

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΠΜΣ: ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ & ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ:

*Μελέτη πρόδρομων N,O-ετεροκυκλικών δομών ως  
αναστολέων της τρανσφεράσης γλουταθειόνης P1-1  
ανθρώπου.*



ΠΟΥΛΙΟΥ Μ. ΦΩΤΕΙΝΗ

ΑΘΗΝΑ 2013

**ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ :**

**Κλώνης Ιωάννης, Καθηγητής**

**Λάμπρου Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής**

**Ηλιόπουλος Ηλίας, Καθηγητής**

**“Μελέτη πρόδρομων Ν,Ο-ετεροκυκλικών δομών ως αναστολέων της  
τρανσφεράσης γλουταθειόνης P1-1 ανθρώπου.”**

**Ο ορισμός της τριμελούς συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής,  
καθώς και η έγκριση του θέματος της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής  
έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Γεωπονικής  
Βιοτεχνολογίας 13ης/07-06-2013.**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ :**

**ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ ΚΛΩΝΗΣ**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας του τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Το εργαστηριακό κομμάτι της μελέτης μου πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Κυρίου Ιωάννη Κλώνη.

Στον Κύριο Ιωάννη Κλώνη οφείλω τις θερμές μου ευχαριστίες που με δέχτηκε στο εργαστήριό του. Επίσης, τον ευχαριστώ για την καθοδήγηση, την υποστήριξη καθώς και τις ουσιαστικές διορθώσεις καθ'όλη τη διάρκεια διεκπεραίωσης της παρούσας διατριβής. Ένας άνθρωπος, πέρα από Καθηγητής, ο οποίος με την υπομονή και την επιμονή του με έκανε τον επιστημονικά, και όχι μόνο, σκεπτόμενο άνθρωπο που είμαι σήμερα. Τον ευχαριστώ για ακόμα μια φορά.

Εν συνεχεία, πολλά ευχαριστώ στον Κύριο Νικόλαο Λάμπρου, Αναπληρωτή Καθηγητή του εργαστηρίου μας, που εκτός από τις γνώσεις που μου πρόσφερε απλόχερα μου έδινε αισιοδοξία και δύναμη κάθε φορά που την είχα ανάγκη.

Ακόμα, ευχαριστώ πολύ τον Καθηγητή Βιοχημείας, Κύριο Ηλία Ηλιόπουλο, για τη σχεδίαση και την προσφορά των εικόνων της *in silico* μοριακής μοντελοποίησης και ελλιμενισμού (*in silico* molecular docking).

Ένα ιδιαίτερο και ουσιαστικό ευχαριστώ οφείλω να πω σε ένα πολύ σημαντικό άνθρωπο της ζωής μου, που εδώ και επτά ολόκληρα χρόνια είναι πάντα δίπλα μου τόσο προσωπικά όσο και επαγγελματικά. Μαζί του μοιράστηκα την αγωνία και τον ενθουσιασμό μου, την ανησυχία και τη χαρά μου, τους προβληματισμούς και τις ανασφάλειες της καθημερινότητας. Ήταν εκεί για μένα όταν όλοι οι υπόλοιποι έφευγαν. Δεν είναι άλλος από τη φίλη μου Φερενίκη Περπεροπούλου. Φερενικάκι μην πάψεις ποτέ να είσαι εκείνος ο χαμογελαστός και αισιόδοξος άνθρωπος που εγώ γνώρισα. Σ' ευχαριστώ για όλα . . .

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την κ. Ευαγγελία Παππά και την Δρ Ευαγγελία Χρονοπούλου, για την άψογη συνεργασία καθώς και για τη

ψυχολογική και ηθική βοήθεια που απλόχερα μου πρόσφεραν όποτε τη χρειάστηκα. Επιπλέον, ευχαριστώ την Άννη, τη Μαριάννα, τη Μαρία και τον Κώστα για τη μοναδική συνεργασία και το υπέροχο κλίμα μέσα στο εργαστήριο.

Επίσης, οφείλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στο φίλο και εξάίρετο συνάδελφο Νικόλα Γεωργακή, με τον οποίο μοιράστηκα τις ανησυχίες μου καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματός μου. Ο Νίκος με βοήθησε πολύ σε διάφορα πρακτικά ζητήματα και ήταν εκεί κάθε φορά που τον χρειάστηκα.

Τέλος, ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στην οικογένειά μου, που παρά τις δυσκολίες που αντιμετωπίσαμε όλο αυτό το χρονικό διάστημα δεν έπαψαν ποτέ να είναι δίπλα μου και να με στηρίζουν. Κάθε φορά ήταν εκεί για να με πάρουν από το χέρι και να μου δώσουν ώθηση να πάω παρακάτω. Τους ευχαριστώ λοιπόν από καρδιάς και εύχομαι να τους κάνω υπερήφανους.

Στους γονείς μου . . .

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Συντμήσεις	11
Περίληψη	12
Abstract	15
Κεφάλαιο 1 <sup>ο</sup> : Εισαγωγή	17
1.1. Το τριπεπτίδιο γλουταθειόνη	18
1.2. Ενδοκυττάρια κατανομή της γλουταθειόνης	19
1.3. Ρόλος της τρανσφεράσης γλουταθειόνης	20
1.4. Ταξινόμηση και ονοματολογία των GSTs	21
Κυτταροπλασματικές GSTs	21
Μικροσωμικές GST	26
Πρωτεΐνες που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό φωσφομυκίνη	27
1.5. Κυτταροπλασματικές GSTs στον άνθρωπο και γενικά στα θηλαστικά	27
1.6. Καταλυτικές λειτουργίες των GSTs	29
<i>Νουκλεόφιλη υποκατάσταση</i>	29
<i>Δράση υπεροξειδάσης GPx</i>	30
<i>Δράση ισομεράσης</i>	30
<i>Καταλυτική δράση αναγωγής και θειοτρανσφεράσης</i>	30
<i>Γλουταθεινυλίωση</i>	31
1.7. Τάξεις των GSTs	31
i. Άλφα τάξη των GSTs	31
ii. Πι τάξη των GSTs	34
iii. Ταυ τάξη των GSTs	36
iv. Ομέγα τάξη των GSTs	37
1.8. Γενικά για το ένζυμο SjGS	39
1.8.1. Δομή του ενζύμου SjGST	40
1.9. Βιοτεχνολογικές εφαρμογές των GSTs	41

1.9.1. Εφαρμογές των GSTs στην ιατρική	42
1.9.1.1. Εφαρμογές των GSTs στην μοριακή διαγνωστική διαφόρων τύπων καρκίνου	43
1.9.1.2. Πολυμορφισμοί των GSTs και συσχέτιση με τον καρκίνο	43
1.9.1.3. Οι GSTs ως μοριακοί στόχοι σχεδιασμού φαρμάκων	45
1.9.2. Ανάπτυξη βιοαισθητήρων	47
1.9.3 Η μέθοδος της βιοεξυγίανσης για την αποικοδόμηση ανθεκτικών περιβαλλοντικών ρύπων	48
1.9.4. Οι GSTs ως εργαλείο αναλυτικών μεθόδων ανίχνευσης ξενοβιοτικών	48
1.9.5. Εφαρμογές του SjGST	49
1.10. Κινητική των Ενζύμων	50
1.10.1. Εύρεση του είδους αναστολής και υπολογισμός της σταθεράς αναστολής $K_i$	55
1.11. Σκοπός της παρούσας εργασίας	64
Κεφάλαιο 2 <sup>ο</sup> : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	66
2.1. ΥΛΙΚΑ	67
2.1.1. Ένζυμα και πρωτεΐνες	67
2.1.2. Ενώσεις προς μελέτη	67
2.1.3. Χημικά Αντιδραστήρια, Υποστρώματα Ενζύμων & Λοιπά Υλικά	72
2.1.4. Υαλικά & Πλαστικά Αναλώσιμα	73
2.2. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ	73
2.2.1. Προγράμματα Η/Υ	74
2.3. ΜΕΘΟΔΟΙ	74
2.3.1. Ετερόλογη έκφραση	74
2.3.1.1. Ετερόλογη έκφραση του ισοενζύμου hGSTA1-1 ανθρώπου σε E. coli BL21(DE3)	74
2.3.1.2. Ετερόλογη έκφραση των ισοενζύμων hGSTP1A, hGSTP1B και hGSTP1C ανθρώπου σε E. coli BL21(DE3)	75

2.3.1.3. Ετερόλογη έκφραση των ισοενζύμων hGSTO1-1 και hGSTT2-2 ανθρώπου σε E. coli BL21(DE3)	75
2.3.2. Φασματοσκοπική δοκιμή ενζυμικής δραστηριότητας τρανσφεράσης γλουτεθειόνης (GST)	76
2.3.3. Υπολογισμός μονάδων ενζυμικής δραστηριότητας της GST	77
2.3.4. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη Μέθοδο Bradford	78
2.3.5. Υπολογισμός της ειδικής δραστηριότητας (SA)	80
2.3.6. Διαπίδυση (dialysis)	80
2.3.7. Καθαρισμός των ισοενζύμων	80
2.3.7.1. Καθαρισμός των ισοενζύμων hGSTA1-1, hGSTP1A, hGSTP1B, hGSTP1C με χρωματογραφία συγγενείας σε προσροφητή BES-GSH	80
2.3.7.2. Καθαρισμός των ισοενζύμων hGSTT2-2 ΚΑΙ hGSTO1-1 με χρωματογραφία συγγενείας σε προσροφητή Ni-NTA-Αγαρόζης	82
2.3.8. Υπολογισμός απόδοσης καθαρισμού	83
2.3.9. Λυοφιλίωση	83
2.3.10. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS-PAGE)	84
2.3.10.1. Παρασκευή πηκτής επιστοίβαξης και πηκτής διαχωρισμού	85
2.3.10.2. Προετοιμασία δείγματος και ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης	85
2.3.10.3. Βαφή με τη χρωστική COOMASSIE BLUE R-250	85
2.3.11. Σάρωση των δύο βιβλιοθηκών συνθετικών ενώσεων ως πιθανών αναστολέων GSTs	86
2.3.11.1. Σάρωση (screening) ουριών και βενζοδιαζεπινών ως πιθανών αναστολέων έναντι των ισοενζύμων hGSTA1-1, hGSTP1*A, hGSTP1*B, hGSTP1*C, hGSTT2-2, hGSTO1-1 και του Schistosoma	86
2.3.11.2. Σάρωση (screening) 2,2'-διυδροξυβενζοφαινονών και	



N-καρβονυλικών παραγώγων τους ως πιθανών αναστολέων έναντι των ισοενζύμων hGSTP1*A, hGSTP1*B, hGSTP1*C	87
2.3.12. Υπολογισμοί παραμένουσας ενζυμικής δραστηριότητας (RA) και ενζυμικής αναστολής (EI)	88
2.3.13. Φασματοσκοπική δοκιμή ενζυμικής δραστηριότητας τρανσφεράσης γλουταθειόνης (GST) παρουσία ουριών και βενζοδιαζεπινών συναρτήσει του χρόνου	89
2.3.14. Υπολογισμός συγκέντρωσης αναστολέα κατά την οποία επέρχεται 50% αναστολή στο ένζυμο (τιμή IC <sub>50</sub> )	89
2.3.15. Κινητική μελέτη αναστολής της τρανσφεράσης γλουταθειόνης ανθρώπου (hGSTP1A, hGSTP1B, hGSTP1C) από τις ενώσεις που επιλέγησαν κατόπιν σάρωσης των 2,2'-διυδροξυβενζοφαινονών και N-καρβονυλικών παραγώγων τους	90
2.3.15.1. Κινητική μελέτη αναστολής των hGSP1A, hGSP1B, hGSP1C έχοντας το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης	91
2.3.15.2. Κινητική μελέτη αναστολής των hGSP1A, hGSP1B, hGSP1C έχοντας τη γλουταθειόνη (GSH) ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης	92
Κεφάλαιο 3 <sup>ο</sup> : ΟΥΡΙΕΣ & BENZOΔΙΑΖΕΠΙΝΕΣ	92
Αποελέσματα	93
3.1. Η δημιουργία της βιβλιοθήκης των ουριών και βενζοδιαζεπινών	94
3.2. Αποτελέσματα προγράμματος PASS	95
3.3. Καθαρισμός ισοενζύμων τρανσφεράσης γλουταθειόνης (GSTs)	98
3.4. Σάρωση αναλόγων-ουριών και βενζοδιαζεπινών ως δυνητικών αναστολέων ισοενζύμων τρανσφεράση γλουταθειόνης ανθρώπου (hGSTA1-1, hGST2-2, hGSTO1-1, hGSP1A, hGSP1B, hGSP1C) και από <i>Schistosoma</i> <i>japonica</i>	98
3.5. Έλεγχος υδατοσυμβατών οργανικών διαλυτών στη δραστηριότητα του ισοενζύμου hGSTA1-1	100
3.6. Έλεγχος της δραστηριότητα του ισοενζύμου hGSTA1-1 συναρτήσει του χρόνου παραμονής των διαλυμάτων τριών επιλεγμένων ενώσεων	102

Συζήτηση	105
Κεφάλαιο 4 <sup>ο</sup> : BENZOΦΑΙΝΟΝΕΣ & N-ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ	109
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	110
4.1. Καθαρισμός ενζύμων τρανσφεράσης γλουταθειόνης (GSTs)	111
4.2. Σάρωση 2,2' -διυδροξυβενζοφαινονών και N-καρβονυλικών παραγώγων τους ως δυνητικών αναστολέων των ισοενζύμων τρανσφεράση γλουταθειόνης ανθρώπου hGSP1A, hGSP1B και hGSP1C	112
4.3. Σάρωση 2,2' -διυδροξυβενζοφαινονών και N-καρβονυλικών παραγώγων τους ως δυνητικών αναστολέων του ισοενζύμου τρανσφεράση γλουταθειόνης ανθρώπου hGSP1A-His <sub>6</sub> που έφερε την απόληξη 6His	115
4.4. Μελέτη αναστολής των ισοενζύμων τρανσφεράση γλουταθειόνης ανθρώπου, hGSP1A, hGSP1B & hGSP1C.	119
4.4.1. Ισοένζυμο hGSTP1A	119
4.4.1.1. Υπολογισμός του δείκτη IC <sub>50</sub> για τον αναστολέα 13	120
4.4.1.2. Υπολογισμός του δείκτη IC <sub>50</sub> για τον αναστολέα 14	123
4.4.1.3. Κινητική μελέτη αναστολής του ισοενζύμου hGSTP1A από την ένωση 14	125
4.4.2. Αλλοένζυμο hGSTP1B	127
4.4.2.1. Υπολογισμός του δείκτη IC <sub>50</sub> για τον αναστολέα 16	128
4.4.2.2. Κινητική μελέτη αναστολής του αλλοενζύμου hGSTP1B από την ένωση 16	130
4.4.3. Αλλοένζυμο hGSTP1C	132
4.4.3.1. Υπολογισμός του δείκτη IC <sub>50</sub> για τον αναστολέα 12	133
4.4.3.2. Κινητική μελέτη αναστολής της hGSTP1C από το παράγωγο 12	135
Συζήτηση	142
Κεφάλαιο 5 <sup>ο</sup> : Βιβλιογραφία	148

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ABS	Απορρόφηση
APS	Υπερθειικό αμμώνιο
BSA	Αλβουμίνη από ορό μόσχου
BES-GSH	1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθερα-GSH-sepharose-CL6B
CDNB	1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο
ddH <sub>2</sub> O	Δις αποιονισμένο νερό
DMSO	Διμεθυσουλφοξείδιο
DTT	Διθειοθρεϊτόλης
GSH	Γλουταθειόνη
GST	S-μεταφοράση της γλουταθειόνης
GSTK1-1	S- τρανσφεράση γλουταθειόνης ποντικού, ισοένζυμο A1-1
hGSTA1-1	S- τρανσφεράση γλουταθειόνης ανθρώπου, ισοένζυμο A1-1
hGSTO1-1	S- τρανσφεράση γλουταθειόνης ανθρώπου, ισοένζυμο O1-1
hGSTP1-1	S- τρανσφεράση γλουταθειόνης ανθρώπου, ισοένζυμο P1-1
hGST1-1	S- τρανσφεράση γλουταθειόνης ανθρώπου, ισοένζυμο T1-1
IC50	Συγκέντρωση αναστολέα που αντιστοιχεί σε 50% αναστολή
IPTG	Ισοπροπυλο-β-D-Θειογαλακτοπυρανοσίδιο
K <sub>m</sub>	Σταθερά Michaelis
K <sub>i</sub>	Σταθερά διάσπασης του αναστολέα
LB	Θρεπτικό υπόστρωμα Luria-Bertani
MDR	(multiple drug resistance) πολλαπλή φαρμακοανθεκτικότητα
NiCl <sub>2</sub>	Nickel Chloride
PAGE	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου
PASS	Prediction of Activity Spectra for Substances
pH	- log [ H <sup>+</sup> ]
rpm	Στροφές ανά λεπτό
SDS	Δωδεκανοθειικό νάτριο
SjGST	GST ένζυμο από το <i>Schistosoma japonica</i>
TEMED	N,N,N',N' - τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη
Tris	Τρις(υδροξιμέθυλ)αμινομεθάνιο
Unit (U)	Ενζυμική μονάδα
V <sub>max</sub>	Μέγιστη ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης
ΔA/Δt	Διαφορά μεταβολής της οπτικής απορρόφησης ανά λεπτό

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι τρανσφεράσες γλουταθειόνης (GSTs) είναι πολυλειτουργικά ένζυμα που συμμετέχουν στην κυτταρική αποτοξίνωση από ενδογενείς και εξωγενείς ηλεκτρονιόφιλες ενώσεις, μέσω κατάλυσης της δημιουργίας ομοιοπολικών συμπλόκων μεταξύ αυτών και της γλουταθειόνης (GSH). Απαντούν στα θηλαστικά, στα φυτά, στα έντομα, στους μύκητες και στα βακτήρια. Παρουσιάζουν πολλές δράσεις, μεταξύ των οποίων είναι η λειτουργία τους ως υπεροξειδάση, ισομεράση και διϋδροασκορβική ρεδοκτάση.

Μέσω του ανωτέρω μηχανισμού αποτοξίνωσης, ορισμένα ισοένζυμα GST εμπλέκονται στο μηχανισμό ‘multiple drug resistance’ (MDR) καρκινικών κυττάρων, μειώνοντας την αποτελεσματικότητα χημειοθεραπευτικών πρωτοκόλλων. Αυτό το πρόβλημα είχε ως αποτέλεσμα την ώθηση της έρευνας προς ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων και κοκτέιλς φαρμάκων με αυξημένη αποτελεσματικότητα. Στο πλαίσιο αυτό, οι τρανσφεράσες γλουταθειόνης αποτελούν μοριακό στόχο για τον σχεδιασμό νέων φαρμάκων και προ-φαρμάκων που θα δρουν στοχευμένα εκεί που υπερεκφράζονται τα συγκεκριμένα ισοένζυμα και εμφανίζουν υψηλή δραστικότητα, καθιστώντας έτσι το χημικοθεραπευτικό πρωτόκολλο περισσότερο αποτελεσματικό.

Στην παρούσα μελέτη εξετάζονται δύο ομάδες συνθετικών ενώσεων οι οποίες δεν έχουν εξετασθεί έως τώρα ως πιθανοί αναστολείς GSTs. Οι εν λόγω ενώσεις έχουν αποδεδειγμένη χρησιμότητα στη φαρμακευτική επιστήμη. Οι δυο αυτές κατηγορίες ενώσεων είναι: (Α) οι ουρίες και τα κυκλοποιημένα παράγωγά τους, γνωστά ως βενζοδιαζεπίνες, και (Β) οι 2,2'-διυδροξυ-βενζοφαινόνες και τα Ν-καρβονυλικά παράγωγα τους.

Η Ομάδα Α εξετάστηκε με τα ισοένζυμα hGSTA1, hGSTT2, hGSTO1, hGSTP1A, hGSTP1B, hGSTP1C & SjGST, ενώ η Ομάδα Β εξετάστηκε με το ισοένζυμο hGSTP1A και τα δύο αντίστοιχα αλλοένζυμα hGSTP1B & hGSTP1C. Σημειώνεται ότι, τα ισοένζυμα hGSTA1, hGSTP1A, hGSTP1B & hGSTP1C έχουν μεγάλη σημασία για τον καρκίνο σε σχέση με το φαινόμενο MDR.

Τα παρασκευάσματα των μελετηθέντων κλωνοποιημένων ενζύμων προέκυψαν κατόπιν ετερόλογης έκφρασης των αντίστοιχων πλασμιδίων σε *E. coli* BL21(DE3) και καθαρισμού των πρωτεϊνών που ενδιαφέρουν (2,4-91 φορές, 28-100% ανάκτηση) σε στήλες χρωματογραφίας συγγενείας, χρησιμοποιώντας είτε 1,4-Βουτανιοδιολο-διγλυκιδυλο-αιθέρα-GSH-Sepharose-CL6B (BES-GSH) για τα ένζυμα hGSTA1-1, hGSTP1A, hGSTP1B & hGSTP1C), είτε Ni-ιμινοδιοξικό οξύ-Sepharose (Ni-NTA-Sepharose) για τα ένζυμα hGSTO1-1 & hGSTT2-2.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε πειραματικός έλεγχος ('σάρωση') σε όλες τις ενώσεις εφαρμόζοντας φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της δραστηριότητας hGSTP1 χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) και γλουταθειόνη (GSH), παρουσία και απουσία του υποψήφιου 'αναστολέα'. Όσον αφορά στην *Ομάδα Α*, παρουσιάστηκε έλλειψη επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων, οπότε και διερευνήθηκε η δραστηριότητα του ισοενζύμου hGSTA1-1 συναρτήσει του χρόνου παραμονής των διαλυμάτων τριών επιλεγμένων ενώσεων (δύο βενζοδιαζεπινών, **174** & **202**, και μίας ουρίας, **195**). Διαπιστώθηκε διακύμανση της ικανότητας αναστολής του ενζύμου από το ίδιο διάλυμα ενώσεως για περίπου μία εβδομάδα, γεγονός που δεν ενθάρρυνε την περαιτέρω μελέτη. Αναφορικά με την *Ομάδα Β*, τρεις ενώσεις έδωσαν σχετικά αξιόλογη αναστολή με τα αλλοένζυμα hGST1PA, B & C, για τις οποίες προσδιορίστηκαν οι τιμές IC50 και το είδος της αναστολής μέσω ενζυμικής κινητικής. Οι ενώσεις αυτές ήταν δύο N-ακυλο-υδραζόνες, ειδικότερα, η ένωση **14** έναντι του ενζύμου hGSTP1A (61.7 %,  $80.0 \pm 4.9 \mu\text{M}$ ) και η ένωση **16** έναντι του hGSTP1B (40.7 %, IC50 =  $115.0 \pm 2.7 \mu\text{M}$ ), και μία κετοξίμη, η ένωση **12** έναντι του hGSTP1C (50.7 %, IC50 =  $101.5 \pm 8.0 \mu\text{M}$ ). Οι τρεις ανωτέρω ενώσεις φαίνεται να δεσμεύονται στην καταλυτική περιοχή του ενζύμου με τρόπο συναγωνιστικό ως προς το υπόστρωμα CDNB ( $K_{i(14)} = 63.6 \pm 3.0 \mu\text{M}$ ,  $K_{i(16)} = 198.6 \pm 14.3 \mu\text{M}$  και  $K_{i(12)} = 16.5 \pm 2.7 \mu\text{M}$ ). Η *ομάδα Β* δεν παρουσίασε αξιόλογη αναστολή με την 6His- μορφή του ισοενζύμου hGSTP1A (η ένωση **13** έδωσε 11% αναστολή, η ένωση **14** 25% αναστολή και η ένωση **15** 11% αναστολή).

Τα αποτελέσματα από την ενζυμική αναστολή και κινητική θα συνεκτιμηθούν με εκείνα που θα προκύψουν από *in silico* μοριακό μοντελισμό και ελλιμενισμό, προκειμένου να διαμορφωθεί μία ευκρινέστερη εικόνα για τον τρόπο δέσμευσης των υπό μελέτη αναστολέων στα ένζυμα-στόχο.

#### **ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ:**

GSTs, hGSTA1-1, hGSTP1A, hGSTP1B, hGSTP1C, hGSTT2-2, hGSTO1-1, IC50, Ενζυμική Κινητική, Ουρίες & Βενζοδιαζεπίνες, Βενζοφαινόνης & N-καρβονυλικά παράγωγα

## ABSTRACT

Glutathione transferases (GSTs) are multifunctional enzymes involved in cellular detoxification of endogenous and exogenous electrophilic compounds by catalyzing the formation of covalent complexes with glutathione (GSH). They are found in mammals, plants, insects, fungi and bacteria, exhibiting several functions, such as peroxidase, isomerase and dihydroascorbic acid reductase.

Through the aforementioned detoxification mechanism, certain GST isoenzymes are involved in 'multiple drug resistance' (MDR) of tumor cells, compromising the effectiveness of chemotherapeutic protocols. This problem resulted in a thrust of research towards developing anticancer drugs and drug 'cocktails' of increased efficiency. In this context, glutathione transferases are molecular targets for the design of new drugs and pro-drugs targeting specifically sites overexpressing GST isoenzymes exhibiting high activity, thus making more effective chemotherapeutic protocols.

In the present study we examined two groups of synthetic compounds ('libraries') which, to the best of our knowledge, have not been studied before as potential inhibitors of GSTs, although they have shown considerable usefulness in pharmaceutical science: *Group A*, featuring ureas and their cyclic derivatives, known also as benzodiazepines, and *Group B*, featuring 2,2'-dihydroxy-benzophenones and their N-carbonyl derivatives.

*Group A* was examined with isoenzymes hGSTA1, hGSTT2, hGSTO1, hGSTP1A, hGSTP1B, hGSTP1C & SjGST while *Group B* was examined with isoenzyme hGSTP1A and the two respective alloenzymes hGSTP1B & hGSTP1C. Notably, isoenzymes hGSTA1, hGSTP1A, hGSTP1B & hGSTP1C are important for cancer research in relation to MDR.

The preparations of the studied cloned enzymes were derived after expression of the respective plasmids in *E. coli* BL21(DE3) and purification of the proteins of interest (2.4-91 fold, 28-100% recovery) on affinity columns,

either 1,4-butanediol-diglycidyl ether-GSH-Sepharose-CL6B (BES-GSH) for enzymes hGSTA1-1, hGSTP1A, hGSTP1B & hGSTP1C, or Ni-iminodiacetic acid-Sepharose (Ni-NTA-Sepharose) for enzymes hGSTO1-1 & hGSTT2-2.

Initially we performed screening experiments with all compounds, by applying spectrophotometric assays of hGSTP1 using as substrates 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and glutathione (GSH), in the presence and absence of candidate inhibitors. Regarding *Group A*, we followed the enzyme activity of hGSTA1-1 versus the elapsed time of the solutions of the three selected compounds (two benzodiazepines, **174** & **202**, and one urea, **195**). We obtained inconsistent results on enzyme activity in the presence of each of the three compounds for up to one week, thus discouraging any further study. Regarding *Group B*, three compounds gave relatively good inhibition with allozymes hGST1PA, B & C, thus were put in the test for IC<sub>50</sub> determination and enzyme kinetics to reveal their inhibition modality. The selected inhibitors were two N-acyl-hydrazones, compound **14** against the isoenzyme hGSTP1A (61.7 %, IC<sub>50</sub> = 80.0 ± 4.9 μM) and compound **16** against the isoenzyme hGSTP1B (40.7%, IC<sub>50</sub> = 115.0 ± 2.7 μM), and a ketoxime, compound **12** against the isoenzyme hGSTP1C (50.7%, IC<sub>50</sub> = 101.5 ± 8.0 μM). All three inhibitors appeared to bind at catalytic region of the targeted enzyme in a competitive manner with respect to the substrate CDNB ( $K_{i(14)} = 63.6 \pm 3.0 \mu\text{M}$ ,  $K_{i(16)} = 198.6 \pm 14.3 \mu\text{M}$  and  $K_{i(12)} = 16.5 \pm 2.7 \mu\text{M}$ ). *Group B* failed to give notable inhibition with the 6His-form of the isoenzyme hGSTP1A (compound **13** gave 11% inhibition, compound **14** 25% inhibition and compound **15** 11% inhibition).

The results from enzyme inhibition and kinetics studies were considered together with those obtained from *in silico* molecular modeling and docking, in order to comprehend better the mode of interaction of the studied compounds with the targeted enzymes.

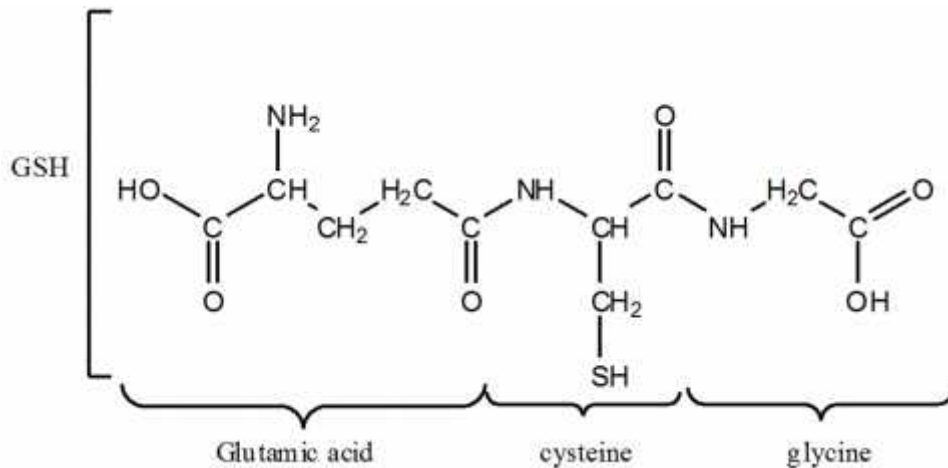
**KEYWORDS:** GSTs, hGSTA1-1, hGSTP1A, hGSTP1B, hGSTP1C, hGSTT2-2, hGSTO1-1, IC<sub>50</sub>, Kinetics, Ureas & Benzodiazepines, Benzophainones & N-carbonyl compounds



# Κεφάλαιο 1

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ





**Σχήμα 1.2.** Το τριπεπτίδιο γλουταθειόνη (σε ανηγμένη μορφή, GSH).

Η γλουταθειόνη εναλλάσσεται μεταξύ μιας ανηγμένης θειολομορφής (GSH) και μιας οξειδωμένης μορφής (GSSG) (Σχήμα 1.3.). Το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης GS-SG (οξειδωμένη μορφή) προκύπτει ύστερα από οξείδωση δύο μορίων ανηγμένης γλουταθειόνης και σχηματισμό δισουλφιδικής γέφυρας. Επίσης, το μόριο της γλουταθειόνης μπορεί να σχηματίσει δισουλφιδική γέφυρα και με άλλα μόρια μικρού μοριακού βάρους, όπως ελεύθερη κυστεΐνη, συνένζυμο A και άλλες θειολικές ομάδες πρωτεϊνών (Sies, 1999).

### 1.2. Ενδοκυττάρια κατανομή της γλουταθειόνης

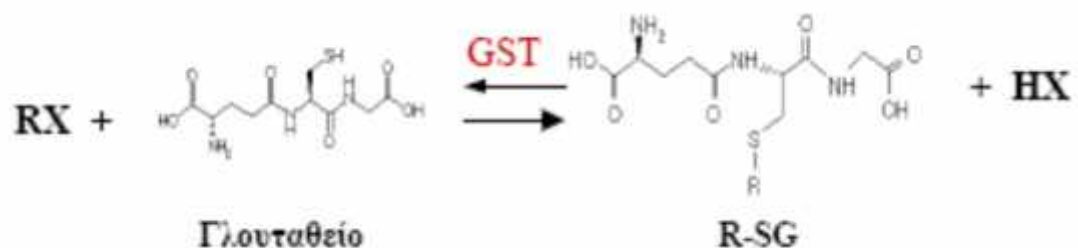
Η γλουταθειόνη συντίθεται στο κυτταρόπλασμα όπου και διανέμεται στα ενδοκυττάρια όργανα (Lushchak, 2012). Η συγκέντρωση της γλουταθειόνης δεν είναι η ίδια σε όλα τα υποκυττάρια οργανίδια ή στα κύτταρα (Samiec *et al.*, 2000) , ενώ η εξωκυττάρια συγκέντρωσή της είναι μικρότερη σε σχέση με την ενδοκυττάρια. Απαντά στα μιτοχόνδρια, στον πυρήνα και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Απαντά, επίσης, στα φυτικά κύτταρα σε εύρος συγκεντρώσεως από 0,5 - 10 Mm (Noctor *et al.*, 2012).

### 1.3. Ρόλος της τρανσφεράσης γλουταθειόνης

Η τρανσφεράση γλουταθειόνης (GST) είναι μια οικογένεια ενζύμων που αποτοξινώνουν ξενοβιοτικές ουσίες, μέσω κατάλυσης πυρηνόφιλης προσβολής της ανηγμένης γλουταθειόνης, GSH, στο ηλεκτρονιόφιλο κέντρο διαφόρων ενώσεων. Ειδικότερα, αποτελούν μια ομάδα πολυλειτουργικών ενζύμων που εμπλέκονται στη Φάση II της κυτταρικής αποτοξίνωσης. Θεωρούνται ως το σημαντικότερο σύστημα ρύθμισης της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής κατάστασης, καθώς συμμετέχουν στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μέσω αντιστρεπτής οξειδωσης της ενεργού θειολικής ομάδας (Mendoza-Cozalt *et al.*, 2005).

Οι GSTs, ούσες βασικός παράγων πολλών λειτουργιών του κυττάρου, αποτελούν ασπίδα προστασίας από οξειδωτικούς και ηλεκτρονιόφιλους παράγοντες και λειτουργούν ως συνένζυμο στη βιοσύνθεση των δεοξυριβονουκλεοτιδίων (Holmegren, 1976). Επίσης συμμετέχουν στην ενδοκυττάρια μεταφορά και αποθήκευση υδροφοβικών μορίων, όπως η αίμη, η μπιριλουμπίνη, οι ορμόνες, τα φλαβονοειδή, τα λιπαρά οξέα και διάφορα ξενοβιοτικά (Acharli *et al.*, 2009, Edwards *et al.*, 2000).

Οι GSTs των φυτών έχουν μελετηθεί για την ικανότητά τους να διασπούν τα ζιζανιοκτόνα. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν την αντίδραση συμπλοκοποίησης του γλουταθειού (GSH) με μία μεγάλη ποικιλία ηλεκτρόφιλων ενώσεων ξενοβιοτικών ή ενδογενών. Συγκεκριμένα, καταλύουν τη νουκλεόφιλη προσβολή του GSH στο ηλεκτρονιόφιλο κέντρο (R) μιας ένωσης, όπως φαίνεται στο κατωτέρω [Σχήμα 1.3](#).



**μ 1.3.** GS - μ , R . R = μ , μ , R-GS = μ , μ (Edwards *et al.*, 2000).

#### 1.4. Ταξινόμηση και ονοματολογία των GSTs

Στα βιολογικά συστήματα, η δραστικότητα της τρανσφεράσης γλουταθειόνης (GST) είναι εξαιρετικά σημαντική καθώς έχει εξελιχθεί μέσω συγκλινουσών οδών σε τουλάχιστον τρεις δομικά διακριτές οικογένειες ενζύμων. Αυτές είναι οι κυτταροπλασματικές GSTs που είναι αυτές που πρωτοανακαλύφθηκαν, έχουν μελετηθεί περισσότερο και εμφανίζονται σε όλες τις κυψελοειδείς μορφές ζωής, οι μεμβρανικές μικροσωμικές GSTs (Mareg) και οι πρωτεΐνες που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό φωσφομυκίνη. Η μεγαλύτερη οικογένεια είναι αυτή των κυτταροπλασματικών ισοενζύμων GSTs των θηλαστικών, η οποία διαχωρίζεται με βάση την αμινοξική αλληλουχία σε 8 κλάσεις: α, μ, π, θ, ζ, ο, σ και κ. Οι περισσότερο μελετημένες είναι οι GST αυτής της οικογένειας (Armstrong, 1998).

##### ***Κυτταροπλασματικές 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).

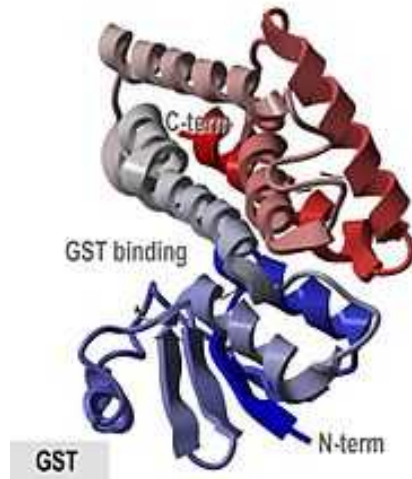
Με βάση την αμινοξική τους ακολουθία, οι κυτταροπλασματικές GSTs μπορούν να διαχωριστούν σε ένα αριθμό τάξεων (Mannervik & Danielson, 1998). Στα θηλαστικά έχουν αναγνωριστεί επτά τάξεις: α (A, alpha), μ (M, mu), π (P, pi), σ (sigma), θ (T, theta), ζ (Z, zeta) και ω (O, omega) (Hayes & Pulford, 1995, Armstrong, 1997, Dixon *et al.*, 1998, Board *et al.*, 2000, Hayes *et al.*, 2005). Επιπλέον τάξεις, εκτός των θηλαστικών, έχουν βρεθεί και σε άλλους οργανισμούς. Στα έντομα έχουν βρεθεί οι τάξεις: δ (D, delta) και ε (E, epsilon) (Alias & Clark, 2007), στα φυτά οι τάξεις: φ (F, phi), τα (Ta, tau), λ (L, lambda), πρωτεΐνες σε δράση διυδροασκορβική αναγωγή (DHAR) (Dixon *et al.*, 2002a , 2002b) και στα βακτήρια οι τάξεις: β (B, beta) (Rossjohn *et al.*, 1998 , Allocati *et al.*, 2003) και χ (X, chi) (Wikteous & Stenberg, 2007). Στα φυτά, επίσης, έχουν βρεθεί και εκπρόσωποι των τάξεων θ και ζ (Droog, 1997 , Edwards *et al.*, 2000 , Dixon *et al.*, 2002b)

που βρίσκονται και στα ζώα αλλά και στους 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%.

Τα μέλη της υπεροικογένειας των κυτταροπλασματικών GSTs συνεχώς αυξάνονται λόγω της συνεχούς αύξησης των γενετικών πληροφοριών. Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες η κ (K, Kappa) τάξη των GSTs που θεωρούνταν μέλος των κυτταροπλασματικών GSTs, αποτελεί μια ξεχωριστή υπεροικογένεια (Jowsey *et al.*, 2003 , Ladner *et al.*, 2004, Robinson *et al.*, 2004) μιτοχονδριακών ενζύμων.

Οι κυτταροπλασματικές GSTs των θηλαστικών ήρθαν στο προσκήνιο στη βιοϊατρική έρευνα λόγω των ρόλων που διαδραματίζουν πολλά μέλη της οικογένειας σε φάρμακα και στο μεταβολισμό των ξενοβιοτικών. Πολυάριθμες μελέτες σε έντομα, φυτά και μικρόβια αναφέρουν ότι τα παραπάνω ένζυμα εμπλέκονται στη σύζευξη της γλουταθειόνης (GSH) με μια μεγάλη σειρά από χημικές ουσίες. Περαιτέρω έρευνα έχει δείξει ότι μέλη της κυτταροπλασματικής οικογένειας εμπλέκονται σε πολλές επιπλέον κυτταρικές διεργασίες.

Οι κυτταροπλασματικές GSTs είναι ενεργές ως διμερείς πρωτεΐνες, είτε ομοδιμερείς (δύο ίδιες υπομονάδες) είτε ετεροδιμερείς (δύο διαφορετικές υπομονάδες). Σε κάθε υπομονάδα (20-28 kDa) διακρίνονται 2 δομικές περιοχές που αποτελούνται από 200-300 αμινοξικά κατάλοιπα (Chronopoulou & Labrou, 2009). Όσον αναφορά 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).



μ 1.4. μ GST. - C-  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Glutathione\\_S-transferase](http://en.wikipedia.org/wiki/Glutathione_S-transferase).

Σε κάθε καταλυτική περιοχή διακρίνονται δύο θέσεις δεσμεύσεως η συντηρημένη G-θέση που απαντά προς το N-τελικό άκρο και η H-θέση η οποία δεν είναι ιδιαίτερα συντηρημένη 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.

