

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΜΙΝΟΤΡΙΑΖΟΛΗΣ
ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ
ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ ΤΩΝ
ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ

ΧΙΩΤΗ ΒΑΣΙΛΕΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΖΕΡΒΟΥΔΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

2016

Περιεχόμενα

Εισαγωγή	2
Οξειδωτικό stress	3
Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS).....	3
Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H ₂ O ₂)	5
Επιπτώσεις οξειδωτικού stress	5
Καταλάση	7
Υπεροξειδάσες	9
Καταλάσες-Υπεροξειδάσες	10
Αμινοτριαζόλη	10
Σκοπός της εργασίας	11
Υλικά και Μέθοδοι	13
Φυτά και δειγματοληψία	14
Προσδιορισμός της δραστικότητας της καταλάσης	14
Η αρχή της μεθόδου	15
Υλικά της μεθόδου	15
Πορεία της μεθόδου	16
Κατασκευή πρότυπης καμπύλης της δραστικότητας της καταλάσης	17
Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	17
Υλικά της μεθόδου:	17
Πορεία της μεθόδου:	18
Αποτελέσματα-Παρατηρήσεις	20
Η επίδραση της αμινοτριαζόλης στη δραστικότητα της καταλάσης	21
Η καταλάση σε διάφορα φυτά και ιστούς	22
Η ολική πρωτεΐνη των φυτών	23
Συμπεράσματα-Συζήτηση	24
Βιβλιογραφία	26

Εισαγωγή

Οξειδωτικό stress

Ο όρος «οξειδωτικό στρες» αναφέρεται στην ειδική κατάσταση που βρίσκονται τα κύτταρα ενός ιστού όταν ανατρέπεται η ισορροπία μεταξύ οξειδωτών και αντιοξειδωτών προς όφελος των πρώτων (Παπαποστόλου 2007). Το οξειδωτικό stress είναι ουσιαστικά μια ρυθμιζόμενη διαδικασία. Υπό κανονικές συνθήκες, το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα παρέχει επαρκή προστασία απέναντι στο δραστικό οξυγόνο και τις ελεύθερες ρίζες. Τόσο οι φυσικές όσο και οι προκαλούμενες από τον άνθρωπο καταστάσεις καταπόνησης προκαλούν την αυξανόμενη παραγωγή των τοξικών παραγώγων οξυγόνου. Ως αντίδραση, η ικανότητα του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος αυξάνεται. Όμως, σε άλλες περιπτώσεις η αντίδραση μπορεί να είναι μέτρια (Κωσταρά 2015).

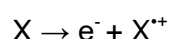
Μερικά παραδείγματα συνθηκών stress για τα φυτά είναι η πολύ έντονη ακτινοβολία, η έλλειψη νερού, η ατμοσφαιρική και εδαφική ρύπανση, η υπερβολική συγκέντρωση αλάτων και οι επιθέσεις από παθογόνα. Τα φυτά και κυρίως αυτά που αναπτύσσονται στον αγρό, έρχονται αντιμέτωπα με πολλές από αυτές τις καταστάσεις και η ικανότητα προσαρμογής τους εξαρτάται από το είδος και την ποικιλία του κάθε φυτού. Η έκθεση των φυτών σε κάποιο stress, ορισμένες φορές τα βοηθάει να αποκτήσουν αντοχές σε κάποια άλλη μορφή stress ενώ, άλλες φορές μπορεί να οδηγήσουν σε άλλες καταπονήσεις.

Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν την ύπαρξη κοινών παραγόντων οι οποίοι εμπλέκονται στις αποκρίσεις απέναντι σε διαφορετικές συνθήκες καταπόνησης. Ένα κοινό στοιχείο είναι πως σε πολλές περιπτώσεις διαφορετικών καταπονήσεων παρατηρούμε τη συσσώρευση δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS – Reactive Oxygen Species) με αποτέλεσμα να δημιουργούνται αλλαγές στην κυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση (Mhamdi et al. 2010).

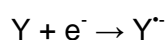
Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Ελεύθερη ρίζα (free radical) είναι κάθε είδος ατόμου ή μορίου που μπορεί να είναι αυθύπαρκτο και περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Ασύζευκτο ηλεκτρόνιο καλείται αυτό που καταλαμβάνει μόνο του ένα ατομικό ή μοριακό τροχιακό. Οι ελεύθερες ρίζες παριστάνονται με μία τελεία πάνω και δεξιά από το χημικό τύπο του ατόμου ή μορίου. Μερικά παραδείγματα των πιο γνωστών ελευθέρων ριζών αποτελούν: το άτομο του υδρογόνου (H^{\bullet}), η ρίζα του σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$), η ρίζα υδροξυλίου (OH^{\bullet}) κλπ. Ο σχηματισμός των ελευθέρων ριζών μπορεί να γίνει με τους εξής τρόπους:

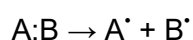
- Με απώλεια ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ή άτομο:



- Με προσθήκη ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ή άτομο:



- Με ομολυτική σχάση ομοιοπολικού δεσμού:



(Παπαποστόλου 2007)

Το μόριο του οξυγόνου στη βασική του (μη διεγερμένη) κατάσταση (ground-state O_2) εμπίπτει στον ορισμό της ελεύθερης ρίζας αφού διαθέτει δύο μονήρη (ή

ασύζευκτα) ηλεκτρόνια με ίδιας κατεύθυνσης στροφορμές (spin), που καταλαμβάνουν το καθένα ένα διαφορετικό μοριακό τροχιακό. Η κατανομή αυτή προσδίδει στην όλη δομή υψηλού βαθμού χημική σταθερότητα, αφού προκειμένου το O₂ να αντιδράσει απευθείας με κάποια ένωση, θα πρέπει η ένωση αυτή να διαθέτει επίσης δύο μονήρη ηλεκτρόνια με στροφορμή αντίθετη ως προς αυτή των ασύζευκτων ηλεκτρονίων του O₂ (Συντιχάκη 2010; Παπαποστόλου 2007).

Οι ROS είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται συχνά από τους επιστήμονες ώστε να συμπεριλάβουν όχι μόνο τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, αλλά και ορισμένες μη ρίζες, παράγωγα του O₂ όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

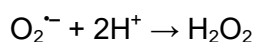
ΡΙΖΕΣ	ΜΗ ΡΙΖΕΣ
Σουπεροξειδίου (O ₂ ^{•-})	Υπεροξειδίου του υδρογόνου (H ₂ O ₂)
Υδροξύλιο (OH [•])	Υποχλωρικό οξύ (HOCl)
Περοξύλιο (RO ₂ [•])	Όζον (O ₃)
Αλκοξύλιο (RO [•])	Μονήρες οξυγόνο (¹ ΔgO ₂)
Υπεροξύλιο (HO ₂ [•])	Περοξενιτρώδες (ONOO ⁻)

Οι πιο συνηθισμένες δραστικές μορφές οξυγόνου είναι η ρίζα του σουπεροξειδίου (O₂^{•-}), η ρίζα υδροξυλίου (OH[•]) και το υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Όταν το O₂ προσεγκύσει δύο άτομα υδρογόνου τότε σχηματίζεται το υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) το οποίο, αν και δεν θεωρείται ελεύθερη ρίζα, είναι ROS και συμμετέχει στην παραγωγή ελεύθερων ριζών (Ντίνου & Σουφλάκη 2013).

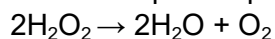
Οι ελεύθερες ρίζες είναι ικανές να προκαλέσουν εκτεταμένες κυτταρικές βλάβες. Οι μακροπρόθεσμες κυτταρικές βλάβες που προκαλούνται αποδίδονται κυρίως στην προσβολή του DNA. Οι περισσότερες ROS παράγονται σε χαμηλά επίπεδα από τον αερόβιο μεταβολισμό και οι βλάβες που προκαλούν επιδιορθώνονται συνεχώς. Όταν όμως η συγκέντρωσή τους αυξηθεί υπέρμετρα, μπορούν να προκαλέσουν ακόμα και κυτταρική νέκρωση.

