



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Μεθυλοτρανσφεράσες ως εργαλεία για τη στοχευμένη
τροποποίηση φυσικών βιοδραστικών προϊόντων**

Αθανασία Δημητρακούλη

Δ.Π.Μ.Σ «Ιατρική Χημεία»

Μεταπτυχιακή Διατριβή

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022

Επιβλέπων Καθηγητής: Σταμάτης Χαράλαμπος

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Σταμάτης Χαράλαμπος, Καθηγητής Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Καταπόδης Πέτρος, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Παυλίδης Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε με πολλή υπομονή, επιμονή, προσπάθεια και κόπο, αλλά συνάμα με πείσμα, όρεξη, χαρά και πολύ μεράκι. Παρά τις όποιες στιγμιαίες απογοητεύσεις που υπάρξαν κατά τη διάρκεια αυτού του ταξιδιού, η εκπόνηση της εργασίας ολοκληρώθηκε αποκομίζοντας όχι μόνο πολλές εργαστηριακές και μαθησιακές γνώσεις, αλλά και πολλές ευχάριστες αναμνήσεις με πολλά χαμόγελα. Ωστόσο, αυτό δεν θα ήταν εφικτό εάν δεν είχε συμβάλει ένας αριθμός ανθρώπων, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων καθηγητή της εργασίας μου κ. Χαράλαμπο Σταμάτη. Έδειξε εμπιστοσύνη στο πρόσωπο μου και με ενέταξε στην επιστημονική του ομάδα προκειμένου να πραγματοποιήσω την μεταπτυχιακή μου εργασία. Η κατεύθυνση και η ενθάρρυνσή του που δινόταν συνεχώς αποτέλεσε σημαντικό παράγοντα στην εκπόνηση της εργασίας. Ήταν πρόθυμος για συζήτηση και βοήθεια οποιαδήποτε στιγμή και εάν χρειαζόταν, αφιερώνοντας όχι μόνο επαγγελματικό αλλά και προσωπικό χρόνο. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Πέτρο Καταπόδη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ιωάννη Παυλίδη, καθώς η βοήθεια και η καθοδήγηση τους ήταν πολύ σημαντική. Οι συζητήσεις μας αποτέλεσαν τροφή για σκέψη και κινητήριο δύναμη για την συνέχιση της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Ιδιαίτερο ευχαριστώ στη μεταδιδασκτορική ερευνήτρια του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας, Αλεξάνδρα Χατζηκωνσταντίνου, με την οποία δώσαμε μαζί βήμα-βήμα την υπόσταση του πρότζεκτ αυτής της εργασίας, έχοντας μία εξαιρετική συνεργασία μαζί της. Ήταν στη διάθεση μου οποιαδήποτε στιγμή χρειαζόταν και η βοήθεια της ήταν απεριόριστη, παρά τον αυξημένο εργασιακό φόρτο που είχε. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για τη βοήθεια, τις συμβουλές τους αλλά και την υπέροχη ατμόσφαιρα του εργαστηρίου. Με αγκάλιασαν από την πρώτη στιγμή, δημιουργώντας όχι μόνο ένα ευχάριστο εργασιακό περιβάλλον αλλά και μία παρέα με πολλές αναμνήσεις γέλιου και χαράς.

Για την αμέριστη βοήθεια και καθοδήγηση τους θα ήθελα να ευχαριστήσω το εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης με επικεφαλής τον Επίκουρο Καθηγητή Ιωάννη Παυλίδη καθώς και το ινστιτούτο Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Greifswald της Γερμανίας με επικεφαλής το Καθηγητή U. T. Bornscheuer. Επίσης, ένα ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα του εργαστηρίου Βιοχημείας της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κ. Άννα-Ειρήνη Κούκκου του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Σταματία Ασημικουλα για τη βοήθειά της ως προς τον μετασχηματισμό των επιδεκτικών κυττάρων, όπως επίσης και στην υποψήφια διδάκτορα Αλίκη Τσακνή από την ομάδα της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κ. Δήμητρα Χούχουλα του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, για την ανάλυση των φασμάτων μάζας.

Τέλος, ένα θερμό ευχαριστώ σε όλους τους φίλους μου και στην οικογένεια μου που ήταν δίπλα μου και με στήριζαν σε όλο το ταξίδι από την αρχή έως το τέλος, παρά το γεγονός ότι μας χώριζε η απόσταση με μερικούς από αυτούς. Ιδίως ένα τεράστιο ευχαριστώ στην μητέρα μου, Βούλα, που στέκεται βράχος δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια και δείχνει απέραντη στήριξη, υπομονή και αγάπη προς το πρόσωπο μου.

Πίνακας περιεχομένων	
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	9
ABSTRACT.....	12
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	14
1. Φυσικά προϊόντα	14
2. Φαινολικές ενώσεις.....	15
2.1 Φαινυλοαιθανοειδή.....	17
2.2 Φαινυλοπροπανοειδή	18
2.3 Φλαβονοειδή.....	19
2.4 Στιλβένια	23
2.5 Ενζυμική τροποποίηση φαινολικών ενώσεων.....	24
3. Βιοτεχνολογία και βιοκατάλυση.....	25
4. Ένζυμα	26
5. Μέθυλοτρανσφεράσες	29
5.1 Κατηγοριοποίηση μεθυλοτρανσφερασών.....	30
5.3 Μηχανισμός δράσης.....	35
5.4 Βιολογικός ρόλος μεθυλοτρανσφερασών	37
5.5 SAM ως δότης μέθυλοομάδας.....	38
5.6 Φαινόμενο μεθυλίου και εφαρμογές μεθυλοτρανσφερασών.....	39
6. Υδρολάση της S-αδενοσυλ-Ομοκυστεΐνης (SAHase)	41
6.1 Δομή.....	42
6.2 Μηχανισμός	44
6.3 Αξιοποίηση της SAHase	45
7. Ακίνητοποίηση ενζύμων	45
7.1 Ακίνητοποίηση σε μαγνητικά νανοϋλικά οξειδίων του σιδήρου	46
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	49
8.1 Υλικά.....	49
8.1.1 Ένζυμα	49
8.1.2 Υποστρώματα και ενζυμικές αντιδράσεις	49
8.1.3 Αντιδραστήρια των βακτηριακών καλλιιεργειών	51
8.1.4 Αντιδραστήρια για την σύνθεση των νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με πολυντοπαμίνη και ιόντα νικελίου ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{polydopamine-Ni}^{2+}$).....	51

8.1.5 Λοιπά αντιδραστήρια	52
8.2 Μέθοδοι.....	52
8.2.1 Χημειοδεκτικά κύτταρα <i>E.coli</i>	53
8.2.2 Μετασχηματισμός χημειοδεκτικών κυττάρων <i>E.coli</i> DH5A και <i>E.coli</i> BL21 (DE3) 53	
8.2.3 Παρασκευή stock γλυκερίνης.....	54
8.2.4 Υγρές βακτηριακές καλλιέργειες υπερέκφρασης πρωτεϊνών	54
8.2.5 Λύση βακτηριακών κυττάρων μέσω υπερήχων	56
8.2.6 Σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με πολυντοπαμίνη και ιόντα νικελίου ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{polydopamine-Ni}^{2+}$)	57
8.2.7 Ακινητοποίηση ενζύμων που φέρουν His-tag σε νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με πολυντοπαμίνη και ιόντα νικελίου	58
8.2.8 Φωτομετρική ανίχνευσης ενζυμικής δραστηριότητας SAH υδρολασών	58
8.2.9 Φασματοσκοπία υπεριώδους (IR).....	59
8.2.10 Ενζυμική τροποποίηση μεθυλίωσης των υποστρωμάτων	60
8.2.11 Προετοιμασία δειγμάτων και ανάλυση ενζυμικής δραστηριότητας με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	61
8.2.12 Προετοιμασία δειγμάτων για φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).....	62
8.2.13 Προετοιμασία δειγμάτων και ανάλυση με φασματομετρία μάζας (MS)...	63
Αποτελέσματα και συζήτηση	64
9.1 Έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας ελεύθερου ενζύμου μεθυλοτρανσφεράσης μέσω χρωματογραφίας HPLC	67
9.1.1 Αποτελέσματα ενζυμικής δραστηριότητας ελεύθερου ενζύμου IeOMT WT και των μεταλλάξεων του T133M και T133M/Y326L	67
9.1.2 Αποτελέσματα ενζυμικής δραστηριότητας ελεύθερου ενζύμου CaRO WT .	68
9.2 Ακινητοποίηση μεθυλοτρανσφερασών σε νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με πολυντοπαμίνη και νικέλιο II.....	69
9.2.1 Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου ακινητοποίησης μεθυλοτρανσφερασών.....	69
9.2.2 Έλεγχος δραστηριότητας ακινητοποιημένων μεθυλοτρανσφερασών.....	71
9.2.3 Ακινητοποίηση των μεθυλοτρανσφερασών σε νανοσωματίδια πολυντοπαμίνης και νιτριλοτριοξικού οξέος	72
9.3 Χαρακτηρισμός νανοβιοκαταλύτη.....	73
9.4 Αποτελέσματα ενζυμικής μεθυλίωσης σε φαινολικά υποστρώματα.....	74
9.4.1 Μελέτη της ενζυμικής μεθυλίωσης του καφεϊκού οξέος.....	74

9.4.2 Μελέτη της ενζυμικής μεθυλίωσης της τυροσόλης	77
9.4.3 Μελέτη της ενζυμικής μεθυλίωσης της υδροξυτυροσόλης	78
9.4.4 Μελέτη της ενζυμικής μεθυλίωσης της λουτεολίνης.....	82
9.4.5 Μελέτη της ενζυμικής μεθυλίωσης της μορίνης	84
9.4.6 Μελέτη της ενζυμικής μεθυλίωσης της μυρικετίνης	85
9.4.7 Μελέτη της ενζυμικής μεθυλίωσης της φισετίνης	88
9.4.8 Μελέτη της ενζυμικής μεθυλίωσης της ρεσβερατρόλης	91
9.4.9 Συνολικές τροποποιήσεις των υποστρωμάτων διαμέσου των μεθυλοτρανσφερασών.....	95
9.5 Ανάπτυξη πρωτοκόλλου φωτομετρικής ανίχνευσης ενζυμικής δραστηριότητας των μεθυλοτρανσφερασών.....	96
9.5.1 Έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας ελεύθερης SAHase.....	98
9.5.2 Έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας ακινητοποιημένης SAHase	99
9.5.3 Αποτελέσματα ανίχνευσης δραστηριότητας O-MTs μέσω του φωτομετρικού δοκιμίου της SAHase.....	100
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	103
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	107
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	117

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μεθυλίωση ενώσεων είναι μια στρατηγική που ακολουθούν οι φαρμακοβιομηχανίες προκειμένου να αναπτύξουν νέες ενώσεις, οι οποίες λόγω της μεθυλίωσης φέρουν βελτιωμένες ιδιότητες ακόμη και νέες βιολογικές δράσεις. Τα φυσικά προϊόντα είναι ενώσεις με σημαντικές βιολογικές δράσεις για αυτό και χρησιμοποιούνται ευρέως. Εμφανίζουν φυσικά μεθυλιωμένα ανάλογα διαθέτοντας σημαντική βιοδραστικότητα, η οποία κάποιες φορές είναι καλύτερη από αυτή που παρουσιάζει η εκάστοτε πρόδρομη ένωση. Σκοπός της παρούσας εργασίας, λοιπόν, είναι η στοχευμένη τροποποίηση φυσικών προϊόντων με χρήση ενζύμων μεθυλοτρανσφερασών για την παραγωγή μεθυλιωμένων παραγώγων με ποικίλες βιολογικές δράσεις.

Ως βιοκαταλύτες χρησιμοποιήθηκαν οι μεθυλοτρανσφεράσες άγριου τύπου (WT) από τους οργανισμούς *Catharanthus roseus* (CaROMT) και *Clarkia breweri* (IeOMT), ενώ από τον τελευταίο οργανισμό χρησιμοποιήθηκαν και δύο μεταλλάξεις η T133M και η T133M /Y326L. Το κάθε ένζυμο ξεχωριστά διαθέτει διαφορετική δραστηριότητα και τοποεκλεκτικότητα. Αρχικά μέσω HPLC, ελέγχθηκε η δραστηριότητα των ελεύθερων ενζύμων σε αντιδράσεις μεθυλίωσης με τα φυσικά υποστρώματα της ισοευγενόλης για τα ένζυμα IeOMT και του καφεϊκού οξέος για το ένζυμο CaRO WT. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η ακινητοποίησή τους σε μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με πολυντοπαμίνη και νικέλιο ($F_3O_4@polydopamine-Ni(II)$), μια τεχνική ακινητοποίησης που βασίζεται στις αρχές της χρωματογραφίας IMAC για ένζυμα που διατεθούν αλληλουχία His-tag και παρέχει ταυτόχρονα καθαρισμό και ακινητοποίηση των ενζύμων. Οι συνθήκες της ακινητοποίησης μελετήθηκαν σχετικά με το χρόνο επώασης (30 λεπτά, 2 και 4 ώρες) και την αναλογία νανοϋλικού : κυτταρικού εκχυλίσματος (1:2 και 1:4). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι βέλτιστες τιμές αυτών των παραγόντων της ακινητοποίησης είναι ο χρόνος των 30 λεπτών και η αναλογία 1:4.

Για πρώτη φορά, η τροποποίηση υποστρωμάτων της τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης έλαβε χώρα από τα ακινητοποιημένα ένζυμα CaRO WT και IeOMT T133M, όπως και αυτής των υποστρωμάτων μορίνης, μυρικετίνης, φισετίνης και ρεσβερατρόλης από τα ακινητοποιημένα ένζυμα IeOMT WT και IeOMT T133M/Y326L. Ο συνδυασμός των αναλύσεων HPLC, MS και NMR ανέδειξε ως προϊόν της μεθυλίωσης της τυροσόλης από το IeOMT T133M το para-μεθυλιωμένο ανάλογο, ενώ η τροποποίηση της από το CaRO WT δεν ήταν επιτυχής. Το ένζυμο IeOMT WT μεθυλίωσε την υδροξυτυροσόλη στη θέση meta, ενώ το IeOMT T133M έδωσε μίγμα προϊόντων με το para-μονομεθυλιωμένο να κυριαρχεί και η διμεθυλιωμένη υδροξυτυροσόλη σε θέση meta και para να ακολουθεί. Τα υπόλοιπα υποστρώματα (μορίνη, μυρικετίνη, φισετίνη και ρεσβερατρόλη) μελετήθηκαν περαιτέρω με το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L λόγω μεγαλύτερης δραστηριότητας που εμφάνισε συγκριτικά με του άγριου τύπου. Η τοποεκλεκτικότητα της αντίδρασης της μυρικετίνης φαίνεται να είναι στις θέσεις 3' και 5' με την παραγωγή της διμέθυλο μυρικετίνης, αυτής της φισετίνης στη θέση 3' με την ύπαρξη της μονομέθυλο φισετίνης, ενώ η τοποεκλεκτικότητα της τροποποίησης της

μορίνης δεν μπόρεσε να αποσαφηνιστεί. Το υπόστρωμα της ρεσβερατρόλης μεθυλιώθηκε δίνοντας μονομεθυλιωμένο και διμεθυιωμένο προϊόντα.

Τέλος, αναπτύχθηκε ένα φωτομετρικό πρωτόκολλο ανίχνευσης της δραστηρότητας των μεθυλοτρανσφερασών με χρήση του ενζύμου SAHase του οργανισμού *Bradyrhizobium elkanii*, το οποίο υδρολύει το παραπροϊόν της μεθυλίωσης SAH και μέσω του αντιδραστηρίου Ellman παράγεται ένα έγχρωμο προϊόν που απορροφά. Το ένζυμο ακινητοποιήθηκε όπως και οι μεθυλοτρανσφεράσες. Περιοριστικός παράγοντας ήταν η χρήση της θειόλης DTT στις αντιδράσεις μεθυλίωσης καθώς αντιδρά με τον παράγοντα Ellman. Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων μεθυλίωσης χωρίς DTT έδειξαν πως μπορεί να αποφευχθεί η χρήση του καθώς η απόδοση της αντίδρασης ανέρχεται άνω του 90 %. Επίσης, μελετήθηκαν οι παράγοντες του pH της αντίδρασης των δύο ενζύμων (pH 7.5 και pH 8.0), της θερμοκρασίας (28 και 35 °C) και της αναλογίας ακινητοποιημένης μεθυλοτρανσφεράσης και ακινητοποιημένης SAHase (250 μ L:50 μ L και 250 μ L : 25 μ L). Βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης φαίνεται να αντιστοιχούν στις τιμές pH 8.0, 28°C και στην αναλογία 250 μ L : 25 μ L.

ABSTRACT

Methylation of compounds is a strategy followed by pharmaceutical industry to develop new compounds, which have improved properties and even new biological activities due to methylation. Natural products are compounds with significant biological activities therefore they are widely used. In nature, they occur as methylated analogues possessing important bioactivity, which is sometimes better than that presented by the respective precursor compound. Thus, the aim of this study is the targeted modification of natural products using methyltransferases enzymes for the production of either existing methylated analogues or new ones with various biological activities.

Wild type (WT) of methyltransferases from the organisms *Catharanthus roseus* (CaROMT) and *Clarkia breweri* (IeOMT) were used as biocatalysts, while two mutations from the latter organism, T133M and T133M/Y326L, were also used. Each enzyme has different activity and regioselectivity. First, the activity of free enzymes was tested through methylation reactions with the natural substrates isoeugenol for the IeOMT enzymes and caffeic acid for the CaRO WT enzyme using HPLC analysis. Then, they were immobilized on polydopamine-nickel-coated magnetic iron oxide nanoparticles (F_3O_4 @polydopamine-Ni(II)), an immobilization technique based on principles of IMAC chromatography for His-tagged enzymes and providing simultaneous purification and enzyme immobilization. The immobilization conditions were studied with respect to incubation time (30 min, 2 and 4 h) and nanomaterial : cell extract ratio (1:2 and 1:4). The results showed that the optimal values of these immobilization factors are the time of 30 minutes and the ratio of 1:4.

For the first time, modification of tyrosol and hydroxytyrosol occurred by immobilized CaRO WT and IeOMT T133M enzymes, as well as modification of morin, myricetin, fisetin and resveratrol occurred by immobilized IeOMT WT and IeOMT T133M/Y326L. The combination of HPLC, MS and NMR analyses revealed the para-methylated analogue as the product of the methylation of tyrosol by IeOMT T133M, while its modification by CaRO WT was not successful. The IeOMT WT enzyme methylated hydroxytyrosol in meta-OH, whereas IeOMT T133M gave a mixture of products with para-methylated product predominating, followed by meta- and para-dimethylated hydroxytyrosol. The methylation of the remaining substrates (morin, myricetin, fisetin and resveratrol) was further studied with the IeOMT T133M/Y326L enzyme due to its higher activity compared to the wild type of enzyme. The regioselectivity of the enzyme towards myricetin appears to be in the 3' and 5' positions with the production of dimethyl myricetin, in case of fisetin in the 3' position with the existence of monomethyl fisetin, while the regioselectivity regarding morin could not be clarified. Resveratrol was methylated to give monomethylated and dimethylated products.

Finally, a photometric protocol was developed to detect the activity of methyltransferases using the SAHase enzyme from the organism *Bradyrhizobium elkanii*, which hydrolyzes the by-product of methylation, SAH, and through the Ellman's reagent, a colored product is produced that absorbs at 412nm. The enzyme

was immobilized as were the methyltransferases. A limiting factor was the use of the thiol DTT in the methylation reactions, as it reacts with Ellman's reagent. The results of the methylation reactions without DTT showed that its use can be avoided as the yield of the reaction was above 90 %. Additionally, the reaction's factors of the two enzymes such as pH (pH 7.5 and pH 8.0), temperature (28 and 35 °C) and the ratio of immobilized methyltransferase and immobilized SAHase (250 µL:50 µL and 250 µL: 25 µL) were studied. The optimal reaction conditions seem to correspond to pH values of 8.0, temperature of 28°C and a ratio of 250 µL: 25 µL.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

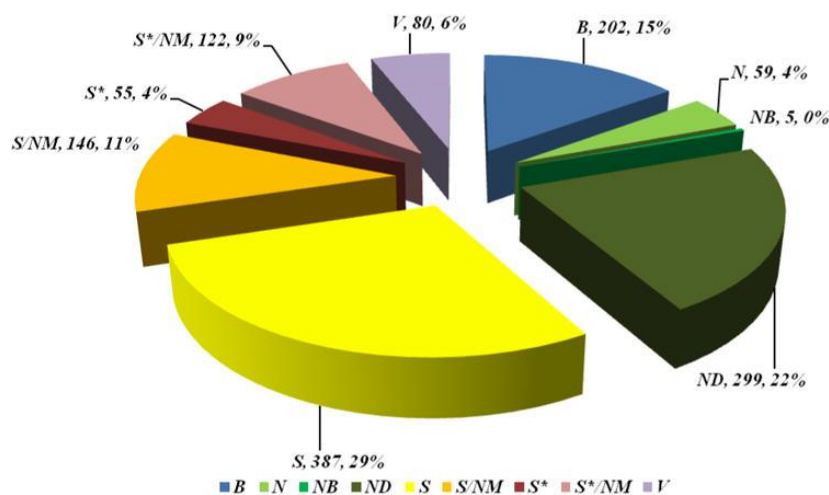
1. Φυσικά προϊόντα

Τα φυσικά προϊόντα, ως βιοδραστικές ενώσεις, έχουν κάνει την εμφάνισή τους εκατοντάδες χρόνια πριν καθώς η ανθρωπότητα έκανε χρήση των φυτών και των βοτάνων από πολύ νωρίς. Αυτό αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι ο κινέζικος λαός, οι αρχαίοι Έλληνες και οι Ρωμαίοι συνέβαλαν σημαντικά στη χρήση βοτάνων ως φάρμακα.[1] Ως φυσικό προϊόν ορίζεται ένα οργανικό μόριο το οποίο είναι δευτερογενής μεταβολίτης ενός ζωντανού οργανισμού.[2] Ιδιαίτερα, η έρευνα έχει στραφεί προς τους δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών. Τέτοιες ενώσεις φέρουν σημαντικές βιολογικές δράσεις για αυτό και χρησιμοποιούνται ευρέως ως φάρμακα ή μοτίβα προς ανακάλυψη νέων φαρμάκων. Χαρακτηρίζονται από τεράστια δομική ποικιλομορφία διαθέτοντας σκελετούς με ιδιαίτερη πολυπλοκότητα, πράγμα που προσθέτει έναν επιπλέον βαθμό δυσκολίας στην *in vitro* σύνθεσή τους. Τυπικά, απαρτίζονται από μεγάλο αριθμό sp^3 υβριδισμένων ανθράκων (C) όπως επίσης και ατόμων οξυγόνου (O), ενώ μικρή είναι η ύπαρξη ατόμων αζώτου (N) και αλογόνων (Cl, Br, I). Επίσης, διαθέτουν υψηλό μοριακό βάρος, πολλά άτομα τόσο δοτών όσο και δεκτών δεσμών υδρογόνου, υψηλή υδροφιλία και μεγαλύτερη μοριακή ακαμψία εν συγκρίσει με τα συνθετικά μόρια. [3]

Κάθε οργανισμός παράγει μοναδικούς δευτερογενείς μεταβολίτες, για αυτό και δεν είναι όμοιοι μεταξύ τους. Ωστόσο, μπορεί να γίνει μία κατηγοριοποίηση αυτών βάσει των δομών που παρουσιάζουν. Συνεπώς, ταξινομούνται ως τερπένια και στεροειδή, παράγωγα λιπαρών οξέων και πολυκετίδια, αλκαλοειδή, υδατάνθρακες, φαινυλοπροπανοειδή και ως ειδικά αμινοξέα και πεπτίδια.[4] Πιο συγκεκριμένα, τα τερπένια και τα στεροειδή έχουν και τα δυο δομικό λίθο το ισοπρένιο αλλά διαφέρουν στις δομές τους, καθώς τα πρώτα δεν φέρουν κάποιο κοινό σκελετό συγκριτικά με τα δεύτερα. Δομικός λίθος των παραγώγων των λιπαρών οξέων και των πολυκετιδίων είναι το ακετύλο-συνένζυμο Α (acetyl-CoA) και τα παράγωγά του, ενώ τα φαινυλοπροπανοειδή περιέχουν τουλάχιστον ένα αρωματικό δακτύλιο. Τέλος, χαρακτηριστικό των δομών των αλκαλοειδών είναι η ύπαρξη αμινομάδων που υποδηλώνει την βιοσύνθεσή τους μέσω των αμινοξέων. [4, 5]

Η αξιοποίηση φυσικών προϊόντων ως φαρμακευτικοί παράγοντες έγκειται στο γεγονός ότι παρουσιάζουν εξαιρετική δομική ποικιλομορφία, πολυπλοκότητα και υψηλό βαθμό στεreoχημείας, πράγμα που τους παρέχει τη δυνατότητα καλύτερης και πιο εκλεκτικής στόχευσης. Επιπλέον, λόγω ότι είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που παρέχουν μηχανισμούς άμυνας στα φυτά, έχουν μία ορισμένη βιολογική δράση η οποία αναπτύσσεται και απευθύνεται σε ζωντανούς οργανισμούς, μπορεί να εμφανίζει βιολογική δράση και στον ανθρώπινο οργανισμό. Έτσι, μπορούν να συσχετιστούν με την μοριακή αναγνώριση και με την αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες, μιας και είναι βιολογικά επικυρωμένες δομές. Επιπροσθέτως, προσφέρουν πολλαπλή στόχευση σε αντίθεση με τις συνθετικές ενώσεις που μπορούν να λειτουργήσουν δυναμικά ως φάρμακα.[6]

Είναι κατανοητό λοιπόν, πως η φύση παρέχει στον άνθρωπο ενώσεις προκειμένου να τις χρησιμοποιεί είτε άμεσα ως φάρμακα, όπως επί παραδείγματι η μορφίνη, είτε έμμεσα μέσω κάποιων τροποποιήσεων που υφίστανται, όπως η ασπιρίνη.[7] Μάλιστα, η μορφίνη και η ασπιρίνη είναι οι πρώτες ενώσεις φυσικών προϊόντων ως φάρμακα που εισήχθησαν από τις εταιρείες Merck και Bayer, αντιστοίχως, κατά τη διάρκεια του 19^{ου} αιώνα.[8] Αξιοσημείωτη επίσης είναι η δημοσίευση των Newman και Cragg το 2012 στην οποία αναφέρεται ότι το 40% των φαρμάκων που εγκρίθηκαν από τον Αμερικάνικο Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) έως το 2010 είναι βασισμένα σε φυσικά προϊόντα, ανάλογά τους ή τα φυσικά προϊόντα αποτελούν το δομικό σκελετό τους ή ενώσεις που τα μιμούνται. (Εικόνα 1)[9]



Εικόνα 1. Κατανομή εγκεκριμένων φαρμάκων από το 1981 έως το 2010. Με «S» υποδηλώνονται τα καθαρά συνθετικά φάρμακα, με «B» υποδηλώνονται τα φάρμακα που είναι βιολογικής προελεύσεως που συνήθως είναι πεπτίδια ή πρωτεΐνες, το «N» αντιστοιχεί στα φυσικά προϊόντα που λειτουργούν ως φάρμακα, το «NB» στα φυσικά προϊόντα που λειτουργούν ως φάρμακα και προέρχονται από βότανα, το «ND» αντιστοιχεί σε φάρμακα που προέρχονται από φυσικά προϊόντα και έχουν υποστεί ημισυνθετική σύνθεση, με «S*» συμβολίζονται εκείνα τα φάρμακα που προέρχονται από πλήρη οργανική σύνθεση με τις φαρμακοφόρες ομάδες όμως της ένωσης να προέρχονται από φυσικά προϊόντα και με «V» συμβολίζονται τα εμβόλια. Τέλος, με «NM» συμβολίζονται εκείνες οι ενώσεις που μιμούνται κάποια βιολογική δράση και είτε είναι πλήρως συνθετικές (S/NM) είτε οι φαρμακοφόρες ομάδες που διαθέτει προέρχονται από φυσικά προϊόντα (S*/NM). [9]

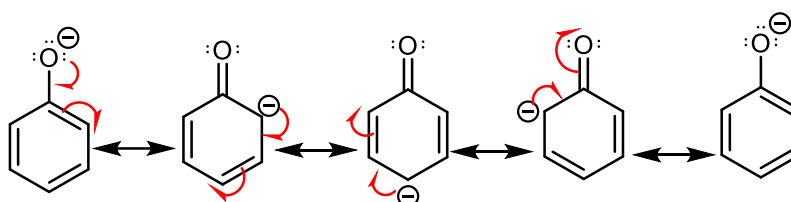
2. Φαινολικές ενώσεις

Μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες των φυσικών προϊόντων είναι οι φαινολικές ενώσεις που απαντώνται ως δευτερογενείς μεταβολίτες κυρίως στο φυτικό βασίλειο. Προέρχονται από τα μεταβολικά μονοπάτια της φωσφορικής πεντόξης, του σικιμικού οξέος και των φαινυλοπροπανοειδών και σχηματίζονται συνήθως κάτω από στρεσογόνες συνθήκες.[10] Είναι υπεύθυνες για τα οργανολυπτικά χαρακτηριστικά των φυτών και για την προστασία έναντι της UV ακτινοβολίας, των παράσιτων και των εντόμων. Φέρουν χαρακτηριστική δομή καθώς περιέχουν τουλάχιστον έναν αρωματικό δακτύλιο υποκατεστημένο με μία ή περισσότερες λειτουργικές υδροξυλομάδες. Επιπροσθέτως, σημαντικό για τα μόρια αυτά είναι ότι συνήθως συναντώνται συνδεδεμένα με άλλα μόρια, όπως για παράδειγμα πρωτεΐνες ή σάκχαρα, ή στην εστεροποιημένη τους μορφή (εστέρες ή μεθυλεστέρες) και σπανίως στην ελεύθερη

τους μορφή, καθώς πιθανόν είναι τοξικά και όταν είναι δεσμευμένα εν μέρει αποτοξινώνονται. [11]

Η δομική ποικιλομορφία που προσφέρουν μπορεί να δώσει ενώσεις από σχετικά μικρού μοριακού βάρους έως αρκετά υψηλού. Βάσει της δομής τους ταξινομούνται σε πληθώρα κατηγοριών, οι οποίες με τη σειρά τους υφίστανται περαιτέρω διαχωρισμό. Οι δύο ευρύτερες ομάδες φαινολικών ενώσεων είναι αυτή των απλών φαινολικών ενώσεων και των πολυφαινολών. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν ενώσεις που δεν παρουσιάζουν μεγάλη δομική πολυπλοκότητα και κατηγοριοποιούνται περαιτέρω σε απλές φαινόλες και φαινολικά οξέα, με τη διαίρεση αυτών σε μικρότερες ομάδες. Αντιθέτως, ενώσεις με αυξημένη δομική πολυπλοκότητα απαρτίζουν την ομάδα των πολυφαινολών, η οποία διαιρείται στα φλαβονοειδή, τις τανίνες, τις λιγνίνες και τα στυλβένια.[12]

Οι χημικές ιδιότητες που εμφανίζουν οι φαινολικές ενώσεις είναι άμεσα συνδεδεμένες με τη δράση τους. Λόγω του επαγωγικού φαινομένου και της διαφορετικής ηλεκτραρνητικότητας των ατόμων του οξυγόνου (O) και του υδρογόνου (H) στο δεσμό O-H του φαινυλίου, το υδρογόνο αποκτά μερικό θετικό φορτίο και αντίστοιχα αρνητικό το οξυγόνο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να καθίσταται όξινο το υδρογόνο και με την κατάλληλη βάση να απομακρύνεται εύκολα. Ωστόσο, τονίζεται πως η οξύτητα εξαρτάται από την υποκατάσταση που υφίσταται ο δακτύλιος της φαινόλης, με ορισμένες ομάδες να την ευνοούν και άλλες όχι. Η συζυγής βάση που δημιουργείται καθίσταται θερμοδυναμικά σταθερή λόγω των πολλαπλών δομών συντονισμού που εμφανίζει (**Σχήμα 1**). Λόγω, λοιπόν, της οξύτητας των ενώσεων αυτών καθίσταται δυνατή και η συμμετοχή τους σε αντιδράσεις εστεροποίησης, αιθεροποίησης και οξειδωσης. Επιπλέον, το μερικό αρνητικό φορτίο του υδρογόνου προσφέρει τη δυνατότητα ανάπτυξης δεσμών υδρογόνου με ετεροάτομα που διαθέτουν ελεύθερο ένα ζεύγος ηλεκτρονίων (O, N, F), σχηματίζοντας έτσι τόσο ενδομοριακούς όσο και διαμοριακούς δεσμούς. [12]



Σχήμα 1. Δομές συντονισμού του φαινολικού ανιόντος.

Συνδυάζοντας δομική ποικιλομορφία και πολυπλοκότητα, τις χημικές ιδιότητες, αλλά και τις αιτίες που συντίθενται στα φυτά, οι φαινολικές ενώσεις εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων. Αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιαλλεργικές, αντικαρκινικές, αντιθρομβωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες είναι μερικές από τις βιολογικές δράσεις που παρουσιάζουν.[13] Αυτό τους καθιστά χρήσιμα εργαλεία για την σύνθεση νέων ενώσεων που μπορούν δυνητικά να εμφανίσουν βιοδραστικότητα. Για τους παραπάνω λόγους, τα φλαβονοειδή έχουν μελετηθεί και μελετώνται όλο ένα και περισσότερο από την επιστημονική κοινότητα και γίνεται χρήση τους σε ένα πλατύ

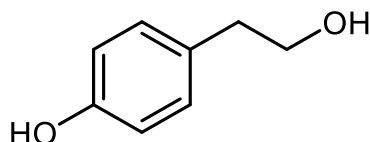
πεδίο εφαρμογών. Έτσι, πέρα από τον τομέα των φαρμάκων, βιομηχανίες όπως αυτή των τροφίμων, των καλλυντικών και της κλωστοϋφαντουργίας κάνουν χρήση αυτών των ενώσεων.[14]

2.1 Φαινυλοαιθανοειδή

Τα φαινυλοαιθανοειδή είναι μια οικογένεια των φαινολικών ενώσεων που ο δομικός τους πυρήνας χαρακτηρίζεται από τη δομή της φαινυλοαιθυλικής αλκοόλης, ενώ συχνά μπορεί να φέρει διάφορες υποκαταστάσεις μέσω εστερικών ή γλυκοσιδικών δεσμών. Στη φύση απαντώνται κυρίως ως προϊόντα γλυκοσιδικών ενώσεων στα φυτά, έχοντας αρκετά σημαντικές βιολογικές ιδιότητες που απορρέουν ως απάντηση τόσο σε βιοτικά όσο και σε αβιοτικά ερεθίσματα.[15] Επομένως, θέτουν σημαντική υποψηφιότητα ως ενώσεις που μπορούν να αξιοποιηθούν, φέροντας θεραπευτικές ιδιότητες ως προς τον άνθρωπο.

2.1.1 Τυροσόλη

Ένας από τους κύριους εκπροσώπους των φαινυλοαιθανοειδών στη φύση είναι η τυροσόλη (4-υδροξυφαινυλοαιθανόλη) (**Σχήμα 2**). Συναντάται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο ελαιόδαδο και στο κρασί, όπως επίσης βρίσκεται και σε ορισμένα αλκοολούχα ποτά, όπως η μπύρα και το βερμούτ. Ο φυσιολογικό ρόλος έγκειται στην αντιμετώπιση και στην προστασία των φυτών έναντι των παθογόνων και των παρασίτων.[16] Ως φαινολική ένωση, παρουσιάζει αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική ικανότητα. Πέραν τούτου, έχουν αξιολογηθεί περαιτέρω βιολογικές της δράσεις, όπως επί παραδείγματι αντιφλεγμονώδη [17], καθώς επίσης έχουν συσχετιστεί ευεργετικές δράσεις της σχετικά με το μεταβολικό σύνδρομο, τον καρκίνο και με διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες. [16]

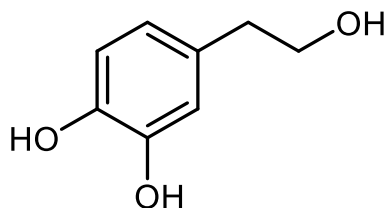


Σχήμα 2. Δομή τυροσόλης.

2.1.2 Υδροξυτυροσόλη

Τυπικό παράδειγμα των φαινυλοαιθανοειδών, πέραν της τυροσόλης, είναι και η υδροξυτυροσόλη (3,4-διυδροξυ-φαινυλοαιθανόλη), με τη δομή της να παρουσιάζεται στο **Σχήμα 3**. Όπως και στην τυροσόλη έτσι και στην υδροξυτυροσόλη κύρια πηγή της είναι η ελιά και το κρασί, φέρει σχεδόν πανομοιότητες βιολογικές ιδιότητες και επιπλέον συναντάται είτε γλυκοζυλιωμένη είτε ως σεκοϊριδοειδές.[16] Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ως ένα από τα πιο ισχυρά αντιοξειδωτικά της φύσης, εμφανίζοντας ωστόσο εξίσου σημαντικές βιοδραστικότητες όπως καρδιοπροστατευτική, αντικαρκινική, αντιμικροβιακή και αντιδιαβητική δράση. Αξιοσημείωτο είναι ότι αν και είναι μια εκτενώς μελετημένη ένωση, δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως ο μηχανισμός δράσεώς της που έχει απορία την βιοδραστικότητά της.[18] Χαρακτηρίζεται ως μη γονιδιοτοξική και μη μεταλλαξιογόνα ένωση γεγονός

που δίνει τη δυνατότητα να αξιοποιηθεί ως θεραπευτική ουσία, για αυτό χρησιμοποιείται ευρέως σε βιομηχανίες.[19]



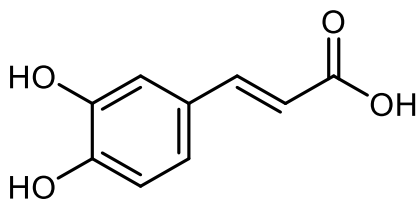
Σχήμα 3. Δομή υδροξυτυροσόλης.

2.2 Φαινυλοπροπανοειδή

Φαινολικές ενώσεις με δομικό μοτίβο C₆-C₃ απαρτίζουν την ομάδα των φαινυλοπροπανοειδών, η οποία περιέχει μια ομάδα αρωματικής φαινόλης και μια ανθρακική αλυσίδα προπερίνου, όπως προδίδει και το όνομά τους. Είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών προερχόμενοι από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη και τυροσίνη ενώ η ελεύθερη μορφή τους είναι κυτταροτοξική. Για το λόγο αυτό, βρίσκονται στη γλυκοσιδωμένη μορφή τους. [20]

2.2.1 Καφεϊκό οξύ

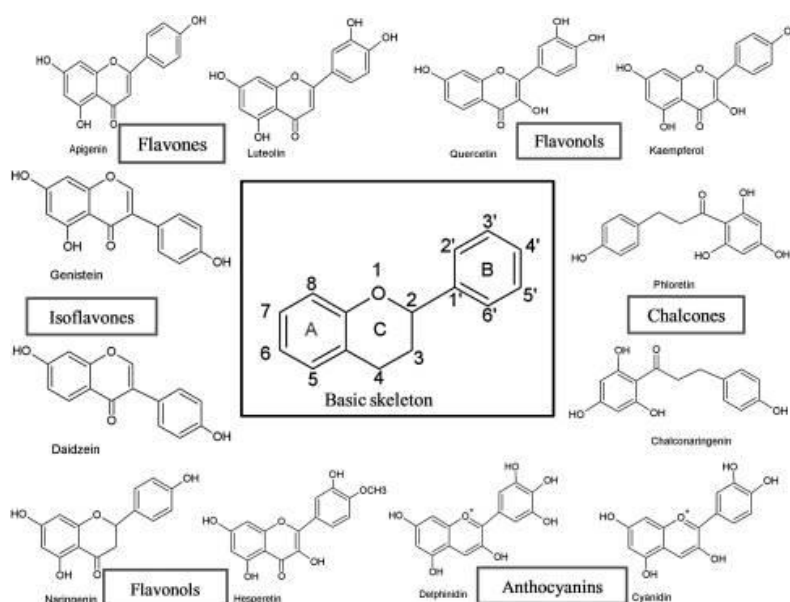
Το καφεϊκό οξύ (3,4-διυδροξυ-κινναμωμικό οξύ) (Σχήμα 4) είναι μία οργανική ένωση που κατατάσσεται ως ένα υδροξυκινναμωμικό οξύ και ανήκει στα φαινυλοπροπανοειδή. Η ονομασία του κατά IUPAC είναι η (E)-3-(3,4-διυδροξυφαινυλ)προπ-2-ενοϊκό οξύ και συναντάται σε πληθώρα φαγώσιμων όπως στο τσάι, στα μήλα, στο μέλι, στην πρόπολη και στον καφέ. Στα φυτά βρίσκεται συνήθως στη μονομερή δομή του ως εστέρας οργανικών ενώσεων σακχάρων, αμιδίων ή γλυκοσιδίων. Αυτό και τα παράγωγά του συμμετέχουν στο μηχανισμό άμυνας των φυτών κατά των εντόμων και μολύνσεων, καθώς επίσης αναστέλλουν την ανάπτυξη μυκήτων και βακτηρίων.[21] Επιπλέον, χαρακτηρίζεται από αντιοξειδωτικές ιδιότητες αναστέλλοντάς μάλιστα την οξείδωση της ανθρώπινης λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL).[15] Ως εκ τούτου, το καφεϊκό οξύ αποτελεί μια ένωση που διαθέτει φαρμακολογικό ενδιαφέρον με όλο και πιο συχνή χρήση της.



Σχήμα 4. Δομή καφεϊκού οξέος.

2.3 Φλαβονοειδή

Μία σημαντική κατηγορία των φυτικών προϊόντων είναι τα φλαβονοειδή, τα οποία κατατάσσονται στην ευρύτερη οικογένεια των φαινυλοπροπανοειδών. Είναι φυσικές πολυφαινόλες και απαντώνται συνήθως στα ανώτατα φυτά. Εντοπίζονται κυρίως στους καρπούς, στα φύλλα, στο φλοιό, στους σπόρους και στα άνθη των φυτών, μιας και διαδραματίζουν προστατευτικό ρόλο έναντι του βιοτικού και αβιοτικού στρες αλλά και της ακτινοβολίας.[22] Ο κύριος σκελετός τους αποτελείται από συνολικά δεκαπέντε άτομα άνθρακα, οι οποίοι σχηματίζουν δύο βενζοϊκούς δακτυλίους (Α και Β) που συνδέονται μεταξύ τους με έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο (C), όπως παρουσιάζεται στο κέντρο της **Εικόνας 2**. Λόγω αυτής της δομής, εμφανίζουν δύο χαρακτηριστικές απορροφήσεις στα 320-385 nm και στα 250-285 nm που οφείλονται στους δακτυλίους Β και Α, αντιστοίχως, οι οποίες υφίστανται μετατοπίσεις όταν υπάρχουν υποκαταστάτες.[23]



Εικόνα 2. Απεικόνιση δομών φλαβονοειδών. Στο κέντρο παρουσιάζεται ο βασικός σκελετός των φλαβονοειδών με τους δύο βενζοϊκούς δακτυλίους (Α και Β) και τον ετεροκυκλικό δακτύλιο C. Επιπλέον, παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά παραδείγματα ενώσεων από κάθε κατηγορία φλαβονοειδών με τις εμπειρικές τους ονομασίες. [24]

Η παραπάνω βασική τους δομή δίνει τη δυνατότητα ύπαρξης πολλών και διαφόρων αναλόγων βάσει της υποκατάστασης που μπορούν να δεχτούν, για αυτό και διακρίνονται σε κατηγορίες. Τα κριτήρια διαχωρισμού είναι ως προς το βαθμό οξείδωσης και ακορεστότητας του δακτυλίου C καθώς και ως προς τον τρόπο υποκατάστασης του.[24] Συνεπώς, διακρίνονται σε φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβονόνες, φλαβανόλες, ανθοκυανίνες και χαλκόνες. Επιπλέον, τονίζεται ότι οι παραπάνω κατηγορίες εκφράζουν διαφορετικές βιολογικές δράσεις καθώς αυτές οφείλονται στη δομή που φέρει το εκάστοτε φλαβονοειδές, ήτοι στο βαθμό οξείδωσης και πολυμερισμού και στην υποκατάσταση, ενώ η πλειονότητα αυτών των μορίων απαντάται στη γλυκοζυλιωμένη τους μορφή στη φύση.[25]

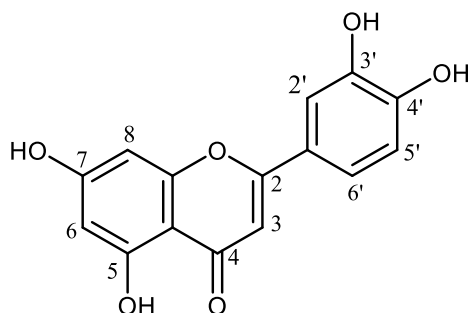
Τα φλαβονοειδή έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον πάνω τους εξαιτίας ορισμένων ιδιοτήτων που φέρουν. Κύρια και πιο καλά μελετημένη ιδιότητά τους είναι η αντιοξειδωτική τους δράση, η οποία οφείλεται και εξαρτάται από την ύπαρξη υδροοξυλομάδων στη δομή τους. Δρουν κυρίως βάσει τριών διαφορετικών μηχανισμών, παρέχοντας ωστόσο το ίδιο αποτέλεσμα δηλαδή την προστασία του οργανισμού έναντι των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS). Ο πρώτος και ίσως πιο κοινός μηχανισμός δράσης αναφέρεται στην καταστολή σχηματισμού των ROS μέσω αναστολής ενζύμων ή δημιουργίας χηλικών συμπλόκων με μέταλλα που εμπλέκονται στο σχηματισμό αυτών. Ο δεύτερος και ο τρίτος μηχανισμός δράσης αφορούν τη σάρωση των ROS και την ενίσχυση της προστασίας ή ρύθμισης της αντιοξειδωτικής άμυνας.[26] Ακόμη μία εξίσου σημαντική ιδιότητα που παρουσιάζουν είναι η αντικαρκινική δράση. Φαίνεται να δρουν με μια πληθώρα μηχανισμών που εμπεριέχουν την αναστολή έκφρασης των Ras πρωτεϊνών ή των κινασών τυροσίνης ή των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, τη μείωση της μετάλλαξης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53, την ικανότητα δέσμευσης οιστρογόνων και τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου.[26] Επιπροσθέτως, παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδες ιδιότητες που σχετίζονται με την αναστολή κινασών οι οποίες εμπλέκονται σε διαδικασίες μεταγωγής σήματος μεταξύ των οποίων και του ανοσοποιητικού, αντιβακτηριακές αντικές ιδιότητες, όπως επίσης και καρδιοπροστατευτικές, αντιδιαβητικές και ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες. Φαίνεται πως κοινό χαρακτηριστικό των φλαβονοειδών που παρουσιάζουν ορισμένες από τις προαναφερθέντες ιδιότητες είναι η ύπαρξη ενός διπλού δεσμού μεταξύ του άνθρακα 3 και 4. [27]

Λόγω των παραπάνω ιδιοτήτων τους, τα φυσικά φλαβονοειδή χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία καθώς προσφέρουν μοναδικές δράσεις εξαιτίας της δομής, η οποία λόγω πολυπλοκότητας αδυνατεί να αντιγραφεί από την οργανική σύνθεση. Έτσι τα φλαβονοειδή συναντώνται στη βιομηχανία των τροφίμων ως nutraceuticals [28], στην κοσμετολογία [29] αλλά και σε αυτήν των φαρμάκων. [30]

2.3.1 Λουτεολίνη

Η λουτεολίνη (3',4',5,7-τετραυδροξυφλαβόνη) (**Σχήμα 5**) είναι ευρέως διαδεδομένη ένωση στα φυτά και στους καρπούς αυτών ως φλαβονοειδές. Ανήκει στην τάξη των φλαβονών έχοντας δομικό σκελετό C₆-C₃-C₆ και όπως την πλειοψηφία των φυσικών προϊόντων βρίσκεται στην γλυκοζυλιωμένη της μορφή, με αυτή να υφίσταται υδρόλυση όταν απορροφάται και να προκύπτει η άγλυκη ελεύθερή της μορφή. [31] Όντας φυσικό προϊόν, η λουτεολίνη διαθέτει μία μεγάλη γκάμα βιολογικών ιδιοτήτων που κυμαίνεται από αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης, αντιμικροβιακή έως νευροπροστατευτική και αντικαρκινική, με την τελευταία να βρίσκει εφαρμογή σε διάφορους τύπους καρκίνους τόσο σε *in vivo* όσο και σε *in vitro* μελέτες.[32] Μάλιστα, η βιβλιογραφία αναφέρει πως πολλές βιολογικές δράσεις της λουτεολίνης μπορούν να εμφανίσουν σενεργιστική δράση αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους, όπως για παράδειγμα η αντιφλεγμονώδη με την αντικαρκινική δράση.[32] Από μελέτες δομής-δράσης, έχει προκύψει πως τα υδροξύλια που φέρει στις θέσεις 3',4',5 και 7 καθώς και ο διπλός

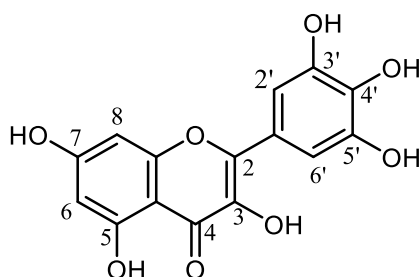
δεσμός μεταξύ των ανθράκων 2-3, συνδέονται με τη βιοδραστικότητα που εμφανίζει.[32]



Σχήμα 5. Δομή λουτεολίνης.

2.3.2 Μυρικετίνη

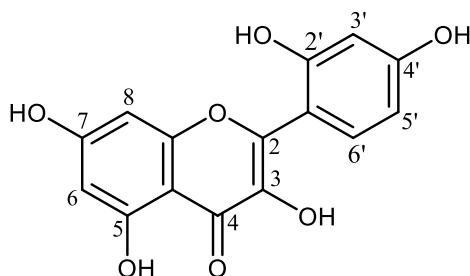
Μέλος των φλαβονολών είναι η μυρικετίνη, η οποία περιέχει έξι υδροξύλια στη δομή της (3,5,7,3',4',5'- εξαϋδροξυφλαβονόλη) όπως φαίνεται στο **Σχήμα 6**. Την πρώτη της εμφάνιση έκανε στα τέλη του 18^{ου} αιώνα όταν απομονώθηκε ως κρυσταλλική ένωση ανοιχτού κίτρινου χρώματος από το φλοιό του δέντρου *Myrica nagi* Thunb.[33] Ο άνθρωπος την λαμβάνει καθημερινά μέσω της διατροφής του καθώς εμπεριέχεται σε πολλά λαχανικά και φρούτα, που βρίσκεται είτε υπό την ελεύθερη είτε στη γλυκοζυλιωμένη μορφή της. Έχει ένα ευρύ πεδίο βιολογικών δράσεων, με αυτές των αντικαρκινικών, αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών, καρδιοπροστατευτικών, νευροπροστατευτικών και αντικών ιδιωτιών να είναι ενδεικτικά παραδείγματα. Αξιοσημείωτο είναι πως στον ανθρώπινο οργανισμό έχει ευεργετικές δράσεις ως προς τη μείωση του οξειδωτικού στρες, των υπατικών τριγλυκεριδίων και της περιεκτικότητας της χοληστερόλης.[34] Δεν είναι τυχαίο μάλιστα που βιβλιογραφικά υπάρχουν πολλές αναφορές για την δράση της ως nutraceutical και αντιοξειδωτικό. [34] Για τον λόγο αυτό, γίνεται εκτενής χρήση της στη βιομηχανία τροφίμων ως συντηρητικό έναντι της αποτροπής της οξείδωσης λιπαρών και ελαίων [35], ενώ μέχρι στιγμής δεν έχει εγκριθεί ως αυτούσια φαρμακρυτική ένωση από τους αρμόδιους φορείς. [36]



Σχήμα 6. Δομή μυρικετίνης.

2.3.3 Μορίνη

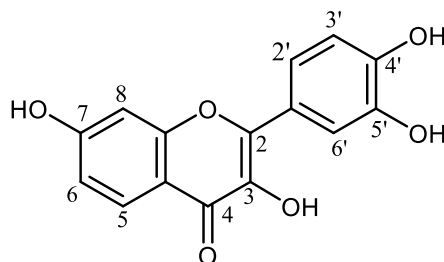
Η μορίνη (3,5,7,2',4'-πενταϋδροξυφλαβονόλη) (**Σχήμα 7**) είναι ακόμη μία ένωση που ανήκει στις φλαβονόλες και είναι ισομερής μορφή της κερσετίνης. Όπως και η μυρικετίνη, έτσι και η μορίνη διαθέτει κίτρινο χρώμα έχοντας απομονωθεί από τα φυτά που ανήκουν στην οικογένεια Moraceae ως χρωστική.[37] Επιπλέον, βρίσκεται σε πολλά φυτά όπως επίσης απαντάται και σε πολλά φαρμακευτικά φυτά και βότανα. Μελέτες έχουν αναδείξει πολλές φαρμακολογικές της δράσεις, όπως δράσεις κατά του καρκίνου, του διαβήτη, αντιφλεγμονώδη, καρδιοπροστατευτική και νευροπροστατευτική δράση. Τονίζεται, πως δεν εμφανίζει κυτταροτοξικότητα και σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν επισημάνει την ωφέλιμη συνεισφορά της σε πληθώρα ασθενειών εξαιτίας της δράσης της με κύριο ρόλο να κατέχουν η αντιφλεγμονώδης και η αντιοξειδωτική. Πέρα από το φαρμακολογικό ενδιαφέρον, η μορίνη έχει αξιοποιείται και ως χρωστική σε βαμβάκι, μετάξι και μαλλί. [38]



Σχήμα 7. Δομή μορίνης.

2.3.4 Φισετίνη

Ακόμη ένα ευρέως διαδεδομένο φλαβονοειδές της φύσης είναι η φισετίνη (3,7,3',4'-τετραϋδροξυφλαβόνη), με τη δομή της να αποτυπώνεται στο **Σχήμα 8**. Για πρώτη φορά απομονώθηκε το 1833 από το φυτό Venetian sumach και βρίσκεται σε διάφορα φρούτα και λαχανικά, με τη φράουλα να είναι το φρούτο που απαντάται στη μεγαλύτερη συγκέντρωσή της. [39] Ως δευτερογενής μεταβολίτης των φυτών, παρουσιάζει αρκετές βιολογικές δράσεις και βρίσκεται συνήθως στη γλυκοζυλιωμένη μορφή της. Παράλληλα, έχει αναφερθεί ως χημειοθεραπευτικός-χημειοπροστατευτικός παράγοντας σε διάφορους τύπους καρκίνου και ως νευροπροστατευτικός παράγοντας, όπως επί παραδείγματι στην ασθένεια του Parkinson.[39] Ιδιαίτερα, στον καρκίνο σε πολλές *in vitro* μελέτες έχει αποδειχθεί πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα μονοπάτια σηματοδότησης και των απορρυθμισμένων πρωτεϊνών ως αναστολέας. [40]



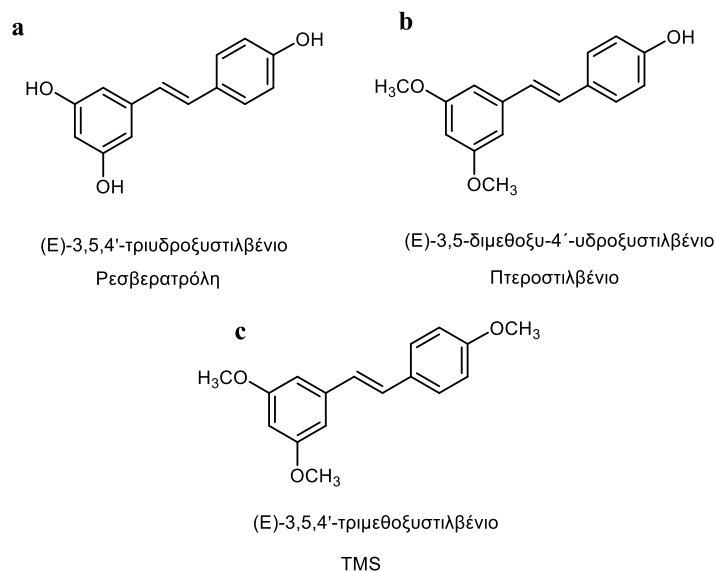
Σχήμα 8. Δομή φισετίνης.

2.4 Στιλβένια

Μία τάξη των φυτικών πολυφαινολών είναι αυτή των στιλβενίων (1,2-διφαινυλαιθυλένια). Απαντώνται στο φυτικό βασίλειο, χωρίς ωστόσο να έχουν ευρεία κατανομή. Ο δομικός τους πυρήνας αποτελείται από δύο φαινολικούς δακτυλίους οι οποίοι ενώνονται μέσω δύο sp^2 υβριδισμένων ανθράκων και πιο συγκεκριμένα με ένα μόριο αιθενίου ($C_6-C_2-C_6$). Ο διπλός δεσμός δίνει τη δυνατότητα ύπαρξης δύο ισομερών μορφών του trans (E) και του cis (Z), καθώς επίσης οι φαινολικοί δακτύλιοι μπορούν να φέρουν διάφορες υποκαταστάσεις. Επιπλέον, εκτός από την μονομερή μορφή τους, μπορούν να απαντηθούν και ως ολιγομερή. Θεωρούνται ως φυτοαλεξίνες αφού η δράση τους έχει συνδεθεί με την αντοχή των φυτών σε διάφορες ασθένειες και στην ακτινοβολία.[41] Τόσο οι ενώσεις των στιλβενίων όσο και τα ανάλογά τους κεντρίζουν το ενδιαφέρον της έρευνας μιας και αξιοποιούνται στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων εξαιτίας των θεραπευτικών τους δράσεων.

