

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΑ
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

**Μελέτη των ισοενζύμων της μεταφοράς του
γλουταθείου από *Phaseolus vulgaris***

Ερευνητική Εργασία στα πλαίσια του
Μεταπτυχιακού Διπλώματος Εξειδίκευσης της

ΑΣΗΜΑΚΟΠΟΥΛΟΥ Ι. ΒΑΣΙΛΙΚΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2009

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

**Μελέτη των ισοενζύμων της μεταφοράς του γλουταθείου
από *Phaseolus vulgaris***

Η πενταμελής Συμβουλευτική & Εξεταστική Επιτροπή:

- | | |
|--------------------------------------|------------------------------|
| 1. Επίκουρος Καθηγητής Λάμπρου Ν. | Άμεσος επιβλέπων (Εισηγητής) |
| 2. Καθηγητής Κλώνης Ι. | Μέλος |
| 3. Αναπληρωτής Καθηγητής Φασσέας Κ. | Μέλος |
| 4. Αναπληρωτής Καθηγητής Κίντζιος Σ. | Μέλος |
| 5. Λέκτορας Φλεμεντάκης Ε. | Μέλος |

Ερευνητική Εργασία στα πλαίσια του

Μεταπτυχιακού Διπλώματος Εξειδίκευσης της

ΑΣΗΜΑΚΟΠΟΥΛΟΥ Ι. ΒΑΣΙΛΙΚΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2008

Ο ορισμός της πενταμελούς συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής, καθώς και η έγκριση του θέματος της παρούσας διατριβής έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας

13^{ης}/18-05-2007.

Ευχαριστίες

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά όσους συνέβαλαν με οποιονδήποτε τρόπο στην ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής και ιδιαιτέρως:

- Τις θερμές ευχαριστίες στον επιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή κ. Ν. Λάμπρου για την ανάθεση του θέματος, την επιστημονική καθοδήγησή του και την πολύτιμη βοήθειά του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.
- Τον Καθηγητή κ. Ι. Κλώνη για την εμπιστοσύνη και την πολύτιμη καθοδήγησή του.
- Τους Αναπληρωτές Καθηγητές κ. Φασσέα Κ., κ. Κίντζιο Σ., και το Λέκτορα κ. Φλεμεντάκη Ε., μέλη της εξεταστικής επιτροπής για τις χρήσιμες παρατηρήσεις τους και το χρόνο που διέθεσαν διορθώνοντας τα κείμενά μου.
- Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Δρ. Πλατή Δ. για την υπομονή, την συμπαράσταση καθώς και για την πολύτιμη και ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφερε κατά την πειραματική διαδικασία. Η συμβολή του για την πραγματοποίηση της παρούσας διατριβής ήταν καθοριστική.
- Τους υποψήφιους διδάκτορες Αξαρχή Ε. και Σκοπελίτου Κ. καθώς και τους συναδέλφους από το εργαστήριο για τη συνεργασία τους και τη δημιουργία ευχάριστου συναδελφικού κλίματος.
- Οφείλω να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου, του μεταπτυχιακού τμήματος, καθώς και την οικογένειά μου για την ανεκτίμητη ηθική και οικονομική υποστήριξη.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

Ala	Αλανίνη
AOS	Ενεργές μορφές οξυγόνου
APS	Υπερθειικό αμμώνιο
ATP	5'-Τριφωσφορική αδενοσίνη
CDNB	1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο
CoA	Συνένζυμο A
Cys	Κυστεΐνη
DOC	Δεοξυχολικό νάτριο
Glu	Γλουταμίνη
Gly	Γλυκίνη
GPOX	Υπεροξειδάσες του γλουταθείου
GST	Μεταφοράση του γλουταθείου
GSH	Γλουταθείο
GSSG	Δισουλφίδιο του γλουταθείου
Km	Σταθερά Michaelis
Lys	Λυσίνη
NAD⁺	Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
NADH	Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (ανηγμένη μορφή)
NADP⁺	Φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
NADPH	Φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (ανηγμένη μορφή)
PAGE	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου
Ser	Σερίνη
SDS	Θειικό δωδεκανοϊκό νάτριο
TEMED	N,N,N',N'-τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη
TRIS	Τρις-υδροξυμεθυλοαμινομεθάνιο
Unit (U)	Ενζυμική μονάδα

Στη μικρή Νικόλ...

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	1a
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
Το γλουταθείο	2
Ρόλος του γλουταθείου	3
Μεταφοράσες του γλουταθείου	4
Δομή και δράση	4
Ταξινόμηση των GST	7
Φυτικές GST	13
Ρόλοι των GST	15
-Ενζυμική αποτοξίνωση μέσω συμπλοκοποίησης με γλουταθείο GSH	16
-Ο ρόλος των κυττάρων στην οξειδωτική καταπόνηση	19
-Ενδοκυτταρική μεταφορά φυσικών μεταβολιτών από GST	21
-Θεραπευτική σήμανση ασθενειών	23
-Κατάλυση αντιδράσεων βιομετατροπής που εξαρτώνται από GSH	25
Υποστρώματα των GST	27
-Οικογένεια τριαζινών	29
-Οικογένεια χλωροακετανυλιδών	31
Ζιζανιοκτόνο Fusilade	32
Το φυτό Phaseolus vulgaris	34
Εισαγωγικά	3
4	
Ταξινόμηση	35
Βοτανικά χαρακτηριστικά	35
Κλίμα και έδαφος	36
Σκοπός της παρούσας μελέτης	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ & ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΙ	38
Υλικά	38
Φυτικό υλικό	38
Πρωτεΐνες	38
Χημικά αντιδραστήρια	38
Εξοπλισμός	38

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΘΟΔΟΙ	40
Ανάπτυξη φυτών	40
Ψεκασμός φύλλων	40
Ενζυμικό εκχύλισμα από φύλλα φασολιού	40
Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST	41
Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST με χρήση του υποστρώματος Fluorodifen	43
Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	44
Διαδικασία της μεθόδου.....	45
Διαπίδυση	45
Καθαρισμός του ενζύμου GST με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής	46
Καθαρισμός του ενζύμου GST με χρωματογραφία συγγένειας	48
Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες	50
Προετοιμασία του δείγματος	50
Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	51
Βαφή με Coomassie Brilliant Blue R-250	53
Βαφή με νιτρικό άργυρο (AgNO ₃).....	53
Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε μη μετουσιωτικές συνθήκες (native PAGE)	55
Προετοιμασία του δείγματος	55
Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	55
Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων σε πολυακρυλαμίδιο (2D-PAGE)	57
Προετοιμασία του δείγματος	57
Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων.....	58
Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής αλληλουχίας	60
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	61
Μελέτη της επαγωγής του ενζύμου GST πριν & μετά τον ψεκασμό	61
Χρωματογραφικός καθαρισμός του ενζύμου GST	63
Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής με τον προσροφητή Q-Sepharose CL-6B	63
Καθαρισμός ενζύμου με χρωματογραφία συγγένειας με τον προσροφητή Se-GSH	65
Χρωματογραφία συγγένειας με τον προσροφητή Se-GSH με χρήση NaCl στο δ/μα εξισορρόπησης.....	69
Χρωματογραφία συγγένειας με τον προσροφητή Se-GSH: βελτιστοποίηση των συνθηκών έκλουσης	71

Μελέτη της διαφορικής επαγωγής ισοενζύμων μεταφοράς του γλουταθείου ύστερα από επαγωγή με το ζιζανιοκτόνο Fusilade	76
Κινητική ανάλυση των ισοενζύμων GST σε φύλλα φασολιού	79
Μεταβαλλόμενο υπόστρωμα CDNB	80
Μέτρηση δραστηριότητας των ισοενζύμων GST με άλλα υποστρώματα.....	81
N-τελική αμινοξική αλληλούχιση.....	82
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	88
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	91

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μεταφοράσες του γλουταθείου (GSTs) είναι ένζυμα που υπάρχουν στους περισσότερους οργανισμούς και συμμετέχουν στην αδρανοποίηση εξωγενών ή ενδογενών τοξικών υδρόφοβων και ηλεκτρονιόφιλων ενώσεων, καταλύοντας την αντίδραση δημιουργίας ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ αυτών και του γλουταθείου (GSH), συμμετέχοντας έτσι στο μηχανισμό αποτοξίνωσης του κυττάρου. Στις ηλεκτρονιόφιλες αυτές ενώσεις ανήκουν τα ζιζανιοκτόνα και τα εντομοκτόνα. Στην παρούσα διατριβή, μελετήθηκε η μεταφοράση του γλουταθείου σε φύλλα του φυτού *Phaseolus vulgaris*. Μετά την ανάπτυξη των φυτών σε θαλάμους με ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας, ψεκάστηκαν τα φύλλα τους με το συστηματικό ζιζανιοκτόνο Fusilade δραστικής ουσίας *Fluazifop-p-butyl*. Ακολούθως μετρήθηκε η ειδική δραστικότητα U/mg του ενζύμου των φυτικών εκχυλισμάτων του δείγματος και του μάρτυρα αντίστοιχα και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του ενζύμου με τη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής και συγγένειας. Μετά τον καθαρισμό, όπου παρατηρήθηκε η επαγωγή ισοτύπων GST, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS σε πηκτή ακρυλαμιδίου, για την καλύτερη ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών των δειγμάτων. Βρέθηκαν τρεις διαφορετικοί ισότυποι, όπου ο ένας (πιθανόν ομοδιμερές) εμφανίστηκε μόνο στα ψεκασμένα φυτά οπότε και μελετήθηκε περισσότερο. Επίσης πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων, η οποία αποτελεί μία μέθοδο που διαχωρίζει το πρωτεϊνικό δείγμα με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο και το μοριακό βάρος των ισοτύπων. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η K_m του ομοδιμερούς ισοενζύμου και προσδιορίστηκε η N-τελική αμινοξική αλληλουχία του.

ABSTRACT

Glutathione transferases (GSTs) are ubiquitous enzymes, present in most organisms and are involved in the neutralization of xenobiotic or endogenous toxic hydrophobic and electrophilic compounds, catalyzing the formation of covalent complex between themselves and glutathione, therefore contributing in cell detoxification. Pesticides and insecticides are such electrophilic compounds. In this dissertation, we studied the glutathione S-transferase present in *Phaseolus vulgaris* leaves. Following the growth of *Phaseolus vulgaris* plants under controlled conditions of temperature and humidity, their leaves were sprayed with the pesticide Fusilade (active substance: *Fluazifop-p-butyl*). The specific activity (U/mg) of the extracted enzyme from sample and control plants was measured and purified by using ion exchange and affinity chromatography. After enzyme purification, the samples were analyzed by using SDS-PAGE. Three distinct GST isotypes were detected, of which one (a possible homo-dimer found specifically in pesticide-sprayed leaves) was subsequently studied. In addition, 2D-PAGE was performed separating the samples of interest according to molecular weight and isoelectric point. The kinetic constant, K_m , for the homodimeric enzyme was calculated, as well as its N-terminal aminoacid sequence.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γλουταθείο

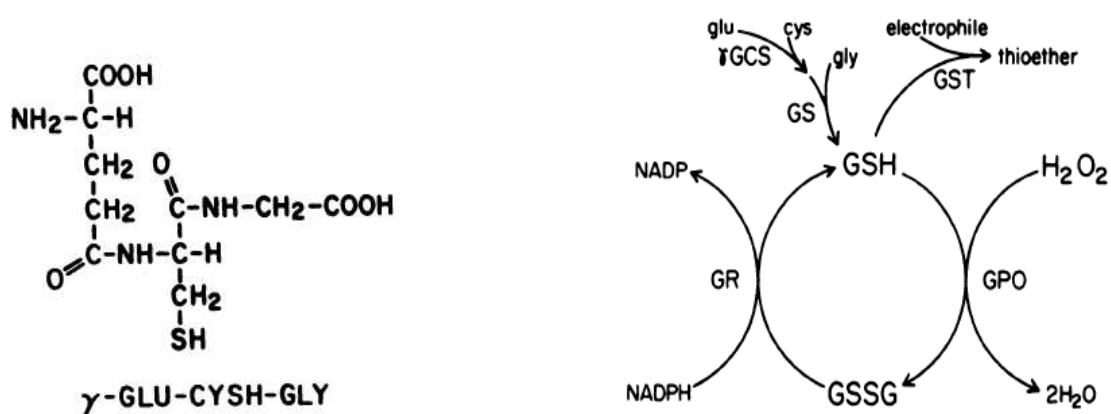
Τα φυτικά κύτταρα περιέχουν σημαντικές ποσότητες μη πρωτεϊνικών θειολών, οι οποίες εμπλέκονται σε πολλές μοριακές, μεταβολικές και φυσιολογικές λειτουργίες μέσω αντιδράσεων ανταλλαγής θειολών/δισουλφιδίων (Kunert & Foyer, 1993). Οι θειόλες είναι σημαντικά αντιοξειδωτικά και εμπλέκονται στη σύνθεση DNA και πρωτεϊνών, όπως και στην ενεργοποίηση και απενεργοποίηση ενζύμων. Το γλουταθείο είναι το σημαντικότερο μικρού μοριακού βάρους, θειολικό στοιχείο στα φυτά (Alscher 1989, Kunert & Foyer, 1993). Είναι ένα τριπεπτίδιο που συντίθεται από τα αμινοξέα γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη σε δύο αντιδράσεις που εξαρτώνται από το ATP και καταλύονται από τη συνθετάση γ-γλουταμυλοκυστεΐνης και τη συνθετάση του γλουταθείου. Τα φυτά, σε αντίθεση με τα ζώα, εκτός από το γλουταθείο συνθέτουν και κάποια ανάλογα τριπεπτίδια, όπως το ομογλουταθείο (γ -Glu-Cys- β -Ala), το οποίο απαντάται σε αρκετά ψυχανθή, ενώ το υδροξυμεθυλ-γλουταθείο (γ -Glu-Cys-er) και το γ -Glu-Cys-Glu έχουν αναφερθεί στα σιτηρά (Coleman et al, 1997).

Σε κανονικές συνθήκες το γλουταθείο υπάρχει κυρίως στην ανηγμένη μορφή (GSH), η οποία αντιστοιχεί στο 90-95% της ολικής ποσότητας του γλουταθείου, και ένα μικρό ποσοστό στην πλήρη οξειδωμένη μορφή του (GSSG). Σε κάποιους ιστούς και σε διάφορα στάδια ανάπτυξης, η συγκέντρωση του γλουταθείου μπορεί να είναι πολύ χαμηλή, όμως τα φύλλα περιέχουν πάνω από 10 mM γλουταθείου στους χλωροπλάστες και στο κυτόπλασμα (Foyer et al, 1994, Noctor et al, 1998b). Όταν το γλουταθείο (GSH) δρα ως αντιοξειδωτικό, οξειδώνεται στο δισουλφίδιο του γλουταθείου (GSSG) που αποτελείται από δύο μόρια γλουταθείου (εικόνα 1).

Ρόλος του γλουταθείου

Ο ρόλος του γλουταθείου είναι κυρίως προστατευτικός και έχει τις εξής μορφές:

- η ανηγμένη του μορφή δρα ως αντιοξειδωτικό
- η σύζευξη του γλουταθείου σε ηλεκτρονιόφιλα μόρια με τη δράση της μεταφοράσης του γλουταθείου (GST) έχει σαν αποτέλεσμα την αποτοξίνωση του φυτικού κυττάρου.
- το γλουταθείο και οι φυτοχελατίνες (πολυμερή του γ -Glu-Cys) δεσμεύουν χηλικά βαρέα μέταλλα, όπως κάδμιο, διευκολύνοντας την απομάκρυνσή τους από το χυμοτόπιο (Noctor et al, 1997 & Foyer et al, 1997).



Εικόνα 1. α) η δομή του γλουταθείου γ -Glu-Cys-Gly β) κύκλος οξείδωσης-αναγωγής του γλουταθείου και η παραγωγή θειαιθέρα (ομάδα οργανικής ένωσης γνωστή και ως σουλφίδια) με την παρουσία των ενζύμων: GR, GPO, γ GCS, GS, GST (Arrick & Nathan, 1984).

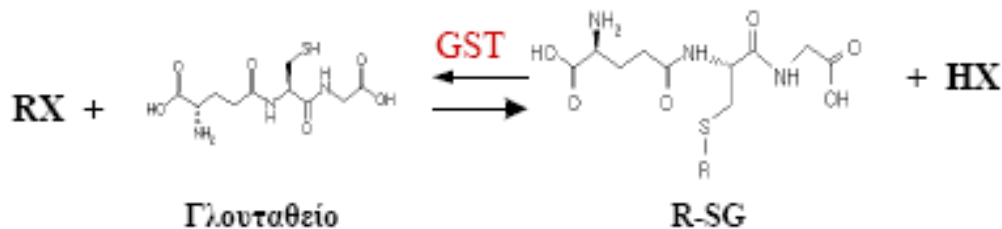
Μεταφοράσες του γλουταθείου

Δομή και δράση

Οι μεταφοράσες (ή S-μεταφοράσες) του γλουταθείου (GSTs, E.C. 2.5.1.18) είναι μια πολυλειτουργική οικογένεια διμερών πρωτεϊνών κυτταροπλασματικής προέλευσης, οι οποίες απαντούν σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς, όπου και παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό αποτοξίνωσης του κυττάρου (Hammastrom et al, 1979). Τα ένζυμα αυτά ανακαλύφθηκαν πρώτα στα ζώα το 1960 (Wilce & Parker, 1994) ενώ στα φυτά μετά το 1970, όταν η δράση μιας GST του αραβόσιτου φάνηκε να είναι υπεύθυνη για τη σύζευξη του γλουταθείου GSH με τη δραστική ουσία χλωρο-S-τριαζίνη του ζιζανιοκτόνου ατραζίνη, προστατεύοντας την καλλιέργεια από τραυματισμούς (Edwards & Dixon, 2000).

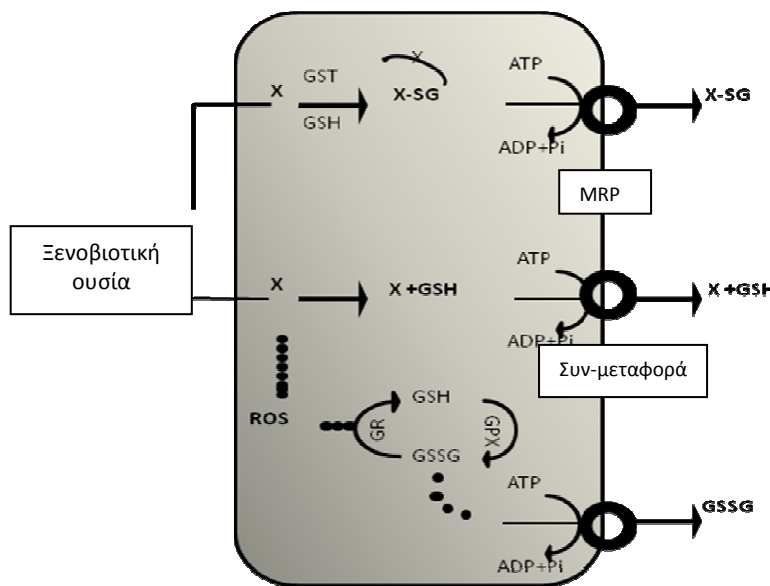
Σ ένα μεγάλο εύρος οργανισμών, από τα θηλαστικά μέχρι τα έντομα, ο μηχανισμός των S-μεταφορασών του γλουταθείου εμπλέκεται στην αποδόμηση τοξικών μορίων συμπεριλαμβανόμενων καρκινογόνων, μεταλλαξιγόνων ουσιών καθώς και βαρέων μετάλλων. Ομοίως και οι φυτικές GST λαμβάνουν μέρος σε σημαντικούς μηχανισμούς, όπως η αποτοξίνωση από τα ζιζανιοκτόνα (Rossini et al, 1996, Mannervik, 1985).

Οι GST των φυτών έχουν μελετηθεί πολύ για την ικανότητά τους να διασπών τα ζιζανιοκτόνα. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν την αντίδραση συμπλοκοποίησης του γλουταθείου (GSH) με μία μεγάλη ποικιλία ηλεκτρόφιλων ενώσεων ξενοβιοτικών ή ενδογενών. Συγκεκριμένα, καταλύουν τη νουκλεόφιλη προσβολή του GSH με το ηλεκτρόφιλο κέντρο (R) μιας ένωσης, όπως φαίνεται στην



όπου R: είναι μία αλειφατική, αρωματική ή ετεροκυκλική ομάδα,
 X: μια σουλφυδρυλική, νιτρώδης ή ομάδα με αλογόνο και
 R-GS: το προϊόν σύνδεσης της R ομάδας με το γλουταθείο (Edwards et all, 2000)

Τα σύμπλοκα αυτά με το γλουταθείο, που παράγονται από αυτή την αντίδραση, παρουσιάζουν αυξημένη διαλυτότητα στο νερό και συνακόλουθα μετατρέπονται σε μερκαπτάνες, μεταφέρονται στο χυμοτόπιο με ATP- αντλίες και απεκκρίνονται (εικόνα 2.). Ο ρόλος των GST στον ενδογενή μεταβολισμό δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος, αν και η πολύπλοκη ρύθμισή τους από περιβαλλοντικά ερεθίσματα υποδεικνύει πως εκφράζουν προστατευτική δράση (Edwards et al, 2000).



Εικόνα 2. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του κυτταρικού γλουταθείου (GSH), της μεταφοράς του γλουταθείου (GST), της ξενοβιοτικής ουσίας (X), του προϊόντος της αντίδρασης (X-SG), των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) και της αντλίας MRP (ATP-αντλία) (Cnubben et al, 2001).

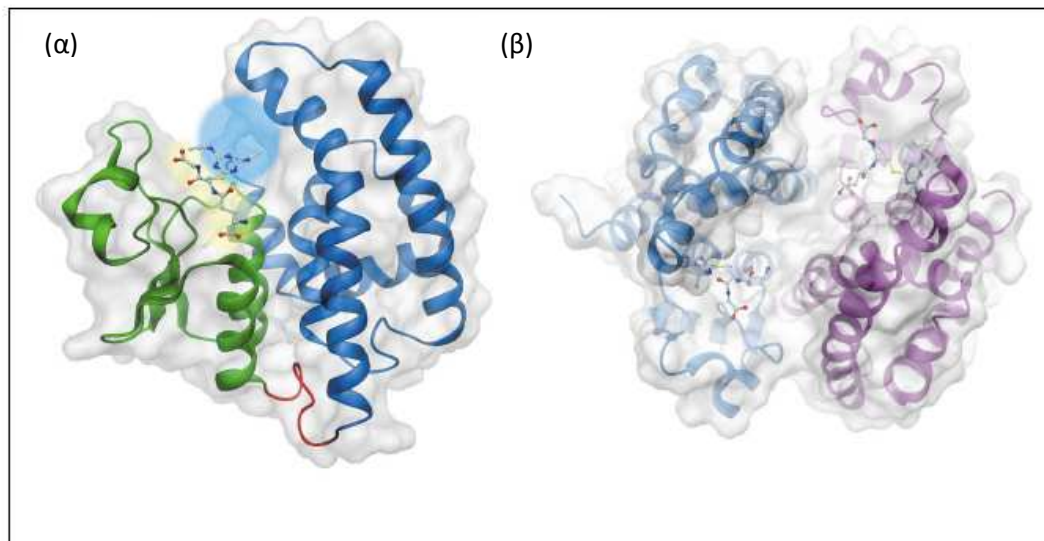
Για την επιβίωση του κυττάρου απαιτείται η διαχείριση των ενεργών μορφών οξυγόνου, των ενδογενών φυτοχημικών και των εξωγενών τοξινών, συμπεριλαμβανομένων των ξενοβιοτικών που απελευθερώνει ο άνθρωπος στο περιβάλλον. Διαφορετικά GST ισοένζυμα μπορούν να αποτοξινώσουν επιλεκτικά συγκεκριμένα ξενοβιοτικά, με διαφορές στην εξειδίκευση των GST ανάμεσα στα

είδη προσδιορίζοντας την επιλεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα. Τα φυτά έχουν περισσότερα από 25 γονίδια που κωδικοποιούν για GST και οι πρωτεΐνες αυτών έχουν από 10% έως 30% ομοιότητα μεταξύ τους σε επίπεδο αμινοξέων (Edwards et al, 2000).

Κάθε μεταφοράση του γλουταθείου είναι ένα διμερές, με μοριακό βάρος κάθε υπομονάδας 26 kDa (μέγεθος πολυπεπτιδικής αλυσίδας περίπου 200-250 αμινοξέα). Τυπικά είναι μία υδρόφοβη πρωτεΐνη μοριακού βάρους 50 kDa, με ισοηλεκτρικό σημείο που κυμαίνεται στα επίπεδα του pH 4-5 (Dixon et al, 1999, Sommer et al, 1999). Κάθε υπομονάδα του διμερούς έχει το δικό της ενεργό κέντρο, στο οποίο εντοπίζονται δύο ανεξάρτητες περιοχές που δεσμεύουν το υπόστρωμα: μία μη εξειδικευμένη περιοχή υδρόφοβης φύσεως (θέση Η-συντηρημένη αμινοτελική περιοχή που καλύπτει περίπου το ένα τρίτο της πρωτεΐνης), που χρησιμοποιείται για τη δέσμευση ηλεκτρόφιλων ενώσεων ευρέος φάσματος (Habig et al, 1974) και μία δεύτερη εξειδικευμένη περιοχή που δεσμεύει το γλουταθείο (θέση G-ασταθής καρβοξυ-τελική περιοχή που περιλαμβάνει τα δύο τρίτα της πρωτεΐνης) (Jakobson et al, 1977, Dirr et al, 1979). Οι δύο αυτές περιοχές ενώνονται με ένα μικρό ευμετάβλητο τμήμα (linker region) που φέρει 5 – 10 κατάλοιπα. Η G- και η Η- θέσεις του ενζύμου μπορούν να μετακινούνται όταν η κρυσταλλική δομή τροποποιείται, δηλώνοντας πως οι υπομονάδες της GST υφίστανται σημαντικές αλλαγές στις διαμορφώσεις κατά την ένωσή τους με τα υποστρώματα (Dixon et al, 2002)(εικόνα 3.).

Η συντηρημένη αμινοτελική περιοχή έχει ένα μοτίβο α/β (βαβαββα) που αποτελείται από μια κεντρική β-πτυχωτή επιφάνεια, η οποία περιβάλλεται από τη μια μεριά της από δύο α-έλικες (α1 και α2) και από την άλλη μεριά από μια μικρή 3_{10} έλικα (Reinemer et al, 1996). Η β-πτυχωτή επιφάνεια αποτελείται από τέσσερις β-κλώνους (β1, β2, β3, β4), όπου ο κλώνος β3 είναι αντιπαράλληλος με τους άλλους τρεις. Οι έλικες α1 και α2 βρίσκονται προς την πλευρά της καρβοξυ-τελικής περιοχής ενώ η 3_{10} προς τη πλευρά του διαλύτη (Neufelnd et al, 1997). Αντίστοιχα η καρβοξυ-τελική περιοχή έχει ένα μοτίβο α-έλικας, που αποτελείται από έξι

αμφιπαθικές α-έλικες (α3, α4, α5, α6, α7, α8) οι οποίες είναι οργανωμένες σε μια δεξιόστροφη περιέλιξη (Reinemer et al, 1996).

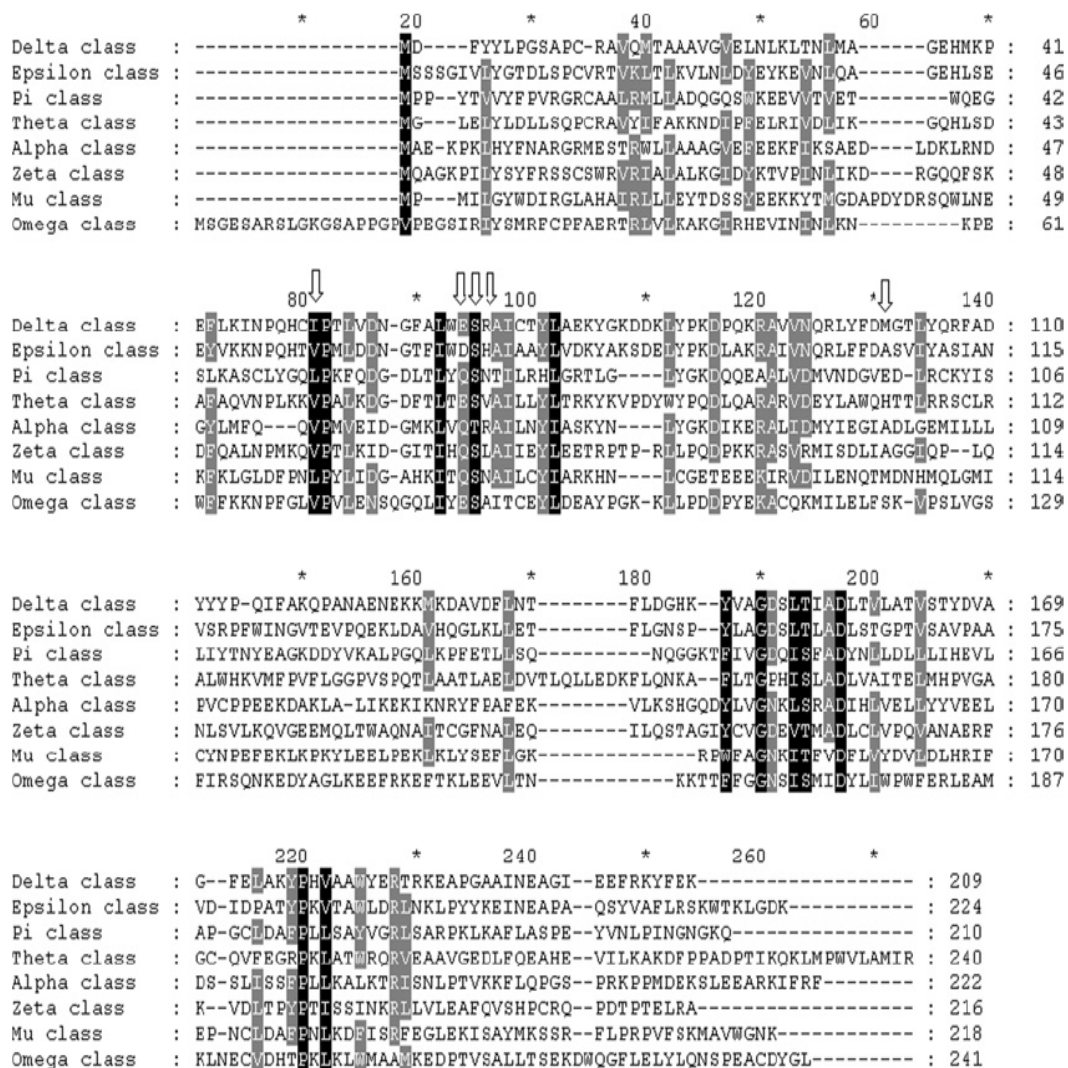


Εικόνα 3. Απεικόνιση της δομής διμερούς GST και της πρόσδεση του υποστρώματος. **α)** Αναπαράσταση μιας τυπικής υπομονάδας GST (*Z. mays* GSTFI, pdb 1BYE), με την αμινοτελική περιοχή βαμμένη πράσινη, την περιοχή σύνδεσης κόκκινη, την καρβοξυτελική περιοχή μπλε και την πρωτεϊνική επιφάνεια γκρι. Η ένωση του γλουταθείου με ένα ζιζανιοκτόνο (atrazine) απεικονίζεται με τα σφαιρίδια στο ενεργό κέντρο. Η περιοχή αυτή ένωσης (G θέση) απεικονίζεται με κίτρινο χρώμα, ενώ η υδρόφοβη περιοχή (H θέση) αντίστοιχα με γαλάζιο. **β)** Αναπαράσταση του ομοδιμερούς ZmGSTFI με τις αμινοτελικές περιοχές να εμφανίζονται κάτω αριστερά και πάνω δεξιά στην κάθε υπομονάδα. Οι υπομονάδες έχουν μπλε και μωβ χρώμα αντίστοιχα και είναι εμφανή τα σύμπλοκα που δημιουργούνται μεταξύ του γλουταθείου και του ζιζανιοκτόνου στα ενεργά τους κέντρα (Dixon et al, 2002).

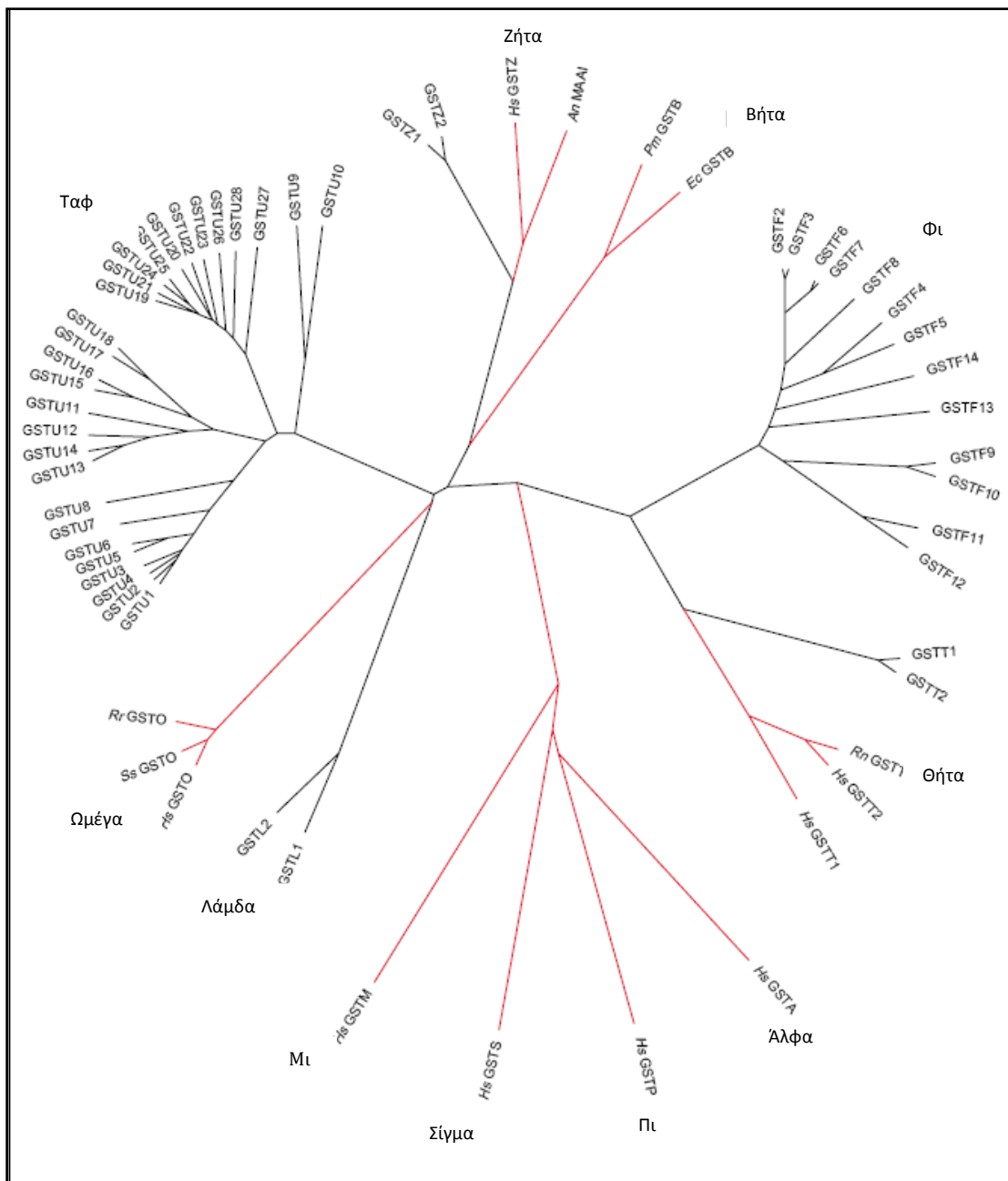
Ταξινόμηση των GST

Οι μεταφοράσεις του γλουταθείου (GST) διακρίνονται σε τρεις διακριτές υπεροικογένειες: τις κυτταροπλασματικές GST, τις μεμβρανικές μικροσωμικές GST και τις GST που έχουν τη δυνατότητα να προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό φωσφομυκίνη. Οι περισσότερες μελετημένες είναι οι GST της πρώτης οικογένειας (Armstrong, 1998).

