

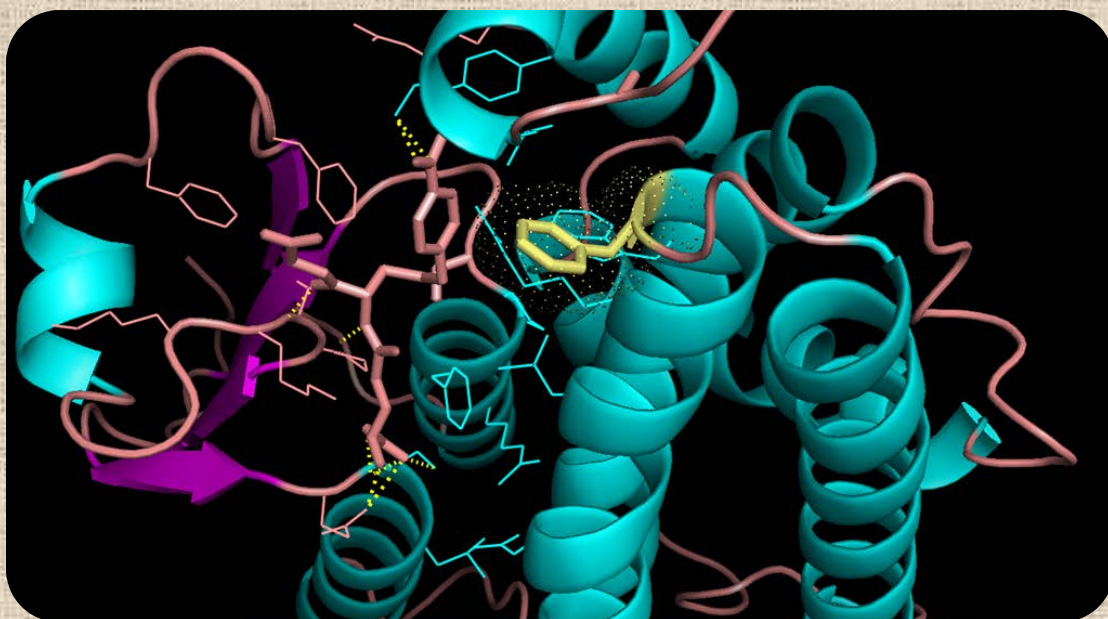


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**«ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣΗ
ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ»**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



ΧΡΟΝΟΠΟΥΛΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Ν. ΛΑΜΠΡΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2013

**«Πρωτεϊνική μηχανική του ενζύμου μεταφοράση της
γλουταθειόνης με στόχο την ανάπτυξη βιοαισθητήρα
μέτρησης ξενοβιοτικών ενώσεων»**

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας του τμήματος Βιοτεχνολογίας (πρώην Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας) του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

«Η έγκριση της παρούσας διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα». [N. 5343/1932, Άρθρο 202]

ΑΘΗΝΑ 2013

Η ανάθεση του θέματος της διδακτορικής διατριβής («Πρωτεϊνική μηχανική του ενζύμου μεταφοράση της γλουταθειόνης με στόχο την ανάπτυξη βιοαισθητήρα μέτρησης ξενοβιοτικών ενώσεων») έγινε με απόφαση της ΓΣΕΣ του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (29-04-2009). Ο ορισμός της επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (Συνεδρία 12^η/17-05-2013).

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων

Λάμπρου Νικόλαος

Αναπληρωτής Καθηγητής Ενζυμικής
Τεχνολογίας, Τμήμα Βιοτεχνολογίας
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μέλη

Κλώνης Ιωάννης

Καθηγητής Ενζυμικής Τεχνολογίας,
Τμήμα Βιοτεχνολογίας
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Φλεμετάκης Εμμανουήλ

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας Φυτών
και Μικροοργανισμών
Τμήμα Βιοτεχνολογίας
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Λάμπρου Νικόλαος Αναπ. Καθηγητής, Γ.Π.Α.
(Επιβλέπων Καθηγητής)
- Κλώνης Ιωάννης Καθηγητής, Γ.Π.Α.
- Φλεμετάκης Εμμανουήλ Επίκ. Καθηγητής, Γ.Π.Α.
- Κίντζιος Σπυρίδων Καθηγητής, Γ.Π.Α.
- Ηλιόπουλος Ηλίας Καθηγητής, Γ.Π.Α.
- Βόντας Ιωάννης Αναπ. Καθηγητής, Πανεπιστημίου Κρήτης
- Ντούνη Ελένη Επίκ. Καθηγήτρια, Γ.Π.Α.



Η εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής έτυχε χορήγηση υποτροφίας από το Πρόγραμμα Ηράκλειτος ΙΙ: Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής διατριβής».

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) - Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ . Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

ΑΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- **E. Chronopoulou**, P. Madesis, B. Asimakopoulou, D. Platis, A. Tsaftaris, N.E. Labrou (2012). *Catalytic and structural diversity of the fluazifop-inducible glutathione transferases from Phaseolus vulgaris*. *Planta*, 235, 1253-1269.
- **E. Chronopoulou**, A.C. Papageorgiou, A. Markoglou and N.E. Labrou (2012). *Inhibition of human glutathione transferases by pesticides: Development of a simple analytical assay for the quantification of pesticides in water*. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 81, 43–51.
- Kotzia, G. A., Platis, D., Axarli, I. A., **Chronopoulou, E.**, Karamitros, C., Labrou, N.E. (2012). *Biocatalysis, Enzyme Engineering and Enzyme Biotechnology, Food Biochemistry and Food Processing, Second Edition*. Edited by Benjamin Simpson, Leo Nollet, Gopinadhan Paliyath and Soottawat Benjakul. John Wiley & Sons, Inc., 125-165.
- **E. Chronopoulou**, I. Axarli, I. Nianiou-Obeidat, P. Madesis, A. Tsaftaris, and N. Labrou (2011). *Structure and antioxidant catalytic function of plant glutathione transferases*. *Current Chemical Biology*, 5, 64-74.
- **E. Chronopoulou**, M. Chatzikonstantinou, P. Madesis, I. Nianiou-Obeidat and N.E. Labrou. (2013). *Structure, function and catalytic properties of human glutathione transferase P1-1*. In: *Glutathione, structure, function and biotechnological implications*. Nova Publishers, USA pp. 187-198.
- **E.G. Chronopoulou** and Nikolaos E. Labrou (2011). *Site-saturation Mutagenesis: A Powerful Tool for Structure-Based Design of Combinatorial Mutation Libraries*. *Curr. Protoc. Protein Sci.* Chapter 26:Unit 26.6.
- **E.G. Chronopoulou** and N.E. Labrou (2009). *Glutathione Transferases: Emerging Multidisciplinary Tools in Red and Green Biotechnology*. *Recent Pat Biotechnol.* 3, 211-223.
- **E. Chronopoulou**, P. Madesis, A. Tsaftaris, N.E. Labrou (2013). *Cloning and characterization of a biotic stress inducible glutathione transferase from Phaseolus vulgaris (υποβλήθηκε προς δημοσίευση)*
- **E.G. Chronopoulou** and N.E. Labrou (2013). *Synthesis and application of dye-ligand affinity adsorbents*. In *Methods in Mol. Biol.*, (in press).

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 2ο Συνέδριο Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, 4-5 Οκτωβρίου 2012, Συνεδριακό Κέντρο ΓΠΑ. Τίτλος ανακοίνωσης: «*Αναστολή της μεταφοράς της γλουταθειόνης από φυτοπροστατευτικά: ανάπτυξη ενζυμικής μεθόδου προσδιορισμού φυτοπροστατευτικών σε δείγματα νερού*».
- 8ο Πανελλήνιο Συνέδριο Βιοεπιστημών «Βιοεπιστήμες: μοχλός ανάπτυξης της κοινωνίας» Συνεδριακό και Πολιτιστικό Κέντρο Πανεπιστημίου Πατρών 18-20 Οκτωβρίου 2012. Τίτλος ανακοίνωσης: «*Πρωτεϊνική μηχανική του ενζύμου μεταφοράς της γλουταθειόνης με στόχο την ανάπτυξη βιοαισθητήρα μέτρησης ξενοβιοτικών ουσιών*».
- 63RD Congress of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, 9-11 Νοεμβρίου 2012, Κρήτη. Τίτλος ανακοίνωσης: «*Molecular and catalytic characterization of the herbicide-inducible glutathione transferases from Phaseolus vulgaris*».
- 35ο Επιστημονικό Συνέδριο, 23-25 Μαΐου 2013, Ναύπλιο. Τίτλος ανακοίνωσης: «*Protein engineering of glutathione transferase for the development of optical biosensor to detect xenobiotics*».

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας του Τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Αναπλ. Καθηγητή Λάμπρου Νικόλαο.

Καθώς η διδακτορική διατριβή είναι μια μακροχρόνια και επίπονη διαδικασία, θα ήθελα να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους, οι οποίοι στάθηκαν αρωγοί σε αυτήν μου την προσπάθεια.

Κατ' αρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπλ. Καθηγητή Λάμπρου Νικόλαο για την αδιάκοπη συμπαράσταση, την άριστη καθοδήγηση του και τις πολύτιμες συμβουλές του. Υπήρξε πάντα πρόθυμος όλα αυτά τα χρόνια, να ακούσει τους προβληματισμούς και τις απογοητεύσεις μου, μεταδίδοντας πάντα αισιοδοξία και προτείνοντας λύσεις. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την αρχή, την κατανόηση του κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μου και για τις ευκαιρίες που μου πρόσφερε. Επίσης τον ευχαριστώ θερμά για τις ουσιαστικές διορθώσεις κατά τη συγγραφή της παρούσας μελέτης.

Ο Καθηγητής Κλώνης Ιωάννης, μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής, βοήθησε σημαντικά με τις συμβουλές και τις πολύτιμες παρατηρήσεις του. Τον ευχαριστώ για ήταν πάντα πρόθυμος για επιστημονικές και όχι μόνο συζητήσεις, καθώς και για την παρότρυνσή του για έρευνα.

Ο Επίκ. Καθηγητής Φλεμετάκης Μανώλης μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής μου έδωσε σημαντική βοήθεια όταν τη χρειάστηκα.

Θέλω επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και στα άλλα μέλη της Επταμελούς Επιτροπής για την πρόθυμη συμμετοχή τους στην εξέταση μου και τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσαν για την ανάγνωση της διατριβής μου.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω το Εθνικό Στρατηγικό Πλαίσιο Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II, για τη χορήγηση υποτροφίας για την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τη φίλη Ευαγγελία Παπά, ΕΤΕΠ του Εργαστηρίου για τη βοήθεια της όλα αυτά τα χρόνια, τη συμπαράσταση και το φιλικό περιβάλλον συνεργασίας.

Θα ήταν παράλειψη μου να μην εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Δρα. Αξαρλή Ειρήνη για τις πρώτες ημέρες μου στο Εργ. Ενζυμικής Τεχνολογίας, η οποία μαζί με την Ευαγγελία Παπά, μου υπέδειξαν τις πρώτες βασικές τεχνικές με ιδιαίτερη υπομονή.

Ακόμα θέλω να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στο φίλο Υποψ. Δρ. Καραμήτρο Χρήστο για τις επιστημονικές του συμβουλές όλα αυτά τα χρόνια, ακόμα και όταν χωρίστηκαν οι δρόμοι μας. Επίσης τον ευχαριστώ για τη βοήθεια του στη συγγραφή αυτής της διατριβής, παρέχοντας μου βιβλιογραφικό υλικό όποτε του το ζητούσα.

Ευχαριστώ ακόμα την Υποψ. Δρα Λία Κουρή και τον Υποψ. Δρ. Γιώργο Τσανικλίδη, για την προθυμία και τις σημαντικές συμβουλές τους, κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων Μοριακής Βιολογίας. Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Υποψ. Δρ Κώστα Κουδουνά για την απλόχερη βοήθεια που μου πρόσφερε για την εύρεση βιβλιογραφικού υλικού καθώς και στην φίλη Λουκία για τις συζητήσεις που είχαμε και τους προβληματισμούς που μοιραζόμασταν.

Θέλω να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές που γνώρισα στο Εργ. Ενζυμικής Τεχνολογίας, γιατί η συναναστροφή μαζί τους με έκανε πολλές φορές να λύνω και δικές μου απλές απορίες. Ακόμα νοιώθω ότι με τα περισσότερα παιδιά υπήρξαμε φίλοι και πάντα υπήρχε ζεστό περιβάλλον εργασίας.

Ακόμα, θέλω να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου, την αδελφή μου, τους θείους μου και τη Σοφιάνα γιατί στάθηκαν δίπλα μου ουσιαστικά όλα αυτά τα χρόνια και ανέχθηκαν την ιδιαιτερότητα της πειραματικής μου εργασίας. Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την προσπάθεια που έκαναν να σπουδάσω και να αγαπήσω την ανθρωποκεντρική επιστήμη. Ευχαριστώ το σύζυγο μου για την ενθάρρυνση, την υπομονή, τη βοήθεια και την αισιοδοξία του από την αρχή των φοιτητικών μου χρόνων μέχρι το τέλος την διατριβής μου. Ήταν πάντα εκεί όταν το χρειαζόμουν. Όμως, πέρα από την ηθική πλευρά, σημαντική ήταν και η συμβολή του στη διαχείριση των προγραμμάτων, για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων μου και τη συγγραφή της διδακτορικής μου διατριβής.

Βέβαια δεν μπορώ να μην ευχαριστήσω το γιό μου, ο οποίος δεν χρειάζεται να κάνει τίποτα, μόνο που υπάρχει με κάνει να θέλω να γίνομαι καλύτερος άνθρωπος ...

Χρονοπούλου Ευαγγελία

Αθήνα, Μάιος 2013

ΣΥΝΤΗΜΗΣΕΙΣ

AITC	Ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας
APx	Ασκορβική υπεροξειδάση
BDNB	1-βρωμο-2,4-δινιτροβενζόλιο
BSA	Αλβουμίνη από ορό μόσχου
CDNB	1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο
CuOOH	Υδροϋπεροξειδίου του κουμηνίου
EDTA	Αιθυλενοδιαμινο-τετραοξικό οξύ
FDNB	1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο
GPx	Υπεροξειδάση του γλουταθείου
GRd	Αναγωγή του γλουταθείου
GRx	Γλουταρεδοξίνη
GSH	Γλουταθειόνη
GSTs	Μεταφοράσες της γλουταθειόνης
HED	2-2-διθειο-δισουλφίδιο
HNE	4-υδροξυ-trans2-ενενάλη
IC50	Συγκέντρωση αναστολέα που προκαλεί 50% αναστολή
IDA	Ιμινοδιοξικό οξύ
IDNB	1-ιωδο-2,4-δινιτροβενζόλιο
IPTG	Ισοπρόπυλ-β-D-θειογαλακτο-πυρανοζίδιο
K_m	Σταθερά Michaelis-Menten
K_i	Σταθερά αναστολής
NADP⁺	Φωσφορικό νικοτιναμίδιο-αδενοσίνιο-δινουκλεοτίδιο
NADPH	Φωσφορικό νικοτιναμίδιο-αδενοσίνιο-δινουκλεοτίδιο (αναγωγμένο)
NBD-Cl	4-χλωρο-7-νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο
PAGE	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης
PEITC	Ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλ-εστέρας
PEG	N-υδροξυ-ηλεκτρικός εστέρας μεθοξυ-πολυαιθυλενογλυκόλης
PNBC	π-νιτροβενζυλ-χλωρίδιο
ROS	Ενεργές μορφές οξυγόνου
RNS	Ενεργές μορφές αζώτου
S.A.	Ειδική δραστηριότητα
SDS	Δωδεκανοθειϊκό νάτριο
SNP	Πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου
TCA	Τριχλωροακετικό οξύ
TEMED	N,N,N',N'-τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη
tert-BuOOH	τ-βουτυλο-υδροϋπεροξειδίου
TRx	Θειορεδοξίνη
U(unit)	Ενζυμική μονάδα
V_{max}	Μέγιστη ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. ΟΙ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΚΑΙ ΤΑ ΑΜΙΝΟΞΕΑ	2
1.2. ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ	4
1.3. Η ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ (GSH) ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ	5
1.3.1. Η γλουταθειόνη	5
1.3.2. Ενδοκυττάρια κατανομή της γλουταθειόνης	10
1.3.3. Ρόλος της γλουταθειόνης	10
1.3.4. Ο ρόλος της γλουταθειόνης στο φυτικό οργανισμό	12
1.4. ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟ ΕΝΖΥΜΟ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GST)	15
1.4.1. Γενικά για τις GSTs	15
1.4.2. Κυτταροπλασματικές GSTs	17
1.5. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ GSTs	18
1.6. ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ GSTs	21
1.6.1. Νουκλεόφιλη υποκατάσταση	22
1.6.2. Δράση υπεροξειδάσης GPx	22
1.6.3. Δράση ισομεράσης	25
1.6.4. Καταλυτική δράση αναγωγής και θειοτρανσφεράσης	27
1.6.5. Γλουταθειονυλίωση	27
1.6.6. Προσθήκη της γλουταθειόνης σε εποξειδία	28
1.6.7. Προσθήκη της γλουταθειόνης σε διπλούς δεσμούς άνθρακα	28
1.6.8. Προσθήκη της γλουταθειόνης σε ισοθειοκυανικά παράγωγα	28
1.6.9. Μη καταλυτικός ρόλος πρωτεΐνης δέσμευσης-μεταφοράς	29
1.7. ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ GSTs	29
1.7.1. Γενικά χαρακτηριστικά της δομής	29
1.7.2. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων	30
1.7.3. Ενεργός περιοχή δέσμευσης της GSH (G-θέση)	31
1.7.4. Ενεργός περιοχή δέσμευσης ηλεκτρονιόφιλων ενώσεων (H-θέση)	32
1.7.5. Ενεργό κέντρο	33
1.7.6. Περιοχή αλληλεπίδρασης με δεσμευτή	34
1.8. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΠΟΥ ΑΚΟΛΟΥΘΟΥΝ ΟΙ GSTs	34
1.9. ΤΥΠΟΙ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ	38
1.10. ΣΥΝΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΛΛΟΣΤΕΡΙΣΜΟΣ	42
1.11. ΤΥΠΟΙ ΤΟΥ ΠΟΛΥ-ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ GSTs	45
1.12. ΦΥΤΙΚΕΣ GSTs	47
1.13. ΤΑ ΜΕΤΑΛΛΑ ΩΣ ΑΙΤΙΑ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ ΣΤΑ ΦΥΤΑ	53
1.13.1. Φυτικές GSTs και μέταλλα	55
1.14. ΦΥΤΙΚΕΣ GSTs ΚΑΙ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ	56

1.14.1. Τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα	56
1.15. GSTs ΚΑΙ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΑ	59
1.16. ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ GSTs	59
1.17. ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ GSTs	62
1.17.1. Γεωπονία	62
1.17.2. Ιατρική	63
1.17.3. Περιβάλλον	67
1.18. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ	71
1.19. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ	75
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	81
2.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ	82
2.1.1. Υλικά	82
2.1.1.1. Βιολογικά υλικά	82
2.1.1.2. Ένζυμα και πρωτεΐνες	83
2.1.1.3. Χημικά αντιδραστήρια, kits και λοιπά	83
2.1.1.4. Φυτικό υλικό	85
2.1.2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	85
2.1.2.1. Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης βακτηρίων	85
2.1.2.2. Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA	85
2.1.2.3. Διαλύματα προετοιμασίας δεκτικών κυττάρων	86
2.1.2.4. Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS)	87
2.1.2.5. Ηλεκτροφόρηση DNA και RNA	88
2.1.2.6. Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης από φυτικούς ιστούς	89
2.1.3. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ	90
2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ	91
2.2.1. Ανάπτυξη φυτών	91
2.2.2. Ψεκασμός φύλλων	91
2.2.3. Συλλογή φυτικού ιστού	92
2.2.4. Φυτικό εκχύλισμα	92
2.2.5. Απομόνωση RNA από φυτικούς ιστούς	93
2.2.6. Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων XL-1 Blue, TOP10, DH5a, BL21(DE3) και BL21pLySs tm (de3) του βακτηρίου <i>E. coli</i> (Competent cells)	94
2.2.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης	95
2.2.8. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA	96
2.2.9. Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA) και ριβονουκλεϊνικών οξέων (RNA) σε πηκτή αγαρόζης	96
2.2.10. Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πηκτή αγαρόζης	97
2.2.11. Κατεργασία δειγμάτων με τη νουκλεάση DNase I	98
2.2.12. Σύνθεση cDNA	99
2.2.13. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	100
2.2.14. Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων DNA και μετάφραση	101
2.2.15. Ένωση προϊόντων PCR στον πλασμιδιακό φορέα PEXP5- CT/TOPO [®] και μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i>	101

Top10	
2.2.16. Μέθοδος λογικού ενζυμικού ανασχεδιασμού	103
2.2.17. Μέθοδος κατευθυνόμενης ενζυμικής εξελίξεως	103
2.2.18. Ετερόλογος έκφραση των ισοενζύμων GST σε στελέχη κυττάρων <i>E. coli</i>	104
2.2.19. Λύσιμο κυττάρων και παραλαβή του ενζυμικού εκχυλίσματος	104
2.2.20. Σύνθεση του προσροφητή συγγένειας 1,4-βουτανεδιυλ-διγλυκιδυλ-αιθέρα-GSH-Sepharose-CL6B (BES-GSH)	104
2.2.21. Καθαρισμός των ισοενζύμων GSTs μέσω βιολογικής λειτουργίας χρωματογραφίας συγγένειας χρησιμοποιώντας ως προσροφητή BES-GSH	106
2.2.22. Σύνθεση του μεταλλοχηλικού προσροφητή συγγένειας με επιγλωρυθρίνη	108
2.2.23. Καθαρισμός των ισοενζύμων GSTs μέσω μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας συγγένειας χρησιμοποιώντας ως προσροφητή Ni-IDA	111
2.2.24. Καθαρισμός των ισοενζύμων GSTs μέσω χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής με χρωματογραφικό υλικό τη DEAE- Sepharose CL6B	113
2.2.25. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη χρωματομετρική μέθοδο Bradford (1976)	114
2.2.26. Διαπίδυση	115
2.2.27. Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης	116
2.2.28. Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με τριχλωροακετικό οξύ (TCA)	116
2.2.29. Ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS)	117
2.2.30. Χρώση με Coomassie Brilliant blue R-250	117
2.2.31. Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα παράγωγα νιτροβενζολίου CDNB, BDCB, IDNB, FDNB, PNBC και NBD-Cl	118
2.2.32. Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας ως πιθανά υποστρώματα το υδροϋπεροξειδίο του κουμενίου, το τ-βουτυλο υδροϋπεροξειδίο, το δι-δωδεκανικό υδροϋπεροξειδίο και το βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίο	122
2.2.33. Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο 2-2-διθειοδιαιθανολη (HED)	124
2.2.34. Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο διϋδροασκορβικό οξύ (DHA)	125
2.2.35. Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο εθακρινικό οξύ (EA)	125
2.2.36. Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο <i>trans</i> -4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη	128
2.2.37. Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο fluorodifen	129
2.2.38. Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο βρωμοσουλφοφθαλεΐνη	130
2.2.39. Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο <i>trans</i> -2-ενεναλη (HNE)	130
2.2.40. Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας ισοθειοκυανικές ενώσεις: ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλ-εστέρας	131

(PEITC) και ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας (AITC)	
2.2.41. Κινητική ανάλυση	133
2.2.42. Αναστολή της ενζυμικής αντιδράσεως και προσδιορισμός τιμής ανασταλτικής ισχύος (IC50)	133
2.2.43. Επεξεργασία αποτελεσμάτων	133
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	135
3.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	136
3.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	137
3.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	151
3.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	159
3.4.1. Ενίσχυση του γονιδίου <i>hGST1*A</i> με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσεως (PCR)	159
3.4.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA των γονιδίων <i>hGSTP1*B</i> , <i>hGSTP1*C</i> , <i>hGSTA1-1</i> <i>hGSTO1-1</i> και <i>hGSTT2-2</i>	159
3.4.3. Καθαρισμός των ενζύμων <i>hGSTA1-1</i> , <i>hGSTP1*A</i> , <i>hGSTP1*B</i> , <i>hGSTP1*C</i> , <i>hGSTT2-2</i> και <i>hGSTO1-1</i> , μέσω χρωματογραφίας συγγένειας και ιοντοανταλλαγής	161
3.4.4. Μελέτη της αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας των ενζύμων <i>hGSTA1-1</i> , <i>hGSTP1*A</i> , <i>hGSTP1*B</i> , <i>hGSTP1*C</i> , <i>hGSTT2-2</i> και <i>hGSTO1-1</i> , από φυτοπροστατευτικά προϊόντα	163
3.4.5. Επίδραση της αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας του <i>hGSTA1-1</i> , από τα εντομοκτόνα <i>dieldrin</i> και <i>spiromesifen</i>	169
3.4.5.1. Προσδιορισμός της ημίσειας ανασταλτικής ισχύος (IC50) των εντομοκτόνων <i>dieldrin</i> και <i>spiromesifen</i> , ως προς το ένζυμο <i>hGSTA1-1</i>	169
3.4.5.2. Επίδραση pH και θερμοκρασίας στην αναστολή του ενζύμου <i>hGSTA1-1</i>	171
3.4.5.3. Κινητική ανάλυση του ενζύμου <i>hGSTA1-1</i> , κάτω από διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων <i>dieldrin</i> και <i>spiromesifen</i> και προσδιορισμός του τύπου αναστολής	173
3.4.6. Προσδιορισμός της θέσης σύνδεσης των εντομοκτόνων <i>dieldrin</i> και <i>spiromesifen</i> στο ένζυμο <i>hGSTA1</i> , με μοριακή μοντελοποίηση και μοριακό ελλιμενισμό	175
3.4.7. Φωτομετρικός προσδιορισμός των εντομοκτόνων <i>dieldrin</i> και <i>spiromesifen</i> σε δείγματα νερού	177
3.4.7.1. Φωτομετρικός προσδιορισμός των εντομοκτόνων <i>dieldrin</i> και <i>spiromesifen</i> σε δείγματα νερού	177
3.4.7.2. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των εντομοκτόνων σε δείγματα νερού	178
3.4.7.3. Σύγκριση της ενζυμικής μεθόδου που αναπτύχθηκε και της HPLC για τον προσδιορισμό των εντομοκτόνων στο νερό	181
3.5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	182
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	187
4.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	188
4.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	189
4.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	190
4.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	198

4.4.1. Ενίσχυση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τα ισοένζυμα και κλωνοποίηση στον φορέα pEXP-5 CT/TA-TOPO®	198
4.4.2. Αλληλούχιση και φυλογενετική ανάλυση των ισοενζύμων	199
4.4.3. Έκφραση και καθαρισμός των ισοενζύμων	202
4.4.4. Μελέτη της δραστηριότητας των ισοενζύμων	204
4.4.5. Κινητική ανάλυση των ισοενζύμων ως προς τα υποστρώματα CDNB, CuOOH και AITC	210
4.4.6. Μελέτη αναστολής των ενζύμων έναντι φυτοπροστατευτικών προϊόντων	217
4.4.7. Μοριακή μοντελοποίηση	220
4.5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	226
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	231
5.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	232
5.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	233
5.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	239
5.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	265
5.4.1. Συλλογή και εκχύλισμα φυτικού ιστού για τη βιοχημική μελέτη του	265
5.4.2. Απομόνωση RNA και δημιουργία cDNA βιβλιοθήκης	272
5.4.3. Ενίσχυση των γονιδίων GSTs με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και εκφυλισμένους εκκινητές που κωδικοποιούν για τα ισοένζυμα και κλωνοποίηση στον φορέα pEXP-5 CT/TA-TOPO®	273
5.4.4. Επεξεργασία του πλασμιδιακού DNA με την τεχνική DNA shuffling	275
5.4.5. Επιλογή της βέλτιστης μεταλλαγμένης μορφής <i>PvGmGSTUG</i> αλληλούχιση και φυλογενετική ανάλυση	276
5.4.6. Έκφραση και καθαρισμός της μορφής <i>PvGmGSTUG</i>	279
5.4.7. Κινητική ανάλυση της μορφής <i>PvGmGSTUG</i> για το υπόστρωμα CDNB	281
5.4.8. Μελέτη του ενζύμου <i>PvGmGSTUG</i> ως προς πιθανά υποστρώματα	282
5.4.9. Σάρωση 66 φυτοπροστατευτικών προϊόντων για την εύρεση τυχόν αναστολής της μορφής <i>PvGmGSTUG</i>	286
5.4.10. Καθαρισμός των ενζύμων GSTs από το φυτό <i>P. vulgaris</i> με χρωματογραφία συγγένειας και δεσμευτή την χρωστική Cibacron blue 3GA	291
5.4.11. Λογικός ανασχεδιασμός της μορφής <i>PvGmGSTUG</i> στη θέση 117 (τεχνική Quick change)	292
5.4.12. Έκφραση και καθαρισμός των νέων μορφών που προέκυψαν από το λογικό ανασχεδιασμό	296
5.4.13. Κινητική ανάλυση των νέων μεταλλαγμένων μορφών που προέκυψαν με το λογικό ανασχεδιασμό	300
5.4.14. Σάρωση 20 φυτοπροστατευτικών προϊόντων για την εύρεση τυχόν αναστολής των νέων μορφών	305
5.4.15. Εξάρτηση της ανασταλτικής ισχύος του εντομοκτόνου endosulfan και του ισομερές α -endosulfan για τις μορφές <i>PvGmGSTUG</i> και Phe117Ile	308
5.4.16. Θερμική σταθερότητα του ενζύμου <i>PvGmGSTUG</i> και της	309

μεταλλαγμένης μορφής Phe117I	
5.4.17. Δομική σταθερότητα του ενζύμου <i>PvGmGSTUG</i> και της μεταλλαγμένης μορφής Phe117Ie στους -20 ⁰ C και η προστατευτική δράση του αντιδραστηρίου PEG	311
5.4.18. Μοριακή μοντελοποίηση της μεταλλαγμένης μορφής <i>PvGmGSTUG</i> και διαφοροποίηση της δομής εξαιτίας της αμινοξικής αλλαγής στη θέση 117	314
5.4.19. Κινητική ανάλυση της ακινητοποιημένης μορφής Phe117Ie σε κολλοειδές πήκτωμα (Sol-gel)	317
5.4.20. Προσδιορισμός της τιμής ανασταλτικής ισχύος του α -endosulfan για την ακινητοποιημένη μορφή Phe117Ie	319
5.4.21. Σταθερότητα της ακινητοποιημένης μορφής Phe117Ie	319
5.4.22. Ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου βασισμένη στην εκλεκτικότητα και δράση της μορφής Phe117Ie, με σκοπό την ανάπτυξη ενζυμικού βιοασθητήρα για την ανίχνευση του α -endosulfan	320
5.4.23. Προσδιορισμός του α -endosulfan με φασματοφωτομετρική ανάλυση\ σε δείγματα νερού με την μέθοδο που αναπτύχθηκε	323
5.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	327
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	333
ΒΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	347

Πρωτεϊνική μηχανική του ενζύμου μεταφοράση της γλουταθειόνης με στόχο την ανάπτυξη βιοαισθητήρα μέτρησης ξενοβιοτικών ενώσεων

ΧΡΟΝΟΠΟΥΛΟΥ Γ. ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης (glutathione S-transferases, GSTs, EC 2.5.1.8), είναι πολυλειτουργικά ένζυμα, που καταλύουν την πυρηνόφιλη προσβολή της σουλφυδρυλικής ομάδας του τριπεπτιδίου της γλουταθειόνης (GSH) στο ηλεκτρονιόφιλο κέντρο ενδογενών και ξενοβιοτικών ενώσεων (π.χ. φαρμάκων, φυτοπροστατευτικών προϊόντων), σχηματίζοντας υδατοδιαλυτά σύμπλοκα. Τα σύμπλοκα αυτά, απεκκρίνονται εύκολα από το κύτταρο. Οι GSTs απαντούν στα θηλαστικά, στα φυτά, στα έντομα, στους μύκητες και στα βακτήρια. Παρουσιάζουν ακόμα δράση υπεροξειδάσης, ισομεράσης, διϋδροασκορβικής ρεδουκτάσης. Τέλος, λειτουργούν και ως μεταφορείς υδρόφοβων μορίων για τη μεταφορά και αποθήκευσή τους, μέσα στο κύτταρο. Η δομική τους ευελιξία είναι αυτή που επιτρέπει και τη διαφοροποίηση της καταλυτικής τους δράσης.

Συνολικά ο σκοπός της παρούσας διατριβής, ήταν η εύρεση ενζύμων GSTs που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν, για την ανάπτυξη απλών αναλυτικών μεθόδων με δυνατότητα κατασκευής βιοαισθητήρα, για τον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε δείγματα κυρίως περιβαλλοντικά, αλλά και βιολογικά. Η αναγκαιότητα τέτοιου είδους ερευνών είναι αδιαμφισβήτητη, λόγω της αλόγιστης χρήσης φυτοπροστατευτικών προϊόντων, της υπολειμματικότητας που εμφανίζουν και της τοξικότητας τους στα οικοσυστήματα. Η έρευνα αυτή χωρίστηκε σε τρεις επιμέρους, όπου στη πρώτη (Κεφάλαιο 3), μελετήθηκαν GSTs από τον άνθρωπο, ενώ οι άλλες δύο (Κεφάλαιο 4 και 5) αφορούσαν σε φυτικές GSTs.

Στην πρώτη μελέτη, μελετήθηκαν ισοένζυμα από τον άνθρωπο, ως προς τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Αφού λοιπόν πρώτα εκφράστηκαν τα ισοένζυμα *hGSTP1*A*, *hGSTP1*B*, *hGSTP1*C*, *hGSTA1-1*, *hGSTT2-2* και *hGSTO1-1*, καθарίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας, ακολούθησε σάρωση ως προς μεγάλη

ποικιλία ζιζανιοκτόνων και εντομοκτόνων. Από τις μετρήσεις προέκυψε ότι, το hGSTA1-1 φαίνεται να αναστέλλεται περισσότερο, παρουσιάζοντας τη μεγαλύτερη αναστολή της δραστηριότητας (>95%) με τα εντομοκτόνα dieldrin και spiromesifen, ενώ οι μικρότερες τιμές IC50 παρατηρήθηκαν στους 37°C και σε pH 6,5, οι οποίες ήταν $17,9 \pm 1,7 \mu\text{M}$ και $12,1 \pm 3,4 \mu\text{M}$ αντίστοιχα. Οι ενώσεις αυτές αλληλεπιδρούν με το ένζυμο, στην περιοχή δέσμευσης των υποστρωμάτων (G- και H-περιοχή) του ενεργού κέντρου και συμπεριφέρονται σαν αναστολείς μικτού-τύπου (K_i $2,3 \pm 0,1$ και $0,1 \pm 0,01 \mu\text{M}$, έναντι GSH και CDNB, αντίστοιχα). Οι πρότυπες καμπύλες οι οποίες σχεδιάστηκαν (σταθερή απόκλιση 4,1%), με γνωστές συγκεντρώσεις των δύο εντομοκτόνων, επιτρέπουν τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό τους σε δείγματα νερού, με αποτελέσματα συγκρίσιμα της HPLC μεθόδου. Από την παρούσα μελέτη φαίνεται ότι το ισοένζυμο hGSTA1-1, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη νέων απλών μεθόδων αναλυτικού προσδιορισμού φυτοπροστατευτικών με ικανοποιητική ακρίβεια, συνδυάζοντας χαμηλό κόστος και ελάχιστη προετοιμασία δείγματος.

Οι μεταφοράδες της γλουταθειόνης (GSTs) που απαντούν στα φυτά, αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια από ισοένζυμα, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση συνθηκών καταπόνησης και στην αποτοξίνωση ξενοβιοτικών. Τέσσερα GST ισοένζυμα από φύλλα του φυτού *P. vulgaris*, αλληλουχήθηκαν και η ανάλυση των cDNA έδειξε υψηλή ομολογία με GSTs των τάξεων τ (*tau*) και ϕ (*phi*). Στη συνέχεια εκφράστηκαν σε *E. coli* και καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας. Ακολούθησε προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας των ισοενζύμων έναντι 20 διαφορετικών υποστρωμάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ισοένζυμα GSTs καταλύουν μεγάλο εύρος αντιδράσεων και επιδεικνύουν ευρεία εκλεκτικότητα. Πραγματοποιήθηκε μοριακή μοντελοποίηση και ανάλυση της δομής, ώστε να αναγνωριστούν τα δομικά χαρακτηριστικά, να κατανοηθεί η εξειδίκευση υποστρώματος και ο καταλυτικός μηχανισμός αυτών των ενζύμων. Τα αποτελέσματα αυτά έδωσαν νέα στοιχεία σχετικά με την καταλυτική και δομική ετερογένεια των GSTs του *P. vulgaris*.

Η μελέτη δραστηριότητας φανέρωσε την ποικιλομορφία που χαρακτηρίζει αυτά τα ισοένζυμα, ως προς την εξειδίκευσή τους. Για το κάθε ισοένζυμο υπήρξε διαφορετικό καλύτερο υπόστρωμα, με τα ισοένζυμα *PvGSTU1-1*, *PvGSTU2-2*, *PvGSTU3-3* και *PvGSTF1-1*, να παρουσιάζουν μεγαλύτερη δραστηριότητα, ως προς τα υποστρώματα

ισοθειοκυανικό αλλυλ-εστέρα, 4-χλωρο-7-νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο, 1-χλώρο-2,4-δινιτροβενζόλιο και 2,2 διθειοδιαιθανόλη, αντίστοιχα.

Δομικές αναλύσεις έδειξαν ότι οι *PvGSTs* μοιράζονται ίδια χαρακτηριστικά με άλλες κυτταροπλασματικές φυτικές *GSTs*, με διαφορές στο ενεργό τους κέντρο και στη C-τελική περιοχή, καθώς και στον σύνδεσμο των N- και C- τελικών περιοχών. Η ετερογένεια που παρατηρήθηκε στη C-τελική περιοχή, φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την διαφορετική εξειδίκευση στις *PvGSTs*.

Τα παραπάνω ισοένζυμα όμως που μελετήθηκαν, δεν έδειξαν ικανοποιητική ευαισθησία αναστολής, ως προς φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Έτσι, έχοντας ως σκοπό την ανάπτυξη βιοαισθητήρα ανίχνευσης και προσδιορισμού φυτοπροστατευτικών προϊόντων, αποφασίστηκε η εφαρμογή μεθόδων πρωτεϊνικής μηχανικής, ώστε να διευρυνθεί η δυνατότητα ευρέσεως νέων ενζύμων *GSTs*, με ικανοποιητική ευαισθησία ως προς τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα.

Για το σκοπό αυτό καταπονήθηκαν φυτά *P.vulgaris* και *G.max*, θέλοντας να επαχθεί η έκφραση των *GSTs*, απομονώθηκε RNA με σκοπό τη δημιουργία cDNA βιβλιοθήκης. Χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκφυλισμένους εκκινητές και PCR, απομονώθηκαν *GST* γονίδια από φύλα, βλαστό και ρίζα. Τα *GST* γονίδια υποβλήθηκαν σε *in vitro* κατευθυνόμενη εξέλιξη (DNA shuffling). Η βιβλιοθήκη νέων *GST* γονιδίων που προέκυψε, κλωνοποιήθηκε σε φορέα κατάλληλο για έκφραση σε *E. coli*. Σάρωση της βιβλιοθήκης, οδήγησε στην επιλογή μιας νέας μορφής *GST* ενζύμου, που ανήκει στην τ τάξη. Το νέο αυτό ένζυμο (*PvGmGSTUG*) καθαρίστηκε με χρωματογραφία συγγένειας και μελετήθηκε κινητικά. Επίσης ελέγχθηκε η εκλεκτικότητά του, ως προς 20 υποστρώματα και 66 φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Το ένζυμο αυτό εμφανίζει υψηλή δράση μεταφοράς και υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης.

Μελετώντας τα διαφορετικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα, βρέθηκαν κυρίως τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα και οι στρομπιλουρίνες (μυκητοκτόνα), να είναι ισχυροί αναστολείς του ενζύμου. Η ευαισθησία του ενζύμου ως προς τα φυτοπροστατευτικά βελτιώθηκε περαιτέρω, εφαρμόζοντας κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση κορεσμού στη θέση Phe117 της αμινοξικής αλληλουχίας. Τελικά προέκυψαν επτά νέες μεταλλαγμένες μορφές, οι οποίες σε γενικές γραμμές διατήρησαν παρόμοια κινητική συμπεριφορά με αυτόν του ενζύμου *PvGmGSTUG*,

παρουσιάζοντας όμως βελτίωση ως προς τη συγγένεια του με τη GSH. Η μορφή Phe117Ile εμφάνισε 5-φορές υψηλότερη καταλυτική αποτελεσματικότητα και μεγαλύτερη ευαισθησία έναντι της ομάδας των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων. Συνεπώς, η μορφή Phe117Ile χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη κατασκευής οπτικού βιοαισθητήρα.

Το ένζυμο ακινητοποιήθηκε σε σύστημα sol-gel αλκοξυσιλανίων (TEOS/PTMOS), το ίδιο και οι δείκτες pH bromocresol purple (όξινος) και phenol red (βασικός). Έτσι με σύστημα δύο διαφορετικών εγκλωβισμών, αναπτύχθηκε αναλυτική μέθοδος προσδιορισμού του ισομερούς α -endosulfan. Το σύστημα εμφανίζει γραμμικότητα στην περιοχή pH=4-7 στα 562 nm. Πρότυπη καμπύλη για το α -endosulfan σχεδιάστηκε σε εύρος συγκέντρωσης 0-30 μ M.

Protein engineering of the enzyme glutathione S-transferase for the development of optical biosensor to detect xenobiotics

CHRONOPOULOU G. EVANGELIA

ABSTRACT

Glutathione S-transferases (GSTs, EC 2.5.1.8), are multifunctional enzymes that catalyze the nucleophilic addition of the sulfur atom of glutathione to the electrophilic groups of a large variety of endogenic and xenobiotic (such as drugs, pesticides), thereby increasing their solubility and helping their excretion from the cell. GSTs can be found in mammals, plants, insects, bacteria and fungi. They have also more functions, like peroxidase, isomerase and dehydroascorbate reductase activity. In addition, GSTs are implicated in the intracellular transport and storage of a broad range of structurally diverse hydrophobic ligands. GSTs structural flexibility allows exhibit different catalytic functions.

The purpose of the present thesis, was the evaluation of GSTs enzymes that could be used for the development of simple analytical methods for pesticides determination. This research can be divided in three parts, with the first one (Chapter 3) describes results from human GSTs, while the other two (Chapter 4 and 5) deal with plant GSTs.

In the first part human GSTs (hGSTP1*A, hGSTP1*B, hGSTP1*C, hGSTA1-1, hGSTT2-2 and hGSTO1-1), were expressed and purified using affinity chromatography. Then, screening was carried out, for the evaluation of the inhibition potency of these isoenzymes, toward a wide range of insecticides and herbicides. The purpose of this project, was to develop simple assays for the determination of pesticides in water samples, based on GSTs use. The insecticides dieldrin and spiromesifen were identified as potent reversible inhibitors toward hGSTA1-1, with IC₅₀ values equal to $17.9 \pm 1.7 \mu\text{M}$ and $12.1 \pm 3.4 \mu\text{M}$, respectively. Based on *in silico* docking analysis and kinetic inhibition studies it was concluded that dieldrin and spiromesifen bind specifically to the enzyme presumably, at a distinct position that partially overlaps with both the G- and H-site. The ability of dieldrin and

spiromesifen to inhibit hGSTA1-1 activity, was exploited for the development of analytical quantification assays for these two pesticides. Linear calibration curves were obtained for dieldrin and spiromesifen, with useful concentration in the range of 0-10 μ M. The reproducibility of the assay response, expressed by relative standard deviation, was in the order of 4.1% (N = 28). The method was successfully applied to the determination of these pesticides in real water samples, without sample preparation steps. The enzyme-based assays have potential advantages over bioassays and other analytical methods based on HPLC, in terms of lower cost and technical complexity. Moreover, they provide reasonable sensitivity for certain applications, such as the direct determination of pesticide residues in water samples.

Plant GSTs comprise a family of isoenzymes that play essential role in plant defense under biotic and abiotic stress, as well as in pesticide detoxification. Four GST isoenzymes from leaves of *P.vulgaris*, were isolated. Analysis of the cDNA clones, showed that the deduced amino acid sequences share high homology with GSTs that belong to *phi* and *tau* classes. The isoenzymes were expressed in *E. coli* and their substrate specificity was determined towards 20 different substrates. The results showed that the GSTs from *P. vulgaris* (*Pv*GSTs), catalyze a broad range of reactions and exhibit quite varied substrate specificity.

Structural analysis shows that *Pv*GSTs share the same overall structure like others cytosolic plant GSTs, with differences at their active center and in the C-terminal domain, as well as in the linker of N- and C- terminal domains. The structural heterogeneity within the C-terminal domain seems to be responsible for the substrate variability and specificity across *Pv*GSTs.

After treatment of *P.vulgaris* and *G.max* under stress conditions, for the GST induction, RNA was isolated for cDNA creation, using degenerated primers and reverse transcription-PCR. Large diversity in GST genes was accomplished employing directed evolution through DNA shuffling. The shuffled library of new GST genes was cloned and expressed in *E. coli*. Screening of the library led to the isolation of a novel GST enzyme that displays both glutathione transferase and glutathione peroxidase activities. The enzyme was purified by affinity chromatography and characterized by kinetic analysis towards 20 different substrates and 66 different pesticides. The results showed that the organochloride insecticides and

strobilurins (fungicides) are strong inhibitors of the enzyme. The specificity of the enzyme towards pesticides was further improved using site-saturation mutagenesis at position Phe117. Seven new mutants were selected and characterized. The mutant Phe117Ile displays 5-fold higher catalytic efficiency and higher sensitivity towards organochloride insecticides. Therefore, the mutant GSTPhe117Ile was used for the research development of an optical biosensor. The enzyme was immobilized in alkoxysilane (TEOS/PTMOS) sol-gel system in the presence of the pH indicators bromocresol purple (acidic) and phenol red (basic). The bioactive material exhibits linear regression in the range pH=4-7 at 562 nm and was used for the development of an analytical method for the determination of α -endosulfan. The calibration curve and analytical range for α -endosulfan determination is 0-30 μ M.

*Στο σύζυγο μου
στους γονείς μου,
και στο γιο μου....*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ ΤΑ ΑΜΙΝΟΞΕΑ

Οι πρωτεΐνες είναι οι μοριακές μηχανές, οι δομικοί λίθοι και τα «χέρια» του ζωντανού κυττάρου. Μία από τις σημαντικότερες λειτουργίες τους, είναι η ενζυμική κατάλυση χημικών μετατροπών, μέσα και γύρω από το κύτταρο. Επίσης οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες ελέγχουν την έκφραση γονιδίων και οι πρωτεΐνες-υποδοχείς (στις λιπιδικές μεμβράνες) δέχονται μεσοκυττάρια σήματα, τα οποία συνήθως μεταφέρονται μέσω των ορμονών. Ακόμα είναι υπεύθυνες για τη διαμεμβρανική μεταφορά πρωτονίων και ηλεκτρονίων, που παρέχονται για την εξ'ολοκλήρου βιοενεργητική, όπως η απορρόφηση του φωτός, η αναπνοή, η παραγωγή ATP κ.α. (Finkelstein & Ptitsyn, 2002).

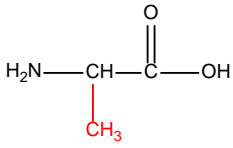
Οι πρωτεΐνες αποτελούνται από 20 αμινοξέα τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με αμέτρητους συνδυασμούς, μέσω των πεπτιδικών δεσμών. Οι διαφορετικές τους βιολογικές λειτουργίες, δεν οφείλονται μόνο στα αμινοξέα και στην πρωτοταγή δομή τους αλλά και στις τριτοταγείς δομές (Maitra & Nowick, 2003). Ακόμα και μια μικρή αλλαγή της δομής τους, μπορεί να επιφέρει δραματικές αλλαγές μέχρι και απώλεια, στη δραστικότητα τους (Finkelstein & Ptitsyn, 2002). Όλα τα αμινοξέα τα οποία συμμετέχουν στην κατασκευή πρωτεϊνών είναι *α*-αμινοξέα, δηλαδή η αμινομάδα και η ομάδα του καρβοξυλικού οξέος διαχωρίζονται από ένα άτομο άνθρακα C_{α} . Κάθε αμινοξύ διαφέρει στην πλευρική αλυσίδα που συνδέεται στον C_{α} άνθρακα (van Holde et al., 2010) και σύμφωνα με αυτές κατατάσσονται (Σχήμα 1.1).

Παρά την πολυπλοκότητα της δομής των πρωτεϊνών, έχουν προκύψει όροι που περιγράφουν απλά κάποια δομικά στοιχεία, όπως *α*-έλικες, *β*-ελάσματα, στροφές και βρόγχοι. Πολλές από τις αλληλεπιδράσεις που συμμετέχουν στην δομή των πρωτεϊνών είναι μη ομοιοπολικές, όπως οι υδρόφοβες, οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και οι δεσμοί υδρογόνου (Maitra & Nowick, 2003).

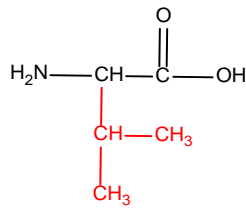
Οι δομές των φυσικών πρωτεϊνών φαίνεται να αποτελούν λεπτή ισορροπία μεταξύ μεγάλων ενεργειακών μαζών, που προκύπτουν από την άθροιση μεγάλου αριθμού ξεχωριστών αδύναμων αλληλεπιδράσεων. Για παράδειγμα η φυσική (N) δομή μιας πρωτεΐνης 100 αμινοξέων μπορεί να διαφέρει από την μετουσιωμένη μορφή (U) λιγότερο από 15 kcal/mol, ενώ οι δεσμοί υδρογόνου, η εντροπία της αλυσίδας, οι υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, καθώς και οι van der Waals δεσμοί ξεχωριστά, μπορούν να έχουν εκατοντάδες kcal/mol (Kallenbach et al., 2003).

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

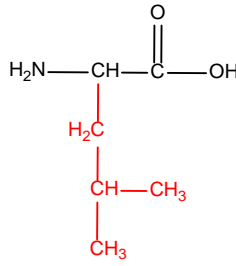
Μη πολικά (υδρόφοβα αμινοξέα)



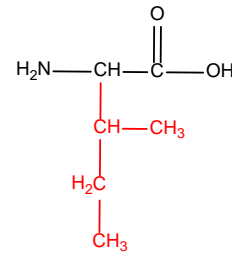
Αλανίνη (Ala, A)



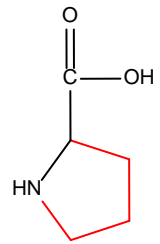
Βαλίνη (Val, V)



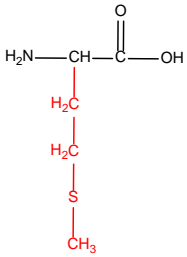
Λευκίνη (Leu, L)



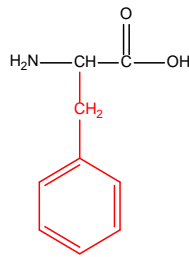
Ισολευκίνη (Ile, I)



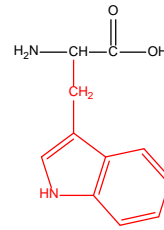
Προλίνη (Pro, P)



Μεθειονίνη (Met, M)

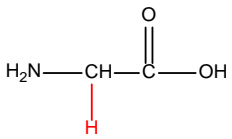


Φαινυλαλανίνη (Phe, F)

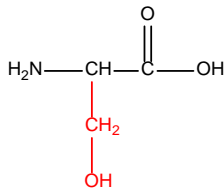


Τρυπτοφάνη (Trp, W)

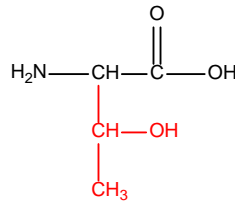
Απόρτιστα πολικά αμινοξέα



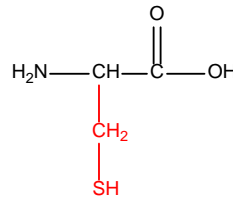
Γλυκίνη (Gly, G)



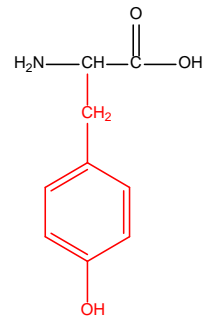
Σερίνη (Ser, S)



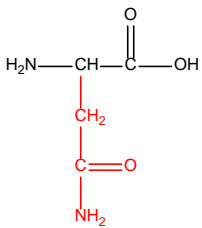
Θρεονίνη (Thr, T)



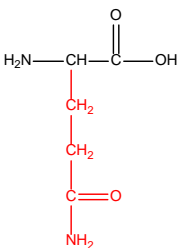
Κυστεΐνη (Cys, C)



Τυροσίνη (Tyr, Y)

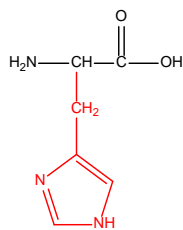


Ασπαραγίνη (Asn, N)

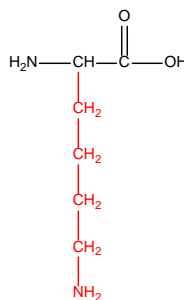


Γλουταμίνη

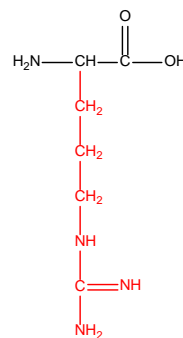
Θετικώς φορτισμένα (βασικά) αμινοξέα



Ιστιδίνη (His, H)

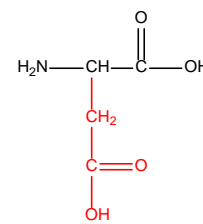


Λυσίνη (Lys, K)

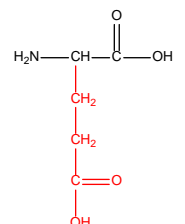


Αργινίνη (Arg, R)

Αρνητικώς φορτισμένα (όξινα) αμινοξέα



Ασπαραγινικό οξύ (Asp, D)



Γλουταμινικό οξύ (Glu, E)

Σχήμα 1.1. Τα 20 φυσικά αμινοξέα που μετέχουν στην πρωτεϊνσύνθεση.

1.2 ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

Καθώς αρκετές φορές θα αναφερθεί ο όρος εξειδίκευση ενζύμου, παρακάτω παρατίθενται συνοπτικά οι υποθέσεις σχετικά με αυτή. Η ιδιότητα αυτή των ενζύμων επιτρέπει στις καταλυμένες αντιδράσεις να παρουσιάζουν εξειδίκευση, τόσο ως προς το υπόστρωμα της αντίδρασης όσο και προς το προϊόν.

- Υπόθεση *Fischer-κλειδαριάς και κλειδιού* (1894)

Στην υπόθεση αυτή το υπόστρωμα (‘κλειδί’) έχει δομή συμπληρωματική προς τη δομή της ενεργού περιοχής (‘κλειδαριά’), στην οποία δεσμεύεται. Οι δομές του υποστρώματος και της ενεργού περιοχής, παραμένουν σταθερές καθ’ όλη τη διάρκεια της διαδικασίας δεσμεύσεως και σχηματισμού του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος. Η συγκεκριμένη υπόθεση, παρουσιάζει αδυναμίες καθώς δεν λαμβάνει υπόψη τη δομική ευκαμψία και πλαστικότητα του ενζυμικού μορίου.

- Υπόθεση *Koshland-υπόθεση επαγόμενης προσαρμογής* (1958)

Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, η δομή της ενεργού περιοχής είναι εύκαμπτη έτσι ώστε το ένζυμο να προσαρμόζεται σταδιακά στερεοδιατακτικά, καθώς το υπόστρωμα δεσμεύεται. Θα μπορούσε να παρομοιαστεί με το ταίριασμα του γαντιού (ένζυμο) στα δάκτυλα του χεριού (υπόστρωμα). Το υπόστρωμα έχει συμπληρωματική δομή προς την ενεργό περιοχή του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος, και όχι ως προς την ενεργό περιοχή του ελεύθερου ενζύμου.

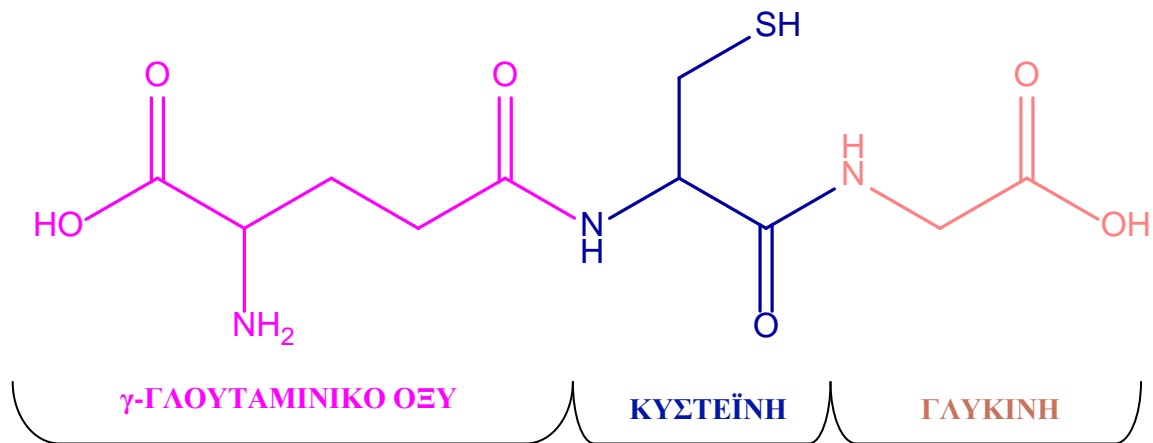
- Υπόθεση *Ogston* (1948)

Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, οι αλληλεπιδράσεις στο σύμπλοκο υποστρώματος-ενεργού περιοχής είναι δυνατόν να αντιστοιχούν σε διαφορετικές λειτουργίες δεσμεύσεως και καταλύσεως. Η ενεργός περιοχή φέρει θέσεις δεσμεύσεως που αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες ομάδες του υποστρώματος και κρατούνται αμοιβαία σε σταθερό προσανατολισμό, φέρνοντας με αυτό τον τρόπο την ομάδα υποστρώματος που θα δεχτεί τη χημική αντίδραση στη θέση καταλύσεως (Κλώνης, 2007).

1.3. Η ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ (GSH) ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ

1.3.1. Η ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ

Η γλουταθειόνη πρωτοανακαλύφθηκε το 1888 στη ζύμη από τον Rey-Pailhade, ενώ ο Hopkins την απομόνωσε το 1921 από μυϊκό ιστό και βραβεύτηκε με το βραβείο Νόμπελ (1929) για την διαδικασία προετοιμασίας του τριπεπτιδίου αυτού σε κρυσταλλική δομή (Noctor et al., 2011). Το τριπεπτίδιο γ-L-γλουταμυλ-L-κυστεΐνη-γλυκίνη με το κοινό όνομα γλουταθειόνη (GSH), είναι μία θειόλη (Σχήμα 1.2) η οποία απαντά με αφθονία σε όλα τα κύτταρα των θηλαστικών (Reed, 1990, Anderson, 1998), των φυτών (Zechmann et al., 2011) και των αερόβιων βακτηρίων (σπανιότερα των αναερόβιων) (Rouhier et al., 2008). Απαντά δε σε συγκεντρώσεις μέχρι και 10 mM (Rouhier et al., 2008, Pompella et al., 2003). Η GSH αποτελεί σχετικά σταθερό πεπτίδιο στο ενδοκυττάριο περιβάλλον καθώς οι πεπτιδάσες διασπούν δεσμούς των α-καρβοξυλικών ομάδων των αμινοξέων και τυπικά, όχι των γ-καρβοξυλικών ομάδων. Επίσης η γλυκίνη στη C- τελική θέση δεν επιτρέπει τη διάσπαση από την γ-γλουταμυλο κυκλοτρανσφεράση (Lushchak, 2012).



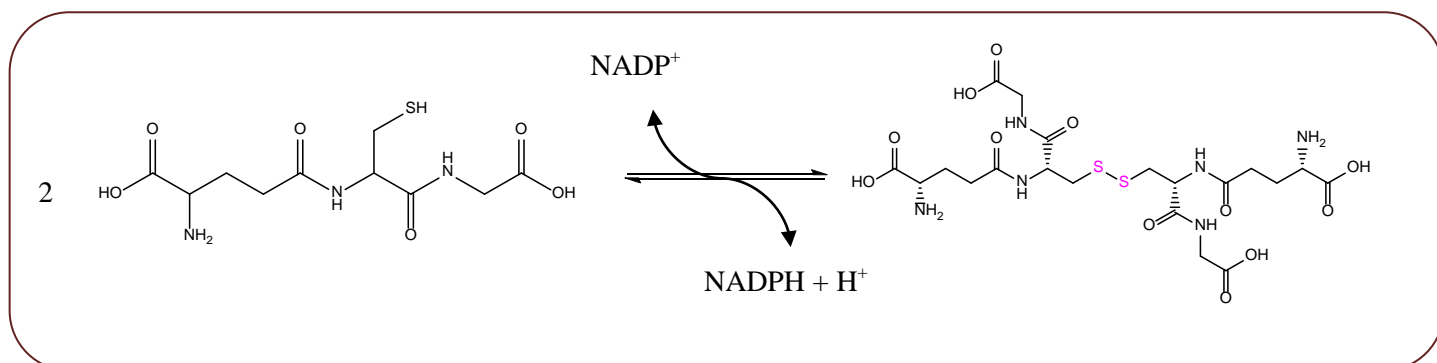
Σχήμα 1.2. Το τριπεπτίδιο της γλουταθειόνης (ανηγμένη μορφή).

Η γλουταθειόνη εναλλάσσεται μεταξύ της ανηγμένης της μορφής (GSH) και της οξειδωμένης (GSSG). Η οξειδωμένη μορφή προκύπτει ύστερα από οξείδωση και

σχηματισμό δισουλφιδικής γέφυρας μεταξύ δύο μορίων γλουταθειόνης (Σχήμα 1.3). Στα υγιή κύτταρα περισσότερο από το 90% της GSH απαντά στην ανηγμένη μορφή (Mittler et al., 2004). Καθώς η βιολογική κατάσταση ενός κυττάρου, σχετίζεται με την οξειδοαναγωγική κατάσταση στην οποία βρίσκεται, είναι λογικό ο λόγος GSSG/GSH να εξυπηρετεί ως σημαντικός δείκτης μιας τέτοιας κατάστασης και να ορίζεται ως οξειδοαναγωγικό δυναμικό:

$$E_{\text{GSSG/2GSH}} = -269,55 \log\left(\frac{[\text{GSH}]^2}{[\text{GSSG}]}\right) \text{ mV στους } 25 \text{ }^\circ\text{C και pH 7.0}$$

Όσο μεγαλύτερο είναι το δυναμικό τόσο περισσότερο κυριαρχεί η οξειδωμένη μορφή, συνεπώς τόσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια ως προς τα ηλεκτρόνια. Η μεγαλύτερη αρνητική τιμή αυτού του δυναμικού είναι στην αρχική φάση ανάπτυξης των φυτών (Schäfer & Buettner, 2001). Στα περισσότερα κύτταρα και ιστούς, το εκτιμώμενο δυναμικό οξειδοαναγωγής για τον παραπάνω λόγο, κυμαίνεται από -260mV έως -150mV (Lushchak, 2012).

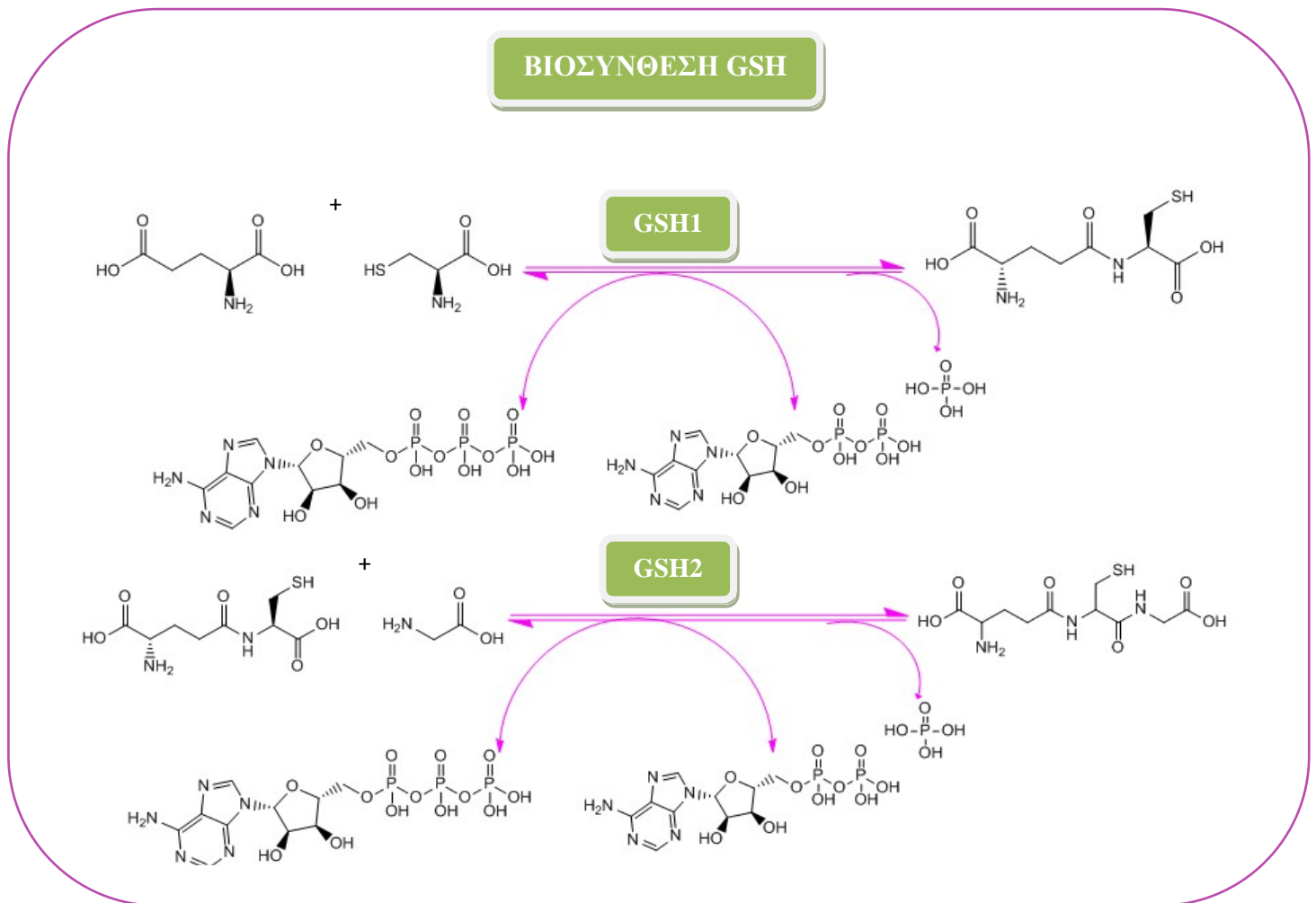


Σχήμα 1.3. Η ανηγμένη (GSH) και η οξειδωμένη μορφή (GSSG) της γλουταθειόνης.

Η σύνθεση της GSH πραγματοποιείται σε δύο στάδια, τα οποία εξαρτώνται από την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP). Στο πρώτο στάδιο, η κυστεΐνη συνδέεται με το γλουταμινικό για να σχηματιστεί η γ-γλουταμυλοκυστεΐνη. Αυτή η αντίδραση ξεκινά με τη συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (GSH1). Στο δεύτερο στάδιο, η γλυκίνη συνδέεται με την γ-γλουταμυλοκυστεΐνη, από τη συνθετάση της γλουταθειόνης (GSH2), ώστε να σχηματιστεί το τελικό προϊόν (Zechmann et al., 2011) (Σχήμα 1.4). Η ενέργεια και των δύο αντιδράσεων, προκύπτει από την

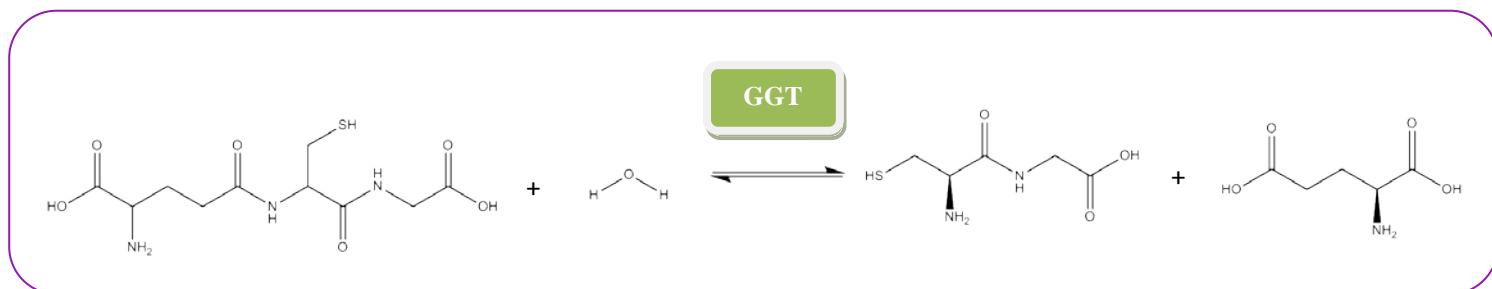
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

υδρόλυση της ATP. Τα κύρια κέντρα σύνθεσης της γλουταθειόνης είναι τα πλαστίδια και το κυτταρόπλασμα (Wachter et al., 2005). Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι το πρώτο ένζυμο βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης (συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης) βρίσκεται υπό *αναδραστική αναστολή* από τη γλουταθειόνη, σε μοριακή αναλογία 1:1, ώστε συγκέντρωση της γλουταθειόνης να μην ξεπερνά τα απαραίτητα επίπεδα (Κλώνης, 2007).



Σχήμα 1.4. Τα δύο στάδια της σύνθεσης της γλουταθειόνης. Στο πρώτο στάδιο η κυστεΐνη συνδέεται με το γλουταμινικό, με τη βοήθεια του ενζύμου συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (GSH1). Στο δεύτερο στάδιο η γλυκίνη συνδέεται με την γ-γλουταμυλοκυστεΐνη από τη συνθετάση της γλουταθειόνης (GSH2) ώστε να σχηματιστεί το τελικό προϊόν.

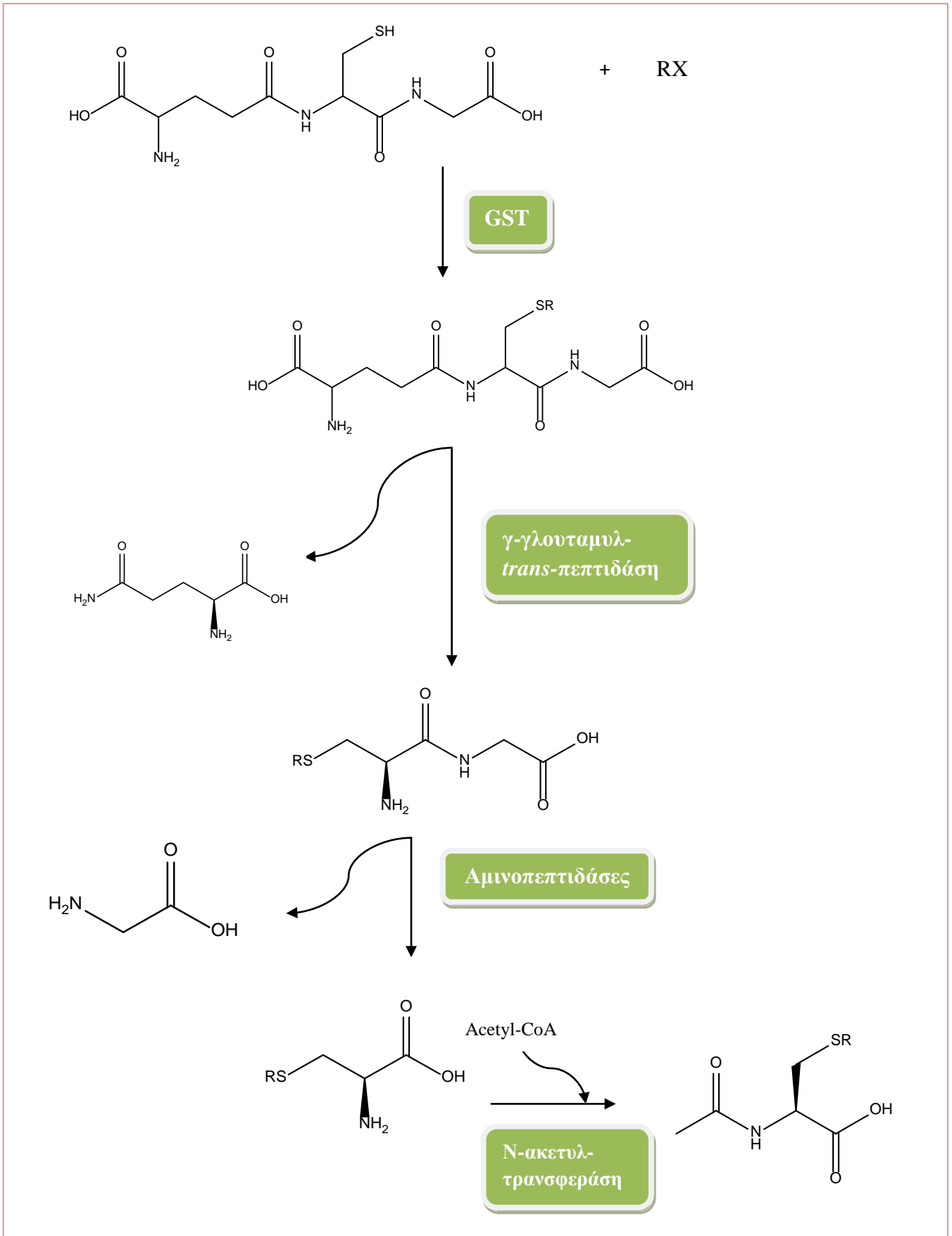
Εξωκυττάρια η GSH μπορεί να υδρολυθεί από το ένζυμο γ -L-γλουταμυλο τρανσπεπτιδάση (GGT, E.C. 2.3.2.2), μεταφέροντας τη γ -γλουταμυλομάδα στο νερό για να σχηματίσει γλουταμινικό (Σχήμα 1.5) (Zhang & Forman, 2009) ή υδρολύεται σε αμινοξέα και πεπτίδια (Lushchak, 2012).



Σχήμα 1.5. Υδρόλυση γλουταθειόνης.

Η γλουταθειόνη μπορεί να απεκκρίνεται από το κύτταρο ως GSH ή GSSG ή GSH-σύμπλοκο. Τα σύμπλοκα με τη GSH υδρολύονται περαιτέρω και επαναπορροφούνται ενώ τα κατάλοιπα της κυστεΐνης παραμένουν δεσμευμένα στα ξενοβιοτικά και αποβάλλονται από τον οργανισμό. Τα περισσότερα σύμπλοκα-GSH μεταβολίζονται σε μερκαπτουρικό οξύ και αποβάλλονται από τον οργανισμό (Σχήμα 1.6) (Lushchak, 2012).

ΕΙΣΑΓΩΓΗ



Σχήμα 1.6. Γλουταθειόνη και βιοσύνθεση μερκαπτοϋρικού οξέος.

1.3.2. ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ

Η GSH συντίθεται στο κυτταρόπλασμα και διανέμεται στα ενδοκυττάρια όργανα, όπου και συμμετέχει στη λειτουργία τους, η οποία σχετίζεται με την ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου (Lushchak, 2012). Η συγκέντρωση της GSH, δεν είναι η ίδια σε όλα τα υποκυττάρια οργανίδια ή στα κύτταρα (Samiec et al, 2000), ενώ η εξωκυττάρια συγκέντρωσή της (π.χ. στο πλάσμα) είναι μικρότερη σε σχέση με την ενδοκυττάρια (Smith et al, 1996). Απαντά στα μιτοχόνδρια, στον πυρήνα και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Στα περισσότερα διαμερίσματα βρίσκεται σε ανηγμένη μορφή, ενώ στο ενδοπλασματικό δίκτυο παρουσιάζει και υψηλό ποσοστό της οξειδωμένης της μορφής. Η συγκέντρωση της GSH στα μιτοχόνδρια είναι μεγαλύτερη και ο ρόλος της σε αυτά τα οργανίδια είναι πολύ σημαντικός, αρκεί να αναφέρουμε ότι η γλουταθειόνη παίζει πολύ σημαντικό ρόλο προστατεύοντας την καρδιολιπίνη των μεμβρανών των μιτοχονδρίων, εμποδίζοντας έτσι την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από την εσωτερική μεμβράνη, με σκοπό την απόπτωση (Lushchak, 2012).

Στα φυτικά κύτταρα απαντά σε εύρος συγκεντρώσεως από 0,5-10 mM (Noctor et al., 2012). Στα σπορόφυτα τα υψηλότερα επίπεδα γλουταθειόνης έχουν ανιχνευθεί στα μιτοχόνδρια και τα χαμηλότερα στα πλαστίδια, ενώ απαντά σε ενδιάμεσες συγκεντρώσεις στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα και στο υπεροξείσωμα (Zechmann et al., 2010). Η γλουταθειόνη απαντά στα χυμοτόπια μόνο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, όπως υψηλή συγκέντρωση θείου στο έδαφος (Höller, et al., 2010), ενώ δεν μπόρεσε να ανιχνευθεί στα κυτταρικά τοιχώματα (Zechmann et al., 2010).

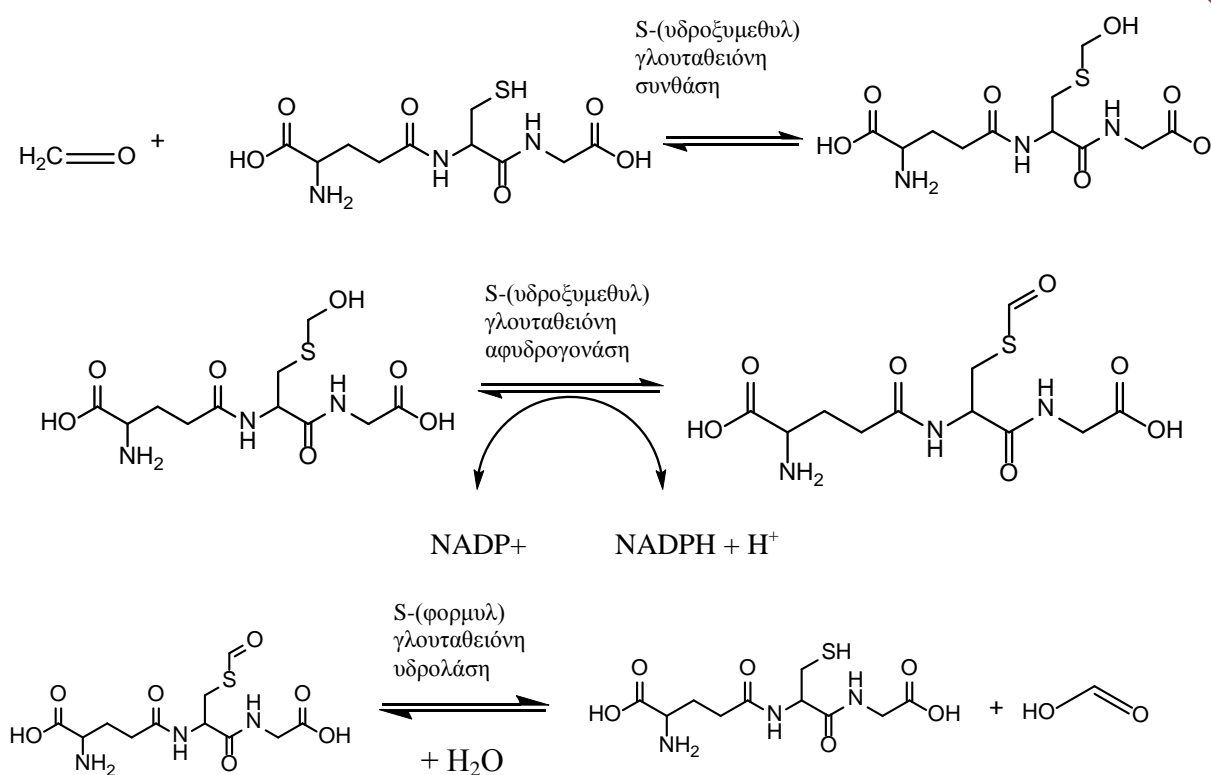
1.3.3. ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ

Η GSH παίρνει μέρος σε πολλές βιοχημικές διεργασίες (Josephy & Mannervic, 2006), ενώ θεωρείται ο σημαντικότερος ρυθμιστής της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής κατάστασης, καθώς συμμετέχει στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μέσω της ενεργής σουλφυδρυλομάδας της κυστεΐνης (Mendoza-Cozatl et al., 2005). Λόγου χάριν, η GSH προστατεύει το κύτταρο από ηλεκτρονιόφιλους παράγοντες, από τις Ενεργές Μορφές Οξυγόνου (ROS) και τις Ενεργές Μορφές Αζώτου (RNS) ((Lushchak, 2012). Προστατεύει τις πρωτεΐνες από την οξείδωση

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

(Dixon et al., 2005, Hurd et al., 2005), όπως και τις GSTs για τις οποίες λειτουργεί και ως υπόστρωμα ή συμπαράγοντας (Chronopoulou et al., 2011). Ακόμα λειτουργεί ως συνένζυμο στη βιοσύνθεση των δεοξυριβονουκλεοτιδίων (Holmegren, 1976), ενώ συμμετέχει στην βιοσύνθεση αμινοξέων και στην επιδιόρθωση του DNA (Lushchak, 2012). Παίρνει μέρος στην οξειδοαναγωγική ρύθμιση μοριακών διεργασιών (Forman et al, 2004) και αποτελεί φορέα μοριακών μηνυμάτων ('σινιάλων') όπως του οξειδίου του αζώτου (Naroli & Ignarro, 2003). Ακόμα εμπλέκεται στην έκφραση γονιδίων και στην απόπτωση (Sies, 1999), καθώς και στο μεταβολισμό οιστρογόνων, λευκοτριενίων και προσταγλανδινών (Lushchak, 2012).

Η GSH προστατεύει από παραπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού, όπως η μεθυλγλυοξάλη και άλλα α-διακαρβονύλια, τα οποία μπορεί να εμπλέκονται στην παραγωγή ROS. Η γλουταθειόνη παίζει το ρόλο συμπαράγοντα στον καταβολισμό της μεθυλογλυοξάλης, στις ζύμες και στα θηλαστικά. Επίσης συμμετέχει στην αποτοξίνωση των θηλαστικών, των φυτών και των ζυμών, από ενδογενείς τοξικές ενώσεις όπως η φορμαλδεΰδη (Σχήμα 1.7). Τέλος συμμετέχει στη μεταφορά των μετάλλων (π.χ. ιόντα Pb, Zn, Cu, Cd, As) και στην αναγωγή τους όπως στην περίπτωση του Cr^{+6} σε Cr^{+3} , καθώς και του Cu^{+2} σε Cu^{+} (Lushchak, 2012).



Σχήμα 1.7. Μηχανισμός αποτοξίνωσης της φορμαλδεΐδης με συνυπόστρωμα τη GSH.

1.3.4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ ΣΤΟ ΦΥΤΙΚΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ

Η GSH εκπληρώνει πολλούς ρόλους στο φυτικό μεταβολισμό, καθώς και στην άμυνα των σπορόφυτων κατά τη διάρκεια καταπονήσεων που οφείλονται σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες (Foyer & Noctor, 2009). Στα σπορόφυτα εμπλέκεται στη αποτοξίνωση των ελεύθερων ριζών, στην οξειδοαναγωγική σηματοδότηση, στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων και της δραστηρότητας των ενζύμων ((Foyer & Noctor, 2009). Η γλουταθειόνη επίσης εμπλέκεται στην αποτοξίνωση από τα ξενοβιοτικά, τα ζιζανιοκτόνα (Edwards et al., 2005, DeRidder, & Goldsbrough, 2006) και τα βαρέα μέταλλα όπως το κάδμιο (Ammar et al., 2008, DalCorso et al., 2008). Συγκεκριμένα για τα βαρέα μέταλλα, η GSH εμπλέκεται στην μεταφορά τους στο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

χυμοτόπιο μέσω της ρύθμισης της βιοσύνθεσης των φυτοχηλατινών (Zhu et al. 1999, Ammar et al., 2008).

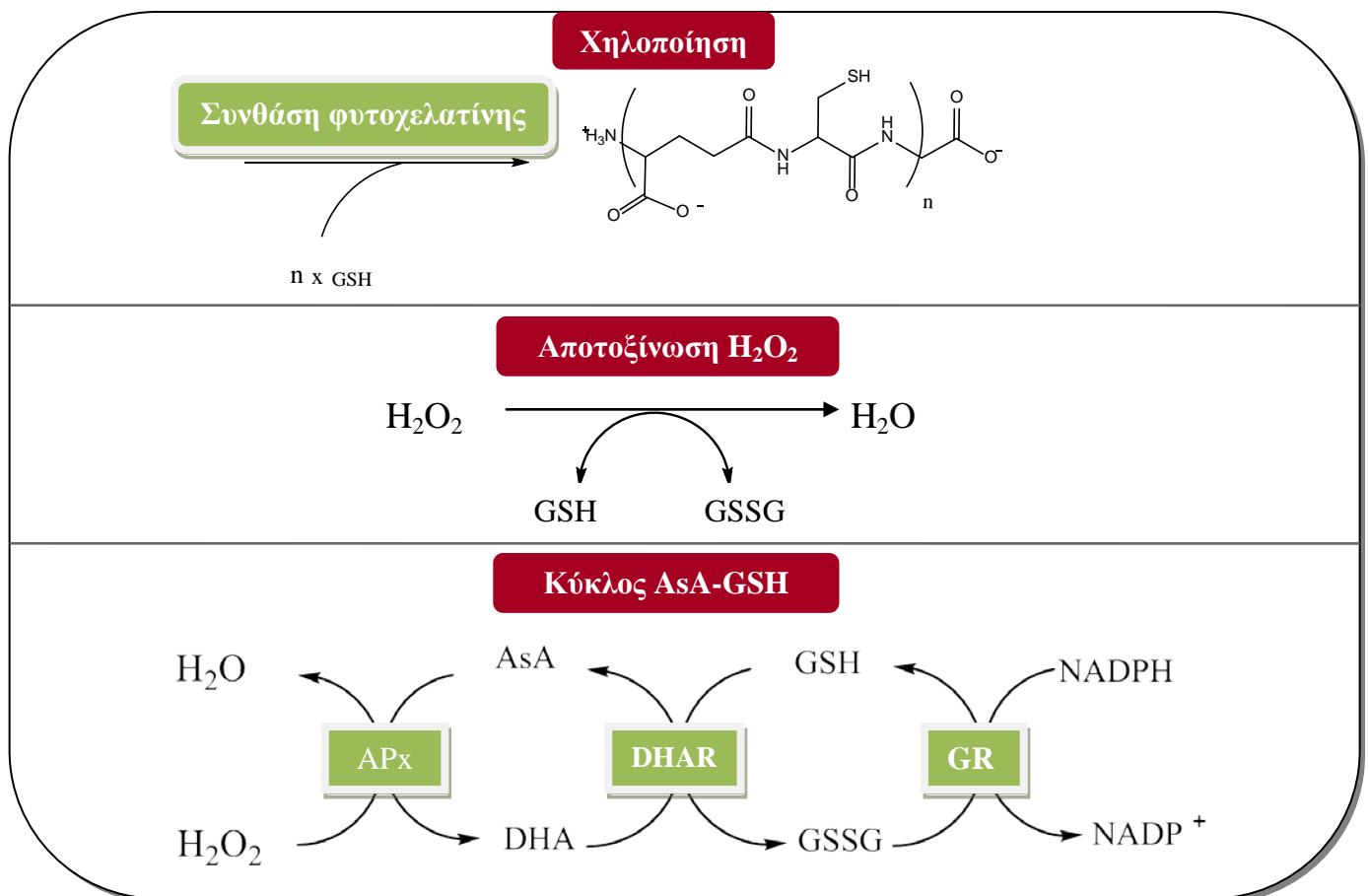
Η γλουταθειόνη είναι ακόμα σημαντική για την ανάπτυξη του φυτού, καθώς έχει επιβεβαιωθεί ότι η μειωμένη σύνθεση γλουταθειόνης σχετίζεται με ανωμαλίες στην ανάπτυξη (Cheng et al., 1995) και ότι η απόλυτη απουσία της γλουταθειόνης, έχει ως αποτέλεσμα το φαινότυπο του νεκρού φυτού (Cairns, et al., 2006). Επίσης αποθηκεύει το ανηγμένο θείο, αποτελεί υπόστρωμα για τα ένζυμα GSTs όπως θα δούμε παρακάτω και διατηρεί τις σουλφυδρυλ-ομάδες της κυστεΐνης σε ανηγμένη μορφή (Noctor et al. 2002).

Επιπλέον, η οξειδοαναγωγική κατάσταση στην οποία βρίσκεται η γλουταθειόνη είναι σημαντική για την ανάπτυξη του φυτού. Σε φυτά τα οποία δεν έχουν καταπονηθεί απαντά κυρίως με την ανηγμένη της μορφή (GSH), ενώ κατά τη διάρκεια οξειδωτικού στρες μπορεί να σχηματιστούν μεγάλες ποσότητες της οξειδωμένης της μορφής (GSSG), η οποία σχετίζεται με τη μειωμένη ανάπτυξη, το λήθαργο ή και τον κυτταρικό θάνατο (Krannet et al., 2002, Kranner et al., 2006). Οι μελέτες που έχουν γίνει για τη GSH στα φυτά αφορούν κυρίως στα σπορόφυτα ενώ πρόσφατη μελέτη αρσενικού γαμετόφυτου αναδεικνύει την σημαντικότητα της γλουταθειόνης στην *in vitro* βλάστηση της γύρης και την πιθανή εμπλοκή της στο μεταβολισμό της αυξίνης ενώ τίθεται και το ερώτημα αν υπάρχουν μεταφορές της γλουταθειόνης μέσω των κυτταροπλασματικών μεμβρανών (Zachmann et al., 2011).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ύπαρξη ομόλογων πεπτιδίων της γλουταθειόνης που απαντούν στα φυτά. Για παράδειγμα, σε όσπρια έχουν βρεθεί πολλές φορές ομόλογα της GSH, τα οποία σηματοδοτούν τις βέλτιστες συνθήκες ή τις καταπονήσεις (Noctor et al., 2010). Μελέτες έχουν δείξει ότι η καταπόνηση σπόρων σόγιας και μπιζελιού με κάδμιο, επιφέρει σημαντική μείωση του λόγου GSH/hGSH, όπου hGST είναι η ομογλουταθειόνη (Σχήμα 1.16) (Noctor et al., 2010, Smiri et al., 2010). Η μείωση που παρατηρείται στην συγκέντρωση της GSH, πιθανόν να οφείλεται στο σχηματισμό συμπλόκων Cd-GSH ή στην συμμετοχή της GSH στη σύνθεση των φυτοχηλατινών (Σχήμα 1.8) (Mendoza-Cózatl & Moreno-Sánchez, 2006). Συνεπώς, η GSH παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση των επιβλαβών μετάλλων, ως πρόδρομη ουσία των φυτοχηλατινών αλλά και λόγω της υψηλής συγγένειας που παρουσιάζει η σουλφυδρυλομάδα (-SH) της με τα μέταλλα. Η

GSH προστατεύει από τη δημιουργία ελεύθερων ριζών υδροξυλίου όταν υπάρχουν μεταλλοϊόντα μέσω της αντίδρασης Fenton, κρατώντας την συγκέντρωση της ελεύθερης κυστεΐνης σε χαμηλά επίπεδα (μέχρι 50 μM). Επίσης προστατεύει δυνητικά ευάλωτες πρωτεΐνες πλούσιες σε κυστεΐνη, που με τη δέσμευση ελεύθερων μεταλλοϊόντων μπορεί να επηρεαστεί η λειτουργία τους. Ακόμα αποτελεί χηλικό παράγοντα και άλλων ξενοβιοτικών εκτός των μετάλλων (Jozefczak et al., 2012).

Υπάρχουν αρκετά μονοπάτια άμυνας έναντι της οξειδωτικής καταπόνησης, όπου εμπλέκεται η γλουταθειόνη. Το πρώτο είναι η μη-ενζυματική οξείδωση της GSH. Στο δεύτερο μονοπάτι, ο κύκλος ασκορβικού-γλουταθειόνης (AsA-GSH), και οι δύο ενώσεις οξειδώνονται και ανάγονται, ώστε το ένζυμο ασκορβική υπεροξειδάση (APx) να καταφέρει να εξουδετερώσει το H_2O_2 (Σχήμα 1.8.). Τρίτο μονοπάτι είναι ο κύκλος της ρεδοξίνης με τα δύο μεγάλα οξειδοαναγωγικά ένζυμα γλουταρεδοξίνη (GRx) και θειορεδοξίνη (TRx) και τη GSH ως συμπαράγοντα (Cooper et al., 2011, Jozefczak et al., 2012).



Σχήμα 1.8. Βασικά μονοπάτια αποτοξίνωσης όπου συμμετέχει η GSH, όπου GSH: γλουταθειόνη, GSSG: οξειδωμένη μορφή γλουταθειόνης, AsA: ασκορβικό οξύ, DHA: διϋδροασκορβικό οξύ, APx: ασκορβική υπεροξειδάση, DHAR: διϋδροασκορβική ρεδοουκτάση, GR: ρεδοουκτάση της γλουταθειόνης.

Σημαντική επίσης είναι η δράση της GSH στα φυτά για την άμυνα έναντι παθογόνων, επάγοντας γονίδια τα οποία κωδικοποιούν ένζυμα για τη βιοσύνθεση φυτοαλεξινών και λιγνίνη (Ghanta & Chattopadhyay, 2011).

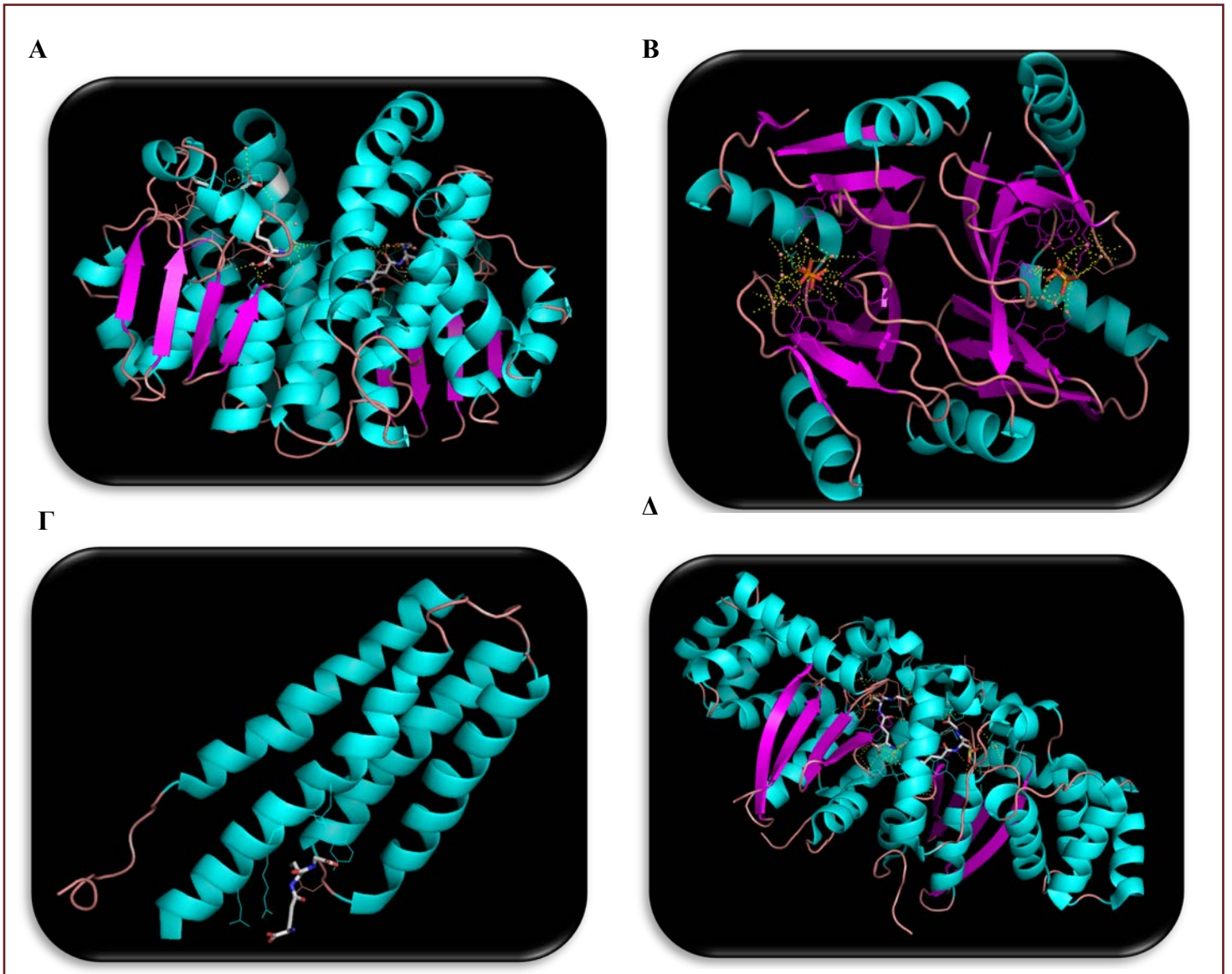
Το 1961 δύο ερευνητικές ομάδες ανακάλυψαν ότι η αντίδραση της GSH με ηλεκτρονιόφιλες ξενοβιοτικές ενώσεις καταλύεται από ένα ένζυμο το οποίο βρίσκεται στο ήπαρ μυός (Combes & Stakelum, 1961; Boyland et al, 1961), ονομάζεται δε μεταφοράση ή τρανσφεράση γλουταθειόνης (glutathione S-transferase, GST). Οι ηλεκτρονιόφιλες ενώσεις είναι κυτταροτοξικές, καρκινογόνες και μεταλλαξιογόνες, έχοντας την ικανότητα να αντιδρούν με τη γλουταθειόνη μέσω νουκλεόφιλης προσβολής της αποπρωτονιωμένης σουλφυδρυλομάδας (-S-) της κυστεΐνης της GSH επί του ηλεκτρονιόφιλου κέντρου της ηλεκτρονιόφιλης ένωσης. Η αντίδραση αυτή αποτελεί βασικό μηχανισμό προστασίας του κυττάρου (Josephy & Mannervic, 2006). Στο εργαστήριο του Eric Boyland στο Λονδίνο, αποδείχτηκε η ύπαρξη αρκετών μορφών της GST (Chasseaud, 1979), έτσι πλέον μιλάμε για την υπερικογένεια των GSTs.

1.4 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟ ΕΝΖΥΜΟ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GST)

1.4.1. ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΙΣ GSTS

Οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης (glutathione S-transferases, GSTs, EC 2.5.1.8) είναι πολυλειτουργικά ένζυμα που καταλύουν την πυρηνόφιλη δέσμευση της σουλφυδρυλικής ομάδας του τριπεπτιδίου της γλουταθειόνης (GSH: γ -Glu-Cys-Gly), στο ηλεκτρονιόφιλο κέντρο (άνθρακα, αζώτου, θείου) ενδογενών και ξενοβιοτικών ενώσεων (π.χ. φαρμάκων, φυτοπροστατευτικών προϊόντων) (Chronopoulou et al., 2012a, Hayes et al., 2005), σχηματίζοντας υδατοδιαλυτά σύμπλοκα με τη GSH. Τα σύμπλοκα αυτά αποβάλλονται από το κύτταρο, μέσω των αντλιών εκροής MRP (Multidrug Resistance Protein) των μεμβρανών (Ishikawa, 1992). Επίσης καταλύουν την υδρόλυση εστέρων, πεπτιδίων και σουλφαμιδίων (Huang et al., 2012). Παίρνουν μέρος στη Φάση II αποτοξίνωσης του οργανισμού και γι' αυτό απαντούν ευρέως στα κύτταρα μικροβίων, ζώων και φυτών (Liu et al., 2013), ως ισοένζυμα διαφορετικής εκλεκτικότητας, τα οποία προκύπτουν από διαφορετικά γονίδια (Hayes et al., 2005, Chronopoulou et al., 2012).

Οι GSTs διακρίνονται δομικά σε τέσσερις οικογένειες: α) τις κυτταροπλασματικές β) τις μιτοχονδριακές της κ τάξης γ) τις μεμβρανικές MAPEG και δ) τις GSTs που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό φωσφομυκίνη (Σχήμα 1.9) (Board & Menon, 2013, Chronopoulou & Labrou, 2009). Οι κυτταροπλασματικές και οι μιτοχονδριακές GSTs είναι διμερείς ενώ έχουν βρεθεί κυτταροπλασματικές ετεροδιμερείς. Η οικογένεια MAPEG αποτελείται από τέσσερις υποομάδες (I–IV). Μεταξύ των υποομάδων οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες έχουν ομοιότητα < 20%. Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί έξι MAPEG ισοένζυμα τα οποία ανήκουν στις υποομάδες ps I, II, και IV (Jakobsson et al., 1999). Οι μικροσωματικές (που ανήκουν στις MAPEG) ξεχωρίζουν από τις κυτταροπλασματικές καθώς σχηματίζουν ομοτριμερή ή ετεροτριμερή με ένα ενεργό κέντρο, ενώ παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό λευκοτριενίων και προσταγλανδινών. Όπως οι κυτταροπλασματικές και οι μιτοχονδριακές GSTs έτσι και αρκετές MAPEGs, καταλύουν την κλασική αντίδραση σύζευξης, άλλα πάλι μέλη καταλύουν τις αντιδράσεις βιοσύνθεσης λευκοτριενίων και προσταγλανδίνης (Hayes et al., 2005).



Σχήμα 1.9. Α. Κυτταροπλασματική GST π τάξης με S-εξυλ-GSH (PDB κωδικός: 1GSS) από *Homo sapiens*, Β. Πρωτεΐνη ανθεκτική στη φωσφομυκίνη (PDB κωδικός: 2LQK) από το *Pseudomonas aeruginosa*, Γ. Μικροσωματική GST1 με GSH (PDB κωδικός: 2H8A) από το επίμυες *Rattus norvegicus*, Δ. GST κ τάξης με S-hexyl -GSH (PDB κωδικός: 1YZX) από *Homo sapiens*.

1.4.2. ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΕΣ GSTs

Οι κυτταροπλασματικές GSTs αποτελούν μια υπεροικογένεια ενζύμων, η οποία απαντά σε όλες τις κυτταρικές μορφές ζωής. Έχουν μελετηθεί εκτενώς στον άνθρωπο, στους μύες, στους επίμυες καθώς και σε φυτά, έντομα και μικροβιακά είδη

(Board & Menon, 2013). Διαχωρίζονται με βάση την αμινοξική και νουκλεοτιδική τους αλληλουχία, τις τριτοταγείς και τεταρτοταγείς δομικές τους ιδιότητες (Chronopoulou & Labrou, 2009, Cummins et al. 2011). Στον Πίνακα 1.1. φαίνονται οι τάξεις για τα θηλαστικά, τα έντομα, τα φυτά, τα βακτήρια και τους μύκητες. Τα μέλη της ίδιας τάξης παρουσιάζουν ομολογία ως προς την αμινοξική τους αλληλουχία περισσότερο από 40%, ενώ μεταξύ πρωτεϊνών διαφορετικών τάξεων η ομολογία είναι μικρότερη του 25% (Oakley, 2005).

Το ενεργό μόριο των κυτταροπλασματικών GSTs αποτελείται από δύο υπομονάδες με μοριακό βάρος 20-28 kDa η καθεμιά. Οι GSTs που προέρχονται από ένα γονίδιο (π.χ. GSTP1) είναι ομοδιμερείς, ενώ οι προερχόμενες από περισσότερα του ενός γονίδια είναι ετεροδιμερείς (Sheehan et al., 2001, Edwards et al., 2000, Dixon et al., 2002b, Schröder, 2001, Frova, 2006).

1.5. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ GSTS

Η ταξινόμηση των GSTs βασίζεται στις ομοιότητες της αμινοξικής αλληλουχίας και της πρωτεϊνικής δομής. Οι GSTs των θηλαστικών ταξινομούνται σε 7 τάξεις: α (*alpha*), μ (*mu*), π (*pi*), σ (*sigma*), ω (*omega*), ζ (*zeta*) και θ (*theta*). Οι φυτικές GSTs των αγγειακών φυτών ταξινομούνται σε 8 τάξεις: τ (*tau*), ϕ (*phi*), θ (*theta*), ζ (*zeta*), λ (*lambda*), *EF1B* γ , ρεδουκτάση του διϋδροασκορβικού (*DHAR*), και απαλογονάση της τετραχλωρο υδροκινόνης (*TCHQD*) (Liu et al., 2013, Lan et al., 2009, Dixon & Edwards, 2010b, Jain et al., 2010), ενώ έχουν βρεθεί 2 νέες τάξεις του βρυόφυτου *Physcomitrella patens* η ι (*iota*) και η αιμερυθρίνη (*hemerythrin*). Μεταξύ αυτών των τάξεων, η ϕ (*phi*), η τ (*tau*), η *DHAR* και η λ (*lambda*) είναι ειδικές για τα φυτά (Liu et al., 2013).

Στα φυτά απαντούν κυρίως GSTs των τάξεων ϕ και τ , καθώς είναι αυτές οι οποίες εμπλέκονται περισσότερο στο μεταβολισμό ξενοβιοτικών (Frova, 2006). Μελετώντας τα βιοχημικά χαρακτηριστικά αυτών των δύο τάξεων GSTs στα φυτά *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa* και *Phaseolus vulgaris* βρέθηκαν να παρουσιάζουν ευρεία εξειδίκευση υποστρώματος (Chronopoulou et al., 2012b, Dixon et al., 2009; Lan et al., 2009), που πιθανόν να σχετίζεται με την υψηλή ανθεκτικότητα σε

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης, ειδικά όταν πρόκειται για ξενοβιοτικές ενώσεις (Chronopoulou et al., 2012b, Liu et al., 2013).

Πίνακας 1.1. Καταλυτικό αμινοξύ κάθε τάξης και σημαντικές δράσεις.

Οργανισμός	Τάξη	Καταλυτικό αμινοξικό κατάλοιπο	Δράση
Θηλαστικά	α (<i>Alpha</i>) ^ε	Tyr	Ισομεράσης, υπεροξειδάσης, μεταβολισμός φαρμάκων, αποτοξίνωση
	μ (<i>Mu</i>) ^ε	Tyr	Μεταβολισμός φαρμάκων
	π (<i>Pi</i>) ^ε	Tyr	Μεταβολισμός φαρμάκων
	σ (<i>Sigma</i>)	Tyr	Συνθάση προσταγλανδίνης
	θ (<i>Theta</i>)	Ser	Θειοεστεράση, πρόληψη ηπατοκαρκινογένεσης, μεταβολισμός βιομηχανικών ενώσεων,
	ζ (<i>Zeta</i>)	Ser	Ισομεράσης, κατάλυση του μεταβολισμού των α -αλογονοξέων
	ω (<i>Omega</i>)	Cys	Γλουταρεδοξίνης Ρεδουκτάσης (οξειδωτικής καταπόνησης)
Φυτά	θ	Ser	Αποτοξίνωση, άμυνα ως προς οξειδωτική καταπόνηση, σήμανση, μη καταλυτική δέσμευση φλαβονοειδών, συμμετοχή σε ενδιάμεσο μεταβολισμό
	ζ	Ser	
	φ ^ε	Ser	
	τ ^ε	Ser	

Οργανισμός	Τάξη	Καταλυτικό αμινοξικό κατάλοιπο	Δράση
	λ^{ϵ}	Cys	
	<i>DHAR</i>	Cys	Διϋδροασκορβικής ρεδοκτάσης
	<i>TCHQD</i>	-	-
	EF1G	-	Κωδικεύουν τη γ υπομονάδα του ευκαρυωτικού μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης
	<i>Βρυόφυτα ι(iota)</i>	Cys	-
	<i>Βρυόφυτα hemerythrin</i>	Cys	-
<i>Έντομα</i>	δ (<i>Delta</i>)	Ser	Πιθανή συμμετοχή στην αποτοξίνωση περιβαλλοντικών ξενοβιοτικών
	ϵ (<i>Epsilon</i>) ^{ϵ}	Ser	Αποτοξίνωση εντομοκτόνων, υπεροξειδάση, οξειδωτικό στρες
	θ (<i>Theta</i>)	Ser	-
	σ (<i>Sigma</i>)	Tyr	Πιθανή συμμετοχή στην αποτοξίνωση προϊόντων οξειδωτικής καταπόνησης και στη λειτουργία των μυών
	ζ (<i>Zeta</i>)	Ser	Μονοπάτι καταβολισμού τυροσίνης
	ω (<i>Omega</i>)	Cys	Πιθανή συμμετοχή στην αντιμετώπιση οξειδωτικής καταπόνησης
<i>Βακτήρια</i>	β (<i>Beta</i>) ^{ϵ}	Cys	Προστασία από χημική και οξειδωτική καταπόνηση, συμμετοχή στην ανθεκτικότητα προς αντιμικροβιακά φάρμακα και στον καταβολισμό

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οργανισμός	Τάξη	Καταλυτικό αμινοξικό κατάλοιπο	Δράση
			ξενοβιοτικών
	<i>χ (Chi)</i>	-	-
	<i>θ (Theta)</i>	-	-
	<i>ζ (Zeta)</i>	-	-
<i>Μύκητες</i>	<i>α (Alpha)</i>	-	-
	<i>μ (Mu)</i>	-	-
	<i>γ (Gamma)</i>	-	-

^{ε:} ειδική τάξη οργανισμού

1.6. ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ GSTs

Η μελέτη διαφορετικών ισοενζύμων GSTs από διαφορετικούς οργανισμούς, αποκάλυψε τη συμμετοχή τους σε μη-συσχετιζόμενες βιολογικές διεργασίες (Chronopoulou et al., 2011). Η κλασική δραστηριότητα των GSTs όπως αναφέρθηκε είναι η σύζευξη ηλεκτρονιόφιλων ενώσεων με τη γλουταθειόνη, όμως και άλλες δραστηριότητες σχετίζονται με αυτές, όπως η βιοσύνθεση στεροειδών και λευκοτριενίων, η διπλού δεσμού *cis-trans* ισομερίωση, η αναγωγή του δεϋδροασκορβικού, η προσθήκη κατά Michael, και η μη-καταλυτική δραστηριότητα «υποκαταστάσης» (δέσμευση υποκαταστάτη και μεταφορά) (Oakley, 2011).

Η σύζευξη της GSH με ενδογενείς ενώσεις εξυπηρετεί αρκετούς σκοπούς: (α) περιορίζει τη χημική δραστηριότητα (β) αυξάνει την διαλυτότητα τους και διευκολύνει τη μεταφορά τους μέσω των μεμβρανών, καθώς και τον περιορισμό τους μέσα στο κύτταρο και στον οργανισμό και (γ) σε κάποιες περιπτώσεις οδηγεί στο σχηματισμό δευτερογενών μεταβολιτών ή ουσιαστικών βιολογικών διαμεσολαβητών (Chronopoulou et al., 2011).

Οι GSTs είναι ένζυμα τα οποία έχουν μελετηθεί πολύ, λόγω του καταλυτικού τους ρόλου στη δέσμευση και τον περιορισμό ηλεκτρονιόφιλων ξеноβιοτικών όπως τα αντικαρκινικά φάρμακα και τα καρκινογόνα. Υπάρχουν επίσης σημαντικά στοιχεία, ότι η έκφραση των GSTs σε όγκους μπορεί να προκαλέσει ανθεκτικότητα σε φάρμακα. Επίσης έχει μελετηθεί αρκετά η αντιοξειδωτική τους δράση ως υπεροξειδάσες και η δυνατότητα που έχουν να δεσμεύουν τη 4-υδροξυεπενάλη (Board & Menon, 2013). Οι διάφοροι ρόλοι των GSTs φαίνονται παρακάτω.

1.6.1. ΝΟΥΚΛΕΟΦΙΛΗ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

Η νουκλεόφιλη υποκατάσταση ενός αλκυλ ή αρυλ-αλογονιδίου ή νιτρο-ομάδας, είναι η πλέον γνωστή αντίδραση που καταλύουν οι GSTs. Τα αλογονίδια ή οι νιτρο-ομάδες των υποστρωμάτων είναι ήπια ηλεκτρονιόφιλα και αντιδρούν εύκολα με τη GSH. Γι' αυτό άλλωστε η συνήθης ενζυμική δοκιμή για τον έλεγχο δραστηριότητας GST γίνεται με το υπόστρωμα 1-χλώρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB). Αυτές οι νουκλεόφιλες αρωματικές αντιδράσεις υποκατάστασης γίνονται μέσω της εξουδετέρωσης του βραχύβιου ενδιάμεσου σ-συμπλόκου (Hayes et al., 2005). Η κλασική αντίδραση δέσμευσης της GSH, πιστεύεται ότι ενεργοποιείται από την αρχική μείωση της pK_a της γλουταθειονύλ-θειόλης, που είναι περίπου $pH=9$ στο διάλυμα σε $pH=6,5$ όταν δεσμεύεται στη G-θέση του ενζύμου. Με τη μείωση της pK_a προάγεται η αποπρωτονίωση της θειόλης και ο σχηματισμός νουκλεόφιλου σουλφιδριλικού ανιόντος ($R-S^-$) (Board & Menon, 2013).

1.6.2. ΔΡΑΣΗ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ GPX

Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειονής (GPxs) είναι σεληνο-ένζυμα που προστατεύουν τα κύτταρα από την οξειδωτική καταπόνηση καταλύοντας την αναγωγή υπεροξειδίων χρησιμοποιώντας τη GSH ως αναγωγικό μέσο (Mills, 1957). Λόγω της σημασίας τους ως αντιοξειδωτικά έχουν γίνει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας. Οι GSTs και οι GPxs έχουν ομοιότητες στη γενικότερη δομή του ενεργού τους κέντρου και στη GSH-θέση δέσμευσης (Martin, 1995). Πολλές GSTs έχουν βρεθεί να έχουν δράση υπεροξειδάσης (Board et al., 1997, Eshdat et al., 1997, Chronopoulou et al., 2012b).

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είναι πλέον γνωστό ότι οι ενδογενείς αλδεϋδες σχηματίζονται κυρίως κατά την υπεροξειδωση των λιπιδίων μια διαδικασία η οποία αυξάνει σημαντικά κατά την οξειδωτική καταπόνηση (Leonarduzzi et al., 2000; Spiteller, 2001). Αν και συμμετέχουν αρκετά ένζυμα στον καταβολισμό αυτών των αλδεϋδών, οι GSTs φαίνεται να συνεισφέρουν περισσότερο σε αυτή την ενδοκυττάρια διαδικασία των ιστών (Davydov et al., 2004; Esterbauer et al., 1985). Επομένως αλλαγές στη λειτουργία τέτοιων ενζύμων μπορεί να συμβάλλουν σημαντικά στην ευαισθησία με την οποία ανταποκρίνεται ο οργανισμός στους διάφορους στρεσογόνους παράγοντες κατά τη διάρκεια της γήρανσης (Chen & Yu, 1996).

Οι GSTs προστατεύουν τα κύτταρα καταλύοντας την αντίδραση δέσμευσης της GSH με τις αλδεϋδες όπως η 4-υδροξυ-trans2-ενενάλη (HNE) (Awasthi et al., 2005, Sharma et al., 2004). Η αλδεϋδη HNE απαντά ευρέως και είναι από τις πιο τοξικές αλδεϋδες, η οποία σχηματίζεται κατά την υπεροξειδωση των λιπιδίων από τις ελεύθερες ρίζες (Yadav et al., 2008). Η αλδεϋδη αυτή θεωρείται ειδικός δείκτης οξειδωτικής καταπόνησης (Waeg et al., 1996, Esterbauer, 1996, Uchida, 2007) και μεσολαβητής της απόπτωσης (Davydov et al., 2004). Η δράση της προκαλεί βλάβη και δυσλειτουργία στο μιτοχόνδριο, κατά τη διάρκεια της γήρανσης (Chen & Yu, 1996). Σε μελέτη που έγινε βρέθηκε ότι αυξάνοντας την GSH και/ή τη GSTA4-4 σε ερυθρολευχαιμικά κύτταρα K562, παρεμποδίζεται σημαντικά η επαγόμενη βλάβη του DNA από την HNE (Yadav et al., 2008). Επομένως η πρόληψη της φθίνουσας αποτοξίνωσης των αλδεϋδών λόγω γήρανσης, μέσω της ρύθμισης της έκφρασης συγκεκριμένων ενζύμων και της ενεργοποίησης των καταλυτικών τους ιδιοτήτων, μπορεί να αποτελέσει μία νέα προοπτική που αφορά στην αύξηση της ανθεκτικότητας του οργανισμού, ενάντια βλαβερών παραγόντων κατά τη γήρανση (Davydov et al., 2004).

GSTs της *α* τάξης παρουσιάζουν δράση υπεροξειδάσης ανάγοντας τα υπεροξειδία από τα λιπαρά οξέα και τα φωσφολιπίδια και κάποιες GSTs της ίδιας τάξης έχουν ως προτιμητέο υπόστρωμα τη 4-υδροξυ-ενενάλη (4-HNE) που αποτελεί προϊόν λιπιδικής υπεροξειδωσης (Yang et al., 2003).

Οι φυτικές GPxs ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες: οι εξαρτώμενες από το σελήνιο (Se) (Sabeih et al., 1993), οι υπεροξειδάσες γλουταθειόνης φωσφολιπιδίων (PHGPxs) (ανεξάρτητες Se) και οι GSTs με δράση υπεροξειδάσης εξαρτώμενης της GSH

(Eshdat et al., 1997). Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης GPXs (EC 1.11.1.9) απαντούν ευρέως και στα φυτικά κύτταρα περιλαμβανομένων των χλωροπλαστών, των μιτοχονδρίων, του κυτταροπλάσματος, του περοξυσώματος και του αποπλάστη χρησιμοποιώντας τη GSH για την αναγωγή του H₂O₂ και των οργανικών και λιπιδιακών υδροϋπεροξειδίων (Eshdat et al., 1997, Milla et al., 2003, Navrot et al., 2006) που παράγονται κάτω από συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης.

Οι φυτικές GSTs των τάξεων ϕ και τ , έχουν βρεθεί να έχουν δράση GPx (Wagner et al., 2002, Edwards & Dixon, 2005, Basantani & Srivastava, 2007). Πιο συγκεκριμένα έχουν βρεθεί GSTs μέλη αυτών των τάξεων από δημητριακά, μονοκότυλα και δικότυλα ζιζάνια να παρουσιάζουν σχετικά υψηλή δράση υπεροξειδάσης σε σχέση με τη δράση της μεταφοράσης (Wagner et al., 2002). Για παράδειγμα ισοένζυμα από το σιτάρι (Cummins et al., 1997), τα μπιζέλια (Edwards, 1996), το φασόλι (Skipsey et al., 1997) μονοκοτυλήδονα ζιζάνια όπως το *Alopecurus myosuroides* και δικοτυλήδονα όπως το *Arabidopsis thaliana* εμφανίζουν ευρεία εξειδίκευση υποστρώματος ως προς τα οργανικά υδροϋπεροξειδία (Eshdat et al., 1997, Wagner et al., 2002). Η έκφραση του ενζύμου AMGSTF2 της ϕ τάξης από το *Alopecurus myosuroides* με υψηλή δραστηριότητα GPx συσχετίζεται με ανθεκτικότητα ως προς την οξειδωτική βλάβη ζιζανιοκτόνου, μέσω της παρεμπόδισης συσσώρευσης κυτταροτοξικών υδροϋπεροξειδίων (Cummins et al., 1999). Το ένζυμο της θ τάξης AtGSTT1, από το φυτό *Arabidopsis* εκδηλώνει υψηλή δραστηριότητα υπεροξειδάσης αλλά όχι δράση μεταφοράσης (Wagner et al., 2002).

Επίσης χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ένα GST ένζυμο της τ τάξης από τομάτα, με σχετικά υψηλή δράση GPx που εμποδίζει έμμεσα τη θανατηφόρο επίδραση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax στη ζύμη (Kampranis et al., 2000). Η συνέκφραση σε ζύμη της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax και του GST ενζύμου από τομάτα, αποκατέστησε τα κανονικά επίπεδα GSH και διατήρησε το μεμβρανικό δυναμικό κατά μήκος της μιτοχονδριακής μεμβράνης, δύο λειτουργίες που είχαν αποδιοργανωθεί από την έκφραση της πρωτεΐνης Bax. Η έκφραση GST στη ζύμη επιπλέον παρείχε ανθεκτικότητα στον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από προ-οξειδωτικά όπως το H₂O₂ και διάφορα υδροϋπεροξειδία (Kilili et al., 2004). Από αυτά τα πειράματα λοιπόν προέκυψε ότι οι GSTs προστατεύουν τα κύτταρα της ζύμης από τις πρωτεΐνες Bax, τις επαγόμενες ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

εξαρτώμενα κυτταρικά γεγονότα, που προέρχονται από τα μιτοχόνδρια και εμπλέκονται στον προγραμματισμένο θάνατο (Αξαρχή, 2009).

Ένα άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα της αντιοξειδωτικής δράσης των GSTs είναι αυτό που αφορά στα φύλλα κριθαριού όπου βρέθηκε η GPx, να προστατεύει τα γερασμένα κύτταρα από τις βλάβες των ελεύθερων ριζών (Kunieda et al., 2005). Επίσης φαίνεται γενετικά τροποποιημένοι καρποί καπνού που υπερεκφράζουν τη GST/GPx να παρουσιάζουν αυξημένη αντοχή σε συνθήκες αλατότητας και θερμοκρασίας που προκαλούν καταπόνηση κατά τη διάρκεια της πρώιμης ανάπτυξης των καρπών και της βλάστησης (Roxas et al., 1997).

1.6.3. ΔΡΑΣΗ ΙΣΟΜΕΡΑΣΗΣ

Οι αντιδράσεις ισομερίωσης που καταλύουν οι GSTs μπορούν να είναι α) μετατοπίσεις διπλών δεσμών β) ενδομοριακές αντιδράσεις οξειδοαναγωγής και γ) ισομεριώσεις *cis-trans* (Deponte, 2013).

Μετατοπίσεις διπλών δεσμών

Κάποια ισοένζυμα GST της α τάξης των θηλαστικών, όπως το ένζυμο GSTA3-3 από τον άνθρωπο, παρουσιάζει σημαντική δράση ισομεράσης Δ5-Δ4, με επιλεγμένα κετοστεροειδή, όπως τις πρόδρομες ενώσεις Δ5-ανδροστεν-3,17-διόνη και Δ5-πρεγνάνιο-3,17-διόνη, της τεστοστερόνης και προγεστερόνης, αντίστοιχα (Benson et al., 1977, Johansson & Mannervik, 2001). Γι' αυτό άλλωστε η GSTA3-3 εκφράζεται επιλεκτικά σε ιστούς παραγωγής στεροειδών (όρχεις, ωοθήκη, πλακούντα και επινεφρίδιο) πιθανόν λόγω του σημαντικού της ρόλου στη βιοσύνθεση στεροειδών ορμονών (Board & Menon, 2013). Η δραστηριότητα της ισομεράσης Δ5-Δ4 ελέγχεται στα 248 nm *in vitro*, όμως δεν υπάρχουν πολλές λεπτομερείς αναφορές κινητικής ανάλυσης (Deponte, 2013).

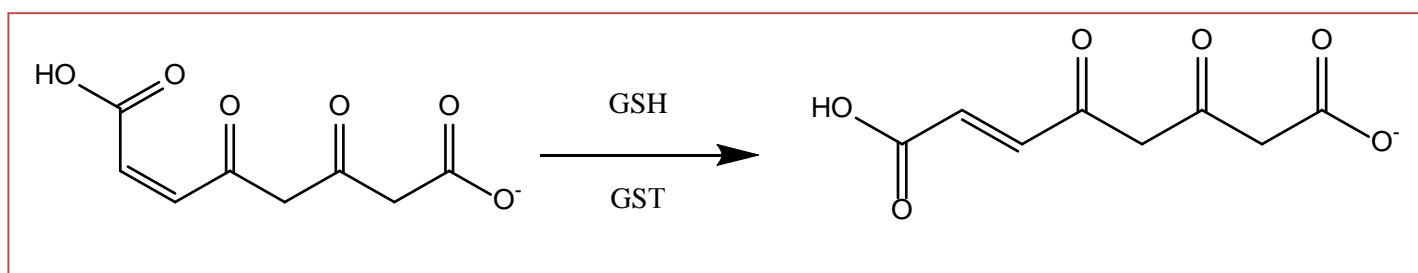
Ενδομοριακές αντιδράσεις οξειδοαναγωγής

Οι GSTs φαίνεται να συμμετέχουν με αρκετούς τρόπους στη σύνθεση και στο μεταβολισμό της προσταγλανδίνης. Έχουν βρεθεί ακόμα να συνδέουν τη GSH σε συγκεκριμένες προσταγλανδίνες και να τροποποιούν τη λειτουργία τους (Board & Menon, 2013). Οι προερχόμενες από τον άνθρωπο GSTs, GSTM2-2 και GSTM3-3

καταλύουν την ισομερίωση της προσταγλανδίνης PGH₂ σε συνθάση της προσταγλανδίνης PGE₂, έτσι φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της θερμοκρασίας και του ύπνου (Beuckmann et al., 2000). Επίσης GSTs της σ τάξης, καταλύουν την ισομερίωση της PGH₂ σε PGD₂ (Jowsey et al., 2001).

Ισομεριώσεις *cis-trans*

Οι GSTs της ζ τάξης συμμετέχουν στον καταβολισμό της τυροσίνης και έχουν δράση ισομεράσης εξαρτώμενης της GSH (Edwards & Dixon, 2005, Dixon & Edwards, 2006). Συγκεκριμένα, τέτοια δράση παρουσιάζουν οι GSTs της ζ τάξης τόσο από τον άνθρωπο (Schultz et al., 2009) (προστατεύοντας από τον καρκίνο) και τον μύκητα *Aspergillus nidulans* (Fernandez-Canon & Penalva, 1998) όσο και από το φυτό *Arabidopsis* (Thom et al., 2001). Με τη δράση τους, καταλύουν την αντίδραση ισομερίωσης του μαλεϋλακετοξικού προς φουμαρυλακετοξικό (Σχήμα 1.10) στο μονοπάτι καταβολισμού της τυροσίνης-φαινυλαλανίνης. Επίσης στο ίδιο μονοπάτι καταλύεται και η αντίδραση ισομερίωσης της μαλεϋακετόνης προς φουμαρυλακετόνη (Board & Menton, 2013) Άλλωστε ευθυγράμμιση των αλληλουχίσεων της GSTZ και του ενζύμου ισομεράση μαλεϋλακετοξικού (MAAI) αποκάλυψε ότι ταυτίζονταν (Blackburn et al., 1998). Επίσης έχει καταγραφεί η εξαρτώμενη της GSH κατάλυση της οξυγόνωσης και της βιομετατροπής των α-αλογονοξέα όπως το διχλωροακετικό οξύ, από το ένζυμο GSTZ1-1 (Tong et al., 1998).



Σχήμα 1.10. Κατάλυση της *cis-trans* ισομερίωσης του μαλεϋλακετοξικού προς φουμαρυλακετοξικό.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.6.4. ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΑΝΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΘΕΙΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ

Οι GSTs της *o* τάξης κυρίως καταλύουν αντιδράσεις αναγωγής και θειομεταφοράς, με τα αμινοξικά κατάλοιπα Cys να παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο (Board & Menon, 2013). Η κρυσταλλική δομή του ενζύμου GSTO1-1 έδειξε ότι η Cys32 σχηματίζει δισουλφιδικό δεσμό με τη γλουταθειόνη και σε άλλες μελέτες βρέθηκε, ότι ο σχηματισμός και η αναγωγή τέτοιων μικτών δισουλφιδίων, είναι σημαντικά για την αναγωγή υποστρωμάτων όπως οι S-φαινακύλ-γλουταθειόνες (Board & Anders, 2007).

Επίσης, οι GSTs των τάξεων *DHAR* και *λ*, λειτουργούν κυρίως ως θειοτρανσφεράσες (Dixon et al., 2002a). Οι DHAR-GSTs παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στον κύκλο ασκορβικού-γλουταθειόνης όπου η ανηγμένη μορφή του ασκορβικού οξέος εξυπηρετεί ως σημαντικό αντιοξειδωτικό (Moons, 2005).

1.6.5. ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΥΛΙΩΣΗ

Η γλουταθειονυλίωση είναι ο σχηματισμός αντιστρεπτών δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των πρωτεϊνικών θειολών και της γλουταθειόνης (Board & Menon, 2013), και συνδέεται με την οξειδωτική καταπόνηση (Lind et al., 2002, Fratelli et al., 2003). Η γλουταθειονυλίωση θεωρείται αντίδραση πρώτης σειράς άμυνας (Board & Menon, 2013). Οι θειόλες κυστεΐνης που βρίσκονται στην επιφάνεια των πρωτεϊνών, είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς στις βλάβες λόγω οξειδωτικής καταπόνησης και μπορούν να οξειδωθούν αντιστρεπτά ή μη αντιστρεπτά (Cooper et al., 2011). Κατά την αποκατάσταση του οξειδοαναγωγικού περιβάλλοντος, η διαδικασία μπορεί να αντιστραφεί μέσω της απογλουταθειονυλίωσης με τη βοήθεια αναγωγικών ενζύμων (Board & Menon, 2013). Μέχρι στιγμής το ένζυμο GSTP1-1 από τον άνθρωπο, φαίνεται να συμμετέχει στον κύκλο της γλουταθειονυλίωσης καταλύοντας την αντίδραση πρωτεΐνη –S-γλουταθειονυλίωση, η οποία μιμείται την κλασική νουκλεόφιλη αντίδραση σύζευξης με τη γλουταθειόνη (Townsend et al., 2009). Η δομική ομοιότητα των GSTs με τη γλουταρεδοξίνη και θειορεδοξίνη, καθώς και η δυνατότητα σύζευξης ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων με τη GSH, είναι στοιχεία που επιτρέπουν την υπόθεση της συμμετοχής και άλλων μελών GSTs στις

αντιδράσεις γλουταθειονυλίωσης και απογλουταθειονυλίωσης (Board & Menone, 2013).

1.6.6. ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ ΣΕ ΕΠΟΞΕΙΔΙΑ

Οι GSTs καταλύουν την προσθήκη GSH σε εποξειδία (Armstrong, 1997). Τα εποξειδία υφίστανται ρήξη του εποξειδικού δακτυλίου με εισαγωγή γλουταθειόνης. Σε αλειφατικά εποξειδία, οι GSTs υποκαθιστούν εύκολα τη γλουταθειόνη στον προτελευταίο άνθρακα της αλειφατικής ομάδας. Η δράση τους είναι μέτρια σε αρωματικά και κυκλικά εποξειδία, εκτός αν αυτά φέρουν χλώριο στο αρωματικό τους σύστημα (Κλώνης, 2007).

1.6.7. ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ ΣΕ ΔΙΠΛΟΥΣ ΔΕΣΜΟΥΣ ΑΝΘΡΑΚΑ

Η προσθήκη σουλφυδρυλίου σε διπλούς δεσμούς άνθρακα, επιτυγχάνεται με διπλούς δεσμούς οι οποίοι απαντούν κοντά σε ομάδες, που έχουν την ικανότητα να έλκουν ηλεκτρόνια (Talalay et al., 1988). Οι αντιδράσεις αυτές ονομάζονται και αντιδράσεις προσθήκης Michael και οδηγούν στη δημιουργία προϊόντος, το οποίο είναι ευαίσθητο στις μεταβολές pH. Υποστρώματα που υπόκεινται σε τέτοιες αντιδράσεις είναι και τα αλκένια (Alias & Clark, 2007). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το υδροξυ-αλκένιο 4-υδροξύ-2,3-trans-ενενάλη (4-HNE), το οποίο αποτελεί προϊόν υπεροξειδωσίας των λιπιδίων και είναι το πιο κυτταροτοξικό και γενετοξικό προϊόν που εμπλέκεται σε κυτταρικές παθήσεις (Esterbauer et al., 1991).

1.6.8. ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ ΣΕ ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ

Τα ισοθειοκυανικά είναι ηλεκτρόφιλα μόρια και παράγονται κάτω από συνθήκες καταπόνησης σε φυτά (Wolf et al., 1984). Προέρχονται από το σύστημα της μυροσινάσης και παίρνουν μέρος στην άμυνα του φυτού λόγω της βιοκτόνου δράσης τους. Τα ισοθειοκυανικά προκαλούν τοξικότητα και αναστολή της ανάπτυξης, στους εχθρούς των φυτών (θηλαστικά, πτηνά, έντομα, νηματώδεις, βακτήρια, μύκητες κ.α.) (Halkier & Gershenzon, 2006).

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα ισοθειοκυανικά παράγωγα αντιδρούν με τη GSH, επιτρέποντας την προσθήκη της θειόλης, στον ηλεκτρονιόφιλο κεντρικό άνθρακα του ισοθειοκυανικού τμήματος, ώστε να σχηματιστούν διθειοκαρβαμίδια [R-NH-C(=S)-SG] (Meyer et al., 1995). Έχουν βρεθεί αρκετές GSTs που καταλύουν την προσθήκη της GSH σε ισοθειοκυανικά παράγωγα, όπως τα ένζυμα GSTM1-1, GSTP1-1, GSTA1-1 και GSTM4-4 (Kolm et al., 1995).

1.6.9. ΜΗ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ-ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ

Οι κυτταροπλασματικές GST δεσμεύουν διάφορες ενώσεις όπως αίμη, χολερυθρίνη, ξενοβιοτικά, στεροειδή και αζοχρώματα (χωρίς να είναι υποστρώματα του ενζύμου). Η θέση δέσμευσης διαφέρει σύμφωνα με την τάξη GST και τη χημική ένωση που δεσμεύεται. Οι θέσεις αυτές μπορεί να είναι η Η-θέση ή η περιοχή επαφής των δύο υπομονάδων (Oakley, 2011).

Αρχικά GSTs της α τάξης, βρέθηκαν να έχουν δραστικότητα δέσμευσης (Hayes & Pulford, 1995). Έχουν βρεθεί όμως και φυτικές GSTs με τέτοια δράση. Πρόσφατα, βρέθηκε το ένζυμο GSTF2 στο φυτό *Arabidopsis* να δεσμεύει επιλεκτικά την φυτοαλεξίνη-καμαλεξίνη και την φλαβονόλη quercetin-3-O-rhamnoside, συνεπώς είναι πιθανός ο ρυθμιστικός της ρόλος, στη δέσμευση και μεταφορά ενώσεων που εμπλέκονται στην άμυνα του φυτού (Dixon et al., 2011). Σε πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι οι GSTs της λ τάξης χρησιμοποιούν τις φλαβονόλες ως υψηλής συγγένειας δεσμευτές, προσθέτοντας ένα νέο ρόλο (εξαρτώμενο της GSH) σε αυτά τα ένζυμα που είναι η ανακύκλωση της οξειδωμένης κερσεΐνης (Dixon & Edwards, 2010b).

1.7. ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ GSTS

1.7.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ

Οι κυτταροπλασματικές GSTs αποτελούνται από δύο υπομονάδες και είναι είτε ομοδιμερείς (προϊόν ενός γονιδίου) είτε ετεροδιμερείς (διαφορετικά γονίδια). Κάθε υπομονάδα αποτελείται από 200-250 αμινοξικά κατάλοιπα και έχει μοριακό βάρος 20-28 kDa (Chronopoulou & Labrou, 2009). Οι ετεροδιμερείς παρουσιάζουν

ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς φαίνεται να επάγονται κάτω από συνθήκες καταπόνησης και δράσης ορμονών (Schröder, 2001). Η κάθε υπομονάδα διαχωρίζεται σε δύο περιοχές, τη N-τελική περιοχή, με τοπολογία βαβαββα και τη C-τελική περιοχή η οποία αποτελείται εξ' ολοκλήρου από έλικες. Το ενεργό κέντρο αποτελείται από τη G-θέση όπου προσδένεται η GSH και την H-θέση όπου προσδένονται τα υδρόφοβα υποστρώματα (Σχήμα 1.11). Η G-θέση βρίσκεται στη N-τελική περιοχή και είναι αρκετά συντηρημένη, ενώ η H-θέση βρίσκεται στη C-τελική περιοχή και δεν είναι τόσο συντηρημένη, σε αυτό οφείλεται η ετερογένεια που χαρακτηρίζει τα ισοένζυμα των GSTs (Board & Menon, 2013).

1.7.2. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΥΠΟΜΟΝΑΔΩΝ

Στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων με σκοπό το σχηματισμό της τεταρτοταγούς δομής, περιλαμβάνονται οι γέφυρες άλατος, οι δεσμοί υδρογόνου, οι υδροφιλικές και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, συμπεριλαμβανομένου και του μοτίβου κλειδί-κλειδαριά που συγκρατεί φυσικά τις υπομονάδες μαζί (Sayed et al., 2000, Hegazy et al., 2004, Vargo et al., 2004).

Συγκεκριμένα το μοτίβο «κλειδί-κλειδαριά» πρόκειται για υδρόφοβη αλληλεπίδραση, όπου ένα αρωματικό κατάλοιπο της N-τελικής περιοχής της μίας υπομονάδας, λειτουργεί ως «κλειδί» το οποίο μπαίνει στη «κλειδαριά» που δημιουργούν υδρόφοβα κατάλοιπα της C-τελικής περιοχής της άλλης υπομονάδας. Στο μοτίβο «κλειδί-κλειδαριά» της α τάξης των GSTs, η πλευρική αλυσίδα του αμινοξικού καταλοίπου Val50, που απαντά σε ένα βρόγχο της N-τελικής περιοχής, λειτουργεί ως «κλειδί», το οποίο εκτείνεται κατά μήκος της κοινής επιφάνειας των υπομονάδων και «κλειδώνει» σε μία υδρόφοβη κοιλότητα, που δημιουργείται από κατάλοιπα που βρίσκονται μεταξύ της $\alpha 4$ και $\alpha 5$ της C-τελικής περιοχής της απέναντι υπομονάδας (Hayes et al., 2005). Το μοτίβο αυτό είναι κοινό για τις GSTs των τάξεων φ , τ , α , μ , και π (Thom et al., 2001, Sayed et al., 2000, Hegazy et al., 2004). Μεταλλάξεις στο αμινοξικό κατάλοιπο που λειτουργεί ως «κλειδί» στα ένζυμα *hGSTP1-1*, *hGSTA1-1* και *hGSTM1-1* συντέλεσαν στη μείωση του διμερισμού ή/και της σταθερότητας του διμερούς, καθώς και σε ελάττωση της καταλυτικής ικανότητας των μεταλλαγμένων μορφών (Sayed et al., 2000, Stenberg et al., 2000).

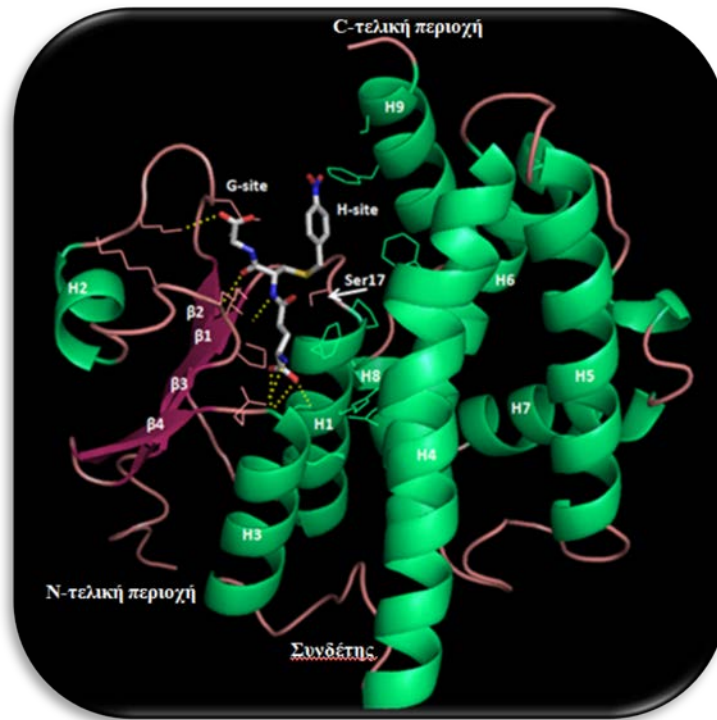
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο δεύτερος τύπος αλληλεπιδράσεων της κοινής επιφάνειας των δύο υπομονάδων είναι περισσότερο υδρόφιλος και εκλείπει το παραπάνω μοτίβο. Τέτοιου τύπου αλληλεπιδράσεις έχουν οι GSTs των τάξεων σ (Ji et al., 1995) και θ (Rossjohn et al., 1998). Η εξειδίκευση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των υπομονάδων στην κάθε τάξη των GSTs, εμποδίζει τη δημιουργία ετεροδιμερών μεταξύ GST υπομονάδων διαφορετικών τάξεων (Hayes et al., 2005, Frova, 2006). Μεταξύ όμοιων τάξεων μπορούν να σχηματιστούν ετεροδιμερή (McGonigle et al., 2000, Dixon et al., 2002b).

1.7.3. ΕΝΕΡΓΟΣ ΠΕΡΙΟΧΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΗΣ GSH (G-ΘΕΣΗ)

Η G-θέση τυπικά σχηματίζεται από τα αμινοξικά κατάλοιπα της N-τελικής περιοχής, αλλά σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να συνεισφέρουν και τα αμινοξικά κατάλοιπα από τη δεύτερη υπομονάδα (Sinning et al., 1993). Τα αμινοξικά κατάλοιπα σε αυτή τη θέση είναι συντηρημένα και σε κάποιες τάξεις όπως την α , μ και π η G-θέση είναι εύκολα προσβάσιμη ενώ σε άλλες τάξεις όπως η θ και η ζ είναι σχετικά «θαμμένη» έτσι δεν είναι προσβάσιμη για τη GSH που είναι ακινητοποιημένη σε χρωματογραφικό υλικό (Κεφάλαιο 3) (Board & Menon, 2013). Στη θέση αυτή βρίσκεται το συντηρημένο καταλυτικό αμινοξικό κατάλοιπο, που αλληλεπιδρά και ενεργοποιεί τη σουλφυδρυλομάδα της GSH, ώστε να προκύψει το καταλυτικά ενεργό ανιόν του σουλφυδρυλίου (GS^-) (Labrou et al., 2001, Oakley, 2005, Frova, 2006). Στον Πίνακα 1.1. φαίνεται το καταλυτικό αμινοξικό κατάλοιπο για κάθε τάξη, όπου έχει προσδιοριστεί.

Στις κυτταροπλασματικές καθώς και στις μιτοχονδριακές GSTs απαντά το αμινοξικό κατάλοιπο *cis*-προλίνη, το οποίο βρίσκεται στη N-τελική περιοχή, στο τέλος του β_3 ελάσματος. Το αμινοξικό αυτό κατάλοιπο, είναι υπεύθυνο για τη συντηρημένη αλληλεπίδραση μέσω δεσμών υδρογόνου με τη «ραχοκοκαλιά» των αμινομάδων του τμήματος της κυστεΐνης της GSH. Επίσης η περιοχή της έλικας α_2 , παρουσιάζει τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση ανάμεσα στις διάφορες τάξεις. Το συγκεκριμένο δομικό στοιχείο περιλαμβάνει αμινοξικά κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν με τη γλυκίνη της GSH (Oakley, 2011). Ακόμα αξίζει να αναφερθεί ότι το θετικά ηλεκτροστατικό φορτισμένο δυναμικό στη G-θέση, που είναι χαρακτηριστικό σε όλες τις GSTs, μάλλον συνεισφέρει στον ιονισμό του ανιόντος του σουλφυδρυλίου της GSH (Labrou et al., 2001).