Οι GSTs παρουσιάζουν και δράση δέσμευσης αρκετών υδρόφοβων ενώσεων και αμφολυτών (MB > 400 Da), χωρίς αυτές να αποτελούν υποστρώματα του ενζύμου. Η δέσμευση τέτοιων ενώσεων όπως λιπαρά οξέα, φάρμακα, αιμίνες 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, Koutsoumbli *et al.*, 2012, Zoi *et al.*, 2013).

Η kappa τάξη αποτελείται επίσης από διαλυτά ένζυμα με κάποιες ιδιαιτερότητες των υποστρωμάτων τους που είναι παρόμοιες με τις κυτταροπλασματικές GSTs και θεωρήθηκαν ως μακρινά μέλη της ίδιας

οικογένειας (Hayes & Pulford, 1995). Φυλογενετική ανάλυση δείχνει ότι διανέμονται ευρέως στη φύση, αλλά απουσιάζουν στα έντομα. Το προκαρυωτικό 2-hydroxychromene-2-καρβοξυλικό ισομερές και ο σχηματιζόμενος δισουλφιδικός δεσμός των οξειδοαναγωγασών (DsbA) μοιράζονται παρόμοια δομικά μοτίβα με τα ένζυμα της Kappa τάξης υποδηλώνοντας έναν κοινό πρόγονο και την πιθανότητα να είναι ακόμα δομικά συσχετιζόμενα ένζυμα σε ένα ευρύ φάσμα των ειδών.

Ένα ενιαίο ένζυμο κατηγορίας Kappa έχει εντοπιστεί σε ανθρώπους και ποντίκια αλλά ο φυσιολογικός του ρόλος δεν έχει σαφώς προσδιοριστεί. Ένας πιθανός ρόλος για GSTK1-1 είναι ο ολιγομερισμός της αδιπνονεκτίνης αλλά μελέτες σε knock-out ποντίκια δεν το έχουν επιβεβαιώσει.



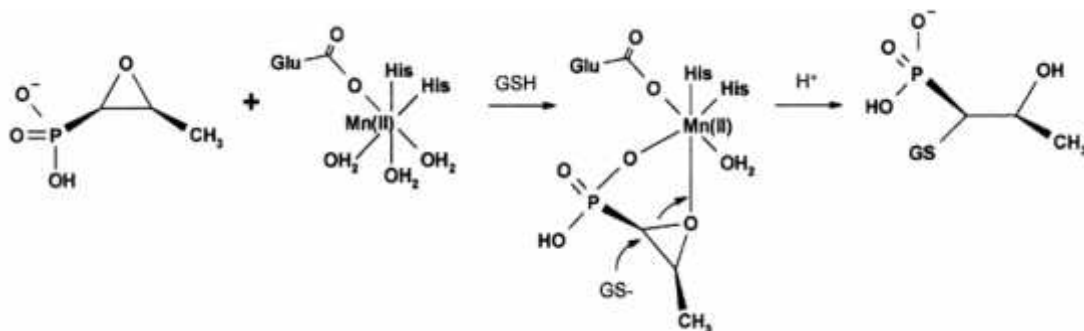
**1.1.** GSTs (Sheehan *et al.*, 2001 , Dixon *et al.*, 2002 , Awasthi, 2005 , Coles and Kadlubar, 2005 , Rossjohn *et al.*, 1998 , Wiktelius and Stendelberg, 2007).

Οργανισμός	Οικογένεια	Τάξη	Λειτουργία	Ενεργό αμινοξικό κατάλοιπο
Θηλαστικά	Κυτταροπλασματικές	Alpha (A)	Λειτουργία ισομαράσεις και υπεροξειδάσης Μεταβολισμός φαρμάκων Αποτοξίνωση	Τυροσίνη
		Mu (M)	Μεταβολισμός Φαρμάκων	Τυροσίνη
		Pi (P)	Μεταβολισμός Φαρμάκων	Τυροσίνη
		Theta (T)	Πρόληψη ηπατοκαρκινογένεσης, Μεταβολισμός ξενοβιοτικών	Σερίνη
		Zeta (Z)	Κατάλυση του μεταβολισμού των α-αλογονοξέων	Σερίνη
		Omega(O)	Οξειδωτικό στρες	Κυστεΐνη



## Πρωτεΐνες που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό φωσφομυκίνη

Οι προκαρυωτικές πρωτεΐνες αντίστασης της φωσφομυκίνης εκπροσωπούν την τρίτη οικογένεια διαλυτών πρωτεϊνών που καταλύουν αντιδράσεις μεταφοράς γλουταθειόνης. Δε φέρουν καμία ομοιότητα με τις κυτταροπλασματικές GSTs (Bernat *et al.*, 1997, Laughlin *et al.*, 1998). Τα μεταλλοένζυμα αυτά προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό φωσφομυκίνη και διακρίνονται σε τέσσερις τύπους: FosA (glutathione-fosfomycin), FosB (L-cystein-fosfomycin), FosC (ATPfosfomycin) και FosX (water-fosfokycin). Το πιο χαρακτηριστικό από τα παραπάνω είναι το FosA το οποίο καταλύει τη σύζευξη της γλουταθειόνης (GSH) με τον άνθρακα του αντιβιοτικού (Behary & Palzkill, 2005)(εικόνα 6.). Η φωσφομυκίνη ( (1R, 2S)-εποξυπροπυλο-φωσφονικό οξύ) είναι ένα αντιβιοτικό ευρέος φάσματος που αδρανοποιείται με την εξαρτώμενη K<sup>+</sup> FosA καταλυόμενη προσθήκη γλουταθειόνης (Arca *et al.*, 1990). Η Fos A είναι μη (II)-εξαρτώμενη μεταλλοπρωτεΐνη με δομικές ομοιότητες με την οικογένεια πρωτεϊνών που περιλαμβάνει γλυοξαλάση I που χρησιμοποιεί επίσης γλουταθειόνη, ως συν-παράγοντα. Η πρωτοταγής δομή τους δεν σχετίζεται με καμία από τις παραπάνω οικογένειες και επίσης δεν καταλύουν την προσθήκη γλουταθείου σε συνήθη ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα (Arca *et al.*, 1990).



**Σχήμα 1.6.** Σχηματική αναπαράσταση νουκλεόφιλης προσθήκης GSH στη φωσφομυκίνη από το εξειδικευμένο για φωσφομυκίνη ένζυμο (Behary & Palzkill, 2005).

### 1.5. Κυτταροπλασματικές GSTs στον άνθρωπο και γενικά στα θηλαστικά.

Στην παρούσα μελέτη ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζουν οι GSTs στον άνθρωπο και τα θηλαστικά.

Οι κυτταροπλασματικές GSTs ανθρώπου κωδικοποιούνται από δεκαέξι γονίδια και ταξινομούνται βάση της αμινοξικής τους αλληλουχίας σε έξι γονιδιακά ανεξάρτητες τάξεις: Alpha (GSTA), Mu (GSTM), Pi (GSTP), Theta (GSTT), Omega (GSTO) και Zeta (GSTZ) (Hayes *et al.*, 2005). Παρόλο που όλες οι τάξεις έχουν εξελιχθεί από ένα και μόνο κοινό πρόγονο, εμφανίζουν εντυπωσιακές διαφορές ως προς την εξειδίκευση και την ποικιλομορφία στα υποστρώματά τους, η οποία έχει αναδιαμορφωθεί μέσω γονιδιακής επικάλυψης, γενετικό ανασυνδυασμό και συσσώρευση μεταλλάξεων (Townsend & Tew, 2003).

Η Alpha τάξη των GSTs εντοπίζεται κυρίως στα ηπατικά κύτταρα, στα εσπειραμένα σωληνάρια των νεφρών, στο εσωτερικό δικτυωτό στρώμα των επινεφρίδιων αδένων, στα διάμεσα κύτταρα των όρχεων και στα κύτταρα του γαστρικού επιθηλίου του στομάχου που εκκρίνουν υδροχλωρικό οξύ. Το ισόένζυμο hGSTA1-1 αποτοξινώνει τα κύτταρα από καρκινογόνους μεταβολίτες, αλκυλιωμένους παράγοντες, καπνό και προϊόντα της ατμοσφαιρικής ρύπανσης. Η αντίδραση που καταλύει βασίζεται στη σύζευξή τους με τη γλουταθειόνη (GSH). Επιπλέον, η hGSTA1-1 εμφανίζει δράση υπεροξειδάσης και ισομεράσης (Zhao *et al.*, 1999).

Οι GSTPs εμφανίζονται σε αφθονία στους παγκρεατικούς και τους σιελογόνους αδένες αλλά και στους νεφρούς. Το ισόένζυμο GSTP1-1 επικρατεί στα κύτταρα των θηλαστικών. Γενικότερα, η GSTP1-1 έχει παρατηρηθεί να υπερεκφράζεται σε διάφορους καρκινικούς όγκους και είναι η κυρίαρχη μορφή ισοενζύμου GST σε ένα μεγάλο εύρος ανθεκτικών καρκινικών κυττάρων.

Το ισόένζυμο ανθρώπου hGSTO1-1 εκφράζεται σε αρκετούς ιστούς του ανθρώπινου σώματος, όπως το συκώτι και σε κύτταρα όπως τα μακροφάγα ή τα κύτταρα του ενδοκρινικού και νευρολογικού συστήματος (Yin *et al.*, 2001). Το συγκεκριμένο ισόένζυμο είναι ομοιομερές και παίρνει μέρος στους μηχανισμούς του αντιοξειδωτικού συστήματος του πυρήνα των κυττάρων (Yin *et al.*, 2001). Επιπλέον, έχει μελετηθεί ο ρόλος του στη ρύθμιση της δράσης της ιντερλευκίνης-1 (IL-1) που σχετίζεται με αρκετός φλεγμονώδεις ασθένειες.

Στα θηλαστικά η τάξη Theta (GSTT) απαρτίζεται από δυο υποκλάσεις (GSTT1-1 και GSTT2-2) που εμφανίζουν περίπου 55% αντιστοιχία στην αμινοξική αλληλουχία τους (Meyer *et al.*, 1991). Η GSTT2-2 ανθρώπου (hGSTT2-2) έχει σημαντικό ρόλο στην προστασία των κυττάρων από τοξικούς παράγοντες του οξυγόνου και των λιπιδιακών υπεροξειδασών. Η έκφραση αυτών των ισοενζύμων έχει ενοχοποιηθεί σε σημαντικές βιολογικές και κλινικές μελέτες, για καρκινογένεση και χημειοανθεκτικότητα. Μάλιστα βρέθηκε συσχετισμός μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των συγκεκριμένων GSTs και της ανθεκτικότητας που παρουσιάζουν σε αντικαρκινικά φάρμακα μέσω του μηχανισμού αποτοξίνωσης των GSTs (Mannervik & Danielson, 1988).

### 1.6. Καταλυτικές λειτουργίες των GSTs

Η κλασική δραστηριότητα των GSTs είναι η σύζευξη ηλεκτρονιόφιλων ενώσεων με τη γλουταθειόνη. Η σύζευξη της γλουταθειόνης με ενδογενείς ενώσεις εξυπηρετεί αρκετούς σκοπούς, όπως περιορίζει τη χημική δραστηριότητα, αυξάνει τη διαλυτότητά τους και διευκολύνει τη μεταφορά τους μέσω των μεμβρανών, καθώς και τον περιορισμό τους μέσα στο κύτταρο και στον οργανισμό. Επίσης, σε κάποιες περιπτώσεις οδηγεί στο σχηματισμό δευτερογενών μεταβολιτών (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 (Zoi *et al.*, 2013).

Μερικοί από τους πιο σημαντικούς ρόλους των GSTs είναι οι ακόλουθοι :

#### *Νουκλεόφιλη υποκατάσταση*

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-



Menon, 2013). Η κρυσταλλική δομή του ενζύμου GSTO1-1 έδειξε ότι η Cys 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).

### *Γλουταθεινυλίωση*

Η γλουταθεινυλίωση είναι ο σχηματισμός αντιστρεπτών δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των πρωτεϊνικών θειολών και της γλουταθειόνης (Board & Menon, 2013). Επίσης, συνδέεται με την οξειδωτική καταπόνηση (Lind *et al.*, 2002 , Fratelli *et al.*, 2003). Θεωρείται πρώτης σειράς άμυνα (Board & Menon, 2013). Οι θειόλες της 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.*, 2001).

## 1.7. Τάξεις των GSTs

### i. Άλφα τάξη των GSTs

Η άλφα τάξη των GSTs ήταν μεταξύ των πρώτων GSTs που χαρακτηρίστηκαν βιοχημικά και αποτελούν τις πρωτεΐνες που είχαν αρχικά ονομαστεί "Λιγανδίνη" με βάση την ικανότητά τους να δεσμεύουν υδρόφοβες ενώσεις (Habig *et al.*, 1974). Υπάρχουν πέντε γονίδια GST της άλφα τάξης στον άνθρωπο που βρίσκονται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 6 (6p12.2) (Board & Webb , 1987). Επίσης, ένας αριθμός ψευδογονιδίων και γονιδιακών θραυσμάτων που έχουν συμβεί σε αυτή την περιοχή δηλώνουν τη μακρά εξελικτική ιστορία της θέσεως. Οι GSTs της Άλφα τάξης περιέχουν επτά εξόνια και αποτελούν 12-18 kb σε μήκος (Suzuki *et al.*, 1993 , Morel *et al.*, 2002). Είναι διμερή και ενώ εκφράζονται σε διάφορα επίπεδα στους περισσότερους ιστούς, η έκφραση των GSTA1 και GSTA2 υπομονάδων είναι ιδιαίτερα ισχυρή στο ήπαρ. Αυτές οι δύο υπομονάδες σχηματίζουν εύκολα ετεροδιμερή και έτσι τα περισσότερα ηπατοκύτταρα περιέχουν GSTA1-1, GSTA1-2 και GSTA2-2 ισοένζυμα (Hayes, 1989).



**Σχήμα 1.8.** Τρανσφεράση γλουταθειόνης ανθρώπου GSTA1-1 σε σύμπλεγμα με τη γλουταθειόνη ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).

### **Δομή και λειτουργίες του ισοενζύμου hGSTA1-1**

Το ισοένζυμο hGSTA1-1 είναι διμερές όπως όλες οι κυτταροπλασματικές GSTs. Κάθε υπομονάδα διαθέτει μία ανεξάρτητη ενεργό περιοχή η οποία αποτελείται από την πολική και υψηλά εξειδικευμένη G-θέση, όπου προσδένεται η GSH και μια γειτονική αλλά πολύ λιγότερη ειδική και υδρόφοβη H-θέση όπου προσδένονται τα ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα (Mannervik *et al.*, 1985).

Χαρακτηριστικό της δομής της  $\alpha$  τάξης είναι μια επιπλέον  $\alpha$ -έλικα ( $\alpha$ -9) στην περιοχή II, που αποτελεί κομμάτι της ενεργού περιοχής (Kuhnert *et al.*, 2005), η οποία «πακετάρεται» στην υδροφοβική περιοχή δέσμησης, δημιουργώντας μια μικρότερη και ισχυρά υδρόφοβη περιοχή σε σχέση με αυτές των  $\mu$  και  $\pi$  τάξεων (Sinning *et al.*, 1993).

Το ισοένζυμο hGSTA1-1 απαντά σε υψηλά επίπεδα στο ήπαρ, στο λεπτό έντερο, στους όρχεις, 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 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 είναι μοναδικά ως προς το προϊόν 4-υδρόξυ-ενεάλη (4-HNE)



της λιπιδικής υπεροξειδάσης, σε σχέση με τις άλλες GSTs, καθώς επεμβαίνουν πριν την παραγωγή αυτού του προϊόντος, μειώνοντας τις λιπιδικές υπεροξειδάσες μέσα από την GPx δράση τους (σελήνιο-εξαρτώμενη) (Yang *et al.*, 2002). Είναι γνωστό ότι η λιπιδική υπεροξειδάση εμπλέκεται στην παθογένεση πολλών ασθενειών, όπως την αρτηριοσκλήρωση (Witztum, 1994) το Alzheimer (Markesbery, 1997), τον καρκίνο (Zhang *et al.*, 1997) κ.α. Συνεπώς η δράση της hGSTA1-1 κρίνεται πολύ σημαντική για την πρόληψη τέτοιων ασθενειών.

Το ισοένζυμο hGSTA1 καθώς και άλλες GSTs της *a* τάξης, είναι κυρίαρχες στο ανθρώπινο ήπαρ (Rowe *et al.*, 1997). *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. Πολυμορφισμοί που επηρεάζουν την έκφραση του ισοενζύμου hGSTA1 στο ήπαρ έχουν ήδη αναφερθεί (Coles *et al.*, 2001 , Morel *et al.*, 2002).

Αντίθετα με άλλα γονίδια των GSTs μόνο ένας πολυμορφισμός έχει εντοπιστεί στην κωδικοποιούσα περιοχή του hGSTA1-1. Αυτό το συνώνυμο SNP (A375G) είναι κοινό σε όλους τους πληθυσμούς που έχουν μελετηθεί, αλλά είναι μάλλον μικρής λειτουργικής σημασίας· ως κατάλοιπο K75 είναι αμετάβλητο (Tetlow *et al.*, 2001). Αρκετά SNPs που υπάρχουν στους δύο απλότυπους έχουν εντοπιστεί στην περιοχή του 5' μη κωδικοποιημένου "προαγωγέα" του hGSTA1-1 (B.F. Coles *et al.*, 2001 , M. Bredschneider *et al.*, 2002 , C.A. Guy *et al.*, 2004). Η συχνότητα του hGSTA1-1 απλότυπου κυμαίνεται μεταξύ 0,6 και 0,85 στις χώρες της Αφρικής, της Ασίας και των ευρωπαϊκών πληθυσμών. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι ομοζυγώτες για το A-52 που περιλαμβάνουν το hGSTA1-1 και έχουν τέσσερις φορές υψηλότερα επίπεδα GSTA1-1 πρωτεΐνης στο ήπαρ από οι ομοζυγώτες για το GSTA1 \* B (B.F. Coles *et al.*, 2001). Παρόμοιες διαφορές στην έκφραση δεν βρέθηκαν στο πάγκρεας γεγονός που υποδηλώνει ότι το αποτέλεσμα αυτού του πολυμορφισμού μπορεί να αφορά έναν ειδικό ιστό (B.F. Coles, 2003).

## ii. Πι τάξη των GSTs

Σε αντίθεση με το ποντίκι που έχει δύο γονίδια κατηγορίας Pi GST, ο άνθρωπος έχει ένα ενιαίο λειτουργικό γονίδιο GSTP (ονομάζεται hGSTP1) που χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 11q13 (Board P.G. *et al.*, 1989). Δύο SNPs που κωδικοποιούν τις I105V και A114V αντικαταστάσεις στο GSTP1 έχουν αναγνωρισθεί και χαρακτηριστεί εκτενώς. Αυτά τα SNPs είχαν αρχικά εντοπισθεί σε cDNA κλώνους και έχουν στη συνέχεια προσδιορισθεί στο γονιδιακό DNA (Board P.G. *et al.*, 1989 , Ali-Osman F. *et al.*, 1997). Λόγω της έκφρασης του σε πολλούς όγκους, το GSTP1-1 έχει μελετηθεί σε σχέση με την αντοχή του στα φάρμακα (Townsend D.M. *et al.*, 2003). Επιπλέον, η πιθανότητα ότι οι δύο πολυμορφικές υποκαταστάσεις επηρεάζουν τον μεταβολισμό φαρμάκων, τις επιπτώσεις στην ευαισθησία σε καρκίνο καθώς και άλλες διαταραχές, αποτέλεσε το αντικείμενο εντατικής έρευνας (Srivastava S.K. *et al.*, 1999 , Goekkurt E. *et al.*, 2006 , Oldenburg J. *et al.*, 2007 , Allan J.M. *et al.*, 2001, McIlwain C.C. *et al.*, 2006).

Οι δύο παραλλαγές έχουν γίνει, επίσης, αντικείμενο εκτεταμένου λειτουργικού χαρακτηρισμού και αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει διαφορές στην δραστηριότητα GSTP1-1, όσο αφορά στα αντικαρκινικά φάρμακα thiotepa και chlorambucil (Srivastava S.K. *et al.*, 1999 , Pandya U. *et al.*, 2000 , Ishimoto T.M. *et al.*, 2002 , Ekhardt C. *et al.*, 2009). Οι περισσότερες έρευνες σε αυτόν τον τομέα έχουν επικεντρωθεί στην I105V υποκατάσταση, δεδομένου ότι κατάλοιπο 105 επηρεάζει την αρχιτεκτονική του υδρόφοβου υποστρώματος σύνδεσης (Reinemer P. *et al.*, 1992). Οι διαφορές στην καταλυτική δραστηριότητα των V105- και I105-παραλλαγών στα καρκινογόνα diolperoxides μπορούν να στηρίζονται στους αλληλομόρφους και στην ευαισθησία του καρκίνου (Hu X. *et al.*, 1998), αν και άλλοι παράγοντες έχουν επίσης ενοχοποιηθεί (Sundberg K. *et al.*, 1998).



Σχήμα 1.9. Δομή της πρωτεΐνης GSTP1 βασισμένη στο πρόγραμμα [PyMOL](http://www.pymol.org) ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).

### **Δομή και λειτουργίες του ισοενζύμου hGSTP1**

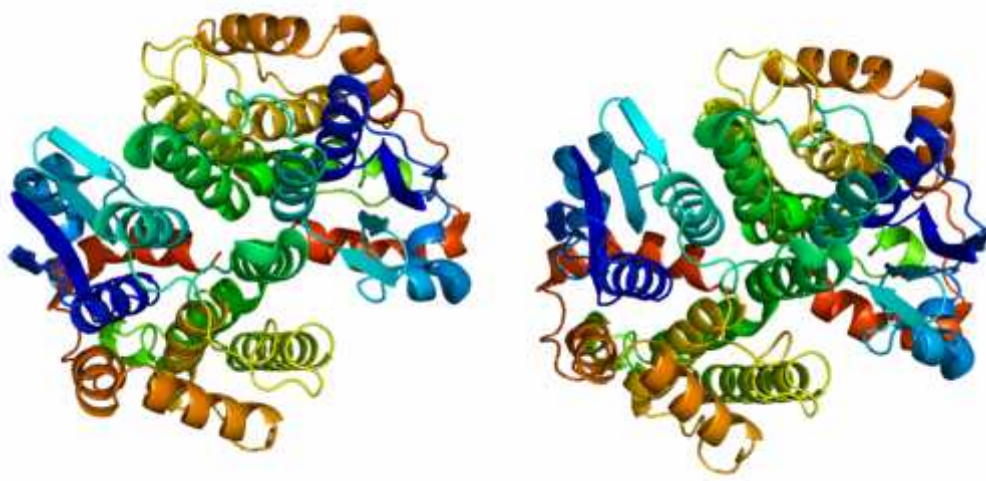
Το ισοένζυμο GSTP1-1 (hGSTP1-1) αποτελεί μέλος της π τάξης, εκφράζεται στους ανθρώπινους ιστούς και παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον εξαιτίας των πολλαπλών ρόλων και λειτουργιών, γι' αυτό και επιλέχθηκε να μελετηθεί στη παρούσα διατριβή μελετώντας και τους τρεις αλληλομόρφους αυτού του ισοενζύμου (hGSTP1\*A, hGSTP1\*B, hGSTP1\*C). Ο Ali-Osman με τους συνεργάτες του το 1997 απομόνωσαν τρεις αλληλόμορφους του γονιδίου P1 του ανθρώπου, από κανονικά και κακοήγη γλοιώματα, τους οποίους προσδιόρισαν ως hGSTP1\*A, hGSTP1\*B και hGSTP1\*C. Αυτοί οι αλληλόμορφοι διαφέρουν είτε σε ένα είτε σε δύο κωδικόνια Ile104 (GSTP1\*A), Val104 (GSTP1\*B), Val104/Val113 (GSTP1\*C)] (Ali-Osman *et al.*, 1997).

Το ισοένζυμο hGSTP1-1 ρυθμίζει τη σηματοδότηση σε κυτταρικά μονοπάτια τα οποία ελέγχουν την επιβίωση καρκινικών κυττάρων, τον κυτταρικό θάνατο από την άμεση αλληλεπίδραση πρωτεϊνών και τον μηχανισμό σηματοδότησης κάτω από συνθήκες στρες. Παρουσιάζει ευρεία εξειδίκευση ως προς τα ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα. Το ισοένζυμο hGSTP1A 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. Έχει βρεθεί ότι οι πολυμορφισμοί των GSTs γονιδίων συσχετίζονται με την ανταπόκριση του ασθενή στη θεραπεία (Sun *et al.*, 2010 , Oldenburg *et al.*, 2007). Το ισoenζυμο hGSTP1-1 συχνά υπερεκφράζεται σε διάφορους όγκους και είναι το κυρίαρχο GST isoenζυμο σε πολλά ευαίσθητα και ανθεκτικά κυτταρικά κύτταρα (Hayes & Pulford, 1995). Παρουσιάζει, επίσης, δράση σουλφοναμιδάσης καταλύοντας την υδρόλυση των σουλφοναμιδικών δεσμών παρουσία GSH. Τέτοιες αντιδράσεις παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την ενεργοποίηση πιθανών προ-φαρμάκων κατά του καρκίνου (Axarli *et al.*, 2009b). Ουσιαστικός ρόλος της hGSTP1-1 είναι η ρύθμιση των μονοπατιών σηματοδότησης λόγω στρες (Wu *et al.*, 2006) και η προσθήκη GSH στις πρωτεΐνες του κυττάρου (Townsend *et al.*, 2009).

### iii. Ταυ τάξη των GSTs

Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν τουλάχιστον τρεις GSTs τάξεις Theta που εκφράζονται στο ποντίκι (M. Coggan *et al.*, 2002), υπάρχουν μόνο δύο λειτουργικά GST γονίδια στη Theta τάξη στον άνθρωπο (GSTT1 και GSTT2) και αμφότερα βρίσκονται στο χρωμόσωμα 22q11.2 (K.L. Tan, *et al.*, 1995 , M. Coggan *et al.* 1998).



Σχήμα 1.10. Δομή της πρωτεΐνης GSTT1 βασισμένη στο πρόγραμμα [PyMOL](http://www.pymol.org) ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).

## Δομή και λειτουργίες του ισοενζύμου hGST2-2

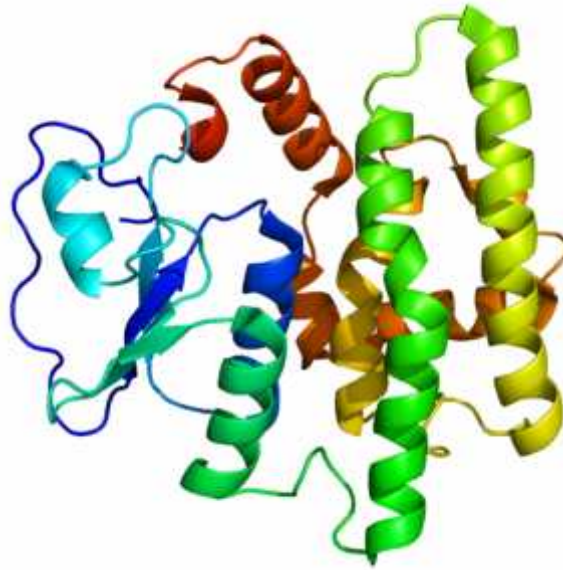
Φυλογενετικές μελέτες που αφορούν στην οικογένεια των GSTs, έχουν αναγνωρίσει παρόμοιες θ-τάξεις στα θηλαστικά, στα έντομα, στα φυτά, στα ψάρια, στους μύκητες, στις ζύμες και στα βακτήρια. Η ύπαρξη αυτής της θ τάξης σε μεγάλο εύρος ειδών επισημαίνει και τη μακρόχρονη ιστορικά εξελικτική της πορεία σε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

Οι GSTs της  $\theta$  τάξης χαρακτηρίζεται κυρίως από αντιοξειδωτική δράση για τα κύτταρα γι' αυτό άλλωστε έχει βρεθεί ότι το υπεροξειδίο του κουμηνίου αποτελεί καλό υπόστρωμα για το ισοένζυμο GSTT2-2 (Hussey & Hayes, 1992, Tan & Board, 1996). Οι GSTs της  $\theta$  τάξης των θηλαστικών αντιδρούν με θειικούς εστέρες και θεωρούνται σημαντικές για την πρόληψη της ηπατοκαρκινογένεσης (Hussey & Hayes, 1992).

Το ισοένζυμο hGSTT2-2 διαφοροποιείται δομικά ως προς τις άλλες GSTs των άλλων τάξεων, λόγω της σερίνης ως υπεύθυνο αμινοξικό κατάλοιπο για την απο-πρωτονιωμένη μορφή της GSH (Rossjohn *et al.*, 1998).

### iv. Ομέγα τάξη των GSTs

Οι GSTs της  $\omega$  τάξης έχουν ένα καταλυτικά ενεργό κατάλοιπο κυστεΐνης στην ενεργό θέση τους και καταλύουν την αναγωγή μιας σειράς ενώσεων που δεν είναι υποστρώματα για άλλες GSTs (P.G. Board *et al.*, 2000 , P.G. Board *et al.*, 2007 , R.A. Zakharyan *et al.*, 2001 , E.M. Schmuck *et al.*, 2005). Υπάρχουν δύο λειτουργικά GST γονίδια  $\omega$  τάξης στον άνθρωπο (GSTO1, GSTO2), που βρίσκονται στο 10q24.3 χρωμόσωμα (A.K. Whitbread *et al.*, 2003).



μ 1.11. μ GSTO1 μ μμ [PyMOL](http://www.wikipedia.org)

### **Δομή και λειτουργίες του ισοενζύμου hGSTO1-1**

Το ισοένζυμο GSTO έχει αρκετά χαρακτηριστικά που το διαχωρίζουν από τις άλλες GSTs και μέσα σε αυτά συμπεριλαμβάνεται η εκτεταμένη N-τελική περιοχή (Zhou *et al.*, 2012) και το αμινοξικό κατάλοιπο Cys32 στο ενεργό κέντρο που επιτρέπει το σχηματισμό δισουλφιδικού δεσμού με τη GSH που αποτελεί μέρος της αντίδρασης της θειοτρανσφεράσης (Board *et al.*, 2000).

Η *omega* τάξη των θηλαστικών GSTs (GSTO1-1 & GSTO2-2) έχει διαφορετικές ιδιότητες με αυτές των άλλων γνωστών GSTs (Board *et al.*, 2000). Το ισοένζυμο hGSTO1-1 παρουσιάζει δράση θειο-τρανσφεράσης και ρεδοκτάσης αφυδροασκορβικού οξέος (Washburn & Wells, 1999).

Το ισοένζυμο hGSTO1-1 απαντά σε αρκετούς διαφορετικούς ανθρώπινους ιστούς όπως στην αορτή, στα οστά, στο στήθος, στον εγκέφαλο, στον κεντρικό νευρικό σύστημα, στις ωθήκες, 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 το οποίο επιδεικνύει ειδική έκφραση για τον κάθε ιστό και ότι το συγκεκριμένο



ισοένζυμο έχει θεμελιώδη ρόλο στον μεταβολισμό του κυττάρου (Board *et al.*, 2000).

Πολυμορφισμοί της omega τάξης των GSTs έχουν συσχετιστεί σημαντικά με την ηλικία απαρχής των ασθενειών Alzheimer και Parkinson (Li *et al.*, 2002). Οι ασθένειες αυτές διαμορφώνονται κάτω από το οξειδωτικό στρες του εγκεφάλου και από την άλλη τα ισοένζυμα hGSTO1-1 και hGSTO2-2 έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας μέσω της δράσης τους ως αναγωγάσες του δεϋδροασκορβικού 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 ανωμαλιών συμπεριλαμβανομένης της αμυοτροφικής πλευρικής σκλήρυνσης (Giessen *et al.*, 2008) και την ανάπτυξη οξείας λεμφοβλαστικής παιδικής λευχαιμίας (Pongstaporn *et al.*, 2009).

### 1.8. Γενικά για το ένζυμο SjGST

Υπάρχουν σημαντικά παράσιτα που επηρεάζουν την υγεία του ανθρώπου και των ζώων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι παρασιτικοί σκώλικες *Fasciola hepatica*, *Schistosoma mansoni* και *Ascaris lumbricoides*. Οι οργανισμοί αυτοί έχουν γενικά χαμηλά επίπεδα δραστηριότητας καθώς και υψηλή έκφραση GSTs ενζύμων, ιδιαίτερα κατά την άμυνα αυτών των οργανισμών έναντι φαρμάκων (Brophy & Barrett, 1990). Τα GSTs των παρασιτικών σκωλήκων χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, αυτά με μοριακή μάζα 26kDa και αυτά με μοριακή μάζα 28kDa με διαφορετική εξειδίκευση υποστρώματος (Walker *et al.*, 1993).

Τα παράσιτα αυτά θεωρείται ότι εμποδίζουν τη συσσώρευση τοξινών στους σκώλικες μέσω της κατάλυσης και της σύζευξης της γλουταθειόνης σε προϊόντα υπεροξειδωσης λιπιδίων και άλλες τοξίνες (Walker *et al.*, 1993) καθώς και με τη διευκόλυνση της εξαγωγής των τοξικών υδροφοβικών μεταβολιτών του ξενιστή όπως την αίμη (Danern *et al.*, 1990). Για τον λόγο αυτό οι GSTs από αυτούς τους οργανισμούς χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία εμβολίων. Ενέσεις GSTs προκαλούν τη μερική προστασία ενάντια στη μόλυνση από το *Schistosoma mansoni* και το *S. japonica* σε τρωκτικά

(Balloul *et al.*, 1987 , Davern *et al.*, 1990) και το *Fasciola hepatica* σε πρόβατα (Sexton *et al.*, 1990).

Πιο συγκεκριμένα, οι παρασιτικοί σκώληκες του γένους *Schistosoma* προκαλούν μια παρασιτική ασθένεια που ονομάζεται σχιστοσωμίαση η οποία προσβάλλει παγκοσμίως 275.000.000 ανθρώπους και προκαλεί περίπου 200.000 θανάτους ετησίως (Lucey & Maguir, 1993 , Jao *et al.*, 2006). Οι σκώληκες ζουν στα αιμοφόρα αγγεία των ξενιστών (θηλαστικών). Οι ξενιστές αντιδρούν στην παρουσία των σκωλήκων κυρίως όταν αυτά βρίσκονται στο στάδιο των αυγών, λόγω της δημιουργίας κοκκιωμάτων που οδηγούν σε σοβαρές ζημιές ιστών (Shekhar, 1991). Τα κυριότερα είδη που προσβάλλουν τον άνθρωπο είναι τα εξής: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum* και διαφέρουν πολύ μεταξύ τους ως προς τους ιστούς που προσβάλλουν και την κλινική τους εκδήλωση (Lucey & Maguir, 1993). Το πιο αποτελεσματικό φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της σχιστοσωμίαςης χωρίς σοβαρές παρενέργειες είναι το praziquantel (PZQ) (Andrews *et al.*, 1983) του οποίου ο στόχος και ο μηχανισμός δράσης δεν είναι πλήρως γνωστός (Shekhar, 1991).

Οι GSTs από *Shistosoma* αποτελούν τον κυριότερο στόχο εμβολίων και ένα πολύ ενδιαφέρον στόχο φαρμάκων έναντι στη σχιστοσωμίαση αλλά και άλλων ασθενειών που προκαλούνται από παρασιτικούς σκώληκες (Brophy & Barrerr, 1990).

#### **1.8.1. Δομή του ενζύμου SjGST**

Εξαιτίας του σημαντικού βιολογικού ρόλου του SjGST έχουν προσδιοριστεί διάφορες κρυσταλλικές δομές του ενζύμου. Η τρισδιάστατη δομή του ενζύμου SjGST σε σύντηξη με ένα μικρό επίτοπο HIV1 από άνθρωπο προσδιορίστηκε με μοριακή αντικατάσταση χρησιμοποιώντας τις συντεταγμένες της δομής GST της μ τάξης από αρουραίο (Ji *et al.*, 1992). Από τη μελέτη αυτή διαπιστώθηκε ότι η δομή του SjGST έχει πολλά κοινά δομικά χαρακτηριστικά με τη μ τάξη των GSTs και κυρίως στην N-τελική περιοχή (Lim *et al.*, 1994). Επίσης, προσδιορίστηκε η κρυσταλλική δομή του ενζύμου SjGST ελεύθερη υποστρώματος (McTigue *et al.*, 1995) και



συγκρίθηκε με τις GST δομές των τάξεων α από άνθρωπο (Sinning *et al.*, 1993), π από γουρούνι (Reinemer *et al.*, 1992b) και μ από αρουραίο (Ji *et al.*, 1992). Με στόχο την κατανόηση της δράσης του φαρμάκου PQZ και ενδεχομένως το σχεδιασμό καινούριων βελτιωμένων φαρμάκων προσδιορίστηκε και η κρυσταλλική δομή του ενζύμου σε σύμπλοκο με το PQZ (McTigue *et al.*, 1995). Από τον προσδιορισμό αυτής της δομής διαπιστώθηκε ότι το PQZ δεσμεύεται στο διμερές SjGST σε συγκεντρώσεις του φαρμάκου που χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς σκοπούς και προσδιορίστηκε και η L-θέση δέσμευσης του ενζύμου.

### 1.9. Βιοτεχνολογικές εφαρμογές των GSTs

Οι τρανσφεράσες γλουταθειόνης (GSTs) παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για αρκετούς κλάδους θετικών επιστημών. Ορισμένοι από αυτούς είναι η βιολογία, η βιοτεχνολογία, η γεωπονία, η ιατρική καθώς και η χημεία. Στη γεωπονία, οι πιο σημαντικές λειτουργίες των GSTs σχετίζονται με τη συμμετοχή τους σε μηχανισμούς που ενισχύουν την ανθεκτικότητα των φυτών, έναντι βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων, αλλά και σε μηχανισμούς αδρανοποίησης ζιζανιοκτόνων.

Επιπλέον, μια σύγχρονη εφαρμογή των GSTs αποτελεί η ανάπτυξη πρωτοκόλλων ενζυμικών αναλύσεων αλλά και η έρευνα στον τομέα των βιοαισθητήρων, με στόχο τη γρήγορη και εύκολη ανάλυση δειγμάτων (Andreou & Clonis, 2002; Fragoulaki *et al.*, 2007; Morou *et al.*, 2008; Dowd *et al.*, 2009). Οι βιοαισθητήρες αποτελούν εξελιγμένα εργαλεία της βιοτεχνολογίας που μπορούν να δώσουν στοιχεία μεγαλύτερης ακρίβειας σε σχέση με την κλασσική χημεία, όντας ταυτόχρονα φιλικόι στο χρήστη και στο περιβάλλον (Karoli *et al.*, 2008). Οι εφαρμογές των βιοαισθητήρων στη διαγνωστική επεκτείνονται τόσο στη γεωπονία όσο και στην ιατρική.

Ιδιαίτερο κεφάλαιο, που θα αναλυθεί παρακάτω, αποτελούν οι εφαρμογές των GSTs στην ιατρική, κυρίως λόγω της ιδιαίτερης χημειοανθεκτικής δράσης που παρουσιάζουν, αλλά και της υπερέκφρασής τους στα καρκινικά κύτταρα. Συνεπώς, αποτελούν σημαντικούς μοριακούς στόχους για τον

σχεδιασμό φαρμάκων και προφαρμάκων με αντικαρκινική δράση (ενότητα 1.10.2.).

### **1.9.1. Εφαρμογές των GSTs στην ιατρική**

Στην ιατρική, οι GSTs μελετώνται στον τομέα της διάγνωσης και παρακολούθησης κλινικών περιπτώσεων καρκίνου. Ορισμένα ένζυμα GSTs χρησιμοποιούνται ως ανοσοϊστολογικοί δείκτες για πολλούς τύπους καρκίνου καθώς και αύξηση στα επίπεδα έκφρασης των ενζύμων αυτών συνδέονται με τη διάγνωση διαφόρων μορφών καρκίνου και τον εντοπισμό προκαρκινικών κυτταρικών βλαβών (Habdous *et al.*, 2002). Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιούνται επιδημιολογικές μελέτες οι οποίες διερευνούν τη σχέση μεταξύ γενετικών πολυμορφισμών των GSTs και συγκεκριμένων ασθενειών όπως ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως (Conolo *et al.*, 2008). Βρέθηκε, μάλιστα, ότι πολυμορφισμοί σε ανθρώπινα γονίδια συνδέονται με τον τρόπο αντίδρασης του οργανισμού στη θεραπεία κατά του καρκίνου (Sweeney *et al.*, 2003 , Numes *et al.*, 2009 , Keller *et al.*, 2006 , Yoshiga & Soya 2005 , Keller *et al.*, 2002).