Οι κυτταροπλασματικές GST διακρίνονται σε επιμέρους τάξεις, που χαρακτηρίζονται με γράμματα το ελληνικού αλφαβήτου (α, κ, μ, π, τ, ζ, σ, φ, θ, β, ω, λ). Η λίστα αυτή αυξάνεται λόγω της συνεχούς ανακάλυψης νέων ενζύμων, ιδίως από φυτά και βακτήρια (Armstrong, 1998). Οι κλάσεις θ, τ, ζ, φ, λ έχουν βρεθεί στα φυτά, σ και ζ στα ζώα, δ και ε στα έντομα και β στα βακτήρια. Όλες οι υπόλοιπες έχουν βρεθεί στα θηλαστικά. Επειδή ήταν φανερό πως η αλληλουχία των φυτικών ενζύμων διέφερε από την αλληλουχία θηλαστικών, ζώων ή βακτηρίων έπρεπε να γίνει μια ταξινόμηση αυτών. Αρχικά ξεκίνησε με τις τρεις κλάσεις θ, τ, ζ και στη συνέχεια βελτιώθηκε λόγω της ανακάλυψης της γονιδιωματικής αλληλουχίας του φυτού *Arabidopsis thaliana* (Dixon et al, 2002)(Εικόνα 4). Η αμινοξική αλληλουχία σε όλες τις κλάσεις φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:

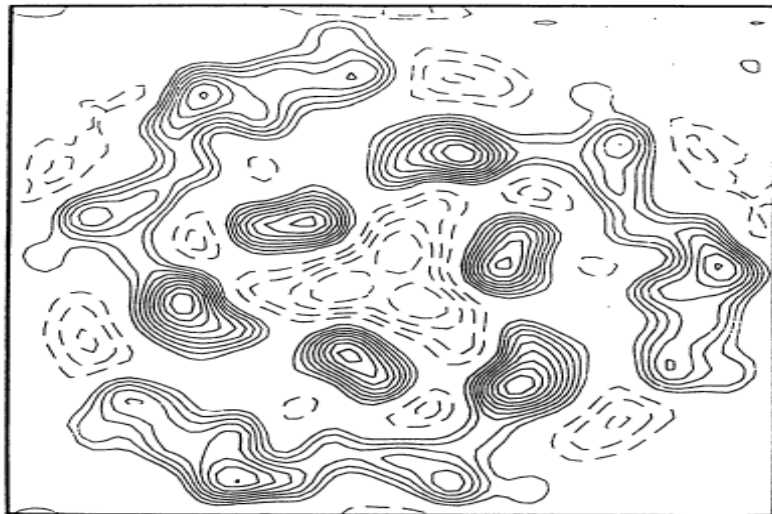


Σύμφωνα με την εικόνα, η μαύρη στήλη αναπαριστά το 100% της ομοιότητας των αλληλουχιών σε όλες τις κλάσεις, ενώ η γκρι στήλη το 80% αντίστοιχα (Winayanuwatticun & Ketterman, 2004).



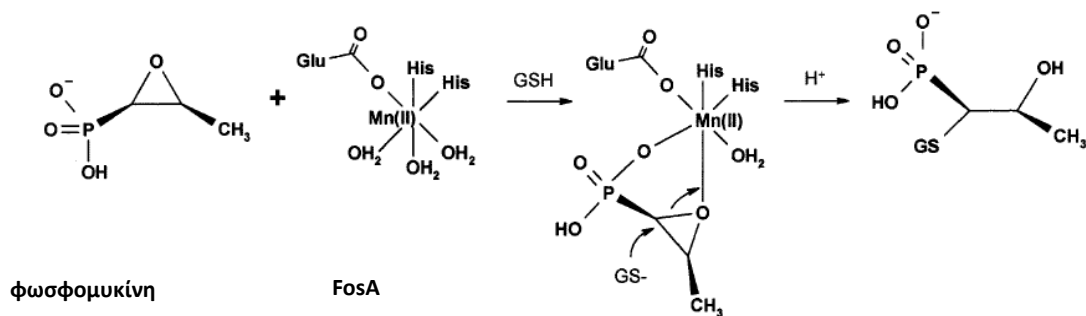
Εικόνα 4. Αναπαράσταση φυλογενετικού δέντρου που επεξηγεί την ποικιλία των GST και την σχέση μεταξύ των κλάσεων. Οι GST του φυτού *Arabidopsis thaliana* εμφανίζονται με μαύρο χρώμα ενώ οι GST άλλων οργανισμών με κόκκινο. Τα δύο γράμματα που παρουσιάζονται μπροστά από τα GST δηλώνουν την πηγή του οργανισμού: Hs → *Homo sapiens*, Rr → *Rattus rattus*, Rn → *Rattus norvegicus*, Ss → *Sus scrofa*, An → *Aspergillus nidulans*, Pm → *Proteus mirabilis*, Ec → *Escherichia coli*. Οι διακλαδώσεις δηλώνουν την εξελικτική απόσταση μεταξύ των πρωτεϊνικών αλληλουχιών (Dixon et al, 2002).

Στη δεύτερη οικογένεια ανήκουν οι μικροσωμικές GST οι οποίες εντοπίζονται πάνω στις μεμβράνες γι' αυτό και καλούνται μεμβρανικές μικροσωμικές GST. Είναι ομοτριμερή ένζυμα με μια μοναδική αμινοξική αλληλουχία και διαφέρουν με τις κυτταροπλασματικές GST κυρίως στις ανοσολογικές ιδιότητες. Καταλύουν είτε τη σύνθεση του λευκοτριενίου C4 είτε την αποτοξίνωση ηλεκτρόφιλων ξενοβιοτικών ουσιών (Sun & Morgenstern, 1997). Οι μικροσωματικές GST έχουν βρεθεί σε υψηλά ποσοστά στο συκώτι και έξω από τη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Βέβαια υπάρχουν και σε κύτταρα άλλων ιστών, αλλά σε χαμηλά επίπεδα. Έχει αποδειχθεί πως η ατομική δομή των πρωτεϊνικών αυτών μεμβρανών μπορεί να προσδιοριστεί με τη μέθοδο της ηλεκτρονιακής κρυσταλλογραφίας (Hebert et al, 1995) (εικόνα 5).



Εικόνα 5. Αναπαράσταση μιας τριμερούς μικροσωμικής GST. Το ένζυμο φέρει έναν εσωτερικό πυρήνα με έξι α -έλικες, οι οποίες σκιαγραφούν μία χαρακτηριστικής πυκνότητας κεντρική περιοχή (διακεκομμένες γραμμές). Ο πυρήνας είναι περικυκλωμένος από τρεις επιμήκεις περιοχές (Hebert et al, 1995).

Την τρίτη οικογένεια αποτελούν οι GST οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία των μεταλλοενζύμων και δε φέρουν καμία ομοιότητα με τις κυτταροπλασματικές GST (Bernat et al, 1997, Laughlin et al, 1998). Τα μεταλλοένζυμα αυτά προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό φωσφομυκίνη και διακρίνονται σε τέσσερεις τύπους: FosA (glutathione-fosfomycin), FosB (L-cystein-fosfomycin), FosC (ATP-fosfomycin) και FosX (water-fosfokycin). Το πιο χαρακτηριστικό από τα παραπάνω είναι το FosA το οποίο καταλύει τη σύζευξη του γλουταθείου (GSH) με τον άνθρακα του αντιβιοτικού (Behary & Palzkill, 2005)(εικόνα 6.).



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση νουκλεόφιλης προσθήκης GSH στη φωσφομυκίνη, από το εξειδικευμένο για φωσφομυκίνη ένζυμο (Behary & Palzkill, 2005).

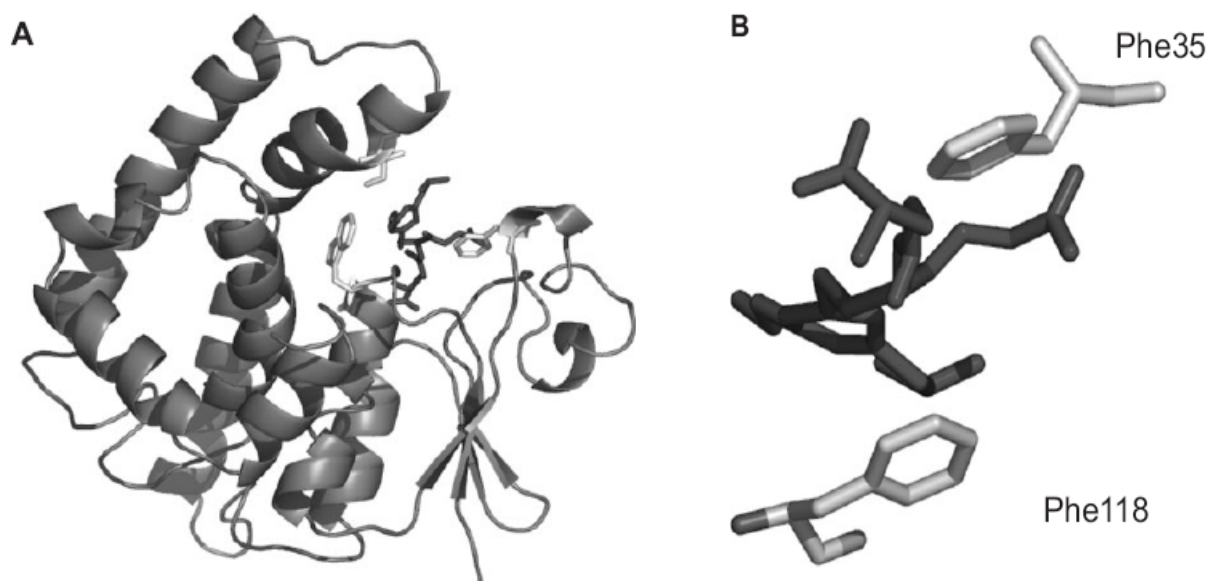
Φυτικές GST

Το ενδιαφέρον για τις GST των φυτών πηγάζει από την αγρονομική τους αξία. Έχει αποδειχθεί πως η συμπλοκοποίηση πολλών φυτοφαρμάκων με το GST καθιστά πολλά φυτά ανθεκτικά απέναντι στα φυτοφάρμακα (Labrou et al, 2001). Οι φυτικές GST μπορούν να διαχωριστούν σε τέσσερις κύριες κλάσεις: φ, ζ, τ και θ. Η φ (F) κλάση (GSTFs) και η τ (U) κλάση (GSTUs) περιλαμβάνουν κυρίως εξειδικευμένα φυτά, ενώ η ζ (Z) και η θ (T) κλάσεις είναι περισσότερο φυλογενετικά διαδεδομένες (Hossain et al, 2007). Όμως οι δράσεις διαφορετικών GST έχουν διαπιστωθεί και χαρακτηρισθεί από πολλά φυτά, κυρίως στο αραβόσιτο (Dixon et al, 1997), στο σιτάρι (Edwards & Cole, 1996), στον καπνό (Droog et al, 1995) στη σόγια (Andrews et al, 1997), στο κριθάρι (Romano et al, 1993), στην αραχίδα (αράπικο φιστίκι) (Lamoureaux et al, 1981), στο ρεβίθι (Hunatti & Ali, 1990), στο σόργο (Dean et al, 1990) και στο ζαχαροκάλαμο (Singhal et al, 1991).

Σχεδόν όλες οι φυτικές μεταφοράσες του γλουταθείου ανήκουν στις θ, φ και τ κλάσεις. Ακόμα όμως σε πολλές περιπτώσεις διατηρείται ο παλιός διαχωρισμός που αφορούσε μόνο τις φυτικές μεταφοράσες του γλουταθείου και γινόταν ανάλογα με τον αριθμό των ιντρονίων που έχουν στα γονίδιά τους. Διαχωρίζονταν σε τρεις τύπους: τύπος I, τύπος II, τύπος III. Οι GST του τύπου I έχουν τρία εξόνια και δύο ιντρόνια (Marrs, 1996). Στην ομάδα αυτή ανήκουν τα τέσσερα ισοένζυμα GST του καλαμποκιού, τα οποία διαφέρουν τόσο στη σύσταση των υπομονάδων τους όσο και στην εξειδίκευσή τους έναντι των φυτοφαρμάκων (Jepson et al, 1994, Holt et al, 1995, Irzyk et al, 1995). Οι GST του τύπου II, έχουν δέκα εξόνια και 9 ιντρόνια. Χαρακτηριστικό αυτής της ομάδας είναι πως τα ένζυμα αυτά έχουν παρουσιαστεί μόνο στα ανθικά όργανα του γαρύφαλλου (Marrs, 1996, Itzhaki & Woodson, 1993). Τέλος, οι GST του τύπου III έχουν δύο εξόνια και ένα ιντρόνιο. Ο τύπος αυτός αποτελεί μία ομάδα από ομόλογα γονίδια που επάγονται από διαφορετικούς παράγοντες π.χ. αιθυλένιο, βαρέα μέταλλα, προσβολή από παθογόνα, αυξίνες, θερμικό σοκ (Marrs, 1996).

Η πρώτη φυτική GST που μελετήθηκε σε βάθος για τον μεταβολισμό στα ζιζανιοκτόνα, είναι το σόργο. Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές δείχθηκε ότι το ένζυμο ήταν υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα του φυτού σε ένα ευρέως διαδεδομένο ζιζανιοκτόνο της ομάδας των τριαζινών, την ατραζίνη (atrazine) (Lamoureux et al, 1970, Lamoureux et al, 1973, Shimabukuro et al, 1973). Εξαιτίας της μεγάλης σημασίας των GST στην ανθεκτικότητα των φυτών στα ζιζανιοκτόνα, πραγματοποιήθηκαν πολλές μελέτες επικεντρώνοντας περισσότερο το ενδιαφέρον στον αραβόσιτο. Τα ισοένζυμα της GST στο καλαμπόκι και είναι ετερο- ή ομοδιμερή, ενώ διαφέρουν ως προς την εξειδίκευση των υποστρωμάτων τους και την ανταπόκριση σε χημικά αντίδοτα που προστατεύουν το φυτό από τα ζιζανιοκτόνα (herbicide safeners)(Labrou et al, 2001 & Sommer et al, 1999). Από όλες τις GST στον αραβόσιτο, το ισοένζυμο GSTI εμφανίζει την πιο ενδεικτική δράση έναντι δύο πολύ σημαντικών ομάδων: τριαζινών και χλωροακεταμιδών, χρησιμοποιώντας τα αντίστοιχα ζιζανιοκτόνα: ατραζίνη (atrazine), αλακλόρ (alachlor) και μεταλακλόρ (metalachlor) (Sommer et al, 1999). Με βάση την κρυσταλλική του δομή έχουν αναφερθεί δύο χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στην καταλυτική αποδοτικότητα προς τα ηλεκτρόφιλα υποστρώματα: α) το μέγεθος και το σχήμα της ηλεκτρόφιλης Η-θέσης, η οποία καθορίζεται από τα υδροφοβικά κατάλοιπα Met¹⁰, Trp¹², Phe³⁵ και Ile¹¹⁸ και β) η ευελιξία του ανώτερου μέρους της Η-θέσης που διαμορφώνεται από το Gly¹²³ και Gly¹²⁴ (Labrou et al, 2001, Neufeind et al, 1997, Prade et al, 1998)(Εικόνα 7.).

Οι περισσότερο μελετημένες GSTs από αραβόσιτο είναι οι GST-I, GST-II, GST-III και GST-IV. Η GST-I (29 kDa) και GST-III (26 kDa) είναι συντηρητικές στο κύτταρο, ενώ η GST-IV (27 kDa) επάγεται από τα αντίδοτα των φυτοφαρμάκων. Η GST-II είναι ετεροδιμερές που αποτελείται από μία υπομονάδα GST-I και μια GST-IV (Holt et al, 1995).





Εικόνα 7. Δομική αναπαράσταση των σημαντικών καταλοίπων του GST-I του αραβόσιτου. **A)** Απεικόνιση της ένωσης S-atrazine-glutathione σε μορφή ράβδου με σκούρο γκρι, ενώ τα Trp¹², Phe³⁵ και Ile¹¹⁸ εμφανίζονται επίσης υπό μορφή ράβδου με ανοιχτό γκρι χρώμα. **B)** Απεικόνιση του συμπλόκου που διαμορφώνεται μεταξύ του Phe³⁵, του αρωματικού δακτυλίου του υποστρώματος και το Phe¹¹⁸ σε μεταλλαγμένο Ile¹¹⁸ Phe (Labrou et al, 2004).

Ρόλοι των GST

Οι GST είναι ως επί το πλείστον ένζυμα αποτοξίνωσης, λειτουργούν ως διμερή και καταλύουν τη σύζευξη της GSH με συστατικά που περιλαμβάνουν ηλεκτρόφιλα κέντρα. Τα ένζυμα αυτά όμως μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως περοξυδάσες, ισομεράσες και τρανσφεράσες της θειόλης (Jowsey et al, 2003). Επίσης ένας αριθμός μη καταλυτικών λειτουργιών των GST έχουν τεκμηριωθεί, όπως:

- 🖼️ Ενζυμική αποτοξίνωση μέσω συμπλοκοποίησης με γλουταθειό GSH
- 🖼️ Ο ρόλος των κυττάρων στην οξειδωτική καταπόνηση
- 🖼️ Ενδοκυτταρική μεταφορά φυσικών μεταβολιτών από GST

 Θεραπευτική σήμανση ασθενειών

 Κατάλυση αντιδράσεων βιομετατροπής που εξαρτώνται από GSH

Ενζυμική αποτοξίνωση μέσω συμπλοκοποίησης με γλουταθειό GSH

Τα ένζυμα GST είναι γνωστά για την ικανότητά τους να αδρανοποιούν τοξικούς εξωγενείς ή ενδογενείς παράγοντες. Οι ζωντανοί οργανισμοί κατά τον ανταγωνισμό τους για την επιβίωσή τους, παράγουν μια εκπληκτική σειρά τοξικών παραγόντων άμυνας. Τα φυτά για παράδειγμα συνθέτουν ένα μεγάλο φάσμα περίπλοκων δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίοι λειτουργούν ως παράγοντες άμυνας έναντι στους φυτοφάγους και παθογόνους μικροοργανισμούς. Τέτοιοι μεταβολίτες είναι οι φυτοαλεξίνες και οι φλαβόνες. Αντίστοιχα, χαρακτηριστικό των εντόμων είναι πως αποθηκεύουν τα πικρά σε γεύση αλκαλοοειδή που παίρνουν από τα φυτά καθώς τρέφονται και τα χρησιμοποιούν για να αποτρέπουν την αρπαγή τους από πουλιά ή άλλα ζώα (Marrs, 1996).

Οι φυτοαλεξίνες είναι λιπόφιλες ουσίες που παρουσιάζουν τεράστιες διαφορές ως προς τη χημική τους σύσταση. Η σύνθεση των φυτοαλεξινών έχει παρατηρηθεί σε όλα τα μέρη του φυτού και κατά την μόλυνσή του εντοπίζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο κέντρο των κηλίδων και στην περιφέρειά τους. Έχει βρεθεί ότι τα ανθεκτικά φυτά σε παθογόνα, βακτήρια και ιούς έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν μεγαλύτερες ποσότητες φυτοαλεξινών σε σχέση με τα πιο ευαίσθητα για την αντιμετώπιση των παθογόνων. Παρατηρήθηκε πως η σύνθεση αυτών πραγματοποιείται από το κιναμικό οξύ, όπου το ένζυμο GCST (glutathione S-cinnamoyl transferases) καταλύει την ένωση του κιναμικού οξέως με το GSH κατά τη διάρκεια των πρώτων βημάτων της σύνθεσης (Edwards & Dixon, 1991, Dean et al, 1990, Marrs, 1996).

Οι φλαβόνες αποτελούν μία μεγάλη οικογένεια στην οποία ανήκουν οι ανθοκυανίνες. Η σύνθεση των ανθοκυανίνων παίζει σημαντικό ρόλο στην ποικιλία

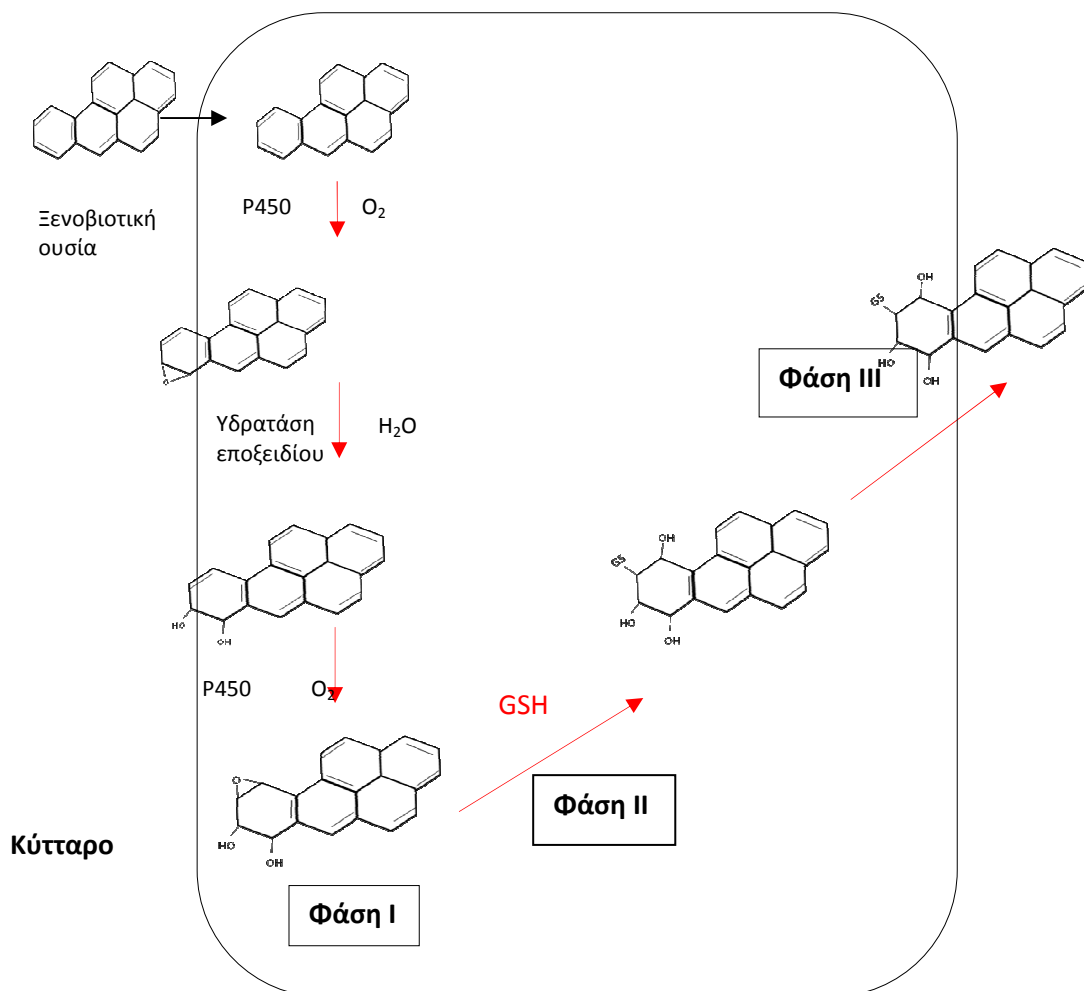
χρωμάτων που εμφανίζονται στα φυτά. Οι περισσότερες από αυτές τις χρωστικές συνθέτονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και μεταφέρονται στο μιτοχόνδριο (Holton & Cornish, 1995). Σύμφωνα με πειράματα που πραγματοποιήθηκαν από τον Alfenito και την ομάδα του το 1998 πάνω στο καλαμπόκι, παρατηρήθηκε πως το γονίδιο bz-2 κωδικοποιεί έναν τύπο του GST III και πραγματοποιεί το τελευταίο βήμα για τη βιοσύνθεση της ανθοκυανίνης. Επίσης φάνηκε πως η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο bz-2 δείχνει μεγάλη ομοιότητα με τις φυτικές GST και είναι δραστική έναντι του CDNB (Alfenito et al,1998).

Η ικανότητα που έχουν τα κύτταρα αλλά και οι οργανισμοί να αποτοξινώνουν επιβλαβείς παράγοντες, είναι πολύ ουσιαστικό για την επιβίωσή τους. Αξιοσημείωτο είναι πως για να πραγματοποιηθεί η αποτοξίνωση των ηλεκτρονιόφιλων ενώσεων, απαντάται ένα κοινό μονοπάτι στο οποίο λαμβάνουν μέρος τρεις διακριτές ομάδες ενζύμων (Itzhaki & Woodson, 1993). Τα ένζυμα της φάσης I (ενεργοποίηση), της φάσης II (συμπλοκοποίηση) και της φάσης III (διαχωρισμός και απομόνωση) (Karam, 1998)(εικόνα 9.). Στη φάση I τα ένζυμα εισάγουν στα υποστρώματα ηλεκτρονιόφιλες λειτουργικές ομάδες (Marrs, 1996) κατάλληλης ενεργότητας για να δράσουν τα ένζυμα της φάσης II (Rea et al, 1998). Στη φάση I δρα κυρίως το σύστημα του κυτοχρώματος P450 (εικόνα 8.)



Εικόνα 8. Αναπαράσταση της δομής του κυτοχρώματος P450 (www.chem.ucsb.edu/~molvisual/chem162.html)

Τα ένζυμα της φάσης II, όπως οι UDP-γλυκοσυλο-μεταφοράσες και οι GST, καταλύουν τη συμπλοκοποίηση ενεργών ξενοβιοτικών σε ένα πιο υδατοδιαλυτό υπόστρωμα, χρησιμοποιώντας τις ηλεκτρονιόφιλες ομάδες σαν θέσεις αντίδρασης με το GSH καταλήγοντας με αυτόν τον τρόπο σε ενώσεις λιγότερο τοξικές (Karam, 1998, Coleman et al, 1997). Στη φάση III γίνεται ο διαχωρισμός και η απομόνωση των συμπλόκων που σχηματίστηκαν στις προηγούμενες φάσεις. Τα ένζυμα που λαμβάνουν μέρος σε αυτή τη φάση περιλαμβάνουν τις εξαρτώμενες από ATP μεμβρανικές αντλίες που αναγνωρίζουν και μεταφέρουν τα σύμπλοκα από το κυτόπλασμα σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα. Στα ζώα, τα σύμπλοκα αυτά απομακρύνονται από το σώμα με την απέκκριση (Coleman et al, 1997).



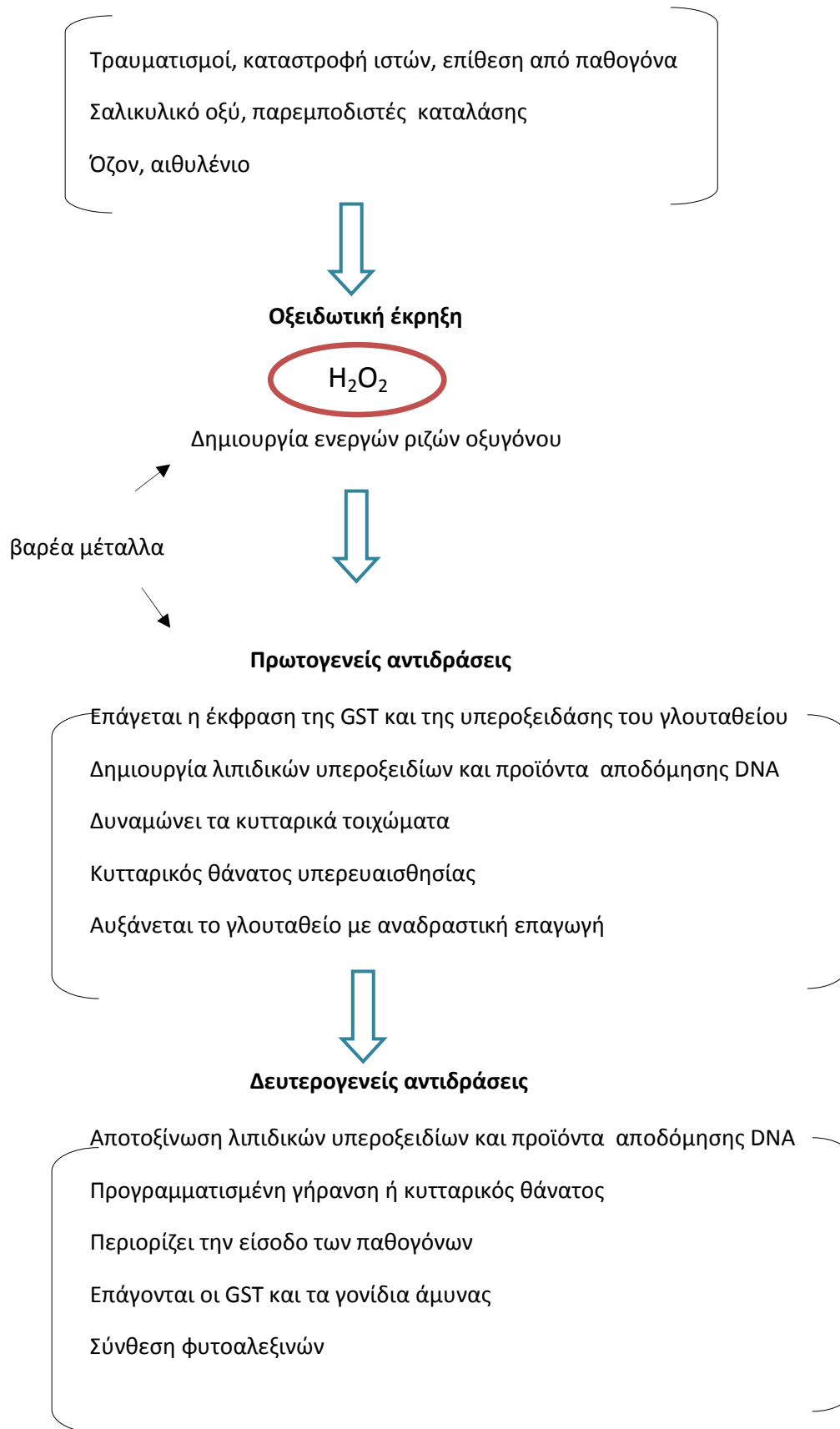
Εικόνα 9. Ένα πιθανό μεταβολικό μονοπάτι μιας ξενοβιοτικής ουσίας που περνάει από την πλασματική μεμβράνη και εισέρχεται μέσα στο κύτταρο. Εκεί δέχεται τις τρεις φάσεις αποτοξίνωσης και τελικά εξέρχεται από αυτό (Sheehan et al, 2001).

Στις περιπτώσεις που τα GS- σύμπλοκα είναι τοξικά, η φάση III μπορεί να αποβεί κρίσιμη στην αποτοξίνωση (Rea et al, 1998). Στα φυτά, το φυτοφάρμακο tridiphane στην τρίτη φάση μετατρέπεται στο αντίστοιχο σύμπλοκό του το οποίο όμως αποτελεί έναν ισχυρό παρεμποδιστή για τον μεταβολισμό του φυτοφαρμάκου atrazine (Lamoureaux & Rusness, 1986). Επομένως είναι πολύ σημαντική η απομάκρυνση του συμπλόκου από το κυτόπλασμα.

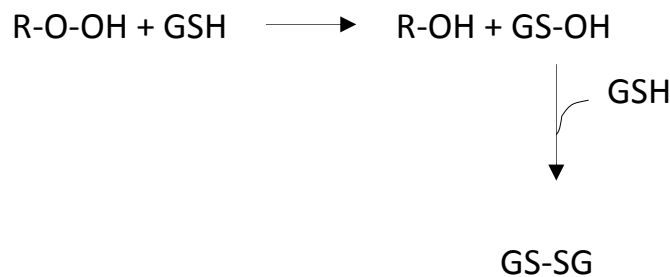
Ο ρόλος των κυττάρων στην οξειδωτική καταπόνηση

Σύμφωνα με τον Marrs το 1996, οι τρανσφεράσες του γλουταθείου GST επάγονται από αυξίνες, βαρέα μέταλλα, τραυματισμούς, προσβολή από παθογόνα, αιθυλένιο και όζον (Marrs, 1996). Το κοινό όλων των παραπάνω περιπτώσεων είναι η δημιουργία ενεργών μορφών οξυγόνου (AOS) που παράγονται κατά τη διάρκεια οξειδωτικής καταπόνησης και είναι πιθανό οι GST να επάγονται για να προστατεύσουν τα κυτταρικά συστατικά από βλάβες.

Οι ενεργές μορφές οξυγόνου παράγονται φυσιολογικά στα κύτταρα όλων των αερόβιων οργανισμών, σε χαμηλά επίπεδα, εξαιτίας της μεταφοράς των ηλεκτρονίων στους χλωροπλάστες, στα μιτοχόνδρια αλλά και από τα ένζυμα που συμμετέχουν σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις άλλων υποκυτταρικών σωματιδίων (Mehdy, 1994). Είναι τοξικά ενδιάμεσα προϊόντα της αναγωγής του μοριακού οξυγόνου και συγκεκριμένα είναι το ανιόν του υπεροξειδίου (O_2^-), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και η ρίζα του υδροξυλίου (OH^-). Οι πηγές δημιουργίας ενεργών μορφών οξυγόνου στα φυτικά κύτταρα και οι πρωτογενείς – δευτερογενείς αντιδράσεις που προκαλούν, φαίνονται στην παρακάτω εικόνα (Sommer & Boger, 1999):



Τα ένζυμα του αντιοξειδωτικού μηχανισμού είναι η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η υπεροξειδάση, η καταλάση, η υπεροξειδάση του γλουταθείου. Επίσης συμμετέχουν και οι χημικές ενώσεις του ασκορβικού οξέος και του γλουταθείου (Sommer & Boger, 1999). Οι GST που επάγονται κατά το οξειδωτικό stress δρουν ως υπεροξειδάσες του γλουταθείου (GPOX). Κυρίως οι κλάσεις θ, φ και τ έχουν εμφανίσει αυτή τη δράση υπεροξειδάσης του γλουταθείου, όπου μετατρέπουν τα οργανικά υδροϋπεροξείδια στα λιπαρά και στα νουκλεϊκά οξέα σε μονοϋδροξυαλκοόλη (εικόνα 10.). Αποτέλεσμα αυτής της μετατροπής είναι η παρεμπόδιση της αποικοδόμησης του οργανικού υδροϋπεροξειδίου σε κυτταροτοξικά παράγωγα αλδεΐδης (Roxas et al, 1997, Cummins et al, 1999, Foyer & Noctor, 2005).

