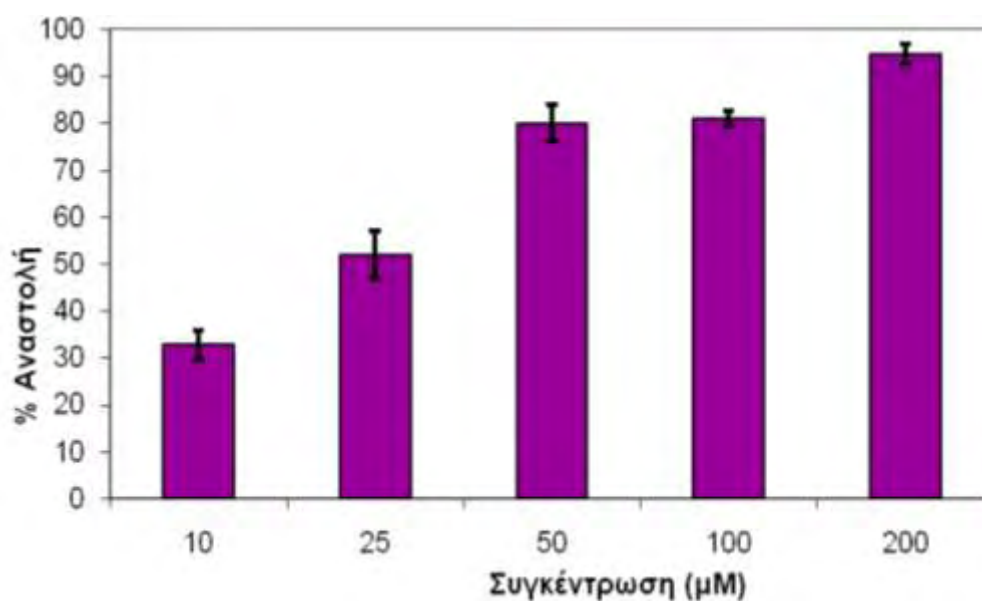
Η ένωση WA, παρουσίασε ισχυρή ανασταλτική δράση στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I στη συγκέντρωση των 500  $\mu$ M και μελετήθηκε περαιτέρω στις συγκεντρώσεις των 10, 25, 50, 100 και 200  $\mu$ M (Εικόνα 30).

Η ένωση WA, σε συγκεντρώσεις 10, 25 και 50  $\mu$ M παρουσίασε αναστολή του ενζύμου σε ποσοστό 33%, 52% και 80% αντίστοιχα, ενώ σε συγκεντρώσεις 100 και 200  $\mu$ M παρουσίασε αναστολή σε ποσοστό 81% και 95% αντίστοιχα (Γράφημα 1). Παρατηρούμε ότι η μέγιστη αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I από την ένωση WA μπορεί να επιτευχθεί στη συγκέντρωση των 200  $\mu$ M. Με βάση τα ποσοστά αναστολής κατασκευάστηκε γραφική παράσταση όπου απεικονίζεται η ανασταλτική δράση της ένωσης WA στις ανωτέρω συγκεντρώσεις, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση της τιμής  $IC_{50}$ , δηλαδή της συγκέντρωσης της ένωσης που απαιτείται για την αναστολή της καταλυτικής ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I κατά 50%. Η ένωση WA αποτελεί καταλυτικό αναστολέα του ενζύμου με τιμή  $IC_{50}$  της τάξεως των 20  $\mu$ M.



- 1 : 1  $\mu$ g πλασμιδίου χωρίς ένζυμο (αρνητικός μάρτυρας)  
 2 : 1  $\mu$ g πλασμιδίου + 1,23 units ενζύμου (θετικός μάρτυρας)  
 3 : 1  $\mu$ g πλασμιδίου + 1,23 units ενζύμου + WA (10  $\mu$ M)  
 4 : 1  $\mu$ g πλασμιδίου + 1,23 units ενζύμου + WA (25  $\mu$ M)  
 5 : 1  $\mu$ g πλασμιδίου + 1,23 units ενζύμου + WA (50  $\mu$ M)  
 6 : 1  $\mu$ g πλασμιδίου + 1,23 units ενζύμου + WA (100  $\mu$ M)  
 7 : 1  $\mu$ g πλασμιδίου + 1,23 units ενζύμου + WA (200  $\mu$ M)

**Εικόνα 30:** Επίδραση της ένωσης WA στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου σε συγκεντρώσεις 10, 25, 50, 100 και 200  $\mu$ M.



**Γράφημα 1:** Αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I του σίτου από την ένωση WA σε συγκεντρώσεις 10, 25, 50, 100 και 500  $\mu$ M.

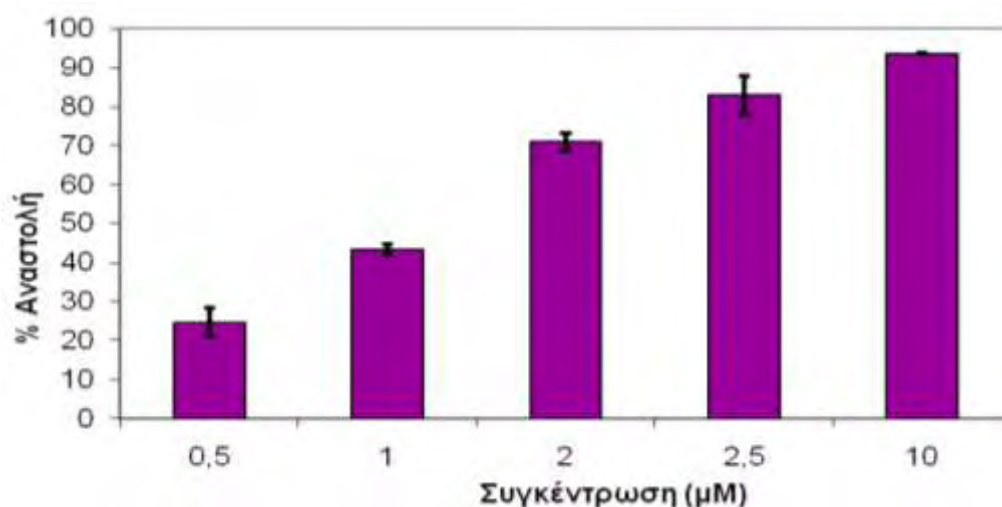
### Ένωση WWB (quercetin-3-O-rhamnoside)

Η ένωση WWB εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις των 0.5, 1, 2, 2.5 και 10  $\mu\text{M}$  στις οποίες εμφάνισε αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I με ποσοστό 25%, 43%, 71%, 83% και 94% αντίστοιχα (Εικόνα 31 και Γράφημα 2). Η ένωση WWB αποτελεί ισχυρό αναστολέα της τοποϊσομεράσης I, όπως υποδεικνύεται από την τιμή  $\text{IC}_{50}$  που είναι 1.2  $\mu\text{M}$ .