2.4.1 Ρεσβερατρόλη

Η πιο γνωστή ένωση των στιλβενίων είναι η ρεσβερατρόλη (3,5,4'-τριυδροξυστιλβένιο) (**Σχήμα 9a**). Απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά το 1939 από τις ρίζες του φυτού *Veratrum grandiflorum* O. Loes. Είναι δευτερογενής μεταβολίτης των φυτών ιδίως των φρούτων με τον φλοιό των σταφυλιών να την περιέχει στη μεγαλύτερη συγκέντρωση. Υφίσταται ως trans και cis ισομερές μορφή, με την πρώτη να κυριαρχεί στη φύση. Το ισομερές αυτό μάλιστα εμφανίζει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω των βιολογικών του δράσεων.[42] Δεν είναι τυχαίο, λοιπόν, που η ερευνητική κοινότητα έχει στρέψει το ενδιαφέρον πάνω της εδώ και αρκετές δεκαετίες. Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές κλινικές μελέτες της ρεσβερατρόλης με προστατευτικό και θεραπευτικό ρόλο σε διάφορες ασθένειες και διαταραχές με τον καρκίνο και την παχυσαρκία να είναι κάποιες από αυτές.[42] Πέραν τούτου, εμφανίζει αντιοξειδωτικές, αντιβακτηριακές και αντιμυκητιακές ιδιότητες.[43] Ωστόσο, τη φαρμακευτική της εφαρμογή έχει περιορίσει η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητά της. Για αυτόν το λόγο, γίνεται η τροποποίηση με σκοπό την σύνθεση παραγώγων της.[44] Δύο πολύ σημαντικά μεθυλιωμένα παράγωγα της ρεσβερατρόλης που απαντώνται και στη φύση είναι το πετροστιλβένιο (**Σχήμα 9b**) και το (E)-3,5,4'-τριμεθοξυστιλένιο (TMS) (**Σχήμα 9c**). Φέρουν εξίσου καλές βιολογικές δράσεις, με ορισμένες να είναι πολύ καλύτερες εν συγκρίσει με της ρεσβερατρόλης. Το διμεθυλιωμένο παράγωγο εμφανίζει διάφορες φαρμακευτικές εφαρμογές με αυτές στην πρόληψη και θεραπεία του καρκίνου, τη γήρανση, τη μνήμη, τις καρδιαγγειακές παθήσεις και τις φλεγμονώδεις δερματικές παθήσεις να είναι κάποιες αντιπροσωπευτικές.[45] Μάλιστα, σύμφωνα με μία ομάδα ερευνητών, τόσο η ρεσβερατρόλη όσο και το πετροστιλβένιο εμφανίζουν πολύ καλή αντική δράση κατά του ιού SARS-CoV-2 στην *in vitro* μελέτη που διέπραξαν.[46] Τέλος, το τριμεθυλιωμένο ανάλογο της ρεσβερατρόλης παρουσιάζει και αυτό σημαντικά καλές βιοδραστικότητες με την αντικαρκινική να φαίνεται να είναι καλύτερη από της ρεσβερατρόλης. [47]



Σχήμα 9. Δομή της ρεσβερατρόλης (a) και των μεθυλοπαραγώγων της πτεροστυλβένιο (b) και του TMS (c).

2.5 Ενζυμική τροποποίηση φαινολικών ενώσεων

Είναι κατανοητό λοιπόν, ότι τα φυσικά προϊόντα και δη οι φαινολικές ενώσεις είναι ενώσεις υψηλής σημασίας καθώς έχουν αποδειχθεί πολλά υποσχόμενα μόρια ακόμη και με τη φυσική τους μορφή, που μπορούν να αποτελέσουν αρωγοί προς τη δημιουργία ενώσεων υψηλής αξίας. Δικαίως, οι ερευνητές έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους όχι μόνο προς τη βελτιστοποίηση και την επέκταση των ιδιοτήτων αυτών, αλλά και στην αντιμετώπιση των περιορισμών που φέρουν όπως η χαμηλή υδατοδιαλυτότητα και σταθερότητα.[48] Επίσης, παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η ζέστη, το οξυγόνο, το φως και χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα λόγω του γρήγορου μεταβολισμού τους.[44] Όλοι αυτοί οι περιορισμοί που υφίστανται έχουν ως αποτέλεσμα την υποβάθμισή της χρήσης τους. Η βελτιστοποίηση αυτών, επομένως, επιτυγχάνεται μέσω τροποποίησης της δομής τους που φέρει ως αποτέλεσμα την επιρροή των φυσικοχημικών αλλά και των βιολογικών ιδιοτήτων τους. Κύριες προσεγγιστικές μέθοδοι τροποποίησης είναι η ενζυμική, η χημική και ο συνδυασμός τους. Αυτή που επικρατεί είναι η πρώτη, δηλαδή με χρήση ενζύμων, μιας και διαθέτει μια πληθώρα πλεονεκτημάτων με το πιο σημαντικό να είναι η εκλεκτικότητα (χήμειο-, τόπο-, στέρεο-) που προσφέρει.[49]

Οι δομικές τροποποιήσεις που επικρατούν είναι η ακυλίωση και η γλυκοζυλίωση των φλαβονοειδών, προκειμένου να ενισχύσουν τον υδροφοβικό ή υδροφιλικό τους χαρακτήρα, αντιστοίχως.[50] Αναλόγως την περίπτωση, γίνεται χρήση λιπασών, υδρολασών, μεταφορασών και άλλων ενζύμων.[51] Όσον αφορά την ακυλίωση τους, η χημική διεργασία φέρει ανεπιθύμητα αποτελέσματα λόγω της μη ειδικότητάς της ως προς τις υδροξυλομάδες και έως εκ τούτου επηρεάζεται η αντιοξειδωτική τους δράση. Αντιθέτως, με την χρήση λιπασών και δει ακινητοποιημένων επιτυγχάνεται μια πιο εκλεκτική τροποποίηση που μάλιστα σταθεροποιεί και την αντιοξειδωτική δράση.[52] Ενδιαφέρον αποτελεί και η στοχευμένη μεθυλίωση των δομών των φλαβονοειδών

καθώς στη φύση πολλά απαντώνται μέσω των μεθυλιωμένων αναλόγων τους παρουσιάζοντας σημαντική βιολογική δράση.[53] Φαίνεται, πως τα μεθυλιωμένα φαινορικά παράγωγα είναι ιδιαίτερα χρήσιμα ως δομική λίθοι για την παραγωγή αντιοξειδωτικών, ενισχυτικών γεύσης, αρωμάτων, χρωστικών, αγροτοχημικών και υψηλής αξίας χημικών ενώσεων. [54]

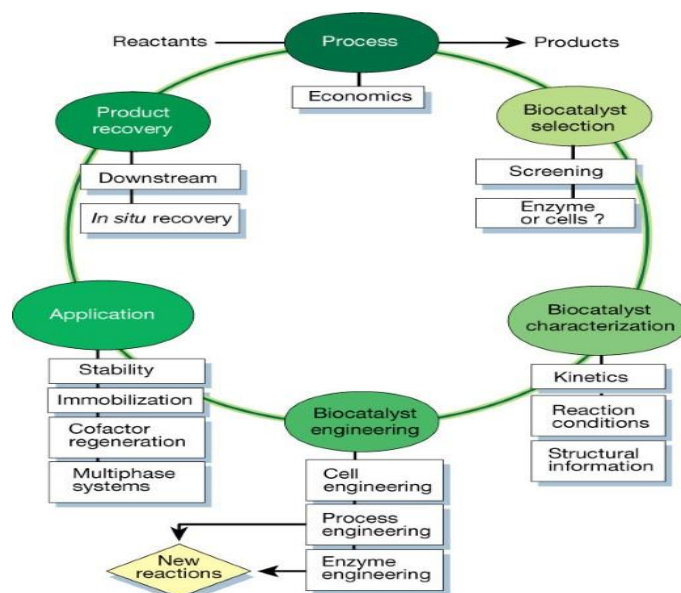
3. Βιοτεχνολογία και βιοκατάλυση

Στα τέλη του 19ου αιώνα εισήχθη για πρώτη φορά η έννοια της ζυμοτεχνολογίας, θέλοντας να περιγράψει όλων των ειδών της ζύμωσης που χρησιμοποιούνταν βιομηχανικά και όχι μόνο της ζυθοποιίας που κατείχε κυρίαρχο ρόλο. Με την πάροδο του χρόνου και την ανάπτυξη των κλάδων της μικροβιολογίας και της βακτηριολογίας, ο όρος «ζυμοτεχνολογία» μετατράπηκε στον όρο «βιοτεχνολογία» από τον Karl Ereky, σε μια προσπάθεια να εισάγει τη βιολογική σκοπιά στην τεχνολογία. [55] Σήμερα, ο όρος «βιοτεχνολογία» αντικατοπτρίζει ένα διεπιστημονικό κλάδο που αφορά την αξιοποίηση μέρος ή ολόκληρων κυττάρων βακτηριακής, φυτικής ή ζωικής προελεύσεως ή και των συστατικών τους, ήτοι ένζυμα, ως προς την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας ή υπηρεσιών που πρόκειται να έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. [56]

Είναι κατανοητό επομένως, πως η βιοτεχνολογία εμπεριέχει πολλούς κλάδους, οι οποίοι εάν και διαφορετικοί μεταξύ τους διότι στοχεύουν σε διαφορετικούς τομείς εφαρμογών, πολλές φορές αλληλεπικαλύπτονται. Έτσι, διακρίνεται σε τέσσερις, κυρίως, τομείς με τον κάθε ένα να αντιπροσωπεύεται από ένα συγκεκριμένο χρώμα, ήτοι κόκκινο, πράσινο, μπλε και άσπρο.[57] Ο κόκκινος τομέας πραγματεύεται ζητήματα που αφορούν την υγεία του ανθρώπου, για αυτό και συχνά απαντάται και ως ιατρική ή φαρμακευτική βιοτεχνολογία. Με αρωγό τις τεχνικές της μοριακής βιολογίας, όπως επί παραδείγματι αυτή του ανασυνδιασμένου DNA και του CRISPR, ασχολείται με γονιδιακές θεραπείες, με την ανάπτυξη εμβολίων και φαρμάκων, με την έρευνα γύρω από τα βλαστοκύτταρα και τη γενετική μηχανική.[58]

Η χρήση τεχνολογιών που επιτρέπουν την παραγωγή αλλά και την αύξηση αυτής προϊόντων που σχετίζονται με την ασφάλεια των τροφίμων αντιπροσωπεύει ο πράσινος τομέας της βιοτεχνολογίας. Βρίσκει εφαρμογή κυρίως σε φυτά ενώ παράλληλα χρησιμοποιεί παραπλήσιες τεχνικές με αυτών του κόκκινου τομέα, λόγω της καθολικότητας των αρχών της μοριακής βιολογίας.[59] Ο μπλε τομέας βασίζεται στη μεγάλη βιοποικιλότητα που υπάρχει στη θάλασσα και στους ωκεανούς, με αποτέλεσμα να εκμεταλλεύεται τους πόρους αυτών προς δημιουργία προϊόντων και εφαρμογών βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος.[60] Τέλος, η άσπρη βιοτεχνολογία εκπροσωπεί την βιοκατάλυση στη βιομηχανία, δηλαδή των χρήση κυττάρων ή συστατικών τους, για αυτό και συνώνυμό της είναι η βιομηχανική βιοτεχνολογία. Αποσκοπεί στη σύνθεση νέων και μη προϊόντων όπου είναι πιο συμβατά με τη φύση, βιοαποικοδομήσιμα, απαιτώντας λιγότερη ενέργεια παραγωγής και λιγότερα απόβλητα. Ένας από τους κυριότερους στόχους της είναι η παραγωγή βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών.[61]

Εάν και οι έννοιες βιοκατάλυση και βιοτεχνολογία συχνά συγχέονται, στην πραγματικότητα η σχέση μεταξύ αυτών είναι ότι η βιοκατάλυση είναι κύριος πυλώνας της εφαρμοσμένης βιοτεχνολογίας. Η βιοκατάλυση βασίζεται στην εφαρμογή ενζύμων ή μικροοργανισμών στη συνθετική χημεία, αξιοποιώντας τα σε νέες χρήσεις που μπορεί να μην πραγματοποιούνται στη φύση.[62] Όλες οι βιοκαταλυτικές διεργασίες γίνονται με γνώμονα συγκεκριμένα βήματα, παρουσιάζουν δε διαφορές με τις αντίστοιχες χημικές κυρίως λόγω των μοναδικών χαρακτηριστικών που φέρουν τα ένζυμα. Προκειμένου όμως να αναπτυχθεί μία εφαρμογή πρέπει να ακολουθηθεί ένας ορθολογικός σχεδιασμός, ο οποίος αποτυπώνεται μέσα από το βιοκαταλυτικό κύκλο. **(Εικόνα 3)** Αυτός ξεκινά με την επιλογή του κατάλληλου βιοκαταλύτη, το χαρακτηρισμό του βιολογικού συστήματος, έπειτα προχωρά στη μηχανική προκειμένου να βελτιστοποιηθούν οι ιδιότητές του. Ακολουθεί το στάδιο της εφαρμογής που εμπεριέχει την βελτιστοποίηση της διεργασίας και τέλος η ανάκτηση του προϊόντος.[63] Συνεπώς, όπως γίνεται κατανοητό, για να διεκπεραιωθεί μια βιοτεχνολογική εφαρμογή απαιτείται συνεργασία διαφορετικών κλάδων της επιστήμης.



Εικόνα 3. Αποτύπωση βιοκαταλυτικού κύκλου. Έχοντας επιλέξει την επιθυμητή βιομετατροπή, απαιτείται η κατάλληλη επιλογή του βιοκαταλύτη, ο χαρακτηρισμός του και η μηχανική του που αποσκοπεί στην βελτιστοποίηση των ιδιοτήτων του. Έπειτα ακολουθεί το στάδιο της εφαρμογής βελτιστοποιώντας τη διεργασία με τελευταίο βήμα να είναι αυτό της ανάκτησης του προϊόντος. [63]

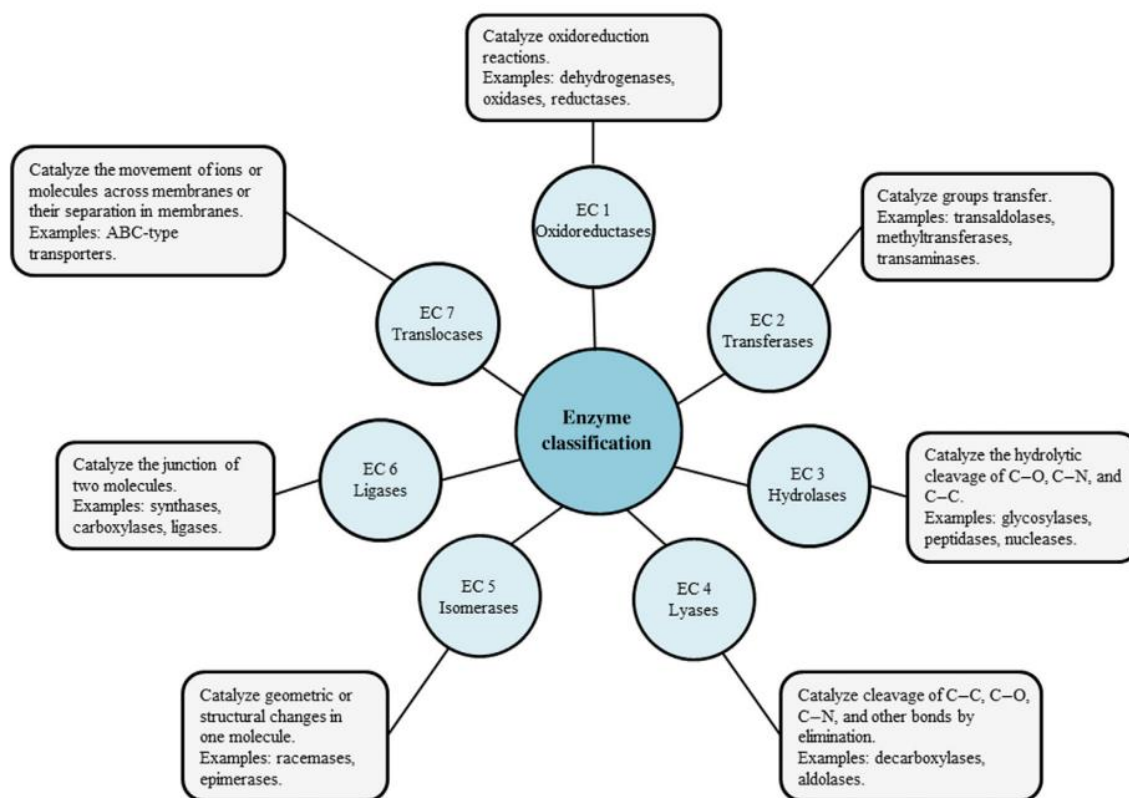
4. Ένζυμα

Οι βιοχημικές αντιδράσεις καταλαμβάνουν ένα μεγάλο ποσοστό των χημικών αντιδράσεων που συμβαίνουν, περικλείοντας το μεταβολισμό όλων των ζωντανών κυττάρων. Πρέπει να καταλύονται με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να εξασφαλίζεται ο απαιτούμενος ρυθμός για τη διατήρηση της ζωής. Για τη διεκπεραίωση αυτής της διαδικασίας υπεύθυνα είναι τα ένζυμα. Ο όρος «ένζυμο» (εν + ζύμη) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1878 από τον Wilhelm Kühne στην προσπάθειά του να περιγράψει

την ικανότητα μιας ζύμης να παράγει αλκοόλη από σάκχαρα.[64] Έκτοτε και έως σήμερα, ο όρος αυτός αναφέρεται σε πρωτεϊνικά ή νουκλεϊκά μόρια που επιταχύνουν την ταχύτητα της αντίδρασης μειώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης (E_a), χωρίς να επηρεάζουν την θέση ισορροπίας. Η έννοια αυτή είναι ταυτόσημη με αυτήν του καταλύτη, με την μόνη διαφορά ότι απευθύνεται σε βιολογικές διαδικασίες και επομένως χαρακτηρίζονται και ως βιοκαταλύτης.[65] Χαρακτηριστικά που φέρουν όλα τα ένζυμα είναι εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα που δέχονται, η υψηλή αποδοτικότητα, η βιοαποικοδόμησή τους. Απαιτούν ήπιες συνθήκες αντίδρασης, μη χρήση οργανικών διαλυτών και παρουσιάζουν εξαιρετική χημειο-, τοπο- και εναντιο-εκλεκτικότητα. Μερικές από αυτές τις ιδιότητες τους προσδίδονται από την τριτοταγή τους αναδίπλωση στο χώρο, για αυτό και είναι αρκετά σημαντική.

Η δέσμευση ενός υποστρώματος πραγματοποιείται συνήθως στην καταλυτική περιοχή του εκάστοτε ενζύμου, η οποία ονομάζεται ενεργό κέντρο. Ωστόσο, με την πρόσδεση αυτή δεν συνεπάγεται και δραστικότητα ορισμένων ενζύμων καθώς πολλά από αυτά, προκειμένου να είναι πλήρως λειτουργικά, απαιτούν τη δέσμευση ενός μικρού μορίου, που ονομάζεται συμπαράγοντας. Αυτός είναι μη πρωτεϊνικής φύσεως, οργανικό ή ανόργανο μόριο. Στην πρώτη περίπτωση, ο συμπαράγοντας ονομάζεται συνένζυμο ενώ στη δεύτερη περίπτωση συνήθως μόνο περιέχονται μεταλλικά ιόντα. Τονίζεται πως ένας συμπαράγοντας είναι ασθενώς συνδεδεμένος με το ένζυμο, προκειμένου να μπορεί να απελευθερωθεί, ή ισχυρά συνδεδεμένος.[66]

Η ταξινόμηση τους γίνεται βάσει ενός κωδικού (EC number) που προτάθηκε από την Επιτροπή Ενζύμων (Enzyme Commission) το 1992. Ο κωδικός αυτός απαρτίζεται από 4 αριθμούς, όπου ο καθένας υποδηλώνει και ένα χαρακτηριστικό. Ο πρώτος αντιστοιχεί στην οικογένεια του ενζύμου, ο δεύτερος στην υποοικογένεια, ο τρίτος υποδεικνύει την υποκατηγορία και ο τέταρτος αντιστοιχεί στον σειριακό αριθμό του εκάστοτε ενζύμου στην υποκατηγορία του. Κατά κύριο λόγο, κατηγοριοποιούνται βάσει της αντίδρασης που καταλύουν σε έξι διαφορετικές κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία αντιστοιχεί στην οικογένεια των οξειδοαναγωγασών που καταλύουν αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, η δεύτερη στην οικογένεια των μεταφορασών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την μεταφορά λειτουργικών χημικών ομάδων, ενώ η τρίτη κατηγορία αντιστοιχεί στις υδρολάσες που διασπούν χημικούς δεσμούς με την χρήση νερού. Την τέταρτη κατηγορία απαρτίζουν οι λυάσες που καταλύουν αντιδράσεις απόσπασης ομάδων χωρίς παρουσία νερού, την πέμπτη οι ισομεράσες όπου συμμετέχουν σε αντιδράσεις ενδομοριακής αναδιάταξης και τέλος στην έκτη κατηγορία ανήκουν οι λιγάσες-συνθετάσες που είναι υπεύθυνες για την σύνδεση δυο μορίων.[67] Αξίζει να σημειωθεί πως πριν λίγα χρόνια, εισήχθη μια έβδομη κατηγορία ενζύμων αυτή των τρανσλοκασών που βοηθούν στη μεταφορά μορίων ή ιόντων μέσω των μεμβρανών.[68]



Εικόνα 4. Απεικόνιση των 7 κατηγοριών των ενζύμων σε πλήρη αντιστοιχία με τις αντιδράσεις που καταλύουν. [69]

Ο καταλυτικός μηχανισμός με τον οποίο δρουν τα ένζυμα, συνήθως εξαρτάται από το ένζυμο που δρα κάθε φορά. Για τον λόγο αυτό, έχουν προταθεί κάποια ενζυμικά μοντέλα προσπαθώντας να περιγράψουν σε μια γενική εικόνα τον τρόπο με τον οποίον δρουν. Το πρώτο μοντέλο προτάθηκε από τον Emil Fischer και υποστηρίζει ότι τα ένζυμα αναγνωρίζουν το υπόστρωμά τους όπως το μοτίβο κλειδί-κλειδαριάς, δηλαδή το μόριο του υποστρώματος να ταιριάζει τέλεια στη δομή του ενεργού κέντρου του ενζύμου. [70] Ωστόσο, με την ανακάλυψη της λυσοζύμης, το μοντέλο αυτό αδυνατούσε να περιγράψει την ευελιξία μιας πρωτεΐνης, καθώς ένζυμο και υπόστρωμα θεωρούνται άκαμπτα. Έτσι, αναπτύχθηκε το μοντέλο της επαγόμενης προσαρμογής, που θεωρεί το ενεργό κέντρο του ενζύμου πιο εύπλαστο, παρομοιάζοντάς τη σχέση ενζύμου-υποστρώματος με αυτή χεριού-γαντιού, περιγράφοντας καλύτερα τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ εύκαμπτης πρωτεΐνης-άκαμπτου υποστρώματος μέσω μιας ισορροπίας μεταξύ των διαμορφώσεων κατά την σύνδεση μεταξύ τους. [71]

Εναλλακτικό του τελευταίου μοντέλου είναι αυτό της επιλεκτικής προσαρμογής (selected-fit model) που περιγράφει μια διαφορετική προέλευση των διαμορφώσεων της πρωτεΐνης κατά την σύνδεση με τον υποκαταστάτη της. Πιο συγκεκριμένα, το μοντέλο αυτό υποστηρίζει πως πριν την σύνδεση με τον υποκαταστάτη προηγείται η αλλαγή της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης. [72] Τέλος, έχει προταθεί ακόμη ένα μοντέλο που αποτελεί επέκταση των παραπάνω. Αυτό παρομοιάζεται με την σχέση κλειδαρότρυπα (μονοπάτι που ακολουθεί)-κλειδαριάς (ενεργό κέντρο του ενζύμου)-

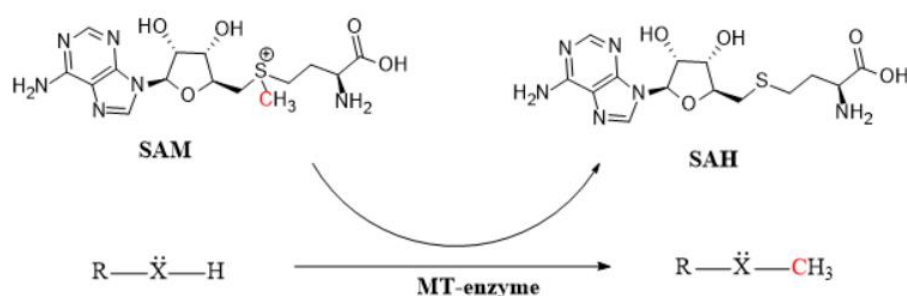
κλειδιού (υπόστρωμα) (keyhole-lock-key model), προσπαθώντας να περιγράψει τον τρόπο κατάλυσης των ενζύμων που τα ενεργά του κέντρα βρίσκονται θαμμένα και όχι επιφανειακά, δίνοντας έμφαση στην εισαγωγή του υποστρώματος, στην απελευθέρωση του προϊόντος, στην ειδικότητα και στην στερεοεκλεκτικότητα.[72]

Λόγω των παραπάνω χαρακτηριστικών τους, τα ένζυμα αποτελούν μεγάλο ελκυστικό τομέα της βιομηχανίας αλλά και της έρευνας, καθώς μέσω αυτών μπορούν να ακολουθηθούν διεργασίες φιλικές προς το περιβάλλον αποφεύγοντας τα κλασσικά μονοπάτια που προσφέρει η οργανική σύνθεση, τα οποία απαιτούν πολυπλοκότερες διαδικασίες. Έτσι, τόσο ο τομέας της βιοτεχνολογίας όσο και της βιοκατάλυσης αξιοποιούν τη δύναμη των ενζύμων προκειμένου να πραγματοποιηθούν βιομετατροπές ενώσεων ως προς κάτι καλύτερο και αξιοποιήσιμο. Πράγματι, τα ένζυμα διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στην βιομηχανία. Χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, υφασμάτων, για την παραγωγή απορρυπαντικών, χαρτιού και άλλα.[73] Ιδιαίτερη έμφαση γίνεται όμως στη βιομηχανία των φαρμάκων καθώς τα ένζυμα μπορούν να αξιοποιούν είτε ως μέσα παραγωγής βιοδραστικών μορίων είτε απευθείας ως θεραπευτικοί παράγοντες.[74]

Ωστόσο, παρουσιάζονται κάποια μειονεκτήματα, τα οποία αφορούν τα ένζυμα. Η ευρεία χρήση των ενζύμων περιορίζεται κυρίως εξαιτίας της σταθερότητάς τους. Αυτή είναι άμεσα συνδεδεμένη με το pH, την θερμοκρασία, τους διαλύτες και την ιονική ισχύ των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται. Επιπλέον, υπάρχει ένας μικρός αριθμός καλά χαρακτηριζόμενων ενζύμων σε σύγκριση με τους χημικούς καταλύτες. Εξελίξεις στη βιοπληροφορική, στη πρωτεϊνική μηχανική, στη συνθετική και δομική βιολογία αλλά και στην ακινητοποίηση των ενζύμων δίνουν λύσεις στα προαναφερθέντα προβλήματα, δίνοντας βήματα προώθησης της βιοτεχνολογίας και της βιοκατάλυσης.

5. Μέθυλοτρανσφεράσες

Οι μεθυλοτρανσφεράσες (MTs) είναι ένζυμα που καταλύουν τη μεταφορά μίας μέθυλο- ομάδας ($-CH_3$) από ένα άτομο δότη σε ένα άτομο δέκτη. Βάσει του ονόματός τους, ανήκουν στη δεύτερη γενική κατηγορία των ενζύμων, αυτή των μεταφορασών και σύμφωνα με την Διεθνή Επιτροπή Ενζύμων (Enzyme Commission) ο κωδικός τους (enzyme ecode) είναι EC 2.1.1.X. Έως σήμερα είναι καταγεγραμμένα 374 διαφορετικά ένζυμα μεθυλοτρανσφερασών. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, προκειμένου να καταλύσουν μια αντίδραση απαιτούν ένα άτομο δότη της μεταφερόμενης μεθυλο-ομάδας, το οποίο λειτουργεί ως συμπαράγοντας και είναι κατά κύριο λόγο η S-αδενόσυλ-L-μεθειονίνη (SAM ή AdoMet). Μάλιστα, ο συμπαράγοντας αυτός είναι ο δεύτερος πιο συχνός μετά από αυτόν της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) που χρησιμοποιούνται από τη φύση.[75] Χαρακτηριστικό των μεθυλοτρανσφερασών είναι ότι δέχονται μία πληθώρα υποστρωμάτων ως άτομα δέκτες, τα οποία μπορεί να είναι από μικρά μόρια έως και μεγάλα, όπως για παράδειγμα πρωτεΐνες, DNA και RNA.[76] Μετά το πέρας της καταλυόμενης αντίδρασης μεθυλίωσης, παράγεται το μεθυλιωμένο προϊόν αλλά και η S-αδενόσυλ-ομοκυστεΐνη (SAH) ως παραπροϊόν. (Σχήμα 10)



Σχήμα 10. Γενικό σχήμα αντίδρασης των μεθυλοτρανσφερασών με τις χημικές δομές του δότη μεθυλομάδας S-αδενόσυλ-μεθειονίνης (SAM) και του παραπροϊόντος S-αδενόσυλ-ομοκυστεΐνης (SAH).

Στη φύση, τα ένζυμα αυτά απαντώνται τόσο σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς αλλά και στα φυτά επιτελώντας ποικίλους και σημαντικούς βιολογικούς ρόλους. Ιδιαίτερα, στα θηλαστικά η δράση τους είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη διατήρηση της ζωής, καθώς ο επιγενετικός μηχανισμός της μεθυλίωσης του DNA που συμμετέχουν ενεργοποιεί και απενεργοποιεί τη γονιδιακή έκφραση αλλά και είναι υπεύθυνος για την επιδιόρθωση μεταλλάξεων.[77]

Στα τέλη του 19^{ου} αιώνα, ο φοιτητής ιατρικής Wilhelm His περιέγραψε για πρώτη φορά την αντίδραση της μεθυλίωσης του αζώτου της πυριδίνης που χορηγήθηκε εξωγενώς σε σκύλους.[78] Ακολούθησε διάστημα όπου δεν μελετήθηκαν εκτενώς, έως ότου το 1950 χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά ο συμπαράγοντας SAM από τον Cantoni και τους συνεργάτες του [79] και έπειτα από τέσσερις δεκαετίες λύθηκε η πρώτη δομή μιας SAM-εξαρτώμενης μέθυλοτρανσφεράσης και πιο συγκεκριμένα της HhaI DNA-MT.[80] Από τότε μέχρι και σήμερα μελετώνται ολοένα και περισσότερο, ιδίως τα τελευταία χρόνια, καθώς αποδεικνύονται πολύτιμα εργαλεία της βιοτεχνολογίας και της συνθετικής βιολογίας με εφαρμογές στην παραγωγή φαρμάκων, ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας, βιοκαυσίμων και αγροτοχημικών. [81, 82]

5.1 Κατηγοριοποίηση μεθυλοτρανσφερασών

Μια πρώτη κατηγοριοποίηση των ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις μεθυλίωσης σχετίζεται με το άτομο που μπορεί να δεχθεί την προστιθέμενη μεθυλομάδα από το μόριο-δότη. Το άτομο αυτό μπορεί να είναι ο άνθρακας, το οξυγόνο, το άζωτο, το θείο, το σελήνιο, το αρσενικό αλλά και ιόντα αλογόνων. Επομένως, γίνεται λόγος για C-MTs, O-MTs, N-MTs, S-MTs, Se-MTs, Ac-MTs και ιόντος αλογόνου-MTs, αντιστοίχως, με την πιο άφθονη κατηγορία να είναι αυτή του οξυγόνου.[83]

Επιπλέον, οι μεθυλοτρανσφεράσες είναι ένζυμα που δέχονται μια πληθώρα υποστρωμάτων που κυμαίνονται από μικρά μόρια, όπως για παράδειγμα η κατεχόλη, το καφεϊκό οξύ και τα φλαβονοειδή, λιπίδια μέχρι μεγάλα υποστρώματα όπως οι πρωτεΐνες, το RNA και το DNA.[84] Για το λόγο αυτό, μπορεί να γίνει η κατάταξη

τους σε ομάδες που περικλείουν το ευρύτερο είδος του υποστρώματος μπορούν να δεχθούν. Έτσι μπορούν τα ταξινομηθούν σε DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DMTs), RNA μεθυλοτρανσφεράσες (RMTs), πρωτεϊνικές μεθυλοτρανσφεράσες (PMTs). Τονίζεται πως η εκάστοτε κατηγορία μεθυλοτρανσφερασών βάσει του υποστρώματος της, μπορεί να διαιρεθεί σε υποκατηγορίες πιο εξειδικευμένες.

Προκειμένου όμως να γίνεται ακριβής αναφορά αυτών των ενζύμων, επικρατεί ο συνδυασμός των παραπάνω δύο ειδών ταξινόμησης. Έτσι η συντομογραφία του εκάστοτε ενζύμου, δίνει πληροφορίες τόσο για το είδος του ατόμου που μεθυλιώνεται όσο και για το είδος του υποστρώματος που δέχεται. Για παράδειγμα, η συντομογραφία “COMTs” απευθύνεται σε μεθυλοτρανσφεράσες που καταλύουν αντιδράσεις σε υποστρώματα αναλόγων κατεχόλης μεθυλιώνοντας άτομα οξυγόνου.

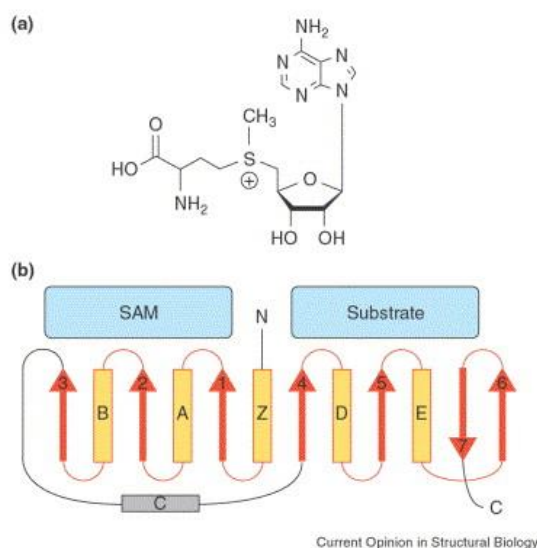
Τέλος, επιπλέον κατηγοριοποίηση τους υφίστανται βάσει της δομής που υιοθετούν, η οποία αναλύεται λεπτομερώς στην *Ενότητα 5.2 Δομή μεθυλοτρανσφερασών*.

5.2 Δομή μεθυλοτρανσφερασών

Οι μεθυλοτρανσφεράσες αποτελούν ένα εξάισιο παράδειγμα της συγκλίνουσας εξέλιξης, καθώς είναι ένζυμα που στη συνολική τους δομή διαφέρουν αρκετά, ωστόσο εντοπίζονται κάποια κοινά χαρακτηριστικά σε όλη αυτήν την οικογένεια ενζύμων όσον αφορά κυρίως το ενεργό τους κέντρο.[85] Όπως αναφέρεται στην *Ενότητα 5.1 Κατηγοριοποίηση μεθυλοτρανσφερασών*, οι SAM-εξαρτώμενες μεθυλοτρανσφεράσες κατηγοριοποιούνται βάσει της δομής τους σε πέντε κατηγορίες (Classes I-V).[86]

Με την λύση των πρώτων δομών, οι μελέτες έδειχναν ότι τα ένζυμα αυτής της κατηγορίας ακολουθούν ένα συγκεκριμένο δομικό πρότυπο, που απαρτίζεται από εναλλασσόμενους β-κλώνους και α-έλικες, σχηματίζοντας έτσι μία επτάκλωνη β-πτυχωτή επιφάνεια έχοντας ένα κεντρικό σημείο εναλλαγής (switch-point) με τρεις α-έλικες σε κάθε πλευρά. Πιο συγκεκριμένα, οι β-κλώνοι 1 έως 6 είναι παράλληλοι μεταξύ τους, ενώ ο έβδομος β-κλώνος είναι αντιπαράλληλος και τοποθετείται ανάμεσα στους β-κλώνους 5 και 6 ($6 \uparrow 7 \downarrow 5 \uparrow 4 \uparrow 1 \uparrow 2 \uparrow 3 \uparrow$), δημιουργώντας το λεγόμενο σημείο φουρκέτα (β-hairpin point) στο καρβοξυλικό άκρο της β-επιφάνειας (**Εικόνα 5**). Το σημείο πρόσδεσης του συμπαραγόντα SAM (SAM binding site) στο ενεργό κέντρο αυτών των ενζύμων τοποθετείται κοντά στο σημείο εναλλαγής, όπου υπάρχει αλληλουχία τριών αμινοξικών καταλοίπων γλυκίνης (GXGXG) που εντοπίζονται στο τέλος του πρώτου β-κλώνου και μια περιοχή με ένα όξινο κατάλοιπο στο τέλος του δεύτερου β-κλώνου. Το μοτίβο της αλληλουχίας γλυκινών βοηθά στο να κάμψει η έλικα που βρίσκεται μπροστά από του κλώνους για να μπορέσει να εισέλθει ο συμπαραγόντας ο οποίος με τη σειρά του σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου μέσω των υδροξυλίων της ριβόξης του με το όξινο κατάλοιπο του δεύτερου κλώνου και έτσι αλληλεπιδρά με το ενεργό κέντρο. Το σημείο πρόσδεσης του υποστρώματος βρίσκεται στο C-τελικό άκρο του β-φύλλου χωρίς όμως να παρουσιάζει κάποια ιδιαίτερα τοπολογικά χαρακτηριστικά, καθώς εξαρτάται από το είδος του υποστρώματος που μπορεί να δεχθεί.[87] Η παραπάνω δομική περιγραφή χαρακτηρίζει την πρώτη

κατηγορία (Class I) των SAM-εξαρτώμενων μεθυλοτρανσφερασών, που γενικά λόγω του ότι αποτελείται από ένα β-φύλλο που περιβάλλεται από 3 α-έλικες σε κάθε του πλευρά, σχηματίζει μία δομή α/β/α σάντουιτς (doubly wound open α/β/α sandwich structure).[86] Εξαιτίας της δομικής ομοιότητας που φέρουν με τις δομές Rossmann που δεσμεύουν NAD(P), πλην του έβδομου β-κλώνου,[88] η πρώτη κατηγορία των μεθυλοτρανσφερασών αναφέρεται και ως Rossmann α/β (Rossmann-like alpha/beta).



Εικόνα 5. Δομές S-αδενυλικής μεθειονίνης (SAM) και Rossmann-like alpha/beta μεθυλοτρανσφερασών. α) Χημική δομή του δότη μεθυλομάδας SAM. β) Σχηματική απεικόνιση της τοπολογίας του πυρήνα της δομής τύπου Rossmann των μεθυλοτρανσφερασών με αναφορά στις περιοχές δέσμευσης του SAM και του υποστρώματος. Με κόκκινο βέλος απεικονίζονται τα β-φύλλα, με κίτρινους κυλίνδρους οι α-έλικες, ενώ επισημαίνονται και το N- και C-τελικό άκρο. Το γκρι πλαίσιο με το γράμμα C, δεν υφίσταται πάντοτε στη δομή αυτή. [87]

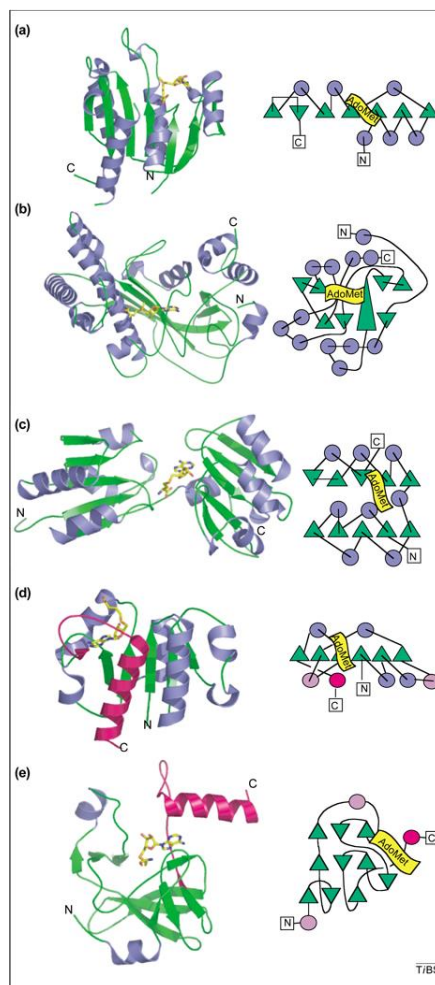
Αυτή η κατηγορία είναι η μεγαλύτερη των μεθυλοτρανσφερασών και περιλαμβάνει ένζυμα που καταλύουν πληθώρα αντιδράσεων μεθυλίωσης, μεταξύ των οποίων όλες τις DNA-MTs [89], μερικές RNA-MTs [90], κάποιες πρωτεϊνικές MTs [91] και κάποιες μικρότερες MTs όπως αυτής κατεχόλης [81]. Ωστόσο, αυτό δεν συνεπάγεται ότι διατηρούν πολλαπλά κοινά χαρακτηριστικά, αλλά υπάρχει μια ποικιλομορφία [87]. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα ένζυμα της κατηγορίας I απαντώνται συνήθως ως μονομερή, ωστόσο υπάρχουν αναφορές για ομοδιμερή [92] ακόμη και για τετραμερή [93].

Η δεύτερη κατηγορία (Class II) είναι γνωστή ως TIM β/α-βαρέλι α/β (TIM beta/alpha-barrel alpha/beta) η οποία δημιουργήθηκε λόγω του ένζυμου της συνθετάσης μεθειονίνης που εξαρτάται από την καβαλαμίνη (Βιταμίνη B12). Το ένζυμο αυτό απαιτεί μία περιοχή επανεργοποίησης της κοβαλμίνης, η οποία οξειδώνεται, μέσω αναγωγικής μεθυλίωσης με χρήση του συμπαραγόντα SAM. Η περιοχή αυτή αποτελείται από ένα μακρύ, αντιπαράλληλο β-φύλλο που πλαισιώνεται από αρκετές ομάδες α-ελίκων (**Εικόνα 6b**) και αποτελεί δομικό χαρακτηριστικό της δεύτερης κατηγορίας. Η δέσμευση του συμπαραγόντα SAM λαμβάνει χώρα σε μια ρηχή αύλακα κατά μήκος των άκρων των κλώνων, σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με ένα συντηρημένο μοτίβο RxxxGY. [94]

Η τρίτη κατηγορία (Class III) είναι γνωστή ως τετραπυρρόλη μεθυλάση α/β (tetrapyrrole methylase alpha/beta). Το ενεργό κέντρο βρίσκεται ανάμεσα στους δυο τομείς α/β/α που σχηματίζονται στο N- και C- τελικό άκρο, όπου ο κάθε ένας απαρτίζεται από πέντε β-κλώνους και τέσσερις α-έλικες, διαμορφώνοντας έτσι μια μεγάλη θέση δέσμευσης για το υπόστρωμα μεταξύ των δύο άκρων (**Εικόνα 6c**). Εάν και στο C-τερματικό άκρο του πρώτου β-κλώνου εμφανίζεται αλληλουχία γλυκινών παρόμοια με αυτή της πρώτης κατηγορίας, ο συμπαράγοντα SAM δεσμεύεται μεταξύ των δύο τομέων. Αντιπροσωπευτικό ένζυμο της κατηγορίας αυτής είναι cobalt-precorrin-4 μεθυλτρανσφεράση (CbiF). [95]

Η τέταρτη κατηγορία (Class IV) είναι γνωστή οικογένεια SPOUT α/β. Όλα τα ένζυμα αυτής της κατηγορίας εμφανίζουν κοινά χαρακτηριστικά τα οποία είναι ότι διαθέτουν με δομή παρόμοια με αυτή της κατηγορίας I (Rossmann διαμόρφωση) κατά το ήμισυ όμως έχοντας 6 β-κλώνους και 7 α-έλικες με το C-τερματικό άκρο να εισχωρεί μεταξύ της τελευταίας α-έλικας και του β-κλώνου, σχηματίζοντας ένα κόμπο (knot) (**Εικόνα 6d**). Επιπλέον, λόγω ότι τα ένζυμα αυτά απαντώνται σε ομοδιμερή, το ενεργό τους κέντρο βρίσκεται στην διεπιφάνεια συνεισφέροντας κατάλοιπα εξίσου και οι δύο υπομονάδες. [88, 96] Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν η πληθώρα των RNA-MTs. [97]

Η πέμπτη κατηγορία (Class V) περιέχει ένζυμα που έχουν την ονομαζόμενη υπομονάδα SET, η οποία αποτελείται από μια σειρά οκτώ β-κλώνων που δημιουργούν τρία μικρά β-φύλλα με το C-τελικό άκρο να βρίσκεται κάτω από το επιφανειακό βρόγχο σχηματίζοντας έτσι μια δομή κόμπου, διαφορετικής τοπολογίας με αυτού της προηγούμενης κατηγορίας. [98] Ο συμπαράγοντας SAM φαίνεται να αγκυροβολεί σε μια σχισμή που δημιουργείται κοντά στο C-τερματικό άκρο.[99] (**Εικόνα 6e**) Τέλος, σε αυτή την κατηγορία ανήκουν πολλές μεθυλοτρανσφεράσες που δρουν πάνω σε πρωτεΐνες και ιδίως στις ευκίνητες ουρές των ιστονών.[100]

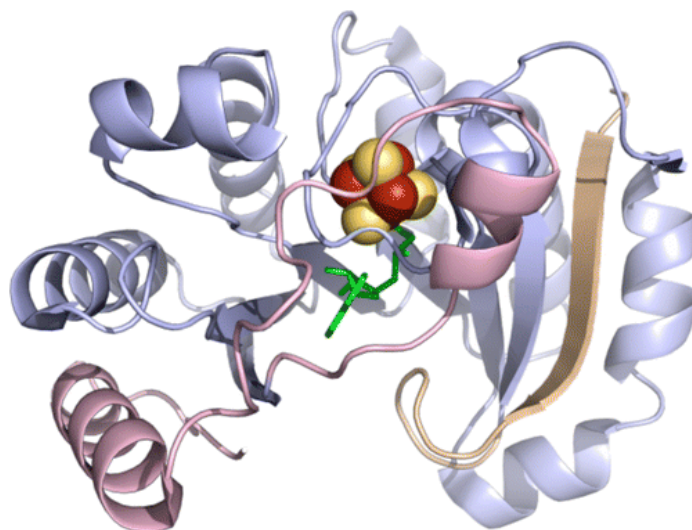


Εικόνα 6. Απεικόνιση των πέντε κατηγοριών των SAM-εξαρτώμενων μεθυλοτρανσφερασών βάσει της δομής τους. Σε κάθε περίπτωση, δίνεται η τεταρτοταγής δομή στα αριστερά και ένα τοπολογικό διάγραμμα του πυρήνα της εκάστοτε δομής στα δεξιά. α) Κατηγορία I: Rossmann-like alpha/beta δομή, β) Κατηγορία II: TIM beta/alpha-barrel alpha/beta δομή, γ) Κατηγορία III: tetrapyrrole methylase alpha/beta δομή, δ) Κατηγορία IV: SPOUT alpha/beta δομή, ε) Κατηγορία V: SET δομή.[86]

Ωστόσο το 2011, από τον T. Wlodarski και τους συνεργάτες του προτάθηκαν επιπλέον τέσσερις δομικές κατηγορίες των μεθυλοτρανσφερασών βάσει των μελετών που έκαναν σε μεθυλοτρανσφεράσες από τον μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Η μία κατηγορία είναι των διαμεμβρανικών που έχουν μία χαρακτηριστική δομών στο N-τελικό τους άκρο. Στην έβδομη κατηγορία ανήκουν ένζυμα που δρουν πάνω στο DNA ή στο RNA έχοντας τρεις έλικες (DNA/RNA-binding 3-helical bundle Class), ενώ η όγδοη κατηγορία αναφέρεται ως SSo0622-like alpha and beta και τέλος η ένατη κατηγορία την ονομάζουν θυμιδική συνθετάση α και β (thymidylate synthetase alpha and beta). [101]

Ξεχωριστή κατηγορία λόγω της δομής αλλά και της δράσης τους αποτελούν και οι ριζικές μεθυλοτρανσφεράσες (radical MTs). Η δομή τους φέρει με αυτήν της κατηγορίας II καθώς διαθέτουν ένα μερικό βαρέλι TIM (α/β)₆ που περιβάλλεται από ένα β-φύλλο το οποίο διαπερνά τις περιφερειακές α-έλικες σχηματίζοντας τον ενδιάμεσο χώρο του ενεργού κέντρου, ενώ παράλληλα καλύπτεται από το N- και C-

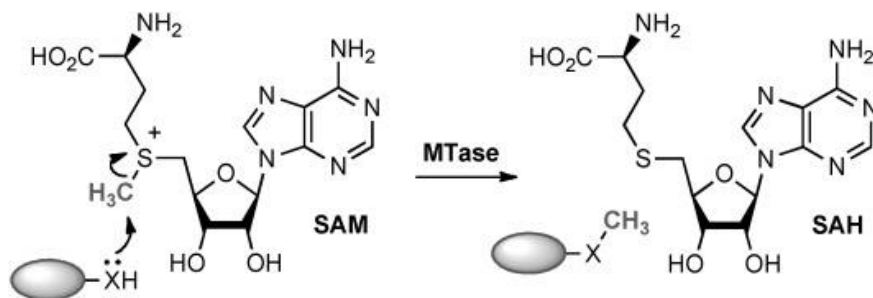
άκρο. Χαρακτηριστικό της δομής αυτής είναι ένα σύμπλοκο σιδήρου-θείου [4Fe-3S] που βρίσκεται πάνω στο TIM μαζί με το συμπράγοντα SAM. Τα τρία εκ των τεσσάρων ιόντα σιδήρου συναρμόζονται με μία αλληλουχία τριών κυστεϊνών που εντοπίζεται στο βρόγχο μετά του πρώτου κλώνου του βαρελιού. Το τέταρτο ιόν συναρμόζεται με το αμιδικό άζωτο και το καρβοξυλικό οξυγόνου ενός δεύτερου μορίου SAM.[102]



Εικόνα 7. Παράδειγμα δομής με TIM βαρέλι μιας ριζικής μεθυλοτρανσφεράσης. Με χρυσό χρώμα απεικονίζεται το N-τελικό άκρο, με ροζ το C-τελικό άκρο, ενώ το μπλε χρώμα αντιστοιχεί στην περιοχή της υπομονάδας του ενεργού κέντρου. Οι σφαίρες κόκκινο-κίτρινο αναπαριστούν το cluster [4Fe-4S] και οι πράσινοι ράβδοι στο μόριο του SAM. [103]

5.3 Μηχανισμός δράσης

Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, η αντίδραση που λαμβάνει χώρα μέσω των μεθυλοτρανσφερασών είναι μία αντίδραση μεθυλίωσης όπου συμμετέχουν αρχικά ένα υπόστρωμα- δέκτης και το μόριο δότης SAM με τελικό προϊόν το μεθυλιωμένο υπόστρωμα και παραπροϊόν την S-αδενοσυλ-ομοκυστεΐνη (SAH). Παρ' όλο το γεγονός ότι όλες οι μεθυλοτρανσφεράσες παρουσιάζουν διαφορετική δομή και αλληλουχία, φαίνεται να ακολουθούν τον ίδιο μηχανισμό, ο οποίος προχωρά με μία απευθείας μεταφορά της μέθυλο-ομάδας στο εκάστοτε υπόστρωμα, δηλαδή μία πυρηνόφιλη αντίδραση υποκατάστασης τύπου S_N2 . [104] Αυτός ο τύπος αντίδρασης, προκειμένου να επιτευχθεί, απαιτεί το σωστό προσανατολισμό και απόσταση μεταξύ του πυρηνόφιλου κέντρου του υποστρώματος, του φτωχού ηλεκτρονιακά μεθυλίου του SAM και της αποχωρούσας ομάδας του θειοεστέρα στην μεταβατική κατάσταση, όπου πρέπει να βρίσκονται σε γραμμική διάταξη. (Σχήμα 11) Σε αυτό βοηθά ο κατάλληλος επαναπροσανατολισμός των αμινοξικών καταλοίπων του ενεργού κέντρου ή οι εύκαμπτοι βρόγχοι του ενζύμου κατά τη σύνδεση.[105] Σημειωτέο είναι οι μεθυλοτρανσφεράσες καταλύουν πυρηνόφιλες προσβολές σε sp^3 υβριδισμένους άνθρακες.



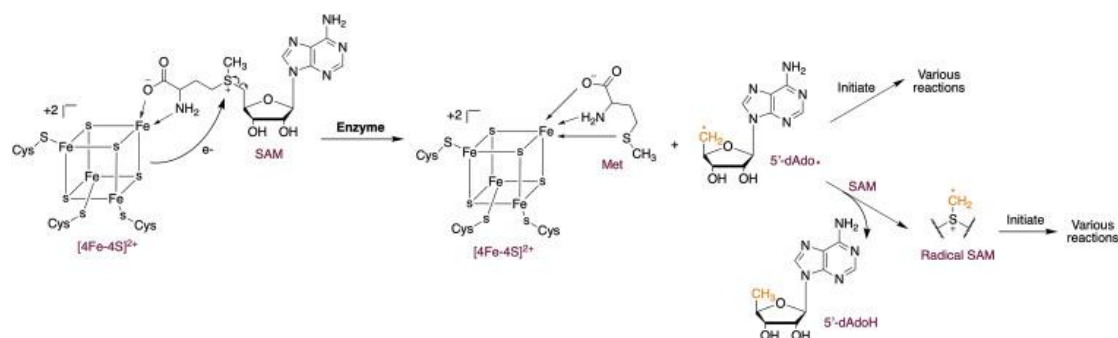
Σχήμα 11. Γενική S_N2 αντίδραση των μεθυλοτρανσφερασών με την χρήση S-αδενυλικής μεθειονίνης (SAM) και του υποστρώματος, όπου με X συμβολίζεται το πυρηνόφιλο άτομο (O, N, S, αλογόνα) που προσβάλλει την μεθυλοομάδα που πρόκειται να μεταφερθεί. Ως προϊόν της αντίδρασης λαμβάνεται το μεθυλιωμένο υπόστρωμα, ενώ παράγεται και η S-αδενοσυλ-ομοκυστεΐνη (SAH) ως παραπροϊόν. [82]

Οι μεθυλίωσεις που αφορούν τα πυρηνόφιλα άτομα του οξυγόνου (O), αζώτου (N) και θείου (S) γίνονται με απευθείας προσβολή του μεθυλίου του SAM με τον τρόπο που περιγράφηκε προηγουμένως, λόγω ότι διαθέτουν ελεύθερο ζεύγος ηλεκτρονίων. Εν αντιθέσει, το άτομο του άνθρακα (C) δεν διαθέτει και για αυτό δεν μπορεί να δράσει ως πυρηνόφιλο. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί μεθυλίωση στο άτομο του άνθρακα είναι απαραίτητο να δημιουργηθεί ένα καρβανιόν το οποίο θα λειτουργήσει ως πυρηνόφιλο. Για αυτόν τον λόγο, σε αυτές τις αντιδράσεις απαιτείται παραπάνω βήμα σχετιζόμενο με τη δημιουργία του καρβανιόντος. [106]

Μέχρι στιγμής, έχουν διαπιστωθεί τρεις διαφορετικοί μηχανισμοί πυρηνόφιλης υποκατάστασης τύπου S_N2 για τα ένζυμα αυτά.[107] Ο πρώτος τύπος μηχανισμού σχετίζεται με την εγγύτητα και την αφαίρεση του νερού (desolvation). Για την υλοποίηση της αντίδρασης δεν απαιτούνται αλληλεπιδράσεις των συστατικών του διαλύτη με το υπόστρωμα και το ένζυμο, καθώς ο μηχανισμός εξαρτάται από το περιβάλλον που διαμορφώνετε από το ενεργό κέντρο του κάθε ενζύμου. Ο μηχανισμός αυτός διαπιστώθηκε για πρώτη φορά κατά τη μελέτη της καρβοξυλο-μεθυλοτρανσφεράσης του σαλικυλικού οξέος.[108] Ο επόμενος τρόπος δράσης χρησιμοποιεί το μηχανισμό οξέος-βάσης, χρησιμοποιώντας κατάλοιπα αμινοξέων του ενεργού κέντρου τα οποία είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση ατόμων υδρογόνου του υποστρώματος. Τέλος, ο τρίτος τρόπος αφορά μεθυλοτρανσφεράσες που στο ενεργό τους κέντρο διαθέτουν ένα μεταλλικό ιόν. Αυτό χρησιμοποιείται ως βάση προκειμένου να αποσπάσει πρωτόνια από το υπόστρωμα μέσω συναρμογής με το υπόστρωμα ή αλλοίωσης της τιμής του pK_a της φαινολικής υδροξυλομάδας που έχει ως αποτέλεσμα την προαγωγή αποπρωτονίωσης.[107] Χαρακτηριστικό παράδειγμα του τρίτου μηχανισμού δράσης είναι το ένζυμο COMT που διαθέτει ένα ιόν Mg^{2+} στο ενεργό του κέντρο. Έχει βρεθεί πως αυτό συναρμόζεται με τις δύο υδροξυλομάδες της κατεχόλης, βοηθώντας έτσι στη δέσμευση του υποστρώματος, ενώ δεν εμφανίζεται κάποια αλληλεπίδραση μεταξύ αυτού και του SAM και δεν δρα ως βάση μιας και η αποπρωτονίωση του υποστρώματος λαμβάνει χώρα από ένα κατάλοιπο λυσίνης.[109]

Υπάρχουν επίσης και μεθυλοτρανσφεράσες που δρουν δημιουργώντας ρίζες και επομένως δεν χρησιμοποιούν μηχανισμό τύπου S_N2 . Σχηματίζουν ρίζες μορίων υψηλής

ενέργειας τα οποία είναι ικανά να μεθυλιώσουν μόρια μη δραστικά και χωρίς πυρυνόφιλο κέντρο. Πιο συγκεκριμένα, το σύμπλοκο σιδήρου-θείου που είναι συναρμοσμένο με το SAM μέσω του Fe διασπάται με αποτέλεσμα το σχηματισμό της 5-αδένυλικής ρίζας. Αυτή δρώντας ως οξειδωτικό ακολουθεί είτε ενεργοποιεί άμεσα το υπόστρωμα για την μεθυλίωση είτε αποσπά ένα πρωτόνιο από την μεθυλομάδα του δεύτερου μορίου SAM σχηματίζοντας εκ νέου μια νέα 5-αδένυλική ρίζα και 5-δεόξυαδενοσίνη. Στη συνέχεια η ρίζα επιδρά στο υπόστρωμα και πραγματοποιείται η αντίδραση.[110]



Σχήμα 12. Μηχανισμός δράσης των μεθυλοτρανσφερασών που δρουν μέσω δημιουργίας δραστικών ριζών. Πραγματοποιείται ομολυτική διάσπαση του δεσμού C-S του SAM, δημιουργώντας την αντίστοιχη ρίζα 5-Ado, η οποία είτε ξεκινά την επακόλουθη αντίδραση είτε αποσπά ένα υδρογόνο από ένα δεύτερο μόριο του SAM και έπειτα πραγματοποιείται αντίδραση. [107]

5.4 Βιολογικός ρόλος μεθυλοτρανσφερασών

Οι μεθυλοτρανσφεράσες δίνουν το παρόν σχεδόν σε όλους τους οργανισμούς επιτελώντας πολύ σημαντικούς ρόλους. Ο κύριος βιολογικός ρόλος τους έχει να κάνει με την αντιγραφή του γονιδιώματος. Προσθέτουν μέθυλο ομάδας στον άνθρακα 5 του πυριμιδικού δακτυλίου της κυτοσίνης σε περιοχές πλούσιες σε CpG νησίδες, με αποτέλεσμα τη δημιουργία της 5-μέθυλο-κυτοσίνης. Έτσι αυτές οι επιγενετικές αλλαγές επιφέρουν τη δημιουργία της ετεροχρωματίνης, δηλαδή τη συμπυκνωμένη μορφή της χρωματίνης, καταστέλλοντας τη γονιδιακή έκφραση.[111] Στη διαδικασία αυτή στα θηλαστικά, λαμβάνουν μέρος τρεις διαφορετικές DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMT), οι οποίες είναι οι DNMT1, DNMT3A και DNMT3B. Η DNMT1 εκφράζεται πιο συχνά και είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση του μοτίβου της DNA μεθυλίωσης κατά την αντιγραφή του DNA, ενώ οι άλλες δύο πραγματοποιούν de novo μεθυλιώσεις.[112] Αντίστοιχα, παρόμοια διαδικασία διαδραματίζεται και στη μεθυλίωση των ιστονών. Στη περίπτωση αυτή, υπάρχει τροποποίηση αμινοξικών καταλοίπων λυσίνης ή αργινίνης με τη συμβολή των μεθυλοτρανσφερασών των ιστονών (KMTs). Ωστόσο, αυτή η μεταμεταφραστική τροποποίηση των ιστονών κάποιες φορές είναι συνδεδεμένη είτε με την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων είτε με την απενεργοποίηση.[113]

Μία εξίσου σημαντική δράση των μεθυλοτρανσφερασών έχει να κάνει με την αποικοδόμηση των νευροδιαβιβαστών της κατεχολαμίνης αλλά και σχετιζόμενων φαρμάκων. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με την παρουσία της Ο-μεθυλοτρανσφεράσης της κατεχόλης (COMT), η οποία απαντάται σε δύο μορφές την

κοντή διαλυτή μορφή S-COMT και τη μακριά προσδεμένη σε μεμβράνη MB-COMT, εξαρτάται από μεταλλικό ιόν Mg^{2+} και μεθυλιώνει τις υδροξυλομάδες που είναι διαθέσιμες στα υποστρώματα. Για αυτό το λόγο, πολλά φάρμακα έχουν αναπτυχθεί με σκοπό την αναστολή αυτού του ενζύμου, όπως επί παραδείγματι η λεβοντόπα και η εντακαπόνη που χορηγούνται ως αναστολείς των ενζύμων αυτών στην ασθένεια του Parkinson.[114]

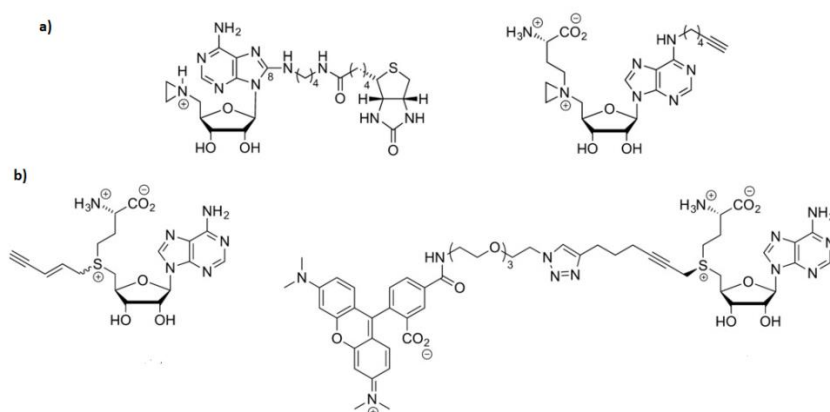
Πέραν από τις παραπάνω σημαντικές βιολογικές δράσεις που επιτελούν οι μεθυλοτρανσφεράσες, έχει βρεθεί πως κατέχουν εξίσου σημαντικό ρόλο στα φυτά. Συμμετέχουν στη βιοσύνθεση διαφόρων δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών και ιδιαίτερα των μεθυλιωμένων, συμβάλλοντας στις δομικές και λειτουργικές ποικιλίες των φυσικών ενώσεων. Σε πρόσφατη μελέτη, αναδείχθηκε πως ένζυμα από την οικογένεια των O-MTs των φυτών συμμετέχουν στη βιοσύνθεση φλαβονοειδών στα σταφύλια.[115]

5.5 SAM ως δότης μέθυλομάδας

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση της μεθυλίωσης από τις μεθυλοτρανσφεράσες, απαιτείται ένα μόριο-δότης της μεταφερόμενης μεθυλομάδας. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων το μόριο αυτό είναι η S-αδενοσυλ-L-μεθειονίνη (SAM ή AdoMet), που χαρακτηρίζεται και ως το μεθυλο-ιώδιο (CH_3I) της φύσης. Ωστόσο, το ρόλο αυτό μπορεί να το έχουν κι άλλα μόρια, με το πιο συνηθέστερα να είναι το φυλλικό οξύ (βιταμίνη B9) και κάποια ανάλογά του, το οποίο απαντάται αμέσως πιο συχνά μετά του SAM και η τριμέθυλογλικίνη.[116]

Το SAM πλεονεκτεί έναντι των λοιπών δοτών-μεθυλομάδας καθώς αυτή συνδέεται με το φορτισμένο άτομο του θείου (**Σχήμα 11**) και αποσταθεροποιεί θερμοδυναμικά το σύστημα. Για τον λόγο αυτό, τείνει να την απομακρύνει πιο εύκολα, κάνοντας έτσι πιο δραστική και εύκολη την μεθυλίωση.[117] Η βιοσύνθεσή του πραγματοποιείται μέσω της στερεοειδικής αντίδρασης μεταξύ της L-μεθειονίνης και της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) που καταλύεται από την αντίστοιχη συνθετάση.[79]

Αξίζει να σημειωθεί πως πολλές MTs δεν παρουσιάζουν ευαισθησία ως προς το μέγεθος του υποκαταστάτη του SAM, με αποτέλεσμα να γίνονται προσπάθειες να επιτευχθούν αλκυλιώσεις με ορισμένα ανάλογα του.[118] Ωστόσο, εξαιτίας του γεγονότος ότι λίγα φυσικά ανάλογα του SAM είναι γνωστά [79, 119], έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές για την δημιουργία συνθετικών αναλόγων που προκύπτουν είτε χημικά είτε ενζυμικά.[120, 121] Οι δύο επικρατέστερες είναι αυτή των αναλόγων των διπλά ενεργοποιημένων αναλόγων (**Εικόνα 8b**) και των αζιριδο-αδενοσινών αναλόγων (**Εικόνα 8a**). Οι στρατηγικές που ακολουθούνται για την σύνθεση αυτών είναι συνδυασμός χημικής και ενζυμικής σύνθεσης για την πρώτη περίπτωση και χημική σύνθεση για την δεύτερη. [122]



Εικόνα 8. Ανάλογα μόρια του SAM. α) Παραδείγματα δομών αναλόγων SAM που βασίζονται σε αζιριδο-αδενοσινική β) Παραδείγματα δομών αναλόγων SAM διπλά ενεργοποιημένων.[122]

5.6 Φαινόμενο μεθυλίου και εφαρμογές μεθυλοτρανσφερασών

Η βιοκατάλυση αποτελεί μία εναλλακτική προσέγγιση παραγωγής μορίων υψηλής προστιθέμενης αξίας μέσω βιολογικών μορίων, ήτοι ένζυμα, κύτταρα ή μέρος αυτών. Τα ένζυμα κατέχουν κεντρικό ρόλο στον τομέα αυτόν, καθώς λαμβάνουν μέρος σε εκατοντάδες αντιδράσεις. Αρωγός στην εξέλιξη και τη χρήση της βιοκατάλυσης αποτελεί οι ολοένα αναπτυσσόμενες τεχνολογίες που προσφέρονται, όπως αυτή του ανασυνδυασμένου DNA. Επί του παρόντος, υπάρχουν εκατοντάδες διαφορετικές βιοκαταλυτικές διεργασίες που έχουν εφαρμοστεί σε διάφορες βιομηχανίες φαρμάκων, χημικών, τροφίμων και γεωργίας. Μία κατηγορία ενζύμων που είναι πολλά υποσχόμενη ως βιοτεχνολογικά εργαλεία είναι αυτή των μεθυλοτρανσφερασών, όπου τα τελευταία χρόνια όλο ένα και περισσότερο κερδίζει έδαφος και τραβά την προσοχή τόσο της έρευνας, όσο και της βιομηχανίας.