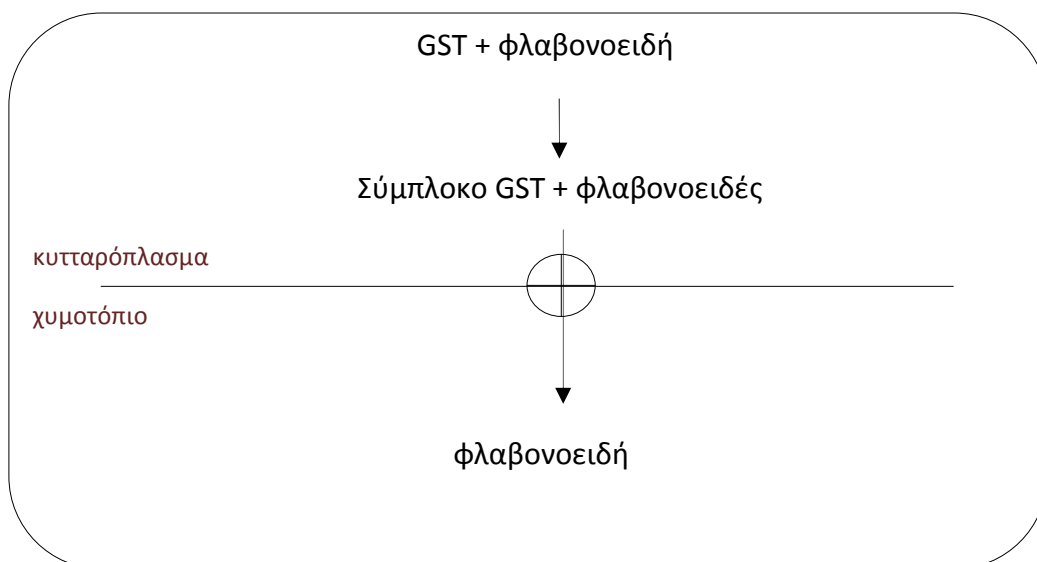


Εικόνα 10. Οι υπεροξειδάσες του γλουταθείου χρησιμοποιούν την γλουταθειόνη GSH ως δότη ηλεκτρονίων με σκοπό την μετατροπή των οργανικών υδροϋπεροξειδίων (ROOH) σε μονοϋδροξυαλκοόλη (R-OH) (Edward et al, 2000).

Ενδοκυτταρική μεταφορά φυσικών μεταβολιτών από GST

Οι GST εκτός από τη λειτουργική τους δράση, έχουν και έναν μη ενζυμικό ρόλο κατά τον οποίον λειτουργούν σαν πρωτεΐνες μεταφορείς. Η θεωρία αυτή προτάθηκε πρώτη φορά το 1970, όπου αναγνωρίστηκε πως οι GST εμπλέκονται στην ενδοκυτταρική μεταφορά στεροϊδών, χολερυθρίνης, αίμης και χολικών

αλάτων στα θηλαστικά (Listowski et al, 1988). Χαρακτηριστικό είναι πως οι ουσίες αυτές δεσμεύονται στην καταλυτική περιοχή του ενζύμου, αλλά σε κάποια θέση του πρωτεϊνικού μορίου μεταξύ των δύο υπομονάδων. Στα φυτικά κύτταρα έχουν βρεθεί ισοένζυμα της GST που δρουν σαν μεταφορείς αυξινών και ειδικότερα του ινδολυλοξικού οξέως IAA (Bilang and Sturm, 1995). Έχουν βρεθεί και ισοένζυμα που δεσμεύουν και κυτοκινίνες, τετραπυρόλες και πορφυρίνες (Edward et al, 2000) και κυρίως βρέθηκαν στις κλάσεις φ και τ (Dixon et al, 1999, Lamoureaux & Rusness, 1993). Η δέσμευση των τετραπυρολών και φυτικών ορμονών εμποδίζει τη δράση των GST έναντι των εξωγενών τοξικών παραγόντων. Παρομοίως στο καλλωπιστικό φυτό πετούνια, στην τύπου I GST η συμπλοκοποίηση του CDNB με GSH παρεμποδίζεται από φλαβονόλες, φλαβόνες και ανθοκυανίνες (Alfenito et al, 1998). Από όλα τα παραπάνω υποδεικνύεται πως οι εξειδικευμένες φυτικές GST μπορούν να θεωρηθούν πρωτεΐνες μεταφοράς λόγω δέσμευσης φυτικών μεταβολιτών (Marrs, 1996)(εικόνα 11.)



Εικόνα 11. Ένζυμα των κλάσεων φ και τ που λειτουργούν ως πρωτεΐνες μεταφοράς των φλαβονοειδών χρωστικών από το κυτταρόπλασμα στο χυμοτόπιο (Dixon et al, 2002).

Θεραπευτική σήμανση ασθενειών

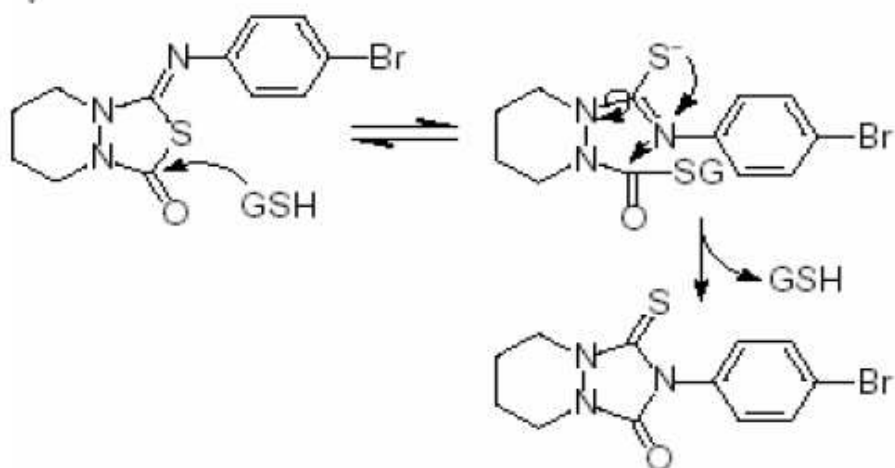
Διάφορες επιστημονικές έρευνες έχουν αποδείξει πως ορισμένα άτομα είναι γενετικά περισσότερο ευαίσθητα στην επίδραση καρκινογόνων. Οι πρώτες ανακοινώσεις για το θέμα αυτό εστιάστηκαν στο σύστημα του κυτοχρώματος P450, αλλά πιο πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι υπάρχουν περισσότεροι δείκτες. Το ισοένζυμο των λευκοκυττάρων (και άλλων ιστών) γλουταθείου S –μεταφοράση μ (GST-μ) φαίνεται πως έχει σημαντική επίδραση στην ευπάθεια των ατόμων να εμφανίσουν καρκίνο του πνεύμονα και άλλους καρκίνους (Lafuente et al, 1993). Η GST-μ έχει βρεθεί στον ηπατικό ιστό με υψηλή δραστικότητα έναντι μιτογόνων ουσιών, όπως το 4,5 οξειδίο του βενζο (α) πυρενίου και το οξειδίο του στυρενίου, και θεωρείται ότι τα άτομα στα οποία εκφράζεται το ένζυμο αυτό προστατεύονται καλύτερα έναντι των διαφόρων ηπατικών και καρκινογόνων παραγόντων. Η GST-μ συνδέεται με ισχυρά καρκινογόνους μεταβολίτες που παράγονται κατά την καύση του καπνού (όπως το βενζο (α) πυρένιο). Έτσι θεωρητικά τουλάχιστον, η ύπαρξη ή η απουσία της GST-μ θα μπορούσε να καθορίσει το βαθμό ευαισθησίας ενός ορισμένου ατόμου στην εμφάνιση του καρκίνου σχετιζομένου με το κάπνισμα (Strange R, 1993, Spirakou et al, 1996).

Ένας μηχανισμός που προτάθηκε για να εξηγήσει την ανθεκτικότητα στα αντικαρκινικά φάρμακα, είναι η αυξημένη και η διαφορική έκφραση ισοενζύμων GST που εκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα κανονικά (Rushmore & Pickett, 1993). Σύμφωνα με μελέτη του Batist και της ομάδας του, αποδείχθηκε πως κατά την ανάπτυξη μιας κυτταρικής σειράς ανθεκτικής στην ανδριομυκίνη, από καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου μαστού, παρατηρήθηκε ότι τα ανθεκτικά κύτταρα σε σχέση με τα κύτταρα άγριου τύπου, εμφάνιζαν μια έντονη αύξηση στη δραστικότητα της GST κατά 45 φορές. Επίσης παρατηρήθηκε πως η GSTA1-1 παρείχε την υψηλότερη ανθεκτικότητα στα chlorambucil και melphalan, ενώ η GSTA3-3 υψηλότερη στο cisplatin, μετά από έκφραση των ενζύμων αυτών σε κύτταρα θηλαστικών (Batist et al, 1986).

Εκτός από τον καρκίνο, οι GST παίζουν σημαντικό ρόλο και στην ανθεκτικότητα απέναντι στο άσθμα. Το 1940 οι Kellaway και Trethewie παρατήρησαν ότι όταν διεγερθούν με αντιγόνο οι πνεύμονες ευαισθητοποιημένων ινδικών χοιριδίων, απελευθερώνουν μια ουσία που συστέλλει τους λείους μύες των βρόγχων. Η ουσία αποτελείται από παράγωγα του αραχιδονικού οξέος, που ονομάστηκαν λευκοτριένια (Kellaway & Trethewie, 1940). Τα λευκοτριένια συντίθενται από το αραχιδονικό οξύ της κυτταρικής μεμβράνης μέσω της δράσης της 5-λιποξυγενάσης και μιας δεσμευμένης στη μεμβράνη πρωτεΐνης που ενεργοποιεί την 5-λιποξυγενάση. Το αραχιδονικό οξύ μετατρέπεται πρώτα σε λευκοτριένιο A₄ (LTA₄), που είναι ασταθές μόριο, και στη συνέχεια είτε σε B₄ (LTB₄) είτε σε C₄ (LTC₄) (Ricardo & Sheldom, 1997, Holgate et al, 1996). Το C₄ σχηματίζεται από τη συμπλοκοποίηση του A₄ με το GSH μέσω ενός ενζύμου, που βρίσκεται πάνω στη μεμβράνη, το οποίο καλείται συνθετάση του λευκοτριενίου C₄ (LTC₄) (Piper, 1984, Ford-Hutchinson, 1990). Αφού δημιουργηθεί το C₄, μεταφέρεται εξωκυττάρια όπου μετατρέπεται σε λευκοτριένιο D₄ (LTD₄) ή διαφορετικά καλείται και πεπτιδολευκοτριένιο. Τα πεπτιδολευκοτριένια είναι υπεύθυνα για ασθένειες, όπως το βρογχικό άσθμα. Επομένως, η αναστολή της σύνθεσης του ενζύμου LTC₄ ή η δημιουργία ανταγωνιστών των υποδοχέων του LTD₄, αποτελούν δυο νέες σημαντικές θεραπευτικές οδούς για τη θεραπεία του άσθματος (Rushmore & Pickett, 1993).

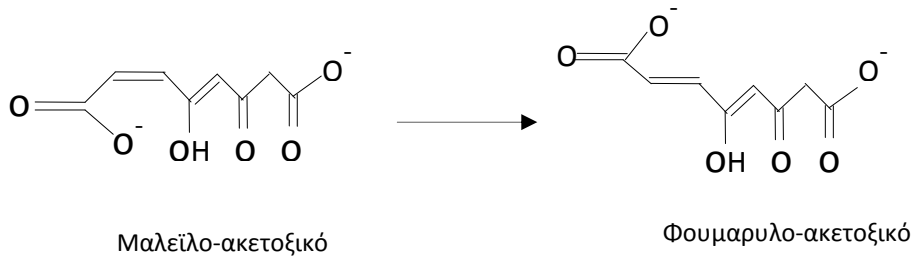
Κατάλυση αντιδράσεων βιομετατροπής που εξαρτώνται από GSH

Οι GST παίζουν ουσιαστικό ρόλο και στην ισομερίωση συγκεκριμένων μεταβολιτών. Ο προτεινόμενος μηχανισμός περιλαμβάνει την ισομερίωση του μεταβολίτη και τελικά τη διάσπαση του ισομερούς και του γλουταθειού GSH. Στα φυτά, η δράση ισομερίωσης των GST έχει αποδειχθεί χρησιμοποιώντας τα ζιζανιοκτόνα thiadiazolidine. Τα ζιζανιοκτόνα αυτά ενεργοποιούνται και ισομεριώνονται σε thiazolidines, οι οποίες αποτελούν ισχυρούς παρεμποδιστές της οξειδάσης του πρωτοπορφυρινογόνου. Ένας πιθανός μηχανισμός της ισομερίωσης περιλαμβάνει την νουκλεόφιλη εισβολή του GSH στην καρβονυλική ομάδα, μια διαδικασία που ενεργοποιείται με τη δράση της GST (εικόνα 12.). Λόγω ανοίγματος του δακτυλίου, διευκολύνεται η περιστροφή του N-C δεσμού, με τη μεταφορά του διπλού δεσμού C=N στην ομάδα C-S. Τελικά, το άτομο του N προσβάλλει την καρβονυλική ομάδα με αποτέλεσμα να επανασηματιστεί ο δακτύλιος και να απομακρυνθεί το GSH (Jablonkai et al, 1997, Edwards et al, 2000).



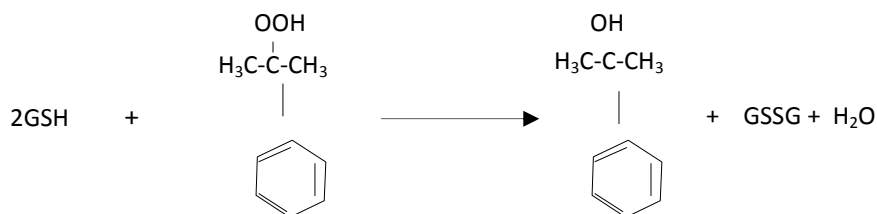
Εικόνα 12. Η κατάλυση ισομερίωσης του ζιζανιοκτόνου thiadiazolidine προς το φυτοτοξικό thiazolidine από GST. Παρουσιάζεται ο προτεινόμενος μηχανισμός αντίδρασης και ο σχηματισμός του ενδιάμεσου GSH συμπλόκου (Edwards et al, 2000).

Στον άνθρωπο, ένα αντίστοιχο ένζυμο GST που προκαλεί ισομερίωση, είναι αυτό που λειτουργεί ως μία ισομεράση του μαλεΐλο-ακετοξικού (MAAI). Το ένζυμο αυτό είναι πολύ σημαντικό στον καταβολισμό της φαινυλαλανίνης και καταλύει τη cis-trans ισομερίωση του μαλεΐλο-ακετοξικού προς φουμαρυλο-ακετοξικό (Edwards et al, 2000)(εικόνα 13.).



Εικόνα 13. Η κατάλυση της cis-trans ισομερίωσης του μαλεΐλο-ακετοξικού προς φουμαρυλο-ακετοξικό από GST της ζ κλάσης (Edwards et al, 2000).

Στα θηλαστικά, ο ρόλος των GST στην ισομερίωση φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με τη σύνθεση της προσταγλαδίνης και των λευκοτριενίων, ενώ αναδεικνύουν τη δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης σε σχέση με το CuOOH (Hayes et al, 2005).

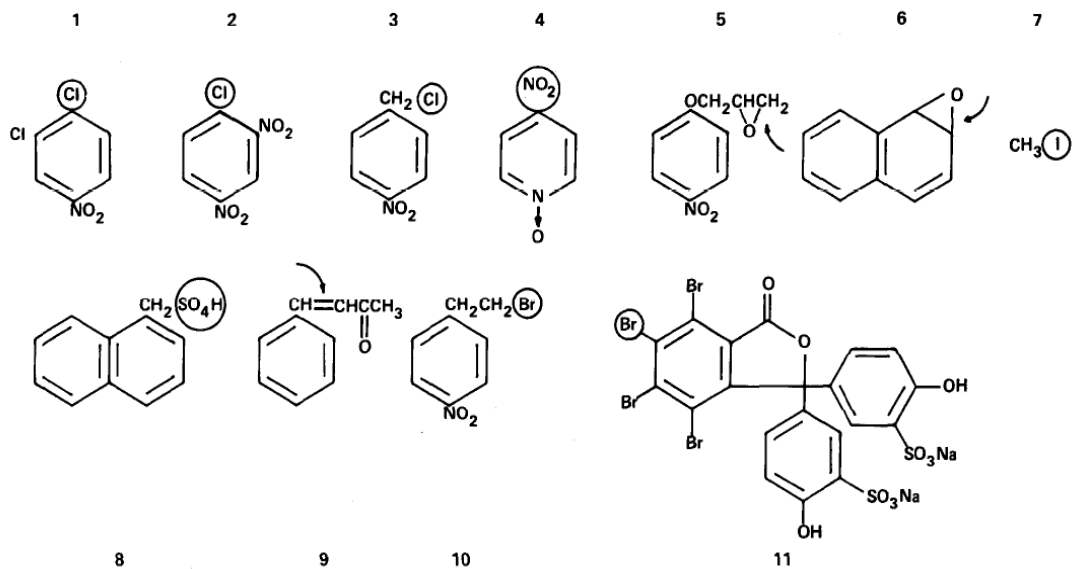


Εικόνα 14. Δράση υπεροξειδάσης χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το CuOOH (Hayes et al, 2005).

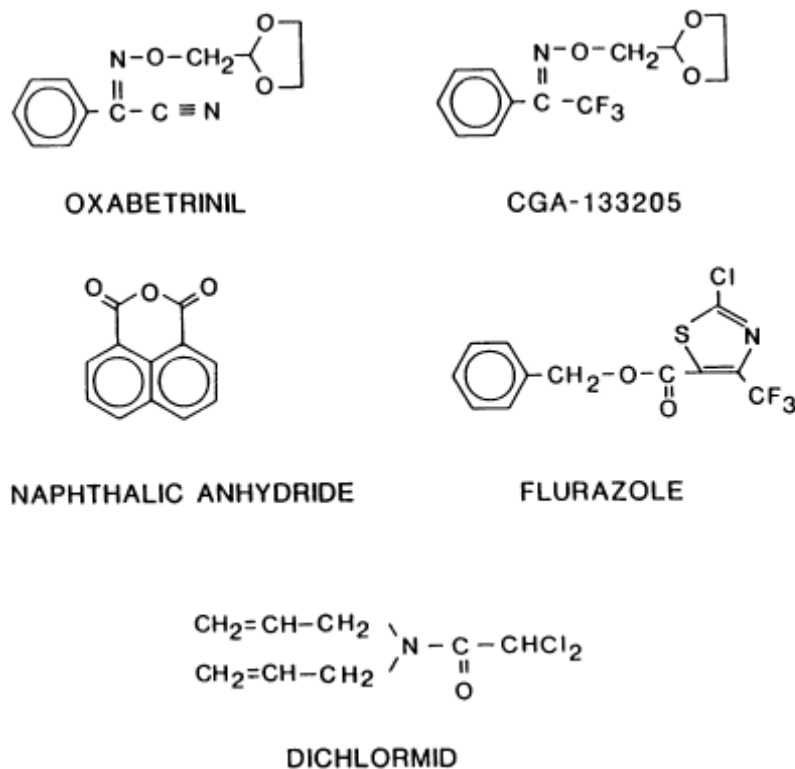
Υποστρώματα των GST

Για τη μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας όλων των GST χρησιμοποιούνται υποστρώματα, τα οποία είναι είτε χημικές ενώσεις είτε ζιζανιοκτόνα. Ως επί το πλείστον η συνθετική ένωση που χρησιμοποιείται είναι η 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB), όπου όλες οι GST, ασχέτως κλάσεως, παρουσιάζουν δραστηριότητα (Stenersen et al, 1987). Άλλα εξειδικευμένα υποστρώματα που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι το [2,3-διχλωρο-4-(2-μεθυλενο-1-οξυβουτυλο)φαινοξυ]οξικό ή αιθακρυνικό οξύ (ETHA) και το 1,2-διχλωρο-4-νιτροβενζόλιο (DCNB). Σύμφωνα με μελέτες, για το ETHA έχουν αναφερθεί υψηλές ταχύτητες μη ενζυμικής αντίδρασης και μη γραμμικής εξέλιξης της αντίδρασης συμπλοκοποίησης, στοιχεία που το καθιστά μέτριο για μετρήσεις δραστηριότητας. Θεωρείται ειδικό υπόστρωμα για την GST της κλάσης π του ποντικού, ενώ δραστηριότητα ως προς αυτό, παρουσιάζουν οι τάξεις α και μ (Ploemen et al, 1993). Το DCNB παρουσιάζει επίσης υψηλή εξειδίκευση με τις GST των εντόμων, αλλά ούτε για αυτή την ένωση όπως και για κανένα από τα χρησιμοποιούμενα συνθετικά υποστρώματα επιτρέπονται ασφαλείς συσχετισμοί με κριτήρια οικολογίας ή συστηματικής, παρά μόνο με το χωρισμό σε κλάσεις (εικόνα 15.)

Οι κυριότερες οικογένειες ζιζανιοκτόνων που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της δραστηριότητας των GST είναι η οικογένεια των τριαζινών και των χλωρακετανυλιδών. Επίσης για την καλύτερη κατανόηση της επαγωγής των ενζύμων, χρησιμοποιούνται και τα αντίδοτα των ζιζανιοκτόνων (herbicide safeners). Τα αντίδοτα είναι χημικά συστατικά που χρησιμοποιούνται για την προστασία ορισμένων καλλιεργειών, όπως καλαμποκιού και σόργου, από τραυματισμούς που οφείλονται σε επιλεγμένα ζιζανιοκτόνα (Devlin et al, 1983, Hatzios, 1989). Ένα παράδειγμα αντίδοτων που προστατεύουν το σόργο από τα ζιζανιοκτόνα της οικογένειας χλωρακετανυλιδών, όπως το metolachlor ή το alachlor, φαίνεται στην εικόνα 16.



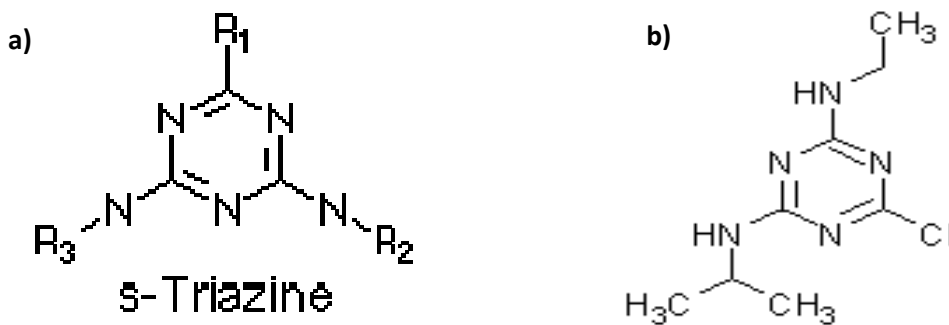
Εικόνα 15. Υποστρώματα για τις GST: **1)** 1,2-διχλωρο-4-νιτροβενζόλιο, **2)** 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) **3)** p-νιτροβενζυλοχλωρίδιο, **4)** 4-νιτροπυριδινό-N-οξείδιο, **5)** 1,2-εποξυ-3-(p-νιτροφαινοξυ)προπάνιο, **6)** 1,2-ναφθαλινοξείδιο, **7)** ιωδομεθάνιο **8)** θειικό 1-μεθυλ-ναφθένιο, **9)** trans-4-φαινυλ-3-βουτεν-2-ονη, **10)** p-νιτροφαιναιθυλοβρομίδιο, **11)** βρομοσουλφοφθαλεΐνη. Οι ομάδες μέσα στον κύκλο είναι αυτές που αποχωρούν κατά τη συμπλοκοποίηση, ενώ τα βέλη υποδηλώνουν το σημείο προσθήκης του γλουταθείου GSH (Habig et al, 1974).



Εικόνα 16. Παραδείγματα αντίδοτων ζιζανιοκτόνων (herbicide safeners). Τα oxabetrinil, CGA-133205, naphthalic anhydride και το flurazole εφαρμόζονται στους σπόρους, ενώ το dichlormid εφαρμόζεται στο έδαφος (Dean et al, 1990).

Οικογένεια τριαζινών

Στην οικογένεια των τριαζινών ανήκουν ζιζανιοκτόνα που χρησιμοποιούνται για εκλεκτικό προ-φυτρωτικό και μετα-φυτρωτικό έλεγχο ετησίων ζιζανίων σε μεγάλες καλλιέργειες, όπως για παράδειγμα καλαμποκιού, αλλά και για καθολικό έλεγχο της βλάστησης σε μη καλλιεργούμενα εδάφη. Οι τριαζίνες είναι σχετικά σταθερές στο έδαφος, αφού παραμένουν ενεργές για αρκετούς μήνες και περιέχουν μια ετεροκυκλική δομή αζώτου που είναι είτε συμμετρική (s-triazines) είτε ασύμμετρη (triazinones). Το κυριότερο ζιζανιοκτόνο της οικογένειας αυτής είναι το atrazine, το οποίο ανήκει στη συμμετρική δομή (s-triazines)(Holt et al, 1993). (εικόνα 17.)

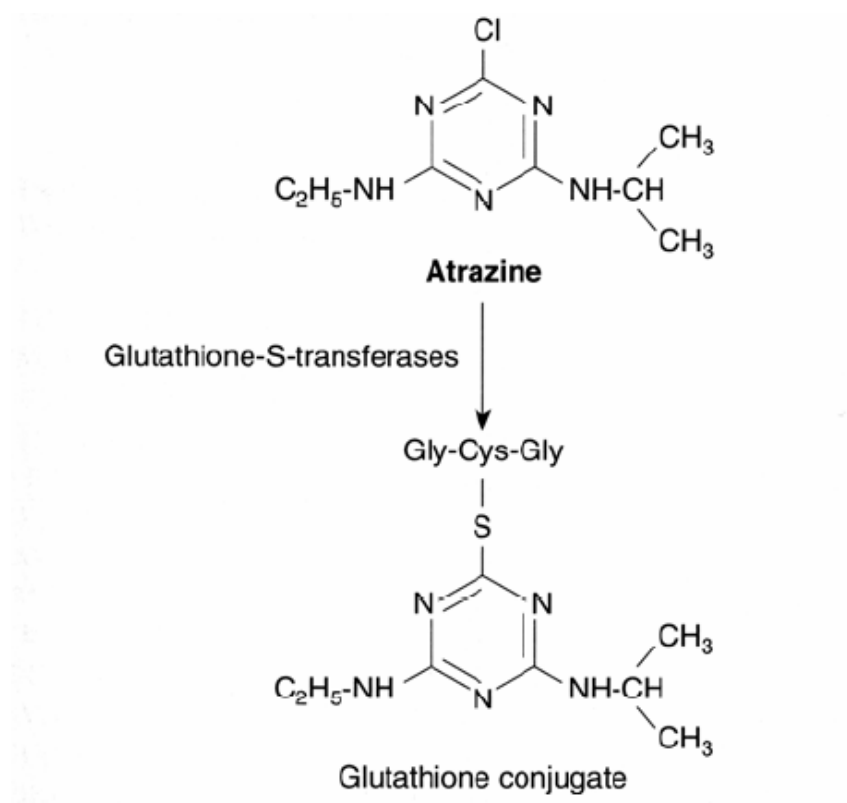


Εικόνα 17. a) Η συμμετρική-ετεροκυκλική δομή του αζώτου s-triazine και **b)** το κυριότερο ζιζανιοκτόνο της οικογένειας των τριαζινών, atrazine (http://umbbd.msi.umn.edu/tria/tria_map.html).

Το ζιζανιοκτόνο atrazine έχει το χαρακτηριστικό να παρεμποδίζει τη μεταφορά των ηλεκτρονίων στο φωτοσύστημα II (PSII). Όταν ένας ή περισσότεροι από τους ενδιάμεσους μεταφορείς ηλεκτρονίων απομακρύνονται ή αδρανοποιούνται λόγω του atrazine ή άλλων παρεμποδιστών, έχει σαν αποτέλεσμα τη παρεμπόδιση της μεταφοράς των ηλεκτρονίων. Το ζιζανιοκτόνο, όπως και οι άλλοι παρεμποδιστές, δεσμεύεται στην πρωτεΐνη του PSII, που δεσμεύει την κινόνη Q_B, και συγκεκριμένα στη θέση δέσμευσης της Q_B. Αυτή η ενέργεια οδηγεί στην παρεμπόδιση της δέσμευσης της πλαστοκινόνης (PQ) και την οξείδωση της κινόνης Q_A. Τα ζιζανιοκτόνα και η PQ δεσμεύονται αντιστρεπτά σε αλληλεπικαλυπτόμενες ή

αλληλεπιδρούσες θέσεις στην πλευρά του PSII που λειτουργεί ως αποδέκτης. Η πρωτεΐνη που δεσμεύει το ζιζανιοκτόνο αναγνωρίστηκε ως μία πρωτεΐνη 32 kD, ονομάζεται και D1 και εμφανίζει υψηλό ρυθμό αντικατάστασης σε φωτιζόμενο φυλλικό ιστό. Επίσης έχει βρεθεί πως το χλωροπλαστικό γονίδιο που κωδικοποιεί για αυτή τη πρωτεΐνη, το *psbA*, υπάρχει σε μεγάλο αριθμό αλγών, κυανοβακτηρίων και ανωτέρων φυτών καθώς επίσης είναι σε μεγάλο βαθμό συντηρημένο (Moreland, 1980, Holt et al, 1993).

Ο μεταβολισμός των *s*-triazines στις φυσικά ανθεκτικές καλλιέργειες πραγματοποιείται μέσω μεταβολικών μονοπατιών. Τα μονοπάτια αυτά είναι η 2-υδροξυλίωση, η δημιουργία συμπλόκου με GSH και η N-αποακυλίωση των πλευρικών αλυσίδων με επακόλουθη οξείδωση. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα φυτού ανθεκτικό στις τριαζίνες και χρησιμοποιεί αυτά τα μονοπάτια, είναι το καλαμπόκι (Holt et al, 1993).(εικόνα 18.).



Εικόνα 18. Η αντίδραση του φυτοφαρμάκου atrazine με το GSH (Griffin, 2005).

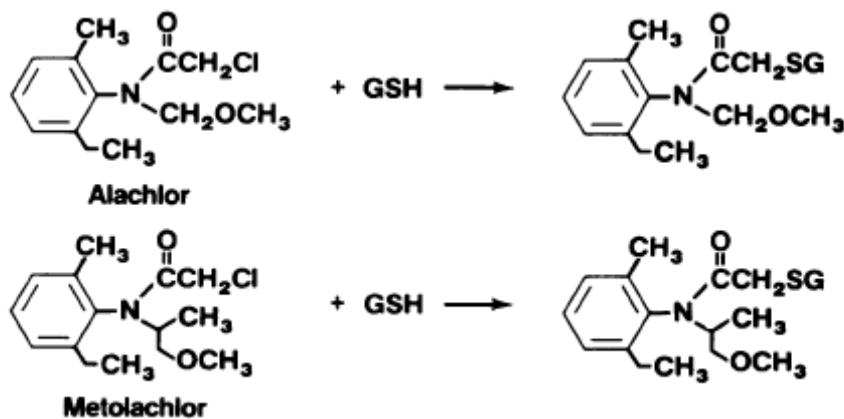
Οικογένεια χλωρακετανυλιδών

Τα ζιζανιοκτόνα της οικογένειας αυτής έχουν την ιδιότητα να μην παρεμποδίζουν τη βλάστηση, ούτε να προκαλούν την άμεση παύση της ανάπτυξης. Επηρεάζουν όμως το μέγεθος και τη μορφή των προσβεβλημένων ζιζανιοκτόνων. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην παρεμπόδιση της κυτταρικής διαίρεσης και της επιμήκυνσης των κυττάρων (Wilkinson, 1982, Fuerst, 1987). Οι κύριες ανατομικές θέσεις που προσβάλλουν είναι το πτερίδιο, το κορυφαίο και τα πλάγια μεριστώματα που βρίσκονται κοντά στην κορυφή του νεαρού βλαστού. Η ρίζα μπορεί να μην αναπτυχθεί με κανονικό ρυθμό, αλλά θίγεται λιγότερο σε σχέση με το βλαστό. Στα πλατύφυλλα ζιζάνια, η βλάστηση καθυστερεί και τα φύλλα μπορεί να είναι ζαρωμένα ή να σχηματίζουν ροζέτα (Fuerst, 1987). Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο ζιζανιοκτόνο της οικογένειας αυτής, είναι το alachlor. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο μονοκότυλων (γρασίδια) και πλατύφυλλων ζιζανίων σε πολλές καλλιέργειες, όπως καλαμπόκι, σόγια, βαμβάκι και είναι αποτελεσματικό μόνο στον προ-φυτρωτικό έλεγχο των ζιζανίων.

Η βιολογική δράση των ζιζανιοκτόνων της οικογένειας αυτής οφείλεται στην ομοιοπολική τους πρόσδεση με τις σουλφυδρικές ομάδες των βιομορίων. Αυτός είναι και ο λόγος που ονομάζονται παράγοντες "αλκυλίωσης". Χαρακτηριστικό της δράσης των ζιζανιοκτόνων αυτών είναι πως δεν αλκυλιώνουν τις σουλφυδρικές ομάδες όλων των ενζύμων. Για παράδειγμα, το alachlor δεν παρεμποδίζει τη δράση των ενζύμων της β-αμυλάσης και αφυδρογονάσης της 3-P-γλυκεριναλδεΐδης (Fuerst, 1987). Ο κύριος όμως στόχος τους πιστεύεται πως είναι το συνένζυμο A (CoA), επειδή το CoA αποτελεί σημαντικό ρόλο σε πολλά , μεταβολικά μονοπάτια, όπως η βιοσύνθεση των λιπιδίων, των ισοπρενοειδών, των φλαβονοειδών αλλά των γιββεριλλινών και ανθοκυανινών που είναι προϊόντα του μεταβολισμού των ισοπρενοειδών και των φλαβονοειδών αντίστοιχα.

