

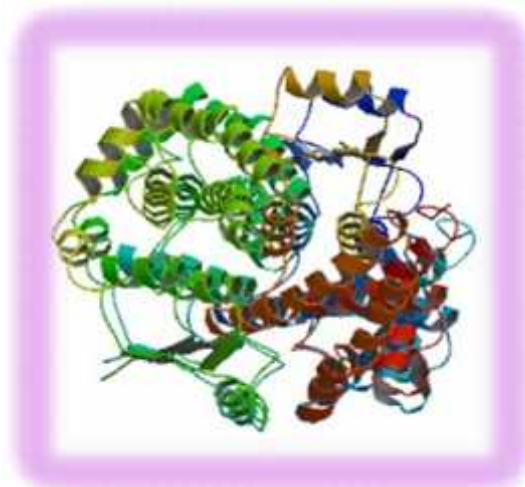


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας
ΠΜΣ: Βιοτεχνολογία & Εφαρμογές στη Γεωπονία

Μεταπτυχιακή Μελέτη:

**“2,2’-ΔΙΥΔΡΟΞΥ-ΒΕΝΖΟΦΑΙΝΟΝΕΣ: ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ
ΔΡΑΣΕΩΣ ΤΟΥΣ ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ
ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ Α1-1 ΑΝΘΡΩΠΟΥ”**



ΠΕΡΠΕΡΟΠΟΥΛΟΥ Δ. ΦΕΡΕΝΙΚΗ

ΑΘΗΝΑ, 2013

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

Ιωάννης Κλώνης, Καθηγητής, Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας, Γ.Π.Α. (Επιβλέπων Καθηγητής)

Ηλίας Ηλιόπουλος, Καθηγητής, Εργαστήριο Γενετικής Γ.Π.Α.

Νικόλαος Λάμπρου, Αναπληρωτής Καθηγητής, Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας, Γ.Π.Α.

Η ανάθεση της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας (“2,2’-Διυδρόξυ-Βενζοφαινόνης: μελέτη της δράσεως τους ως αναστολέων της μεταφοράς γλουταθειόνης A1-1 ανθρώπου”) έγινε με απόφαση της ΓΣΕΣ του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (07-06-2013). Ο ορισμός της τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (Συνεδρία 13^η/06-06-2013).



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών με επιβλέποντα τον καθηγητή, κ. Ιωάννη Κλώνη.

Κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας υπήρξαν τόσο ευχάριστες όσο και κάποιες δύσκολες στιγμές, οι οποίες ξεπεράστηκαν με την βοήθεια και την κατανόηση κάποιων ανθρώπων, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω ως ελάχιστη ένδειξη της εκτίμησης μου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Ιωάννη Κλώνη τόσο για την επιστημονική του καθοδήγηση όσο και την ηθική συμπαράσταση που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Η υπομονή του και η αμέριστη κατανόηση του διευκόλυνε πολύ την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Στη συνέχεια, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον αναπληρωτή καθηγητή κ. Νικόλαο Λάμπρου για τις εύστοχες παρατηρήσεις του και την αισιοδοξία που μετέδιδε κάθε φορά που προέκυπτε κάποιος σκόπελος στην πορεία των πειραμάτων.

Οφείλω επίσης, να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Ηλία Ηλιόπουλο αρχικά για την τιμή που μου έκανε να συμμετάσχει στην εξεταστική επιτροπή αλλά και για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε για τον μοριακό σχεδιασμό προκειμένου να είναι πιο ολοκληρωμένη η εργασία μου.

Επιπλέον, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ κ. Πέτρο Τσουνγκα για την αμέριστη βοήθεια του κατά τη χημική σύνθεση των ενώσεων, παρέχοντας μου τις κατάλληλες γνώσεις και επιδεικνύοντας υπομονή και κατανόηση.

Δε θα μπορούσα να μην αναφερθώ στην απλόχερη βοήθεια και στήριξη της υπεύθυνης εργαστηρίου κας Ευαγγελίας Παππά, η οποία δεν έχανε

στιγμή το χαμόγελο της και ήταν πάντα πρόθυμη να με ακούσει και να με συμβουλευτεί σχετικά με κάθε μου προβληματισμό. Σε αυτό το σημείο, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος και την Δρα Χρονοπούλου Εύη η καθημερινή παρουσία της οποίας στο εργαστήριο συνέβαλλε καθοριστικά στην ευκολότερη διεξαγωγή των πειραμάτων, αφού ήταν δίπλα μου σε κάθε πειραματική μου προσπάθεια. Επίσης, η ψυχολογική και ηθική στήριξη που δέχτηκα από τα παιδιά του εργαστηρίου (Άννη Κοντούρη, Μαριάννα Χατζηκωνσταντίνου, Κώστας Γάκος και Νίκος Γεωργακής) ήταν πολύ σημαντική για εμένα. Οι συμβουλές τους καθώς και οι συζητήσεις που κάναμε βοήθησαν στο να γίνει η πορεία των πειραμάτων πιο εύκολη.

Ευχαριστώ πολύ την οικογένεια μου και τις φίλες μου για την κατανόηση και την υπομονή που έδειξαν σε όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου μελέτης. Η ψυχολογική στήριξη που μου παρείχαν σε καθημερινή βάση είναι ανεκτίμητη και χωρίς αυτήν δε θα μπορούσα να ανταπεξέλθω στις όποιες δυσκολίες προέκυπταν.

Κλείνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόθερμα την φίλη μου και συνάδελφο Φωτεινή Πούλιου. Η παρουσία της στο εργαστήριο, οι συμβουλές της, η βοήθεια της τόσο σε επιστημονικό όσο και σε ψυχολογικό επίπεδο και η στήριξη της όλα αυτά τα χρόνια με έχουν βοηθήσει και με έχουν εμπνεύσει όχι μόνο σε ό, τι αφορά στην μεταπτυχιακή μου εργασία αλλά και στην υπόλοιπη ζωή μου. Είναι ένας άνθρωπος που εκτιμώ βαθύτατα για τις απόψεις και τις ιδέες του και είμαι πολύ τυχερή που την έχω κοντά μου όλα αυτά τα χρόνια.

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
CH ₂ Cl ₂	Δίχλωρο-μεθάνιο
ddH ₂ O	Δις απιονισμένο νερό
DMSO	Διμεθυσουλφοξείδιο
GSH	Γλουταθειόνη
GST	S-τρανσφεράση γλουταθειόνης
hGSTA1-1	S- τρανσφεράση γλουταθειόνης ανθρώπου, ισοένζυμο A1-1
hGSTP1-1	S- τρανσφεράση γλουταθειόνης ανθρώπου, ισοένζυμο P1-1
IC50	Συγκέντρωση αναστολέα που αντιστοιχεί σε 50% αναστολή
IPTG	Ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτοπυρανοσίδιο
IR	Φασματοσκοπία απορρόφησης υπερύθρου
K _m	Σταθερά Michaelis
LB	Θρεπτικό υπόστρωμα Luria-Bertani
MDR	(multiple drug resistance) πολλαπλή φαρμακοανθεκτικότητα
MS	Φασματοσκοπία μάζας
NMR	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού
PAGE	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου
pH	- log [H ⁺]
rpm	Στροφές ανά λεπτό
SDS	Δωδεκανοθειικό νάτριο
TEMED	N,N,N',N' - τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη
Unit (U)	Ενζυμική μονάδα
UV	Υπεριώδης ακτινοβολία
V _{max}	Μέγιστη ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης
ΔA/Δt	Διαφορά μεταβολής της οπτικής απορρόφησης ανά λεπτό

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	10
Κεφάλαιο 1 ^ο : ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1.Τρανσφεράσες Γλουταθειόνης (GSTs)	14
1.2.Τριπεπίδιο της Γλουταθειόνης (GSH)	15
1.3.Καταλυτικός μηχανισμός των GSTs	16
1.4.Λειτουργικός ρόλος των GSTs	18
1.4.1.Ενζυμική αποτοξίνωση ξеноβιοτικών μέσω συμπλοκοποίησης με τη γλουταθειόνη (GSH)	18
1.4.2.Οξειδωτική καταπόνηση και ο ρόλος των GSTs	19
1.4.3.Οι GSTs και ο ρόλος τους ως πρωτεΐνες μεταφοράς-δέσμησης	20
1.4.4.Αντιδράσεις ισομερίωσης	21
1.4.5.Θεραπευτική σήμανση σε ασθένειες	21
1.5.Ταξινόμηση και ονοματολογία των GSTs	23
1.6.Κυτταροπλασματικές GSTs	25
1.6.1.Δομή	25
1.6.2.Τάξεις	27
1.6.3.Κυτταροπλασματικές GSTs ανθρώπου	29
1.7.Εφαρμογές των GSTs	31
1.7.1.GSTs και Γεωπονία	31
1.7.2.GSTs και Περιβάλλον	31
1.7.3.GSTs και Βιοαισθητήρες	31
1.7.4.GSTs και Ιατρική	33
1.8.Σκοπός της παρούσας μελέτης	36
Κεφάλαιο 2 ^ο : Χημική σύνθεση 2,2'-διυδρόξυβενζοφαινονων	
2.1.Εισαγωγή	38
2.2.Μέθοδοι	39
2.2.1.Φασματοσκοπία	39
2.2.2.Σύνθεση των 2,2'-διυδρόξυβενζοφαινονων 6 και 8	40
2.3.Αποτελέσματα	42

Κεφάλαιο 3 ^ο : Έκφραση και καθαρισμός του ισοενζύμου h GSTA1-1 από ανασυνδυασμένα κύτταρα <i>E. Coli</i>	
3.1.Εισαγωγή	47
3.2.Υλικά & Μέθοδοι	47
3.2.1.Ένζυμα & Πρωτεΐνες	47
3.2.2.Χημικά αντιδραστήρια & Υποστρώματα	48
3.2.3.Πλαστικά αναλώσιμα	49
3.2.4.Όργανα	49
3.2.5.Προγράμματα Η/Υ	50
3.2.6.Έκφραση του ισοενζύμου Τρασφεράση Γλουταθειόνης hGSTA1-1 από ανασυνδυασμένα κύτταρα <i>E. Coli</i>	50
3.2.7.Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός δραστηριότητας του ενζύμου Τρασφεράση Γλουταθειόνης (GST) (enzyme assay)	51
3.2.8.Υπολογισμός μονάδων ενζυμικής δραστηριότητας GST	52
3.2.9.Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο κατά Bradford	53
3.2.10.Λύση κυττάρων και παραλαβή ενζυμικού εκχυλίσματος	55
3.2.11.Διαπίδυση	55
3.2.12.Καθαρισμός του ισοενζύμου Τρασφεράση Γλουταθειόνης hGSTA1-1 σε στήλη χρωματογραφίας συγγένειας	56
3.2.13.Αξιολόγηση ενζυμικής καθαρότητας	57
3.2.13.1.Υπολογισμός ειδικής δραστηριότητας του ενζυμικού παρασκευάσματος (SA)	57
3.2.13.2.Υπολογισμός ανάκτησης ενζύμου (%)	57
3.2.13.3.Καθαρισμός που επετεύχθη (φορές)	58
3.2.14.Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου	58
3.2.14.1.Προετοιμασία της πηκτής πολυακρυλαμιδίου	59
3.2.14.2.Προετοιμασία δειγμάτων	60
3.2.14.3.Βαφή με τη χρωστική Coomassie Blue R-250	60
3.3.Αποτελέσματα	61
Κεφάλαιο 4 ^ο : Σάρωση της βιβλιοθήκης υποψήφιων αναστολέων του ισοενζύμου hGSTA1-1 & Κινητική ενζυμικής αναστολής των επιλεγέντων αναστολέων	
4.1.Εισαγωγή	63

4.2.Υλικά & Μέθοδοι	68
4.2.1.Ενώσεις προς μελέτη	68
4.2.2.Χημικά αντιδραστήρια, υποστρώματα & πλαστικά αναλώσιμα	70
4.2.3.Όργανα & Προγράμματα Η/Υ	71
4.2.4.Σάρωση (screening) 2,2'-διυδροξύβενζοφαινονων και N-καρβονυλικών παραγώγων τους ως αναστολέων του ενζύμου τρανσφεράση γλουταθειόνης ανθρώπου (hGSTA1-1)	71
4.2.5.Υπολογισμοί παραμένουσας ενζυμικής δραστικότητας και αναστολής	72
4.2.6.Κινητική μελέτη της τρανσφεράσης γλουταθειόνης hGSTA1-1 έχοντας το 1-χλώρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης	73
4.2.7.Κινητική μελέτη της τρανσφεράσης γλουταθειόνης hGSTA1-1 έχοντας τη γλουταθειόνη (GSH) ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης	74
4.2.8.Υπολογισμός των τιμών IC50	75
4.2.9.Κινητική μελέτη αναστολής της τρανσφεράσης γλουταθειόνης hGSTA1-1 από τις ενώσεις που επελέγησαν	76
4.2.9.1.Κινητική μελέτη αναστολής της τρανσφεράσης γλουταθειόνης hGSTA1-1 έχοντας το 1-χλώρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης	76
4.2.9.2.Κινητική μελέτη αναστολής της τρανσφεράσης γλουταθειόνης hGSTA1-1 έχοντας τη γλουταθειόνη (GSH) ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης	77
4.2.10.Υπολογισμός της σταθεράς αναστολής K_i	78
4.2.10.1.Υπολογισμός της σταθεράς συναγωνιστικής αναστολής	78
4.2.10.2.Υπολογισμός της σταθεράς μικτής αναστολής	79
4.2.10.3.Υπολογισμός της σταθεράς ανταγωνιστικής αναστολής	80
4.3.Αποτελέσματα	81
4.3.1.Σάρωση της βιβλιοθήκης των ενώσεων και επιλογή ενώσεων-οδηγών ως ισχυρών αναστολέων hGSTA1-1	81
4.3.2.Υπολογισμός IC50 των ενώσεων-οδηγών ως αναστολέων hGSTA1-1	84
4.3.3.Κινητική μελέτη των επιλεγμένων ενώσεων ως αναστολέων hGSTA1-1 έχοντας το 1-χλώρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης	87

4.3.4.Κινητική μελέτη των επιλεγμένων ενώσεων ως αναστολέων hGSTA1-1 έχοντας την γλουταθειόνη (GSH) ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης	91
4.3.5. Υπολογισμός των σταθερών αναστολής K_i	96
Κεφάλαιο 5 ^ο : Συζήτηση	
5.1.Χημική σύνθεση των 2,2'-διυδροξυβενζοφαινονων 6 και 8	99
5.2.Έκφραση και καθαρισμός του ισοενζύμου h GSTA1-1 από ανασυνδυασμένα κύτταρα <i>E.coli</i>	99
5.3.Σάρωση της βιβλιοθήκης υποψήφιων αναστολέων έναντι του ισοενζύμου hGSTA1-1 & κινητική ενζυμικής αναστολής	100
5.3.1.Σάρωση της βιβλιοθήκης των υποψήφιων αναστολέων και επιλογή των ισχυρότερων έναντι του ενζύμου hGSTA1-1	100
5.3.2.Κινητική μελέτη της ενζυμικής αναστολής με τις επιλεγμένες ενώσεις 6, 8, 14 και 16	103
5.4.Συμπεράσματα	110
Βιβλιογραφία	111

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι τρανσφεράσες γλουταθειόνης (GSTs) αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια ενζύμων με βασική λειτουργία την αποτοξίνωση του οργανισμού μέσω της τροποποίησης τοξικών ενδογενών ή εξωγενών ενώσεων (ηλεκτρονιόφιλων ενώσεων) με τη δημιουργία ομοιοπολικού συμπλόκου μεταξύ αυτών και της γλουταθειόνης (GSH). Ειδικότερα, το ισοένζυμο τρανσφεράση γλουταθειόνης A1-1 ανθρώπου (hGSTA1-1) έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα, μειώνοντας την αποτελεσματικότητα των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων. Για τον λόγο αυτόν, είναι αναγκαία η ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων και κοκτέιλς φαρμάκων με αυξημένη αποτελεσματικότητα. Επομένως, το ισοένζυμο hGSTA1-1 αποτελεί μοριακό στόχο για τον σχεδιασμό νέων φαρμάκων και προφαρμάκων, τα οποία θα δρουν στοχευμένα στις θέσεις που υπερεκφράζεται το ένζυμο.

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε μία ομάδα 2,2'-διυδροξυ-βενζοφαινονών και N-καρβονυλικών παραγώγων τους που δεν έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα ως πιθανοί αναστολείς του ενζύμου hGSTA1-1.

Αρχικά, εφαρμόζοντας φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό ενζυμικής δραστηριότητας, πραγματοποιήθηκε σάρωση των υποψήφιων αναστολέων (screening) έναντι της επίδρασής τους στη δραστηριότητα του ισοενζύμου hGSTA1-1, χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) και τη γλουταθειόνη (GSH), παρουσία και απουσία 'αναστολέα'. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της σάρωσης, οι ενώσεις **6**, **8**, **14** και **16** επέφεραν αναστολή πάνω από 80 % και για αυτό μελετήθηκαν περαιτέρω. Ειδικότερα, υπολογίστηκε ο δείκτης IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) για τις επιλεγείσες ενώσεις, IC₅₀₍₆₎ = 1,75 ± 0,11 μM, IC₅₀₍₈₎ = 0,24 ± 0,04 μM, IC₅₀₍₁₄₎ = 0,33 ± 0,06 μM και IC₅₀₍₁₆₎ = 0,18 ± 0,01 μM. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη της ενζυμικής αναστολής για τις επιλεγείσες ενώσεις, προκειμένου να διευκρινιστεί ο τύπος της αναστολής. Οι ενώσεις **6** και **14** έδειξαν καθαρά συναγωνιστική αναστολή, χρησιμοποιώντας το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης, με σταθερές αναστολής K_{i(6)} = 1,47 ± 0,15 μM και K_{i(14)} = 0,38

$\pm 0,05 \mu\text{M}$ αντίστοιχα, ενώ οι εν λόγω ενώσεις παρουσίασαν μικτού τύπου αναστολή ως προς την GSH. Όσον αφορά στις ενώσεις **8** και **16**, οι οποίες φέρουν ένα άτομο βρωμίου, τόσο με το CDNB ($K_{i(8)} = 0,36 \pm 0,11 \mu\text{M}$ και $K_{i(16)} = 1,75 \pm 0,25 \mu\text{M}$) όσο και με τη GSH, ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα, αντιστοίχως, έδειξαν μικτού τύπου αναστολή.

Τα αποτελέσματα από την κινητική μελέτη συνεκτιμήθηκαν με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από *in silico* μοριακό μοντελισμό και ελλιμενισμό (docking), προκειμένου να έχουμε μία πληρέστερη εικόνα του τρόπου αλληλεπίδρασης και αναστολής των υπό μελέτη αναστολέων έναντι του ενζύμου.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, συντέθηκαν χημικά και αναλύθηκαν φασματοσκοπικά οι ενώσεις **6** και **8**, προκειμένου να υπάρξουν οι απαιτούμενες ποσότητες για να μελετηθούν ως ανωτέρω.

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ:

GSTs, hGSTA1-1, IC50, Ένζυμική Κινητική, Βενζοφαινόνες & N-καρβονυλικά παράγωγα

ABSTRACT

Glutathione transferases comprise a big family of enzymes with basic function the detoxification of organism via the inactivation of endogenous or exogenous toxic compounds (electrophilic compounds) by creating a covalent complex between them and glutathione (GSH). Specifically, the human isoenzyme transferase glutathione A1-1 (hGSTA1-1) is found to be overexpressed in cancer cells, reducing the effectiveness of chemotherapeutic drugs. For this reason, the development of anticancer drugs and drug cocktails with increased efficiency is necessary. Thus, the isoenzyme hGSTA1-1 constitutes a molecular target for the design of new drugs and prodrugs which would target selectively positions overexpressing the enzyme of interest.

This study examines a library of 2,2'-dihydroxy-benzophenones and N-carbonyl derivatives which have not been examined so far as potential inhibitors of hGSTA1-1.

Primarily, by applying spectrophotometric determinations of enzyme activity, we screened the library for potential inhibitors towards the activity isoenzyme hGSTA1-1, using the 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and glutathione (GSH) as substrates, in the presence and the absence of compound. On the basis of the results obtained, compounds **6**, **8**, **14** and **16** showed high inhibition (over 80 %) so they were taken to further study. Specifically, the index IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) of the chosen compounds was and found: IC₅₀₍₆₎ = 1,75 ± 0,11 μM, IC₅₀₍₈₎ = 0,24 ± 0,04 μM, IC₅₀₍₁₄₎ = 0,33 ± 0,06 μM and IC₅₀₍₁₆₎ = 0,18 ± 0,01 μM. Furthermore, of enzyme inhibition kinetic studies were undertaken for the chosen compounds, in order to elucidate the inhibition modality. Compounds **6** and **14** displayed purely competitive inhibition, using CDNB as variable substrate, with inhibition constant K_{i(6)} = 1,47 ± 0,15 μM and K_{i(14)} = 0,38 ± 0,05 μM respectively, while both showed mixed type of inhibition with GSH as variable substrate. Compounds **8** and **16**, bearing a bromine atom, either

with CDNB ($K_{i(8)} = 0,36 \pm 0,11 \mu\text{M}$ and $K_{i(16)} = 1,75 \pm 0,25 \mu\text{M}$) or GSH as variable substrates respectively, they showed a mixed type of inhibition.

The results of the enzyme kinetics were evaluated along with those obtained by *in silico* molecular modeling and docking, so as to better understand the binding and inhibition modality of the studied compounds towards the target hGSTA1-1.

Within the framework of the present study, compounds **6** and **8** were chemically synthesized and analyzed spectroscopically, in order to ensure the quantities required.

KEYWORDS:

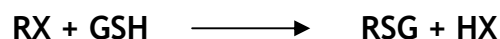
GSTs, hGSTA1-1, IC50, Kinetics, Benzophainones & N-carbonyl compounds

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1:

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΕΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GSTs)

Οι S-τρανσφεράσες γλουταθειόνης (GSTs) αποτελούν μια σημαντική υπεροικογένεια ενζύμων (Chasseaud, 1979), υπάρχουν δε σχεδόν σε όλους τους οργανισμούς (προκαρυωτικούς & ευκαρυωτικούς) ως ισόένζυμα διαφορετικής εκλεκτικότητας τα οποία αποτελούν προϊόντα έκφρασης διαφορετικών γονιδίων (Hayes *et al.*, 2005; Chronopoulou *et al.*, 2012a). Τα ένζυμα αυτά πρωτοανακαλύφθηκαν στα ζώα το 1960 (Wilce & Parker, 1994), ενώ στα φυτά μετά το 1970 (Edwards & Dixon, 2000). Πρόκειται για πολυλειτουργικά ένζυμα που συμμετέχουν στο μηχανισμό αποτοξίνωσης του κυττάρου στη Φάση II (Liu *et al.*, 2013) αδρανοποιώντας ενδογενείς ή εξωγενείς τοξικούς παράγοντες (Hayes *et al.*, 2005). Πιο συγκεκριμένα, καταλύουν τη νουκλεόφιλη προσβολή του τριπεπτιδίου γλουταθειόνης (GSH) στο ηλεκτρονιόφιλο κέντρο (R) διαφόρων κυτταροτοξικών, καρκινογόνων και μεταλλαξιογόνων ενώσεων (Townsend & Tew, 2003; Wang *et al.*, 2009; Hasegawa *et al.*, 2007), χωρίς η ενζυμική λειτουργία να επηρεάζεται και να εξαρτάται από συνένζυμο, προσθετική ομάδα ή μεταλλοϊόν, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση (Σχήμα 1.1) (Armstrong, 1997), όπου R μπορεί να είναι μια αρωματική, αλειφατική, ετεροκυκλική ή εποξειδική ομάδα και το X ποικιλία ανόργανων ή οργανικών ομάδων.



μ 1.1:

GSTs.

Το προϊόν της αντίδρασης του Σχήματος 1.1 (RSG) είναι περισσότερο υδρόφιλο, μη τοξικό και αποβάλλεται πιο εύκολα από το κύτταρο μέσω αντλιών εκροής MRP (Multidrug Resistance Protein) των μεμβρανών (Frova, 2006; Ishikawa, 1992).

Οι GSTs παρουσιάζουν ιδιαίτερο φαρμακολογικό και τοξικολογικό ενδιαφέρον, αφού εμπλέκονται σε θεραπείες κατά του άσθματος και του καρκίνου (Evans *et al.*, 1991; Matsushita *et al.*, 1998; Jakobsson *et al.*, 1999; Ruscoe *et al.*, 2001), ενώ μεταβολίζουν χημειοθεραπευτικούς παράγοντες κατά του καρκίνου, ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα, καρκινογόνους παράγοντες και παραπροϊόντα οξειδωτικού στρες (Hayes *et al.*, 2005).

1.2. ΤΡΙΠΕΠΤΙΔΙΟ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GSH)

Η γλουταθειόνη είναι μια μικρού μοριακού βάρους θειόλη που απαντάται σε αφθονία στα κύτταρα θηλαστικών (Reed, 1990; Anderson, 1998) και καταλύει πολλές βιοχημικές διεργασίες (Josephy & Mannervic, 2006). Είναι ένα τριπεπίδιο που συντίθεται από τα αμινοξέα γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη (γ-L-Glu-L-Cys-Gly) σε δυο αντιδράσεις που εξαρτώνται από το ATP και καταλύονται από τη συνθετάση γ-γλουταμυλοκυστεΐνης και τη συνθετάση γλουταθείου.

Κάποιες από τις λειτουργίες της γλουταθειόνης (GSH) είναι οι εξής:

- προστατεύει το κύτταρο από οξειδωτικούς και ηλεκτρονιόφιλους παράγοντες,
- λειτουργεί ως συνένζυμο στη βιοσύνθεση των δεοξυριβονουκλεοτιδίων (Holmegren, 1976),
- συμμετέχει στην οξειδοαναγωγική ρύθμιση μοριακών διεργασιών σε διάφορα κυτταρικά τμήματα (Forman *et al.*, 2004),

- αποτελεί φορέα μοριακών μηνυμάτων-σινιάλων, όπως του οξειδίου του αζώτου (Napoli & Ignarro, 2003),
- στα ανώτερα φυτά, συμμετέχει στην αποθήκευση και μεταφορά του ανηγμένου θείου, όπως και στον μηχανισμό καταστροφής των υπεροξειδίων H₂O₂ στους κλωροπλάστες (Edwards & Owen, 1986).

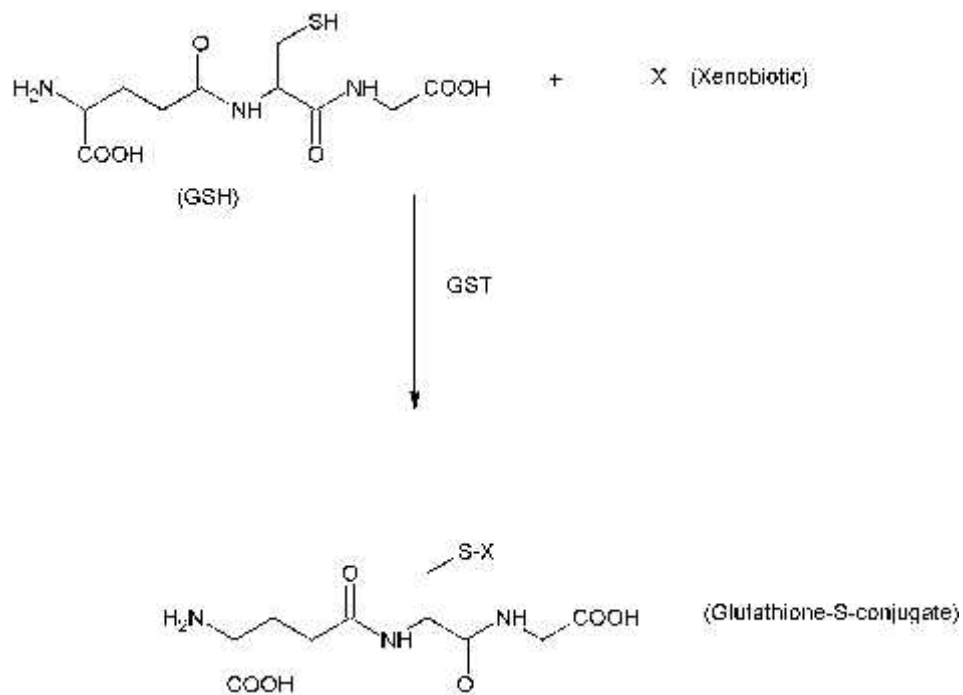
Γενικά, η γλουταθειόνη φαίνεται να έχει προστατευτικό ρόλο έναντι της οξειδωτικής δράσης διάφορων καταπονητικών παραγόντων, όπως η ακτινοβολία, η ζέστη και η έκθεση στα βαρέα μέταλλα (Freeman *et al.*, 2004).

Η συγκέντρωση της GSH δεν είναι ίδια σε όλα τα κύτταρα ή τα υποκυτταρικά οργανίδια (Samiec *et al.*, 2000), όλες δε οι ανωτέρω λειτουργίες εξαρτώνται από τη συγκέντρωση και την αναγωγική κατάσταση στην οποία βρίσκονται τα μόρια της γλουταθειόνης.

Από πειραματικές μελέτες έχει βρεθεί ότι η δέσμευση της GSH με τα διάφορα ξενοβιοτικά καταλύεται από κάποια τρανσφεράση γλουταθειόνης (GST) (Combes & Stakelum, 1961; Boyland *et al.*, 1961).

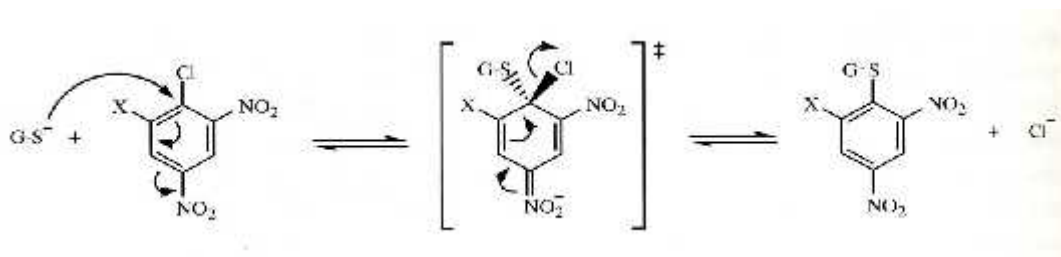
1.3. ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΩΝ GSTs

Η τρανσφεράση γλουταθειόνης καταλύει την πυρηνόφιλη προσβολή του θειολοανιόντος της κυστεΐνης της GSH (1^ο υπόστρωμα, G-S⁻) στο ηλεκτρονιόφιλο κέντρο διάφορων οργανικών υδρόφοβων ενώσεων (2^ο υπόστρωμα, R-X) του κυττάρου, σχηματίζοντας αντίστοιχες ενώσεις συζεύξεως (G-SR), αυξάνοντας έτσι τη διαλυτότητά τους και βοηθώντας την έκκρισή τους από το κύτταρο (Townsend & Tew, 2003; Wang *et al.*, 2009; Abel *et al.*, 2004). Η αντίδραση αυτή αποτελεί βασική μορφή άμυνας του κυττάρου (Coleman *et al.*, 1997; Dixon *et al.*, 1998; Josephy & Mannervic, 2006).



μ 1.2: μ μ (GSH) μ
 μ G-SR. μ (GST), μ μ

Χαρακτηριστικό παράδειγμα του μηχανισμού καταλύσεως του ενζύμου είναι η αντίδραση με το υδρόφοβο συνθετικό υπόστρωμα 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) το οποίο χρησιμοποιείται συχνά ως υπόστρωμα προσδιορισμού του ενζύμου.



μ 1.3: μ GSH μ CDNB
 μ GST (, 2007).

1.4. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ GSTs

Ο θεμελιώδης ρόλος των GSTs είναι η κυτταρική αποτοξίνωση ενός μεγάλου εύρους ενδογενών και εξωγενών τοξικών παραγόντων. Ωστόσο, τα ένζυμα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υπεροξειδάσες, ισομεράσες και θειοτρανσφεράσες (Jowsey *et al.*, 2003). Έτσι, οι ρόλοι τους επεκτείνονται στους μηχανισμούς του μεταβολισμού για αντιμετώπιση της καταπόνησης/στρες, στη βιοσύνθεση της προσταγλαδίνης και του λευκοτριενίου (Tsuchida *et al.*, 1987; Kanaoka *et al.*, 1997; Jakobsson *et al.*, 1999). Κάποιοι από τους πολλαπλούς ρόλους των GSTs αναλύονται παρακάτω.

1.4.1. ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΠΟΤΟΞΙΝΩΣΗ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩ ΣΥΜΠΛΟΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ (GSH)

Οι ζωντανοί οργανισμοί καλούνται συχνά να αντιμετωπίσουν μια σειρά από παράγοντες που ενδεχομένως να έχουν αρνητικά αποτελέσματα για τον οργανισμό, αφού μπορεί, λόγω χάριν, να είναι τοξικοί ή καρκινογόνοι παράγοντες (Ames *et al.*, 1990). Η ικανότητα των οργανισμών να επιβιώνουν από τέτοιου είδους ξενοβιοτικές ενώσεις είναι μια βιολογική προσαρμογή, θεμελιώδης για την επιβίωση τους (Hayes & Pulford, 1995; Hayes & McLellan, 1999). Τα κύτταρα, προκειμένου να προστατευθούν, χρησιμοποιούν μια σειρά από ένζυμα, τα οποία μπορούν να μετασχηματίσουν ποικιλία χημικών παραγόντων μέσα από μία διαδικασία αποτοξίνωσης η οποία πραγματοποιείται σε τρία διακριτά στάδια (Φάση I, II, III):

ΦΑΣΗ I : Τα ξενοβιοτικά εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα οπότε και ενεργοποιείται η διαδικασία αποτοξίνωσης, κυρίως μέσω οξειδωσης του ξενοβιοτικού από οξειδοορεδοουκτάσες, όπως τα ένζυμα κυτοχρώματος P450 (Guengerich, 1990), ή και της δράσης υδρολασών. Σε αυτή τη φάση, ο ρόλος των ενζύμων είναι να εισάγουν ηλεκτρονιόφιλες πολικές λειτουργικές ομάδες (Mars, 1996) (οξειδωτικά ένζυμα) ή και να αποκαλύψουν πολικές ομάδες (υδρολυτικά ένζυμα) στο ξενοβιοτικό μόριο, κάνοντάς το

περισσότερο υδρόφιλο και με δυνατότητα να δράσουν επάνω του τα ένζυμα του δεύτερου σταδίου (Rea *et al.*, 1998).