Οι παραλλαγές αυτές των τρανσφερασών γλουταθείου θα βοηθήσουν στο μέλλον για την επιλογή της καλύτερης εξατομικευμένης θεραπείας για διάφορους τύπους καρκίνου (Oldenburg *et al.*, 2007 , Sweeney *et al.*, 2003). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το αλλοένζυμο GSTP1 105Val το οποίο φαίνεται να σχετίζεται με την επιμήκυνση της διάρκειας ζωής των ασθενών σε προχωρημένα στάδια καρκίνου του παχέος εντέρου που λαμβάνουν συνδυασμένη χημειοθεραπεία (Stoehlmacheret *et al.*, 2002). Τα ένζυμα GSTs δεν σχετίζονται μόνο με τον καρκίνο. Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης ισοενζύμων της  $\pi$  και  $\alpha$  τάξης φαίνεται να συνδέονται επίσης με ασθένειες στο συκώτι και στους νεφρούς (Sundberg *et al.*, 1994). Οι GSTs  $\omega$  τάξης (GSTO) εμφανίζουν ένα μοναδικό εύρος ενζυμικών ιδιοτήτων σε σύγκριση με άλλες GSTs. Το ισοένζυμο GSTO1-1 δρα ως διυδροασκορβικού οξέος και θειολτρανσφεράση ενώ καταλύει επίσης και την αναγωγή ενός ενδιάμεσου προϊόντος, του μονομεθυλαρσενικού οξέος, στο μεταβολικό μονοπάτι βιομετατροπής του αρσενικού οξέος (Board *et al.*, 2000 , Li *et al.*, 2006). Επίσης, η δράση της GSTO1-1 έχει συνδεθεί με την ηλικία

εμφάνισης των ασθενειών του Αλτσχάιμερ και του Πάρκισον (Li *et al.*, 2006). Στην περίπτωση αυτή, ο ρόλος του ενζύμου στη μείωση του διϋδροασκορβικού οξέος στον εγκέφαλο μπορεί να σχετίζεται με την ηλικία εμφάνισης των δύο ασθενειών (Li *et al.*, 2006 , Allen *et al.*, 2003).

#### **1.9.1.1. Εφαρμογές των GSTs στην μοριακή διαγνωστική διαφόρων τύπων καρκίνου**

Λόγο των αυξημένων συγκεντρώσεων της GSH και των μεταβαλλόμενων επιπέδων έκφρασης των GSTs στα καρκινικά κύτταρα και τους όγκους (Mannervic *et al.*, 1987), οι GSTs μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιτυχώς στη διάγνωση και την κλινική παρακολούθηση του καρκίνου. Παραδείγματος χάρη, 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) και σε ασθενείς με γλοίωμα (Ali-Osman *et al.*, 1998) και καρκίνο του στομάχου (Fan, 1995), έχει παρατηρηθεί αύξηση του επιπέδου έκφρασης της GSTP1-1 με την εξέλιξη του όγκου, ενώ άλλες GSTs μπορεί να εκφράζονται σε χαμηλότερα επίπεδα. Η έκφραση του ενζύμου GSTP1-1 στα επιθηλιακά κύτταρα του ανθρώπινου μαστού, μειώνεται προοδευτικά όσο το φυσιολογικό επιθήλιο αποδιαφοροποιείται σε προ-νεοπλασματικές και νεοπλασματικές αλλοιώσεις. Τέτοιου είδους ρύθμιση της GSTP1-1 διακρίνεται κυρίως στον καρκίνο του προστάτη (Josephy & Mannervic, 2006). Μελέτες έχουν δείξει πως, η GSTP1-1 μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο ανοσο-ιστολογικό δείκτη για διάφορους τύπους κακοήθειας, καθώς η έκφρασή της αυξάνεται σε προ-νεοπλασματικό επίπεδο αλλά και σε κακοήθεις όγκους.

#### **1.9.1.2. Πολυμορφισμοί των GSTs και συσχέτιση με τον καρκίνο**

Έχουν παρατηρηθεί ποικίλοι γενετικοί πολυμορφισμοί των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την έκφραση των GSTs. Πολλές επιδημιολογικές μελέτες, στις οποίες λαμβάνεται υπόψη το γενετικό προφίλ των ασθενών, ερευνούν τη συσχέτιση των γενετικών πολυμορφισμών των GSTs και συγκεκριμένων ασθενειών, όπως ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστεως (Conolo *et al.*, 2008). Σε πρόσφατες δοκιμές, έχει χρησιμοποιηθεί η υψηλής

ανάλυσης τεχνική της PCR για τον χαρακτηρισμό του γενετικού προφίλ, που επιτρέπει το γρήγορο και ακριβή χαρακτηρισμό των κληρονομούμενων αλληλομόρφων των πολυμορφικών GST γονιδίων κυρίως των τάξεων Alpha, Mu, Pi και Theta (GSTM1, GSTM3, GSTP1 και GSTT1) (Nunes, 2006 , Keller, 2006 , Keller, 2002). 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 (Ali-Osman, 2007).

Οι πολυμορφισμοί των γονιδίων των GSTs του ανθρώπου φαίνεται να σχετίζονται και με την ανταπόκριση που έχουν οι ασθενείς στην χημειοθεραπεία (Oldenburg, 2007 , Sweeney, 2003 , Stoehlmacher, 2002). Συνεπώς, οι υπότυποι και οι διάφορες μορφές των GSTs μπορούν να αποτελέσουν παράγοντες οι οποίοι θα λαμβάνονται υπόψη για την καλύτερη εξατομικευμένη θεραπεία στο μέλλον (Oldenburg, 2007 , Sweeney, 2003).

Η επιστήμη της φαρμακογονιδιωματικής, εστιάζει το ενδιαφέρον της στο χαρακτηρισμό των γονιδιωματικών διαφορών (π.χ. πολυμορφισμοί ή διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων) που σχετίζονται με τη διαφορετική ανταπόκριση των ασθενών στα φάρμακα. Βασίζεται στα SNPs (Sun *et al.*, 2009) και πιθανολογείται ότι τα SNPs στα γονίδια των ενζύμων, τα οποία είναι υπεύθυνα για τον μεταβολισμό των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και στα γονίδια των μεταφορέων των φαρμάκων, μπορεί να μεταβάλλουν την έκφρασή τους ή τη δραστηριότητά τους, επηρεάζοντας έτσι τη διάθεσή τους στον οργανισμό και τα αποτελέσματα της χημειοθεραπείας (Bernig & Chanock, 2006). Παράδειγμα αποτελεί ο αλληλόμορφος GSTP\*1C, ο οποίος φαίνεται να λειτουργεί πιο προστατευτικά για το κύτταρο ως προς τα φαρμακευτικά σκευάσματα cisplatin και carboplatin, συγκρινόμενος με τους αλληλόμορφους GSTP\*1A και GSTP\*1B (Ishimoto & Ali-Osman, 2002). Επίσης, σε ασθενείς που έπασχαν από οξεία και χρόνια μυελίτιδα, λευχαιμία, γλοιώμα, πολλαπλό μύελωμα, λέμφωμα Hodgkin και καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, του οισοφάγου και του στομάχου, εντοπίστηκαν οι αλληλογράφοι GSTP\*1B και GSTP\*1C και παρατηρήθηκε πως οι ασθενείς είχαν καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία και εμφάνισαν μεγαλύτερο χρόνο ίασης, σε

σχέση με άλλους ασθενείς χωρίς τους συγκεκριμένους αλληλομόρφους (Goekkurt *et al.*, 2006 , Allan *et al.*, 2001).

Αντίστοιχοι πολυμορφισμοί, οι οποίοι επηρεάζουν τη δραστικότητα του ενζύμου GST, έχουν περιγραφεί και για τα γονίδια των GSTT1 και GSTM1 (London *et al.*, 2000). Στοιχεία υποστηρίζουν πως, ο πολυμορφισμός της GSTM1 σχετίζεται με την αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας, καθώς, σε περιπτώσεις παιδικής οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (Hall *et al.*, 1994) και καρκίνου των ωοθηκών (Howells *et al.*, 2001), ο γονότυπος GSTM1\*0 σχετίστηκε με καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία σε σχέση με τους γονότυπους GSTM1\*A και GSTM1\*B (Hall *et al.*, 1994). Επιπλέον, ο αλληλόμορφος GSTT1\*0 θεωρείται ο πιο σημαντικός προγνωστικός δείκτης ανταπόκρισης στη θεραπεία και στον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. 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 (Salagonic *et al.*, 1999).

Με βάση τα όσα αναφερθήκαν ανωτέρω, μπορεί κανείς να καταλήξει στο συμπέρασμα ότι, οι λειτουργικοί γονιδιωματικοί πολυμορφισμοί των γονιδίων-στόχων των φαρμάκων (Gebhardt *et al.*, 1999 , Lima *et al.*, 1999), των ενζύμων μεταβολισμού (Ando *et al.*, 2000) και των ενζύμων επιδιόρθωσης του DNA (Park *et al.*, 2001) μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Ένα από τα πιο σημαντικά πεδία έρευνας λοιπόν, είναι η αξιολόγηση των φαρμακογονιδιωματικών παραλλαγών, σε σχέση με την ανταπόκριση των ασθενών με καρκίνο στα χημικοθεραπευτικό πρωτόκολλο.

### **1.9.1.3. Οι GSTs ως μοριακοί στόχοι σχεδιασμού φαρμάκων**

Οι GSTs εμπλέκονται σε μηχανισμούς που σχετίζονται με την αποτοξίνωση των κυττάρων των οργανισμών, είναι όμως υπεύθυνες και για την ενεργοποίηση της τοξικότητας ορισμένων ουσιών. Συνεπώς, λόγω αυτής της ιδιότητάς τους, αποτελούν σημαντικούς μοριακούς στόχους για την ανάπτυξη νέων ισχυρών αναστολών, έναντι της GST και το σχεδιασμό νέων φαρμάκων και προφαρμάκων, που θα ενεργοποιούνται και θα δρουν

στοχευόμενα στις θέσεις που υπερεκφράζονται τα εν λόγω ένζυμα. Η GSTP1-1 που κυρίως υπερεκφράζεται στο καρκινικά κύτταρα, με άμεση συνέπεια να εμφανίζουν έντονη χημειοανθεκτικότητα, αποτελεί ένα σημαντικό μοριακό στόχο για την ενεργοποίηση των προφαρμάκων.

Ένα παράδειγμα προφαρμάκου, το οποίο ενεργοποιείται από την GSTP1-1 είναι το TLK286 (Telcyta). Αυτό το φάρμακο ενεργοποιείται από το αμινοξύ Tyr7 το οποίο βρίσκεται στην ενεργό περιοχή της GSTP1-1 ανθρώπου (Morgan *et al.*, 1996).

Ένα ακόμη παράδειγμα αποτελεί η αζαθειοπρίνη, ένα προφάρμακο το οποίο λειτουργεί ανοσοκατασταλτικά. Η βιομετατροπή του στην ενεργό μορφή 6-μερκαπτοπουρίνη αποτελεί ενζυματική αντίδραση με τη γλουταθειόνη και καταλύεται από αρκετές GSTs του ανθρώπου. Συγκεκριμένα, σε δοκιμή μελετήθηκαν δεκατέσσερις hGSTs για τη δραστηκότητά τους στην κατάλυση αυτής της αντίδρασης και η Alpha τάξη παρουσίαζε τα καλύτερα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, η GSTA2-2 είχε τη μεγαλύτερη ειδική δραστηκότητα, ενώ η GSTA1-1 παρουσίαζε ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα καταλυτική δραστηκότητα με την αζαθειοπρίνη (Eklund *et al.*, 2006).

Πολλά φάρμακα και προφάρμακα έχουν αναφερθεί να παρουσιάζουν αξιόλογη αναστολή έναντι των διαφόρων GSTs και προτείνονται ως αποτελεσματικοί αναστολείς για το σχεδιασμό αντικαρκινικών φαρμάκων και την αντιμετώπιση του MDR (Multiple Drug Resistance) (Sau *et al.*, 2010, Mahajan & Atkins, 2005). Το εθακρινικό οξύ είναι ένας από τους πρώτους αναστολείς της GST, που χρησιμοποιήθηκε για να ευαισθητοποιήσει τα καρκινικά κύτταρα στα κυτταροτοξικά αποτελέσματα των χημικοθεραπευτικών φαρμάκων (Tew *et al.*, 1997). Παράγωγα του εθακρινικού οξέος (Yang *et al.*, 2010), παράγωγα ξανθονών (Zoi *et al.*, 2013), παράγωγα πύρρολο-σουλφόνυλο-αδρυλιμινών (Koutsoumbli *et al.*, 2012) καθώς και παράγωγα των προσταγλαδινών (6,9-deepoxy-6,9-(phenylimino)- $\Delta^{6,8}$ -prostaglandin I<sub>1</sub>) (Tew *et al.*, 1988) αλλά και αρκετά μόρια προφαρμάκων (Axarli *et al.*, 2009, Pezzola *et al.*, 2010, Johansson *et al.*, 2011) έχουν μελετηθεί ως πιθανοί αναστολείς των GSTs.

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 and Ommen, 1991 , Mahajan and Atkins, 2005). Ο σχεδιασμός και η σύνθεση πεπτιδικών αναλόγων είναι ουσιώδης προσέγγιση, συνεισφέροντας στην ανάπτυξη αποτελεσματικού “target screening” (στοχευμένη σάρωση) και “lead structure optimization” (βελτιστοποίηση φαρμακοφόρας δομής), για τις ενώσεις με διαγνωστική ή φαρμακευτική αξία (Eberle, 1991).

### **1.9.2. Ανάπτυξη βιοαισθητήρων**

Λόγο της ικανότητας των GSTs να καταλύουν τις αντιδράσεις δέσμευσης της GSH με ξενοβιοτικές ενώσεις, τα ένζυμα αυτά βοήθησαν σημαντικά την ανάπτυξη βιοαισθητήρων για τον προσδιορισμό ζιζανιοκτόνων. Παραδείγματος χάρη, το ισοένζυμο hGST1-1 από τον αραβόσιτο χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη φορητού βιοαισθητήρα οπτικής ίνας, για τον προσδιορισμό του φυτοπροστατευτικού προϊόντος atrazine (Andreou & Clonis, 2002). Ακόμα, παρατηρήθηκε ότι η μετάλλαξη Gln53Ala της hGST1-1 του αραβοσίτου παρουσιάζει σχεδόν 10-φορές μεγαλύτερη αναστολή, ως προς το εντομοκτόνο malathion, σε σχέση με τον άγριο τύπο του ενζύμου. Έτσι, το Gln53Ala χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη βιοαισθητήρα με σκοπό τον προσδιορισμό του εντομοκτόνου αυτού (Karoli *et al.*, 2008).

Η έρευνα στον τομέα αυτό δεν αφορά μόνο στα φυτοφάρμακα και το περιβάλλον. Άλλη μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση είναι η μελέτη του βιοαισθητήρα για την ανίχνευση της ακρυλαμίδης σε αμυλούχα τρόφιμα (Hasegawa *et al.*, 2007). Η ακρυλαμίδα θεωρείται επικίνδυνη ουσία για την ανθρώπινη υγεία και είναι πολύ σημαντική η ανάπτυξη μιας γρήγορης και οικονομικής μεθόδου ανίχνευσής της.

Επίσης, βιοαισθητήρες αναπτυχθήκαν για μια μέθοδο ανάλυσης ηπατονεοπλασματικών 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). Συνεπώς, είναι δυνατός ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη βιοαισθητήρων με ιατρικές εφαρμογές.

### **1.9.3. Η μέθοδος της βιοεξυγίανσης για την αποικοδόμηση ανθεκτικών περιβαλλοντικών ρύπων**

Η απομάκρυνση των ανθρωπογενών ρύπων από το περιβάλλον θεωρείται ως ένα από τα βασικά θέματα για τη βιώσιμη ανάπτυξη του πλανήτη. Πρέπει να σημειωθεί ότι η συμβολή της πρωτεϊνικής μηχανικής και του ανασυνδυασμένου DNA θεωρείται σημαντική για τη δημιουργία βελτιωμένων μορφών ενζύμων GSTs με αυξημένη καταλυτική και αποτοξινωτική δράση έναντι τοξικών επιβλαβών ενώσεων. Τα μεταλλαγμένα αυτά ένζυμα προκύπτουν από τροποποίηση συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων μέσω σημειακής κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης (Κλώνης, 2007).

### **1.9.4. 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 , 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 , Μίαο, 2010 , Pohanka *et al.*, 2009).

Πρόσφατα, οι GSTs λόγω της ικανότητας τους να αλληλεπιδρούν με ξενοβιοτικές ενώσεις, χρησιμοποιήθηκαν 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 , Karoli *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.



### 1.9.5. Εφαρμογές του SjGST

Ο φυσιολογικός ρόλος του SjGST ως ένζυμο αποτοξίνωσης είναι στόχος εμβολίων και φαρμάκων. Η ανάγκη για καινούρια, περισσότερο δραστικά και αποτελεσματικά φάρμακα έναντι των *Schistosoma spp* που προκαλεί 200.000 θανάτους ετησίως (Jao *et al.*, 2006) έχει στρέψει ένα μεγάλο κομμάτι της επιστημονικής έρευνας στο ένζυμο SjGST. Με στόχο την έρευνα νέων φαρμάκων και εμβολίων συνεχώς γίνονται νέες μελέτες και κρυσταλλογραφικές αναλύσεις για την εύρεση νέων αναστολέων (Jao *et al.*, 2006) και την πλήρη κατανόηση της δομής και της λειτουργίας της L-θέσης του ενζύμου (Cardoso *et al.*, 2003 , Yassin *et al.*, 2003 , Yassin *et al.*, 2004 , Rufer *et al.*, 2005).

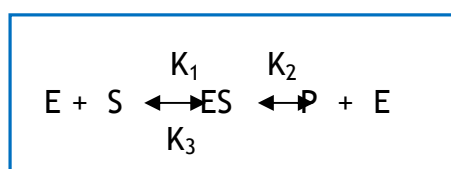
Μερικά από τα χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης SjGST είναι ότι έχει υψηλή σταθερότητα και διαλυτότητα, μπορεί να εκφραστεί ετερόλογα σε υψηλές συγκεντρώσεις σε κύτταρα *E. coli* καθώς και να καθοριστεί με μεγάλη ευκολία με χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή με ακινητοποιημένο GSH. Για όλους τους παραπάνω λόγους το ένζυμο SjGST χρησιμοποιείται ευρέως για την έκφραση, τον καθαρισμό και την απομόνωση-ανίχνευση συντηγμένων πρωτεϊνών που παράγονται ετερόλογα σε κύτταρα *E. coli*. Το σύστημα αποτελείται από τρία κύρια στοιχεία : τους πλασμιδιακούς φορείς pGEX, το χρωματογραφικό σύστημα καθαρισμού της GST-συντηγμένης πρωτεΐνης και το ενζυμικό σύστημα απομάκρυνσης του GST ενζύμου. Οι πλασμιδιακοί φορείς pGEX έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να παράγουν υψηλά επίπεδα ενδοκυτταρικής έκφρασης γονιδίων σε σύντηξη με το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης SjGST (Smith & Johnson, 1988). Οι συντηγμένες πρωτεΐνες μπορούν να καθαριστούν εύκολα με χρωματογραφία συγγένειας. Ο διαχωρισμός της επιθυμητής πρωτεΐνης από τη SjGST επιτυγχάνεται με πρωτεάση ειδικής θέσης η οποία αναγνωρίζει ακολουθίες που βρίσκονται αμέσως μετά τη θέση κλωνοποίησης των pGEX πλασμιδίων. Οι συντηγμένες πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνευτούν με ενζυμικές μεθόδους μέτρησης του GST ενζύμου. Το σύστημα έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχημένα σε πολλές εφαρμογές όπως τη μοριακή ανοσολογία (Toye *et al.*, 1990), την παραγωγή εμβολίων

(Fikrig *et al.*, 1990) και μελέτες αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και DNA-πρωτεϊνών (Chittenden *et al.*, 1991).

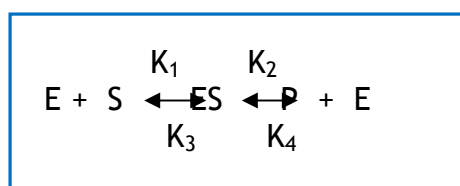
### 1.10. Κινητική των Ενζύμων

Το πρότυπο ενζυμικής αντίδρασης 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 σε ελεύθερη μορφή (E), ώστε να είναι διαθέσιμο για μια νέα αντίδραση.

Η γενική ενζυμική αντίδραση είναι η ακόλουθη :



Όπου  $K_1$ ,  $K_2$  και  $K_3$  είναι οι σταθερές της ταχύτητας αντίδρασης. Από το παραπάνω σχήμα φαίνεται ότι η δέσμευση του υποστρώματος είναι αντιστρεπτή, ενώ η αποδέσμευση του προϊόντος είναι μη αντιστρεπτή. Εδώ αξίζει να σημειώσουμε, ότι το παραπάνω πρότυπο αντίδρασης χρησιμοποιείται για *in vitro* κινητικές αναλύσεις, καθώς κάτω από αυτές τις συνθήκες θεωρείται ότι το προϊόν απαντά σε ασήμαντη συγκέντρωση και γ'αυτό η αντίδραση αντίθετης κατεύθυνσης είναι τάξη μηδέν. Παρόλο αυτά, η *in vivo* αντίδραση είναι διαφορετική και αυτό γιατί στο κύτταρο το προϊόν θα πρέπει να απαντά σε τέτοια συγκέντρωση ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί το επόμενο μεταβολικό μονοπάτι. Συνεπώς, *in vivo* οι περισσότερες αντιδράσεις παρουσιάζουν κάποιο βαθμό αντιστρεψιμότητας 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.

### *Ισορροπία Michaelis & Menten*

Η εξίσωση των Michaelis & Menten είναι η ακόλουθη :

$$u = \frac{K_2 [E_0][S]}{K_m + [S]}$$

Όπου  $u$  = ταχύτητα συνολικής αντίδρασης

$K_2$  = 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 ακόλουθες :

α ) η αντίδραση να είναι μονο-υποστρωματική,

β ) κάθε μόριο ενζύμου να φέρει μία περιοχική δέσμευσης υποστρώματος ή και περισσότερες οι οποίες όμως δεν πρέπει να αλληλεπιδρούν,

γ ) σχηματισμός ενός ενδιάμεσου συμπλόκου ES ή και δεύτερου που όμως περιορίζει και να ελέγχει την ταχύτητα της συνολικής αντίδρασης,

δ ) σε πολύ-υποστρωματικές αντιδράσεις, όταν οι συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων, εκτός μίας, διατηρούνται σταθερές (Κλώνης, 2007).

### *Σταθερά καταλύσεως - $K_{cat}$*

Η καταλυτική σταθερά 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). Θεωρητικά, η τιμή της  $K_{cat}$  δε μπορεί να ξεπερνά το  $10^9 \text{ sec}^{-1}$  (Sauro, 2009).

### Σταθερά Michaelis - $K_m$

Η σταθερά Michaelis έχει διαστάσεις συγκεντρώσεως, είναι το μέγεθος

$$\frac{K_1 + K_2}{K_1}$$

Και προσδιορίζει τις σχετικές συγκεντρώσεις των E, S και ES σε συνθήκες σταθεροποιημένης κατάστασης (steady-state).

### Μέγιστη ταχύτητα- $V_{max}$

Όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος [S] στην οποία καλείται να λειτουργήσει το ένζυμο είναι πολύ μεγαλύτερη της  $K_m$  η σταθερά Michaelis λαμβάνει την απλοποιημένη της μορφή

$$u = k_{cat} [E]$$

Η παραπάνω σχέση αντιστοιχεί σε αντίδραση μηδενικής τάξης που είναι ανεξάρτητη της [S]. Σ' αυτήν την περίπτωση, η u ονομάζεται *μέγιστη ταχύτητα* ή *οριακή ταχύτητα (limiting rate)*,  $V_{max}$ . Από την παραπάνω σχέση προκύπτει ότι η μέγιστη ταχύτητα εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ενζύμου (Κλώνης, 2007).

### Σταθερά Εξειδικεύσεως - $K_{cat}/K_m$ ή $K_A$

Η τιμή της σταθεράς εξειδικεύσεως (specificity constant) είναι ο πλέον αξιόπιστος τρόπος εκτίμησης ειδικεύσεως ενός ενζύμου για διάφορα υποστρώματα. Η σταθερά εξειδικεύσεως συνεκτιμά και τη σταθερά  $K_{cat}$ , που

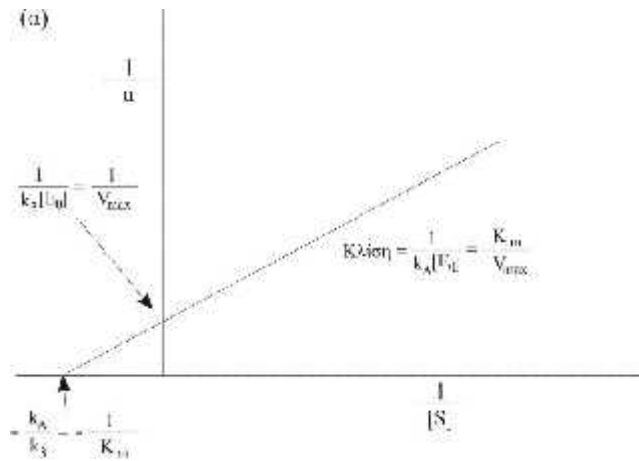
αφορά στα μεταβατικά στάδια και τη σταθερά  $K_m$ , που αφορά στις αλληλεπιδράσεις των αρχικών σταδίων (Κλώνης, 2007).

Η κλασική γραφική παράσταση των Michaelis & Menten, ως προς τις μεταβλητές ταχύτητα και υπόστρωμα, οδηγεί σε ορθογώνια υπερβολή. Υπάρχουν και εναλλακτικές μορφές προσδιορισμού των  $K_m$  και  $V_{max}$  μέσω άλλων εξισώσεων, όπως η γραφική παράσταση των Lineweaver-Burk (Σχήμα 1.8α), η γραφική παράσταση του Hanes (Σχήμα 1.8β) και η γραφική παράσταση του Hofstee (Σχήμα 1.8γ).

Όσο αφορά στη γραφική παράσταση των διπλών αντιστρόφων ή των Lineweaver-Burk, λαμβάνοντας υπόψη ότι  $V_{max} = K_2[E_0]$ , η παραπάνω σχέση μπορεί να γίνει η εξής:

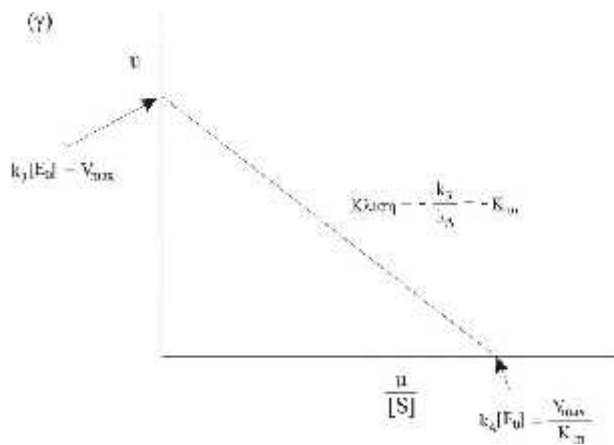
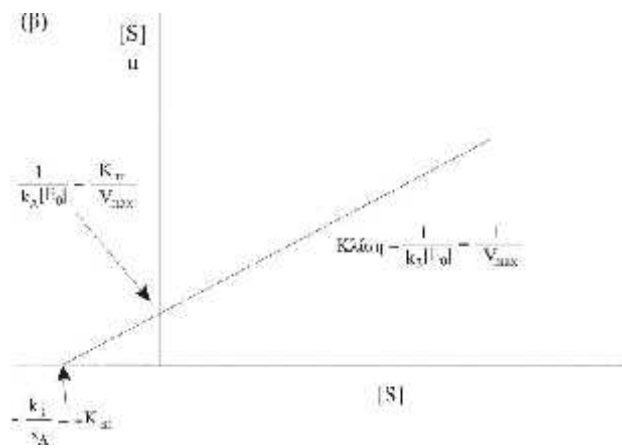
$$\frac{1}{u} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Η γραφική παράσταση της ανωτέρω 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 1.8α). Πρέπει να προσέξουμε τα πειραματικά σφάλματα, τα οποία μεγεθύνονται στις αντίστροφες τιμές και την επιλογή των τιμών  $[S]$  ώστε να είναι ομοιόμορφα κατανομημένες στον άξονα των τετημένων (Κλώνης, 2007). Πρέπει, επίσης, να σημειώσουμε ότι η ταχύτητα της αντίδρασης επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, το pH και τη συγκέντρωση ενζύμου.



(α) Διπλών αντιστρόφων ή των Lineweaver & Burk

(β) Γραφική παράσταση του Hanes



(γ) Γραφική παράσταση του Hofstee

μ 1.12.

μ  $K_{max}$   $V_{max}$  ( , 2007).

### 1.10.1. Εύρεση του είδους αναστολής και υπολογισμός της σταθεράς αναστολής $K_i$

Υπάρχουν πολλά μόρια ικανά να μειώσουν ή να αυξήσουν την ταχύτητα μιας αντίδρασης, τα οποία ονομάζονται αναστολείς ή παρεμποδιστές (inhibitors) και ενεργοποιητές, αντίστοιχα (Sauro, 2009). Οι αναστολείς διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες στους αντιστρεπτούς (reversible) και στους μη αντιστρεπτούς (irreversible), ανάλογα με τη δράση τους στη λειτουργία του ενζύμου. Οι αντιστρεπτοί αναστολείς δεσμεύονται κατά τρόπο αντιστρέψιμο με το ένζυμο, οπότε το τελευταίο μπορεί να ανακτήσει πλήρως τη δραστηριότητά του (κατόπιν διαπιδύσεως, αραιώσεως ή χρωματογραφίας μοριακού ηθμού). Αντίθετα, οι μη αντιστρεπτοί αναστολείς δεσμεύονται κατά τρόπο μόνιμο (για παράδειγμα σχηματισμός ομοιοπολικού δεσμού), οπότε το ένζυμο αδρανοποιείται, συνήθως, οριστικά. Οι μη αντιστρεπτοί αναστολείς ονομάζονται και αδρανοποιητές (inactivators).

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 σε 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 πλέον γνωστούς να είναι η πενικιλίνη και η βανκομυκίνη (Sauro, 2009).

Μέσω της κινητικής μελέτης του ενζύμου, στην περίπτωση παρουσίας ενός αναστολέα μπορεί κανείς να αντλήσει χρήσιμες πληροφορίες τόσο για το είδος της αναστολής που επιφέρει ο εν λόγω αναστολέας στο ένζυμο, αλλά και τον τρόπο που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους.

Οι αναστολείς (αντιστρεπτοί ή μη-αντιστρεπτοί) επηρεάζουν αρνητικά την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης και συνεπώς την ενζυμική δραστηριότητα. Όμως το ένζυμο ακόμα και όταν βρίσκεται σε αναστολή εξακολουθεί να υπακούει στην 'κλασσική' κινητική των Michaelis-Menten, με τη μόνη διαφορά ότι οι διάφορες σταθερές που χαρακτηρίζουν την ενζυμική αντίδραση ( $K_A$ ,  $K_{cat}$ ,  $K_m$ ,  $V_{max}$ ) αποκτούν νέες φαινομενικές τιμές ( $K_A^{app}$ ,  $K_{cat}^{app}$ ,  $K_m^{app}$ ,  $V_{max}^{app}$ ).

Τα κύρια είδη ενζυμικής αναστολής είναι τα εξής :

- (α) Συναγωνιστική αναστολή - competitive inhibition
- (β) Ανταγωνιστική αναστολή - uncompetitive inhibition
- (γ) Μικτή ή μη συναγωνιστική αναστολή - mixed or noncompetitive inhibition

Μια αναστολή λέγεται *αντιστρεπτή* όταν αποκαθίσταται ισορροπία στην αντίδραση  $I + E \leftrightarrow EI$  που μπορεί να μετακινηθεί προς τα δεξιά ή αριστερά. Οι δεσμοί σύνδεσης του ενζύμου (E) με τον αναστολέα (I), είναι ασθενείς και υπάρχει κάποια σταθερά αστάθειας ( $K_i$ ), που αποτελεί και το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου προς τον αναστολέα.

Μια αναστολή λέγεται *μη αντιστρεπτή* όταν οι δεσμοί του ενζύμου και του αναστολέα είναι σταθεροί και η αντίδραση είναι μόνιμα μετατοπισμένη προς τα δεξιά (δηλαδή  $E + I \rightarrow EI$ ). Δεν απελευθερώνεται το ένζυμο, όταν απομακρυνθεί ο αναστολέας. Υπάρχει μια σταθερά ταχύτητας ( $K$ ), που δηλώνει το κλάσμα του ενζύμου που αναστέλλεται σε ορισμένη χρονική περίοδο και από ορισμένη συγκέντρωση αναστολέα.

Κάθε κατηγορία περιλαμβάνει διάφορες υποκατηγορίες ανάλογα με το αν ο αναστολέας συνδέεται με το ένζυμο στην ενεργό περιοχή, κοντά ή μακριά απ' αυτή ή αν κάθε μόριο ενζύμου συνδέεται με περισσότερα από ένα μόρια αναστολέα.

Στους διάφορους τύπους αναστολής, ιδιαίτερη σημασία έχει ο υπολογισμός της *σταθεράς αναστολής* ( $K_i$ ), η οποία αποτελεί ένδειξη του πόσο ισχυρός είναι ένας αναστολέας. Η σταθερά αναστολής, κατ' ουσία είναι η σταθερά



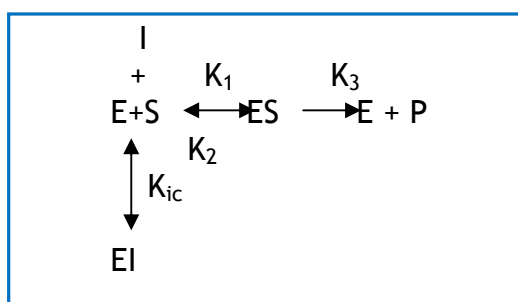
διάσπασης του συμπλόκου που δημιουργείται με την αλληλεπίδραση ενζύμου (E) και αναστολέα (I), ανάλογα με το είδος της αναστολής.

Η τιμή της σταθεράς αναστολής  $K_i$  ισούται με τη συγκέντρωση του αναστολέα στην οποία επέρχεται 50% αναστολή στο ένζυμο (τιμή γνωστή ως  $IC_{50}$ ), για το είδος της *συναγωνιστικής αναστολής* και εφόσον οι δοκιμές έγιναν σε  $[S] \ll K_m$ . Για τη *μη συναγωνιστική (μικτή) αναστολή*,  $K_i = IC_{50}$  μόνον όταν  $a = 1$ . Γενικά, υπάρχουν μαθηματικές εξισώσεις που επιτρέπουν τον υπολογισμό της  $K_i$  εάν είναι γνωστά τα  $IC_{50}$  και το είδος της αναστολής (Yung and Prusoff, 1973).

Σύμφωνα με τα ανωτέρω, η  $K_i$  ενός αναστολέα αποτελεί μέτρο για το πόσο ισχυρός είναι, αλλά και δείκτη σύγκρισης με άλλους αναστολείς και μάλιστα, όσο μικρότερη τιμή αποκτά τόσο μεγαλύτερη συγγένεια φαίνεται να έχει με το ένζυμο και το αντίστροφο. Σε κάθε περίπτωση, τρόπος πειραματικού υπολογισμού της  $K_i$ , διαφέρει στα διάφορα είδη αναστολής. Ειδικότερα στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη αναστολής σε τρία παράγωγα (12, 14 και 16) της βιβλιοθήκης των συνθετικών βενζοφαινονών ενώσεων, προκειμένου να κατανοήσουμε τον τρόπο αλληλεπίδρασής τους με το εκάστοτε ένζυμο, ενώ υπολογίστηκαν και οι σταθερές αναστολής στις διάφορες περιπτώσεις.

Στην περίπτωση της *συναγωνιστικής αναστολής*, ο αναστολέας (I) και το υπόστρωμα (S) συναγωνίζονται για την ίδια θέση δέσμευσης στο ένζυμο (E). Συνεπώς η δέσμευση του ενός αποκλείει την ταυτόχρονη δέσμευση του άλλου, ενώ δεν είναι απαραίτητο ο αναστολέας να έχει δεσμευτεί στην θέση δέσμευσης του υποστρώματος αλλά αρκεί να είναι κοντά, οπότε και εμποδίζεται στερεοχημικά η προσέγγιση και η δέσμευση του υποστρώματος. Από το πρότυπο ισορροπίας της αντίδρασης, είναι εμφανές ότι αν υπάρξει δέσμευση του αναστολέα (I) με το ένζυμο (E) δεν σχηματίζεται προϊόν (P), λόγω του σχηματισμού του καταλυτικά αδιέξοδου συμπλόκου (EI) (dead-end reaction).

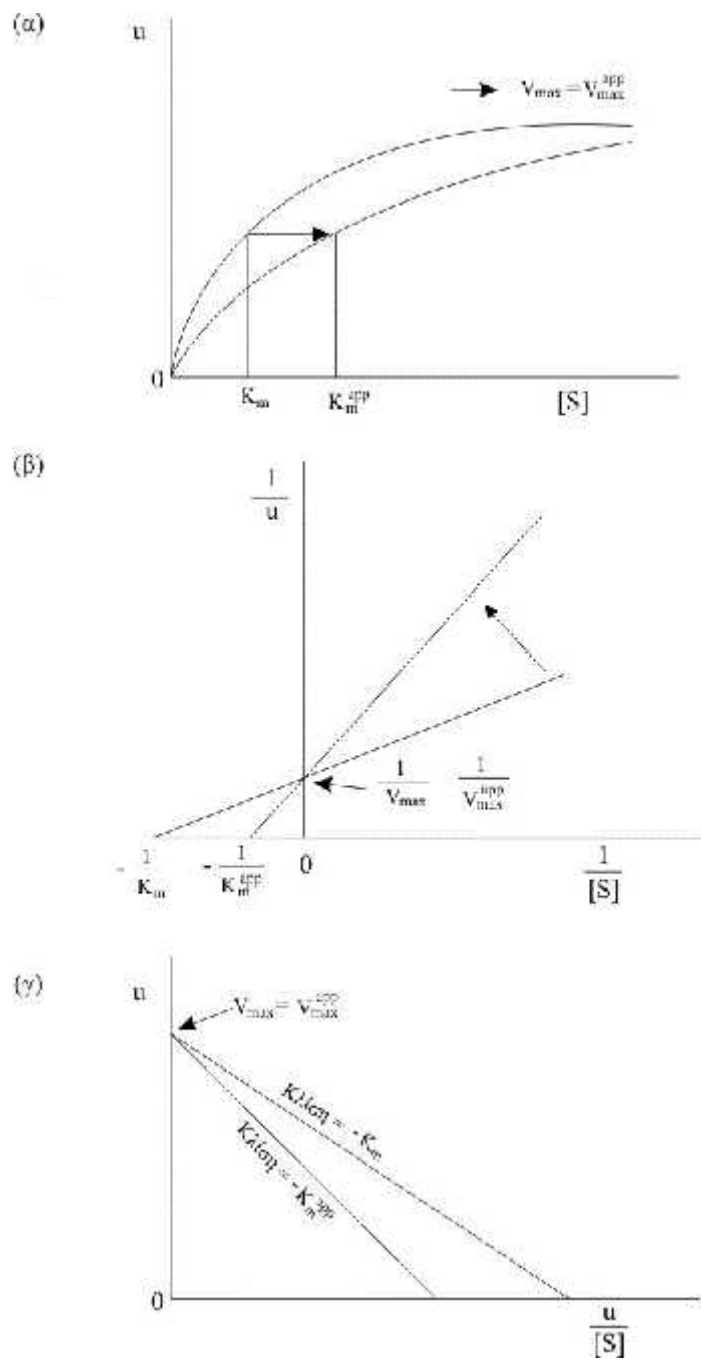
Το πρότυπο ισορροπίας της συναγωνιστικής αναστολής είναι το ακόλουθο :



Για τη σταθερά συναγωνιστικής αναστολής  $K_i (=K_{ic})$  του συμπλόκου EI ισχύει:

$$K_i = [E][I]/[EI]$$

Σε αυτόν τον τύπο αναστολής, ο υπολογισμός της  $K_i$  μπορεί να πραγματοποιηθεί γραφικώς δεδομένα της γραφικής απεικόνισης Lineweaver-Burk (Σχήμα 1.10β). Ειδικότερα, από τις κλίσεις των ευθειών (slopes) που σχηματίζουν οι διάφορες συγκεντρώσεις αναστολέα, δημιουργήσουμε ένα δευτερογενές γράφημα των κλίσεων (slopes) έναντι των αντίστοιχων συγκεντρώσεων αναστολέα ( $[I]$ ). Αυτό το δευτερογενές γράφημα θα πρέπει να απεικονίζει ευθεία γραμμή, εάν έχουμε *καθαρή συναγωνιστική αναστολή*, το δε σημείο τομής της ευθείας στον οριζόντιο άξονα του δευτερογενούς γραφήματος ισούται με  $-K_i$ .