Προκειμένου να διατηρηθεί η κυτταρική ομοιόσταση, είναι αναγκαίο να εγκατασταθεί μια ισορροπία μεταξύ δημιουργίας και αδρανοποίησης των ROS (https://el.wikipedia.org/wiki/Οξειδωτικό_στρες). Για να διατηρηθεί ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης των ελευθέρων ριζών και δραστικών ειδών οξυγόνου, οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει κατάλληλη αντιοξειδωτική άμυνα. Η αντιοξειδωτική άμυνα μπορεί να είναι είτε ενζυμική (π.χ. καταλάση, υπεροξειδάση) ή μη ενζυμική (αντιοξειδωτικές ουσίες). Αντιοξειδωτικό είναι κάθε ουσία η οποία όταν βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται, καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξειδωση του υποστρώματος αυτού. Αυτό πραγματοποιείται γιατί τα μόρια των αντιοξειδωτικών ενώσεων είναι ικανά να προσφέρουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια, τερματίζοντας έτσι τις αντιδράσεις ελευθέρων ριζών (Τζίκα 2008). Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά όπλα που διαθέτει το κύτταρο είναι:

- Η δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD), που καταλύει την αντίδραση:



- Η καταλάση, που καταλύει την αντίδραση:



- Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, που καταλύει την αντίδραση:

$$2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$$

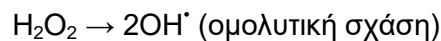
(https://el.wikipedia.org/wiki/Οξειδωτικό_στρες)

Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)

Το H_2O_2 είναι η πρωτονιομένη μορφή του O_2^{2-} και είναι ένα σχετικά παχύρρευστο υγρό χρώματος ανοιχτού μπλε και με σημείο βρασμού τους 150°C . Είναι τοξικό για τα περισσότερα κύτταρα σε συγκεντρώσεις από 10 έως $100\mu\text{M}$. Αναμιγνύεται πολύ εύκολα με το νερό και διαχέεται εξαιρετικά εύκολα ανάμεσα και μέσα στα κύτταρα *in vivo*. Διάφορα ένζυμα που υπάρχουν *in vivo* όπως η οξειδάση της ξανθίνης, του ουρικού και των D-αμινοξέων μπορούν να παράγουν H_2O_2 (Παπαποστόλου 2007). Από τις κυριότερες ROS, το H_2O_2 είναι το πιο σταθερό μόριο, έχει το μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής και μπορεί να διασχίζει φυτικές κυτταρικές μεμβράνες. Για αυτό το λόγο είναι και αυτό που μπορεί να λειτουργήσει άμεσα και ως διακυτταρικό σήμα. Έτσι, το H_2O_2 που παράγεται σε ένα κύτταρο μπορεί να επηρεάσει την έκφραση ορισμένων γονιδίων του ίδιου αλλά και των παρακείμενων σε αυτό κυττάρων καθώς και να ενεργοποιήσει αμυντικούς μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένου του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (programmed cell death, PCD). Αυτό προϋποθέτει πως υπάρχουν συστήματα ανίχνευσης μέσα στα κύτταρα, που μπορούν να μεταφράσουν αυτή την πληροφορία σε αντίστοιχες βιολογικές αποκρίσεις (Μύρτζιου 2012).

Επιπλέον, οποιοδήποτε βιολογικό σύστημα παράγει O_2^- , παράγει και H_2O_2 μέσω αυτοοξειδοαναγωγής. Το H_2O_2 είναι γενικά ένας ασθενής οξειδωτικός και αναγωγικός παράγοντας και έχει μικρή δραστηριότητα. Για παράδειγμα, ακόμα και σε επίπεδα mM η επώαση του H_2O_2 με DNA, λιπίδια και αρκετές πρωτεΐνες δεν έχει σαν συνέπεια την οξείδωσή τους. Το H_2O_2 φαίνεται όμως ότι είναι ικανό να αδρανοποιήσει κάποια ένζυμα με την οξείδωση που προκαλεί στις θειολικές ομάδες (-SH groups) του ενεργού κέντρου.

Παρά τη μικρή του δραστηριότητα, από ορισμένες συγκεντρώσεις και πάνω είναι κυτταροτοξικό και σε υψηλότερες ακόμη συγκεντρώσεις χρησιμοποιείται και ως αντισηπτικό. Το H_2O_2 περνάει εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες και μπορεί άμεσα στο εσωτερικό των κυττάρων να αντιδράσει με ιόντα σιδήρου ή χαλκού σχηματίζοντας πολύ δραστηκές και καταστροφικές μορφές οξυγόνου όπως το OH^\cdot . Συγκεκριμένα, οι υδροξυλικές ρίζες έχει βρεθεί ότι είναι οι ρίζες που προκαλούν τις περισσότερες καταστροφές στο DNA κυττάρων τα οποία έχουν επωαστεί με H_2O_2 . Επιπρόσθετα, η μετατροπή του H_2O_2 σε OH^\cdot μπορεί να συμβεί με την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας σύμφωνα με την αντίδραση:



(Παπαποστόλου 2007)

Επιπτώσεις οξειδωτικού stress

Όπως συνάγεται από τις αντιδράσεις τους, οι ελεύθερες ρίζες και κυρίως οι πολύ δραστηκές όπως η ρίζα υδροξυλίου μπορούν να προσβάλλουν μεγάλη ποικιλία μορίων όπως σάκχαρα, αμινοξέα, φωσφολιπίδια και γενικά λιπίδια, βάσεις DNA και οργανικά οξέα. Οι λιγότερο δραστηκές ελεύθερες ρίζες μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή δραστηκότερων καταλήγοντας τελικά στο ίδιο αποτέλεσμα.

Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι βλάβες και οι επιπτώσεις που προκαλούνται από τις ROS εις βάρος του DNA και των λιπιδίων:

Οξειδωτικές βλάβες	Στόχοι	Είδος βλαβών	Επιπτώσεις
DNA	Πυρηνικό Μιτοχονδριακό DNA χλωροπλαστών	DNA εγκοπές DNA σπασίματα	Μεταλλαξιγένεση Κυτταρική δυσλειτουργία Καρκινογένεση
	Βάσεις πουρίνης Βάσεις πυριμιδίνης	Χημικές τροποποιήσεις: 8 υδρόξυ-γουανίνη 5- υδρόξυ-6-υδροθυμίνη	
	Πρωτεΐνες DNA	Σχηματισμός ομοιοπολικών ενώσεων DNA-πρωτεϊνών (DNA- protein διασυνδέσεις) Ομοιοπολική δέσμευση και διμερισμός μεταξύ γειτονικών διπυριμιδινών (pyrimidine dimers) από ακτινοβολία UV.	
Λιπίδια	Φωσfolιπιδική διπλοστοιβάδα κυτταροπλασματικής και ενδοκυττάρων μεμβρανών (υδρόφοβο τμήμα)	Υπεροξειδωση λιπιδίων: Σχηματισμός ριζών άνθρακα (R·) Παραγωγή οργανικών υδροϋπεροξειδίων (ROOH) Αποικοδόμηση λιπιδικών υπεροξειδίων σε τοξικά προϊόντα (κετόνες, εποξειδία, μαλονική διαλδεϋδη, 4- υδροξυνοενάλη, ισοπροστάνες κ.α.)	Καταστροφικά αποτελέσματα για τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα των μεμβρανών. Βιοφυσικές και βιοχημικές διαταραχές στο κύτταρο.

Σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στα λιπίδια, ο σχηματισμός υπεροξειδίων είτε στον πεπτιδικό κορμό είτε στις πλευρικές αλυσίδες ορισμένων αμινοξέων αποτελεί έναν μόνο από τους πολλούς τύπους οξειδωτικών βλαβών που έχουν παρατηρηθεί στις πρωτεΐνες. Παρ' όλα αυτά, ο όρος υπεροξειδωση πρωτεϊνών έχει προσλάβει μια ευρύτερη έννοια και δηλώνει όλα τα είδη ομοιοπολικών τροποποιήσεων που προκαλούνται στις πρωτεΐνες από τα διάφορα είδη ROS ή άλλα παραπροϊόντα του οξειδωτικού στρες.

Οι χημικές μεταβολές που επέρχονται στις πρωτεΐνες ως συνέπεια του οξειδωτικού στρες ποικίλουν ανάλογα με το προσβαλλόμενο σε κάθε περίπτωση αμινοξύ αλλά και το είδος του δραστικού μορίου που επιφέρει τη βλάβη. Οι περισσότερες οξειδωτικές επιδράσεις οδηγούν στη δυσλειτουργία πολλών πρωτεϊνών, η οποία μπορεί να οφείλεται σε αυτή την άμεση μεταβολή/αλλαγή αμινοξέων που βρίσκονται σε μια λειτουργική περιοχή για την πρωτεΐνη ή σε μερική

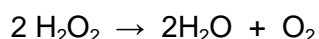
αποδιάταξη της. Αν οι πρωτεΐνες δεν αποδομηθούν εγκαίρως σ' αυτό το στάδιο, τείνουν να δημιουργούν συσσωματώματα τα οποία μακροπρόθεσμα σχηματίζουν ομοιοπολικές ενώσεις (cross links) μεταξύ τους και με τη συσσώρευσή τους, μπορούν να οδηγήσουν ακόμα και στον κυτταρικό θάνατο (Συντιχάκη 2010).