ΦΑΣΗ II : Σε αυτό το στάδιο, ένζυμα όπως οι GSTs καταλύουν τη συμπλοκοποίηση ενεργών ξενοβιοτικών, μέσω των ηλεκτρονιόφιλων ομάδων σαν θέσεις αντίδρασης με τη γλουταθειόνη (GSH), δημιουργώντας έτσι ενώσεις λιγότερο τοξικές και πιο υδατοδιαλυτές (Karam, 1998; Coleman *et al.*, 1997).

ΦΑΣΗ III : Διαχωρίζονται και απομακρύνονται οι ενώσεις που σχηματίστηκαν στη προηγούμενη φάση από εξειδικευμένα ένζυμα. Η απομάκρυνση των GS-συμπλόκων από το κυτόπλασμα είναι πολύ βασική στη διαδικασία της αποτοξίνωσης, ειδικά παρεμποδίζεται η δράση των GSTs και συνεπώς η αποτοξίνωση.

1.4.2. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ GSTs

Πολλές GSTs φαίνεται να έχουν δράση υπεροξειδάσης γλουταθειόνης (GPx) έναντι οργανικών υδροϋπεροξειδίων λιπαρών οξέων που παράγονται κατά τον οξειδωτικό τραυματισμό (Bartling *et al.*, 1993; Board *et al.*, 1997; Cummins *et al.*, 1999). Έτσι, αποδεικνύεται μια άλλη λειτουργία των GSTs, δηλαδή η προστασία του κυττάρου από ζημιές που προκαλεί η οξειδωτική καταπόνηση. Αυτή η δράση των GSTs ως GPxs αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των κυττάρων έναντι των υδροϋπεροξειδίων που ανήκουν στις ενεργές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species- ROS) (Prohaska & Ganther, 1976).

Οι GSTs με GPx δράση, στους ανθρώπους ανήκουν κυρίως στην α τάξη (Yang *et al.*, 2001). Στα θηλαστικά, η GPx δράση έχει βρεθεί στις τάξεις θ και ζ των GSTs. Επίσης, πολλές φυτικές GSTs παρουσιάζουν τέτοια δράση και έχει φανεί ότι συμβάλλουν στην άμυνα έναντι οξειδωτικών τραυμάτων κατά τη διάρκεια οξειδωτικής καταπόνησης, επίθεσης από παθογόνα, χειρισμού με

ζιζανιοκτόνα και παρατεταμένης και σοβαρής έκθεσης σε μια σειρά από αβιοτικές καταπονήσεις (Allocati *et al.*, 2003; Moons, 2005).

Οι GSTs που επάγονται κατά το οξειδωτικό στρες δρουν ως υπεροξειδάσες γλουταθειόνης (GPOX), μετατρέποντας τα οργανικά υδροϋπεροξειδία σε μονοϋδροξυαλκοόλη στα λιπαρά και στα νουκλεϊκά οξέα, κυρίως στις τάξεις θ, φ και τ. Αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας τη γλουταθειόνη (GSH) ως δότη ηλεκτρονίων (Edward *et al.*, 2000). Με αυτόν τον τρόπο παρεμποδίζεται η αποικοδόμηση του οργανικού υδροϋπεροξειδίου σε κυτταροτοξικά παράγωγα αλδεΐδης (Roxas *et al.*, 1997; Cummins *et al.*, 1999; Foyer & Noctor, 2005).

1.4.3. ΟΙ GSTs ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΩΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ-ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ

Οι GSTs, πέρα από τους καταλυτικούς τους ρόλους, μπορούν να λειτουργήσουν και σαν πρωτεΐνες μεταφοράς-δέσμευσης ή ligandin πρωτεΐνες τόσο για εξωγενή όσο και για ενδογενή υποστρώματα (Sheehan *et al.*, 2001). Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι οι GSTs μπορούν να δεσμεύσουν αντιστρεπτά αρκετά υδρόφοβα υποστρώματα όπως η αίμη, στεροειδή, ορμόνες, αζωχρώματα, χολερυθρίνη τα οποία δεν αποτελούν υποστρώματά των GSTs, αλλά συνεισφέρουν στην ενδοκυτταρική μεταφορά ή την απομόνωσή τους (Listowsky *et al.*, 1988; Hayes & Pulford, 1995; Hayes *et al.*, 2005). Οι ουσίες αυτές δεσμεύονται σε μια ξεχωριστή θέση του πρωτεϊνικού μορίου, την L-θέση. Δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες για την ακριβή τοποθεσία της, ενώ φαίνεται να υπάρχει διαφοροποίηση στα διάφορα ισοένζυμα (Chronopoulou *et al.*, 2011).

Οι GSTs της α τάξης βρέθηκε αρχικά να έχουν δράση πρωτεϊνών δέσμευσης (Hayes & Pulford, 1995). Αργότερα όμως, διαπιστώθηκε ο ίδιος ρόλος των GSTs τόσο σε θηλαστικά (Sheehan *et al.*, 2001) όσο και σε φυτά (Bilang & Sturm, 1995). Οι φυτικές GSTs ενδεχομένως έχουν σημαντικό ρόλο στη διευκόλυνση μεταφοράς δευτερογενών προϊόντων και τοξικών ενδιάμεσων του μεταβολισμού του φυτού (Edwards *et al.*, 2000; Dixon *et al.*, 2002a).

1.4.4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΙΣΟΜΕΡΙΩΣΗΣ

Ένας διαφορετικός ρόλος των GSTs είναι η κατάλυση αντιδράσεων ισομερίωσης. Αυτές οι αντιδράσεις μπορεί να είναι μετατοπίσεις διπλών δεσμών, ενδομοριακές αντιδράσεις οξειδοαναγωγής ή ισομεριώσεις cis-trans (Deponte, 2013).

Ο πιο μελετημένος τύπος είναι η μετατροπή cis διαμόρφωσης διπλού δεσμού σε trans διαμόρφωση (Boylard & Chasseaud, 1967; Keen *et al.*, 1976).

Στον άνθρωπο, στο *Aspergillus nidulans* καθώς επίσης και στο φυτό *Arabidopsis*, οι GSTs της ζ τάξης (Schultz *et al.*, 2009; Fernandez- Canon & Penalva, 1998; Thom *et al.*, 2001) δρουν ως μαλεϋλακετοξικές ισομεράσες και παίζουν ρόλο σε ένα σημαντικό στάδιο στο μονοπάτι καταβολισμού της τυροσίνης, το οποίο συνδέεται με πολλές δυσλειτουργίες (Blackburn *et al.*, 2000, 2001). Επίσης, στο ίδιο μονοπάτι πραγματοποιείται και η αντίδραση ισομερίωσης της μαλεϋακετόνης προς φουμαρυλακετόνη (Board & Menon, 2013).

Στα θηλαστικά, έχει βρεθεί ότι οι GSTs εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των προσταγλαδινών και των λευκοτριενίων (Tsuchida *et al.*, 1987; Kanaoka *et al.*, 1997; Jakobsson *et al.*, 1999).

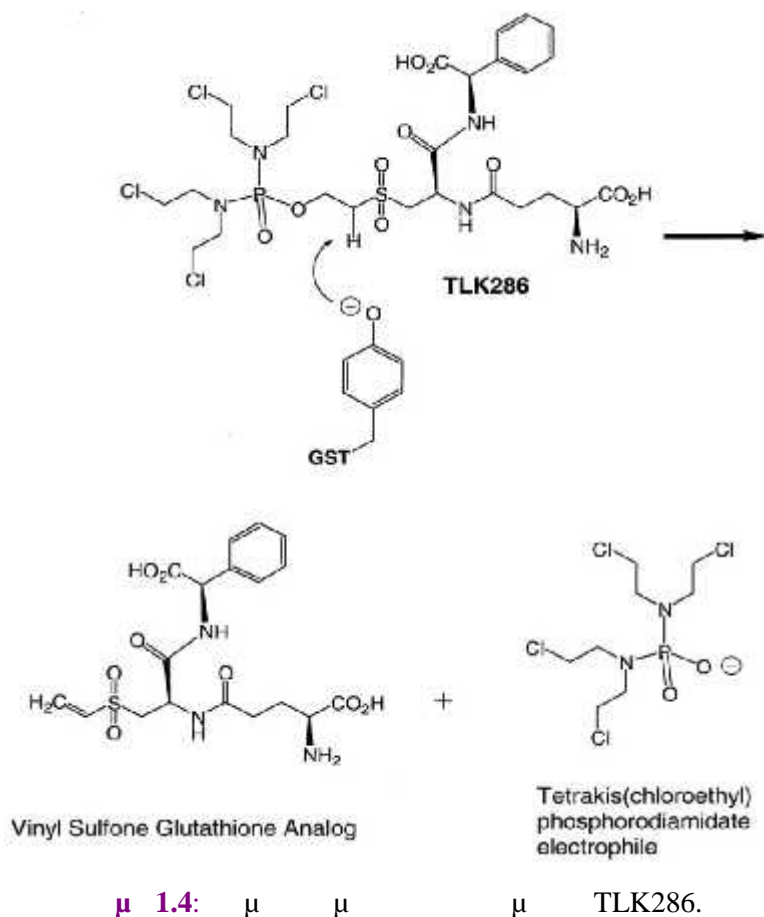
1.4.5. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΣΗΜΑΝΣΗ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Έρευνες σε ινδικά χοιρίδια έδειξαν ότι όταν οι πνεύμονες διεγερθούν με αντιγόνο, απελευθερώνονται κάποιες ουσίες, τα λευκοτριένια, που συστέλλουν τους λείους μύες των βρόγχων (Kellaway & Trethewie, 1940). Η σύνθεση των λευκοτριενίων πραγματοποιείται από το αραχιδονικό οξύ της κυτταρικής μεμβράνης με τη δράση της 5-λιποξυγενάσης και μιας πρωτεΐνης που ενεργοποιεί τη 5-λιποξυγενάση. Αρχικά, το αραχιδονικό οξύ μετατρέπεται σε ένα ασταθές μόριο, το λευκοτριένιο A₄ και στη συνέχεια μεταβολίζεται είτε σε B₄ είτε σε C₄ (Ricardo & Sheldon, 1997; Holgate *et al.*,

1996). Για τη σύνθεση του B_4 πραγματοποιείται υδρόλυση από τη κυτταροπλασματική υδρολάση LTA_4 , ενώ για να σχηματιστεί το λευκοτριένιο C_4 γίνεται συμπλοκοποίηση με τη GSH μέσω του ενζύμου συνθετάση λευκοτριενίου C_4 , το οποίο ανήκει στην οικογένεια των GSTs (Piper, 1984; Ford-Hutchinson, 1990). Τέλος, με απομάκρυνση του L-γλουταμινικού παράγεται το LTD_4 ή αλλιώς το πεπτιδολευκοτριένιο.

Σύμφωνα με μελέτες, τα πεπτιδολευκοτριένια είναι υπεύθυνα για ασθένειες όπως το βρογχικό άσθμα στον άνθρωπο (Rushmore & Pickett, 1993). Άρα, κάποιοι πιθανοί τρόποι θεραπείας θα μπορούσαν να είναι η αναστολή της σύνθεσης του ενζύμου LTC_4 ή η δημιουργία ανταγωνιστών για τους υποδοχείς του LTD_4 (Rushmore & Pickett, 1993).

Η αυξημένη και διαφορική έκφραση των ισοενζύμων των GSTs σε καρκινικά κύτταρα (Rushmore & Pickett, 1993) δείχνει τον σημαντικό ρόλο που μπορεί να παίζουν τα συγκεκριμένα ένζυμα στην ανθεκτικότητα των αντικαρκινικών φαρμάκων. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι το ισοένζυμο GSTP1-1 υπερεκφράζεται σε περιπτώσεις καρκίνου, αναγνωρίζοντας τα φάρμακα (chlorambucil, cisplatin, adriamycin κ.α) σαν ξενοβιοτικά, με άμεσο αποτέλεσμα να αναστέλλει τη δράση τους (Batist *et al.*, 1986). Επομένως, η GSTP1-1 χρησιμοποιείται σα μοριακός στόχος ενεργοποίησης προφαρμάκων. Ένα τέτοιο προφάρμακο είναι το TLK286. Αυτό διασπάται μέσω μιας αντίδρασης β-απόσπασης σε ένα προϊόν που αποτελεί το τελικό αλκυλιωτικό μόριο και σε ένα ανάλογο της GSH (Townsend & Tew, 2003) (Σχήμα 1.4).



Σύμφωνα με μελέτη του Lafuente και της ομάδας του (Lafuente *et al.*, 1993), η GSTμ σχετίζεται με την ευπάθεια των ατόμων να εμφανίσουν καρκίνο τόσο στον πνεύμονα όσο και σε άλλα όργανα. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι στα άτομα, στα οποία εκφράζεται η GSTμ, προστατεύονται καλύτερα έναντι διάφορων καρκινογόνων παραγόντων. Η GSTμ συνδέεται με ισχυρά καρκινογόνους μεταβολίτες που παράγονται κατά το κάπνισμα. Επομένως, θεωρητικά, είτε η ύπαρξη είτε η απουσία του συγκεκριμένου ενζύμου μπορεί να καθορίσει την ευαισθησία ενός ατόμου στην εμφάνιση καρκίνου εξ αιτίας του καπνίσματος (Strange, 1993; Spirakou *et al.*, 1996).

1.5. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ & ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ GSTs

Οι GSTs χωρίζονται σε τέσσερις οικογένειες (Armstrong, 1997; Chronopoulou & Labrou, 2009; Board & Menon, 2013):

- τις κυτταροπλασματικές,
- τις μεμβρανικές μικροσωμικές,
- τις μιτοχονδριακές της κ τάξης και
- τις GSTs που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό φωσφομυκίνη.

Οι *κυτταροπλασματικές* GSTs έχουν μελετηθεί εκτενώς στον άνθρωπο, στα φυτά, στα έντομα και σε μικροβιακά είδη (Board & Menon, 2013), αφού αποτελούν μια υπεροικογένεια ενζύμων, που απαντά σε όλες τις κυτταρικές μορφές ζωής. Ανακαλύφθηκαν πρώτες και τα μέλη τους αυξάνονται συνεχώς καθώς υπάρχει συνεχής αύξηση των γενετικών πληροφοριών.

Οι *μεμβρανικές μικροσωμικές* δεν παρουσιάζουν καμία ομοιότητα με τις κυτταροπλασματικές, αφού δομικά πρόκειται για τριμερή με τρεις ανεξάρτητες ενεργές περιοχές (Sun & Morgenstem, 1997). Απαντώνται στα θηλαστικά, στα φυτά και στα ζώα (Diesperger & Sandermann, 1979; Zettl *et al.*, 1994). Η περισσότερο μελετημένη είναι η GST1 από αρουραίο (MGST1), εξ αιτίας της δράσης της στη κυτταρική άμυνα έναντι αντικαρκινικών φαρμάκων (Zhang & Lou, 2003).

Οι *μιτοχονδριακές* της κ τάξης GSTs θεωρούνταν μέλη των κυτταροπλασματικών GSTs, ενώ με πρόσφατες έρευνες αποδείχτηκε ότι αποτελούν ξεχωριστή υπεροικογένεια (Jowsey *et al.*, 2003; Ladner *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2004).

Οι GSTs που προσδίδουν *ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό φωσφομυκίνη* ανήκουν στη κατηγορία των μεταλλοενζύμων. Δεν παρουσιάζουν καμία ομοιότητα με τις κυτταροπλασματικές καθώς επίσης η πρωτοταγής δομή τους δε σχετίζεται με καμία άλλη οικογένεια (Arca *et al.*, 1990). Οι συγκεκριμένες GSTs δεν καταλύουν τη προσθήκη του γλουταθείου σε συνήθη ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα (Arca *et al.*, 1990).

1.6. ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΕΣ GSTs

1.6.1. ΔΟΜΗ

Η τρισδιάστατη δομή πολλών κυτταροπλασματικών GSTs έχουν καθοριστεί κρυσταλλογραφικά και τα αποτελέσματα έχουν δείξει μια εκπληκτικά συντηρημένη δομή. Πρόκειται για διμερή, που αποτελούνται από δυο υπομονάδες. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από 200-250 αμινοξικά κατάλοιπα με μοριακό βάρος ~25-28 KDa και περιέχει ένα ανεξάρτητο ενεργό κέντρο με ευδιάκριτες περιοχές δέσμησης του υποστρώματος: μια μη εξειδικευμένη περιοχή υδρόφοβης φύσεως (θέση Η-συντηρημένη αμινοτελική περιοχή που καλύπτει περίπου το ένα τρίτο της πρωτεΐνης), όπου δεσμεύονται ηλεκτρονιόφιλες ενώσεις ευρέος φάσματος ([Habig et al., 1974](#)) και μια δεύτερη θέση που δεσμεύεται η γλουταθειόνη (θέση G-ασταθής καρβοξυτελική περιοχή που περιλαμβάνει τα δυο τρίτα της πρωτεΐνης) ([Jakobson et al., 1977](#)).

Οι δυο υπομονάδες συγκρατούνται κυρίως μέσω δυο τύπων αλληλεπιδράσεων μεταξύ της κοινής τους επιφάνειας, τις υδρόφιλες και τις υδρόφοβες ([Armstrong, 1997](#)).

Η σημαντικότερη υδρόφοβη αλληλεπίδραση είναι το ονομαζόμενο μοτίβο κλειδιού-κλειδαριάς, το οποίο δημιουργείται σχεδόν σε όλες τις τάξεις των GSTs ([Vargo et al., 2004](#)). Συγκεκριμένα, ένα αρωματικό κατάλοιπο της Ν-τελικής περιοχής της μιας υπομονάδας λειτουργεί ως κλειδί, το οποίο μπαίνει σε μια κλειδαριά που δημιουργούν υδρόφοβα κατάλοιπα της C-τελικής περιοχής της άλλης υπομονάδας. Το μοτίβο αυτό έχει βρεθεί στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης των υπομονάδων των τάξεων α, φ, μ, ζ, τ και π ([Sinning et al., 1993](#); [Reinemer et al., 1996](#); [Thom et al., 2001](#); [Hayes et al., 2005](#)).

Όσον αφορά στις υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις, η σταθεροποίηση του διμερούς βασίζεται σε ηλεκτροστατικές επιδράσεις και δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των καταλοίπων των υπομονάδων. Τέτοιου τύπου αλληλεπιδράσεις εμφανίζουν οι τάξεις σ και θ ([Ji et al., 1995](#); [Rossjohn et al., 1998](#)). Σε κάθε τάξη GST, οι αλληλεπιδράσεις είναι εξειδικευμένες εμποδίζοντας τη

δημιουργία ετεροδιμερών μεταξύ υπομονάδων διαφορετικών τάξεων (Hayes *et al.*, 2005; Frova, 2006).

Η G- και η H- θέσεις του ενζύμου μπορούν να μετακινούνται όταν η κρυσταλλική δομή τροποποιείται, δείχνοντας έτσι πως οι δυο υπομονάδες της GST υφίστανται σημαντικές αλλαγές στις διαμορφώσεις κατά την ένωσή τους με τα υποστρώματα (Dixon *et al.*, 2002). Οι δυο υπομονάδες μπορεί να είναι ίδιες (ομοδιμερές), αποτέλεσμα έκφρασης ενός μόνο γονιδίου ή διαφορετικές (ετεροδιμερές), δηλαδή κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια (Sheehan *et al.*, 2001; Edwards *et al.*, 2000; Dixon *et al.*, 2002; Schröder, 2001; Frova, 2006). Τα ετεροδιμερή παρουσιάζουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον αφού έχει παρατηρηθεί ότι επάγονται σε καταστάσεις έντονης ορμονικής δραστηριότητας και στρες (Schröder, 2001).

Ενεργός περιοχή

Η ενεργός περιοχή είναι η περιοχή δέσμευσης των υποστρωμάτων και αποτελείται από την G- και την H-θέση. Κάθε υπομονάδα έχει ένα ανεξάρτητο ενεργό κέντρο, όπου δεσμεύεται αρχικά η γλουταθειόνη (G-θέση) και έπειτα το υδρόφοβο υπόστρωμα (H-θέση) (Κλώνης, 2007).

G-θέση

Η G-θέση βρίσκεται στη N-τελική περιοχή και αποτελεί τη θέση πρόσδεσης της γλουταθειόνης (GSH). Σε κάθε μονομερές προσδένεται ένα μόριο GSH. Τα αμινοξικά κατάλοιπα σε αυτή τη θέση είναι συντηρημένα, ωστόσο το πρωταρχικό αμινοξικό κατάλοιπο, που είναι υπεύθυνο για τη κατάλυση της αντίδρασης διαφέρει σημαντικά μεταξύ των τάξεων (Board & Menon, 2013). Στην τεταρτοταγή δομή της G-θέσης παρατηρείται μια χαρακτηριστική GST αναδίπλωση, ίδια με αυτήν της θειορεδοξίνης, η οποία θεωρείται πρόγονος των GSTs (Katti *et al.*, 1990; Armstrong, 1997). Για την αναγνώριση του γ-γλουταμυλ-τμήματος της GSH είναι υπεύθυνο το μοτίβο ββα και αποτελεί τη πιο καλά συντηρημένη περιοχή της δομής σε όλα τα GSTs ένζυμα (Armstrong, 1997). Επιπλέον, στη G-θέση βρίσκεται το συντηρημένο

καταλυτικό κατάλοιπο που είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση της σουλφυδρυλομάδας της GSH ώστε να παραχθεί το καταλυτικά ενεργό ανιόν του σουλφυδρυλίου (GS^-) (Armstrong, 1997; Labrou *et al.*, 2001; Frova, 2006).

H-θέση

Η H-θέση βρίσκεται στην C-τελική περιοχή και αποτελεί θέση δέσμευσης ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων. Πρόκειται για υδρόφοβη περιοχή με τις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων της να χρησιμοποιούνται ως δότες δεσμών υδρογόνου (Thom *et al.*, 2002). Τα αμινοξικά κατάλοιπα από τα οποία αποτελείται δεν είναι συντηρημένα, γι αυτό μπορούν να δεσμευτούν μια ποικιλία υποστρωμάτων (Hayes *et al.*, 2005). Λόγω της δομικής ευελιξίας της συγκεκριμένης θέσης, τα υποστρώματα είναι ελεύθερα να προσδεθούν με διάφορες δομικές προσαρμογές (Josephy & Mannervik, 2006).

L-θέση

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι GSTs παίζουν ρόλο σε διάφορες λειτουργίες των κυττάρων. Μια από αυτές είναι η δέσμευση υδρόφοβων ενώσεων (αίμη, χολυρεθρίνη κ.α), οι οποίες δεν αποτελούν υποστρώματα των ενζύμων. Η θέση που δεσμεύονται αυτές οι ουσίες ονομάζεται L-θέση, όμως οι πληροφορίες τόσο για τη τοποθεσία της όσο και για τον ρόλο της είναι ακόμα λίγες.

1.6.2. ΤΑΞΕΙΣ

Κάθε οικογένεια υποδιαιρείται σε τάξεις με βασικό κριτήριο την αμινοξική τους αλληλουχία (Mannervic & Danielson, 1988). Ωστόσο παράλληλα συνεκτιμούνται και άλλα κριτήρια, όπως η νουκλεοτιδική αλληλουχία των γονιδίων από τα οποία εκφράζονται, η τριτοταγής και τεταρτοταγής δομή

των ενζύμων (Chronopoulou & Labrou, 2009; Cummins *et al.*, 2011; Sheenan *et al.*, 2001).

Η ταξινόμηση των κυτταροπλασματικών GSTs έγινε με βάση τις ομοιότητες της αμινοξικής αλληλουχίας και της πρωτεϊνικής δομής.

Στα θηλαστικά υπάρχουν επτά τάξεις : α (άλφα), μ (μι), π (πι), σ (σίγμα), θ (θήτα), ω (ωμέγα) και ζ (ζήτα), ενώ στα φυτά υπάρχουν οχτώ τάξεις : τ (ταυ), φ (φι), θ (θήτα), ζ (ζήτα), λ (λάμδα), EF1By, Ρεδουκτάση του διϋδροασκορβικού (DHAR) και Απαλογονάση της τετρακλώρο υδροκινόνης (TCHQD) (Liu *et al.*, 2013; Dixon *et al.*, 2010; Jain *et al.*, 2010; Lan *et al.*, 2009). Οι πιο σημαντικές τάξεις στα φυτά είναι η φ και η τ, αφού εμπλέκονται περισσότερο στον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών (Frova, 2006). Στα βακτήρια, οι τάξεις που έχουν βρεθεί είναι η β (Beta) και η χ (Chi) (Rossjohn *et al.*, 1998; Allocati *et al.*, 2003; Wikteliu & Stenberg, 2007). Ενώ, στα έντομα βρέθηκαν η δ (Delta) και ε (Epsilon) (Alias & Clark, 2007).

1.1:

μ GSTs

(Rossjohn *et al.*, 1998; Sheehan *et al.*, 2001; Dixon *et al.*, 2002; Awasthi *et al.*, 2005; Coles & Kadlubar, 2005; Wikteliu & Stenberg, 2007)

ΤΑΞΗ	ΑΜΙΝΟΞΙΚΟ ΚΑΤΑΛΟΙΠΟ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
Alpha (A)	Τυροσίνη	Λειτουργία ισομεράσης και υπεροξειδάσης, Μεταβολισμός φαρμάκων, Αποτοξίνωση
Mu (M)	Τυροσίνη	Μεταβολισμός Φαρμάκων
Pi (P)	Τυροσίνη	Μεταβολισμός Φαρμάκων
Theta (T)	Σερίνη	Πρόληψη ηπατοκαρκινογένεσης, Μεταβολισμός ξενοβιοτικών

Zeta (Z)	Σερίνη	Κατάλυση του μεταβολισμού των α-αλογονοξέων
Omega(O)	Κυστεΐνη	Οξειδωτικό στρες
Sigma (S)	Τυροσίνη	Σύνθεση προγλασταδινών

1.6.3. ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΕΣ GSTs ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Στον άνθρωπο, οι GSTs κωδικοποιούνται από δεκαέξι γονίδια και ταξινομούνται βάσει 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](#)). Η γονιδιακή επικάλυψη, ο γενετικός ανασυνδυασμός καθώς και η συσσώρευση μεταλλάξεων έχουν οδηγήσει σε διαφορές ως προς την εξειδίκευση και την ποικιλομορφία στα υποστρώματα μεταξύ των τάξεων, παρά το γεγονός της ύπαρξης ενός μόνο κοινού προγόνου ([Townsend & Tew, 2003](#)).

Ειδικότερα για το ισοένζυμο hGSTA1-1 :

Πρόκειται για ένα ισοένζυμο, το οποίο αποτοξινώνει τα κύτταρα από καρκινογόνους μεταβολίτες, αλκυλιωμένους παράγοντες, καπνό και προϊόντα περιβαλλοντικής ρύπανσης.

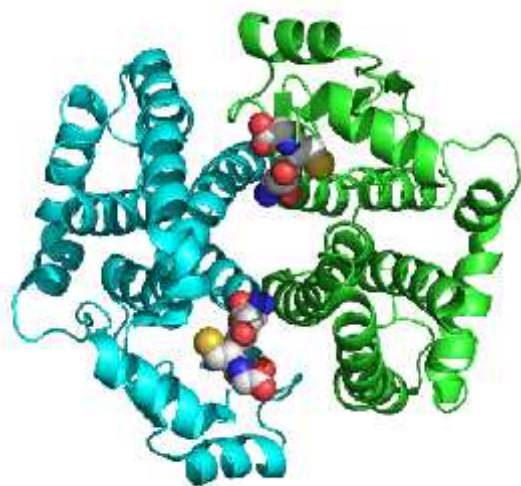
Απαντάται σε υψηλά επίπεδα στο ήπαρ, στα εσπειραμένα σωληνάρια των νεφρών, στο εσωτερικό δικτυωτό στρώμα των επινεφρίδιων αδένων, στα διάμεσα κύτταρα των όρχεων και στο πάγκρεας, καθώς επίσης και στους περισσότερους ιστούς σε χαμηλά επίπεδα ([Rowe et al., 1997; Coles et al., 2002; Morel et al., 2002](#)).

Χαρακτηριστικό της δομής της α τάξης είναι μια α-έλικα στην περιοχή II, η οποία αποτελεί κομμάτι του ενεργού κέντρου και δεν υπάρχει στις άλλες

τάξεις (Kuhnert *et al.*, 2005). Η σταθερότητα του διμερούς καθώς επίσης και η ικανότητα δέσμησης ενώσεων που δεν είναι υποστρώματα, οφείλονται σε αυτήν την επιπλέον έλικα (Dirr & Wallace, 1999). Οι αλληλεπιδράσεις των δυο υπομονάδων είναι κυρίως υδρόφοβες και υπακούουν στο μοτίβο κλειδιού-κλειδαριάς. Συγκεκριμένα, το αρωματικό αμινοξύ Phe52 λειτουργεί ως κλειδί και ταιριάζει στη κλειδαριά που σχηματίζεται από την άλλη υπομονάδα (Sinning *et al.*, 1993).

Σύμφωνα με έρευνες το συγκεκριμένο ισοένζυμο έχει τη μεγαλύτερη καταλυτική δραστηριότητα σύζευξης της GSH με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (Dirven *et al.*, 1994).

Η υπεροξειδωση των λιπών εμπλέκεται σε ασθένειες όπως η αρτηριοσκλήρωση, ο καρκίνος, το Alzheimer κ. α. Το ισοένζυμο GSTA1-1 αποδέχεται ως υπόστρωμα το προϊόν της υπεροξειδωσης των λιπών και επεμβαίνει πριν τη παραγωγή αυτού του προϊόντος, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο την υπεροξειδωση των λιπών, μέσω της GPx δράσης του (Yang *et al.*, 2002).



1 μ 1.5 : μ
μ μ

μ hGSTA1-
(GSH).

1.7. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ GSTs

1.7.1. GSTs ΚΑΙ ΓΕΩΠΟΝΙΑ

Μια περισσότερο βιοτεχνολογική εφαρμογή θα μπορούσε να είναι η ανάπτυξη νέων φυτοπροστατευτικών προϊόντων, τα οποία να αποτοξινώνονται πιο εύκολα από τις φυτικές GSTs.

Επιπλέον, διαφορές στα ενεργά κέντρα των ενζύμων σε ζιζάνια και αγρωστώδη θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην εύρεση ενώσεων με ανασταλτική λειτουργία για το ένζυμο με εξειδίκευση. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η ένωση tridiphane, η οποία παρεμποδίζει την ανθεκτικότητα των ζιζανίων, λειτουργώντας ως επιλεκτικός συναγωνιστής του ζιζανιοκτόνου atrazine (Cummins *et al.*, 2011).

1.7.2. GSTs ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Είναι πλέον γνωστό ότι τα ένζυμα μπορούν να συμβάλλουν στην αποκατάσταση επιβαρυμένου από ρύπους περιβάλλοντος. Για παράδειγμα, η ακινητοποίηση κυττάρων από μικροοργανισμούς που εκφράζουν GSTs έδειξε ότι μπορούν να βιοαποικοδομήσουν φαρμακευτικά απόβλητα όπως η τετρακυκλίνη (Park, 2012).

1.7.3. GSTs ΚΑΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

Πρόκειται για συσκευές ανάλυσης, οι οποίες διαθέτουν βιολογικό μηχανισμό αναγνώρισης και μεταδίδουν συνήθως ηλεκτρικό σήμα (Phadke, 1992; Sassolas *et al.*, 2012). Η έρευνα στον τομέα των βιοαισθητήρων είναι πολύ σημαντική, αφού οι αναλύσεις των δειγμάτων γίνονται γρηγορότερα, ευκολότερα και με πιο χαμηλό κόστος (Kandimalla *et al.*, 2006). Οι βιοαισθητήρες μπορούν να δώσουν στοιχεία μεγαλύτερης ακρίβειας από την κλασική χημεία με ταυτόχρονη προστασία του περιβάλλοντος και της δημόσιας υγείας. Βρίσκουν εφαρμογή στον περιβαλλοντικό έλεγχο, στη βιομηχανία τροφίμων και στις κλινικές αναλύσεις (Sassolas *et al.*, 2012). Ένα

επιπλέον πλεονέκτημα των βιοαισθητήρων είναι η ελάχιστη προετοιμασία που χρειάζονται τα δείγματα πριν την ανάλυση. Πρώτοι οι Clark & Lyons, το 1962, ανέπτυξαν έναν βιοαισθητήρα για τον προσδιορισμό γλυκόζης.

Ανάλογα με το σήμα που μεταδίδουν χωρίζονται στις εξής κατηγορίες :

- ✓ ηλεκτροχημικοί (Alonso-Lomillo *et al.*, 2009),
- ✓ οπτικοί (Sai *et al.*, 2009),
- ✓ θερμικοί (Ramanathan *et al.*, 2001),
- ✓ ελεύθεροι σήματος (Gauglitz & Proll, 2008) και
- ✓ ακουστικοί (Lucklum & Hauptmann, 2006).

Χάρη στην ικανότητα των GSTs να λαμβάνουν μέρος στην αντίδραση δέσμευσης της GSH αναπτύχθηκαν οι βιοαισθητήρες για τον προσδιορισμό των ζιζανιοκτόνων, οι οποίοι βασίζονται στην αναστολή του ενζύμου από τα ξενοβιοτικά. Συγκεκριμένα, η μετατροπή του υποστρώματος αναστέλλεται από τα ξενοβιοτικά, με έμμεσο αποτέλεσμα αυτά να ανιχνεύονται. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η ανάπτυξη ενός φορητού βιοαισθητήρα οπτικής ίνας που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του φυτοπροστατευτικού προϊόντος atrazine με τη βοήθεια του ισοενζύμου GST1 από αραβόσιτο (Andreou & Clonis, 2002). Ακόμα ένα σημαντικό παράδειγμα είναι η ανάπτυξη ενός βιοαισθητήρα για την ανίχνευση του captan σε ύδατα, μια ουσία η οποία χαρακτηρίζεται ως καρκινογόνα και επιπλέον είναι επικίνδυνη για το υδάτινο οικοσύστημα (Choi *et al.*, 2003).