- 1 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου χωρίς ένζυμο (αρνητικός μάρτυρας)
- 2 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,23 unit ενζύμου (θετικός μάρτυρας)
- 3 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,23 unit ενζύμου + WWB (0.5  $\mu\text{M}$ )
- 4 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,23 unit ενζύμου + WWB (1  $\mu\text{M}$ )
- 5 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,23 unit ενζύμου + WWB (2  $\mu\text{M}$ )
- 6 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,23 unit ενζύμου + WWB (2,5  $\mu\text{M}$ )
- 7 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,23 unit ενζύμου + WWB (10  $\mu\text{M}$ )

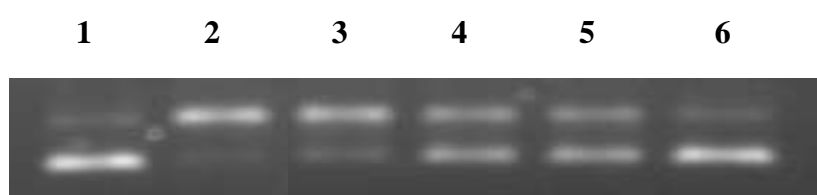
**Εικόνα 31:** Επίδραση της ένωσης WWB στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου σε συγκεντρώσεις 0.5, 1, 1.5, 2 και 2.5  $\mu\text{M}$ .



**Γράφημα 2:** Αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I του σίτου από την ένωση WWB σε συγκεντρώσεις 0.5, 1, 2, 2.5 και 10  $\mu\text{M}$ .

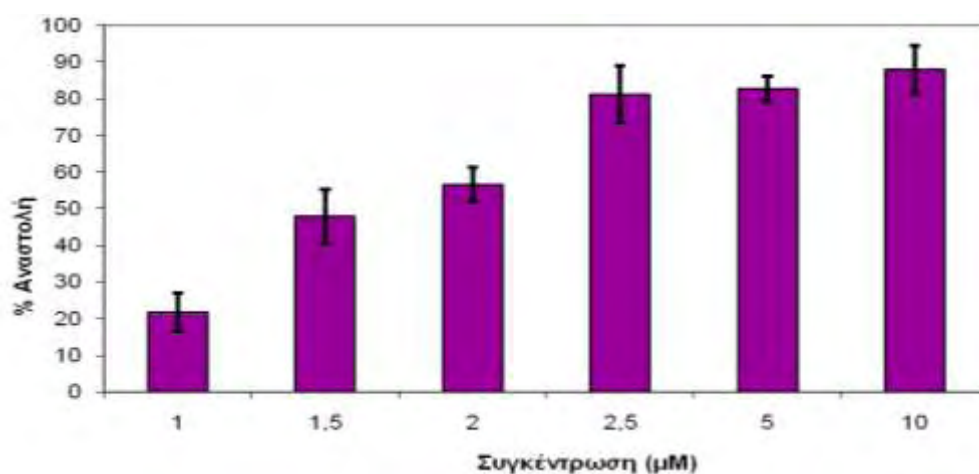
### Ένωση WC (kaempferol-3-O-rutinoside)

Η ένωση WC μελετήθηκε σε εύρος συγκεντρώσεων από 1 έως 10  $\mu\text{M}$  στις οποίες εμφάνισε σημαντική επίδραση στη δράση της τοποϊσομεράσης I (Εικόνα 32). Συγκεκριμένα, σε συγκεντρώσεις 1, 1.5 και 2  $\mu\text{M}$  εμφάνισε αναστολή της ενζυμικής ενεργότητας σε ποσοστά 22%, 48% και 57% αντίστοιχα και στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των 2.5, 5 και 10  $\mu\text{M}$  τα ποσοστά αυξήθηκαν σε 81%, 83% και 88% αντίστοιχα (Γράφημα 3). Για την αξιολόγηση της ανασταλτικής δράσης της ένωσης WC κατασκευάστηκε γραφική παράσταση των ποσοστών αναστολής στις διαφορετικές συγκεντρώσεις και υπολογίστηκε ότι η τιμή  $\text{IC}_{50}$  είναι 1.6  $\mu\text{M}$ .



- 1 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου (αρνητικός μάρτυρας)
- 2 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,4 units ενζύμου (θετικός μάρτυρας)
- 3 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,4 units ενζύμου + WC (1  $\mu\text{M}$ )
- 4 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,4 units ενζύμου + WC (1.5  $\mu\text{M}$ )
- 5 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,4 units ενζύμου + WC (2  $\mu\text{M}$ )
- 6 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,4 units ενζύμου + WC (2.5  $\mu\text{M}$ )

**Εικόνα 32:** Επίδραση της ένωσης WC στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου σε συγκεντρώσεις 1, 1.5, 2, και 2.5  $\mu\text{M}$ .

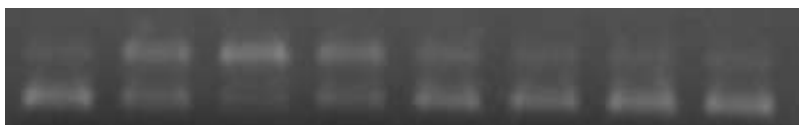


**Γράφημα 3:** Αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I του σίτου από την ένωση WC σε συγκεντρώσεις 1, 1.5, 2, 2.5, 5 και 10  $\mu\text{M}$ .