Οι μεθυλοτρανσφεράσες παρουσιάζουν ένα φαινόμενο, αποκαλούμενο ως «methyl magic effect», το οποίο οφείλεται στη μεταφερόμενη ομάδα μεθυλίου. Πιο συγκεκριμένα, χαρακτηρίζεται ως «μαγικό» καθώς η προστιθέμενη μέθυλο-ομάδα προσφέρει νέες βελτιωμένες ιδιότητες στο προϊόν, σχετικά με τη βιοδραστικότητά του, τη γεύση, την οσμή του, καθώς επίσης έχει αντίκτυπο και στις φυσικοχημικές του ιδιότητες.[123] Οι νέες διαφορετικές βελτιωμένες ιδιότητες οφείλονται στο στερεοηλεκτρονικό¹ φαινόμενο που προσφέρει μια μέθυλο-ομάδα.[124] Εξαιτίας, λοιπόν, του φαινομένου «methyl magic effect», η μεθυλίωση είναι μια αρκετά συχνή στρατηγική για την ανακάλυψη φαρμάκων [125], καθώς φαίνεται πως επιδρά σημαντικά και στην εκλεκτικότητα της ένωσης ενάντια του στόχου [126], πέρα από τις νέες ιδιότητες που προσφέρει. Αυτό πιστεύεται ότι οφείλεται στο γεγονός ότι μεθυλο-ομάδα στο μόριο τους περιέχουν έξι από τα είκοσι φυσικά αμινοξέα, κάνοντας έτσι πιο εύκολη την πρόσδεση μιας μεθυλιωμένης ένωσης σε ένα πρωτεϊνικής φύσεως

¹ Το φαινόμενο που καθορίζει τις ιδιότητες ή τη δραστηριότητα ενός μορίου βάσει της κατεύθυνσης των τροχιακών των ατόμων που λαμβάνουν μέρος στον εκάστοτε δεσμό.

μόριο.[125] Επιπλέον, οι δυνάμεις London που αναπτύσσονται λόγω αυτής, εάν και ασθενείς, διαμορφώνουν τις υπόλοιπες αλληλεπιδράσεις σύνδεσης μεταξύ υποκαταστάση και στόχου.[83] Ακόμη ένα πλεονέκτημα της μεθυλίωσης προς την ανακάλυψη φαρμάκων, είναι η αύξηση της λιποφιλικότητας, που συνεπάγεται με την αυξημένη διαλυτότητα της μεθυλιωμένης ένωσης στις μεμβράνες των κυττάρων, την βιοδιαθεσιμότητά της και την επιρροή του LogP, έναν από τους κανόνες του Lipinsk.

Η χημική μεθυλίωση, ωστόσο, κάνει χρήση μεθυλοιωδίου (CH_3I), απαιτώντας σχετικά σκληρές συνθήκες αντίδρασης [127] και έχοντας επιπτώσεις στο περιβάλλον [128], αλλά και στον άνθρωπο.[129] Επιπλέον, είναι ελλιπής ως προς την στέρεο-, τόπο- και χήμιο- εκλεκτικότητα. Τα παραπάνω, ξεπερνιούνται με την ενζυμική μεθυλίωση και τη χρήση μεθυλοτρανσφερασών προσφέροντας μια πράσινη, φιλική προς το περιβάλλον διεργασία, η οποία είναι ελκυστική αρκετά για την βιομηχανία. Τέλος, άλλος ένας λόγος μελέτης και αξιοποίησης αυτών των ενζύμων είναι η βιολογική τους δράση η οποία κάποιες φορές σχετίζεται με διάφορες ασθένειες, όπως για παράδειγμα με τον καρκίνο.[130]

Όμως, η αξιοποίηση των μεθυλοτρανσφερασών φέρει κάποιες προκλήσεις που περιορίζουν την μέχρι στιγμής χρήση τους. Όπως έχει αναφερθεί, απαιτούν τη χρήση SAM προκειμένου να είναι καταλυτικά ενεργές. Ο συμπαράγοντας αυτός δεν αναγεννάται κατά τον καταλυτικό μηχανισμό, πράγμα που απαιτεί τη σύνθεσή ή την αγορά του που είναι αρκετά δαπανηρό. Επιπλέον δεν παρουσιάζει καλή σταθερότητα, ακόμη και σε ήπιες συνθήκες. Σημαντικό επίσης είναι ότι απαιτείται σε ισομοριακές ποσότητες με το υπόστρωμα, δημιουργώντας το παραπροϊόν SAH που αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα των μεθυλοτρανσφερασών.[131] Μελέτες έχουν καταφέρει να ξεπεράσουν τα δύο αυτά προβλήματα, έχοντας αναπτύξει μεθοδολογίες *in situ* σύνθεσης SAM [132, 133] και μεθοδολογίες απομάκρυνσης του ανασταλτικού παράγοντα είτε με την χρήση άλλων ενζύμων.[134, 135]

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα χρήσης μεθυλοτρανσφερασών και του φαινομένου που προσφέρουν είναι η βιοσύνθεση της βανιλίνης, ενός ενισχυτικού γεύσης που χρησιμοποιείται ευρύτατα από την βιομηχανία τροφίμων. Η βανιλίνη ή αλλιώς 4-υδροξυ-3-μεθοξυβενζαλδεΐδη είναι κύριο συστατικό των ενισχυτικών γεύσης βανίλιας που είναι εμπορικώς διαθέσιμα. Το πρόδρομο μόριο της, η διυδροξυβενζαλδεΐδη είναι μία άοσμη ένωση που δεν παρουσιάζει τις ιδιότητες του μεθυλιωμένου παραγώγου της.[136] Έχει πραγματοποιηθεί η βιοσύνθεση της βανιλίνης από γλυκόζη. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ένα τροποποιημένο στέλεχος *E.coli* KL7 όπου παρήγαγε βανιλοκό οξύ, χρησιμοποιώντας στο τελικό βήμα μία O-MT κατεχόλης.[137]

Περαιτέρω, οι μεθυλοτρανσφεράσες αποδεικνύονται χρήσιμα εργαλεία για την παραγωγή μεθυλιωμένων αναλόγων φλαβονοειδών. Τα φλαβονοειδή ως φυσικοί δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών παρουσιάζουν βιολογικές δράσεις από μόνα τους.[138] Έχει επισημανθεί πως η μεθυλίωση των ελεύθερων υδροξυλομάδων των φλαβονοειδών επιφέρει δραματική αύξηση της μεταβολικής τους σταθερότητας, της βιοδιαθεσιμότητάς τους και της βιοδραστικότητάς τους.[123] Για τον λόγο αυτό, έχει

6. Υδρολάση της S-αδενοσυλ-Ομοκυστεΐνης (SAHase)

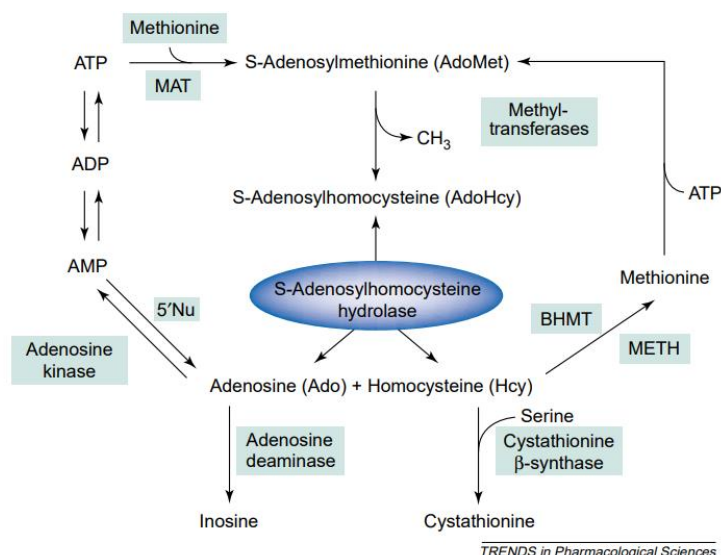
S-αδενοσυλ-L-ομοκυστεΐνη (SAH)

Ομοκυστεΐνη (Hcy)

Αδενοσίνη (Ado)

In vitro, η χημική ισορροπία της αντίδρασης μετατοπίζεται, όντας θερμοδυναμικά ευνοούμενη, προς τη σύνθεση του SAH, εν αντιθέσει με τη φύση που μετατοπίζεται προς την υδρολυτική κατεύθυνση υπό φυσιολογικές συνθήκες. Ευνοείται η υδρολυτική πορεία διότι και τα δύο προϊόντα, ήτοι της ομοκυστεΐνης και της αδενοσίνης, μεταβολίζονται ταχέως ακολουθώντας το καθένα ξεχωριστά μονοπάτια. **(Εικόνα 9)**

Πιο συγκεκριμένα, η ομοκυστεΐνη ακολουθεί το μεταβολικό μονοπάτι της trans-θείωσης για τον περαιτέρω μεταβολισμό της σε κυσταθειονίνη ή μπορεί να σχηματιστεί σε μεθειονίνη μέσω μίας επαναμεθυλίωσης. Η αδενοσίνη είτε μπορεί να απαμινωθεί από την απαμινάση της αδενοσίνης δημιουργώντας την ινोσίνη είτε μπορεί να εισέλθει στο μεταβολικό μονοπάτι της αποικοδόμησης της πουρίνης με τη συμμετοχή της κινάσης της αδενοσίνης.[142] Συνεπώς, η υδρολάση της της S-αδενοσυλ-L-ομοκυστεΐνης είναι ο κύριος ρυθμιστής των επιπέδων των μορίων της αδενοσίνης, της ομοκυστεΐνης και του SAH στους οργανισμούς, με τα επίπεδά τους μάλιστα να σχετίζονται και να εμπλέκονται σε ορισμένες ζωτικές αλλά και παθολογικές διεργασίες.[143]



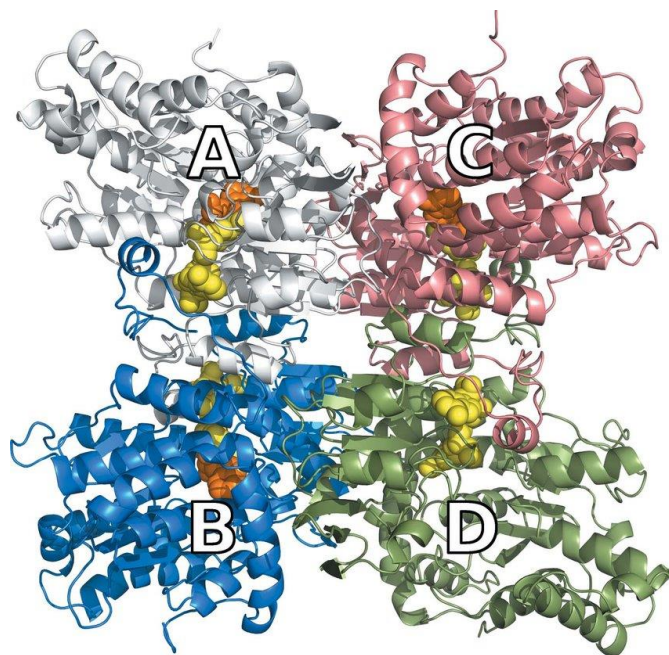
Εικόνα 9. Μονοπάτι ενδοκυτταρικού μεταβολισμού της S-αδενόσυλ-ομοκεστεΐνης (SAH), της αδενοσίνης (Ado), της ομοκυστεΐνης (Hcy) και της S-αδενόσυλ-μεθειονίνης (AdoMet). Η S-αδενόσυλ-ομοκεστεΐνη υδρολύεται από την αντίστοιχη υδρολάση (SAHase) σε ομοκυστεΐνη και αδενοσίνη. Εν συνεχεία, η αδενοσίνη είτε μετατρέπεται σε ινσοΐνη μέσω της απαμινάσης της αδενοσίνης είτε μπαίνει στο μονοπάτι των πουρινών με τη δράση της κινάσης της αδενοσίνης. Η ομοκυστεΐνη μπορεί να εισέλθει είτε στο μονοπάτι της trans-θείωσης και τον μετασχηματισμό της σε κυσταθειονίνη είτε να μεθυλιωθεί εκ νέου σε μεθειονίνη. Ορισμένοι από τους μεταβολίτες της αδενοσίνης και της ομοκυστεΐνης οδηγούν στον σχηματισμό της S-αδενόσυλ-μεθειονίνης που είναι το πρόδρομο μόριο της S-αδενόσυλ-ομοκεστεΐνης.[142]

6.1 Δομή

Οι SAHases βρίσκονται σε όλα τα βασίλεια ζωής, είναι καλά διατηρημένες πρωτεΐνες με την αλληλουχία τους, ωστόσο, να παρουσιάζει διαφορές σύμφωνα με την προέλευσή τους. Συνεπώς οι πρωτεΐνες αυτές απαντώνται από 45 έως 55 kDa και επί το πλείστον είναι ενεργές στην ομοτετραμερική μορφή τους με εξαίρεση να αποτελούν αυτές που προέχονται από τα φυτά και είναι δραστικές στη διμερή μορφή τους.[144] Κάθε υπομονάδα δεσμεύει και υποστρώμα και συμπαραγόνα NAD^+ καθώς φέρει τρεις τομείς οι οποίοι είναι ο τομέας δέσμευσης του υποστρώματος, ο τομέας δέσμευσης του συμπαραγόντα και ένα μικρό τομέα διμερισμού στο καρβοξυλικό άκρο. Οι δύο πρώτοι τομείς φέρουν αναδίπλωση τύπου Rossmann και συνδέονται μεταξύ τους με ένα σημείο άρθρωσης.[145] Κατά τον καταλυτικό κύκλο, μπορούν να υιοθετήσουν δύο διαμορφώσεις την ανοικτή και την κλειστή, η συχνότητα εναλλαγής των οποίων καθορίζεται από την παρουσία ή απουσία ενός αλκαλιμετάλλου στην κατάλληλη θέση δέσμευσης στην περιοχή της άρθρωσης.[146] Ο τομέας του διμερισμού επεκτείνεται και αναπτύσσει αλληλεπιδράσεις με το μακρομοριακό περιβάλλον προσφέροντας σταθερότητα.[145] Η κλειστή διαμόρφωση αναφέρεται όταν η θέση δέσμευσης του υποστρώματος καταλαμβάνεται και οι δύο τομείς έρχονται κοντά. Αντίθετα, απουσία κάποιου συνδέτη, οι δύο τομείς διαχωρίζονται σχηματίζοντας μία μοριακή πύλη υποδοχής και πρόσβασης του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο.[147]

Το βακτήριο *Bradyrhizobium elkanii* αποικίζει στα οζίδια της ρίζας των φυτών συμβιώνοντας μαζί και δεσμεύει το ατμοσφαιρικό άζωτο. Παράγει την υδρολάση της S-αδενόσυλ-L-ομοκυστεΐνης (BeSAHase), πρωτεΐνη που έχει χαρακτηριστεί δομικά και χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία. Είναι μια τετραμερής πρωτεΐνη (**Εικόνα**

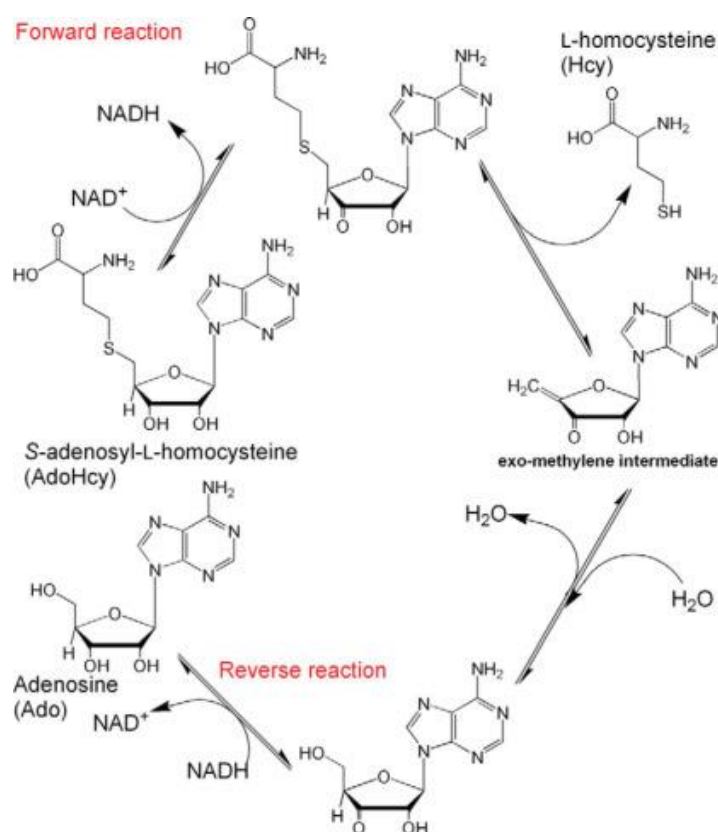
10) όπου η κάθε υπομονάδα της αποτελείται από 473 αμινοξικά κατάλοιπα και εμφανίζει τους τρεις τομείς, που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Ο τομέας της δέσμευσης του υποστρώματος υιοθετεί α/β αναδίπλωση με το παράλληλο β κεντρικό φύλλο να έχει διαμόρφωση Rossman και τοποθετείται έξω από το κέντρο του ολιγομερούς. Αντίθετα, στον πυρήνα του ολιγομερούς εντοπίζονται ασυνήθιστες διαμορφώσεις τύπου Rossman που ανήκουν στους τομείς της δέσμευσης του συμπαράγοντα με το εκάστοτε κεντρικό β φύλλο να αποτελείται από οκτώ κλώνους. Αυτοί οι δύο τομείς ενώνονται σε δύο σημεία της άρθρωσης στα οποία συμμετέχουν τα αμινοξέα Asn222-Leu233 και His392-Val396. Ο τρίτος τομέας του διμερισμού τοποθετείται μακριά από την καταλυτική περιοχή, έχοντας αρχιτεκτονική μοτίβου έλικας-βρόχου-έλικας-βρόχου και εισάγεται αυθόρμητα στον τομέα δέσμευσης του συμπαράγοντα μιας γειτονικής υπομονάδας με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός διμερούς.[148] Έχει αναφερθεί πως η διαμόρφωση της BeSAHase επηρεάζεται από τον τύπο του υποστρώματος που δέχεται, ενώ δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ διαμόρφωσης μοριακής πύλης και τύπου συνδέτη, όπως επίσης διαμόρφωσης μοριακής πύλης και διαμόρφωση πρωτεϊνικής υπομονάδας.[149]



Εικόνα 10. Απεικόνιση τεταρτοταγούς δομής της υδρολάσης της S-αδενυλικής-ομοκυστεΐνης του βακτηρίου *Bradyrhizobium elkanii* (BeSAHase). Το τετραμερές αποτελείται από τις υπομονάδες A,B,C και D, όπου στην κάθε μία είναι προσδεδεμένο ένα μόριο συμπαράγοντα NAD^+ που αποτυπώνεται με κίτρινο χρώμα. [148]

6.2 Μηχανισμός

Ο μηχανισμός υδρόλυσης της S-αδενοσυλ-L-ομοκυστεΐνης από την υδρόλωση της μελετήθηκε επαρκώς από τους Palmer και Abeles στα τέλη της δεκαετίας του 1970. [150, 151] Πρόκειται για μια διαδικασία που εξαρτάται από την οξειδοαναγωγική ικανότητα του συμπαράγοντα NAD^+ που αποτυπώνεται στην **Εικόνα 11**. Ως πρώτο βήμα είναι η οξείδωση του C_3' του SAH από το NAD^+ , σχηματίζοντας το ενδιάμεσο της 3'-κετοαδενοσίνης και NADH . Έτσι το υδρογόνο του C_4' καθίσταται αρκετά όξινο και συνεπώς αποσπάται από το άζωτο μιας λυσίνης του ενεργού κέντρο και μέσω μίας β-απόσπασης στον C_5' , γίνεται απελευθέρωση της ομοκυστεΐνης και ο σχηματισμός του δεύτερου ενδιάμεσου 3'-κετο-4',5'-δεϋδροαδενοσίνης. Στον διπλό δεσμό που υπάρχει μεταξύ των ανθράκων C_4' και C_5' , λαμβάνει χώρα μία προσθήκη κατά Michael ενός μορίου νερού. Τελευταίο βήμα του καταλυτικού κύκλου είναι η αναγωγή του 3'-κετο παραγώγου σε αδενοσίνη με την ταυτόχρονη αναγέννηση του συμπαράγοντα NAD^+ .



Εικόνα 11. Καταλυτικός μηχανισμός της S-αδενοσυλ-L-ομοκυστεΐνης υδρόλωσης προς τις δύο κατευθύνσεις. Η υδρολυτική κατεύθυνση ξεκινά με την οξείδωση της 3'-υδροξυ ομάδας σε 3'-κέτο ομάδα μέσω του συμπαράγοντα NAD^+ που μετατρέπεται σε NADH . Ακολουθεί μία β-απόσπαση της ομοκυστεΐνης, έπειτα μία στεροεκλεκτική προσθήκη νερού κατά Michael και τέλος μία αναγωγή της κέτο ομάδας του C_3' σε υδροξυ ομάδα, με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία αδενοσίνης και την αναγέννηση του συμπαράγοντα NAD^+ . Η αντίθετη κατεύθυνση, αυτή της σύνθεσης, ξεκινά από την οξείδωση του C_3' της αδενοσίνης και καταλήγει στη σύνθεση της της S-αδενοσυλ-L-ομοκυστεΐνης και της αναγέννησης εκ νέου του συμπαράγοντα.[152]

6.3 Αξιοποίηση της SAHase

Τα ένζυμα αυτά διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στους ζωντανούς οργανισμούς και ιδίως στον άνθρωπο. Όπως έχει αναφερθεί, χαρακτηρίζονται ως ρυθμιστές των επιπέδων SAH, ομοκυστεΐνης και αδενοσίνης. Για παράδειγμα, όταν υπολειτουργεί το ένζυμο, τα υψηλά επίπεδα SAH στο αίμα που δημιουργούνται αναστέλλουν τις μεθυλοτρανσφεράσες που εξαρτώνται από το SAM, οι οποίες με τη σειρά του ρυθμίζουν την μετατροπή της μεθειονίνης σε SAM, έχοντας ως αποτέλεσμα την ύπαρξη της νόσου της υπερμεθειοαναιμίας.[153] Αντίθετα, όταν υπερλειτουργεί γίνεται συσσώρευση της ομοκυστεΐνης η οποία δεν μπορεί να μεταβολιστεί πλήρως και συσχετίζεται άμεσα με την ανάπτυξη διαφόρων παθολογικών καταστάσεων μεταξύ αυτών και της στεφανιαίας θρόμβωσης.[154] Επίσης, η αδενοσίνη έχει βρεθεί πως ρυθμίζει πολυάριθμες νευρολογικές και καρδιαγγειακές παθήσεις.[155] Από τα παραπάνω, είναι κατανοητό πως η υδρολάση της S-αδενοσυλ-L-ομοκυστεΐνης είναι ένας δυναμικός φαρμακολογικός στόχος με σκοπό την αναστολή του προς αποτροπή ποικίλων παθολογικών καταστάσεων, ενώ μέχρι στιγμής δεν έχει αναφερθεί κάποια βιοτεχνολογική αξιοποίηση.

7. Ακίνητοποίηση ενζύμων

Τα ένζυμα προσφέρουν μία πληθώρα πλεονεκτημάτων, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, πράγμα που αποσπά το ενδιαφέρον της βιομηχανίας. Ωστόσο, στην ελεύθερη μορφή τους δεν είναι κατάλληλα για βιομηχανικής κλίμακας χρήση, καθώς παρουσιάζουν μειωμένη σταθερότητα και δραστικότητα υπό μη φυσικές ή σκληρές συνθήκες.[156] Προκειμένου λοιπόν να επιτευχθεί η βιομηχανική τους χρήση, αυτά ακινητοποιούνται, χωρίς ωστόσο να αποτελεί δεσμευτικό παράγοντα η βιομηχανική χρήση μιας και μπορούν να ακινητοποιηθούν με σκοπό τη βελτιστοποίηση των ιδιοτήτων τους. Με τον όρο ακινητοποίηση γίνεται λόγος για τον περιορισμό ενός βιοκαταλύτη (ένζυμο, πολυενζυμικό σύστημα ή και ολόκληρα κύτταρα) σε τεχνητή στερεά φάση, την λεγόμενη μήτρα ή φορέα ακινητοποίησης, καθορίζοντας έτσι μία ετερογενή καταλυτική βιοδιεργασία.[157] Ο περιορισμός αυτός πραγματοποιείται με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτρέπεται η αμφίδρομη μεταφορά μεταξύ βιοκαταλυτικής στερεάς φάσης και κύριας υγρής φάσης.

Τα πλεονεκτήματα που απορρέουν από την ακινητοποίηση είναι αρκετά σημαντικά για την περαιτέρω αξιοποίηση των ενζύμων. Μέσω αυτής, επιτυγχάνεται η αύξηση της σταθερότητας του εκάστοτε βιοκαταλύτη ακόμη και σε μη συμβατά μέσα και της αντοχής του σε θερμοκρασίες και pH πέρα από εκείνων που ορίζονται από την φύση τους.[157] Επιπλέον, κάνοντας λόγο για ετερογενή κατάλυση, η ακινητοποίηση προσφέρει δυνατότητα εύκολης ανάκτησης τόσο του βιοκαταλύτη όσο και του προϊόντος, τον καλύτερο έλεγχο της αντίδρασης, την συνεχή λειτουργία της βιοδιεργασίας αλλά και την επαναχρησιμοποίηση του, περιορίζοντας έτσι ταυτόχρονα τόσο τους περιβαλλοντικούς παράγοντες όσο και το κόστος.[158] Ωστόσο, κύριο μειονέκτημά της είναι η μειωμένη δραστικότητα που παρουσιάζουν τα ακινητοποιημένα ένζυμα, πράγμα που αποδίδεται στην ακαμψία που υφίστανται λόγω του περιορισμού και η διάχυση μεταφοράς μάζας.

Ένα σύστημα ακινητοποίησης ενζύμου ορίζεται από το βιοκαταλυτικό σύστημα, τον φορέα ακινητοποίησης ή μήτρα και τον τρόπο που τα προηγούμενα δύο συνδέονται μεταξύ τους. Όπως έχει αναφερθεί, το βιοκαταλυτικό σύστημα απαρτίζεται από ένζυμα, πολυενzymικά συστήματα ή ολόκληρα κύτταρα. Ως φορέας ακινητοποίησης χρησιμοποιείται ένα ευρύ φάσμα υλικών τα οποία μπορούν να καταταχθούν βάσει της προέλευσής τους. Υπάρχουν φορείς που είναι φτιαγμένοι από ανόργανα υλικά, από πολυμερή ή βιοπολυμερή, από οργανικά συνθετικά υλικά και από νανοϋλικά. Τα χαρακτηριστικά που πρέπει να φέρει η εκάστοτε μήτρα προκειμένου να χρησιμοποιηθεί είναι η αδράνειά, το χαμηλό κόστος, φυσική αντοχή, σταθερότητα και να φέρει ορισμένες λειτουργικές ομάδες μέσω των οποίων να μπορέσει να γίνει η ακινητοποίηση.[159] Επισημαίνεται πως η ακινητοποίηση λαμβάνει χώρα είτε πάνω στην επιφάνεια του φορέα ή στο εσωτερικό της δομής του, με τον τρόπο που θα πραγματοποιηθεί να εξαρτάται συνήθως από την εφαρμογή του ακινητοποιημένου ενζύμου, έχοντας έτσι αντίκτυπο και στην επιλογή της μήτρας.

Ο τρόπος σύνδεσης μεταξύ του βιοκαταλύτη και του φορέα ακινητοποίησης ορίζει την μέθοδο ακινητοποίησης. Οι μέθοδοι αυτοί μπορούν να διακριθούν σε φυσικές και χημικές τεχνικές εξαρτώμενες από το είδος των δυνάμεων που αναπτύσσονται μεταξύ βιοκαταλύτη-φορέα. Στις φυσικές μεθόδους δημιουργούνται ασθενείς δυνάμεις οι οποίες είναι αντιστρέψιμες. Σε αυτές εντάσσονται κυρίως η προσρόφηση και η παγίδευση ή ενθυλάκωση. Η πρώτη βασίζεται στην ανάπτυξη κυρίως ηλεκτροστατικών δυνάμεων, υδρόβοφων αλληλεπιδράσεων ή δυνάμεων Van der Waals επάνω στην επιφάνεια του φορέα, ενώ στη δεύτερη το ένζυμο δεν υφίσταται άμεσα σύνδεση με την επιφάνεια του φορέα αλλά παγιδεύεται εντός της δομής του λόγω του μοριακού του βάρους, επιτρέποντας μόνο την διέλευση του υποστρώματος και την διαφυγή του προϊόντος προς και από τους πόρους του φορέα αντίστοιχα. Τονίζεται πως τόσο η παγίδευση όσο και η ενθυλάκωση, βασίζονται στην ίδια αρχή με την μόνη διαφορά πως στην ενθυλάκωση ο εγκλωβισμός πραγματοποιείται στο εσωτερικό μιας ημιπερατής μεμβράνης που έχει μορφή μικροσφαιριδίων. Αντίθετα, στις χημικές μεθόδους αναπτύσσονται πιο ισχυρές δυνάμεις, συνήθως ομοιοπολικές, χωρίς να είναι αντιστρέψιμες. Οι πιο συχνοί χημικοί μέθοδοι ακινητοποίησης είναι η διασταυρούμενη σύνδεση (cross-linking) και η ομοιοπολική ακινητοποίηση. Αναπτύσσονται ομοιοπολικές δυνάμεις και στις δύο περιπτώσεις είτε απευθείας μεταξύ ενζύμου και φορέα, όπως συμβαίνει στην ομοιοπολική ακινητοποίηση, είτε μεταξύ των ενζύμων και του φορέα στην περίπτωση της διασταυρούμενης σύνδεσης.[160]

7.1 Ακινητοποίηση σε μαγνητικά νανοϋλικά οξειδίων του σιδήρου

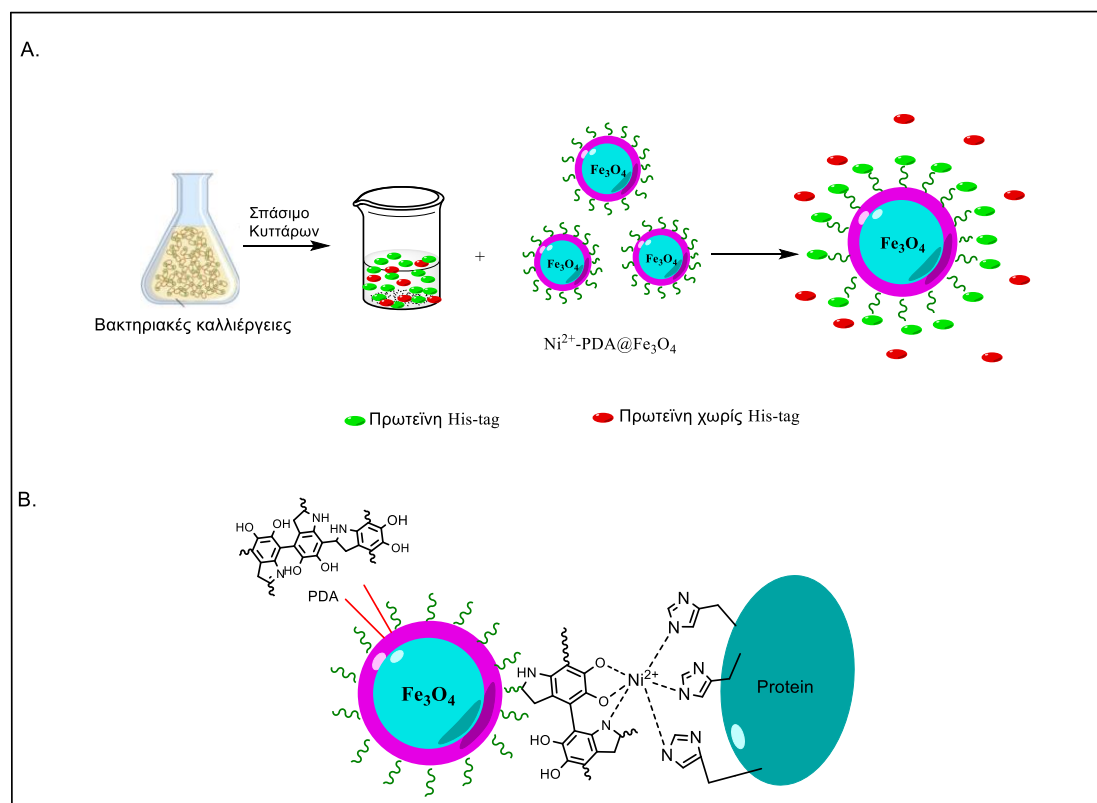
Τα τελευταία χρόνια αναπτύσσεται ταχύτατα ο τομέας της νανοβιοτεχνολογίας, ο οποίος κάνει χρήση και αναπτύσσει νανοδομές της τάξεως 75-200 nm, όπου πάνω τους ή μέσα τους ενσωματώνονται ένζυμα ή πρωτεΐνες ή βιοδραστικές ενώσεις με σκοπό την εφαρμογή τους.[161] Η ακινητοποίηση ενζύμων σε νανοϋλικά προσφέρει πληθώρα πλεονεκτημάτων καθώς αυτά φέρουν κάποια ιδανικά χαρακτηριστικά όπως υψηλή αναλογία επιφάνειας προς όγκο επιφάνειας, αποδίδοντας εξαιρετικές χημικές, οπτικές, ηλεκτρονικές ιδιότητες αλλά και μηχανική σταθερότητα.[162] Επιπλέον, έχει βρεθεί

ότι μέσω αυτών μειώνεται το πρόβλημα της διάχυσης, ενισχύοντας έτσι την απόδοση και την αποτελεσματικότερη φόρτωση ενζύμων.[163] Υπάρχουν τέσσερις τρόποι πραγματοποίησης της ακινητοποίησης των ενζύμων σε φορείς νανοδομών. Ένας εξ αυτών είναι μέσω απευθείας σύνδεσης του βιοκαταλύτη και του νανοσωματιδίου λόγω κάποιων λειτουργικών ομάδων που φέρουν στην επιφάνειά τους. Επίσης μπορεί να επιτευχθεί μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης του ενζύμου στην καταλλήλως τροποποιημένη επιφάνεια του νανοσωματιδίου. Πιο απλή μέθοδος είναι αυτής της ηλεκτροστατικής προσρόφησης του ενζύμου στην επιφάνεια του φορέα. Τέλος, η σύζευξη μπορεί να λάβει χώρα μέσω κάποιας συγγένειας δέσμευσης που εμφανίζεται στο σύστημα ενζύμου-νανοσωματιδίου.[164]

Ευρέως διαδεδομένα είναι τα μαγνητικά νανοσωματίδια (MNPs) καθώς πέραν των άλλων πλεονεκτημάτων, προσφέρουν και δυνατότητα εύκολου διαχωρισμού τους από το μείγμα της αντίδρασης με την εφαρμογή ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, αντιμετωπίζοντας έτσι τυχόν ζητήματα ανάκτησης και επαναχρησιμοποίησης.[162] Στη φύση τα νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου απαντώνται σε τρεις μορφές οι οποίες είναι ως αιματίτης ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), ως μαγκεμίτης ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) και ως μαγνητίτης (Fe_3O_4), με την τελευταία να είναι η πιο συχνή και χρησιμοποιούμενη λόγω των ισχυρών μαγνητικών ιδιοτήτων της και της θερμικής αγωγιμότητάς της.[165] Επιπλέον, τα μαγνητικά νανοσωματίδια της μορφής Fe_3O_4 είναι βιοσυμβατά με χαμηλή τοξικότητα ως προς τον ανθρώπινο οργανισμό, δεν παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία στην οξείδωση και είναι εύκολη η σύνθεσή τους, αλλά και η επεξεργασία και τροποποίηση της επιφάνειάς τους. Αυτά έχουν ως αποτέλεσμα την αξιοποίησή τους σε βιοιατρικές εφαρμογές. [166]

Η αξιοποίησή τους πραγματοποιείται και στο κομμάτι της ακινητοποίησης των ενζύμων. Έχουν αναπτυχθεί πρωτόκολλα που χρησιμοποιούν μαγνητικά νανοσωματίδια Fe_3O_4 , τα οποία φέρουν στην επιφάνειά τους τέτοιες τροποποιήσεις ή επικαλύψεις έτσι ώστε να παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια με τις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος και να ακινητοποιούνται. Έτσι έχει αναπτυχθεί ένα βήμα δύο σε ένα, καθώς με την ακινητοποίηση επιτυγχάνεται και ο καθαρισμός του ενδιαφερόμενου ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα, γίνεται η εκμετάλλευση της εξαιρετικής συγγένειας που εμφανίζεται μεταξύ του αμινοξικού καταλοίπου της ιστιδίνης και των μετάλλων, όπως το νικέλιο (Ni^{2+}), το κοβάλτιο (Co^{2+}) και ο χαλκός (Cu^{2+}), έχοντας την ίδια αρχή με την οποία λειτουργεί η χρωματογραφία συγγένειας στην κατιούσα επεξεργασία των πρωτεϊνών. Το εκάστοτε μέταλλο έχει συναρμοσμένους υποκαταστάτες το άζωτο του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης και λειτουργικές ομάδες του υλικού επικάλυψης της νανοδομής, δημιουργώντας ένα σύμπλοκο (**Εικόνα 14B**). Επομένως, μία πρωτεΐνη που περιέχει τον επίτοπο αλληλουχίας 6 ιστιδινών στο καρβοξυλικό άκρο της είναι εύκολο να ακινητοποιηθεί και να καθαριστεί με τον παραπάνω τρόπο (**Εικόνα 14A**). Τέτοια μαγνητικά νανοσωματίδια Fe_3O_4 έχουν τροποποιηθεί επιφανειακά με νιτριλοτριοξικό οξύ και Ni^{2+} (Ni-NTA) [167] και με πολυντοπαμίνη και Ni^{2+} [168]. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η επικάλυψη νανοσωματιδίων με πολυντοπαμίνη καθώς είναι προσφέρει επιπλέον ιδιότητες όπως αδιάβροχες ιδιότητες, ισχυρή προσρόφηση

και αντοχή.[168] Τέλος, σημαντικό είναι και το γεγονός ότι με την επικάλυψη της επιφάνειας των νανοσωματιδίων με νικέλιο δίνεται η δυνατότητα ανάκτησης της δεσμευμένης πρωτεΐνης μέσω του ανταγωνισμού ως προς τη θέση δέσμευσης της, χρησιμοποιώντας ένα διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης μιας ένωσης που παρουσιάζει και αυτή συγγένεια δέσμευσης προς το Ni^{2+} , όπως για παράδειγμα το ιμιδαζόλιο.



Εικόνα 12. Α) Καθαρισμός και ακινητοποίηση σε ένα βήμα πρωτεϊνών με ακολουθία His-tag με χρήση νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου (Fe_3O_4) επικαλυμμένα με πολυντοπαμίνη (PDA) και ιόντα νικελίου (Ni^{2+}). Β) Ακινητοποίηση πρωτεϊνών His-tag μέσω της δημιουργίας συμπλόκων των ιόντων νικελίου των νανοσωματιδίων και του αζώτου του ημιδαζολίου της ιστιδίνης.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

8.1 Υλικά

8.1.1 Ένζυμα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικές οικογένειες ενζύμων αυτή των τρανσφερασών και αυτή των υδρολοσών. Τα ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια των μεθυλοτρασφερασών προέρχονται από τους οργανισμούς *Clarkia breweri* (IeOMT) και *Catharanthus roseus* (CaROMT). Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται τα ένζυμα άγριου τύπου (wild type, WT) και από τους δύο οργανισμούς αλλά και δύο διαφορετικά μεταλλάγματα του πρώτου, τα οποία είναι η μετάλλαξη T133M (IeOMT T133M) και η διπλή μετάλλαξη T133M-Y326L (IeOMT T133M-Y326L). Η ετερόλογη έκφρασης τους διεξάγεται σε βακτηριακά κύτταρα *Escherichia coli* (*E.coli*) στελεχών BL21, σε πλασμιδικό φορέα pET21a(+). Σημειώνεται πως όλα τα παραπάνω ένζυμα διαθέτουν επίτοπο έξι ιστιδινών (6His-Tag) στο καρβοξυτελικό τους άκρο.

Την κατηγορία των υδρολασών αντιπροσωπεύει η υδρολάση της S-αδενυλικής ομοκυστεΐνης (SAHase) προερχόμενη από τον οργανισμό *Bradyrhizobium elkanii*. Η ετερόλογη έκφρασης τους πραγματοποιείται σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli* στελεχών BL21, σε πλασμιδικό φορέα pET151/D-TOPO καθώς επίσης διαθέτουν και την αλληλουχία έξι ιστιδινών (6His-Tag) στο αμινοτελικό άκρο.

8.1.2 Υποστρώματα και ενζυμικές αντιδράσεις

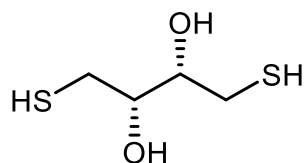
Για την σύνθεση μεθυλιωμένων αναλόγων χρησιμοποιήθηκε ένα εύρος υποστρωμάτων που ποικίλει δομικά. Αυτά μπορούν να ταξινομηθούν στο ευρύτερο πλαίσιο των φαινολικών ενώσεων, των φλαβονοειδών και των στιλβеноοειδών ενώσεων και είναι εμπορικά διαθέσιμα. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα υποστρώματα που μελετώνται, οι δομές αυτών και η εταιρία παροχής τους.

Πίνακας 1. Κατηγοριοποίηση και παράθεση των υποστρωμάτων, των δομών τους καθώς και των εταιριών που διατίθενται εμπορικά.

	Υπόστρωμα	Δομή	Προέλευση
Φαινολικές ενώσεις	Ισοευγενόλη		Sigma-Aldrich
	Καφεϊκό οξύ		Sigma
	Τυροσόλη		Alfa Aesar
	Υδροξυτυροσόλη		CarboSynth
Φλαβονοειδή	Λουτεολίνη		CarboSynth
	Μορίνη		TCI
	Φισετίνη		TCI
	Μυρικετίνη		CarboSynth
Στιλβеноειδή	Ρεσβερατρόλη		CarboSynth

Προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι ενζυμικές αντιδράσεις με τα παραπάνω υποστρώματα απαιτείται η χρήση δότη μεθυλομάδας της S-αδενυλικής μεθειονίνη (SAM) από την εταιρία New England BioLabs, του κυτταρικού λύματος από κύτταρα *E.coli* BL21 χωρίς πλασμιδιακό φορέα και του αναγωγικού παράγοντα της

διθειοθρεϊόλης (Dithiothreitol, DTT) που παρέχεται από την εταιρία Sigma και η δομή του παρουσιάζεται στο **Σχήμα 14**.



Σχήμα 14. Δομή του αναγωγικού παράγοντα διθειοθρεϊόλης (DTT).

8.1.3 Αντιδραστήρια των βακτηριακών καλλιιεργειών

Για τη διεξαγωγή βακτηριακών καλλιιεργειών είτε υγρών είτε στερεών, απαιτείται χρήση θρεπτικών μέσων, αντιβιοτικών και επαγωγέων. Στον **Πίνακα 2**, παρατίθενται τα αντιδραστήρια καθώς και η εταιρία προέλευσής τους.

Πίνακας 2. Αντιδραστήρια για την διεξαγωγή των βακτηριακών καλλιιεργειών, ήτοι του θρεπτικού μέσου LB τόσο για υγρές όσο και για στερεές καλλιιεργειες, το αντιβιοτικό και ο επαγωγέας. Επιπλέον, δίνεται η εταιρία προέλευσης του κάθε αντιδραστηρίου.

Σκοπός	Αντιδραστήριο	Προέλευση
Θρεπτικό μέσω υγρών καλλιιεργειών	LB Broth Lennox	NEOGEN
Θρεπτικό μέσω στερεών καλλιιεργειών	LB Agar Lennox	NEOGEN
Αντιβιοτικό	Άλας νατρίου Αμικικιλίνης	Sigma
Επαγωγέας	Ισοπροπυλο-b-D- θειογαλακτοπυρανοζίτης (IPTG)	HT innovation

8.1.4 Αντιδραστήρια για την σύνθεση των νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με πολυντοπαμίνη και ιόντα νικελίου ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{polydopamine-Ni}^{2+}$)

Η σύνθεση των νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου τα οποία είναι επικαλυμμένα με πολυντοπαμίνη και ιόντα νικελίου πραγματοποιείται με τα αντιδραστήρια που παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3. Παράθεση αντιδραστηρίων για την σύνθεση νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου με πολυντοπαμίνη και ιόντα νικελίου (II).

Αντιδραστήριο	Προέλευση
Οξύδιο σιδήρου (II,III) (50-100 nm)	Sigma
Υδροχλωρικό άλας ντοπαμίνης	Sigma
Εξαένυδρο θειικό νικέλιο (II) ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Acrosn Organnics

8.1.5 Λοιπά αντιδραστήρια

Περαιτέρω αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4** μαζί με τον σκοπό χρήσης τους και τις εταιρίες που τα καθιστούν εμπορικά διαθέσιμα.

Πίνακας 4. Παράθεση αντιδραστηρίων που γίνονται χρήση κατά τον έλεγχο της ενζυμικής δραστηριότητας της SAHase, για την παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων και για την αναλυτική τεχνική της HPLC.

Σκοπός	Αντιδραστήριο	Προέλευση
Ενζυμική δραστηριότητα SAHase	S-αδενυλική ομοκυστεΐνη (SAH)	USP
	5,5 διθειοδι-(2-νιτροβενζοϊκό οξύ) (παράγοντας Ellman)	Sigma
Χειμοδεκτικά κύτταρα	Γλυκερίνη	Fisher Scientific
	Άλας διένυδρου χλωριούχου ασβεστίου ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Fluka
Ρυθμιστικά διαλύματα	Άλας $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sigma
	Άλας NaH_2PO_4	Sigma
	Άλας Τρις-(υδροξυμεθυλ)-αμινομεθάνιο (Tris)	Riedel
	Άλας 3-(N-μορφολινο)προπανοσουλγονικό οξύ (MOPS)	Acros Organics
	Υδροξείδιο του νατρίου (2M)	Panreac
	Υδροχλωρικό οξύ (2M)	Sigma
HPLC	Μεθανόλη	Fisher
	Ακετονντρίλιο	Fisher
	Νερό υπερκάθαρο	Fisher
	Οξικό οξύ	Sigma
NMR	Δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d_6)	Deutero

8.2 Μέθοδοι

Η παρούσα εργασία ασχολείται με τις μεθυλοτρανσφεράσες (O-MTs) οι οποίες αποτελούν το προϊόν γονιδιακής έκφρασης που πραγματοποιείται σε κύτταρα ξενιστές E.coli του στελέχους BL21 (DE3). Για το χειρισμό των βακτηριακών κυττάρων, όλα τα θρεπτικά μέσα και τα σκεύη που χρησιμοποιούνται έχουν αποστειρωθεί προηγουμένως στο αυτόκαυστο στους 120 °C για 25-30 λεπτά και οι διαδικασίες λαμβάνουν χώρα σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow hood) υπό φλόγα και ασυπτητικές και στείρες συνθήκες, που επιτυγχάνονται με χρήση 70% αιθανόλης και λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας.

8.2.1 Χημειοδεκτικά κύτταρα *E.coli*

Προκειμένου να δεχτούν τα κύτταρα το επιθυμητό πλασμίδιο χρήζουν κατάλληλο χειρισμό και επεξεργασία για να γίνουν δεκτικά. Πραγματοποιείται χημική επεξεργασία αυτών με χρήση άλατος χλωριούχου ασβεστίου (CaCl_2). Πριν την έναρξη της διαδικασίας απαιτείται η παρασκευή ορισμένων διαλυμάτων. Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάζεται διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου (CaCl_2) συγκέντρωσης 1 M, το οποίο λειτουργεί ως stock του διαλύματος εργασίας που χρησιμοποιείται (10x working solution). Μέσω αυτού, παρασκευάζεται και το διάλυμα εργασίας συγκέντρωσης 0.1 M. Τα δύο παραπάνω διαλύματα μετά την παρασκευή τους αποστειρώνονται με φίλτρο που διαθέτει μέγεθος πόρων 0.22 μm . Επιπλέον προετοιμάζεται ακόμη ένα διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου συγκέντρωσης 0.1 M με 15% (v/v) αποστειρωμένης γλυκερίνης. Σημειώνεται, πως χρησιμοποιείται δις απεσταγμένο νερό για την προετοιμασία όλων των παραπάνω.

Το πρωτόκολλο των χημειοδεκτικών κυττάρων έχει διάρκεια δυο ημερών. Η πρώτη μέρα αντιστοιχεί στην ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων. Σε ασηπτικές, στείρες συνθήκες και υπό φλόγα στο θάλαμο νηματικής ροής, 1 mL υγρού θρεπτικού μέσου LB, το οποίο έχει προηγουμένως αποστειρωθεί, εμβολιάζεται με 20 μL stock γλυκερίνης της επιθυμητής κυτταρικής σειράς. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C με ανάδευση στα 180 rpm για 12-16 ώρες. Την επόμενη μέρα, λαμβάνεται 1 mL από την καλλιέργεια και εναποτίθεται σε 99 mL θρεπτικού μέσου LB. Επωάζεται εκ νέου στους 37°C με ανάδευση στα 180 rpm και ανά τακτά χρονικά διαστήματα ελέγχεται η οπτική θολερότητα στα 600 nm (OD_{600}) έως ότου φτάσει σε απορρόφηση 0.4. όταν ληφθεί η επιθυμητή τιμή του OD_{600} , η καλλιέργεια επωάζεται περαιτέρω σε πάγο για 20 λεπτά. Έπειτα φυγοκεντρείται στους 4°C, 4,000 rpm για 10 λεπτά και μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης απορρίπτεται πλήρως το υπερκείμενο. Η κυτταρική πελέτα επαναιωρείται με σε 20 mL παγωμένου διαλύματος 0.1 M CaCl_2 και επωάζεται εκ νέου σε πάγο για 30 λεπτά. Επαναλαμβάνεται μία φυγοκέντρωση με τις ίδιες συνθήκες, απομακρύνεται το υπερκείμενο και σε 5 mL παγωμένου διαλύματος 0.1 M CaCl_2 με 15% γλυκερίνη γίνεται η απαναιώρηση των κυττάρων. Τα κύτταρα διαμοιράζονται σε φιαλίδια erppendorf χωρητικότητας 1.5 mL σε ποσότητες των 50 μL και έπειτα καταψύχονται στους -80°C ή χρησιμοποιούνται περαιτέρω στη διαδικασία του μετασχηματισμού τους.

8.2.2 Μετασχηματισμός χημειοδεκτικών κυττάρων *E.coli* DH5A και *E.coli* BL21 (DE3)

Ο μετασχηματισμός χημειοδεκτικών κυττάρων είναι μια διαδικασία κατά την οποία το ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό DNA εισάγεται σε βακτηριακά κύτταρα ξενιστές, προκειμένου μέσω αυτών να επιτευχθεί η έκφραση των γονιδίων που υπάρχει στο εκάστοτε πλασμίδιο. Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται ως ξενιστές ανήκουν στο βακτήριο *E.coli*, όπου το στέλεχος DH5A περιέχει μια μετάλλαξη *recA* που προσδίδει υψηλή σταθερότητα στο ένθετο πλασμίδιο, ενώ το στέλεχος BL21 (DE3) είναι τροποποιημένο για σκοπούς έκφρασης πρωτεϊνών.