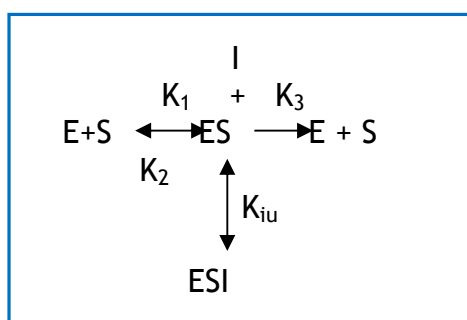
μ 1.13.  $u$   $\mu$  [S]  $\mu$   
 . ( ) Michaelis-Menten ( ) , ( )  
 ( ) ( ) Hofstee ( ) ( , 2007).

Στην περίπτωση της παραβολικής συναγωνιστικής αναστολής, δεδομένου ότι το δευτερογενές γράφημα, που αντλεί τα δεδομένα του από τη γραφική απεικόνιση Lineweaver-Burk, δεν εμφανίζει γραμμικότητα (παρά μόνο για ορισμένες συγκεντρώσεις αναστολέα), αλλά παίρνει τη μορφή παραβολής, η σταθερά αναστολής  $K_i$  υπολογίζεται κατόπιν επεξεργασίας των δεδομένων

του δευτερογενούς γραφήματος και το σχηματισμό μιας νέας γραφικής παράστασης, των  $\Delta Slopes$  συναρτήσει της συγκέντρωσης του αναστολέα. Από τη γραφική απεικόνιση των δίπλων αντιστρόφων της τελευταίας ( $1/\Delta Slopes$  συναρτήσει  $1/[αναστολέα]$ ) προκύπτει ο υπολογισμός της τιμής της  $K_i$ , δεδομένου ότι το σημείο τομής της ευθείας με τον οριζόντιο άξονα ισούται με  $-1/K_i$ . Η φυσική έννοια αυτού του φαινόμενου είναι ότι υπάρχει δέσμευση και δεύτερου μορίου αναστολέα στο ένζυμο, σε θέση διαφορετική από εκείνη που δεσμεύεται το υπόστρωμα και η οποία είναι δεσμευμένη από το πρώτο μόριο αναστολέα, ώστε συνολικά παρατηρείται αύξηση της αναστολής. Εάν η καμπύλη του δευτερογενούς διαγράμματος είναι υπερβολή, τότε και έχουμε *υπερβολική συναγωνιστική αναστολή*, τότε ο μεν υπολογισμός της  $K_i$  γίνεται με τον ίδιο τρόπο ως ανωτέρω, η δε φυσική έννοια είναι ότι, παρουσία αναστολέα και υποστρώματος, πραγματοποιείται καταλυτική αντίδραση με μικρότερη ταχύτητα συγκριτικά απουσία αναστολέα.

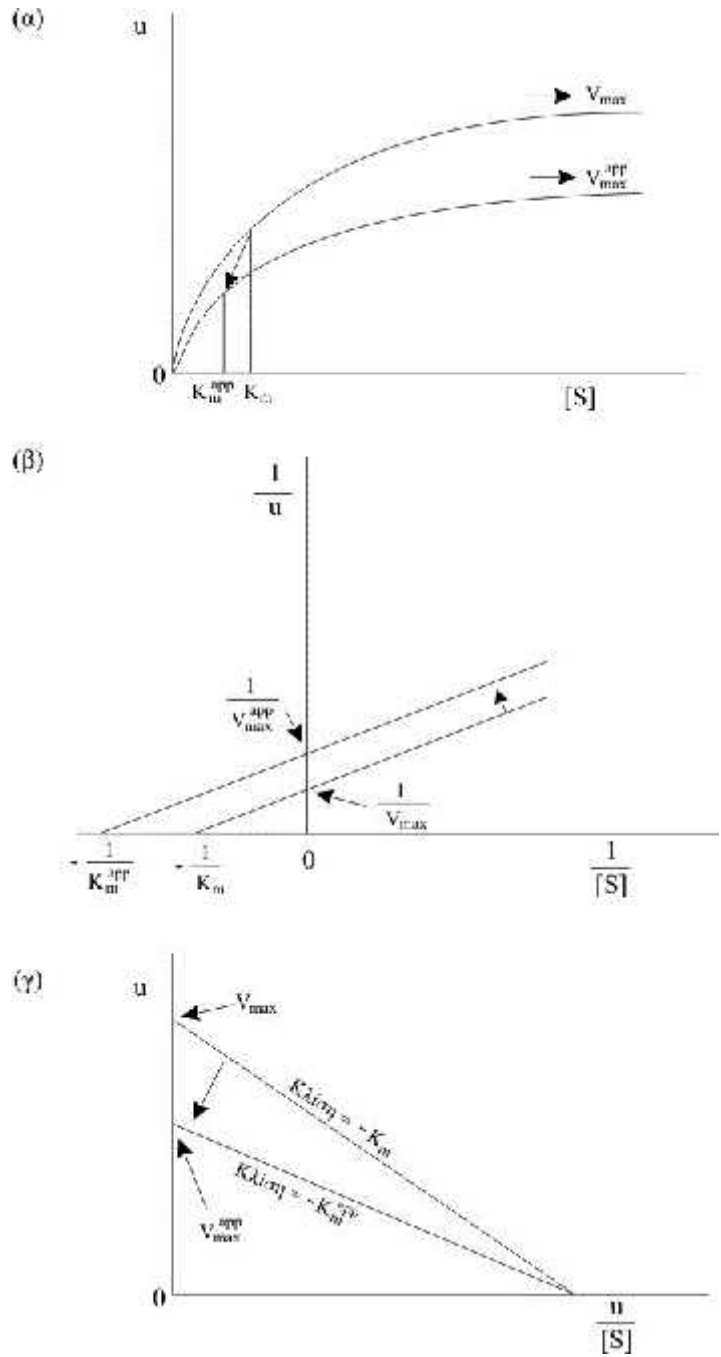
Στην περίπτωση *ανταγωνιστικού αναστολέα*, ο αναστολέας (I) και το υπόστρωμα (S) δεσμεύονται σε διαφορετικές θέσεις, αλλά ο αναστολέας δεσμεύεται μόνο στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος ES και οδηγεί σε σχηματισμό καταλυτικά αδιέξοδου συμπλόκου ESI το οποίο αδυνατεί να δώσει προϊόν.

Το πρότυπο ισοροπίας της ανταγωνιστικής αναστολής έχει ως εξής :



Για τη σταθερά ανταγωνιστικής αναστολής του συμπλόκου ESI ισχύει:

$$K_i = [ES][I]/[ESI]$$



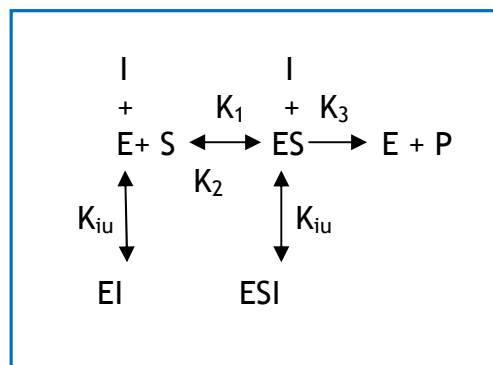
μ 1.14.

u . ( ) Michaelis-Menten ( ) ( ) Hofstee ( ) ( , 2007). μ [S] μ , ( )

Ο υπολογισμός της  $K_i$  πραγματοποιείται μέσω της γραφικής παράστασης  $v/[S]$  έναντι των διαφόρων τιμών  $[I]$ . Στην περίπτωση της γραφικής παραστάσεως του διπλού αντιστρόφου τέμνει τον οριζόντιο άξονα  $[I]$  στο σημείο  $-K_i$ .

Η περίπτωση της μη συναγωνιστικής (υποπερίπτωση μικτής αναστολής) που μπορεί να αποτελεί συνδυασμό συναγωνιστικής και ανταγωνιστικής αναστολής, ο αναστολέας (I) δεσμεύεται τόσο σε ελεύθερο ένζυμο (E), προς σχηματισμό συμπλόκου EI με σταθερά αναστολής  $K_{ic}$ , όσο και στο σύμπλοκο ES με σταθερά αναστολής  $K_{iu}$ . Οι σταθερές αναστολής  $K_{ic}$  και  $K_{iu}$  υπολογίζονται όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, για συναγωνιστική και ανταγωνιστική αναστολή αντίστοιχα. Η συναγωνιστική αναστολή αποτελεί μια υποπερίπτωση της μικτής αναστολής όταν  $K_{ic} = K_{iu}$ .

Το πρότυπο ισορροπίας της μικτής αναστολής έχει ως εξής :





### 1.11. Σκοπός της παρούσας εργασίας.

Η μειωμένη αποτελεσματικότητα ορισμένων χημειοθεραπευτικών πρωτοκόλλων αποτελεί σημαντικό θεραπευτικό πρόβλημα και υπογραμμίζει την ανάγκη ανάπτυξης τέτοιων εξατομικευμένων πρωτοκόλλων ως και αντικαρκινικών φαρμάκων με αυξημένη αποτελεσματικότητα (π.χ. κοκτέιλς φαρμάκων, προ-φαρμάκων, χιμαιρικών φαρμάκων). Η hGSTP1 αποτελεί μοριακό στόχο για τον σχεδιασμό νέων φαρμάκων που, ιδανικά, θα δρουν στοχευόμενα στις θέσεις που υπερεκφράζεται το ένζυμο, καθιστώντας εν τέλει το χημειοθεραπευτικό πρωτόκολλο περισσότερο αποτελεσματικό λόγω στοχευόμενης ενζυμικής αναστολής.

Η παρούσα εργασία στόχευε στην εξέταση δύο ομάδων συνθετικών ενώσεων ('Βιβλιοθηκών') που δεν είχαν εξετασθεί ως πιθανοί αναστολείς GSTs ενώ είχαν αποδεδειγμένη χρησιμότητα στη φαρμακευτική επιστήμη. Οι δυο αυτές ομάδες είναι: (A) οι ουρίες και τα κυκλοποιημένα παράγωγά τους (βενζοδιαζεπίνες), και (B) οι 2,2'-διυδροξυ-βενζοφαινόνες και τα N-καρβονυλικά παράγωγα τους.

Θεωρήθηκε σκόπιμο να εξεταστεί η ομάδα A με το ισοένζυμο hGSTP1A ανθρώπου και τα δύο αντίστοιχα αλλοένζυμα hGSTP1B & hGSTP1C τα οποία ήταν και ο κύριος στόχος της εργασίας λόγω της εμπλοκής τους στην έρευνα του καρκίνου και το φαινόμενο MDR, ενώ κρίθηκε χρήσιμο να συλλεχθούν πληροφορίες και με τα ισοένζυμα hGSTA1, hGSTT2, hGSTΩ1 & SjGST. Επίσης, είχε προγραμματιστεί να εξεταστεί και η ομάδα B, επίσης με το ισοένζυμο hGSTP1A και τα δύο αλλοένζυμα hGSTP1B & hGSTP1C. Σημειώνεται ότι, τα ισοένζυμα hGSTA1 και hGSTP1 έχουν ιδιαίτερη σημασία για τον καρκίνο και το φαινόμενο MDR, όπως συζητήθηκε νωρίτερα.

Σε όλες τις ενώσεις προγραμματίστηκε αξιολόγηση των ενώσεων μέσω σάρωσης (screening) με το κάθε ισοένζυμο, προκειμένου να εντοπιστούν ενώσεις με αξιόλογη ικανότητα ενζυμικής αναστολής. Ειδικότερα στην περίπτωση της ομάδας B, οι ενώσεις που θα επιλέγονταν από τη σάρωση ως οι έχουσες τη σχετικά υψηλότερη ικανότητα ενζυμικής αναστολής, θα υποβάλλονταν σε κινητική μελέτη ενζυμικής αναστολής προκειμένου να



διαπιστωθεί το είδος και να υπολογισθεί, αντιστοίχως, η ισχύς της αναστολής.

Τέλος, με τη βοήθεια *in silico* μοριακού μοντελισμού και ελλιμενισμού, θα επιχειρείτο συσχέτιση της πειραματικής συμπεριφοράς των επιλεγέντων ενώσεων με τις δομικές ιδιαιτερότητες των τριών αλλοενζύμων hGSTP1.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ενδέχεται να αποβούν χρήσιμα στον σχεδιασμό ισχυρότερων αναστολέων έναντι hGSTs ως και αντίστοιχων χημικικών ενώσεων με εν δυνάμει φαρμακευτική εφαρμογή.

# Κεφάλαιο 2

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 2.1. ΥΛΙΚΑ

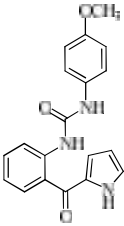
### 2.1.1. Ένζυμα και πρωτεΐνες

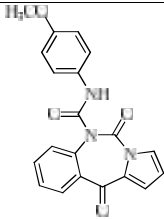
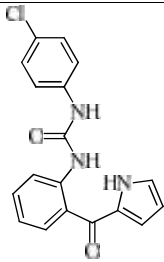
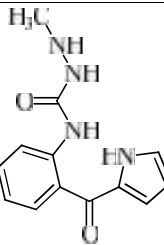
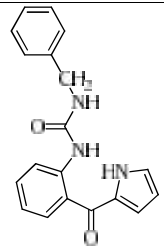
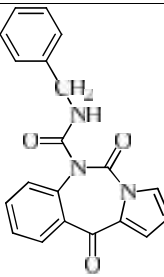
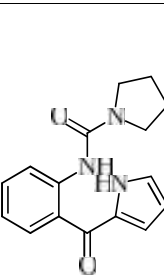
Χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταροπλασματικές τρανσφεράσες γλουταθειόνης ανθρώπου (hGSTA1-1, hGSTP1A, hGSTP1B και hGSTP1C) που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο μας, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που αναφέρονται στις παραγράφους 2.3.1.1. & 2.3.1.2., καθώς και οι hGSTT2-2, hGSTO1-1 που παρασκευάστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρεται στην παράγραφο 2.3.1.3. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η κυτταροπλασματική τρανσφεράση γλουταθειόνης ανθρώπου hGSTP1A που έφερε την απόληξη 6His (ευγενική προσφορά της Δρ. Ε. Χρονοπούλου). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε και τρανσφεράση γλουταθειόνης από το παράσιτο *Schistosoma japonica* που υπήρχε σε καθαρή μορφή και διατηρημένη σε 50% γλυκερόλη, στο Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας, Γ.Π.Α.

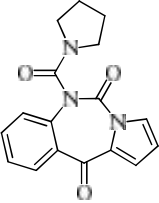
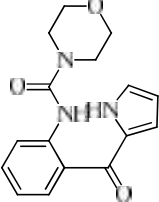
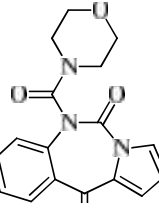
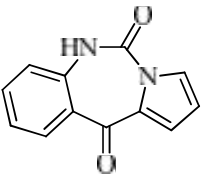
### 2.1.2. Ενώσεις προς μελέτη

Οι ενώσεις που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν ευγενική προσφορά των κκ. Γ. Βαρβούνη, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (**Πίνακας 2.1.**) και Δρ. Π. Τσουνγκα, Ερευνητή του Τμήματος Βιοχημείας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ (**Πίνακας 2.2.**).

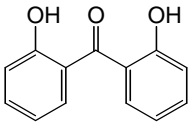
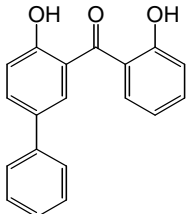
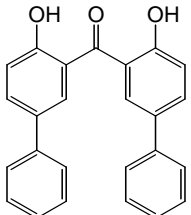
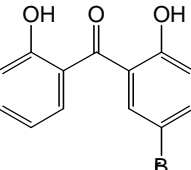
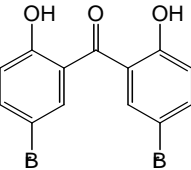
**Πίνακας 2.1.** Πληροφορίες για τα ανάλογα ουριών και βενζοδιαζεπινών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ως δυνητικών αναστολέων GSTs.

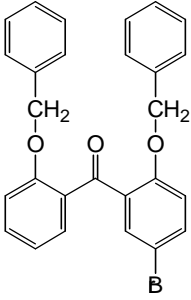
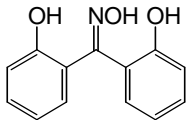
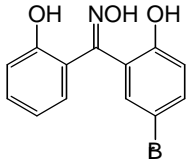
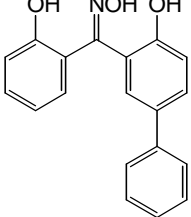
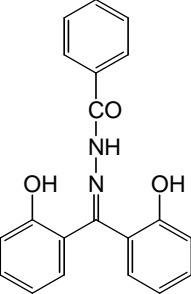
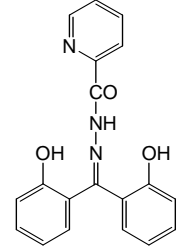
Αριθμός Ένωσης	Χημική Δομή	Μοριακός Τύπος	Μοριακό Βάρος
GVMF160		C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	335,3566

GVMF174		$C_{20}H_{15}N_3O_4$	361,3508
GVMF195		$C_{18}H_{14}ClN_3O_2$	339,7757
GVMF205		$C_{13}H_{14}N_4O_2$	258,2759
GVMF201		$C_{19}H_{17}N_3O_2$	319,3572
GVMF200		$C_{20}H_{15}N_3O_3$	345,3514
GVMF203		$C_{16}H_{17}N_3O_2$	283,3251

<p><b>GVMF202</b></p>		<p><math>C_{17}H_{15}N_3O_3</math></p>	<p>309,3193</p>
<p><b>GVMF8</b></p>		<p><math>C_{16}H_{17}N_3O_3</math></p>	<p>299,3245</p>
<p><b>GVMF7</b></p>		<p><math>C_{17}H_{15}N_3O_4</math></p>	<p>325,3187</p>
<p><b>GVMF</b></p>		<p><math>C_{12}H_8N_2O_2</math></p>	<p>212,2041</p>

**Πίνακας 2.2 :** Πληροφορίες για τις 2,2'-διυδροξυβενζοφαινόνες και των N-καρβονυλικών παραγώγων τους που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ως δυνητικών αναστολέων GSTs.

Αριθμός Ένωσης	Χημική δομή	Μοριακός Τύπος	Μοριακό Βάρος
5		$C_{13}H_{10}O_3$	214
6		$C_{19}H_{14}O_3$	290
7		$C_{25}H_{18}O_3$	366
8		$C_{13}H_9BrO_3$	293
9		$C_{13}H_8Br_2O_3$	372

10	 <p>Chemical structure showing two benzene rings connected by a carbonyl group. The left benzene ring has a benzyloxy group (-OCH<sub>2</sub>Ph) at the ortho position. The right benzene ring has a benzyloxy group (-OCH<sub>2</sub>Ph) at the para position and a substituent 'B' at the meta position.</p>	$C_{27}H_{21}BrO_3$	473
11	 <p>Chemical structure showing two benzene rings connected by a carbonyl group. Both benzene rings have hydroxyl groups (-OH) at the 3 and 4 positions.</p>	$C_{13}H_{11}NO_3$	229
12	 <p>Chemical structure showing two benzene rings connected by a carbonyl group. Both benzene rings have hydroxyl groups (-OH) at the 3 and 4 positions. The right benzene ring also has a substituent 'B' at the meta position.</p>	$C_{13}H_{10}BrNO_3$	308
13	 <p>Chemical structure showing two benzene rings connected by a carbonyl group. Both benzene rings have hydroxyl groups (-OH) at the 3 and 4 positions. The right benzene ring also has a phenyl ring substituent at the meta position.</p>	$C_{19}H_{15}NO_3$	305
14	 <p>Chemical structure showing two benzene rings connected by a carbonyl group. Both benzene rings have hydroxyl groups (-OH) at the 3 and 4 positions. The right benzene ring also has a benzamide group (-CONHPh) at the meta position.</p>	$C_{20}H_{16}N_2O_3$	332
15	 <p>Chemical structure showing two benzene rings connected by a carbonyl group. Both benzene rings have hydroxyl groups (-OH) at the 3 and 4 positions. The right benzene ring also has a pyridin-2-yl group (-CONH-pyridine) at the meta position.</p>	$C_{19}H_{16}N_3O_3$	334

16		$C_{15}H_{13}BrN_2O_3$	349
----	--	------------------------	-----

### 2.1.3. Χημικά Αντιδραστήρια, Υποστρώματα Ενζύμων & Λοιπά Υλικά

- ✓ Αιθανόλη 99,5%, (Scharlan)
- ✓ Αιθυλενοδιαμινο-τετραοξικό οξύ, (EDTA), (Sigma-U.S.A.)
- ✓ Αλβουμίνη μόσχου (BSA), (SERVA-Electrophoresis GmgH-Germany)
- ✓ Αμπικιλίνη-99,9% (SERVA), (Sigma-U.S.A.)
- ✓ Βακτηριακή τρυπτόνη, (Bacto-tryptone), (Scharlan)
- ✓ Γλουταθειόνη, (GST), (Sigma-USA)
- ✓ Γλυκερόλη-99,5%, (Panreak, Quimica. S.A.)
- ✓ Διμεθυλοσουλφοξύδιο - 99.9%, (DMSO), (Riedel de Haen)
- ✓ Δισόξινο φωσφορικό νάτριο ( $NaH_2PO_4$ ), (Scharlau-Spain)
- ✓ Δωδεκανοθειικό νάτριο, (SDS), (Sigma-USA)
- ✓ Εκχύλισμα ζύμης, (Yeast Extract), (Scharlan)
- ✓ Ιμιδαζόλιο (Imidazole), (Biochemika-Switzerland)
- ✓ Ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτοπυρανοζίδιο, (IPTG), (AppliChem-Germany)
- ✓ Καναμικίνη, (Sigma-U.S.A.)
- ✓ Μεθανόλη (MeOH), (Scharlan)
- ✓ N,N,N',N'-τετραμεθυλενοδιαμίνη, (TEMED), (Sigma-U.S.A.)
- ✓ Οξικό νάτριο ( $CH_3COONa$ ), (Merck-Germany)
- ✓ Οξικό οξύ (Acetic Acid), (Panreac, Quimica. S.A.)
- ✓ Όξινο φωσφορικό κάλιο, ( $KH_2PO_4$ ), (Merck-Germany)
- ✓ Υπερθειικό αμμώνιο, (Ammonium Persulfate-APS), (Sigma-Aldrich-Germany)
- ✓ Χλωραμφενικόλη-99,9% (USB), (AppliChem-Germany)
- ✓ Χλωριούχο νάτριο, (NaCl), (Merck-Germany)
- ✓ Χλωριούχο νικέλιο ( $NiCl_2$ ), (AnalaR-England)



- ✓ Bromophenol blue, (Merc-Germany)
- ✓ Coomassie Brilliant Blue (G-250), (Merck-Germany)
- ✓ Glycine (M.P. Biochemicals, LLC, France)
- ✓ N, N'-Methylene-bis-acrylamide, (Sigma-U.S.A.)
- ✓ Tris HCl (Sigma-U.S.A.)
- ✓ 1-χλώρο-2,4 δινιτροβενζόλιο, (CDNB), (Sigma-Aldrich-Germany)

#### 2.1.4. Υαλικά & Πλαστικά Αναλώσιμα

- ✓ Πλαστικά ακρορύγχια (tips), (Greiner Bio-one)
- ✓ Πλαστικοί σωλήνες των 15ml και 50ml (Falcon)
- ✓ Πλαστικά σωληνάρια erpedorfs των 1,5 και 2ml (Greiner)
- ✓ Μembrάνες διαπίδυσης (Spectrum)
- ✓ Πλαστικές κυβέτες μίας χρήσης (Greiner Bio-one)

#### **2.2. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ**

- Ⓜ Η ζύγιση αντιδραστηρίων και υποστρωμάτων έγινε με χρήση του αναλυτικού ζυγού METTLER AT261 και του φαρμακευτικού ζυγού METTLER PM2500.
- Ⓜ Το pH των διαλυμάτων μετρήθηκε με πεχάμετρο ORION (μοντέλο 410A).
- Ⓜ Η διάρρηξη των κυττάρων έγινε με τη συσκευή υπερήχων Vibra Cell (Sonics & Materials).
- Ⓜ Οι κυτταρικές καλλιέργειες έγιναν σε θερμοστατούμενο επωαστήρα με περιστροφική ανακίνηση της εταιρίας LabTech.
- Ⓜ Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας έγινε σε φασματοφωτόμετρο Lamda-Bio ορατού-υπεριώδους (μονής δέσμης) της εταιρίας Perkin-Elmer.
- Ⓜ Ως υδατόλουτρο χρησιμοποιήθηκε συσκευή της εταιρίας Stuart.
- Ⓜ Η φυγοκέντρηση των μικροβιακών καλλιεργειών πραγματοποιήθηκε με φυγόκεντρο Erpedorf.
- Ⓜ Η αποστείρωση έγινε με αυτόκαυστο της εταιρίας 'Αφοί Αγγελόπουλοι'.
- Ⓜ Μηχανικές πιπέτες (Gibson)

### 2.2.1. Προγράμματα Η/Υ

- UVKinLab (Perkin-Elmer Software)
- GraFit 3.0 (Erithacus Software, Ltd, UK)
- Microsoft Excel

## 2.3. ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.3.1. Ετερόλογη έκφραση

#### **2.3.1.1. Ετερόλογη έκφραση του ισοενζύμου hGSTA1-1 ανθρώπου σε *E. coli* BL21(DE3)**

Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε φιάλες Erlenmeyer που περιείχαν θρεπτικό υλικό μέσο, η σύσταση του οποίου ήταν: 1% πεπτόνη, 1% NaCl και 0,5% εκχύλισμα ζύμης. Σε μικρή κωνική φιάλη προκαλλιέργειας (50 mL) προσθέτουμε αμπικιλίνη (100 μg/mL H<sub>2</sub>O) για την κυτταρική καλλιέργεια *E. coli* με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pETGSTA1-1 καθώς και ίση ποσότητα μετασχηματισμένων κυττάρων. Οι μικρές κωνικές φιάλες τοποθετούνται στον επωαστήρα στους 37° C για 14-16 ώρες υπό συνεχή ανακίνηση στις 250 rpm. Από την καλλιέργεια αυτή μεταφέρονται 500 μL σε erpedorf στο οποίο στη συνέχεια προστίθενται 500 μL διάλυμα γλυκερόλης 50 % v/v. Ακολουθεί καλή ανάμιξη με πολύ αργό ρυθμό, διότι μπορεί να προκληθεί οσμωτικό σοκ στα κύτταρα και έπειτα αποθηκεύονται στους -80° C. Μετά το πέρας, προσθέτω το αντιβιοτικό σε μεγάλη κωνική (500 mL), εμβολιάζω με τη μικρή φιάλη προκαλλιέργειας, και την τοποθετώ στον επωαστήρα στους 37° C. Η έκφραση των γονιδίων επάγεται με προσθήκη ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτοπυρανοσιδίου (IPTG) όταν η οπτική απορρόφηση των καλλιεργειών είναι 0.6 (600 nm) ύστερα από συνεχή ανάδευση και επώαση για 4h. Έπειτα, μεταφέρουμε την καλλιέργεια σε falcons έτσι ώστε να συλλέξουμε την πάστα μετά από φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm, στους 4° C για 20 min.

### **2.3.1.2. Ετερόλογη έκφραση των ισοενζύμων hGSTP1A, hGSTP1B και hGSTP1C ανθρώπου σε *E. coli* BL21(DE3)**

Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε φιάλες Erlenmeyer που περιείχαν θρεπτικό υλικό μέσο, η σύσταση του οποίου ήταν: 1% πεπτόνη, 1% NaCl και 0,5% εκχύλισμα ζύμης. Σε μικρή κωνική φιάλη προκαλλιέργειας (50 mL) προσθέτουμε αμπικιλίνη, 100 µg/mL H<sub>2</sub>O, για την κυτταρική καλλιέργεια *E. coli* με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pT7hGSTP1\*A και χλωραμφαινικόλη, 34 µg/mL, για τις κυτταρικές καλλιέργειες *E. coli* με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pOX04-hGSTP1\*B και pOX04-hGSTP1\*C καθώς και ίση ποσότητα μετασχηματισμένων κυττάρων. Οι μικρές κωνικές φιάλες τοποθετούνται στον επωαστήρα στους 37°C για 14-16 h υπό συνεχή ανάδευση στις 250 rpm. Από την καλλιέργεια αυτή μεταφέρονται 500 µL σε erpedorf στο οποίο στη συνέχεια προστίθενται 500 µL διάλυμα γλυκερόλης 50 % v/v. Ακολουθεί καλή ανάμιξη με πολύ αργό ρυθμό, διότι μπορεί να προκληθεί οσμωτικό σοκ στα κύτταρα και έπειτα αποθηκεύονται στους -80°C. Μετά το πέρας, προσθέτω το αντίστοιχο αντιβιοτικό στη μεγάλη κωνική (500 mL), εμβολιάζω με τη μικρή φιάλη προκαλλιέργειας και την τοποθετώ στον επωαστήρα, στους 37°C. Η έκφραση των γονιδίων επάγεται με προσθήκη ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτοπυρανοσιδίου (IPTG) όταν η οπτική απορρόφηση των καλλιεργειών είναι 0.6 (600 nm) ύστερα από συνεχή ανάδευση και επώαση για 4h. Έπειτα, μεταφέρουμε την καλλιέργεια σε falcons έτσι ώστε να συλλέξουμε την πάστα μετά από φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm, στους 4°C για 20 min.

### **2.3.1.3. Ετερόλογη έκφραση των ισοενζύμων hGSTO1-1 και hGSTT2-2 ανθρώπου σε *E. coli* BL21(DE3)**

Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε φιάλες Erlenmeyer που περιείχαν θρεπτικό υλικό μέσο, η σύσταση του οποίου ήταν : 1% πεπτόνη, 1% NaCl και 0,5% εκχύλισμα ζύμης. Σε μικρή κωνική φιάλη προκαλλιέργειας (50ml) προσθέτουμε αμπικιλίνη, 100 µg/mL H<sub>2</sub>O και καναμυκίνη, 25 µg/mL, για την κυτταρική καλλιέργεια *E. coli* με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pQE30hGST O1-1 και pQE30hGST T2-2 καθώς και ίση ποσότητα μετασχηματισμένων κυττάρων. Οι μικρές κωνικές τοποθετούνται στον

επωαστήρα στους 37°C για 14-16h υπό συνεχή ανάδευση στις 250 rpm. Από την καλλιέργεια αυτή μεταφέρονται 500 µL σε erpedorf στο οποίο στη συνέχεια προστίθενται 500 µL διάλυμα γλυκερόλης 50 % v/v. Ακολουθεί καλή ανάμιξη με πολύ αργό ρυθμό, διότι μπορεί να προκληθεί οσμωτικό σοκ στα κύτταρα και έπειτα αποθηκεύονται στους -80°C. Μετά το πέρας, προσθέτω τα αντιβιοτικά στη μεγάλη κωνική (500 mL), εμβολιάζω με τη μικρή φιάλη προκαλλιέργειας και την τοποθετώ στον επωαστήρα, στους 37°C. Η έκφραση των γονιδίων επάγεται με προσθήκη ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτοπυρανοσιδίου (IPTG) όταν η οπτική απορρόφηση των καλλιεργείων είναι 0.6 (600 nm) ύστερα από συνεχή ανάδευση και επώαση για 4h. Έπειτα, μεταφέρουμε την καλλιέργεια σε falcons έτσι ώστε να συλλέξουμε την πάστα μετά από φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm, στους 4°C για 20 min.

### 2.3.2. Φασματοσκοπική δοκιμή ενζυμικής δραστηριότητας τρανσφεράσης γλουταθειόνης (GST)

Η μέτρηση της δραστηριότητας της GST βασίζεται στον προσδιορισμό της ταχύτητας σχηματισμού του ομοιοπολικού συμπλόκου GS-CDNB. Η αντίδραση παρακολουθείται φωτομετρικά και υπολογίζεται η αύξηση της απορρόφησης στα 340 nm, οφειλόμενη στο σχηματισμό του συμπλόκου GS-CDNB.



Σε μια τυπική δοκιμή ενζυμικής δραστηριότητας, απουσία αναστολέα, χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα (stock) :

- i. Ρυθμιστικό διάλυμα:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 M, pH = 6.5.
- ii. Γλουταθειόνη (GST): 75 mM σε δις απεσταγμένο νερό.
- iii. 1-χλώρο-2,4 δινιτροβενζόλιο (CDNB): 30 mM σε αιθανόλη
- iv. Ένζυμο: αραιωμένο ή μη, ανάλογα με τις μονάδες του κάθε ενζυμικού παρασκευάσματος.

Χρησιμοποιούνται κυψελίδες μάρτυρες και δείγματος. Αρχικά, στις κυψελίδες προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα. Έπειτα, προσθέτουμε το CDNB, τη GSH (ανακινούμε) και τέλος την κατάλληλη ποσότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος.

Αναλυτικότερα, οι όγκοι για μια τυπική φασματοσκοπική δοκιμή ενζυμικής δραστηριότητας έχουν ως εξής:

	<b>Μάρτυρας ( <math>\mu\text{L}</math> )</b>	<b>Δείγμα ( <math>\mu\text{L}</math> )</b>
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα</b>	<b>934</b>	<b>924 ή 884 (*)</b>
<b>CDNB</b>	<b>33</b>	<b>33</b>
<b>GSH</b>	<b>33</b>	<b>33</b>
<b>Ένζυμο</b>	<b>-</b>	<b>10 ή 50 (**)</b>
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>

(\*) 924  $\mu\text{L}$  όταν χρησιμοποιούμε 10  $\mu\text{L}$  ενζύμου και 884  $\mu\text{L}$  όταν χρησιμοποιούμε 50  $\mu\text{L}$  ενζύμου.

(\*\*) 10  $\mu\text{L}$  από αραιώση 1:20 σε ρυθμιστικό διάλυμα για το ισοένζυμο hGSTA1-1, και 50  $\mu\text{L}$  για τα ισοένζυμα hGSTP1\*A, hGSTP1\*B, hGSTP1\*C, hGSTO1-1 και hGSTT2-2.

### 2.3.3. Υπολογισμός μονάδων ενζυμικής δραστηριότητας της GST

Μονάδα μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας ορίζεται η ‘ενζυμική μονάδα’ (enzyme unit, U) που ισούται με την ποσότητα ενζύμου που μετατρέπει 1  $\mu\text{mol}$  υποστρώματος ή παράγει 1  $\mu\text{mol}$  προϊόντος ανά λεπτό, στους 25°C σε pH = 6.5. Συγκεκριμένα, κατά τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης καταγράφεται η μεταβολή της οπτικής απορρόφησης ( $\Delta A$ ) σε στοιχειώδη χρόνο ( $\Delta t$ ). Αρχικά, λαμβάνεται ευθεία η οποία όμως, κατά την εξέλιξη της αντίδρασης καμπυλώνει. Η κλίση της εφαπτομένης σε κάθε σημείο της καμπύλης ορίζεται ως η ταχύτητα της αντίδρασης.

Ο υπολογισμός των ενζυμικών μονάδων γίνεται χρησιμοποιώντας την τιμή της αρχικής ταχύτητας ( $u_0$ ), δηλαδή την κλίση του γραμμικού τμήματος, που αντιστοιχεί στη μέγιστη τιμή. Για να υπολογίσουμε τα U/mL δείγματος χρησιμοποιούμε τον τύπο:

$$U/mL \text{ δείγματος} = (\Delta A / \Delta t) (V_{\text{συνολ}} / V_{\text{δειγ}}) (1/\epsilon) (1/d) \text{ αραιωση}$$

όπου :

$\Delta A / \Delta t$  = καθαρή μεταβολή απορρόφησης στα 340 nm (1/min)

$V_{\text{συνολ}}$  = συνολικός όγκος αντίδρασης (όγκος κυψελίδας, mL)

$V_{\text{δειγ}}$  = όγκος του δείγματος ενζύμου στην αντίδραση (mL)

$d$  = μήκος οπτικής διαδρομής φωτός μέσα από το δείγμα (1 cm)

$\epsilon$  = συντελεστής απόσβεσης (για το CDNB = 9600 L/mol/cm ή 1/M/cm)

Συνεπώς, διαιρώντας την τιμή του λόγου 'ΔA/min' με το 9.6 λαμβάνω την ταχύτητα αντίδρασης σε μονάδες μmol/mL/min.

#### 2.3.4. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη Μέθοδο Bradford ( Bradford 1976)

Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συνολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε διάφορα δείγματα. Βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να αλλάζει χρώμα όταν αυτή αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον. Η ελεύθερη χρωστική έχει χρώμα καστανό και απορροφά στα 465 nm, ενώ το σύμπλοκο είναι γαλάζιο και απορροφά στα 595 nm. Η μέθοδος είναι αξιόπιστη για πρωτεϊνικά δείγματα των οποίων η συγκέντρωση κυμαίνεται από 0,02 mg/ml έως 0,20 mg/mL (20-200 μg/mL).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης βασίζεται στη σχέση:

$$C = \frac{A}{\epsilon l} * \frac{V_{\text{τελ}}}{V_{\text{δειγ}}} * \text{αραιωση}$$

$A$  : απορρόφηση διαλύματος

$\epsilon$  : συντελεστής απόσβεσης (απορρόφησης) (mL mg<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)

$l$  : οπτική διαδρομή (πλάτος κυβέτας) (cm)

$c$  : συγκέντρωση πρωτεΐνης (mg / mL)

$V_{\text{τελ}}$  : 50 mL (πάντα)

$V_{\text{δειγ}}$  : ποσότητα δείγματος που προστέθηκε (μL)

Αρχικά κατασκευάζουμε μια πρότυπη καμπύλη, χρησιμοποιώντας την πρωτεΐνη αλβουμίνη μόσχου, από την οποία υπολογίζεται η συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος με βάση την απορρόφηση του.

Αναλυτικά η διαδικασία έχει ως εξής : η χρωστική (100 mg) διαλύεται σε 100 mL υδατικού διαλύματος μεθανόλης (50% v/v). Στο διάλυμα αυτό προστίθενται 100 mL πυκνού φωσφορικού οξέος (85% w/v). Όλα τα υλικά προστίθενται εντός σκοτεινού δοχείου και αυτό αποτελεί το πυκνό αντιδραστήριο Bradford.

Για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης το παραπάνω αντιδραστήριο αραιώνεται με νερό σε αναλογία  $\frac{1}{4}$  και το διάλυμα που προκύπτει διατηρείται σε σκοτεινό δοχείο και σε θερμοκρασία 25°C. Για να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης, προσθέτουμε 50 μL πρωτεΐνης κατάλληλης συγκέντρωσης σε 950 μL αραιωμένου αντιδραστηρίου Bradford, ώστε η τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης στην κυβελίδα να είναι 2 - 10 μg. Το μείγμα επώαζεται σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) για 20 λεπτά στο σκοτάδι και έπειτα λαμβάνεται η απορρόφηση στα 595 nm έχοντας ως μάρτυρα αναφοράς (control) διάλυμα που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από την πρωτεΐνη.

Τέλος, για να γίνει ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών είναι απαραίτητος ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης « $\epsilon$ », ο οποίος και υπολογίζεται από την κλίση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται έχοντας σαν πρότυπο γνωστές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης αλβουμίνης από ορό μόσχου (BSA). Η συγκέντρωση ανάγεται σε συγκέντρωση πρωτεΐνης με βάση την καμπύλη αναφοράς.

Ακολούθησε διαπίδυση (βλέπε επόμενη παράγραφο) σε διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου (20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH=7) για 24 ώρες και επαναπροσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας των ενζύμων.