### Ένωση WD (Quercetin-3-O-rutinoside)

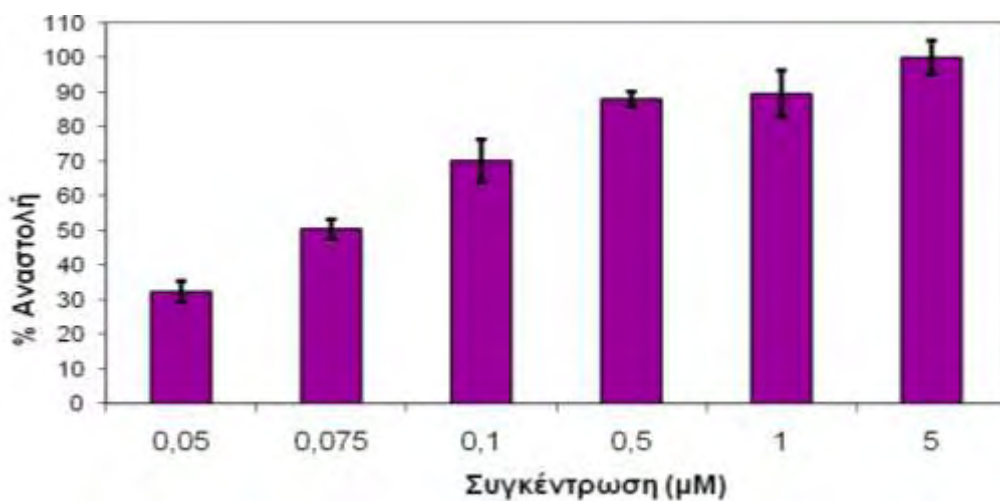
Η ένωση WD μελετήθηκε σε εύρος συγκεντρώσεων από 0.05 έως και 5  $\mu\text{M}$  (Εικόνα 33) και εμφάνισε σημαντική αναστολή στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I. Συγκεκριμένα, τα ποσοστά αναστολής στις συγκεντρώσεις 0.05, 0.075, 0.1, 0.5, 1 και 5  $\mu\text{M}$  εκτιμήθηκαν σε 32%, 50%, 70%, 88%, 90% και 100% αντίστοιχα (Γράφημα 4). Η ένωση WC, με τιμή  $\text{IC}_{50}$  0,075  $\mu\text{M}$ , αποτελεί τον ισχυρότερο αναστολέα της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I.

1      2      3      4      5      6      7      8



- 1 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου (αρνητικός μάρτυρας)
- 2 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,4 unit ενζύμου (θετικός μάρτυρας)
- 3 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,4 unit ενζύμου + WD (0.05  $\mu\text{M}$ )
- 4 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,4 unit ενζύμου + WD (0.075  $\mu\text{M}$ )
- 5 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,4 unit ενζύμου + WD (0.1  $\mu\text{M}$ )
- 6 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,4 unit ενζύμου + WD (0.5  $\mu\text{M}$ )
- 7 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,4 unit ενζύμου + WD (1  $\mu\text{M}$ )
- 8 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,4 unit ενζύμου + WD (5  $\mu\text{M}$ )

**Εικόνα 33:** Επίδραση της ένωσης WD στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου σε συγκεντρώσεις 0.05, 0.075, 0.1, 0.5, 1 και 5  $\mu\text{M}$ .

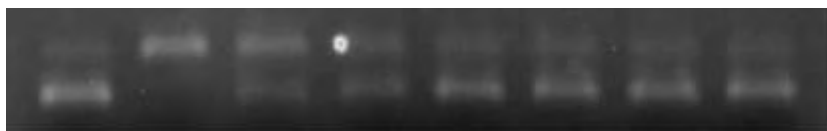


**Γράφημα 4:** Αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I του σίτου από την ένωση WD σε συγκεντρώσεις 0.05, 0.075, 0.1, 0.5, 1 και 5  $\mu\text{M}$ .

### Ένωση WE (καφεϊκό οξύ)

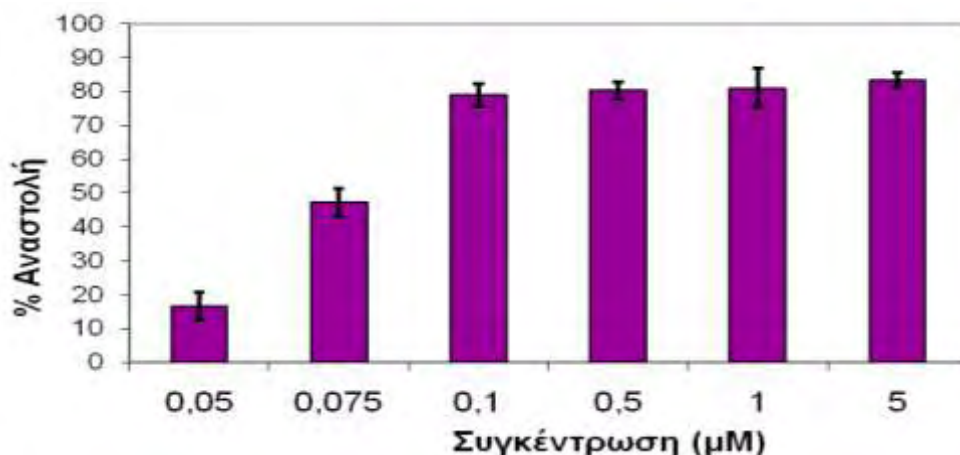
Η ένωση WE στις συγκεντρώσεις 0.05, 0.075 και 0.1  $\mu\text{M}$  εμφάνισε αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I σε ποσοστό 17%, 47% και 79% αντίστοιχα και παρουσίασε μέγιστη αναστολή στην ενζυμική δράση στις συγκεντρώσεις 0.5, 1 και 5  $\mu\text{M}$ , με αντίστοιχα ποσοστά 80%, 81% και 83% (Εικόνα 34 και Γράφημα 5). Η ένωση WE αποτελεί ισχυρό αναστολέα της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I, καθώς παρουσίασε τιμή  $\text{IC}_{50}$  της τάξεως των 80 nM.