Στα φυτά, τα ζιζανιοκτόνα της οικογένειας αυτής μεταβολίζονται μέσω της συμπλοκοποίησης με το GSH, μέσω του ενζύμου GST. Εκτός από το alachlor, άλλα εξίσου σημαντικά για την έρευνα ζιζανιοκτόνα είναι το metolachlor και το

propachlor, τα οποία μελετήθηκαν όχι μόνο στο φυτικό βασίλειο αλλά στο ποντίκι και στον άνθρωπο (Dierickx, 1999). Η αντίδραση του alachlor και του metolachlor περιγράφεται παρακάτω:

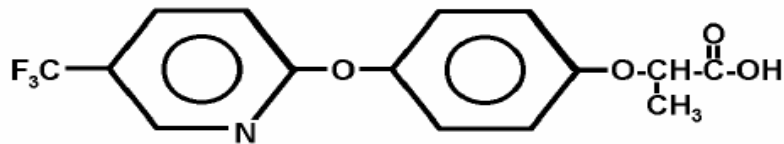


Εικόνα 19. Η αντίδραση των χλωρακετανυλιδών ζιζανιοκτόνων alachlor και metolachlor με το GSH (O'Connell et al, 1988).

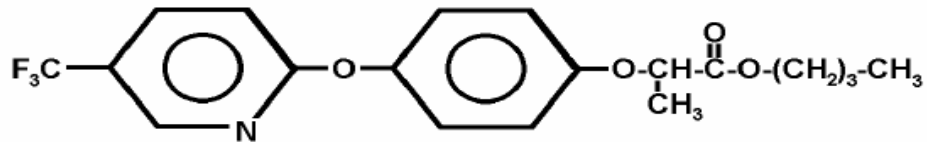
Ζιζανιοκτόνο *Fusilade*

Το *Fusilade* ανήκει στην οικογένεια των προπανικο-αρυλοξυφαινοξυ λιπόφιλων ζιζανιοκτόνων. Χαρακτηριστικό αυτής της οικογένειας είναι πως έχουν χαμηλή διαλυτότητα στο νερό και η τιμή του $\log K_{ow}$ είναι πολύ μεγαλύτερη από 1. Ο $\log K_{ow}$ αποτελεί την αναλογία της ποσότητας του ζιζανιοκτόνου που βρέθηκε σε έναν οργανικό διαλύτη (octanol) σε σύγκριση με την ποσότητα του φαρμάκου μέσα στο νερό. Είναι ένας καλός δείκτης των λιπόφιλων ή υδρόφιλων ζιζανιοκτόνων και όσο πιο μεγάλη είναι η τιμή του $\log K_{ow}$ τόσο πιο λιπόφιλο και το παρασιτοκτόνο (*Fusilade*: 3,1 $\log K_{ow}$).

Το *Fusilade* απορροφάται από την εφυμενίδα υπό μορφή αιθυλίου ή βουτυλ-εστέρας (Kogan & Bayer, 1996, Rossi et al, 1994). Ο εστέρας μέσα στο φυτό υφίσταται υδρολύεται και παράγεται έτσι ένα ελεύθερο οξύ, το οποίο αποτελεί και τη δραστική ουσία του ζιζανιοκτόνου:



Fluazifop-P acid



Fluazifop-P butyl ester

Το *Fusilade* ή *fluazifop-P-butyl* είναι ένα μεταφυτρωτικό ζιζανιοκτόνο με συστηματική δράση, που χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση ετησίων και πολυετών αγρωστωδών ζιζανίων σε πλατύφυλλες καλλιέργειες, όπως βέλιουρα, αγριάδας, μουχρίτσας, σετάριας, ήρας, αγριοβρώμης, νεραγριάδας και άλλων αγρωστωδών ζιζανίων. Απορροφάται κυρίως από τα φύλλα και μετακινείται γρήγορα στα υπέργεια αλλά και υπόγεια μέρη των φυτών. Κινείται στους ξυλώδεις ιστούς και τον ηθμό και συσσωρεύεται στους μεριστωματικούς ιστούς όπου επιφέρει αποδιοργάνωση στη σύνθεση των λιπιδίων. (Urano, 1982, Erlingson, 1988). Η δράση του οφείλεται στην παρεμπόδιση σχηματισμού ATP και εντοπίζεται στα σημεία αύξησεως των ζιζανίων, τα οποία και καταστρέφει. Αμέσως μετά την εφαρμογή του, τα αγρωστώδη ζιζάνια παύουν να αναπτύσσονται και τα νεότερα φύλλα γίνονται κίτρινα-κιτρινοκόκκινα. Τα ριζώματα των πολυετών και το εσωτερικό των βλαστών καφετιάζουν μετά από μία με δύο εβδομάδες. Τελικά ολόκληρο το φυτό νεκρώνεται μετά από τρεις με τέσσερις εβδομάδες ανάλογα και με τις καιρικές συνθήκες (Tu et al, 2001).

Διασπάται γρήγορα στο έδαφος, όπου ο χρόνος ημιζωής του είναι περίπου τρεις εβδομάδες. Η αποτελεσματικότητα μειώνεται όταν το έδαφος είναι ξηρό και η σχετική υγρασία είναι μικρότερη από 60%. Δεν είναι τοξικό στα πουλιά και τις μέλισσες, είναι όμως τοξικό στους θαλάσσιους οργανισμούς και επικίνδυνο για τα ωφέλιμα έντομα (Tu et al, 2001).

Το φυτό *Phaseolus vulgaris*

Εισαγωγικά

Το κοινό φασόλι, *Phaseolus vulgaris*, ανήκει στην οικογένεια των ψυχανθών, μια οικογένεια που περιλαμβάνει πολύ σημαντικά φυτά. Τα ψυχανθή καλλιεργούνται για την παραγωγή ξηρού χόρτου (σανός), σπόρου για την κτηνοτροφία και σπόρου για την ανθρώπινη κατανάλωση (όσπρια). Τα σπουδαιότερα ψυχανθή που καλλιεργούνται για παραγωγή σανού, είναι η μηδική, ο βίκος και τα τριφύλλια ενώ τα αντίστοιχα για την κτηνοτροφία που έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, είναι τα μπιζέλια, τα κτηνοτροφικά κουκιά, τα λούπινα και η σόγια. Τέλος, τα πιο σημαντικά ψυχανθή που χρησιμοποιούνται για την ανθρώπινη κατανάλωση είναι τα όσπρια, όπως: φασόλια, φακές, ρεβίθια, κουκιά, μπιζέλια και λαθούρι (Υπ.Α.Α.Τ., 2007).

Τα όσπρια σε παγκόσμιο επίπεδο καταλαμβάνουν μικρές εκτάσεις, παρόλο τη σπουδαιότητά τους και τα πλεονεκτήματά τους. Στην Ελλάδα, το σύνολο της καλλιεργούμενης έκτασης ανέρχεται σε 150.000 στρέμματα περίπου, με μέση παραγωγή τους 29.000 τόνους, από τους οποίους τα φασόλια καλύπτουν το 64 % των εκτάσεων και το 73 % της συνολικής παραγωγής (Υπ.Α.Α.Τ., 2007).

Το φασόλι κατάγεται από τη Νότια και Κεντρική Αμερική, όπου οι άγριοι τύποι του ανακαλύφθηκαν σε ένα μεγάλο εύρος από την Αργεντινή έως το Μεξικό, όπου και διαδόθηκε στις αρχές του 17^{ου} αι (Sauer, 1993). Στην Ελλάδα διαδόθηκε γύρω στα μέσα του 17^{ου} αι.

Ταξινόμηση

Το φασόλι ανήκει στο γένος *Phaseolus* της οικογένειας Leguminosae. Τα διάφορα καλλιεργούμενα είδη φασολιού, σύμφωνα με τη σπουδαιότητά τους, είναι τα εξής:

- *Phaseolus vulgaris*
- *Phaseolus coccineus*
- *Phaseolus Lunatus*
- *Phaseolus acutifolius var. lufifolius*

Και τα τέσσερα είδη είναι διπλοειδή, με $2n=22$ χρωματοσώματα. Είναι ένα ετήσιο φυτό, αν και πολλές φορές στην άγρια μορφή του συναντάται και ως πολυετές.

Βοτανικά χαρακτηριστικά

Ρίζα: το ριζικό σύστημα του φασολιού είναι αρκετά ανεπτυγμένο. Αποτελείται από μία ασθενική, κύρια ρίζα και πολυάριθμες δευτερεύουσες. Οι δευτερεύουσες ρίζες αναπτύσσονται πολύ καλύτερα και υποκαθιστούν πλήρως την κύρια ρίζα, η οποία φθάνει σε βάθος 50 – 60 cm ενώ ο μεγαλύτερος αριθμός των δευτερευουσών ριζών σε βάθος 20 – 30 cm και εκτείνεται σε ακτίνα 45 – 60 cm από τον κεντρικό βλαστό. Χαρακτηριστικό όλων των ψυχανθών είναι πως στη ρίζα συμβιώνει το αζωτοβακτήριο *Bacterium radicicola* και δεσμεύει το ατμοσφαιρικό άζωτο, το οποίο είναι απαραίτητο για τη θρέψη του φυτού.

Βλαστός: Οι βλαστοί του *Phaseolus vulgaris* είναι ποώδεις, όρθιας αναπτύξεως, κυλινδρικού σχήματος και ισχυρώς διακλαδιζόμενοι. Η επιμήκυνση του βλαστού σταματάει με το σχηματισμό της κορυφαίας ταξιανθίας και το ύψος τους μπορεί να φτάσει στα 30 – 60 cm.

Φύλλα: τα φύλλα της νάνο ποικιλίας φασολιού είναι σύνθετα και τρίλοβα.

Τόσο τα φύλλα όσο και οι βλαστοί είναι χνουδωτοί με μεγάλους μίσχους.

Άνθη: τα άνθη των νάνων φασολιών είναι μικρά και φέρονται σε μασχαλιαίες ταξιανθίες ανά 2-6, στην άκρη ενός ανθικού άξονα που είναι βραχύτερος από το μίσχο του αντίστοιχου φύλλου. Το χρώμα των ανθέων είναι συνήθως λευκό και η άνθισή τους διαρκεί μέχρι και 20 ημέρες. Η γονιμοποίηση πραγματοποιείται κυρίως με αυτογονιμοποίηση.

Καρπός: ο καρπός είναι λοβός, μήκους 8 – 20 cm και πλάτους 0,6 – 2,0 cm, με διατομή κυλινδρική ή πλατιά. Το χρώμα του είναι πράσινο και φέρει 4-9 σπόρους.

Κλίμα και έδαφος

Το φασόλι ευδοκίμει σε θερμές περιόδους του έτους και δεν αντέχει στον παγετό (θερμοκρασίες κάτω από 15°C και πάνω από 30°C). Κατά τη σπορά, οι θερμοκρασίες εδάφους σε βάθος 5 cm περίπου, πρέπει να είναι 15–30 °C με άριστη τους 26–27 °C. Στους 15 °C ο σπόρος φυτρώνει σε 16 ημέρες, στους 25 °C φυτρώνει σε 6 ημέρες, ενώ σε θερμοκρασίες άνω των 30 °C και κάτω των 10-12 °C είναι σχεδόν αδύνατον να αναπτυχθεί. Οι κατάλληλες συνθήκες αέρα για ανάπτυξη του φυτού είναι 20-26°C. Η καρπόδεση είναι αδύνατη σε θερμοκρασίες κάτω από 10 °C και άνω των 32-33 °C.

Κατάλληλα εδάφη για την ανάπτυξη του φασολιού είναι τα αμμώδη και αργιλλοπηλώδη, αλλά και τα οργανικά. Το φυτό προτιμά ελαφρώς όξινα εδάφη (pH 5,5-6,5) αλλά αναπτύσσεται και σε pH 5,5-7,0. Στα αλκαλικά όμως εδάφη δεν μπορεί να ευδοκιμήσει, ιδίως όταν παρατηρείται έλλειψη Mn (Σπάρτση Ν., 1987, Δημητράκη Κ., 1982).

Σκοπός της παρούσας μελέτης

Οι μεταφοράδες του γλουταθείου GST, όπως αναφέρθηκε, αποτελούν μία οικογένεια ενζύμων μεγάλου ενδιαφέροντος, λόγω του εξαιρετικά σημαντικού τους ρόλου στα πεδία της ιατρικής αλλά και της γεωπονίας. Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η μελέτη της επαγωγής και καθαρισμός των ισοενζύμων GST από φύλλα του φυτού *Phaseolus vulgaris*, μετά από ψεκασμό τους με το ζιζανιοκτόνο Fusilade. Επιμέρους στόχος της μελέτης ήταν και ο χαρακτηρισμός των επαγόμενων GST.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ & ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Υλικά

Φυτικό υλικό

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν σπόροι του φυτού *Phaseolus vulgaris*, τυποποιημένοι σε φακελάκι της εταιρείας K & F, Enterprises.

Πρωτεΐνες

Για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ο BenchMark Pre-stained protein marker (lot no. 1363282) της Invitrogen (ΗΠΑ).

Χημικά αντιδραστήρια

Το μεταφυτρωτικό ζιζανιοκτόνο Fusilade (12,5 E.C.) κυκλοφορεί στο εμπόριο και ανήκει στην Syngenta Hellas AEBE. Το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) αγοράστηκε από την εταιρία SIGMA Co (St. Louis, Mo ΗΠΑ), ενώ η προμήθεια του ανηγμένου γλουταθείου GSH έγινε από τον οίκο SIGMA-ALDRICH (USA). Προϊόν επίσης της εταιρίας SIGMA είναι και η β-μερκαπτοαιθανόλη, ενώ τα υπόλοιπα χημικά αντιδραστήρια όπως η χρωστική Coomassie Brilliant R-250, το NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 , και το NaCl αγοράστηκαν από την γερμανική εταιρία Merck (Γερμανία).

Εξοπλισμός

Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο HITACHI (μοντέλο U-2000), διπλής δέσμης με μήκος οπτικής διαδρομής 10 mm που διαθέτει θερμοστατούμενη υποδοχή κυψελίδας.

Ο διαχωρισμός στερεών-υγρών πραγματοποιήθηκε με δύο διαφορετικές φυγόκεντρους: τη Heraeus instruments Biofuge primo (μικρή) και τη Heraeus SEPATECH Contriguge 17RS (μεσαία).

Το pH των διαφόρων διαλυμάτων ρυθμίστηκε σε πεχάμετρο ORION μοντέλο 410A.

Για τον καθαρισμό του ενζύμου χρησιμοποιήθηκαν δύο ειδών χρωματογραφίες: η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, όπου χρησιμοποιήθηκε ο προσροφητής Q-Sepharose CL-6B και η χρωματογραφία συγγένειας, χρησιμοποιώντας τον προσροφητή Se-GSH. Τα υλικά χρωματογραφίας αγοράστηκαν από τον οίκο Sigma-Aldrich (USA).

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Hoefer SE250 Mini-Vertical gel electrophoresis system, ενώ η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων στην Zoom IPG Runner system, της εταιρίας Invitrogen.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΕΘΟΔΟΙ

Ανάπτυξη φυτών

Αρχικά σπόροι από *Phaseolus vulgaris* προβλάστησαν σε τρυβλία, πάνω σε απορροφητικό χαρτί Whatman 2MM το οποίο ήταν βρεγμένο με δις-απιονισμένο νερό. Τα τρυβλία παρέμειναν σε θάλαμο για 48 ώρες στους 30°C. Μετά από δυο ημέρες οι αναπτυγμένοι σπόροι μεταφτεύτηκαν στο χώμα σε πλαστικές γλάστρες μεγέθους 12 cm. Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε ειδικό θάλαμο κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες υγρασίας (65%) και θερμοκρασίας (25°C) και ποτίζονταν κάθε 4 ημέρες.

Ψεκάσμος φύλλων

Μετά από τρεις εβδομάδες ανάπτυξης των φυτών τα φύλλα φασολιού ψεκάστηκαν με ζιζανιοκτόνο *Fusilade*, δραστικής ουσίας *Fluazifop-p-butyl* με αραιώση 1/250 με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, τα φυτά καλύφθηκαν με διαφανή μεμβράνη και παρέμειναν στο θάλαμο για 24 ώρες.

Ενζυμικό εκχύλισμα

από φύλλα φασολιού

Μετά από τη μία μέρα ψεκάσμου, κόβονται τα φύλλα και αφού πλυθούν καλά με απιονισμένο νερό, ζυγίζονται και τοποθετούνται σε falcon των 50 ml, όπου προστίθεται διάλυμα εκχύλισης σε τριπλάσιο όγκο σε σχέση με το βάρος των φύλλων. Το διάλυμα εκχύλισης αποτελείται από 20 mM KH_2PO_4 , 1% w/v PVP pH

7,0 και διατηρείται στους 4°C. Ακολουθεί εκχύλιση των φύλλων σε μηχανικό ομοιογενοποιητή για 5 λεπτά και το μίγμα που δημιουργείται φυγοκεντρείται στις 13 000g στροφές για 60 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο που προκύπτει, συλλέγεται για περαιτέρω επεξεργασία.

Φωτομετρικός προσδιορισμός

της GST

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, είναι δυνατό να ταξινομηθεί σύμφωνα με το μήκος κύματος ή τη συχνότητά της. Τα δύο αυτά μεγέθη συνδέονται με την παρακάτω σχέση:

$$\lambda\nu=c$$

όπου λ είναι το μήκος κύματος (cm)

ν είναι η συχνότητα

c η ταχύτητα του φωτός (3×10^{10} cm/s)

Οι μονάδες μέτρησης του μήκους κύματος είναι συνήθως σε νανόμετρα (nm).

Οι διάφορες χημικές ενώσεις αλληλεπιδρούν με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με τέτοιο τρόπο ώστε η ένταση της ακτινοβολίας να ελαττώνεται. Οι αλληλεπιδράσεις των χημικών ενώσεων με την ακτινοβολία ποσοτικοποιούνται συγκρίνοντας την ακτινοβολία που προσπίπτει σε ένα δείγμα με την ακτινοβολία που αποδίδεται (ή εκπέμπεται) από το δείγμα. Τέτοιες συγκρίσεις γίνονται με ειδικά όργανα που καλούνται φασματοφωτόμετρα.

Η αλληλεπίδραση του φωτός μ' ένα δείγμα μπορεί να εκφρασθεί σαν «διαπερατότητα», είτε σαν «απορρόφηση». Η διαπερατότητα (T) είναι το κλάσμα του φωτός που διαδίδεται μέσω ενός διαλύματος μιας ένωσης:

$$T=I/I_0$$

όπου I είναι η ένταση της ακτινοβολίας που διέρχεται από ένα δείγμα και I_0 η ακτινοβολία που προσπίπτει στο δείγμα. Η απορρόφηση (A) είναι η έκφραση της ποσότητας της ακτινοβολίας που απορροφάται (συγκρατείται) από ένα δείγμα και είναι ίση με τον αρνητικό λογάριθμο του T :

$$A = -\log T = \log I/I_0$$

Η ποσότητα της ακτινοβολίας, η οποία απορροφάται από ένα διάλυμα, είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της απορροφούσα χημικής ένωσης στο διάλυμα. Επίσης ανάλογη της απόστασης που η ακτινοβολία διανύει μέσα στο διάλυμα. Ο νόμος του Beer εκφράζει αυτή ακριβώς τη σχέση:

$$A = \epsilon Cl$$

όπου ϵ είναι ο συντελεστής απορρόφησης (ή μοριακός συντελεστής απόσβεσης)

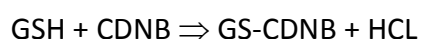
l είναι το μήκος της διαδρομής της ακτινοβολίας στο δείγμα και

C η συγκέντρωση της χημικής ένωσης του διαλύματος η οποία απορροφά την ακτινοβολία.

Ο νόμος του Beer είναι χρήσιμος για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης χημικών ενώσεων σε ένα διάλυμα. Προβλέπει ότι υπάρχει μία γραμμική συσχέτιση μεταξύ της απορρόφησης και της συγκέντρωσης αυτής. Επομένως εάν είναι γνωστά τα ϵ και l , είναι δυνατόν να υπολογιστεί η συγκέντρωση από μία τιμή απορρόφησης η οποία μετρείται και καταγράφεται από το φασματοφωτόμετρο. Σε πολλές περιπτώσεις η ένωση που μελετάται αντιδρά με μια δεύτερη ένωση έτσι ώστε να προκύπτει ένα έγχρωμο συστατικό που να απορροφά χαρακτηριστικά. Μια γενική εξίσωση για μετρήσεις αυτού του τύπου είναι:

Ένωση που μετρείται (A) + αντιδραστήριο που αναπτύσσει χρώμα (B) = σύμπλοκη ένωση (AB) που απορροφά ανάλογα με τη συγκέντρωση της ένωσης A . Η μέτρηση της δραστηριότητας της GST στηρίζεται στον νόμο του Beer και βασίζεται στον

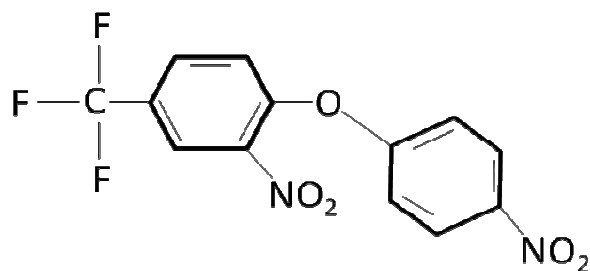
προσδιορισμό της ταχύτητας σχηματισμού του συμπλόκου GS-CDNB όπου υπολογίζεται η αύξηση της απορρόφησης στα 340 nm:



Το μίγμα επώασης στις κυψελίδες έχει συνολικό όγκο 1 ml και αποτελείται από: 0,1 M διάλυμα KH_2PO_4 pH 6,5, 2,5 mM GSH, 1 mM CDNB και ένζυμο GST (έως 0,02 units). Ως ενζυμική μονάδα GST εννοείται η ποσότητα του ενζύμου που καταλύει τη μετατροπή 1 μmole CDNB σε GS-CDNB ανά λεπτό στους 37°C. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του συμπλόκου χρησιμοποιήθηκε σαν συντελεστής μοριακής απόσβεσης η τιμή 9,6 l/mmole x cm.

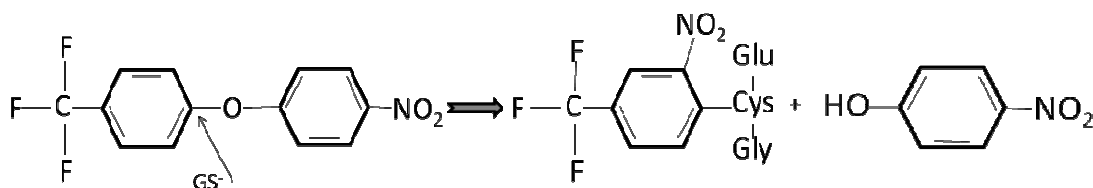
Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST με χρήση του υποστρώματος *Fluorodifen*

Ένας άλλος τρόπος μέτρησης της δραστικότητας της GST αποτελεί η μέθοδος του φωτομετρικού προσδιορισμού, χρησιμοποιώντας το υπόστρωμα *Fluorodifen*. Το *Fluorodifen* (4-nitrophenyl α,α,α-trifluoro-2nitro-*p*-tolyl ether) (Σχήμα 2.1) είναι ζιζανιοκτόνο και ανήκει στην κατηγορία των διφαινυλαιθέρων (DPE). Ο ακριβής τρόπος δράσης του δεν είναι ακόμα ολοκληρωτικά κατανοητός. Γενικά, οι διφαινυλαιθέρες προκαλούν την υπεροξειδωση των λιπιδίων με τελικό αποτέλεσμα την διάσπαση των μεμβρανών και συνεπώς τον θάνατο των κυτάρων.



Σχήμα 2.1: η δομή του ζιζανιοκτόνου *Fluorodifen*

Η μέτρηση της δραστηριότητας της GST βασίζεται στον προσδιορισμό της ταχύτητας σχηματισμού του συμπλόκου GS-Fluorodifen, όπου υπολογίζεται η αύξηση της απορρόφησης στα 400 nm:



Το μίγμα επώασης στις κυψελίδες έχει συνολικό όγκο 1 ml και αποτελείται από: 0,1 M διάλυμα γλυκίνης pH 9,5, 2,5 mM GSH, 5,63 mM *Fluorodifen* και ένζυμο GST (έως 0,02 units). Το μίγμα επωάζεται στους 30 °C για μία ώρα. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του συμπλόκου χρησιμοποιήθηκε σαν συντελεστής μοριακής απόσβεσης η τιμή 17,2 l/mmole x cm.

Σαν μάρτυρας χρησιμοποιείται όμοιο μίγμα επώασης που όμως δεν περιέχει το αντίστοιχο φυτοφάρμακο ή ένζυμο. Μετά το πέρας της μίας ώρας τα μίγματα επώασης τοποθετούνται στους 4 °C προκειμένου να σταματήσει η αντίδραση.

Ποσοτικός προσδιορισμός

πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

(Bradford, 1976)

Υπό κατάλληλες συνθήκες οι όξινες και οι βασικές ομάδες των πρωτεϊνών αλληλεπιδρούν με αποχωρούσες ομάδες οργανικών χρωστικών και σχηματίζουν έγχρωμα ιζήματα. Στο φαινόμενο αυτό στηρίζεται και η χρωματομετρική μέθοδος Bradford κατά την οποία χρησιμοποιείται η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 που σχηματίζει σύμπλοκα πρωτεΐνης – χρωστικής με μέγιστο απορρόφησης στα 595 nm και έχουν χρώμα γαλάζιο. (η ελεύθερη χρωστική έχει χρώμα καστανό και απορροφά στα 465 nm). Η εκτίμηση της συγκέντρωσης γίνεται συγκρίνοντας

την απορρόφηση του δείγματος στα 595 nm με μια πρότυπη καμπύλη που σχετίζει τη συγκέντρωση γνωστών διαλυμάτων της πρωτεΐνης αλβουμίνης BSA με την απορρόφηση τους στα 595 nm. Η αξιοπιστία της μεθόδου περιορίζεται σε πρωτεϊνικά δείγματα που η συγκέντρωσή τους κυμαίνεται μεταξύ των 0,04 mg/ml και 0,20 mg/ml. Χρησιμοποιείται ευρέως γιατί είναι ευαίσθητη, γρήγορη και σχετικά ακριβής.

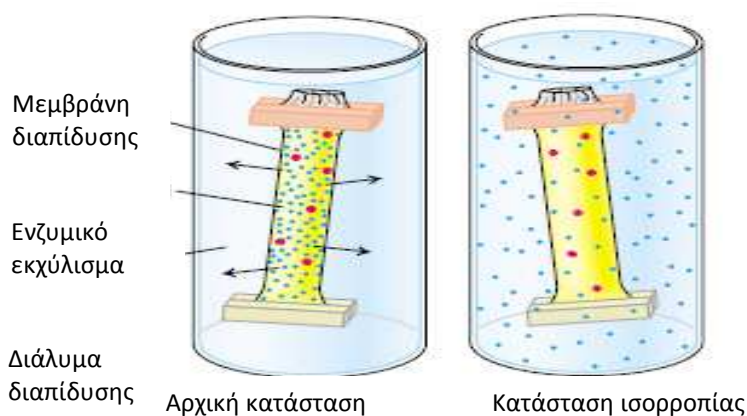
Διαδικασία της μεθόδου

Η χρωστική (100mg) διαλύεται σε 100 ml υδατικού διαλύματος μεθανόλης (50% v/v). Επίσης στο διάλυμα προστίθεται 100 ml πυκνού φωσφορικού οξέος (85% w/v). Όλα τα υλικά προστίθενται εντός σκοτεινού δοχείου και το διάλυμα που προκύπτει αποτελεί το πυκνό αντιδραστήριο Bradford, το οποίο διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου (25⁰C). Για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης, αραιώνεται η χρωστική με νερό σε αναλογία 1/4 και το διάλυμα που προκύπτει διατηρείται σε σκοτεινό δοχείο και σε θερμοκρασία 25⁰C. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό άγνωστου δείγματος αναμιγνύουμε 950 μl του αραιωμένου αντιδραστηρίου Bradford με 50μl πρωτεΐνης κατάλληλης συγκέντρωσης ώστε στην κυψελίδα να υπάρχουν 2-10 μg πρωτεΐνης. Το μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 25⁰C για 25 λεπτά και ακολούθως λαμβάνεται η απορρόφηση στα 595 nm, χρησιμοποιώντας ένα διάλυμα αναφοράς ως μάρτυρα ο οποίος περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από πρωτεΐνη.

Διαπίδυση

Στο πείραμα, το ενζυμικό εκχύλισμα, μετά τη φυγοκέντρωση και πριν τον καθαρισμό, υποβλήθηκε σε διαπίδυση έναντι 4L ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM NaH₂PO₄, 50 mM NaCl pH 7,0 όταν ακολουθούσε χρωματογραφία συγγένειας ή 4L ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM NaH₂PO₄ pH 7,5, για χρωματογραφία

ιοντοανταλλαγής. Χρησιμοποιήθηκε ημιπερατή μεμβράνη κυτταρίνης με όριο αποκλεισμού 12 kDa (Sigma). Η διαδικασία διαρκεί 17-20 h, πραγματοποιείται στους 4°C και έχει σαν στόχο την απομάκρυνση όλων των ενώσεων μικρού μοριακού βάρους (<12 kDa).



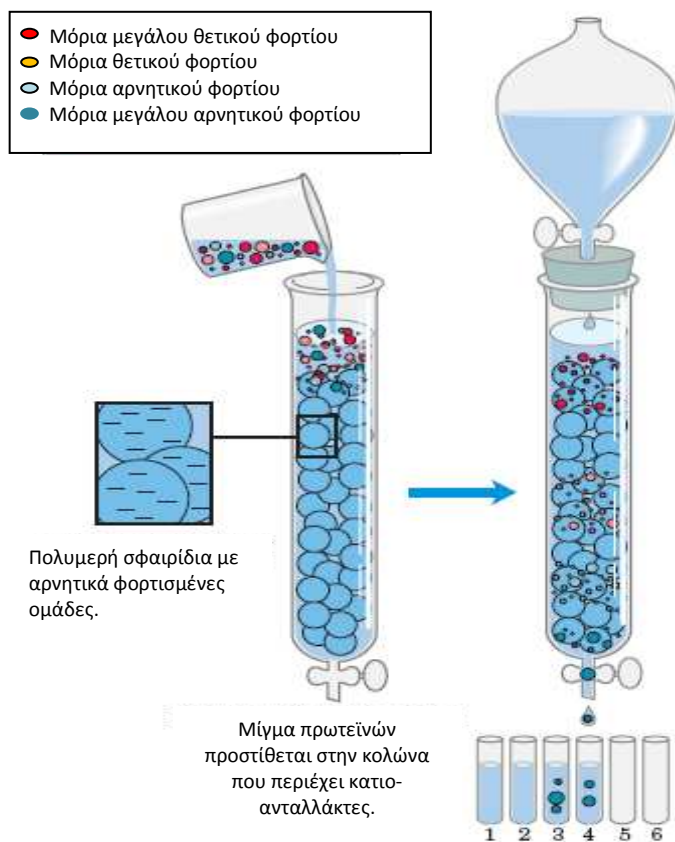
Εικόνα 2.1: Απεικόνιση της διαπίδυσης ενζυμικού εκχυλίσματος, χρησιμοποιώντας ημιπερατή μεμβράνη σε κατάλληλο διάλυμα διαπίδυσης.

Καθαρισμός του ενζύμου GST με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί μια τεχνική και είναι μία από τις σπουδαιότερες μεθόδους κλασμάτωσης πρωτεϊνών αλλά και άλλων ουσιών. Η βασική αρχή της ιοντοανταλλαγής είναι ότι ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με βάση το φορτίο που φέρουν τα μόρια. Η ιοντοανταλλαγή είναι ικανή να διαχωρίζει μόρια τα οποία διαφέρουν πολύ λίγο από άποψη φορτίου και αποτελεί έτσι μια τεχνική μεγάλη διακριτικής ικανότητας.

Ο ιονικός ανταλλάκτης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι ο ανιοντοανταλλάκτης Q-Sepharose CL-6B. Χρησιμοποιήθηκε 1 ml από τον ανταλλάκτη αυτόν σε στήλη 10 ml στους 4°C. Αρχικά η κολώνα εξισορροπήθηκε με 10 ml διαλύματος φωσφορικών 20 mM NaH_2PO_4 pH 7,5. Στη συνέχεια το ακάθαρτο ενζυμικό εκχύλισμα φορτώνεται στη στήλη και αφήνεται να περάσει μέσα από

αυτήν. Ακολουθεί πλύσιμο της κολώνας με το διάλυμα εξισορρόπησης και στη συνέχεια οι εκλούσεις με διάλυμα 20 mM NaH_2PO_4 pH 7,5 με διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος (50 – 500 mM NaCl). Κλάσματα των εκλούσεων συλλέγονται και υπολογίζεται η ενζυμική δραστητικότητα με φωτομετρικό προσδιορισμό, χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα είτε το CDNB είτε το *Fluorodifen*. Τέλος ο χρησιμοποιούμενος ανταλλάκτης αναγεννάται με διάλυμα 50 mM NaH_2PO_4 , 1M NaCl pH 7,5 με σκοπό την αποδέσμευση όλων των αδέσμευτων πρωτεϊνών.

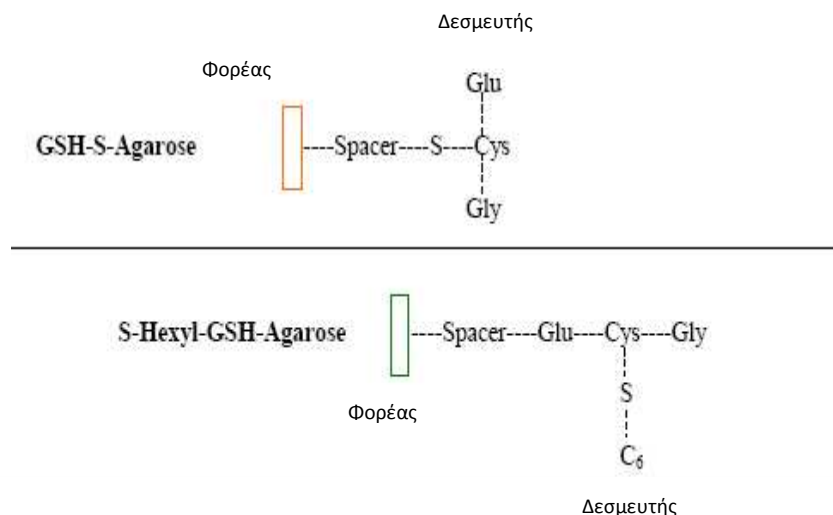


Εικόνα 2.2: Απεικόνιση της χρωματογραφίας ιοντοαναλλαγής, χρησιμοποιώντας κατιοανταλλάκτη και αρνητικά φορτισμένο μίγμα πρωτεϊνών.