Σχήμα 1.11. Δομή κυτταροπλασματικής GST, όπου τα β-ελάσματα απεικονίζονται με φούξια και οι έλικες με πράσινο. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα PyMOL (DeLano, 2002).

1.7.4. ΕΝΕΡΓΟΣ ΠΕΡΙΟΧΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΟΦΙΛΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (H-ΘΕΣΗ)

Η υδρόφοβη H-θέση που βρίσκεται στη C-τελική περιοχή αποτελείται από μη-συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα, επιτρέποντας τη δέσμευση ποικιλίας υποστρωμάτων (Hayes et al., 2005). Για παράδειγμα, η H-θέση του ενζύμου *GmGSTU4-4* είναι τυπικά υδρόφοβη και σχηματίζεται κυρίως από υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα της C-τελικής περιοχής: έλικα H4a, (Tyr107, Arg111), έλικα H6 (Trp163), έλικα H9 (Phe208, Leu212, Lys215 και Leu216), και Phe10 και Leu37 από τη N-τελική περιοχή (Axarli et al., a,b).

Η H-θέση παρουσιάζει κάποια δομική ευελιξία και μπορεί να προσδέσει το υπόστρωμα, με διάφορες δομικές προσαρμογές. Απόδειξη αυτού αποτελεί η δέσμευση ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων στην H-θέση, με πάνω από έναν προσανατολισμούς (Josephy & Mannervik, 2006).

1.7.5. ΕΝΕΡΓΟ ΚΕΝΤΡΟ

Κάθε υπομονάδα έχει ένα ανεξάρτητο ενεργό κέντρο, αποτελούμενο από τη G-θέση και την H-θέση (Chronopoulou et al., 2011). Το ενεργό κέντρο είναι η περιοχή δεσμεύσεως των υποστρωμάτων και μοιάζει με ρήγμα μεταβλητού μεγέθους, όπου πρώτα δεσμεύεται η γλουταθειόνη (στον πυθμένα). Στη συνέχεια προσδένεται το υδρόφοβο υπόστρωμα, καταλαμβάνοντας την H-θέση, που διαμορφώνεται πάνω από τη γλουταθειόνη, από υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα (Κλώνης, 2007).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω τα αμινοξικά κατάλοιπα της G-θέσης είναι συντηρημένα, όμως το πρωταρχικό αμινοξικό κατάλοιπο αυτής της θέσης, το οποίο είναι υπεύθυνο για την κατάλυση της αντίδρασης, διαφέρει σημαντικά μεταξύ των τάξεων (Board & Menon, 2013) (Πίνακας 1.1). Επίσης αυτό το αμινοξικό κατάλοιπο, απαντά στην «καταλυτική» θηλειά μετά το β₁ έλασμα στην N-τελική περιοχή (Oakley, 2011).

Σε αρκετές κρυσταλλικές δομές φαίνεται ότι το καταλυτικό αμινοξικό κατάλοιπο του ενεργού κέντρου, σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το άτομο του θείου της GSH και τοποθετείται σε τέτοια θέση που να επιτρέπει τη σταθεροποίηση του θειολοανιόντος της GSH, ώστε να βελτιώνει τη νουκλεοφιλικότητα της (Labrou et al., 2001, Thom et al., 2002, Axarli et al., 2009a). Όταν το καταλυτικό αμινοξύ είναι η τυροσίνη ή η σερίνη οι υδροξυλομάδες αυτών των αμινοξέων σχηματίζουν δεσμό υδρογόνου με τη σουλφυδρυλομάδα της GSH, προκαλώντας το σχηματισμό θειολοανιόντος. Η κυστεΐνη στη θέση του καταλυτικού αμινοξέος, επιτρέπει το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών (Oakley, 2011).

Η ανάλυση κρυσταλλικών δομών διαλυτών GSTs αναδεικνύει ότι για το σχηματισμό και τη σταθεροποίηση του σουλφυδριλοανιόντος (-RS⁻), συμμετέχουν αρκετά αμινοξικά κατάλοιπα του ενεργού κέντρου και ένα συντηρημένο λειτουργικά δίκτυο κατανομής ηλεκτρονίων. Αμινοξέα θετικά φορτισμένα όπως η αργινίνη Arg18, τοποθετημένη στο τέλος της G-θέσης, είναι συντηρημένο αμινοξύ σε όλες τις τ τάξεις. Παρόλο που δεν εμπλέκεται άμεσα στο σχηματισμό της θέσης, φαίνεται να παίζει έμμεσο ρόλο στη δέσμευση της GSH και τη σταθεροποίηση της δομής της θέσης, μέσα από ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (Axarli et al., 2009a).

1.7.6 ΠΕΡΙΟΧΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΔΕΣΜΕΥΤΗ (L-ΘΕΣΗ)

Οι GSTs εκτός της καταλυτικής τους δράσης, δεσμεύουν υδρόφοβες ενώσεις (αίμη, στεροειδή, φυτικές ορμόνες και φλαβονοειδή κ.α.) χωρίς να είναι υποστρώματα, σε ξεχωριστή θέση (L-θέση). Υπάρχουν λίγες πληροφορίες σχετικά με την ακριβή τοποθεσία της L-θέσης, ενώ φαίνεται να διαφοροποιείται ανάμεσα στα διάφορα ισόενζυμα (Chronopoulou et al., 2011).

Για παράδειγμα βρέθηκε στην L-θέση του ενζύμου *GmGSTU4-4*, να δεσμεύεται η ένωση 4-νιτροφαινυλ-μεθανοθειόλη (Axarli et al., 2009a) και να τοποθετείται στην υδροφοβική «τσέπη» επιφάνειας που σχηματίζεται από τα αμινοξικά κατάλοιπα Trp11, Arg20, Tyr30, Tyr32, Leu199 και Pro200. Τα κύρια αμινοξικά κατάλοιπα δέσμευσης (Trp11, Arg20, Tyr30 και Tyr32) είναι γενικά συντηρημένα στην τ τάξη (Chronopoulou et al., 2011). Από την άλλη, η L-θέση της GST από το *Schistosoma japonica* βρίσκεται στην περιοχή επαφής των δυο υπομονάδων του διμερές (McTigue, et al., 1995). Στην περίπτωση του *Arabidopsis* (Reinemer et al., 1996), η L-θέση τοποθετείται δίπλα στη G-θέση ενώ στην π τάξη GST και στη GST I του αραβοσίτου τοποθετείται εντός της H-θέσης (Oakley et al., 1999, Axarli et al., 2004).

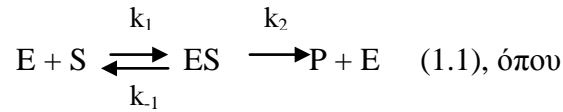
Δεν έχει εξακριβωθεί ο ρόλος αυτής της θέσης, όμως είναι πιθανόν να αποτρέπεται η τροποποίηση (π.χ. αποδόμηση, οξειδωση) μορίων *in vivo*, η προστασία του κυττάρου από γενετοξικές και κυτταροτοξικές ενώσεις καθώς και η μεταφορά ενώσεων σε κυτταρικά διαμερίσματα και πρωτεϊνικούς υποδοχείς (Oakley et al., 1999, Mueller et al., 2000, Axarli et al., 2004, Axarli et al., 2009a).

1.8. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΠΟΥ ΑΚΟΛΟΥΘΟΥΝ ΟΙ GSTs

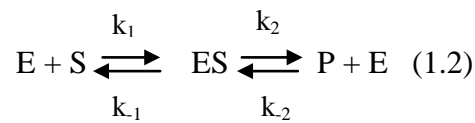
Το πρότυπο της ενζυμικής κινητικής, πρώτα προτάθηκε από τους Brown και Henri το 1902 και αργότερα καθιερώθηκε από τους Michaelis & Menten το 1913, το οποίο περιγράφει τη δέσμευση του ελεύθερου ενζύμου (E) στο αντιδρών (S) και το σύμπλοκο που σχηματίζεται (ES). Το σύμπλοκο αυτό μετατρέπεται σε προϊόν (P) και το ένζυμο απαντά πάλι σε ελεύθερη μορφή (E), ώστε να είναι διαθέσιμο για μια νέα αντίδραση.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η γενική ενζυμική αντίδραση είναι η εξής:



k_1 , k_{-1} και k_2 είναι σταθερές της ταχύτητας της αντίδρασης. Από την παραπάνω αντίδραση φαίνεται ότι η δέσμευση του υποστρώματος είναι αντιστρεπτή, ενώ η αποδέσμευση του προϊόντος είναι μη αντιστρεπτή. Εδώ αξίζει να σημειωθεί, ότι αυτό το πρότυπο αντίδρασης χρησιμοποιείται για *in vitro* κινητικές αναλύσεις, καθώς κάτω από αυτές τις συνθήκες θεωρείται ότι το προϊόν απαντά σε ασήμαντη συγκέντρωση και γι' αυτό η αντίδραση αντίθετης κατεύθυνσης είναι τάξης μηδέν. Παρόλο αυτά, η *in vivo* αντίδραση 1.1. είναι διαφορετική και αυτό γιατί στο κύτταρο το προϊόν θα πρέπει πάντα να απαντά σε τέτοια συγκέντρωση, ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί το επόμενο μεταβολικό μονοπάτι. Συνεπώς *in vivo* οι περισσότερες αντιδράσεις παρουσιάζουν κάποιο βαθμό ανιστρεψιμότητας και χαρακτηρίζονται από το γενικότερο μοντέλο (Sauro, 2009):



Στην πράξη καθώς οι σταθερές αντίδρασης των αρχικών κυρίως σταδίων είναι δύσκολο να προσδιοριστούν, προσεγγίζουμε την αντίδραση στην απλοποιημένη της μορφή (1.1) και ακολουθούμε δύο υποθέσεις, είτε των Michaelis και Menten που αφορά στην υπόθεση ταχείας ισορροπίας (1), είτε την υπόθεση δυναμικής ισορροπίας (2) των Briggs και Haldane. Σύμφωνα με την υπόθεση (1), η δέσμευση και η αποδέσμευση του υποστρώματος στο ένζυμο είναι σε ισορροπία και η διάσταση σε προϊόν γίνεται σε μικρότερη κλίμακα χρόνου. Στην υπόθεση (2), το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος πλησιάζει ταχύτατα τη δυναμική ισορροπία. Ο λόγος που επιλέγεται περισσότερο η υπόθεση (1), είναι ότι είναι πιο απλή (Sauro, 2009).

Υπόθεση ταχείας ισορροπίας (Michaelis & Menten)

Η εξίσωση των Michaelis και Menten είναι η εξής:

$$u = \frac{k_2[E_0][S]}{K_m + [S]} \quad (1.3) \quad \text{όπου,}$$

u : ταχύτητα συνολικής αντιδράσεως

k_2 : σταθερά της ταχύτητας του σταδίου σχηματισμού του προϊόντος

E_0 : συνολική συγκέντρωση ενζύμου

$[S]$: συνολική συγκέντρωση υποστρώματος

K_m : σταθερά Michaelis

Οι προϋποθέσεις που πρέπει να ισχύουν για την παραπάνω εξίσωση είναι οι εξής: α) η αντίδραση να είναι μονο-υποστρωματική, β) κάθε μόριο ενζύμου να φέρει μία περιοχή δέσμευσης υποστρώματος ή και περισσότερες οι οποίες όμως δεν πρέπει να αλληλεπιδρούν, γ) σχηματισμός ενός ενδιάμεσου συμπλόκου ES ή και δεύτερου που όμως να περιορίζει και να ελέγχει την ταχύτητα της συνολικής αντίδρασης, δ) σε πολυ-υποστρωματικές αντιδράσεις, όταν οι συγκεντρώσεις υποστρωμάτων εκτός μίας, διατηρούνται σταθερές (Κλώνης, 2007).

Η καταλυτική σταθερά (k_{cat})

Η καταλυτική σταθερά (k_{cat}) προσδιορίζει την ικανότητα του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος να μετατρέπεται σε τελικό προϊόν, ονομάζεται και αριθμός μετατροπής ή αριθμός ανακυκλήσεως (turnover number) και ισούται με τον αριθμό μορίων υποστρώματος που καταλύονται σε προϊόν, από ένα ενζυμικό μόριο (ενεργό περιοχή) ανά μονάδα χρόνου (μονάδες s^{-1}). Η αντίστροφη τιμή της, ισούται με το χρόνο που απαιτείται προκειμένου να καταλυθεί ένα μόριο υποστρώματος (Κλώνης, 2007). Στη θεωρία η τιμή της k_{cat} δεν μπορεί να ξεπερνά το $10^9 M^{-1}sec^{-1}$ ((Sauro, 2009).

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η σταθερά Michaelis (K_m)

Η σταθερά Michaelis (K_m) έχει διαστάσεις συγκεντρώσεως, είναι το μέγεθος $(k_{-1}+k_2)/k_1$ και προσδιορίζει τις σχετικές συγκεντρώσεις των E, S και ES σε συνθήκες σταθεροποιημένης κατάστασης (*steady-state*).

Η σταθερά εξειδικεύσεως (k_{cat}/K_m)

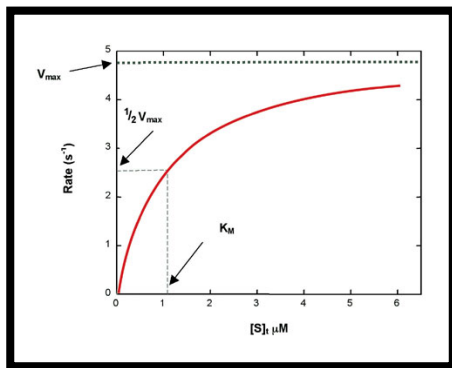
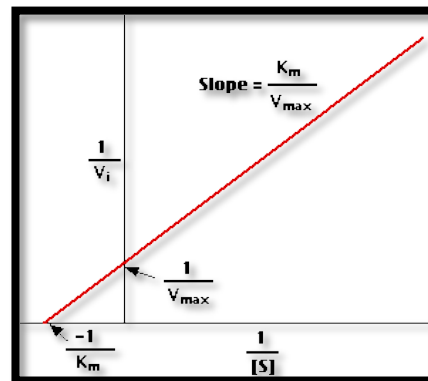
Η τιμή της σταθεράς εξειδικεύσεως είναι ο πλέον αξιόπιστος τρόπος εκτίμησης εξειδικεύσεως ενός ενζύμου για διάφορα υποστρώματα. Η σταθερά εξειδικεύσεως συνεκτιμά και τη σταθερά k_{cat} , που αφορά στα μεταβατικά στάδια και τη σταθερά K_m , που αφορά στις αλληλεπιδράσεις των αρχικών σταδίων (Κλώνης, 2007).

Η κλασική γραφική παράσταση των Michaelis και Menten, ως προς τις μεταβλητές ταχύτητα και υπόστρωμα, οδηγεί σε ορθογώνια υπερβολή (Σχήμα 1.12). Υπάρχουν και εναλλακτικές μορφές προσδιορισμού των K_m και V_{max} μέσω άλλων εξισώσεων, όπως η γραφική παράσταση των Lineweaver-Burk, η γραφική παράσταση του Hanes, η γραφική παράσταση του Hofstee και η γραφική παράσταση των Eisenthal και Cornish-Bowden.

Περιληπτικά θα αναφερθούν κάποια στοιχεία για τη γραφική παράσταση διπλού αντιστρόφου των Lineweaver-Burk, καθώς είναι η πλέον συνηθισμένη. Αν η σχέση 1.1 γραφτεί με τη μορφή διπλού αντιστρόφου και ληφθεί υπόψη ότι $V_{max}=k_2[E_0]$ λαμβάνεται η σχέση:

$$\frac{1}{u} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (1.4)$$

Η γραφική παράσταση της παραπάνω σχέσης είναι μία ευθεία, η οποία προκύπτει αν παραστήσουμε γραφικά στον άξονα των τεταγμένων τις τιμές $1/u$ και στον άξονα των τετημένων τις τιμές $1/[S]$ (Σχήμα 1.12) Δύο σημεία που πρέπει να επισημανθούν για αυτή τη γραφική παράσταση είναι πρώτον ότι πιθανά πειραματικά σφάλματα μεγεθύνονται ανισόρροπα στις αντίστροφές τιμές και δεύτερον ότι θα πρέπει να είναι προσεκτική η επιλογή των τιμών $[S]$ ώστε οι αντίστροφές τιμές να είναι ομοιόμορφα κατανομημένες στον άξονα των τετημένων (Κλώνης, 2007).

α**β**

Σχήμα 1.12. Γραφικές παραστάσεις για τον υπολογισμό K_m και V_{max} α) Michaelis-Menten β) διπλού αντιστρόφου των Lineweaver-Burk.

Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι η ταχύτητα της αντίδρασης επηρεάζεται ως γνωστόν από τη θερμοκρασία, το pH και τη συγκέντρωση του ενζύμου.

1.9. ΤΥΠΟΙ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ

Υπάρχουν πολλά μόρια ικανά να μειώνουν ή να επιταχύνουν την ταχύτητα μιας αντίδρασης, τα οποία ονομάζονται αναστολείς και ενεργοποιητές, αντίστοιχα (Sauro, 2009). Οι αναστολείς διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες στους αντιστρεπτούς και τους μη αντιστρεπτούς, ανάλογα με τη δράση τους στη λειτουργία του ενζύμου. Η συναγωνιστική αναστολή πρόκειται για μια αντιστρεπτή αναστολή που προκύπτει από ενώσεις όμοιες δομικά με τα υποστρώματα και μπορεί να αντιστραφεί προσθέτοντας παραπάνω υπόστρωμα. Αυτό δεν μπορεί να συμβεί στην ανταγωνιστική αναστολή καθώς ο αναστολέας για να δεσμευτεί στο ενεργό κέντρο του ενζύμου ή σε κάποια άλλη θέση, θα πρέπει πρώτα να έχει δεσμευτεί το υπόστρωμα. Οι μη αντιστρεπτοί αναστολείς είναι αυτοί που δεσμεύονται ομοιοπολικά με το ένζυμο ή τροποποιούν χημικά το ένζυμο, προκαλώντας τελικά μόνιμη αλλαγή του ενζύμου. Οι αναστολείς είναι σημαντικοί για πολλούς λόγους. Πολλές φαρμακευτικές ενώσεις λειτουργούν ως αναστολείς ενζύμου ή ως σήμανση πρωτεϊνών. Επίσης βοηθούν στην κατανόηση του ενεργού κέντρου και της καταλυτικής δράσης του ενζύμου. Υπάρχουν πολλοί φυσικοί αναστολείς με τους

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

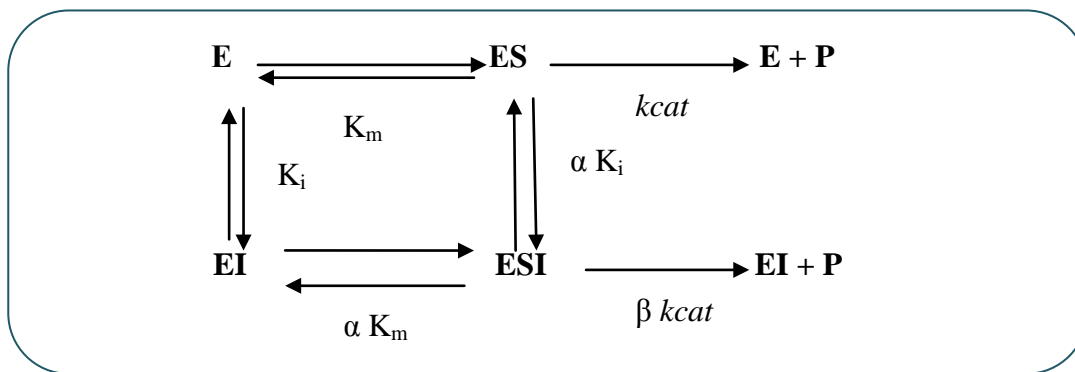
πλέον γνωστούς να είναι η πενικιλίνη και η βανκομυκίνη ή οι αντιβακτηριακές σουλφοναμίδες (Sauro, 2009).

Γενικά, ο αναστολέας δεσμεύεται είτε στο ενεργό κέντρο, είτε σε εναλλακτική θέση στην πρωτεΐνη, είτε στο υπόστρωμα που είναι δεσμευμένο στο ενεργό κέντρο. Στο Σχήμα 1.13 απεικονίζεται η δέσμευση ενός αντιστρεπτού αναστολέα (I) είτε στο ελεύθερο ένζυμο (E), είτε στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος (ES), σύμφωνα με το πρότυπο των Botts-Morales (1953). Επίσης το υπόστρωμα μπορεί να δεσμευτεί στο σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα (EI). Διαφοροποιώντας την ισχύ δέσμευσης και τα καταλυτικά βήματα μπορούν να προκύψουν διαφορετικοί τύποι αναστολής (Sauro, 2009).

Στο μοντέλο αυτό των Botts-Morales, που βασίζεται στην υπόθεση ταχείας ισορροπίας (Σχήμα 1.13), θεωρείται ότι η καταλυτική σταθερά k_{cat} μπορεί να διαφέρει στα δύο στάδια μετατροπής των ES ή ESI σε προϊόν, και η διαφορά αυτή προσδιορίζεται από τον παράγοντα β . Για να υπάρχει αναστολή θα πρέπει να ισχύει $0 \leq \beta \leq 1$. Ο παράγοντας α υποδηλώνει, τη διαφορά στη συγγένεια δέσμευσης μεταξύ του υποστρώματος και του συμπλόκου EI και μεταξύ του αναστολέα και του συμπλόκου ES. Όταν το $\alpha=1$, δεν υπάρχει διαφορά, ενώ όταν $\alpha=0$, ο αναστολέας μπορεί να προσδεθεί μόνο στο ελεύθερο ένζυμο. Αλλάζοντας το α και το β αλλάζει ο τύπος αναστολής. K_i είναι η σταθερά διαστάσεως του αναστολέα και όσο μεγαλύτερη τιμή έχει τόσο πιο δύσκολα σχηματίζεται το σύμπλοκο ESI (Sauro, 2009).

Εξίσωση γενικού τύπου αναστολής:

$$u = \frac{V_{max} S [1 + \beta (I/\alpha K_i)]}{K_m (1 + I/K_i) + S (1 + I/\alpha K_i)} \quad (1.5)$$



Σχήμα 1.13. Γενικό μοντέλο αναστολής (Botts-Morales). (I) είναι η συγκέντρωση του αναστολέα, ES το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος και ESI το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος-αναστολέα. K_i είναι η σταθερά διάστασης του αναστολέα. Οι τιμές των K_m και k_{cat} διαφέρουν σύμφωνα με το αν ο αναστολέας δεσμεύεται ή όχι.

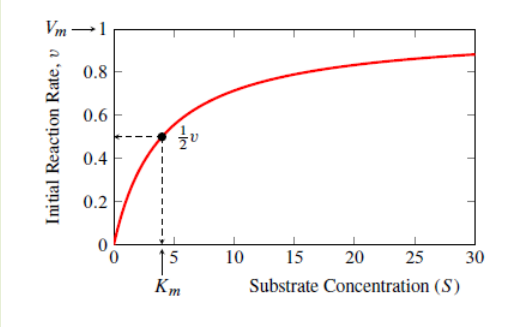
Τα κύρια είδη ενζυμικής αναστολής είναι η συναγωνιστική, η ανταγωνιστική και η μικτή αναστολή (Κλώνης, 2007). Ο πιο κοινός τύπος αναστολής είναι η συναγωνιστική (Sauro, 2009). Στον πίνακα 1.2 περιγράφονται οι διαφορές αυτών των τύπων αναστολής. Στη συναγωνιστική αναστολή ο αναστολέας και το υπόστρωμα συναγωνίζονται για την ίδια θέση δεσμεύσεως, ακόμα και αν δεσμευτεί ο αναστολέας κοντά στη θέση δέσμευσης, εμποδίζεται στερεοχημικά η δέσμευση του υποστρώματος. Συνεπώς στη συναγωνιστική αναστολή η δέσμευση του αναστολέα, αδυνατεί να δώσει προϊόν. Στην ανταγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας και το υπόστρωμα δεσμεύονται σε διαφορετική θέση στο ένζυμο και για να δεσμευτεί ο αναστολέας, θα πρέπει πρώτα να έχει δεσμευτεί το υπόστρωμα. Το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος-αναστολέα, αδυνατεί να δώσει προϊόν. Η μικτή αναστολή αποτελεί συνδυασμό ανταγωνιστικής και συναγωνιστικής αναστολής, έτσι ο αναστολέας δεσμεύεται στο ελεύθερο ένζυμο E με σταθερά διάστασης K_i και στο σύμπλοκο ES με σταθερά διάστασης αK_i , ενώ γενικά ισχύει $K_i \neq \alpha K_i$. Η μη συναγωνιστική αναστολή αποτελεί υποπερίπτωση της μικτής αναστολής και ισχύει $K_i = \alpha K_i$ (Κλώνης, 2007).

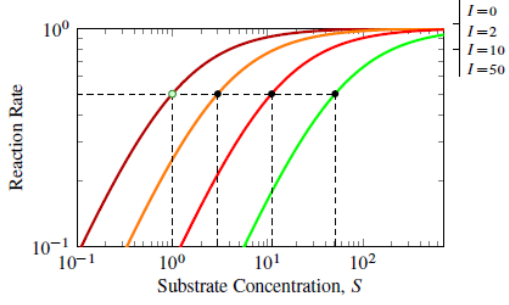
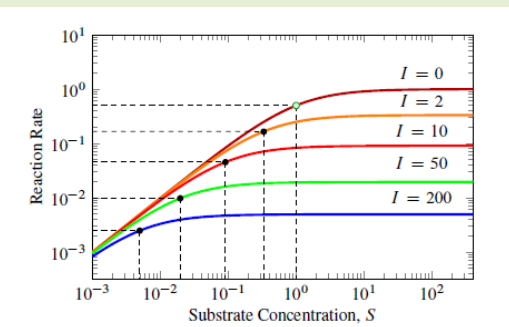
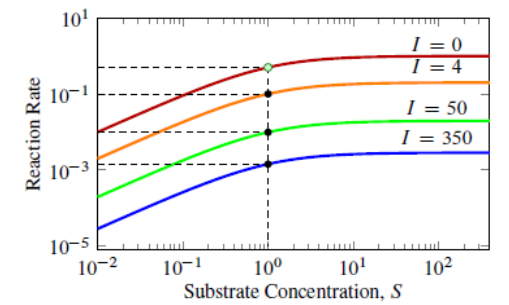
Σύμφωνα με το γενικό τύπο που περιγράφεται παραπάνω, αν ο παράγοντας α είναι μεγάλος ($\alpha \gg 0$), τότε περιορίζεται ο σχηματισμός του συμπλόκου ESI κι έτσι καταλήγουμε σε συναγωνιστικού τύπου αναστολή. Στην ανταγωνιστική αναστολή θεωρείται $\beta=0$ και $\alpha \rightarrow 0$ και ότι το K_i τείνει στο άπειρο, έτσι το $K_i \gg \alpha K_i$. Αυτό σημαίνει ότι ο αναστολέας μπορεί να δεσμευτεί στο ES. Η μικτή αναστολή αφορά

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

στον αναστολέα που μπορεί να προσδεθεί στο ελεύθερο ένζυμο και στο σύμπλοκο ES. Στις περισσότερες περιπτώσεις η δέσμευση του αναστολέα υποτίθεται ότι επηρεάζει τη δέσμευση του υποστρώματος και το αντίστροφο και τότε πρόκειται για μη-συναγωνιστική μικτού τύπου αναστολή, εάν δεν έχει καμία επίδραση στη δέσμευση του υποστρώματος τότε πρόκειται για καθαρή μη-συναγωνιστική αναστολή. Στου μικτού τύπου μη συναγωνιστική αναστολή, όπου μόνο το σύμπλοκο ES μπορεί να δώσει προϊόν λαμβάνεται ως αποδεκτό ότι $\beta=0$ και $\alpha>1$ (Sauro, 2009).

Πίνακας 1.2. Τύποι αναστολής, σταθερές που επηρεάζονται σε κάθε τύπο αναστολής και η αντίστοιχη εξίσωση της ταχύτητας. Οι σταθερές διάστασης K_i είναι η σταθερά διάστασης του συμπλόκου EI και aK_i η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ESI.

Τύπος αναστολής	Γραφική παράσταση	Σταθερές που επηρεάζονται	Τύπος εξίσωσης της ταχύτητας αντιδράσεως
Χωρίς αναστολή	 <p>The graph shows a plot of Initial Reaction Rate, v, on the y-axis (ranging from 0 to 1) against Substrate Concentration (S) on the x-axis (ranging from 0 to 30). A red curve starts at the origin and increases, approaching a horizontal asymptote at $v = 1$, which is labeled V_m. A specific point on the curve is highlighted with dashed lines: a vertical line from the x-axis at K_m (approximately 5) meets the curve, and a horizontal line from that point to the y-axis at $\frac{1}{2}v$ (approximately 0.5).</p>	-	$u = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$

<p>Συναγωνιστική</p>		<p>Σταθερά εξειδικεύσεως (k_{cat}/K_m). Μείωση της φαινομενικής συγγένειας και εξειδικεύσεως του ενζύμου έναντι του υποστρώματος. Η V_{max} παραμένει σταθερή</p>	$u = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$
<p>Ανταγωνιστική</p>		<p>Σταθερά καταλύσεως (k_{cat}). Αύξηση της φαινομενικής συγγένειας και μείωση της ταχύτητας καταλύσεως του ενζύμου με το υπόστρωμα. Ο λόγος V_{max}/K_m παραμένει σταθερός.</p>	$u = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)}$
<p>Μικτή</p>		<p>Σταθερά εξειδικεύσεως (k_{cat}/K_m) και η σταθερά καταλύσεως (k_{cat}). Αλλάζει η V_{max}. Η K_m παραμένει σταθερή.</p>	$u = \frac{V_{max} [S]}{K_m(1+[I]/K_i) + [S](1+[I]/\alpha K_i)}$ <p><i>Στη μη συναγωνιστική $\alpha=1$</i></p>

1.10. ΣΥΝΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΛΛΟΣΤΕΡΙΣΜΟΣ

Η συνέργεια θεωρείται τρόπος εσωτερικής ρύθμισης της ενζυμικής δραστηριότητας. Είναι φαινόμενο το οποίο παρατηρήθηκε αρκετές φορές στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής. Σε ολιγομερή ένζυμα η δέσμευση ενός μορίου-δεσμευτή σε μία περιοχή

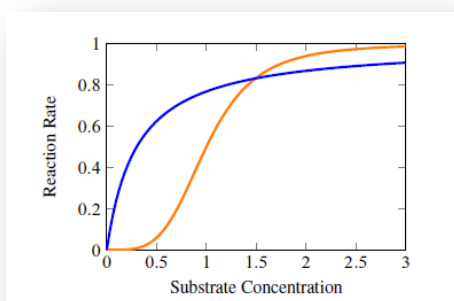
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

δέσμευσης, μπορεί να επηρεάσει τη συγγένεια κάποιας άλλης θέσης δεσμεύσεως (σε άλλη υπομονάδα) ως προς το δεσμευτή. Όταν η συνέργεια εμφανίζεται μεταξύ δύο ίδιων περιοχών και αφορά σε ίδιους δεσμευτές τότε η συνέργεια χαρακτηρίζεται *ομότροπη*, στην αντίθετη περίπτωση χαρακτηρίζεται ως *ετερότροπη* (Κλώνης 2007). Επίσης, διακρίνεται σε *θετική* και *αρνητική* συνέργεια, ανάλογα με το αν η δέσμευση ενός δεσμευτή αυξάνει ή μειώνει αντίστοιχα, τη συγγένεια του δεσμευτή με μία άλλη θέση δεσμεύσεως του ενζύμου (Κλώνης, 2007, Sauro, 2009). Η θετική συνέργεια καταλήγει σε σιγμοειδή καμπύλη και όχι σε υπερβολή (Σχήμα 1.14).

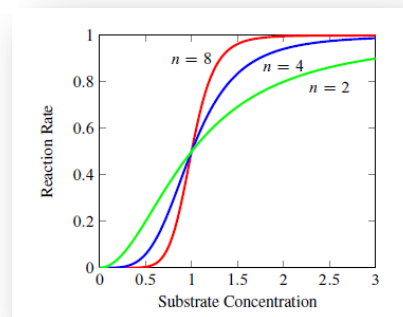
Ο αλλοστερισμός πρόκειται για αναστολή με τα μόρια-τροποποιητές να παρουσιάζουν ελάχιστη ή καμία δομική ομοιότητα με το υπόστρωμα. Διακρίνεται στον *αρνητικό* αλλοστερισμό, όπου η δέσμευση του μορίου-τροποποιητή στην αλλοστερική θέση μειώνει τη συγγένεια του ενζύμου για το υπόστρωμα, ενώ το ακριβώς αντίθετο συμβαίνει στην περίπτωση του θετικού αλλοστερισμού. Το φαινόμενο αυτό παρουσιάζεται σε ολιγομερή, μονομερή και σε πολυμερή ένζυμα και αφορά σε μία υπομονάδα, δηλαδή δεν επηρεάζεται η συγγένεια των θέσεων δέσμευσης στην άλλη υπομονάδα (Κλώνης, 2007).

Η συνέργεια και ο αλλοστερισμός είναι δύο ξεχωριστά φαινόμενα, υπάρχουν ένζυμα τα οποία παρουσιάζουν συνέργεια χωρίς να συσχετίζεται με τον αλλοστερισμό και το αντίθετο. Όμως υπάρχουν αρκετά ένζυμα που παρουσιάζουν συνέργεια η οποία συσχετίζεται με τον αλλοστερισμό, αυτός είναι και ο λόγος που συγχέονται (Sauro, 2009).

α



β



Σχήμα 1.14. α) Η κίτρινη σιγμοειδής καμπύλη υποδηλώνει θετική συνέργεια και η μπλε καμπύλη την κλαστική Michaelis-Menten β) Σιγμοειδείς καμπύλες διαφορετικών συντελεστών Hill.

Πρότυπο Hill

Το πρότυπο του Hill εξηγεί ικανοποιητικά το φαινόμενο θετικής συνέργειας και η γραφική παράσταση αποτελεί σιγμοειδή καμπύλη (Κλώνης, 2007). Αν θεωρήσουμε ένα ολιγομερές ένζυμο με n υπομονάδες και μία θέση δεσμεύσεως σε κάθε υπομονάδα για το υπόστρωμα S . Επίσης, αν υποθέσουμε ότι με τη δέσμευση του υποστρώματος στη μία θέση δεσμεύσεως αλλάζει η συγγένεια για τις υπόλοιπες $n-1$ θέσεις, έτσι ώστε να μπορούν να καλυφθούν ταυτόχρονα οι θέσεις αυτές από το S , προκύπτει η παρακάτω εξίσωση (με την υπόθεση ταχείας ισορροπίας).



$$K_a = \frac{[ES]}{[E][S]^n}, \quad \text{όπου}$$

K_a είναι η σταθερά δέσμευσης του υποστρώματος. Κατόπιν σύμφωνα με τη σχέση $E_t = E_0 + ES$ (E_t : συνολική συγκέντρωση ενζύμου, E_0 : αρχική συγκέντρωση ενζύμου) προκύπτει η εξίσωση Hill:

$$u = \frac{V_{\max} [S]^n}{K_d + [S]^n} \quad (1.6)$$

όπου K_d είναι η σταθερά διαστάσεως και n ο μετρήσιμος συντελεστής Hill. Πολλές φορές ο συντελεστής Hill εκφράζεται ως σταθερά ημίσειας δραστηριότητας, έτσι αν θεωρήσουμε ως 0,5 την ταχύτητα προκύπτει από την εξίσωση 1.6. ότι $S = \sqrt[n]{K_d}$. K_H ή K_H είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος που δίνει 50% της συνολικής δραστηριότητας, έτσι $\sqrt[n]{K_d} = K_H$ (Sauro, 2009).

Για να γίνει ακόμα περισσότερη κατανοητή η θετική συνέργεια αρκεί να αναφερθεί ότι όσο αυξάνεται η τιμή του συντελεστή Hill τόσο μικρότερη αλλαγή απαιτείται στη συγκέντρωση του υποστρώματος για να αυξηθεί ο ρυθμός αντίδρασης π.χ. για μια αλλαγή του ρυθμού από 10% της δραστηριότητας σε 90%, ενώ απαιτείται αλλαγή στη συγκέντρωση του υποστρώματος 81 φορές, με $n=2$ απαιτείται 9 φορές και με $n=4$

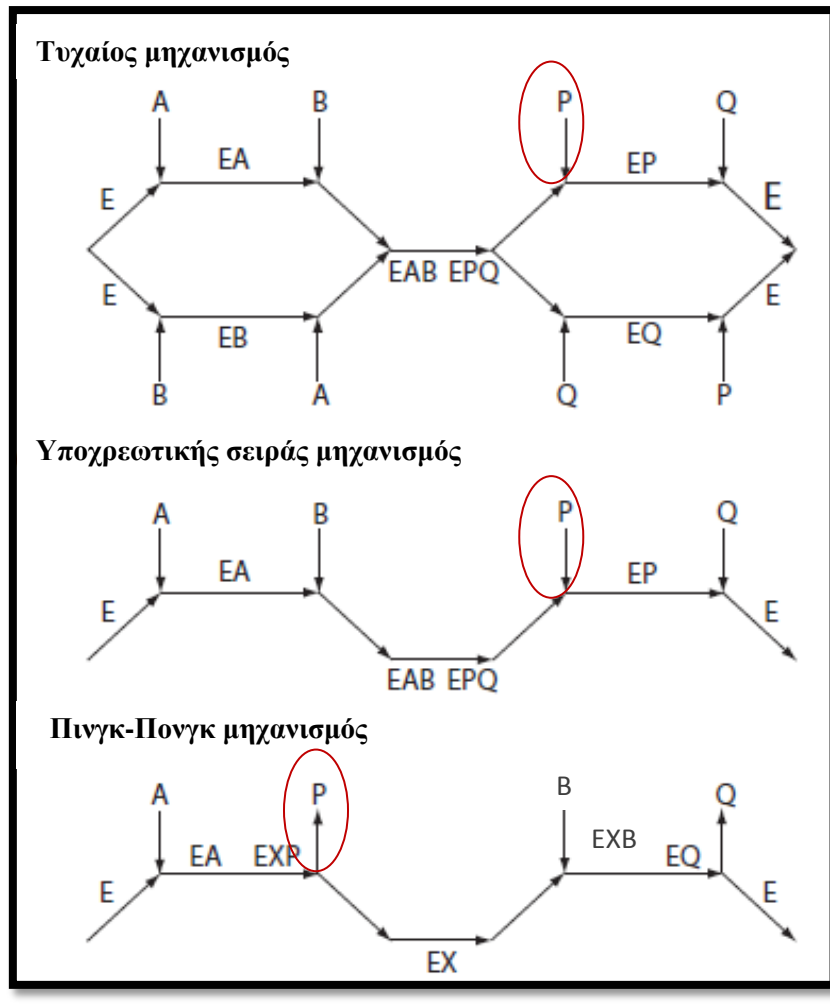
απαιτείται 3 φορές. Επίσης όσο μεγαλύτερος είναι ο συντελεστής Hill, τόσο πιο απότομη είναι και η σιγμοειδής καμπύλη (Σχήμα 1.14) (Sauro, 2009).

1.11. ΤΥΠΟΙ ΤΟΥ ΠΟΛΥ-ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ GSTs

Η κινητική των δύο υποστρωμάτων είναι πολύ πιο πολύπλοκη από αυτή του ενός, αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα υποστρώματα και τα προϊόντα μπορούν να δεσμεύονται και να αποδεσμεύονται από το ενεργό κέντρο του ενζύμου, με διαφορετικούς τρόπους (Sauro, 2009). Εάν τα δύο υποστρώματα πρέπει να δεσμευτούν στο ένζυμο, προτού δημιουργηθεί και απελευθερωθεί οποιοδήποτε προϊόν, πρόκειται για το *διαδοχικό* μηχανισμό (Cleland, 1963). Ο μηχανισμός αυτός χωρίζεται στους επιμέρους: τον *υποχρεωτικής-διαδοχής*, όπου το ένα υπόστρωμα δεσμεύεται μετά το άλλο και της *τυχαίας διαδοχής*, όπου δεσμεύονται τυχαία στο ένζυμο και τα προϊόντα απελευθερώνονται επίσης με τυχαίο τρόπο. Οι αντιδράσεις αυτές είναι αντιστρεπτές, καθώς τα υποστρώματα προσδένονται στο ένζυμο πριν συμβεί οποιαδήποτε αντίδραση (Cleland, 1963). Κλασικό παράδειγμα του μηχανισμού υποχρεωτικής σειράς, αποτελεί η αλκοολική αφυδρογονάση όπου το υπόστρωμα NADH δεσμεύεται στο ένζυμο και μετά δεσμεύεται η αλκοόλη. Με αυτό το μηχανισμό λειτουργούν και άλλες αφυδρογονάσες και κάποιες κινάσες, όπως η καρβαμδική κινάση.

Εάν απελευθερώνεται ένα προϊόν, πριν προσδεθεί το δεύτερο υπόστρωμα, ο μηχανισμός ονομάζεται *πινγκ-πονγκ* (ping-pong). Συγκεκριμένα το πρώτο υπόστρωμα τροποποιεί το ένζυμο και παράγει προϊόν P και στη συνέχεια δεσμεύεται το άλλο υπόστρωμα. Σε αυτόν τον μηχανισμό, καθώς υπάρχει τροποποίηση του ενζύμου, τα ενδιάμεσα στάδια είναι μη αναστρέψιμα (Cleland, 1963).

Οι GSTs σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Cleland (1963) ανήκουν στην κατηγορία των αντιδράσεων *Bi Bi* ($A + B \rightleftharpoons P + Q$). Στο Σχήμα 1.15 φαίνονται γραφικά κατά Cleland, οι τρεις μηχανισμοί που αναφέρθηκαν παραπάνω (Sauro, 2009).



Σχήμα 1.15. Ενζυμικοί μηχανισμοί για τα συστήματα Bi Bi.

Αρκετά ένζυμα ακολουθούν τον τυχαίο μηχανισμό αντίδρασης με χαρακτηριστικά παραδείγματα τις κινάσες όπως, η φωσφοφρουκτοκινάση, εξοκινάση και β-φωσφορυλάση. Το 1953 από τον Alberty προτάθηκε μία γενική εξίσωση προσδιορισμού του ρυθμού της αντίδρασης, που ακολουθεί μη αντιστρέψιμο τυχαίος σειράς μηχανισμό. Η εξίσωση που προτάθηκε βασίστηκε στην υπόθεση ταχείας ισορροπίας:

$$u = \frac{V_{\max}[A][B]}{K_B[A] + K_A[B] + [A][B] + K_{iA}K_B} \quad \text{όπου,}$$

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

K_A και K_B είναι σταθερές Michaelis και K_{iA} είναι σταθερά διάστασης (Sauro, 2009). .

Οι τρανσαμινάσες ακολουθούν τον *πινγκ-πονγκ* μηχανισμό, μεταφέροντας την αμινομάδα στην φωσφορική πυριδοξάλη σχηματίζοντας πυριδοξαμίνη, η οποία στη συνέχεια μπορεί να μεταφέρει την αμινομάδα σε κάποιο άλλο υπόστρωμα. Όπως και στους άλλους μηχανισμούς η υπόθεση δυναμικής ισορροπίας αν και πιο ακριβής είναι αρκετά πολύπλοκη με πολλές παραμέτρους. Στην περίπτωση όμως της μη αντιστρέψιμης μορφής ακολουθείται η παρακάτω εξίσωση:

$$u = \frac{V_{\max}[A][B]}{[A][B] + K_a[A] + K_b[B]} \quad \text{όπου,}$$

K_a και K_b , είναι η συγκέντρωση του A ή B που αποδίδει $V_{\max}/2$ στο κορεσμένο υπόστρωμα [B] ή [A], αντίστοιχα (Sauro, 2009).

Γενικά οι κινητικοί μηχανισμοί, που διέπουν τις νουκλεόφιλες αντιδράσεις ανήκουν σε όλες τις παραπάνω κατηγορίες. Συγκεκριμένα για τις GSTs, έχουν βρεθεί μηχανισμοί *υποχρεωτικής* και *τυχαίας* διαδοχής καθώς και *πινγκ-πονγκ* (Salinas & Wong, 1999, Labrou et al, 2001).

1.12. ΦΥΤΙΚΕΣ GSTs

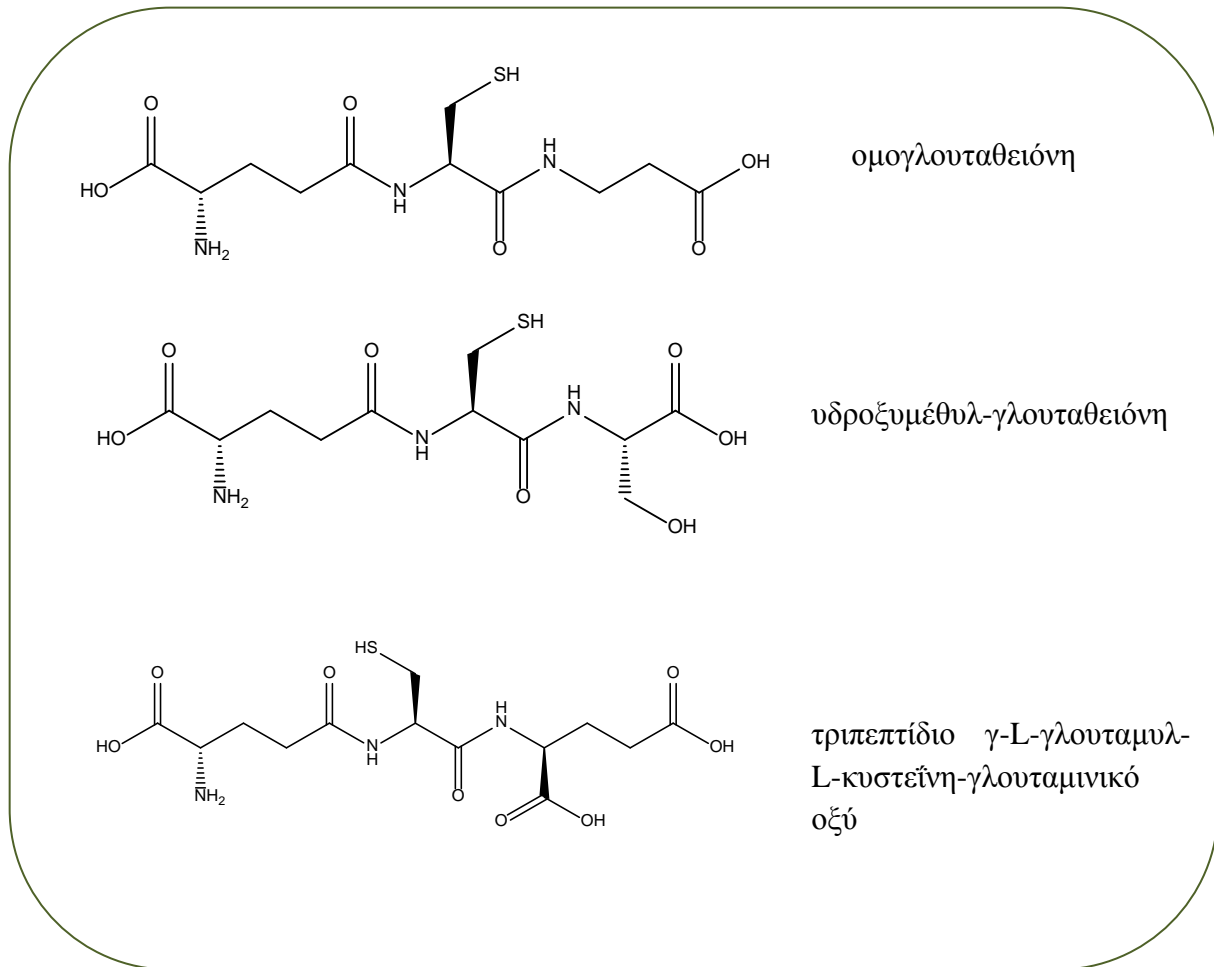
Οι φυτικές GSTs ανακαλύφθηκαν περίπου πριν 40 χρόνια και μέχρι τα μέσα του 1980, πραγματοποιούνταν περιορισμένες μελέτες σχετικά με τις GSTs των φυτών. Δεν ίσχυε όμως το ίδιο για τις GSTs των θηλαστικών, καθώς ήταν πλέον γνωστός ο ρόλος τους στο μεταβολισμό των φαρμάκων (Cummins et al., 2011). Οι GSTs παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία του φυτικού κυττάρου, από την καταπόνηση που προκαλούν βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες, όπως η εισβολή παθογόνου, οι τοξίνες από ξενοβιοτικά και βαρέα μέταλλα και η UV ραδιενέργεια (Kampranis et al., 2000, Thom et al., 2002).

Οι φυτικές GSTs ταξινομούνται σε τάξεις όπως φαίνονται στον Πίνακα 1.1., με τις φ και τ , να έχουν μελετηθεί περισσότερο. Οι GSTs αυτών των τάξεων καταλύουν την αντίδραση δέσμευσης διαφορετικών ξενοβιοτικών και αποτοξινώνουν ζιζανιοκτόνα.

Η θ τάξη έχει περιορισμένη δραστηριότητα μεταφοράσης, αλλά παρουσιάζει υψηλή δράση υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Edwards & Dixon, 2005). Από την άλλη, οι GSTs της ζ τάξης ξεχωρίζουν από τις άλλες τάξεις, καθώς δεν παρουσιάζουν δραστηριότητα υπεροξειδάσης και μεταφοράσης, αλλά εμπλέκονται στον εξαρτώμενο από τη GSH, καταβολισμό της τυροσίνης (Subramaniam et al., 1999, Dixon et al., 2000). Οι GSTs της *DHAR* τάξης δρουν ως οξειδοεδοουκτάσες εξαρτώμενες της GSH (Dixon et al., 2002a) και οι GSTs της *EFIG* τάξης κωδικεύουν τη γ υπομονάδα του ευκαρυωτικού μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης. Φαίνεται ότι η N-τελική περιοχή των GSTs της *EFIG* τάξης, μπορεί να εμπλέκεται στη διαμεσολάβηση της συγκρότησης του EF1 και της ρύθμισης του σχηματισμού συμπλόκων πολυ-υπομονάδων που περιέχουν τον EF1 (Koonin et al., 1994). Τέλος ο ρόλος των GSTs της τάξης *TCHQD* δεν έχει διευκρινιστεί (Jain et al., 2010).

Μια σημαντική διαφορά των φυτικών GSTs με αυτές των θηλαστικών, είναι ότι αρκετά φυτικά είδη διαθέτουν και εναλλακτικά τμήματα θειόλης της γλουταθειόνης, τα οποία χρησιμοποιούνται από τις GSTs. Στα φυτά μπορούν να παραχθούν διαφορετικές μορφές γλουταθειόνης, τροποποιώντας το τελευταίο αμινοξύ, είτε κατά τη δεύτερη φάση σύνθεσης, είτε μετασυνθετικά (Skipsey et al., 2005). Σε κάποια χέδρωπα η β -αλανίνη αντικαθιστά τη γλυκίνη παράγοντας την ομογλουταθειόνη (Klarheck, 1988), ενώ στην οικογένεια *Poaceae*, η σερίνη αντικαθιστά τη γλυκίνη παράγοντας την υδροξυμέθυλ-γλουταθειόνη (Klarheck et al., 1992). Επίσης έχει παρατηρηθεί αντικατάσταση της γλυκίνης από γλουταμινικό οξύ και συσσώρευση αυτού του τριπεπτιδίου, μετά από έκθεση σε κάδμιο (Meuwly et al., 1993) (Σχήμα 1.16). Υπάρχουν περιπτώσεις όπου τα ομόλογα γλουταθειόνης κυριαρχούν, όπως στην περίπτωση των φασολιών, όπου επικρατεί η ομογλουταθειόνη ενώ η γλουταθειόνη απαντά σε ίχνη (Klarheck, 1988), ενώ άλλες φορές συνυπάρχουν (σιτάρι, ρύζι) (Klarheck et al., 1992).

ΕΙΣΑΓΩΓΗ



Σχήμα 1.16. Ομόλογα γλουταθειόνης.

Οι GSTs παρουσιάζουν ευρεία εξειδίκευση ως προς ηλεκτρονιόφιλα μόρια όπως τα οργανικά υδροϋπεροξειδία, τα εποξειδία, τα ακόρεστα καρβονύλια, τα οργανικά θειοκυανιούχα και οι οργανικοί νιτρικοί εστέρες (Chronopoulou et al., 2011). Οι πολυάριθμες και ειδικές για τα φυτά τάξεις ρ και τ , είναι κυρίως υπεύθυνες για την αποτοξίνωση, κυρίως μέσω της αντίδρασης σύζευξης και πιο σπάνια μέσω της ισομερίωσης (Cummins et al., 2011). Επίσης εμπλέκονται στη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών που περιέχουν θείο, όπως τα γλυκοζίδια καθώς και στη δέσμευση, μεταφορά και αποθήκευση ενεργών οξυλιπινών, φαινολικών και φλαβονοειδών (Dixon et al., 2010). Ακόμα δρουν ως υπεροξειδάσες (GPxs), θειοτρανσφεράσες και ως δεϋδροασκορβική ρεδοκτάση (Dixon et al., 1998; Edwards et al., 2000; Frova,

2003). Ακόμα έχει διαπιστωθεί ότι παίζουν ρόλο στην απόπτωση και στη μεταγωγή σημάτων καταπόνησης (Αξαρχλή, 2009).

Οι φυτικές GSTs φαίνεται να εμπλέκονται και στην ανάπτυξη των φυτών (Moons, 2005). Δεσμεύουν ορμόνες όπως η αυξίνη και η κυτοκίνη (Zettl et al., 1994, Gonpeau et al., 1998) και επάγονται από ποικιλία φυτορμονών όπως το αιθυλένιο, η αυξίνη, το σαλικυλικό οξύ και το αψισικό οξύ (Wagner et al., 2002, Moons, 2003, Smith et al., 2003). Αυτές οι ορμόνες ρυθμίζουν την ανάπτυξη των φυτών, έτσι είναι πιθανόν οι φυτικές GSTs να παίρνουν επίσης μέρος σε αυτή (Jiang et al., 2010).

Η οικογένεια των φυτικών GSTs, έχει υψηλού βαθμού λειτουργικής επικάλυψης, ενώ υπάρχει απόκλιση στην ίδια αλλά και σε διαφορετικές τάξεις (Lui et al., 2013). Κυρίως οι μελέτες που γίνονται αφορούν τα αγγειακά φυτά ειδικά τα γεωργικά. Τελευταία έχουν γίνει μελέτες με χερσαία φυτά όπως το βρυόφυτο *Physcomitrella patens* το οποίο αποτελεί ένα νέο μοντέλο οργανισμού λόγω της απλής μορφολογίας του, του κυρίαρχου σταδίου του που είναι το απλοειδές γαμετόφυτο και της υψηλής αποτελεσματικότητας του ομόλογου ανασυνδιασμού (Rensing et al., 2008).

Είναι πλέον ευρέως γνωστό ότι τα επίπεδα μεταγραφής των GSTs αυξάνονται κατά τη διάρκεια βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων. Πιο συγκεκριμένα την επαγωγή των γονιδίων GSTs μπορούν να προκαλέσουν μολύνσεις, βιοτικοί παράγοντες, το όζον, η UV ακτινοβολία, τα βαρέα μέταλλα, η θερμική καταπόνηση, οι χαμηλές θερμοκρασίες, η αφυδάτωση, η οξειδωτική καταπόνηση, τα τραύματα, η γήρανση, η αιθανόλη, τα οξειδωτικά, τα αντιοξειδωτικά, τα ζιζανιοκτόνα και τα ζιζανιοκτόνα προστασίας (Moons, 2005). Χαρακτηριστικά μέλη της τ τάξης αποκρίνονται στις παραπάνω συνθήκες καταπόνησης (Marrs, 1996; Droog, 1997, Edwards et al., 2000, Kilili et al., 2004, Moons, 2005).

Υπάρχουν στοιχεία ότι οι GSTs υπάρχουν σε κάθε στάδιο ανάπτυξης του φυτού από τα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης έως τη γήρανση, και σε κάθε τύπο ιστού που μελετήθηκε (McGonigle et al., 2000, Soranzo et al., 2004, Sali-Gorla et al., 1993). Τα δε επίπεδα έκφρασης τους διαφοροποιούνται ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης των φυτών ή τους διαφορετικούς φυτικούς ιστούς ή όργανα (Αξαρχλή, 2009). Η τάξη ζ των GSTs επάγεται από το αιθυλένιο και το γηρασμό του φυτού (Meyer et al., 1991, Board et al., 1997).

Οι φυτικές GSTs έχουν μελετηθεί εκτενώς λόγω της συμμετοχής τους στην αποτοξίνωση ζιζανιοκτόνων (π.χ. τριαζίνες, θειοκαρβαμίδια, διφαινυλαιθέρες, αρυλοξυφαινοξυπροπιονικά οξέα και χλωροακετανιλίδια) και αρκετές GSTs θεωρούνται υπεύθυνες για την ανθεκτικότητα των αγρωστωδών και των ζιζανίων σε ζιζανιοκτόνα (Chronopoulou & Labrou, 2009). Η πρώτη GST που αναφέρθηκε να εμπλέκεται στο μεταβολισμό της ατραζίνης, απομονώθηκε από τον αραβόσιτο (Lamoureaux et al., 1970).

Οι ειδικές φυτικές τάξεις ϕ και τ , είναι κυρίως υπεύθυνες για την αποτοξίνωση από τα ζιζανιοκτόνα, παρουσιάζοντας εξειδίκευση (Mars, 1996, Edwards & Dixon, 2000b, Chronopoulou & Labrou, 2009), όπως για παράδειγμα οι GSTFs παρουσιάζουν υψηλή δραστηριότητα ως προς τα χλωροακετανιλίδια και τα θειοκαρβαμίδια (Edwards & Dixon, 2000), ενώ οι GSTUs αποτοξινώνουν αποτελεσματικά διφαινυλαιθέρες και αρυλοξυφαινοξυπροπιονικά οξέα (Jepson et al., 1994, Thom et al., 2002, Axarli et al., 2009a). Στα ζιζανιοκτόνα που δημιουργούν εύκολα σύμπλοκα με τη GSH περιλαμβάνονται οι τριαζίνες, τα θειοκαρβαμίδια, τα χλωροακετανιλίδια, οι σουλφονουλourίες και οι διφαινυλαιθέρες (Frona, 2003). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα προστατευτικά ζιζανιοκτόνων, τα οποία είναι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για να προστατεύσουν τα καλλιεργούμενα φυτά από τα ζιζανιοκτόνα, αυξάνουν την έκφραση και τις δραστηριότητες των GSTs (Moons, 2005).

Η λειτουργία των GSTs ως ισομεράσες αποδεικνύεται και με τη χρήση των φυτοφαρμάκων της οικογένειας των θειοδιαζολιδινών. Τα τελευταία ενεργοποιούνται με την ισομερίωση τους σε τριαζολίνες, οι οποίες αποτελούν ισχυρούς παρεμποδιστές της οξειδάσης του πρωτοπορφυρογόνου, η αντίδραση αυτή καταλύεται από GSTs (Jablonkai et al., 1997).

Διαφορετική καταλυτική δραστηριότητα παρουσιάζουν οι GSTs των τάξεων λ και *DHARs*. Μέλη των δύο αυτών τάξεων από το φυτό *Arabidopsis thaliana* δεν καταλύουν αντιδράσεις σύζευξης με τη GSH ούτε παρουσιάζουν GPx δράση αλλά καταλύουν αντιδράσεις τρανσουλφυδρυλίωσης χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα μοντέλο, το 2-2-διθειο-διαιθανόλη (HED) (Dixon et al., 2002a). Επιπλέον οι *DHARs* καταλύουν την αναγωγή του δευδροασκορβικού (DHA) σε ασκορβικό οξύ μέσω της

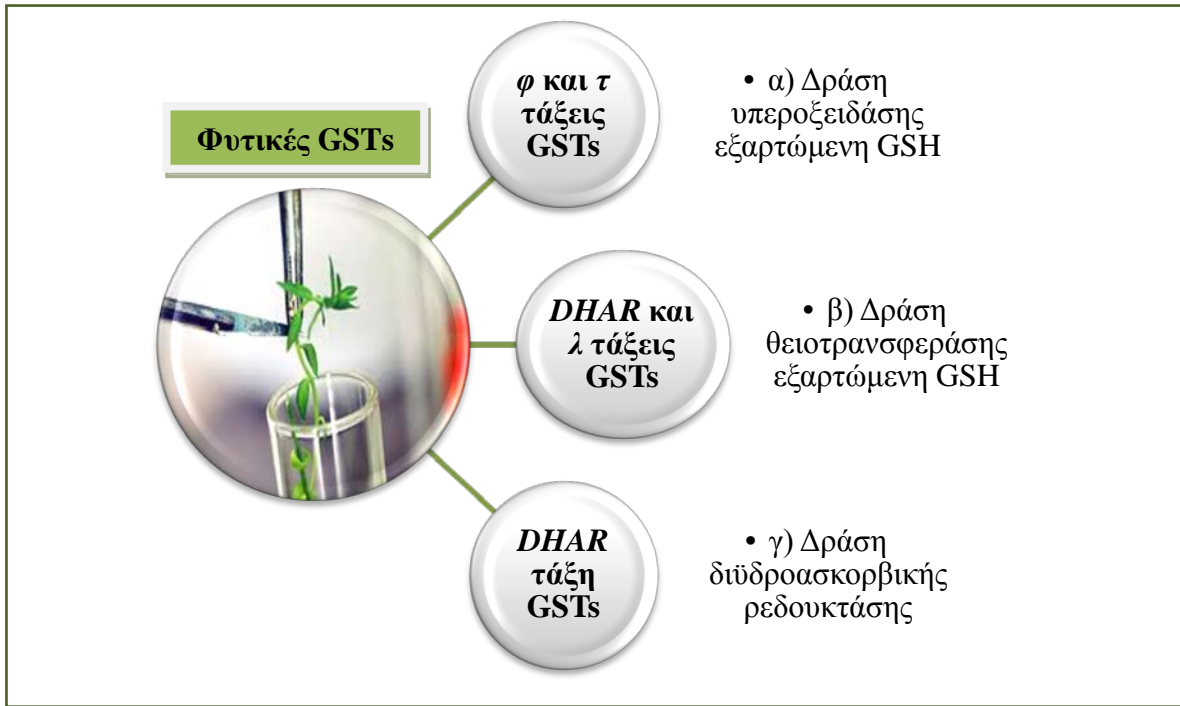
GSH (Frova, 2003). Μέλη της *DHAR* τάξης έχουν βρεθεί στο *Arabidopsis* (Dixon et al., 2002a) στο ρύζι και στο φασόλι (Frova, 2003).

Μία άλλη λειτουργία των φυτικών GSTs όπως αναφέρθηκε είναι η προστασία των φυτικών κυττάρων από ζημιές που επιφέρει η οξειδωτική καταπόνηση. GSTs με δράση υπεροξειδάσης του γλουταθείου (GPx) έχουν βρεθεί σε διάφορα φυτικά είδη και παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναγωγή οργανικών υδροϋπεροξειδίων λιπαρών οξέων που παράγονται κατά την οξειδωτική καταπόνηση (Roxas et al., 1997, Cummins et al., 1999). Οι φυτικές GSTs με δράση GPx συνεισφέρουν στην άμυνα του φυτού (Moons, 2005). Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι πέρα από τη άμεση προστασία της GPx δράσης, η ανθεκτικότητα των φυτών πιθανόν να οφείλεται στην επερχόμενη αύξηση της συγκέντρωσης της οξειδωμένης GSH (GSSG) στα κύτταρα, η οποία λειτουργεί ως σήμα ενεργοποίησης άλλων προστατευτικών μηχανισμών (Filomeni et al., 2003, Circu & Aw, 2008, Schafer & Buettner, 2001).

Οι GSTs μπορούν επίσης να λειτουργήσουν ως μη-καταλυτικές πρωτεΐνες μεταφοράς ή πρόσδεσης ενδογενών ή εξωγενών υποστρωμάτων (Sheehan et al., 2001). Οι φυτικές GSTs που λειτουργούν ως πρωτεΐνες πρόσδεσης ενδεχομένως παίζουν ρόλο στη διευκόλυνση της μεταφοράς δευτερογενών προϊόντων και τοξικών ενδιάμεσων του μεταβολισμού του φυτού (Edwards et al., 2000). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι GSTs του αραβοσίτου και της πετούνιας οι οποίες ευθύνονται για την απόθεση ανθοκυανινών στο χυμοτόπιο. Επίσης φαίνεται να δρουν και ως πρωτεΐνες πρόσδεσης φυτορμονών όπως οι αυξίνες (Zettl et al., 1994) και κυτοκινίνες (Gonneau et al., 1998). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το ένζυμο *AtGSTF2* της ϕ τάξης από *Arabidopsis*, το οποίο εμπλέκεται στην πρόσδεση και μεταφορά της αυξίνης ινδολ-3-οξικό οξύ (IAA), στο συνθετικό αναστολέα μεταφοράς της αυξίνης 1-ναφθοφθαλαμικό οξύ (NPA) (Zettl et al., 1994), της τεχνητής αυξίνης 2-ναφθοξυξικό οξύ (NAA) και των ενδογενών φλαβονοειδών κερκετίνης και καμπφερόλης (Smith et al., 2003).

Ακόμα οι GSTs παίζουν ρόλο στη μεταγωγή σημάτων καταπόνησης για την προστασία του κυττάρου, όπως παρατηρήθηκε για το PcGST1 ένζυμο από μαϊντανό που ανήκει στην τ τάξη. Το ένζυμο αυτό βρέθηκε να συμμετέχει στο μονοπάτι μεταγωγής των UV σημάτων που οδηγεί στη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων

που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των προστατευτικών φλαβονοειδών (Loyall et al., 2000).



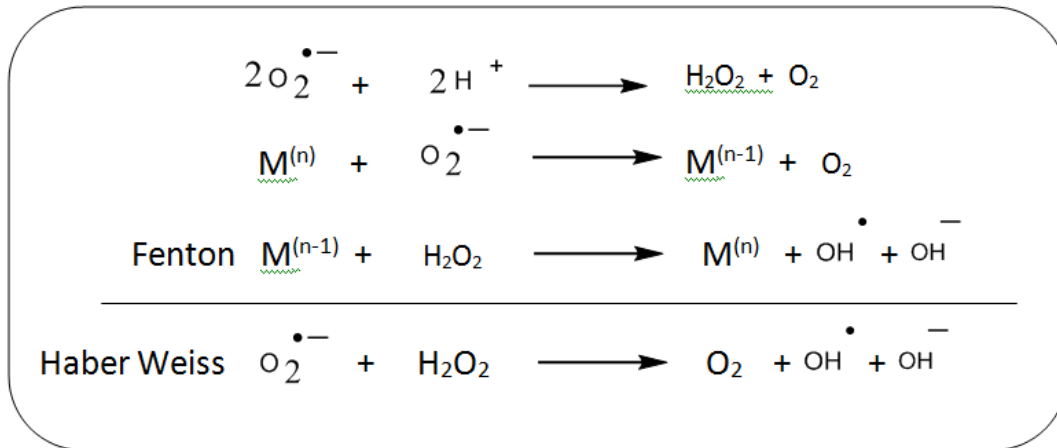
Σχήμα 1.17. Αντιοξειδωτική δράση GSTs: α) δράση υπεροξειδάσης, β) δράση θειοτρανσφεράσης και γ) δράση διϋδροασκορβικής ρεδοκτάσης.

1.13. ΤΑ ΜΕΤΑΛΛΑ ΩΣ ΑΙΤΙΑ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ ΣΤΑ ΦΥΤΑ

Τα μέταλλα κοβάλτιο (Co), χαλκός (Cu), σίδηρος (Fe), μαγγάνιο (Mn), μολυβδαίνιο (Mo), νικέλιο (Ni) και ψευδάργυρος (Zn), είναι απαραίτητα για την ομαλή ανάπτυξη των οργανισμών. Όμως μπορούν να γίνουν τοξικά για τα φυτά σε υψηλές συγκεντρώσεις, γι' αυτό και τα φυτά έχουν αναπτύξει αυστηρή ρύθμιση της απορρόφησης, της μεταφοράς και αποθήκευσης αυτών των μετάλλων. Βέβαια είναι αναπόφευκτη και η απορρόφηση και άλλων μη-απαραίτητων μετάλλων και μεταλλοειδών όπως το αρσενικό (As), το κάδμιο (Cd), το χρώμιο (Cr), ο μόλυβδος (Pb) και ο υδράργυρος (Hg) (Jozefczak et al., 2012).

Οι χημικές ιδιότητες των μετάλλων που τα κάνουν απαραίτητα για τις βιολογικές λειτουργίες, είναι οι ίδιες που μπορούν να είναι η αιτία τοξικότητας, όταν τα μέταλλα απαντούν σε υψηλές συγκεντρώσεις (Jozefczak et al., 2012). Για την αποφυγή συσσώρευσης μετάλλων απαιτείται μεταλλική ομοιόσταση. Με την είσοδο των μετάλλων στο κύτταρο επικρατούν δύο μηχανισμοί: τα ειδικά τσαπερόνια ή μοριακοί συνοδοί που μεταφέρουν τα απαραίτητα μέταλλα απευθείας στο κυτταρικό σημείο δράσης τους (Puig et al., 2007) και οι χηλικοί παράγοντες (GSH και PCs) που εξουδετερώνουν και απομακρύνουν την υπολειπόμενη ποσότητα μετάλλων (Verbruggen et al., 2009). Η τοξικότητα μετάλλων προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης των χηλικών παραγόντων, ώστε να δεσμεύσουν τα μέταλλα και να τα απομακρύνουν (Cobbett, 2000).

Η πρώτη ανταπόκριση των φυτών όταν προκαλείται καταπόνηση από τα μέταλλα, είναι η παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS), όπως το σουπεροξειδίο ($O_2^{\bullet-}$), το υπεροξειδίο (H_2O_2) και η ρίζα του υδροξυλίου (HO^{\bullet}). Οι ελεύθερες ρίζες είναι παραπροϊόντα και της κυτταρικής αναπνοής, συνεπώς είναι αναπόφευκτη η παραγωγή τους ακόμα και σε συνθήκες μη-στρεσογόνες. Η δυνατότητα που έχουν τα ελεύθερα οξειδοαναγωγικά-ενεργά μέταλλα όπως το χρώμιο, ο χαλκός και ο σίδηρος να αλλάζουν τον αριθμό οξείδωσης τους, μπορεί να παράξει άμεσα ROS, μέσω των αντιδράσεων Fenton και Haber Weiss (Σχήμα 1.18). Επίσης τα μέταλλα (όπως το αρσενικό, το κάδμιο, το κοβάλτιο, ο υδράργυρος, το μαγγάνιο, το νικέλιο, ο μόλυβδος, ο ψευδάργυρος) μπορούν να αλλάξουν έμμεσα την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου, στοχεύοντας ενώσεις της αναπνευστικής αλυσίδας ή το αντιοξειδωτικό σύστημα άμυνας. Ακόμα μπορούν να ενεργοποιήσουν προ-οξειδωτικά ένζυμα όπως οι NADPH οξειδάσες και οι λιποξυγενάσες. Οι ROS που προκύπτουν μπορούν να επηρεάσουν τα φυτά μορφολογικά, φυσιολογικά και βιοχημικά (Jozefczak et al., 2012).



Σχήμα 1.18. Αντίδραση Fenton-Haber Weiss. $\text{M}^{(n)}$: οξειδωμένη μορφή μετάλλου, $\text{M}^{(n-1)}$: ανηγμένη μορφή μετάλλου.

Ένα από τα πιο επιβλαβή μέταλλα είναι το κάδμιο το οποίο απελευθερώνεται στο περιβάλλον μέσω της αγροτικής παραγωγής, της βιομηχανίας και των δραστηριοτήτων των πόλεων (Nakamura et al., 2013). Λαμβάνεται εύκολα από τις ρίζες και μεταφέρεται σε άλλους φυτικούς ιστούς και είναι τοξικό για τα κύτταρα ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Clemens et al., 1999). Έχουν γίνει αρκετές μελέτες που αφορούν στο Cd και στη γλουταθειόνη και φαίνεται να επηρεάζεται η φυσιολογία του φυτού π.χ. η εφαρμογή GSH στις ρίζες φυτών καταπονημένων με Cd, είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της συγκέντρωσης του Cd από το κυτταρόπλασμα των κυττάρων της ρίζας και την παρεμπόδιση της μεταφοράς του μετάλλου στο βλαστό του φυτού *Brassica napus* (Nakamura et al., 2013).

1.13.1. ΦΥΤΙΚΕΣ GSTS ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑ

Έχει βρεθεί η GST δραστικότητα σπόρων της *Glycine max* να επηρεάζεται από τη δόση και το χρόνο έκθεσης σε Cd, παρουσιάζοντας αύξηση της δραστικότητας μετά από 72 και 96 ώρες καταπόνησης (Cd 200 mg/Lt) σε σχέση με τις 24 ώρες, αλλά και τις αντίστοιχες ώρες του μάρτυρα. Επίσης παρατηρήθηκε καθυστέρηση της βλάστησης των σπόρων, ιδιαίτερα στις υψηλές συγκεντρώσεις καδμίου (100 mM και 200 mM) (Yang et al., 2012). Ακόμα έχει παρατηρηθεί αύξηση της GST, στο φυτό *Arabidopsis*, στην προσπάθεια να ρυθμίσει την συγκέντρωση του χαλκού ή του

καδμίου (Semane et al., 2010, Skorzynska-Polit et al., 2010). Περισσότερα αναφέρονται στο Κεφάλαιο 5.

1.14. ΦΥΤΙΚΕΣ GSTs ΚΑΙ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

Ο ρόλος των φυτικών GSTs στην αποτοξίνωση ζιζανιοκτόνων είναι γνωστός, ενώ δεν υπάρχουν πολλές αναφορές σχετικά με τα εντομοκτόνα και τα μυκητοκτόνα. Σε αυτές τις περιπτώσεις οι μελέτες αφορούν στα έντομα και στους μύκητες περισσότερο παρά για το ίδιο το φυτό. Για παράδειγμα υπάρχουν αρκετές μελέτες όπου φαίνεται ότι οι GSTs εμπλέκονται με σημαντικούς ρόλους στην ανθεκτικότητα των εντόμων ως προς τα εντομοκτόνα, μεταβολίζοντας αρκετές τέτοιες ομάδες φυτοπροστατευτικών προϊόντων, όπως τα οργανοφωσφορικά, τα οργανοχλωριωμένα και τα καρβαμιδικά (Huang et al., 2012).

Αρκετές ομάδες ζιζανιοκτόνων δεσμεύονται με τη γλουταθειόνη είτε μέσω της υποκατάστασης, είτε πιο σπάνια μέσω της προσθήκης. Γενικότερα θα μπορούσαν οι αντιδράσεις αποτοξίνωσης να διαχωριστούν σε αντιδράσεις υποκατάστασης είτε με την εκτόπιση του αλογόνου από τα αλκυλαλογονίδια (π.χ. atrazine, alachlor) είτε σε αντιδράσεις διάσπασης (π.χ. fluorodifen, fenoxaprop ethyl), σε αντιδράσεις προσθήκης όπως οι αντιδράσεις με τα εποξειδία (π.χ. tridiphane) και σε αντιδράσεις ισομερίωσης (π.χ. fluthiacet methyl) (Cummins et al., 2011).

1.14.1. ΟΡΓΑΝΟΧΛΩΡΙΩΜΕΝΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ

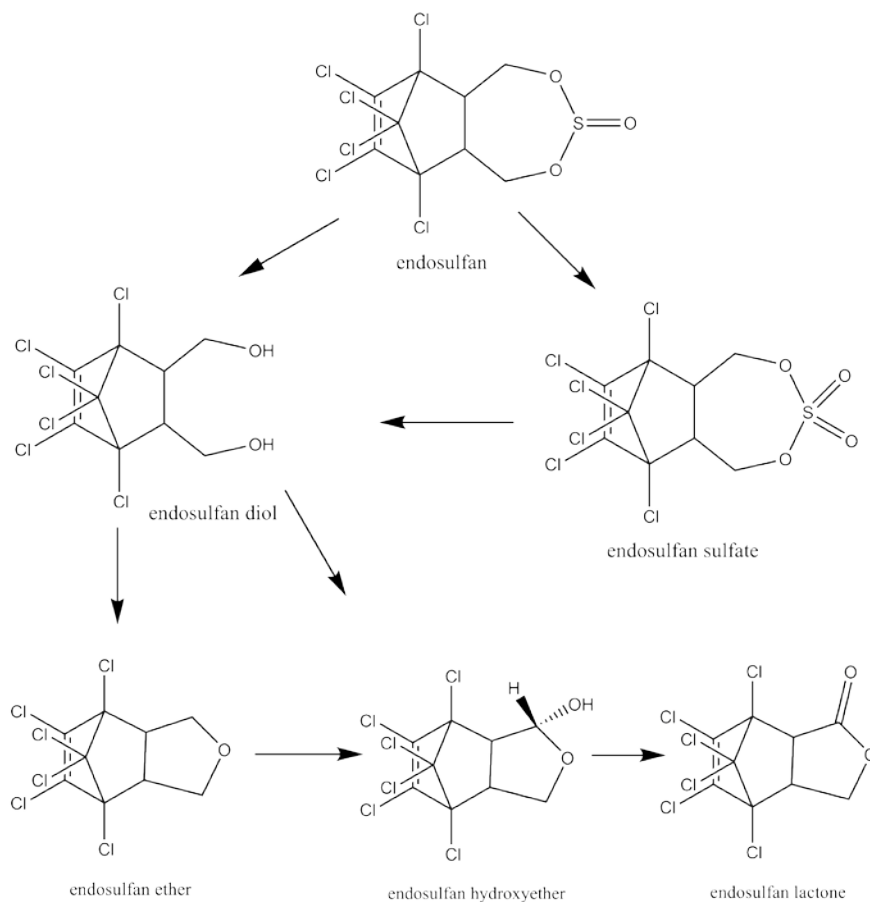
Τα οργανοχλωριωμένα φυτοπροστατευτικά προϊόντα είναι μία από τις μεγαλύτερες ομάδες χημικών, που είναι υπεύθυνη για την περιβαλλοντική ρύπανση (Shivaramaiah & Kennedy, 2006). Τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα κατατάσσονται σε τρεις ομάδες: στην ομάδα DDT, στην ομάδα HCH (γ-εξαχλώρο κυκλοεξάνιο) και στην ομάδα των χλωριωμένων κυκλοδιενίων. Χαρακτηριστικό όλων των ομάδων, είναι η παρουσία χλωριωμένων ανθρακικών δακτυλίων και δεσμών C-C, C-H και C-Cl, γεγονός που καθιστά αυτές τις ενώσεις σταθερές στο περιβάλλον (Κλώνης, 2007). Παρακάτω αναφέρονται κάποια στοιχεία για το εντομοκτόνο endosulfan και τα ισομερή του από τα οποία προκύπτει, καθώς με την αναλυτική μέθοδο που

αναπτύχθηκε (Κεφάλαιο 5) προσδιορίζεται η συγκέντρωση του μέσω της αναστολής της GST δραστηριότητας.

Endosulfan

Το endosulfan, ανήκει στην υποομάδα των χλωριωμένων κυκλοδιενίων και διαθέτει ένα διπλό δεσμό. Αποτελεί μίγμα των δύο ισομερών, α -endosulfan και β -endosulfan και χρησιμοποιείται για τον πληθυσμιακό έλεγχο μασητικών και μυζητικών εντόμων. Χρησιμοποιείται σε καλλιέργειες βάμβακος, λαχανικών, φρούτων, καφέ και δημητριακών. Το endosulfan έχει ανιχνευτεί στο έδαφος, στο επιφανειακό νερό, στα τρόφιμα, στην ατμόσφαιρα και σε ιζήματα (Shivaramaiah & Kennedy, 2006). Έχει αναφερθεί ότι το ξέπλυμα αγροτεμαχίων όπου έχει χρησιμοποιηθεί το endosulfan, μπορεί να περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις από 1 μέχρι και 100 $\mu\text{g/L}$, με μέσο όρο συγκέντρωσης 13,4 $\mu\text{g/L}$ (Mersie et al., 2003). Η μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση γλυκών υδάτων για το endosulfan είναι 0,02 $\mu\text{g/L}$ (Menone et al., 2008).

Η αποδόμηση του endosulfan επηρεάζεται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και μπορεί να γίνει βιοαποδόμηση του από καλλιέργειες βακτηρίων και μυκήτων (Martens, 1977, Shivaramaiah & Kennedy, 2006). Στο Σχήμα 1.19. φαίνεται το μονοπάτι αποδόμησης του endosulfan όπως έχει προταθεί (Miles & May, 1979, Kullman & Matsumura, 1996).



Σχήμα 1.19. Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού αποδόμησης του endosulfan.

Παρότι έχει μελετηθεί η τοξικότητα του για τα ζώα υπάρχουν πολύ λίγες μελέτες για τα φυτά (Menone et al., 2008). Μία από αυτές είναι η μελέτη που αφορά στο υδρόβιο μακρόφυτο *Myriophyllum quitense*, όπου και βρέθηκε να επάγεται η δραστικότητα GST σε συγκέντρωση endosulfan 5 µg/L και να παρουσιάζει τάση αύξησης σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, ενώ στα 0,5 µg/L παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση (~2,5 φορές μεγαλύτερη από το μάρτυρα) (Menone et al., 2008).

Το endosulfan λόγω της υψηλής τοξικότητας του και της επίμονης οργανικής ρύπανσης, όπως προέκυψε στο Συνέδριο UNEP στη Στοκχόλμη, ψηφίστηκε να αποσυρθεί από την παγκόσμια αγορά το 2012 (Chakrabarty et al., 2012).

1.15. GSTs ΚΑΙ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΑ

Η έκφραση των GSTs φαίνεται να ενεργοποιείται πέρα από την εφαρμογή ζιζανιοκτόνων (Edwards & Dixon, 2000) και με τη ψύξη (Lo Piero et al., 2005), την ξηρασία (Bianchi et al., 2002), τα τραύματα (Vollenweider et al., 2000) και την υποξία (Moons, 2003). Επίσης τα GST γονίδια ανταποκρίνονται διαφορετικά σε πλήθος ουσιών με πιθανή λειτουργία σήμανσης συμπεριλαμβανομένων αρκετών ρυθμιστών της ανάπτυξης του φυτού όπως το σαλικυλικό οξύ (Chen et al., 1996), το αιθυλένιο (Zhou & Goldsbrough, 1993) και η αυξίνη (Marrs, 1996). Ενώ φαίνεται να επάγεται η έκφραση τους και με την φυτοπαθογένεια (Mauch & Dudler, 1993).

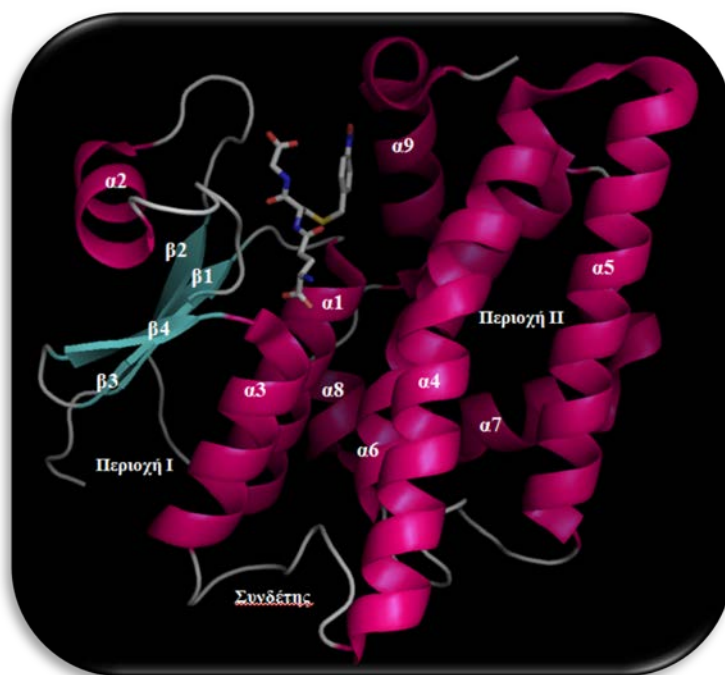
Η άμυνα του φυτού κατά των παθογόνων ξεκινά καθώς οι μικροοργανισμοί παράγουν σήματα τα οποία μπορούν αν ληφθούν από τα φυτά. Η αρχική αναγνώριση προκύπτει μέσω μορίων σχετιζόμενων με τα παθογόνα, τα οποία απαντούν στα παθογόνα όχι όμως στα φυτά (Mukherjee et al., 2010). Αν και δεν υπάρχουν πολλές μελέτες που αφορούν στη συσχέτιση των φυτοπαθογόνων με τις GSTs, έχει παρατηρηθεί αύξηση διαφορετικών πρωτεϊνών GST σε ανταπόκριση βακτηριακής (Jones et al., 2004) ή μυκητολογικής μόλυνσης (Mukherjee et al., 2010).

Κατά τη διάρκεια της μόλυνσης από μύκητες, τα φυτικά κύτταρα ανταποκρίνονται εκφράζοντας γονίδια ανταπόκρισης στην παθογένεια, τα οποία μπορεί να προκαλούν την παραγωγή διαφόρων τοξικών φυτικών προϊόντων, όπως οι φυτοαλεξίνες (Marrs, 1996). Επίσης ο μύκητας που εισβάλλει στο φυτό μπορεί να παράγει χημικές ουσίες οι οποίες να προκαλούν στρες στο φυτό, όπως οι φυτοτοξίνες. Ένα από τα μέτρα ανταπόκρισης του φυτού στην εισβολή παθογόνων, είναι η αύξηση της έκφρασης των γονιδίων GST (Mauch & Dudler, 1993, Wagner et al., 2002, Dean et al., 2005).

1.16. ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ GSTs

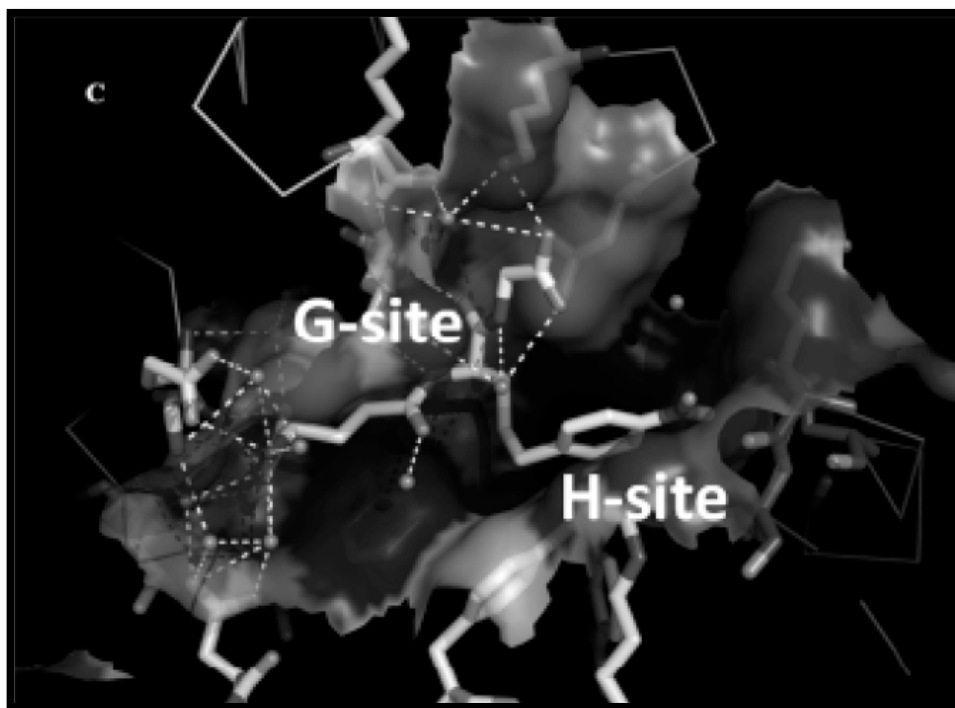
Οι φυτικές κυτταροπλασματικές GSTs, όπως περιγράφηκε και στην παράγραφο 1.7, αποτελούνται από δύο όμοιες υπομονάδες με μια μεγάλη κοιλότητα μεταξύ τους όπου τοποθετούνται τα ενεργά κέντρα των δύο υπομονάδων. Η κάθε υπομονάδα αποτελείται από δύο περιοχές τη Ν-τελική περιοχή και τη C-τελική περιοχή. Η αλληλουχία της Ν-τελικής περιοχής (I) κωδικοποιεί για τα δομικά στοιχεία

$\beta_1\alpha_1\beta_2(\alpha_2)\beta_3\beta_4\alpha_3$, έτσι αποτελείται από 4 β-ελάσματα με δύο πλευρικές έλικες (α_1 , α_3) και μια συντηρημένη ακανόνιστη θηλειά/έλικα (α_2). Ένας συνδέτης ενώνει την περιοχή I με την περιοχή II, η οποία αποτελείται εξ'ολοκλήρου από α- έλικες. Το ενεργό κέντρο κάθε υπομονάδας σχηματίζεται μεταξύ των δύο περιοχών με την G-θέση να βρίσκεται στην περιοχή I και την H-θέση στην περιοχή II. Οι μεγαλύτερες διαφορές που παρατηρούνται στην τριτοταγή δομή των φυτικών GSTs, είναι η α_2 /θηλειά, ο συνδέτης των περιοχών I και II, το πλάγιασμα των α_4 και α_6 ελίκων και το μήκος της α_9 έλικας (Cummins et al., 2011).



Σχήμα 1.20. Τριτοταγής δομή της φυτικής GST από *G.max* (GmGSTU4-4) με κωδικό PDB: 2VO4.

Η περιοχή δέσμευσης της γλουταθειόνης είναι ιδιαίτερα ειδική και συντηρημένη ενώ δεν συμβαίνει το ίδιο στην H-θέση, γι' αυτό είναι εφικτή η δέσμευση πολλών διαφορετικών υδροφοβικών ενώσεων. Υπάρχουν 4 αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία είναι συντηρημένα στις τάξεις φ και τ , και τα οποία καθορίζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της G-θέσης και της προσδεμένης GSH (Πίνακας 1.3).



Σχήμα 1.21. Η G- και H-θέση του ενζύμου *GmGSTU4-4*. Τα μόρια νερού απεικονίζονται με σφαίρες και ο αναστολέας S-(p-νιτροβενζυλο)-γλουταθειόνη (Nb-GSH) με ράβδους. Η εικόνα είναι από Chronopoulou et al., 2011).

Πίνακας 1.3. Συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα των τάξεων φ και τ , υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση της GSH με τη G-θέση.

Αμινοξέα	Θέση	Δράση
Glu/Asp	65–72	Αλληλεπιδρούν με το γλουταμινικό της GSH
Ser	66–73	Αλληλεπιδρούν με το γλουταμινικό της GSH
Val/Ile	53–60	Αλληλεπιδρούν με την κυστεΐνη της GSH
Lys/Gln	40–46	Αλληλεπιδρούν με τη γλυκίνη της GSH

Επίσης στις φυτικές GSTs, το υπεύθυνο αμινοξικό κατάλοιπο για τη σταθεροποίηση του σουλφυδρυλικού ανιόντος της GSH (και μείωση pK_a της θειολ-ομάδας), είναι η σερίνη (θέσεις 10-17) (Cummins et al., 2011).

1.17. ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ GSTS

1.17.1. ΓΕΩΠΟΝΙΑ

Ανάπτυξη νέων φυτοπροστατευτικών προϊόντων

Γνωρίζοντας τη σημασία των GSTs σχετικά με την εκλεκτικότητα σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα (όπως φαίνεται και στα επόμενα κεφάλαια) και με γνώμονα την προστασία του περιβάλλοντος και της δημόσιας υγείας, μελέτες δομικής ανάλυσης μπορούν να βοηθήσουν στην ανάπτυξη νέων φυτοπροστατευτικών προϊόντων, τα οποία να αποτοξινώνονται εύκολα από τις φυτικές GSTs.

Δομικές μελέτες έχουν δείξει ότι η διαφοροποίηση υποστρώματος όπως GSH ή S-πνιτροφανυλ-GSH ακολουθείται και από διαφοροποίηση στην κρυσταλλική δομή και στον προσανατολισμό υποστρώματος. Για παράδειγμα, στην κρυσταλλική δομή της GST της *G.max* GmGSTU4-4 (Axarli et al., 2009a, b) βρέθηκε ότι η GSH παρουσιάζει μεγαλύτερη ευελιξία στη δέσμευση απ' ό,τι το σύμπλοκο S-πνιτροφαινυλ-γλουταθειόνη-GST. Συγκρίνοντας επίσης τις δύο δομές παρατηρήθηκε μετακίνηση της C-τελικής περιοχής και των ελίκων α_4 και α_5 , που συνάγει επαγωγική προσαρμογή για τις GSTUs, όπως έχει προσδιοριστεί και για τις GSTFs (Cummins et al., 2011).

Ακόμα διαφορές στα ενεργά κέντρα των GSTs ζιζανίων και αγρωστωδών μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη ενώσεων οι οποίες να λειτουργούν ανασταλτικά για το ένζυμο με εξειδίκευση. Παράδειγμα αποτελεί η ένωση tridiphane, η οποία λειτουργεί ως επιλεκτικός συναγωνιστής του ζιζανιοκτόνου ατραζίνη (atrazine) παρεμποδίζοντας την ανθεκτικότητα των ζιζανίων (βασισμένη στο ένζυμο GST) (Cummins et al., 2011).

1.17.2. ΙΑΤΡΙΚΗ

GSTs και καρκίνος

Οι περισσότερες καρκινογόνες ουσίες είναι ηλεκτρονιόφιλες, αντιδρούν με τις αζωτούχες βάσεις και το σκελετό (δεοξυριβόζη) του DNA, και τις περισσότερες φορές ενεργοποιούνται από τον μεταβολισμό του οργανισμού. Πολλές φορές, η επίθεση αυτών των ενεργοποιημένων καρκινογόνων στο DNA, μπορεί να ανασταλεί κατόπιν αντίδρασης (χημική ‘γεφύρωση’) με την ενδογενή GSH. Οι αντιδράσεις αυτές καταλύονται από τις GSTs, αλλά δεν αποκλείεται να γίνονται αυθόρμητα (Josephy & Mannervic, 2006). Διάφορες GSTs, καταλύουν τη δέσμευση καρκινογόνων, συμπεριλαμβανομένων και μελών των τάξεων α (Alpha), μ (Mu) και π (Pi) (Sundberg et al, 1997, Sundberg et al, 1998).

Ο μετασχηματισμός των κυττάρων από την κανονική τους μορφή σε κακοήθη κατάσταση, συνοδεύεται από αυξημένες συγκεντρώσεις GSH και μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης των GSTs (Mannervic et al, 1987). Σε πολλούς όγκους έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου GSTP1-1, σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς γύρω από την περιοχή εμφάνισης του όγκου (Lewis et al, 1989, Kelley et al, 1994). Σε ασθενείς με γλοιόμα (Ali-Osman et al, 1998) και καρκίνο του στομάχου (Fan, 1995), έχει παρατηρηθεί αύξηση του επιπέδου της GSTP1-1 με την εξέλιξη του όγκου. Άλλες πάλι GSTs, μπορεί να παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης. Η έκφραση του ενζύμου GSTP1-1 στα επιθηλιακά κύτταρα του ανθρώπινου μαστού, μειώνεται προοδευτικά όσο το φυσιολογικό επιθήλιο αποδιαφοροποιείται σε προνεοπλασματικές και νεοπλασματικές αλλοιώσεις. Τέτοιου είδους ρύθμιση της GSTP1-1, διακρίνεται κυρίως στον καρκίνο του προστάτη (Josephy & Mannervic, 2006).

Σύμφωνα με τα ανωτέρω, οι GSTs παίζουν ιδιαίτερος σημαντικό ρόλο στην προστασία του κυττάρου, όμως ο ρόλος αυτός είναι διαφορούμενος. Οι GSTs αφενός προστατεύουν τα κύτταρα από εξωγενείς και ενδογενείς καρκινογόνες ουσίες οι οποίες, κατόπιν χημικής δέσμευσής τους με τη γλουταθειόνη, αποβάλλονται από το κύτταρο και τον οργανισμό, αφετέρου αναγνωρίζουν χημειοθεραπευτικές ενώσεις ως ξενοβιοτικές και αναστέλλουν τη δράση τους.

Πολυμορφισμός των GSTs και συσχέτιση με τον καρκίνο και τη θεραπεία του

Οι περισσότεροι πολυμορφισμοί των γονιδίων των GSTs του ανθρώπου, οφείλονται κυρίως σε διαφορές σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) και πιο σπάνια σε μεταλλάξεις εξαλείψεως (Hui-Wen & Ali-Osman, 2007). Τα τελευταία χρόνια γίνονται όλο και περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες, στις οποίες λαμβάνεται υπόψη το γενετικό προφίλ των μαρτύρων και των ασθενών και μελετάται η συσχέτιση των γενετικών πολυμορφισμών των GSTs και συγκεκριμένων ασθενειών, όπως ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστεως (Conolo et al, 2008). Σε πρόσφατες μελέτες έχει χρησιμοποιηθεί η υψηλής ανάλυσης PCR για τον χαρακτηρισμό του γενετικού προφίλ. Συγκεκριμένα, αυτές οι αναλύσεις επιτρέπουν το γρήγορο και ακριβή χαρακτηρισμό των κληρονομούμενων αλληλομόρφων των πολυμορφικών GST γονιδίων GSTM1, GSTM3, GSTP1 και GSTT1 (Nunes, 2006, Keller, 2006, Yoshiga, 2005, Keller, 2002, Nishimura, 2002).

Επίσης έχει βρεθεί ότι οι πολυμορφισμοί των GST γονιδίων του ανθρώπου εμπλέκονται και στην ανταπόκριση που έχουν οι πάσχοντες στην χημειοθεραπεία (Oldenburg, 2007, Sweeney, 2003, Stoehlmacher, 2002). Η σχέση αυτή μεταξύ πολυμορφισμών και χημειοθεραπείας αποτελεί σημαντικό πεδίο έρευνας δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στις τάξεις α (alpha), μ (mu), π (pi) και θ (theta) (Hui-Wen & Ali-Osman, 2007). Οι υπότυποι και οι διάφορες μορφές των GSTs μπορούν λοιπόν να αποτελέσουν στο μέλλον επιπρόσθετους παράγοντες, οι οποίοι θα λαμβάνονται υπόψη για την καλύτερη εξατομικευμένη θεραπεία (Oldenburg, 2007, Sweeney, 2003).

Η φαρμακογονιδιοματική λοιπόν βασίζεται στους SNPs (Sun et al, 2010). Πιθανολογείται ότι οι SNPs στα γονίδια των ενζύμων τα οποία είναι υπεύθυνα για τον μεταβολισμό των φαρμάκων και στα γονίδια των μεταφορέων των φαρμάκων, μπορεί να μεταβάλλουν την έκφρασή τους ή τη δραστηρότητά τους, να επηρεάσουν τη διάθεση τους στον οργανισμό και τέλος να επηρεάσουν τα αποτελέσματα της χημειοθεραπείας (Bernig & Chanock, 2006). Για παράδειγμα το αλλοένζυμο GSTP1 105Val έχει βρεθεί να σχετίζεται με μεγαλύτερη επιβίωση ασθενών ορθοκολικού καρκίνου προχωρημένης κατάστασης, οι οποίοι λαμβάνουν συνδυασμένη χημειοθεραπεία (Stoehlmacher et al, 2002).

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος του πνεύμονα θεωρείται ο πιο κοινός θανατηφόρος καρκίνος σε πολλές χώρες, με περισσότερο από ένα εκατομμύριο ανθρώπους να πεθαίνουν κάθε χρόνο (Guilbert, 2003). Περίπου το 80% των ασθενών διαγιγνώσκονται με τον τύπο μη-μικρό καρκίνο του πνεύμονα κυττάρων (NSCLC) (Spiro & Silvestri, 2005). Το cisplatin θεωρείται βασικό θεραπευτικό σκεύασμα στην συνδυασμένη χημειοθεραπεία αυτής της μορφής καρκίνου, έτσι η χημειοαντίσταση των καρκινικών κυττάρων σε αυτό το σκεύασμα αποτελεί δυσμενή εξέλιξη (Sun et al, 2010). Ένας από τους λόγους αυτής της χημειοαντίστασης καρκινικών κυττάρων, οφείλεται στην αντίδραση του cisplatin με τη GSH (Rabik & Dolan, 2007). Οι παρατηρήσεις του Sun και των συνεργατών του, προτείνουν ότι η πολυμορφική κατάσταση της GSTP1-1 μπορεί να προβλέψει την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία, ασθενών που βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο NSCLC.

Ακόμα πολυμορφισμοί της GSTM1 σχετίζονται με το αποτέλεσμα της χημειοθεραπείας, όπως σε περιπτώσεις παιδικής οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (Hall et al, 1994) και καρκίνου των ωοθηκών (Howells et al, 2001). Ακόμα ο αλληλόμορφος GSTT1*0 θεωρείται ο πιο σημαντικός προγνωστικός δείκτης ανταπόκρισης στη θεραπεία και κινδύνου εμφάνισης καρκίνου. Για παράδειγμα, άτομα με τον γονότυπο GSTT1*0 θεωρούνται άτομα με υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστης, μηνιγγιώματος, οξείας μυελοειδούς λευχαιμίας και καρκινώματος των πλακωδών κυττάρων (Salagovic et al, 1999). Συνεπώς αν καθοριστούν συγκεκριμένοι συσχετισμοί μεταξύ των γονιδιωματικών πολυμορφισμών και καθορισμένων κλινικών τελικών σημείων (π.χ. επιβίωση, ανταπόκριση, τοξικότητα) μπορεί να αυξηθούν οι πιθανότητες μιας επιτυχούς θεραπείας (Stoehlmacher et al, 2004).

GSTs ως μοριακοί στόχοι σχεδιασμού νέων φαρμάκων

Όπως αναφέρθηκε, οι GSTs υπερεκφράζονται στους νεοπλασματικούς ιστούς, με την GSTP1-1 κυρίως να υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα, τα οποία εμφανίζουν χημειοανθεκτικότητα. Συνεπώς η GSTP1-1 αποτελεί σημαντικό μοριακό στόχο, για το σχεδιασμό νέων φαρμάκων και προ-φαρμάκων που ενεργοποιούνται στοχευμένα στις θέσεις που υπερεκφράζονται (π.χ. καρκινικά κύτταρα).

Μία επιπλέον δράση των GSTs, που τα τελευταία χρόνια μελετάται εκτενώς και συνδέεται με το ενδιαφέρον σχεδιασμού νέων αναστολέων για το ένζυμο, σχετίζεται με το ρυθμιστικό ρόλο που παίζουν σε μηχανισμούς μεταγωγής σήματος μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-πρωτεϊνών με την κινάση Jun (JunK) ή την αποπτωτική κινάση ASK1 (Wang et al., 2001; Cho et al., 2001; Adler, et al., 2002; Villafania et al., 2000). Ο καλύτερα μελετημένος μηχανισμός συνδέεται με την αλληλεπίδραση του ισοενζύμου GSTP1-1 με την JunK. Η αλληλεπίδραση αυτή με το N-τελικό άκρο της JunK ρυθμίζει την έκφραση της τελευταίας και αναστέλλει τον μονοπάτι cJun/MAPK και τροποποιεί το αποπτωτικό αποτέλεσμα.

Η αζαθειοπρίνη αποτελεί προφάρμακο το οποίο λειτουργεί ανοσοκατασταλτικά. Η βιομετατροπή του στην ενεργό μορφή 6-μερκαπτοπουρίνη, θεωρείται για χρόνια μη ενζυμική αντίδραση με γλουταθειόνη. Όμως σε πρόσφατη μελέτη, διαπιστώθηκε ότι αρκετές GSTs ανθρώπου καταλύουν αυτή την αντίδραση. Συγκεκριμένα, από τις 14 hGSTs που μελετήθηκαν, οι GSTA2-2, GSTA1-1 καθώς και η GSTM1-1 παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ειδική δραστηριότητα με την αζαθειοπρίνη (Eklund et al, 2006).

Οι GSTs παρουσιάζουν και δραστηριότητα σουλφοναμιδάσης, καταλύοντας την υδρόλυση του σουλφοναμιδικού δεσμού (Zhao et al, 1999; Koeplinger et al, 1999). Λόγου χάριν, οι Axarli και συνεργάτες (Axarli et al, 2009c) ανέφεραν το σχεδιασμό και την σύνθεση καινοτόμων χημικών παραγώγων σουλφοναμιδής ικανών να ενεργοποιούνται από το ένζυμο GSTA1-1 (hGSTA1-1). Τα παράγωγα αυτά αποτελούνται από μια πεπτιδική ομάδα (ανάλογη του πεπτιδίου της βομβεσίνης), η οποία λειτουργεί ως μοριακό οδηγό αναγνώρισης καρκινικών κυττάρων. Το πεπτίδιο της βομβεσίνης αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα βομβεσίνης των καρκινικών κυττάρων. Μετά από τη ρήξη του σουλφοναμιδικού δεσμού, με την μεσολάβηση της hGSTA1-1, ελευθερώνεται η δομή S-αλκυλ-GSH η οποία αποτελεί ισχυρό αναστολέα των GSTs.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αντικαρκινικού προφαρμάκου αποτελεί το PABA/NO το οποίο ανήκει στην οικογένεια των O²-aryl-diazoniumdiolates (O²Ads) (Saavedra et al., 2001). Ο μεταβολισμός του PABA/NO από το ένζυμο GSTP1-1, απελευθερώνει NO (Findlay et al., 2004) το οποίο συνεισφέρει στη χημειοθεραπεία αναστέλλοντας τη σύνθεση του DNA, παράγοντας τοξικούς μεταβολίτες και παρεμποδίζοντας τη

δράση ενζύμων τα οποία προλαμβάνουν ή επιδιορθώνουν την κυτταρική βλάβη (Findlay et al., 2004, Saavedra et al., 2006).

Επίσης ο σχεδιασμός νέων πεπτιδικών αναλόγων της γλουταθειόνης (GSH), αποτελεί σημαντική στρατηγική ανάπτυξης νέων αναστολέων για τις GSTs και έχει αποδώσει αξιοσημείωτα αποτελέσματα τα τελευταία χρόνια (Bladeren & Ommen., 1991, Mahajan & Atkins, 2005). Η εισαγωγή ομάδων ή μορίων στον πεπτιδικό σκελετό, συνιστά μία ιδιαίτερος αποτελεσματική μέθοδο συνθέσεως μη φυσικών πεπτιδίων. Τα χαρακτηριστικά της διαμορφώσεως ενός πεπτιδίου μπορούν να τροποποιηθούν με χημικές προσεγγίσεις, προς όφελος των βιο(φαρμακο)λογικών χαρακτηριστικών του, κατόπιν αντικατάστασης ενός φυσικού αμινοξέος από ένα μη φυσικό (συνθετικό) ανάλογο σε συγκεκριμένη θέση της πεπτιδικής αλληλουχίας. Τα αντιστοίχως προκύπτοντα μη φυσικά πεπτίδια ονομάζονται πεπτιδικά ανάλογα, ή μιμητές πεπτιδίων ή υβριδικά πεπτίδια. Το πεδίο των συνθετικών πεπτιδικών αναλόγων, παρουσιάζει έντονη δραστηριότητα τα τελευταία χρόνια, συνεπικουρούμενο με την ανάπτυξη μεθόδων συνθέσεως μη φυσικών αμινοξέων, ως συστατικών μοριακών σχηματισμών με θεραπευτική δράση (Meschenmoser et al., 2013, Renfrew et al., 2012).

1.17.3. ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Αποκατάσταση επιβαρυνμένου από ρύπους περιβάλλον

Η συμβολή των ενζύμων στην αποκατάσταση του περιβάλλοντος είναι πλέον γνωστή. Ενδεικτικά αναφέρεται η περίπτωση των φαρμακευτικών αποβλήτων παρακεταμόλης, όπου μετά τη δράση του κυτοχρώματος P450, η παρακεταμόλη οξειδώνεται και στη συνέχεια μπορεί να δεσμευτεί στη γλουταθειόνη μέσω της δράσης της GST (Huber et al., 2009). Ακόμα έχει βρεθεί η ακινητοποίηση κυττάρων από μικροοργανισμούς που εκφράζουν GSTs, να βιοαποικοδομούν φαρμακευτικά απόβλητα όπως η τετρακυκλίνη (Park, 2012).

Βιοαισθητήρες

Οι βιοαισθητήρες αποτελούν αναλυτικά εργαλεία ανίχνευσης και προσδιορισμού βιομορίων. Βρίσκουν εφαρμογή στον περιβαλλοντικό έλεγχο, στη βιομηχανία τροφίμων και στις κλινικές αναλύσεις (Sassolas et al., 2012). Μπορούν να θεωρηθούν συμπληρωματικά εργαλεία των κλασικών αναλυτικών μεθόδων, με μοναδικά χαρακτηριστικά, όπως το χαμηλό κόστος, τα άμεσα αποτελέσματα και τη συνεχή χρήση (Kandimalla et al., 2006, Sassolas et al., 2012). Οι βιοαισθητήρες είναι ένα από τα πιο υποσχόμενα πεδία, κάνοντας χρήση τεχνολογιών μικρο- και νανο-κλίμακας (Senveli & Tigli, 2013).

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για το ερευνητικό πεδίο των βιοαισθητήρων και των ενζυμικών-βιοαναλύσεων κι αυτό γιατί έχει αυξηθεί σημαντικά η ανάγκη για οικονομική, γρήγορη κι εύκολη ανάλυση δείγματος (Fragoulaki et al, 2007, Morou et al, 2008, Dowd et al, 2009). Οι βιοαισθητήρες δίνουν γρήγορες ποσοτικές και ποιοτικές πληροφορίες, με την ελάχιστη προετοιμασία δείγματος. Επίσης παρέχουν στοιχεία υψηλής ακρίβειας και εκλεκτικότητας, σε σχέση με την κλασική χημεία. Ακόμα είναι ασφαλείς για το περιβάλλον και το χρήστη (Karoli et al, 2008) και επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών δειγμάτων (Choi et al, 2003).

Ο βιοαισθητήρας αποτελείται από δύο κυρίως τμήματα (Σχήμα1.19): τον βιο-υποδοχέα (ένζυμο, αντισώματα, DNA) που αναγνωρίζει την ουσία προς ανάλυση, όπου τις περισσότερες φορές είναι ένζυμο και τον μεταγωγέα που μετατρέπει το βιοχημικό σήμα της αλληλεπίδρασης του βιο-υποδοχέα και της ουσίας προς ανάλυση, σε ηλεκτρονικό (Kandimalla et al., 2006, Sassolas et al., 2012). Οι βιοαισθητήρες μπορούν να βασίζονται και σε μηχανικό, μαγνητικό ή οπτικό σήμα. Βέβαια υπάρχουν και οι βιοαισθητήρες που δίνουν περισσότερα από ένα σήμα, είναι οι λεγόμενοι ελεύθεροι σήματος (label-free) και μαζί με τη νανοτεχνολογία αποτελούν νέες προκλήσεις στο πεδίο αυτό (Senveli & Tigli, 2013).

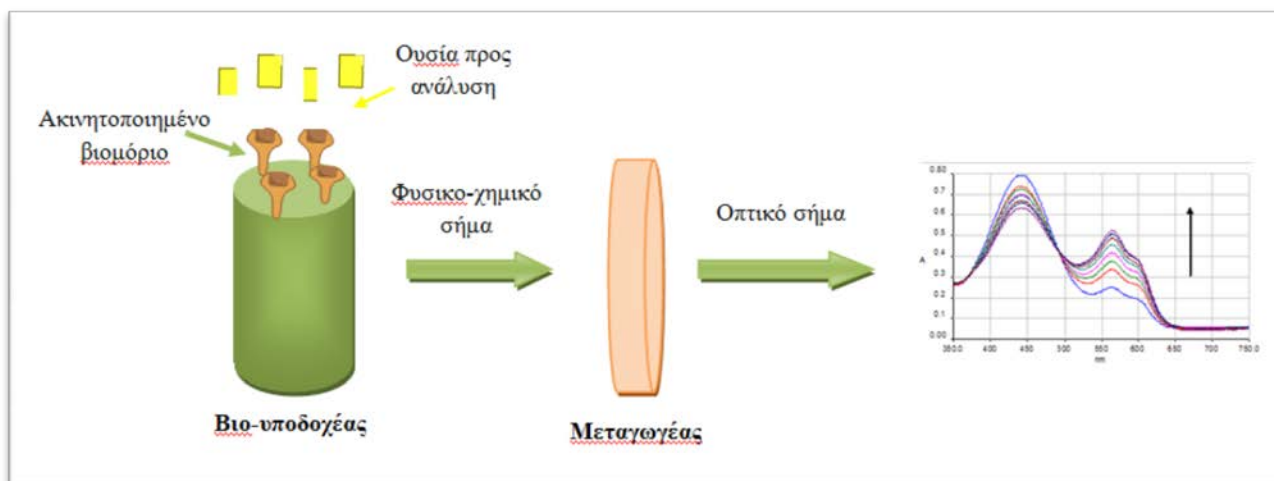
Οι βιοαισθητήρες όπως αναφέρθηκε παραπάνω είναι αναλυτικές συσκευές οι οποίες διαθέτουν βιολογικό μηχανισμό αναγνώρισης (κυρίως ένζυμο) και μεταδίδουν σήμα συνήθως ηλεκτρικό (Phadke, 1992, Sassolas et al., 2012). Ο πρώτος βιοαισθητήρας αναπτύχθηκε από τους Clark και Lyons το 1962, για τον προσδιορισμό γλυκόζης, με την ακινητοποίηση της οξειδάσης της γλυκόζης (GOD). Από τότε έχουν αναπτυχθεί

πολλοί ενζυμικοί βιοαισθητήρες για τον προσδιορισμό γλυκόζης, χοληστερόλης ή γαλακτικού οξέος σε βιολογικά δείγματα, για τοξικές αναλύσεις σε περιβαλλοντικά δείγματα, για τον έλεγχο ποιότητας τροφίμων και κλινικών αναλύσεων (Sassolas et al., 2012).

Οι διάφοροι τύποι βιοαισθητήρα, οι οποίοι έχουν αναπτυχθεί, κατατάσσονται σύμφωνα με το σήμα στους εξής: *ηλεκτροχημικοί* όπου ανήκουν οι αμπερομετρικοί (Alonso-Lomillo, et al., 2009, Njagi & Andreescu, 2007), οι ποτενσιομετρικοί (Singhal et al., 2002, Sohail & Adeloju, 2008) ή οι βιοαισθητήρες αντίστασης (Essegheier et al., 2008, Han et al., 2007), *αγωγιμότητας* (Lee et al., 2000), *οπτικοί* (Sai et al., 2009, Vareiro et al., 2005, Arya et al., 2007) όπου ανήκουν οι βιοαισθητήρες χημειοφωταύγειας (Zhou & Arnold, 1996), φθορισμού (de Marcos et al., 1999, Wu & Choi, 2004), οι *θερμικοί* (Danielsson & Mosbach, 1989, Ramanathan & Danielsson, 2001, Ramanathan et al., 2001), οι *ελεύθεροι σήματος* (Gauglitz & Proll, 2008) και οι *ακουστικοί* (Lucklum & Hauptmann, 2006). Στους οπτικούς βιοαισθητήρες όπως και σε αυτόν που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή (Σχήμα 1.22), κύριο ρόλο παίζουν οι οπτικές ίνες, όπου το οπτικό κύμα προωθείται εσωτερικά της ίνας. Η οπτική ίνα βρίσκει δύο τρόπους εφαρμογής, ο ένας τρόπος βασίζεται στο διαφεύγον κύμα και στον άλλο τρόπο η ίνα χρησιμοποιείται απλώς για μεταφορά του κύματος από την πηγή στον ανιχνευτή, οπότε και ισχύει ο νόμος Beer-Lambert (Κλώνης, 2007).

Η ικανότητα των GSTs να καταλύουν τις αντιδράσεις δέσμευσης της GSH έδωσε τη δυνατότητα ανάπτυξης βιοαισθητήρων για τον προσδιορισμό ζιζανιοκτόνων. Για παράδειγμα, το ισοένζυμο GSTI από τον αραβόσιτο, χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη φορητού βιοαισθητήρα οπτικής ίνας, για τον προσδιορισμό του φυτοπροστατευτικού προϊόντος ατραζίνη (Andreou & Clonis, 2002b). Σε αυτή τη μελέτη η πρότυπη καμπύλη για την ατραζίνη είχε εύρος συγκεντρώσεως 2,52–125 μM . Το όριο ανίχνευσης γι' αυτόν τον βιοαισθητήρα ήταν τα 0,84 μM , ενώ η επαναληψιμότητα ήταν της τάξης $\pm 3-5\%$. Ακόμα η μεταλλαγμένη μορφή Gln53Ala της GSTI του αραβόσιτου, παρουσιάζει 9,2 φορές μεγαλύτερη αναστολή ως προς το εντομοκτόνο malathion σε σχέση με τον άγριο τύπο του ενζύμου. Έτσι η μορφή Gln53Ala, χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη βιοαισθητήρα για τον προσδιορισμό του εντομοκτόνου αυτού (Karpoli et al, 2008). Επίσης το ισοένζυμο GmGSTU4-4 από σόγια, χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη βιοαισθητήρα για τον

προσδιορισμό του ζιζανιοκτόνου alachlor. Το ισοένζυμο *GmGSTU4-4*, καταλύει τη δέσμευση της GSH με το alachlor απελευθερώνοντας H^+ (HCl), η συγκέντρωση των οποίων είναι ανάλογη του δεσμευμένου alachlor. Το οπτικό σήμα ήταν στα 600 nm, έχοντας ως όξινο δείκτη τον bromocresol green (Fragoulaki et al, 2007).



Σχήμα 1.22. Σχηματική απεικόνιση οπτικού βιοαισθητήρα.

Πιο πρόσφατα το ισοένζυμο *AaGSTE2-2* από το κουνούπι *Aedes aegypti*, χρησιμοποιήθηκε ώστε να έχουμε μια υψηλής εκλεκτικότητας μέθοδο ανάλυσης για τον προσδιορισμό του DDT (π, π'-διχλωρο-διφαινυλοτριχλωροαιθάνιο) (Morou et al, 2008). Η ανίχνευση βασίστηκε στην αλλαγή του pH σε κατάλληλο διάλυμα, καθώς το ένζυμο *AaGSTE2-2* καταλύει την αντίδραση αφυδροχλωρίωσης. Η αλλαγή pH, καταγράφηκε ποτενσιομετρικά και οπτικά με την παρουσία δείκτη pH. Το θεωρητικό όριο ανίχνευσης ορίστηκε η τιμή 3,8 $\mu\text{g/mL}$ και η γραμμική εξάρτηση είχε εύρος τιμών 11,5-250 $\mu\text{g/mL}$.

Αυτού του είδους οι βιοαισθητήρες βασίζονται στην αναστολή του ενζύμου από τα ξενοβιοτικά, τα οποία αναστέλλουν τη μετατροπή του υποστρώματος και έμμεσα ανιχνεύεται το ξενοβιοτικό. Επομένως, η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση των ξενοβιοτικών μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας φασματοφωτομετρικές ή ποτενσιομετρικές μεθόδους, υπολογίζοντας τους ρυθμούς αντίδρασης (Enayati et al., 2001, Karoli et al., 2008, Dowd et al., 2009).

Άλλο παράδειγμα αποτελεί ο οπτικός βιοαισθητήρας για την γρήγορη και υψηλής ευαισθησίας ανίχνευση του captan (πάνω από 2 ppm) σε ύδατα. Το captan είναι γνωστό, ως πιθανή καρκινογόνο ουσία και επικίνδυνη για το υδάτινο οικοσύστημα (Choi et al, 2003). Άλλη μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση που έγινε το 2007, είναι αυτή των Hasegawa και των συνεργατών του, οι οποίοι ανέπτυξαν βιοαισθητήρα για την ανίχνευση της ακρυλαμίδης σε αμυλούχα τρόφιμα (Hasegawa et al, 2007).

Επίσης πρόσφατα αναπτύχθηκε μια απλή μέθοδο ανάλυσης ηπατο-νεοπλασματικών και προ-νεοπλασματικών αλλοιώσεων, χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει την GST του πλακούντα και συνεκτιμά το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου της 2-μακρογλοβουλίνης (Sugata et al, 2005).

1.18. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ

Με τον όρο «ακίνητοποιημένο ένζυμο», περιγράφονται τα ένζυμα τα οποία εντοπίζονται σε συγκεκριμένη περιοχή ή προσκολλώνται σε υλικό υποστήριξης (Abdul, 1993). Η τεχνητή φάση στην οποία ακίνητοποιείται το ένζυμο, ονομάζεται βιοκαταλυτική στερεά φάση. Στο σύστημα διακρίνεται και η στατική υγρή φάση που εντοπίζεται στο εσωτερικό της βιοκαταλυτικής φάσης, της οποίας και αποτελεί μέρος. Η ακίνητοποίηση γίνεται με τέτοιο τρόπο, ώστε να επιτρέπεται η αμφίδρομη μεταφορά μάζας μεταξύ βιοκαταλυτικής φάσης και κύριας υγρής φάσης (Κλώνης, 2011). Στον Πίνακα 1.4. φαίνονται τα βασικότερα πλεονεκτήματα της ακίνητοποίησης ενζύμων (Kotzia et al., 2012).

Πίνακας 1.4. Βασικότερα πλεονεκτήματα της ακίνητοποίησης ενζύμου.

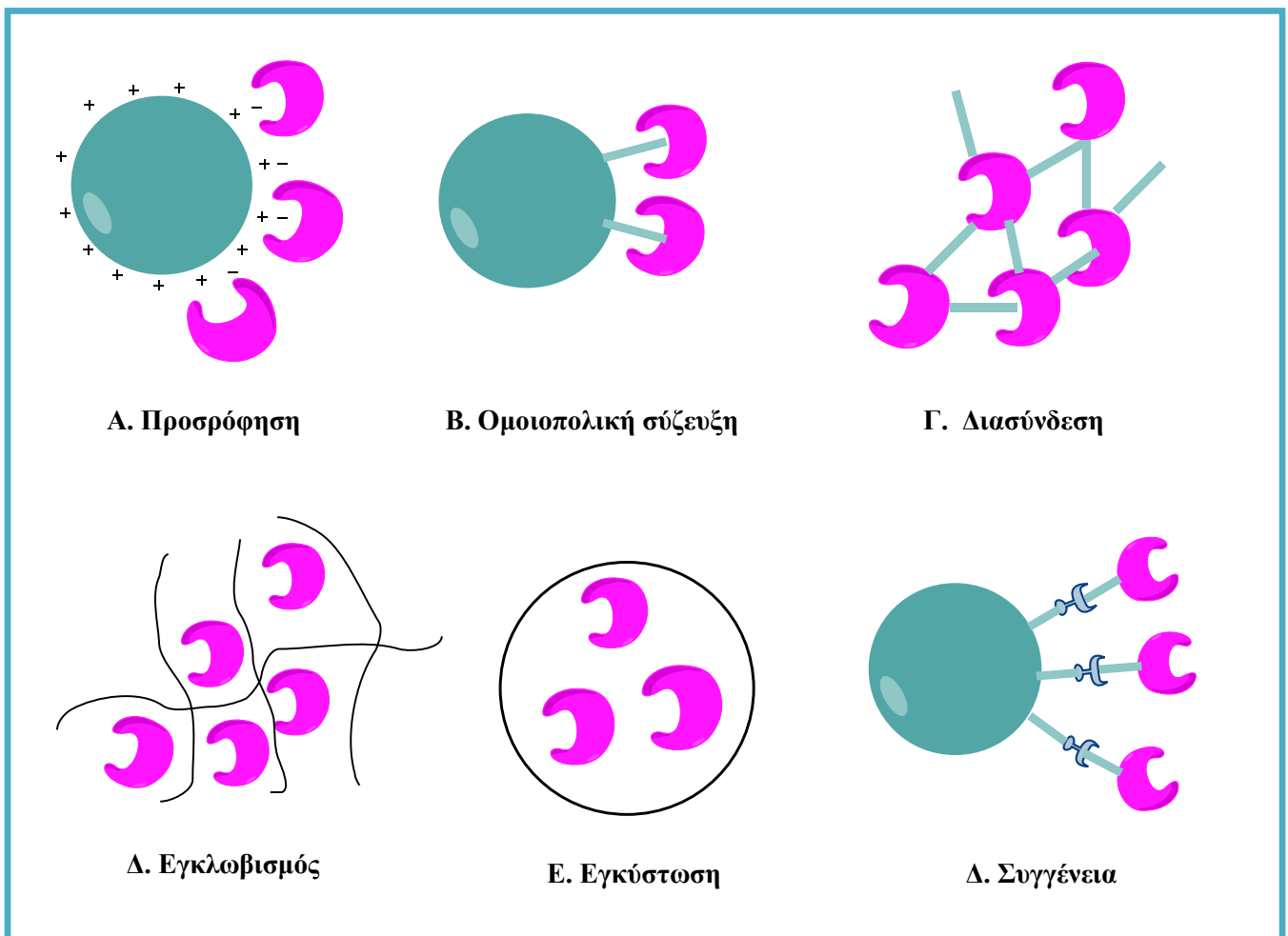
Πλεονεκτήματα ακίνητοποιημένου ενζύμου	
1	Επαναλαμβανόμενη χρήση του ενζύμου.
2	Βελτίωση της σταθερότητας του ενζύμου αποτρέποντας το ξεδίπλωμα της πρωτεΐνης.
3	Δεν υπάρχει επιμόλυνση του προϊόντος με το ένζυμο. Πολύ σημαντικό για τη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων.
4	Η αντίδραση ελέγχεται ταχύτατα απομακρύνοντας το ένζυμο από το διάλυμα αντίδρασης (ή το αντίστροφο).

Τα ακινητοποιημένα ένζυμα μπορούν να βρουν εφαρμογή στη βιομηχανία, στο περιβάλλον, στη χημειοθεραπεία και στην αναλυτική χημεία (Kotzia et al., 2012). Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι ακινητοποίησης: η προσρόφηση, η ομοιοπολική σύζευξη, η διασύνδεση ή ο εγκλωβισμός (Podgornik & Tennikova 2002). Η επιλογή της μεθόδου ακινητοποίησης αποτελεί σημαντική παράμετρο της λειτουργίας του βιοαισθητήρα κυρίως όσον αφορά την ευαισθησία, την εκλεκτικότητα και τη σταθερότητα, επηρεάζοντας τη βιολογική δραστικότητα, την κινητικότητα, τη σταθερότητα και τη δομή του ενζύμου (Sassolas et al., 2012).

Τα ένζυμα μπορούν να ακινητοποιηθούν σε υλικά τριών διαστάσεων όπως ηλεκτροπολυμερισμένα φιλμ, σε αμφιφιλικό δίκτυο, σε πηκτή πυριτίου (silica gel) κ.α. (Sassolas et al., 2012). Η προσρόφηση είναι η πιο απλή μέθοδος, με αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ενζύμου και της βιοκαταλυτικής φάσης. Η προσρόφηση (Σχήμα 1.23. Α) γίνεται με μη-ομοιοπολικούς δεσμούς όπως οι γέφυρες άλατος, οι δεσμοί van der Waals, οι δεσμοί υδρογόνου και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (Calleri et al. 2004). Η ομοιοπολική σύζευξη (Σχήμα 1.23.Β) πραγματοποιείται με την ενεργοποίηση της στερεάς βιοκαταλυτικής φάσης και τη σύζευξη του υποκαταστάτη (Calleri et al. 2004). Η ακινητοποίηση με διασύνδεση (Σχήμα 1.23.Γ) των ενζύμων δεν απαιτεί υλικό στήριξης και είναι οικονομικότερη από την ομοιοπολική σύζευξη. Πραγματοποιείται με το σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ του ενζύμου και ενός διλειτουργικού ή πολυλειτουργικού αντιδραστηρίου (όπως η γλουταραλδεΐδη) (Podgornik & Tennikova 2002). Κατά την ακινητοποίηση με τη μέθοδο του εγκλωβισμού, το ένζυμο είναι ελεύθερο στο διάλυμα αλλά περιορίζεται η κίνηση του από το πλέγμα της πηκτής (Σχήμα 1.23. Δ) (Balabushevich et al. 2004). Ο εγκλωβισμός γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να συγκρατείται η πρωτεΐνη ενώ μπορεί να διεισδύει το υπόστρωμα. Η διαδικασία πραγματοποιείται αναμιγνύοντας το ένζυμο με χημικά μονομερή τα οποία πολυμερίζονται, εγκλωβίζοντας το ένζυμο στο εσωτερικό της πηκτής. Η εγκύστωση (Σχήμα 1.23.Ε) επιτυγχάνεται με την κάλυψη των πρωτεϊνών με ημιπερατή μεμβράνη (π.χ. κυτταρίνη) (Kotzia et al., 2012). Παρακάτω αναφέρονται συνοπτικά οι διάφοροι τεχνικές ακινητοποίησης και στον Πίνακα 1.5 φαίνονται τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των μεθόδων. Στην βιβλιογραφική ανασκόπηση του Sassolas και των συνεργατών του (2012) υπάρχουν καταγεγραμμένες μελέτες για κάθε περίπτωση ακινητοποίησης.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τελευταία για την ανάπτυξη βιοαισθητήρα χρησιμοποιούνται νανο-υλικά (π.χ. νανο-σωματίδια, νανο-αγωγοί άνθρακα), τα οποία λόγω των μοναδικών χαρακτηριστικών τους, υπόσχονται βελτίωση της λειτουργίας των βιοαισθητήρων (Sassolas et al., 2012). Οι νανο-αγωγοί άνθρακα έχουν αξιοθαύμαστες ηλεκτρικές, μηχανικές και δομικές ιδιότητες (Wang, 2005b). Τα νανο-σωματίδια διαφορετικής σύστασης και μεγέθους, έχουν χρησιμοποιηθεί τα τελευταία χρόνια ως ανιχνευτές ηλεκτρονικής, οπτικής ή μικροβαρομετρικής μεταγωγής διαφορετικών βιομοριακών διεργασιών αναγνώρισης (Wang, 2005a). Επίσης έχουν ακινητοποιηθεί βιομόρια σε υλικά που έχουν νανοδομή με απορρόφηση, ομοιοπολικό δεσμό ή εγκλωβισμό. Τα νανοσωματίδια SiO_2 , είναι επίσης τέλεια μητρική ουσία για την ενζυμική ακινητοποίηση, εξαιτίας της καλής βιοσυμβατότητας και εύκολης προετοιμασίας (Luo et al., 2006).



Σχήμα 1.23. Σχηματική απεικόνιση των διαφορετικών μεθόδων ενζυμικής ακινητοποίησης.

Πίνακας 1.5. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των πέντε βασικών μεθόδων ακινητοποίησης (Sassolas et al., 2012, Kotzia et al., 2012).

Μέθοδος	Δεσμοί	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Προσρόφηση	Ασθενείς δεσμοί	Απλή Περιορισμένης απώλεια δραστικότητας ενζύμου Αναγέννηση με φρέσκο ένζυμο	Εκρόφηση, μη- ειδική απορρόφηση Πιθανή προσρόφηση και άλλων πρωτεϊνών ή ουσιών
Ομοιοπολική σύζευξη	Χημικός δεσμός μεταξύ των λειτουργικών ομάδων του ενζύμου και του υποστρώματος	Σταθερή, χωρίς διάχυση και άμεσα αποτελέσματα	Δεν αναγεννάται η μητρική ουσία, σύζευξη τοξικών ουσιών
Εγκλωβισμός	Ενσωμάτωση του ενζύμου σε πηκτή ή πολυμερές	Καμία αντίδραση μεταξύ του μονομερούς και του ενζύμου, έτσι δεν επηρεάζεται η δραστικότητα. Διαφορετικά ένζυμα μπορούν να ακινητοποιηθούν στο ίδιο πολυμερές.	Παρεμπόδιση διάχυσης, διαφυγή ενζύμου, απαιτούνται υψηλές συγκεντρώσεις ενζύμου και μονομερούς
Διασύνδεση (Cross-linking)	Δεσμός μεταξύ του ενζύμου και του cross-linker όπως η γλουταραλδεΐδη	Απλή	Χάνεται υψηλό ποσοστό δραστικότητας του ενζύμου
Συγγένεια	Δεσμοί συγγένειας μεταξύ λειτουργικής ομάδας του υποστρώματος (π.χ. αβιδίνη) και ουρά συγγένεια (π.χ. βιοτίνη) της πρωτεϊνικής αλληλουχίας	Ελεγχόμενη και προσανατολισμένη ακινητοποίηση	Πρέπει να υπάρχουν συγκεκριμένες ομάδες στο ένζυμο (π.χ. βιοτίνη, His)

1.19. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ

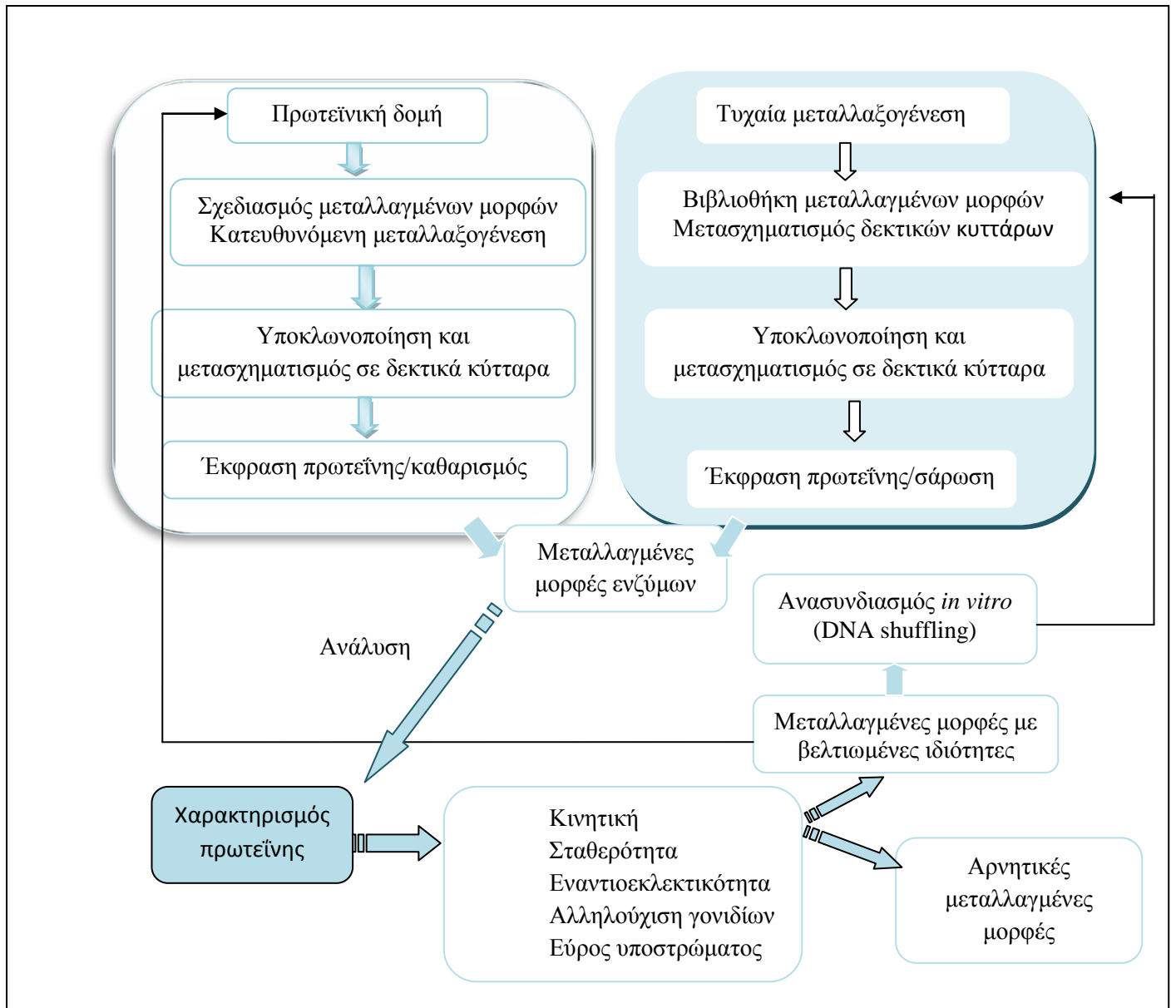
Ιδιαίτερα υποσχόμενο πεδίο της ενζυμικής τεχνολογίας, αποτελεί η πρωτεϊνική μηχανική, καθώς μπορούν να σχεδιαστούν και να παραχθούν νέες πρωτεϊνικές δομές. Οι νέες αυτές δομές μπορούν να παρουσιάζουν βελτιωμένες ή καινούριες δραστηριότητες (Kotzia et al., 2012). Ουσιαστικά, η πρωτεϊνική μηχανική άλλαξε τον τρόπο με τον οποίο ορίζονται οι αρχές της πρωτεϊνικής χημείας. Η τεχνολογία των γονιδίων με την έκφραση των πρωτεϊνών αναδεικνύει τι μπορεί να επιτευχθεί με τη δομή των πρωτεϊνών. Η αλλαγή ενός ή πολλών αμινοξέων χρησιμοποιείται ευρέως για να ελεγχθούν ή και να λυθούν ζητήματα που αφορούν στη μοριακή βιολογία (Perczel & Csizmadia, 2003).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ένζυμα σε βιομηχανικές διεργασίες, εξαιτίας της ικανότητας που έχουν να καταλύουν αντιδράσεις, προσδίδοντας υψηλή ταχύτητα και μοναδική εξειδίκευση. Οι συνθήκες όμως που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία, όπως η υψηλή θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσουν τη σταθερότητα του ενζύμου. Με την πρωτεϊνική μηχανική όμως είναι δυνατόν να βελτιωθούν ιδιότητες του ενζύμου προσφέροντας μεγαλύτερη σταθερότητα (Eijsink et al., 2005).

Στην πρωτεϊνική μηχανική απαντούν δύο μέθοδοι δημιουργίας νέων δομών: α) ο λογικός ανασχεδιασμός και β) η κατευθυνόμενη εξέλιξη (Σχήμα 1.24) (Schmidt et al., 2009). Στη μέθοδο του λογικού ανασχεδιασμού, γνωρίζοντας τη δομή του ενζύμου, καθώς και τη σχέση δομής-λειτουργίας, μπορούν να μεταλλαχθούν συγκεκριμένες αμινοξικές θέσεις προσδίδοντας τελικά τις επιθυμητές ιδιότητες στο ένζυμο (Scrutton et al., 1990, Cedrone et al., 2000). Στη μέθοδο της κατευθυνόμενης εξέλιξης, δεν απαιτείται να είναι γνωστή η τρισδιάστατη δομή του ενζύμου, καθώς συνήθως ακολουθούνται τεχνικές τυχαίας μεταλλαξογένεσης (Jaeger & Eggert 2004, Jestin & Kaminski 2004). Ακόμα η τυχαία ή κατευθυνόμενη μετάλλαξη δίνει τη δυνατότητα να μελετηθεί η σχέση μεταξύ δομής και λειτουργίας των πρωτεϊνών (Goltermann et al., 2010, Labrou, 2010).

Κατά τη διάρκεια επιλογής των νέων δομών, οι μεταλλάξεις οι οποίες παρουσιάζουν θετικό αποτέλεσμα, επιλέγονται και ταυτοποιούνται. Συνήθως πραγματοποιούνται επαναλαμβανόμενοι κύκλοι μετάλλαξης, μέχρι να προκύψει το νέο ένζυμο με τις επιθυμητές ιδιότητες (Kotzia et al., 2012). Επίσης τις περισσότερες φορές, χρησιμοποιείται συνδυασμός των δύο μεθόδων, εφαρμόζοντας τυχαία

μεταλλαξογένεση σε επιλεγμένες περιοχές (μέσω λογικού ανασχεδιασμού) του αρχικού «άγριου-τύπου» πρωτεΐνης (Kotzia et al., 2012). Παραδείγματα συνδυασμού και των δύο μεθόδων μεταλλαξογένεσης στο ένζυμο γλυοξαλάση II, προκάλεσε απώλεια της αρχικής δραστηριότητας, αντικαθιστώντας αυτή με τη δράση της β-λακταμάσης (Park et al. 2006).



Σχήμα 1.24. Σύγκριση του λογικού ανασχεδιασμού και κατευθυνόμενης εξέλιξης.

Ο συνδυασμός της κατευθυνόμενης εξέλιξης και της μεταλλαξογένεσης κορεσμού οδήγησε σε μεταλλάξεις στη θέση 476 του ενζύμου δικαρβοξυλάση του φαινυλογλυοξυλικού οξέος από το *Pseudomonas putida*, με τις νέες μεταλλαγμένες μορφές να παρουσιάζουν μεγαλύτερη δραστικότητα και εναντιοεκλεκτικότητα (Lingen et al., 2002).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός και των δύο μεθόδων για το ένζυμο GST. Οι GSTs αποτελούν καλή πλατφόρμα για την πρωτεϊνική μηχανική με ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Η γνώση της σχέσης δομής-δραστικότητας, η ευκολία καθαρισμού τους και η σταθερότητα τους είναι κάποια από τα στοιχεία που κάνουν αυτά τα ένζυμα σημαντικό πεδίο μελέτης για το σχεδιασμό νέων ιδιοτήτων και λειτουργιών (Armstrong, 1997).

Μέθοδος λογικού ενζυμικού ανασχεδιασμού

Ο λογικός ανασχεδιασμός χρησιμοποιείται κυρίως για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό σημαντικών αμινοξικών καταλοίπων ή θέσεων στις πρωτεΐνες. Οι τρόποι ανασυνδυασμού των αμινοξικών καταλοίπων είναι πάρα πολλοί (10^{325} για μια πρωτεΐνη 250 αμινοξέων), οπότε για την επίτευξη του επιθυμητού, μπορεί να πραγματοποιηθεί αρκετές φορές ο λογικός ανασχεδιασμός (Kotzia et al., 2012). Κάθε φορά που πραγματοποιείται λογικός ανασχεδιασμός απαιτούνται:

1. Η γνώση της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης και το κατάλληλο εκφραστικό σύστημα για την παραγωγή του.
2. Ανάλυση της σχέσης δομής-λειτουργίας της αρχικής αμινοξικής αλληλουχίας και προσδιορισμός των απαιτούμενων αμινοξικών αλλαγών.
3. Να υπάρχουν διαθέσιμες ακριβείς και ευαίσθητες δοκιμές, οι οποίες να προσδιορίζουν τη λειτουργία του ενζύμου, ώστε να αποκαλύπτονται οι αλλαγές στις ιδιότητες των νέων μορφών που προκύπτουν.
4. Η βιοπληροφορική επιτρέπει τη σύγκριση ομόλογων ενζύμων, έχοντας ως πρότυπο δομές που έχουν κρυσταλλογραφηθεί. Έτσι τις περισσότερες φορές είναι εφικτό να προβλεφθεί η δομή ενός ενζύμου, αλλά και η αλλαγή που μπορεί να επιφέρει μια μετάλλαξη, στη διαμόρφωση και στο ηλεκτροστατικό δυναμικό της δομής αυτής.

5. Γενετικός χειρισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του άγριου τύπου. Γνωρίζοντας της τριτοταγή δομή του ενζύμου και τη σχέση δομής-λειτουργίας μπορεί να πραγματοποιηθεί γενετικός χειρισμός για τη δημιουργία νέων μεταλλαγμένων μορφών, έχοντας ως βασικό εργαλείο την PCR (Korzia et al., 2012).

Ο γενετικός επανασχεδιασμός των ενζύμων πραγματοποιείται με μεταλλαξογένεση κορεσμού, με μετάλλαξη εξαλείψεως, με μετάλλαξη παρεμβολής/συγχώνευσης, με ανταλλαγή περιοχών. Η μεταλλαξογένεση κορεσμού, η οποία και χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, αφορά στην αλλαγή συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων της πρωτεΐνης. Η βασική αρχή είναι η χρήση συνθετικών πολυμορφικών ολιγονουκλεοτιδίων (Garvey & Matthews 1990, Wagner & Benkovic 1990) και στη συνέχεια με αναδιάταξη προκύπτουν οι νέες μεταλλαγμένες μορφές.