Καταλάση

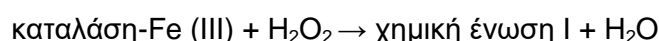
Σημαντικούς μηχανισμούς αντιοξειδωτικής άμυνας, συνιστούν παράγοντες που απομακρύνουν καταλυτικά τις ελεύθερες ρίζες και τις δραστικές μη-ρίζες, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε παραγωγή ελευθέρων ριζών (προ-οξειδωτές). Τέτοιοι παράγοντες είναι διάφορα ένζυμα όπως η δισμουτάση της ρίζας του υπεροξειδίου (SOD), η καταλάση, οι υπεροξειδάσες καθώς και κάποια ένζυμα που ρυθμίζουν τη θειολική οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου και έχουν ως υπόστρωμα, κυρίως, το μόριο της γλουταθειόνης (Συντιχάκη 2010).

Στους αερόβιους οργανισμούς, το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταβολίζεται συνήθως από δύο τύπους ενζύμων, τις καταλάσες και τις υπεροξειδάσες.

Οι καταλάσες καταλύουν κατευθείαν τη διάσπαση του H_2O_2 προς O_2 .



Ο μηχανισμός αντίδρασης της καταλάσης είναι ουσιαστικά μία αυτοοξειδοαναγωγή (dismutation). Ένα H_2O_2 ανάγεται προς H_2O και ένα άλλο οξειδώνεται προς O_2 .



(Κυρίμη 2013)

Η καταλάση (catalase) είναι το πρώτο αντιοξειδωτικό ένζυμο που ανακαλύφθηκε και χαρακτηρίστηκε. Το όνομα του ενζύμου το έδωσε ο Loew (1900) σημειώνοντας ότι «φαίνεται ότι δεν υπάρχει φυτό ή ζώο που να μην έχει αυτό το συγκεκριμένο ένζυμο». Επίσης, κάποιοι αναερόβιοι οργανισμοί γνωρίζουμε πως περιέχουν καταλάση (Mhamdi et al., 2010).

Η πρωτεΐνη βρίσκεται σαν τετραμερές σχήματος αλτήρα, με 4 όμοιες υπομονάδες και μοριακό βάρος 220-350 kDa. Κάθε μονομερές έχει μια προσθετική ομάδα αίμης στο ενεργό κέντρο. Τα μονομερή της καταλάσης ορισμένων ειδών περιέχουν ένα στενά συνδεδεμένο μόριο NADP ανά υπομονάδα. Αυτό το μόριο NADP μπορεί να παίζει ρόλο στην προστασία του ενζύμου από την οξειδωτική δράση του H_2O_2 (Ντουρούπη 2004). Το ποσοστό συμμετοχής της στην συνολική πρωτεΐνη των μικροσωμάτων κυμαίνεται από 10 έως 25%. Έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη πολλαπλών μορφών της καταλάσης σε αρκετά φυτά αλλά μόνο στο καλαμπόκι και στο βαμβάκι έχει μελετηθεί η δομή της, τα ισοένζυμα, η φυσιολογική της λειτουργία και η γενετική βάση της έκφρασης της.

Τα μικροσώματα αναλόγως τους ιστού που απαντώνται διακρίνονται σε υπεροξυσώματα στα φωτοσυνθέτοντα κύτταρα του φύλλου, γλυοξυσώματα στους ελαιώδεις σπόρους των φυτών, εξειδικευμένα μικροσώματα σε μη χλωροφυλλούχους και μη ελαιώδεις αποθηκευτικούς ιστούς, και μικροσώματα των φυματίων των ψυχανθών. Η καταλάση των υπεροξυσωμάτων και των γλυοξυσωμάτων αποδομεί το H_2O_2 το οποίο παράγεται κατά τη διάρκεια της φωτοαναπνοής (μετατροπή του γλυκολικού οξέος σε γλυοξυλικό από την γλυκολική οξειδάση στα υπεροξυσώματα)

και της β-οξειδωσης των λιπαρών οξέων (από τη δράση της οξειδάσης του λιπο-ακυλ-CoA στα γλυοξυσώματα), αντίστοιχα (Συμίνης 1996).

Αν και μερικές βακτηριακές καταλάσες χρησιμοποιούν το μαγγάνιο ως οξειδοαναγωγικό παράγοντα, όλες οι γνωστές ευκαριωτικές μορφές περιέχουν αίμη. Ο καλύτερα χαρακτηρισμένος τύπος της αίμη-εξαρτώμενης καταλάσης συναντιέται σε διαφορετικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων και προκαρυωτών, αλλά και σε μύκητες, ζώα και φυτά και είναι η τυπική μορφή της μονολειτουργικής καταλάσης. Αυτά τα ένζυμα αποτελούνται από πολυπεπτίδια των 50-70 kDa, και οργανώνονται σε τετραμερή, που το καθένα μεμονωμένα φέρει προσθετική ομάδα αίμης. Ένας δεύτερος τύπος αίμη-εξαρτώμενης καταλάσης είναι μια διλειτουργική καταλάση υπεροξειδάση (catalase-peroxidase) που είναι δομικά διαφορετική πρωτεΐνη και βρίσκεται σε μερικούς μύκητες και προκαρυωτικούς οργανισμούς.

Η διάκριση μεταξύ μονολειτουργικής και διλειτουργικής καταλάσης δεν είναι απόλυτη, επειδή ο πρώτος τύπος μπορεί μερικές φορές να καταλύσει και εξαρτώμενη από το H₂O₂ υπεροξειδωση οργανικών υποστρωμάτων. Από την άλλη πλευρά, οι διλειτουργικές καταλάσες-υπεροξειδάσες μοιάζουν περισσότερο με τις αίμη-εξαρτώμενες υπεροξειδάσες. Επίσης, έχουν υψηλότερη συγγένεια με το H₂O₂ από τις μονολειτουργικές καταλάσες και μπορεί να διακρίνονται από σχετική έλλειψη ευαισθησίας στον αναστολέα 3-αμινο-1,2,4-τριαζόλη (3-AT). Όπως προαναφέρθηκε, ακόμα και οι μονολειτουργικές καταλάσες μπορούν να καταλύσουν την υπεροξειδωση υποστρωμάτων. Η υπεροξειδωση που οφείλεται σε δράση καταλάσης έχει αναφερθεί και σε φυτά (Κωσταρά 2015).

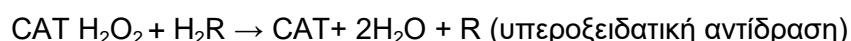
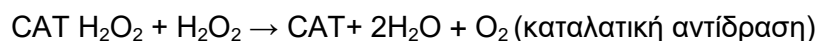
Τα τελευταία χρόνια χρόνια έχουν γίνει μελέτες φυλογενετικής ταξινόμησης των πολυάριθμων γνωστών αλληλουχιών καταλάσης. Έτσι, έχει βρεθεί ότι υπάρχουν δύο γονίδια καταλάσης στην *Escherichia coli*: το KatE κωδικοποιεί μία μονολειτουργική καταλάση ενώ το KatG μία καταλάση-υπεροξειδάση. Αντιθέτως, στα περισσότερα ζώα, συμπεριλαμβανομένων των θηλαστικών, έχει βρεθεί ένα μόνο γονίδιο καταλάσης. Από την άλλη πλευρά, από τις μέχρι τώρα μελέτες στα αγγειόσπερμα φυτά (τόσο σε μονοκοτυλήδονα όσο και σε δικοτυλήδονα) έχουν βρεθεί να περιέχουν τρία γονίδια καταλάσης (CAT1, CAT2, CAT3).

Μια πρόσφατη ταξινόμηση που βασίστηκε στα γονίδια της καταλάσης στον καπνό διαχωρίζει τις καταλάσες σε:

- i. Κλάση I (Class I) που εκφράζονται ισχυρά στους φωτοσυνθετικούς ιστούς
- ii. Κλάση II (Class II) που συνδέονται με τους αγγειακούς ιστούς
- iii. Κλάση III (Class III) που εκφράζονται στα σπέρματα και τους αναπαραγωγικούς ιστούς

Βέβαια, οι τρεις ισομορφές (CAT1, CAT2, CAT3) δεν αντιστοιχούν σε κάθε είδους φυτό με τις ίδιες Κλάσεις, ενώ ίδια ισομορφή μπορεί να εμφανιστεί ταυτόχρονα σε διαφορετικούς ιστούς του ίδιου φυτού (Κυρίμη 2013).

Οι δύο ενεργόητες (καταλατική και υπεροξειδατική) που δείχνουν τα ισοένζυμα της καταλάσης φαίνονται στις επόμενες αντιδράσεις:



Το υπόστρωμα H₂R θα μπορούσε να είναι αιθανόλη, μεθανόλη, φορμαλδεΐδη ή φορμικό οξύ (Συμίνης 1996).