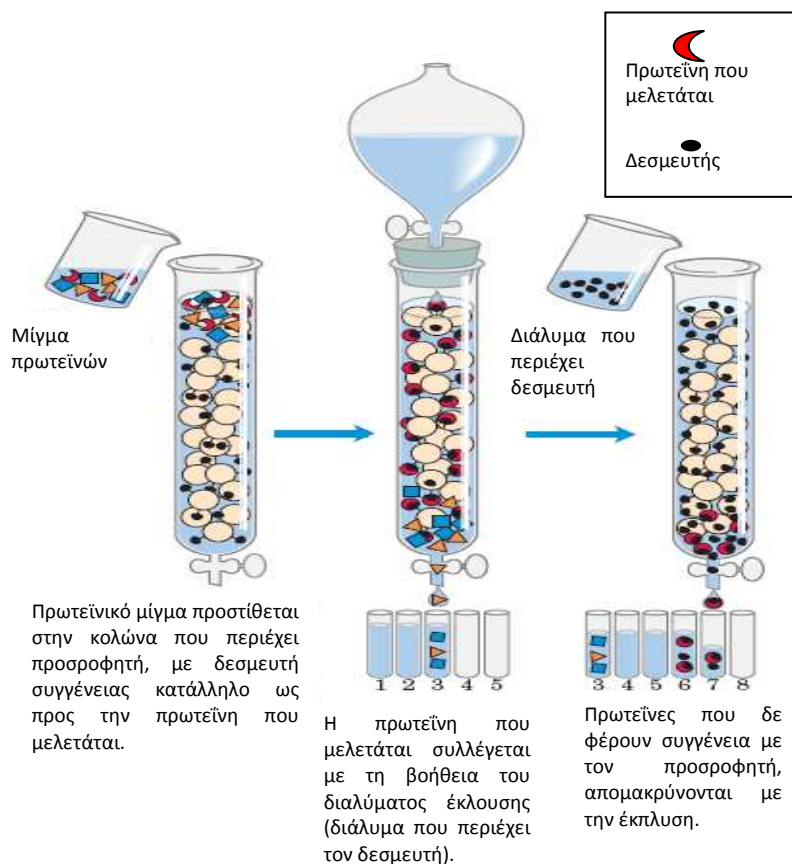
Οι πρωτεΐνες εκλύονται από την κολώνα ανάλογα από pH του διαλύματος που προστίθεται. Με τους κατιο-ανταλλάκτες, οι πιο αρνητικές πρωτεΐνες μετακινούνται και εκλύονται πιο γρήγορα.

Καθαρισμός του ενζύμου GST με χρωματογραφία συγγένειας

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου βασίζεται στη βιολογική συγγένεια, όπου στα ένζυμα εκφράζεται με την ικανότητα που διαθέτουν να αναγνωρίζουν και να δεσμεύουν με εκλεκτικό και αντιστρέψιμο τρόπο συγκεκριμένα μόρια-δεσμευτές (ligand). Αν κάποιος δεσμευτής δεσμευθεί χημικά (ακινητοποιηθεί) σε κατάλληλο πολυμερές στερεό υλικό (φορέας), τότε λαμβάνεται ο λεγόμενος προσροφητής συγγένειας. Σε ορισμένες περιπτώσεις, δεσμευτής και φορέας γεφυρώνονται χημικά από μόριο το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ τους και ονομάζεται βραχίονας (spacer).



Όταν ένα βιολογικό δείγμα που περιέχει μίγμα μακρομορίων περάσει από τη χρωματογραφική στήλη που φέρει τον προσροφητή τότε, τυπικά, μόνο το μακρομόριο που παρουσιάζει συγγένεια με τον δεσμευτή θα συγκρατηθεί (προσροφηθεί) στη στήλη, ενώ όλα τα άλλα μόρια θα απομακρυνθούν κατά το επόμενο στάδιο, της έκπλυσης. Ακολούθως, το προσροφημένο μακρομόριο εκλύεται υπό συνθήκες που εξασθενούν τις δυνάμεις μοριακής αναγνώρισης με το δεσμευτή, με αποτέλεσμα τη διάσπαση του συμπλόκου στη στήλη και την παραλαβή του μακρομορίου.



Εικόνα 2.3: Απεικόνιση της χρωματογραφίας συγγένειας, χρησιμοποιώντας κατάλληλο δεσμευτή ως προς την πρωτεΐνη που πρόκειται να μελετηθεί.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε προσροφητής 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρα-GSH- Sepharose-CL6B (Se-GSH), ο οποίος παρασκευάστηκε στο εργαστήριο. Για τη σύνθεσή της χρησιμοποιήθηκαν περίπου 20 g σφαιρίδια αγαρόζης (Sepharose CL6B), τα οποία είχαν πλυθεί με δις-απιονισμένο νερό (200 ml), και προστέθηκαν σε διάλυμα 0,6 M NaOH (20 ml) για να ενεργοποιηθεί η αγαρόζη. Ακολουθεί ήπια ανάδευση του μίγματος για 3 ώρες σε θερμοκρασία 25 °C. Στη συνέχεια στην ενεργοποιημένη αγαρόζη προστίθενται 4 ml 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρα (1,4-Butanediol diglycidyl ether) και η αντίδραση ολοκληρώνεται με μια δεύτερη ήπια ανάδευση για 2 ώρες στην ίδια θερμοκρασία. Επόμενο βήμα είναι η διήθηση και το πλύσιμο του αιωρήματος με δις-απιονισμένο νερό και στη συνέχεια η αγαρόζη προστίθεται σε διάλυμα γλουταθείου (400 μmol), το οποίο ήδη έχει διαλυθεί σε φωσφορικό διάλυμα 1 M Na₂HPO₄ pH 8 (10 ml). Το μίγμα αφήνεται για 3 ημέρες να αναδεύεται ήπια σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C)

και στη συνέχεια αφού ακολουθήσει διήθηση και πλύσιμο με δεκαπλάσιο όγκο δις-απιονισμένου νερού, αποθηκεύεται σε διάλυμα 20% αιθανόλης, στους 4°C.

Ο προσροφητής Se-GSH χρησιμοποιήθηκε σε στήλη 10 ml στους 4°C. Αρχικά η κολώνα εξισορροπήθηκε με 10 ml διαλύματος φωσφορικών 10 mM NaH₂PO₄ pH 7,0 και κατά τη διάρκεια του πειράματος με 10 mM NaH₂PO₄, 50 mM NaCl pH 7,0. Στη συνέχεια το ακάθαρτο ενζυμικό εκχύλισμα φορτώνεται στη στήλη και αφήνεται να περάσει μέσα από αυτήν. Στη συνέχεια πλένεται η κολώνα με το αντίστοιχο διάλυμα εξισορρόπησης και η διαδικασία συνεχίζεται με τις εκλούσεις, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε διάλυμα με σταθερή συγκέντρωση φωσφορικών (10 mM NaH₂PO₄), διάφορες συγκεντρώσεις στο NaCl και διαφορετικές κλασματώσεις στη συγκέντρωση της GSH. Το pH του διαλύματος κυμαινόταν από 7,0-7,5. Όπως και στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής έτσι και στη χρωματογραφία συγγένειας τα κλάσματα των εκλούσεων συλλέγονταν και μετρίονταν η ενζυμική δραστηριότητα με φωτομετρικό προσδιορισμό, χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα είτε το CDNB είτε το *Fluorodifen*. Μετά από κάθε χρήση για την αναγέννηση του προσροφητή χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 50 mM NaH₂PO₄, 1M NaCl pH 7,5 με σκοπό την αποδέσμευση όλων των αδέσμευτων πρωτεϊνών.

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

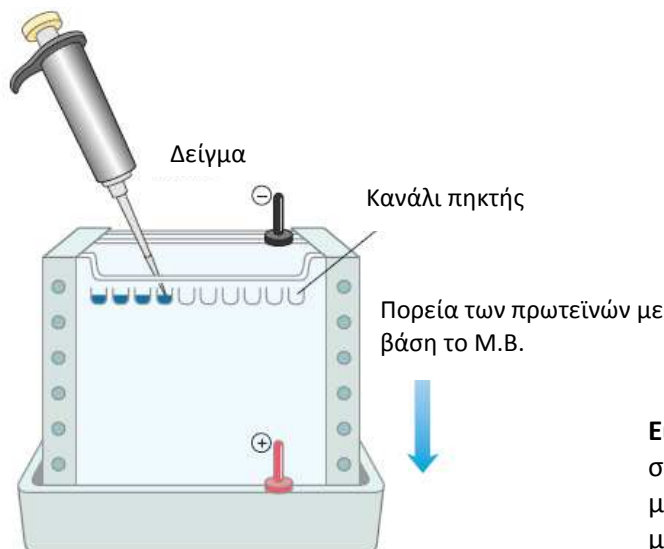
κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες

(SDS-PAGE)

Προετοιμασία του δείγματος

Σύμφωνα με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Πριν όμως την ηλεκτροφόρηση, κατάλληλος όγκος πρωτεϊνικού δείγματος (40 μg πρωτεΐνης) ακολουθεί την εξής διαδικασία: σε 1 ml δείγματος προστίθενται 10 μl δεοξυολικό νάτριο (DOC) 2% w/v. Το μίγμα

ανακατεύεται πολύ καλά, τοποθετείται στον πάγο και διατηρείται στους 4°C για 30 min. Στη συνέχεια προστίθενται 156 ml τριχλωρο-οξικό οξύ (TCA) 15,6 % v/v για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, ακολουθεί καλή ανάδευση και αφήνεται το μίγμα στους 4°C για όλη τη νύχτα. Ακολουθεί φυγοκέντριση του μίγματος στις 13 000 g για 40 min στους 4°C, αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται 1 ml παγωμένης ακετόνης (-20 °C). Ακολουθεί πάλι φυγοκέντριση στις ίδιες συνθήκες (13 000 g για 40 min στους 4°C) και αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο, το ίζημα διαλύεται σε 10 ml δις-απιονισμένο νερό με 10 ml χρωστική μπλε βρωμοκρεζόλης (0,02% w/v) και 10 ml μερκαπτοαιθανόλη. Το μίγμα θερμαίνεται για 2 λεπτά στους 80°C, ακολουθεί φυγοκέντριση στις 13 000g για 2 min στους 4°C και το πρωτεϊνικό δείγμα είναι έτοιμο να εισαχθεί στα κανάλια της πηκτής (εικόνα 2.4).



Εικόνα 2.4: Απεικόνιση της κάθετης συσκευής ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος, κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες.

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Κατά την ηλεκτροφόρηση σε ασυνεχή πηκτή πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιούνται δύο πηκτές πολυακρυλαμιδίου τοποθετημένες στη σειρά. Τα πρωτεϊνικά δείγματα εισάγονται στο σύστημα από την επάνω πηκτή, η οποία ονομάζεται πηκτή συσσώρευσης (stacking gel) και προκαλεί συσσώρευση σε στενές ζώνες του πρωτεϊνικού δείγματος πριν εισέλθει στη δεύτερη πηκτή. Η δεύτερη πηκτή ονομάζεται πηκτή διαχωρισμού (separating gel) και προκαλεί το διαχωρισμό του μίγματος των πρωτεϊνών.

Η ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1979) σε ασυνεχές σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων, των οποίων η σύσταση είναι η εξής:

<i>Ρυθμιστικό δ/μα ηλεκτροδίων:</i>	0,025 M Tris 0,192 M γλυκίνη 0,1% w/v SDS pH 8,3
<i>Ρυθμιστικό δ/μα πηκτής επιστοίβαξης:</i>	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
<i>Ρυθμιστικό δ/μα πηκτής διαχωρισμού:</i>	3,0 M Tris/HCl pH 8,8
<i>Διάλυμα ακρυλαμιδίου:</i>	30 g ακρυλαμίδιο (0,42 mol) & 0,8 g N,N-μεθυλενο-bis-ακρυλαμίδιο (5,2 mmol) διαλυμένα σε 100 ml νερού
<i>Διάλυμα SDS:</i>	10% w/v SDS
<i>Διάλυμα APS:</i>	1,5% υπερθειικό αμμώνιο w/v

Η διαδικασία παρασκευής της πηκτής διαχωρισμού και επιστοίβαξης είναι η ακόλουθη: ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (875 μl) αναμιγνύεται με διάλυμα SDS (70 μl) και διάλυμα ακρυλαμιδίου (2937,5 μl). Το διάλυμα αραιώνεται με προσθήκη δις-απιονισμένου νερού (2937,5 μl) και στη συνέχεια προσθέτονται υπερθειικό αμμώνιο APS (170 μl) και TEMED (6,25 μl) όπου το μίγμα αναδεύεται πολύ καλά με τη πιπέτα. Με την προσθήκη του TEMED αρχίζει ο πολυμερισμός, γι' αυτό και το διάλυμα εισάγεται αμέσως στη συσκευή μέσα σε 2 με 3 λεπτά προτού πήξει. Στη συνέχεια προστίθεται από πάνω διφασικό διάλυμα βουτανόλης – νερού για την απομάκρυνση του οξυγόνου και αφήνεται να πραγματοποιηθεί ο πολυμερισμός (30 min, 20-25°C). Αφού ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός,

απομακρύνεται το διάλυμα της βουτανόλης και αφού ξεπλυθεί με νερό η επιφάνεια της πηκτής, εισάγεται η πηκτή επιστοιβάξης. Η πηκτή επιστοιβάξης αντίστοιχα παρασκευάζεται ως εξής: ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοιβάξης (625 μl) αναμιγνύεται με διάλυμα SDS (50 μl) και διάλυμα ακρυλαμιδίου (625 μl). Το μίγμα αραιώνεται με προσθήκη νερού (3450 μl) και στη συνέχεια προσθέτονται APS (250 μl) και TEMED (6,25 μl). Πριν ξεκινήσει ο πολυμερισμός, στην κορυφή της πηκτής εισάγεται κατάλληλος υποδοχέας (χτένα) ώστε να δημιουργηθούν τα κανάλια-θέσεις εισαγωγής των δειγμάτων. Ο πολυμερισμός ολοκληρώνεται σε περίπου 30 min στους 25°C. Ακολούθως το πρωτεϊνικό δείγμα εισάγεται στα κανάλια της πηκτής και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε σταθερή ένταση 20 mA για κάθε πηκτή (20-25°C).

Βαφή με Coomassie Brilliant Blue R-250

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται μετά από ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης και μη μετουσίωσης. Μετά την ηλεκτροφόρηση η πηκτή εμβαπτίζεται σε υδατικό διάλυμα που περιέχει μεθανόλη (45% v/v), οξικό οξύ (7%v/v) και Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,25 – 1% w/v) όπου και επώαζεται για 30 min. Ο αποχρωματισμός της πηκτής πραγματοποιείται μετά από επώαση για 2 ώρες περίπου στο καθένα από τα παρακάτω δύο υδατικά διαλύματα:

- ◆ Μεθανόλη (40% v/v) και οξικό οξύ (7% v/v) (δ/μα αποχρωματισμού 1)
- ◆ Μεθανόλη (5% v/v) και οξικό οξύ (7% v/v) (δ/μα αποχρωματισμού 2)
- ◆

Βαφή με νιτρικό άργυρο (AgNO₃)

Η βαφή των πρωτεϊνικών ζωνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με νιτρικό άργυρο χρησιμοποιείται αντί της πιο απλής μεθόδου με Coomassie Brilliant Blue R-250 για τη μεγαλύτερη ευαισθησία της στην ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών. Οι

ποσότητες των πρωτεϊνών που μπορεί να ανιχνεύσει είναι μέχρι 1 ng έχοντας περίπου 100 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι με βάση το πρωτόκολλο της Invitrogen (Silver Quest-Silver Staining Kit) και είναι η εξής: αρχικά η πηκτή ακρυλαμιδίου εμβαπτίζεται σε διάλυμα που αποτελείται από 40% αιθανόλη και 10% οξικό οξύ και αφού θερμανθεί για 30 s, αναδεύεται καλά για 5 min προκειμένου να στερεωθούν οι ζώνες των πρωτεϊνών. Αφαιρείται το διάλυμα αυτό και η πηκτή εμβαπτίζεται σε υδατικό διάλυμα με 30% αιθανόλη, θερμαίνεται πάλι για 30 s και αναδεύεται για 5 min. Στη συνέχεια η πηκτή τοποθετείται σε υδατικό διάλυμα με 30% αιθανόλη και 10% sensitizer (διάλυμα που αυξάνει την ευαισθησία και δημιουργεί αντίθεση με τη βαφή) θερμαίνεται για 30 s και αναδεύεται για 2 min. Κατόπιν η πηκτή ξεπλένεται 2 φορές με απιονισμένο νερό (αφού θερμανθεί και αναδευτεί όπως προηγουμένως) και ακολουθεί εμβάπτιση αυτής σε 1% stainer (διάλυμα που προκαλεί την ένωση των ιόντων του αργύρου με τις πρωτεΐνες) με θέρμανση για 30 s και ανακίνηση για 5 min. Ακολουθεί ανάδευση της πηκτής σε απιονισμένο νερό για 1 λεπτό και εμβαπτίζεται σε διάλυμα με 10% developer (περιορίζει τα ιόντα του αργύρου σε μεταλλικό άργυρο στις πρωτεϊνικές ζώνες με αποτέλεσμα την εμφάνιση των ζωνών αυτών) και με μία σταγόνα developer enhancer όπου και ανακατεύεται για 5 min. Εφόσον οι πρωτεϊνικές ζώνες αποκτήσουν την επιθυμητή ένταση, η αντίδραση εμφάνισης σταματά με την προσθήκη 10% stopper (διάλυμα που δημιουργεί σύμπλοκα με κάθε ελεύθερο άργυρο και περιορίζει την περαιτέρω εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών) η πηκτή ξεπλένεται και φυλάσσεται σε απιονισμένο νερό.

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

σε μη μετουσιωτικές συνθήκες

(native PAGE)

Η τεχνική αυτή διαφέρει κατά πολύ με την ηλεκτροφόρηση SDS - PAGE. Στην SDS ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται το απορρυπαντικό SDS για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών, ενώ στη native PAGE οι πρωτεΐνες δεν υποβάλλονται σε καμία επεξεργασία, βρίσκονται στη φυσική τους κατάσταση. Μπορεί να χρησιμοποιηθούν κάποια απορρυπαντικά στην περίπτωση που πρέπει να γίνει λύση των κυττάρων και να ελευθερωθούν οι πρωτεΐνες. Στην native PAGE, τα σύμπλοκα των πρωτεϊνών παραμένουν όσο το δυνατό περισσότερο ενωμένα, όπως ακριβώς βρίσκονται στο κύτταρο.

Προετοιμασία του δείγματος

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πρωτεϊνών μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας. Η προετοιμασία που πραγματοποιήθηκε είναι η εξής: σε 800 μl δείγματος πρωτεϊνών προστίθενται 100 μl χρωστική (0,5 M Tris pH 6,8, glycerol (380 μl) και Bromophenol Blue). Το δείγμα αναδεύεται καλά και είναι έτοιμο να εισαχθεί στα κανάλια της ηλεκτροφόρησης.

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών μέσω native PAGE είναι παραπλήσια της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE, με κύρια διαφορά την απουσία του απορρυπαντικού SDS. Η native PAGE πραγματοποιήθηκε σε ασυνεχές σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων, των οποίων η σύσταση είναι η ακόλουθη:

Ρυθμιστικό δ/μα ηλεκτροδίων:

0,025 M Tris
0,192 M γλυκίνη
pH 8,3

<i>Ρυθμιστικό δ/μα πηκτής επιστοίβαξης:</i>	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
<i>Ρυθμιστικό δ/μα πηκτής διαχωρισμού:</i>	3,0 M Tris/HCl pH 8,8
<i>Διάλυμα ακρυλαμιδίου:</i>	30 g ακρυλαμίδιο (0,42 mol) & 0,8 g N,N-μεθυλενο-bis-ακρυλαμίδιο (5,2 mmol) διαλυμένα σε 100 ml νερού
<i>Διάλυμα APS:</i>	1,5% υπερθειικό αμμώνιο (w/v)

Η διαδικασία παρασκευής της πηκτής διαχωρισμού και επιστοίβαξης είναι η ακόλουθη: ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (875 μl) αναμιγνύεται με διάλυμα ακρυλαμιδίου (2348 μl). Το διάλυμα αραιώνεται με προσθήκη δις-απιονισμένου νερού (3572 μl) και στη συνέχεια προσθέτονται υπερθειικό αμμώνιο APS (170 μl) και TEMED (6,25 μl). Με την προσθήκη του TEMED αρχίζει ο πολυμερισμός, γι' αυτό και το διάλυμα εισάγεται αμέσως στη συσκευή μέσα σε 2 με 3 λεπτά προτού πήξει. Στη συνέχεια προστίθεται δις-απιονισμένο νερό για την απομάκρυνση του οξυγόνου και αφήνεται να πολυμεριστεί (30 min, 20-25°C). Αφού ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός, απομακρύνεται το δις-απιονισμένο νερό, εισάγεται η πηκτή επιστοίβαξης. Η πηκτή επιστοίβαξης αντίστοιχα παρασκευάζεται ως εξής: ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης (625 μl) αναμιγνύεται με διάλυμα ακρυλαμιδίου (625 μl). Το μίγμα αραιώνεται με προσθήκη νερού (3450 μl) και στη συνέχεια προσθέτονται APS (250 μl) και TEMED (6,25 μl). Πριν ξεκινήσει ο πολυμερισμός, στην κορυφή της πηκτής εισάγεται κατάλληλος υποδοχέας (χτένα) ώστε να δημιουργηθούν τα κανάλια-θέσεις εισαγωγής των δειγμάτων. Ο πολυμερισμός ολοκληρώνεται σε περίπου 30 min στους 25°C. Ακολούθως το πρωτεϊνικό δείγμα εισάγεται στα κανάλια της πηκτής και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε σταθερή ένταση 20 mA για κάθε πηκτή σε θερμοκρασία 4°C. Μετά την ηλεκτροφόρηση, η πηκτή ακρυλαμιδίου μπορεί να βαφτεί με νιτρικό άργυρο (silver staining).

Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων

σε πολυακρυλαμίδιο (2D-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση πρωτεϊνών που λαμβάνονται από κύτταρα, ιστούς ή άλλα βιολογικά δείγματα. Αυτή η μέθοδος διαχωρίζει τις πρωτεΐνες βασιζόμενη σε δύο ανεξάρτητα βήματα:

- Το πρώτο βήμα αφορά το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο, ενώ
- το δεύτερο βήμα το διαχωρισμό με βάση το μοριακό τους βάρος (M.B.).

Κάθε στίγμα (spot) που προκύπτει στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου μετά την 2D αντιστοιχεί σε ένα μοναδικό είδος της πρωτεΐνης του δείγματος (Εικόνα 2.5).

Προετοιμασία του δείγματος

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πρωτεϊνών μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας. Τα δείγματα αυτά υποβλήθηκαν σε διαπίδυση με δις-απιονισμένο νερό (4 lt) για 15-20 ώρες. Στη συνέχεια ακολουθεί δεύτερη διαπίδυση με δις-απιονισμένο για άλλες 3 ώρες και τα δείγματα τελικά υποβάλλονται σε λυοφιλίωση, αφού πρώτα ψύχονται με υγρό άζωτο. Με κατάλληλες συνθήκες πίεσεως και θερμοκρασίας, προκαλείται εξάχνωση του σχηματίζοντος πάγου και στα αφυδατωμένα δείγματα που παράγονται προστίθενται 200 μl από το διάλυμα λύσης (lysis buffer). Το διάλυμα αυτό περιλαμβάνει 7 M ουρία, 2 M θειουρία, 1% Triton, 50 mM DTT, 0,8% διάλυμα αμφολυτών pH 3-10, χρωστική Bromophenol blue και συμπληρώνεται μέχρι 1 ml δις-απιονισμένο νερό. Διάλυμα μαζί με δείγμα αναδεύονται πολύ καλά και το μίγμα υποβάλλεται σε φυγοκέντριση για 5 λεπτά, στις 13 000 g και είναι έτοιμο να εισαχθεί στην κασέτα (εικόνα 2.6).



Εικόνα 2.6 : η ZOOM IPG Runner κασέτα πάνω στην οποία φορτώνεται το δείγμα πρωτεϊνών και το strip. Το δείγμα προετοιμάζεται για την ισοηλεκτρική εστίαση.

Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη βασίστηκε στο πρωτόκολλο της Invitrogen και απαιτούνται δύο ημέρες για να ολοκληρωθεί.

Μέρα 1^η

Από τα 200 μl δείγματος φορτώθηκαν τα 156 μl σε ένα από τα έξι κανάλια της κασέτας (εικόνα 2.6). Στη συνέχεια προστίθεται το strip (pH 3-10) και καλύπτονται τα κενά της κασέτας με αυτοκόλλητα για να μην εξατμιστεί το διάλυμα και κρυσταλλοποιηθεί η ουρία. Η κασέτα αφήνεται σε επίπεδη επιφάνεια για 16 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Μέρα 2^η

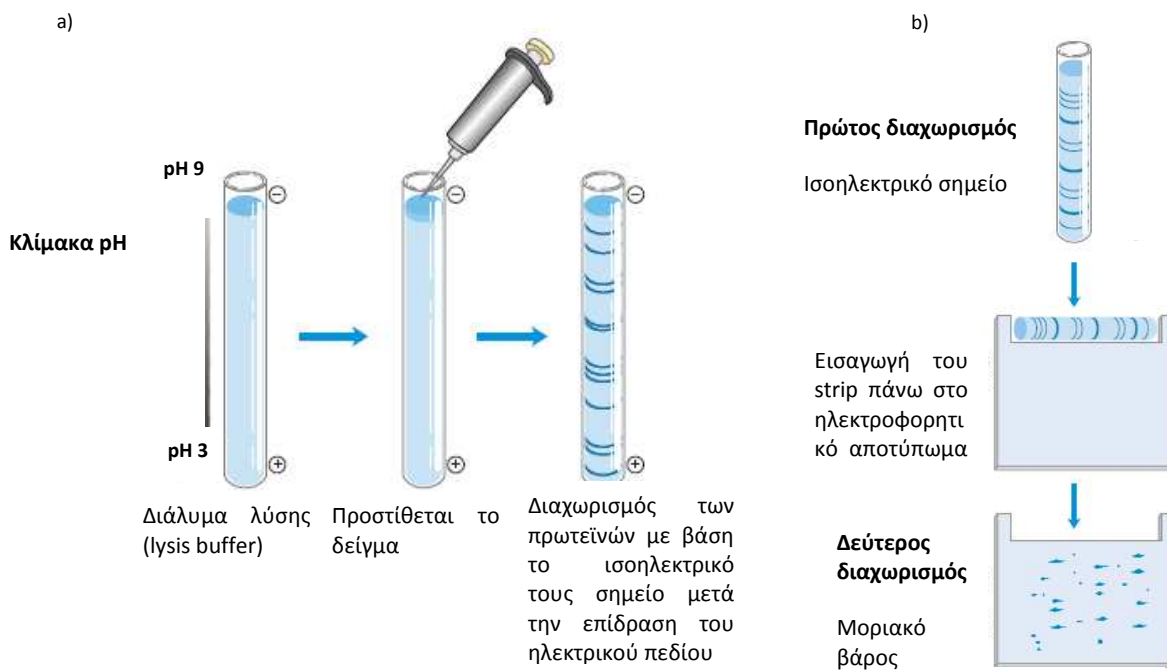
Την επόμενη ημέρα, αφού αφαιρεθούν τα αυτοκόλλητα από την κασέτα, αυτή τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή (ZOOM IPG Runner core) η οποία ενώνεται με τα ηλεκτρόδια και ξεκινάει ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (Εικόνα 2.5a). Η διαδικασία είναι η ακόλουθη:

VOLTAGE (mA)	TIME (min)
200	20
450	15
750	15
2000	45

Στη συνέχεια το strip τοποθετείται σε Falcon των 15 ml που περιέχει 10 ml διάλυμα εξισορρόπησης (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 6 M ουρία, 30% v/v γλυκερόλη, 2% w/v SDS, χρωστική Bromophenol blue και μέχρι 50 ml συμπληρώνεται με δις-απιονισμένο νερό) και 750 μ l από 1% DTT. Το strip αναδεύεται για 20 λεπτά.

Ταυτόχρονα, γίνεται η προετοιμασία για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Η διαδικασία που εφαρμόζεται είναι η ίδια με την αντίστοιχη της ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE, με τη διαφορά ότι στη θέση της βουτανόλης, που προστίθεται μετά το ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού, χρησιμοποιείται δις-απιονισμένο νερό. Όταν η πηκτή επιστοιβάξης πολυμεριστεί, εισάγεται στην κορυφή της το strip και συμπληρώνεται διάλυμα αγαρόζης (250 mg αγαρόζη σε 50 ml αραιωμένου 1/10 ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροδίων που χρησιμοποιείται στην ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE). Αφού πήξει η αγαρόζη, ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση σε σταθερή ένταση 20 mA στους 20-25 °C.

Μετά την ηλεκτροφόρηση, η πηκτή ακρυλαμιδίου μπορεί να βαφτεί είτε με νιτρικό άργυρο (silver staining) είτε με Coomassie Brilliant Blue R-250.



Εικόνα 2.5: Στη 2D ηλεκτροφόρηση ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται αρχικά a) με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (ισοηλεκτρική εστίαση) και στη συνέχεια b) με βάση το μοριακό τους βάρος (ηλεκτροφόρηση πηκτώματος - SDS).

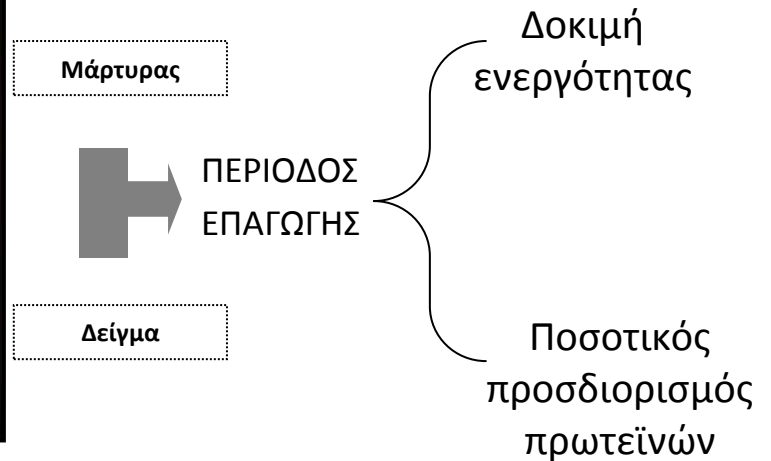
Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής αλληλουχίας

Ο προσδιορισμός της πρωτεϊνικής αλληλουχίας που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη έγινε από το Ινστιτούτο μεμβρανικής και συστηματικής βιολογίας του πανεπιστημίου του Leeds (U.K.).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μελέτη της επαγωγής του ενζύμου GST πριν & μετά τον ψεκασμό

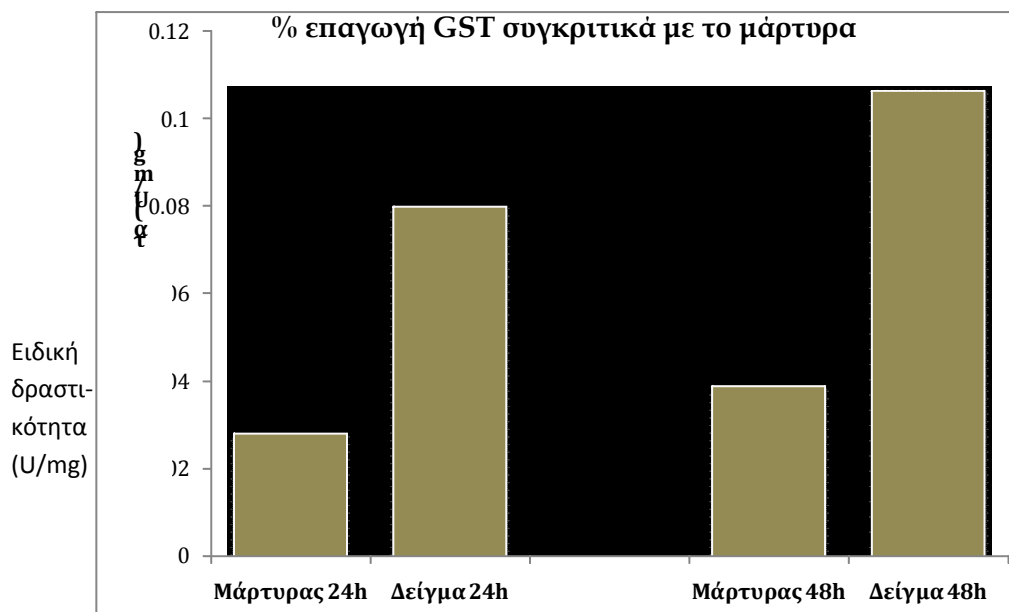


Εικόνα 4.1: Σχηματική αναπαράσταση για τη μελέτη της επαγωγής της μεταφοράς του γλουταθείου (GST) πριν (Μάρτυρας) και μετά (Δείγμα) τον ψεκασμό σε φύλλα φασολιού.

Κατά τη μελέτη της επαγωγής της μεταφοράς του γλουταθείου (GST) αρχικά προσδιορίστηκε το χρονικό πλαίσιο της επαγωγής της GST ύστερα από τον ψεκασμό με τη δραστική ουσία προκειμένου να υπολογιστεί η βέλτιστη περίοδος συγκομιδής των φυτών. Κατά τη διαδικασία αυτή φυτά φασολιού (Δ1,Δ2) ψεκάστηκαν με το ζιζανιοκτόνο Fusilade (δραστική ουσία: fluazifop-p-butyl) με αραιώση 1/250 και καλύφθηκαν με διαφανή μεμβράνη προκειμένου να αποφευχθεί η μόλυνση των φυτών-μαρτύρων από το ζιζανιοκτόνο. Φυτά-μάρτυρες (M1,M2) χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να υπολογιστεί η ενεργότητα υποβάθρου της μεταφοράς του γλουταθείου (background activity), τα οποία επίσης καλύφθηκαν με διαφανή μεμβράνη. Η ειδική δραστηριότητα της μεταφοράς του γλουταθείου στα δείγματα και τους μάρτυρες υπολογίστηκε ύστερα από 24 και 48 ώρες από τον ψεκασμό με τη μέθοδο του φωτομετρικού προσδιορισμού της ενζυμικής ενεργότητας και του ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών με τη φωτομετρική μέθοδο Bradford. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω στον Πίνακα 1. και στο Διάγραμμα 4.1:

Πίνακας 1. Απεικόνιση της ειδικής δραστικότητας (S.A.) της μεταφοράς του γλουταθείου στα εκχυλίσματα των φυτών μετά από 24 (M₁, Δ₁) και 48 ώρες (M₂, Δ₂) από τον ψεκασμό αντίστοιχα.

	S.A. (U/mg)
M ₁	0,028
Δ ₁	0,085
M ₂	0,039
Δ ₂	0,100



Διάγραμμα 4.1. Απεικόνιση της ειδικής δραστικότητας της μεταφοράς του γλουταθείου στα εκχυλίσματα των φυτών 24h και 48h ύστερα από ψεκασμό με το ζιζανιοκτόνο *Fusilade*.