1      2      3      4      5      6      7      8



- 1 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου (αρνητικός μάρτυρας)
- 2 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,4 unit ενζύμου (θετικός μάρτυρας)
- 3 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,4 unit ενζύμου + WE (0,05  $\mu\text{M}$ )
- 4 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,4 unit ενζύμου + WE (0,075  $\mu\text{M}$ )
- 5 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,4 unit ενζύμου + WE (0,1  $\mu\text{M}$ )
- 6 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,4 unit ενζύμου + WE (0,5  $\mu\text{M}$ )
- 7 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,4 unit ενζύμου + WE (1  $\mu\text{M}$ )
- 8 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,4 unit ενζύμου + WE (5  $\mu\text{M}$ )

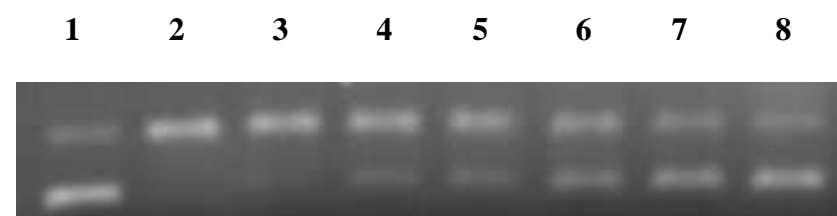
**Εικόνα 34:** Επίδραση της ένωσης WE στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου σε συγκεντρώσεις 0.05, 0.075, 0.1, 0.5, 1 και 5  $\mu\text{M}$ .



**Γράφημα 5:** Αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I του σίτου από την ένωση WE σε συγκεντρώσεις 0.05, 0.075, 0.1, 0.5, 1 και 5  $\mu\text{M}$

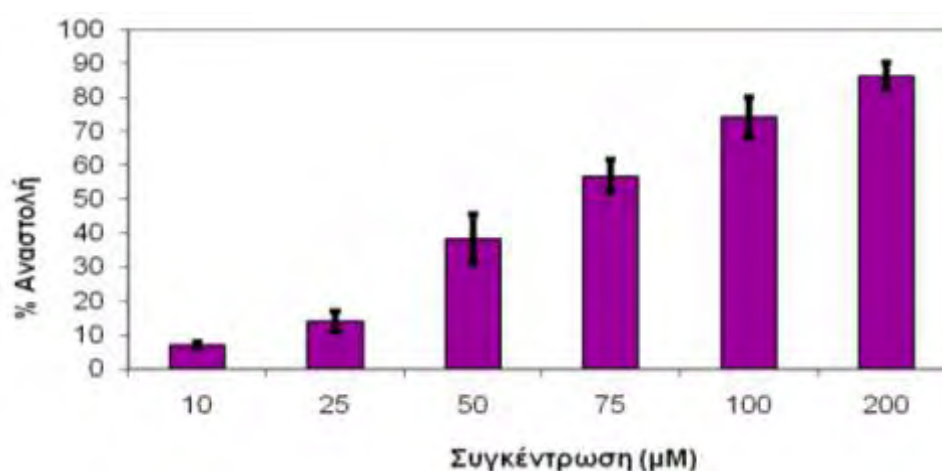
### Ένωση WH (Apigenin-8-c-a-D-glycopyranoside-6-c-a-L-arabinopyranosyl)

Η ένωση WH μελετήθηκε σε εύρος συγκεντρώσεων από 10 έως και 200  $\mu\text{M}$  (Εικόνα 35). Συγκεκριμένα, τα ποσοστά αναστολής στην δράση της τοποϊσομεράσης I στις συγκεντρώσεις 10, 25, 50, 75, 100 και 200  $\mu\text{M}$  εκτιμήθηκαν σε 7%, 14%, 38%, 57%, 74% και 86% αντίστοιχα (Γράφημα 6). Η τιμή  $\text{IC}_{50}$  για την ένωση WH είναι περίπου 55  $\mu\text{M}$ .



- 1 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου (αρνητικός μάρτυρας)
- 2 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,23 unit ενζύμου (θετικός μάρτυρας)
- 3 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,23 unit ενζύμου + WH (10  $\mu\text{M}$ )
- 4 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,23 unit ενζύμου + WH (25  $\mu\text{M}$ )
- 5 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,23 unit ενζύμου + WH (50  $\mu\text{M}$ )
- 6 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,23 unit ενζύμου + WH (75  $\mu\text{M}$ )
- 7 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,23 unit ενζύμου + WH (100  $\mu\text{M}$ )
- 8 : 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1,23 unit ενζύμου + WH (200  $\mu\text{M}$ )

**Εικόνα 35:** Επίδραση της ένωσης WH στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου σε συγκεντρώσεις 10, 25, 50, 75, 100 και 200  $\mu\text{M}$ .

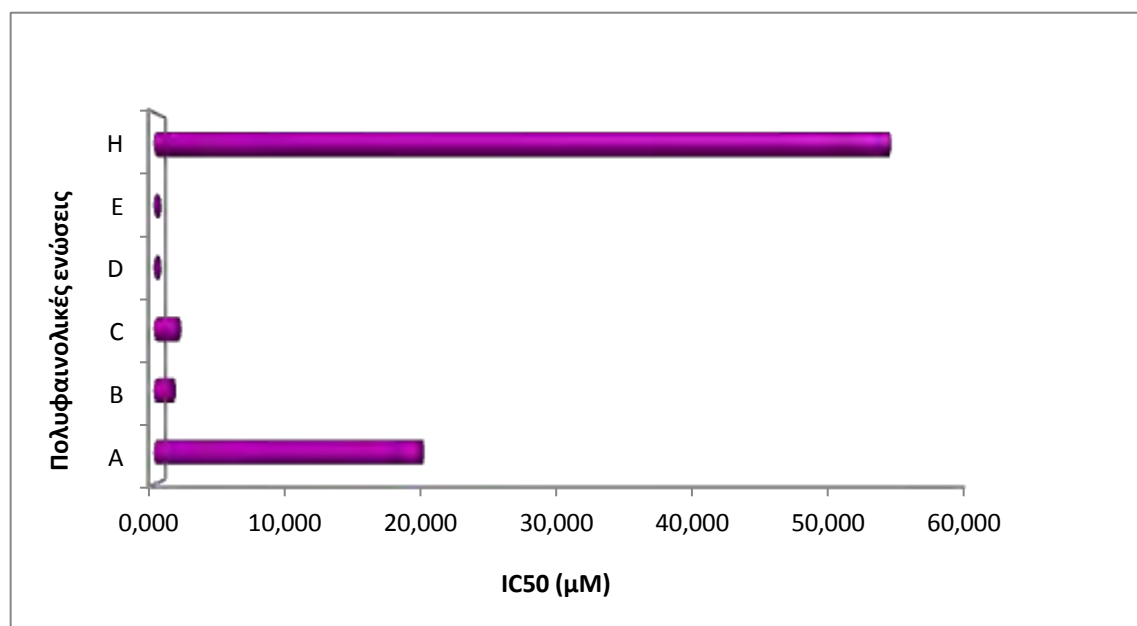


**Γράφημα 6:** Αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I του σίτου από την ένωση WH σε συγκεντρώσεις 10, 25, 50, 75, 100 και 200  $\mu\text{M}$ .