Η μεταλλαξογένεση με PCR είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος. Μετάλλαξη επιλεγμένων αμινοξικών καταλοίπων της G-θέσης του ενζύμου GSTF1-1 από τον αραβόσιτο, προκάλεσε ουσιαστικές αλλαγές στη σχέση των κινητικών παραμέτρων με το pH (Labrou et al., 2004). Μετάλλαξη στη θέση 118 του ίδιου ενζύμου (Ile118Phe) οδήγησε σε βελτιωμένη εξειδίκευση κατά 4 φορές, ως προς το ζιζανιοκτόνοalachlor (Labrou et al., 2005). Ακόμα, σημαντική αλλαγή παρατηρήθηκε στο ένζυμο hGSTA1-1 μεταλλάσσοντας 4 διαφορετικές περιοχές (12, 107, 108, 111) με τα αμινοξικά κατάλοιπα που απαντούν στο ένζυμο GSTA4-4, όπου αύξησε σημαντικά την καταλυτική του δράση ως προς τα αλκένια. Η μετάλλαξη αυτή οδήγησε σε μείωση της δραστικότητας ως προς το CDNB, κατά 20 φορές (Nilsson et al., 2000). Επίσης η μετάλλαξη 5 αμινοξικών καταλοίπων της H-θέσης του ενζύμου hGSTA2-2, οδήγησε σε αποτελεσματική δράση ισομεράσης στεροειδών (Pettersson et al., 2002).

Μέθοδος κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης

Η μέθοδος της κατευθυνόμενης εξέλιξης, προέκυψε ως εναλλακτική προσέγγιση του λογικού ανασχεδιασμού, και παρουσίασε τη δυνατότητα να βελτιώνει δομικές και λειτουργικές ιδιότητες, όπως η σταθερότητα και η λειτουργία των ενζύμων κάτω από διαφορετικές συνθήκες (ακραίες θερμοκρασίες, pH κ.α.) (Roodvelt et al., 2005). Η κατευθυνόμενη εξέλιξη μέσω της τεχνολογίας του ανασυνδιασμένου DNA, μπορεί να χαρακτηριστεί ως τεχνολογία επιταχυνόμενης πρωτεϊνικής εξέλιξης. Η εξέλιξη

αποτελεί έναν σημαντικό αλγόριθμο με δυνατότητα αλλαγής της λειτουργίας και των ιδιοτήτων των ενζύμων (Roodveldt et al. 2005, Chatterjee & Yuan 2006). Το πρώτο στάδιο της διαδικασίας της κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης, είναι η δημιουργία μιας βιβλιοθήκης μεταλλαγμένων μορφών του ενζύμου και ακολουθεί η επιλογή των καλύτερων μορφών, οι οποίες μπορούν να μουν σε ένα νέο κύκλο κατευθυνόμενης εξέλιξης, μέχρι να βρεθεί εκείνη η ενζυμική μορφή με τις επιθυμητές ιδιότητες (Arnold, 2001).

Τα βήματα που ακολουθούνται στην *in vitro* εξέλιξη είναι τα εξής: (1) η δημιουργία διαφοροποιημένου γονιδιακού αποθέματος (από φυσική διαφοροποίηση, από λογικό ανασχεδιασμό ή τυχαία μεταλλαξογένεση), (2) ανασυνδυασμός του γονιδιακού αποθέματος ή προ-επιλογή διαφορετικών γονιδίων και (3) σάρωση *in vivo* και επιλογή ή εφαρμογή αναλυτικών δοκιμών στις μεταλλαγμένες μορφές ώστε να επιλεγεί αυτή με τις επιθυμητές ιδιότητες (Eijsink et al., 2005).

Υπάρχουν αρκετοί τρόποι για να επιτευχθεί η γενετική διαφοροποίηση. Η μία προσέγγιση είναι προκαλώντας σημειακές μεταλλάξεις τυχαία, μία άλλη προσέγγιση είναι η μετάλλαξη κορεσμού όπου η μετάλλαξη περιορίζεται σε συγκεκριμένες θέσεις ή σε περιορισμένες περιοχές του ενζύμου. Η τρίτη και πολύ σημαντική προσέγγιση είναι η εφαρμογή τεχνικών ανασυνδυασμού στο γονιδιακό απόθεμα που προήλθε από τη φύση από τις δύο παραπάνω προσεγγίσεις (Eijsink et al., 2005). Μια από τις βασικότερες τεχνικές αυτής της προσέγγισης είναι το DNA shuffling (Stemmer, 1994).

Υπάρχουν πολλές τεχνικές για τη δημιουργία βιβλιοθήκης νέων γονιδίων με την κατευθυνόμενη εξέλιξη (Labrou, 2010). Κάποιες από αυτές είναι τυχαίας μεταλλαξογένεσης, χρησιμοποιώντας κυρίως error-prone PCR, DNA shuffling, StEP (staggered extension process), GSSM (gene site saturation mutagenesis) κ.α. (Kotzia et al., 2012).

Τα τελευταία χρόνια η κατευθυνόμενη εξέλιξη έχει αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τον γρήγορο σχεδιασμό ενζύμων, με ιδιότητες βιοτεχνολογικής και φαρμακευτικής αξίας (Kotzia et al., 2012). Για παράδειγμα με DNA shuffling των ενζύμων του κυτοχρώματος P450, προέκυψαν νέα ένζυμα για την παραγωγή νέων χρωστικών (Rosic, 2009). Επίσης η κατευθυνόμενη εξέλιξη έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία, για τη βελτίωση της θερμοσταθερότητας της πεπτιδάσης (Komeda et al.,

2003), καθώς και της σταθερότητας (οξειδωτικής και θερμικής) της *N*-καρβαμλο- D-αμινοξικής πεπτιδο-υδρολάσης (Oh et al., 2002). Επίσης έχουν προκύψει μεταλλαγμένες μορφές ενζύμων, με διαφορετική εξειδίκευση υποστρώματος και στερεοεκλεκτικότητας (Alexeeva et al., 2002, Zha et al. 2001, Williams et al., 2003). Ακόμα έχει επιτευχθεί βελτιωμένη σταθερότητα και διαλυτότητα των πρωτεϊνών, στο περιβάλλον του ξενιστή (π.χ. *E. coli*), παρουσιάζοντας καλύτερη έκφραση (Roodveldt et al., 2005). Στο παρελθόν έχει καταγραφεί βελτίωση της δραστηριότητας *ZmGSTU* στον αραβόσιτο, ως προς την αποτοξίνωση του fluorodifen κατόπιν τυχαίας και κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης (Dixon et al., 2003).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



2. 1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

2.1.1. ΥΛΙΚΑ

2.1.1.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Για τις ανάγκες των πειραματικών διαδικασιών αυτής της διατριβής, με στόχο τη κλωνοποίηση και έκφραση των γονιδίων της μεταφοράς της γλουταθειόνης, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pEXP5-CT/TOPO[®] με τα δεκτικά κύτταρα *E. coli* TOP10 για την επιλογή του γονιδίου, της εταιρείας Invitrogen (Η.Π.Α.), καθώς και εκφραστικά κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) και BL21(DE3) pLysS τα οποία προήλθαν από την εταιρεία Novagen. Ακόμα χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα *E. coli* XL1-Blue της εταιρείας Stratagene, για τον πολλαπλασιασμό και την απομόνωση των γονιδίων GST. Στον παρακάτω Πίνακα 2.1 συνοψίζονται τα στοιχεία που αφορούν στα στελέχη αυτά.

Ο πλασμιδιακός φορέας στον οποίο ήταν κλωνοποιημένα τα γονίδια hGSTP1*B, hGSTP1*C και hGSTA1-1μ ήταν ευγενική προσφορά του Καθηγητή Morrow C.S. (Department of Biochemistry, Wake Forest University School of Medicine, NC), ενώ ο πλασμιδιακός φορέας pQE30 με κλωνοποιημένα τα γονίδια hGSTO1-1 και hGSTT2-2, ήταν ευγενική προσφορά του Καθηγητή Board P. (John Curtin School of Medical Research, Australian National University, Australia).

Πίνακας 2.1. Στελέχη *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, οι γενότυποι των στελεχών αυτών και η ανθεκτικότητα που εμφανίζουν σε αντιβιοτικά.

Στέλεχος <i>E. coli</i>	Γενότυπος	Αντιβιοτικό
XL1-Blue	endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' ::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)	Τετρακυκλίνη
BL21(DE3)	F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	-

Στέλεχος <i>E. coli</i>	Γενότυπος	Αντιβιοτικό
BL21(DE3) pLysS	F ⁺ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3) pLysS(cm ^R)	Χλωραμφαινικόλη 34 µg/mL
TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS- mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-	-
DH5a	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ-	-

2.1.1.2. ENZYMA ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ

Η νουκλεάση DNaseI (2U/µL) ήταν από την εταιρεία Invitrogen (Η.Π.Α.). Οι πολυμεράσες Taq DNA πολυμεράση (5U/µL) και η Pfu DNA πολυμεράση (1U/µL), προήλθαν από τις εταιρείες New England Biolabs (Αγγλία) και Finnzymes (Φιλανδία), αντίστοιχα. Επίσης οι πολυμεράσες KAPA Taq και KAPA High fidelity ήταν από τον οίκο KAPA Biosystems (Η.Π.Α.).

2.1.1.3. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ, KITS ΚΑΙ ΛΟΙΠΑ.

Τα αντιδραστήρια: 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) (καθαρότητας 98%), 1-βρώμο-2,4-δινιτροβενζόλιο (BDNB) (καθαρότητας 98%), 1-ιωδο-2,4-δινιτροβενζόλιο (IDNB) (καθαρότητα 97%), 1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο (IDNB) (καθαρότητα 99>%), trans-4-φαινυλ-3-βουτεν-2-όνη (καθαρότητας 99%), βενζοϊκό υπεροξείδιο (καθαρότητας 75%), παρα-νιτροβενζολικό χλωρίδιο, trans-2-ενενάλη (καθαρότητας >93%), η γλουταθειόνη, το ρυθμιστικό Trizma-base, το δωδεκανοθειϊκό νάτριο (SDS), ο 1-βουτανεδυλ-διγλυκιδυλ αιθέρας, η σουλφανιλαμίδα (καθαρότητας 99%), ο αλλυλ-ισοθειοκυανικός εστέρας (καθαρότητας 95%), ο προπυλ-ισοθειοκυανικός

εστέρας (καθαρότητας 95%), το εθακρινικό οξύ, το τετρα-βουτυλο-υπεροξειδίο (καθαρότητας 70%), η αλβουμίνη μόσχου (BSA)(fraction V), το υπερθειϊκό αμμώνιο, τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και καναμυκίνη, προήλθαν από τον οίκο Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.), ενώ η χλωραμφαινικόλη από την εταιρεία United States Biochemical. Επίσης τα αντιδραστήρια 2,2-διθειοαιθανόλη (καθαρότητας 90%), 4-χλώρο-7-νιτροβενζοφουραζάνιο (καθαρότητας 98%) και το υδροϋπεροξειδίο του κουμηνίου (CuOOH), ήταν της εταιρείας Fluka (Γερμανία) .

Τα εντομοκτόνα: fenvalerate, permethrin, diazinon, malathion, carbaryl και τα ζιζανιοκτόνα: atrazine, diuron, fluorodifen, alachlor, metolachlor, ήταν από την εταιρεία Riedel de Haen (Γερμανία). Όλα τα υπόλοιπα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, ήταν ευγενική προσφορά του Βόντα Ιωάννη και του Επικ. Καθηγητή Μαρκόγλου Αναστάσιου του Εργ. Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ο επαγωγέας έκφρασης ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτο-πυρανοζίδιο (IPTG) και η αγαρόζη, προήλθαν από τις εταιρείες AppliChem και Invitrogen, αντίστοιχα. Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue (G-250), ήταν της εταιρείας Merck. Το εκχύλισμα ζύμης, η πεπτόνη και το άγαρ, από την εταιρεία Scharlau (Ισπανία). Τα υπόλοιπα αντιδραστήρια (NaCl, KH₂PO₄ κ.λ.π.) αναλυτικής καθαρότητας, από τον οίκο Merck.

Τα υλικά χρωματογραφίας Sepharose CL6B, S-Hexyl-GSH και DEAE-Sepharose CL6B, ήταν της εταιρείας Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.).

Οι εκκινητές για την αντίδραση πολυμεράσης, συντέθηκαν και καθαρίστηκαν στις εταιρείες MWG-Biotech (Eberberg, Γερμανία) και Invitrogen (Η.Π.Α.). Οι δείκτες μοριακών μαζών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις ηλεκτροφορήσεις του DNA ήτα οι εξής: 1 Kb DNA ladder, 100bp DNA ladder και 2-log DNA ladder της εταιρείας New England Biolabs (Αγγλία) και 1Kb DNA ladder της εταιρείας Lab Suppliers. Ο δείκτης μοριακών μαζών Protein Prestained Marker για τις ηλεκτροφορήσεις πρωτεϊνών, ήταν της εταιρείας Invitrogen (Η.Π.Α.).

Τέλος χρησιμοποιήθηκαν τα kit QIAquickTM Gel Extraction από τον οίκο Quiagen και MiniPlasmid isolation kit από τον οίκο Macherey–Nagel.

2.1.1.4. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν σπόροι του φυτού *Phaseolus vulgaris* (φασόλι) και *Glycine max* (σόγια), τυποποιημένοι σε φακελάκια της εταιρείας 3A.

2.1.2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

2.1.2.1. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Θρεπτικό μέσο LB

- 1% (w/v) πεπτόνη
- 1% (w/v) NaCl
- 0,5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης

Αν είναι επιθυμητή η πήξη του μέσου αυτού προστίθεται 1,5% (w/v) άγαρ.

Θρεπτικό μέσο SOC

- 2% (w/v) πεπτόνη
- 0,5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης
- 10 mM NaCl
- 2,5 mM KCl
- 10 mM MgCl₂
- 10 mM MgSO₄
- 20 mM γλυκόζη

2.1.2.2. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων

Για την παρασκευή 3 mL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης κυττάρων αναμιγνύονται:

- 150 μL 0,5 M Tris-Cl pH=8
- 60 μL 0,5 M EDTA pH=8
- 75μL 2 M γλυκόζης

Διάλυμα NaOH/SDS

Για την παρασκευή 5 mL διαλύματος NaOH/SDS αναμιγνύονται:

- 114 μL 10 M NaOH
- 568 μL 10% (w/v) SDS

Διάλυμα RNάσης A

Για να παραχθεί το διάλυμα RNάσης A, διαλύεται η RNάσης A σε 10 mM Tris-Cl pH=7,4 και 15 mM NaCl σε τελική συγκέντρωση 10 mg/mL. Το διάλυμα επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 100⁰C για 15 λεπτά και αφού πρώτα πέσει η θερμοκρασία του σε θερμοκρασία δωματίου (25 ⁰C) αποθηκεύεται στους -20 ⁰C.

Διάλυμα CH₃COONH₄/RNάσης A

Για την παρασκευή 4.5 mL διαλύματος CH₃COONH₄/RNάσης A αναμιγνύονται:

- 4,5 mL CH₃COONH₄ (7,5 M) pH=7,8
- 45 μL διαλύματος RNάσης A.

2.1.2.3. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Διάλυμα TB

Για την παρασκευή του διαλύματος προετοιμασίας δεκτικών κυττάρων TB pH=6,7 αναμιγνύονται:

- 10 mM PIPES
- 55 mM MnCl₂
- 15 mM CaCl₂
- 250 mM KCl
- πυκνό KOH για τη ρύθμιση του

Ακολουθεί αποστείρωση μέσω φίλτρου.

Διάλυμα CaCl₂ 25mM και 75mM

Παρασκευάζονται διαλύματα 25mM CaCl₂ σε 10 mM Tris pH=8 και 75mM CaCl₂ σε 10 mM Tris pH=8 και ακολουθεί αποστείρωση σε κλίβανο.

2.1.2.4. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΕΤΟΥΞΙΩΣΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΔΩΔΕΚΑΝΟΘΕΪΪΚΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ (SDS).

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων 10x

Το διάλυμα αποτελείται από:

- 0,25 M Tris
- 1,92 M γλυκίνη
- 1% SDS (w/v) pH=8,3

Για την παρασκευή διαλύματος 1 λίτρου απαιτούνται 30,3 g Tris-base, 144 g γλυκίνη και 10 g SDS.

Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού

Το διάλυμα αποτελείται από 3 M Tris-Cl pH=8,8.

Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοιβαξης

Το διάλυμα αποτελείται από 0,5 M Tris-Cl pH=6,8.

Διάλυμα ακρυλαμιδίου

Για την παρασκευή του διαλύματος ακολουθείται ο τύπος:

$$T\%=(g \text{ ακυλαμίδης} + g \text{ δις-ακρυλαμίδης})/\text{συνολικό όγκο (mL)}$$

Έτσι για την παρασκευή 30% ακρυλαμίδης αναμιγνύονται 0,42 mol (30 g) ακρυλαμιδίου και 0,8 g (5,2 mol) N,N'-μεθυλενο-bis-ακρυλαμιδίου σε 100 ddH₂O. Το διάλυμα φιλτράρεται με διηθητικό χαρτί και φυλάσσεται σε σκοτεινόχρωμο δοχείο στους 4 °C.

Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων

Το διάλυμα αποτελείται από:

- 0,125 M Tris-Cl pH=6,8
- 4% (w/v) SDS
- 20% (v/v) γλυκερόλη
- 10% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη
- 0,02% (w/v) χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης

Διάλυμα SDS: 10% (w/v) SDS

Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου

Διαλύεται 1,5% (w/v) υπερθειικό αμμώνιο σε ddH₂O. Παρασκευάζεται εκ νέου σε κάθε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.

2.1.2.5. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΚΑΙ RNA

Ρυθμιστικό διάλυμα TAE 50X

Το διάλυμα αποτελείται από:

- 2M Trizma base
- 5,71% v/v CH₃COOH
- 10% v/v 0,5M EDTA (pH=8). Αποστείρωση σε αυτόκαυστο και αποθήκευση στους 4°C.

Βρωμιούχο αιθίδιο

Διαλύουμε 5mg/mL βρωμιούχου αιθιδίου σε ddH₂O. Διατηρείται σε σκοτεινόχρωμο δοχείο στους 4 °C.

Διάλυμα πηκτής ηλεκτροφόρησης

Το διάλυμα πηκτής περιέχει τα εξής:

- 0,5-1% αγαρόζη (DNA) ή 2% αγαρόζη (RNA)
- 1X TAE
- 4 μL βρωμιούχο αιθίδιο

Το διάλυμα (χωρίς το βρωμιούχο αιθίδιο) αποστειρώνεται για την ηλεκτροφόρηση του RNA.

Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης σε πηκτή ηλεκτροφόρησης DNA και RNA

Για 10 mL διαλύματος αναμιγνύονται 10 mL γλυκερόλης 50% (w/v), 200 μL EDTA 0,5 M pH=8 και 25 mg της χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης. Κατά την ηλεκτροφόρηση του RNA το διάλυμα θα πρέπει να είναι αποστειρωμένο.

2.1.2.6. ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ

Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης από φυτικό ιστό για την απομόνωση RNA

Το διάλυμα αποτελείται από:

- 50 mM Tris-Cl pH=8,3
- 150 mM NaCl
- 10 mM EDTA
- 1% Lauryl sarcosine

Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης πρωτεϊνών από φυτικό ιστό

- 50 mM KH₂PO₄
- 0,1 mM EDTA
- 1% w/v PVP pH=6

2.1.3. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Για τους προσδιορισμούς της ενζυμικής δραστηριότητας, χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης-ορατού-υπεριώδους-του οίκου Hitachi (μοντέλο U-2000, μήκος οπτικής διαδρομής 10 mm), που φέρει θερμοστατούμενη υποδοχή κυψελίδας. Για την διεξαγωγή φασμάτων, χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer UV/Vis Lambda 16.

Οι μετρήσεις pH των διαλυμάτων, πραγματοποιήθηκαν με το pHμετρο ORION μοντέλο 410A.

Για τη συλλογή των κυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν οι φυγόκεντροι Heraeus SEPATECH Contrifuge 17RS και Varifuge 20RS, καθώς και η Heraeus Instruments Biofuge primo. Το λύσιμο των κυττάρων, έγινε με το σύστημα υπερήχων Sonics & Materials Inc. Vibra Cell.

Ο θερμικός κυκλοποιητής που χρησιμοποιήθηκε, ήταν της εταιρείας PE Applied Biosystems, μοντέλο Gene Amp[®] 9700.

Οι ηλεκτροφορήσεις δειγμάτων DNA σε πηκτή αραρόζης, έγιναν με τη συσκευή της Biorad-μοντέλο MINI-SUB[®] CELL GT και των πρωτεϊνών στη συσκευή της Biorad-μοντέλο Mini PROTEAN[®] Tetran System, συνδεδεμένες σε τροφοδοτικό SP500 x T (500 volt, 400 mA) του οίκου Hoefer, Η.Π.Α.

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΤΩΝ

Αρχικά σπόροι από *Phaseolus vulgaris* και *Glycine max*, προβλάστησαν σε τρυβλία, πάνω σε απορροφητικό χαρτί Whatman 3MM, το οποίο ήταν βρεγμένο με διαπιονισμένο αποστειρωμένο νερό. Τα τρυβλία παρέμειναν σε θάλαμο για 48 ώρες στους 30 °C.

Μετά από δυο ημέρες, οι αναπτυγμένοι σπόροι μεταφυτεύτηκαν στο χώμα σε πλαστικές γλάστρες μεγέθους 12 cm. Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε ειδικό θάλαμο, κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες υγρασίας (65%) και θερμοκρασίας (27 °C) και ποτίζονταν κάθε 3 ημέρες.

2.2.2. ΨΕΚΑΣΜΟΣ ΦΥΛΛΩΝ

Μετά από τρεις εβδομάδες ανάπτυξης, τα φυτά εκτός τους μάρτυρες ψεκάστηκαν με υδατικό διάλυμα βαρέων μετάλλων, με τις κάτωθι τελικές συγκεντρώσεις:

- Νικέλιο (Ni^{+2}): 150 μM
- Ψευδάργυρο (Zn^{+2}): 200 μM
- Χρώμιο (Cr^{+3}): 50 μM

Τα φυτά καλύφθηκαν με διαφανή μεμβράνη και παρέμειναν στο θάλαμο για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα συλλέχθηκε φυτικός ιστός και εν συνεχεία τα φυτά ψεκάστηκαν με υδατικό διάλυμα, που περιείχε 20% αιθανόλη, ζιζανιοκτόνο Fusilade (δραστικής ουσίας Fluazifop-p-butyl) με αραίωση 1/250, atrazine 0,2 mM (δραστικής ουσίας ατραζίνης) καιalachlor 0,2 mM (δραστικής ουσίαςalachlor). Τα φυτά καλύφθηκαν με διαφανή μεμβράνη και μεταφέρθηκαν εκτός θαλάμου, σε θερμοκρασία 35-37 °C για 24 ώρες. Τα φυτά μάρτυρες δεν υπέστησαν καμία καταπόνηση. Μετά από αυτό το διάστημα συλλέχθηκε πάλι φυτικός ιστός. Ο ιστός των φυτών (φύλλα, βλαστός, ρίζα) φυλλάχθηκε στους -80°C, ενώ ένα μέρος χρησιμοποιήθηκε την ίδια μέρα κοπής για περαιτέρω επεξεργασία (§ 2.2.4.).

Πίνακας 2.2. Παράγοντες καταπόνησης των φυτών *P. vulgaris* και *G. max*.

Παράγοντες καταπόνησης φυτών	
Νικέλιο	150 μM
Ψευδάργυρος	200 μM
Χρόμιο	50μM
Ατραζίνη	0,2 mM
Fluazifop-p-butyl	1/250
Alachlor	0,2 mM
Αιθανόλη	20% v/v
Θερμοκρασία	35-37 $^{\circ}$C

2.2.3. ΣΥΛΛΟΓΗ ΦΥΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ

Η συλλογή των φυτικών μερών έγινε με την κοπή τους με ψαλίδι, μετά το πέρας 3 εβδομάδων και την άμεση φύλαξη τους στους -80°C , αφού πρώτα εμβαπτίστηκαν σε υγρό άζωτο, για την μεταφορά τους, από το θάλαμο ανάπτυξης τους.

2.2.4. ΦΥΤΙΚΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ

Ο φυτικός ιστός (φύλλα, βλαστός, ρίζα) που συλλέχθηκε, πλύθηκε καλά με απιονισμένο νερό, ζυγίστηκε και εκχυλίστηκε (χρήση γουδιού) με διάλυμα εκχύλισης τριπλάσιου όγκου, σε σχέση με το βάρος του ιστού στους 4°C . Το διάλυμα εκχύλισης αποτελούνταν από 50 mM KH_2PO_4 , 0,1 mM EDTA και 1% w/v PVP pH=6. Η προσθήκη του πολυαμιδίου πολυβινυλοπυρρολιδόνης (PVP) στο διάλυμα κρίνεται απαραίτητη, καθώς απομακρύνει τις πολυφαινόλες των φυτικών ιστών μέσω της ανάπτυξης δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αμιδικών καρβονυλικών ατόμων οξυγόνου και των υδροξυλίων των πολυφαινολών και του σχηματισμού συμπλόκων PVP-πολυφαινολών (Κλώνης, 2007).

Το μίγμα που δημιουργήθηκε, φυγοκεντρίθηκε στις 13 000 rpm για 10 λεπτά, στους 4 °C. Το υπερκείμενο που προέκυψε, συλλέχθηκε για τη μέτρηση ειδικής δραστηριότητας, έναντι των υποστρωμάτων CDNB, υπεροξειδίου του κουμενίου, fluorodifen, εθακρινικού οξέος και π-νιτροβενζυλ-χλωριδίου, για τις 24 και για τις 48 ώρες καταπόνησης. Επίσης τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, κάτω από συνθήκες μετουσίωσης SDS-PAGE.

2.2.5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ

Η απομόνωση του RNA από τους φυτικούς ιστούς έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Brusslan & Tobin, 1992.

Ο παγωμένος φυτικός ιστός, αφού πρώτα κονιορτοποιηθεί (πούδρα 0,2 g) σε υγρό άζωτο, μεταφέρεται με παγωμένη σπάτουλα σε αποστειρωμένα erpendorf, τα οποία βρίσκονται στον πάγο και περιέχουν 300 μL διάλυμα εκχυλίσεως (§ 2.1.2.6.) και 300 μL διάλυμα PIC (Phenol/Isoamyl alcohol/Chloroform) (εταιρεία sigma). Ακολουθεί ανάδευση (vortex) με έντονο ρυθμό για 30 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια φυγοκέντριση του δείγματος για 5 λεπτά στις 14.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν μεταφέρεται η υδάτινη φάση σε νέο erpendorf και ακολουθεί επανεκχύλιση με 300 μL διαλύματος PIC. Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 14.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Το DNA και το RNA στην υδάτινη φάση καθιζάνει, προσθέτοντας 30 μL 3M CH₃COONa και 300 μL ισοπροπανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντριση του δείγματος για 15 λεπτά στις 14.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 4 °C. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1125 μL 10T/10E (10 mM Tris pH=8,3 και 10 mM EDTA) και προστίθενται 375 μL 8 M LiCl₂ και αφήνεται στους 4 °C όλη τη νύχτα, ώστε να κατακρημνιστεί το DNA. Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντριση στις 14.000 rpm για 15-30 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη και αφήνεται να στεγνώσει και να επαναδιαλυθεί το ίζημα με 10T/1E (10 mM Tris pH=8,3 και 1 mM EDTA) ή νερό.

2.2.6. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ XL-1BLUE, TOP10, DH5A, BL21(DE3) ΚΑΙ BL21pLYSSTM(DE3) ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *E.coli* (COMPETENT CELLS)

1^{ος} τρόπος

Τα στελέχη XL-1Blue, TOP10 και DH5a χρησιμοποιήθηκαν για την αναπαραγωγή και υποκλωνοποίηση πλασμιδίων, λόγω της υψηλής ικανότητας μετασχηματισμού που έχουν, ενώ τα στελέχη BL21(DE3), και BL21PlysTM(DE3) για την έκφραση του επιθυμητού γονιδίου. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την μετατροπή τους σε δεκτικά κύτταρα, αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου των Chung et al., 1989. Από τρυβλίο με θρεπτικό διάλυμα LB που περιέχει το απαραίτητο αντιβιοτικό (Πίνακας 2.1.) στην κατάλληλη συγκέντρωση, λαμβάνεται κάθε φορά μονή αποικία του επιθυμητού βακτηριακού στελέχους. Η μονή αποικία από κάθε στέλεχος, αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB για 14-16 ώρες στους 37⁰C, υπό συνεχή ανάδευση στις 250 rpm. Στη συνέχεια ακολουθεί μόλυνση αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου όγκου 50 mL, με 1 mL από την αρχική καλλιέργεια και επώαση στους 37⁰C, μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα OD στα 600 nm να είναι περίπου 0,2. Κατόπιν η καλλιέργεια τοποθετείται στον πάγο για 10 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντριση για 10 λεπτά στις 4.000 rpm σε προψυγμένη στους 4⁰C φυγόκεντρο, ώστε να κατακρημνιστούν τα κύτταρα. Αφού απορριφθεί το υπερκείμενο, η πάστα των κυττάρων επαναϊωρείται με παγωμένο διάλυμα TB (§ 2.1.2.3) όγκου ίσου με το 1/10 της αρχικής καλλιέργειας (δηλ. 5 mL) και ψύχεται για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 10 λεπτά στις 4.000 rpm στους 4⁰C και επαναϊώρηση των κυττάρων με TB όγκου 1/15 της αρχικής καλλιέργειας (δηλ. 3,5 mL). Κατόπιν το αιώρημα τοποθετείται στον πάγο και προστίθεται DMSO τελικής συγκέντρωσης 7% (v/v) (δηλ. 0,245 mL). Εν συνεχεία αναδεύονται ήπια και διατηρούνται στον πάγο για 10 λεπτά. Κατόπιν μοιράζονται σε κλάσματα των 200 μL σε παγωμένα erpendorf, καταψύχονται με υγρό N₂ και φυλάσσονται στους -80 ⁰C.

2^{ος} τρόπος

Από τρυβλίο με θρεπτικό διάλυμα LB, που περιέχει το απαραίτητο αντιβιοτικό (Πίνακας 2.1.) στην κατάλληλη συγκέντρωση, λαμβάνεται μονή αποικία του επιθυμητού βακτηριακού στελέχους. Η μονή αποικία από κάθε στέλεχος,

αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο για 14-16 ώρες στους 37⁰C, υπό συνεχή ανάδευση στις 250 rpm. Στη συνέχεια αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο 200 mL, μολύνεται με 2 mL από την αρχική καλλιέργεια και επωάζεται στους 37⁰C, μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα OD στα 550 nm να είναι περίπου 0,5. Κατόπιν τοποθετείται η καλλιέργεια στον πάγο για 10 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντριση για 5 λεπτά στις 4.500 rpm, σε προψυγμένη στους 4⁰C φυγόκεντρο, ώστε να κατακρημνιστούν τα κύτταρα. Αφού απορριφθεί το υπερκείμενο, η πάστα των κυττάρων, επαναιωρείται με παγωμένο διάλυμα 25 mM CaCl₂ σε 10 mM Tris pH=8 όγκου ίσου με το 1/2 της αρχικής καλλιέργειας (δηλ. 100 mL) και ψύχεται για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 5 λεπτά στις 4.500 rpm στους 4⁰C και επαναιώρηση των κυττάρων, με παγωμένο διάλυμα 75 mM CaCl₂ σε 10 mM Tris pH=8 όγκου 1/15 της αρχικής καλλιέργειας (δηλ. 13,3 mL). Κατόπιν το αιώρημα τοποθετείται στον πάγο και προστίθεται γλυκερόλη τελικής συγκέντρωσης 15% (v/v). Αναδεύονται ήπια και διατηρούνται στον πάγο για 10 λεπτά. Στη συνέχεια μοιράζονται σε κλάσματα των 200 µL σε παγωμένα erpendorf, καταψύχονται με υγρό N₂ και φυλάσσονται στους -80⁰C.

2.2.7. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΑΛΚΑΛΙΚΗΣ ΛΥΣΗΣ

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου της μεθόδου που περιγράφεται από τους Birnboim & Doly, 1979, όπου μονή αποικία βακτηριακού στελέχους αναπτύσσεται σε υγρό LB (Luria-Bertani), με πιθανή παρουσία αντιβιοτικού (ως μέσο επιλογής) στους 37⁰C για 12-16 ώρες υπό συνεχή ανάδευση στις 250 rpm. Ακολούθως 1,5 mL από την καλλιέργεια μεταφέρεται σε erpendorf και τα κύτταρα κατακρημνίζονται με φυγοκέντριση στις 13000 rpm για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται τελείως και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 200 µL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης κυττάρων (§ 2.1.2.2.) Στη συνέχεια προστίθενται 400 µL από το διάλυμα NaOH/SDS (§ 2.1.2.2.). Το δείγμα αναμιγνύεται προσεχτικά και επωάζεται σε πάγο για 5 λεπτά ακριβώς. Μετά το πέρας των 4 λεπτών προστίθεται η RNάση A (10 µL/mL) σε παγωμένο CH₃COONH₄, προκειμένου να παρασκευαστεί διάλυμα CH₃COONH₄/RNάσης A (§ 2.1.2.2.) το οποίο προστίθεται στο δείγμα, ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση στον πάγο για 10 λεπτά. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε ένα

νέο erpendorf, στο οποίο προστίθεται ισοπροπανόλη 700 μL και μετά από ανάδευση το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Κατόπιν το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται με έντονη ανάδευση σε 1mL 70% (v/v) παγωμένης αιθανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντριση στις 13.000 rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τελικά κατόπιν εξάτμισης της αιθανόλης σε θερμοκρασία δωματίου, το ίζημα (DNA) επαναδιαλύεται σε 30-50 μL αποστειρωμένου ddH₂O.

2.2.8. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA

Σε περίπου 200 μl δεκτικών κυττάρων προστίθενται 10-50 ng πλασμιδιακού DNA. Αναμιγνύονται με ήπια ανάδευση και το μίγμα τοποθετείται στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολουθεί θερμικό σοκ των κυττάρων με επώαση στους 42-43⁰C για 90 δευτερόλεπτα και έπειτα αφήνονται στον πάγο για περίπου 3 λεπτά, ώστε να μειωθεί η θερμοκρασία τους. Αφού προστεθούν 500 μl θρεπτικού μέσου LB, το δείγμα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται στους 37 ⁰C για 1 ώρα. Ακολουθεί ήπια φυγοκέντριση στις 2000 rpm για 2 λεπτά, προκειμένου να συγκεντρωθούν τα κύτταρα στον πάτο του erpendorf. Αφού αφαιρεθεί το μεγαλύτερο μέρος του υπερκείμενου, επαναδιαλύονται τα κύτταρα με ήπιο τρόπο (100-150 μL). Στη συνέχεια επιστρώνεται αυτή η ποσότητα του δείγματος, σε τρυβλία με LB, όπου πιθανόν να υπάρχει και ως μέσο επιλογής κάποιο αντιβιοτικό, συνήθως αμικιλίνη ή καναμυκίνη (ή και τα δύο μαζί). Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 ⁰C για 12-16 ώρες. Εάν πρόκειται για υγρή προκαλλιέργεια, το δείγμα εμβολιάζεται απευθείας στη φλάσκα με το απαραίτητο αντιβιοτικό, χωρίς πρώτα να ακολουθήσει φυγοκέντριση.

2.2.9. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΟΞΥΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (DNA) ΚΑΙ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (RNA) ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται προκειμένου να διαχωριστούν και να αναλυθούν νουκλεϊνικά οξέα διαφορετικού μεγέθους και διαμόρφωσης. Στη παρούσα διατριβή η περιεκτικότητα της πηκτής για την ηλεκτροφόρηση του DNA ήταν 1% και για το RNA 2%. Τα μόρια των νουκλεϊνικών

οξέων ανιχνεύονται με τη βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να αλληλεπιδρά με τις βάσεις των μορίων και να φθορίζει σε υπεριώδες φως.

Επομένως κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστίθεται σε διάλυμα 1xTAE (§ 2.1.2.5.) και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως το διάλυμα και να γίνει διαυγές. Αφού μειωθεί η θερμοκρασία του, προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο με τελική συγκέντρωση 0,5 µg/mL. Στη συνέχεια το μίγμα εισάγεται στο ειδικό δοχείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης, όπου και τοποθετείται το ειδικό χτενάκι για τη δημιουργία των εσοχών –τα λεγόμενα «πηγαδάκια»–όπου και τοποθετούνται τα δείγματα. Ο χρόνος αναμονής για να στερεοποιηθεί το μίγμα, είναι περίπου 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25⁰C). Κατόπιν το δοχείο με το μίγμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης η οποία και γεμίζεται με το διάλυμα 1xTAE (~ 400 mL). Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (~15 µL) (§ 2.1.2.5.) στα προς ανάλυση δείγματα και τοποθετούνται στα «πηγαδάκια». Στη συνέχεια εφαρμόζεται συνεχής τάση κατά μήκος της συσκευής στα 80 V για το DNA (~25 λεπτά) και στα 110 V (~ 10 λεπτά) για το RNA. Ως μοριακοί δείκτες χρησιμοποιήθηκαν ο 2-Log DNA ladder, ο 100bp DNA ladder, ο 50 bp DNA ladder και ο 1 kb DNA ladder. Στην περίπτωση του RNA ό,τι χρησιμοποιείται εκτός από το βρωμιούχο αιθίδιο θα πρέπει να είναι αποστειρωμένο.

2.2.10. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για την απομόνωση συγκεκριμένου κλάσματος DNA από κάποιο δείγμα παρασκευάζεται πηκτή αγαρόζης 1% (w/v) και το δείγμα αναλύεται ηλεκτροφορητικά, μέχρις ότου επιτευχθεί ο μέγιστος δυνατός διαχωρισμός του κλάσματος, που πρόκειται να απομονωθεί από τα υπόλοιπα. Ακολουθώς η πηκτή τοποθετείται σε γυάλινη πλάκα και μεταφέρεται σε συσκευή, που εκπέμπει υπεριώδες φως. Εκεί με τη βοήθεια ξυραφιού, αφαιρείται το τμήμα της πηκτής που περιέχει το ζητούμενο κλάσμα DNA και τοποθετείται σε eppendorf. Στη συνέχεια για τον καθαρισμό, ακολουθείται η μέθοδος που περιγράφεται στο εμπορικό σκεύασμα QIAquickTM Gel Extraction Kit (Qiagen) και βασίζεται στη μέθοδο προσρόφησης του DNA σε πηκτή πυριτίου (silica gel) παρουσία χαοτροπικών παραγόντων.

2.2.11. ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΝΟΥΚΛΕΑΣΗ DNASE I

Πριν από τις αντιδράσεις RT-PCR, όλα τα δείγματα RNA υποβλήθηκαν σε κατεργασία με DNase I, ώστε να μην υπάρχουν ίχνη χρωμοσωμικού DNA στα δείγματα. Αν τα δείγματα που προκύπτουν από την απομόνωση του RNA, έχουν πολύ μικρή ποσότητα χρωμοσωμικού DNA, μπορούν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της αντίδρασης RT-PCR. Για το λόγο αυτό, προκειμένου να διασφαλιστεί η ακεραιότητα του RNA χρησιμοποιήθηκε RNase-free DNase και συγκεκριμένα το πλήρες σύστημα αντιδραστηρίων RQ1 RNase-free DNase I της εταιρείας Promega, σύμφωνα με τη παρακάτω διαδικασία:

1. Σε αποστειρωμένο eppendorf προστίθενται τα εξής: 4-5 μg ολικού RNA (μέχρι 30 μL), RQ1 DNase I (1U/ μg RNA), 5 μL από το διάλυμα RQ1 DNase 10X, 1 μL RNase Out-DNase free και αποστειρωμένο ddH₂O μέχρι τα 50 μL (τελικός όγκος).
2. Επώαση για 90 δευτ. στους 37 °C.
3. Προσθήκη νερού μέχρι τελικού όγκου αντίδρασης 150 μL .
4. Προσθήκη 1:1 (δηλαδή 150 μL) PIC.
5. Φυγοκέντριση στις 13.000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25°C) και μεταφορά της υδάτινης φάσης σε νέο eppendorf.
6. Προσθήκη 1:1 (δηλαδή 150 μL) CHCl₃.
7. Φυγοκέντριση στις 13.000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25°C) και μεταφορά της υδάτινης φάσης σε νέο eppendorf.
8. Προσθήκη 1:10 (δηλαδή 15 μL) 3M CH₃COONa pH=5,2.
9. Προσθήκη 2,5 x αρχικό όγκο (δηλαδή 375 μL) αιθανόλη.
10. Το διάλυμα αντίδρασης αφήνεται στους - 20°C για 24 ώρες.
11. Την επόμενη μέρα μεταφέρθηκαν στους - 80°C για 30 λεπτά.

12. Φυγοκέντριση στις 13.000 rpm για 30 λεπτά στους 4⁰C και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
13. Προσθήκη 300 µL 70% αιθανόλη.
14. Φυγοκέντριση στις 13.000 rpm για 15 λεπτά στους 4⁰C και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
15. Τα eppendorf μένουν στους 4⁰C στραμμένα ανάποδα για ~ 30 λεπτά.
16. Τέλος ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος με 20-25 µL αποστειρωμένου νερού.

2.2.12. ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA

Σε αποστειρωμένο eppendorf προστίθενται κάθε φορά:

- 1 ng-5µg ολικού RNA (μετά από την επεξεργασία με DNase I § 2.2.11.)
- 1 µL oligo(dT)12-18 (οίκος Invitrogen)
- 1 µL dNTP mix (10 mM το κάθε ένα)
- Αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικό όγκο αντίδρασης 12 µL.

Ακολουθεί θέρμανση στους 65⁰C για 5 λεπτά και τοποθέτηση των δειγμάτων απευθείας στον πάγο. Μετά από γρήγορη φυγοκέντριση προστίθενται τα εξής:

- 4 µL first-strande διάλυμα (5x)
- 2 µL DTT (0,1 M)
- 1 µL RNase Out (40 U/µL)

Απαλή ανάδευση και επώαση στους 42⁰C για 2 λεπτά και προσθήκη 1µL Superscript II RT και ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση στους 42⁰C για 50 λεπτά και στους 70⁰C για 15 λεπτά, ώστε να σταματήσει η αντίδραση.

2.2.13. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Ανάλογα με τις απαιτήσεις κάθε φορά του πειράματος, προσαρμόζονται και οι συγκεντρώσεις των συστατικών, καθώς και οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Τα συστατικά προστίθενται σε erpendorf χωρητικότητας 0,2 mL κατάλληλο για PCR. Στη συνέχεια αναμιγνύονται καλά και φυγοκεντρώνται για λίγο (spin) ώστε να βρεθούν στον πυθμένα του erpendorf. Στο τέλος προστίθεται η πολυμεράση και τα erpendorf, τοποθετούνται στο θερμοκυκλοποιητή PE Applied Biosystems Gene Amp[®] 9700.

Οι θερμοκύκλοι που συνήθως χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή είναι οι ακόλουθοι:

A) ΑΡΧΙΚΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ

Στους 95 °C για 2 λεπτά

B) ΚΥΚΛΟΣ

Αποδιάταξη στους 95 °C για 2 λεπτά

Υβριδισμός εκκινητών στους 50-55 °C για 2 λεπτά

Επιμήκυνση στους 72 °C για 2 λεπτά

} 30 κύκλοι

Γ) ΤΕΛΙΚΗ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ

Στους 72 °C για 10 λεπτά

Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης και υποκλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα.

Σε έναν κύκλο πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε παραλλαγή της Touchdown PCR οι συνθήκες της οποίας φαίνονται παρακάτω:

A) ΑΡΧΙΚΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ

Στους 95 °C για 2 λεπτά

B) ΚΥΚΛΟΣ

<i>Αποδιάταξη στους 95 °C για 2 λεπτά</i>	}	30 κύκλοι
<i>Υβριδισμός εκκινητών στους 40 °C για 2 λεπτά</i>		
<i>Επιμήκυνση στους 72 °C για 2 λεπτά</i>		
<i>Αποδιάταξη στους 95 °C για 2 λεπτά</i>	}	10 κύκλοι
<i>Υβριδισμός εκκινητών στους 45 °C για 2 λεπτά</i>		
<i>Επιμήκυνση στους 72 °C για 2 λεπτά</i>		
<i>Αποδιάταξη στους 95 °C για 2 λεπτά</i>	}	10 κύκλοι
<i>Υβριδισμός εκκινητών στους 50 °C για 2 λεπτά</i>		
<i>Επιμήκυνση στους 72 °C για 2 λεπτά</i>		

Γ) ΤΕΛΙΚΗ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ

Στους 72 °C για 10 λεπτά

2.2.14. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ DNA ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

Οι προσδιορισμοί της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων, πραγματοποιήθηκαν από την εταιρεία MWG-Biotech AG (Γερμανία) και από την εταιρεία Invitrogen (Ελλάδα). Η μετάφραση των γονιδίων έγινε με τη χρήση του προγράμματος Translate (<http://web.expasy.org/translate/>) διαθέσιμο από το διακομιστή μοριακής βιολογίας ExPASy (<http://au.expasy.org/>).

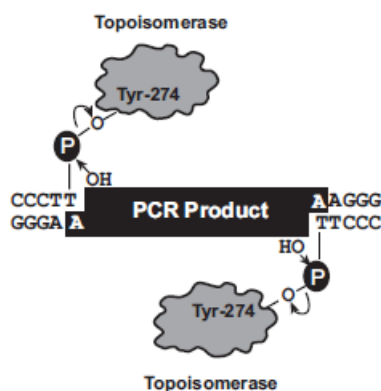
2.2.15. ΕΝΩΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΣΤΟΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ pEXP5-CT/TOPO® ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E. coli* TOP10

Η αντίδραση ένωσης (ligation) των προϊόντων PCR, στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO® και ο μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων *E. coli* TOP10 με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια, πραγματοποιήθηκε με την τεχνολογία του TOPO®

Cloning όπως περιγράφεται στο βιβλίο οδηγιών pEXP5-CT/TOPO[®]TA Kit (Invitrogen, USA).

Τα στάδια που ακολουθήθηκαν κατά την αντίδραση ένωσης των προϊόντων PCR στο φορέα pEXP5-CT/TOPO[®] έχουν ως εξής:

- Προσθήκη καταλοίπων αδενίνης (A) στο 3'-άκρο του PCR προϊόντος, προκειμένου να γίνει η πρόσδεση του PCR προϊόντος στον πλασμιδιακό φορέα. Για την προσθήκη αυτή αναμιγνύονται 50 μ L PCR προϊόντος με 2 U Ταq πολυμεράσης. Το μίγμα επωάζεται στους 72 $^{\circ}$ C για 10 λεπτά.

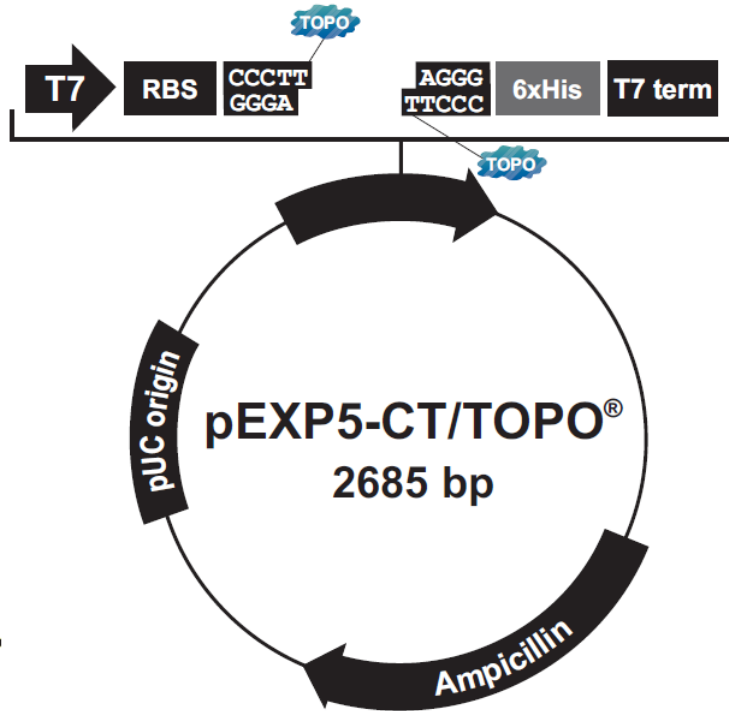


Σχήμα 2.1. Τρόπος πρόσδεσης του PCR προϊόντος στον πλασμιδιακό φορέα.

- Στη συνέχεια ακολουθεί η αντίδραση κλωνοποίησης του PCR προϊόντος στον πλασμιδιακό φορέα (TOPO Cloning Reaction) όπου αναμιγνύονται:
 - ✓ 1-4 μ L προϊόντος
 - ✓ 1 μ L φορέα pEXP5-CT/TOPO[®]
 - ✓ 1 μ L διαλύματος αλάτων (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂)
 - ✓ Δις-απιονισμένο αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικό όγκο αντίδρασης 6 μ L.

Κατόπιν πολύ ήπιας ανάδευση, το μίγμα επωάζεται για 5-30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (22-23 $^{\circ}$ C) και έπειτα τοποθετείται τον πάγο. Στη συνέχεια ακολουθεί μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων *E. coli* TOP10. Όλη η ποσότητα της αντίδρασης προστίθεται σε 50 μ L δεκτικών κυττάρων και αναμιγνύονται καλά με ήπιο τρόπο, στη συνέχεια το μίγμα τοποθετείται στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολουθεί θερμικό σοκ των κυττάρων, με επώαση στους 42 $^{\circ}$ C για 30 δευτερόλεπτα. Κατόπιν μεταφέρονται άμεσα στον πάγο για μικρό χρονικό διάστημα (3-5 λεπτά). Ακολούθως

προστίθενται 250 μL θρεπτικού μέσου SOC και αφού αναμιχθεί καλά το δείγμα, επωάζεται στους 37 $^{\circ}\text{C}$ για 1 ώρα. Έπειτα ποσότητα 100-200 μL επιστρώνεται σε τριβλύο με θρεπτικό μέσο LB, το οποίο περιέχει ως μέσο επιλογής το αντιβιοτικό αμπικιλίνη και επωάζεται στους 37 $^{\circ}\text{C}$ για 12-16 ώρες.



Σχήμα 2.2. Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα pEXP5-CT/TOPO[®].

2.2.16. ΜΕΘΟΔΟΣ ΛΟΓΙΚΟΥ ΕΝΖΥΜΙΚΟΥ ΑΝΑΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ

Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόστηκε για σημειακή μεταβολή ισοενζύμου, με σκοπό τη βελτίωση της ενζυμικής εκλεκτικότητας, ως προς φυτοπροστατευτικά προϊόντα (αναλυτικότερα στο Κεφάλαιο 5).

2.2.17. ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΕΞΕΛΙΞΕΩΣ

Για τη κατευθυνόμενη ενζυμική εξέλιξη επιλέχθηκε η τεχνική ανασυναρμολόγησης DNA (DNA shuffling), (Αναλυτικότερα στο Κεφάλαιο 5).

2.2.18. ΕΤΕΡΟΛΟΓΟΣ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ GST ΣΕ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E. coli*

Τα ισοένζυμα GST εκφράστηκαν σε διάφορα στελέχη κυττάρων *E. coli*, με θρεπτικό μέσο LB και το αντιβιοτικό επιλογής (κυρίως αμπικιλίνη). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής: σε κωνική φιάλη που περιέχει 450 mL με θρεπτικό μέσο, εμβολιάζονται 50 mL ολονύκτιας καλλιέργειας (12-16 ώρες) κατάλληλα μετασχηματισμένων κυττάρων. Η καλλιέργεια επώαζεται στους 37 °C σε περιστροφικό αναδευτήρα (200-220 rpm), μέχρι η απορρόφηση του δείγματος στα 600 nm να φτάσει 0,5-0,6, όπου και προστίθεται IPTG (λειτουργεί ως επαγωγέας) σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Έπειτα ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 4 ώρες και φυγοκέντριση στις 8000 rpm στους 4°C για 20 λεπτά, ώστε να συλλεχθούν τα κύτταρα και να φυλαχθούν στους -20°C, μέχρι να ξαναχρησιμοποιηθούν.

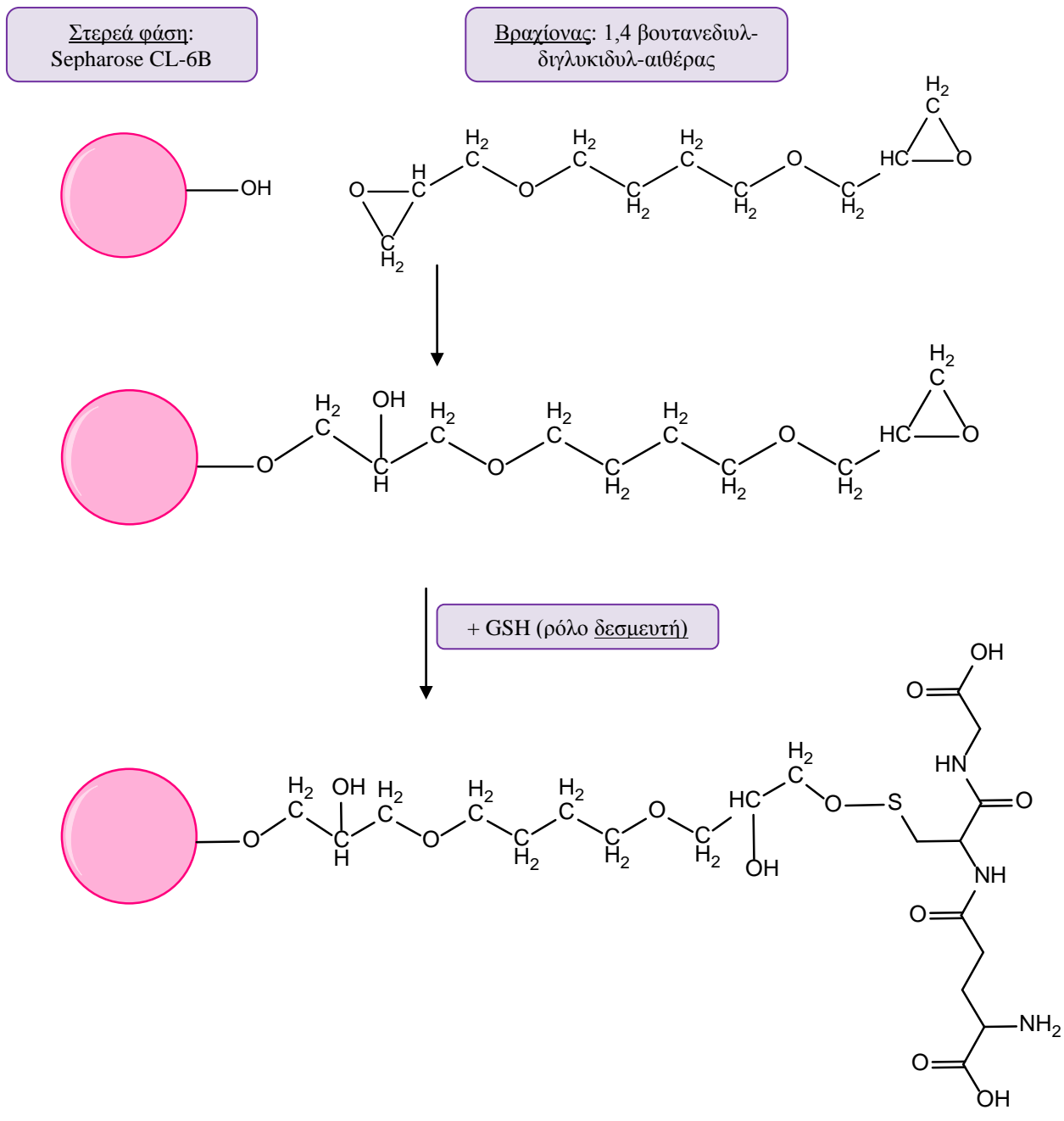
2.2.19. ΛΥΣΙΜΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ

Τα κύτταρα (έστω 1 g) επαναιωρούνται σε τριπλάσιο όγκο διαλύματος εξισορρόπησης, που χρησιμοποιείται στη κάθε χρωματογραφία, συνήθως ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM KH_2PO_4 pH=7. Στη συνέχεια η λύση των κυττάρων, πραγματοποιείται με επίδραση υπερήχων τρεις με τέσσερις φορές για 10 δευτερόλεπτα κάθε φορά. Η διαδικασία πραγματοποιείται στους 4 °C. Το τελικό αιώρημα φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 5 λεπτά και συλλέγεται το υπερκείμενο, για περαιτέρω επεξεργασία.

2.2.20. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ 1,4-ΒΟΥΤΑΝΕΔΙΥΛ-ΔΙΓΛΥΚΙΔΥΛ-ΑΙΘΕΡΑ-GSH-SEPHAROSE-CL6B (BES-GSH)

Σφαιρίδια αγαρόζης (Sepharese-CL6B) (περίπου 15 g) αφού πλυθούν με 200 mL ddH₂O, κάνοντας διήθηση σε ηθμό με αντλία κενού, τοποθετούνται σε falcon όπου και προστίθενται 19 mL νερού και 1,2 mL NaOH 10 M, προκειμένου να ενεργοποιηθεί η αγαρόζη. Το αιώρημα αφήνεται για 2 ώρες υπό ήπια ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C).

Στην ενεργοποιημένη πλέον αγαρόζη, προστίθενται 3 mL 1,4-βουτανεδιυλ-διγλυκιδυλ-αιθέρα. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 2 ώρες υπό συνεχή ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε γυάλινο μπουκαλάκι, για να αποφευχθεί η υδρόλυση του αιθέρα. Ακολούθως το αιώρημα διηθείται και πλένεται με ddH₂O. Έπειτα η αγαρόζη προστίθεται σε διάλυμα GSH (300 μmol, ο προσροφητής έχει υποκατάσταση 20 μmol GSH/g αγαρόζης), το οποίο είναι διαλυμένο σε 1 M ρυθμιστικό διάλυμα Na₂HPO₄ pH=8 (40 mL). Η αντίδραση αφήνεται να πραγματοποιηθεί για 42 ώρες, υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Ακολουθεί διήθηση και πλύσιμο με δεκαπλάσιο όγκο δια-απιονισμένου νερού. Η αποθήκευση γίνεται στους 4°C, σε υδατικό διάλυμα 20% αιθανόλης.



Σχήμα 2.3. Δημιουργία του προσροφητή συγγένειας 1,4-βουτανεδυλ-διγλυκιδυλ-αιθέρα-GSH-sepharose-CL-6B (BES-GSH) με εποξειδική ενεργοποίηση της στερεάς φάσης.

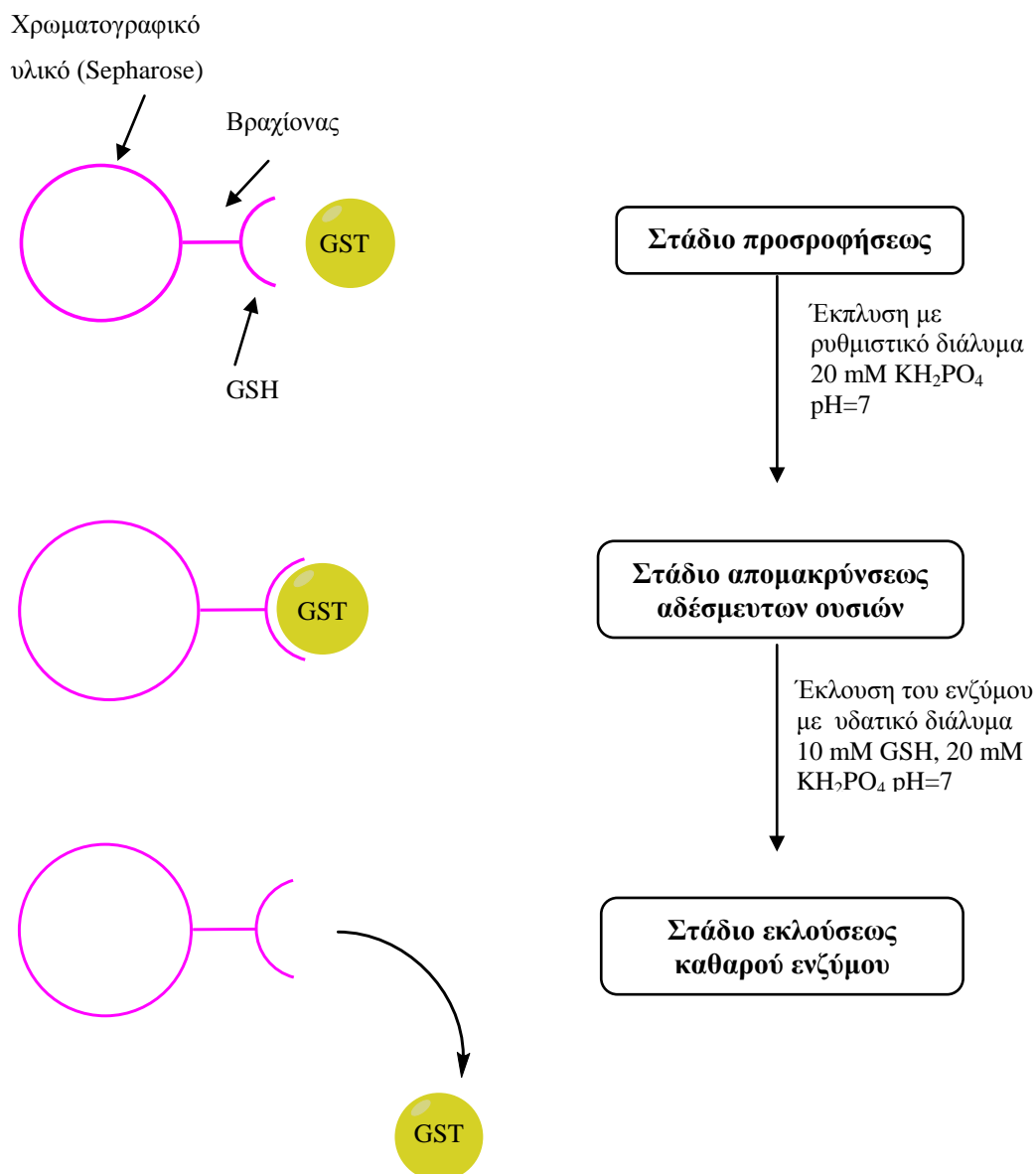
2.2.21. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ GSTS ΜΕΣΩ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΩΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ BES-GSH

Για τον καθαρισμό κάποιων GST ενζύμων χρησιμοποιήθηκε η στήλη χρωματογραφίας συγγένειας, με προσροφητή συγγένειας τον BES-GSH. Η

διαδικασία απεικονίζεται στο Σχήμα 2.4. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για όλους τους καθαρισμούς με χρωματογραφία συγγένειας είναι η παρακάτω:

Ο προσροφητής συγγένειας εγκιβωτίζεται σε χρωματογραφική στήλη (1 mL) και εξισορροπείται με το ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης 20 mM KH_2PO_4 pH=7 (10 mL) στους 4°C . Στη συνέχεια η στήλη φορτώνεται με το βιολογικό υλικό (το οποίο δεν είναι άλλο από την πάστα κυττάρων διαλυμένη σε διάλυμα εξισορρόπησης, § 2.2.19.) που περιέχει και το ένζυμο-στόχο, για το οποίο θα πρέπει να είναι γνωστή η ειδική δραστηριότητα του. Λόγω της συγγένειας του δεσμευτή και του ένζυμο-στόχου, το αντίστοιχο σύμπλοκο σχηματίζεται επί της στήλης. Η στήλη πλένεται με το διάλυμα εξισορρόπησης (20 mL), ώστε να απομακρυνθούν τα αδέσμευτα μόρια. Ακολούθως το προσροφημένο ένζυμο, αποδεσμεύεται (εκλύεται) με το ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης, το οποίο αποτελείται από 10 mM GSH διαλυμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης pH=7 και συναγωνίζεται το σύμπλοκο ένζυμο-δεσμευτή. Η έκλυση (10 mL) γίνεται σε διαφορετικές κλασματώσεις. Τέλος το χρωματογραφικό υλικό αναγεννάται με τα διαλύματα:

- 10 mL: 0,1 M Tris-Cl και 1 M NaCl pH=8,5
- 10 mL: 0,1 M CH_3COONa και 1 M NaCl pH=5,5
- 10 mL: H_2O



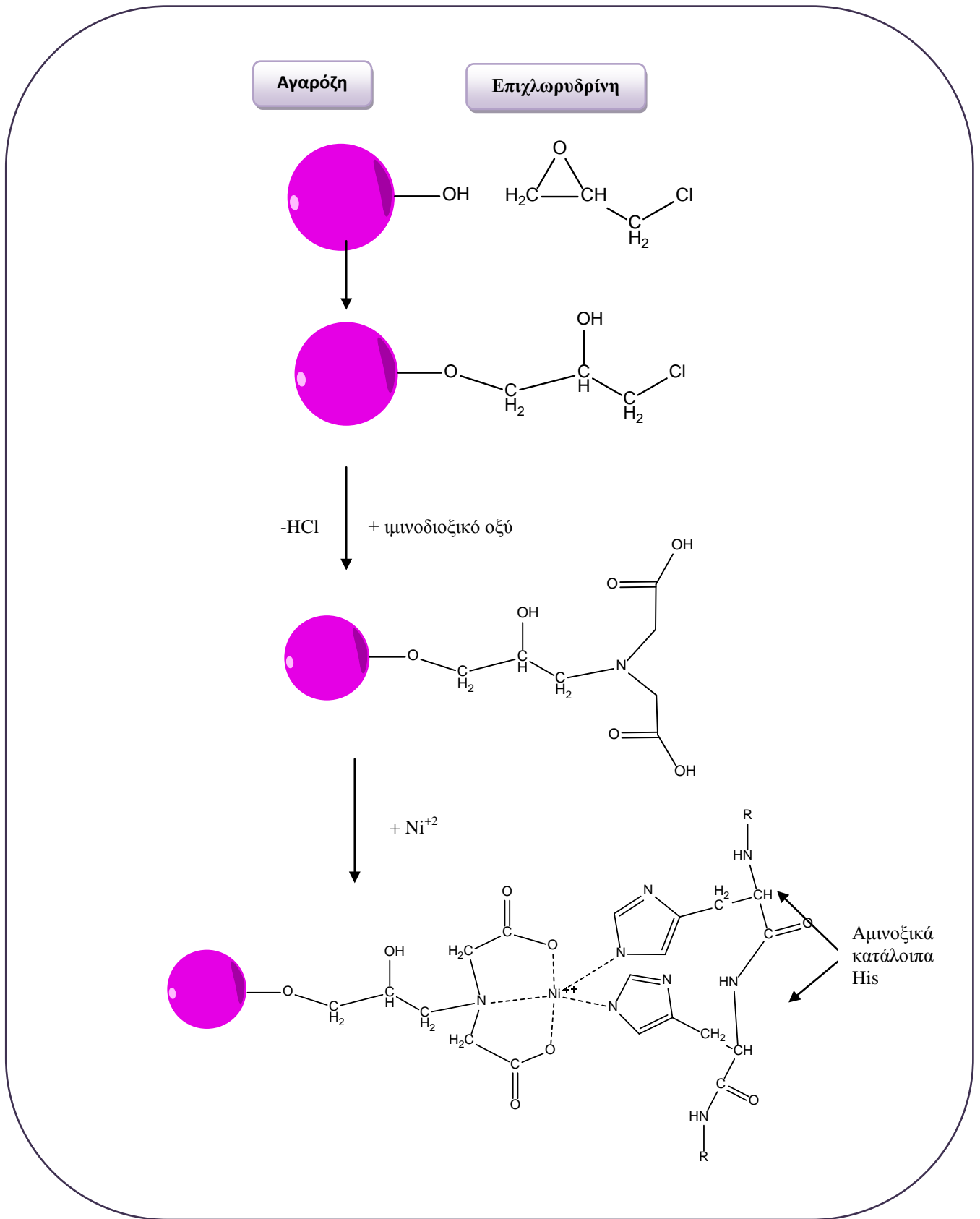
Σχήμα 2.4. Αρχή της χρωματογραφίας συγγένειας.

2.2.22. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΛΛΟΧΗΛΙΚΟΥ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΜΕ ΕΠΙΧΛΩΡΥΔΡΙΝΗ

Σφαιρίδια αγαρόζης (Sepharose-CL6B) (περίπου 10 g), αφού πλυθούν με 100 mL ddH₂O, κάνουντας διήθηση σε ηθμό με αντλία κενού, ζυγίζονται και τοποθετούνται σε falcon όπου και προστίθενται η αντίστοιχη ποσότητα σε mL 1 M NaOH. Το αιώρημα αφήνεται για 24 ώρες, υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C), προκειμένου να ενεργοποιηθεί η αγαρόζη.

Στην ενεργοποιημένη πλέον αγαρόζη, προστίθενται 1 mL επιγλωρυδίνης και ακολουθεί ήπια κυκλική ανάδευση για 6 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Μετά το πέρας της αντίδρασης, το αιώρημα διηθείται και ξεπλένεται με νερό και μεταφέρεται σε γυάλινο μπουκαλάκι.

Ακολούθως προστίθεται 1 g ιμινοδιοξικό οξύ (IDA), διαλυμένο σε ελάχιστο όγκο (~3 mL) ρυθμιστικού διαλύματος NaHCO_3 0,1 M pH=9. Η αγαρόζη με το ιμινοδιοξικό οξύ, αφήνεται υπό συνεχή κυκλική ανάδευση για 42 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Ακολουθεί διήθηση και πλύσιμο με δεκαπλάσιο όγκο δις-απιονισμένου νερού. Η αποθήκευση γίνεται στους 4°C, σε υδατικό διάλυμα 20% αιθανόλης.



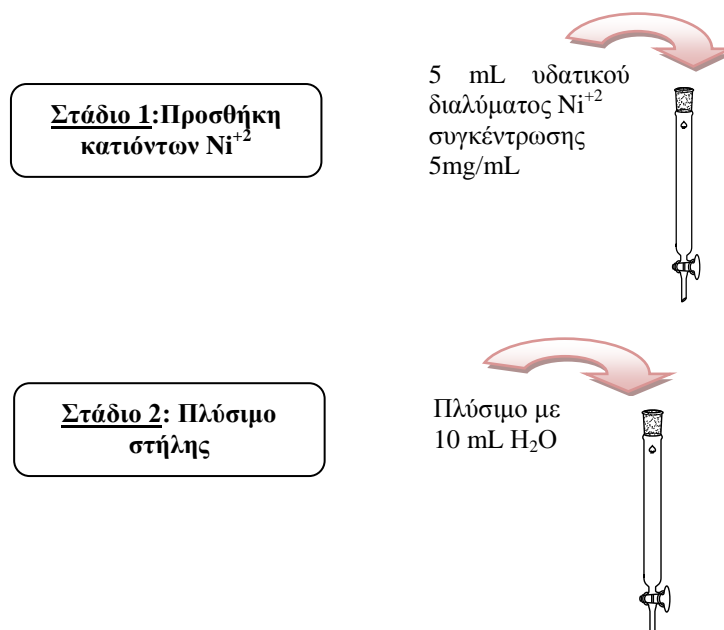
Σχήμα 2.5. Δημιουργία του προσροφητή μεταλλοχηλική συγγένειας με επιχλωρυδρίνη και μινοδιοξικό οξύ, με εποξειδική ενεργοποίηση της στερεάς φάσης.

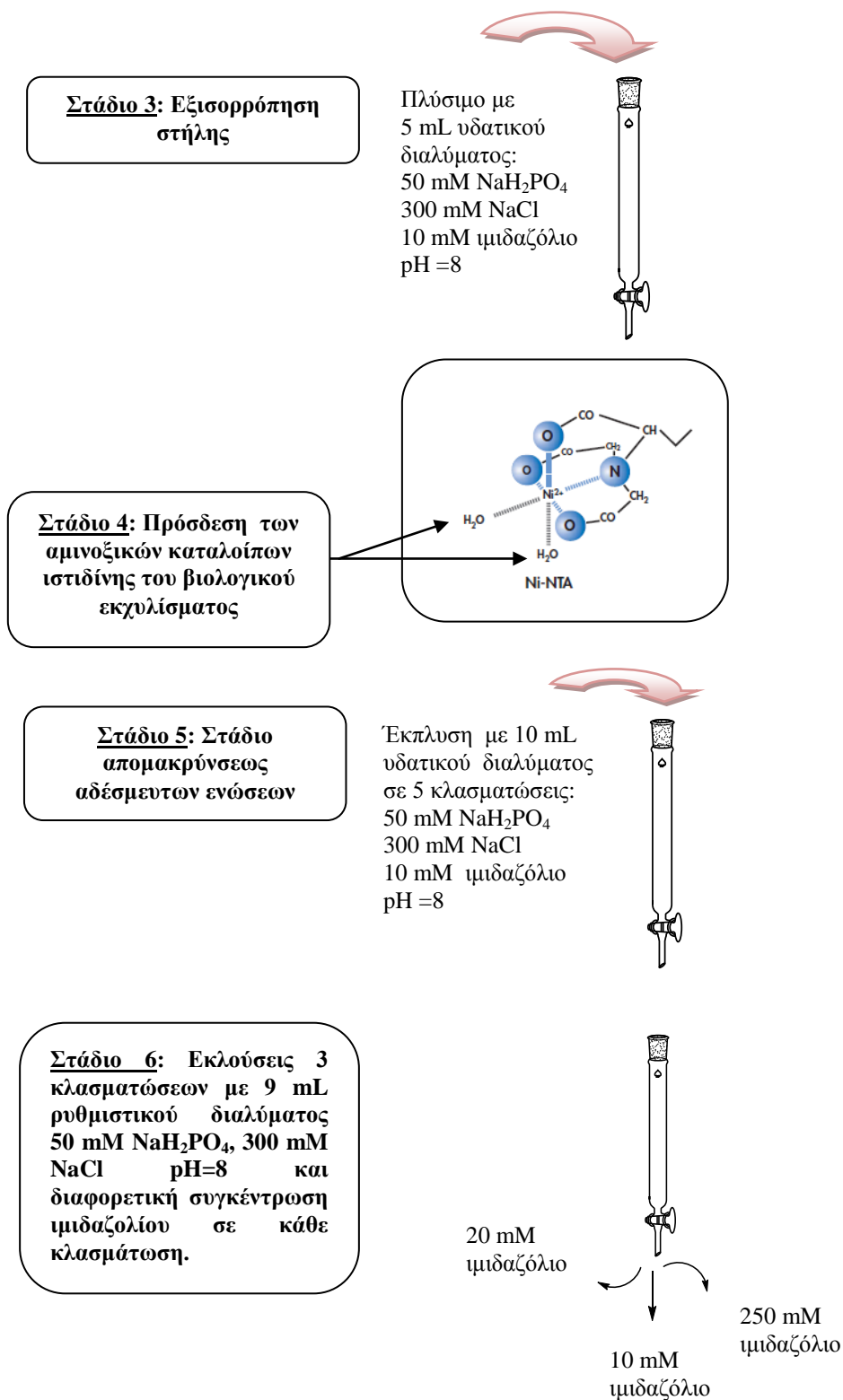
2.2.23. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ GSTS ΜΕΣΩ ΜΕΤΑΛΛΟΧΗΛΙΚΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΩΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ Ni-IDA

Στη παρούσα διατριβή τα ισοένζυμα GSTs τα οποία ήταν υποκλωνοποιημένα σε πλασμίδιο pQE (Qiagen), διέθεταν στο τελικό άκρο έξι ιστιδίνες 6His-tag και καθαρίστηκαν με μεταλλοχημική χρωματογραφία, λόγω της ικανότητας της ιστιδίνης να δρα ως δότης ηλεκτρονίων προς το μεταλλοϊόν-δέκτη ηλεκτρονίων, το Ni^{+2} . Στη συγκεκριμένη χρωματογραφία, ακινητοποιούνται ιόντα Ni^{+2} σε ρητίνη σχηματίζοντας χηλικό σύμπλοκο με τη χηλοποιητική ένωση, το ιμινοδιοξικό οξύ. Η συγκεκριμένη ένωση συγκρατεί ισχυρά το μεταλλοϊόν, μέσω δεσμών συναρμογής που μετέχουν τα καρβοξυλικά οξυγόνα και το άζωτο, ενώ οι υπόλοιπες θέσεις του μεταλλοκατιόντος καταλαμβάνονται προσωρινά από μόρια νερού (Κλώνης, 2007).

Τα αμινοξικά κατάλοιπα της ιστιδίνης αλληλεπιδρούν με τις θέσεις εκείνες του μεταλλοκατιόντος που καταλαμβάνονται από μόρια νερού και έτσι προσροφάται το ένζυμο. Η έκλυση του κάθε ενζύμου αυτής της διατριβής, το οποίο καθαρίστηκε με τέτοιου είδους χρωματογραφία, έγινε με το συναγωνιστικό για την ιστιδίνη παράγοντα, το ιμιδαζόλιο. Τέλος η αναγέννηση της στήλης γίνεται με 5mL 0,1 M EDTA και 10 mL νερού. Σε αυτή τη χρωματογραφία, η λύση των κυττάρων έγινε σε διάλυμα 50 mM NaH_2PO_4 , 300mM NaCl pH=8.

Στάδια μεταλλοχημικής χρωματογραφίας





Σχήμα 2.6. Απεικόνιση της διαδικασίας μεταλλοχημικής χρωματογραφίας.

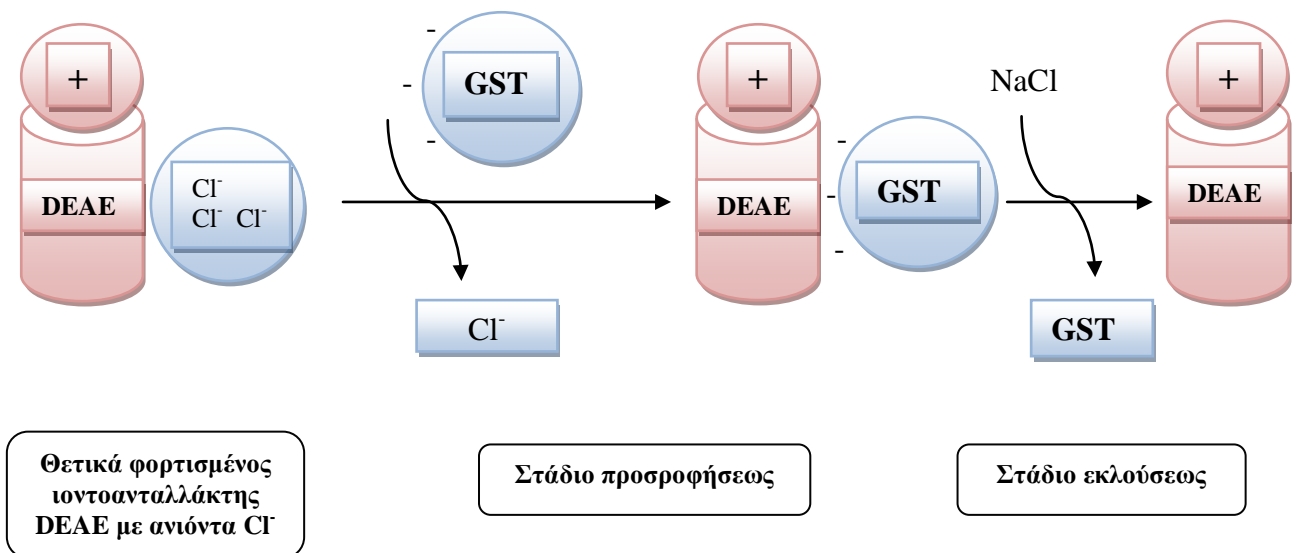
2.2.24. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ GSTS ΜΕΣΩ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΙΟΝΤΟΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΤΗ DEAE- SEPHAROSE CL6B

Η παρουσία φορτισμένων αμινοξικών καταλοίπων στην επιφάνεια κάθε πρωτεΐνης, καθιστά εφικτή την προσρόφηση της σε χρωματογραφικό υλικό με αντίθετα φορτία (ιοντοανταλλάκτης). Ο ιοντοανταλλάκτης φέρει είτε ανιοντικές καρβοξυλομάδες, είτε κατιοντικές τριτοταγείς αμινομάδες, οι οποίες είναι χημικά δεσμευμένες στο πολυμερές των χρωματογραφικών μικροσφαιριδίων (Κλώνης, 2007).

Για τον καθαρισμό κάποιων ισοενζύμων GST χρησιμοποιήθηκε ως χρωματογραφικό υλικό η σεφαρόζη, με θετικά φορτισμένο ιοντοανταλλάκτη, τη διαιθυλοαιθυλαμίνη (DEAE) $(\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{N}^+\text{H}$, pKa 9-9,5. Ο συγκεκριμένος ιοντοανταλλάκτης φαίνεται εξουδετερωμένος, καθώς φέρει αρνητικά φορτισμένα ιόντα Cl^- (αντισταθμιστικό ιόν). Περιοχές του ενζυμικού μορίου με αντίθετο φορτίο του ιοντοανταλλάκτη (αρνητικά φορτισμένες), συναγωνίζονται και απομακρύνουν το αντισταθμιστικό ιόν και τέλος προσδένεται το ένζυμο στη στήλη χρωματογραφίας.

Αρχικά ο προσροφητής πλένεται με 5 mL νερού και στη συνέχεια με 25 mL 200 mM KH_2PO_4 $\text{pH}=7,5$ (επιβεβαιώνεται το pH της στήλης με πεχαμετρικό χαρτί). Ακολουθεί εξισορρόπηση της στήλης με 40 mL 20 mM KH_2PO_4 $\text{pH}=7,5$ και φόρτωμα του βιολογικού εκχυλίσματος. Στη συνέχεια για την απομάκρυνση των αδέσμευτων ενώσεων, η χρωματογραφική στήλη πλένεται με 50 mL 20 mM KH_2PO_4 $\text{pH}=7,5$. Οι εκλούσεις του κάθε ενζύμου, γίνονται με μεταβολή της ιοντικής ισχύος, στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκαν, 5 κλασματώσεις των 4 mL με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (50-500 mM). Τέλος το χρωματογραφικό υλικό αναγεννάται με τα εξής διαλύματα:

- 10 mL: 0,1 M Tris-Cl και 1 M NaCl $\text{pH}=8,5$
- 10 mL: 0,1 M CH_3COONa και 1 M NaCl $\text{pH}=5,5$
- 10 mL: H_2O



Σχήμα 2.7. Αναπαριστάται η αρχή λειτουργίας της χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής, στο πλαίσιο των πειραμάτων αυτής της διδακτορικής διατριβής.

2.2.25. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD (1976)

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, να αλλάζει χρώμα όταν αυτή αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον. Η ελεύθερη κατιοντική χρωστική έχει χρώμα καστανό και απορροφά στα 465, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνη-χρωστική (ανιοντική) είναι γαλάζιο και απορροφά στα 595 nm (Kruger, 1994). Η μέθοδος είναι αξιόπιστη για πρωτεϊνικά δείγματα, των οποίων η συγκέντρωση κυμαίνεται από 0,04 mg/mL έως 0,20 mg/mL. Χρησιμοποιείται ευρέως γιατί είναι ευαίσθητη, γρήγορη και σχετικά ακριβής.

Η χρωστική (100 mg) διαλύεται σε 100 mL υδατικού διαλύματος μεθανόλης 50% (v/v) και στη συνέχεια προστίθενται 100 mL πυκνού φωσφορικού οξέος (85% w/v). Το μίγμα μεταφέρεται σε σκοτεινό δοχείο και ακολουθεί απαέρωση για 20 min σε υπέρηχους. Το διάλυμα αυτό αποτελεί το πυκνό αντιδραστήριο Bradford, το οποίο φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος. Για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης το αντιδραστήριο Bradford αραιώνεται με νερό σε αναλογία 1/4 και το διάλυμα που προκύπτει μπορεί να διατηρηθεί σε σκοτεινό δοχείο σε θερμοκρασία δωματίου 25 °C για 24 ώρες.

Κάθε φορά που θέλουμε να προσδιορίσουμε την πρωτεΐνη σε ένα άγνωστο δείγμα, με το ίδιο διάλυμα του αντιδραστήριου Bradford που θα γίνει ο προσδιορισμός κάνουμε και μια πρότυπη καμπύλη με αλβουμίνη από ορό μόσχου (BSA) γνωστής συγκέντρωσης. Το στοκ της BSA που χρησιμοποιούμε είναι τα 0,2 mg/mL και θεωρούμε τελικό όγκο αντίδρασης τα 50 mL. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι συγκεντρώσεις της BSA και οι όγκοι των αντιδραστηρίων.

Πίνακας 2.3. Όγκοι και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο Bradford.

Μετρήσεις	Αντιδραστήριο Bradford (μL)	BSA (mg/mL)	H ₂ O (μL)	
1	950	0	50	Μάρτυρας
2	950	0,04 (10 μL)	40	
3	950	0,08 (20 μL)	30	
4	950	0,12 (30 μL)	20	
5	950	0,16 (40 μL)	10	
6	950	0,20 (50 μL)	0	
7	950	x	50-x	Άγνωστο δείγμα

Το μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου 25 °C για 20 λεπτά και ακολούθως λαμβάνεται η απορρόφηση στα 595 nm, μηδενίζοντας με το μάρτυρα. Η απορρόφηση ανάγεται σε συγκέντρωση πρωτεΐνης σύμφωνα με το νόμο του Beer-Lambert και τον τύπο:

$$A = c \cdot \epsilon \cdot d$$

όπου A: απορρόφηση

c: συγκέντρωση (mg/mL)

ε: συντελεστής μοριακής απόσβεσης (υπολογίζεται

από τη πρότυπη καμπύλη αναφοράς και είναι η κλίση της ευθείας)

d: μήκος κυψελίδας 1 cm

2.2.26. ΔΙΑΠΙΔΥΣΗ

Το κυτταρικό εκχύλισμα πριν τον καθαρισμό υποβάλλεται σε διαπίδυση, ως μορφή χαμηλού καθαρισμού σε ρυθμιστικό διάλυμα (~3-4 λίτρα) κατάλληλης συγκέντρωσης

και pH, προκειμένου να αποκτήσουν την ίδια σύσταση με το ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης της χρωματογραφίας. Για τη διαπίδυση χρησιμοποιείται ημιπερατή μεμβράνη κυτταρίνης, με όριο αποκλεισμού 12 kDa της εταιρείας Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.). Η διαδικασία διαρκεί 18-24 ώρες και πραγματοποιείται στους 4 °C.

2.2.27. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΕΤΟΥΣΙΩΣΗΣ

Τα πρωτεϊνικά δείγματα, τα οποία είχαν χαμηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης συμπυκνώνονταν είτε με λυοφιλίωση είτε με κατακρήμνιση με τριχλωρικό οξύ TCA (§ 2.2.29). Επίσης τα δείγματα που είχαν αυξημένη αλατότητα υποβάλλονταν σε διαπίδυση με ρυθμιστικό διάλυμα 25 mM Tris-Cl pH= 6,8, όγκου ίσου του πρωτεϊνικού δείγματος x 1000 για 20 ώρες.

Μετά από αυτές τις προεργασίες εφόσον κρίνονται απαραίτητες, σε κάθε δείγμα προστίθενται 15-20 μL ρυθμιστικού διαλύματος μετουσίωσης και ακολουθεί θέρμανση στους 95 °C για 5 λεπτά. Σε κάθε δείγμα 15-20 μL θα πρέπει να υπάρχουν 30-50 μg πρωτεΐνης.

2.2.28. ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΤΡΙΧΛΩΡΟΑΚΕΤΙΚΟ ΟΞΥ (TCA)

Για την κατακρήμνιση δειγμάτων χαμηλής συγκέντρωσης πρωτεΐνης, με τριχλωρικό οξύ (TCA) ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία (Louis Sanchez, 2001):

- ✓ Προσθήκη υποτετραπλάσιου όγκου TCA (100% v/v) από τον όγκο κάθε έκλουσης και παραμονή τους στον πάγο για 20 λεπτά
- ✓ Φυγοκέντριση στις 13.000 rpm για 9 λεπτά
- ✓ Απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 150 μL «παγωμένης» ακετόνης
- ✓ Φυγοκέντριση στις 13.000 rpm για 8 λεπτά
- ✓ Απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 150 μL «παγωμένης» ακετόνης
- ✓ Φυγοκέντριση στις 13.000 rpm για 8 λεπτά

- ✓ Τοποθέτηση του δείγματος στους 95 °C για 5-8 λεπτά ώστε να εξατμιστεί η ακετόνη.

2.2.29. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΕΤΟΥΣΙΩΣΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΔΩΔΕΚΑΝΟΘΕΪΚΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ (SDS)

Η ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης SDS, έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970), σε ασυνεχές σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων. Στην εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκε πηκτή διαχωρισμού και επιστοιβάξης περιεκτικότητας ακρυλαμιδίου 12,5% και 4,5 %, αντίστοιχα.

Η διαδικασία παρασκευής της πηκτής διαχωρισμού είναι η ακόλουθη: ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (0,875 mL) (§ 2.1.2.4.) αναμιγνύεται με διάλυμα SDS (0,07 mL) και διάλυμα ακρυλαμιδίου (2,94 mL) και αραιώνεται με προσθήκη νερού (2,94 mL). Στη συνέχεια ακολουθεί απαέρωση ~ 5 λεπτά και κατόπιν προστίθενται υπερθειικό αμμώνιο (0,160 mL) και TEMED (6,25 µL), το μίγμα αναδεύεται ελαφρώς και εισάγεται άμεσα στο γυάλινο κάθετο καλούπι. Η επιφάνεια καλύπτεται με 1 mL νερό και το μίγμα πολυμερίζεται μέσα σε χρονικό διάστημα ~ 30 λεπτών (25 °C). Αφού περάσει ο χρόνος αυτός αφαιρούμε το επιφανειακό νερό, ώστε να προστεθεί το μίγμα για την πηκτή επιστοιβάξης. Η πηκτή αυτή παρασκευάζεται ως εξής: ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοιβάξης (0,625 mL) (§ 2.1.2.4.) αναμιγνύεται με διάλυμα SDS (0,05 mL) και διάλυμα ακρυλαμιδίου (0,625 mL) και αραιώνεται με προσθήκη νερού (3,45 mL). Στη συνέχεια αφού έχει πραγματοποιηθεί απαέρωση προστίθενται υπερθειικό αμμώνιο (0,25 mL) και TEMED (6,25 µL) και το μίγμα αφού αναδευτεί ελαφρώς εισάγεται άμεσα στο γυάλινο κάθετο καλούπι. Κατόπιν τοποθετείται το ειδικό χτενάκι ώστε να δημιουργηθούν τα «πηγαδάκια», όπου και εισάγονται τα δείγματα. Ο πολυμερισμός ολοκληρώνεται σε ~30 λεπτά (25 °C). Στη συνέχεια προσθέτουμε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων 10x στη συσκευή, όπου και θα γίνει η ηλεκτροφόρηση συνδέουμε με το τροφοδοτικό για ~ 1 ½ ώρα σε ένταση 20 mA για κάθε πηκτή.

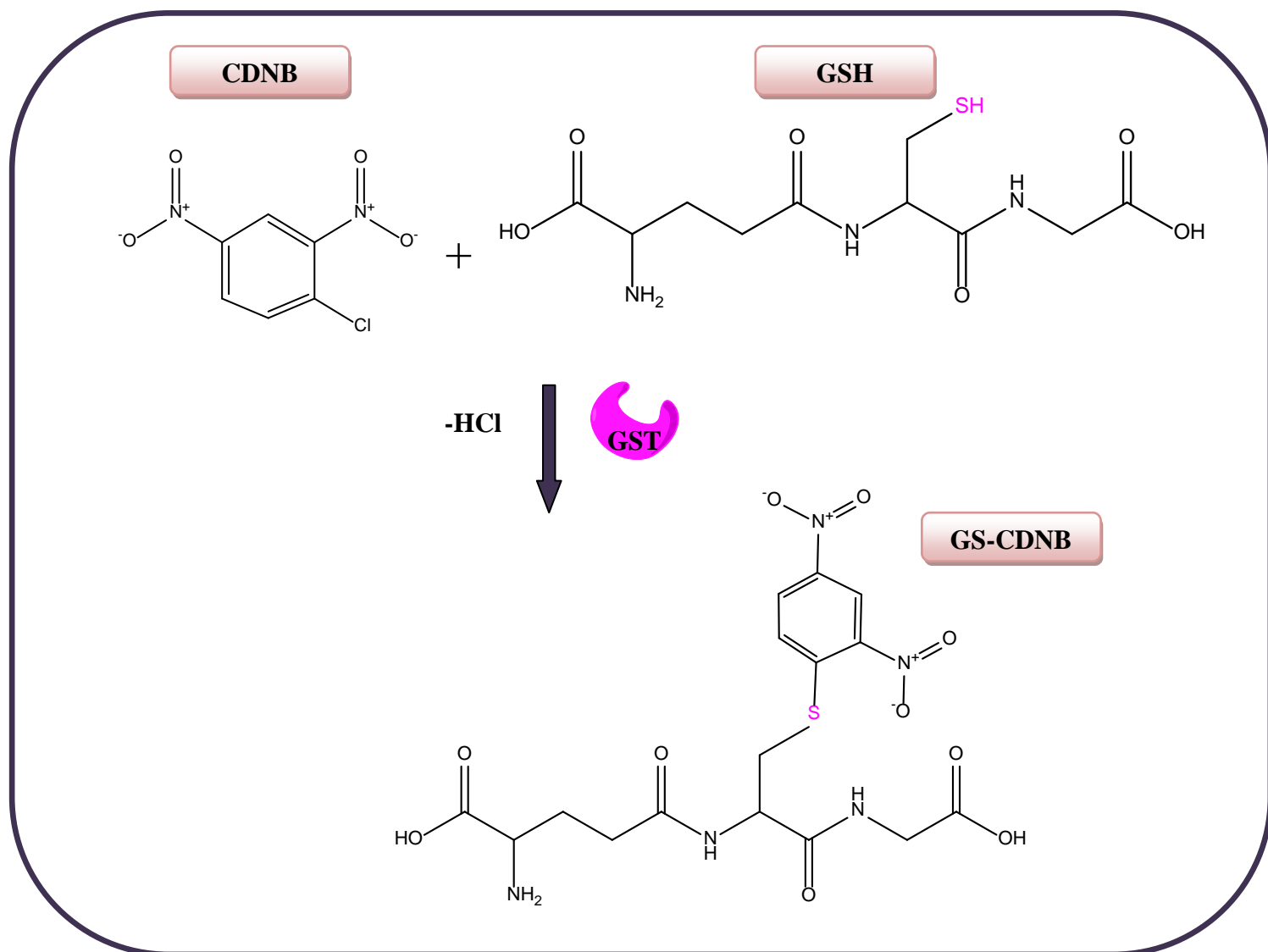
2.2.30. ΧΡΩΣΗ ΜΕ COOMASSIE BRILLIANT BLUE R-250

Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολουθεί εμβάπτιση της πηκτής σε υδατικό διάλυμα που περιέχει μεθανόλη (45% v/v), οξικό οξύ (7% v/v) και Coomassie Brilliant Blue R-250

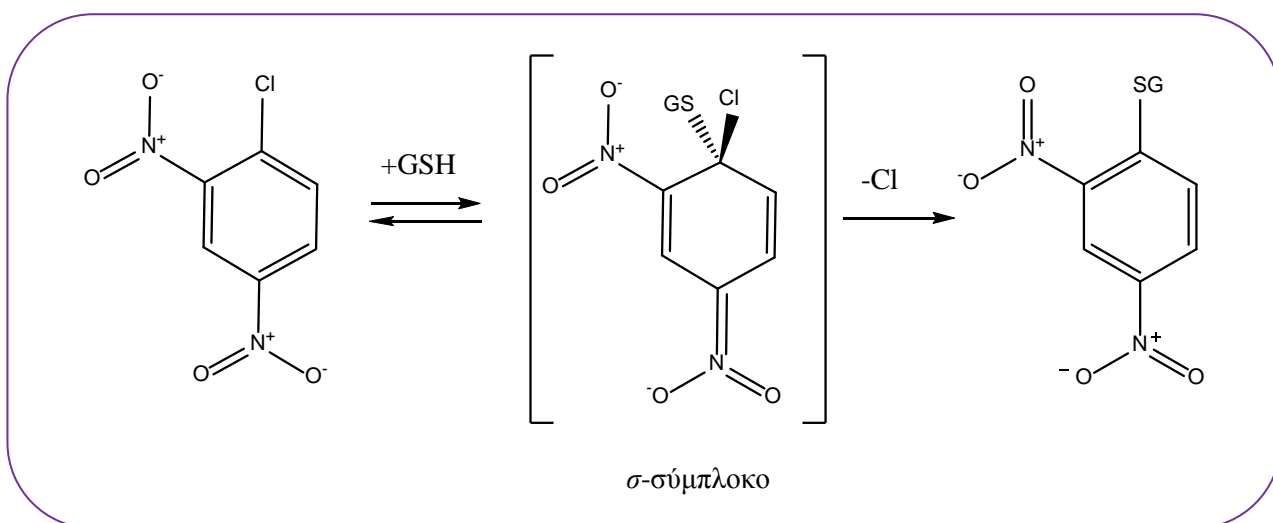
(0.25-1% w/v), όπου και επωάζεται για 30 λεπτά. Για τον αποχρωματισμό της πηκτής ακολουθεί εμβάπτιση αυτής στο υδατικό διάλυμα I, το οποίο περιέχει μεθανόλη (40% v/v), και οξικό οξύ (7% v/v) για 1 ώρα. Επαναλαμβάνεται η τελευταία διαδικασία και στο τέλος η πηκτή αποχρωματίζεται από το υδατικό διάλυμα II, το οποίο αποτελείται από μεθανόλη (5% v/v) και οξικό οξύ (7% v/v) μέσα στο οποίο και διατηρείται.

2.2.31. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ GST ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΩΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΝΙΤΡΟΒΕΝΖΟΛΙΟΥ CDNB, BDCB, IDNB, FDNB, PNBC ΚΑΙ NBD-Cl.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του ενζύμου γίνεται μέσω του προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας (δοκιμή, assay). Ως μονάδα μετρήσεως της ενζυμικής δραστηριότητας, έχει οριστεί η ενζυμική μονάδα (unit), η οποία ισούται με την ποσότητα ενζύμου που μετατρέπει 1 μmol του υποστρώματος (ή παράγει 1 μmol προϊόντος) ανά λεπτό, σε καθορισμένες πειραματικές συνθήκες. Η μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας της GST πρωτίτως, βασίζεται στον προσδιορισμό της ταχύτητας του σχηματισμού του συμπλόκου της γλουταθειόνης με το 1-χλώρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (GS-CDNB, Σχήμα 2.7) (Labrou et al., 2001).



Σχήμα 2.8. Ηλεκτρονιόφιλη υποκατάσταση του χλωρίου από την σουλφιδρυλομάδα της γλουταθειόνης και δημιουργία του συμπλόκου GS-CDNB.



Σχήμα 2.9. Σχηματισμός του ενδιάμεσου σ-σύνπλοκου κατά τη σύζευξη της GSH με το CDNB.

Η γενική αντίδραση την οποία ακολουθούν τα αλογωμένα νιτροβενζόλια 1-ιωδο-2,4-δινιτροβενζόλιο (IDNB), 1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο (FDNB), 1-βρωμο-2,4-δινιτροβενζόλιο (BDNB), π-νιτροβενζυλ-χλωρίδιο (PNBC) και 4-χλωρο-7-νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο (NBD-Cl) με τη γλουταθειόνη είναι η εξής:



Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηρότητας των υποστρωμάτων CDNB, IDNB, FDNB, BDNB χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο και οι μετρήσεις έγιναν για τα παραπάνω υποστρώματα στα 340 nm, όπου και απορροφά το σύνπλοκο σ. Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηρότητας με το υπόστρωμα PNBC και NBD-Cl οι μετρήσεις έγιναν στα 310 nm και 420 nm, αντίστοιχα. Οι δοκιμές έγιναν σύμφωνα με τις Skopelitou et al. 2011 και Axarli et al. 2009a.

Στην κυψελίδα εισάγεται διάλυμα τελικού όγκου 1 mL και περιέχει εκτός από το ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού οξέος (KH_2PO_4 0,1 M pH 6,5) τα εξής αντιδραστήρια: 2,5 mM GSH, 1 mM CDNB, FDNB, IDNB, BDNB και το προς προσδιορισμό ένζυμο, ενώ στο μάρτυρα απουσιάζει το ένζυμο. Για το υπόστρωμα PNBC (1 mM) η συγκέντρωση της γλουταθειόνης ανέρχεται στα 5 mM και το διάλυμα της αντίδρασης είναι 0,1 M KH_2PO_4 pH 6,5 - 1 mM EDTA ενώ για το

υπόστρωμα NBD-Cl (0,2 mM) η γλουταθειόνη απαντάται σε 0,5 mM και το διάλυμα της αντίδρασης είναι το 0,1 M CH₃COONa pH=5. Ως ενζυμική μονάδα GST λαμβάνεται το ποσό εκείνο του ενζύμου, που καταλύει την αντίδραση μετατροπής 1 μmol υποστρώματος σε σύμπλοκο με τη γλουταθειόνη, ανά min στους 37 °C. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ενζύμου γίνεται από την σχέση του νόμου Beer και Lambert:

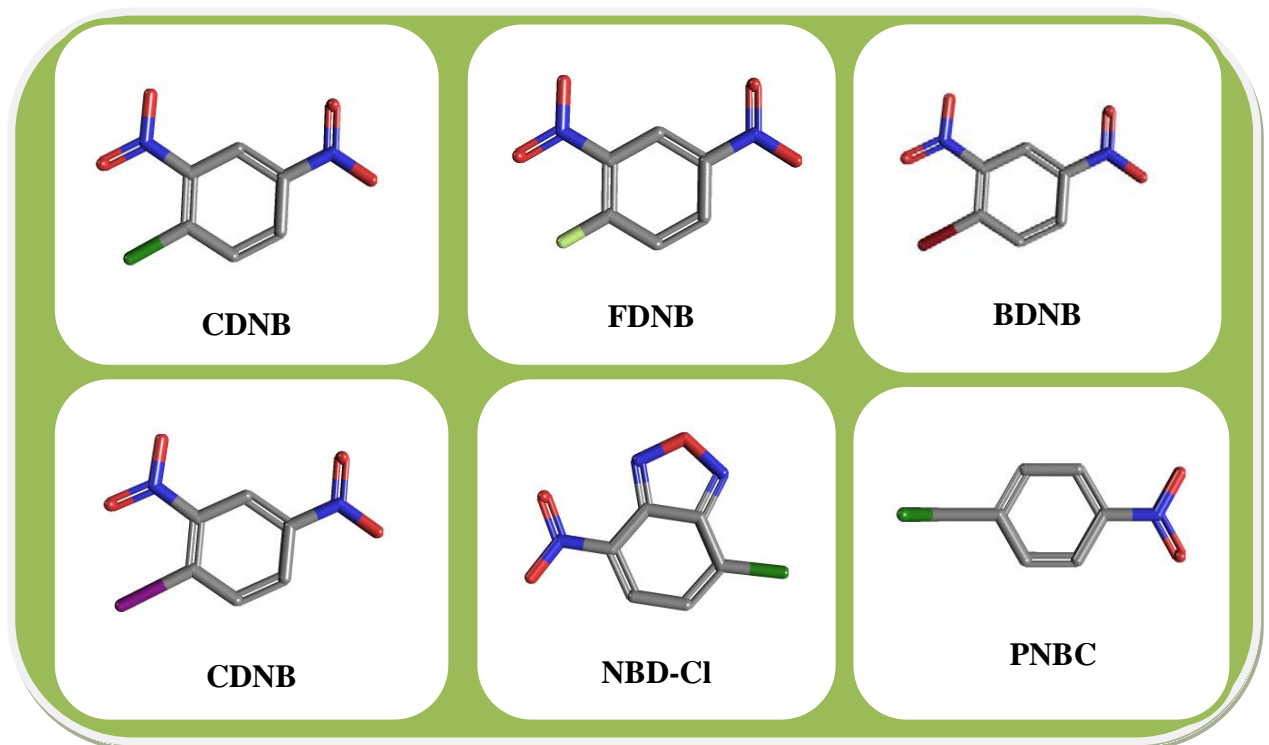
$$A=c \cdot \epsilon \cdot d \text{ όπου,}$$

A: απορρόφηση του φωτός

c: συγκέντρωση του ενζύμου (U/mL)

ε: συντελεστής μοριακής απόσβεσης (στα 340 nm= 9,6 L/mmol·cm και στα 310 nm=1,9 L/mmol·cm)

d: μήκος κυβελίδας 1cm

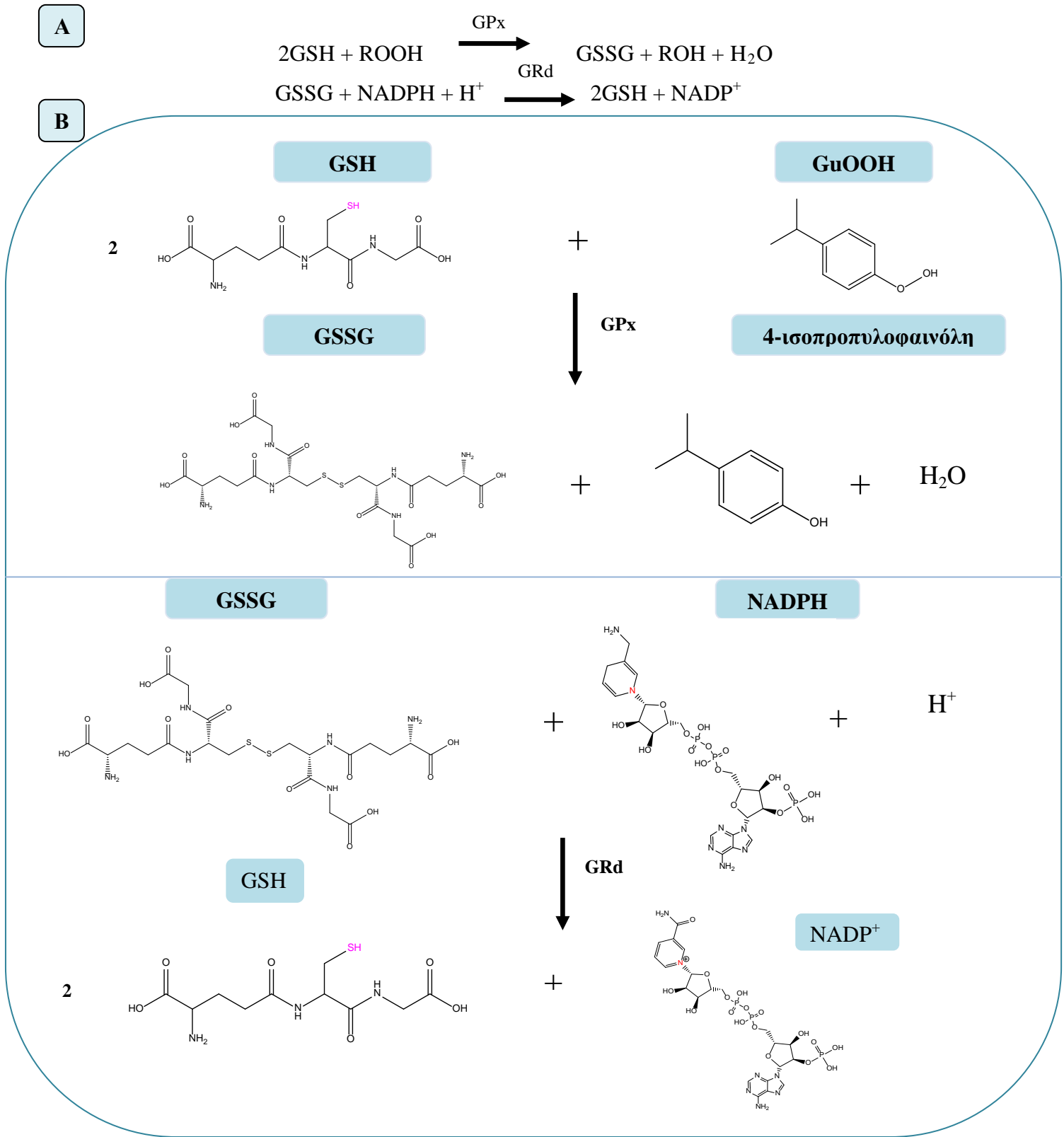


Σχήμα 2.10. Δομές των αλογωμένων νιτροβενζολίων (PubChem, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

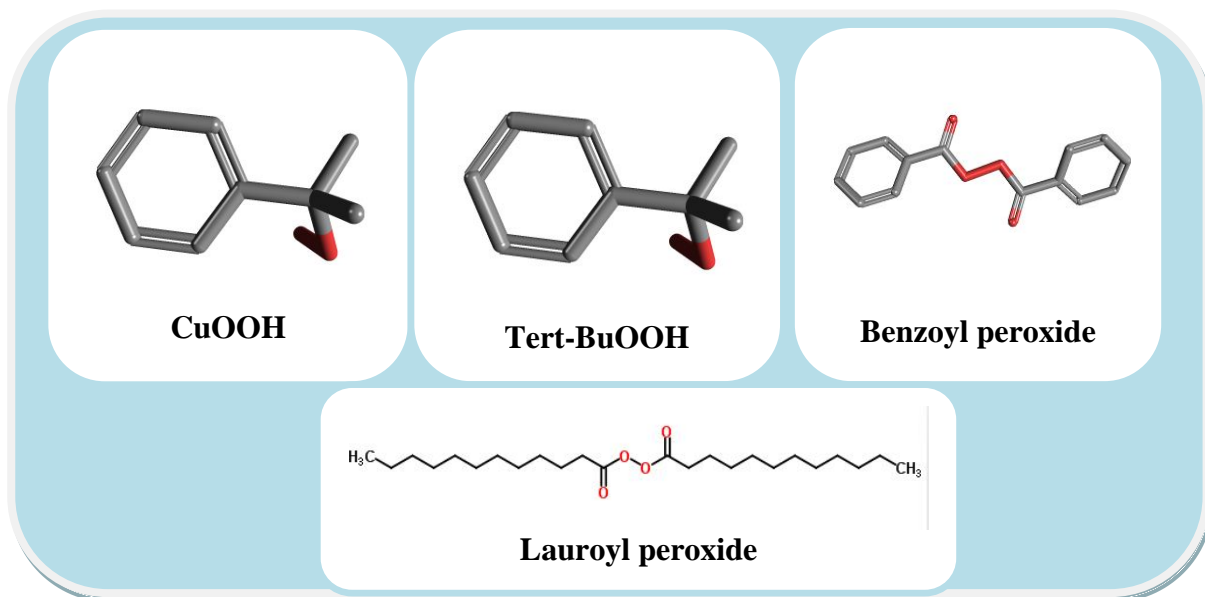
2.2.32. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ GST ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΩΣ ΠΙΘΑΝΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΤΟ ΥΔΡΟΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΚΟΥΜΕΝΙΟΥ, ΤΟ τ -ΒΟΥΤΥΛΟ-ΥΔΡΟΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ, ΤΟ ΔΙ-ΔΩΔΕΚΑΝΙΚΟ ΥΔΡΟΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ ΚΑΙ ΤΟ ΒΕΝΖΟΪΚΟ ΥΔΡΟΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας GST με το υδροϋπεροξείδιο του κουμενίου (CuOOH), το τ -βουτυλο-υδροϋπεροξείδιο (tert-BuOOH), το δι-δωδεκανικό υδροϋπεροξείδιο (Lauroyl peroxide) και το βενζοϊκό υδροϋπεροξείδιο (Benzoyl peroxide), πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον Tappel, 1978.

Η αντίδραση παρακολουθείται φωτομετρικά και προσδιορίζεται η ταχύτητα μετατροπής του NADPH σε NADP⁺, σε μήκος κύματος 340 nm και συντελεστή απόσβεσης $\epsilon = 6,22$ L/mmol·cm. Ο τελικός όγκος του διαλύματος προσδιορισμού ήταν 0,6 mL και περιείχε 1mM GSH, 0,2 mM NADPH, 1 U του ενζύμου ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (Sigma) και 1,5 mM αποστρώματος (CuOOH, tert-BuOOH κ.α.) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου με 0,1 M KH₂PO₄ - 1 mM EDTA pH=7,5. Στο Σχήμα 2.11.A φαίνεται η γενική αντίδραση και στο Σχήμα 2.11.B. η αντίδραση με το υδροϋπεροξείδιο του κουμενίου.

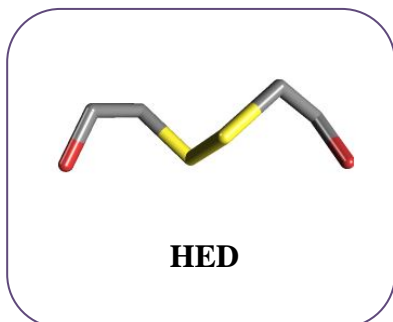


Σχήμα 2.11. Α. Γενική αντίδραση υπεροξειδίων με τη γλουταθειόνη. Β. Αντίδραση του υπεροξειδίου του κουμενίου με τη γλουταθειόνη. Οι δομές σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα ChemBio Draw Ultra, Perkin Elmer.

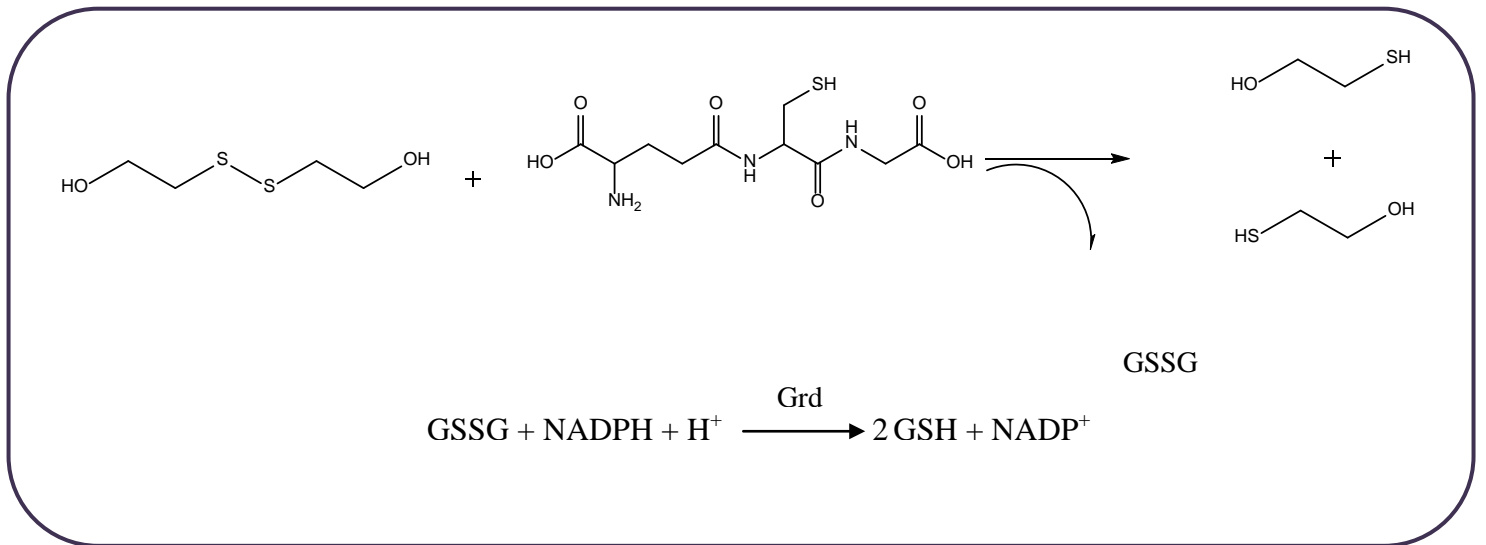


Σχήμα 2.12. Δομές των υπεροξειδίων (PubChem, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.chemspider.com/Search.aspx>).

2.2.33. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ GST ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ 2-2-ΔΙΘΕΙΟΔΙΑΙΘΑΝΟΛΗ (HED)

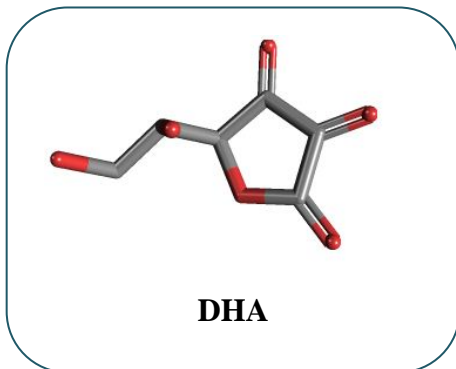


Η αντίδραση πραγματοποιείται με 0,5 mM GSH, 2 mM HED, 0,2 mM NADPH, 0,5 U ενζύμου ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης (Sigma) και την ποσότητα του ενζύμου σε διάλυμα 100 mM Tris-Cl, pH=7,8 τελικού όγκου 1 mL στους 37°C. Για τον έμμεσο ποσοτικό προσδιορισμό του ενζύμου υπολογίζεται το NADPH, μετρώντας τη μείωση της απορρόφησης στα 340 nm, έχοντας ως μοριακό συντελεστή απόσβεσης τη τιμή 6,22 L/mmol·cm (Wilson et al., 1989).

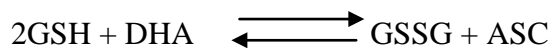


Σχήμα 2.13. Αντίδραση της διθειοδιαιθανόλης με τη γλουταθειόνη. Οι δομές σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα ChemBio Draw Ultra, Perkin Elmer.

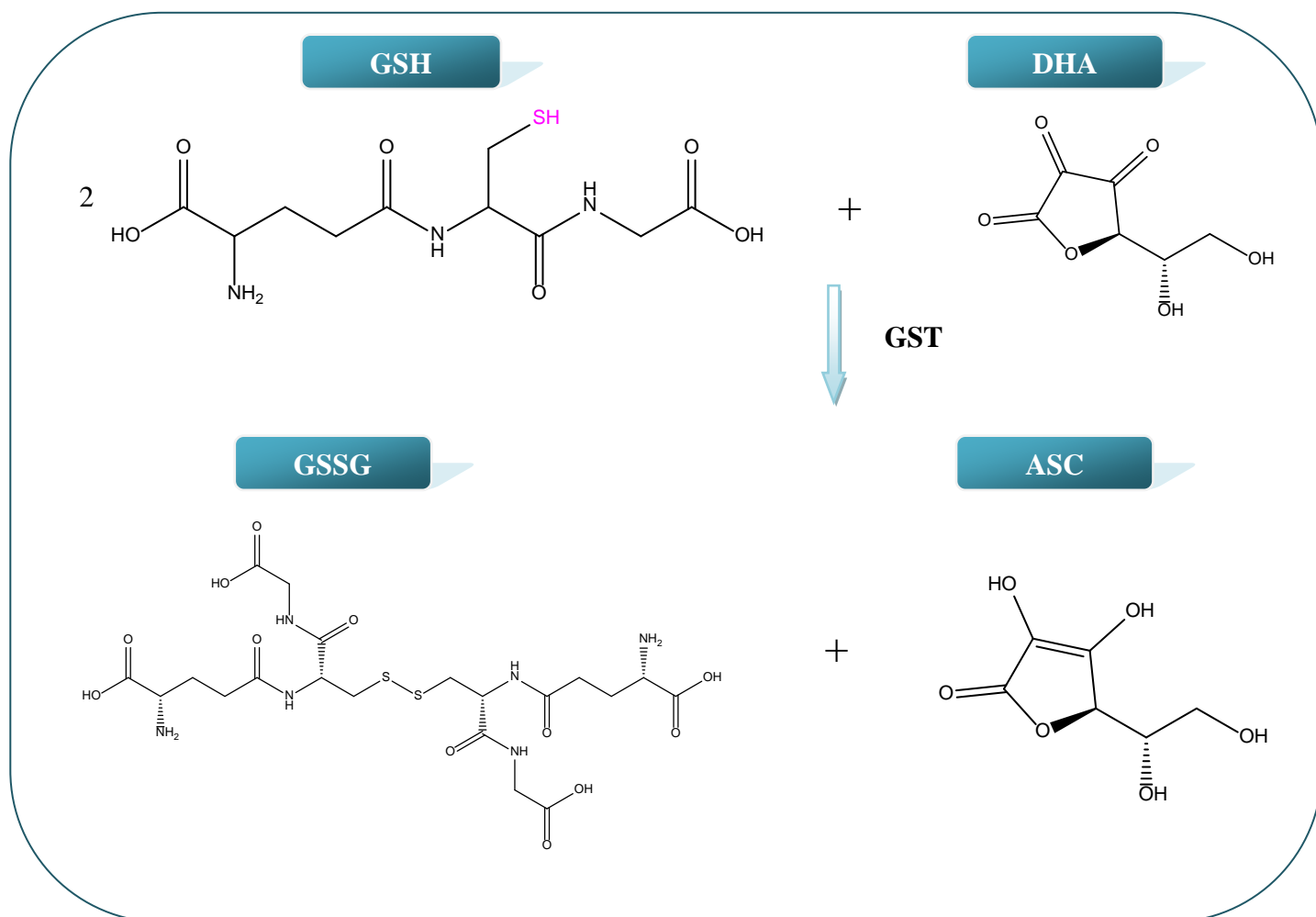
2.2.34. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ GST ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ ΔΙΪΔΡΟΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ (DHA)



Η GST καταλύει την αντίδραση της αναγωγής του διϋδροασκορβικού οξέος (DHA) σε ασκορβικό, χρησιμοποιώντας την ανοιγμένη γλουταθειόνη ως δότη ηλεκτρονίων (Mizohata et al., 2001). Η αντίδραση παρακολουθείται φωτομετρικά στα 265 nm, με μοριακό συντελεστή απόσβεσης 6,22 L/mmol·cm.



Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 1 mL έχοντας 1 mM GSH, 0,25 mM DHA σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM KH_2PO_4 , pH=8.



Σχήμα 2.14. Αντίδραση του διϋδροασκορβικού οξέος με τη γλουταθειόνη. Οι δομές σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα ChemBio Draw Ultra, Perkin Elmer.

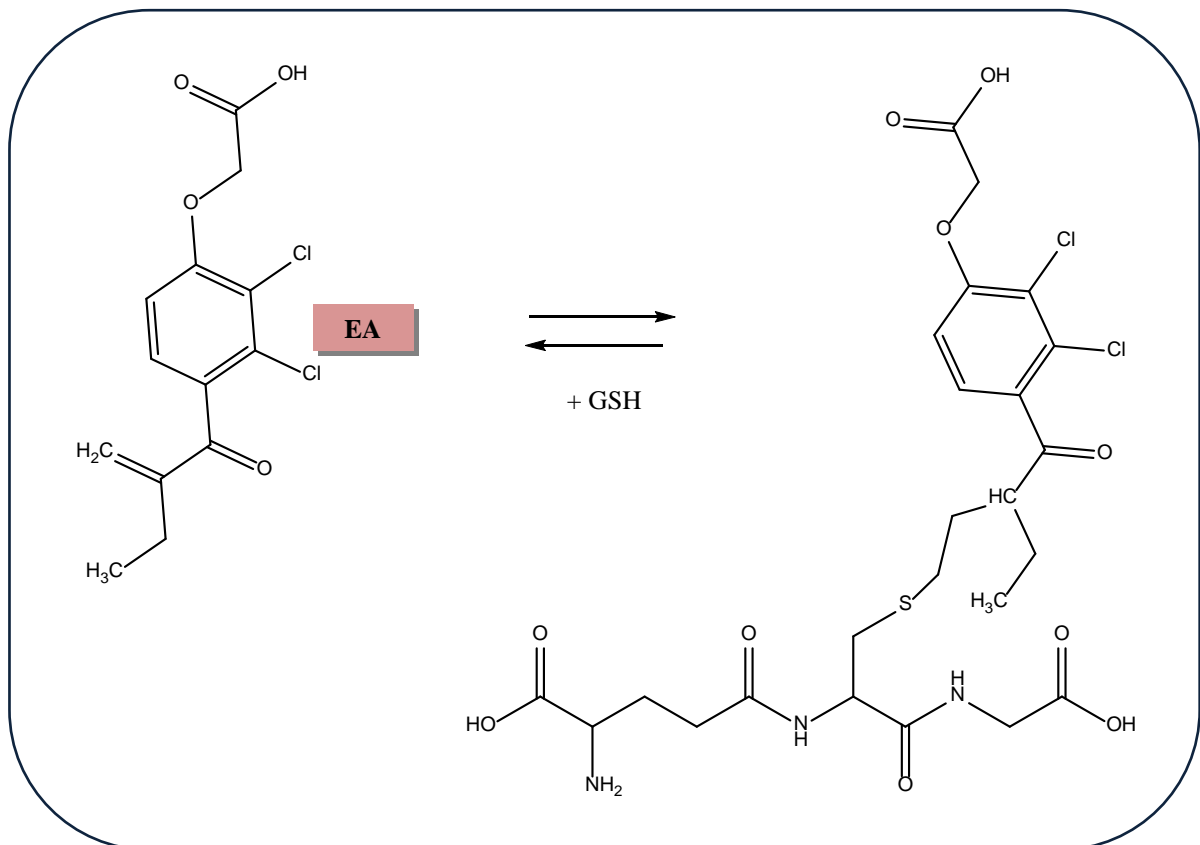
2.2.35. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ GST ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ ΕΘΑΚΡΙΝΙΚΟ ΟΞΥ (EA)

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας των GSTs ως προς το εθακρινικό οξύ (EA), δηλαδή η ταχύτητα σχηματισμού του συμπλόκου GS-EA (Habig et al., 1974), βασίστηκε στη φωτομετρική μέθοδο του Satoh (1995). Το εθακρινικό οξύ περιέχει ακόρεστο δεσμό, που μπορεί να σχηματίσει διάφορες ενώσεις προσθήκης με νουκλεόφιλες ομάδες. Η αντίδραση προσθήκης GSH, οδηγεί στο σχηματισμό του συμπλόκου GS-EA.



ΔΟΜΗ ΕΘΑΚΡΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

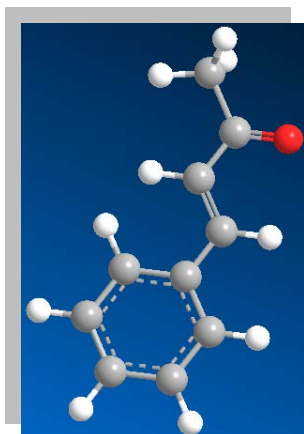
Η αντίδραση τελικού όγκου 1 mL, περιέχει 0,25 mM GSH και 0,2 mM ΕΑ σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M KH_2PO_4 pH=6,5. Ο φωτομετρικός προσδιορισμός διεξήχθη στα 270 nm, με συντελεστή απόσβεσης $\epsilon=5$ L/mmol-cm. Ως ενζυμική μονάδα GST ορίζεται το ποσό του ενζύμου, που καταλύει τη μετατροπή 1 μmol εθακρινικού οξέος σε N^5 -(3-((3-4-(καρβοξυμεθοξύ)-2,3-διχλωροβενζο)πεντυλ)θειο)1-((καρβοξυμεθυλ)αμινο)-1-οξοπροπανο-2-υλ) γλουταμίνη ανά λεπτό στους 37°C .



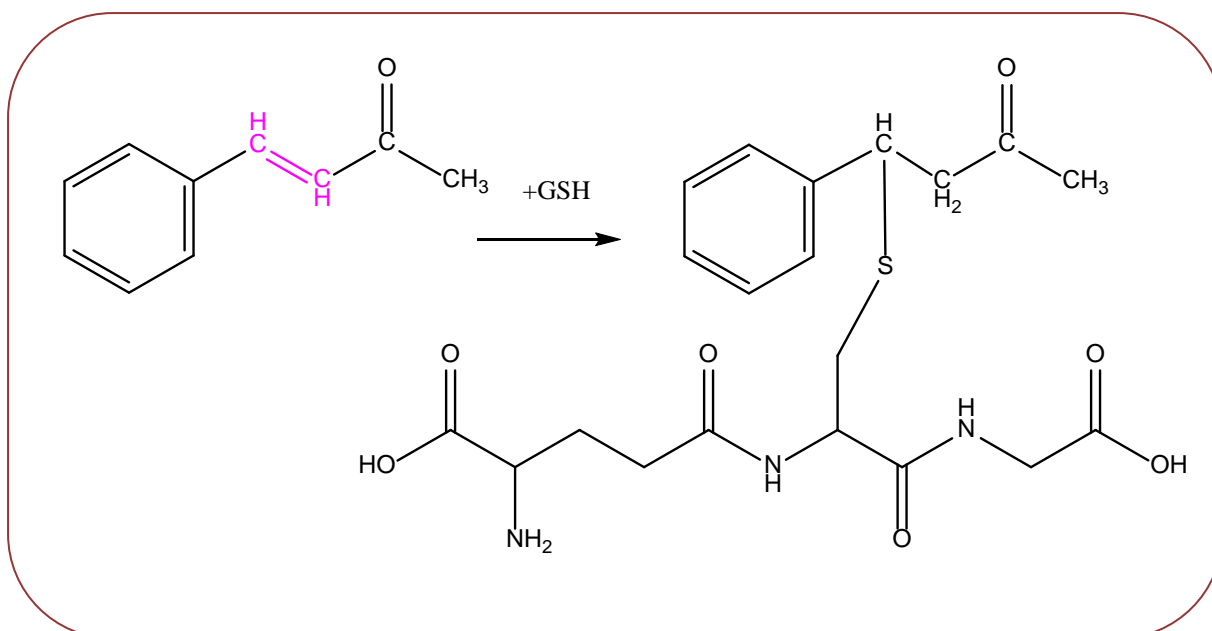
Σχήμα 2.15. Αντίδραση του εθακρινικού οξέος με τη γλουταθειόνη. Οι δομές σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα ChemBio Draw Ultra, Perkin Elmer.

2.2.36. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ GST ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ *trans*-4-ΦΑΙΝΥΛΒΟΥΤ-3-ΕΝ-2-ΟΝΗ

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας GST έναντι της *trans*-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη, δηλαδή η ταχύτητα σχηματισμού του συμπλόκου των δύο υποστρωμάτων, οφείλεται στην ακόρεστη ομάδα της *trans*-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη (Habig et al., 1974).

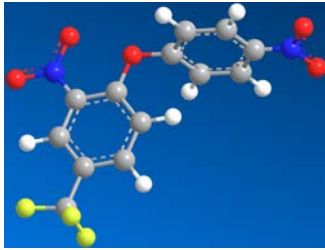


Η αντίδραση τελικού όγκου 1 mL, περιέχει 0,25 mM GSH και 0,05 mM της *trans*-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη, σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M KH_2PO_4 pH=6,5. Ο φωτομετρικός προσδιορισμός διεξήχθη στα 290 nm, με συντελεστή απόσβεσης $\epsilon=24,8$ L/mmol-cm. Ως ενζυμική μονάδα GST ορίζεται το ποσό του ενζύμου που καταλύει τη μετατροπή 1 μmol *trans*-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη σε *N*-(1-((καρβοξυμεθυλο)αμινο)-1-οξο-3-((3-οξο-1-φαινυλβουτ)θειο)προπαν-2-υλ) γλουταμίνη ανά λεπτό στους 37°C .



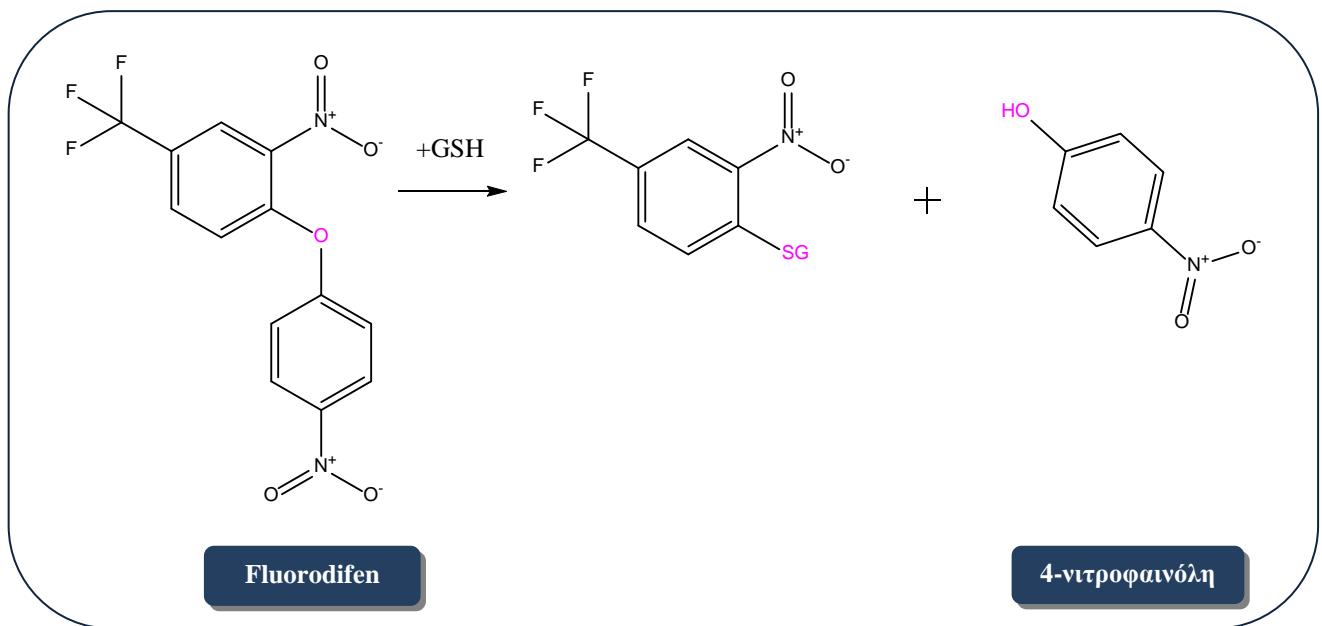
Σχήμα 2.16. Αντίδραση της *trans*-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-ονη με τη γλουταθειόνη. Οι δομές σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα ChemBio Draw Ultra, Perkin Elmer.

2.2.37. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ GST ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ FLUORODIFEN



ΔΟΜΗ FLUORODIFEN

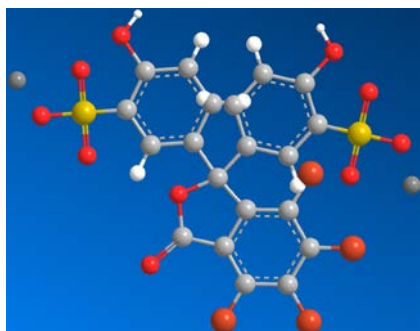
Η μέθοδος βασίζεται στην αύξηση της απορρόφησης, κατά την αντίδραση της GSH με το fluorodifen, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση (Dixon et al., 2003).



Σχήμα 2.17. Αντίδραση του fluorodifen με τη γλουταθειόνη. Οι δομές σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα ChemBio Draw Ultra, Perkin Elmer.

Το μίγμα επώασης τελικού όγκου 1 mL περιείχε 0,05 mM fluorodifen, 5 mM GSH και το ένζυμο το οποίο θέλαμε να μελετήσουμε σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M Glycine-NaOH pH=9,5. Το μίγμα του δείγματος καθώς και το μίγμα-μάρτυρας (χωρίς ένζυμο) επώαζονταν για 1 ώρα στους 37⁰C. Μετά το πέρας της 1 ώρας, λαμβανόταν απορρόφηση στα 400 nm, καθώς το προϊόν της αντίδρασης είναι η 4-νιτροφαινόλη και ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης έχει τιμή 18,5 L/mmol·cm (Dixon et al., 2003). Ως ενζυμική μονάδα GST, ορίζεται το ποσό του ενζύμου που καταλύει τη μετατροπή 1 μmol fluorodifen σε 4- νιτροφαινόλη ανά λεπτό στους 37⁰C.

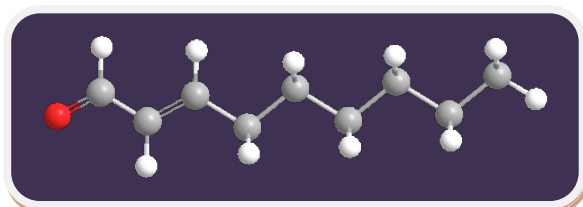
2.2.38. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ GST ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ ΒΡΩΜΟΣΟΥΛΦΟΦΘΑΛΕΪΝΗ



Σύμφωνα με τους Javitt et al., 1960, Goldstein and Combes, 1966, ο λακτονικός δακτύλιος της βρωμοσουλφοφθαλεΐνης, μπορεί πιθανότατα να αντιδράσει με την ανοιγμένη GSH σχηματίζοντας έναν θειοαιθέρα και με αντικατάσταση του βρωμίου πάνω στον δακτύλιο του φθαλικού οξέος οδηγείται στο σχηματισμό υδροβρωμικού οξέος.

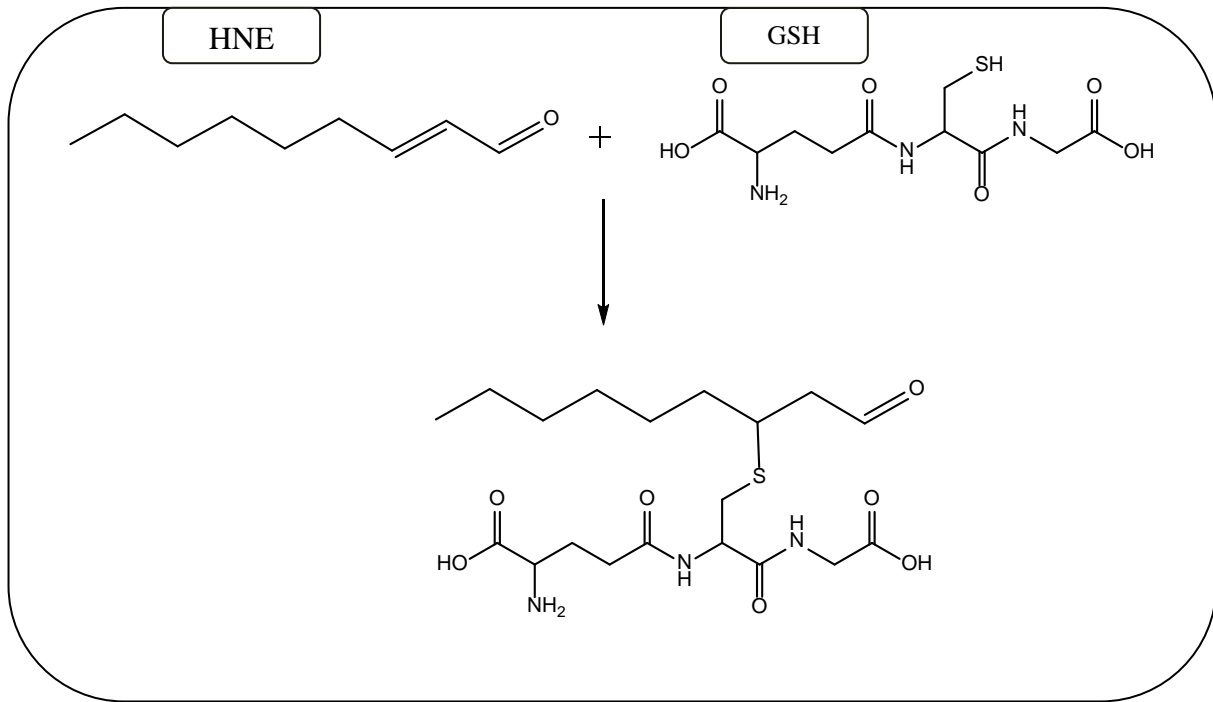
Η αντίδραση τελικού όγκου 1 mL πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M KH_2PO_4 pH=6,5 με 5 mM GSH και 0,03 mM βρωμοσουλφοφθαλεΐνη. Ο φωτομετρικός προσδιορισμός έγινε στα 330 nm, έχοντας ως μοριακό συντελεστή απόσβεσης $\epsilon = 4,5 \text{ L/mmole}\cdot\text{cm}$.

2.2.39. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ GST ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ TRANS-2-ΕΝΕΝΑΛΗ (HNE)



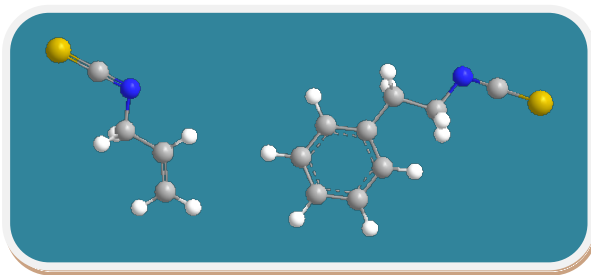
Το υπόστρωμα trans-2-ενενάλη διαθέτει μια ελεύθερη αλδεϋδομάδα, έτσι πραγματοποιείται αντίδραση προσθήκης με την ανοιγμένη GSH (Hiratsuka et al., 2001).

Η αντίδραση τελικού όγκου 1 mL πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M KH_2PO_4 pH=6,5 με 0,5 mM GSH και 0,1 mM υποστρώματος. Ο φωτομετρικός προσδιορισμός έγινε στα 224 nm, έχοντας ως μοριακό συντελεστή απόσβεσης $\epsilon = 13,75 \text{ L/mmole}\cdot\text{cm}$.



Σχήμα 2.18. Αντίδραση της *trans*-2-εννάλης με τη γλουταθειόνη. Οι δομές σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα ChemBio Draw Ultra, Perkin Elmer.

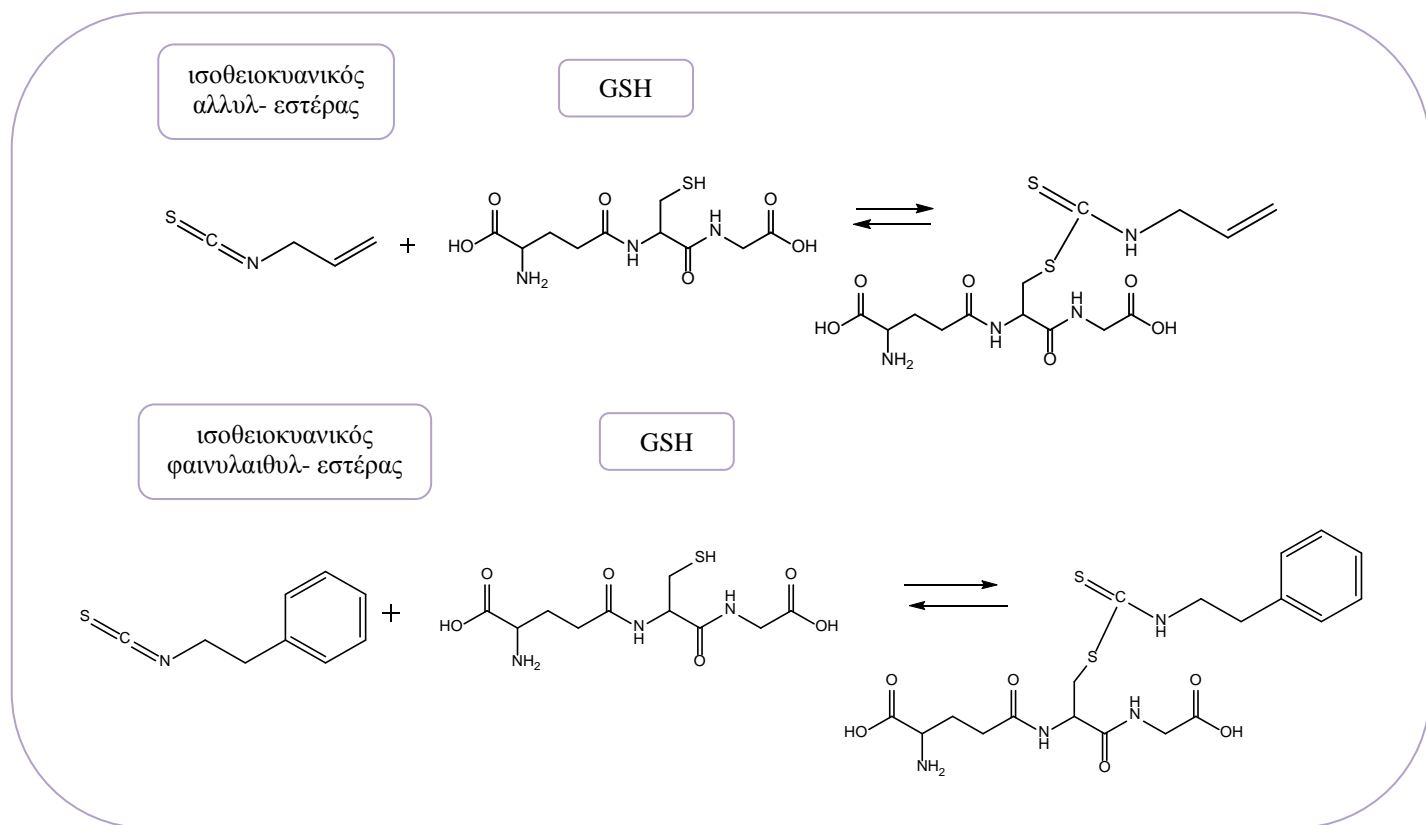
2.2.40. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ GST ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ: ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΟΣ ΦΑΙΝΥΛΑΙΘΥΛ-ΕΣΤΕΡΑΣ (PEITC) ΚΑΙ ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΟΣ ΑΛΛΥΛ-ΕΣΤΕΡΑΣ (AITC)



Οι οργανικές ισοθειοκυανικές ενώσεις: ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας και ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλ-εστέρας δημιουργούν προϊόντα σύζευξης με τη γλουταθειόνη ενζυμικά και μη, σχηματίζοντας διθειοκαρβαμίδια (Meyer et al., 1995).