Εκτός από την ανάπτυξη βιοαισθητήρων για περιβαλλοντικούς σκοπούς, ενδιαφέρον παρουσιάζει και η ανάπτυξη βιοαισθητήρων με ιατρικές εφαρμογές καθώς επίσης και εφαρμογές στη βιομηχανία των τροφίμων.

Σχετικά με τις ιατρικές εφαρμογές έχουν ήδη αναπτυχθεί βιοαισθητήρες σαν εργαλείο ανάλυσης ηπατο-νεοπλασματικών και προ-νεοπλασματικών αλλοιώσεων, με τη χρήση ενός αντισώματος που αναγνωρίζει τη GST του πλακούντα και εκτιμά το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου της 2-μακρογλοβουλίνης (Sugata *et al.*, 2005).

Τέλος, στη βιομηχανία τροφίμων ενδιαφέρουσα είναι η ανάπτυξη ενός βιοαισθητήρα που ανιχνεύει την ακρυλαμίδα σε αμυλούχα τρόφιμα, ουσία επικίνδυνη για την ανθρώπινη υγεία (Hasegawa *et al.*, 2007).

1.7.4. GSTs ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ

Οι GSTs προστατεύουν τα κύτταρα από ενδογενείς και εξωγενείς καρκινογόνες ουσίες, ωστόσο αυτός ο ρόλος κάποιες φορές δημιουργεί προβλήματα. Συγκεκριμένα, υπάρχουν περιπτώσεις όπου οι GSTs αναγνωρίζουν τις χημειοθεραπευτικές ενώσεις ως ξενοβιοτικές και αναστέλλουν την δράση τους.

Διάφορες GSTs καταλύουν τη δέσμευση καρκινογόνων ουσιών, αφού οι περισσότερες από αυτές τις ουσίες είναι ηλεκτρονιόφιλες αντιδρούν με τις αζωτούχες βάσεις και τον σκελετό του DNA και τις περισσότερες φορές ενεργοποιούνται από τον μεταβολισμό του οργανισμού. Συχνά, η ενδογενής GSH μπορεί να αναστείλει την επίθεση αυτών των ενεργοποιημένων καρκινογόνων ενώσεων στο DNA, ίσως και αυθόρμητα (Josephy & Mannervic, 2006). Αυτή η δέσμευση καταλύεται κυρίως από GSTs των τάξεων alpha, mu και pi (Sundberg et al., 1997; Sundberg et al., 1998).

Αυξημένες συγκεντρώσεις GSH και μεταβαλλόμενα επίπεδα έκφρασης των GSTs συνοδεύουν τον μετασχηματισμό των κυττάρων από την υγιή κατάσταση στην κακοήθη (Mannervik et al., 1987). Έρευνες έχουν δείξει ότι σε πολλούς όγκους αυξάνεται η έκφραση του ισοενζύμου GSTP1-1 σε σχέση με την έκφρασή του στους φυσιολογικούς ιστούς (Lewis et al., 1989; Kelley et al., 1994). Μια ακόμη εφαρμογή λοιπόν των GSTs είναι η χρησιμοποίησή τους στη μοριακή διαγνωστική διάφορων τύπων καρκίνου καθώς επίσης και στην κλινική παρακολούθησή του.

Πολυμορφισμοί των GSTs και Καρκίνος

Σύμφωνα με έρευνες, οι πολυμορφισμοί των GSTs του ανθρώπου σχετίζονται άμεσα με την ανταπόκριση των ασθενών στη χημειοθεραπεία (Stoehlmacher et al., 2002; Sweeney et al., 2003; Oldenburg et al., 2007). Έτσι, οι διάφορες μορφές των GSTs μπορούν στο μέλλον να αποτελέσουν παράγοντες για την ανάπτυξη εξατομικευμένης θεραπείας (Sweeney et al., 2003; Oldenburg et al., 2007). Μελέτες στις οποίες λαμβάνεται υπ όψιν το γενετικό προφίλ των ασθενών ερευνούν την συσχέτιση των γενετικών

πολυμορφισμών των GSTs και συγκεκριμένων ασθενειών, όπως η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστεως (Covolo *et al.*, 2008). Με την τεχνική της PCR πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός των κληρονομούμενων αλληλομόρφων των πολυμορφικών GSTs γονιδίων των τάξεων alpha, mu, pi και theta (Nishimura *et al.*, 2002; Keller *et al.*, 2002; Yoshiga & Soya, 2005; Nunes *et al.*, 2006). Στον άνθρωπο, οι περισσότεροι πολυμορφισμοί είναι αποτέλεσμα της αλλαγής ενός νουκλεοτιδίου (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) και σπανιότερα μεταλλάξεων εξαλείψεως (Hui-Wen & Ali-Osman, 2007). Έτσι, η επιστήμη της φαρμακογονιδιωματικής βασίζεται στους SNPs (Sun *et al.*, 2009), οι οποίοι μπορούν να μεταβάλλουν την έκφρασή τους ή τη δραστικότητα τους επηρεάζοντας τη διάθεσή τους στον οργανισμό και τα αποτελέσματα της χημειοθεραπείας (Bernig & Chanock, 2006). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο αλληλόμορφος GSTP1*C, ο οποίος λειτουργεί πιο προστατευτικά για τα κύτταρα ως προς τα φάρμακα cisplatin και carboplatin σε σχέση με τους αλληλομόρφους GSTP1*A και GSTP1*B (Ishimoto & Ali-Osman, 2002). Επιπλέον, οι αλληλόμορφοι GSTP1*B και GSTP1*C σε ασθενείς που έπασχαν από οξεία και χρόνια μυελώδη λευχαιμία, γλοιώμα, πολλαπλό μύελωμα, λέμφωμα Hodgkin και καρκίνο της ουροδόχου κύστεως προσδίδουν καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία και μεγαλύτερο χρόνο ζωής σε σχέση με άλλους αλληλομόρφους (Srivastava *et al.*, 1999; Allan *et al.*, 2001; Goekkurt *et al.*, 2006; Maggini *et al.*, 2008). Σε περιπτώσεις παιδικής οξείας λευχαιμίας και καρκίνου των ωοθηκών, ο αλληλόμορφος GSTM1*0 παρουσίασε καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία σε σχέση με τους αλληλομόρφους GSTM1*A και GSTM1*B (Hall *et al.*, 1994; Howells *et al.*, 2001). Τέλος, άτομα που φέρουν τον αλληλόμορφο GSTT1*0 διατρέχουν τον μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστεως, μηνιγγιώματος, οξείας μυελώδους λευχαιμίας και καρκινώματος των πλακωδών κυττάρων (Salagovic *et al.*, 1999). Σύμφωνα με τις παραπάνω πληροφορίες, οι λειτουργικοί γονιδιωματικοί πολυμορφισμοί των γονιδίων-στόχων φαρμάκων, των ενζύμων μεταβολισμού και των ενζύμων επιδιόρθωσης DNA είναι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα ενός φαρμάκου (Lima *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2001).

Οι GSTs και η χρήση τους στον σχεδιασμό φαρμάκων

Οι GSTs αποτελούν σημαντικούς μοριακούς στόχους τόσο για την ανάπτυξη νέων ισχυρών αναστολέων όσο και για τον σχεδιασμό φαρμάκων και προφαρμάκων, λόγω της συμμετοχής τους σε μηχανισμούς αποτοξίνωσης των κυττάρων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η GSTP1-1 υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα, άρα μπορεί να αποτελέσει μοριακό στόχο για την ενεργοποίηση των προφαρμάκων. Ένα τέτοιο προφάρμακο είναι το TLK286, το οποίο ενεργοποιείται από το αμινοξύ Tyr7 του ενεργού κέντρου της GSTP1-1 ανθρώπου. Επιπλέον, ένα ακόμα προφάρμακο είναι η αζαθειοπρίνη, η οποία λειτουργεί ανοσοκατασταλτικά. Συγκεκριμένα, η βιομετατροπή της στην ενεργή μορφή 6-μερκαπτοπουρίνη καταλύεται από GSTs που ανήκουν κυρίως στην τάξη alpha και ειδικότερα η GSTA2-2 (Eklund *et al.*, 2006).

Αξιόλογη αναστολή έναντι διαφόρων GSTs παρουσιάζουν και πολλά συνθετικά φάρμακα και προφάρμακα, τα οποία προτείνονται και ως αποτελεσματικοί αναστολείς για τον σχεδιασμό αντικαρκινικών φαρμάκων και την αντιμετώπιση του MDR (Mahajan & Atkins, 2005; Sau *et al.*, 2010). Ένας από τους πρώτους αναστολείς των GSTs είναι το εθακρινικό οξύ και χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να ευαισθητοποιήσει τα καρκινικά κύτταρα στα κυτταροτοξικά αποτελέσματα των χημειοθεραπευτικών κυττάρων (Tew *et al.*, 1997). Αργότερα, πολλά παράγωγα του εθακρινικού οξέος και άλλες ενώσεις μελετήθηκαν ως πιθανοί αναστολείς των GSTs (Yang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει ο σχεδιασμός νέων πεπτιδικών αναλόγων της γλουταθειόνης (GSH) με σκοπό την ανάπτυξη νέων αναστολέων των GSTs, ο οποίος τα τελευταία χρόνια παρουσιάζει εξαιρετικά αποτελέσματα (Mahajan & Atkins, 2005). Η ανάπτυξη μεθόδων συνθέσεως μη φυσικών αμινοξέων, ως συστατικών μοριακών σχηματισμών με θεραπευτική δράση σε συνδυασμό με την ανάπτυξη συνθετικών πεπτιδικών αναλόγων παρουσιάζει έντονη αύξηση τα τελευταία χρόνια (Renfrew *et al.*, 2012; Meschenmoser *et al.*, 2013).

1.8. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το ισοένζυμο της τρανσφεράσης γλουταθειόνης ανθρώπου (hGSTA1-1) αποτελεί μοριακό στόχο για τον σχεδιασμό νέων φαρμάκων και προφαρμάκων, αφού υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα και παρουσιάζει υψηλή δραστικότητα. Τα συγκεκριμένα φάρμακα ενδεχομένως θα μπορούσαν να δράσουν στοχευμένα στους ιστούς υπερέκφρασης του ενζύμου, κάνοντας τη θεραπεία περισσότερο αποτελεσματική και προσωποποιημένη, χάρη στη στοχευμένη ισοενζυμική αναστολή.

Η παρούσα εργασία στόχευε στη μελέτη μιας βιβλιοθήκης ενώσεων που δεν είχαν εξεταστεί έως τώρα ως αναστολείς της hGSTA1-1, και την οποία αποτελούσαν κετόνες, κετοξίμες και N-άκυλο-υδραζόνες. Η επιλογή αυτών των ενώσεων οφείλεται στο γεγονός ότι, από δομικής απόψεως, ως αρχική τους ένωση είναι οι αντίστοιχες ξανθόνες, πολλές από τις οποίες μελετήθηκαν πρόσφατα (Zoi *et al.*, 2013) οπότε και αποδείχθηκε η δράση τους ως αναστολείς του ισοενζύμου hGSTA1-1 σε διαφορετικό βαθμό.

Στόχος της μελέτης ήταν η αξιολόγηση των συγκεκριμένων ενώσεων ως αναστολέων του συγκεκριμένου ισοενζύμου, καθώς επίσης και η πιθανή χρήση κάποιας ένωσης ως δομής 'οδηγού' (lead structure) για τον σχεδιασμό ισχυρότερων αναστολέων.

Στα πλαίσια των εργασιών, προγραμματίστηκε σάρωση της βιβλιοθήκης των ενώσεων με φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της δραστικότητας του ισοενζύμου hGSTA1-1, επιλογή των ενώσεων με την υψηλότερη δραστικότητα και υπολογισμός των τιμών IC50, ως και κινητική μελέτη της ενζυμικής αναστολής των επιλεγμένων ενώσεων για να διαπιστωθεί το είδος της αναστολής. Επίσης, εκτιμήθηκε ως πιθανή εργασία η χημική σύνθεση και ανάλυση ενώσεων, βάσει των ποσοτήτων που θα έπρεπε να ήταν διαθέσιμες για την πραγματοποίηση των μελετών.

Τα αποτελέσματα της κινητικής της ενζυμικής αναστολής, θα μπορούσαν να συνεκτιμηθούν με *in silico* μοριακό μοντελισμό και ελλιμενισμό στην hGSTA1-1, προκειμένου να σχηματιστεί μια πληρέστερη εικόνα του τρόπου της ενζυμικής αναστολής που επιφέρουν οι επιλεγείσες ενώσεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ 2,2'-ΔΙΥΔΡΟΞΥΒΕΝΖΟΦΑΙΝΟΝΩΝ

2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι 2-υδροξυβενζοφαινόνες αφθονούν σε φυσικές και συνθετικές ενώσεις, μαζί δε με τις ξανθόνες, τις κουμαρίνες και τα φλαβονοειδή (Martin, 2005), παρουσιάζουν σημαντική βιολογική δράση (Alvarez *et al.*, 2008). Η παρουσία της ορθο-υδροξυ-διαρυλο-κετόνης σε πολλές βιολογικά δραστικές ενώσεις (Liou *et al.*, 2004; Weng, 2010) και φυσικά προϊόντα (Ruan *et al.*, 2008; Yawer *et al.*, 2008) φέρνει την εν λόγω δομή σε προνομιούχο θέση στο χώρο της ιατρικής χημείας, καθιστώντας την συνθετικό στόχο. Λόγου χάριν, τέτοιες γνωστές και σημαντικές ενώσεις είναι οι combretastatins και οι phenstatins (Appel *et al.*, 2006).

Πολλές μέθοδοι είναι γνωστές για τη σύνθεση 2-υδροξυβενζοφαινονών, χαρακτηρίζονται, ωστόσο, από αρκετά συνθετικά 'βήματα' λόγω της παρουσίας υδροξυλίων. Για τον λόγο αυτό, η πυρηνόφιλη διάνοιξη της ξανθόνης, ως αρχικής ένωσης, καταλλήλως υποκατεστημένης, προσφέρει μία ιδιαιτέρως χρήσιμη εναλλακτική οδό για τη σύνθεση τοποεκλεκτικώς και ποικιλοτρόπως υποκατεστημένων διαρυλο-κετονών. Αυτή η εναλλακτική προσέγγιση επιτυγχάνεται υπό ήπιες συνθήκες, χρησιμοποιώντας μεταλλικά σύμπλοκα συναρμογής (π.χ. με Cr, Fe, Ir) (Wawzonck, 1951; Lee *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1984; Gill & Sutherland, 1986; Abd-El-Aziz & Bernardin, 2000) ή υπό δραστικές συνθήκες (Gardikis *et al.*, 2011; Gardikis *et al.*, 2011a). Σε αμφότερες τις περιπτώσεις επιτυγχάνεται η σύνθεση ο-υδροξυ-διαρυλο-φαινονών.

Η αξιοποίηση της δραστικότητας της ξανθόνης (Odrowaz -Sypniewski *et al.*, 2009) στη συνθετική χημεία (Gardikis *et al.*, 2011; Gardikis *et al.*, 2011a) ως και η αποδεδειγμένη δράση του εν λόγω μορίου ως αναστολέα του

ενζύμου τρανσφεράση γλουταθειόνης A1-1 ανθρώπου (hGSTA1-1) (Zoi *et al.*, 2013), μας ώθησαν στη δημιουργία υποκατεστημένων 2,2'-ο-διυδροξυ-βενζοφαινονών και στη μελέτη τους με το ανωτέρω ισοένζυμο hGSTA1-1, ως εν δυνάμει ισχυρών αναστολέων του ενζύμου, το οποίο και εμπλέκεται σε μηχανισμό MDR, εκμεταλλευόμενοι την ομοιότητα δομής μεταξύ των δύο ενώσεων, ξανθόνης και 2,2'-ο-διυδροξυ-βενζοφαινόνης.

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ

Τα φάσματα απορρόφησης υπερύθρου (IR) (Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών) στη περιοχή 4000-600 cm^{-1} ελήφθησαν σε όργανο της BRUKER.

Τα φάσματα ^1H και ^{13}C -NMR καταγράφηκαν (Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών) σε φασματόμετρο 400 MHz Bruker Advance ως διαλύματα σε CDCl_3 και θερμοκρασία δωματίου. Οι χημικές μετατοπίσεις (δ σε ppm) μετρήθηκαν με εσωτερικό πρότυπο το TMS και οι σταθερές J στρογγυλοποιήθηκαν στην πλησιέστερη ημιακέραιη τιμή.

Τα φάσματα μάζας (MS) καταγράφηκαν (Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών) με χαμηλή και υψηλή διαχωριστική ικανότητα σε φασματογράφο Micromass-Platform LC υπό συνθήκες ιονισμού δια ψεκασμού ηλεκτρονίων (ESI-MS).

Ο έλεγχος της καθαρότητας των ενώσεων και η παρακολούθηση της πορείας των αντιδράσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε πλάκες επιστρωμένες με silica gel 60 και δείκτη φθορισμού F₂₅₄ (Sigma-Aldrich). Για την ανάπτυξη των πλακών χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω συστήματα διαλυτών:

- Διχλωρομεθάνιο : Πετρελαϊκός αιθέρας (5:1, v/v)
- Πετρελαϊκός αιθέρας : Οξικός αιθυλεστέρας (4:1, v/v)

- Πετρελαϊκός αιθέρας : Οξικός αιθυλεστέρας (5:1, v/v)
- Πετρελαϊκός αιθέρας : Οξικός αιθυλεστέρας (9:1, v/v)

Η εμφάνιση των πλακών έγινε με υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

Οι οργανικοί διαλύτες και τα αντιδραστήρια χημικής σύνθεσης αγοράστηκαν από τις εταιρίες Merck και Sigma-Aldrich. Επίσης, οι ενώσεις που αξιολογήθηκαν ως αναστολείς του ενζύμου hGSTA1-1 συνετέθησαν ως μέρος προγράμματος ΜΔΕ στο Πανεπιστήμιο Πατρών υπό την επίβλεψη του Δρ Π.Γ. Τσούγκα (Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ). Επιπροσθέτως, οι ενώσεις (4-υδροξυ-φαινυλ-3-υλ)(2-υδροξυφαινυλ)μεθανόνη (**6**) και (5-βρωμο-2-υδροξυφαινυλ)(2-υδροξυ-φαινυλ)μεθανόνη (**8**) συνετέθησαν στο Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας του ΓΠΑ.

2.2.2.

2,2'-

6

8

Σύνθεση (4-υδροξυ-φαινυλ-3-υλ)(2-υδροξυφαινυλ)μεθανόνης (ένωση 6)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της 2-φαινυλ-ξανθον-9-όνης (130 mg) σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (~1 mL) προστίθεται υδατικό διάλυμα 12N KOH (~1 mL), το οποίο υποβάλλεται σε βρασμό (170°C) για 12 ώρες. Κατόπιν, το μίγμα της αντίδρασης διαλύεται σε ~50 mL H₂O και οξινίζεται υπό ψύξη με πυκνό διάλυμα HCl μέχρι pH 3. Έπειτα, η υδατική φάση εκχειλίζεται με CH₂Cl₂ (4×10 mL). Οι οργανικές φάσεις συνενώνονται και ακολουθεί εκχύλιση με κορεσμένο διάλυμα NaCl. Τέλος γίνεται ξήρανση με θειικό νάτριο και ακολουθεί συμπύκνωση (αερισμός). Στο υπόλειμμα προστίθεται νερό (10 mL) και κυκλοεξάνιο (15 mL). Ακολουθεί εκχύλιση της υδατικής φάσης με κυκλοεξάνιο. Οι οργανικές στοιβάδες συγκεντρώνονται, ξηραίνονται με θειικό νάτριο και το προϊόν καθαρίζεται με παρασκευαστική TLC σε σύστημα πετρελαϊκού αιθέρα : οξικού αιθυλεστέρα (9:1 v/v).

ΑΠΟΔΟΣΗ: 63%

TLC: R_f 0,64

M.B.: 290

ES-MS [M+H⁺]: 291

IR (KBr) ν : (O-H) 3422 cm⁻¹, (C=O) 1615, 1594, 1509, 1479 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 7,01-6,92 (m, 3H, Ar-H), 7,14-7,11 (d 1H, Ar-H J = 8,4 Hz), 7,20-7,17 (d, 1H, Ar-H J = 8,4 Hz), 7,38-7,34 (d, 1H, Ar-H J = 7,2 Hz), 7,45-7,41 (d, 1H, Ar-H, J = 7,6 Hz), 7,57-7,48 (m, 2H, Ar-H), 7,70-7,66 (dd, 1H, Ar-H, J = 8,0 Hz, J = 1,6 Hz), 7,87-7,74 (dd, 1H, Ar-H, J = 8,8 Hz, J = 2,4 Hz), 7,83 (d, 1H, Ar-H, J = 2,4 Hz) 10,50 (s, 1H, Ar-O-H), 10,64 (s, 1H, Ar-O-H).

Σύνθεση (5-βρωμο-2-υδροξυφαινυλ)(2-υδροξυφαινυλ)μεθανόνης (ένωση 8)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα 2-βρωμο-ξανθον-9-όνης (51 mg) σε διμεθυλοσουλφοξειδίο (DMSO, ~1 mL) προστίθεται υδατικό διάλυμα 12 N KOH (1 mL) το οποίο υποβάλλεται σε βρασμό (165 °C) για 14 ώρες. Κατόπιν, το μίγμα της αντίδρασης διαλύεται σε ~50 mL H₂O και οξινίζεται υπό ψύξη με πυκνό διάλυμα HCl μέχρι pH 3. Εν συνεχεία, η υδατική φάση εκχυλίζεται με CH₂Cl₂ (3×10 mL). Οι οργανικές φάσεις συνενώνονται και γίνεται εκχύλιση με κορεσμένο διάλυμα NaCl. Τέλος, γίνεται ξήρανση με θειικό νάτριο και συμπύκνωση (αερισμός).

ΑΠΟΔΟΣΗ: 80%

TLC: R_f 0,59

Σ.Τ. : 128, 1 °C

M.B.: 293

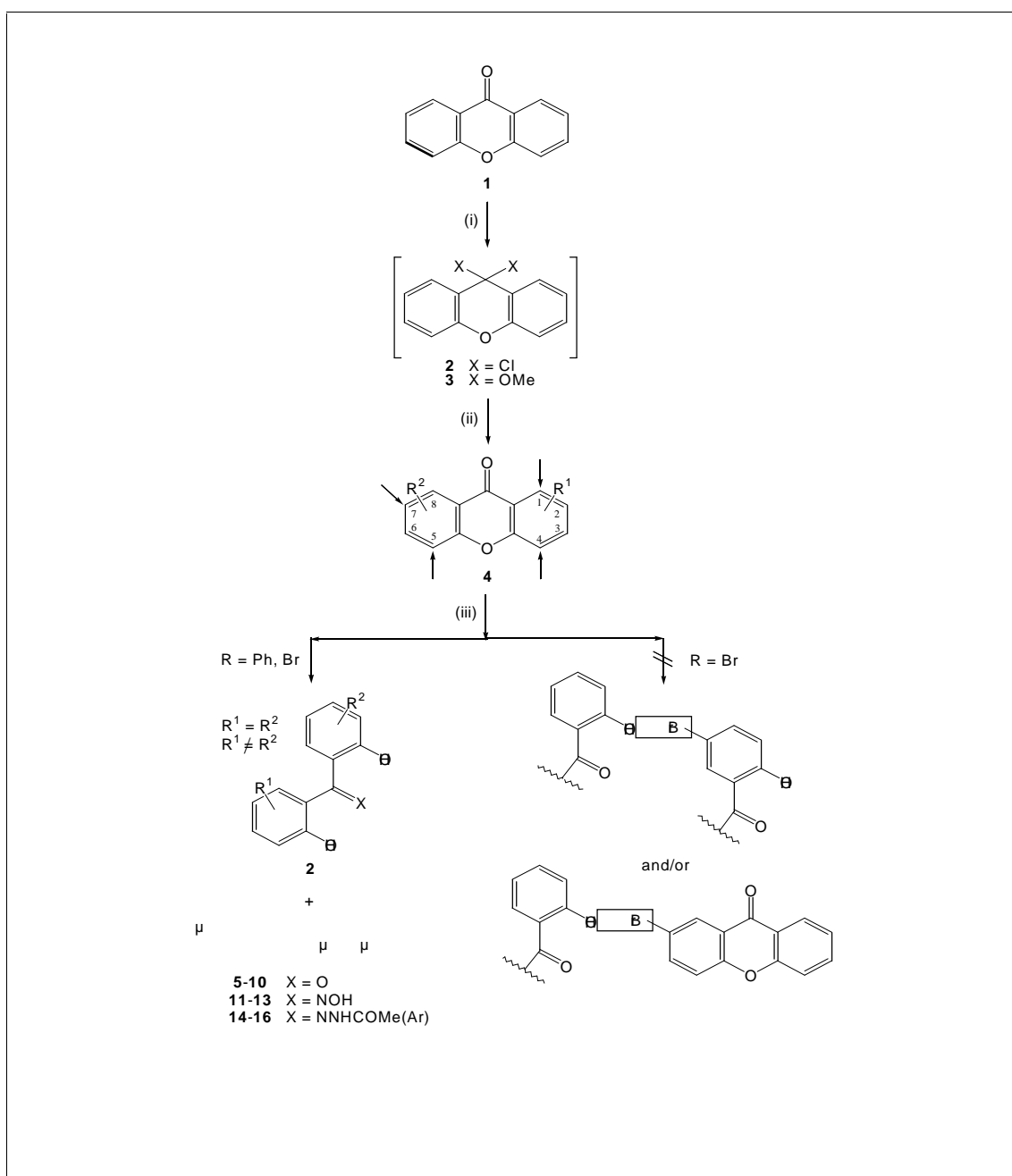
ES-MS [M+H⁺]: 294

IR (KBr) ν : (O-H) 3450-3200 cm⁻¹, (C=O) 1621, 1609, 1585, 1479 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 7,1-6,9 (m, 2H, Ar-H), 7,08 (d 1H, Ar-H), 7,6-7,5 (m, 3H, Ar-H), 7,69 (d, 1H, Ar-H J = 2,4 Hz), 10,48 (brs, 2H, Ar-O-H).

2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Διάνοξη του δακτυλίου της ένωσης 4 επετεύχθη υπό δραστικές συνθήκες (Gardikis *et al.*, 2011; Gardikis *et al.*, 2011a) (Σχήμα 2.1). Το αντιδραστήριο DMSO/KOH, που χρησιμοποιήθηκε για την πυρηνόφιλη διάνοξη του δακτυλίου, είναι γνωστό ως ‘superbase reagent’ (Yuan *et al.*, 2010).

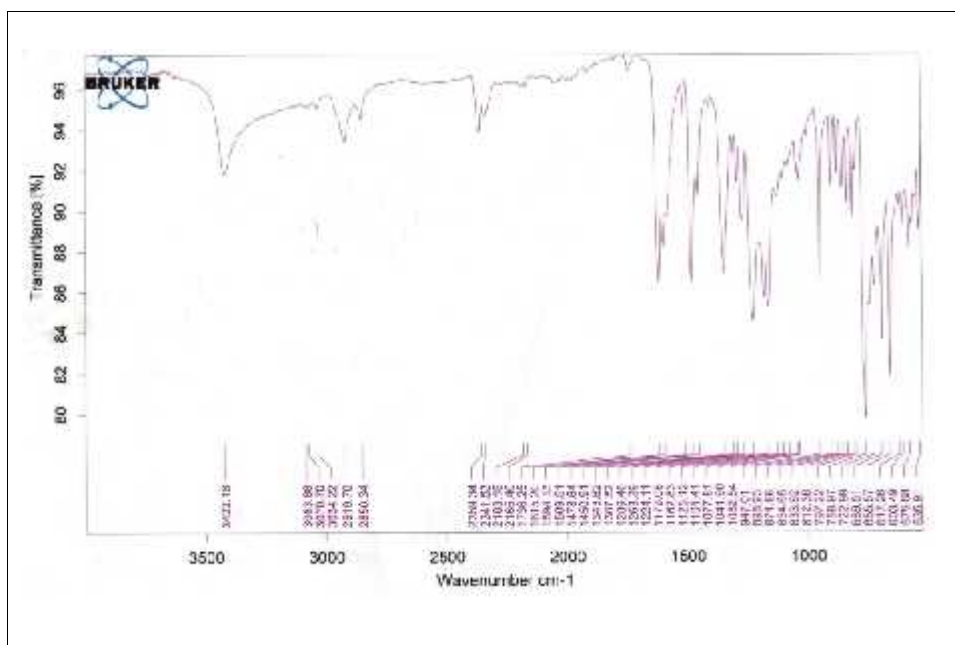


Μη υποκατεστημένες ως και συμμετρικά ή ασύμμετρα υποκατεστημένες ο-υδροξυ-βενζοφαινόνες **5-10** (Σχήμα 2.1), απαντούν ως ένα μοναδικό τοποϊσομερές.

Επιπλέον ποσότητα των ενώσεων (4-υδροξυ-φαινυλ-3-υλ)(2-υδροξυφαινυλ)μεθανόνης (**6**) και (5-βρωμο-2-υδροξυφαινυλ)(2-υδροξυφαινυλ)μεθανόνης (**8**) συντέθηκε στο εργαστήριο διότι, μετά από αρχική αξιολόγηση, παρουσίασαν ενδιαφέρον ως αναστολείς του ισοενζύμου hGSTA1-1. Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως αρχικές ενώσεις παράγωγα ξανθόνης τύπου 4 (Σχήμα 2.1).

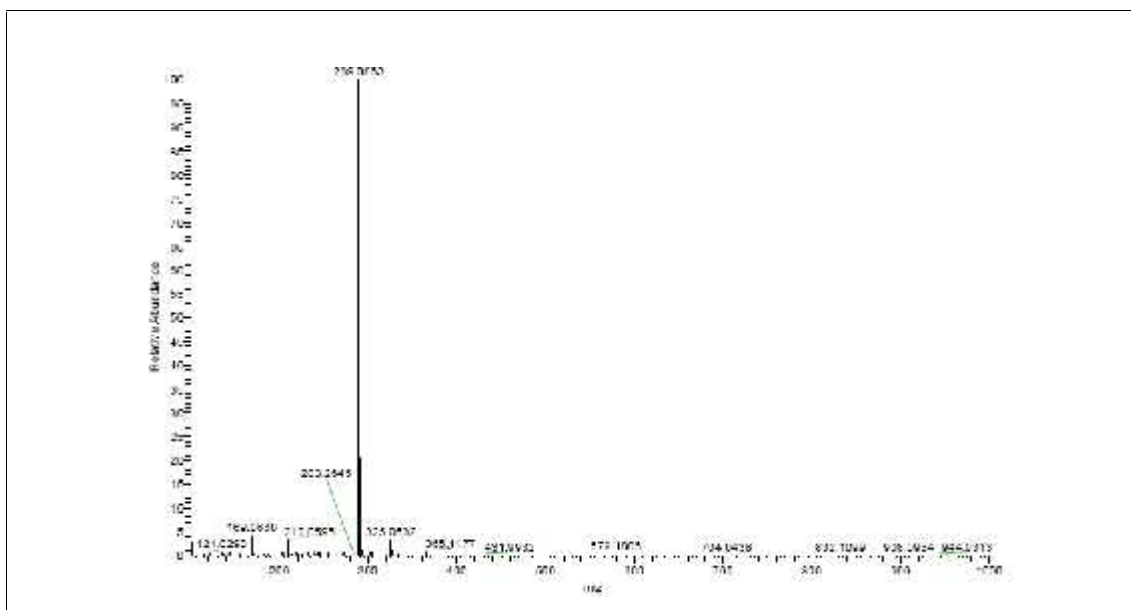
Ένωση 6:

Στο φάσμα IR που ακολουθεί εμφανίζονται ισχυρές απορροφήσεις στα 3422 cm^{-1} και μια τετραπλή στα $1615, 1594, 1509$ και 1479 cm^{-1} χαρακτηριστικές των φαινολικών υδροξυλίων και του καρβονυλίου, αντίστοιχα.



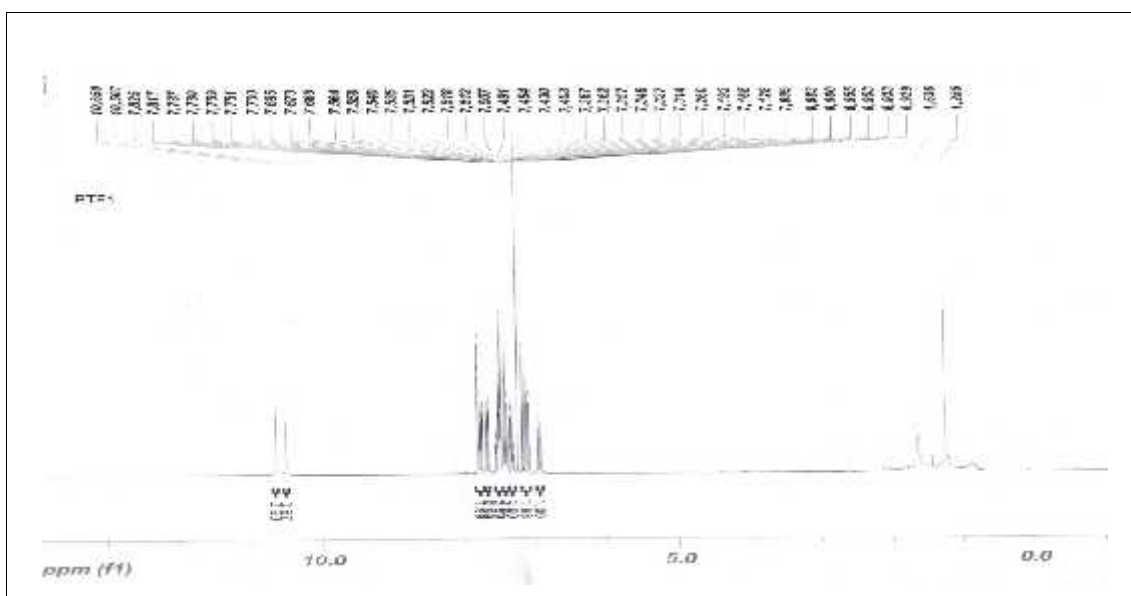
μ 2.2. μ (IR) **6.**

Στο φάσμα μάζης που ακολουθεί έχουμε το μοριακό ιόν χαρακτηριστικό του μοριακού βάρους στα M^+ 290 και θραυσματοποίηση σύμφωνη προς τη δομή.