### 2.3.5. Υπολογισμός της ειδικής δραστηριότητας (SA)

Η ειδική δραστηριότητα (SA) μας δείχνει πόσα mg πρωτεΐνης έχουμε σε κάθε ml ενζυμικού παρασκευάσματος.

Δίνεται από τον παρακάτω τύπο, στον οποίο τα μεγέθη προφανώς αναφέρονται στον ίδιο όγκο παρασκευάσματος:

$$\text{SA} = \frac{\text{Units ενζύμου}}{\text{mg πρωτεΐνης}}$$

### 2.3.6. Διαπίδυση (dialysis)

Τα ενζυμικά εκχυλίσματα μετά την έκφραση και πριν τον καθαρισμό τους (βλέπε κατωτέρω) υποβάλλονται σε 'διαπίδυση', συνήθως έναντι 2,5 - 5 λίτρων (αναλόγως πόσα mL είναι το ακατέργαστο εκχύλισμα/crude) ρυθμιστικού διαλύματος  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM, pH = 7, με σκοπό να αποκτήσουν την ίδια σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος με αυτό της διαπίδυσης. Για τη μέθοδο χρησιμοποιείται μεμβράνη διαπίδυσης από κυτταρίνη (Sigma-Aldrich), η οποία είναι ημιπερατή και επιτρέπει στον διαλύτη και σε μικρά ιόντα να εξισορροπηθούν, αλλά δεν διαπερνάται από τα μόρια της πρωτεΐνης. Η ιοντική ισχύς και το pH του πρωτεϊνικού διαλύματος που περιέχεται μέσα στη μεμβράνη ρυθμίζεται με εξισορρόπηση έναντι του διαλύματος εκτός. Η διαδικασία αυτή διαρκεί σχεδόν μία ημέρα (24 ώρες) και λαμβάνει χώρα στους 4°C. Κατά αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η απομάκρυνση όλων των ενώσεων με μικρό μοριακό βάρος (<12 kDa).

### 2.3.7. Καθαρισμός των ισοενζύμων

#### **2.3.7.1. Καθαρισμός των ισοενζύμων hGSTA1-1, hGSTP1A, hGSTP1B, hGSTP1C με χρωματογραφία συγγενείας σε προσροφητή BES-GSH**

Επαναιωρούμε τα κύτταρα της κυτταρικής 'πάστας' σε τριπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM, pH = 7) και



θραύουμε τα κύτταρα με χρήση συσκευής υπερήχων έχοντας εμβαπτισμένο το κυτταρικό αιώρημα σε παγόλουτρο. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα με το γονίδιο της hGSTA1-1 χρειάστηκαν τέσσερις έως πέντε επαναλήψεις των 10 sec καθεμία (~8 sec) για τη θραύση (λύση) των κυττάρων, ενώ όλα τα υπόλοιπα (hGSTP1\*A, hGSTP1\*B, hGSTP1\*C, hGSTO1-1 και hGSTT2-2) χρειάστηκαν τρεις επαναλήψεις των 10 sec εκάστη. Φυγοκεντρούμε το τελικό αιώρημα στις 13.000 rpm για 5 min και συλλέγουμε το υπερκείμενο διάλυμα. Στη συνέχεια προσδιορίζουμε φωτομετρικά την ενζυμική δραστηριότητα στα υπερκείμενα χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα τα GSH και CDNB, ως επίσης και τη συνολική πρωτεΐνη (μέθοδος του Bradford).

Ο καθαρισμός των ισοενζύμων πραγματοποιείται σε στήλη χρωματογραφίας συγγένειας με προσροφητή 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρα-GSH-Sepharose-CL6B (BES-GSH), 2 mL. Γίνεται πλύσιμο και εξισορρόπηση της χρωματογραφικής στήλης με 10 mL H<sub>2</sub>O και 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM, pH = 7). Φορτώνουμε το δείγμα (5 mL) στη χρωματογραφία στήλη συγγένειας. Εκπλένουμε τη στήλη με 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM, pH = 7) ώστε να απομακρυνθούν τα αδέσμευτα μόρια. Εκλούουμε το ένζυμο (σε 10 κλάσματα των 2 mL) με διάλυμα 10 mM GSH σε ρυθμιστικό φωσφορικών (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM, pH = 7). Αναγεννούμε τη στήλη, σε πρώτο στάδιο, με 10 ml διάλυμα Tris-HCl 0.1M & NaCl 1M, και σε δεύτερο στάδιο, με CH<sub>3</sub>COONa 0,1 M, και τέλος, με δις απεσταγμένο νερό. Τα ενζυμικά κλάσματα συλλέγονται και υπόκεινται σε φασματοσκοπικό προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας καθώς και σε προσδιορισμό της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Τα κλάσματα με δραστηριότητα ενώνονται και το παρασκεύασμα αραιώνεται με ίσο όγκο γλυκερόλης (τελική συγκέντρωση γλυκερόλης 50% v/v) και ακολουθώς το διατηρούμε στους -20°C για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η καθαρότητα των εκλούσεων και τα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης εκτιμήθηκαν ηλεκτροφορητικά σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (12,5 % SDS-PAGE) υπό συνθήκες μετουσίωσης. Στο κεφάλαιο 3 περιγράφεται αναλυτικά η χρωματογραφία συγγένειας.

### **2.3.7.2. Καθαρισμός των ισοενζύμων hGSTT2-2 ΚΑΙ hGSTO1-1 με χρωματογραφία συγγενείας σε προσροφητή Ni-NTA-Αγαρόζης**

Επαναιωρούμε τα κύτταρα της κυτταρικής ‘πάστας’ σε τριπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος όξινου φωσφορικού νατρίου NaHPO<sub>4</sub> συγκέντρωσης 50 mM, pH = 8 και 0.3 M NaCl και τα θραύουμε σε συσκευή υπερήχων (4 επαναλήψεις των 10 sec). Φυγοκεντρούμε το τελικό αιώρημα στις 13.000 rpm για 5 min με σκοπό τη συλλογή του υπερκείμενου διαλύματος. Στη συνέχεια προσδιορίζουμε φωτομετρικά την ενζυμική δραστηριότητα των υπερκείμενων χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα GSH& CDNB, καθώς και τη συνολική πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford. Ακολούθησε διαπίδυση σε διάλυμα όξινου φωσφορικού νατρίου (50 mM NaHPO<sub>4</sub>, pH=8 και 0.3 M NaCl) για 20 ώρες και επαναπροσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας των ενζύμων.

Ακολούθησε καθαρισμός των ενζύμων με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας με προσροφητή ιμινοδιοξικού οξέος (Ni-NTA-Sepharose) (1 mL, Sigma-Aldrich, USA), 2 mL. Πλύσιμο και εξισορρόπηση της χρωματογραφικής στήλης συγγένειας με 5 mL NiCl<sub>2</sub>, με 10 mL δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O και 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης (50 mM NaHPO<sub>4</sub>, 0.3 M NaCl και 10 mM imidazole, pH=8, Lysis Buffer). Φορτώνουμε το δείγμα (6 mL) στη χρωματογραφία στήλη συγγένειας. Εκπλένουμε τη μη προσροφημένη πρωτεΐνη με 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης και 10 mL διαλύματος έκπλυσης (50 mM NaHPO<sub>4</sub>, 0.3 M NaCl, Ph=8 - Wash Buffer) ώστε να απομακρυνθούν τα αδέσμευτα μόρια. Οι εκλούσεις των ενζύμων hGSTT2-2 και hGSTO1-1 έγιναν σε τέσσερα κλάσματα με ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης (lysis buffer) και διαφορετικές συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου (20 mM, 100 mM, 250 mM και 300 mM). Αναγεννούμε τη στήλη , σε πρώτο στάδιο, με 5 mL 0.1 M EDTA και σε δεύτερο στάδιο με 10 mL δις απεσταγμένο νερό. Τα ενζυμικά κλάσματα συλλέγονται και υπόκεινται σε φασματοσκοπικό προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας καθώς και στη μέθοδο Bradford. Τα κλάσματα με δραστηριότητα ενώνονται και το παρασκεύασμα αραιώνεται με ίσο όγκο γλυκερόλης (50% <sup>v/v</sup> τελική συγκέντρωση γλυκερόλης) και ακολούθως τα διατηρούμε στους - 20°C για

μεγάλο χρονικό διάστημα. Η καθαρότητα των προϊόντων έκλουσης και τα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης εκτιμήθηκαν ηλεκτροφορητικά σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (12,5 % SDS-PAGE) υπό από συνθήκες μετουσίωσης. Στο κεφάλαιο 3 περιγράφεται αναλυτικά η χρωματογραφία συγγένειας με μεταλλοχηλικό προσροφητή.

#### 2.3.8. Υπολογισμός απόδοσης καθαρισμού

Δίνονται από τον παρακάτω τύπο (x100) :

$$\frac{\text{Units που ανακτήθηκαν μετά τον καθαρισμό}}{\text{Units που υπήρξαν πριν τον καθαρισμό}}$$

#### 2.3.9 Λυοφιλίωση

Κατά τη διάρκεια του πειράματος έτυχε να έχουμε πολύ αραιά δείγματα πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα η συγκέντρωσή της να είναι πολύ μικρότερη από την απαιτούμενη για να τα ηλεκτροφορήσουμε. Έτσι, εφαρμόζοντας την τεχνική της λυοφιλίωσης, μειώνουμε τον όγκο των δειγμάτων με εξάχνωση, ώστε να συμπυκνώσουμε το διάλυμα με την πρωτεΐνη. Τα δείγματα ετοιμάζονται σε erpendorf, στα οποία έχουν ανοιχτεί μικρές τρύπες στο επάνω μέρος. Στην συνέχεια τοποθετούνται σε σφαιρική φιάλη ('φλάσκα') στη συσκευή λυοφιλίωσης, η οποία ψύχεται μεταξύ -50°C και -80°C. Μετά από εφαρμογή χαμηλής πίεσης για 24h, παραλαμβάνονται τα δείγματα σε στερεή μορφή στην βάση των erpendorfs και τέλος τα επαναδιαλύουμε στον επιθυμητό όγκο.

### 2.3.10. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS-PAGE)

Για την ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου. Η ομοιόμορφη δέσμευση του φορτισμένου απορρυπαντικού SDS στις πρωτεΐνες τις κάνει να αποκτήσουν σταθερό αρνητικό φορτίο με αποτέλεσμα παρουσία ηλεκτρικού πεδίου η κινητικότητά τους να εξαρτάται μόνο από το μοριακό τους βάρος. Η ταχύτητα μετακίνησης των πρωτεϊνών εξαρτάται από το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος, το οποίο ρυθμίζεται με τη μεταβολή της περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο. Η ηλεκτροφόρηση στο συγκεκριμένο πείραμα έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1979) σε ασυνεχές σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων που αποτελούνται από:

- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων (running buffer) : Tris (0.025 M) - γλυκίνη (0.192 M), SDS (0.1% <sup>w/v</sup>), pH = 8.3.
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (separating buffer): Tris-HCl (3 M), pH = 8.8.
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης (stacking buffer): Tris-HCl (0.5 M), pH = 6.8.
- Διάλυμα ακρυλαμιδίου : ακρυλαμίδιο (30 g, 0.42 mol) και N,N'-μεθυλενο-bis-ακρυλαμίδιο (0.8 g, 5.2 mol) διαλυμένα σε 100 mL νερού.
- Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων : Tris-HCl (0.125 M), pH = 6.8 , SDS (4% <sup>w/v</sup>), γλυκερόλη (20 % <sup>v/v</sup>) και β-μερκαπτοαιθανόλη (10 % <sup>v/v</sup>).
- Διάλυμα SDS (10 % <sup>w/v</sup>).
- Διάλυμα υπερθειϊκού αμμωνίου (0.1 % <sup>w/v</sup>).

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε πηκτή διαχωρισμού (separating buffer) και επιστοίβαξης (stacking buffer) με περιεκτικότητα ακρυλαμιδίου 30%.

### **2.3.10.1. Παρασκευή πηκτής επιστοιίβαξης και πηκτής διαχωρισμού.**

Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (875  $\mu\text{L}$ ) αναμειγνύεται με διάλυμα SDS (70  $\mu\text{L}$ ) και διάλυμα ακρυλαμιδίου (2.935  $\mu\text{L}$ ). Το μείγμα αραιώνεται με προσθήκη νερού (2.935  $\mu\text{L}$ ) και στη συνέχεια προσθέτουμε υπερθειϊκό αμμώνιο (APS) (170  $\mu\text{L}$ ). Στο τέλος, προσθέτουμε TEMED (6.24  $\mu\text{L}$ ). Αφού ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός (30 min) ξεπλύνουμε την επιφάνεια της πηκτής με νερό και εισάγουμε την πηκτική επιστοιίβαξης, η οποία παρασκευάζεται ως εξής: διάλυμα πηκτής επιστοιίβαξης (625  $\mu\text{L}$ ) αναμειγνύεται με διάλυμα SDS (50 $\mu\text{L}$ ) και διάλυμα ακρυλαμιδίου (625  $\mu\text{L}$ ). Το μείγμα αραιώνεται με προσθήκη νερού(3.450  $\mu\text{L}$ ). Έπειτα προσθέτουμε υπερθειϊκό αμμώνιο (APS) (250  $\mu\text{L}$ ) και τέλος TEMED (6,25  $\mu\text{L}$ ). Πριν ξεκινήσει ο πολυμερισμός, στην κορυφή της πηκτής εισάγεται κατάλληλος υποδοχέας (χτένα) ώστε να δημιουργηθούν οι θέσεις εισαγωγής των δειγμάτων. Ο πολυμερισμός ολοκληρώνεται σε 20-30 min.

### **2.3.10.2. Προετοιμασία δείγματος και ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης.**

Κατάλληλος όγκος πρωτεϊνικού διαλύματος διαλύεται σε νερό (10  $\mu\text{L}$ ) και χρωστική (10  $\mu\text{L}$ ). Θερμαίνονται στους 95°C για 5 min ώστε να αποδιαταχθούν και ακολούθως το πρωτεϊνικό δείγμα εισάγεται στα κανάλια της πηκτής. Η παρουσία της διθειοθρεϊτόλης (DTT) και της μερκαπτοαιθανόλης στο διάλυμα του δείγματος προκαλεί την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών της πρωτεΐνης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε σταθερή ένταση 25 mA και υπό σταθερή τάση 200 Volts για περίπου δύο ώρες.

### **2.3.10.3. Βαφή με τη χρωστική COOMASSIE BLUE R-250**

Μετά την ηλεκτροφόρηση, η πηκτική εμβαπτίζεται σε υδατικό διάλυμα που περιέχει μεθανόλη (40%  $\text{v/v}$ ), οξικό οξύ (7%  $\text{v/v}$ ) και Coomassie Blue R-250 (0.025-1%  $\text{w/v}$ ) όπου και επωάζεται για περίπου 30 min. Έπειτα αποχρωματίζεται σε δύο υδατικά διαλύματα που περιέχουν, αντίστοιχα, (α) μεθανόλη (40%  $\text{v/v}$ ) & οξικό οξύ (7%  $\text{v/v}$ ) και (β) μεθανόλη (5 %  $\text{v/v}$ ), οξικό οξύ (7%  $\text{v/v}$ ).

### 2.3.11. Σάρωση των δύο βιβλιοθηκών συνθετικών ενώσεων ως πιθανών αναστολέων GSTs

#### **2.3.11.1. Σάρωση (screening) ουριών και βενζοδιαζεπινών ως πιθανών αναστολέων έναντι των ισοενζύμων hGSTA1-1, hGSTP1\*A, hGSTP1\*B, hGSTP1\*C, hGSTT2-2, hGSTO1-1 και του Schistosoma**

Για τον έλεγχο των ενώσεων του Πίνακα 2.1 (αναλόγων ουριών και βενζοδιαζεπινών) ως δυνητικών αναστολέων των ισοενζύμων hGSTA1-1, hGSTP1A, hGSTP1B, hGSTP1C, hGSTT2-2, hGSTO1-1 και του Schistosoma πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί της δραστηριότητας του ενζύμου με τη μέθοδο που περιγράφεται στην 2.3.2 & 2.3.3.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής (stock): ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) 0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH = 6.5, γλουταθειόνη (GSH) 100 mM, 1-χλωρο-2,4 δινιτροβενζόλιο (CDNB) 15 mM, διάλυμα ενζύμου (hGSTA1-1 ή hGSTP1A ή hGSTP1B ή hGSTP1C ή hGSTT2-2 ή hGSTO1-1) σε buffer και ‘αναστολέας’ (25  $\mu\text{M}$  σε DMSO). Χρησιμοποιούνται κυψελίδες για μάρτυρες και δείγματα. Στις κυψελίδες προστίθενται, εν σειρά, ρυθμιστικό διάλυμα, διάλυμα CDNB, διάλυμα ‘αναστολέα’, ανακινούνται, και ακολούθως δείγμα με ένζυμο, ανακινούνται, και εν τέλει η αντίδραση αρχίζει με προσθήκη διαλύματος γλουταθειόνης. Όλα τα διαλύματα των ‘αναστολέων’ είναι σε 100% DMSO και αρχική συγκέντρωση 5 mM (stock). Η τελική συγκέντρωση του DMSO στην κυψελίδα είναι σταθερή και ίση με 0,5% του τελικού όγκου της δοκιμής. Όλοι οι ‘αναστολείς’ ελέχθησαν στην ίδια τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα δοκιμής, ίση με 25  $\mu\text{M}$ . Στις κυψελίδες-μάρτυρες, αντί ‘αναστολέα’ προστίθεται ίσος όγκος DMSO. Η συγκέντρωση των υποστρωμάτων CDNB και GSH ήταν επίσης σταθερή και ίση με 0,30 mM και 0,75 mM αντίστοιχα (αντιστοιχούν σε όγκο 20  $\mu\text{L}$  για κάθε υπόστρωμα). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης (στην κυψελίδα) ισούται πάντα με 1mL. Ο όγκος του ενζυμικού δείγματος είναι σταθερός και ισούται με 20  $\mu\text{L}$  (~ 0.014 Units) για την υψηλή συγκέντρωση του hGSTA1-1 (με rate 0.1337) και 5  $\mu\text{L}$  (~ 0.0034 Units) για την χαμηλή συγκέντρωση του hGSTA1-1 (με rate

0.0326), 100  $\mu\text{L}$  (~ 0.0046 Units) για το hGSTP1A (με rate 0.0443), με 7  $\mu\text{L}$  (~ 0.0051 Units) για το hGSTP1B (με rate 0.0489), 6  $\mu\text{L}$  (~ 0.0055 Units) για το hGSTP1C (με rate 0.0529), 130  $\mu\text{L}$  (~ 0.0048 Units) για το hGSTT2-2 (με rate 0.0461), 60  $\mu\text{L}$  (~ 0.0044 Units) για το hGSTO1-1 (με rate 0.0424) και 178  $\mu\text{L}$  (~ 0.022 Units) για το Schistosoma (με rate 0.2105). Έγιναν μετρήσεις της μεταβολής της οπτικής απορρόφησης για όλες τις ενώσεις και δοκιμή χωρίς αναστολέα αλλά με DMSO.

Όλα τα αποτελέσματα (κεφάλαιο 3) προέκυψαν έπειτα από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις. Οι μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο μονής δέσμης, στα 340 nm, ανά 1s και για συνολικό χρόνο 1 min, με τη χρήση του προγράμματος UVKinLab.

#### **2.3.11.2. Σάρωση (screening) 2,2'-διυδροξυβενζοφαινονών και N-καρβονυλικών παραγώγων τους ως πιθανών αναστολέων έναντι των ισοενζύμων hGSTP1\*A, hGSTP1\*B, hGSTP1\*C**

Για τον έλεγχο των ενώσεων του Πίνακα 2.2 (κετονών, κετοξιμών και N-ακυλο-υδραζόνων) ως δυνητικών αναστολέων των ισοενζύμων hGSTP1A, hGSTP1B και hGSTP1C, πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί της δραστηριότητας του ενζύμου με τη μέθοδο που περιγράφεται στην 2.3.2 & 2.3.3.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής (stock): ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) 0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH = 6.5, γλουταθειόνη (GSH) 125 mM, 1-χλωρο-2,4 δινιτροβενζόλιο (CDNB) 50 mM, διάλυμα ενζύμου (hGSTP1A ή hGSTP1B ή hGSTP1C) σε buffer και 'αναστολέας' (0,1 mM). Χρησιμοποιούνται κυψελίδες για μάρτυρες και δείγματα. Στις κυψελίδες προστίθενται, εν σειρά, ρυθμιστικό διάλυμα, διάλυμα CDNB, διάλυμα 'αναστολέα', ανακινούνται, και ακολούθως δείγμα με ένζυμο, ανακινούνται, και εν τέλει η αντίδραση αρχίζει με προσθήκη διαλύματος γλουταθειόνης. Όλα τα διαλύματα των 'αναστολέων' είναι σε 100% DMSO και αρχική συγκέντρωση 5mM (stock). Η τελική συγκέντρωση του DMSO στην κυψελίδα

είναι σταθερή και ίση με 2% του τελικού όγκου της δοκιμής. Όλοι οι ‘αναστολείς’ ελέχθησαν στην ίδια τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα δοκιμής, ίση με 100 μΜ. Στις κυψελίδες-μάρτυρες, αντί ‘αναστολέα’ προστίθεται ίσος όγκος DMSO. Η συγκέντρωση των υποστρωμάτων CDNB και GSH ήταν επίσης σταθερή και ίση με 1 mM και 2,5 mM αντίστοιχα (αντιστοιχούν σε όγκο 20 μL για κάθε υπόστρωμα). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης (στην κυψελίδα) ισούται πάντα με 1mL. Ο όγκος του ενζυμικού δείγματος είναι σταθερός και ισούται με 80 μL (~ 0.0039 Units) για το hGSTP1A (με rate 0.03705 ), με 50 μL (~ 0.0051 Units) για το hGSTP1B (με rate 0.0491) και 35 μL από αραιώση 1:10 (~ 0.0052 Units) για το hGSTP1C (με rate 0.0502). Έγιναν μετρήσεις της μεταβολής της οπτικής απορρόφησης για όλες τις ενώσεις και δοκιμή χωρίς αναστολέα αλλά με DMSO.

Όλα τα αποτελέσματα (κεφάλαιο 3) προέκυψαν έπειτα από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις. Οι μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο μονής δέσμης, στα 340 nm, ανά 1s και για συνολικό χρόνο 1 min, με τη χρήση του προγράμματος UVKinLab.

### 2.3.12. Υπολογισμοί παραμένουσας ενζυμικής δραστηριότητας (RA) και ενζυμικής αναστολής (EI)

Το ‘rate’ ( $\Delta A/\Delta t$ ) που παρατηρήθηκε με κάθε ένωση χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της αντίστοιχης ‘παραμένουσας ενζυμικής δραστηριότητας’ (% *Remaining Activity*, RA) και, εξ’ αυτής, της ‘ενζυμικής αναστολής’ (% *Enzyme Inhibition*, EI). Το ‘rate’ απουσία ‘αναστολέα’ ( $\Delta A/\Delta t$ )<sub>0</sub> θεωρήθηκε ως 100% RA και 0% EI. Οι τιμές RA & EI υπολογίσθηκαν ως εξής :

$$RA (\%) = \{(\Delta A/\Delta t)_i / (\Delta A/\Delta t)_0\} 100$$

$$EI (\%) = 100\% - RA (\%)$$



**2.3.13. Φασματοσκοπική δοκιμή ενζυμικής δραστηριότητας τρανσφεράσης γλουτεθειόνης (GST) παρουσία ουριών και βενζοδιαζεπινών (Πίνακας 2.1) συναρτήσει του χρόνου.**

Πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί ενζυμικής δραστηριότητας παρουσία ουριών και βενζοδιαζεπινών όπως απαντούν στον Πίνακα 2.1., και σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.2 & 2.3.3 με σταθερές τις συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων (όπως αναφέρονται ανωτέρω). Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για κάθε αναστολέα χωριστά σε τακτά χρονικά διαστήματα, με συνολικό πειραματικό χρόνο τις εξήντα (60) ημέρες. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ανά μέρα, κατόπιν ανά δύο μέρες, τρεις, τέσσερις και τέλος ανά έξι ημέρες.

**2.3.14. Υπολογισμός συγκέντρωσης αναστολέα κατά την οποία επέρχεται 50% αναστολή στο ένζυμο (τιμή IC<sub>50</sub>).**

Για τον υπολογισμό του IC<sub>50</sub> (half maximal inhibitory concentration) πραγματοποιήθηκαν δοκιμές (enzyme assays) στις ίδιες συνθήκες που περιγράφονται στην παράγραφο 2.3.2 & 2.3.3 με σταθερές τις συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων (όπως αναφέρονται ανωτέρω), εκτός του μεταβαλλόμενου αναστολέα. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση του επιλεγέντος αναστολέα χωριστά. Οι μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο μονής δέσμης, στα 340 nm, ανά 1s και για συνολικό χρόνο 1 min, με τη χρήση του προγράμματος UVKinLab.

Όλα τα αποτελέσματα (κεφάλαιο 3) προέκυψαν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις και επεξεργάστηκαν από το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraFit 3.0.

**2.3.15. Κινητική μελέτη αναστολής της τρανσφεράσης γλουταθειόνης ανθρώπου (hGSTP1A, hGSTP1B, hGSTP1C) από τις ενώσεις που επιλέγησαν κατόπιν σάρωσης των 2,2'-διυδροξυβενζοφαινονών και N-καρβονυλικών παραγώγων τους (Πίνακας 2.2)**

Ο σχεδιασμός όλων των γραφημάτων της κινητικής αυτής μελέτης αλλά και όλων των κινητικών παραμέτρων και σταθερών πραγματοποιήθηκε σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraFit 3.0. Δεδομένου ότι, η αντίδραση που καταλύουν οι τρανσφεράσες γλουταθειόνης απαιτεί την παρουσία δύο υποστρωμάτων, η κινητική μελέτη αναστολής για κάθε ένα από τα υπό μελέτη παράγωγα απαιτεί τη διεξαγωγή επιμέρους κινητικής μελέτης για κάθε ένα από τα δυο υποστρώματα ξεχωριστά.

***2.3.15.1. Κινητική μελέτη αναστολής των hGSP1A, hGSP1B, hGSP1C έχοντας το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης***

Οι αρχικές ταχύτητες στην αντίδραση που καταλύουν οι hGSP1A, hGSP1B, hGSP1C με το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης υπολογίστηκαν στους 25 °C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (buffer)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1M, pH = 6.5, γλουταθειόνη (GSH) 2.5 mM (σταθερή συγκέντρωση), 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης που καλύπτει το εύρος τιμών 30 - 2100  $\mu\text{M}$ .

Πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί ενζυμικής δραστηριότητας, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.2 & 2.3.3 με σταθερές τις συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων (όπως αναφέρονται ανωτέρω), εκτός του μεταβαλλόμενου υποστρώματος (CDNB). Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για κάθε αναστολέα χωριστά σε διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις (για συγκεντρώσεις κατά περίπτωση βλέπε 'Αποτελέσματα' ενότητα 3.7.1.3, 3.7.2.2, 3.7.3.2(α))

Όλα τα αποτελέσματα (κεφάλαιο 3) προέκυψαν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις και επεξεργάστηκαν από το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraFit 3.0. Οι μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο μονής δέσμης, στα 340 nm, ανά 1s και για συνολικό χρόνο 1 min, με τη χρήση του προγράμματος UVKinLab.

#### **2.3.15.2. Κινητική μελέτη αναστολής των hGSP1A, hGSP1B, hGSP1C έχοντας τη γλουταθειόνη (GSH) ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης**

Οι αρχικές ταχύτητες στην αντίδραση που καταλύουν hGSP1A, hGSP1B, hGSP1C με το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης υπολογίστηκαν στους 25°C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (buffer) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1M, pH = 6.5, 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) 1 mM (σταθερή συγκέντρωση), γλουταθειόνη (GSH) μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης που καλύπτει το εύρος τιμών 60 - 2500 μM.

Πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί ενζυμικής δραστηριότητας, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.2 & 2.3.3 με σταθερές τις συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων (όπως αναφέρονται ανωτέρω), εκτός του μεταβαλλόμενου υποστρώματος (CDNB). Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για κάθε αναστολέα χωριστά σε διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις. (για συγκεντρώσεις κατά περίπτωση βλέπε 'Αποτελέσματα' ενότητα 3.7.3.2(B))

Όλα τα αποτελέσματα (κεφάλαιο 3) προέκυψαν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις και επεξεργάστηκαν από το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraFit 3.0. Οι μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο μονής δέσμης, στα 340 nm, ανά 1s και για συνολικό χρόνο 1 min, με τη χρήση του προγράμματος UVKinLab.

# Κεφάλαιο 3

## **ΟΥΡΙΕΣ & BENZODIAZEPINEΣ**

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1. Η δημιουργία της βιβλιοθήκης των ουριών και βενζοδιαζεπινών

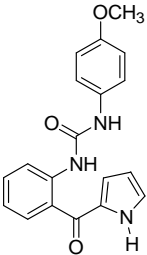
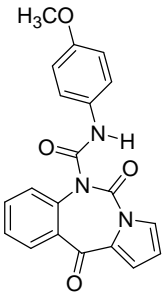
Οι ενώσεις που επιχειρήθηκε να αξιολογηθούν συντέθηκαν στο Εργαστήριο Οργανικής Σύνθεσης Ετεροκυκλικών Ενώσεων του Καθηγητή κ. Γ. Βαρβούνη (Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων) και είναι ενώσεις που έχουν εν δυνάμει βιολογική δράση. Οι εν λόγω ενώσεις είχαν προβλεφθεί και επιλεγεί ως εν δυνάμει αντικαρκινικές από την Καθηγήτρια κ. Α. Γερονικάκη του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, εφαρμόζοντας την υπολογιστική μέθοδο PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*). Η μέθοδος αυτή, που έχει αναπτυχθεί από τον Καθηγητή V.V. Poroiko του Institute of Biomedical Chemistry Russian Academy of Medical Science, πραγματεύεται μια καινοτόμο προσέγγιση που αφορά στην ταυτόχρονη πρόβλεψη πολλών βιολογικών δράσεων από τη χημική δομή μίας ένωσης (Filimonov & Poroikov, 1996). Η προσέγγιση αυτή βασίζεται στην ανάλυση των σχέσεων δομής-δράσης σε ετερογενές πεδίο δεδομένων (training set). Το πεδίο αυτό περιλαμβάνει περίπου 200.000 ενώσεις από διαφορετικές χημικές σειρές με εκατοντάδες διαφορετικές βιολογικές δράσεις. Η τελευταία έκδοση του προγράμματος PASS 9.1 προβλέπει 3750 φαρμακολογικές δράσεις και μηχανισμούς για κάθε ένωση (<http://www.ibmh.msk.su/PASS>). Η ακρίβεια της μεθόδου αγγίζει το 95% την ορθότητα της πρόβλεψης (leave-one-out cross validation). Αν και το PASS λειτουργεί μόνο με βάση περιγραφικού αναλυτή δομής (2D descriptors), έχει ήδη αποδειχθεί πολύτιμο εργαλείο στο σχεδιασμό φαρμάκων. Σχετικά πρόσφατα εννέα επιστήμονες από οκτώ χώρες δοκίμασαν το υπολογιστικό αυτό πρόγραμμα με τη μέθοδο της τυφλής δοκιμής (Babaev, et al., unpublished results). Η βιολογική δράση 138 ενώσεων από 15 τάξεις χημικών ενώσεων με 58 διαφορετικά είδη βιολογικής δραστηριότητας είχαν προβλεφθεί με ακρίβεια 82.6%. Έχουν βρεθεί νέες ενώσεις με την βοήθεια του PASS που χαρακτηρίζονται από αντιφλεγμονώδη (Geronikaki et al., 2006; Geronikaki et al., 2008), μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη, τοπική αναισθητική και αντιοξειδωτική (Geronikaki et al., 1999), αγχολυτική (Geronikaki, et al., 2006; Babaev et al., 2004) και αντιυπερτασική (Lagunin et al., 2003) δράση. Επίσης, έχουν βρεθεί ενώσεις με ενισχυτική δράση στη μνήμη (Geronikaki et al., 2004), αναστολείς

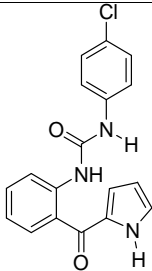
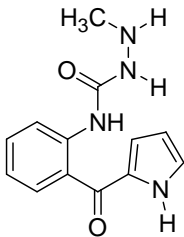
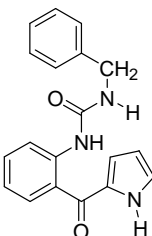
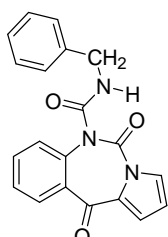
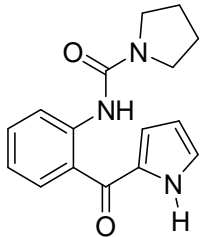
αγγειογένεσης (Poroikou, V. V. *et al.* 2003) και δράση κατά της λείσμανιάσης (Di Giorgio *et al.* 2003).

### 3.2. Αποτελέσματα προγράμματος PASS

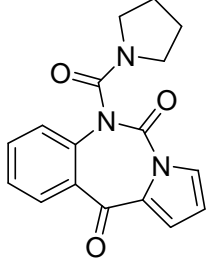
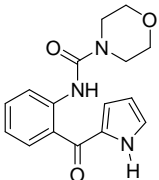
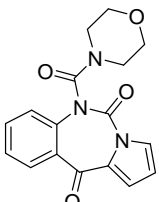
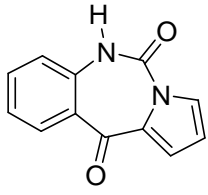
Παρακάτω παραθέτονται τα αποτελέσματα του προγράμματος PASS με ουρίες και βενζοδιαζεπίνες από τις οποίες επελέγησαν ορισμένες με υψηλή πιθανότητα αντικαρκινικής δράσης: (+) > 0.5 (50%), (-) < 0.1 (10%)

**Πίνακας 3.1.** Αποτελέσματα του προγράμματος PASS. Με **κόκκινο** είναι με άμεση αντικαρκινική δράση (κυτταρικός θάνατος) και με **πορτοκαλί** με αντιαγγειογενεσιουργό δράση που καταστέλλει τον καρκίνο έμμεσα. Με μαύρο είναι δύο μάρτυρες.

Κωδικός αριθμός ένωσης	Χημική δομή ένωσης	Πιθανότητα αντικαρκινικής δράσης
GVMF160		0.655 0.007 Angiogenesis inhibitor
GVMF174		0.583 0.060 Antineoplastic (myeloid leukemia) 0.506 0.112 Antineoplastic (sarcoma)

<p><b>GVMF195</b></p>		<p><b>0.622 0.009 Angiogenesis inhibitor</b></p>
<p><b>GVMF205/6</b></p>		<p><b>0.729 0.003 Antineoplastic (non-Hodgkin's lymphoma) 0.712 0.024 Antineoplastic 0.615 0.002 Antineoplastic (astrocytoma) 0.517 0.018 Angiogenesis inhibitor 0.506 0.013 Antineoplastic (colorectal cancer) 0.500 0.012 Antineoplastic (colon cancer)</b></p>
<p><b>GVMF201</b></p>		<p><b>0.562 0.013 Angiogenesis inhibitor</b></p>
<p><b>GVMF200</b></p>		<p><b>0.496 0.136 Antineoplastic (myeloid leukemia) 0.451 0.098 Antineoplastic (multiple myeloma)</b></p>
<p><b>GVMF203</b></p>		<p><b>0.624 0.005 Platelet aggregation inhibitor (μάρτυρας)</b></p>



<p><b>GVMF202</b></p>		<p><b>0.529 0.008 Antineoplastic (solid tumors)</b>  <b>0.516 0.086 Antineurotoxic</b>  <b>0.520 0.092 Antineoplastic (sarcoma)</b></p>
<p><b>GVMF8</b></p>		<p><b>0.610 0.044 Antineoplastic (myeloid leukemia)</b>  <b>0.513 0.019 Angiogenesis inhibitor</b></p>
<p><b>GVMF7</b></p>		<p><b>0.578 0.005 Antineoplastic (solid tumors)</b>  <b>0.537 0.069 Antineoplastic (sarcoma)</b></p>
<p><b>GVMF0/177</b></p>		<p><b>Μάρτυρας</b></p>

### 3.3. Καθαρισμός ισοενζύμων τρανσφεράσης γλουταθειόνης (GSTs)

Πραγματοποιήθηκε μετά από ετερόλογη έκφραση του κάθε ισοενζύμου της τρανσφεράσης γλουταθειόνης, σύμφωνα με την ενότητα 2.3.7.

**Πίνακας 3.2.** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα πρωτοκόλλου καθαρισμού ισοενζύμων GSTs.

	Ειδική Δραστηκότητα (SA, U/mg)	Καθαρισμός (φορές)	Ανάκτηση (%)
hGSTA1-1	82,60	2,4	81
hGST2-2	0,42	13	100
hGSTO1-1	1,07	12	100
hGSP1A	5,64	91	78,0
hGSP1B	27,60	28	81,8
hGSP1C	19,32	77	100

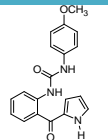
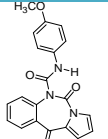
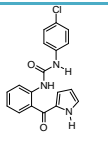
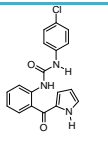
### 3.4. Σάρωση αναλόγων-ουριών και βενζοδιαζεπινών ως δυνητικών αναστολέων ισοενζύμων τρανσφεράση γλουταθειόνης ανθρώπου (hGSTA1-1, hGST2-2, hGSTO1-1, hGSP1A, hGSP1B, hGSP1C) και από *Schistosoma japonica*

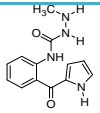
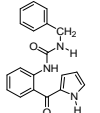
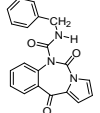
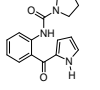
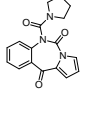
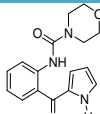
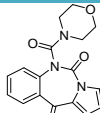
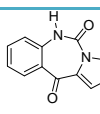
Προκειμένου να αξιολογηθούν τα έντεκα ανάλογα ουριών και βενζοδιαζεπινών ως δυνητικών αναστολέων ισοενζύμων τρανσφεράση γλουταθειόνης ανθρώπου και από *Schistosoma japonica*, πραγματοποιήθηκε *in vitro* έλεγχος ('σάρωση') για την ικανότητα τους να δρουν ως αναστολείς της δραστηκότητας των ισοενζύμων που εξετάστηκαν.

Η μελέτη διεξήχθη κάτω από τις ίδιες συνθήκες που περιγράφονται στις παραγράφους 2.3.2 & 2.3.3, ενώ όλες οι ενώσεις ελέγχθηκαν στην ίδια τελική συγκέντρωση (25  $\mu\text{M}$ ). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω προέκυψαν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις.

Στον παρακάτω πίνακα εμφανίζεται η παραμένουσα δραστικότητα (% *remaining activity*) την οποία παρουσιάζουν τα ισοενζύμα hGSTA1-1, hGST2-2, hGSTO1-1, hGSP1A, hGSP1B, hGSP1C & από *Schistosoma japonica*, έναντι αναλόγων ουριών και βενζοδιαζεπινών ως δυνητικών αναστολέων.

**Πίνακας 3.2.** Παραμένουσα δραστικότητα (%) που παρουσιάζουν τα ισοενζύμα hGSTA1-1, hGSTT2-2, hGSTO1-1, hGSP1A, hGSP1B, hGSP1C και από *Schistosoma japonica* έναντι αναλόγων ουριών και βενζοδιαζεπινών ως δυνητικών αναστολέων της ενζυμικής δραστικότητας. Το ισοένζυμο από *Schistosoma japonica* (σε rate = 0,2010) δεν υφίσταται αναστολή (παραμένουσα δραστικότητα 90-113%) από καμία ένωση οπότε και δεν περιλαμβάνεται στον πίνακα.