Το μίγμα της αντίδρασης τελικού όγκου 1 mL περιείχε 1 mM GSH και 0,4 mM υποστρώματος σε 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος KH_2PO_4 pH=6,5. Η αντίδραση παρακολουθούνταν στα 274 nm, έχοντας ως μοριακό συντελεστή απόσβεσης $\epsilon = 7,45$

L/mmole-cm και $\epsilon = 8,89$ L/mmole-cm για τον ισοθειοκυανικό αλλυλ-εστέρα και τον ισοθειοκυανικό φαινυλαιθυλ-εστέρα, αντίστοιχα.



Σχήμα 2.19. Αντίδραση των ισοθειοκυανικών εστέρων με τη γλουταθειόνη. Οι δομές σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα ChemBio Draw Ultra, Perkin Elmer.

Πίνακας 2.4. Συγκεντρωτικός πίνακας των συνθηκών με τις οποίες δοκιμάστηκαν όλα τα υποστρώματα.

Υπόστρωμα	Συγκέντρωση υποστρώματος/διαλύτης	GSH	pH	λ_{max}	Συντ/στής μοριακής απόσβεσης σε (L/mmole-cm)
1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο	1 mM /αιθανόλη	2,5 mM	6,5	340 nm	9,6
1-ιοδω-2,4-δινιτροβενζόλιο	1 mM /αιθανόλη	2,5 mM	6,5	340 nm	9,6
1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο	1 mM /αιθανόλη	2,5 mM	6,5	340 nm	9,6
1-βρωμο-2,4-δινιτροβενζόλιο	1 mM /αιθανόλη	2,5 mM	6,5	340 nm	9,6
4-χλωρο-7-νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο	0,2 mM /νερό	0,5 mM	5	420 nm	14,5
π-νιτροβενζυλ-χλωρίδιο	1 mM /αιθανόλη	5 mM	6,5	310 nm	1,9
υδροϋπεροξειδίο του κουμηνίου	1,5 mM /νερό	1 mM	7,5	340 nm	6,22
t-βουτυλο-υδροϋπεροξειδίο	1,5 mM /νερό	1 mM	7,5	340 nm	6,22
δι-δωδεκανικό υδροϋπεροξειδίο	1,5 mM /νερό	1 mM	7,5	340 nm	6,22
βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίο	1,5 mM /νερό	1 mM	7,5	340 nm	6,22

2-2- διθειοδιαιθανόλη	2 mM /νερό	0,5 mM	7,8	340 nm	6,22
δωδροασκορβικό οξύ	0,25 mM /νερό	1 mM	8	265 nm	6,22
Εθακρινικό οξύ	0,2 mM /αιθανόλη	0,25 mM	6,5	270 nm	5
trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη	0,05 mM /νερό	0,25 mM	6,5	290 nm	-24,8
fluorodifen	0,05 mM /ακετόνη	5 mM	9,5	400 nm	18,5
βρωμοσουλφοφθαλείνη	0,03 mM /νερό	5 mM	6,5	330 nm	4,5
trans-2-ενενάλη	0,1 mM /αιθανόλη	0,5 mM	6,5	224 nm	13,75
σουλφανιλαμίδη	1 mM /ακετόνη	1 mM	6,5	540 nm	4,23
ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας	0,4 mM /αιθανόλη	1 mM	6,5	274 nm	7,45
ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλ-εστέρας	0,4 mM /αιθανόλη	1 mM	6,5	274 nm	8,89

2.2.41. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Κατά την κινητική ανάλυση για τον προσδιορισμό της ταχύτητας της αντίδρασης και της σταθεράς εξειδικεύσεως, πραγματοποιούνταν αντιδράσεις με διαφορετικές συγκεντρώσεις του υποστρώματος που μας ενδιέφερε, κρατώντας τη συγκέντρωση του άλλου υποστρώματος σταθερή. Τα ισοένζυμα που μελετήθηκαν σε αυτή τη διατριβή για διάφορα υποστρώματα, κυρίως όμως για το CDNB, ακολουθούσαν την εξίσωση των *Michaelis* και *Menten* ή πιο σπάνια την εξίσωση του *Hill*. Σε κάθε κεφάλαιο αναφέρεται αναλυτικά η κινητική ανάλυση των ισοενζύμων.

2.2.42. ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΙΜΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΙΣΧΥΩΣ (IC50)

Για να δούμε αν μια ένωση προκαλούσε αναστολή της δράσης του ενζύμου, προσδιορίζαμε την ταχύτητα αντιδράσεως, χωρίς αναστολέα και με αναστολέα. Αποδεχόμασταν την τιμή της ταχύτητας χωρίς αναστολέα ως 100% και στη συνέχεια υπολογιζόνταν η υπολειπόμενη δραστηριότητα σε ποσοστό %. Με αυτόν τον τρόπο φαινόταν, αν μια ένωση αποτελούσε ισχυρό αναστολέα του ενζύμου. Στη συνέχεια με ειδικά υπολογιστικά προγράμματα (§ 2.2.43.), προσδιοριζόταν η τιμή ανασταλτικής ισχύος (IC50) για τον αναστολέα.

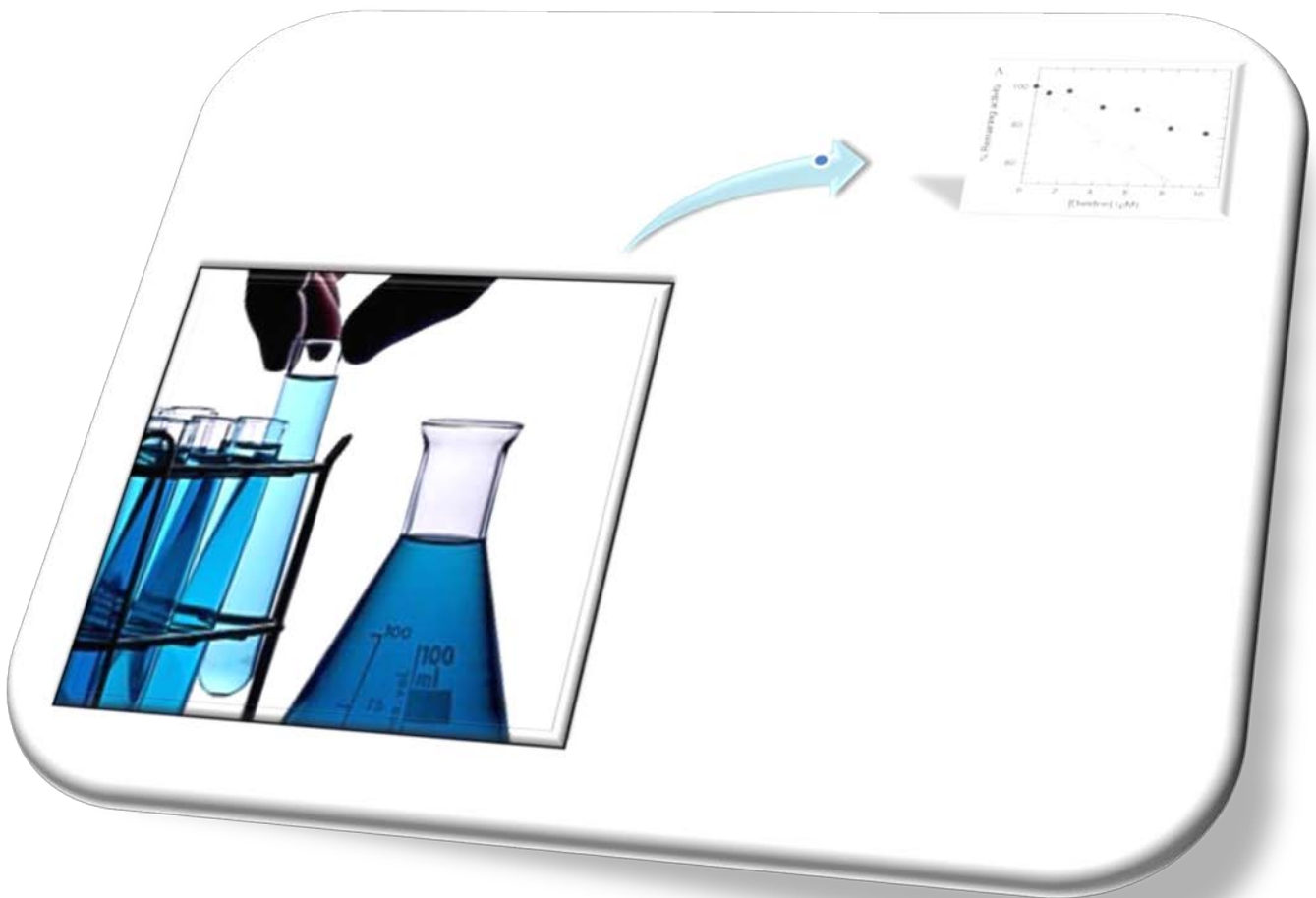
2.2.43. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων κινητικής ανάλυσης, της αναστολής των ενζύμων και του προσδιορισμού της τιμής IC50 έγινε χρήση των προγραμμάτων

Grafit version 3.03: Data analysis and Graphics programme, Erithacus Software Ltd.,
Grafit version 4.06: Data analysis and Graphics programme, Erithacus Software Ltd.,
GraphPad Prism version 5.06, GraphPad Software Inc. Οι απεικονίσεις των
τριτοταγών και τεταρτοταγών δομών των πρωτεϊνών, παρήχθησαν με τη χρήση του
προγράμματος PyMOL (Delano, 2002), ChemBio Draw Ultra version 13.0.0.3015
Perkin Elmer Cambridge Soft και το VDM version 1.9.1. από την ομάδα Theoretical
and Computational Biophysics του NIH Resource for Macromolecular Modeling and
Bioinformatics. Όλες οι χημικές δομές σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα
ChemBioDrawUltra version 13.0.0.3015 Perkin Elmer Cambridge Soft.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

“Αναστολή ισοενζύμων της μεταφοράς της γλουταθειόνης από φυτοπροστατευτικά προϊόντα: ανάπτυξη ενζυμικής μεθόδου προσδιορισμού φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε δείγματα νερού”.



3.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης (GSTs, EC 2.5.1.18) αποτελούν μια ομάδα πολυλειτουργικών ενζύμων, που εμπλέκονται στη Φάση II της κυτταρικής αποτοξίνωσης. Θέλοντας να μελετήσουμε την αναστολή των GSTs, έναντι φυτοπροστατευτικών προϊόντων, επιλέξαμε τέσσερα ισοένζυμα από τον άνθρωπο (*hGSTA1-1*, *hGSTP1-1*, *hGSTT2-2* και *hGSTO1-1*), απ' όπου και προέκυψε ότι το ισοένζυμο *hGSTA1-1*, ήταν το καταλληλότερο. Τα εντομοκτόνα dieldrin και spiromesifen χαρακτηρίστηκαν ως αντιστρεπτοί αναστολείς του *hGSTA1-1*, με τιμές IC₅₀ $17,9 \pm 1,7 \mu\text{M}$ και $12,1 \pm 3,4 \mu\text{M}$, αντίστοιχα. Από τις μελέτες κινητικής με αναστολέα και *in silico* μοριακή μοντελοποίηση, προέκυψε ότι το dieldrin και το spiromesifen, συνδέονται στο ένζυμο πιθανόν σε μια ξεχωριστή θέση που καλύπτει μερικώς τη G- και H-θέση. Η δυνατότητα των dieldrin και spiromesifen, να αναστέλλουν το ένζυμο *hGSTA1-1*, χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη αναλυτικών ποσοτικών μεθόδων, για αυτά τα δύο εντομοκτόνα. Προσδιορίστηκαν γραμμικές καμπύλες αναφοράς δόσης-αντίδρασης για το dieldrin και το spiromesifen, σε συγκεντρώσεις εύρους 0-10 μM . Η επαναληψιμότητα της δοκιμής εκτιμήθηκε με τη σχετική τυπική απόκλιση η οποία ήταν 4,1% (N = 28). Η μέθοδος εφαρμόστηκε επιτυχώς για το προσδιορισμό των εντομοκτόνων σε δείγματα νερού, χωρίς να προηγηθεί επεξεργασία των δειγμάτων αυτών.

3.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι κυτταροπλασματικές GSTs

Οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης (glutathione S-transferases, GSTs) συμμετέχουν ουσιαστικά στο μηχανισμό αποτοξίνωσης του κυττάρου, αδρανοποιώντας εξωγενείς ή ενδογενείς τοξικούς παράγοντες (Hayes et al., 2005, Chronopoulou et al., 2012a), καταλύοντας την πυρηνόφιλη προσβολή του θειολοανιόντος της κυστεΐνης της γλουταθειόνης (GSH) στο ηλεκτρονιόφιλο κέντρο τέτοιων ενώσεων, σχηματίζοντας αντίστοιχες ενώσεις συζεύξεως (G-SR) (Sheehan et al., 2001).

Οι GSTs όπως έχει αναφερθεί, έχουν και άλλες λειτουργίες, όπως το να συμμετέχουν σε αντιδράσεις βιοσύνθεσης και ισομερίωσης, στην αναγωγή τοξικών οργανικών υπεροξειδίων καθώς και στη προστασία κατά της οξειδωτικής καταπόνησης (Coles & Kadlubar, 2005, Axarli et al., 2009, Edwards et al., 2000). Επίσης συμμετέχουν στην ενδοκυττάρια μεταφορά και αποθήκευση υδροφοβικών μορίων όπως η αίμη, η χολερυθρίνη, οι ορμόνες, τα φλαβονοειδή, τα λιπαρά οξέα και τα ξενοβιοτικά (Axarli et al., 2009, Edwards et al., 2000). Οι GSTs παρουσιάζουν και δράση δέσμησης αρκετών υδροφοβικών ενώσεων και αμφολυτών (MB > 400 Da) χωρίς αυτές να αποτελούν υποστρώματα του ενζύμου. Η δέσμηση τέτοιων ενώσεων όπως λιπαρά οξέα, φάρμακα, αιμίνη και χολικά οξέα, γίνεται σε ξεχωριστή θέση (L-θέση). Τέτοιου είδους δεσμεύσεις, προκαλούν αναστολή (συναγωνιστική ή μη) της καταλυτικής δραστηριότητας των GSTs (Axarli et al., 2004, Karoli et al., 2008, Kolobe et al., 2004, Mukanganyama et al., 2011, Sayed et al., 2002).

Η οικογένεια των GSTs των θηλαστικών αποτελείται από τρεις υπεροικογένειες ενζύμων: τη κυτταροπλασματική, τη μιτοχονδριακή και τη μικροσωμική. Η μεγαλύτερη οικογένεια, είναι αυτή των κυτταροπλασματικών ισοενζύμων GSTs των θηλαστικών, η οποία διαχωρίζεται με βάση την αμινοξική αλληλουχία σε 8 τάξεις: *α*, *μ*, *π*, *θ*, *ζ*, *ο*, *σ* και *κ* (Πίνακας 3.1) (Jowsey et al., 2001, Morel et al., 2004). Οι κυτταροπλασματικές GSTs είναι ενεργές ως διμερή πρωτεΐνες, είτε ομοδιμερείς (δύο ίδιες υπομονάδες) είτε ετεροδιμερείς (δύο διαφορετικές υπομονάδες). Σε κάθε υπομονάδα (22-29 kDa) διακρίνονται 2 δομικές περιοχές. Η περιοχή I με δομή α/β που βρίσκεται προς το N-τελικό άκρο και αποτελείται από ένα β -φύλλο τεσσάρων ελασμάτων με τρεις α -έλικες ($\alpha 1$ - $\alpha 3$). Η περιοχή II, που βρίσκεται προς το C-τελικό

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

άκρο και αποτελείται εξ' ολοκλήρου από έλικες ($\alpha 4$ - $\alpha 9$). Σε κάθε καταλυτική περιοχή διακρίνονται δύο θέσεις δεσμεύσεως η συντηρημένη G-θέση που απαντά προς το N-τελικό άκρο και η H-θέση προς το C-τελικό άκρο (Axarli et al., 2009, Armstrong, 1997, Mannervik, 1988, Oakley, 2005, Sheehan et al., 2001). Η H-θέση παρουσιάζει μικρή ομολογία, μεταξύ των ισοενζύμων μιας τάξης και διαφορετικών τάξεων και μπορεί να προσδέσει αρκετά υποστρώματα διαφορετικά σε μέγεθος, δομή και υδροφοβικότητα. Συνεπώς, η δομή της H-θέσης είναι αυτή που καθορίζει και την εξειδίκευση, που παρουσιάζει κάθε GST για κάθε υπόστρωμα.

Πίνακας 3.1. Τάξεις και βιολογικές λειτουργίες των κυτταροπλασματικών GSTs.

Οργανισμός	Τάξη	Λειτουργία	Αμινοξικό κατάλοιπο ενεργού κέντρου
Θηλαστικά	<i>Alpha</i> (α) ^a	Δράση ισομεράσης, μεταβολισμό φαρμάκων, δράση υπεροξειδάσης και αποτοξίνωση	<i>Τυροσίνη</i>
	<i>Mu</i> (μ) ^a	Μεταβολισμό φαρμάκων	<i>Τυροσίνη</i>
	<i>Pi</i> (π) ^a	Μεταβολισμό φαρμάκων	<i>Τυροσίνη</i>
	<i>Theta</i> (θ)	Παρεμπόδιση της ηπατοκαρκινογένεσης, μεταβολισμό βιομηχανικών ενώσεων	<i>Σερίνη</i>
	<i>Zeta</i> (ζ)	Κατάλυση του μεταβολισμού των α-αλογονοξέων	<i>Σερίνη</i>

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

<i>Omega(ω)</i>	Οξειδωτική καταπόνηση	<i>Κυστεΐνη</i>
<i>Sigma(σ)</i>	Σύνθεση προσταγλανδίνης	<i>Τυροσίνη</i>
<i>Kappa(κ)</i>	Δράση υπεροξειδάσης	<i>Σερίνη</i>

α: τάξεις ειδικές για τα θηλαστικά

Οι GSTs ως εργαλείο αναλυτικών μεθόδων ανίχνευσης ξενοβιοτικών

Για την ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων βασισμένες στην αναστολή που παρουσιάζει ένα ένζυμο, προσδιορίζεται η ενζυμική δραστηριότητα πριν και μετά από την έκθεση στον παράγοντα, που θέλουμε να αναλύσουμε (Amine et al., 2006, Enayati et al., 2001, Pohanka et al., 2009). Τέτοιου είδους μελέτες μπορούν να αναπτυχθούν για διάφορα ένζυμα, αλλά μέχρι στιγμής οι περισσότερες βασίζονται στη χρήση της χολινεστεράσης για τον προσδιορισμό οργανοφωσφορικών εστέρων και καρβαμιδικών (Andreou & Clonis, 2002b, Miao, 2010, Pohanka et al., 2009).

Οι GSTs λόγω της ικανότητας τους να αλληλεπιδρούν με ξενοβιοτικές ενώσεις, έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη απλών, ευαίσθητων, ποιοτικών και ποσοτικών δοκιμών. GSTs από διαφορετικές πηγές έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί, για την ανίχνευση εντομοκτόνων (Enayati et al., 2001, Enayati et al., 2005, Kapoli et al., 2008, Morou et al., 2008). Αυτές οι μελέτες βασίστηκαν στην αναστολή της καταλυτικής δράσης της GST από ξενοβιοτικά, η οποία παρατηρήθηκε είτε φωτομετρικά είτε ηλεκτροχημικά.

Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα συμπεριφέρονται ως ρυπογόνα, έτσι αποτελούν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία και το περιβάλλον. Διαφορετικές κατηγορίες φυτοπροστατευτικών προϊόντων, έχουν διαφορετικό αντίκτυπο στους ζωντανούς οργανισμούς. Παρόλο που τέτοιου είδους ενώσεις, έχουν άμεση επίδραση στη χερσαία επιφάνεια, η χημική μόλυνση του υδροφόρου ορίζοντα, από υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων, είναι η βασική περιβαλλοντική καταστροφή. Το ενδιαφέρον για την ανάπτυξη απλών μεθόδων προσδιορισμού φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε δείγματα νερού, έχει αρχίσει και ανθίζει και θεωρείται πλέον

ουσιαστική και απαραίτητη η αποτελεσματική περιβαλλοντική διαχείριση (Karoli et al., 2008, Miao et al., 2010, Morou et al., 2008, Pohanka et al., 2009).

Με σκοπό λοιπόν την ανάπτυξη μιας απλής αναλυτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε περιβαλλοντικά δείγματα και στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, έγινε σάρωση ισοενζύμων GST από άνθρωπο (*hGST*) που ανήκουν στις τάξεις: *α* (*hGSTA1-1*), *π* (αλληλόμορφοι *hGSTP1*A*, *hGSTP1*B*, *hGSTP1*C*), *θ* (*hGSTT2-2*) και *ο* (*hGSTO1-1*), ως προς 27 διαφορετικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα (εντομοκτόνα και ζιζανιοκτόνα). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το *hGSTA1-1* είναι το πιο ευαίσθητο σε αναστολή ισοένζυμο, ως προς τα εντομοκτόνα dieldrin και spiromesifen. Συνεπώς το ένζυμο *hGSTA1-1*, χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση απλών φωτομετρικών κινητικής ανάλυσης δοκιμών, για τον προσδιορισμό του dieldrin και του spiromesifen σε δείγματα νερού. Για την καλύτερη κατανόηση της μελέτης αυτής από τον αναγνώστη, αξίζει να αναφερθούν συνοπτικά οι δομές και οι λειτουργίες των ισοενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν.

Δομή και λειτουργίες του ισοενζύμου hGSTA1

Το ισοένζυμο *hGSTA1-1* είναι διμερές (Σχήμα 3.1.A), όπως όλες οι κυτταροπλασματικές GSTs και κάθε υπομονάδα διαθέτει ένα ανεξάρτητο ενεργό κέντρο (που αποτελείται από την G- και H-θέση) (Mannervik et al., 1985). Το αμινοξικό κατάλοιπο Tyr9, του ενεργού κέντρου του ισοενζύμου *hGSTA1-1*, βρίσκεται στο β1 έλασμα και είναι σε απόσταση δεσμού υδρογόνου από τη σουλφυδρυλομάδα της GSH (Σχήμα 3.1.B) (Sheehan et al. 2001). Πειράματα κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης, έχουν δείξει ότι το συγκεκριμένο αμινοξύ είναι πολύ σημαντικό για την καταλυτική δράση του ενζύμου (Armstrong, 1997). Είναι αυτό που απο-πρωτονιώνει και ενεργοποιεί το σουλφίδιο ($-S^-$) σε ουδέτερο pH και βρίσκεται στο μεσοδιάστημα της G-θέσης και H-θέσης (Kuhnert et al., 2005). Επίσης η φ γωνία της κύριας αλυσίδας, γύρω από το αμινοξικό κατάλοιπο Tyr9 είναι περίπου 180° , το οποίο προκαλεί μια ασυνήθιστη στροφή στο β1 έλασμα, πιθανότατα διευκολύνοντας τη κατάλυση (Martin, 1995).

Ακόμα στο ισοένζυμο *hGSTA1-1* απαντά, όπως και σε άλλες GSTs, το μοτίβο SNAIL/TRAIL στην α3-έλικα της περιοχής I (π.χ. Ser-Asp-Ala-Ile-Leu/Thr-Arg-Ala-Ile-Leu) (Koonin et al., 1994) και περιλαμβάνει αμινοξέα τα οποία συνεισφέρουν στη δέσμευση της GSH, όπως το αμινοξύ Thr-68 που σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου, με την α-καρβοξυλομάδα του γλουταμινικού της GSH και του αζώτου της αμινομάδας (Sinninh et al., 1993).

Χαρακτηριστικό της δομής της α τάξης είναι μια επιπλέον α-έλικα (α-9) στην περιοχή II, που αποτελεί κομμάτι του ενεργού κέντρου (Kuhnert et al., 2005), η οποία «πακετάρεται» στην υδροφοβική περιοχή δέσμευσης (Σχήμα 3.1.B), δημιουργώντας μια μικρότερη και πιο ισχυρά υδρόφοβη τοποθεσία, σε σχέση με αυτές των μ και π τάξεων (Sinning et al., 1993). Αυτή η έλικα θεωρείται σημαντική για τη σταθερότητα του διμερές και για τη δέσμευση ενώσεων που δεν είναι υποστρώματα (Dirr & Wallace, 1999). Επίσης, επηρεάζει το ρυθμό δέσμευσης της GSH και τη διάσταση του καταλυτικά σημαντικού αμινοξέος Tyr9 (Gustafsson et al. 1999).

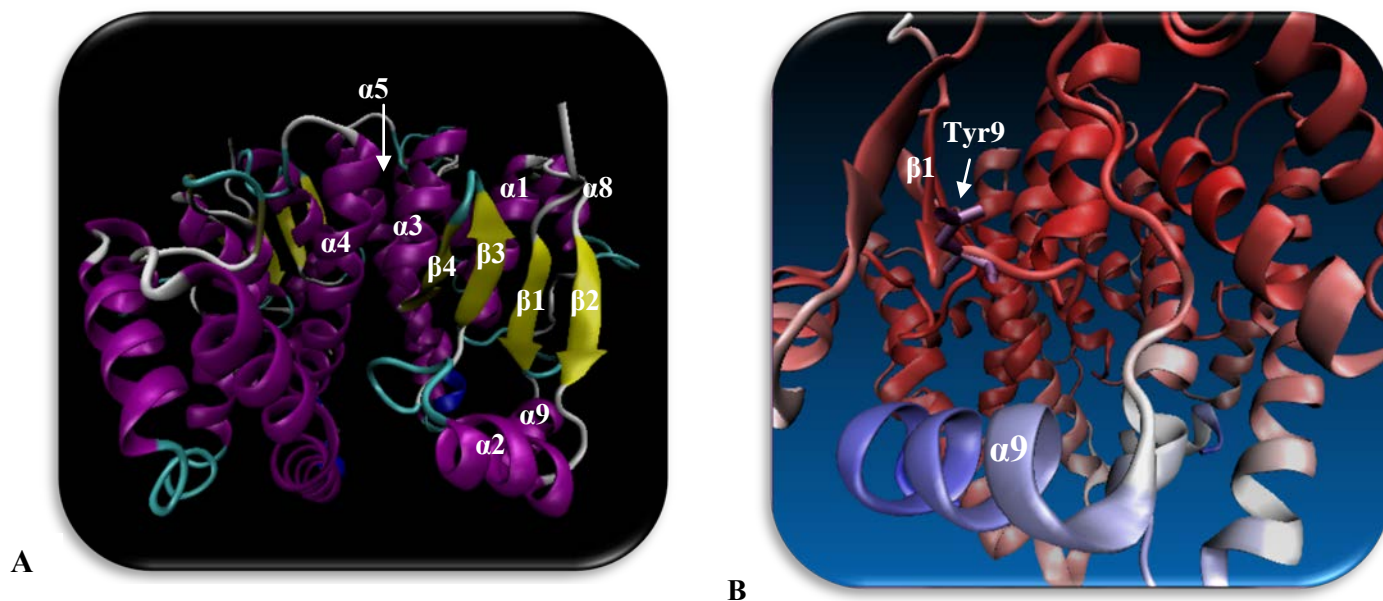
Συγκρίνοντας τις δομές της α τάξης με τις μ και π, υπάρχουν πολλές ομοιότητες αλλά και σημαντικές διαφορές (Dirr et al., 1994). Η μεγάλη περιοχή II ξεκινά από της C-τελική περιοχή στην συνδετική αλληλουχία (linker) και αποτελείται από 5 έλικες για τις τάξεις μ και π (Ji et al., 1992, Reinemer et al., 1991) και 6 έλικες για την τάξη α (Sinning et al., 1993). Οι διαφορές που παρουσιάζουν στη C-τελική περιοχή, πιθανόν να είναι η αιτία και για τις διαφορές τους στην εξειδίκευση των υποστρωμάτων (Wilce & Parker, 1994).

Οι αλληλεπιδράσεις στο μεσοδιάστημα των δύο υπομονάδων είναι κυρίως υδροφοβικές μεταξύ των αμινοξέων της περιοχής I από τη μία υπομονάδα με εκείνα της περιοχής II της άλλης υπομονάδας, ακολουθούν δηλαδή το μοτίβο «κλειδί-κλειδαριά». Για τη α τάξη το αρωματικό αμινοξύ Phe52 λειτουργεί ως «κλειδί», που επεκτείνεται από τον βρόγχο (loop) που προηγείται του ελάσματος β3, και ταιριάζει στην υδροφοβική «κλειδαριά» που σχηματίζεται από τους έλικες α4 και α5 της άλλης υπομονάδας (Sinning et al., 1993).

Το ισοένζυμο *hGSTA1* απαντά σε υψηλά επίπεδα στο ήπαρ, στο λεπτό έντερο, στους όρχις, στους νεφρούς, στο επινεφρίδιο και στο πάγκρεας και σε χαμηλά επίπεδα σε περισσότερους ιστούς (Coles et al., 2000, Coles et al., 2001, Coles et al., 2002; Hayes & Pulford, 1995; Morel et al., 2002; Mulder et al., 1999; Rowe et al., 1997).

Όπως είναι ήδη γνωστό οι GSTs παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο θέμα του καρκίνου, είτε για την πρόληψη, είτε για την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία (Chronopoulou & Labrou, 2009, Sweeney et al., 2003). Τα ισοένζυμα GSTA1-1/GSTA2-2 αποδέχονται ως υπόστρωμα το προϊόν της υπεροξειδωσής των λιπών 4-υδρόξυ-ενενάλη (4-HNE), σε σχέση με τις άλλες GSTs. Ακόμα επεμβαίνουν πριν την παραγωγή αυτού του προϊόντος, μειώνοντας την υπεροξειδωσής των λιπών, μέσω της GPx δράση τους (Yang et al., 2002). Είναι γνωστό ότι η υπεροξειδωσής των λιπών εμπλέκεται στην παθογένεση πολλών ασθενειών, όπως την αρτηριοσκλήρωση (Witztum, 1994) το Alzheimer (Markesbery, 1997) και τον καρκίνο (Zhang et al., 1997) κ.α.

In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι ανάμεσα στις ανθρώπινες GSTs, η GSTA1 έχει τη μεγαλύτερη καταλυτική δραστηριότητα σύζευξης της GSH με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (Dirven et al., 1994), που χρησιμοποιούνται στη συνδυαστική χημειοθεραπεία του καρκίνου του μαστού.



Σχήμα 3.1.A. Τεταρτοταγής δομή του ισοενζύμου *hGSTA1-1*. (PDB κωδικός: 1PKW). **B.** Η χαρακτηριστική έλικα $\alpha 9$ και το αμινοξικό κατάλοιπο Tyr9 στο ενεργό κέντρο. Οι δομές έγιναν με το πρόγραμμα VMD version 1.9.1.

Δομή και λειτουργίες του ισοενζύμου hGSTP1

Το ισοένζυμο GSTP1-1 (*hGSTP1-1*) αποτελεί μέλος της π τάξης, εκφράζεται στους ανθρώπινους ιστούς και παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον εξαιτίας των πολλαπλών ρόλων και λειτουργιών, γι' αυτό και επιλέχθηκε να μελετηθεί στη παρούσα διατριβή. Ο Ali-Osman με τους συνεργάτες του το 1997 απομόνωσαν τρεις αλληλόμορφους του γονιδίου P1 του ανθρώπου, από κανονικά και κακοήθη γλοιώματα, τους οποίους προσδιόρισαν ως *hGSTP1*A*, *hGSTP1*B* και *hGSTP1*C*. Αυτοί οι αλληλόμορφοι διαφέρουν είτε σε ένα είτε σε δύο κωδικόνια [Ple104 (*GSTP1*A*), Val104 (*GSTP1*B*), Val104/Val113 (*GSTP1*C*)] (Ali-Osman et al., 1997). Έτσι στο πλαίσιο μελέτης του ενζύμου *hGSTP1-1*, μελετήθηκαν και οι τρεις αλληλόμορφοι.

Το ισοένζυμο GSTP1-1 του ανθρώπου, ρυθμίζει τη σηματοδότηση σε κυτταρικά μονοπάτια, τα οποία ελέγχουν την επιβίωση καρκινικών κυττάρων, τον κυτταρικό θάνατο από την άμεση αλληλεπίδραση πρωτεϊνών (Chen & Juchau, 1998) και τον μηχανισμό σηματοδότησης κάτω από συνθήκες καταπόνησης (Wu et al., 2006). Παρουσιάζει ευρεία εξειδίκευση, ως προς τα ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα. Η δομή αυτών των υποστρωμάτων διαφέρει και μέσα σε αυτά συγκαταλέγονται και σημαντικές ενδογενείς ενώσεις, καθώς και φαρμακευτικές ουσίες, ξενοβιοτικά και προϊόντα μεταβολισμού ξενοβιοτικών. Η νουκλεόφιλη αντικατάσταση είτε ενός αλκυλ- ή αρυλ-αλογόνου, είτε μιας νιτρο-ομάδας καταλύεται αποτελεσματικά από το *hGSTP1-1*. Τα αλογόνα ή οι νιτροομάδες αυτών των μορίων, έλκουν ελαφρώς ηλεκτρόνια και αντιδρούν άμεσα με τη γλουταθειόνη (Chen & Juchau, 1998).

Το ισοένζυμο *hGSTP1* είναι αυτό το οποίο απαντά, στους περισσότερους ιστούς (Sibhatu et al., 2008). Παρόλο που συγκαταλέγεται στις κυτταροπλασματικές GSTs, έχει βρεθεί ότι συσχετίζεται με τη κυτταρική μεμβράνη των μικρών καρκινικών κυτταρικών σειρών του πνεύμονα όπως η H69 και η H69AR, καθώς και των εμβρυϊκών κυτταρικών σειρών των ανθρώπινων νεφρών HEK 293 και MCF-7. Ακόμα έχει βρεθεί ότι οι πολυμορφισμοί των GSTs γονιδίων, συσχετίζονται με την ανταπόκριση του ασθενή στη θεραπεία (Sun et al., 2010, Oldenburg et al., 2007). Για παράδειγμα το αλλοένζυμο *GSTP1*B*, βρέθηκε να συσχετίζεται με μεγαλύτερο χρόνο επιβίωσης σε ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο, όταν λάμβαναν μικτού τύπου χημειοθεραπεία (Stoehlmacher et al., 2008). Το ισοένζυμο *hGSTP1-1*, συχνά υπερεκφράζεται σε διάφορους όγκους και είναι το κυρίαρχο GST ισοένζυμο σε πολλά

ευαίσθητα και ανθεκτικά κυτταρικά κύτταρα (Hayes & Pulford, 1995). Επίσης παρουσιάζει δράση σουλφωναμιδάσης, καταλύοντας την υδρόλυση των σουλφαναμιδικών δεσμών παρουσία GSH. Τέτοιες αντιδράσεις παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την ενεργοποίηση πιθανών προ-φαρμάκων κατά του καρκίνου (π.χ. χημειοθεραπευτικά σουλφωναμιδικά παράγωγα της βομβεσίνης) (Axarli et al., 2009b).

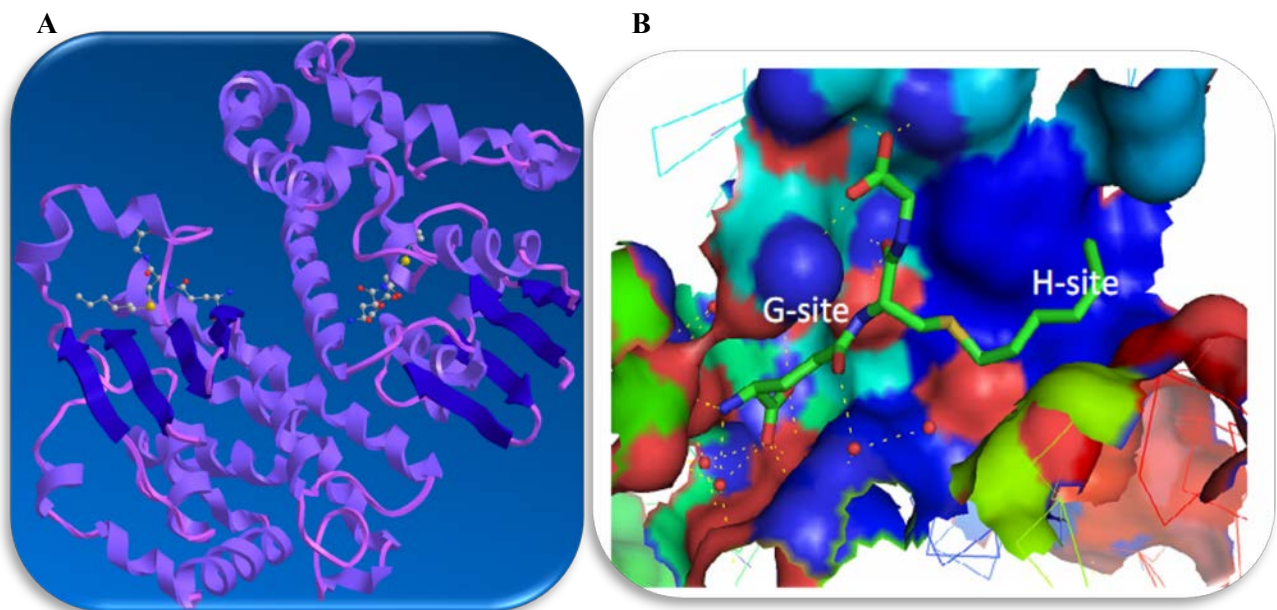
Στο κύτταρο η «επίθεση» των ελεύθερων ριζών (ROS) στις οργανικές ενώσεις, οδηγεί στο σχηματισμό οργανικών υδροϋπεροξειδίων. Οι GSTs συμμετέχουν στο μηχανισμό άμυνας του οργανισμού, απέναντι σε αυτές τις ενώσεις, είτε με απενεργοποίηση τους, είτε με δέσμευση τους, είτε με την αναγωγή τους σε μη τοξικές αλκοόλες. Για παράδειγμα το ισοένζυμο *hGSTP1-1* εμπλέκεται στη διαδικασία απενεργοποίησης των προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσής, όπως οι οξειδωμένες βάσεις DNA, τα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία και τα παράγωγα τους, όπως τα υδροξυαλκένια, μαλονδιαλδεϋδες και προπενάλες (Berhane et al., 1994, Ketterer & Christodoulides, 1994).

Ουσιαστικό ρόλο της *hGSTP1-1* αποτελεί και η προσθήκη GSH στις πρωτεΐνες του κυττάρου (Townsend et al., 2009). Μέσω της αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών, το ισοένζυμο *hGSTP1-1* μπορεί να αναστέλλει την κινάση *c-jun N-terminal kinase* (JNK), ένα ένζυμο κλειδί για την απόπτωση του κυττάρου (Federici et al., 2009) και να λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής αυτής της κινάσης, όταν παράγεται κάτω από συνθήκες καταπόνησης. Επιπλέον το ένζυμο αυτό, εμπλέκεται στην μεταμεταφραστική ρύθμιση των αμινοξικών καταλοίπων Cys των πρωτεϊνών με την προσθήκη GSH, ρυθμίζοντας έτσι τη λειτουργία/δραστικότητα αρκετών πρωτεϊνών. Επιπλέον μπορεί να σχηματίζει σύμπλοκα με άλλες πρωτεΐνες, που συμμετέχουν στην οξειδωαναγωγική ρύθμιση (Manevich et al., 2004). Έχει ακόμα αναφερθεί η συσχέτιση της *GSTP1-1*, με τον υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης TRAF2, παρεμποδίζοντας την προκαλούμενη ενεργοποίηση των κινάσων JNK και p38-MAP από αυτόν (Wu et al., 2006). Τέλος το ισοένζυμο *hGSTP1-1* έχει προστατευτικό ρόλο κυρίως ενάντια της κυτταροτοξικότητας αλκυλιωτικών παραγόντων και των μεταβολιτών τους (Sun et al., 2010).

Το ισοένζυμο *GSTP1-1* είναι ομοδιμερές (Σχήμα 3.2.A.) με την κάθε υπομονάδα να έχει μοριακό βάρος 23,355.8 Da και να αποτελείται από 210 αμινοξέα και ένα ενεργό

κέντρο. Η G-θέση περιλαμβάνει το αμινοξικό κατάλοιπο τυροσίνη στη θέση 8 του ενεργού κέντρου (Tyr8). Η τυροσίνη αλληλεπιδρά και ενεργοποιεί τη σουλφυδρυλομάδα της GSH ώστε να προκύψει καταλυτικά ενεργό σουλφύδιο ($-S^-$) (Chronopoulou et al., 2013).

Η N-τελική περιοχή ακολουθεί α/β τοπολογία πτυχών βαβαββα. Στο τέλος της έλικας α_3 , ξεκινά ένας μικρός συνδέτης που ενώνει τις N- και C-τελικές περιοχές. Είναι γνωστό ότι όλες οι διαλυτές GSTs έχουν σχεδόν ίδιες πολυπεπτιδικές πτυχές, όμως κάθε τάξη επιδεικνύει μοναδικά χαρακτηριστικά, ειδικά στη C-τελική περιοχή (Manevich et al., 2004). Η C-τελική περιοχή αποτελείται αποκλειστικά από έλικες. Το ενεργό κέντρο του ισοενζύμου *hGSTP1-1* φαίνεται ως μεγάλη και ανοικτή κοιλότητα. Η G-θέση βρίσκεται στην πολική N-περιοχή που σχηματίζεται από τις έλικες H1, H2 και H3. Στο παρακάτω Σχήμα 3.2 φαίνεται η τεταρτοταγής δομή του *hGSTP1-1*, καθώς και οι θέσεις G- και H-.



Σχήμα 3.2. **A.** Απεικόνιση της τεταρτοταγής δομής της *hGSTP1* από ανθρώπινο πλακούντα έχοντας συζευχθεί με την S-εξυλγλουταθειόνη, PDB κωδικός: 1GSS. Η εικόνα έγινε με το πρόγραμμα ChemBio3D Ultra 13.0. **B.** Οι θέσεις G- και H-, είναι οι θέσεις που προσδέονται τα υποστρώματα. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα PyMol (Delano, 2002). Η S-εξυλγλουταθειόνη παριστάνεται με ράβδους.

Αναλύσεις κρυσταλλικών δομών του *hGSTP1-1* (Inoue et al., 1995, Mannervik et al., 1987, Sun et al., 2010) αποκάλυψαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων των ομοδιμερών τριών τύπων: πολικές επαφές, δεσμούς υδρογόνου καθώς και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, όπου περιλαμβάνεται και το μοτίβο «κλειδί-κλειδαριά». Στο *hGSTP1-1* το αμινοξικό κατάλοιπο-κλειδί είναι η Tyr50. Για να ερευνηθεί η σημασία του αμινοξέος-κλειδί για το διμερισμό και τη σταθερότητα του *hGSTP1-1*, έχουν γίνει διάφορες μεταλλάξεις (Okuyama et al., 1994). Το αμινοξύ Tyr50 στο *hGSTP1-1*, παίζει ρόλο στη δομή και στη λειτουργία του ισοενζύμου ως μέρος της ευέλικτης έλικας H2. Οι Hegazy et al., (2004) ανέφεραν ότι η μετάλλαξη της τυροσίνης σε αλανίνη στη θέση 50, προκαλεί μείωση της τιμής της k_{cat} , περίπου 1.300-φορές σε σχέση με αυτή του άγριου τύπου.

Δομή και λειτουργίες του ισοενζύμου hGST2-2

Φυλογενετικές μελέτες που αφορούν στην οικογένεια των GSTs, έχουν αναγνωρίσει παρόμοιες θ -τάξεις στα θηλαστικά, στα έντομα, στα φυτά, στα ψάρια, στους μύκητες, στις ζύμες και στα βακτήρια. Η ύπαρξη αυτής της θ τάξης, σε μεγάλο εύρος ειδών δείχνει και τη μακρόχρονη ιστορικά εξελικτική της πορεία, σε σχέση με αυτή των τάξεων α , μ και π (Tan & Board, 1996).

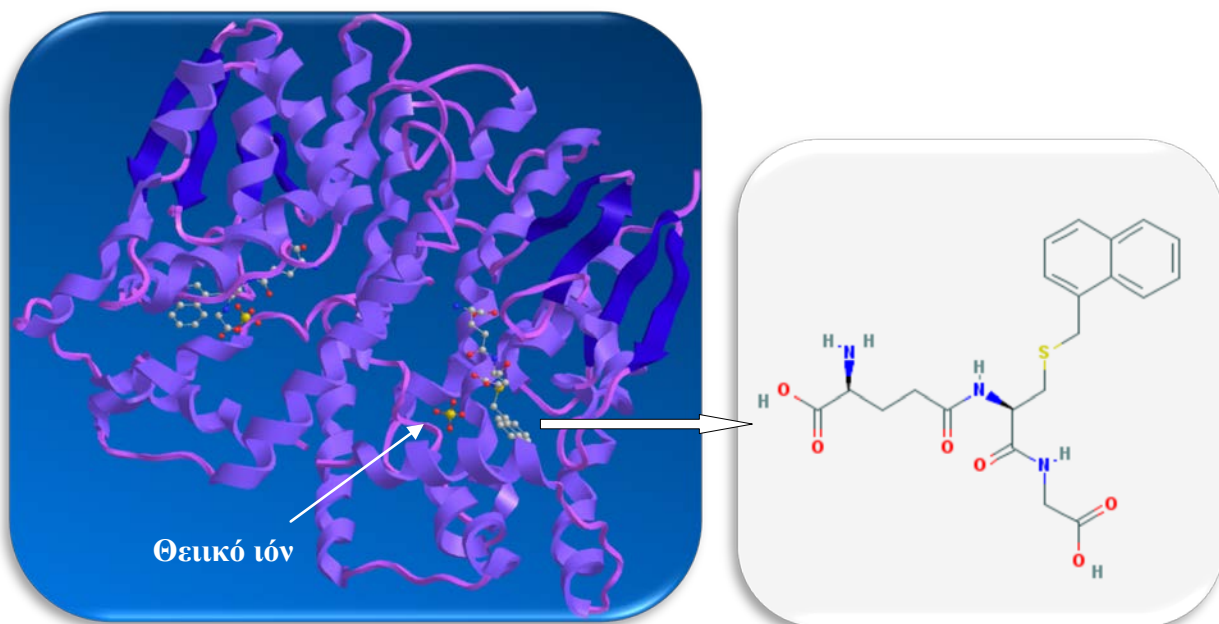
Οι GSTs της θ τάξης χαρακτηρίζονται κυρίως από αντιοξειδωτική δράση για τα κύτταρα, γι' αυτό άλλωστε έχει βρεθεί ότι το υπεροξειδίο του κουμενίου, αποτελεί άριστο υπόστρωμα για το ισοένζυμο GSTT2-2 (Hussey & Hayes, 1992, Tan & Board, 1996), ενώ παρουσιάζει πολύ μικρή δραστικότητα ως προς το CDNB (Chronopoulou et al, 2012a). Για χρόνια η έλλειψη δραστικότητας με το υπόστρωμα CDNB, αποτελούσε κριτήριο κατάταξης το οποίο έπαυε να ισχύει, όταν βρέθηκαν GSTs από τη θ τάξη από το φυτό *Brassica oleracea* (μπρόκολο) να είναι ενεργές με αυτό το υπόστρωμα (Lopez et al., 1994).

Το αμινοξικό κατάλοιπο Ser11, φαίνεται να είναι σημαντικό για την καταλυτική δράση της θ τάξης GSTs, καθώς μετάλλαξη της Ser11 σε Ala στο ένζυμο GSTT2-2 περιόρισε τη δράση υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, έχοντας ως υπόστρωμα το υδροϋπεροξειδίο του κουμενίου (CuOOH) και τη δράση σύζευξης με το εθακρινικό

οξύ, αλλά διπλασίασε τη δραστηριότητα με το 1-menaphthyl sulphate (MSu) (Tan et al., 1996).

Οι GSTs της θ τάξης των θηλαστικών δέχονται σαν υποστρώματα θειϊκού εστέρες και θεωρούνται σημαντικές για την πρόληψη της ηπατοκαρκινογένεσης (Hussey & Hayes, 1992). Επίσης έχουν χρησιμοποιηθεί στον μεταβολισμό βιομηχανικών χημικών ενώσεων, όπως τα αλογονωμένα αλκάνια και αλειφατικά εποξειδία, των οποίων οι μεταβολίτες μπορεί να προκαλούν καρκινογένεσεις και μεταλλάξεις (Hiratsuka et al., 1994).

Το ισοένζυμο *hGSTT2-2* διαφοροποιείται δομικά ως προς τις GSTs των άλλων τάξεων, λόγω της σερίνης ως υπεύθυνο αμινοξικό κατάλοιπο για την ενεργοποίηση της GSH, καθώς και λόγω της επιμηκυμένης C-τελικής περιοχής με 40 αμινοξικά κατάλοιπα. Επίσης παρουσιάζει μοναδική δραστηριότητα σουλφατάσης, διαθέτοντας μια περιοχή δέσμευσης θειϊκού ιόντος, που βρίσκεται βαθιά στο ενεργό κέντρο (Rossjohn et al., 1998) (Σχήμα 3.3.).



Σχήμα 3.3. Αναπαράσταση του συμπλόκου της τρισδιάστατης δομής του ισοενζύμου *hGSTT2-2* με τη συζευγμένη 1-μεναφθυλ-γλουταθειόνη, PDB κωδικός: 3LJR. Η δομή της πρωτεΐνης σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα ChemBio Draw Ultra 13.0 και η δομή της συζευγμένης γλουταθειόνης προήλθε από την ιστοσελίδα pubchem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Δομή και λειτουργίες του ισοένζυμου hGSTO1-1

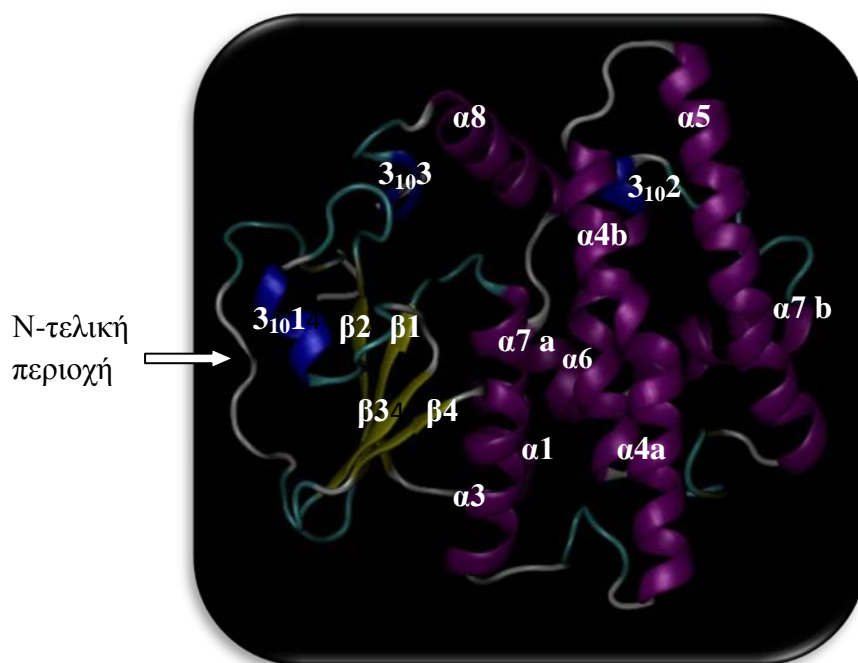
Το ισοένζυμο *hGSTO1-1*, έχει αρκετά χαρακτηριστικά που το διαχωρίζουν από τις άλλες GSTs, και μέσα σε αυτά συμπεριλαμβάνεται η εκτεταμένη N-τελική περιοχή (Zhou et al., 2012) (Σχήμα 3.4) και το αμινοξικό κατάλοιπο Cys32 στο ενεργό κέντρο, που επιτρέπει το σχηματισμό δισουλφιδικού δεσμού με τη GSH (Board et al., 2000). Μετάλλαξη της Cys-32 σε Ala φαίνεται να περιορίζει τη δράση θειοτρανσφεράσης, ενώ αυξάνει τη δραστικότητα της μεταφοράς της γλουταθειόνης (Board et al., 2000). Επίσης στο μεσοδιάστημα των δύο υπομονάδων κυριαρχούν μη-πολικές αλληλεπιδράσεις και αυτό βρέθηκε να είναι σε βάθος αρκετά μικρό (1.960 Å²), σε σχέση με αυτό των άλλων GST διμερών (2.700-3.400 Å²) (Sheehan et al., 2001).

Η ο τάξη των ανθρώπινων GSTs (*hGSTO1-1* και *hGSTO2-2*), έχει διαφορετικές ιδιότητες με αυτές των άλλων γνωστών GSTs (Board et al., 2000). Το ισοένζυμο *hGSTO1-1* παρουσιάζει δράση θειοτρανσφεράσης και αναγωγής του διϋδροασκορβικού οξέος, δράσεις που είναι χαρακτηριστικές της γλουταρεδοξίνης (Washburn & Wells, 1999). Επίσης λειτουργεί ως αναγωγή του αρσενικού ανιόντος, του μονομεθυλ-αρσενικού οξέος και του διμεθυλ-αρσενικού οξέος (Aposhian et al., 2004; Zakharyan et al., 1999). Ακόμα το ισοένζυμο *hGSTO1-1* είναι δομικά όμοιο με τις πρωτεΐνες CLIC, μια οικογένεια πρωτεϊνών των ενδοκυτταρικών καναλιών χλωρίου. Επιπλέον ρυθμίζει την ενεργοποίηση του υποδοχέα της ρυανοδίνης (Dulhunty et al., 2001) και παίρνει μέρος στο αντιοξειδωτικό σύστημα του πυρήνα (Yin et al., 2001). Ακόμα οι GSTs αυτής της τάξης εμπλέκονται στην λειτουργία και απελευθέρωση της προ-φλεγμονώδης κυτοκίνης, την ιντερλευκίνη-1 (Laliberte et al., 2003).

Το ισοένζυμο *hGSTO1-1* απαντά σε αρκετούς διαφορετικούς ανθρώπινους ιστούς όπως στην αορτή, στα οστά, στο στήθος, στον εγκέφαλο, στον κεντρικό νευρικό σύστημα, στις ωοθήκες, στο έντερο, στο πάγκρεας, στον παραθυροειδή αδένα, στον οισοφάγο, στο στομάχι στον προστάτη, στους όρχεις, στη μήτρα, στη λέμφο και σε ολόκληρο το έμβρυο. Αυτή η ευρεία μορφής έκφραση έρχεται σε αντίθεση με τις άλλες GSTs, κάτι που δείχνει ότι το συγκεκριμένο ισοένζυμο έχει θεμελιώδη ρόλο στον μεταβολισμό του κυττάρου (Board et al., 2000).

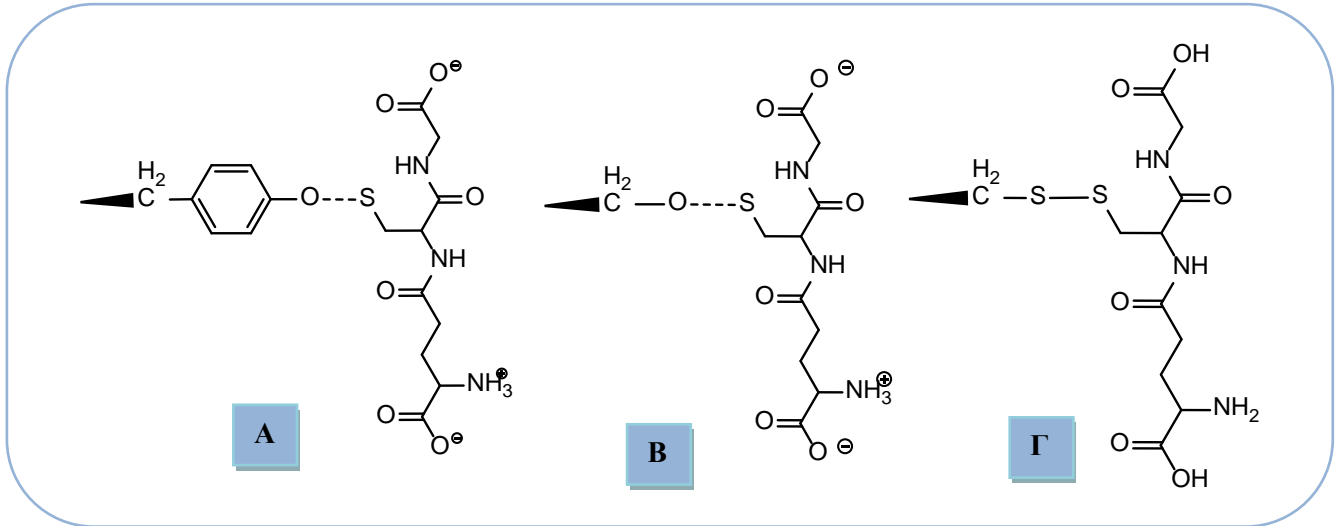
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Πολυμορφισμοί της σ τάξης των GSTs έχουν συσχετιστεί σημαντικά με την έναρξη των ασθενειών Alzheimer και Parkinson (Li et al., 2002). Οι ασθένειες αυτές διαμορφώνονται κάτω από συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης του εγκεφάλου. Τα ισοένζυμα *hGSTO1-1* και *hGSTO2-2* έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας μέσω της δράσης τους ως αναγωγάσες του διϋδροασκορβικού οξέος, συνεπώς έτσι εξηγείται και ο σημαντικός τους ρόλος σε αυτές τις παθήσεις (Zhou et al., 2012). Επίσης σε πλήθος μελετών έχει αναφερθεί η συσχέτιση τους με εύρος διαταραχών, συμπεριλαμβανομένης της αμυοτροφικής πλευρικής σκλήρυνσης (van de Giessen et al., 2008) και την ανάπτυξη οξείας λεμφοβλαστικής παιδικής λευχαιμίας (Pongstaporn et al., 2009).

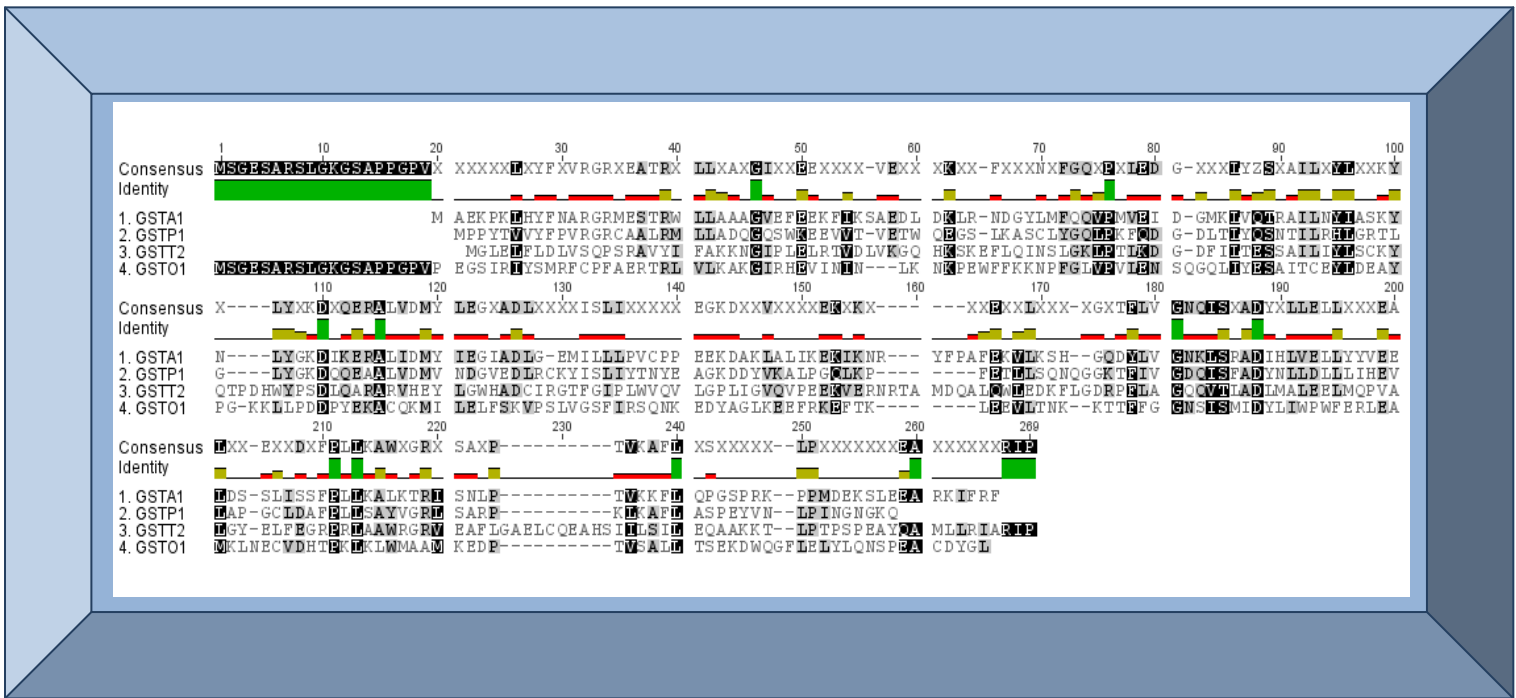


Σχήμα 3.4. Τριτοταγής δομή του ισοενζύμου *hGSTO1-1* (κωδικός PDB: 1EEM).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3



Σχήμα 3.5. **A.** Το αμινοξικό κατάλοιπο Tyr της N-τελικής περιοχής που αλληλεπιδρά με τη GSH σταθεροποιώντας το απο-πρωτονιωμένο σουλφυδρύλιο, έχοντας ως αποτέλεσμα την μείωση της τιμής pK_a (τάξεις α και π). **B.** το αμινοξικό κατάλοιπο Ser της N-τελικής περιοχής, που αλληλεπιδρά με τη GSH σταθεροποιώντας το απο-πρωτονιωμένο σουλφυδρύλιο (θ τάξη) **Γ.** το αμινοξικό κατάλοιπο Cys της N-τελικής περιοχής, αλληλεπιδρά με τη GSH σχηματίζοντας δισουλφιδικό δεσμό (σ τάξη).



Σχήμα 3.6. Αμινοξική αλληλούχιση των ισοενζύμων *hGSTA1*, *hGSTP1*, *hGSTT2* και *hGSTO1* με το πρόγραμμα Geneious v.5.5 (<http://www.geneious.com/>) (Drummond et al., 2011). Οι σκιασμένες περιοχές είναι οι συντηρημένες.

3.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.3.1. ΥΛΙΚΑ

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν, αναφέρονται στο Κεφάλαιο 2.

3.3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

3.3.2.1. ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ *hGSTP1*Α* ΣΤΟΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ pEXP-5 CT/TA-ΤΟΡΟ[®]

Αρχικά πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR για την απομόνωση του γονιδίου *hGSTP1*Α*. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 μ L περιέχοντας: 10 ng μήτρα πλασμιδίου, 0,125 mM από κάθε ένα από τα τέσσερα dNTPs, 10 μ L 5 \times Pfu διάλυμα buffer, 1 unit από την υψηλής πιστότητας DNA πολυμεράση Phusion[®] High-fidelity (FINNZYMES) και 8 pmol από κάθε εκκινητή. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι συνθήκες της αντίδρασης.

Πίνακας 3.2. Οι εκκινητές GSTP2AF και GSTP1AP καθώς και οι συνθήκες κάτω από τις οποίες ενισχύθηκε το γονίδιο *GSTP1*Α*.

ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ (5'→ 3')
GSTP1AF	ATGCCGCCCTACACCGTGTT
GSTP1AR	TCACTGTTTCCCGTTGCCAT
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ	
1. Αρχική αποδιάταξη	96 °C για 3 λεπτά
2.1. Αποδιάταξη	95 °C για 2 λεπτά
2.2. Υβριδισμός	53 °C για 2 λεπτά
2.3. Επιμήκυνση	72 °C για 2 λεπτά
3. Τελική επιμήκυνση	72 °C για 10 λεπτά

Μετά την ολοκλήρωση της PCR ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v), ώστε να αναλυθεί το προϊόν της αντίδρασης. Παρατηρήθηκε μια ζώνη μεγέθους ~ 650 bp, η οποία και αντιστοιχεί στο μέγεθος του γονιδίου. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εισαγωγή του γονιδίου της αντίδρασης στον T7 πλασμιδιακό φορέα pEXP-5 CT/TA-TOPO[®]. Αυτός ο πλασμιδιακός φορέας, παρέχεται από το pEXP-5 CT/TA-TOPO[®] kit της εταιρείας Invitrogen και τα χαρακτηριστικά του φαίνονται στο Σχήμα 2.2. Η διαδικασία εισαγωγής του γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα περιγράφεται στη παράγραφο 2.2.15. Ο μετασχηματισμός των κυττάρων *E. coli* TOP10 με το ανασυνδιασμένο γονίδιο έγινε σύμφωνα με την μέθοδο της παραγράφου 2.2.8. Τα μετασχηματισμένα πλέον κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία Petri με θρεπτικό διάλυμα LB –άγαρ και για αντιβιοτικό αμπικιλίνη 100 µg/mL. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα μη μετασχηματισμένα και ως θετικός μάρτυρας κύτταρα μετασχηματισμένα με τον φορέα PUC19.

Για να ελεγχθούν οι κλώνοι οι οποίοι φέρουν την ένθεση επιλέχθηκαν 20 αποικίες οι οποίες αναπτύχθηκαν ξεχωριστά σε υγρό θρεπτικό διάλυμα LB ώστε να ακολουθήσει η μικρής κλίμακας ετερόλογη έκφραση των μετασχηματισμένων κυττάρων. Η έκφραση έγινε σύμφωνα με την § 2.2.18. Στη συνέχεια μελετήθηκαν ως προς την ενζυμική τους δραστηριότητα έχοντας ως υπόστρωμα το CDNB (§ 2.2.31.). Επιλέχθηκε ο καλύτερος κλώνος pT7hGSTP1*A ο οποίος και αλληλουχήθηκε και στη συνέχεια εκφράστηκε σε κύτταρα BL21(DE3) *E. coli*, ώστε να καθαριστεί το ένζυμο με χρωματογραφία συγγένειας και να μελετηθεί περαιτέρω.

3.3.2.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *hGSTP1*B*, *hGSTP1*C*, *hGSTA1-1* *hGSTO1-1* ΚΑΙ *hGSTT2-2*

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA, από τα εκφραστικά πλασμίδια pOXO4-*hGSTP1*B*, pOXO4-*hGSTP1*C*, pOXO4-*hGSTA1-1*, pQE30-*hGSTO1-1* και pQE30-*hGSTT2-2*, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης (§ 2.2.7.).

3.3.2.3. ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ENZYΜΩΝ *hGSTP1*A*, *hGSTP1*B*, *hGSTP1*C* ΚΑΙ *hGSTA1-1* ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ *E. coli* ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ BL21(DE3)

Κατόπιν μετασηματισμού των κυττάρων BL21(DE3) *E. coli*, με ανασυνδιασμένο DNA των πλασμιδίων pT7*hGSTP1*A*, pOXO4-*hGSTP1*B*, pOXO4-*hGSTP1*C* και pOXO4-*hGSTA1-1*, καλλιεργήθηκαν και αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο LB το οποίο περιείχε αμπικιλίνη (100 µg/mL) (για την κυτταρική καλλιέργεια *E. coli* με το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο pT7*hGSTP1*A*) και χλωραμφαινικόλη (33 µg/mL) (για τις κυτταρικές καλλιέργειες *E. coli* με τα ανασυνδιασμένα πλασμίδια pOXO4-*hGSTP1*B*, pOXO4-*hGSTP1*C* και pOXO4-*hGSTA1-1*). Η έκφραση των γονιδίων, επάχθηκε από τον επαγωγέα IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM, ο οποίος εισήχθη στην υγρή καλλιέργεια όταν η απορρόφηση στα 600 nm ήταν 0,6. Μετά το διάστημα 4 ωρών τα κύτταρα συλλέχθηκαν, με φυγοκέντριση στις 8000 rpm στους 4 °C για 20 λεπτά.

3.3.2.4. ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ENZYΜΩΝ GSTS ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ *E. coli* ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ BL21(DE3)

Για την έκφραση των γονιδίων GSTO1-1 και GSTT2-2, μετασηματίστηκαν τα κύτταρα M15[pREP4] *E. coli* με τα ανασυνδιασμένα πλασμίδια pQE30*hGST O1-1* και pQE30*hGST T2-2*. Στη συνέχεια αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό διάλυμα LB, έχοντας ως αντιβιοτικό αμπικιλίνη (100 µg/mL) και καναμυκίνη (25 µg/mL). Η έκφραση των γονιδίων επάχθηκε με τον παράγοντα IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM, ο οποίος εισήχθη στην υγρή καλλιέργεια όταν η απορρόφηση στα 600 nm έφτασε 0,6. Μετά το διάστημα 4 ωρών τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντριση, στις 8000 rpm στους 4 °C για 20 λεπτά.

3.3.2.5. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ENZYΜΩΝ *hGSTA1-1*, *hGSTP1*A*, *hGSTP1*B*, *hGSTP1*C* ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ BES-GSH

Το βιολογικό εκχύλισμα το οποίο συλλέχθηκε, αιωρήθηκε σε υδατικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH₂PO₄ συγκέντρωσης 20 mM, pH 7), ώστε να πραγματοποιηθεί λύση των κυττάρων με υπερήχους. Τα μετασηματισμένα κύτταρα

χρειάστηκαν τέσσερις επαναλήψεις των 10 sec για την λύση τους. Το τελικό αιώρημα φυγοκεντρίθηκε για 5 λεπτά στις 13,000 rpm. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε φωτομετρικά η ενζυμική δραστηριότητα των υπερκείμενων με το σύστημα GSH-CDNB (§2.2.31.) καθώς και η συνολική πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford (§ 2.2.25.). Ακολούθησε διαπίδυση σε διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4 συγκέντρωσης 20 mM, pH 7) για 20 ώρες και επαναπροσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας των ενζύμων.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των ενζύμων με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας με προσροφητή 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρα-GSH-Sepharose-CL6B (BES-GSH). Οι πρωτεΐνες που δεν δεσμεύονται στην στήλη απομακρύνθηκαν με 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης (KH_2PO_4 συγκέντρωσης 20 mM, pH 7) . Οι εκλούσεις των GSTs που προσδέθηκαν στη στήλη έγιναν με ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης που περιείχε 10 mM γλουταθειόνης. Στην παράγραφο 2.2.21. περιγράφεται αναλυτικά η χρωματογραφία συγγένειας. Η καθαρότητα των εκλούσεων και τα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης εκτιμήθηκαν ηλεκτροφορητικά σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (12,5 % SDS-PAGE) κάτω από συνθήκες μετουσίωσης (§2.2.29.).

3.3.2.6. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ENZYMΩΝ *hGSTT2-2* ΚΑΙ *hGSTO1-1* ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΣΕ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ Ni-IDA-ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Το βιολογικό εκχύλισμα το οποίο συλλέχθηκε, επαναδιαλύθηκε στο διάλυμα εξισορρόπησης (υδατικό διάλυμα όξινο φωσφορικού νατρίου Na_2HPO_4 συγκέντρωσης 50 mM, pH 8 και 0,3 M NaCl), ώστε να πραγματοποιηθεί λύση των κυττάρων με υπερήχους (4 επαναλήψεις των 10 sec). Το τελικό αιώρημα φυγοκεντρίθηκε για 5 λεπτά στις 13,000 rpm. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε φωτομετρικά η ενζυμική δραστηριότητα των υπερκείμενων, με το σύστημα GSH-CDNB (§2.2.31.) καθώς και η συνολική πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford (§2.2.25.). Ακολούθησε διαπίδυση σε διάλυμα όξινο φωσφορικού νατρίου (Na_2HPO_4 συγκέντρωσης 50 mM, pH 8 και 0,3 M NaCl) για 20 ώρες και επαναπροσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας των ενζύμων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Στη συνέχεια ακολούθησε καθαρισμός των ενζύμων με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας, με προσροφητή ιμινοδιοξικού οξέος (Ni-IDA-Sepharose) (1 mL, Sigma-Aldrich, USA). Οι πρωτεΐνες που δεν δεσμεύονται στην στήλη απομακρύνθηκαν με 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης και 10 ml διαλύματος έκπλυσης (Na_2HPO_4 συγκέντρωσης 50 mM, pH 8 και 0,3 M NaCl). Η εκλούσεις των ενζύμων *hGSTT2-2* και *hGSTO1-1* έγιναν σε τρία κλάσματα με ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης και διαφορετικές συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου (20 mM, 100 mM και 250 mM). Στα τρία αυτά κλάσματα των 3 ml προσδιορίστηκε η GST ενζυμική δραστηριότητα με υπόστρωμα το CDNB. Η καθαρότητα των εκλούσεων και τα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης εκτιμήθηκαν ηλεκτροφορητικά σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (12,5 % SDS-PAGE) κάτω από συνθήκες μετουσίωσης (§2.2.29.). Στην παράγραφο 2.2.23. περιγράφεται αναλυτικά η χρωματογραφία συγγένειας με μεταλλοχηλικό προσροφητή.

3.3.2.7. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών έγινε με την μέθοδο Bradford (§2.2.25) χρησιμοποιώντας αλβουμίνη μόσχου για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης.

3.3.2.8. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ (%) ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ ΑΠΟ 27 ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

Για τον προσδιορισμό της αναστολής των GSTs κατά την έκθεση τους σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα, εκτιμάται η δραστηριότητα του ενζύμου με το σύστημα CDNB-GSH στους 37 °C (§ 2.2.31.) πριν και μετά την έκθεση. Συνεπώς, στην κυβέτα σε τελικό όγκο 1 ml περιέχονταν: 2,5 mM GSH, 1 mM CDNB, 0,1 mM εντομοκτόνου ή ζιζανιοκτόνου (διαλυμένο σε ακετόνη), ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M KH_2PO_4 pH 6,5 και το ένζυμο. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το ίδιο μίγμα, χωρίς ένζυμο και η αντίδραση μελετήθηκε φωτομετρικά υπολογίζοντας τον ρυθμό αύξησης της απορρόφησης στα 340 nm. Οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν και παρουσιάζεται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων. Ως 1 Unit ενζύμου λαμβάνεται η ποσότητα εκείνη του ενζύμου για την παραγωγή 1 μmol προϊόντος ανά λεπτό σε pH=6,5 και στους 37

⁰C. Το ποσοστό % της αναστολής του ενζύμου υπολογίστηκε με την εξίσωση: % αναστολή = $R_0 - R_i / R_0$ όπου R_0 είναι ο ρυθμός αύξησης της απορρόφησης για την μη αναστέλλουσα αντίδραση και R_i ο ρυθμός αύξησης της απορρόφησης για την αναστέλλουσα αντίδραση. Και οι δύο ρυθμοί αφορούν στην ίδια συγκέντρωση υποστρώματος.

3.3.2.9. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΤΙΜΗΣ IC₅₀ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ *hGSTA1-1* ΑΠΟ ΤΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ DIELDRIN ΚΑΙ SPIROMESIFEN

Ο προσδιορισμός της τιμής IC₅₀ έγινε φωτομετρικά παρακολουθώντας το σχηματισμό του συμπλόκου του CDNB με τη GSH στα 340 nm για κάθε διαφορετική συγκέντρωση των εντομοκτόνων. Συγκεκριμένα υπολογίστηκε η ενζυμική δραστηριότητα του *hGSTA1-1*, υπό την παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων εντομοκτόνων με ένα εύρος τιμών από (0-0,08 mM) για το dieldrin και (0-0,09 mM) για το spiromesifen στους 20 ⁰C, 25 ⁰C και 37 ⁰C. Επίσης προσδιορίστηκαν οι τιμές IC₅₀ και για διαφορετικές τιμές pH του ρυθμιστικού διαλύματος (pH 6,5, 7,0 και 7,5) στους 37 ⁰C. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής (30-60 sec) δεν παρατηρήθηκε καμία αντίδραση μεταξύ εντομοκτόνου και GSH. Οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν και παρουσιάζεται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων. Οι τιμές IC₅₀ προσδιορίστηκαν προσαρμόζοντας τα αποτελέσματα συγκέντρωσης-δραστηριότητας στην εξίσωση: % αναστολή = $100 / [1 + (IC_{50} / [I])]$, όπου [I] η συγκέντρωση του εντομοκτόνου. Οι τιμές IC₅₀ προέκυψαν κατόπιν επεξεργασίας των αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., Version 5.03).

3.3.2.10. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ *hGSTA1-1* ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΩΝ DIELDRIN ΚΑΙ SPIROMESIFEN

Η κινητική ανάλυση του *hGSTA1-1* έχοντας την GSH ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα, πραγματοποιήθηκε στους 37 ⁰C σε τελικό όγκο μίγματος 1 mL περιέχοντας 0,1 M δισόξινο φωσφορικό κάλιο (pH 6,5), 1 mM CDNB και διαφορετικές συγκεντρώσεις GSH (0,075-5,25 mM) απουσίας ή παρουσίας διαφορετικών συγκεντρώσεων dieldrin (0-5 μM) ή spiromesifen (0-15 μM). Επίσης

έχοντας το CDNB ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το μίγμα αντίδρασης τελικού όγκου 1 mL, περιείχε 0,1 M δισόξινο φωσφορικό κάλιο (pH 6,5), 2,5 mM GSH και CDNB σε συγκεντρώσεις από 0,05 mM έως 1,05 mM απουσίας ή παρουσίας διαφορετικών συγκεντρώσεων dieldrin (0-5 μ M) ή spiromesifen (0-15 μ M). Οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν και παρουσιάζεται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων, των οποίων η επεξεργασία έγινε με το πρόγραμμα GraFit 3 (Erithacus Software Ltd., Version 3.06).

3.3.2.11. ΠΡΟΣΛΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΗΜΕΙΟΥ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΩΝ DIELDRIN ΚΑΙ SPIROMESIFEN ΣΤΟ ΕΝΖΥΜΟ *hGSTA1-1* ΜΕ ΙN SILICO ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ

Η μοριακή προσομοίωση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Autodock Vina (Trott & Olson, 2010). Ως πρότυπο χρησιμοποιήθηκε το σύμπλοκο του ενζύμου *hGSTA1-1* με το εθακρινικό οξύ με κωδικό 1GSF (από τη βάση δεδομένων PDB) (Cameron et al., 1995). Χρησιμοποιήθηκαν προκαθορισμένες τιμές κατά την προσομοίωση. Το μέγεθος του πλέγματος προσομοίωσης καθορίστηκε στα $40^\circ \text{A} \times 40^\circ \text{A} \times 40^\circ \text{A}$ ώστε να καλύψει τη G- και H-θέση. Το διάστημα πλέγματος είχε την τιμή την προκαθορισμένη (0, 375 A°). Η εργασία αυτή έγινε από τον Dr. A. Parageorgiou (Τούρκου, Φιλανδία).

3.3.2.12. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΩΝ DIELDRIN ΚΑΙ SPIROMESIFEN ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΕΡΟΥ

Για τον προσδιορισμό των εντομοκτόνων dieldrin και spiromesifen σε δείγματα νερού καταγράφηκε ο ρυθμός της αύξησης της απορρόφησης (340 nm) και το ποσοστό της αναστολής % υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την μαθηματική εξίσωση: % αναστολή = $R_0 - R_i / R_0$, όπου R_0 και R_i είναι ο ρυθμός αύξησης της απορρόφησης στη μη αναστέλλουσα και αναστέλλουσα αντίδραση, αντίστοιχα. Αυτά τα πειράματα ανάκτησης πραγματοποιήθηκαν με δείγματα πόσιμου νερού από το δίκτυο της Αθήνας και μεταλλικού νερού (Korpi, NESTLE Hellas), στα οποία είχαν

προστεθεί γνωστές ποσότητες από τα δύο εντομοκτόνα (0,8-10 μM) του dieldrin και του spiromesifen.

3.3.2.13. HPLC ΚΑΙ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΕΣ

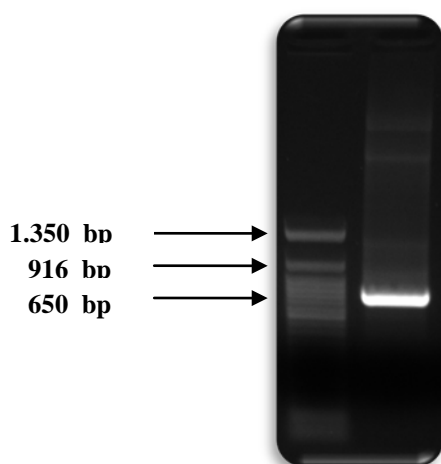
Θέλοντας να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα μας με αυτά μιας κλασικής μεθόδου αναλυτικής χημείας (HPLC), πραγματοποιήθηκε ανάλυση των δειγμάτων νερού (§ 3.3.2.12), με τη συμμετοχή του Α. Μαρκόγλου (Εργ. Φαρμακολογίας, Γ.Π.Α.).

Αρχικά έγιναν πρότυπα μητρικά διαλύματα ανάλυσης (0.2 mg/mL) του spiromesifen και του dieldrin σε μεθανόλη και ακετόνη, αντίστοιχα. Τα πρότυπα διαλύματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν και είχαν διάφορες συγκεντρώσεις προήλθαν από την αραιώση του μητρικού διαλύματος σε μεθανόλη. Αυτά τα διαλύματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C . Ακόμα προετοιμάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα που περιείχε και τις δύο ενώσεις σε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/mL}$ η κάθε μία, από πρότυπα διαλύματα. Έξι πρότυπα διαλύματα από spiromesifen και dieldrin σε συγκεντρώσεις από 0,1 έως 10 $\mu\text{g/mL}$ σε μεθανόλη προετοιμάστηκαν ώστε να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπα βαθμονόμησης. Τα δύο εντομοκτόνα προσδιορίστηκαν από το σύστημα Shimadzu HPLC εξοπλισμένο με αντλία δυαδικού διαλύματος (LC-10ADvp), DGU-14A απασερωτή, CTO-10Avp στήλη φούρνου, SIL-10ADvp αυτόματο δειγματολήπτη με καθορισμένο όγκο έγχυσης 10 μL , και έναν ανιχνευτή υπεριώδους συστοιχίας φωτοδιοδίων (SPD-M10Avp). Η απόκτηση και επεξεργασία των στοιχείων έγινε με το LC/MS solution Ver. 3.0 Workstation. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε Discovery reversed-phase C18 narrow-bore column (250 \times 4.6 mm id, 5 μm μέγεθος σωματιδίου), με θερμοστάτη στους 40°C . Η κινητή φάση ήταν ακετονιτρίλιο-0,1 M οξικό οξύ (85:15, v/v), η διανεμόταν ισοθερμικά με ρυθμό ροής 0,7 mL min^{-1} για 20 min. Η πρότυπη γραφική παράσταση ήταν γραμμική για τον ανιχνευτή υπεριώδους συστοιχίας φωτοδιοδίων, με εύρος τιμών από 0,1 έως 10 $\mu\text{g/mL}$, και το όριο ανίχνευσης (LOD) της αναλυτικής μεθόδου ήταν περίπου 0,1 $\mu\text{g/mL}$ για το spiromesifen και 1 $\mu\text{g/mL}$ για το dieldrin. Η γραμμικότητα καθορίστηκε από πρότυπες καμπύλες σε έξι συγκεντρώσεις με εύρος τιμών από 0,1 έως 10 $\mu\text{g/mL}$.

3.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.4.1. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *hGSTP1*A* ΜΕ ΑΛΥΣΙΑΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Με την μέθοδο της PCR, ενισχύθηκε το γονίδιο του ισοενζύμου *hGSTP1*A*. Οι εκκινητές και οι συνθήκες της αντίδρασης φαίνονται στον Πίνακα 3.2. και στην παράγραφο 3.3.2.1. Στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της αντίδρασης σε αγαρόζη (1% w/v).



Σχήμα 3.7. Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της αντίδρασης PCR σε πηκτή αγαρόζης (1% w/v), για την ενίσχυση του γονιδίου *hGSTP1*A*, με τους εκκινητές *GSTP1AF* και *GSTP1AR*. Ως δείκτης μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο 50 bp DNA Ladder (Biolabs).

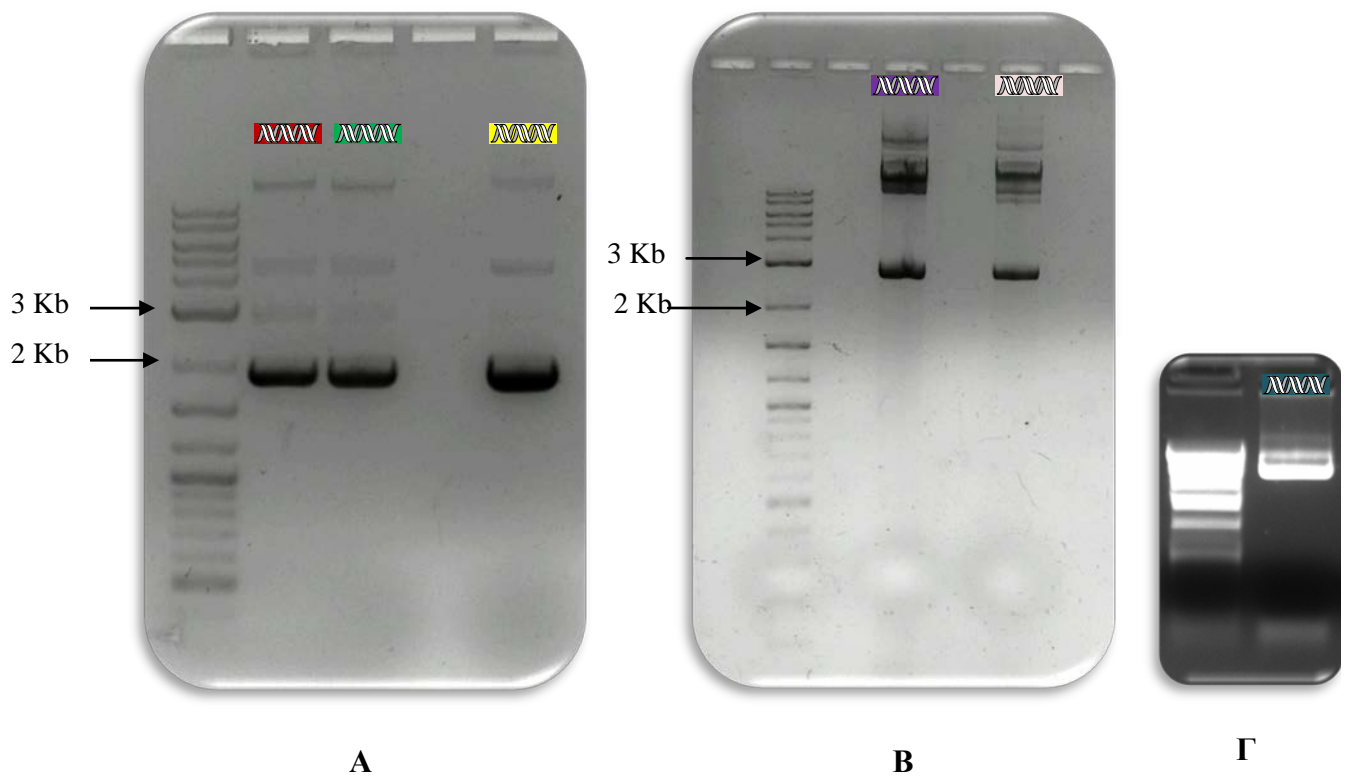
Ακολούθως πραγματοποιήθηκε εισαγωγή του γονιδίου, στον T7 πλασμιδιακό φορέα pEXP-5 CT/TA-TOPO[®] και μετασχηματισμός των κυττάρων *E. coli* TOP10 με το ανασυνδιασμένο γονίδιο. Τα μετασχηματισμένα πλέον κύτταρα, επιστρώθηκαν σε τρυβλία Petri με θρεπτικό διάλυμα LB –άγαρ έχοντας ως αντιβιοτικό την αμπικιλίνη (100 µg/mL). Επιλέχθηκε εκείνη η αποικία με την καλύτερη καταλυτική δραστηριότητα και αλληλουχήθηκε το πλασμιδιακό DNA, για την επιβεβαίωση του γονιδίου *hGSTP1*A*.

3.4.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *hGSTP1*B*, *hGSTP1*C*, *hGSTA1-1* *hGSTO1-1* ΚΑΙ *hGSTT2-2*

Με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης (§2.2.7), απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA από τα πλασμίδια pEXP-5CT- *hGSTP1*A*, pOXO4-*hGSTP1*B*, pOXO4-*hGSTP1*C*, pOXO4-*hGSTA1-1*, pQE30-*hGSTO1-1* και pQE30-*hGSTT2-2*. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, το προϊόν κάθε απομόνωσης αναλύθηκε

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

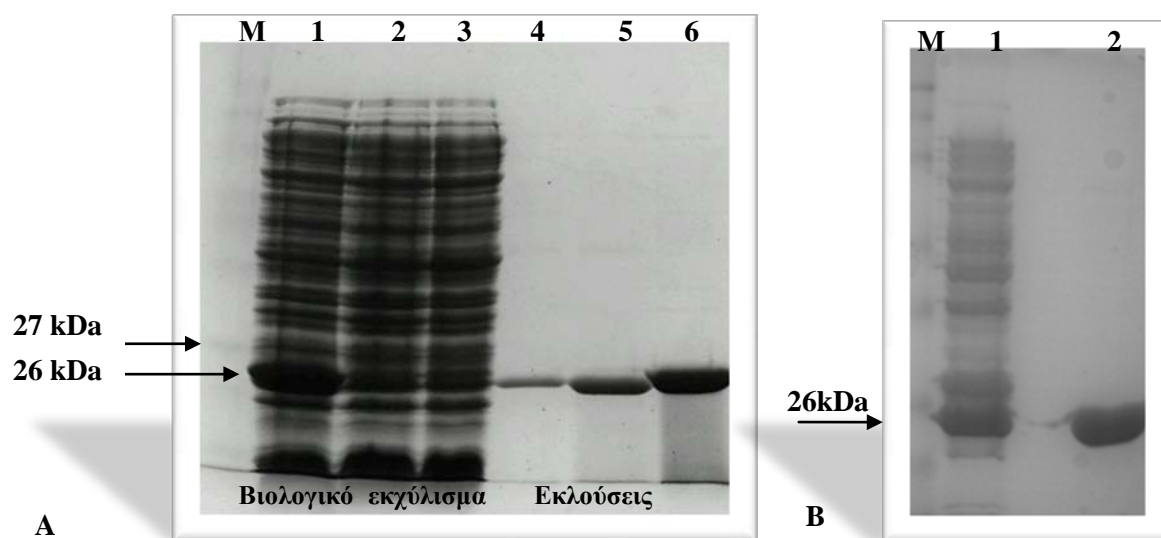
ηλεκτροφορητικά σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.8.



Σχήμα 3.8. Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA των γονιδίων **A.** (hGSTA1-1, hGSTP1*B, hGSTP1*C **B.** hGSTT2-2 και hGSTO1-1 **Γ.** hGSTP1*A κατόπιν απομόνωσης τους με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης σε πηκτή αγαρόζης (1% w/v). Ως δείκτης μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο 2-Log DNA Ladder (Biolabs).

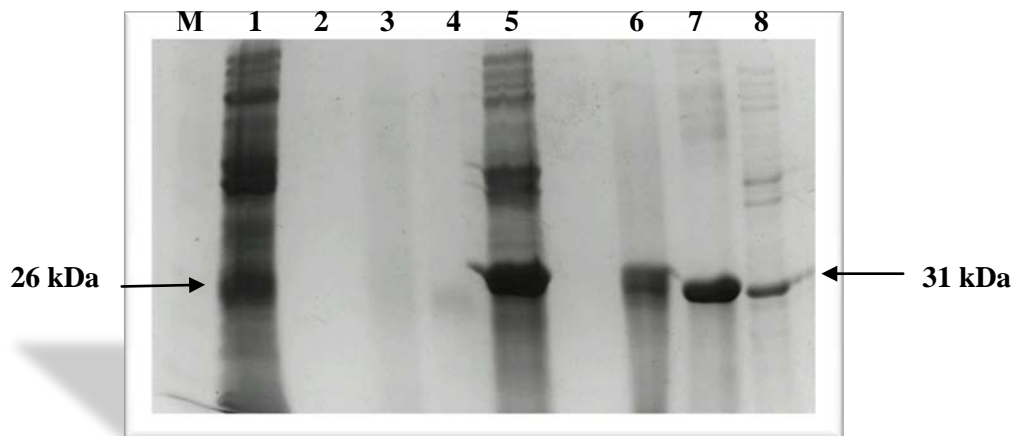
3.4.3. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ENZYΜΩΝ *hGSTA1-1*, *hGSTP1*A*, *hGSTP1*B*, *hGSTP1*C*, *hGSTT2-2* ΚΑΙ *hGSTO1-1*, ΜΕΣΩ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΚΑΙ ΙΟΝΤΟΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ

Τα ισοένζυμα *hGSTA1-1*, *hGSTP1*A*, *hGSTP1*B* και *hGSTP1*C* καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας και προσροφητή BES-GSH, με υψηλές αποδόσεις 100%, 100%, 68% και 79%, αντίστοιχα (Πίνακας 3.3). Στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση, κάτω από συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS για να ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης των ισοενζύμων (Σχήμα 3.9).



Σχήμα 3.9. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (12,5 % w/v) παρουσία SDS, σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970). Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250. **A.** M: Protein Marker Broad Range (Biolabs), **1-3:** Το βιολογικό εκχύλισμα πριν τον καθαρισμό με τη χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή BES-GSH. **1:** το βιολογικό εκχύλισμα μετασχηματισμένων κυττάρων, με το γονίδιο του ισοενζύμου *hGSTA1-1*, **2:** το βιολογικό εκχύλισμα μετασχηματισμένων κυττάρων, με το γονίδιο του ισοενζύμου *hGSTP1*B*, **3:** το βιολογικό εκχύλισμα μετασχηματισμένων κυττάρων, με το γονίδιο του ισοενζύμου *hGSTP1*C* **4-6:** ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα των εκλούσεων καθαρής πρωτεΐνης. **4:** έκλυση *hGSTP1*B*, **5:** έκλυση *hGSTP1*C*, **6:** έκλυση *hGSTA1-1*. **B.** M: Protein Marker Broad Range (Biolabs), **1:** το βιολογικό εκχύλισμα μετασχηματισμένων κυττάρων, με το γονίδιο του ισοενζύμου *hGSTP1*A* πριν τον καθαρισμό με τη χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή BES-GSH, **2:** έκλυση *hGSTP1*A*.

Σε αντίθεση με τις GSTs των τάξεων α , μ και π , οι GSTs της θ τάξης των θηλαστικών δεν συγκρατούνται σε χρωματογραφική στήλη έχοντας ως δεσμευτή τη γλουταθειόνη ή την S-εξυλγλουταθειόνη, καθώς η G-θέση είναι «θαμμένη» λόγω της επιμηκυμένης C-τελικής περιοχής (Rossjohn et al., 1998), γι' αυτό και από την αρχή το ισοένζυμο *hGSTT2-2* επιλέχθηκε να εκφραστεί σε pQE30 πλασμίδιο, ώστε να ακολουθήσει χρωματογραφία μεταλλοχηλικής συγγένειας. Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι το ισοένζυμο *hGSTT2-2*, παρουσιάζει πολύ χαμηλή ή καθόλου δραστηριότητα με το υπόστρωμα 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) (Tan & Board, 1996). Το ίδιο ισχύει και για το ισοένζυμο *hGSTO1-1*, του οποίου η δραστηριότητα με το CDNB βρέθηκε να είναι χαμηλή, κάτι το οποίο έχει επιβεβαιωθεί και στο παρελθόν και φαίνεται να οφείλεται στο αμινοξικό κατάλοιπο Cys 32 του ενεργού κέντρου (Board et al., 2000). Το ισοένζυμο *hGSTO1-1*, καθαρίστηκε και αυτό με μεταλλοχηλική χρωματογραφία συγγένειας, λόγω της δυσκολίας πρόσδεσης σε προσροφητή με δεσμευτή τη GSH. Τα επίπεδα απόδοσης και για τα δύο ισοένζυμα δεν ήταν ιδιαίτερα υψηλά (Πίνακας 3.3).



Σχήμα 3.10. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (12,5 % w/v) παρουσία SDS, σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970). Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250. **M:** Protein Marker Broad Range (Biolabs), **1:** το βιολογικό εκχύλισμα μετασχηματισμένων κυττάρων, με το γονίδιο του ισοενζύμου *hGSTT2-2*, πριν τον καθαρισμό με μεταλλοχηλική χρωματογραφία συγγένειας **2-4:** εκλούσεις καθαρού ενζύμου *hGSTT2-2* **5:** το βιολογικό εκχύλισμα μετασχηματισμένων κυττάρων, με το γονίδιο του ισοενζύμου *hGSTO1-1*, πριν τον καθαρισμό με μεταλλοχηλική χρωματογραφία συγγένειας **6-8:** εκλούσεις καθαρού ενζύμου *hGSTO1-1*.

Πίνακας 3.3. Αποτελέσματα από τη χρωματογραφία συγγένειας για κάθε ισοένζυμο.

Ισοένζυμο	Απόδοση καθαρισμού (%)	Ειδική δραστικότητα καλύτερης έκλουσης
<i>hGSTA1-1</i>	100	95,818 U/mg
<i>hGSTP1*A</i>	100	15,965 U/mg
<i>hGSTP1*B</i>	68	4 U/mg
<i>hGSTP1*C</i>	79	83 U/mg
<i>hGSTT2-2</i>	61	0,682 U/mg
<i>hGSTO1-1</i>	10	0,515 U/mg

3.4.4. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ *hGSTA1-1*, *hGSTP1*A*, *hGSTP1*B*, *hGSTP1*C*, *hGSTT2-2* ΚΑΙ *hGSTO1-1*, ΑΠΟ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

Έχοντας ως σκοπό την ανάπτυξη μιας απλοποιημένης μεθόδου ανίχνευσης, φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε περιβαλλοντικά δείγματα, κρίθηκε πρώτα απ' όλα απαραίτητο να μελετηθούν διαφορετικά ισοένζυμα GST που απαντούν στον άνθρωπο, ως προς την επίδραση των φυτοπροστατευτικών. Επομένως μελετήθηκε η αναστολή των ενζύμων *hGSTA1-1*, *hGSTP1*A*, *hGSTP1*B*, *hGSTP1*C*, *hGSTT2-2* και *hGSTO1-1*, παρουσία ζιζανιοκτόνων και εντομοκτόνων (οι δομές τους παρατίθενται στο παράρτημα) τελικής συγκέντρωσης 0,1 mM. Στον παρακάτω Πίνακα 3.4 και στο Σχήμα 3.11 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα φαίνεται ότι οι τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα συμπεριφέρονται ως ισχυροί αναστολείς επιδεικνύοντας >60% αναστολή για τα ένζυμα *hGSTA1-1* και *hGSTP1*B*. Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα παρουσίασαν μέτρια αναστολή, με εξαίρεση το dichlorvos το οποίο προκάλεσε αναστολή >90%

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

στο ένζυμο *hGSTA1-1*. Ακόμα τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα, οι σπινοσύνες καθώς και το *fluorodifen* από τους διφαινυλικούς αιθέρες, φαίνεται να αναστέλλουν σημαντικά τα ισοένζυμα *hGSTA1-1* και *hGSTP1*B* και λιγότερο το *hGSTP1*A* και το *hGSTP1*C*. Η ομάδα των καρβαμιδικών εντομοκτόνων δεν φαίνεται να αναστέλλει σημαντικά κανένα από τα ισοένζυμα ενώ το ίδιο ισχύει γενικά και για τα ζιζανιοκτόνα που μελετηθήκαν. Επίσης είναι αξιοσημείωτο ότι κάποια εντομοκτόνα όπως το *spiromesifen* προάγουν την ενεργοποίηση των ενζύμων *hGSTP1*C*, *hGSTT2-2* και *hGSTO1-1*, ενώ προκαλούν αναστολή των ενζύμων *hGSTA 1-1* και *hGSTP1*B* μεγαλύτερη από 90%. Αυτό το φαινόμενο έχει ήδη παρατηρηθεί και με άλλες GSTs (Dixon & Edwards, 2010b).

Γενικά, από αυτή τη μελέτη φαίνεται ότι το ένζυμο *hGSTA1-1* είναι πιο ευάλωτο στην αναστολή, υπό την επίδραση φυτοπροστατευτικών σε σχέση με τα άλλα ένζυμα που μελετήθηκαν, ενώ το *hGSTO1-1* είναι το λιγότερο ευαίσθητο. Συνεπώς επιλέχθηκε το *hGSTA1-1* για περαιτέρω ανάλυση και συγκεκριμένα μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του, με τα εντομοκτόνα *dieldrin* και *spiromesifen*, καθώς αυτά προκάλεσαν και τη μεγαλύτερη αναστολή >95% (Σχήμα 3.11).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

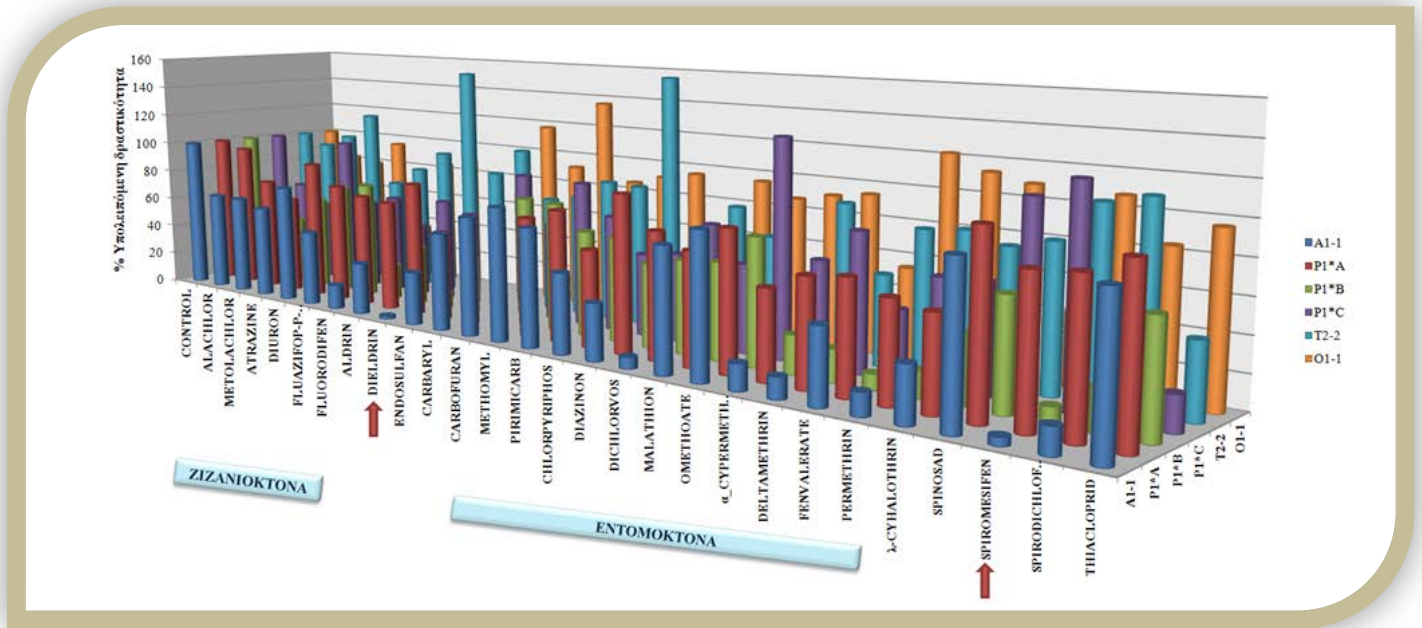
Πίνακας 3.4. Υπολειπόμενη δραστικότητα (%) των ενζύμων *hGSTA1-1*, *hGSTP1*A*, *hGSTP1*B*, *hGSTP1*C*, *hGSTT2-2* και *hGSTO1-1*, μετά την επίδραση ζιζανιοκτόνων και εντομοκτόνων. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών επαναλήψεων, με απόκλιση λιγότερη του 5% για όλες τις περιπτώσεις. Απουσία ξενοβιοτικού η ενζυμική δραστικότητα θεωρήθηκε 100%.

	ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ						
	ΠΡΟΪΟΝΤΑ	<i>hGSTA1-1</i>	<i>hGSTP1*A</i>	<i>hGSTP1*B</i>	<i>hGSTP1*C</i>	<i>hGSTT2-2</i>	<i>hGSTO1-1</i>
Ζιζανιοκτόνα	ΙΣΟΕΝΖΥΜΑ						
	ΧΛΩΡΟΑΚΕΤΑΜΙΔΙΑ						
	Alachlor	64,2	95,8	49,6*	65,3	93,3	82,6
	Metolachlor	64,2	73,9	44,2*	52,4	100,9	79,2
	ΤΡΙΑΖΙΝΕΣ						
	Atrazine	60	63,5	60,3	99,4	117,6	95,2
	Diuron	76,4	90,3	71	58,9	70,4	35,7*
	ΑΡΥΛΟΞΥΦΑΙΝΟΞΥΠΡΟΠΙΟΝΙΚΑ ΟΞΕΑ						
	Fluazifop-p-butyl	48,5*	77,2	75,6	64,1	82,3	83,6
	ΔΙΦΑΙΝΥΛΙΚΟΙ ΑΙΘΕΡΕΣ						
Fluorodifen	15,7*	72,6	22,8*	47*	95,5	88,1	
Εντομοκτόνα	ΟΡΓΑΝΟΧΛΩΡΙΩΜΕΝΑ						
	Aldrin	33,3*	70,8	37,9**	66,4	152,4	67,7
	Dieldrin	2,1**	85,3	10,3*	59,9	85,7	69,7
	Endosulfan	33,5*	56,2	37*	20*	102,9	117,2
	ΚΑΡΒΑΜΙΔΙΚΑ						
Carbaryl	61,2	68,7	60,3	90,6	72,4	91,9	
Carbofuran	74	68,7	80,3	60,6	76,4	135,9	
Methomyl	82,6	73,3	79,5	89,8	88,2	85,9	
Pirimicarb	72,7	80,5	64,8	71,1	87,6	91,5	

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

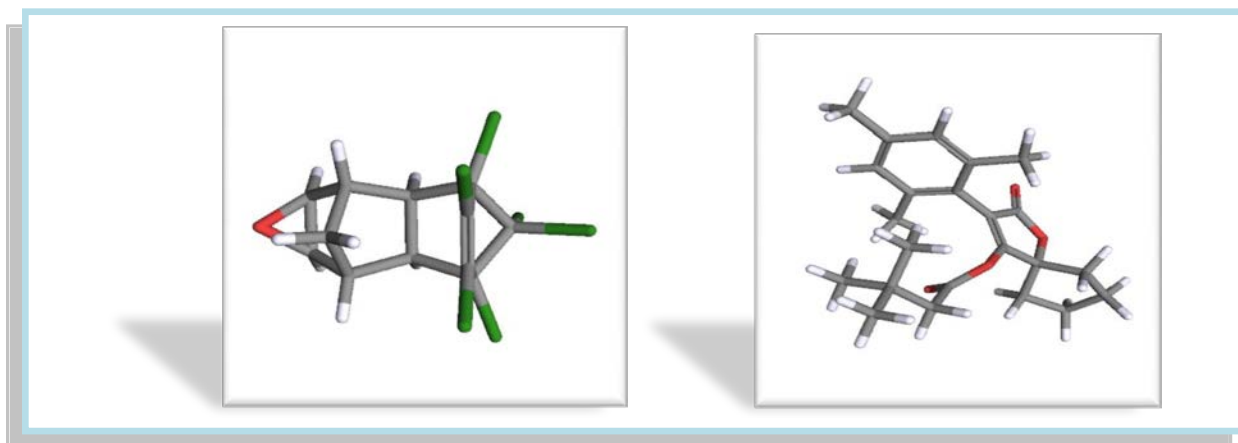
ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ	ΙΣΟΕΝΖΥΜΑ					
	<i>hGSTA1-1</i>	<i>hGSTP1*A</i>	<i>hGSTP1*B</i>	<i>hGSTP1*C</i>	<i>hGSTT2-2</i>	<i>hGSTO1-1</i>
ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ						
Chlorpyrifos	49,1*	59,4	63,8	50,4	157,1	95,4
Diazinon	34,5*	95,1	50,8	53,5	42*	50,5
Dichlorvos	7**	76	56,3	74,2	81,9	95,1
Malathion	73,9	67,7	58,1	53,5	66,7	86,8
Omethoate	85,4	83,2	75,5	129,5	35,7*	91,1
ΠΥΡΕΘΡΟΕΙΔΗ						
α -Cypermethrin	15,7*	53,1	23,1*	61,7	91,4	94
Deltamethrin	12,7*	62,9	19,2*	81,1	53,3	53,9
Fenvalerate	43,9*	65,6	9,4**	40,6*	82	121,8
Permethrin	13,3*	58	15,6*	61,8	84,2	113,3
Lambda-cyhalothrin	32,1*	54,1	39,8*	62,7	78	108,9
ΣΠΙΝΟΣΥΝΕΣ						
Spinosad	89,1	101	63	110	83,8	41,7*
ΕΣΤΕΡΕΣ ΤΕΤΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ						
Spiromesifen	4,8**	82,1	9,8**	120,8	106,7	107,2
Spirodiclofen	15,1*	83,7	23,5*	42,4*	111,7	83,8
ΝΕΟΝΙΚΟΤΙΝΟΕΙΔΗ						
Thiacloprid	84,2	93,7	63,4	20,3*	42,9*	96

Υποσημείωση: *τιμές < 50%, ** τιμές <10%

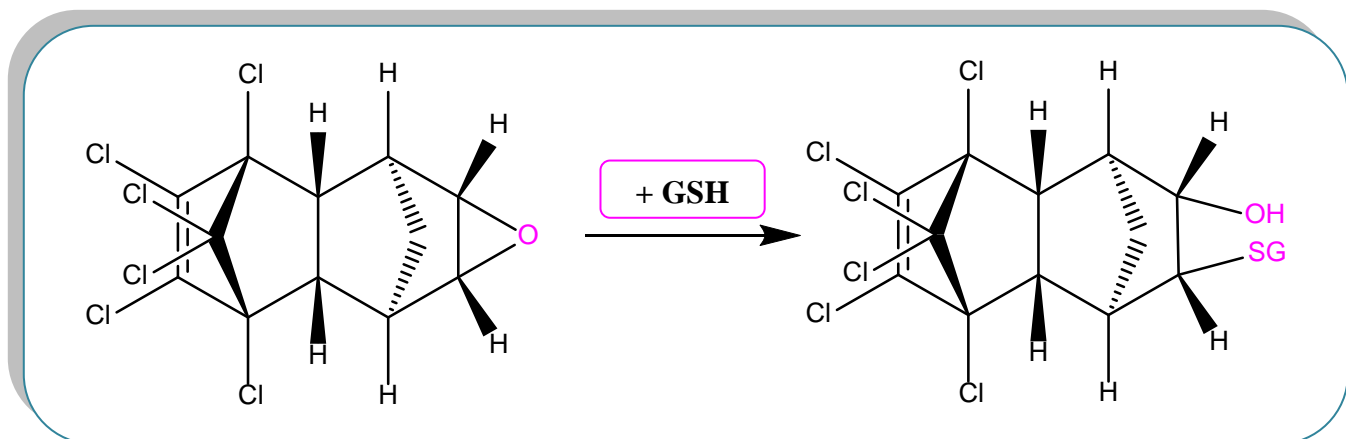


Σχήμα 3.11. Μελέτη της υπολειπόμενης δραστηριότητας (%) των ενζύμων *hGSTA1-1*, *hGSTP1*A*, *hGSTP1*B*, *hGSTP1*C*, *hGSTT2-2* και *hGSTO1-1*, υπό την επίδραση φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Οι μετρήσεις έγιναν με το σύστημα GSH-CDNB.

Το dieldrin ανήκει στα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα στην ομάδα των κυκλοδιενίων και αποτελεί ένα από τα πιο ενεργά και ευρέως φάσματος εντομοκτόνα επαφής. Αναστέλλει τη λειτουργία των καναλιών των ιόντων χλωρίου που συνδέονται με τους υποδοχείς του GABA. Αποτέλεσμα της αναστολής αυτής είναι η υπερδιέγερση του νευρικού συστήματος (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 2008). Ως κυκλικό εποξειδίο, κατά τον μεταβολισμό του με τη GSH, αυτή προκαλεί διάσπαση του εποξειδικού δακτυλίου του dieldrin (Κλώνης, 2007), σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση μεταβολισμού (Σχήμα 3.13).



Σχήμα 3.12. Δομές των εντομοκτόνων dieldrin και spiromesifen (όπου ● = άνθρακας, ● = χλώριο, ● = υδρογόνο, ○ = οξυγόνο).



Σχήμα 3.13. Μεταβολισμός του οργανοχλωριωμένου εντομοκτόνου dieldrin με διάσπαση του εποξειδικού δακτυλίου και εισαγωγή της GSH.

Το spiromesifen είναι εστέρας του τετρονικού οξέος (μακροκυκλική ένωση) και ανήκει, στους αναστολείς της βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων. Έχει ακαρεοκτόνο και εντομοκτόνο δράση η οποία είναι αργή, ενώ παρουσιάζει μεγάλη υπολειμματικότητα (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 2008).

3.4.5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ *hGSTA1-1*, ΑΠΟ ΤΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ DIELDRIN ΚΑΙ SPIROMESIFEN

3.4.5.1. Προσδιορισμός της ημίσειας ανασταλτικής ισχύος (IC50) των εντομοκτόνων *dieldrin* και *spiromesifen*, ως προς το ένζυμο *hGSTA1-1*

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.4, τα εντομοκτόνα *dieldrin* και *spiromesifen*, προκαλούν τη μεγαλύτερη αναστολή στο ισοένζυμο *hGSTA1-1* και γι' αυτό επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη και για τον προσδιορισμό της τιμής ανασταλτικής ισχύος IC50. Η τιμή αυτή υποδηλώνει την τιμή της συγκέντρωσης του ξενοβιοτικού, που προκαλεί αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου κατά 50%. Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε, για τον προσδιορισμό των τιμών IC50 είναι η ακόλουθη:

$$\% \text{ Αναστολή} = 100 / [1 + (\text{IC50} / [\text{I}])],$$

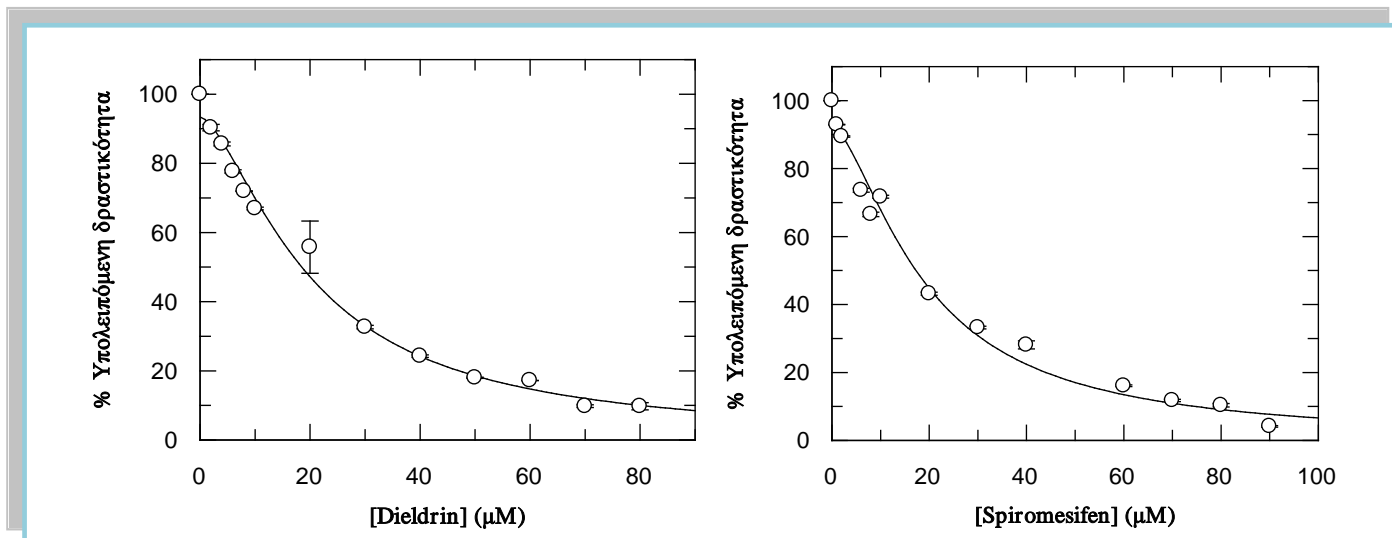
όπου [I] η συγκέντρωση του παρεμποδιστή.

Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις δοκιμών, για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας του *hGSTA1-1*, υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων των εντομοκτόνων. Το εύρος τιμών συγκέντρωσης κυμαινόταν από 0 έως 0,08 mM για το *dieldrin* και από 0 έως 0,09 mM για το *spiromesifen*. Ακόμα προσδιορίστηκε η τιμή IC50 σε διαφορετικές θερμοκρασίες (20 °C, 25 °C και 37 °C), καθώς και σε διαφορετικές τιμές pH του ρυθμιστικού διαλύματος (pH 6,5, 7,0 και 7,5) στους 37 °C. Στον Πίνακα 3.5. παρουσιάζονται οι τιμές IC50 για το ισοένζυμο *hGSTA1-1* ως προς το *dieldrin* και το *spiromesifen* σε διαφορετικές τιμές pH και θερμοκρασίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Πίνακας 3.5. Τιμές IC₅₀ των dieldrin και spiromesifen ως προς το *hGSTA1-1*. Οι τιμές IC₅₀ προσδιορίστηκαν σε pH 6,5 για διαφορετικές θερμοκρασίες (20 °C, 25 °C, 37 °C) και στους 37 °C για διαφορετικές τιμές pH (pH 6,5, 7, 7,5).

Φυτοπροστατευτικά προϊόντα	IC ₅₀ ± S.E.M at pH 6,5		
	37 °C	25 °C	20 °C
Dieldrin	17,9 ± 1,7 μM	34,5 ± 4,5 μM	98,3 ± 45,8 μM
Spiromesifen	12,1 ± 3,4 μM	79,5 ± 9,7 μM	24,2 ± 0,9 μM
	IC ₅₀ ± S.E.M at 37° C		
	pH=6,5	pH=7	pH=7,5
Dieldrin	17,9 ± 1,7 μM	47,2 ± 3,3 μM	50,4 ± 18,1 μM
Spiromesifen	12,1 ± 3,4 μM	62 ± 12,9 μM	29,5 ± 4,3 μM

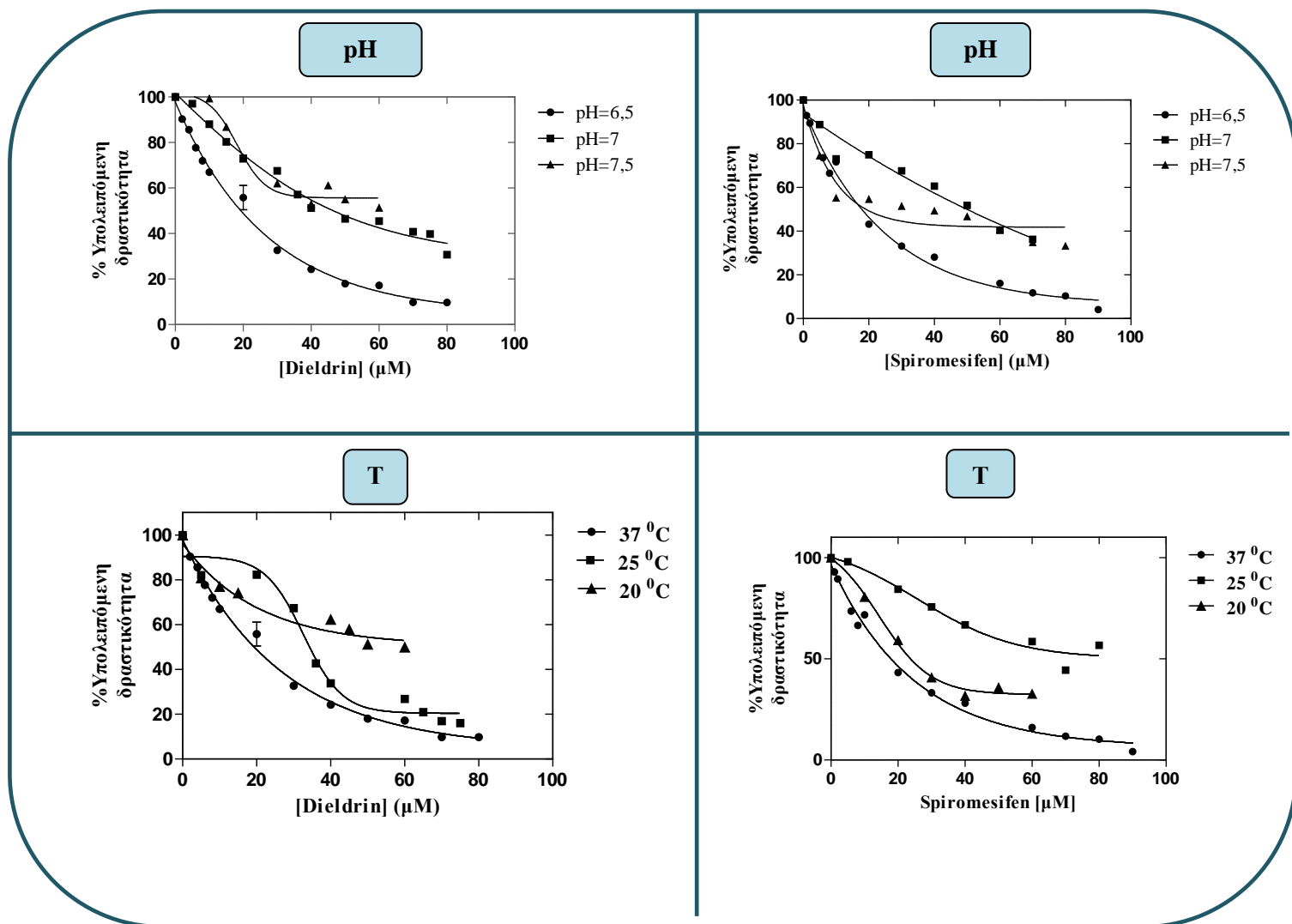


Σχήμα 3.14. Καμπύλες συγκέντρωσης-υπολειπόμενης δραστηριότητας για τα εντομοκτόνα dielrin και spiromesifen. Όλες οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν χρησιμοποιώντας το σύστημα CDNB-GSH, σε pH 6,5 και στους για 37 °C.

3.4.5.2. Επίδραση pH και θερμοκρασίας στην αναστολή του ενζύμου hGSTA1-1

Η θερμοκρασία επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την ταχύτητα της αντίδρασης και αυτό οφείλεται σε αρκετούς παράγοντες, καθώς επηρεάζει την σταθερότητα και στερεοδομή του ενζύμου, τη διαλυτότητα των αντιδρώντων, τη συγγένεια αδρανοποιητών και ενεργοποιητών με το ένζυμο, την ιοντική ισχύ, τη διηλεκτρική σταθερά κ.α. Το ίδιο ισχύει και για το pH, παίζοντας σημαντικό ρόλο στη στερεοδιάταξη του ενζύμου, καθώς και στη συγγένεια του ενζύμου με το υπόστρωμα και με άλλα μόρια (Κλώνης, 2007). Συνεπώς θεωρήθηκε πλέον απαιτούμενο, να προσδιοριστεί η επίδραση της θερμοκρασίας και του pH, στην αναστολή του hGSTA1-1 από το dieldrin και το spiromesifen, έτσι προσδιορίστηκαν οι τιμές IC₅₀ σε διαφορετικές συνθήκες pH και θερμοκρασίας (Πίνακας 3.5).

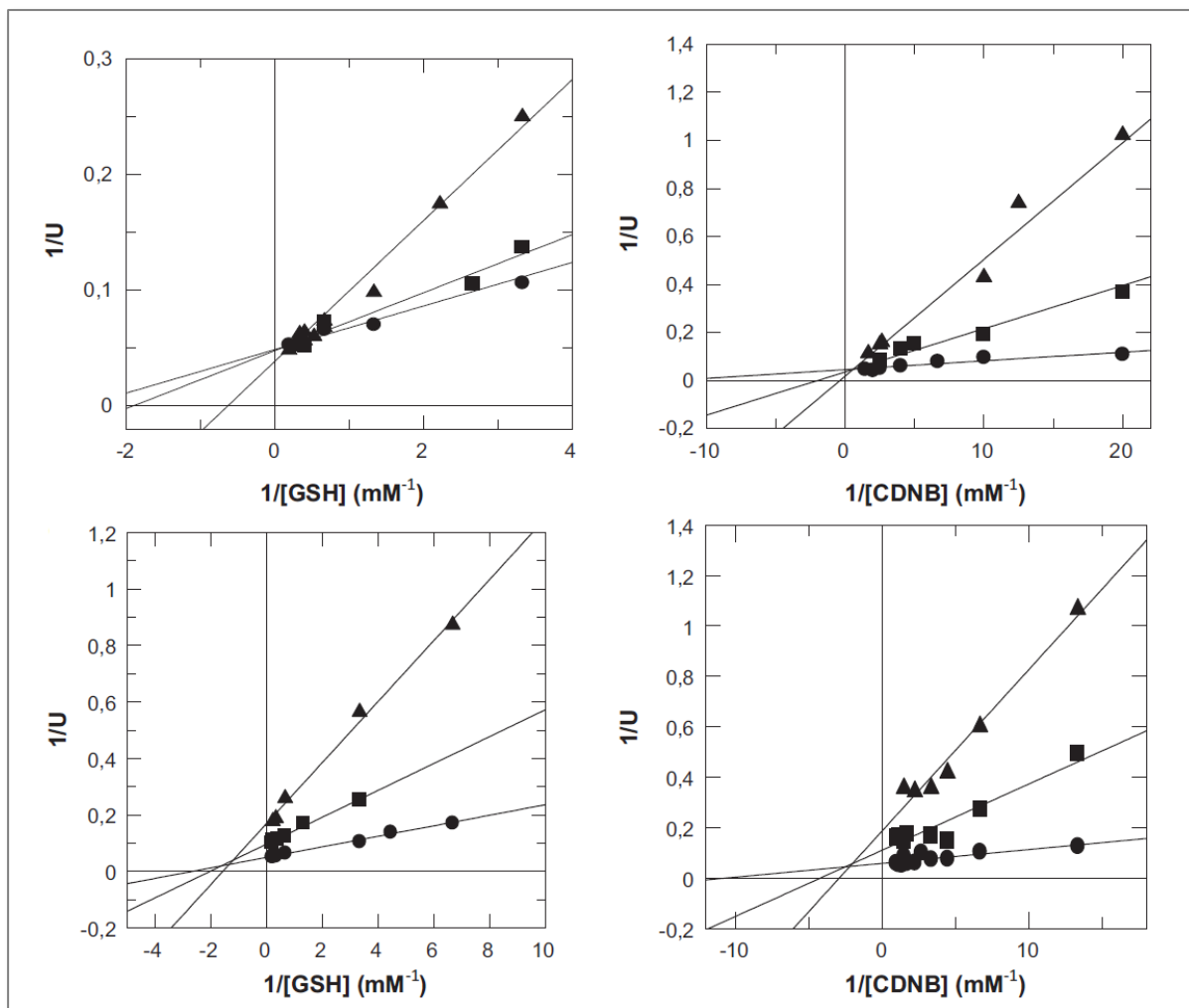
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δείχνουν ότι οι τιμές IC₅₀ εξαρτώνται και από τους δύο παράγοντες, επιδεικνύοντας ότι τυχόν αλλαγές στη θερμοκρασία και στο pH, επηρεάζουν σημαντικά τη συγγένεια των φυτοπροστατευτικών για το ένζυμο. Συγκεκριμένα μειώθηκε σημαντικά η δυνατότητα αναστολής του ενζύμου, από το dieldrin και το spiromesifen, με αυξήσεις στο pH και μειώσεις της θερμοκρασίας. Οι τιμές IC₅₀ ήταν χαμηλότερες στους 37 °C και σε pH 6,5 και για τα δύο εντομοκτόνα. Στο Σχήμα 3.15 φαίνονται οι καμπύλες συγκέντρωσης-υπολειπόμενης δραστηριότητας των δύο εντομοκτόνων, για διαφορετικές συνθήκες pH και θερμοκρασίας.



Σχήμα 3.15. Καμπύλες συγκέντρωσης-υπολειπόμενης δραστηριότητας του ενζύμου *hGSTA1-1*, ως προς τα εντομοκτόνα dieldrin και spiromesifen, σε διαφορετικές συνθήκες pH και θερμοκρασίας. Όλες οι μετρήσεις έγιναν χρησιμοποιώντας το σύστημα CDNB–GSH.

3.4.5.3. *Κινητική ανάλυση του ενζύμου hGSTA1-1, κάτω από διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων dieldrin και spiromesifen και προσδιορισμός του τύπου αναστολής*

Με σκοπό να προσδιοριστεί το σημείο σύνδεσης των dieldrin και spiromesifen στο hGSTA1-1, πραγματοποιήθηκαν μελέτες κινητικής ανάλυσης με αναστολέα (Σχήμα 3.16) Το dieldrin παρουσίασε μικτού τύπου αναστολή ως προς το υπόστρωμα της GSH ($K_i = 2,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$) και του CDNB ($K_i = 0,1 \pm 0,01 \mu\text{M}$). Στο διάγραμμα διπλού αντιστρόφου (Lineweaver–Burk) οι ευθείες για το μάρτυρα (ένζυμο χωρίς αναστολή) και για τις δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις του dieldrin, τέμνουν τον άξονα των τεταγμένων $1/U$, ενώ τέμνονται στο πρώτο τεταρτημόριο. Μικτού τύπου αναστολή προκαλεί και το spiromesifen ως προς τη GSH ($K_i = 2,2 \pm 0,12 \mu\text{M}$) και το CDNB ($K_i = 0,4 \pm 0,02 \mu\text{M}$). Με τις ευθείες να τέμνονται στο τέταρτο τεταρτημόριο. Η μικτή αναστολή που παρουσιάζουν τα δύο εντομοκτόνα, αποτελεί συνδυασμό ανταγωνιστικής και συναγωνιστικής αναστολής. Σύμφωνα με τα παραπάνω συνάγεται ότι το dieldrin και το spiromesifen, δεσμεύονται στο ελεύθερο ένζυμο hGSTA1-1 και στο σύμπλοκο του ενζύμου με το υπόστρωμα, αλλά η συγγένεια τους ως προς τις δύο αυτές μορφές του ενζύμου είναι διαφορετική ($K_{ic} \neq K_{iu}$). Συνεπώς, το dieldrin και το spiromesifen, εμπλέκονται στη δέσμευση του υποστρώματος (π.χ. αυξάνουν την K_m) και παρακωλύουν την κατάλυση στο σύμπλοκο ένζυμο-υπόστρωμα (π.χ. μειώνουν τη V_{max}).



Σχήμα 3.16. Μελέτες κινητικής ανάλυσης με αναστολή. (Α) Σχεδιαγράμματα Lineweaver–Burk για την αναστολή του ενζύμου *hGSTA1-1* από το dieldrin σε διαφορετικές συγκεντρώσεις GSH. Μάρτυρας 0 μM (●), 2 μM dieldrin (■), 5 μM dieldrin (▲). (Β) Αναστολή του *hGSTA1-1* από το dieldrin σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CDNB. Μάρτυρας 0 μM (●), 2 μM dieldrin (■), 4 μM dieldrin (▲). (Γ) Αναστολή του *hGSTA1-1* από το spiromesifen σε διαφορετικές συγκεντρώσεις GSH. Μάρτυρας 0 μM (●), 10 μM spiromesifen (■), 15 μM spiromesifen (▲). (Δ) Αναστολή του *hGSTA1-1* από το spiromesifen σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CDNB. Μάρτυρας 0 μM (●), 10 μM spiromesifen (■), 15 μM spiromesifen (▲).

3.4.6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΘΕΣΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΩΝ ENTOMOKTONΩΝ DIELDRIN ΚΑΙ SPIROMESIFEN ΣΤΟ ΕΝΖΥΜΟ *hGSTA1-1*, ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΛΛΙΜΕΝΙΣΜΟ

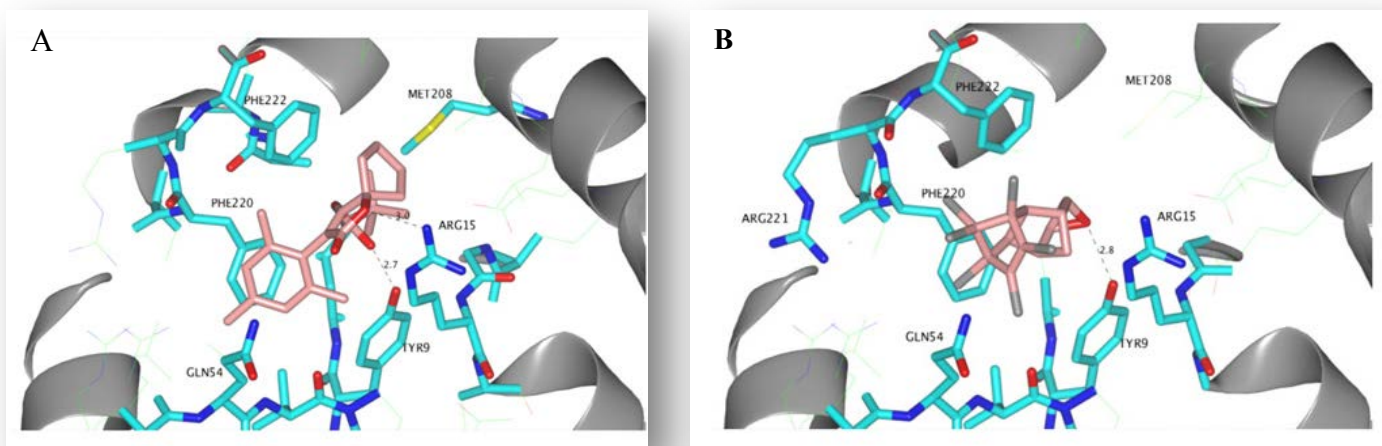
Το ισοένζυμο *hGSTA1-1* εξαιτίας του μεγέθους, της δομής και της υψηλής ευελιξίας που παρουσιάζει η Η-θέση, καθίσταται κατάλληλο για τη δέσμευση αρκετών υδροφοβικών υποκαταστατών (Axarli et al., 2004, Koutsoubli et al., 2012, Kolobe et al., 2004). Το dieldrin και το spiromesifen καθώς δεν παρουσιάζουν ομοιότητα στη δομή με τα υποστρώματα/αναστολείς, τα οποία έχουν χαρακτηριστεί κρυσταλλογραφικά με το ένζυμο (και είναι διαθέσιμα στη βάση PDB), χρειάστηκε να γίνουν μελέτες μοριακής μοντελοποίησης και μοριακού ελλιμενισμού, ώστε να προκύψει μια λεπτομερής εικόνα των αλληλεπιδράσεων του dieldrin και του spiromesifen με το *hGSTA1-1*.

Στο Σχήμα 3.17, φαίνεται ο πιο πιθανός τρόπος αλληλεπίδρασης των δύο εντομοκτόνων με το ένζυμο *hGSTA1-1*. Και οι δύο ενώσεις δεσμεύονται με το ένζυμο σε διακριτές θέσεις, οι οποίες κατά ένα μέρος καλύπτουν τις θέσεις G- και H-, πολύ κοντά στο σημείο σύνδεσης του εθακρινικού οξέος (Σχήμα 3.18) [(PDB code 1GSF) (Cameron et al., 1995)]. Αναλύοντας την υποθετική θέση σύνδεσης του κάθε αναστολέα φαίνεται ότι η σύνδεση του dieldrin και του spiromesifen στο ένζυμο πιθανόν να οφείλεται πρωταρχικά σε υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις (Σχήμα 3.18), με τη συνεισφορά κάποιων πολικών δεσμών (δεσμοί υδρογόνου), για τη σωστή κατεύθυνση και αναγνώριση αυτών των ενώσεων. Στην περίπτωση του dieldrin, ο εξαχλωρικός δακτύλιος εκτίθενται στο διαλύτη, ενώ ο εποξειδικός δακτύλιος του μορίου αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη. Η περιοχή όπου πραγματοποιούνται οι αλληλεπιδράσεις με το ένζυμο, περιλαμβάνει αμινοξικά κατάλοιπα του έλικα της C-τελικής περιοχή (Ala216, Phe220, Phe222). Επιπλέον, είναι πιθανό να σχηματίζεται δεσμός υδρογόνου με την υδροξυλική ομάδα του καταλυτικού αμινοξέος Tyr9.

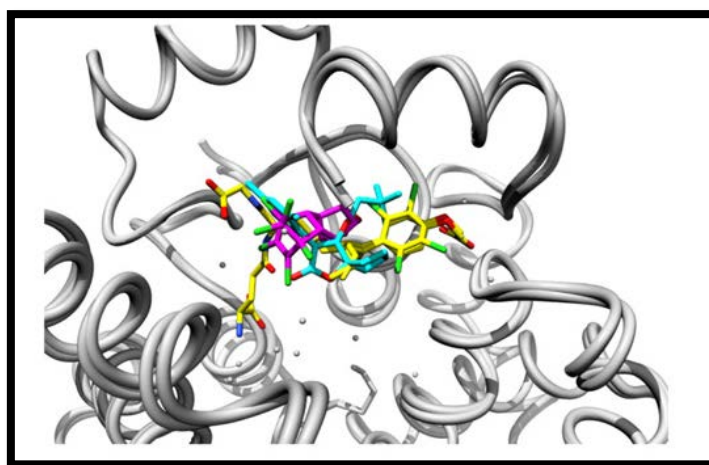
Ο προβλεπόμενος τρόπος αλληλεπίδρασης του spiromesifen με το *hGSTA1-1* φαίνεται στο Σχήμα 3.17.A. Το μόριο τοποθετείται έτσι ώστε να σχηματίζει δεσμούς van der Waals με τη Phe220 και τη Phe222. Ο εποξειδικός δακτύλιος φαίνεται να είναι τοποθετημένος έτσι ώστε να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με την Arg15. Ένας επιπλέον δεσμός υδρογόνου σχηματίζεται μεταξύ της ομάδας του καρβονυλίου και της υδροξυλικής ομάδας της πλευρικής αλυσίδας της Tyr9. Ο αρωματικός δακτύλιος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

του spiromesifen δύναται να σχηματίσει π-αρωματική αλληλεπίδραση με την Phe220 και η τριμεθυλ-ομάδα τοποθετείται σε μια υδρόφοβη «τσέπη» κοντά στα αμινοξέα Met208, Ala12 και Phe10. Στο Σχήμα 3.18. παρουσιάζονται οι δύο τρόποι σύνδεσης των δύο εντομοκτόνων ακριβώς πάνω στο σύμπλοκο GSH-εθακρινικό οξύ (δομή 1GSE). Φαίνεται ότι το dieldrin και το spiromesifen, καλύπτουν τη G-θέση και από την Η-θέση. Η διαθέσιμη μοριακή επιφάνεια των θέσεων G και Η είναι αρκετά μεγάλη (~1200 Å²), ώστε να επιτρέπει την ταυτόχρονη διεύθυνση του αντιδρώντος και του φυτοπροστατευτικού. Συνεπώς ο μικτός τύπος αναστολής που παρατηρήθηκε στην κινητική ανάλυση (Σχήμα 3.16), φαίνεται να ερμηνεύεται και δομικά.



Σχήμα 3.17. Προβλεπόμενος τρόπος αλληλεπίδρασης του *hGSTA1-1* με το spiromesifen (A) και το dieldrin (B). Οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξικών καταλοίπων οι οποίες είναι σε επαφή με το δεσμευτή απεικονίζονται με ράβδους.



Σχήμα 3.18. Επικάλυψη της θέσης του συμπλόκου GSH-εθακρινικό οξύ (κίτρινο, PDB κωδικός: 1GSE (Cameron et al., 1995) με το dieldrin (ροζ) και το spiromesifen (τουρκουάζ).

3.4.7. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΩΝ DIELDRIN ΚΑΙ SPIROMESIFEN ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΕΡΟΥ

3.4.7.1. Φωτομετρικός προσδιορισμός των εντομοκτόνων dieldrin και spiromesifen σε δείγματα νερού

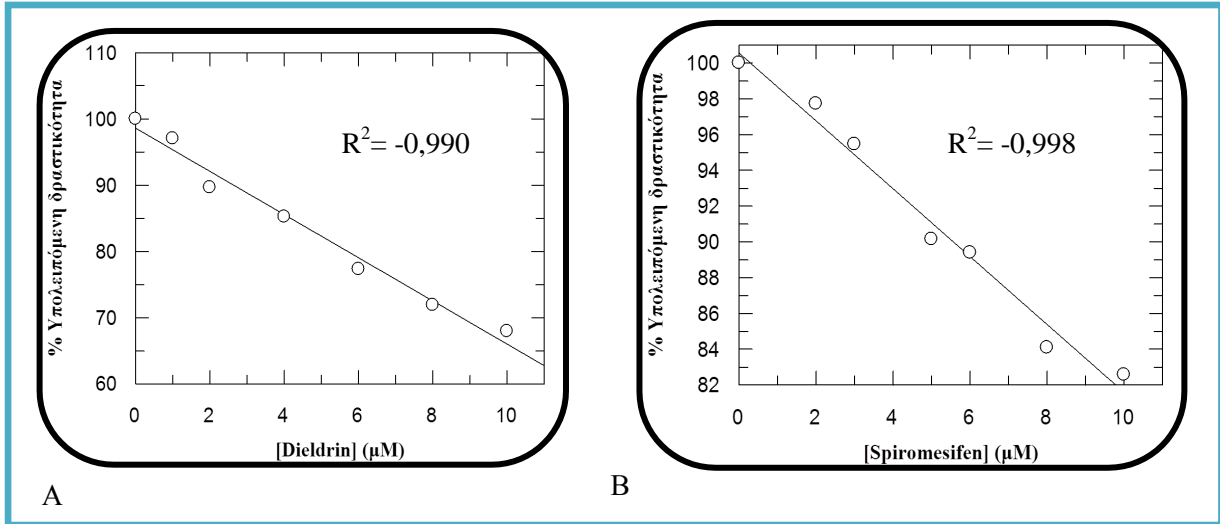
Το ένζυμο hGSTA1-1, χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη νέας απλής φωτομετρικής δοκιμής προσδιορισμού του dieldrin και του spiromesifen. Η ευαισθησία αυτής της προτεινόμενης μεθόδου, βασίζεται στην ικανότητα που έχει η GST, να καταλύει τη δέσμευση της GSH με το CDNB, προκύπτοντας το σύμπλοκο GSH-CDNB το οποίο απορροφά σε μήκος κύματος 340 nm. Συνεπώς μπορεί να προσδιοριστεί έμμεσα η συγκέντρωση του dieldrin και του spiromesifen, εκτιμώντας το σχηματισμό του συμπλόκου GSH-CDNB, μέσω της αύξησης της απορρόφησης. Η αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας από τα εντομοκτόνα dieldrin και spiromesifen, προκαλεί μείωση του ρυθμού αύξησης της απορρόφησης. Η αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας, λόγω της παρουσίας του dieldrin και του spiromesifen, μπορεί να συσχετιστεί με τις συγκεντρώσεις αυτών των ενώσεων, χρησιμοποιώντας πρότυπες καμπύλες. Στο Σχήμα 3.19. φαίνονται οι πρότυπες καμπύλες οι οποίες δημιουργήθηκαν, για το dieldrin και το spiromesifen σε απιονισμένο νερό. Φαίνεται ότι το ποσοστό της αναστολής άρα και της υπολειπόμενης δραστηριότητας του ενζύμου, εξαρτάται γραμμικά από τη συγκέντρωση των dieldrin και spiromesifen στο διάλυμα, σε ένα εύρος συγκεντρώσεως από 0 μM έως 10 μM . Οι εξισώσεις γραμμικής εξάρτησης που προέκυψαν είναι οι εξής:

$$\text{Για το dieldrin : } y = -3,26x + 9,6 \text{ (R}^2 = -0,990\text{)}$$

$$\text{Για το spiromesifen : } y = -1,89x + 100,6 \text{ (R}^2 = -0,998\text{)}$$

Η επαναληψιμότητα της δοκιμής αυτής εκφράζεται από τη σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, RSD), η οποία ήταν 1,9% (N = 7). Οι τιμές ανάκτησης όπως φαίνονται στον Πίνακα 3.6, κυμαίνονταν από 99,7 έως 102% για το dieldrin, με μέση τιμή $101 \pm 2,5\%$ (N = 5), ενώ για το spiromesifen οι τιμές αυτές ήταν μεταξύ 95,3 και 101,3%, με μέση τιμή $99,7 \pm 2,5\%$ (N = 5).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3



Σχήμα 3.19. Πρότυπες καμπύλες για το dieldrin (A) και το spiromesifen (B), χρησιμοποιώντας το ένζυμο hGSTA1-1. Κάθε σημείο είναι η μέση τιμή τριών επαναλήψεων.