Η διαδικασία του μετασχηματισμού ξεκινάει με ήπιο ξεπάγωμα για 10 λεπτά σε πάγο του επιθυμητού στελέχους των βακτηριακών κυττάρων *E.coli*, τα οποία προηγουμένως έχουν υποστεί χημική επεξεργασία με σκοπό να γίνουν επιδεκτικά. Έπειτα, σε αποστειρωμένα erppendorfs εισάγονται 200 μ L επιδεκτικών κυττάρων και 10 μ L ανασυνδιασμένου πλασμιδίου και αφήνονται σε ηρεμία στον πάγο για 30 min. Για τον έλεγχο της διαδικασίας πραγματοποιούνται δύο δείγματα ελέγχου (controls) όπου το θετικό περιέχει την αντίστοιχη ποσότητα σκέτου πλασμιδιακού φορέα και το αρνητικό δεν περιέχει τίποτα. Μετά το πέρας των 30 min, τα μετασχηματισμένα κύτταρα υπόκεινται σε θερμικό σοκ στους 44 °C για 45 sec, με σκοπό οι πόροι της κυτταρικής μεμβράνης να ανοίξουν καλύτερα και έπειτα πραγματοποιείται προσθήκη 1 mL θρεπτικού μέσου LB και επωάζονται για 45-60 λεπτά τους 37 °C. Αφού πραγματοποιηθεί μία ήπια ανάδευση στο κυτταρικό μείγμα, επιστρώνονται 200 μ L αυτού σε τρυβλίο Petri που περιέχει στερεό θρεπτικό μέσο LB και το αντιβιοτικό της αμπικιλίνης. Η εναπομένουσα ποσότητα κυτταρικού μείγματος φυγοκεντρείται (4000 rpm, 4 °C, 3 min), απομακρύνεται η περίσσεια του υπερκειμένου, επαναιωρούνται τα κύτταρα με το ελάχιστο υπερκείμενο που έμεινε και επιστρώνονται τρυβλία εκ νέου (ΟΛΟΝ). Τέλος, όλα τα τρυβλία επωάζονται ολονυκτίως στους 37 °C προκειμένου να γίνει η ανάπτυξη των βακτηρίων και η αποθήκευσή τους γίνεται στους 4 °C.

8.2.3 Παρασκευή stock γλυκερίνης

Μετά τον επιτυχή μετασχηματισμό, πραγματοποιείται προκαλλιέργεια από μονοκλωνική αποικία με σκοπό τη δημιουργία stock γλυκερίνης. Η γλυκερίνη βοηθά στην αποθήκευση των βακτηρίων καθώς αποτρέπει την λύση της κυτταρικής μεμβράνης. Για την προκαλλιέργεια απαιτείται η προσθήκη 5 mL θρεπτικού μέσου LB, αμπικιλίνης με συγκέντρωση 100 μ g/ mL και μιας μονοκλωνικής αποικίας. Πραγματοποιείται ολονύκτια επώαση στους 37 °C και με ανάδευση στις 180 στροφές ανά λεπτό (rpm). Την επόμενη μέρα, παρασκευάζεται το stock γλυκερίνης με την ανάμειξη 900 μ L προκαλλιέργειας και 600 μ L υδατικού διαλύματος γλυκερίνης 50% v/v και αποθηκεύονται στους -80 °C.

8.2.4 Υγρές βακτηριακές καλλιέργειες υπερέκφρασης πρωτεϊνών

Σκοπός της ετερόλογης πρωτεϊνικής έκφρασης είναι η υπερέκφραση της εκάστοτε πρωτεΐνης σε μεγάλη ποσότητα και σε μικρό χρονικό διάστημα. Η υπερέκφραση των ενζύμων που μελετώνται στην παρούσα εργασία πραγματοποιείται μέσω βακτηριακών καλλιιεργειών *E. coli*. Ως θρεπτικό μέσο ανάπτυξης επιλέγεται το Luria Bertani ή Luria Broth (LB), το οποίο εξασφαλίζει πηγές απαραίτητες, όπως άνθρακα και άζωτο, που συμβάλουν στη δημιουργία ενός περιβάλλοντος ευνοϊκού για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, περιέχει εκχύλισμα ζύμης δίνοντας την απαραίτητη πηγή άνθρακα, χλωριούχο νάτριο παρέχοντας ιόντα νατρίου με σκοπό την εξασφάλιση της οσμωτικής ισορροπίας και τρυπτόνες για την εξασφάλιση των απαραίτητων αμινοξέων. Γίνεται χρήση θρεπτικού μέσου όγκου 150 mL και 5 mL, προοριζόμενα για την καλλιέργεια και την προ-καλλιέργεια, αντιστοίχως.

Ποσότητα κατάλληλη σύμφωνα με τις οδηγίες του σκευάσματος LB ζυγίζεται σε ζυγά και τοποθετείται σε κωνική φιάλη των 500 mL και έπειτα προστίθεται δις-απεσταγμένο νερό όγκου 150 mL. Πραγματοποιείται καλή ανάδευση, έτσι ώστε να διαλυθούν όλα τα στερεά υπολείμματα, είτε με κίνηση του χεριού, είτε υπό την βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα, ο οποίος αφαιρείται στο πέρας της διαδικασίας. Στη συνέχεια, πωματίζεται το δοχείο και αποστειρώνεται με χρήση αυτόκαυστου, μαζί με τα λοιπά σκεύη. Ο χρόνος αναμονής από την παρασκευή έως την αποστείρωση του θρεπτικού μέσου, απαιτείται να είναι ελάχιστος για αποφυγή τυχόν επιμολύνσεων. Τονίζεται πως πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία, τα θρεπτικά μέσα και τα υπόλοιπα σκεύη όπως δοκιμαστικοί σωλήνες, tips για πιπέτες ακριβείας Gilson 100, 200 και 1000 μL , αποστειρώνονται με χρήση αυτόκαυστου στους 180°C για 25-30 λεπτά.

Η διαδικασία της προ-καλλιέργειας γίνεται με σκοπό τον εμβολιασμό της καλλιέργειας με μία ποσότητα ενεργών κυττάρων, που θα ενισχύσουν την ανάπτυξη όλων των κυττάρων μετέπειτα. Πραγματοποιείται σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminar flow) υπό ασηπτικές, στείρες συνθήκες με χρήση αιθανόλης 70% και υπό φλόγα, έτσι ώστε να μην επέλθει κάποια ανεπιθύμητη επιμολύνση. Γίνεται χρήση αντιβιοτικού μέσου, στο οποίο παρουσιάζει ανθεκτικότητα το πλασμίδιο του βακτηρίου με σκοπό την αποφυγή ανάπτυξης διαφορετικού μικροοργανισμού. Όλα τα συστατικά που χρησιμοποιούνται στην προ-καλλιέργεια καθώς και οι απαιτούμενες ποσότητες αυτών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 5**.

Πίνακας 5. Παράθεση κατάλληλων όγκων σε μL των συστατικών που απαιτούνται για μια προ-καλλιέργεια όγκου 5 mL. Η προσθήκη τους πραγματοποιείται με την αναγραφόμενη σειρά.

Συστατικό	Όγκος (μL)
Θρεπτικό μέσο LB	5000
Αμπικιλίνη (αντιβιοτικό)	5
Στοκ γλυκερίνης*	100

*Τα stock γλυκερίνης κυττάρων *E.coli* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια ενδιαφέροντος βρίσκονται αποθηκευμένα στους -80°C . Καθ' όλη την διάρκεια της διαδικασίας βρίσκονται σε πάγο.

Σε ένα αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται τα αντιδραστήρια με την σειρά που αναγράφονται στον παραπάνω πίνακα, υπό τις συνθήκες που αναφέρθηκαν. Η αμπικιλίνη περιέχεται σε συγκέντρωση $100\text{ }\mu\text{g/ mL}$ και η ποσότητα που παίρνεται αντιστοιχεί σε διάλυμα stock 100 mg/ mL . Έπειτα πωματίζεται καλά ο σωλήνας και μεταφέρεται στον επωαστήρα, ο οποίος έχει προηγουμένως ρυθμιστεί στους 37°C . Η τοποθέτησή του γίνεται σε στατό υπό γωνία με χαλάρωση του πόματος, ρυθμίζεται η ανακίνηση σε 180 στροφές ανά λεπτό (rpm) και αφήνεται όλη τη νύχτα για περίπου 18 ώρες.

Την επόμενη μέρα, η ανάπτυξη των κυττάρων διακρίνεται από την οπτική θολερότητα της υγρής προ-καλλιέργειας. Μεταφέρεται εκ νέου στο θάλαμο νηματικής ροής και υπό ασηπτικές, στείρες συνθήκες και φλόγα γίνεται η παρασκευή της κυρίως καλλιέργειας, αναμειγνύοντας με την αναγραφόμενη σειρά τα συστατικά του **Πίνακα 6** σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη των 500 mL.

Πίνακας 6. Παράθεση όγκου των συστατικών που προστίθενται με την αναγραφόμενη σειρά σε κωνική φιάλη για την δημιουργία καλλιέργειας τελικού όγκου 500 mL.

Συστατικό	Όγκος (mL)
Θρεπτικό μέσο LB	150
Αμπικιλίνη (αντιβιοτικό)	0.15
Προ-καλλιέργεια	1.50*

* Ο όγκος της προ-καλλιέργειας αποτελεί το 1% του τελικού όγκου της κύριας καλλιέργειας.

Η κωνική φιάλη που περιέχει την υγρή καλλιέργειας επανατοποθετείται στον επωαστήρα, αφού πρώτα έχει πωματιστεί. Ο επωαστήρας ρυθμίζεται στους 37°C και με ανακίνηση 160 rpm. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, πραγματοποιείται έλεγχος οπτικής πυκνότητας του περιεχομένου της κωνικής φιάλης με μέτρηση απορρόφησης στα 600nm (OD₆₀₀). Για την καταγραφή της απορρόφησης, λαμβάνεται κάθε φορά 1 mL δείγματος καλλιέργειας και τοποθετείται σε πλαστική κυψελίδα, ενώ ως τυφλό διάλυμα χρησιμοποιείται αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο LB όγκου 1 mL. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα υπό ασηπτικές συνθήκες και φλόγα. Όταν η τιμή της απορρόφησης εμπίπτει στο εύρος απορρόφησης 0.6-0.8, σημαίνει πως τα κύτταρα βρίσκονται στην εκθετική τους φάση και είναι υγιή. Επομένως, γίνεται προσθήκη του επαγωγέα ισοπροπυλο-b-D-θειογαλακτοπυρανοζίτη (IPTG) τελικής συγκέντρωσης 0.2 mM υπό τις ίδιες συνθήκες, από διάλυμα stock 0.2 M. Έπειτα, τοποθετείται εκ νέου η καλλιέργεια στον επωαστήρα με συνθήκες 20°C, 130 rpm και αφήνεται για περίπου 20 ώρες.

Μετά το πέρας του απαιτούμενου χρόνου επαγωγής, γίνεται εκ νέου λήψη απορρόφησης OD₆₀₀. Ο υπολειπόμενος όγκος της καλλιέργειας μεταφέρεται και διαμοιράζεται σε κατάλληλα φιαλίδια τύπου Falcon των 50 mL για την συγκέντρωσή τους. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση με συνθήκες 4°C, 9.000 rpm για 20 λεπτά σε υπερφυγόκεντρο τύπου Hereaus Megafuge 8R. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και η πελέτα επαναδιαλυτοποιείται με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για πλύση αυτής. Γίνεται εκ νέου φυγοκέντρηση και πραγματοποιείται η αποθήκευση της πελέτας στους -20°C.

8.2.5 Λύση βακτηριακών κυττάρων μέσω υπερήχων

Προκειμένου να γίνει αξιοποίηση της παραγόμενης πρωτεΐνης από την ετερόλογη έκφραση, κρίνεται απαραίτητη η λύση των βακτηριακών κυττάρων. Η κατεργασία τους μέσω υπερήχων είναι μία αποτελεσματική μέθοδος λύσης αυτών που αποσκοπεί στη συλλογή της κυτταροπλασματικής επιθυμητής πρωτεΐνης. Η ποσότητα πελέτας που είναι αποθηκευμένη στους -20°C, επαναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (50 mM, pH 7.5 για τις O-MTs και 50 mM, pH 8.0 για την SAHase), σε φιαλίδια τύπου

Falcon 50 mL. Η χρήση του ρυθμιστικού είναι απαραίτητη για την αποφυγή μετουσίωσης των πρωτεϊνών και η ποσότητα του είναι 2.5 mL. Τονίζεται πως ο όγκος αυτού προτιμάται να είναι μικρός για την καλύτερη λύση των κυττάρων.

Η διαλυτοποιημένη κυτταρική πελέτα σπάει μέσω συσκευής υπερήχων και της κατάλληλης βελόνας που φέρει. Οι παράμετροι λειτουργίας της συσκευής υπερήχων για ένταση και παλμό ρυθμίζονται σε τιμές 50% και 30, αντίστοιχα. Η διαδικασία της λύσης διαρκεί πέντε λεπτά, υπό πάγο, με τη βελόνα της συσκευής να είναι εμβαπτισμένη εντός του φιαλιδίου. Μετά το πέρας του χρόνου, το δείγμα αφήνεται σε ηρεμία στον πάγο για 4-5 λεπτά. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται τρεις φορές για κάθε δείγμα κυτταρικής πελέτας. Έπειτα, ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων σε φυγόκεντρο Hereaus Megafuge 8R για 20 λεπτά σε συνθήκες 4°C, 9000 rpm. Το υπερκείμενο υγρό περιέχει την υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη και γι' αυτό συλλέγεται σε φιαλίδιο Falcon των 15 mL για περαιτέρω επεξεργασία.

8.2.6 Σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με πολυντοπαμίνη και ιόντα νικελίου ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{polydopamine-Ni}^{2+}$)

Η σύνθεση νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου (Fe_3O_4) πραγματοποιείται με σκοπό να αποτελέσουν τον φορέα ακινητοποίησης του εκάστοτε ενζύμου που υπερεκφράζεται μέσω βακτηριακών καλλιιεργειών. Τα νανοσωματίδια αυτά είναι επικαλυμμένα με πολυντοπαμίνη και ιόντα νικελίου μέσω του οποίου ακινητοποιείται το ένζυμο που φέρει 6His-tag αλληλουχία.

Ποσότητα 10 mg εμπορικά διαθέσιμων νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου (Fe_3O_4) ζυγίζεται σε κατάλληλο ζυγό και διασπείρεται σε 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (25 mM, pH 8.0) μέσω επώασης σε υδατόλουτρο υπερήχων Elma- Ultrasonics Steam Ultraclean για 15 λεπτά. Έπειτα, πραγματοποιείται προσθήκη 10 mg υδροχλωρικού άλατος ντοπαμίνης και η αντίδραση επωάζεται για 12 ώρες στους 25°C υπό ήπια ανάδευση. Την επόμενη μέρα, τα νανοσωματίδια διαχωρίζονται με φυγοκέντρηση με συνθήκες 4000 rpm για 10 λεπτά σε φυγόκεντρο τύπου Hettich zentrifugen Universal 32. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και πραγματοποιούνται τουλάχιστον τρεις πλύσεις με απιονισμένο νερό. Μετά το πέρας της τελευταίας πλύσης, στα νανοσωματίδια προστίθεται διάλυμα θειικού νικελίου (NiSO_4) συγκέντρωσης 100 mM και όγκου 10 mL και επωάζονται εκ νέου στους 25°C υπό ήπια ανάδευση για δύο ακόμη ώρες. Εν συνεχεία, διαχωρίζονται τα νανοσωματίδια μέσω φυγοκέντρωσης υπό τις συνθήκες που αναφέρθηκαν προηγουμένως, απομακρύνεται το υπερκείμενο και πραγματοποιούνται πλύσεις με απιονισμένο νερό. Τέλος, τα νανοσωματίδια επαναιωρούνται σε 500 μL υπερκάθολου νερού για HPLC με τη βοήθεια υπερήχων και μεταφέρονται σε erppendorf για περαιτέρω χρήση. Η αποθήκευσή τους γίνεται στους 4°C έως και 5 μέρες από την μέρα σύνθεσής τους.

8.2.7 Ακίνητοποίηση ενζύμων που φέρουν His-tag σε νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με πολυντοπαμίνη και ιόντα νικελίου

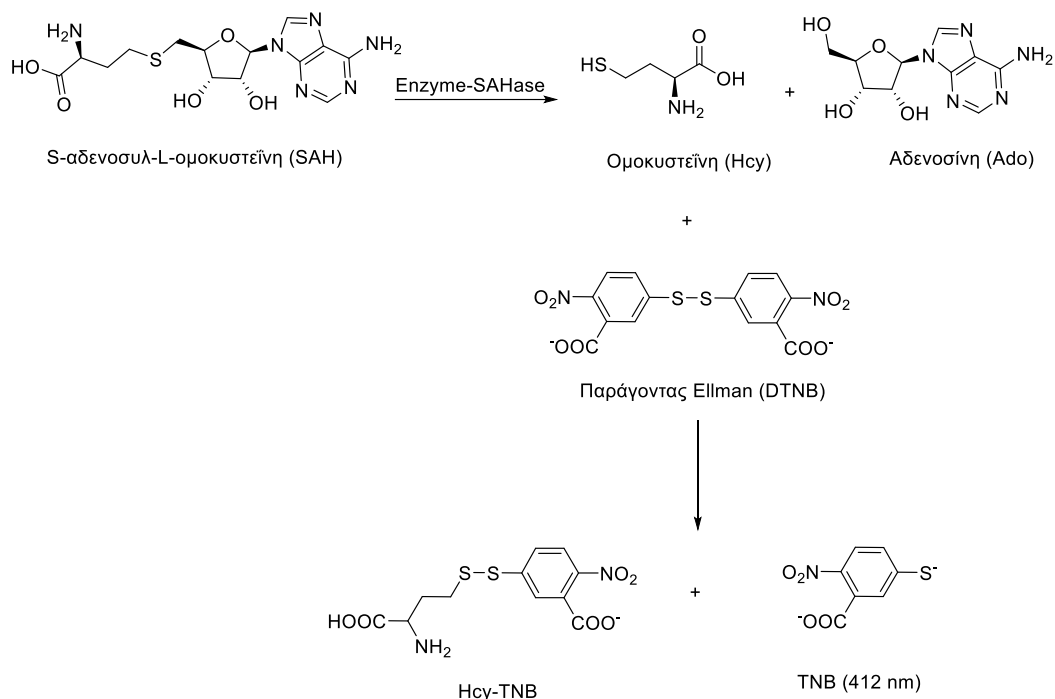
Η ακίνητοποίηση αποτελεί μια μέθοδο που φέρει πληθώρα πλεονεκτημάτων για τα ένζυμα. Ένας από τους τρόπους που μπορεί να πραγματοποιηθεί είναι και η μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση μέσω ανάπτυξη δεσμών συγγένειας, μέθοδος που χρησιμοποιείται και για τον καθαρισμό πρωτεϊνών. Ως φορέας ακίνητοποίησης, όπως έχει αναφερθεί, γίνεται χρήση νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου (Fe_3O_4), τα οποία είναι επικαλυμμένα με πολυντοπαμίνη και ιόντα νικελίου. Τονίζεται πως στην παρούσα εργασία, τα ένζυμα που υπερεκφράζονται διαθέτουν έναν επίτοπο έξι ιστιδινών, το λεγόμενο His-tag, είτε στο καρβοξυτελικό είτε στο αμινοτελικό τους άκρο. Η ακίνητοποίηση των His-tag ενζύμων στα νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου (Fe_3O_4), τα οποία είναι επικαλυμμένα με πολυντοπαμίνη και ιόντα νικελίου, επιτυγχάνεται μέσω των δεσμών ένταξης που σχηματίζει το νικέλιο με το άζωτο του ημιδαζολίου της ιστιδίνης, καθώς φέρουν υψηλή συγγένεια δέσμευσης (**Εικόνα 12**). Με αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται όχι μόνο η ακίνητοποίηση αλλά και ο καθαρισμός του εκάστοτε ενζύμου από το εκχύλισμα των βακτηριακών κυττάρων.

Η διαδικασία της ακίνητοποίησης-καθαρισμού του ενζύμου ξεκινά αφού προηγουμένως έχει γίνει η λύση των κυττάρων και η σύνθεση των νανοσωματιδίων, όπως έχει περιγράψει στις αντίστοιχες ενότητες. Λαμβάνονται 100 μL νανοσωματιδίων συγκέντρωσης 2 mg/mL και αναμειγνύονται με 1.900 μL υπερκείμενου υγρού προερχόμενο από την λύση των κυττάρων. Πραγματοποιείται μια ήπια ανάδευση και έπειτα επωάζονται στους 25°C με ανάδευση 750 rpm για 30 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 7 λεπτά στου 4°C και στις 4,000 στροφές, απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα νανοσωματίδια επαναιωρούνται σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος, το οποίο διαφέρει αναλόγως με το ένζυμο που έχει ακίνητοποιηθεί. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7.5 για τις O-MTs και 50 mM, pH 8.0 για την SAHase. Τονίζεται πως το υπερκείμενο μπορεί να αποθηκευτεί για περαιτέρω μελέτη σχετικά με το ποσοστό ακίνητοποίησης ή τη διαδικασία της SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης ή να απορριφθεί πλήρως. Εν συνεχεία, πραγματοποιείται ακόμη μία πλύση του νανοβιοκαταλύτη υπό τις ίδιες συνθήκες και τέλος επαναιωρείται σε 500 μL του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος. Η αποθήκευση του γίνεται στους -20°C.

8.2.8 Φωτομετρική ανίχνευσης ενζυμικής δραστηριότητας SAH υδρολάσων

Οι SAH υδρολάσες είναι ένζυμα τα οποία καταλύουν αντιδράσεις σύμφωνα με το **Σχήμα 13**. Η φωτομετρική ανίχνευση της δραστηριότητάς τους, προς την υδρολυτική κατεύθυνση, μπορεί να πραγματοποιηθεί με τον σχηματισμό κίτρινου χρώματος που οφείλεται στη διάσπαση του παράγοντα Ellman, δηλαδή του 5,5-Διθειο-δις-2-νιτροβενζοϊκού οξέος, όπως απεικονίζεται στο **Σχήμα 15**. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα υπό την παρουσία 50 μL ακίνητοποιημένου ή ελεύθερου ενζύμου προερχόμενο από το υπερκείμενο της κυτταρικής λύσης, 50 μM S-αδενυλικής ομοκυστεΐνης (SAH) που λειτουργεί ως υπόστρωμα και 100 μM παράγοντα Ellman σε τελικό όγκο 1 mL. Χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (50 mM, pH 8.0) και

επωάζεται στους 37°C για 5 λεπτά. Μέσω ενός φασματοφωτομέτρου τύπου Thermo Scientific Multiscan Sky σε UV μικροπλακίδιο 96 θέσεων πραγματοποιείται ανίχνευση του έγχρωμου προϊόντος στα 412 nm με δειγματοληψία 200 μL από την αντίδραση. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης (ϵ) του προϊόντος ανίχνευσης ισούται με $13,700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Σημειώνεται πως εάν μελετάται η δραστηριότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου πριν την φωτομέτρηση είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί μια φυγοκέντρωση στα 10,000 rpm για 2 λεπτά, προκειμένου να απομακρυνθεί ο νανοβιοκαταλύτης, ο οποίος είναι χρώματος μαύρο.



Σχήμα 15. Σχηματική πορεία αντιδράσεων φωτομετρικής ανίχνευσης της ενζυμικής δραστηριότητας της υδrolάσης της S-αδενοσυλ-L-ομοκυστεΐνης (SAHase). Το υπόστρωμα S-αδενοσυλ-L-ομοκυστεΐνη (SAH) υδrolύεται από το ένζυμο σχηματίζοντας ομοκυστεΐνη (Hcy) και αδενοσίνη (Ado). Η πρώτη αντιδρά με τον παράγοντα Ellman (DTNB) δημιουργώντας το χρωμοφόρο προϊόν TNB που απορροφά στα 412 nm.

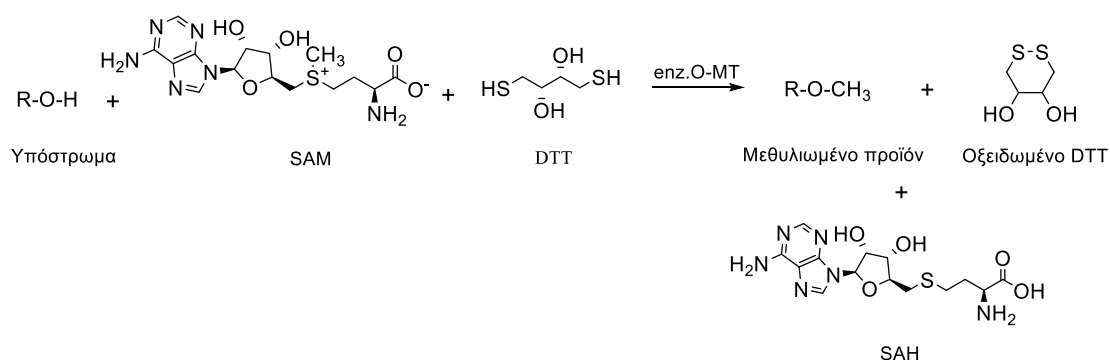
8.2.9 Φασματοσκοπία υπεριώδους (IR)

Μέσω της φασματοσκοπίας υπεριώδους (Infrared spectroscopy, IR) γίνεται η επαλήθευση ακινητοποίησης του ενζύμου στα νανοσωματίδια που χρησιμοποιούνται. Η τεχνική αυτή εκμεταλλεύεται την αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας με την ύλη μετρώντας απορρόφησης, καθώς κάθε μόριο απορροφά σε συγκεκριμένη ακτινοβολία στην περιοχή του υπεριώδους, οι οποίες αντιστοιχούν σε δονήσεις δεσμών, είτε κάμψης είτε έκτασης. Η προετοιμασία του κάθε δείγματος λαμβάνει χώρα αφού έχει προέλθει η ακινητοποίηση των ενζύμων και περιλαμβάνει την πλήρη απομάκρυνση του νερού, αρχικά με φυγοκέντρωση και απόρριψη του υπερκειμένου και έπειτα με ξήρανση με την χρήση συμπυκνωτή κενού SpeedVac DNA130 Vacuum Concentrator για περίπου 2 ώρες στους 4°C. Το στερεό δείγμα της πελέτας που αναλύεται παρασκευάζεται με την προσθήκη βρωμιούχου καλίου (KBr) και μίας μικρής ποσότητας δείγματος, συγκέντρωσης 1% w/w. Τα υλικά αυτά αναμιγνύονται σε γουδί, έτσι ώστε να πάρουν την μορφή πούδρας και στην συνέχεια δημιουργείται η πελέτα πάχους 7 mm με την

βοήθεια κατάλληλης πρέσας. Η ανάλυση πραγματοποιείται με εύρος συχνότητας φάσματος από 4,000-400 cm^{-1} και με 32 scans, αφού προηγουμένως έχει ληφθεί μέτρηση του υποβάθρου. Η επεξεργασία των φασμάτων γίνεται με τη χρήση του προγράμματος Spectra manager. Πραγματοποιείται λήψη φασμάτων τόσο του νανοβιοκαταλύτη όσο και του σκέτου φορέα ακινητοποίησης.

8.2.10 Ενζυμική τροποποίηση μεθυλίωσης των υποστρωμάτων

Οι ενζυμικές αντιδράσεις υλοποιούνται με σκοπό την μεθυλίωση των υπό μελέτη υποστρωμάτων. Για τις τροποποιήσεις μπορεί να χρησιμοποιηθεί το εκάστοτε ένζυμο σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή. Για αντίδραση τελικού όγκου 500 mL σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (50 mM, pH 7.5), χρησιμοποιούνται 250 μL κυτταρικού λύματος που περιέχει την υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη ή αντίστοιχη ποσότητα ακινητοποιημένου ενζύμου. Στο μείγμα της αντίδρασης περιέχονται επίσης το επιθυμητό υπόστρωμα σε συγκέντρωση 1 mM και 1 mM μόριο δότη της μέθυλο-ομάδας, δηλαδή του SAM. Λόγω ότι το παραπροϊόν της αντίδρασης SAH αναστέλλει ισχυρά τις μεθυλοτρανσφεράσες, το 25% του όγκου της αντίδρασης αντιστοιχεί σε κυτταρικό λύμα *E.coli* BL21, αφού προηγουμένως τα κύτταρα έχουν σπάσει σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (50 mM, pH 7.5), όπως αναφέρεται λεπτομερώς παραπάνω. Το κυτταρικό εκχύλισμα περιέχει την νουκλεοσιδάση του SAH απομακρύνοντας έτσι το παραπροϊόν και ελαχιστοποιώντας την αναστολή των ενζύμων. Σημαντικό επίσης, είναι ότι οι μεθυλοτρανσφεράσες που χρησιμοποιούνται έχουν ελεύθερες σουλφιδρυλικές ομάδες και προς αποφυγήν της δημιουργίας διαμοριακών και ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών που μπορεί να δημιουργήσουν πρόβλημα στη δραστηριότητα του ενζύμου, χρησιμοποιούνται 5 mM του αναγωγικού παράγοντα DTT. Η αντίδραση επωάζεται για 72 ώρες στους 28°C υπό ανάδευση στα 800 rpm και κάθε 24 ώρες προστίθεται 1 mM SAM. Τερματίζεται με προσθήκη οργανικού διαλύτη με αναλογία όγκου αντίδρασης-οργανικού διαλύτη 1:1. Η γενική σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης παρουσιάζεται στο **Σχήμα 16**.



Σχήμα 16. Γενική απεικόνιση της ενζυμικής μεθυλίωσης υποστρωμάτων με χρήση του αναγωγικού παράγοντα DTT.

8.2.11 Προετοιμασία δειγμάτων και ανάλυση ενζυμικής δραστηριότητας με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) επιλέγεται ως μία μέθοδος για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση ενζυμικών αντιδράσεων. Ο διαχωρισμός των προϊόντων και των υποστρωμάτων βασίζεται στην πολικότητα των ενώσεων και γίνεται με τη χρήση της στήλης μBondapak C18 (3.9X300 mm, 10 μm) ως στατική φάση και μείγματα μεθανόλης, ακετοννιτρίλιου για HPLC και υπερκάθολου νερού με 1% οξικό οξύ ως κινητή φάση, αναλόγως του δείγματος προς ανάλυση. Πιο συγκεκριμένα, για το υπόστρωμα της ισοευγενόλης ως κινητή φάση επιλέγεται μείγμα υπερκάθολου νερού με 1% οξικό οξύ και μεθανόλης για HPLC. Αρχικά, η αναλογία τους από τα 0-5 λεπτά είναι 40%:60%, έπειτα από τα 5-7 λεπτά 50%:50%, από τα 7-18 λεπτά 0%:100% και τέλος από τα 18-25 λεπτά είναι 40%:60%. Οι συνθήκες διεξαγωγής της ανάλυσης περιλαμβάνουν της ροή της κινητής φάσης που είναι 1 mL/min, σε θερμοκρασία 27°C και ανίχνευση στα 260 nm. Για τα λοιπά υποστρώματα, ως κινητή φάση χρησιμοποιείται μείγμα ακετοννιτρίλιου για HPLC και υπερκάθολου νερού με 1% οξικό οξύ. Η μέθοδος ανάλυσης ξεκινάει με αναλογία 5%:95% έως το 11^ο λεπτό, συνεχίζει με 100%:0% έως το 17^ο λεπτό και τελειώνει με αναλογία 5%:95% έως τα 30 λεπτά, με την θερμοκρασία στήλης να ανέρχεται στους 27°C, την ροή της στήλης στο 1 mL/min ενώ το μήκος κύματος ανίχνευσης εξαρτάται από τον εκάστοτε αναλυτή. Συγκεκριμένα, τα υποστρώματα της τυροσόλης, υδροξυτυροσόλης και της ρεσβερατρόλης ανιχνεύονται στα 280 nm, το καφεϊκό οξύ ανιχνεύεται στα 320 nm, η λουτεολίνη στα 346 nm ενώ τα υπόλοιπα φλαβονοειδή, δηλαδή μορίνη, φισετίνη και μυρικετίνη, στα 360 nm.

Η προετοιμασία του δείγματος προς ανάλυση απαιτεί πρώτα τον τερματισμό της ενζυμικής αντίδρασης. Έτσι σε 500 μL αντίδρασης προστίθεται 500 μL μεθανόλη για HPLC για το υπόστρωμα της ισοευγενόλης ή 500 μL ακετοννιτρίλιο για HPLC για τα υπόλοιπα υποστρώματα. Έπειτα, το δείγμα φυγοκεντρείται (13.000 rpm, 4 °C, 5 min) αφού προηγηθεί η ανάδυσή του. Με το πέρας της φυγοκέντρωσης, απομακρύνεται ο νανοβιοκαταλύτης, οι πρωτεΐνες από το κυτταρικό εκχύλισμα και ό,τι άλλο καθιζάνει και συλλέγεται το υπερκείμενο για περαιτέρω χρήση. Φιλτράρεται από φίλτρο με μέγεθος πόρων 0.22 μm έτσι ώστε να απομακρυνθεί ό,τι πρωτεϊνικό υπόλειμμα που έχει απομείνει και μικροσωματίδια και τέλος αραιώνεται με τον αντίστοιχο οργανικό διαλύτη. Η τελική συγκέντρωση του υποστρώματος της αντίδρασης στο δείγμα ανέρχεται στα 0.3 mM για την ισοευγενόλη, στα 0.25 mM για υποστρώματα των φλαβονοειδών και 0.50 mM για τα υπόλοιπα υποστρώματα. Η έγχυση του εκάστοτε δείγματος πραγματοποιείται με τη βοήθεια βελόνας στον κατάλληλο βρόγχο με όγκο 20 μL. Η έγχυση γίνεται αφού έχει επέλθει εξισορρόπηση του συστήματος με την κινητή φάση. Ο διαχωρισμός παρακολουθείται με τον ανιχνευτή UV, όπου γίνεται η ανίχνευση των αναλυτών. Το μήκος κύματος ανίχνευσης ποικίλει ανάλογα με το υπόστρωμα που μελετάται κάθε φορά. Πιο συγκεκριμένα, η ανίχνευση της ισοευγενόλης γίνεται στα 260 nm, της λουτεολίνης στα 346 nm, των υπόλοιπων φλαβονοειδών (μορίνη, φισετίνη, μυρικετίνη) στα 360 nm και της ρεσβερατρόλης, της

τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης στα 280 nm. Ο καθορισμός του χρόνου έκλυσης του κάθε αναλύτη γίνεται βάσει προτύπων, που έχουν προηγουμένως αναλυθεί με την κατάλληλη μέθοδο και η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων γίνεται βάσει της **Εξίσωσης 1**:

$$\text{Μετατροπή(\%)} = \frac{\text{Εμβαδόν}_{\text{Προϊόντος}}}{[\text{Εμβαδόν}_{\text{Υποστρώματος}} + \text{Εμβαδόν}_{\text{Προϊόντος}}]} \text{Εξίσωση (1)}$$

8.2.12 Προετοιμασία δειγμάτων για φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού πεδίου (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) βασίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή συχνοτήτων που είναι χαρακτηριστική για κάθε πυρήνα. Γίνεται χρήση της μεθόδου αυτής είτε για τον χαρακτηρισμό της δομής ενώσεων, δηλαδή την ταυτοποίησή τους, είτε για τη ποσοτικοποίησή τους. Για την ανάλυση των δειγμάτων, πραγματοποιούνται τουλάχιστον τρεις αντιδράσεις ενδιαφέροντος τελικού όγκου 500 μL , οι οποίες τερματίζονται με τον τρόπο που περιγράφεται στην παραπάνω παράγραφο και ενώνονται σε κοινό φιαλίδιο για να αυξήσουμε την τελική συγκέντρωση των προϊόντων. Ο οργανικός διαλύτης απομακρύνεται μέσω περιστροφικού εξατμιστήρα κενού (rotary vacuum flash evaporator), του οποίου η διάταξη παρουσιάζεται στην **Εικόνα 13**. Εν συνεχεία τα δείγματα συμπυκνώνονται περαιτέρω με την διαδικασία της λυοφιλίωσης όπου αφήνονται για περίπου 24 ώρες. Διαλυτοποιούνται εκ νέου σε 500 μL δευτεριωμένου διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO-d_6), φυγοκεντρούνται και το υπερκείμενο τοποθετείται σε σωληνάκια NMR 5 mm προς ανάλυση. Πραγματοποιήθηκε λήψη φασμάτων μιας διάστασης (1D ^1H -NMR) και δύο διαστάσεων (2D, ^{13}C -HSQC/HMBC) σε φασματογράφο NMR Bruker AV-500 εξοπλισμένο με αντίστροφο ανιχνευτή ευρείας ζώνης (broadband inverse probe, Bruker Biospin, Rheinstetten, Γερμανία) του Κέντρου Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στους 25 $^\circ\text{C}$. Η ανάλυση και επεξεργασία των φασμάτων έγινε με την βοήθεια του λογισμικού TopSpin 3.2.



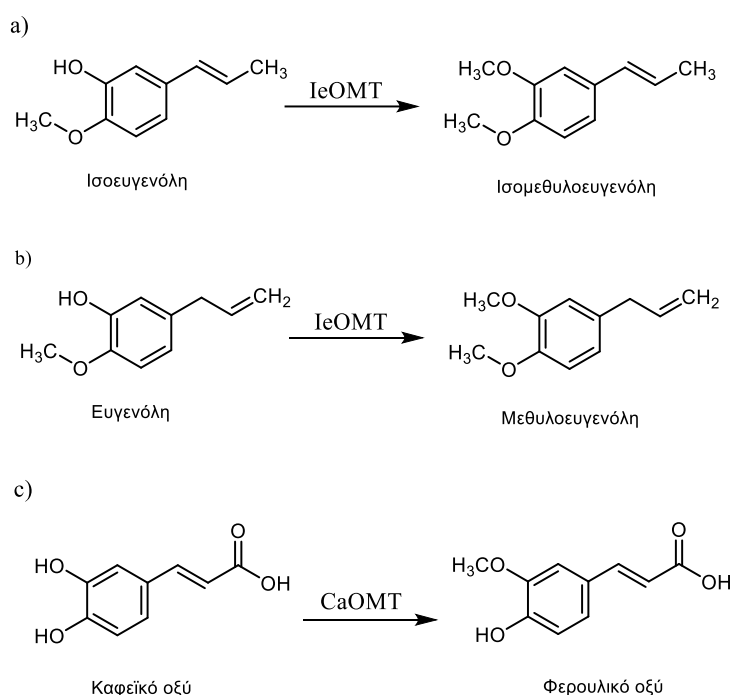
Εικόνα 13. Διάταξη περιστροφικού εξατμιστή κενού.

8.2.13 Προετοιμασία δειγμάτων και ανάλυση με φασματομετρία μάζας (MS)

Μια από τις αναλυτικές μεθόδους που βοηθά στην ταυτοποίηση και στο χαρακτηρισμό μια ένωσης είναι και η φασματομετρία μάζας (Mass Spectroscopy, MS). Η αναλυτική της ικανότητα βασίζεται στην θραυσματοποίηση των αναλυτών και στο διαχωρισμό τους βάσει του λόγου της μάζας προς το φορτίο (m/z). Προκειμένου να εφαρμοστεί αυτή η τεχνική, πραγματοποιείται προηγουμένως η αντίδραση ενδιαφέροντος τελικού όγκου 1 mL και ακολουθεί επεξεργασία του δείγματος, σύμφωνα με την διαδικασία που έχει περιγράψει για την επεξεργασία των δειγμάτων του NMR. Τονίζεται πως οι ενζυμικές αντιδράσεις που προορίζονται για την ανάλυση MS πραγματοποιούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα άλατος MOPS και όχι φωσφορικών. Η τελική του διαλυτοποίηση πραγματοποιείται με την προσθήκη 600 μ L καθαρής μεθανόλης. Χρησιμοποιείται αναλυτικό όργανο MS με φασματογράφο μάζας Advion που φέρει χημικό ιοντισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI) και τετράπολο αναλυτή μάζας απαρτιζόμενο από τέσσερις ράβδους ανά δύο παράλληλες και εκατέρωθεν. Με την χρήση ηλεκτρικών πεδίων και βάσει της αναλογίας μάζας- φορτίου (m/z) γίνεται ο επιθυμητός διαχωρισμός των ενώσεων, οι οποίες εν συνεχεία ανιχνεύονται μέσω ενός πολλαπλασιαστή ηλεκτρονίων. Κάθε ανάλυση πραγματοποιείται με συνθήκες τάσης τριχοειδούς 180 V, αντιστάθμιση τάσης της πηγής ιονισμού στα 25 V, το εύρος της τάσης της πηγής ιονισμού ανέρχεται στο 20 V, η θερμοκρασία της πηγής των αερίων στους 350°C, η θερμοκρασία του τριχοειδούς στους 200°C και το APCI Corona Discharge στα 5 μ A. Τέλος, η ροή του εκνεφωτικού αερίου (N_2) είναι 1.5 mL/min. Όλες οι αναλύσεις έλαβαν χώρα στο εργαστήριο Ελέγχου Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων και Ποτών, του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Αποτελέσματα και συζήτηση

Η παρούσα εργασία πραγματεύεται τη μελέτη ενζύμων που ανήκουν στην οικογένεια των μεθυλοτρανσφερασών και προέρχονται από τους οργανισμούς *Clarkia breweri* (IeOMT) και *Catharanthus roseus* (CaRoMT). Από το φυτό *Clarkia breweri* έχουν απομονωθεί δύο μεθυλοτρανσφεράσες αυτές του καφεϊκού οξέος (CaOMT) και της ισοευγενόλης (IeOMT)[169], οι οποίες εάν και μοιράζονται ένα μεγάλο ποσοστό ταυτόσιμης αμινοξικής αλληλουχίας, παρουσιάζουν διαφορετική εκλεκτικότητα και ως προς το υπόστρωμα αλλά και ως προς την τοποεκλεκτικότητα της μεθυλίωσης.[170] Η πρώτη εμφανίζει μεγαλύτερη προτίμηση σε υποστρώματα τύπου καφεϊκού οξέος με την μεθυλίωση να πραγματοποιείται σε meta-θέση (Σχήμα 17c), ενώ η δεύτερη δέχεται μόνο τα υποστρώματα της ισοευγενόλης και ευγενόλης με την μεθυλίωση να έχει τοποεκλεκτικότητα στη para-θέση. (Σχήμα 17a-17b)



Σχήμα 17. Απεικόνιση μεθυλίωσης της ισοευγενόλης, της ευγενόλης και του καφεϊκού οξέος από τα ένζυμα IeOMT και CaOMT. a) Μεθυλίωση της ισοευγενόλης μέσω του ενζύμου IeOMT προς παραγωγή ισομεθυλοευγενόλης. b) Μεθυλίωση της ευγενόλης μέσω του ενζύμου IeOMT προς παραγωγή μεθυλοευγενόλης c) Τοποεκλεκτική μεθυλίωση του καφεϊκού οξέος προς τη δημιουργία του meta-μεθυλωμένου παραγώγου, φερουλικού οξέος, με το ένζυμο CaOMT.

Γνωρίζοντας την αρχιτεκτονική του ενεργού κέντρου και των δύο αυτών ενζύμων, η ερευνητική ομάδα του Ι. Παυλίδη πραγματοποίησε μία μελέτη, όπου με αρωγό την πρωτεϊνική μηχανική διερευνήθηκε η επιρροή ορισμένων αμινοξικών καταλοίπων του ενεργού κέντρου της IeOMT στο είδος του υποστρώματος, στην ενζυμική δραστηριότητα και στην τοποεκλεκτικότητα της μεθυλίωσης.[171] Πιο συγκεκριμένα, προχώρησαν στη στοχευμένη μετάλλαξη τριών αμινοξέων του ενεργού κέντρου της IeOMT στις θέσεις 133-135 που αντιστοιχούν στα ανιμοξέα της θρεονίνης (T), της αλανίνης (A) και της θρεονίνης (T). Τα αμινοξέα αυτά αντικαταστάθηκαν από αυτά των μεθειονίνης (M), ασπαραγίνης (N) και γλουταμίνης (Q) δεδομένου ότι έχει αναφερθεί πως προσδίδουν τον χαρακτήρα της CaOMT στην IeOMT όσον αφορά στην

εξειδίκευση του υποστρώματος και της τοποεκλεκτικότητας, αφού τα συγκεκριμένα αμινοξέα εντοπίζονται στο ενεργό κέντρο της CaOMT στις θέσεις 135- 137.[170] Έλαβε χώρα τόσο η ταυτόχρονη τριπλή μετάλλαξη των παραπάνω αμινοξέων στην IeOMT, ο συνδυασμός T133M/A134N όσο και κάθε μίας ξεχωριστά. Ελέγχθηκε η ενζυμική δραστηριότητα των μεταλλαγμάτων ως προς μια πληθώρα απλών φαινολικών υποστρωμάτων και ταυτοποιήθηκαν τα προϊόντα μεθυλίωσης με σκοπό τον έλεγχο της εκλεκτικότητας της μεθυλίωσης. Παράλληλα ελέγχθηκε και η μεθυλοτρανσφεράση του καφεϊκού οξέος από τον οργανισμό *Catharanthus roseus* (CaRoMT WT), η οποία διαθέτει ακριβώς το ίδιο μοτίβο αμινοξέων στις θέσεις 135-137 με αυτήν της CaOMT από τον οργανισμό *Clarkia breweri*. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το μετάλλαγμα T133M ενισχύει σημαντικά την ενζυμική δραστηριότητα, δεχόμενο όλα τα υποστρώματα που μελετήθηκαν. Ωστόσο, χάνεται η τοποεκλεκτικότητα του στο καφεϊκό οξύ σε σύγκριση με την ισοευγενόλη και την ευγενόλη, αφού προκύπτει μείγμα μεθυλιωμένων προϊόντων τόσο μόνομεθυλιωμένων στις θέσεις para και meta όσο και του διμεθυλιωμένου, με την μεγαλύτερη προτίμηση να είναι στο para-μεθυλιωμένο προϊόν. Η μεμονωμένη μετάλλαξη A134N ενισχύει την τοποεκλεκτικότητα της μεθυλίωσης στη meta-θέση, ενώ η T135Q μειώνει σε μεγάλο βαθμό την ενζυμική δραστηριότητα. Τόσο ο συνδυασμός των δύο μεταλλάξεων όσο και η τριπλή μετάλλαξη έδειξαν βελτιωμένη δραστηριότητα σε όλα τα υποστρώματα σε σύγκριση με το ένζυμο άγριου τύπου (WT). Ωστόσο τη μεγαλύτερη δραστηριότητά φέρει η μετάλλαξη T133M με σημαντική την περίπτωση του καφεϊκού οξέος που έχει σχεδόν πανομοιότυπο ποσοστό μετατροπής του υποστρώματος με την CaRoMT WT που είναι φυσικό της υπόστρωμα.[171]

Στα πλαίσια αυτά, οι ερευνητές διεξήγαγαν περαιτέρω έρευνα αυτή τη φορά σε υποστρώματα φλαβονοειδών, μιας και το ένζυμο IeOMT WT είναι μία μεθυλοτρανσφεράση που μεθυλιώνει φαινυλοπροπανοειδή (POMT) εμφανίζοντας προτίμηση στο 3' υδροξύλιο υποστρωμάτων όπως η λουτεολίνη και η κερσετίνη. Κρατώντας την μετάλλαξη T133M της IeOMT που φέρει καθολική επίδραση της ενζυμικής δραστηριότητας στα φαινολικά υποστρώματα, προέβησαν σε διάφορες μεταλλάξεις στο αμινοξύ της λευκίνης (L) 322 και της τυροσίνης (Y) 326 με σκοπό την επίδραση της τοποεκλεκτικότητας ή/και της ενζυμικής δραστηριότητας εν συγκρίσει με τα δεδομένα που παρουσιάζει το ένζυμο άγριου τύπου (IeOMT WT). Η μετάλλαξη T133M έδειξε και εδώ καλή ικανότητα μεθυλίωσης των φλαβονοειδών υποστρωμάτων, εκ των οποίων ορισμένα δεν διαθέτουν υδροξύλιο στον άνθρακα 3' και η IeOMT WT δεν εμφανίζει δραστηριότητα. Πέραν τούτου, εμφάνισε αλλαγή στην τοποεκλεκτικότητα της αντίδρασης μεθυλιώνοντας τόσο την 4' θέση όσο και ταυτόχρονα τη 3' και 4'. Αξιοσημείωτα είναι και τα δεδομένα που παρουσιάζει η διπλή μετάλλαξη T133M/Y326L καθώς φέρει αρκετά σημαντική ενζυμική δραστηριότητα σε όλα τα υπό μελέτη υποστρώματα αλλά και διαφορετική τοποεκλεκτικότητα η οποία εξαρτάται και από το εκάστοτε υπόστρωμα που χρησιμοποιείται αλλά και από το χρόνο της αντίδρασης.[172]

Βάσει των παραπάνω δεδομένων, για την παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν τα ένζυμα IeOMT WT, IeOMT T133M, IeOMT T133M/Y326L και CaRoMT WT προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για την στοχευμένη τροποποίηση φυσικών ενώσεων, με σκοπό την βελτίωση της βιολογικής τους δράσης. Σε ένα γενικό πλαίσιο και δεδομένου των υποστρώματων που μελετήθηκαν τόσο στις προαναφερόμενες έρευνες όσο και σε αυτών που πραγματεύεται η παρούσα μελέτη, μπορεί να γίνει μια κατηγοριοποίηση των ενζύμων με τα IeOMT T133M και CaRoMT WT να χρησιμοποιούνται κυρίως για τα φαινολικά υποστρώματα και τα IeOMT WT και IeOMT T133M/Y326L για τα φλαβονοειδή.

Με τη μεθυλίωση να αποτελεί μια στρατηγική για τη βελτιστοποίηση των βιολογικών ιδιοτήτων ενώσεων στον κλάδο της φαρμακευτικής χημείας [173], επιλέχθηκαν να τροποποιηθούν φυσικά προϊόντα, καθώς διαθέτουν ποικίλες βιολογικές δράσεις. Αυτά εμπίπτουν στις κατηγορίες των φαινολικών ενώσεων, των φλαβονοειδών και των στυλβενίων. Πιο συγκεκριμένα, την πρώτη κατηγορία την εκπροσωπούν η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη, το καφεϊκό οξύ και η ισοευγενολή, την κατηγορία των φλαβονοειδών εκπροσωπούν η λουτεολίνη, η μορίνη, η μυρικετίνη και η φισετίνη, ενώ μοναδικός εκπρόσωπος των στυλβενίων είναι η ρεσβερατρόλη. Οι ενώσεις αυτές αποτέλεσαν τα υπό μελέτη υποστρώματα της παρούσας εργασίας, καθώς φέρουν φυσικά μεθυλιωμένα παράγωγα, τα οποία εμφανίζουν σημαντικές βιολογικές δράσεις [174-178], οι οποίες είναι βελτιωμένες αναφορικά με τις πρόδρομες ενώσεις. Στην παρούσα μελέτη στόχος ήταν η παραγωγή τόσο των ήδη υπαρχόντων μεθυλιωμένων φυσικών αναλόγων των παραπάνω ενώσεων που φέρουν σημαντικές βιολογικές δράσεις, όσο και νέων που μπορεί να φέρουν εξίσου ή βελτιωμένες βιολογικές δράσεις. Η διαφορετική τοποεκλεκτικότητα των ενζύμων/βιοκαταλυτών που χρησιμοποιήθηκαν μπορεί να συμβάλει στη δημιουργία ποικίλων νέων τροποποιημένων φυσικών προϊόντων με διαφοροποιημένες βιολογικές δράσεις.

Με σκοπό την τροποποίηση των φυσικών προϊόντων αναπτύχθηκαν αποτελεσματικοί βιοκαταλύτες μέσω της ακινητοποίησης των ενζύμων που αναφέρθηκαν παραπάνω σε μαγνητικά νανοσωματίδια. Πιο συγκεκριμένα, μέσω της ακινητοποίησης δίνεται η δυνατότητα χρήσης των ενζύμων σε διαφορετικές συνθήκες περιβάλλοντος (pH, θερμοκρασία) έναντι των φυσικών συνθηκών, σε οργανικούς διαλύτες και δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης. Υπάρχει πληθώρα επιλογών ως προς το φορέα ακινητοποίησης, με τα μαγνητικά νανοσωματίδια να κερδίζουν όλο ένα και περισσότερο την προσοχή των ερευνητών στην ακινητοποίηση διαφόρων ενζύμων [162]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι στρατηγικές που προσφέρουν ταυτόχρονο καθαρισμό και ακινητοποίηση των πρωτεϊνών με His-tag με τη χρήση νανοσωματιδίων. [168] Η στρατηγική αυτή έχει όμοιες αρχές με αυτές της χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC), μιας τεχνικής που χρησιμοποιείται ευρέως για τον καθαρισμό πρωτεϊνών που διαθέτουν την ετικέτα του His-tag και βασίζεται στην ανάπτυξη αναστρέψιμων αλληλεπιδράσεων μεταξύ ενός χηλικού μετάλλου και του His-tag των πρωτεϊνών. [179] Επιπλέον, τα νανοσωματίδια συγγένειας, πέρα από τις μαγνητικές ιδιότητες που παρουσιάζουν, δίνουν τη δυνατότητα τροποποίησης της

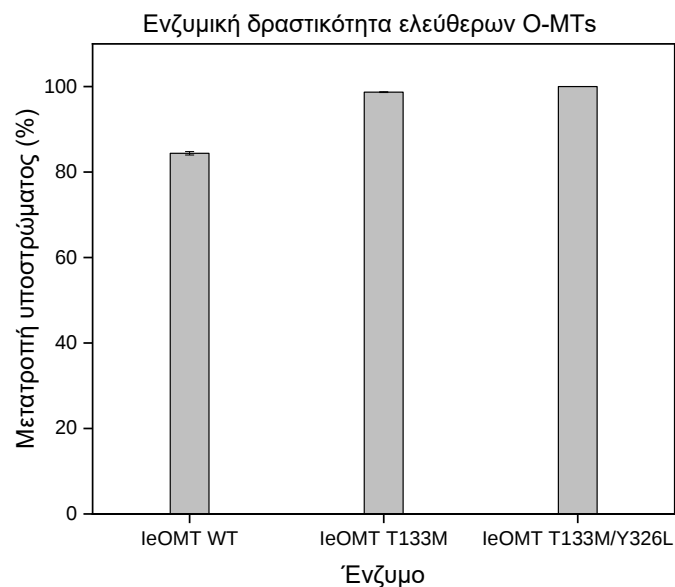
επιφάνειας τους με διάφορα βιοπολυμερή, όπως η πολυντοπαμίνη, αυξάνοντας έτσι την λειτουργικότητά τους, με μια τέτοια τροποποίηση να πλεονεκτεί έναντι αυτών που χρησιμοποιούν συμβατικά υλικά, όπως το νιτριλοτριωξικό οξύ (NTA), ως προς την απλότητα της σύνθεσης και του κόστους.[180] Επομένως, μια τέτοια μέθοδος ταυτόχρονου καθαρισμού και ακινητοποίησης ενζύμων προσφέρει την αποφυγή της κλασσικής διαδικασίας του καθαρισμού, μιας διαδικασίας αρκετά χρονοβόρας και κοστοβόρας ιδιαίτερα σε επίπεδο βιομηχανικής κλίμακας[181] αλλά και την απαραίτητη εκλεκτικότητα δέσμευσης που απαιτείται. Έτσι, πραγματοποιήθηκε η ακινητοποίηση των μεθυλοτρανσφερασών σε νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με πολυντοπαμίνη και νικέλιο II ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{polydopamine-Ni(II)}$).[168]

9.1 Έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας ελεύθερου ενζύμου μεθυλοτρανσφεράσης μέσω χρωματογραφίας HPLC

Έχοντας μετασχηματίσει τα κατάλληλα κύτταρα και συνεπώς υπερεκφράσει τα ένζυμα μέσω βακτηριακών κυτάρων *E.coli* BL21, μέλημα ήταν ο έλεγχος της δραστηριότητας των ενζύμων αυτών. Ως υπόστρωμα επιλέχθηκε η ισοευγενόλη για το ένζυμο IeOMT WT και τις μεταλλάξεις του (T133M, T133M/Y326L), ενώ το καφεϊκό οξύ για το ένζυμο CaRO WT, αφού αυτά αποτελούν φυσικά υποστρώματα για τα αντίστοιχα ένζυμα άγριου τύπου. Οι ενζυμικές αντιδράσεις διεξήχθησαν σε τελικό συνολικό όγκο 0.5 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (50 mM, pH 7.5), όπως περιγράφεται στην **Ενότητα 8.2.10**, για 24 ώρες. με 1 mM του εκάστοτε υποστρώματος, 1 mM δότη μεθυλομάδας SAM, 5 mM. Σημαντική καθίσταται η προσθήκη τόσο του DTT όσο και του κυτταρικού εκχυλίσματος *E.coli* BL21 για την απόδοση της αντίδρασης, καθώς με αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται η ανάπτυξη διαμοριακών και ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών στο ένζυμο με τη βοήθεια του DTT και επιπλέον απομακρύνεται το ανασταλτικό παραπροϊόν SAH μέσω των νουκλεοσιδάση του SAH που εμπεριέχεται στο κυτταρικό εκχύλισμα *E.coli*. Η ανίχνευση της ενζυμικής δραστηριότητας πραγματοποιήθηκε μέσω την αναλυτικής τεχνικής HPLC, με την μέθοδο ανάλυσης να διαφέρει αναλόγως με το υπόστρωμα, όπως αναγράφεται στην **Ενότητα 8.2.11**. Τονίζεται πως για κάθε αντίδραση, πραγματοποιήθηκε έλεγχος και ανάλυση του αντίστοιχου blank καθώς δεν χρησιμοποιήθηκε ακινητοποιημένη/καθαρισμένη πρωτεΐνη αλλά κυτταρικό εκχύλισμα που την περιείχε σε περίσσεια με την παρουσία όμως και άλλων πρωτεϊνών πέρα της επιθυμητής. Οι αποδόσεις των ενζυμικών τροποποιήσεων υπολογίσθηκαν σύμφωνα με την **Εξίσωση 1 (Ενότητα 8.2.11)**.

9.1.1 Αποτελέσματα ενζυμικής δραστηριότητας ελεύθερου ενζύμου IeOMT WT και των μεταλλάξεών του T133M και T133M/Y326L

Όπως αναφέρθηκε, η ενζυμική δραστηριότητα των ενζύμων IeOMT WT, IeOMT T133M και IeOMT T133M/Y326L βασίζεται στη μεθυλίωση της ισοευγενόλης (**Σχήμα 17a**), φυσικού υποστρώματος του ενζύμου άγριου τύπου. Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας μέσω παρακολούθησης της κατανάλωσης του υποστρώματος και της σύνθεσης των προϊόντων πραγματοποιείται μέσω ανάλυσης με χρωματογραφία HPLC.



Διάγραμμα 1. Ενζυμική δραστικότητα των ελεύθερων ενζύμων IeOMT WT, IeOMT T133M και IeOMT T133M/Y326L ως προς το υπόστρωμα της ισοευγενόλης. Οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (50 mM, pH 7.5), 1 mM ισοευγενόλη, 1 mM SAM, 5 mM DTT, 125 μ L κυτταρικού λύματος E.coli BL21 και 250 μ L κυτταρικού εκχυλίσματος με την υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη στους 28°C υπό ανάδευση για 24 h.