Ένα σημαντικό ερώτημα είναι ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός της καταλάσης στα φυτά. Έτσι, από διάφορες μελέτες φαίνεται ότι τα περοξυσώματα περιέχουν

υψηλή δραστηριότητα καταλάσης αν και έχουν αναφερθεί και δραστηριότητες στο κυτταρόπλασμα και στο μιτοχόνδριο. Υπάρχουν και αναφορές σε πειράματα με απομονωμένους χλωροπλάστες αλλά αμφισβητούνται διότι μπορεί να οφείλεται στην παρουσία περοξυσωμάτων κατά τη διαδικασία απομόνωσης ή στην πρόσδεση του ενζύμου στο εξωτερικό των χλωροπλαστών (Κυρίμη 2013).

Υπεροξειδάσες

Οι υπεροξειδάσες είναι μία κατηγορία ενζύμων που απαντάται ευρύτατα στα ζώα, τα φυτά και τα μικρόβια και η κύρια λειτουργία των οποίων είναι η οξειδωση διαφόρων αρωματικών ουσιών, όπως οι φαινόλες, οι υδροκινόνες, κλπ με τη βοήθεια του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Τζίκα 2008). Είναι μονομερείς γλυκοπρωτεΐνες με προσθετική ομάδα αίμης και οι υδαάνθρακες αποτελούν περίπου το 15% της συνολικής μοριακής μάζας της πρωτεΐνης. Στα ανώτερα φυτά έχουν εντοπισθεί μέχρι 35 ισοενζυμικές μορφές της υπεροξειδάσης, αποτέλεσμα της ύπαρξης πολλών γονιδίων, μεγάλου αριθμού αντιγράφων γονιδίων λόγω πολυμορφισμών και μετα-μεταφραστικών αλλαγών στην πρωτεΐνη (Συμίνης 1996).

Η σύνθεσή της υπεροξειδάσης γίνεται πιθανώς στο ενδοπλασματικό δίκτυο, η τροποποίηση της στα όργανα Golgi, απ' όπου και εκκρίνεται με ίδιο τρόπο με τις άλλες γλυκοπρωτεΐνες, είναι δε περισσότερο δραστήρια στα κυτταρικά τοιχώματα. Γενικά η υπεροξειδάση δεν εμφανίζει αυστηρή εξειδίκευση έναντι των αναγωγικών, ενώ έχουν αναφερθεί κάποια ισοένζυμα υπεροξειδάσης που καταλύουν και την ανεξάρτητη του H_2O_2 οξειδαναγωγή (Τζίκα 2008).

Το ένζυμο αν και έχει μεγάλη καταλυτική ικανότητα ωστόσο δείχνει μικρή εξειδίκευση στο υπόστρωμα δότη. Οι πολλές ισοενζυμικές μορφές και η μικρή εξειδίκευση του ενζύμου έχουν ως αποτέλεσμα την δυσκολία στην κατανόηση των λειτουργιών και του ρόλου του *in planta*. Ωστόσο η απλότητα των μεθόδων εντοπισμού και μέτρησης της ενεργότητας των υπεροξειδασών την έχουν καταστήσει ένα εύχρηστο δείκτη στην φυσιολογία και ανάπτυξη των φυτικών οργανισμών (Συμίνης 1996).

Οι υπεροξειδάσες είναι ένζυμα που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, στα κυτταρικά οργανίδια, αλλά και στις εξωκυττάρια δομές των φυτικών και ζωικών ιστών και χρησιμοποιούν τον επικίνδυνο για το κύτταρο μεταβολίτη του οξυγόνου, το H_2O_2 , ευεργετικά για το κύτταρο σε μια ποικιλία φυσιολογικών λειτουργιών, όπως η προσκόλληση και μετακίνηση των κυττάρων, ο πολυμερισμός και αποπολυμερισμός της λιγνίνης στα φυτά και μύκητες, η αντιβακτηριακή δράση στα φύκη, η προστασία του μιτοχονδρίου και των χλωροπλαστών, η δόμηση του κυτταρικού τοιχώματος, ο καταβολισμός της αυξίνης και η συμμετοχή στην άμυνα των φυτών.

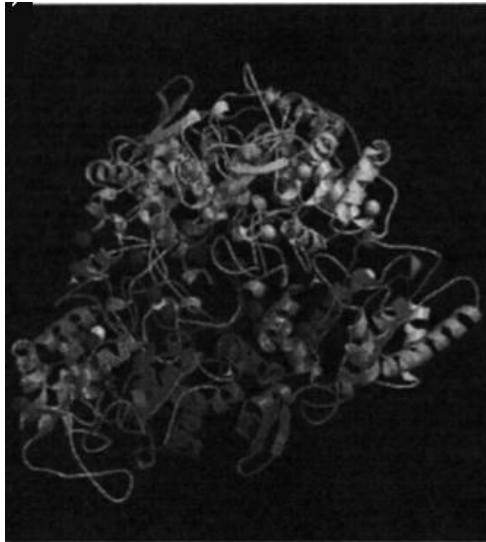
Η κατανόηση του μηχανισμού κατάλυσης των κλασσικών υπεροξειδασών προέρχεται σε μεγάλο βαθμό από τη μελέτη της υπεροξειδάσης του ραπανακιού (HRP) και της κυτοχρωμικής c υπεροξειδάσης (CcP), για τις οποίες υπάρχει μια πληθώρα πληροφοριών, που είναι αποτέλεσμα προσέγγισης με βιοχημικές, φασματοσκοπικές και κρυσταλλογραφικές μεθόδους (Κεραμάρης 1999).

Συχνά, τα φυτά και τα βακτήρια διαθέτουν αίμη-εξαρτώμενες υπεροξειδάσες που μπορούν να οξειδώσουν διάφορα υποστρώματα με τη χρήση H_2O_2 όπως για παράδειγμα η υπεροξειδάση του ασκορβικού (ascorbateperoxidase, APX) που βρίσκεται στους χλωροπλάστες, οι οποίοι δεν περιέχουν καταλάση (Κυρίμη 2013).

Καταλάσες-Υπεροξειδάσες

Είναι μια κατηγορία ενζύμων που παρουσιάζουν ταυτόχρονη καταλασική και υπεροξειδική ενεργότητα και έχουν καθαριστεί από πολλά βακτηριακά στελέχη (Εικόνα 1). Τα ένζυμα αυτού του τύπου διαφέρουν από τις κλασσικές καταλάσες στις εξής ιδιότητες:

- i. η ενζυμική ενεργότητά τους περιορίζεται σε ένα πολύ στενό εύρος pH
- ii. απενεργοποιούνται από αιθανόλη – χλωροφόρμιο
- iii. δεν αναστέλλονται από το κλασσικό καταλασικό αναστολέα 3-αμινο1,2,4 τριαζόλη
- iv. είναι περισσότερο ευαίσθητα στην επίδραση της θερμοκρασίας, του pH και του H_2O_2
- v. για τη καταλασική ενεργότητα απαιτείται H_2O_2 της τάξεως mM
- vi. ο σίδηρος της αίμης ανάγεται από διθειόνη.



Εικόνα 1 Καταλάση-Υπεροξειδάση

Πρόσφατες μελέτες των αμινοξικών αλληλουχιών και των ομολογιών τους, δείχνουν ότι οι βακτηριακές καταλάσες-υπεροξειδάσες είναι διπλασιασμένα αντίγραφα μέλη της υπεροικογένειας των φυτικών υπεροξειδασών (Ντουρούπη 2004).

Αμινοτριαζόλη

Η δραστικότητα της καταλάσης παρεμποδίζεται από αζίδια, κυανιούχα άλατα και HOCl, αλλά ένας πιο χρήσιμος αναστολέας της καταλάσης είναι η αμινοτριαζόλη, η οποία χρησιμοποιείται σε πειράματα *in vitro* και *in vivo* για τη μέτρηση παραγωγής του H_2O_2 . Η δραστικότητα της καταλάσης βρίσκεται στους ιστούς ζώων και φυτών και βρίσκεται κυρίως σε υποκυτταρικά οργανίδια, όπου δεσμεύεται από απλές μεμβράνες που είναι γνωστές ως υπεροξεισώματα (peroxisomes). Τα υπεροξεισώματα περιέχουν αρκετά κυτταρικά ένζυμα που παράγουν H_2O_2 όπως η γλυκολική οξειδάση, η ουρική οξειδάση και οι φλαβινοπρωτεϊνικές δεϋδρογονάσες (συμμετέχουν στην οξείδωση των λιπαρών οξέων). Τα μιτοχόνδρια, οι χλωροπλάστες και το ενδοπλασματικό δίκτυο περιέχουν ελάχιστη καταλάση. Στη περίπτωση που έχει σχηματισθεί H_2O_2 στις περιοχές αυτές δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί με καταλάση, εκτός αν υπάρχει διαρροή στα υπεροξεισώματα. Αρκετοί μικροοργανισμοί περιέχουν ένζυμα που καλούνται ψευδοκαταλάσες. Οι καταλάσες αυτές διασπούν το H_2O_2 αλλά δεν είναι ευαίσθητες στα αζίδια ή στα κυανιούχα άλατα και δεν περιέχουν αίμη (Παπαποστόλου 2007).

Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετήσουμε και να συγκρίνουμε τη δραστικότητα της καταλάσης σε φύλλα και ρίζες φυτών από διαφορετικά είδη και οικογένειες. Ταυτόχρονα, με τη μελέτη της επίδρασης της αμινοτριαζόλης στη δραστικότητα του ενζύμου προσπαθήσαμε να εκτιμήσουμε αν η καταλάση στους διαφορετικούς ιστούς ανταποκρίνεται στο πρότυπο της μονολειτουργικής καταλάσης ή στο πρότυπο της διλειειτουργικής καταλάσης-υπεροξειδάσης.

Υλικά και Μέθοδοι

Φυτά και δειγματοληψία

Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 1) για το πείραμα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

1. Φυτά που αναπτύχθηκαν στην αεροπονική φάρμα του Τμήματος (δειγματοληψία σε στάδιο πλήρης ανάπτυξής τους)
2. Νεαρά φυτά σε γλαστράκι

Η δειγματοληψία στην πρώτη περίπτωση έγινε με επιλογή υγείων και πράσινων φύλλων και κεντρικό κομμάτι του ριζικού συστήματος. Στη δεύτερη περίπτωση, ακολουθήθηκε η ίδια λογική για τη συλλογή των φύλλων όμως όσον αφορά τη λήψη τμήματος της ρίζας τηρήθηκε η εξής διαδικασία:

- Αφαίρεση του φυτού από το γλαστράκι
- Καθάρισμα του χώματος με νερό βρύσης
- Λήψη κεντρικού τμήματος της ρίζας (σε μερικές περιπτώσεις ήταν αδύνατο εξαιτίας της νεαρής ηλικίας του φυτού και της μικρής ανάπτυξης του ριζικού συστήματος, οπότε χρησιμοποιήθηκε ολόκληρη η ρίζα)

Και για τις δύο περιπτώσεις, η δειγματοληψία γινόταν την ίδια ημέρα που είχε προγραμματιστεί και η μέτρηση του κάθε δείγματος. Πριν τη χρήση τους οι φυτικοί ιστοί, πλένονταν με νερό βρύσης και έπειτα με απιονισμένο.

Πίνακας 1. Φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα

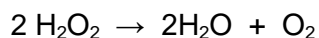
Φυτό	Είδος	Οικογένεια	Ανάπτυξη
Μαρούλι	<i>Lactuca sativa</i>	Cichoriaceae	Αεροπονία
Αντίδι	<i>Cichorium endivia</i>		Αεροπονία
Σέλινο	<i>Apium graveolens</i>	Apiaceae (Umbelliferae)	Κάποια φυτά σε αεροπονία και κάποια σε γλαστράκια
Μαϊντανός	<i>Petroselinum crispum</i>		Γλαστράκια
Τομάτα	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Solanaceae	Αεροπονία
Μελιτζάνα	<i>Solanum melongena</i>		Αεροπονία

Προσδιορισμός της δραστηριότητας της καταλάσης

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου καταλάση (catalase) γίνεται με τη μέτρηση της κατανάλωσης του H_2O_2 στα 240 nm ή εναλλακτικά, όπως εφαρμόστηκε και στο πείραμά μας, στα 253 nm.

Η αρχή της μεθόδου

Η καταλάση καταλύει τη διάσπαση του H_2O_2 προς H_2O και O_2 :



Η διάσπαση του H_2O_2 συνοδεύεται από τη μείωση της απορρόφησης στο υπεριώδες φάσμα και πιο συγκεκριμένα στα 240 nm. Η διαφορά στην απορρόφηση (ΔA_{240}) ανά μονάδα χρόνου είναι ένα μέτρο της δραστηριότητας της καταλάσης. Όμως, ως μέτρο της συγκέντρωσης του H_2O_2 μπορεί να χρησιμοποιηθεί η οπτική απορρόφηση σε οποιοδήποτε μήκος κύματος σε αυτήν την περιοχή του φάσματος, δεδομένου ότι η απορρόφηση αυξάνεται αναλογικά με τη συγκέντρωση της ουσίας, σύμφωνα με το νόμο Beer-Lambert. Τα προϊόντα της αντίδρασης (οξυγόνο και νερό) δεν απορροφούν σε αυτήν την περιοχή του φάσματος. Αν η ενζυμική δοκιμή περιέχει άλλα συστατικά τα οποία απορροφούν στο υπεριώδες, το σφάλμα στη μέτρηση μπορεί να ελαχιστοποιηθεί με τη χρήση μήκους κύματος στο οποίο η απορρόφηση αυτών των συστατικών θα είναι η μικρότερη δυνατή. Η ύπαρξη ενός συστατικού το οποίο παρεμβαίνει στη μέτρηση μπορεί να αποκαλυφθεί από την αύξηση της αρχικής απορρόφησης κατά την ενζυμική δοκιμή.

Για να αποφευχθεί, κατά τη διάρκεια της ενζυμικής δοκιμής, ο σχηματισμός φυσαλίδων στην κυψελίδα λόγω της απελευθέρωσης του O_2 , είναι απαραίτητο να χρησιμοποιήσουμε μια σχετικά χαμηλή συγκέντρωση H_2O_2 (μέχρι 10 mM). Η συγκέντρωση του H_2O_2 είναι καθοριστική δεδομένου ότι υπάρχει άμεση αναλογία μεταξύ της συγκέντρωσης του υποστρώματος και το ρυθμό διάσπασής του. Η επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό της διάσπασης του H_2O_2 είναι μικρή κι έτσι οι μετρήσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν από 0° έως 37°C. Η καμπύλη δραστηριότητας του pH διαθέτει ένα αρκετά ευρύ βέλτιστο (pH 6,8-7,5) γι' αυτό και οι μετρήσεις γίνονται συνήθως σε pH 7,0.

Υλικά της μεθόδου

- Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer)
 - 100 mM Na_2HPO_4 pH 7,0
 - 1 mM EDTA
 - 0,5 mM PMSF διαλυμένο σε αιθανόλη τελικής συγκέντρωσης 0,3% (v/v). Το διάλυμα δεν πρέπει να περιέχει τον συνήθη αντιοξειδωτή BHA, διότι παρεμβάλλεται στη μέθοδο. Το διάλυμα χρησιμοποιείται για την ομογενοποίηση αλλά και για την αραίωση του ομογενοποιημένου (η ομογενοποίηση γίνεται σε χαμηλή ένταση φωτισμού, σε αναλογία περίπου 1 gr : 10 ml, με όλα τα υλικά παγωμένα).
- H_2O_2 4,5 mM (συγκέντρωση στην κυβέτα, διάλυμα φρέσκο): Αναμειγνύονται 92 μl πυκνού H_2O_2 (9,8 M) με 908 μl ρυθμιστικό διάλυμα (δ/μα 1). Το διάλυμα που προκύπτει έχει συγκέντρωση 900 mM. Από αυτό κάνουμε αραίωση 10 φορές, δηλαδή 100 μl με 900 μl ρυθμιστικό διάλυμα (δ/μα 2). 100 μl από αυτό το διάλυμα σε 1 ml τελικό όγκο αντίδρασης δίνουν τελική συγκέντρωση H_2O_2 9 mM που αντιστοιχεί σε απορρόφηση $A_{240\text{nm}} = 0,400$ ή $A_{253\text{nm}} = 0,200$ (Κωσταρά 2015).
- Αμινοτριαζόλη (AT) 0,4 M (διάλυμα φρέσκο σε ρυθμιστικό διάλυμα)
- Επειδή οι μετρήσεις γίνονται στο υπεριώδες φάσμα, χρησιμοποιείται κυβέτα χαλαζία (Q) για τις φωτομετρήσεις.

Πορεία της μεθόδου

1. Βάζω το γουδί και το γουδοχέρι που θα χρησιμοποιηθούν για την ομογενοποίηση στην κατάψυξη για τουλάχιστον 30 min.
2. Ζυγίζω περίπου 0,5 g φύλλο (χωρίς το κεντρικό νεύρο) ή ρίζα (τμήμα από το μέσο της)
3. Ψιλοκόβω τον ιστό στο κρύο γουδί και όλη η διαδικασία γίνεται σε πάγο.
4. Προσθέτω 1 ml κρύου ρυθμιστικού διαλύματος και ομογενοποιώ.
5. Επαναλαμβάνω το 4^ο βήμα έως τα 3 ml (ή και 4 ml).
6. Μεταφέρω το ομογενοποίημα σε δοχείο για φυγοκέντρηση (το οποίο βρίσκεται και αυτό σε πάγο).
7. Ξεπλένω το γουδί και το γουδοχέρι με 1 ml (δύο δόσεις των 500 µl) buffer βάζοντας και συμπληρώνω το δείγμα για φυγοκέντρηση.
8. Φυγοκεντρώ το ομογενοποίημα στις 13400 rpm για 15 min στους 4°C.
9. Μεταφέρω το υπερκείμενο (σε αυτό κάνουμε και την ποσοτικοποίηση των ολικών πρωτεϊνών) σε έναν ογκομετρικό σωλήνα, ογκομετρώ και το μεταφέρω σε γυάλινο σωλήνα.