μ 2.3. μ μ (ES-MS) 6.

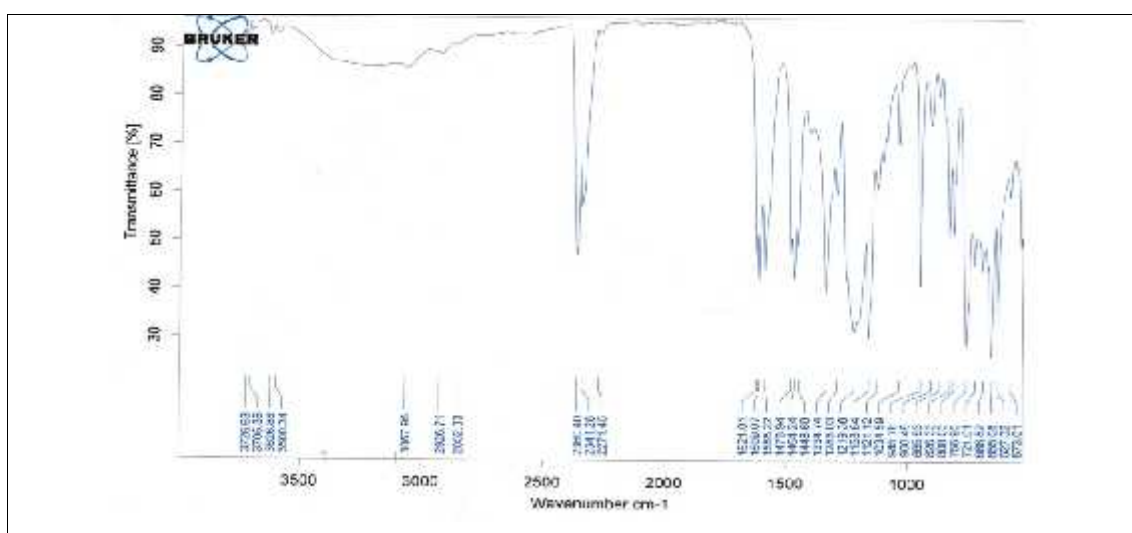
Στο φάσμα ^1H NMR που ακολουθεί εμφανίζονται χαρακτηριστικά σήματα για τα δώδεκα αρωματικά πρωτόνια ως μια πολλαπλή με διακριτή δομή συζεύξεως μεταξύ τους στα δ 6,93-7,82 ppm και δυο διακριτά σήματα για τα υδροξυλικά πρωτόνια στα δ 10,51 και 10,65 ppm.



μ 2.4. μ ^1H NMR 6.

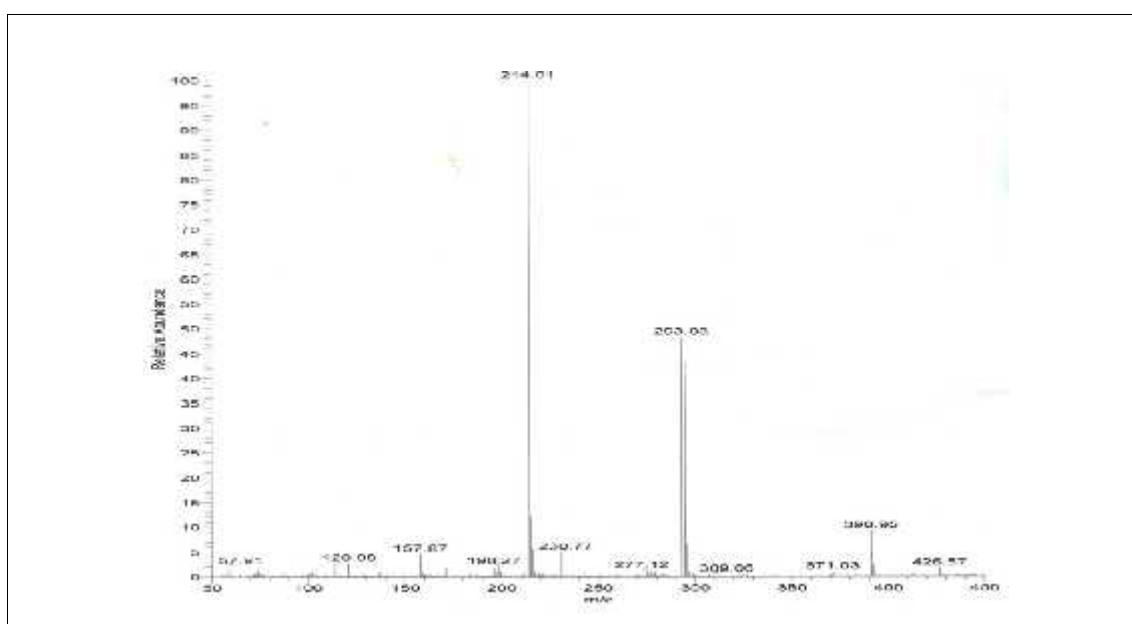
Ένωση 8:

Στο φάσμα IR που ακολουθεί εμφανίζεται ευρεία απορρόφηση μεταξύ 3450-3200 cm^{-1} χαρακτηριστική των φαινολικών υδροξυλίων και μια τετραπλή στα 1621, 1609, 1585 και 1479 cm^{-1} χαρακτηριστική του καρβονυλίου.



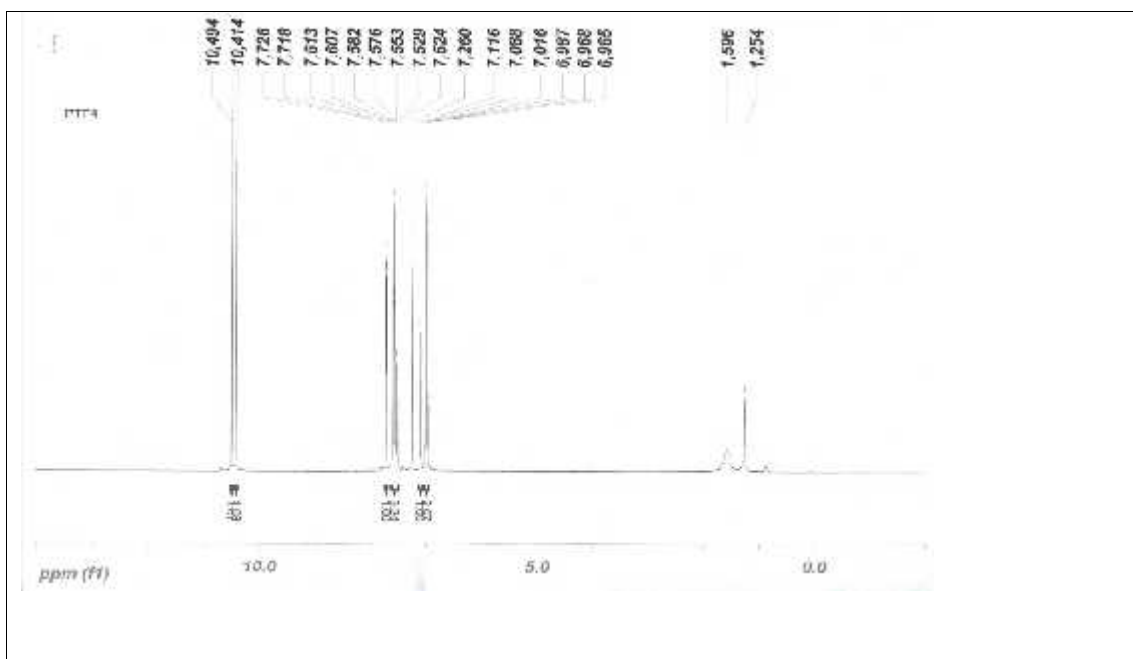
μ 2.5. μ (IR) 8.

Στο φάσμα μάζης που ακολουθεί έχουμε το μοριακό ιόν χαρακτηριστικό του μοριακού βάρους στα M^+ : 293 και 295, αντιστοιχούν στα ισότοπα του βρωμίου για απλή υποκατάσταση σε αρωματικό δακτύλιο.



μ 2.6. μ μ (ES-MS) 8.

Στο φάσμα ^1H NMR που ακολουθεί εμφανίζονται χαρακτηριστικά σήματα για τα επτά αρωματικά πρωτόνια ως δυο διακριτές πολλαπλές λόγω συζεύξεως των αντίστοιχων πρωτονίων στα δ 7,55-7,72 ppm και 6,96-7,53 ppm και δυο ισχυρά σήματα για τα υδροξυλικά πρωτόνια στα δ 10,41 και 10,49 ppm.



μ 2.7.

μ ^1H NMR

8.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3:

ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΙΣΟΕΝΖΥΜΟΥ hGSTA1-1 ΑΠΟ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ *E. coli*

3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μικροοργανισμοί θεωρούνται ως ιδανική πηγή ενζύμων, αφού μπορεί να παραχθεί μεγάλη ποσότητα ενζύμου σε σύντομο χρόνο και περιορισμένο χώρο. Επιπλέον, η χρήση μικροοργανισμών διευκολύνει την κατιούσα επεξεργασία, δηλαδή το σύνολο των σταδίων που ακολουθούν το πέρας της καλλιέργειας του μικροοργανισμού και έχουν ως σκοπό την απομόνωση και τον καθαρισμό του ενζύμου.

Στην παρούσα ενότητα στόχος ήταν η έκφραση και ο καθαρισμός του ισοενζύμου hGSTA1-1 από ανασυνδυασμένα κύτταρα *E. coli* για μελέτη πιθανής ενζυμικής αναστολής από συγκεκριμένες συνθετικές ενώσεις.

3.2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ & ΟΡΓΑΝΑ

3.2.1. ΕΝΖΥΜΑ & ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ:

Χρησιμοποιήθηκε η κυτταροπλασματική τρανσφεράση γλουταθειόνης ανθρώπου (hGSTA1-1) που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρεται στη παράγραφο 3.2.6.

3.2.2. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ & ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ:

Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω χημικά αντιδραστήρια:

3.1: μ .

Αντιδραστήριο	Εταιρεία
Αιθανόλη απόλυτη	Scharlan
Methylenebisacrylamide	SIGMA
Αλβουμίνη μόσχου (BSA)	SERVA
Αμπικιλίνη 99,9%	SERVA
Βακτηριακή Τρυπτόνη (Bacto-tryptone)	Scharlan
Γλυκερόλη 99,5 %	Panreac
Δωδεκανοθειικό Νάτριο (SDS)	SIGMA
Εκχύλισμα Ζύμης (Yeast Extract)	Scharlan
Ισοπρόπυλο-β-D-θειογαλακτοπυρανοσίδιο (IPTG)	AppliChem
N,N,N',N'-τετραμεθυλενοδιαμίνη (TEMED)	SIGMA
Οξικό Νάτριο (CH ₃ COONa)	MERCK
Όξινο Φωσφορικό Κάλιο (KH ₂ PO ₄)	MERCK
Υπερθειικό Αμμώνιο (Ammonium Pelsufate- APS)	SIGMA
Χλωριούχο Νάτριο (NaCl)	MERCK
Coomassie Brilliant Blue (R-250)	MERCK
Tris HCl	SIGMA

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υποστρώματα:

3.2: μ .

Υπόστρωμα	Εταιρεία
-----------	----------

1-χλώρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB)	ALDRICH
Γλουταθειόνη (ανηγμένη) (GSH, Reduced form)	SIGMA

3.2.3. ΠΛΑΣΤΙΚΑ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ:

Τα πλαστικά αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

1.3:	μ	μ	.
Πλαστικά ακρορύγχια (tips)	Greiner Bio-one		
Πλαστικοί σωλήνες των 15 και 50 ml (Falcon)	NerbePlus		
Πλαστικά σωληνάρια των 1,5 και 2 ml (Eppendorf)	Greiner Bio-one		
Πλαστικές κυβέτες μιας χρήσης semi-macro	Greiner Bio-one		
Ημιπερατές Μembrάνες διαπίδυσης	Spectrum		

3.2.4. ΌΡΓΑΝΑ:

- Οι προσδιορισμοί ενζυμικής δραστηριότητας πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο Lamda-Bio μονής δέσμης, ορατού υπεριώδους, του οίκου Perkin-Elmer.
- Οι μετρήσεις pH των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του πεχαμέτρου ORION (μοντέλο 410 A).
- Η ζύγιση των χημικών αντιδραστηρίων και υποστρωμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του φαρμακευτικού ζυγού METTLER PM 2500 και του αναλυτικού ζυγού METTLER AT261.
- Η εξισορρόπηση των δειγμάτων, που προορίζονται για φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό ενζυμικής δραστηριότητας (enzyme assay) πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο Stuart.
- Η φυγοκέντρηση των μικροβιακών καλλιιεργειών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της φυγοκέντρου EPPENDORF.

- Η διάρρηξη των κυττάρων έγινε με συσκευή δονήσεων υπερήχων Vibra Cell της εταιρείας Sonics & Materials.
- Επωαστήρας με λειτουργία ταυτόχρονης ανάδευσης των κυτταρικών καλλιεργειών της εταιρείας Lab Tech.
- Η αποστείρωση πραγματοποιήθηκε σε αυτόκαυστο (Αφοί Αγγελόπουλοι).
- Μηχανικές πιπέτες (Gibson).

3.2.5. ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ Η/Υ:

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

ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.6. ΈΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΙΣΟΕΝΖΥΜΟΥ ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ hGSTA1-1 ΑΠΟ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ *E.coli*:

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται σε δημοσιευμένη εργασία ([Paumi et al., 2004](#)) με κάποιες τροποποιήσεις.

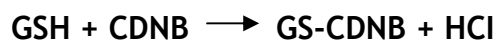
Τα στάδια αυτής της διαδικασίας είναι τα εξής :

1. Ανάπτυξη βακτηριακών καλλιεργειών ανασυνδυασμένων κυττάρων *E. coli* BL21 που περιέχουν το πλασμίδιο pET101/D. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό Luria-Bertani (LB, με σύνθεση 1% πεπτόνη, 1% NaCl και 0,5% εκχύλισμα ζύμης) που περιέχει το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (100μg/mL H₂O).
2. Επαγωγή της έκφρασης του hGSTA1-1 με προσθήκη 1 mM ισοπρόπυλο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδιο (IPTG), τη χρονική στιγμή που η οπτική απορρόφηση των καλλιεργειών, στα 600 nm, είναι ίση με 0,6 και επώαση υπό ταυτόχρονη ανάδευση για 4h.

3. Συλλογή της πάστας των κυττάρων, έπειτα από φυγοκέντρηση στις 8000 στροφές για 10 min και φύλαξη της στη κατάψυξη για μελλοντική χρήση

3.2.7. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GST) (enzyme assay):

Ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της δραστικότητας για το ένζυμο GST βασίζεται στον σχηματισμό ομοιοπολικού συμπλόκου του υποστρώματος 1-χλώρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) και της γλουταθειόνης (GSH). 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 δραστικότητας, απουσία αναστολέα, χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα (stock):

- i. Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer): KH_2PO_4 , 0,1 M, pH 6,5
- ii. Γλουταθειόνη (GSH): 75 mM σε H_2O
- iii. 1-χλώρο-2,4 δινιτροβενζόλιο (CDNB): 30 mM σε αιθανόλη
- iv. Ένζυμο: αραιωμένο ή μη (ανάλογα με τις μονάδες του 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 ενζυμικού παρασκευάσματος.

Αναλυτικά οι όγκοι σε ένα τυπικό προσδιορισμό είναι:

3.4:

μ

μ GST.

	ΜΑΡΤΥΡΑΣ	ΔΕΙΓΜΑ
ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ	934 μL	914 μL
CDNB	33 μL	33 μL
GSH	33 μL	33 μL
ΕΝΖΥΜΟ	-	20 μL
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	1000 μL	1000 μL

3.2.8. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΜΟΝΑΔΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ GST:

Μονάδα μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας ορίζεται η ‘ενζυμική μονάδα’ (enzyme unit, U) που ισούται με την ποσότητα ενζύμου που μετατρέπει 1 μmol υποστρώματος ή παράγει 1 μmol προϊόντος ανά λεπτό, στους 25 °C σε pH 6,5. Συγκεκριμένα, κατά τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης καταγράφεται η μεταβολή της οπτικής απορρόφησης (ΔA) σε στοιχειώδη χρόνο (Δt). 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:

$$U = (\Delta A/\Delta t) \cdot (V_{\text{συνολ}}/V_{\text{ενζύμου}}) \cdot (1/\epsilon) \cdot (1/d)$$

όπου :

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

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

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

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

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

Συνεπώς, διαιρώντας την τιμή του λόγου $\Delta A/\text{min}$ με το 9,6 λαμβάνω την ταχύτητα αντίδρασης σε μονάδες $\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{min}$.

3.2.9. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΚΑΤΑ Bradford:

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 ερυθρό-καστανό και απορροφά στα 465 nm, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνη-χρωστική είναι γαλάζιο και απορροφά στα 595 nm. Συνεπώς, η ποσότητα του εν λόγω συμπλόκου που παρουσιάζεται στο διάλυμα αποτελεί μέτρο του προσδιορισμού της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης και μπορεί να εκτιμηθεί με τη λήψη μετρήσεων στο φωτόμετρο.

Η μέθοδος είναι αξιόπιστη για πρωτεϊνικά δείγματα των οποίων η συγκέντρωση κυμαίνεται από 0,02 mg/mL έως 0,20 mg/mL (20-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης βασίζεται στη σχέση:

$$C = \frac{A}{\epsilon \cdot l} \cdot \frac{V_{\text{τελ}}}{V_{\text{δειγ}}} \cdot \text{αραίωση}$$

όπου:

A : απορρόφηση διαλύματος

ϵ : συντελεστής απόσβεσης (απορρόφησης) ($\text{mL mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

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)

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 $\frac{1}{4}$ (ένα μέρος διαλύματος προς τέσσερα μέρη νερού) 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 κυψελίδα να είναι 2 - 10 μg . Το μείγμα επωάζεται 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.

Για να γίνει ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών είναι απαραίτητος ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης ϵ , ο οποίος υπολογίζεται από τη κλίση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται έχοντας σα πρότυπο γνωστές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης αλβουμίνης από ορό μόσχου (BSA).

3.2.10. ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΕΝΖΥΜΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ:

Από την πάστα των κυττάρων που έχει συλλεχθεί και φυλαχθεί στην κατάψυξη μεταφέρεται κάποια ποσότητα σε δοχεία erpedorf και ζυγίζεται η μάζα της. Έπειτα, η ποσότητα επαναδιαλυτοποιείται σε τριπλάσιο όγκο σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (KH_2PO_4 , 20 mM, pH 7), τα κύτταρα διαρρηγνύονται με την εφαρμογή υπερήχων (10 φορές \times 5 s) και με φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 5 min συλλέγεται το υπερκείμενο του διαλύματος.

3.2.11. ΔΙΑΠΙΔΥΣΗ:

Η διαδικασία της διαπίδυσης προηγείται του καθαρισμού του ενζύμου. Στόχος είναι ο διαχωρισμός των μορίων ενός διαλύματος βάσει του βαθμού διάχυσής τους μέσω μιας ημιπερατής μεμβράνης. Η μεμβράνη αυτή συνήθως αποτελείται από κυτταρίνη και διαθέτει μικρού μεγέθους πόρους με όριο αποκλεισμού 12 KDa.

Κατά τη διάρκεια της διαπίδυσης, τα μικρότερα μόρια, όπως το νερό τείνουν να κινούνται προς τα μέσα ή έξω της μεμβράνης, στην κατεύθυνση της μειούμενης συγκέντρωσης. Μεγαλύτερα μόρια, όπως πρωτεΐνες δε μπορούν να κινηθούν προς τα έξω λόγω των μεγαλύτερων διαστάσεων τους. Ο λόγος που χρησιμοποιείται η συγκεκριμένη διαδικασία είναι για την απομάκρυνση των διαφόρων αλάτων από τα διαλύματα των πρωτεϊνών με στόχο τη βελτίωση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς του εκχυλίσματος.

Σε διαπίδυση υποβάλλεται το ενζυμικό εκκύλισμα που παραλάβαμε μετά τη λύση των κυττάρων αφού τοποθετηθεί στη μεμβράνη, η οποία ασφαλίζεται πολύ καλά για να αποφευχθεί η απώλεια του δείγματος. Το δείγμα με τη μεμβράνη τοποθετείται σε δοχείο που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ίδιας σύστασης με το διάλυμα που έγινε η λύση των κυττάρων (KH_2PO_4 , 20 mM, pH 7) για 20-24 h στους 4°C με όγκο 3-5 L με μαγνητικό αναδευτήρα ώστε να περιστρέφεται αργά.

3.2.12. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΙΣΟΕΝΖΥΜΟΥ ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ hGSTA1-1 ΣΕ ΣΤΗΛΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ:

Τα στάδια που ακολουθήσαμε για τον καθαρισμό του ενζύμου είναι τα εξής:

1. Πλύσιμο με 10 mL δις απιονισμένου νερού (dd H_2O) και εξισορρόπηση της χρωματογραφικής στήλης συγγενείας (2 mL) με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (20 mL, KH_2PO_4 , 20 mM, pH 7).
2. Φόρτωση του ενζυμικού εκκυλίσματος (2,3 mL) στη χρωματογραφική στήλη συγγενείας προσροφητή 1,4-Βουτανεδιολο-διγλυκιδυλ-αιθέρα-GSH-Sepharose-CL6B (BES-GSH).
 - ✓ Από το στάδιο αυτό μέχρι το τελικό στάδιο του καθαρισμού, όλα τα κλάσματα που εκρέουν από τη στήλη συλλέγονται και φυλάσσονται το καθένα ξεχωριστά σε περίπτωση που χρειαστεί περαιτέρω μελέτη.
3. Έκπλυση της στήλης με 10 mL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (KH_2PO_4 , 20 mM, pH 7) (wash buffer).
4. Έκλουση του ενζύμου με διάλυμα 10 mM GSH (διαλυμένη σε 20 mM KH_2PO_4 pH 7), σε κλάσματα του 1 mL έκαστο.
5. Αναγέννηση της στήλης με διαλύματα 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5, με 1M NaCl (10 mL) και 0,1M CH_3COONa , pH 5,5, με 1M NaCl (10 mL) και πλύσιμο με 10

mL ddH₂O. Πριν την εκροή και της τελευταίας ποσότητας νερού που έχει προστεθεί, ασφαρίζεται με ειδικό πώμα η είσοδος και η έξοδος της κολώνας για την αποφυγή της ξήρανσης του φορέα καθαρισμού.

Τα ενζυμικά κλάσματα συλλέγονται και υπόκεινται σε φασματοσκοπικό προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας (παράγραφος 3.2.7.) καθώς και σε προσδιορισμό της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford (παράγραφος 3.2.9.). Τα κλάσματα με δραστηριότητα ενώνονται και το παρασκεύασμα αραιώνεται με ίσο όγκο γλυκερόλης (τελική συγκέντρωση γλυκερόλης 50 % v/v) και ακολουθώντας το διατηρούμε στους -20°C για μεγάλο χρονικό διάστημα.

3.2.13. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ:

3.2.13.1. Υπολογισμός ειδικής δραστηριότητας του ενζυμικού παρασκευάσματος (SA):

Η ειδική δραστηριότητα αποτελεί ένα από τα μέτρα ενζυμικής καθαρότητας και υπολογίζεται από τον τύπο :

$$SA = \frac{\text{Units / mL}}{\text{mg / mL}}$$

3.2.13.2. Υπολογισμός ανάκτησης ενζύμου (%):

Η απόδοση του καθαρισμού δίνεται από τον παρακάτω τύπο (x100) :

$$\frac{\text{Units που ανακτήθηκαν από την στήλη}}{\text{Units που προστέθηκαν αρχικά στη στήλη}} \times 100$$

3.2.13.3. Καθαρισμός που επετεύχθη (φορές):

Για να υπολογίσουμε το πόσες φορές καθαρίστηκε το ένζυμο χρησιμοποιούμε τον εξής τύπο:

$$\frac{SA_{\text{εκλουσθέντος}}}{SA_{\text{αρχικού}}}$$

3.2.14. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ:

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών πραγματοποιείται για να επιβεβαιωθεί ο βαθμός επιτυχίας του καθαρισμού του ενζύμου. Για τον σκοπό αυτό, επιλέγονται τα προϊόντα έκλυσης από τον καθαρισμό, ο μάρτυρας καθώς επίσης και το εκχύλισμα ολικών πρωτεϊνών του μικροοργανισμού. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου παρουσία του δωδεκανοθειικού νατρίου (SDS) ως αποδιατακτικού παράγοντα. 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% w/v), 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 % w/v), γλυκερόλη (20 % v/v) και β-μερκαπτοαιθανόλη (10 % v/v)
- ✓ Διάλυμα SDS (10 % w/v)
- ✓ Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (0.1 % w/v)

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

3.2.14.1. Προετοιμασία της πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Αρχικά, ετοιμάζεται η πηκτή διαχωρισμού πρωτεϊνικών δειγμάτων (separating gel), αναμειγνύοντας 2.935 μL ddH₂O, 2.935 μL διάλυμα ακρυλαμιδίου περιεκτικότητας 30 % w/v, 875 μL ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (separating buffer), 170 μL APS, 70 μL διάλυμα SDS 10 % w/v και 6,24 μL TEMED. Η διαδικασία αυτή δε πρέπει να διαρκέσει περισσότερο των 2 min αφού το μείγμα αρχίζει και πήζει. Η πηκτή χρειάζεται περίπου 30 min επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για να πήξει. Στη συνέχεια, ετοιμάζεται το διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης (stacking gel), το οποίο παρασκευάζεται ως εξής: 3.450 μL ddH₂O, 625 μL ακρυλαμιδίου περιεκτικότητας 30 % w/v, 625 μL ρυθμιστικό διάλυμα επιστοίβαξης (stacking buffer), 250 μL APS, 50 μL SDS 10 % w/v και 6,25 μL TEMED. Πριν ξεκινήσει ο πολυμερισμός, στην κορυφή της πηκτής εισάγεται κατάλληλος υποδοχέας (χτενάκι) ώστε να δημιουργηθούν οι θέσεις εισαγωγής των δειγμάτων (πηγαδάκια). Ο πολυμερισμός ολοκληρώνεται σε 20-30 min, οπότε αφαιρείται με προσοχή το χτενάκι ώστε να απελευθερωθούν τα πηγαδάκια.

3.2.14.2. Προετοιμασία δειγμάτων

Η ποσότητα πρωτεΐνης που χρειάζεται για την ηλεκτροφόρηση είναι 20-50 µg. Για τη συλλογή των ποσοτήτων αυτών, προηγείται προσδιορισμός των ολικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford. Οι ποσότητες που τοποθετούνται στα πηγαδάκια περιορίζονται στα 20 µL. Αν οι υπολογιζόμενες ποσότητες είναι μεγαλύτερες, απαιτείται μια προεπεξεργασία των δειγμάτων. Τα προϊόντα των εκλούσεων ψύχονται και στη συνέχεια υφίστανται λυοφιλίωση με σκοπό την απομάκρυνση του περιεχόμενου νερού μέσω εξάχνωσης. Έχοντας έτοιμα τα δείγματα μετά τη λυοφιλίωση, τα αραιώνουμε με 10 µL νερό και 10 µL ρυθμιστικό διάλυμα χρωστικής φόρτωσης (loading buffer). Το ρυθμιστικό διάλυμα χρωστικής φόρτωσης αραιώνεται με μερκαπτοαιθανόλη με σκοπό την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών. Έπειτα, θερμαίνονται στους 95° C για 5 min ώστε να αποδιαταχθούν οι δομές των πρωτεϊνών, ακολουθεί έντονη ανάδευση και στροβίλισμα (spin), αφήνονται για λίγο στον πάγο και ακολούθως το πρωτεϊνικό δείγμα εισάγεται στα κανάλια της πηκτής. Επίσης, χρησιμοποιείται ένας μάρτυρας (marker) με γνωστά μεγέθη δειγμάτων από τον οποίο φορτώνουμε 13 µL. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε σταθερή ένταση 25 mA και υπό σταθερή τάση 200 Volts για περίπου δύο ώρες.

3.2.14.3. Βαφή με τη χρωστική COOMASSIE BLUE R-250

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πολυμερές (‘ηλεκτροφόρημα’) μεταφέρεται σε ένα πλαστικό δοχείο με προσοχή, ώστε να μη καταστραφεί και εμβαπτίζεται σε υδατικό διάλυμα που περιέχει μεθανόλη (40 % v/v), οξικό οξύ (7 % v/v) και χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250 (0.025-1 % w/v) για περίπου 20 min. Έπειτα, η πηκτή εμβαπτίζεται με το πρώτο διάλυμα αποχρωματισμού (destaining I), το οποίο αποτελείται από μεθανόλη 40 % v/v και οξικό οξύ 7 % v/v για 1 h. Τέλος, αφού απορριφθεί το πρώτο διάλυμα, εμβαπτίζεται στο δεύτερο διάλυμα αποχρωματισμού (destaining II), το οποίο αποτελείται από μεθανόλη 5 % v/v και οξικό οξύ 7 % v/v, όπου αφήνεται μέχρι την επόμενη ημέρα.

3.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στη παράγραφο 3.2.6. πραγματοποιήθηκε η έκφραση του ισοενζύμου τρανσφεράση γλουταθειόνης hGSTA1-1 και στη συνέχεια έγινε λύση 845,4 mg κυττάρων σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (2.536 μ L). Αφού κρατήθηκαν κάποιες ποσότητες για τον προσδιορισμό ενζυμικών μονάδων και ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford, το ενζυμικό παρασκεύασμα υποβλήθηκε σε διαπίδυση, όπως περιγράφεται στη παράγραφο 3.2.11.

Το ακατέργαστο ενζυμικό παρασκεύασμα μετά τη διαπίδυση και πριν τον καθαρισμό (crude) είχε 550 Units/mL και η ποσότητα ολικών πρωτεϊνών ήταν 15,7 mg/mL, ήτοι SA = 35.0 U/mg.

Το ενζυμικό κλάσμα που συλλέχθηκε μετά τον καθαρισμό είχε 446 Units/mL και η ποσότητα των ολικών πρωτεϊνών ήταν 5,4 mg/mL, ήτοι SA = 82.6 U/mg.

Συγκεντρωτικά, η ειδική δραστηριότητα (SA) υπολογίστηκε βάσει του τύπου που αναφέρεται στη παράγραφο 3.2.13.2. και ήταν για το αρχικό ακατέργαστο ενζυμικό παρασκεύασμα (crude) 35,0 Units/mg ενώ για το ενζυμικό κλάσμα ήταν 82,6 Units/mg.

Η απόδοση του καθαρισμού όπως περιγράφεται στη παράγραφο 3.2.13.1. ήταν 80 %.

Το ενζυμικό παρασκεύασμα, σύμφωνα με τον τύπο της παραγράφου 3.2.13.3. καθαρίστηκε 2,4-φορές.

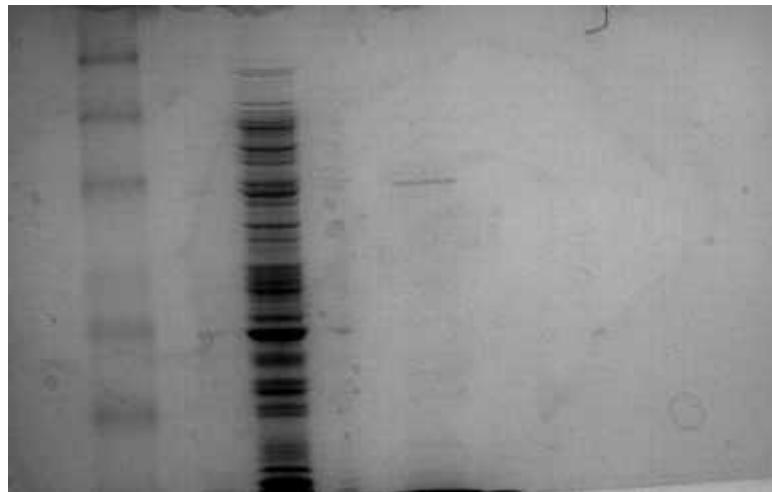
3.5:

μ

μ hGSTA1-1.

	Συνολική δραστηριότητα (Units)	Ειδική Δραστηριότητας (Units/mg)	Καθαρισμός (φορές)	Ανάκτηση (%)
Ακατέργαστο εκχύλισμα (μετά τη διαπίδυση)	550	35	1	100
Καθαρισμένο ένζυμο (από τη στήλη)	446	82.6	2.4	81

Τέλος, για να επιβεβαιωθεί ο βαθμός επιτυχίας του καθαρισμού πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.14. και το αποτέλεσμα της πηκτής παρουσιάζεται παρακάτω.



() () ()

μ 3.1:

μ

μ (crude), ()

μ . ()

μ

, ()

μ

μ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:

ΣΑΡΩΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ ΙΣΟΕΝΖΥΜΟΥ hGSTA1-1 & ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΕΝΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ

4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

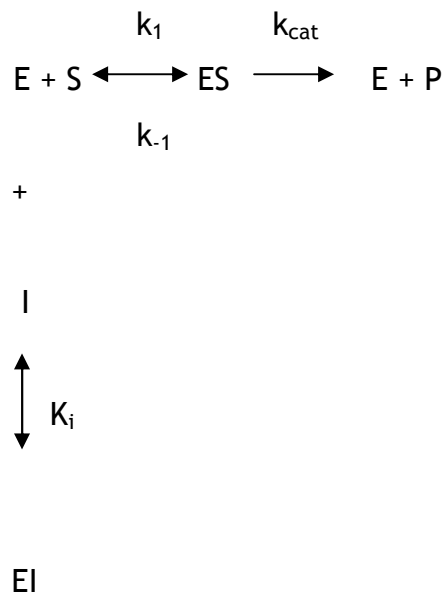
Προκειμένου να αξιολογηθεί μια ένωση ως πιθανός αναστολέας του ισοενζύμου τρανσφεράση της γλουταθειόνης hGSTA1-1 ακολουθείται ένα πρωτόκολλο συγκεκριμένων ενεργειών. Αυτό το πρωτόκολλο περιλαμβάνει τη σάρωση της βιβλιοθήκης των υποψήφιων αναστολέων, τον σχηματισμό καταλόγου της ενζυμικής αναστολής (%) που αποφέρει κάθε ένωση υπό συγκεκριμένες συνθήκες, την επιλογή των ισχυρότερων αναστολέων, τον υπολογισμό της συγκέντρωσης IC₅₀ για κάθε επιλεγμένο αναστολέα, την διευκρίνιση του τρόπου λειτουργίας και του είδους της αναστολής και τέλος την κινητική μελέτη και τον υπολογισμό της σταθεράς αναστολής K_i για κάθε επιλεγμένο αναστολέα.