Παραμένουσα δραστικότητα (%)							
Ενώσεις: Ουρίες (U) και Βενζοδιαζεπίνες (B) (25 $\mu\text{M}$ τελική, σε DMSO)	hGSA1-1		hGST2-2	hGSO1-1	hGSP1A	hGSP1B	hGSP1C
	Cntrl rate	Cntrl rate	Cntrl rate	Cntrl rate	Cntrl rate	Cntrl rate	Cntrl rate
 <b>160 - U</b>	0,1337	0,0619	0,0391	0,0424	0,0443	0,0489	0,0529
 <b>174 - B</b>	103.8	35.3	66.4	72.8	91.1	100	100
 <b>195 - U</b>	99.0	60	73.7	93	63.2	100	100
 <b>195 - U</b>	82	52	46.6	80	52.8	100	88.0

	<b>206 - U</b>	<b>98.3</b>	<b>61.1</b>	<b>85.57</b>	<b>100</b>	<b>77</b>	<b>100</b>	<b>84.2</b>
	<b>201 - U</b>	<b>88.9</b>	<b>86.5</b>	<b>75.7</b>	<b>48.3</b>	<b>67</b>	<b>100</b>	<b>78.6</b>
	<b>200 - B</b>	<b>72.5</b>	<b>97.7</b>	<b>54.4</b>	<b>68.5</b>	<b>58.7</b>	<b>100</b>	<b>81.1</b>
	<b>203 - U</b>	<b>79.3</b>	<b>86.9</b>	<b>100</b>	<b>71.3</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>96.5</b>
	<b>202 - B</b>	<b>92.4</b>	<b>50</b>	<b>90.8</b>	<b>100</b>	<b>84.9</b>	<b>100</b>	<b>93.4</b>
	<b>8 - U</b>	<b>101.5</b>	<b>100</b>	<b>81.3</b>	<b>96</b>	<b>86.4</b>	<b>100</b>	<b>95</b>
	<b>7 - B</b>	<b>91.1</b>	<b>100</b>	<b>85.6</b>	<b>76.5</b>	<b>73.1</b>	<b>100</b>	<b>78.3</b>
	<b>177-B</b>	<b>84.0</b>	<b>100</b>	<b>63</b>	<b>88.7</b>	<b>73</b>	<b>100</b>	<b>80.5</b>
<b>Σφάλμα (ΜΟ 3 δοκιμών )</b>	<b>&lt; 5%</b>	<b>&lt; 7%</b>	<b>&lt; 7%</b>	<b>&lt; 8%</b>	<b>&lt; 5%</b>	<b>&lt; 5%</b>	<b>&lt; 5%</b>	<b>&lt; 4%</b>

### 3.5. Έλεγχος υδατοσυμβατών οργανικών διαλυτών στη δραστικότητα του ισοενζύμου hGSTA1-1

Προκειμένου να ελεγχθεί το εάν και κατά πόσο επηρεάζεται η δραστικότητα του ενζύμου από οργανικούς υδατοσυμβατούς διαλύτες, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις διαλύτες με διαφορετικές τελικές συγκεντρώσεις κατά περίπτωση,

ειδικότερα ακετονιτρίλιο, διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO, 99.9%), διοξάνιο και μεθανόλη.

Η μελέτη διεξήχθη σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου, μία υψηλή (0,0162 Units) και μία χαμηλή (0,0053 Units) κάτω από τις ίδιες συνθήκες που περιγράφονται στην παράγραφο 2.3.2. με μοναδική διαφορά ότι προστέθηκαν διαφορετικές ποσότητες του εκάστοτε διαλύτη κάθε φορά (όπως φαίνεται παρακάτω). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω προέκυψαν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις.

**Πίνακας 3.3.** Επίδραση της παρουσίας υδατοσυμβατών οργανικών διαλυτών στην δραστικότητα hGSTA1-1 σε χαμηλή συγκέντρωση ενζύμου (0,0053 Units).

Συγκέντρωση (% v/v στη δοκιμή)	Παραμένουσα Ενζυμική Δραστικότητα (%) <sup>(*)</sup>			
	Ακετονιτρίλιο	Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)	Μεθανόλη	Διοξάνιο
0,5 %	100	100	78,0	-
1%	96,2	95,0	80,1	-
1,5%	-	96,8	79,8	-
2%	88,8	83,0	80,0	-
3%	75,0	76,3	-	-
5%	67,7	75,1	91,34	-

<sup>(\*)</sup> Σφάλμα <3.5% (Μ.Ο. 3 δοκιμών).

**Πίνακας 3.4.** Επίδραση της παρουσίας υδατοσυμβατών οργανικών διαλυτών στην δραστικότητα hGSTA1-1 σε υψηλή συγκέντρωση ενζύμου (0,0162 Units).

	Παραμένουσα Ενζυμική Δραστικότητα (%) <sup>(*)</sup>			
Συγκέντρωση (% v/v στη δοκιμή)	Ακετονιτρίλο	Διμεθυλοσουλφοξειδίο (DMSO)	Μεθανόλη	Διοξάνιο
0,5 %	97,5	86,9	100	84,75
1%	100	87,6	98,8	85,24
1,5%	-	91,7	100	73,37
2%	100	97,7	100	77,38
3%	93,8	98,0	-	-
5%	79,6	96,5	100	-

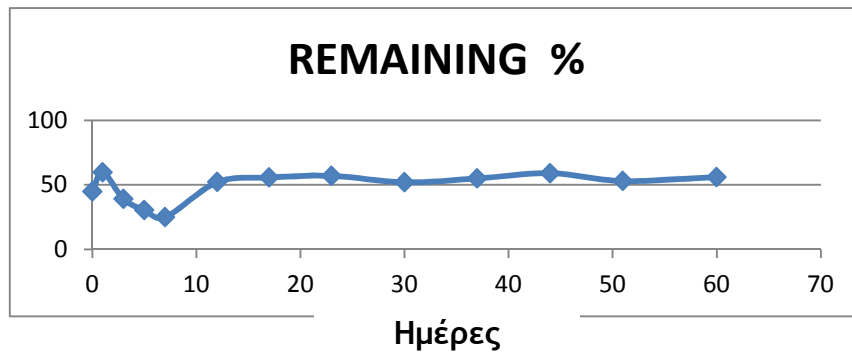
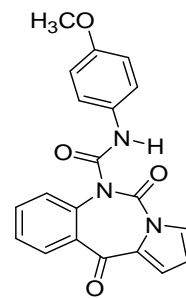
<sup>(\*)</sup> Σφάλμα <4% (Μ.Ο. 3 δοκιμών).

### 3.6. Έλεγχος της δραστικότητας του ισοενζύμου hGSTA1-1 συναρτήσει του χρόνου παλαίωσης των διαλυμάτων τριών επιλεγέντων ενώσεων.

Επιλέχθηκαν τρεις ενώσεις, δύο εκ των οποίων βενζοδιαζεπίνες (174 & 202) και μία ουρία (195), για τις οποίες ελέγχθηκε η επαναληψιμότητα / σταθερότητα της επίδρασή τους στην ενζυμική δραστικότητα συναρτήσει της παλαίωσης (χρόνου παραμονής / παρασκευής) των διαλυμάτων τους.

Η μελέτη διήρκησε 60 ημέρες, διεξήχθη δε υπό τις ίδιες συνθήκες που περιγράφονται στις παραγράφους 2.3.2 & 2.3.3. Όλες οι ενώσεις ελέγχθηκαν στην ίδια τελική συγκέντρωση (25 μΜ). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω προέκυψαν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις.

## Ένωση 174

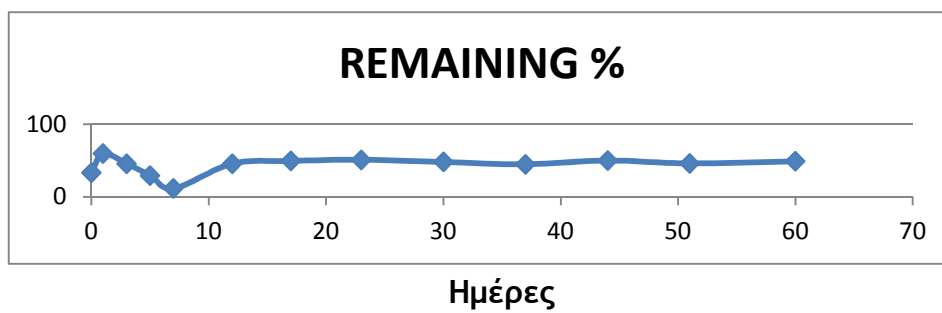
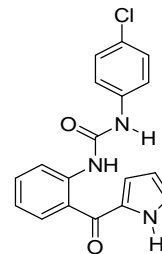


μ 3.1.

174

μ hGSTA1-1

## Ένωση 195

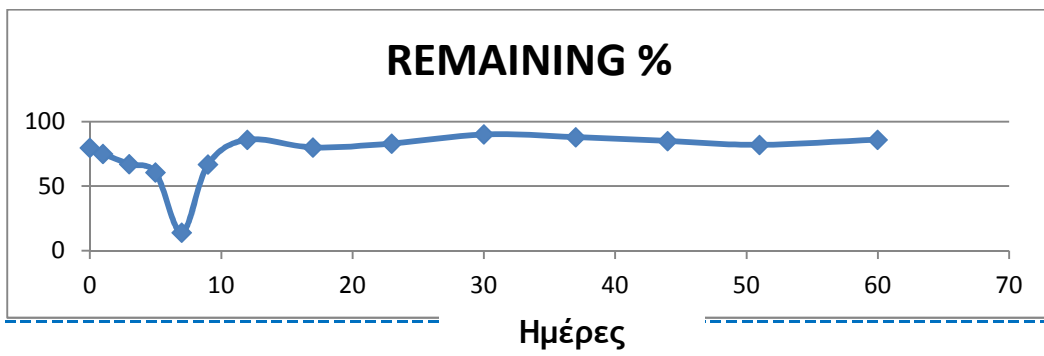
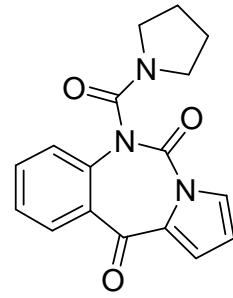


μ 3.2.

195

μ hGSTA1-1

## Ένωση 202



μ 3.3.

202

μ hGSTA1-1



# ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η βιβλιοθήκη των ουριών και βενζοδιαζεπινών συντέθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Σύνθεσης Ετεροκυκλικών Ενώσεων Καθηγητή κ. Γ. Βαρβούνη (Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων). Οι εν λόγω ενώσεις είχαν προβλεφθεί και επιλεγεί ως εν δυνάμει αντικαρκινικές από την Καθηγήτρια κ. Α.Γερονικάκη του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, εφαρμόζοντας την υπολογιστική μέθοδο PASS.

Πραγματοποιήθηκε ετερόλογη έκφραση έξι ισοενζύμων της τρανσφεράσης γλουταθειόνης (hGSTA1-1, hGST2-2, hGSTO1-1, hGSP1A, hGSP1B & hGSP1C) σύμφωνα με την ενότητα 2.3.7. Τα αποτελέσματα που πήραμε στη παρούσα εργασία, όσο αναφορά στην ειδική δραστικότητα (ΕΔ), είναι παρόμοια, για ορισμένα από τα ισοένζυμα, με εκείνα που αναφέρθηκαν πρόσφατα (Chronopoulou *et al.*, 2012a). Πιο συγκεκριμένα, το ισοένζυμο hGSTA1-1 παρουσιάζει ΕΔ = 81 U/mg στην παρούσα εργασία και 95,8 U/mg στην εργασία των Chronopoulou *et al.*, 2012a. Το ισοένζυμο hGSTT2-2 εμφανίζει ΕΔ = 0,42 U/mg που είναι σχεδόν διπλάσια από τη μελέτη των Flanagan *et al.*, 2008, όπως συμβαίνει άλλωστε και για το ισοένζυμο hGSTO1-1 (1,0 U/mg έναντι 0,5 U/mg). Η ανάκτηση του ενζύμου, όσον αναφορά στο ισοένζυμο hGSTA1-1 είναι 81% στην παρούσα εργασία έναντι 100% (Chronopoulou *et al.*, 2012a), ενώ για τα ισοένζυμα hGST2-2 & hGSTO1-1 διαφέρει, ειδικότερα, στην παρούσα μελέτη βρέθηκε να είναι 100%, ενώ στην εργασία των Chronopoulou *et al.*, 2012a αναφέρθηκε ως 61% και 10%, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα του καθαρισμού για τα ισοένζυμα hGSP1A, hGSP1B & hGSP1C αναφέρονται και σχολιάζονται στο κεφάλαιο 4 που αφορά στις δι-υδροξυ-βενζοφαινόνες και τα παράγωγά τους.

Προκειμένου να αξιολογηθούν τα έντεκα ανάλογα ουριών και βενζοδιαζεπινών ως δυνητικών αναστολέων ισοενζύμων τρανσφεράση γλουταθειόνης ανθρώπου, πραγματοποιήθηκε *in vitro* έλεγχος ('σάρωση') για την ικανότητα τους να δρουν ως αναστολείς της δραστικότητας των ισοενζύμων που εξετάστηκαν.

Παρατηρήθηκε ότι τα αποτελέσματα της σάρωσης (Πίνακας 3.2) δεν παρουσίαζαν επαναληψιμότητα, οπότε θεωρήσαμε ότι ενδεχομένως τα διαλύματα των ενώσεων να υφίστανται κάποια αλλοίωση συναρτήσεως του χρόνου παλαίωσης τους (παραμονής). Ως εκ τούτου, μελετήθηκε η δραστηριότητα του ισοενζύμου hGSTA1-1 συναρτήσεως του χρόνου παραμονής (παλαίωσης) των διαλυμάτων τριών ενώσεων, ήτοι, δύο βενζοδιαζεπίνων (174 & 202) και μίας ουρίας (195). Για τις ενώσεις αυτές ελέγχθηκε η επαναληψιμότητα / σταθερότητα της επίδρασή τους στην ενζυμική δραστηριότητα συναρτήσεως του χρόνου παλαίωσης των διαλυμάτων τους. Η μελέτη αυτή διήρκεσε 60 ημέρες και παρατηρήθηκε ότι οι εν λόγω ενώσεις, πράγματι, μετέβαλαν την συμπεριφορά τους ως αναστολείς του ενζύμου, σύμφωνα με τις γραφικές παραστάσεις στα Σχήματα 3.1, 3.2 και 3.3. Για κάθε ένωση παρατηρήθηκε συνεχής αύξηση της ικανότητας αναστολής του ενζύμου (μείωση της παραμένουσας δραστηριότητας) έως και για μία εβδομάδα. Ακολούθως το εν λόγω φαινόμενο αντιστρέφεται σταδιακά έως και τη 10<sup>η</sup> ημέρα οπότε και σταθεροποιείται η συμπεριφορά των διαλυμάτων των ενώσεων, σε όλες τις περιπτώσεις, σε τιμή χαμηλότερη της αρχικής (βλ. τιμή δοκιμής φρέσκου διαλύματος ή τιμή δοκιμής ‘πρώτης ημέρας’).

Πολλές βιβλιογραφικές αναφορές αφορούν σε ορισμένες χαμηλού μοριακού βάρους οργανικές ενώσεις οι οποίες όταν βρίσκονται διαλυτοποιημένες σε οργανικούς διαλύτες οδηγούν σε σχηματισμό πηκτώματος (‘gel’) (Esch et al., 1997). Ειδικότερα, απλές δις-ουρίες σχηματίζουν θερμοανθεκτικά gels, έως τους 100°C και για μήνες. Μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξαν ότι η οργανική ένωση διαμορφώνεται σε ορθογώνιες επιφάνειες-φύλλα μήκους μερικών δεκάδων μm (Esch et al., 1997). Τα περισσότερα από τα μόρια ενώσεων που οδηγούν σε gels έχουν ως κοινό ότι διαθέτουν τουλάχιστον μία χαρακτηριστική ομάδα η οποία μπορεί να συμμετέχει σε έντονα κατευθυνόμενες μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις με άλλα ίδια μόρια. Σώρευση των εν λόγω μορίων μπορεί να οδηγήσει σε εκτεταμένη μονοδιάστατη δομή μέσω δεσμών υδρογόνου. Οι εν λόγω δομές, ακολούθως, συνενώνονται και δημιουργούν ίνες οι

οποίες, τελικά, διαμορφώνουν ένα εκτεταμένο τρισδιάστατο πλέγμα στον υγρό οργανικό διαλύτη, οδηγώντας σε πηκτωματοποίηση.

Μία ομάδα ενώσεων που σχηματίζει εκτεταμένη μονοδιάστατη δομή, κυρίως μέσω δεσμών υδρογόνου, είναι οι ουρίες (Esch et al., 1996). Επιπλέον, άλλες μοριακές αλληλεπιδράσεις, όπως οι δυνάμεις Van Der Waals και οι αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου, συνεισφέρουν στη σταθερότητα των δομών αυτών (Esch et al., 1996). Ειδικότερα οι δις-ουρίες, απεδείχθησαν ιδιαίτερα αποτελεσματικές ως πηκτοματοποιητές για ποικιλία οργανικών διαλυτών, μεταξύ των οποίων το DMSO (Loos, 2000).

Βάσει των ανωτέρω βιβλιογραφικών δεδομένων και των πειραματικών αποτελεσμάτων, δεν κρίθηκε σκόπιμο να συνεχιστεί η μελέτη με τη 'βιβλιοθήκη' των ουριών και βενζοδιαζεπινών.

# Κεφάλαιο 4

**BENZOΦΑΙΝΟΝΕΣ**

**&**

**N-ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ**

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 4.1. Καθαρισμός ενζύμων τρανσφεράσης γλουταθειόνης (GSTs)

Μετά από ετερόλογη έκφραση του ισοενζύμων της τρανσφεράσης γλουταθειόνης. Τα ισοένζυμα hGSTP1A, hGSTP1B και hGSTP1C καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας και προσροφητή BES-GSH, με υψηλές ανακτήσεις, 91%, 73,8% και 100%, αντίστοιχα. Στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση (Φωτογραφία 4.1.) κάτω από συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS για να ελεγχθούν τα επίπεδα καθαρότητας των ισοενζύμων.

4.1. DNA (SDS-PAGE)  $\mu$  2-Log DNA  
(1% w/v).  $\mu$   
Ladder (Biolabs).



4.1. μ μ μ GSTPs

	Ειδική Δραστικότητα (SA, U/mg)	Καθαρισμός (φορές)	Ανάκτηση (%)
hGSP1A	2,54	104	91,0
hGSP1B	28,6	14	73,8
hGSP1C	22,7	87	100

4.2. Σάρωση 2,2'-διυδροξυβενζοφαινονών και N-καρβονυλικών παραγώγων τους ως δυνητικών αναστολέων των ισοενζύμων τρανσφεράση γλουταθειόνης ανθρώπου hGSP1A, hGSP1B και hGSP1C

Προκειμένου να αξιολογηθούν δώδεκα 2,2'-διυδροξυβενζοφαινόνες και N-καρβονυλικών παραγώγων τους ως δυνητικών αναστολέων ισοενζύμων τρανσφεράση γλουταθειόνης ανθρώπου (hGSP1A, hGSP1B και hGSP1C), πραγματοποιήθηκε *in vitro* έλεγχος ('σάρωση', screening) για την επίδραση που έχουν ως αναστολέων της ενζυμικής δραστηριότητας των ανωτέρω ισοενζύμων.

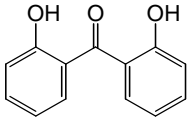
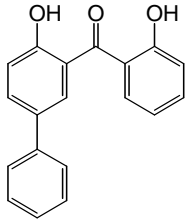
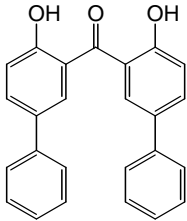
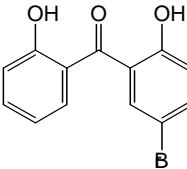
Η μελέτη διεξήχθη υπό ίδιες συνθήκες όπως περιγράφονται στις παραγράφους 2.3.2 & 2.3.3, όλες δε οι ενώσεις ελέγχτηκαν στην ίδια τελική συγκέντρωση (100 μM). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω προέκυψαν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις.

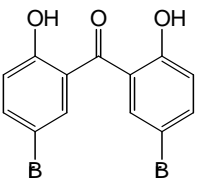
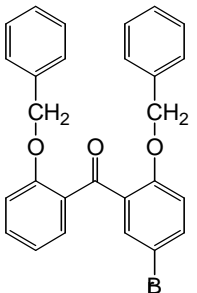
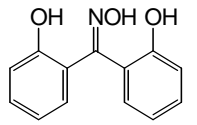
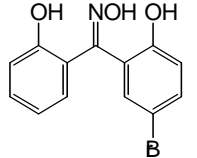
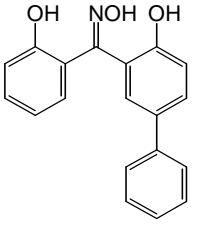
Στον παρακάτω πίνακα εμφανίζεται η παραμένουσα δραστηριότητα (%) - *remaining activity* που παρουσιάζουν τα ισοενζύμα hGSP1A, hGSP1B &

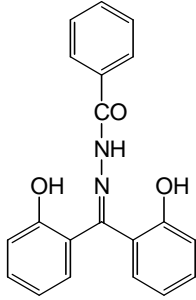
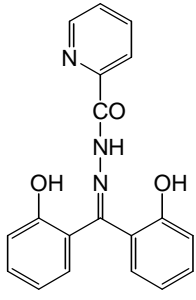
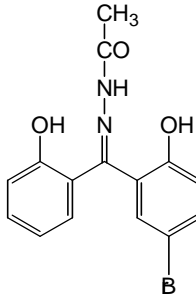


hGSP1C έναντι των 2,2'-διυδροξυβενζοφαινονών και των N-καρβονυλικών παραγώγων ως δυνητικών αναστολέων .

4.2. μ hGSP1C (%) (5-10), μ hGSP1A, (11-13) - μ hGSP1B (14-16) -

Αριθμός ένωσης	Δομή	Μοριακός τύπος	Μοριακό Βάρος	Παραμένουσα δραστικότητα (%) (*)		
				hGSP1A	hGSP1B	hGSP1C
5		C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	214	73,2	87,6	75
6		C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	290	58,7	111	97
7		C <sub>25</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	366	98,5	301	144
8		C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> BrO <sub>3</sub>	293	105	119	81

9		$C_{13}H_8Br_2O_3$	372	105	89	116
10		$C_{27}H_{21}BrO_3$	473	(προβλήματα διαλυτότητας και επαναληπτικότητας)		
11		$C_{13}H_{11}NO_3$	229	83	120	78,6
12		$C_{13}H_{10}BrNO_3$	308	69	77	49,3
13		$C_{19}H_{15}NO_3$	305	33	62,3	29,9

14		$C_{20}H_{16}N_2O_3$	332	38,3	69,3	70,4
15		$C_{19}H_{16}N_3O_3$	334	83	78,2	82
16		$C_{15}H_{13}BrN_2$ $O_3$	349	75,8	59,3	86

( ) Μέγιστο σφάλμα (Μ.Ο. 3 δοκιμών) είναι <5%.

**4.3. Σάρωση 2,2'-διυδροξυβενζοφαινονών και N-καρβονυλικών παραγώγων τους ως δυνητικών αναστολέων του ισοενζύμου τρανσφεράση γλουταθειόνης ανθρώπου hGSP1A-His<sub>6</sub> που έφερε την απόληξη 6His.**

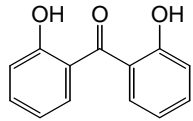
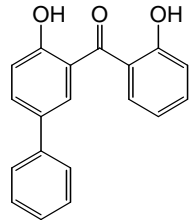
Προκειμένου να αξιολογηθούν δώδεκα 2,2'-διυδροξυβενζοφαινόνες και N-καρβονυλικών παραγώγων τους ως δυνητικοί αναστολείς του ισοενζύμου τρανσφεράση γλουταθειόνης ανθρώπου hGSP1A, πραγματοποιήθηκε *in*

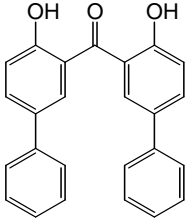
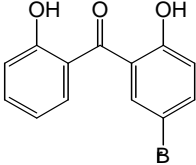
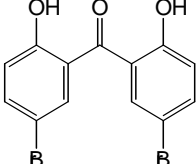
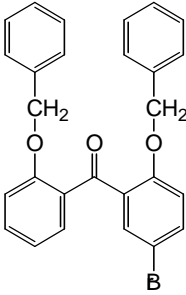
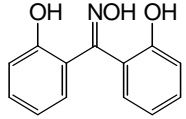
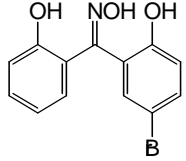
*in vitro* έλεγχος (‘σάρωση’, screening) για την επίδραση που έχουν ως αναστολείς της ενζυμικής δραστηριότητας.

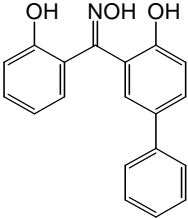
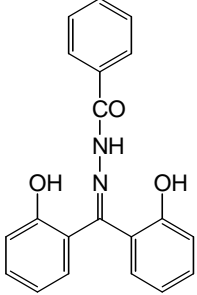
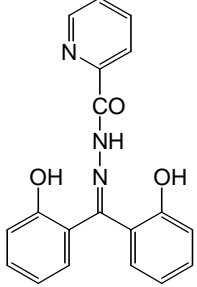
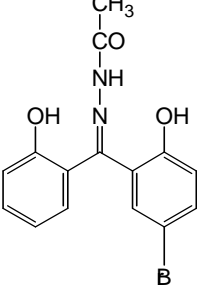
Η μελέτη διεξήχθη υπό ίδιες συνθήκες όπως περιγράφονται στις παραγράφους 2.3.2 & 2.3.3, όλες δε οι ενώσεις ελέγχτηκαν στην ίδια τελική συγκέντρωση (100 μM). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω προέκυψαν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις.

Στον παρακάτω πίνακα εμφανίζεται η παραμένουσα δραστηριότητα (%) - *remaining activity* που παρουσιάζει το ισοενζύμο hGSTP1A-His<sub>6</sub> έναντι των 2,2’-διυδροξυβενζοφαινονών και των N-καρβονυλικών παραγώγων ως δυνητικών αναστολέων .

4.3. hGS P1A-His<sub>6</sub> (14-16) μ (5-10), (%) μ (11-13) - μ - μ

Αριθμός ένωσης	Δομή	Μοριακός τύπος	Μοριακό Βάρος	hGSTP1A-His <sub>6</sub>
5		C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	214	110
6		C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	290	134

7		$C_{25}H_{18}O_3$	366	233,6
8		$C_{13}H_9BrO_3$	293	114
9		$C_{13}H_8Br_2O_3$	372	110
10		$C_{27}H_{21}BrO_3$	473	(προβλήματα διαλυτότητας και επαναληπτικότητας)
11		$C_{13}H_{11}NO_3$	229	105,5
12		$C_{13}H_{10}BrNO_3$	308	91,3

13		$C_{19}H_{15}NO_3$	305	89
14		$C_{20}H_{16}N_2O_3$	332	75,4
15		$C_{19}H_{16}N_3O_3$	334	89
16		$C_{15}H_{13}BrN_2O_3$	349	99

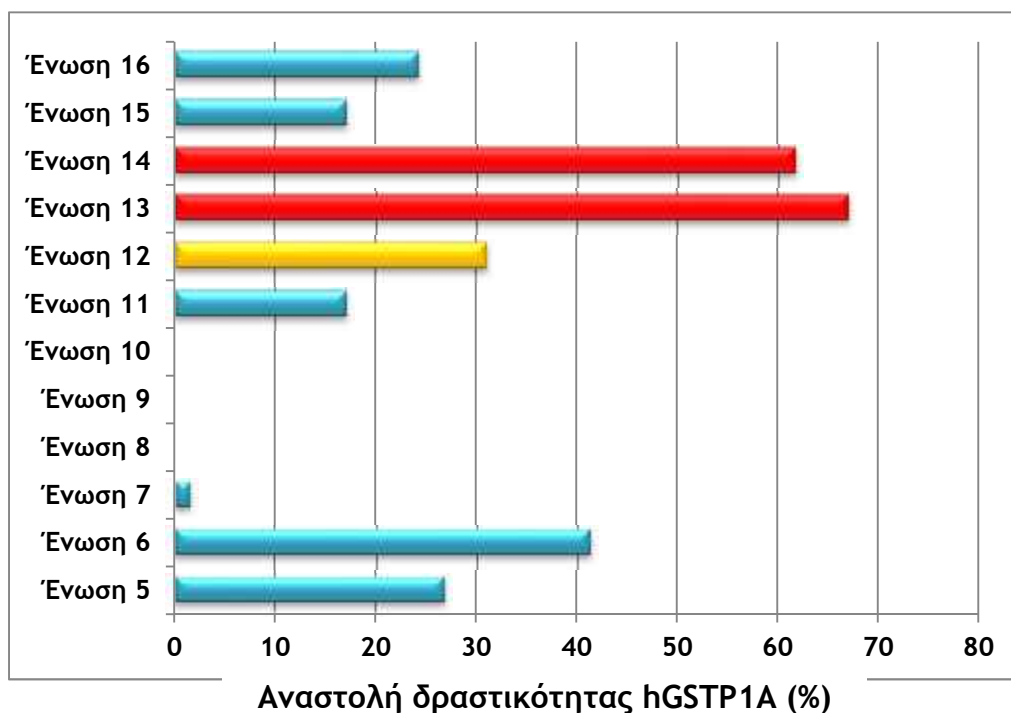
#### 4.4. Μελέτη αναστολής των αλλοενζύμων τρανσφεράση γλουταθειόνης ανθρώπου, hGSP1A, hGSP1B & hGSP1C.

##### **4.4.1. Αλλοένζυμο hGSTP1A**

Το ιστόγραμμα που ακολουθεί (Σχήμα 4.1.) παρουσιάζει συγκεντρωτικά και σχηματικά τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης για το αλλοένζυμο hGSTP1A.

Οι ενώσεις-αναστολείς έχουν ταξινομηθεί σε τρεις ομάδες με βάση το ποσοστό της αναστολής που παρουσιάζουν :

- i. *Ομάδα ενώσεων χαμηλής αναστολής:* περιλαμβάνει τις ενώσεις **5, 7, 8, 9, 11, 15** και **16**, οι οποίες παρουσιάζουν κατά προσέγγιση αναστολή του ισοενζύμου hGSTP1A περίπου έως 30%.
- ii. *Ομάδα ενώσεων μέτριας αναστολής:* περιλαμβάνει την ένωση **12**, η οποία παρουσιάζει κατά προσέγγιση αναστολή του ισοενζύμου hGSTP1A περίπου από 31 έως 65%.
- iii. *Ομάδα ενώσεων υψηλής αναστολής:* περιλαμβάνει τις ενώσεις **13** και **14**, οι οποίες παρουσιάζουν κατά προσέγγιση αναστολή του ισοενζύμου hGSTP1A πάνω 66%.



μ 4.1. μμ μ hGSTP1A μ  
 12 μ μ μ  
 μ μ μ μ μ  
 μμ Microsoft Excel. μ (M.O. 3 μ ) μμ <5%.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, είναι εμφανές ότι οι αναστολείς **13** και **14** είναι οι ισχυρότεροι, σε σύγκριση με τα δώδεκα παράγωγα που ελέγχθηκαν, παρουσιάζοντας αναστολή πάνω από 60% επί της δραστηριότητας του ισοενζύμου hGSTP1A.

#### 4.4.1.1. Υπολογισμός του δείκτη IC50 για τον αναστολέα 13.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, ο κετοξιμικός αναστολέας **13** εμφάνισε υψηλή αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας (67%) οπότε και μελετήθηκε περαιτέρω. Ειδικότερα, υπολογίστηκε ο δείκτης IC50 (half maximal inhibitory concentration). Για τον υπολογισμό του IC50 πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές δοκιμές στις ίδιες συνθήκες που περιγράφονται στις παραγράφους 2.3.2 & 2.3.3.

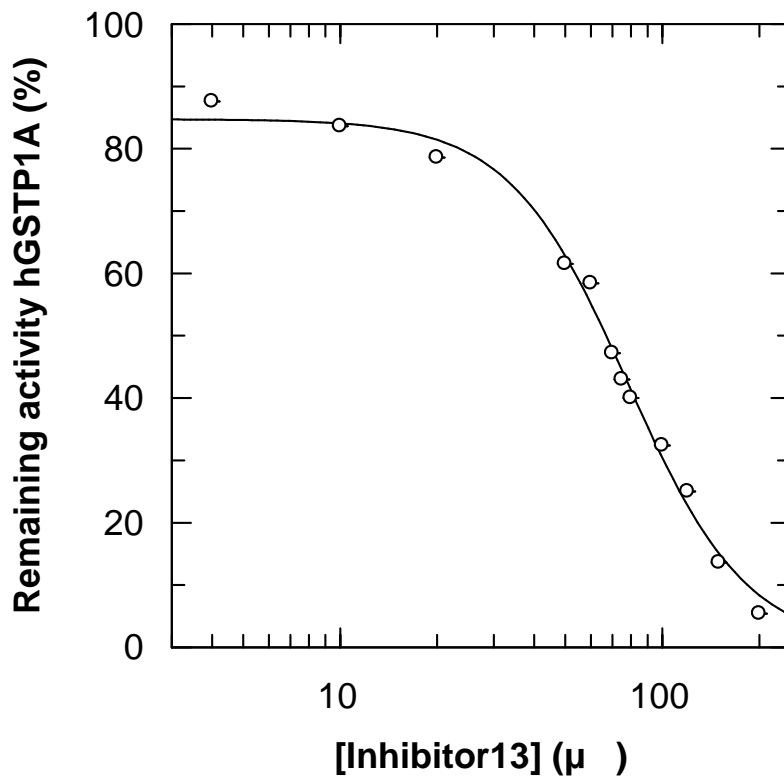




6,00	25,0
7,50	13,6
10,00	5,4

(\*) Μέγιστο σφάλμα (Μ.Ο. 3 δοκιμών ) είναι <5%.

Εν συνεχεία τα δεδομένα που προέκυψαν από τις ανωτέρω μετρήσεις επεξεργάστηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με το πρόγραμμα GraFit 3.0, τα δε αποτελέσματα έδωσαν την κατωτέρω γραφική παράσταση (Σχήμα 4.2.), από την οποία προκύπτει  $IC_{50(13)} = 77.8 \pm 3.4 \mu M$ .



μ 4.2. μ

μ 15

hGSTP1A (%)  
(4-200 μ )

13. 13.

#### 4.4.1.2. Υπολογισμός του δείκτη IC50 για τον αναστολέα 14

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα ο κετοξιμικός αναστολέας **14** (N-ακυλο-υδραζόνη) εμφάνισε υψηλή αναστολή (61,7%) οπότε και μελετήθηκε περαιτέρω. Ειδικότερα, υπολογίστηκε ο δείκτης IC50 (half maximal inhibitory concentration). Για τον υπολογισμό του IC50 πραγματοποιήθηκαν δοκιμές (enzyme assays) στις ίδιες συνθήκες που περιγράφονται στην παράγραφο 2.3.2 & 2.3.3..

Σκοπός της συγκεκριμένης διαδικασίας είναι να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση του αναστολέα, στην οποία έχουμε παραμένουσα δραστηριότητα του ενζύμου ίση με το 50% της αρχικής.

Ο αναστολέας **14** μελετήθηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ως προς την αναστολή που επιφέρει στη δραστηριότητα σε σταθερή ποσότητα ισοενζύμου hGSTP1A και υπολογίστηκε η παραμένουσα δραστηριότητα του ενζύμου.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

4.3.  $\mu\mu$   
 $\mu$  hGSTP1A.

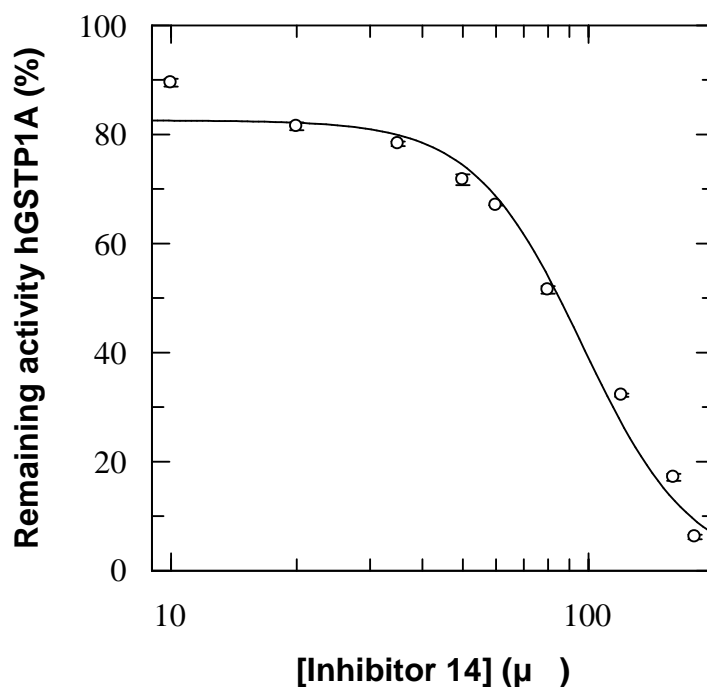
14

[Αναστολέας 14] (mM)	Παραμένουσα δραστηριότητα hGSTP1A (%) (*)
0,50	92,6
1,00	80,0
1,75	78,3
2,50	71,3

4,00	67
5,00	51,5
7,50	32,2
8,00	17,2
9,00	6,2

(\*) Μέγιστο σφάλμα (Μ.Ο. 3 δοκιμών ) είναι <5%.

Εν συνεχεία τα δεδομένα που προέκυψαν από τις μετρήσεις επεξεργάστηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με το πρόγραμμα GraFit 3.0, τα δε αποτελέσματα έδωσαν την κατωτέρω γραφική παράσταση (Σχήμα 4.3.), από την οποία προκύπτει  $IC_{50(14)} = 80.0 \pm 4.9 \mu M$ .



μ 4.3.  
μ

μ

μ  
9

hGSTP1A (%)  
(10-180 μ )

14.  
14.

#### 4.4.1.3. Κινητική μελέτη αναστολής του αλλοενζύμου hGSTP1A από την ένωση 14.

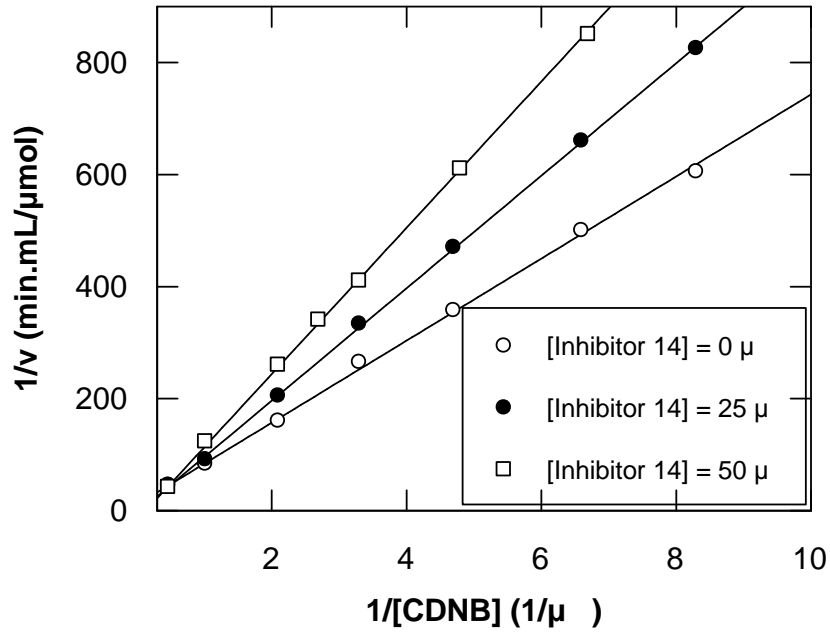
Κινητική μελέτη έχοντας το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενηόλιο (CDNB) ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα.

Ακολουθώντας την τεχνική που περιγράφηκε στις παραγράφους 2.3.2 & 2.3.3, χρησιμοποιήσαμε το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης για την κινητική μελέτη της αναστολής από το παράγωγο 14 κρατώντας σταθερή τη συγκέντρωση της γλουταθειόνης ([GSH] = 2.500  $\mu\text{M}$ ). Οι μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις του CDNB καλύπτουν το εύρος 60-2.100  $\mu\text{M}$  και μελετήθηκαν σε δύο διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις του αναστολέα 14 (0, 25, 50  $\mu\text{M}$ ).