Σημειώσεις:

- Ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιώ το πυκνό δείγμα ή κάνω αραιώση. Σε περίπτωση αραιώσης, δε χρησιμοποιείται όλο το δείγμα αλλά μικρότερη ποσότητα η οποία εξαρτάται από τις απαιτήσεις του πειράματος.
- Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων το δείγμα πρέπει να μένει σε πάγο και να υπάρχει χαμηλός φωτισμός. Ενδείκνυται ο γυάλινος σωλήνας να είναι καλυμμένος με αλουμινόχαρτο.

10. Κατασκευάζω σωληνάκια όπως περιγράφεται στους παρακάτω πίνακες:

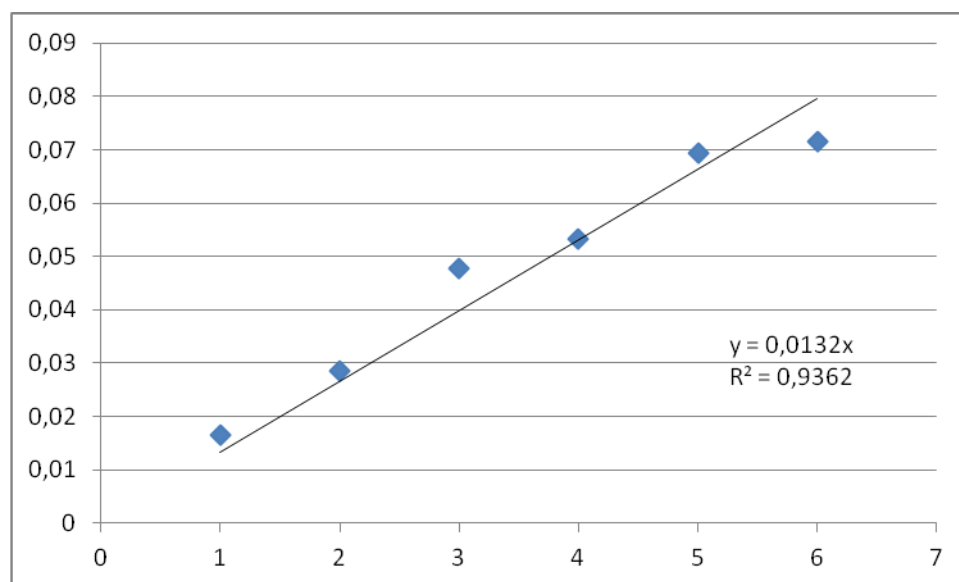
Υλικά	Μάρτυρας AT (µl)	Δείγμα (µl)
Δείγμα ολικό σε buffer	850	900
Διάλυμα Αμινοτριαζόλης	50	-
Επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου και μετά προσθέτω		
Διάλυμα H ₂ O ₂	100	100
Μετρείται η κλίση στα 253 nm Μηδενίζω με buffer ενώ οι ρυθμίσεις του οργάνου είναι: Lagtime: 10 sec Ratetime: 30 sec Ολοκλήρωση μέτρησης: 100 sec		

Προσδιορίζεται η κλίση της αντίδρασης σε χρονικό διάστημα 30 sec (ratetime) ενώ για το ίδιο δείγμα γίνεται τουλάχιστον τρεις φορές (μέσα σε 100 sec), ώστε να επιβεβαιωθεί ότι η τιμή της κλίσης σταθεροποιείται στην ίδια τιμή (μετά από τα 100 sec η κλίση θα αρχίσει να μειώνεται λόγω της κατανάλωσης του H₂O₂). Η κλίση εκφράζεται ανά λεπτό και μετατρέπεται σε units ενζύμου με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης που κατασκευάζεται με καθαρή καταλάση (Sigma). Η τελική έκφραση της δραστηριότητας γίνεται σε units CAT/ml ή units CAT/mg πρωτεΐνης του υπερκειμένου (που έχει προσδιοριστεί με τη μέθοδο Coomassie Brilliant Blue) (Κωσταρά 2015).

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης της δραστικότητας της καταλάσης

1. Μηδενίζω το φωτόμετρο με το ρυθμιστικό μας διάλυμα στα 253 nm.
2. Παρασκευάζω υπεροξειδίο (4,5 mM) και πρότυπο διάλυμα καταλάσης από ήπαρ βοδιού (Sigma) 1unit/μl (σε buffer) το οποίο αραιώνω δέκα φορές ώστε να έχω 1unit/10 μl. Τα δείγματα είναι 10-60 μl αραιού διαλύματος καταλάσης (1-6 units) και συμπληρώνονται με buffer μέχρι τα 900 μl
3. Τα αφήνω να επωαστούν για 1 min.
4. Προσθέτω 100 μl H₂O₂ και φωτομετρώ (253 nm).

Δείγμα	A _{initial}	ΔA/min
1 unit/μl	0,2191	-0,0165
2 units/μl	0,1962	-0,0286
3 units/μl	0,2181	-0,0478
4 units/μl	0,1863	-0,0532
5 units/μl	0,2195	-0,0693
6 units/μl	0,1763	-0,0715



Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος εφαρμόζεται σε περιπτώσεις που το ομογενοποίημα είναι άφθονο σε πρωτεΐνη και βασίζεται στην ηλεκτροστατικής φύσης αντίδραση των πρωτεϊνών με το αντιδραστήριο Coomassie Brilliant Blue G-250.0

Υλικά της μεθόδου:

1. Διάλυμα Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB):

Φτιάχνεται διάλυμα 0,033% CBB (w/v) σε 0,5N HCl. Αναμειγνύονται 240ml αποσταγμένο νερό (ddH₂O) και 10ml πυκνό HCl (12,07 N) προσθέτοντας αργά και προσεκτικά (σε απαγωγό) το πυκνό HCl στο νερό. Χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή, επειδή η διάλυση είναι ισχυρά εξώθερμη και αν γίνει γρήγορα μπορεί να συμβούν φαινόμενα απότομης εξάτμισης κατά την οποία σταγονίδια HCl μπορεί να εκτιναχθούν. Στη συνέχεια, προστίθενται 0,0825 g Coomassie Brilliant Blue G-250 (MB 854,0) και αφήνεται το διάλυμα να αναδεύεται για περίπου 30min. Στη συνέχεια, διηθείται το διάλυμα σε χωνί υπό κενό με χαρτί whatman και μεταγγίζεται σε γυάλινο κλειστό δοχείο προφυλαγμένο από το φως. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

2. 0,5% (w/v) triton-X 100: Αραιώνεται 20 φορές (με ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης) το stock διάλυμα 10% (w/v).
3. HCl 6,035N: Αραιώνεται το πυκνό HCl (12,07N) 1:1 με ddH₂O.
4. HCl 0,5N: Αραιώνεται το πυκνό HCl με ddH₂O.
5. Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης (BSA) συγκέντρωσης 1mg/ml (σε διάλυμα ομογενοποίησης).

Πορεία της μεθόδου:

1. Μηδενίζω το φωτόμετρο στα 620 nm με ddH₂O.
2. Παρασκευάζω το τυφλό αντιδραστηρίων όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα, κάνω τρεις μετρήσεις και βγάζω τον μέσο όρο τους.
3. Φτιάχνω πρότυπη καμπύλη κάνοντας μετρήσεις με διαφορετικές ποσότητες BSA (στο συγκεκριμένο πείραμα, έγιναν 4 μετρήσεις με 10, 20, 30 και 40μl)
4. Κάνω τις μετρήσεις των δειγμάτων μου. Τα αντιδραστήρια προστίθενται σύμφωνα με τον πίνακα:

Διάλυμα (μl)	Τυφλό αντιδραστηρίων (μl)	Δείγμα (μl)	Τυφλό δείγματος (μl)
Ομογενοποίησημα	-	63	63
Ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης	63	-	-
Triton-X-100 0,5% (w/v)		20	
HCl 6,035 N		17	
Ανάδευση και κατόπιν επώαση για 10 min στους 85°C.			
Στη συνέχεια, τα αφήνω να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου.			
HCl 0,5 N	-	-	900
CBB	900	900	-
Σύντομη υπερήχηση (sonication) και μέτρηση της απορρόφησης στα 620 nm.			