Το είδος αναστολής που επιφέρει κάθε ένωση αλλά και ο τρόπος που αλληλεπιδρά με το ένζυμο μπορούν να κατανοηθούν μέσω της κινητικής μελέτης του ενζύμου παρουσία της ένωσης. Όλοι οι αναστολείς (αντιστρεπτοί ή μη αντιστρεπτοί) επηρεάζουν αρνητικά την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης και συνεπώς την ενζυμική δραστηριότητα. Το ένζυμο εξακολουθεί να υπακούει στην κλασική κινητική των Michaelis-Menten, όμως οι σταθερές ενζυμικής αντίδρασης (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:

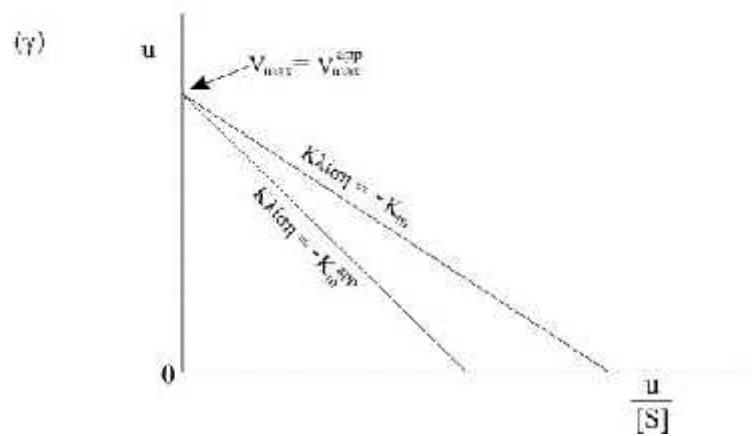
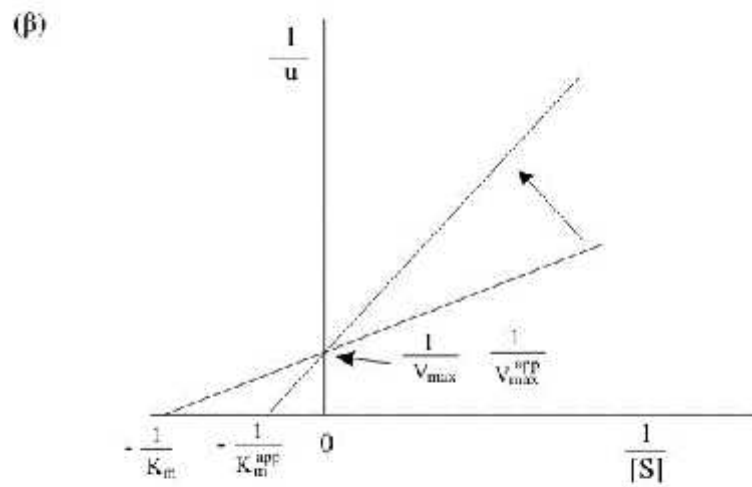
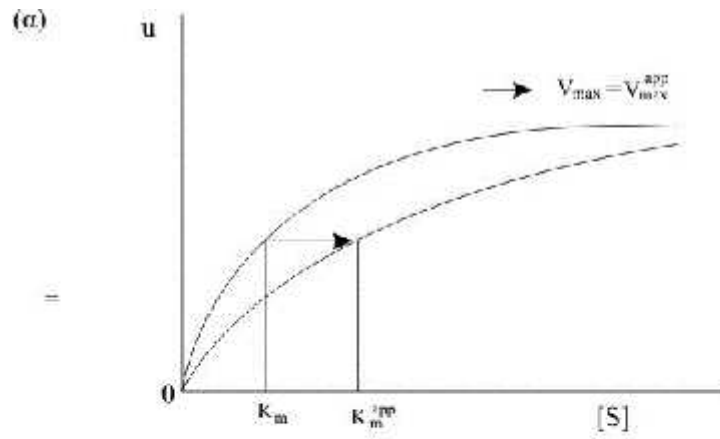
- Συναγωνιστική αναστολή
- Μη συναγωνιστική (ή μικτή αναστολή) &
- Ανταγωνιστική αναστολή

Στην *συναγωνιστική* αναστολή, επηρεάζεται η σταθερά εξειδικεύσεως k_a , ενώ παραμένει ανέπαφη η σταθερά καταλύσεως k_3 . Ο αναστολέας (I) και το υπόστρωμα (S) συναγωνίζονται για την ίδια θέση δέσμευσης στο ένζυμο (E). Επομένως, η δέσμευση του ενός αποκλείει την ταυτόχρονη δέσμευση του άλλου, χωρίς αυτό απαραίτητα να σημαίνει ότι ο αναστολέας έχει δεσμευτεί στη θέση δέσμευσης του υποστρώματος. Μπορεί να έχει δεσμευτεί κοντά και έτσι να εμποδίζεται στερεοχημικά η προσέγγιση και η δέσμευση του υποστρώματος. Το πρότυπο ισορροπίας αυτής της αντίδρασης δείχνει εμφανώς ότι αν υπάρξει δέσμευση του αναστολέα (I) με το ένζυμο (E) δεν σχηματίζεται προϊόν (P), εξαιτίας του σχηματισμού του καταλυτικά αδιέξοδου συμπλόκου (EI).



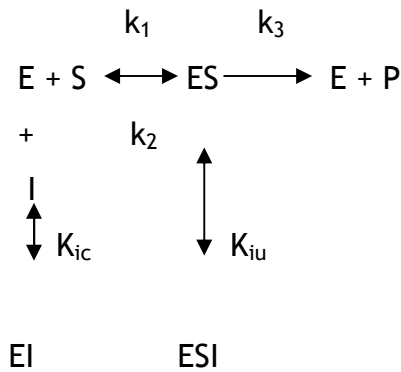
μ 4.1:

(, 2007)

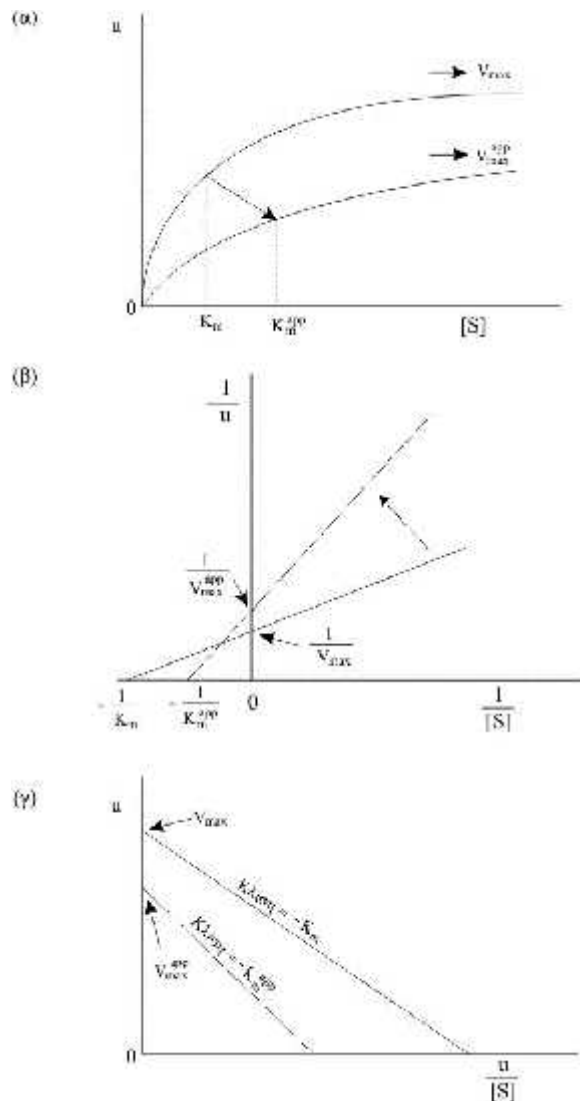


- μ 4.2 :
- () Michaelis-Menten ()
 - () ()
 - () Hofstee ()
 - (, 2007)

Στη μη συναγωνιστική ή μικτή αναστολή, χαρακτηριστικό αποτελεί το γεγονός ότι μεταβάλλονται όλες οι κινητικές σταθερές k_3 , k_A και k_m . Στην περίπτωση αυτή, ο αναστολέας δεσμεύεται στο ένζυμο σε διαφορετική θέση από τη θέση του υποστρώματος και σχηματίζει μη καταλυτικό (αδρανές) σύμπλοκο, χωρίς παράλληλα να απαγορεύει τη δέσμευση υποστρώματος στο σύμπλοκο.



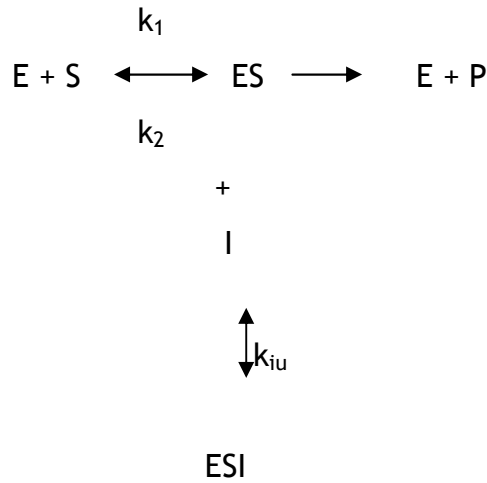
μ 4.3: (, 2007)



μ 4.4 :

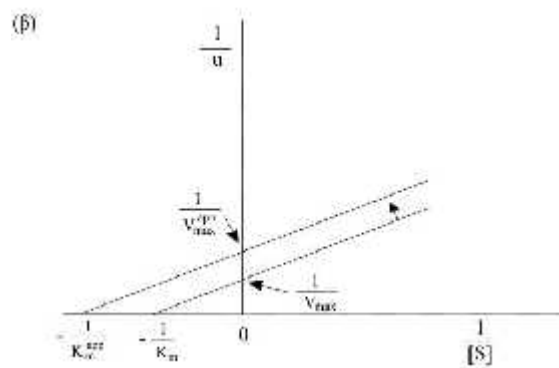
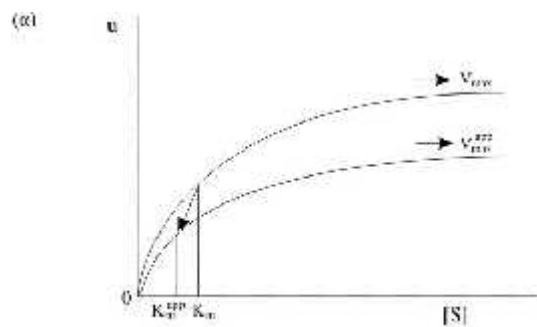
μ [S]
 $k_{ic} < k_{iu}$
 () Michaelis-Menten
 ()
 ()
 () Hofstee ()
 (, 2007)

Στην ανταγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας και το υπόστρωμα δεσμεύονται σε διαφορετικές θέσεις. Ωστόσο, απαραίτητη προϋπόθεση για να δεσμευτεί ο αναστολέας είναι να έχει προηγουμένως δεσμευτεί το υπόστρωμα στο ένζυμο.



μ 4.5:

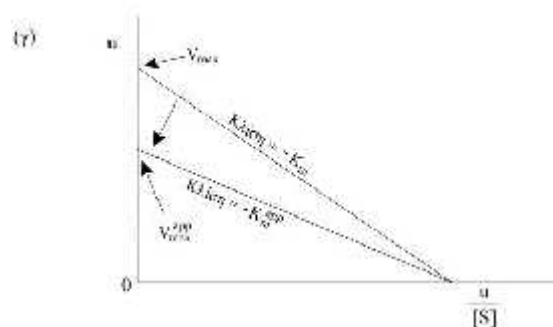
(, 2007)



μ 4.6 :

μ u

μ [S]



() Michaelis-Menten (

)

() ()

() Hofstee ()

(, 2007)

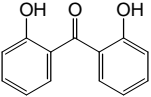
Η σταθερά αναστολής K_i είναι η σταθερά διάσπασης του συμπλόκου που δημιουργείται με την αλληλεπίδραση ενζύμου και αναστολέα, ανάλογα με το είδος της αναστολής και αποτελεί μέτρο του πόσο ισχυρός είναι ένας αναστολέας. Επίσης, όσο μεγαλύτερη τιμή αποκτά η K_i , τόσο χαμηλότερη χημική συγγένεια έχει ο αναστολέας με το ένζυμο. Η τιμή της σταθεράς K_i μπορεί να συσχετιστεί μαθηματικά με τη συγκέντρωση του αναστολέα που επιφέρει 50 % αναστολή της ενζυμικής δράσης (IC50), υπό ορισμένες προϋποθέσεις για τα ως άνω είδη αναστολής (Yung & Prusoff, 1973).

Η βιβλιοθήκη των ενώσεων, που μελετήθηκαν ως δυνητικοί αναστολείς της ενζυμικής δραστηριότητας του ισοενζύμου τρανσφεράση γλουταθειόνης GSTA1-1 ανθρώπου (hGSTA1-1), αποτελείται από διυδροξυβενζοφαινόνες (5-10), κετοξίμες (11-13) και Ν-άκυλο-υδραζόνες (14-16).

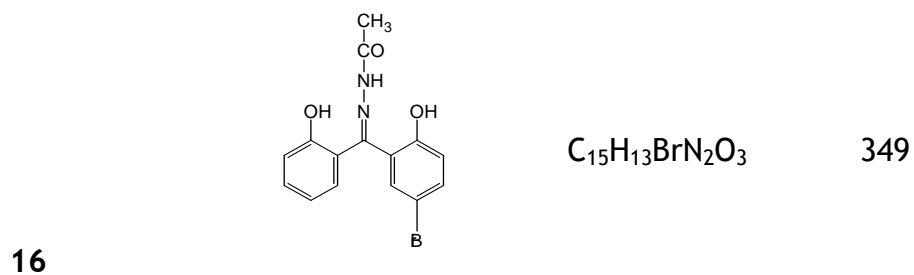
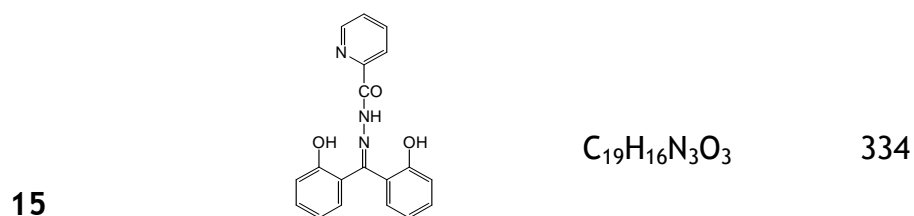
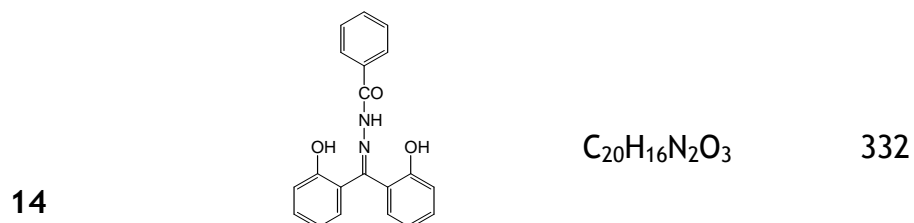
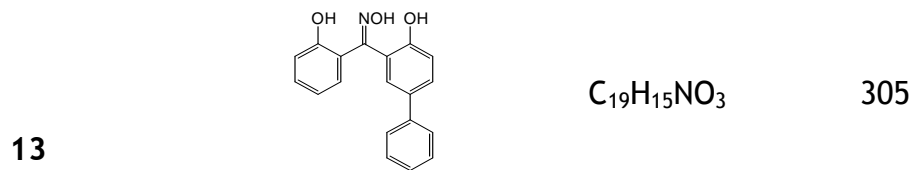
4.2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ και ΟΡΓΑΝΑ

4.2.1. ΕΝΩΣΕΙΣ ΠΡΟΣ ΜΕΛΕΤΗ:

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		$C_{27}H_{21}BrO_3$	473
11		$C_{13}H_{11}NO_3$	229
12		$C_{13}H_{10}BrNO_3$	308



4.2.2. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ, ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ & ΠΛΑΣΤΙΚΑ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ:

Τα χημικά αντιδραστήρια καθώς και τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στο κεφάλαιο 3, παράγραφο 3.2.2., ενώ τα πλαστικά αναλώσιμα αναφέρονται στο κεφάλαιο 3, παράγραφο 3.2.3.

4.2:

μ

Αντιδραστήριο

Εταιρεία

Διμεθυλοσουλφοξείδιο 99,9 % (DMSO)

Riedel de Haen

4.2.3. ΌΡΓΑΝΑ & ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ Η/Υ:

Τα όργανα και τα προγράμματα Η/Υ που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στο κεφάλαιο 3, παράγραφοι 3.2.4. & 3.2.5. αντίστοιχα.

ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.4. ΣΑΡΩΣΗ (screening) 2,2'-ΔΙΥΔΡΟΞΥΒΕΝΖΟΦΑΙΝΟΝΩΝ ΚΑΙ Ν-ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥΣ ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥ (hGSTA1-1):

Για τον έλεγχο των ενώσεων του Πίνακα 4.1 (κετονών, κετοξιμών και Ν-ακυλο-υδραζονών) ως δυνητικών αναστολέων του ισοενζύμου τρανσφεράση της γλουταθειόνης hGSTA1-1 πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί της δραστηριότητας του ενζύμου με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.7. και 3.2.8. του κεφαλαίου 3.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

- Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) 0.1 M KH_2PO_4 , pH 6,5
- Γλουταθειόνη (GSH) 100 mM
- 1-χλωρο-2,4 δινιτροβενζόλιο (CDNB) 15 mM
- Αραιωμένο διάλυμα ενζύμου (hGSTA1-1) σε ρυθμιστικό διάλυμα και
- Αναστολέας 5 mM

Οι παραπάνω συγκεντρώσεις αναφέρονται σε αρχικές συγκεντρώσεις (stock).

Χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες για μάρτυρες και δείγματα. Στις κυψελίδες προστίθενται, εν σειρά, ρυθμιστικό διάλυμα, διάλυμα CDNB, διάλυμα 'αναστολέα', ανακινούνται, ακολούθως προστίθεται η ποσότητα ενζυμικού παρασκευάσματος, ανακινούνται, επωάζονται για 1 min, και η αντίδραση αρχίζει με προσθήκη διαλύματος γλουταθειόνης. Όλα τα διαλύματα των 'αναστολέων' είναι σε 100 % DMSO. Η τελική συγκέντρωση του DMSO στην κυψελίδα είναι σταθερή και ίση με 2 % του τελικού όγκου της κυψελίδας. Όλοι οι 'αναστολείς' ελέχθησαν στην ίδια τελική συγκέντρωση των 25 μM . Η συγκεκριμένη συγκέντρωση επιλέχθηκε βάσει της σταθεράς K_m (0.32 ± 0.08 mM), ώστε να μην υποεκτιμήσουμε ή υπερεκτιμήσουμε κανέναν από τους αναστολείς. Στις κυψελίδες-μάρτυρες, αντί 'αναστολέα' προστίθεται ίσος όγκος DMSO.

Η συγκέντρωση των υποστρωμάτων CDNB και GSH ήταν επίσης σταθερή και ίση με 0,3 mM και 2 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 15 μL (~0,01 units).

Έγιναν μετρήσεις της μεταβολής της οπτικής απορρόφησης για όλες τις ενώσεις και δοκιμή χωρίς αναστολέα αλλά με DMSO. Όλα τα αποτελέσματα προέκυψαν έπειτα από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις.

Οι μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο μονής δέσμης, στα 340 nm, ανά 2s και για συνολικό χρόνο 1 min, με τη χρήση του προγράμματος UVKinLab.

4.2.5. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΠΑΡΑΜΕΝΟΥΣΑΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ:

Η μεταβολή της οπτικής απορρόφησης (rate) ($\Delta A/\Delta t$) που παρατηρήθηκε σε κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της παραμένουσας ενζυμικής δραστηριότητας (% Remaining Activity, RA) και της αναστολής (% Enzyme Inhibition, EI). Το rate απουσία αναστολέα ($\Delta A/\Delta t$)₀ θεωρήθηκε ως

100 % RA και 0 % EI. Οι τιμές RA και EI υπολογίσθηκαν από τους παρακάτω τύπους:

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

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

4.2.6. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ hGSTA1-1 ΕΧΟΝΤΑΣ ΤΟ 1-ΧΛΩΡΟ-2,4-ΔΙΝΙΤΡΟΒΕΝΖΟΛΙΟ (CDNB) ΩΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΜΕΤΑΒΑΛΛΟΜΕΝΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ:

Οι αρχικές ταχύτητες στην αντίδραση που καταλύει η τρανσφεράση της γλουταθειόνης hGSTA1-1 με το 1-χλώρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης υπολογίσθηκαν στους 25°C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν τα εξής:

- Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer): KH_2PO_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 75 - 980 μ M,
- Ένζυμο: αραιωμένο ή μη (ανάλογα με τις μονάδες του ενζυμικού παρασκευάσματος).

Πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί ενζυμικής δραστηριότητας, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο κεφάλαιο 3, παράγραφος 3.2.7. με σταθερές τις συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων (όπως αναφέρονται ανωτέρω), εκτός του μεταβαλλόμενου υποστρώματος (CDNB).

Όλα τα αποτελέσματα (παράγραφος 4.3) 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 2s και για συνολικό χρόνο 1 min, με τη χρήση του προγράμματος UVKinLab.

4.2.7. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ hGSTA1-1 ΕΧΟΝΤΑΣ ΤΗ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ (GSH) ΩΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΜΕΤΑΒΑΛΛΟΜΕΝΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ:

Οι αρχικές ταχύτητες στην αντίδραση που καταλύει η τρανσφεράση της γλουταθειόνης hGSTA1-1 με τη γλουταθειόνη (GSH) ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης υπολογίστηκαν στους 25 °C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL όπως αναφέρονται στη παράγραφο 4.2.6 και περιείχαν:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer):** KH_2PO_4 , 0,1M, pH 6,5
- **1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB):** 1 mM (σταθερή συγκέντρωση)
- **Γλουταθειόνη (GSH):** μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης που καλύπτει το εύρος τιμών 100 - 2500 μM
- **Ένζυμο:** αραιωμένο ή μη (ανάλογα με τις μονάδες του ενζυμικού παρασκευάσματος)

Πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί ενζυμικής δραστηριότητας, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο κεφάλαιο 3, στην παράγραφο 3.2.7. με σταθερές τις συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων (όπως αναφέρονται ανωτέρω), εκτός του μεταβαλλόμενου υποστρώματος (GSH).

Όλα τα αποτελέσματα της παραγράφου 4.3 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 2s και για συνολικό χρόνο 1 min, με τη χρήση του προγράμματος UVKinLab.

4.2.8. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ IC50:

Η IC50 ορίζεται ως η συγκέντρωση αναστολέα που επιφέρει 50 % αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας υπό συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες.

Για τον υπολογισμό του IC50 (half maximal inhibitory concentration) πραγματοποιήθηκαν δοκιμές (enzyme assays) στις ίδιες συνθήκες που περιγράφονται στο κεφάλαιο 3, στην παράγραφο 3.2.7. 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 2s και για συνολικό χρόνο 1 min, με τη χρήση του προγράμματος UVKinLab.

Όλα τα αποτελέσματα της παραγράφου 4.3 προέκυψαν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις και επεξεργάστηκαν από το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraFit 3.0.

4.2.9. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ hGSTA1-1 ΑΠΟ ΤΙΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΠΟΥ ΕΠΕΛΕΓΗΣΑΝ:

Δεδομένου ότι η αντίδραση που καταλύεται από την τρανσφεράση της γλουταθειόνης hGSTA1-1 απαιτεί την παρουσία δύο υποστρωμάτων, η κινητική μελέτη αναστολής για κάθε μια από τις υπό μελέτη ενώσεις απαιτεί επιμέρους κινητικές μελέτες για κάθε ένα από τα δυο υποστρώματα χωριστά.

4.2.9.1. Κινητική μελέτη αναστολής της τρανσφεράσης γλουταθειόνης hGSTA1-1 έχοντας το 1-χλώρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης:

Οι αρχικές ταχύτητες στην αντίδραση που καταλύει η τρανσφεράση γλουταθειόνης hGSTA1-1 με το 1-χλώρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης υπολογίστηκαν στους 25 °C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν:

- Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer): KH_2PO_4 , 0,1M, pH 6,5
- Γλουταθειόνη (GSH): 2,5 mM (σταθερή συγκέντρωση)
- 1-χλώρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB): μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης που καλύπτει το εύρος τιμών 75 - 980 μM
- Ένζυμο: αραιωμένο ή μη (ανάλογα με τις μονάδες του ενζυμικού παρασκευάσματος)
- Αναστολέα (οι αναστολείς και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονται αναλυτικά στη παράγραφο 4.3.3)

Πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί ενζυμικής δραστηριότητας, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο κεφάλαιο 3, στην παράγραφο 3.2.7. με σταθερές τις συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων (όπως αναφέρονται ανωτέρω), εκτός του μεταβαλλόμενου υποστρώματος (CDNB).

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για κάθε επιλεγέντα αναστολέα χωριστά σε διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις (παράγραφος 4.3.3).

Όλα τα αποτελέσματα της παραγράφου 4.3 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 2s και για συνολικό χρόνο 1 min, με τη χρήση του προγράμματος UVKinLab.

4.2.9.2. Κινητική μελέτη αναστολής της τρανσφεράσης γλουταθειόνης hGSTA1-1 έχοντας τη γλουταθειόνη (GSH) ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης:

Οι αρχικές ταχύτητες στην αντίδραση που καταλύει η τρανσφεράση της γλουταθειόνης hGSTA1-1 με τη γλουταθειόνη (GSH) ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης υπολογίστηκαν στους 25 °C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν:

- Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer): KH₂PO₄, 0,1M, pH 6,5
- 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB): 1 mM (σταθερή συγκέντρωση)
- Γλουταθειόνη (GSH): μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης που καλύπτει το εύρος τιμών 100 - 2500 μM
- Ένζυμο: αραιωμένο ή μη (ανάλογα με τις μονάδες του ενζυμικού παρασκευάσματος)
- Αναστολέας (οι αναστολείς και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονται αναλυτικά στη παράγραφο 4.3.4)

Πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί ενζυμικής δραστηριότητας, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο κεφάλαιο 3

στην παράγραφο 3.2.7. με σταθερές τις συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων (όπως αναφέρονται ανωτέρω), εκτός του μεταβαλλόμενου υποστρώματος (GSH).

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για κάθε αναστολέα χωριστά σε διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις (παράγραφος 4.3.4).

Όλα τα αποτελέσματα της παραγράφου 4.3 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 2s και για συνολικό χρόνο 1 min, με τη χρήση του προγράμματος UVKinLab.

4.2.10. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΑΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ K_i :

4.2.10.1. Υπολογισμός της σταθεράς συναγωνιστικής αναστολής

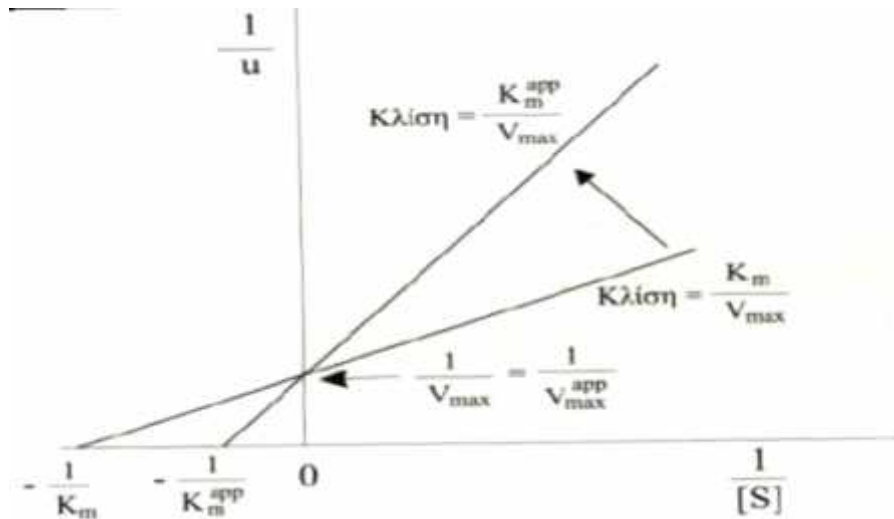
Για τη σταθερά συναγωνιστικής αναστολής K_i του συμπλόκου EI ισχύει:

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

Ο υπολογισμός της K_i πραγματοποιείται γραφικά, ξεκινώντας τη γραφική παράσταση των 2πλών αντιστρόφων Lineweaver- Burk (Σχήμα 4.3) από την οποία λαμβάνουμε τις κλίσεις των ευθειών (slopes) και δημιουργούμε ένα δευτερογενές γράφημα των κλίσεων έναντι των διαφόρων συγκεντρώσεων αναστολέα ([I]).

Αυτό το δευτερογενές γράφημα θα πρέπει να απεικονίζει ευθεία γραμμή, εάν πρόκειται για καθαρή (γραμμική) συναγωνιστική αναστολή, όπου το σημείο

τομής της ευθείας στον οριζόντιο άξονα (των X) του γραφήματος ισούται με $-K_i$.



μ 4.7: Lineweaver-Burk (u) ([S]), (, 2007)

Αν το δευτερογενές γράφημα δεν εμφανίζει γραμμικότητα αλλά λαμβάνει τη μορφή καμπύλης, έχουμε περίπτωση μερικώς συναγωνιστικής αναστολής, για την οποία η σταθερά K_i υπολογίζεται από μια τριτογενή γραφική παράσταση διπλών αντιστρόφων, $1/\Delta Intercept$ συναρτήσει $1/[I]$ όπου το σημείο τομής της ευθείας με τον οριζόντιο άξονα (των X) ισούται με $-1/K_i$. Αντίστοιχα, η σταθερά K_i' υπολογίζεται, επίσης, από τριτογενή γραφική παράσταση διπλών αντιστρόφων, $1/\Delta Slope$ συναρτήσει $1/[I]$, όπου το σημείο τομής της ευθείας με τον οριζόντιο άξονα (των X) ισούται με $-1/K_i'$.

4.2.10.2. Υπολογισμός της σταθεράς μικτής αναστολής

Η μικτή αναστολή (από ορισμένους φέρεται και ως μη συναγωνιστική αναστολή) συχνά αποτελεί συνδυασμό συναγωνιστικής και ανταγωνιστικής αναστολής (στη δεύτερη, ο αναστολέας δεσμεύεται μόνο στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος ES), οπότε και έχει δυο σταθερές αναστολής, την K_i

(για το σύμπλοκο EI) και την K_i' (για το σύμπλοκο ESI). Η μεν K_i υπολογίζεται όπως η σταθερά συναγωνιστικής αναστολής (παράγραφος 4.2.10.1)(εάν πρόκειται για 'καθαρή'/γραμμική περίπτωση), η δε K_i' υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το δευτερογενές γράφημα *τομών-Υ* (δηλ. των τομών των ευθειών του πρωτογενούς γραφήματος διπλών αντιστρόφων στον κάθετο άξονα των Υ) έναντι των διαφόρων *συγκεντρώσεων αναστολέα* ($[I]$), οπότε το αντίστοιχο δευτερογενές γράφημα θα πρέπει να απεικονίζει *ευθεία γραμμή*, εάν πρόκειται για *καθαρή (γραμμική) μεικτή αναστολή*, όπου το σημείο τομής της ευθείας στον οριζόντιο άξονα (των Χ) του δευτερογενούς γραφήματος ισούται με K_i' .

Εάν το δευτερογενές γράφημα δεν είναι ευθεία, έχουμε *μερικώς μεικτή αναστολή* και ο υπολογισμός των δύο σταθερών αναστολής, K_i & K_i' , είναι περισσότερο πολύπλοκος. Κατ' αρχήν, υπολογίζουμε τις τιμές K_m & V_{max} για την αντίδραση χωρίς αναστολέα. Ακολούθως, δημιουργούμε τις γραφικές παραστάσεις $1/\Delta Intercept-Y$ συναρτήσει $1/[I]$ και $1/\Delta Slope$ συναρτήσει $1/[I]$. Το πρώτο γράφημα έχει τομή στον κάθετο άξονα-Υ = $BV_{max}/1-B$ και στον οριζόντιο άξονα-Χ = $-B/\alpha K_i$. (με $\alpha K_i = K_i'$). Το δεύτερο γράφημα έχει τομή στον κάθετο άξονα-Υ = $BV_{max}/K_m(\alpha-B)$ και στον οριζόντιο άξονα-Χ = $-BV_{max}/\alpha K_i$ (με $\alpha K_i = K_i'$). Η παράμετρος Β υπολογίζεται από την τομή-Υ στο πρώτο γράφημα, και η παράμετρος α από την τομή-Υ από το δεύτερο γράφημα (έχοντας ήδη γνωστό το β). Συνεπώς, η σταθερά K_i για το σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα υπολογίζεται από την τομή-Χ (οριζόντιος άξονας) των εν λόγω γραφημάτων. Στην σπάνια περίπτωση που $K_i = K_i'$ έχουμε την καθαρή μη-συναγωνιστική αναστολή.

4.2.10.3. Υπολογισμός της σταθεράς ανταγωνιστικής αναστολής

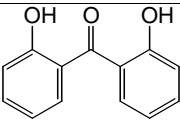
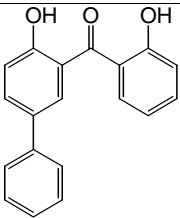
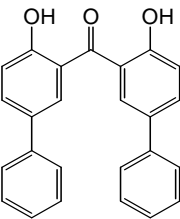
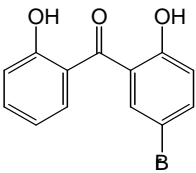
Είναι σχετικά ασυνήθιστη περίπτωση αναστολής. Στη περίπτωση αυτή, η σταθερά K_i (για το σύμπλοκο ESI) υπολογίζεται μέσω της γραφικής παράστασης $u/[S]$ έναντι διαφόρων τιμών $[I]$. Το σημείο τομής στον οριζόντιο άξονα $[I]$ ισούται με $-K_i$.