Στο **Διάγραμμα 1** παρουσιάζεται η ενζυμική δραστικότητα των ελεύθερων ενζύμων IeOMT WT και των μεταλλάξεων του. Μέσω της ανάλυσης HPLC ανιχνευτικό ένα μόνο προϊόν της κάθε αντίδρασης ξεχωριστά, πράγμα που επιβεβαιώνεται και από την βιβλιογραφία.[171] Στις συγκεκριμένες συνθήκες παρατηρήθηκαν υψηλές αποδόσεις τροποποίησης της ισοευγενόλης. Πιο συγκεκριμένα παρατηρείται πως υπάρχει αύξηση αυτής των μεταλλαγμάτων εν συγκρίσει με του άγριου τύπου, πράγμα που δικαιολογείται καθώς μέσω της πρωτεϊνικής μηχανικής επιτεύχθηκε η βελτίωση της καταλυτικής τους δραστικότητάς[171, 172]. Η απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης για το IeOMT WT ανέρχεται στο $84 \pm 0.4\%$, αυτής του IeOMT T133M στο $99 \pm 0.1\%$ και αυτής της διπλής μετάλλαξης T133M/Y326L στο 100 %. Τα αποτελέσματα της αυξημένης δραστικότητας σύμφωνα με την μετάλλαξη επιβεβαιώνονται βιβλιογραφικά, καθώς η μετάλλαξη T133M φέρει μεγαλύτερη καταλυτική δράση συγκριτικά με το ένζυμο άγριου τύπου [171]

9.1.2 Αποτελέσματα ενζυμικής δραστικότητας ελεύθερου ενζύμου CaRO WT

Το καφεϊκό οξύ αποτελεί φυσικό υπόστρωμα του ενζύμου CaRO WT για αυτό επιλέχθηκε προκειμένου να μελετηθεί η ενζυμική του δραστικότητα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το συγκεκριμένο ένζυμο είναι τοποεκλεκτικό ως προς την meta-θέση του καφεϊκού οξέος όπου και πραγματοποιείται η μεθυλίωση (**Σχήμα 17c**).[171] Πράγματι, η ανάλυση των δειγμάτων μέσω της HPLC έδειξε ένα μόνο προϊόν και με την απόδοση της αντίδρασης να είναι της τάξεως του $88 \pm 1.3\%$, επιβεβαιώνοντας έτσι τα βιβλιογραφικά δεδομένα. [171]

9.2 Ακίνητοποίηση μεθυλοτρανσφερασών σε νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με πολυντοπαμίνη και νικέλιο II

Υπάρχουν ελάχιστες βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με την ακίνητοποίηση των μεθυλοτρανσφερασών, μερικές από τις οποίες πραγματεύονται την ομοιοπολική τους σύνδεση σε πηκτή αγαρόζης συμπολυμερισμένης με ακρυλαμίδιο [182] ή σε σφαιρίδια 3M Emphaze ABI [183], με τις δύο αυτές μεθόδους να μην προσφέρουν το πλεονέκτημα της ανάκτησης του ενζύμου και της επαναχρησιμοποίησής του. Προκειμένου να ακίνητοποιηθούν τα υπό μελέτη ένζυμα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που προτείνεται από την επιστημονική ομάδα του Jianbing Yang, όπου ένζυμα που διαθέτουν ομάδα His-tag μπορούν να ακίνητοποιηθούν σε νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με πολυντοπαμίνη και νικέλιο II ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{polydopamine-Ni(II)}$). [168] Η ακίνητοποίηση βασίζεται την υψηλή συγγένεια δέσμευσης που παρουσιάζει το άζωτο του ημιδαζολίου της ιστιδίνης με το νικέλιο. (Εικόνα 12), έχοντας ως αποτέλεσμα τόσο τον καθαρισμό του ενζύμου από ένα μείγμα όσο και την ακίνητοποίησή του ταυτόχρονα.

9.2.1 Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου ακίνητοποίησης μεθυλοτρανσφερασών

Η ακίνητοποίηση ενζύμων σε νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με πολυντοπαμίνη και νικέλιο II ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{polydopamine-Ni(II)}$) αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης προηγουμένως στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και έτσι στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτόκολλα που αναπτύχθηκαν και ακολούθησε μελέτη βελτιστοποίησης της ακίνητοποίησης των μεθυλοτρανσφερασών ως προς την αναλογία ενζύμου νανοϋλικού και τον χρόνο επώασης

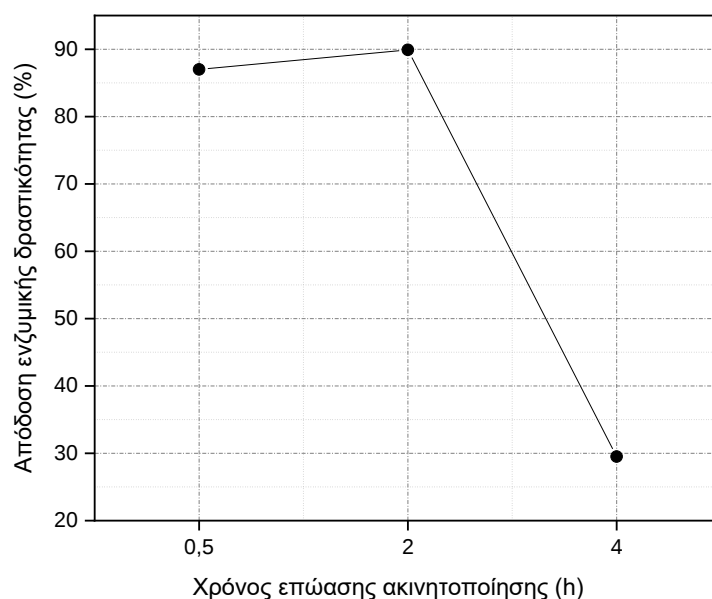
Για τη μελέτη της επίδρασης της αναλογίας ενζύμου-νανοϋλικού στην αποτελεσματικότητα του νανοβιοκαταλύτη πραγματοποιήθηκε μία σειρά πειραμάτων όπου η συγκέντρωση του νανοβιοκαταλύτη κρατήθηκε σταθερή στα 2 mg/mL και μεταβαλλόταν η συγκέντρωση του ενζύμου. Δεδομένου ότι δεν προηγήθηκε καθαρισμός του ενζύμου από το εκχύλισμα των κυττάρων, δεν ήταν γνωστή η ακριβής συγκέντρωσή του κάθε φορά. Για τον λόγο αυτό αναφέρεται η αναλογία νανοϋλικού-κυτταρικού εκχυλίσματος. Οι αναλογίες νανοϋλικού-κυτταρικού εκχυλίσματος που μελετήθηκαν ήταν 1:2 και 1:4. Οι αναλογίες αυτές προκύπτουν από την επαναιώρηση της κυτταρικής πελέτας που προήλθε από ίδιο όγκο καλλιέργειας συγκεκριμένης περιεκτικότητας σε βακτήρια σε διαφορετικό κάθε φορά όγκο ρυθμιστικού διαλύματος. Η αναλογία 1:2 αντιστοιχεί στην επαναιώρηση της πελέτας σε 5 mL ρυθμιστικού διαλύματος και η αναλογία 1:4 σε 2.5 mL. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 25°C υπό ανάδευση για 4 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης της ακίνητοποίησης, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του νανοβιοκαταλύτη και έλεγχος της ενζυμικής δραστηριότητας των ενζύμων μέσω της παρακολούθησης της αντίδρασης της τροποποίησης της ισοευγενόλης με HPLC. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα, Οι αποδόσεις της ενζυμικής τροποποίησης υπολογίστηκαν σύμφωνα με την Εξίσωση 1 (Ενότητα 8.2.11). Από τα δεδομένα του Πίνακα 7,

διαπιστώνεται ότι βέλτιστη αναλογία νανοϋλικού-κυτταρικού εκχυλίσματος είναι η 1:4 και αυτή χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις μελέτες.

Πίνακας 7. Παράθεση αποδόσεων (%) ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου IeOMT T133M ύστερα από ακινητοποίηση που έλαβε χώρα στους 25°C υπό ανάδευση για 4 h και με μεταβλητό παράγοντα την αναλογία νανοϋλικού-κυτταρικού εκχυλίσματος. Οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (50 mM, pH 7.5), 1 mM ισοευγενόλη, 1 mM SAM, 5 mM DTT, 125 μ L κυτταρικού λύματος E.coli BL21 και 250 μ L ακινητοποιημένης πρωτεΐνης στους 28°C υπό ανάδευση για 24 h. Οι τυπικές αποκλίσεις είναι μικρότερες του 5% σε όλες τις περιπτώσεις.

Αναλογία νανοϋλικού-κυτταρικού εκχυλίσματος	Μετατροπή υποστρώματος (%)
1:4	26
1:2	19

Επόμενο βήμα ήταν η μελέτη του χρόνου επώασης της ακινητοποίησης. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία και η αναλογία νανοϋλικού-κυτταρικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η 1:4, για το ένζυμο IeOMT T133M και το υπόστρωμα της ισοευγενόλης. Οι χρόνοι επώασης της ακινητοποίησης που μελετήθηκαν ήταν 30 λεπτά, 2 ώρες και 4 ώρες και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 2**.



Διάγραμμα 2. Διάγραμμα αποδόσεων (%) ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου IeOMT T133M συναρτήσει του χρόνου επώασης της ακινητοποίησης, η οποία έλαβε χώρα στους 25°C υπό ανάδευση με αναλογία νανοϋλικού-ενζύμου και με μελετώμενους χρόνους επώασης 0,5, 2 και 4 h. Οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (50 mM, pH 7.5), 1 mM ισοευγενόλη, 1 mM SAM, 5 mM DTT, 125 μ L κυτταρικού λύματος E.coli BL21 και 250 μ L ακινητοποιημένης πρωτεΐνης στους 28°C υπό ανάδευση για 24 h. Οι τυπικές αποκλίσεις είναι μικρότερες του 5% σε όλες τις περιπτώσεις.

Παρατηρείται πως ο χρόνος επώασης της ακινητοποίησης είναι πολύ σημαντικός στην απόδοση της δραστηριότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου. Παρατηρείται έντονη διαφορά στην απόδοση του ενζύμου για χρόνους επώασης ανάμεσα στις 0,5 και 2 ώρες με αυτή των 4 ωρών. Η χαμηλότερη δραστηριότητα εμφανίζεται στις 4 ώρες με την

απόδοση της αντίδρασης να ανέρχεται στο 30 %. Ωστόσο, μικρή είναι η διαφορά που υπάρχει στην ενζυμική δραστικότητα ανάμεσα στα 30 λεπτά και 2 ώρες, εμπίπτοντας στα πλαίσια του πειραματικού σφάλματος, αφού αυτή ανέρχεται στο 87 % για τα 30 λεπτά και στο 90 % για τις 2 ώρες. Λόγω της μικρής αυτής διαφοράς, επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί ο χρόνος των 30 λεπτών καθώς η διαδικασία είναι αρκετά αποτελεσματική και όχι τόσο χρονοβόρα έναντι της επώασης των 2 ωρών.

9.2.2 Έλεγχος δραστικότητας ακινητοποιημένων μεθυλοτρανσφερασών

Με γνώμονα τις παραπάνω βελτιστοποιήσεις, έγινε μία σύγκριση της δραστικότητας των ακινητοποιημένων ενζύμων IeOMT WT, IeOMT T133M και IeOMT T133M/Y326L ως προς την ικανότητά τους να τροποποιούν το υπόστρωμα της ισοευγενόλης. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές αντιδράσεις διάρκειας 24 ωρών σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (50 mM, pH 7.5), 1 mM υποστρώματος ισοευγενόλης, 1 mM SAM, 5 mM DTT, 125 μ L κυτταρικού λύματος *E.coli* BL21 και 250 μ L ακινητοποιημένου ενζύμου στους 28°C υπό ανάδευση. Μέσω χρωματογραφίας HPLC αναλύθηκαν οι αντιδράσεις και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 8**.

Πίνακας 8. Σύγκριση αποδόσεων (%) ενζυμικής δραστικότητας των ακινητοποιημένων ενζύμων IeOMT WT, IeOMT T133M και IeOMT T133M/Y326L ως προς το υπόστρωμα της ισοευγενόλης. Η ακινητοποίηση έλαβε χώρα υπό τις βέλτιστες συνθήκες των 30 min επώσης, αναλογία 1:4 νανοσωματιδίου-ενζύμου και στους 25°C. Οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (50 mM, pH 7.5), 1 mM ισοευγενόλη, 1 mM SAM, 5 mM DTT, 125 μ L κυτταρικού λύματος *E.coli* BL21 και 250 μ L ακινητοποιημένου ενζύμου στους 28°C υπό ανάδευση για 24 h. Οι τυπικές αποκλίσεις είναι μικρότερες του 5% σε όλες τις περιπτώσεις.

Ένζυμο	Απόδοση ενζυμικής δραστικότητας (%)
IeOMT WT	55
IeOMT T133M	63
IeOMT T133M/Y326L	80

Βάσει του παραπάνω πίνακα, φαίνεται πως υπάρχει μια αύξηση της ενζυμικής δραστικότητας του ενζύμου ως προς την τροποποίηση της ισοευγενόλης που σχετίζεται με τις μεταλλάξεις. Το ένζυμο άγριου τύπου (IeOMT WT), έχοντας ως φυσικό υπόστρωμα την ισοευγενόλη, παρουσιάζει 55 % απόδοση, η οποία είναι μικρότερη έναντι του ελεύθερου ενζύμου. Το ίδιο μοτίβο παρατηρείται και στην μετάλλαξη T133M όσον αφορά το ελεύθερο και το ακινητοποιημένο ένζυμο, με την ενζυμική δραστικότητα να ανέρχεται στο 63 % για το ακινητοποιημένο έναντι του 99 % για το ελεύθερο. Συνεπώς, η δραστικότητα που παρουσιάζουν τα ακινητοποιημένα ένζυμα είναι φανερά μειωμένη εν συγκρίσει με αυτή των ελεύθερων. Η μείωση αυτή συνδέεται με το γεγονός ότι στο μόριο του ενζύμου υφίστανται διαμορφωτικές αλλαγές ύστερα από την ακινητοποίηση του ή υπάρχουν φαινόμενα μεταφοράς μάζας, μειώνοντας έτσι την καταλυτική του ικανότητα.[184] Ωστόσο, όσον αφορά τη δραστικότητα των μεταλλαγμένων ενζύμων συγκριτικά με αυτή του άγριου τύπου και εδώ παρατηρούμε ότι οι μεταλλάξεις βελτίωσαν την καταλυτική ικανότητα του ενζύμου. Το ένζυμο άγριου τύπου παρουσιάζει χαμηλότερη δραστικότητα από αυτό της μονής μετάλλαξης T133M, πράγμα που επιβεβαιώνεται και βιβλιογραφικά με τη χρήση ελεύθερων

ενζύμων [171], ενώ η διπλή μετάλλαξη T133M/Y236L παρουσιάζει τη μεγαλύτερη δραστικότητα.

Αντίστοιχος έλεγχος δραστικότητας πραγματοποιήθηκε και για την μεθυλοτορρανσφεράση καφεϊκού οξέος CaRO WT. Η δραστικότητα του ακινητοποιημένου και του ελεύθερου ενζύμου στην συγκεκριμένη περίπτωση μελετήθηκε με την ανάλυση την ενζυμικής τροποποίησης του καφεϊκού οξέος που αποτελεί το φυσικό υπόστρωμα του εν λόγω ενζύμου. Η απόδοση της αντίδρασης για το ακινητοποιημένο ένζυμο ήταν της τάξεως του 80 %, τιμής μικρότερης από αυτής του ελεύθερου ενζύμου (βάλε την τιμή), πιθανόν λόγω φαινομένων μεταφοράς μάζας ή δομικών αλλαγών στο μόριο του ενζύμου που επιφέρει η ακινητοποίηση με αρνητικές συνέπειες στη δραστικότητά του.

9.2.3 Ακινητοποίηση των μεθυλοτορρανσφερασών σε νανοσωματίδια πολυντοπαμίνης και νιτριλοτριοξικού οξέος

Υπάρχουν ποικίλοι τύποι νανοσωματιδίων που προσφέρουν τη δυνατότητα ταυτόχρονου καθαρισμού και ακινητοποίησης ενζύμων που προέρχονται από ετερόλογη υπερέκφραση. Πέρα από τα μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με πολυντοπαμίνη και νικέλιο, χρησιμοποιούνται και νανοσωματίδια που έχουν ως επικάλυψη το νιτριλοτριοξικό οξύ (NTA) με ιόντα νικελίου[167, 185], το οποίο εφαρμόζεται στη χρωματογραφία IMAC. Έτσι στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σύνθεση νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου με Ni-NTA/H₂N-SiO₂ με σκοπό να διερευνηθεί ποιος φορέας ακινητοποίησης είναι πιο αποτελεσματικός για την ακινητοποίηση των μεθυλοτορρανσφερασών. Η ακινητοποίηση έλαβε χώρα υπό τις βελτιστοποιημένες συνθήκες στους 25°C με ανάδευση και για τον έλεγχο της ενζυμικής δράσης χρησιμοποιήθηκε η μελέτη της ενζυμικής τροποποίησης της ισοευγενόλης για το ένζυμο IeOMT WT, όπως περιγράφεται παραπάνω.

Πίνακας 9. Σύγκριση αποδόσεων (%) νανοσωματιδίων Fe₃O₄@polydopamine-Ni(II) και Fe₃O₄@Ni-NTA/H₂N-SiO₂ στην ακινητοποίηση του ενζύμου IeOMT WT. Οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (50 mM, pH 7.5), 1 mM ισοευγενόλη, 1 mM SAM, 5 mM DTT, 125 μ L κυτταρικού λύματος E.coli BL21 και 250 μ L ακινητοποιημένης πρωτεΐνης στους 28°C υπό ανάδευση για 24 h. Οι τυπικές αποκλίσεις είναι μικρότερες του 5% σε όλες τις περιπτώσεις.

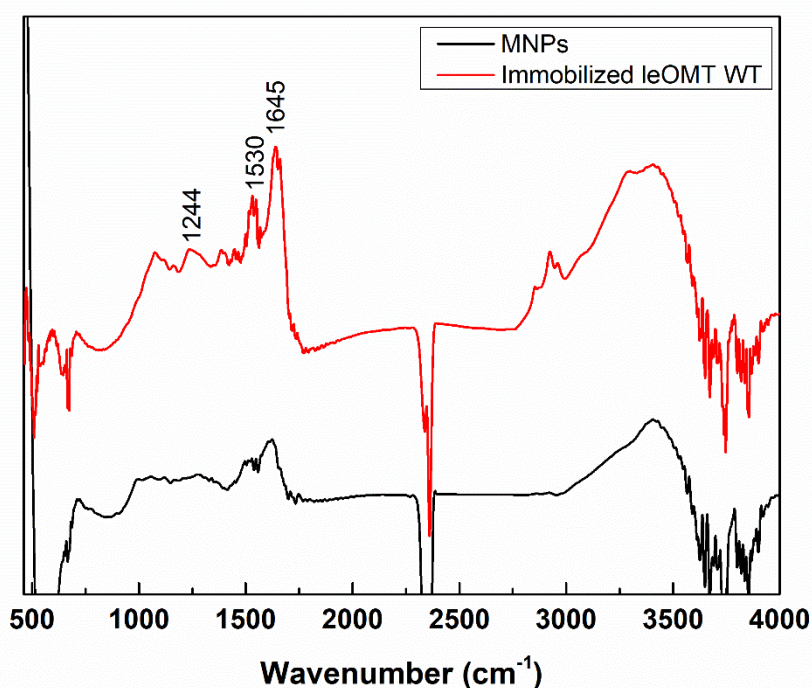
Νανοσωματίδιο	Απόδοση ενζυμικής δραστικότητας (%)
Fe ₃ O ₄ @polydopamine-Ni(II)	55
Fe ₃ O ₄ @Ni-NTA/H ₂ N-SiO ₂	48

Η ενζυμική δραστικότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου IeOMT WT όταν είναι ακινητοποιημένο σε νανοσωματίδια Fe₃O₄ πολυντοπαμίνης και νικελίου είναι ελαφρώς μεγαλύτερη (55%) συγκριτικά με αυτή όταν είναι ακινητοποιημένο σε νανοσωματίδια Ni-NTA/H₂N-SiO₂, (48%) όπως φαίνεται στον **Πίνακα 9**. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να οφείλεται είτε σε υψηλότερο ποσοστό ακινητοποίησης του ενζύμου στο πρώτο υλικό είτε στην καλύτερη δραστικότητα του ενζύμου στο συγκεκριμένο υλικό για λόγους που μπορούν να αφορούν τη διαμόρφωση του ή την καλύτερη διάχυση του υποστρώματος. Φαίνεται ότι τα νανοσωματίδια Fe₃O₄ πολυντοπαμίνης-νικελίου

πλεονεκτούν καθώς της αφενός η πολυντοπαμίνη συγκριτικά με το NTA χαρακτηρίζεται ως βιοπολυμερές που προσδίδει μεγαλύτερη βιοσυμβατότητα, αφετέρου η διαδικασία σύνθεσής αυτών των νανοσωματιδίων χρησιμοποιεί ήπια αντιδραστήρια και όχι τοξικά συγκριτικά με αυτή των NTA..

9.3 Χαρακτηρισμός νανοβιοκαταλύτη

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επιτυχής ακινητοποίηση του ενζύμου στα νανοσωματίδια, ο νανοβιοκαταλύτης αναλύθηκε με φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR). Για να αποδειχθεί η παρουσία του ενζύμου στο υπό μελέτη νανοϋλικό απαραίτητη προϋπόθεση είναι η εμφάνιση κορυφών στην περιοχή των $1200-1700\text{ cm}^{-1}$ που αντιστοιχούν στις ειδικές απορροφήσεις της αμιδικής ομάδας (amide I, II και III) καθώς υποδηλώνουν την ύπαρξη της μονάδας H-N-O-C.[186] Παρακάτω, παρατίθεται φάσματα FTIR του νανοϋλικού $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{polydopamine-Ni(II)}$ και του ακινητοποιημένου ενζύμου IeOMT WT στο νανοϋλικό $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{polydopamine-Ni(II)}$.



Εικόνα 14. Φάσματα υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR) MNPs $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{polydopamine-Ni(II)}$ (μαύρο), και ακινητοποιημένου ενζύμου IeOMT WT (κόκκινο).

Στην παραπάνω εικόνα, αποτυπώνονται τα φάσματα υπερύθρου του νανοϋλικού Fe_3O_4 -πολυντοπαμίνης-νικελίου (II) με μαύρο χρώμα και του νανοβιοκαταλύτη με το ένζυμο IeOMT WT με κόκκινο χρώμα. Στο φάσμα του νανοβιοκαταλύτη, είναι ευδιάκριτες κορυφές στα 1244, 1530 και 1645 cm^{-1} . Η κορυφή στα 1530 cm^{-1} αποδίδεται κυρίως στις δονήσεις κάμψης του δεσμού N-H στο επίπεδο και στη δόνηση

έκτασης του δεσμού N-C και που αντιστοιχούν στη ζώνη αμιδίου II. Στις ίδιες δονήσεις αντιστοιχεί και η κορυφή στα 1244 cm^{-1} , εκπροσωπώντας όμως τη ζώνη αμιδίου III. Η κορυφή στα 1645 cm^{-1} εκπροσωπεί τη ζώνη αμιδίου I καθώς αποδίδεται στις δονήσεις έκτασης του δεσμού C=O.[187] Βάσει λοιπόν της παρουσίας των παραπάνω κορυφών, επιβεβαιώνεται η επιτυχής ακινητοποίηση του ενζύμου στα νανοσωματίδια Fe_3O_4 -πολυντοπαμίνης-νικελίου (II), καθώς αυτές δεν εντοπίζονται στο αντίστοιχο φάσμα των νανοσωματιδίων.

9.4 Αποτελέσματα ενζυμικής μεθυλίωσης σε φαινολικά υποστρώματα

Με τη μεθυλίωση να αποτελεί μία ελκυστική τεχνική για την παραγωγή βιοδραστικών μορίων, επιλέχθηκαν να τροποποιηθούν ενώσεις που αποτελούν φυσικά προϊόντα όπως φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή, οι οποίες είναι ευρέως γνωστές για τις πολυάριθμες βιολογικές τους δράσεις. Πιο συγκεκριμένα γίνεται λόγος για τις ενώσεις του καφεϊκού οξέος, της τυροσόλης, της υδροξυτυροσόλης, της λουτεολίνης, της μορίνης, της μυρικετίνης, της φισετίνης και της ρεσβερατρόλης, οι οποίες φέρουν αξιοσημείωτες βιολογικές δράσεις, όπως παραδείγματος χάριν αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων τους, καθίστανται σημαντικές ενώσεις και συνεπώς η τροποποίησή τους με μεθυλίωση μπορεί να εμφανίζει προϊόντα με ανάλογες ή και βελτιστοποιημένες δράσεις.[188] Οι ενζυμικές αντιδράσεις χαρακτηρίζονται από υψηλή τόπο και στέρεο-εκλεκτικότητα γεγονός που δίνει τη δυνατότητα παραγωγής διαφόρων αναλόγων των φυσικών προϊόντων που μπορεί να εμφανίσουν διαφοροποιημένη βιολογική δράση. Σκοπός αυτής της μελέτης είναι η τροποποίηση της δομής των φυσικών προϊόντων με σκοπό την βελτίωση των ήδη υπάρχοντων βιολογικών ιδιοτήτων τους ή ακόμη και την προσθήκη νέων. Παράλληλα, η βιοκατάλυση αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο καθώς χαρακτηρίζεται από υψηλή τοποεκλεκτικότητα και υπόσχεται σχετικά υψηλές αποδόσεις προϊόντων.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι νανοβιοκαταλύτες που αναπτύχθηκαν στην τροποποίηση των λουτεολίνης, μορίνης, φισετίνης, μυρικετίνης, καφεϊκού οξέος, τυροσόλης, υδροξυτυροσόλης και ρεσβερατρόλης. Όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις έγιναν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (50 mM, pH 7.5), 1 mM υποστρώματος, 1 mM SAM, 5 mM DTT, 125 μL κυτταρικού λύματος *E.coli* BL21 και 250 μL ακινητοποιημένου ενζύμου στους 28°C υπό ανάδευση. Έπειτα, αναλύθηκαν ποιοτικά μέσω της χρωματογραφίας HPLC και ορισμένες εξ αυτών αναλύθηκαν περαιτέρω με MS και εν συνεχεία με NMR, προκειμένου να παρθεί το δακτυλικό αποτύπωμα του κάθε προϊόντος για να μπορέσει να χαρακτηριστεί.

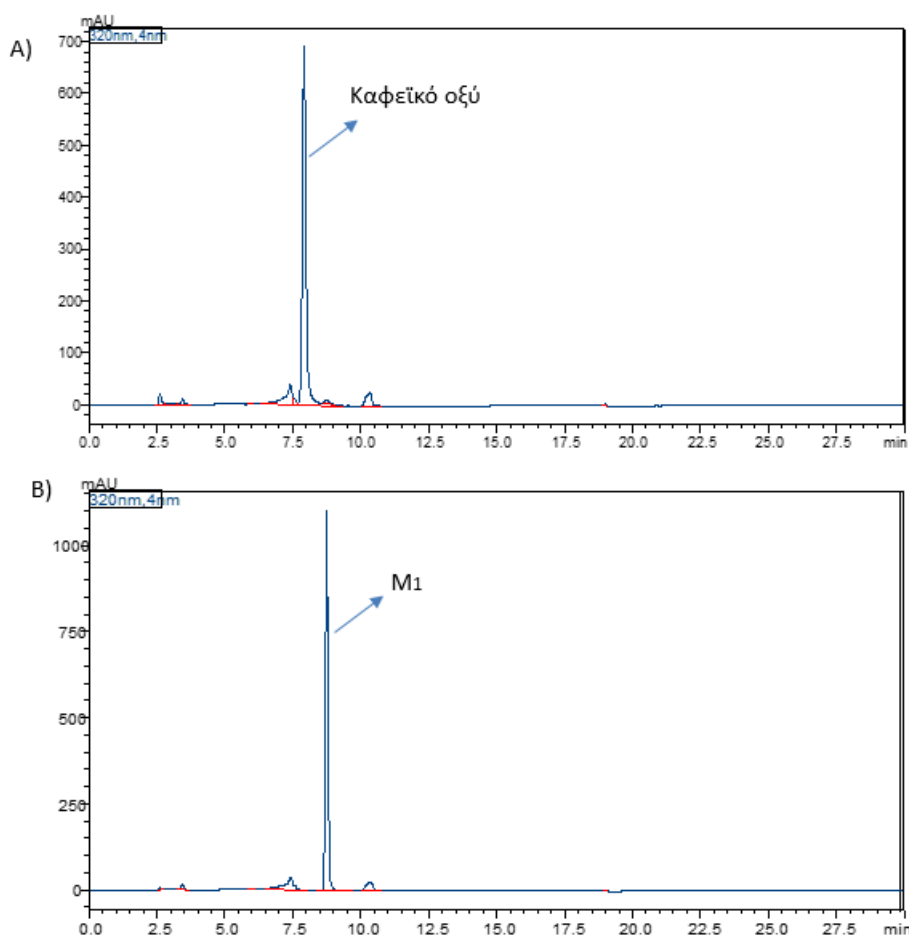
9.4.1 Μελέτη της ενζυμικής μεθυλίωσης του καφεϊκού οξέος

Όπως έχει εξηγηθεί παραπάνω, για τα μικρά φαινολικά υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν κυρίως το ένζυμο CaRO WT και το IeOMT T133M στην ακινητοποιημένη τους μορφή, με το δεύτερο να φέρει χαρακτήρα μεθυλοτρανσφεράσης καφεϊκού οξέος με διαφορετική τοποεκλεκτικότητα με τη βοήθεια της πρωτεϊνικής μηχανικής.[171] Έχοντας ήδη μελετηθεί αυτή η τροποποίηση με τα ελεύθερα ένζυμα [171], στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η καταλυτική

ικανότητα των ενζύμων στην τροποποίηση του καφεϊκού οξέος μετά την ακινητοποίησή τους. Οι αντιδράσεις ενζυμικής τροποποίησης επωάστηκαν για 48 ώρες και στη συνέχεια αναλύθηκαν με χρωματογραφία HPLC. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις υποενότητες 9.4.1.1 και 9.4.1.2.

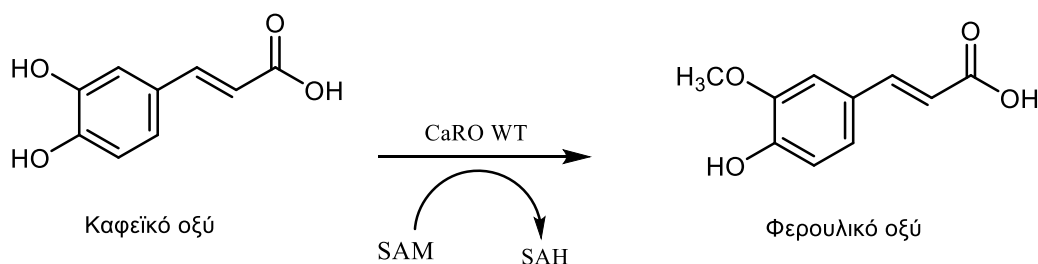
9.4.1.1 Αποτελέσματα HPLC της μεθυλίωσης καφεϊκού οξέος από το ένζυμο CaRO WT

Η αντίδραση μεθυλίωσης του καφεϊκού οξέος από το ακινητοποιημένο ένζυμο CaRO WT επωάστηκε συνολικά για 48 ώρες και υ πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία στις 24 ώρες και έπειτα συνεχίστηκε η αντίδραση για επιπλέον 24 ώρες με την προσθήκη επιπλέον δότη μεθυλομάδας, SAM. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης HPLC έδειξαν ότι στις 24 ώρες η απόδοση της αντίδρασης ανέρχεται στο 80 % και στις 48 ώρες το υπόστρωμα έχει καταναλωθεί σχεδόν πλήρως και έχει προκύψει μία νέα κορυφή που ανήκει στον προϊόν (M1) με την απόδοση να είναι της τάξεως του 100 %. Ενδεικτικά, στην **Εικόνα 15** παρουσιάζεται χρωματογράφημα HPLC τόσο του πρότυπου υποστρώματος από αντίδραση απουσία ενζύμου (blank) (**Εικόνα 15A**), όσο και της αντίδρασης 48 ωρών που φαίνεται η κορυφή του προϊόντος M₁.(**Εικόνα 15B**)



Εικόνα 15. A) Χρωματογράφημα αντίδρασης απουσία ενζύμου του καφεϊκού οξέος με t_r 7.9 min. B) Χρωματογράφημα της ενζυμικής μεθυλίωσης του καφεϊκού οξέος από το ένζυμο CaRO WT, με το t_r του προϊόντος (M₁) να ισούται με 8.7 min και την απόδοση της αντίδρασης στο 100 υστέρα από 48 ώρες επώασης.

Είναι εμφανές ότι υπήρξε πλήρη μετατροπή του υποστρώματος, το οποίο εμφανίζει χρόνο έκλουσης στα 7.9 min, σχηματίζοντας ένα μεθυλιωμένο προϊόν που δίνει σήμα ανίχνευσης περίπου στα 8.7 min. Δεδομένου ότι η συγκεκριμένη αντίδραση έχει μελετηθεί από τους Tang Q., Bornscheur U.T. και Pavlidis I.V. και έχει ταυτοποιηθεί το προϊόν ως το meta-μεθυλιωμένο [171] και συνδυάζοντας τα αποτελέσματα της HPLC, η ενζυμική τροποποίηση του καφεϊκού οξέος από το ένζυμο CaRO WT γίνεται σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 18. Αντίδραση μεθυλίωσης του καφεϊκού οξέος μέσω του ενζύμου CaRO WT με την παραγωγή του meta-μεθυλιωμένου προϊόντος, δηλαδή του φερουλικού οξέος.

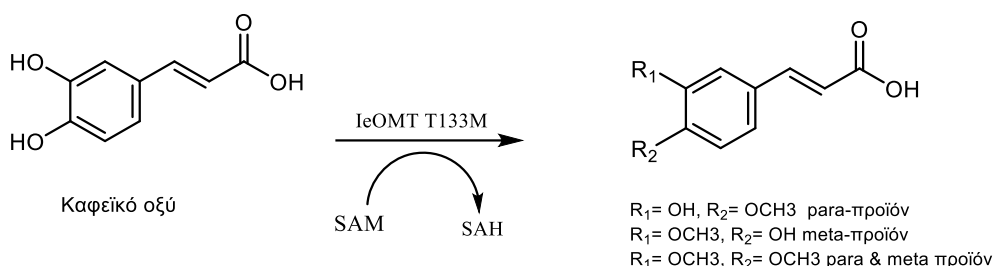
Η τοποεκλεκτικότητα της αντίδρασης είναι προς την meta-θέση του καφεϊκού οξέος, δημιουργώντας το 4-υδροξυ-3-μεθοξυκινναμικό οξύ, δηλαδή του φερουλικού οξέος. Η ένωση αυτή είναι ευρέως μελετημένη καθώς παρουσιάζει σημαντικές βιολογικές δράσεις ενώ απαντάται και ως φυσικό προϊόν [189]. Η ενζυμική της παραγωγή αναφέρεται βιβλιογραφικά κυρίως από την υδρόλυση της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας [190, 191], αφού αποτελεί δομικό λίθο αυτής, ενώ δεν γίνεται λόγος παραγωγής του από το καφεϊκό οξύ.

9.4.1.2 Αποτελέσματα HPLC της μεθυλίωσης καφεϊκού οξέος από το ένζυμο IeOMT T133M

Από το χρωματογράφημα (**Παράρτημα**) της αντίδρασης του καφεϊκού οξέος με το ακινητοποιημένο ένζυμο IeOMT T133M φαίνεται η ύπαρξη δύο προϊόντων μεθυλίωσης, με το ένα να εμφανίζει έντονη κορυφή στα 8.7 min και το δεύτερο μία πιο μικρής έντασης στα 9.5 min. Η απόδοση της αντίδρασης ελέγχθηκε στις 24 και στις 48 ώρες με την συνολική απόδοση να ανέρχεται στο 53 % και 84 %, αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα, για το πρώτο 24ωρο η απόδοση του πρώτου προϊόντος που εμφανίζεται στα 8.7 min ανέρχεται στο 50 % και του δεύτερου στο 3 %, ενώ στις 48 ώρες αυτές μετατρέπονται σε 71 % και 12 %.

Βάσει βιβλιογραφίας, η αντίδραση αυτή έχει τρία προϊόντα με το κύριο να αποτελεί το para-μεθυλιωμένο προϊόν και δευτερεύοντα το meta-μεθυλιωμένο και το διμεθυλιωμένο σε θέσεις para και meta, με το τελευταίο να έχει τη μικρότερη απόδοση. [171] Η μέθοδος της HPLC είναι μια τεχνική η οποία δεν δίνει τη δυνατότητα να χαρακτηριστούν τα προϊόντα μιας αντίδρασης καθώς ο διαχωρισμός βασίζεται στην πολικότητα μιας ένωσης. Συνεπώς δεν καθίσταται δυνατός ο διαχωρισμός δύο ενώσεων που εμφανίζουν συντακτική ισομέρεια. Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω μαζί με τα αποτελέσματα της HPLC, φαίνεται πως στην πρώτη κορυφή (8.7 min) υπάρχουν δύο προϊόντα τα οποία έχουν μεθυλωθεί στις θέσεις meta και para για αυτό

και είναι μεγάλης έντασης, ενώ η κορυφή στα 9.5 min αντιστοιχεί στο διμεθυλιωμένο προϊόν. Η αντίδραση του καφεϊκού οξέος με το ένζυμο IeOMT T133M καθώς και τα προϊόντα που σχηματίζονται, παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα.



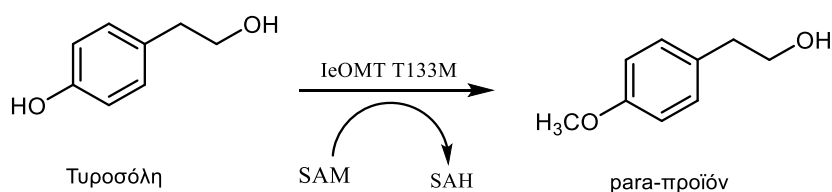
Σχήμα 19. Αντίδρασης μεθυλίωσης του καφεϊκού οξέος από το ένζυμο IeOMT T133M προς παραγωγή μείγμα προϊόντων με κύριο το μονομεθυλιωμένο στην para-θέση και δευτερεύοντα το μονομεθυλιωμένο στη meta-θέση και το διμεθυλιωμένο σε para και meta θέση.

9.4.2 Μελέτη της ενζυμικής μεθυλίωσης της τυροσόλης

Η τυροσόλη εμφανίζει πληθώρα βιολογικών δράσεων και γίνεται χρήση αυτής με μεγάλη συχνότητα. Λόγω της δομής της (**Σχήμα 2**) επιλέχθηκαν τα ένζυμα CaRO WT και IeOMT T133M στην ακινητοποιημένη τους μορφή με σκοπό την στοχευμένη τροποποίηση της. Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα για 48 ώρες και αρχικά μελετήθηκαν μέσω HPLC για έναν πρώτο ποιοτικό έλεγχο. Ωστόσο, η αντίδραση με το ένζυμο CaRO WT φάνηκε να μη δίνει κάποιο προϊόν, γεγονός αναμενόμενο καθώς το ένζυμο αυτό είναι τοποεκλεκτικό ως προς την meta-θέση[171] και η δομή της τυροσόλης δεν εμφανίζει υδροξύλιο στη θέση αυτή. Για το λόγο αυτόν, πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω μελέτες MS και NMR μόνο για την ενζυμική τροποποίηση της τυροσόλης από το ένζυμο IeOMT T133M. Τονίζεται πως η τροποποίηση της τυροσόλης με τα συγκεκριμένα ένζυμα πραγματοποιείται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία.

9.4.2.1 Αποτελέσματα HPLC της μεθυλίωσης της τυροσόλης από το ένζυμο IeOMT T133M

Το χρωματογράφημα της αντίδρασης έδειξε την ύπαρξη ενός προϊόντος. Πιο συγκεκριμένα, η τυροσόλη εκλύεται σε χρόνο 7.6 min ενώ το προϊόν σε χρόνο περίπου 8.1 min το οποίο εμφανίζει μικρής έντασης κορυφή (**Παράρτημα**). Η απόδοσή της αντίδρασης μετά το πέρας των 48 ωρών ανέρχεται στο 19 %. Δεδομένου ότι το συγκεκριμένο ένζυμο μπορεί να δώσει meta-μεθυλιωμένο προϊόν στο καφεϊκό οξύ[171] και ότι η τυροσόλη διαθέτει ένα μόνο υδροξύλιο στο φαινολικό της δακτύλιο σε θέση para, πιθανώς το προϊόν της αντίδρασης να είναι το para-μεθυλιωμένο. (**Σχήμα 20**) Ωστόσο, για να αποδειχθεί κάτι τέτοιο, απαιτούνται περαιτέρω αναλύσεις με MS και NMR προκειμένου να γίνει πλήρως ο χαρακτηρισμός.



Σχήμα 20. Πιθανή αντίδραση μεθυλίωσης της τυροσόλης από το ένζυμο IeOMT T133M.

9.4.2.2 Αποτελέσματα MS της μεθυλίωσης της τυροσόλης από το ένζυμο IeOMT T133M

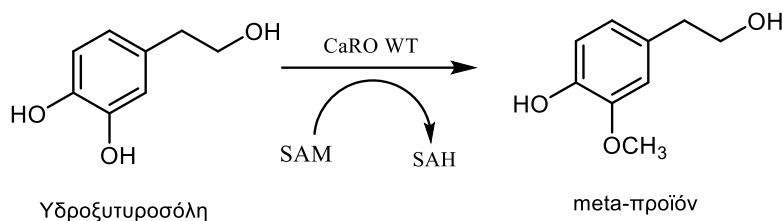
Η ανάλυση MS δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού του μοριακού τους βάρους του προϊόντος. Η ανάλυση ανέδειξε την ύπαρξη πέντε κορυφών διαφορετικής εντάσεως (**Παράτημα**) που αποδίδονται στις ενώσεις που υπάρχουν αλλά και δημιουργούνται κατά την ενζυμική αντίδραση. Η τυροσόλη που δεν αντέδρασε αντιστοιχεί στην κορυφή με λόγο m/z 139.1, ενώ οι κορυφές στα 153.0 m/z , 155.0 m/z και 385.1 m/z αντιστοιχούν στην οξειδωμένη μορφή του DTT, στο DTT και στο παραπροϊόν SAH. Μάλιστα αυτές που αφορούν το DTT και στις δυο μορφές είναι υψηλής έντασης καθώς το DTT χρησιμοποιείται σε μεγάλη συγκέντρωση. Τέλος, το αποτύπωμα του μονομεθυλιωμένου προϊόντος δίνεται με μια κορυφή στα 153.1 m/z

9.4.3 Μελέτη της ενζυμικής μεθυλίωσης της υδροξυτυροσόλης

Για την στοχευμένη τροποποίηση της υδροξυτυροσόλης επιλέχθηκαν τα ακινητοποιημένα ένζυμα CaRO WT και IeOMT T133M λόγω της δομής της (**Σχήμα 3**), η οποία ανήκει στα φαινολικά υποστρώματα και φέρει δομικά προς το καφεϊκό οξύ το οποίο έχει τροποποιηθεί επιτυχώς από τα συγκεκριμένα ένζυμα.[171] Μεθυλιωμένο παράγωγό της απαντάται στη φύση, το οποίο είναι η 3-υδροξυ-4-μεθοξυφαιναιθυλική αλκοόλη ή διαφορετικά ομοβανιλυλική αλκοόλη, εμφανίζοντας σημαντικές βιολογικές δράσεις [174], με την σύνθεσή της να αναφέρεται κυρίως με χημικές μεθόδους.[174, 192] Επιπλέον, ένα ακόμη μεθυλιωμένο παράγωγο της υδροξυτυροσόλης, η 4-υδροξυ-3-μεθοξυφαιναιθυλική αλκοόλη, έχει ανιχνευτεί ως μεταβολίτης της. [193] Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν για 48 ώρες, ενώ πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία και στις 24 ώρες. Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις HPLC, MS και NMR με σκοπό να γίνει ο πλήρης χαρακτηρισμός των προϊόντων καθώς για πρώτη φορά η υδροξυτυροσόλη μεθυλιώνεται από τα συγκεκριμένα ένζυμα

9.4.3.1 Αποτελέσματα HPLC της μεθυλίωσης της υδροξυτυροσόλης από το ένζυμο CaRO WT

Η ανάλυση HPLC ανέδειξε την κορυφή ενός προϊόντος κατά την τροποποίηση της υδροξυτυροσόλης από το ένζυμο CaRO WT. Ο χρόνος έκλουσης του υποστρώματος αντιστοιχεί περίπου στα 6.9 min, ενώ αυτός του προϊόντος στα 7.8 min. Κατά το πρώτο 24ωρο της αντίδρασης, η απόδοση ανέρχεται στο 60 % και έπειτα στις 48 ώρες αυξάνεται στο 76 %. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 3**, η υδροξυτυροσόλη διαθέτει δύο υδροξύλια στον φαινολικό της δακτύλιο στις θέσεις meta και para. Με το ένζυμο CaRO WT να πραγματοποιεί αντιδράσεις τοποεκλεκτικότητας meta [171], πιθανόν το προϊόν της αντίδρασης να είναι το meta-μεθυλιωμένο, ήτοι η ομοβανιλυλική αλκοόλη.(**Σχήμα 21**)



Σχήμα 21. Πιθανή αντίδραση μεθυλίωσης της υδροξυτυροσόλης από το ένζυμο CaRO WT.

9.4.3.2 Αποτελέσματα MS της μεθυλίωσης της υδροξυτυροσόλης από το ένζυμο CaRO WT

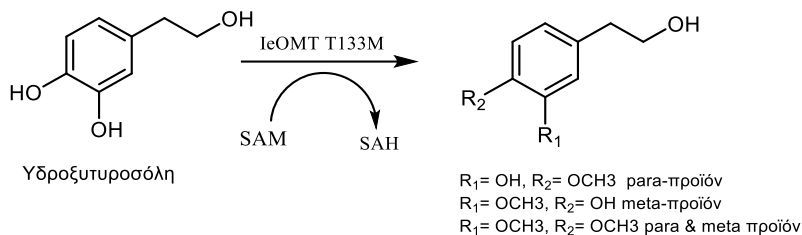
Σημαντική είναι η συνεισφορά του MS στην ταυτοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης. Όπως σε κάθε αντίδραση μεθυλίωσης που μελετάται στην παρούσα εργασία, έτσι και στην προκειμένη εμφανίζονται κορυφές που αποδίδονται στο DTT, στην οξειδωμένη του μορφή και στο SAH, οι οποίες αντιστοιχούν στα 155.1 m/z, 153.0 m/z και 385.1 m/z. Στο χρωματογράφημα (**Παράρτημα**) εμφανίζεται μία κορυφή στα 155.1 m/z που αντιπροσωπεύει την υδροξυτυροσόλη που δεν έχει καταναλωθεί. Ο εντοπισμός του σήματος 169.1 m/z εκπροσωπεί την ύπαρξη ενός μονομεθυλιωμένου προϊόντος, ενισχύοντας την εικασία ότι αυτό μπορεί να είναι το meta-μεθυλιωμένο. Προκειμένου όμως τούτο να επιβεβαιωθεί, είναι απαραίτητη η λήψη φασμάτων NMR όπου θα δώσουν το δακτυλικό αποτύπωμα του προϊόντος.

9.4.3.3 Αποτελέσματα HPLC της μεθυλίωσης της υδροξυτυροσόλης από το ένζυμο IeOMT T133M

Δεδομένης της διαφορετικής τοποεκλεκτικότητας που παρουσιάζει το ένζυμο IeOMT T133M από το CaRO WT [171], πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με το υπόστρωμα της υδροξυτυροσόλης με σκοπό την ταυτοποίηση των προϊόντων. Στο χρωματογράφημα HPLC της αντίδρασης αυτής (**Παράρτημα**) εμφανίζεται μία επιπλέον κορυφή εν συγκρίσει με αυτού της αντίδρασης με το CaRO WT. Γίνεται λόγος, επομένως, για δύο φαινομενικά προϊόντα με χρόνους έκλουσης στα 7.8 min και 8.0 και τις αποδόσεις του πρώτου 24ώρου να ανέρχονται στο 53.8 % και 17.9 %, ενώ του δευτέρου στο 72 % και 14 %, αντιστοίχως. Αθροιστικά, οι αποδόσεις είναι της τάξεως του 72 % για τις 24 ώρες αντίδρασης και 86 % για τις 48 ώρες. Η υδροξυτυροσόλη που δεν έχει μετατραπεί σε προϊόν εκλύεται σε χρόνο 6.9 min.

Το ένζυμο IeOMT T133M δεν έχει καλή τοποεκλεκτικότητα ως προς τη μεθυλίωση του καφεϊκού οξέος, αφού έχει αποδειχθεί πως δίνει μείγμα μεθυλιωμένων προϊόντων με αυτά να είναι τα μονομεθυλιωμένα para και meta και το διμεθυλιωμένο στις ίδιες θέσεις, με μεγαλύτερη προτίμηση να εμφανίζει στην para θέση.[171] Συγκρίνοντας τις δομές της υδροξυτυροσόλης (**Σχήμα 3**) και του καφεϊκού οξέος (**Σχήμα 4**) παρατηρείται πως και οι δύο διαθέτουν δύο υδροξύλια στο φαινολικό δακτύλιο σε θέσεις meta και para. Επομένως, αναμένεται να υπάρχει παρόμοια μεθυλίωση της υδροξυτυροσόλης με τις κορυφές που εμφανίζονται στην HPLC να αντιστοιχούν στα μονομεθυλιωμένα προϊόντα (7.8 min), τα οποία δεν μπορούν να διαχωριστούν μέσω της τεχνικής αυτής για αυτό και η έντασης της κορυφής είναι υψηλή και στο

διμεθυλιωμένο (8.0 min). (**Σχήμα 22**) Για τον πλήρη χαρακτηρισμό των προϊόντων απαιτείται περαιτέρω ανάλυση αυτών με φασματοσκοπία NMR και MS.



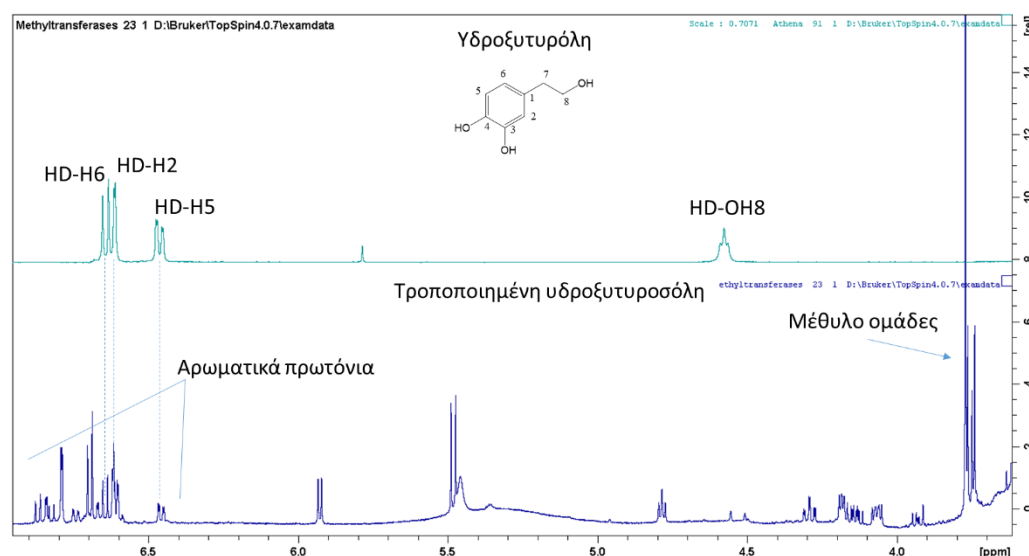
Σχήμα 22. Πιθανή αντίδραση μεθυλίωσης της υδροξυτυροσόλης από το ένζυμο IeOMT T133M.

9.4.3.4 Αποτελέσματα MS της μεθυλίωσης της υδροξυτυροσόλης από το ένζυμο IeOMT T133M

Η ανάλυση του δείγματος με MS έδειξε την ύπαρξη μονομεθυλιωμένου αλλά και διμεθυλιωμένου προϊόντος. (**Παράρτημα**) Συγκεκριμένα, κύριο προϊόν φαίνεται να είναι το μόνομεθυλιωμένο καθώς εμφανίζει ισχυρό σήμα στο 169.1 m/z. Δευτερεύον φαίνεται να είναι το διμεθυλιωμένο καθώς εμφανίζει σήμα μικρότερης έντασης στα 183.1 m/z. Ωστόσο, η τεχνική αυτή δεν δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού συντακτικά ισομερών ενέσεων καθώς λαμβάνει υπόψιν της τη μάζα της εκάστοτε ένωσης. Επομένως, για να γίνει χαρακτηρισμός απαιτείται και η συμβολή του NMR. Σημειώνεται πως οι κορυφές στα 153.0 m/z, 155.1 m/z και 385.1 m/z αντιστοιχούν στην οξειδωμένη μορφή του DTT, στο DTT και στο SAH ενώ η υδροξυτυροσόλη που δεν αντέδρασε εμφανίζεται με στο σήμα στα 155.0 m/z.

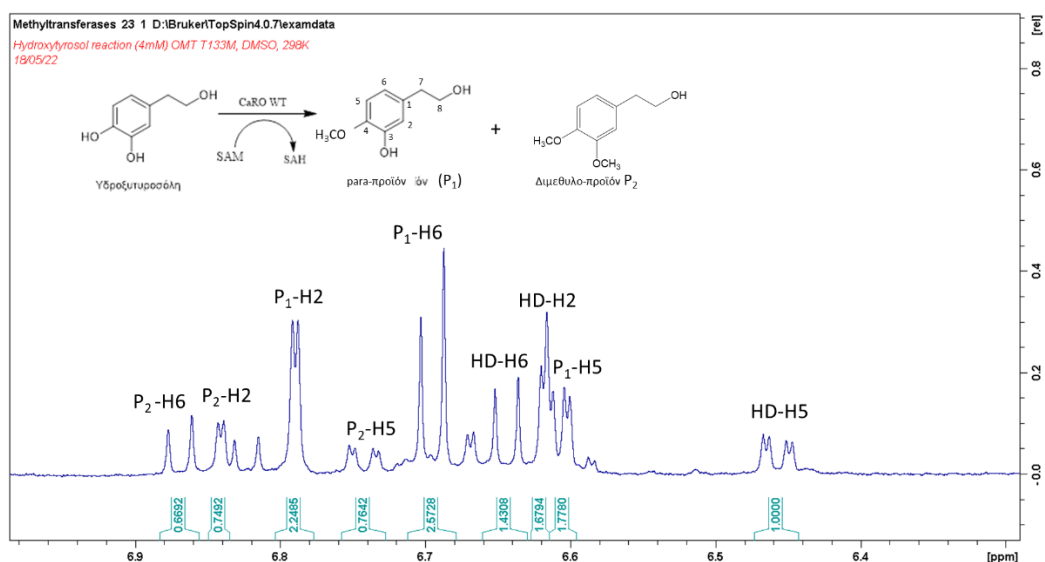
9.4.3.5 Αποτελέσματα NMR της μεθυλίωσης της υδροξυτυροσόλης από το ένζυμο IeOMT T133M

Για να επιβεβαιωθεί η ενζυμική τροποποίηση της υδροξυτυροσόλης από το ένζυμο IeOMT T133M πραγματοποιήθηκε λήψη φασμάτων ¹H-NMR στο μίγμα της ενζυμικής αντίδρασης (**Εικόνα 16**).



Εικόνα 16. Επιλεγμένη περιοχή υπέρθεσης ¹H-NMR φασμάτων, πάνω της πρότυπης υδροξυτυροσόλης και κάτω του μίγματος της ενζυμικής αντίδρασης της υδροξυτυροσόλης από το ένζυμο IeOMT T133M, σε DMSO-d₆, 298K.

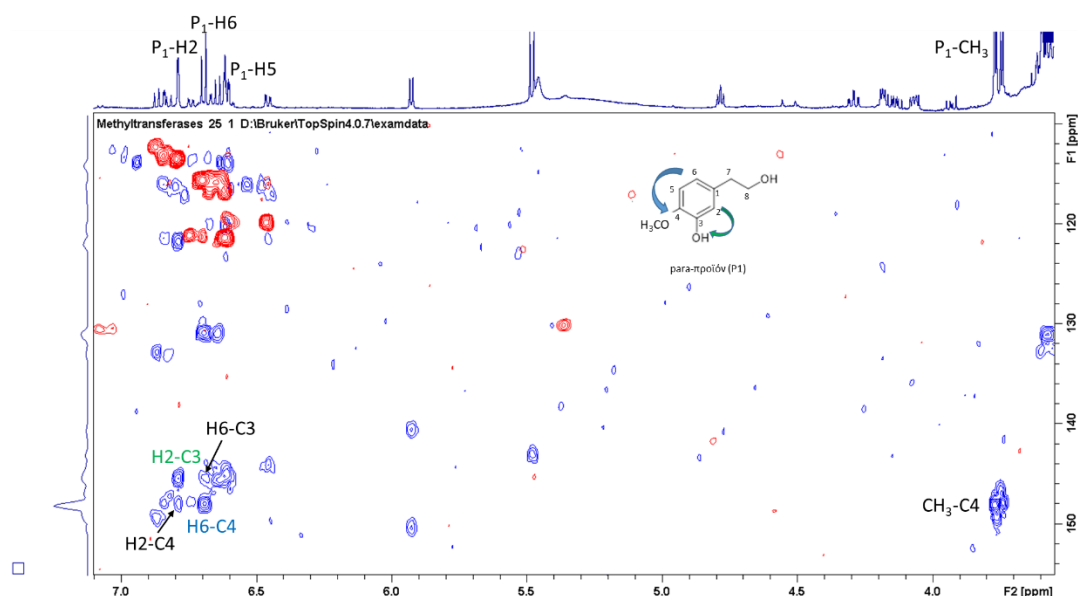
Όπως αποτυπώνεται στην **Εικόνα 16** στο φάσμα του μίγματος της αντίδρασης (κάτω φάσμα) εντοπίζεται μικρή ποσότητα της υδροξυτυροσόλης που δεν αντέδρασε καθώς εντοπίζουμε τα αρωματικά πρωτόνια της υδροξυτυροσόλης στην περιοχή 6.4-6.7 ppm. Παράλληλα εντοπίζονται νέες κορυφές στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων (6.4-6.9 ppm) και κορυφές που ανήκουν σε μέθυλοομάδες στα 3.7-3.8 ppm υποδηλώνοντας την ύπαρξη νέων μεθυλιωμένων προϊόντων.



Εικόνα 17. Επιλεγμένη περιοχή ^1H -NMR φάσματος, του μίγματος της ενζυμικής αντίδρασης της υδροξυτυροσόλης με το ένζυμο IoMT T133M, σε DMSO-d_6 , 298K.