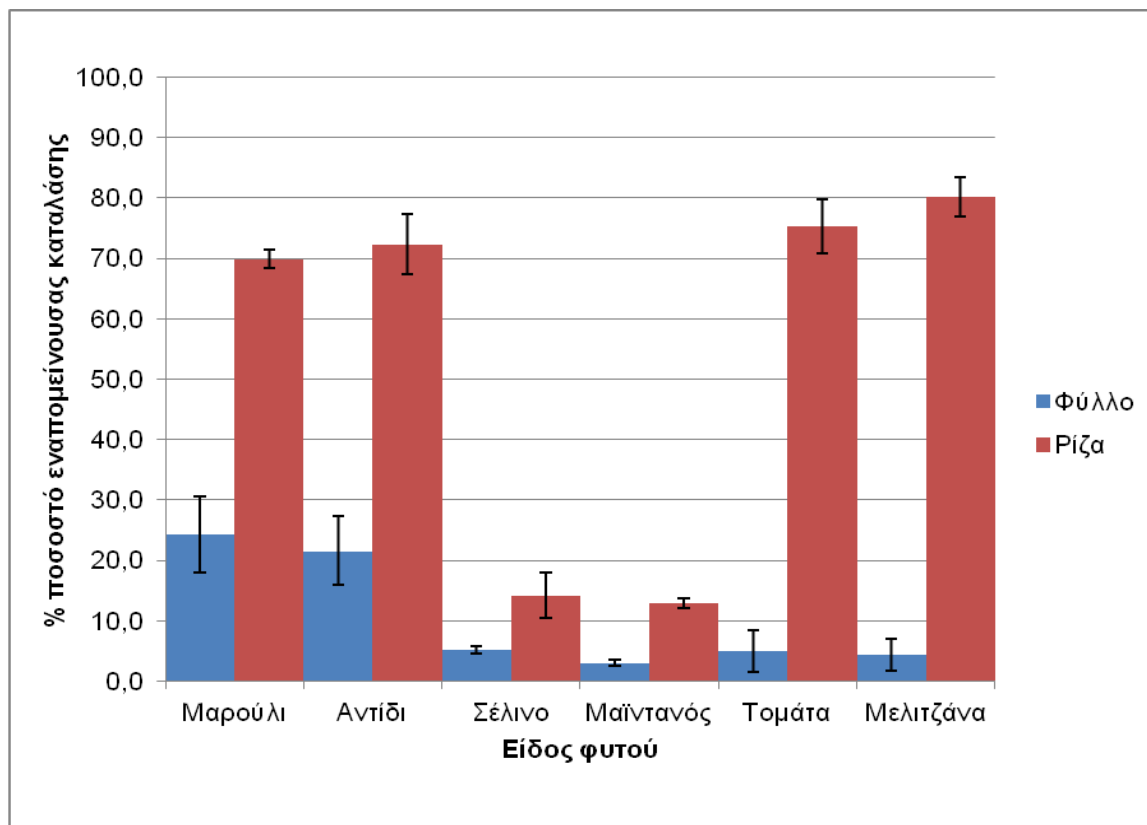
Από την τιμή του δείγματος αφαιρούνται οι τιμές του τυφλού των αντιδραστηρίων και του τυφλού δείγματος και η καθαρή τιμή μετατρέπεται σε ισοδύναμα αλβουμίνης

BSA σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη που είναι ευθυγραμμική από 10 έως 60 μg BSA (αναφέρεται σε 1ml όγκο αντίδρασης). Συνήθως, η αντίδραση πραγματοποιείται για διάφορες αραιώσεις του δείγματος, ώστε να επιβεβαιώνεται η τιμή στις διάφορες αναλογίες. Το τελικό αποτέλεσμα υπολογίζεται με βάση την πρότυπη καμπύλη και εκφράζεται συνήθως ως mg ολικής πρωτεΐνης (ισοδύναμα BSA)/ml ομογενοποιημένου (Κωσταρά 2015).

Αποτελέσματα-Παρατηρήσεις

Η επίδραση της αμινοτριαζόλης στη δραστικότητα της καταλάσης

Στο Σχήμα 1 φαίνονται τα αποτελέσματα της επίδρασης της αμινοτριαζόλης στη δραστικότητα της καταλάσης στα φύλλα και τις ρίζες έξι (6) διαφορετικών φυτικών ειδών.

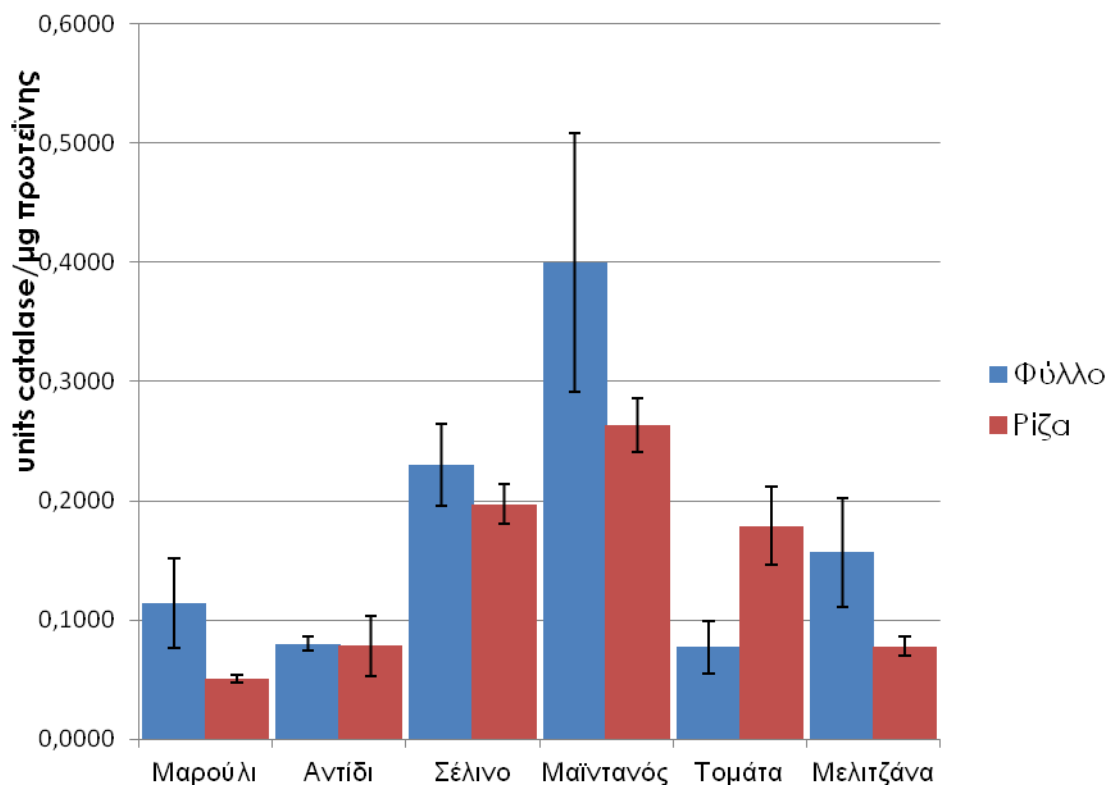


Σχήμα 1. Η επίδραση της αμινοτριαζόλης στη δραστικότητα της καταλάσης. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος \pm standard error από 3 ή 4 ανεξάρτητες μετρήσεις.

Παρατηρούμε πως η δραστικότητα του ενζύμου παραμένει σε υψηλά επίπεδα στις ρίζες των περισσότερων φυτών ενώ στα φύλλα αναστέλλεται σχεδόν ολοκληρωτικά. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και σε πειράματα μέτρησης της δραστικότητας της καταλάσης σε φύλλα και ρίζα βασιλικού (οικ. *Lamiaceae*) (Zeroudakis et al. 2015) τα οποία αποτέλεσαν και το έναυσμα για τα πειράματα της παρούσας πτυχιακής. Εξάιρεση, όπως φαίνεται και στο γράφημα, αποτελούν το Σέλινο και ο Μαϊντανός (οικ. *Apiaceae*) στα οποία παρατηρείται στις ρίζες, όπως και στα φύλλα, σχεδόν καθολική αναστολή λειτουργίας της καταλάσης.

Η καταλάση σε διάφορα φυτά και ιστούς

Στο Σχήμα 2 βλέπουμε τη δραστικότητα της καταλάσης στα φύλλα και τις ρίζες έξι (6) διαφορετικών φυτικών ειδών.