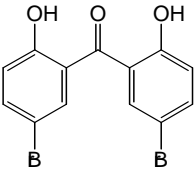
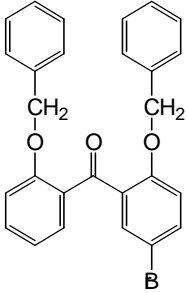
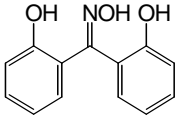
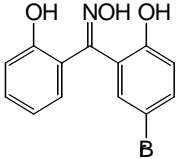
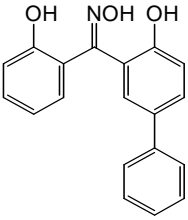
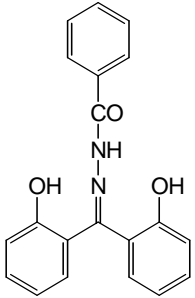
4.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

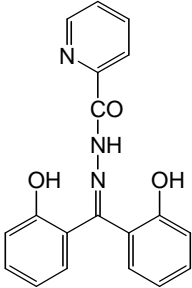
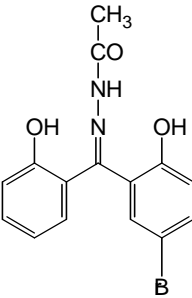
4.3.1. ΣΑΡΩΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΝΩΣΕΩΝ-ΟΔΗΓΩΝ ΩΣ ΙΣΧΥΡΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ hGSTA1-1:

Προκειμένου να αξιολογηθούν οι δώδεκα ενώσεις της βιβλιοθήκης πραγματοποιήθηκε σάρωση υπό τις συνθήκες της παραγράφου 4.2.4. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω συγκεντρωτικό πίνακα (πίνακας 4.3).

4.3: μ μ μ .

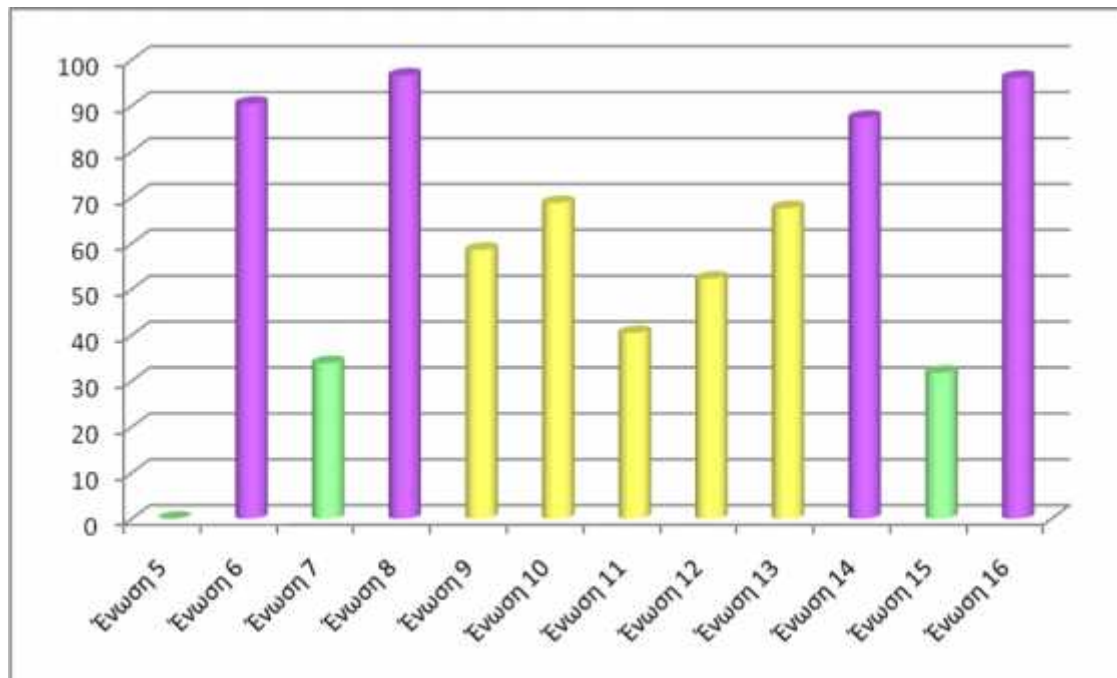
Αριθμός Ένωσης	Χημική δομή	Παραμένουσα Δραστικότητα (%)	Αναστολή (%)
5		127	-
6		9,6	90,4
7		66,1	33,9
8		3,4	96,6

9		41,4	58,6
10		31,2	68,8
11		59,5	40,5
12		47,7	52,3
13		32,3	67,7
14		12,6	87,4

15		68,2	31,8
16		3,9	96,1

Στο παρακάτω ιστόγραμμα παρουσιάζονται σχηματικά τα αποτελέσματα της μελέτης. Οι ενώσεις έχουν ταξινομηθεί σε τρεις κατηγορίες με βάση το ποσοστό αναστολής που επιφέρουν:

- **Ομάδα ενώσεων χαμηλής αναστολής :** ανήκουν οι ενώσεις **5, 7** και **15**
- **Ομάδα ενώσεων μεσαίας αναστολής :** ανήκουν οι ενώσεις **9, 10, 11, 12** και **13**
- **Ομάδα ενώσεων υψηλής αναστολής :** ανήκουν οι ενώσεις **6, 8, 14** και **16**



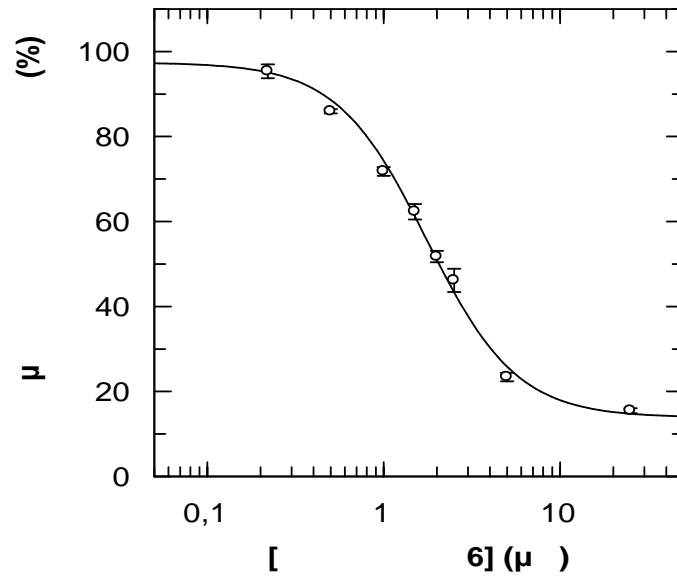
μ 4.8: μ μ (%), hGSTA1-1.
 μ μ μ μ

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα είναι φανερό πως οι ενώσεις που επιφέρουν τη μεγαλύτερη αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας είναι οι 6, 8, 14 και 16.

4.3.2. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ IC50 ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ-ΟΔΗΓΩΝ ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ hGSTA1-1:

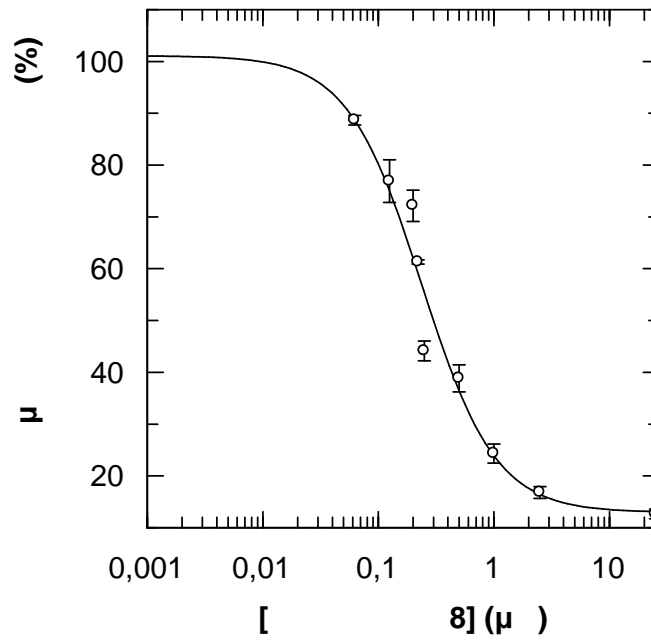
Στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι τιμές IC50 των ενώσεων 6, 8, 14 και 16 με τη μέθοδο που περιγράφεται στη παράγραφο 4.2.8 και τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης είναι τα παρακάτω.

Ένωση 6:



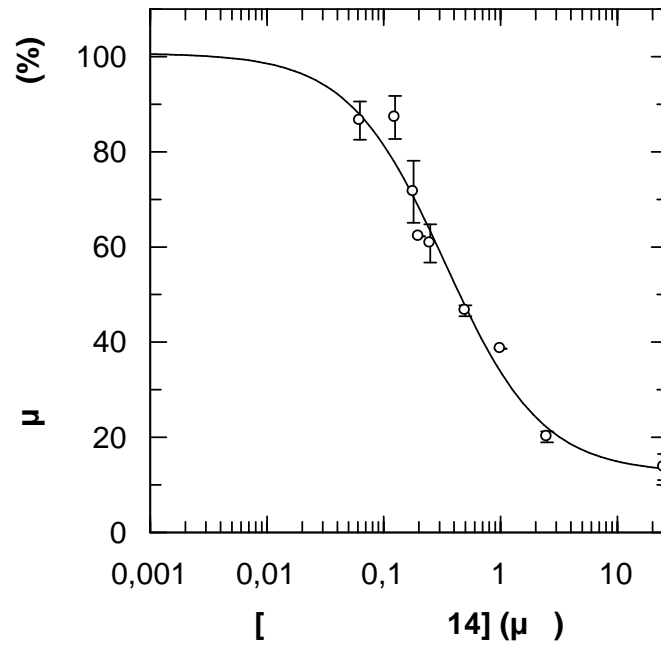
μ 4.9: μ μ hGSTA1-1 (%) **6.** μ
 IC50 1,75 μ .

Ένωση 8:



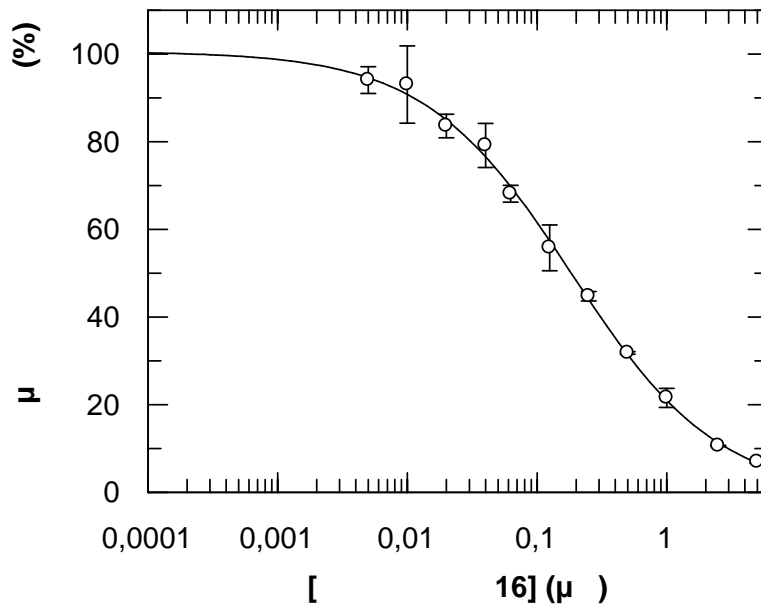
μ 4.10: μ μ hGSTA1-1 (%) **8.**
 μ IC50 0,24 μ .

Ένωση 14:



μ 4.11: μ μ hGSTA1-1 (%) **14.**
 μ IC50 0,33 μ .

Ένωση 16:

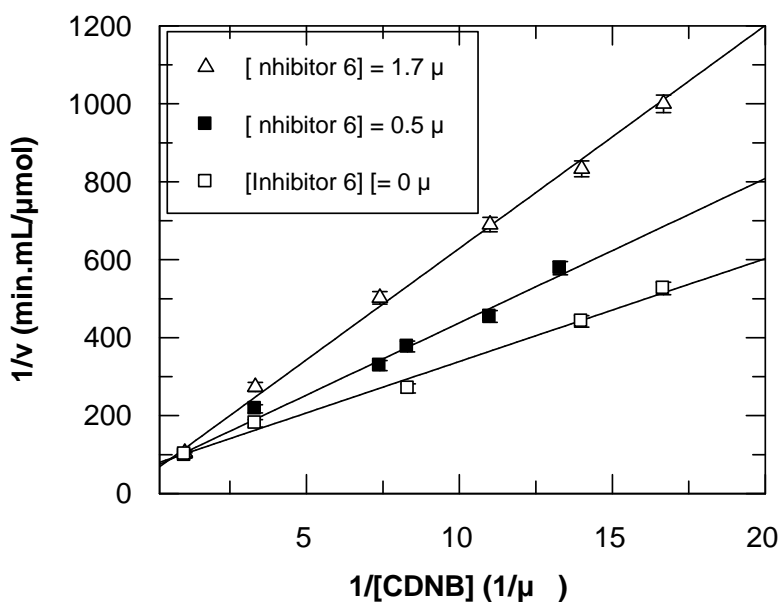


μ 4.12: μ μ hGSTA1-1 (%) **16.**
 μ IC50 0,18 μ .

4.3.3. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ hGSTA1-1 ΕΧΟΝΤΑΣ ΤΟ 1-ΧΛΩΡΟ-2,4-ΔΙΝΙΤΡΟΒΕΝΖΟΛΙΟ (CDNB) ΩΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΜΕΤΑΒΑΛΛΟΜΕΝΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ:

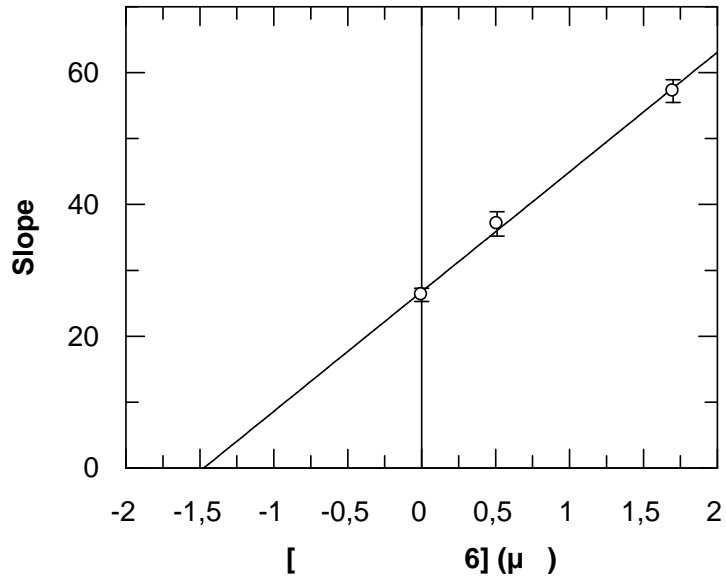
Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη κινητική μελέτη με το 1-χλώρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης για τους αναστολείς που έχουν επιλεγεί, ακολουθώντας την τεχνική που περιγράφηκε στην παράγραφο 4.2.9.1.

Όσον αφορά στην ένωση 6, μελετήθηκαν δυο διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις (0,5 μM και 1,7 μM) καθώς επίσης και η περίπτωση απουσία αναστολέα.



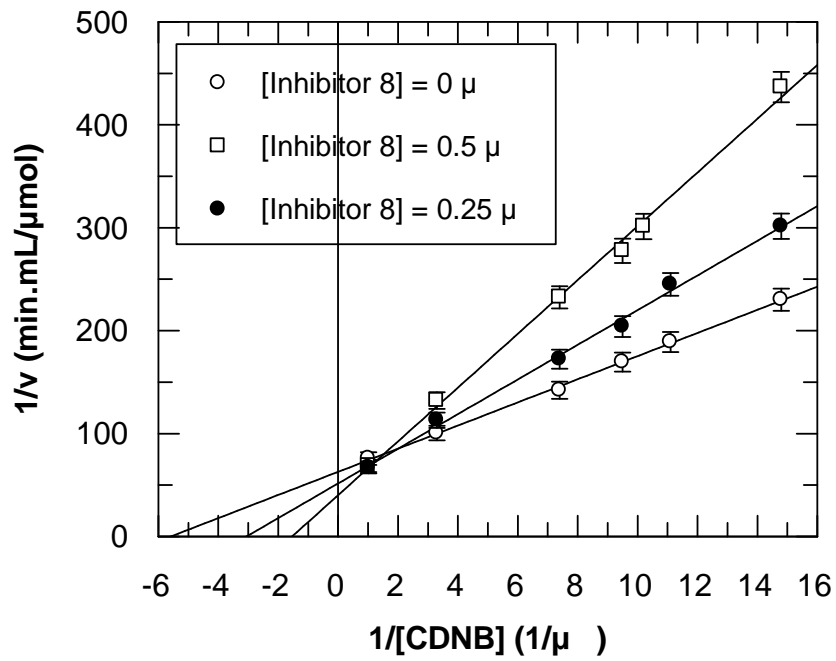
μ 4.13 :
μ

Lineweaver-Burk ()
μ CDNB
6.

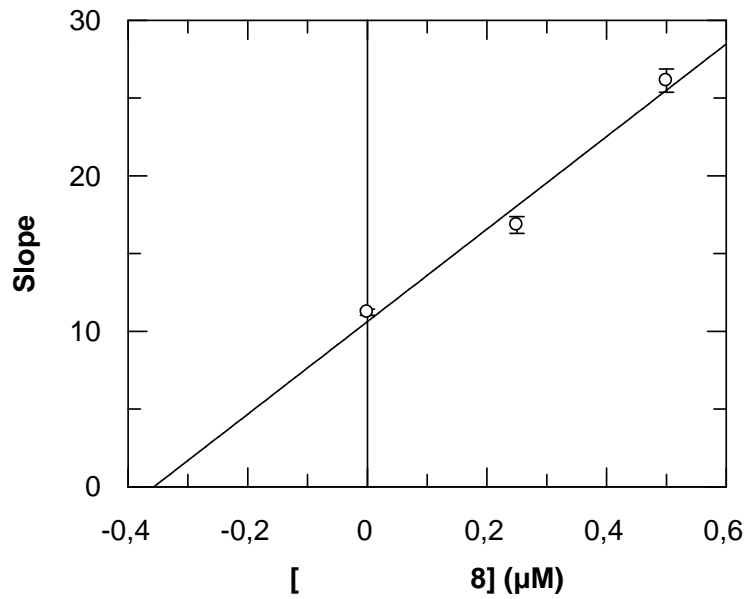


μ 4.14 :
 4.13. (slopes)
 6.

Σχετικά με την ένωση 8, μελετήθηκαν δυο σταθερές συγκεντρώσεις (0,25 μM και 0,5 μM). Τα διαγράμματα είναι τα ακόλουθα:

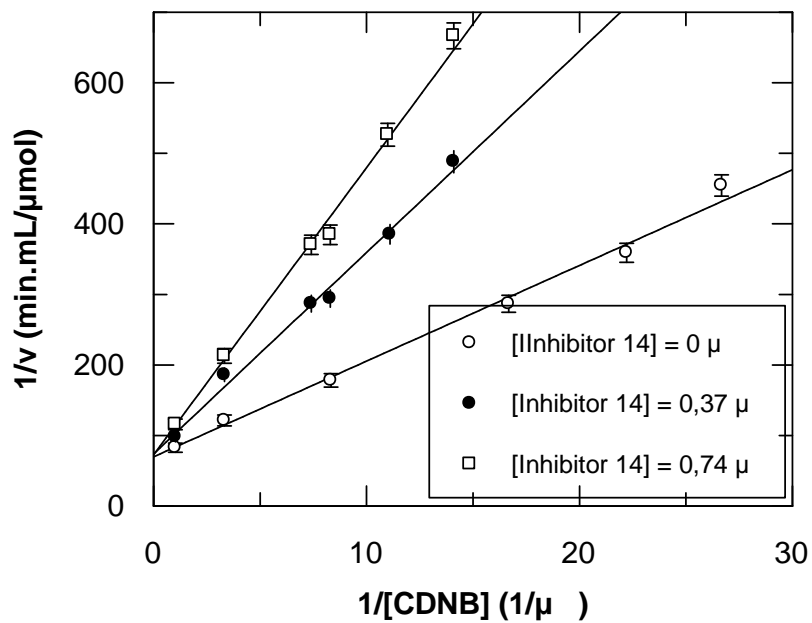


μ 4.15 :
 μ Lineweaver-Burk (μ CDNB)
 8.

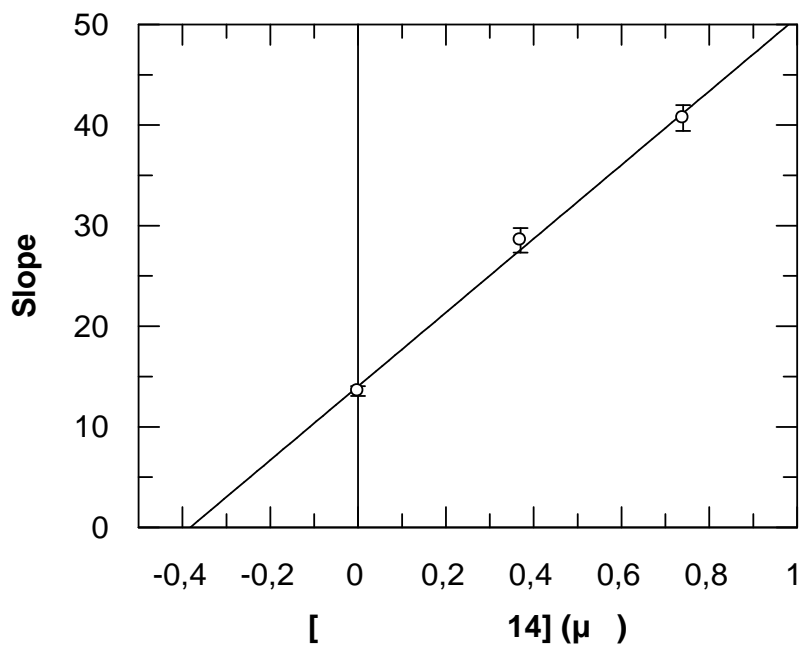


μ 4.16 : (slopes) μ
 4.15. 8.

Ακολούθως παρουσιάζονται τα διαγράμματα για την ένωση 14, όπου μελετήθηκαν δυο σταθερές συγκεντρώσεις (0,37 μM και 0,74 μM):



μ 4.17 : Lineweaver-Burk (μ)
 μ CDNB
 14.

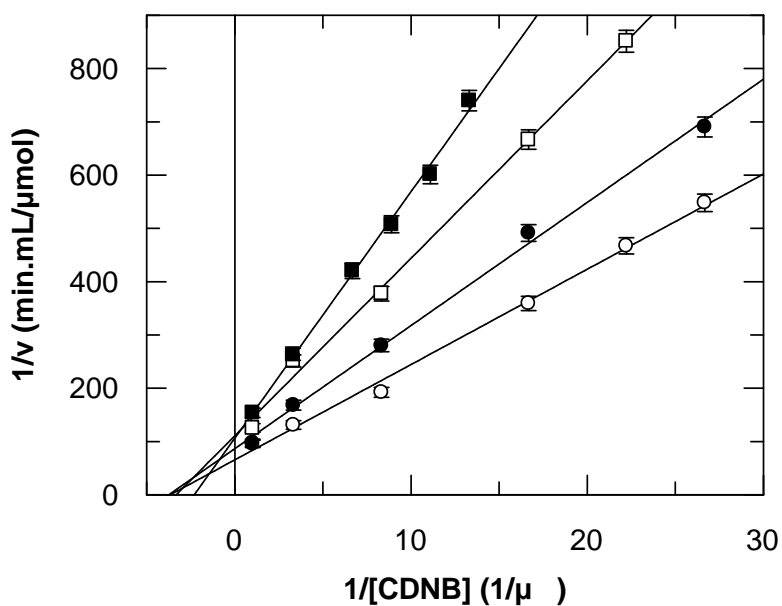


μ 4.18 :
4.17.
14.

(slopes)

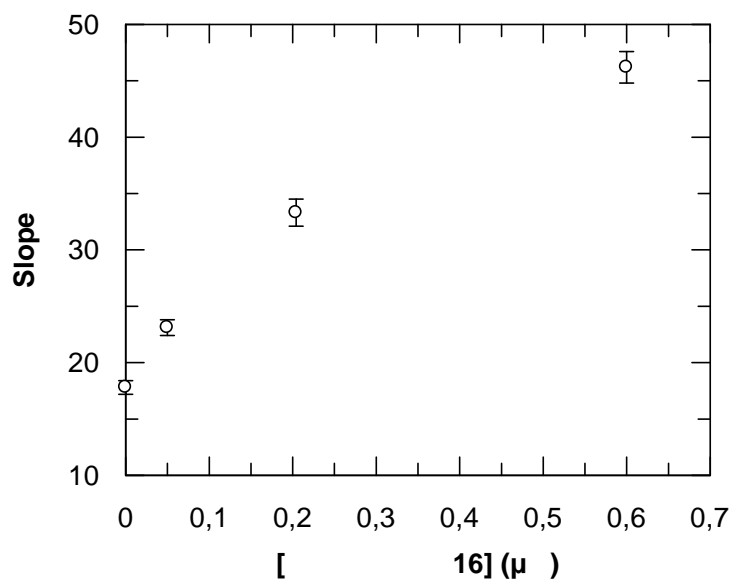
μ

Η ένωση 16 μελετήθηκε σε τρεις διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις (0,05 μM, 0,2 μM και 0,6 μM). Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα της κινητικής μελέτης.



μ 4.19 :
μ

Lineweaver-Burk ()
μ CDNB
16 (0, 0.05, 0.20 and 0.60 μM).

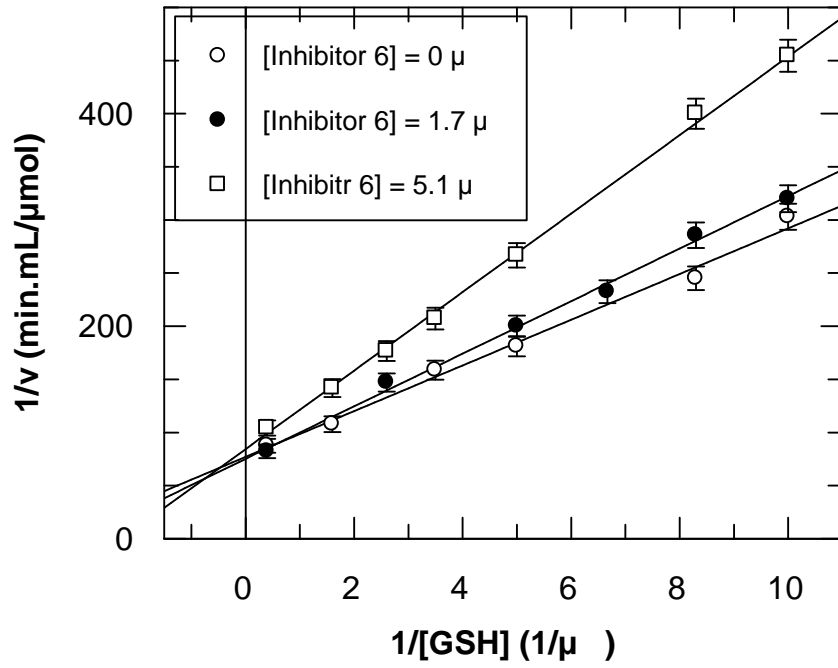


μ 4.20 :
 4.19. (slopes) μ
 16.

4.3.4. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ hGSTA1-1 ΕΧΟΝΤΑΣ ΤΗΝ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ (GSH) ΩΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΜΕΤΑΒΑΛΛΟΜΕΝΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ:

Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη των ενώσεων που έχουν επιλεχθεί έχοντας τη γλουταθειόνη (GSH) ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης όπως περιγράφεται στη παράγραφο 4.2.9.2.

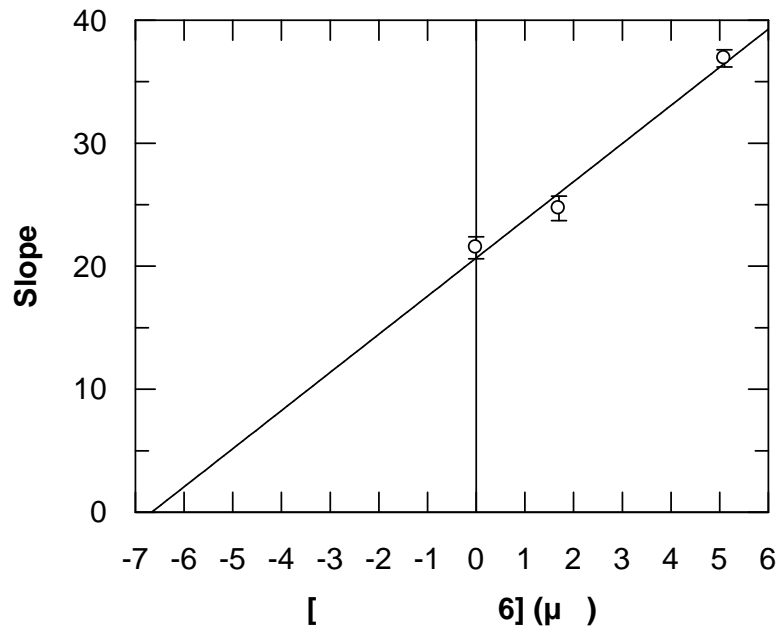
Η ένωση 6 μελετήθηκε σε δυο διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις (1,7 μΜ και 5,1 μΜ). Παρακάτω απεικονίζονται τα διαγράμματα με τα διπλα αντίστροφα (εικόνα 4.21) καθώς επίσης και η δευτερογενής παράσταση (εικόνα 4.22).



μ 4.21 :
 μ

Lineweaver-Burk (μ GSH)

6.

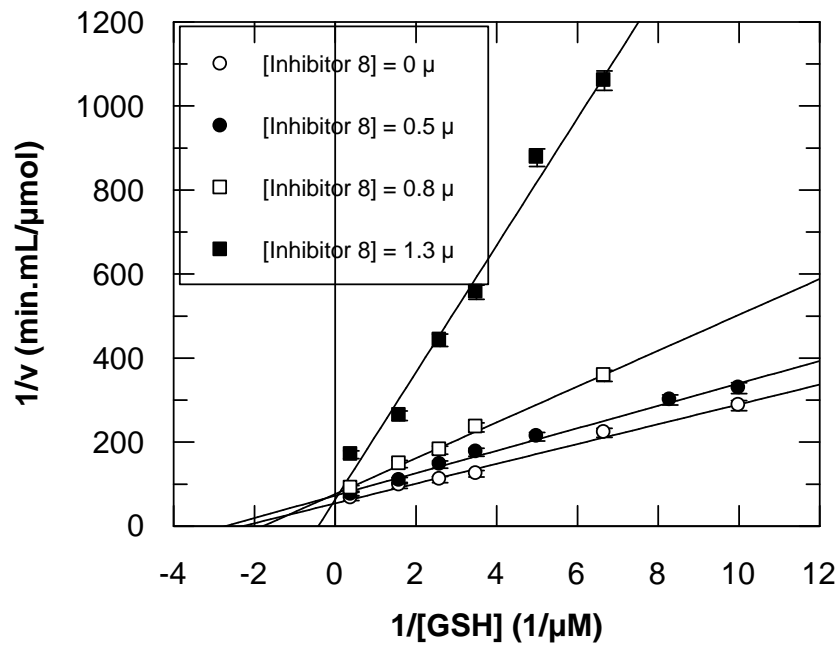


μ 4.22 :
4.21. 6.

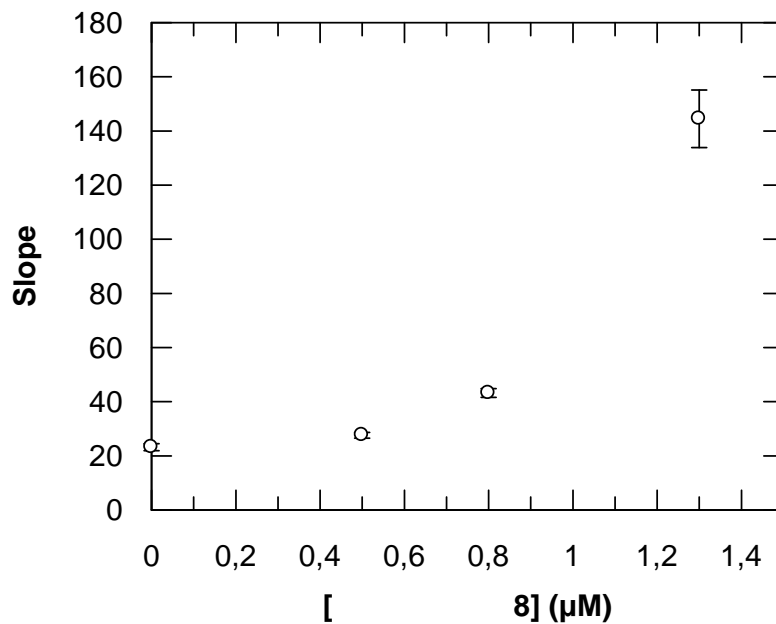
(slopes)

μ

Στη συνέχεια μελετήθηκε η ένωση **8** σε τρεις διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις (0,5 μM , 0,8 μM και 1,3 μM).