Από την ανάλυση του ^1H -NMR φάσματος του μείγματος της αντίδρασης παρατηρείται η εμφάνιση δύο προϊόντων. Το κύριο προϊόν φαίνεται να είναι η μεθυλιωμένη υδροξυτυροσόλη πιθανά στην para θέση καθώς βάσει βιβλιογραφίας το συγκεκριμένο ένζυμο εμφανίζει εκλεκτικότητα για την para θέση.[171] Παρατηρείται στο φάσμα 2D ^1H και ^{13}C -NMR HSQC-HMBC ότι το πρωτόνιο στην θέση C6 δίνει έντονη κορυφή διασταύρωσης για τον άνθρακα C4 (148.00ppm) που φέρει τη μέθυλο ομάδα και κορυφή διασταύρωσης μικρότερης έντασης για τον C3 (145.80) που φέρει την υδροξυλομάδα. Αντίθετα, το πρωτόνιο στη θέση C2 δίνει έντονη κορυφή διασταύρωσης για τον άνθρακα C3 (145.80ppm) που φέρει την υδροξυλομάδα και κορυφή διασταύρωσης μικρότερης έντασης για τον C4 (148.00) που φέρει τη μέθυλο ομάδα (**Εικόνα 18**). Παράλληλα εμφανίζεται μία κορυφή στα 3.8 ppm που ανήκει σε μία μεθυλοομάδα σύμφωνα με τα ολοκληρώματα των κορυφών (**Εικόνα 17**). Επιπλέον, παρατηρείται και ένα μικρότερο προϊόν που ανήκει στη διμέθυλο υδροξυτυροσόλη. Φαίνεται έντονη μετατόπιση σε όλες τις κορυφές των αρωματικών πρωτονίων και δύο κορυφές στα 3.76 και 3.73 ppm που ανήκουν στις δύο μέθυλο ομάδες σύμφωνα με τα ολοκληρώματα των κορυφών. Με βάση τα ολοκληρώματα των κορυφών η συνολική απόδοση της αντίδρασης φαίνεται να είναι 85% ,με 57% για το μονομεθυλιωμένο προϊόν και 17% για το διμεθυλιωμένο προϊόν. Παρόλα αυτά για τον πλήρη χαρακτηρισμό των προϊόντων και τη θέσης μεθυλίωσης του μονομεθυλιωμένου

προϊόντος απαιτείται καθαρισμός των προϊόντων και περαιτέρω ανάλυση με NMR όπως λήψη 1D ^1H -NMR και 2D ^1H και ^{13}C -NMR κ.α.



Εικόνα 18. Επιλεγμένη περιοχή ^1H -NMR φάσματος, του μίγματος της ενζυμικής αντίδρασης της υδροξυτυροσόλης με το ένζυμο *IeOMT* T133M, σε DMSO-d_6 , 298K.

9.4.4 Μελέτη της ενζυμικής μεθυλίωσης της λουτεολίνης

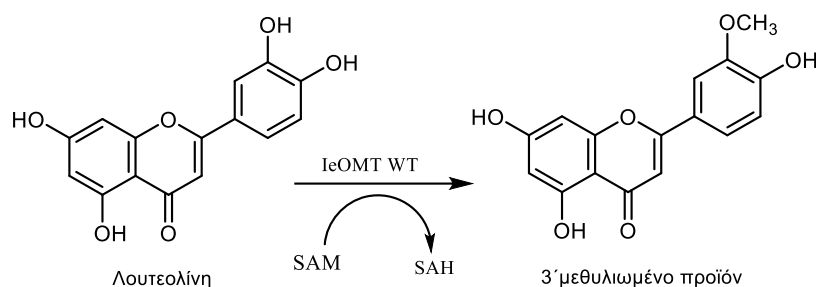
Μεθυλιωμένα παράγωγα της λουτεολίνης που υφίστανται στη φύση είναι το 3'-μέθυλο παράγωγο (χρυσοερόλη) και το 4'-μέθυλο παράγωγο (διοσμετίνη), οι οποίες όχι μόνο εμφανίζουν βιολογικές δράσεις παρόμοιες με της λουτεολίνης αλλά εμφανίζουν και δικές τους κατά της οστεοπόρωσης. [175] Η ενζυμική μεθυλίωση της λουτεολίνης από τα ένζυμα *IeOMT* WT και *IeOMT* T133M/Y326L έχει μελετηθεί προηγουμένως. Τα δύο αυτά ένζυμα φέρουν διαφορετική προτίμηση ως προς την τοποεκλεκτικότητα της μεθυλίωσης με το ένζυμο άγριου τύπου (*IeOMT* WT) να προτιμά το 3'-OH της λουτεολίνης, ενώ η διπλή μετάλλαξη T133M/Y326L να δίνει ως κύριο προϊόν το διμεθυλιωμένο ανάλογο της λουτεολίνης στις θέσεις 3'-OH και 4'-OH και ένα δευτερεύον μονομεθυλιωμένο στο 3'-OH.[172] Πραγματοποιήθηκε, λοιπόν, η τροποποίηση της λουτεολίνης και με τα δύο ακινητοποιημένα ένζυμα σε αντιδράσεις διάρκειας 48 ωρών και έπειτα έγινε ποιοτικός έλεγχος αυτών μέσω της HPLC, με τα αποτελέσματα να παρουσιάζονται παρακάτω.

9.4.4.1 Αποτελέσματα HPLC της μεθυλίωσης της λουτεολίνης από το ένζυμο *IeOMT* WT

Σύμφωνα με τα δεδομένα του χρωματογραφήματος της HPLC (**Παράρτημα**), είναι ευδιάκριτη η τροποποίηση της λουτεολίνης με το ακινητοποιημένο ένζυμο *IeOMT* WT. Μετά από 48 ώρες αντίδρασης, η απόδοση ανέρχεται στο 71 % η οποία αναφέρεται στο προϊόν που παράγεται και εμφανίζει κορυφή περίπου στα 10.4 min. Η λουτεολίνη που έχει παραμείνει χωρίς να αντιδράσει εκλούεται σε χρόνο 9.8 min.

Η αντίδραση αυτή έχει ένα προϊόν το οποίο αντιστοιχεί σε ένα μονομεθυλιωμένο παράγωγο της λουτεολίνης και πιο συγκεκριμένα στο 3'. [172] Με βάσει τα

αποτελέσματα της HPLC και την βιβλιογραφία αντίδραση που λαμβάνει χώρα αποτυπώνεται στο **Σχήμα 23**.

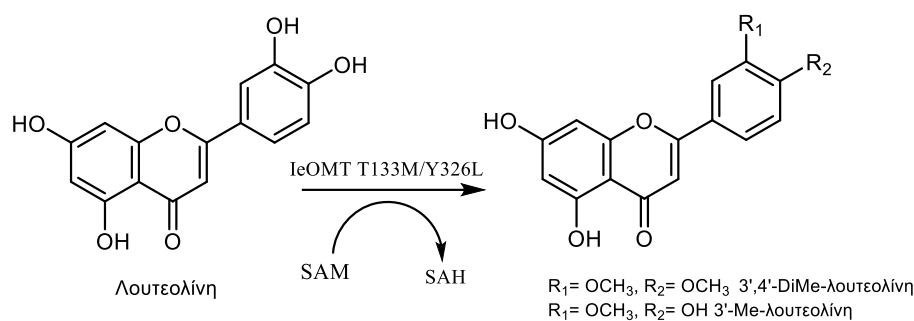


Σχήμα 23. Ενζυμική μεθυλίωση της λουτεολίνης από το ένζυμο IeOMT WT προς σχηματισμό του 3' μεθυλιωμένου προϊόντος.

9.4.4.2 Αποτελέσματα HPLC της μεθυλίωσης της λουτεολίνης από το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L

Επιτυχής ήταν και η τροποποίηση της λουτεολίνης από το ακινητοποιημένο ένζυμο IeOMT T133M/Y326L σε αντίδραση 48 ωρών. Σε χρόνο 9.8 min εμφανίζεται το σήμα του υποστρώματος που δεν αντέδρασε και σε χρόνο 10.4 min εμφανίζεται κορυφή προϊόντος με απόδοση της τάξεως του 23 %. Συγκριτικά με την αντίδραση του IeOMT WT, εμφανίζεται μία επιπλέον κορυφή στα 11.2 min που αντιπροσωπεύει την ύπαρξη ενός δεύτερου προϊόντος, με απόδοσή 70 %. Η συνολική απόδοση της αντίδρασης ανέρχεται στο 93 %.

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν πως τα προϊόντα της συγκεκριμένης αντίδρασης είναι δύο. Ειδικότερα, το κύριο είναι αυτό που έχει υποστεί μεθυλίωση στα υδροξύλια των θέσεων 3' και 4' και το δευτερεύον αυτό που εμφανίζει την μέθυλοομάδα μόνο στο 3'-OH της λουτεολίνης (**Σχήμα 5**).[171] Τα ποιοτικά αποτελέσματα της HPLC έδειξαν την ύπαρξη δύο κορυφών, με αυτές να διακρίνονται λόγω της διαφορετικής πολικότητας των ενώσεων που αντιστοιχούν. Έτσι, το διμεθυλιωμένο προϊόν, όντας πιο άπολο, εμφανίζει μεγαλύτερο χρόνο έκλουσης έναντι του μονομεθυλιωμένου. Συνδυάζοντας τα παραπάνω, η κορυφή μεγαλύτερης έντασης και χρόνου έκλουσης (11.2 min) αντιστοιχεί στο διμεθυλιωμένο προϊόν στις θέσεις 3' και 4' της λουτεολίνης, ενώ η κορυφή στα 9.8 min αποδίδεται στο 3'-μεθυλιωμένο παράγωγο του υποστρώματος. Για τον πλήρη χαρακτηρισμό των προϊόντων απαιτείται περαιτέρω ανάλυση των προϊόντων με φασματοσκοπία NMR.



Σχήμα 24. Ενζυμική μεθυλίωση της λουτεολίνης από το ένζυμο IeOMT WT προς σχηματισμό του κύριου προϊόντος 3',4'-διμεθυλιωμένης λουτεολίνης και του δευτερεύοντος 3'-μονομεθυλιωμένης λουτεολίνης.

9.4.5 Μελέτη της ενζυμικής μεθυλίωσης της μορίνης

Η μορίνη ανήκει στην οικογένεια των φλαβονοειδών (**Σχήμα 7**). Έχουν αξιολογηθεί παράγωγά της κυρίως στη μορφή σουλφονικών αλάτων ως προς την αντικαρκινική τους δράση [194, 195], χωρίς να υπάρχει κάποια αναφορά της ενζυμικής της μεθυλίωσης, μέχρι στιγμής, και κατά συνέπεια δεν έχουν μελετηθεί οι βιολογικές δράσεις τέτοιων αναλόγων της. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά η ενζυμική μεθυλίωσή της από τα ένζυμα IeOMT WT και IeOMT T133M/Y326L στην ακινητοποιημένη τους μορφή, η οποία διήρκεσε 72 ώρες και έγινε προσπάθεια ανάλυσης τους μέσω HPLC, MS και NMR, των οποίων τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω.

9.4.5.1 Αποτελέσματα HPLC της μεθυλίωσης της μορίνης από το ένζυμο IeOMT WT και IeOMT T133M/Y326L

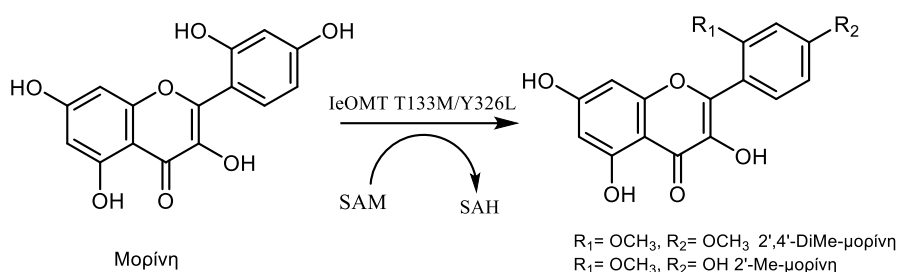
Η ανάλυση HPLC των δειγμάτων των αντιδράσεων από τα δύο ένζυμα ήταν δύσκολη και δεν μπόρεσε να δώσει μία πρώτη εικόνα για την ύπαρξη προϊόντων, καθώς δεν έγιναν ορατές νέες κορυφές. Αυτό αποδίδεται στη διαχωριστική ικανότητα της στήλης, η οποία δεν ήταν επαρκής για την ανάλυση των συγκεκριμένων ενώσεων και η κορυφή της πρότυπης ένωσης ήταν αρκετά διευρυμένη δυσκολεύοντας την ανάλυση. Προκειμένου να μελετηθεί περεταίρω η μεθυλίωση της μορίνης πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις MS και NMR μόνο για την αντίδραση που αφορά το ακινητοποιημένο ένζυμο IeOMT T133M/Y326L. Η επιλογή αυτή έγινε καθώς αυτό εμφανίζει μεγαλύτερη δραστηριότητα έναντι των φλαβονοειδών σε σχέση με το ένζυμο άγριου τύπου.[172]

9.4.5.2 Αποτελέσματα MS της μεθυλίωσης της μορίνης από το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης MS για τη μεθυλίωση της μορίνης από το ακινητοποιημένο IeOMT T133M/Y326L (**Παράρτημα**), φαίνεται να έχει πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Η ένωση του DTT που προστίθεται στην αντίδραση αλλά και τα παραπροϊόντα της οξειδωμένης μορφής του DTT και του SAH, εμφανίσουν σήματα στα 155.0 m/z, 153.0 m/z και 385.1 m/z, αντιστοίχως. Πιθανά προϊόντα φαίνονται να είναι ένα μονομεθυλιωμένο ανάλογό της μορίνης με σήμα στα 317.1 m/z και διμεθυλιωμένο ανάλογό της με σήμα στα 331.1 m/z. Η παρουσία της μορίνης που δεν έχει καταναλωθεί αποτυπώνεται με το σήμα στα 303.0 m/z, με την

ένταση της κορυφής της να είναι χαμηλή πράγμα που σημαίνει πως δεν έχει επέλθει ο ιονισμός της πλήρως κατά την ανάλυση.

Λόγω της ύπαρξης δύο προϊόντων, μπορούν να πιθανολογηθούν και οι θέσεις μεθυλίωσης συνδυαστικά με τη βιβλιογραφία. Όπως έχει αναφερθεί, το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L εμφανίζει προτίμηση στον Β δακτύλιο της λουτεολίνης και πιο συγκεκριμένα δίνει το διμεθυλιωμένο προϊόν στις θέσεις 3' και 4' και σε πιο μικρή αναλογία το μονομεθυλιωμένο στη θέση 3'. [172] Η διαφορά μεταξύ των δομών της λουτεολίνης (Σχήμα 5) και της μορίνης (Σχήμα 7), όσον αφορά το δακτύλιο Β, έγκειται στην ύπαρξη ενός υδροξυλίου στη θέση 3' της πρώτης, το οποίο δεν εντοπίζεται στη ίδια θέση της δεύτερης αλλά στη θέση 2', ενώ διαθέτουν και οι δύο ένα 4'-OH. Βάσει των παραπάνω, πιθανά προϊόντα της αντίδρασης μπορεί να είναι το μονομεθυλιωμένο στη θέση 4' και το διμεθυλιωμένο στη θέση 2' και 4'. (Σχήμα 25). Ωστόσο, για τον πλήρη χαρακτηρισμό και ταυτοποίηση των προϊόντων απαιτείται ανάλυση NMR.



Σχήμα 25. Πιθανή αντίδραση μεθυλίωσης της μορίνης από το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L.

9.4.5.3 Αποτελέσματα NMR της μεθυλίωσης της μορίνης από το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L

Στο NMR δεν εντοπίστηκε η ύπαρξη κάποιου προϊόντος. Αυτό σημαίνει ότι τα προϊόντα που ανέδειξε η ανάλυση MS ήταν απειροελάχιστα, πράγμα που επιβεβαιώνεται και από τη χαμηλή ένταση των σημάτων στο γράφημα του MS. Επομένως, η απόδοση της αντίδρασης είναι πάρα πολύ μικρή.

9.4.6 Μελέτη της ενζυμικής μεθυλίωσης της μυρικετίνης

Η μυρικετίνη παρουσιάζει πληθώρα μεθυλιωμένων αναλόγων της με αυτά να απαντώνται και στη φύση. [196, 197] Μερικά από αυτά είναι η κομπρετόλη, μεθυλιωμένο παράγωγο στις θέσεις 3,7,2',3' και 4' και η ευρωπετίνη (europetin) έχοντας μέθυλο ομάδα στο υδροξύλιο της θέση 7, με την σύνθεση αυτών να έχει πραγματοποιηθεί κυρίως χημικά. [197] Επίσης, σε in vitro μελέτες έχουν μελετηθεί οι αντικαρκινικές ιδιότητες του 3,7,4',5' τετραμεθυλιωμένου αναλόγου της μυρικετίνης ως προς ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα με αυτές να είναι σημαντικές σε σύγκριση με της μυρικετίνης η οποία δεν εμφάνιζε κάποια δράση. [176] Επιλέχθηκε ως υπόστρωμα η μυρικετίνη προκειμένου να παραχθούν είτε ήδη υπάρχοντα μεθυλιωμένα παράγωγά της είτε καινούρια μέσω της ενζυμικής τροποποίησης της από τα ακινητοποιημένα ένζυμα IeOMT WT και IeOMT T133M/Y326L. Μάλιστα, δεν υπάρχει προηγούμενη

βιβλιογραφική αναφορά σχετικά την τροποποίηση της μυρικετίνης από τα ένζυμα IeOMT WT και IeOMT T133M/Y36L.

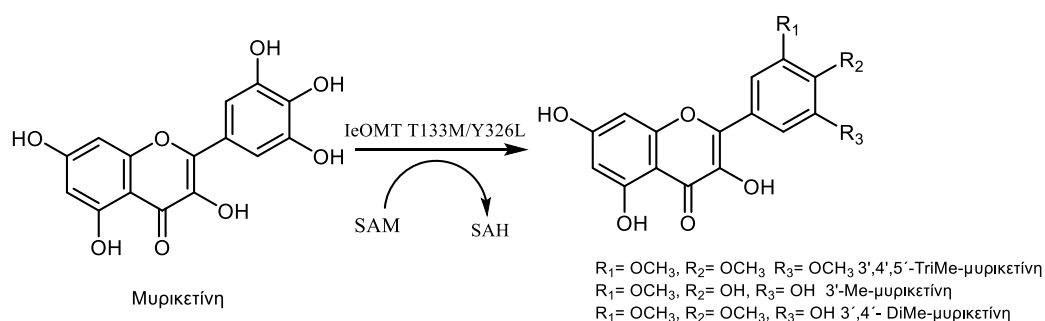
9.4.6.1 Αποτελέσματα HPLC της μεθυλίωσης της μυρικετίνης από το ένζυμο IeOMT WT και IeOMT T133M/Y326L

Όπως και στην περίπτωση της μορίνης έτσι και στη μυρικετίνη, η ανάλυση HPLC δεν μπόρεσε να δώσει σαφή αποτελέσματα για την ύπαρξη προϊόντων. Ωστόσο, δείγμα ότι πραγματοποιήθηκε η αντίδραση αποτέλεσε το γεγονός ότι παρατηρήθηκε μείωση στην ένταση της κορυφής του υποστρώματος σε σύγκριση με την ανάλυση της τυφλής ένωσης. Μάλιστα, η μείωση αυτή φάνηκε να είναι αρκετά μεγάλη για το ακινητοποιημένο ένζυμο της διπλής μετάλλαξης T133M/Y326L, ενώ λίγο μικρότερη για το ακινητοποιημένο ένζυμο άγριου τύπου (**Παράρτημα**). Έτσι, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω η ανάλυση της αντίδρασης με το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L με φασματοσκοπίες MS και NMR, προκειμένου να γίνει ο χαρακτηρισμός των προϊόντων της αντίδρασης

9.4.6.2 Αποτελέσματα MS της μεθυλίωσης της μυρικετίνης από το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L

Την ύπαρξη τριών προϊόντων ανίχνευσε η ανάλυση της μεθυλίωσης της μυρικετίνης μέσω MS (**Παράρτημα**). Ειδικότερα, ανέδειξε την ύπαρξη μονομεθυλιωμένης μυρικετίνης με σήμα στα 333.0 m/z, διμεθυλιωμένης με σήμα στα 347.1 m/z αλλά και τριμεθυλιωμένης μυρικετίνης με κορυφή στα 361.1 m/z. Εντοπίζονται εκ νέου σήματα κορυφών που αντιστοιχούν στην οξειδωμένη μορφή του DTT (153.0 m/z), στο ίδιο το DTT (155.0 m/z) αλλά και στο παραπροϊόν SAH (385.1 m/z). Η ένωση της μυρικετίνης ανιχνεύεται με σήμα στα 319.0 m/z, ενώ εντοπίζεται και ένα σήμα στα 399.1 m/z το οποίο δεν μπορεί να αποδοθεί κάπου συγκεκριμένα.

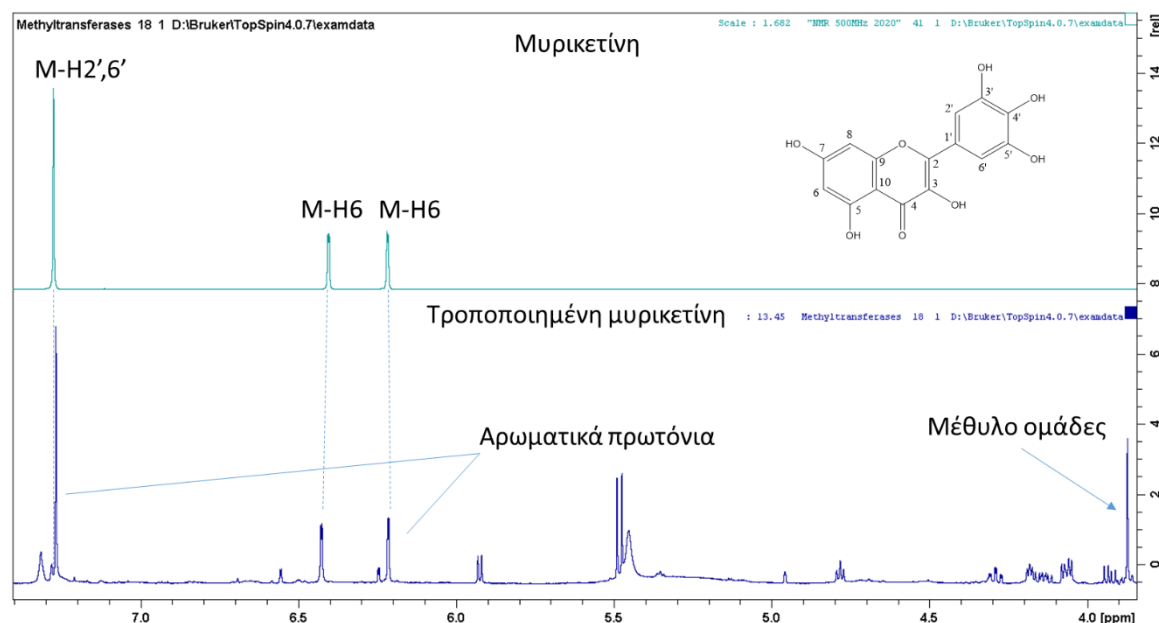
Όσον αφορά τον B δακτύλιο των δομών της λουτεολίνης και της μυρικετίνης, εντοπίζονται διαφορές οι οποίες οφείλονται στα υδροξύλια. Η μυρικετίνη (**Σχήμα 6**) εμφανίζει ένα παραπάνω υδροξύλιο στη θέση 4' σε σύγκριση με την λουτεολίνη (**Σχήμα 5**). Λαμβάνοντας υπόψιν την τοποεκλεκτικότητα του ενζύμου IeOMT T133M/Y326L το υπόστρωμα της λουτεολίνης,[172] πιθανώς η μεθυλίωση να έχει πραγματοποιηθεί στη θέση 3' για το μονομεθυλιωμένο παράγωγο, στις θέσεις 2' και 3' για το διμεθυλιωμένο και το τριμεθυλιωμένο με τη μέθυλο ομάδα να υφίσταται σε όλα τα υδροξύλια του B δακτυλίου. (**Σχήμα 26**)



Σχήμα 26. Πιθανή αντίδραση μεθυλίωσης της μυρικετίνης από το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L

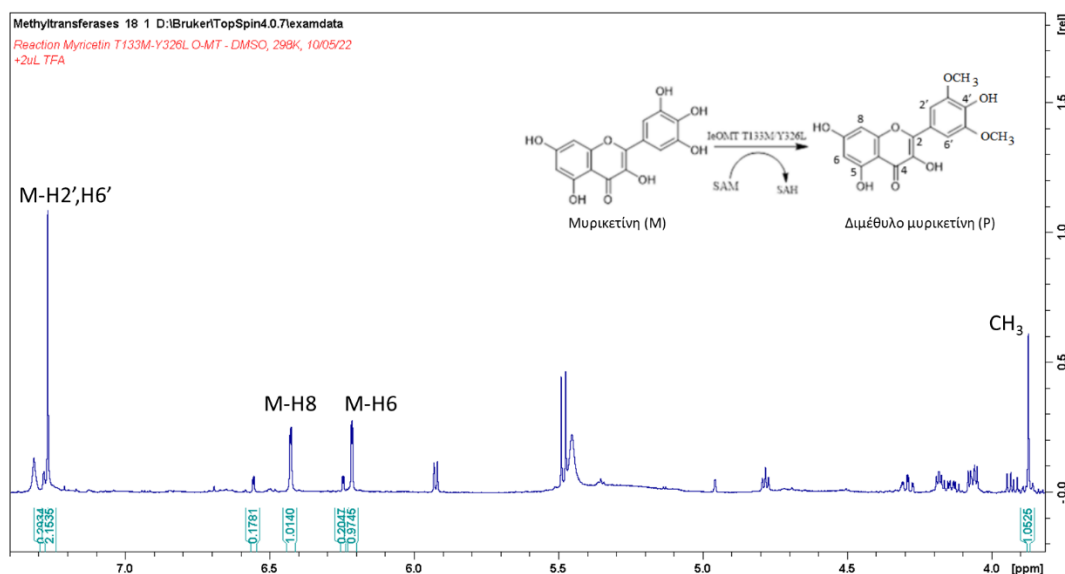
9.4.6.3 Αποτελέσματα NMR της μεθυλίωσης της μυρικετίνης από το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L

Για να επιβεβαιωθεί η ενζυμική τροποποίηση της μυρικετίνης από το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L πραγματοποιήθηκε λήψη φασμάτων ^1H -NMR στο μίγμα της ενζυμικής αντίδρασης (**Εικόνα 19**).



Εικόνα 19. Επιλεγμένη περιοχή υπέρθεσης ^1H -NMR φασμάτων, πάνω της πρότυπης μυρικετίνης και κάτω του μίγματος της ενζυμικής αντίδρασης της μυρικετίνης από το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L, σε DMSO-d_6 , 298K.

Σύμφωνα με την **Εικόνα 19**, στο φάσμα του μείγματος της αντίδρασης (κάτω φάσμα) εντοπίζεται αρκετή ποσότητα της μυρικετίνης που δεν αντέδρασε καθώς εντοπίζουμε τα αρωματικά πρωτόνια της στην περιοχή 6.2-7.4 ppm. Παράλληλα εντοπίζονται νέες κορυφές στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων (6.2-7.4 ppm) και μία κορυφή που ανήκει σε μέθυλοομάδες στα 3.9 ppm υποδηλώνοντας την ύπαρξη νέων μεθυλιωμένων προϊόντων.



Εικόνα 20. Επιλεγμένη περιοχή ^1H -NMR φάσματος, του μίγματος της ενζυμικής αντίδρασης της μυρικετίνης με το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L, σε DMSO- d_6 , 298K.

Από την ανάλυση του ^1H -NMR φάσματος του μείγματος της αντίδρασης παρατηρείται η εμφάνιση ενός προϊόντος που φαίνεται να είναι η διμεθυλιωμένη μυρικετίνη στις θέσεις 3' και 5'. Εμφανίζεται μία κορυφή στα 3.9 ppm που ανήκει σύμφωνα με τα ολοκληρώματα των κορυφών σε δύο μέθυλοομάδες. Με βάση τα ολοκληρώματα των κορυφών η απόδοση της αντίδρασης φαίνεται να είναι 17%. Στην ανάλυση NMR δεν εντοπίστηκε μόνο και τριμεθυλιωμένη μυρικετίνη πιθανά λόγω πολύ μικρής απόδοσης των εν λόγω προϊόντων. Για τον πλήρη χαρακτηρισμό των προϊόντων απαιτείται βελτίωση της απόδοσης της αντίδρασης, καθαρισμός των προϊόντων και λήψη 1D ^1H -NMR και 2D ^1H και ^{13}C -NMR.

9.4.7 Μελέτη της ενζυμικής μεθυλίωσης της φισετίνης

Η φισετίνη δεν διαθέτει πολλά γνωστά μεθυλιωμένα παράγωγά της, χωρίς αυτό να σημαίνει πως δεν έχουν μελετηθεί. Ίσως το πιο γνωστό μονομεθυλιωμένο παράγωγο της είναι η γεραλδόλη, με την ύπαρξή της μεθυλομάδας να βρίσκεται στη θέση 3', με αυτή να εμφανίζει καλύτερη αντικαρκινική δράση από την φισετίνη ακόμη και σε μεταστατικούς καρκίνους.[177] Με σκοπό τη δημιουργία μεθυλιωμένων προϊόντων της φισετίνης, πραγματοποιήθηκαν για πρώτη φορά ενζυμικές αντιδράσεις με χρήση των ακινητοποιημένων ενζύμων IeOMT WT και IeOMT T133M/Y326L, οι οποίες αναλύθηκαν.

9.4.7.1 Αποτελέσματα HPLC της μεθυλίωσης της φισετίνης από το ένζυμο IeOMT WT και IeOMT T133M/Y326L

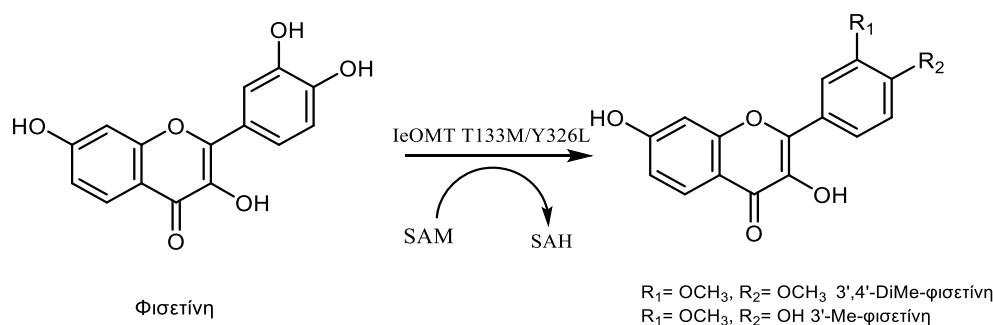
Η ανάλυση του χρωματογραφήματος ως προς τον εντοπισμό νέων κορυφών προϊόντων ήταν και στην προκειμένη περίπτωση δύσκολη. Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκε έντομη μείωση της απορρόφησης της κορυφής της φισετίνης μετά την τροποποίησή, γεγονός που υποδηλώνει την κατανάλωση της συνεπώς και την τροποποίησή της. Η ένταση της κορυφής του υποστρώματος στην αντίδραση του ενζύμου άγριου τύπου ήταν μικρότερη από εκείνης της πρότυπης αντίδρασης που αναλύθηκε. Επιπλέον ακόμη

μικρότερης έντασης ήταν η κορυφή του υποστρώματος στο χρωματογράφημα της αντίδρασης του ενζύμου με τη διπλή μετάλλαξη T133M/Y326L (**Παράρτημα**).

9.4.7.2 Αποτελέσματα MS της μεθυλίωσης της φισετίνης από το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L

Μέσω της ανάλυσης MS, κατά τη μεθυλίωση της φισετίνης από το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L φαίνεται να σχηματίστηκε μείγμα προϊόντων (**Παράρτημα**). Η ύπαρξη σημάτων στα 301.1 m/z και 315.1 m/z υποδηλώνει την παραγωγή τόσο του μονομεθυλιωμένου προϊόντος όσο και του διμεθυλιωμένου, χωρίς ωστόσο να μπορούν να βγουν συμπεράσματα για την τοποεκλεκτικότητα της μεθυλίωσης. Σημαντική είναι όμως η ένταση του σήματος του διμεθυλιωμένου προϊόντος (315.1 m/z) καθώς είναι αρκετά μεγαλύτερη εν συγκρίσει με αυτό του μονομεθυλιωμένου (301.1 m/z). Σημειώνεται πως τα σήματα 153.0 m/z, 155.0 m/z και 385.1 m/z αντιπροσωπεύουν την ύπαρξη του οξειδωμένου DTT, του DTT και του SAH, αντίστοιχα.

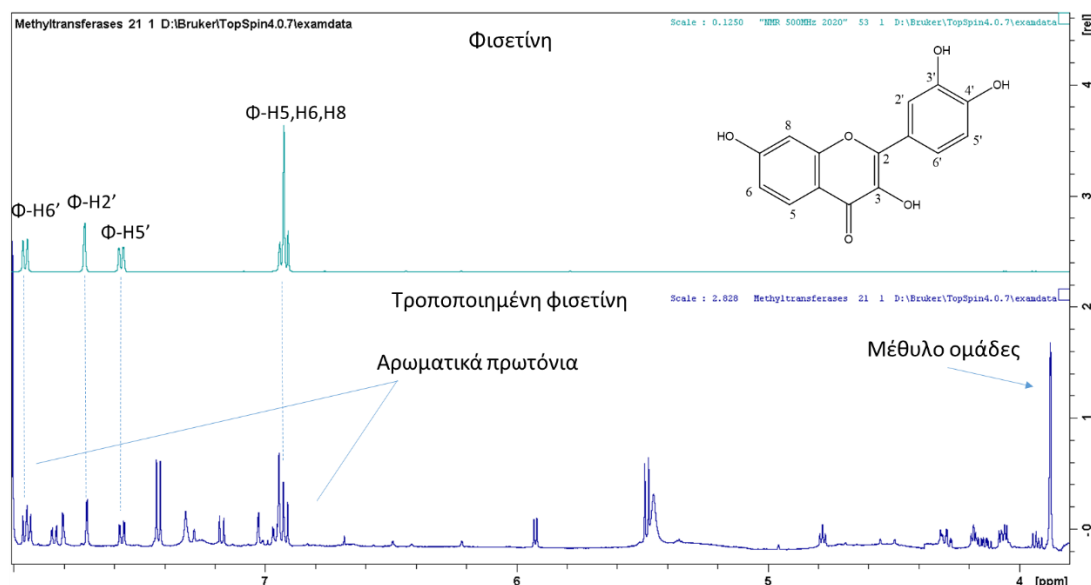
Πιθανά η μεθυλίωση να έχει συμβεί στο Β δακτύλιο της φισετίνης και ειδικότερα στις θέσεις 3' και 4' μιας και λουτεολίνη και μυρικετίνη έχουν την ίδια υποκατάσταση στον συγκεκριμένο δακτύλιο, με την πρώτη να υφίσταται μεθυλίωση στις θέσεις που προαναφέρθηκαν.[172] (**Σχήμα 27**) Παρόλα αυτά, μόνο έσω της ανάλυσης NMR θα μπορέσει να γίνει ο πλήρης χαρακτηρισμός των προϊόντων της μεθυλίωσης της φισετίνης.



Σχήμα 27. Πιθανή αντίδραση μεθυλίωσης της φισετίνης από το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L

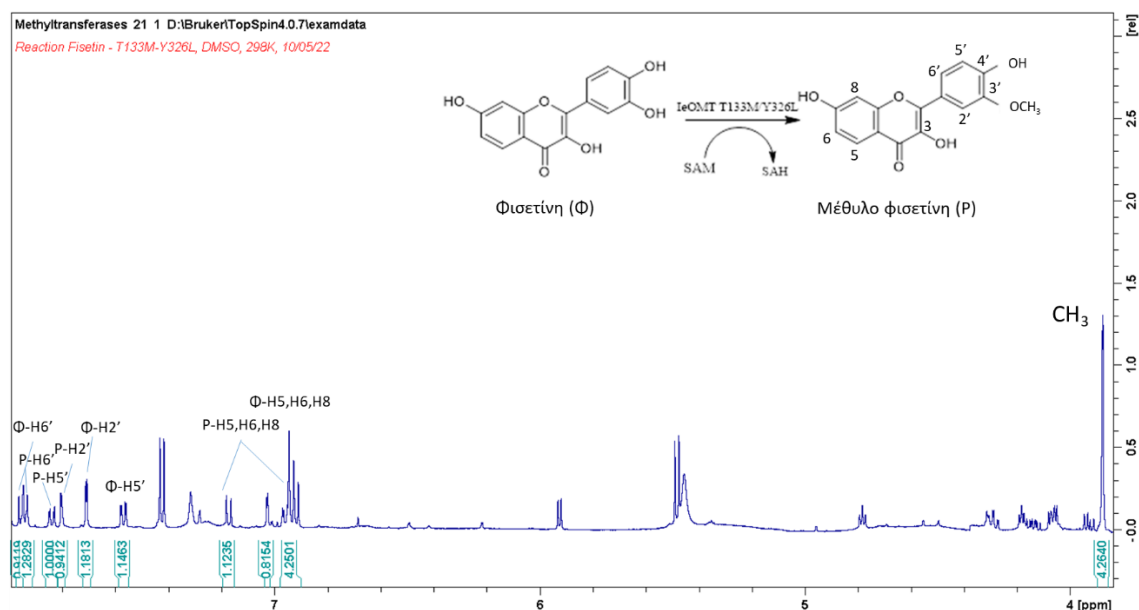
9.4.7.3 Αποτελέσματα NMR της μεθυλίωσης της φισετίνης από το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L

Για να επιβεβαιωθεί η ενζυμική τροποποίηση της φισετίνης από το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L πραγματοποιήθηκε λήψη φασμάτων ^1H -NMR στο μίγμα της ενζυμικής αντίδρασης (**Εικόνα 21**).



Εικόνα 21. Επιλεγμένη περιοχή υπέρθεσης ^1H -NMR φασμάτων, πάνω της πρότυπης φισετίνης και κάτω του μίγματος της ενζυμικής αντίδρασης της φισετίνης από το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L, σε $\text{DMSO}-d_6$, 298K.

Όπως παρατηρείται από την **Εικόνα 21**, στο φάσμα του μείγματος της αντίδρασης (κάτω φάσμα) εντοπίζεται αρκετή ποσότητα της φισετίνης που δεν αντέδρασε καθώς εντοπίζονται τα αρωματικά πρωτόνια της στην περιοχή 6.9-8.0 ppm. Παράλληλα, εντοπίζονται νέες κορυφές στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων (6.2-7.4 ppm) και μία κορυφή που ανήκει σε μεθυλοομάδες στα 3.9 ppm υποδηλώνοντας την ύπαρξη νέων μεθυλιωμένων προϊόντων.



Εικόνα 22. Επιλεγμένη περιοχή ^1H -NMR φάσματος, του μίγματος της ενζυμικής αντίδρασης της φισετίνης με το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L, σε DMSO-d_6 , 298K.

Από την ανάλυση του ^1H -NMR φάσματος του μείγματος της αντίδρασης παρατηρούμε την εμφάνιση ενός προϊόντος που φαίνεται να είναι η μονομεθυλιωμένη φισετίνη στη meta θέση. Εμφανίζεται μία κορυφή στα 3.9 ppm που ανήκει σύμφωνα με τα ολοκληρώματα των κορυφών σε μία μεθυλοομάδα. Με βάση τα ολοκληρώματα των κορυφών η απόδοση της αντίδρασης φαίνεται να είναι 50%. Για τον πλήρη χαρακτηρισμό του προϊόντος απαιτείται καθαρισμός των προϊόντων και λήψη 1D ^1H -NMR και 2D ^1H και ^{13}C -NMR.

9.4.8 Μελέτη της ενζυμικής μεθυλίωσης της ρεσβερατρόλης

Φυσικά μεθυλιωμένα παράγωγα της ρεσβερατρόλης έχουν μελετηθεί επαρκώς καθώς προσφέρουν σημαντικές βιολογικές δράσεις. Πολλές αναφορές γίνονται για το περοστιλβένιο, το διμεθυλιωμένο ανάλογο στις θέσεις 3 και 5 (**Σχήμα 9**), αφού εμφανίζει αξιοσημείωτες βιολογικές δράσεις.[178] Έχουν προταθεί διάφορα τεχνητά βιοσυνθετικά μονοπάτια [198-200], ένα εκ των οποίων παράγει περοστιλβένιο στην ποσότητα των $33.6 \pm 4.1 \text{ mg/L}$ η οποία είναι 3.6 φορές μεγαλύτερη έναντι της φυσιολογικής παραγωγής.[199] Έλαβε χώρα η ενζυμική τροποποίησης της ρεσβερατρόλης έτσι ώστε να παραχθούν τα μεθυλιωμένα παράγωγά της. Αρχικά, δοκιμάστηκαν τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για τα απλά φαινολικά υποστρώματα, το IeOMT T133M και το CaRO WT, χωρίς ωστόσο να ήταν επιτυχής η τροποποίηση της ρεσβερατρόλης. Έπειτα δοκιμάστηκαν τα ένζυμα IeOMT WT και IeOMT T133M/Y326L με την τροποποίηση της ρεσβερατρόλης αυτή τη φορά να είναι επιτυχής. Τονίζεται πως τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν στην ακινητοποιημένη τους μορφή και οι τροποποιήσεις που έλαβαν χώρα πραγματοποιήθηκαν πρώτη φορά βιβλιογραφικά. Οι αντιδράσεις αυτές μελετήθηκαν με HPLC, MS και NMR, τα αποτελέσματα των οποίων παρατίθενται παρακάτω.

9.4.8.1 Αποτελέσματα HPLC της μεθυλίωσης της ρεσβερατρόλης από το ένζυμο IeOMT WT

Σύμφωνα με το χρωματογράφημα HPLC τροποποίησης της ρεσβερατρόλης από το ακινητοποιημένο ένζυμο IeOMT WT (**Παράρτημα**), υπάρχει μόνο ένα προϊόν το οποίο βρίσκεται σε μικρή απόδοση. Η ρεσβερατρόλη εκλύεται σε χρόνο περίπου 9.4 min, ενώ μία μικρής έντασης κορυφή παρουσιάζεται σε χρόνο 10.5 min. Αυτή αποδίδεται στο προϊόν της αντίδρασης καθώς δεν εμφανίζεται στο αντίστοιχο χρωματογράφημα της αντίδρασης που πραγματοποιήθηκε χωρίς το ένζυμο για έλεγχο. Η απόδοση της φτάνει μόλις στο 2 % στις 72 ώρες.

9.4.8.2 Αποτελέσματα MS της μεθυλίωσης της ρεσβερατρόλης από το ένζυμο IeOMT WT

Σε αντίθεση με την ανάλυση της HPLC, η ανάλυση MS (**Παράρτημα**) έδειξε ότι υπάρχουν δύο προϊόντα με την ένταση των σημάτων να μην είναι τόσο μικρή. Η εναπομένουσα ρεσβερατρόλη δίνει σήμα στα 229.1 m/z, το υπολειπόμενο DTT στα 155.0 m/z, ενώ τα παραγόμενα SAH και οξειδωμένο DTT δίνουν σήμα στα 385.1 m/z και 153.0 m/z. Το σήμα στα 243.1 m/z αντιστοιχεί στο μονομεθυλιωμένο προϊόν, που είναι μεγαλύτερης έντασης συγκριτικά με αυτό που εμφανίζεται στα 275.1 m/z και αντιστοιχεί στο διμεθυλιωμένο προϊόν. Επιπλέον, εμφανίζονται δύο ακόμη σήματα στα 319.0 m/z και 399.1 m/z των οποίων η προέλευση είναι άγνωστη.

9.4.8.3 Αποτελέσματα HPLC της μεθυλίωσης της ρεσβερατρόλης από το ένζυμο IeOMT T133m/Y326L

Μια πιο ξεκάθαρη εικόνα για την πρώτη εκτίμηση της πορείας της μεθυλίωσης της ρεσβερατρόλης από το ακινητοποιημένο ένζυμο IeOMT T133M/Y326L λήφθηκε ύστερα από την ανάλυση της αντίδρασης μέσω HPLC. Αναδείχθηκαν δύο προϊόντα τα οποία έχουν χρόνο έκλυσης περίπου στα 10.5 min και 11.9 min, με το δεύτερο να εμφανίζει μεγαλύτερης έντασης κορυφή. Δεδομένου ότι η ρεσβερατρόλη έχει χρόνο έκλυσης στα 9.4 min και ότι ο διαχωρισμός γίνεται βάσει της πολικότητας των ενώσεων, πιθανολογείται η ένωση στα 10.5 min να αντιστοιχεί σε μονομεθυλιωμένο ανάλογο της ρεσβερατρόλης και η κορυφή στα 11.9 min σε διμεθυλιωμένο. Η αντίδραση παρακολούθηθηκε για 72 ώρες με δειγματοληψία ανά 24 ώρες, με τις αποδόσεις του εκάστοτε προϊόντος αλλά και της συνολικής να παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα. Η συνολική απόδοση της αντίδρασης των 72 ωρών ανέρχεται στο 80%.

Πίνακας 10. Παράθεση αποδόσεων (%) της μεθυλίωσης της ρεσβερατρόλης από το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L. Οι αποδόσεις κάθε 24ωρο παρατίθενται και ως συνολικές αλλά και ως προς το κάθε προϊόν ξεχωριστά. Στις 72h αντίδρασης η συνολική απόδοση ανέρχεται στο 79 %. Οι τυπικές αποκλίσεις είναι μικρότερες του 5% σε όλες τις περιπτώσεις.

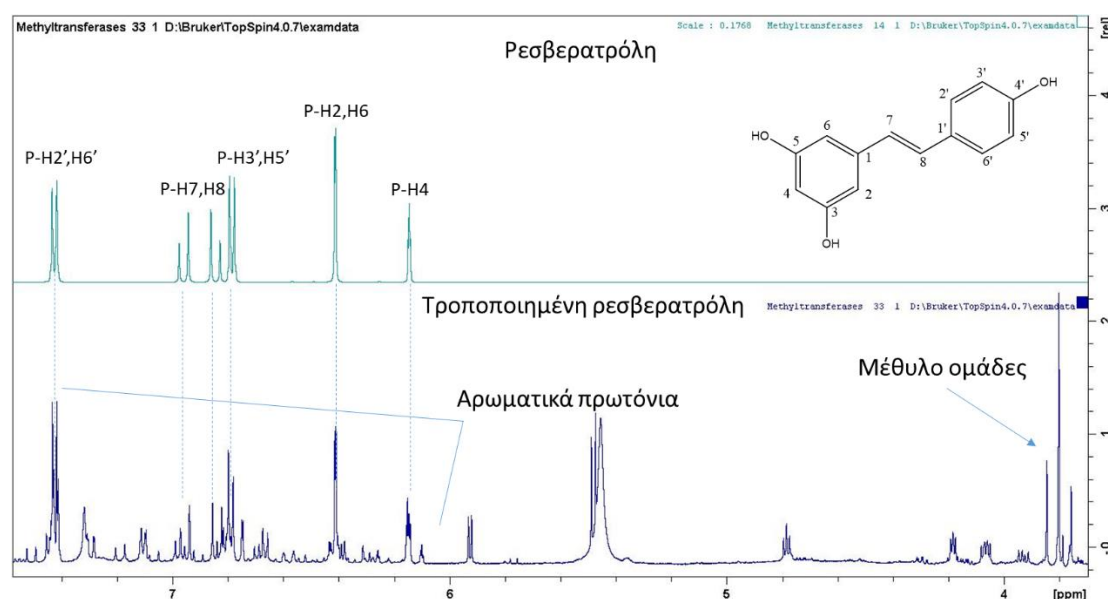
Ωρες αντίδρασης (h)	Απόδοση προϊόντος ₁ (%)	Απόδοση προϊόντος ₂ (%)	Συνολική απόδοση (%)
24	12	33	45
48	21	25	46
72	10	70	80

9.4.8.4 Αποτελέσματα MS της μεθυλίωσης της ρεσβερατρόλης από το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L

Η ανάλυση MS μαρτυρά την ύπαρξη φαινομενικά τριών προϊόντων (**Παράρτημα**) έναντι των δύο της HPLC. Σήματα στα 243.1 m/z και 257.1 m/z ταυτίζονται με αυτά που εμφανίζονται στη μεθυλίωση της ρεσβερατρόλης από το IeOMT WT εκπροσωπώντας μονομεθυλιωμένα και διμεθυλιωμένα ανάλογα. Ένα τρίτο σήμα προδίδει την ύπαρξη κι άλλου προϊόντος στα 27.1 m/z που αποδίδεται στο τριμεθυλιωμένο. Ωστόσο, φαίνεται να υπερισχύει το διμεθυλιωμένο προϊόν, έπειτα ακολουθεί το μονομεθυλιωμένο και έπειτα το τριμεθυλιωμένο. Και σε αυτήν την περίπτωση εμφανίζονται οι γνωστές κορυφές των DTT, οξειδωμένο DTT, SAH στα 155.0 m/z, 153.0 m/z και 385.1 m/z, ενώ το σήμα στα 210.1 m/z οφείλεται στο άλας MOPS του ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης.

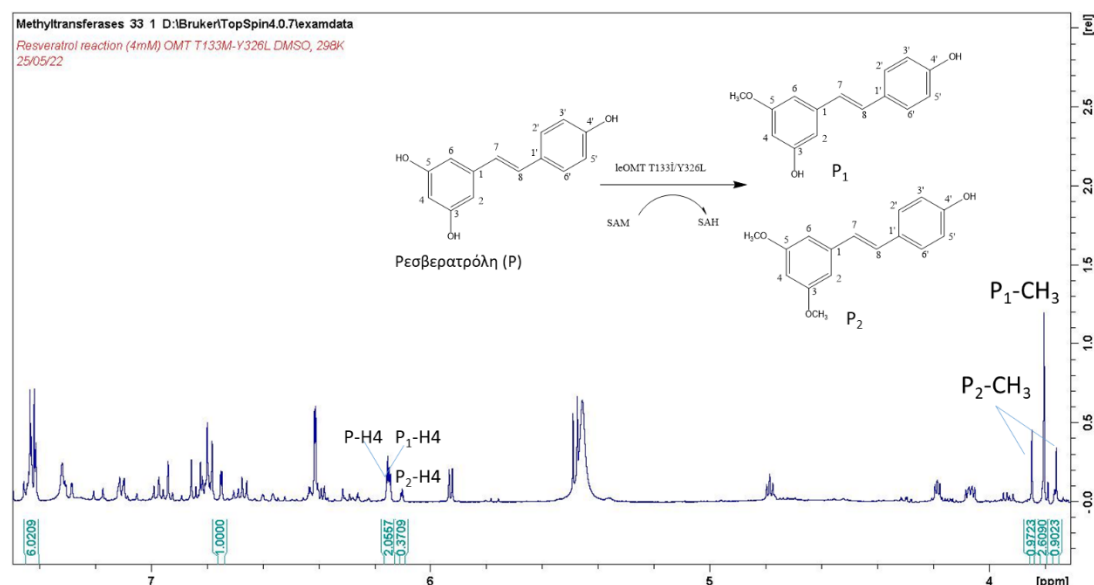
9.4.8.5 Αποτελέσματα NMR της μεθυλίωσης της ρεσβερατρόλης από το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L

Με σκοπό να επιβεβαιωθεί η ενζυμική τροποποίηση της ρεσβερατρόλης από το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L πραγματοποιήθηκε λήψη φασμάτων ^1H -NMR στο μίγμα της ενζυμικής αντίδρασης (**Εικόνα 23**).



Εικόνα 23. Επιλεγμένη περιοχή υπέρθεσης ^1H -NMR φασμάτων, πάνω της πρότυπης ρεσβερατρόλης και κάτω του μίγματος της ενζυμικής αντίδρασης της ρεσβερατρόλης από το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L, σε DMSO- d_6 , 298K.

Σύμφωνα με την **Εικόνα 23**, στο φάσμα του μείγματος της αντίδρασης (κάτω φάσμα) εντοπίζεται κάποια ποσότητα της ρεσβερατρόλης που δεν αντέδρασε καθώς εντοπίζουμε τα αρωματικά πρωτόνια της στην περιοχή 6.0-7.5 ppm. Παράλληλα εντοπίζονται νέες κορυφές στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων (6.0-7.5 ppm) και κορυφές που ανήκουν σε μέθυλοομάδες στην περιοχή 3.7-3.8 ppm υποδηλώνοντας την ύπαρξη νέων μεθυλιωμένων προϊόντων.



Εικόνα 24. Επιλεγμένη περιοχή ^1H -NMR φάσματος, του μίγματος της ενζυμικής αντίδρασης της ρεσβερατρόλης με το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L, σε DMSO- d_6 , 298K.

Από την ανάλυση του ^1H -NMR φάσματος του μείγματος της αντίδρασης παρατηρείται η εμφάνιση δύο προϊόντων. Το κύριο προϊόν φαίνεται να είναι η μεθυλιωμένη ρεσβερατρόλη. Παράλληλα εμφανίζεται μία κορυφή στα 3.8 ppm που ανήκει σε μία μέθυλοομάδα σύμφωνα με τα ολοκληρώματα των κορυφών (**Εικόνα 24**). Επιπλέον, παρατηρείται και ένα μικρότερο προϊόν που ανήκει στη διμέθυλο ρεσβερατρόλη, καθώς εμφανίζονται δύο κορυφές στα 3.7 και 3.8 ppm που σύμφωνα με τα ολοκληρώματά τους ανήκουν σε δύο μέθυλοομάδες. Με βάση τα ολοκληρώματα των κορυφών η συνολική απόδοση της αντίδρασης φαίνεται να είναι 58% ,με 42% για το μονομεθυλιωμένο προϊόν και 16% για το διμέθυλιωμένο προϊόν. Για τον πλήρη χαρακτηρισμό των προϊόντων απαιτείται καθαρισμός και των προϊόντων και λήψη 1D ^1H -NMR και 2D ^1H και ^{13}C -NMR.

9.4.9 Συνολικές τροποποιήσεις των υποστρωμάτων διαμέσου των μεθυλοτρανσφερασών

Στον παρακάτω πίνακα αποτυπώνονται συμπερασματικά όλες οι τροποποιήσεις στα υπό μελέτη υποστρώματα με χρήση των ακινητοποιημένων μεθυλοτρανσφερασών

Πίνακας 11. Συνοπτικός πίνακας παράθεσης τροποποιήσεων όλων των υποστρωμάτων ενδιαφέροντος σε πλήρη αντιστοιχία με το εκάστοτε ένζυμο και τα αποτελέσματα των αναλυτικών τεχνικών HPLC, MS και NMR για το χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση των προϊόντων. Οι τυπικές αποκλίσεις είναι μικρότερες του 5% σε όλες τις περιπτώσεις.

Ένωση	Ένζυμο	Ανάλυση HPLC	Ανάλυση MS	Ανάλυση NMR
Τυροσόλη	CaRO WT	-	-	-
	IeOMT T133M	Ένα προϊόν (19 %)	Μονομεθυλιωμένο προϊόν	-
Υδροξυτυροσόλη	CaRO WT	Ένα προϊόν (76 %)	Μονομεθυλιωμένο προϊόν	-
	IeOMT T133M	Δυο προϊόντα (72% και 14%)	Μονομεθυλιωμένα (κυρίαρχο), διμεθυλιωμένα προϊόντα	meta-μεθυλιωμένο (κύριο) Διμεθυλιωμένο
Ρεσβερατρόλη	IeOMT WT	Ένα προϊόν (2 %)	Μονομεθυλιωμένα (κυρίαρχο), διμεθυλιωμένα προϊόντα	-
	IeOMT T133M -Y326L	Δυο προϊόντα (10 % και 70 %)	Μονομεθυλιωμένα, διμεθυλιωμένα (κυρίαρχο) και τριμεθυλιωμένα προϊόντα	Μονομεθυλιωμένο (κύριο) διμεθυλιωμένο
Μορίνη	IeOMT T133M -Y326L	-	Μονομεθυλιωμένα, διμεθυλιωμένα προϊόντα	-
Μυρικήτίνη	IeOMT T133M -Y326L	Κατανάλωση υποστρώματος	Μονομεθυλιωμένα, διμεθυλιωμένα (κυρίαρχο) και τριμεθυλιωμένα προϊόντα	3',5' διμεθυλιωμένο προϊόν
Φισετίνη	IeOMT T133M -Y326L	Κατανάλωση υποστρώματος	Μονομεθυλιωμένα (κυρίαρχο), διμεθυλιωμένα προϊόντα	3'-μονομεθυλιωμένο προϊόν

Από τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται αντιληπτό ότι πραγματοποιήθηκε επιτυχής τροποποίηση όλων των υποστρωμάτων με τα αντίστοιχα ένζυμα, πλην αυτής της τυροσόλης με το ένζυμο CaRO WT το οποίο εμφανίζει τοποεκλεκτικότητα σε μεταθέση που δεν διαθέτει το υπόστρωμα αυτό. Παρατηρήθηκε ότι τα ένζυμα άγριου τύπου (CaRO WT και IeOMT WT) είναι αυστηρά πιο τοποεκλεκτικά εν αντιθέσει με τα μεταλλάγματα IeOMT T133M και IeOMT T133M/Y326L, τα οποία εμφανίζουν μείγματα προϊόντων στις αντιδράσεις που συμμετέχουν έχοντας ωστόσο μεγαλύτερη δραστικότητα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες[171, 172]. Αναφορικά με τα ένζυμα CaRO WT και IeOMT T133M, φαίνεται να προτιμούν τα μικρά φαινολικά υποστρώματα (τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη) και όχι πιο μεγάλα όπως το υπόστρωμα της ρεσβερατρόλης που δεν τροποποιήθηκε επιτυχώς με τη χρήση των συγκεκριμένων ενζύμων. Αυτή τροποποιήθηκε, εν συνεχεία, επιτυχώς με τα ένζυμα IeOMT WT και IeOMT T133M/Y326L, όπως και όλα τα φλαβονοειδή που δοκιμάστηκαν (μορίνη, μυρική, φισετίνη), με αυτό της διπλής μετάλλαξης να εμφανίζει μεγαλύτερη και καλύτερη δραστικότητα ως προς αυτά τα υποστρώματα.

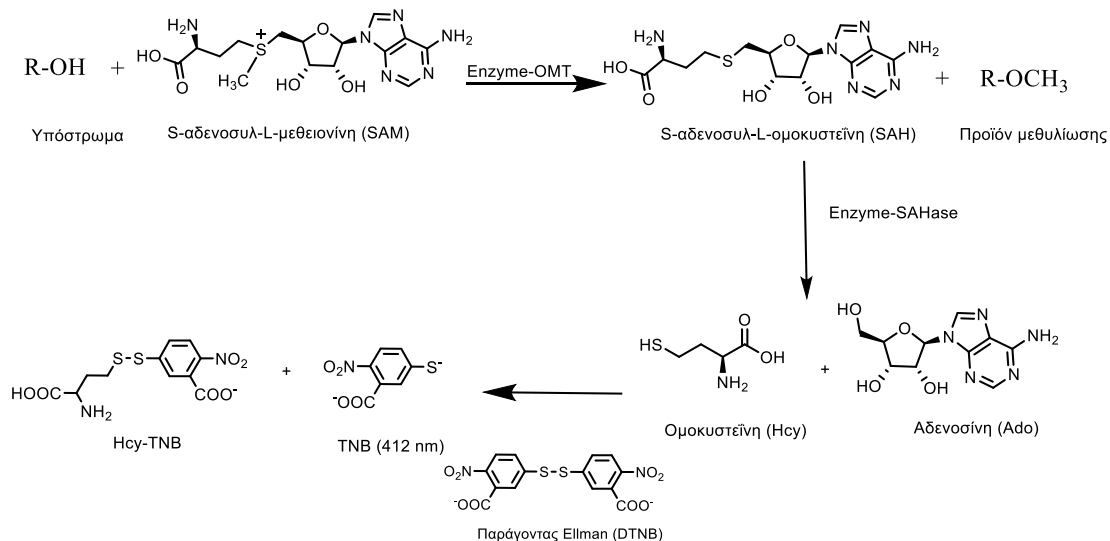
9.5 Ανάπτυξη πρωτοκόλλου φωτομετρικής ανίχνευσης ενζυμικής δραστικότητας των μεθυλοτρανσφερασών

Η ανίχνευση της δραστικότητας των μεθυλοτρανσφερασών πραγματοποιείται κυρίως μέσω ανάλυσης με χρωματογραφία HPLC, χωρίς να υπάρχει κάποιο διαφορετικό πειραματικό πρωτόκολλο που να προσφέρει άμεση, γρήγορη και αξιόπιστη ανίχνευση της δραστικότητας με μικρό κόστος. Εξαίρεση αποτελούν οι DNA-μεθυλοτρανσφεράσες για τις οποίες έχουν αναπτυχθεί αρκετά πρωτόκολλα ανίχνευσης της δραστικότητας τους [201], καθώς είναι άμεσα συνδεδεμένες με τη γονιδιακή ρύθμιση και δυνητικά αποτελούν ένα βιοδείκτη για την ανίχνευση γενετικών διαταραχών. Η τεχνική της HPLC μπορεί να είναι μία από τις πιο διαδεδομένες αναλυτικές τεχνικές, ωστόσο είναι χρονοβόρα και το κόστος της διεργασίας αυξάνεται όταν χρησιμοποιείται. Για το λόγο αυτό, ήταν επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης ενός πρωτοκόλλου για την ανίχνευση της ενζυμικής δραστικότητας των μεθυλοτρανσφερασών, που προσδίδει μεγαλύτερη αμεσότητα και ευκολία μειώνοντας παράλληλα και το χρόνο ανάλυσης. Έτσι, θα μπορεί να πραγματοποιηθεί και η μελέτη του ακινητοποιημένου ενζύμου ευκολότερα προκειμένου να διαπιστωθούν εάν υπάρχουν βελτιστοποιημένες ιδιότητες σε σχέση με το ελεύθερο.