Για την σύγκριση της ανασταλτικής δράσης όλων των ενώσεων που μελετήθηκαν στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I παρατίθενται οι τιμές  $IC_{50}$  της κάθε πολυφαινολικής ένωσης στο Γράφημα 7.

**Γράφημα 7:** Τιμές  $IC_{50}$  των πολυφαινολικών ενώσεων για την ευκαρυωτική τοποϊσομεράση I του σίτου.



## **4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Τα ψυχανθή παίζουν σημαντικό ρόλο στην διατροφή παγκοσμίως, λόγω της υψηλής τους διατροφικής αξίας και επειδή περιέχουν βιοδραστικά φυτοχημικά μόρια που έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον ως πιθανοί χημειοπροστατευτικοί και αντιοξειδωτικοί παράγοντες. Φαινολικά μόρια, όπως φαινολικά οξέα, λιγνάνες, φλαβονοειδή (κυρίως ισοφλαβονοειδή) και ανθοκυανίνες βρίσκονται στα ψυχανθή και είναι υπεύθυνα για τις ευεργετικές τους επιδράσεις σε χρόνιες ασθένειες, όπως σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου (μαστού, προστάτη), καρδιαγγειακές ασθένειες και διαβήτη (Spanou et al., 2008).

Οι πολυφαινόλες είναι μια πολύπλοκη ομάδα ενώσεων που χαρακτηρίζονται από σημαντική αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση έναντι διάφορων τύπων καρκίνων (Dragsted et al., 2003). Η ισχυρή αντιοξειδωτική τους δράση οφείλεται στην ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες και να ενεργοποιούν ένζυμα με αντιοξειδωτική λειτουργία (Heim et al., 2002). Η ικανότητα των πολυφαινολών να δρουν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες αποδίδεται, μεταξύ των άλλων, και στη δυνατότητα αναστολής της δράσης των τοποϊσομερασών, λειτουργώντας είτε ως καταλυτικοί αναστολείς είτε ως καταστολείς-δηλητήρια (poisons) των ενζύμων σε καρκινικά κύτταρα-στόχους (Chowdhury et al., 2002).

Οι τοποϊσομεράσες αποτελούν σημαντικά ένζυμα που ρυθμίζουν την τοπολογία του DNA. Η συγκέντρωση των ενζύμων είναι χαμηλή στα κύτταρα σε φυσιολογικές συνθήκες, ενώ παρατηρείται αύξηση στην έκφρασή τους σε καρκινικά κύτταρα, καθώς αυτά τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με γρήγορους ρυθμούς (Froelich- Ammon et al., 1995). Όπως έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Suzuki et al., 2001), φυτοχημικά συστατικά αναστέλλουν σε διαφορετικό βαθμό τοποϊσομεράσες που προέρχονται από διαφορετικά είδη. Θα έπρεπε να σημειωθεί ότι η ανίχνευση ουσιών που αναστέλλουν την τοποϊσομεράση I θεωρείται σημαντική, γιατί αν και έχουν αναγνωριστεί αρκετές ουσίες (αμσακρίνη, ετοποσίδη και δοξορουμπικίνη) που αναστέλλουν την τοποϊσομεράση II και οι οποίες χρησιμοποιούνται στην αντικαρκινική θεραπεία (Liu, 1989) δε συμβαίνει το ίδιο και με την τοποϊσομεράση I. Ωστόσο, επειδή η συγκέντρωση της τοποϊσομεράσης I δε μεταβάλλεται σημαντικά κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου θεωρείται πιο κατάλληλος στόχος για αντικαρκινικά φάρμακα σε σύγκριση με την τοποϊσομεράση II (Sobhani et al., 2002).

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η επίδραση καθαρών ενώσεων που απομονώθηκαν από φυτά της οικογένειας *Leguminosae* στην ενεργότητα της

τοποϊσομεράσης I του σίτου. Συνολικά μελετήθηκαν 6 ενώσεις που προέρχονται από το φυτό *Lathyrus laxiflorus*. Αναλυτικά, οι ενώσεις που εξετάστηκαν ανήκουν στα φαινολικά οξέα (καφεϊκό οξύ) και στα φλαβονοειδή και ειδικότερα στις φλαβονόλες (δύο γλυκοσίδια της κερκετίνης, δύο γλυκοσίδια της καιμπφερόλης) και στις φλαβόνες (διγλυκοσίδιο της απιγενίνης). Όλες οι ενώσεις που μελετήθηκαν εμφάνισαν αναστολή της τοποϊσομεράσης I του σίτου. Η πιο δραστική ήταν η ένωση D (quercetin-3-O-rutinoside), η οποία παρουσίασε έδωσε  $IC_{50}$  0.075  $\mu$ M. Παρομοίως, το καφεϊκό οξύ (ένωση E) παρουσίασε ισχυρή αναστολή της τοποϊσομεράσης I του σίτου με  $IC_{50}$  0.08  $\mu$ M. Παρόμοια ικανότητα αναστολής του ενζύμου εμφάνισαν οι ενώσεις B (quercetin-3-O-rhamnoside) και C (kaempferol-3-O-rutinoside), με τιμές  $IC_{50}$  1.2  $\mu$ M και 1.6  $\mu$ M αντίστοιχα. Τέλος, λιγότερο δραστικές ήταν οι ενώσεις A (kaempferol-3-O-rhamnoside) και H (apigenin-8-c-a-D-glycopyranoside-6-c-a-L-arabinopyranosyl), οι οποίες παρουσίασαν καταλυτική αναστολή της τοποϊσομεράσης, με  $IC_{50}$  20  $\mu$ M και 55  $\mu$ M αντίστοιχα.