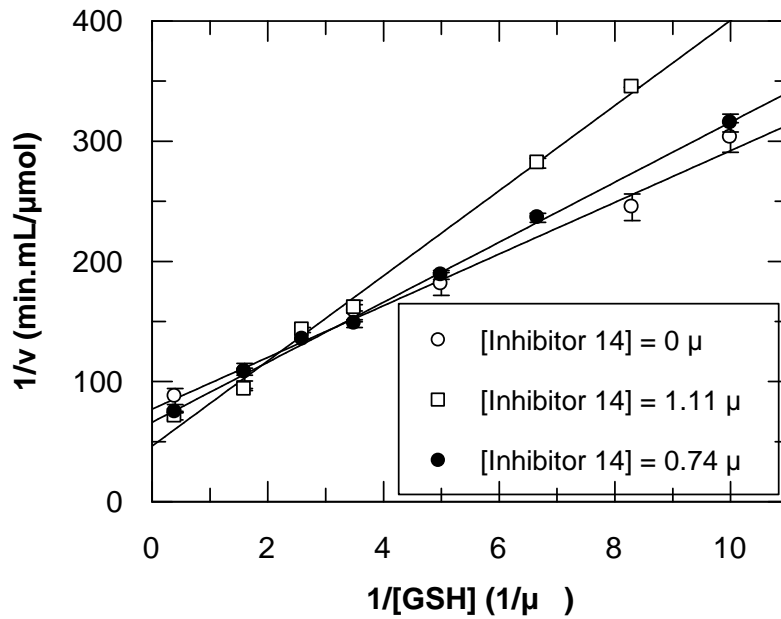


μ 4.23 :
 μ Lineweaver-Burk (μ GSH)
8.



μ 4.24 :
 4.23. μ (slopes)
8.

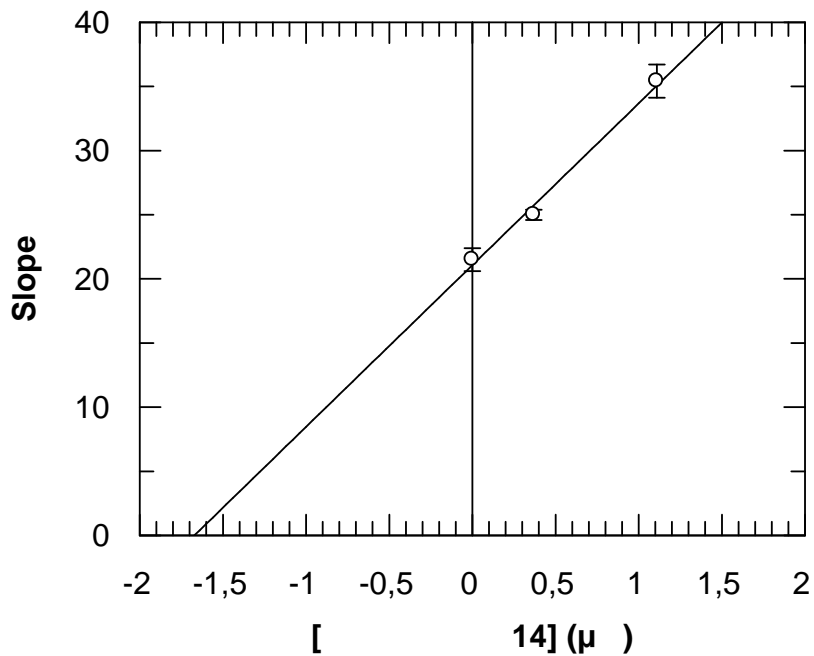
Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη κινητική μελέτη για την ένωση 14 σε δυο διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις (0,74 μM και 1,11 μM).



μ 4.25 :

Lineweaver-Burk (μ GSH)

14.

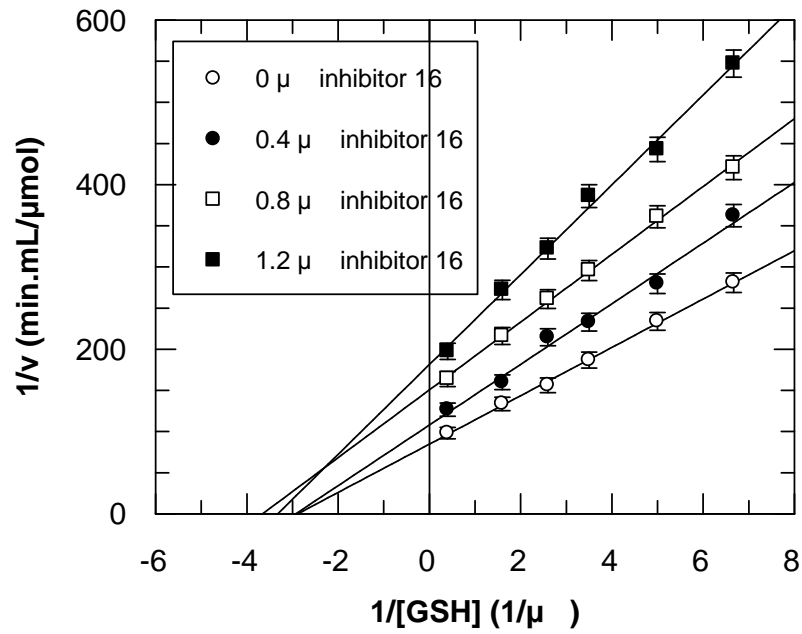


μ 4.26 :

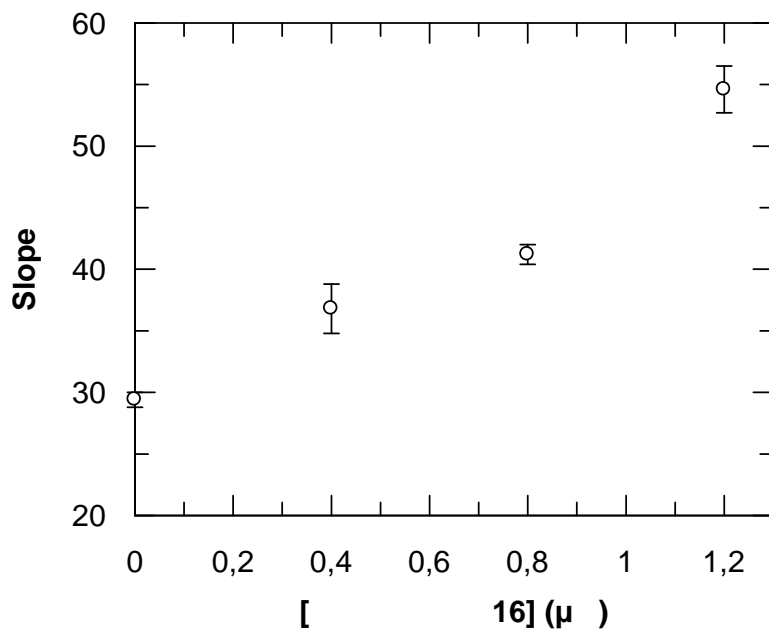
(slopes)

14.

Τέλος, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα κινητικής μελέτης για την ένωση **16** σε τρεις διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις (0,4 μM , 0,8 μM και 1,2 μM).



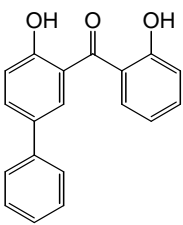
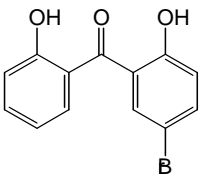
μ 4.27 : Lineweaver-Burk (μ GSH)
 μ 16.



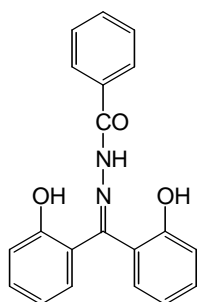
μ 4.28 : (slopes) μ
 4.27. 16.

4.3.5. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΤΑΘΕΡΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ K_i

Έπειτα από τις κινητικές μελέτες υπολογίστηκαν οι σταθερές αναστολής με τον τρόπο που περιγράφεται στην παράγραφο 4.2.10. Ακολουθεί συγκεντρωτικός πίνακας (πίνακας 4.4), όπου αναγράφονται οι τιμές των K_i ως προς CDNB των ενώσεων που έχουν επιλεχθεί καθώς επίσης και το είδος αναστολής σε κάθε περίπτωση.

4.4.	4.3	(K_i)	CDNB,
hGST 1-1.			μ
μ &			K_i (μ)
μ		CDNB ([GSH]) hGSTA1-1
6		$\mu\mu$	1.47 ± 0.15
8		$\mu\mu$ (>	0.36 ± 0.11

14

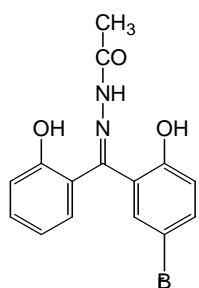


μμ

0.7 μ

, 0.38 ± 0.05

16



,

1.75 ± 0.25
[0.25 ± 0.04 μμ]

Σε όλες τις περιπτώσεις, οι τέσσερις ενώσεις επέδειξαν μικτή αναστολή, πλήρη (γραμμική) ή μερική (μη γραμμική), ως προς GSH.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5:

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης των GSTs σε καρκινικά κύτταρα καθώς και η εμπλοκή τους σε μηχανισμούς που σχετίζονται με την αντίσταση του κυττάρου σε φάρμακα (MDR), ήταν εφελκέρια της παρούσας μελέτης που αφορά σε μία μικρή ‘βιβλιοθήκη’ ενώσεων αποτελούμενης από διυδροξυβενζοφαινόνες (5-10), κετοξίμες (11-13) και N-ακυλο-υδραζόνες (14-16) ως δυνητικών αναστολέων τρανσφεράσης γλουταθειόνης. Ειδικότερα, οι συγκεκριμένες ενώσεις μελετήθηκαν για πρώτη φορά ως πιθανοί αναστολείς του ισοενζύμου GSTA1-1 ανθρώπου (hGSTA1-1) που είναι γνωστό ότι εμπλέκεται σε διεργασίες multiple drug resistance (MDR).

Τα αποτελέσματα της μελέτης (κεφάλαιο 4, παράγραφος 4.3) συνεκτιμήθηκαν με τα αποτελέσματα *in silico* μοριακού μοντελισμού και ελλιμενισμού (docking) που παρουσιάζονται στο παρόν κεφάλαιο, προκειμένου να κατανοηθεί πληρέστερα ο τρόπος της αναστολής του ενζύμου-στόχου, hGSTA1-1, από τις ενώσεις που επελέγησαν ως εκείνες με την ισχυρότερη αναστολή.

Τα *in silico* μοριακά μοντέλα, τα οποία βοήθησαν στην αξιολόγηση των πειραματικών αποτελεσμάτων της συγκεκριμένης εργασίας, είναι ευγενική προσφορά του κ. Ηλία Ηλιόπουλου, Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοτεχνολογίας του ΓΠΑ.

Στη συνέχεια συζητούνται και σχολιάζονται τα αποτελέσματα που εκτέθηκαν στα κεφάλαια 2,3 και 4.

5.1. ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ 2,2'-ΔΙΥΔΡΟΞΥΒΕΝΖΟΦΑΙΝΟΝΩΝ 6 ΚΑΙ 8

Η χημική σύνθεση των ενώσεων 6 και 8 ήταν απαραίτητη ύστερα από το ενδιαφέρον που παρουσίασαν κατά την αξιολόγησή τους ως αναστολείς της δράσης του ισοενζύμου GSTA1-1 ανθρώπου (hGSTA1-1). Ως αρχικές ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν παράγωγα ξανθόνης τύπου 4 (κεφάλαιο 2, Σχήμα 2.1).

Κατά την διάνοιξη της ενώσεως 8 δεν παρατηρήθηκε αντίδραση συζεύξεως (“coupling reaction”), όπως απεικονίζεται στο κεφάλαιο 2, Σχήμα 2.1, αντίδραση συνήθης υπό τις εφαρμοσθείσες συνθήκες (Yuan *et al.*, 2010). Ο ισχυρός «bifurcated» ενδομοριακός δεσμός Η «δεσμεύει» τις ΟΗ ομάδες στην δομή τύπου 2, συνεπώς αποτρέπει την συμμετοχή τους σε αντίδραση συζεύξεως.

Αναφορικά και με τις ενώσεις 6 και 8, οι θέσεις των απορροφήσεων στα φάσματα IR και NMR (κεφάλαιο 2, Σχήματα 2.2, 2.4, 2.5 & 2.7) είναι ενδεικτικές της επιδράσεως του ενδομοριακού (“bifurcated”) δεσμού υδρογόνου που υπάρχει μεταξύ υδροξυλίων και καρβονυλίου αυτών των ομάδων. Ενώ, στα φάσματα NMR οι αρωματικές πολλαπλές είναι χαρακτηριστικές του τύπου υποκαταστάσεως (κεφάλαιο 2, Σχήματα 2.3 & 2.4).

5.2. ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΙΣΟΕΝΖΥΜΟΥ hGSTA1-1 ΑΠΟ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ *E. coli*

Προκειμένου να ελεγχθεί η ανασταλτική δράση που μπορεί να επιφέρουν οι ενώσεις στο ένζυμο hGSTA1-1, προηγήθηκε έκφραση του ενζύμου από ανασυνδυασμένα κύτταρα *E. coli* και καθαρισμός του με χρωματογραφία συγγένειας, δηλαδή διαχωρισμός με βάση τη βιολογική λειτουργία.

Για την αξιολόγηση της ενζυμικής καθαρότητας χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι δείκτες, όπως η ειδική δραστηριότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος (SA), η απόδοση καθώς και το πόσες φορές καθαρίστηκε το ένζυμο. Τέλος, για να επιβεβαιώσουμε την καθαρότητα του παρασκευάσματος πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου.

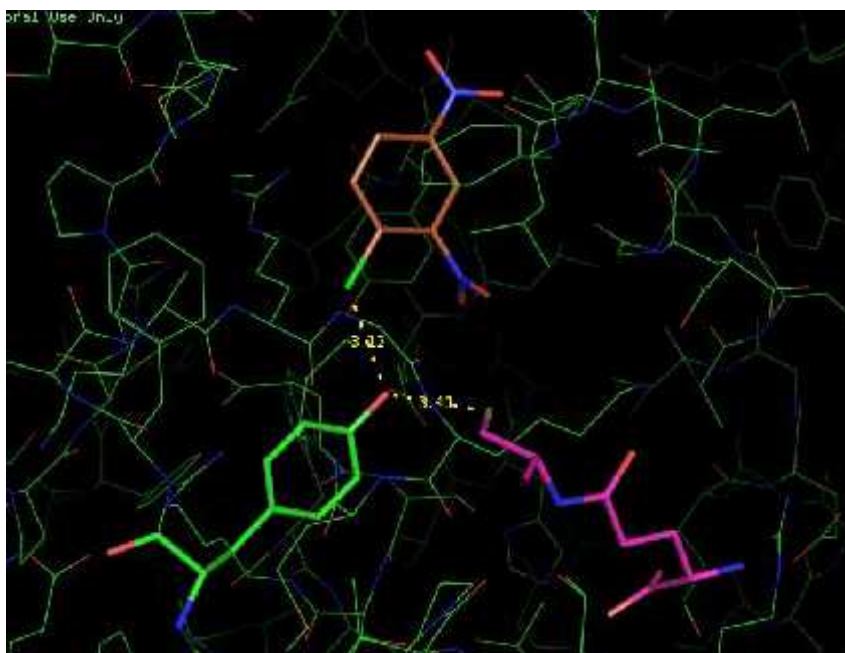
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο κεφάλαιο 3, παράγραφος 3.3, ο καθαρισμός του ισοενζύμου έδωσε ειδική δραστηριότητα (SA) = 82.6 U/mg και ανάκτηση 80 %, ενώ η ανάλυση με SDS-PAGE (Σχήμα 3.1) έδειξε ότι το παρασκεύασμα hGSTA1-1 ήταν απαλλαγμένο από τις περισσότερες πρωτεΐνες του ακατέργαστου αρχικού βιολογικού υλικού. Τα εν λόγω αποτελέσματα συγκρίνονται θετικά ως προς προηγούμενα αποτελέσματα (π.χ. SA = 68,5 U/mg και ανάκτηση = 98 %, [Chronopoulou et al., 2012a](#)).

5.3. ΣΑΡΩΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΙΣΟΕΝΖΥΜΟΥ hGSTA1-1 & ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ

5.3.1. ΣΑΡΩΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΙΣΧΥΡΟΤΕΡΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ hGSTA1-1

Αρχικά πραγματοποιήθηκε σάρωση (screening) όλων των ενώσεων εφαρμόζοντας φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της δραστηριότητας της hGSTA1-1 με τα υποστρώματα CDNB & GSH (παράγραφος 4.3.1). Οι περισσότερες ενώσεις εμφάνισαν αναστολή έναντι της hGSTA1-1 σε διαφορετικό βαθμό ανάλογα με τους υποκαταστάτες (Πίνακας 4.3). Η ένωση 5 ήταν η μοναδική που δεν εμφάνισε αναστολή και δεν είχε υποκαταστάτη.

Η *in silico* απεικόνιση του μορίου της hGSTA1-1 δείχνει να υπάρχει μια περιοχική δέσμευση υποστρωμάτων και άλλων μορίων, η οποία είναι σε σχήμα V (Σχήμα 5.1). Η περιοχική αυτή αποτελείται από :



μ 5.2: *In silico* μ hGSTA1-1.
 μ Cl (3.1 Å) S (3.4 Å) μ μ CDNB Tyr9 () μ
 (Koutsoumbli et al., 2012). GSH

Τα αποτελέσματα της σάρωσης (παράγραφος 4.3.1, Πίνακας 4.3), σύμφωνα με τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της παραμένουσας ενζυμικής δραστηριότητας και της εξ' αυτής προκύπτουσας αναστολής που επιφέρουν επί της hGSTA1-1, οι ενώσεις μπορεί να ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες βάσει του ποσοστού αναστολής που επιφέρουν:

- **Ομάδα ενώσεων χαμηλής αναστολής :** ανήκουν οι ενώσεις 5, 7 και 15, με αναστολή της GST μέχρι 34 %.
- **Ομάδα ενώσεων μεσαίας αναστολής :** ανήκουν οι ενώσεις 9, 10, 11, 12 και 13, με αναστολή 34-69 %.
- **Ομάδα ενώσεων υψηλής αναστολής :** ανήκουν οι ενώσεις 6, 8, 14 και 16, με αναστολή πάνω από 86 %.

Ειδικότερα, η υψηλή αναστολή που προσδιορίστηκε για τις ενώσεις 6, 14, 8 και 16 (86,1 %, 87,4 %, 87,7 % και 96,1 %, αντίστοιχα) επιβεβαιώθηκε από τις

χαμηλές τιμές IC50 (παράγραφος 4.3.2, Σχήματα 4.9, 4.10, 4.11 & 4.12). Παρόλο που ο *in silico* μοριακός ελλιμενισμός των υποψήφιων αναστολέων με την hGSTA1-1 εμφανίζει πτυχές διαμοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της πρωτεΐνης, του υποστρώματος και του αναστολέα, ορισμένα δομικά χαρακτηριστικά των αναστολέων μπορεί να σχετίζονται με την δράση τους. Από τις χημικές ενώσεις που μελετήθηκαν, υψηλότερη δραστικότητα έδειξαν αυτές που έχουν ηλεκτραρνητικό υποκαταστάτη στη θέση 5 ή 5' αλλά όχι και στις δυο, με ταυτόχρονη διατήρηση της διαθεσιμότητας των δυο πρωτονιοδοτών στις θέσεις 2 και 2' και του ενός πρωτονιοδέκτη στη θέση 7, δηλαδή των ενώσεων 16, 8, 14 και 6.

5.3.2. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΜΕ ΤΙΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ 6, 8, 14 & 16

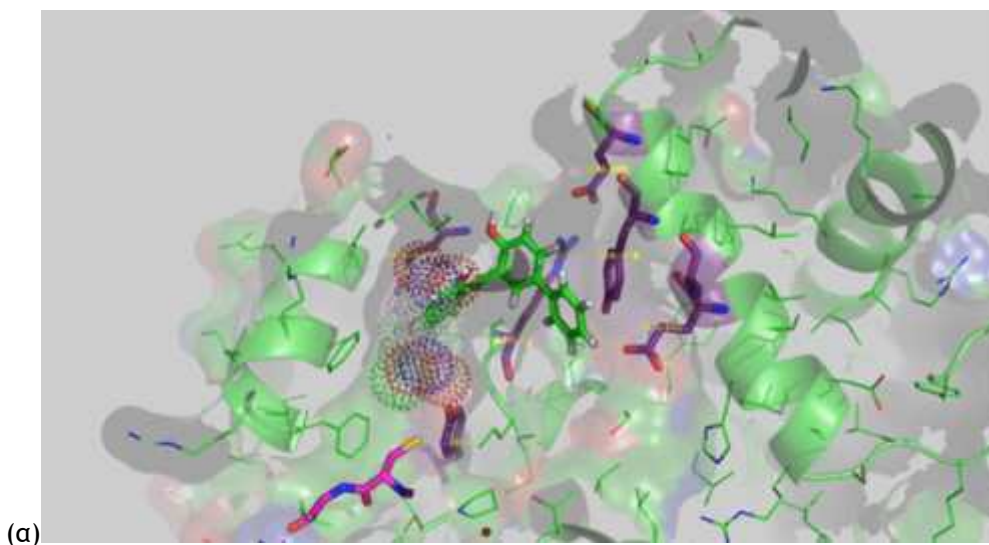
Έχοντας επιλέξει τους πιο ισχυρούς αναστολείς έναντι του ενζύμου-στόχου, πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη της με την hGSTA1-1 προκειμένου να κατανοηθεί καλύτερα και πληρέστερα ο τρόπος δέσμευσης των αναστολέων στον στόχο. Αυτή η γνώση θα είναι πολύτιμη για τον μελλοντικό σχεδιασμό ισχυρότερων αναστολέων και πιθανών προφαρμάκων.

Δεδομένου ότι στην αντίδραση που καταλύει το υπό μελέτη ένζυμο μετέχουν δυο υποστρώματα (CDNB & GSH), για κάθε επιλεγμένο αναστολέα πραγματοποιούνται δυο επιμέρους κινητικές μελέτες. Συγκεκριμένα, στη μια σειρά πειραμάτων παραμένει σταθερή η συγκέντρωση του ενός υποστρώματος (π.χ. GSH) και μεταβάλλεται η συγκέντρωση του άλλου (π.χ. CDNB), ενώ στην άλλη σειρά πειραμάτων συμβαίνει το αντίστροφο (παράγραφος 4.2.9). Σε κάθε περίπτωση, υπάρχει παρουσία σταθερής συγκέντρωσης αναστολέα.

Στις επόμενες δυο παραγράφους αναλύεται ο τύπος αναστολής των επιλεγμένων ενώσεων, χωρίζοντας τες σε δυο ομάδες τρόπου συμπεριφοράς: αναστολείς 6 & 14 και αναστολείς 8 & 16.

- Αναστολείς 6 & 14

Έχοντας το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης, οι ενώσεις 6 και 14 εμφανίζουν καθαρά συναγωνιστική αναστολή βάσει της γραμμικότητας που παρατηρήθηκε για αμφότερα τα γραφήματα των διπλών αντιστρόφων Lineweaver-Burk (παράγραφος 4.3.3, Σχήματα 4.13 & 4.17) και των αντίστοιχων δευτερογενών γραφημάτων τους (Σχήματα 4.14 & 4.18) (Roberts, 1977; Dixon & Webb, 1979; Leskovac, 2003). Τα αποτελέσματα αυτά σημαίνουν ότι οι δυο αυτοί αναστολείς και το υπόστρωμα CDNB συναγωνίζονται για την ίδια θέση δέσμευσης του ενζύμου. Οι σταθερές αναστολής υπολογίστηκαν ως εξής $K_{i(6)} = 1,47 \pm 0,15 \mu\text{M}$ (Σχήμα 4.14) και $K_{i(14)} = 0,38 \pm 0,05 \mu\text{M}$ (Σχήμα 4.18). Τα ανωτέρω αποτελέσματα συνάδουν με τον *in silico* μοριακό ελλιμενισμό, ο οποίος προβλέπει και για τους δυο αναστολείς να συναγωνίζονται με το CDNB προκειμένου να συνδεθούν στην ίδια καταλυτική θέση του ενζύμου (Σχήματα 5.3). Είναι χαρακτηριστικό ότι όταν επιχειρηθεί ελλιμενισμός ταυτόχρονα των CDNB και αναστολέα, 6 (Σχήμα 5.3α) ή 14 (Σχήμα 5.3β), παρατηρείται σύγκρουση μεταξύ τους η οποία οδηγεί στο φαινόμενο της *συναγωνιστικής αναστολής* και δέσμευση ενός εκ των δύο, είτε CDNB είτε αναστολέα, 6 ή 14.

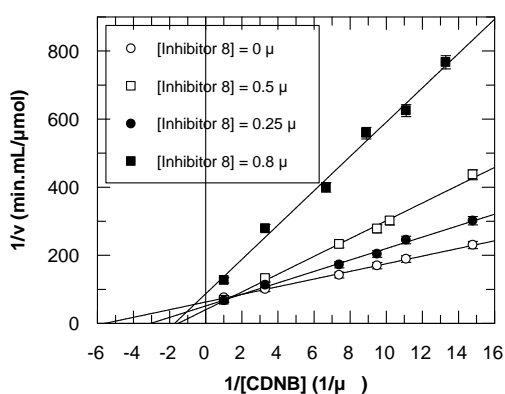


- Αναστολείς **8** & **16**

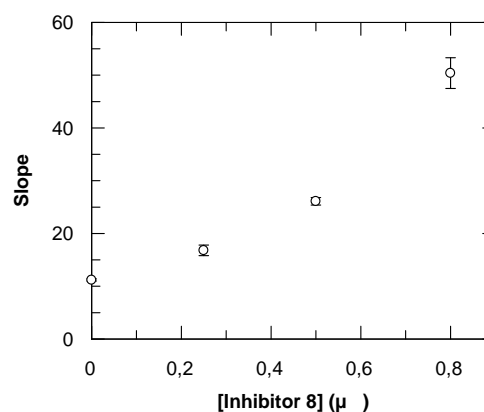
Οι ενώσεις **8** και **16** φέρουν ένα άτομο βρωμίου σε παρα-θέση, αντί για τη φαινυλομάδα που φέρουν οι ενώσεις **6** και **14** στην ίδια θέση.

ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ **8**

Έχοντας σαν υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης το CDNB, ο αναστολέας **8** έδειξε μικτού τύπου αναστολή, που φαίνεται από τις ευθείες του γραφήματος των διπλών αντιστρόφων Lineweaver-Burk, οι οποίες δεν τέμνονται στον άξονα αλλά στο πρώτο τεταρτημόριο (Σχήμα 4.15). Αυτός ο τύπος αναστολής επιβεβαιώνεται από τη γραμμικότητα του δευτερογενούς γραφήματος (Σχήμα 4.16), από όπου υπολογίζεται και η σταθερά αναστολής $K_{i(8)} = 0,36 \pm 0,11 \mu\text{M}$. Το μοντέλο ισορροπίας αυτού του τύπου αναστολής δεν προβλέπει τη δημιουργία προϊόντος, αφού τα σύμπλοκα ενζύμου-αναστολέα **8** και ενζύμου-CDNB-αναστολέα **8** είναι χημικώς αδρανή (Roberts, 1977; Dixon & Webb, 1979; Leskovac, 2003).



(a)



(β)

μ 5.4: ()
μ

Lineweaver-Burk ()
μ CDNB

8. ()
($0 \mu\text{M}$, $0,25 \mu\text{M}$, $0,5 \mu\text{M}$, $0,8 \mu\text{M}$).

Ωστόσο, σε συγκεντρώσεις αναστολέα **8** μεγαλύτερες από $0,5 \mu\text{M}$, το δευτερογενές γράφημα λαμβάνει μια ανοδική τάση (Σχήμα 5.4β), γεγονός

Η παραβολική μικτή αναστολή που παρατηρήθηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις **8** δεν προβλέπει καταλυτική δραστικότητα για τα σύμπλοκα ενζύμου-αναστολέα και ενζύμου-υποστρώματος-αναστολέα (Roberts, 1977; Dixon & Webb, 1979; Leskovic, 2003) και αυτό επιβεβαιώνεται από τον μοριακό μοντελισμό και ελλιμενισμό. Ειδικότερα, τα *in silico* μοντέλα προβλέπουν δυνατότητα ταυτόχρονης δέσμησης στο ένζυμο του υποστρώματος CDNB και του αναστολέα **8**, μάλιστα δε με τρόπο ώστε να βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους, σε απόσταση δεσμών υδρογόνου (π.χ. παρατηρούνται δυο δεσμοί υδρογόνου, 2.56 και 2.76 Å) (Σχήμα 5.5).

ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ 16

Έχοντας το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης, παρατηρήθηκε μικτού τύπου αναστολή, όπως φαίνεται από τις ευθείες των διπλών αντιστρόφων Lineweaver-Burk, οι οποίες τέμνονται στο δεύτερο τεταρτημόριο (Σχήμα 4.19). Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι στο δευτερογενές γράφημα υπάρχει καθοδική τάση (Σχήμα 4.20), φαίνεται να λειτουργεί τύπος υπερβολικής μικτής αναστολής (Leskovic, 2003). Κάτι τέτοιο συνεπάγεται ότι ο αναστολέας **16** συνδέεται τόσο στο ελεύθερο ένζυμο όσο και στο σύμπλοκο ενζύμου-CDNB, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο σε σχηματισμό τουλάχιστον δυο συμπλόκων, ενζύμου-**16** και ενζύμου-CDNB-**16**, αντίστοιχα. Ένα μόριο GSH πρέπει να είναι παρόν και στα δυο σύμπλοκα, γεγονός που οφείλεται στην χρησιμοποίηση συγκέντρωσης GSH κορεσμού για το ένζυμο. Αντίθετα με τον αναστολέα **8**, αυτό το μοντέλο προβλέπει διάσπαση του συμπλόκου ενζύμου-GSH-**16** σε προϊόντα με ρυθμό βραδύτερο από αυτόν που θα γινόταν χωρίς αναστολέα (Dixon & Webb, 1979; Leskovic, 2003). Σύμφωνα με τα παραπάνω, είναι λογικό να υποθέτουμε ότι παρουσία CDNB, η **16** συνδέεται σε μια θέση η οποία δεν αποτρέπει μεν πλήρως την καταλυτική λειτουργία, αλλά την επιβραδύνει συγκριτικά απουσία αναστολέα. Αυτό είναι σε συμφωνία με τον *in silico* μοριακό ελλιμενισμό (Σχήμα 5.6), που προβλέπει το CDNB στην κύρια καταλυτική θέση και την ένωση **16** σε μια δεύτερη θέση του ενζύμου, ως τις

5.4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η συγκεκριμένη εργασία είναι η πρώτη που μελετά διυδροξυβενζοφαινόνες και *N*-καρβονυλικά τους παράγωγα ως αναστολείς τρανσφεράσης γλουταθειόνης, ειδικότερα του ισοενζύμου hGSTA1-1.
- Δυο 2,2'-διυδροξυβενζοφαινόνες (**6** & **8**) και δυο *N*-ακυλο-υδραζόνες (**14** & **16**), ύστερα από σάρωση μιας βιβλιοθήκης δώδεκα ενώσεων, βρέθηκαν να είναι ισχυροί αναστολείς του ισοενζύμου hGSTA1-1 (αναστολή > 86%) και τιμές IC₅₀ μεταξύ 0.18 και 1.8 μΜ.
- Βάσει μελετών κινητικής αναστολής και μοριακού μοντελισμού, οι ενώσεις **6** και **14** (αμφότερες με έναν φαινυλικό υποκαταστάτη) έδειξαν να δεσμεύονται και αλληλεπιδρούν με τη θέση δέσμησης του υποστρώματος CDNB, ενώ οι ενώσεις **8** και **16** (με ένα βρώμιο ως υποκαταστάτη), έδειξαν να μην δεσμεύονται στη θέση αυτή.
- Σε κάθε περίπτωση, προκειμένου να κρίνουμε ασφαλέστερα ποιες από τις ενώσεις είναι οι καταλληλότερες ως 'δομή οδηγός' ('*lead structure*'), θεωρούμε απαραίτητο τον έλεγχο της κυτταροτοξικής τους συμπεριφοράς έναντι κυτταρικών σειρών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ✓ Abel E., Bammler T.K., Eaton D.L. (2004). Biotransformation of Methyl Parathion by Glutathione S-transferases. *Toxic. Sci.* 79, 224-232.
- ✓ Abd-El-Aziz A.S., Bernandin S. (2000) Synthesis and reactivity of arenes coordinated to cyclopentadienyliron cations. *Coord. Chem. Rev.* 203, 219-267.
- ✓ 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.
- ✓ Allan J.M. Wild C.P. Rollinson S., Willett E.V., Moorman A.V., Dovey G.J., Roddam P.L., Roman E., Cartwright R.A., Morgan G.J. (2001). Polymorphism in glutathione S-transferase P1 as associated with susceptibility to chemotherapy-induced leukaemia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 11592-11597.
- ✓ Allocati N., Favaloro B., Masulli M., Alexeyev M.F., Di Ilio C. (2003). *Proteus mirabilis* glutathione S-transferase B1-1 is involved in protective mechanisms against oxidative and chemical stress. *Biochem. J.* 373, 305-311.
- ✓ Alonso-Lomillo M.A., Dominguez-Renedo O., Arcos-Martinez M.J. (2009) Electrochemical determination of levetiracetam by screen-printed based biosensors. *Bioelectrochemistry.* 74, 306-309.
- ✓ Alvarez C., Alvarez R. , Corchete P., Pirez-Melero C., Peláez R., Medarde M. (2008) Naphthylphenstatins as tubulin ligands: Synthesis and biological evaluation *Bioorg.Med.Chem.* 16: 8999-9008 and references cited therein.
- ✓ Ames B.N., Profet M., Gold L.S. (1990) Nature's chemicals and synthetic chemicals: Comparative toxicology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 7782-7786.
- ✓ Anderson M.E. (1998). Glutathione : An overview of biosynthesis and modulation. *Chem. Biol. Interact.* 111-112, 1-14.
- ✓ Andreou V.G., Clonis Y.D. (2002). Novel fiber-optic biosensor based on immobilized glutathione S-transferase and sol-gel entrapped romocresol green for determination of atrazine. *Anal. Chim. Acta.* 460, 151-161.
- ✓ Appel B., Rotzoll S., Kranich R., Reinke H., Langer P. (2006) Domino Michael/ Retro-Michael/ Mukaiyama-Aldol Reactions of 1,3-Bis-Silyl Enol Ethers with 3-Acyl- and 3-Formylbenzopyryllium Triflates-Synthesis of Fuctionalised 2,4'-Dihydroxy-benzophenones. *Eur. J. Org. Chem.* 16, 3638-3644.