Το παραπροϊόν της ενζυμικής μεθυλίωσης των SAM εξαρτώμενων μεθυλοτρανσφερασών είναι το SAH, το οποίο αποτελεί σημαντικό ανασταλτικό παράγοντα των ενζύμων αυτών. Όμως, η φύση προνόησε για αυτό έχοντας δημιουργήσει τα υδρολυτικά ένζυμα του SAH (SAHases) τα οποία απομακρύνουν το παραπροϊόν SAH υδrolύοντας το σε ομοκυστεΐνη και αδενοσίνη. **(Σχήμα 13)** Η καταλυτική δραστικότητα αυτού του ενζύμου είναι κρίσιμης σημασίας για τον έλεγχο των επιπέδων του SAH. Επομένως, έχουν προταθεί αρκετά πρωτόκολλα ανίχνευσης της δραστικότητας τους, τα οποία εκμεταλλεύονται είτε την παραγωγή της ομοκυστεΐνης είτε της αδενοσίνης και στη συνέχεια με μία συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιείται η ανίχνευση τους. Σε αυτά που αιχμαλωτίζουν και ανιχνεύουν την

ύπαρξη της ομοκυστεΐνης ανήκουν πρωτόκολλα που βασίζονται στη μετατροπή της σε ινοσίνη διαμέσου της απαμινάσης της αδενοσίνης και ανιχνεύονται μέσω της HPLC [202], τα οποία έχουν υποστεί παραλλαγές [203]. Τη μετατροπή της αδενοσίνης, αυτή τη φορά σε μονοσφωφορικής αδεσονίνης (AMP) μέσω της κινάσης της αδενοσίνης, εκμεταλλεύεται ένα άλλο φωτομετρικό πρωτόκολλο, όπου μέσω ενός καταρράκτη ενζυμικών αντιδράσεων γίνεται ανίχνευση της μείωσης της απορρόφησης του NADH.[204] Μία χρωματομετρική μέθοδος μέτρησης της δραστηριότητας των SAHases προτάθηκε η οποία εκμεταλλεύεται την παραγωγή της ομοκυστεΐνης η οποία εν συνεχεία αντιδρά με το παράγοντα Ellman (5,5-διθειο-δις-(2-νιτροβενζοϊκό οξύ), DTNB), μία ένωση που αντιδρά με τις ομάδες θειολών. Παράγεται, επομένως, το έγχρωμο 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ (TNB), το οποίο ανιχνεύεται φωτομετρικά στα 412 nm (Σχήμα 15).[205]

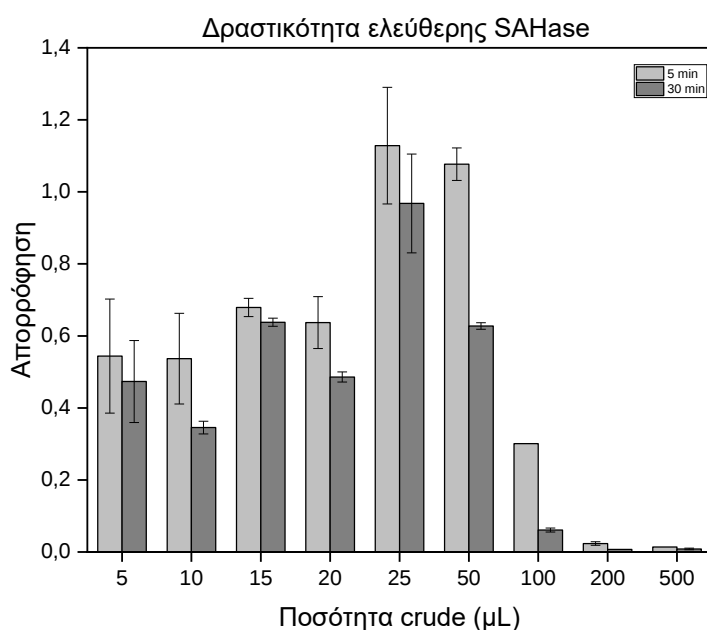
Επιλέχθηκε το φωτομετρικό δοκίμιο που χρησιμοποιεί την ομοκυστεΐνη προκειμένου να γίνει η ανίχνευση, λόγω της ευκολίας, της αμεσότητας και του χαμηλού του κόστους. Σκεπτικό λοιπόν ήταν, ο συνδυασμός των μεθυλοτρανσφερασών και της υδρολάσης του SAH με σκοπό την έμμεση μέτρηση της δραστηριότητας των OMTs. Έτσι, με την προσθήκη του ενζύμου SAHase και του παράγοντα Ellman στις αντιδράσεις μεθυλίωσης που πραγματεύεται η παρούσα εργασία, θα μπορούσε να γίνει έμμεση ανίχνευση της δραστηριότητας των OMTs. Αυτό επιτυγχάνεται καθώς το παραπροϊόν της αντίδρασης της μεθυλίωσης, SAH, είναι φυσικό υπόστρωμα του ενζύμου SAHase, η οποία με τη σειρά της το υδρολύει, η παραγόμενη ομοκυστεΐνη αντιδρά με τον προστιθέμενο παράγοντα Ellman ανιχνεύοντας την δημιουργία του TNB φωτομετρικά. (Σχήμα 28)



Σχήμα 28. Σχήμα πορείας αντιδράσεων της φωτομετρικής ανίχνευσης της δραστηριότητας των μεθυλοτρανσφερασών με χρήση SAHase.

9.5.1 Έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας ελεύθερης SAHase

Απαραίτητος ήταν ο έλεγχος της δραστηριότητας του ενζύμου SAHase μετά την υπερεκφρασή του μέσω βακτηριών καλλιιεργειών E.coli. Αυτό πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το χρωμομετρικό πρωτόκολλο, κατά το οποίο η αντίδραση λαμβάνει χώρα υπό την παρουσία 50 μM υποστρώματος SAH, ενζύμου SAHase και 100 μM DTNB στους 37°C.[205] Δεδομένου ότι δεν χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο σε καθαρή μορφή, δοκιμάστηκαν διάφορες ποσότητες του κυτταρικού λύματος (crude) που το περιείχαν σε περίσσεια και ελέγχθηκε η δραστηριότητα του σε αντίδραση που επώαστηκε 5 και 30 λεπτά, ανιχνεύοντας κάθε φορά το παραγόμενο TNB στα 412 nm. Για κάθε ποσότητα και χρόνο που μελετήθηκαν, λήφθηκαν μετρήσεις και των αντίστοιχων τυφλών αντιδράσεων. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στο **Διάγραμμα 3**.

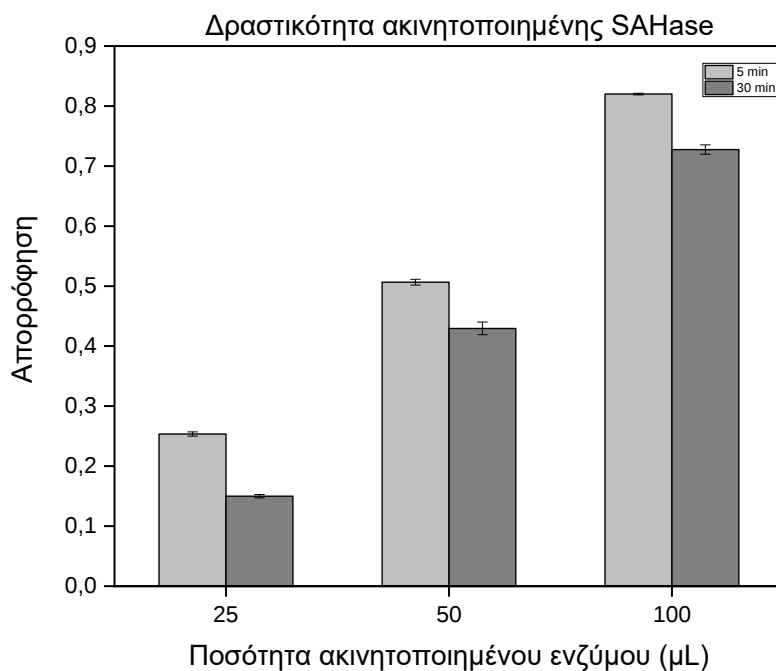


Διάγραμμα 3. Δραστηριότητα της ελεύθερης SAHase μέσω της ανίχνευσης του χρωμοφόρου προϊόντος TNB στα 412 nm, το οποίο προκύπτει από την αντίδραση του DTT με το προϊόν υδρόλυσης της L-ομοκυστεΐνης. Η απορρόφηση της αντίδρασης μετρήθηκε στα 5 και 30 min επώασης. Μέγιστη δραστηριότητα εμφανίζεται στα 25 μL του κυτταρικού λύματος που εμπεριέχει την υπερεκφρασμένη ποσότητα και των δύο χρόνων, ενώ υπάρχει φθίνουσα πορεία για τις μεγαλύτερες ποσότητες. Η επώαση στα 5 min φέρει καλύτερη δραστηριότητα.

Παρατηρείται μια αυξανόμενη δραστηριότητα της SAHase σε σχέση με την αύξηση της ποσότητας του κυτταρικού λύματος που χρησιμοποιείται κάθε φορά έως το μέγιστο στα 25 μL . Έπειτα, όσο η ποσότητα γίνεται μεγαλύτερη υπάρχει μια εμφανής φθίνουσα πορεία της δραστηριότητας, με αυτήν στα 500 μL σχεδόν να χάνεται. Η συμπεριφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι μέσα στο κυτταρικό εκχύλισμα που χρησιμοποιείται δεν υπάρχει μόνο η επιθυμητή πρωτεΐνη, αλλά και πολλές άλλες πρωτεΐνες καθώς και ενώσεις, οι οποίες μπορούν να αντιδρούν με το DTNB, που αντιδρά με θειόλες, όπως έχει αναφερθεί. Όσον αφορά το χρόνο της αντίδρασης, τα 5 λεπτά επώασης αποδίδουν καλύτερη δραστηριότητα έναντι των 30 λεπτών. Πιθανή εξήγηση αυτού μπορεί να είναι η μετουσίωση των πρωτεϊνών, η οποία ήταν εμφανής μετά το πέρας των 30 λεπτών, μιας και η αντίδραση ήταν θολή με αναγκαία την πραγματοποίηση φυγοκέντρησης πριν τη μέτρηση της απορρόφησης.

9.5.2 Έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας ακινητοποιημένης SAHase

Για να αντιμετωπιστούν τα προβλήματα που εντοπίστηκαν κατά των προσδιορισμό της δραστηριότητας του ελεύθερου ενζύμου SAHase, πραγματοποιήθηκε η ακινητοποίηση του ενζύμου. Αυτή έλαβε χώρα με τη χρήση νανοσωματιδίων Fe_3O_4 επικαλυμμένα με πολυντοπανίμη και νικέλιο (II) υπό τις βελτιστοποιημένες συνθήκες που βρέθηκαν κατά τη μελέτη ακινητοποίησης των μεθυλοτρανσφερασών. Ελέγχθηκε η δραστηριότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου υπό την παρουσία διαφόρων ποσοτήτων αυτού, ήτοι 25, 50 και 100 μL , σε χρόνους επώασης 5 και 30 λεπτών.



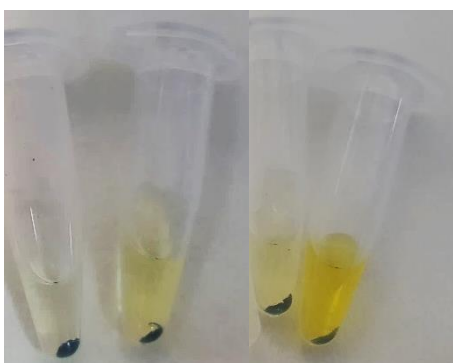
Διάγραμμα 4. Δραστηριότητα της ακινητοποιημένης SAHase μέσω της ανίχνευσης του χρωμοφόρου προϊόντος TNB στα 412 nm, το οποίο προκύπτει από την αντίδραση του DTT με το προϊόν υδρόλυσης της L-ομοκυστεΐνης. Παρατηρείται αύξηση αυτής όσο αυξάνεται και η ποσότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου. Η απορρόφηση της αντίδρασης μετρήθηκε στα 5 και 30 min επώασης. Η επώαση στα 5 min φέρει καλύτερη δραστηριότητα.

Στο **Διάγραμμα 4**, παρουσιάζεται η δραστηριότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου συναρτήσει της αύξησης της προστιθέμενης ποσότητάς του. Υπάρχει μία αυξητική πορείας της δραστηριότητας μάλιστα ανάλογης της ποσότητας καθώς όταν αυτή διπλασιάζεται, σχεδόν διπλασιάζεται και η απορρόφηση. Επίσης, παρατηρείται πως δεν εμφανίζονται οι περιορισμοί που εντοπίζονται στο ελεύθερο ένζυμο διότι σε ποσότητες μεγαλύτερες των 25 μL αυξάνεται η δραστηριότητά του ακινητοποιημένου εναντιθέσει με του ελεύθερου που μειώνεται. Άρα, όπως αποδεικνύεται, η καθαρότητα του ενζύμου είναι σημαντικός παράγοντας στη διεξαγωγή αυτού του πρωτοκόλλου. Επιπλέον, φαίνεται πως και η ακινητοποίηση συνέβαλε στη σταθεροποίηση του ενζύμου, καθώς στα 30 λεπτά επώασης δεν παρατηρούνται μεγάλες διαφορές στην απορρόφηση σε σχέση με τα 5 λεπτά, με αυτά ωστόσο να παραμένουν αποδοτικότερα.

9.5.3 Αποτελέσματα ανίχνευσης δραστηριότητας O-MTs μέσω του φωτομετρικού δοκιμίου της SAHase

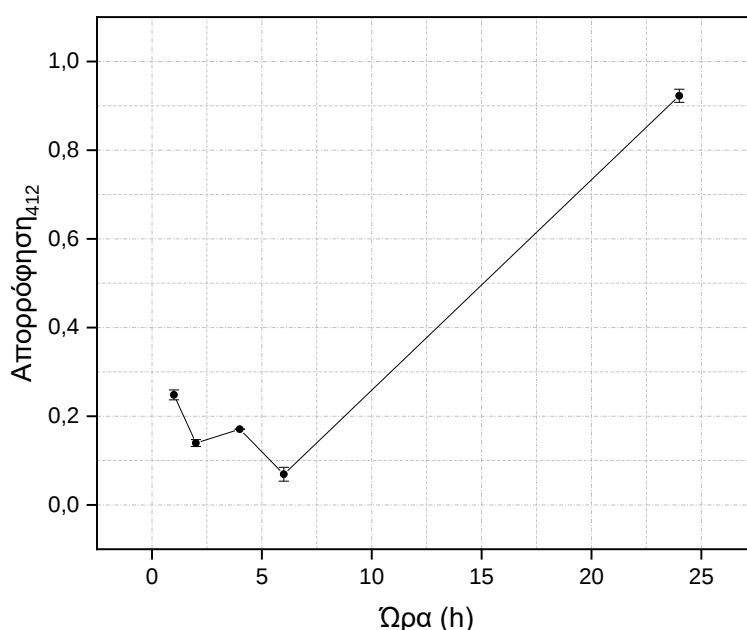
Στις αντιδράσεις μεθυλίωσης της παρούσας εργασίας, προστίθεται ο αναγωγικός παράγοντας DTT για να αποφευχθεί ο σχηματισμός διαμοριακών και ενδομοριακών σουλφιδικών δεσμών που μπορούν να αποτελέσουν αποσταθεροποιητικοί παράγοντες για τη δραστηριότητα του ενζύμου, αφού διαθέτει ελεύθερες σουλφριδικές ομάδες. Από την άλλη πλευρά, στο φωτομετρικό πρωτόκολλο της SAHase γίνεται χρήση του αντιδραστήριου DTNB το οποίο ανιχνεύει θειόλες, με τον περιορισμό ότι αντιδρά με όλες τις θειόλες χωρίς να εμφανίζει ειδικότητα προς την L-ομοκυστεΐνη.[204] Βάσει αυτού και του ότι το DTT είναι μια θειόλη που μάλιστα βρίσκεται σε μεγάλη περίσσεια (5 mM) στην αντίδραση σε σύγκριση με το υπόστρωμα (1 mM), κρίθηκε αναγκαίος ο έλεγχος της διεξαγωγής της αντίδρασης χωρίς την παρουσία DTT. Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με τη χρήση του ενζύμου IeOMT WT και του υποστρώματος της ισοευγενόλης για 72 ώρες με και χωρίς την παρουσία DTT και έπειτα αναλύθηκαν μέσω HPLC.

Κατά τη διάρκεια των πρώτων 24 ωρών αντίδρασης, αυτή που εμπεριείχε το DTT έδωσε απόδοση της τάξεως των 55 %, ενώ αυτή που δεν το περιείχε η απόδοσή της ήταν στο 25 %, φανερά πιο μειωμένη. Ωστόσο, με την πάροδο άλλων δύο 24 ωρών, οι αποδόσεις και των δύο των αντιδράσεων ήταν κοντά με αυτή του DTT στα 86 % και η άλλη μόλις τρεις μονάδες κάτω δηλαδή στο 83 %. Αυτά τα αποτελέσματα, δείχνουν ότι το διενζυμικό σύστημα O-MT-SAHas μπορεί να λειτουργήσει ακόμη και χωρίς την παρουσία του περιοριστικού DTT. Επιπλέον, ελέγχθηκε και η περίπτωση της υδρόλυσης του SAM από την υδρολάση SAHase, δεδομένου ότι οι δομές των SAM και SAH διαφέρουν στο μεθύλιο που εντοπίζεται πάνω στο άτομο του θείου στο SAM και όχι στο SAH. Έτσι, διεξήχθη μία αντίδραση με ακινητοποιημένη SAHase, SAM και DTNB, η οποία επώαστηκε για 24 ώρες με την απορρόφησή της στα 412 nm να είναι αμελητέα εν συγκρίσει με την αντίδραση της υδρόλυσης του SAH, όπως διαπιστώνεται και οπτικά στην παρακάτω εικόνα.



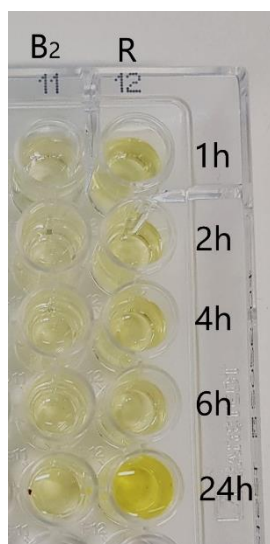
Εικόνα 25. Αντιδράσεις υδρόλυσης SAM (αριστερά) και SAH (δεξιά) ύστερα από 24 ώρες επώαση, με τις αντίστοιχες τυφλές αντιδράσεις.

Αφού αποσαφηνίστηκαν τα παραπάνω ζήτημα, πραγματοποιήθηκε δοκιμή του φωτομετρικού πρωτοκόλλου με την ταυτόχρονη παρουσία O-MT και SAHase. Πιο συγκεκριμένα, η αντίδραση έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (50 mM, pH 7.5) με 1 mM ισοευγενόλη, 2 mM DTNB, 1 mM SAM, 250 μ L ακινητοποιημένου ενζύμου IeOMT WT και 50 μ L ακινητοποιημένου ενζύμου SAHase στους 35°C υπό ανάδευση (800 rpm). Λήφθηκαν δείγματα στις 1, 2, 4, 6 και 24 ώρες αντίδρασης, στα οποίο μετρήθηκε η απορρόφησή τους στα 412 nm. Τονίζεται πως έγινε αντίστοιχη μελέτη της τυφλής αντίδρασης, δηλαδή χωρίς την παρουσία του IeOMT WT.



Διάγραμμα 5. Παρακολούθηση της πορείας αντίδρασης μεθυλίωσης της ισοευγενόλης από το ένζυμο IeOMT WT διαμέσου του φωτομετρικού πρωτοκόλλου με χρήση της SAHase και του παράγοντα Ellman.

Από το παραπάνω διάγραμμα, φαίνεται πως δίνεται η δυνατότητα παρακολούθησης της αντίδρασης διαμέσου του φωτομετρικού αυτού πρωτοκόλλου, καθώς στις 24 ώρες αντίδρασης η απορρόφηση είναι εμφανώς μεγαλύτερη από αυτές που αντιστοιχούν μέχρι και τις 6 ώρες. Επιπλέον, μπορεί να παρατηρηθεί και οπτικά η εξέλιξη της αντίδρασης μιας και το χρώμα που δημιουργείται είναι κίτρινο. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 26**, η ένταση του κίτρινου χρώματος αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου.



Εικόνα 26. Παρακολούθηση αλλαγής χρώματος της ενζυμικής μεθυλίωσης της ισοευγενόλης από το ένζυμο IeOMT (R) και της τυφλής (blank) αντίδρασης (B₂) με χρήση του φωτομετρικού πρωτοκόλλου της SAHase στις 1, 2, 4, 6 και 24 h.

Επίσης, έλαβαν χώρα ορισμένες δοκιμές προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης των δύο ενζύμων. Πρώτος παράγοντας που ελέγχθηκε η θερμοκρασία της αντίδρασης καθώς οι ενζυμικές μεθυλιώσεις πραγματοποιούνται στους 28°C και το φωτομετρικό πρωτόκολλο των SAHases στους 37°C. Η ενζυμική δραστηριότητα της ελεύθερης IeOMT WT διατηρείται σύμφωνα με τη βιβλιογραφία στους 35°C [169], επομένως μελετήθηκε η συγκεκριμένη τιμή θερμοκρασίας. Πραγματοποιήθηκαν εκ νέου οι αντιδράσεις μεθυλίωσης της ισοευγενόλης από το ένζυμο IeOMT WT, με και χωρίς την παρουσία DTT στους 35°C. Η ανάλυση HPLC ανέδειξε ότι στις 72 ώρες αντίδρασης, οι αποδόσεις ήταν μικρότερες από εκείνες στους 28°C, καθώς με DTT η απόδοση αντιστοιχεί σε 50.0 % και χωρίς σε 30.7 %. Επόμενος παράγοντας που μελετήθηκε ήταν αυτός του pH αντίδρασης μιας και οι δύο αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε διαφορετικά pH, ήτοι 7.5 και 8.0. Συνεπώς, γίνανε αντιδράσεις μεθυλίωσης της ισοευγενόλης από το ένζυμο IeOMT WT, με και χωρίς την παρουσία DTT σε pH 8.0, με τις αποδόσεις και των δύο αντιδράσεων να ξεπερνούν το 90 % . Τέλος, ελέγχθηκε και η αναλογία των δύο ενζύμων. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε η αναλογία 250:50 που αντιστοιχεί στη χρήση 250 μ L ακινητοποιημένης O-MT και 50 μ L ακινητοποιημένης SAHase. Πέραν τούτης της αναλογίας, δοκιμάστηκε και η αναλογία 250:25, με τις αποδόσεις της σε αντιδράσεις με και χωρίς DTT να ξεπερνούν και αυτές το 90 % και να είναι κοντά στις τιμές των αποδόσεων της αναλογίας 250:50.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όλο ένα και περισσότερο χρησιμοποιείται η μεθυλίωση ενώσεων στην ιατρική χημεία καθώς η προσθήκη μέθυλο-ομάδας ($-\text{CH}_3$) σε μία ένωση έχει ως απόρροια την ύπαρξη του φαινομένου του μεθυλίου, γνωστό και ως methyl magic effect, το οποίο εμφανίζει σημαντική επιρροή στις φυσικοχημικές και στις οργανοληπτικές ιδιότητες και στη βιολογική δράση του μεθυλιωμένου παραγώγου συγκριτικά με την πρόδρομη ένωση του. Ενώσεις όπως τα φυσικά προϊόντα αποτελούν πόλο έλξης στη φαρμακευτική και ιατρική χημεία, καθώς ως δευτερογενείς μεταβολήτες παρουσιάζουν εξαιρετικές βιολογικές δράσεις. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται ποικίλες φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή, με τα τελευταία να τροποποιούνται ενζυμικά για την επιμήκυνση και τη βελτιστοποίηση των βιολογικών τους δράσεων, όπως επίσης και για την αντιμετώπιση των περιορισμών που υπόκεινται προκειμένου να μπορέσουν να αξιοποιηθούν ευκολότερα. Συνεπώς, στόχος της εργασίας είναι η τροποποίηση φυσικών προϊόντων με τη χρήση μεθυλοτρανσφερασών, δηλαδή ένζυμα που καταλύουν τη μεταφορά μιας μεθυλο-ομάδας από ένα μόριο δότη σε ένα μόριο δέκτη. Γίνεται λόγος για βιοκαταλυτική διεργασία πράγμα που σημαίνει πως λόγω τοποεκλεκτικότητας πραγματοποιείται στοχευμένη τροποποίηση των υποστρωμάτων, με τη θέση μεθυλίωσης να έχει αποδειχθεί ότι είναι πολύ σημαντική καθώς απορρέουν διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες από διαφορετικές θέσεις.

Επιλέχθηκαν να τροποποιηθούν τα φαινορικά υποστρώματα της ισοευγενόλης, του καφεϊκού οξέος, της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης, τα φλαβονοειδή λουτεολίνη, μορίνη, μυρικετίνη και φισετίνη και το στυλβένιο της ρεσβερατρόλης. Για την τροποποίηση των υποστρωμάτων, χρησιμοποιήθηκαν μεθυλοτρανσφεράσες από δύο διαφορετικούς οργανισμούς *Clarkia breweri* (IeOMT) και *Catharanthus roseus* (CaROMT). Πιο συγκεκριμένα, έγινε χρήση του άγριου τύπου αυτών (IeOMT WT και CaROMT WT) και δύο μεταλλάξεων του ενζύμου IeOMT (IeOMT T133M και IeOMT T133M/Y326L) οι οποίες προσφέρουν μεγαλύτερη καταλυτική ικανότητα σε σύγκριση με του άγριου τύπου. Όλα τα ένζυμα υπερεκφράστηκαν μέσω βακτηριακών καλλιέργειών με κύτταρα *E.coli* του στελέχους BL21. Αρχικά ελέγχθηκε η δραστηριότητα των ελεύθερων ενζύμων μέσω HPLC έχοντας ως υπόστρωμα την ισοευγενόλη για τα ένζυμα IeOMT και το καφεϊκό οξύ για το ένζυμο CaROMT WT, με τα αποτελέσματα να συμφωνούν με αυτά της βιβλιογραφίας καθώς φέρουν παρόμοια δραστηριότητα και παρατηρείται μια αύξηση αυτής στα μεταλλάγματα σε σχέση με του άγριου τύπου.

Προκειμένου να βελτιωθεί η λειτουργικότητα των ενζύμων αναπτύχθηκαν αποτελεσματικοί βιοκαταλύτες, μέσω της ακινητοποίησης των ενζύμων σε μαγνητικά νανοσωματίδια για πρώτη φορά. Δοκιμάστηκαν δύο φορείς ακινητοποίησης οι οποίοι διαθέτουν ίδιο πυρήνα, δηλαδή νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου (Fe_3O_4) ωστόσο διαφέρουν ως προς την επικάλυψη καθώς ο ένας επικαλύπτεται με πολυτοπανίνη και νικέλιο και ο άλλος με NTA και νικέλιο. Η στρατηγική ακινητοποίησης είναι ίδια και για τους δυο φορείς και βασίζεται στη χρωματογραφία IMAC, όπου λαμβάνει χώρα εξαιτίας της μεγάλης συγγένειας δέσμευσης που εμφανίζει το νικέλιο με το άζωτο του

ημιδαζολίου της ιστιδίνης σε ένζυμο με His-tag. Μάλιστα, η τεχνική αυτή προσφέρει μαζί με την ακινητοποίηση των ενζύμων και τον ταυτόχρονο καθαρισμό τους από το κυτταρικό λύμα. Ανάμεσα στους δύο φορείς, μεγαλύτερη δραστικότητα της τάξεως του 55 % εμφάνισε ο βιοκαταλύτης με την πολυντοπανίμη συγκριτικά με το δεύτερο που η δραστικότητα του ανέρχεται στο 48 %, διαφορά που μπορεί να οφείλεται είτε στην καλύτερη δραστικότητα του ενζύμου λόγω διαμορφωτικών αλλαγών ή καλύτερης διάχυσης υποστρώματος είτε σε υψηλότερο ποσοστό ακινητοποίησης.

Για την αποτελεσματικότερη ακινητοποίηση των ενζύμων, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων με σκοπό τη βελτιστοποίηση αυτής της διαδικασίας. Έτσι ελέγχθηκαν οι παράμετροι του χρόνου της επώασης της ακινητοποίησης και της αναλογίας νανοβιοκαταλυτικού εκχυλίσματος, με κάθε φορά να μεταβάλλεται ο ένας από τους δύο παράγοντες. Οι μελετώμενες αναλογίες ήταν οι 1:2 και 1:4 και οι χρόνοι 30 λεπτά, 2 και 4 ώρες. Η ανάλυση των αντιδράσεων διαμέσου της HPLC ανέδειξε βέλτιστη αναλογία την 1:4 και βέλτιστο χρόνο επώασης τις 2 ώρες. Ωστόσο, η διαφορά στη δραστικότητα του ενζύμου ανάμεσα στις 2 ώρες επώασης (90 %) και στα 30 λεπτά (87 %) εμπίπτει στα πλαίσια του πειραματικού σφάλματος και για αυτό επιλέχθηκε ο χρόνος των 30 λεπτών. Υπό τις βελτιωμένες συνθήκες ελέγχθηκε η δραστικότητα των νανοβιοκαταλυτών IeOMT WT, IeOMT T133M και IeOMT T133M/Y326L με τη δραστικότητα να αυξάνεται από του άγριου τύπου προς τις μεταλλάξεις σε συμφωνία με τη δραστικότητα που εμφανίζουν τα ελεύθερα ένζυμα. Επιπλέον, η ακινητοποίηση επιβεβαιώθηκε και μέσω της τεχνικής FTIR.

Η τροποποίηση των φαινολικών υποστρωμάτων της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τα ακινητοποιημένα ένζυμα CaRO WT και IeOMT T133M και η ανάλυση αυτών έγινε μέσω HPLC, MS και για ορισμένες αντιδράσεις με NMR. Η τυροσόλη δεν τροποποιήθηκε από το ένζυμο CaRO WT διότι βάσει βιβλιογραφίας διαθέτει τοποεκλεκτικότητα σε meta-θέση η οποία δεν υφίσταται στη δομή της τυροσόλης. Ωστόσο, αυτή τροποποιήθηκε από το IeOMT T133M δίνοντας το para-μεθυλιωμένο ανάλογό της. Λόγω της ύπαρξης υδροξυλίου σε meta-θέση στην υδροξυτυροσόλη, η τροποποίησή της από το ένζυμο CaRO WT έδωσε το meta-μεθυλιωμένο ανάλογό της. Μείγμα προϊόντων δίνει η τροποποίηση της υδροξυτυρολόσης από το ακινητοποιημένο ένζυμο IeOMT T133M, με το μονομεθυλιωμένο σε para-θέση να είναι το κύριο, ενώ εμφανίζεται και το διμεθυλιωμένο σε πολύ μικρότερο ποσοστό. Τα υποστρώματα της ισοευγενόλης και του καφεϊκού οξέος έχουν μελετηθεί προηγουμένως βιβλιογραφικά τα αποτελέσματα των οποίων επιβεβαιώθηκαν.

Τα υποστρώματα των φλαβονοειδών τροποποιήθηκαν για πρώτη φορά από τα ακινητοποιημένα ένζυμα IeOMT WT και IeOMT T133M/Y326L, με το δεύτερο ένζυμο να μελετάται περαιτέρω λόγω καλύτερης δραστικότητας. Το διμεθυλιωμένο παράγωγο στις θέσης 2' και 5' φαίνεται να είναι το προϊόν της τροποποίησης της μυρικετίνης και το μονομεθυλιωμένο στη θέση meta (3') παράγωγο φαίνεται να είναι προϊόν της μεθυλίωσης της φισετίνης. Εάν και η ανάλυση MS έδειξε την ύπαρξη προϊόντων για το υπόστρωμα της μορίνης, δεν μπόρεσε να δείξει κάτι η ανάλυση NMR

πράγμα που σημαίνει ότι πιθανόν να υπήρξε πολύ μικρή τροποποίηση αυτής. Αναφορικά για το υπόστρωμα της λουτεολίνης, τα αποτελέσματα συμφωνούν με τη βιβλιογραφία, καθώς από την ανάλυση HPLC βρέθηκαν δύο προϊόντα που αντιστοιχούν στη 3'μονομέθυλο λουτεολίνη και στη 3',4'διμέθυλο λουτεολίνη.

Επιπροσθέτως, επιτεύχθηκε για πρώτη φορά και η τροποποίηση της ρεσβερατρόλης, ενός στιλβενίου, από τα ακινητοποιημένα ένζυμα IeOMT WT και IeOMT T133M/Y326L. Λόγω καλύτερης δραστηριότητας δόθηκε έμφαση στην τροποποίησή της από το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L, όπου φαίνεται να υπάρχει μείγμα προϊόντων με την μονομέθυλο να είναι το κύριο και να ακολουθεί η διμέθυλο ρεσβερατρόλη.

Λόγω ότι ο έλεγχος της δραστηριότητας των μεθυλοτρανσφερασών απαιτεί τη χρήση HPLC, ήταν επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης ενός δοκιμίου γρηγορότερου και πιο οικονομικού. Έτσι, έγινε μια προσπάθεια ανάπτυξης ενός φωτομετρικού δοκιμίου που εκμεταλλεύεται τη δημιουργία του παραπροϊόντος της μεθυλίωσης SAH, το οποίο υδρολύεται με τη χρήση των ενζύμων SAHases και συνδυαστικά με το αντιδραστήριο Ellman, δημιουργείται ένα χρωμοφόρο προϊόν απορροφώντας στα 412 nm. Αρχικά, ελέγχθηκε η δραστηριότητα του SAHase προερχόμενο από τον οργανισμό *Bradyrhizobium elkanii*, τόσο σε ελεύθερη όσο και σε ακινητοποιημένη μορφή, με τη μέθοδο ακινητοποίησης να είναι ίδια με αυτή των μεθυλοτρανσφερασών, δοκιμάζοντας διαφορετικές ποσότητες κυτταρικούς εκχυλίσματος ή ακινητοποιημένου ενζύμου, αντιστοίχως. Η ποσότητα των 25 μ L και των δύο μορφών ενζύμου αποδείχθηκε καλύτερη για την διεξαγωγή του ελέγχου δραστηριότητάς του. Δεδομένου ότι το αντιδραστήριο Ellman δεν εμφανίζει εκλεκτικότητα ως προς τις θειόλες και στην αντίδραση μεθυλίωσης περιέχεται μια θειόλη, το DTT, ως σταθεροποιητικός παράγοντας του ενζύμου πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις μεθυλίωσης χωρίς DTT. Από την ανάλυση HPLC φάνηκε πως είναι δυνατή η διεξαγωγή της μεθυλίωσης χωρίς το DTT αφού ύστερα από 48 ώρες αντίδρασης το ποσοστό μετατροπής που υποστρώματος και των δύο αντιδράσεων (με ή χωρίς DTT) ήταν κοντά στο 86 %. Επιπλέον, μελετήθηκαν παράγοντες όπως το pH της αντίδρασης (pH 7.5 και pH 8.0), η θερμοκρασία της αντίδρασης (28 και 35 °C) και η αναλογία των ακινητοποιημένων ενζύμων μεθυλοτρανσφερασών και SAHases (250 μ L:50 μ L και 250 μ L : 25 μ L) προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής του δοκιμίου. Τα πρώτα αποτελέσματα δείχνουν ως βέλτιστη θερμοκρασία αυτή των 28 °C με την απόδοση της αντίδρασης 72 ωρών να ανέρχεται πάνω από 80 %, ενώ η τιμή του pH 8.0 της αντίδρασης έδωσε μεγαλύτερη απόδοση συγκριτικά με την τιμή pH 7.5, με την απόδοση της αντίδρασης να είναι της τάξεως άνω του 90 %. Τέλος, οι αναλογίες των ενζύμων που δοκιμάστηκαν έδωσα παρόμοια αποτελέσματα.

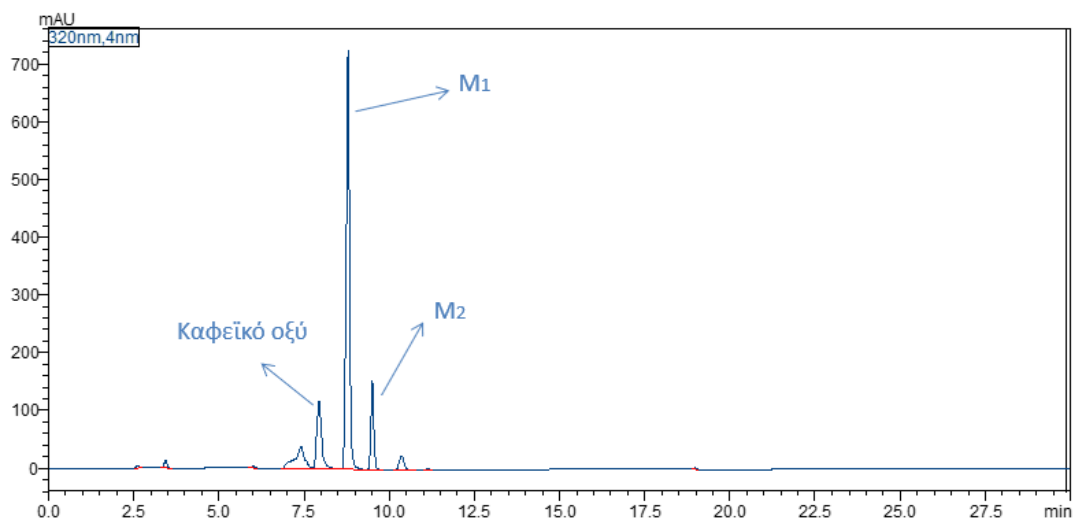
Συμπερασματικά λοιπόν, επιτεύχθηκε η ανάπτυξη αποτελεσματικών νανοβιοκαταλυτών μεθυλοτρανσφερασών διαμέσου των οποίων τροποποιήθηκαν επιτυχώς πληθώρα υποστρωμάτων όπως αυτά της ισοευγενόλης, του καφεϊκού οξέος, της τυροσόλης, της υδροξυτυροσόλης, της λουτεολίνης, της μορίνης, της μυρικετίνης, της φισετίνης και της ρεσβερατρόλης. Οι τροποποιήσεις αυτές είναι σε διαφορετικές θέσεις καθώς το κάθε ένζυμο που χρησιμοποιείται παρουσιάζει διαφορετική

τοποεκλεκτικότητα. Επιπλέον, προτείνεται και ένα φωτομετρικό πρωτόκολλο ανίχνευσης δραστηριότητας των μεθυλοτρανσφερασών το οποίο χρησιμοποιεί τα υδρολυτικά ένζυμα του παραπροϊόντος της αντίδρασης της μεθυλίωσης SAH τις SAHases και τον παράγοντα Ellman για την παραγωγή ενός χρωμοφόρου προϊόντος το οποίο απορροφά στα 412 nm. Το πρωτόκολλο αυτό φαίνεται να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την δραστηριότητα των μεθυλοτρανσφερασών διότι καθίσταται δυνατή η παρακολούθηση της αντίδρασης με το πέρασ του χρόνου.

Μελλοντικοί στόχοι είναι η απομόνωση των επιμέρους προϊόντων και έπειτα ο πλήρης χαρακτηρισμός τους. Η απομόνωση των προϊόντων απαιτεί την κλιμάκωση των αντιδράσεων καθώς αυτές πραγματοποιούνται σε πολύ μικρή κλίμακα. Ωστόσο η κλιμάκωση αποτελεί μία πρόκληση καθώς θα πρέπει να βρεθούν λύσεις σχετικά με το κόστος της διαδικασίας μιας και είναι μεγάλο. Η επίλυση αυτού θα οδηγήσει και στη μελέτη των βιολογικών δράσεων των μεθυλιωμένων παραγώγων. Τέλος, όσον αφορά το προτεινόμενο φωτομετρικό δοκίμιο ανίχνευσης της δραστηριότητας των μεθυλοτρανσφερασών ως μελλοντικός στόχος είναι η βελτιστοποίηση αυτού προκειμένου να μπορέσει να χρησιμοποιείται ευρέως εμφανίζοντας αποτελεσματικότητα και επαναληψιμότητα.

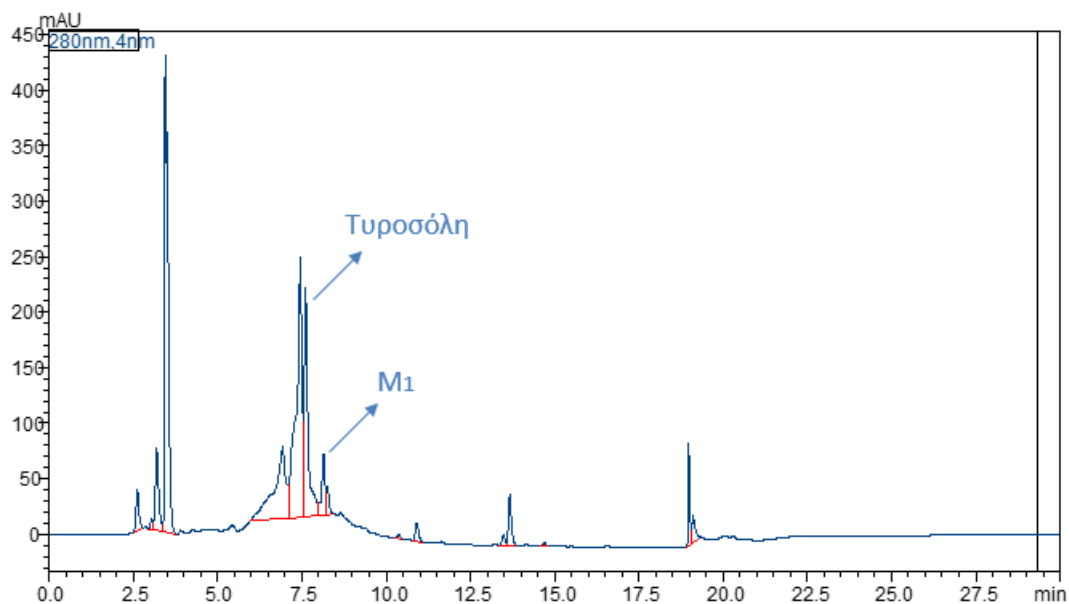
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

- i. Χρωματογράφημα HPLC μεθυλίωσης καφεϊκού οξέος από το ακινητοποιημένο ένζυμο IeOMT T133M



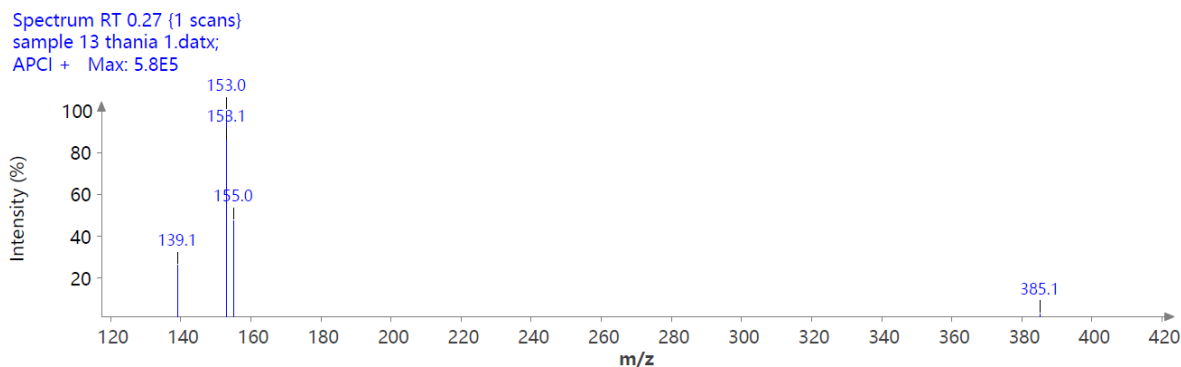
Εικόνα 1. Χρωματογράφημα HPLC τροποποίησης καφεϊκού οξέος από το ένζυμο IeOMT T133M με διάρκεια αντίδρασης 48 ώρες. Ο χρόνος έκλουσης του υποστρώματος αντιστοιχεί στα 7.9 min, του προϊόντος M₁ στα 8.7 min και του προϊόντος M₂ στα 9.5 min.

- ii. Χρωματογράφημα HPLC μεθυλίωσης τυροσόλης από το ακινητοποιημένο ένζυμο IeOMT T133M



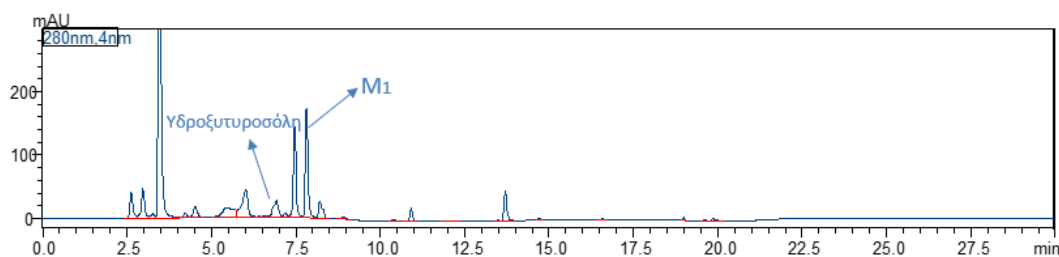
Εικόνα 2. Χρωματογράφημα HPLC τροποποίησης τυροσόλης από το ένζυμο IeOMT T133M με διάρκεια αντίδρασης 48 ώρες. Ο χρόνος έκλουσης του υποστρώματος αντιστοιχεί στα 7.6 min, και του προϊόντος M₁ στα 8.2 min.

iii. Γράφημα MS μεθυλίωσης της τυροσόλης από το ακινητοποιημένο ένζυμο IeOMT T133M



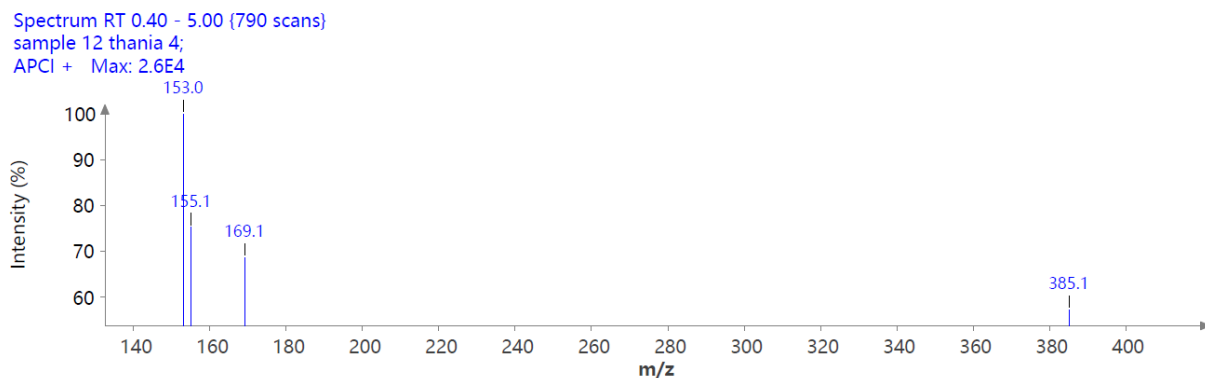
Εικόνα 3. Γράφημα ανάλυσης MS της τροποποίησης της τυροσόλης από το IeOMT T133M. Η τυροσόλη που δεν αντέδρασε εμφανίζει m/z στα 139.1, οι κορυφές στα 153.0 m/z, 155.0 m/z και 385.1 m/z αντιστοιχούν στην οξειδωμένη μορφή του DTT, στο DTT και στο παραπροϊόν SAH. Η κορυφή στα 153.1 m/z αντιστοιχεί στο μονομεθυλιωμένο προϊόν.

iv. Χρωματογράφημα HPLC μεθυλίωσης υδροξυτυροσόλης από το ακινητοποιημένο ένζυμο CaRO WT



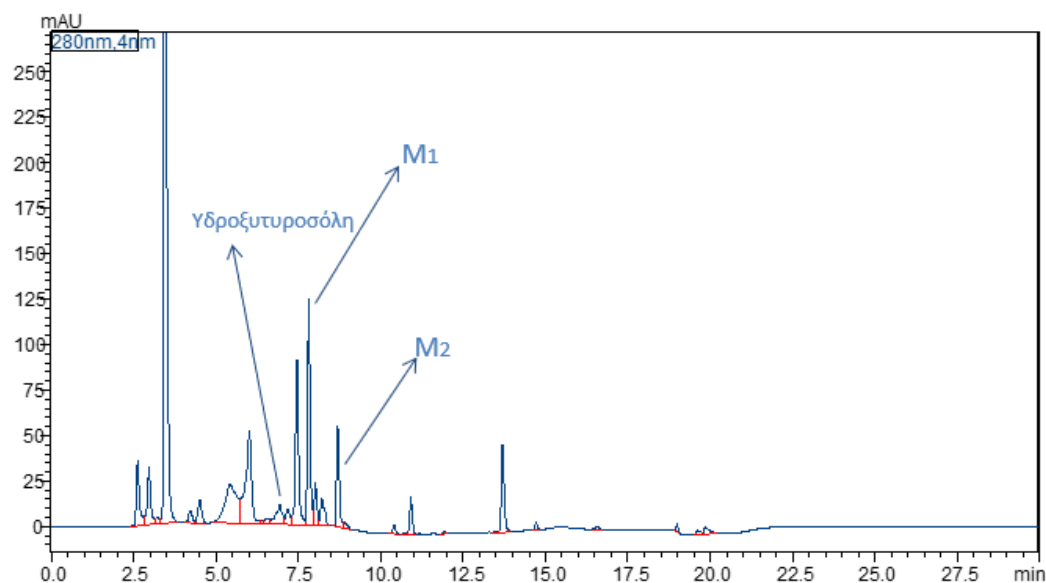
Εικόνα 4. Χρωματογράφημα HPLC τροποποίησης υδροξυτυροσόλης από το ένζυμο CaRO WT με διάρκεια αντίδρασης 48 ώρες. Ο χρόνος έκλουσης του υποστρώματος αντιστοιχεί στα 6.9 min και του προϊόντος M₁ στα 7.8 min.

v. Γράφημα MS μεθυλίωσης της υδροξυτυροσόλης από το ακινητοποιημένο ένζυμο CaRO WT



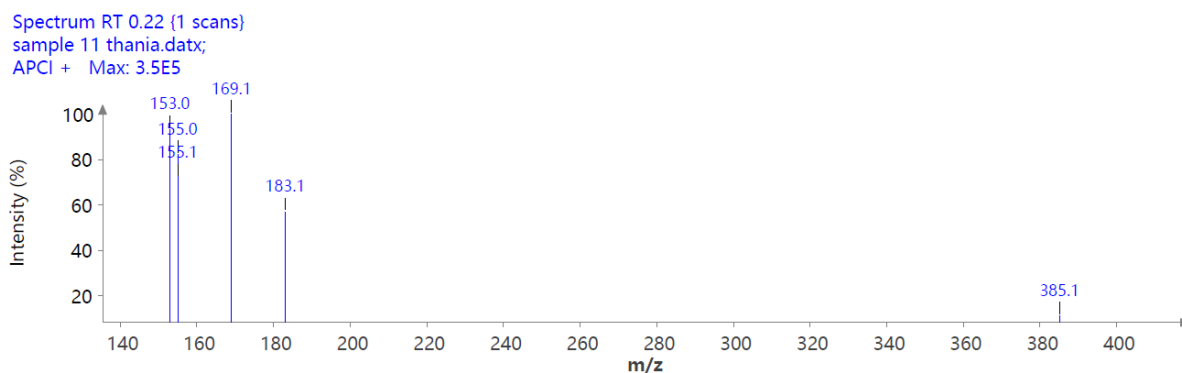
Εικόνα 5. Γράφημα ανάλυσης MS της τροποποίησης της υδροξυτυροσόλης από το CaRO WT. Η υδροξυτυροσόλη που δεν αντέδρασε εμφανίζει m/z στα 155.1, οι κορυφές στα 153.0 m/z και 385.1 m/z αντιστοιχούν στην οξειδωμένη μορφή του DTT και στο παραπροϊόν SAH. Η κορυφή στα 169.1 m/z αντιστοιχεί σε μονομεθυλιωμένο προϊόν

- vi. Χρωματογράφημα HPLC μεθυλίωσης υδροξυτυροσόλης από το ακινητοποιημένο ένζυμο IeOMT T133M



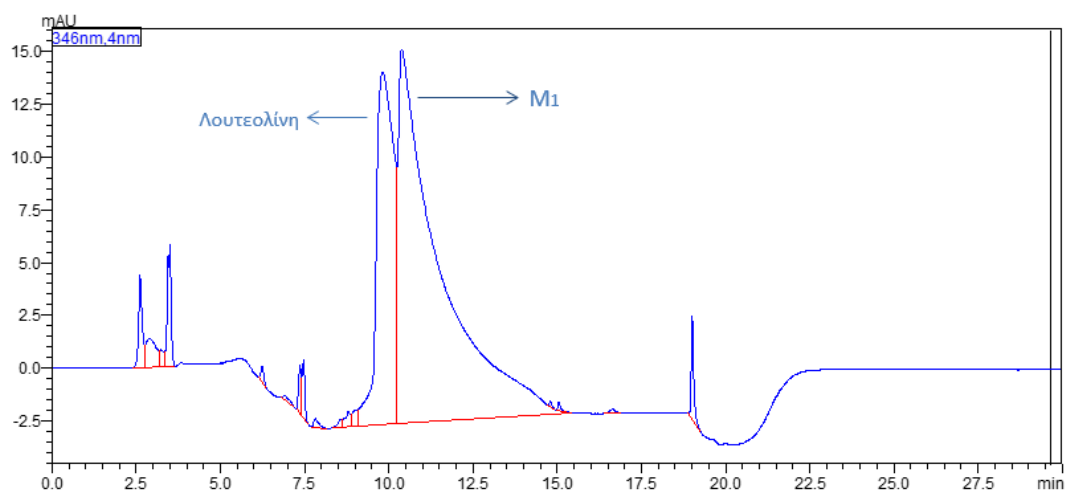
Εικόνα 6. Χρωματογράφημα HPLC τροποποίησης υδροξυτυροσόλης από το ένζυμο IeOMT T133M με διάρκεια αντίδρασης 48 ώρες. Ο χρόνος έκλουσης του υποστρώματος αντιστοιχεί στα 6.9 min, του προϊόντος M₁ στα 7.8 min και του προϊόντος M₂ στα 8.0 min.

- vii. Γράφημα MS μεθυλίωσης της υδροξυτυροσόλης από το ακινητοποιημένο ένζυμο IeOMT T133M



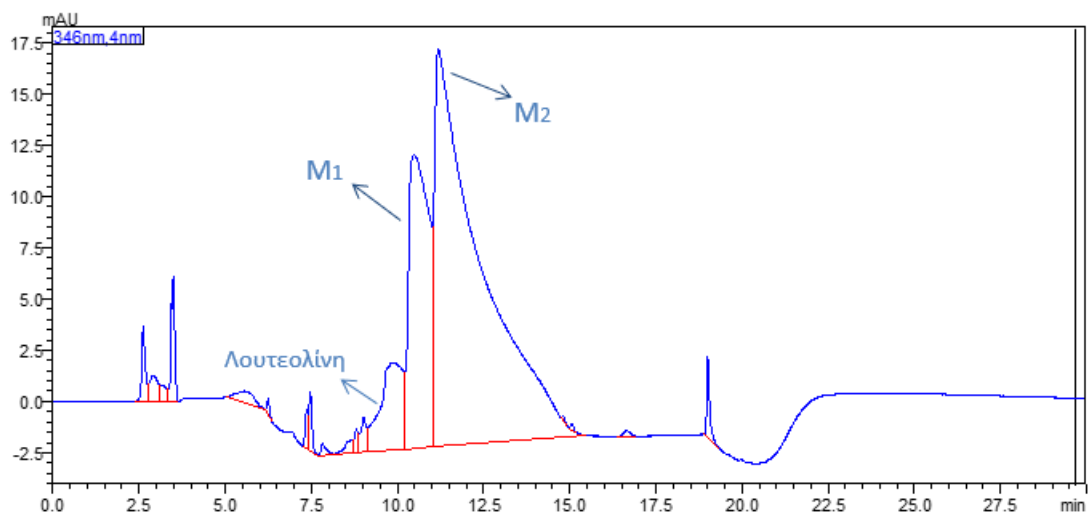
Εικόνα 7. Γράφημα ανάλυσης MS της τροποποίησης της υδροξυτυροσόλης από το CaRO WT. Η υδροξυτυροσόλη που δεν αντέδρασε εμφανίζει m/z στα 155.1, οι κορυφές στα 153.0 m/z, 155.0 m/z και 385.1 m/z αντιστοιχούν στην οξειδωμένη μορφή του DTT, στο DTT και στο παραπροϊόν. Η κορυφή στα 169.1 m/z αντιστοιχεί σε μονομεθυλιωμένο προϊόν και αυτή στα 183.1 m/z σε διμεθυλιωμένο.