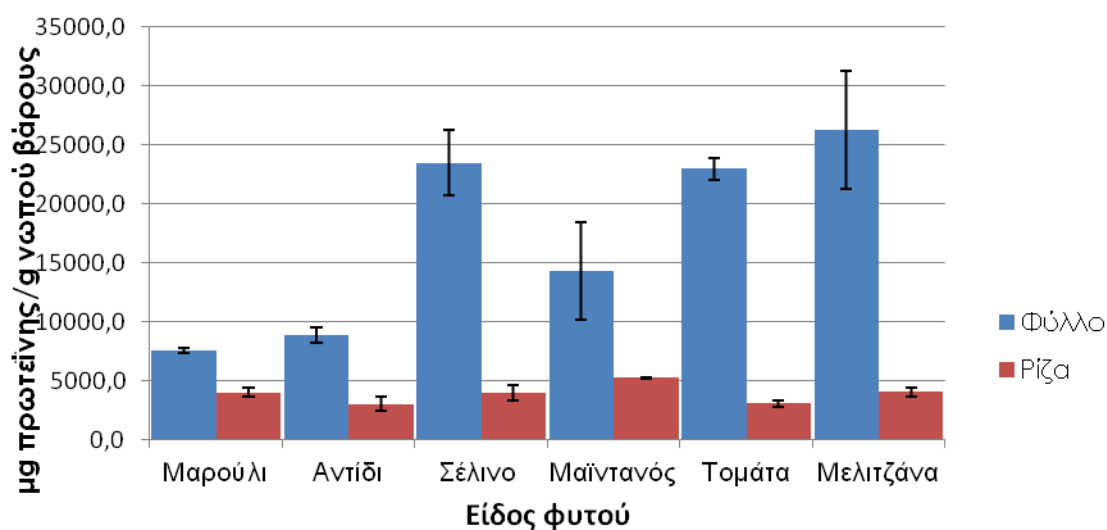
Σχήμα 2. Η καταλάση σε διάφορα φυτά και ιστούς. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος \pm standard error από 3 ή 4 ανεξάρτητες μετρήσεις.

Παρατηρούμε ότι στο μαρούλι, τον μαϊντανό και τη μελιτζάνα η δραστικότητα της καταλάσης στα φύλλα είναι πολύ μεγαλύτερη από ό,τι στη ρίζα ενώ στο αντίδι και στο σέλινο δεν υπάρχει διαφορά. Αντιθέτως, στην τομάτα η ρίζα φαίνεται να έχει πολύ μεγαλύτερη δραστικότητα του ενζύμου σε σχέση με το φύλλο.

Φαίνεται επίσης ότι ο μαϊντανός έχει τη μεγαλύτερη δραστικότητα του ενζύμου σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα φυτά τόσο στο φύλλο όσο και στη ρίζα.

Η ολική πρωτεΐνη των φυτών

Στο Σχήμα 3 βλέπουμε την ολική πρωτεΐνη ανά gr νωπού βάρους, στα φύλλα και τις ρίζες έξι (6) διαφορετικών φυτικών ειδών.



Σχήμα 3. Η ολική πρωτεΐνη των φυτών. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος \pm standard error από 3 ή 4 ανεξάρτητες μετρήσεις.

Παρατηρούμε ότι σε όλα τα φυτά το φύλλο είναι πολύ πιο πλούσιο σε πρωτεΐνη σε σχέση με τη ρίζα. Ειδικά στο σέλινο και τη μελιτζάνα η διαφορά ανάμεσα σε φύλλο και ρίζα φτάνει τις έξι (6) φορές.

Συμπεράσματα-Συζήτηση

Η πτυχιακή αυτή εργασία, αρχικά βασίστηκε στην παρατήρηση ότι σε φυτά βασιλικού η δραστικότητα της καταλάσης, μετά την προσθήκη αμινοτριαζόλης, παρουσίαζε διαφορετικές τιμές στα φύλλα και στις ρίζες (Zervoudakis et al. 2015). Διεξάγοντας πειράματα σε έξι (6) διαφορετικά φυτά από τρεις (3) διαφορετικές οικογένειες, παρατηρούμε (Σχήμα 1) πως η δραστικότητα της καταλάσης στα φύλλα των φυτών, παρουσία αμινοτριαζόλης, μειώνεται δραστικά. Αυτό υποδεικνύει πως στα φύλλα υπάρχει η μονολειτουργική καταλάση. Αντίθετα, η δραστικότητα της καταλάσης στις ρίζες παρουσία αμινοτριαζόλης συνήθως μειώνεται σε μικρό σχετικά ποσοστό κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα πως το ένζυμο που υπάρχει στη ρίζα, στην πλειοψηφία των φυτών, δεν είναι απλή μονολειτουργική καταλάση αλλά διλειτουργική καταλάση-υπεροξειδάση. Σημαντική εξαίρεση, αποτελούν το Σέλινο και ο Μαϊντανός στα οποία φαίνεται πως στη ρίζα, όπως και στα φύλλα, υπάρχει μονολειτουργική καταλάση κάτι που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα από τα υπόλοιπα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα. Τέλος, πρέπει να τονιστεί πως, φυτά που βρίσκονται στην ίδια οικογένεια παρουσιάζουν παρόμοια αποτελέσματα στη δραστικότητα του ενζύμου.

Εξετάζοντας τη δραστικότητα της καταλάσης αναλογικά με την ολική ποσότητα πρωτεΐνης (Σχήμα 2), καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως η δραστικότητά της σε φύλλα και ρίζα δεν παρουσιάζει κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο και πως διαφορετικά φυτά οδηγούν σε διαφορετικά αποτελέσματα όσον αφορά τη σχέση φύλλο-ρίζα. Κάτι τέτοιο μπορεί να οφείλεται κυρίως στις φυσικοχημικές ιδιότητες του κάθε φυτού και την ανάγκη για παραγωγή πρωτεϊνών. Στην πλειοψηφία, παρατηρείται μεγαλύτερη δραστικότητα της καταλάσης στα φύλλα σε σχέση με τη ρίζα. Σε άλλες περιπτώσεις παρόμοια δραστικότητα και, όπως παρατηρήθηκε στην τομάτα, μεγαλύτερη δραστηριότητα στη ρίζα.

Τέλος, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3, τα φύλλα έχουν αισθητά μεγαλύτερη περιεκτικότητα πρωτεϊνών σε σχέση με τις ρίζες κάτι που δεν είναι παράδοξο δεδομένου ότι στα φύλλα εκτελείται η φωτοσύνθεση και άλλες διαδικασίες βιοσύνθεσης ενώ η ρίζα πολλές φορές λειτουργεί ως αποθήκη υδατανθράκων.

Βιβλιογραφία

- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., and Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: A focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, 61 (15): 4197-4220. <http://doi.org/10.1093/jxb/erq282>
- Zervoudakis, G., Salahas, G. & Rodi, M., 2015. Nitrogen Nutrition Effect on Aeroponic Basil (*Ocimum basilicum* L .) Catalase and Lipid Peroxidation. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 43(2), pp.561–567.
- Κεραμάρης, Κ. (1999). Ανίχνευση, χαρακτηρισμός και συγκριτική μελέτη των υπεροξειδασών στα ωοθυλάκια των εντόμων *Drosophila melanogaster*, *Dacus oleae*, *Ceratitidis capitata*: συσχέτιση με άλλες υπεροξειδάσες. Διδακτορική διατριβή, ΕΚΠΑ.
- Κυρίμη, Κ. (2013). Ανάπτυξη μεθόδων ποσοτικοποίησης της ενεργότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων στα καλλιεργούμενα φυτά. Πτυχιακή εργασία.
- Κωσταρά, Θ. (2015). Εκτίμηση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων και της δραστηριότητας της καταλάσης σε φύλλα τοματιάς προσβεβλημένης από νηματώδεις. Πτυχιακή εργασία.
- Μύρτζιου, Ι. (2012). Ο ρόλος του μονοξειδίου του αζώτου στον ενζυμικό αντιοξειδωτικό μηχανισμό του φυτού *Medicago truncatula*. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Ντίνου, Κ., & Σουφλάκη, Θ. (2013). Ανάπτυξη φασματοφθορισμομετρικής μεθόδου ποσοτικοποίησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου στα καλλιεργούμενα φυτά. Πτυχιακή εργασία.
- Ντουρούπη, Τ. (2004). Συγκριτική μελέτη υπεροξειδασών. Διδακτορική διατριβή, ΕΚΠΑ.
- Παπαποστόλου, Ι. (2007). Ο ρόλος του Υπεροξειδίου του Υδρογόνου και της ρίζας του Σουπεροξειδίου στην σκληρωτική διαφοροποίηση των μυκήτων. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών.
- Συμίνης, Χ. (1996). Αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα σε πρωτοπλάστες από μεσόφυλλο *Vitis Vinifera* L. και *Nicotiana Tabacum* L. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- Συντιγάκη, Ε. (2010). Ποσοτικοποίηση και βιοχημική σημασία των πρωτεϊνικών θειολών στους οργανισμούς. Μεταπτυχιακή διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών.
- Τζίκα, Ε. (2008). Οξειδωτικά ένζυμα ελιάς και ελαιόλαδου: αλληλεπίδραση με αντιοξειδωτικά. Διδακτορική διατριβή, ΕΚΠΑ.
- https://el.wikipedia.org/wiki/Οξειδωτικό_στρες