Επειδή η παρούσα μελέτη αφορά καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις είναι εφικτή η συσχέτιση των δομικών χαρακτηριστικών των ενώσεων με την ικανότητά τους να δρουν ως αναστολείς της τοποϊσομεράσης I. Στην περίπτωση των μονογλυκοσιδίων φαίνεται ότι το σάκχαρο που συνδέεται στην 3' θέση των φλαβονολών παίζει σημαντικό ρόλο στην ικανότητα της ένωσης να δρα ως αναστολέας της τοποϊσομεράσης. Ενδεικτικά, η παρουσία ρουτίνης, σε σύγκριση με ραμνόζη, καθιστά την ένωση ως πιο αποτελεσματικό καταλυτικό αναστολέα του ενζύμου. Αυτό το συμπέρασμα προκύπτει από την σύγκριση τόσο των γλυκοσιδίων της κερκετίνης, όσο και των γλυκοσιδίων της καιμπφερόλης. Φαίνεται ότι η παρουσία της ρουτίνης στην 3' θέση της κερκετίνης καθιστά την ένωση 16 φορές πιο αποτελεσματική στην καταλυτική αναστολή της τοποϊσομεράσης I, συγκριτικά με την παρουσία ραμνόζης στην ίδια θέση (σύγκριση ενώσεων D και B με αντίστοιχες τιμές  $IC_{50}$  0.075 και 1.2  $\mu$ M). Ομοίως, η παρουσία ρουτίνης στην 3' θέση της καιμπφερόλης κάνει την ένωση 12 φορές πιο αποτελεσματική στην ικανότητα αναστολής του ενζύμου, σε σύγκριση με την παρουσία ραμνόζης στην ίδια θέση (σύγκριση ενώσεων C και A με αντίστοιχες τιμές  $IC_{50}$  1.6 και 20  $\mu$ M). Φαίνεται λοιπόν ότι η δομή του σακχάρου παίζει σημαντικό ρόλο, και παρόλο που η ρουτίνη είναι μεγαλύτερη σε μέγεθος σε σύγκριση με την ραμνόζη, η συνολική διαμόρφωση της ένωσης ευνοεί την αλληλεπίδραση και την αναστολή της τοποϊσομεράσης I.

Προηγούμενες μελέτες είχαν εστιαστεί στην ικανότητα αναστολής τοποϊσομεράσης I του σίτου από άλλες καθαρές ενώσεις που ήταν επίσης γλυκοσίδια της καιμπφερόλης και της κερκετίνης (Tselepi et al, 2011). Οι ενώσεις αυτές ήταν διγλυκοσίδια και τριγλυκοσίδια των φλαβονολών που προαναφέρθηκαν με τα σάκχαρα να είναι συνδεδεμένα στις θέσεις 3 και 7 του δακτυλίου της φλαβονόλης, αλλά δεν αποτέλεσαν ισχυρούς αναστολείς (οι τιμές  $IC_{50}$  κυμαίνονταν από 110 έως 350  $\mu M$ ) σε σύγκριση με τις ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη (οι τιμές  $IC_{50}$  κυμαίνονται από 0.075 έως 20  $\mu M$ ). Αυτή η παρατήρηση είναι σε συμφωνία με το αποτέλεσμα της παρούσης μελέτης, που έδειξε ότι το διγλυκοσίδιο της απιγενίνης είναι λιγότερο αποτελεσματικό στην αναστολή του ενζύμου συγκριτικά με τις άλλες ενώσεις που μελετήθηκαν.

Σε προηγούμενες εργασίες τα φλαβονοειδή, όπως η κερκετίνη και η καιμπφερόλη, καθώς και τα γλυκοσίδιά τους, έχουν χαρακτηριστεί ως ισχυροί αναστολείς των τοποϊσομερασών I και II (Webb et al., 2004). Είναι πλέον αποδεκτό ότι οι διαφορές στην ανασταλτική δράση των φλαβονοειδών μπορούν να αποδοθούν στην διαφορετική στερεοχημική διαμόρφωση, στον αριθμό και τη διαθεσιμότητα των υδροξυλομάδων, καθώς και στις θέσεις γλυκοσυλίσωσης των υδροξυλομάδων και την δομή του σακχάρου. Τα γλυκοσίδια της καιμπφερόλης και της κερκετίνης φέρουν στη δομή τους χαρακτηριστικά που είναι σημαντικά για την ικανότητα των φλαβονοειδών να αναστέλλουν τη δραστηριότητα των τοποϊσομερασών. Συγκεκριμένα, φέρουν μια υδροξυλομάδα στον δακτύλιο B (C3' ή/και C4'), μια υδροξυλομάδα στη θέση C3 και C7 του βασικού ανθρακικού σκελετού των φλαβονοειδών και διπλό δεσμό μαζί με την οξο-θέση στη γέφυρα του πυρανικού δακτυλίου C, τα οποία καθιστούν τα φλαβονοειδή ισχυρούς αναστολείς των τοποϊσομερασών (Constantinou et al., 1995).

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η κερκετίνη αποτελεί ισχυρό αναστολέα των τοποϊσομερασών I και II και συγκεκριμένα κατατάσσεται στους καταστολείς-δηλητήρια (poisons). Η ικανότητα της κερκετίνης να σταθεροποιεί το παροδικό σύμπλεγμα της τοποϊσομεράσης I με το DNA εξαρτάται από τα δομικά της χαρακτηριστικά και συγκεκριμένα απαιτεί υδροξυλικές υποκαταστάσεις στις θέσεις 5 και 7 του φαινολικού δακτυλίου. Το πειραματικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ταυτοποίησε τα γλυκοσίδια της κερκετίνης ως καταλυτικούς αναστολείς της τοποϊσομεράσης I, χωρίς αυτό το αποτέλεσμα να αποκλείει την πιθανή δράση τους και ως καταστολείς-δηλητήρια.

Η παρούσα μελέτη ανέδειξε το καφεϊκό οξύ, ως ένα ισχυρό καταλυτικό αναστολέα της τοποϊσομεράσης I. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με μια πρόσφατη μελέτη, η οποία έδειξε ότι το καφεϊκό οξύ μπορεί να δράσει ως αναστολέας της τοποϊσομεράσης I, με τιμή  $IC_{50}$  περίπου 0.15 mM (Jang et al, 2011). Η μεγάλη διαφορά στην τιμή  $IC_{50}$  μεταξύ της μελέτης που αναφέρθηκε (0.15 mM) και της παρούσας μελέτης (0.08  $\mu$ M) πιθανώς εξηγείται από το διαφορετικό ένζυμο (ευκαρυωτική τοποϊσομεράση I από σπόρο σίτου σε σχέση με τοποϊσομεράση θηλαστικών) που χρησιμοποιήθηκε στο πειραματικό πρωτόκολλο.