3.4.7.2. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των φυτοπροστατευτικών σε δείγματα νερού

Η παραπάνω μέθοδος επιβεβαιώθηκε, χρησιμοποιώντας δείγματα πόσιμου νερού βρύσης και εμφιαλωμένου. Στο Σχήμα 3.20. φαίνονται οι πρότυπες καμπύλες για το dieldrin και το spiromesifen, χρησιμοποιώντας πόσιμο νερό βρύσης και εμφιαλωμένο. Η κλίση της ευθείας είναι διαφορετική για το νερό του δικτύου και του εμφιαλωμένου νερού σε σχέση με το δις-απιονισμένο (Σχήμα 3.19), και οφείλεται στη διαφορετική σύσταση του νερού του δικτύου, σε άλατα και οργανικές ενώσεις. Το ποσοστό της υπολειπόμενης δραστηριότητας, εξαρτάται γραμμικά από τη συγκέντρωση του dieldrin και του spiromesifen με εύρος τιμών 0-10 μM . Η γραμμικότητα χαρακτηρίζεται από τις παρακάτω εξισώσεις:

Για το dieldrin: $y = -5,49x + 97,6$ ($R^2 = -0,982$), για το πόσιμο νερό δικτύου και

$$y = -2,36x + 100,05$$
 ($R^2 = -0,981$), για το εμφιαλωμένο νερό.

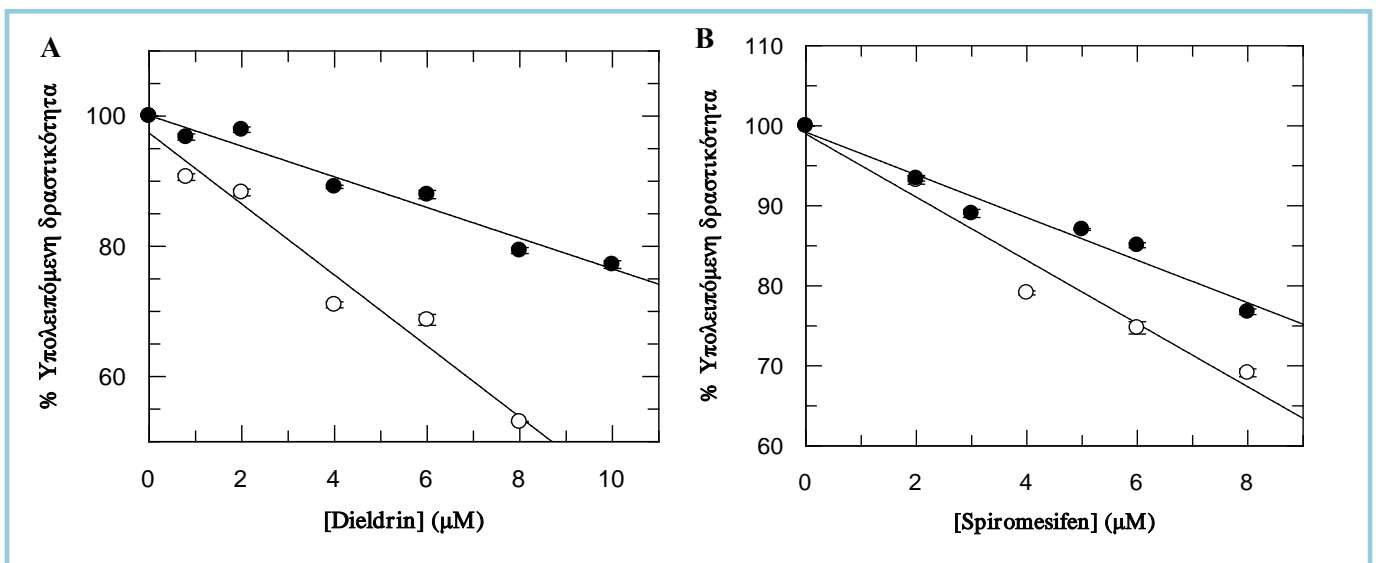
Για το spiromesifen: $y = -3,98x + 99,03$ ($R^2 = -0,98$), για το πόσιμο νερό δικτύου

$$\text{και } y = -2,69x + 99,26$$
 ($R^2 = -0,98$), για το εμφιαλωμένο νερό.

Η εφαρμογή και η επαναληψιμότητα αυτής της μεθόδου, μελετήθηκε και με πειράματα ανάκτησης χρησιμοποιώντας δείγματα πόσιμου νερού δικτύου και εμφιαλωμένου, επιβαρυσμένα με ήδη γνωστές συγκεντρώσεις του dieldrin και του spiromesifen. Στον Πίνακα 3.6. φαίνονται τα αποτελέσματα από τα πειράματα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ανάκτησης. Η ανάκτηση για τα δείγματα νερού δικτύου και το dieldrin κυμάνθηκε από 91 - 110% με μέση τιμή $102 \pm 8\%$ και για το spiromesifen μεταξύ 94-96% με μέση τιμή $94,5 \pm 1,1\%$. Οι τιμές ανάκτησης του dieldrin στο εμφιαλωμένο νερό ήταν 93 - 104% με μέση τιμή $99,3 \pm 4,4\%$ και για το spiromesifen μεταξύ 97 και 100% με μέση τιμή $98,8 \pm 1,7\%$. Οι τιμές αυτές συμπίπτουν με το αποδεκτό εύρος τιμών ανάκτησης για το πόσιμο νερό (Cunniff, 1999). Τα δείγματα πόσιμου νερού που περιείχαν το spiromesifen έδωσαν τις μικρότερες τιμές ανάκτησης, πιθανόν λόγω της υψηλής συγκέντρωσης ιόντων σε αυτά τα δείγματα.



Σχήμα 3.20. Πρότυπες καμπύλες για τα εντομοκτόνα dieldrin και spiromesifen, χρησιμοποιώντας την υπολειπόμενη δραστηκότητα του ενζύμου *hGSTA1-1*. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων. **A.** Dieldrin σε δείγματα νερού δικτύου (○) και εμφιαλωμένου (●). **B.** Spiromesifen σε δείγματα νερού δικτύου (○) και εμφιαλωμένου (●).

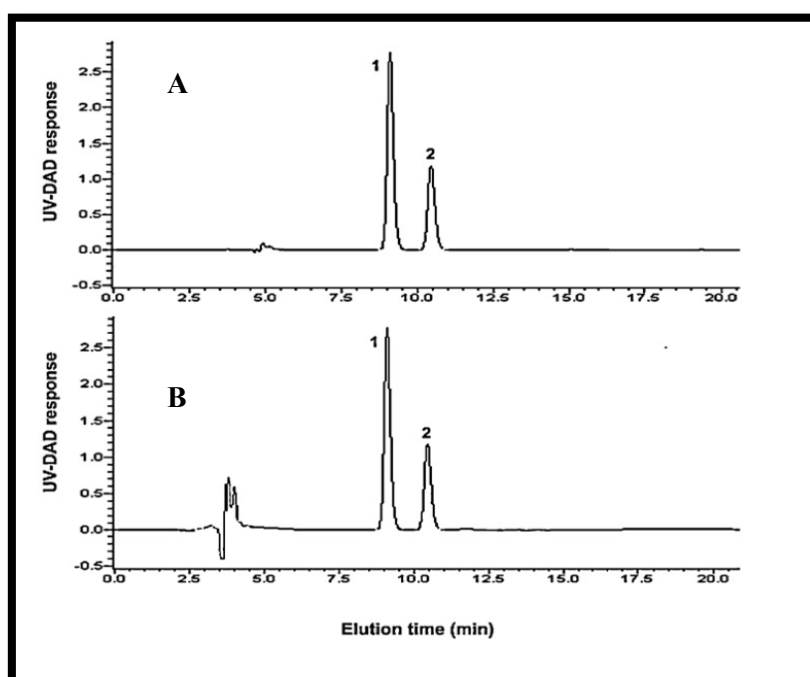
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Πίνακας 3.6. Τιμές ανάκτησης δειγμάτων πόσιμο νερού δικτύου, εμφιαλωμένου και απιονισμένου νερού, με ήδη γνωστές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων dieldrin και spiromesifen.

Δείγμα	Dieldrin			Spiromesifen		
	Προστέθηκε	Βρέθηκε	Ανάκτηση (%)	Προστέθηκε	Βρέθηκε	Ανάκτηση (%)
Νερό δικτύου	0,8	98,918	109,580	2	86,842	93,522
	2	90,384	101,958	4	75,789	96
	4	64,743	90,739	6	70,000	94,327
	6	71,604	105,133	8	65,263	93,940
RSD%			7,89%			1,14%
Εμφιαλωμένο νερό	0,8	93,457	96,920	0,8	97,023	100
	2	97,802	100,187	2	90,476	97,097
	6	91,588	103,615	3	81,308	96,830
	8	81,308	102,90	6	85,119	100,319
	10	71,428	93,023	10	73,118	100
RSD%			4,43%			1,75%
Δις-απιονισμένο νερό	0,8	97,297	99,672	2	94,475	101,321
	2	92,972	100,330	4	88,397	101,155
	4	91,891	100,610	6	84,530	100,891
	8	84,864	101,837	8	78,421	100
	10	81,621	102,026	10	71,270	95,314
RSD%			0,99%			2,53%

3.4.7.3. Σύγκριση της ενζυμικής μεθόδου που αναπτύχθηκε και της HPLC για τον προσδιορισμό των εντομοκτόνων στο νερό

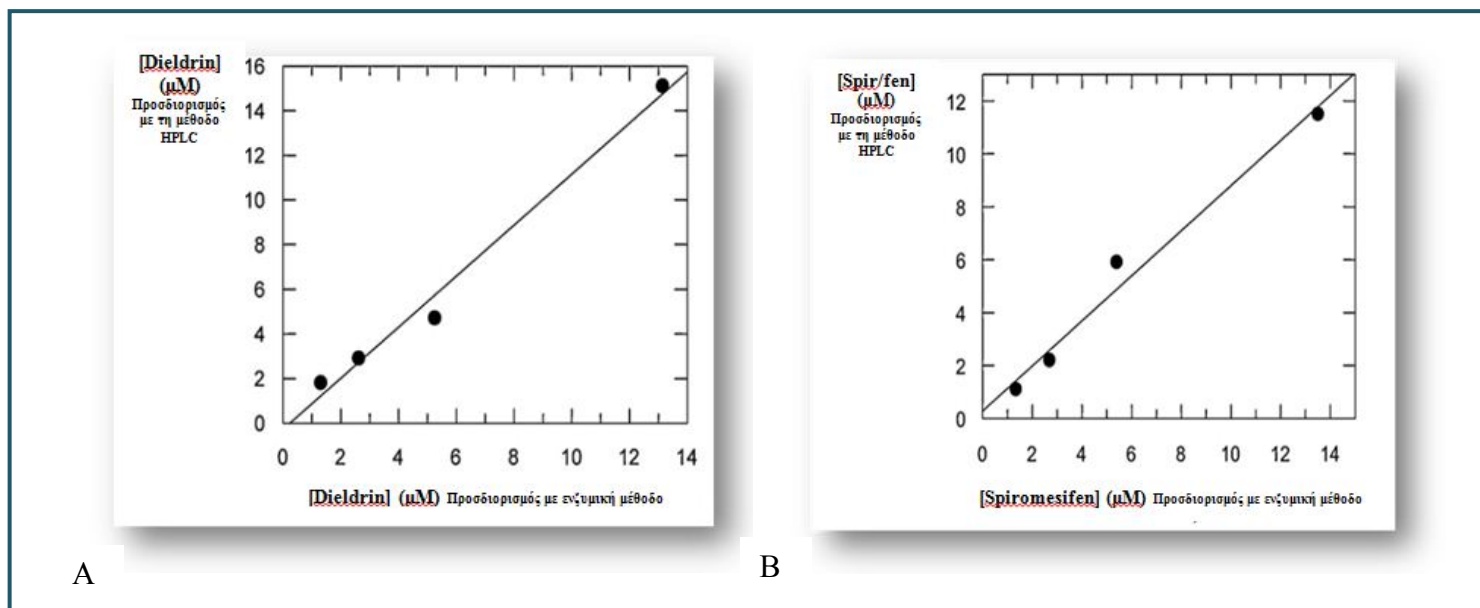
Με την ενζυμική μέθοδο που αναπτύχθηκε, μπορεί να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των dieldrin και spiromesifen. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά που βασίζονται στην HPLC μέθοδο (κ.Μαρκόγλου). Οι συγκεντρώσεις των dieldrin και spiromesifen υπολογίστηκαν με πρότυπες καμπύλες, οι οποίες έγιναν χρησιμοποιώντας γνωστές συγκεντρώσεις που προετοιμάστηκαν, από πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την HPLC–UV-DAD ανάλυση (Σχήμα 3.21).



Σχήμα 3.21. UV-DAD χρωματογραφήματα (210nm) **A.** πρότυπων διαλυμάτων μίξης spiromesifen (1) και dieldrin (2) σε συγκέντρωση 1 µg/mL και **B.** δείγματα νερού επιβαρυσμένο και με τα δύο εντομοκτόνα σε συγκέντρωση 1 µg/mL.

Στο Σχήμα 3.22 απεικονίζεται η συσχέτιση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την ενζυμική μέθοδο, με αυτά της HPLC-UV-DAD μεθόδου. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των εντομοκτόνων και με τις δύο μεθόδους, παρουσιάζει γραμμικότητα με συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0,98$ για το dieldrin και το spiromesifen. Συνεπώς, η προτεινόμενη ενζυμική αναλυτική μέθοδος ποσοτικού

προσδιορισμού των δύο εντομοκτόνων κρίνεται αξιόπιστη, αφού τα αποτελέσματα της είναι συγκρίσιμα με αυτά της HPLC μεθόδου.



Σχήμα 3.22. Σύγκριση των συγκεντρώσεων dieldrin (A) και spiromesifen (B) που προσδιορίστηκαν με την ενζυμική μέθοδο, χρησιμοποιώντας το ένζυμο *hGSTA1-1* και τη μέθοδο HPLC.

Συνολικά μπορούμε να πούμε ότι η ενζυμική μέθοδος παρουσιάζει πλεονεκτήματα όπως το χαμηλό κόστος και τη δυνατότητα επιτόπιου ελέγχου, με ελάχιστη προετοιμασία δείγματος, προσφέροντας τη δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού των dieldrin και spiromesifen, με ικανοποιητική επαναληψιμότητα και ακρίβεια.

3.5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρουσία υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε τρόφιμα, στο νερό και στο έδαφος έχει αποτελέσει μεγάλο θέμα στη περιβαλλοντική χημεία (FAO, 2010, Aspelin, 1994). Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν στον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε περιβαλλοντικά δείγματα έχουν γίνει για τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμδικά προϊόντα, λόγω της συσσώρευσης τους σε λαχανικά και φρούτα (Andreou & Clonis, 2002a, Andreescu et al., 2002, Rogacnik & Franco, 2003, Lin et al., 2005). Στοιχεία των τελευταίων χρόνων αναδεικνύουν όμως

και την ανάγκη να ληφθούν αποφάσεις για την μείωση της χημικής μόλυνσης επιφανειακών και υπόγειων υδάτων από ευδιάλυτα οργανοχλωριωμένα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, λόγω της υπολειμματικότητας τους (Pundir & Chauhan, 2012).

Η ανάλυση φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε περιβαλλοντικά δείγματα είναι δύσκολη λόγω της πολυπλοκότητας του υλικού και της χαμηλής συγκέντρωσης των χημικών ενώσεων-στόχων. Η χρωματομετρική τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE) (Lu et al., 2009), η φασματομετρία μάζας (MS) (Hernández et al., 2001), η αέρια χρωματογραφία (GC) (Hoff & Van Zoonen, 1999), η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC) (Mitobe et al., 2001) η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) (Sherma, 2005, Shutherland et al., 2002), είναι κάποιες από τις αναλυτικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Όμως παρά τα καλά αποτελέσματα, είναι χρονοβόρες, απαιτούν προετοιμασία δείγματος και δεν είναι εύχρηστες καθώς απαιτούν ακριβό εξοπλισμό και εκπαιδευμένο προσωπικό. Από την άλλη, οι βιοαισθητήρες ξεπερνούν αυτούς τους περιορισμούς προσφέροντας απλότητα, ταχύτητα, εξειδίκευση, ευαισθησία, σχετικά χαμηλού κόστους εξοπλισμό και είναι ιδιαίτερα φιλικόι στο χρήστη (Pundir & Chauhan, 2012).

Τα τελευταία χρόνια η επιστήμη έχει στραφεί στη ανάπτυξη βιοαισθητήρων για την ανίχνευση φυτοπροστατευτικών προϊόντων, έχοντας καλά αποτελέσματα. Η ικανότητα των GSTs να καταλύουν αντιδράσεις νουκλεόφιλης προσβολής της σουλφυδρυλομάδας του GSH σε μεγάλη ποικιλία ηλεκτρονιόφιλων ενώσεων, έχει δώσει τη δυνατότητα ανάπτυξης βιοαισθητήρων για τον προσδιορισμό ξеноβιοτικών ενώσεων όπως τα ζιζανιοκτόνα και τα εντομοκτόνα (Andreou & Clonis, 2002b, Choi et al, 2003, Morou et al, 2008, Karoli et al, 2008).

Το ενζυμικό *hGSTA1-1* το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα αναλυτική μέθοδο είναι καλά μελετημένο, σταθερό και αναπαράγεται εύκολα μέσω της τεχνολογίας του ανασυνδιασμένου DNA (Axarli et al., 2009). Μπορεί να εκφραστεί σε *E. coli* και να καθαριστεί με υψηλές αποδόσεις (περίπου 10-20 mg πρωτεΐνης/L καλλιέργειας). Αυτή η ποσότητα είναι επαρκής για περισσότερες από $2,4 \times 10^5$ δοκιμές. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η ενζυμική μέθοδος αυτή έχει σημαντικά πλεονεκτήματα, ως προς τις βιοδοκιμές και άλλες αναλυτικές μεθόδους, όπως η HPLC και η GC/MS

(Banerjee, 2010, Chronopoulou et al., 2011) και αφορούν στο χαμηλό κόστος και στην απλότητα της τεχνικής. Επίσης προσφέρει ικανοποιητική ευαισθησία, για τον προσδιορισμό της υπολειμματικότητας του dieldrin και του spiromesifen, σε δείγματα νερού (Chronopoulou et al., 2012a) με αποτελέσματα συγκρίσιμα με αυτά της HPLC.

Σχετικά με την εξειδίκευση της μεθόδου θα λέγαμε ότι αυτό είναι ένα μειονέκτημα για τέτοιου είδους μεθόδους και τους βιοαισθητήρες, όμως στην παρούσα μελέτη φαίνεται το ένζυμο *hGSTA1-1* να παρουσιάζει μεγαλύτερη εξειδίκευση σε σχέση με τα άλλα ισόένζυμα αλλά και ανά κατηγορία φυτοπροστατευτικών. Για παράδειγμα παρουσιάζει εξειδίκευση για το οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο dichlorvos, σε σχέση με τα υπόλοιπα τα οποία μελετήθηκαν, παρουσιάζοντας αναστολή >90%. Επίσης και το dieldrin και το spiromesifen προκαλούν αναστολή >95%, κάτι που δεν παρατηρήθηκε για άλλα φυτοπροστατευτικά προϊόντα ή ένζυμα. Συνεπώς πιθανές βελτιώσεις του ενζύμου και της δοκιμής, μπορούν να δώσουν ακόμα καλύτερα αποτελέσματα σχετικά με την εξειδίκευση.

Η κατηγορία των οργανοχλωριωμένων φυτοπροστατευτικών προϊόντων (OCPs), στην οποία ανήκει και το dieldrin, ανήκουν στις οργανικές ενώσεις που παραμένουν στο περιβάλλον ως οργανικοί ρυπαντές (POPs) και ενώ τις δεκαετίες 1970 και 1980 απαγορεύτηκαν στις αναπτυγμένες χώρες δεν έγινε το ίδιο και στις αναπτυσσόμενες (Muir & Sverko, 2006). Επίσης, παρόλο που η χρήση κάποιων φυτοπροστατευτικών προϊόντων έχει απαγορευτεί από την Ε.Ε., φαίνεται να διακινούνται παράνομα κυρίως στην Ανατολική Ευρώπη αλλά και στα βαλκάνια (Vryzas et al., 2009). Άλλες πάλι αν και έχουν απαγορευτεί όπως το dieldrin είναι δυνατόν να βρεθούν στο περιβάλλον, λόγω της πολύ αργής αποδόμησής τους στο έδαφος και στο νερό.

Τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα μπορεί να συσσωρεύονται στην τροφική αλυσίδα και έμμεσα ή άμεσα είναι πιθανόν να έχουν δυσμενή αποτελέσματα στον άνθρωπο και στο περιβάλλον. Ο μεταβολισμός των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων στα θηλαστικά είναι αργός και ένα ουσιαστικό ποσοστό πρόσληψης αυτών, μπορεί να συσσωρευτεί στο λιπώδη ιστό (Robert & Hutson, 1999).

Το spiromesifen ανήκει στους εστέρες τετρονικού οξέος και χρησιμοποιείται ως εντομοκτόνο και ακαρεοκτόνο σε καλλιέργειες αγγουριού, πιπεριάς, τομάτας, μελιτζάνας και κολοκυθίου καθώς και σε καλλιέργειες θερμοκηπίου (φράουλα, πεπόνι κ.α.). Δεν παραμένει για πολύ στο έδαφος αλλά μεταβολίζεται σε αερόβιες και

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

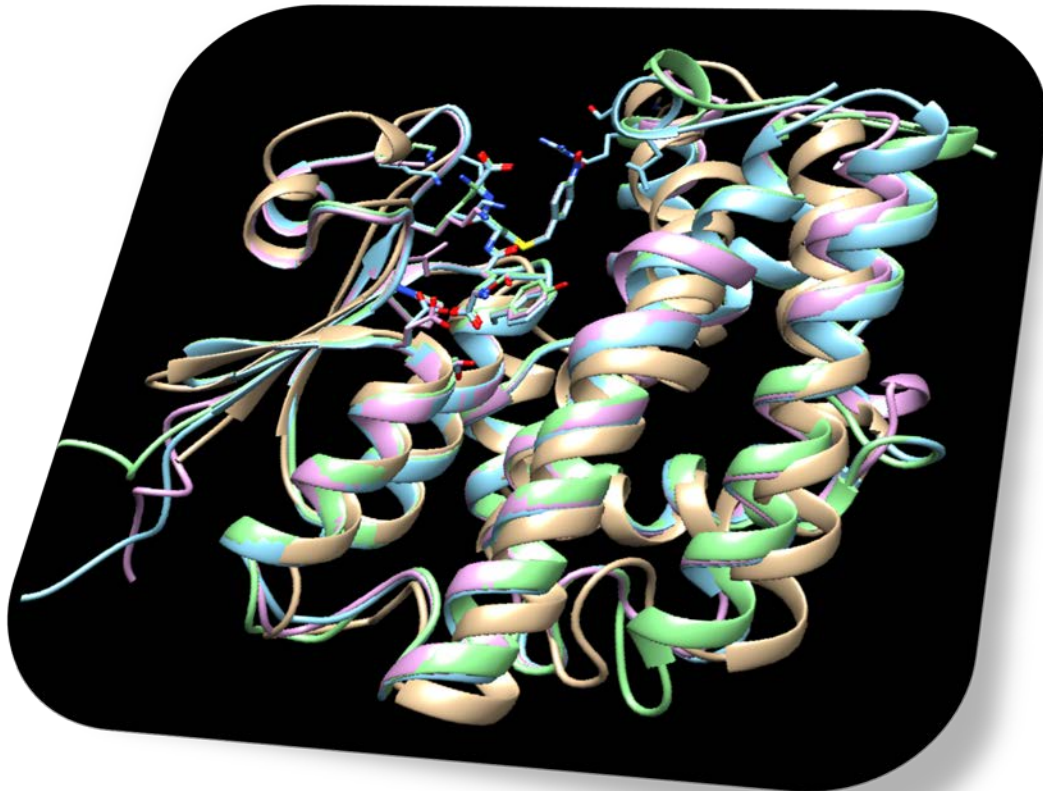
σκοτεινές συνθήκες στους 20 °C. Η υδρόλυση του εξαρτάται από το pH και πραγματοποιείται πιο γρήγορα σε αλκαλικό περιβάλλον (44,7 ημέρες, στους 20°C) και παράγει το μεταβολίτη M01, ο οποίος δεν υδρολύεται περαιτέρω και χαρακτηρίζεται από χαμηλό κίνδυνο για την υδάτινη ζωή, σε αντίθεση με το spiromesifen (EFSA, 2012).

Με αυτή την εύχρηστη αναλυτική ενζυμική μέθοδο, καλύπτεται η αναγκαιότητα προσδιορισμού φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε περιβαλλοντικά δείγματα, για την προστασία του ίδιου του περιβάλλοντος αλλά και των οργανισμών που ζουν σε αυτό. Επίσης είναι μια υποσχόμενη μέθοδος, η οποία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και σε βιολογικά δείγματα μιας και το dieldrin έχει ανιχνευτεί και σε ανθρώπινους ιστούς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

“Καταλυτική και δομική ετερογένεια των επαγωγίμων ισοενζύμων μεταφοράς της γλουταθειόνης από το φυτό *Phaseolus vulgaris*”



4.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τέσσερα GST ισοένζυμα από το φυτό *P. vulgaris*, αλληλουχήθηκαν και η ανάλυση cDNA των κλώνων, έδειξε υψηλή ομολογία με GSTs των τάξεων τ (*tau*) και ϕ (*phi*). Στη συνέχεια εκφράστηκαν σε *E. coli* και καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας. Ακολούθησε προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας των ισοενζύμων, έναντι 20 διαφορετικών υποστρωμάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα παραπάνω ισοένζυμα GSTs, καταλύουν μεγάλο εύρος αντιδράσεων και επιδεικνύουν μεγάλη ποικιλομορφία εξειδίκευσης, ως προς το υπόστρωμα. Πραγματοποιήθηκε μοριακή μοντελοποίηση και ανάλυση της δομής, ώστε να αναγνωριστούν τα δομικά χαρακτηριστικά, να κατανοηθεί η εξειδίκευση υποστρώματος και ο καταλυτικός μηχανισμός αυτών των ενζύμων. Τα αποτελέσματα αυτά έδωσαν νέα στοιχεία σχετικά με την καταλυτική και δομική ετερογένεια των GSTs και τον ρόλο τους στο *P. vulgaris*.

4.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η εξειδίκευση υποστρώματος που παρουσιάζουν οι κυτταροπλασματικές GSTs συσχετίζεται με την δομική ευελιξία, η οποία επιτρέπει την αναγνώριση διαφορετικών δομών, με το ελάχιστο ενεργειακό κόστος (Hou et al. 2007). Γενικά η καταλυτική αποτελεσματικότητα των GSTs έναντι ξενοβιοτικών είναι σχετικά χαμηλή (Armstrong 1997, Hayes et al. 2005). Τα επίπεδα όμως των GSTs στον οργανισμό είναι υψηλά (3–10% της συνολικής κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης) (Hayes & Pulford 1995, Mannervik & Danielson 1988), συνεπώς παρά τη σχετικά χαμηλή καταλυτική αποτελεσματικότητα, η συνολική τους δράση είναι υψηλή εξαιτίας της υψηλής έκφρασης τους (Aharli et al. 2009a).

Η πλειονότητα των μελετών στις GSTs, αφορούν στα ισοένζυμα από θηλαστικά, όμως τα ισοένζυμα των φυτών προσφέρουν εντυπωσιακή δυνατότητα, για την έρευνα της εξέλιξης των GSTs και την προσαρμοστικότητα που παρουσιάζουν στις βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (π.χ. εφαρμογή ζιζανιοκτόνου) (Benekos et al. 2010, Frova 2006, Sheehan et al. 2001). Είναι πλέον καλά θεμελιωμένο ότι το σύστημα GSH/GST, απαντά ευρέως στα φυτά και συνεισφέρει στη προστασία τους από τα ζιζανιοκτόνα, καταλύοντας την αντίδραση της γλουταθειόνης στο ηλεκτρονιόφιλο κέντρο των ζιζανιοκτόνων. Είδη ανθεκτικά και ευαίσθητα σε πλήθος ζιζανιοκτόνα (π.χ. τριαζίνες, ακετανιλίδια, θειοκαρβαμίδια), χαρακτηρίζονται από υψηλά και χαμηλά επίπεδα δραστηριότητας GSTs, αντίστοιχα (Lamoureaux & Rusness 1993). Επίσης έχει αναφερθεί αύξηση της ειδικής δραστηριότητας GST, ως ανταπόκριση στην μεταχείριση με ζιζανιοκτόνα (Edwards & Cole 1996).

Οι φυτικές-διαλυτές GSTs ταξινομούνται σε 8 τάξεις: τ (*tau*), ϕ (*phi*), θ (*theta*), ζ (*zeta*), λ (*lambda*), *EF1B*, *ρεδουκτάση του διϋδροασκορβικού (DHAR)*, και *απαλογονάση της τετραχλωρο υδροκινόνης (TCHQD)* (Liu et al., 2013, Lan et al., 2009). Οι τάξεις ϕ και τ είναι ειδικές για τα φυτά και παρουσιάζουν δραστηριότητα ως προς πλήθος ξενοβιοτικών, όπου περιλαμβάνονται και τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Edwards & Dixon 2005). Διαφορετικές τάξεις ζιζανιοκτόνων όπως οι τριαζίνες, τα θειοκαρβαμίδια, τα χλωροακετανιλίδια, οι διφαινυλαιθέρες, τα αρυλοξυφαινοξυπροπιονικά οξέα κ.τ.λ., μπορούν να αποτοξινωθούν από τις GSTs. Οι GSTs των τάξεων ϕ και τ επάγονται κάτω από συνθήκες αβιοτικής και βιοτικής καταπόνησης και παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντίδραση συνθηκών οξειδωτικής

καταπόνησης. Για παράδειγμα, η απενεργοποίηση μιας ομάδας τεσσάρων *φ*-GSTs του φυτού *Arabidopsis*, είχε ως αποτέλεσμα την αλλαγή της μεταβολικής ευαισθησίας σε συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης (Sapri et al. 2009). Επιπλέον οι GSTs εμπλέκονται στη σύνθεση δευτερογενών θειο-μεταβολιτών, καθώς και στη δέσμευση, μεταφορά και αποθήκευση φαινολικών και φλαβονοειδών (Dixon et al. 2010).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι λειτουργικές και δομικές διαφορές επιλεγμένων μελών της οικογένειας GST από φύλλα του φυτού *Phaseolus vulgaris*. Η επιλογή αυτού του φυτού έγινε λόγω το ότι αποτελεί ένα από τα πέντε καλλιεργούμενα είδη του γένους *Phaseolus* και το τρίτο σε σημαντικότητα μετά από τη σόγια και το φυστίκι (αράπικο), αλλά πρώτο στην άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο (Broughton et al. 2003).

4.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.3.1. ΥΛΙΚΑ

Όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν, αναφέρονται στο Κεφάλαιο 2. Το cDNA που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, ήταν προσφορά του Δρ. Π. Μάδεση (INEB, Θεσσαλονίκη).

4.3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

4.3.2.1. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Για την ενίσχυση των cDNA, πραγματοποιήθηκε PCR για κάθε ισοένζυμο και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται παρακάτω. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50 μ L και περιείχαν: 8 pmol από κάθε εκκινητή, 1 μ g γενωματικό DNA ως μήτρα, 50 mM dNTPs, 5 μ L 10x Pfu ρυθμιστικό διάλυμα, 1 Unit Pfu DNA πολυμεράση και αποστειρωμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο. Στον Πίνακα 4.1. φαίνονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Α) ΑΡΧΙΚΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ

Στους 95 °C για 2 λεπτά

Β) ΚΥΚΛΟΣ

Αποδιάταξη στους 95 °C για 2 λεπτά

Υβριδισμός εκκινητών στους 55 °C για 2 λεπτά

Επιμήκυνση στους 72 °C για 2 λεπτά

} 30 κύκλοι

Γ) ΤΕΛΙΚΗ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ

Στους 72 °C για 10 λεπτά

Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν σε πηκτική αгарόζης και υποκλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλο T7 εκφραστικό πλασμιδιακό φορέα, τον (pEXP5-CT/TOPO®TA) (αναλυτικά στην § 2.2.15). Τα pT7PvGSTs που προέκυψαν, χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό των κυττάρων *E. coli* BL21(DE3).

Πίνακας 4.1. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των cDNA.

ΙΣΟΕΝΖΥΜΟ	ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ (5'→3')
<i>PvGSTF1-1</i>	PvGST2F	5'-ATGGTAGTGAAGGTGTACGGTC-3'
	PvGST2R	5'-CTAGATTGGAGGTAGGTAGAGT-3'
<i>PvGSTU1-1</i>	PvGST3F	5'-ATGGCAGAGCAAGAAAAGGTG-3'
	PvGST3R	5'-TCAGGCTGCAGAAGAAGATTTTC-3'
<i>PvGSTU2-2</i>	PvGST4F	5'-ATGGCTTCAAGTCAGGAAGAGG-3'
	PvGST4R	5'-CTATTTTGAAGCAAAAAGGC-3'
<i>PvGSTU3-3</i>	PvGST5F	5'-ATGGCTTCAGAAGAGAGCTCAG-3'
	PvGST5R	5'-CTATTTCTTTGCAGAAGCTTTG-3'

4.3.2.2. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΑΠΟΙΚΙΕΣ ΓΙΑ ΤΟ ΙΣΟΕΝΖΥΜΟ PVGSTF1-1

Πραγματοποιήθηκε PCR αποικιών, επιλέγοντας 14 αποικίες οι οποίες τοποθετήθηκαν σε erpendorf χωρητικότητας 0,2 mL, όπου και προστέθηκαν σε τελικό όγκο 50 μ L τα εξής: 8 pmol από κάθε εκκινητή (Πίνακας 4.1.), 50 mM dNTPs, 5 μ L 10x Dream Taq ρυθμιστικό διάλυμα, 1 Unit Dream Taq DNA πολυμεράση (Fermentas) και αποστειρωμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο. Οι συνθήκες που ακολουθήθηκαν είναι οι εξής:

A) ΑΡΧΙΚΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ

Στους 95 $^{\circ}$ C για 5 λεπτά

B) ΚΥΚΛΟΣ

Αποδιάταξη στους 95 $^{\circ}$ C για 2 λεπτά	}	30 κύκλοι
Υβριδισμός εκκινητών στους 55 $^{\circ}$ C για 2 λεπτά		
Επιμήκυνση στους 72 $^{\circ}$ C για 2 λεπτά		

Γ) ΤΕΛΙΚΗ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ

Στους 72 $^{\circ}$ C για 10 λεπτά

Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν σε πηκτή αгарόζης και οι αποικίες που έδωσαν θετικό σήμα, χρησιμοποιήθηκαν για προκαλλιέργεια και απομόνωση πλασμιδιακού DNA, ώστε να εκφραστούν τα γονίδια σε *E. coli* BL21(DE3).

4.3.2.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E. coli* BL21(DE3).

Το πλασμιδιακό DNA απομονώθηκε με kit απομόνωσης πλασμιδιακού DNA, του οίκου Macherey–Nagel και εν συνεχεία στάλθηκε για αλληλούχιση στην εταιρεία Eurofins MWG Operon. Κατόπιν ακολούθησε μετασχηματισμός των κυττάρων *E. coli* BL21(DE3) με πλασμιδιακό DNA σύμφωνα με την § 2.2.15.

4.3.2.4. ΕΤΕΡΟΛΟΓΟΣ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ PnGST ΣΕ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E. coli* BL21(DE3).

Τα ισοένζυμα GST εκφράστηκαν σε στελέχη κυττάρων *E. coli* BL21(DE3) στους 37⁰C, σε θρεπτικό μέσο LB έχοντας ως αντιβιοτικό επιλογής, την αμικικιλίνη (100 μg/mL). Σε κωνική φιάλη που περιείχε 450 mL με θρεπτικό μέσο, εμβολιάστηκαν 50 mL ολονύκτιας καλλιέργειας (12-16 ώρες), κατάλληλα μετασηματισμένων κυττάρων. Η καλλιέργεια επώαστηκε στους 37⁰C σε περιστροφικό αναδευτήρα (200-220 rpm), μέχρι η απορρόφηση του δείγματος στα 600 nm να φτάσει 0,5-0,6, όπου και προστέθηκε IPTG (λειτουργεί ως επαγωγέας) σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Έπειτα ακολούθησε επώαση στους 37⁰C για 4 ώρες και φυγοκέντριση στις 8.000 rpm στους 4⁰C για 20 λεπτά, ώστε να συλλεχθούν τα κύτταρα (περίπου 3 g). Στη συνέχεια η πάστα των κυττάρων, επαναδιαλύθηκε σε τριπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM KH₂PO₄, pH=7 για τα ισοένζυμα PnGSTU1-1, PnGSTU2-2, PnGSTU3-3 και PnGSTF1-1. Ακολούθως η λύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με επίδραση υπερήχων τρεις με τέσσερις φορές για 10 δευτερόλεπτα κάθε φορά, στους 4⁰C. Το τελικό αιώρημα, φυγοκεντρίθηκε στις 13.000 rpm για 5 λεπτά και συλλέχθηκε το υπερκείμενο για περαιτέρω επεξεργασία.

4.3.2.5. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ PnGSTF1-1, PnGSTU1-1, PnGSTU2-2 ΚΑΙ PnGSTU3-3 ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΟΝ BES-GSH ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ

Στο υπερκείμενο που προέκυψε από την λύση των κυττάρων § 4.3.2.4. έγινε διαπίδυση, σε 2-3 λίτρα ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM KH₂PO₄, pH=7 και προσδιορίστηκε η ειδική δραστηριότητα πριν και μετά τη διαπίδυση (§ 2.2.26). Ακολούθως το βιολογικό εκχύλισμα φορτώθηκε σε κολώνα με εποξειδική ενεργοποίηση της στερεάς φάσης (προσροφήτη BES-GSH) και πραγματοποιήθηκαν τα στάδια της χρωματογραφίας συγγένειας (αναλυτικά § 2.2.20). Οι δεσμευμένες GSTs εκλούστηκαν με διάλυμα 20 mM KH₂PO₄, pH=7 που περιείχε 10 mM GSH. Η καθαρότητα των εκλούσεων κρίθηκε με την ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης SDS-PAGE σύμφωνα με την § 2.2.29.

4.3.2.6. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών έγινε με την μέθοδο Bradford (Bradford, 1976) (§2.2.25) χρησιμοποιώντας αλβουμίνη μόσχου για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης.

4.3.2.7. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ (%) ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ ΑΠΟ 26 ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

Για τον προσδιορισμό της αναστολής των GSTs κατά την έκθεση τους σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα, εκτιμήθηκε η δραστικότητα του ενζύμου με το σύστημα CDNB-GSH στους 37⁰C (§ 2.2.31), πριν και μετά την έκθεση. Συνεπώς, στην κυβέτα σε τελικό όγκο 1 ml περιέχονταν: 2,5 mM GSH, 1 mM CDNB, 0,1 mM εντομοκτόνου ή ζιζανιοκτόνου (διαλυμένο σε ακετόνη), ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M KH₂PO₄ pH 6,5 και το ένζυμο. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε, το ίδιο μίγμα χωρίς ένζυμο και η αντίδραση μελετήθηκε φωτομετρικά, υπολογίζοντας τον ρυθμό αύξησης της απορρόφησης στα 340 nm. Οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν και παρουσιάζεται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων. Ως 1 Unit ενζύμου λαμβάνεται η ποσότητα εκείνη του ενζύμου για την παραγωγή 1μmol προϊόντος, ανά λεπτό σε pH=6,5 και στους 37⁰C. Το ποσοστό % της αναστολής του ενζύμου υπολογίστηκε με την εξίσωση:

$$\% \text{ αναστολή} = (R_0 - R_i) / R_0 \text{ όπου,}$$

R₀: είναι ο ρυθμός αύξησης της απορρόφησης για την μη αναστέλλουσα αντίδραση
R_i: ο ρυθμός αύξησης της απορρόφησης για την αναστέλλουσα αντίδραση. Και οι δύο ρυθμοί αφορούν στην ίδια συγκέντρωση υποστρώματος.

4.3.2.8. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ GSTs ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΩΣ ΠΙΘΑΝΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός ως προς τα παράγωγα του 1-αλογονο-2,4-δινιτροβενζολίου (CDNB, FDNB, BDNB, IDNB) και το fluorodifen έγιναν σύμφωνα με δημοσιευμένες μεθόδους (Skopelitou et al. 2011, Axarli et al. 2009a), οι οποίες περιγράφονται αναλυτικά στις παραγράφους 2.2.31. και 2.2.37.

Για να μελετηθούν ως προς τη δράση υπεροξειδάσης πραγματοποιήθηκαν φωτομετρικές δοκιμές με αντιδραστήρια υπεροξειδίου (CuOOH , tert-BuOOH , lauroyl peroxide, benzoyl peroxide) οι οποίες αναφέρονται αναλυτικά στην παράγραφο 2.2.32. Οι δοκιμές για τα αντιδραστήρια της 2-2 διθειοδιαιθανόλης (HED), του διϋδροασκορβικού οξέος, του εθακρινικού οξέος (EA), της *trans*-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη, της βρωμοσουλφοφθαλεΐνης, της *trans*-2 εννάλης, και των ισοθειοκυανικών εστέρων (PEITC και AITC) περιγράφονται αναλυτικά στις παραγράφους 2.2.33-2.2.40.

Τα ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα διαλύθηκαν είτε σε αιθανόλη είτε σε ακετόνη σε τελική συγκέντρωση 2–5% (v/v) του οργανικού διαλύτη στο διάλυμα της δοκιμής και όλες οι δοκιμές έγιναν σε σταθερή θερμοκρασία. Όλες οι τιμές της καταλυτικής σταθεράς k_{cat} υπολογίστηκαν παίρνοντας ως δεδομένο την ύπαρξη ενός ενεργού κέντρου ανά υπομονάδα. 1 μονάδα (Unit) ενζυμικής δραστηριότητας ορίστηκε η ποσότητα εκείνη του ενζύμου που καταλύει την μετατροπή 1 μmol υποστρώματος ανά λεπτό. Η ειδική δραστηριότητα έχει εκφραστεί σε μmol ανά λεπτό ανά mg πρωτεΐνης. Όλες οι μετρήσεις διορθώθηκαν με τις μη-καταλυτικές.

4.3.2.9. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ CDNB, AITC, CuOOH ΚΑΙ HED

Η κινητική ανάλυση των ισοενζύμων έχοντας την GSH ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα πραγματοποιήθηκε στους 37°C σε τελικό όγκο μίγματος 1 mL που περιείχε: 0,1 M δισόξινο φωσφορικό κάλιο (pH 6,5), είτε 1 mM CDNB, είτε 0,4 mM ισοθειοκυανικό αλλυλ-εστέρα (AITC) ή 1,5 mM υδροϋπεροξειδίου του κουμενίου (CuOOH) ή 2 mM 2,2-διθειοδιαιθανόλη (HED) και διαφορετικές συγκεντρώσεις GSH (0,0075–2 mM). Επίσης προσδιορίστηκαν οι αρχικές ταχύτητες σε μίγμα 0,1 M δισόξινο φωσφορικό κάλιο (pH 6,5), παρουσίας 2,5 mM GSH και το CDNB ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα με συγκεντρώσεις από 0,06 mM έως 1,8 mM, ενώ τα AITC, CuOOH και το HED χρησιμοποιήθηκαν σε εύρος συγκεντρώσεων 0,3–1,2, 0,2–2 και 0,05–1,5 mM, αντίστοιχα. Οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν και παρουσιάζεται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων, των οποίων η επεξεργασία έγινε με ανάλυση μη-γραμμικής παλινδρόμησης ακολουθώντας την εξίσωση των Michaelis–

Menten στο πρόγραμμα GraFit 3 (Erithacus Software Ltd., Version 3.06). Στις περιπτώσεις όπου οι καμπύλες δεν ταίριαζαν σε αυτές των Michaelis–Menten για την τιμή V_{\max} , προσδιορίστηκε η τιμή $S_{0,5}$ ($S_{0,5}$ είναι η συγκέντρωση εκείνη του υποστρώματος όπου η ταχύτητα $v = 0,5V_{\max}$) και ο συντελεστής Hill n_H , προσδιορίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση Hill:

$$v = \frac{V_{\max}[S]^{n_H}}{S_{0,5}^{n_H} + [S]^{n_H}}$$

4.3.2.10. ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΤΟΥ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ HDNB ΜΕ ΤΟ ΕΝΖΥΜΟ PVGSTU1-1

Οι φασματοσκοπικές τιτλοδοτήσεις έγιναν στο φασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer Lamda16, διπλής δέσμης-ορατού-υπεριώδους. Προετοιμάστηκαν δύο μίγματα του 1 mL, όπου το ένα περιείχε και ένζυμο. Το δείγμα με το ένζυμο περιείχε 0,5 mg PVGSTU1-1 σε 0,1 M KH_2PO_4 , pH 6,5, και 1 mM GSH και το άλλο, μίγμα-μάρτυρας, 0,1 M KH_2PO_4 , pH 6,5, και 1 mM GSH σε τελικό όγκο 1 mL. Χρησιμοποιήθηκαν κυβέτες από χαλαζία Quant 10 mm. Σε κάθε κυβέτα του δείγματος και του μάρτυρα προστέθηκαν ίδιες ποσότητες (2 μ L) διαλύματος 1-υδροξυ-2,4-δινιτροβενζόλιο (HDNB) (1 mM) και καταγράφηκαν τα διαφορετικά φάσματα σε εύρος μήκους κύματος από 290 έως 600 nm, μετά από κάθε προσθήκη. Η διαφορά απορρόφησης ΔA στα 355 nm, υπολογίστηκε σχετικά με την περιοχή μηδενικής απορρόφησης στα 620 nm. Τα στοιχεία αναλύθηκαν σύμφωνα με τους Stellwagen 1976 και Labrou et al. 2001, και την εξίσωση:

$$\Delta A = \frac{\Delta A_{\max}[S]^{n_H}}{S_{0,5}^{n_H} + [S]^{n_H}}$$

όπου ΔA : διαφορά απορρόφησης στα 355 nm μετά από κάθε προσθήκη HDNB, ΔA_{\max} : η μέγιστη διαφορά απορρόφησης στα 355 nm με το HDNB σε συγκέντρωση κορεσμού.

4.3.2.11. ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ

Πραγματοποιήθηκε εύρεση GST αλληλουχιών από τις τάξεις $\varphi, \tau, \zeta, \theta, \lambda$ DAHR και TCHQD καθώς και αλληλουχιών ομόλογων των PnGSTs με το πρόγραμμα pBLAST (Altschul et al. 1990), του δικτυακού τόπου NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Οι αλληλουχίες που βρέθηκαν, ευθυγραμμίστηκαν με το πρόγραμμα ClustalW (Thompson et al. 1994) χρησιμοποιώντας το BLOSUM62 ως scoring matrix. Για την απεικόνιση της ευθυγράμμισης των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Geneious v5.5 (Drummond et al., 2011). Τα ομόλογα μοντέλα δημιουργήθηκαν με το πρόγραμμα MODELLER (Sali & Blundell 1993), μέσω του προγράμματος UCSF Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>, Pettersen et al. 2004) και παρήχθησαν πέντε μοντέλα σε κάθε περίπτωση. Για την ποιοτική εκτίμηση των μοντέλων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα PROSA II (Sippl 1993) και Verify 3D (Luthy et al. 1992). Οι δομές που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα για τη δημιουργία των μοντέλων φαίνονται στον Πίνακα 4.9. Για την απεικόνιση των μοντέλων έγινε χρήση των προγραμμάτων PyMOL (<http://www.pymol.org/>, DeLano 2002) και UCSF Chimera. Η ανάλυση επιφάνειας ηλεκτροστατικού δυναμικού, πραγματοποιήθηκε με το UCSF Chimera. Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Geneious v5.5 (Drummond et al., 2011).

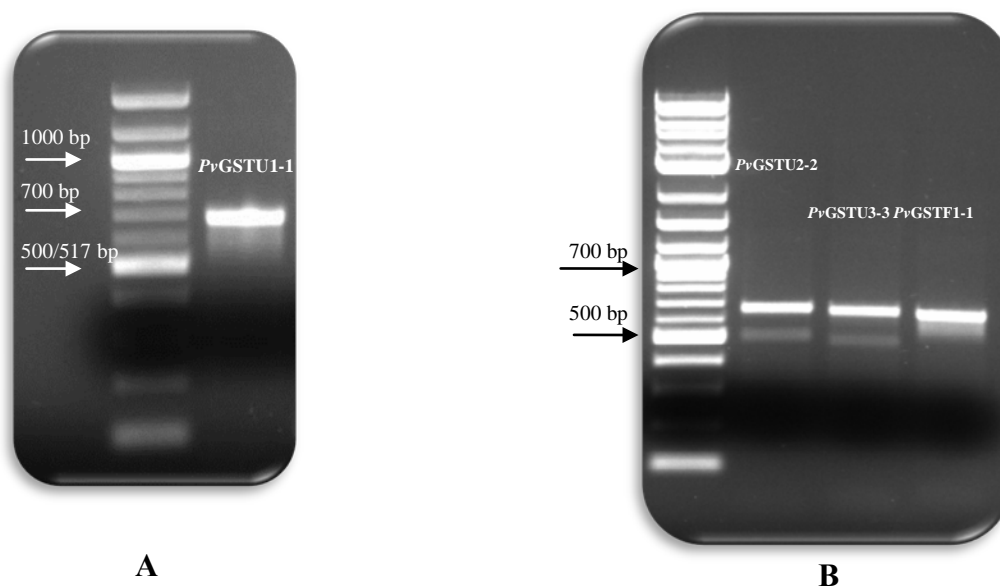
Ακόμα για την *in silico* ανάλυση της πιθανής τοποθεσίας των ενζύμων, χρησιμοποιήθηκαν οι αλγόριθμους iPSORT (<http://ipsort.hgc.jp/how.html>) (Banai et al., 2002), TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) (Emanuelsson et al., 2000) και SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Bendtsen et al., 2004), φαίνεται ότι τα ισοένζυμα είναι κυτταροπλασματικά λόγω της απουσίας N-τελικών πεπτιδίων διέλευσης. Επίσης για την εύρεση των αμινοξέων που εμπλέκονται στη G-θέση των ενζύμων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα What If (<http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/>).

4.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.4.1. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΓΙΑ ΤΑ ΙΣΟΕΝΖΥΜΑ ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΟΝ ΦΟΡΕΑ pEXP-5 CT/TA-TOPO[®]

Για την ενίσχυση των γονιδίων των τεσσάρων ισοενζύμων, πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Στην παράγραφο 4.3.2.1. και 4.3.2.2. περιγράφονται αναλυτικά οι συνθήκες και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν. Στο Σχήμα 4.1. φαίνονται τα προϊόντα που προέκυψαν από τις αντιδράσεις.

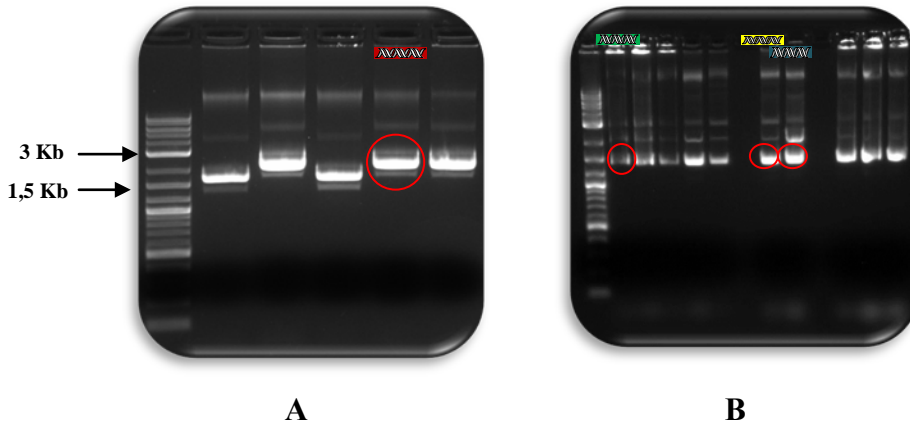
Ακολούθως πραγματοποιήθηκε εισαγωγή των γονιδίων στον πλασμιδιακό φορέα pEXP-5 CT/TA-TOPO[®] και μετασχηματισμός των κυττάρων *E. coli* TOP10, με το ανασυνδιασμένο γονίδιο. Τα μετασχηματισμένα πλέον κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία Petri, με θρεπτικό διάλυμα LB-άγαρ και αντιβιοτικό επιλογής την αμπικιλίνη (100 µg/mL). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα μη μετασχηματισμένα και ως θετικός μάρτυρας κύτταρα μετασχηματισμένα με τον φορέα PUC19. Επιλέχθηκαν 20 αποικίες και προχωρήσαμε σε προκαλλιέργεια και απομόνωση πλασμιδιακού DNA από εκείνη την αποικία, με την καλύτερη ειδική δραστηριότητα (Σχήμα 4.2.). Το πλασμιδιακό DNA απομονώθηκε με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης (§ 2.2.7) και με kit απομόνωσης πλασμιδιακού DNA για να υποβληθεί σε νουκλεοτιδική αλληλούχιση.



Σχήμα 4.1. **A.** Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της αντίδρασης PCR σε πηκτή αγαρόζης (1% w/v), για την ενίσχυση του γονιδίου *PnGSTU1-1*. Ως δείκτης μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο *100 bp DNA Ladder* (Biolabs). **B.** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR σε πηκτή αγαρόζης (1%

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

w/v), για την ενίσχυση των γονιδίων *PvGSTU2-2*, *PvGSTU3-3* και *PvGSTF1-1*. Ως δείκτης μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο *2-Log DNA Ladder* (Biolabs).



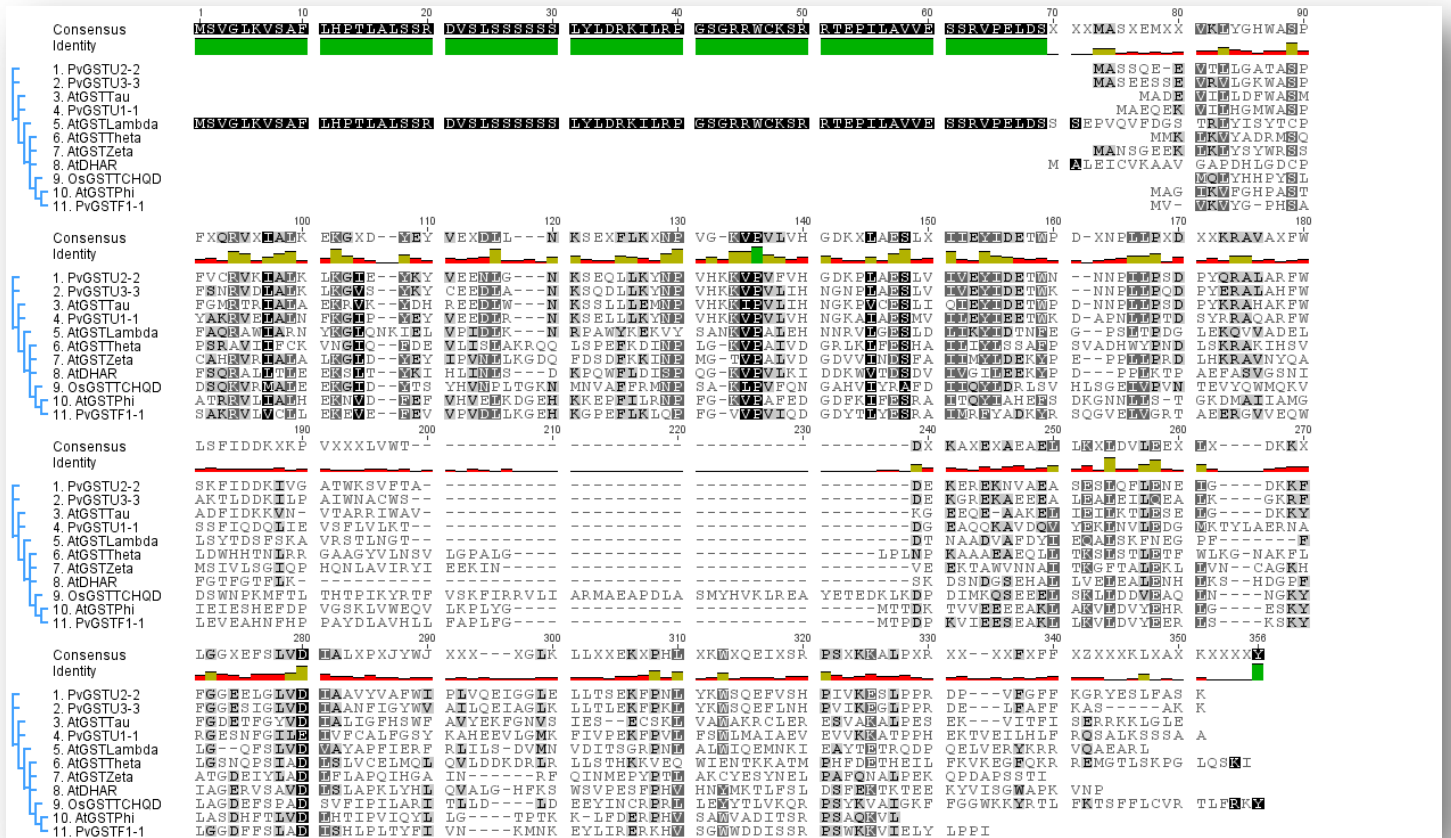
Σχήμα 4.2. Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA των γονιδίων **A.** *PvGSTU1-1* (οι υπόλοιπες ζώνες είναι από αποικίες του ίδιου γονιδίου) **B.** *PvGSTU2-2*, *PvGSTU3-3* και *PvGSTF1-1* κατόπιν απομόνωσης τους με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης σε πηκτή αγαρόζης (1% w/v). Ως δείκτης μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο *2-Log DNA Ladder* (Biolabs).

4.4.2. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ

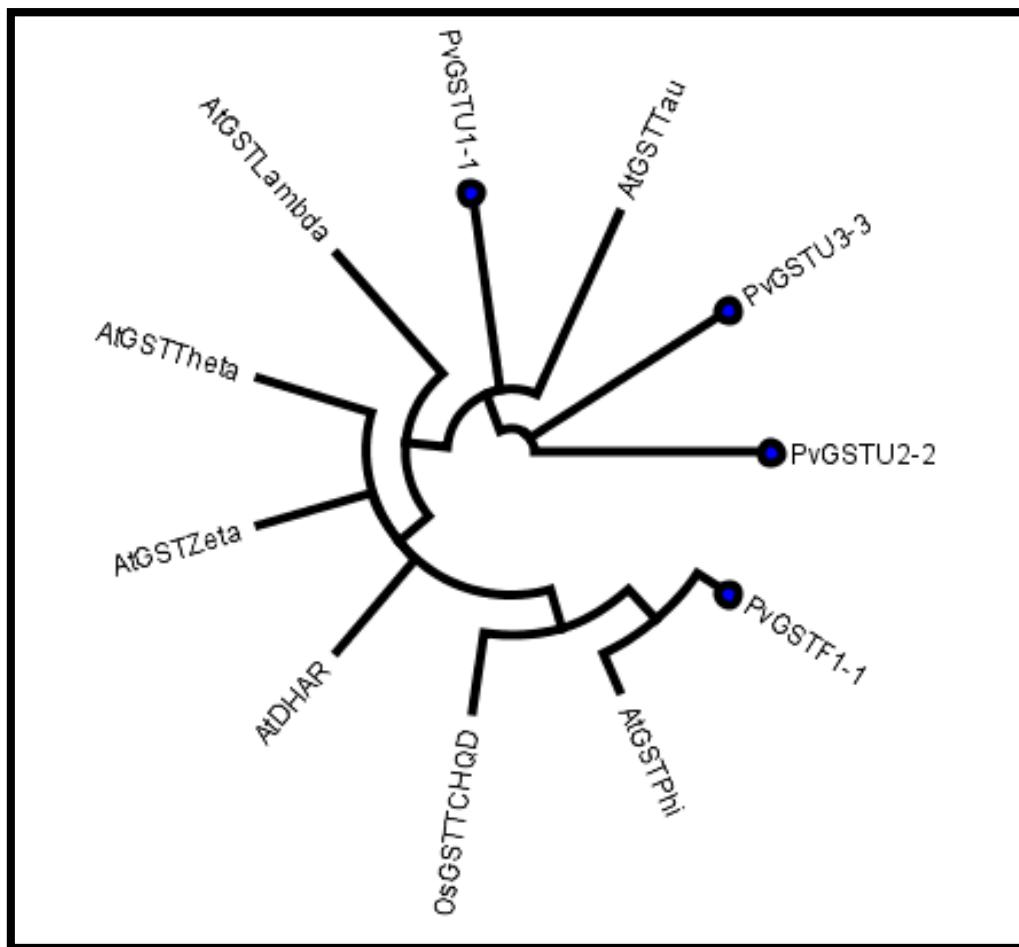
Τα ισοένζυμα GST1, GST2, GST3 και GST4, βρέθηκαν να αποτελούνται από 696, 678, 663 και 648 bp, κωδικοποιώντας πολυπεπίδια των 231, 225, 220 και 215 αμινοξέων, αντίστοιχα. Τα μοριακά βάρη των πολυπεπτιδίων αυτών είναι 26.419,60, 25.567,29, 25.071,91 και 24.779,70 Da, με θεωρητικά ισοηλεκτρικά σημεία pI 5,93, 5,29, 5,70 και 5,84, αντίστοιχα. Από την *in silico* ανάλυση χρησιμοποιώντας τους αλγόριθμους iPSORT, TargetP και SignalP, φαίνεται ότι τα ισοένζυμα είναι κυτταροπλασματικά λόγω της απουσίας N-τελικών πεπτιδίων διέλευσης.

Για την εύρεση της φυλογενετικής σχέσης των τεσσάρων GST ισοενζύμων με άλλες GSTs από άλλες γνωστές τάξεις, κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο πολικής μορφής μετά από πολλαπλή αλληλούχιση αμινοξέων (Σχήματα 4.2 και 4.3). Η αμινοξική αλληλούχιση και το φυλογενετικό δέντρο δημιουργήθηκαν, χρησιμοποιώντας μέλη του φυτού *Arabidopsis thaliana* της οικογένειας GST (*AtGSTs*), λόγω το ότι οι *AtGSTs* έχουν χαρακτηριστεί με λεπτομέρεια και κάποιες από αυτές χρησιμοποιούνται ευρέως ως πρότυπα-ένζυμα στη βιολογία φυτών και

στην έρευνα των μηχανισμών που απαντούν σε συνθήκες καταπόνησης (Dixon et al. 2009). Τα ισοένζυμα GST1, GST2 και GST3 ομαδοποιήθηκαν μαζί με τις GSTs της τ τάξης, ενώ το GST4 με τις φυτικές GSTs της ϕ τάξης. Σύμφωνα με την ονοματολογία των Edwards et al. (2000) τα ένζυμα GST1, GST2 και GST3 μπορούν να οριστούν ως PnGSTU1-1, PnGSTU2-2, PnGSTU3-3 και το GST4 ως PnGSTF1-1.



Σχήμα 4.3. Αμινοξική αλληλούχιση (ClustalW, Thompson et al. 1994) των ισοενζύμων PnGSTU1-1, PnGSTU2-2, PnGSTU3-3 και PnGSTF1-1 με αντιπροσωπευτικά μέλη από όλες τις γνωστές τάξεις: ϕ , τ , θ , ζ , λ , DHAR και TCHQD. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα Geneious v5.5 (Drummond et al., 2011). Οι συντηρημένες περιοχές είναι σκιασμένες, με διαβαθμίσεις του γκρι, ■ 100% ομοιότητα, ■ 80-100% ομοιότητα, ■ 60-80% ομοιότητα, ■ λιγότερο από 60% ομοιότητα.



Σχήμα 4.4. Φυλογενετική ανάλυση των ισοενζύμων *PvGSTU1-1*, *PvGSTU2-2*, *PvGSTU3-3* και *PvGSTF1-1*. Το φυλογενετικό δέντρο πολικής μορφής, κατασκευάστηκε με τη μέθοδο Neighbour-Joining από το πρόγραμμα Geneious v5.5 (Drummond et al., 2011), επιλέγοντας τα ισοένζυμα και αντιπροσωπευτικά μέλη, από όλες τις γνωστές τάξεις: *φ*, *τ*, *θ*, *ζ*, *λ*, *DHAR* και *TCHQD*. Προέκυψε κατόπιν αμινοξικής αλληλούχισης χρησιμοποιώντας το ClustalW (ClustalW, Thompson et al. 1994). Οι αριθμοί πρόσβασης των αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν είναι: *AtGSTPhi* (*Arabidopsis thaliana φ* τάξη GST, NP_171792), *PvGSTF1-1* (*Phaseolus vulgaris φ* τάξη GST, AEX37999.1), *AtGSTTheta* (*Arabidopsis thaliana θ* τάξη GST, NP_198937), *AtGSTDHAR* (*Arabidopsis thaliana* διϋδροασκορβική ρεδουκτάση, Q9FWR4), *AtGSTZeta* (*Arabidopsis thaliana zeta* class GST, Q9ZVQ3), *AtGSTTau* (*Arabidopsis thaliana τ* τάξη GST, AAS76278), *PvGSTU1-1* (*Phaseolus vulgaris τ* τάξη GST, AEX38000.1), *PvGSTU2-2* (*Phaseolus vulgaris τ* τάξη GST, AEX38001.1), *AtGSTLambda* (*Arabidopsis thaliana λ* τάξη GST, NP_191064), *OsGSTTCHQD* (*Oriza sativa TCHQD* τάξη, CAZ68077).

4.4.3. ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ

Για την έκφραση των ισοενζύμων *PnGSTU1-1*, *PnGSTU2-2*, *PnGSTU3-3* και *PnGSTF1-1*, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός των κυττάρων *E. coli* BL21(DE3) με πλασμιδιακό DNA (αναλυτικότερα § 2.2.8.) και εν συνεχεία προχωρήσαμε στην έκφραση τους στους 37⁰C, σε θρεπτικό μέσο LB έχοντας ως αντιβιοτικό επιλογής την αμπικιλίνη (100 µg/mL). Το βιολογικό εκχύλισμα που προέκυψε μετά τη λύση των κυττάρων, φορτώθηκε στην κολώνα χρωματογραφίας (§ 4.3.2.5). Στον Πίνακα 4.2. φαίνονται τα επίπεδα έκφρασης των ισοενζύμων και η ειδική δραστηριότητα του βιολογικού εκχυλίσματος, πριν και μετά τη διαπίδυση.

Πίνακας 4.2. Επίπεδα έκφρασης των ισοενζύμων και η ειδική δραστηριότητα του βιολογικού εκχυλίσματος πριν και μετά τη διαπίδυση.

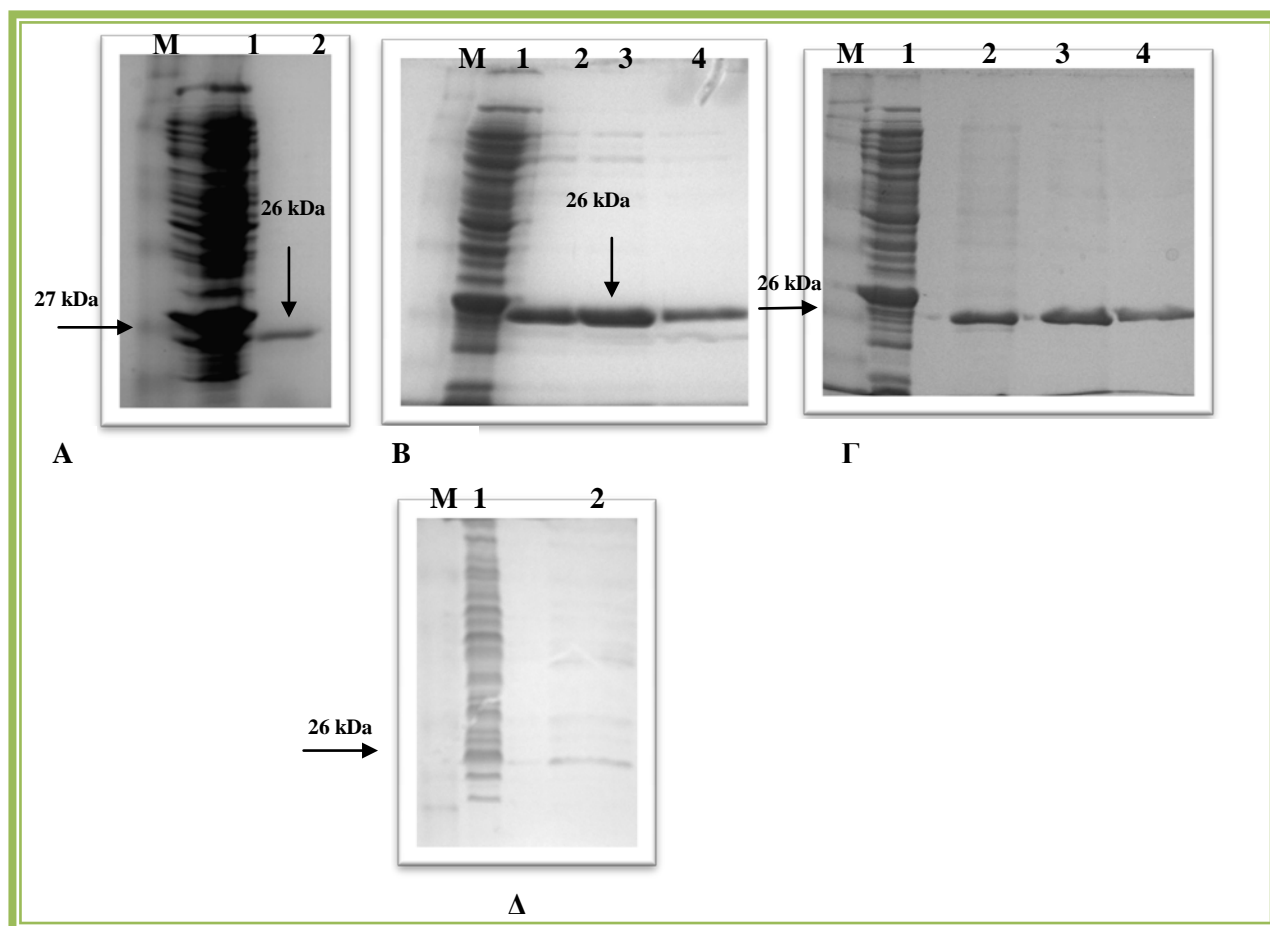
Ισοένζυμο	g βιολογικού εκχυλίσματος/ml καλλιέργειας	Ειδική δραστηριότητα πριν τη διαπίδυση (U/mg)	Ειδική δραστηριότητα μετά τη διαπίδυση (U/mg)
<i>PnGSTU1-1</i>	1,119/500	0,0247	0,0527
<i>PnGSTU2-2</i>	1,036/500	0,170	0,162
<i>PnGSTU3-3</i>	1,164/500	0,0100	0,0103
<i>PnGSTF1-1</i>	0,715/500	0,0049	0,0037

Τα ισοένζυμα *PnGSTU1-1*, *PnGSTU2-2*, *PnGSTU3-3* και *PnGSTF1-1*, καθарίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας και προσροφητή BES-GSH (§ 4.3.2.5), με υψηλές αποδόσεις 81%, 82%, 100% και 70%, αντίστοιχα (Πίνακας 4.3). Στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS (§ 2.2.27), για να ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης των ισοενζύμων και η καθαρότητα τους (Σχήμα 4.5).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Πίνακας 4.3. Αποτελέσματα από τη χρωματογραφία για κάθε ισοένζυμο.

Ισοένζυμο	Απόδοση καθαρισμού	Καθαρισμός (φορές)	Ειδική δραστηκότητα καλύτερης έκλουσης (U/mg)
<i>PvGSTU1-1</i>	81%	145	7,633
<i>PvGSTU2-2</i>	82%	156	25,287
<i>PvGSTU3-3</i>	100%	957	9,86
<i>PvGSTF1-1</i>	70%	935	3,460



Σχήμα 4.5. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (12,5 % w/v) παρουσία SDS, σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970). Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250. **A.** **M:** Protein Marker Broad Range (Biolabs), **1:** εκχύλισμα μετασχηματισμένων κυττάρων με το γονίδιο του ισοενζύμου *PvGSTU1-1*, **2:** έκλουση 2 (E2) *PvGSTU1-1*. **B.** **M:** Protein

Marker Broad Range (Biolabs), **1**: εκχύλισμα μετασχηματισμένων κυττάρων με το γονίδιο του ισοενζύμου *PvGSTU2-2*, **2-4**: ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα των εκλούσεων καθαρής πρωτεΐνης με **2**: έκλουση 2 (E2) *PvGSTU2-2*, **3**: έκλουση 3 (E3) *PvGSTU2-2*, **4**: έκλουση 4 (E4) *PvGSTU2-2*. **Γ. M**: Protein Marker Broad Range (Biolabs), **1**: εκχύλισμα μετασχηματισμένων κυττάρων με το γονίδιο του ισοενζύμου *PvGSTU3-3*, **2-4**: ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα των εκλούσεων καθαρής πρωτεΐνης με **2**: έκλουση 1 (E1) *PvGSTU3-3*, **3**: έκλουση 2 (E2) *PvGSTU3-3*, **4**: έκλουση 3 (E3) *PvGSTU3-3*. **Δ. M**: Protein Marker Broad Range (Biolabs), **1**: εκχύλισμα μετασχηματισμένων κυττάρων με το γονίδιο του ισοενζύμου *PvGSTF1-1*, **2**: ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα της έκλουσης 2 (E2) *PvGSTF1-1*.

4.4.4. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ

Τα ισοένζυμα πλέον σε καθαρές μορφές, χρησιμοποιήθηκαν σε φωτομετρικές δοκιμές, ώστε να μελετηθεί η εκλεκτικότητα τους και η δραστηκότητάς τους, όπως η μεταφοράση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδάση εξαρτώμενη της GSH, η διϋδροασκορβική ρεδοκτάση και η θειοτρανσφεράση. Από τα αποτελέσματα (Πίνακας 4.4) φαίνεται ότι οι *PvGSTs* καταλύουν ένα μεγάλο εύρος αντιδράσεων, με το κάθε ισοένζυμο να παρουσιάζει και διαφορετική εξειδίκευση, ως προς το υπόστρωμα. Από τις αλογονωμένες αρωματικές ενώσεις που δοκιμάστηκαν: το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) και τα ανάλογα του: 1-βρωμο-2,4-δινιτροβενζόλιο (BDNB), 1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο (FDNB), 1-ιοδω-2,4-δινιτροβενζόλιο (IDNB), π-νιτροβενζυλοχλωρίδιο (pNBC) και 4-χλωρο-7-νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο, αποτέλεσαν αποδεκτά υποστρώματα σχεδόν για όλα τα ένζυμα, παρά τις δραματικές διαφορές (x 148-φορές) που παρατηρήθηκαν στην ειδική δραστηκότητα. Για παράδειγμα το ένζυμο *PvGSTU2-2* της τ τάξης, παρουσίασε την υψηλότερη ειδική δραστηκότητα ως προς το CDNB και τα ανάλογα του, σε σχέση με τα άλλα ένζυμα (*PvGSTU1-1*, *PvGSTU3-3* και *PvGSTF1-1*).

Οι *PvGSTs* επίσης εξετάστηκαν για δράση υπεροξειδάσης εξαρτώμενης από τη γλουταθειόνη (GPOX), χρησιμοποιώντας το υδροϋπεροξειδίο του κουμενίου, το τ-βουτυλο-υδροϋπεροξειδίο, το δι-δωδεκανικό υδροϋπεροξειδίο και το βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίο, ως πιθανά υποστρώματα (Πίνακας 4.4). Είναι ευρέως γνωστό ότι οι GSTs συμμετέχουν στους μηχανισμούς άμυνας οξειδωτικής καταπόνησης, καταλύοντας τις GSH-εξαρτώμενες αντιδράσεις που αδρανοποιούν τα οργανικά υπεροξειδία, μετατρέποντας τα σε μη τοξικές αλκοόλες (Bartling et al. 1993, Cummins et al. 1999). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα ένζυμα της τ τάξης

παρουσιάζουν μεγαλύτερη ειδική δραστικότητα ως προς τα υδροϋπεροξειδία, σε σχέση με αυτό της φ τάξης. Επίσης φαίνεται το υδροϋπεροξειδίο του κουμινίου να είναι το καλύτερο υπόστρωμα, ενώ τα πιο μεγάλα υποστρώματα, το δι-δωδεκανικό υδροϋπεροξειδίο και το βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίο, να μην είναι αποδεκτά για τις *PnGSTs*, με εξαίρεση το ένζυμο *PnGSTU3-3*.

Η οξειδωτική καταπόνηση έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή κυτταροτοξικών αλκενίων, όπως η *trans-2-ενενάλη*, η οποία προκύπτει από την οξείδωση λιπιδίων που περιέχουν πολυακόρεστες ωμέγα-6 ακυλομάδες, όπως αραχιδονικές ή λινολαϊκές ομάδες, και τα αντίστοιχα λιπαρά οξέα (Esterbauer et al. 1986). Οι *GSTs* καταλύουν την αποτοξίνωση και απομάκρυνση της ενενάλης από τα κύτταρα. Γενικά έχουν χαμηλές τιμές K_m για την ενενάλη και είναι αρκετά αποτελεσματικές στη ρύθμιση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης αυτής (Balogh & Atkins 2011). Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι μόνο η *PnGSTU2-2*, έδειξε αξιόλογη ειδική δραστικότητα ως προς την *trans-2-ενενάλη*. Παρομοίως, οι *PnGSTs* δεν δεσμεύουν αποτελεσματικά άλλα αλκένια-υποστρώματα, όπως την *trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη*, όμως τα ένζυμα *PnGSTF1-1* και *PnGSTU2-2* έδειξαν μέτρια ειδική δραστικότητα με το εθακρινικό οξύ. Αυτά τα υποστρώματα πιστεύεται ότι συνδέονται με τη GSH, μέσω της Michael αντίδρασης προσθήκης, στα α,β -ακόρεστα καρβονύλια (Labrou et al. 2004).

Θέλοντας να προσδιορίσουμε αν τα ένζυμα *PnGSTU1-1*, *PnGSTU2-2*, *PnGSTU3-3* και *PnGSTF1-1*, συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα του φυτού ως προς τα ζιζανιοκτόνα, αξιολογήθηκε η δυνατότητα κατάλυσης αντιδράσεως δέσμευσης ζιζανιοκτόνου/GSH. Στον Πίνακα 4.4. φαίνεται η ειδική δραστικότητα των ενζύμων ως προς επιλεγμένα ζιζανιοκτόνα, που ανήκουν στα αρυλοξυ-φαινοξυπροπιονικά οξέα (fluzifop-p-butyl), στις τριαζίνες (atrazine), στα χλωρακεταμίδια (alachlor, metolachlor) και στους διφαινυλικούς αιθέρες (fluorodifen). Όλα τα ένζυμα δείχνουν σημαντική ειδική δραστικότητα ως προς το fluzifop-p-butyl και τοalachlor, μικρή δραστικότητα ως προς την atrazine και το metolachlor, αλλά πολύ μικρή ή και καθόλου δραστικότητα για το fluorodifen.

Οι *PnGSTs* δοκιμάστηκαν επίσης ως προς τη δράση διϋδροασκορβικής ρεδουκτάσης (DHAR) και θειοτρανσφεράσης. Μόνο το ένζυμο *PnGSTU3-3* φαίνεται να έχει υψηλή δραστικότητα διϋδροασκορβικής ρεδουκτάσης, καταλύοντας την αναγωγή του διϋδροασκορβικού (DHA) σε ασκορβικό οξύ, έχοντας ως αναγωγικό μέσο τη GSH.

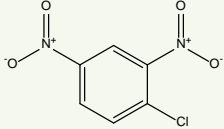
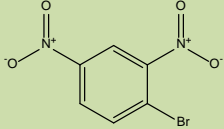
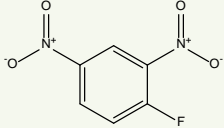
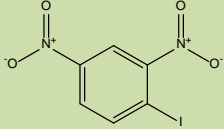
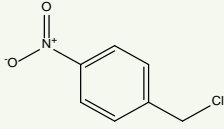
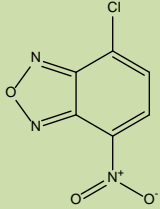
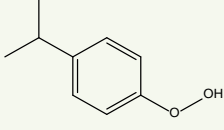
Διαφορετική εικόνα παρατηρήθηκε με τις *PnGSTs*, όταν δοκιμάστηκαν ως θειοτρανσφεράσες, με υπόστρωμα τη 2-2 διθειοδιαιθανόλη (HED). Το ένζυμο *PnGSTF1-1*, βρέθηκε να έχει υψηλή ειδική δραστικότητα θειοτρανσφεράσης, ενώ παρουσίασε τη μεγαλύτερη δραστικότητα με το υπόστρωμα HED, απ' ότι τα υπόλοιπα υποστρώματα. Συνεπώς είναι πιθανόν ότι το ένζυμο αυτό παίζει σημαντικό βιολογικό ρόλο.

Τέλος σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι *PnGSTs* καταλύουν την αντίδραση προσθήκης της θειόλης της GSH στον ηλεκτρονιόφιλο κεντρικό άνθρακα της ισοθειοκυανικής ομάδας (χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τον ισοθειοκυανικό αλλυ-εστέρα και τον ισοθειοκυανικό φαινυλαιθυλ-εστέρα), σχηματίζοντας διθειοκαρβαμίδια [R-NH-C(=S)-SG] (Meyer et al. 1995). Φαίνεται ότι ο αλειφατικός ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας να είναι το καλύτερο υπόστρωμα για τις *PnGSTs*, με το ένζυμο *PnGSTU2-2* να έχει τη μεγαλύτερη ειδική δραστικότητα και να ακολουθούν τα *PnGSTU1-1* και *PnGSTF1-1*. Τα ισοθειοκυανικά απαντούν άφθονα στα σταυρανθή (Kolm et al. 1995) είτε από μόνα τους, είτε μετά τη δράση του ενζύμου μυροσινάση (Kumar, 2009). Ο ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας εξυπηρετεί στην άμυνα ενάντια στα φυτοφάγα και λόγω της επικινδυνότητας για το ίδιο το φυτό, αποθηκεύεται υπό την αβλαβή μορφή του γλυκοσιδίου (Agrawal & Kurashige, 2003).

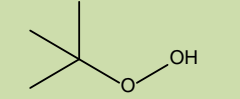
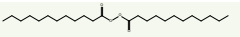
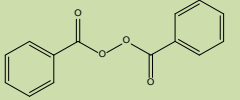
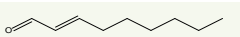
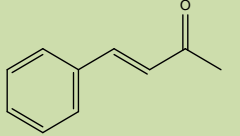
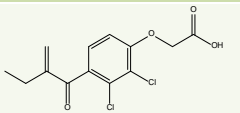
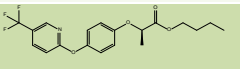
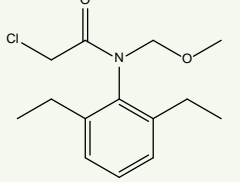
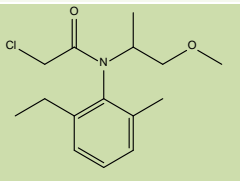
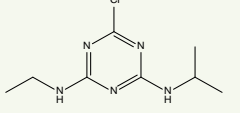
Επίσης φαίνεται τα ισοένζυμα *PnGSTU3-3* και *PnGSTF1-1*, να έχουν για υπόστρωμα την βρωμοσουλφοφθαλεΐνη, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση του *hGSTA1-1*, η βρωμοσουλφοφθαλεΐνη αποτελεί μη-συναγωνιστικό αναστολέα (Kolobe et al., 2004).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Πίνακας 4.4. Ειδική δραστηριότητα των ισοενζύμων *PvGSTU1-1*, *PvGSTU2-2*, *PvGSTU3-3* και *PvGSTF1-1* ως προς διαφορετικά υποστρώματα. Με τα βέλη σημειώνονται τα καλύτερα υποστρώματα για κάθε ένζυμο.

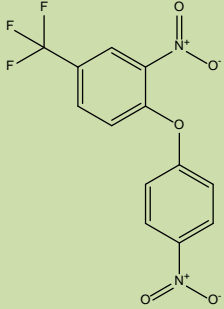
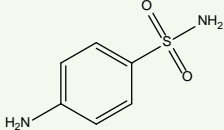
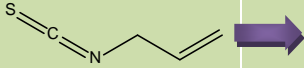
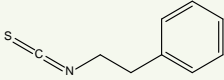
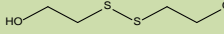
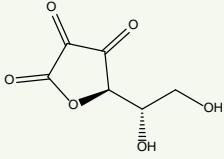
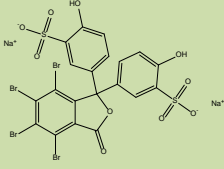
Ειδική δραστηριότητα (U/mg)					
Υπόστρωμα	Δομή	<i>PvGSTU1-1</i>	<i>PvGSTU2-2</i>	<i>PvGSTU3-3</i>	<i>PvGSTF1-1</i>
1-γλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο		0,3	16,6	➔ 3,5	3,5
1-βρωμο-2,4-δινιτροβενζόλιο		0,6	27,9	2,8	8,4
1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο		MA	8,5	0,5	MA
1-ιοδο-2,4-δινιτροβενζόλιο		0,2	2,4	1,5	1,7
π-νιτροβενζυλ-γλωρίδιο		MA	MA	MA	0,7
4-γλωρο-7-νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο		0,07	➔ 148,2	1,9	3,9
υδροϋπεροξειδίου του κουμηνίου		0,4	2,6	0,6	MA

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

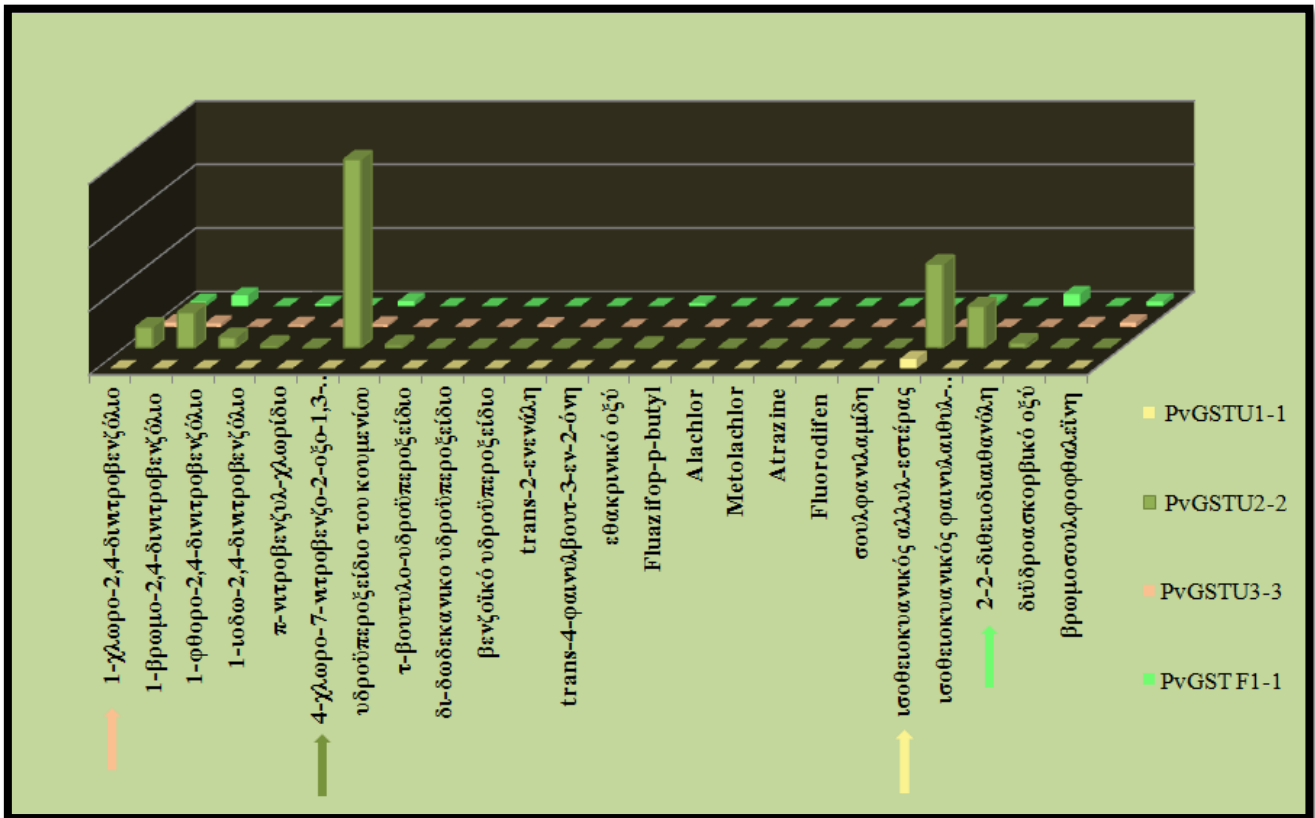
Ειδική δραστηριότητα (U/mg)					
τ-βουτυλο- υδροϋπεροξειδίο		0,07	0,5	0,4	0,01
δι-δωδεκανικό υδροϋπεροξειδίο		MA	0,4	0,1	MA
βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίο		MA	MA	1,42	MA
trans-2-ενενάλη		0,008	0,1	MA	MA
trans-4- φαινυλβουτ-3-εν- 2-όνη		0,0008	0,6	MA	0,01
εθακρινικό οξύ		MA	1,6	MA	2,2
Fluazifop-p-butyl		0,09	0,1	0,2	0,1
Alachlor		0,04	0,1	0,07	0,1
Metolachlor		0,01	0,05	0,03	0,03
Atrazine		0,005	0,02	0,01	0,01

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Ειδική δραστηριότητα (U/mg)

Fluorodifen		0,002	MA	MA	MA
σουλφανιμίδη		MA	MA	MA	MA
ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας		7,6	66,1	MA	2,7
ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλ- εστέρας		0,005	32,7	0,097	0,1
2-2- διθειοδιαιθανόλη		0,06	4,1	0,36	9,5
διϋδροασκορβικό οξύ		0,01	MA	1,46	MA
βρωμοσουλφο- φθαλεΐνη		MA	MA	3,5	3,6

MA: Μη ανιχνεύσιμο



Σχήμα 4.6. Γραφική απεικόνιση της ειδικής δραστηριότητας των ισοενζύμων *PvGSTU1-1*, *PvGSTU2-2*, *PvGSTU3-3* και *PvGSTF1-1*, ως προς διαφορετικά υποστρώματα. Με τα βέλη σημειώνονται τα καλύτερα υποστρώματα για κάθε ένζυμο.

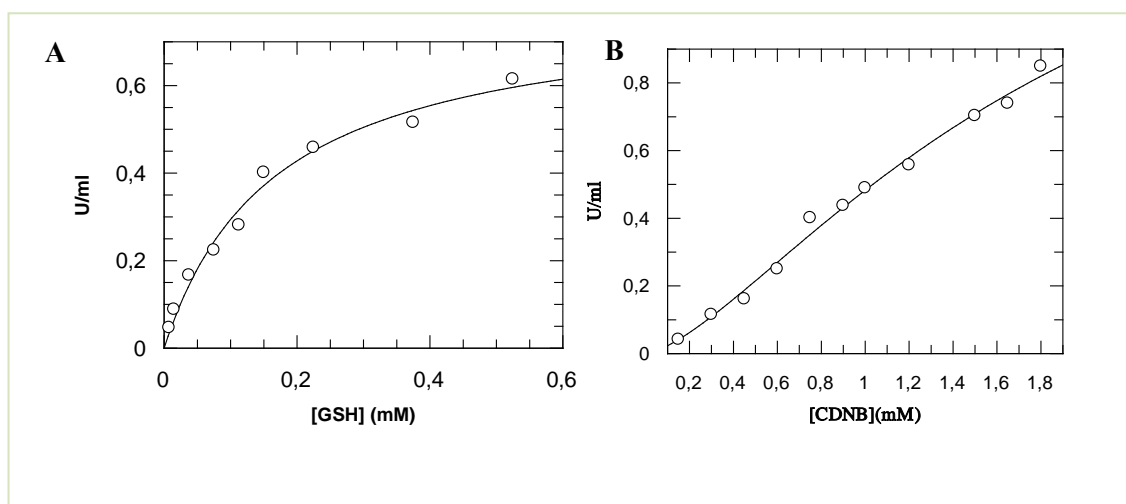
4.4.5. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ CDNB, CuOOH ΚΑΙ AITC

Πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση για το υπόστρωμα CDNB και προσδιορίστηκαν οι παράμετροι k_{cat} και K_m (Πίνακας 4.5). Τα ισοένζυμα *PvGSTU2-2*, *PvGSTU3-3* και *PvGSTF1-1*, υπακούουν στην εξίσωση κινητικής των Michaelis-Menten (Σχήμα 4.11). Οι τιμές της K_m των *PvGSTU2-2*, *PvGSTU3-3* και *PvGSTF1-1* για το CDNB, είναι μέσα στο εύρος τιμών των φυτικών GSTs (Labrou et al. 2004, Axarli et al. 2009a, b). Οι τιμές K_m των ενζύμων *PvGSTF1-1* και *PvGSTU3-3*, για τη GSH, είναι περίπου 5–10 φορές πιο χαμηλές σε σχέση με αυτές που έχουν παρατηρηθεί σε άλλα φυτικά ισοένζυμα (Labrou et al. 2004, Axarli et al. 2009a, b).

Σε αντίθεση με τα άλλα ισοένζυμα, το *PvGSTU1-1* δεν ακολουθεί την κινητική των Michaelis-Menten έχοντας το CDNB ως μεταβλητό υπόστρωμα. Κατά την κινητική

ανάλυση του *PvGSTU1-1*, με σταθερή τη συγκέντρωση της GSH και μεταβλητή τη συγκέντρωση του CDNB, παρατηρήθηκε σιγμοειδή εξάρτηση του υποστρώματος (Σχήμα 4.7.B). Τα αποτελέσματα προσδιορισμού των αρχικών ταχυτήτων, υπακούουν στην εξίσωση που εκφράζει θετική συνέργεια μεταξύ των δύο Η-θέσεων, του ομοδιμερούς ενζύμου. Από την άλλη, όταν χρησιμοποιήθηκε η GSH ως μεταβλητό υπόστρωμα με το CDNB σε σταθερή συγκέντρωση, η εξάρτηση που παρατηρήθηκε ήταν υπερβολή που ακολουθεί την εξίσωση των Michaelis–Menten. Οι κινητικές παράμετροι k_{cat} , K_m GSH, $S_{0,5}^{CDNB}$ και n_H που προσδιορίστηκαν μέσω της κινητικής ανάλυσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.6.

Σχετικά με τον ισοθειοκυανικό αλλυλ-εστέρα, που φαίνεται να είναι το καλύτερο υπόστρωμα για το *PvGSTU1-1*, υπήρξε διαφορετική εικόνα κινητικής συμπεριφοράς. Όταν χρησιμοποιήθηκε ο ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας ως μεταβλητό υπόστρωμα με τη συγκέντρωση της GSH σταθερή και το αντίστροφο, παρατηρήθηκε σιγμοειδής εξάρτηση και για τα δύο υποστρώματα (Σχήμα 4.8). Τα αποτελέσματα των αρχικών ταχυτήτων υπακούουν στην εξίσωση που εκφράζει θετική συνέργεια μεταξύ των δύο θέσεων Η- και G- και οι κινητικές παράμετροι k_{cat} , $S_{0,5}^{GSH}$, $S_{0,5}^{AITC}$ και n_H φαίνονται στον Πίνακα 4.6.



Σχήμα 4.7. Κινητική ανάλυση του ενζύμου *PvGSTU1-1* με τη GSH ως μεταβλητό υπόστρωμα (A) και το CDNB σε σταθερή συγκέντρωση 1mM. Κινητική ανάλυση του ενζύμου *PvGSTU1-1* με το CDNB ως μεταβλητό υπόστρωμα (B) και τη GSH σε σταθερή συγκέντρωση 2,5 mM. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Πίνακας 4.5. Κινητική ανάλυση των *PvGSTU1-1*, *PvGSTU2-2*, *PvGSTU3-3* και *PvGSTF1-1* για το σύστημα CDNB/GSH.

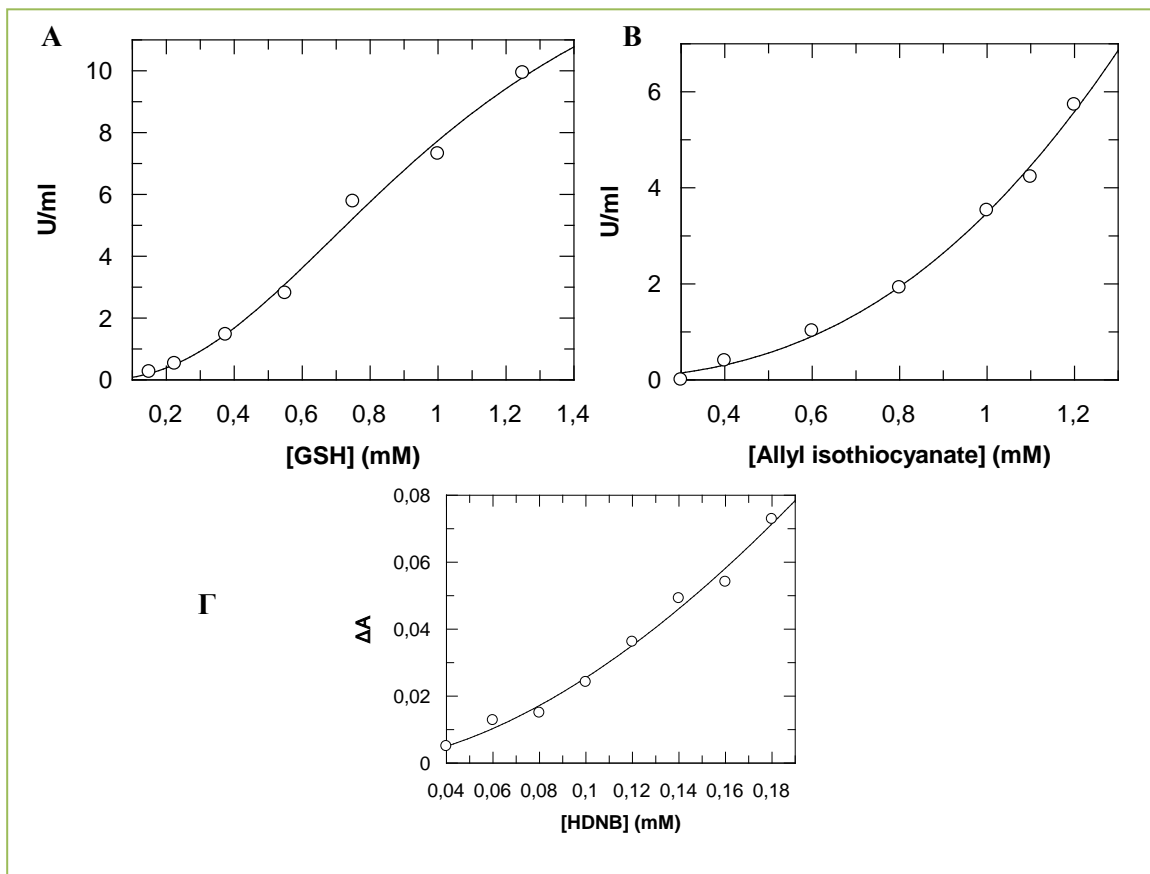
Ένζυμο	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)
	(GSH)	(GSH)	(CDNB)	(CDNB)	(GSH)	(CDNB)
<i>PvGSTU1-1</i>	167,3 ± 26,4	5,038 ± 0,335	MA	MA	0,031 ± 0,007	MA
<i>PvGSTU2-2</i>	49,6 ± 6,2	650,4 ± 19,165	864,6 ± 110,8	1.274 ± 80,61	13,271 ± 1,272	1,485 ± 0,0975
<i>PvGSTU3-3</i>	23 ± 2,2	72,75 ± 1,603	1.399 ± 246	351,2 ± 34,1	3,198 ± 0,375	0,263 ± 0,070
<i>PvGSTF1-1</i>	44,4 ± 3,4	17,5 ± 0,339	5.873,7 ± 2.391,2	360,8 ± 66	0,395 ± 0,0227	0,098 ± 0,068

MA: Μη ανιχνεύσιμο

Πίνακας 4.6. Κινητική ανάλυση του *PvGSTU1-1* για τα συστήματα CDNB/GSH και ισοθειοκυανικό αλλυλ-εστέρα/GSH.

Υπόστρωμα	Κινητικές παράμετροι	GSH	CDNB ή ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας (AITC)
CDNB/GSH	k_{cat}	-	10,8 ± 3,5
	$S_{0,5}^{\text{CDNB}}$	-	2,5 ± 1,2
	n_H	-	1,5 ± 0,2
Ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας (AITC)	k_{cat}	105,9 ± 32,8	37,4
	$S_{0,5}^{\text{GSH}}$	1,1 ± 0,7	-
	$S_{0,5}^{\text{AITC}}$	-	5,8
	n_H	2,2 ± 0,4	1,7

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4



Σχήμα 4.8. Κινητική ανάλυση του ενζύμου *PnGSTU1-1* με το AITC ως μεταβλητό υπόστρωμα (A) και τη GSH σε σταθερή συγκέντρωση 2,5 mM. Κινητική ανάλυση του ενζύμου *PnGSTU1-1* με τη GSH ως μεταβλητό υπόστρωμα (B) και το AITC σε σταθερή συγκέντρωση 0,4 mM. Τα αποτελέσματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν και οι καμπύλες προέκυψαν με ανάλυση παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων (Γ) Φασματοσκοπική ανάλυση της δέσμευσης του 1-υδροξυ-2,4-δινιτροβενζόλιο (HDNB) στο *PnGSTU1-1*. Στο γράφημα φαίνεται η διαφορά απορρόφησης ΔA στα 310 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης του HDNB.

Θέλοντας να ερευνήσουμε τη θετική συνέργεια του ενζύμου *PnGSTU1-1*, αναλύσαμε την ισοθερμική δέσμευση του 1-υδροξυ-2,4-δινιτροβενζόλιο (υδρολυμένο προϊόν του CDNB) στο *PnGSTU1-1*, παρουσία GSH με διαφορική φασματοσκοπία (Σχήμα 4.8). Το ένζυμο παρουσίασε σιγμοειδή καμπύλη δέσμευσης με συντελεστή Hill = $1,6 \pm 0,1$, πολύ κοντά στη τιμή που βρέθηκε κατά την κινητική ανάλυση (Πίνακας 4.6). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τη συνέργεια.

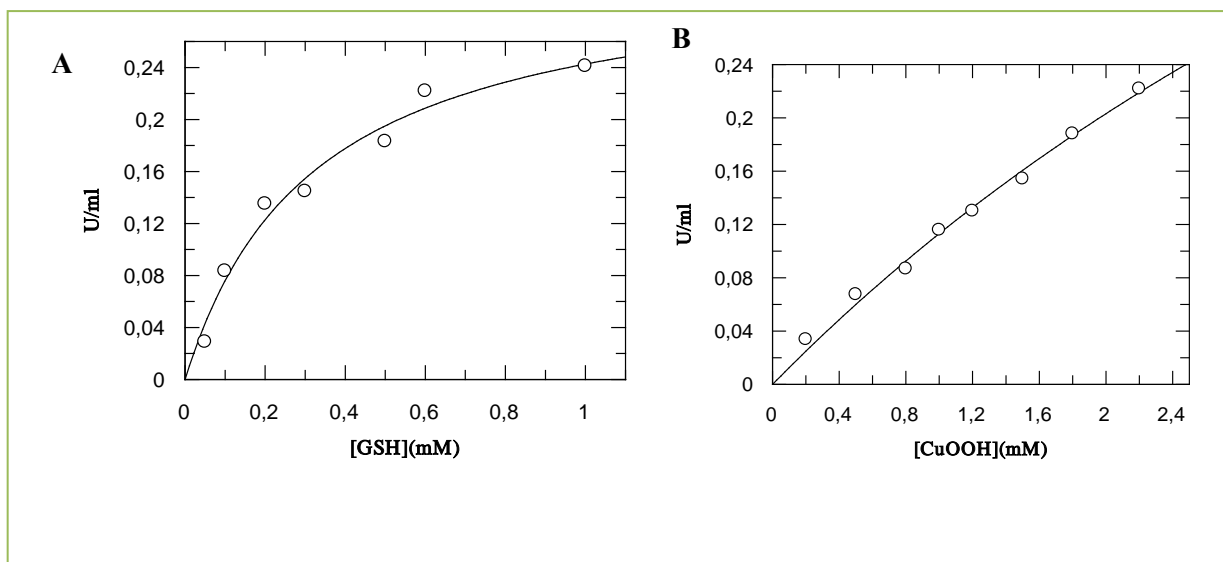
Επίσης πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση του *PnGSTU1-1*, ως προς το σύστημα CuOOH/GSH, καθώς παρουσίασε σχετικά υψηλή ειδική δραστηριότητα μεγαλύτερη

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

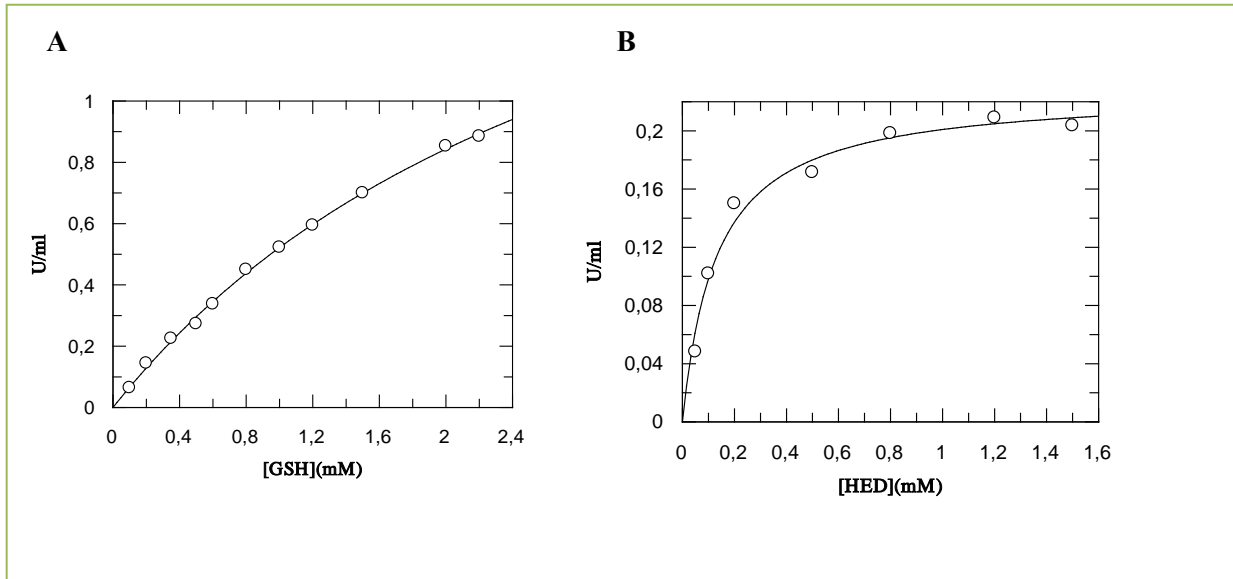
από αυτή του CDNB και τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 4.7. Η εξάρτηση ήταν υπερβολή, ακολουθώντας την εξίσωση Michaelis–Menten (Σχήμα 4.9). Το ίδιο παρατηρήθηκε για το ένζυμο PnGSTF1-1, ως προς το σύστημα HED/GSH (Σχήμα 4.10).

Πίνακας 4.7. Κινητική ανάλυση των ενζύμων PnGSTU1-1 και PnGSTF1-1 ως προς τα συστήματα CuOOH/GSH και HED/GSH, αντίστοιχα.

Ένζυμο	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m	k_{cat}/K_m
	(GSH)	(GSH)	(CuOOH)/(HED)	(CuOOH)/(HED)	($\mu\text{L}^{-1} \text{min}^{-1}$)	($\mu\text{L}^{-1} \text{min}^{-1}$)
					(GSH)	(CuOOH)/(HED)
PnGSTU1-1	348 ± 134	$6,367 \pm 1,018$	7.780 ± 285	$19,9 \pm 5,9$	$0,0228 \pm 0,0118$	$0,0026 \pm 0,00085$
PnGSTF1-1	$3.216,7 \pm 689,7$	$104,3 \pm 18,64$	$131,3 \pm 20,4$	$10,8 \pm 0,4$	$0,0353 \pm 0,0134$	$0,085 \pm 0,015$

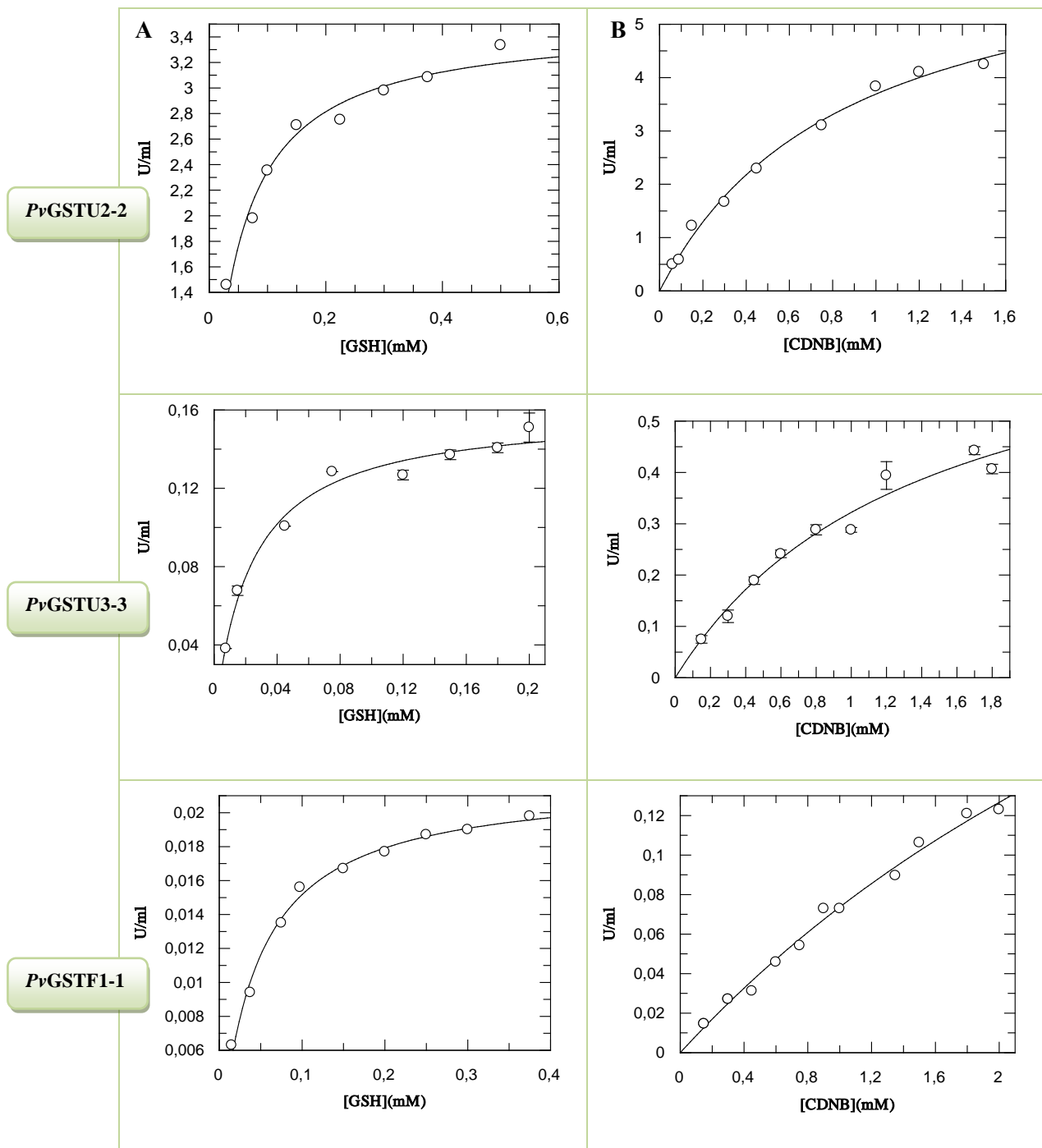


Σχήμα 4.9. Κινητική ανάλυση του ενζύμου PnGSTU1-1 με τη GSH ως μεταβλητό υπόστρωμα (A) και το CuOOH σε σταθερή συγκέντρωση 1,5 mM. Κινητική ανάλυση του ενζύμου PnGSTU1-1 με το CuOOH ως μεταβλητό υπόστρωμα (B) και τη GSH σε σταθερή συγκέντρωση 1 mM. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων.



Σχήμα 4.10. Κινητική ανάλυση του ενζύμου *PnGSTF1-1* με το HED ως μεταβλητό υπόστρωμα (A) και τη GSH σε σταθερή συγκέντρωση 0,5 mM. Κινητική ανάλυση του ενζύμου *PnGSTU1-1* με τη GSH ως μεταβλητό υπόστρωμα (B) και σε σταθερή συγκέντρωση 2 mM. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4



Σχήμα 4.11. **A.** Κινητική ανάλυση των ενζύμων *PvGSTU2-2*, *PvGSTU3-3* και *PvGSTF1-1*, με τη GSH ως μεταβλητό υπόστρωμα και το CDNB σε σταθερή συγκέντρωση 1 mM. **B.** Κινητική ανάλυση των ενζύμων *PvGSTU2-2*, *PvGSTU3-3*, και *PvGSTF1-1*, με το CDNB ως μεταβλητό υπόστρωμα τη GSH σε σταθερή συγκέντρωση 2,5 mM. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων.

4.4.6. ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Για τον υπολογισμό της (%) υπολειπόμενης δραστηριότητας των ισοενζύμων έναντι είκοσι έξι φυτοπροστατευτικών προϊόντων (ζιζανιοκτόνων και εντομοκτόνων, οι δομές τους φαίνονται στο Παράρτημα), προσδιορίστηκε η δραστηριότητα τους πριν και μετά την προσθήκη του πιθανού αναστολέα (§ 4.3.2.8, Πίνακας 4.8, Σχήμα 4.12). Γενικά, δεν παρατηρήθηκε αναστολή μεγαλύτερη από 50%. Ομαδοποιώντας τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα φαίνεται ότι το ένζυμο *PnGSTU1-1*, είναι πιο ευαίσθητο προς τα χλωρακεταμίδια και τις τριαζίνες σε σχέση με τα άλλα ισοένζυμα, παρουσιάζοντας αναστολή 26-40%, ενώ το ένζυμο *PnGSTU3-3* φαίνεται να ενεργοποιείται. Σημαντική αναστολή σε σχέση με τα άλλα ισοένζυμα, αλλά και τα άλλα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, προκαλεί το fluorodifen στο ισοένζυμο *PnGSTU2-2*. Τα οργανοχλωριωμένα και τα πυρεθροειδή φαίνεται να αναστέλλουν περισσότερο όλα τα ισοένζυμα, γενικά όμως θα λέγαμε ότι τα ισοένζυμα αυτά δεν είναι ευαίσθητα ως προς τα ζιζανιοκτόνα και εντομοκτόνα που μελετήθηκαν. Στο Σχήμα 4.12 απεικονίζεται η επίδραση (αναστολή ή ενεργοποίηση) των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στα ισοένζυμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

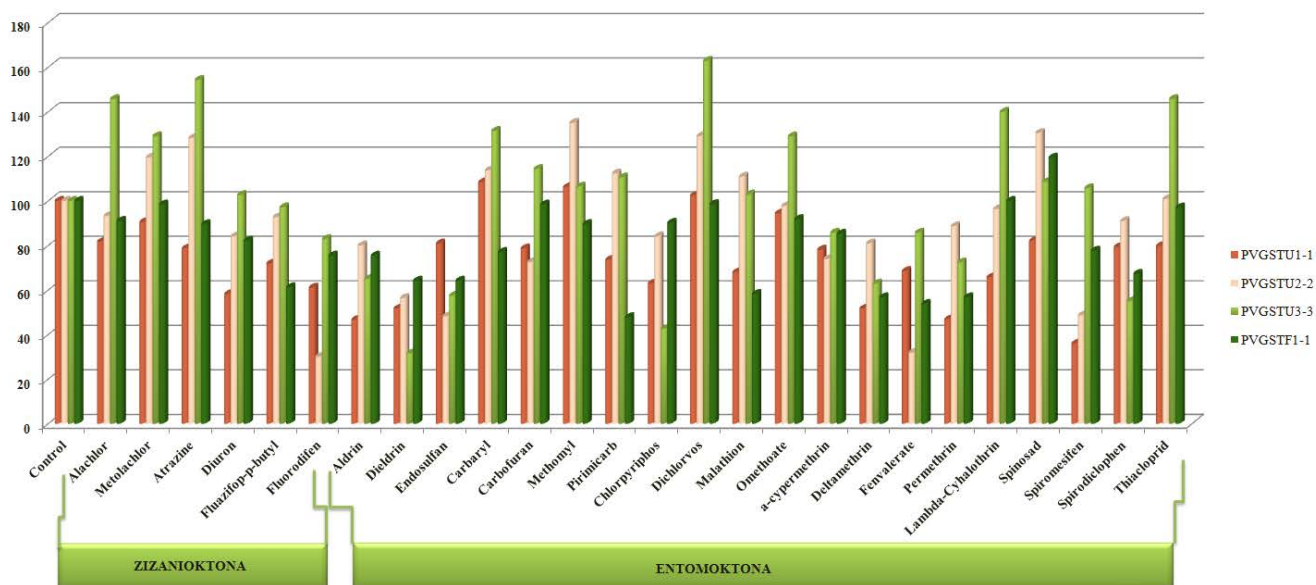
Πίνακας 4.8. Υπολειπόμενη δραστικότητα (%) των ισοενζύμων *PvGSTU1-1*, *PvGSTU2-2*, *PvGSTU3-3* και *PvGSTF1-1*, επίδραση ζιζανιοκτόνων και εντομοκτόνων. Απουσία ξενοβιοτικού η ενζυμική δραστικότητα θεωρήθηκε 100%.

ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ	ΙΣΟΕΝΖΥΜΑ			
	<i>PvGSTU1-1</i>	<i>PvGSTU2-2</i>	<i>PvGSTU3-3</i>	<i>PvGSTF1-1</i>
ΧΛΩΡΟΑΚΕΤΑΜΙΔΙΑ				
Alachlor	64,2	93,1	145,7	91
Metolachlor	64,2	119,5	129,03	98,4
ΤΡΙΑΖΙΝΕΣ				
Atrazine	60	128,2	154,3	89,5
Diuron	76,3	84,1	102,6	82,1
ΑΡΥΛΟΕΥΦΑΙΝΟΕΥΠΡΟΠΙΟΝΙΚΑ ΟΞΕΑ				
Fluazifop-p-butyl	71,9	92,7	97,1	61,2
ΔΙΦΑΙΝΥΛΙΚΟΙ ΑΙΘΕΡΕΣ				
Fluorodifen	61	30*	82,9	75,4
ΟΡΓΑΝΟΧΛΩΡΙΩΜΕΝΑ				
Aldrin	46,6*	80	65	75,4
Dieldrin	51,7	56,4	31,6*	64,2
Endosulfan	80,9	48,2*	57,4	64,2
ΚΑΡΒΑΜΙΔΙΚΑ				
Carbaryl	108,4	113,6	131,4	77
Carbofuran	78,7	72,5	114,3	98,4
Methomyl	106,2	135	106,4	89,5
Pirimicarb	73,6	112,3	110,5	47,7*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ	ΙΣΟΕΝΖΥΜΑ			
	<i>Pv</i> GSTU1-1	<i>Pv</i> GSTU2-2	<i>Pv</i> GSTU3-3	<i>Pv</i> GSTF1-1
ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ				
Chlorpyrifos	62,9	84	42,5*	90,1
Dichlorvos	102,4	129	162,9	98,5
Malathion	68	110,9	102,8	58,2
Omethoate	94,4	97,7	128,9	91,8
ΠΥΡΕΘΡΟΕΙΔΗ				
<i>α</i> -Cypermethrin	78,1	73,9	85,7	85,2
Deltamethrin	51,7	80,9	62,8	56,7
Fenvalerate	68,5	31,8*	85,7	53,7
Permethrin	46,7*	88,6	72,3	56,7
Lambda-cyhalothrin	65,7	96,4	140	100
ΣΠΙΝΟΣΥΝΕΣ				
Spinosad	82	130,4	108,5	119,4
ΕΣΤΕΡΕΣ ΤΕΤΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ				
Spiromesifen	35,9*	48,6*	105,7	77,6
Spirodiclofen	79,2	90,9	55	67,2
ΝΕΟΝΙΚΟΤΙΝΟΕΙΔΗ				
Thiacloprid	79,7	100,9	145,7	97

*Υποσημείωση: *τιμές < 50%*



Σχήμα 4.12. Μελέτη της υπολειπόμενης δραστηριότητας (%) των ισοενζύμων *PvGSTU1-1*, *PvGSTU2-2*, *PvGSTU3-3* και *PvGSTF1-1*, υπό την επίδραση φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Οι μετρήσεις έγιναν με το σύστημα GSH-CDNB.

4.4.7. ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ

Για να κατανοηθούν καλύτερα οι καταλυτικές και δομικές ιδιότητες των ενζύμων *PvGSTU1-1*, *PvGSTU2-2*, *PvGSTU3-3* και *PvGSTF1-1*, προσδιορίστηκε η δομή τους με ομόλογη μοντελοποίηση. Η τρισδιάστατη δομή τους βασίστηκε σε δομές φυτικών GSTs, που προσδιορίστηκαν κρυσταλλογραφικά μέσω ακτίνων X (Πίνακας 4.9). Η συνολική επιφάνεια των μονομερή ενζύμων *PvGSTU1-1*, *PvGSTU2-2*, *PvGSTU3-3* και *PvGSTF1-1*, είναι 9,604, 9,460, 9,729, 9,868 και 10,23 Å², αντίστοιχα. Τα τέσσερα ένζυμα μοιράζονται το ίδιο πρότυπο δομής (Σχήματα 4.13 και 4.14). Κάθε μονομερές των *PvGSTs* αποτελείται από δύο περιοχές, μια μικρότερη N-τελική περιοχή όμοια-θειορεδοξίνης και μια μεγαλύτερη C-τελική περιοχή που αποτελείται από α-έλικες. Η N-τελική περιοχή είναι μια α/β δομή με τοπολογία πτυχών βαβαββα, με το β3 έλασμα να είναι αντιπαράλληλο των β1, β2 και β4, δημιουργώντας μια συνηθισμένη δεξιόστροφη β-πτυχωτή επιφάνεια περικυκλωμένη από τρεις α-έλικες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Στο τέλος της έλικας H3, ξενικά ένας σύνδεσμος που ενώνει τις N- και C-τελικές περιοχές. Το κέντρο της C-τελικής περιοχής είναι μια δεσμίδα έξι ελίκων (H4H5H6H7H8H9). Η σύγκριση της δομής του ενζύμου της φ τάξης PnGSTF1-1 με αυτά της τ τάξης PnGSTU1-1, PnGSTU2-2 και PnGSTU3-3 αποκαλύπτει ότι τα κεντρικά τέσσερα ελάσματα και η διαμόρφωση των ελίκων H4 και H5 είναι πολύ όμοια. Διαφορές παρατηρούνται στο τμήμα του συνδέσμου, στη C-τελική περιοχή και στη περιοχή της έλικας που ενώνει τα ελάσματα $\beta 2$ και $\beta 3$. Σημαντική διαφορά παρουσίασε το ένζυμο της φ τάξης με το ένζυμο GST από το φυτό *A. Thaliana* (Reinemer et al. 1996) στην περιοχή μετά την έλικα H8, όπου διαφέρουν στο μήκος και στη διαμόρφωση.

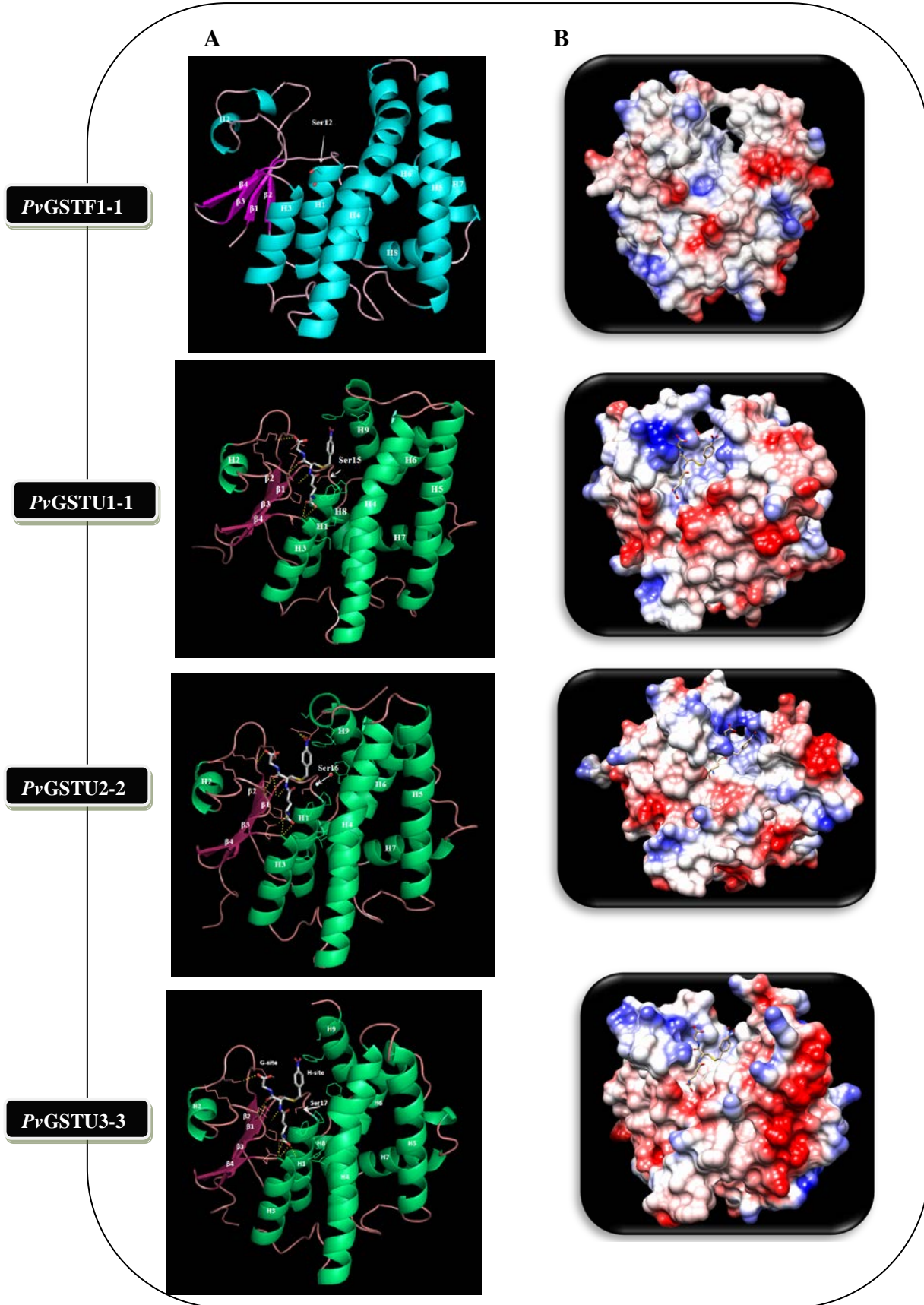
Το ενεργό κέντρο των ενζύμων PnGSTU1-1, PnGSTU2-2 και PnGSTU3-3 φαίνεται να είναι σαν ένα μεγάλο ανεστραμμένο σχήμα -L το οποίο είναι διαφορετικό σε σχήμα και μέγεθος με το αυτό του PnGSTF1-1, στο οποίο το ενεργό κέντρο είναι μια μεγάλη και ανοιχτή κοιλότητα. Το τμήμα της GSH του δεσμευμένου μορίου τοποθετείται σε πολική περιοχή, η οποία σχηματίζεται από την αρχή των ελίκων H1, H2 και H3 στη N-τελική περιοχή.

Το μοτίφ Ser-Asn-Ala-Ile-Leu/ Thr-Arg-Ala-Ile-Leu (Pemble et al. 1996) στη N-τελική περιοχή υπάρχει στις περισσότερες τάξεις των GSTs και συμβάλλει στη δημιουργία πολικής θέσης στη θέση δέσμευσης της GSH. Στις PnGSTs βρίσκεται στο μεσοδιάστημα του διμερές. Η ανάλυση της ηλεκτροστατικής επιφάνειας (Σχήμα 4.13B) έδειξε ότι η G-θέση στη τ τάξη ενζύμων (PnGSTU1-1, PnGSTU2-2 και PnGSTU3-3) παρουσιάζει πολύ πιο θετικό ηλεκτροστατικό δυναμικό σε σχέση με το ισοένζυμο της φ τάξης (PnGSTF1-1). Το θετικό δυναμικό της G-θέσης μπορεί να συνεισφέρει στον ιονισμό της -SH ομάδας της GSH (Labrou et al. 2001). Η συμμετοχή των θετικά φορτισμένων αμινοξέων στη ρύθμιση του ηλεκτροστατικού πεδίου G-θέσης, έχει παρατηρηθεί και σε άλλες GSTs (Patskovsky et al. 2000). Δεν υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ του τμήματος της GSH και των αμινοξέων της C-τελικής περιοχής.

Επίσης είναι πλέον αποδεκτό ότι το αμινοξικό κατάλοιπο Ser παίζει το ρόλο του καταλυτικού αμινοξέος, στις GSTs των τάξεων τ και φ (Axarli et al. 2009a, b, Labrou et al. 2001), το οποίο υποτίθεται ότι σταθεροποιεί την απο-πρωτονιωμένη μορφή της GSH και ενισχύει τον πυρηνόφιλο της χαρακτήρα (Lo Pierro et al., 2009). Από την

ανάλυση ομόλογης μοντελοποίησης φαίνεται ότι υπάρχει μια Ser πιθανότατα σημαντική καταλυτικά: Ser12 για το ένζυμο *PnGSTF1-1*, Ser15, Ser16 και Ser17 για τα ένζυμα *PnGSTU1-1*, *PnGSTU2-2* και *PnGSTU3-3*, αντίστοιχα. Ακόμα στην περιοχή που θεωρείται κρίσιμη για τη δέσμευση της GSH, απαντούν δύο συντηρημένες τριπλέτες η His-Lys-Lys και η His-Asn-Gly, οι οποίες ξεχωρίζουν τις GSTs που ανήκουν στην τ τάξη από τις άλλες (Droog, 1997, Lo Pierro et al., 2009). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.14.B και τα τρία ένζυμα της τ τάξης διαθέτουν την τριπλέτα His-Lys-Lys στις θέσεις 58-60.

Η Η-θέση των *PnGSTF1-1*, *PnGSTU1-1*, *PnGSTU2-2* και *PnGSTU3-3* τοποθετείται δίπλα στη G-θέση και σχηματίζεται από υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα της C-τελικής περιοχής. Οι Η-θέσεις των *PnGSTs* παρουσιάζουν χαμηλού βαθμού ομολογίας. Υπάρχει διαφορετικότητα στη δομή και κατ' επέκταση στην εξειδίκευση υποστρώματος (Σχήμα 4.14). Η Η-θέση του *PnGSTF1-1* είναι πιο υδρόφοβη και πιο προσβάσιμη σε μεγάλα υποστρώματα σε σχέση με τις Η-θέσεις των *PnGSTU1-1*, *PnGSTU2-2* και *PnGST3-3* (Σχήμα 4.13B).

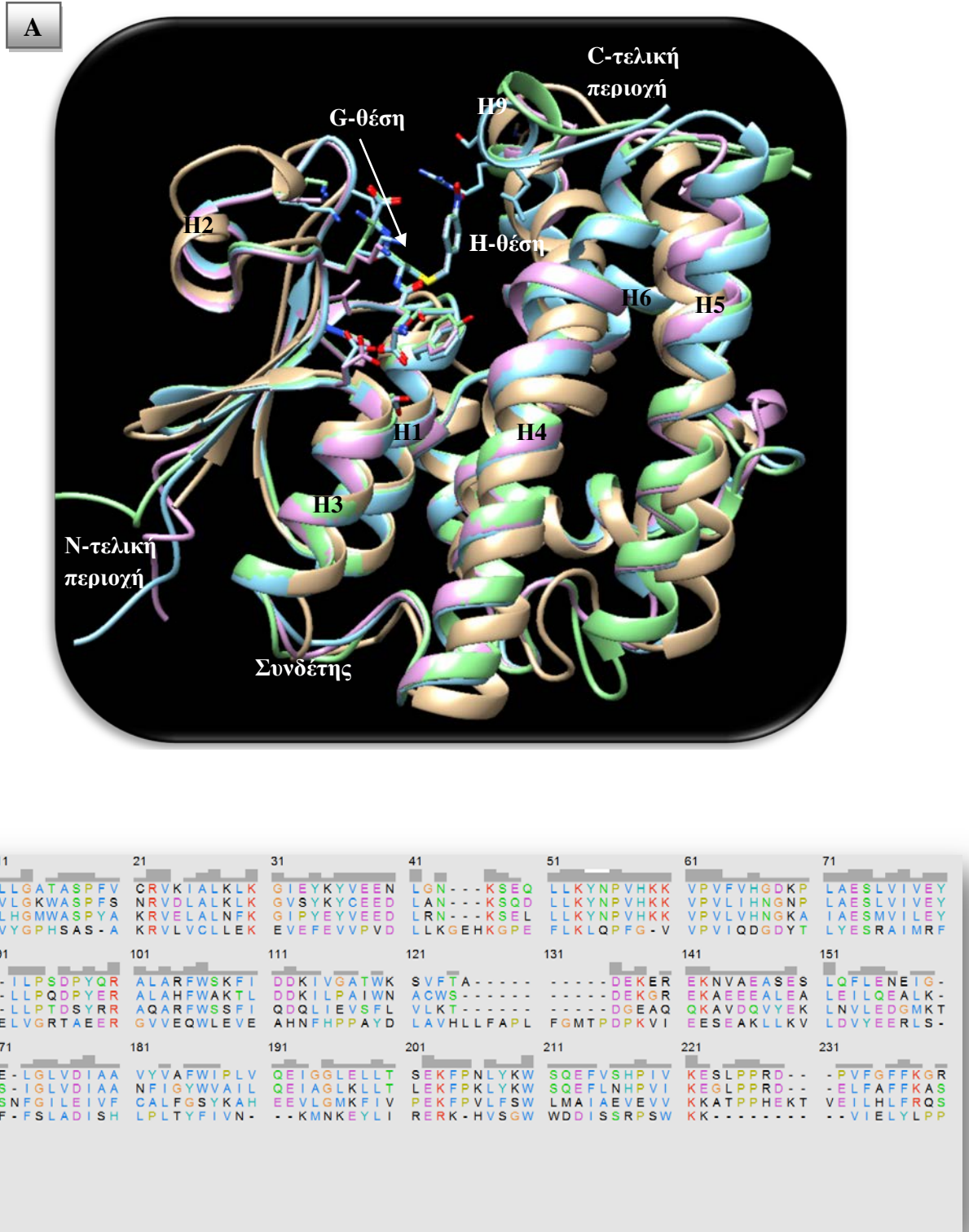


Σχήμα 4.13. Α. Απεικόνιση της πρωτεϊνικής δομής των *PvGSTF1-1*, *PvGSTU1-1*, *PvGSTU2-2* και *PvGSTU3-3*. Οι έλικες της φ τάξης είναι χρωματισμένοι τρκουάζ και τα β-ελάσματα φούξια, ενώ της τ τάξης απεικονίζονται με ροζ τα ελάσματα και πράσινο οι έλικες. Οι εικόνες δημιουργήθηκαν με το

πρόγραμμα PyMOL (DeLano 2002). **B.** Ανάλυση επιφάνειας coulombic δυνάμεων των *PvGSTF1-1*, *PvGSTU1-1*, *PvGSTU2-2* και *PvGSTU3-3*. Η ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα UCSF Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>). Στην επιφάνεια ηλεκτροστατικού δυναμικού απεικονίζονται με λευκό οι ουδέτερες περιοχές, με μπλε οι θετικά φορτισμένες περιοχές και με κόκκινο οι αρνητικά φορτισμένες.

Η C-τελική περιοχή των κυτταροπλασματικών GSTs περιλαμβάνει ένα αυστηρά συντηρημένο μοτίφ καλυπτήριου δοχείου (N-capping box) (Ser/Thr-Xaa-Xaa- Asp) στην αρχή της έλικας H6 (Cocco et al. 2001). Στις GSTs, το N-καλυπτήριο δοχείο εμπλέκεται στο σχηματισμό της H6-έλικας, παίζοντας σημαντικό ρόλο στη δομή και στη λειτουργία και είναι απαραίτητο για την αναδίπλωση των GSTs. Το N-καλυπτήριο δοχείο σχηματίζεται από δεσμούς υδρογόνου των υδροξυλίων της Ser/Thr με Asp (Aceto et al. 1997). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι μόνο το ένζυμο *PvGSTF1-1* κατέχει αυτό το συντηρημένο μοτίφ (Ser-Leu-Ala-Asp), το οποίο τοποθετείται μεταξύ των αμινοξέων 162-165. Στα ένζυμα της τ τάξης *PvGSTU1-1*, *PvGSTU2-2* και *PvGSTU3-3*, οι αντιπροσωπευτικές αλληλουχίες είναι Gly-Ile-Leu-Glu, Gly-Leu-Val-Asp και Gly-Leu-Val-Asp, αντίστοιχα. Η κρίσιμη αλληλεπίδραση μεταξύ της Ser και του Asp, απουσιάζει. Αυτό πιθανότατα να δείχνει, το πιθανό διαφορετικό μηχανισμό αναδίπλωσης των GSTs της τ τάξης από αυτών των GSTs της φ τάξης.

Πρόσφατα περιγράφηκε μια νεοχαρακτηριζόμενη L-θέση δέσμευσης στο ένζυμο *GmGSTU4-4* από το φυτό *Glycine max* (Axarli et al., 2009). Αυτή η θέση σχηματίζεται από τα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα (Trp11, Arg20, Tyr30 Tyr32, Lys197, Leu199, Pro200), τα οποία ενδέχεται να δεσμεύουν υδρόφοβα μόρια μη-καταλυτικά (Axarli et al., 2009a). Τα κύρια αμινοξικά κατάλοιπα (Trp11, Arg20, Tyr30, Tyr32) που συμμετέχουν στη δέσμευση, καθώς και το συντηρημένο ζευγάρι αμινοξέων Leu-Pro, παρόλο που μπορεί να διαφέρουν ως προς την ακριβή θέση, είναι συντηρημένα σε όλες τις μέχρι τώρα διαθέσιμες τ κλάσης GSTs (Lo Pierro et al., 2009). Το ίδιο και στα ένζυμα *PvGSTU1-1*, *PvGSTU2-2* και *PvGSTU3-3*, όπου το συντηρημένο ζευγάρι Leu-Pro βρίσκεται στις θέσεις 93-94, η τυροσίνη στις θέσεις Tyr34 και Tyr36, η αργινίνη στη θέση 22, ενώ η τρυπτοφάνη απαντά στη θέση 15 (Trp13), στα ένζυμα *PvGSTU1-1* και *PvGSTU3-3*, ενώ φαίνεται να έχει αντικατασταθεί με τη θρεονίνη στο ένζυμο *PvGSTU2-2* (Σχήμα 4.14).



Σχήμα 4.14. Α. Δομική ευθυγράμμιση των πρωτεϊνικών μοντέλων των ενζύμων PvGSTF1-1 (καφέ), PvGSTU1-1 (πράσινο), PvGSTU2-2 (ροζ) και PvGSTU3-3 (μπλέ). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα UCSF Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>). Β. Αμινοξική ευθυγράμμιση βασισμένη στη δομή ομόλογων μοντέλων. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα UCSF Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Πίνακας 4.9. Κρυσταλλικές δομές GSTs που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα για την ομόλογη μοντελοποίηση.

Ένζυμο	Κωδικός PDB	Είδη φυτών	Τάξη	Ομοιότητα (%)	E-value
<i>PvGSTF1-1</i>	1AW9	<i>Zea mays</i>	φ	47	3e-48
	1GNW	<i>Arabidopsis thaliana</i>	φ	43	3e-42
	1BYE	<i>Zea mays</i>	φ	41	3e-37
<i>PvGSTU1-1</i>	2VO4	<i>Glycine max</i>	τ	40	2e-42
	1GWC	<i>Aegilops tauschii</i>	τ	39	2e-36
	1OYJ	<i>Oryza sativa</i>	τ	34	1e-28
<i>PvGSTU2-2</i>	2VO4	<i>Glycine max</i>	τ	46	3e-46
	1GWC	<i>Aegilops tauschii</i>	τ	41	5e-36
	1OYJ	<i>Oryza sativa</i>	τ	36	7e-24
<i>PvGSTU3-3</i>	2VO4	<i>Glycine max</i>	τ	43	5e-51
	1GWC	<i>Aegilops tauschii</i>	τ	44	2e-45
	1OYJ	<i>Oryza sativa</i>	τ	33	3e-23

4.5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Θέλοντας να μελετηθούν οι διαφορές ισοενζύμων GST από το *P. vulgaris*, κλωνοποιήθηκαν τέσσερα γονίδια GST, εκφράστηκαν και καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας. Η μελέτη της δραστηρότητάς τους φανέρωσε καταλυτική ποικιλομορφία. Για το κάθε ισοένζυμο υπήρξε διαφορετική προτίμηση ως προς το υπόστρωμα, με τα ισοένζυμα *PvGSTU1-1*, *PvGSTU2-2*, *PvGSTU3-3* και *PvGSTF1-1*, να παρουσιάζουν μεγαλύτερη δραστηρότητα ως προς τα υποστρώματα ισοθειοκυανικό αλλυλ-εστέρα, 4-χλωρο-7-νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο, 1-χλώρο-

2,4-δινιτροβενζόλιο και 2,2 διθειοδιαιθανόλη, αντίστοιχα. Το ένζυμο *PnGSTF1-1* παρουσίασε δραστικότητα ως προς και το υπόστρωμα NBD-Cl, όπως έχει παρατηρηθεί και στο παρελθόν για τις GSTs αυτής της τάξης (Lan et al., 2009). Μόνο το ένζυμο *PnGSTU3-3* φάνηκε να έχει υψηλή δραστικότητα διϋδροασκορβικής ρεδοκτάσης, καταλύοντας την αναγωγή του διϋδροασκορβικού (DHA) σε ασκορβικό οξύ, έχοντας ως αναγωγικό μέσο τη GSH. Μία όμοια GST-τάξη με δραστικότητα DHAR (λ τάξη) έχει ήδη βρεθεί στο *Arabidopsis* (Dixon et al. 2002a), στο ρύζι και στη σόγια (Frona 2003).