- ✓ Arca P., Hardisson C., Suarez J.E. (1990) Purification of glutathione S-transferase that mediates fosfomycin resistance bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 844-848.
- ✓ Armstrong R.N. (1997). Structure, Catalytic Mechanism and Evolution of the Glutathione Transferases. *Chem, Res. Toxicol.* 10, 2-18.
- ✓ Awasthi Y.C., Ansari G.A., Awasthi S. (2005). Regulation of 4-hydroxynoneral mediated signaling by glutathione S-transferases. *Methods Enzymol.* 401, 379-407.
- ✓ Bartling D., Radzio R., Steiner U., Weiler E.W. (1993) A glutathione S-transferase with glutathione-peroxidase activity from Arabidopsis thaliana. Molecular cloning and functional characterization. *Eur. J. Biochem.* 216, 579-586.
- ✓ Batist C., Tulpules A., Sinha B., Katki A., Myers C.E and Cowan K.H. (1986) Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug-resistant human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 261, 15544-15549.
- ✓ 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.
- ✓ Bilanz J., Sturm A. (1995) Cloning and characterization of a glutathione S-transferase that can be photolabeled with 5-azido-indole-3-acetic acid. *Plant Physiol.* 109, 253-260.
- ✓ Blackburn A. C., Coggan M., Tzeng H-F., Lantum H., Polekhina G., Parker M. W., Anders M. W., Board P. G. (2001) GSTZ1d, a new allele of glutathione transferase Zeta and maleylacetoacetate isomerase. *Pharmacogenetics* 11, 671-178.
- ✓ Blackburn A. C., Tzeng H-F., Anders M. W., Board P. G. (2000) Discovery of a functional polymorphism in human glutathione transferase zeta by expressed sequence tag database analysis. *Pharmacogenetics* 10, 49-57.
- ✓ Board P.G., Baker R.T., Chelvanayagam G., Jermini L.S. (1997). Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem. J.* 328, 929-935.
- ✓ Board P. G., Menon D. (2013) Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochimica and Biophysica Acta.* 1830, 3267-3288.
- ✓ Boyland E., Booth L., Sirns P. (1961). An enzyme from rat liver catalyzing conjugations with glutathione. *Biochem. J* 79, 516-524.
- ✓ Boyland E., Chasseaud L. F. (1967) Enzyme-catalysed conjugations of glutathione with unsaturated compounds. *Biochem. J.* 104, 95-102.

- ✓ Chasseaud L.F. (1979). The role of glutathione and glutathio S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens for detection of captan. *Biosens Bioelectron* 18, 1461-1466.
- ✓ Choi J.W., Kim Y.L., Song S.Y., Lee I., Lee W.H. (2003). Optical biosensor consisting of glutathione-S-transferase for detection of captan. *Biosensors and Bioelectronics* 18, 1461-1466.
- ✓ Chronopoulou E.G., Labrou N.E. (2009) Glutathione Transferases: Emerging Multidisciplinary Tools in Red and Green Biotechnology. *Rec. Patents Biotech.* 3, 211-223.
- ✓ Chronopoulou E.G., Labrou N.E. (2011) Site-saturation Mutagenesis: A Powerful Tool of Structure-Based Design of Combinatorial Mutation Libraries.
- ✓ 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
- ✓ Coleman J.O.D., Blake-Kalff M.M.A., Davies T.C.E. (1997). Detoxification of xenobiotics by plants : Chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci.* 2, 144-151.
- ✓ 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.
- ✓ Coles B.F., Chen G., Kadlubar F.F., Radomska-Pandya A. (2002) Interindividual variation and organ-specific patterns of glutathione S-transferase alpha mu and pi expression in gastrointestinal tract mucosa of normal individuals. *Arch. Biochem. Biophys.* 403, 270-276.
- ✓ Combes B., 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., Campagna 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, 355-362.
- ✓ Cummins I., Cole D.J., Edwards R. (1999). A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *Plant J.* 18, 285-292.
- ✓ Cummins I., 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.

- ✓ Deponte M. (2013) Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1830, 3217-3266.
- ✓ Diesperger H., Sandermann H. (1979) Soluble and microsomal glutathione S-transferase activities in pea seedlings (*Pisum sativum* L.). *Planta.*146, 643-648.
- ✓ Dirr H.W., Wallace L.A. (1999) Role of the C-terminal helix 9 in the stability and ligandin function of class alpha glutathione transferase A1-1. *Biochemistry.*38, 15631-15640.
- ✓ Dirven H.A., Van Ommen B., Van Bladeren P.J. (1994) Involvement of human glutathione S-transferase isoenzymes in the conjugation of cyclophosphamide metabolites with glutathione. *Cancer Res.* 54, 6215-6220.
- ✓ Dixon, M., Webb E. (1979) *Enzymes (3rd ed.)*; Longman Group Ltd.: London, UK, pp 332-381.
- ✓ Dixon D.P., Cummins I., Cole D.J., Edwards R. (1998). Glutathione mediated detoxification systems in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 258-266.
- ✓ Dixon D. P., Davis B. G., Edwards R. (2002a) Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 277, 30859-30869.
- ✓ Dixon D.P., Laphorn A., Edwards R. (2002). Protein family review. Plant glutathione transferases. *Genome Biol* 3 : 3004.1-3004.10.
- ✓ Dixon D.P., Skipsey M., Edwards R. (2010) Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 71, 338-350.
- ✓ Edwards R., Dixon D. P. (2000). The role of glutathione transferases in herbicide metabolism. In: Cobb A. H., Kirkwood R. C., (Eds.), *Herbicides and Their Mechanisms of Action. In Sheffield: Sheffield Academic Press Ltd*, pp 38-71.
- ✓ Edwards R., Dixon D.P., Walbot V. (2000). Plant glutathione S-transferases : enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.*, 5, 193-198.
- ✓ Edwards R., Owen W.J. (1986). Comparison of glutathione S-transferases of *Zea mays* responsible for herbicide detoxification in plants and suspension-cultural cells. *Planta* 169, 208-215.
- ✓ Eklund B.I., Moberg M., Bergquist J., Mannervik B. (2006). Divergent activities of human glutathione transferases in the bioactivation of azathioprine. *Mol. Pharmacol.* 70, 747-754.

- ✓ Evans J. F., Leville C., Mancini J. A., Prasit P., Therien M., et al. (1991) 5-Lipoxygenase-activating protein is the target of a quinoline class of leukotriene synthesis inhibitors. *Mol. Pharmacol.* 40, 22-27
- ✓ Fernandez-Canon J. M., Penalva M. A. (1998) Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue. *J. Biol. Chem.* 273, 329-337.
- ✓ Ford-Hutchinson A. W. (1990) Leukotriene B4 in inflammation. *Critical Reviews in Immunology* 10(1), 1-12.
- ✓ Forman H.J., Fukuto J.M., Torres M. (2004). Redox signaling : thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287, C246-C256.
- ✓ Foyer C. H. & Noctor G. (2005) Oxidant and antioxidant signaling in plants: a reevaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment* 28, 1056-1071.
- ✓ Freeman J.L., Persans M.W., Nieman K., Albechta C., Peera W., Peckering I.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. (2006). Glutathione transferases in the genomics era ; new insights and perspectives. *Biomol. Eng.* 23, 149-169.
- ✓ Gardikis, Y., Tsoungas, P.G., Potamitis, C., Zervou, M., Cordopatis, P. (2011) Xanthenes in heterocyclic synthesis. An efficient route for the synthesis of C-3 o-hydroxyaryl- substituted 1,2-benzisoxazoles and their N-oxides, potential scaffolds for angiotensin(II) antagonist hybrid peptides. *Heterocycles* ; 83: 1077-1091.
- ✓ Gardikis, Y., Tsoungas, P.G., Potamitis, C., Zervou, M., Pairas, G., Cordopatis, P. (2011) Xanthenes in heterocyclic synthesis. An efficient and general route for the synthesis of regioselectively substituted phthalazines. *Heterocycles* ; 83: 1291-1302.
- ✓ Gauglitz G., Proll G. (2008) Strategies for label-free optical detection. *Biosens. 21st Century* 109, 395-435.
- ✓ Gill U.S., Sutherland R.G. (1986) *Synth. Commun.* 16(4), 467-471.
- ✓ Guengerich F. P. (1990) Enzymatic oxidation of xenobiotic chemicals. *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25, 97-153
- ✓ Goekkur E., Hoehn S., Wolschke C., Wittmer C., Stueber C., Hossfeld D.K., Stoehlmacher J. (2006). Polymorphisms of glutathione S-transferases (GST) and thymidylate synthase (TS)-novel predictors for response and survival in gastric cancer patients. *Br. J. Cancer* 94, 281-286.
- ✓ Habig W.H., Pabst M.J and Jakoby W.B. (1974) Glutathione S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.

- ✓ Hall A.G., Autzen P., Cattan A.R., Malcolm A.J., Cole M., Kernahan J., Reid M.M. (1994). Expression of mu class glutathione S-transferase correlates with event-free survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Cancer Res.* 54, 5251-5254
- ✓ Hasegawa K., Miwa S., Tajima T., Tsutsumiuchi K., Taniguchi H., Miwa J. (2007). A Rapid and Inexpensive Method to Screen for Common Foods that Reduce The Action of Acrylamide, a Harmful Substance in Food. *Toxicol Lett* 175, 82-88.
- ✓ Hayes J. D., McLellan L. I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Res.* 31, 300-373.
- ✓ Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. (2005). Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51-88.
- ✓ Hayes J.D., Pulford D. J. (1995) The glutathione S-transferase supergene family : regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 445-600.
- ✓ Holgate S. T., Bradding P., Sampson A. P. (1996) Leukotriene antagonists and synthesis inhibitors: New directions in asthma therapy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 98(1), 1-12.
- ✓ Holmegren A. (1976). Hydrogen donor system for Escherichia coli ribonucleosidediphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 7, 2275-2279.
- ✓ Howells R.E., Holland T., Dhar K.K., Redman C.W., Hand P., Hoban P.R., Jones P.W., Fryer A.A., Strange R.C. (2001). Glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 genotypes in ovarian cancer: association with p53 expression and survival. *Int. J. Gynecol. Cancer* 11, 107-112.
- ✓ Hui-Wen L., Ali-Osman F. (2007). Genetic polymorphism and function of glutathione S-transferases in tumor drug resistance. *Current Opinion in Pharmacology* 7, 367-374.
- ✓ Ishikawa T.(1992). The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump, *Trends Biochem. Sci.* 17, 463-468.
- ✓ Ishimoto T.M., Ali-Osman F. (2002). Allelic variants of the human glutathione S-transferase P1 gene confer differential cytoprotection against anticancer agents in *Escherichia coli*. *Pharmacogenetics* 12, 543-553.
- ✓ Jain M., Ghanashyam C., Bhattacharjee A. (2010) Comprehensive expression analysis suggests overlapping and specific roles of rice glutathione S-transferase gene during development and stress responses. *BMC Genomics* 11, 73-89.

- ✓ Jakobsson P.J., Morgenstern R., Mancini J., Ford-Hutchinson A., Persson B. (1999) Common structural features of MAPEG-a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Prot. Sci.* 8, 689-692.
- ✓ Jakobson I., Askelof P., Warholm M. and Mannervik B. (1977) A steady-state-kinetic random mechanism for glutathione S-transferase A from rat liver. A model involving kinetically significant enzyme product complexes in the forward reaction. *Eur. J. Biochem.* 77(2), 253-262.
- ✓ Ji X., von Rosenvinge E.C., Johnson W.W., Tomarev S.I., Paitigorsky J., Armstrong R.N., Gilliland G.L. (1995) Three-dimensional structure, catalytic properties and evolution of sigma class glutathione transferase from squid, a progenitor of the lens S-crystallins of cephalopods. *Biochemistry.* 34, 5317-5328.
- ✓ Josephy P.D., Mannervik B. (2006). *Molecular Toxicology* Oxford University Press, Second Edition.
- ✓ Jowsey R.I., Thomson R.E., Orton T.C., Elcombe C.R., Hayes J.D. (2003) Biochemical and genetic characterization of a murine class Kappa glutathione S-transferase. *Biochem. J.* 373, 559-569.
- ✓ Kanaoka Y., Ago H., Inagaki E., Nanayama T., Miyano M., Kikuno R., Fujii Y., Eguchi N., Toh H., Urade Y., Hayaishi O. (1997) Cloning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin D synthase. *Cell* 90, 1085-1095.
- ✓ Kandimalla V.B., Tripathi V.S., Ju H. (2006) Immobilization of Biomolecules in Sol-Gels: Biological and Analytical Applications. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36, 73-106.
- ✓ Karam D. (1998) Glutathione S-transferase : an enzyme for chemical defense in plants. Brazilian Agricultural Research Corporation.
- ✓ Katti S.K., LeMaster D.M., Eklund H. (1990) Crystal structure of thioredoxin from *Escherichia Coli* at 1.68 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 212, 167-184.
- ✓ Keen J. H., Habig W. H., Jakoby W. B. (1976) Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 251, 6183-6188.
- ✓ Kellaway C. H., Trethewie E. R. (1940) The liberation of a slow reacting smooth muscle stimulating substance in anaphylaxis. *QJ Exp Physiol.* 30, 121-145.
- ✓ Keller C., Ballard L., Lemons R., Ali-Osman F. (2002). WO0208465.
- ✓ Kelley M.K., Engqvist-Goldstein A., Montali J.A., Wheatley J.B., Schmidt D.E., Jr Kauvar L.M. (1994). Variability of glutathione S-transferase isoenzyme patterns in matched normal and cancer human breast tissue. *Biochem. J.* 304, 843-848.

- ✓ Kolobe D., Sayed Y., Dirr H.W. (2004) Characterisation of bromosulphophthalein binding to human glutathione S-transferase A1-1: thermodynamics and inhibition kinetics. *Biochem. J.* 382, 703-709.
- ✓ Koutsoumpli G.E., Dimaki V.D., Thireou T.N., Eliopoulos E.E., Labrou N.E., Varvounis G.I., Clonis Y.D. (2012) Synthesis and study of 2-(pyrrolesulfonylmethyl)-*N*-arylimines: a new class of inhibitors for human glutathione transferase A1-1. *J Med Chem*, 55, 6802-6813.
- ✓ Kuhnert D.C., Sayed Y., Mosebi S., Sayed M., Sewell T., Dirr H.W. (2005) Tertiary Interactions Stabilize the C-terminal Region of Human Glutathione Transferase A1-1: a Crystallographic and Calorimetric Study. *J. Mol. Biol.* 349, 825-838.
- ✓ Labrou N.E., Mello L.V., Clonis Y.D. (2001) Functional and structural roles of the glutathione-binding residues in maize (*Zea mays*) glutathione S-transferase I. *Biochem. J.* 358, 101-110.
- ✓ Ladner J.E., Parson J.F., Rife C.L., Gilliland G.L., Armstrong R.N. (2004) Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanisms of the mitochondrial class Kappa enzyme rGSTK1-1. *Biochemistry.* 43, 352-361.
- ✓ Lafuente A., Pujol F., Carretero P., Villa J.P., Cuchi A. (1993) Human glutathione S-transferase μ (GST μ) deficiency as a marker for the susceptibility to bladder and larynx cancer among smokers. *Cancer Letters*, 68, 49-54.
- ✓ Lan T., Yang Z-L., Yang X., Liu Y-J., Wang X-R., Zenga Q-Y. (2009) Extensive Functional Diversification of the Populus Glutathione S-Transferase Supergene Family. *The Plant Cell.* 21, 3749-3766.
- ✓ Lee C.C., Pibrko A., Steele B.R., Gill U.S. and Sutherland R.G. (1983) *J. Organometal. Chem.* 256, 303.
- ✓ Lee C.C., Gill U.S. and Sutherland R.G. (1984) *J. Organometal. Chem.* 267, 157.
- ✓ Leskovac V. (2003) *Comprehensive Enzyme Kinetics*, Kluwer Academic Publishers: New York, USA pp 73-94, 95-110, 139-170.
- ✓ Lewis A.D., Forrester L.M., Hajes J.D., Wareing C.L., Carmichael J., Harris A.L., Mooghen M., Wolf C.R. (1989). Glutathione S-transferase isoenzymes in human tumours and tumour cell lines. *Br. L. Cancer* 60, 327-331.
- ✓ Lima J.J., Thomason D.B., Mohamed M.H., Eberle L.V., Self T.H., Johnson J.A. (1999). Impact of genetic polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor on albuterol bronchodilator pharmacodynamics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 65, 519-525.
- ✓ Liou J-P., Chang J-Y., Chang C-W., Chang C-Y., Mahindroo N., Kuo F-M., Hsieh H-P. (2004) Synthesis and Structure-Activity Relationships of 3-Amino-benzophenones as Antimitotic Agents. *J. Med. Chem.*; 47:2897-2905.

- ✓ Listowsky I., Abramovitz M., Homma H., Niitsu Y. (1988) Intracellular binding and transport of hormones and xenobiotics by glutathione S-transferase. *Drug Metab. Rev.* 19, 305-318
- ✓ Liu Y. J., Han X. M., Ren L. L., Yang H. L., Zeng Q. Y. (2013). Functional Divergence of the Glutathione S-Transferase Supergene Family in *Physcomitrella patens* Reveals Complex Patterns of Large Gene Family Evolution in Land Plants^{1[W]}[OA]. *Plant Physiol.* 161, 773-786.
- ✓ Lucklum R., Hauptmann P. (2006) Acoustic-wave microsensors-the challenge behind microgravimetry. *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 667-682.
- ✓ Maggini V., Buda G., Galimberti S., Conidi E., Giuliani N., Morabito F., Genestreti G., Iacopino P., Rizzoli V., Barale R., Petrini M., Rossi A.M. (2008). Response to chemotherapy and tandem autologous transplantation of multiple myeloma patients and GSTP1 and TYMS polymorphisms. *Leuk. Res.* 32, 49-53.
- ✓ Mahajan S., Atkins W.M. (2005). The chemistry and biology of inhibitors and pro-drugs targeted to glutathione S-transferases. *Cell Mol. Life Sci.* 62, 1221-1233.
- ✓ Mannervik B., Castro V.M., Danielson U.H., Tahir M.K., Hansson J., Ringborg U. (1987). Expression of class Pi glutathione transferase in human malignant melanoma cells. *Carcinogenesis* 8, 1929-1932.
- ✓ Mannervik B., Danielson U.H., (1988). Glutathione transferases-structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 23, 283-337.
- ✓ Mars K.A. (1996). The functions and regulation of plant glutathione S-transferases. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 127-158.
- ✓ Martin R. (2005) Aromatic Hydroxyketones: Preparation and Physical Properties 1. Hydroxybenzophenones, 3rd ed.
- ✓ Matsushita N., Aritake K., Takada A., Hizue M., Hayashi K. et al. (1998) Pharmacological studies on the novel antiallergic drug HQL-79 : II. Elucidation of mechanisms for antiallergic and antiasthmatic effects. *Jpn. J. Pharmacol.* 78,11-22.
- ✓ Meschenmoser K., Kim Y., Franken S., Nowak M., Feldmann G., Bendas G., Wolfgarten M., Messmer D., Schmidt-Wolf I.G. (2013) Targeting Cancer with a Bi-functional Peptide: In Vitro and In Vivo Results. *In Vivo* 27, 431-42.
- ✓ Moons A., (2005). Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs). *Vitamins and Hormones.* 72, 155-202.
- ✓ Morel F., Rauch C., Coles B., Ferrec E.L., Guillouzo A. (2002) The human glutathione transferase alpha locus: genomic organization of the gene cluster and functional characterization of the genetic

- polymorphism in the hGSTA1 promoter. *Pharmacogenetics*. 12, 277-286.
- ✓ Napoli C., Ignarro L.J. (2003). Nitric acid-releasing drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 97-123.
 - ✓ Nishimura M., Yaguchi H., Naito S., Hiraoka I. (2002). JP2002058483.
 - ✓ Nunes F., Maccollin M., Ahronowitz I. (2006). US20060269925.
 - ✓ Odrowaz-Sypniewski M.R., Tsoungas P.G., Varvounis G., Cordopatis P. (2009) Xanthone in synthesis: a reactivity profile via directed lithiation of its dimethyl ketal. *Tetrahedron Lett.*, 50: 5981-5983.
 - ✓ Oldenburg J., Kraggerud S.M., Brydøy M., Cvancarova M., Lothe R.A., Fossa S.D. (2007). Association between long-term neuro-toxicities in testicular cancer survivors and polymorphisms in glutathione S-transferase-P1 and -M1, a retrospective cross sectional study. *J. Transl. Med.* 5, 1.
 - ✓ Park D.J., Stoehlmacher J., Zhang W., Tsao-Wei D.D., Groshen S., Lenz H.J. (2001). A Xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res.* 61, 8654-8658.
 - ✓ Park H. (2012) Reduction of antibiotics using microorganisms containing glutathione S-transferases under immobilized conditions. *Environ. Toxicol. Phar.* 34, 345-350.
 - ✓ Paumi C.M., Smitherman P.K., Townsend A.J., Morrow C.S. (2004). Glutathione S-transferases (GSTs) inhibit transcriptional activation by the peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) ligand, 15-deoxy-Delta(12,14)prostaglandin J(2) (15-d-PGJ(2)). *Biochemistry*, 43, 2345-2352.
 - ✓ Phadke R.S. (1992) Biosensors and enzyme immobilized electrodes. *Biosystems*. 27, 203-206.
 - ✓ Piper P. J. (1984) Formation and actions of leukotrienes. *Physiol. Rev.* 64, 744-761.
 - ✓ Prohaska J. R., Ganther H. E. (1976) Glutathione peroxidase activity of glutathione S-transferases purified from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76, 437-445.
 - ✓ Ramanathan K., Jonsson B.R., Danielsson B. (2001) Sol-gel based thermal biosensor for glucose. *Anal. Chim. Acta.* 427, 1-10.
 - ✓ Rea Philip A., Ze-Sheng Li, Yu-Ping Lu & Yolanda M. Drozdowicz (1998) From vacuolar gs-x pumps to multispecific ABC transporters. *Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 49, 727-760.
 - ✓ Reed D.J. (1990). Glutathione : toxicological implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30. 603-631.

- ✓ Reinemer P., Prade L., Hof P. et al. (1996) Three-dimensional structure of glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2 Å resolution : structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione S-transferases and a novel active site architecture. *J. Mol. Biol.* 255, 289-309.
- ✓ Renfrew P.D., Choi E.J., Bonneau R., Kuhlman B. (2012) Incorporation of Noncanonical Amino Acids into Rosetta and Use in Computational Protein-Peptide Interface Design. *PLoS One.* 7, e32637.
- ✓ Ricardo Antonio Tan and Sheldon L. Spector. (1997) Antileukotriene agents. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 3, 215-220.
- ✓ Roberts D.V. (1977) *Enzyme Kinetics*; Cambridge University Press: Cambridge, UK pp 49-58, 65-69.
- ✓ Robinson A., Huttley G.A., Booth H.S., Board P.G. (2004) Modelling and bioinformatics studies of the human Kappa class glutathione transferase predict a novel third transferase family with homology to prokaryotic 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerases. *Biochem. J.* 379, 541-552
- ✓ Rossjohn J., Mckinstry W.J., Oakley A.J., Verger D., Flanagan J., Chelvanayagam G., Tan K.L, Board F.J., Parker M.W. (1998). Human theta class glutathione transferase: the crystal structure reveals a sulfate-binding pocket within a buried active site. *Structure* 6, 309-322.
- ✓ Roxas V.P., Smith R.K.Jr., Allen E.R., Allen R.D. (1997). Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nature Biotechnol.* 15, 988-991.
- ✓ 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.
- ✓ Ruan, J., Saidi, O., Iggo, J. A., Xiao, J. (2008) Direct Acylation of Aryl Bromides with Aldehydes by Palladium Catalysis. *J. Am.Chem. Soc.*; 130: 10510-1051.
- ✓ Ruscoe J. E., Rosario L. A., Wang T., Gate L., Arifoglu P. et al. (2001) Pharmacologic or genetic manipulation of glutathione S-Transferase P1-1 (GSTπ) influences cell proliferation pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 339-345.
- ✓ Rushmore T. H. and Pickett C. B. (1993) Glutathione S-transferases, structure, regulation and therapeutic implications. *J. Biol. Chem.* 268, 11475-11478.

- ✓ Sai V.V.R., Kundu T., Mukherji S. (2009) Novel U-bent fiber optic probe for localized surface Plasmon resonance based biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 24, 2804-2809.
- ✓ Salagovic J., Kalina I., Habalova V., Hrivnak M., Valansky L., Biroš E. (1999). The role of human glutathione S-transferase M1 and T1 in individuals susceptibility to bladder cancer. *Physiol. Res.* 48, 465-471.
- ✓ Samiec P.S., Dahm L.J., Jones D.P. (2000). Glutathione S-transferase in mucus of rat small intestine. *Toxic. Sci.* 54, 52-59.
- ✓ Sassolas A., Blum L.J., Leca-Bouvier B.D. (2012) Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechn. Adv.* 30, 489-511.
- ✓ Sau A., Trengo F.P., Valentino F., Federici G., Caccuri A.M. (2010). Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. *Arc. Biochem. Biophys.* 500, 116-122.
- ✓ Sayed Y., Hornby J.A., Lopez M., Dirr H. (2002) Thermodynamics of the ligand function of human class Alpha glutathione S-transferase A1-1: energetics of organic anion ligand binding. *Biochem. J.* 363 (Pt 2), 341-346.
- ✓ 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.
- ✓ Schröder P. (2001). The role of glutathione and glutathione S-transferases in plant reaction and adaptation to xenobiotics. In : *Significance of glutathione in plant adaptation to the environment.* Eds. : White P.J., Hammond J.P., 155-183.
- ✓ Sheehan D., Meade G., Foley V.M., Down C.A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases : implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1-16.
- ✓ Sinning I., Kleywegt G.J., Cowan S.W., Reinemer P., Dirr H.W., Huber R., Gilliland G.L., Armstrong R.N., Ji X., Board P.G. et al. (1993) Structure determination and refinement of human alpha class glutathione transferase A1-1 and a comparison with the Mu and Pi class enzymes. *J. Mol. Biol.* 232, 192-212.
- ✓ Sluis-Cremer N., Wallace L., Burke J., Stevens J., Dirr H.W. (1998) Aflatoxin B1 and sulphobromophthalein binding to the dimeric human glutathione S-transferase A1-1: a fluorescence spectroscopic analysis. *Eur. J. Biochem.* 257, 434-442.
- ✓ Sluis-Cremer N., Naidon N.N., Kaplan W.H., Monoharan T.H., Fahl W.E., Dirr H.W. (1996) Determination of a binding site for non-substrate ligand in mammalian cytosolic glutathione S-transferase by means of fluorescence-resonance energy transfer. *Eur. J. Biochem.* 241, 484-488.

- ✓ Spirakou U., Filippou N., Polyzogopoulos D., Papakonstantinou A. (1996) Association of GST- μ with the incidence and histological type of lung cancer in smokers. *Clinical Chemistry* 42,253.
- ✓ Srivastava S.K., Singhal S.S., Hu X., Awasthi Y.C., Zimniak P., Singh S.V. (1999). Differential catalytic efficiency of allelic variants of human glutathione S-transferase Pi in catalyzing the glutathione conjugation of thiotepa. *Arch. Biochem. Biophys.* 366, 89-94.
- ✓ Stoehlmacher J., Park D.J., Zhang W., Groshen S., Tsao-Wei D.D., Yu M.C., Lenz H.J. (2002). Association between glutathione S-transferase P1, T1, and M1 genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer. *J. Natl. Cancer. Inst.* 94, 936-942.
- ✓ Strange R. (1993) The glutathione S-transferase GSTM1 0 locus and cancer susceptibility. *In* Structure and function of glutathione S-transferases (Hayes J.D., Mannervik B., Mantle T.J., Pickett C.B, Tew K.D., eds), CRC Press, Boca Raton, Florida.
- ✓ Sugata T., Ozaki K., Uwakaa M., Sumita, Y. (2005). Method for assaying hepato-neoplastic lesion or pre-neoplastic lesion of rat negative to antibody recognizing placental glutathione- s-transferase.
- ✓ Sun N., Sun X., Chen B., Cheng H., Feng J., Cheng L., Lu Z. (2009). MRP2 and GSTP1 polymorphisms and chemotherapy response in advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.*
- ✓ Sun T.H., Morgenstem R. (1997). Binding of glutathione and an inhibitor to microsomal glutathione transferase. *Biochem. J.* 326, 193-196.
- ✓ Sundberg K., Johansson A.S., Stenberg G., Widersten M., Seidel A., Mannervik B., Jernstrom B. (1998). Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* 19, 433-436.
- ✓ Sundberg K., Wildersten M., Seidel A., Mannervik B., Jernstrom B. (1997). Glutathione conjugation of bay- and fjord region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by glutathione transferases M1-1 and P1-1. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 1221-1227.
- ✓ Sweeney C., Ambrosone C.B., Joseph L., Stone A., Hutchins L.F., Kadlubar F.F., Coles B.F. (2003). Association between a glutathione S-transferase A1 promoter polymorphism and survival after breast cancer treatment. *Int. J. Cancer* 103, 810-814.
- ✓ Tew K.D., Dutta S., Schultz M. (1997). Inhibitors of glutathione S-transferases as therapeutic agents. *Adv. Drug Deliv. Res.* 26, 91-104.
- ✓ Thom R., Dixon D.P., Edwards R., Cole D.J., Laphorn A.J. (2001) The structure of a zeta class glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana*: characterization of a GST with novel active-site

- architecture and a putative role in tyrosine catabolism. *J. Mol. Biol.* 308, 949-62.
- ✓ Thom R., Cummins I., Dixon D.P., Edwards R., Cole D.J., Laphorn A.J. (2002) Structure of a tau class glutathione S-transferase from wheat active in herbicide detoxification. *Biochem.* 41, 7008-7020.
 - ✓ Townsend D.M., Tew K.D. (2003). The Role of Glutathione-S-Transferase in Anti-cancer Drug Resistance. *Oncogene* 22, 7369-7375.
 - ✓ Tsuchida S., Izumi T., Shimizu T., Ishikawa T., Hatayama I., Satoh K., Sato K. (1987) Purification of a new acidic glutathione S-transferase, GSTYn1Yn1, with a high leukotriene-C4 synthase activity from the rat brain. *Eur. J. Biochem.* 170, 159-164.
 - ✓ 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.
 - ✓ Wang C-H., Wu H.T., Cheng H.M., Yen T-J., Lu I-H., Cheng H.C., Jao S-C., Shing T.K.M., Li W-S. (2011). Inhibition of glutathione S-transferases M1 by new gabosine analogues is essential for overcoming cisplatin resistance in lung cancer cells. *J. Med. Chem.* 54, 8574-8581.
 - ✓ Wang Z., Jin L., Wegrzyn G., Wegrzyn A. (2009). A Novel method for Screening the Glutathione Transferase Inhibitors. *BMC Biochemistry* 10, 1-11.
 - ✓ Wawzonck S. (1951), in ‘‘Heterocyclic Compounds’’ Vol. 2, R.C. Elderfield, ed., New York, John Wiley and Sons, Inc., London, p.443 and references cited therein.
 - ✓ Weng F., Wang C., Xu B. (2010) Direct C-H bond arylation of 2-hydroxy-benzaldehydes with arylboronic acids via ligand-free palladium catalysis. *Tetrahedron Lett.*; 51:2593-2596.
 - ✓ Wikteliu s E., Stenberg G. (2007). Novel class of glutathione transferases from cyanobacteria exhibit high catalytic activities towards naturally occurring isothiocyanates. *Biochem. J.* 406, 115-123.
 - ✓ Wilce M. C. J., Parker M. W.(1994). Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochim. Biophys. Acta* 1205,1-18.
 - ✓ Yang Y., Cheng J. Z., Singhal S. S., Saini M., Pandya U., Awasthi S., Awasthi Y. C. (2001) Role of glutathione S-Transferases in protection against lipid peroxidation: overexpression of h GSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation. *J. Biol. Chem.* 276, 19220-19230.
 - ✓ Yang Y., Sharma R., Cheng J.Z., Saini M.K., Ansari N.H., Andley U.P., Awasthi S., Awasthi Y.C. (2002) Protection of HLE B-3 cells against

hydrogen peroxide- and naphthalene-induced lipid peroxidation and apoptosis by transfection with hGSTA1 and hGSTA2. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 434-445.

- ✓ Yang X., Liu G., Li H., Zhang Y., Song D., Li C., Wang R., Li B., Liang W., Jing Y., Zhao G. (2010). Novel oxadiazole analogues derived from ethacynic acid : Design, synthesis and structure-activity relationships in inhibiting the activity of glutathione S-transferase P1-1 and cancer cell proliferation. *J. Med. Chem.* 53, 1015-1022.
- ✓ Yawer M.A., Hussain I., Fischer C., Gorls H., Langer P. (2008) Synthesis of 2-benzoyl-4-(2-hydroxybenzoyl)phenols by catalytic domino 'Michael-retro-Michael-Mukaiyama-aldol' reactions of 1-aryl-1,3-bis(silyloxy)buta-1,3-dienes with 3-formylchromones. *Tetrahedron*; 64: 894-900.
- ✓ Yoshiga S., Soya Y. (2005) JP 2005198525.
- ✓ Yuan Y., Thomé I., Kim S.H., Chen D., Beyer A., Bonnamour J., Zuidema E., Chang S., Bolm C. (2010) DMSO-KOH: A Superbase for S_NAr and Cross Coupling Reactions. *Adv. Synth. Catal.* 352, 2892-2898.
- ✓ Yung C., Prusoff W.H. (1973). Relationship between the inhibition constant and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology, Vol.* 22, 3099-3108.
- ✓ Zettl R., Schell J. Palme K. (1994). Photoaffinity labeling of Arabidopsis thaliana plasma membrane vesicles by 5-azido-[7-3h]indole-3-acetic acid identification of a glutathione S-transferase. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 689-693.
- ✓ Zhang J., Lou Y.J. (2003) Relationship between activation of microsomal glutathione S-transferase and metabolism behavior of chlorambucil. *Pharmacol. Res.* 48, 623-630.
- ✓ 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. (2013) Designer xanthone: an inhibitor scaffold for MDR-involved human glutathione transferase isoenzyme A1-1. *J. Biomol. Screen.*, 18, 1092-1102
- ✓ Κλώνης Ι. (2007). Ενζυμολογία. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.