Συνοπτικά, όσον αφορά την ικανότητα αναστολής της τοποϊσομεράσης I μπορούμε να κατατάξουμε τις ενώσεις που μελετήθηκαν ως εξής, από ισχυρότερο προς ασθενέστερο αναστολέα: υδροξυκινναμικό οξύ > φλαβανόλες > φλαβόνες και πιο ενδεικτικά: καφεϊκό οξύ > μονογλυκοσίδια κερκετίνης > μονογλυκοσίδια καιμπερόλης > διγλυκοσίδιο απιγενίνης.

Έχει δειχθεί ότι οι γλυκονικές μορφές της καιμπερόλης έχουν διαφορετικές επιδράσεις στην ανάπτυξη διαφόρων τύπων καρκινικών κυττάρων (Dimas et al., 2000). Προηγούμενη μελέτη του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας έδειξε ότι η kaempferol-3-O-rutinoside δεν αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων HepG2, ενώ η kaempferol-3-O-rhamnoside αναστέλλει την ανάπτυξη σε μικρό ποσοστό (αναστολή 20% σε συγκέντρωση 10  $\mu$ M). Η τελευταία ένωση σε μια άλλη μελέτη δεν ανέστειλε την αύξηση καρκινικών κυττάρων μαστού, πνεύμονα και παχέος εντέρου (Vareed et al., 2007). Επιπλέον, οι γλυκοσυλιωμένες μορφές της κερκετίνης αναστέλλουν σε μικρό ποσοστό την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων HepG2. Ενδεικτικά, σε συγκέντρωση 200  $\mu$ M, η quercetin-3-O-rhamnoside προκαλεί αναστολή σε ποσοστό 32% και η quercetin-3-O-rutinoside σε ποσοστό 15%. Όσον αφορά, την απιγενίνη, προηγούμενη μελέτη του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών έδειξε ότι η χορήγηση της γλυκοσυλιωμένης μορφής της απιγενίνης που εξετάστηκε στην παρούσα εργασία (στη συγκέντρωση των 200  $\mu$ M) αναστέλλει ελάχιστα (ποσοστό 14%) τον πολλαπλασιασμό κυττάρων HepG2. Πιστεύεται ότι η γλυκοσυλίωση της απιγενίνης ευθύνεται για την ελάττωση της αντικαρκινικής της δράσης (Srivastava & Gupta, 2009). Τέλος, το καφεϊκό οξύ, που αποτελεί ισχυρό αναστολέα της τοποϊσομεράσης I στην παρούσα μελέτη, εμφανίζει διαφορά στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ανάλογα με την καρκινική σειρά που μελετάται. Ενδεικτικά, το καφεϊκό οξύ σε συγκέντρωση 200  $\mu$ M αναστέλλει την ανάπτυξη

κυττάρων HepG2 σε ποσοστό 40%, ενώ σε συγκέντρωση 45  $\mu$ M προκαλεί 50% αναστολή του πολλαπλασιασμού λευχαιμικών κυττάρων (Jang et al., 2011). Στο σημείο αυτό είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η ισχυρή αναστολή της τοποϊσομεράσης I από τις πολυφαινολικές ενώσεις εκτιμάται στην παρούσα εργασία χρησιμοποιώντας μία *in vitro* δοκιμή (topoisomerase I plasmid relaxation assay). Τα αποτελέσματα αυτά δεν αντικατοπτρίζονται πάντα σε ένα *in vivo* πείραμα, όπου εκτιμάται η ικανότητα των ενώσεων να αναστέλλουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί ότι ο καρκινικός τύπος κυττάρων που επιλέχθηκε στις μελέτες που προαναφέρθηκαν μπορεί να αποτελέσει παράγοντα ποικιλότητας των αποτελεσμάτων που διεξάγονται από την κάθε μελέτη.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι οι πολυφαινολικές ενώσεις που προέρχονται από το φυτό *Lathyrus laxiflorus* παρουσιάζουν ανασταλτική επίδραση στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I. Σε συνδυασμό με τις αντιοξειδωτικές τους ικανότητες οι ενώσεις αυτές μπορούν να θεωρηθούν πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες, δημιουργώντας μελλοντικές προοπτικές στην χημειοθεραπεία του καρκίνου.

## 5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Baikar S, Malpathak N., (2010), Secondary metabolites as DNA topoisomerase inhibitors: A new era towards designing of anticancer drugs, *Pharmacogn Rev.*,4(7):12-26.
- Baker N.M., Rajan R., Mondragón A., (2009), Structural studies of type I topoisomerases, *Nucleic Acids Research*, 37(3):693-701.
- Benedetti P., Silvestri A., (1999), Visualization of DNA Topoisomerases by Electron Microscopy, *Methods in Molecular Biology*, 94:269-277
- Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L.,(2005) Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Δεύτερος τόμος, κεφάλαιο 27
- Berger J.M., Fass D., Wang J.C., Harrison S.C., (1998), Structural similarities between topoisomerases that cleave one or both DNA strands, *National Academy of Sciences*, 95:7876-7881
- Cantero G., Campanella C., Mateos S., Cortés F., (2006), Topoisomerase II inhibition and high yield of endoreduplication induced by the flavonoids luteolin and quercetin, *Mutagenesis*, 21: 321-325
- Chahar M.K., Sharma N., Dobhal M.P., Joshi Y.C., (2011), Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs, *Pharmacogn Rev.*, 5(9): 1–12.
- Chowdhury A.R., Sharma S., Mandal S., Goswami A., Mukhopadhyay S., Majumder H.K. (2002), Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I, *Biochemical Society*, 366:653-661
- Constantinou A., Mehta R., Runyan C., Rao K., Vaughan A., Moon R., (1995) Flavonoids as topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationship, *Journal of natural products* , 58(2):217-25
- Corbett K.D.,Berger J.M., (2004) Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 33:95–118.
- Crozier A., Jaganath I.B., Clifford M.N., (2009), Dietary phenolics: Chemistry bioavailability and effects on health, *Nat. Prod. Reports*, 26:1001-1043
- Cummings J., Smyth J. F., (1993),DNA topoisomerase I and II as targets for rational design of new anticancer drugs, *Annals of Oncology* 4: 533-543, 1993