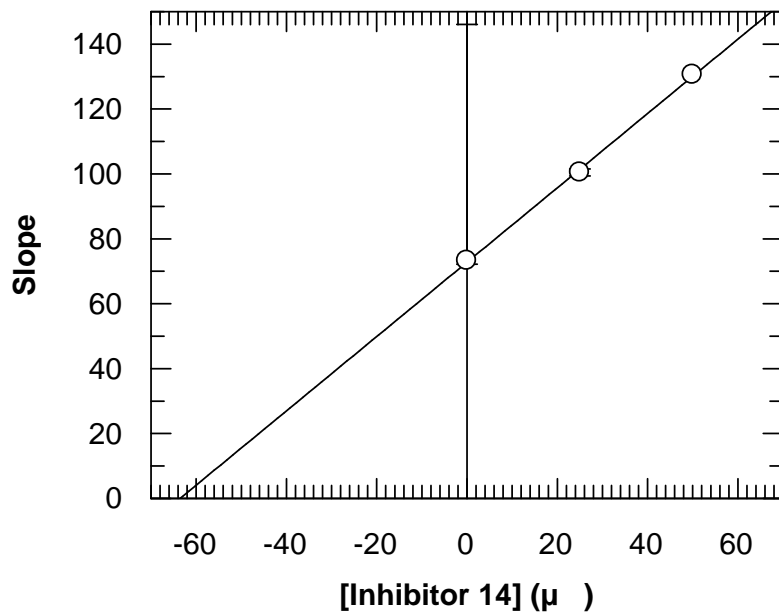
Σύμφωνα με τη μελέτη, ο αναστολέας 14 φαίνεται να παρουσιάζει καθαρή συναγωνιστική αναστολή, δηλαδή αναστολέας 14 και CDNB ανταγωνίζονται για την ίδια θέση δέσμευσης της GST. Η εκτίμηση αυτού του αποτελέσματος στηρίζεται στο γεγονός ότι, τόσο η γραφική παράσταση Lineweaver-Burk (διπλά αντίστροφα) (Σχήμα 4.4.) όσο και η δευτερεύουσα επεξεργασία της, παρουσιάζουν γραμμικότητα (Σχήμα 4.5.), ενώ το κοινό σημείο τομής στο Σχήμα 3.6 βρίσκεται στο κάθετο άξονα (Y).

Όλα τα αποτελέσματα της κινητικής μελέτης προκύπτουν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις, ενώ επεξεργάστηκαν με Y/Π με το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraFit 3.0.

Η γραμμικότητα των παρακάτω διαγραμμάτων υποδεικνύουν τύπο καθαρής συναγωνιστικής αναστολής. Επιπλέον, από το δευτερογενές γράφημα (Σχήμα 4.5.) υπολογίστηκε η σταθερά αναστολής  $K_{i(14)} = 63.6 \pm 3.0 \mu\text{M}$  ως το σημείο τομής της ευθείας με τον οριζόντιο άξονα στο Σχήμα 4.5. Αναλυτικά ο υπολογισμός της σταθεράς αναστολής  $K_i$  περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.13..



$\mu$  4.4. Lineweaver-Burk ( )  
 $\mu$   $\mu$  CDNB (60-2.100  
 $\mu$ M) 14 (0,25 50  $\mu$  ).



$\mu$  4.5.  $\mu$  4.4.  $\mu$  (slopes)  
 14.



Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, είναι εμφανές ότι οι αναστολείς **13** και **16** είναι οι ισχυρότεροι, σε σύγκριση με τα δώδεκα παράγωγα που ελέγχθηκαν και παρουσιάζουν αναστολή περίπου 40 % επί της δραστηριότητας του ενζύμου hGSTP1B.

#### 4.4.2.1. Υπολογισμός του δείκτη IC50 για τον αναστολέα 16

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα ο αναστολέας **16** εμφάνισε σχετικά μέτρια αναστολή (40,7 %) οπότε και μελετήθηκε περαιτέρω. Ειδικότερα, υπολογίστηκε ο δείκτης IC50 (half maximal inhibitory concentration). Για τον υπολογισμό του IC50 πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές δοκιμές στις ίδιες συνθήκες που περιγράφονται στις παραγράφους 2.3.3 & 2.3.3..

Σκοπός της συγκεκριμένης διαδικασίας είναι να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση του αναστολέα, στην οποία έχουμε παραμένουσα δραστηριότητα του ενζύμου ίση με το 50% της αρχικής.

Ο αναστολέας **16** μελετήθηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ως προς την αναστολή που επιφέρει στη δραστηριότητα σε σταθερή ποσότητα ισοενζύμου hGSTP1A και υπολογίστηκε η παραμένουσα δραστηριότητα του ενζύμου. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

**Πίνακας 4.4.** Αποτελέσματα μελέτης του αναστολέα **16** σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ως προς το αλλοένζυμο hGSTP1B.

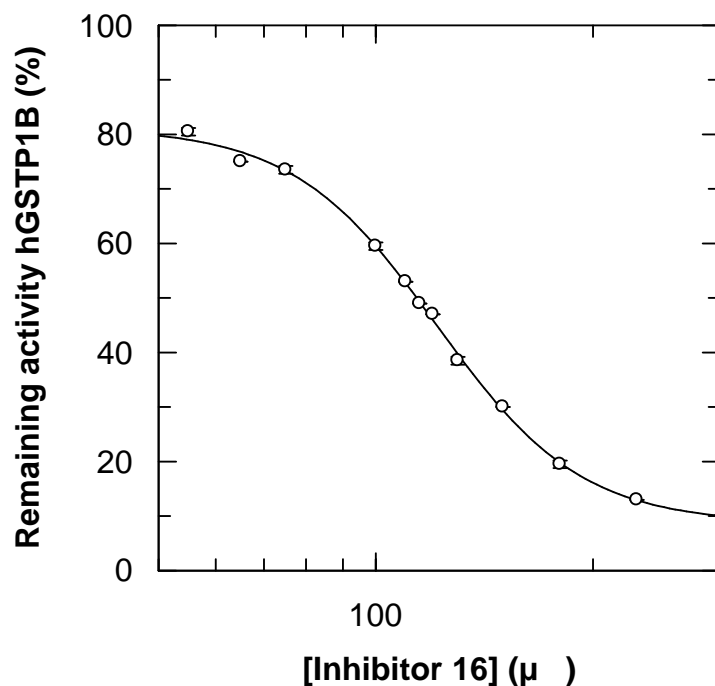
[Αναστολέας 16] (mM)	Παραμένουσα δραστηριότητα hGSTP1B (%) (†)
0,00	100
2,75	80



3,25	75
3,75	73
5,00	60
5,50	53
5,75	49
6,00	47
6,50	35
9,00	20
11,50	13

(\*) Μέγιστο σφάλμα (Μ.Ο. 3 δοκιμών ) είναι <5%.

Εν συνεχεία, τα δεδομένα που προέκυψαν από τις μετρήσεις επεξεργάστηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με το πρόγραμμα GraFit 3.0, τα δε αποτελέσματα έδωσαν την κατωτέρω γραφική παράσταση (Σχήμα 4.7.), από την οποία προκύπτει  $IC50_{(16)} = 115.0 \pm 2,7 \mu M.$



μ 4.7. μ μ hGSTP1B (%) 16.  
 μ μ 15 (0-230 μ ) 16.

#### 4.4.2.2. Κινητική μελέτη αναστολής του αλλοενζύμου hGSTP1B από την ένωση 16

Κινητική μελέτη έχοντας το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενηόλιο (CDNB) ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα.

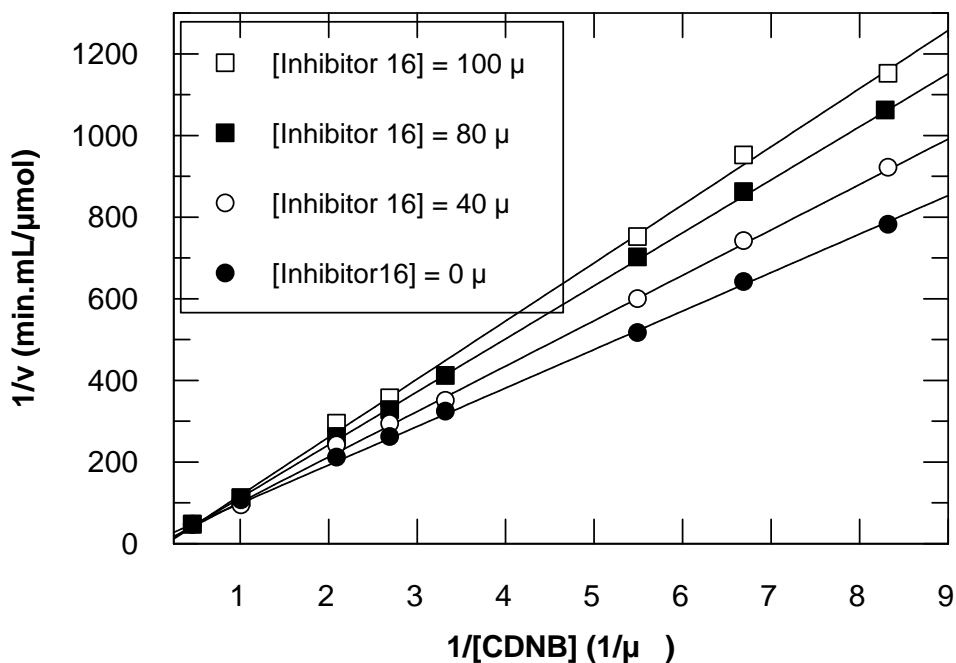
Ακολουθώντας την τεχνική που περιγράφηκε στις παραγράφους 2.3.2 & 2.3.3, χρησιμοποιήσαμε το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης για την κινητική μελέτη της αναστολής από το παράγωγο 16 κρατώντας σταθερή τη συγκέντρωση της γλουταθειόνης ([GSH] = 2.500 μM). Οι μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις του CDNB καλύπτουν το εύρος 75-2.100 μM και μελετήθηκαν σε τρεις διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις του αναστολέα 16 (0, 40, 80, 100 μM).

Σύμφωνα με τη μελέτη, ο αναστολέας 16 φαίνεται να παρουσιάζει καθαρή συναγωνιστική αναστολή, δηλαδή αναστολέας 16 και CDNB ανταγωνίζονται

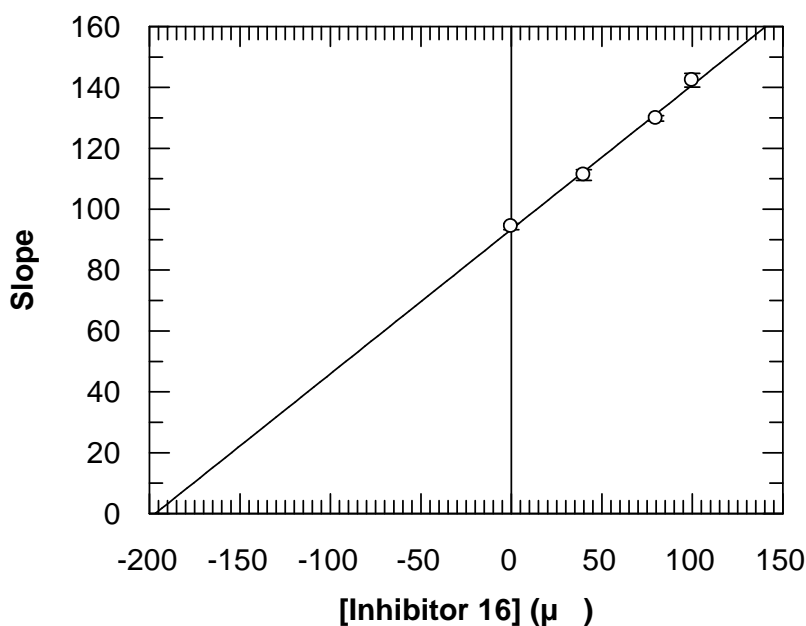
για την ίδια θέση δέσμευσης της GST. Η εκτίμηση αυτού του αποτελέσματος στηρίζεται στο γεγονός ότι, τόσο η γραφική παράσταση Lineweaver-Burk (διπλά αντίστροφα) (Σχήμα 4.8.) όσο και η δευτερεύουσα επεξεργασία της, παρουσιάζουν γραμμικότητα (Σχήμα 4.9.), ενώ το κοινό σημείο τομής βρίσκεται στον κάθετο άξονα (Y).

Όλα τα αποτελέσματα της κινητικής μελέτης προκύπτουν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις, ενώ επεξεργάστηκαν με Υ/Π με το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraFit 3.0.

Η γραμμικότητα των παρακάτω διαγραμμάτων (Σχήματα 4.8. & 4.9.) υποδεικνύουν τύπο *καθαρής συναγωνιστικής αναστολής*. Επιπλέον από το δευτερογενές γράφημα (Σχήμα 4.9.) υπολογίστηκε η σταθερά αναστολής  $K_{i(16)} = 198,6 \pm 14,3 \mu\text{M}$  (ως το σημείο τομής της ευθείας με τον οριζόντιο άξονα στο Σχήμα 4.9.). Αναλυτικά ο υπολογισμός της σταθεράς αναστολής  $K_i$  περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.13..



μ 4.8. Lineweaver-Burk ( )  
 μ μ CDNB (75-2.100  
 μM) 16 (0-100 μM).



μ 4.9.  
4.8..

16.

(slopes)

μ

μ

#### 4.4.3. Αλλοένζυμο hGSTP1C

Το ιστόγραμμα που ακολουθεί (Σχήμα 4.10.) παρουσιάζει συγκεντρωτικά και σχηματικά τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης για το ένζυμο hGSTP1C.

Οι ενώσεις-αναστολείς έχουν ταξινομηθεί σε δύο ομάδες με βάση το ποσοστό της αναστολής που παρουσιάζουν :

- i. *Ομάδα ενώσεων χαμηλής αναστολής:* Περιλαμβάνει τις ενώσεις **5, 6, 7, 8, 9, 11, 14, 15** και **16**, οι οποίες παρουσιάζουν αναστολή του ενζύμου hGSTP1C περίπου έως 35%.
- ii. *Ομάδα ενώσεων μέτριας αναστολής:* Περιλαμβάνει την ένωση **12**, η οποία παρουσιάζει αναστολή του ενζύμου hGSTP1C περίπου 35% έως 65%.



του IC50 πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές δοκιμές στις ίδιες συνθήκες που περιγράφονται στις παραγράφους 2.3.2 & 2.3.3..

Σκοπός της συγκεκριμένης διαδικασίας είναι να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση του αναστολέα, στην οποία έχουμε παραμένουσα δραστηριότητα του ενζύμου ίση με το 50 % της αρχικής.

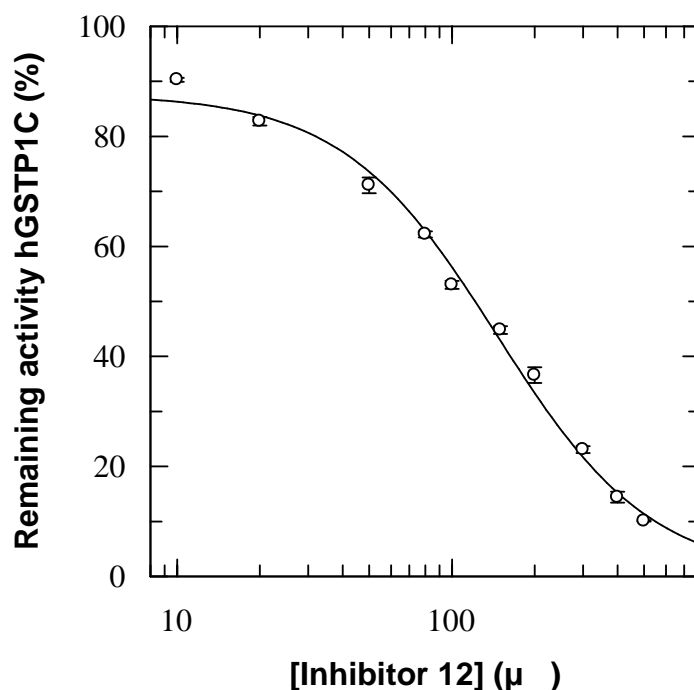
Ο αναστολέας **12** μελετήθηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ως προς την αναστολή που επιφέρει στο ένζυμο hGSTP1C και υπολογίστηκε η παραμένουσα δραστηριότητα του ενζύμου. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

**Πίνακας 4.5.** Αποτελέσματα μελέτης του αναστολέα **12** σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ως προς το αλλοένζυμο hGSTP1C.

[Αναστολέας 12] (mM)	Παραμένουσα δραστηριότητα hGSTP1C (%) (*)
1,0	82,9
2,5	71,1
4,0	62,2
5,0	49,2
10,0	40,0
20,0	14,4
25,0	10,1
30,0	5,5

(\*) Μέγιστο σφάλμα (Μ.Ο. 3 δοκιμών) είναι <5%.

Εν συνεχεία, τα δεδομένα που προέκυψαν από τις μετρήσεις επεξεργάστηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με το πρόγραμμα GraFit 3.0, τα δε αποτελέσματα έδωσαν την κατωτέρω γραφική παράσταση (Σχήμα 4.10), από την οποία προκύπτει  $IC_{50(12)} = 101.5 \pm 8.0 \mu\text{M}$ :



**μ 4.10.** μ μ μ hGSTP1C (%) **12.**  
μ 8 (20-600 μ ) **12.**

#### 4.4.3.2. Κινητική μελέτη αναστολής του αλλοενζύμου hGSTP1C από το παράγωγο 12

(α) Κινητική μελέτη αναστολής του αλλοενζύμου hGSTP1C έχοντας το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενηόλιο (CDNB) ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα.

Ακολουθώντας την τεχνική που περιγράφηκε στις παραγράφους 2.3.2. & 2.3.3., χρησιμοποιήσαμε το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης για την κινητική μελέτη της αναστολής από το παράγωγο 12 κρατώντας σταθερή τη συγκέντρωση της γλουταθειόνης ([GSH] = 2.500 μM). Οι μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις του

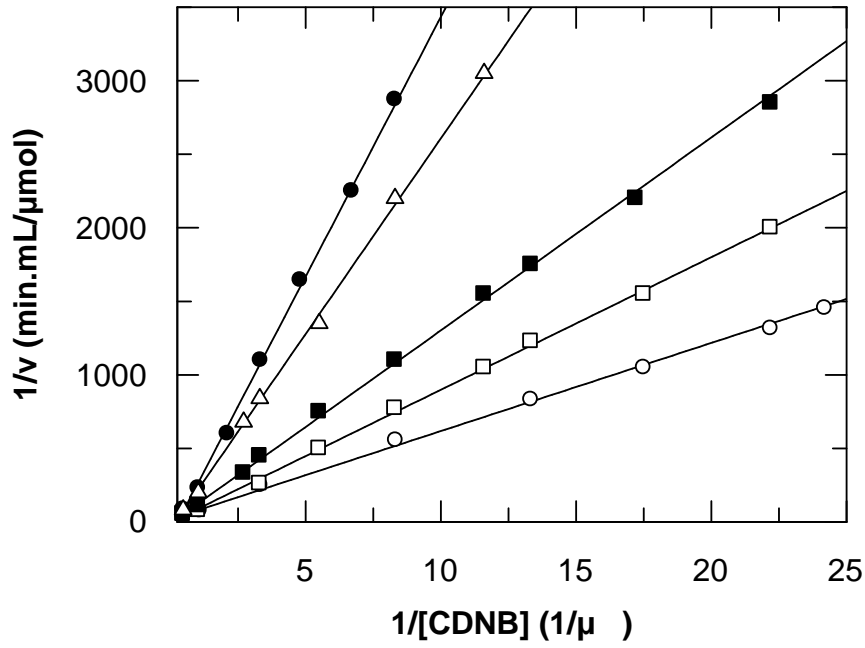
CDNB καλύπτουν το εύρος 37,5-2.100  $\mu\text{M}$  και μελετήθηκαν σε τέσσερις διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις του αναστολέα **12** (0, 15, 30, 70, 100  $\mu\text{M}$ ) καθώς επίσης και στην περίπτωση απουσίας αναστολέα (0  $\mu\text{M}$ ).

Σύμφωνα με τη μελέτη, ο αναστολέας **12** φαίνεται να παρουσιάζει καθαρή συναγωνιστική αναστολή, δηλαδή αναστολέας **12** και CDNB ανταγωνίζονται για την ίδια θέση δέσμευσης της GST. Η εκτίμηση αυτού του αποτελέσματος στηρίζεται στο γεγονός ότι, τόσο η γραφική παράσταση Lineweaver-Burk (διπλά αντίστροφα) (Σχήμα 4.11.) όσο και η δευτερεύουσα επεξεργασία της (Σχήμα 4.12.) παρουσιάζουν γραμμικότητα, ενώ το κοινό σημείο τομής στο Σχήμα 4.11. είναι στον κάθετο άξονα (Y).

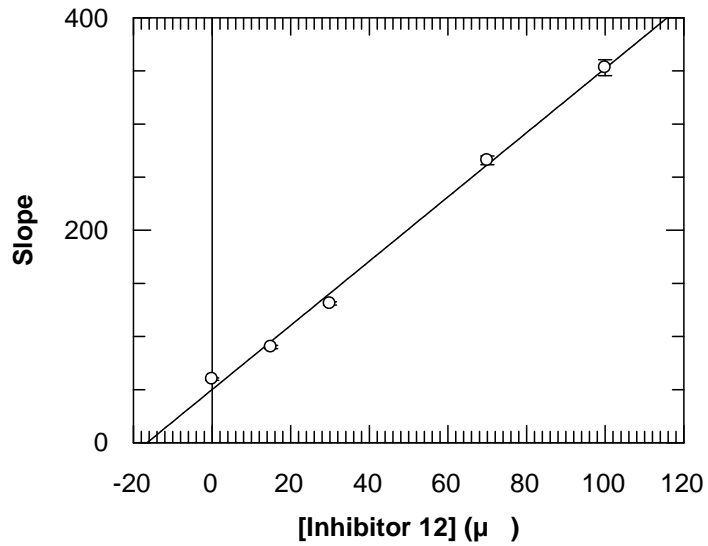
Όλα τα αποτελέσματα της κινητικής μελέτης προκύπτουν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις, ενώ επεξεργάστηκαν με Y/Π με το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraFit 3.0. Τα παρακάτω διαγράμματα αποδεικνύουν την καθαρή συναγωνιστική αναστολή.

Επιπλέον, από το δευτερογενές γράφημα (Σχήμα 4.12.) υπολογίστηκε η σταθερά αναστολής  $K_{i(12)} = 16.5 \pm 2.7 \mu\text{M}$  (ως το σημείο τομής της ευθείας με τον οριζόντιο άξονα στο Σχήμα 4.12.). Αναλυτικά, ο υπολογισμός της σταθεράς αναστολής  $K_{i(12)}$  περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.13.





$\mu$  4.11. Lineweaver-Burk ( )  
 $\mu$  CDNB (75-2.100  
 $\mu$ M) 12 (0, 15, 30, 70 100  $\mu$ M).  
 $\circ$  [Inhibitor 12] = 0  $\mu$  , [Inhibitor 12] = 100  $\mu$  , [Inhibitor 12] = 15  $\mu$  ,  $\blacksquare$  [Inhibitor  
 12]=30 $\mu$  ,  $\triangle$  [Inhibitor 12] = 70  $\mu$  .



$\mu$  4.12.  $\mu$  4.11. (slopes)  $\mu$   
 12.

(β) Κινητική μελέτη αναστολής του αλλοενζύμου hGSTP1C έχοντας τη γλουταθειόνη (GSH) ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα.

Ακολουθώντας την τεχνική που περιγράφηκε στις παραγράφους 2.3.2 & 2.3.3 χρησιμοποιήσαμε τη γλουταθειόνη (GSH) ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης, για τη μελέτη της αναστολής που προκαλεί ο αναστολέας **12**, διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση του υποστρώματος 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζολίου ([CDNB] = 1 μM). Οι μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις της GSH καλύπτουν το εύρος 45-2.500 μM και μελετήθηκαν σε 3 διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις του αναστολέα **12** (15, 30, 60 μM) καθώς επίσης και στην περίπτωση απουσίας αναστολέα.

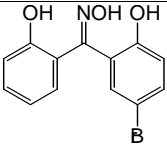
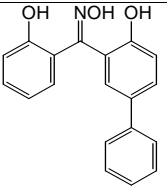
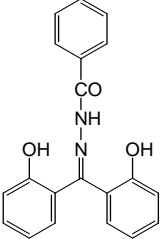
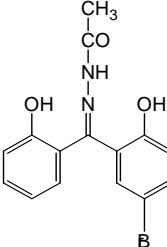
Σύμφωνα με τη μελέτη ο αναστολέας **12** φαίνεται να παρουσιάζει *μεικτή αναστολή*. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι οι ευθείες που σχηματίζουν οι διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα **12** στη γραφική απεικόνιση Lineweaver-Burk (δίπλων αντιστρόφων) (Σχήμα 4.13.) έχουν κοινό σημείο τομής εκτός των αξόνων Χ,Υ (κοινό σημείο τομής στο 4<sup>ο</sup> τεταρτημόριο). Επιπλέον, επειδή το δευτερογενές γράφημα (Σχήμα 4.14.), που προκύπτει από στοιχεία του Σχήματος 4.13., παρουσιάζει γραμμικότητα, έχουμε *γραμμική μεικτή αναστολή*.

Όλα τα αποτελέσματα της κινητικής μελέτης προκύπτουν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις, ενώ επεξεργάστηκαν με Υ/Π με το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraFit 3.0. Τα παρακάτω διαγράμματα υποδηλώνουν τύπο μεικτής αναστολής.



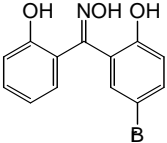
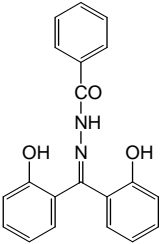
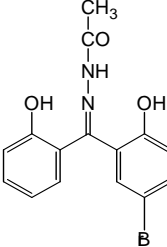
4.7.

μ IC<sub>50</sub>

Αριθμός Ένωσης	Δομή Ένωσης	IC <sub>50</sub> (μM)		
		hGSTP1A	hGSTP1B	hGSTP1C
12				101.5 ± 8.0
13		77.8 ± 3.4		
14		80.0 ± 4.9		
16			115.0 ± 2.7	

4.8.

 $\mu K_i$  (CDNB)

Αριθμός Ένωσης	Δομή Ένωσης	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )		
		hGSTP1A	hGSTP1B	hGSTP1C
12				$16.5 \pm 2.7$
14		$63.6 \pm 3.0$		
16			$198.6 \pm 14.3$	

# ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι τρανσφεράσες γλουταθειόνης (GSTs) είναι πολυλειτουργικά ένζυμα που συμμετέχουν στην κυτταρική αποτοξίνωση από ενδογενείς και εξωγενείς ηλεκτρονιόφιλες ενώσεις, μέσω κατάλυσης της δημιουργίας ομοιοπολικών συμπλόκων μεταξύ αυτών και της γλουταθειόνης (GSH). Αποτελούν μοριακό στόχο για τον σχεδιασμό νέων φαρμάκων και προ-φαρμάκων που θα δρουν στοχευμένα εκεί που υπερεκφράζονται τα συγκεκριμένα ισοένζυμα και εμφανίζουν υψηλή δραστικότητα.

Στην παρούσα μελέτη εξετάζεται μια ομάδα συνθετικών ενώσεων (Πίνακας 2.2.) οι οποίες δεν έχουν εξετασθεί έως τώρα ως πιθανοί αναστολείς GSTs. Οι εν λόγω ενώσεις έχουν αποδεδειγμένη χρησιμότητα στη φαρμακευτική επιστήμη και είναι οι 2,2'-διυδροξυ-βενζοφαινόνες και τα Ν-καρβονυλικά παράγωγα τους. Ειδικότερα, η ομάδα αποτελείται από διυδροξυβενζοφαινόνες (5-10), κετοξίμες (11-13) και Ν-ακυλο-υδραζόνες (14-16). Οι ενώσεις αυτές εξετάστηκαν με το ισοένζυμο hGSTP1A και τα δύο αντίστοιχα αλλοένζυμα hGSTP1B & hGSTP1C. Σημειώνεται ότι, τα ισοένζυμα hGSTP1A, hGSTP1B & hGSTP1C έχουν μεγάλη σημασία για τον καρκίνο σε σχέση με το φαινόμενο MDR.

Τα αποτελέσματα της μελέτης (ενότητα 4.2.) θα συνεκτιμηθούν με τα αποτελέσματα *in silico* μοριακού μοντελισμού και ελλιμενισμού (docking) που παρουσιάζονται στο παρόν κεφάλαιο, προκειμένου να διαμορφωθεί μία ευκρινέστερη εικόνα για τον τρόπο δέσμευσης των υπό μελέτη αναστολέων στα ένζυμα-στόχο. Τα *in silico* μοριακά μοντέλα, τα οποία θα βοηθήσουν στην αξιολόγηση των πειραματικών αποτελεσμάτων της συγκεκριμένης εργασίας, θα είναι ευγενική προσφορά του κ. Ηλία Ηλιόπουλου, Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοτεχνολογίας του ΓΠΑ.

Τα παρασκευάσματα των μελετηθέντων κλωνοποιημένων ενζύμων προέκυψαν κατόπιν ετερόλογης έκφρασης (ενότητα 2.3.1.2.) των αντίστοιχων πλασμιδίων σε *E. coli* BL21 (DE3) και καθαρισμού (ενότητα 2.3.7.1.) των πρωτεϊνών που ενδιαφέρουν (2,4-91 φορές, 28-100% ανάκτηση) σε στήλες χρωματογραφίας συγγενείας, χρησιμοποιώντας 1,4-βουτανοδιολο-διγλυκιδυλο-αιθέρα-GSH-Sepharose-CL6B (BES-GSH) για τα ένζυμα hGSTP1A, hGSTP1B & hGSTP1C. Η καθαρότητα των εν λόγω

ισοενζύμων φαίνεται στο φωτογραφία 4.1.. Τα αποτελέσματα του καθαρισμού, αναφορικά με την ανάκτηση της ενζυμικής δραστηριότητας (%), είναι συγκρίσιμα με προηγούμενα αποτελέσματα (Ε. Χρονοπούλου, 2013 και Chronopoulou *et al.*, 2012a). Η απόδοση του καθαρισμού των ισοενζύμων hGSTP1A, hGSTP1B & hGSTP1C είναι 91, 73,8 & 100% αντίστοιχα στην παρούσα μελέτη ενώ 100, 70 & 85 % στη μελέτη της Ε.Χρονοπούλου,2013. Ωστόσο, η ειδική δραστηριότητα (ΕΔ) των τριών ενζυμικών παρασκευασμάτων διαφέρει σημαντικά. Συγκεκριμένα, για τα ισοένζυμα hGSTP1A & hGSTP1C, στην παρούσα εργασία, η ΕΔ είναι υψηλότερη κατά έξι και τέσσερις φορές, αντίστοιχα (2,54 U/mg & 22,7 U/mg έναντι 15,9 U/mg & 83 U/mg), ενώ για το ισοένζυμο hGSTP1B η ΕΔ είναι σχεδόν επτά φορές χαμηλότερη (28,6 U/mg έναντι 4 U/mg), σε σχέση τη μελέτη της Ε.Χρονοπούλου.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε πειραματικός έλεγχος ('σάρωση') σε όλες τις ενώσεις (ενότητα 2.3.11.2. & 4.2.) εφαρμόζοντας φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της δραστηριότητας hGSTP1 χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) και γλουταθειόνη (GSH), παρουσία και απουσία του υποψήφιου 'αναστολέα' (ενότητα 2.3.2. & 2.3.3.).

Όσο αναφορά το ισοένζυμο hGSTP1A δύο ενώσεις παρουσίασαν υψηλή αναστολή, η ένωση 13 η οποία εμφάνισε 67 % αναστολή και η ένωση 14 με 61.7 % αναστολή. Ειδικότερα, ο κετοξιμικός αναστολέας 13 μελετήθηκε περαιτέρω και υπολογίστηκε ο δείκτης  $IC_{50(13)}$  ίσος με  $77.8 \pm 3.4 \mu\text{M}$  (Σχήμα 4.2). Επίσης, για τον κετοξιμικό αναστολέα 14 υπολογίστηκε ο δείκτης  $IC_{50(14)} = 80.0 \pm 4.9 \mu\text{M}$  (Σχήμα 4.3), ενώ πραγματοποιήθηκε και κινητική μελέτη αναστολής έχοντας το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα. Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή, ο αναστολέας 14 φαίνεται να παρουσιάζει καθαρά συναγωνιστική αναστολή, δηλαδή αναστολέας 14 και CDNB συναγωνίζονται για την ίδια θέση δέσμευσης του hGSTP1A. Η εκτίμηση αυτού του αποτελέσματος στηρίζεται στο γεγονός ότι, τόσο η γραφική παράσταση Lineweaver-Burk (διπλά αντίστροφα) (Σχήμα 4.4.) όσο και η δευτερεύουσα επεξεργασία της,



παρουσιάζουν γραμμικότητα (Σχήμα 4.5.). Επιπλέον, από το δευτερογενές γράφημα (Σχήμα 4.5.) υπολογίστηκε η σταθερά αναστολής  $K_{i(14)} = 63.6 \pm 3.0 \mu\text{M}$  (ως το σημείο τομής της ευθείας με τον οριζόντιο άξονα στο Σχήμα 4.5.).

Όσο αναφορά στο ισοένζυμο hGSTP1B, ο N-ακυλο-υδραζονικός αναστολέας **16** παρουσίασε σχετικά μέτρια αναστολή (40.7 %). Υπολογίστηκε ο δείκτης  $IC_{50(16)}$  ίσος με  $115.0 \pm 2.7 \mu\text{M}$  (Σχήμα 4.7.), ενώ πραγματοποιήθηκε και κινητική μελέτη αναστολής έχοντας το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα. Ο αναστολέας **16** φαίνεται να παρουσιάζει *καθαρά συναγωνιστική αναστολή*, δηλαδή αναστολέας **16** και CDNB ανταγωνίζονται για την ίδια θέση δέσμησης της hGSTP1B. Η εκτίμηση αυτού του αποτελέσματος στηρίζεται στο γεγονός ότι, τόσο η γραφική παράσταση Lineweaver-Burk (διπλά αντίστροφα) (Σχήμα 4.8.) όσο και η δευτερεύουσα επεξεργασία της, παρουσιάζουν γραμμικότητα (Σχήμα 4.9.). Από το δευτερογενές γράφημα (Σχήμα 4.9.) υπολογίστηκε η σταθερά αναστολής  $K_{i(16)} = 198,6 \pm 14,3 \mu\text{M}$ .

Τέλος, όσο αναφορά στο ισοένζυμο hGSTP1C, ο κετοξιμικός αναστολέας **12** παρουσιάζει αναστολή περίπου 50.7 % επί της δραστηριότητας του ενζύμου. Υπολογίστηκε ο δείκτης  $IC_{50(12)}$  ίσος με  $101.5 \pm 8.0 \mu\text{M}$  (Σχήμα 4.10.), ενώ έγινε και κινητική μελέτη αναστολής έχοντας το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα. Ο αναστολέας **12** φαίνεται να παρουσιάζει *καθαρά συναγωνιστική αναστολή*, δηλαδή αναστολέας **12** και CDNB ανταγωνίζονται για την ίδια θέση δέσμησης της hGSTP1C. Η εκτίμηση αυτού του αποτελέσματος στηρίζεται στο γεγονός ότι, τόσο η γραφική παράσταση Lineweaver-Burk (διπλά αντίστροφα) (Σχήμα 4.11.) όσο και η δευτερεύουσα επεξεργασία της, παρουσιάζουν γραμμικότητα (Σχήμα 4.12.). Από το δευτερογενές γράφημα (Σχήμα 4.12.) υπολογίστηκε η σταθερά αναστολής  $K_{i(12)} = 16.5 \pm 2.7 \mu\text{M}$ . Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη αναστολής έχοντας τη γλουταθειόνη (GSH) ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα. Σύμφωνα με τη μελέτη ο αναστολέας **12** φαίνεται να παρουσιάζει *μεικτή αναστολή*. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι οι ευθείες που σχηματίζουν οι

διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα **12** στη γραφική απεικόνιση Lineweaver-Burk (δίπλων αντιστρόφων) (Σχήμα 4.13) έχουν κοινό σημείο τομής εκτός των αξόνων Χ,Υ (κοινό σημείο τομής στο 2<sup>ο</sup> τεταρτημόριο). Επιπλέον, επειδή το δευτερογενές γράφημα (Σχήμα 4.14.) που προκύπτει από δεδομένα του Σχήματος 4.13., παρουσιάζει γραμμικότητα, υποδεικνύεται περίπτωση *καθαρής (γραμμικής) μεικτής αναστολής*.

Συμπερασματικά, οι τρεις ανωτέρω ενώσεις φαίνεται να δεσμεύονται μέσα ή κοντά στην καταλυτική περιοχή του ενζύμου με τρόπο συναγωνιστικό ως προς το υπόστρωμα CDNB.

Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε σάρωση των ενώσεων με το ισοένζυμο τρανσφεράση γλουταθειόνης ανθρώπου hGSP1A-His<sub>6</sub> που φέρει την απόληξη 6His. Οι ανωτέρω ενώσεις δεν παρουσίασαν αξιόλογη αναστολή με την 6His-μορφή του ισοενζύμου hGSTP1A (η ένωση **13** έδωσε 11% αναστολή, η ένωση **14** 25% αναστολή και η ένωση **15** 11% αναστολή). Αν και η εν λόγω μορφή καθαρού ενζύμου παρουσιάζει σημαντικά υψηλότερη ειδική δραστηριότητα (10,79 U/mg) συγκριτικά με τη φυσιολογική μορφή hGSTP1A (2,54 U/mg) (Chronopoulou et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα), ενδεχομένως η παρουσία της 6His απολήξεως πλησίον της εισόδου προς την ενεργό περιοχή, παρεμποδίζει την πρόσβαση του αναστολέα που είναι ογκωδέστερος του υποστρώματος CDNB.

Τα γενικά συμπεράσματα συνοψίζονται ως εξής:

- ✓ Οι ενώσεις 2,2'-διυδροξυ-βενζοφαινόνες και τα Ν-καρβονυλικά παραγωγά τους μελετήθηκαν για πρώτη φορά ως αναστολείς GSTs και συγκεκριμένα του ισοενζύμου hGSTP1A καθώς και των δύο αντίστοιχων αλλοενζύμων hGSTP1B & hGSTP1C.
- ✓ Δύο κετοξίμες (12 & 14) και μία Ν-ακυλο-υδραζόνη (16), επιλέγισαν ως αξιόλογοι αναστολείς (βάσει τιμών IC<sub>50</sub>) για τα αλλοένζυμα hGSTP1C, hGSTP1A και hGSTP1B, αντιστοίχως.

- ✓ Και οι τρεις επιλεγείσες ενώσεις, με το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα, φαίνεται να παρουσιάζουν καθαρή συναγωνιστική αναστολή, δηλαδή αναστολείς και CDNB ανταγωνίζονται για την ίδια περιοχική δέσμευση της GST.
- ✓ Λεπτομερέστερη κατανόηση της αλληλεπίδρασης αναστολέα και ενζύμου θα μπορούσε να προσφέρει *in silico* ανάλυση μέσω μοριακού μοντελισμού και ελλιμενισμού.

# Κεφάλαιο 5

## **ΒΙΒΛΙΟΦΡΑΦΙΑ**

### Ελληνική Βιβλιογραφία

- ✓ Αξαρχλή Ε. (2009). Πρωτεϊνική μηχανική και χαρακτηρισμός του ενζύμου μεταφοράση του γλουταθείου. Διδακτορική διατριβή, ΓΠΑ.
- ✓ Κλώνης Ιωάννης , Ενζυμολογία , εκδόσεις ΕΜΒΡΥΟ, Αιγάλεω, 2007.
- ✓ Πλατής Μ. (2010). Μελέτη της αλληλεπίδρασης του ενζύμου S-μεταφοράση του γλουταθείου από *Shistosoma japonica* με ξενοβιοτικές ενώσεις. Μεταπτυχιακή Διατριβή, ΓΠΑ.
- ✓ Χρονοπούλου Ε. (2013). Πρωτεϊνική μηχανική του ενζύμου μεταφοράση της γλουταθειόνης με στόχο την ανάπτυξη βιοαισθητήρα μέτρησης ξενοβιοτικών ενώσεων. Διδακτορική διατριβή, ΓΠΑ.

### Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- ✓ Adersson C., Mosialou E., Weinarder R., Morgenstern R. (1994). In conjugation-dependent carcinogenicity and toxicity of foreign compounds. *Academic Press* 27, 19-35.
- ✓ 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., O. Akande, G. Antoun, J.X. Mao, J. Buolamwini. 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 (1997) 10004-10012.
- ✓ Ali-Osman F., Lopez-Berestein G., Buolamwini J., Antoun G., Lo H.W., Keller C., Akande O. (1998). Glutathione S-transferase genes in cancer.
- ✓ Allan J.M., C.P. Wild, S. Rollinson, E.V. Willett, A.V. Moorman, G.J. Dovey, P.L. Roddam, E. Roman, R.A. Cartwright, G.J. Morgan. Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy-induced leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 11592-11597.

- ✓ Allen, I. Elaine, Seaman, Jeff. Seizing the Opportunity: The Quality and Extent of Online Education in the United States, 2002 and 2003.
- ✓ Allocati N., Favalaro B., Masulli M., Alexeyev M.F., Di Illio C.(2003). Proteus mirabilis glutathione S-transferase B1-1 is involved in protective mechanisms against oxidative and chemical stresses. *Biochem. J.* 373, 305-311.
- ✓ Andreou V.G., Clonis Y.D. (2002). Novel fiber-optic biosensor based on immobilized glutathione S-transferase and sol-gel entrapped rococresol green for determination of atrazine. *Analyt Chim Acta* 460, 151-161.
- ✓ Ando Yuichi, Hideo Saka, Maki Ando, Toshiyuki Sawa, Kei Muro, Hiroshi Ueoka, Akira Yokoyama, Soh Saitoh, Kaoru Shimokata, Yoshinori. Hasegawa Polymorphisms of UDP-Glucuronosyltransferase Gene and Irinotecan Toxicity: A Pharmacogenetic Analysis.
- ✓ Antony Andrews. *February 1983*. Breakdowns of caseins by proteinases in bovine milks with high somatic cell counts arising from mastitis or infusion with bacterial endotoxin. *Journal of Dairy Research. Volume 50. Issue 01, Pp 57-66.*
- ✓ Arca P., C. Hardisson, J.E. Suárez (1990). Purification of a glutathione S-transferase that mediates fosfomycin resistance in bacteria.
- ✓ Armstrong Richard N. (1997). Structure, Catalytic Mechanism, and Evolution of the Glutathione Transferases. *Chem. Res. Toxicol.* 1997, 10, 2-18.
- ✓ Awasthi, Y.C., Ansari, G.A., Awasthi, S. (2005). Regulation of 4-hydroxynonemal mediated signaling by glutathione S-transferases. *Methods Enzymol.* 401, 379-407.
- ✓ Awasthi Y.C., Ansari G.A., Awashti S. (2006). Regulation of 4-hydroxynoneral mediated signaling by glutathione S- transferases. *Methods Enzymol.* 401, 379-407.
- ✓ Axarli E., Labrou N.E., Petrou C., Kordopatis P., Rassias N., Clonis Y.D. (2009). Sulphonamide-based bombesin prodrug analogues for

glutathione S-transferase, useful in targeting cancer chemotherapy. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 2009-2016.

- ✓ Aziz Amine, Hasna Mohammadi, Ilhame Bourais, Giuseppe Palleschi. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Volume 21, Issue 8, 15 February 2006, Pages 1405-1423.*
- ✓ Ballou W. Ripley, J. Sherwood, F. Neva, D. Gordon, R. Wirtze, F. Wasserman, Carter. Diggs a, S.L. Hoffman, Michael R. Hollingdale, Wayne T. Hockmeyer, Imogene Schneider, James F. Young, Peter Reeve, Jeffrey D. Chulay. Safety and efficacy of a recombinant dna plasmodium falciparum sporozoite vaccine. *Biochem. J.* (1992) 286 (929-935).
- ✓ Basantani, M., Stivastana, A. (2007). Plant glutathione transferases: a decade falls short. *Can.J. Bot.* 85, 443-456.
- ✓ Batist C., Tulpules A., Sinha B., Katki A., Myers C.E. and Cowan K.H. (1986). Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrugresistant human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 261., 15544-15549.
- ✓ Beharry Z. and Palzkill T. (2005). Functional analysis of active residues of the fosfomycin resistance enzyme FosA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 280(18), 17786-17791.
- ✓ Benson, A.M., Talalay, P., Keen, J.H., Jakody, W.B. (1997). Relationship between the soluble glutathione-dependent delta 5-3-ketosteroid isomerase and the glutathione S-transferases of thi liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 158-162.
- ✓ Bernat B.A., Laughlin L.T. and Armstrong R.N. (1997). Fosfomycin resistance protein (FosA) is a manganese metalloglutathione transferase related to glyoxalase I and the extradiol dioxygenases. *Biochem.* 36, 3050-3055.
- ✓ Berning T., Chankock S. J.(2006). Challenges of SNp genotyping and genetic variation : its future role in diagnosis and treatment of cancer. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 6, 319-331.
- ✓ Beuckman, C.T., Fujimori, K., Urade, Y. Hayaishi, O.(2000). Identification of mu-class glutathione transferase M2-2 and M3-3 as

cytosolic prostaglandin E synthases in the human brain. *Neurochem. Res.* 25, 733-738.

- ✓ Bladeren Peter J., Ben van Ommen. 1991 The inhibition of glutathione S-transferases: Mechanisms, toxic consequences and therapeutic benefits. *Pages 35-46. Brophy P. M., Barrett J. Glutathione transferase in helminthes. Review Article.*
- ✓ Board P.G., Webb G.C., Isolation of a cDNA clone and localization of human glutathione S-transferase 2 genes to chromosome band 6p12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84 (1987) 2377-2381.
- ✓ Board P.G., G.C. Webb, M. Coggan, Isolation of a cDNA clone and localization of the human glutathione S-transferase 3 genes to chromosome bands 11q13 and 12q13-14. *Ann. Hum. Genet.* 53 (1989) 205-213.
- ✓ Board P.G., Baker M., Chelvanayagam G., Jermiin L.S. (1997). Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem. J.* 328,929-235.
- ✓ Board P.G., Coggan M., Chelvanayagam G., Eastel S., Jermiin L.S., Sculte G.K., Danley D.E., Holth L.R., Griffor M.C., Kamath A.V., Ronsner M.H., Chrnyk B.A., Perregaux D.E., Gabel C.A., Geoghean K.F., Pandit J. (2000). Identification, characterization and crystal structure of the omega class glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* 275,24789-24806.
- ✓ Board P.G., Coggan M., Chelvanayagam G., Eastel S., Jermiin L.S., Sculte G.K., Danley D.E., Holth L.R., Griffor M.C., Kamath A.V., Ronsner M.H., Chrnyk B.A., Perregaux D.E., Gabel C.A., Geoghean K.F., Pandit J. (2000). Identification, characterization and crystal structure of the omega class glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* 275,24789-24806.
- ✓ 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., M.W. Anders, Glutathione transferase omega 1 catalyzes the reduction of S-(phenacyl)glutathiones to acetophenones. *Chem. Res. Toxicol.* 20 (2007) 149-154.
- ✓ Board P.G., The omega-class glutathione transferases: structure, function, and enetics. *Drug Metab. Rev.* 43 (2011) 226-235.
- ✓ Chittenden Thomas, David M. Livingston, William G. Kaelin Jr. The T/E1A-binding domain of the retinoblastoma product can interact selectively with a sequence-specific DNA-binding protein. *Volume 65, Issue 6, 14 June 1991, Pages 1073-1082.*
- ✓ 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., 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.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., Tsaftaris, A., Labrou, N.E (2012b). Catalytic and structural diversity of the fluazifop-individual glutathione transferases from *Phaseolous vulgaris*. *Planta.* 235, 1253-69.
- ✓ Cote M.L., W. Chen, D.W. Smith, S. Benhamou, C. Bouchardy, D. Butkiewicz, K.M. Fong, M. Gene, A. Hirvonen, C. Kiyohara, J.E. Larsen, P. Lin, O. Raaschou-Nielsen, A.C. Povey, E. Reszka, A. Risch, J. Schneider. Meta- and pooled analysis of GSTP1 polymorphism and lung cancer: a HuGE-GSEC review. *Am. J. Epidemiol.* 169 (2009) 802-814.
- ✓ Coles Michael G.H, Marten K Scheffers, Clay B Holroyd (2000). Why is there an ERN/Ne on correct trials? Response representations, stimulus-related components, and the theory of error-processing. *Biological Psychology.* Volume 56, Issue 3, 1 June 2001, Pages 173-189.

- ✓ Coles G.C., A.C. Rhodes, A.J. Wolstenholme (2001). Rapid selection for ivermectin resistance in *Haemonchus contortus* Veterinary Parasitology. *Volume 129, Issues 3-4, 15 May 2005, Pages 345-347.*
- ✓ Coles B.F., Kadlubar F.F. (2005). Human Alpha Class Glutathione S-transferases : Genetic polymorphism , expression and susceptibility to disease. *Methods in enzymology, 401, 9-42.*
- ✓ Combes, B., and Stakelum, G. S. (1961) A liver enzyme that conjugates sulfobromophthalein sodium with glutathione. *J. Clin. Invest. 40, 981-988.*
- ✓ Covolo L., Placidi D., Gelatti U., Carta A., Scotto Di Carlo A., Lodetti P., Picciche A., Orizio G., Campagne M., Arici C., Porru S. (2008). Bladder cancer, GSTs, NAT1, NAT2, SUT1A1, XRCC1, XRCC3, XPC genetic polymorphisms and coffee consumption : a case-control study. *Eur. J. Epidemiol. 23, 355-360.*
- ✓ 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.*
- ✓ Danley D.E., L.R. Hoth, M.C. Griffor, A.V. Kamath, M.H. Rosner, B.A. Chrnyk, D.E. Perregaux, C.A. Gabel, K.F. Geoghegan, J. Pandit, Identification, characterization and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J. Biol. Chem. 275 (2000) 24798-24806.*
- ✓ Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta. 1830, 3217-3266.*
- ✓ Di Giorgio, C., Delmas, F., Filloux, N., Robin, M., Seferian, L., Azas, N., Gasquet, M., Costa, M., Timon-David, P., Galy, J.-P. (2003). In Vitro Activities of 7-Substituted 9-Chloro and 9-Amino-2-Methoxy-acridines and Their Bis- and Tetra-Acridine Complexes against *Leishmania infantum*. *Antimicrob. Agents Chemother, 47: 174-180.*
- ✓ Dirven Hubert A. A. M., Ben van Ommen, Peter J. van Bladeren. Involvement of Human Glutathione S-Transferase Isoenzymes in the Conjugation of Cyclophosphamide Metabolites with Glutathione. *Cancer Res. 54. 6215-6220.*

- ✓ Dixons DM., Webb E.(1979). Enzyme (3<sup>rd</sup> ed).Longman Group Ltd: London, UK. 332-381.
- ✓ Dixon D.P., Cummins I., Cole D.J., Edwards R. (1998). Glutathione mediated detoxification system in plants. *Curr. Opini. Plant Biol.* 1, 258-266.
- ✓ Dixons D.P., Laphorn A., Edwaeds R. (2002). Protein family review. Plant glutathione transferases. *Gerome Biol.*3 : 3004.1-3004.10.
- ✓ Donald B. Smith , Kevin S. Johnson. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Volume 67, Issue 1, 15 July 1988, Pages 31-40.*
- ✓ Down A.J., Steven A., Morou E., Hemingway J., Vontow J., Paine M.J.I. (2009). A simple glutathione transferases based colorimetric endpoint assay for insecticide detection. *Enzyme Microb. Technol.* 45, 164-168.
- ✓ Dourado Daniel F.A.R., Fernandes Pedro Alexandrino, Ramos Maria João. Mammalian Cytosolic Glutathione Transferases. *Current Protein and Peptide Science*, 2008, 9, 325-337.
- ✓ Droog F. (1997). Plant glutathione S-transferases , a tale of theta and tau. *J.Plant Growth Regal.* 16, 95-107.
- ✓ Eberle Wolfgang, Chris Sander, Werner Klaus, Bernhard Schmidt, Kurt von Figura, Christoph Peters. The essential tyrosine of the internalization signal in lysosomal acid phosphatase is part of a  $\beta$  turn. *Volume 67, Issue 6, 20 December 1991, Pages 1203-1209.*
- ✓ Edele A.N. (1991). *Chimia.* 45, 145.
- ✓ Edwards R., Owen W.J. (1986). Comparison of glutathioneS-transferases of *Zea mays* responsible for herbicide detoxification in plants and suspension -cultural cells. *Planta* 169, 208-215.
- ✓ Edwards R., Dixons D.P. (2000). The role of glutathione transferases in herbicide metabolism. *Sheffild Academic Press*, 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.

- ✓ Ekhart C., V.D.Doodeman, S. Rodenhuis, P.H. Smits, J.H. Beijnen, A.D.Huitema, Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes (GST, CYP2B6 and CYP3A) affect the pharmacokinetics of thiotepa and tepa. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 67 (2009) 50-60.
- ✓ Eklund A., C. Rudberg<sup>1</sup>, S. Smedberg<sup>2</sup>, L. K. Enander<sup>3</sup>, C. E. Leijonmarck<sup>4</sup>, J. Österberg<sup>5</sup>, A. Montgomery. Short-term results of a randomized clinical trial comparing Lichtenstein open repair with totally extraperitoneal laparoscopic inguinal hernia repair. *Article first published online: 24 JUL 2006DOI: 10.1002/bjs.5405.*
- ✓ Eshdat, Y., Holland, D., Faltin, Z., Ben-Hayyim, G. (1997). Plant glutathione peroxidases. *Physiol. Plant.* 100, 234-240.
- ✓ Fikrig E, SW Barthold, FS Kantor, RA Flavell. Protection of mice against the Lyme disease agent by immunizing with recombinant OspA. Vol. 250 no. 4980 pp.553-556.
- ✓ Filimonov, D.A., Poroikov, V.V. (1996) Bioactive Compound Design: Possibilities for Industrial Use. *BIOS Scientific Publishers, pp. 47-56.*
- ✓ Flanagan<sup>1</sup>J. U., J. Rossjohn, Parker, P. G. Board, G. Chelvanayagam (2008). Mutagenic analysis of conserved arginine residues in and around the novel sulfate binding pocket of the human Theta class glutathione transferase T2-2. *Protein Science.* Pp 2205-2212.
- ✓ Forman H.J., TFukut 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.* 278, C246-C256.
- ✓ Fragoulaki M.K., Axarli I.A., Labrou N.E., Clonis Y.D. (2007). Recombinant glutathioneS-transferase for the determination of the herbicide alachlor : The foundations od an optical biosensor. *1<sup>st</sup> UK-US Conference on Chemical and Biological Sensors and Detectors London, UK.*
- ✓ Fratelli, M., Demol, H., Puype, M., Casagrande, S., Villa, P., Eberini, L, Vandekerckhove, J., Gianazza, E., Ghezzi, P. (2003). Identification of proteins undergoing glutathionylation in oxidatively stressed hepatocytes and hepatoma cells. *Proteomics.* 3, 1154-1161.

- ✓ Freeman J.L., Persans M.W., Nieman K., Albechta C., Peera W., Peckeringb L.J., Salta D.E. (2004). Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *The Plant Cell*. 16, 2176-2191.
- ✓ Frova C. (2003). The plant glutathione transferase gene family: genomics structure, functions, expressions and evolution. *Physiol. Plant*. 119, 469-479.
- ✓ Gao Y., X. Pan, T. Su, Z. Mo, Y. Cao, F. Gao, Glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism and colorectal cancer risk: a meta-analysis and HuGE review. *Eur. J. Cancer* 45 (2009) 3303-3314.
- ✓ Gebhardt Frank, Kurt S. Zänker, Burkhard Brandt Modulation of Epidermal Growth Factor Receptor Gene Transcription by a Polymorphic Dinucleotide Repeat in Intron 1 (1999).
- ✓ Geronikaki, A., Poroikov, V.V., Hadjipavlou-Litina, D., Filimonov, D., Lagunin, A., Mgonzo, R. (1999). Computer aided predicting the biological activity spectra and experimental testing of new thiazole derivatives. *Quant Struct-Activ. Relat*, 18(1):16-25.
- ✓ Geronikaki, A., Babaev, E., Dearden, J., Dehaen, W., Filimonov, D., Galaeva I., Krajneva, V., Lagunin, A., Macaev, F., Molodavkin, G. Poroikov, V.V, Pogrebnoi, S., Saloutin, V., Stepanchikova, A., Stingaci, E., Tkach, N., Vlad, L., Voronina, T. (2004). Design, synthesis, computational and biological evaluation of new anxiolytics. *Bioorg Med Chem*, 12(24):6559-6568.
- ✓ Geronikaki, A., Dearden, J.C.; Filimonov, D., Galaeva, I., Garibova, T.L.; Glorizova, T., Krajneva, V., Lagunin, A. Macaev, F.Z., Molodavkin, G., Poroikov, V.V., Pogrebnoi, S.I., Shepeli, F., Voronina, T.A., Tsitlakidou, M., Vlad, L. (2004). Design of New Cognition Enhancers: From Computer Prediction to Synthesis and Biological Evaluation. *J Med Chem*, 47(11):2870-2876.
- ✓ Geronikaki A., Vasilevsky S., Hadjipavlou-Litina D., Lagunin A., Poroikov V.V. (2006). Synthesis and anti-inflammatory activity of ethynylthiazoles. *Chem Heterocycl Compd (English Transl)*, 42(5):769-774.

- ✓ Geronikaki, A., Lagunin, A., Hadjipavlou-Litina, D., Eleftheriou, P., Filimonov, D., Poroikov, V.V., Alam, I., Saxena, A.K. (2008). Computer-Aided Discovery of Anti-Inflammatory Thiazolidinones with Dual Cyclooxygenase/Lipoxygenase Inhibition. *J Med Chem*, 51(6):1601-1609.
- ✓ Goekkurt E., S. Hoehn, C. Wolschke, C. Wittmer, C. Stueber, D.K. Hossfeld, J. Stoehlmacher, Polymorphisms of glutathione S-transferases (GST) and thymidylate synthase (TS)—novel predictors for response and survival in gastric cancer patients. *Br. J. Cancer* 94 (2006) 281-286.
- ✓ Goekkurt E , J Stoehlmacher. Is thymidylate synthase a reliable predictor for response and survival during hepatic arterial infusion for hepatic metastasis from colorectal cancer. *British Journal of Cancer* (2006) 95, 1306-1307.
- ✓ Habig W.H., M.J. Pabst, G. Fleischner, Z. Gatmaitan, I.M. Arias, W.B. Jakoby, The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71 (1974) 3879-3882.
- ✓ Halkier, B.A., Gershenson, J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 303-333.
- ✓ Hall A. Small GTP-Binding Proteins and the Regulation of the Actin Cytoskeleton. *Annual Review of Cell Biology.* Vol. 10: 31-54 (Volume November 1994).
- ✓ Hall A.G., Autzen P., Cattan A.R., Malcom A.J., Cole M., supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemo protection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 445-600.
- ✓ Hasegawa S., Satoshi H., Ryotaro M., Katsunori Mochizuki ,Yoshinori Kinoshita , and Susumu Kitagawa. Three-Dimensional Porous Coordination Polymer Functionalized with Amide Groups Based on Tridentate Ligand: Selective Sorption and Catalysi. Kyoto University,

Katsura, Nishikyo-ku, Kyoto. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129 (9), pp 2607-2614.

- ✓ Hayes J.D., Kerr L.A., Cronshaw A.D., Evidence that glutathione S-transferases B1B1 and B2B2 are the products of separate genes and that their expression in human liver is subject to inter-individual variation. Molecular relationships between the B1 and B2 subunits and other Alpha class glutathione S-transferases. *Biochem. J.* 264 (1989) 437-445.
- ✓ Hayes J.D., McLellan L.I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defense against oxidative stress. *Free Radical Res.* 31, 300-373.
- ✓ Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. (2005). Glutathione transferase. *Annu. Rev Pharmacol. Toxicol.* 45, 51-88.
- ✓ Hebert H., Schmidt-krey I. and Morgenstern R. (1995). The projection structure of microsomal glutathione transferase. *EMBO J.* 14 (16), 3864-3869.
- ✓ Hegazy, U.M. Mannervick, 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.
- ✓ Holmegren A. (1976). Hydrogen donor system for Escherichia coli ribonucleosidediphosphate reductase upon glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 7, 2257-2279.
- ✓ Hu X., H. Xia, S.K. Srivastava, C. Herzog, Y.C. Awasthi, X. Ji, P. Zimniak, S.V. Singh, Activity of four allelic forms of glutathione S-transferase hGSTP1-1 for diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238 (1997) 397-402.
- ✓ Hu X., H. Xia, S.K. Srivastava, A. Pal, Y.C. Awasthi, P. Zimniak, S.V. Singh, Catalytic efficiencies of allelic variants of human glutathione S-transferase P1-1 toward carcinogenic anti-diol epoxides of benzo[c]phenanthrene and benzo[g]chrysene. *Cancer Res.* 58 (1998) 5340-5343.
- ✓ Hussey A J and Hayes J D. Characterization of a human class-Theta glutathione S-transferase with activity towards 1-menaphthyl sulphate.

- ✓ Ishimoto T.M., F. Ali-Osman, Allelic variants of the human glutathione S-transferase P1 gene confer differential cytoprotection against anticancer agents in *Escherichia coli*. *Pharmacogenetics* 12 (2002) 543-553.
- ✓ Jahanson ., Ito M., Schopuizen C.M.S., Thengumtharayil S.M., Heuse V.D., Zhang J., Shimiji M., Ang W.H., Dyson P.J., Shibata A., Shuto S., Ito Y., Abe H., Morgenstern R. (2011). Characterization of New Potential Anticancer Drugs Designed To Overcome Glutathione Transferase Mediated Resistance. *Mol. Pharmaceutics* 8, 1696-1708.
- ✓ 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.
- ✓ Johansson A.S., G. Stenberg, M. Widersten, B. Mannervik, Structure-activity relationships and thermal stability of human glutathione transferase P1-1 governed by the H-site residue 105. *J. Mol. Biol.* 278 (1998) 687-698.
- ✓ John A. O. Ojewole. Analgesic, antiinflammatory and hypoglycaemic effects of ethanol extract of *Zingiber officinale* (roscoe) rhizomes (zingiberaceae) in mice and rats. *Volume 20, Issue 9, pages 764-772, September 2006.*
- ✓ Kapoli Panagiota, Irene A. Axarli, Dimitris Platis, Maria Fragoulaki, Mark Paine, Janet Hemingway, John Vontas, Nikolaos E. Labrou. Engineering sensitive glutathione transferase for the detection of xenobiotics. *Volume 24, Issue 3, 15 November 2008, Pages 498-503.*
- ✓ Kapoli P. Axarli I.A., Platis D., Fragoulaki M., Pain M., Hemingway J., Vontas J., Labrou N.E. (2008). Engineering sensitive glutathione transferase for the detection of xenobiotics. *Biosens Bioelectron* 24, 498-503.
- ✓ Keller C., Ballard L., Lemmons R., Ali-Osman F. (2006) *US20060194200.*
- ✓ Keller C., Ballard L., Lemmons R., Ali-Osman F. (2006) *WO0208465.*



- ✓ Kellen E., M. Hemelt, K. Broberg, K. Golka, V.N. Kristensen, R.J. Hung, G. Matullo, R.D. Mittal, S. Porru, A. Povey, W.A. Schulz, J. Shen, F. Buntinx, M.P. Zeegers, E. Taioli. Pooled analysis and meta-analysis of the glutathione S-transferase P1 Ile 105Val polymorphism and bladder cancer: a HuGE-GSEC review. *Am. J. Epidemiol.* 165 (2007) 1221-1230.
- ✓ Koutsoumpli G.E., Dimaki V., Thireou T., Eliopoulos E., Labrou N., Varvounis G., Clonis Y. Synthesis and Study of 2-(Pyrrolo-sulfonylmethyl)-N-arylimines: A New Class of Inhibitors for Human Glutathione Transferase A1-1. *J. Med Chem.* 55 (2012) 6802-6212.
- ✓ Lagunin, A.A., Gomazkov, O.A., Filimonov, D.A., Gureeva, T.A., Dilakyan, E.A., Kugaevskaya, E.V., Elisseeva, Y.E., Solovyeva, N.I., Poroikov, V.V. (2003). Computer-Aided Selection of Potential Antihypertensive Compounds with Dual Mechanism of Action. *J. Med. Chem.*, 46(15):3326-3332.
- ✓ Laughlin S., R.R. de Ruyter van Steveninck, J.C. Anderson (1998). The metabolic cost of neural information. *Nature Neuroscience* 1, 36 - 41.
- ✓ Li Zhi-Yun and Fumitaka Nakamura. Cluster Formation in Protostellar Outflow-driven Turbulence. *The Astrophysical Journal Letters Volume 640, Number 2. 2006.*
- ✓ Lind, C., Gerdesa, R., Hamnella, Y., Koistinenc, I.S., von Loenhielmd, H.B. Holmgrege, A. Cotgrevea, 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.
- ✓ Lushcak, V.I. (2012). Glutathione Homeostasis and Fuctions : Potential Targets for Medical Interventions. *Journal of Amino Acid.* Hindawi Publishing Corporatino. *Article ID 736837.*
- ✓ Mahajan S., W. M. Atkins. The chemistry and biology of inhibitors and pro-drugs targeted to glutathione S-transferases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS. June 2005, Volume 62, Issue 11, pp 1221-1233.*

- ✓ Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jansson, H., Tahir, M.K., Warholm, M. Jorvall, H. (1985). Identification of three glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 82, 7202-7206.
- ✓ Mannervik, B., and Danielson, U. H. (1988) Glutathione transferases structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 23, 283-337.
- ✓ Markesbery William R. Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Free Radical Biology and Medicine*. Volume 23, Issue 1, 1997, Pages 134-147.
- ✓ Martin, J.L. (1995). *Contact Toxicol.* 17, 438-446.
- ✓ McIlwain C.C., D.M. Townsend, K.D. Tew, Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene* 25 (2006) 1639-1648.
- ✓ Mendoza-Cozalt, D., Loza-Tavera, H., Hernandez-Navarro, A., Moreno-Sanchez, R. (2005) Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 653-671.
- ✓ Michael Rufer, Andreas Grothusen, Reinhard Maß, Helmut Peter, Iver Hand. Temporal stability of symptom dimensions in adult patients with obsessive-compulsive disorder. *Volume 88, Issue 1, September 2005, pp 99-102.*
- ✓ Milla, M.A.R., Maurer, A., Huete, A.R., Gustafon, J.P. (2003). Glutathione peroxidase genes in Arabidopsis are ubiquitous and regulated by abiotic stress through diverse signaling pathways. *Plant J.* 36, 602-615.
- ✓ Mills, G.C. (1957). Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects haemoglobin from peroxidase breakdown. *J. Biol. Chem.* 229, 187-197.
- ✓ Minelli C., R. Granell, R. Newson, M.J. Rose-Zerilli, M. Torrent, S.M. Ring, J.W. Holloway, S.O. Shaheen, J.A. Henderson, Glutathione-S-transferase genes and asthma phenotypes: a Human Genome Epidemiology (HuGE) systematic review and meta-analysis including unpublished data. *Int. J. Epidemiol.* 39 (2010) 539-562.

- ✓ Mo Z., Y. Gao, Y. Cao, F. Gao, L. Jian, An updating meta-analysis of the GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and prostate cancer: a HuGE review. *Prostate* 69 (2009) 662-688.
- ✓ Mohammed Habdous, Monique Vincent-Viry, Sophie Visvikis, Gérard Siest. Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity. *Clinica Chimica Acta. Volume 326, Issues 1-2, December 2002, Pages 131-142.*
- ✓ Morel F., Rauch C., Coles B., Le Ferrec E., Guillouzo A., 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 (2002) 277-286.
- ✓ Morgan Barak, Ori Lahav. The effect of pH on the kinetics of spontaneous Fe(II) oxidation by O<sub>2</sub> in aqueous solution - basic principles and a simple heuristic description. *Volume 68, Issue 11, August 2007, Pages 2080-2084.*
- ✓ 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, 400-467.
- ✓ 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.
- ✓ Napoli C., Ignaro 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., Knayff D.B., Issakidis E., Jacquot J.P., Rouhier N. (2006). Plant glutathione peroxidases are functional peroxidases distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology*. 142, 1364-1379.
- ✓ Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., Foyer, C.H. (2012) Glutathione in plant: *An integrated overview.*

- ✓ Oakley Aaron J., Lo Bello, M., Nuccetelli, M., Mazzetti, A.P., Parker, M.W. (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.
- ✓ O'Dowd Matthew, David Schiminovich, Benjamin D. Johnson, Marie A. Treyer, Christopher D. Martin, Ted K. Wyder, S. Charlot, Timothy M. Heckman, Lucimara P. Martins, Mark Seibert, and J. M. van der Hulst. The effect of star formation and active galactic nuclei. *Astrophysical Journal Volume 705*.
- ✓ Oldenburg J., S.M. Kraggerud, M. Cvancarova, R.A. Lothe, S.D. Fossa, Cisplatininduced long-term hearing impairment is associated with specific glutathione s-transferase genotypes in testicular cancer survivors. *J. Clin. Oncol.* 25 (2007) 708-714.
- ✓ Pandya U., S.K. Srivastava, S.S. Singhal, A. Pal, S. Awasthi, P. Zimniak, Y.C. Awasthi, S.V. Singh, Activity of allelic variants of Pi class human glutathione S-transferase toward chlorambucil. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278 (2000) 258-262.
- ✓ Pezzola S., Geroni C., Beria I., Colombo M., Brogginini M., Marchini S., Mozzi F. Correction to role of glutathione ransferases in the mechanism of brostallicin activation. *Biochemistry*, 2010, 49 (23), pp 4930-4960.
- ✓ Pohanka M., Musilek K., Kuca K. Progress of Biosensors Based on Cholinesterase Inhibition. *Current Medicinal Chemistry*, Volume 16, Number 14, May 2009 , pp. 1790-1798.
- ✓ Pongstaporn W., S. Pakakasama, S. Sanguansin, S. Hongeng, Songsak Petmitr. Polymorphism of glutathione S-transferase Omega gene: association with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.* pp 673-678.
- ✓ Poroikov, V.V., Filimonov, D.A., Ihlenfeldt, W.-D., Glorizova, T.A., Lagunin, A.A., Borodina, Y.V., Stepanchikova, A.V., Nicklaus, M.C. (2003). PASS Biological Activity Spectrum Predictions in the Enhanced Open NCI. *J Chem Inf Comput Sci*, 43(1):228-236.

- ✓ Reinemer Peter, Heini W. Dirr, Rudolf Ladenstein, Robert Huber, Mario Lo, Bello, Giorgio Federici, Michael W. Three-dimensional structure of class  $\pi$  glutathione S-transferase from human placenta in complex with S-hexylglutathione at 2.8 Å resolution. *ParkerJournal of Molecular Biology. Volume 227, Issue 1, 5 September 1992, Pages 214-226.*
- ✓ 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 glyththione transferase: the crystal structure reveals a sylfate-binding pocket within a buried active site. *Structure. 6, 309-322.*
- ✓ Rouhier, N., Lemaire, S.D., Jacquot, J.P. (2008). The role of gloutathione in photosynthetic organisms: Emerging functions for glutaredoxins and glutathionylatio. *Annu REV. Plant.Biol. 59, 143-166.*
- ✓ 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.*
- ✓ Sabeth, F., Wright, T., Norton, S.J. (1993). Purification and characterization of a glutathione peroxidase from tho Aloe vera plant. *Enzyme Protein. 47, 92-98.*
- ✓ Samiec, P.S., Dahm, L.J., Jones,D.P. (2000). Glutathione S-Transferases- a review. *Curr.Med.Chem. 6,279-309.*
- ✓ Sau Jay D., Roman M. Lutchyn, Sumanta Tewari, S. Das Sarma. Generic New Platform for Topological Quantum Computation Using Semiconductor Heterostructures. *Received 17 July 2009; published 27 January 2010.*
- ✓ Sayed, Y., Wallance, L.A., Dirr, H.W. (2000). The hydrophobic lock-and-key intersubunit motif of glutathione transferase A1-1: implication for catalysis, ligandin function and stability. *FEBS Lett. 465, 169-172.*
- ✓ Sayed, Y., Hornby, J.A., Lopez, Dirr, M. (2002). Thermodynamics of the ligandin function of human class Alpha glutathione transferase A1-1: energetic of organic anion ligand binding. H. *Biochemistry. 363, 341-*

346Sauro, H.M. (2009-2011). Enzyme kinetics for systems biology. Ambrosius publishing and future skill software. USA.

- ✓ Schmuck E.M., P.G. Board, A.K. Whitbread, N. Tetlow, J.A. Cavanaugh, A.C. Blackburn, A. Masoumi, Characterization of the monomethylarsonate reductase and dehydroascorbate reductase activities of Omega class glutathione transferase variants: implications for arsenic metabolism and the age-at-onset of Alzheimer's and Parkinson's diseases, *Pharmacogenet. Genomics* 15 (2005) 493-501.
- ✓ 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.
- ✓ Sebhatu , Samuel Petros (2008). The challenges and the opportunities of creating sustainable shared value at the base of the pyramid: Cases from sub-Saharan Africa.
- ✓ Sexton J. L., Milner A. R., Panaccio M., Waddington J., G. Wijffels, D. Chandler, C. Thompson, L. Wilson, T. W. Spithill, G. F. Mitchell. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *The Journal of Immunology*. December 1, 1990 vol. 145 no. 11 3905-3910.
- ✓ Sies H., Glutathione and its role in cellular functions (1999)
- ✓ Sinning Irmgard, Gerard J. Kleywegt, Sandra W. Cowan, Peter Reinemer, Heini W. Dirr, Robert Huber, Gary L. Gilliland, Richard N. Armstrong, Xinhua Ji, Philip G. Board, Birgit Olin, Bengt Mannervik, T. Alwyn Jones. Structure Determination and Refinement of Human Alpha Class Glutathione Transferase A1-1, and a Comparison with the Mu and Pi Class Enzymes. *Journal of Molecular Biology*. Volume 232, Issue 1, 5 July 1993, Pages 192-212.
- ✓ Sheehan , D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferase: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. G.* 360, 1-16.

- ✓ Shekhar Y.Chandra, MD, Inder S. Anand, MD, DPhil, Raghav Sarma, MD, Roberto Ferrari, MD, PhD, Purshotam L. Wahi, MD, Philip A. Poole-Wilson, MD. Effects of prolonged infusion of human alpha calcitonin gene-related peptide on hemodynamics, renal blood flow and hormone levels in congestive heart failure. *The American Journal of Cardiology. Volume 67, Issue 8, 1 April 1991, Pages 732-736.*
- ✓ Srivastava S.K., S.S. Singhal, X. Hu, Y.C. Awasthi, P. Zimniak, S.V. Singh, Differential catalytic efficiency of allelic variants of human glutathione S-transferase Pi in catalyzing the glutathione conjugation of thiotepa. *Arch. Biochem. Biophys.* 366 (1999) 89-94.
- ✓ Suzuki T., Johnston P.N., Board P.G., Structure and organization of the human alpha class glutathione S-transferase genes and related pseudogenes. *Genomics* 18 (1993) 680-686.
- ✓ Sun, Juanzhen, Dawn W. Flicker, Douglas K. Lilly (2010): Recovery of Three-Dimensional Wind and Temperature Fields from Simulated Single-Doppler Radar Data. *J. Atmos. Sci.*, 48, 876-890.
- ✓ Sundberg K., M. Widersten, A. Seidel, B. Mannervik, B. Jernstrom, 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 (1997) 1221-1227.
- ✓ Sundberg K., A.S. Johansson, G. Stenberg, M. Widersten, A. Seidel, B. Mannervik, B. Jernstrom, Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* 19 (1998) 433-436.
- ✓ Sundberg K., A. Seidel, B. Mannervik, B. Jernstrom, Detoxication of carcinogenic fjord-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by glutathione transferase P1-1 variants and glutathione. *FEBS Lett.* 438 (1998) 206-210.
- ✓ Sundberg Jan, Christer Larsson. *Animal Behaviour*. Male coloration as an indicator of parental quality in the yellow hammer, *Emberiza citronella*. Vol. 48, Is. 4, (1994), pp 885-892.

- ✓ Sweeney Michael O., MD, Anne S. Hellkamp, MS, Kenneth A. Ellenbogen, MD, Arnold J. Greenspon, MD, Roger A. Freedman, MD, Kerry L. Lee, PhD, Gervasio A. Lamas, MD. (2003) Adverse Effect of Ventricular Pacing on Heart Failure and Atrial Fibrillation Among Patients With Normal Baseline QRS Duration in a Clinical Trial of Pacemaker Therapy for Sinus Node Dysfunction. *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. *Pro.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 8261-8265.
- ✓ Tan K.L., G.C. Webb, R.T. Baker, P.G. Board, Molecular cloning of a cDNA and chromosomal localization of a human theta-class glutathione S-transferase gene (GSTT2) to chromosome 22. *Genomics* 25 (1995) 381-387.
- ✓ Tetlow Lynne C., Daman J. Adlam, David E. Woolley. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: Associations with degenerative changes. *Volume 44, Issue 3, pages 585-594, March 2001.*
- ✓ Tew, John G., Jihua Wu, Dahui Qin, Shirley Helm, Gregory F. Burton, Andrus K. Szakal Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. *Volume 156, Issue 1, p. 39-52, April 1997.*
- ✓ Townsend D.M., K.D. Tew. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 22 (2003) 7369-7375.
- ✓ 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.
- ✓ 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.



- ✓ 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., William W. Identification of the Dehydroascorbic Acid Reductase and Thioltransferase (Glutaaredoxin) Activities of Bovine Erythrocyte Glutathione Peroxidase. Wells Biochemical and Biophysical Research Communications. *Volume 257, 1999, p 567-571.*
- ✓ Wiktelius E., Stendelberg G. (2007). Novel calss of glutathione transferases from cyanobacteria exhibit high catalytic activities towards naturally occurring isothiocyanates. *Biochem. J.* 406, 115-123.
- ✓ Whitbread A.K., N. Telow, H.J. Eyre, G.R. Sutherland, P.G. Board. Characterization of the human Omega class glutathione transferase genes and associated polymorphisms. *Pharmacogenetics 13 (2003) 131-144.*
- ✓ Whitbread A.K., A. Masoumi, N. Tetlow, E. Schmuck, M. Coggan, P.G. Board, Characterization of the omega class of glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 401 (2005) 78-99.
- ✓ Wolf, R.B., Spencer, G.F., Kwolek, W.F. (1984). Inhibition of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) germination and growth by benzylisothiocyanate, a natural toxicant. *WeedSci.* 32, 612-615.
- ✓ 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 aand regulates TRAF2-ASK1 signals. *Oncogene.* 25, 5787-800.
- ✓ 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 signaling. *Acta Biochemica Polonica.* 50, 319-336.
- ✓ Yin, A.J., Li, J., Jian, W., Bennett, A.J. (2001). Division of Engineering, Brown University, Providence. Fabrication of highly ordered metallic nanowire arrays by electrodeposition.
- ✓ Yoshizawa-Sugata N., Ai I., Chika T., Etsuko M., Ken-ichi A., Hisao M. A Second Human Dbf4/ASK-related Protein, Drf1/ASKL1, Is Required for Efficient Progression of S and M Phases.

- ✓ Yung-Chi C., William H. P.. Relationship between the inhibition constant ( $K_I$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Volume 22, Issue 23, 1 December 1973, Pages 3099-3108.*
- ✓ Zakharyan R.A., A. Sampayo-Reyes, S.M. Healy, G. Tsaprailis, P.G. Board, D.C. Liebler, H.V. Aposhian, Human monomethylarsonic acid (MMA(V)) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. *Chem. Res. Toxicol. 14 (2001) 1051-1057.*
- ✓ Zechmann B., Muller, M. (2010). Subcellular compartmentation of glutathione in dicotyledonous plants. *Protoplasma 246, 15-24.*
- ✓ Zhou H., Joseph B., Dan L.P.G. Board, Aaron J. O. Structural Insights into the Dehydroascorbate Reductase Activity of Human Omega-Class Glutathione Transferases *Journal of Molecular Biology. Volume 420, Issue 3, 13 July 2012, Pages 190-203.*
- ✓ Zimniak P., B. Nanduri, S. Pikula, J. Bandorowicz-Pikula, S.S. Singhal, S.K. Srivastava, S. Awasthi, Y.C. Awasthi, Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. *Eur. J. Biochem. 224 (1994) 893-899.*
- ✓ Zoi O.G., Thireou T.N., Rinotas V.E., Tsoungas P.G., Eliopoulos E.E., Douni E.K., Labrou N.E. and Clonis Y.D. Designer xanthone: an inhibitor scaffold for MDR-involved human glutathione transferase isoenzyme A1-1. *J. Biomol. Screen. 18 (2013) 1092-1102.*