Το ένζυμο *PnGSTF1-1* παρουσίασε τη μεγαλύτερη δραστικότητα με το υπόστρωμα HED, απ' ό,τι τα υπόλοιπα υποστρώματα. Τέτοια φυτικά ένζυμα δεν έχουν δραστικότητα δέσμευσης της GSH και διαφέρουν δομικά από τις άλλες GSTs, καθώς είναι μονομερή και σχηματίζουν μικτά δισουλφίδια με GSH (Dixon et al. 2002a). Σε περιπτώσεις οξειδωτικής καταπόνησης απουσία GSH, κάποιες θειόλες πρωτεϊνών σουλφυδρυλιώνονται σχηματίζοντας δισουλφίδια πρωτεΐνης-θειόλης. Αυτή η τροποποίηση πιστεύεται ότι παίζει ρυθμιστικό και/ή προστατευτικό ρόλο για τις πρωτεϊνικές θειόλες μέσω των αντιδράσεων σουλφυδρυλίωσης/αποσουλφυδρυλίωσης (Spadaro et al. 2010). Είναι επομένως αρκετά ενδιαφέρον που τα ένζυμα *PnGSTF1-1* και *PnGSTU2-2* βρέθηκαν να είναι δρουν ως θειοτρανσφεράσες, αφού μέχρι στιγμής οι μόνες φυτικές GSTs που έχουν τέτοια δράση ανήκουν στις τάξεις λ και DHARs (Dixon et al. 2002a, b, 2010). Τα ένζυμα *PnGSTF1-1* και *PnGSTU2-2* φαίνεται να είναι οι πρώτες φυτικές GSTs που παρουσιάζουν κανονικές και άτυπες GST λειτουργίες.

Κατά τη μελέτη της κινητικής τους συμπεριφοράς, παρατηρήθηκαν ενδιαφέρουσες διαφορές. Τα ένζυμα τα οποία παρουσίασαν περισσότερες ιδιαιτερότητες, ήταν το *PnGSTU1-1* και το *PnGSTF1-1*. Το ισοένζυμο *PnGSTU1-1*, ήταν το μόνο από τα τέσσερα το οποίο παρουσίασε θετική συνέργεια με το CDNB, ενώ η κινητική συμπεριφορά των υπολοίπων ακολουθούσε αυτή των Michael-Menten. Ακόμα κατά την κινητική ανάλυση του ισοενζύμου *PnGSTU1-1* με το σύστημα AITC/GSH, παρουσίασε θετική συνέργεια και για τα δύο υποστρώματα. Επίσης πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση του *PnGSTU1-1* ως προς το σύστημα CuOOH/GSH, καθώς παρουσίασε σχετικά υψηλή ειδική δραστικότητα, όπου προέκυψε ότι εξάρτηση ήταν ορθογώνια υπερβολή, ακολουθώντας την εξίσωση Michaelis-Menten. Το ίδιο παρατηρήθηκε για το ένζυμο *PnGSTF1-1* ως προς το

σύστημα HED/GSH. Η σταθερά K_m^{GSH} , δεν διαφέρει αρκετά μεταξύ των PnGSTs (23-167 μM), παρουσιάζοντας παρόμοια υψηλή συγγένεια με τη GSH, αυτό είναι σύμφωνο και με την υψηλά συντηρημένη N-τελική περιοχή. Τη μεγαλύτερη σταθερά εξειδικεύσεως k_{cat}/K_m ως προς τη GSH και το CDNB, την παρουσίασε το ισοένζυμο PnGSTU2-2.

Η θετική συνέργεια που παρατηρήθηκε για το ένζυμο PnGSTU1-1, έχει αρκετές πιθανές εξηγήσεις (Labrou et al. 2001, Lo Bello et al. 1995, Ricci et al. 1995). Μία από αυτές είναι ότι το ένζυμο ακολουθεί τυχαία αλληλοδιάδοχη κινητική (Labrou et al. 2001). Ένα ένζυμο διμερές το οποίο έχει δύο ανεξάρτητες υπομονάδες και δύο υποστρώματα, μπορεί κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, να παρουσιάσει θετική συνέργεια αν ακολουθήσει το μηχανισμό τυχαίας διαδοχής (Segel, 1975). Για παράδειγμα, η GST του εντόμου *Lucilia cuprina* (Caccuri et al. 1997) και οι GSTs του ποντικού M1-1, M1-2 και A3-3 (Ivanetich et al. 1990; Jakobson et al. 1979), δεν ακολουθούν την κινητική των Michaelis-Menten και αυτό έχει εξηγηθεί ως συνέπεια του *Bi Bi* μηχανισμού τυχαίας διαδοχής. Άλλη αιτία συνέργειας, θα μπορούσε να είναι η αλλαγή της ισορροπίας του μονομερούς-διμερούς εξαιτίας του υποστρώματος, όπως έχει παρατηρηθεί σε GST από το πρωτόζωο *Plasmodium falciparum* (Liebau et al. 2009). Η τρίτη πιθανότητα είναι το υπόστρωμα (CDNB ή AITC) να δεσμεύεται στην πρώτη υπομονάδα, προκαλώντας αλλαγή στη διαμόρφωση της άλλης υπομονάδας έτσι ώστε να παρουσιάσει αύξηση στην συγγένεια με το υπόστρωμα (LoBello et al. 1995, McManus et al. 2011, Ricci et al. 1995).

Θέλοντας να ερευνήσουμε αυτές τις πιθανότητες, αναλύσαμε την ισοθερμική δέσμευση του 1-υδρόξυ-2,4-δινιτροβενζόλιο (υδρολυμένο προϊόν του CDNB) στο PnGSTU1-1, παρουσία GSH με διαφορική φασματοσκοπία (Σχήμα 4.8). Το ένζυμο παρουσίασε σιγμοειδή καμπύλη δέσμευσης με συντελεστή Hill = $1,6 \pm 0,1$, πολύ κοντά στη τιμή που βρέθηκε κατά την κινητική ανάλυση. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τη συνέργεια και υποστηρίζουν την πιθανότητα ότι η συνέργεια οφείλεται στον μηχανισμό τυχαίας διαδοχής. Οι συντελεστές Hill που προσδιορίστηκαν μέσω διαφορικής φασματοσκοπίας (σε 0,5 mg/mL πρωτεΐνης) και κινητικής ανάλυσης (προσδιορίστηκαν σε 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ πρωτεΐνης) είναι παρόμοιοι, συνεπώς είναι λιγότερο πιθανό να εμπλέκεται οποιαδήποτε αλλαγή στην ισορροπία μονομερούς-διμερούς στη θετική συνέργεια, κατά τη δέσμευση του CDNB που παρατηρήθηκε στο PnGSTU1-1.

Ο πραγματικός ρόλος της θετικής συνέργειας που παρατηρήθηκε για το ένζυμο *PvGSTU1-1*, δεν είναι πλήρως κατανοητός. Οι GSTs προσφέρουν αξιόλογες καταλυτικές δυνατότητες, στον μεταβολισμό και στον περιορισμό κάθε πιθανής τοξικής ουσίας, στην οποία μπορεί να εκτεθεί το κύτταρο και πιθανόν ο αλλοστερισμός να εξοπλίζει ακόμα περισσότερο το ένζυμο, κατά την αποτοξίνωση βιοενεργών τοξικών προϊόντων που αποτελούν σημαντική απειλή για τον οργανισμό (Atkins et al. 2002, McManus et al. 2011). Ο ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας είναι τοξική οργανική ένωση που εξυπηρετεί όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στην άμυνα των φυτών κατά των φυτοφάγων και είναι βλαβερός και για το ίδιο το φυτό. Ο χαμηλός ρυθμός μετατροπής, σε χαμηλές συγκεντρώσεις AITC από ένα συνεργειακό ένζυμο (όπως το *PvGSTU1-1*), μπορεί να αποτελεί σημαντικό τοξικολογικό πλεονέκτημα, αποτρέποντας πιθανή συσσώρευση. Η υψηλή καταλυτική σταθερά που πετυχαίνεται από ένα μη συνεργειακό ένζυμο, μπορεί να αποτελεί μειονέκτημα για έναν οργανισμό που μετατρέπει γρήγορα το υπόστρωμα σε συγκεντρώσεις κάτω του τοξικού ορίου. Τα ένζυμα με θετικά ομότροπους αλλοστερικούς τροποποιητές, μπορούν να ελαχιστοποιήσουν αυτό το μειονέκτημα. Σε υψηλές συγκεντρώσεις AITC, που σχετίζονται πιθανά με υψηλή τοξικότητα, ο γρήγορος ρυθμός μετατροπής είναι επιθυμητός και αυτό γίνεται από ένζυμα συνέργειας (Atkins et al. 2002).

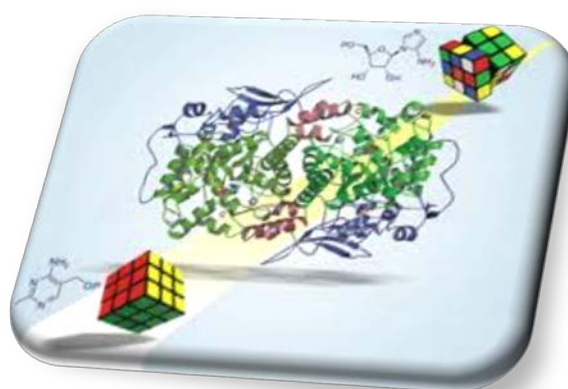
Από τη δομική μελέτη και σύγκριση που έγινε για αυτά τα τέσσερα ένζυμα βρέθηκαν όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.14 αλλά και όπως αναφέρεται βιβλιογραφικά (Cummins et al., 2011) μεγάλες διαφορές στην περιοχή της α2 έλικα/βρόγχο, στην περιοχή του συνδέσμου των περιοχών I και II, στην διευθέτηση της α4 και α6 έλικας, καθώς και στο μήκος της α9 έλικας.

Συμπερασματικά, στην παρούσα εργασία χαρακτηρίστηκαν, τέσσερα διαφορετικά ισοένζυμα GST από το φυτό *P. vulgaris*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι *PvGSTs* καταλύουν διαφορετικές αντιδράσεις και παρουσιάζουν διαφορετική εξειδίκευση ως προς τα υποστρώματα. Δομικές αναλύσεις έδειξαν ότι οι *PvGSTs* έχουν παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά, με άλλες κυτταροπλασματικές φυτικές GSTs. Μεγάλες διαφορές εμφανίστηκαν στη C-τελική περιοχή και τον σύνδεσμο των N- και C-τελικών περιοχών. Η ετερογένεια που παρατηρήθηκε στη C-τελική περιοχή, φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την ποικιλομορφία και εξειδίκευση των υποστρωμάτων, ανάμεσα στις *PvGSTs*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

“Ανάπτυξη βιοαισθητήρα ανίχνευσης ξενοβιοτικών ουσιών”



5.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης (GSTs, EC 2.5.1.18), είναι ένζυμα του σημαντικότερου μηχανισμού αποικοδόμησης και απομάκρυνσης, τοξικών ουσιών από το κύτταρο. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης, ήταν η ανάπτυξη βιοαισθητήρα ανίχνευσης και προσδιορισμού φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε περιβαλλοντικά δείγματα, βασισμένου στο ένζυμο GST. Για τη δημιουργία ενός ενζύμου υψηλότερης εκλεκτικότητας σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα, χρησιμοποιήθηκε πρωτεϊνική μηχανική. Έτσι δημιουργήθηκε cDNA βιβλιοθήκη από καταπονημένα φυτά *Phaseolus vulgaris* και *Glycine max*, χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκφυλισμένους εκκινητές και αντίστροφη μεταγραφή-PCR. Τα GST γονίδια υποβλήθηκαν σε *in vitro* κατευθυνόμενη εξέλιξη (DNA shuffling). Η βιβλιοθήκη των νέων GST γονιδίων που προέκυψε, κλωνοποιήθηκε σε φορέα κατάλληλο για έκφραση σε *E. coli*. Σάρωση της βιβλιοθήκης οδήγησε στην επιλογή μιας νέας μορφής GST ενζύμου, το οποίο καθарίστηκε με χρωματογραφία συγγένειας και μελετήθηκε η κινητική του συμπεριφορά, η εκλεκτικότητά του ως προς 20 υποστρώματα και 66 φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Η μορφή αυτή εμφανίζει ιδιαίτερα υψηλή δράση μεταφοράς και υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Μελετώντας τα διαφορετικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα βρέθηκαν κυρίως τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα και οι στρομπιλουρίνες (μυκητοκτόνα), να είναι ισχυροί αναστολείς του ενζύμου. Η ευαισθησία του ενζύμου ως προς τα φυτοπροστατευτικά, βελτιώθηκε περαιτέρω εφαρμόζοντας κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση κορεσμού στη θέση Phe117 της αμινοξικής αλληλουχίας. Η μορφή Phe117Ile εμφανίζει 5-φορές υψηλότερη καταλυτική αποτελεσματικότητα και μεγαλύτερη ευαισθησία, έναντι της ομάδας των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων. Συνεπώς η μορφή Phe117Ile χρησιμοποιήθηκε, για την μελέτη κατασκευής οπτικού βιοαισθητήρα. Το ένζυμο ακινητοποιήθηκε σε σύστημα sol-gel αλκοξυσιλανίων (TEOS/PTMOS), το ίδιο και οι δείκτες pH bromocresol purple (όξινος) και phenol red (βασικός). Το σύστημα με τους δείκτες εμφάνισε γραμμικότητα στην περιοχή pH=4-7 στα 562 nm και χρησιμοποιήθηκε, για την ανάπτυξη του βιοαισθητήρα και για τον προσδιορισμό του ισομερές α -endosulfan σε περιβαλλοντικά δείγματα. Η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του α -endosulfan και της απορρόφησης είναι γραμμική και η σχετική τυπική απόκλιση της προτεινόμενης μεθόδου, είναι της τάξεως 3-5% (N=5). Το αναλυτικό εύρος γραμμικότητας για το α -endosulfan είναι από 0-30 μ M.

5.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Επαγωγή της έκφρασης των GSTs

Στις φυτικές καλλιέργειες οι GSTs αποτοξινώνουν τα ζιζανιοκτόνα, μέσω της δέσμευσης τους με τη GSH και το σχηματισμό μη τοξικών προϊόντων ή μέσω άλλων εναλλακτικών δραστηριοτήτων των GSTs, προσδιορίζοντας με αυτόν τον τρόπο την εκλεκτικότητα ζιζανιοκτόνου (Dixon et al., 2003). Παράδειγμα αποτελεί το fluorodifen το οποίο αποτοξινώνεται ταχύτατα στα όσπρια ενώ δεν συμβαίνει το ίδιο στον αραβόσιτο (Frear & Swanson, 1973). Αρκετά ζιζανιοκτόνα των ομάδων όπως οι σουλφονουλουρίες, οι τριαζίνες, τα χλωρακεταμίδια, τα θειοκαρβαμιδικά σουλφοξείδια και οι διφαινυλ-αιθέρες, απαντούν συζευγμένα με τη GSH, παύοντας να είναι τοξικά για το ένζυμο – στόχος (McGonigle et al., 2000).

Οι GSTs των ρ και τ τάξεων είναι πρωτίστως υπεύθυνες για την αποτοξίνωση των ζιζανιοκτόνων, επιδεικνύοντας εξειδίκευση (Dixon et al., 2003). Οι GSTFs παρουσιάζουν υψηλή δραστηριότητα ως προς τα χλωροακετανιλίδια και θειοκαρβαμιδικά ζιζανιοκτόνα, ενώ οι GSTUs είναι αποτελεσματικές για την αποτοξίνωση διφαινυλ-αιθέρων και αρυλοξυφαινοξυπροπιονικών (Jepson et al., 1994, Thom et al., 2002, Chronopoulou et al., 2012). Στον αραβόσιτο οι GSTFs εκφράζονται περισσότερο, ενώ στο φασόλι κυριαρχούν οι GSTUs με τη διαφορά αυτή να αντικατοπτρίζει και τη διαφορά στην αποτοξίνωση των ζιζανιοκτόνων των δύο καλλιεργειών (McGonigle et al., 2000).

Είναι πλέον αποδεκτός ο σημαντικός ρόλος των GSTs για την ανταπόκριση των φυτών στις περιβαλλοντικές συνθήκες (McGonigle et al., 2000). Με γνώμονα αυτό, στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, πραγματοποιήθηκε καταπόνηση των *Phaseolus vulgaris* και *Glycine max*, με σκοπό την αύξηση της έκφρασης των γονιδίων GSTs. Ως μέσα καταπόνησης, κατόπιν βιβλιογραφικής ανασκόπησης, επιλέχθηκαν τα ζιζανιοκτόνα atrazine, alachlor και fluazifop-p-butyl (οι δομές τους φαίνονται στο παράρτημα), τα βαρέα μέταλλα ψευδαργύρου, νικελίου και τρισθενές χρωμίου, καθώς και η αιθανόλη. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυστηρά με τον όρο «βαρέα μέταλλα» θεωρούνται τα μέταλλα που έχουν πυκνότητα $>5 \text{ g/cm}^3$, όμως ο όρος αυτός χρησιμοποιείται για μεγάλο εύρος μετάλλων και μεταλλοειδών, τα οποία είναι τοξικά για τα φυτά όπως ο χαλκός, ο ψευδάργυρος, το νικέλιο, ο σίδηρος, το μαγγάνιο, το αρσενικό κ.α. (Dučić & Polle, 2005). Στα φυτά η έκθεση σε βαρέα μέταλλα μπορεί να

συσχετίζεται με το ένζυμο GST, όχι μόνο για την απομάκρυνση των τοξικών προϊόντων της υπεροξειδωσής των λιπών, αλλά πιθανόν να εμπλέκεται και στη μεταφορά των συμπλόκων των μετάλλων με τις φυτοχελατίνες, στο χυμοτόπιο (Marrs & Walbot, 1997).

Όπως έχει αναφερθεί, η ενδοκυττάρια GSH απαντά σε αφθονία και αποτελεί πιθανό στόχο για τα μεταλλοϊόντα, ειδικά αυτών που συμπλοκοποιούνται με τη σουλφυδρυλομάδα. Σε αυτά τα μεταλλοϊόντα ανήκουν και τα βιογενή στοιχεία όπως ο ψευδάργυρος και το νικέλιο (Krzyszal & Bal, 2004). Το νικέλιο είναι ένα από τα μέταλλα τα οποία χρειάζονται τα φυτά για το σχηματισμό του ενεργού κέντρου της ουρεάσης (E.C. 3.5.1.5.) (Gerendás et al., 1999), αλλά σε υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί έμμεσα να προκαλέσει οξειδωτική καταπόνηση (Pandolfini et al., 1996). Δηλαδή αν και θεωρείται σημαντικό ιχνοστοιχείο για τα φυτά, σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι τοξικό, προκαλώντας επιπλοκές στην φωτοσύνθεση, στη θρέψη, στη μεταφορά υδατανθράκων (Gajewska & Skłodowska, 2008). Οι τροποποιήσεις που προκαλεί το νικέλιο στο μεταβολισμό του φυτού οδηγούν σε μειωμένη ανάπτυξη, χλώρωση, νέκρωση και μαρασμό (Pandey & Sharma, 2002). Στο σιτάρι βρέθηκε η εφαρμογή νικελίου, σε συγκέντρωση 100 μM και 200 μM , να μειώνει την ανάπτυξη των βλαστών κατά 20% και 26%, αντίστοιχα. Στις ρίζες οι αντίστοιχες μειώσεις ήταν 37% και 53%. Επίσης στους βλαστούς βρέθηκε να αυξάνει η δραστηριότητα GST κατά 4,7 και 6,8-φορές, για τις συγκεντρώσεις νικελίου 100 μM και 200 μM , αντίστοιχα. Όμως, παρά την κατά 16-φορές υψηλότερη δραστηριότητα GST της ρίζας, δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή με την εφαρμογή Ni (Gajewska & Skłodowska, 2008).

Το χρώμιο είναι τοξικό για τα φυτά και η φυτοτοξικότητά του, μπορεί να προκαλέσει παρεμπόδιση της βλάστησης των σπόρων, αποικοδόμηση της χλωροφύλλης και επαγωγή οξειδωτικής καταπόνησης (Panda & Choudhury, 2005). Η φυτοτοξικότητα του χρωμίου παρατηρείται σε πολλαπλά επίπεδα, από μειωμένη απόδοση έως αναστολή ενζυμικών δραστηριοτήτων και μεταλλαξογένεση (Shanker et al., 2004).

Σε υδροπονικό μέσο καλλιέργειας του φυτού *A. halleri*, έχει βρεθεί ο ψευδάργυρος είτε σε χαμηλή είτε σε υψηλή συγκέντρωση, να προκαλεί αύξηση των μεταγραφημάτων mRNA των γονιδίων GSTs (Becher et al., 2004).

Τα χλωρακετανιλίδια (alachlor) και οι τριαζίνες (triazine), χρησιμοποιούνται ευρέως για τον περιορισμό ετήσιων και πλατύφυλλων ζιζανίων. Τοalachlor, είναι ένα από τα πλέον χρησιμοποιούμενα ζιζανιοκτόνα στις αγροτικές καλλιέργειες, το οποίο απορροφάται από τις ρίζες νεαρών φυτών και μεταφέρονται στο επάνω τμήμα του φυτού μέσω του αποπλάστη. Περιορίζει την επιμήκυνση του ριζικού συστήματος και την ανάπτυξη των βλαστών σε νεαρά φυτά (Sharp, 1998). Στον αραβόσιτο έχει βρεθεί ότι τοalachlor και η atrazine μεταβολίζονται από το σύστημα GSH/GST (Rossini et al., 1997, Karavangeli et al., 2005). Έχει παρατηρηθεί αύξηση της δραστηριότητας της GST σε βλαστούς μικρών φυτών αραβοσίτου, κατόπιν εφαρμογής του ζιζανιοκτόνου atrazine κατά 31% και 38%, στις 24 και 48 ώρες, αντίστοιχα. Επίσης παρατηρήθηκε αύξηση κατά 59% και 29% μόνο στις 48 ώρες, στα φυτά *Triticum aestivum L.* και *Sorghum bicolor L.*, αντίστοιχα (Cataneo et al., 2002). Ακόμα για το ζιζανιοκτόνο fluazifop-p-butyl που επιλέχθηκε, έχει παρατηρηθεί αύξηση της συνολικής δραστηριότητας GST φύλλων του *Phaseolus vulgaris* κατά 2,7 έως 2,9 φορές (Chronopoulou et al., 2012).

Τέλος ένα άλλο μέσο καταπόνησης στην παρούσα μελέτη υπήρξε η αιθανόλη, καθώς έχει καταγραφεί έμμεση επαγωγή των GSTs στο φυτό *Cucurbita maxima*, πιθανόν μέσω της μετατροπής της σε ακεταλδεϋδη (Fujita & Hossain, 2003). Από άλλους τύπους αλκοολών (μεθανόλη, αιθανόλη, προπανόλη και βουτανόλη) που μελετήθηκαν, μόνο η μεθανόλη δεν βρέθηκε να είναι καλός επαγωγέας. Επίσης παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης και της δραστηριότητας GST στο υποκοτύλιο του φυτού, κατόπιν καταπόνηση έκθεσης του σε υψηλή θερμοκρασία (42⁰C) (Fujita & Hossain, 2003).

Ακινητοποίηση ενζύμων με τη μέθοδο του εγκλωβισμού για την ανάπτυξη βιοαισθητήρα

Η χρήση των ενζύμων στη φυσική μορφή τους παρουσιάζει περιορισμούς, όπως το υψηλό κόστος, η χαμηλή σταθερότητα και η δυσκολία αναγέννησης. Η ακινητοποίηση αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μεθόδους, ώστε να ξεπερνιούνται τέτοιου είδους περιορισμοί (Martin & Kostrov, 2013). Επομένως, η ενζυμική ακινητοποίηση φαίνεται να είναι το κλειδί για την ανάπτυξη αποτελεσματικών βιοαισθητήρων με τις κατάλληλες αποδόσεις, όπως η υψηλή ευαισθησία και

εκλεκτικότητα, τα γρήγορα αποτελέσματα και η υψηλή επαναληψιμότητα (Sassolas et al., 2012).

Το ακινητοποιημένο ένζυμο πρέπει να διατηρεί τη δομή του, τη λειτουργία του, τη βιολογική δραστικότητα του μετά την ακινητοποίηση, να παραμένει ισχυρά δεσμευμένο στην επιφάνεια και να μην διαχέεται κατά τη χρήση του βιοαισθητήρα. Επίσης ένας ιδανικός βιοαισθητήρας πρέπει να παραμένει σταθερός στο χρόνο. Ο τύπος ακινητοποίησης που επιλέγεται επηρεάζει τη σταθερότητα, την ευαισθησία και τη δραστικότητα των ενζυμικών βιοαισθητήρων (Sassolas et al., 2012).

Γενικά οι τεχνικές ακινητοποίησης που βασίζονται στην προσρόφηση, είναι εύκολες να πραγματοποιηθούν αλλά οι δεσμοί είναι χαλαροί και τέτοιου είδους βιοκαταλύτες δεν είναι σταθεροί και υπάρχει εύκολη διάχυση από τη μήτρα. Από την άλλη οι τεχνικές ομοιοπολικής δέσμευσης τις περισσότερες φορές απαιτούν αρκετά χημικά στάδια, έτσι οι εμπλεκόμενες ενώσεις αδρανοποιούν ή μειώνουν τη δραστικότητα των βιομορίων (Kandimalla et al., 2006).

Η ακινητοποίηση με εγκλωβισμό σε πολυμερές είναι εύκολη σαν διαδικασία, όπου το ένζυμο και οι άλλες ουσίες αποθέτονται στο ίδιο πήκτωμα (Sassolas et al., 2012). Στην απλή μέθοδο εγκλωβισμού ενζύμου σε ένα μόνο στάδιο, δεν πραγματοποιείται χημική αντίδραση μεταξύ του μονομερούς και του ενζύμου, ώστε να επηρεάσει τη δραστικότητα του. Βέβαια απαιτούνται υψηλές συγκεντρώσεις μονομερούς (0,05–0,5 M) και ενζύμου (0,2–3,5 mg·mL⁻¹) (Cosnier, 2007). Εκτός από την ευκολία, άλλοι λόγοι που έχουν κάνει τον εγκλωβισμό να παρουσιάζει σημαντικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, είναι η χημική αδράνεια, η πορώδης υφή, η χαμηλή θερμοκρασία εγκλωβισμού, η μηχανική σταθερότητα, η οπτική διαπερατότητα και η αμελητέα διόγκωση (Kandimalla et al., 2006). Ο εγκλωβισμός προστατεύει από τη συσσώρευση και την μετουσίωση της πρωτεΐνης μέσω ξεδιπλώματος. Δεν χρειάζονται ιοντικοί ή ομοιοπολικοί δεσμοί, ούτε φυσική προσρόφηση για τη δέσμευση των ενζυμικών μορίων στο πήκτωμα, οι οποίοι μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά τη λειτουργία του ενζύμου (Bhatia et al., 2000). Οι βιοαισθητήρες οι οποίοι βασίζονται σε φυσικό εγκλωβισμό, συνήθως χαρακτηρίζονται από αυξημένη λειτουργικότητα και σταθερότητα αποθήκευσης. Όμως υπάρχουν και περιορισμοί, όπως η διαφυγή των συστατικών και η πιθανή διάχυση, που μπορεί να περιορίζουν την αποδοτικότητα του (Sassolas et al., 2012).

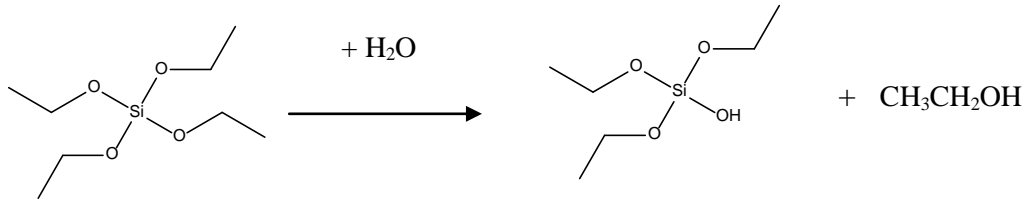
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Η διαδικασία κολλοειδούς πηκτώματος (Sol-gel) που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα μελέτη, βασίζεται στη δυνατότητα σχηματισμού στερεών μεταλλοξειδίων ή ημι-μεταλλοξειδίων, μέσω της διαδικασίας υδρόλυσης ευμετάβλητων πρόδρομων ουσιών (Gill & Ballesteros, 2000). Η διαδικασία περιλαμβάνει υδρόλυση των αλκοξειδίων σε νερό κάτω από όξινες (ή αλκαλικές) συνθήκες, ακολουθούμενη από τη συμπύκνωση των υδροξυλιωμένων μονάδων, οδηγώντας στο σχηματισμό πορώδους πηκτώματος που αποτελεί οργανικό/ανόργανο υβρίδιο (Σχήμα 5.1.) (Makote & Collinson, 1999, Campas & Marty, 2006, Gupta & Chaudhury, 2007).

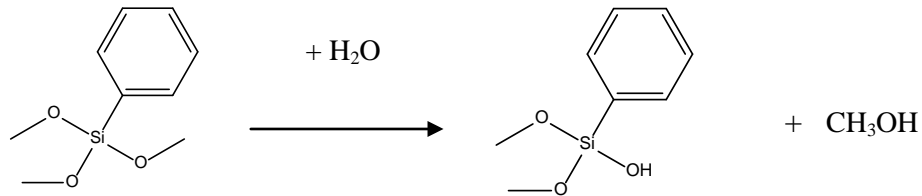
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

1. Υδρόλυση του τετρααιθοξυσιλανίου (TEOS) (α) και τριμεθοξυφαινυλσιλανίου (PTMOS) (β)

α)

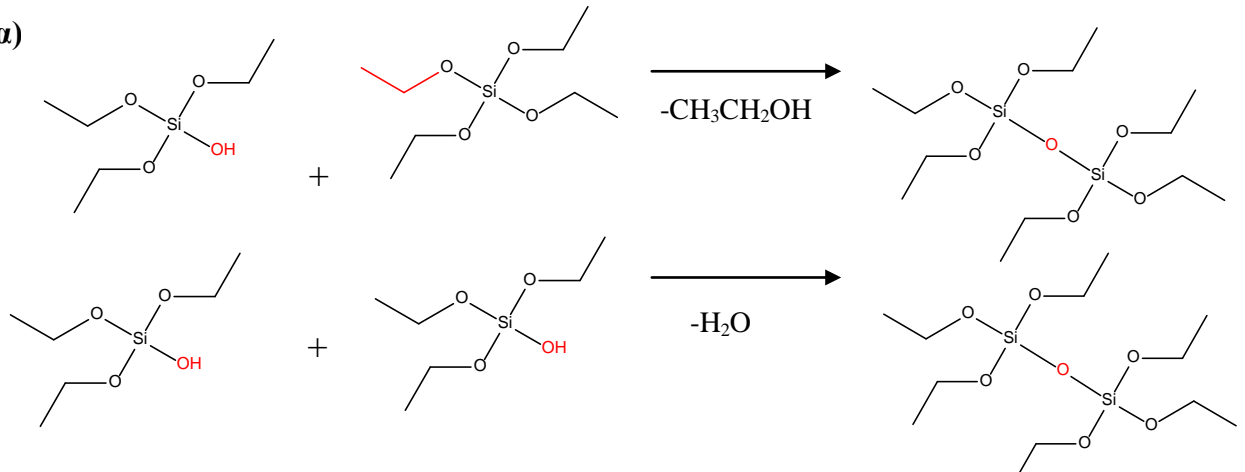


β)

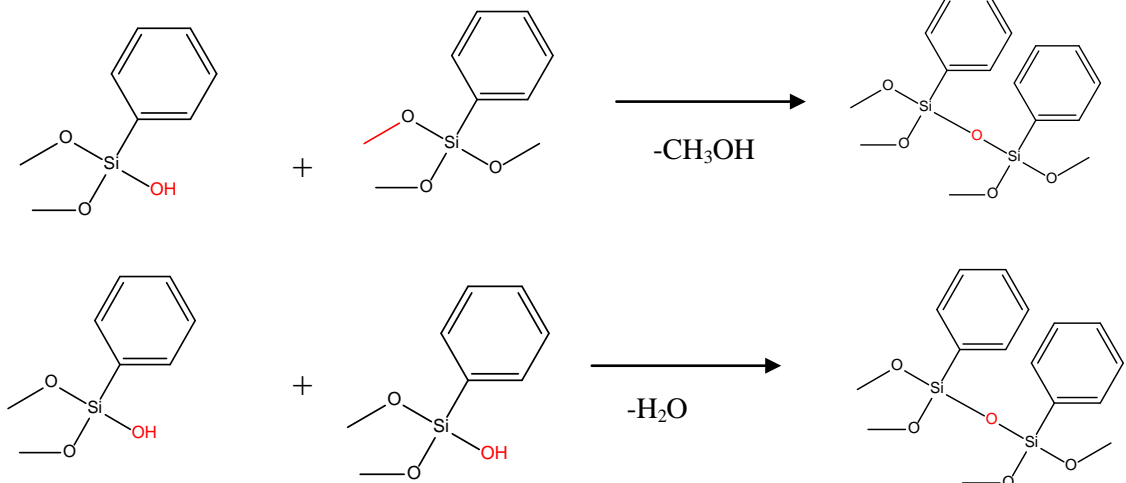


2. Συμπύκνωση

α)



β)



Σχήμα 5.1. Η διαδικασία κolloειδούς πηκτώματος πραγματοποιείται σε δύο στάδια 1) υδρόλυση 2) συμπύκνωση.

Το κολλοειδές πήκτωμα που προκύπτει διαθέτει πόρους διαστάσεως υπο-μικρομέτρου και πολυμερείς αλυσίδες, των οποίων το μήκος κατά μέσο όρο είναι μεγαλύτερο από 1 (μm) (Brinker & Scherer, 1990). Για την καλύτερη λειτουργία των εγκλωβισμένων βιομορίων, οι πόροι θα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλοι ώστε να επιτρέπεται ανεμπόδιστα η μεταφορά μορίων συμπεριλαμβανομένων ιόντων, υποστρωμάτων, προϊόντων της αντίδρασης, καθώς και της προς ανάλυση ουσίας. Όμως θα πρέπει να εξαιρούνται μεγάλα σωματίδια. Συνάμα θα πρέπει να είναι αρκετά μικροί, ώστε να αποφεύγεται η διαφυγή των εγκλωβισμένων μακρομορίων (Kandimalla et al., 2006, Dave et al., 1994). Μελέτες έχουν δείξει ότι στις συνηθισμένες διαδικασίες δημιουργίας κολλοειδούς πηκτώματος, το μέγεθος των πόρων των υδρο-πηκτωμάτων (υγρό/γηρασμένο πήκτωμα), είναι 4–100 nm (Kandimalla et al., 2006).

Η δομή και οι ιδιότητες των κολλοειδών πηκτωμάτων εξαρτώνται από τη χημική σύσταση των αρχικών ενώσεων, αλλά και από άλλους παράγοντες κατά την προετοιμασία, όπως ο λόγος νερό/ SiO_2 , ο διαλύτης, ο καταλύτης, το pH και η θερμοκρασία. Αυτές οι παράμετροι επηρεάζουν ισχυρά τη υδρόλυση και τη συμπύκνωση, ελέγχοντας τις νανοδομές και μικροδομές των τελικού πηκτώματος (Dave et al., 1994). Αυτό είναι απαραίτητο ώστε να επιτυγχάνεται ισορροπία μεταξύ των βιομορίων που έχουν εγκλωβιστεί και της προσβασιμότητας στην ουσία προς ανάλυση. Επιπλέον οι χρόνοι αναμονής και οι συνθήκες γήρανσης και ξήρανσης, μπορούν να επηρεάσουν το χρόνο ζωής αυτών των πηκτωμάτων (Collinson et al., 2002).

5.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.3.1. ΥΛΙΚΑ

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, αναφέρονται στο Κεφάλαιο 2. Ειδικά, τα αλκοξυσιλάνια TEOS (καθαρότητας 98%) και PTMOS (καθαρότητας 97%), καθώς και η ένωση N-υδροξυ-ηλεκτρικός εστέρας μεθοξυπολυαιθυλενο-γλυκόλη (PEG), ήταν από τον οίκο Sigma-Aldrich, Η.Π.Α. Από τον ίδιο οίκο ήταν και οι δείκτες bromocresol purple και phenol red.

5.3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

5.3.2.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ ΦΥΤΩΝ *P. vulgaris* ΚΑΙ *G. max*

Αρχικά σπόροι από *Phaseolus vulgaris* και *Glycine max*, αφού προβλάστησαν σε τρυβλία, πάνω σε απορροφητικό χαρτί Whatman, μεταφυτεύτηκαν στο χώμα σε πλαστικές γλάστρες μεγέθους 12 cm. Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε ειδικό θάλαμο κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες υγρασίας (65%) και θερμοκρασίας (27 °C) και ποτίζονταν κάθε 3 ημέρες.

Μετά το πέρας 3 εβδομάδων τα φυτά εκτός τους μάρτυρες, καταπονήθηκαν με μίγμα βαρέων μετάλλων, ζιζανιοκτόνων και αιθανόλης, καθώς και με θερμικό σοκ. Οι παράγοντες καταπόνησης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Οι παράγοντες και οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν βασίστηκαν σε βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου κάθε ένας παράγοντας χωριστά βρέθηκε να επάγει τις GSTs. Στις παραγράφους 2.2.1. και 2.2.2. περιγράφονται αναλυτικότερα οι διαδικασίες ανάπτυξης και καταπόνησης των φυτών.

Πίνακας 5.1. Παράγοντες καταπόνησης των φυτών *P. vulgaris* και *G. max*.

Παράγοντες καταπόνησης φυτών	
Νικέλιο	150 μM
Ψευδάργυρος	200 μM
Χρόμιο	50μM
Ατραζίνη	0,2 mM
Fluazifop-p-butyl	1/250 (αραίωση του αρχικού δείγματος)
Alachlor	0,2 mM
Αιθανόλη	20% v/v
Θερμοκρασία	35-37 °C

5.3.2.2. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΦΥΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ

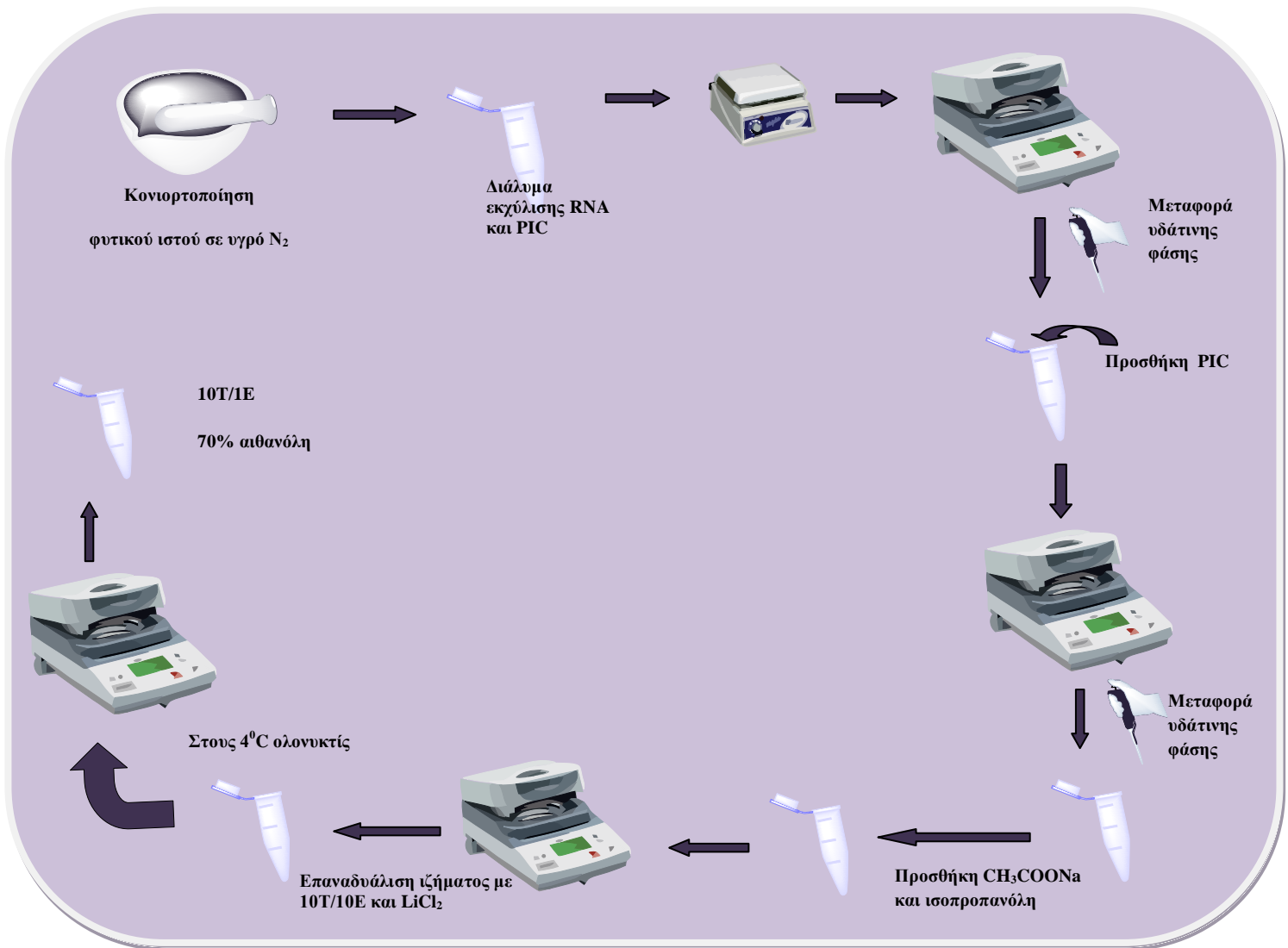
Η συλλογή των φυτικών μερών έγινε με την κοπή τους με ψαλίδι μετά το πέρας 3 εβδομάδων και την άμεση φύλαξη τους στους -80°C αφού πρώτα εμβαπτίστηκαν σε υγρό άζωτο, για την μεταφορά τους από το θάλαμο ανάπτυξης τους.

Ο φυτικός ιστός (φύλλα, βλαστός, ρίζα) που συλλέχθηκε πλύθηκε καλά με απιονισμένο νερό, ζυγίστηκε και εκχυλίστηκε (χρήση γουδιού) με διάλυμα εκχύλισης τριπλάσιου όγκου σε σχέση με το βάρος του ιστού στους 4°C . Το διάλυμα εκχύλισης αποτελούνταν από 50 mM KH_2PO_4 , 0,1 mM EDTA και 1% w/v PVP pH=6 (§ 2.2.4).

Το μίγμα που δημιουργήθηκε φυγοκεντρίθηκε στις 13 000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C . Το υπερκείμενο που προέκυψε, συλλέχθηκε και προσδιορίστηκε η ειδική δραστικότητα έναντι των υποστρωμάτων CDNB, CuOOH, fluorodifen, ethacrynic acid και p-nitrobenzyl chloride, για 24 και για 48 ώρες καταπόνησης, καθώς και για τα φυτά-μάρτυρες. Η ίδια διαδικασία εκχύλισης ακολουθήθηκε και για τους σπόρους. Επίσης τα εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κάτω από συνθήκες μετουσίωσης, τα οποία πέρασαν πρώτα από τη διαδικασία διαπίδυσης σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,06 mM Tris-Cl pH=6,8.

5.3.2.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΤΟ ΦΥΤΙΚΟ ΙΣΤΟ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΕ (ΦΥΛΛΑ, ΒΛΑΣΤΟΣ, ΡΙΖΑ)

Η απομόνωση του RNA από τους φυτικούς ιστούς έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Brusslan & Tobin, 1992 (§ 2.2.5). Στο Σχήμα 5.2. απεικονίζεται γραφικά η διαδικασία.



Σχήμα 5.2. Σχηματική περιγραφή της απομόνωσης RNA από φυτικό ιστό.

5.3.2.4. ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ RNA ΜΕ DNASE I ΚΑΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ cDNA ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ

Τα δείγματα RNA υποβλήθηκαν σε κατεργασία με DNase I, πριν από τις αντιδράσεις RT-PCR, ώστε να απομακρυνθεί το χρωμοσωματικό DNA από τα δείγματα. Για το λόγο αυτό, προκειμένου να διασφαλιστεί η ακεραιότητα του RNA, χρησιμοποιήθηκε RNase-free DNase και συγκεκριμένα το πλήρες σύστημα αντιδραστηρίων RQ1 RNase-free DNase I της εταιρείας Promega, σύμφωνα με την παράγραφο 2.2.11. Για τη σύνθεση του cDNA ακολουθήθηκε η διαδικασία της παραγράφου 2.2.12.

5.3.2.5. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΥΡΕΣΗ ΚΑΙ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ GSTs ΑΠΟ cDNA –ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΦΥΛΙΣΜΕΝΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Για την ενίσχυση GSTs γονιδίων από τη cDNA βιβλιοθήκη, πραγματοποιήθηκε παραλλαγή της Touchdown PCR, με τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν να φαίνονται παρακάτω. Δοκιμάστηκαν αρκετές παραλλαγές διαφοροποιώντας εκτός από τη θερμοκρασία, τη συγκέντρωση των εκκινήτων, τους κύκλους ακόμα και την προσθήκη διαφόρων βελτιωτικών όπως PVP, DMSO, MgCl₂. Επίσης οι συνθήκες των αντιδράσεων δεν ήταν γενικευμένες για όλα τα δείγματα. Παρακάτω αναφέρονται μόνο οι συνθήκες οι οποίες ενίσχυσαν τα γονίδια GST στα φύλλα, στο βλαστό και στη ρίζα των καταπονημένων φυτών του *P. vulgaris* και *G. max*. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50 μL και περιείχαν: 10 pmol από τον forward εκκινήτη, 30 pmol από τον reverse εκκινήτη, 1 μg cDNA ως μήτρα, 0,4 μL 50 mM dNTPs, 10 μL 5x Taq ρυθμιστικό διάλυμα, 1 Unit KAPA Taq DNA πολυμεράση και αποστειρωμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο. Στον πίνακα 5.2. φαίνονται οι εκφυλισμένοι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

A) ΑΡΧΙΚΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ

Στους 94 °C για 3 min

B) ΚΥΚΛΟΣ

Αποδιάταξη στους 94 ⁰ C για 1 min	} 9 κύκλοι
Υβριδισμός εκκινήτων στους 37 ⁰ C για 1:30 min	
Επιμήκυνση στους 72 ⁰ C για 50 δευτερόλεπτα	

Αποδιάταξη στους 94 ⁰ C για 1 min	} 9 κύκλοι
Υβριδισμός εκκινήτων στους 44 ⁰ C για 1:30 min	
Επιμήκυνση στους 72 ⁰ C για 50 δευτερόλεπτα	

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Αποδιάταξη στους 94 ⁰ C για 1 min	}	32 κύκλοι
Υβριδισμός εκκινήτων στους 53 ⁰ C για 1:30 min		
Επιμήκυνση στους 72 ⁰ C για 50 δευτερόλεπτα		

Γ) ΤΕΛΙΚΗ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ

Στους 72⁰C για 10 λεπτά

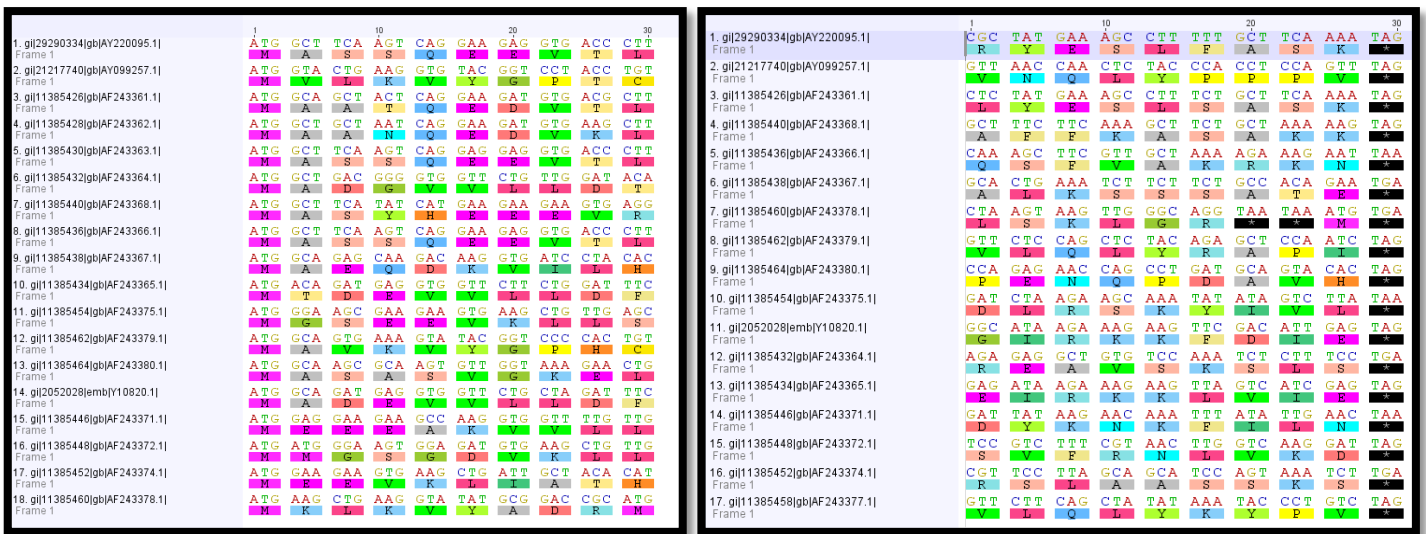
Οι παραπάνω συνθήκες αντίδρασης αφορούν σε όλα τα δείγματα με τη διαφορά ότι για τα καταπονημένα φύλλα της σόγιας οι κύκλοι στο στάδιο B ήταν: 7,7 και 36. Για την καταπονημένη ρίζα σόγιας και φασολιού οι κύκλοι ήταν: 5,5 και 40 ενώ για τα καταπονημένα φύλλα φασολιού οι κύκλοι ήταν 10, 10 και 30.

Πίνακας 5.2. Εκφυλισμένοι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση και ενίσχυση των γονιδίων GSTs.

ΕΚΦΥΛΙΣΜΕΝΟΙ	ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ (5'→ 3')
ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	
Plant1F	5' ATG GCW KCW AVT CAG GAR GAK GTG 3'
Plant1R	5' CTA TTT TGA AGC ARW RAG RCT TT 3'
Plant2F	5' ATG RHR STG AAR GTR TAY GS 3'
Plant2R	5' CTA RAY TGG AGS TSK GTA GAG YT 3'
Plant3F	5' ATG RCW GAY GRG GTG GTT CT 3'
Plant3R	5' CTA CTC DAT NWC NAA CTT CTT TCT 3'
Plant4F	5' ATG GMN GAN GAR GTN GWN GWN ST 3'
Plant4R	5' YTA NTT YTT NGC NWW NTT WAG 3'

Οι εκφυλισμένοι εκκινητές χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση ομόλογων γονιδίων ή γονιδίων της ίδια οικογένειας πρωτεϊνών, με στόχο τη μελέτη της διαφορετικότητας τους (Najafabadi et al., 2008). Οι εκφυλισμένοι εκκινητές μπορούν να σχεδιαστούν είτε από τον ίδιο τον επιστήμονα μελετώντας την νουκλεοτιδική ευθυγράμμιση των αλληλουχιών-στόχων, είτε με τη χρήση ειδικών υπολογιστικών προγραμμάτων, όπως το CODEHOP (Rose et al., 1998) και το DePiCt (Wei et al., 2003). Το CODEHOP κατασκευάζει ένα ζευγάρι εκκινητών και ο κάθε εκκινητής αποτελείται, από μία εκφυλισμένη 3' κεντρική περιοχή και μια 5' συντηρημένη αλληλουχία που σταθεροποιεί την αποδιάταξη. Με το πρόγραμμα DePiCt ομαδοποιούνται οι αλληλουχίες και σχεδιάζονται οι εκκινητές με βάση τα συντηρημένα μπλοκ (blocks) (Najafabadi et al., 2008).

Κατόπιν έρευνας στο Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) επιλέχθηκαν γονίδια GST τα οποία έχουν βρεθεί στη σόγια και στο φασόλι και πραγματοποιήθηκε νουκλεοτιδική αλληλούχιση. Στο Σχήμα 5.3 φαίνεται η αλληλούχιση για το 3'- και 5'- τελικό άκρο.



Σχήμα 5.3. Νουκλεοτιδική αλληλούχιση γονιδίων, όπου AY382831: *G. max* GST, AY220095.1: *P. acutifolius* GST, AY099257.1: *P. acutifolius* GST, AF243361.1: *G. max* GST6, AF243362.1: *G. max* GST7, AF243363.1: *G. max* GST8, AF243364.1: *G. max* GST9, AF243365.1: *G. max* GST10, AF243366.1: *G. max* GST11, AF243367.1: *G. max* GST12, AF243368.1: *G. max* GST13, AF243371.1: *G. max* GST16, AF243372.1: *G. max* GST17, AF243374.1: *G. max* GST19, AF243378.1: *G. max* GST23, Y10820.1: *G. max* GST, AF243380.1: *G. max* GST25.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Λόγω της χαμηλής ομολογίας στα άκρα οι αλληλουχίες ομαδοποιήθηκαν περαιτέρω και προέκυψαν 4 ζευγάρια κλώνων (Πίνακας 5.2). Το πρώτο ζεύγος αφορούσε στα γονίδια AF243361.1, AF243362.1 και AF243363.1, το δεύτερο ζεύγος στα γονίδια AY099257.1, AF243379.1 και AF243378.1, το τρίτο ζεύγος στα γονίδια Y10820.1, AF243364.1 και AF243365.1, το τέταρτο ζεύγος στα γονίδια AY820.1, AF243375.1, AF243372.1 και AF243380.1.

5.3.2.6. ΑΠΟΚΟΠΗ ΑΠΟ ΤΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΚΑΙ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Η αποκοπή της ζώνης – ενδιαφέροντος από τα πηκτώματα, καθαρίστηκε με gel extraction kit και στη συνέχεια ενισχύθηκαν τα GST γονίδια με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50 μL και περιείχαν: 10 pmol από τον forward εκκινητή, 30 pmol από τον reverse εκκινητή, DNA από το gel extraction, 0,4 μL 50 mM dNTPs, 10 μL 5x Taq ρυθμιστικό διάλυμα, 1 Unit KAPA Taq DNA πολυμεράση και αποστειρωμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

A) ΑΡΧΙΚΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ

Στους 95 $^{\circ}\text{C}$ για 3 λεπτά

B) ΚΥΚΛΟΣ

Αποδιάταξη στους 95 $^{\circ}\text{C}$ για 30 δευτερόλεπτα

Υβριδισμός εκκινητών στους 45 $^{\circ}\text{C}$ για 30 δευτερόλεπτα

Επιμήκυνση στους 72 $^{\circ}\text{C}$ για 1 λεπτά

} 40 κύκλοι

Γ) ΤΕΛΙΚΗ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ

Στους 72 $^{\circ}\text{C}$ για 10 λεπτά

5.3.2.7. ΕΝΩΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΣΤΟΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ pEXP5-CT/TOPO® ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E. coli* TOP10

Η αντίδραση ένωσης (ligation) των προϊόντων PCR στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO® και ο μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων *E. coli* TOP10 με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια, πραγματοποιήθηκε με την τεχνολογία του TOPO® Cloning, όπως περιγράφεται στο βιβλίο οδηγιών pEXP5-CT/TOPO®TA Kit (Invitrogen, USA). Τα στάδια περιγράφονται αναλυτικά στην παράγραφο 2.2.15. Κατόπιν ακολούθησε απομόνωση πλασμιδιακού DNA.

5.3.2.7. ΜΕΘΟΔΟΣ *IN VITRO* ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΕΞΕΛΙΞΕΩΣ (ΤΕΧΝΙΚΗ DNA SHUFFLING)

Η μέθοδος της κατευθυνόμενης εξέλιξης, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Zhao & Arnold, 1997.

Για τη μέθοδο της κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης, αρχικά το πλασμιδιακό DNA κόπηκε σε μικρά κομμάτια 50-100 bp (Σχήμα 5.4) με DNase προετοιμάζοντας μίγμα πλασμιδιακού DNA τελικού όγκου 50 μ L ως εξής:

- Μίγμα πλασμιδιακού DNA από τους καταπονημένους φυτικούς ιστούς των *P. vulgaris* και *G. max* σε αναλογία 1:1, τελικού όγκου 24 μ L (4 μ L από κάθε ιστό, σύνολο ιστών για κάθε φυτό 3).
- 5 μ L διάλυμα DNase
- 21 μ L διάλυμα εξισορρόπησης TE

Στη συνέχεια προστέθηκαν 0,7 μ L DNase. Ακολούθησε εξισορρόπηση στους 15°C για 15 λεπτά. Στους χρόνους t=0, t=2 λεπτά, t=4 λεπτά, t=6 λεπτά, t=8 λεπτά, t=10 λεπτά και t=15 λεπτά πραγματοποιήθηκε παύση της αντίδρασης, προσθέτοντας σε 6 μ L του μίγματος, 1 μ L διάλυμα παύσης (stop solution) και επωάζοντας στους 65°C για 10 λεπτά. Η Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων έγινε με 2% αγαρόζη.

Κατόπιν ακολούθησε επανασύνδεση των κομματιών 50-100 bp με PCR. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 μ L και περιείχε: 5 μ L 10x Pfu ρυθμιστικό διάλυμα, 0,4 μ L 50 mM dNTPs, 10 μ L από τα προϊόντα DNase (για τους χρόνους,

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

t=8 λεπτά, t=10 λεπτά και t=15 λεπτά) 1,25 μL Unit Pfu DNA πολυμεράση και αποστειρωμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο.

A) ΑΡΧΙΚΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ

Στους 94°C για 3 λεπτά

B) ΚΥΚΛΟΣ

Αποδιάταξη στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα

Υβριδισμός εκκινητών στους 55°C για 60 δευτ.

Επιμήκυνση στους 72°C για 60 δευτ. + 5 δευτ. ανά κύκλο

} 40 κύκλοι

Γ) ΤΕΛΙΚΗ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ

Στους 72°C για 10 λεπτά



Σχήμα 5.4. Σχηματική περιγραφή της τεχνικής - κατευθυνόμενη ενζυμικής εξέλιξη DNA shuffling.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Τέλος πραγματοποιήθηκε PCR των συναρμολογημένων κομματιών, με τους εκφυλισμένους εκκινητές. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 μL και περιείχε: 10 pmol από τον forward εκκινητή, 30 pmol από τον reverse εκκινητή, 5 μL 10x Pfu ρυθμιστικό διάλυμα, 0,4 μL 50 mM dNTPs, 1 μg από το προϊόν της αντίδρασης επανασύνδεσης των κομματιών, 1,25 Unit Taq/Pfu DNA πολυμεράση και αποστειρωμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο. Οι συνθήκες αντίδρασης φαίνονται παρακάτω.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

A) ΑΡΧΙΚΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ

Στους 94 $^{\circ}\text{C}$ για 3 λεπτά

B) ΚΥΚΛΟΣ

Αποδιάταξη στους 94 $^{\circ}\text{C}$ για 30 δευτερόλεπτα	}	11 κύκλοι
Υβριδισμός εκκινητών στους 55 $^{\circ}\text{C}$ για 30 δευτερ.		
Επιμήκυνση στους 72 $^{\circ}\text{C}$ για 45 δευτερόλεπτα		
Αποδιάταξη στους 94 $^{\circ}\text{C}$ για 30 δευτερόλεπτα	}	14 κύκλοι
Υβριδισμός εκκινητών στους 55 $^{\circ}\text{C}$ για 30 δευτερ.		
Επιμήκυνση στους 72 $^{\circ}\text{C}$ για 45 δευτερ. + 25 δευτερ.		
σε κάθε κύκλο		

Γ) ΤΕΛΙΚΗ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ

Στους 72 $^{\circ}\text{C}$ για 10 λεπτά

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση της ζώνης μεταξύ των 600-700 bp με Gel extraction kit και ακολούθησε ενίσχυση με PCR τελικού όγκου 50 μL που

περιείχε: 5 μ L διαλύματος 10X Taq πολυμεράσης, 0,4 μ L από 25 mM dNTPs, 10 pmol από κάθε forward εκκινητή Plant1F, Plant2F, Plant3F και Plant4F, 30 pmol από κάθε reverse εκκινητή Plant1R, Plant2R, Plant3R και Plant4R, 1 unit Taq KAPA πολυμεράση. Οι συνθήκες ήταν οι εξής: αρχική αποδιάταξη στους 94⁰C για 3 λεπτά, 30 κύκλοι όπου ο καθένας είχε τα στάδια: 94⁰C για 30 δευτ., 45⁰C για 30 δευτ., 72⁰C για 1 λεπτό και τελική επιμήκυνση στους 72⁰C για 10 λεπτά. Τέλος με gel extraction υπήρξε η κατάλληλη ποσότητα για την κλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO® (§ 5.3.2.7).

5.3.2.8. ΜΕΘΟΔΟΣ ΛΟΓΙΚΟΥ ΕΝΖΥΜΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ

Για τη μέθοδο λογικού σχεδιασμού ακολουθήθηκαν η τεχνική Quick Change PCR, ώστε να πραγματοποιηθεί κατευθυνόμενη εξέλιξη στη θέση Phe117Ile του νέου ενζύμου GST, που προέκυψε από το *DNA shuffling*. Για τις δύο αυτές τεχνικές σχεδιάστηκε ζεύγος συμπληρωματικών και αλληλεπικαλυπτόμενων εκκινητών, γύρω από τη θέση 117, όπου απαντά το κωδικόνιο της φαινυλαλανίνης. Οι εκκινητές είναι συμπληρωματικοί, στις απέναντι αλυσίδες του δίκλωνου πλασμιδιακού DNA της μήτρας. Για να προκύψει μετάλλαξη στη θέση 117, κατά το ανασχεδιασμό των εκκινητών, το κωδικόνιο της φαινυλαλανίνης αντικαταστάθηκε από το κωδικόνιο NNN. Έτσι οι εκκινητές που προέκυψαν ήταν οι εξής:

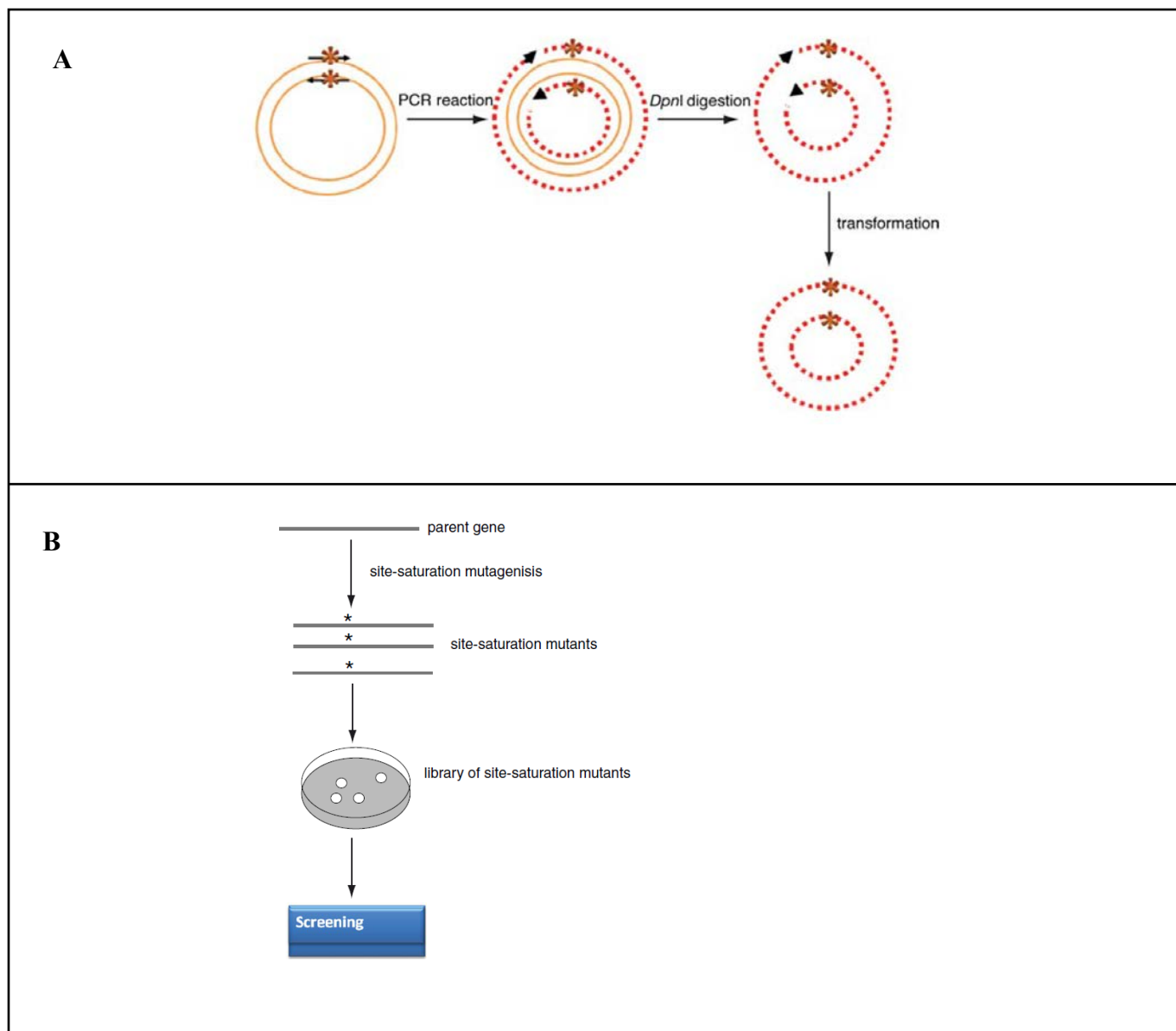
FPrimer117 5' AAA GCT ACT **NNN** TCT ATT GAT 3'

RPrimer117 5' ATC AAT AGA **NNN** AGT AGC TTT 3'

Η τεχνική Quick Change PCR

Η τεχνική Quick Change έγινε σε 2 στάδια όπως φαίνεται και στο Σχήμα 5.5.A: στο πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε PCR, ώστε να συντεθεί ολόκληρο το πλασμίδιο με το μεταλλαγμένο γονίδιο και στο δεύτερο στάδιο έγινε πέψη του μητρικού πλασμιδίου, με ενδονουκlease *DpnI*. Η *DpnI* αναγνωρίζει την αλληλουχία G^mATC και υδρολύει μεταξύ των βάσεων A και T, ώστε να προκύψουν τυφλά κομμάτια. Η ενδονουκlease αυτή απαιτεί μεθυλιωμένα αμινοξικά κατάλοιπα αδενίνης και γι' αυτό μπορεί και υδρολύει μόνο G^mATC αλληλουχίες, που περιέχουν N⁶-μεθυλαδενίνη. Το πλασμίδιο με την επιθυμητή μετάλλαξη, δεν περιέχει μεθυλιωμένο DNA και δεν

κόβεται. Τα δεκτικά κύτταρα μετασχηματίζονται με το νεοσυντιθέμενο πλασμίδιο και οι εγκοπές που υπάρχουν, επιδιορθώνονται *in vivo* από το κυτταρικό μηχανισμό, ώστε να προκύψει ένα μεταλλαγμένο κυκλικό πλασμίδιο (Chronopoulou & Labrou, 2011). Η PCR που πραγματοποιήθηκε τελικού όγκου 50 μL περιείχε: 8 pmol από κάθε εκκινητή, 10 μL διάλυμα της Pfu DNA πολυμεράσης, 0,2 μL από 50 mM dNTPs, 5 ng πλασμιδιακό DNA-shuffling, 1 U Pfu DNA πολυμεράση και αποστειρωμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε στον θερμοκυκλοποιητή ήταν το εξής: αρχική αποδιάταξη στους 94⁰C για 3 λεπτά, ακολούθησαν 30 κύκλοι με 2 λεπτά στους 94⁰C, 2 λεπτά στους 40⁰C και 2 λεπτά στους 72⁰C. Η τελική επιμήκυνση πραγματοποιήθηκε στους 72⁰C για 10 λεπτά. Αφού ηλεκτροφορήθηκε το προϊόν της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης (1%) ακολούθησε η πέψη με την ενδονουκλεάση *DpnI*, προσθέτοντας 10 Units από την ενδονουκλεάση αμέσως στο προϊόν της αντίδρασης. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 20 μL όπου 12 μL ήταν ο όγκος του προϊόντος (100 ng), 1 μL *DpnI*, 2 μL από το 10x διάλυμα *DpnI* και 5 μL αποστειρωμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο. Κατόπιν ήπιας ανάδευσης και στιγμιαίας στροφορμής, ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 37⁰C. Για την αδρανοποίηση της ενδονουκλεάσης το μίγμα επώαστηκε στους 70⁰C για 15 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησε μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* του στελέχους DH5 α , με το προϊόν της *DpnI* διεργασίας κατόπιν αραίωσης 1/10. Ο μετασχηματισμός έγινε σύμφωνα με την παράγραφο 2.2.8. και το υλικό στρώθηκε σε τρυβλία Petri με αντιβιοτικό την αμπικιλίνη (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), όπου στη συνέχεια ακολούθησε σάρωση ή εκλογή για την απομόνωση κλώνων με την επιθυμητή δραστηριότητα (Σχήμα 5.5. B).



Σχήμα 5.5. **A.** Κατευθυνόμενη μεταλλαζογένεση με την τεχνική Quick change **B.** Τα κύρια βήματα της *in vitro* της μεταλλαζογένεσης κορεσμού. Σάρωση ή επιλογή για την απομόνωση κλώνων με την επιθυμητή δραστητικότητα.

5.3.2.9. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *GSTs*

Οι απομονώσεις πλασμιδιακού DNA των γονιδίων που προέκυψαν από τις μεθόδους κατευθυνόμενης ενζυμικής εξελίξεως και λογικού ενζυμικού σχεδιασμού, έγιναν με kit απομόνωσης ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη καθαρότητα και να σταλούν για αλληλούχιση.

5.3.2.10. ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ENZYMΩΝ GSTS ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ *E. coli* ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ BL21(DE3) ΚΑΙ BL21(DE3)pLysS

Για την έκφραση του γονιδίου *PvGmGSTUG* και των νέων μεταλλαγμένων μορφών, που προέκυψαν από το λογικό ενζυμικό ανασχεδιασμό, μετασηματίστηκαν κύτταρα από τα στελέχη του βακτηρίου *E. coli*, BL21(DE3) και BL21(DE3)pLysS με τα αντίστοιχα ανασυνδιασμένα πλασμίδια. Στον πίνακα 5.3. φαίνεται το στέλεχος και τα αντιβιοτικά επιλογής, που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε κλώνο. Στη συνέχεια αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό διάλυμα LB, έχοντας το αντιβιοτικό επιλογής. Η έκφραση των γονιδίων επάχθηκε με τον παράγοντα IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM, ο οποίος εισήχθη στην υγρή καλλιέργεια όταν η απορρόφηση στα 600 nm έφτασε 0,6. Μετά το διάστημα 4 ωρών τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντριση στις 8000 rpm στους 4°C για 20 λεπτά.

Πίνακας 5.3. Στον πίνακα αυτό φαίνονται τα στελέχη *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση κάθε μεταλλαγμένης μορφής και το αντίστοιχο αντιβιοτικό επιλογής.

ΜΟΡΦΗ	ΣΤΕΛΕΧΟΣ <i>E. coli</i>	ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ
<i>PvGmGSTUG</i>	BL21(DE3)	αμπικιλλίνη (100 µg/mL)
<i>PvGmGSTUG</i> (Phe117Ile)	BL21(DE3)pLysS	αμπικιλλίνη (100 µg/mL) και χλωραμφαινικόλη (34 µg/mL)
<i>PvGmGSTUG</i> (Phe117Arg)	BL21(DE3)	αμπικιλλίνη (100 µg/mL)
<i>PvGmGSTUG</i> (Phe117Gly)	BL21(DE3)pLysS	αμπικιλλίνη (100 µg/mL) και χλωραμφαινικόλη (34 µg/mL)
<i>PvGmGSTUG</i> (Phe117His)	BL21(DE3) pLysS	αμπικιλλίνη (100 µg/mL) και χλωραμφαινικόλη (34 µg/mL)
<i>PvGmGSTUG</i> (Phe117Ser)	BL21(DE3) pLysS	αμπικιλλίνη (100 µg/mL) και χλωραμφαινικόλη (34 µg/mL)
<i>PvGmGSTUG</i> (Phe117Thr)	BL21(DE3) pLysS	αμπικιλλίνη (100 µg/mL) και

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΜΟΡΦΗ	ΣΤΕΛΕΧΟΣ <i>E. coli</i>	ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ
		χλωραμφαινικόλη (34 µg/mL)
<i>PvGmGSTUG</i> (Phe117Trp)	BL21(DE3) pLysS	αμπικιλίνη (100 µg/mL) και χλωραμφαινικόλη (34 µg/mL)

5.3.2.11. ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ GSTs ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ *E. coli* ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ BL21(DE3) pLysS ΚΑΙ BL21(DE3)

Σε αυτή την μελέτη δοκιμάστηκε ένας διαφορετικός τρόπος έκφρασης, όπου αρχικά μετασχηματίστηκαν κύτταρα BL21(DE3) pLysS με DNA των γονιδίων *PvGmGSTUG* (Phe117Ile) και *PvGmGSTUG* (Phe117Thr) και στη συνέχεια ακολούθησε στρώσιμο σε τρυβλίο. Κάθε φορά που χρειάστηκε να εκφραστεί κάποιο από τα γονίδια λαμβανόταν μία αποικία και εμβολιαζόταν στο παρακάτω θρεπτικό διάλυμα (1 L):

- 5 g ζύμης
- 10 g πεπτόνης
- 5 g γλυκερόλης
- 0,5 g γλυκόζης
- 2 g λακτόζης
- 0,7 g Na₂SO₄
- 2,5 g NH₄Cl
- Mg, Ca, K σε τελική συγκέντρωση 0,1 g/L

Μετά το πέρας 24 ωρών πραγματοποιούνταν φυγοκέντριση στις 13.000 rpm στους 4°C για 20 λεπτά.

5.3.2.12. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών έγινε με την μέθοδο Bradford (Bradford, 1976) (§2.2.25) χρησιμοποιώντας αλβουμίνη μόσχου για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης.

5.3.2.13. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ENZYMΩΝ GSTs ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΚΑΙ BES-GSH ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ ΜΕ ΔΕΣΜΕΥΤΗ ΤΗΝ S-ΕΞΥΑ GSH

Το εκχύλισμα το οποίο συλλέχθηκε, επαναδιαλύθηκε σε υδατικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4 συγκέντρωσης 20 mM, pH 7), ώστε να πραγματοποιηθεί λύση των κυττάρων με υπερήχους (~ 7 επαναλήψεις των 10 δευτερόλεπτα) για την λύση των κυττάρων. Το τελικό αιώρημα φυγοκεντρίθηκε για 5 λεπτά στις 13.000 rpm. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε φωτομετρικά η ενζυμική δραστηριότητα των υπερκείμενων με το σύστημα GSH-CDNB (§2.2.31), καθώς και η συνολική πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford (§ 2.2.25.). Ακολούθησε διαπίδυση σε διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4 συγκέντρωσης 20 mM, pH 7) για 20 ώρες και επαναπροσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας των ενζύμων.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των ενζύμων με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας με δεσμευτή την S-εξυλ GSH. Στην παράγραφο 2.2.21 περιγράφεται αναλυτικά η χρωματογραφία συγγένειας. Η καθαρότητα των εκλούσεων και τα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης εκτιμήθηκαν ηλεκτροφορητικά σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (12,5 % SDS-PAGE), κάτω από συνθήκες μετουσίωσης (§2.2.29).

5.3.2.14. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ENZYMΩΝ GSTs ΑΠΟ ΤΟ ΦΥΤΟ *P. vulgaris* ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΜΕ ΔΕΣΜΕΥΤΗ ΤΗΝ ΧΡΩΣΤΙΚΗ CIBACRON BLUE 3GA

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής: αρχικά σπόροι από φασόλι πολτοποιήθηκαν με γουδί, αφού είχαν εμβαπτιστεί σε νερό για 24 ώρες. Η εκχύλιση των GSTs, έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM KH_2PO_4 pH=6. Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντριση και προσδιορίστηκε φωτομετρικά η ενζυμική δραστηριότητα του υπερκείμενου με το σύστημα GSH-CDNB (§2.2.31), καθώς και η συνολική πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford (§ 2.2.25). Κατόπιν πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του ενζύμου με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας, με δεσμευτή την χρωστική Cibacron blue 3GA (1 mL). Η εξισσορόπηση της κολώνας έγινε με 20 mM KH_2PO_4 pH=7. Από την στήλη απομακρύνθηκαν άλλες πρωτεΐνες και ουσίες με 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος KH_2PO_4 συγκέντρωσης 20 mM, pH =7 και 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος KH_2PO_4 συγκέντρωσης 20 mM, pH=8,5. Οι εκλούσεις των

GSTs που προσδέθηκαν στη στήλη έγιναν 1) με 4mL ρυθμιστικό διάλυμα KH_2PO_4 συγκέντρωσης 20 mM, pH =7 με 20 mM γλουταθειόνης, 2) με 4 mL ρυθμιστικού διαλύματος KH_2PO_4 συγκέντρωσης 20 mM, pH=8,5 με 10 mM γλουταθειόνης και 3) με 4 mL ρυθμιστικού διαλύματος KH_2PO_4 συγκέντρωσης 20 mM, pH=8,5 με 20 mM γλουταθειόνης. Η αναγέννηση της κολόνας έγινε με διάλυμα θειοκυανικού νατρίου (3M) Η καθαρότητα των εκλούσεων και τα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης εκτιμήθηκαν ηλεκτροφορητικά σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (12,5 % SDS-PAGE) κάτω από συνθήκες μετουσίωσης (§2.2.29).

5.3.2.15. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ (%) ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Για τον προσδιορισμό της αναστολής των GSTs, κατά την έκθεση τους σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα, εκτιμάται η δραστικότητα του ενζύμου με το σύστημα CDNB-GSH στους 37°C (§ 2.2.31), πριν και μετά την έκθεση. Συνεπώς, στην κυβέτα σε τελικό όγκο 1 mL περιέχονταν: 2,5 mM GSH, 1 mM CDNB, 0,1 mM φυτοπροστατευτικού προϊόντος (διαλυμένο σε ακετόνη), ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M KH_2PO_4 pH 6,5 και το ένζυμο. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το ίδιο μίγμα χωρίς ένζυμο και η αντίδραση μελετήθηκε φωτομετρικά, υπολογίζοντας τον ρυθμό αύξησης της απορρόφησης στα 340 nm. Οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν και παρουσιάζεται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων. Ως 1 Unit ενζύμου λαμβάνεται η ποσότητα εκείνη του ενζύμου για την παραγωγή 1μmol προϊόντος ανά λεπτό σε pH=6,5 και στους 37°C . Το ποσοστό % της αναστολής του ενζύμου υπολογίστηκε με την εξίσωση:

$$\% \text{ αναστολή} = \frac{R_0 - R_i}{R_0} \text{ όπου,}$$

R_0 : είναι ο ρυθμός αύξησης της απορρόφησης για την μη αναστέλλουσα αντίδραση

R_i : ο ρυθμός αύξησης της απορρόφησης για την αναστέλλουσα αντίδραση. Και οι δύο ρυθμοί αφορούν στην ίδια συγκέντρωση υποστρώματος.

5.3.2.16. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΤΙΜΗΣ IC₅₀ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΩΝ ENZYΜΩΝ *PvGmGSTUG* ΚΑΙ *PvGmGSTUG(Phe117Ile)* ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΟ ENDOSULFAN ΚΑΙ ΤΟ ΙΣΟΜΕΡΕΣ α -ENDOSULFAN

Ο προσδιορισμός της τιμής IC₅₀ έγινε φωτομετρικά παρακολουθώντας το σχηματισμό του συμπλόκου του CDNB με τη GSH στα 340 nm, για κάθε διαφορετική συγκέντρωση του εντομοκτόνου endosulfan και του ισομερές α -endosulfan. Συγκεκριμένα υπολογίστηκε η ενζυμική δραστηριότητα των *PvGmGSTUG* και *PvGmGSTUG(Phe117Ile)*, υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του εντομοκτόνου endosulfan και του α -endosulfan με ένα εύρος τιμών από (0,01-300 μ M) και (0,5-100 μ M), αντίστοιχα. Στην κυβέτα σε τελικό όγκο 1 mL περιέχονταν: 2,5 mM GSH, 1 mM CDNB, 0,1 mM εντομοκτόνου (διαλυμένο σε ακετόνη), ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M KH₂PO₄ pH 6,5 και το ένζυμο, ενώ η ακετόνη απαντούσε σε ποσοστό 5% στο διάλυμα. Οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν και παρουσιάζεται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων. Οι τιμές IC₅₀ προσδιορίστηκαν προσαρμόζοντας τα αποτελέσματα συγκέντρωσης-δραστηριότητας στην εξίσωση:

$$\% \text{ αναστολή} = 100 / [1 + (IC_{50} / [I])],$$

όπου [I] η συγκέντρωση του εντομοκτόνου. Οι τιμές IC₅₀ προέκυψαν κατόπιν επεξεργασίας των αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα Grafit (version 3.03: Data analysis & Graphics programme, Erithacus Software Ltd).

5.3.2.17. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ GSTs ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΩΣ ΠΙΘΑΝΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός ως προς τα παράγωγα του 1-αλογονο-2,4-δινιτροβενζολίου (CDNB, FDNB, BDNB, IDNB) και το fluorodifen, έγιναν σύμφωνα με δημοσιευμένες μεθόδους (Skopelitou et al. 2011; Axarli et al. 2009a), οι οποίες περιγράφονται αναλυτικά στις παραγράφους 2.2.31 και 2.2.37.

Για να μελετηθούν ως προς τη δράση υπεροξειδάσης, πραγματοποιήθηκαν φωτομετρικές δοκιμές με αντιδραστήρια υπεροξειδίου (CuOOH, tert-BuOOH, lauroyl peroxide, benzoyl peroxide), οι οποίες αναφέρονται αναλυτικά στην παράγραφο 2.2.32. Οι δοκιμές για τα αντιδραστήρια της 2-2-διθειοδιαιθανόλης (HED), του διϋδροασκορβικού οξέος, του εθακρινικού οξέος (EA), της trans-4-

φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη, της βρωμοσουλφοφθαλεΐνης, της trans-2 ενενάλης, και των ισοθειοκυανικών εστέρων (PEITC και AITC), περιγράφονται αναλυτικά στις παραγράφους 2.2.33-2.2.40.

Τα ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα, διαλύθηκαν είτε σε αιθανόλη είτε σε ακετόνη σε τελική συγκέντρωση 2–5% (v/v) του οργανικού διαλύτη στο διάλυμα της δοκιμής και όλες οι δοκιμές έγιναν σε σταθερή θερμοκρασία. Ως 1 μονάδα (Unit) ενζυμικής δραστηρότητας ορίστηκε η ποσότητα εκείνη του ενζύμου που καταλύει την μετατροπή 1 μμολ υποστρώματος ανά λεπτό. Η ειδική δραστηρότητα έχει εκφραστεί σε μμολ ανά λεπτό ανά mg πρωτεΐνης. Όλες οι μετρήσεις διορθώθηκαν με τις μη-καταλυτικές.

5.3.2.18. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ GSH/CDNB

Η κινητική ανάλυση των ισοενζύμων, έχοντας την GSH ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα πραγματοποιήθηκε στους 37°C σε τελικό όγκο μίγματος 1 mL που περιείχε: 0,1 M δισόξινο φωσφορικό κάλιο (pH 6,5), 1 mM CDNB και διαφορετικές συγκεντρώσεις GSH (0,00375–5 mM). Επίσης προσδιορίστηκαν οι αρχικές ταχύτητες σε μίγμα 0,1 M δισόξινο φωσφορικό κάλιο (pH 6,5), παρουσίας 2,5 mM GSH και το CDNB ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα με συγκεντρώσεις από 0,06 mM έως 2,8 mM. Οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν και παρουσιάζεται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων, των οποίων η επεξεργασία έγινε με ανάλυση μη-γραμμικής παλινδρόμησης ακολουθώντας την εξίσωση των Michaelis–Menten στο πρόγραμμα GraphPad Software. Όλες οι τιμές της καταλυτικής σταθεράς υπολογίστηκαν παίρνοντας ως δεδομένο την ύπαρξη ενός ενεργού κέντρου ανά υπομονάδα. Στις περιπτώσεις, όπου οι καμπύλες δεν ικανοποιούσαν αυτές των Michaelis–Menten για την τιμή K_m , προσδιορίστηκε η τιμή $S_{0,5}$ ($S_{0,5}$ είναι η συγκέντρωση εκείνη του υποστρώματος όπου η ταχύτητα $v = 0,5V_{max}$) και ο συντελεστής Hill n_H , προσδιορίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση Hill:

$$v = \frac{V_{max}[S]^{n_H}}{S_{0,5}^{n_H} + [S]^{n_H}}$$

5.3.2.19. ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ

Πραγματοποιήθηκε εύρεση GST αλληλουχιών από τις τάξεις φ , τ , ζ , θ , λ , *DAHR* και *TCHQD* καθώς και αλληλουχιών ομόλογων των *PvGSTs* με το πρόγραμμα BLASTp (Altschul et al. 1990), του δικτυακού τόπου NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Οι αλληλουχίες που βρέθηκαν ευθυγραμμίστηκαν με το πρόγραμμα ClustalW (Thompson et al. 1994) χρησιμοποιώντας το BLOSUM62, ως scoring matrix. Για την απεικόνιση της ευθυγράμμισης των αλληλουχιών, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Geneious v5.5 (Drummond et al., 2011). Τα ομόλογα μοντέλα δημιουργήθηκαν με το πρόγραμμα MODELLER (Sali & Blundell 1993), μέσω του προγράμματος UCSF Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>, Pettersen et al. 2004) και παρήχθησαν πέντε μοντέλα για τον κλώνο *PvGmGSTUG*. Για την ποιοτική εκτίμηση των μοντέλων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα PROSA II (Sippl 1993) και Verify 3D (Luthy et al. 1992). Οι δομές που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα για τη δημιουργία των μοντέλων, φαίνονται στον Πίνακα 5.16. Η δομή της μορφής Phe117Ile προέκυψε από το πρόγραμμα What IF.

Για την απεικόνιση των μοντέλων έγινε χρήση των προγραμμάτων PyMOL (<http://www.pymol.org/>, DeLano 2002) και UCSF Chimera. Η ανάλυση επιφάνειας ηλεκτροστατικού δυναμικού πραγματοποιήθηκε με το UCSF Chimera. Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Geneious v5.5 (Drummond et al., 2011).

5.3.2.20. ΘΕΡΜΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ *PvGmGSTUG* ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ F117I

Μελετήθηκε η θερμική σταθερότητα του ενζύμου *PvGmGSTUG* και της μορφής Phe117Ile, στις θερμοκρασίες 10⁰C έως 80⁰C. Για τη μελέτη αυτή, καθαρίστηκαν οι μορφές με χρωματογραφία συγγένειας και στη συνέχεια επώαστηκαν σε κάθε θερμοκρασία για 5 λεπτά. Η δραστικότητα στους 4⁰C θεωρήθηκε 100% ώστε να προσδιοριστεί η υπολειπόμενη δραστικότητα για τις άλλες θερμοκρασίες. Η δραστικότητα προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη φωτομετρική διαδικασία που αναλύεται στην παράγραφο 2.2.31. Έτσι προσδιορίστηκε η τιμή της T_m δηλαδή η θερμοκρασία που παρατηρείται απώλεια του 50% της συνολικής δραστικότητας. Το

ίδιο ακριβώς πείραμα πραγματοποιήθηκε έχοντας προσθέσει στα ενζυμικά δείγματα N-υδροξυ-ηλεκτρικό εστέρα μεθοξυπολυαιθυλενο- γλυκόλη σε αναλογία 1:1.

5.3.2.21. ΔΟΜΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ *PvGmGSTUG* ΚΑΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ F117I ΓΙΑ ΤΟΥΣ -20⁰C

Μελετήθηκε στους -20⁰C, η σταθερότητα του *PvGmGSTUG* και της μεταλλαγμένης μορφής (Phe117Ile), με γρήγορη και αργή αποκατάσταση, καθώς και σε δυο διαφορετικά διαλύματα: σε 20mM KH₂PO₄ pH=7 και 20mM Na₂HPO₄ pH=7. Η παραμονή τους στους -20⁰C ήταν για μία ώρα και η γρήγορη αποκατάσταση προήλθε με επώαση του ενζύμου απευθείας στους 37⁰C, ενώ κατά την αργή αποκατάσταση το ένζυμο αφέθηκε να ξεπαγώσει στους 4⁰C. Ακόμα μελετήθηκε η δραστικότητα του ενζύμου *PvGmGSTUG* και της μεταλλαγμένης μορφής, κατόπιν αποθήκευσης τους στους -20⁰C για μία ώρα σε διάλυμα 20mM KH₂PO₄ pH=7, αφού πρώτα είχε προστεθεί στο κάθε ενζυμικό δείγμα N-υδροξυ-ηλεκτρικός εστέρας μεθοξυπολυαιθυλενο-γλυκόλης (PEG) σε αναλογία 1:1, καθώς και με αργή και γρήγορη αποκατάσταση. Η δραστικότητα προσδιορίστηκε με το σύστημα GSH/CDNB όπως αναλύεται στην παράγραφο 2.2.31.

5.3.2.22. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ F117I ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΕΓΚΛΩΒΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΣΕ ΥΒΡΙΔΙΚΟ ΚΟΛΛΟΕΙΔΕΣ ΠΗΚΤΩΜΑ (SOL-GEL)

Ο σχηματισμός του κολλοειδούς πηκτώματος βασίστηκε στη μέθοδο των Makote και Collinson (1999) και η διαδικασία που ακολουθήθηκε βασίστηκε σε αυτή των Andreou και Clonis (2002). Το υβριδικό κολλοειδές περιείχει TEOS και PTMOS σε γραμμομοριακή αναλογία 2:1. Έτσι σε γυάλινο σωλήνα προστέθηκε 1,1 mL TEOS, 0,45 mL PTMOS, 82mM CTAB, 0,70 mL νερό, 0,50 mL αιθανόλη και τέλος 0,35 mL HCl 0,1 M. Ακολούθως ο σωλήνας αφού πρώτα είχε πωματιστεί, τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο υπερήχων για 10 λεπτά και στη συνέχεια αφέθηκε για μία ώρα στον πάγο. Επιπλέον αναμίχθηκε σε αναλογία 1:1 το ένζυμο με την ένωση N-υδροξυ-ηλεκτρικό εστέρα μεθοξυ-πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) και αφέθηκε στον πάγο για μία ώρα. Το ένζυμο που χρησιμοποιούνταν για κάθε ακινητοποίηση μπορούσε να

είναι από 100-250 μL και αναμιγνυόταν με 1-2,5 mg (PEG). Ο όγκος αυτός του ενζύμου (100-250 μL) αντιστοιχούσε σε 3,8-9,5 U/mg (0,95-2,4 U/mL).

Μετά το πέρας της μίας ώρας ακολουθούσε ανάμιξη του πηκτώματος με το ένζυμο σε αναλογία 1:1 και το μίγμα (200-500 μL) τοποθετούνταν σε γυάλινη κυψελίδα και εν συνεχεία προστίθονταν 30-60 μL KOH 1M, ώστε με την αλλαγή του pH του μίγματος από όξινο σε αλκαλικό, δημιουργούνταν άμεσα στερεά φάση. Κατόπιν ακολουθούσε «γήρανση» της στερεάς φάσης με TEOS για 2 ημέρες, ενώ έχει πραγματοποιηθεί «γήρανση» και για 5 ημέρες, ώστε να προσδιοριστεί πότε επιτυγχάνεται η καλύτερη σταθερότητα του συστήματος. Μετά το πέρας της «γήρανσης» το πήκτωμα διατηρούνταν σε διάλυμα 1 mM KH_2PO_4 , pH=7.

5.3.2.23. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ Phe117Ile ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ IC50 ΓΙΑ ΤΟ ΙΣΟΜΕΡΕΣ α -ENDOSULFAN

Η κινητική ανάλυση της ακινητοποιημένης μορφής Phe117Ile έχοντας την GSH ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα, πραγματοποιήθηκε στους 37⁰C σε τελικό όγκο μίγματος 1 mL που περιείχε: 0,1 M δισόξινο φωσφορικό κάλιο (pH 6,5), 1 mM CDNB και διαφορετικές συγκεντρώσεις GSH (0, 5-9 mM). Επίσης προσδιορίστηκαν οι αρχικές ταχύτητες σε μίγμα 0,1 M δισόξινο φωσφορικό κάλιο (pH 6,5), παρουσίας 2,5 mM GSH και το CDNB ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα, με συγκεντρώσεις από 0,015mM έως 2,5 mM. Οι μετρήσεις έγιναν εις διπλούν και παρουσιάζεται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων, των οποίων η επεξεργασία έγινε με το πρόγραμμα GraphPad Software.

Ο προσδιορισμός της τιμής IC50 για το α -endosulfan, έγινε σύμφωνα με την παράγραφο 5.3.2.16. Ο προσδιορισμός της δραστηρότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου έγινε με το σύστημα GSH/CDNB σύμφωνα με τη φωτομετρική διαδικασία που αναλύεται στην παράγραφο 2.2.31. Για τον μάρτυρα ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την παράγραφο 5.3.2.22. χωρίς την ύπαρξη του ενζύμου με το PEG.

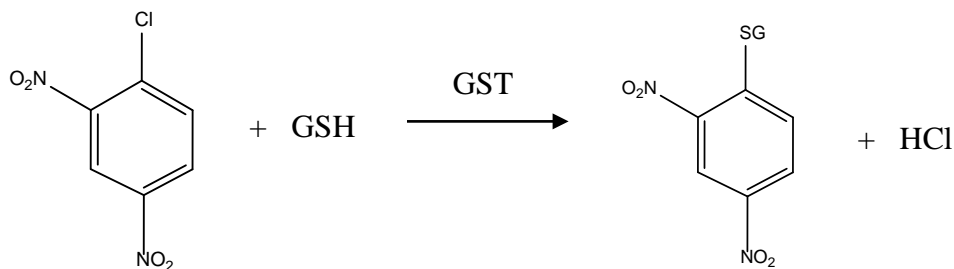
5.3.2.24. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΦΥΓΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΑΠΟ ΤΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΚΗΣ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

Για την μέτρηση της διαφυγής του ενζύμου από το πήκτωμα κάθε φορά προσδιοριζόταν η δραστικότητα του διαλύματος μέσα στο οποίο διατηρούνταν το πήκτωμα, με το σύστημα GSH/CDNB (§ 2.2.31). Σχετικά με τη διάρκεια σταθερότητας προσδιορίστηκε η δραστικότητα του κολλοειδούς πήκτωματος με το ακινητοποιημένο ένζυμο σε βάθος χρόνου, ενώ παράλληλα προσδιορίστηκαν οι δραστικότητες του ελεύθερου ενζύμου και του μίγματος ενζύμου-PEG.

5.3.2.25. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΙΣΟΜΕΡΕΣ α -ENDOSULFAN

Για την ανάπτυξη της μεθόδου προσδιορισμού φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε περιβαλλοντικά δείγματα με φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό, παράλληλα με την ακινητοποίηση του ενζύμου πραγματοποιήθηκε ακινητοποίηση των δεικτών bromocresol purple (όξινος) και phenol red (αλκαλικός). Το κολλοειδές πήκτωμα έγινε σύμφωνα με τη παράγραφο 5.3.2.21, έτσι σε γυάλινο σωλήνα προστέθηκαν 1,1 mL TEOS, 0,45 mL PTMOS, 82mM CTAB, 0,70 mL νερό, 0,50 mL αιθανόλη και τέλος 0,35 mL HCl 0,1 M. Ακολούθως ο σωλήνας αφού πρώτα είχε πωματιστεί τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο υπερήχων για 10 λεπτά και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 15 ώρες. Το κολλοειδές πήκτωμα (1 mL) του τοποθετήθηκε σε erpendorf που περιείχε 1,5 mg bromocresol purple και 1,5 mg phenol red. Ακολούθησε vortex του μίγματος για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, 20 μ L του μίγματος τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες διαστάσεων, ίδιων με την κυψελίδα. Οι πλάκες αυτές, είχαν πρώτα βράσει μέσα σε υδατικό διάλυμα HCl /H₂O 1:1 για 15 λεπτά. Αποθηκεύτηκαν στους 4⁰C σε σχετική υγρασία 40%.

Για τον προσδιορισμό του α -endosulfan, η αναλυτική μέθοδος που αναπτύχθηκε ήταν δυο συστημάτων. Στο ένα ήταν ακινητοποιημένο το ένζυμο και στο άλλο οι δείκτες pH. Έτσι σύμφωνα με τη πορεία της παρακάτω αντίδρασης η παραγωγή HCl, μπορεί έμμεσα να συσχετιστεί με τη συγκέντρωση του α -endosulfan και πιθανόν και άλλων οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων.



Για να προσδιοριστεί το μήκος κύματος της αλλαγής χρώματος των ακινητοποιημένων δεικτών και των δύο συστημάτων μαζί, πραγματοποιήθηκε μέτρηση διαφοράς φάσματος στο εύρος 700-300 nm, σε διάλυμα 1mM KH_2PO_4 pH=6,5.

5.3.2.26. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ α -ENDOSULFAN ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΕΡΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΠΟΥ ΑΝΑΠΤΥΧΘΗΚΕ

Για τον προσδιορισμό του α -endosulfan σε δείγματα νερού, με την αναλυτική μέθοδο δύο συστημάτων που αναπτύχθηκε, πραγματοποιήθηκε καταγραφή του φάσματος στην περιοχή 700-300 nm σε διάλυμα 1mM KH_2PO_4 pH=6,5. Καταγράφηκαν οι διαφορές στα 562 nm, όπου και παρατηρήθηκε η γραμμική εξάρτηση της συγκέντρωσης του α -endosulfan στο νερό και της απορρόφησης. Τα πειράματα ανάκτησης πραγματοποιήθηκαν με δείγματα πόσιμου νερού από το δίκτυο της Αθήνας και μεταλλικού νερού (Korpi, NESTLE Hellas), στα οποία είχαν προστεθεί γνωστές ποσότητες, από το ισομερές α -endosulfan (0,8–16 μM).

5.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.4.1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΥΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ

Η συλλογή των φυτικών μερών έγινε με την κοπή τους με ψαλίδι, μετά το πέρας 3 εβδομάδων. Ο φυτικός ιστός (φύλλα, βλαστός, ρίζα) που συλλέχθηκε πλύθηκε καλά με απιονισμένο νερό, ζυγίστηκε και εκχυλίστηκε (χρήση γουδιού) με διάλυμα εκχύλισης τριπλάσιου όγκου σε σχέση με το βάρος του ιστού, στους 4⁰C. Το διάλυμα εκχύλισης αποτελούνταν από 50 mM KH₂PO₄, 0,1 mM EDTA και 1% w/v PVP pH=6. Το μίγμα που δημιουργήθηκε φυγοκεντρίθηκε στις 13.000 rpm για 10 λεπτά στους 4⁰C. Το υπερκείμενο που προέκυψε, συλλέχθηκε για τον προσδιορισμό της ειδικής δραστηριότητας, έναντι των υποστρωμάτων CDNB, CuOOH, fluorodifen, εθακρινικό οξύ και p-nitrobenzyl chloride, για 24 και για 48 ώρες καταπόνησης, καθώς και για τα φυτά-μάρτυρες. Επίσης τα εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, κάτω από συνθήκες μετουσίωσης. Στον Πίνακα 5.3. φαίνεται η ειδική δραστηριότητα του κάθε φυτικού μέρους για τα πέντε υποστρώματα που μελετήθηκαν. Επιπλέον μελετήθηκαν και οι σπόροι αυτών των φυτών (Σχήμα 5.8).

Πίνακας 5.4. Ειδική δραστηριότητα των φυτικών μερών (φύλλα, βλαστός, ρίζα), ως προς τα υποστρώματα CDNB, CuOOH, εθακρινικό οξύ, fluorodifen και NBD-Cl, καθώς και των σπόρων των φυτών αυτών. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών επαναλήψεων, με απόκλιση λιγότερη του 5% για όλες τις περιπτώσεις.

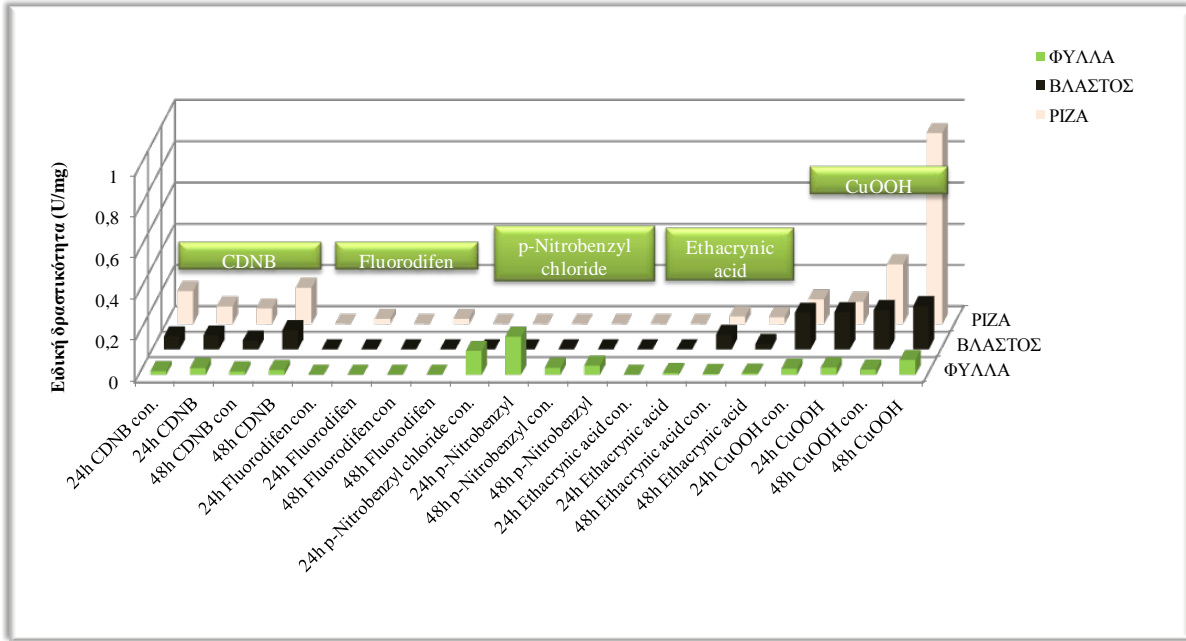
Ειδική δραστηριότητα (U/mg)·10 ⁻²						
ΦΥΤΟ	ΦΥΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	CDNB	CuOOH	Εθακρινικό οξύ	Fluorodifen	NBD- Cl
Μετά από 24 ώρες φυτά μάρτυρες						
<i>P.vulgaris</i>	Φύλλα	4,6	0	0	0	30,2
	Βλαστός	9,9	11,6	0	0	0
	Ρίζα	11,7	12	0	0	0

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Ειδική δραστηριότητα (U/mg)·10 ⁻²						
ΦΥΤΟ	ΦΥΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	CDNB	CuOOH	Εθακρινικό οξύ	Fluorodifen	NBD- Cl
<i>G. max</i>	Φύλλα	3,3	7,1	9,9	0	0
	Βλαστός	5,2	29,9	10,3	0	0
	Ρίζα	8,3	25,6	8,9	0	0
ΦΥΤΟ	ΦΥΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	CDNB	CuOOH	Εθακρινικό οξύ	Fluorodifen	NBD- Cl
Μετά από 24 ώρες καταπόνησης των φυτών						
<i>P. vulgaris</i>	Φύλλα	7,1	3,5	1,8	0	40,6
	Βλαστός	9,2	1,8	0	0	0
	Ρίζα	8,1	10,8	0	0,02	0
<i>G. max</i>	Φύλλα	2,6	2,8	19,6	0	19,6
	Βλαστός	5,5	3,6	20,8	0	20,8
	Ρίζα	12,6	0,55	37,9	0	37,9
ΦΥΤΟ	ΦΥΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	CDNB	CuOOH	Εθακρινικό οξύ	Fluorodifen	NBD- Cl
Μετά από 48 ώρες φυτά μάρτυρες						
<i>P. vulgaris</i>	Φύλλα	1,6	2,6	0,5	0	3,4
	Βλαστός	4,3	19,1	7,1	0	0
	Ρίζα	7,5	28,9	3,7	0	0
<i>G. max</i>	Φύλλα	3,7	9,4	10,9	0	0
	Βλαστός	5,5	34,4	14,5	0	0

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Ειδική δραστηριότητα (U/mg)·10 ⁻²						
ΦΥΤΟ	ΦΥΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	CDNB	CuOOH	Εθακρινικό οξύ	Fluorodifen	NBD- Cl
	Ρίζα	0,09	0,3	0,1	0	0
Μετά από 48 ώρες καταπόνησης των φυτών						
<i>P. vulgaris</i>	Φύλλα	2,3	7,2	0,6	0	4,4
	Βλαστός	9,3	0,2	2,6	0	0
	Ρίζα	17,6	92,5	3,3	2,5	0
<i>G. max</i>	Φύλλα	6,2	19,9	24,6	0	0
	Βλαστός	12,9	28,7	15,7	0	0
	Ρίζα	14	16,7	69,1	0	0
Σπόροι						
<i>P. vulgaris</i>	Σπόροι	1,6	0,1	0,54	0,05	5,2
<i>G. max</i>	Σπόροι	1,1	0,5	0,49	0,06	2,9



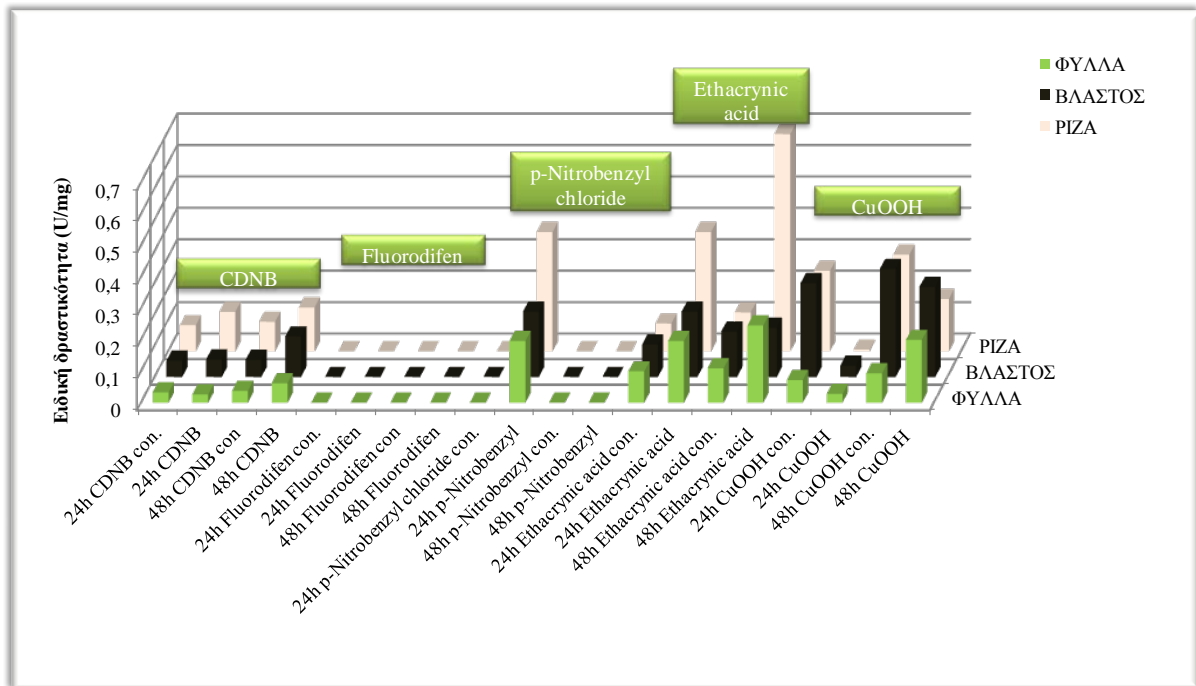
Σχήμα 5.6. Διάγραμμα που απεικονίζει την ειδική δραστηριότητα (U/mg) των GSTs έναντι των υποστρωμάτων CDNB, CuOOH, εθακρινικό οξύ, fluorodifen και NBD-Cl, για κάθε φυτικό μέρος του φυτού *P. vulgaris*, για τα φυτά μάρτυρες και τα καταπονημένα. Όπου 24h CDNB con.: η ειδική δραστηριότητα ως προς το CDNB για το φυτό-μάρτυρα 24 ωρών και 24h CDNB: η ειδική δραστηριότητα ως προς το CDNB για το καταπονημένο φυτό 24 ωρών, αντίστοιχα ακολουθούν και τα άλλα δείγματα.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.4 για τα φυτά μάρτυρες *G. max* των 24 ωρών, η δραστηριότητα GST φαίνεται να είναι υψηλότερη στη ρίζα σε σχέση με τα άλλα φυτικά μέρη, ενώ κανένα δεν φαίνεται να παρουσιάζει δραστηριότητα, ως προς το fluorodifen και π-νιτροβενζυλοχλωρίδιο. Όλα τα φυτικά μέρη αυτών των φυτών μαρτύρων, παρουσίασαν υψηλή δράση υπεροξειδάσης, όπως και τα φυτικά μέρη των φυτών μαρτύρων *P. vulgaris*. Κατόπιν 24 ωρών καταπόνησης βρέθηκαν τα φυτά της σόγιας *G. max*, να παρουσιάζουν υψηλή δραστηριότητα με το π-νιτροβενζυλοχλωρίδιο, να τριπλασιάζεται η δραστηριότητα ως προς το εθακρινικό, ενώ μειώθηκε αισθητά η δράση υπεροξειδάσης. Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι η καταπόνηση με βαρέα μέταλλα, επηρέασε περισσότερο το φυτό *G.max* σε σχέση με το *P. vulgaris*.

Μετά τις 48 ώρες καταπόνησης παρατηρήθηκε πάλι αύξηση της δραστηριότητας της GST του φυτού *G. max*, ως προς το π-νιτροβενζυλοχλωρίδιο και μείωση ως προς τη

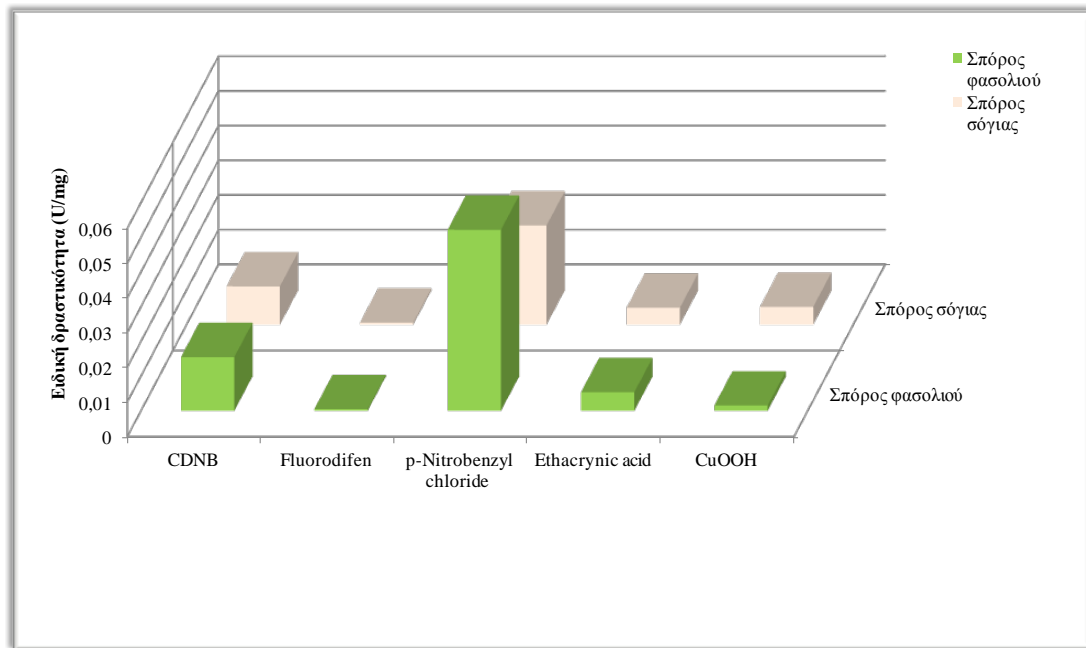
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

δράση υπεροξειδάσης, σε σχέση με τους μάρτυρες. Αντίθετα, τα φυτά *P. vulgaris* παρουσίασαν υψηλότερη δράση υπεροξειδάσης, σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες.



Σχήμα 5.7. Διάγραμμα που απεικονίζει την ειδική δραστηριότητα (U/mg) των GSTs έναντι των υποστρωμάτων CDNB, CuOOH, εθακρινικό οξύ, fluorodifen και NBD-Cl, για κάθε φυτικό μέρος του φυτού *G. max* για τα φυτά μάρτυρες και τα καταπονημένα. . Όπου 24h CDNB con.: η ειδική δραστηριότητα ως προς το CDNB για το φυτό-μάρτυρα 24 ωρών και 24h CDNB: η ειδική δραστηριότητα ως προς το CDNB για το καταπονημένο 24 ωρών, αντίστοιχα ακολουθούν και τα άλλα δείγματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5



Σχήμα 5.8. Διάγραμμα που απεικονίζει την ειδική δραστηριότητα (U/mg) των υποστρωμάτων CDNB, CuOOH, εθακρινικό οξύ, fluorodifen και NBD-Cl, για τους σπόρους των *P. vulgaris* και *G. max*.

Πίνακας 5.5. Η αύξηση που παρατηρήθηκε στην ειδική δραστηριότητα των καταπονημένων φυτών των 48 ωρών, σε σχέση με τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες.

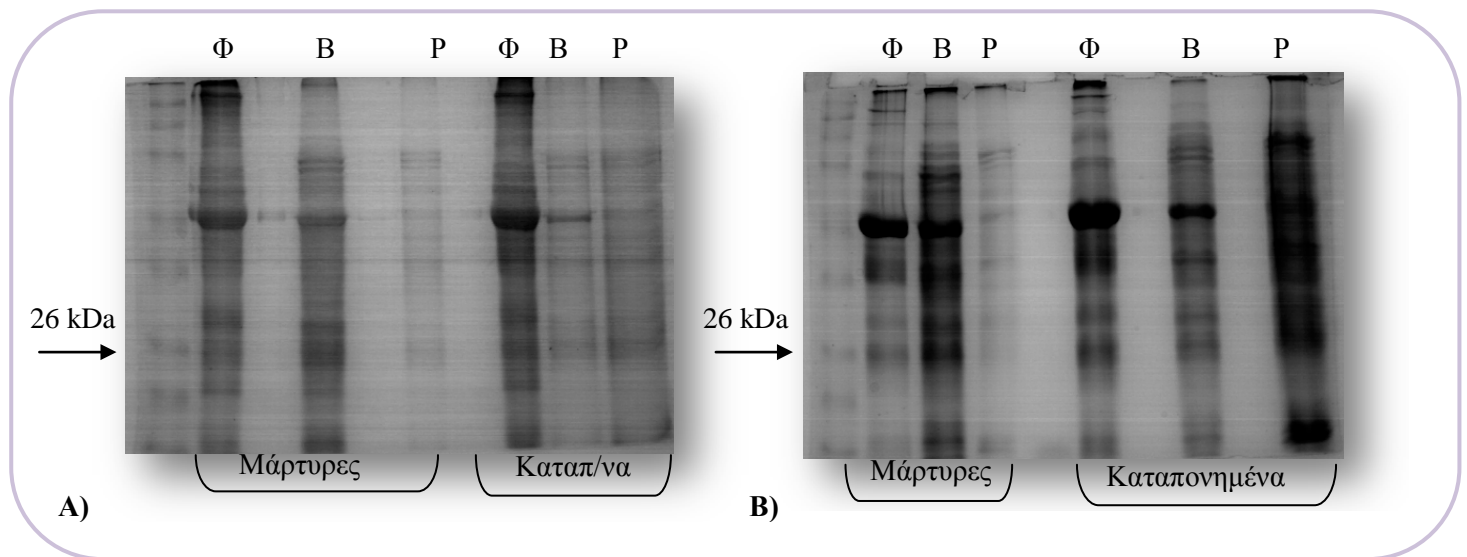
ΦΥΤΑ	CDNB	CuOOH	Fluorodifen	Ethacrynic acid	NBD-Cl
<i>P. vulgaris</i>					
Φύλλα	1,4 φορές	2,8 φορές	-	1,4 φορές	1,3 φορές
Βλαστός	2,1 φορές	1,1 φορές	-	-	-
Ρίζα	2,3 φορές	3,2 φορές	*	-	-
<i>G. max</i>					
Φύλλα	1,7 φορές	2,1 φορές	-	2,2 φορές	-
Βλαστός	2,3 φορές	-	-	1,08 φορές	-
Ρίζα	1,5 φορές	-	-	5,6 φορές	-

* Τα φυτά μάρτυρες δεν έδειξαν καθόλου δραστηριότητα, ενώ τα καταπονημένα 48 ωρών παρουσίασαν ειδική δραστηριότητα 0,025 U/mg.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

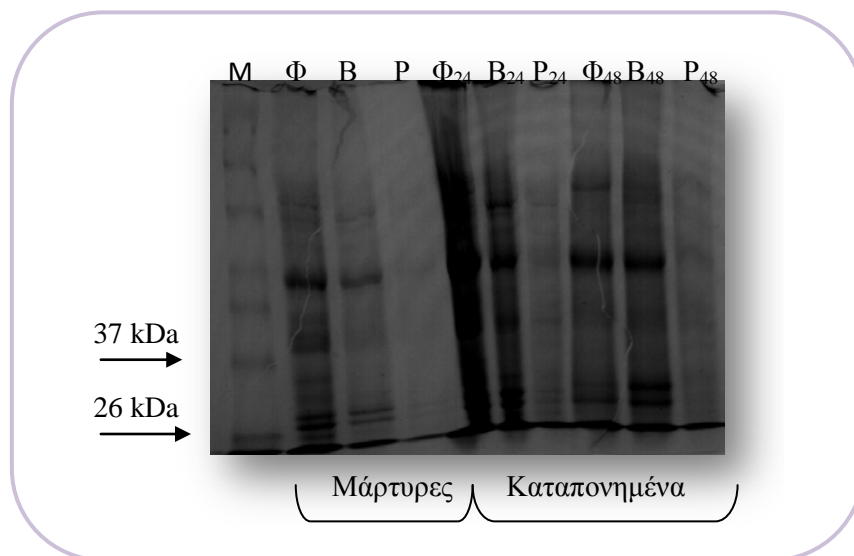
Η μεγαλύτερη δραστικότητα GST ως προς το υπόστρωμα CDNB, παρατηρήθηκε και στα δύο φυτά μετά τις 48 ώρες καταπόνησης, παρουσιάζοντας αύξηση από 1,4 έως 2,3-φορές.

Επίσης πραγματοποιήθηκαν ηλεκτροφορήσεις των φυτικών εκχυλισμάτων κάτω από συνθήκες μετουσίωσης οι οποίες φαίνονται στα Σχήματα 5.9 και 5.10 για το φασόλι και τη σόγια, αντίστοιχα.



Σχήμα 5.9. Α. Πρωτεϊνικό αποτύπωμα των φυτικών μερών του φυτού *P.vulgaris* για τις 24 ώρες, για τα φυτά μάρτυρες και τα καταπονημένα. Όπου Φ: φύλλα, Β: βλαστός και Ρ: ρίζα Β. Πρωτεϊνικό αποτύπωμα των φυτικών μερών του φυτού *P.vulgaris* για τις 48 ώρες, για τα φυτά μάρτυρες και τα καταπονημένα. Όπου Φ: φύλλα, Β: βλαστός και Ρ: ρίζα. Ως δείκτης χρησιμοποιήθηκε ο Prestained Protein Ladder (Invitrogen).

Όπως φαίνεται στο παραπάνω πρωτεϊνικό αποτύπωμα Α., δεν παρατηρούνται διαφορές στις ζώνες που αντιστοιχούν στις GSTs, αυτό βέβαια επαληθεύεται και με την ειδική δραστικότητα των υποστρωμάτων (Πίνακας 5.3). Στο πρωτεϊνικό αποτύπωμα Β. που αφορά στα φυτά καταπόνησης για 48 ώρες παρατηρείται πιο έντονη ζώνη στα φύλλα και στη ρίζα, ενώ στο βλαστό δεν είναι τόσο εμφανές. Βέβαια οι παρατηρήσεις αυτές επαληθεύονται σύμφωνα με τους Πίνακες 5.3. και 5.4., αφού παρατηρείται αύξηση της ειδικής δραστικότητας για όλα τα υποστρώματα και για τα τρία μέρη των φυτών.



Σχήμα 5.10. Πρωτεϊνικό αποτύπωμα των φυτικών μερών του φυτού *G.max*, για τα φυτά μάρτυρες για 48 ώρες και για τα καταπονημένα φυτά για 24 και 48 ώρες. Όπου Φ: φύλλα, Β: βλαστός και Ρ: ρίζα. Ως δείκτης χρησιμοποιήθηκε ο Prestained Protein Ladder (Invitrogen).

Στο πρωτεϊνικό αποτύπωμα του Σχήματος 5.10. που αφορά στα φυτά *G.max* 48 ωρών, παρατηρείται ελαφρώς πιο έντονη ζώνη στο βλαστό (δεν είναι τόσο εμφανές), ενώ δεν αντικατοπτρίζεται η αύξηση της ειδικής δραστηριότητας ως προς το CDNB (Πίνακας 5.4) για τα φύλλα και τη ρίζα. Σε γενικές γραμμές και για τα δύο φυτά *P. vulgaris* και *G. max*, δεν είναι τόσο εμφανείς στα πρωτεϊνικά αποτυπώματα, οι διαφορές της έκφρασης των GSTs, μεταξύ των μαρτύρων και των καταπονημένων φυτικών μερών.

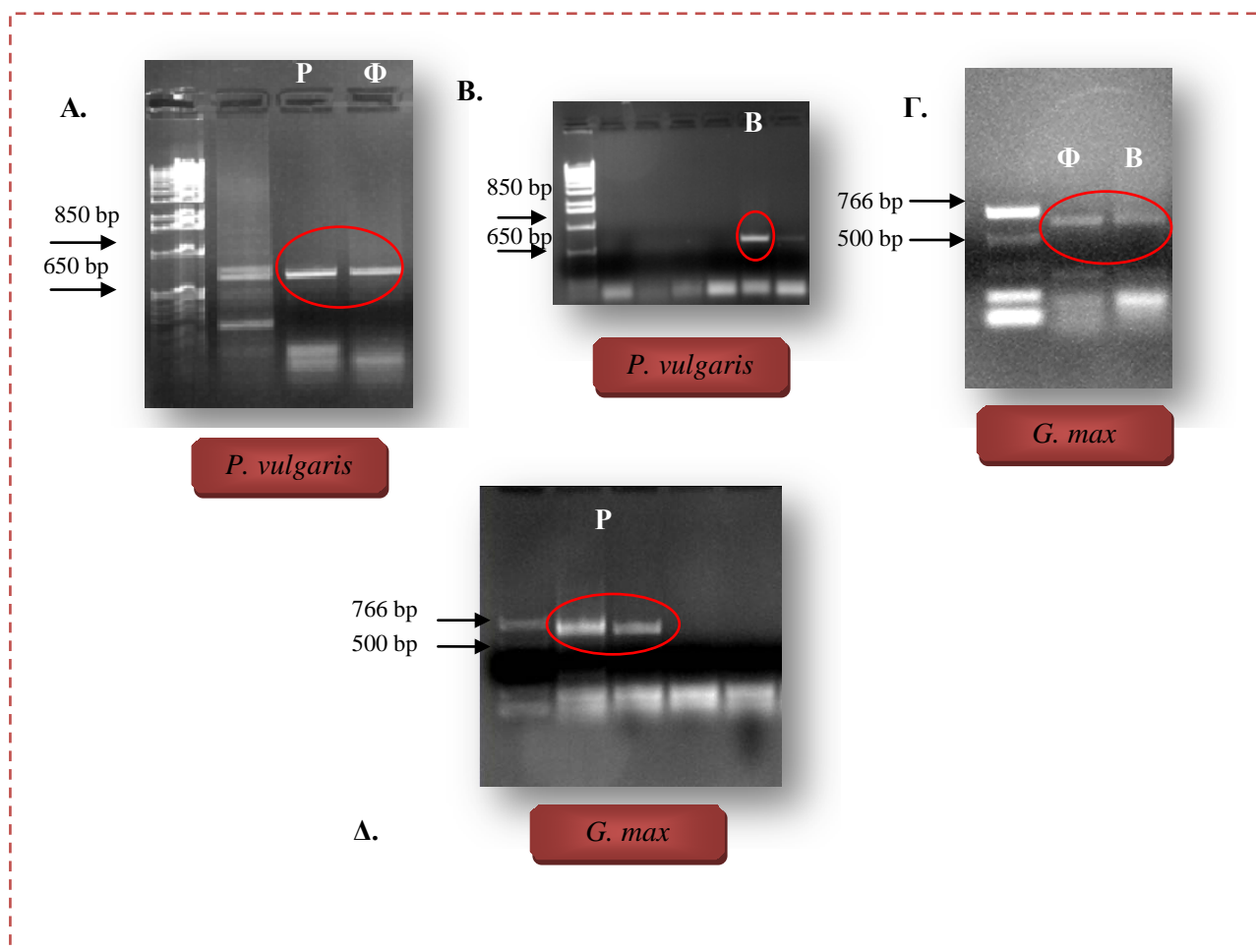
5.4.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΚΑΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ cDNA ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ

Για τη δημιουργία cDNA βιβλιοθήκης επιλέχθηκαν τα δείγματα από τα καταπονημένα φυτά 48 ωρών, και έτσι σε αυτά πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA (Σχήμα 5.12.A). Στη συνέχεια τα υψηλής καθαρότητας δείγματα RNA αφού υπέστησαν επεξεργασία με DNase, χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία cDNA

βιβλιοθήκης. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση σε πλασμίδιο pEXP5 CT/TA-TOPO[®]

5.4.3. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ GSTS ΜΕ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΕΚΦΥΛΙΣΜΕΝΟΥΣ ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΓΙΑ ΤΑ ΙΣΟΕΝΖΥΜΑ ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΟΝ ΦΟΡΕΑ pEXP-5 CT/TA-TOPO[®]

Για την ενίσχυση των πιθανών GST γονιδίων, πραγματοποιήθηκε παραλλαγή της Touchdown PCR (§ 5.3.2.5) έχοντας ως μήτρα το cDNA των καταπονημένων για 48 ώρες φυτών *P. vulgaris* και *G. max*. Στην παράγραφο 5.3.2.5. περιγράφονται αναλυτικά οι συνθήκες της PCR αντίδρασης και οι πολυμορφικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν. Στο Σχήμα 5.11 απεικονίζονται τα προϊόντα της αντίδρασης PCR, για κάθε δείγμα.



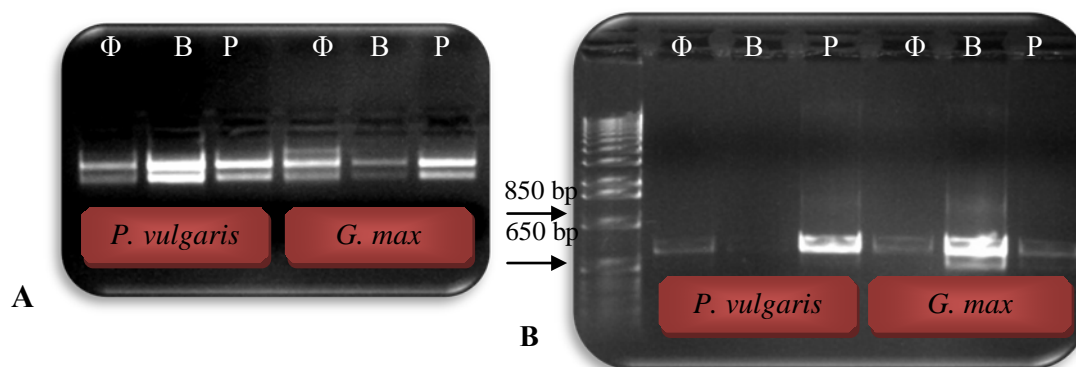
Σχήμα 5.11. Α. Τα προϊόντα της PCR αντίδρασης προήλθαν από το cDNA της ρίζας και των φύλλων του *P. vulgaris*. Β. Το προϊόν της PCR αντίδρασης προήλθε από το cDNA του βλαστού του *P. vulgaris*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

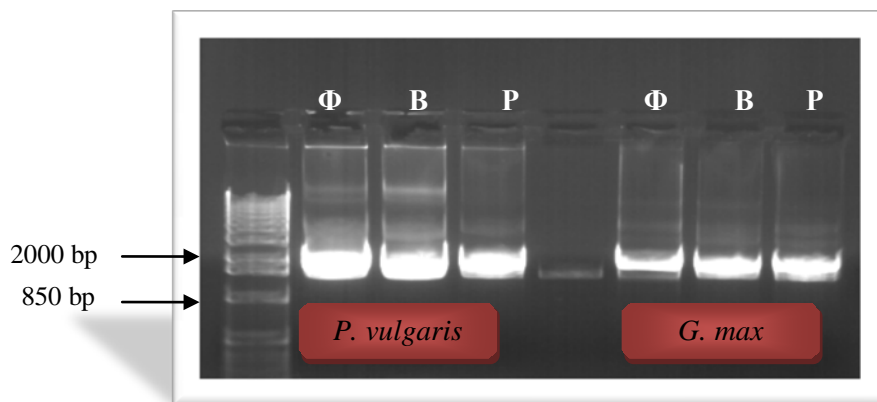
Ως δείκτης χρησιμοποιήθηκε ο 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Γ. Τα προϊόντα της PCR αντίδρασης προήλθαν από το cDNA του βλαστού και των φύλλων του φυτού *G. max*. Δ. Το προϊόν της PCR αντίδρασης προήλθε από το cDNA της ρίζας του φυτού *G. max*. Ως δείκτης χρησιμοποιήθηκε ο 1 PCR Marker (Biolabs).

Κατόπιν της PCR αντίδρασης, απομονώθηκαν οι ζώνες που βρίσκονταν μεταξύ 600-700 bp, με το gel extraction kit (Quiagen) (Σχήμα 5.12.B). Στην περίπτωση του βλαστού του *P. vulgaris* πραγματοποιήθηκε επιπλέον ενίσχυση του προϊόντος με PCR αντίδραση (§ 5.3.2.6).

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε εισαγωγή των πιθανών GST γονιδίων στον εκφραστικό T7 πλασμιδιακό φορέα pEXP-5 CT/TA-TOPO[®] και μετασχηματισμός των κυττάρων *E. coli* TOP10 με το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο. Απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA κάθε δείγματος (Σχήμα 5.13) και ακολούθησε *in vitro* κατευθυνόμενη εξέλιξη (*DNA shuffling*).



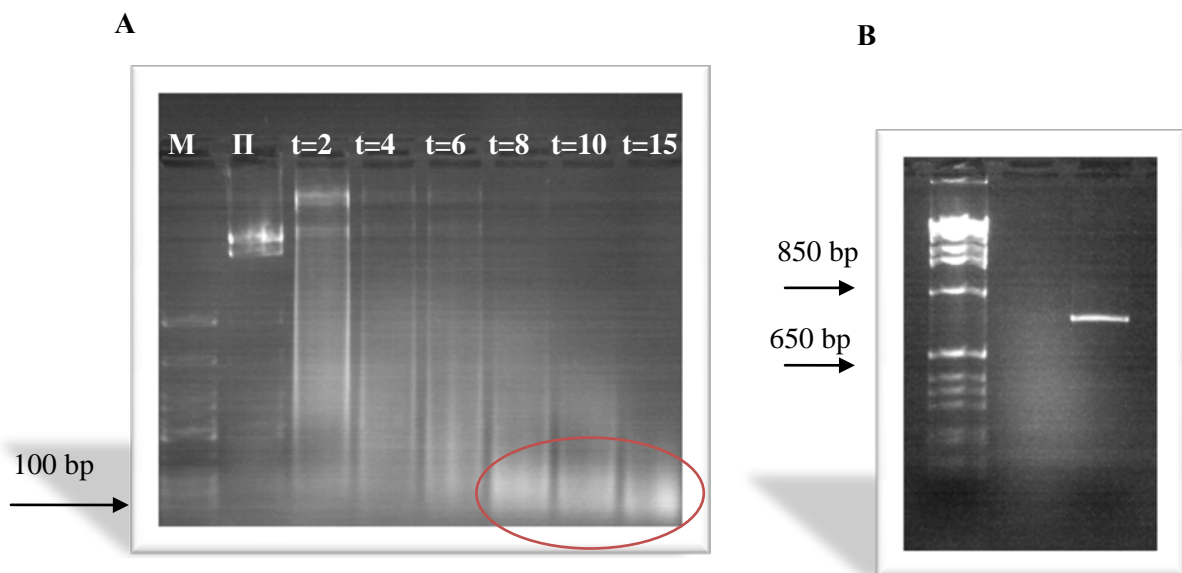
Σχήμα 5.12. Α. Απομόνωση RNA από τα καταπονημένα φυτά 48 ωρών *P. vulgaris* και *G. max* Β. Προϊόντα αντίδρασης PCR με πολυμορφικούς εκκινητές από τις cDNA βιβλιοθήκες των καταπονημένων (48 ωρών) φυτών *P.vulgaris* και *G.max*, μετά από επεξεργασία με gel extraction kit. Όπου Φ: φύλλα, Β: βλαστός και Ρ: ρίζα. Ως δείκτης χρησιμοποιήθηκε ο 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).



Σχήμα 5.13. Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA των GST γονιδίων από το φυτό *P. vulgaris* και *G. max*, όπου Φ: φύλλα, Β: βλαστός και Ρ: ρίζα. Ως δείκτης χρησιμοποιήθηκε ο 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

5.4.4. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ DNA SHUFFLING

Για το DNA *shuffling*, στη φάση της DNases (ώστε να προκύψουν μικρά κομμάτια DNA, 50-100 bp), δούλεψαν καλύτερα οι χρόνοι $t=8$ έως 15 λεπτά (Σχήμα 5.14.A). Έτσι τα δείγματα $t=8$, $t=10$ και $t=15$ χρησιμοποιήθηκαν για την PCR επανασύνδεσης των κομματιών (§ 5.3.2.8) (Σχήμα 5.14.B).



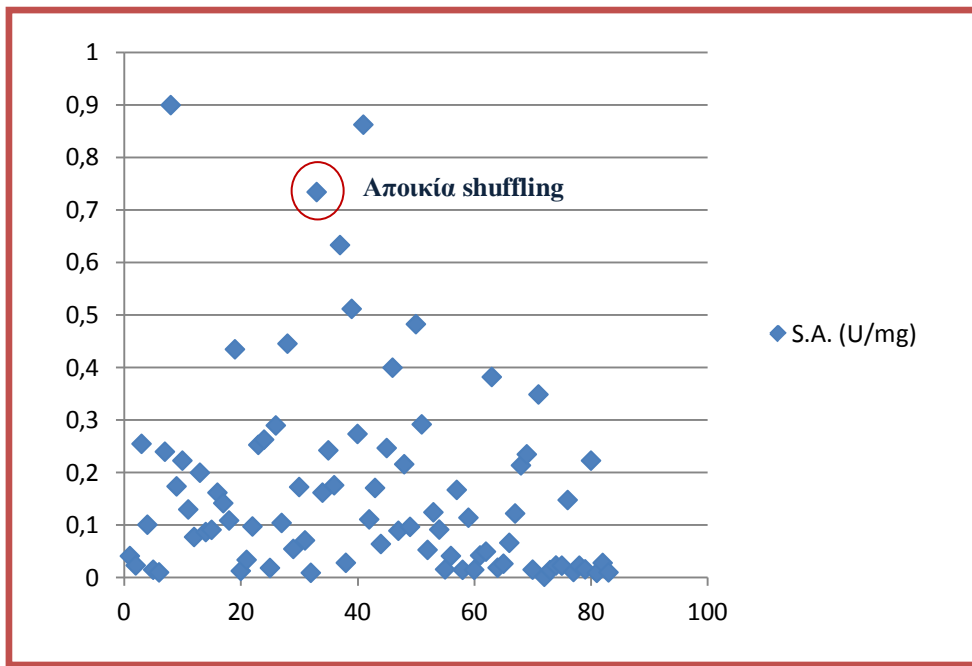
Σχήμα 5.14. Α. Επεξεργασία του πλασμιδιακού DNA με DNase με αδρανοποίηση της δράσης της, στους χρόνους $t=2-15$ λεπτά. Μ: μάρτυρας 100 bp DNA Ladder (Biolabs), Π: πλασμιδιακό DNA Β. Προϊόν της αντίδρασης PCR επανασύνδεσης των κομματιών $t=8-15$ λεπτά. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο 1 kb ladder (Invitrogen).

Το προϊόν της αντίδρασης, κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO® και ακολούθησε μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων *E. coli* TOP10, με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Στη συνέχεια τα δεκτικά κύτταρα, στρώθηκαν σε τρυβλία με αντιβιοτικό επιλογής την αμπικιλίνη και ακολούθησε σάρωση των αποικιών που αναπτύχθηκαν.

5.4.5. ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΗΣ ΒΕΛΤΙΣΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ *PnGmGSTUG* ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Πραγματοποιήθηκε σάρωση 180 αποικιών, ως προς την ειδική δραστικότητα με το σύστημα GSH/CDNB. Από τις 180 που μελετήθηκαν, οι 83 παρουσίασαν θετική ειδική δραστικότητα και στο Σχήμα 5.15 φαίνεται η κατανομή τους. Η αποικία η οποία επιλέχθηκε (αποικία shuffling) και αποτελεί το νέο ένζυμο παρουσίασε ειδική δραστικότητα 0,734 U/mg. Υπήρξαν άλλες δύο αποικίες με μεγαλύτερη τιμή ειδικής δραστικότητας αλλά κατόπιν αλληλούχισης διαπιστώθηκε υψηλή ομολογία με το ένζυμο *PnGSTU2-2* το οποίο είχε ήδη μελετηθεί (Κεφάλαιο 4). Στη συνέχεια εκφράστηκε το νέο ένζυμο και απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης (§ 2.2.7) και με kit απομόνωσης πλασμιδιακού DNA για να σταλεί για αλληλούχιση. Στο Σχήμα 5.16, φαίνεται η νουκλεοτιδική αλληλούχιση του νέου ενζύμου, με άλλα φυτικά ένζυμα GST. Επίσης κατόπιν αναζήτησης ομολογίας αυτού του ενζύμου με άλλα μέσω του Blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), φαίνεται να παρουσιάζει 87% ομολογία, με τη GST από το φυτό *Medicago truncatula*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

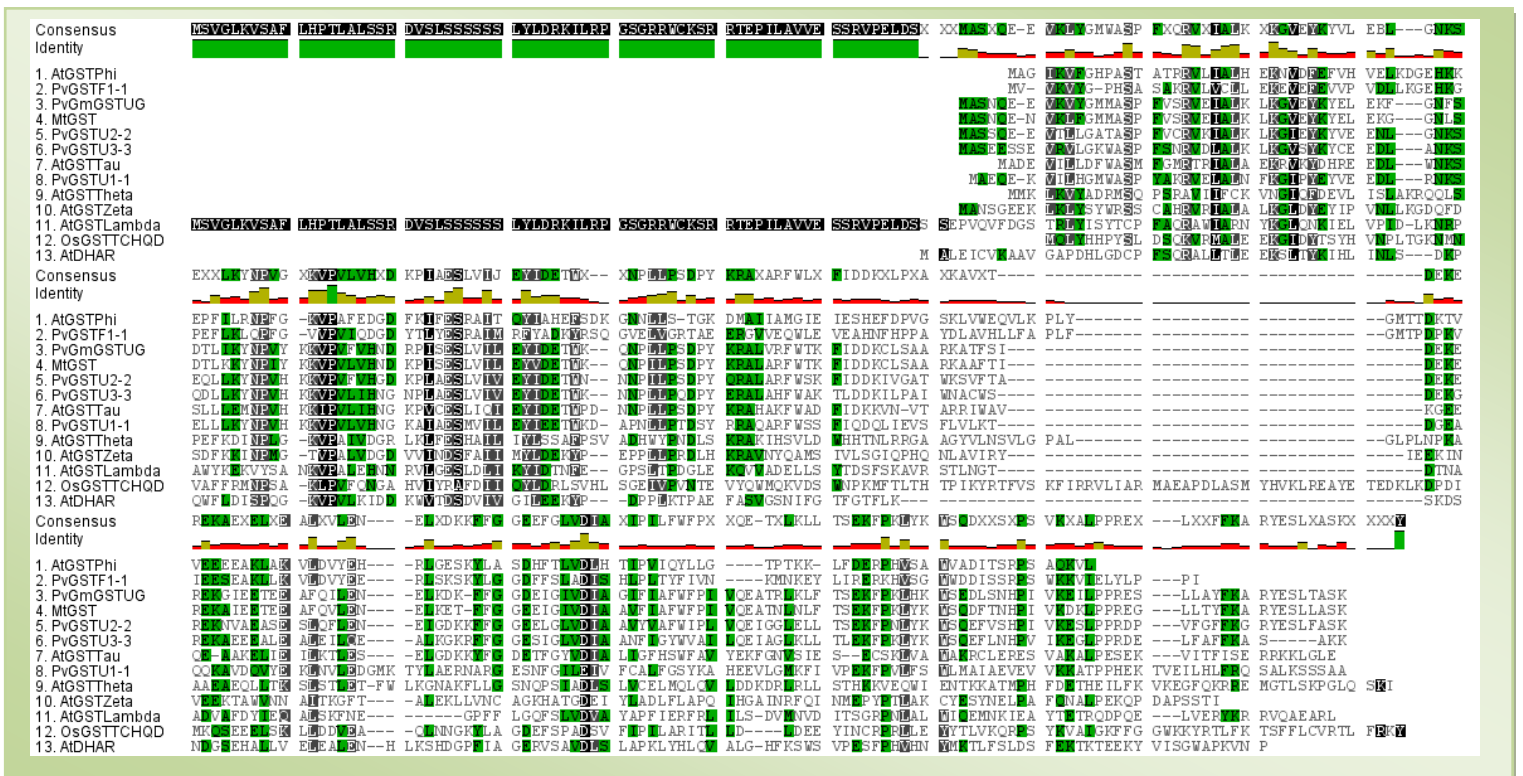


Σχήμα 5.15. Σάρωση των 83 αποικιών με θετική ειδική δραστηριότητα. Η αποικία η οποία επιλέχθηκε (απουκία shuffling) και αποτελεί το ένζυμο *PvGmGSTUG* επισημαίνεται με κύκλο και η ειδική δραστηριότητα της είναι 0,734 U/mg.