- Davalli P., Rizzi F., Caporali A., Pellacani D., Davoli S., Bettuzzi S., Brausi M., D'Arca D., (2012), Anticancer activity of green tea polyphenols in prostate gland, *Oxid Med Cell Longev.*, 2012:984219
- D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., Masella R., (2007) Polyphenols, dietary sources and bioavailability, *Ann Ist Super Sanità*, 43(4):348-61
- Dexheimer T.S., Pommier Y., (2008), DNA cleavage assay for the identification of topoisomerase I inhibitors, *National Protocols*, 3(11):1736-50
- Dimas K., Demetzos C., Angelopoulou D., Kolokouris A., Mavromoustakos T., (2000), Biological activity of mericetic and its derivatives against human leucemin cell lines in vitro, *Pharmacol Res*, 42(5)475-8
- Dragsted L., (2003), Antioxidant Actions of Polyphenols in Humans, *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 73:112-119
- Forterre P., Gadelle D., (2009), Phylogenomics of DNA topoisomerases: their origin and putative roles in the emergence of modern organisms, *Nucleic Acids Research*, 37(3):679-92
- Fortune J.M., Osheroff N., (2000), Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 64:221–253
- Froelich-Ammon S.J., Osheroff N., (1995), Topoisomerase Poisons: Harnessing the Dark Side of Enzyme Mechanism, *Journal of Biol. Chem.*, 270(37):21429-32.
- Froelich-Ammon, S. J., Patchan, M. W., Osheroff, N., Thompson, R. B., (1995), Topoisomerase II binds to ellipticine in the absence or presence of DNA. Characterization of enzyme-drug interactions by fluorescence spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, 270(25):14998-5004
- Harborne J.B., (1971), Distribution of flavonoids in the Leguminosae. *Chemotaxonomy of the Leguminosae*, pp 257-282, Academic Press, London
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., (2002), Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13:572-584

- Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF., (1985), Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I, *J Biol Chem*, 260:14873–8
- Jang SY, Bae JS, Lee YH, Oh KY, Park KH, Bae YS. Caffeic acid and quercitrin purified from *Houttuynia cordata* inhibit DNA topoisomerase I activity. *Nat Prod Res*. 2011 Feb;25(3):222-31
- Leppard J.B., Champoux J.J., (2005), Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control, *Chromosoma*, 114:75–85
- Lima,C.D., Wang,J.C., Mondragon,A., (1994), Three-dimensional structure of the 67K N-terminal fragment of *E. coli* DNA topoisomerase I, *Nature*, 367, 138–146
- Liu L.F., (1989), DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs, *Annu. Rev. Biochem*, 58:351-375
- McDonell, M. W., Simon, M. N. and Studier, F. W., (1977), Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels, *J Mol Biol*, 110: 119-146
- Manach C., Schalbert A., Monand C., Remesy C., Jimenez L., (2004), Polyphenols: food source and bioavailability, *Am J Clin Nutr*, 79(5):727-47
- Nichenametla S., Taruscio T., Barney D., Exon J.H., (2006), A Review of the Effects and Mechanisms of Polyphenolics in Cancer, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46:161-183
- Nitiss John L., (2009), Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy, *Nat Rev Cancer*, 9(5): 338–350
- Pommier Y., Pourquier P., Fan Y., Strumberg D., (1998), Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1400: 83-106
- Pommier Y., (2009), DNA Topoisomerase I Inhibitors: Chemistry, Biology and Interfacial Inhibition, *National Institute of Health*, 109(7): 2894–2902
- Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L., (2003) Flavonoids: Promising Anticancer Agents., *Medicinal Research Reviews*, 23(4):519-534
- Roca J., (1995), The mechanisms of DNA topoisomerases, *Trends in Biochemical Sciences*, 20:151-160

- Spanou C., Bourou G., Dervishi A., Aligiannis N., Angelis A., Komiotis D., Skaltsounis A.L., Kouretas D., (2008), Antioxidant and Chemopreventive Properties of Polyphenolic Compounds Derived from Greek Legume Plant Extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:6967-6976
- Spanou C., Stagos D., Aligiannis N., Kouretas D., (2010), Influence of potent antioxidant leguminosae family plant extracts on growth and antioxidant defense system of HepG2 cancer cell lines, *J Med Food*, 13(1) 149-155
- Sobhani A.M., Ebrahimi S.A., Mahmoudian M., (2002), *AN in vitro* evaluation of human DNA topoisomerase I inhibition by *Pegunum harmala* L.seeds extract and its beta carboline alkaloids, *J. Pharm. Sci*, 5:19-23
- Srivastava J.K., Gupta S., (2009), Extraction, characterization, stability and biological activity of flavonoids isolated from chamomile flowers, *Mol Cell Pharmacol*, 1(3):138
- Stewart,L., Ireton,G.C., Champoux,J.J., (1996), The domain organization of human topoisomerase I. *J. Biol. Chem.*, 271,7602–7608
- Suzuki K., Yahara S., Hashimoto F., Uyeda M., (2001), Inhibitory activities of (-)- epigallocatechin-3-O-gallate against topoisomerase I and II, *Biol. Pharm. Bull*, 24:1088-1090
- Tselepi M., Papachristou E., Emmanouilidi A., Angelis A., Aligiannis N., Skaltsounis A.L., Kouretas D., Liadaki K., (2011), Catalytic inhibition of eukaryotic topoisomerases I and II by flavonol glycosides extracted from *Vicia faba* and *Lotus edulis*. *J Nat Prod.*, 28;74(11):2362-70
- Vareed S.K., Schutzki R.E., Nair M.G., (2007), Lipid peroxidation, cyclooxygenase enzyme and tumor cell proliferation inhibitory compounds in *Cornus kousa* fruits, *Phytomedicine*,14(10):706-709
- Wang H., Morris-Natschke S., Lee K., (1997), Recent advances in the discovery and development of topoisomerase inhibitors as antitumor agents, *Medicinal Researches Reviews*, 17:367-425
- Wang J. C., (1996), DNA Topoisomerases, *Annual Reviews of Biochemistry*, 65: 635-92
- Wang J. C., (2002), Cellular roles of DNA Topoisomerases: a molecular perspective, *Nature Publishing*, 3: 430-440

- Webb M. R., Ebeler S. E., (2003), A gel electrophoresis assay for the simultaneous determination of topoisomerase I inhibition and DNA intercalation, *Analytical Biochemistry*, 321: 22-30
- Webb M.R., Ebeler S.E., (2004), Comparative analysis of topoisomerase IB inhibition and DNA intercalation by flavonoids and similar compounds: structural determinates of activity, *Biochem J* 384: 527-41.