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα η % επαγωγή της μεταφοράς του γλουταθείου (GST) συγκριτικά με το μάρτυρα είναι μεγαλύτερη στα φυτά με περίοδο επαγωγής 24 ώρες (285%) σε σχέση με αυτά με περίοδο επαγωγής 48 ωρών (273%). Αυτό είναι, κατά πάσα πιθανότητα, ενδεικτικό της βραχύβιας περιόδου επαγωγής της GST, όπου μέσα σε 24 ώρες ύστερα από τον ψεκασμό παρουσιάζεται μια σημαντική αύξηση (επαγωγή) της ενεργότητας της GST, πιθανότατα για να επιτελέσει τον αποτοξινωτικό της ρόλο μέσα στο φυτό δηλαδή στην αποδόμηση του φυτοφαρμάκου, η οποία όμως ξεκινά να φθίνει μετά τις 24-48 ώρες προκειμένου να επιστρέψει στα φυσιολογικά επίπεδα. Επομένως, στα επακόλουθα πειράματα, προκειμένου να συλλέξουμε τη μέγιστη δυνατή ποσότητα επαγόμενης GST, χρησιμοποιήθηκαν φυτικά εκχυλίσματα του μάρτυρα και του ψεκασμένου φυτού (crude) ύστερα από επαγωγή 24 ωρών.

Ακολούθως, τα φυτικά εκχυλίσματα υπεβλήθησαν σε διαπίδυση προκειμένου να επιτευχθεί η αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος σε αυτό που θα χρησιμοποιηθεί κατά τα επόμενα χρωματογραφικά στάδια.

Χρωματογραφικός καθαρισμός του ενζύμου μεταφοράσης του γλουταθείου (GST)

Βασικός στόχος αυτής της μελέτης αποτελεί ο ποιοτικός καθώς και ποσοτικός προσδιορισμός των επαγόμενων ενεργοτήτων μεταφοράσης του γλουταθείου, δηλαδή της μελέτης της επαγωγής διαφορετικών ισοτύπων GST κατά τον ψεκάσμο των φυτών με το ζιζανιοκτόνο Fusilade. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό είναι απαραίτητος ο καθαρισμός των επαγόμενων ενζύμων GST. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικού τύπου χρωματογραφίες: η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (στον προσροφητή Q- Sepharose) και η χρωματογραφία συγγένειας (στον προσροφητή Se-GSH).

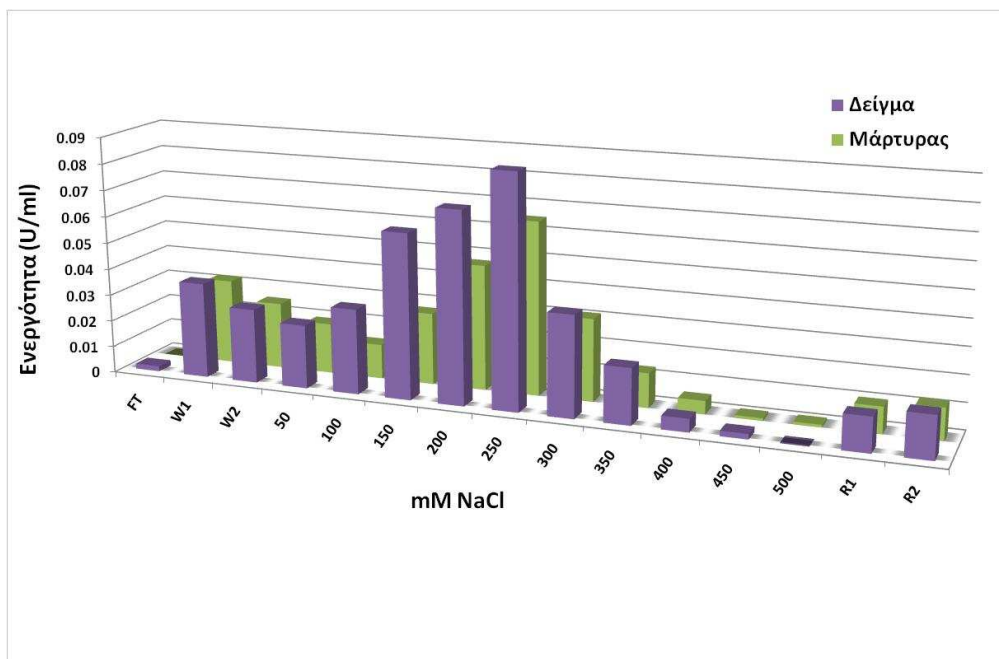
Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής με τον προσροφητή Q- Sepharose CL-6B

Η μέθοδος της χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής χρησιμοποιείται για την κλασμάτωση των μορίων με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο. Οι χρησιμοποιούμενοι για τον καθαρισμό πρωτεϊνών ιοντοανταλλάκτες αποτελούνται από αδιάλυτο στο νερό υλικό (το πολυμερές αгарόζη), πάνω στο οποίο βρίσκονται ομοιοπολικά συνδεδεμένες οι φορτισμένες ομάδες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν αντιστρεπτά από το περιβάλλον τους, με ηλεκτροστατικές δυνάμεις, ιόντα και πρωτεΐνες αντίθετου φορτίου. Ο ιοντοαντάλλακτης Q-Sepharose είναι φορτισμένος αρνητικά και κατά συνέπεια δεσμεύει πρωτεΐνες θετικού φορτίου.

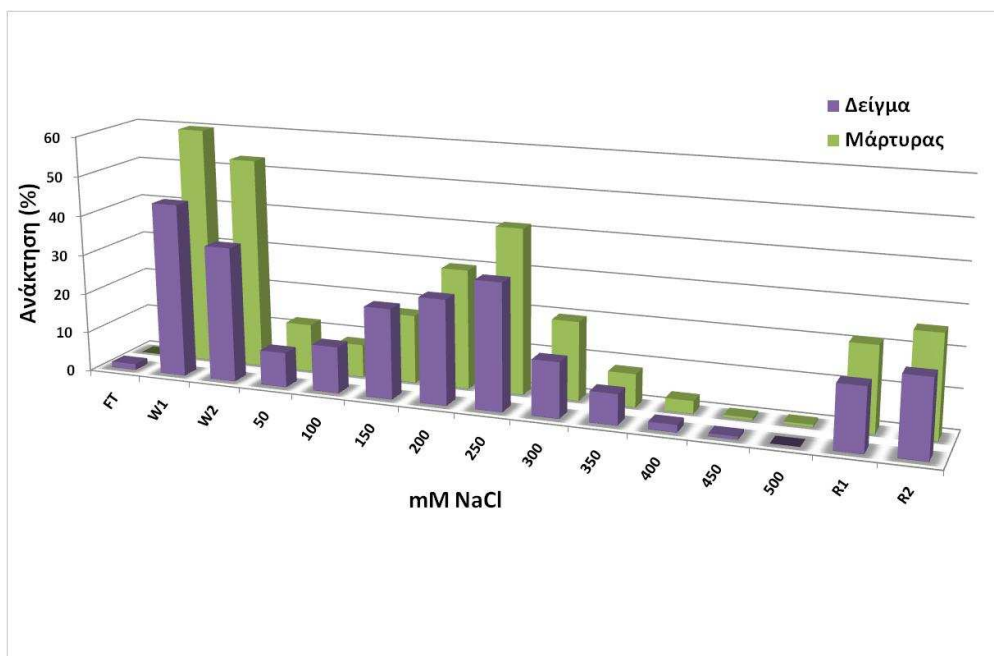
Πριν τον καθαρισμό του ενζύμου GST, τα ενζυμικά εκχυλίσματα του μάρτυρα και του δείγματος υποβλήθηκαν σε διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM NaH₂PO₄ pH 7,5 για 17-20 ώρες.

Στη συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία καθαρισμού του ενζύμου GST με τη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, χρησιμοποιώντας κολώνα με προσροφητή Q-Sepharose. Αρχικά, η κάθε κολώνα εξισορροπήθηκε με 10 ml διαλύματος φωσφορικών 20 mM NaH_2PO_4 pH 7,5. Στη συνέχεια το ακάθαρτο ενζυμικό εκχύλισμα του μάρτυρα και του δείγματος φορτώθηκαν στην κάθε στήλη ξεχωριστά, ακολούθησε έκπλυση της κολώνας με το διάλυμα εξισορρόπησης και στη συνέχεια έκλουση των δεσμευμένων πρωτεϊνών (10 x 1,5 ml) με διάλυμα 20 mM NaH_2PO_4 pH 7,5 που εμπεριείχε διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος (E1: 50 mM NaCl, E2: 100 mM NaCl, E3: 150 mM NaCl, E4: 200 mM NaCl, E5: 250 mM NaCl, E6: 300 mM NaCl, E7: 350 mM NaCl, E8: 400 mM NaCl, E9: 450 mM NaCl & E10: 500 mM NaCl). Η αναγέννηση του ιοντοανταλλάκτη επιτεύχθει με διάλυμα 50 mM NaH_2PO_4 , 1 M NaCl pH 7,5 με σκοπό την αποδέσμευση όλων των αδέσμευτων πρωτεϊνών (1 x 5 ml). Τα κλάσματα των εκλούσεων συλλέχθηκαν και υπολογίστηκε η ενεργότητα καθώς και η % ανάκτηση του ενζύμου GST, χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα το CDNB και το ζιζανιοκτόνο Fluorodifen. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Διάγραμμα 4.2:

(α)



(β)



Διάγραμμα 4.2. Απεικόνιση της ενεργότητας της μεταφοράς του γλουταθείου στο μάρτυρα και στο δείγμα, μετά από χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής με Q-Sepharose με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (50 – 500 mM), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το CDNB (α) και το ζιζανιοκτόνο Fluorodifen (β). FT: Μη προσροφημένο κλάσμα, W1/W2: εκπλύσεις, R1/R2: κλάσματα αναγέννησης.

Στα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται η ενεργότητα του ενζύμου στο μάρτυρα και στο δείγμα μετά τη χρωματογραφία. Κατά τον προσδιορισμό της ενεργότητας της GST χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το CDNB, παρατηρούνται δύο μέγιστα έκλυσης (peaks), που παρουσιάζονται στην έκλυση 250 mM NaCl και στην έκλυση αναγέννησης R2. Είναι πιθανόν αυτό να αποτελεί μια ένδειξη της ύπαρξης δύο διαφορετικών ενεργοτήτων μεταφοράς του γλουταθείου, με υπόστρωμα το CDNB, με διαφορετική ικανότητα πρόσδεσης στον προσροφητή. Κατά το φωτομετρικό προσδιορισμό της ενεργότητας GST χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το ζιζανιοκτόνο Fluorodifen ένα παρόμοιο μοτίβο ενεργότητας εμφανίστηκε.

Λόγω της μεγάλης αραίωσης του ενζύμου στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, είναι δύσκολη η μελέτη, γι αυτό το λόγο το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε στα μετέπειτα πειράματα απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας.

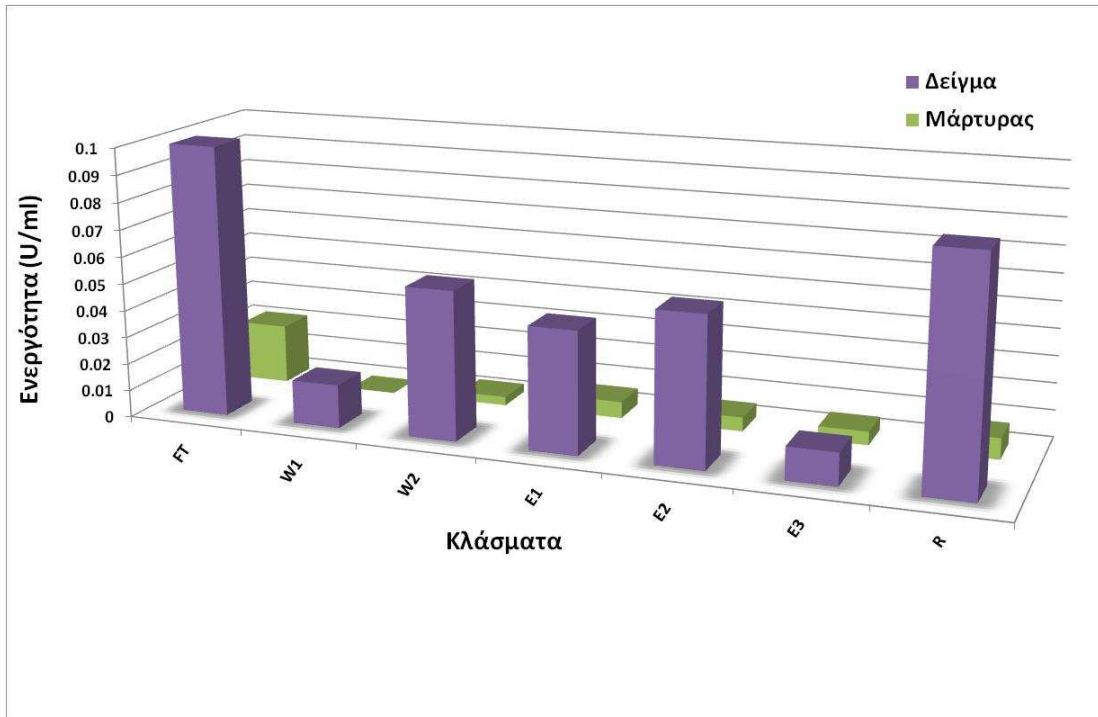
Καθαρισμός ενζύμου με χρωματογραφία συγγένειας με τον προσροφητή Se-GSH

Ο καθαρισμός μιας πρωτεΐνης από ένα μίγμα πρωτεϊνών μπορεί να επιτευχθεί με βάση την εξειδικευμένη και αντιστρεπτή δέσμευσή της, πάνω σε μόρια-δεσμευτές (ligands) που βρίσκονται καθηλωμένα πάνω σε αδρανές υλικό χρωματογραφίας. Μόρια που είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν για το διαχωρισμό πρωτεϊνών είναι το υπόστρωμα ή ένα ανάλογο του υποστρώματος ενός ενζύμου, ένα συνένζυμο, ένας αναστολέας ή ακόμη μια άλλη πρωτεΐνη που δεσμεύεται στην πρωτεΐνη που μελετάται. Στο πείραμα συγκεκριμένα, η GST περνώντας από τον προσροφητή, δεσμεύεται από την ακινητοποιημένη γλουταθειόνη, η οποία αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου. Οι λοιπές πρωτεΐνες που δε χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα το γλουταθείο, δε δεσμεύονται στη στήλη.

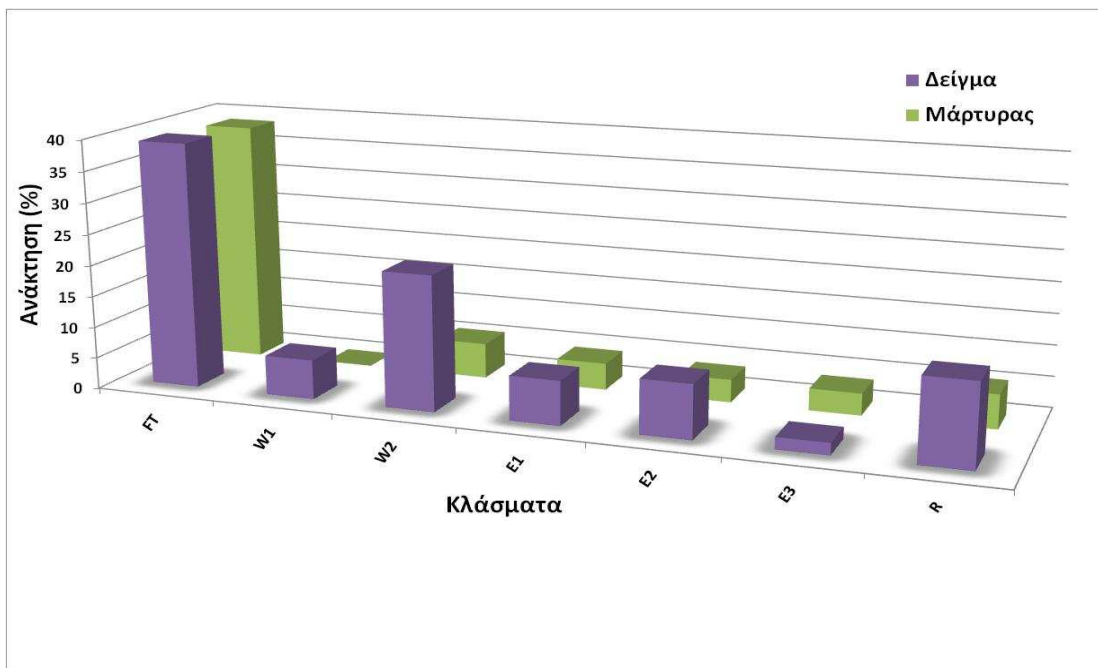
Μετά τη διαπίδυση των ακάθαρτων ενζυμικών εκχυλισμάτων του μάρτυρα και του δείγματος σε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM NaH₂PO₄ pH 7,0 για 17-20 ώρες, ακολουθεί ο καθαρισμός του ενζύμου GST σε χρωματογραφία συγγένειας, χρησιμοποιώντας ως 1 ml προσροφητή Se-GSH. Αρχικά η κάθε κολώνα εξισορροπήθηκε με 10 ml διαλύματος φωσφορικών (10mM NaH₂PO₄, pH 7,0). Μετά τη φόρτωση του ενζύμου (5 ml για τον μάρτυρα και για το δείγμα αντίστοιχα) στη στήλη, έγινε πλύση του προσροφητή με 10 ml του ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης (10 mM NaH₂PO₄, pH 7,0) για την απομάκρυνση μη προσροφημένου υλικού και χαλαρά συνδεδεμένων πρωτεϊνών. Για τις εκλούσεις (3 x 2 ml), χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 10 mM NaH₂PO₄ με σταθερές συγκεντρώσεις GSH (10 mM) και NaCl (0,2 M) pH 7,0. Τέλος ο χρησιμοποιούμενος ανταλλάκτης αναγεννάται με διάλυμα 50 mM NaH₂PO₄, 1M NaCl pH 7,5 με σκοπό την αποδέσμευση όλων των αδέσμευτων πρωτεϊνών (1 x 2 ml).

Στη συνέχεια, μετά το χρωματογραφικό καθαρισμό, υπολογίστηκε η ενεργότητα καθώς και η % ανάκτηση της ενζυμικής ενεργότητας της μεταφοράσης του γλουταθείου στα κλάσματα έκλυσης, στον μάρτυρα και στο δείγμα αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το CDNB. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται παρακάτω στο Διάγραμμα 4.3:

(α)

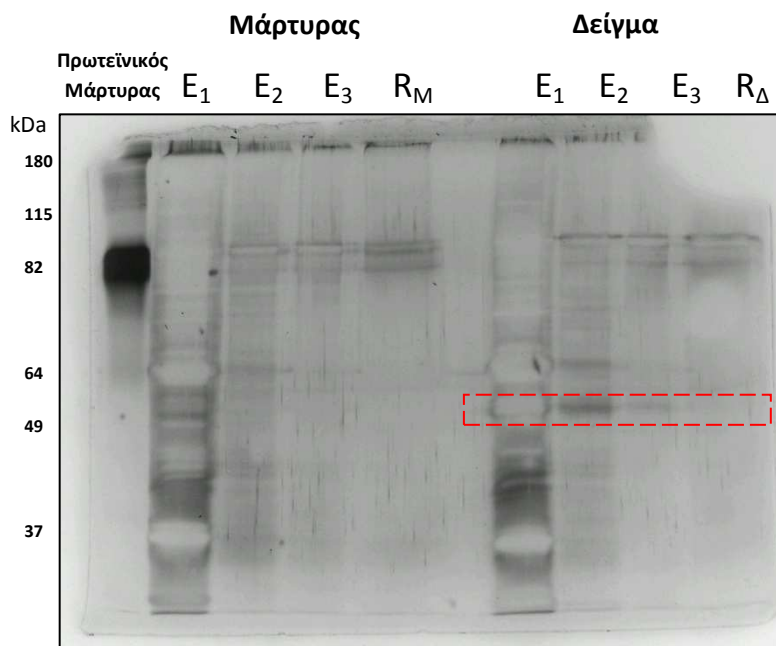


(β)



Διάγραμμα 4.3. Απεικόνιση της ενεργότητας της μεταφοράς του γλουταθείου (α) και της % ανάκτησης (β) στο μάρτυρα και στο δείγμα μετά από χρωματογραφία συγγένειας Se-GSH. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση, ήταν το CDNB. FT: Μη προσροφημένο κλάσμα, W1/W2: εκπλύσεις, E1/E2/E3: διαδοχικές έκλουσεις 10 mM GSH, R: κλάσμα αναγέννησης.

Παρατηρείται ξεκάθαρα από τα παραπάνω διαγράμματα η επαγωγή του ενζύμου GST στα ψεκασμένα δείγματα. Για επιβεβαίωση της καθαρότητας των πρωτεϊνικών δειγμάτων μετά το χρωματογραφικό καθαρισμό, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS σε πηκτή ακρυλαμιδίου, μετά από χρώση αργύρου (silver staining) για την καλύτερη ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο πρωτεϊνικός μάρτυρας (εύρος 6-180 kDa), ενώ τα πρωτεϊνικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εκλούσεις και η αναγέννηση του μάρτυρα και του δείγματος αντίστοιχα. Συγκρίνοντας τα ηλεκτροφορητικά αποτυπώματα του μάρτυρα και του δείγματος σε πηκτή ακρυλαμιδίου (Σχήμα 4.4) παρατηρήθηκε μια πρωτεϊνική ζώνη (κόκκινη περιοχή) στις εκλούσεις-αναγέννηση του δείγματος που έλειπε από τα πρωτεϊνικά δείγματα του μάρτυρα υποδηλώνοντας την επαγωγή του ενζύμου GST στα ψεκασμένα φύλλα φασολιού συγκριτικά με τα φύλλα του μάρτυρα.



Σχήμα 4.4. Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα σε πηκτή ακρυλαμιδίου (12,5% w/v) παρουσία SDS, των εκλούσεων και της αναγέννησης του μάρτυρα - δείγματος μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας με χρήση του προσροφητή Se-GSH. **Θέσεις E₁, E₂, E₃:** οι εκλούσεις του μάρτυρα και του δείγματος αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας το διάλυμα 10 mM NaH₂PO₄ με σταθερές συγκεντρώσεις GSH (10 mM) και NaCl (0,2 M) pH 7,0. **Θέσεις R_M, R_Δ:** η αναγέννηση του μάρτυρα και του δείγματος αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας για διάλυμα 50 mM NaH₂PO₄ και 1 M NaCl pH 7,5. Η κόκκινη περιοχή υποδηλώνει την επαγωγή του ενζύμου GST στα ψεκασμένα φύλλα με ζιζανιοκτόνο *Fusilade* σε σχέση με τα φύλλα του μάρτυρα. Το ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα έχει υποστεί χρώση με AgNO₃.

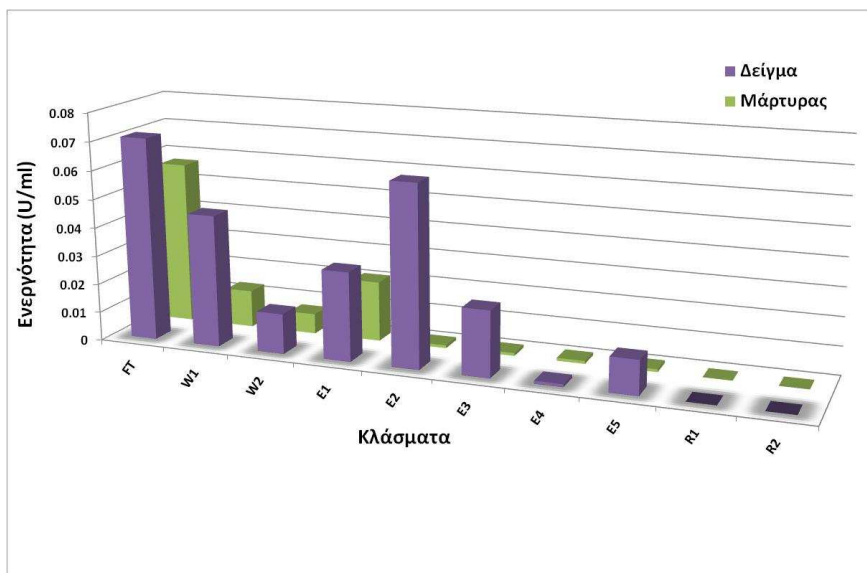
Κρίνοντας από το Σχήμα 4.4 σημαντική ποσότητα του ενζύμου δεν δεσμεύεται από τον προσροφητή πιθανότατα λόγω κάλυψης θέσεων δέσμευσης στον προσροφητή από άλλες πρωτεΐνες (non-specific binding). Για τη βελτίωση των συνθηκών δέσμευσης του ενζύμου και της αποφυγής μη ειδικής δέσμευσης άλλων πρωτεϊνών στον προσροφητή χρησιμοποιήθηκε NaCl στο διάλυμα εξισορρόπησης της κολώνας Se-GSH, για τον μάρτυρα και το δείγμα αντίστοιχα.

Χρωματογραφία συγγένειας με τον προσροφητή Se-GSH με χρήση NaCl στο δ/μα εξισορρόπησης

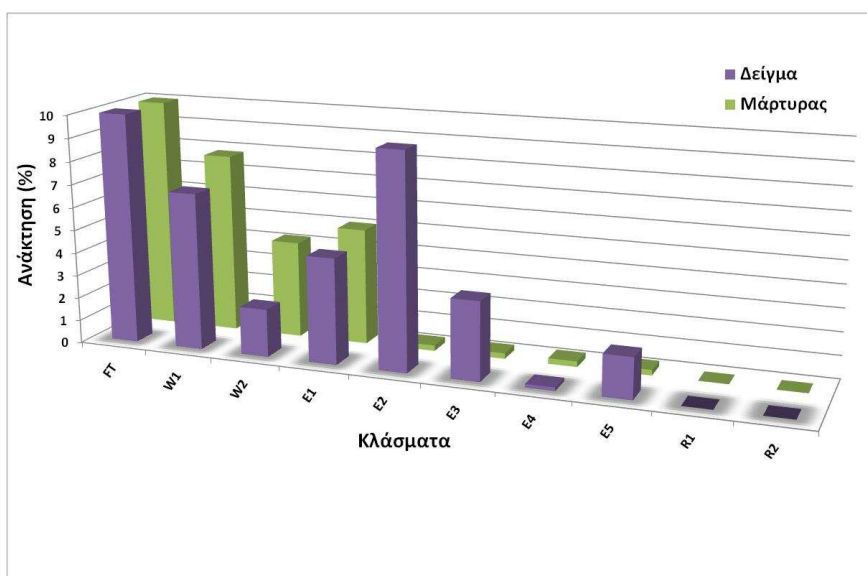
Ο χρωματογραφικός καθαρισμός του ενζύμου GST επαναλήφθηκε με την προσθήκη NaCl στο διάλυμα εξισορρόπησης αφού πρώτα προηγήθηκε διαπίδυση των ακάθαρτων ενζυμικών εκχυλισμάτων του μάρτυρα και του δείγματος σε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM NaH₂PO₄ με pH 7,0 για 17-20 ώρες. Για τον καθαρισμό του ενζύμου GST σε χρωματογραφία συγγένειας, χρησιμοποιήθηκε 1 ml προσροφητή Se-GSH, σε δύο ξεχωριστές κολώνες. Η κάθε κολώνα εξισορροπήθηκε με 10 ml διαλύματος φωσφορικών 10 mM NaH₂PO₄ και 50 mM NaCl, pH 7,0. Μετά τη φόρτωση του ενζύμου, στη στήλη, έγινε πλύση του προσροφητή με 10 ml του ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης. Για τις εκλούσεις (5 x 2 ml για τον μάρτυρα και 5 x 5 ml για το δείγμα), χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 10 mM NaH₂PO₄ με σταθερές συγκεντρώσεις γλουταθείου GSH (10 mM) και άλατος NaCl (50 mM) pH 7,0. Τέλος ο χρησιμοποιούμενος ιοντοανταλλάκτης αναγεννήθηκε με διάλυμα 50 mM NaH₂PO₄, 1M NaCl pH 7,5 με σκοπό την αποδέσμευση όλων των αδέσμευτων πρωτεϊνών (1 x 2 ml).

Στη συνέχεια, μετά το χρωματογραφικό καθαρισμό, μετρήθηκε η ενεργότητα καθώς και η % ανάκτηση της ενεργότητας του ενζύμου στα κλάσματα του μάρτυρα και του δείγματος, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το CDNB. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στο Διάγραμμα 4.5:

(α)

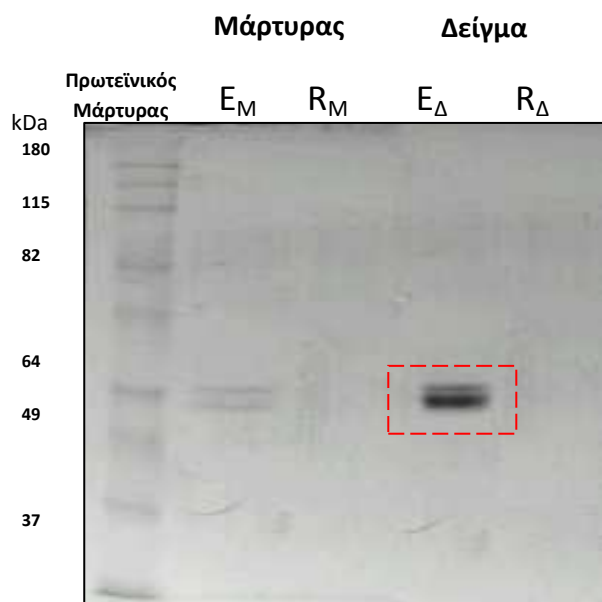


(β)



Διάγραμμα 4.5. Απεικόνιση της ενεργότητας της μεταφοράσης του γλουταθείου (α) και της % ανάκτησης (β) στο μάρτυρα και στο δείγμα, ύστερα από χρήση NaCl στο διάλυμα εξισορρόπησης σε χρωματογραφία συγγένειας Se-GSH (χρήση υποστρώματος CDNB). FT: Μη προσροφημένο κλάσμα, W1/W2: εκπλύσεις, E1/E2/E3: διαδοχικές έκλουσεις 10 mM GSH, R1/R2: κλάσματα αναγέννησης.

Μετά το χρωματογραφικό καθαρισμό, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS σε πηκτή ακρυλαμιδίου. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο πρωτεϊνικός μάρτυρας (εύρος 6-180 kDa), ενώ τα πρωτεϊνικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι τρεις πρώτες εκλούσεις του μάρτυρα και η 2η έκλουση του δείγματος αντίστοιχα (E) καθώς και τα κλάσματα αναγέννησης (R). Το ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα φαίνεται παρακάτω, στο Σχήμα 4.6:



Σχήμα 4.6. Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα σε πηκτή ακρυλαμιδίου (12,5% w/v) παρουσία SDS, των εκλούσεων και της αναγέννησης του μάρτυρα και του δείγματος αντίστοιχα, μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας με τη χρήση προσροφητή Se-GSH . **Θέσεις E_M, E_Δ :** οι εκλούσεις του μάρτυρα και του δείγματος αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας διάλυμα έκλουσης 10 mM NaH_2PO_4 , 10 mM GSH και 50 mM NaCl pH 7,0. **Θέσεις R_M, R_Δ :** η αναγέννηση του μάρτυρα και του δείγματος αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας για διάλυμα 50 mM NaH_2PO_4 και 1M NaCl pH 7,5. Στην κόκκινη περιοχή παρατηρείται μία πρωτεϊνική ζώνη που δεν εμφανίζεται στα φύλλα του μάρτυρα.

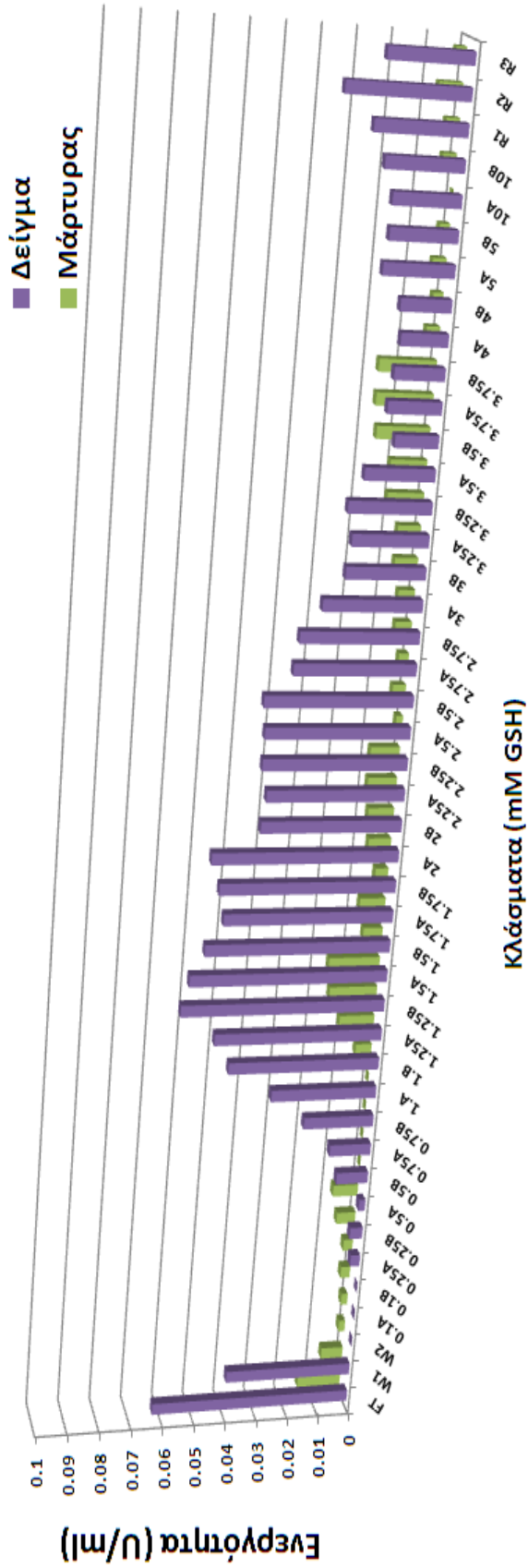
Είναι φανερό, επίσης, ότι η χρήση NaCl στο διάλυμα εξισορρόπησης της κολώνας Se-GSH βελτίωσε σημαντικά τις συνθήκες δέσμευσης του ενζύμου. Σύμφωνα με το χρωματογράφημα (Διάγραμμα 4.5) παρατηρείται εμφανής επαγωγή του ενζύμου GST παρουσία ζιζανιοκτόνου στα φύλλα του φασολιού. Το ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα των εκλούσεων του μάρτυρα (Διάγραμμα 4.6) αποκαλύπτει την ύπαρξη δύο πρωτεϊνικών ζωνών στο προβλεπόμενο μοριακό βάρος των 26-29 kDa (ενεργότητα GST υποβάθρου), ενώ πιο σημαντικό είναι η διαφορική επαγωγή ισοτύπων της GST κατά τον ψεκασμό των φύλλων του φασολιού όπως αποκαλύπτεται από την εμφάνιση μιας επιπρόσθετης, επαγόμενης πρωτεϊνικής ζώνης με ενδιάμεσο μοριακό βάρος στην έκλυση του δείγματος. Προκειμένου να μελετήσουμε εις βάθος την επαγωγή διαφορετικών ισοτύπων GST και την απομόνωση μεμονωμένων ισοτύπων χρειάστηκε να βελτιώσουμε τη διαχωριστική ικανότητα του χρωματογραφικού καθαρισμού.