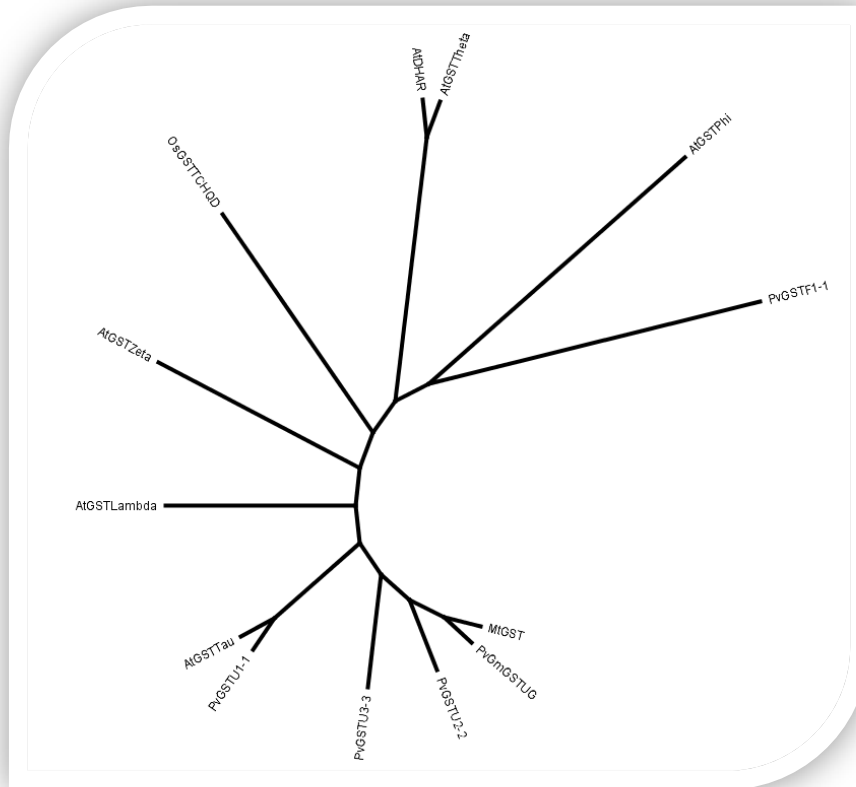


Σχήμα 5.16. Νουκλεοτιδική ευθυγράμμιση (ClustalW, Thompson et al., 1994) του ενζύμου *PvGmGSTUG* (GST1) με τα ένζυμα GST2: *Medicago truncatula* GST, XM_003623148.1, GST3: *Pinus brutia* GST, GU570446.1, GST4: *Glycine max* GST, NM_001251762.2, GST5: *Gossypium hirsutum* GST, EU074792.2, GST6: *Glycine soja*, GST, GQ265911.1. Οι συντηρημένες περιοχές είναι με 100% ομοιότητα, 80-100% ομοιότητα, 60-80% ομοιότητα, <60% ομοιότητα.

Κατόπιν αλληλούχησης, το αναγνωστικό πλαίσιο του ενζύμου βρέθηκε να αποτελείται από 672 bp, κωδικοποιώντας πολυπεπτιδίο των 224 αμινοξέων. Το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου είναι 26.088,08 Da, με θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο pI 5,80. Για την εύρεση της φυλογενετικής του σχέσης με άλλες GSTs, από γνωστές τάξεις (βάσεις δεδομένων κοινού), κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο πολικής μορφής μετά από πολλαπλή αλληλούχηση αμινοξέων (Σχήματα 5.17 και 5.18). Η αμινοξική αλληλούχηση και το φυλογενετικό δέντρο, δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας μέλη του φυτού *Arabidopsis thaliana* της οικογένειας GST (*AtGSTs*), λόγω το ότι οι *AtGSTs* έχουν χαρακτηριστεί με λεπτομέρεια και κάποιες από αυτές χρησιμοποιούνται ευρέως ως πρότυπα-ένζυμα στη βιολογία φυτών και στην έρευνα των μηχανισμών που απαντούν σε συνθήκες καταπόνησης (Dixon et al. 2009). Το νέο ένζυμο ομαδοποιήθηκε μαζί με τις GSTs της τ τάξης και ονομάστηκε *PvGmGSTUG*.



Σχήμα 5.17. Αμινοξική ευθυγράμμιση (ClustalW, Thompson et al. 1994) του ενζύμου *PvGmGSTUG* με αντιπροσωπευτικά μέλη από όλες τις γνωστές τάξεις: ϕ , τ , θ , ζ , λ , *DHAR* και *TCHQD*. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα Geneious v5.5 (Drummond et al., 2011). Οι συντηρημένες περιοχές είναι σκιασμένες, με ■ 100% ομοιότητα, ■ 80-100% ομοιότητα, ■ 60-80% ομοιότητα και λιγότερο από 60% □.



Σχήμα 5.18. Φυλογενετική ανάλυση του ενζύμου *PvGmGSTUG*. Το φυλογενετικό δέντρο πολικής μορφής κατασκευάστηκε με τη μέθοδο Neighbour-Joining, από το πρόγραμμα Geneious v5.5 (Drummond et al., 2011) επιλέγοντας τα ισοένζυμα και αντιπροσωπευτικά μέλη από όλες τις γνωστές τάξεις: ϕ , τ , θ , ζ , λ , *DHAR* και *TCHQD*. Προέκυψε κατόπιν αμινοξικής αλληλουχίας χρησιμοποιώντας το ClustalW (ClustalW, Thompson et al. 1994). Οι αριθμοί πρόσβασης των αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν είναι: *AtGSTPhi* (*Arabidopsis thaliana* ϕ τάξη GST, NP_171792), *PvGSTF1-1* (*Phaseolus vulgaris* ϕ τάξη GST, AEX37999.1), *AtGSTTheta* (*Arabidopsis thaliana* θ τάξη GST, NP_198937), *At-DHAR* (*Arabidopsis thaliana* διϋδροασκορβική ρεδουκτάση, Q9FWR4), *AtGSTZeta* (*Arabidopsis thaliana* zeta class GST, Q9ZVQ3), *AtGSTTau* (*Arabidopsis thaliana* τ τάξη GST, AAS76278), *PvGSTU1-1* (*Phaseolus vulgaris* τ τάξη GST, AEX38000.1), *PvGSTU2-2* (*Phaseolus vulgaris* τ τάξη GST, AEX38001.1), *PvGSTU3-3* (*Phaseolus vulgaris* τ τάξη GST, δεν έχει καταχωρηθεί ακόμα), *MtGST* (*Medicago truncatula* τ τάξη GST, XP_003623196.1), *At-GSTLambda* (*Arabidopsis thaliana* λ τάξη GST, NP_191064), *OsGSTTCHQD* (*Oriza sativa* *TCHQD* τάξη, CAZ68077).

5.4.6. ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΟΡΦΗΣ *PvGmGSTUG*

Για την έκφραση του ενζύμου *PvGmGSTUG* πραγματοποιήθηκε μετασηματισμός των κυττάρων *E. coli* BL21(DE3) με πλασμιδιακό DNA (αναλυτικότερα § 2.2.8) και

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

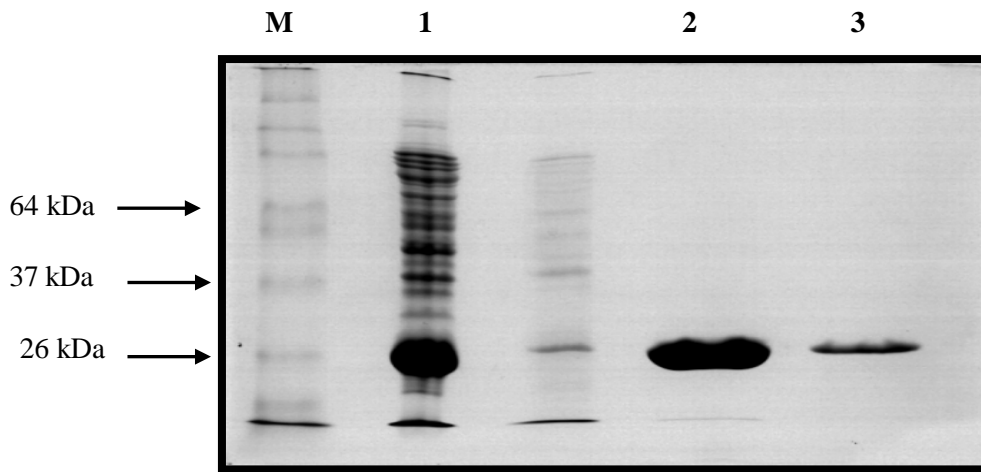
εν συνεχεία προχωρήσαμε στην έκφραση τους στους 37⁰C, σε θρεπτικό μέσο LB έχοντας ως αντιβιοτικό επιλογής την αμπικιλίνη (100 µg/mL). Το βιολογικό εκχύλισμα που προέκυψε μετά τη λύση των κυττάρων φορτώθηκε στην κολώνα χρωματογραφίας συγγένειας (§ 5.3.2.13). Στον πίνακα 5.6 φαίνονται τα επίπεδα έκφρασης των ισοενζύμων και η ειδική δραστηριότητα του βιολογικού εκχυλίσματος, πριν και μετά τη διαπίδυση.

Πίνακας 5.6. Επίπεδα έκφρασης του ενζύμου *PvGmGSTUG* και η ειδική δραστηριότητα του βιολογικού εκχυλίσματος, πριν και μετά τη διαπίδυση.

Ένζυμο <i>PvGmGSTUG</i>	g εκχυλίσματος/mL καλλιέργειας	Ειδική δραστηριότητα πριν τη διαπίδυση (U/mg)	Ειδική δραστηριότητα μετά τη διαπίδυση (U/mg)
Έκφραση IPTG	0,570/500	4,19	4,85

Το ένζυμο *PvGmGSTUG* καθαρίστηκε με χρωματογραφία συγγένειας και δεσμευτή την S-εξυλ GSH (δεν δεσμεύεται στον προσροφητή BES-GSH) (§ 5.3.2.13), με απόδοση περίπου 60%. Η καλύτερη έκλουση, είχε ειδική δραστηριότητα 14,65 U/mg και καθαρίστηκε 3-φορές. Στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS (§ 2.2.27) για να ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου (Σχήμα 5.19).

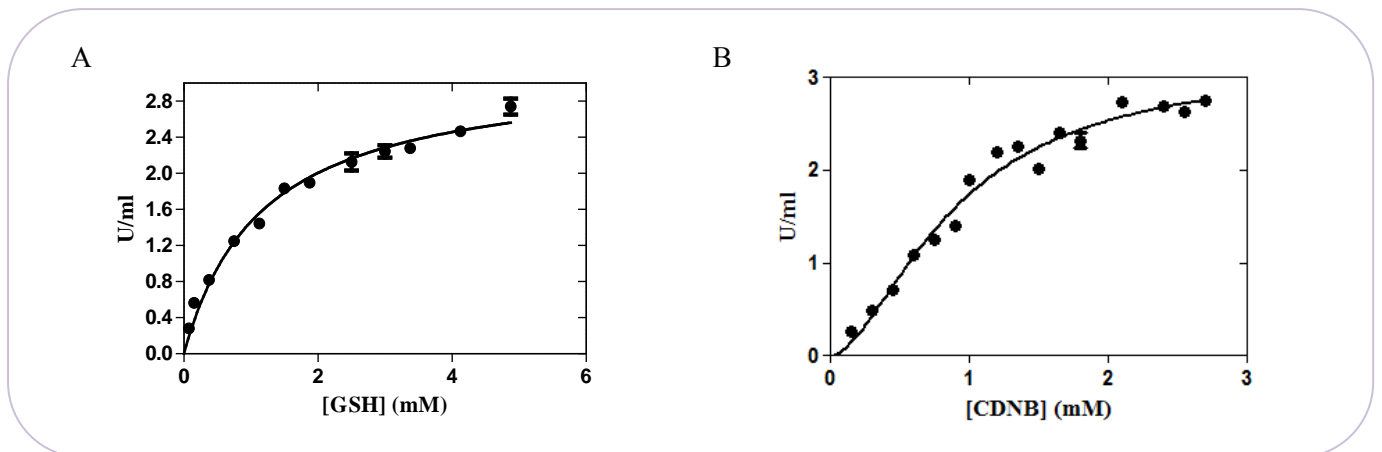
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5



Σχήμα 5.19. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (12,5 % w/v) παρουσία SDS, σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970). Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250. **M:** BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen), **1:** εκχύλισμα μετασχηματισμένων κυττάρων με το γονίδιο *PvGmGSTUG*, **2:** έκλουση 1 (E1), **3:** έκλουση 2 (E2).

5.4.7. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΜΟΡΦΗΣ *PvGmGSTUG* ΓΙΑ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ CDNB

Πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση για το υπόστρωμα CDNB και προσδιορίστηκαν οι παράμετροι k_{cat} και K_m σύμφωνα με την εξίσωση των Michaelis–Menten (Πίνακας 5.7).



Σχήμα 5.20. A. Κινητική ανάλυση του ενζύμου *PvGmGSTUG* με τη GSH ως μεταβλητό υπόστρωμα και το CDNB σε σταθερή συγκέντρωση 1mM. **B.** Κινητική ανάλυση του ενζύμου *PvGmGSTUG* με το CDNB ως μεταβλητό υπόστρωμα και τη GSH σε σταθερή συγκέντρωση 2,5 mM. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων.

Πίνακας 5.7. Κινητική ανάλυση του ενζύμου *PvGmGSTUG* για το σύστημα CDNB/GSH

	K_m (mM) (GSH)	k_{cat} (min^{-1}) (GSH)	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$) (GSH)
	$1,169 \pm 0,103$	$193,6 \pm 5,83$	$167,35 \pm 19,73$
<i>PvGmGSTUG</i>	$S_{0,5}$ (mM) (CDNB)	k_{cat} (min^{-1}) (CDNB)	n_H (CDNB)
	$0,89 \pm 0,06$	$198,7 \pm 9,5$	$1,7 \pm 0,15$

5.4.8. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΚΛΩΝΟΥ *PvGmGSTUG* ΩΣ ΠΡΟΣ ΠΙΘΑΝΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Το νέο αυτό ένζυμο GST σε καθαρή πλέον μορφή, χρησιμοποιήθηκε σε φωτομετρικές δοκιμές, ώστε να ελεγχθεί ως προς διαφορετικές δραστηριότητες, όπως η μεταφοράση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδάση εξαρτώμενη της GSH, η διϋδροασκορβική ρεδοουκτάση και η θειοτρανσφεράση. Από τα αποτελέσματα (Πίνακας 5.8) φαίνεται ότι η *PvGmGSTUG* καταλύει ένα μεγάλο εύρος αντιδράσεων. Από τις αρκετές αλογονωμένες αρωματικές ενώσεις που δοκιμάστηκαν: το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) και τα ανάλογα του: 1-βρωμο-2,4-δινιτροβενζόλιο (BDNB), 1-ιοδω-2,4-δινιτροβενζόλιο (IDNB), π-νιτροβενζυλοχλωρίδιο (pNBC) και 4-χλωρο-7-νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο, αποτέλεσαν αποδεκτά υποστρώματα. Το CDNB και το pNBC παρουσίασαν μεγαλύτερη ειδική δραστηριότητα από τα άλλα.

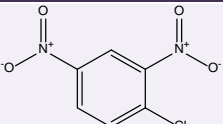
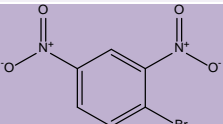
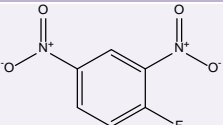
Επίσης εξετάστηκε για δράση υπεροξειδάσης εξαρτώμενης από τη γλουταθειόνη (GPX), χρησιμοποιώντας το υδροϋπεροξείδιο του κουμενίου, το τ-βουτυλο-υδροϋπεροξείδιο, το δι-δωδεκανικό υδροϋπεροξείδιο και το βενζοϊκό υδροϋπεροξείδιο, ως πιθανά υποστρώματα (Πίνακας 5.8). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το υδροϋπεροξείδιο του κουμενίου και το δι-δωδεκανικό υδροϋπεροξείδιο, είναι

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

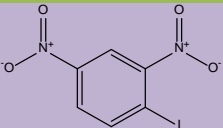
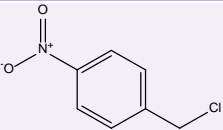
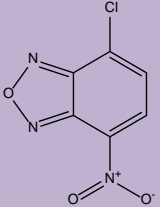
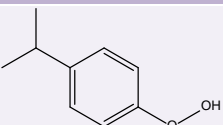
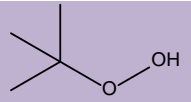
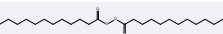
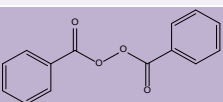
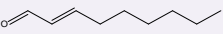
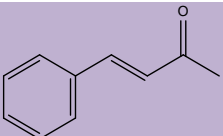
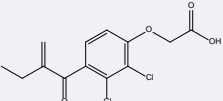
τα καλύτερα υποστρώματα, παρουσιάζοντας σχεδόν ίδια ειδική δραστηριότητα με το CDNB.

Επίσης παρουσίασε δραστηριότητα με το εθακρινικό οξύ και φάνηκε να καταλύει την αντίδραση προσθήκης τηςθειόλης της GSH, στον ηλεκτρονιόφιλο κεντρικό άνθρακα της ισοθειοκυανικής ομάδας (χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τον ισοθειοκυανικό αλλυλ-εστέρα και τον ισοθειοκυανικό φαινυλαιθυλ-εστέρα), σχηματίζοντας διθειοκαρβαμίδια [R-NH-C(=S)-SG] (Meyer et al. 1995). Φαίνεται ότι ο αλειφατικός ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας αποτέλεσε καλύτερο υπόστρωμα, από τον ισοθειοκυανικό φαινυλαιθυλ-εστέρα, παρουσιάζοντας αύξηση της ειδικής δραστηριότητας περίπου 4,5-φορές.

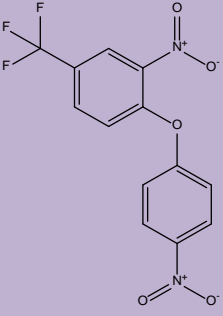
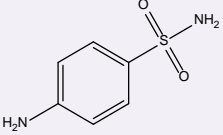
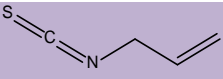
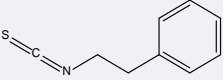
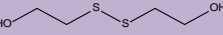
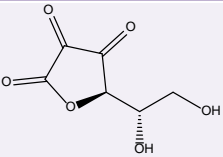
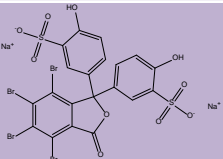
Πίνακας 5.8. Ειδική δραστηριότητα του ενζύμου *PvGmGSTUG* ως προς διαφορετικά υποστρώματα. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών επαναλήψεων, με απόκλιση λιγότερη του 5% για όλες τις περιπτώσεις.

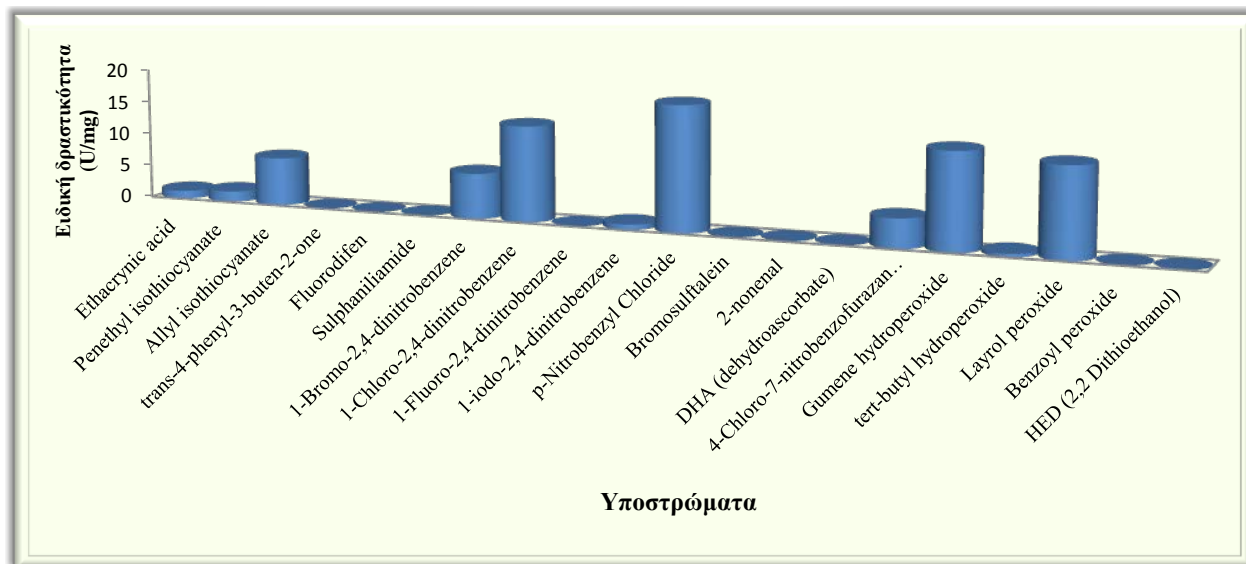
Υπόστρωμα	Δομή	Ειδική δραστηριότητα (U/mg)
		<i>PvGmGSTUG</i>
1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο		14,6
1-βρωμο-2,4-δινιτροβενζόλιο		6,9
1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο		0

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

1-ιοδω-2,4- δινιτροβενζόλιο		0,8
π-νιτροβενζυλ- χλωρίδιο		19,2
4-χλωρο-7- νιτροβενζο-2-οξο- 1,3-διαζόλιο		4,5
υδροϋπεροξειδίο του κουμενίου		14,8
τ-βουτυλο- υδροϋπεροξειδίο		0,5
δι-δωδεκανικο υδροϋπεροξειδίο		13,8
βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίο		0
trans-2-ενενάλη		0,07
trans-4- φαινυλβουτ-3-εν- 2-όνη		0
εθακρινικό οξύ		1,2

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Fluorodifen		0
σουλφαναμίδη		0
ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας		7,3
ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλ- εστέρας		1,6
2-2- διθειοδιαιθανόλη		0
διϋδροασκορβικό οξύ		0
βρωμοσουλφο- φθαλεΐνη		0



Σχήμα 5.21. Γραφική απεικόνιση της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου *PvGmGSTUG* ως προς διαφορετικά υποστρώματα.

5.4.9. ΣΑΡΩΣΗ 66 ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΥΡΕΣΗ ΤΥΧΟΝ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΜΟΡΦΗΣ *PvGmGSTUG*

Για τον υπολογισμό της (%) υπολειπόμενης δραστηριότητας του ενζύμου έναντι 66 φυτοπροστατευτικών προϊόντων, (ζιζανιοκτόνων, εντομοκτόνων και μυκητοκτόνων, οι δομές τους φαίνονται στο παράρτημα), προσδιορίστηκε η δραστηριότητα τους πριν και μετά την προσθήκη του πιθανού αναστολέα (§ 5.3.2.14). Στον Πίνακα 5.9 φαίνεται η (%) υπολειπόμενη δραστηριότητα και στο Σχήμα 5.22 απεικονίζεται η επίδραση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Κατά τη μελέτη αυτή προέκυψε ότι η ομάδα των οργανοχλωριωμένων και των στρομπιλουρινών, αποτελούν ισχυρούς αναστολείς με >50% αναστολή, ενώ παρουσίασαν ισχυρή αναστολή τα μυκητοκτόνα prothioconazole, zodium zoxide και το tolclofosmethyl.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Πίνακας 5.9. Υπολειπόμενη δραστικότητα (%) του ενζύμου *PvGmGSTUG* κάτω από την επίδραση ζιζανιοκτόνων, εντομοκτόνων και μυκητοκτόνων. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών επαναλήψεων, με απόκλιση λιγότερη του 5% για όλες τις περιπτώσεις. Απουσία ξενοβιοτικού η ενζυμική δραστικότητα θεωρήθηκε 100%.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ		ΟΝΟΜΑΣΙΑ	(%) ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΟΡΦΗΣ <i>PvGmGSTUG</i>
Ζιζανιοκτόνα	Χλωροακεταμίδια	Alachlor	85,5
		Metolachlor	92,9
	Τριαζίνες	Atrazine	95,5
		Metribuzin	101,2
		Diuron	81,1
		Terbutylazine	107,8
	Αρυλοξυφαινοξυπροπιονικά οξέα	Fluaziprop-p-butyl	74,5
	Διφαινυλικοί αιθέρες	Fluorodifen	107
		Desmedipham	106,1
		Phenmedipham	106,6
Εντομοκτόνα	Οργανοχλωριωμένα	Aldrin	42,9

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

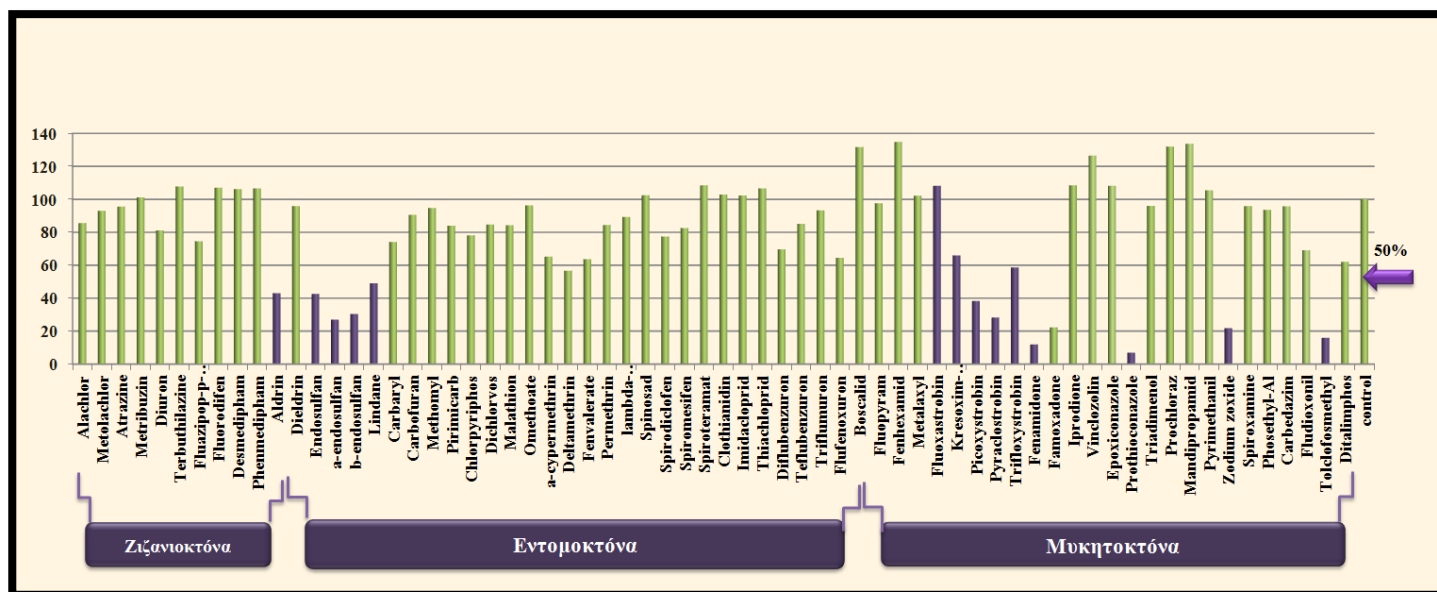
ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ		ΟΝΟΜΑΣΙΑ	(%) ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΟΡΦΗΣ <i>PvGmGSTUG</i>
		Dieldrin	95,9
		Endosulfan	42,5
		α-endosulfan	26,9
		β-endosulfan	30,4
		Lindane	49
	Καρβαμικά	Carbaryl	74,1
		Carbofuran	90,6
		Methomyl	94,8
		Pirimicarb	84
	Οργανοφωσφορικά	Chlorpyrifos	78,
		Dichlorvos	84,7
		Malathion	84,3
		Omethoate	96,3
		Chlorpyrifos	78
	Πυρεθροειδή	α-cypermethrin	65,1
		Deltamethrin	56,7
		Fenvalerate	63,7
		Permethrin	84,4
		lambda-cyhalothrin	89,2

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ		ΟΝΟΜΑΣΙΑ	(%) ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΟΡΦΗΣ <i>PvGmGSTUG</i>
	Σπινοσύνες	Spinosad	102,5
	Εστέρες τετρωνικού οξέος	Spirodiclofen	77,3
		Spiromesifen	82,6
		Spiroteramat	108,5
	Νεοκοτινοειδή	Clothianidin	102,8
		Imidacloprid	102,4
Thiachloprid		106,6	
Εντομοκτόνα	Φαινυλακυλουρίες	Diflubenzuron	69,7
		Teflubenzuron	85,1
		Triflumuron	93,3
		Flufenoxuron	64,4
Μυκητοκτόνα	Ανιλίδια	Boscalid	131,6
		Metalaxyl	102,1
		Fenhexamid	134,8
	Στρομπιλουρίνες	Fluoxastrobin	108,2
		Kresoxim-methyl	66
		Picoxystrobin	38,3
		Pyraclostrobin	28,3
	Trifloxystrobin	58,7	

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ	ΟΝΟΜΑΣΙΑ	(%) ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΟΡΦΗΣ <i>PvGmGSTUG</i>	
	Fenamidone	11,9	
	Famoxadone	22,3	
	Δικαρβοξιμίδια	Iprodione	108,4
		Vinclozolin	126,6
	Τριαζόλια	Epoxiconazole	108,2
		Prothioconazole	6,9
		Triadimenol	96
	Ιμιδαζόλιο	Prochloraz	131,9
	Αμίδιο	Mandipropamid	133,6
	Ανιλικο-πυριμιδίνη	Pyrimethanil	105,4
	Βενζαμίδιο	Zodium zoxide	21,8
		Fluopyram	97,6
	Σπироκεταλαμίνη	Spiroxamine	95,9
	Φωσφονικό άλας	Fosetyl-Al	93,6
	Βενζιμιδαζόλιο	Carbedazim	95,7
	Φαινυλοπυρρολικό	Fludioxonil	69,1
	Οργανοφωσφορικοί εστέρες	Tolclofosmethyl	15,9
Ditalimphos		62	

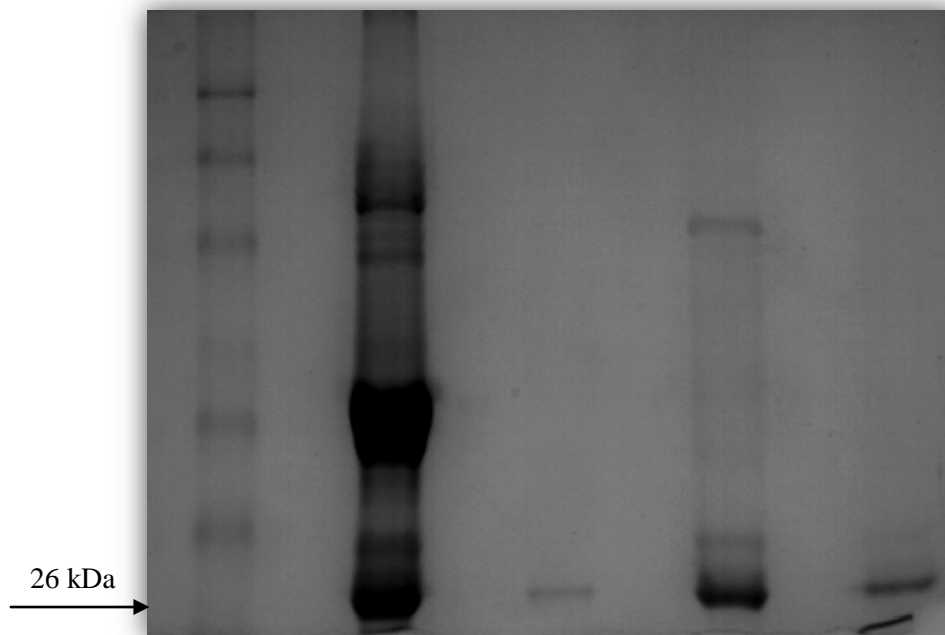


Σχήμα 5.22. Μελέτη της υπολειπόμενης δραστηριότητας (%) του ενζύμου *PnGmGSTUG* υπό την επίδραση φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Οι μετρήσεις έγιναν με το σύστημα GSH-CDNB εις τριπλούν.

5.4.10. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ENZYΜΩΝ *GSTs* ΑΠΟ ΤΟ ΦΥΤΟ *P. vulgaris* ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΚΑΙ ΔΕΣΜΕΥΤΗ ΤΗΝ ΧΡΩΣΤΙΚΗ CIBACRON BLUE 3GA

Η χρωματογραφία συγγένειας με τη χρωστική Cibacron blue 3GA, αποτέλεσε ικανοποιητική μέθοδο καθαρισμού φυτικών GSTs, καθώς δεν φαίνεται βιβλιογραφικά τουλάχιστον να έχουν καθαριστεί φυτικές GSTs (πρωτογενές εκχύλισμα) με χρωματογραφία συγγένειας, έχοντας ως δεσμευτή χρωστική. Οι εκλούσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν 1) με 4mL ρυθμιστικό διάλυμα KH_2PO_4 συγκέντρωσης 20 mM, pH =7 με 20 mM γλουταθειόνης, 2) με 4 mL ρυθμιστικού διαλύματος KH_2PO_4 συγκέντρωσης 20 mM, pH=8,5 με 10 mM γλουταθειόνης και 3)

με 4 mL ρυθμιστικού διαλύματος KH_2PO_4 συγκέντρωσης 20 mM, pH=8,5 με 20 mM γλουταθειόνης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η απόδοση της χρωματογραφίας ήταν 91% και το εκχύλισμα καθαρίστηκε 50-φορές. Η ειδική δραστηριότητα της καλύτερης έκλουσης (2) ήταν 1,3 U/mg, ενώ του πρωτογενές εκχυλίσματος ήταν 0,026 U/mg. Στο Σχήμα 5.23. απεικονίζονται οι τρεις διαφορετικές εκλούσεις κατόπιν ηλεκτροφόρησης κάτω από συνθήκες μετουσίωσης SDS-PAGE. Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί και αξιοποιηθεί περαιτέρω για την πρωτεωμική ανάλυση και τον χαρακτηρισμό νέων GSTs.



Σχήμα 5.23. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (12,5 % w/v) παρουσία SDS, σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970). Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250. **M:** BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen), **1:** πρωτογενές εκχύλισμα από το σπόρους του φυτού *P. vulgaris*, **2:** έκλουση 1 (E1), **3:** έκλουση 2 (E2), **4:** έκλουση 3 (E3). Όπου, E1: έκλουση με ρυθμιστικό διάλυμα KH_2PO_4 συγκέντρωσης 20 mM, pH =7 με 20 mM γλουταθειόνης, E2: έκλουση με ρυθμιστικό διάλυμα KH_2PO_4 συγκέντρωσης 20 mM, pH=8,5 με 10 mM γλουταθειόνης και E3: έκλουση με ρυθμιστικό διάλυμα KH_2PO_4 συγκέντρωσης 20 mM, pH=8,5 με 20 mM γλουταθειόνης.

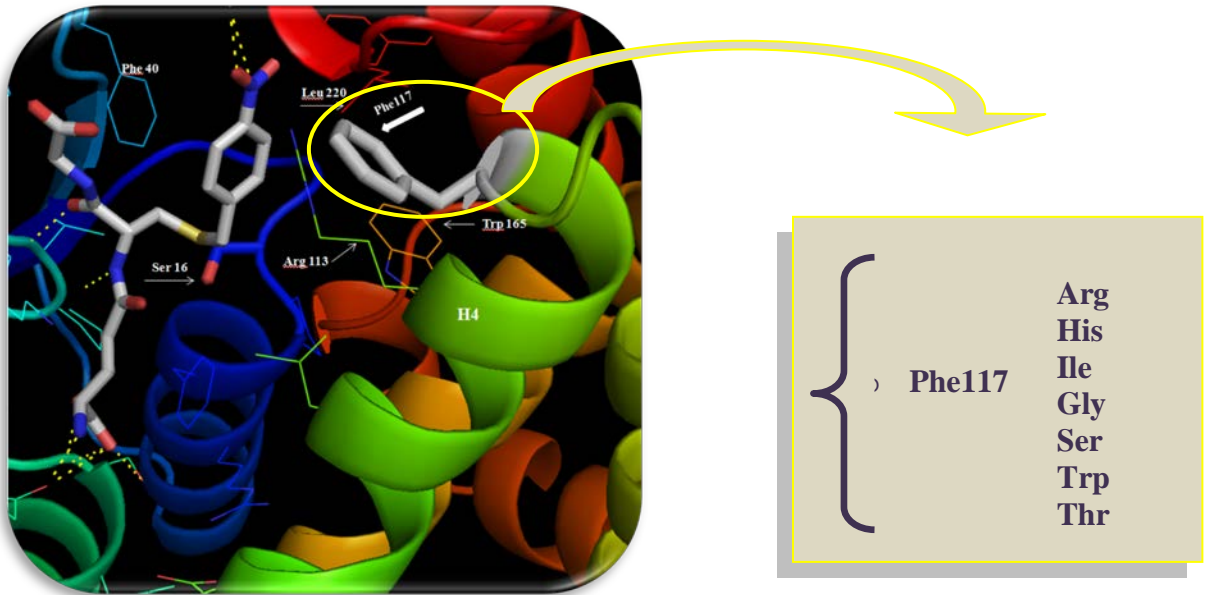
5.4.11. ΛΟΓΙΚΟΣ ΑΝΑΣΧΕΛΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΟΡΦΗΣ *PvGmGSTUG* ΣΤΗ ΘΕΣΗ 117 (ΤΕΧΝΙΚΗ QUICK CHANGE PCR)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

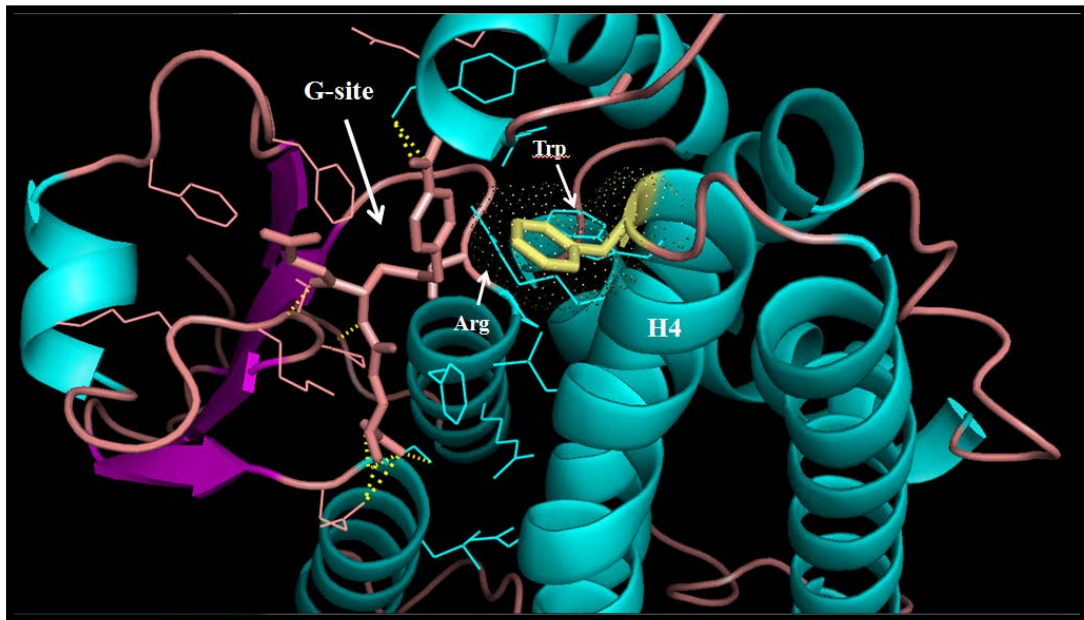
Κρίθηκε απαραίτητο για την ανάπτυξη του βιοαισθητήρα, να βελτιωθεί η εκλεκτικότητα του ενζύμου *PvGmGSTUG* ως προς τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Αυτό πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του λογικού ανασχεδιασμού (§ 5.3.2.8) στη θέση 117, όπου απαντά το αμινοξικό κατάλοιπο φαινυλαλανίνη (Σχήμα 5.24). Με την τεχνική Quick change προέκυψαν 7 νέες μορφές όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.24.A. Η θέση αυτή επιλέχθηκε, καθώς η φαινυλαλανίνη ως υδροφοβικό αμινοξύ συμβάλλει στη σταθερότητα του ενζύμου και συμμετέχει στο σχηματισμό της Η-θέσης. Επίσης έχει σχολιαστεί η πιθανή σημαντικότητα της θέσης 117, για το ένζυμο GST σε πορτοκάλι (*Citrus sinensis* L.) (Lo Pierro et al., 2009), ενώ έχει παρατηρηθεί ότι η μετάλλαξη στη θέση 118 του ενζύμου GSTF1-1 από τον αραβόσιτο (Ile118Phe), οδήγησε σε βελτιωμένη εξειδίκευση κατά 4 φορές, ως προς το ζιζανιοκτόνο alachlor (Labrou et al., 2005). Οι νέες αυτές μορφές (Σχήμα 5.24A) όπως φαίνεται και στα παρακάτω κεφάλαια, παρουσίασαν διαφορές ως προς την έκφραση, τη συγγένεια ως προς τη GSH και το CDNB, καθώς και στην αναστολή με συγκεκριμένα φυτοπροστατευτικά προϊόντα.

Στο Σχήμα 5.25 φαίνεται το προϊόν της αντίδρασης PCR, κατά το πρώτο στάδιο της μεταλλαξογένεσης κορεσμού, πριν τη δράση της DpnI. Κατόπιν κλωνοποίησης του νέου προϊόντος στον φορέα pEXP-5 CT/TA-TOPO[®], ακολούθησε σάρωση 69 αποικιών ως προς την καταλυτική δραστηριότητα (U/mL) με το σύστημα GSH/CDNB, ενώ θετικές τιμές παρουσίασαν οι 24 από αυτές (Σχήμα 5.26).

A

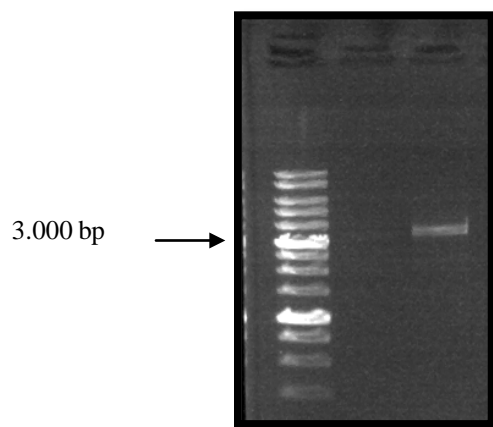


B

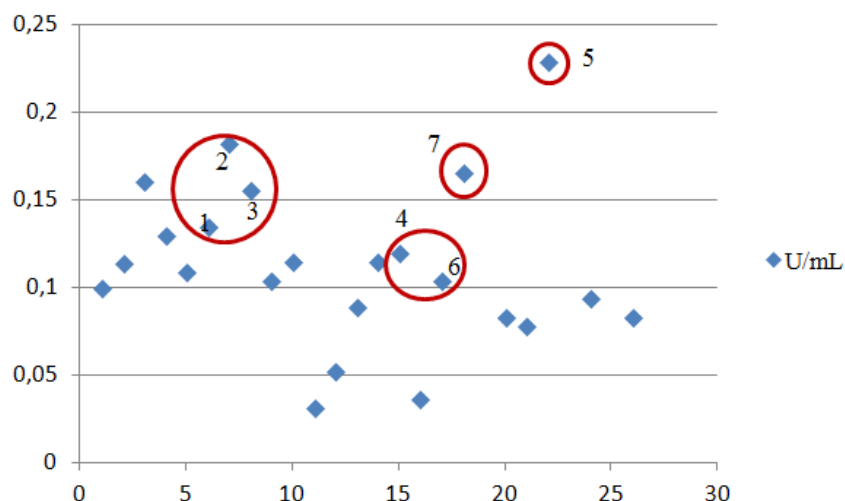


Σχήμα 5.24. Α. Απεικονίζεται η θέση του αμινοξικού καταλοίπου Phe117 και οι αντικαταστάσεις που προέκυψαν από το λογικό ανασχεδιασμό. Β. Η θέση 117 που απαντά στην έλικα H4.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5



Σχήμα 5.25. Προϊόν της *Quick Change PCR* αντίδρασης. Ως δείκτης χρησιμοποιήθηκε ο 1 Kb DNA Molecular Weight Marker (Lab Suppliers).



Σχήμα 5.26. Σάρωση των αποικιών που προέκυψαν από το λογικό ανασχεδιασμό (μεταλλαξογένεση κορεσμού) και οι οποίες είχαν θετική καταλυτική δραστηριότητα ως προς το σύστημα GSH/CDNB.

Κατόπιν αλληλούχισης προέκυψε ότι η αποικία 1 είναι η μορφή Phe117Arg, η αποικία 2 είναι η μορφή Phe117Trp, η αποικία 3 είναι η μορφή Phe117Ser, η αποικία 4 είναι η μορφή Phe117Ile, η αποικία 5 είναι η μορφή Phe117Gly, η αποικία 6 είναι η μορφή Phe117His, η αποικία 7 είναι η μορφή Phe117Thr (Σχήμα 5.27).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Σχήμα 5.27. Νουκλεοτιδική αλληλούχιση του ενζύμου *PnGmGSTUG* και των μεταλλαγμένων μορφών που προέκυψαν από το λογικό ανασχεδιασμό.

5.4.12. ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΟ ΛΟΓΙΚΟ ΑΝΑΣΧΕΔΙΑΣΜΟ

Στον Πίνακα 5.2. φαίνονται τα στελέχη *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε νέα μεταλλαγμένη μορφή. Εκτός από τη μορφή Phe117Arg, σε όλες τις άλλες υπήρξε δυσκολία έκφρασης, πιθανόν λόγω τοξικότητας του γονιδίου στο στέλεχος της *E. coli* BL21DE3. Στον Πίνακα 5.10 φαίνονται το θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο pI και μοριακό βάρος της κάθε νέας μορφής.

Πίνακας 5.10. Θεωρητικό pI και Μοριακό Βάρος των νέων μορφών που προέκυψαν από το λογικό ανασχεδιασμό.

Μορφή	Θεωρητικό pI	Θεωρητικό MB (Da)
F117I	5,80	25.997
F117G	5,80	25.997,9

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

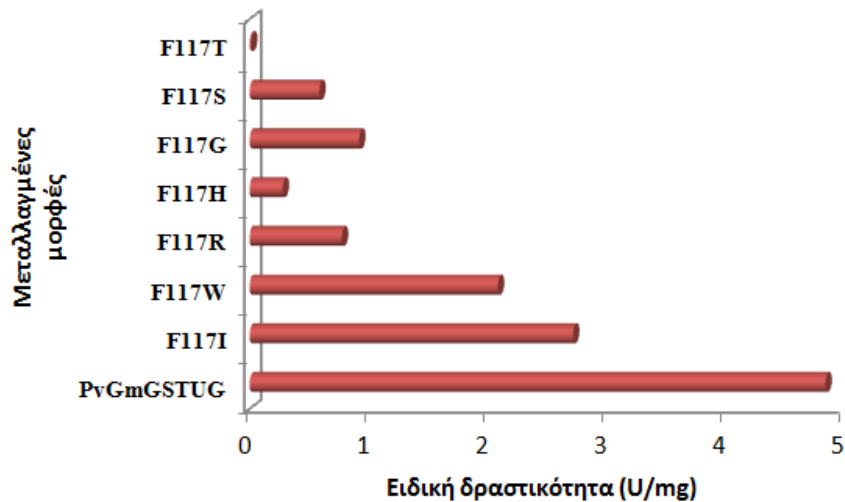
F117R	6,05	26.097,1
F117H	5,93	26.078
F117W	5,61	26.110,2
F117S	5,80	26.027,9
F117T	5,80	26.042

Πίνακας 5.11. Επίπεδα έκφρασης των κλώνων που προέκυψαν μετά από λογικό ανασχεδιασμό και η ειδική δραστηριότητα του βιολογικού εκχυλίσματος πριν και μετά τη διαπίδυση.

Μορφές λογικού ανασχεδιασμού	g εκχυλίσματος/mL καλλιέργειας	Ειδική δραστηριότητα πριν τη διαπίδυση (U/mg)	Ειδική δραστηριότητα μετά τη διαπίδυση (U/mg)
F117I	0,514/500	2,94	2,72
F117G	0,377/500	1,03	0,92
F117R	0,522/500	1,25	0,78
F117H	0,498/500	0,73	0,28
F117W	0,504/500	2,75	2,09
F117S	0,522/500	0,72	0,59
F117T	0,245/500	0,012	0,012

Σύμφωνα με τους Πίνακες 5.6 και 5.11, φαίνεται ότι το ένζυμο *PvGmGSTUG* παρουσιάζει ελαφρώς καλύτερη έκφραση και υψηλότερη ειδική δραστηριότητα ως προς το υπόστρωμα CDNB, σε σχέση με τις νέες μορφές που προέκυψαν από το λογικό ανασχεδιασμό. Από την άλλη οι μορφές Phe117Ile και Phe117Trp, παρουσίασαν τις υψηλότερες ειδικές δραστηριότητες ενώ η Phe117Thr τη χαμηλότερη. Στο Σχήμα 5.28 αναπαριστάται γραφικά η διαφορά των ειδικών δραστηριοτήτων μεταξύ των μορφών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5



Σχήμα 5.28. Σχηματική απεικόνιση της ειδικής δραστηριότητας (U/mg) του βιολογικού εκχυλίσματος, μετά τη διαδικασία της διαπίδυσης για το ένζυμο *PvGmGSTUG* και τις μορφές που προέκυψαν από το λογικό ανασχεδιασμό.

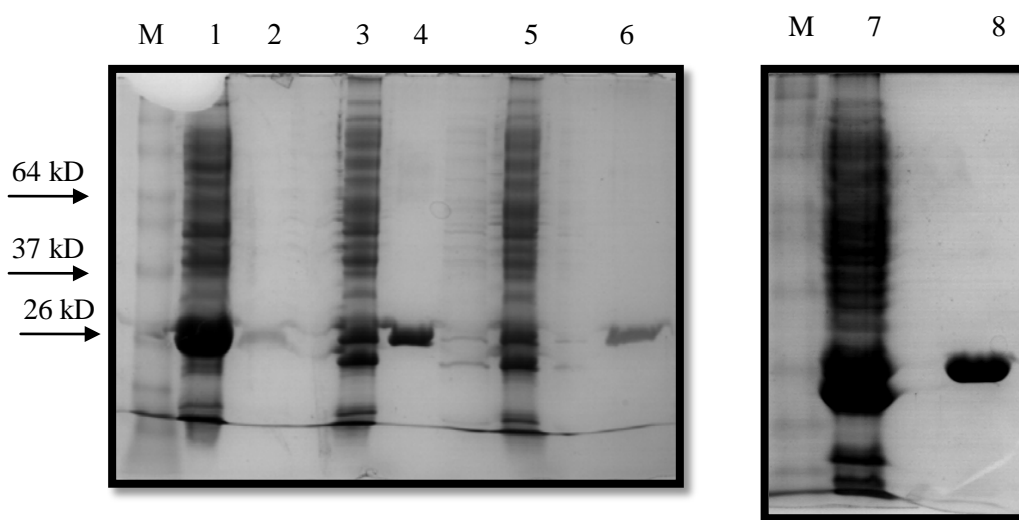
Αφού εκφράστηκαν οι νέες μορφές ακολούθησε καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας έχοντας ως δεσμευτή την S-εξυλ γλουταθειόνη. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας, απ' όπου φαίνεται ότι περισσότερο καθαρίζεται η μορφή Phe117Ile και την καλύτερη ειδική δραστηριότητα την παρουσιάζει η Phe117Trp και μετά η Phe117Ile.

Πίνακας 5.12. Αποτελέσματα από τη χρωματογραφία συγγένειας με δεσμευτή την S-εξυλ γλουταθειόνη για κάθε μορφή του λογικού ανασχεδιασμού.

Μορφές	Απόδοση καθαρισμού	Καθαρισμός (φορές)	Ειδική δραστηριότητα καλύτερης έκλυσης (U/mg)
F117I	37%	2,7	7,5
F117G	24%	1,7	1,63
F117H	48%	6,9	1,92
F117R	23%	3,3	2,56

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Μορφές	Απόδοση καθαρισμού	Καθαρισμός (φορές)	Ειδική δραστηριότητα καλύτερης έκλουσης (U/mg)
F117W	42%	6	12,68
F117S	46%	4,8	2,82
F117T	30%	2,5	0,03



Σχήμα 5.29. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (12,5 % w/v) παρουσία SDS, σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970). Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250. **M:** BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen), **1:** εκχύλισμα μετασχηματισμένων κυττάρων της μορφής Phe117His, **2:** έκλουση 1 (E1), **3:** εκχύλισμα μετασχηματισμένων κυττάρων της μορφής Phe117Trp, **4:** έκλουση 1 (E1), **5:** εκχύλισμα μετασχηματισμένων κυττάρων της μορφής Phe117Arg, **6:** έκλουση 2 (E1), **7:** εκχύλισμα μετασχηματισμένων κυττάρων της μορφής Phe117Ile, **8:** έκλουση 1 (E1).

Καθώς παρουσιάστηκε αρκετές φορές δυσκολία στην έκφραση για κάποιες μορφές, κυρίως όμως για την Phe117Thr, αλλά και χαμηλή έκφραση, κρίθηκε απαραίτητη η βελτιστοποίηση των συνθηκών έκφρασης. Έτσι δοκιμάστηκε μια νέα διαδικασία έκφρασης που περιγράφεται στην παράγραφο 5.3.2.11, όπου ως βέλτιστες συνθήκες

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

κρίθηκαν οι 24 ώρες επώασης καθώς φάνηκε να έχει καλύτερα αποτελέσματα συγκριτικά με τις 19 ώρες (αύξηση της έκφρασης 10%). Στον Πίνακα 5.13 συγκρίνονται τα αποτελέσματα, από τις δύο διαφορετικές εκφράσεις που δοκιμάστηκαν.

Πίνακας 5.13. Επίπεδα έκφρασης και η ειδική δραστηριότητα του βιολογικού εκχυλίσματος πριν και μετά τη διαπίδυση, για τις μορφές Phe117Ile και Phe117Thr, έχοντας διαφορετικό επαγωγέα σε κάθε περίπτωση.

Μορφές λογικού ανασχεδιασμού	g εκχυλίσματος/mL καλλιέργειας	Ειδική δραστηριότητα πριν τη διαπίδυση (U/mg)	Ειδική δραστηριότητα μετά τη διαπίδυση (U/mg)
F117I/IPTG	0,504/500	2,94	2,7
F117I/Λακτόζη	0,7/250	0,38	0,26
F117T/IPTG	0,245/500	0,012	0,012
F117T/Λακτόζη	1/500	0,008	0,008

Από τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι η ειδική δραστηριότητα είναι καλύτερη, για την έκφραση με επαγωγέα το IPTG. Το πλεονέκτημα της έκφρασης με επαγωγέα τη λακτόζη, είναι η αυξημένη μάζα κυττάρων που προκύπτει.

5.4.13. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΜΕ ΤΟ ΛΟΓΙΚΟ ΑΝΑΣΧΕΔΙΑΣΜΟ

Πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση των μεταλλαγμένων μορφών του ενζύμου του *PvGmGSTUG*, για το υπόστρωμα CDNB και προσδιορίστηκαν οι παράμετροι k_{cat} και K_m (Πίνακας 5.14). Όλες οι μεταλλαγμένες μορφές, όπως και το ένζυμο *PvGmGSTUG*, υπακούουν στην εξίσωση κινητικής των Michaelis–Menten, ως προς το υπόστρωμα της GSH (Σχήματα 5.30 και 5.31). Οι τιμές K_m που προέκυψαν για τη GSH είναι χαμηλότερες σε σχέση με την K_m του ενζύμου *PvGmGSTUG*. Η K_m του ενζύμου *PvGmGSTUG* είναι 1,169 Mm, ενώ στις μεταλλαγμένες μορφές απαντά

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

μεταξύ 0,047 έως 0,887 mM. Επίσης η σταθερά εξειδικεύσεως φαίνεται να αυξάνεται περίπου κατά 3,5 έως 5,5 φορές στις μορφές Phe117Ser, Phe117Ile και Phe117Trp.

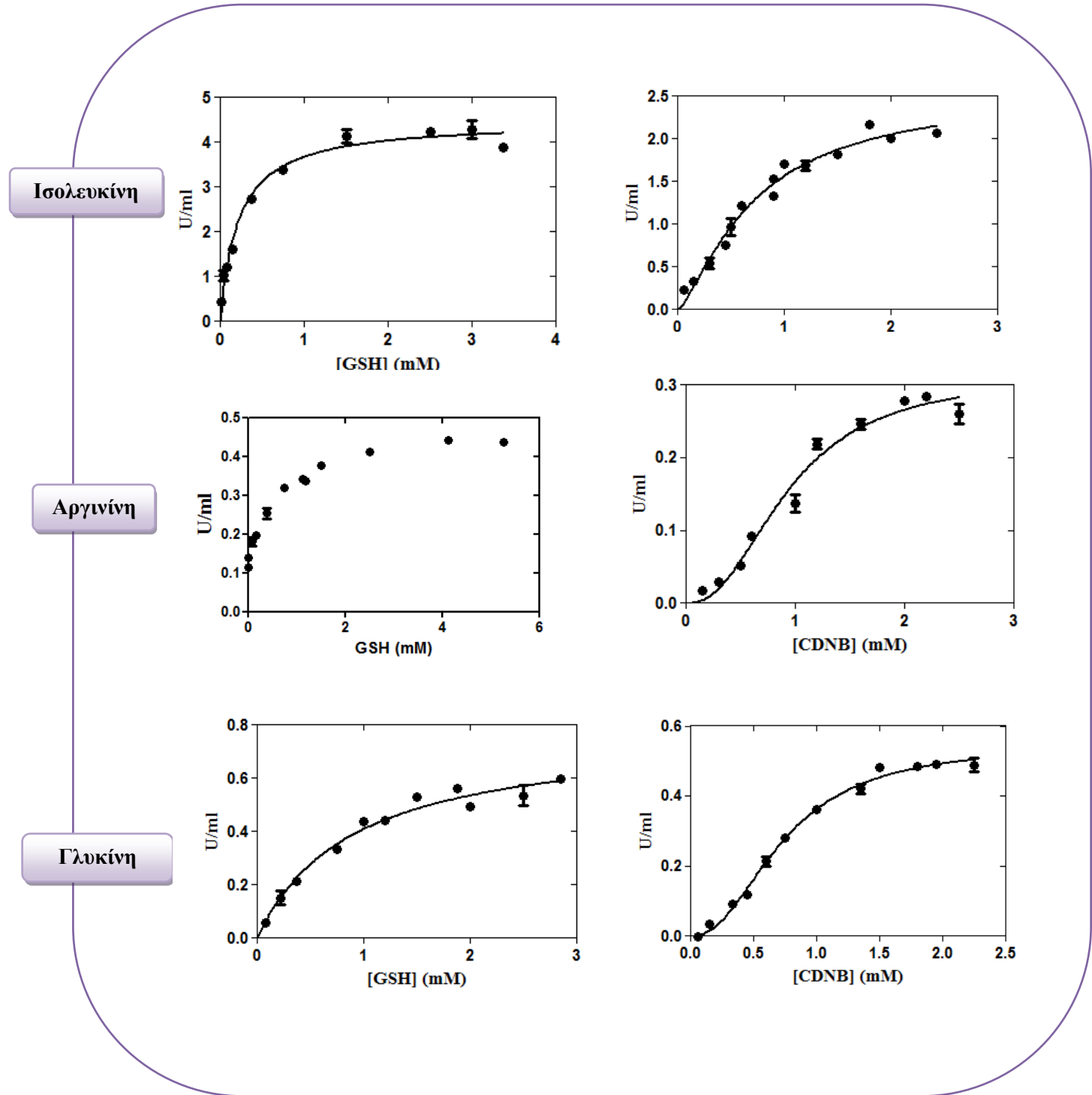
Σε αντίθεση με τη GSH, έχοντας το CDNB ως μεταβλητό υπόστρωμα και σταθερή τη συγκέντρωση της GSH, παρατηρήθηκε σιγμοειδή εξάρτηση του υποστρώματος (Σχήμα 5.30 και 5.31). Τα αποτελέσματα των αρχικών ταχυτήτων προσαρμόζονται πολύ καλά, στην εξίσωση που εκφράζει θετική συνέργεια και φαίνεται όλες οι μορφές εκτός από την Phe117Ser, να παρουσιάζουν θετική συνέργεια ως προς το CDNB. Οι μορφές Phe117Gly, Phe117Arg και Phe117Thr παρουσίασαν μεγαλύτερο συντελεστή Hill, από αυτόν του ενζύμου *PvGmGSTUG* (1,7). Οι κινητικές παράμετροι k_{cat} , K_m GSH, $S_{0,5}$ CDNB και n_H που προσδιορίστηκαν μέσω της κινητικής ανάλυσης, παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.14. Η μορφή Phe117Arg δεν φαίνεται να υπακούει στην εξίσωση Michaelis-Menten ή σε σιγμοειδή εξάρτηση, για το υπόστρωμα της GSH.

Πίνακας 5.14. Κινητική ανάλυση του ενζύμου *PvGmGSTUG* για κάθε σημειακή μετάλλαξη ως προς το σύστημα CDNB/GSH.

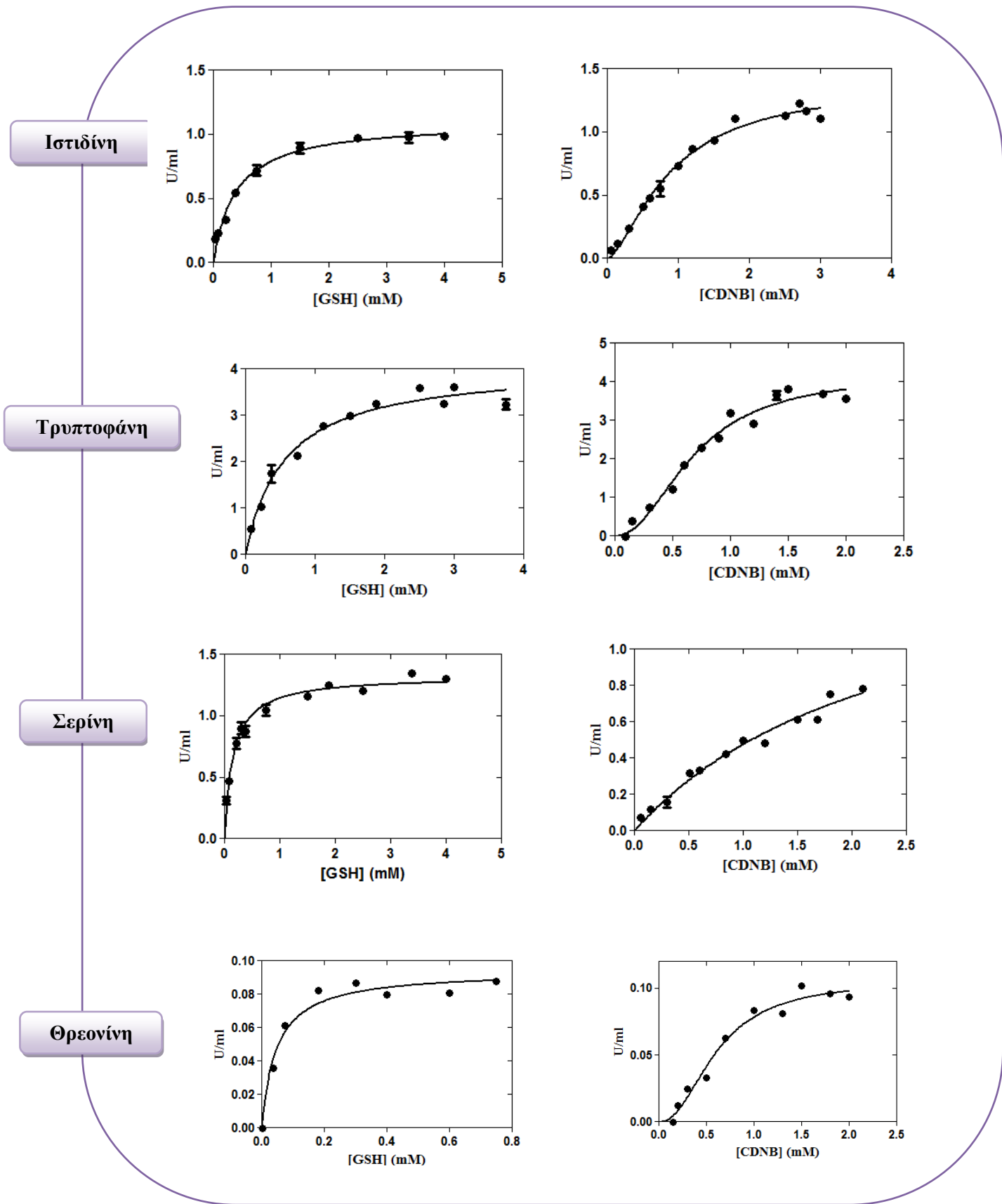
Μορφή	K_m (mM) (GSH)	k_{cat} (min^{-1}) (GSH)	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$) (GSH)
F117I	$0,214 \pm 0,024$	$114,7 \pm 2,82$	$544,305 \pm 74,225$
F117G	$0,887 \pm 0,118$	$59,59 \pm 2,96$	$68,844 \pm 12,496$
F117R	Δε υπακούει στην εξίσωση Michaelis-Menten		
F117H	$0,386 \pm 0,042$	$68,68 \pm 1,9$	$180,6 \pm 24,58$
F117W	$0,558 \pm 0,066$	$194 \pm 6,135$	$354,224 \pm 52,856$
F117S	$0,154 \pm 0,013$	$75,65 \pm 1,3$	$492,8 \pm 41,6$
F117T	$0,047 \pm 0,012$	$0,271 \pm 0,013$	$6,243 \pm 1,871$

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Μορφή	$S_{0,5}$ (mM)(CDNB)	k_{cat} (min^{-1}) (CDNB)	n_H (CDNB)
F117I	$0,71 \pm 0,09$	$65,589 \pm 5,13$	$1,364 \pm 0,16$
F117G	$0,94 \pm 0,087$	$24,077 \pm 1,69$	$2,316 \pm 0,337$
F117R	$0,733 \pm 0,034$	$42,015 \pm 1,4$	$2,22 \pm 0,17$
F117H	$0,893 \pm 0,073$	$86,25 \pm 4,12$	$1,53 \pm 0,13$
F117W	$0,683 \pm 0,052$	$200,095 \pm 12,143$	$2,11 \pm 0,27$
F117S	$K_m(\text{mM}): 2,44 \pm 0,45$	$93,91 \pm 11,04$	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$): $43,205 \pm 14,535$
F117T	$0,61 \pm 0,081$	$0,305 \pm 0,026$	$2,174 \pm 0,46$



Σχήμα 5.30. Κινητική ανάλυση των μεταλλαγμένων μορφών Phe117Ile, Phe117Gly και Phe117Arg του ενζύμου PvGmGSTUG.



Σχήμα 5.31. Κινητική ανάλυση των μεταλλαγμένων μορφών Phe117His, Phe117Trp, Phe117Ser και Phe117Thr του ενζύμου *PvGmGSTUG*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5.4.14. ΣΑΡΩΣΗ 20 ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΥΡΕΣΗ ΤΥΧΟΝ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΜΟΡΦΩΝ

Για την ανάπτυξη του βιοαισθητήρα έπρεπε να επιλεγθεί εκείνη η μεταλλαγμένη μορφή, που θα παρουσίαζε την μεγαλύτερη επιλεκτικότητα ως προς τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Για αυτόν τον λόγο, πραγματοποιήθηκε σάρωση των μορφών που προέκυψαν από τον λογικό ανασχεδιασμό, έναντι των 20 πιο ισχυρών αναστολέων του ενζύμου *PvGmGSTUG*. Δεν μελετήθηκε η μορφή Phe117Thr, λόγω της χαμηλής ειδικής δραστηριότητας. Στον Πίνακα 5.15 φαίνονται τα αποτελέσματα της σάρωσης.

Πίνακας 5.15. Υπολειπόμενη δραστηριότητα (%) των 6 μεταλλαγμένων μορφών του ενζύμου, που προέκυψαν από το λογικό ανασχεδιασμό, κάτω από την επίδραση εντομοκτόνων και μυκητοκτόνων. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών επαναλήψεων, με απόκλιση λιγότερη του 5% για όλες τις περιπτώσεις. Απουσία ξενοβιοτικού η ενζυμική δραστηριότητα θεωρήθηκε 100%.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ		ΟΝΟΜΑΣΙΑ	(%) ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ					
			F117R	F117W	F117I	F117S	F117H	F117G
			Εντομοκτόνα	Οργανοχλωριωμένα	Aldrin	36,4	27,1	9,4**
Dieldrin	0	14			8,9**	0	52,8	73,7
Endosulfan	30,9	21,1			15,9*	20,3	38,6	49,1
α-endosulfan	34,5	15,7*			0	13*	28,5	67,3
β-endosulfan	40,7	29,4			19,6*	33,3	37,3	32,7
Μυκητοκτόνα	Ανιλίδια	Boscalid	77,4	80,3	92,9	108,2	94,9	76,9
	Στρομπιλουρίνες	Kresoxim-methyl	57,3	96,5	69,4	85,6	85,7	64,6
		Fluoxastrobin	64,7	45	49,3	48,8	97,1	57,8

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

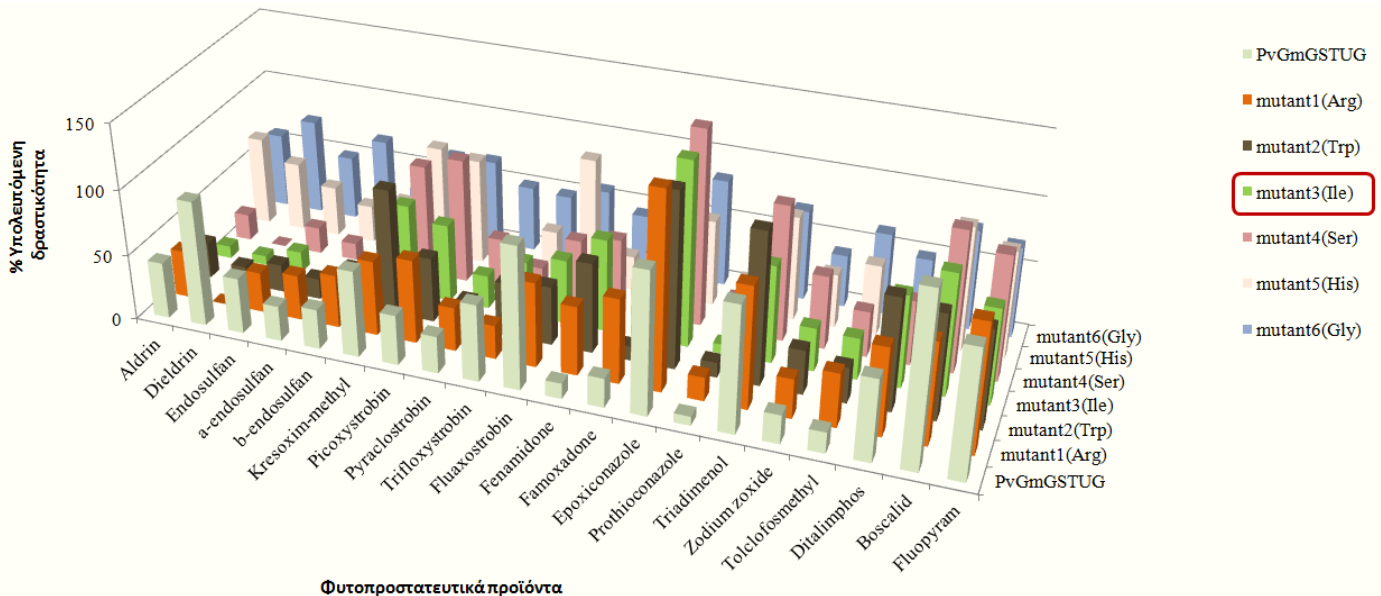
ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ	ΟΝΟΜΑΣΙΑ	(%) ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ					
		F117R	F117W	F117I	F117S	F117H	F117G
			Picoxystrobin	64	49,4	59,6	95,6
	Pyraclostrobin	33,4	21,7	25,4	38,6	15,8*	50,3
	Trifloxystrobin	25,8	41,1	42	21,5	34,8	48,3
	Famoxadone	64,7	10,8 *	44,8	49,5	58,6	29,5
	Fenamidone	52,7	68,9	70,8	55	26,2	43,5
Τριαζόλια	Epoxiconazole	156,6	134,2	141,3	217,6	65,7	82,3
	Prothioconazole	18,2*	11,4*	7**	26	24	12,2**
	Triadimenol	92,6	116,2	74,5	104	80	69,4
Βενζαμίδιο	Zodium zoxide	30,2	33,7	33,1	56,1	41,1	40,1
	Fluopyram	98	75,1	73,1	95,6	82,3	69,4
Οργανοφωσφορικοί εστέρες	Tolclofomethyl	41,1	27,2	31,7	34,8	53,8	62,6
	Ditalimphos	66,9	85,7	70,5	49,5	27,1	48,42

*<20%, **<10%

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι οι μεταλλαγμένες μορφές Phe117Arg, Phe117Trp, Phe117Ile και Phe117Ser, παρουσιάζουν μεγαλύτερη αναστολή ως προς τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα, σε σχέση με το ένζυμο *PvGmGSTUG*, ενώ όλες οι μορφές παρουσίασαν μεγαλύτερη αναστολή με το dieldrin. Η δραστηριότητα των μορφών Phe117Arg και Phe117Ser, βρέθηκε να μηδενίζεται με την επίδραση του εντομοκτόνου dieldrin. Σε γενικές γραμμές, η αναστολή που παρατηρήθηκε στο ένζυμο *PvGmGSTUG* ως προς τα μυκητοκτόνα, ίσχυσε και στις μεταλλαγμένες μορφές. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.15 καθώς και στο Σχήμα 5.32 η μορφή Phe117Ile, παρουσιάζει μεγαλύτερη αναστολή ως προς το σύνολο των

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

φυτοπροστατευτικών προϊόντων, ενώ εμφανίζει τη μεγαλύτερη αναστολή ως προς τα οργανοχλωριώμενα εντομοκτόνα. Τα οργανοχλωριώμενα εντομοκτόνα είναι σταθερά, λιπόφιλα μόρια τα οποία δεν βιοαποδομούνται εύκολα και συσσωρεύονται στο περιβάλλον (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 2008). Συνεπώς η εκλεκτικότητα που παρουσίασε η μορφή Phe117Ile είναι από βιοτεχνολογικής άποψης αρκετά σημαντική.



Σχήμα 5.32. Απεικόνιση της υπολειπόμενης δραστηριότητας (%) των έξι μεταλλαγμένων μορφών που προέκυψαν από το λογικό ανασχεδιασμό, υπό την επίδραση φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Οι μετρήσεις έγιναν με το σύστημα GSH-CDNB εις τριπλούν.

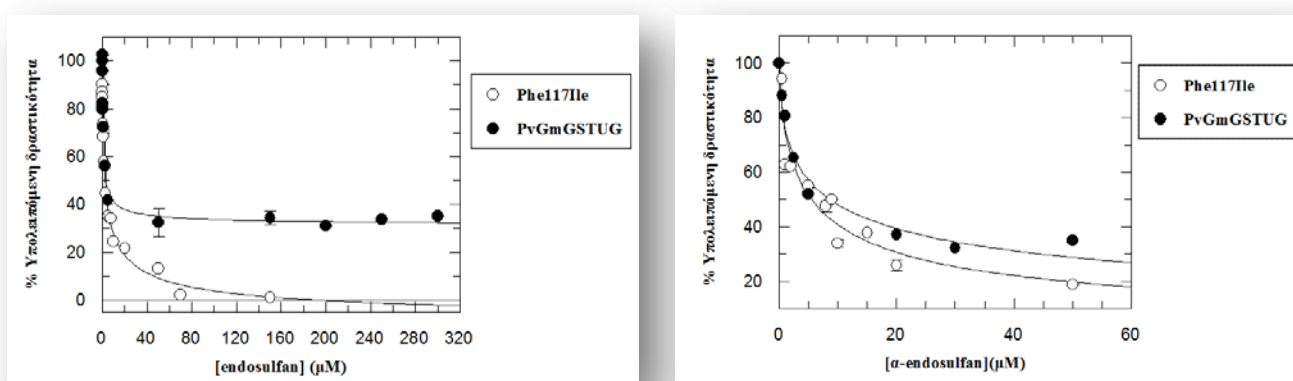
Σύμφωνα με τον Πίνακα 5.15 η μορφή Phe117Ile παρουσιάζει υψηλή αναστολή με το a-endosulfan (100%). Επίσης η τοξικότητα και η υπολειμματικότητα της συγκεκριμένης μορφής εντομοκτόνου, συνάγουν στην αναγκαιότητα προσδιορισμού του, σε περιβαλλοντικά δείγματα. Συνεπώς, σε αυτό το φυτοπροστατευτικό προϊόν βασίστηκε και η κατασκευή του βιοαισθητήρα.

5.4.15. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΙΣΧΥΟΣ ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΟΥ ENDOSULFAN ΚΑΙ ΤΟΥ ΙΣΟΜΕΡΕΣ α -ENDOSULFAN ΓΙΑ ΤΙΣ ΜΟΡΦΕΣ *PvGmGSTUG* ΚΑΙ *Phe117Ile*

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η μεταλλαγμένη μορφή *Phe117Ile* παρουσίασε καλύτερη εκλεκτικότητα ως προς τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, σε σχέση με τις άλλες μεταλλαγμένες μορφές. Συνεπώς επιλέχθηκε αυτή η μορφή για ακινητοποίηση, με σκοπό την ανάπτυξη βιοαισθητήρα. Είναι η μόνη μορφή που παρουσιάζει > 80%, αναστολή για τα οργανοχλωριωμένα. Έτσι ο βιοαισθητήρας θα αφορούσε στα οργανοχλωριωμένα και επιλέξαμε συγκεκριμένα το α -endosulfan, ένα από τα δύο ισομερή του ρακεμικού μίγματος του endosulfan, λόγω της σταθερότητας του στο περιβάλλον.

Το endosulfan ανήκει στα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα στη ομάδα των κυκλοδιενικών, παρουσιάζοντας εντομοκτόνο και ακαρεοκτόνο δράση. Σε υδατικά αλκαλικά και όξινα διαλύματα υδρολύεται αργά και δίνει διόλες και SO₂ (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 2008) (Περισσότερα στην εισαγωγή).

Σχεδιάστηκαν οι καμπύλες ανασταλτικής ισχύος για το ένζυμο *PvGmGSTUG* και την μορφή *Phe117Ile* (Σχήμα 5.33) ώστε να φανεί η εξάρτηση τους ως προς το endosulfan και το α -endosulfan. Οι καμπύλες IC₅₀ κατασκευάστηκαν με το πρόγραμμα Grafit 3.0.



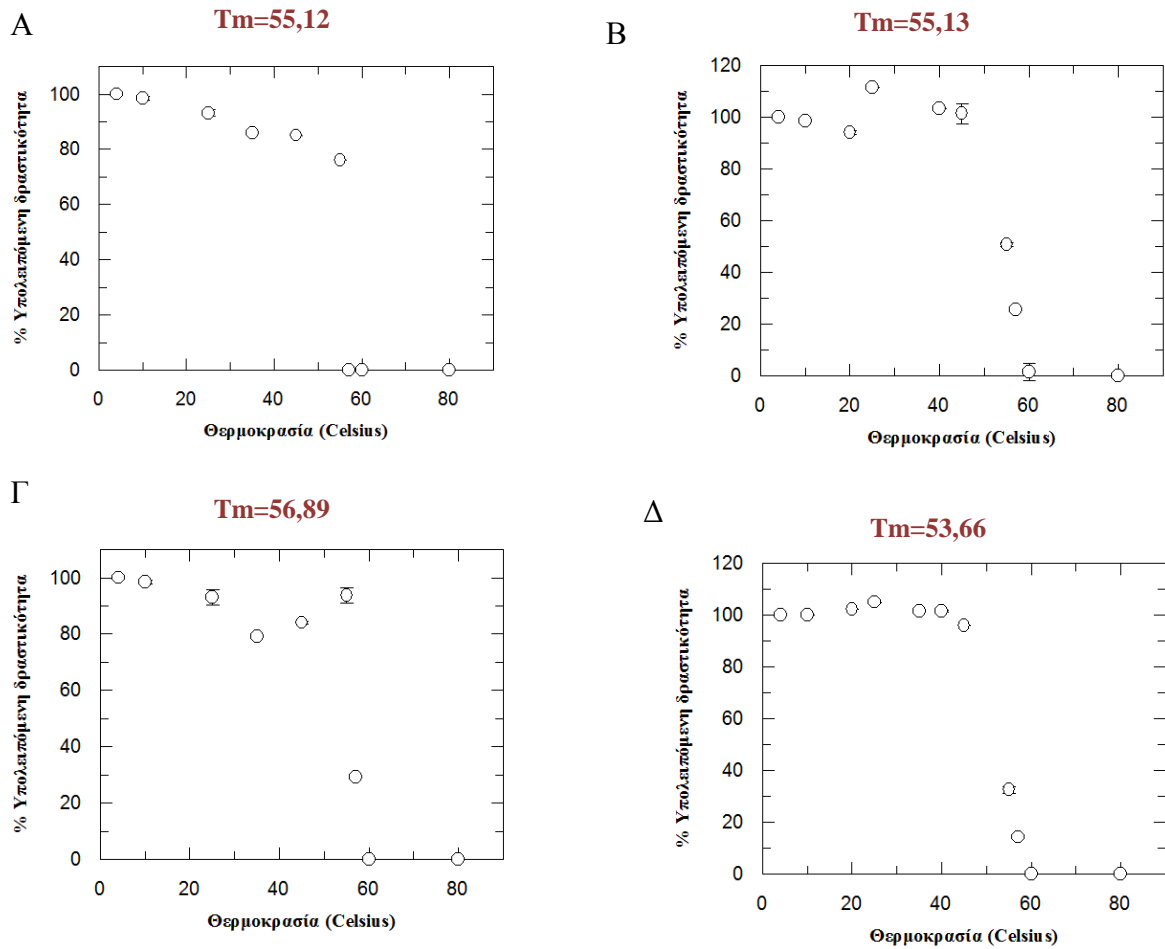
Σχήμα 5.33. Γραφική απεικόνιση της εξάρτησης της ανασταλτικής ισχύος του εντομοκτόνου endosulfan και του ισομερές α -endosulfan για τις μορφές *PvGmGSTUG* και *Phe117Ile*.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η μεταλλαγμένη μορφή Phe117Ile παρουσιάζει υψηλότερη ευαισθησία (πιο απότομη καμπύλη), ως προς το endosulfan και το α -endosulfan.

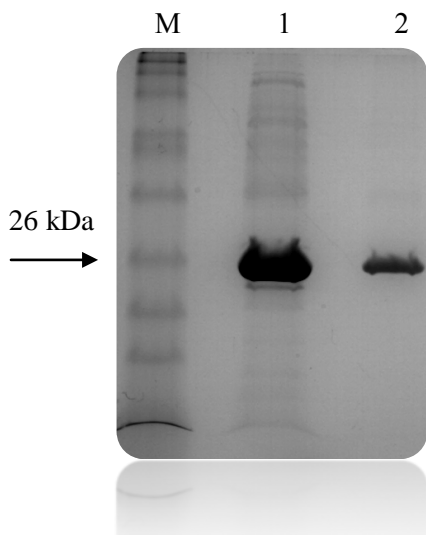
5.4.16. ΘΕΡΜΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ *PvGmGSTUG* ΚΑΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ Phe117Ile

Με σκοπό να εξετάσουμε τη δομική σταθερότητα του ενζύμου *PvGmGSTUG* και της μεταλλαγμένης μορφής Phe117Ile, μελετήθηκε η θερμική σταθερότητα τους σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 10⁰C έως 80⁰C σε pH=6,5. Στο Σχήμα 5.34, φαίνεται η εξάρτηση της υπολειπόμενης δραστηριότητας με τη θερμοκρασία. Επίσης προσδιορίστηκαν οι τιμές T_m (ως T_m ορίζεται η θερμοκρασία στην οποία το ένζυμο χάνει το 50% της αρχικής του δραστηριότητας), ενώ μελετήθηκε η δομική σταθερότητα των ενζύμων και με τη χρήση PEG.

Από τα παρακάτω αποτελέσματα, δεν φαίνεται το PEG να λειτουργεί ιδιαίτερα προστατευτικά, ως προς αυτές τις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν, φαίνεται όμως να εξομαλύνει την απώλεια δραστηριότητας του ενζύμου. Για παράδειγμα στο ένζυμο *PvGmGSTUG* απουσία PEG στους 57⁰C φαίνεται να μηδενίζεται η δραστηριότητα, με την προσθήκη PEG παραμένει περίπου το 25% της δραστηριότητας. Δεν ισχύει όμως το ίδιο για την μεταλλαγμένη μορφή Phe117Ile. Επιπλέον όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.35, η επώαση της μεταλλαγμένης μορφής με PEG, δεν φαίνεται να της επιφέρει δομική μεταβολή.



Σχήμα 5.34. Α. Καμπύλη θερμικής αδρανοποίησης του ενζύμου *GmPvGSTUG*, Β. Καμπύλη θερμικής αδρανοποίησης του ενζύμου *GmPvGSTUG* με PEG, Γ. Καμπύλη θερμικής αδρανοποίησης της μορφής Phe117Ile, Δ. Καμπύλη θερμικής αδρανοποίησης της μορφής Phe117Ile με PEG. Οι υπολειπόμενες δραστηριότητες προσδιορίστηκαν ύστερα από επώαση 5 λεπτών σε κάθε θερμοκρασία και αποτελούν το μέσο όρο τριών επαναλήψεων.



Σχήμα 5.35. Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα της μορφής Phe117Ile χωρίς (1) και με PEG (2)

5.4.17. ΔΟΜΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ *PvGmGSTUG* ΚΑΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ *Phe117Ile* ΣΤΟΥΣ -20°C ΚΑΙ Η ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ PEG

Η διατήρηση πρωτεϊνών στην κατάψυξη στα ερευνητικά εργαστήρια συνηθίζεται, καθώς αναμένεται να διατηρείται περισσότερο η δραστικότητα τους, σε σχέση με τη συντήρησή τους στους 4°C . Όμως η πήξη και η τήξη πρωτεϊνικών διαλυμάτων, μπορεί να οδηγήσει σε μετουσίωση και τελικά απώλεια της δραστικότητας τους. Συνεπώς οι επιπτώσεις της πήξης και της τήξης, είναι κρίσιμες για την ανάπτυξη σταθερών βιοτεχνολογικών προϊόντων (Pikal-Cleland et al., 2000).

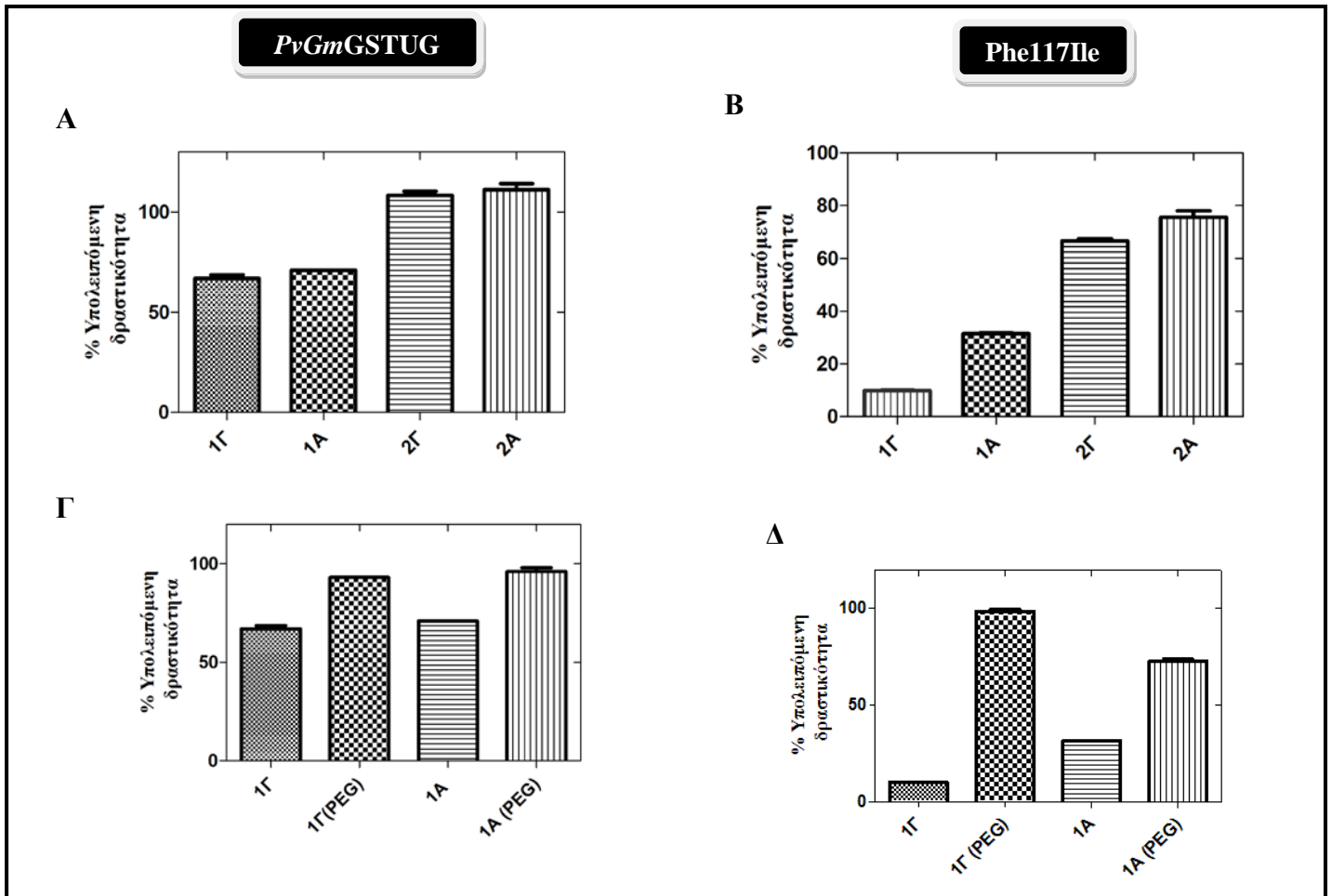
Κατά τη διάρκεια της πήξης με το σχηματισμό κρυστάλλων, αυξάνεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης και των αλάτων του διαλύματος και αυτό μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τη σταθερότητα της πρωτεΐνης. Συνήθως αυξάνει η σταθερότητα της πρωτεΐνης, με την αύξηση της συγκέντρωσης λόγω αυτό-σταθεροποίησης, ενώ η αύξηση των ηλεκτρολυτών μπορεί να αποσταθεροποιήσει την πρωτεΐνη. Επίσης η επιλεκτική κατακρήμνιση συστατικών του διαλύματος, κατά τη διάρκεια της πήξης, μπορεί να προκαλέσει μετατόπιση της τιμής του pH του διαλύματος και να επέλθει μετουσίωση της πρωτεΐνης (Pikal-Cleland et al., 2000). Θέλοντας λοιπόν να μελετηθεί η σταθερότητα των ενζύμων *PvGmGSTUG* και *Phe117Ile* στους -20°C , παρέμειναν σε αυτή τη θερμοκρασία για μία ώρα. Η σταθερότητα μελετήθηκε, πραγματοποιώντας γρήγορη και αργή αποκατάσταση, καθώς και σε δύο διαφορετικά διαλύματα: σε $20\text{mM KH}_2\text{PO}_4$, $\text{pH}=7$ και $20\text{mM Na}_2\text{HPO}_4$, $\text{pH}=7$. Ακόμα μελετήθηκε η σταθερότητα τους στους -20°C , αφού πρώτα είχε προστεθεί στο κάθε ενζυμικό δείγμα PEG με αναλογία 1:1. Η καταλυτική σταθερότητα προσδιορίστηκε, μετρώντας τη δραστικότητα με το σύστημα GSH/CDNB. Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι η συγκέντρωση πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα ήταν και για τα δύο ένζυμα περίπου ίδια.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Σχήματος 5.36, φαίνεται ότι το PEG λειτουργεί προστατευτικά, υπό την επίδραση της θερμοκρασίας πήξης (-20°C) για μία ώρα, ιδιαίτερα για την μορφή *Phe117Ile*. Στο ένζυμο *PvGmGSTUG* στην γρήγορη αποκατάσταση, η δραστικότητα μειώνεται κατά 34%, ενώ με την προσθήκη PEG παρατηρείται μείωση κατά 7%, παρόμοια είναι τα αποτελέσματα και στην αργή αποκατάσταση. Στη μορφή *Phe117Ile* στην γρήγορη αποκατάσταση, η δραστικότητα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

μειώνεται κατά 90%, ενώ με την προσθήκη PEG παρατηρείται μείωση μόνο κατά 1,3%. Στην αργή αποκατάσταση η δραστηριότητα μειώνεται κατά 69%, ενώ με την προσθήκη PEG παρατηρείται μείωση κατά 27,5%. Τέλος και στους δύο τύπους αποκατάστασης, η υπολειπόμενη δραστηριότητα των ενζύμων ήταν μεγαλύτερη σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου pH=7. Οι ειδικές δραστηριότητες του ενζύμου *PvGmGSTUG* ήταν 7,9 U/mg και 4,9 U/mg για τα διαλύματα καλίου και νατρίου, αντίστοιχα. Ενώ οι ειδικές δραστηριότητες για την μορφή Phe117Ile ήταν 8,6 U/mg και 2,213 U/mg για τα διαλύματα καλίου και νατρίου, αντίστοιχα.

Οι μετατοπίσεις pH κατά τη διάρκεια πήξης των φωσφορικών διαλυμάτων καλίου και νατρίου, εξαρτώνται από τη συγκέντρωση του διαλύματος και τις θερμοκρασίας ευθιξίας. Στο παρελθόν έχει αναφερθεί μείωση του pH κατά την πήξη διαλύματος Na_2HPO_4 και αύξηση για το διάλυμα KH_2PO_4 (Pikal-Cleland et al., 2000). Στην παρούσα μελέτη δεν προσδιορίστηκε η αλλαγή του pH κατά την πήξη, σύμφωνα όμως με την παρατήρηση, ότι η υπολειπόμενη δραστηριότητα των ενζύμων, ήταν μεγαλύτερη για το διάλυμα φωσφορικού νατρίου και το Σχήμα 5.36, πιθανολογούμε ότι μάλλον υπήρξε μικρή αλλαγή στην περίπτωση του νατρίου και πολύ μεγάλη στην περίπτωση του καλίου (αρχικό pH=7).



Σχήμα 5.36. Επίδραση της θερμοκρασίας πήξης (-20°C), στο ένζυμο *PnGmGSTUG* και στην μεταλλαγμένη μορφή Phe117Ile. **A.** Υπολειπόμενη δραστηριότητα του ενζύμου *PnGmGSTUG* για τη γρήγορη και αργή αποκατάσταση σε ρυθμιστικά διαλύματα δισόξινου φωσφορικού καλίου και νατρίου pH=7 **B.** Υπολειπόμενη δραστηριότητα κατά τη γρήγορη και αργή αποκατάσταση, με την παρουσία ή απουσία PEG, **Γ.** Υπολειπόμενη δραστηριότητα της μορφής Phe117Ile, για τη γρήγορη και αργή αποκατάσταση και για τα ρυθμιστικά διαλύματα καλίου και νατρίου **Δ.** Υπολειπόμενη δραστηριότητα της μορφής Phe117Ile, για τη γρήγορη και αργή αποκατάσταση, με την παρουσία ή απουσία PEG. Όπου **1A:** ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου pH =7 και αργή αποκατάσταση, **1Γ:** ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου pH =7 και γρήγορη αποκατάσταση, **2A:** ρυθμιστικό διάλυμα μονόξινου φωσφορικού νατρίου pH =7 και αργή αποκατάσταση, **2Γ:** ρυθμιστικό διάλυμα μονόξινου φωσφορικού νατρίου pH =7 και γρήγορη αποκατάσταση.

5.4.18. ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ *PvGmGSTUG* ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΗ ΘΕΣΗ 117

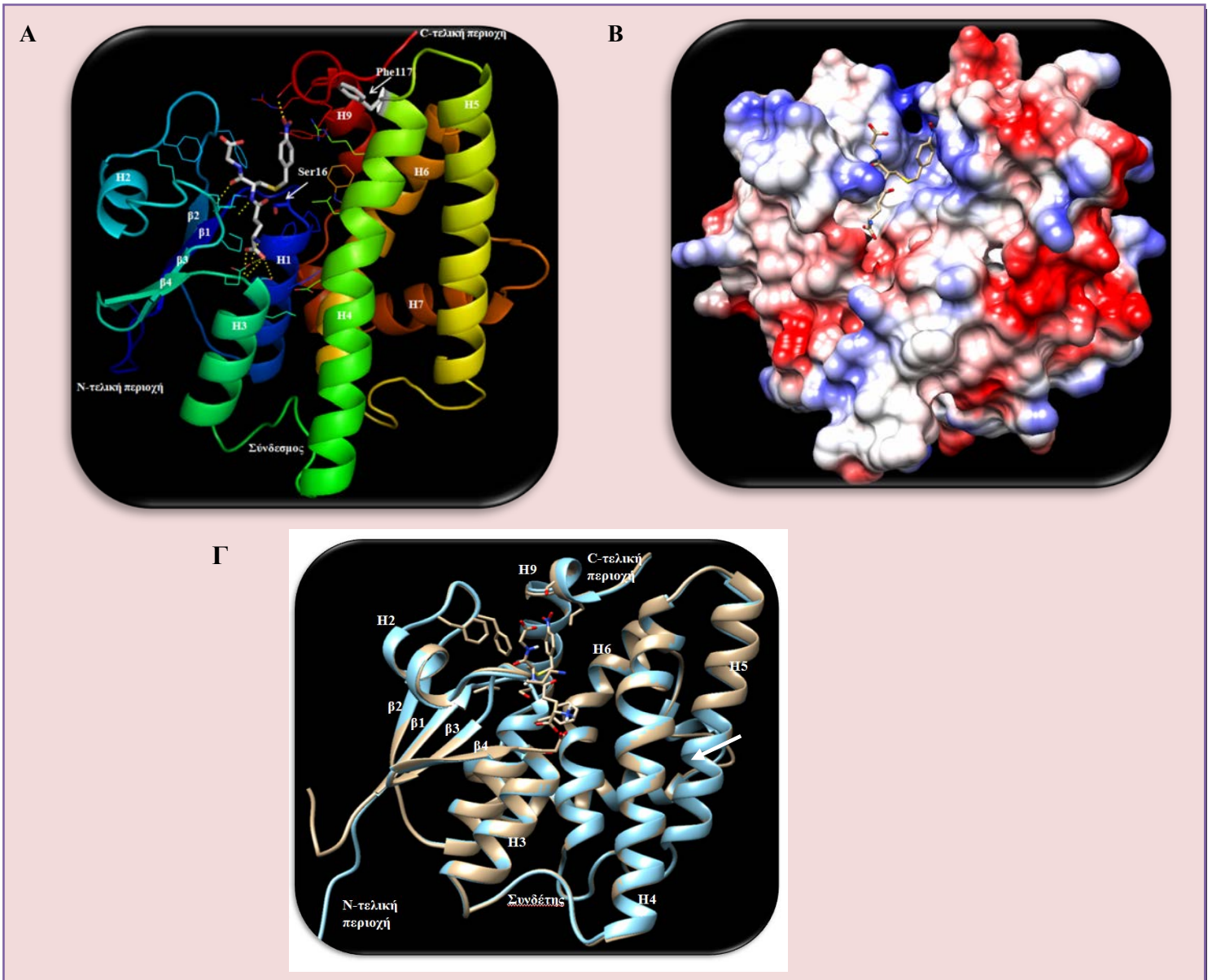
Για να κατανοήσουμε τα καταλυτικά και δομικά χαρακτηριστικά του ενζύμου *PvGmGSTUG* και της μορφής Phe117Ile, προσδιορίστηκε αρχικά η δομή του ενζύμου *PvGmGSTUG* (Σχήμα 5.37) με ομόλογη μοντελοποίηση και στη συνέχεια με το πρόγραμμα What If, η δομή της μεταλλαγμένης μορφής Phe117Ile. Η ομόλογη μοντελοποίηση βασίστηκε στην τρισδιάστατη δομή φυτικών GSTs που προσδιορίστηκαν κρυσταλλογραφικά μέσω ακτίνων-X (Πίνακας 5.16). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.37, κάθε μονομερές του ενζύμου *PvGmGSTUG* αποτελείται από δύο περιοχές, μια μικρότερη N-τελική περιοχή όμοια-θειορεδοξίνης και μια μεγαλύτερη C-τελική περιοχή που αποτελείται από έλικες. Η N-τελική περιοχή είναι μια α/β δομή με τοπολογία πτυχών βαβαββα με το $\beta 3$ έλασμα να είναι αντιπαράλληλο των $\beta 1, \beta 2$ και $\beta 4$, δημιουργώντας μια συνηθισμένη δεξιόστροφη β -πτυχωτή επιφάνεια περικυκλωμένη από τρεις α -έλικες. Στο τέλος της έλικας H3 ξενικά ένας σύνδεσμος που ενώνει τις N- και C-τελικές περιοχές. Το κέντρο της C-τελικής περιοχής είναι μια δεσμίδα έξι ελίκων (H4H5H6H7H8H9). Η σύγκριση της δομής του ενζύμου *PvGmGSTUG* και της Phe17Ile, δεν φαίνεται να έχει διαφορές. Το ενεργό κέντρο και των δύο φαίνεται να είναι σαν ένα μεγάλο ανεστραμμένο σχήμα -L. Επίσης η ανάλυση ηλεκτροστατικού δυναμικού (Σχήμα 5.37 B) έδειξε ότι η G-θέση του ενζύμου *PvGmGSTUG* παρουσιάζει θετικό ηλεκτροστατικό δυναμικό. Η μόνη διαφορά που παρατηρείται είναι στις θέσεις 179-182 με τα αμινοξέα Thr/Ser/Glu/Lys (Σχήμα 5.37.Γ).

Επίσης είναι πλέον αποδεκτό ότι Ser κατέχει τη θέση του καταλυτικού αμινοξέος στις GSTs των τάξεων τ και ϕ (Chronopoulou et al., 2012, Labrou et al. 2001), το οποίο υποτίθεται ότι σταθεροποιεί την απο-πρωτονιωμένη μορφή της GSH και την κάνει πιο πυρηνόφιλη (Lo Pierro et al., 2009). Από την ανάλυση ομόλογης μοντελοποίησης φαίνεται ότι υπάρχει μια Ser που είναι σημαντική καταλυτικά, η Ser στη θέση 16.

Όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 4, στο ένζυμο GmGSTU4-4 στο φυτό *Glycine max*, έχει περιγραφεί μια νεοχαρακτηριζόμενη θέση δέσμευσης η L-θέση (Axarli et al., 2009a). Αυτή η θέση σχηματίζεται από τα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα (Trp11, Arg20, Tyr30 Tyr32, Lys197, Leu199, Pro200) τα οποία ενδέχεται να δεσμεύουν υδρόφοβα μόρια χωρίς να αποτελούν υποστρώματα του ενζύμου,

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

απομακρύνοντας τα από κρίσιμους ενδοκυττάριους στόχους (Acharli et al., 2009a). Τα κύρια για τη δέσμευση αμινοξικά κατάλοιπα (Trp11, Arg20, Tyr30, Tyr32) καθώς και το συντηρημένο ζευγάρι αμινοξέων LP, παρόλο που μπορεί να διαφέρει ως προς την ακριβή θέση, απαντά σε όλες τις μέχρι τώρα διαθέσιμες τGSTs (Lo Pierro et al., 2009). Το ίδιο και στο ένζυμο *PvGmGSTUG*, το συντηρημένο ζευγάρι LP βρίσκεται στις θέσεις 87-88, η τυροσίνη στις θέσεις Tyr33 και Tyr35, η αργινίνη στη θέση 21 ενώ στη θέση 11 (Trp11) η τρυπτοφάνη φαίνεται να έχει αντικατασταθεί με τυροσίνη (Σχήμα 5.37 Γ).



Σχήμα 5.37. **A.** Απεικόνιση της πρωτεϊνικής δομής του ενζύμου *PnGmGSTUG*. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα PyMOL (DeLano 2002). **B.** Ανάλυση ηλεκτροστατικού δυναμικού του ενζύμου *PnGmGSTUG*. Η ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα UCSF Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>). Στην επιφάνεια ηλεκτροστατικού δυναμικού απεικονίζονται με λευκό οι ουδέτερες περιοχές, με μπλε οι θετικά φορτισμένες περιοχές και με κόκκινο οι αρνητικά φορτισμένες, **Γ.** Αμινοξική αλληλούχιση του ενζύμου *PnGmGSTUG* και της μορφής Phe117Ile.

Πίνακας 5.16. Φυτικές δομές, στις οποίες βασίστηκε ο προσδιορισμός της δομής του ενζύμου *PvGmGSTUG*.

Ένζυμο	Κωδικοί PDB	Είδη φυτών	Τάξη	Ομοιότητα (%)	E-value
<i>PvGmGSTUG</i>	2VO4	<i>Glycine max</i>	τ	40	6e-44
	1GWC	<i>Aegilops tauschii</i>	τ	37	2e-37
	1OYJ	<i>Oryza sativa</i>	τ	34	2e-22

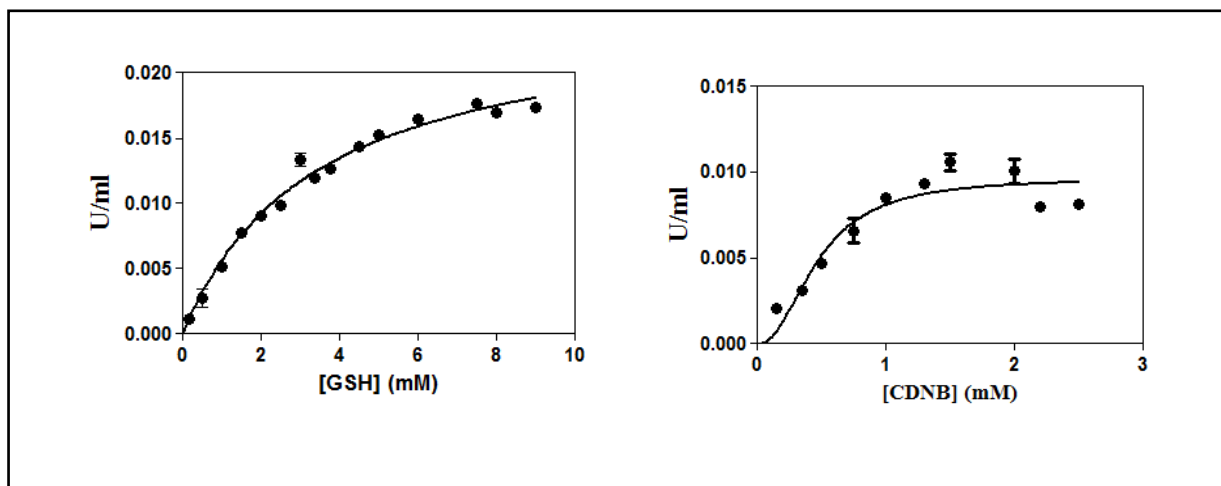
5.4.19. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ F117I ΣΕ ΚΟΛΛΟΕΙΔΕΣ ΠΗΚΤΩΜΑ (SOL-GEL)

Ο σχηματισμός του κολλοειδούς πηκτώματος για την ακινητοποίηση του ενζύμου βασίστηκε στη διαδικασία σχηματισμού των Andreou και Clonis (2002). Το υβριδικό κολλοειδές περιείχε TEOS και PTMOS σε γραμμομοριακή αναλογία 2:1. Σε γυάλινο σωλήνα προστέθηκε 1,1 mL TEOS, 0,45 mL PTMOS, 82mM CTAB, 0,70 mL νερό, 0,50 mL αιθανόλη και τέλος 0,35 mL HCl 0,1 M. Επίσης το ένζυμο αναμίχθηκε με την ένωση N-υδροξυηλεκτρικός εστέρας μεθοξυ-πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) σε αναλογία 1:1. Μετά το πέρας μίας ώρας ακολούθησε ανάμιξη του πηκτώματος με το ένζυμο σε αναλογία 1:1 και υπό αλκαλικές συνθήκες δημιουργήθηκε στερεή φάση, ενώ η γήρανση σε TEOS, αύξησε τη μηχανική αντοχή. Η γήρανση των 5 ημερών, φάνηκε να επιτρέπει την μικρότερη απώλεια της δραστηκότητας, σε σχέση με τις 2 ημέρες. Στην πρώτη περίπτωση διατηρείται το 17% της δραστηκότητας και στη δεύτερη το 5%. Ακόμα δεν παρατηρήθηκε διάχυση του ενζύμου, στο διάλυμα φύλαξης του κολλοειδούς πηκτώματος.

Θέλοντας να μελετηθεί η κινητική συμπεριφορά της ακινητοποιημένης μορφής Phe117Ile, πραγματοποιήθηκε ανάλυση και για τα δύο υποστρώματα GSH και CDNB. Η ακινητοποιημένη μορφή, υπακούει στην εξίσωση κινητικής των Michaelis–Menten ως προς το υπόστρωμα της GSH (Σχήμα 5.38). Η K_m ως προς τη GSH φαίνεται να αυξάνει κατά 17-φορές και η σταθερά εξειδικεύσεως να μειώνεται κατά περίπου 4-φορές. Σε αντίθεση με τη GSH, έχοντας το CDNB ως μεταβλητό υπόστρωμα και σταθερή τη συγκέντρωση της GSH, παρατηρήθηκε σιγμοειδή

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

εξάρτηση του υποστρώματος, όπως και στο ελεύθερο ένζυμο. Τα αποτελέσματα των αρχικών ταχυτήτων επαληθεύουν την εξίσωση που εκφράζει θετική συνέργεια ως προς το CDNB, με μεγαλύτερο συντελεστή Hill, από αυτόν της ελεύθερης μορφής (1,364). Οι κινητικές παράμετροι k_{cat} , K_m GSH, $S_{0,5}$, k_{cat} , k_{cat} , CDNB και n_H που προσδιορίστηκαν μέσω της κινητικής ανάλυσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.17.



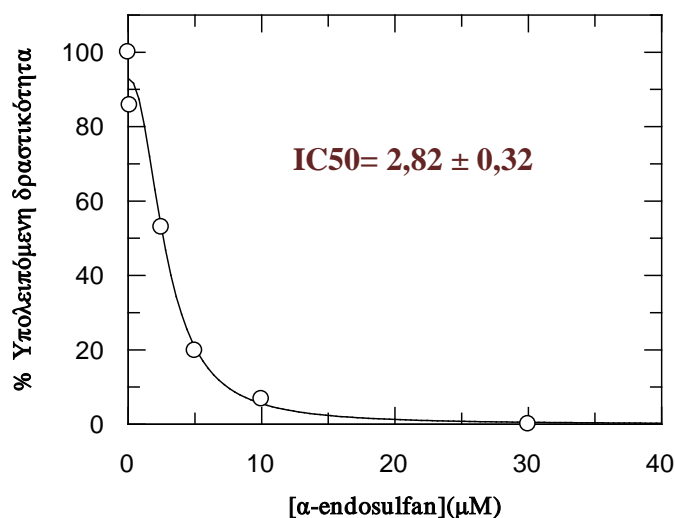
Σχήμα 5.38. Κινητική ανάλυση του ακινητοποιημένου ενζύμου. Όλες οι μετρήσεις έγιναν χρησιμοποιώντας το σύστημα CDNB–GSH και κάθε σημείο αποτελεί το μέσο τριών επαναλήψεων.

Πίνακας 5.17. Κινητική ανάλυση της ακινητοποιημένης μορφής F117I για το σύστημα CDNB/GSH.

Μορφή	K_m (mM) (GSH)	k_{cat} (min^{-1}) (GSH)	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$) (GSH)
Phe117Ile	$3,376 \pm 0,277$	$0,639 \pm 0,022$	$0,191 \pm 0,022$
Μορφή	$S_{0,5}$ (mM)(CDNB)	k_{cat} (min^{-1}) (CDNB)	n_H (CDNB)
Phe117Ile	$0,469 \pm 0,058$	$0,248 \pm 0,017$	$2,191 \pm 0,605$

5.4.20. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΤΙΜΗΣ ΑΝΑΣΤΑΤΙΚΗΣ ΙΣΧΥΟΣ ΤΟΥ α -ENDOSULFAN ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΜΟΡΦΗ F117I

Θέλοντας να προσδιορίσουμε την τιμή IC₅₀ για το α -endosulfan, έχοντας ακινητοποιημένη τη μορφή Phe117Ie σε κολλοειδές πήκτωμα, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις με διαφορετικές συγκεντρώσεις του α -endosulfan και με το σύστημα GSH/CDNB. Η τιμή IC₅₀ φαίνεται να υποδιπλασιάζεται σε σχέση με αυτή της ελεύθερης μορφής.

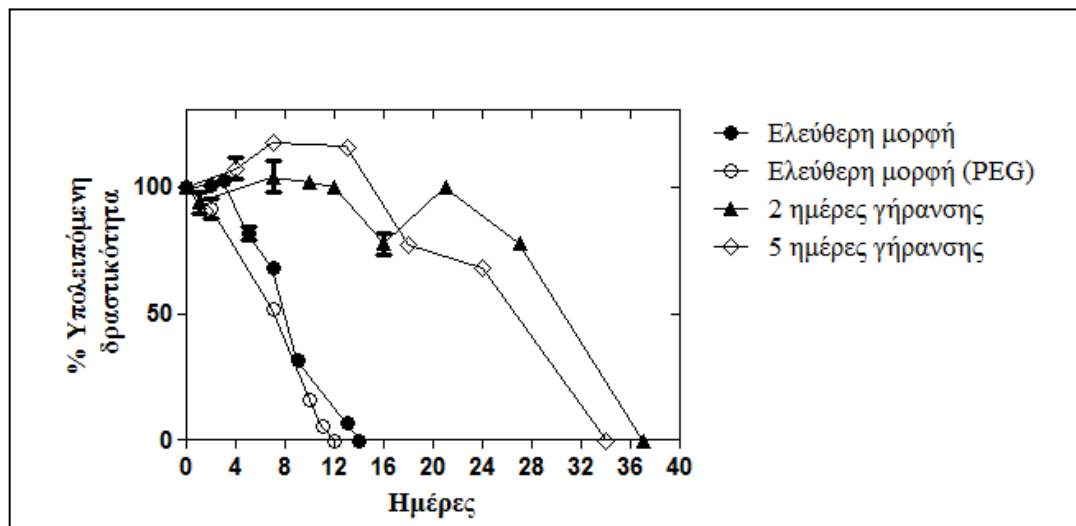


Σχήμα 5.39. Καμπύλη συγκέντρωσης-υπολειπόμενης δραστηριότητας για το εντομοκτόνο α -endosulfan, με ακινητοποιημένο ένζυμο. Όλες οι μετρήσεις έγιναν χρησιμοποιώντας το σύστημα CDNB-GSH και κάθε σημείο αποτελεί το μέσο όρο δύο επαναλήψεων.

5.4.21. ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ F117I

Μελετήθηκε η λειτουργική σταθερότητα της μορφής Phe117Ie, σε ελεύθερη κατάσταση παρουσία ή απουσία PEG και σε ακινητοποιημένη κατάσταση, έχοντας υποστεί 2 και 5 ημέρες γήρανσης σε TEOS. Σύμφωνα με το Σχήμα 5.40, φαίνεται ότι η ακινητοποίηση του ενζύμου παρέτεινε τη λειτουργική του σταθερότητα για τουλάχιστον 20 ημέρες στους 4⁰C. Ειδικότερα παρατηρήθηκε η ακινητοποιημένη

μορφή να αδρανοποιείται πλήρως στις 33-36 ημέρες, ενώ η ελεύθερη μορφή στις 12 ημέρες, παρουσία ή απουσία PEG.



Σχήμα 5.40. Απεικονίζονται η λειτουργική σταθερότητα (4⁰C) στην ελεύθερη μορφή Phe117Ile, στην ελεύθερη μορφή Phe117Ile με PEG, στην ακινητοποιημένη μορφή Phe117Ile με 2 ημέρες γήρανσης και με 5 ημέρες γήρανσης.

5.4.22. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΗ ΣΤΗΝ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΟΡΦΗΣ Phe117Ile, ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΝΖΥΜΙΚΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ α -ENDOSULFAN

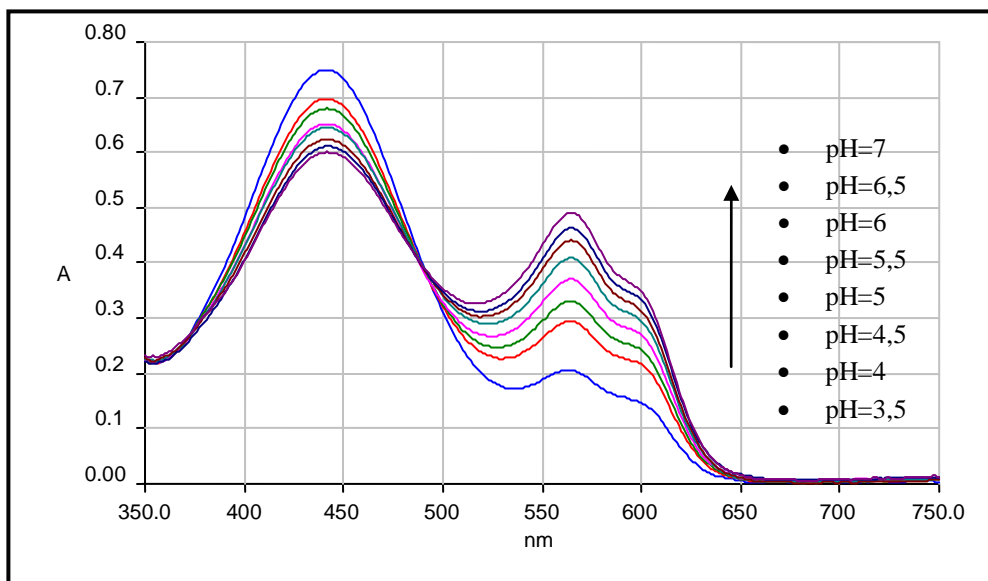
Στο Σχήμα 5.41, φαίνονται τα αποτελέσματα της φασματοφωτομετρικής ανάλυσης της μίξης των δεικτών bromcresol purple και phenol red, ακινητοποιημένα στο κολλοειδές πήκτωμα, για διαφορετικές τιμές pH σε ένα εύρος τιμών από 3,5 μέχρι 7. Οι δύο δείκτες παρουσιάζουν δύο κορυφές, στα 444 και στα 562 nm. Η καμπύλη τιτλοδότησης παρουσιάζει γραμμική σχέση μεταξύ της αλλαγής του pH και της απορρόφησης στα 562 nm, για τις τιμές pH=4-7 (Σχήμα 5.41 B). Η γραμμική σχέση είναι η εξής:

$$y=0,0635x \pm 0,05 \text{ με } R^2=0,9814$$

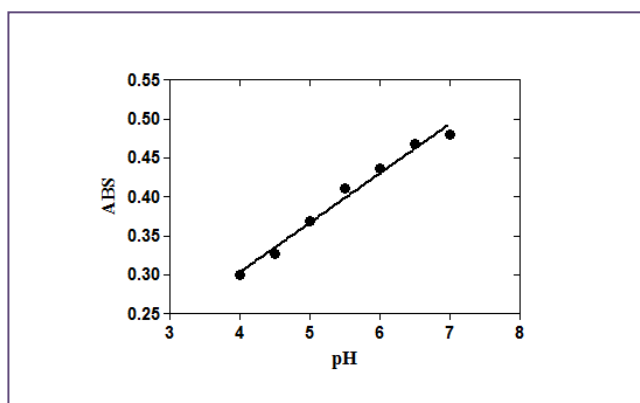
Η περιοχή pH 4-7, καλύπτει την περιοχή δράσης του ενζύμου καθώς η αντίδραση με το σύστημα πραγματοποιείται σε pH 6,5 και υπάρχει πτώση λόγω παραγωγής HCl, ενώ στη συνέχεια εξαιτίας της αναστολής αναμένεται να αυξηθεί.

Η αλλαγή της απορρόφησης είναι μεγαλύτερη στα 562 nm συγκριτικά με τα 444 nm για το ίδιο εύρος pH, συνεπώς επιλέχθηκε το μήκος κύματος στα 562 nm για τις αναλυτικές μετρήσεις, όπου ο χρόνος απόκρισης ήταν τα 3 λεπτά.

A



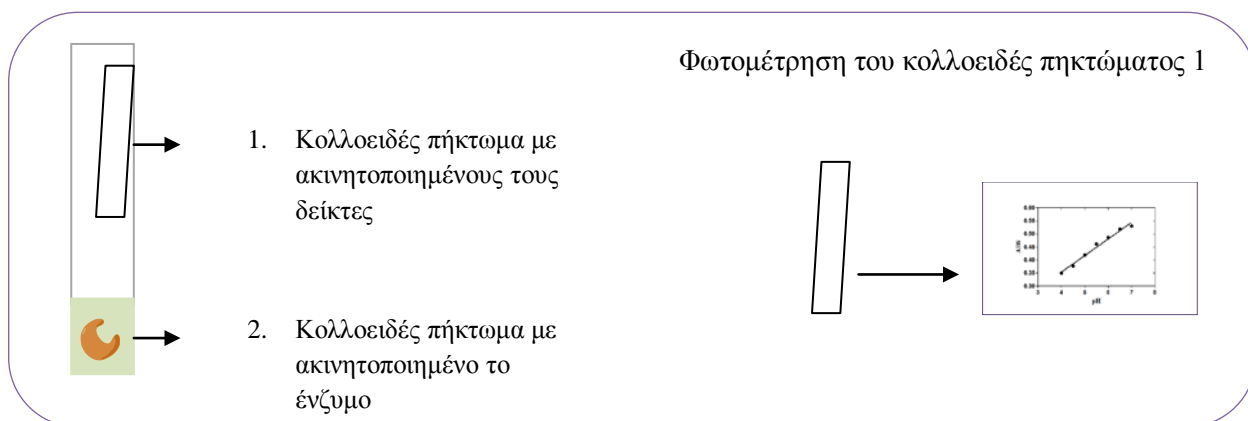
B



Σχήμα 5.41. **A.** Απεικόνιση των φασμάτων των δεικτών phenol red και bromocresol purple, οι οποίοι απαντούν σε μίξη μέσα στο sol-gel **B.** Καμπύλη τιτλοδότησης του μίγματος των δύο δεικτών (απορρόφηση έναντι pH στα 562 nm).

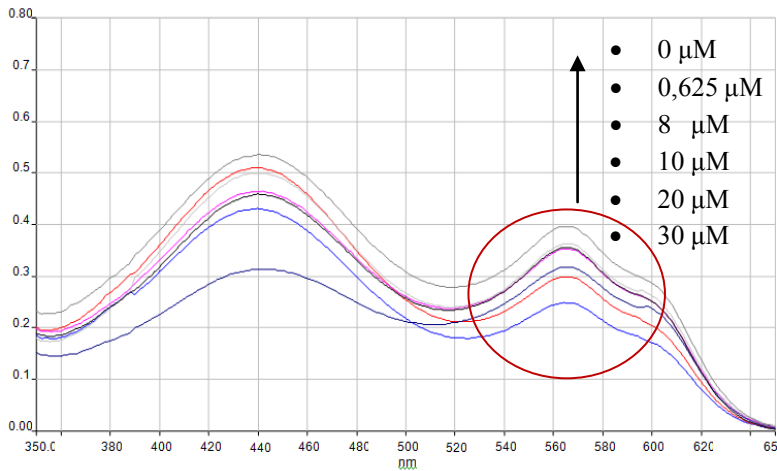
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της αναλυτικής ουσίας, που λειτουργεί σαν αναστολέας έναντι της GST, και στην προκειμένη περίπτωση είναι το α -endosulfan, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα το οποίο αποτελείται από το κolloειδές πήκτωμα με το ακινητοποιημένο ένζυμο και το κolloειδές πήκτωμα με ακινητοποιημένους τους δείκτες, σε αντικειμενοφόρο πλάκα διαστάσεων όσο η γυάλινη κυψελίδα (Σχήμα 5.42). Έτσι αφού πραγματοποιούνται η αντίδραση στο πήκτωμα 2 (δηλαδή μετά από 5 min) τοποθετούνταν το πήκτωμα 1 και μετά από 3 λεπτά, λαμβανόταν το φάσμα. Παρακάτω φαίνεται ο προσδιορισμός του α -endosulfan. Στο Σχήμα 5.43 φαίνεται η πρότυπη καμπύλη, που προέκυψε από το σύστημα για την περιοχή 0-30 μM α -endosulfan.

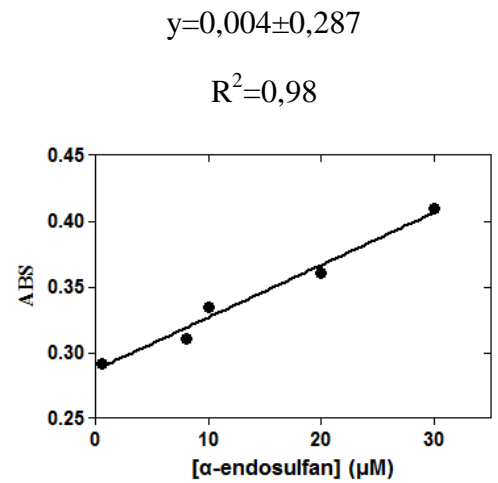


Σχήμα 5.42. Απεικόνιση του συστήματος της αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού του α -endosulfan.

A



B



Σχήμα 5.43. A. Απεικόνιση των φασμάτων του ενζυμικού βιοαισθητήρα, για διαφορετικές συγκεντρώσεις α -endosulfan **B.** Πρότυπη καμπύλη για διαφορετικές συγκεντρώσεις α -endosulfan (απορρόφηση έναντι pH στα 562 nm). Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο δύο επαναλήψεων με τυπική απόκλιση μικρότερη του 5%.

5.4.23. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ α -ENDOSULFAN ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΕΡΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΠΟΥ ΑΝΑΠΤΥΧΘΗΚΕ

Η μεταλλαγμένη μορφή Phe117Ile, χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη βιοαισθητήρα προσδιορισμού του ισομερές α -endosulfan. Η ευαισθησία αυτής της προτεινόμενης μεθόδου, βασίζεται στην ικανότητα που έχει η GST να καταλύει τη δέσμευση της GSH με το CDNB, προκύπτοντας το σύμπλοκο GSH-CDNB και σύμφωνα με την αντίδραση αυτή, να διαφοροποιείται το pH. Η αλλαγή αυτή του pH γίνεται αντιληπτή φασματοσκοπικά στα 562 nm, με το σύστημα των εγκλωβισμένων δεικτών pH brocresol purple και phenol red. Η αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας από το α -endosulfan προκαλεί αύξηση της τιμής του pH (αισθητή με τους δείκτες). Όπως έδειξαν τα αποτελέσματα της παραγράφου 5.4.22 η συγκέντρωση του α -endosulfan συσχετίζεται γραμμικά με την αλλαγή του pH (δηλαδή την αναστολή του ενζύμου). Στο Σχήμα 5.45. φαίνονται οι πρότυπες καμπύλες οι οποίες δημιουργήθηκαν για το α -endosulfan σε εμφιαλωμένο νερό και νερό του δικτύου της Αθήνας. Φαίνεται η αναστολή του ενζύμου να εξαρτάται γραμμικά από τη συγκέντρωση του α -endosulfan στο νερό, σε ένα εύρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

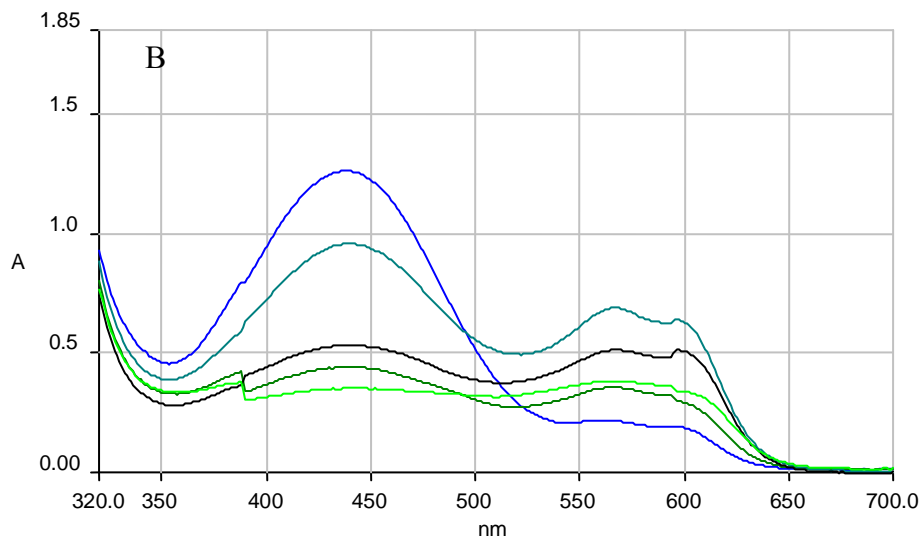
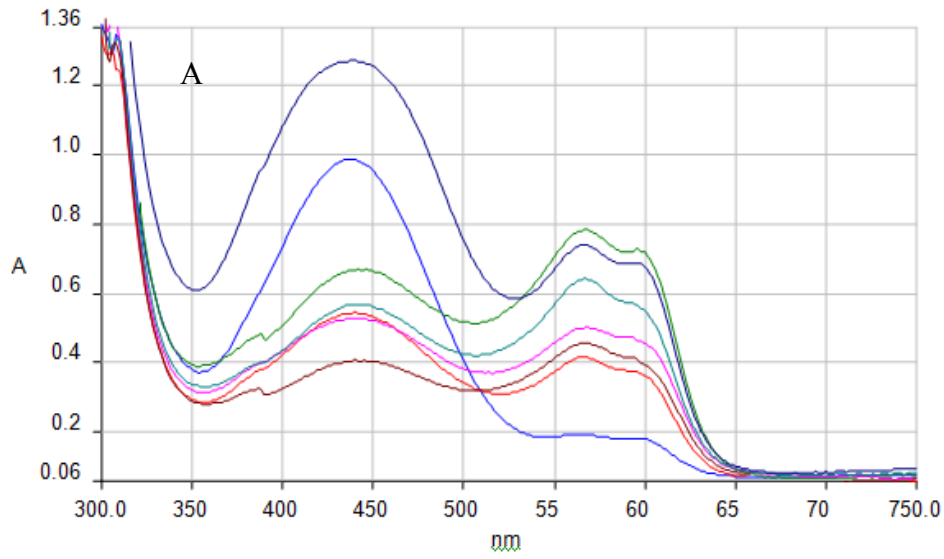
συγκεντρώσεως από 0,8 έως 16 μM . Οι εξισώσεις γραμμικής εξάρτησης που προέκυψαν είναι οι εξής:

Για το εμφιαλωμένο νερό : $y=0,0249x + 0,338$, ($R^2 = 0,99$)

Για το πόσιμο νερό : $y = 0,0472 x + 0,303$, ($R^2 = 0,999$)

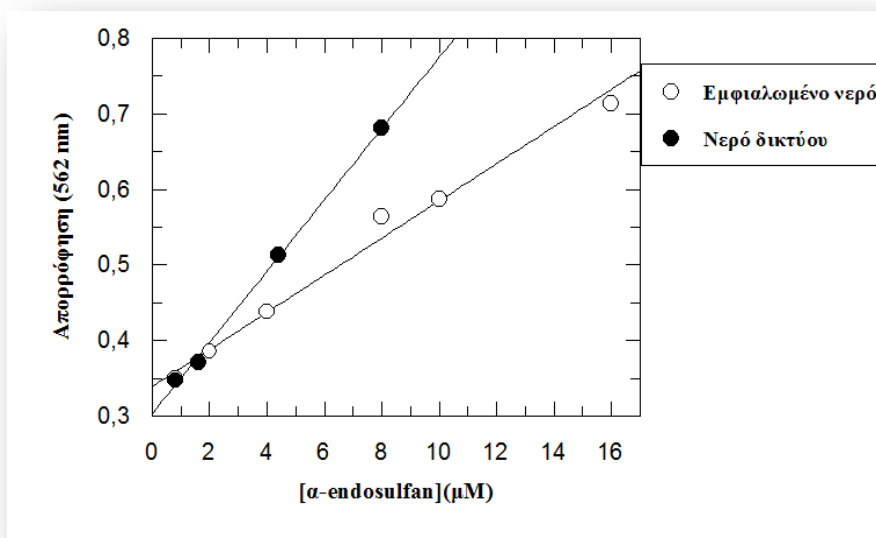
Η εφαρμογή και η επαναληψιμότητα αυτής της μεθόδου μελετήθηκε και με πειράματα ανάκτησης, χρησιμοποιώντας δείγματα πόσιμου νερού δικτύου και εμφιαλωμένου, επιβαρυμένα με ήδη γνωστές συγκεντρώσεις του α -endosulfan. Στον Πίνακα 5.18, φαίνονται τα αποτελέσματα από τα πειράματα ανάκτησης. Η ανάκτηση για τα δείγματα εμφιαλωμένου νερού και το α -endosulfan κυμάνθηκε από 89 - 102% με μέση τιμή $93,42 \pm 8,56\%$ ($N=6$) και για το νερό δικτύου 88 - 104% με μέση τιμή $98,6 \pm 7\%$ ($N=4$).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5



Σχήμα 5.44. Φάσματα εξάρτησης της συγκέντρωσης του α -endosulfan σε εμφιαλωμένο νερό (0,8-16 μ M) (A) και της συγκέντρωσης του α -endosulfan σε νερό δικτύου (0,8-8 μ M) (B).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5



Σχήμα 5.45. Πρότυπες καμπύλες για το α-endosulfan στα 562 nm για το α-endosulfan σε δείγματα εμφιαλωμένου νερού (○) και νερού δικτύου (●).

Πίνακας 5.18. Τιμές ανάκτησης δειγμάτων πόσιμο νερού δικτύου και εμφιαλωμένου, με ήδη γνωστές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων α-endosulfan.

Δείγμα	μM	CONTROL	SPIKED	%
Εμφιαλωμένο νερό	0,8	0,34	0,35	102,94
	2	0,41	0,38	94,15
	4	0,5	0,44	87,6
	8	0,55	0,56	102,73
	10	0,7	0,58	83,86
	16	0,8	0,714	89,25
RDS (%)				8,57
Νερό δικτύου	0,8	0,33	0,35	104,52
	1,6	0,42	0,37	88,75
	4	0,50	0,51	102,19
	8	0,68	0,68	98,98
RDS (%)				7,05

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Καταπόνηση των φυτών P.vulgaris και G.max

Τα βαρέα μέταλλα όταν εφαρμόζονται στο έδαφος ή στο μέσο καλλιέργειας, αμέσως επηρεάζουν το ριζικό σύστημα του φυτού. Επίσης στα περισσότερα μη-υπερ-συσσωρευτικά είδη φυτών, όπως το σιτάρι, το Ni συσσωρεύεται κυρίως στις ρίζες. Συνεπώς, αναμένεται να ανταποκρίνονται βιοχημικά διαφορετικά, το ριζικό σύστημα και το επάνω τμήμα του φυτού, σε αυτές τις συνθήκες καταπόνησης (Gajewska & Skłodowska, 2008). Έτσι και στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε διαφορετική βιοχημική ανταπόκριση μετά την εφαρμογή βαρέων μετάλλων (24 ώρες) και ζιζανιοκτόνων, αιθανόλης και θερμοκρασίας (48 ώρες). Κατόπιν 24 ωρών καταπόνησης βρέθηκαν στα φυτά της σόγιας να παρουσιάζουν υψηλή GST δραστικότητα με το π-νιτροβενζυλοχλωρίδιο σαν υπόστρωμα, να τριπλασιάζεται η δραστικότητα ως προς το εθακρινικό οξύ, ενώ μειώθηκε αισθητά η δράση υπεροξειδάσης. Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται, ότι η καταπόνηση που εφαρμόστηκε, επηρέασε την έκφραση των GSTs περισσότερο στο φυτό *G.max*, σε σχέση με το *P.vulgaris*. Μετά τις 48 ώρες καταπόνησης παρατηρήθηκε πάλι αύξηση της GST δραστικότητας στο *G.max*, ως προς το π-νιτροβενζυλοχλωρίδιο και μείωση ως προς τη δράση υπεροξειδάσης σε σχέση με τους μάρτυρες. Αντίθετα τα φυτά *P.vulgaris* παρουσίασαν υψηλότερη δράση υπεροξειδάσης, σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες. Και τα δύο φυτά μετά τις 48 ώρες, παρουσίασαν αύξηση της ειδικής δραστικότητας ως προς το CDNB. Σκοπός της παρούσας μελέτης, δεν ήταν τόσο η εκτενής βιοχημική έρευνα ως προς του παράγοντες καταπόνησης, αλλά η επαγωγή της έκφρασης των GSTs, το οποίο και επιτεύχθηκε.

Πρωτεϊνική μηχανική

Στη συνέχεια δημιουργήθηκε cDNA βιβλιοθήκη, από τα καταπονημένα φυτά των 48 ωρών και πραγματοποιήθηκε η δημιουργία μη-φυσικών γονιδίων GSTs, με την τεχνική της *in vitro* κατευθυνόμενης εξέλιξης (DNA *shuffling*). Κατόπιν σάρωσης των αποικιών, που προέκυψαν από την εισαγωγή των νέων γονιδίων στον πλασμιδιακό φορέα pEXP-5 CT/TA-TOPO[®], επιλέχθηκε το βέλτιστο ένζυμο με βάση την ειδική δραστικότητα, έναντι του CDNB. Το νέο αυτό ένζυμο *PvGmGSTUG* ανήκει στην τ τάξη.

Οι GSTs των τάξεων τ και φ (GSTUs και GSTFs), δέχονται αλλαγές στη δομή τους κατά την κατάλυση αναδεικνύοντας τον επαγωγικό μηχανισμό προσαρμογής, για τη δέσμευση του υποστρώματος. Συνεπώς είναι κατανοητή η σχέση δομής-λειτουργίας επιτρέποντας έτσι την εφαρμογή μεθόδων πρωτεϊνικής μηχανικής, ώστε να επιφέρουν νέες καταλυτικές λειτουργίες και ιδιότητες (Cummins et al., 2011). Η μεταλλαξογένεση κορεσμού που πραγματοποιήθηκε στη θέση Phe117 του ενζύμου *PvGmGSTUG*, επέφερε επτά νέες μεταλλαγμένες μορφές. Ο σκοπός της εφαρμογής του λογικού ανασχεδιασμού, ήταν η βελτίωση της εκλεκτικότητας του ενζύμου *PvGmGSTUG*, ως προς τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Το συγκεκριμένο ένζυμο παρουσίασε >50% αναστολή με την ομάδα των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων, με την ομάδα των στρομπιλουρινών των μυκητοκτόνων και κάποια μυκητοκτόνα από διαφορετικές κατηγορίες. Οι μορφές Phe117Arg, Phe117Trp, Phe117Ser και η Phe117Ile, παρουσίασαν υψηλότερη αναστολή για τα παραπάνω φυτοπροστατευτικά προϊόντα, με την μορφή Phe117Ile να παρουσιάζει την ισχυρότερη αναστολή για την ομάδα των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων.

Επίσης αν και στο παρελθόν, είχε σχολιαστεί η πιθανή σημαντικότητα της θέσης 117 για το ένζυμο GST σε πορτοκάλι (*Citrus sinensis* L.) (Lo Pierro et al., 2009), στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώθηκε με το λογικό ανασχεδιασμό, καθώς παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές. Βρέθηκε να μειώνεται αισθητά η τιμή της K_m για τη GSH, μέχρι και 27-φορές στη μορφή Phe117Thr, συνεπώς παρατηρήθηκε αύξηση της συγγένειας με τη GSH. Επίσης παρατηρήθηκε αύξηση της σταθεράς εξειδικεύσεως περίπου κατά 3,5 έως 5,5 φορές στις μορφές Phe117Ser, Phe117Ile και Phe117Trp. Ακόμα βρέθηκε να αυξάνεται η θετική συνέργεια ως προς το CDNB για τις μορφές Phe117Gly, Phe117Arg και Phe117Thr.

Το ένζυμο *PvGmGSTUG* βρέθηκε να καταλύει ένα μεγάλο εύρος αντιδράσεων. Από τις αρκετές αλογονωμένες αρωματικές ενώσεις που δοκιμάστηκαν: το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) και τα ανάλογα του: 1-βρωμο-2,4-δινιτροβενζόλιο (BDNB), 1-ιοδω-2,4-δινιτροβενζόλιο (IDNB), π-νιτροβενζυλοχλωρίδιο (pNBC) και 4-χλωρο-7-νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο αποτέλεσαν αποδεκτά υποστρώματα, με το CDNB και το pNBC να παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ειδική δραστηριότητα. Επίσης παρουσίασε δράση υπεροξειδάσης, με το υδροϋπεροξειδίου του κουμενίου και το δι-δωδεκανικό υδροϋπεροξειδίου να είναι τα καλύτερα υποστρώματα, παρουσιάζοντας σχεδόν ίδια ειδική δραστηριότητα με το CDNB. Ακόμα παρουσίασε δραστηριότητα με το

εθακρινικό οξύ και τους ισοθειοκυανικούς εστέρες. Καθώς η μορφή Phe117Ile είναι αυτή που επιλέχθηκε για την ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού φυτοπροστατευτικών προϊόντων και λόγω της σημαντικότητας της δράσης υπεροξειδάσης, μελετήθηκε η δράση της έχοντας ως υπόστρωμα το CuOOH, απ' όπου και προέκυψε ότι έχει την ίδια περίπου ειδική δραστηριότητα με το CDNB.

Ακίνητοποίηση της μεταλλαγμένης μορφής Phe117Ile σε κολλοειδές πήκτωμα (Sol-gel) με σκοπό την έρευνα κατασκευής βιοαισθητήρα

Τα πηκτώματα ως μεσόπορα υλικά, έχουν αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, λόγω των πολλών εφαρμογών τους, όπως ως μέσο προσρόφησης, ως καταλυτική βάση, ως συστήματα διανομής φαρμάκων, καθώς και στο πεδίο της χρωματογραφίας, των μικροηλεκτρονικών και των ηλεκτρο-οπτικών (Schiller et al., 2009). Υπάρχουν πολλά υλικά για τη δημιουργία πηκτώματος, όμως προτιμάται το SiO₂ καθώς προσδίδει δομές δικτύου, μεγάλου εύρους πόρους, επιφανειακές λειτουργίες και οι συνθήκες προετοιμασίας μπορούν να προσαρμόζονται, σε συγκεκριμένο ένζυμο ή εφαρμογή (Pierre, 2004).