- viii. Χρωματογράφημα HPLC μεθυλίωσης λουτεολίνης από το ακινητοποιημένο ένζυμο IeOMT WT



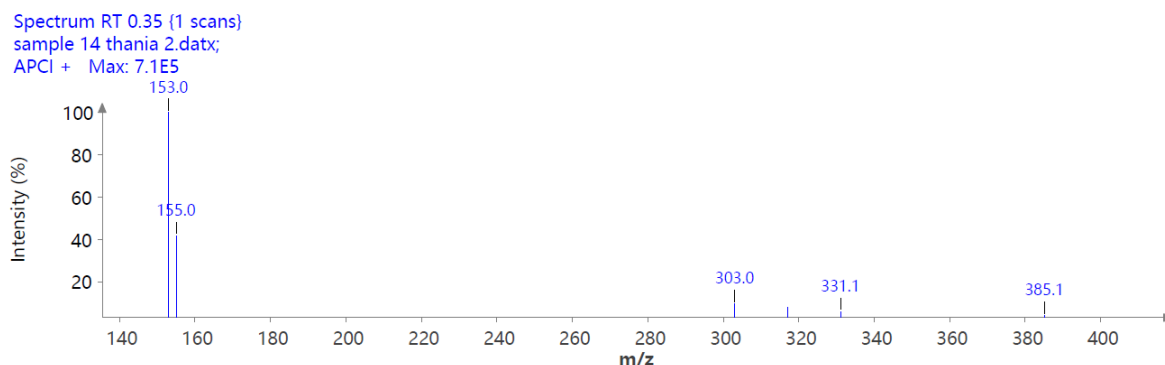
Εικόνα 8. Χρωματογράφημα HPLC τροποποίησης λουτεολίνης από το ένζυμο IeOMT WT με διάρκεια αντίδρασης 48 ώρες. Ο χρόνος έκλουσης του υποστρώματος αντιστοιχεί στα 9.8 min και του προϊόντος M1 στα 10.4 min.

- ix. Χρωματογράφημα HPLC μεθυλίωσης λουτεολίνης από το ακινητοποιημένο ένζυμο IeOMT T133M/Y326L



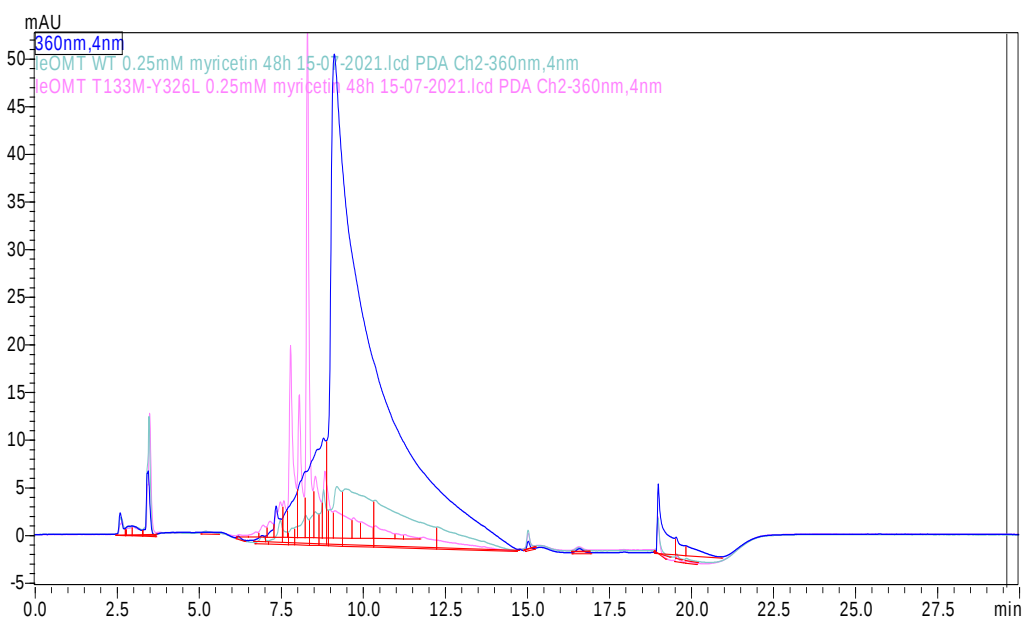
Εικόνα 9. Χρωματογράφημα HPLC τροποποίησης λουτεολίνης από το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L με διάρκεια αντίδρασης 48 ώρες. Ο χρόνος έκλουσης του υποστρώματος αντιστοιχεί στα 9.8 min, του προϊόντος M1 στα 10.4 min και του προϊόντος M2 στα 11.2 min.

x. Γράφημα MS μεθυλίωσης της μορίνης από το ακινητοποιημένο ένζυμο IeOMT T133M/Y326L



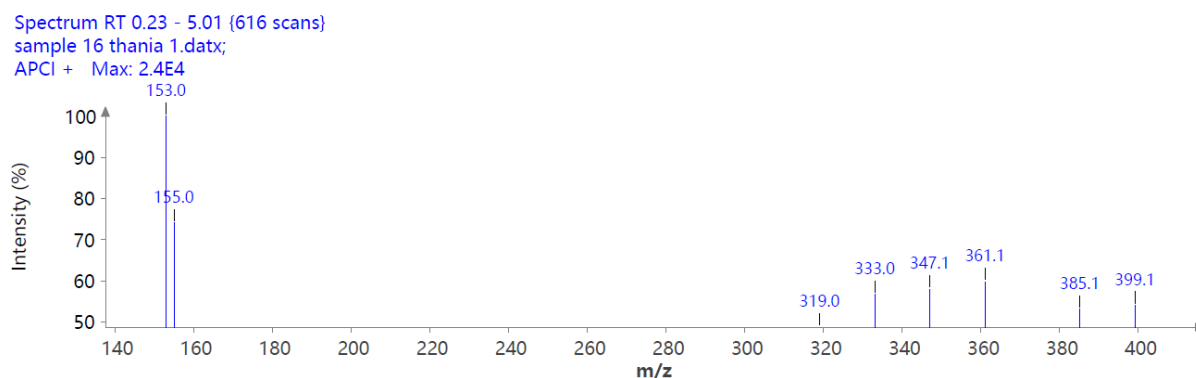
Εικόνα 10. Γράφημα ανάλυσης MS της τροποποίησης της μορίνης από το IeOMT T133M/Y326L. Η μορίνη που δεν αντέδρασε εμφανίζει m/z στα 303.0, οι κορυφές στα 153.0 m/z, 155.0 m/z και 385.1 m/z αντιστοιχούν στην οξειδωμένη μορφή του DTT, στο DTT και στο παραπροϊόν. Η κορυφή στα 317.1 m/z αντιστοιχεί σε μονομεθυλιωμένο προϊόν και 331.1 m/z αντιστοιχεί σε διμεθυλιωμένο προϊόν.

xi. Χρωματογραφήματα HPLC μεθυλίωσης μυρικετίνης από το ακινητοποιημένο ένζυμο IeOMT WT και IeOMT T133M/Y326L



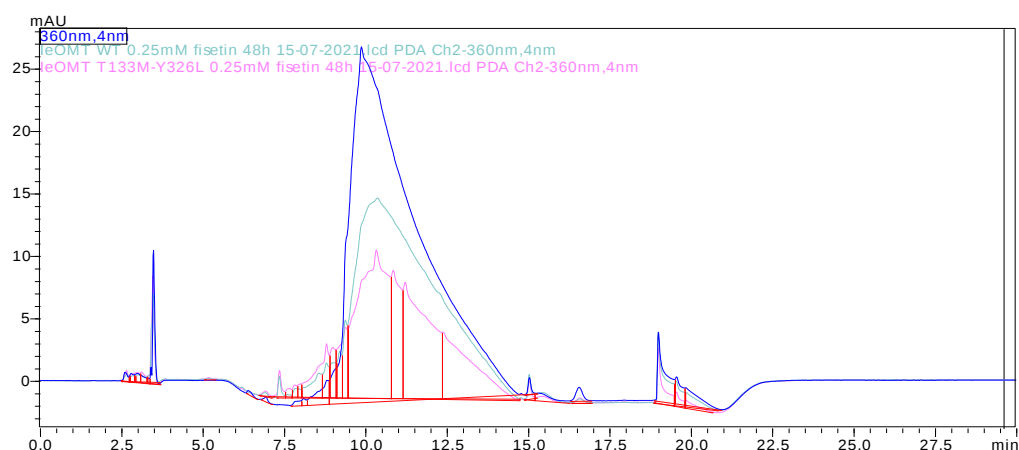
Εικόνα 11. Υπέρθεση χρωματογραφημάτων HPLC τροποποίησης μυρικετίνης από το ένζυμο IeOMT WT και IeOMT T133M/Y326L με διάρκεια αντίδρασης 48 ώρες. Με μπλε χρώμα αποτυπώνεται το χρωματογράφημα της αντίδρασης χωρίς ένζυμο, με πράσινο αυτής με το ένζυμο IeOMT WT και με ροζ αυτής με το ένζυμο IeOMT T133M/Y32L. Ο χρόνος έκλουσης του υποστρώματος αντιστοιχεί στα 9.8 min και αποτυπώνεται η κατανάλωσή του.

xii. Γράφημα MS μεθυλίωσης της μυρκετίνης από το ακινητοποιημένο ένζυμο IeOMT T133M/Y326L



Εικόνα 12. Γράφημα ανάλυσης MS της τροποποίησης της μυρκετίνης από το IeOMT T133M/Y326L. Η μυρκετίνη που δεν αντέδρασε εμφανίζει m/z στα 319.0, οι κορυφές στα 153.0 m/z, 155.0 m/z και 385.1 m/z αντιστοιχούν στην οξειδωμένη μορφή του DTT, στο DTT και στο παραπροϊόν. Η κορυφή στα 333.0 m/z αντιστοιχεί σε μονομεθυλιωμένο προϊόν, αυτή στα 347.1 m/z σε διμεθυλιωμένο και αυτή στα 361.1 m/z σε τριμεθυλιωμένο προϊόν. Το σήμα στα 399.1 m/z είναι άγνωστης προέλευσης.

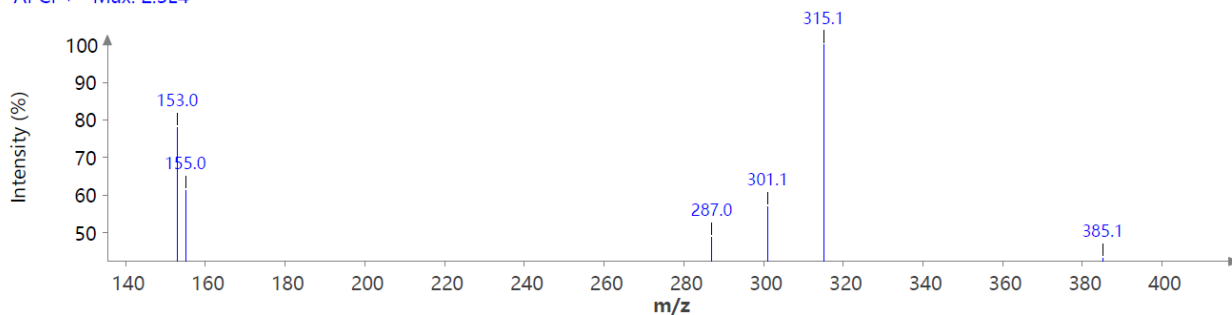
xiii. Χρωματογραφήματα HPLC μεθυλίωσης φισετίνης από το ακινητοποιημένο ένζυμο IeOMT WT και IeOMT T133M/Y326L



Εικόνα 13. Υπέρθεση χρωματογραφημάτων HPLC τροποποίησης φισετίνης από το ένζυμο IeOMT WT και IeOMT T133M/Y326L με διάρκεια αντίδρασης 48 ώρες. Με μπλε χρώμα αποτυπώνεται το χρωματογράφημα της αντίδρασης χωρίς ένζυμο, με πράσινο αυτής με το ένζυμο IeOMT WT και με ροζ αυτής με το ένζυμο IeOMT T133M/Y32L. Ο χρόνος έκλουσης του υποστρώματος αντιστοιχεί στα 11.2 min και αποτυπώνεται η κατανάλωσή του.

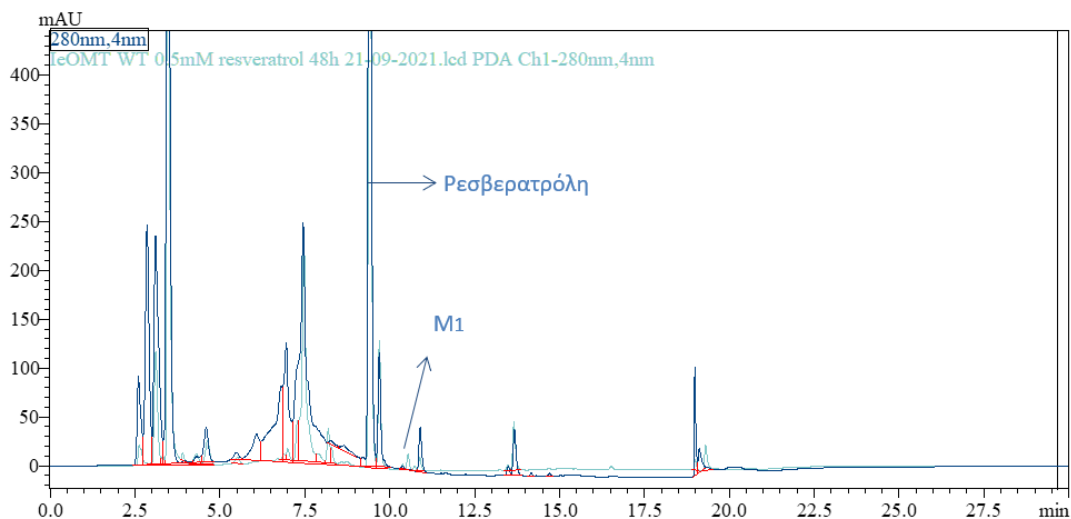
xiv. Γράφημα MS μεθυλίωσης της φισετίνης από το ακινητοποιημένο ένζυμο IeOMT T133M/Y326L

Spectrum RT 0.20 - 5.00 (708 scans)
sample 15 thania 1.datx;
APCI + Max: 2.3E4



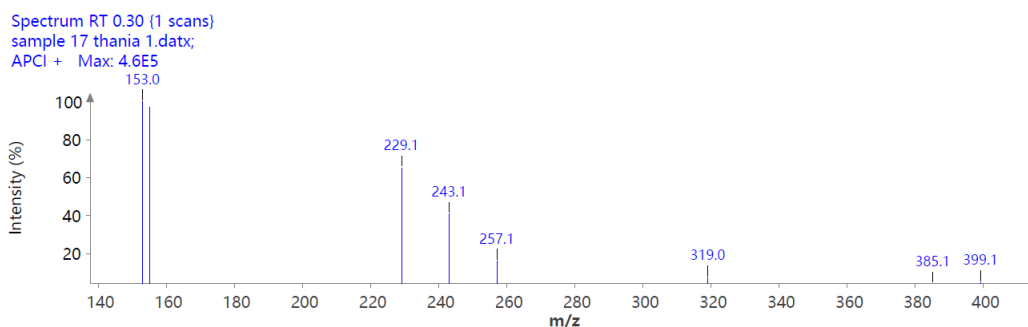
Εικόνα 14. Γράφημα ανάλυσης MS της τροποποίησης της φισετίνης από το IeOMT T133M/Y326L. Η φισετίνη που δεν αντέδρασε εμφανίζει m/z στα 287.0, οι κορυφές στα 153.0 m/z , 155.0 m/z και 385.1 m/z αντιστοιχούν στην οξειδωμένη μορφή του DTT, στο DTT και στο παραπροϊόν. Η κορυφή στα 301.0 m/z αντιστοιχεί σε μονομεθυλιωμένο προϊόν και αυτή στα 315.1 m/z σε διμεθυλιωμένο.

xv. Χρωματογράφημα HPLC μεθυλίωσης ρεσβερατρόλης από το ακινητοποιημένο ένζυμο IeOMT WT



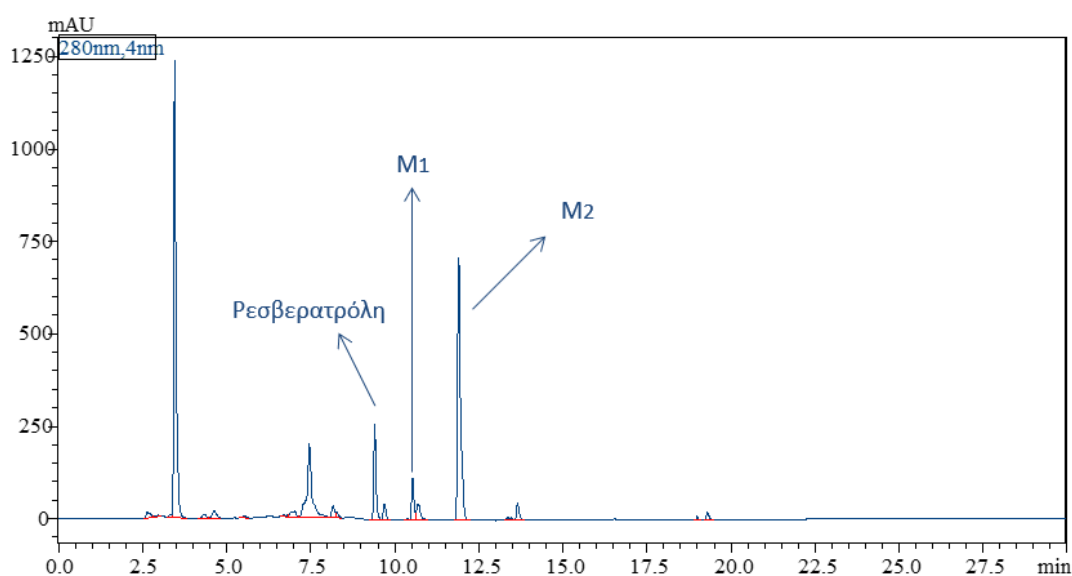
Εικόνα 15. Χρωματογράφημα HPLC τροποποίησης ρεσβερατρόλης (μπλε χρώμα) από το ένζυμο IeOMT WT με διαρκεία αντίδρασης 48 ώρες και τυφλής αντίδρασης (μαύρο χρώμα). Ο χρόνος έκλουσης του υποστρώματος αντιστοιχεί στα 9.4 min και του προϊόντος M_1 στα 10.5 min.

χvi. Γράφημα MS μεθυλίωσης της ρεσβερατρόλης από το ακινητοποιημένο ένζυμο IeOMT WT



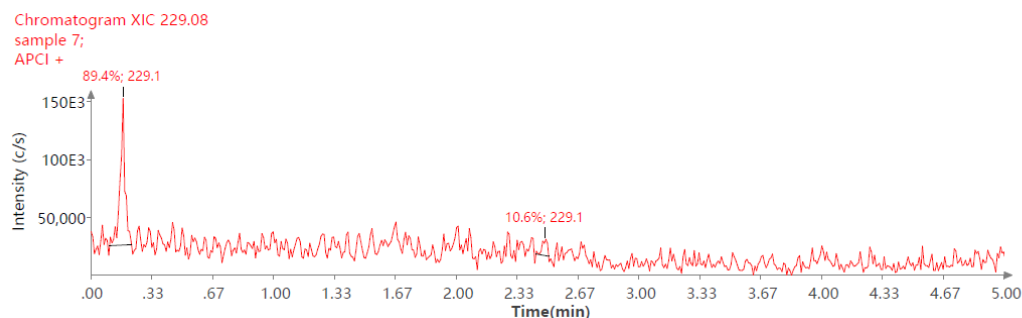
Εικόνα 16. Γράφημα ανάλυσης MS της τροποποίησης της ρεσβερατρόλης από το IeOMT WT. Η ρεσβερατρόλη που δεν αντέδρασε εμφανίζει m/z στα 229.1, οι κορυφές στα 153.0 m/z, 155.0 m/z και 385.1 m/z αντιστοιχούν στην οξειδωμένη μορφή του DTT, στο DTT και στο παραπροϊόν. Η κορυφή στα 243.1 m/z αντιστοιχεί σε μονομεθυλιωμένο προϊόν και αυτή στα 25.1 m/z σε διμεθυλιωμένο. Το σήμα στα 319.0 m/z και στα 399.1 m/z είναι άγνωστης προέλευσης.

χvii. Χρωματογράφημα HPLC μεθυλίωσης ρεσβερατρόλης από το ακινητοποιημένο ένζυμο IeOMT T133M/Y326L

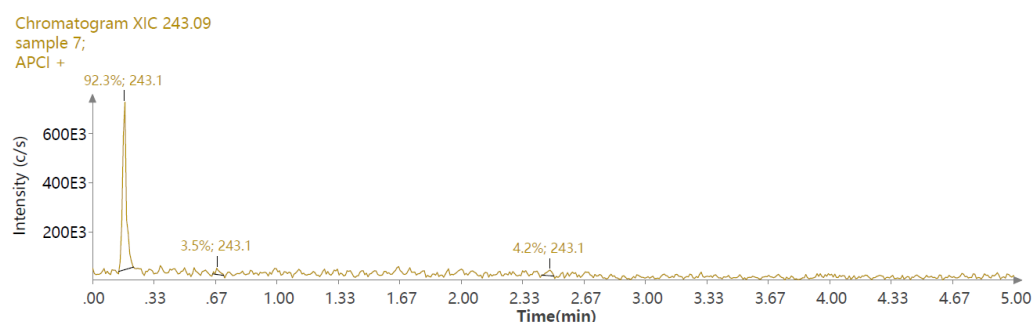


Εικόνα 17. Χρωματογράφημα HPLC τροποποίησης ρεσβερατρόλης από το ένζυμο IeOMT T133M/Y326L με διάρκεια αντίδρασης 48 ώρες. Ο χρόνος έκλουσης του υποστρώματος αντιστοιχεί στα 9.4 min, του προϊόντος M₁ στα 10.5 min και του προϊόντος M₂ στα 11.9 min.

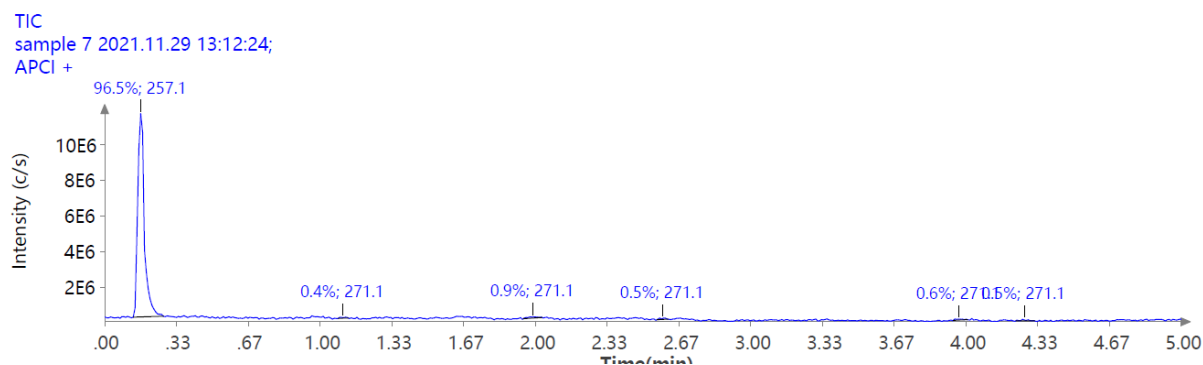
xviii. Γραφήματα MS μεθυλίωσης της ρεσβερατρόλης από το ακινητοποιημένο ένζυμο IeOMT T133M/Y326L



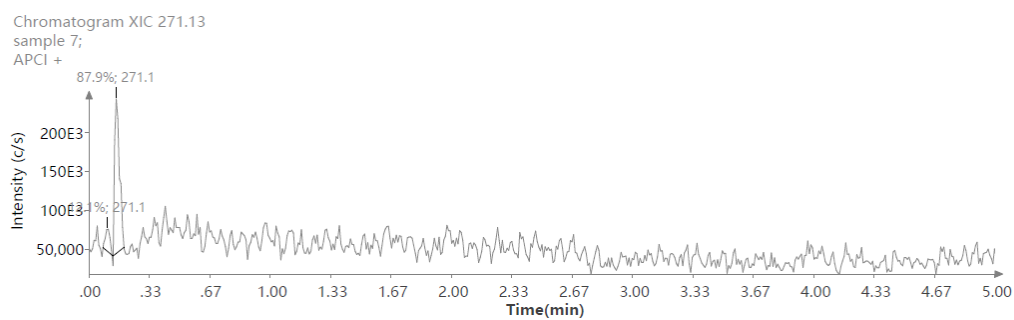
Εικόνα 18. Γράφημα ανάλυσης MS εναπομεινουσας ρεσβερατρόλης με m/z στα 229.1 κατά την τροποποίησης της από το IeOMT T133M/Y326L.



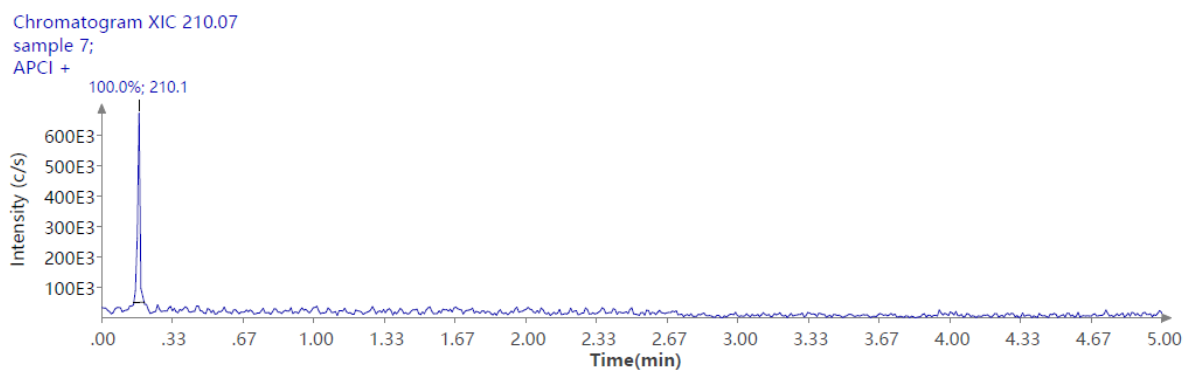
Εικόνα 19. Γράφημα ανάλυσης MS διμεθυλιωμένου προϊόντος με m/z στα 243.1 κατά την τροποποίησης της από το IeOMT T133M/Y326L.



Εικόνα 20. Γράφημα ανάλυσης MS μονομεθυλιωμένου προϊόντος με m/z στα 257.1 κατά την τροποποίησης της από το IeOMT T133M/Y326L.



Εικόνα 21. Γράφημα ανάλυσης MS τριμεθυλωμένου προϊόντος με m/z στα 271.13 κατά την τροποποίησης της από το IeOMT T133M/Y326L.



Εικόνα 22. Γράφημα MS σήματος στα 210.1 m/z που αντιστοιχεί στο άλας MOPS του ρυθμιστικού διαλύματος της ενζυμικής μεθυλίωσης της ρεσβερατρόλης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Cragg, G.M. and D.J.J.B.e.B.A.-G.S. Newman, *Natural products: a continuing source of novel drug leads*. 2013. **1830**(6): p. 3670-3695.
2. Segneanu, A.E., et al., *Bioactive molecules profile from natural compounds*. 2017: p. 209-228.
3. Atanasov, A.G., et al., *Natural products in drug discovery: advances and opportunities*. 2021. **20**(3): p. 200-216.
4. Hanson, J.R., *Natural products: the secondary metabolites*. Vol. 17. 2003: Royal Society of Chemistry.
5. Vijayakumar, R. and S.S. Raja, *Secondary Metabolites: Sources and Applications*. 2018: BoD—Books on Demand.
6. Akhtar, M.S., M.K. Swamy, and U.R. Sinniah, *Natural Bio-Active Compounds*. Vol. 1. 2019: Springer.
7. Verpoorte, R.J.D.D.T., *Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development*. 1998. **3**(5): p. 232-238.
8. Hussein, R.A. and A.A.J.H.m. El-Anssary, *Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants*. 2019. **1**: p. 13.
9. Newman, D.J. and G.M.J.J.o.n.p. Cragg, *Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010*. 2012. **75**(3): p. 311-335.
10. Ozcan, T., et al., *Phenolics in human health*. 2014. **5**(5): p. 393.
11. Giada, M.J.O.s. and c.d.d.-A.r.f. antioxidants, *Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power*. 2013. **2013**: p. 87-112.
12. Al Mamari, H.H., *Phenolic Compounds: Classification, Chemistry, and Updated Techniques of Analysis and Synthesis*, in *Phenolic Compounds*. 2021, IntechOpen.
13. Nishimoto-Sauceda, D., et al., *Biopolymer nanoparticles: a strategy to enhance stability, bioavailability, and biological effects of phenolic compounds as functional ingredients*. 2022. **102**(1): p. 41-52.
14. Albuquerque, B.R., et al., *Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges*. 2021. **12**(1): p. 14-29.
15. Xue, Z. and B.J.M. Yang, *Phenylethanoid glycosides: Research advances in their phytochemistry, pharmacological activity and pharmacokinetics*. 2016. **21**(8): p. 991.
16. Rodríguez-Morató, J., et al., *Metabolic disposition and biological significance of simple phenols of dietary origin: Hydroxytyrosol and tyrosol*. 2016. **48**(2): p. 218-236.
17. Yadav, T.C., et al., *Exploration of interaction mechanism of tyrosol as a potent anti-inflammatory agent*. 2020. **38**(2): p. 382-397.
18. Karković Marković, A., et al., *Hydroxytyrosol, tyrosol and derivatives and their potential effects on human health*. 2019. **24**(10): p. 2001.
19. Annunziata, F., et al., *Biocatalyzed flow oxidation of tyrosol to hydroxytyrosol and efficient production of their acetate esters*. 2021. **10**(7): p. 1142.
20. Schendel, R.R., *Phenol content in sprouted grains, in Sprouted Grains*. 2019, Elsevier. p. 265.
21. Espíndola, K.M.M., et al., *Chemical and pharmacological aspects of caffeic acid and its activity in hepatocarcinoma*. 2019: p. 541.
22. Li, K., et al., *Structure-activity relationship of eight high content flavonoids analyzed with a preliminary assign-score method and their contribution to antioxidant ability of flavonoids-rich extract from Scutellaria baicalensis shoots*. 2018. **11**(2): p. 159-170.
23. Rice-Evans, C.A., et al., *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*. 1996. **20**(7): p. 933-956.
24. Panche, A.N., A.D. Diwan, and S.R.J.J.o.n.s. Chandra, *Flavonoids: an overview*. 2016. **5**.
25. Heim, K.E., A.R. Tagliaferro, and D.J.J.T.J.o.n.b. Bobilya, *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*. 2002. **13**(10): p. 572-584.

26. Kumar, S. and A.K.J.T.s.w.j. Pandey, *Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview*. 2013. **2013**.
27. Wang, T.-y., Q. Li, and K.-s.J.A.j.o.p.s. Bi, *Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate*. 2018. **13**(1): p. 12-23.
28. Kaleem, M. and A. Ahmad, *Flavonoids as nutraceuticals*, in *Therapeutic, probiotic, and unconventional foods*. 2018, Elsevier. p. 137-155.
29. Ruiz-Cruz, S., et al., *Flavonoids: Important biocompounds in food*. 2017: p. 353-369.
30. Brodowska, K.M.J.E.J.o.B.R., *Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues*. 2017. **7**(2): p. 108-123.
31. Lin, Y., et al., *Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy*. 2008. **8**(7): p. 634-646.
32. Imran, M., et al., *Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review*. 2019. **112**: p. 108612.
33. Afroze, N., et al., *A review on myricetin as a potential therapeutic candidate for cancer prevention*. 2020. **10**(5): p. 1-12.
34. Imran, M., et al., *Myricetin: A comprehensive review on its biological potentials*. 2021. **9**(10): p. 5854-5868.
35. Gupta, G., et al., *Current pharmacological trends on myricetin*. 2020. **70**(10): p. 448-454.
36. Song, X., et al., *Myricetin: A review of the most recent research*. 2021. **134**: p. 111017.
37. Caselli, A., et al., *Morin: a promising natural drug*. 2016. **23**(8): p. 774-791.
38. Rajput, S.A., et al., *Morin hydrate: A comprehensive review on novel natural dietary bioactive compound with versatile biological and pharmacological potential*. 2021. **138**: p. 111511.
39. Imran, M., et al., *Fisetin: An anticancer perspective*. 2021. **9**(1): p. 3-16.
40. Sundarraj, K., et al., *A review on the chemotherapeutic potential of fisetin: In vitro evidences*. 2018. **97**: p. 928-940.
41. Benbouguerra, N., et al., *Stilbenes in grape berries and wine and their potential role as anti-obesity agents: A review*. 2021. **112**: p. 362-381.
42. Singh, A.P., et al., *Health benefits of resveratrol: Evidence from clinical studies*. 2019. **39**(5): p. 1851-1891.
43. Tian, B., J.J.J.o.t.S.o.F. Liu, and Agriculture, *Resveratrol: A review of plant sources, synthesis, stability, modification and food application*. 2020. **100**(4): p. 1392-1404.
44. Salehi, B., et al., *Resveratrol: A double-edged sword in health benefits*. 2018. **6**(3): p. 91.
45. Obrador, E., et al., *Pterostilbene in cancer therapy*. 2021. **10**(3): p. 492.
46. Ter Ellen, B.M., et al., *Resveratrol and pterostilbene inhibit SARS-CoV-2 replication in air-liquid interface cultured human primary bronchial epithelial cells*. 2021. **13**(7): p. 1335.
47. Aldawsari, F.S. and C.A.J.I.N.D. Velázquez-Martínez, *3, 4', 5-trans-Trimethoxystilbene; a natural analogue of resveratrol with enhanced anticancer potency*. 2015. **33**(3): p. 775-786.
48. de Araújo, M.E.M., et al., *Biocatalytic synthesis of flavonoid esters by lipases and their biological benefits*. 2017. **83**(01/02): p. 7-22.
49. Straathof, A.J., S. Panke, and A.J.C.o.i.b. Schmid, *The production of fine chemicals by biotransformations*. 2002. **13**(6): p. 548-556.
50. Xanthakis, E., et al., *Enzymatic transformation of flavonoids and terpenoids: structural and functional diversity of the novel derivatives*. 2010. **82**(1): p. 1-16.
51. Wang, A., et al., *New progress in biocatalysis and biotransformation of flavonoids*. 2010. **4**(10): p. 847-856.
52. Chebil, L., et al., *Enzymatic acylation of flavonoids*. 2006. **41**(11): p. 2237-2251.

53. Wen, L., et al., *Structure, bioactivity, and synthesis of methylated flavonoids*. 2017. **1398**(1): p. 120-129.
54. Farnberger, J.E., et al., *Biocatalytic methylation and demethylation via a shuttle catalysis concept involving corrinoid proteins*. 2018. **1**(1): p. 1-8.
55. Bud, R., *The uses of life: a history of biotechnology*. 1994: Cambridge University Press.
56. Stamatis, H., *Αρχές Βιοτεχνολογίας*. 2015: p. 6.
57. DaSilva, E.J.J.E.j.o.b., *The colours of biotechnology: science, development and humankind*. 2004. **7**(3): p. 01-02.
58. Steiner, U., *Fachenglisch für BioTAs und BTAs*. 2020: Springer.
59. Saxena, A., *Biotechnology Business-Concept to Delivery*. 2020: Springer.
60. Kafarski, P.J.C., *Rainbow code of biotechnology*. 2012. **66**(8): p. 811-816.
61. Frazzetto, G.J.E.r., *White biotechnology: the application of biotechnology to industrial production holds many promises for sustainable development, but many products still have to pass the test of economic viability*. 2003. **4**(9): p. 835-837.
62. Bornscheuer, U.T., et al., *Engineering the third wave of biocatalysis*. 2012. **485**(7397): p. 185-194.
63. Schmid, A., et al., *Industrial biocatalysis today and tomorrow*. 2001. **409**(6817): p. 258-268.
64. Robinson, P.K.J.E.i.b., *Enzymes: principles and biotechnological applications*. 2015. **59**: p. 1.
65. Cooper, G.M., *The central role of enzymes as biological catalysts*. 2000, Sinauer Associates.
66. Berg, J.M., Tymoczko J.L., Gatto G.J., Stryer L., , *Βιοχημεία*. 8th ed. 2017. 226-227.
67. Barrett, A.J.J.E.J.o.B., *Enzyme Nomenclature. Recommendations 1992: Supplement 2: Corrections and Additions (1994)*. 1995. **232**(1): p. 1-1.
68. Iubmb.org. *Translocases (EC 7): A new EC Class*. 2018 [cited 2022 04-13-22]; Available from: <https://iubmb.org/wp-content/uploads/sites/10116/2018/10/Translocases-EC-7.pdf>.
69. de Souza Vandenberghe, L.P., et al., *Classification of enzymes and catalytic properties, in Biomass, Biofuels, Biochemicals*. 2020, Elsevier. p. 11-30.
70. Fischer, E.J.B.d.d.c.G., *Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme*. 1894. **27**(3): p. 2985-2993.
71. Renneberg, R. and V. Lorch, *Biotechnology for beginners*. 2016: Academic Press.
72. Prokop, Z., et al., *Engineering of protein tunnels: Keyhole-lock-key model for catalysis by the enzymes with buried active sites*. 2012. **3**: p. 421-464.
73. D.ZhuQ.WuN.Wang, *Industrial Enzymes. Comprehensive Biotechnology*. 2nd ed. 2011.
74. Shrivastava, A., N. Shrivastava, and P.K. Singh, *Enzymes in pharmaceutical industry, in Enzymes in Food Biotechnology*. 2019, Elsevier. p. 591-602.
75. Cantoni, G.L.J.A.r.o.b., *Biological methylation: selected aspects*. 1975. **44**(1): p. 435-451.
76. Zhang, Y., D.J.G. Reinberg, and development, *Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails*. 2001. **15**(18): p. 2343-2360.
77. Davis, C.D., E.O.J.E.b. Uthus, and medicine, *DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions*. 2004. **229**(10): p. 988-995.
78. His, W.J.A.f.e.P.u.P., *Ueber das stoffwechselproduct des pyridins*. 1887. **22**(3): p. 253-260.
79. Cantoni, G.J.J.o.t.A.C.S., *The nature of the active methyl donor formed enzymatically from l-methionine and adenosinetriphosphate1, 2*. 1952. **74**(11): p. 2942-2943.
80. Cheng, X., et al., *Crystal structure of the HhaI DNA methyltransferase complexed with S-adenosyl-L-methionine*. 1993. **74**(2): p. 299-307.

81. Malla, S., et al., *Production of 7-O-methyl aromadendrin, a medicinally valuable flavonoid, in Escherichia coli*. 2012. **78**(3): p. 684-694.
82. Nawabi, P., et al., *Engineering Escherichia coli for biodiesel production utilizing a bacterial fatty acid methyltransferase*. 2011. **77**(22): p. 8052-8061.
83. Struck, A.W., et al., *S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferases: highly versatile enzymes in biocatalysis, biosynthesis and other biotechnological applications*. 2012. **13**(18): p. 2642-2655.
84. Cheng, X. and R.J.J.N.a.r. Roberts, *AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping*. 2001. **29**(18): p. 3784-3795.
85. Schubert, H.L., J.D. Phillips, and C.P.J.B. Hill, *Structures along the catalytic pathway of PrmC/HemK, an N 5-glutamine AdoMet-dependent methyltransferase*. 2003. **42**(19): p. 5592-5599.
86. Schubert, H.L., R.M. Blumenthal, and X.J.T.i.b.s. Cheng, *Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence*. 2003. **28**(6): p. 329-335.
87. Martin, J.L. and F.M.J.C.o.i.s.b. McMillan, *SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold*. 2002. **12**(6): p. 783-793.
88. Chouhan, B.P.S., et al., *Rossmann-fold methyltransferases: taking a "β-Turn" around their cofactor, S-adenosylmethionine*. 2018. **58**(3): p. 166-170.
89. Scavetta, R.D., et al., *Structure of Rsr I methyltransferase, a member of the N 6-adenine β class of DNA methyltransferases*. 2000. **28**(20): p. 3950-3961.
90. Bujnicki, J.M., et al., *Structure prediction and phylogenetic analysis of a functionally diverse family of proteins homologous to the MT-A70 subunit of the human mRNA: m6A methyltransferase*. 2002. **55**(4): p. 431-444.
91. Skinner, M.M., et al., *Crystal structure of protein isoaspartyl methyltransferase: a catalyst for protein repair*. 2000. **8**(11): p. 1189-1201.
92. Ruszkowska, A., et al., *Structural insights into the RNA methyltransferase domain of METTL16*. 2018. **8**(1): p. 1-13.
93. Huang, Y., et al., *Mechanisms for auto-inhibition and forced product release in glycine N-methyltransferase: crystal structures of wild-type, mutant R175K and S-adenosylhomocysteine-bound R175K enzymes*. 2000. **298**(1): p. 149-162.
94. Dixon, M.M., et al., *The structure of the C-terminal domain of methionine synthase: presenting S-adenosylmethionine for reductive methylation of B12*. 1996. **4**(11): p. 1263-1275.
95. Schubert, H.L., et al., *The X-ray structure of a cobalamin biosynthetic enzyme, cobalt-precorrin-4 methyltransferase*. 1998. **5**(7): p. 585-592.
96. Nureki, O., et al., *An enzyme with a deep trefoil knot for the active-site architecture*. 2002. **58**(7): p. 1129-1137.
97. Hori, H.J.B., *Transfer RNA methyltransferases with a SpoU-TrmD (SPOUT) fold and their modified nucleosides in tRNA*. 2017. **7**(1): p. 23.
98. Trievel, R.C., et al., *Structure and catalytic mechanism of a SET domain protein methyltransferase*. 2002. **111**(1): p. 91-103.
99. Jacobs, S.A., et al., *The active site of the SET domain is constructed on a knot*. 2002. **9**(11): p. 833-838.
100. Kwon, T., et al., *Mechanism of histone lysine methyl transfer revealed by the structure of SET7/9—AdoMet*. 2003. **22**(2): p. 292-303.
101. Wlodarski, T., et al., *Comprehensive structural and substrate specificity classification of the Saccharomyces cerevisiae methyltransferome*. 2011. **6**(8): p. e23168.
102. Vey, J.L. and C.L.J.C.R. Drennan, *Structural insights into radical generation by the radical SAM superfamily*. 2011. **111**(4): p. 2487-2506.
103. Broderick, J.B., et al., *Radical S-adenosylmethionine enzymes*. 2014. **114**(8): p. 4229-4317.

104. Woodard, R., et al., *Stereochemical course of the transmethylation catalyzed by catechol O-methyltransferase*. 1980. **255**(19): p. 9124-9127.
105. Liscombe, D.K., G.V. Louie, and J.P.J.N.p.r. Noel, *Architectures, mechanisms and molecular evolution of natural product methyltransferases*. 2012. **29**(10): p. 1238-1250.
106. Cheng, X. and R. Blumenthal, *S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases: structures and functions*. 1999: World Scientific.
107. Sun, Q., M. Huang, and Y.J.A.P.S.B. Wei, *Diversity of the reaction mechanisms of SAM-dependent enzymes*. 2021. **11**(3): p. 632-650.
108. Zubieta, C., et al., *Structural basis for substrate recognition in the salicylic acid carboxyl methyltransferase family*. 2003. **15**(8): p. 1704-1716.
109. Lennard, L.J.i.-C.C.T., *4.21-Methyltransferases*. 2010. **4**: p. 435-57.
110. Atta, M., et al., *S-Adenosylmethionine-dependent radical-based modification of biological macromolecules*. 2010. **20**(6): p. 684-692.
111. Moore, L.D., T. Le, and G.J.N. Fan, *DNA methylation and its basic function*. 2013. **38**(1): p. 23-38.
112. Damelin, M., T.H.J.M. Bestor, and c. biology, *Biological functions of DNA methyltransferase 1 require its methyltransferase activity*. 2007. **27**(11): p. 3891-3899.
113. Cui, J.Y., Z.D. Fu, and J. Dempsey, *The role of histone methylation and methyltransferases in gene regulation, in Toxicoeugenetics*. 2019, Elsevier. p. 31-84.
114. Gnegy, M.E., *Catecholamines, in Basic neurochemistry*. 2012, Elsevier. p. 283-299.
115. Lu, S., et al., *Systematic analysis reveals O-methyltransferase gene family members involved in flavonoid biosynthesis in grape*. 2022.
116. Awad, W., et al., *Evidence for direct methyl transfer in betaine: homocysteine S-methyl-transferase*. 1983. **258**(21): p. 12790-12792.
117. Engel, P., *Enzymatic reaction mechanisms: By C Walsh. pp 978. WH Freeman & Co, Oxford. 1979.£ 18.30. 1981, Wiley Online Library*.
118. Huber, T.D., et al., *AdoMet analog synthesis and utilization: current state of the art*. 2016. **42**: p. 189-197.
119. Kim, J., et al., *Structure-guided discovery of the metabolite carboxy-SAM that modulates tRNA function*. 2013. **498**(7452): p. 123-126.
120. Zhang, J. and Y.G.J.A.c.b. Zheng, *SAM/SAH analogs as versatile tools for SAM-dependent methyltransferases*. 2016. **11**(3): p. 583-597.
121. Tang, Q., et al., *Directed evolution of a halide methyltransferase enables biocatalytic synthesis of diverse SAM analogs*. 2021. **60**(3): p. 1524-1527.
122. Deen, J., et al., *Methyltransferase-Directed Labeling of Biomolecules and its Applications*. 2017. **56**(19): p. 5182-5200.
123. Koirala, N., et al., *Methylation of flavonoids: Chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production*. 2016. **86**: p. 103-116.
124. Barreiro, E.J., A.E. Kümmerle, and C.A.J.C.r. Fraga, *The methylation effect in medicinal chemistry*. 2011. **111**(9): p. 5215-5246.
125. Schönherr, H. and T.J.A.C.I.E. Cernak, *Profound Methyl Effects in Drug Discovery and a Call for New C² H Methylation Reactions*. 2013. **52**(47): p. 12256-12267.
126. Zhang, L., et al., *1-[(1-Methyl-1 H-imidazol-2-yl) methyl]-4-phenylpiperidines as mGluR2 Positive Allosteric Modulators for the Treatment of Psychosis*. 2011. **54**(6): p. 1724-1739.
127. Needs, P. and R.J.C.R. Selvendran, *Avoiding oxidative degradation during sodium hydroxide/methyl iodide-mediated carbohydrate methylation in dimethyl sulfoxide*. 1993. **245**(1): p. 1-10.
128. Guo, M. and S.J.J.o.e.q. Gao, *Degradation of methyl iodide in soil: effects of environmental factors*. 2009. **38**(2): p. 513-519.

129. Mileson, B.E., et al., *Iodomethane human health risk characterization*. 2009. **21**(6): p. 583-605.
130. Xiao, W., et al., *Role of protein arginine methyltransferase 5 in human cancers*. 2019. **114**: p. 108790.
131. McKean, I.J., P.A. Hoskisson, and G.A.J.C. Burley, *Biocatalytic Alkylation Cascades: Recent Advances and Future Opportunities for Late-Stage Functionalization*. 2020. **21**(20): p. 2890-2897.
132. Cornelissen, N.V., et al., *Nucleoside-modified AdoMet analogues for differential methyltransferase targeting*. 2020. **56**(14): p. 2115-2118.
133. Sadler, J.C., et al., *A Tandem Enzymatic sp²-C-Methylation Process: Coupling in Situ S-Adenosyl-L-Methionine Formation with Methyl Transfer*. 2017. **18**(11): p. 992-995.
134. Mordhorst, S., et al., *Catalytic alkylation using a cyclic S-adenosylmethionine regeneration system*. 2017. **56**(14): p. 4037-4041.
135. Liao, C. and F.P.J.N.C. Seebeck, *S-adenosylhomocysteine as a methyl transfer catalyst in biocatalytic methylation reactions*. 2019. **2**(8): p. 696-701.
136. Andexer, J.N. and A.J.N.C. Rentmeister, *Challenging nature's preference for methylation*. 2020. **12**(9): p. 791-792.
137. Walton, N.J., et al., *Novel approaches to the biosynthesis of vanillin*. 2000. **11**(5): p. 490-496.
138. Benavente-Garcia, O., J.J.J.o.a. Castillo, and f. chemistry, *Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity*. 2008. **56**(15): p. 6185-6205.
139. Kim, H., et al., *Effects of naturally occurring compounds on fibril formation and oxidative stress of β -amyloid*. 2005. **53**(22): p. 8537-8541.
140. Kim, B.-G., et al., *Plant flavonoid O-methyltransferases: substrate specificity and application*. 2010. **53**(5): p. 321-329.
141. Chiang, P.K.J.P. and therapeutics, *Biological effects of inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase*. 1998. **77**(2): p. 115-134.
142. Kloor, D. and H.J.T.i.p.S. Osswald, *S-Adenosylhomocysteine hydrolase as a target for intracellular adenosine action*. 2004. **25**(6): p. 294-297.
143. Jakubowski, H.J.T.J.o.n., *Pathophysiological consequences of homocysteine excess*. 2006. **136**(6): p. 1741S-1749S.
144. Brzezinski, K., et al., *Purification, crystallization and preliminary crystallographic studies of plant S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase (*Lupinus luteus*)*. 2008. **64**(7): p. 671-673.
145. Brzezinski, K.J.B., *S-adenosyl-L-homocysteine Hydrolase: a structural perspective on the enzyme with two rossmann-fold domains*. 2020. **10**(12): p. 1682.
146. Czyrko, J., et al., *Metal-cation regulation of enzyme dynamics is a key factor influencing the activity of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Pseudomonas aeruginosa**. 2018. **8**(1): p. 1-15.
147. Reddy, M.C., et al., *Crystal structures of *Mycobacterium tuberculosis* S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase in ternary complex with substrate and inhibitors*. 2008. **17**(12): p. 2134-2144.
148. Manszewski, T., et al., *An enzyme captured in two conformational states: crystal structure of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Bradyrhizobium elkanii**. 2015. **71**(12): p. 2422-2432.
149. Manszewski, T., K. Szpotkowski, and M.J.I. Jaskolski, *Crystallographic and SAXS studies of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Bradyrhizobium elkanii**. 2017. **4**(3): p. 271-282.
150. Palmer, J. and R.J.J.o.B.C. Abeles, *Mechanism for enzymatic thioether formation. Mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase*. 1976. **251**(18): p. 5817-5819.

151. Palmer, J.L. and R.H.J.J.o.B.C. Abeles, *The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase*. 1979. **254**(4): p. 1217-1226.
152. Wang, Y., et al., *Regulation of S-adenosylhomocysteine hydrolase by lysine acetylation*. 2014. **289**(45): p. 31361-31372.
153. Garg, U. and L.D. Smith, *Biomarkers in Inborn Errors of Metabolism: Clinical Aspects and Laboratory Determination*. 2017: Elsevier.
154. Nygård, O., et al., *Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease*. 1997. **337**(4): p. 230-237.
155. Hershfield, M.S. and N.M.J.S. Krodich, *S-adenosylhomocysteine hydrolase is an adenosine-binding protein: a target for adenosine toxicity*. 1978. **202**(4369): p. 757-760.
156. Cacicedo, M.L., et al., *Immobilized enzymes and their applications*, in *Advances in enzyme technology*. 2019, Elsevier. p. 169-200.
157. Ιωάννης, Κ., *Ενζυμική Βιοτεχνολογία*. 2008: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. 140-142.
158. Fessner, W.-D. and T. Anthonsen, *Modern biocatalysis: stereoselective and environmentally friendly reactions*. 2009: John Wiley & Sons.
159. Zdarta, J., et al., *A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility*. 2018. **8**(2): p. 92.
160. Nguyen, H.H., M.J.A.S. Kim, and C. Technology, *An overview of techniques in enzyme immobilization*. 2017. **26**(6): p. 157-163.
161. Pavlidis, I.V., et al., *Immobilization of Enzymes and other Biomolecules on Graphene*. 2014: p. 139-172.
162. Giannakopoulou, A., et al., *Development of a four-enzyme magnetic nanobiocatalyst for multi-step cascade reactions*. 2019. **9**(12): p. 995.
163. Pavlidis, I., et al., *Functionalized multi-wall carbon nanotubes for lipase immobilization*. 2010. **12**(5): p. B179-B183.
164. Ahmad, R., M.J.B. Sardar, and A. Biochemistry, *Enzyme immobilization: an overview on nanoparticles as immobilization matrix*. 2015. **4**(2): p. 1.
165. Yew, Y.P., et al., *Green biosynthesis of superparamagnetic magnetite Fe₃O₄ nanoparticles and biomedical applications in targeted anticancer drug delivery system: A review*. 2020. **13**(1): p. 2287-2308.
166. Ghazanfari, M.R., et al., *Perspective of Fe₃O₄ nanoparticles role in biomedical applications*. 2016. **2016**.
167. Liao, J., et al., *Co-immobilization of two-component hydroxylase monooxygenase by functionalized magnetic nanoparticles for preserving high catalytic activity and enhancing enzyme stability*. 2020. **164**: p. 3163-3170.
168. Yang, J., et al., *One-step purification and immobilization of his-tagged protein via Ni²⁺-functionalized Fe₃O₄@ polydopamine magnetic nanoparticles*. 2015. **20**(5): p. 901-907.
169. Wang, J., E.J.A.o.b. Pichersky, and biophysics, *Characterization of S-Adenosyl-L-methionine:(Iso) eugenol O-methyltransferase involved in floral scent production in Clarkia breweri*. 1998. **349**(1): p. 153-160.
170. Wang, J., E.J.A.o.b. Pichersky, and biophysics, *Identification of specific residues involved in substrate discrimination in two plant O-methyltransferases*. 1999. **368**(1): p. 172-180.
171. Tang, Q., U.T. Bornscheuer, and I.V.J.C. Pavlidis, *Specific Residues Expand the Substrate Scope and Enhance the Regioselectivity of a Plant O-Methyltransferase*. 2019. **11**(14): p. 3227-3233.

172. Tang, Q., et al., *Influence of Substrate Binding Residues on the Substrate Scope and Regioselectivity of a Plant O-Methyltransferase against Flavonoids*. 2020. **12**(14): p. 3721-3727.
173. Aynedinova, D., et al., *Installing the "magic methyl"—C–H methylation in synthesis*. 2021. **50**(9): p. 5517-5563.
174. Bernini, R., et al., *Synthesis of lipophilic esters of tyrosol, homovanillyl alcohol and hydroxytyrosol*. 2019. **8**(6): p. 174.
175. Chen, Z., et al., *Pharmacokinetic study of luteolin, apigenin, chrysoeriol and diosmetin after oral administration of Flos Chrysanthemi extract in rats*. 2012. **83**(8): p. 1616-1622.
176. Dimas, K., et al., *Biological activity of myricetin and its derivatives against human leukemic cell lines in vitro*. 2000. **42**(5): p. 475-478.
177. Touil, Y.S., et al., *Fisetin disposition and metabolism in mice: Identification of geraldol as an active metabolite*. 2011. **82**(11): p. 1731-1739.
178. Zhan, J., et al., *Pterostilbene is more efficacious than hydroxystilbenes in protecting liver fibrogenesis in a carbon tetrachloride-induced rat model*. 2021. **84**: p. 104604.
179. Cheung, R.C.F., et al., *Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications*. 2012. **96**(6): p. 1411-1420.
180. Asimakoula, S., et al., *Characterization of Gentisate 1, 2-Dioxygenase from Pseudarthrobacter phenanthrenivorans Sphe3 and Its Stabilization by Immobilization on Nickel-Functionalized Magnetic Nanoparticles*. 2022. **2**(1): p. 113-133.
181. Garcia-Galan, C., et al., *Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance*. 2011. **353**(16): p. 2885-2904.
182. Brunner, G. and F.J.E. Tegtmeier, *Immobilization of S-methyltransferase*. 1983. **30**: p. 181-184.
183. Scotti, C., C.R.J.B. Hutchinson, and bioengineering, *Immobilization and properties of carminomycin 4-O-methyltransferase, the enzyme which catalyzes the final step in the biosynthesis of daunorubicin in Streptomyces peucetius*. 1995. **48**(2): p. 133-140.
184. Patila, M., et al., *Graphene oxide derivatives with variable alkyl chain length and terminal functional groups as supports for stabilization of cytochrome c*. 2016. **84**: p. 227-235.
185. Graff, R.A., T.M. Swanson, and M.S.J.C.o.M. Strano, *Synthesis of Nickel–Nitrilotriacetic Acid Coupled Single-Walled Carbon Nanotubes for Directed Self-Assembly with Polyhistidine-Tagged Proteins*. 2008. **20**(5): p. 1824-1829.
186. Ji, Y., et al., *DFT-calculated IR spectrum amide I, II, and III band contributions of N-methylacetamide fine components*. 2020. **5**(15): p. 8572-8578.
187. Kong, J. and S.J.A.b.e.b.S. Yu, *Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures*. 2007. **39**(8): p. 549-559.
188. Landis-Piowar, K. and Q.J.C.m.p. Dou, *Polyphenols: biological activities, molecular targets, and the effect of methylation*. 2008. **1**(3): p. 233-243.
189. Ou, S., K.C.J.J.o.t.S.o.F. Kwok, and Agriculture, *Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods*. 2004. **84**(11): p. 1261-1269.
190. Valério, R., et al., *Combined hydrothermal pre-treatment and enzymatic hydrolysis of corn fibre: Production of ferulic acid extracts and assessment of their antioxidant and antiproliferative properties*. 2021. **170**: p. 113731.
191. Uraji, M., et al., *Enzymatic production of ferulic acid from defatted rice bran by using a combination of bacterial enzymes*. 2013. **171**(5): p. 1085-1093.
192. Bovicelli, P., et al., *Expedient synthesis of hydroxytyrosol and its esters*. 2007. **37**(23): p. 4245-4252.
193. Bai, C., et al., *Determination of synthetic hydroxytyrosol in rat plasma by GC-MS*. 1998. **46**(10): p. 3998-4001.

194. Li, H.-W., et al., *Anticancer effects of morin-7-sulphate sodium, a flavonoid derivative, in mouse melanoma cells*. 2016. **84**: p. 909-916.
195. Król, W., et al., *Synthesis and tumoricidal activity evaluation of new morin and quercetin sulfonic derivatives*. 2002. **59**(1): p. 77-79.
196. Ayanoglu, E., et al., *Myricetin and quercetin methyl ethers from *Haplopappus integerrimus* var. *punctatus**. 1981. **20**(7): p. 1715-1717.
197. Sarma, P., G. Srimannarayana, and N. Subba Rao. *Synthesis of naturally occurring partial methyl ethers of myricetin*. in *Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section A*. 1974. Springer.
198. Kang, S.-Y., et al., *Biosynthesis of methylated resveratrol analogs through the construction of an artificial biosynthetic pathway in *E. coli**. 2014. **14**(1): p. 1-11.
199. Heo, K.T., S.-Y. Kang, and Y.-S.J.M.c.f. Hong, *De novo biosynthesis of pterostilbene in an *Escherichia coli* strain using a new resveratrol O-methyltransferase from *Arabidopsis**. 2017. **16**(1): p. 1-8.
200. Jeong, Y.J., et al., *Production of pinostilbene compounds by the expression of resveratrol O-methyltransferase genes in *Escherichia coli**. 2014. **54**: p. 8-14.
201. Poh, W.J., C.P.P. Wee, and Z.J.T. Gao, *DNA methyltransferase activity assays: advances and challenges*. 2016. **6**(3): p. 369.
202. Gomi, T., et al., *Site-directed mutagenesis of rat liver S-adenosylhomocysteinase. Effect of conversion of aspartic acid 244 to glutamic acid on coenzyme binding*. 1990. **265**(27): p. 16102-16107.
203. Franceschini, N., et al., *S-adenosylhomocysteine hydrolase from *Acinetobacter calcoaceticus*: purification and partial characterization*. 1993. **30**(6): p. 1081-1092.
204. Kailing, L.L., et al., *A coupled photometric assay for characterization of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolases in the physiological hydrolytic direction*. 2017. **39**: p. 11-17.
205. Lozada-Ramírez, J., et al., *A colorimetric assay for S-adenosylhomocysteine hydrolase*. 2006. **67**(2-3): p. 131-140.