*Χρωματογραφία συγγένειας με τον
προσοροφητή Se-GSH: βελτιστοποίηση
των συνθηκών έκλουσης*

Για την ποιοτική και ποσοτική μελέτη των επαγόμενων, από το ζιζανιοκτόνο *Fusilade*, ισοενζύμων GST πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία συγγένειας Se-GSH, χρησιμοποιώντας πρανές συγκέντρωσης γλουταθείου GSH (0,1 mM – 10 mM) κατά τις εκλούσεις. Με αυτόν τον τρόπο κατέστη δυνατή η αύξηση της διαχωριστικής ικανότητας του χρωματογραφικού καθαρισμού.

Κατά τη χρωματογραφία συγγένειας Se-GSH η στήλη χρωματογραφίας που εμπεριείχε τον προσροφητή εξισορροπήθηκε με 10 ml διαλύματος φωσφορικών 10 mM NaH_2PO_4 , 50 mM NaCl, pH 7,0. Ύστερα από τη φόρτωση του ενζύμου, ακολούθησε έκπλυση του προσροφητή με 10 ml του ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης και στη συνέχεια ακολούθησαν οι εκλούσεις [22 x (1+1) ml για τον μάρτυρα και το δείγμα], όπου (1+1) ml σημαίνει πως από το διάλυμα έκλουσης φορτώνονται αρχικά 1 ml (π.χ. έκλυση 0.1 A) και στη συνέχεια 1 ml από την ίδια συγκέντρωση (π.χ. έκλυση 0.1B). Τέλος, ο χρησιμοποιούμενος προσροφητής αναγεννήθηκε με διάλυμα 50 mM NaH_2PO_4 , 1M NaCl pH 7,5 (3 x 2 ml) με σκοπό την αποδέσμευση όλων των αδέσμευτων πρωτεϊνών.

Μετά το χρωματογραφικό καθαρισμό, μετρήθηκε η ενεργότητα των κλασμάτων του μάρτυρα και του δείγματος, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το CDNB. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στο Διάγραμμα 4.7:

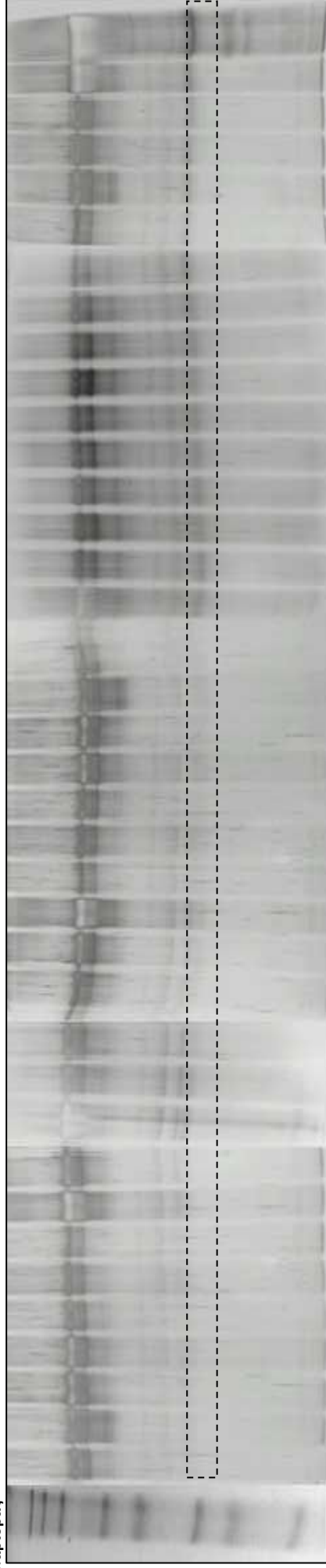


Διάγραμμα 4.7. Απεικόνιση της ενεργότητας (U/ml) της μεταφοράσης του γλουταθείου στο μάρτυρα και στο δείγμα ύστερα από χρωματογραφία συγγένειας Se-GSH. Η έκλουση επιτεύχθηκε με τη χρήση βαθμιαία αυξανόμενων συγκεντρώσεων GSH. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για το φωτομετρικό προσδιορισμό της ενζυμικής ενεργότητας είναι το CDNB. FT: Μη προσροφημένο κλάσμα, W1/W2: εκλύσεις, E: διαδοχικές εκλύσεις μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης GSH, R: κλάσματα αναγέννησης.

Πρωτεϊνικός
Μάρτυρας

0.1A 0.1B 0.25A 0.25B 0.5A 0.5B 0.75A 0.75B 1A 1B 1.25A 1.25B 1.5A 1.5B 1.75A 1.75B 2A 2B 2.25A 2.25B 2.5A 2.5B 2.75A 2.75B 3A 3B 3.25A 3.25B 3.5A 3.5B 3.75A 3.75B 4A 4B 5A 5B 10 R

kDa
180
115
82
64
49
37
26
19
15
6

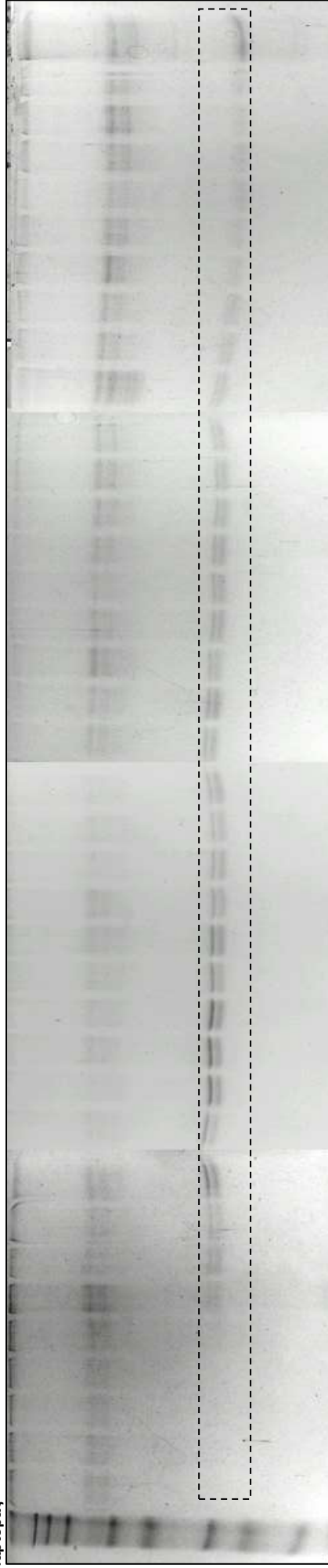


Σχήμα 4.8. Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα σε πηκτή ακρυλαμίδιου (12,5% w/v) παρουσία SDS των 37 εκλούσεων του και της αναγέννησης μάρτυρα ύστερα από χρωματογραφία συγγένειας στον προσροφητή Se-GSH. Το διάλυμα έκλουσης ήταν 10 mM NaH_2PO_4 , με μεταβαλλόμενη τη συγκέντρωση του γλουταθείου GSH (0,1 mM – 10 mM) & 50 mM NaCl pH 7,0, ενώ της αναγέννησης 50 mM NaH_2PO_4 , 1 M NaCl pH 7,5.

Πρωτεϊνικός
Μάρτυρας

0.1A 0.1B 0.25A 0.25B 0.5A 0.5B 0.75A 0.75B 1A 1B 1.25A 1.25B 1.5A 1.5B 1.75A 1.75B 2A 2B 2.25A 2.25B 2.5A 2.5B 2.75A 2.75B 3A 3B 3.25A 3.25B 3.5A 3.5B 3.75A 3.75B 4A 4B 5A 5B 10 R

kDa
180
115
82
64
49
37
26
19
15
6



Σχήμα 4.9. Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα σε πηκτή ακρυλαμίδιου (12,5% w/v) παρουσία SDS των 37 εκλούσεων και της αναγέννησης του δείγματος ύστερα από χρωματογραφία συγγένειας στον προσροφητή Se-GSH. Το διάλυμα έκλουσης ήταν 10 mM NaH_2PO_4 , με μεταβαλλόμενη τη συγκέντρωση του γλουταθείου GSH (0,1 mM – 10 mM) & 50 mM NaCl pH 7,0, ενώ της αναγέννησης 50 mM NaH_2PO_4 , 1 M NaCl pH 7,5.

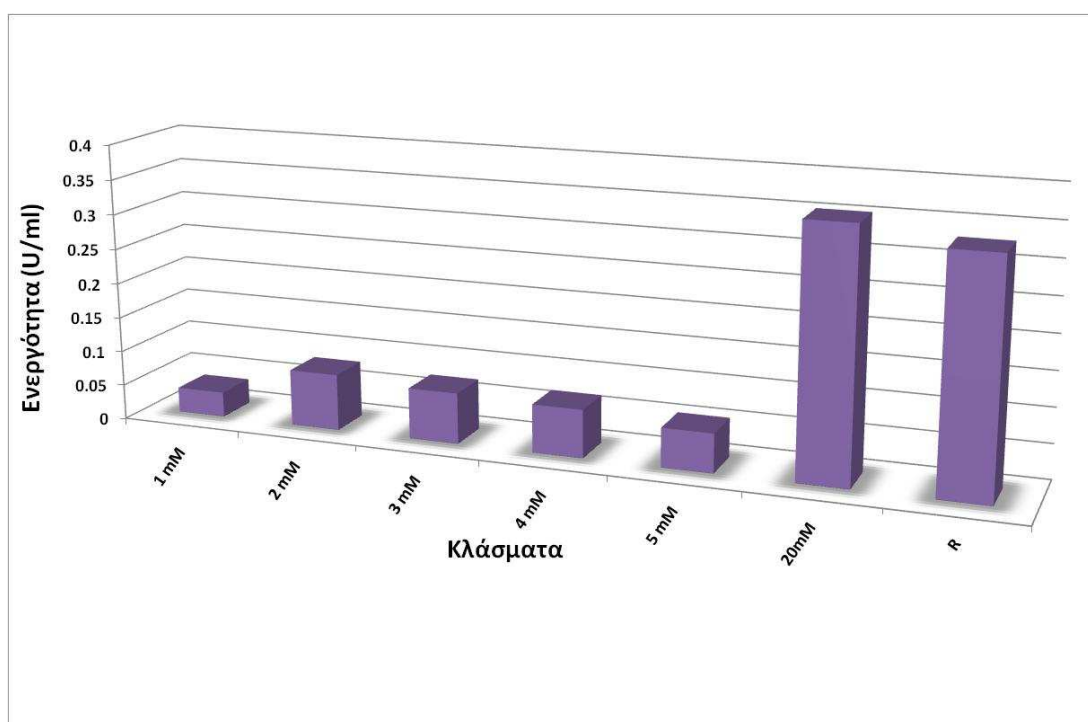
Στο διάγραμμα 4.7 παρατηρείται η εμφάνιση επαγώμενης ενεργότητας GST μετά τον ψεκασμό του φυτού παρουσιάζοντας τρία διαδοχικά μέγιστα ενεργότητας στις εκλούσεις 1.25B, 2.5B καθώς και στο κλάσμα αναγέννησης R2 που πιθανόν να αποτελούν τρεις διαφορετικούς επαγώμενους ισότυπους GST. Ο μάρτυρας έχει παρόμοια εικόνα με το δείγμα, αλλά σε πιο χαμηλά επίπεδα.

Το ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα σε συνθήκες μετουσίωσης, παρουσία SDS σε πηκτή αγαρόζης του μάρτυρα φαίνεται στο Σχήμα 4.8, ενώ του δείγματος στο Σχήμα 4.9. Η ταυτόχρονη βαθμιαία εξασθένηση των δύο επαγόμενων πρωτεϊνικών ζωνών (Σχήμα 4.9) από τη συγκέντρωση 2A mM GSH έως τη 10 mM GSH των εκλούσεων μας δίνει σημαντικές πληροφορίες για δομή των επαγόμενων ισότυπων GST και αποτελεί σοβαρή ένδειξη της ύπαρξης επαγόμενου ετεροδιμερούς GST. Για ευκολία, ας υποθέσουμε ότι η άνω πρωτεϊνική ζώνη αποτελεί ως τη βαριά υπομονάδα GST και η κάτω πρωτεϊνική ζώνη την ελαφριά υπομονάδα GST. Εν αντιθέσει, η μεμονωμένη, έντονη επαγόμενη άνω πρωτεϊνική ζώνη (συγκέντρωση 1A mM GSH έως τη 2A mM GSH) που τυγχάνει να συμπίπτει με την άνω πρωτεϊνική ζώνη των εκλούσεων 2A-10 mM GSH (βαριά υπομονάδα GST) υποδεικνύει την επαγωγή ενός ομοδιμερούς (δύο βαριές υπομονάδες GST). Αυτό το ομοδιμερές προσδένεται με χαμηλότερη συγγένεια με τον προσροφητή GSH συγκριτικά με το υποθετικό ετεροδιμερές των εκλούσεων 2-10 mM GSH, εφόσον χαμηλότερη συγκέντρωση GSH απαιτείται για την έκλουσή του από τον προσροφητή. Επιπρόσθετα, ο επαγόμενος ισότυπος GST που ανιχνεύτηκε στο κλάσμα αναγέννησης εμφανίζει ισχυρότατη συγγένεια με τον προσροφητή Se-GSH όπως αποδεικνύεται από τις ακραίες συνθήκες έκλουσης που απαιτούνται.

Συμπερασματικά, κατά την ποιοτική και ποσοτική μελέτη των επαγόμενων, από το ζιζανιοκτόνο Fusilade, ισοενζύμων GST εντοπίσαμε την ύπαρξη τριών επαγόμενων ενεργοτήτων μεταφοράς του γλουταθείου με διαφορετική συγγένεια προς το υπόστρωμα γλουταθειόνη (GSH).

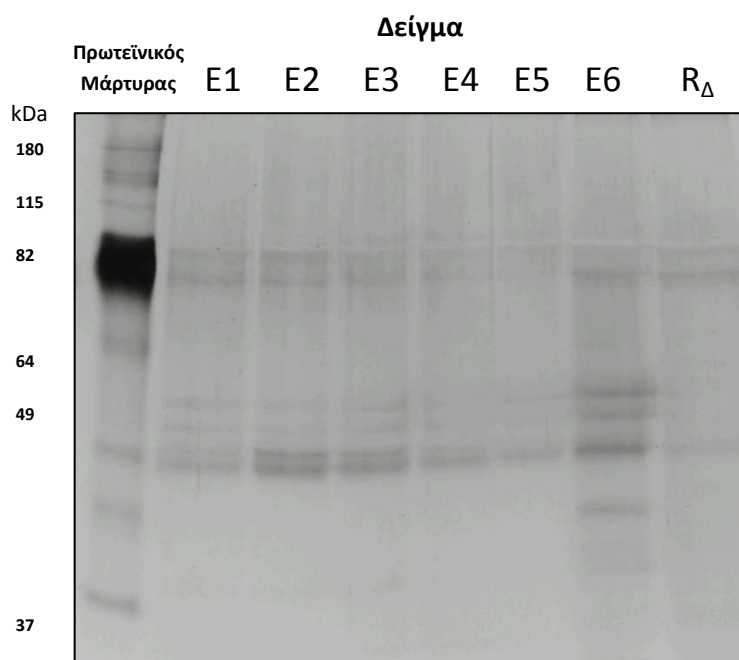
*Μελέτη της διαφορικής επαγωγής
ισοενζύμων μεταφοράσης του γλουταθείου
ύστερα από επαγωγή με το ζιζανιοκτόνο Fusilade*

Η διαδικασία είναι ίδια με την προηγούμενη, με μόνη διαφορά τη συγκέντρωση του GSH και του NaCl στο διάλυμα της έκλουσης. Πραγματοποιήθηκαν πέντε εκλούσεις από 4 ml η κάθε μία, με ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM NaH₂PO₄, 50 mM NaCl και 1-5 mM GSH pH 7,0 (E1:1 mM GSH, E2:2 mM GSH, E3:3 mM GSH, E4:4 mM GSH & E5:5 mM GSH) και μία επιπρόσθετη έκλουση (E6) με ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM NaH₂PO₄, 200 mM NaCl και 20 mM GSH pH 7,5. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Διάγραμμα 4.10:



Διάγραμμα 4.10. Απεικόνιση της ενεργότητας της μεταφοράσης του γλουταθείου στο δείγμα, ύστερα από χρωματογραφία συγγένειας Se-GSH (χρήση υποστρώματος CDNB). 1-20 mM : διαδοχικές εκλούσεις μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης GSH, R: κλάσμα αναγέννησης.

Μετά τη χρωματογραφία συγγένειας ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης, παρουσία SDS σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, για τον προσδιορισμό της καθαρότητας των εκλούσεων – αναγέννησης του δείγματος, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 4.11:



Σχήμα 4.11. Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα σε πηκτή ακρυλαμιδίου (12,5% w/v) παρουσία SDS των εκλούσεων και της αναγέννησης του δείγματος ύστερα από χρωματογραφία συγγένειας στον προσροφητή Se-GSH. **Θέσεις: E1,E2,E3,E4,E5:** εκλούσεις του δείγματος, χρησιμοποιώντας διάλυμα έκλουσης 10 mM NaH₂PO₄, 50 mM NaCl και 1,2,3,4,5 mM GSH αντίστοιχα, με pH 7,0. **Θέση E6:** η τελευταία έκλυση του δείγματος με διάλυμα 10 mM NaH₂PO₄, 200 mM NaCl και 20 mM GSH pH 7,5. **Θέση R_Δ:** η αναγέννηση του δείγματος, χρησιμοποιώντας για διάλυμα 50 mM NaH₂PO₄ και 1M NaCl pH 7,5.

Από το παραπάνω αποτύπωμα φαίνεται πως οι ισότυποι των εκλούσεων E1, E2, E3, E4 και E5 αποτελούν το πιθανές ετεροδιμερές ισοένζυμο, ενώ ο ισότυπος στην έκλυση 20 mM (E6) αποτελεί το ομοδιμερές. Στην αναγέννηση δεν εμφανίζεται κανένα ένζυμο. Για τη μελέτη της διαφορικής επαγωγής της μεταφοράς του γλουταθείου στα ψεκασμένα φύλλα του φασολιού με το ζιζανιοκτόνο *Fusilade*, πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων (2D-PAGE). Για την ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων, η οποία αποτελεί μία μέθοδο που διαχωρίζει το πρωτεϊνικό δείγμα με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο και το μοριακό βάρος των ισοτύπων, χρησιμοποιήθηκε πρωτεϊνικό δείγμα από ολική έκλυση με διάλυμα 10 mM NaH₂PO₄, 200 mM NaCl και 20 mM GSH pH 7,5. Το δείγμα μετά τον καθαρισμό, υπέστη λυοφιλίωση και στη συνέχεια ολοκληρώθηκε η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων (2D-PAGE). Τα αποτελέσματά της, παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.12:



Σχήμα 4.12. Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων σε πηκτική ακρυλαμίδιου (12,5% w/v) παρουσία SDS ολικής έκλυσης του δείγματος, ύστερα από καθαρισμό του ενζύμου με χρωματογραφία συγγένειας στον προσροφητή Se-GSH με διάλυμα έκλυσης 10 mM NaH_2PO_4 , 200 mM NaCl και 20 mM GSH pH 7,5.

α) ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα με χρώση AgNO_3

β) ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα με χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250.

Κινητική ανάλυση των
ισοενζύμων GST
σε φύλλα φασολιού

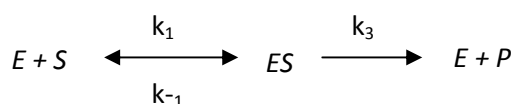
Η ενζυμική κινητική αποτελεί τον κλάδο εκείνο που μελετά τους παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης. Σύμφωνα με τη μελέτη της κινητικής της ενζυμικής αντίδρασης αντλούνται πολλά συμπεράσματα όσο αφορά το μηχανισμό της αντίδρασης, τη σειρά με την οποία τα υποστρώματα ενώνονται ή απομακρύνονται από το ένζυμο και τη χημική φύση του συμπλόκου ενζύμου – υποστρώματος. Με τη μέθοδο αυτή υπολογίζονται επίσης βασικές κινητικές σταθερές και από αυτές εκτιμάται η ενδοκυτταρική συγκέντρωση διαφόρων μεταβολιτών, η φυσιολογική φορά κάθε αντίδρασης καθώς και οι *in vivo* ρυθμιστές των ενζυμικών αντιδράσεων (Κλώνης, 1997).

Στο συγκεκριμένο πείραμα, μελετήθηκε η K_m σταθερά που υπολογίζεται από τη σχέση

$$u = \frac{V_{max} * [S]}{K_m + [S]}$$

Όπου: S το υπόστρωμα,
u η αρχική ταχύτητα για
δεδομένη συγκέντρωση
υποστρώματος

σύμφωνα με το πρότυπο των Michaelis-Menten. Το πρότυπο βασίζεται στην αντίδραση στην οποία συμμετέχει ένα αντιδρόν και περιγράφεται από τη γενική εξίσωση:



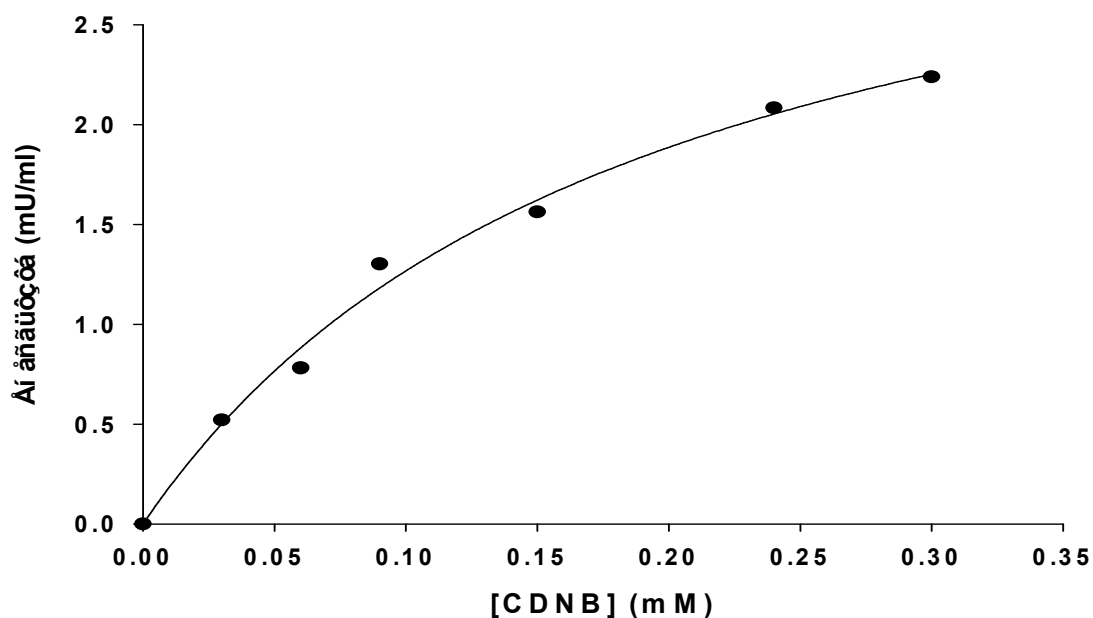
Όπου: E το ένζυμο,
S το υπόστρωμα,
ES το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος,
P το προϊόν της αντίδρασης

Η ενζυμική κινητική μελετήθηκε στα επαγόμενα ισοένζυμα (εκλούσεις) χρησιμοποιώντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα CDNB. Οι εκλούσεις της χρωματογραφίας συγγένειας υποβλήθηκαν σε διαπίδυση για να απομακρυνθεί η περίσσεια GSH που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διαδικασία του καθαρισμού

προκειμένου να πραγματοποιηθεί ενζυμική κινητική των δειγμάτων. Κατά τη διαδικασία της διαπίδυσης παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της ενεργότητας των δειγμάτων, πιθανότατα λόγω της απομάκρυνσης του υποστρώματος GSH που ενδεχομένως να αποτελεί σταθεροποιητικό παράγοντα της ενζυμικής ενεργότητας. Κατά συνέπεια, επιτελέστηκε ενζυμική κινητική με μεταβαλλόμενο υπόστρωμα μόνο με το CDNB.

Μεταβαλλόμενο υπόστρωμα CDNB

Μετά τη χρωματογραφία συγγένειας πραγματοποιήθηκε διαπίδυση στην Ε6 έκλουση (που πιθανόν αποτελεί ομοδιμερές ισοένζυμο). Αφού πέρασαν 17-20 ώρες από τη διαδικασία της διαπίδυσης, πραγματοποιήθηκε ενζυμική κινητική σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M NaH_2PO_4 pH 6,5 στα δείγματα χρησιμοποιώντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το CDNB (0,30-3,03 mM) και GSH σε σταθερή συγκέντρωση. Ο υπολογισμός της σταθεράς K_m και της μέγιστης ταχύτητας παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 4.13:



Διάγραμμα 4.13: Εξάρτηση της ενζυμικής αντιδράσης του ομοδιμερούς ισοενζύμου GST, από τη συγκέντρωση του υποστρώματος CDNB.

Μέτρηση δραστηκότητας των ισοενζύμων GST με άλλα υποστρώματα

Εκτός από τα υποστρώματα CDNB χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικά άλλες δύο ηλεκτρονιόφιλες ενώσεις για το εάν αποτελούν υποστρώματα του ενζύμου.

π-Νιτροβαινυλ-χλωρίδιο

Το μίγμα επώασης στις κυψελίδες είχε συνολικό όγκο 1 ml και περιείχε 5 mM GSH, 1 mM π-Νιτροβαινυλ-χλωρίδιο, ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M NaH₂PO₄ pH 6,5 και ένζυμο GST (έως 0,02 units). Το μίγμα επωάζεται στους 30°C και για τον ποσοτικό προσδιορισμό του συμπλόκου, χρησιμοποιήθηκε σαν συντελεστής μοριακής απόσβεσης η τιμή 1,9 l/mmol x cm.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το ισοένζυμο της έκλουσης E6 δεν παρουσίασε δραστηκότητα με το υπόστρωμα αυτό.

Ethacrynic Acid

Το μίγμα επώασης στις κυψελίδες είχε συνολικό όγκο 1 ml και περιείχε 75 mM GSH, 75 mM ethacrynic acid, ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M NaH₂PO₄ pH 6,5 και ένζυμο GST (έως 0,02 units). Το μίγμα επωάζεται στους 30°C και για τον ποσοτικό προσδιορισμό του συμπλόκου, χρησιμοποιήθηκε σαν συντελεστής μοριακής απόσβεσης η τιμή 5 l/mmol x cm.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το ισοένζυμο της έκλουσης E6 επίσης δεν παρουσίασε κάποια δραστηκότητα με το υπόστρωμα αυτό.

N-τελική αμινοξική αλληλούχιση

N-τελική αμινοξική αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε στο ομοδιμέρες ισοένζυμο GST. Η αμινοξική αλληλούχιση της πρωτεϊνικής ζώνης που εμφανίζεται στην έκλουση Ε6, έδωσε σαν κύρια αλληλουχία "ASSQEE". Με τοποθέτηση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας (MASSQEE) στον αλγόριθμο BLAST (έλεγχος στις βάσεις δεδομένων) έδειξε ότι η αλληλουχία του εξαπεπτιδίου εμφανίζει ομοιότητα με την καταχωρημένη αλληλουχία AY220095 που κωδικοποιεί για μία υποτιθέμενη GST από *Phaseolus acutifolius*. Αυτή η GST ανήκει στην οικογένεια *tau*. Η αμινοξική αλληλουχία της ομόλογης πρωτεΐνης *Phaseolus acutifolius* είναι:

MASSQEEVTLGATGSPFVCRVKIALKLGIEYKYVEENLANKSEQLLKYNP VHKKVPV FVH

GDKPLAESLVIVEYIDETWNNNPILSPDPYQRALARFWSKFIDDNIVGSTWKS VFTADEKEREK

NVAEASESLQFLENEIADKKFFGGEEELGLVDIAAVYVAFWIPLVQEIAGLELLTSEKFPNLYKW

SQEFVSHPIVKESLPPRDPVFGFFKGRYESLFASK

Με βάση την αμινοξική ακολουθία της ομόλογης πρωτεΐνης του φυτού *Phaseolus acutifolius* και χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα protein-Blast, βρήκαμε ομόλογες αλληλουχίες με τα εξής φυτά (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>):

- <i>Glycine max</i>	AAG34798	(GST-Gly)
- <i>Vigna radiata</i>	AAA87173	(GST-Vig)
- <i>Vitis vinifera</i>	CAO15737	(GST-Vit)
- <i>Lycopersicon esculentum</i>	AAG16756	(GST-Lyc)
- <i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_187538	(GST-Ara)
- <i>Capsicum annuum</i>	AAX20044	(GST-Cap)
- <i>Zea mays</i>	NP_001104994	(GST-Zea)
- <i>Oryza sativa</i>	EAY77227	(GST-Ory)

Με βάση τις αλληλουχίες των παραπάνω φυτών και έχοντας ως πρότυπο την αμινοξική αλληλουχία του *Phaseolus acutifolius*, βρέθηκαν οι % ομοιότητες του κάθε ενζύμου ξεχωριστά σε σχέση με τα υπόλοιπα. Οι ομοιότητες απεικονίζονται στον Πίνακα 2-8 και πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>):

Πίνακας 2

<i>Phaseolus acutifolius</i>		
Πρωτεϊνικός αριθμός	Φυτό	Ομοιότητα %
AAG34798	<i>Glycine max</i>	85
AAA87173	<i>Vigna radiata</i>	84
CAO15737	<i>Vitis vinifera</i>	56
AAG16756	<i>Lycopersicon esculentum</i>	47
AAX20044	<i>Capsicum annuum</i>	48
EAY77227	<i>Arabidopsis thaliana</i>	48
NP_001104994	<i>Zea mays</i>	45
NP_187538	<i>Oryza sativa</i>	44

Πίνακας 3

<i>Glycine max</i>		
Πρωτεϊνικός αριθμός	Φυτό	Ομοιότητα %
AAA87173	<i>Vigna radiata</i>	78
CAO15737	<i>Vitis vinifera</i>	60
AAG16756	<i>Lycopersicon esculentum</i>	50
EAY77227	<i>Arabidopsis thaliana</i>	51
AAX20044	<i>Capsicum annuum</i>	50
NP_001104994	<i>Zea mays</i>	44
NP_187538	<i>Oryza sativa</i>	45

Πίνακας 4

<i>Vigna radiata</i>		
Πρωτεϊνικός αριθμός	Φυτό	Ομοιότητα %
CAO15737	<i>Vitis vinifera</i>	53
AAG16756	<i>Lycopersicon esculentum</i>	49
EAY77227	<i>Arabidopsis thaliana</i>	45
AAX20044	<i>Capsicum annuum</i>	48
NP_001104994	<i>Zea mays</i>	44
NP_187538	<i>Oryza sativa</i>	40

Πίνακας 5

<i>Vitis vinifera</i>		
Πρωτεϊνικός αριθμός	Φυτό	Ομοιότητα %
AAG16756	<i>Lycopersicon esculentum</i>	57
EAY77227	<i>Arabidopsis thaliana</i>	60
AAX20044	<i>Capsicum annuum</i>	54
NP_001104994	<i>Zea mays</i>	47
NP_187538	<i>Oryza sativa</i>	44

Πίνακας 6

<i>Arabidopsis thaliana</i>		
Πρωτεϊνικός αριθμός	Φυτό	Ομοιότητα %
AAX20044	<i>Capsicum annuum</i>	49
NP_001104994	<i>Zea mays</i>	41
NP_187538	<i>Oryza sativa</i>	45

Πίνακας 7

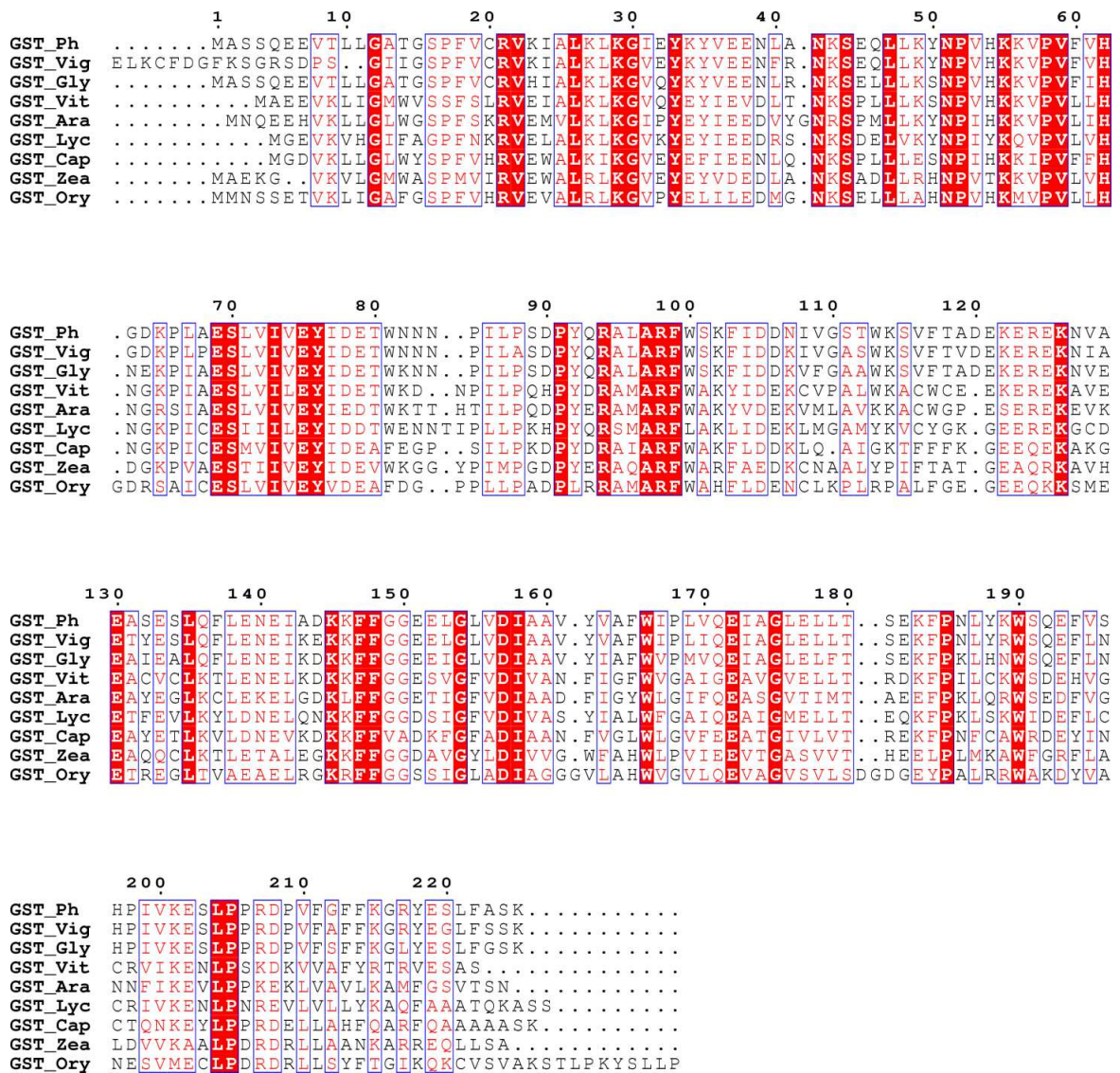
<i>Capsicum annuum</i>		
Πρωτεϊνικός αριθμός	Φυτό	Ομοιότητα %
NP_001104994	<i>Zea mays</i>	47
NP_187538	<i>Oryza sativa</i>	45