Ο εγκλωβισμός της μεταλλαγμένης μορφής, έγινε σε πήκτωμα όπως περιγράφεται από τους Andreou και Clonis, 2001 με την προσθήκη 82 mM CTAB. Οι πηκτές πυριτίου που συντίθενται από σιλάνια μέσω επιφανειοδραστικού παράγοντα, προσδίδουν επιθυμητή δομή πόρων, ομοιόμορφη κατανομή αυτών και μεγάλη εσωτερική επιφάνεια (μέχρι και 1500 m² g⁻¹). Το μέγεθος των πόρων μπορεί να είναι από 1,5 έως 30 nm επιλέγοντας τον κατάλληλο επιφανειοδραστικό παράγοντα και/ή τις κατάλληλες συνθήκες σύνθεσης (Hartmann & Kostrov, 2013). Το CTAB που χρησιμοποιήθηκε, είναι κατιονικός επιφανειοδραστικός παράγοντας, του οποίου οι ιδιότητες προκύπτουν κυρίως από την αμφιφιλική φύση του. Μία από αυτές είναι ο σχηματισμός ευέλικτου πολυμερούς, ώστε να προσαρμόζεται στη δομή και στο σχηματισμό του περιβάλλοντος του, το οποίο είναι το δίκτυο πόρων του κολλοειδούς πηκτώματος. Επίσης τα μόρια του CTAB, μπορούν και προσροφούνται στην επιφάνεια του SiO₂, επηρεάζοντας την κολλοειδή φάση του διαλύματος του πηκτώματος και την μετατροπή του διαλύματος σε πήκτωμα, ομογενοποιώντας αυτό και μειώνοντας την εσωτερική πίεση των τριχοειδών, στα διαφορετικά στάδια σχηματισμού του πορώδους (Rottman et al., 1999). Υπάρχουν πολλές μελέτες σχηματισμού μεσόπορων σωματιδίων, όπου εμπλέκεται το CTAB (Schacht et al.,

1996, Zoldesi et al., 2007, Rana et al., 2002). Ακόμα, η προσθήκη CTAB αυξάνει τη μηχανική αντοχή (Wang et al., 1998).

Κατόπιν εγκλωβισμού του ενζύμου στο πήκτωμα, ακολούθησε η διαδικασία «γήρανσης». Κατά τη διάρκεια «γήρανσης», αυξάνεται ο βαθμός διασύνδεσης (cross-linking) στο πλέγμα και ο εσωτερικός διαλύτης αποβάλλεται από τη μήτρα, προκαλώντας αλλαγή της εσωτερικής πολικότητας και του ιξώδους. Επίσης μειώνεται ο μέσος όρος μεγέθους των πόρων ανάλογα με τις συνθήκες γήρανσης (Dunn & Zink, 1997). Ακόμα κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, είναι πιθανό να τροποποιούνται οι αλληλεπιδράσεις που αφορούν στη δημιουργία δεσμών Si-O-Si και στη συμπύκνωση (Flora & Brennan, 2001). Έχει καταγραφεί ότι η «γήρανση» του ηηκτώματος στους 4⁰C, προκάλεσε μείωση της συρρίκνωσης και καλή πορώδη υφή (Wu & Choi, 2004). Η «γήρανση πραγματοποιήθηκε με TEOS για 2 και για 5 ημέρες. Η χρονική διάρκεια «γήρανσης» των 5 ημερών φάνηκε να διατηρείται καλύτερα τη λειτουργική σταθερότητα του ενζύμου για τις πρώτες 16 ημέρες.

Θέλοντας να μελετηθεί η κινητική συμπεριφορά του ακινητοποιημένου ενζύμου, πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση, όπου βρέθηκε να υπακούει στην εξίσωση κινητικής των Michaelis–Menten ως προς το υπόστρωμα της GSH, με την K_m να αυξάνει περίπου κατά 17-φορές ενώ η σταθερά εξειδικεύσεως να μειώνεται κατά περίπου 4-φορές. Σε αντίθεση με τη GSH, έχοντας το CDNB ως μεταβλητό υπόστρωμα, παρατηρήθηκε σιγμοειδή εξάρτηση του υποστρώματος, παρουσιάζοντας θετική συνέργεια, με μεγαλύτερο συντελεστή Hill από αυτόν της ελεύθερης μορφής. Τις περισσότερες φορές δεν αλλάζει η κινητική συμπεριφορά για το εγκλωβισμένο ένζυμο. Όμως ανάλογα με τη φύση του μέσου εγκλωβισμού και το ένζυμο μπορεί να αλλάξει η σταθερά Michaelis (K_m), η σταθερά αναστολής (K_i), η μέγιστη ταχύτητα (V_{max}) και η ενδογενής καταλυτική σταθερά (k_{cat}) της ενζυμικής αντίδρασης (Pierre, 2004).

Γενικά τα περισσότερα εγκλωβισμένα ένζυμα παρουσιάζουν αύξηση της K_m σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο (Bhatia et al., 2000). Αυτό μπορεί να οφείλεται στον καταμερισμό των υποστρωμάτων μεταξύ διαλύματος και sol gel, καθώς και στην αντίσταση διάχυσης και μεταφοράς των υποστρωμάτων στο ένζυμο. Επιπλέον η παρουσία μικρών πόρων ή στενωπών φαινομένων σε μεγάλους πόρους, μπορεί να μειώσει σημαντικά τους συντελεστές διάχυσης υποστρωμάτων και προϊόντων σε

μήτρα SiO₂. Αν οι διαστάσεις της μήτρας είναι μεγάλες ή αν υπάρχουν πολλοί μικροί πόροι, τα ενζυμικά μόρια «θάβονται» μέσα στο υλικό, κι έτσι η συγκέντρωση του υποστρώματος που δεσμεύεται είναι σημαντικά χαμηλότερη, σε σχέση με αυτή που απαντά στην επιφάνεια. Αν ο ρυθμός διάχυσης του υποστρώματος είναι ικανοποιητικά αργός σε σχέση με την ενζυμική κατάλυση, τότε τα ενζυμικά μόρια που είναι κοντά στην επιφάνεια μπορούν να χρησιμοποιήσουν, τα περισσότερα μόρια υποστρώματος που εισέρχονται στο υλικό, έχοντας ως αποτέλεσμα η συγκέντρωση του υποστρώματος να είναι μηδέν, στο εσωτερικό του υλικού (Bhatia et al., 2000). Για να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα, θα πρέπει να ελέγχονται το μέγεθος των πόρων και η πυκνότητά τους. Επιφανειοδραστικοί και μη, παράγοντες χρησιμοποιούνται για την βελτίωση των πόρων (Kandimalla et al., 2006).

Το σύστημα που αναπτύχθηκε για την ανίχνευση του α -endosulfan, βασίστηκε στην αναστολή του ενζύμου GST από ξενοβιοτικά, τα οποία περιορίζουν τη μετατροπή του υποστρώματος και έμμεσα ανιχνεύεται το ξενοβιοτικό. Έχουν υπάρξει στο παρελθόν τέτοιου είδους βιοαισθητήρες (Enayati et al., 2001, Kapoli et al., 2008, Dowd et al., 2009). Παρότι αυτά τα συστήματα είναι ευαίσθητα, η εξειδίκευσή τους είναι περιορισμένη καθώς μπορεί να υπάρξουν άλλες ενώσεις, οι οποίες μπορούν να λειτουργήσουν ανασταλτικά για το ένζυμο (Chronopoulou & Labrou, 2009).

Το σύστημα βασίστηκε στον εγκλωβισμό του ενζύμου σε πήκτωμα και των δεικτών pH σε άλλο πήκτωμα. Οι μετρήσεις προσδιορισμού του α -endosulfan έγιναν φασματοφωτομετρικά. Από διάφορες μελέτες προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα τα οποία θεωρούνται σημαντικά για τις οπτικές μετρήσεις α) οι χαμηλού μοριακού βάρους αναλυόμενες ουσίες μπορούν να διαχυθούν μέσα στα sol-gels έχοντας πρόσβαση στο εγκλωβισμένο βιομόριο β) η λειτουργία του ακινητοποιημένου βιομορίου είναι ίδια με αυτή του ελεύθερου, αν και παρατηρούνται κάποιες διαφορές γ) ο εγκλωβισμός δεν αποτρέπει την κίνηση του βιομορίου. Συνεπώς η δυνατότητα φυσικής κίνησης, μπορεί να δώσει αρκετές πληροφορίες σχετικά με τις αντιδράσεις του βιομορίου, μέσω φασματοσκοπικής ανάλυσης από τους sol-gel αισθητήρες. Ακόμα τα βιομόρια μπορεί να αλλάξουν λιγότερο, με τον εγκλωβισμό σε σχέση με τις άλλες μεθόδους ακινητοποίησης (Cunningham, 1998).

Για τον προσδιορισμό του α -endosulfan δεν χρειάστηκε επώαση, καθώς η αναστολή ήταν άμεση. Η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του α -endosulfan και της

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

απορρόφησης είναι γραμμική και η σχετική τυπική απόκλιση της προτεινόμενης μεθόδου, είναι της τάξεως 3-5% (N=5). Το αναλυτικό εύρος γραμμικότητας για το α-endosulfan είναι από 0-30 μM .

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΚΑΙ ΔΟΜΕΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ

ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ

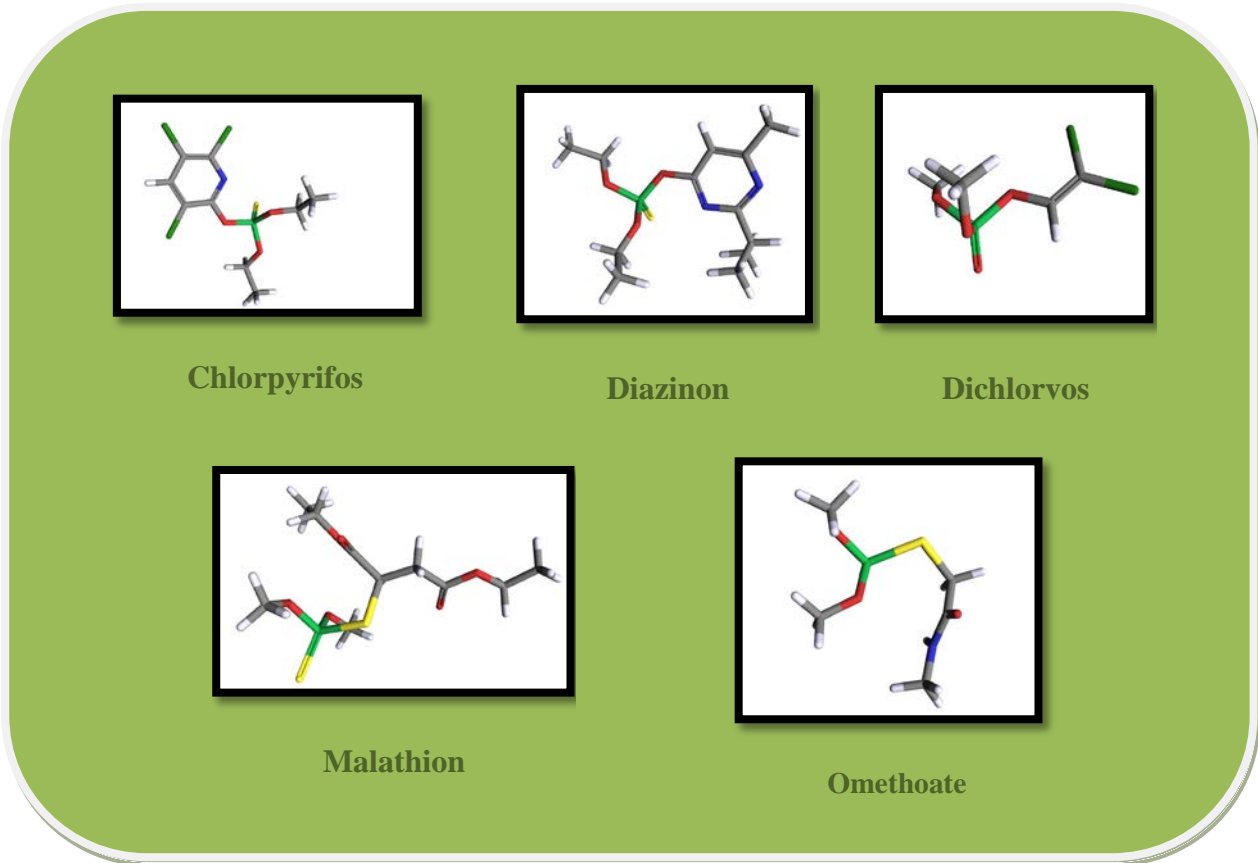
Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα διακρίνονται σε διάφορους τύπους σύμφωνα με τη βιολογική τους δράση, η οποία διακρίνεται σε μοριακό επίπεδο (μηχανισμός δράσης) και κυτταρικό (τρόπο δράσης) (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 2008). Ο βασικός διαχωρισμός γίνεται σε κυτταρικό επίπεδο και υπάρχουν οι εξής κατηγορίες: εντομοκτόνα, ακαρεοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, νηματωδοκτόνα, μυκητοκτόνα. Οι δομές των φυτοπροστατευτικών προϊόντων, στα παρακάτω σχήματα είναι από την ιστοσελίδα PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>) και το πρόγραμμα Pc3D Viewer. Η απεικόνιση των στοιχείων γίνεται με τα εξής χρώματα:

● = άνθρακα	● = άζωτο
● = οξυγόνο	● = χλώριο
○ = υδρογόνο	● = φώσφορος
● = θείο	● = φθόριο

A. ENTOMOKTONA

- Οργανοφωσφορικά

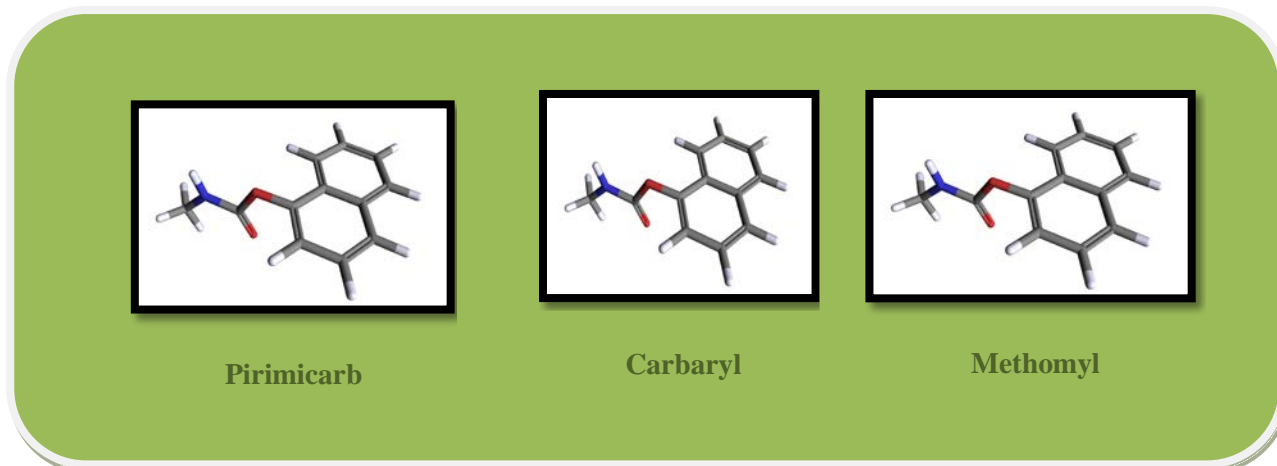
Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα είναι ουδέτεροι εστέρες του φωσφορικού, φωσφοροθειονικού, πυροφωσφορικού και φωσφοροαμιδικού οξέος με αριστή υδατοδιαλυτότητα και λιποφιλικότητα ώστε να απορροφούνται από τον εξωσκελετό και τις πλασματικές μεμβράνες των εντόμων και ακάρεων.



Σχήμα 1. Οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα: chlorpyrifos, diazinon, dichlorvos, malathion, omethoate.

ο Καρβαμιδικά

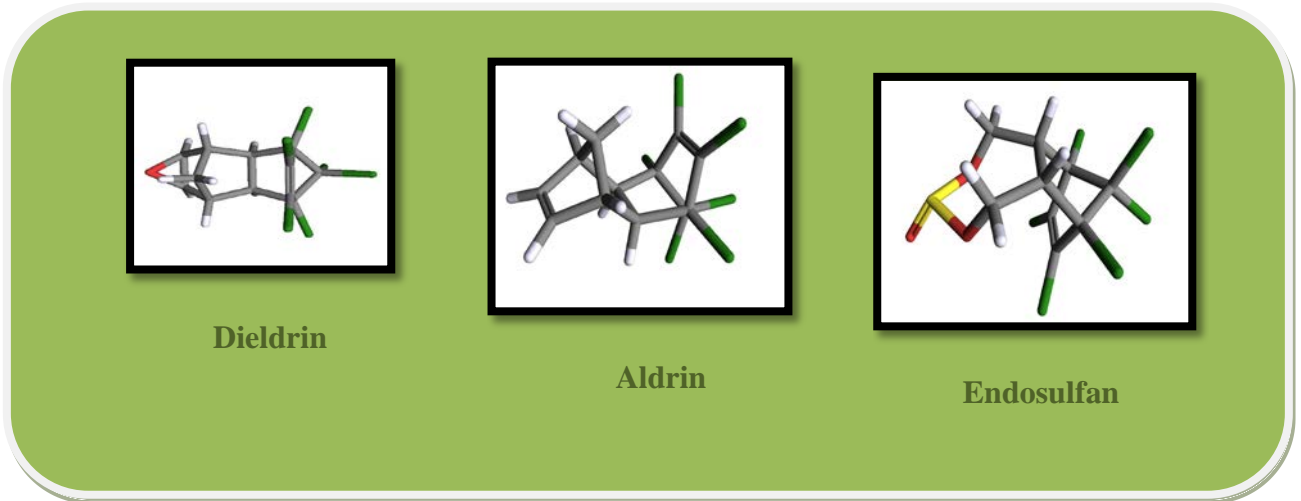
Τα καρβαμιδικά είναι αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης. Το pirimicarb είναι διμεθυλοκαρβαμιδικό, ταχείας δράσεως αφιδοκτόνο με αρωματικό ετεροκυκλικό δακτύλιο ($LD_{50}=20,9$ mg/Kg). Το carbaryl είναι μονομεθυλοκαρβαμιδικό εντομοκτόνο επαφής με διασυστηματική δράση ευρέως φάσματος ($LD_{50}=614$ mg/Kg). Το methomyl είναι σχετικά τοξικό ($LD_{50}=30$ mg/Kg) ευρέως φάσματος διασυστηματικό εντομοκτόνο και ακαρεοκτόνο (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 2008).



Σχήμα 2. Καρβαμιδικά εντομοκτόνα: pirimicarb, carbaryl, methomyl.

- ο Οργανοχλωριωμένα

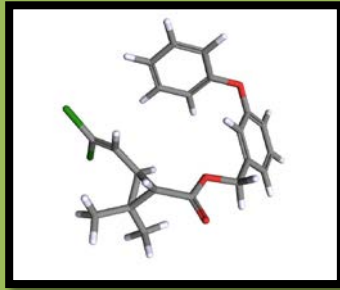
Τα οργανοχλωρικά εντομοκτόνα κατατάσσονται σε τρεις ομάδες: ομάδα DDT, ομάδα HCH και ομάδα των χλωριωμένων κυκλοδιενίων (Κλώνης, 2007). Τα πιο σημαντικά οργανοχλωριωμένα κυκλοδιενικά εντομοκτόνα είναι εκείνα που έχουν στο μόριο τους 4-ενωμένους 5-μελής δακτυλίους. Σε αυτή την υποομάδα ανήκουν το dieldrin και το aldrin (Σχήμα 3). Είναι εντομοκτόνα επαφής, σταθερά και πολύ λιπόφιλα. Το endosulfan είναι συγγενικό κυκλοδιενικό, το οποίο υδρολύεται αργά σε υδατικά αλκαλικά και όξινα διαλύματα δίνοντας διόλες και SO₂. Τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα λόγω το ότι είναι λιπόφιλα σταθερά μόρια, βιοαποδομούνται δύσκολα και γι' αυτό έχουν τάση να συσσωρεύονται στο περιβάλλον (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 2008). Δρουν αναστέλλοντας την λειτουργία των καναλιών των ιόντων χλωρίου που συνδέονται με τους υποδοχείς GABA, έτσι προκαλείται υπερδιέγερση του νευρικού συστήματος.



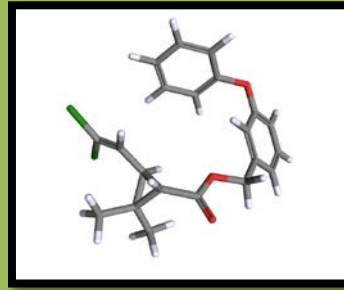
Σχήμα 3. Οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα: dieldrin, aldrin, endosulfan.

ο Πυρεθροειδή

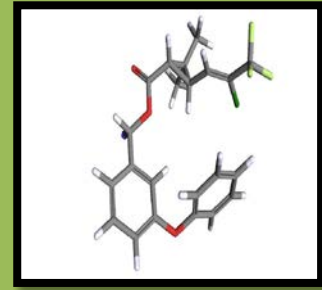
Τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα απαντούν ως φυσικοί και συνθετικοί εστέρες. Τα φυσικά πυρεθροειδή είναι συνθετικά ομόλογα της πυρεθρίνης I, ενός φυτικού προϊόντος (πύρεθρου) προερχόμενο από την εκχύλιση χρυσανθέμων (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 2008).



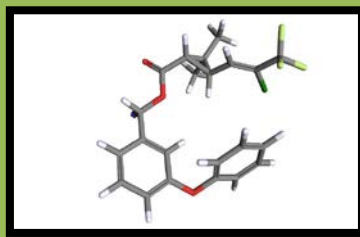
Permethrin



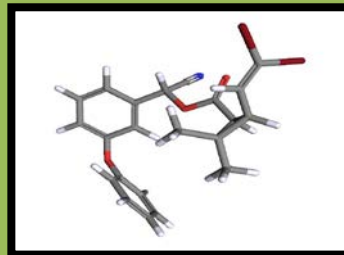
Fenvalerate



Lambda cyhalothrin



α -cypermethrin

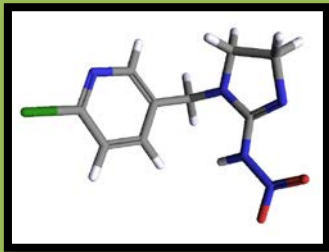


Deltamethrin

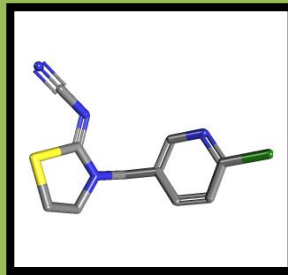
Σχήμα 4. Πυρεθροειδή εντομοκτόνα: permethrin, fenvalerate, lambda-cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin.

ο Νεονικοτινοειδή

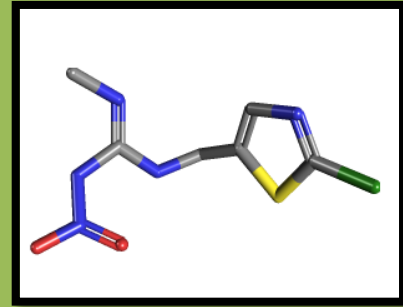
Τα νεονικοτινοειδή δρουν ως συναγωνιστές της ακετυλοχολίνης στους νικοτινικούς υποδοχείς της (nAChR_ς). Ο διαχωρισμός των ουσιών που δρουν σε αυτούς τους υποδοχείς σε νικοτινοειδή και νεονικοτινοειδή, κατά ορισμένους ερευνητές οφείλεται στο ότι τα νικοτινοειδή σε φυσιολογικό pH είναι ιονισμένα και είναι εκλεκτικά των nAChR_ς των θηλαστικών. Αντίθετα, τα νεονικοτινοειδή δεν ιονίζονται και έχουν εκλεκτικότητα έναντι των nAChR_ς των εντόμων (Παπαδόπουλου-Μουρκίδου, 2008).



Imidacloprid



Thiacloprid

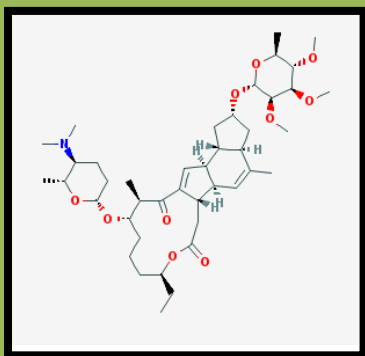


Clothianidin

Σχήμα 5. Νεανικοτινοειδή εντομοκτόνα: imidacloprid, thiacloprid, clothianidin.

ο Σπινოსύνες

Οι σπινοςύνες είναι μακροκυκλικές λακτόνες, που έχουν στο μόριο τους ένα χαρακτηριστικό τετρακυκλικό σκελετό, αποτελούμενο από δύο πενταμελείς, έναν εξαμελή και έναν δεκατριαμελή δακτύλιο, καθώς και δύο μόρια σακχάρου. Έχουν εξαιρετική και ταχεία εντομοκτόνο δράση εναντίον αφίδων, διπτέρων, κατσαρίδων, τερμιτών, ακάρεων και λεπιδοπτέρων. Δρουν στους νικοτινικούς υποδοχείς της ακετυλοχολίνης και στους υποδοχείς GABA (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 2008).

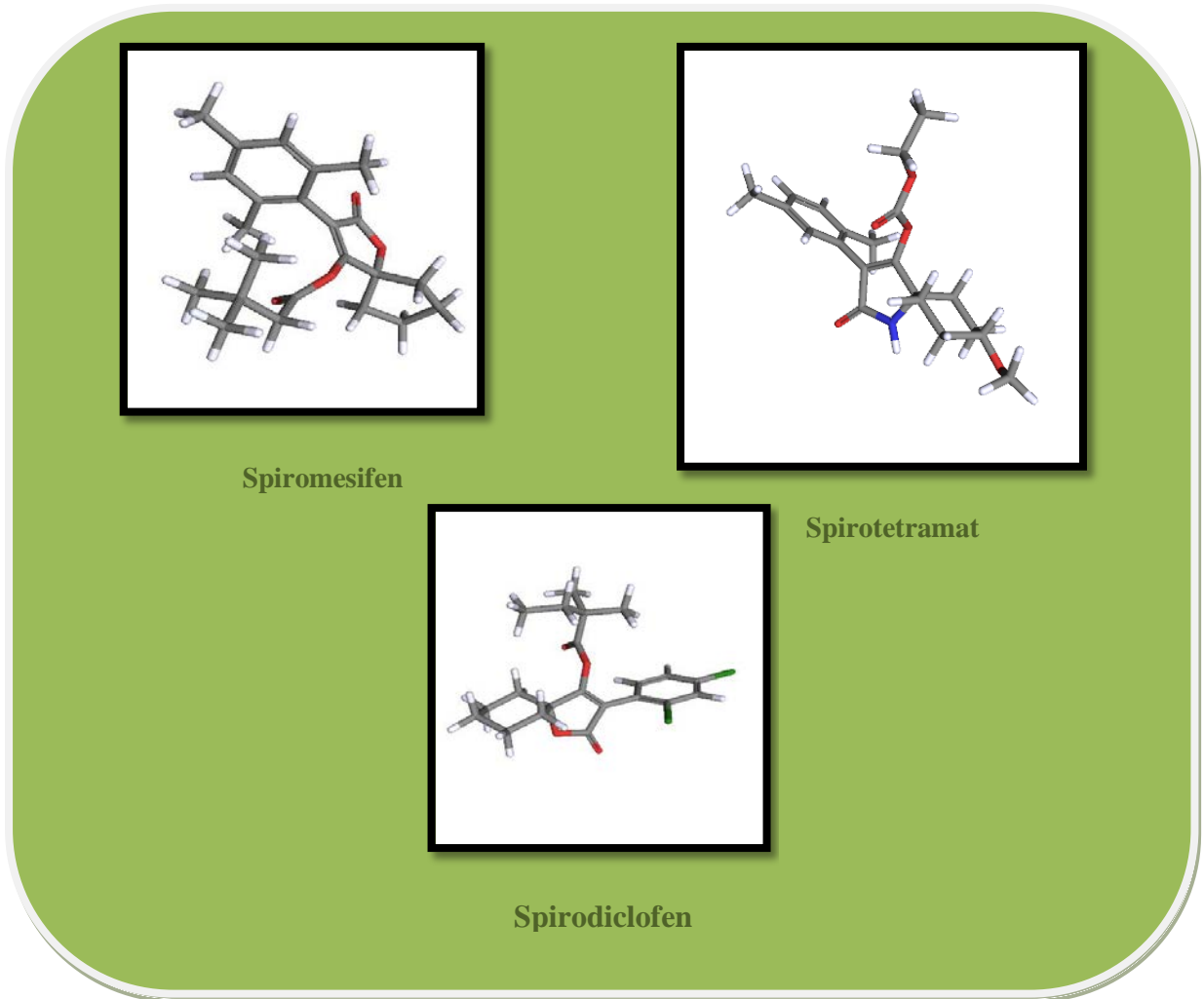


Spinosad

Σχήμα 6. Σπινοςύνες: spinosad, spiroticlofen.

ο Εστέρες τετρονικού οξέος

Τα τετρονικά παράγωγα spiromesifen spirodichlofen έχουν εντομοκτόνο και ακαρεοκτόνο δράση, ενώ το spirotetramat μόνο εντομοκτόνο. Πρόκειται για αναστολείς της βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 2008).

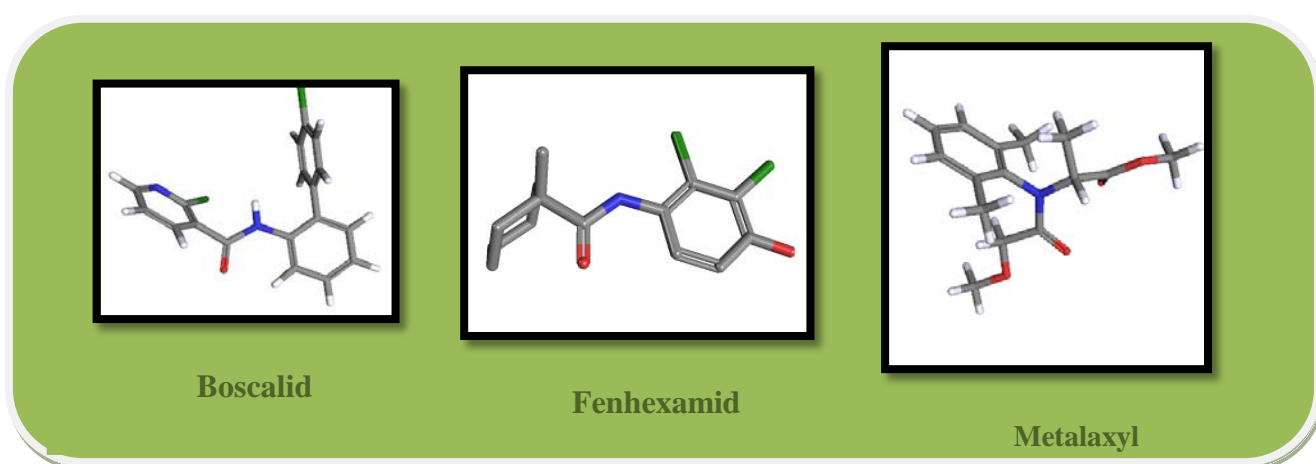


Σχήμα 7. Εστέρες τετρονικού οξέος: spiromesifen, spirotetramat spirodichlofen.

ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ

ο Ανιλίδια

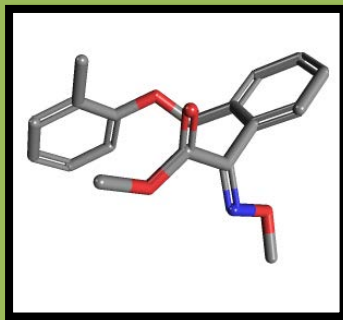
Είναι ομάδα διασυστηματικών μυκητοκτόνων που αναστέλλουν την οξείδωση του σαζινικού οξέος προς φουμαρικό, αναστέλλοντας την σαζινική αφυδρογονάση στο Σύμπλοκο II της αναπνοής. Η σαζινική αφυδρογονάση, συμμετέχει στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA). Συνεπώς, προκαλείται συσσώρευση σαζινικού οξέος στα κύτταρα των μυκήτων, διακόπτεται ο κύκλος TCA και το κύτταρο στερείται $FADH_2$ (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 2008).



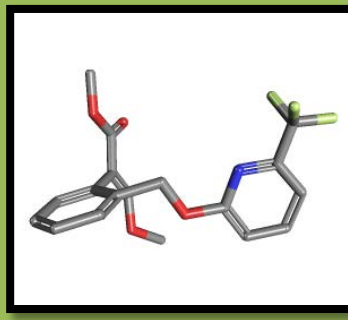
Σχήμα 8. Ανιλίδια: boscalid, fenhexamid, matalaxyl.

ο Στρομπιλουρίνες

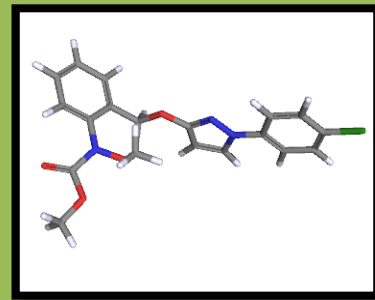
Οι στρομπιλουρίνες είναι μια νέα σχετικά ομάδα μυκητοκτόνων που αναπτύχθηκε έχοντας ως πρότυπο ένα φυσικό προϊόν τη στρομπιλουρίνη Α, που παράγεται από τον μύκητα *Strobilurus tenacellus*. Δρουν ως αναστολείς της μιτοχονδριακής αναπνοής, συγκεκριμένα στο Σύμπλοκο III, στην αλυσίδα της αναπνοής (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 2008).



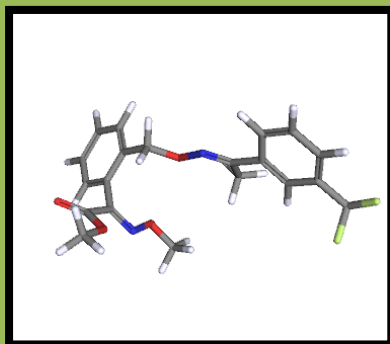
Kresoxim-methyl



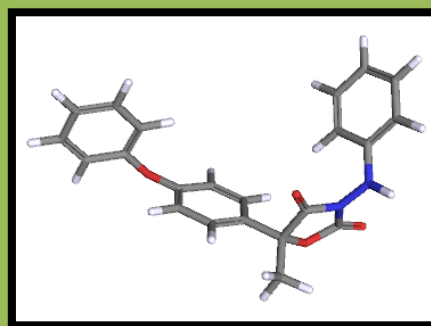
Picoxystrobin



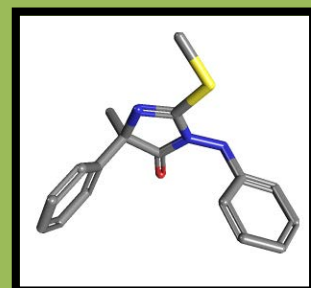
Pyraclostrobin



Trifloxystrobin



Famoxadone

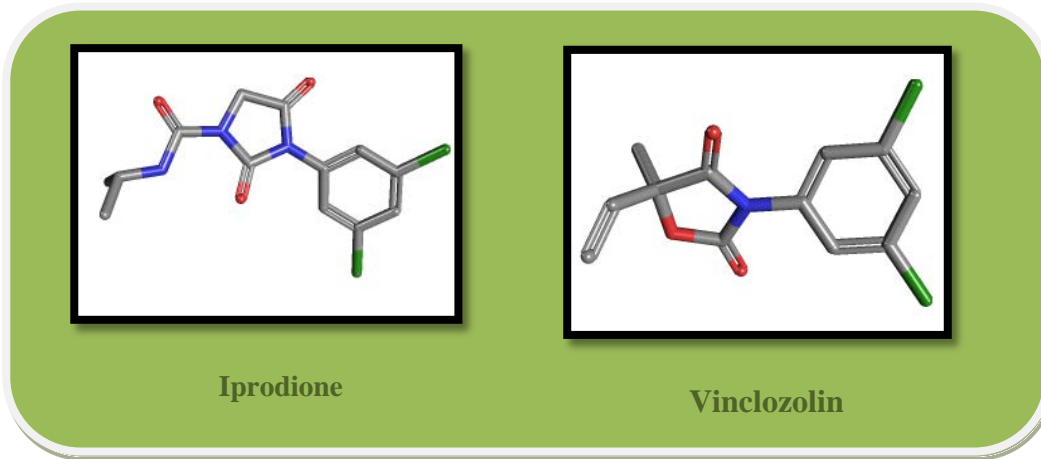


Fenamidone

Σχήμα 9. Στρομπιλουρίνες: Kresoxim-methyl, picoxystrobin, pyraclostrobin, trifloxystrobin, famoxadone, fenamidone.

ο Δικαρβοξιμίδια

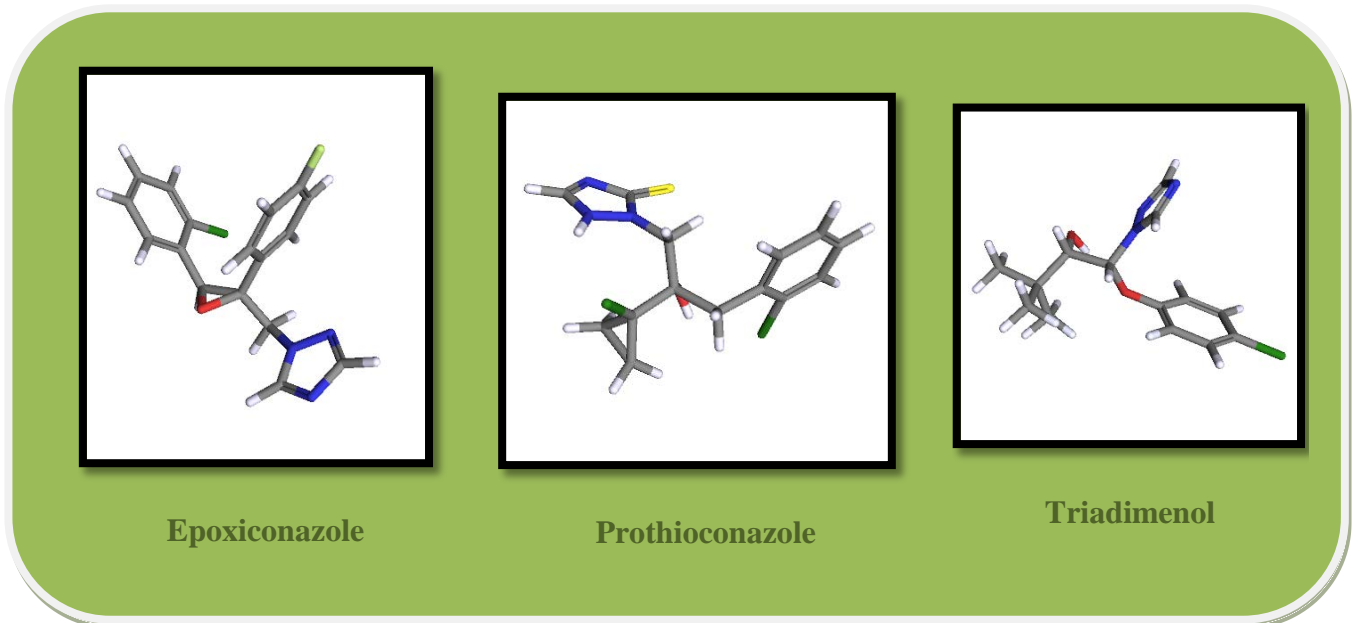
Τα δικαρβοξιμίδια χρησιμοποιούνται ευρέως για την καταπολέμηση του βοτρυτή στην άμπελο. Αναστέλλουν την ανάπτυξη μυκηλίων και τη βλάστηση σπορίων των μυκήτων. Αναφέρεται ότι αναστέλλουν τη σύνθεση της χιτίνης. Ειδικά το vinclozolin αναστέλλει την παραγωγή τριγλυκεριδίων και το iprodione τη βιοσύνθεση στερολών και του DNA (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 2008).



Σχήμα 10. Δικαρβοξαμίδια: iprodione, vinclozolin.

ο Τριαζόλια

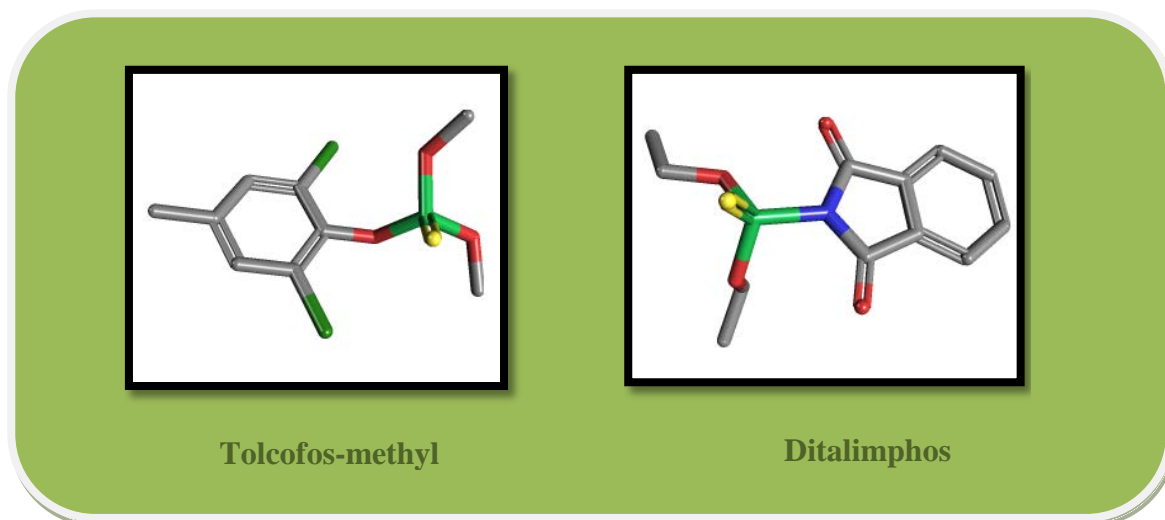
Τα τριαζόλια έχουν στο μόριο τους ένα ή περισσότερα ασύμμετρα άτομα άνθρακα και υπαπτούν ως μίγματα ισομερών. Το κάθε ισομερές έχει συνήθως διαφορετική βιολογική εξειδίκευση συμπεριλαμβανομένης της παρεμβολής τους στη βιοσύνθεση της γιββερελλίνης και στη βιοσύνθεση φυτικών στερολών (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 2008).



Σχήμα 11. Τριαζόλια: epoxiconazole, prothioconazole, triadimenol.

ο Οργανοφωσφορικοί εστέρες

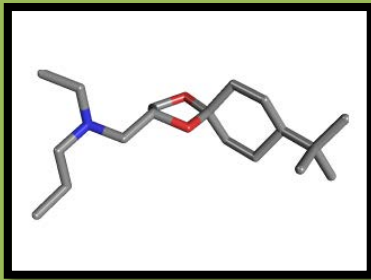
Το toclofos-methyl ανήκει στην ομάδα των αναστολέων, της βιοσύνθεσης φωσφοριλιπιδίων των μεμβρανών. Είναι φωσφοθειονικός εστέρας και χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση ειδών *Rhizoctonia*, *Corticium*, *Sclerotium* και *Typhula*, στις πατάτες, στα τεύτλα, στο βαμβάκι, σε καλλωπιστικά φυτά κ.α. Το ditalimphos προκαλεί αλκυλιώσεις ενζύμων, χωρίς να είναι σίγουρο, αν σε αυτό οφείλεται η μυκητοτοξικότητα (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 2008).



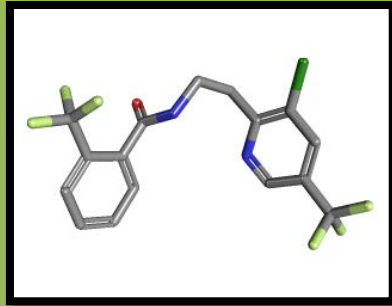
Σχήμα 12. Οργανοφωσφορικοί εστέρες: tolcophosmethyl, ditalimphos.

ο Διάφορα μυκητοκτόνα

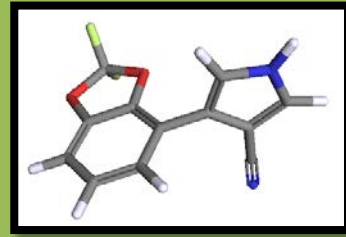
Το spiroxamine, είναι μίγμα δύο ισομερών και ανήκει στις σπυροκεταλαμίνες. Αναστέλλει την Δ^{14} -αναγωγή, καθώς και άλλα ένζυμα του μονοπατιού της εργοστερόλης. Το carbendazim ανήκει στα βενζιμιδαζολικά, τα οποία θεωρούνται αναστολείς της μίτωσης, παρεμβαίνοντας στον πολυμερισμό της τουμπουλίνης. Το fludioxonil ανήκει στα φαινυλοπυρρόλια, τα οποία αναστέλλουν την κινάση MAP, που συμμετέχει στην μετάδοση μηνύματος ελέγχου της ωσμωτικής πίεσης των κυττάρων (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 2008). Το fluopyram ανήκει στις πυριδίνες και αναστέλλει τη βιοσύνθεση στερολών.



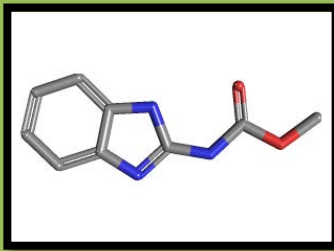
Spiroxamine



Carbendazim



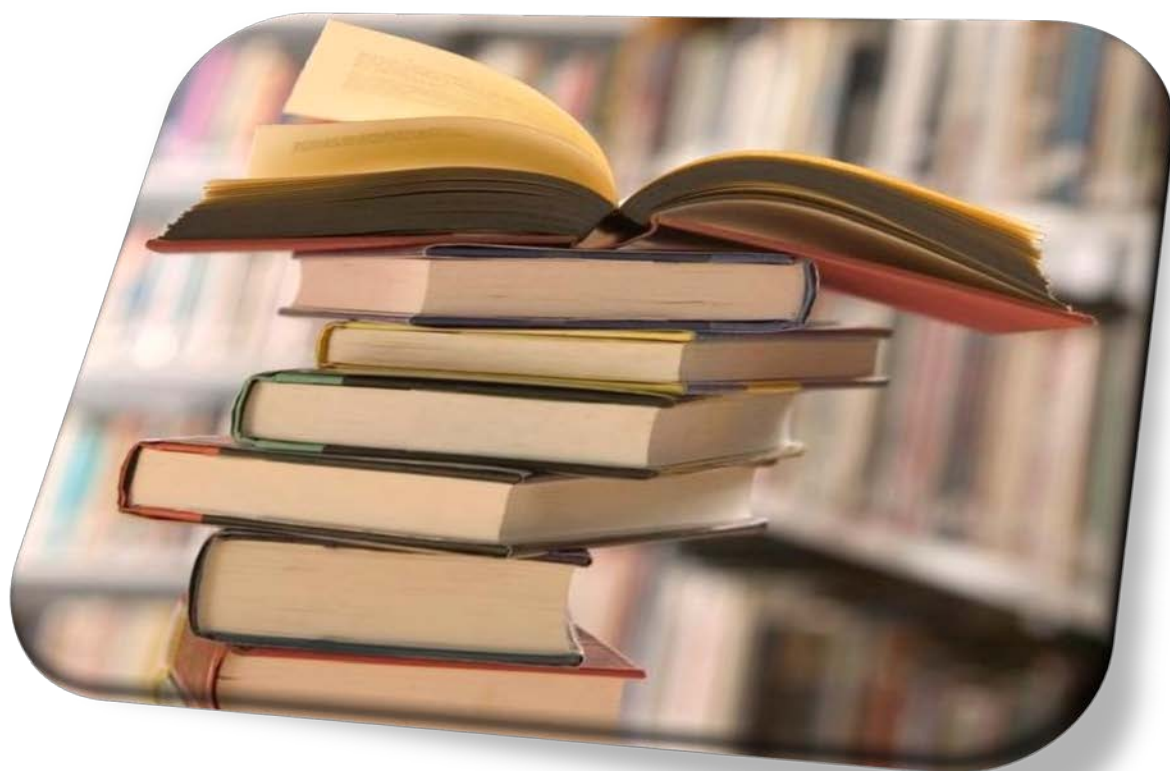
Fludioxonil



Fluopyram

Σχήμα 13. Διάφορα μυκητοκτόνα: spiroxamine, carbendazim, fludioxonil, fluopyram.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



Ελληνική βιβλιογραφία

Αξαρχλή, Ε. (2009). Πρωτεϊνική μηχανική και χαρακτηρισμός του ενζύμου μεταφοράση του γλουταθείου. Διδακτορική διατριβή.

Κλώνης, Ι. (2011). Ενζυμική Βιοτεχνολογία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. Ηράκλειο.

Κλώνης, Ι. (2007). Ενζυμολογία. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.

Παπαδοπούλου- Μουρκίδου, Ε. (2008). Γεωργικά Φάρμακα: Χημεία, Φαρμακολογία (Φαρμακοκινητική/Μεταβολισμός/Τρόπος δράσης), Τοξικολογία, Οικοτοξικολογία και συμπεριφορά και τύχη στο περιβάλλον. Εκδόσεις Μέθεξις, Θεσσαλονίκη.

Ξένη βιβλιογραφία

Abdul, M.M. (1993). Biocatalysis and immobilized enzyme/cell bioreactors. Promising techniques in bioreactor technology. *Biotechnology (NY)*. 11, 690–695.

Aceto, A., Dragani, B., Melino, S., Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., Petruzzelli, R. (1997). Identification of an N-capping box that affects the $\alpha 6$ -helix propensity in glutathione S-transferase superfamily proteins: a role for an invariant aspartic residue. *Biochem. J.* 322, 229–234.

Adler, V., Yin, Z., Fuchs, S.Y., Benezra, M., Rosario, L., Tew, K.D., Pincus, M.R., Sardana, M., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Davis, R.J., Ronai, Z. (2002). Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J.* 18, 1321–1334.

Agrawal, A.A., Kurashige, N.S. (2003). A role for isothiocyanates in plant resistance against the specialist herbivore *Pieris rapae*. *J. Chem. Ecol.* 29, 1403–1415.

Alexeeva, M., Enright, A., Dawson, M.J., Mahmoudian, M., Turner, N.J. (2002). Deracemisation of α -methylbenzylamine using an enzyme obtained by in vitro evolution. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41, 3177–3180.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alias, Z., Clark, A.G. (2007). Studies on the glutathione S-transferase proteome of adult *Drosophila melanogaster*: responsiveness to chemical challenge. *Proteomics*. 7, 3618-3628.
- Ali-Osman, F., Akande, O., Antoun, G., Mao, J.X., Buolamwini, J. (1997). Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J. Biol. Chem.* 272, 10004-100012.
- Alonso-Lomillo, M.A., Dominguez-Renedo, O., Arcos-Martinez, M.J. (2009). Electrochemical determination of levetiracetam by screen-printed based biosensors. *Bioelectrochemistry*. 74, 306–309.
- Allocati, N., Federici, L., Masulli, M., Di Ilio, C. (2008). Cysteine 10 is critical for the activity of *Ochrobactrum anthropi* glutathione transferase and its mutation to alanine causes the preferential binding of glutathione to the H-site. *Proteins*. 71, 16-23.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Amine, A., Mohammadi, H., Bourais, I., Palleschi, G. (2006). Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosens. Bioelectron.* 21, 1405-1423.
- Ammar, W.B., Mediouni, C., Tray, B., Ghorbel, M.H., Jemal, F. (2008). Glutathione and phytochelatin contents in tomato plants exposed to cadmium. *Biol. Plant.* 52, 314-320.
- Anderson, M.E. (1998). Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem. Biol. Interact.* 111-112, 1-14.
- Andreou, V.G., Clonis, Y.D. (2002a). A portable fiber-optic pesticide biosensor based on immobilized cholinesterase and sol-gel entrapped bromocresol purple for in-field use. *Biosens. Bioelectron.* 17, 61–69.
- Andreou, V.G., Clonis, Y.D. (2002b). Novel fiber-optic biosensor based on immobilized glutathione S-transferase and sol-gel entrapped bromocresol green for the determination of atrazine. *Anal. Chim. Acta* 460, 151–161.

Andreescu, S., Avramescu, A., Bala, C., Magearu, V., Marty, J.L. (2002). Detection of organophosphorus insecticides with immobilized acetylcholinesterase: comparative study between two enzyme sensors. *Anal. Bioanal. Chem.* 374, 39–45.

Aposhian, H.V., Zakharyan, R.A., Avram, M.D., Sampayo-Reyes, A., Wollenberg, M.L. (2004). A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 327-335.

Armstrong, R.N. (1997). Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 2–18.

Arnold, F.H. (2001). Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature.* 409, 253-257.

Arya, S.K., Prusty, A.K., Singh, S.P., Solanki, P.R., Pandey, M.K., Datta, M., Malhotra, B.D. (2007). Cholesterol niosensor based on N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyl-trimethoxysilane self-assembled monolayer. *Anal. Biochem.* 363, 210–218.

Aspelin, L. Pesticide Industry Sales and Usage, 1992 and 1993 Market Estimates, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1994.

Atkins, W.M., Lu, W.D., Cook, D.L. (2002). Is there a toxicological advantage for non-hyperbolic kinetics in cytochrome P450 catalysis? Functional allostery from “distributive catalysis”. *J. Biol. Chem.* 277, 33258–33266.

Atkinson, H. J., Babbitt, P. C. (2009). Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold. *Biochemistry.* 48, 11108–11116.

Axarli, I., Dhavala, P., Papageorgiou, A.C., Labrou, N.E. (2009a). Crystallographic and functional characterization of the fluorodifeninducible glutathione transferase from *Glycine max* reveals an active site topography suited for diphenylether herbicides and a novel L-site. *J. Mol. Biol.* 385, 984–1002.

Axarli, I., Dhavala, P., Papageorgiou, A.C., Labrou, N.E. (2009b). Crystal structure of *Glycine max* glutathione transferase in complex with glutathione: investigation of the

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

mechanism operating by the Tau class glutathione transferases. *Biochem. J.* 422, 247-256.

Axarli I., Labrou N.E., Petrou C., Kordopatis P., Rassias N., Clonis Y.D. (2009c). Sulphonamide-based bombesin prodrug analogues for glutathione S-transferase, useful in targeted cancer chemotherapy. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 2009-2016.

Axarli, I.A., Rigden, D.J., Labrou, NE. (2004). Characterization of the ligandin site of maize glutathione S-transferase I. *Biochem. J.* 382, 885-893.

Awasthi, Y.C., Ansari, G.A., Awasthi, S. (2005). Regulation of 4-hydroxynonenal mediated signaling by glutathione S-transferases. *Methods Enzymol.* 401, 379-407.

Balabushevich, N.G. Zimina, E.P., Larionova, N.I. (2004). Encapsulation of catalase in polyelectrolyte microspheres composed of melamine formaldehyde, dextran sulfate, and protamine. *Biochemistry (Mosc.)* 69, 763-769

Balogh, L.M., Atkins, W.M. (2011). Interactions of glutathione transferases with 4-hydroxynonenal. *Drug Metab. Rev.* 43, 165-178.

Bannai, H., Tamada, Y., Maruyama, O., Nakai, K., Miyano, S. (2002). Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics.* 18, 298-305.

Banerjee, K. (2010). Novel GC/MS, HPLC/MS, and HPLC-diode array detector-based methods for determination of pesticide residues in food, feed, water, and soil samples. *J. AOAC Int.* 93, 353-354.

Bartling, D., Radzio, R., Steiner, U., Weiler, E.W. (1993). A glutathione S-transferase with glutathione-peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*. Molecular cloning and functional characterization. *Eur. J. Biochem.* 216, 579-586.

Basantani, M., Srivastava, A. (2007). Plant glutathione transferases: a decade falls short. *Can. J. Bot.* 85, 443-456.

Becher, M., Talke, I.N., Krall, L., Krämer, U. (2004). Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant J.* 37, 251-258.

Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne G., Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.*, 340, 783-795.

Benekos, K., Kissoudis, C., Nianiou-Obeidat, I., Labrou, N., Madesis, P., Kalamaki, M., Makris, A., Tsaftaris, A. (2010). Overexpression of a specific soybean GmGSTU4 isoenzyme improves diphenyl ether and chloroacetanilide herbicide tolerance of transgenic tobacco plants. *J. Biotechnol.* 150, 195–201.

Benson, A.M., Talalay, P., Keen, J.H., Jakoby, W.B. (1977). Relationship between the soluble glutathione-dependent delta 5-3-ketosteroid isomerase and the glutathione S-transferases of the liver, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 158–162.

Berhane, K., Widerstein, M., Engstrom, A., Kozarich, J.W., Mannervik, B. (1994). Detoxification of base propenals and other alpha, beta unsaturated aldehyde products of radical reactions, and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 1480-1484.

Beuckmann, C.T., Fujimori, K., Urade, Y. Hayaishi, O. (2000). Identification of mu-class glutathione transferases M2-2 and M3-3 as cytosolic prostaglandin E synthases in the human brain, *Neurochem. Res.* 25, 733–738.

Bhatia, R.B., Brinker, C.J., Gupta, A.K., Singh, A.K. (2000). Aqueous sol-gel process for protein encapsulation. *Chem. Mater.* 12, 2434–2441.

Bianchi, M.W., Roux, C., Vartanian, N. (2002). Drought regulation of GST8, encoding the Arabidopsis homologue of ParC/Nt107 glutathione transferase/peroxidase. *Physiol. Plant* 116, 96–105.

Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.

Blackburn, A.C., Woollatt, E., Sutherland, G.R., Board, P.G. (1998). Characterization and chromosome location of the gene GSTZ1 encoding the human Zeta class glutathione transferase and maleylacetoacetate isomerase, *Cytogenet. Cell Genet.* 83, 109–114.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bladeren, P.J.V., Ommen, B.V. (1991). The inhibition of glutathione S-transferases: mechanisms, toxic consequences and therapeutic benefits. *Pharmac. Ther.* 51, 35—46.
- Board, P.G., Anders, M.W. (2007). Glutathione transferase omega 1 catalyzes the reduction of S-(phenacyl)glutathiones to acetophenones, *Chem. Res. Toxicol.* 20, 149–154.
- Board, P.G., Baker, R.T., Chelvanayagam, G., Jermiin, L.S. (1997). Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem. J.* 328, 929-935.
- Board, P.G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermiin, L.S., Schulte, G.K., Danley, D.E., Hoth, L.R., Griffor, M.C., Kamath, A.V., Rosner, M.H., Chrnyk, B.A., Perregaux, D.E., Gabel, C.A., Geoghegan, K.F., Pandit, J. (2000). Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* 275, 24798-24806.
- Board, P.G., Menon, D. (2013). Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1830, 3267–3288.
- Boyland, E., Booth, J., Sims, P. (1961). An enzyme from rat liver catalyzing conjugations with glutathione. *Biochem. J.* 79, 516-524.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the detection of microgram quantities of proteins. *Anal Biochem.* 72, 248-254.
- Brinker, C. J., Scherer, G. W. (1990). *Sol–gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing.* Academic Press, Boston, MA.
- Broughton, W.J., Hernandez, G., Blair, M.W., Beebe, S.E., Gepts, P., Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.)—model food legumes. *Plant Soil.* 252, 55–128.
- Brusslan, J.A., Tobin, E.M. (1992). Light-independent developmental regulation of cab gene expression in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7791–7795.
- Caccuri, A., Antonini, G., Nicotra, M., Battistoni, A., Lo Bello, M., Board, P., Parker, M., Ricci, G. (1997). Catalytic mechanism and role of hydroxyl residues in the active

site of theta class glutathione S-transferases. Investigation of Ser-9 and Tyr-113 in a glutathione S-transferase from the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *J. Biol. Chem.* 274, 29681–29686.

Cairns, N.G., Pasternak, M., Wachter, A., Cobbett, C.S., Meyer, A.J. (2006). Maturation of *Arabidopsis* seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo. *Plant Physiol.* 141, 446–455.

Cameron, A.D. Sinning, I., L’Hermite, G., Olin, B., Board, P.G., Mannervik, B., Jones, T.A. (1995). Structural analysis of human alpha-class glutathione transferase A1-1 in the apo-form and in complexes with ethacrynic acid and its glutathione conjugate. *Structure* 3, 717–727.

Campas, M., Marty, J.L. (2006). Encapsulation of enzymes using polymers and sol-gel techniques. Humana Press Inc. p.77–85.

Cataneo, A.C., Chamma, K. L., Ferreira, L. C., Gomes Déstro, G.F., Carvalho, J. C., Barbosa Novelli, E. L. (2002). Glutathione S-transferase activity in acetochlor, atrazine and oxyfluorfen metabolization in maize (*Zea mays* L.), sorghum (*Sorghum bicolor* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) (Poaceae). *Acta Scientiarum.* 24, 619–623.

Cedrone, F., Ménez, A., Quéméneur, E. (2000). Tailoring new enzyme functions by rational redesign. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 405–410.

Chakrabarty, S., Rajakumar, A., Raghuvver, K., Sridevi, P., Mohanachary, A., Prathibha, Y., Bashyam, L., Dutta-Gupta, A., Senthilkumaran, B. (2012). Endosulfan and flutamide, alone and in combination, target ovarian growth in juvenile catfish, *Clarias batrachus*. *Comp.Biochem.Physiol. PartC155*, 491–497.

Chasseaud, L.F. (1979). The role of glutathione and glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv. Cancer Res.* 29, 175–274.

Chatterjee, R., Yuan, L. (2006). Directed evolution of metabolic pathways. *Trends Biotechnol.* 24, 28–38.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Chen, H., Juchau, M.R. (1998). Recombinant human glutathione S-transferases catalyse enzymic isomerization of 13-cis-retinoic acid to all-trans-retinoic acid in vitro *Biochem. J.* 336, 223-226.
- Chen, W., Chao, G., Singh, K.B. (1996). The promoter of a H₂O₂-inducible, Arabidopsis glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. *Plant J.* 10, 955–966.
- Chen, J.J., Yu, B.P. (1996). Detoxication of reactive aldehydes in mitochondria: effect of age and dietary restriction. *Aging.* 8, 334–340.
- Cheng, J.C., Seeley, K.A., Sung, Z.R. (1995). RML1 and RML2, Arabidopsis genes required for cell proliferation at the root tip. *Plant Physiol.* 107, 365-376.
- Cho, S.G., Lee, Y. H., Park, H.S., Ryoo, K., Kang, K. W., Park, J., Eom, S.J., Kim, M. J., Chang, T.S., Choi, S.Y., Shim, J., Kim, Y., Dong, M.S., Lee, M.J., Kim, S.G., Ichijo, H., Choi, E.J. (2001). Glutathione S-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1. *J. Biol. Chem.* 276, 12749–12755.
- Choi, J.W., Kim, Y.K., Song, S.Y., Lee, I., Lee, W.H. (2003). Optical biosensor consisting of glutathione-S-transferase for detection of captan. *Biosens. Bioelectron.* 18, 1461-1466.
- Chronopoulou, E., Axarli, I., Nianiou-Obeidat, I., Madesis, P., Tsaftaris, A., Labrou, N. (2011). Structure and Antioxidant Catalytic Function of Plant Glutathione Transferases. *Curr. Chem. Biol.* 5, 64–74.
- Chronopoulou, E., Chatzikonstantinou, M., Madesis, P., Nianiou-Obeidat I., Labrou, N.E. (2013). Structure, function and catalytic properties of human glutathione transferase P1-1. In: *Glutathione, structure, function and biotechnological implications*, Nova Publishers, USA, pp. 187-198.
- Chronopoulou, E.G., Labrou, N.E. (2011). Site-saturation Mutagenesis: A Powerful Tool for Structure-Based Design of Combinatorial Mutation Libraries

Chronopoulou, E.G., Labrou, N.E. (2009). Glutathione Transferases: Emerging Multidisciplinary Tools in Red and Green Biotechnology. *Rec. Patents Biotech.* 3, 211-223.

Chronopoulou, E.G., Papageorgiou, A.C., Markoglou A, Labrou N.E. (2012a). Inhibition of human glutathione transferases by pesticides: Development of a simple analytical assay for the quantification of pesticides in water. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 81, 43– 51.

Chronopoulou, E., Madesis, P., Asimakopoulou, B., Platis, D., Tsiftaris, A., Labrou, N.E. (2012b). Catalytic and structural diversity of the fluazifop-inducible glutathione transferases from *Phaseolus vulgaris*. *Planta.* 235, 1253-69.

Chung, C.T., Niemela, S.L., Miller, R.H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 2172-2175.

Circu, M.L., Aw, T.Y. (2008). Glutathione and apoptosis. *Free Radic. Res.* 42, 689-706.

Cleland, W.W. (1963). The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products.I. Nomenclature and rate equations. *Biochim. Biophys. Acta.* 67, 104 – 137.

Clemens, S., Kim, E.J., Neumann, D., Schroeder, J.I. (1999). Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J.* 18, 3325–3333.

Cobbett, C.S. (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* 123, 825–832.

Cocco, R., Stenberg, G., Dragani, B., Rossi Principe, D., Paludi, D., Mannervik, B., Aceto, A. (2001). The folding and stability of human alpha class glutathione transferase A1-1 depend on distinct roles of a conserved N-capping box and hydrophobic staple motif. *J.Biol. Chem.* 276, 32177–32183.

Coles, B. F., Anderson, K. E., Doerge, D. R., Churchwell, M. I., Lang, N. P., Kadlubar, F.F. (2000). Quantitative analysis of interindividual variation of glutathione

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

S-transferase expression in human pancreas and the ambiguity of correlating genotype with phenotype. *Cancer Res.* 60, 573–579.

Coles, B.F., Chen, G., Kadlubar, F.F., Radominska-Pandya, A. (2002). Interindividual variation and organ-specific patterns of glutathione S-transferase alpha mu and pi expression in gastrointestinal tract mucosa of normal individuals. *Arch. Biochem. Biophys.* 403, 270–276.

Coles, B.F., Kadlubar, F.F. (2005). Human alpha class glutathione S-transferases: genetic polymorphism, expression, and susceptibility to disease. *Methods Enzymol.* 401, 9-42.

Coles, B.F., Morel, F., Rauch, C., Huber, W.W., Yang, M., Teitel, C.H., Green, B., Lang, N.P., Kadlubar, F.F. (2001). Effect of polymorphism in the human glutathione S-transferase A1 promoter on hepatic GSTA1 and GSTA2 expression. *Pharmacogenetics.* 11, 663–669.

Collinson, M. M., Wang, H., Makote, R., Khramov, A. (2002). The effects of drying time and relative humidity on the stability of sol–gel derived silicate films in solution. *J. Electroanal. Chem.* 59, 65–71.

Combes, B., Stakelum, G.S. (1961). A liver enzyme that conjugates sulfobromophthalein sodium with glutathione. *J. Clin. Invest.* 40, 981-988.

Cooper, A. J. L., Pinto, J. T., Callery, P. S. (2011). Reversible and irreversible protein glutathionylation: biological and clinical aspects. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 7, 891–910.

Cosnier, S. (2007). Immobilization of biomolecules by electropolymerized films. In: Marks, R.S., Cullen, D.C., Karube, I., Lowe, C.R., Weetall, H.H., editors. *Handbook of biosensors and biochips.* John Wiley & Sons. p. 237–249.

Covolo, L., Placidi, D., Gelatti, U., Carta, A., Scotto Di Carlo, A., Lodetti, P., Piccichè, A., Orizio, G., Campagna, M., Arici, C., Porru, S. (2008). Bladder cancer, GSTs, NAT1, NAT2, SULT1A1, XRCC1, XRCC3, XPD genetic polymorphisms and coffee consumption: a case–control study. *Eur. J. Epidemiol.* 23, 355-362.

Cunningham, A.J. (1998). Introduction to bioanalytical sensors. Techniques in Analytical Chemistry Series. John Wiley & Sons, Inc. USA.

Cummins, I., Cole, D.J., 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.

Cummins, I., Cole, D.J., Edwards, R. (1997). Purification of multiple glutathione transferases involved in herbicide detoxification from wheat (*Triticum aestivum L.*) treated with the safener fenchlorazole-ethyl. *Pestic. Biochem. Physiol.* 59, 35-49.

Cummins, I., Dixon, D.P., Freitag-Pohl, S., Skipsey, M., Edwards, R. (2011). Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. *Drug Metab. Rev.* 43, 266-280.

Cunniff, P. (1999). Official Methods of Analysis: Pesticide and Industrial Chemical Residues, 16th ed., AOAC International Press.

DalCorso, G., Farinati, S., Maistri, S., Furini, A. (2008). How plants cope with cadmium: Staking all on metabolism and gene expression. *J. Integr. Plant Biol.* 50, 1268-1280.

Dave, B. C., Dunn, B., Valentine, J. S., Zink, J. I. (1994). Sol-gel encapsulation method for biosensors. *Analytical Chemistry* 66, 1120A-1127A.

Davydov, V.V., Dobaeva, N.M., Bozhkov, A.I. (2004). Possible role of alteration of aldehyde's scavenger enzymes during aging. *Exp. Gerontol.* 39, 11-16.

Dean, J.D., Goodwin, P.H., Hsiang, T. (2005). Induction of glutathione S-transferase genes of *Nicotiana benthamiana* following infection by *Colletotrichum destructivum* and *C. orbiculare* and involvement of one in resistance. *J. Exp. Bot.* 56, 1525-1533.

DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System DeLano Scientific, San Carlos CA, USA, (2002).

de Marcos, S., Galindo, J., Sierra, J. F., Galban, J., Castillo, J. R. (1999). An optical glucose biosensor based on derived glucose oxidase immobilized onto a sol-gel matrix. *Sens. Actuators B.* 57, 227-232.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1830, 3217–3266.
- DeRidder, B.P., Goldsbrough, P.B. (2006). Organ-specific expression of glutathione S-transferases and the efficacy of herbicide safeners in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 140, 167-175.
- Dirr, H.W., Reinemer, P., Huber, R. (1994). X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. *Eur. J. Biochem.* 220, 645-661.
- Dirr, H.W., Wallace, L.A. (1999). Role of the C-terminal helix 9 in the stability and ligandin function of class alpha glutathione transferase A1-1. *Biochemistry.* 38, 15631-15640.
- Dirven, H.A., van Ommen, B., Van Bladeren, P.J.(1994). Involvement of human glutathione S-transferase isoenzymes in the conjugation of cyclophosphamide metabolites with glutathione. *Cancer Res.* 54, 6215–6220.
- Dixon, D.P., Cole, D.J., Edwards, R. (2000). Characteristics of a zeta class GST from *Arabidopsis thaliana* with a putative role in tyrosine catabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 384, 407-412.
- Dixon, D.P., Cummins, I., Cole, D.J., Edwards, R. (1998). Glutathione mediated detoxification systems in plants. *Curr. Opini. Plant Biol.* 1, 258-266.
- Dixon, D.P., Davis, B.G., Edwards, R. (2002a). Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 277, 30859–30869.
- Dixon, D.P., Edwards, R. (2006) Enzymes of tyrosine catabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science.* 171, 360–366.
- Dixon, D.P., Edwards, R. (2010a). Glutathione transferases. *The Arabidopsis Book* 8: e0131 10.1199/tab.0131

- Dixon, D.P., Edwards, R. (2010b). Roles for stress-inducible lambda glutathione transferases in flavonoid metabolism in plants as identified by ligand fishing. *J. Biol. Chem.* 285, 36322–36329.
- Dixon, D.P., Hawkins, T., Hussey, P.J., Edwards, R. (2009). Enzyme activities and subcellular localization of members of the Arabidopsis glutathione transferase superfamily. *J. Exp. Bot.* 60, 1207–1218.
- Dixon, D.P., Laphorn, A., Edwards, R. (2002b). Protein family review: plant glutathione transferases. *Genome Biol.* 3, 3004.1–3004.10.
- Dixon, D.P., McEwen A.G., Adrian J. Laphorn, A.J. and Edwards, R. (2003). Forced Evolution of a Herbicide Detoxifying Glutathione Transferase. *J. Biol. Chem.* 278, 23930-23935.
- Dixon, D.P., Sellars, J.D., Edwards, R. (2011). The Arabidopsis phi class glutathione transferase AtGSTF2: binding and regulation by biologically active heterocyclic ligands. *Biochem J.* 438, 63–70.
- Dixon, D.P., Skipsey, M., Edwards, R. (2010). Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 71, 338–350.
- Dixon, D.P., Skipsey, M., Grundy, N.M., Edwards, R. (2005). Stress-induced protein Sglutathionylation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 138, 2233-2244.
- Dowd, A.J., Steven, A., Morou, E., Hemingway, J., Vontas, J., Paine, M.J.I. (2009). A simple glutathione transferase-based colorimetric endpoint assay for insecticide detection. *Enzyme Microb. Technol.* 45, 164-168.
- Droog, F. (1997). Plant glutathione S-transferases, a tale of theta and tau. *J. Plant Growth Regul.* 16, 95-107.
- Drummond, A.J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Duran, C., Field, M., Heled, J., Kearse, M., Markowitz, S., Moir, R., Stones-Havas, S., Sturrock., S., Thierer, T., Wilson, A. (2011). Geneious v5.5.
- Dučić, T., Polle, A. (2005). Transport and detoxification of manganese and copper in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17, 103-112.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Dulhunty, A., Gage, P., Curtis, S., Chelvanayagam, G., Board, P. (2001). The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. *J. Biol. Chem.* 276, 3319-3323.
- Dunn, B. Zink, J. I. (1997). Probes of pore environment and molecule-matrix interactions in sol-gel materials. *Chem. Mater.* 9, 2280-2291.
- Durbin, M.L., McCaig, B., Clegg, M.T. (2000). Molecular evolution of the chalcone synthase multigene family in the morning glory genome. *Plant Mol. Biol.* 42, 79-92.
- Edwards, R. (1996). Characterisation of glutathione transferases and glutathione peroxidases in pea (*Pisum sativum*). *Physiol. Plant.* 98, 594-604.
- Edwards, R., Cole, D.G. (1996). Glutathione transferases in wheat (*Triticum*) species with activity toward fenoxaprop-ethyl and other herbicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 54, 96-104.
- Edwards, R., Dixon, D.P. (2000). The role of glutathione transferases in herbicide metabolism. In: Cobb, A.H., Kirkwood, R.C. (Eds.), *Herbicides and Their Mechanisms of Action*. In Sheffield: Sheffield Academic Press Ltd, pp. 38-71.
- Edwards, R., Dixon, D.P., Walbot, V. (2000). Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* 5, 193-198.
- Edwards R., Dixon DP. (2005). Plant glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 401, 169-186.
- Edwards, R., Brazier-Hicks, M., Dixon, D.P., Cummins, I. (2005). Chemical manipulation of antioxidant defences in plants. *Adv. Bot. Res.* 42, 1-32.
- Eijnsink, V.G.H., Gåseidnes, S., Borchert, T.V., van den Burg, B. (2005). Directed evolution of enzyme stability. *Biomol. Eng.* 22, 21-30.
- Eklund, B.I., Moberg, M., Bergquist, J., Mannervik, B. (2006). Divergent activities of human glutathione transferases in the bioactivation of azathioprine. *Mol. Pharmacol.* 70, 747-754.

- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 300, 1005-1016.
- Enayati, A.A., Lengeler, C., Erlanger, T., Hemingway, J. (2005). Field evaluation of a recombinant glutathione S-transferase-based pyrethroid quantification assay. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99, 369-78.
- Enayati, A.A., Vontas, J.G., Small, G.J., McCarroll, L., Hemingway, J. (2001). Quantification of pyrethroid insecticides from treated bednets using a mosquito recombinant glutathione S-transferase. *Med. Vet. Entomol.* 15, 58-63.
- Eshdat, Y., Holland, D., Faltin, Z., Ben-Hayyim, G. (1997). Plant glutathione peroxidases. *Physiol. Plant.* 100, 234-40.
- Esseghaier, C., Bergaoui, Y., Tlili, A., Abdelghani, A. (2008). Impedance spectroscopy on immobilized streptavidin horseradish peroxidase layer for biosensing. *Sens. Actuators B. Chem.* 134,112–116.
- Esterbauer, H., Benedetti, A., Lang, J., Fulceri, R., Fauler, G., Comporti, M. (1986). Studies on the mechanism of formation of 4-hydroxynonenal during microsomal lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta.* 876, 154–166.
- Esterbauer, H., Zollner, H., Lang, J. (1985). Metabolism of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by isolated hepatocytes and by liver cytosolic fractions. *Biochem. J.* 228, 363–373.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol.Med.* 11, 81-128.
- European Food Safety Authority (2012). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance spiromesifen. *EFSA Journal* 2012;10, 2879 (56 pp.).
- Fan, K.C., Huang, Y.C., Li, C.H. (1995). Radioimmunoassay for plasma glutathione s-transferase-pi and its clinical application in gastrointestinal cancer. *Cancer.* 76, 1363-1367.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

FAO, Agriculture: towards 2010 document, in: Proceedings of the C 93/94 Document of 27th Session of the FAO Conference, Rome, Italy, 1993.

Federici, L., Lo Sterzo, C., Pezzola, S., Di Matteo, A., Scaloni, F., Federici, G., Caccuri, A.M. (2009). Structural basis for the binding of the anticancer compound 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio) hexanol to human glutathione s-transferases. *Cancer Res.* 69, 8025-8034.

Fernandez-Canon, J.M., Penalva, M.A. (1998). Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue. *J. Biol. Chem.* 273, 329-337.

Filomeni, G., Rotilio, G., Ciriolo, M.R. (2003). Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway. *FASEB. J.* 17, 64-66.

Findlay, V.J., Townsend, D.M., Saavedra, J.E., Buzard, G.S., Citro, M.L., Keefer, L.K., Ji, X., Tew, K.D. (2004). Tumor cell responses to a novel glutathione S-transferase-activated nitric oxide-releasing prodrug. *Mol. Pharmacol.* 65, 1070–1079.

Finkelstein, A., Ptitsyn, O.B. (2002). *Protein Physics*. Academic Press. USA. Lecture 1.p.3-14.

Flora, K.K., Brennan, J.D. (2001). Effect of matrix aging on the behavior of human serum albumin entrapped in a tetraethyl orthosilicate-derived glass, *Chem. Mat.* 13, 4170-4179.

Forman, H.J., Fukuto, J.M., Torres, M. (2004). Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287, C246-C256.

Foyer, C.H., Noctor, G. (2009). Redox regulation and photosynthetic organisms: Signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 861-905.

Fragoulaki, M.N., Axarli, I.A., Labrou, N.E., Clonis, Y.D. (2007). Recombinant glutathione S-transferase for the determination of the herbicide alachlor: The

foundations of an optical biosensor. 1st UK-US Conference on Chemical and Biological Sensors and Detectors London, UK.

Fratelli, M., Demol, H., Puype, M., Casagrande, S., Villa, P., Eberini, I., Vandekerckhove, J., Gianazza, E., Ghezzi, P. (2003). Identification of proteins undergoing glutathionylation in oxidatively stressed hepatocytes and hepatoma cells, *Proteomics*. 3, 1154–1161.

Frear, D. S. and Swanson, H. R. (1973). Metabolism of substituted diphenyl-ether herbicides in plants:I. Enzyme cleavage of fluorodifen in peas (*Pisum sativum*) *Pestic. Biochem. Physiol.* 3, 473–482.

Frova, C. (2006). Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomol. Eng.* 23, 149–169.

Frova, C. (2003). The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. *Physiol. Plant.* 119, 469-479.

Fujita, M., Hossain, M.Z. (2003). Modulation of Pumpkin Glutathione S-Transferases by Aldehydes and Related Compounds. *Plant Cell Physiol.* 44, 481–490.

Gajewska, E., Skłodowska, Z.M. (2008). Differential biochemical responses of wheat shoots and roots to nickel stress: antioxidative reactions and proline accumulation. *Plant Growth Regul.* 54, 179–188.

Calleri, E., Temporini, C., Massolini, G., Caccialanza, G. (2004). Penicillin G acylase-based stationary phases: analytical applications. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35, 243–258.

Garvey, E.P., Matthews, C.R. (1990). Site-directed mutagenesis and its application to protein folding. *Biotechnology.* 14, 37–63.

Gauglitz, G., Proll, G. (2008). Strategies for label-free optical detection. *Biosens. 21st Century* 109, 395–435.

Gerendás, J., Polacco, J.C., Freyermuth, S.K., Sattelmacher, B. (1999). Significance of nickel for plant growth and metabolism. *J. Plant Nutr. and Soil Sci.* 162, 241-256.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ghanta, S., Chattopadhyay, S. (2011). Glutathione as a signaling molecule Another challenge to pathogens. *Plant Signal. Behav.* 6, 783-788.
- Gill, I., Ballesteros, A. (2000). Bioencapsulation within synthetic polymers (part 1): sol-gel encapsulated biologicals. *Tibtech.* 18, 282-96.
- Goldstein, J., Combes, B. (1966). Spectrophotometric assay of the liver enzyme that catalyzes sulfobromophthalein-glutathione conjugation. *J.Lab. Clin. Med.* 67, 863-872.
- Goltermann, L., Larsen, M.S., Banerjee, R., Joerger, A.C., Ibba, M., Bentin, T. (2010). Protein evolution via amino acid and codon elimination. *PLoS One* 26:e10104
- Gonneau, M., Mornet, R., Laloue, M. A. (1998). *Nicotiana plumbaginifolia* protein labeled with an azido cytokinin agonist is a glutathione S-transferase. *Physiol. Plant* 103, 114-124.
- Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D.I., Métoz, F. (1999). ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. 15, 305-308.
- Gupta, R., Chaudhury, N.K. (2007). Entrapment of biomolecules in sol-gel matrix for applications in biosensors: problems and future prospects. *Biosens. Bioelectron.* 22, 2387-99.
- Gustafsson, A., Etahadieh, M., Jemth, P. Mannervik, B. (1999). The C-terminal region of human glutathione transferase A1-1 affects the rate of glutathione binding and the ionization of the active site Tyr9. *Biochemistry* 38, 16268-16275.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby W.B. (1974). Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Halkier, B.A., Gershenzon, J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 303-333.
- Hall, A.G., Autzen, P., Cattan, A.R., Malcolm, A.J., Cole, M., Kernahan, J., Reid, M.M. (1994). Expression of mu class glutathione S-transferase correlates with event-free survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Cancer Res.* 54, 5251-5254.

Han, A., Yang, L., Frazier, A.B. (2007). Quantification of the heterogeneity in breast cancer cell lines using whole-cell impedance spectroscopy. *Clin. Cancer Res.* 13, 139–143.

Hartmann, M., Kostrov, X. (2013). Immobilization of enzymes on porous silicas – benefits and challenges. *Chem. Soc. Rev.* (in press).

Hasegawa, K., Miwa, S., Tajima, T., Tsutsumiuchi, K., Taniguchi, H., Miwa, J. (2007). A rapid and inexpensive method to screen for common foods that reduce the action of acrylamide, a harmful substance in food. *Toxicol. Lett.* 175, 82-88.

Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey I.R. (2005). Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51-88.

Hayes, J.D., Pulford, D.J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 445-600.

He, D.M., Hutchens, L., Pazoles S., C.J., Tew, K.D. (2009). Novel role for glutathione S-transferase pi. Regulator of protein S-Glutathionylation following oxidative and nitrosative stress. *J. Biol. Chem.* 284, 436-445.

Hegazy, U.M., Mannervik, B., Stenberg, G.J. (2004). Functional role of the lock and key motif at the subunit interface of glutathione transferase P1-1. *J. Biol. Chem.* 279, 9586-9596.

Hernández, F., Sancho, J.V., Pozo, O., Lara, A., Pitarch, E. (2001). Rapid direct determination of pesticides and metabolites in environmental water samples at sub-mg/L level by on-line solid-phase extraction–liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 939, 1–11.

Hiratsuka, A., Okada, T., Nishiyama, T., Fujikawa, M., Ogura, K., Okuda, H., Watabe, T., Watabe, T. (1994). Novel theta class glutathione S- transferases Yrs-Yrs' and Yrs'-Yrs' in rat liver cytosol: their potent activity toward 5-sulfoxymethylchrysene, a reactive metabolite of the carcinogen 5-hydroxymethylchrysene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202, 278-284.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Hiratsuka, A., Tobita, K., Saito, H., Sakamoto, Y., Nakano, H., Ogura, K., Nishiyama, T., Watabe, T. (2001). (S)-preferential detoxification of 4-hydroxy-2(E)-nonenal enantiomers by hepatic glutathione S-transferase isoforms in guinea-pigs and rats. *Biochem. J.* 355, 237-244.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., Pease, L.R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene.* 77, 51-59.
- Hoff, G.R., Van Zoonen, P. (1999). Trace analysis of pesticides by gas chromatography, *J. Chromatogr. A.* 843, 301–322.
- Höller, K., Király, L., Künstler, A., Müller, M., Gullner, G., Fattinger, M., Zechmann, B. (2010). Enhanced glutathione metabolism is correlated with sulfur induced resistance in Tobacco mosaic virus-infected genetically susceptible *Nicotiana tabacum* plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23, 1448-1459.
- Holmegren, A. (1976). Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleosidediphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73, 2275-2279.
- Hou, L., Honaker, M.T., Shireman, L.M., Balogh, L.M., Roberts, A.G., Ng, K., Nath, A., Atkins, W.M. (2007). Functional promiscuity correlates with conformational heterogeneity in A-class glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 282, 23264–23274.
- Huang, H., Yao, H., Liu, J.Y., Samra, A.I. Kamita, S.G., Cornel, A.J., Hammock, B.D. (2012). Development of pyrethroid-like fluorescent substrates for glutathione S-transferase. *Anal. Biochem.* 431, 77–83.
- Huber, C., Bartha, B., Harpaintner, R., Schröder, P. (2009). Metabolism of acetaminophen (paracetamol) in plants—two independent pathways result in the formation of a glutathione and a glucose conjugate. *Env Sci Pollut Res* 16:206–213.
- Hurd, T.R., Costa, N.J., Dahm, C.C., Beer, S.M., Brown, S.T., Filipovska, A., Murphy, M.P. (2005). Glutathionylation of mitochondrial proteins. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 999-1010.

Hussey, A.J., Hayes, J.D. (1992). Characterization of a human class theta glutathione S-transferase with activity towards 1-menaphthyl sulphate. *Biochem. J.* 286, 929-935.

Inoue, T., Ishida, T., Sugio, K., Maehara, Y., Sugimachi, K. (1995). Glutathione S transferase Pi is a powerful indicator in chemotherapy of human lung squamous-cell carcinoma. *Respiration.* 62, 223-227.

Ishikawa, T. (1992). The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump, *Trends Biochem. Sci.* 17, 463–468.

Ivanetich, K.M., Goold, R.D., Sikakana, C.N.T. (1990). Explanation of the non-hyperbolic kinetics of the glutathione S-transferases by the simplest steady-state random sequential Bi Bi mechanism. *Biochem. Pharmacol.* 39, 1999–2004.

Jablonkai, I et al., (1997). Chemical catalysis of the isomerization of a peroxidising herbicidal thiadiazolidine. In: *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference-Weeds*, 771-776. British Crop Protection Council, Farnham, UK.

Jaeger, K.E., Eggert, T. (2004). Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 305–313.

Jain, M., Ghanashyam, C., Bhattacharjee, A. (2010). Comprehensive expression analysis suggests overlapping and specific roles of rice glutathione S-transferase genes during development and stress responses. *BMC Genomics.* 11, 73-89.

Jakobsson, P.J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., Persson, B. (1999). Common structural features of MAPEG—a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Prot. Sci.* 8, 689–692.

Jakobson, I., Warholm, M., Mannervik, B. (1979). The binding of substrates and a product of the enzymatic reaction to glutathione S-transferase A. *J. Biol. Chem.* 254, 7085–7089.

Javitt, N.B., Wheeler, H.O., Baker, K.J., Ramos, O.L., Bradley, S.E. (1960). The intrahepatic conjugation of sulfobromophthalein and glutathione in the dog. *J.Clin. Invest.* 39, 1570-1577.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Jepson, I., Lay, V. J., Holt, D. C., Bright, S. W. J., 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.
- Jestin, J.L., Kaminski, P.A. (2004). Directed enzyme evolution and selections for catalysis based on product formation. *J. Biotechnol.* 113, 85–103.
- Ji, X., Zhang, P., Armstrong, R. N., Gilliland, G. L. (1992). The three-dimensional structure of a glutathione S-transferase from the mu class gene. Structural analysis of the binary complex of isoenzyme 3-3 and glutathione at 2.2 Å resolution. *Biochemistry.* 31, 10169-10184.
- Ji, X., von Rosenvinge, E.C., Johnson, W.W., Tomarev, S.I., Paitigorsky, J., Armstrong, R.N., Gilliland, G.L. (1995). Three-dimensional structure, catalytic properties, and evolution of sigma class glutathione transferase from squid, a progenitor of the lens S-crystallins of cephalopods. *Biochemistry.* 34, 5317-5328.
- Jiang, H.W., Liu, M.J., Chen, I.C., Huang, C.H., Chao, L.Y., Hsieh, H.L. (2010) A Glutathione S-Transferase Regulated by Light and Hormones Participates in the Modulation of Arabidopsis Seedling Development1[C][W][OA]. *Plant Physiol.* 154, 1646–1658.
- Johannes, T.W. and Zhao, H. (2006). Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 261-267.
- Johansson, A.S., Mannervik, B. (2001). Human glutathione transferase A3-3, a highly efficient catalyst of double-bond isomerization in the biosynthetic pathway of steroid hormones. *J. Biol. Chem.* 276, 33061–33065.
- Jones, A.M., Thomas, V., Truman, B., Lilley, K., Mansfield, J., Grant, M. (2004). Specific changes in the Arabidopsis proteome in response to bacterial challenge: differentiating basal and R-gene mediated resistance. *Phytochemistry.* 65, 1805–1816.
- Josephy, P.D., Mannervic, B. (2006). *Molecular Toxicology* Oxford University Press, Second Edition.
- Jowsey, I.R., Thomson, A.M., Flanagan, J.U., Murdock, P.R., Moore, G.B., Meyer, D.J., Murphy, G.J., Smith, S.A., Hayes, J.D. (2001). Mammalian class Sigma

glutathione S-transferases: catalytic properties and tissue-specific expression of human and rat GSHdependent prostaglandin D2 synthases, *Biochem. J.* 359, 507–516.

Jozefczak, M., Remans, T., Vangronsveld J., Cuypers, A. (2012). Glutathione Is a Key Player in Metal-Induced Oxidative Stress Defenses. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 3145-3175.

Kallenbach, N.R., Bell, A.J., J.R., Spek, E.J. (2003). The amide linkage. Role of the peptide bond in protein structure and folding. Chapter 18. P. 599. John Wiley & Sons, Inc.

Kampranis, S.C, Damianova, R., Atallah, M., Toby, G., Kondi, G., Tsihchlis, P.N., Makris, A.M. (2000). A novel plant glutathione S-transferase/oxidase suppresses bax lethality in yeast. *J. Biol. Chem.* 275, 29207–29216.

Kandimalla, V.B., Tripathi, V.S., Ju, H. (2006). Immobilization of Biomolecules in Sol–Gels: Biological and Analytical Applications. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36, 73–106.

Kapoli, P., Axarli, I.A., Platis, D., Fragoulaki, M., Paine, M., Hemingway, J., Vontas, J., Labrou, N.E. (2008) Engineering sensitive glutathione transferase for the detection of xenobiotics. *Biosens Bioelectron* 24, 498-503.

Karavangeli, M., Labrou, N.E., Clonis, Y.D., Tsaftaris, A. (2005). Development of transgenic tobacco plants overexpressing maize glutathione S-transferase I for chloroacetanilide herbicides phytoremediation. *Biomol. Eng.* 22, 121–128.

Keller, C., Ballard, L., Lemmons, R., Ali-Osman, F. (2006). US20060194200

Keller, C., Ballard, L., Lemons, R., Ali-Osman, F. (2002). WO0208465

Kelley, M.K., Engqvist-Goldstein A., Montali J.A., Wheatley J.B., Schmidt D.E., Jr Kauvar L.M. (1994). Variability of glutathione S-transferase isoenzyme patterns in matched normal nad cancer human breast tissue. *Biochem. J.* 304, 843-848.

Ketterer, B., Christodoulides, L.G. (1994). Enzymology of cytosolic glutathione S-transferases. *Adv. Pharmacol.* 27, 37–69.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Kilili, K.G., Atanassova, N., Vardanyan, A., Clatot, N., Al-Sabarna, K., Kanellopoulos, P.N., Makris, A.M., Kampranis, S.C. (2004). Differential roles of tau class glutathione S-transferases in oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 279, 24540-24551.
- Koeplinger, K.A., Zhao, Z., Peterson, T., Leone, J.W., Schwende, F.S., Henrikson, R.L., Tomasselli, A.G. (1999). Activated sulfonamides are cleaved by glutathione-S-transferases. *Drug Metab. Dispos.* 27, 986–991.
- Kolm, R.H., Danielson, U.H., Zhang, Y., Talalay, P., Mannervik, B. (1995). Isothiocyanates as substrates for human glutathione transferases: structure–activity studies. *Biochem. J.* 311, 453–459.
- Kolobe, D., Sayed, Y., Dirr, H.W. (2004). Characterization of bromosulphophthalein binding to human glutathione S-transferase A1-1: thermodynamics and inhibition kinetics. *Biochem. J.* 382, 703–709.
- Kotzia, G. A., Platis, D., Axarli, I. A., Chronopoulou, E., Karamitros, C., Labrou, N.E. (2012). *Biocatalysis, Enzyme Engineering and Enzyme Biotechnology, Food Biochemistry and Food Processing, Second Edition*. Edited by Benjamin Simpson, Leo Nollet, Gopinadhan Paliyath and Soottawat Benjakul. John Wiley & Sons, Inc., 125-165.
- Kręzel, A., Bal, W. (2004). Studies of Zinc(II) and Nickel(II) Complexes of GSH, GSSG and Their Analogs Shed More Light on Their Biological Relevance. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2, 293-305.
- Klapheck, S. (1988). Homoglutathione: isolation, quantification, and occurrence in legumes. *Physiol. Plant* 74, 727–732.
- Klapheck, S., Chrost, B., Starke, J., Zimmerman, H. (1992). γ -glutamylcysteinylserine—a new homologue of glutathione in plants of the family Poaceae. *Bot. Acta* 105, 174–179.
- Komeda, H., Ishikawa, N., Asano, Y. (2003). Enhancement of the thermostability and catalytic activity of D-stereospecific amino acid amidase from *Ochrobactrum anthropi* SV3 by directed evolution. *J. Mol. Catal. B. Enz.* 21, 283–290

Koonin, E.V., Mushegian, A.R., Tatusov, R.L., Altschul, S.F., Bryant, S.H., Bork, P., Valencia, A. (1994). Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma contains a glutathione transferase domain—study of a diverse, ancient protein superfamily using motif search and structural modeling. *Protein Sci.* 3, 2045-2054.

Koutsoumpli, G.E., Dimaki, V.D., Thireou, T.N., Eliopoulos, E.E., Labrou, N.E., Varvounis, G.I., Clonis, Y.D. (2012). Synthesis and study of 2-(pyrrolo-sulfonylmethyl)-N-arylimines: a new class of inhibitors for human glutathione transferase A1-1. *J. Med. Chem.* 55, 6802-6813.

Kranner, I., Beckett, R.P., Wornik, S., Zorn, M., Pfeifhofer, H.W. (2002). Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. *Plant J.* 31, 13-24.

Kranner, I., Birtic, S., Anderson, K.M., Pritchard, H.W. (2006). Glutathione half-cell reduction potential: A universal stress marker and modulator of programmed cell death. *Free Rad Biol. Med.* 40, 2155-2165.

Kruger, N.J. (1994). The Bradford method for protein quantification. *Methods in Molecular Biology*, volume 32, chapter 3, Edited by John M.Walker, Human Press, Totowa New Jersey.

Kuhnert, D.C., Sayed, Y., Mosebi, S., Sayed, M., Sewell, T., Dirr, H.W. (2005). Tertiary Interactions Stabilise the C-terminal Region of Human Glutathione Transferase A1-1: a Crystallographic and Calorimetric Study. *J. Mol. Biol.* 349, 825–838.

Kullman, S.W., Matsumura, F. (1996). Metabolic pathway utilised by phanerochete chrysosporium for degradation of the cyclodiene pesticide endosulfan. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 593–600.

Kumar, A., D'Souza, S.S., Tickoo, S., Salimath, B.P., Singh H.B. (2009). Antiangiogenic and Proapoptotic Activities of Allyl Isothiocyanate Inhibit Ascites Tumor Growth in Vivo. *Integrative Cancer Therapies* 8, 75-87.

Labrou, N.E., Rigden, D.J., Clonis, Y.D. (2004). Engineering the pH-dependence of kinetic parameters of maize glutathione S-transferase I by site-directed mutagenesis. *Biomol. Eng.* 21, 61–66.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Labrou, N.E. (2010). Random mutagenesis methods for in vitro directed enzyme evolution. *Curr. Protein Pept. Sci.* 11, 91-100.
- Labrou, N.E., Karavangeli, M., Tsaftaris, A., Clonis, Y.D. (2005). Kinetic analysis of maize glutathione S-transferase I catalyzing the detoxification from chloroacetanilide herbicides. *Planta.* 222, 91-97.
- Labrou, N.E., Kotzia, G.A., Clonis, Y.D. (2004). Engineering the xenobiotic substrate specificity of maize glutathione S-transferase I. *Protein Eng. Des. Sel.* 17, 741–748.
- Labrou, N.E., Mello, L.V., 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.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
- Laliberte, R. E., Perregaux, D. G., Hoth, L. R., Rosner, P. J., Jordan, C. K., Peese, K. M. et al. (2003). Glutathione S-transferase omega 1-1 is a target of cytokine release inhibitory drugs and may be responsible for their effect on interleukin-1 β posttranslational processing. *J. Biol. Chem.* 278, 16567–16578.
- Lamoureux, G.L., Rusness, D.G. (1993). Glutathione in the metabolism and detoxification of xenobiotics in plants. In: De Kok IJ, Stulen J, Rennenberg H, Brunold C, Rauser W (eds) Sulphur nutrition and assimilation in higher plants. SPB Academic Publishers, Netherlands, pp 221–237.
- Lamoureux, G.L., Shimabukuro, R.H., Swanson, H.R., Frear, D.S. (1970). Metabolism of 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine (atrazine) in excised sorghum leaf sections. *J. Agric. Food Chem.* 18, 81-86.
- Lan, T., Yang, Z-L., Yang, X., Liu, Y-J., Wang, X-R., Zenga, Q-Y. (2009). Extensive Functional Diversification of the Populus Glutathione S-Transferase Supergene Family. *The Plant Cell.* 21, 3749–3766.
- Lee, W. Y., Kim, S. R., Kim, T. H., Lee, K. S., Shin, M. C., Park, J. K. (2000). Sol-gel-derived thick-film conductometric biosensor for urea determination in serum. *Anal. Chim. Acta.* 404, 195–203.

- Leonarduzzi, G., Arkan, M.C., Basaga, H., Chiarpotto, E. (2000). Lipid oxidation products in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1370–1378.
- Lewis, A.D., Forrester, L.M., Hajes, J.D., Wareing, C.J., Carmichael, J., Harris, A.L., Mooghen, M., Wolf, C.R. (1989). Glutathione S-transferase isoenzymes in human tumours and tumour derived cell lines. *Br. J. Cancer.* 60, 327-331.
- Li, Z.S., Alfenito, M., Rea, P.A., Walbot, V., Dixon, R.A. (1997). Vacuolar uptake of the phytoalexin medicarpin by the glutathione conjugate pump. *Phytochemistry.* 45, 689-693.
- Li, Y.J., Scott, W. K., Hedges, D. J., Zhang, F., Gaskell, P. C., Nance, M. A. et al. (2002). Age at onset in two common neurodegenerative diseases is genetically controlled. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 985–993.
- Liebau, E., Dawood, K.F., Fabrini, R., Fischer-Riepe, L., Perbandt, M., Stella, L., Pedersen, J.Z., Bocedi, A., Petrarca, P., Federici, G., Ricci, G. (2009). Tetramerization and cooperativity in *Plasmodium falciparum* glutathione S-transferase are mediated by atypic loop 113–119. *J. Biol. Chem.* 284, 22133–22139.
- Lin, G., Lee, Y.R., Liu, Y.C., Wu, Y.G. (2005). Ortho effect for inhibition mechanisms of butyrylcholinesterase by o-substitute phenyl L-butyl carbamates and comparison with acetylcholinesterase, cholesterol esterase, and phenol, *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1124–1131.
- Lind, C., Gerdesa, R., Hamnella, Y., Koistinenc, I.S., von Löwenhielmd, H.B. Holmgrene, A. Cotgreavea, I.A. (2002). Identification of S-glutathionylated cellular proteins during oxidative stress and constitutive metabolism by affinity purification and proteomic analysis, *Arch. Biochem. Biophys.* 406, 229–240.
- Lingen, P. Grötzinger, J., Kolter, D., Kula, M.R., Pohl, M. (2002) Improving the carboligase activity of benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* by a combination of directed evolution and site-directed mutagenesis. *Protein Eng.* 15, 585–593.
- Litwack, G., Ketterer, B., Arias, I. M. (1971) Ligandin: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions. *Nature (London)* 234, 466–467.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Liu, Y.J., Han, X.M., Ren, L.L., Yang, H.L., Zeng, Q.Y. (2013). Functional Divergence of the Glutathione S-Transferase Supergene Family in *Physcomitrella patens* Reveals Complex Patterns of Large Gene Family Evolution in Land Plants^[W][OA]. *Plant Physiol.* 161, 773-786.
- Lo, H.W., Ali-Osman, F. (2007). Genetic polymorphism and function of glutathione S-transferases in tumor drug resistance. *Current Opinion in Pharmacology* 7, 367-374.
- LoBello, M., Battistoni, A., Mazzetti, A.P., Board P.G., Muramatsu, M., Federici, G., Ricci, G. (1995). Site-directed mutagenesis of human glutathione transferase P1-1. Spectral, kinetic, and structural properties of Cys-47 and Lys-54 mutants. *J. Biol. Chem.* 270, 1249-1253.
- Lo Piero, A.R., Mercurio, V., Puglisi, I., Petrone, G. (2009). Gene isolation and expression analysis of two distinct sweet orange [*Citrus sinensis* L. (Osbeck)] tau-type glutathione transferases. *Gene.* 443, 143-150.
- Lo Piero, A.R., Puglisi, I., Rapisarda, P., Petrone, G. (2005). Anthocyanin accumulation and related gene expression in red orange fruit induced by low temperature storage. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9083-9088.
- Lopez, M.F., Patton, W.F., Sawlivich, W.B., Erdjument-Bromage, H., Barry, P., Gmyrek, K., Hines, T., Tempst, P. Skea, W.M. (1994). A glutathione S-transferase (GST) isozyme from broccoli with significant sequence homology to the mammalian theta-class of GSTs. *Biochim. Biophys. Acta* 1205, 29-38.
- Loyall, L., Uchida, K., Brown, S., Furuya, M., Frohnmeyer, H. (2000). Glutathione and a UV-light induced glutathione S-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures. *Plant Cell.* 12, 1939-1950.
- Lu, W.J., Chen, Y.L., Zhu, J.H., Chen, X.G. (2009). The combination of flow injection with electrophoresis using capillaries and chips. *Electrophoresis.* 30, 83-91.
- Lucklum, R., Hauptmann, P. (2006). Acoustic-wave microsensors-the challenge behind microgravimetry. *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 667-682.
- Luo, X., Morrin, A., Killard, A., Smyth, M. (2006). Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors. *Electroanal.* 18, 319-26.

- Lushchak, V.I. (2012). Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *Journal of Amino Acids*. Hindawi Publishing Corporation. Article ID 736837.
- Luthy, R., Bowie, J.U., Eisenberg, D. (1992). Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* 35, 83–85.
- Mahajan, S., Atkins, W.M. (2005). The chemistry and biology of inhibitors and pro-drugs targeted to glutathione S-transferases. *Cell Mol Life Sci* 62, 1221–1233.
- Makote, R., Collinson, M. (1999). Organically modified silicate films for stable pH sensors. *Anal. Chim. Acta* 394, 195–200.
- Maitra, S., Nowick J.S. (2003). The amide linkage. β -Sheet interactions between proteins. Chapter 15. P. 495. John Wiley & Sons, Inc.
- Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jansson, H., Tahir, M. K., Warholm, M. Jornvall, H. (1985). Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 82, 7202–7206.
- Mannervik, B., Castro, V. M., Danielson, U. H., Tahir, N. K., Hansson, J., Ringborg, U. (1987). Expression of class pi glutathione transferase in human malignant melanoma cells. *Carcinogenesis*. 8, 1929-1932.
- Mannervik, B., Danielson, U.H. (1988). Glutathione transferases-structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 23, 283–337.
- Manevich, Y., Feinstein, S.I., Fisher, A.B. (2004). Activation of the anti-oxidant enzyme 1-cys peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with π GST. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 101, 3780-3785.
- Marrs, KA. (1996). The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 47, 127-158.
- Marrs, K.A., Walbot, V. (1997). Expression and RNA splicing of the maize glutathione S-transferase Bronze2 gene is regulated by cadmium and other stresses. *Plant Physiol.* 113, 93–102.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Martens, R. (1977). Degradation of endosulfan in soil under different conditions. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 17, 438–446.
- Martin, J.L. (1995). Thioredoxin-a fold for all seasons. *Structure*.3, 245-250.
- Mauch, F., Dudler, R. (1993). Differential induction of distinct glutathione S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol.* 102, 1193–1201.
- McGonigle, B., Keeler, S.J., Lau, S.M., Koeppe, M.K., O’Keefe, D.P. (2000). A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. *Plant Physiol.* 124, 1105-1120.
- McGoldrick, S., O’Sullivan, S.M., Sheehan, D. (2005). Glutathione transferase-like proteins encoded in genomes of yeasts and fungi: insights into evolution of a multifunctional protein superfamily. *FEMS Microbiol. Lett.* 242, 1–12.
- McTigue, M.A., Williams, D.R., Tainer, J.A. (1995). Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. *J. Mol. Biol.* 246, 21-27.
- McManus, G., Costa, M., Canals, A., Coll, M., Mantle, T.J. (2011). Sitedirected mutagenesis of mouse glutathione transferase P1-1 unlocks masked cooperativity, introduces a novel mechanism for ‘ping pong’ kinetic behaviour, and provides further structural evidence for participation of a water molecule in proton abstraction from glutathione. *FEBS J.* 278, 273–281.
- Mendoza-Cózatl, D., Loza-Tavera, H., Hernández-Navarro, A., Moreno-Sánchez, R. (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 653-671.
- Mendoza-Cózatl, D.G., Moreno-Sánchez, R. (2006). Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmium stress. Pathway modeling for plants. *J. Theor. Biol.* 238, 919–936.

- Menone, M.L., Pesce, S.F., Díaz, M.P., Moreno, V.J., Wunderlin, D.A. (2008). Endosulfan induces oxidative stress and changes on detoxication enzymes in the aquatic macrophyte *Myriophyllum quitense*. *Phytochemistry*. 69, 1150–1157.
- Mersie, W., Seybold, C.A., McNamee, C., Lawson, M.A. (2003). Abating endosulfan from runoff using vegetative filter strips: the importance of plant species and flow rate. *Agric. Ecos. Environ.* 97, 215–223.
- Meschenmoser, K., Kim, Y., Franken, S., Nowak, M., Feldmann, G., Bendas, G., Wolfgarten, M., Messmer, D., Schmidt-Wolf, I.G. (2013). Targeting Cancer with a Bi-functional Peptide: In Vitro and In Vivo Results. *In Vivo*. 27, 431-42.
- Meyer, D.J., Coles, B., Pemble, S.E., Gilmore, K.S., Fraser, G.M., Ketterer, B. (1991). Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochem. J.* 274 , 409-414.
- Meyer, D.J., Crease, D.J., Ketterer, B. (1995). Forward and reverse catalysis and product sequestration by human glutathione S-transferases in the reaction of GSH with dietary aralkyl isothiocyanates. *Biochem. J.* 306, 565–569.
- Meuwly, P., Thibault, P., Rauser, W.E. (1993). γ -glutamylcysteinylglutamic acid—a new homologue of glutathione in maize seedlings exposed to cadmium. *FEBS Lett.* 336, 472–476.
- Milla, M.A.R., Maurer, A., Huete, A.R., Gustafson, J.P. (2003). Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signalling pathways. *Plant J.* 36, 602-615.
- Miles, J.R.W., May, P. (1979). Degradation of endosulfan and its metabolites by a mixed culture of soil microorganisms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 23, 13–19.
- Mills, G.C. (1957). Hemoglobin catabolism.I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects haemoglobin from peroxidase breakdown. *J. Biol.Chem.*229, 187-197.
- Mitobe, H., Ibaraki, T., Tanabe, A., Kawata, K., Yasuhara, A. (2001). High performance liquid chromatographic determination of pesticides in soluble phase and suspended phase in river water, *Toxicol. Environ. Chem.* 81, 97–110.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9, 490–498.
- Mizohata, E., Kumei, M., Matsumura, H., Shimaoka, T., Miyake, C., Inoue, T., Yokota A, Kai Y (2001). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of glutathione-dependent dehydroascorbate reductase from spinach chloroplasts. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 57, 1726-1728.
- Moons, A. (2003). *Osgstu3* and *osgtu4*, encoding tau class glutathione S-transferases, are heavy metal and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots. *FEBS Lett.* 553, 427–432.
- Moons, A. (2005). Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs). *Vitam Horm* 72, 155–202.
- Morel, F., Rauch, C., Coles, B., Ferrec, E.L., Guillouzo, A. (2002). The human glutathione transferase alpha locus: genomic organization of the gene cluster and functional characterization of the genetic polymorphism in the hGSTA1 promoter. *Pharmacogenetics.* 12, 277– 286.
- Morel, F., Rauch, C., Petit, E., Piton, A., Theret, N., Coles, B., Guillouzo, A. (2004). Gene and Protein Characterization of the Human Glutathione S-Transferase Kappa and Evidence for a Peroxisomal Localization. *J. Biol. Chem.* 279, 16246–16253.
- Morgenstern, R., DePierre, J.W. (1988). In *Glutathione Conjugation: Its Mechanism and Biological Significance*. Academic Press Ltd Eds.: Ketterer B, Sies H, 157-174.
- Morou, E., Ismail, H.M., Dowd AJ, Hemingwaya, J., Labrou, N., Paine, M., Vontas, J. (2008). A dehydrochlorinase-based pH change assay for determination of DDT in sprayed surfaces. *Anal. Biochem.* 378, 60-64.
- Mueller, L., Goodman, C.D., Silady, R.A., Walbot, V. (2000). AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiol.* 123, 1561-1570.
- Muir, D., Sverko, E. (2006), Analytical methods for PCBs and organochlorine pesticides in environmental monitoring and surveillance: a critical appraisal. *Anal.Bioanal. Chem.* 386, 769–789.

- Mukanganyama, S., Bezabih, M., Robert, M., Ngadjui, B.T., Kapche, G.F., Ngandeu, F., Abegaz, B. (2011). The evaluation of novel natural products as inhibitors of human glutathione transferase P1-1. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 26, 460–467.
- Mukherjee, A.K., Carp, M.J., Zuchman, R., Ziv, T. Horwitz, B.A., Gepstein, S. (2010). Proteomics of the response of *Arabidopsis thaliana* to infection with *Alternaria brassicicola*. *J. Proteomics.* 73, 709-720.
- Mulder, T.P J., Court, D.A., Peters, W.H.M. (1999). Variability of glutathione S-transferase in human liver and plasma. *Clin. Chem.* 45, 355–359.
- Najafabadi, H.S., Torabi, N., Chamankhah, M. (2008). Designing multiple degenerate primers via consecutive pairwise alignments. *BMC Bioinformatics.* 9, 55-62.
- Nakamura, S., Suzui, N., Nagasaka, T., Komatsu, F., Ishioka, N.S., S. Ito- Tanabata, Kawachi, N., Rai, H., Hattori, H., Chino, M., Fujimaki, S. (2013). Application of glutathione to roots selectively inhibits cadmium transport from roots to shoots in oilseed rape. *J. Exp. Bot.* 64, 1073–1081.
- Napoli C., Ignarro L.J. (2003). Nitric oxide-releasing drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 97-123.
- Navrot N., Collin V., Gualberto J., Gelhaye E., Hirasawa M., Rey P., Knaff D.B., Issakidis E., Jacquot J.P., Rouhier N. (2006). Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol.* 142, 1364-1379.
- Nilsson, L.O., Gustafsson, A., Mannervik, B. (2000). Redesign of substrate selectivity determining modules of glutathione transferase A1-1 installs high catalytic efficiency with toxic alkenal products of lipid peroxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 9408-9412.
- Nishimura, M., Yaguchi, H., Naito, S., Hiraoka, I. (2002). JP2002058483
- Njagi, J., Andreescu, S. (2007). Stable enzyme biosensors based on chemically synthesized Aupolypyrrole nanocomposites. *Biosens. Bioelectron.* 23, 168–175.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., Foyer, C.H. (2002). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J. exp. Bot.* 53, 1283-1304.
- Noctor, G. Queval, G., Mhamdi, A., Chaouch, S. Foyer, C.H. (2011). Glutathione. *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., Foyer, C.H. (2012) Glutathion in plant: An integrated overview. *Plant Cell Environ.* 35, 454–484.
- Nunes, F., Maccollin, M., Ahronowitz, I. (2006). US20060269925.
- Oakley, A.J. (2005). Glutathione transferases: New functions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 716-723.
- Oakley, A. (2011). Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metab. Rev.* 43, 138–151.
- Oakley, A.J., Lo Bello, M., Nuccetelli, M., Mazzetti, A.P., Parker, M.W. (1999). The ligandin (non-substrate) binding site of human Pi class glutathione transferase is located in the electrophile binding site (Hsite). *J. Mol. Biol.* 291, 913-926.
- Oh, K.H., Nam, S.H., Kim, H.S. (2002). Improvement of oxidative and thermostability of N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase by directed evolution. *Protein Eng.* 15, 689–695.
- Okuyama, T., Maehara, Y., Endo, K., Baba, H., Adachi, Y., Kuwano, M., Sugimachi, K. (1994). Expression of glutathione S-transferase-pi and sensitivity of human gastric cancer cells to cisplatin. *Cancer.* 74, 1230-1236.
- Oldenburg, J., Kraggerud, S.M., Brydøy, M., Cvancarova, M., Lothe, R.A., Fossa, S.D. (2007). Association between long-term neuro-toxicities in testicular cancer survivors and polymorphisms in glutathione-S-transferase- P1 and -M1, a retrospective cross sectional study. *J. Transl. Med.* 5, 1-8.
- Panda, S.K., Choudhury, S. (2005). Chromium stress in plants. *Brazilian J. Plant Physiol.* 17, 95-102.

- Pandey, N., Sharma, C.P. (2002). Effect of heavy metals Co^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} on growth and metabolism of cabbage. *Plant Sci.* 163, 753–758.
- Pandolfini, T., Gabbrielli, R., Ciscato, M. (1996). Nickel toxicity in two durum wheat cultivars differing in drought sensitivity. *J. Plant Nutr.* 19, 1611-1627.
- Park, H. (2012). Reduction of antibiotics using microorganisms containing glutathione S-transferases under immobilized conditions. *Environ. Toxicol. Phar.* 34, 345-350.
- Park, H.S., Nam, S.H., Lee, J.K., Yoon, C.N., Mannervik, B., Benkovic, S.J., Kim, H.S. (2006). Design and evolution of new catalytic activity with an existing protein scaffold. *Science.* 311, 535–538.
- Patskovsky, Y.V., Patskovska, L.N., Listowsky, I. (2000). The enhanced affinity for thiolate anion and activation of enzyme-bound glutathione is governed by an arginine residue of human Mu class glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 275, 3296–3304.
- Perczel, A., Csizmadia I.G. (2003). The amide linkage. Ab initio conformational analysis of protein-subunits: a case-study of the serine diamide model. Chapter 13. P. 409. John Wiley & Sons, Inc.
- Phadke, R.S. (1992). Biosensors and enzyme immobilized electrodes. *Biosystems.* 27, 203–206.
- Pierre, A.C. (2004). The Sol-Gel Encapsulation of Enzymes. *Biocatal. Biotransform.* 22, 145-170.
- Pikal-Cleland, K.A., Rodríguez-Hornedo, N., Amidon, G.L., Carpenter, J.F. (2000). Protein Denaturation during Freezing and Thawing in Phosphate Buffer Systems: Monomeric and Tetrameric b-Galactosidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 384, 398–406.
- Pemble, S.E., Wardle, A.F., Taylor, J.B. (1996). Glutathione S-transferase class Kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. *Biochem. J.* 319, 749–754.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E. (2004.) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612.
- Pettersson, P.L., Johansson, A.S., Mannervik, B. (2002). Translocation of human glutathione transferase A2-2 with peroxidase activity into an efficient steroid isomerase. *J. Biol. Chem.* 277, 30019-30022.
- Podgornik, A., Tennikova, T.B. (2002). Chromatographic reactors based on biological activity. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 76, 165–210.
- Pogacnik, L., Franko, M. (2003). Detection of organophosphate and carbamate pesticides in vegetable samples by a photothermal biosensor, *Biosens. Bioelectron.* 18, 1–9.
- Pohanka, M., Musilek, K., Kuca, K. (2009). Cholinesterase based amperometric biosensors for assay of anticholinergic compounds. *Curr. Med. Chem.* 16, 1790–1798.
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., Casini, A.F. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1499-1503.
- Pongstaporn, W., Pakakasama, S., Sanguansin, S., Hongeng, S. & Petmitr, S. (2009). Polymorphism of glutathione S-transferase omega gene: association with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 135, 673–678.
- Potterton, L., McNicholas, S., Krissinel, E., Gruber, J., Cowtan, K., Emsley, P., Murshudov, G.N., Cohen, S., Perrakis, A., Noble, M. (2004). *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60, 2288–2294.
- Puig, S., Mira, H., Dorcey, E., Sancenon, V., Andres-Colas, N., Garcia-Molina, A., Burkhead, J.L., Gogolin, K.A., Abdel-Ghany, S.E., Thiele, D.J. et al. (2007). Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 385–390.
- Pundir, C.S., Chauhan, N.(2012). Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. *Anal. Biochem.* 429, 19–31.

- Rabik, C.A., Dolan, M.E. (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat. Rev.* 3, 9–23.
- Ramanathan, K., Danielsson, B. (2001). Principles and applications of thermal applications. *Biosens. Bioelectron.* 16, 417–423.
- Ramanathan, K., Jonsson, B. R., Danielsson, B. (2001). Sol–gel based thermal biosensor for glucose. *Anal. Chim. Acta* 427, 1–10.
- Rana, R. K., Mastai, Y., Gedanken, A. (2002). Acoustic Cavitation Leading to the Morphosynthesis of Mesoporous Silica Vesicles. *Adv. Mater.* 14, 1414–1418.
- Reed D.J. (1990). Glutathione: toxicological implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30, 603-631.
- Renfrew, P. D., Choi, E. J., Bonneau, R., Kuhlman, B. (2012). Incorporation of Noncanonical Amino Acids into Rosetta and Use in Computational Protein-Peptide Interface Design. *PLoS One.* 7, e32637.
- Reinemer, P., Dirr, H. W., Ladenstein, R., Schaeffer, J., Gallay, O., Huber, R. (1991). The three-dimensional structure of class p glutathione S-transferase in complex with glutathione sulfonate at 2.3 Å resolution. *EMBO J.* 10, 1997-2005.
- Reinemer, P., Prade, L., Hof, P., et al. (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.
- Rensing, S.A., Lang, D., Zimmer, A.D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P.F., Lindquist, E.A., Kamisugi, Y., et al. (2008). The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319, 64–69.
- Ricci, G., Lo Bello, M., Caccuri, A.M., Pastore, A., Nuccetelli, M., Parker, M.W., Federici, G. (1995). Site-directed mutagenesis of human glutathione transferase P1-1. Mutation of Cys-47 induces a positive cooperatively in glutathione transferase P1-1. *J. Biol. Chem.* 270, 1243–1248.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Roberts, T.R., Hutson, D.H. (1999). *Metabolic Pathways of Agrochemicals: Part 2: Insecticides and Fungicides*.
- Roodveldt, C., Aharoni, A., Tawfiket, D.S. (2005). Directed evolution of proteins for heterologous expression and stability. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 50–56.
- Rose, T., Schultz, E., Henikoff, J., Pietrokovski, S., McCallum, C., Henikoff, S. (1998). Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic. Acids Res.* 26, 1628-1635.
- Rosic, N.N. (2009). Versatile capacity of shuffled cytochrome P450s for dye production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 203– 210.
- Rossjohn, J., McKinstry, W.J., Oakley, A.J., Verger, D., Flanagan, J., Chelvanayagam, G., Tan, K.L., Board, P.G., Parker, M.W. (1998). Human theta class glutathione transferase: the crystal structure reveals a sulfate-binding pocket within a buried active site. *Structure.* 6, 309–322.
- Rossini, L., Jepson, I., Greenland, A.J., Sari Gorla, M. (1997). Characterization of glutathione S-transferase isoforms in three maize inbred lines exhibiting differential sensitivity to alachlor. *Plant Physiol.* 112, 1595–600.
- Rottman, C., Grader, G., De Hazan, Y., Melchior, S., Avnir, D. (1999). Surfactant-Induced Modification of Dopants Reactivity in Sol-Gel Matrixes. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 8533-8543.
- Rouhier, N., Lemaire, S.D., Jacquot, J.P. (2008). The Role of Glutathione in Photosynthetic Organisms: Emerging Functions for Glutaredoxins and Glutathionylation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 143-166.
- Rouimi, P., Anglade, P., Benzekri, A., Costet, P., Debrauwer, L., Pineau, T., Tulliez, J. (2001). Purification and characterization of a glutathione S-transferase Omega in pig: Evidence for two distinct organ-specific transcripts. *Biochem. J.* 358, 257–262.
- Rowe, J.D., Nieves, E., Listowsky, I. (1997). Subunit diversity and tissue distribution of human glutathione S-transferases: interpretations based on electrospray ionization-MS and peptide sequence-specific antisera. *Biochem. J.* 325, 481–486.

- Roxas, V.P., Smith, R.K., Allen E.R., Allen R.D. (1997). Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nature Biotechnol.* 15, 988-991.
- Saavedra, J.E., Srinivasan, A., Bonifant, C.L., Chu J., Shanklin, A.P., Flippen-Anderson, J.L., Rice, W.G., Turpin, J.A., Davies, K.M., Keefer, L.K. (2001). The secondary amine/nitric oxide complex ion $R_2N[N(O)NO]^-$ as nucleophile and leaving group in S_NAr reactions. *J. Org. Chem.*, 66, 3090–3098.
- Saavedra, J.E., Srinivasan, A., Buzard, G.S., Davies, K.M., Waterhouse, D.J., Inami, K., Wilde, T.C., Citro, M.L., Cuellar, M., Deschamps, J.R., Parrish, D., Shami, P.J., Findlay, V.J., Townsend, D.M., Tew, K.D., Singh, S., Jia, L., Ji, X., Keefer, L.K. (2006). PABA/NO as an anticancer lead: analogue synthesis, structure revision, solution chemistry, reactivity toward glutathione, and in vitro activity. *J. Med. Chem.* 49, 1157–64.
- Sabeh, F., Wright, T., Norton, S.J. (1993). Purification and characterization of a glutathione peroxidase from the Aloe vera plant. *Enzyme Protein.* 47, 92-98.
- Sai, V.V.R., Kundu, T., Mukherji, S. (2009). Novel U-bent fiber optic probe for localized surface plasmon resonance based biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 24, 2804–2809.
- Salagovic, J., Kalina, I., Habalova, V., Hrivnak, M., Valansky, L., Biro, E. (1999). The role of human glutathione S-transferase M1 and T1 in individuals susceptibility to bladder cancer. *Physiol Res.* 48, 465-471.
- Sali, A., Blundell, T.L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J.Mol. Biol.* 234, 779–815.
- Salinas, A.E., Wong, M.G. (1999). Glutathione S-transferases – a review. *Curr. Med. Chem.* 6, 279–309.
- Samiec, P.S., Dahm, L.J., Jones, D.P. (2000). Glutathione S-transferase in mucus of rat small intestine. *Toxicol. Sci.* 54, 52-59.
- Sappl, P.G., Carroll, A.J., Clifton, R., Lister, R., Whelan, J., Harvey Millar, A., Singh, K.B. (2009). The Arabidopsis glutathione transferase gene family displays

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress. *Plant J.* 58, 53–68.

Sari-Gorla, M., Ferrario, M.S., Rossini, L., Frova, C., Villa, M. (1993). Developmental expression of glutathione S-transferase in maize and its possible connection with herbicide tolerance. *Euphytica.* 67, 221-230.

Sassolas, A., Blum, L.J., Leca-Bouvier, B.D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechn. Adv.* 30, 489–511.

Satoh, K. (1995). The high non-enzymatic conjugation rates of some glutathione S-transferase (GST) substrates at high glutathione concentrations. *Carcinogenesis* 16, 869-874.

Sauro, H.M. (2009-2011). *Enzyme Kinetics for Systems Biology.* Ambrosius Publishing and Future Skill Software. USA.

Sayed, Y., Hornby, J.A., Lopez, Dirr, M. (2002). Thermodynamics of the ligandin function of human class Alpha glutathione transferase A1-A1: energetics of organic anion ligand binding. *Biochemistry.* 363, 341–346.

Sayed, Y., Wallance, L.A., Dirr, H.W. (2000). The hydrophobic lock-and-key intersubunit motif of glutathione transferase A1-1: implications for catalysis, ligandin function and stability. *FEBS Lett.* 465, 169-172.

Schacht, S., Huo, Q., Voigt-Martin, I. G., Stucky, G. D., Sch€ath, F. (1996). Oil-Water Interface Templating of Mesoporous Macroscale Structures. *Science.* 273, 768–771.

Sch€afer, F.Q., Buettner, G.R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Res. Inst. ESR Facil.* 30, 1191–1212.

Schiller, R., Weiss, C.K., Geserick, J., H€using, N., Landfester, K. (2009). Synthesis of Mesoporous Silica Particles and Capsules by Miniemulsion Technique. *Chem. Mater.* 2009, 21, 5088–5098.

- Schröder P. (2001). The role of glutathione and glutathione S-transferases in plant reaction and adaptation to xenobiotics. In: Significance of glutathione in plant adaptation to the environment. Eds.: White PJ, Hammond JP, 155-183.
- Schultz, I.R., Merdink, J.L., Gonzalez-Leon, A., Bull, R.J. (2009). Dichloroacetate toxicokinetics and disruption of tyrosine catabolism in B6C3F1 mice: dose-response relationships and age as a modifying factor. *Toxicol.* 173, 229-247.
- Schmidt, M., Böttcher, D., Bornscheuer, U.T. (2009). Protein engineering of carboxyl esterases by rational design and directed evolution. *Protein Pept. Lett.* 16, 1162–1171.
- Scrutton, N.S., Berry, A., Perham, R.N. (1990). Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature* 343, 38–43.
- Segel, I.H. (1975). *Enzyme kinetics*. Wiley, New York, pp 460–461
- Semane, B., Dupae, J., Cuypers, A., Noben, J.P., Tuomainen, M., Tervahauta, A., Karenlampi, S., van Belleghem, F., Smeets, K., Vangronsveld, J. (2010). Leaf proteome responses of *Arabidopsis thaliana* exposed to mild cadmium stress. *J. Plant Physiol.* 167, 247–254.
- Senveli, S.U., Tigli, O. (2013). Biosensors in the small scale: methods and technology trends. *IET Nanobiotechnol.* 7, 7–21.
- Shanker, A.K., Djanaguiraman, M., Sudhagar, R., Chandrashekar, C.N., Pathmanabhan, G. (2004). Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vigna radiata* (L.) RWilczek, cv CO 4) roots, *Plant Sci.* 166, 1035–1043.
- Sharma, R., Yang, Y., Sharma, A., Awasthi, S., Awasthi, Y.C. (2004). Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. *Antioxid. Redox Signal.* 6, 289–300.
- Sharp, D.B. (1998). Alachlor. In: Kearney DP, Kaufman PC, editors. *Herbicides: chemistry degradation and mode of action*. New York: Marcel Dekker Inc.; p. 301–33.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1–16.
- Sherma, J. (2005). Thin-layer chromatography of pesticides: a review of applications for 2002–2004. *Acta Chromatogr.* 15, 5–30.
- Shivaramaiah, H. M., Kennedy, I. R. (2006) Biodegradation of Endosulfan by a Soil Bacterium. *J. Environ. Sci. Health, Part B.* 41, 895–905.
- Sibhatu, M.B., Smitherman, P.K., Townsend, A.J., Morrow, C.S. (2008). Expression of MRP1 and GSTP1-1 modulate the acute cellular response to treatment with the chemopreventive isothiocyanate, sulforaphane. *Carcinogenesis.* 29, 807–815.
- Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol. Med.* 27, 916-921.
- Singhal, R., Gambhir, A., Pandey, M.K., Annapoorni, S., Malhotra, B.D. (2002). Immobilization of urease on poly(N-vinyl carbazole)/stearic acid Langmuir–Blodgett films for application to urease biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 17, 697–703.
- Sinning, I., Kleywegt, G.J., Cowan, S.W., Reinemer, P., Dirr, H.W., Huber, R., Gilliland, G.L., Armstrong, R.N., Ji, X., Board, P.G. et al. (1993). Structure determination and refinement of human alpha class glutathione transferase A1-1, and a comparison with the Mu and Pi class enzymes. *J. Mol. Biol.* 232, 192–212.
- Sippl, M.J. (1993). Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins* 17, 355–362.
- Skipsey, M., Andrews, C.J., Townson, J.K., Jepson, I., Edwards, R. (1997). Substrate and thiol specificity of a stress-inducible glutathione transferase from soybean. *FEBS Lett.* 409, 370-374.
- Skipsey, M., Davis, B. G., Edwards, R. (2005). Diversification in substrate usage by glutathione synthetases from soya bean (*Glycine max*), wheat (*Triticum aestivum*), and maize (*Zea mays*). *Biochem. J.* 391, 567–574.
- Skopelitou, K., Muleta, A.W., Pavli, O., Skaracis, G.N., Flemetakis, E., Papageorgiou, A.C., Labrou, N.E. (2011). Overlapping protective roles for

glutathione transferase gene family members in chemical and oxidative stress response in *Agrobacterium tumefaciens*. *Funct. Integr. Genomics*. 12, 157-172.

Skorzynska-Polit, E., Drazkiewicz, M., Krupa, Z. (2010). Lipid peroxidation and antioxidative response in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium and copper. *Acta Physiol. Plant*. 32, 169–175.

Smiri, M., Chaoui, A., Rouhier, N., Celhaye, E., Jacquot, J.P., Ferjani, E.I. (2010). Oxidative damage and redox change in pea seeds treated with cadmium. *C. R. Biol.* 333, 801–807.

Smith, C.V., Jones, D.P., Guenther, T.M., Lash, L.H., Lauterburg, B.H. (1996). Compartmentation of glutathione: implications for the study of toxicity and disease. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140, 1-12.

Smith, A.P., Nourizadeh, S.D., Peer, W.A., Xu, J., Bandyopadhyay, A., Murphy, A.S., Goldsbrough, P.B. (2003). *Arabidopsis* AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids. *Plant J.* 36, 433-442.

Sohail, M., Adeloju, S. (2008). Electroimmobilization of nitrate reductase and nicotinamide adenine dinucleotide into polypyrrole films for potentiometric detection of nitrate. *Sens. Actuators B. Chem.* 133, 333–339.

Soranzo, N., Sari Gorla, M., Mizzi, L., De Toma, G., Frova, C. (2004). Organisation and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family. *Mol. Genet. Genomics*. 271, 511-521.

Spadaro, D., Yun, B.W., Spoel, S.H., Chu, C., Wang, Y.Q., Loake, G.J. (2010). The redox switch: dynamic regulation of protein function by cysteine modifications. *Physiol. Plant* 138, 360–371.

Spiro, S.G., Silvestri, G.A. (2005). The treatment of advanced nonsmall cell lung cancer. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 11, 287–291.

Spiteller, G. (2001). Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases. *Exp. Gerontol.* 36, 1425–1457.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Stemmer, W.P. (1994). Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*. 370, 389–391.
- Stenberg, G., Abdalla, A.M., Mannervik, B. (2000). Tyrosine 50 at the subunit interface of dimer human glutathione transferase P1-1 is a structural key residue for modulating protein stability and catalytic function. *BBRC*. 271, 59-63.
- Stoehlmacher, J., Park, D.J., Zhang, W., Yang, D., Groshen, S., Zahedy, S., Lenz, H.J. (2004). A multivariate analysis of genomic polymorphisms: prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *Br. J. Cancer*. 91, 344–354.
- Stoehlmacher, J, Park DJ, Zhang W, Groshen S, Tsao-Wei DD, Yu MC, Lenz HJ (2002). Association between glutathione S-transferase P1, T1 and M1 genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst*. 94, 936–942.
- Subramaniam, K., Ye, Z., Buechley, G., Shaner, G., Solomos, T., Ueng, P.P. (1999). Isolation of a zeta class wheat glutathione S-transferase gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1447, 348-356.
- Sundberg, K., Widersten, M., Seidel, A., Mannervik, B., Jernstrom, B. (1997). Glutathione conjugation of bay- and fjord-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by glutathione transferases M1-1 and P1-1. *Chem. Res. Toxicol*. 10, 1221-1227.
- Sundberg, K., Johansson, A.S., Stenberg, G., Widersten, M., Seidel, A., Mannervik, B., Jernstrom, B. (1998). Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* 19, 433-436.
- Sugata, T., Ozaki, K., Uwakaa, M., Sumita, Y. (2005). JP2005176764.
- Sun, N., Sun, X., Chen, B., Cheng, H., Feng, J., Cheng, L., Lu, Z. (2010). MRP2 and GSTP1 polymorphisms and chemotherapy response in advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 65, 437-446.

Sutherland, T.D., Horne, I., Russell, R.J., Oakeshott, J.G. (2002). Gene cloning and molecular characterization of a two-enzyme system catalyzing the oxidative detoxification of b-endosulfan, *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 6237–6245.

Sweeney, C., Ambrosone, C.B., Joseph, L., Stone, A., Hutchins, L.F., Kadlubar, F.F., Coles, B.F. (2003). Association between a glutathione S-transferase A1 promoter polymorphism and survival after breast cancer treatment. *Int. J. Cancer.* 103, 810-814.

Talalay, P., De Long, M.J., Prochaska, H.J. (1988). Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 8261-8265.

Tan, K.L., Chelvanayagam, G., Parker, M.W., Board, P.G. (1996). Mutagenesis of the active site of the human Theta-class glutathione transferase GSTT2-2: catalysis with different substrates involves different residues. *Biochem. J.* 319, 315–321.

Tappel, A.L. (1978). Glutathione peroxidase and hydroperoxides. IN Fleischer S and Packer L (eds). *Methods in Enzymology.* 52, 506-513.

Thom, R., Cummins, I., Dixon, D. P., Edwards, R., Cole, D. J., Laphorn, A. J. (2002). Structure of a *tau* class glytathione S-transferase from wheat active in herbicide detoxification. *Biochem.* 41, 7008–7020.

Thom, R., Dixon, D.P., Edwards, R., Cole, D.J., Laphorn, AJ. (2001). The structure of a zeta class glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana*: characterisation of a GST with novel active-site architecture and a putative role in tyrosine catabolism. *J. Mol. Biol.* 308, 949-62.

Thompson, J.D., Higgins, D.J., Gibson, T.J. (1994). CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids. Res.* 22, 4673–4680.

Thompson, S.T., Stellwagen, E. (1976). Binding of Cibacron blue F3GA to proteins containing the dinucleotide fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 361–365.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Tong, Z., Board, P.G., Anders, M.W. (1998). Glutathione transferase zeta-catalyzed biotransformation of dichloroacetic acid and other alpha-haloacids, *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1332–1338.
- Townsend, D.M., Manevich, He, Y. L., Hutchens, S., Pazoles, C.J., Tew, K.D. (2009). Novel role for glutathione S-transferase pi. Regulator of protein S-Glutathionylation following oxidative and nitrosative stress, *J. Biol. Chem.* 284, 436–445.
- Trott, O., Olson, A.J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J. Comput. Chem.* 31, 455–461.
- Uchida, K. (2007). Future of toxicology—lipid peroxidation in the future: from biomarker to etiology. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 3–5.
- van de Giessen, E., Fogh, I., Gopinath, S., Smith, B., Hu, X., Powell, J. et al. (2008). Association study on glutathione S-transferase omega 1 and 2 and familial ALS. *Amyotrophic Lateral Scler.* 9, 81–84.
- Vareiro, M.L.M., Liu, J., Knoll, W., Zak, K., Williams, D., Jenkins, A. T.A. (2005). Surface plasmon fluorescence measurements of human chorionic gonadotrophin: role of antibody orientation in obtaining enhanced sensitivity and limit of detection. *Anal. Chem.* 77, 2426–2431.
- Vargo, M.A., Nguyen, L., Colman, R.F.(2004). Subunit interface residues of glutathione S-transferase A1-1 that are important in the monomer-dimer equilibrium. *Biochemistry.* 43, 3327-35.
- Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H. (2009) Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 364–372.
- Villafania, A., Anwar, K., Amar, S., Chie, L., Way, D., Chung, D.L., Adler, V., Ronai, Z., Brandt-Rauf, P.W., Yamaizumii, Z., Kung, H.F., Pincus, M.R. (2000). Glutathione-S-transferase as a selective inhibitor of oncogenic ras-p21-induced mitogenic signaling through blockade of activation of jun by jun-N-terminal kinase. *Ann. Clin. Lab Sci.* 30, 57–64.

- Vollenweider, S., Weber, H., Stolz, S., Chetelat, A., Farmer, E.E. (2000). Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased Arabidopsis leaves. *Plant J.* 24, 467–476.
- Vryzas, Z., Vassiliou, G., Alexoudis, C., Papadopoulou-Mourkidou, E. (2009). Spatial and temporal distribution of pesticide residues in surface waters in northeastern Greece. *Water Res.* 43, 1-10.
- Waeg, G., Dimsit, Y.G., Esterbauer, H. (1996). Monoclonal antibodies for detection of 4-hydroxynonenal modified proteins. *Free Radic. Res.* 25, 149–159.
- Wachter, A., Wolf, S., Steininger, H., Bogs, J., Rausch, T. (2005) Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the Brassicaceae. *Plant J.* 41, 15-30.
- Wagner, C.R., Benkovic, S.J. (1990). Site directed mutagenesis: a tool for enzyme mechanism dissection. *Trends Biotechnol.* 8, 263–270.
- Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D.P., Mauch, F. (2002). Probing the Diversity of the Arabidopsis glutathione S-Transferase Gene Family. *Plant Mol. Biol.* 49, 515-532.
- Washburn, M. P., Wells, W. W. (1999). Identification of the Dehydroascorbic Acid Reductase and Thioltransferase (Glutaredoxin) Activities of Bovine Erythrocyte Glutathione Peroxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 567-571.
- Wang, T., Arifoglu, P., Ronai, Z., Tew, K. D. (2001). Glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) inhibits c-Jun N-terminal kinase (JNK1) signaling through interaction with the C terminus. *J. Biol. Chem.* 276, 20999–21003.
- Wang, J. (2005a). Nanomaterial-based amplified transduction of biomolecular interactions. *Small.* 1, 1036–43.
- Wang, J. (2005b). Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: a review. *Electroanal.* 17, 7-14.
- Wang, B., Li, B., Deng, Q., Dong, S. (1998). Amperometric glucose biosensor based on sol-gel organic-inorganic hybrid material. *Anal. Chem.* 70, 3170–3174.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Wei, X., Kuhn, D., Narasimhan, G. (2003). Degenerate primer design via clustering. Proceedings of the 2nd IEEE Computer Society Bioinformatics Conference (CSB 2003) 2003, 75-83.
- Wilce, M. C. J., Parker, M. W. (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochim. Biophys. Acta* 1205, 1-18.
- Wilson, S.R., Zucker, P.A., Huang, R.R.C., Spector, A. (1989). Development of synthetic compounds with glutathione transferases. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 5936-5939.
- Williams, G.J., Domann, S., Nelson, A., Berry, A. (2003). Modifying the stereochemistry of an enzyme-catalyzed reaction by directed evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 3143–3148.
- Wolf, R.B., Spencer, G.F., Kwolek, W.F. (1984). Inhibition of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) germination and growth by benzylisothiocyanate, a natural toxicant. *Weed Sci.* 32, 612–615.
- Wu, X.J., Choi, M.M.F. (2004). An optical glucose biosensor based on entrapped-glucose oxidase in silicate xerogel hybridized with hydroxyethyl carboxymethyl cellulose. *Anal. Chim. Acta.* 514, 219–226.
- Wu, Y., Fan, Y., Xue, B., Luo, L., Shen, J., Zhang, S., Jiang, Y., Yin, Z. (2006). Human glutathione S-transferase P1-1 interacts with TRAF2 and regulates TRAF2-ASK1 signals. *Oncogene.* 25, 5787-800.
- Yadav, S.K., Dhote, M., Kumar, P. Sharma, J., Chakrabartia, T., Juwarkara, A.A. (2010). Differential antioxidative enzyme responses of *Jatropha curcas* L. to chromium stress. *J. Hazard. Mater.* 180, 609–615.
- Yadav, U.C.S, Ramana, K.V., Awasthi, Y.C., Srivastava, S.K. (2008). Glutathione level regulates HNE –induced genotoxicity in human erythroleukemia cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 227, 257–264.
- Yang, Y., Sharma, R., Cheng, J.Z., Saini, M.K., Ansari, N.H. Andley, U.P., Awasthi, S., Awasthi, Y.C.(2002). Protection of HLE B-3 cells against hydrogen

peroxide- and naphthalene-induced lipid peroxidation and apoptosis by transfection with hGSTA1 and hGSTA2. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 434–445.

Yang, Y., Sharma, R., Sharma, A., Awasthi, S., Awasthi, Y. C. (2003). Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signalling. *Acta Biochimica Polonica.* 50, 319–336.

Yang, S., Xie, J., Li, Q. (2012). Oxidative Response and Antioxidative Mechanism in Germinating Soybean Seeds Exposed to Cadmium. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 9, 2827-2838.

Yin, Z.L., Dahlstrom, J.E., Le Couteur, D.G., Board, P.G. (2001). Immunohistochemistry of omega class glutathione S-transferase in human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 983-988.

Yoshiga, S., Soya, Y. (2005). JP 2005198525.

Zakharyan, R.A., Aposhian, H.V. (1999). Enzymatic reduction of arsenic compounds in mammalian systems: the rate-limiting enzyme of rabbit liver arsenic biotransformation is MMA(V) reductase. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 1278-1283.

Zechmann, B., Koffler, B.E., Russell S.D. (2011). Glutathione synthesis is essential for pollen germination in vitro. *BMC Plant Biol.* 11, 54-64.

Zechmann, B., Müller, M. (2010). Subcellular compartmentation of glutathione in dicotyledonous plants. *Protoplasma* 246, 15-24.

Zettl, R., Schell, J., Palme, K. (1994). Photoaffinity labeling of *Arabidopsis thaliana* plasma membrane vesicles by 5-azido-[7-3H]indole-3-acetic acid identification of a glutathione S-transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 689-693.

Zha, D., Wilensek, S., Hermes, M., Jaegerb, K.E., Reetz, M.T. (2001). Complete reversal of enantioselectivity of an enzyme catalysed reaction by directed evolution. *Chem. Commun.*, 2664–2665.

Zhang, H., Forman, H. J. (2009). Redox regulation of gammaglutamyl transpeptidase. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 41, 509–515.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Zhao, H., Arnold, F.H. (1997). Optimization of DNA shuffling for high fidelity Recombination. *Nucl. Acids Res.* 25, 1307–1308.
- Zhao, Z., Koeplinger, K.A., Peterson, T., Conradi, R.A., Burton, P.S., Suarato, A., Heinrikson, R.L., Tomasselli, A.G. (1999). Mechanism, structure activity studies, and potential applications of glutathione S-transferase-catalyzed cleavage of sulfonamides. *Drug Metab. Dispos.* 27, 992-998.
- Zhou, X.Z., Arnold, M.A. (1995). Internal enzyme fibre-optic biosensors for hydrogen peroxide and glucose. *Anal. Chim. Acta.* 304, 147-156.
- Zhou, H., Brock, J., Liu, D., Board, P.G., Oakley, A.J. (2012). Structural Insights into the Dehydroascorbate Reductase Activity of Human Omega-Class Glutathione Transferases. *J. Mol. Biol.* 420, 190–203.
- Zhou, J., Goldsbrough, P.B. (1993). An Arabidopsis gene with homology to glutathione S-transferases is regulated by ethylene. *Plant Mol. Biol.* 22, 517–523.
- Zhu, O.Y.L., Pilon-Smits, E.A.H., Jouanin, I., Terry, N. (1999). Overexpression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol.* 119, 73-79.
- Zoldesi, C. I., Steegstra, P., Imhof, A. (2007). Encapsulation of emulsion droplets by organo-silica shells. *J. Colloid Interface Sci.* 308, 121–129.