Πίνακας 8

<i>Zea mays</i>		
Πρωτεϊνικός αριθμός	Φυτό	Ομοιότητα %
NP_187538	<i>Oryza sativa</i>	44

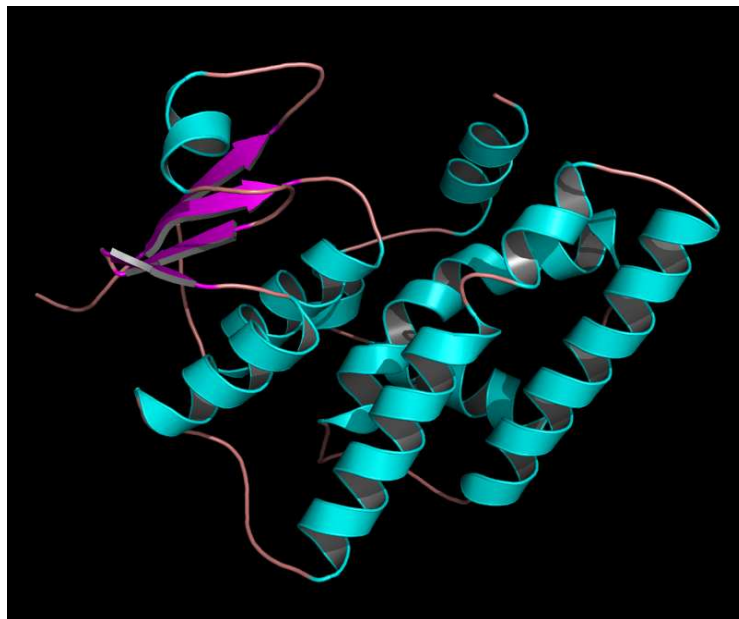
Αναλυτικά, από τον Πίνακα 2 παρατηρείται πως το ισοένζυμο του *phaseolus acutifolius* (GST Ph) παρουσιάζει 85% ομοιότητα με το ισοένζυμο (GST Gly) της σόγιας (*Glycine max*), 84% με το ισοένζυμο (GST Vig) ενός είδους φασολιού (*Vigna radiate*), 56% με το (GST Vit) του αμπελιού (*Vitis vinifera*), 47% με το ισοένζυμο (GST Lyc) της ντομάτας (*Lycopersicon esculentum*), 48% με τα ισοένζυμα (GST Ara) και (GST Cap) του *Arabidopsis* και της πτεριάς αντίστοιχα (*Arabidopsis thaliana*, *Capsicum annuum*), 45% με το ισοένζυμο (GST Zea) του καλαμποκιού (*Zea mays*) και 44% με το ρυζιού (GST Ory), (*Oryza sativa*).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η στοίχιση αλληλουχιών όλων των φυτών με βάση το πρόγραμμα ESPript (<http://espript.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>), η οποία απεικονίζεται στο Σχήμα 4.13:

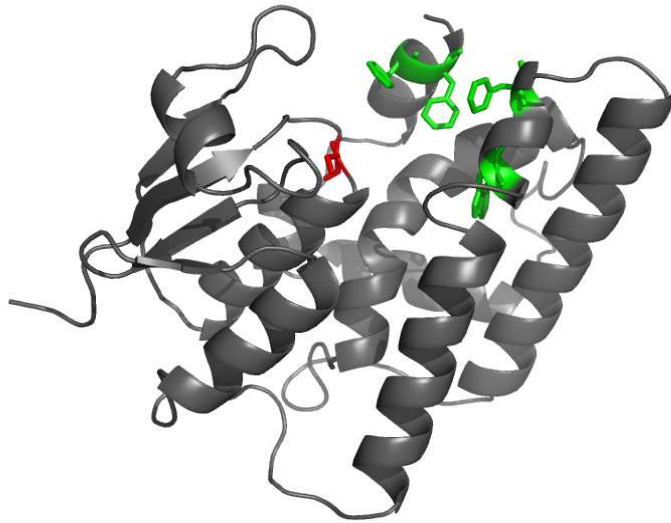


Σχήμα 4.13: Πολλαπλή ευθυγράμμιση των εννέα ισοενζύμων GST από εννέα διαφορετικά φυτά. Οι συντηρημένες αμινοξικές περιοχές εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα.

Επίσης πραγματοποιήθηκε μοντελοποίηση της τρισδιάστατης μορφής του ενζύμου ακολουθώντας τη διαδικασία της ομόλογης μοντελοποίησης χρησιμοποιώντας τον διακομιστή Swissserver (<http://swissmodel.expasy.org/>). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μπορεί να σχεδιαστεί με ικανοποιητική αξιοπιστία το μοντέλο της τρισδιάστατης δομής του ενζύμου GST χρησιμοποιώντας σαν πρότυπο την αλληλουχία της μεταφοράς του γλουταθείου GST1 από ρύζι (κωδικός: PDB:1OY1). Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 4.14:



Μελέτη της τρισδιάστατης δομής και των αμινοξέων που συμμετέχουν έδειξε ότι η σερίνη στη θέση 16 αποτελεί πιθανότητα το καταλυτικό αμινοξύ του ενζύμου. Επίσης μελέτη της περιοχής Η που δεσμεύονται τα ξενοβιοτικά υποστρώματα έδειξε ότι κυρίως σχηματίζεται από υδρόφοβα αρωματικά αμινοξέα όπως η τρυπτοφάνη 113, η φαινυλανίνη 117 και οι φαινυλανίνες 213, 214 που βρίσκονται στο καρβοξυλικό άκρο του ενζύμου. Οι θέσεις αυτές των αμινοξέων φαίνονται στο παρακάτω Σχήμα 4.15:



Σχήμα 4.15: Γραφική αναπαράσταση της δομής του ενζύμου GST από *Phaseolus acutifolius*. Με γκρι ανοιχτό και σκούρο απεικονίζονται τα στοιχεία δευτερογενούς δομής της υπομονάδας του ενζύμου, με κόκκινο αναπαρίσταται η καταλυτική σερίνη στη θέση 16 ενώ με πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα υδρόφοβα αμινοξέα όπως η τρυπτοφάνη 113 και η φαινυλανίνη 117 που σχηματίζουν μέρος της περιοχής δέσμευσης ξενοβιοτικών ουσιών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Συζήτηση

Το ένζυμο η μεταφοράση του γλουταθείου (GST) δρα ως διμερές και καταλύει τη σύζευξη του τριπεπτιδίου γλουταθείου GSH με έναν αριθμό ηλεκτρονιόφιλων, λιπόφιλων ουσιών, δημιουργώντας ένα υδατοδιαλυτό προϊόν, το οποίο έχει μειωμένη τοξικότητα. Αυτή η αντίδραση παίζει σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση πολλών τοξικών μορίων (ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα), σ' ένα μεγάλο εύρος οργανισμών από θηλαστικά και έντομα, έως φυτά (Rossini et al, 1996, Mannervik, 1985). Γι αυτό το λόγο θεωρούνται ένζυμα εξαιρετικά μεγάλου ερευνητικού ενδιαφέροντος (Coleman et al, 1997).

Η παρούσα μελέτη εκτελέσθηκε σε τέσσερα στάδια:

Στο πρώτο στάδιο, πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη των φυτών και ο ψεκασμός των φύλλων τους με το ζιζανιοκτόνο *Fusilade* (δραστική ουσία: fluazifop-r-butyl), σε πρώτη φάση, τα ψεκασμένα φυτά και οι μάρτυρες παρέμειναν σε ειδικό θάλαμο για 24 και 48 ώρες. Στη συνέχεια μετρήθηκε η ειδική δραστικότητα του GST στα ψεκασμένα φύλλα των 24 και 48 ωρών και παρατηρήθηκε πως η % επαγωγή της μεταφοράσης του γλουταθείου GST συγκριτικά με τον μάρτυρα είναι μεγαλύτερη στα φυτά με περίοδο επαγωγής 24 ωρών σε σχέση με τα αντίστοιχα φυτά των δυο ημερών. Επομένως, για να υπολογισθεί η μεγαλύτερη δυνατή ποσότητα επαγόμενης GST, στα επακόλουθα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν φυτικά εκχυλίσματα ψεκασμένου φυτού και μάρτυρα, ύστερα από επαγωγή 24 ωρών.

Στο δεύτερο στάδιο, έγινε ο καθαρισμός των ισοενζύμων με δύο διαφορετικές χρωματογραφίες: την χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής και της συγγένειας (Jepson et al, 1994). Για την επιβεβαίωση της καθαρότητας των πρωτεϊνικών δειγμάτων μετά το χρωματογραφικό ακολουθούσε ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS σε πηκτή ακρυλαμιδίου, για την καλύτερη ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών. Βασικός στόχος του καθαρισμού αποτελεί ο ποιοτικός αλλά και ποσοτικός προσδιορισμός των επαγόμενων ισοενζύμων GST,

δηλαδή η μελέτη των διαφορετικών ισοτύπων GST κατά τον ψεκασμό με το ζιζανιοκτόνο *Fusilade*. Με την χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (προσροφητής Q-Sepharose CL 6B) και χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το CDNB, παρατηρήθηκε η εμφάνιση πιθανών δυο διαφορετικών ενεργοτήτων GST που σημαίνει πως έχουν διαφορετική ικανότητα πρόσδεσης με τον προσροφητή. Παρόμοιο πρότυπο παρατηρείται και με τη χρήση υποστρώματος Fluorodifen. Επειδή όμως είναι δύσκολη η μελέτη των ισοενζύμων με τη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, λόγω μεγάλης αραίωσης των κλασμάτων, χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία συγγένειας. Στα πρώτα πειραματικά στάδια καθαρισμού του ενζύμου με τη χρωματογραφία συγγένειας, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα εξισορρόπησης χωρίς NaCl (10 mM NaH₂PO₄ pH 7,0). Τα αποτελέσματα έδειξαν εμφανώς την επαγωγή του GST στα δείγματα σε σχέση με τον μάρτυρα, όμως φάνηκε πως στον προσροφητή δεσμεύεται είτε μικρή ποσότητα ενζύμου λόγω κάλυψης των θέσεων από άλλες πρωτεΐνες, είτε μεγάλη ποσότητα ενζύμου η οποία δεν εκλύεται με το διάλυμα έκλυσης. Για το λόγο αυτό, προστέθηκε NaCl στο διάλυμα εξισορρόπησης, το οποίο όπως έδειξε βελτίωσε σημαντικά τις συνθήκες δέσμευσης του ενζύμου στον προσροφητή. Με τη χρωματογραφία συγγένειας, παρατηρήθηκαν τελικά 3 διαφορετικοί ισοτύποι GST: ένα πιθανόν ομοδιμερές ισοένζυμο με μοριακό βάρος 26-29 kDa, που εμφανίζει χαμηλή συγγένεια με τον προσροφητή, ένα ετεροδιμερές με μοριακό βάρος 26-29 kDa, με μεγαλύτερη συγγένεια με τον προσροφητή και ένα ομοδιμερές ισοένζυμο, με ενδιάμεσο μοριακό βάρος των 26-29 kDa που παρατηρείται μόνο στα ψεκασμένα δείγματα και έχει μεγάλη συγγένεια με τον προσροφητή (Irzyk et al, 1995). Το ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα της χρωματογραφίας συγγένειας, όπου εμφάνισε την πιθανή ύπαρξη τριών διαφορετικών ισοτύπων GST, σε συνδυασμό με το εμφανιζόμενο χρωματογραφικό μοτίβο κατά τη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής ενθυμίζει την περιγραφείσα περίπτωση επαγωγής GST στο καλαμπόκι (Dixon et al, 1997). Παρόλο που στην παρούσα μελέτη η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής απεκάλυψε την ύπαρξη δύο, μόνο, ξεχωριστών ενεργοτήτων κατά την έκλυση, είναι πιθανόν, όπως στην περίπτωση του καλαμποκιού, η επιπρόσθετη ενεργότητα GST που παρατηρήθηκε κατά την χρωματογραφία συγγένειας, να εμπεριέχεται στο χαμηλής συγγένειας κλάσμα (έκλυση με χαμηλή συγκέντρωση NaCl) και εξαιτίας της χαμηλής διακριτικότητας

(resolution) της χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής καθώς και λόγω της υψηλής αραιώσης των εκλούσεων να μην κατέστη δυνατόν να ανιχνευθεί (Reinemer et al, 1996).

Στα πειράματα που ακολούθησαν, πραγματοποιήθηκε μελέτη για το ομοδιμερές ισοένζυμο που εμφανίζεται μόνο στα δείγματα.

Στο τρίτο στάδιο, υπολογίσθηκε η k_m του ομοδιμερούς ενζύμου, χρησιμοποιώντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το CDNB. Η σταθερά k_m ($k_m=190$ μ M) είναι αρκετά χαμηλή, που δηλώνει πως ο ισότυπος εμφανίζει μεγάλη συγγένεια με το υπόστρωμα. Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε στο καλαμπόκι, παρατηρήθηκε πως τα εννέα αμινοξέα (Ser-11, Trp-12, Phe-35, His-40, Lys-41, Gln-53, Asn-49, Ser-69, and Ile-118) που συμμετέχουν στη δέσμευση των υποστρωμάτων, ρυθμίζουν την K_m του ενζύμου για τη GSH (Labrou et al, 2004).

Στο τέταρτο και τελευταίο στάδιο, βρέθηκε η αμινοξική αλληλούχιση της πρωτεϊνικής ζώνης του ομοδιμερούς ισοενζύμου, η οποία είναι " ASSQEE". Έλεγχος στη βάση δεδομένων με τον αλγόριθμο BLAST, παρατηρήθηκε πως η ακολουθία είναι 100% όμοια με την καταχωρημένη αλληλουχία, την AY220095 η οποία κωδικοποιεί για μία υποτιθέμενη GST από *Phaseolus acutofolius*. Η GST αυτή ανήκει στην tau οικογένεια. Μετά από επεξεργασία των πρωτεϊνικών αλληλουχιών με τα προγράμματα ClustalW και ESPript παρατηρήθηκε η ομοιότητα της αμινοξικής αλληλουχίας του *Phaseolus acutofolius* με GSTs από άλλα φυτά: *Glycine max* (AAG34798), *Vigna radiata* (AAA87173), *Vitis vinifera* (CAO15737), *Lycopersicon esculentum* (AAG16756), *Arabidopsis thaliana* (NP_187538), *Capsicum annuum* (AAX20044), *Zea mays* (NP_001104994) και *Oryza sativa* (EAY77227). Παρατηρήθηκε πως το *Phaseolus acutofolius* παρουσιάζει μεγαλύτερη ομοιότητα με το *Glycine max* (85%) και μικρότερη με το *Oryza sativa* (44%).

Μελλοντικός στόχος της μελέτης αυτής αποτελεί η απομόνωση και η κλωνοποίηση του ενζύμου. Επίσης θα ήταν πολύ ενδιαφέρουσα η ετερόλογη έκφραση, ο καθαρισμός και ο χαρακτηρισμός του ανασυνδυασμένου ενζύμου.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alfenito M.R., Souer E., Goodman C.D., Buell R., Mol J., Koes R., Walbot V.** (1998). Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *Plant Cell* 10, 1135-1149.
- Alscher R.G.** (1989). Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Plant Physiol.* 77,457-464.
- Andrews C.J., Skipsey M., Townson J.K., Morris C., Jepson I., Edwards R.** (1997). Glutathione transferase activities toward herbicides used selectively in soyabean. *Pestic. Sci.* 51, 213-222.
- Armstrong R. N.** (1998). Mechanistic imperatives for the evolution of glutathione transferases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 618-623.
- Arrick A. Bradley and Nathan F. Carl** (1984). Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review. *Cancer Research* 44, 4224-4232.
- Batist C., Tulpules A., Sinha B., Katki A., Myers C.E. and Cowan K.H.** (1986). Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug-resistant human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 261., 15544-15549.
- Beharry Z. and Palzkill T.** (2005). Functional analysis of active residues of the fosfomycin resistance enzyme FosA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 280(18), 17786-17791.
- Bernat B.A., Laughlin L.T. and Armstrong R.N.** (1997). Fosfomycin resistance protein (FosA) is a manganese metalloglutathione transferase related to glyoxalase I and the extradiol dioxygenases. *Biochem.* 36, 3050-3055.
- Bilang J. and Strum A.** (1995). Cloning and characterization of a glutathione S-transferase that can be photolabeled with 5-Azido-indole-3-acetic acid. *Physiol. Plant* 109, 253-260.
- Cnubben N., Rietjens, I., Wortelboer, H., van Zanden, J. and van Bladeren, P.** (2001). The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environ. Toxic. Pharm.* 10,141-152.
- Coleman J., Blake-Kalff, M. and Emyr Davies, T.G.** (1997). Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *TIPS* 2(4), 144-151.

- Commins I., Cole D.J. and Edwards R.** (1999). A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *Plant J.* 18,285-292.
- Dean J.V., Gronwald J.W., Eberlein C.V.** (1990). Induction of glutathione S-transferase isozymes in sorghum by herbicide antidotes. *Plant Physiol.* 92, 467-473.
- Devlin D.L., Moshier L.J., Russ O.G., Stahlman P.W.** (1983). Antidotes reduce injury to grain sorghum (*Sorghum bicolor*) from acetanilide herbicides. *Weed Sci.* 31,790-795.
- Dierickx P.J.,** (1999). Glutathione-dependent cytotoxicity of the chloroacetanilide herbicides alachlor, metolachlor, and propachlor in rat and human hepatoma-derived cultured cells. [Cell Biology and Toxicology](#), 15(5), 325-332.
- Dirr H., Reinemer, P. and Sandermann H.** (1979). Soluble and microsomal glutathione S transferase activities in pea seedlings (*Pisum sativum L.*). *Planta* 146, 643-648.
- Dixon D.P., Cole D.J., Edwards R.** (1997). Characterization of multiple glutathione transferases containing the GSTI subunit with activities toward herbicide substrates in maize (*Zea mays*). *Pestic. Sci.* 50, 72-82.
- Dixon D.P., Cole D.J., Edwards R.** (1999). Dimerisation of maize glutathione transferases in recombinant bacteria. *Plant Mol. Biol.*, 40, 997-1008.
- Dixon D.P., Laphorn A. and Edward R.** (2002). Plant glutathione transferases. *Genome Biology* 3(3) reviews 3004, 1-3004, 10.
- Droog F.N.J., Hooykaas P.J.J., van der Zaal E.J.** (1995). 2,4-Dichloro-phe-noxylacetic acid and related chlorinated compounds inhibit two auxin-regulated type-III tobacco glutathione S-transferases. *Plant Physiol.* 107, 1139-1146.
- Edwards R., and Cole D.J.** (1996). Glutathione transferases in wheat (Triticum) species with activity toward fenoxaprop-ethyl and other herbicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 54, 96-104.
- Edwards R., and Dixon R.A.** (1991). Glutathione S-cinnamoyl transferase in plants. *Phytochemistry* 30, 79-84.

- Edwards R., Dixon D.P.** (2000). The role of glutathione transferases in herbicide metabolism. *In* Herbicides and their mechanisms of action. (Codd AH, Kirkwood RC, eds) Sheffield, Sheffield Academic Press, pp 33-71.
- Edwards R., Dixon D.P. and Walnot V.** (2000). Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *TIPS* 5(5), 193-198.
- Erlingson M.** (1988). Fysilade-a strategy for long-term control of couch (*Elymus repens*). *Weeds and Weed Control* 1, 158-165.
- Ford-Hutchinson A.W.** (1990). Leukotriene B4 in inflammation. *Critical Reviews in Immunology* 10 (1), 1-12.
- Foyer C.H., Descourvieres P., Kunert K.J.** (1994). Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Envir.* 17, 507-523.
- Foyer C.H. & Noctor G.** (2005). Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment* 28, 1056-1071.
- Foyer C.H., Lopez-ddelgado H., Dat J.F. and Scott I.M.** (1997). Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanism of acclimatory stress tolerance and signaling. *Plant Physiol.* 100, 241-254.
- Fuerst E.P.** (1987). Understanding the mode of action of chloroacetamide and thiocarbamate herbicides. *Weed Technol.* 1, 270-277.
- Griffin J.L.** (2005). Metabolism of herbicides in plants, L.S.U. Ag.Center (Chapter 8).
- Habig W.H., Pabst M.J. and Jakoby W.B.** (1974). Glutathione S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 229 (22), 7130-7139.
- Hammastrom S., Murphy R.C. and Samuelxon B.** (1979). Process for the preparation of esters of leukotriene A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91, 1266-1272.
- Hatzios K.K.** (1989). Development of herbicide safeners: industrial and university perspectives. *In* Crop Safeners for Herbicides: Development, Uses and Mechanisms of Action. (KK Hatzios, RE Hoagland, eds), Academic Press, New York, pp 3-45.
- Hayes J.D., Flanagan J.U. and Jowsey I.R.** (2005). Glutathione Transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45,51-88.

- Hebert H., Schmidt-krey I. and Morgenstern R.** (1995). The projection structure of microsomal glutathione transferase. *EMBO J.* 14 (16), 3864-3869.
- Holgate S.T., Bradding P., Sampson A.P.** (1996). Leukotriene antagonists and synthesis inhibitors: New directions in asthma therapy. *J. Allergy Clin Immunol*, 98 (1), 1-12.
- Holt D.C., Lay V.J., Clarke E.D., Dinsmore A., Jepson I., Bright S.W. and Greenland A.** (1995). Characterization of the safener-induced glutathione S-transferase isoform II from maize. *Planta* 196, 295-302.
- Holt J.S., Powles S.B. and Holtum J.A.M.** (1993). Mechanisms and agronomic aspects of Herbicide Resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 203-229.
- Holton T.A. and Cornish E.C.** (1995). Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis. *Plant Cell* (7), 1071-1083.
- Hossain Md Daud, Rohman Md Motiar, Fujita Masayuki** (2007). Comparative investigation of glutathione S-transferases, glyoxalase-I and alliinase activities in different vegetable crops. *J. Crop. Sci. Biotech.* 10, 21-28.
- Hunatti A.A., Ali Br.** (1990). Glutathione S-transferase from oxadiazon treated chickpea. *Phytochemistry* 29, 2431-2435.
- Irzyk G., Potter S., Ward E, and Fuerst E.** (1995). A cDNA clone encoding the 27-kilodalton subunits of glutathione S-transferase IV from *Zea mays*. *Plant Physiol.* 107, 311-312.
- Itzhaki H. and Woodson W.R.** (1993). Characterization of an ethylene-responsive glutathione S-transferase gene cluster in carnation. *Plant Mol. Biol.* 22, 43-58.
- Jablonkai I. et al** (1997). Chemical catalysis of the isomerization of a peroxidising, herbicidal thiadiazolide. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference-Weeds*, 771-776.
- Jakobson I., Askelof P., Warholm M. and Mannervik B.** (1977). A steady-state-kinetic random mechanism for glutathione S-transferase A from rat liver. A model involving kinetically significant enzyme-product complexes in the forward reaction. *Eur. J Biochem.* 77(2), 253-262.

- Jepson I., Lay V.J., Holt D.C., Bright S.W.J. and Greenland A.J.** (1994). Cloning and characterization of maize herbicide safener-induced cDNAs encoding subunits of glutathione S-transferase isoforms I, II and IV. *Plant Mol. Biol.* 26, 1855-1866.
- Jowsey I.R., Thomson R.E., Orton T.C., Elcombe C.R. and Hayes J.D.** (2003). Biochemical and genetic characterization of a murine class Kappa glutathione S-transferase. *Biochem. J.* 373, 559-569.
- Karam D.**, (1998). Glutathione S-transferase: an enzyme for chemical defense in plants. Brazilian Agricultural Research Corporation.
- Kellaway C.H., Trethewie E.R.** (1940). The liberation of a slow reacting smooth muscle stimulating substance in anaphylaxis. *Q J Exp Physiol*, 30, 121-145.
- Kogan M. and D.E. Bayer** (1996). Herbicide uptake as influenced by plant water status. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 56, 174-182.
- Kunert K.J., Foyer C.H.** (1993). Thiol/disulfide exchange in plants. *In Sulfur nutrition and assimilation in higher plants* (LJ de Kok, eds), SPB Academic Publishing, Hague, Netherlands, pp 139-151.
- Labrou N.E., Mello L.V. and Clonis Y.D.** (2001). Functional and structural roles of the glutathione-binding residues in maize (*Zea mays*) glutathione S-transferase I. *Biochem J.* 358, 101-110.
- Labrou N.E., Kotzia G.A., Clonis Y.D.** (2004). Engineering the xenobiotic substrate specificity of maize glutathione S-transferase I. *Protein Engineering, Design & Selection* 17 (10), 741-748.
- Lafuente A., Pujol F., Carretero P., Villa J.P., Cuchi A.** (1993). Human glutathione S-transferase μ (GST μ) deficiency as a marker for the susceptibility to bladder and larynx cancer among smokers. *Cancer Letters*, 68, 49-54
- Lamoureux G.L., Gouot J.M., Davis D.G., Rusness D.G.** (1981). Pentachloro-nitrobenzene metabolism in peanut. 3. Metabolism in peanut cell suspension cultures. *J. Agric. Food Chem.* 29, 996-1002.
- Lamoureux G.L. and Rusness D.G.** (1986). Tridiphane [2-(3,5-dichlorophenyl)-2-(2,2,2-trichloroethyl)oxirane], an atrazine synergist:enzymatic conversion to a potent glutathione S-transferase inhibitor. *Pestic. Biochem. Physiol.* 26, 323-342.

- Lamoureux G.L. and Rusness D.G.** (1993). Glutathione in the metabolism and detoxification of xenobiotics in plants. Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants, SPB Academic Publishing, pp. 221-237
- Lamoureux G.L., Shimabukuro R.H., Swanson H.R. and Frear D.S.** (1970). Metabolism of 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine(atrazine) in excised sorghum leaf sections. J. Agr. Food Chem. 18 (1) 81-86.
- Lamoureux G.L., Stafford L.E., Shimabukuro R.H. and Zaylskie R.G.** (1973). Atrazine metabolism in sorghum: catabolism of the glutathione conjugate of atrazine. J. Agr. Food Chem. 21(6), 1020-1030.
- Laughlin L.T., Bernat B.A. and Armstrong R.N.** (1998). Mechanistic imperative for the evolution of a metalloglutathione transferase of the vicinal oxygen chelate superfamily. Chem. Biol. Interact. 111, 41-50.
- Listowsky I., Abramovitz M., Homma H. and Nitsu Y.** (1988). Intracellular binding and transport of hormones and xenobiotics by glutathione S- transferase. Drug Metab. Rev. 19, 305-318.
- Mannervik B.** (1985). The isozymes of glutathione S-transferase. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Boil. 57, 357-417.
- Marss K.A.** (1996). The functions and regulation of glutathione S-transferase in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47, 127-158.
- Mehdy M.C.** (1994). Active oxygen species in plant defense against pathogens. Plant Physiol. 105, 467-472.
- Moreland D.E.** (1980). Mechanisms of Action of Herbicides. Ann. Rev. Plant Physiol. 31, 597-638.
- Neuefeind T., Huber R., Dasenbrock H., Prade L. and Bieseler B.** (1997). Crystal structure of herbicide-detoxifying maize glutathione S-transferase-I in complex with lactoylglutathione: evidence for an induced-fit mechanism. J. Mol. Biol. 274, 446-453.
- Neuefeind T., Huber R., Reinemer P., Knablein J., Prade L., Mann K. and Bieseler B.** (1997). Cloning, sequencing, crystallization and X-ray structure of glutathione S-transferase-III from *Zea mays var. mutin*: a leading enzyme in detoxification of maize herbicides. J.Mol.Biol. 274, 577-587.

- Noctor G., Arisi A.C.M., Jouanin L., Kunert K.J., Rennenberg H., Foyer C.H.** (1998b) Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J. Exp. Bot.* 49,623-647.
- Noctor G., Arisi A.C.M., Jouanin L., Valadier, M.H., Roux, Y. and Foyer, C.H.** (1997) The role of glycine in determining the rate of glutathione synthesis in poplar. Possible implications for glutathione production during stress. *Plant Physiol.*, 100, 255-263.
- O' Conell Keith M., Breaux E. Jay. and Fraley Robert T.** (1988). Different rates of metabolism of two chloroacetanilide herbicides in Pioneer 3320 Corn. *Plant Physiol.* 86, 0359-0363.
- Piper P.J.** (1984). Formation and actions of leukotrienes. *Physiol. Rev.* 64, 744-761.
- Ploemen J.H., Bogaards J.J., Veldink G.A., Van Ommen B., Jansen D.H. and Van Bladeren P.J.** (1993). Isoenzyme Selective Irreversible Inhibition of Rat and Human Glutathione STransferases by Ethacrynic Acid and 2 Brominated Derivatives. *Biochem. Pharmacol.* 45 (3), 633-639.
- Prade L., Huber R. and Bieseler B.** (1998). Structure of herbicides in complex with their detoxifying enzyme glutathione S-transferase – explanations for the selectivity of the enzyme in plants. *Structure (London)* 6, 1445-1452.
- Rea Philip A., Ze-Sheng Li, Yu-Ping Lu and Yolanda M. Drozdowicz** (1998). From vacuolar gs-x pumps to multispecific ABC transporters. *Plant Physiol. and Plant Molecular Biology* 49, 727-760.
- Reinemer P., Prade L., Hof P., Neufeind T., Huber R., Zerri R., Palme K., Schell J., Koelln I., Bartunik H.D. and Bieseler B.** (1996). Three-dimensional structure of glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2 Å resolution: structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione S-transferases and a novel active site architecture. *J.Mol. Biol.* 255, 289-309.
- Ricardo Antonio Tan and Sheldon L. Spector.** (1997). Antileukotriene agents. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 3, 215-220.
- Romano M.L., Stepheson G.R., Tal A., Hall J.C.** (1993). The effect of monooxygenase and glutathione S-transferase inhibitors on the metabolism of diclofop-methyl and fenoxaprop-ethyl in barley and wheat. *Pesticide Biochem. Physiol.* 46, 181-189.

- Rossi F.S., J.C. Neal and A.F. Semesac.** (1994). Alleviating the antagonistic effect of moisture stress on smooth crabgrass (*Digitaria ischaemum*) control with fenoxaprop. *Weed Science* 42, 418-423.
- Rossini L., Jepson I., Greenland A.J. and Sari Gorla M.** (1996). Characterization of glutathione S-transferase isoforms in three maize inbred lines exhibiting differential sensitivity to alachlor. *Plant Physiol.* 112, 1595-1600.
- Roxas V.P., Smith R.K., Allen E.R. and Allen R.D.** (1997). Overexpression of glutathione S – transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nat. Biotechnol.* 15, 988-991.
- Rushmore T.H. and Pickett C.B.** (1993). Glutathione S-transferases, structure, regulation and therapeutic implications. *J. Biol. Chem.* 268, 11475-11478.
- Sauer J.D.** (1993). Historical geography of crop plants - a select roster. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Sheehan David, Meade Gerardene, Foley Vivienne M. and Dowd Catriona A.** (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem.* 360, 1-16.
- Singhal S.S., Tiwari N.K., Ahmad H., Srivastava S.K., Awatshi Y.C.** (1991). Purification and characterization of glutathione S-transferase from sugarcane leaves. *Phytochemistry* 30, 1409-1414.
- Shimabukuro R.H., Walsh W.C., Lamoureux G.L. and Stafford L.E.** (1973). Atrazine metabolism in sorghum: chloroform-soluble intermediates in the N-dealkylation and glutathione conjugation pathways. *J. Agr. Food Chem.* 21(6), 1031-1036.
- Sommer A., Boger P.** (1999). Characterization of recombinant corn glutathione S-transferases isoforms I, II, III and IV. *Pestic Biochem Physiol*, 63, 127-138.
- Spirakou U., Filippou N., Polyzogopoulos D., Papaconstantinou A.** (1996). Association of GST- μ with the incidence and histological type of lung cancer in smokers. *Clinical Chemistry* 42, 253.
- Stenersen J., Korbo S., Bjerke M. and Arend U.** (1987). Glutathione transferases in aquatic and terrestrial animals from nine phyla. *Comp. Biochem. Physiol.* 86C (1), 73-82.

- Strange R.** (1993). The glutathione S-transferase GSTM1 0 locus and cancer susceptibility. *In* Structure and function of glutathione S-transferases (Hayes JD, Mannervik B, Mantle TJ, Pickett CB, Tew KD., eds), CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Sun Tie-Hua and Morgenstern R.** (1997). Binding of glutathione and an inhibitor to microsomal glutathione transferase. *Biochem. J.* 326, 193-196.
- Tu et al.** (2001). Fluazifop-p-butyl. *Weed Control Methods Handbook*, The Nature Conservancy.
- Urano K.** (1982). Onecide, new herbicide fluazifop-butyl. *Jap. Pestic. Inf.* 41, 28-31.
- Wilce M.C.J., Parker M.W.** (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochim. Biophys. Acta* (1994), 1205, 1-18.
- Wilkinson R.E.** (1982). Alachlor influence on sorghum growth and gibberellin precursor synthesis. *Pestic. Biochem. Physiol.* 17, 177-184.
- Winayanuwattikun Pakorn and Ketterman J Albert** (2004): Catalytic and structural contributions for glutathione-binding residues in a Delta class glutathione S-transferase. *Biochem. J.* 382, 751-757.

Ελληνικές βιβλιογραφίες:

- Δημητράκη Κ.** (1982). Πρακτική Λαχανοκομία. Potamitis Press, Αθήνα.
- Κλώνης Ι.** (1997). Ενζυμική Βιοτεχνολογία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Σπάρτση Ν.** (1987). Γενική και Ειδική Λαχανοκομία. Ο.Ε.Δ.Β. Αθήνα.
- Υπ.Α.Α.Τ.** (2007/ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ). Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων. Προοπτικές ανάπτυξης τομέα οσπρίων και κτηνοτροφικών φυτών. (προτάσεις και συμπεράσματα περιφερειακών μελετών νέας ΚΑΠ).